

**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 NĂM BÀO NGƯ'
CÓ TIỀM NĂNG THƯƠNG MẠI**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH – 2023

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 CHỨNG NẤM BÀO NGƯ
CÓ TIỀM NĂNG THƯƠNG MẠI

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2



TS. Nguyễn Hoàng Dũng



TS. Hồ Bảo Thùy Quyên

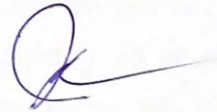
TP. HỒ CHÍ MINH – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "Xây dựng bộ chủng nấm bào ngư có tiềm năng thương mại" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 09 tháng 11 năm 2023

Tác giả luận án



Phạm Văn Lộc

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc TS. Phạm Nguyễn Đức Hoàng – Viện trưởng Viện Công nghệ Sinh học Ứng dụng – người thầy đã định hướng, hỗ trợ, động viên, hướng dẫn và tạo điều kiện tốt nhất để cho tôi hoàn thành luận án tại Viện.

Tôi xin trân trọng biết ơn TS. Nguyễn Hoàng Dũng - Viện Sinh học Nhiệt đới và TS. Hồ Bảo Thùy Quyên - Trường Đại học Mở TP. Hồ Chí Minh – thầy, cô đã luôn tận tình giúp đỡ, hướng dẫn khoa học và định hướng nghiên cứu cho tôi trong suốt quá trình tôi thực hiện và hoàn thành luận án.

Luận án này được hoàn thành tại Viện Công nghệ Sinh học Ứng dụng, tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện và các cán bộ Viện đã luôn ủng hộ và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi tập trung nghiên cứu và hoàn thành luận án.

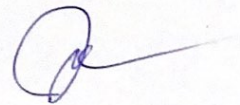
Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Ban Lãnh đạo Viện Sinh học Nhiệt đới; Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ cùng các thầy, cô và các anh, chị chuyên viên Học viện đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tạo những điều kiện tốt nhất cho tôi trong thời gian học tập và nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời biết ơn đến Trường Đại học Công Thương TP. Hồ Chí Minh đã hỗ trợ và tạo điều kiện cho tôi học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, người thân và bạn bè đã luôn quan tâm, hỗ trợ và động viên trong suốt thời gian qua để tôi có thể hoàn thành tốt nhiệm vụ học tập.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Tác giả luận án



Phạm Văn Lộc

MỤC LỤC

| | Trang |
|--|-----------|
| Lời cam đoan | i |
| Lời cảm ơn..... | ii |
| Mục lục | iii |
| Danh mục các ký hiệu, các chữ viết tắt và thuật ngữ | vii |
| Danh mục bảng..... | viii |
| Danh mục các hình vẽ, đồ thị | x |
| MỞ ĐẦU..... | 1 |
| CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU..... | 3 |
| 1.1. Ngành trồng nấm | 3 |
| 1.1.1. Lịch sử, tiềm năng và thực trạng | 3 |
| 1.1.2. Các vấn đề cần giải quyết của ngành trồng nấm Việt Nam | 4 |
| 1.2. Giới thiệu về nấm bào ngư..... | 4 |
| 1.2.1. Giới thiệu chung | 4 |
| 1.2.2. Vòng đời và đặc điểm di truyền giới tính..... | 6 |
| 1.3. Thu thập và giữ giống nấm..... | 7 |
| 1.3.1. Thu thập..... | 7 |
| 1.3.2. Giữ giống | 9 |
| 1.4. Định danh nấm | 10 |
| 1.4.1. Định danh dựa trên các đặc điểm hình thái | 11 |
| 1.4.2. Định danh dựa trên sự tương hợp loài | 13 |
| 1.4.3. Định danh dựa trên các trình tự bảo tồn | 15 |
| 1.5. Phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật AFLP | 17 |
| 1.6. Đánh giá chất lượng giống | 19 |
| 1.6.1. Đánh giá dựa trên DNA và sự biểu hiện gen | 19 |
| 1.6.2. Đánh giá dựa trên enzyme và các phản ứng sinh hóa | 19 |
| 1.6.3. Đánh giá sự sinh trưởng của giống nấm trên các môi trường dinh dưỡng | 20 |
| 1.6.4. Đánh giá tốc độ lan tở và hiệu suất sinh học trên giá thể sản xuất | 21 |
| 1.7. Các phương pháp cải tiến giống nấm..... | 22 |
| 1.7.1. Phương pháp lai | 22 |
| 1.7.2. Phương pháp chuyển gen và chỉnh sửa gen | 26 |
| 1.7.3. Phương pháp xử lý đột biến dòng song nhân/đa bào tử..... | 26 |
| 1.8. Các công trình nghiên cứu có liên quan đến nội dung luận án | 26 |
| CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... | 29 |
| 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..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.1. Thu thập mẫu..... | 29 |
| 2.1.2. Xử lý mẫu tươi, phân lập mẫu..... | 29 |
| 2.1.3. Phương pháp định danh bằng đặc điểm hình thái..... | 29 |
| 2.1.4. Phương pháp định danh bằng đặc điểm sinh học phân tử..... | 30 |
| 2.1.5. Phương pháp phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật AFLP..... | 31 |
| 2.2. Nội dung 2. Khảo sát một số đặc điểm sinh học của các chủng nấm bào ngư thu thập được..... | 35 |
| 2.2.1. Khảo sát khả năng phát triển hệ sợi của các chủng nấm ở môi trường thạch đĩa và môi trường lỏng..... | 35 |
| 2.2.1.1. Khảo sát tốc độ lan tơ trên môi trường thạch đĩa..... | 35 |
| 2.2.1.2. Khảo sát sinh khối khi nuôi cấy trên môi trường lỏng..... | 36 |
| 2.2.2. Khảo sát tốc độ lan tơ trên mặt cưa cao su..... | 36 |
| 2.2.2.1. Khảo sát tốc độ lan tơ trên đĩa Petri mặt cưa..... | 36 |
| 2.2.2.2. Khảo sát tốc độ lan tơ trên ống nghiệm mặt cưa..... | 37 |
| 2.2.3. Khảo sát tỉ lệ chuyển hóa..... | 37 |
| 2.2.4. Khảo sát hiệu suất sinh học của các chủng nấm bào ngư và phân tích mối tương quan giữa tốc độ lan tơ trên mặt cưa và hiệu suất sinh học..... | 37 |
| 2.2.4.1. Khảo sát hiệu suất sinh học..... | 37 |
| 2.2.4.2. Phân tích mối tương quan giữa tốc độ lan tơ trên mặt cưa với hiệu suất sinh học..... | 38 |
| 2.3. Nội dung 3. Thu thập và khảo sát một số đặc điểm sinh học các dòng đơn bội của các chủng nấm bào ngư..... | 38 |
| 2.3.1. Thu thập và giữ giống các dòng đơn bội..... | 38 |
| 2.3.2. Khảo sát sinh trưởng của các dòng đơn bội trên môi trường dinh dưỡng..... | 39 |
| 2.3.3. Khảo sát tỉ lệ chuyển hóa các dòng đơn bội..... | 39 |
| 2.3.4. Xác định kiểu bắt cặp của các dòng đơn bội..... | 40 |
| 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..... | 40 |
| 2.4.1. Phân tích đa dạng di truyền các dòng đơn bội bằng kỹ thuật AFLP..... | 40 |
| 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..... | 40 |
| 2.5. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu..... | 41 |
| CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN..... | 42 |
| 3.1. Thu thập, định danh và phân tích đa dạng di truyền các chủng nấm bào ngư được nuôi trồng phổ biến..... | 42 |
| 3.1.1. Thu thập và nuôi cấy giữ giống các chủng nấm bào ngư..... | 42 |
| 3.1.2. Định danh các chủng nấm bằng các đặc điểm hình thái..... | 42 |
| 3.1.2.1. Các chủng bào ngư xám..... | 43 |
| 3.1.2.2. Các chủng bào ngư trắng..... | 54 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.2.3. Chủng nấm bào ngư tiểu yển ABI-F000201 | 58 |
| 3.1.3. Định danh các chủng nấm bằng đặc điểm sinh học phân tử | 62 |
| 3.1.3.1. So sánh vùng trình tự ITS | 62 |
| 3.1.3.2. Xây dựng cây phát sinh loài trên vùng trình tự ITS | 63 |
| 3.1.4. Phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật AFLP | 66 |
| 3.2. Khảo sát một số đặc điểm sinh học của các chủng nấm bào ngư thu | |
| thập được | 69 |
| 3.2.1. Khảo sát khả năng phát triển hệ sợi của các chủng giống nấm | |
| ở môi trường thạch đĩa và môi trường lỏng..... | 69 |
| 3.2.2. Khảo sát tốc độ lan tơ trên mặt cưa cao su | 72 |
| 3.2.3. Khảo sát tỉ lệ chuyển hóa | 74 |
| 3.2.4. Khảo sát hiệu suất sinh học và mối tương quan giữa tốc độ lan tơ | |
| trên mặt cưa với hiệu suất sinh học các chủng nấm..... | 76 |
| 3.3. Thu thập và khảo sát một số đặc điểm sinh học của các dòng đơn bội | 78 |
| 3.3.1. Thu thập và giữ giống các dòng đơn bội | 78 |
| 3.3.1.1. Thu thập các dòng đơn bội..... | 78 |
| 3.3.1.2. Giữ giống các dòng đơn bội..... | 80 |
| 3.3.2. Khảo sát sinh trưởng của các dòng đơn bội trên môi trường | |
| dinh dưỡng..... | 80 |
| 3.3.2.1. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000241..... | 80 |
| 3.3.2.2. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000252..... | 82 |
| 3.3.2.3. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000253..... | 83 |
| 3.3.2.4. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000224..... | 85 |
| 3.3.3. Khảo sát tỉ lệ chuyển hóa các dòng đơn bội | 87 |
| 3.3.3.1. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000241..... | 87 |
| 3.3.3.2. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000252..... | 88 |
| 3.3.3.3. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000253..... | 89 |
| 3.3.3.4. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000224..... | 90 |
| 3.3.4. Xác định kiểu di truyền bắt cặp của các dòng đơn bội | 92 |
| 3.3.4.1. Xác định kiểu bắt cặp riêng các chủng nấm..... | 92 |
| 3.3.4.2. Lai chéo giữa các dòng đơn bội các chủng nấm bào ngư | |
| xám..... | 96 |
| 3.4. Thử nghiệm phân nhóm kiểu di truyền bắt cặp các dòng đơn bội bằng | |
| một số marker sinh học phân tử | 98 |
| 3.4.1. Phân tích đa dạng di truyền các dòng đơn bội bằng kỹ thuật AFLP... 98 | |
| 3.4.2. Thử nghiệm phân nhóm kiểu di truyền bắt cặp các dòng đơn bội | |
| bằng một số cặp mồi chuyên biệt của nấm đùi gà..... | 101 |
| 3.4.2.1. Tái kiểm tra độ đặc hiệu của các cặp mồi trên nấm đùi gà .. 101 | |
| 3.4.2.2. Đánh giá khả năng áp dụng của các cặp mồi với chủng nấm | |
| bào ngư xám <i>P. pulmonarius</i> trên dữ liệu sinh tin học | 102 |

| | |
|---|------------|
| CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ | 107 |
| 4.1. Kết luận..... | 107 |
| 4.2. Kiến nghị | 107 |
| DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN..... | 108 |
| DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO | 109 |
| PHỤ LỤC | |

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT VÀ THUẬT NGỮ

| Ký hiệu/viết tắt/thuật ngữ | Tiếng Anh | Diễn giải |
|----------------------------|--|--|
| AFLP | Amplified Fragment Length Polymorphism | Đa hình độ dài nhân bản chọn lọc |
| Amyloid | | Bắt màu với thuốc thử có iod |
| Basidia | | Đảm |
| Basidioles | | Tiền đảm |
| BE | Biological efficiency | Hiệu suất sinh học |
| Cheilocystidia | | Liệt bào đỉnh |
| Cs. | | Cộng sự |
| Cystidia | | Liệt bào |
| Dimitic | | Cấu trúc hệ sợi bao gồm cả hai loại: sợi nguyên thủy và sợi cứng |
| ITS | Internal transcribed spacer | Vùng sao mã bên trong |
| Inamyloid | | Không bắt màu với thuốc thử có iod |
| Hymenium | | Vùng bào tầng |
| Monokaryon | | Đơn bội |
| Monomitic | | Cấu trúc hệ sợi chỉ có một loại sợi nguyên thủy |
| PCR | Polymerase chain reaction | Phản ứng chuỗi polymerase |
| PDA | Potato dextrose agar | Môi trường thạch khoai tây dextrose |
| PDB | Potato dextrose broth | Môi trường khoai tây dextrose |
| Pileipellis | | Hệ sợi mặt trên mũ nấm |
| Pleurocystidia | | Liệt bào bên |
| Pseudodimitic | | Cấu trúc hệ sợi gần giống dimitic |
| LSU | Large subunit | Vùng gen quy định tiểu phần lớn của ribosome |
| SSU | Small subunit | Vùng gen quy định tiểu phần nhỏ của ribosome |
| Subhymenium | | Vùng cận bào tầng |
| Trama | | Thế nền |
| YBLB | Yeast bromothymol blue lactose broth | Môi trường chứa cao nấm men, bromothymol blue và lactose |

DANH MỤC BẢNG

| | Trang |
|---|--------------|
| <i>Bảng 1.1.</i> Các nhóm không tương hợp của chi <i>Pleurotus</i> | 15 |
| <i>Bảng 1.2.</i> Một số trình tự và gen được sử dụng để định danh nấm bào ngư trong một số công bố | 17 |
| <i>Bảng 1.3.</i> Một số nghiên cứu sử dụng chỉ thị DNA trong phân tích đa dạng di truyền nấm bào ngư..... | 18 |
| <i>Bảng 1.4.</i> Tốc độ lan tở của một số giống bào ngư xám, trắng phổ biến trên môi trường PDA | 21 |
| <i>Bảng 1.5.</i> Hiệu suất sinh học của một số giống bào ngư trên mặt cưa | 22 |
| <i>Bảng 1.6.</i> Một số kết quả lai tạo các giống nấm bào ngư | 24 |
| <i>Bảng 2.1.</i> Trình tự các đoạn môi sử dụng trong phản ứng PCR | 30 |
| <i>Bảng 2.2.</i> Thành phần cơ bản của một phản ứng PCR | 31 |
| <i>Bảng 2.3.</i> Thông tin các trình tự tham chiếu để xây dựng cây phát sinh loài | 32 |
| <i>Bảng 2.4.</i> Thành phần phản ứng cắt..... | 33 |
| <i>Bảng 2.5.</i> Thành phần phản ứng nối DNA..... | 33 |
| <i>Bảng 2.6.</i> Thành phần phản ứng PCR không chuyên biệt | 34 |
| <i>Bảng 2.7.</i> Thành phần phản ứng PCR chuyên biệt | 34 |
| <i>Bảng 3.1.</i> Danh sách các chủng nấm bào ngư thu thập được..... | 42 |
| <i>Bảng 3.2.</i> Kích thước các cấu trúc đại thể và vi thể các chủng nấm..... | 60 |
| <i>Bảng 3.3.</i> Kết quả so sánh trình tự ITS của các chủng nấm bào ngư với GenBank . | 62 |
| <i>Bảng 3.4.</i> Hệ số tương quan di truyền của các chủng nấm bào ngư | 69 |
| <i>Bảng 3.5.</i> Tốc độ lan tở trung bình trên môi trường PDA và sinh khối khô trên môi trường PDB của các chủng nấm sau 7 ngày nuôi cấy..... | 70 |
| <i>Bảng 3.6.</i> Tốc độ lan tở của các chủng nấm bào ngư trên Petri và ống nghiệm mặt cưa | 73 |
| <i>Bảng 3.7.</i> Tỷ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các chủng nấm bào ngư.... | 75 |
| <i>Bảng 3.8.</i> Hiệu suất sinh học và tốc độ thể tích sinh khối tở trên mặt cưa của các chủng thuộc loài <i>P. ostreatus</i> | 76 |

| | |
|---|-----|
| <i>Bảng 3.9.</i> Hiệu suất sinh học và tốc độ thể tích sinh khối tơ trên mặt cưa của các chủng thuộc loài <i>P. pulmonarius</i> | 77 |
| <i>Bảng 3.10.</i> Danh sách dòng đơn bội của các chủng nấm bào ngư..... | 79 |
| <i>Bảng 3.11.</i> Tốc độ lan tơ trên môi trường PDA (mm ² /ngày) các dòng đơn bội của chủng ABI-F000241 | 81 |
| <i>Bảng 3.12.</i> Tốc độ lan tơ trên môi trường PDA (mm ² /ngày) các dòng đơn bội của chủng ABI-F000252 | 82 |
| <i>Bảng 3.13.</i> Tốc độ lan tơ trên môi trường PDA (mm ² /ngày) các dòng đơn bội của chủng ABI-F000253 | 84 |
| <i>Bảng 3.14.</i> Tốc độ lan tơ trên môi trường PDA (mm ² /ngày) các dòng đơn bội của chủng ABI-F000224 | 85 |
| <i>Bảng 3.15.</i> Tỷ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000241 | 87 |
| <i>Bảng 3.16.</i> Tỷ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000252 | 88 |
| <i>Bảng 3.17.</i> Tỷ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000253 | 89 |
| <i>Bảng 3.18.</i> Tỷ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000224 | 91 |
| <i>Bảng 3.19.</i> Kết quả phân nhóm các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000241 | 93 |
| <i>Bảng 3.20.</i> Kết quả phân nhóm các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000252 | 94 |
| <i>Bảng 3.21.</i> Kết quả phân nhóm các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000253 | 95 |
| <i>Bảng 3.22.</i> Kết quả phân nhóm các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000224 | 96 |
| <i>Bảng 3.23.</i> Kết quả các phép lai chéo các chủng nấm bào ngư xám | 97 |
| <i>Bảng 3.24.</i> Tổng hợp kiểu di truyền bắt cặp của 60 dòng đơn bội của 3 chủng nấm bào ngư xám | 98 |
| <i>Bảng 3.25.</i> Hệ số tương quan di truyền của các dòng đơn bội nấm bào ngư chủng ABI-F000253..... | 99 |
| <i>Bảng 3.26.</i> Tính đặc hiệu của 10 môi với chủng nấm bào ngư xám <i>P. pulmonarius</i> khi phân tích dữ liệu sinh tin học | 103 |

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

| | Trang |
|--|--------------|
| <i>Hình 1.1.</i> Vòng đời cơ bản của các loài nấm bào ngư | 6 |
| <i>Hình 1.2.</i> Quá trình tạo bào tử xảy ra tại thể đảm | 7 |
| <i>Hình 1.3.</i> Di truyền giới tính kiểu dị tản tứ cực của nấm đảm..... | 7 |
| <i>Hình 1.4.</i> Các phương pháp phổ biến để xác định loài <i>Pleurotus</i> | 10 |
| <i>Hình 1.5.</i> Đặc điểm hình thái một số loài trong chi <i>Pleurotus</i> | 12 |
| <i>Hình 1.6.</i> Kết quả lai mon–mon và di–mon giữa các loài <i>Pleurotus</i> | 14 |
| <i>Hình 1.7.</i> Cấu trúc của vùng rDNA nấm..... | 16 |
| <i>Hình 2.1.</i> Phương pháp thu bào tử nấm bào ngư | 39 |
| <i>Hình 3.1.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000241 | 44 |
| <i>Hình 3.2.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000248 | 45 |
| <i>Hình 3.3.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000252 | 46 |
| <i>Hình 3.4.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000253 | 47 |
| <i>Hình 3.5.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000254 | 48 |
| <i>Hình 3.6.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000255 | 49 |
| <i>Hình 3.7.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000256 | 50 |
| <i>Hình 3.8.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000257 | 51 |
| <i>Hình 3.9.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000259 | 52 |
| <i>Hình 3.10.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000261 | 53 |
| <i>Hình 3.11.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000219 | 55 |
| <i>Hình 3.12.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000222 | 56 |
| <i>Hình 3.13.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000223 | 57 |
| <i>Hình 3.14.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000224 | 58 |
| <i>Hình 3.15.</i> Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng ABI-F000201 | 59 |
| <i>Hình 3.16.</i> Cây phát sinh loài dựa theo trình tự ITS theo phương pháp Maximum Likelihood (ML) | 65 |
| <i>Hình 3.17.</i> Cây UPGMA dựa trên đa dạng di truyền 4 marker APLP các chủng nấm bào ngư | 67 |
| <i>Hình 3.18.</i> Bản điện di trên gel agarose sử dụng môi chọn lọc G (A) và GC (B) | 67 |

| | |
|--|----|
| <i>Hình 3.19.</i> Bản điện di trên gel agarose sử dụng mỗi chọn lọc AAG (A) và CAA (B) | 68 |
| <i>Hình 3.20.</i> Hệ sợi của các chủng nấm <i>Pleurotus</i> trên môi trường PDA sau 7 ngày nuôi cấy | 71 |
| <i>Hình 3.21.</i> Hệ sợi của các chủng nấm <i>Pleurotus</i> trên môi trường PDB sau 7 ngày nuôi cấy | 72 |
| <i>Hình 3.22.</i> Hệ sợi của các chủng nấm <i>Pleurotus</i> trên đĩa Petri mặt cưa sau 6 ngày nuôi cấy | 73 |
| <i>Hình 3.23.</i> Hệ sợi của các chủng nấm <i>Pleurotus</i> trên ống nghiệm mặt cưa sau 19 ngày nuôi cấy | 74 |
| <i>Hình 3.24.</i> Màu sắc của các môi trường trong thử nghiệm YBLB của các chủng nấm <i>Pleurotus</i> sau 4 ngày nuôi cấy..... | 76 |
| <i>Hình 3.25.</i> Hình thái hệ sợi nấm bào ngư | 79 |
| <i>Hình 3.26.</i> Các dạng hình thái hệ sợi của các dòng đơn bội | 80 |
| <i>Hình 3.27.</i> Hệ sợi của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000241 sau 10 ngày nuôi cấy | 82 |
| <i>Hình 3.28.</i> Hệ sợi của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000252 sau 10 ngày nuôi cấy | 83 |
| <i>Hình 3.29.</i> Hệ sợi của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000253 sau 10 ngày nuôi cấy | 85 |
| <i>Hình 3.30.</i> Hệ sợi của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000224 sau 10 ngày nuôi cấy | 86 |
| <i>Hình 3.31.</i> Màu môi trường khi nuôi cấy của các dòng đơn bội chủng nấm bào ngư ABI-F000241 trên môi trường YBLB sau 4 ngày | 88 |
| <i>Hình 3.32.</i> Màu môi trường khi nuôi cấy của các dòng đơn bội chủng nấm bào ngư ABI-F000252 trên môi trường YBLB sau 4 ngày | 89 |
| <i>Hình 3.33.</i> Màu môi trường khi nuôi cấy của các dòng đơn bội chủng nấm bào ngư ABI-F000253 trên môi trường YBLB sau 4 ngày | 90 |
| <i>Hình 3.34.</i> Màu môi trường khi nuôi cấy của các dòng đơn bội chủng nấm bào ngư ABI-F000224 trên môi trường YBLB sau 4 ngày | 91 |
| <i>Hình 3.35.</i> Các dạng hình thái của cấu trúc mẫu nổi | 92 |

| | |
|---|-----|
| <i>Hình 3.36.</i> Các dạng hình thái hệ sợi nấm tại rìa tiếp xúc | 92 |
| <i>Hình 3.37.</i> Cây UPGMA dựa trên đa dạng di truyền 4 marker AFLP các dòng đơn bội nấm bào ngư xám..... | 100 |
| <i>Hình 3.38.</i> Bản điện di trên gel agarose sử dụng môi chọn lọc G, GC..... | 100 |
| <i>Hình 3.39.</i> Bản điện di trên gel agarose sử dụng môi chọn lọc AAG, CAA | 101 |
| <i>Hình 3.40.</i> Kết quả điện di sản phẩm PCR của 10 cặp môi đặc hiệu trên chủng nấm đùi gà..... | 101 |
| <i>Hình 3.41.</i> Kết quả điện di sản phẩm PCR của các cặp môi trên chủng nấm ABI- F000253 | 104 |
| <i>Hình 3.42.</i> Kết quả điện di sản phẩm PCR của cặp môi số 1 ở nhiệt độ bất cặp 60 °C trên các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000253 và chủng bố mẹ | 104 |
| <i>Hình 3.43.</i> Kết quả điện di sản phẩm PCR của cặp môi số 1 ở nhiệt độ bất cặp 56 °C trên các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000253 và chủng bố mẹ. | 105 |
| <i>Hình 3.44.</i> Kết quả điện di sản phẩm PCR của cặp môi số 1 ở nhiệt độ bất cặp 62 °C trên các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000253 và chủng bố mẹ. | 105 |

MỞ ĐẦU

Việt Nam là quốc gia thuộc khu vực nhiệt đới với khí hậu nóng ẩm quanh năm và có ngành nông nghiệp phát triển. Trữ lượng phụ phẩm của nông nghiệp lớn với khoảng 50 triệu tấn rơm rạ, 4 triệu tấn bã mía mỗi năm [1]. Bên cạnh đó, ngành chế biến gỗ hàng năm cũng thải ra một lượng lớn mặt cưa. Với trữ lượng phụ phẩm dồi dào, trồng nấm được kỳ vọng trở thành một ngành chủ lực của nông nghiệp. Tuy nhiên cho đến nay, sự phát triển của ngành này vẫn còn hạn chế cả về sản lượng và số loài nuôi trồng. Theo số liệu của FAOSTAT năm 2021, Việt Nam sản xuất được 24637 tấn nấm các loại [2]; sản lượng này vẫn chưa đáp ứng đủ nhu cầu trong nước. Một số loại nấm được trồng phổ biến hiện nay là nấm rơm (*Volvariella volvacea*), nấm mèo (*Auricularia* spp.), nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.), nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) và nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*). Hàng năm nước ta nhập nhiều loại nấm khác nhau, đặc biệt là các loài sinh trưởng trong điều kiện ôn đới từ các quốc gia như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản. Để thúc đẩy ngành trồng nấm phát triển, nhiều giải pháp đã được thực hiện. Các giải pháp hiện tại chủ yếu tập trung vào việc đầu tư mở rộng cơ sở sản xuất, trang thiết bị, quảng bá sản phẩm hay cải tiến năng suất dựa trên kinh nghiệm của người trồng. Trong khi đó để cải tiến năng suất, cần có những giống nấm tốt, năng suất cao, phù hợp với điều kiện nuôi trồng. Các giống nấm nuôi trồng hiện nay tại nước ta có nhiều nguồn gốc 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 sau một thời gian sản xuất bị thoái hóa. Do vậy 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 [3]. 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 [4]. Tại Việt Nam, bào ngư là loại nấm được trồng phổ biến đặc biệt tại khu vực Đông Nam Bộ. Trong các giống nấm bào ngư đang nuôi trồng, bào ngư xám và bào ngư trắng là các 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 cũng 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 sẽ tạo nền tảng ban đầu cho nghiên cứu ứng dụng. Bên cạnh đó trên cơ sở bộ sưu tập này, việc nghiên cứu lai tạo, cải tiến giống cũng sẽ được tiến hành thuận lợi. Nguồn nguyên liệu quan trọng cho công tác lai tạo này chính là các dòng đơn bội đơn nhân (monokaryon, gọi tắt là dòng đơn bội) của các giống nấm. Trong đó việc xác định kiểu bắt cặp, sàng lọc các dòng đơn bội có các đặc điểm phù hợp để làm nguyên liệu cho các tổ hợp lai là cần thiết.

Với mục tiêu 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 - giống nấm có nguồn gốc rõ ràng, xác định được chính xác tên loài, một số chỉ tiêu sinh trưởng được xác định và phù hợp các yêu cầu sản xuất - luận án này tiến hành xây dựng bộ dữ liệu ban đầu của các giống nấm bào ngư bao gồm mô tả hình thái, đặc điểm di truyền, đặc điểm sinh lý sinh hóa cũng như xây dựng bộ sưu tập các dòng đơn bội tiềm năng để tạo ra các tổ hợp lai với chất lượng cao.

Mục tiêu nghiên cứu:

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.

Nội dung nghiên cứu:

- 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.

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).

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. NGÀNH TRỒNG NẤM

1.1.1. Lịch sử, tiềm năng và thực trạng

Nấm lớn (macro fungi) là một nhóm trong giới nấm để phân biệt với vi nấm (micro fungi). Đây là nhóm bao gồm các loại nấm có sự hình thành quả thể quan sát được bằng mắt thường. Nhóm nấm lớn bao gồm các nấm ăn được (nấm ăn), nấm có giá trị dược liệu và nhóm nấm độc. Từ xa xưa con người đã biết thu hái nấm trong tự nhiên để sử dụng trong đời sống hàng ngày. Theo thời gian con người đã biết trồng nấm. Năm 600, nấm mèo (*Auricularia auricula*) đã được trồng trên gỗ khúc tại Trung Quốc. Sau đó nhiều loài nấm cũng đã được con người nuôi trồng nhân tạo với quy mô lớn [5]. Đến nay ngành trồng nấm đã phát triển rộng khắp trên toàn thế giới với sản lượng hơn 44 triệu tấn, tăng gần 2 lần so với năm 2010 [2]. Các quốc gia và khu vực có sản lượng nấm lớn trên thế giới là Trung Quốc, Ấn Độ, Úc, Nhật Bản, Bắc Mỹ, Tây Âu... Trong đó Trung Quốc là quốc gia có sản lượng lớn nhất với hơn 41 triệu tấn (chiếm hơn 90% sản lượng toàn cầu). Sáu loài nấm có sản lượng cao nhất chiếm khoảng 90% tổng sản lượng là nấm hương (22%), nấm bào ngư (19%), nấm mèo (18%), nấm mỡ (15%), kim châm (11%) và nấm rơm (5%) [3].

Việt Nam là quốc gia nằm trong khu vực nhiệt đới, khí hậu quanh năm nóng ẩm. Bên cạnh đó khu vực phía bắc và một số vùng núi cao có khí hậu dịu mát nên nước ta phù hợp trồng nhiều loại nấm khác nhau, đặc biệt là các loại nấm nhiệt đới. Đồng thời với lượng phụ phẩm nông, lâm nghiệp dồi dào, Việt Nam được đánh giá có tiềm năng lớn trong phát triển nghề trồng nấm. Số liệu năm 2021 cho thấy sản lượng nấm của Việt Nam ước tính hơn 24 ngàn tấn (tăng khoảng 20% so với năm 2010) với nhiều loại nấm khác nhau trồng trên khắp cả nước [2]. Các loài nấm phổ biến được trồng là: nấm rơm trồng chủ yếu tại Đồng bằng sông Cửu Long; nấm mèo trồng chủ yếu tại vùng Đông Nam Bộ; nấm bào ngư, nấm linh chi trồng nhiều vùng khác nhau. Ngoài ra một số lượng nhỏ các loài nấm khác cũng được trồng tại các địa phương có khí hậu mát mẻ hoặc trong các nhà trồng điều khiển được các điều kiện sinh trưởng phù hợp như nấm hương, nấm mỡ, nấm hầu thủ, nhộng trùng thảo [6]... Về công nghệ, ngành trồng nấm chủ yếu vẫn áp dụng các công nghệ truyền thống, trình độ cơ giới hóa thấp và năng suất chưa cao. Tuy nhiên hiện nay một số cơ sở đầu tư công nghệ hiện đại trong canh tác các loại nấm có hiệu quả kinh tế cao, đặc biệt các loài nấm sinh trưởng ở điều kiện lạnh.

1.1.2. Các vấn đề cần giải quyết của ngành trồng nấm Việt Nam

Để phát triển ngành trồng nấm tại Việt Nam một cách hiệu quả, về mặt khoa học và công nghệ cần có một giải pháp tổng thể. Trong đó 3 khâu chính là: giống, công nghệ nuôi trồng và sau thu hoạch.

- Giống: cần có bộ sưu tập các giống đang được trồng tại Việt Nam. Đồng thời cần khai thác các giống tự nhiên bổ sung vào bộ sưu tập. Các giống bản địa có vai trò rất lớn trong phát triển thành giống thương mại phù hợp với khí hậu nước ta. Ngoài ra việc nhập nội các giống từ nước ngoài cũng nên được xem xét. Trên cơ sở bộ sưu tập này, tiến hành định danh chính xác và khảo sát các đặc điểm về sinh lý, sinh hóa và năng suất nuôi trồng. Trong đó chú trọng phát triển các phương pháp nhận diện nhanh giống nấm để chọn ra giống nấm phù hợp. Từ bộ sưu tập, tiến hành phát triển kỹ thuật để bảo tồn bộ sưu tập lâu dài, ổn định các giống có tiềm năng thương mại; cũng như thúc đẩy các phương pháp cải tiến giống nấm để tạo ra giống có đặc tính tốt. Bên cạnh đó cần quan tâm đến các giải pháp công nghệ trong bảo vệ bản quyền giống.

- Nuôi trồng: chủ yếu là nghiên cứu, áp dụng công nghệ phù hợp với điều kiện sản xuất cụ thể; đa dạng hóa cơ chất và cải tiến công thức nuôi trồng. Bên cạnh đó, kiểm soát sâu bệnh hại nấm là một vấn đề cần quan tâm.

- Sau thu hoạch: cần xây dựng bộ tiêu chuẩn chất lượng nấm; phát triển các phương pháp sơ chế bảo quản phù hợp, đồng thời phát triển các sản phẩm từ nấm để nâng cao giá trị thương phẩm cũng như chủ động sản xuất.

Đông Nam Bộ nói riêng và khu vực phía nam nói chung là vùng trọng điểm của Việt Nam trong sản xuất phôi giống cũng như nuôi trồng nấm. Tại đây có nhiều vùng trồng nấm lâu đời với đa dạng chủng loại nấm như Long Khánh, Trảng Bom, Xuân Lộc (Đồng Nai), Củ Chi (TP. Hồ Chí Minh), Dầu Tiếng (Bình Dương) ... Đông Nam Bộ cũng là khu vực chiếm gần 40% cơ sở sản xuất phôi nấm của cả phía nam (31/80 đơn vị từ Đà Nẵng trở vào) [7]. Luận án này góp phần trong việc xây dựng bộ sưu tập giống nấm bào ngư xám và bào ngư trắng, hai nhóm nấm bào ngư đang được trồng phổ biến tại khu vực này.

1.2. GIỚI THIỆU VỀ NẤM BÀO NGƯ

1.2.1. Giới thiệu chung

Nấm bào ngư (*Pleurotus spp.*) là một trong những chi nấm nuôi trồng quan trọng nhất của thế giới. 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 trong lĩnh vực môi

trường [4, 8, 9]. Đặc biệt, nấm bào ngư chứa nhóm chất lovastatin (mevinolin/monacolin K), là chất tiềm năng được sử dụng làm thuốc để hạ nồng độ cholesterol trong máu [10-12]. Xét về sản lượng nuôi trồng, nấm *Pleurotus* đứng vị trí thứ hai trong các loài nấm được nuôi trồng nhiều nhất trên thế giới (sau nấm hương) và cũng là một trong các loài nấm nuôi trồng phổ biến tại Việt Nam đặc biệt tại khu vực Đông Nam Bộ.

Vị trí phân loại của chi *Pleurotus* như sau [13]:

Giới: Fungi
 Ngành: Basidiomycota
 Lớp: Agaricomycetes
 Bộ: Agaricales
 Họ: Pleurotaceae
 Chi: *Pleurotus*

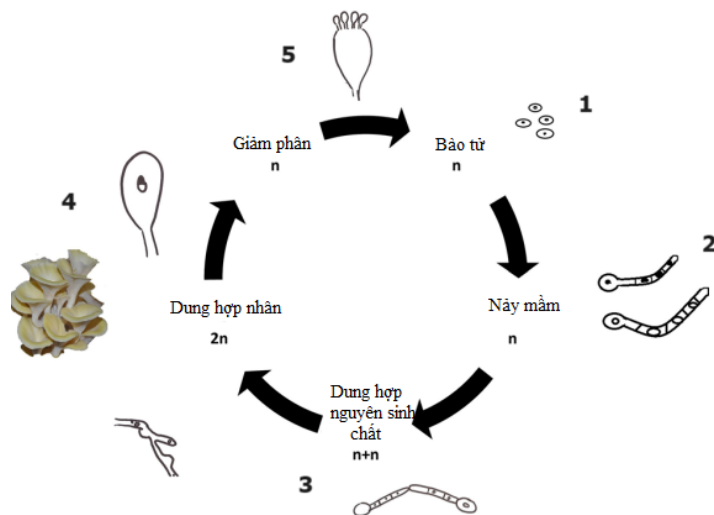
Loài điển hình: *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (1871).

Với hơn 25 loài được nuôi trồng trên toàn thế giới, chi *Pleurotus* là một trong những chi nấm trồng đa dạng nhất. Chi nấm này phân bố rộng cả khu vực nhiệt đới và ôn đới [14]. Sự đa dạng của chi nấm *Pleurotus* còn được thể hiện ở sự khác biệt về genome của các loài. Hiện tại, bộ genome của một số loài trong chi này cũng đã được phân tích. *P. pulmonarius* có bộ gen khoảng 39,2 - 39,9 Mb, 10848 - 11139 gen [15], 12 nhiễm sắc thể [16]. *P. ostreatus* có bộ gen khoảng 35 Mb [17], 11875 - 12330 gen [18], 11 nhiễm sắc thể [19]. *P. eryngii* có bộ gen khoảng 49,9 Mb, 13213 gen [20], 10 nhiễm sắc thể [21]. 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 [13]. Trong khi đó, Chang và Miles (2004) cho rằng chi *Pleurotus* gồm khoảng 50 loài [5]. Nguyên nhân khiến việc phân loại nhóm nấm này trở nên phức tạp và thường xuyên bị nhầm lẫn là do sự đa dạng, thay đổi hình thái và đặc điểm phân bố rộng khắp. Ngoài ra, sự phức tạp này có lẽ một phần do sự phát triển nhanh của ngành nuôi trồng nấm. Rất nhiều loài mới khi đưa vào nuôi trồng thương mại đã không được định danh kỹ càng và được gọi bằng những tên không chính xác. Một vài ví dụ là nấm bào ngư xám trồng chủ yếu tại khu vực châu Á thường được gọi tên là *P. sajor-caju* nhưng thực chất là loài *P. pulmonarius* [22-25]; hoặc nấm được gọi *P. florida* thực chất là loài *P. ostreatus* hoặc là *P. pulmonarius* [26, 27].

1.2.2. Vòng đời và đặc điểm di truyền giới tính

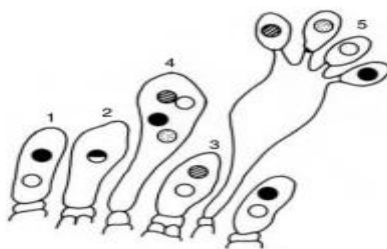
Chu trình sống của nấm bào ngư điển hình cho nhóm nấm đảm bao gồm hai pha chính: pha đơn nhân (monokaryon - n) và pha song nhân (dikaryon - $n+n$). Hai hệ sợi đơn nhân dung hợp tế bào chất với nhau tạo thành hệ sợi song nhân có khả năng hình thành quả thể (tạo mấu/clamp connection) khi 2 hệ sợi đơn nhân tạo được kiểu hình dị hợp ở cả 2 gen điều khiển sự bắt cặp ($AxBx$, $AyBy$). Quá trình giảm phân tạo ra 4 kiểu bào tử (dựa trên khả năng bắt cặp). Vòng đời điển hình của nấm bào ngư được trình bày ở Hình 1.1 và quá trình tạo bào tử xảy ra tại thể đảm được trình bày ở Hình 1.2.

Nấm bào ngư có kiểu di truyền dị tản tứ cực, nguyên tắc bắt cặp của nấm bào ngư được trình bày trong Hình 1.3. Với hệ thống bắt cặp tứ cực được điều khiển bởi 2 nhân tố bắt cặp A và B, các phản ứng tương tác có thể xảy ra giữa các dòng đơn bội. Việc xác định khả năng bắt cặp của các hệ sợi đơn bội trong lai chéo là giai đoạn mất nhiều thời gian. Cho đến nay chưa có phương pháp phổ biến giúp xác định kiểu hình của 2 nhân tố A và B trong hệ sợi đơn bội ngoài phương pháp kiểm tra khả năng bắt cặp của từng cặp dòng đơn bội một cách ngẫu nhiên.



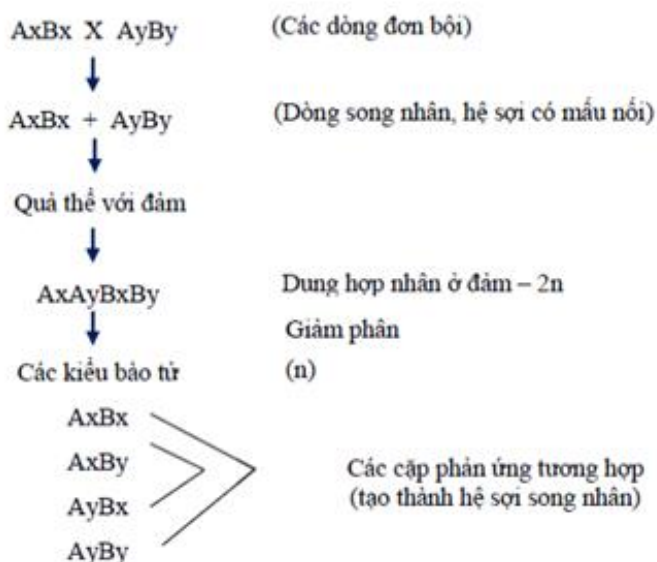
Hình 1.1. Vòng đời cơ bản của các loài nấm bào ngư (tham khảo theo Barh và cs., 2019) [28]

(1): Bào tử; (2): nảy mầm của bào tử tạo hệ sợi nấm đơn nhân; (3): dung hợp nguyên sinh chất hình thành sợi nấm song nhân; (4): dung hợp nhân; (5): giảm phân tại đảm tạo thành bào tử đảm.



Hình 1.2. Quá trình tạo bào tử xảy ra tại thể đảm [5]

(1): Thể đảm chứa 2 nhân chưa dung hợp; (2): Thể đảm sau khi dung hợp 2 nhân (nhân lưỡng bội); (3): Thể đảm sau giảm phân I; (4): Thể đảm sau giảm phân II (4 nhân đơn bội); (5): Bào tử đảm hữu tính trưởng thành.



Hình 1.3. Di truyền giới tính kiểu dị tản tứ cực của nấm đảm (tham khảo theo Chang và cs., 2004) [5]

1.3. THU THẬP VÀ GIỮ GIỐNG NẤM

1.3.1. 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:

Theo cơ sở dữ liệu của Hiệp hội Bảo tàng giống vi sinh vật quốc tế - WFCC (The World Federation of Culture Collections) hiện nay có 768 cơ sở từ 76 nước thuộc hệ thống này [29]. Trong đó một số ngân hàng gen có lưu trữ giống nấm nổi tiếng trên thế giới như: ATCC (the American Type Culture Collection) tại Mỹ; CBS (The Dutch Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Fungal Biodiversity Centre) tại Hà Lan; NBRC (National Biological Resource Center), FMRC (Fungus/Mushroom

Resource and Research Center) tại Nhật Bản... Các chủng giống thuộc các bộ sưu tập này có đầy đủ thông tin cơ bản phục vụ cho nghiên cứu, ứng dụng.

Việt Nam có 3 bộ sưu tập thuộc hệ thống WFCC là Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam (VTCC) thuộc Đại học Quốc gia Hà Nội, Bảo tàng giống vi sinh vật (VCCM) thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Bảo tàng giống vi sinh vật công nghiệp (VCIM) thuộc Viện Công nghiệp Thực phẩm. Trong đó VTCC bảo quản nhiều loài nấm sợi và nấm men. Tuy nhiên, bảo tàng không tập trung lưu trữ các chủng giống nhóm nấm lớn [30]. Hầu hết các nhóm nấm ăn thông thường như bào ngư (*Pleurotus* sp.), nấm mèo (*Auricula* sp.), nấm rơm (*Vovariella* sp.) ... đều không được lưu trữ tại bảo tàng. Tại phía nam, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. HCM đã có bộ sưu tập giống vi sinh vật và đã tiến hành bảo quản được trên 150 chủng vi nấm và vi khuẩn... Tuy nhiên mảng nấm lớn vẫn chưa được quan tâm nhất là các loại nấm ăn thông dụng như nấm rơm, nấm bào ngư...

Ngoài ra, tại nhiều đơn vị nghiên cứu cũng có các bộ sưu tập riêng, tuy nhiên nhìn chung trong tình trạng được bảo quản sơ sài, thiếu thông tin đối chiếu, thiếu các thông tin về năng suất, chất lượng giống.

- *Giống phân lập từ giống thương mại, nuôi trồng*

Các cơ sở sản xuất giống cũng thường lựa chọn các loại nấm lưu hành trên thị trường và tiến hành phân lập từ quả thể và giữ giống. Một dạng nguyên liệu khác cũng có thể phân lập được là sợi tơ trong các bịch giống hay bịch phôi. Tuy nhiên thông tin về nguồn gốc giống thường không đầy đủ.

- *Phân lập từ các chủng giống bản địa*

Đây là nhóm được các cơ sở nghiên cứu quan tâm vì các giống bản địa thường có khả năng thích nghi với điều kiện khí hậu cũng như khả năng chống chịu tốt với các tác nhân gây bệnh. Từ các chủng giống này người ta cũng tiến hành định danh, đánh giá và các nghiên cứu về nuôi trồng, chất lượng dinh dưỡng, hoạt tính sinh học và các yếu tố an toàn. Các giống phù hợp có thể đưa vào sản xuất thương mại. Nguồn giống này còn là nguồn vật liệu quan trọng cho công tác lai tạo, cải tiến giống. Tại nước ta, một vài chủng nấm có nguồn gốc bản địa đã được thu thập, nghiên cứu và thương mại hóa như chủng nấm hương (*Lentinula edodes*) tại vùng Langbiang (Lâm Đồng) [31], chủng nấm bào ngư (*P. cystidiosus* var. *blaoensis*) tại Bảo Lộc (Lâm Đồng) [32], chủng nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) thu thập tại phía nam.

1.3.2. Giữ giống

Giống nấm qua quá trình cấy chuyền nhiều lần hay giữ giống không đúng cách thường sẽ bị thoái hóa. Một số biểu hiện của quá trình thoái hóa giống nấm có thể quan sát được như như tốc độ lan tơ yếu, giảm hàm lượng một số sắc tố và nghiêm trọng nhất là giảm năng suất nuôi trồng, thậm chí không ra quả thể [5, 33, 34]. Sự thoái hóa của giống trong quá trình giữ giống có thể do sự thiếu dinh dưỡng, giảm hàm lượng oxy, tích lũy các chất độc, thay đổi pH dẫn đến sự thay đổi cấu trúc và tính chất của tế bào. Bên cạnh đó quá trình giữ giống cũng có thể làm xuất hiện các đột biến. Ngoài ra, nhiễm tạp cũng là vấn đề lo ngại trong giữ giống. Do vậy các kỹ thuật giữ giống đều hướng đến mục tiêu: giống vẫn sống sau thời gian dài; giữ được các đặc điểm di truyền, hình thái, sự ổn định các yếu tố sinh lý sinh hóa và năng suất nuôi trồng; không bị tạp nhiễm vi sinh vật [5].

Hiện tại có nhiều phương pháp giữ giống nấm khác nhau. Tùy theo đối tượng, điều kiện, người ta sẽ lựa chọn phương pháp phù hợp.

Giữ giống trong thời gian ngắn: các yếu tố ảnh hưởng là tần suất cấy chuyền, môi trường giữ giống và nhiệt độ. Giống khi lan đầy trong dụng cụ chứa (ống nghiệm/vial) chứa môi trường phù hợp (potato dextrose agar - PDA, malt yeast agar - MYA, mushroom complete medium - MCM...) sẽ đặt vào tủ giữ giống ở nhiệt độ 5 °C (riêng nấm rơm là 15 °C). Cấy chuyền sau mỗi 3-12 tháng. Đây là phương pháp giữ giống sử dụng phổ biến trong các phòng thí nghiệm giữ giống của các đơn vị sản xuất [35]. Ngoài ra người ta có thể giữ giống trên các giá thể làm giống như lúa miến [36], lúa mì [37].

Giữ giống trong thời gian dài: người ta có thể sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp các phương pháp: hạn chế dinh dưỡng, hạn chế oxy, đông khô, lạnh sâu hay giữ trong nitơ lỏng. Các phương pháp này có thể giống ổn định từ 1-5 năm.

Phương pháp hạn chế dinh dưỡng: phương án này đề xuất giữ sợi tơ nấm trong nước cất vô trùng ở nhiệt độ phòng trong 1-2 năm [38].

Phương pháp hạn chế oxy: tương tự như phương pháp giữ giống trên thạch nhưng người ta đổ thêm một lớp dầu khoáng vô trùng trên môi trường thạch có tơ nấm đã lan đầy và có thể giữ ổn định đến 2 năm [39-41].

Phương pháp đông khô: phương pháp này phù hợp cho giữ bào tử, không phù hợp cho giữ hệ sợi. Nước trong bào tử sẽ được tách ra ở nhiệt độ thấp dưới áp suất

thấp trong các máy đông khô và sau đó được giữ trong ống ampoules. Phương pháp này cũng ghi nhận phù hợp giữ đến 4 năm cho nấm *Cordyceps militaris* [38].

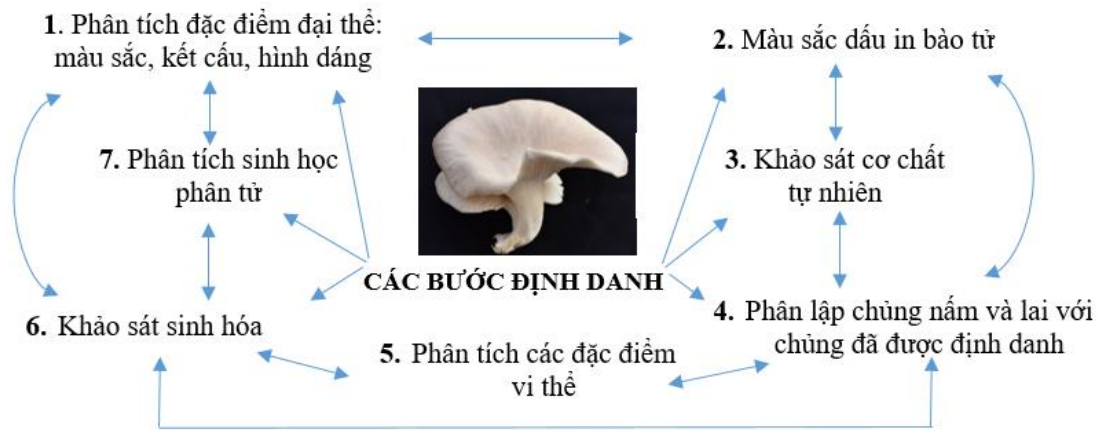
Phương pháp lạnh đến lạnh sâu: bảo quản giống nấm ở nhiệt độ lạnh ngưỡng -20 đến -80 °C, có thể giữ giống đến 3 năm khi kết hợp một số chất chống đông để giữ giống [42-46].

Phương pháp giữ giống trong ni tơ lỏng (-196 °C): đây là phương pháp phù hợp để giữ giống trong thời gian dài hơn 5 năm [35, 47-49].

1.4. ĐỊNH DANH NẤM

Việc định danh chính xác tên nấm có vai trò quan trọng. 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 định danh, 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.

Guzman đã hệ thống các phương pháp khác nhau để định danh nấm *Pleurotus* theo Hình 1.4.



Hình 1.4. Các phương pháp phổ biến để xác định loài *Pleurotus* (tham khảo theo Guzman, 2000) [27]

Theo đó, việc định danh nấm người ta sử dụng các bước sau đây:

1. Khảo sát quả thể: màu sắc của các phần, kết cấu, kiểu bề mặt mũ nấm, vị trí và bề mặt của cuống nấm, có hay không vân trên cuống
2. Màu sắc của bào tử (dấu in bào tử)
3. Cơ chất tự nhiên
4. Phân lập chủng nấm và cho lai với chủng đã được định danh chính xác (khảo sát sự tương hợp loài)
5. Nghiên cứu cấu trúc vi thể của quả thể

6. Phân tích đặc tính sinh hóa

7. Phân tích sinh học phân tử

Các bước trên được tiến hành theo một trật tự xác định, sau khi đủ 7 bước người ta rút ra mối liên hệ và đánh giá chung để định danh cuối cùng. Tuy nhiên tùy theo điều kiện, mục tiêu, đối tượng mà một số bước có thể được bỏ qua hoặc một số loài có một số đặc điểm rất đặc trưng chỉ cần một/một số bước là có thể xác định được.

Việc định danh nấm bào ngư thông thường sẽ có 3 nội dung: định danh bằng hình thái (tương ứng các bước 1, 2, 3, 5, 6), định danh dựa trên sự tương hợp loài (tương ứng với bước 4) và định danh dựa trên sinh học phân tử (tương ứng với bước 7).

1.4.1. Định danh dựa trên các đặc điểm hình thái

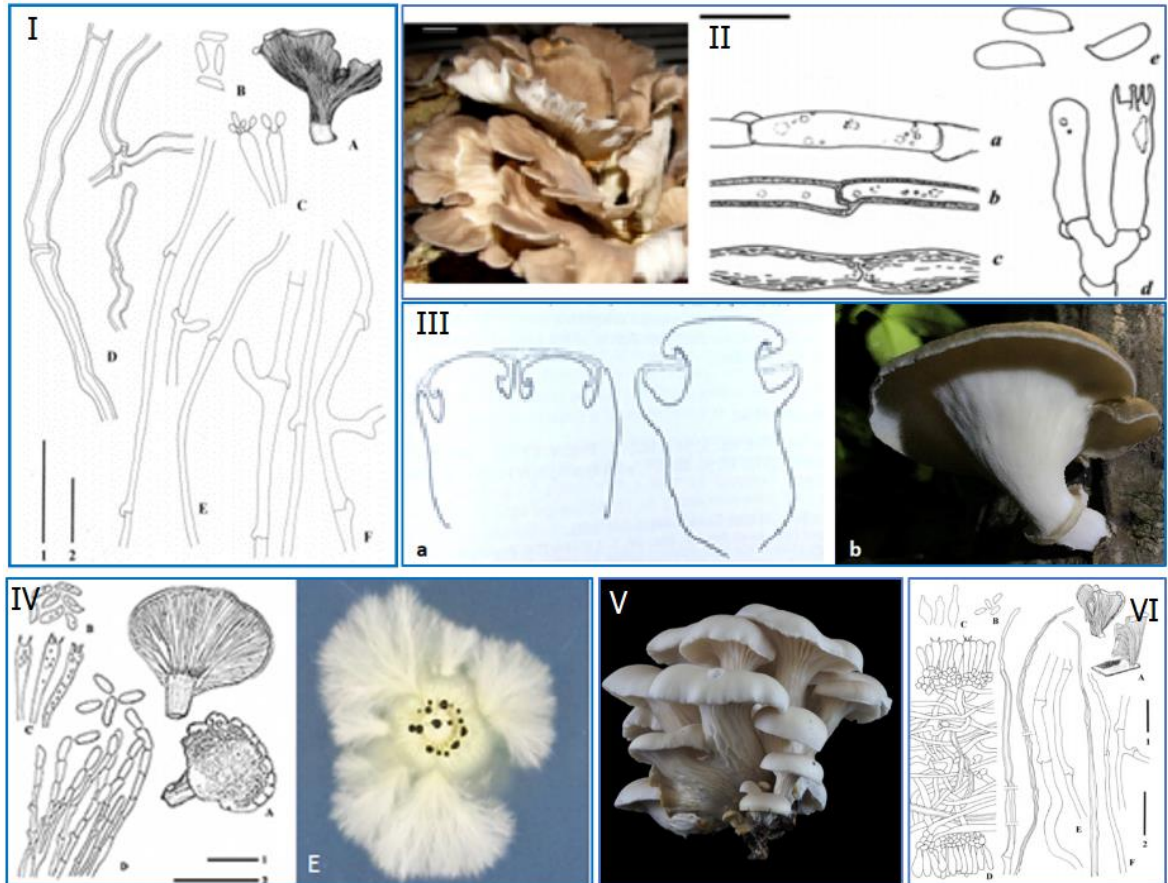
1.4.1.1. Đặc điểm chung của các loài thuộc chi *Pleurotus*

Đặc điểm chung các loài thuộc chi *Pleurotus* được mô tả như sau [50]:

Quả thể có cuống ở giữa, ở một bên hoặc không có cuống, nấm gây mục gỗ trên cây một lá mầm hoặc dương xỉ, một số loài phát triển trên mặt đất. Mũ nấm có lông mịn đến trơn láng; rìa mép lúc đầu cuộn lại. Vòng cổ có hoặc không, một số loài có vòng trên thân. Phiến nấm kéo dài xuống cuống, hiếm khi phân đôi, mép phiến rõ ràng. Thịt nấm dày đến rất mỏng, dạng thịt đến hơi ẩm hoặc nhầy, thường trở nên dai.

Bào tử màu trắng hoặc hồng nhạt, trơn láng, inamyloid, có nhiều đốm màu hoặc không; hình cầu, hình elip hoặc hình trụ, hiếm khi có hình hạt đậu. Đám ngắn đến khá dài (11-)18 - 80 μm , dài gấp 2 đến 6 lần chiều dài bào tử. Cheilocystidia có hoặc không, thường có mấu nhọn đến mấu nhọn-đỉnh tròn. Pleurocystidia có ở một số loài. Bào tầng không dày, vùng cận bào tầng mỏng (5 μm) đến dày (50 μm). Hệ sợi tơ monomitic hoặc dimitic với sợi nấm liên kết thuôn gọn, hiếm khi phân nhánh; hệ sợi nguyên thủy ít nhiều căng phòng hoặc không, vách trở nên dày ở một số loài, có mấu ngoại trừ một số loài dị thường, các tế bào sợi nấm hiếm khi dài tới 300 μm . Lớp nền của phiến được cấu tạo bởi hệ sợi giảm dần, sau đó là dạng đan xen, trong một số trường hợp có cấu trúc hướng tâm. Bề mặt của mũ nấm được cấu tạo bởi các sợi nấm hình tia, ở một số loài có sợi nấm hình liềm đơn giản đến phân nhánh hoặc ít phân nhánh, tạo thành lớp lông nhung.

Đặc điểm hình thái một số loài phổ biến trong chi *Pleurotus* được mô tả trong Hình 1.5.



Hình 1.5. Đặc điểm hình thái một số loài trong chi *Pleurotus*

I: *P. ostreatus*: A. Mũ nấm; B. Bào tử; C. Basidia; D. Hệ sợi của thể nền phiến nấm; E. Hệ sợi của cuống nấm; F. Hệ sợi của mũ nấm. Thước 1 = 10 cm cho hình A; thước 2: = 20 μm cho hình B–F [51].

II: *P. pulmonarius*: a. Hệ sợi nguyên thủy vách mỏng; b. Hệ sợi nguyên thủy vách dày; c. Hệ sợi lớp nền có cấu trúc giống khung xương, keo hóa; d. Cụm basidia; e. Bào tử. Thước = 10 μm [22].

III: *Lentinus sajor-caju* (Fr.) Fr. (1838): a. Quả thể non [50]; b. Quả thể trưởng thành.

IV: *P. cystidiosus* O.K. Mill: A. Tai nấm; B. Bào tử; C. Đám; D. Cấu trúc hiển vi bào tử vô tính; E. Hình thái sợi nấm khi nuôi cấy. Thước 1 = 30 μm cho hình B–D, thước 2 = 10 cm cho hình A [51].

V: *P. cornucopiae* [52].

VI: *P. djamor*: A. Quả thể; B. Bào tử; C. Cheilocystidia; D. Thể nền bào tầng và bào tầng; E. Hệ sợi mũ nấm; F. Hệ sợi cuống nấm. Thước 1 = 5 cm cho hình A, thước 2 = 30 μm cho hình B – F [51].

1.4.1.2. Một số đặc điểm hình thái phân biệt một số loài nấm bào ngư phổ biến tại Việt Nam

Việc phân tích bằng hình thái đòi hỏi phải quan sát kỹ lưỡng các đặc điểm và đối chiếu với các khóa phân loại. Tuy nhiên, qua các mô tả [22, 50, 51, 53-57], một số loài nấm bào ngư phổ biến có thể phân biệt bằng các đặc điểm điển hình.

- *P. citrinopileatus*: màu sắc vàng tươi đặc trưng của quả thể, cuống phân nhánh; tỉ lệ chiều dài trên chiều rộng của bào tử (Q) = 2,6 [58].
- *P. djamor*: màu hồng của tai nấm khi còn non; có liệt bào, $Q = 2,8$ [51].
- *P. cornucopiae*: phiến nấm kéo dài từ mũ nấm xuống đến chân cuống nấm, tại cuống các phiến nấm tạo thành các gờ nối với nhau giống như mạng lưới; $Q = 1,8-2,3$ [56].
- *P. cystidiosus*: bề mặt mũ nấm có nhiều vảy nhỏ màu nâu đen hình thành khi bề mặt bị nứt, có bó cuống bào tử màu đen rất đặc trưng khi tơ nấm phát triển; kích thước bào tử lớn: $12-16 \times 4,0-6,0 \mu\text{m}$ [59], $Q=3,0$ [60].
- *Lentinus sajor-caju*: đặc trưng là có vòng cổ; các tác giả trên thế giới chấp nhận tên nấm *P. sajor-caju* chính là một đồng danh của loài này [61]. Còn loài bào ngư xám đang được trồng phổ biến hiện nay và được gọi tên là *P. sajor-caju* thực chất là loài *P. pulmonarius* [22-25].
- *P. pulmonarius*: mũ nấm màu xám, tai nấm mỏng, với các vân sọc đặc trưng phân rìa mũ nấm tạo hình gợn sóng khi về già.
- *P. ostreatus*: loài này có nhiều phân loại dưới loài nên loài này có nhiều màu sắc khác nhau của mũ nấm (trắng, tím, xám...). Đặc trưng là tai nấm lớn, dày; không có liệt bào. Phức hợp *P. ostreatus* bao nhiêu loài có đặc điểm cơ bản giống nhau như *P. columbinus*, *P. spodoleucus*, *P. salignus*, *P. floridanus*, *P. abieticola*, *P. placentodes* [13, 23, 26, 27, 61-64].
- Phân biệt giữa *P. ostreatus* và *P. pulmonarius*: ngoài những đặc điểm bên ngoài có thể quan sát được, đặc điểm vi thể giúp phân biệt là hình thái bào tử. Tỉ lệ giữa chiều dài/chiều rộng của bào tử (Q) có sự khác biệt giữa hai loài. Q của loài *P. pulmonarius* thấp hơn Q của loài *P. ostreatus*. Một số thông tin về giá trị Q như sau: Q của *P. ostreatus*: 2,8-3,1 [60]; 2,7 – 2,8 [65]; *P. pulmonarius*: 2,1 [66]; 2,2 -2,7 [60]; 2,3 -2,8 [65].

1.4.2. 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 nhóm tương hợp sẽ không lai được với nhau [67]. Các dữ liệu về sự tương hợp loài có giá trị không

(biological species) [71]. Các tác giả cũng cho rằng nghiên cứu về hệ thống bắt cặp (mating system) là tương ứng với loài sinh học và phù hợp cho phân loại nấm.

Bảng 1.1. Các nhóm không tương hợp của chi Pleurotus

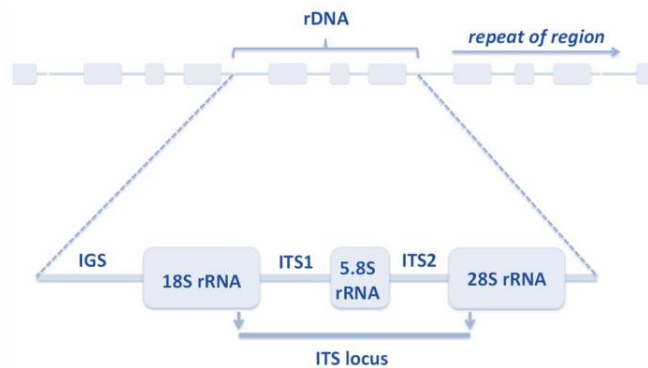
| Loài | Loài đồng danh/Dưới loài | Nhóm không tương hợp |
|------------------------------|--|-----------------------------|
| <i>P. ostreatus</i> | <i>P. ostreatus</i> var. <i>columbinus</i> <i>P. djamor</i> <i>P. flabellatus</i> | I |
| <i>P. pulmonarius</i> | <i>P. eugrammus</i> <i>P. eugrammus</i> var. <i>brevisporus</i> <i>P. sajor-caju</i> <i>P. sapidus</i> <i>P. sp. florida</i> <i>P. opuntiae</i> | II |
| <i>P. calypttratus</i> | | III |
| <i>P. cornucopiae</i> | <i>P. cornucopiae</i> var. <i>citrinopileatus</i> | IV |
| <i>P. corticatus</i> | | V |
| <i>P. cystidiosus</i> | <i>P. abalonus</i> | VI |
| <i>P. dryinus</i> | | VII |
| <i>P. eryngii</i> | | VIII |
| <i>P. nebrodensis</i> | | IX |
| <i>P. salmoneostramineus</i> | <i>P. rhodophyllus</i> <i>P. ostreatoroseus</i> | X |
| <i>P. smithii</i> | | XI |
| <i>P. ulmarius</i> | | XII |

1.4.3. Định danh dựa trên các trình tự bảo tồn

Phương pháp định danh bằng đặc điểm hình thái là nền tảng của quá trình định danh. Tuy vậy hình thái của nấm (kích thước, màu sắc, hình dáng...) thay đổi bởi ảnh hưởng của các yếu tố môi trường và nhiều loài có quan hệ di truyền gần khó xác định. Đồng thời phương pháp này đòi hỏi nhà phân loại phải có trình độ chuyên môn và cần nhiều thời gian để xử lý mẫu và so sánh với các khóa phân loại khác nhau. Do đó người ta đã phát triển phương pháp định danh hỗ trợ dựa trên phân tích dữ liệu các gen bảo tồn. Phần lớn 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.

Gen mã hóa RNA của ribosome (rDNA) đóng vai trò quan trọng trong các nghiên cứu định danh và phát sinh loài. rDNA có liên quan mật thiết tới quá trình tiến hóa và đặc biệt không mã hóa cho bất kì protein nào. Các gen rDNA có đến hàng trăm bản lặp lại, nằm cách nhau bởi các vùng không phiên mã NTS (non transcribed spacer), tạo thành một vùng phức hợp nằm trong nhân. Phần lớn rDNA tương đối bảo tồn nên được xem là cơ sở để tìm ra sự tương đồng và khác biệt khi so sánh các sinh vật khác nhau. Thành phần một rDNA bao gồm: ba trình tự mã hóa 18S, 5.8S, 28S rRNA và hai vùng sao mã bên trong ITS1, ITS2 (internal transcribed spacer) nằm phân cách các trình tự mã hóa. ITS1, ITS2 và tiểu phần 5.8S được gọi chung là vùng sao mã bên trong (Hình 1.7) [72, 73].



Hình 1.7. Cấu trúc của vùng rDNA nấm [72]

Các vùng ITS có độ dài 600 đến 700 bp và tiến hóa nhanh nên có thể thay đổi về trình tự, độ dài [74, 75]. Các vùng khác bên cạnh ITS như 18S (SSU), 5.8S và 28S (LSU) thường bảo tồn và được sử dụng để thiết kế các môi chung cho nhân bản vùng ITS [76] [73]. Đặc biệt, ITS có tính bảo thủ cao trong loài nhưng lại thay đổi ở các loài khác nhau nên ITS trở thành vùng trình tự phù hợp cho nghiên cứu tiến hóa, phát sinh loài và đa dạng di truyền. Trong khi đó vùng SSU phù hợp cho phân biệt mức độ họ trở lên và vùng LSU phân biệt mức độ chi trở lên [77]. Do vậy, vùng ITS được sử dụng để phân biệt giống ở các mức độ khác nhau (dưới loài, loài, chi...) [70].

ITS là vùng trình tự đã được sử dụng rộng rãi trong định danh nấm. ITS được phát triển trong định danh nấm vào năm 1990 bởi White và cs. [78]. Hai primer ITS1 và ITS4 cùng một số primer khác để khuếch đại toàn bộ đoạn trình tự đến nay vẫn được sử dụng phổ biến [78]. Trình tự vùng ITS hiện được sử dụng rộng rãi và đã được đề xuất là DNA barcode cơ bản cho nấm tại International Fungal Barcoding Consortium năm 2012 [79]. Hiện nay mặc dù có khá nhiều trình tự gen được sử dụng để định danh, ITS với tính chất mã vạch năng, dễ khuếch đại bằng PCR và khả năng

phân tách loài, nó vẫn được đánh giá là marker định danh hiệu quả nhất cho giới nấm và dữ liệu ITS cũng là một trong những dữ liệu phong phú nhất của Gen Bank hiện nay [76, 77, 79]. Thống kê đến nay cho thấy có gần 3700 trình tự ITS của chi *Pleurotus* có trên Gen Bank. Tuy vậy, ở một số chi nấm khác như *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* việc sử dụng ITS không hiệu quả, các đoạn trình tự khác được phát triển [77, 80]. Các trình tự khác như elongation factor 1- α (*EF1 α*), RNA polymerase II subunits (*RPB1* và *RPB2*) ... cũng đã được sử dụng trong định danh nấm [76, 77, 81, 82]. Thông tin một số vùng trình tự và gen để định danh các loài thuộc chi *Pleurotus* được trình bày trong Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Một số trình tự và gen được sử dụng để định danh nấm bào ngư trong một số công bố

| STT | Loài | Vùng trình tự sử dụng | Tham khảo |
|-----|--|--|-----------|
| 1 | Khoảng 200 loài nấm | ITS, LSU, SSU, <i>EF1α</i> , <i>RPB1</i> , <i>RPB2</i> | [81] |
| 2 | 4 chủng thuộc 2 loài <i>P. ostreatus</i> và <i>P. djamor</i> | LSU | [83] |
| 3 | 25 chủng <i>Pleurotus</i> tại Mexico | ITS | [84] |
| 4 | <i>P. floridanus</i> , <i>P. cystidiosus</i> | ITS | [85] |
| 5 | 31 chủng nấm (thuộc 10 loài) | ITS | [86] |
| 6 | 9 chủng nấm bào ngư tại Việt Nam | ITS | [60] |
| 7 | 19 mẫu nấm (có chi <i>Pleurotus</i>) | ITS | [87] |
| 8 | 19 chủng <i>P. eryngii</i> tại Jordan | ITS, LSU | [88] |
| 9 | 3 loài tại Nigeria | ITS | [89] |
| 10 | 8 chủng tại Nigeria | ITS | [90] |
| 11 | 132 chủng tại Trung Quốc | ITS và LSU | [91] |

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

Theo các quy luật di truyền, trong một quần thể khi các cá thể có quan hệ di truyền gần gũi với nhau thì thế hệ con có khả năng giảm sức sống, kém thích nghi. Do vậy, quần thể có sự đa dạng di truyền cao sẽ có nhiều cơ hội sống sót và phát triển hơn so với quần thể có sự đa dạng di truyền thấp. Chính vì vậy, trong quá trình lai tạo giống, phân tích quan hệ di truyền các dòng bố mẹ là công đoạn quan trọng. Các cá thể có quan hệ di truyền xa, sẽ được ưu tiên lựa chọn làm dòng bố mẹ để giúp tăng khả năng xuất hiện các tổ hợp có ưu thế lai cũng như tránh hiện tượng thoái hóa giống.

Để phân tích quan hệ di truyền, người ta thường sử dụng dữ liệu về trình tự của gen. Tuy nhiên, việc giải trình tự các gen khá tốn kém nên các phương pháp sinh học

phân tử khác để đánh giá quan hệ di truyền đã được phát triển. Mặc dù hiện nay việc giải trình tự các đoạn gen đã trở nên đơn giản và nhanh chóng, nhưng các kỹ thuật phân tích dựa trên chỉ thị DNA vẫn tiếp tục được phát triển nhằm đánh giá nhanh độ đa dạng di truyền mà không cần giải trình tự các gen hay toàn bộ genome.

Chỉ thị DNA từ lâu đã được sử dụng trong phân tích đa dạng di truyền. Phương pháp RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) là phương pháp đầu tiên được sử dụng [92]. Sau đó với sự phát triển của kỹ thuật PCR nhiều chỉ thị phân tử khác đã được giới thiệu để đánh giá đa dạng di truyền cho nhiều đối tượng sinh vật [73]. Trong đánh giá di truyền nấm bào ngư dựa trên chỉ thị DNA, một số kỹ thuật đã được giới thiệu như RFLP, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) ... đã được áp dụng và một số kết quả được trình bày ở Bảng 1.3.

Trong các phương pháp đánh giá đa dạng di truyền, AFLP đã được sử dụng phổ biến trong phân tích đa dạng di truyền nấm lớn. Phương pháp này kết hợp các hệ thống marker khác nhau để phân tích các đối tượng còn ít biết thông tin [93]. AFLP được đánh giá cho nhiều thông tin hơn so với các phương pháp RFLP hay RAPD [16]. Phương pháp này cũng được đánh giá phù hợp khi phân tích đa dạng di truyền trên một vài đối tượng khác [94]. Phương pháp AFLP đã được áp dụng trong phân tích đa dạng di truyền một số loài nấm ăn khác như nấm hương [95, 96], nấm ngọc châm (*Hypsizygos marmoreus*) [97], nấm mỡ [98]... 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 (RE) thông qua PCR. Phương pháp này được giới thiệu bởi Vos và cs. (1995), sau đó Pawlik và cs. (2012) phát triển bộ môi chuyên biệt cho chi *Pleurotus* [93, 99].

1.6. ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG GIỐNG

Để đánh giá, lựa chọn giống nấm phù hợp người ta thường 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 khi trồng thử nghiệm.

1.6.1. Đánh giá dựa trên DNA và sự biểu hiện gen

Đây là mức độ đánh giá được mong đợi vì sẽ nhanh chóng phát hiện giống thoái hóa dựa vào sự thay đổi cấu trúc của DNA hay sự biểu hiện của các gen. Tuy nhiên cho đến nay các công bố thuộc nội dung này còn rất ít. Mức độ methyl hóa DNA được ghi nhận gia tăng khi nấm *C. militaris* bị thoái hóa [100]. Phương pháp Tunel ghi nhận sự thay đổi của DNA của nấm *P. ostreatus* và cho thấy mức độ hư hỏng

Bảng 1.3. Một số nghiên cứu sử dụng chỉ thị DNA trong phân tích đa dạng di truyền nấm bào ngư

| | Loài | Phương pháp | Tham khảo |
|----|---|-------------|-----------|
| 1 | 34 chủng tại Châu Á (thuộc 12 nhóm tương hợp loài) | RFLP | [101] |
| 2 | <i>P. pulmonarius</i> | AFLP | [16] |
| 3 | 21 chủng tại Châu Á và Châu Âu (<i>P. ostreatus</i> , <i>P. sajor-caju</i> , <i>P. eryngii</i> , <i>P. pulmonarius</i> , <i>P. florida</i> , <i>P. cystidiosus</i>) | AFLP | [99] |
| 4 | 71 chủng thuộc 5 loài <i>Pleurotus</i> tại Kenya | AFLP | [102] |
| 5 | 7 chủng (thuộc 5 loài) <i>Pleurotus</i> tại Mỹ | RAPD | [103] |
| 6 | 9 chủng <i>Pleurotus</i> tại Việt Nam | AFLP | [60] |
| 7 | <i>Pleurotus</i> tại Ấn Độ | RAPD | [104] |
| 8 | 19 chủng <i>P. eryngii</i> tại Jordan | ISSR | [88] |
| 9 | <i>P. ostreatus</i> tại Indonesia | RAPD | [105] |
| 10 | 132 chủng <i>Pleurotus</i> tại Trung Quốc | ISSR | [91] |

DNA tương ứng với các giống sau các lần cấy chuyển (sau 1, 5, 10, 15 lần) [106]. Cũng trong nghiên cứu này người ta sử dụng các công cụ khác nhau của proteomics đánh giá biểu hiện của các nhóm gen liên quan và cho rằng quá trình sửa chữa sai khác của gen bị khóa trong quá trình nhân đôi DNA khi cấy chuyển.

1.6.2. Đánh giá dựa trên enzyme và các phản ứng sinh hóa

Nấm có khả năng sử dụng cơ chất hiệu quả nhờ vào các enzyme ngoại bào được tiết ra môi trường để thủy phân cơ chất. Các nhóm enzyme đó là cellulase, laccase... Việc đánh giá hoạt lực của các nhóm enzyme này cũng là một phương pháp cơ bản để xác định chất lượng giống nấm cũng như khai thác cho các mục đích khác [107]. Hoạt lực enzyme CMCase và laccase cao đồng thời cũng cho năng suất cao được ghi nhận trong nghiên cứu trên nấm *P. ostreatus* và *P. sajor-caju* [108]. Các nghiên cứu khác trên nấm *P. ostreatus* và nấm hương (*Lentinula edodes*) cũng ghi nhận kết quả tương tự [109, 110]. Trong sự thoái hóa của giống nấm *C. militaris* người ta ghi nhận sự suy giảm hoạt lực enzyme cellulase và amylase [34].

Để đánh giá nhanh hơn nữa chất lượng giống nấm, các thử nghiệm sinh hóa đã được nghiên cứu áp dụng. Thông qua phản ứng, các chất trong môi trường sẽ thay đổi và được đo đạc qua các thiết bị từ đó tính toán được khả năng chuyển hóa và đánh giá chất lượng giống nấm. Khởi đầu là công bố của Magae và cs. (2005). Các tác giả nuôi cấy nấm kim châm (*Flammulina velutipes*) trên môi trường YBLB [111]. Môi trường này chứa cao nấm men, peptone, bromothymol blue (BTB) và lactose. Thông qua sự thay đổi màu của môi trường nuôi cấy tương ứng với năng suất nấm trồng người ta nhận thấy những giống có năng suất thấp (dấu hiệu thoái hóa) thì màu môi

trường là xanh lục (blue). Những giống có năng suất ổn định sẽ có màu xanh lá cây (green) hoặc màu vàng (yellow). Đây là phát hiện ý nghĩa cho phép sàng lọc các giống thoái hóa trong thời gian ngắn mà không cần phải nuôi trồng (trong nghiên cứu này là 4 ngày). Trên nền tảng phương pháp này, Chen và cs. (2019) đã khảo sát trên nấm rơm (*Volvariella volvacea*) cũng cho kết quả tương tự [33]. Những giống sau quá trình cấy chuyền liên tục sẽ bị thoái hóa. Số lần cấy chuyền càng nhiều thì dấu hiệu thoái hóa càng lớn (tốc độ lan tơ trên môi trường thạch và sinh khối trên môi trường lỏng giảm tương ứng). Đặc biệt là có sự tương ứng giữa màu sắc của môi trường trong thử nghiệm YBLB với sự thoái hóa. Phương pháp này được áp dụng để sàng lọc giống nấm thoái hóa trước khi tiến hành thí nghiệm [112]. Sự thay đổi màu của môi trường được giải thích có thể là do thay đổi pH [33], hoặc có thể do hoạt lực enzyme laccase và peroxidase phân giải thuốc thử thông qua phản ứng oxy hóa khử [113]. Cấu trúc phenolic của BTB tương tự cấu trúc của lignin nên sẽ được hệ enzyme ligninolytic phân giải [114]. Phương pháp đánh giá này đang được các đơn vị thương mại áp dụng để sàng lọc nhanh các giống nấm trong bộ sưu tập giống của mình.

1.6.3. Đánh giá sự sinh trưởng của giống nấm trên các môi trường dinh dưỡng

Môi trường cấp 1 (môi trường thạch) được sử dụng để phân lập, nhân giống và giữ giống. Môi trường này cũng được lựa chọn để khảo sát sơ bộ chất lượng giống nấm. Tốc độ lan tơ và hình thái khuẩn lạc phù hợp là những tiêu chí được lựa chọn vì giúp rút ngắn thời gian sản xuất giống [115]. Các môi trường cấp 1 được sử dụng thường bổ sung nguồn carbon là glucose và nguồn nitơ là các thành phần tự nhiên gồm các loại dịch chiết rau củ; trong đó môi trường PDA là môi trường phổ biến nhất. Người ta thường đo đường kính vòng lan tơ của các khuẩn lạc trên môi trường dinh dưỡng sau một thời gian nhất định từ đó so sánh giữa các giống. Tùy theo đặc tính của giống mà người ta lựa chọn các giống nhanh nhất. Bảng 1.4 tổng hợp một số công bố về tốc độ lan tơ trên PDA của một số giống nấm bào ngư có hình thái trắng và xám phổ biến. Mặc dù PDA là môi trường phổ biến, một số môi trường khác (malt yeast agar - MYA, malt extract agar - MEA...) cũng được sử dụng trong nhân giống, giữ giống nấm [116-118].

Hiện nay người ta cũng áp dụng nhân giống cấp 2 trên điều kiện lỏng [119]. Kỹ thuật nhân giống lỏng (meo lỏng) có các ưu điểm như rút ngắn thời gian, chất lượng giống đồng nhất, sức sinh trưởng tốt, năng suất cao hơn và đã được áp dụng trên một số đối tượng như nấm hương (*Lentinula edodes*), kim châm (*Flammulina velutipes*), nấm Bai-Ling (*P. nebrodensis*), bào ngư (*P. ostreatus*) [120-

123]. Tuy vậy kỹ thuật này đòi hỏi độ vô trùng cao, cũng như đầu tư ban đầu về thiết bị phù hợp.

Bảng 1.4. Tốc độ lan tơ của một số giống bào ngư xám, trắng phổ biến trên môi trường PDA

| Loài | Đường kính/tốc độ vòng lan tơ theo công bố | Tốc độ lan tơ quy đổi (mm ² /ngày) | Tham khảo |
|-----------------------|--|---|-----------|
| <i>P. pulmonarius</i> | 5,6 mm/ngày | 172,32 | [124] |
| | 3,2 cm sau 7 ngày | 114,83 | [125] |
| | 6,44 mm/ngày | 227,45 | [126] |
| | 4,4 cm sau 7 ngày | 217,11 | [127] |
| | 23 mm ² /ngày | 23,00 | [128] |
| <i>P. ostreatus</i> | 3,0 mm/ngày | 49,45 | [124] |
| | 9 cm sau 8 ngày | 908,43 | [129] |
| | 0,79 cm/ngày | 342,94 | [130] |
| | 8,42 mm/ngày | 389,58 | [126] |
| | 6,43 cm sau 7 ngày | 465,13 | [117] |
| | 10,12 mm/ngày | 803,95 | [131] |
| <i>P. cystidiosus</i> | 3,02 cm sau 6 ngày | 119,33 | [129] |
| | 4,3 cm sau 12 ngày | 120,96 | [132] |
| | 2,1 cm sau 7 ngày | 49,46 | [133] |
| <i>P. cornucopiae</i> | 6,11 mm/ngày | 205,09 | [126] |

Việc đánh giá tốc độ lan tơ trên môi trường thạch, sinh khối trên môi trường lỏng được xem bước sàng lọc ban đầu đánh giá chất lượng giống. Những giống có tốc độ lan tơ trên PDA cao thường được chọn để nuôi trồng.

1.6.4. Đánh giá tốc độ lan tơ và hiệu suất sinh học trên giá thể sản xuất

Nấm bào ngư có thể trồng được trên cơ chất giàu cellulose như mạt cưa, rom rạ, bã mía... Tại Việt Nam, cơ chất chính để trồng nấm bào ngư là mạt cưa cao su. Việc đánh giá tốc độ lan tơ trên mạt cưa là bước quan trọng để xem xét khả năng sử dụng cơ chất của giống. Một giống lan tơ nhanh trên giá thể sẽ rút ngắn quá trình sản xuất. Giá trị chuẩn để tính năng suất là hiệu suất sinh học (BE) được tính bằng khối lượng nấm tươi thu được (gam) trên 100 gam cơ chất khô tuyệt đối [115]. Tuy vậy một số nghiên cứu không có đầy đủ thông tin về cơ chất (khối lượng, độ ẩm cơ chất) để có tính được BE mà chỉ có năng suất chung dẫn đến khó so sánh đối chiếu với các nghiên cứu khác. Bên cạnh đó để có thể sàng lọc và so sánh giống cần chuẩn hóa các yếu tố nuôi trồng (giống, cơ chất, môi trường...).

Nhìn chung hiệu suất sinh học của các giống thay đổi theo giống nuôi trồng cũng như cơ chất sử dụng. Cùng trên một cơ chất có một số giống có hiệu suất sinh học cao như *P. ostreatus*, *P. citrinopileatus*. Một số giống có BE thấp hơn như *P.*

pulmonarius [134]. Thông tin về hiệu suất sinh học của một số loài nấm bào ngư khi nuôi trồng trên mặt cưa được trình bày ở Bảng 1.5.

Bảng 1.5. Hiệu suất sinh học của một số giống bào ngư trên mặt cưa

| Loài | Thời gian lan tơ (ngày) | Tốc độ lan tơ quy đổi (mm/ngày) | Hiệu suất sinh học (%) | Tham khảo |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------------|------------------------|-----------|
| <i>P. pulmonarius</i> | 18 (túi 1,4 kg) | - | 54 | [135] |
| | 24,3 (túi 1,2 kg) | 9,2 | 33,9 | [136] |
| | - | - | 16,07 – 20,12 | [137] |
| | - | - | 25,56 – 36,13 | [138] |
| | - | - | 20,21 – 48,83 | [139] |
| | - | - | 26,68 | [140] |
| <i>P. ostreatus</i> | 17,33 | - | 64,69 | [141] |
| | 30,03 (túi 1 kg) | - | 46,44 | [142] |
| | 20 (1 kg cơ chất) | - | 78,90 | [143] |
| | 18,2 -19,2 | 6,3–7,6 | 78,30 – 84,08 | [144] |
| | - | - | 41,36 | [140] |
| | - | - | 57,34 – 72,64 | [145] |
| | 28,6 (túi 1,4 kg) | 6,9 | * | [146] |
| - | - | 89,70 | [147] | |
| <i>P. cystidiosus</i> | 48,3 (túi 1 kg) | - | 36,27 | [142] |
| | - | - | 50-70 | [115] |
| <i>P. citrinopileatus</i> | 13 (túi 1 kg) | 13,0-18,3 | 41,60 – 70,93 | [148] |

(Ghi chú: -: Không có thông tin; *: số liệu không đủ thông tin để quy đổi)

1.7. CÁC PHƯƠNG PHÁP CẢI TIẾN GIỐNG NẤM

Trong cải tiến giống nấm, các tính trạng quan tâm của nấm là hương vị, màu sắc, kết cấu của nấm (độ dai, giòn), năng suất cao, khả năng thích nghi với biên độ nhiệt rộng, khả năng sử dụng cơ chất cũng như một số tính trạng đặc biệt khác: nấm không có bào tử, cải thiện thành phần dinh dưỡng, chống chịu sâu bệnh [5, 28]. Mặc dù có nhiều phương pháp cải tiến giống được sử dụng, nhưng cơ bản có thể chia thành các nhóm chính là: phương pháp lai (truyền thống và dung hợp tế bào trần), phương pháp chuyển gen và xử lý đột biến dòng song nhân [28, 149, 150].

1.7.1. Phương pháp lai

Đây là phương pháp cải tiến giống cơ bản trong ngành nấm. Hầu hết các giống nấm cải tiến hiện nay đều được tạo ra bằng phương pháp này. Phương pháp lai có thể chia thành 2 nhóm khác nhau, đó là: lai truyền thống và dung hợp tế bào trần [150].

1.7.1.1. Phương pháp lai truyền thống

Lai truyền thống và vai trò của dòng đơn bội

Phương pháp lai ra đời vào những năm 1980, dựa trên đặc tính bắt cặp của hệ sợi nấm và có thể áp dụng cho cả nhóm nấm đồng tản và dị tản [151]. Xét về nguồn gốc của các đối tượng lai, phương pháp lai có thể chia thành hai kiểu: tự lai và lai chéo. Tự lai là lai giữa 2 dòng của cùng một giống bố mẹ, lai chéo là lai giữa 2 dòng của 2 giống bố mẹ khác nhau [152]. Xét đặc điểm di truyền của đối tượng lai, hai kiểu lai bao gồm: lai giữa hai dòng đơn bội (mon – mon mating) và lai giữa một dòng đơn bội và một sợi song nhân (di – mon mating). Đặc biệt hơn, lai giữa hai sợi nấm còn ghi nhận lai giữa hai loài khác nhau [153, 154].

Phương pháp này tiến hành trên các bước cơ bản: thu thập bào tử và phân lập dòng đơn bội, nhân nhóm kiểu di truyền giới tính dòng đơn bội, chọn lọc dòng đơn bội, lai giữa hai dòng đơn bội phù hợp và chọn lọc tổ hợp lai có đặc tính mong muốn [155]. Phương pháp lai truyền thống đã có nhiều kết quả nổi bật trong chọn tạo giống nấm bào ngư và được trình bày ở Bảng 1.6.

Nền tảng của phương pháp lai truyền thống là các dòng đơn bội. Do đó các phương pháp thu nhận, xác nhận dòng đơn bội và các phương pháp lai giữa hai dòng đơn bội đã được phát triển. Trước đây, việc nhận diện tổ hợp lai dựa trên sự hình thành cấu trúc mấu nối nên phương pháp này chỉ áp dụng cho các giống nấm có mấu nối ở sợi dị nhân. Ngày nay, nhiều công cụ được phát triển đã giúp phân biệt các thể đồng nhân (homokaryon) và các thể dị nhân (heterokaryon) dễ dàng hơn. Nhờ những công cụ này, hiện nay phương pháp lai chéo đã có thể ứng dụng cho các giống nấm không có cấu trúc mấu nối như nấm rom (*Volvariella volvacea*), nấm mỡ (*Agaricus bisporus*) [156, 157].

Do yêu cầu xác định nhanh kiểu bắt cặp của các dòng đơn bội trước khi tiến hành lai tạo, hiện tại việc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để xác định nhân tố A và B đang được một số tác giả nghiên cứu. Ryu và cs. (2012) sử dụng phương pháp RAPD – SCAR với các cặp mồi cho vùng B3. Kết quả xác định được marker đặc trưng vùng B3 của nấm *P. eryngii* và các SCAR marker primers này đã đăng ký Korean patent, #100993814 [158]. Tuy nhiên đối với các loài khác như *P. florida*, *P. sajor-caju*, *P. salmoneostramineus*, *P. cornucopiae* và *P. ostreatus* marker này không sử dụng được. Sau đó các gen liên quan của vùng này cũng đã được xác định cấu trúc và chức năng [159]. Năm 2019, Lee và cs. đã phát triển SCAR marker để phát hiện

Bảng 1.6. Một số kết quả lai tạo các giống nấm bào ngư

| STT | Giống | Tiến hành | Kết quả | Tham khảo |
|-----|---|-----------------------------------|--|-----------|
| 1 | <i>P. ostreatus</i> | Lai 17 dòng đơn bội | Xác định tính chất của 27 tổ hợp lai | [160] |
| 2 | <i>P. ostreatus</i> | Lai các dòng đơn bội từ 2 giống | 16 tổ hợp lai được thu thập và chọn dòng có năng suất cao | [161] |
| 3 | <i>P. eryngii</i> | Lai mon - mon của các giống bố mẹ | Thu tổ hợp lai có quả thể giữ được 67,5 ngày ở 4 °C | [162] |
| 4 | <i>P. ostreatus</i> | Lai di – mon giữa 2 dòng | Tạo dòng lai “Hwaseong 5ho” có năng suất cao hơn 16,6 (%) so với đối chứng “Suhan 1ho” | [163] |
| 5 | <i>P. ostreatus</i> | Lai di – mon giữa 2 dòng | Thu dòng thương mại “Mongdol” có năng suất cao hơn đối chứng | [164] |
| 6 | <i>P. pulmonarius</i> | Lai mon - mon | Thu 3 dòng lai UM-012, UM-073, UM-65 có đặc tính mong muốn | [137] |
| 7 | <i>P. flabellatus</i> | Lai mon - mon | Thu 34 tổ hợp, trồng 20 tổ hợp, xác định tổ hợp cho hàm lượng protein và năng suất cao | [165] |
| 8 | <i>P. pulmonarius</i> và <i>P. citrinopileatus</i> | Lai 2 dòng đơn bội của hai giống | Thu dòng lai P19xC5 giữa 2 giống có đặc tính của cả hai giống và năng suất cao hơn | [153] |
| 9 | <i>P. djamor</i> và <i>P. florida</i> / <i>P. ostreatus</i> | Lai giữa 2 dòng đơn bội 2 giống | Thu tổ hợp hai mang quả thể có đặc tính trung gian | [154] |
| 10 | <i>P. giganteus</i> | Lai mon – mon giữa hai dòng bố mẹ | Thu tổ hợp lai IH32 có năng suất gấp 6 lần chủng bố mẹ | [166] |

vùng A4 và xác định cấu trúc vùng này [167]. Tuy nhiên các tác giả cũng nhận thấy marker này không phát hiện được đối với loài *P. florida*, *P. sajor-caju*, *P. salmoneostramineus*, *P. cornucopiae* và *P. ostreatus*. Trên loài *P. eryngii* một số marker cho nhân tố A và B cũng đã được phát triển [168]. Đối với nấm *P. tuoliensis*, EST-SSR markers cũng đã được phát triển hỗ trợ chọn tạo dòng đơn bội [169]. Trên nấm *P. ostreatus* đã phát triển RAPD marker L3₁₃₀₀ cho B2 và B4 (không có vạch ở B1 và B2), L6₁₈₀₀ cho B1 và B4 (không có vạch ở B2 và B3) [170], tuy nhiên vẫn chưa có thông tin rõ ràng. Các nghiên cứu trên nấm bào ngư xám (*P. pulmonarius*) chưa thấy công bố.

Gây đột biến đơn bào tử thu nhận dòng đơn bội đột biến

Bên cạnh lai các dòng đơn bội sau khi phân lập từ quả thể để thu hệ con lai, hiện tại người ta còn tiến hành gây đột biến bào tử để thu nhận dòng đơn bội đột biến trước khi thực hiện các phép lai. Phương pháp này có nhiều thuận lợi vì số lượng bào tử nấm lớn, dễ chịu tác động bởi các yếu tố đột biến, đồng thời khả năng tái sinh cao sau xử lý. Bào tử nấm ngọc châm (*Hypsizygus marmoreus*) được xử lý đột biến bằng methyl methanesulfonic acid (MMS) sau đó cho lai các dòng đột biến với nhau đã thu được thế hệ con lai tăng năng suất 10% cũng như khác biệt về hình thái [150]. Trên nấm bào ngư đã xử lý tia UV để tạo dòng ít phát sinh bào tử của nấm *P. florida* và *P. sajor – caju* [171]. Ngoài ra các dòng đồng tản như nấm rom cũng đã được áp dụng khi xử lý bào tử hoặc phiến nấm thu được thế hệ con có năng suất cao hơn và quả thể chịu được nhiệt độ thấp khi bảo quản [172].

1.7.1.2. Phương pháp dung hợp tế bào trần

Quy trình tạo giống nấm bằng phương pháp dung hợp tế bào trần gồm các bước như sau: phân lập các tế bào trần, dung hợp các tế bào trần, tái tạo sức sống cho các tổ hợp lai dị nhân, tuyển chọn và đánh giá khả năng hình thành quả thể và các đặc tính mong muốn của các tổ hợp lai thành công. Với phương pháp này, các tế bào có thể trao đổi vật chất di truyền mà không bị giới hạn bởi hàng rào di truyền tự nhiên. Phương pháp này có tỉ lệ dung hợp thành công cao, dung hợp được giữa các tế bào khác chủng cùng loài, đến các tế bào khác loài cùng chi, thậm chí là giữa các tế bào khác chi với nhau [152].

Với khả năng dung hợp tế bào hiệu quả, phương pháp dung hợp tế bào trần được đánh giá trở thành phương pháp cải tiến giống nấm quan trọng và công cụ hiệu quả trong các nghiên cứu về di truyền nấm lớn. Tuy vậy phương pháp này có hạn chế là việc tái tạo hoàn chỉnh tế bào sau dung hợp còn một số khó khăn nhất định. Một số công bố lai tạo thành công trong thời gian gần đây. Hai loài *P. ostreatus* và *P. djamor* được dung hợp thành công và thu được giống nấm có hình thái trung gian [173]; tạo dòng nấm bào ngư chịu nhiệt khi lai giữa nấm rom (*Volvariella volvacea*) và bào ngư trắng (*P. florida*) [174]; dòng lai có năng suất cao được tạo ra từ 2 loài *P. florida* và *P. cystidiosus* [175]. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận khi lai 2 giống *P. ostreatus* var. *florida* và *P. djamor* var. *roseus* [176]. Gần đây là nghiên cứu tạo dòng nấm rom chịu lạnh khi bảo quản khi lai giữa nấm rom và nấm đùi gà (*P. eryngii*) [177], hay nghiên cứu lai giữa *P. sajor-caju* và nấm hoàng đế (*Calocybe indica*) [178].

1.7.2. Phương pháp chuyển gen và chỉnh sửa gen

Các phương pháp chuyển gen chính vào nấm *Pleurotus* là hóa dung hợp bằng polyethylene glycol/CaCl₂ [179], súng bắn gen [180], và dùng vi khuẩn *Agrobacterium* [181, 182]. Hiện nay, các công trình nghiên cứu chuyển gen vào nấm đã được thực hiện. Tuy nhiên các nghiên cứu này chỉ dừng lại ở mức độ đánh giá khả năng chuyển các vật liệu di truyền ngoại lai (như gen, chromosome) vào các loài nấm bậc cao, hoặc dùng để nghiên cứu chức năng gen hay đặc điểm di truyền; chưa có giống nấm nào thực hiện bằng phương pháp này được thương mại hóa. Bên cạnh phương pháp chuyển gen, hiện nay người ta đã công bố sử dụng kỹ thuật chỉnh sửa gen CRISPR tạo giống nấm mỡ không bị nâu [183]. Kỹ thuật này cũng đang được tiến hành trên chi *Pleurotus* [184, 185].

1.7.3. Phương pháp xử lý đột biến dòng song nhân/đa bào tử

Phương pháp này xử lý hệ sợi song nhân bằng các tác nhân gây đột biến. Sau đó thu nhận hệ sợi, nuôi trồng so sánh để tìm những dòng có đặc tính mong muốn. Nấm bào ngư xám (*P. pulmonarius*) khi được xử lý bằng tia UV đã thu nhận được dòng có năng suất cao hơn gấp đôi [186]. Phân tích hệ sợi và sinh học phân tử cũng cho thấy có những điểm khác biệt rất rõ so với giống ban đầu. Nấm *P. ostreatus* xử lý bằng tia UV cũng thu được dòng đột biến PO-7(U4) có ít bào tử hơn so với đối chứng [187]. Nghiên cứu gây đột biến bằng tia gamma nấm *Agaricus bisporus* cũng cho giống có năng suất cao [188].

1.8. CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CÓ LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN

Là một trong những nhóm nấm ăn được nuôi trồng phổ biến, từ lâu trên thế giới các nghiên cứu lai tạo và di truyền chi *Pleurotus* đã được thực hiện và mang lại nhiều kết quả quan trọng. Tính tương hợp của 32 dòng thuộc chi *Pleurotus* đã được nghiên cứu và xác nhận sự tồn tại của 5 loài *Pleurotus* khác nhau tại Argentina bao gồm *P. albidus*, *P. cystidiosus*, *P. djamor*, *P. ostreatus* và *P. pulmonarius* [189]. Các nghiên cứu về phân loại và đánh giá đa dạng di truyền đã được trình bày ở các phần phía trên.

Về nghiên cứu phân loại, định danh nấm bào ngư tại Việt Nam dựa trên phân tích đặc điểm hình thái có một số công bố. Các loài *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* ... đã được mô tả hình thái trong chuyên khảo [190]; loài bản địa *P. cystidiosus* var. *blaoensis* được phát hiện ở Lâm Đồng; các loài *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. pulmonarius* được ghi nhận ở Đồng Nai...[32]. Trong những năm gần đây, các nghiên

cứu phân loại dựa trên vùng trình tự ITS của nấm bào ngư bắt đầu được quan tâm [191-194]. Tại phía nam, chưa ghi nhận nhiều công bố về sưu tập, định danh các chủng nấm bào ngư. Chín chủng nấm bào ngư có tên thương mại là bào ngư tím, bào ngư vàng, bào ngư đỏ, bào ngư trắng và bào ngư xám tại TP. Hồ Chí Minh và các vùng lân cận đã được định danh bằng các đặc điểm hình thái và ITS [60]. Ba chủng nấm bào ngư xám thu thập tại tỉnh Long An được xác định là loài *P. pulmonarius* khi sử dụng kết hợp mô tả hình thái và phân tích vùng trình tự ITS, LSU [128]. Vùng trình tự ITS cũng cho thấy hỗ trợ phân loại các loài *P. pulmonarius*, *P. ostreatus*, *P. djamor*, *P. citrinopileatus* thu thập tại các tỉnh phía nam [195].

Bên cạnh các nghiên cứu về phân loại, tại nước ta có một số nghiên cứu về kỹ thuật nuôi trồng, khảo sát giá trị dinh dưỡng, cũng như tác dụng dược lý. Các nghiên cứu về kỹ thuật nuôi thường tập trung vào phương pháp sản xuất giống nấm (khảo sát cơ chất nhân giống, nhiệt độ ủ tơ), phương pháp nuôi trồng (các loại cơ chất, ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng khác nhau lên sự phát triển hệ sợi ...) [136, 196-199]. Bên cạnh đó cũng có công bố lựa chọn chủng nấm nhập nội phù hợp điều kiện nuôi trồng [200]. Tuy vậy chưa có các nghiên cứu hệ thống mối liên quan giữa các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất nấm.

Hiện nay các giống nấm bào ngư trồng tại khu vực phía nam được các cơ sở gọi bằng rất nhiều tên khác nhau như bào ngư xám Thái Lan, bào ngư xám dài ngày, bào ngư xám ngắn ngày, bào ngư xám 1676, bào ngư xám Đà Lạt, bào ngư rùa, sò Mỹ, sò Thái, sò trắng, hoàng kim, bào ngư hồng, đùi gà... Trong đó giống nấm bào ngư xám dài ngày là nấm trồng chủ lực của khu vực. Giống này cho năng suất cao, quả thể đều, chắc, thời gian bảo quản lâu được thị trường ưu chuộng. Giống nấm tại khu vực phía nam đa số có nguồn gốc từ một số nước như Thái Lan, Trung Quốc, Ấn Độ, Đài Loan, Mỹ...; rất ít giống có nguồn gốc từ bản địa (bào ngư phương vĩ); nhiều giống không rõ nguồn gốc. Đa số trong đó là giống được phân lập từ sản phẩm thương mại nên thiếu các thông tin nguồn gốc, đặc tính sinh học và bị thoái hóa nhanh. Các vấn đề các cơ sở sản xuất giống nấm thường gặp phải là thiếu thông tin đầy đủ về giống, thiếu phương pháp bảo quản giống nấm lâu dài (hơn 80% đơn vị phải mua lại giống gốc sau 3 đến 6 tháng), nhiễm tạp giống và không kiểm soát được chất lượng giống khi xuất bán. Đây là các thách thức cần được giải quyết để phát triển ngành nấm tại khu vực [7].

Các nghiên cứu chọn tạo giống nấm bào ngư đã được nhiều tác giả trên thế giới công bố. Các dòng đơn bội từ *P. florida* được lai chéo và nhận các dòng lai cho năng suất, chất lượng nuôi trồng cao, đồng thời có các đặc điểm màu sắc và hình dạng

quả thể như mong muốn [201]. Trên nấm *P. eryngii* kết quả lai mon – mon đã thu nhận các dòng thương mại có khả năng lưu trữ lên đến trên 40 ngày và vẫn giữ nguyên các tính chất về màu sắc và độ cứng thân nấm [202]. Kết quả lai các dòng đơn bội của nấm *P. flabellatus* đã lựa chọn 5 tổ hợp lai có năng suất cao [203]. Các nghiên cứu khác về nội dung này cũng đã được trình bày trong phần phía trên.

Việc xác định kiểu bắt cặp bằng phương pháp lai ngẫu nhiên các dòng đơn bội trước khi tiến hành lai tạo là cần thiết, giúp giảm công sức và thời gian do có thể xác định nhanh chóng các cặp đơn bội có thể bắt cặp nhau. Bên cạnh đó phương pháp sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để xác định nhân tố A và B cũng đang được một số tác giả quan tâm phát triển. Cấu trúc và đa dạng di truyền của gen A và B của nấm *P. djamor* cũng đã được xác định [204]. Trên đối tượng bào ngư đùi gà (*P. eryngii*) một số tác giả đã công bố việc phân tích các gen cũng như các marker phân tử liên quan đến gen A và gen B [158, 167]. Trên nấm *P. tuoliensis*, kỹ thuật EST-SSR cũng đã được phát triển để xác định các dòng đơn bội [169].

Các nghiên cứu về lai tạo các loài trong chi *Pleurotus* tại Việt Nam vẫn còn ít. Tại khu vực phía bắc, hệ sợi nấm mầm từ bào tử (chưa xác nhận là dòng đơn bội) được tiến hành lai tạo và kết quả ghi nhận tổ hợp P7 có đặc điểm phù hợp (không rõ tên loài bố mẹ) [205]. Một vài tổ hợp lai cũng đã được ghi nhận các chỉ tiêu sinh trưởng và nuôi trồng khi lai giữa hai dòng đơn bội (lai ngẫu nhiên/không xác định kiểu di truyền bắt cặp, không rõ tên loài bố mẹ) [206]. Tại phía nam, dòng đơn bội của một số giống nấm bào ngư (*P. citrinopileatus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. djamor*) cũng được một số tác giả thu thập [60, 207]. Tuy vậy, cho đến nay, chưa có các công bố tại Việt Nam về cách nhận diện sơ khởi các dòng đơn bội có tiềm năng thương mại ở các khu vực khác hay sử dụng công cụ sinh học phân tử để phân nhóm các dòng đơn bội.

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. Đề tài tập trung thu mẫu nấm và chủng nấm ở các tỉnh, thành phố có các trại là đầu mối cung cấp phôi nấm tại khu vực Đông Nam Bộ như Đồng Nai, Tây Ninh, Bình Dương, Bà Rịa - Vũng Tàu và TP. Hồ Chí Minh. Đề tài cũng tiến hành thu một số mẫu nấm thương mại tại một số địa phương khác thuộc khu vực phía nam như Bình Thuận, Vĩnh Long, Cần Thơ. Bên cạnh đó, đề tài cũng thu thập chủng tự nhiên tại Lâm Đồng. Mỗi địa điểm tiến hành thu nhận 5 mẫu quả thể. Trong quá trình thu thập mẫu nấm và chủng nấm, các thông tin về nguồn gốc xuất xứ, điều kiện tự nhiên cũng như điều kiện nuôi trồng sơ bộ sẽ được ghi nhận theo từng mẫu nấm hoặc chủng nấm thu thập được.

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. Bề mặt quả thể được lau bằng cồn 70 độ, sau đó tách đôi quả thể và dùng dao mổ lấy một miếng thịt nấm vô trùng và cấy sang ống nghiệm chứa môi trường PDA đã chuẩn bị sẵn (*thành phần môi trường thể hiện trong Phụ lục 1*) [208]. Giống được làm thuần qua vài lần cấy chuyển. Mẫu giống thuần được giữ trong ống thạch nghiêng chứa môi trường MYA (malt yeast agar) và bảo quản ở nhiệt độ 4 °C (*thành phần môi trường thể hiện trong Phụ lục 2*). Lưu mẫu khô sau khi sấy quả thể ở nhiệt độ 60 °C, bảo quản mẫu trong túi nilon cùng với chất hút ẩm và giữ mẫu trong tủ hút ẩm để tiến hành phân tích vi thể sau này [207].

2.1.3. Phương pháp định danh bằng đặc điểm hình thái

Bước đầu phân nhóm các chủng giống theo đặc điểm hình thái ngoài và các đặc điểm chủng giống ghi nhận được khi thu thập như bào ngư xám, bào ngư trắng. 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) [209, 210]. Các cấu trúc được phân tích bao gồm: mũ nấm, cuống nấm, bào tâng, bào tử, đằm, liệt bào, bề mặt và thể nền của mũ nấm, cuống nấm. 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) để xác định loài cho các chủng nấm thu thập [22, 27, 50, 53-55, 66, 189].

Kích thước các cấu trúc đại thể được đo bằng thước thông thường. Kích thước các cấu trúc hiển vi được quan sát dưới kính hiển vi (BH2 – Olympus, Nhật Bản), chụp ảnh và đo bằng phần mềm Piximètre 5.10 (ACH Logiciels, Pháp) kết hợp với thước đo micrometer của kính hiển vi. Chỉ số Q là tỉ lệ chiều dài trung bình (L) trên chiều rộng trung bình (W) của 50 bào tử.

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) [81]. DNA bộ gen của các mẫu nấm được tách chiết dựa theo phương pháp CTAB [211]. Đầu tiên tơ nấm được nghiền trong 50 µl CTAB 2X sau đó bổ sung thêm 450 µl CTAB 2X và ủ ở 65 °C trong 1 giờ (*thành phần dung dịch CTAB 2X thể hiện ở Phụ lục 6*). Thêm vào eppendorf 500 µl CIA, vortex và ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 7 phút ở nhiệt độ phòng (*thành phần dung dịch CIA thể hiện ở Phụ lục 7*). Tiếp theo thu 300 µl dịch nổi cho vào eppendorf chứa 300 µl isopropanol lạnh và ủ ở -20 °C trong 30 phút. Tiến hành ly tâm 13000 vòng/phút trong 7 phút ở 4 °C, bỏ dịch nổi; thêm 500 µl ethanol 70% và tiến hành ly tâm 13000 vòng/phút trong 7 phút ở 4 °C, bỏ dịch nổi, lặp lại bước rửa ethanol 3 lần. Sau khi rửa, làm khô trên bồn ủ khô ở 50 °C trong 30 phút. Cuối cùng, thêm 50 µl TE và giữ DNA ở -20°C cho đến khi sử dụng (*thành phần TE thể hiện ở Phụ lục 8*).

Các mẫu DNA tổng sau đó được khuếch đại bằng phản ứng PCR trên máy luân nhiệt (Blue-Ray Biotech – Đà Loan) với các cặp mồi ITS1 và ITS4 hoặc cặp mồi ITS5 và ITS4 (các chủng ABI-F000252; ABI-F000254; ABI-F000257). Thông tin về thành phần mồi, các thành phần cơ bản Bảng 2.1, 2.2. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với 35 chu kỳ gồm: biến tính DNA ở 95 °C trong 5 phút; 95 °C trong 30 giây, bắt cặp mồi ở 56 °C trong 30 giây, kéo dài DNA ở 72 °C trong 1 phút 30 giây; kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 10 phút và giữ sản phẩm ở 4 °C.

Bảng 2.1. Trình tự các đoạn mồi sử dụng trong phản ứng PCR [78]

| STT | Tên mồi | Trình tự (5' → 3') |
|-----|---------|-------------------------------|
| 1 | ITS1 | TCC GTA GGT GAA CCT GCG G |
| 2 | ITS4 | TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC |
| 3 | ITS5 | GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G |

Bảng 2.2. Thành phần cơ bản của một phản ứng PCR

| STT | Thành phần | Thể tích (μ l) |
|--------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| 1 | DNA template | 2 |
| 2 | Primer (20 μ M) | 0,5 |
| 3 | My Taq HS Mix (Meridian Bioscience) | 12,5 |
| 4 | Nước cất 2 lần | 10 |
| Tổng thể tích cho một phản ứng | | 25 μ l |

Sản phẩm sau PCR được tinh sạch bằng ExoSAP-IT (Thermo Scientific, Massachusetts, Hoa Kỳ) và được gửi giải trình tự hai chiều theo phương pháp Sanger (công ty 1st Base, Selangor, Malaysia). Kết quả giải trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC ver. 7 (Genetyx Corp., Tokyo, Nhật Bản) và tiến hành so sánh với các dữ liệu trên GenBank thông qua chương trình BLAST của NCBI. Ghi nhận các trình tự tương đồng có chỉ số Max score cao nhất và kiểm tra tính toàn vẹn của các trình tự này để xem xét tính chính xác của phép so sánh. Dữ liệu được sắp giống cột (alignment) bằng phần mềm AliView ver 1.28 [212]; xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA X [213]. 27 trình tự được sử dụng tham chiếu; trong đó 25 trình tự của các loài bào ngư có hình thái trắng xám phổ biến, hai loài khác chi *Pleurotus* nhưng cùng họ (*Pleurotaceae*) là *Hohenbuehelia auriscalpium* và *Hohenbuehelia mastrucata* được chọn làm nhóm ngoài (Bảng 2.3).

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

Phân tích đa dạng di truyền trên kỹ thuật AFLP được sử dụng để khảo sát khả năng phân biệt các chủng dưới loài. Phân tích đa dạng di truyền bằng AFLP được thực hiện dựa trên công bố của Pawlik và cs. (2012) [99]. Trong đề tài có điều chỉnh một số điểm để phù hợp. Quy trình thực tế bao gồm các bước như sau:

- *Tách chiết DNA bộ gen*: tương tự như phần 2.1.4
- *Tinh sạch DNA sau tách chiết*: bổ sung 1 μ l RNase (10mg/ml) vào 100 μ l dung dịch chứa DNA, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng để loại bỏ RNA. Tiếp theo xác định nồng độ DNA bằng máy quang phổ NanoDrop (Thermo Scientific), sau đó pha loãng DNA các mẫu đến nồng độ 100 ng/ μ l.
- *Cắt DNA*:

Thành phần của phản ứng cắt được thể hiện ở Bảng 2.4.

Bảng 2.3. Thông tin các trình tự tham chiếu để xây dựng cây phát sinh loài

| STT | Loài | Voucher/specimen/ strain | Nguồn gốc | Mã định danh | Tham khảo |
|-----|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|-----------------|--------------|
| 1 | <i>P. pulmonarius</i> | HMAS76672 | China | AY696299 | [214] |
| 2 | <i>P. pulmonarius</i> | CCMSSC00498 | France | KU612946 | [215] |
| 3 | <i>P. pulmonarius</i> | ECS-0158 | Mexico | GU722283 | [214] |
| 4 | <i>P. pulmonarius</i> | LAU09 | Nigeria | JF736658 | [216] |
| 5 | <i>P. pulmonarius</i> | HKAS73350 | China | KP867917 | [64] |
| 6 | <i>P. pulmonarius</i> | CBS100130 | Australia | EU424311 | [215] |
| 7 | <i>P. pulmonarius</i> | SP445807 | Brazil | KF280340 | [217] |
| 8 | <i>P. pulmonarius</i> | NZFRI3528 | New Zealand | U60648 | [217] |
| 9 | <i>P. ostreatus</i> | TENN53662/AFTO L-ID564 (Epitype) | Austria | AY854077 | [214] |
| 10 | <i>P. ostreatus</i> | HKAS84903 | Germany | KP867913 | [218] |
| 11 | <i>P. ostreatus</i> | CBS375.51 | Italy | EU424310 | [219] |
| 12 | <i>P. ostreatus</i> | CCMSSC06141 | China | KP867915 | [214] |
| 13 | <i>P. cf. floridanus</i> | CCMSSC04604 | China | KX836194 | [64] |
| 14 | <i>P. cf. floridanus</i> | CCMSSC00331 | China | KX836192 | [64] |
| 15 | <i>P. floridanus</i> | ZP742 | Halminton/ Canada | KX836193 | [64] |
| 16 | <i>P. floridanus</i> | ZP718 | Halminton/ Canada | KX836195 | [64] |
| 17 | <i>P. floridanus</i> | M2125 | Florida/USA | MK757101 | [63] |
| 18 | <i>P. cornucopiae</i> | PHZAU19 | China | DQ342325 | [217] |
| 19 | <i>P. cornucopiae</i> | 8763 | Austria | AY450341 | [218] |
| 20 | <i>P. citrinopileatus</i> | TFM-M-E793 | Japan | AB115043 | [218] |
| 21 | <i>P. citrinopileatus</i> | HMAS63344 | Jilin/China | AY696301 | [218] |
| 22 | <i>P. placentodes</i> | HKAS57145 (epitype) | China | KR827693 | [218] |
| 23 | <i>P. placentodes</i> | HKAS9409 | China | KX061787 | [218] |
| 24 | <i>P. abieticola</i> | HKAS45720 | China | KP771696 | [219] |
| 25 | <i>P. abieticola</i> | TENN58284 | Russia | AF345656 | [220] |
| 26 | <i>Hohenbuehelia auriscalpium</i> | T-082 | UK | EF409725 | [218] |
| 27 | <i>Hohenbuehelia mastrucata</i> | T-025 | Canada | EF409737 | [218] |

Bảng 2.4. Thành phần phản ứng cắt

| STT | Thành phần | Thể tích (µl) |
|----------------------------|---|---------------|
| 1 | Dung dịch DNA | 10 |
| 2 | <i>Pst</i> I Fastdigest (Thermo Scientific) | 2 |
| 3 | Buffer Fastdigest 10X | 2 |
| 4 | Nước cất 2 lần | 36 |
| Tổng thể tích một phản ứng | | 50 µl |

(Enzyme phân cắt bộ gen DNA được thay bằng *Pst*I)

+ Ủ ở bể ổn nhiệt 37 °C trong 30 phút.

– *Tinh sạch DNA sau khi cắt:*

Đầu tiên bổ sung sodium acetate 3M vào eppendorf chứa DNA đã phân cắt với lượng 1/10 thể tích dung dịch DNA, sau đó cho tiếp ethanol tuyệt đối với lượng gấp 2 – 2,5 lần thể tích dung dịch DNA và ủ ở -20 °C khoảng 1 giờ. Tiếp theo ly tâm 13000 vòng/phút ở 4 °C trong 20 phút và loại bỏ phần dịch nổi, thu lấy tủa. Tiến hành rửa tủa bằng ethanol 70%, ly tâm 13000 vòng/phút ở 4 °C trong 10 phút, loại bỏ phần dịch nổi; lặp lại bước rửa tủa bằng ethanol 70% như trên (3 lần). Cuối cùng làm khô tủa ở 50 °C trong 20 – 30 phút, bổ sung 20 µl nước cất vào eppendorf và để ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút để hòa tan tủa và bảo quản mẫu ở -20 °C cho đến khi sử dụng.

– *Tạo đầu tiếp hợp PstI*

Cho vào eppendorf 5 µl đầu tiếp hợp *Pst*IAF 10µM và 5 µl đầu tiếp hợp *Pst*IAR 10µM (*trình tự các đầu tiếp hợp thể hiện ở Phụ lục 9*). Ủ trên máy PCR với chương trình cài đặt: 95 °C trong 10 phút, 37 °C trong 30 phút. Bảo quản các eppendorf ở -20 °C đến khi sử dụng.

– *Nối DNA*

Thành phần cho một phản ứng nối được thể hiện theo Bảng 2.5.

Bảng 2.5. Thành phần phản ứng nối DNA

| STT | Thành phần | Thể tích (µl) |
|----------------------------|---------------------------------|---------------|
| 1 | Đầu tiếp hợp <i>Pst</i> I 10 µM | 10 |
| 2 | DNA đã cắt và tinh sạch | 10 |
| 3 | T4 ligase 5U | 1 |
| 4 | T4 ligase buffer 10X | 2 |
| 5 | Nước cất 2 lần | 2 |
| Tổng thể tích một phản ứng | | 25 µl |

Ủ ở nhiệt độ 16 °C trên máy PCR qua đêm.

- *Tinh sạch sản phẩm nối*: thực hiện tương tự quy trình tinh sạch DNA sau khi cắt.
- *PCR không chuyên biệt*

Thành phần của phản ứng PCR không chuyên biệt DNA đã nối được phối trộn theo Bảng 2.6.

Bảng 2.6. Thành phần phản ứng PCR không chuyên biệt

| STT | Thành phần | Thể tích (µl) |
|----------------------------|---------------------------------------|---------------|
| 1 | Oligonucleotide <i>Pst</i> IAF* 10 µM | 1,25 |
| 2 | DNA đã cắt nối và tinh sạch | 5 |
| 3 | My Taq HS Mix (Meridian Bioscience) | 12,5 |
| 4 | Nước cất 2 lần | 6,25 |
| Tổng thể tích một phản ứng | | 25 µl |

(*) *Trình tự oligonucleotide PstIAF thể hiện ở Phụ lục 9*

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với 35 chu kỳ gồm: biến tính DNA ở 94 °C trong 2 phút; 94 °C trong 45 giây, bắt cặp mồi ở 56 °C trong 30 giây, kéo dài DNA ở 72 °C trong 2 phút; kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 10 phút và giữ sản phẩm ở 4 °C.

Sản phẩm PCR không chuyên biệt được điện di trên gel agarose 1%, dung môi TAE 0,5X (pH 8,0), điện trường 100V trong 30 phút (Mupid, Nhật Bản).

- *PCR chuyên biệt*

Thành phần của phản ứng PCR chuyên biệt DNA đã nối được phối trộn theo Bảng 2.7.

Bảng 2.7. Thành phần phản ứng PCR chuyên biệt

| STT | Thành phần | Thể tích (µl) |
|----------------------------|-------------------------------------|---------------|
| 1 | Môi <i>Pst</i> IG/GC/AAG/CAA* 10 µM | 0,5 |
| 2 | Sản phẩm PCR không chuyên biệt | 2,0 |
| 3 | My Taq HS Mix (Meridian Bioscience) | 12,5 |
| 4 | Nước cất 2 lần | 10 |
| Tổng thể tích một phản ứng | | 25 µl |

(*) *Trình tự các mồi thể hiện ở Phụ lục 9.*

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR chuyên biệt môi *PstIG/GC* với 40 chu kỳ gồm: biến tính DNA ở 94 °C trong 2 phút; chu kỳ 1: 94 °C trong 30 giây, bắt cặp môi ở 67 °C trong 30 giây, kéo dài DNA ở 72 °C trong 30 giây; chu kỳ 2: 94 °C trong 30 giây, bắt cặp môi ở 66 °C trong 30 giây, kéo dài DNA ở 72 °C trong 30 giây; từ chu kỳ 3 đến 7: giảm tuần tự mỗi chu kỳ 1 °C nhiệt độ bắt cặp (từ 65 °C – 61 °C); 33 chu kỳ tiếp theo: 94 °C trong 30 giây, bắt cặp môi ở 60 °C trong 45 giây, kéo dài DNA ở 72 °C trong 45 giây; kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 7 phút và giữ sản phẩm ở 4 °C.

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR chuyên biệt môi *PstIAAG/CAA* với 40 chu kỳ gồm: biến tính DNA ở 94 °C trong 2 phút; chu kỳ 1: 94 °C trong 30 giây, bắt cặp môi ở 60 °C trong 30 giây, kéo dài DNA ở 72 °C trong 30 giây; chu kỳ 2: 94 °C trong 30 giây, bắt cặp môi ở 59 °C trong 30 giây, kéo dài DNA ở 72 °C trong 30 giây; từ chu kỳ 3 đến 7: giảm tuần tự mỗi chu kỳ 1 °C nhiệt độ bắt cặp (từ 58 °C – 54 °C)/thời gian 45 giây; 33 chu kỳ tiếp theo: 94 °C trong 30 giây, bắt cặp môi ở 53 °C trong 45 giây, kéo dài DNA ở 72 °C trong 45 giây; kết thúc phản ứng ở 72 °C trong 7 phút và giữ sản phẩm ở 4 °C.

Sản phẩm PCR chuyên biệt được điện di trên gel agarose 1,5%, dung môi TAE 0,5X (pH 8,0), điện trường 70V trong 7 giờ (Clever Scientific, Anh).

– *Phân tích kết quả điện di*

Các băng điện di được mã hóa theo nhị phân: số hàng ngang mẫu nào có vạch thì đánh số 1 và mẫu nào không có vạch thì đánh số 0; lưu kết quả lại dưới dạng file MS Excel. Trên cơ sở bảng nhị phân này, phần mềm NTSYSpc ver. 2.1 được sử dụng để ước lượng khoảng cách di truyền của các chủng nấm bằng thuật toán UPGMA [221].

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

Các chủng được lựa chọn theo thông tin sơ bộ năng suất và đánh giá vị trí thu thập mẫu được sử dụng để tiến hành nội dung này.

2.2.1. 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 trên môi trường thạch đĩa

Các giống từ ống bảo quản được hoạt hoá trên môi trường PDA. Sau 7 ngày nuôi cấy, sợi nấm ở phần rìa khuẩn lạc được thu nhận bằng dụng cụ khoan thạch có diện tích 5 mm² rồi cấy vào giữa đĩa Petri (đường kính 9 cm). Tiến hành nuôi cấy ở

nhệt độ 25 °C trong điều kiện tối (IN800 – Yamato, Nhật Bản). Theo dõi các đĩa thạch đến khi hệ sợi nấm của chủng đầu tiên lan kín đĩa. Trong thí nghiệm này là sau 7 ngày nuôi cấy. Đo diện tích khuẩn lạc nấm sau 7 ngày bằng cách chụp hình và áp dụng phần mềm ImageJ (National Institutes of Health, Hoa Kỳ) [222]. Chỉ tiêu tốc độ lan tơ của hệ sợi ($\text{mm}^2/\text{ngày}$) được tính bằng công thức:

$$\text{Tốc độ lan tơ (mm}^2/\text{ngày)} = \frac{\text{Diện tích hệ sợi sau 7 ngày (mm}^2\text{)}}{\text{Thời gian lan tơ (7 ngày)}}$$

Thí nghiệm này được lặp lại 5 lần, tổng cộng 50 đĩa Petri.

2.2.1.2. *Khảo sát sinh khối khi nuôi cấy trên môi trường lỏng*

Các giống từ ống bảo quản được hoạt hoá trên môi trường PDA. Sau 7 ngày nuôi cấy, sợi nấm ở phần rìa khuẩn lạc được thu nhận bằng dụng cụ khoan thạch có diện tích 5 mm^2 rồi cấy vào bình tam giác (thể tích 50 ml) có chứa 20 ml môi trường PDB (potato dextrose broth – thành phần môi trường ở Phụ lục 3). Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện lỏng tĩnh theo mô tả của Kupradit và cs. (2020) [119] có điều chỉnh để phù hợp cho thí nghiệm. Theo dõi các bình nuôi cho đến khi hệ sợi của chủng nấm đầu tiên lan kín bình. Trong thí nghiệm này là sau 7 ngày nuôi cấy. Sinh khối nấm sau 7 ngày nuôi cấy được thu nhận và sấy khô ở nhiệt độ 60 °C đến khối lượng không đổi để xác định khối lượng. Thí nghiệm này được lặp lại 7 lần, tổng cộng 70 bình tam giác.

2.2.2. *Khảo sát tốc độ lan tơ trên mặt cưa cao su*

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

Các giống từ ống bảo quản được hoạt hoá trên môi trường PDA. Sau 7 ngày nuôi cấy, sợi nấm ở phần rìa khuẩn lạc được thu nhận bằng dụng cụ khoan thạch có diện tích 5 mm^2 rồi cấy vào giữa đĩa Petri (đường kính 9 cm). Mỗi đĩa chứa 15 g mặt cưa cao su (có kích thước hạt 0,5 – 2,0 mm) có độ ẩm 65% đã hấp vô trùng. Tiến hành nuôi cấy ở nhiệt độ 25 °C trong điều kiện tối (IN800 – Yamato, Nhật Bản). Theo dõi các đĩa đến khi hệ sợi nấm của chủng đầu tiên lan kín đĩa (quan sát dưới kính lúp). Trong thí nghiệm này là sau 6 ngày nuôi cấy. Đo diện tích khuẩn lạc nấm sau 6 ngày bằng cách chụp hình và áp dụng phần mềm ImageJ (National Institutes of Health, Hoa Kỳ) [222]. Chỉ tiêu tốc độ lan tơ của hệ sợi ($\text{mm}^2/\text{ngày}$) được tính bằng công thức:

$$\text{Tốc độ lan tơ (mm}^2/\text{ngày)} = \frac{\text{Diện tích khuẩn lạc sau 6 ngày (mm}^2\text{)}}{\text{Thời gian lan tơ (6 ngày)}}$$

Thí nghiệm này được lặp lại 5 lần, tổng cộng 50 đĩa Petri.

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

Các giống từ ống bảo quản được hoạt hoá trên môi trường PDA. Sau 7 ngày nuôi cấy, sợi nấm ở phần rìa khuẩn lạc được thu nhận bằng dụng cụ khoan thạch có diện tích 5 mm² rồi cấy vào các ống nghiệm (đường kính 25 mm). Mỗi ống nghiệm chứa 28 g mặt cưa cao su (kích thước hạt 0,5 – 2,0 mm) có độ ẩm 65% đã hấp vô trùng. Chiều dài khối mặt cưa là 150 mm. Ủ mẫu ở nhiệt độ 25 °C trong điều kiện tối. Xác định thời gian tơ lan kín ống nghiệm và tính tốc độ lan tơ trung bình của hệ sợi (mm/ngày). Thí nghiệm này được lặp lại 5 lần, tổng cộng 50 ống nghiệm.

2.2.3. *Khảo sát tỉ lệ chuyển hóa*

Các giống từ ống bảo quản được hoạt hoá trên môi trường PDA. Sau 7 ngày nuôi cấy, sợi nấm ở phần rìa khuẩn lạc được thu nhận bằng dụng cụ khoan thạch có diện tích 5 mm² rồi cấy vào ống nghiệm (đường kính 16 mm) có chứa 5 ml môi trường YBLB (*Thành phần môi trường ở Phụ lục 5*). Phương pháp này được tiến hành theo Magae và cs. (2005) và có điều chỉnh để phù hợp với điều kiện thí nghiệm [111]. Màu môi trường sẽ chuyển từ màu xanh da trời (tương ứng với ống chuẩn) sang các màu xanh lá cây hoặc màu vàng ở các ống có cấy nấm và chuyển hóa. Sau 4 ngày tính tỉ lệ chuyển hóa (tỉ lệ chuyển hóa đường lactose trong môi trường) theo công thức bên dưới:

$$\text{Tỉ lệ chuyển hóa (\%)} = [1 - (A_{615} \text{ mẫu} / A_{615} \text{ chuẩn})] \times 100$$

Trong đó: A₆₁₅ là độ hấp thu tại bước sóng 615 nm; mẫu chuẩn là mẫu môi trường không cấy nấm.

Thí nghiệm này được lặp lại 5 lần. Tổng cộng 100 ống nghiệm cho mỗi chủng.

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 mặt cưa với hiệu suất sinh học*

2.2.4.1. *Khảo sát hiệu suất sinh học*

Chuẩn bị môi trường nhân giống cấp 2 như sau: hạt lúa đã nấu có bổ sung 2% cám gạo, 1% thạch cao sau đó cho vào chai thủy tinh, hấp khử trùng trong 30 phút ở 121 °C, để nguội và cấy giống cấp 1 (giống trên môi trường thạch) vào. Giống được nuôi ở nhiệt độ 25 °C trong điều kiện tối, đến khi tơ nấm lan đầy chai.

Môi trường nuôi trồng đã hấp khử trùng (mặt cưa 79%, cám bắp 20%, CaSO₄ 1%) để nguội được cấy khoảng 20 gam giống cấp 2. Mỗi bịch giá thể có khối lượng 1200 g với độ ẩm là 65%. Bịch phôi sau khi cấy được ủ trong phòng nuôi tơ với nhiệt độ trung bình 25 °C trong điều kiện tối. Khi tơ nấm lan đầy bịch, chuyển các bịch

phôi ra nhà trồng với các thông số: ánh sáng 500 – 1000 lux, nhiệt độ trung bình 25 – 28 °C, tưới phun sương giữ độ ẩm 80 – 90%. Xác định khối lượng sau 3 lần thu hái và tính hiệu suất sinh học.

Hiệu suất sinh học (BE – Biological Efficiency) được tính theo công thức bên dưới [115]:

$$BE (\%) = \frac{\text{Khối lượng nấm tươi thu được của một bịch phôi (g)}}{\text{Khối lượng cơ chất khô của một bịch phôi (g)}} \times 100$$

Thí nghiệm tiến hành trên 30 bịch phôi mỗi chủng, tổng cộng 300 bịch phôi.

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

Trên cơ sở kết quả các thí nghiệm trên, tiến hành nhận xét sơ bộ sự tương quan giữa một số chỉ tiêu sinh trưởng (tỉ lệ chuyển hóa, tốc độ lan tơ trên Petri, tốc độ lan tơ trên ống nghiệm) và hiệu suất sinh học. Sau đó trên cơ sở số liệu tốc độ lan tơ trên đĩa Petri mặt cưa, tốc độ lan tơ trên ống nghiệm mặt cưa và hiệu suất sinh học, tiến hành phân tích mối tương quan giữa tốc độ lan tơ trên mặt cưa với hiệu suất sinh học. Trong đó tốc độ lan tơ trên mặt cưa được tính bằng tích của tốc độ lan tơ theo chiều ngang (trên Petri) và chiều dọc (trên ống nghiệm) và được định nghĩa là thể tích tốc độ lan tơ (mm³/ngày). Trong phân tích này, tiến hành phân thành 2 nhóm theo loài (*P. ostreatus* và *P. pulmonarius*).

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

Các chủng được lựa chọn dựa trên thông tin về hiệu suất sinh học ở nội dung 2 được sử dụng để tiến hành nội dung này.

2.3.1. Thu thập và giữ giống các dòng đơn bội

Tiến hành thu nhận bào tử theo mô tả của Gharehaghaji và cs. (2007) [160]. Một số bước trong quy trình được điều chỉnh để phù hợp với điều kiện nghiên cứu. Quy trình cụ thể như sau:

- Thu bào tử: quả thể nấm bào ngư trưởng thành được đặt trên đĩa Petri vô trùng và trong không gian kín để phát tán bào tử trong 4-6 giờ (Hình 2.1). Sau đó tiến hành phân lập hoặc giữ đĩa bào tử ở nhiệt độ 4 °C đến khi sử dụng.
- Phân lập bào tử: thu bào tử trên đĩa Petri và pha loãng liên tục trong nước cất vô trùng đến mật độ khoảng 50 – 100 bào tử/mL (kiểm tra trên buồng đếm hồng cầu). 0,1 mL dung dịch pha loãng được trải trên đĩa môi trường PDA và

nuôi cấy ở 25 °C. Sau 4 -7 ngày, các sợi nấm nảy mầm từ bào tử được cấy chuyển sang môi trường thạch PDA mới; mỗi dòng đơn bội được nuôi cấy trên một đĩa môi trường.

- Kiểm tra kháng định dòng đơn bội: hệ sợi trên từng đĩa được làm tiêu bản phòng ẩm và sau đó nhuộm sợi nấm với thuốc nhuộm phenol cotton blue (*thành phần thuốc nhuộm thể hiện ở Phụ lục 10*). Quan sát hệ sợi dưới kính hiển vi ở vật kính 40X-100X để sàng lọc dòng đơn bội. Hệ sợi nấm không có cấu trúc mẫu nổi là dòng đơn bội [223].
- Giữ các dòng đơn bội: các dòng đơn bội sau khi sàng lọc được giữ giống ngay trong ống thạch nghiêng chứa môi trường MYA và bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.



Hình 2.1. Phương pháp thu bào tử nấm bào ngư

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

Các dòng đơn bội được hoạt hóa trên đĩa môi trường thạch MCM (Mushroom Complete Medium - *thành phần môi trường thể hiện ở Phụ lục 4*). Sau 10 ngày hoạt hóa, sợi nấm ở phần rìa khuẩn lạc được thu nhận bằng dụng cụ khoan thạch có diện tích 5 mm² rồi cấy vào giữa đĩa Petri (đường kính 9 cm). Tiến hành nuôi cấy ở nhiệt độ 25 °C trong điều kiện tối. Theo dõi các đĩa thạch đến khi hệ sợi nấm của dòng đầu tiên lan kín đĩa. Trong thí nghiệm này là sau 10 ngày nuôi cấy. Phương pháp thực hiện tương tự như phần 2.2.1.1. Thí nghiệm này được lặp lại 5 lần. Tổng cộng 100 đĩa Petri cho mỗi chủng.

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

Các giống từ ống bảo quản được hoạt hoá trên môi trường MCM. Sau 10 ngày nuôi cấy, sợi nấm ở phần rìa khuẩn lạc được thu nhận bằng dụng cụ khoan thạch có diện tích 5 mm² rồi cấy vào ống nghiệm (đường kính 16 mm) có chứa 5 ml môi trường YBLB. Phương pháp thực hiện tương tự phần 2.2.3. Thí nghiệm này được lặp lại 5 lần. Tổng cộng 100 ống nghiệm cho mỗi chủng.

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

Cắt 2 mảnh thạch có chứa hệ sợi của 2 dòng đơn bội và đặt cách nhau khoảng 2 cm trên môi trường PDA. Theo dõi đến khi rìa 2 khuẩn lạc tiếp xúc với nhau thì ủ thêm 7 ngày. Sau đó cắt mảnh thạch tại vị trí tiếp xúc của 2 khuẩn lạc, tiến hành làm tiêu bản phòng ẩm, nhuộm sợi nấm với thuốc nhuộm phenol cotton blue và quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 40X. Dựa trên kết quả hình thành và hình thái của cấu trúc mẫu nối các dòng đơn bội được xác định kiểu di truyền bắt cặp [60]. Sau đó, để xác định số lượng alen các nhân tố A và B của các dòng đơn bội của 3 chủng nấm bào ngư xám, một dòng đại diện của một nhóm di truyền bắt cặp của mỗi chủng nấm được chọn và cho lai chéo với nhau [223].

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

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

Nghiên cứu chọn 8 dòng đơn bội đại diện cho 4 kiểu di truyền bắt cặp của một chủng nấm bào ngư xám từ nội dung 3 và tiến hành 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 môi chuyên biệt của nấm đùi gà

Để thử nghiệm khả năng nhận diện kiểu di truyền bắt cặp của các dòng đơn bội một chủng nấm bào ngư xám từ nội dung 3, 10 cặp môi có sẵn tại phòng thí nghiệm theo khảo sát trên nấm đùi gà (*P. eryngii*) đã được sử dụng [168], thông tin trình tự của các cặp môi được trình bày trong Phụ lục 11.

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

DNA của chủng nấm *P. eryngii* được tách chiết, độ đặc hiệu của 10 cặp môi được tái kiểm tra bằng phản ứng PCR. Điều kiện phản ứng: 94 °C trong 5 phút; 30 chu kỳ: 94 °C trong 45 giây, 60 °C trong 30 giây, và 72 °C trong 60 giây; 72 °C trong 5 phút. Điện di trên gel agarose 1,5% trong TAE 0,5X, điện trường 100V trong 30 phút [168].

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

Độ đặc hiệu của các cặp môi được đánh giá thông qua chương trình Blast với dữ liệu của loài *P. pulmonarius* được thu nhận từ Genbank trên cơ sở dữ liệu NCBI (accession code: GCA_012980535.1). Xác định khả năng vùng trình tự có thể khuếch

đại được khi áp dụng cặp mồi. Đồng thời xác định vị trí các cặp mồi có thể gắn được trên vùng có score cao nhất và số nucleotide (NU) lớn nhất mà mồi gắn được trên genome. Từ đó nhận định sơ bộ về độ đặc hiệu của mồi.

2.4.2.3. Thử đánh giá độ đặc hiệu của mồi trên các dòng đơn bội nấm bào ngư xám

Quy trình thực hiện như sau: tách DNA của chủng bào ngư xám song nhân và 8 dòng đơn bội đại diện 4 kiểu di truyền bất cặp. Độ đặc hiệu của 10 cặp mồi được kiểm tra bằng phản ứng PCR. Tiến hành kiểm tra độ đặc hiệu của 10 cặp trên chủng nấm song nhân, sau đó lựa chọn cặp mồi kiểm tra độ đặc hiệu trên các dòng đơn bội với điều kiện PCR tương tự như trên.

2.5. BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM VÀ XỬ LÝ SỐ LIỆU

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), các thí nghiệm được lặp lại 5 lần; riêng thí nghiệm khảo sát sinh khối trên môi trường lỏng lặp lại 7 lần, khảo sát hiệu suất sinh học được xác định trên 30 bịch cơ chất mỗi chủng. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm StatDirect ver. 3.3 (StatDirect Ltd., Merseyside, UK) sử dụng trắc nghiệm đa biên độ Duncan với độ tin cậy 95%.

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

Đề tài đã thu thập và phân lập được 15 chủng nấm bào ngư (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Danh sách các chủng nấm bào ngư thu thập được

| STT | Mã chủng | Tên địa phương | Nơi thu mẫu |
|-----|-------------|------------------|-------------------|
| 1 | ABI-F000201 | Bào ngư tiểu yến | TP. Hồ Chí Minh |
| 2 | ABI-F000219 | Bào ngư trắng | Cần Thơ |
| 3 | ABI-F000222 | Bào ngư trắng | TP. HCM |
| 4 | ABI-F000223 | Bào ngư trắng | TP. HCM |
| 5 | ABI-F000224 | Bào ngư trắng | Đồng Nai |
| 6 | ABI-F000241 | Bào ngư xám | Vĩnh Long |
| 7 | ABI-F000248 | Bào ngư xám | TP. Hồ Chí Minh |
| 8 | ABI-F000252 | Bào ngư xám | Đồng Nai |
| 9 | ABI-F000253 | Bào ngư xám | Đồng Nai |
| 10 | ABI-F000254 | Bào ngư xám | Bình Dương |
| 11 | ABI-F000255 | Bào ngư xám | Bà Rịa – Vũng Tàu |
| 12 | ABI-F000256 | Bào ngư xám | Tây Ninh |
| 13 | ABI-F000257 | Bào ngư xám | Tây Ninh |
| 14 | ABI-F000259 | Bào ngư xám | Bình Thuận |
| 15 | ABI-F000261 | Bào ngư xám | Lâm Đồng |

Các mẫu nấm này từ các công ty/trại trồng và cơ sở cung cấp phôi nấm tại một số địa phương phía nam như: Đồng Nai, Tây Ninh, Bình Dương, Bà Rịa - Vũng Tàu, TP. Hồ Chí Minh, Bình Thuận, Vĩnh Long và Cần Thơ. Đề tài cũng thu thập được một 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, một chủng nấm thuộc nhóm bào ngư tiểu yến. Trong 15 chủng ngoại trừ chủng nấm ABI-F000261 là chủng tự nhiên từ cây gỗ chết, các chủng còn lại là chủng thương mại từ quả thể mọc trên bịch phôi mặt cưa.

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

Từ các mẫu quả thể nấm đã thu thập, các đặc điểm hình thái đại thể và vi thể đã được phân tích và kết quả được mô tả dưới đây.

3.1.2.1. Các chủng bào ngư xám

Hình thái đại thể:

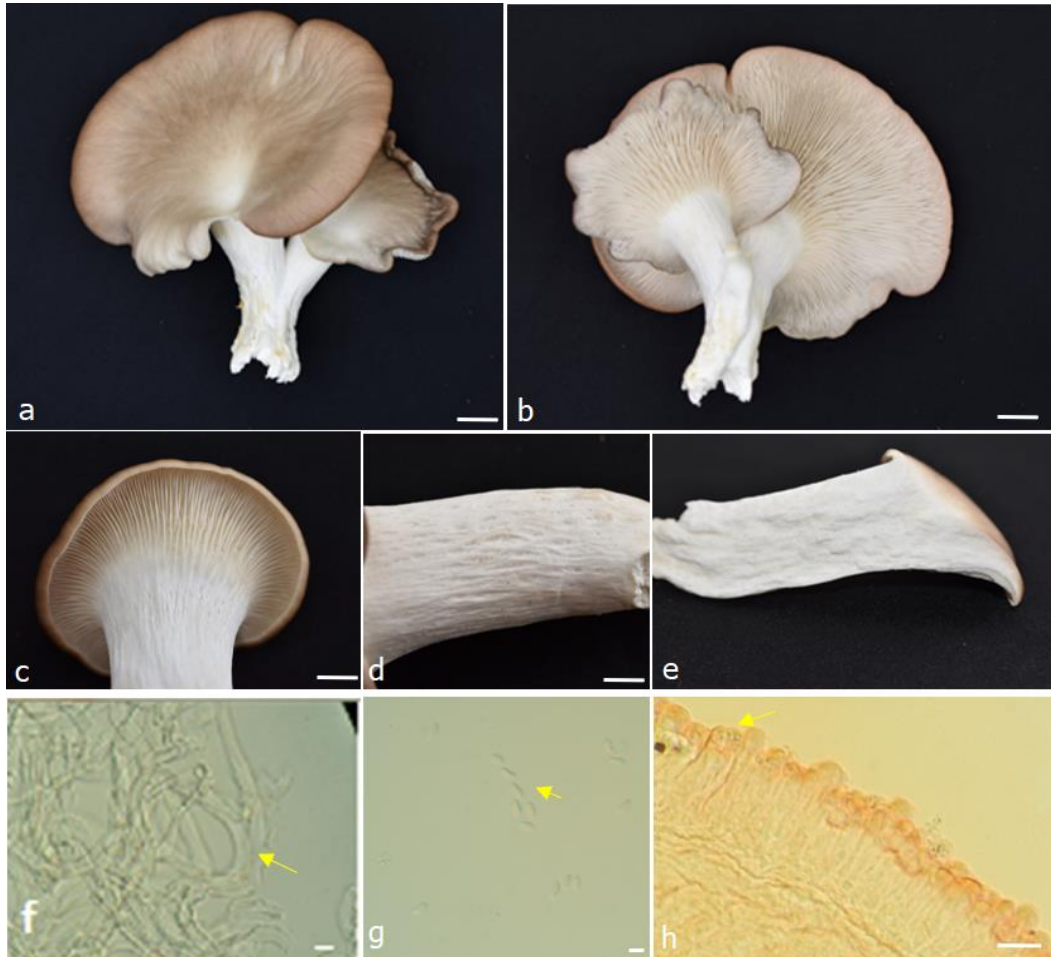
Quả thể có kích thước trung bình tới lớn, dạng thịt, thường mọc thành dạng ngói lợp, có dạng sò, dạng quạt. Mũ nấm có bề mặt khô, mượt; có màu xám nhạt hoặc xám nâu; phần rìa mũ ban đầu cuộn vào trong khi còn non, gợn sóng, đôi khi rìa bị rách khi về già. Cuống dính lệch tâm hoặc dính bên, thon, đều hoặc có khi nhỏ dần từ đỉnh đến gốc cuống; ở các mẫu già có nhiều lông mao. Phiến nấm nối dài đến cuống, dày đặc, khoảng cách giữa các phiến hẹp, thường có dạng bảng, màu nhạt, phần rìa phiến mịn; có cùng màu với cuống. Phần thịt mềm, có màu trắng khi tươi và ngả màu kem nhạt khi khô; màu sắc không thay đổi khi bị cắt.

Hình thái hiển vi:

Bào tử có bề mặt mịn, hình trụ, thành mỏng, màu kem nhạt. Đám hình chùy, có bốn bào tử, hoặc đôi khi có hai bào tử. Có nhiều dạng tương tự đám, hình trụ. Không ghi nhận thấy liệt bào. Vùng cận bào tầng mỏng, có vách. Thể nền nằm rời rạc, cấu thành từ các sợi mỏng hoặc dày, trong suốt, có vách ngăn và mấu. Thịt nấm có kết cấu dạng monomitic hoặc dimitic, các sợi nguyên thủy có thành mỏng, mịn, có vách ngăn, phân nhánh; sợi cứng thành dày, không phân nhánh.

Chủng ABI-F000241 (Hình 3.1)

Phần mũ có kích thước 43 – 78 x 47 – 98 mm. Kích thước cuống khoảng 53 – 78 x 64 – 90 mm. Phần thịt dày khoảng 6 – 9 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 4,9 - 7,6 x 2,0 – 3,4 μm ; L = 5,8 μm ; W = 2,5 μm ; Q = 2,3. Đám có kích thước 28,6 – 34,8 x 6,1 – 7,8 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 12,0 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 4,6 - 5,4 μm .

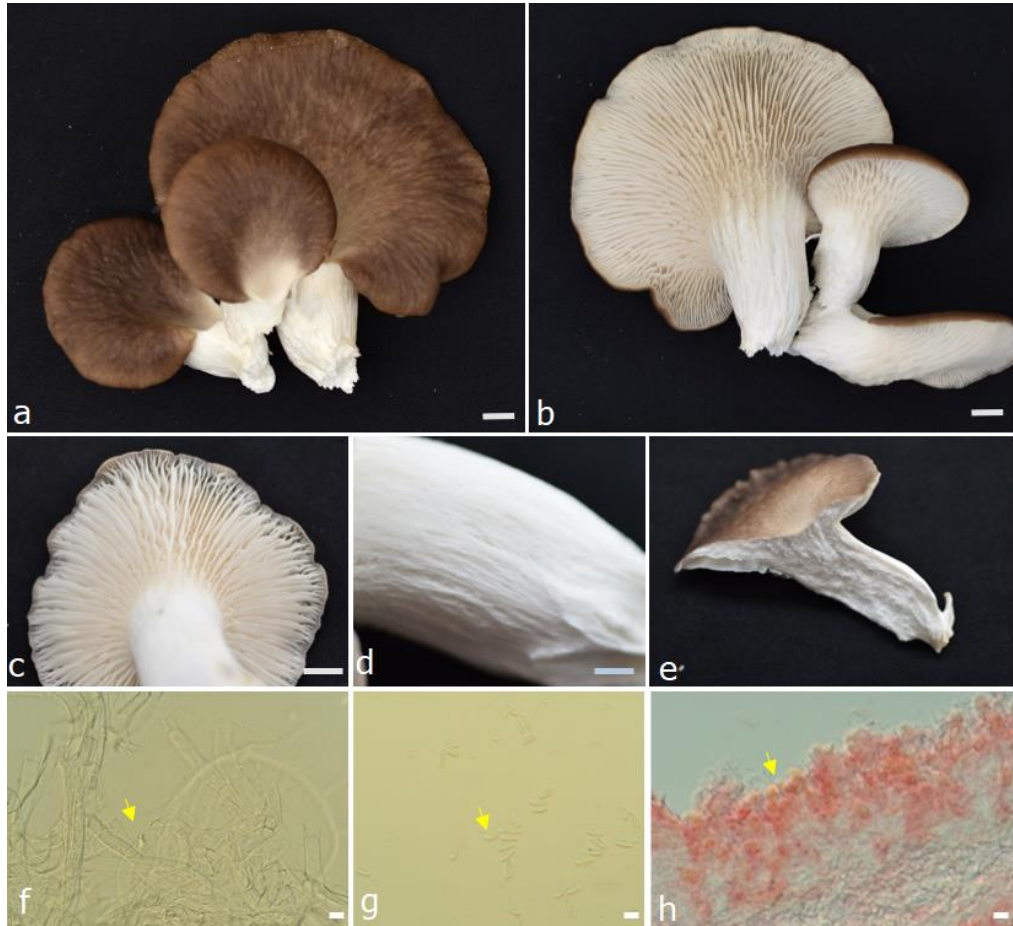


Hình 3.1. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000241

a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g: bào tử; h: tế bào tương tự đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000248 (Hình 3.2)

Phần mũ có kích thước 52 – 75 x 49 – 98 mm. Kích thước cuống nấm khoảng 16 – 35 x 12 – 26 mm. Phần thịt dày khoảng 11 – 16 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 6,6 – 8,4 x 2,8 – 3,4 μm ; L = 7,4 μm ; W = 3,1 μm ; Q = 2,4. Đám có kích thước 20,2 – 27,6 x 2,8 – 4,6 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 9,3 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 5,5 – 9,4 μm .

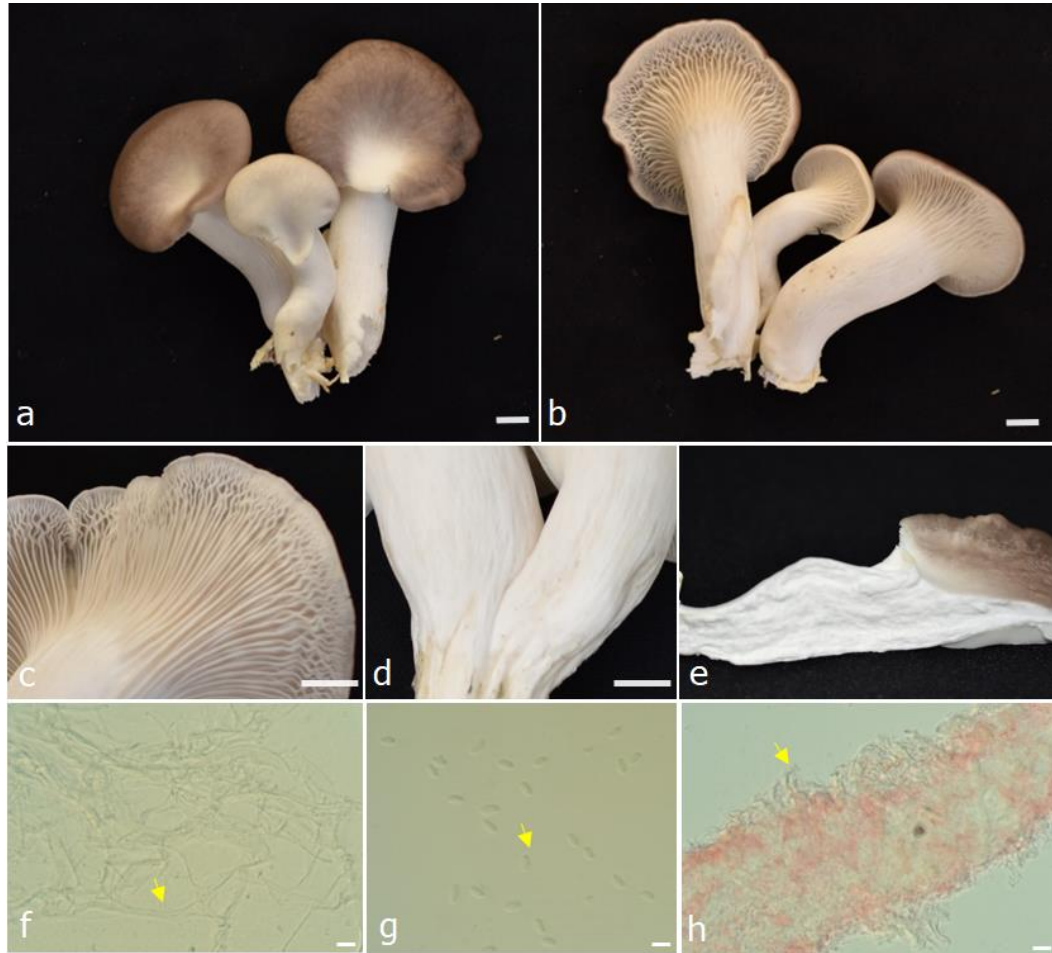


Hình 3.2. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000248

a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g: bào tử; h: tế bào tương tự đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000252 (Hình 3.3)

Phần mũ có kích thước 40 – 87 x 45 – 123 mm. Kích thước cuống khoảng 8 – 30 x 2 – 25 mm. Phần thịt dày khoảng 7 – 19 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 5,9 – 7,5 x 2,6 – 3,2 μm ; L = 6,6 μm ; W = 2,9 μm ; Q = 2,3. Đám có kích thước 23,8 – 38,2 x 6,4 – 8,1 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 9,2 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 6,0 – 9,1 μm , sợi cứng khoảng 1,7– 5,4 μm .



Hình 3.3. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000252
a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g:
bào tử; h: tế bào tương tự đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000253 (Hình 3.4)

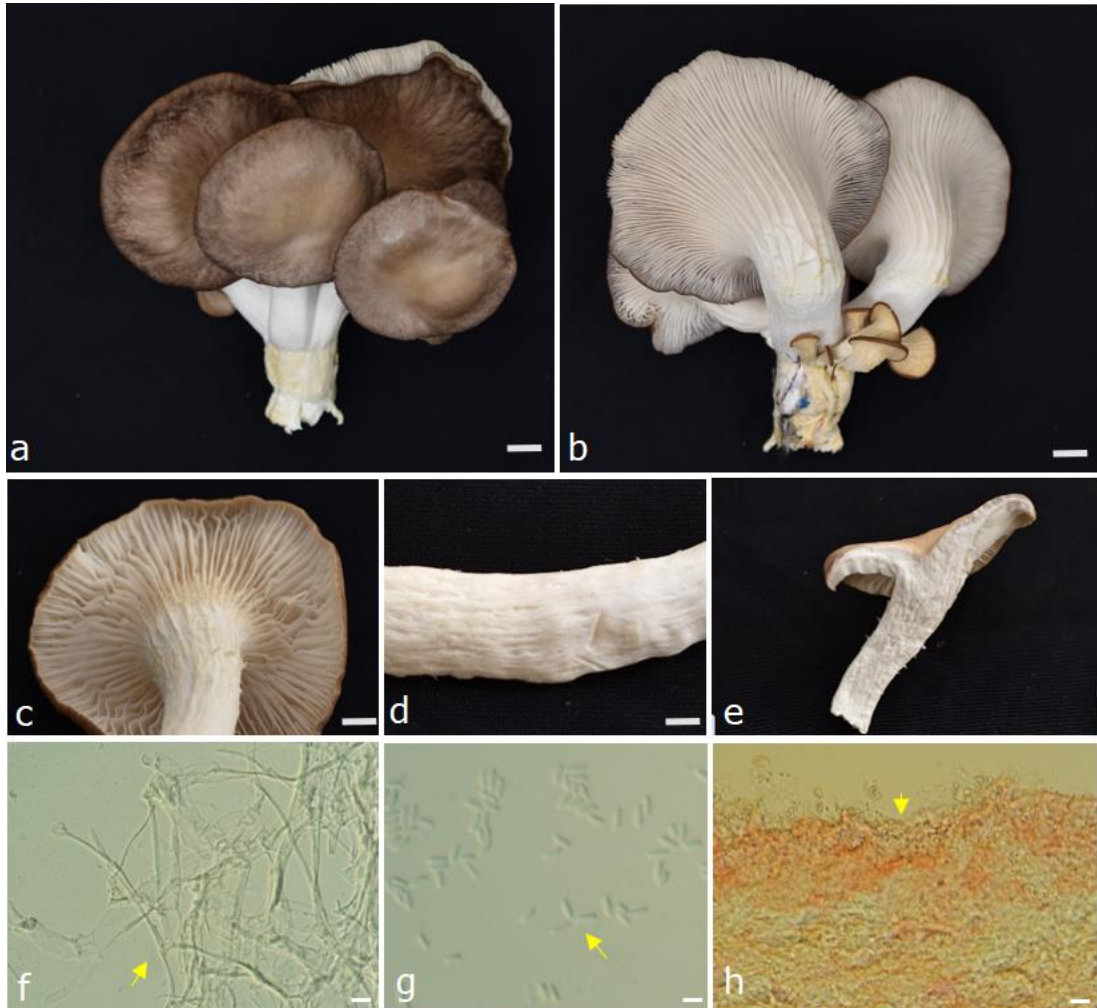
Phần mũ có kích thước 45 – 95 x 60 – 131 mm. Kích thước cuống khoảng 12 – 54 x 2 – 23 mm. Phần thịt dày khoảng 9 – 19 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 6,0 -7,4 x 2,6 - 3,4 μm ; L = 6,7 μm ; W = 3,0 μm ; Q = 2,2. Đám có kích thước 22,3 – 30,6 x 4,9 – 9,8 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 12,5 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 3,5 - 12,9 μm .



Hình 3.4. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000253
a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g:
bào tử; h: đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000254 (Hình 3.5)

Phần mũ có kích thước 35 – 66 x 45 – 92 mm. Kích thước cuống khoảng 40 – 77 x 8 – 29 mm. Phần thịt dày khoảng 5– 25 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 6,7 – 8,1 x 2,6 – 3,4 μm ; L = 7,4 μm ; W=3,1 μm ; Q = 2,4. Đám có kích thước 23,3– 35,4 x 5,3 – 7,7 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 10,9 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 4,2 – 13,9 μm , sợi cứng khoảng 2,6– 3,6 μm .

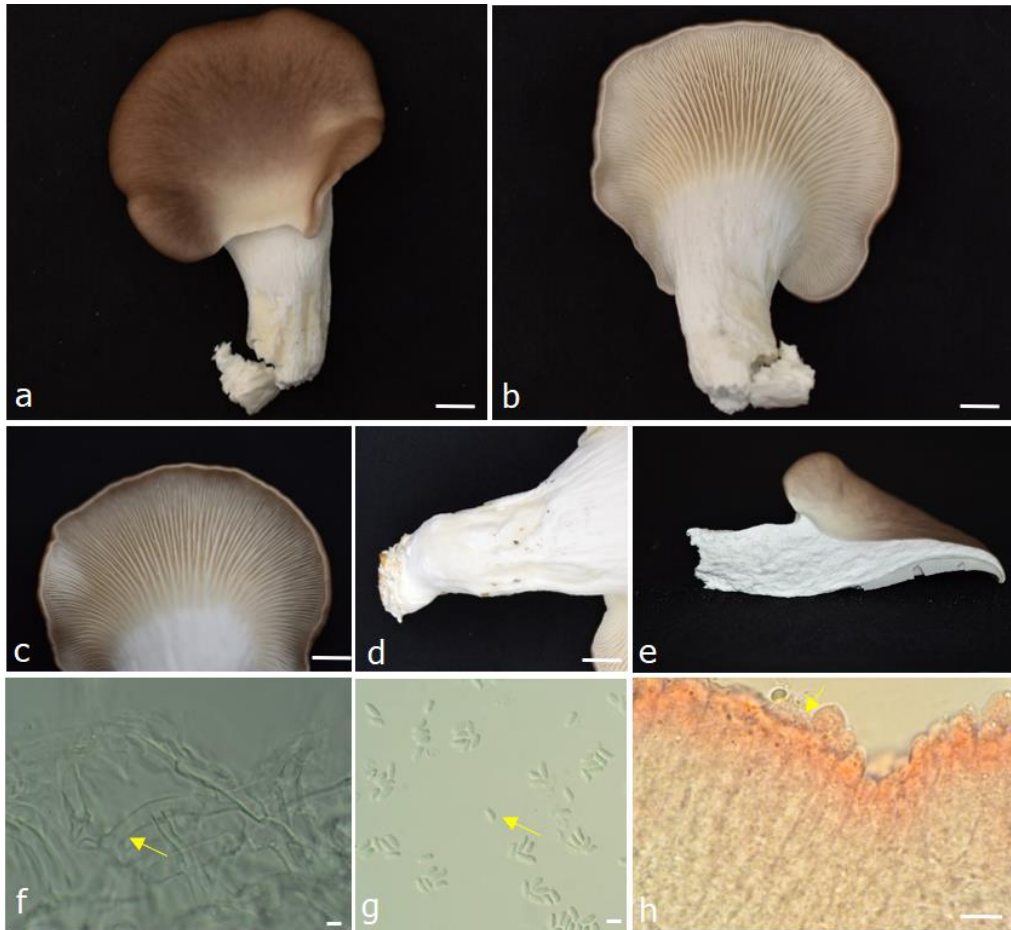


Hình 3.5. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000254

a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g: bào tử; h: tế bào tương tự đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000255 (Hình 3.6)

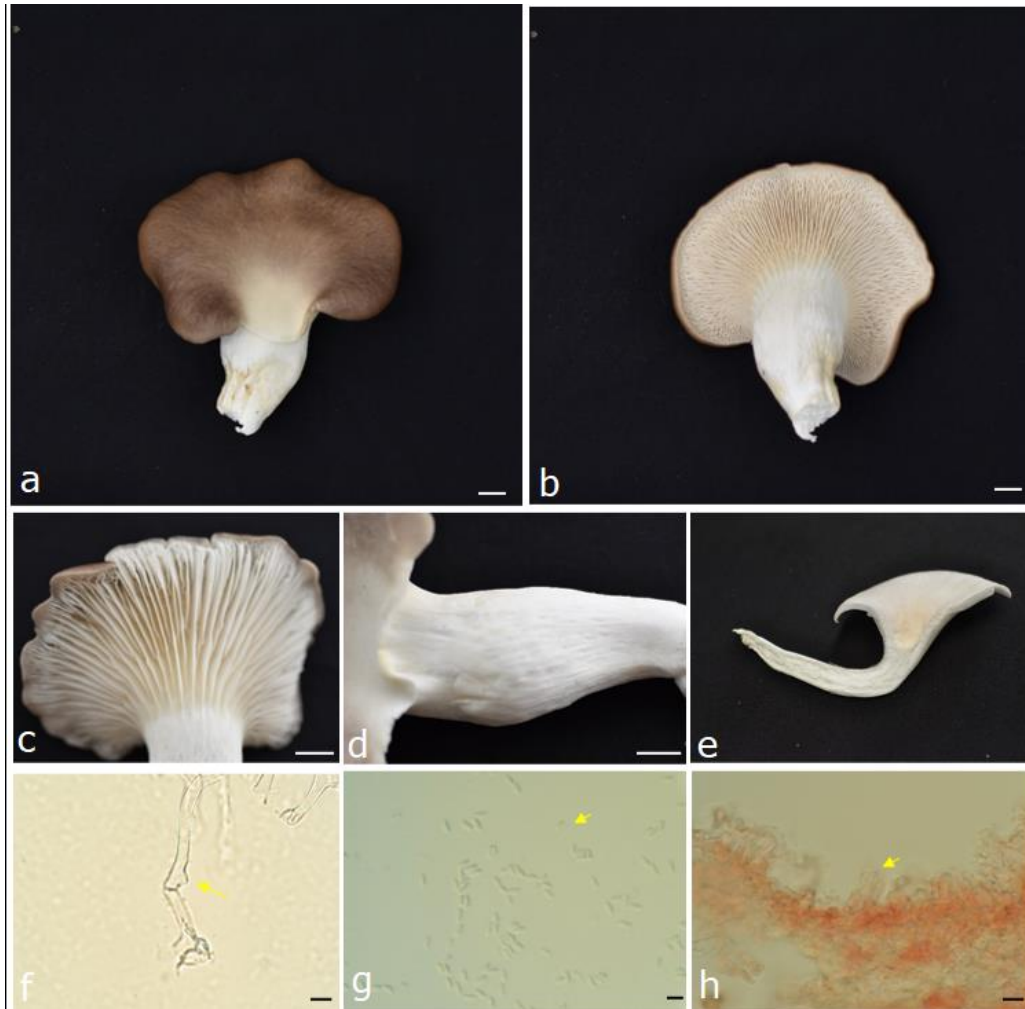
Phần mũ có kích thước 46 – 64 x 55 – 88 mm. Kích thước cuống khoảng 45–86 x 4 – 16 mm. Phần thịt dày khoảng 5 – 8 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 4,4 – 6,9 x 1,9 – 3,6 μm ; L = 5,7 μm ; W = 2,5 μm ; Q = 2,3. Đám có kích thước 23,9 – 35,7 x 6,3 – 8,2 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 12,0 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 6,8 – 10,4 μm .



Hình 3.6. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000255
a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g:
bào tử; h: đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000256 (Hình 3.7)

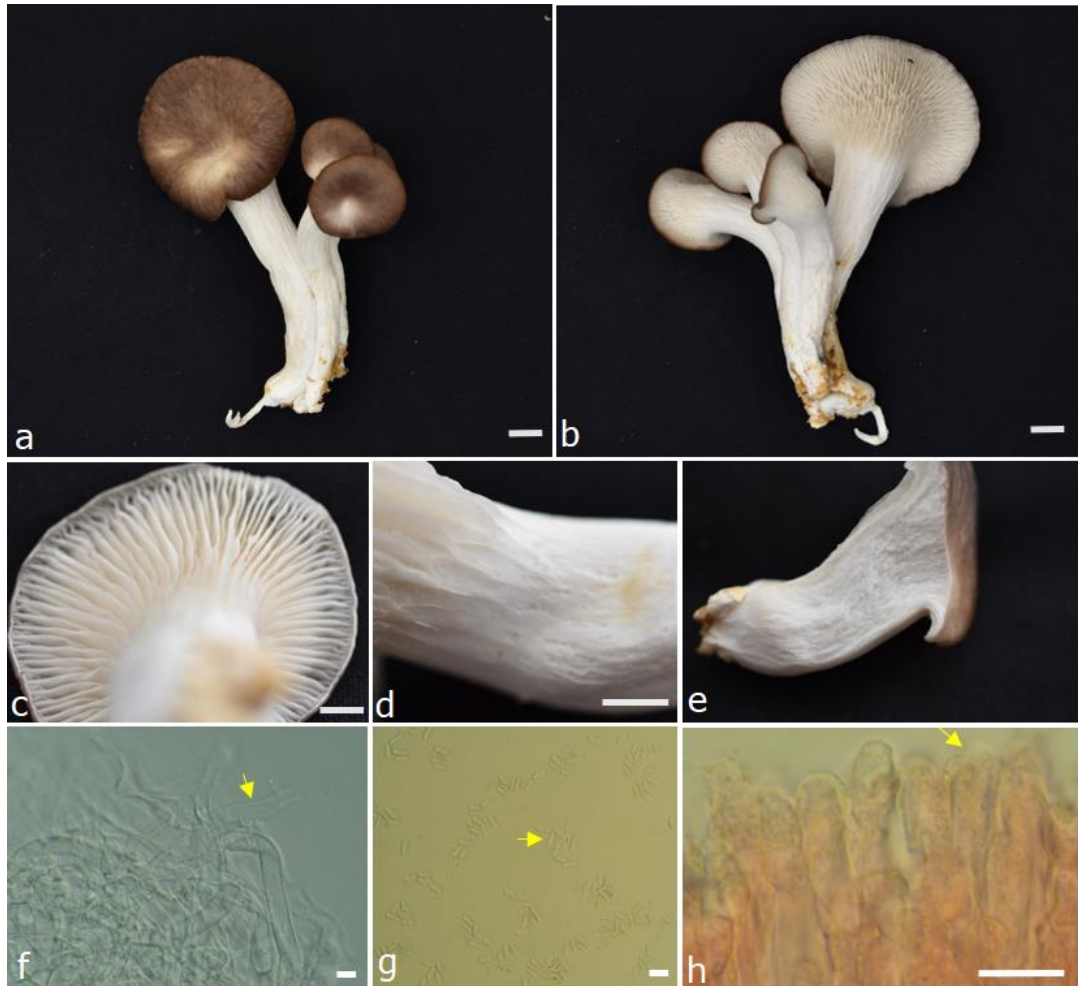
Phần mũ có kích thước 46 – 90 x 53 – 104 mm. Kích thước cuống khoảng 63 – 113 x 7 – 16 mm. Phần thịt dày khoảng 8 – 11 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 5,5 – 8,0 x 2,0 – 3,9 μm ; L = 6,8 μm ; W = 2,8 μm ; Q = 2,5. Đám có kích thước 20,5 – 37,8 x 5,9 – 8,1 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 11,5 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 4,0 – 14,2 μm .



Hình 3.7. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000256
a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g:
bào tử; h: tế bào tương tự đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000257 (Hình 3.8)

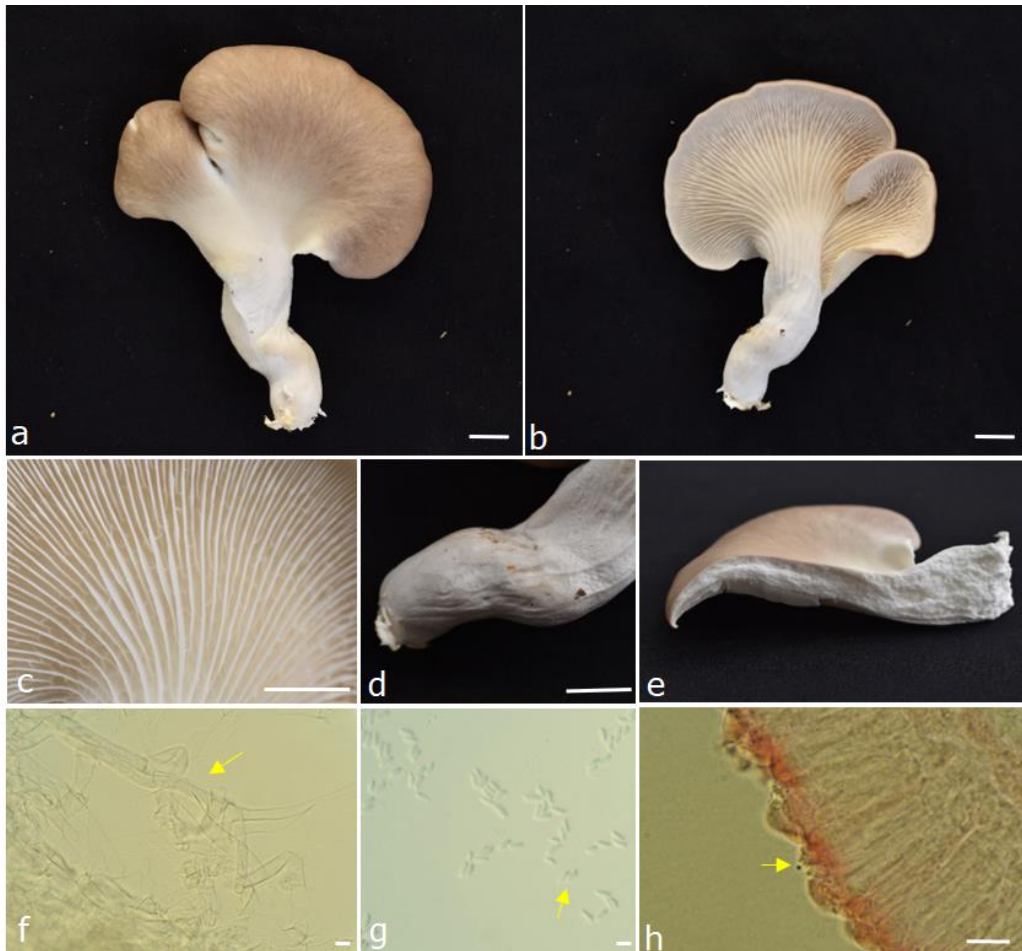
Phần mũ có kích thước 22 – 60 x 20 – 80 mm. Kích thước cuống khoảng 31 – 90 x 2 – 22 mm. Phần thịt dày khoảng 4 – 15 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 6,2 – 7,4 x 2,3 – 3,2 μm ; L = 6,8 μm ; W = 2,8 μm ; Q = 2,5. Đám có kích thước 20,9 – 34,9 x 4,1 – 5,7 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 9,5 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 6,3 – 7,9 μm .



Hình 3.8. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000257
a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g:
bào tử; h: tế bào tương tự đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000259 (Hình 3.9)

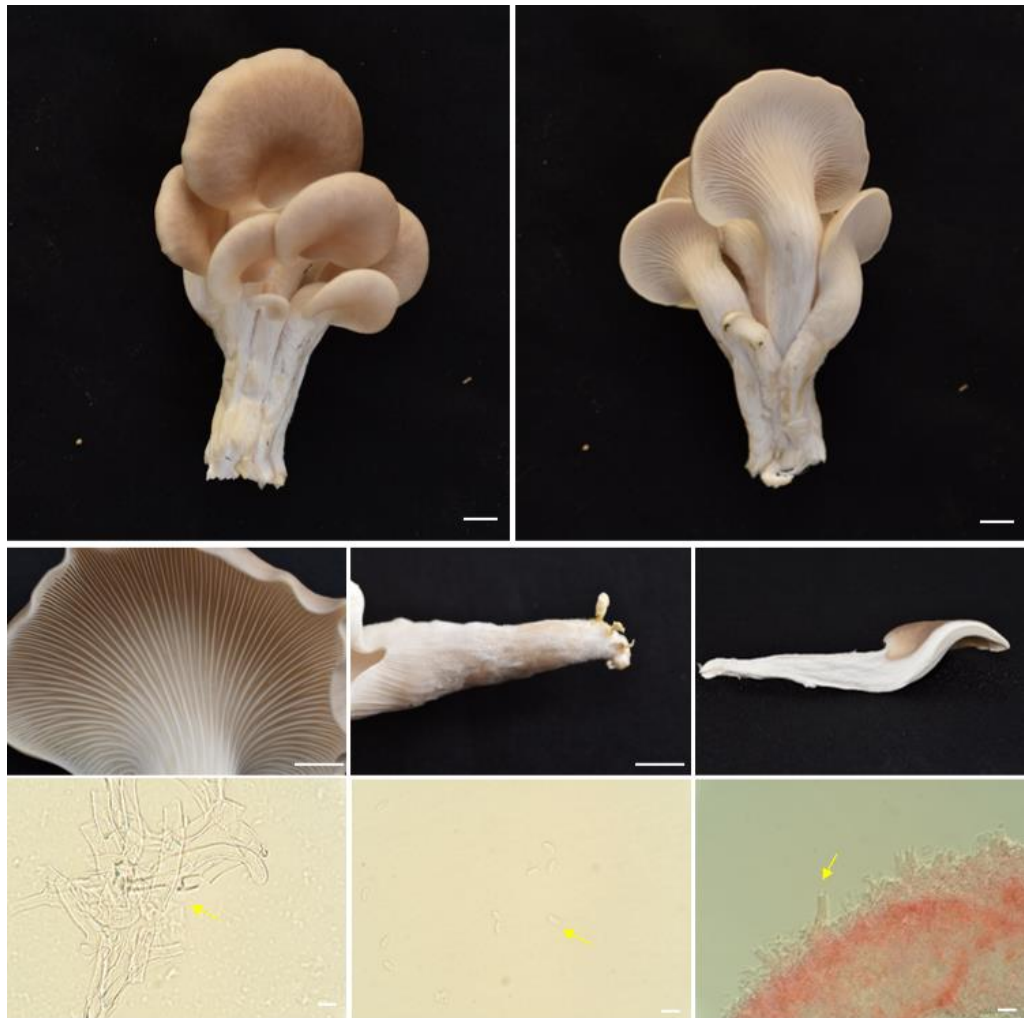
Phần mũ có kích thước 20 – 85 x 22 – 130 mm. Kích thước cuống nấm khoảng 10 – 60 x 4 – 31 mm. Phần thịt dày khoảng 4 – 25 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 4,8 – 7,3 x 1,8 – 3,3 μm ; L = 5,6 μm ; W = 2,7 μm ; Q = 2,1. Đám có kích thước 35,6 – 39,5 x 6,3 – 7,9 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 10,6 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 3,7– 8,6 μm .



Hình 3.9. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000259
a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g:
bào tử; h: đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000261 (Hình 3.10)

Phần mũ có kích thước 44 – 96 x 59 – 125 mm. Kích thước cuống khoảng 5 – 73 x 3 – 16 mm. Phần thịt dày khoảng 7 – 13 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 5,9 – 6,9 x 2,4 – 3,0 μm ; L = 6,4 μm ; W = 2,7 μm ; Q = 2,4. Đám có kích thước 15,3 – 21,3 x 4,3 – 6,0 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 6,7 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 3,4– 8,5 μm .



Hình 3.10. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000261
a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g:
bào tử; h: tế bào tương tự đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

3.1.2.2. Các chủng bào ngư trắng

Hình thái đại thể:

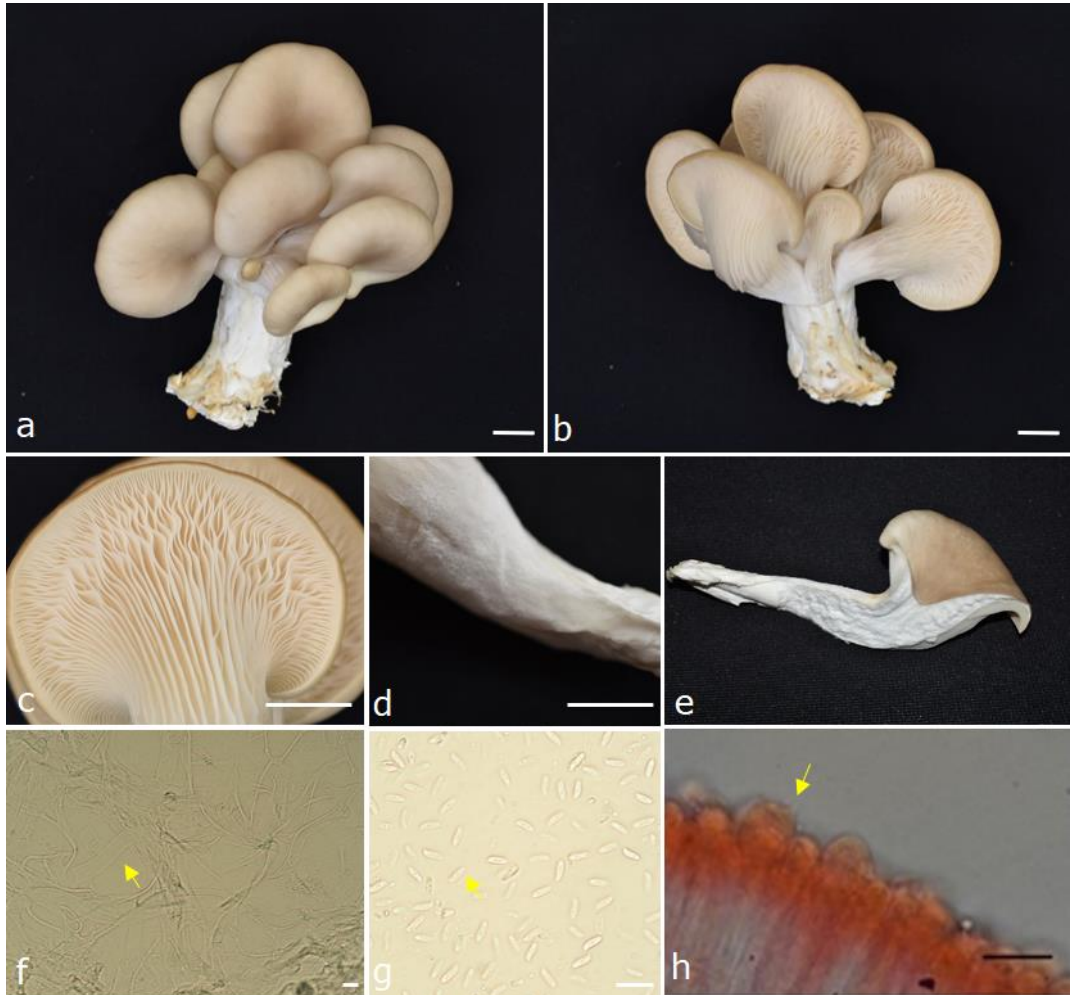
Quả thể có kích thước trung bình tới lớn, dạng thịt, có phiến nổi dài tới cuống, thường mọc thành kiểu xếp chồng thành tầng dạng ngói lợp, dạng quạt tới dạng thìa, có dạng phễu nông. Mũ nấm có bề mặt mũ khô, mượt; có màu trắng đến trắng kem. Phần rìa mũ ban đầu cuộn vào trong, sau đó trải dẹt ra hoặc hướng lên trên, tạo thành hình gợn sóng khi về già. Phần cuống mọc lệch tâm hoặc sát phía rìa của phiến, mọc đều hoặc nhỏ dần từ đỉnh đến gốc cuống; có ghi nhận ít nhiều lông mao ở các mẫu già. Phiến nấm mọc dài tới cuống, dày đặc, khoảng cách giữa các phiến hẹp, thường tạo thành dạng lưới ở đỉnh cuống, rìa của phiến mịn; phiến có cùng màu với cuống. Phần thịt mềm; thịt có màu trắng khi tươi và màu kem nhạt khi khô; màu sắc không đôi khi bị cất.

Hình thái hiển vi:

Bào tử có bề mặt mịn, hình trụ, thành mỏng, màu kem nhạt. Đám hình chùy, có bốn bào tử, hoặc đôi khi có hai bào tử. Có nhiều dạng tương tự đám, hình chùy. Không ghi nhận liệt bào. Vùng cận bào tầng mỏng, có vách. Thể nền nằm rời rạc, cấu thành từ các sợi mỏng hoặc dày, trong suốt, có vách ngăn và máu. Thịt nấm có kết cấu dạng monomitic hoặc dimitic, các sợi nguyên thủy có thành mỏng, mịn, có vách ngăn, phân nhánh; sợi cứng thành dày, không phân nhánh.

Chủng ABI-F000219 (Hình 3.11)

Phần mũ có kích thước 35 – 90 x 35 – 99 mm. Kích thước cuống khoảng 39 – 75 x 3 – 19 mm. Phần thịt dày khoảng 4 – 15 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 7,2 – 9,8 x 2,2 – 3,9 μm ; L = 8,7 μm ; W = 3,0 μm ; Q = 2,9. Đám có kích thước 29,7 – 44,8 x 6,12 – 8,5 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 10 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 2,9 – 7,3 μm , sợi cứng khoảng từ 1,2 – 3,5 μm .



Hình 3.11. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000219
a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g:
bào tử; h: đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000222 (Hình 3.12)

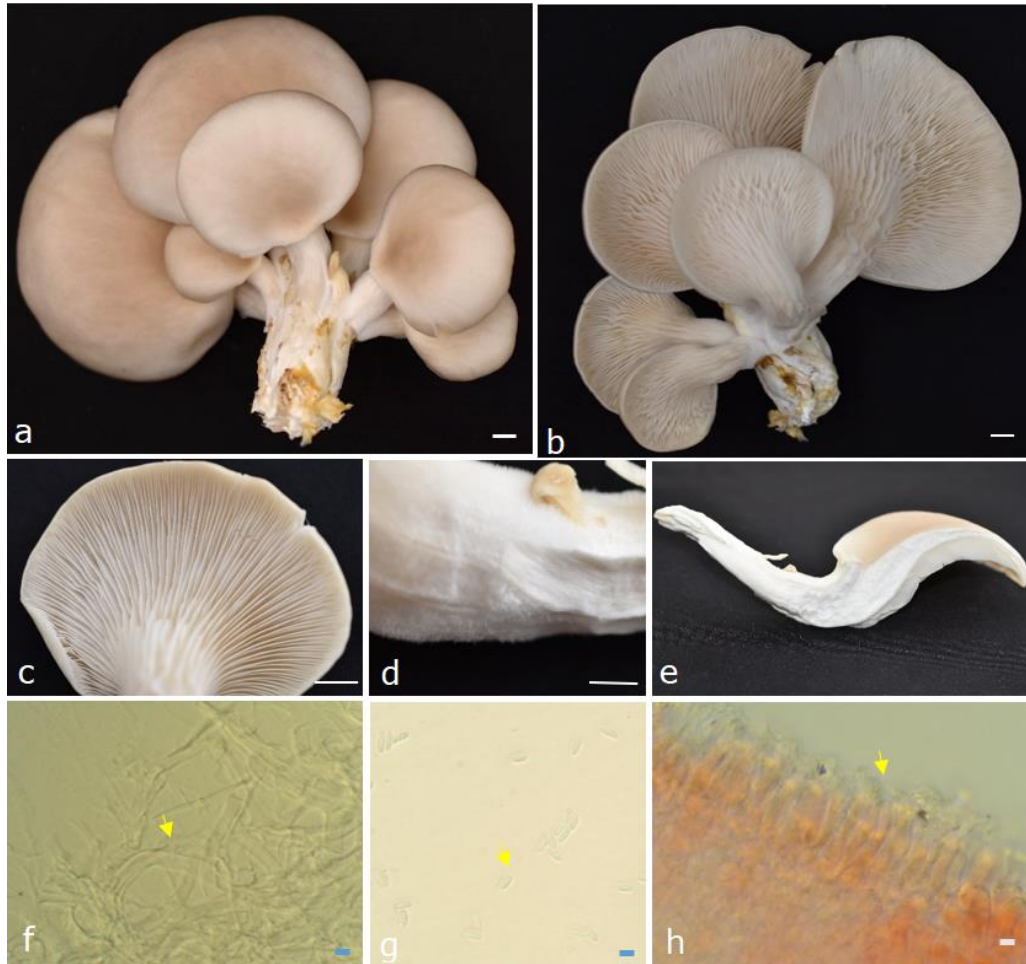
Phần mũ có kích thước 39 – 84 x 42 – 99 mm. Kích thước cuống khoảng 44 – 66 x 3 – 17 mm. Phần thịt dày khoảng 5 – 12 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 6,2 – 10,8 x 2,1 – 3,8 μm ; L = 8,2 μm ; W = 3,0 μm ; Q = 2,7. Đám có kích thước 20,1 – 27,5 x 10,6 – 14,3 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 9,3 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 2,8 – 11,5 μm , sợi cứng khoảng từ 0,8 – 3,9 μm .



Hình 3.12. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000222
a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g:
bào tử; h: tế bào tương tự đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000223 (Hình 3.13)

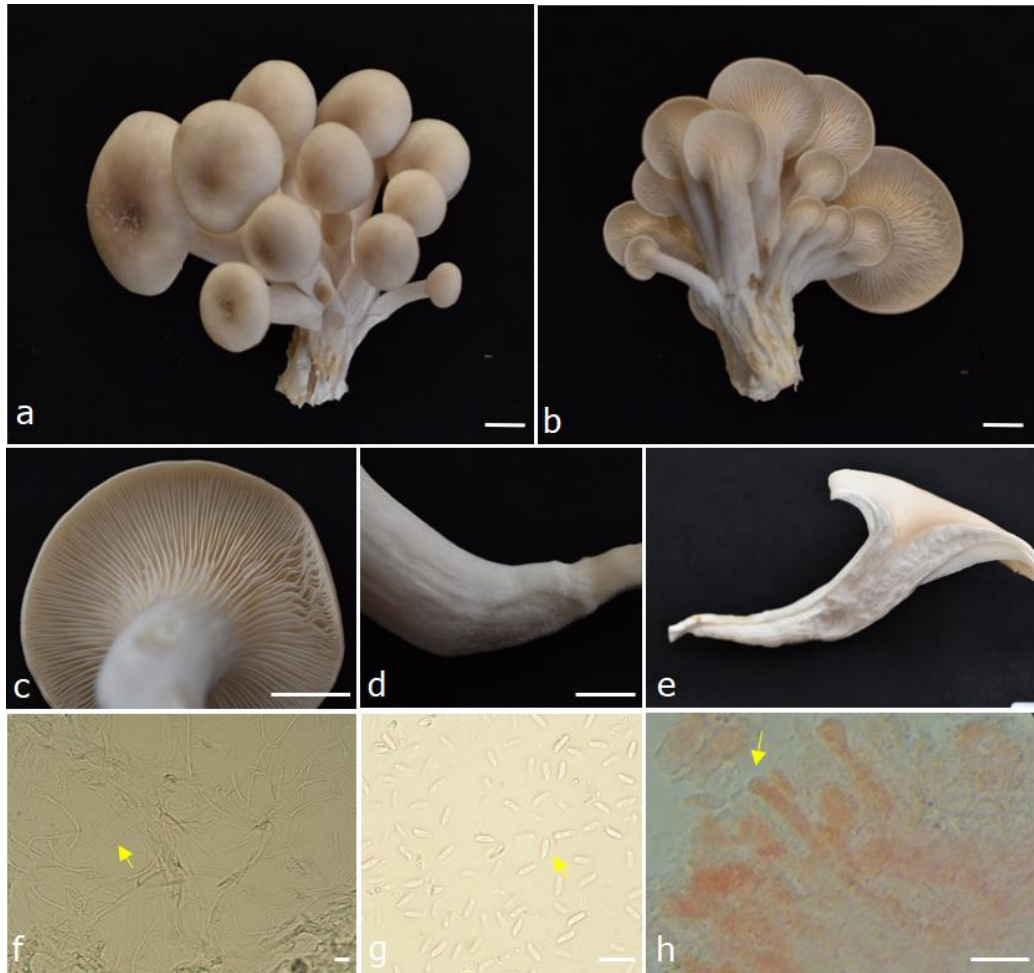
Phần mũ có kích thước 45 – 129 x 50 – 120 mm. Kích thước cuống khoảng 51 – 91 x 2– 23 mm. Phần thịt dày khoảng 8 – 16 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 6,1 – 7,9 x 2,2 – 3,0 μm ; L = 7,1 μm ; W = 2,6 μm ; Q = 2,8. Đám có kích thước 44,9 – 50,1 x 7,6 – 8,9 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 10,9 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 5,0 – 8,9 μm .



Hình 3.13. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000223
a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g:
bào tử; h: tế bào tương tự đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Chủng ABI-F000224 (Hình 3.14)

Phần mũ có kích thước 35 – 90 x 36 – 120 mm. Kích thước cuống khoảng 36 – 80 x 2 – 19 mm. Phần thịt dày khoảng 8– 20 mm ở đỉnh cuống nấm và khoảng 1 mm gần phần rìa. Bào tử có kích thước 6,1 – 7,8 x 2,0 – 2,8 μm ; L = 7,0 μm ; W = 2,4 μm ; Q = 2,9. Đám có kích thước 20,1 – 27,5 x 10,6 – 14,3 μm . Vùng cận bào tầng khoảng 10,9 μm . Kích thước các sợi thịt nấm nguyên thủy khoảng 4,9 – 12,2 μm .



Hình 3.14. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng nấm ABI-F000224

a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g: bào tử; h: tế bào tương tự đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

3.1.2.3. Chủng nấm bào ngư tiểu yển ABI-F000201 (Hình 3.15)

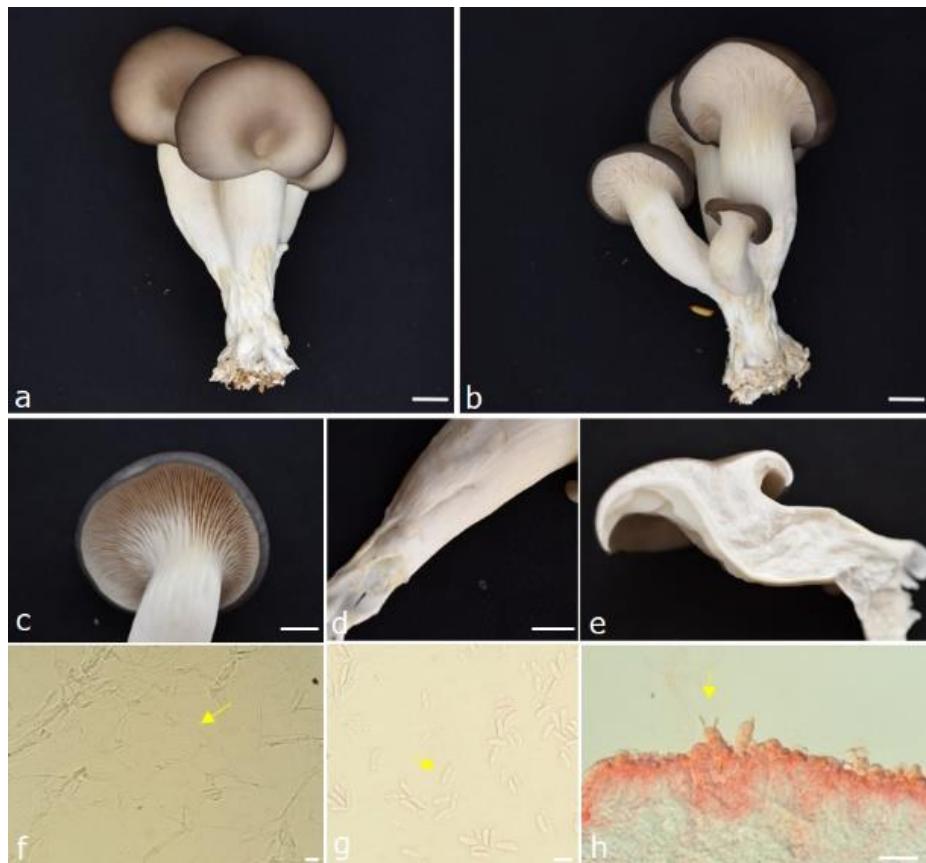
Hình thái đại thể:

Quả thể có kích thước nhỏ tới trung bình, dạng thịt, có hoặc không có phiến nổi dài tới cuống, hiếm khi dạng ngói lợp, thỉnh thoảng có dạng lồi. Mũ nấm có kích thước khoảng 25 – 74 x 30 – 85 mm; bề mặt mũ khô, mượt; có màu xám nhạt, xám nâu hoặc xám tím; phần rìa mũ cuộn vào trong. Kích thước cuống khoảng 45 – 78 x 3 – 23 mm, cuống dính tâm hoặc lệch tâm, dạng chùy, mọc đều hoặc nhỏ dần từ đỉnh

đến gốc cuống; có ghi nhận ít nhiều lông mao ở các mẫu già. Phiến nấm mọc dài tới cuống, dày đặc, khoảng cách giữa các phiến hẹp, thường tạo thành dạng lưới ở đỉnh cuống, rìa của phiến mịn; phiến có cùng màu với cuống. Phần thịt hơi cứng, dày khoảng 7 – 15 mm ở đỉnh cuống nấm, 0,5 mm ở gần phần rìa; thịt có màu trắng khi tươi và màu kem nhạt khi khô; màu sắc không đổi khi bị cắt.

Hình thái hiển vi:

Bào tử có kích thước khoảng $6,8 - 8,2 \times 2,4 - 3,2 \mu\text{m}$; $L = 7,4 \mu\text{m}$; $W = 2,7 \mu\text{m}$; $Q = 2,8$; bề mặt mịn, hình trụ, thành mỏng, màu kem nhạt. Đám có kích thước $28,6 - 39,5 \times 14,0 - 15,5 \mu\text{m}$, hình chùy, có bốn bào tử. Có nhiều dạng tương tự đám, hình chùy. Không ghi nhận thấy liệt bào. Vùng cận bào tầng mỏng, khoảng $9,3 \mu\text{m}$, có vách. Thể nền nằm rời rạc, cấu thành từ các sợi mỏng hoặc dày, trong suốt, có vách ngăn và mấu. Thịt nấm có kết cấu dạng dimitic, các sợi nguyên thủy có thành mỏng, mịn, có vách ngăn, phân nhánh; khoảng từ $2,4 - 11,1 \mu\text{m}$; sợi cứng thành dày, không phân nhánh, khoảng từ $1,1 - 4,8 \mu\text{m}$.



Hình 3.15. Đặc điểm đại thể và vi thể của chủng ABI-F000201

a, b: quả thể; c: phiến; d: bề mặt của cuống; e: thịt nấm; f: hệ sợi của thịt nấm; g: bào tử; h: đám; Thước: a-d: 1 cm; f-h: 10 μm

Nhìn chung giữa các chủng nấm cùng nhóm (xám/trắng) không có sự khác biệt về các đặc điểm hình thái. Tổng hợp kích thước các cấu trúc đại thể và vi thể của các chủng nấm được trình bày trong Bảng 3.2

Bảng 3.2. Kích thước các cấu trúc đại thể và vi thể của các chủng nấm

| STT | Mã chủng | Mũ (mm) | Cuống (mm) | Thịt nấm (mm) | Bào tử (μm) | Đám (μm) | Cận bào tầng (μm) | Sợi nấm (μm) |
|-----|-------------|--------------------|------------------|---------------|---|--------------------------|--------------------------------|--|
| 1 | ABI-F000241 | 43-78 x 47-98 | 53-78 x 64-90 | 6-9/1 | 4,9-7,6 x 2,0-3,4 L=5,8; W=2,5; Q=2,3 | 28,6-34,8 x 6,1-7,8 | 12 | 4,6-5,4 |
| 2 | ABI-F000248 | 52-75 x 49-98 | 16-35 x 12-26 | 11-16/1 | 6,6-8,4 x 2,8 – 3,4 L=7,4; W=3,1; Q=2,4 | 20,2-27,6 x 2,8-4,6 | 9,3 | 5,5-9,4 |
| 3 | ABI-F000252 | 40-87 x 45-123 | 8-30 x 2-25 | 7-19/1 | 5,9-7,5 x 2,6-3,2 L=6,6; W=2,9; Q=2,3 | 23,8-38,2 x 6,4-8,1 | 9,2 | 6,0-9,1 (nguyên thủy) 1,7- 5,4 (cứng) |
| 4 | ABI-F000253 | 45-95 x 60-131 | 12-54 x 2-23 | 9-19/1 | 6,0-7,4 x 2,6-3,4 L=6,7; W=3,0; Q=2,2 | 22,3-30,6 x 4,9-9,8 | 12,5 | 3,5-12,9 |
| 5 | ABI-F000254 | 35-66 x 45-92 | 40-77 x 8-29 | 5-25/1 | 6,7-8,1 x 2,6-3,4 L=7,4; W=3,1; Q=2,4 | 23,3-35,4 x 5,3-7,7 | 10,9 | 4,2-13,9 (nguyên thủy) 2,6-3,6 (cứng) |
| 6 | ABI-F000255 | 46-64 x 55-88 | 45-86 x 4-16 | 5-8/1 | 4,4-6,9 x 1,9-3,6 L=5,7; W=2,5; Q=2,3 | 23,9-35,7 x 6,3 - 8,2 | 12 | 6,8-10,4 |
| 7 | ABI-F000256 | 46-90 x 53-104 | 63-113 x 7-16 | 8-11/1 | 5,5-8,0 x 2,0-3,9 L=6,8; W=2,8; Q=2,5 | 20,5-37,8 x 5,9-8,1 | 11,5 | 4,0-14,2 |
| 8 | ABI-F000257 | 22-60 x 20-80 | 3-90 x 2-22 | 4-15/1 | 6,2-7,4 x 2,3-3,2 L=6,8; W=2,8; Q=2,5 | 20,9-34,9 x 4,1-5,7 | 9,5 | 6,3-7,9 |
| 9 | ABI-F000259 | 20-85 x 22-130 | 10-60 x 4-31 | 4-25/1 | 4,8-7,3 x 1,8-3,3 L=5,6; W=2,7; Q=2,1 | 35,6-39,5 x 6,3-7,9 | 10,6 | 3,7-8,6 |
| 10 | ABI-F000261 | 44-96 x 59-125 | 5-73 x 3-16 | 7-13/1 | 5,9-6,9 x 2,4-3,0 L=6,4; W=2,7; Q= 2,4 | 15,3-21,3 x 4,3-6,0 | 6,7 | 3,4-8,5 |
| 11 | ABI-F000219 | 35-90 x 35-99 | 39-75 x 3-19 | 4-15/1 | 7,2-9,8 x 2,2-3,9 L=8,7; W=3,0; Q=2,9 | 29,7-44,8 x 6,12-8,5 | 10 | 2,9-7,3 (nguyên thủy) 1,2 – 3,5 (cứng) |
| 12 | ABI-F000222 | 39-84 x 42-99 | 44-66 x 3-17 | 5-12/1 | 6,2-10,8 x 2,1-3,8 L=8,2; W=3,0; Q=2,7 | 20,1-27,5 x 10,6-14,3 | 9,3 | 2,8-11,5 (nguyên thủy) 0,8-3,9 (cứng) |
| 13 | ABI-F000223 | 45-129 x 50-120 | 51-91 x 2-23 | 8-16/1 | 6,1-7,9 x 2,2-3,0 L=7,1; W=2,6; Q=2,8 | 44,9-50,1 x 7,6-8,9 | 10,9 | 5,0-8,9 |
| 14 | ABI-F000224 | 35-90 x 36-120 | 36-80 x 2-19 | 8-20/1 | 6,1-7,8 x 2,0-2,8 L=7,0; W=2,4; Q=2,9 | 20,1-27,5 x 10,6-14,3 | 10,9 | 4,9-12,2 |
| 15 | ABI-F000201 | 25-74 x 30-85 | 45-78 x 3-23 | 7-15/0,5 | 6,8-8,2 x 2,4-3,2 L=7,4; W=2,7; Q=2,8 | 28,6-39,5 x 14,0-15,5 | 9,3 | 2,4-11,1 (nguyên thủy) 1,1 – 4,8 (cứng) |

Kết quả định danh các chủng nấm bào ngư dựa vào đặc điểm hình thái

Các đặc điểm tương đồng:

Nhìn bên ngoài, cấu trúc đại thể của các chủng nấm có nhiều điểm tương đồng nhau: quả thể nấm dạng sò, sắp xếp thành cụm dạng ngói lợp, cuống nấm dính bên so với mũ nấm, phiến nấm kéo dài từ rìa mũ nấm đến cuống nấm, cuống nấm đặc, xốp. Các đặc điểm hiển vi tương đồng nhau: hình dạng, kích thước đảm, cấu tạo hệ sợi.

Các đặc điểm riêng:

Các chủng nấm bào ngư xám: mũ nấm có màu từ xám nhạt – xám đậm đến xám nâu, mũ nấm dày, chắc, rìa mũ nấm gọn sóng, đôi khi bị rách khi về già, có vân sọc hướng tâm đặc trưng; giá trị Q (tỉ lệ chiều dài/chiều rộng) của bào tử: 2,1 – 2,5.

Các chủng nấm bào ngư trắng: mũ nấm màu trắng đến trắng kem, mũ nấm mỏng, dễ rách; giá trị Q của bào tử: 2,7 – 2,9.

Chủng nấm bào ngư tiêu yển: kích thước mũ nấm nhỏ hơn, mũ nấm thường có màu xám tím đến tím đen, mũ nấm dày, chắc; giá trị Q của bào tử: 2,8.

Các chủng nấm bào ngư được định danh như sau:

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*.

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*.

Chủng nấm bào ngư tiêu yển 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 vậy chủng này có thể thuộc loài *P. ostreatus*.

Trong nghiên cứu này loài *P. pulmonarius* có giá trị Q (cao nhất 2,5) thấp hơn so với loài *P. ostreatus* (thấp nhất là 2,7). Do vậy giá trị Q là đặc điểm phù hợp có thể dùng để phân biệt loài *P. pulmonarius* và *P. ostreatus*. Điều này tương đồng với các nghiên cứu trong và ngoài nước trên hai loài này [60, 65, 66]. Các báo cáo cho thấy giá trị Q của *P. pulmonarius* thường thấp hơn giá trị Q của *P. ostreatus*. Tuy

nhiên để có thể kết luận chính xác hơn cần tiến hành với nhiều chủng khác các khu vực địa lý hơn nữa.

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

3.1.3.1. So sánh vùng trình tự ITS

Các kết quả phân tích trình tự ITS của các mẫu nấm bào ngư được trình bày trong Bảng 3.3 và Phụ lục 12. Kết quả cho thấy các chủng nấm đều thuộc chi *Pleurotus* với mức độ tương đồng cao (Bảng 3.3). 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 ở trên.

Các nghiên cứu định danh các chủng nấm bào ngư thu thập tại khu vực phía nam cũng được một số tác giả công bố. Các chủng nấm bào ngư xám thu thập tại khu vực phía nam được định danh là *P. pulmonarius* [60]. Một vài nghiên cứu khác cũng có kết quả tương tự [128, 193]. Riêng các các chủng nấm bào ngư trắng thu được có sự khác nhau giữa các công bố: *P. ostreatus* [193]; *P. ostreatus* và *P. cornucopiae* [60]; *P. floridanus* [192].

Bảng 3.3. Kết quả so sánh trình tự ITS của các chủng nấm bào ngư với GenBank

| STT | Mã chủng | Tên địa phương | Mã định danh | Độ bao phủ (%) | Độ tương đồng (%) | E-value | Tên loài |
|-----|-------------|------------------|--------------|----------------|-------------------|---------|-----------------------|
| 1 | ABI-F000201 | Bào ngư tiêu yên | MK603976 | 100 | 99,85 | 0,0 | <i>P. ostreatus</i> |
| 2 | ABI-F000219 | Bào ngư trắng | MG819727 | 99 | 99,85 | 0,0 | <i>P. ostreatus</i> |
| 3 | ABI-F000222 | Bào ngư trắng | MK603976 | 100 | 100 | 0,0 | <i>P. ostreatus</i> |
| 4 | ABI-F000223 | Bào ngư trắng | MG819739 | 99 | 99,70 | 0,0 | <i>P. ostreatus</i> |
| 5 | ABI-F000224 | Bào ngư trắng | MG819739 | 100 | 100 | 0,0 | <i>P. ostreatus</i> |
| 6 | ABI-F000241 | Bào ngư xám | KT273376 | 99 | 100 | 0,0 | <i>P. pulmonarius</i> |
| 7 | ABI-F000248 | Bào ngư xám | MN239983 | 99 | 100 | 0,0 | <i>P. pulmonarius</i> |
| 8 | ABI-F000252 | Bào ngư xám | MN239983 | 99 | 100 | 0,0 | <i>P. pulmonarius</i> |
| 9 | ABI-F000253 | Bào ngư xám | MG819635 | 100 | 99,54 | 0,0 | <i>P. pulmonarius</i> |
| 10 | ABI-F000254 | Bào ngư xám | MN239983 | 100 | 99,84 | 0,0 | <i>P. pulmonarius</i> |

Bảng 3.3. Kết quả so sánh trình tự ITS của các chủng nấm bào ngư với GenBank (tiếp theo)

| STT | Mã chủng | Tên địa phương | Mã định danh | Độ bao phủ (%) | Độ tương đồng (%) | E-value | Tên loài |
|-----|-------------|----------------|--------------|----------------|-------------------|---------|-----------------------|
| 11 | ABI-F000255 | Bào ngư xám | KT273376 | 99 | 100 | 0,0 | <i>P. pulmonarius</i> |
| 12 | ABI-F000256 | Bào ngư xám | MT778822 | 97 | 100 | 0,0 | <i>P. pulmonarius</i> |
| 13 | ABI-F000257 | Bào ngư xám | KF932728 | 99 | 100 | 0,0 | <i>P. pulmonarius</i> |
| 14 | ABI-F000259 | Bào ngư xám | ON869366 | 98 | 99,87 | 0,0 | <i>P. pulmonarius</i> |
| 15 | ABI-F000261 | Bào ngư xám | MN239983 | 100 | 99,84 | 0,0 | <i>P. pulmonarius</i> |

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

Để ước tính mối quan hệ phát sinh loài của các chủng bào ngư thu thập được, nghiên cứu đã dựa trên trình tự ITS và sử dụng phần mềm MEGA X để dựng cây phả hệ Maximum Likelihood (ML) theo mô hình Kimura 2 yếu tố (dựa trên kết quả tối ưu của phần mềm) [224]. Các kết quả dựng cây phát sinh loài giúp khẳng định lại lần nữa các kết quả so sánh với dữ liệu từ GenBank. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự ITS của các chủng nấm bào ngư thu thập được trình bày trong Hình 3.16.

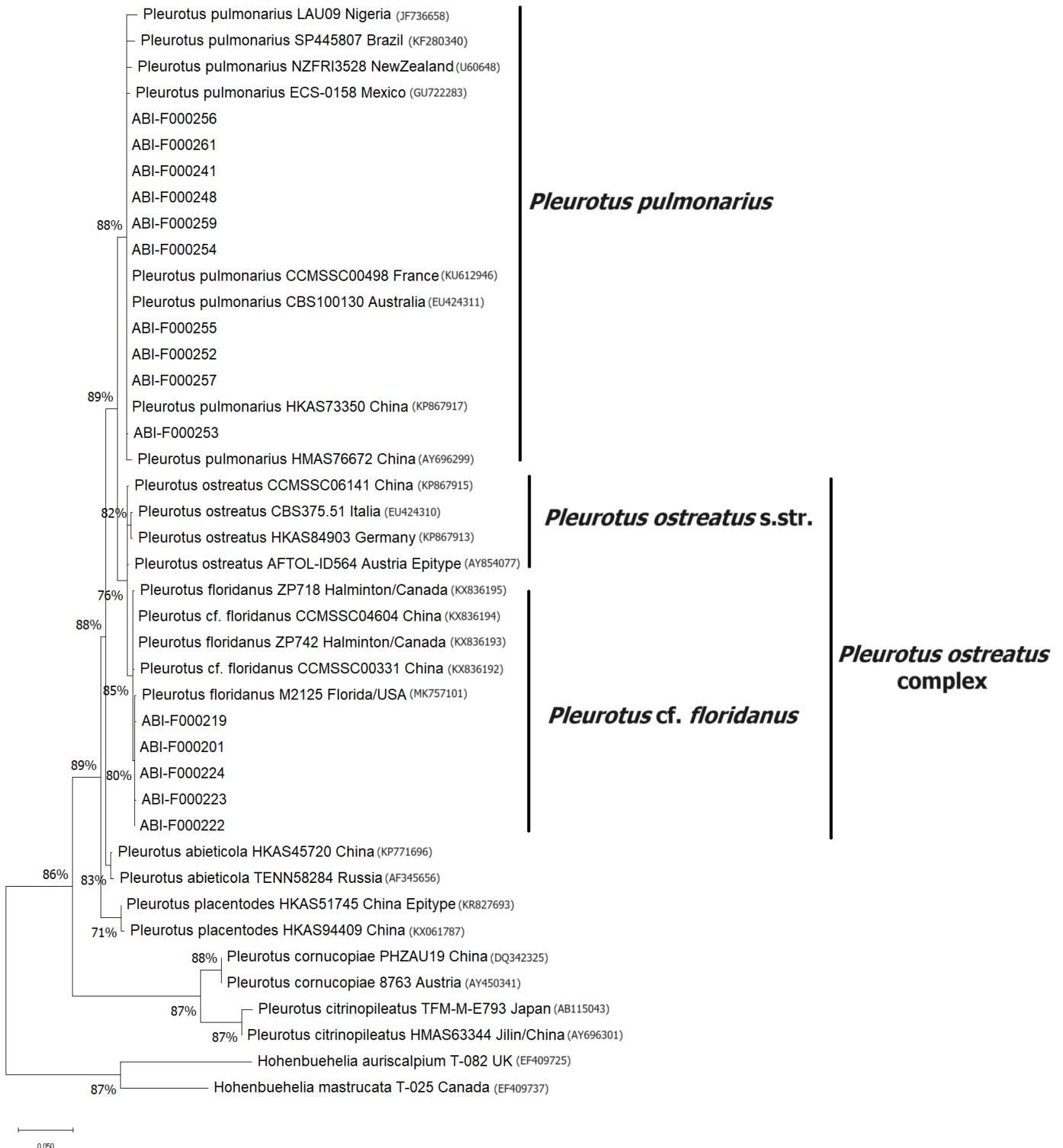
Với cây phát sinh loài của bộ dữ liệu trình tự ITS 719 bp, các chủng bào ngư xám được xác định là *P. pulmonarius* tập hợp thành một nhánh với chỉ số bootstrap là 88% cùng với 8 trình tự tham chiếu của *P. pulmonarius*. Các chủng nấm bào ngư trắng và chủng nấm bào ngư tiểu yển tạo thành một phân nhánh khác với chỉ số bootstrap là 80% với 5 trình tự tham chiếu của nhóm *Pleurotus cf. floridanus*. Các chủng này tách biệt với nhóm *P. ostreatus sensu stricto* (s.str.) (bootstrap 76%). Có thể thấy nhóm bào ngư trắng và tiểu yển nuôi trồng thương mại tại Việt Nam đã tách ra khỏi nhóm *P. ostreatus* s.str. tự nhiên trên cây phát sinh loài. Tuy nhiên, khi xét đặc điểm hình thái chính để phân biệt giữa *P. floridanus* và *P. ostreatus* có sự xuất hiện của nhiều liệt bào trong lớp thụ tầng ở *P. floridanus* [56], nhưng tất cả các mẫu nấm bào ngư trắng và nấm bào ngư tiểu yển trong nghiên cứu này đều không ghi nhận liệt bào. Bên cạnh đó, *P. floridanus* trước đây được xem là phân loại dưới loài của *P. ostreatus* với danh pháp *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. Do vậy khi kết hợp các

đặc điểm hình thái và các thông tin về loài *Pleurotus floridanus*, các chủng nấm bào ngư trắng và nấm tiêu yến trong nghiên cứu này vẫn tương đồng với loài *P. ostreatus*.

Trình tự ITS cũng phân tách được các nhóm *P. pulmonarius*, *Pleurotus* cf. *floridanus*, *P. ostreatus* s.str., với các chỉ số bootstrap tương ứng là 99%, 90%, 92%. Các cây phát sinh loài xây dựng trên đơn gen của các trình tự khác (*TEF1*, *RPB1*, *RPB2*) và cây đa gen kết hợp 4 vùng trình tự cũng tách được các nhóm tương tự. Trong đó vùng trình tự *RPB2* được đánh giá là phân nhóm tốt nhất [64]. Nhóm *P. ostreatus* tự nhiên (kí hiệu là OA) đã cho thấy tách khỏi nhóm *P. ostreatus* thương mại trên cây phát sinh loài (trong đó có nhóm nấm thương mại có mã chủng “*P. florida*” M2125 – kí hiệu là OB) trong một nghiên cứu tương tự. Các tác giả sử dụng riêng lẻ và kết hợp 3 vùng trình tự ITS, *TEF1*, *RPB2* và cho thấy hai nhóm này tách trên cây phát sinh loài [63].

Do ba nhóm *P. pulmonarius*, *Pleurotus* cf. *floridanus*, *P. ostreatus* s.str. đều thuộc *P. ostreatus* complex, đồng thời màu sắc quả thể nấm bào ngư bị ảnh hưởng bởi môi trường nuôi trồng, cũng như quá trình nuôi trồng thương mại có sự lai tạo nên các phương pháp định danh bằng hình thái gặp khó khăn [63, 225]. Với sự hỗ trợ của sinh học phân tử cho thấy một số vùng trình tự phù hợp để định danh nấm. Trong đó vùng trình tự ITS được đánh giá là phù hợp nhất do ITS với tính chất mã vạch năng, dễ khuếch đại bằng PCR, khả năng phân tách tốt... Trong nghiên cứu này trình tự ITS đã thấy phù hợp để tách 3 nhóm *P. pulmonarius*, *Pleurotus* cf. *floridanus*, *P. ostreatus* s.str. trên cây phát sinh loài.

Tổng hợp các kết quả định danh dựa trên hình thái, kết quả phân tích trình tự và dựng cây phát sinh loài dựa trên trình tự ITS có thể khẳng định: ITS có thể phân biệt được các loài *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* và *Pleurotus* cf. *floridanus*; kết quả định danh bằng sinh học phân tử hỗ trợ tốt cho định danh hình thái; 10 chủng bào ngư xám được định danh là loài *P. pulmonarius*, 4 chủng nấm bào ngư trắng và chủng nấm bào ngư tiêu yến được định danh là loài *P. ostreatus*.

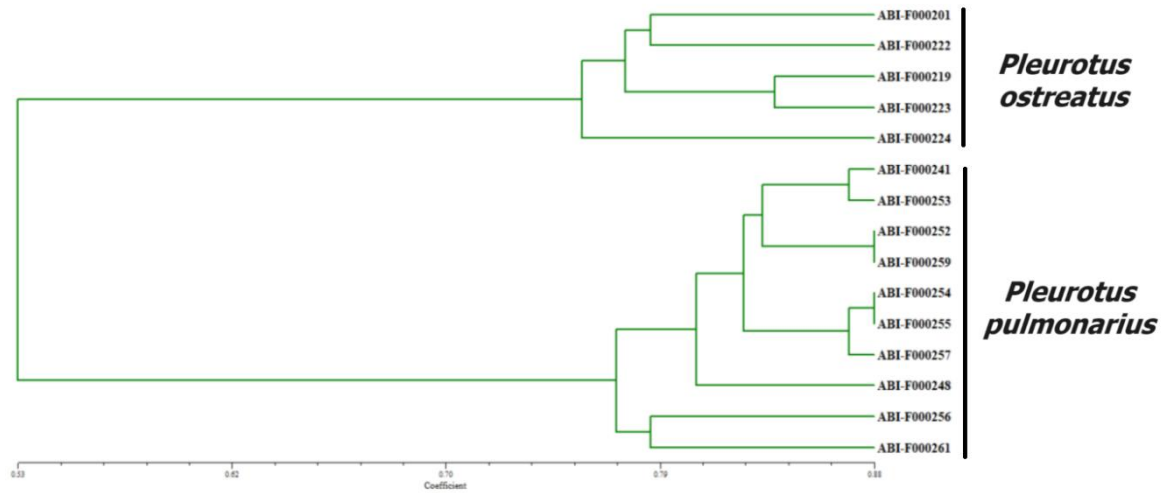


Hình 3.16. Cây phát sinh loài dựa theo trình tự ITS theo phương pháp Maximum Likelihood (ML) theo mô hình Kimura 2 yếu tố của các chủng *Pleurotus* spp. (bootstrap lặp lại 1000 lần)

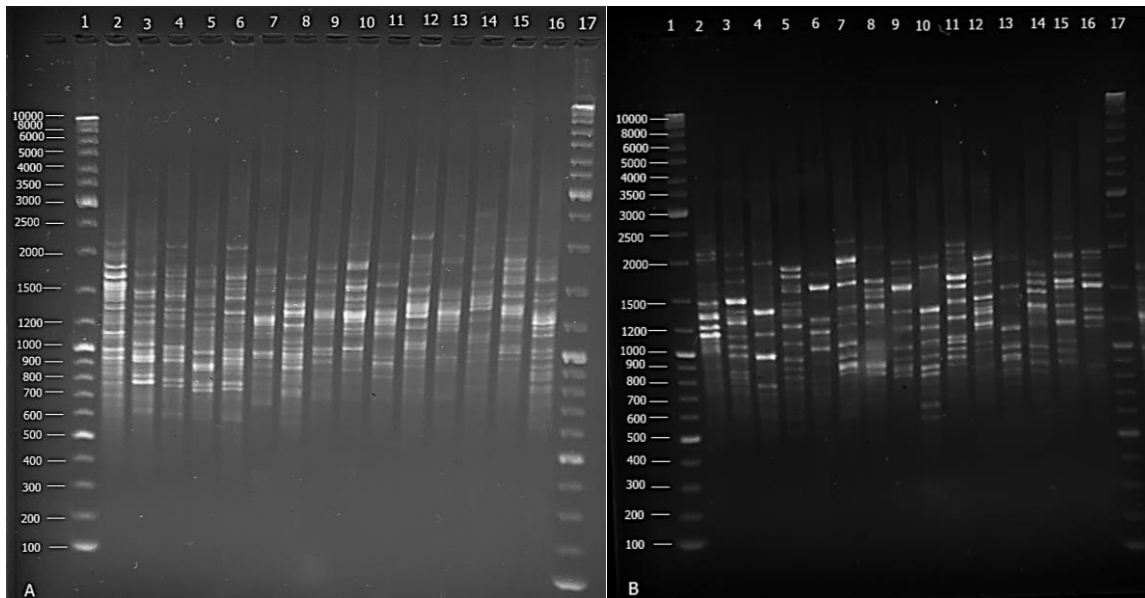
3.1.4. Phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật AFLP

Kết quả phân tích AFLP dựa trên các bản điện di (Hình 3.18; 3.19) cho thấy có 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% (Bảng 3.4). Cây phả hệ di truyền UPGMA được xây dựng từ kết quả tổng hợp của cả 4 bản điện di cho thấy các chủng nấm cùng một loài có quan hệ di truyền gần nhau hơn so với các chủng khác loài (Hình 3.17). Mô hình cây phả hệ chia 15 chủng nấm làm 2 nhánh chính: nhánh 1 gồm các 5 chủng nấm thuộc loài *P. ostreatus*, hệ số tương đồng các chủng thuộc nhánh này từ 72% đến 84%. Trong nhánh 1, giữa chủng ABI-F000219 và ABI-F000224 có sự tương đồng thấp nhất (72%); trong khi đó giữa chủng ABI-F000219 và ABI-F000223 có sự tương đồng cao nhất (84%). Nhánh 2 gồm 10 chủng nấm thuộc loài *P. pulmonarius*; hệ số tương đồng các chủng thuộc nhánh này từ 71% đến 88%. Trong nhánh 2, giữa chủng ABI-F000261 và ABI-F000248 có sự tương đồng thấp nhất (71%); trong khi đó giữa chủng ABI-F000254 và ABI-F000255, ABI-F000252 và ABI-F000259 có sự tương đồng cao nhất (88%). Kết quả AFLP hỗ trợ khẳng định lại kết quả xây dựng cây phát sinh loài dựa trên trình tự ITS. Cây UPGMA cũng có thể phân tách được các chủng nấm thuộc loài *P. pulmonarius* và *P. ostreatus*. Bên cạnh đó phương pháp AFLP đánh giá được sự khác biệt di truyền giữa các chủng trong cùng một loài. Đây là cơ sở lựa chọn các chủng bố mẹ phù hợp cho các phương pháp lai tạo giống [105, 226, 227]. Theo kết quả của nghiên cứu này, các chủng cùng loài và có sự khác biệt di truyền lớn có thể được lựa chọn làm cặp chủng bố mẹ tạo vật liệu ban đầu để lai tạo. Ví dụ trong loài *P. pulmonarius* là giữa các chủng ABI-F000241/ ABI-F000252/ ABI-F000253 với các chủng ABI-F000256/ ABI-F000261; trong loài *P. ostreatus* là giữa chủng ABI-F000224 với các chủng ABI-F000222/ ABI-F000201.

Phương pháp AFLP cũng đã được sử dụng để phân biệt 21 chủng nấm bào ngư: *P. ostreatus* (12 chủng), *P. sajor-caju* (3 chủng), *P. eryngii* (2 chủng), *P. pulmonarius* (1 chủng), *P. florida* (1 chủng), *P. cystidiosus* (1 chủng), 1 chủng *Pleurotus* sp., phân biệt được các chủng trong cùng loài *P. ostreatus* và *P. sajor –caju* [99]. Sự đa dạng di truyền của 15 chủng nấm *P. ostreatus* khu vực Indonesia và Thái Lan cũng đã được ghi nhận với 202 băng vạch và hệ số đa hình là 31%. Kết quả ghi nhận không có sự khác biệt trong kết quả phân tích AFLP giữa các chủng nấm thương mại cho dù khác biệt về mặt địa lý [227].

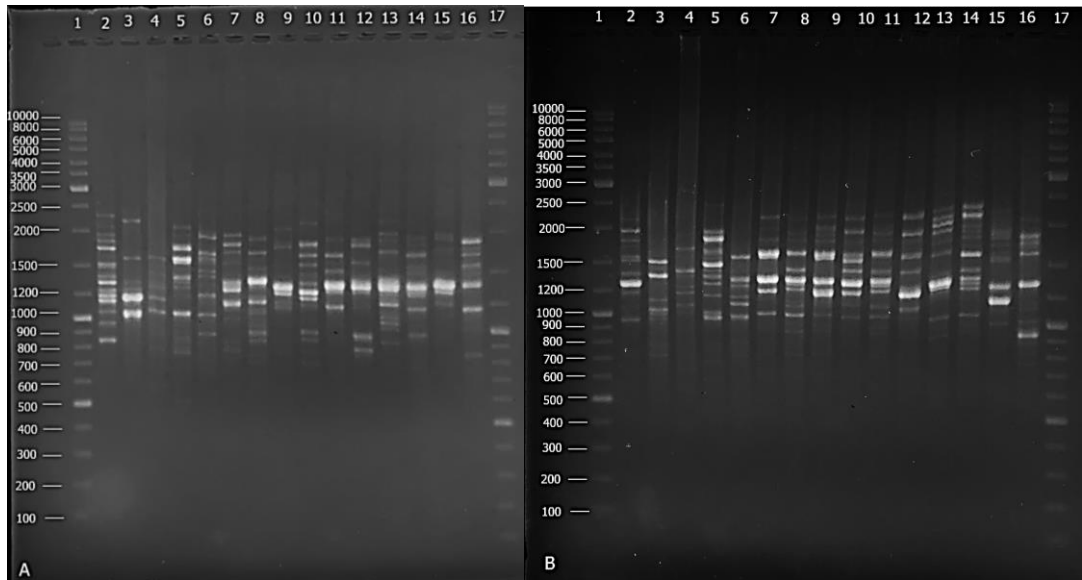


Hình 3.17. Cây UPGMA dựa trên đa dạng di truyền 4 marker APLP các chủng nấm bào ngư



Hình 3.18. Bản điện di trên gel agarose sử dụng môi chọn lọc G (A) và GC (B) của các chủng nấm bào ngư

(1, 17: DNA marker; 2: ABI-F000201; 3: ABI-F000219; 4: ABI-F000222; 5: ABI-F000223; 6: ABI-F000224; 7: ABI-F000241; 8: ABI-F000248; 9: ABI-F000252; 10: ABI-F000253; 11: ABI-F000254; 12: ABI-F000255; 13: ABI-F000256; 14: ABI-F000257; 15: ABI-F000259; 16: ABI-F000261)



Hình 3.19. Bản điện di trên gel agarose sử dụng môi chọn lọc AAG (A) và CAA (B) của các chủng nấm bào ngư

(1, 17: DNA marker; 2: ABI-F000201; 3: ABI-F000219; 4: ABI-F000222; 5: ABI-F000223; 6: ABI-F000224; 7: ABI-F000241; 8: ABI-F000248; 9: ABI-F000252; 10: ABI-F000253; 11: ABI-F000254; 12: ABI-F000255; 13: ABI-F000256; 14: ABI-F000257; 15: ABI-F000259; 16: ABI-F000261)

Bảng 3.4. Hệ số tương quan di truyền của các chủng nấm bào ngư

| Chủng | ABI-F000 201 | ABI-F000 219 | ABI-F000 222 | ABI-F000 223 | ABI-F000 224 | ABI-F000 241 | ABI-F000 248 | ABI-F000 252 | ABI-F000 253 | ABI-F000 254 | ABI-F000 255 | ABI-F000 256 | ABI-F000 257 | ABI-F000 259 | ABI-F000 261 |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ABI-F000201 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| ABI-F000219 | 0,74 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| ABI-F000222 | 0,79 | 0,77 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| ABI-F000223 | 0,82 | 0,84 | 0,79 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| ABI-F000224 | 0,76 | 0,72 | 0,79 | 0,78 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| ABI-F000241 | 0,57 | 0,48 | 0,50 | 0,59 | 0,55 | 1,00 | | | | | | | | | |
| ABI-F000248 | 0,62 | 0,52 | 0,55 | 0,58 | 0,58 | 0,81 | 1,00 | | | | | | | | |
| ABI-F000252 | 0,51 | 0,51 | 0,45 | 0,57 | 0,48 | 0,86 | 0,79 | 1,00 | | | | | | | |
| ABI-F000253 | 0,56 | 0,54 | 0,48 | 0,60 | 0,54 | 0,87 | 0,82 | 0,83 | 1,00 | | | | | | |
| ABI-F000254 | 0,56 | 0,54 | 0,51 | 0,58 | 0,52 | 0,83 | 0,82 | 0,83 | 0,86 | 1,00 | | | | | |
| ABI-F000255 | 0,56 | 0,58 | 0,53 | 0,66 | 0,54 | 0,85 | 0,80 | 0,85 | 0,82 | 0,88 | 1,00 | | | | |
| ABI-F000256 | 0,54 | 0,45 | 0,44 | 0,54 | 0,49 | 0,77 | 0,70 | 0,77 | 0,76 | 0,82 | 0,80 | 1,00 | | | |
| ABI-F000257 | 0,55 | 0,46 | 0,47 | 0,61 | 0,51 | 0,80 | 0,79 | 0,80 | 0,79 | 0,87 | 0,87 | 0,83 | 1,00 | | |
| ABI-F000259 | 0,55 | 0,51 | 0,52 | 0,57 | 0,51 | 0,84 | 0,83 | 0,88 | 0,81 | 0,85 | 0,81 | 0,79 | 0,84 | 1,00 | |
| ABI-F000261 | 0,51 | 0,51 | 0,49 | 0,55 | 0,53 | 0,78 | 0,71 | 0,76 | 0,71 | 0,79 | 0,81 | 0,79 | 0,78 | 0,84 | 1,00 |

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

Dựa trên các ghi nhận sơ bộ về năng suất và vị trí thu thập mẫu, chọn ra 10 chủng nấm để sử dụng cho nội dung 2.

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

Những chủng có tốc độ lan tơ cao trên môi trường PDA phù hợp cho quá trình nhân giống cấp 1. Bên cạnh môi trường thạch, giống cấp 1 còn được nhân giống trong môi trường lỏng và sự gia tăng sinh khối trong môi trường PDB giúp đánh giá khả năng nhân giống bằng môi trường lỏng. Khảo sát này đánh giá khả năng phát triển hệ sợi của các chủng nấm làm cơ sở cho công tác nhân giống, giữ giống về sau.

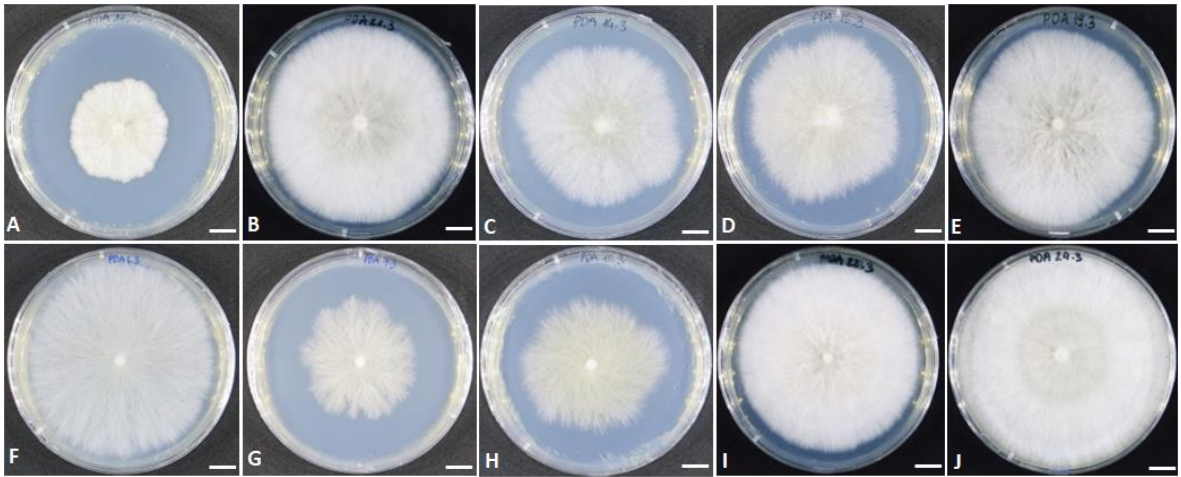
Sau 7 ngày theo dõi, tốc độ lan tơ trung bình và sinh khối khô của các chủng nấm bào ngư được trình bày trong Bảng 3.5. Kết quả cho thấy tốc độ lan tơ của các chủng trên môi trường PDA có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê (Bảng 3.5 và Hình 3.20). Chủng có tốc độ lan nhanh nhất là ABI-F000261 (chủng tự nhiên). Chủng có tốc độ lan tơ chậm nhất là ABI-F000201. Trong cùng một loài, tốc độ lan tơ của các chủng cũng có sự khác biệt rõ rệt.

Bảng 3.5. Tốc độ lan tơ trung bình trên môi trường PDA và sinh khối khô trên môi trường PDB của các chủng nấm sau 7 ngày nuôi cấy

| 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 |

*Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

PDA là môi trường phổ biến để nhân giống nấm. Trong nghiên cứu này tốc độ lan tơ có sự khác biệt giữa các chủng nấm cùng loài. Các chủng tuy cùng loài nhưng do quá trình nhân giống, nuôi trồng khác nhau nên chất lượng giống nấm có sự khác biệt. Các chủng nấm thương mại đều có tốc độ lan tơ thấp hơn chủng nấm tự nhiên (ABI-F000261). Điều đó có thể do quá trình cấy chuyển nhiều lần trong nhân giống cũng như giữ giống, chủng nấm có thể xuất hiện những đặc tính thoái hóa so với chủng tự nhiên mới phân lập. Các chủng nấm thuộc loài *P. pulmonarius* trong nghiên cứu này có tốc độ lan tơ cao hơn so với các công bố khác: 217,11 (mm²/ngày) [127], 114,83 (mm²/ngày) [125]. Các chủng nấm thuộc giống *P. ostreatus* có sự khác biệt về tốc độ lan tơ trên PDA và tốc độ lan tơ các chủng này thấp hơn hoặc tương đương so với các công bố khác: 908,43 (mm²/ngày) [129], 465,13 (mm²/ngày) [117].

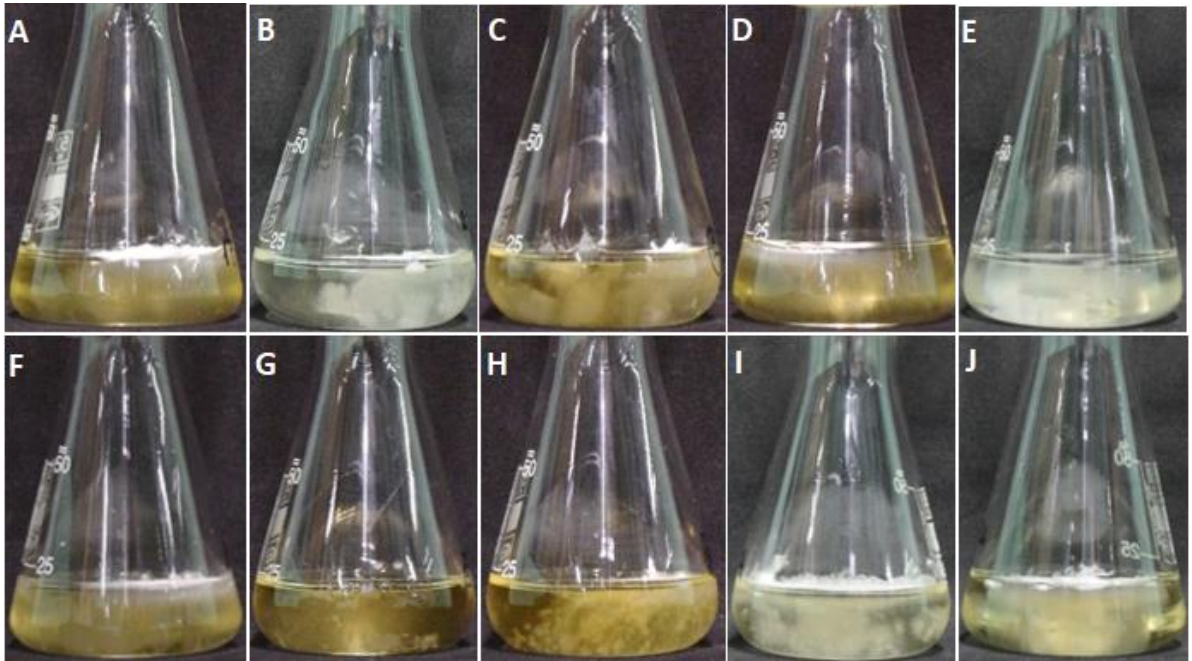


Hình 3.20. Hệ sợi của các chủng nấm *Pleurotus* trên môi trường PDA sau 7 ngày nuôi cấy

(A: ABI-F000201; B: ABI-F000219; C: ABI-F000222; D: ABI-F000224; E: ABI-F000241; F: ABI-F000252; G: ABI-F000253; H: ABI-F000256; I: ABI-F000259; J: ABI-F000261; thước: 1 cm)

Trên môi trường PDB, sinh khối khô có sự khác biệt ý nghĩa thống kê (Bảng 3.5 và Hình 3.21). Chủng có sinh khối cao nhất là ABI-F000259 và ABI-F000261 (chủng tự nhiên) cũng có lượng sinh khối cao tương đương chủng ABI-F000259. Hai chủng cho lượng sinh khối thấp là ABI-F000253 và ABI-F000256. Sinh khối của các chủng trong nghiên cứu này thấp hơn nghiên cứu khác: 3,76 g/l (loài *P. ostreatus*) [119]. Sự khác nhau này có thể có do sự khác biệt về nhiệt độ nuôi cấy của tác giả so với nghiên cứu này (30 °C so với 25 °C). Trong một nghiên cứu khác cũng ghi nhận sinh khối nấm *P. ostreatus* trên môi trường MCM khi sử dụng các loại đường khác nhau dao động từ 0,98 g/l đến 5,46 g/l sau 10 ngày nuôi cấy [228].

Kết quả khảo sát sự phát triển hệ sợi trên môi trường PDA và môi trường PDB cho thấy các chủng khảo sát của nghiên cứu có tốc độ lan tơ ổn định và tương đương các nghiên cứu khác. Như vậy các chủng này phù hợp cho nhân giống cấp một trong quy trình nuôi trồng. Tuy vậy khả năng lan tơ trên PDA và tích lũy sinh khối trên PDB chưa thể hiện rõ đặc tính nuôi trồng mà cần phải có các khảo sát trên giá thể nuôi trồng (ví dụ: mật cưa).



Hình 3.21. Hệ sợi của các chủng nấm *Pleurotus* trên môi trường PDB sau 7 ngày nuôi cấy

(A: ABI-F000201; B: ABI-F000219; C: ABI-F000222; D: ABI-F000224; E: ABI-F000241; F: ABI-F000252; G: ABI-F000253; H: ABI-F000256; I: ABI-F000259; J: ABI-F000261).

3.2.2. Khảo sát tốc độ lan tơ trên mặt cưa cao su

Kết quả lan tơ của các chủng trên đĩa Petri mặt cưa phản ánh chủ yếu sự phát triển hệ sợi trên bề mặt cơ chất khi nuôi trồng. Trong khi đó, sự lan tơ trong ống nghiệm thể hiện đầy đủ hơn sự gia tăng sinh khối trong cơ chất (sợi tơ cơ chất). Một chủng vừa có tốc độ lan tơ nhanh trên bề mặt, vừa có tốc độ nhanh trong khối cơ chất sẽ có tiềm năng khi nuôi trồng vì giúp rút ngắn thời gian nuôi trồng cũng như phản ánh được khả năng sử dụng cơ chất.

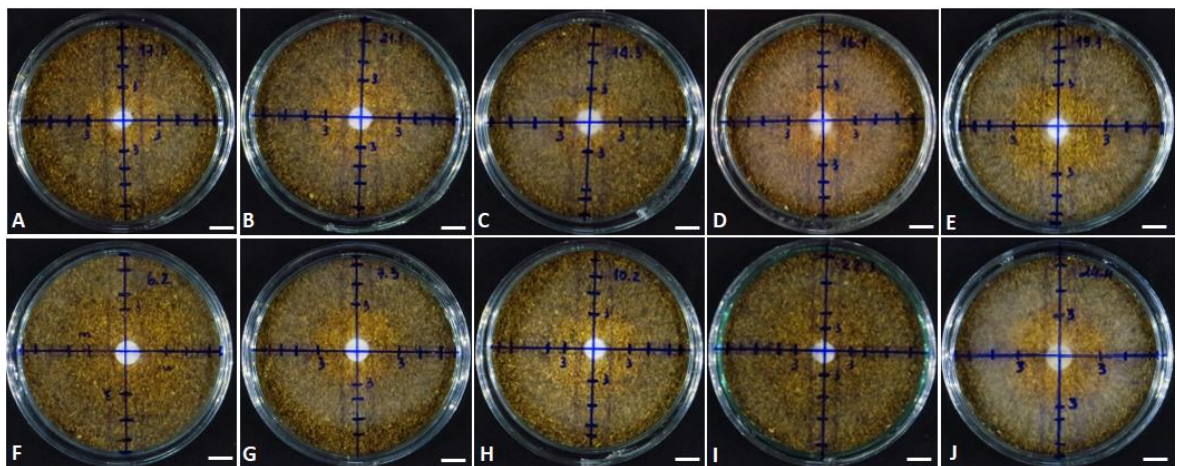
Tốc độ lan tơ trên Petri mặt cưa và ống nghiệm mặt cưa sau thời gian theo dõi được trình bày trong Bảng 3.6. Kết quả cho thấy tốc độ lan tơ của các chủng trên Petri môi trường mặt cưa có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê (Bảng 3.6 và Hình 3.22). Chủng có tốc độ lan nhanh nhất là ABI-F000252. Chủng có tốc độ lan tơ chậm nhất là ABI-F000201. Trong cùng một loài, tốc độ lan tơ của các chủng cũng có sự khác biệt.

Bảng 3.6. Tốc độ lan tơ của các chủng nấm bào ngư trên Petri và ống nghiệm mật cưa

| STT | 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 ^e ± 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 |

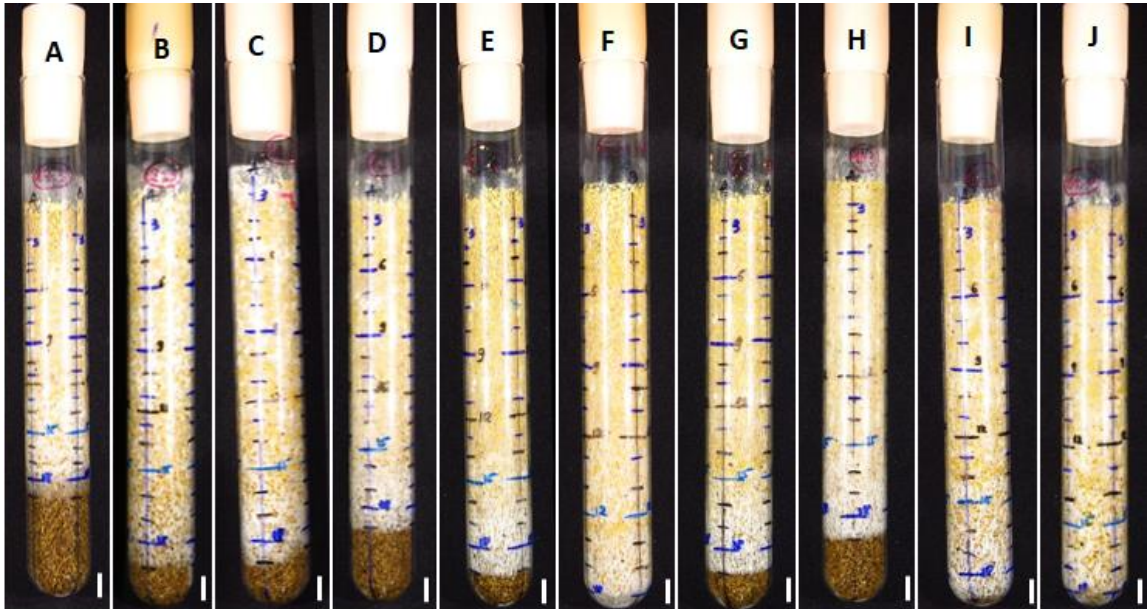
*Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Trên ống nghiệm mật cưa tốc độ lan tơ của các chủng cũng có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê (Bảng 3.6 và Hình 3.23). Chủng có tốc độ lan nhanh nhất là ABI-F000252. Chủng có tốc độ lan tơ chậm nhất là ABI-F000201. Trong cùng một loài, tốc độ lan tơ của các chủng cũng có sự khác biệt.



Hình 3.22. Hệ sợi của các chủng nấm *Pleurotus* trên đĩa Petri mật cưa sau 6 ngày nuôi cấy

(A: ABI-F000201; B: ABI-F000219; C: ABI-F000222; D: ABI-F000224; E: ABI-F000241; F: ABI-F000252; G: ABI-F000253; H: ABI-F000256; I: ABI-F000259; J: ABI-F000261; thước: 1 cm)



Hình 3.23. Hệ sợi của các chủng nấm *Pleurotus* trên ống nghiệm mật cưa sau 19 ngày nuôi cấy

(A: ABI-F000201; B: ABI-F000219; C: ABI-F000222; D: ABI-F000224; E: ABI-F000241; F: ABI-F000252; G: ABI-F000253; H: ABI-F000256; I: ABI-F000259; J: ABI-F000261; thước: 1 cm)

Các chủng nấm lan tơ đầy ống nghiệm trong khoảng từ 19 đến 26 ngày. Kết quả về tốc độ lan tơ trong ống nghiệm của nghiên cứu này cũng tương tự các công bố khác [138, 141, 143]. Thời gian lan tơ theo các công bố trên là 17,3 – 21,3 ngày. Trong nghiên cứu này tốc độ lan tơ của các chủng thuộc loài *P. pulmonarius* là 6,64 – 7,81 (mm/ngày), trong khi đó tốc độ của các chủng của loài *P. ostreatus* là 5,69 – 7,21 (mm/ngày). Các nghiên cứu khác cho thấy, loài *P. pulmonarius* có chiều dài tơ lan sau 8 ngày là 5,24 cm (tốc độ lan tơ trung bình tương đương là 6,55 mm/ngày) [127], thấp hơn nghiên cứu này; loài *P. ostreatus* có tốc độ lan tơ trên mặt cưa của 5 loài cây khác nhau (*Magifera indica*, *Albizia saman*, *Tectona grandis*, *Gmelina arborea*, *Swietenia mahagoni*) cho kết quả 6,3–7,6 mm/ngày [144], tương tự các chủng của nghiên cứu này.

Với kết quả lan tơ trên Petri và ống nghiệm, các chủng trong nghiên cứu có tốc độ lan tơ trên cơ chất ổn định để nuôi trồng. Trong đó chủng tự nhiên ABI-F00261 có tốc độ lan tơ trên Petri và ống nghiệm đều cao.

3.2.3. Khảo sát tỉ lệ chuyển hóa

Khảo sát tỉ lệ chuyển hóa nhằm đánh giá khả năng sử dụng cơ chất (lactose) trong môi trường YBLB, từ đó đánh giá nhanh tình trạng giống. Sau 4 ngày nuôi cấy

trên môi trường YBLB, tỉ lệ chuyển hóa của các chủng nấm bào ngư được trình bày theo Bảng 3.7.

Bảng 3.7. 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 |

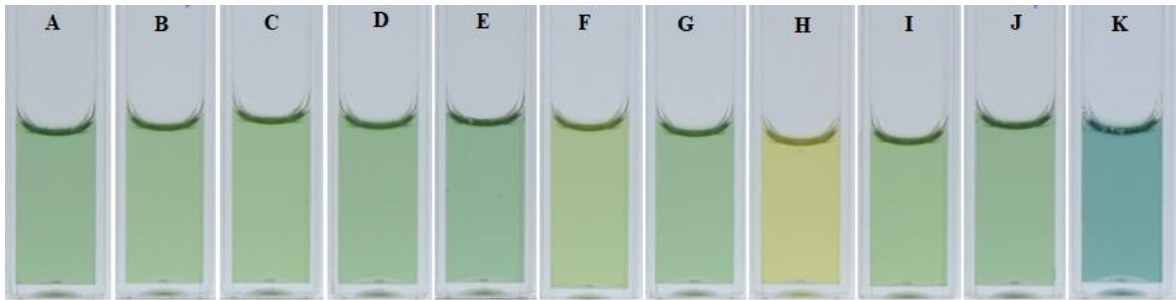
*Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Trong nghiên cứu này, tỉ lệ chuyển hóa có sự khác biệt giữa các chủng nghiên cứu. Tỉ lệ chuyển hóa của các chủng ở mức trung bình đến cao, dao động từ 30,32% đến 79,65%, tương ứng với màu của môi trường từ xanh lá cây đến vàng (Bảng 3.7 và Hình 3.24). Kết quả thí nghiệm ghi nhận chủng chuyển hóa cao nhất là ABI-F000256 và thấp nhất là ABI-F000241.

Nghiên cứu của Magae và cs. (2005) cho thấy chuyển hóa của nấm kim châm trên môi trường YBLB cho thấy những chủng nấm có giá trị chuyển hóa âm (-20% - màu môi trường sau thử nghiệm là màu xanh lục) có năng suất thấp và thể hiện sự thoái hóa giống [111]. Những giống có chuyển hóa trung bình (15% đến 72% - môi trường sau thử nghiệm có màu xanh lá cây) và chuyển hóa cao (trên 90% - môi trường sau thử nghiệm có màu vàng) năng suất ổn định và không có sự khác biệt giữa năng suất nuôi trồng của hai nhóm này. Nghiên cứu của Chen và cs. (2019) trên nấm rom (*Volvariella volvacea*) cho thấy các giống sau một vài thế hệ cây chuyển sinh khối vẫn ổn định, có chuyển hóa cao và tương ứng với màu vàng của môi trường. Các giống ở thế hệ cây chuyển thứ 3, bắt đầu xuất hiện dấu hiệu thoái hóa [33]. Sự khác biệt về độ tương ứng màu sắc với mức độ thoái hóa của 2 nhóm tác giả có thể do phụ thuộc vào tính chất giống cũng như điều kiện cụ thể mà mỗi nhóm tác giả thực hiện kỹ thuật này.

Tỉ lệ chuyển hóa được sử dụng nhằm mục đích đánh giá nhanh chất lượng giống. Có thể thấy tỉ lệ chuyển hóa của các chủng phù hợp với kết quả khảo sát sinh trưởng ở trên. Các chủng trong bộ sưu tập có các kết quả sinh trưởng ổn định đều có

kết quả chuyển hóa trung bình đến cao, màu môi trường tương ứng là xanh lá cây và vàng. Nhận diện sơ bộ theo kết quả thử nghiệm sinh hóa tất cả 10 chủng nấm trong bộ sưu tập có đều đang ổn định, chưa có dấu hiệu thoái hóa giống.



Hình 3.24. Màu sắc của các môi trường trong thử nghiệm YBLB của các chủng nấm *Pleurotus* sau 4 ngày nuôi cấy

(A: ABI-F000201; B: ABI-F000219; C: ABI-F000222; D: ABI-F000224; E: ABI-F000241; F: ABI-F000252; G: ABI-F000253; H: ABI-F000256; I: ABI-F000259; J: ABI-F000261; K: đối chứng – không cấy giống)

3.2.4. Khảo sát hiệu suất sinh học và mối tương quan giữa tốc độ lan tơ trên mặt cưa với hiệu suất sinh học các chủng nấm

Trong nghiên cứu này, 10 chủng nấm bào ngư chia làm 2 nhóm. Nhóm 1 là 4 chủng nấm thuộc loài *P. ostreatus* (ABI-F000201 đến ABI-F000224) và nhóm 2 là 6 chủng nấm thuộc loài *P. pulmonarius* (ABI-F000241 đến ABI-F000261).

Hiệu suất sinh học và tốc độ thể tích sinh khối tơ trên mặt cưa được thể hiện ở Bảng 3.8 và 3.9. Hình ảnh quả thể nấm trên bịch phôi và số liệu năng suất được trình bày ở Phụ lục 13 và 14.

Bảng 3.8. Hiệu suất sinh học và tốc độ thể tích sinh khối tơ trên mặt cưa của các chủng thuộc loài *P. ostreatus*

| STT | Chủng nấm | Hiệu suất sinh học (%) | Tốc độ thể tích sinh khối trên mặt 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 |

*Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Bảng 3.9. Hiệu suất sinh học và tốc độ thể tích sinh khối tơ trên mặt cưa của các chủng thuộc loài *P. pulmonarius*

| STT | Chủng nấm | Hiệu suất sinh học (%) | Tốc độ 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 |

*Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.

Khảo sát hiệu suất sinh học (BE) là tiêu chí quan trọng nhất để xác định những giống có tiềm năng sản xuất. Trong khảo sát này các chủng thuộc loài *P. pulmonarius* có BE từ 14,29% (chủng ABI-F000259) đến 23,43% (chủng tự nhiên ABI-F000261). BE của các chủng *P. pulmonarius* trong nghiên cứu này thấp hơn so với một số nghiên cứu khác: 54% [135], 25,56 - 36,13% [138]. Các chủng thuộc loài *P. ostreatus* trong nghiên cứu này có BE từ 38,03% đến 49,73%. Kết quả này thấp hơn so với một số nghiên cứu: 64,69% [141], 187- 213,2% [229], 78,30 - 84,08% [144]; nhưng cao hơn kết quả một nghiên cứu khác: 9,73% [143].

Xem xét mối liên quan giữa hiệu suất sinh học (Bảng 3.18, 3.19) và tỉ lệ chuyển hóa (Bảng 3.7) cho thấy các chủng có chuyển hóa ghi nhận phía trên là trung bình và cao đều cho năng suất ổn định (giống vãn tạo quả thể bình thường và phù hợp cho yêu cầu sản xuất). Xét riêng từng chủng: đối với 4 chủng loài *P. ostreatus* các chủng có hiệu suất sinh học cao thì chuyển hóa cũng cao, trong khi của chủng thuộc loài *P. pulmonarius* không có sự tương ứng giữa hiệu suất sinh học và tỉ lệ chuyển hóa. Do vậy thử nghiệm sinh hóa có thể xác nhận chủng còn có khả năng sản xuất (vãn tạo quả thể). Tuy nhiên, thử nghiệm này chưa giúp phân biệt các chủng có năng suất khác nhau.

Xem xét mối liên quan giữa hiệu suất sinh học (Bảng 3.18, 3.19) và tốc độ lan tơ trên đĩa Petri (Bảng 3.6) cho thấy 4 chủng loài *P. ostreatus* và 6 chủng loài *P. pulmonarius* đều có sự liên quan giữa hai chỉ tiêu này. Các chủng có năng suất cao có tốc độ lan tơ trên Petri mặt cưa cao và ngược lại.

Đối với mối liên quan giữa hiệu suất sinh học (Bảng 3.18, 3.19) và tốc độ lan tơ trên ống nghiệm (Bảng 3.6), nhìn chung cho thấy các chủng có hiệu suất sinh học cao cho tốc độ lan tơ cao. Xét riêng 4 chủng loài *P. ostreatus* cho thấy có sự liên quan giữa 2 chỉ tiêu này. Riêng 6 chủng loài *P. pulmonarius* có chủng ABI-F000259 có sự

khác biệt là có tốc độ lan tơ cao mặc dù có năng suất thấp. Tuy vậy có thể nhận định đây có thể là một chỉ tiêu có thể phù hợp cho sàng lọc giống.

Để xem xét đầy đủ hơn mối liên quan giữa tốc độ lan tơ trong toàn bộ khối cơ chất (theo cả chiều ngang trên bề mặt và chiều sâu theo hướng đi xuống), nghiên cứu tiến hành xem xét mối liên quan giữa tốc độ thể tích và hiệu suất sinh học (Bảng 3.18, 3.19). Kết quả giá trị tốc độ thể tích: đối với loài *P. ostreatus* ghi nhận ba chủng ABI-F000219, ABI-F000222, ABI-F000224 bằng nhau (dao động từ 4910,34 mm³ đến 5403,13 mm³) và cao hơn chủng ABI-F000201 (3597,17 mm³) và hiệu suất sinh học có thể chia làm 2 lớp: cao (ba chủng ABI-F000219, ABI-F000222, ABI-F000224) và thấp (chủng ABI-F000201). Đối với loài *P. pulmonarius* giá trị tốc độ thể tích ghi nhận hai chủng ABI-F000261, ABI-F000252 cao nhất và thấp nhất là chủng ABI-F000259. Ta có thể thấy tốc độ thể tích của các chủng *P. pulmonarius* có thể chia làm 3 lớp: cao (hai chủng ABI-F000261, ABI-F000252), trung bình (hai chủng ABI-F000241, ABI-F000253) và thấp (hai chủng ABI-F000256, ABI-F000259). Và đặc biệt ghi nhận tương ứng với 3 lớp của tốc độ thể tích các chủng này cũng tương ứng với 3 lớp của hiệu suất sinh học, do đó có sự tương quan giữa tốc độ thể tích và hiệu suất sinh học đối với các chủng thuộc loài *P. pulmonarius*.

Tổng hợp các kết quả phân tích này cho thấy có thể áp dụng thử nghiệm sinh hóa để xác định nhanh khả năng nuôi trồng của chủng (vẫn tạo ra quả thể). Sau đó có thể dùng phương pháp xem xét tốc độ thể tích để dự đoán hiệu suất sinh học các chủng nấm.

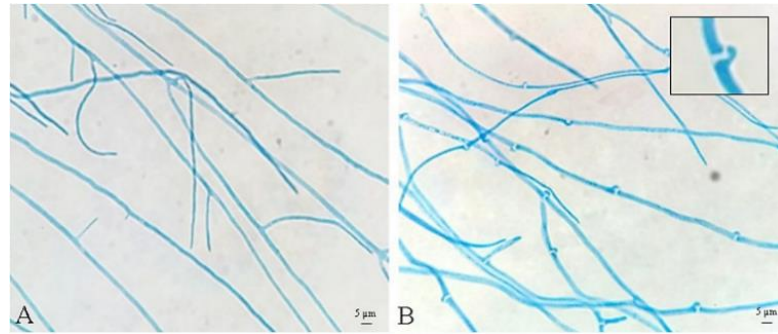
3.3. THU THẬP VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CÁC DÒNG ĐƠN BỘI

Từ kết quả nghiên cứu của nội dung 2 tiến hành lựa chọn 4 chủng nấm phù hợp để tiến hành thu nhập dòng đơn bội bao gồm: 3 chủng nấm bào ngư xám thương mại có hiệu suất sinh học cao: ABI-F000241, ABI-F000252, ABI-F000253 và một chủng nấm bào ngư trắng có hiệu suất sinh học cao nhất ABI-F000224.

3.3.1. Thu thập và giữ giống các dòng đơn bội

3.3.1.1. Thu thập các dòng đơn bội

Quả thể của 3 chủng nấm bào ngư xám ABI-F000241, ABI-F000252, ABI-F000253 và một chủng nấm bào ngư trắng ABI-F000224 được thu nhận. Các hệ sợi nảy mầm từ bào tử được cấy phân lập. Dựa vào sự khác biệt hình thái của cấu trúc hệ sợi để sàng lọc dòng đơn bội: sợi nấm đơn bội không có mấu nối, sợi nấm song nhân có mấu nối để thu nhận các dòng đơn bội (Hình 3.25). Từ mỗi chủng nấm, thu nhận 20 dòng đơn bội (Bảng 3.10).



Hình 3.25. Hình thái hệ sợi nấm bào ngư

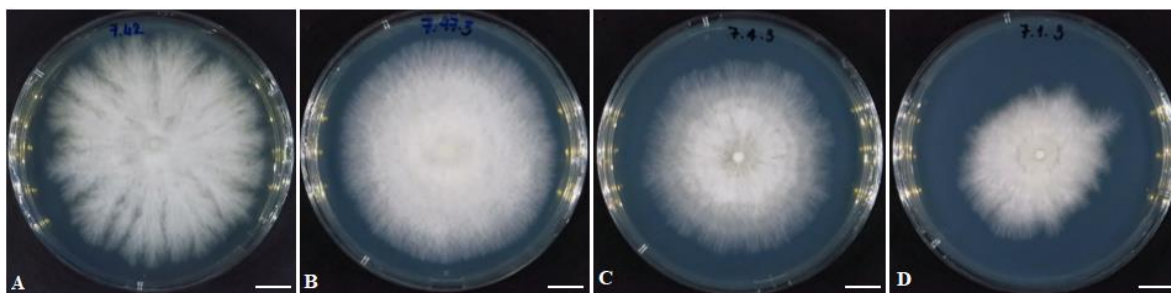
(A: đơn bội; B: song nhân và cấu trúc mấu nối – hình góc)

Bảng 3.10. Danh sách dòng đơn bội của các chủng nấm bào ngư

| STT | Chủng nấm ABI-F000241 | Chủng nấm ABI-F000252 | Chủng nấm ABI-F000253 | Chủng nấm ABI-F000224 |
|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 01 | 02 | 01 | 02 |
| 2 | 04 | 04 | 04 | 05 |
| 3 | 05 | 07 | 08 | 14 |
| 4 | 06 | 09 | 09 | 18 |
| 5 | 08 | 12 | 13 | 19 |
| 6 | 09 | 13 | 16 | 20 |
| 7 | 13 | 15 | 20 | 35 |
| 8 | 19 | 16 | 23 | 42 |
| 9 | 20 | 20 | 24 | 44 |
| 10 | 23 | 22 | 27 | 45 |
| 11 | 24 | 24 | 36 | 46 |
| 12 | 26 | 27 | 37 | 47 |
| 13 | 33 | 29 | 41 | 49 |
| 14 | 34 | 30 | 42 | 50 |
| 15 | 36 | 31 | 44 | 54 |
| 16 | 37 | 33 | 45 | 55 |
| 17 | 43 | 34 | 47 | 60 |
| 18 | 45 | 36 | 51 | 61 |
| 19 | 59 | 39 | 52 | 62 |
| 20 | 60 | 43 | 54 | 64 |

(Ghi chú: mỗi dòng đơn bội của từng chủng được ký hiệu bằng 2 chữ số)

Về hình thái của hệ sợi dòng đơn bội, ở 4 chủng nấm nhận thấy các dòng đơn bội có các dạng hình thái đặc trưng: dạng rẽ, dạng bông, dạng vân đồng tâm và dạng dày đặc (Hình 3.26).



Hình 3.26. Các dạng hình thái hệ sợi của các dòng đơn bội

(A: dạng rễ; B: dạng bông; C: dạng vân đồng tâm; D: dạng dày đặc; thước: 1 cm)

Các dạng hình thái dòng đơn bội ghi nhận trong đề tài này tương tự nghiên cứu khác [37]. Khi nghiên cứu dòng đơn bội của cả ba loài *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. citrinopileatus*, các tác giả ghi nhận 4 dạng hình thái: dạng rễ (rooting), dạng bông (cotton), dạng dày đặc (dense mycelial) và dạng vân đồng tâm (concentric striate). Tác giả cũng nhận thấy hệ sợi dạng bông có tốc độ lan tơ nhanh nhất và chậm nhất là dạng dày đặc. Trên loài *P. ostreatus* cũng được ghi nhận có 6 dạng hình thái khuẩn lạc của các dòng đơn bội: dạng đám mây (cumulous), dạng rễ (feathery), dạng sưng (puffy), vân đồng tâm (concentric), dạng lông tơ (fluffy), dạng tia (streak) [223]. Tuy vậy nghiên cứu này không có hình ảnh về các dạng hình thái khuẩn lạc được xác nhận như trên.

3.3.1.2. Giữ giống các dòng đơn bội

Các dòng đơn bội sau khi được xác nhận, 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

Tốc độ lan tơ trên môi trường PDA là thông tin quan trọng cho quá trình giữ giống hay nhân giống dòng đơn bội. Bên cạnh đó cặp dòng đơn bội bố mẹ nếu có kiểu bắt cặp di truyền phù hợp, có tốc độ lan tơ cao và hình thái khác biệt có thể được lựa chọn làm vật liệu cho các quy trình lai tạo sau này.

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

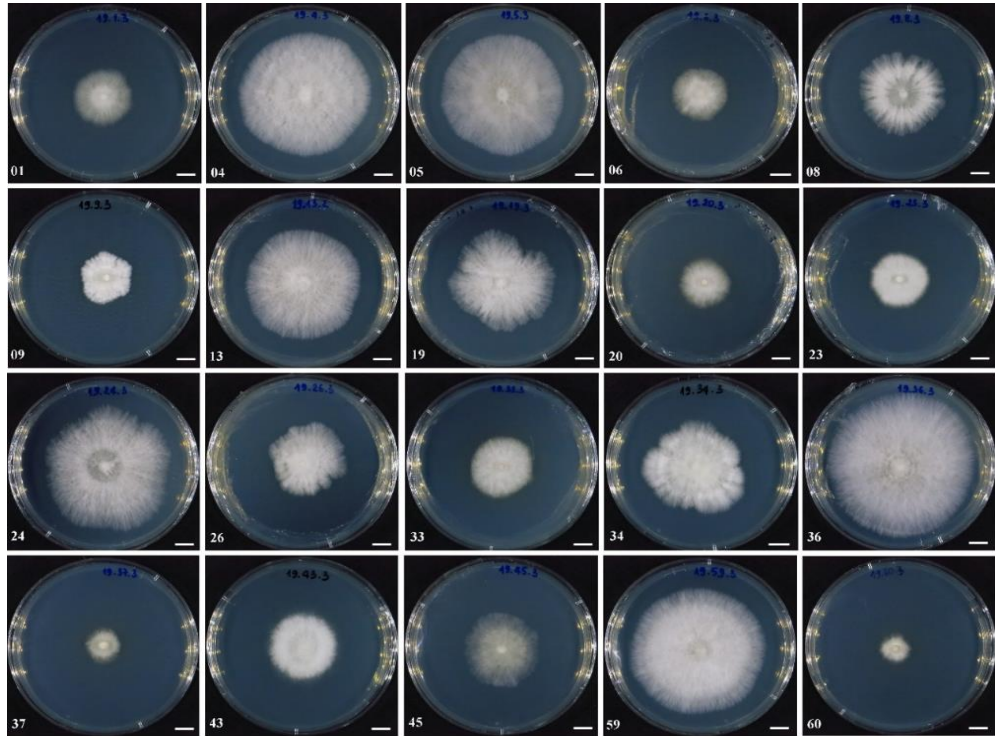
Tốc độ lan tơ của 20 dòng đơn bội của chủng ABI-F000241 trên môi trường PDA sau 10 ngày được trình bày ở Bảng 3.11 và các Hình 3.27

Bảng 3.11. Tốc độ lan tơ trên môi trường PDA (mm²/ngày) các dòng đơn bội của chủng ABI-F000241

| STT | Mã dòng | Tốc độ lan tơ (mm ² /ngày) |
|-----|---------|---------------------------------------|
| 1 | 01 | 70,5 ^{ij} ± 1,4 |
| 2 | 04 | 303,3 ^{cd} ± 11,7 |
| 3 | 05 | 274,4 ^d ± 13,1 |
| 4 | 06 | 66,8 ^{ij} ± 6,2 |
| 5 | 08 | 130,3 ^g ± 14,0 |
| 6 | 09 | 58,4 ^{ij} ± 3,7 |
| 7 | 13 | 227,1 ^e ± 29,5 |
| 8 | 19 | 206,8 ^{ef} ± 26,9 |
| 9 | 20 | 50,2 ^{jk} ± 4,2 |
| 10 | 23 | 65,1 ^{ij} ± 3,7 |
| 11 | 24 | 322,8 ^{bc} ± 55,2 |
| 12 | 26 | 118,0 ^{gh} ± 41,0 |
| 13 | 33 | 81,9 ^{hij} ± 4,7 |
| 14 | 34 | 191,8 ^f ± 37,2 |
| 15 | 36 | 428,8 ^a ± 26,2 |
| 16 | 37 | 20,9 ^k ± 4,0 |
| 17 | 43 | 95,8 ^{ghi} ± 6,0 |
| 18 | 45 | 110,9 ^{gh} ± 5,8 |
| 19 | 59 | 353,1 ^b ± 66,9 |
| 20 | 60 | 15,8 ^k ± 2,1 |

**Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.*

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



Hình 3.27. Hệ sợi của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000241 sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA (thước 1 cm, số trong mỗi hình là mã dòng đơn bội)

3.3.2.2. Khảo sát các dòng của chủng ABI-F000252

Tốc độ lan tơ của 20 dòng đơn bội của chủng ABI-F000252 trên môi trường PDA sau 10 ngày được trình bày ở Bảng 3.12 và các Hình 3.28.

Bảng 3.12. Tốc độ lan tơ trên môi trường PDA ($\text{mm}^2/\text{ngày}$) các dòng đơn bội của chủng ABI-F000252

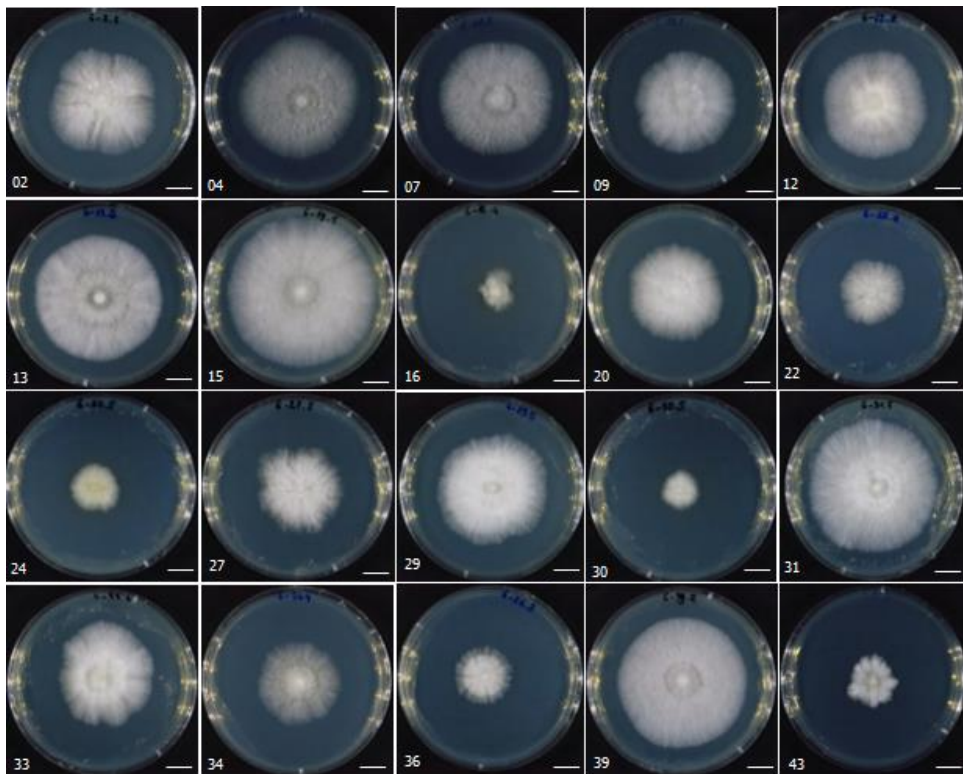
| STT | Mã dòng | Tốc độ lan tơ ($\text{mm}^2/\text{ngày}$) |
|-----|---------|---|
| 1 | 02 | $241,5^d \pm 34,1$ |
| 2 | 04 | $326,3^b \pm 34,2$ |
| 3 | 07 | $299,0^c \pm 19,4$ |
| 4 | 09 | $207,2^e \pm 24,3$ |
| 5 | 12 | $246,1^d \pm 24,8$ |
| 6 | 13 | $327,7^b \pm 7,4$ |
| 7 | 15 | $399,2^a \pm 36,9$ |
| 8 | 16 | $26,9^k \pm 8,7$ |
| 9 | 20 | $163,4^{fg} \pm 19,2$ |
| 10 | 22 | $83,5^h \pm 12,3$ |
| 11 | 24 | $41,7^k \pm 9,9$ |
| 12 | 27 | $179,1^f \pm 13,4$ |
| 13 | 29 | $236,9^d \pm 16,8$ |
| 14 | 30 | $27,0^k \pm 2,0$ |
| 15 | 31 | $347,7^b \pm 17,4$ |
| 16 | 33 | $350,6^b \pm 14,8$ |

Bảng 3.12. Tốc độ lan tơ trên môi trường PDA (mm²/ngày) các dòng đơn bội của chủng ABI-F000252 (tiếp theo)

| STT | Mã dòng | Tốc độ lan tơ (mm ² /ngày) |
|-----|---------|---------------------------------------|
| 17 | 34 | 181,1 ^f ± 11,1 |
| 18 | 36 | 141,1 ^g ± 15,7 |
| 19 | 39 | 327,7 ^b ± 21,5 |
| 20 | 43 | 37,3 ^k ± 3,8 |

**Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.*

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



Hình 3.28. Hệ sợi của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000252 sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA (thước 1 cm, số trong mỗi hình là mã dòng đơn bội)

3.3.2.3. Khảo sát các dòng của chủng ABI-F000253

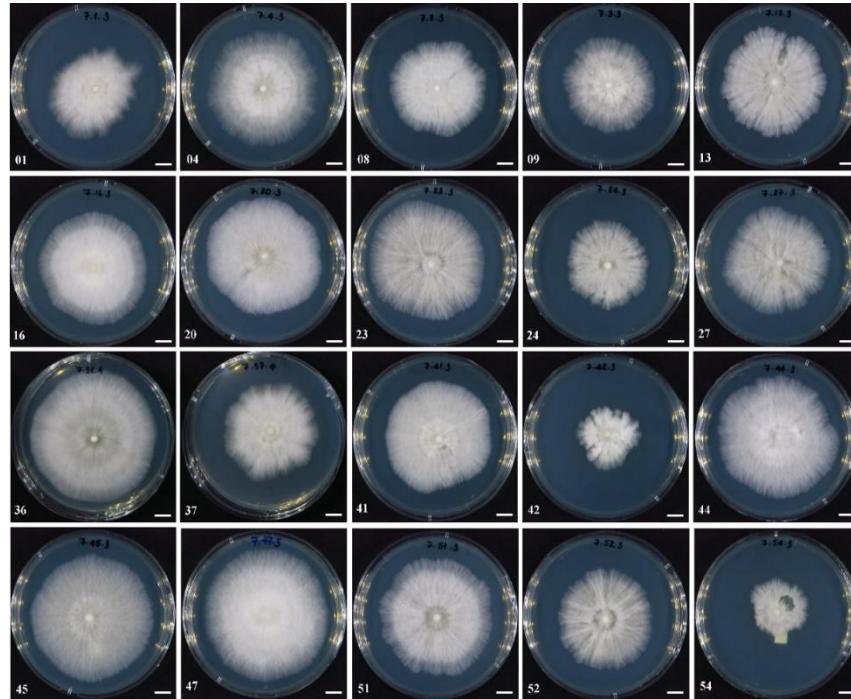
Tốc độ lan tơ của 20 dòng đơn bội của chủng ABI-F000253 trên môi trường PDA sau 10 ngày được trình bày được trình bày ở Bảng 3.13 và Hình 3.29.

Bảng 3.13. Tốc độ lan tơ trên môi trường PDA (mm²/ngày) các dòng đơn bội của chủng ABI-F000253

| STT | Mã dòng | Tốc độ lan tơ (mm ² /ngày) |
|-----|---------|---------------------------------------|
| 1 | 01 | 165,7 ^f ± 22,3 |
| 2 | 04 | 329,9 ^b ± 10,5 |
| 3 | 08 | 212,5 ^{ef} ± 17,1 |
| 4 | 09 | 171,3 ^f ± 38,4 |
| 5 | 13 | 238,6 ^{de} ± 27,1 |
| 6 | 16 | 266,2 ^{cd} ± 29,4 |
| 7 | 20 | 323,3 ^b ± 19,4 |
| 8 | 23 | 390,5 ^a ± 32,6 |
| 9 | 24 | 205,0 ^{ef} ± 29,8 |
| 10 | 27 | 341,7 ± 41,4 |
| 11 | 36 | 401,8 ^a ± 24,3 |
| 12 | 37 | 164,7 ^f ± 58,2 |
| 13 | 41 | 335,4 ^b ± 66,4 |
| 14 | 42 | 105,1 ^f ± 21,8 |
| 15 | 44 | 410,2 ^a ± 38,0 |
| 16 | 45 | 390,9 ^a ± 24,3 |
| 17 | 47 | 340,0 ^b ± 57,3 |
| 18 | 51 | 309,4 ^{bc} ± 28,0 |
| 19 | 52 | 246,0 ^{de} ± 31,2 |
| 20 | 54 | 75,2 ^f ± 13,8 |

**Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.*

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



Hình 3.29. Hệ sợi của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000253 sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA (thước 1 cm, số trong mỗi hình là mã dòng đơn bội)

3.3.2.4. Khảo sát các dòng của chủng ABI-F000224

Tốc độ lan tở của 20 dòng đơn bội của chủng ABI-F000224 trên môi trường PDA sau 10 ngày được trình bày được trình bày ở Bảng 3.14 và Hình 3.30.

Bảng 3.14. Tốc độ lan tở trên môi trường PDA ($\text{mm}^2/\text{ngày}$) các dòng đơn bội của chủng ABI-F000224

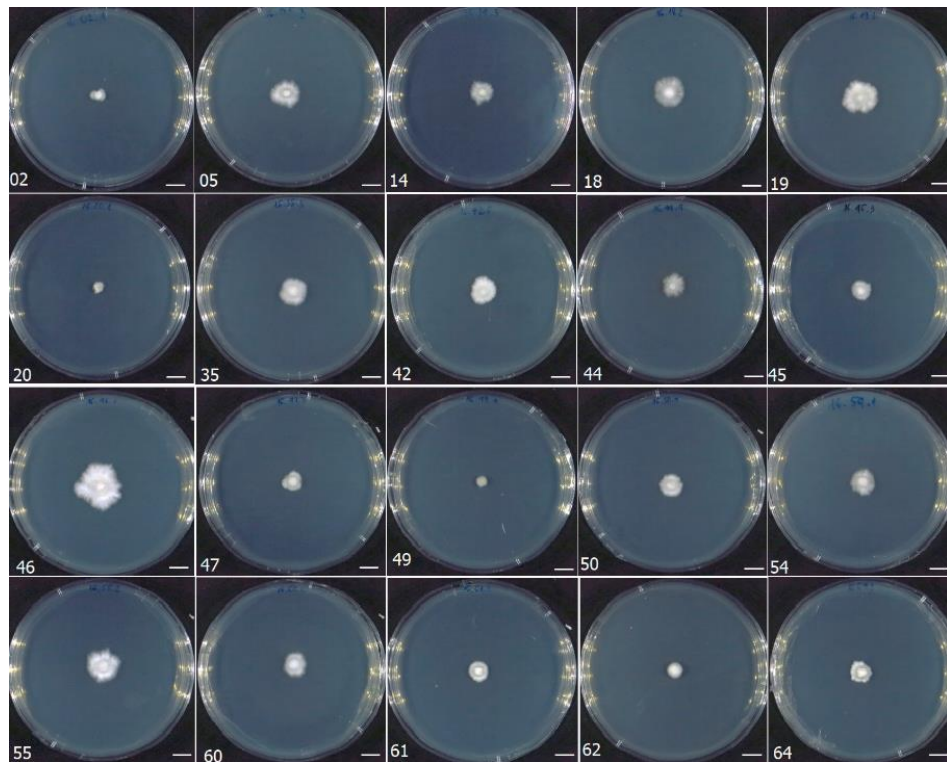
| STT | Mã dòng | Tốc độ lan tở ($\text{mm}^2/\text{ngày}$) |
|-----|---------|---|
| 1 | 02 | $9,3^{hi} \pm 1,6$ |
| 2 | 05 | $17,0^{cd} \pm 5,3$ |
| 3 | 14 | $12,4^{efgh} \pm 1,7$ |
| 4 | 18 | $19,8^c \pm 1,0$ |
| 5 | 19 | $24,1^b \pm 3,1$ |
| 6 | 20 | $5,5^{jk} \pm 0,1$ |
| 7 | 35 | $16,7^{cd} \pm 0,8$ |
| 8 | 42 | $16,1^{cde} \pm 4,1$ |
| 9 | 44 | $11,7^{fgh} \pm 0,7$ |
| 10 | 45 | $9,5^{hi} \pm 0,6$ |
| 11 | 46 | $50,7^a \pm 5,1$ |
| 12 | 47 | $6,7^{ij} \pm 1,6$ |
| 13 | 49 | $2,7^k \pm 0,3$ |
| 14 | 50 | $13,5^{defg} \pm 2,8$ |
| 15 | 54 | $10,7^{gh} \pm 0,9$ |
| 16 | 55 | $25,3^b \pm 4,1$ |
| 17 | 60 | $13,9^{defg} \pm 1,2$ |

Bảng 3.14. Tốc độ lan tơ trên môi trường PDA (mm²/ngày) các dòng đơn bội của chủng ABI-F000224 (tiếp theo)

| STT | Mã dòng | Tốc độ lan tơ (mm ² /ngày) |
|-----|---------|---------------------------------------|
| 18 | 61 | 14,7 ^{def} ± 1,6 |
| 19 | 62 | 5,5 ^{jk} ± 0,7 |
| 20 | 64 | 9,6 ^{hi} ± 1,5 |

**Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.*

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



Hình 3.30. Hệ sợi của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000224 sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA (thước 1 cm, số trong mỗi hình là mã dòng đơn bội)

Trong nghiên cứu này biến thiên tốc độ của các dòng đơn bội trong chủng bào ngư xám tương đối giống nhau: ABI-F000241 từ 15,8 – 428,8 mm²/ngày; ABI-F000252 từ 26,9 – 399,2 mm²/ngày; ABI-F000253 từ 75,2 – 410,8 mm²/ngày. Nghiên cứu này cũng ghi nhận tốc độ lan tơ của các dòng đơn bội của các chủng bào ngư xám nhanh hơn tốc độ các dòng bào chủng nấm ngư trắng. Một số tác giả cũng công bố tốc độ lan tơ của các dòng đơn bội nấm bào ngư. Dòng đơn bội nấm *P. ostreatus* được ghi nhận có tốc độ lan tơ khác nhau trong một số nghiên cứu: 2,5 – 6,1 mm²/ngày

[223]; 1,1 - 5,0 mm/ngày [230]; 3,4 mm/ngày [231]. Tuy nhiên các nghiên cứu trên không đủ thông tin (thử nghiệm trên Petri nhưng đo lan tơ theo chiều dài từng ngày) để so sánh đối chiếu với nhau và với nghiên cứu này.

Các dòng đơn bội có tốc độ lan tơ và hình thái khác so với dòng bố mẹ song nhân của chúng. Các nghiên cứu khác cũng ghi nhận tương tự [60, 161, 223, 231]. Tuy nhiên chủng ABI-F000253 có nhiều dòng đơn bội có tốc độ lan tơ nhanh hơn chủng bố mẹ. Dòng song nhân của chủng ABI-F000241 có tốc độ lan tơ 752,8 mm²/ngày; ABI-F000252 có tốc độ lan tơ 726,8 mm²/ngày; ABI-F000253 có tốc độ lan tơ 284,9 mm²/ngày; ABI-F000224 có tốc độ lan tơ 414,9 mm²/ngày (Nội dung 2).

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

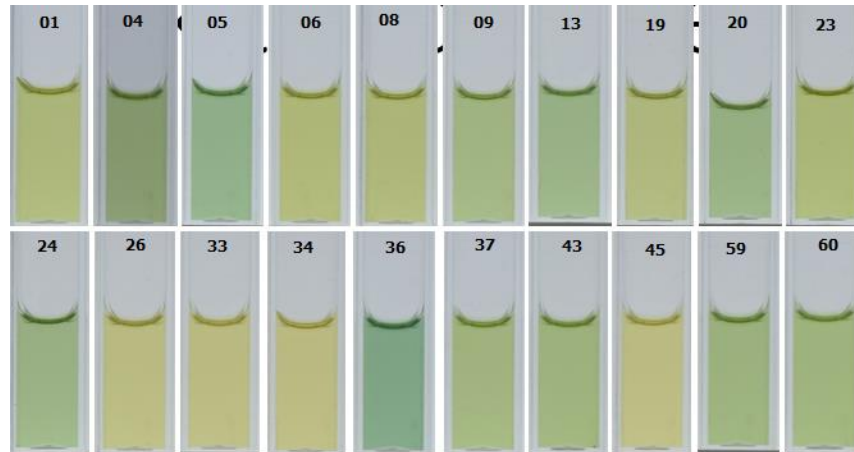
3.3.3.1. Khảo sát các dòng của chủng nấm ABI-F000241

Sau 4 ngày theo dõi kết quả tỉ lệ chuyển hóa của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000241 được trình bày ở Bảng 3.15 và Hình 3.31.

Bảng 3.15. Tỉ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000241

| STT | Dòng đơn bội | Tỉ lệ chuyển hóa (%) |
|-----|--------------|------------------------------|
| 1 | 01 | 58,83 ^{bcd} ± 11,17 |
| 2 | 04 | 46,63 ^{efg} ± 5,23 |
| 3 | 05 | 29,02 ^h ± 5,38 |
| 4 | 06 | 58,43 ^{bcd} ± 12,69 |
| 5 | 08 | 56,59 ^{bcd} ± 12,22 |
| 6 | 09 | 52,55 ^{def} ± 3,61 |
| 7 | 13 | 34,43 ^{gh} ± 16,04 |
| 8 | 19 | 67,76 ^b ± 1,53 |
| 9 | 20 | 39,49 ^{fgh} ± 7,31 |
| 10 | 23 | 67,26 ^b ± 3,07 |
| 11 | 24 | 40,35 ^{fgh} ± 21,06 |
| 12 | 26 | 85,29 ^a ± 1,85 |
| 13 | 33 | 87,57 ^a ± 4,67 |
| 14 | 34 | 88,16 ^a ± 2,31 |
| 15 | 36 | 11,23 ⁱ ± 2,82 |
| 16 | 37 | 52,75 ^{def} ± 15,60 |
| 17 | 43 | 51,53 ^{def} ± 10,32 |
| 18 | 45 | 89,54 ^a ± 2,72 |
| 19 | 59 | 58,78 ^{bcd} ± 19,44 |
| 20 | 60 | 61,92 ^{bc} ± 22,81 |

*Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.



Hình 3.31. Màu môi trường khi nuôi cấy của các dòng đơn bội chủng nấm bào ngư ABI-F000241 trên môi trường YBLB sau 4 ngày (số trong mỗi hình là mã dòng đơn bội)

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

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

Sau 4 ngày theo dõi kết quả tỉ lệ chuyển hóa của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000252 được trình bày ở Bảng 3.16 và Hình 3.32.

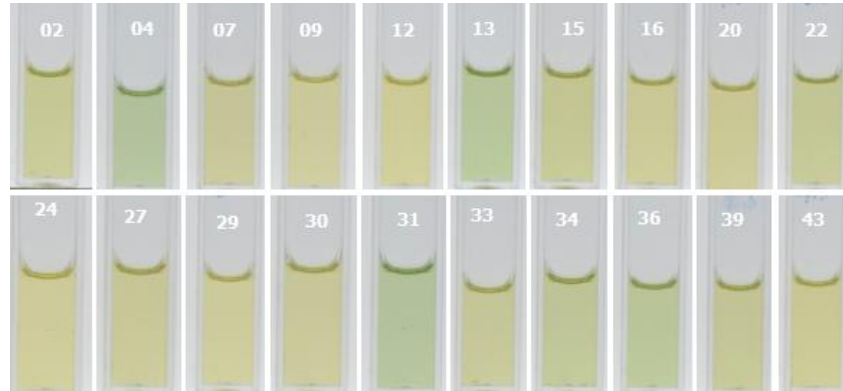
Bảng 3.16. Tỉ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000252

| STT | Dòng đơn bội | Tỉ lệ chuyển hóa (%) |
|-----|--------------|-------------------------------|
| 1 | 02 | 67,54 ^{cde} ± 14,41 |
| 2 | 04 | 20,96 ^k ± 1,98 |
| 3 | 07 | 50,42 ^{fgh} ± 5,82 |
| 4 | 09 | 80,48 ^{abc} ± 3,45 |
| 5 | 12 | 83,46 ^{ab} ± 2,39 |
| 6 | 13 | 19,72 ^k ± 3,56 |
| 7 | 15 | 39,79 ^h ± 26,96 |
| 8 | 16 | 79,58 ^{abc} ± 4,52 |
| 9 | 20 | 73,93 ^{abcd} ± 13,23 |
| 10 | 22 | 57,72 ^{efg} ± 5,22 |
| 11 | 24 | 87,02 ^a ± 6,33 |
| 12 | 27 | 71,31 ^{bcd} ± 6,10 |
| 13 | 29 | 85,03 ^{ab} ± 4,05 |
| 14 | 30 | 76,02 ^{abcd} ± 5,96 |
| 15 | 31 | 20,94 ^k ± 13,49 |
| 16 | 33 | 63,04 ^{def} ± 5,55 |
| 17 | 34 | 37,17 ^h ± 13,16 |
| 18 | 36 | 37,17 ^h ± 12,46 |

Bảng 3.16. Tỷ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000252 (tiếp theo)

| STT | Dòng đơn bội | Tỷ lệ chuyển hóa (%) |
|-----|--------------|-----------------------------|
| 19 | 39 | 48,82 ^{gh} ± 10,26 |
| 20 | 43 | 84,42 ^{ab} ± 4,62 |

*Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.



Hình 3.32. Màu môi trường khi nuôi cấy của các dòng đơn bội chủng nấm bào ngư ABI-F000252 trên môi trường YBLB sau 4 ngày (số trong mỗi hình là mã dòng đơn bội)

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

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

Sau 4 ngày theo dõi kết quả tỷ lệ chuyển hóa của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000253 được trình bày ở Bảng 3.17 và Hình 3.33.

Bảng 3.17. Tỷ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000253

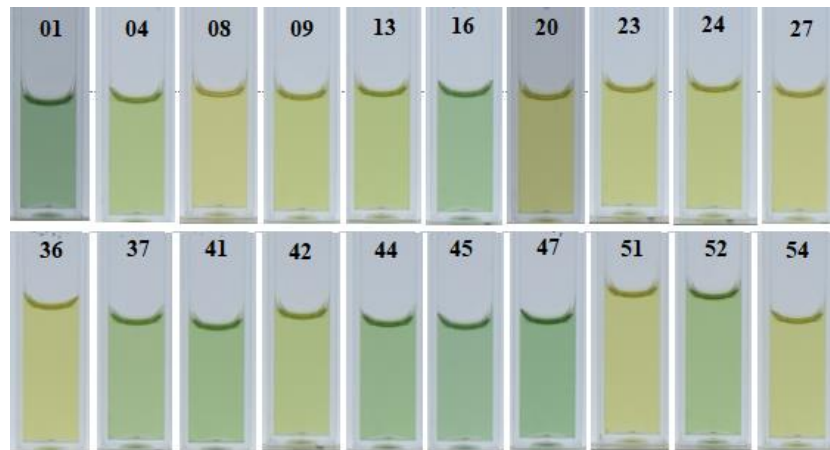
| STT | Dòng đơn bội | Tỷ lệ chuyển hóa (%) |
|-----|--------------|---------------------------------|
| 1 | 01 | 41,17 ^{gh} ± 26,80 |
| 2 | 04 | 49,78 ^{efgh} ± 17,67 |
| 3 | 08 | 86,97 ^a ± 9,28 |
| 4 | 09 | 67,32 ^{abcdef} ± 19,74 |
| 5 | 13 | 72,41 ^{abcde} ± 17,06 |
| 6 | 16 | 55,38 ^{defg} ± 19,08 |
| 7 | 20 | 60,51 ^{bcdefg} ± 27,26 |
| 8 | 23 | 78,01 ^{abcd} ± 18,75 |
| 9 | 24 | 74,83 ^{abcd} ± 15,48 |
| 10 | 27 | 86,93 ^a ± 2,78 |

Bảng 3.17. Tỷ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000253 (tiếp theo)

| STT | Dòng đơn bội | Tỷ lệ chuyển hóa (%) |
|-----|--------------|--------------------------------|
| 11 | 36 | 81,02 ^{abc} ± 13,96 |
| 12 | 37 | 48,49 ^{fgh} ± 14,48 |
| 13 | 41 | 59,22 ^{cdefg} ± 19,92 |
| 14 | 42 | 48,10 ^{fgh} ± 7,12 |
| 15 | 44 | 30,04 ^{hi} ± 12,44 |
| 16 | 45 | 14,78 ⁱ ± 8,85 |
| 17 | 47 | 14,29 ⁱ ± 4,66 |
| 18 | 51 | 73,58 ^{abcde} ± 2,57 |
| 19 | 52 | 70,26 ^{abcdef} ± 3,35 |
| 20 | 54 | 83,46 ^{ab} ± 2,69 |

**Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.*

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



Hình 3.33. Màu môi trường khi nuôi cấy của các dòng đơn bội chủng nấm bào ngư ABI-F000253 trên môi trường YBLB sau 4 ngày (số trong mỗi hình là mã dòng đơn bội)

3.3.3.4. Khảo sát dòng của chủng nấm ABI-F000224

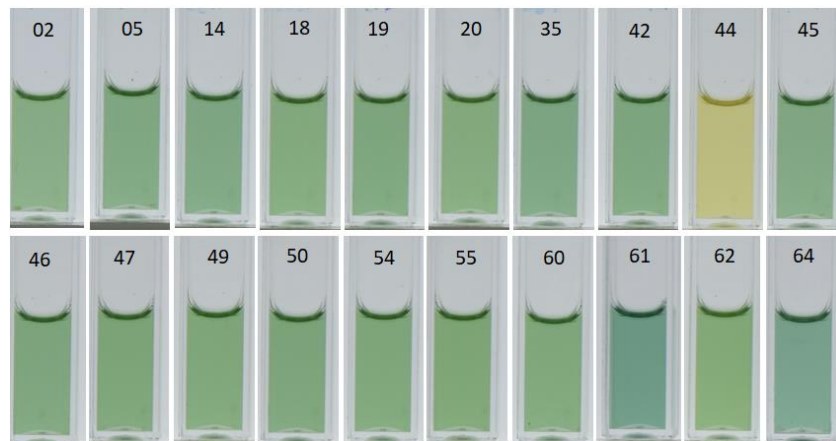
Sau 4 ngày theo dõi kết quả tỷ lệ chuyển hóa của các dòng đơn bội của chủng ABI-F000224 được trình bày ở Bảng 3.18 và Hình 3.34.

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

Bảng 3.18. Tỷ lệ chuyển hóa trên môi trường YBLB của các dòng đơn bội của chủng nấm ABI-F000224

| STT | Dòng đơn bội | Tỷ lệ chuyển hóa (%) |
|-----|--------------|------------------------------|
| 1 | 02 | 28,67 ^c ± 4,40 |
| 2 | 05 | 13,14 ^{efg} ± 1,08 |
| 3 | 14 | 8,83 ^g ± 3,63 |
| 4 | 18 | 21,11 ^{cde} ± 1,44 |
| 5 | 19 | 13,85 ^{defg} ± 2,24 |
| 6 | 20 | 28,60 ^c ± 9,25 |
| 7 | 35 | 11,59 ^{fg} ± 4,60 |
| 8 | 42 | 14,37 ^{defg} ± 2,91 |
| 9 | 44 | 81,63 ^a ± 6,29 |
| 10 | 45 | 22,13 ^{cd} ± 5,17 |
| 11 | 46 | 14,65 ^{defg} ± 4,45 |
| 12 | 47 | 15,43 ^{defg} ± 0,88 |
| 13 | 49 | 19,66 ^{def} ± 8,21 |
| 14 | 50 | 13,51 ^{efg} ± 1,63 |
| 15 | 54 | 14,19 ^{defg} ± 3,11 |
| 16 | 55 | 16,93 ^{defg} ± 5,91 |
| 17 | 60 | 36,57 ^b ± 4,06 |
| 18 | 61 | 10,12 ^g ± 1,26 |
| 19 | 62 | 39,42 ^b ± 9,20 |
| 20 | 64 | 9,86 ^g ± 3,90 |

*Các mẫu tự khác nhau biểu diễn mức độ sai biệt có ý nghĩa (theo cột) ở độ tin cậy 95%.



Hình 3.34. Màu môi trường khi nuôi cấy của các dòng đơn bội chủng nấm bào ngư ABI-F000224 trên môi trường YBLB sau 4 ngày (số trong mỗi hình là mã dòng đơn bội)

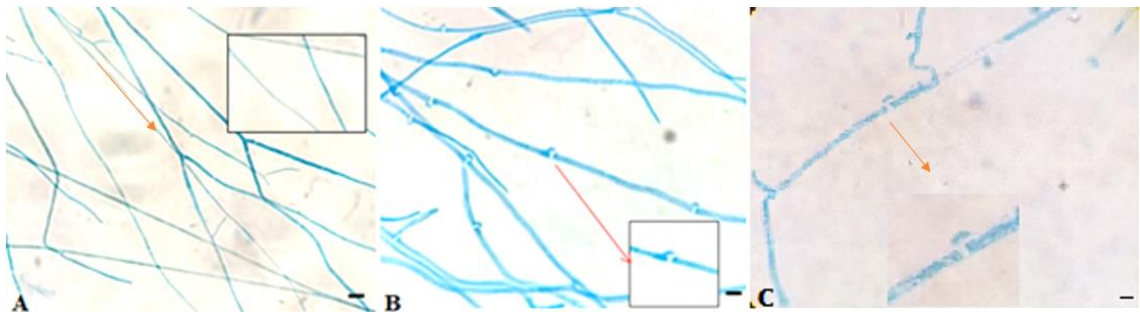
Nhìn chung, các dòng đơn bội của các chủng nấm bào ngư xám có tỷ lệ chuyển hóa cao hơn các dòng đơn bội của các chủng nấm bào ngư trắng và so với chủng song nhân của bố mẹ tỷ lệ chuyển hóa của dòng đơn bội không có khác biệt lớn. Chuyển

hóa dòng song nhân chủng được ghi nhận ở phần trước như sau: ABI-F000241: 30,32%; ABI-F000252: 59,72%; ABI-F000253: 49,79%; ABI-F000224: 51,79%. Kết quả xác định tỉ lệ chuyển hóa cho thấy các dòng đơn bội này phù hợp trong giữ giống và làm vật liệu ban đầu cho các nghiên cứu lai tạo giống nấm.

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

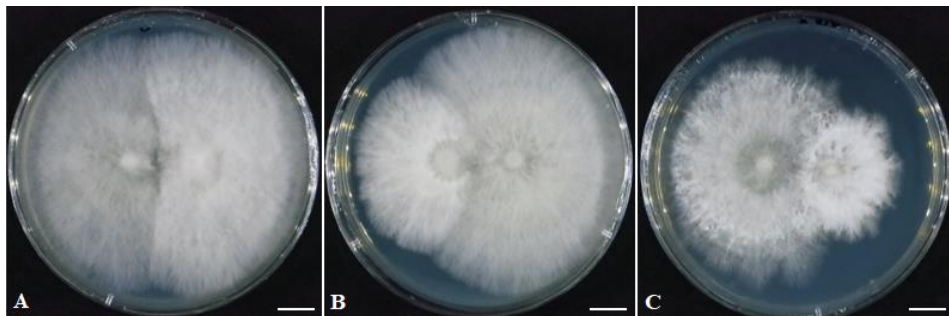
3.3.4.1. Xác định kiểu bắt cặp riêng các chủng nấm

Việc phân nhóm di truyền bắt cặp các dòng đơn bội mỗi chủng nấm được xác định theo kết quả các phép lai ngẫu nhiên giữa các dòng đơn bội. Kết quả của các phép lai nhận thấy có 3 dạng hình thái sợi nấm của phép lai: sợi nấm không có mấu nối, sợi nấm có mấu nối hoàn chỉnh và sợi nấm có mấu nối giả (có mấu nối nhưng mấu nối không dung hợp với tế bào liền kề) (Hình 3.35). Hình thái hệ sợi nấm tại rìa tiếp xúc của hai khuẩn lạc được ghi nhận có ba dạng: dạng ranh giới, dạng bao phủ và dạng đường viền (Hình 3.36).



Hình 3.35. Các dạng hình thái của cấu trúc mấu nối

A: Hệ sợi nấm không có mấu nối; B: Mấu nối hoàn chỉnh; B: Mấu nối giả



Hình 3.36. Các dạng hình thái hệ sợi nấm tại rìa tiếp xúc

(A)- Dạng ranh giới, (B)- Dạng bao phủ, (C)- Dạng đường viền

Các dạng hình thái trong nghiên cứu này cũng tương tự với một số công bố [60]. Một số tác giả khác cũng ghi nhận hình thái hệ sợi nấm tại rìa tiếp xúc. Kiểu tiếp xúc giữa các dòng đơn bội nấm *P. ostreatus* không hình thành mấu nối được mô tả bao gồm: bao phủ (surrounding), dạng ranh giới (borderline), dạng ngăn cách

(barrage) [160]. Tuy nhiên dạng hình thái có sự hình thành mấu nổi không được mô tả trong nghiên cứu này. Hình thái hệ sợi tại rìa tiếp xúc là phát triển mở rộng thì sẽ tương hợp (hình thành mấu nổi); nếu là dạng ngăn cách (barrage) và dạng bao phủ sẽ không hình thành mấu nổi cũng được mô tả trong một nghiên cứu khác [223].

Phân nhóm chủng nấm ABI-F000241

20 dòng đơn bội được phân nhóm như sau: nhóm A1B1 có 3 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 01, 05, 08); A1B2 có 5 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 04, 20, 26, 37, 60); nhóm A2B1 có 5 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 13, 19, 23, 36, 45); nhóm A2B2 có 7 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 06, 09, 24, 33, 34, 43, 59). Chi tiết kết quả được trình bày trong Bảng 3.19.

Bảng 3.19. Kết quả phân nhóm các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000241

| | | A ₁ B ₁ | A ₁ B ₂ | A ₂ B ₁ | A ₂ B ₂ |
|-------------------------------|-------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 01 05 08 | 04 20 26 37 60 | 13 19 23 36 45 | 06 09 24 33 34 43 59 |
| A ₁ B ₁ | 01 05 | - - - | - - - | (+) (+) (+) | + + + |
| | 08 | - - - | - - - | (+) (+) (+) | + + + |
| A ₁ B ₂ | 04 20 | - - - | - - - | + + + | (+)(+)(+) |
| | 26 37 | - - - | - - - | + + + | (+)(+)(+) |
| | 60 | - - - | - - - | + + + | (+)(+)(+) |
| A ₂ B ₁ | 13 19 | (+)(+)(+) | + + + | - - - | - - - |
| | 23 36 | (+)(+)(+) | + + + | - - - | - - - |
| | 45 | (+)(+)(+) | + + + | - - - | - - - |
| A ₂ B ₂ | 06 09 | + + + | (+) (+) (+) | - - - | - - - |
| | 24 33 | + + + | (+) (+) (+) | - - - | - - - |
| | 43 59 | + + + | (+) (+) (+) | - - - | - - - |

*Ghi chú: +: hình thành mấu nổi hoàn chỉnh; (+): hình thành mấu nổi giả;
-: không hình thành mấu nổi*

Phân nhóm chủng nấm ABI-F000252

20 dòng đơn bội được phân nhóm như sau: nhóm A1B1 có 8 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 02, 04, 12, 13, 15, 20, 22, 24); A1B2 có 2 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 27, 29); nhóm A2B1 có 5 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 07, 09, 31, 39, 43); nhóm A2B2 có 5 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 16, 30, 34, 33, 36). Chi tiết kết quả được trình bày trong Bảng 3.20.

Bảng 3.20. Kết quả phân nhóm các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000252

| | | A₁B₁ | A₁B₂ | A₂B₁ | A₂B₂ |
|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | | 02 04 12 13 15 20 22 24 | 27 29 | 07 09 31 39 43 | 16 30 34 33 36 |
| A₁B₁ | 02 04 | - - - | - - | (+) (+) (+) | + + + |
| | 12 13 | - - - | - - | (+) (+) (+) | + + + |
| | 15 20 | - - - | - - | (+) (+) (+) | + + + |
| | 22 24 | - - - | - - | (+) (+) (+) | + + + |
| A₁B₂ | 27 29 | - - - | - - | + + + | (+)(+)(+) |
| A₂B₁ | 07 09 | (+) (+) (+) | + + | - - - | - - - |
| | 31 39 | (+) (+) (+) | + + | - - - | - - - |
| | 43 | (+) (+) (+) | + + | - - - | - - - |
| A₂B₂ | 16 30 | + + + | (+) (+) | - - - | - - - |
| | 33 34 | + + + | (+) (+) | - - - | - - - |
| | 36 | + + + | (+) (+) | - - - | - - - |

*Ghi chú: +: hình thành mấu nổi hoàn chỉnh; (+): hình thành mấu nổi giả;
-: không hình thành mấu nổi*

Phân nhóm chủng nấm ABI-F000253

20 dòng đơn bội được phân nhóm như sau: nhóm A1B1 có 5 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 04, 08, 09, 36, 54); nhóm A1B2 có 5 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 01, 20, 23, 24, 37); nhóm A2B1 có 6 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 16, 41, 42, 44, 47, 52); nhóm A2B2 có 4 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 13, 27, 45; 51). Chi tiết kết quả được trình bày trong Bảng 3.21.

Bảng 3.21. Kết quả phân nhóm các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000253

| | | A₁B₁ | A₁B₂ | A₂B₁ | A₂B₂ |
|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | | 04 08 09 36 54 | 01 20 23 24 37 | 16 41 42 44 47 52 | 13 27 45 51 |
| A₁B₁ | 04 08 | - - - | - - - | (+) (+) (+) | + + + |
| | 09 36 | - - - | - - - | (+) (+) (+) | + + + |
| | 54 | - - - | - - - | (+) (+) (+) | + + + |
| A₁B₂ | 01 20 | - - - | - - - | + + + | (+) (+) (+) |
| | 23 24 | - - - | - - - | + + + | (+) (+) (+) |
| | 37 | - - - | - - - | + + + | (+) (+) (+) |
| A₂B₁ | 16 41 | (+) (+) (+) | + + + | - - - | - - - |
| | 42 44 | (+) (+) (+) | + + + | - - - | - - - |
| | 47 52 | (+) (+) (+) | + + + | - - - | - - - |
| A₂B₂ | 13 27 | + + + | (+)(+)(+) | - - - | - - - |
| | 45 51 | + + + | (+)(+)(+) | - - - | - - - |

Ghi chú: +: hình thành mấu nối hoàn chỉnh; (+): hình thành mấu nối giả;
-: không hình thành mấu nối

Phân nhóm chủng nấm ABI-F000224

20 dòng đơn bội được phân nhóm như sau: nhóm A1B1 có 2 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 20; 42); nhóm A1B2 có 10 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 02; 05; 19; 35; 44; 47; 49; 54; 55; 62); nhóm A2B1 có 1 dòng (dòng đánh số thứ tự: 18). A2B2 có 7 dòng (các dòng đánh số thứ tự: 14; 45; 46; 50; 60; 61; 64). Chi tiết kết quả được trình bày trong Bảng 3.22.

Bảng 3.22. Kết quả phân nhóm các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000224

| | | A₁B₁ | A₁B₂ | A₂B₁ | A₂B₂ |
|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | | 20 42 | 02 05 19 35 44 47 49 54 55 62 | 18 | 14 45 46 50 60 61 64 |
| A₁B₁ | 20 42 | - - | - - | (+) | + + + + |
| A₁B₂ | 02 05 19 | - - | - - - | + | (+)(+)(+) (+) |
| | 35 44 47 | - - | - - - | + | (+)(+)(+) (+) |
| | 49 54 55 | - - | - - - | + | (+)(+)(+) (+) |
| | 62 | - - | - - - | + | (+)(+)(+) (+) |
| A₂B₁ | 18 | (+) (+) | + + + | - | - - - - |
| A₂B₂ | 14 45 46 | + + | (+) (+) (+) | - | - - - - |
| | 50 60 61 | + + | (+) (+) (+) | - | - - - - |
| | 64 | + + | (+) (+) (+) | - | - - - - |

Ghi chú: +: hình thành mẫu nổi hoàn chỉnh; (+): hình thành mẫu nổi giả;
-: không hình thành mẫu nổi

Kết quả bắt cặp giữa các dòng đơn bội của 3 chủng nấm bào ngư xám: ABI-F000241, ABI-F000252, ABI-F000253 (loài *P. pulmonarius*) và chủng nấm bào ngư trắng ABI-F000224 (loài *P. ostreatus*) đều tuân theo qui tắc di truyền của các loài dị tản tứ cực. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu về di truyền giới tính của các loài nấm *P. pulmonarius* và *P. ostreatus* trong các nghiên cứu khác [230]. 23 dòng đơn bội nấm *P. ostreatus* đã được phân thành 4 dòng AxBx, 6 dòng AxBy, 5 dòng AyBx và 8 dòng AyBy [223]. 120 dòng đơn bội của 3 chủng nấm bào ngư thu thập tại Nam Bộ cũng ghi nhận các kiểu di truyền bắt cặp tương tự [60].

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

Để xác định số lượng alen các nhân tố A và B của các dòng đơn bội của 3 chủng nấm bào ngư xám, 1 dòng của một nhóm di truyền bắt cặp của mỗi chủng nấm được chọn và cho lai chéo với nhau. Kết quả của các phép lai chéo được trình bày trong Bảng 3.23.

Bảng 3.23. Kết quả các phép lai chéo các chủng nấm bào ngư xám

| Dòng | 241. 08 | 241. 26 | 241. 13 | 241. 24 | 252. 02 | 252. 29 | 252. 31 | 252. 16 |
|--------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 241.08 | | | | | - | - | - | + |
| 241.26 | | | | | - | - | + | - |
| 241.13 | | | | | - | + | - | - |
| 241.24 | | | | | + | - | - | - |
| 252.02 | | | | | | | | |
| 252.29 | | | | | | | | |
| 252.31 | | | | | | | | |
| 252.16 | | | | | | | | |
| 253.08 | - | - | + | - | - | - | + | - |
| 253.23 | - | - | - | + | - | - | - | + |
| 253.16 | + | - | - | - | + | - | - | - |
| 253.27 | - | + | - | - | - | + | - | - |

Theo kết quả các phép lai chéo, 3 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. Ba chủng của nấm *P. pulmonarius* đề tài thu thập cùng chung nhân tố quy định di truyền bắt cặp, do vậy 3 chủng này có thể cùng nguồn gốc giống ban đầu. Điều này phản ánh đúng tình trạng giống nấm bào ngư hiện tại là có thể giống thương mại ban đầu xuất phát tại một cơ sở. Tuy nhiên sau khi mua bán, trao đổi... giống gốc, bịch phôi xuất hiện thêm các tên giống gắn với địa phương khác nhau mặc dù về mặt nguồn gốc và đặc tính di truyền là một. Bên cạnh đó kết hợp kết quả ở các Bảng 3.19, 3.20, 3.21, 3.23 được tổng hợp kiểu di truyền bắt cặp của 60 dòng đơn bội của 3 chủng nấm bào ngư xám (4 kiểu AxBx, AxBy, AyBx, AyBy) ở Bảng 3.24. Dựa vào bảng này có thể chọn được tổ hợp lai tạo mẫu (có dòng song nhân tương hợp tạo quả thể) của tất cả các dòng đơn bội của 3 chủng bào ngư xám trong công tác lai tạo giống sau này.

Bảng 3.24. Tổng hợp kiểu di truyền bất cặp của 60 dòng đơn bội của 3 chủng nấm bào ngư xám

| Chủng Kiểu di truyền | ABI-F000241 | ABI-F000252 | ABI-F000253 |
|---------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| AxBx | 01; 05; 08 | 02; 04; 12; 13; 15; 20; 22; 24 | 01; 20; 23; 24; 37 |
| AxBy | 04; 20; 26; 37; 60 | 27; 29 | 04; 08; 09; 36; 54 |
| AyBx | 13; 19; 23; 36; 45 | 07; 09; 31; 39; 43 | 16; 41; 42; 44; 47; 52 |
| AyBy | 06; 09; 24; 33; 34; 43; 59 | 16; 30; 34; 33; 36 | 13; 27; 45; 51 |

Một số tác giả cũng công bố về số alen các nhân tố di truyền bất cặp của nấm bào ngư. Ít nhất 63 alen A và 190 alen B của loài *P. ostreatus* đã được ghi nhận [232]. Trong một nghiên cứu khác, loài *P. ostreatus* được ước tính có 126 alen A và 354 alen B [233]. Loài *P. pulmonarius* được ghi nhận có 30 alen A và 90 alen B [204], trong khi loài *P. eryngii* ghi nhận có 16 alen A và 15 alen B [158]. Điều này chứng tỏ số lượng alen A và B sẽ rất lớn tùy theo số lượng chủng thu thập. Sự đa dạng càng cao, công tác tạo giống càng thuận lợi.

3.4. THỬ NGHIỆM PHÂN NHÓM KIỂU DI TRUYỀN BẤT 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

Nghiên cứu chọn 8 dòng đơn bội đại diện cho 4 kiểu di truyền bất cặp của nấm bào ngư xám chủng ABI-F000253: dòng 08 và 09 (kiểu A1B1), dòng 23 và 24 (kiểu A1B2), dòng 16 và 44 (kiểu A2B1), dòng 27 và 51 (kiểu A2B2). Các dòng này có tốc độ lan tở cao, thuận lợi cho quá trình thu nhận sinh khối để tách DNA.

Kết quả phân tích AFLP trên các dòng đơn bội của nấm bào ngư xám của chủng ABI-F000253 cho thấy 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% (Bảng 3.25). Kết quả xây dựng cây phả hệ UPGMA sử dụng 4 mỗi lần lượt chọn lọc 1, 2 và 3 nucleotide (G, GC, AAG, CAA) cho thấy các dòng nấm cùng một kiểu di truyền bất cặp có quan hệ di truyền gần nhau hơn so với các dòng khác kiểu di truyền (Hình 3.37).

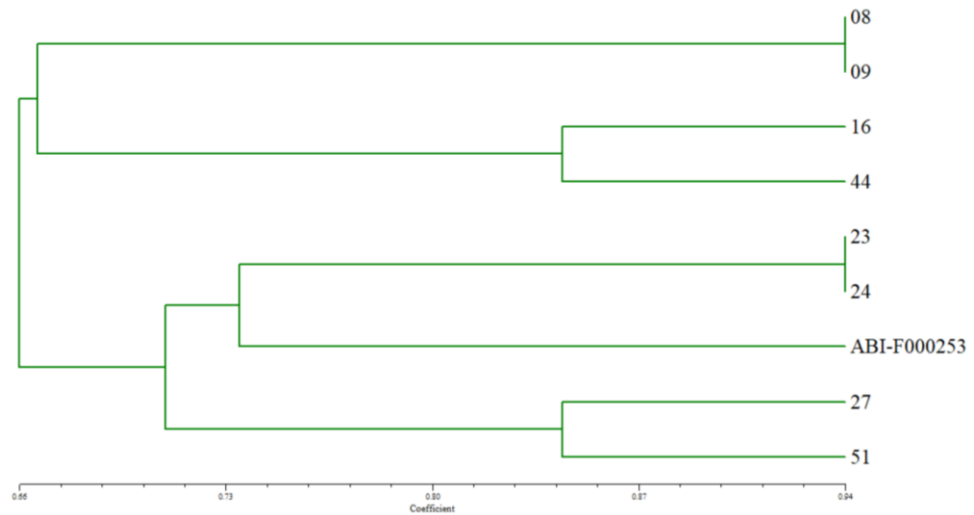
Mô hình cây phả hệ (Hình 3.37) chia các dòng đơn bội nấm làm 2 nhánh chính: nhánh 1 gồm các dòng có kiểu yếu tố di truyền bất cặp là B1: 08, 09 (kiểu A1B1), dòng 16 và 44 (kiểu A2B1). Trong nhánh này chia làm 2 phân nhánh: phân nhánh 1

là dòng 08, 09 (kiểu A1B1), hệ số tương đồng của hai mẫu này đạt 94%; phân nhánh 2 gồm dòng 16 và 44 (kiểu A2B1), hệ số tương đồng của hai mẫu này đạt 85%. Nhánh 2 gồm các dòng có kiểu yếu tố di truyền bắt cặp là B2: 23, 24 (kiểu A1B2), dòng 27 và 51 (kiểu A2B2). Trong nhánh này chia làm 2 phân nhánh: phân nhánh 1 là 2 dòng 23, 24 (kiểu A1B2), hệ số tương đồng của hai mẫu này đạt 94%, 2 dòng này cũng nằm chung phân nhánh cùng chủng bố mẹ; phân nhánh 2 gồm dòng 27 và 51 (kiểu A2B2), hệ số tương đồng của hai mẫu này đạt 85% (Bảng 3.23). Tuy kết quả không có một vạch/số vạch đặc trưng cho từng kiểu di truyền bắt cặp do sự xuất hiện nhiều băng đa hình, nhưng kết quả AFLP giúp hỗ trợ khẳng định kết quả phân nhóm di truyền bắt cặp đã xác định ở trên (Hình 3.38, 3.39).

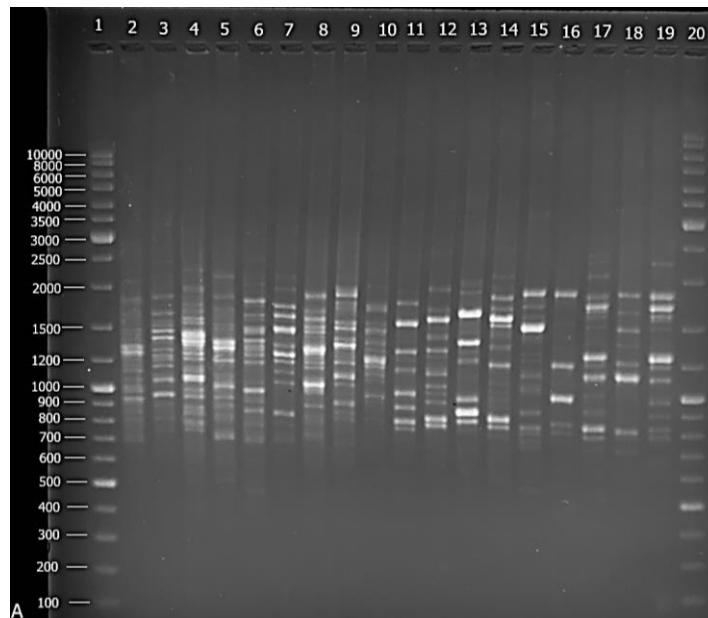
Một vài nghiên cứu khác cũng sử dụng marker sinh học phân tử phân tích đa dạng di truyền dòng đơn bội của nấm lớn. Phương pháp RAPD phân tích các dòng đơn bội loài *Stropharia rugoso-annulata* cho thấy những dòng đơn bội khác chủng bố mẹ ban đầu có độ đa dạng di truyền cao hơn các dòng cùng bố mẹ [234]. Sử dụng marker EST-SSR phân tích đa dạng di truyền 37 dòng đơn bội nấm *P. tuoliensis* cho thấy có sự đa dạng di truyền cao giữa các dòng đơn bội [169].

Bảng 3.25. Hệ số tương quan di truyền của các dòng đơn bội nấm bào ngư chủng ABI-F000253

| Dòng/ chủng | 08 | 09 | 23 | 24 | 16 | 44 | 27 | 51 | ABI- F000 253 |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------------------|
| 08 | 1,00 | | | | | | | | |
| 09 | 0,94 | 1,00 | | | | | | | |
| 23 | 0,71 | 0,71 | 1,00 | | | | | | |
| 24 | 0,65 | 0,68 | 0,94 | 1,00 | | | | | |
| 16 | 0,67 | 0,69 | 0,68 | 0,68 | 1,00 | | | | |
| 44 | 0,65 | 0,65 | 0,67 | 0,61 | 0,85 | 1,00 | | | |
| 27 | 0,61 | 0,61 | 0,76 | 0,79 | 0,67 | 0,65 | 1,00 | | |
| 51 | 0,65 | 0,63 | 0,69 | 0,65 | 0,63 | 0,69 | 0,85 | 1,00 | |
| ABI- F000253 | 0,67 | 0,67 | 0,76 | 0,71 | 0,69 | 0,65 | 0,72 | 0,65 | 1,00 |

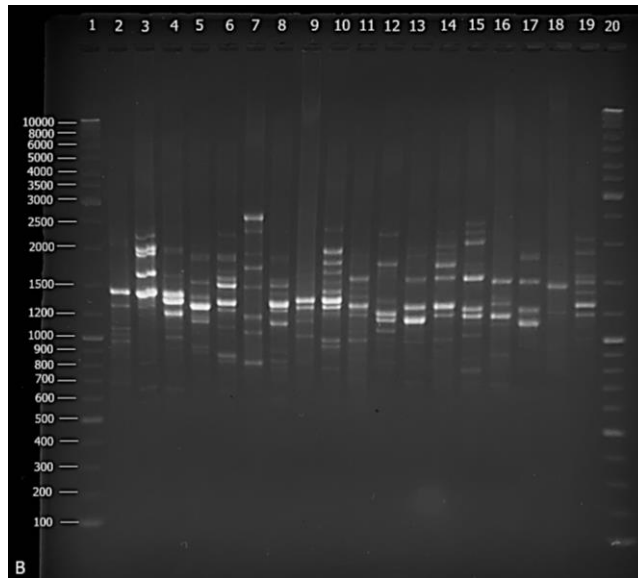


Hình 3.37. Cây UPGMA dựa trên đa dạng di truyền 4 marker AFLP các dòng đơn bội nấm bào ngư xám (Dòng 08 và 09: kiểu A1B1; dòng 16 và 44: kiểu A2B1; dòng 23 và 24: kiểu A1B2; dòng 27 và 51: kiểu A2B2).



Hình 3.38. Bản điện di trên gel agarose sử dụng môi chọn lọc G, GC

(1, 20: DNA marker; Từ 2-10: môi G. 2: dòng 08, 3: dòng 09; 4: dòng 23; 5: dòng 24; 6: dòng 16; 7: dòng 44; 8: dòng 27; 9: dòng 51; 10: chủng bố mẹ. Từ 11-19 môi GC: 11: dòng 08; 12: dòng 09; 13: dòng 23; 14: dòng 24; 15: dòng 16; 16: dòng 44; 17: dòng 27; 18: dòng 51; 19: chủng bố mẹ)



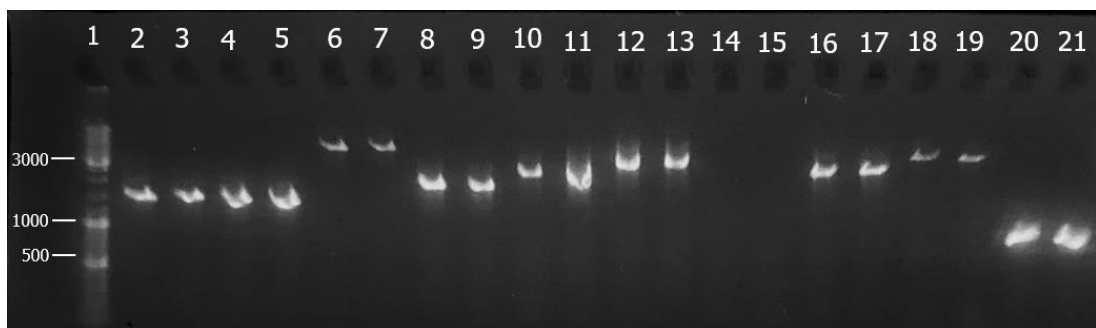
Hình 3.39. Bản điện di trên gel agarose sử dụng môi chọn lọc AAG, CAA

(1, 20: DNA marker; Từ 2-10: môi AAG. 2: dòng 08, 3: dòng 09; 4: dòng 23; 5: dòng 24; 6: dòng 16; 7: dòng 44; 8: dòng 27; 9: dòng 51; 10: chủng bố mẹ. Từ 11-19 môi CCA: 11: dòng 08; 12: dòng 09; 13: dòng 23; 14: dòng 24; 15: dòng 16; 16: dòng 44; 17: dòng 27; 18: dòng 51; 19: chủng bố mẹ)

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

3.4.2.1. 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 3.40). Như vậy độ đặc hiệu của các cặp môi ổn định đối với nấm đùi gà.



Hình 3.40. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 10 cặp môi đặc hiệu 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)

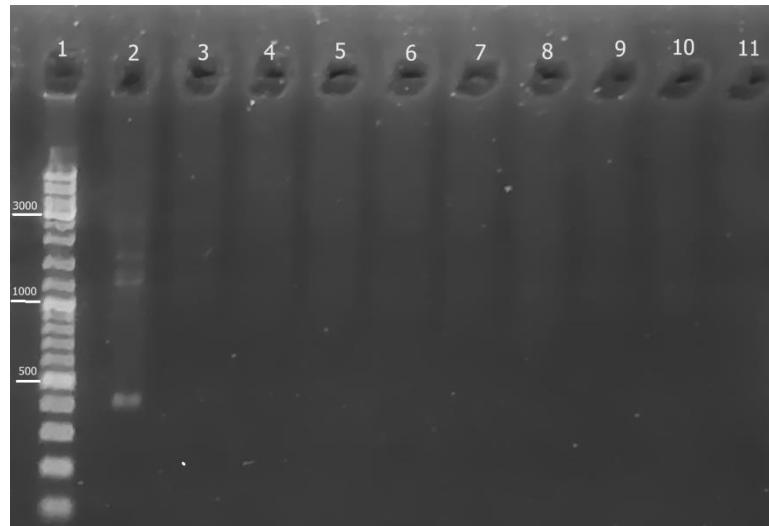
3.4.2.2. Đánh giá khả năng áp dụng của các cặp mồi với chủng nấm bào ngư xám *P. pulmonarius* trên dữ liệu sinh tin học

Độ đặc hiệu của 10 cặp mồi được đánh giá thông qua chương trình Blast với cơ sở genome của loài *P. pulmonarius* đã công bố trên NCBI (Accession code: GCA_012980535.1). Vị trí mồi có thể gắn được trên vùng có score cao nhất và số nucleotide lớn nhất mà mồi gắn được trên genome được trình bày trong Bảng 3.26.

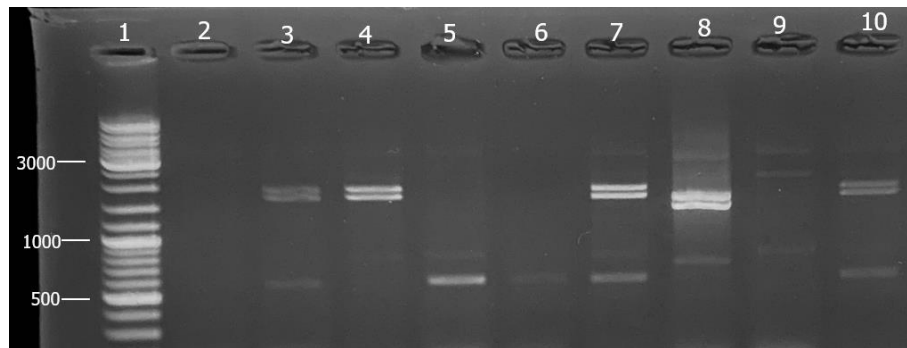
Kết quả Bảng 3.25 cho thấy không có đoạn trình tự phù hợp khi phân tích cả mồi xuôi và mồi ngược. Nếu chỉ phân tích từng mồi xuôi và mồi ngược cũng không có mồi nào phù hợp 100% trình tự. Như vậy các cặp mồi được sử dụng ở *P. eryngii* không đặc hiệu để khuếch đại đoạn trình tự chuyên biệt trên nấm *P. 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 mồi sử dụng (Hình 3.41-3.44).

Bảng 3.26. Tính đặc hiệu của 10 môi với chủng nấm bào ngư xám *P. pulmonarius* khi phân tích dữ liệu tin sinh học

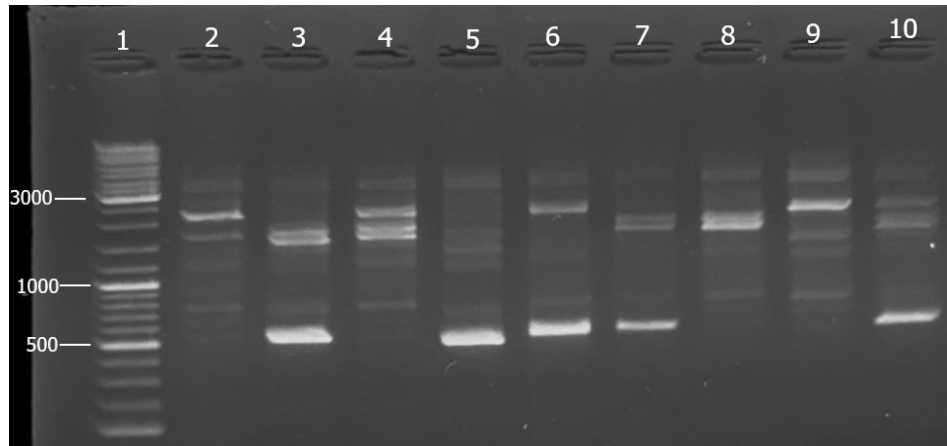
| Môi | Đoạn trình tự trên genome cặp môi có thể gắn được hoàn toàn | Số lượng NU tối đa môi gắn được/tổng số NU của môi | Trình tự môi (tô đậm và gạch dưới vị trí NU gắn được) | Thông tin gen (nếu có) của <i>P. pulmonarius</i> có thể liên quan đến môi |
|------------|---|--|---|---|
| 1F | Không có | 14/19 | <u>GGTGTGACATCCGCTGCGC</u> | KAF4599516 (gen EYR40_006610) |
| 1R | | 14/23 | <u>GGCATTCTTCGATGGGCGAGATT</u> | Chưa rõ gen |
| 2F | Không có | 14/22 | <u>CTGGAAGGATGACCGCTCCGAA</u> | Chưa rõ gen |
| 2R | | 15/24 | <u>CGCTTCGATTTCCTTTAGCAGACG</u> | KAF4608811.1 (gen CDC60) |
| 3F | Không có | 16/18 | <u>TGAAGGAGGCGGTGTAGA</u> | Chưa rõ gen |
| 3R | | 15/20 | <u>AGGAAGGTGTGCAATTGGGG</u> | Chưa rõ gen |
| 4F | Không có | 15/23 | <u>ATGGCTGATCCTCTTTATCCTCT</u> | KAF4587038 (gen EYR40_011059) |
| 4R | | 15/24 | <u>CGACAGATATGAAAGGTTTTGTGC</u> | Chưa rõ gen |
| 5F | Không có | 14/20 | <u>GACCTCACCTACCCACTGTA</u> | Chưa rõ gen |
| 5R | | 15/24 | <u>TCATATGGCTATGGCTACAGATTG</u> | Chưa rõ gen |
| 6F | Không có | 14/19 | <u>ATGGCCATCGAGCTACCCA</u> | Chưa rõ gen |
| 6R | | 16/22 | <u>CGAATGGATAAACGTTGGGCTG</u> | KAF4602008 (gen EYR40_005209) |
| 7F | Không có | 14/19 | <u>ATGCGTCCCGAGTTTGCC</u> | KAF4608899 (gen EYR40_001252) |
| 7R | | 15/19 | <u>CCTTCTGCTGATGCATGGC</u> | KAF4599029 (gen EYR40_006117) |
| 8F | Không có | 14/20 | <u>GACCTCACCTACCCACTGTA</u> | Chưa rõ gen |
| 8R | | 15/21 | <u>GCTACAGCGTGTTTTTCTGGG</u> | Chưa rõ gen |
| 9F | Không có | 14/27 | <u>CTCGTATTGTTTGAGACTCCGATTCC</u> | Chưa rõ gen |
| 9R | | 14/25 | <u>GAAAGTGGTATACCGTGGTATTCAT</u> | Chưa rõ gen |
| 10F | Không có | 14/23 | <u>GGCCACATGTATGAGATGAAGTA</u> | KAF4590665 (gen EYR40_009261) |
| 10R | | 15/24 | <u>TTCATCAATTCCGTTGTGTGGCAC</u> | Chưa rõ gen |



Hình 3.41. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các cặp mồi trên chủng nấm ABI-F000253 (giếng 1: DNA marker; giếng 2: mồi số 1; giếng 3: mồi số 2; giếng 4: mồi số 3; giếng 5: mồi số 4; giếng 6: mồi số 5; giếng 7: mồi số 6; giếng 8: mồi số 7; giếng 9: mồi số 8; giếng 10: mồi số 19; giếng 11: mồi số 10)

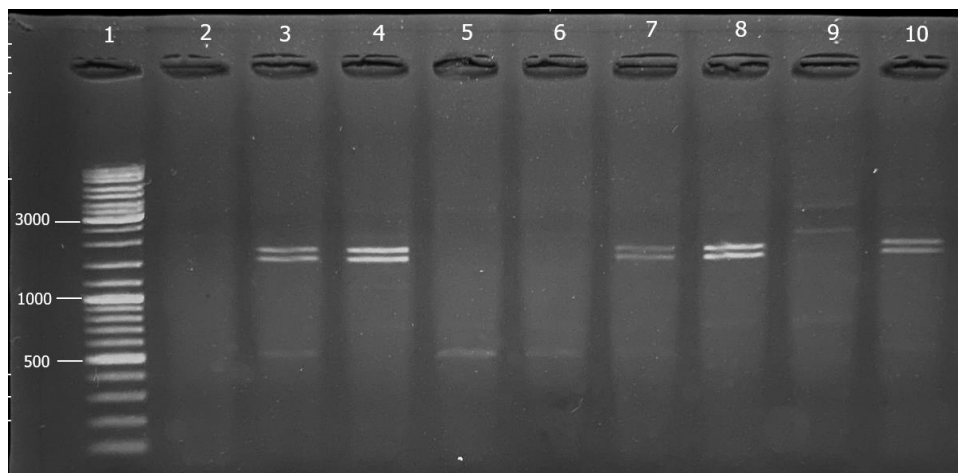


Hình 3.42. Kết quả điện di sản phẩm PCR của cặp mồi số 1 ở nhiệt độ bắt cặp 60 °C trên các dòng đơn bội chủng nấm ABI-F000253 và chủng bố mẹ (giếng 1: DNA marker, giếng 2: dòng 08, giếng 3: dòng 09, giếng 4: dòng 23, giếng 5: dòng 24, giếng 6: dòng 16, giếng 7: dòng 44, giếng 8: dòng 27, giếng 9: dòng 51, giếng 10: chủng bố mẹ: ABI-F000253)



Hình 3.43. 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

(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 3.44. 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

(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)

Hiện nay vẫn chưa có công bố sử dụng marker phân tử để sàng lọc kiểu di truyền bắt cặp trên nấm bào ngư xám *P. pulmonarius*. Các nghiên cứu khác cũng nhận thấy các cặp mồi chuyên biệt áp dụng được trên nấm đùi gà nhưng không phù hợp để áp dụng trên loài nấm bào ngư khác. Điều này có thể có sự khác biệt trong trình tự vùng gen quy định kiểu bắt cặp của các loài nấm bào ngư. RAPD – SCAR marker sử dụng cặp mồi chuyên biệt sàng lọc được vùng B3 của nấm *P. eryngii*, tuy

nhiên các cặp mồi này không áp dụng được cho các loài *P. florida*, *P. sajor-caju*, *P. salmoneostramineus*, *P. cornucopiae* và *P. ostreatus* [158]. SCAR marker sàng lọc được vùng A4 cho *P. eryngii*, tuy nhiên marker này không phát hiện được đối với loài *P. florida*, *P. sajor-caju*, *P. salmoneostramineus*, *P. cornucopiae* và *P. ostreatus* [167]. Do vậy, trong tương lai cần phát triển các cặp mồi đặc hiệu để có thể sàng lọc kiểu di truyền bắt cặp các dòng đơn bội của nấm bào ngư xám.

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 yên 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 trên 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 tổ 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 bằng một số cặp mồi 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.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ 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.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Năng Vịnh, 2020, *Báo cáo kết quả tự đánh giá nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp quốc gia: Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng một số vật liệu mới (chất hấp thụ, hạt cải tạo và vải địa kỹ thuật) từ phế phụ phẩm mía đường và lúa để nâng cao giá trị gia tăng và phục vụ nông nghiệp bền vững, Chương trình Nghị định thư với Cộng hòa Liên bang Đức.*
2. FAOSTAT, (2023, 12/01), Value of Agricultural Production. Available: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>.
3. Royse D.J., Baars J., Tan Q., (2017), Current overview of mushroom production in the world, in *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications*, Diego, C.Z., Pardo-Giménez, A., Eds. John Wiley & Sons, India.
4. Cohen R., Persky L., Hadar Y., 2002, Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), pp. 582–594.
5. Chang S.-T., Miles P.G., 2004, *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*, CRC Press, USA.
6. Lê Quang Thái, 2018, Hiện trạng ngành sản xuất nấm Việt Nam và giới thiệu các giải pháp công nghệ nhằm giải quyết một số vấn đề tồn tại, *Kỷ yếu Hội thảo Quốc tế Ứng dụng công nghệ cao trong nông nghiệp tại Việt Nam*, TP. Hồ Chí Minh. tr. 1–15.
7. Đinh Minh Hiệp, 2019, Nhu cầu và định hướng phát triển giống nấm phục vụ nuôi trồng và sản xuất ở khu vực phía nam, *Hội thảo quốc tế Tiềm năng ứng dụng nấm trong nông nghiệp*, TP. Hồ Chí Minh.
8. Hultberg M., Ahrens L., Golovko O., 2020, Use of lignocellulosic substrate colonized by oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) for removal of organic micropollutants from water, *Journal of Environmental Management*, 272, pp. 111087.
9. Hu Y., Xu J., Sheng Y., Liu J., Li H., Guo M., Xu W., Luo Y., Huang K., He X., 2022, *Pleurotus ostreatus* ameliorates obesity by modulating the gut microbiota in obese mice induced by high-fat diet, *Nutrients*, 14(9), pp. 1868.
10. Dos Santos L. F., Zanatta A. L., Soccol V. T., Torres M. F., Bonatto S. J. R., Rubel R., Soccol C.R., 2013, Hypolipidemic and antiatherosclerotic potential of *Pleurotus ostreatus*, cultivated by submerged fermentation in the high-fat diet fed rats, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(1), pp. 201–208.

11. Bobek P., Ozdin L., Kuniak L., Hromadová M., 1997, Regulation of cholesterol metabolism with dietary addition of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) in rats with hypercholesterolemia, *Casopis Lekarů Ceských*, 136(6), pp. 186–190.
12. Seethapathy P., Thangaraj P., Pandita A., Sankaralingam S., Pandita D., (2023), Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), in *Mushrooms: Nutraceuticals Functional Foods*, Deepu Pandita, Anu Pandita, Eds. CRC Press, USA.
13. Singer R., 1986, *The Agaricales in modern taxonomy*, Koeltz Botanical Books, USA.
14. Raman J., Jang K.-Y., Oh Y.-L., Oh M., Im J.-H., Lakshmanan H., Sabaratnam V., 2021, Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: An overview, *Mycobiology*, 49(1), pp. 1–14.
15. Vidal-Diez de Ulzurrun G., Lee Y.-Y., Stajich J. E., Schwarz E. M., Hsueh Y.-P., 2021, Genomic analyses of two Italian oyster mushroom *Pleurotus pulmonarius* strains, *G3*, 11(2), pp. jkaa007.
16. Okuda Y., Murakami S., Matsumoto T., 2009, A genetic linkage map of *Pleurotus pulmonarius* based on AFLP markers, and localization of the gene region for the sporeless mutation, *Genome*, 52(5), pp. 438–446.
17. Wang L., Gao W., Wu X., Zhao M., Qu J., Huang C., Zhang J., 2018, Genome-wide characterization and expression analyses of *Pleurotus ostreatus* MYB transcription factors during developmental stages and under heat stress based on de novo sequenced genome, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), pp. 2052.
18. Lee Y.-Y., Vidal-Diez de Ulzurrun G., Schwarz E. M., Stajich J. E., Hsueh Y.-P., 2021, Genome sequence of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* strain PC9, *G3*, 11(2), pp. jkaa008.
19. Larraya L. M., Pérez G., Ritter E., Pisabarro A.G., Ramírez L.A., 2000, Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), pp. 5290–5300.
20. Zhang Z., Wen J., Li J., Ma X., Yu Y., Tan X., Wang Q., Liu B., Li X., Li Y., 2018, The evolution of genomic and epigenomic features in two *Pleurotus* fungi, *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–15.
21. Lee S.-H., (2014, 19/9), Chromosome-Length Polymorphism in *Pleurotus eryngii* (Abstract PhD Thesis). Available: https://academic.naver.com/article.naver?doc_id=80066777.

22. Zmitrovich I.V., Wasser S.P., 2016, Is widely cultivated " *Pleurotus sajor-caju*", especially in Asia, indeed an independent species?, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(7), pp. 583–588.
23. Zervakis G., Balis C., 1996, A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa, *Mycological Research*, 100(6), pp. 717–731.
24. Li X., Yao Y., 2005, Revision of the taxonomic position of the phoenix mushroom, *Mycotaxon*, 91, pp. 61–74.
25. Chang S.T., Wasser S.P., (2017), The cultivation and environmental impact of mushrooms, in *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*.
26. Vilgalys R., Smith A., Sun B.L., Miller Jr O.K., 1993, Intersterility groups in the *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United States and adjacent Canada, *Canadian Journal of Botany*, 71(1), pp. 113–128.
27. Guzmán G., 2000, Genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm.(Agaricomycetidae): diversity, taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2(2), pp. 29–123.
28. Barh A., Sharma V., Annepu S.K., Kamal S., Sharma S., Bhatt P., 2019, Genetic improvement in *Pleurotus* (oyster mushroom): a review, *3 Biotech*, 9(9), pp. 1–14.
29. World Federation for Culture Collections, (2023, 1/1). Available: <http://www.wfcc.info/membership/>.
30. VTCC, (2023, 12/01), Online catalogue. Available: <http://vtcc.imbt.vnu.edu.vn/category/nam-lon/>.
31. Lê Hoàng Phương Lê, Đỗ Thị Thiên Lý, Lê Huyền Ái Thúy, Trương Bình Nguyên, 2010, Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng nấm hương *Lentinula edodes* hoang dã, mới phát hiện tại núi Langbiang, Đà Lạt, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 8(3B), tr. 1397-1404.
32. Lê Xuân Thám, 2010, *Nấm bào ngư – Pleurotus spp.*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
33. Chen X., Zhang Z., Liu X., Cui B., Miao W., Cheng W., Zhao F., 2019, Characteristics analysis reveals the progress of *Volvariella volvacea* mycelium subculture degeneration, *Frontiers in Microbiology*, 10, pp. 2045.
34. Sun S.-J., Deng C.-H., Zhang L.-Y., Hu K.-H., 2017, Molecular analysis and biochemical characteristics of degenerated strains of *Cordyceps militaris*, *Archives of Microbiology*, 199(6), pp. 939–944.

35. Singh S., Upadhyay R., Kamal S., Tiwari M., 2004, Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yield and genetic stability, *CryoLetters*, 25(1), pp. 23–32.
36. Veena S., Pandey M., 2010, A simple method for culture conservation of some commercial mushrooms, *Mycosphere*, 1, pp. 191–194.
37. Abatenh E., Gizaw B., 2018, Mushroom preservation protocol, *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 3(1), pp. 000127.
38. Liu Q., Wang F., Liu K., Dong C., 2018, Influence of strain preservation methods on fruiting body growth and metabolite production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* (Ascomycetes), *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20(10), pp. 1003–1011.
39. Buell C.B., Weston W.H., 1947, Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures, *American Journal of Botany*, 34(10), pp. 555–561.
40. Paul J.S., Tiwari K., Jadhav S., 2015, Long term preservation of commercial important fungi in glycerol at 4 °C, *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 9(2), pp. 79–85.
41. Kannoja P., Kashyap A.S., Manzar N., Srivastava D., Singh U.B., Sharma S.K., Sharma P.K., (2020), Preservation of fungal culture with special reference to mineral oil preservation, in *Microbiological Advancements for Higher Altitude Agro-Ecosystems Sustainability*, Springer, Singapore.
42. Ilyas M., Soeka Y., 2019, Accelerated rate storage and viability test of Basidiomycetous fungal strains were cryopreserved at -80 °C, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 308. 1, pp. 012069.
43. Kitamoto Y., Suzuki A., Shimada S., Yamanaka K., 2002, A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing, *Mycoscience*, 43(2), pp. 0143–0149.
44. Mantovani T.R.D.A., Tanaka H.S., Umeo S.H., Junior L.L.Z., Do Valle J.S., Paccola-Meirelles L.D., Linde G.A., Colauto N. B., 2012, Cryopreservation at -20 °C and -70 °C of *Pleurotus ostreatus* on grains, *Indian Journal of Microbiology*, 52(3), pp. 484–488.
45. Zaghi Júnior L.L., Lopes A.D., Cordeiro F.A., Colla I.M., Bertéli M.B.D., Valle J.S.D., Linde G.A., Colauto N.B., 2018, Cryopreservation at -75 °C of *Agaricus subrufescens* on wheat grains with sucrose, *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, pp. 370–377.

46. Ito T., 1983, Preservation of basidiomycete cultures by freezing, *FO Res Communication*, 11, pp. 60–70.
47. Linde G.A., Luciani A., Lopes A.D., Valle J.S.D., Colauto N.B., 2018, Long-term cryopreservation of basidiomycetes, *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, pp. 220–231.
48. Mata G., Salmones D., Gaitán-Hernández R., 2004, Spawn viability and mushroom production in *Pleurotus* strains frozen for eight years in liquid nitrogen, *Journal of Mushrooms*, 16, pp. 185–191.
49. Mata G., Savoie J.-M., 2013, Preservation of *Agaricus subrufescens* strains at low temperature by using cultures on sorghum grains, *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(2), pp. 96–102.
50. Corner E.J.H., 1981, *The agaric genera Lentinus, Panus, and Pleurotus with particular reference to Malaysian species*, Nova Hedwig Beih, Germany.
51. Lechner B.E., Wright J.E., Albertó E., 2004, The genus *Pleurotus* in Argentina, *Mycologia*, 96(4), pp. 845–858.
52. Pallante J., (2022, 05/06), Branching oyster (*Pleurotus cornucopiae*). Available: <https://uk.inaturalist.org/photos/203958681>.
53. Petersen R.H., Krisai-Greilhuber I., 1996, An epitype specimen for *Pleurotus ostreatus*, *Mycological Research*, 2(100), pp. 229–235.
54. Miller Jr O.K., 1969, A new species of *Pleurotus* with a coremioid imperfect stage, *Mycologia*, 61(5), pp. 887–893.
55. Petersen R.H., Krisai-Greilhuber I., 1999, Type specimen studies in *Pleurotus*, *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 17(2), pp. 201–219.
56. Singer R., (1946), Two new species of the Pleurotoideae, in *Papers of the Michigan Academy of Science, Arts, and Letters.*, v.32, McCartney, E. S., Schalie, H.V.D., Eds. The University of Michigan Press, USA.
57. Singer R., 1943, Das system der Agaricales III, *Annales Mycologici*, 41(1), pp. 148–149.
58. Ohira I., 1990, A revision of the taxonomic status of *Pleurotus citrinopileatus*, *Reports of the Tottori Mycological Institute* 28, pp. 143-150.
59. Chaudhary M.M., John P., 2017, Morphological and molecular characterization of oyster mushroom (*Pleurotus cystidiosus*), *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(8), pp. 246-250.
60. Tran Thi Ngoc My, Ho Bao Thuy Quyen, Pham Nguyen Duc Hoang, 2017, Isolating the monokaryon collection of *Pleurotus* spp., *Vietnam Journal of Science and Technology*, 55(1A), pp. 73–91.

61. Buchanan P.K., (1993), Identification, names, and nomenclature of common edible mushrooms, in *Mushroom biology and mushroom products*, Chang, J.A., Buswell, S., Chiu. C, Eds. Chinese University Press, Hong Kong.
62. Choi S.-G., Jang K.-Y., Kim G.-H., Kong W.-S., Jo J.-S., Kim H.-Y., Yoo Y.-B., 2014, Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species based on RAPD analysis, *Journal of Mushroom*, 12(3), pp. 154–162.
63. Pánek M., Wiesnerová L., Jablonský I., Novotný D., Tomšovský M., 2019, What is cultivated oyster mushroom? Phylogenetic and physiological study of *Pleurotus ostreatus* and related taxa, *Mycological Progress*, 18(9), pp. 1173–1186.
64. Li J., He X., Liu X.-B., Yang Z.L., Zhao Z.-W., 2017, Species clarification of oyster mushrooms in China and their DNA barcoding, *Mycological Progress*, 16(3), pp. 191–203.
65. Rajarathnam S., Bano Z., Miles P.G., 1987, *Pleurotus* mushrooms. Part I A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation, *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 26(2), pp. 157–223.
66. Segedin B.P., Buchanan P.K., Wilkie J., 1995, Studies in the Agaricales of New Zealand: new species, new records and renamed species of *Pleurotus* (*Pleurotaceae*), *Australian Systematic Botany*, 8(3), pp. 453–482.
67. Shnyreva A., Shtær O., 2006, Differentiation of closely related oyster fungi *Pleurotus pulmonarius* and *P. ostreatus* by mating and molecular markers, *Russian Journal of Genetics*, 42(5), pp. 539–545.
68. Bao D., Kinugasa S., Kitamoto Y., 2004, The biological species of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) from Asia based on mating compatibility tests, *Journal of Wood Science*, 50(2), pp. 162–168.
69. Zervakis G.I., Moncalvo J.-M., Vilgalys R., 2004, Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa, *Microbiology*, 150(3), pp. 715–726.
70. Shnyreva A., Sivolapova A., Shnyreva A., 2012, The commercially cultivated edible oyster mushrooms *Pleurotus sajor-caju* and *P. pulmonarius* are two separate species, similar in morphology but reproductively isolated, *Russian Journal of Genetics*, 48(11), pp. 1080–1088.
71. Petersen R.H., Hughes K.W., 1999, Species and speciation in mushrooms: development of a species concept poses difficulties, *Bioscience*, 49(6), pp. 440–452.

72. Puvača N., Budakov D., Petrović A., Vuković G., Merkuri J., Avantaggiato G., Bursić V., Cara M., Molecular characterization of *Alternaria* spp. and presence of toxin in isolated genes: Review, *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management*, 3(6), pp. 506–515.
73. Nguyễn Đức Thành, 2014, Các kỹ thuật chỉ thị DNA trong nghiên cứu và chọn lọc thực vật, *Tạp chí Sinh học*, 36(3), tr. 265–294.
74. Petersen G., Seberg O., 1996, ITS regions highly conserved in cultivated barleys, *Euphytica*, 90(2), pp. 233–234.
75. Porrás-Alfaro A., Liu K.L., Kuske C.R., Xie G., 2014, From genus to phylum: large-subunit and internal transcribed spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition, *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), pp. 829–840.
76. Xu J., 2016, Fungal DNA barcoding, *Genome*, 59(11), pp. 913–932.
77. Raja H.A., Miller A.N., Pearce C.J., Oberlies N.H., 2017, Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community, *Journal of Natural Products*, 80(3), pp. 756–770.
78. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., (1990), Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Academic Press, Inc., USA.
79. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Consortium F.B., 2012, Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), pp. 6241–6246.
80. Stielow J.B., Levesque C.A., Seifert K.A., Meyer W., Iriny L., Smits D., Renfurm R., Verkley G., Groenewald M., Chaduli D., 2015, One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes, *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35, pp. 242–263.
81. James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C.J., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., 2006, Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny, *Nature*, 443(7113), pp. 818–822.
82. Zhao P., Ji S.-P., Cheng X.-H., Bau T., Dong H.-X., Gao X.-X., 2021, DNA barcoding mushroom spawn using EF-1 α barcodes: a case study in oyster mushrooms (*Pleurotus*), *Frontiers in Microbiology*, 12, pp. 1043.
83. Menolli Junior N., Asai T., Capelari M., Paccola-Meirelles L.D., 2010, Morphological and molecular identification of four Brazilian commercial isolates

- of *Pleurotus* spp. and cultivation on corncob, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(2), pp. 397–408.
84. Huerta G., Martínez-Carrera D., Sánchez J., Leal-Lara H., Vilgalys R., 2010, Genetic relationships between Mexican species of *Pleurotus* analyzing the ITS-region from rDNA, *Micologia Aplicada International*, 22(1), pp. 15–25.
 85. Dung N.T.P., Tuyen D.B., Quang P.H., 2012, Morphological and genetic characteristics of oyster mushrooms and conditions effecting on its spawn growing, *International Food Research Journal*, 19(1), pp. 347–352.
 86. Shnyreva A., Shnyreva A., 2015, Phylogenetic analysis of *Pleurotus* species, *Russian Journal of Genetics*, 51(2), pp. 148–157.
 87. Adeniyi M., Titilawo Y., Oluduro A., Odeyemi O., Nakin M., Okoh A.I., 2018, Molecular identification of some wild Nigerian mushrooms using internal transcribed spacer: polymerase chain reaction, *Amb Express*, 8(1), pp. 1–9.
 88. Aref Hasan H., Mohamad Almomany A., Hasan S., Al-Abdallat A.M., 2018, Assessment of genetic diversity among *Pleurotus* spp. isolates from Jordan, *Journal of Fungi*, 4(2), pp. 52.
 89. Chuku S., Nwachukwu E., Agbagwa I., Stanley H., 2020, Molecular characterisation and identification of three mushrooms found in the Niger delta region, *Annual Research & Review in Biology*, 35(7), pp. 115–121.
 90. Adebayo E., Elkanah F., Afolabi F., Ogundun O., Alabi T., Oduoye O., 2021, Molecular characterization of most cultivated *Pleurotus* species in sub-western region Nigeria with development of cost effective cultivation protocol on palm oil waste, *Heliyon*, 7(2), pp. e06215.
 91. Lin P., Yan Z.-F., Kook M., Li C.-T., Yi T.-H., 2022, Genetic and chemical diversity of edible mushroom *Pleurotus* species, *BioMed Research International*, 2022, pp. 6068185.
 92. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *American Journal of Human Genetics*, 32(3), pp. 314–331.
 93. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.V.D., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research*, 23(21), pp. 4407–4414.
 94. Costa R., Pereira G., Garrido I., Tavares-de-Sousa M.M., Espinosa F., 2016, Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP molecular markers to reveal and classify orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) germplasm variations, *PLoS One*, 11(4), pp. e0152972.

95. Mukhopadhyay K., Haque I., Bandopadhyay R., Covert S., Porter D., 2012, AFLP based assessment of genetic relationships among shiitake (*Lentinula* spp.) mushrooms, *Molecular Biology Reports*, 39(5), pp. 6059–6065.
96. Terashima K., Matsumoto T., Hasebe K., Fukumasa-Nakai Y., 2002, Genetic diversity and strain-typing in cultivated strains of *Lentinula edodes* (the shiitake mushroom) in Japan by AFLP analysis, *Mycological Research*, 106(1), pp. 34–39.
97. Wang L., Hu X., Feng Z., Pan Y., 2009, Development of AFLP markers and phylogenetic analysis in *Hypsizygus marmoreus*, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 55(1), pp. 9–17.
98. Alipoor M., Farsi M., Mirshamsi Kakhki A., 2014, Improvement of white button mushroom yield by AFLP marker-assisted single spore selection method *Journal of Horticultural Science*, 28(3), pp. 327–337.
99. Pawlik A., Janusz G., Koszerny J., Małek W., Rogalski J., 2012, Genetic diversity of the edible mushroom *Pleurotus* sp. by amplified fragment length polymorphism, *Current Microbiology*, 65(4), pp. 438–445.
100. Xin X., Yin J., Zhang B., Li Z., Zhao S., Gui Z., 2019, Genome-wide analysis of DNA methylation in subcultured *Cordyceps militaris*, *Archives of Microbiology*, 201(3), pp. 369–375.
101. Bao D., Ishihara H., Mori N., Kitamoto Y., 2004, Phylogenetic analysis of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) based on restriction fragment length polymorphisms of the 5' portion of 26S rDNA, *Journal of Wood Science*, 50(2), pp. 169–176.
102. Otieno O. D., Onyango C., Onguso J.M., Matasyoh L.G., Wanjala B.W., Wamalwa M., Harvey J.J., 2015, Genetic diversity of Kenyan native oyster mushroom (*Pleurotus*), *Mycologia*, 107(1), pp. 32–38.
103. Khan N.A., Binyamin R., Awan F.S., Khan A.I., Waseem M., 2017, Genetic diversity of edible mushroom *Pleurotus* spp. revealed by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting, *Pakistan Journal of Botany*, 49(4), pp. 1517–1521.
104. Yadav M., Chandra R., Singh H., Yadav S., Naik S., Dhakad P., 2017, Genetic diversity characterization of *Pleurotus* strains by random amplified polymorphic DNA fingerprinting, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), pp. 1260–1267.
105. Ekowati N., Mumpuni A., Muljowati J.S., Ratnaningtyas N.I., Maharning A.R., 2021, Genetic diversity of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. strains in Java

- based on random amplified polymorphic DNA markers, *Biodiversitas* 22(6), pp. 3488–3493.
106. Zhu W., Hu J., Chi J., Li Y., Yang B., Hu W., Chen F., Xu C., Chai L., Bao Y., 2020, Label-free proteomics reveals the molecular mechanism of subculture induced strain degeneration and discovery of indicative index for degeneration in *Pleurotus ostreatus*, *Molecules*, 25(21), pp. 4920.
 107. Karittapattawan P., Benchawattananon R., 2021, Evaluation of laccase production by monokaryotic strains of edible mushrooms, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 24(4), pp. 454–460.
 108. Kurt S., Buyukalaca S., 2010, Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes, *Bioresource Technology*, 101(9), pp. 3164–3169.
 109. Siwulski M., Drzewiecka K., Sobieralski K., Chong Y., 2010, Comparison of growth and enzymatic activity of mycelium and yielding of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm on different substrates, *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 9(3), pp. 45–50.
 110. Sousa M.A.D.C., Costa L.M.A.S., Pereira T.S., Zied D.C., Rinker D.L., Dias E.S., 2019, Enzyme activity and biochemical changes during production of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Food Science and Technology*, 39, pp. 774–780.
 111. Magae Y., Akahane K., Nakamura K., Tsunoda S., 2005, Simple colorimetric method for detecting degenerate strains of the cultivated basidiomycete *Flammulina velutipes* (Enokitake), *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), pp. 6388–6389.
 112. Kim S.Y., Kim K.-H., Im C.H., Ali A., Lee C.Y., Kong W.-S., Ryu J.-S., 2014, Identification of degenerate nuclei and development of a SCAR marker for *Flammulina velutipes*, *PloS One*, 9(9), pp. e107207.
 113. Moreno A.D., Ibarra D., Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., 2015, A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(3), pp. 342–354.
 114. Chivukula M., Renganathan V., 1995, Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), pp. 4374–4377.
 115. Stamets P., 2011, *Growing gourmet and medicinal mushrooms*, Ten Speed Press, USA.

116. Nasim G., Malik S., Bajwa R., Afzal M., Mian S., 2001, Effect of three different culture media on mycelial growth of oyster and Chinese mushrooms, *Journal of Biological Sciences* 1, pp. 1130–1133.
117. Nguyen T.M., Ranamukhaarachchi S.L., 2020, Effect of different culture media, grain sources and alternate substrates on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 23(3), pp. 223–230.
118. Mahadevan K., Shanmugasundaram K., 2018, Comparative effect of different culture media on mycelial growth performance of *Pleurotus sapidus*, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(4), pp. 874–878.
119. Kupradit C., Ranok A., Mangkalan S., Khongla C., Musika S., 2020, Effects of natural carbon sources and temperature on mycelium cultivations of *Lentinus squarrosulus* (Mont.), *Lentinus polychrous* Lev., *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. and *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer., *Thai Journal of Science and Technology*, 9(4), pp. 539–553.
120. Kawai G., Kobayashi H., Fukushima Y., Ohsaki K., 1996, Effect of liquid mycelial culture used as a spawn on sawdust cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*), *Mycoscience*, 37(2), pp. 201–207.
121. Ryu Y.-H., Yoon Y.-S., Jo W.-S., Park S.-D., Choi B.-S., Kim J.-K., 1998, Effect of liquid spawn on *Flammulina velutipes* cultivation, *The Korean Journal of Mycology*, 26(1), pp. 20–24.
122. Guo J., Liu X., 2011, Comparison between liquid culture and solid culture technologies for edible mushroom spawn production and analysis on their economic benefits, *Scientia Agricultura Sinica*, 44(4), pp. 835–841.
123. Hong S.-J., Lee W.-H., Shin B.-S., Sung J.-M., 2003, Production of *Pleurotus ostreatus* and *Flammulina velutipes* using liquid spawn inoculation system, *The Korean Journal of Mycology*, 31(1), pp. 22–27.
124. Zervakis G., Philippoussis A., Ioannidou S., Diamantopoulou P., 2001, Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates, *Folia Microbiologica*, 46(3), pp. 231–234.
125. Stanley H., Nyenke C., 2011, Cultural studies on mycelia of *Pleurotus pulmonarius* (oyster mushroom) in selected culture media, *International Journal of Science and Nature* 2, pp. 183–185.
126. Ogidi O.C., Nunes M.D., Oyetayo V.O., Akinyele B.J., Kasuya M.C.M., 2016, Mycelial growth, biomass production and iron uptake by mushrooms of *Pleurotus*

- species cultivated on *Urochloa decumbens* (Stapf) RD Webster, *Journal of Food Research*, 5(3), pp. 13–19.
127. Ilyas N., Avin F.A., 2018, Analysis of physicochemical parameters to evaluate the mycelia growth of *Pleurotus pulmonarius*, *Annual Research & Review in Biology*, 25(2), pp. 1–13.
128. Hồ Bảo Thùy Quyên, Ngô Thùy Trâm, Lê Quang Anh Tuấn, Bùi Thị Như Quỳnh, Nguyễn Hòa Minh Tuấn, Cổ Đức Trọng, 2019, Khả năng sinh trưởng của hệ sợi của các chủng nấm bào ngư xám *Pleurotus* sp. trên một số môi trường thạch dinh dưỡng, *Tạp chí Di truyền và Ứng dụng*, Chuyên san Nấm và Công nghệ sinh học, tr. 112–118.
129. Hoa H.T., Wang C.-L., 2015, The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*), *Mycobiology*, 43(1), pp. 14–23.
130. Sardar H., Ali M.A., Ayyub C.M., Ahmed R., 2015, Effects of different culture media, temperature and pH levels on the growth of wild and exotic *Pleurotus* species, *Pakistan Journal of Phytopathology*, 27(2), pp. 139–145.
131. Chanprapai P., Thanaporn Wichai S.S., Sajee Noitang W.S., Winatta Sakdasri, Sawangkeaw R., 2022, Aqueous extracts of lemon basil straw as chemical stimulator for gray oyster mushroom cultivation, *Foods*, 11(9), pp. 1370.
132. Atri N., 2018, Evaluation of physical parameters for vegetative growth of *Pleurotus cystidiosus*, *Kavaka*, 49, pp. 72–76.
133. Dawidowicz L., Siwulski M., 2017, Comparison of growth of mycelium of *Pleurotus cystidiosus* (Miller) on various agar media, *Journal Agriculture and Forestry*, 63(1), pp. 61–68.
134. Ritota M., Manzi P., 2019, *Pleurotus* spp. cultivation on different agri-food by-products: Example of biotechnological application, *Sustainability*, 11(18), pp. 5049.
135. Adebayo E., Alao M., Olatunbosun O., Omoleye E., Omisakin O., 2014, Yield evaluation of *Pleurotus pulmonarius* (oyster mushroom) on different agricultural wastes and various grains for spawn production, *Ife Journal of Science*, 16(3), pp. 475–480.
136. Lê Vĩnh Thúc, Lê Thị Ngọc Minh, Mai Vũ Duy, 2015, So sánh một số loại cơ chất tiềm năng trồng nấm bào ngư xám (*Pleurotus sajor-caju*) ở đồng bằng sông Cửu Long, *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 39, tr. 36–43.

137. Avin F.A., Bhassu S., Rameeh V., Tan Y.S., Vikineswary S., 2016, Genetics and hybrid breeding of *Pleurotus pulmonarius*: heterosis, heritability and combining ability, *Euphytica*, 209(1), pp. 85–102.
138. Adewoyin A., Ayandele A., 2018, Comparative study of yield performance and nutrient composition of the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius*, cultivated on different substrates, *African Journal of Plant Science*, 12(8), pp. 148–154.
139. Familoni T.V., Ogidi C.O., Akinyele B.J., Onifade A.K., 2018, Evaluation of yield, biological efficiency and proximate composition of *Pleurotus* species cultivated on different wood dusts, *Czech Mycology*, 70(1), pp. 33–45.
140. Sobowale A.A., Atoyebi F.T., Adenipekun C.O., 2018, Fungal incidence and growth of two *Pleurotus* species on sawdust of *Ceiba pentandra* (Linn.) Gaertn and *Ficus mucoso* Welw (softwoods), *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 9(448), pp. 1–6.
141. Shah Z., Ashraf M., Ishtiaq M., 2004, Comparative study on cultivation and yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates (wheat straw, leaves, saw dust), *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(3), pp. 158–160.
142. Hoa H. T., Wang C.-L., Wang C.-H., 2015, The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*), *Mycobiology*, 43(4), pp. 423–434.
143. Girmay Z., Gorems W., Birhanu G., Zewdie S., 2016, Growth and yield performance of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm (oyster mushroom) on different substrates, *Amb Express*, 6(1), pp. 1–7.
144. Miah M.N., Begum A., Shelly N.J., Bhattacharjya D.K., Paul R.K., Kabir M.H., 2017, Effect of different sawdust substrates on the growth, yield and proximate composition of white oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), *Bioresearch Communications (BRC)*, 3(2), pp. 397–410.
145. Oladipo A., Adegboyega D., Osunlaja O., Agboje I., Ogunsola O., Haastrup N., 2020, Comparative yield and biological efficiency of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivated on sawdust of some selected tree species, *Journal of Research in Forestry, Wildlife and Environment*, 12(3), pp. 216–222.
146. Trần Anh Đức, Nguyễn Đình Thi, Hoàng Kim Toàn, 2017, Ảnh hưởng của các tổ hợp giá thể mùn cưa gỗ keo đến sinh trưởng, phát triển và năng suất nấm sò tại Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 126(3D), tr. 109–118.

147. Yu G., Li X., Zhao S., Sun S., Yu Y., Chen J., Cheng X., Li W., 2022, Waste apple wood: A safe and economical alternative substrate for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*, *Folia Horticulturae*, 34(2), pp. 1–13.
148. Kilic C., 2020, Production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus citrinopileatus* and *Pleurotus djamor* in different contents and some physical analysis, *Wood Industry Engineering*, 2(1), pp. 17–23.
149. Adebayo E.A., Oloke J.K., Bordoloi A.K., M.B., Bora T.C., 2014, Improvement of *Pleurotus pulmonarius* Lau 09 through mutation for yield performance, *Research Journal of Mutagenesis*, 4, pp. 1–13.
150. Lee J., Kang H.-W., Kim S.-W., Lee C.-Y., Ro H.-S., 2011, Breeding of new strains of mushroom by basidiospore chemical mutagenesis, *Mycobiology*, 39(4), pp. 272–277.
151. Zhou X.-W., (2017), Cultivation of *Ganoderma lucidum* in *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*, Zied, D., Pardo-Gimnez, A., Eds. Wiley-Blackwell, UK.
152. Chang A.C., Buswell J.A., Miles P.G., 1993, *Genetics and breeding of edible mushrooms*, CRC Press, The Netherlands.
153. Abdulgani R., Ching-Ching L., Abdullah N., Vikineswary S., 2017, Morphological and molecular characterization of *Pleurotus pulmonarius* hybrids with improved sporophore features and higher biological efficacy, *International Journal of Agriculture and Biology*, 19, pp. 707–712.
154. Jyothi K.R., Thara S.S., 2021, Development of improved strain of *Pleurotus* species by interspecific hybridization, *Journal of Tropical Agriculture*, 58(2), pp. 246–255.
155. Kim M.K., Ryu J.-S., Lee Y.-H., Kim H.-R., 2013, Breeding of a long shelf-life strain for commercial cultivation by mono–mono crossing in *Pleurotus eryngii*, *Scientia Horticulturae*, 162, pp. 265–270.
156. Nazrul M.I., YinBing B., 2011, Differentiation of homokaryons and heterokaryons of *Agaricus bisporus* with inter-simple sequence repeat markers, *Microbiological Research*, 166(3), pp. 226–236.
157. Xiong D., Wang H., Chen M., Xue C., Li Z., Bian Y., Bao D., 2014, Application of mating type genes in molecular marker-assisted breeding of the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*, *Scientia Horticulturae*, 180, pp. 59–62.
158. Ryu J.-S., Kim M. K., Ro H.-S., Kang Y. M., Kwon J.-H., Kong W.-S., Lee H.-S., 2012, Identification of mating type loci and development of SCAR marker

- genetically linked to the B3 locus in *Pleurotus eryngii*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9), pp. 1177–1184.
159. Kim K.-H., Kang Y. M., Im C. H., Ali A., Kim S. Y., Je H.-J., Kim M.-K., Rho H.S., Lee H.S., Kong W.-S., 2014, Identification and functional analysis of pheromone and receptor genes in the B3 mating locus of *Pleurotus eryngii*, *PLoS One*, 9(8), pp. e104693.
160. Gharehaghaji A.N., Goltapeh E.M., Masiha S., Gordan H.R., 2007, Hybrid production of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fries) Kummer, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(14), pp. 2334–2340.
161. Gaitán-Hernández R., Salmones D., 2008, Obtaining and characterizing *Pleurotus ostreatus* strains for commercial cultivation under warm environmental conditions, *Scientia Horticulturae*, 118(2), pp. 106–110.
162. Kim M.-K., Ryu J.-S., Park K.-K., Je H.-J., Jeong S.-G., Suk S.-W., Song W.-D., 2011, Characterization of a new cultivar "KNR11-1" by mono-mono hybridization in *Pleurotus eryngii*, *The Korean Society of Mushroom Science*, 15(2), pp. 56–56.
163. Lee J.-W., Han Y.-S., Cheong J.-C., 2013, Characteristics of a new cultivar 'Hwaseong 5ho' in *Pleurotus ostreatus*, *Journal of Mushroom*, 11(4), pp. 244–248.
164. Oh M.-J., Kim E.-J., Jung J.-H., Shin P.-G., Kim E.-S., Oh Y.-L., Jang K.-Y., Kong W.-S., Yoo Y.-B., 2015, Characterization of a new commercial strain 'Mongdol' by intra-specific hyphal anastomosis in *Pleurotus ostreatus*, *Journal of Mushroom*, 13(3), pp. 212–216.
165. Baral D., Roy A., Thapa S., Chewang Bhutia K., 2017, Development of intraspecific hybridization of *Pleurotus flabellatus* for better yield and nutrition, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, pp. 735–742.
166. Yun H.K., Boon C.S., Shin T.Y., Sabaratnam V., 2020, Breeding and evaluation of *Pleurotus giganteus* (Berk.) Karunarathna & KD Hyde Hybrids via intraspecific mating, *Sains Malaysiana*, 49(6), pp. 1223–1236.
167. Lee S.H., Ali A., Ha B., Kim M.-K., Kong W.-S., Ryu J.-S., 2019, Development of a molecular marker linked to the A4 locus and the structure of HD genes in *Pleurotus eryngii*, *Mycobiology*, 47(2), pp. 200–206.
168. Ju Y., Kim S., Kim M., San Ryu J., Ro H.-S., 2020, Structure analysis of A and B mating type loci in a representative commercial strain of *Pleurotus eryngii*, *Scientia Horticulturae*, 274, pp. 109686.

169. Dai Y., Su W., Yang C., Song B., Li Y., Fu Y., 2017, Development of novel polymorphic EST-SSR markers in Bailinggu (*Pleurotus tuoliensis*) for crossbreeding, *Genes*, 8(11), pp. 325.
170. Larraya L.M., Pérez G., Iribarren I., Blanco J.A., Alfonso M., Pisabarro A.G., Ramírez L.A., 2001, Relationship between monokaryotic growth rate and mating type in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), pp. 3385–3390.
171. Ravishankar S., Pandey M., Tewari R., Krishna V., 2006, Development of sporeless/low sporing strains of *Pleurotus* through mutation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(10), pp. 1021–1025.
172. Liu Z., Zhang K., Lin J.-F., Guo L.-Q., 2011, Breeding cold tolerance strain by chemical mutagenesis in *Volvariella volvacea*, *Scientia Horticulturae*, 130(1), pp. 18–24.
173. Dhitaphichit P., Pornsuriya C., 2005, Protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *P. djamor*, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(5), pp. 975–982.
174. Chakraborty U., Sikdar S. R., 2008, Production and characterization of somatic hybrids raised through protoplast fusion between edible mushroom strains *Volvariella volvacea* and *Pleurotus florida*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), pp. 1481–1492.
175. Djajanegara I., Masduki A., 2010, Protoplast fusion between white and brown oyster mushrooms, *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 11(1), pp. 16–23.
176. Selvakumar P., Rajasekar S., Babu A.G., Periasamy K., Raaman N., Reddy M.S., 2015, Improving biological efficiency of *Pleurotus* strain through protoplast fusion between *P. ostreatus* var. *florida* and *P. djamor* var. *roseus*, *Food Science and Biotechnology*, 24(5), pp. 1741–1748.
177. He B.-L., You L.-R., Ye Z.-W., Guo L.-Q., Lin J.-F., Wei T., Zheng Q.-W., 2018, Construction of novel cold-tolerant strains of *Volvariella volvacea* through protoplast fusion between *Volvariella volvacea* and *Pleurotus eryngii*, *Scientia Horticulturae*, 230, pp. 161–168.
178. Das P., Sikdar S. R., Samanta A., 2021, Nutritional analysis and molecular characterization of hybrid mushrooms developed through intergeneric protoplast fusion between *Pleurotus sajor-caju* and *Calocybe indica* with the purpose to achieve improved strains, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(4), pp. 1–12.

179. Honda Y., Matsuyama T., Irie T., Watanabe T., Kuwahara M., 2000, Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*, *Current Genetics*, 37(3), pp. 209–212.
180. Sunagawa M., Magae Y., 2002, Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment, *FEMS Microbiology Letters*, 211(2), pp. 143–146.
181. Romruen U., Bangyeekhun E., 2017, Yield improvement of the king oyster mushroom, *Pleurotus eryngii*, by transformation of its cellulase gene, *Biologia*, 72(2), pp. 140–144.
182. Sharma K.K., Kuhad R.C., 2010, Genetic transformation of lignin degrading fungi facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*, *BMC Biotechnology*, 10(1), pp. 1–8.
183. Waltz E., 2016, Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation, *Nature*, 532(7599), pp. 293.
184. Koshi D., Ueshima H., Kawauchi M., Nakazawa T., Sakamoto M., Hirata M., Izumitsu K., Sumita T., Irie T., Honda Y., 2022, Marker-free genome editing in the edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*, using transient expression of genes required for CRISPR/Cas9 and for selection, *Journal of Wood Science*, 68(1), pp. 27.
185. Yamasaki F., Nakazawa T., Oh M., Bao D., Kawauchi M., Sakamoto M., Honda Y., 2022, Gene targeting of dikaryotic *Pleurotus ostreatus* nuclei using the CRISPR/Cas9 system, *FEMS Microbiology Letters*, 369(1), pp. fnac083.
186. Adebayo E., Oloke J., Bordoloi A., Barooah M., Bora T., 2014, Improvement of *Pleurotus pulmonarius* Lau 09 through mutation for yield performance, *Research Journal of Mutagenesis*, 4(1), pp. 1.
187. Sharma R., Sharma B., 2014, Strain improvement in *Pleurotus ostreatus* using UV light and ethyl methyl sulfonate as mutagens, *African Journal of Microbiology Research*, 8(5), pp. 432–436.
188. Harfi T., Alireza M.-A., Farzad R., Fariborz Z.-N., 2021, Induced mutation in *Agaricus bisporus* by gamma ray to improve genetic variability, degradation enzyme activity, and yield, *International Journal of Radiation Biology*, 97(7), pp. 1–12.
189. Lechner B.E., Wright J., Albertó E., 2005, The genus *Pleurotus* in Argentina: mating tests, *Sydowia*, 57(2), pp. 233–245.
190. Trịnh Tam Kiệt, 2011, *Nấm lớn ở Việt Nam, tập 1*, NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.

191. Trần Thị Trúc, Trần Nhân Dũng, Bùi Thị Minh Diệu, Đỗ Tấn Khang, 2019, Khảo sát ảnh hưởng nguồn dinh dưỡng đến sinh trưởng và phát triển của nấm chân dài *Panus giganteus* (Berk.) Corner, *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 55(CĐ Công nghệ Sinh học), tr. 110–118.
192. Ngô Thị Phương Dung, Đặng Bích Tuyên, Phạm Hồng Quang, 2011, Đặc tính hình thái, di truyền và điều kiện nuôi cấy meo giống của nấm bào ngư, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 18b, tr. 146–156.
193. Liễu Như Ý, Trần Nhân Dũng, 2012, Đa dạng di truyền một số loại nấm ăn dựa trên trình tự ITS (internal transcribed spacer), *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 22b, tr. 18–25.
194. Nguyễn Hoàng Thanh, Đỗ Tấn Khang, Nguyễn Tường Vi, Trần Nhân Dũng, 2019, Nghiên cứu môi trường và giá thể phù hợp để sản xuất nấm hoàng kim (*Pleurotus citrinopileatus* Singer), *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 55(CĐ Công nghệ Sinh học), tr. 95–102.
195. Bùi Ngọc Trang, Ngô Thùy Trâm, Phạm Văn Lộc, Hồ Bảo Thùy Quyên, 2021, Nghiên cứu định danh và khả năng sinh trưởng hệ sợi của các giống nấm bào ngư thương mại trên một số môi trường dinh dưỡng, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 6(2), tr. 48–56.
196. Lê Bá Dũng, 1999, Nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn dinh dưỡng, phytohormon lên sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *Pleurotus pulmonarius*, *Tạp chí Sinh học*, 21(1), tr. 55–60.
197. Nguyễn Thị Mai Thảo, Trần Văn Khuê, Lương Bảo Uyên, Ảnh hưởng của một số ion kim loại lên khả năng sinh tổng hợp laccase ở nấm *Pleurotus* sp., *Tạp chí Sinh học*, 36(1se), tr. 107–111.
198. Lê Thị Thu Hương, Trần Thị Thu Hà, Lê Thị Hà, 2022, Nghiên cứu sử dụng cây lục bình (*Eichhornia crassipes* (Mart) Solms) làm giá thể trồng nấm sò trắng (*Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué.) tại Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*, 6(3), tr. 3180–3188.
199. Nguyễn Hoàng Mai, Trương Bình Nguyên, Phan Hoàng Đại, Lê Bá Dũng, 2019, Cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) using fermentation substrate, *Dalat University Journal of Science*, 9(2), tr. 104–111.
200. Nguyễn Duy Trình, Trần Thu Hà, Lê Thanh Uyên, Phạm Xuân Hội, 2020, Tuyển chọn các chủng giống nấm đùi gà *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) mới nhập nội nuôi trồng trên giá thể phụ phẩm nông nghiệp, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 62(9), tr. 36–41.

201. Kaur J., Sodhi H. S., Kapoor S., 2008, Breeding of *Pleurotus florida* (oyster mushroom) for phenotypic pigmentation and high yield potential, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(15), pp. 2676–2681.
202. Kim M.K., Ryu J.S., Lee Y.H., Kim H.R., 2013, Breeding of a long shelf – life strain for commercial cultivation by mono – mono crossing in *Pleurotus eryngii*., *Scientia Horticulturae*, 162, pp. 265 –270.
203. Deewakar B., Ayon R., Sukram T., Karma C.B., 2017, Development of intraspecific hybridization of *Pleurotus flabellatus* for better yield and nutrition, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(11), pp. 735–742.
204. James T.Y., Liou S.-R., Vilgalys R., 2004, The genetic structure and diversity of the A and B mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*, *Fungal Genetics and Biology*, 41(8), pp. 813–825.
205. Ngô Xuân Nghiễn, Nguyễn Thị Bích Thùy, Đinh Xuân Linh, Trần Thu Hà, Trịnh Tam Kiệt, Trần Đông Anh, 2013, Kết quả nghiên cứu chọn tạo các chủng nấm sò mới có triển vọng trong sản xuất ở Việt Nam, *Hội thảo Quốc gia về Khoa học Cây trồng lần thứ nhất*, tr. 516–524.
206. Trần Đông Anh, Nguyễn Thị Bích Thùy, Ngô Xuân Nghiễn, Nguyễn Thị Luyện, Vũ Thị Như Hoa, Lê Thế Cương, Đỗ Thị Thu Quỳnh, Đinh Văn Nam, 2021, Đánh giá khả năng phối hợp và đặc điểm sinh học của các tổ hợp lai từ một số nguồn gen nấm sò, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(7), tr. 952–963
207. Hồ Bảo Thùy Quyên, 2021, *Xây dựng bộ sưu tập các dòng đơn bội của các chủng nấm bào ngư ở khu vực Tây Nam Bộ làm cơ sở cho chọn giống*, Báo cáo tổng kết đề tài khoa học công nghệ Bộ Giáo dục và Đào tạo.
208. Nguyễn Lâm Dũng, 2004, *Công nghệ trồng nấm - Tập 1*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
209. Largent D., 1977, *How to identify mushrooms to genus I: Macroscopic Features*, Mad River Press, USA.
210. Largent D., Johnson D., Watling R., 1977, *How to identify mushrooms to genus. III. Microscopic features*. Mad River, USA.
211. Winnepeninckx B., 1993, Extraction of high molecular weight DNA from molluscs, *Trends in Genetics*, 9, pp. 407.
212. Larsson A., 2014, AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets, *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(22), pp. 3276–3278.

213. 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), pp. 1547–1549.
214. Liu X.-B., Liu J.-W., Yang Z.-L., 2015, A new edible mushroom resource, *Pleurotus abieticola*, in southwestern China, *Mycosystema*, 34(4), pp. 581–588.
215. Zhao M., Zhang J., Chen Q., Wu X., Gao W., Deng W., Huang C., 2016, The famous cultivated mushroom Bailinggu is a separate species of the *Pleurotus eryngii* species complex, *Scientific Reports*, 6(1), pp. 1–9.
216. Adebayo E., Oloke J., Achana Y., Bora T., 2012, Improvement of laccase production in *Pleurotus pulmonarius*-LAU 09 by mutation, *Journal of Microbiology Research*, 2(1), pp. 11–17.
217. Menolli Jr N., Breternitz B.S., Capelari M., 2014, The genus *Pleurotus* in Brazil: a molecular and taxonomic overview, *Mycoscience*, 55(5), pp. 378–389.
218. Liu X.-B., Li J., Horak E., Yang Z. L., 2016, *Pleurotus placentodes*, originally described from Sikkim, rediscovered after 164 years, *Phytotaxa*, 267(2), pp. 137–145.
219. Zervakis G.I., Venturella G., Fryssouli V., Inglese P., Polemis E., Gargano M.L., 2018, *Pleurotus opuntiae* revisited—An insight to the phylogeny of dimitic *Pleurotus* species with emphasis on the *P. djamor* complex, *Fungal Biology*, 123(3), pp. 188–199.
220. Petersen R.H., Hughes K.W., 1997, A new species of *Pleurotus*, *Mycologia*, 89(1), pp. 173–180.
221. Rohlf FJ, 2000; Exeter Software: New York, USA.
222. Hendricks K.E., Christman M.C., Roberts P.D., 2017, A statistical evaluation of methods of *in vitro* growth assessment for *Phyllosticta citricarpa*: Average colony diameter vs. area, *PloS One*, 12(1), pp. e0170755.
223. Lee B.-J., Lee M.-A., Kim Y.-G., Lee K.-W., Lim Y.-P., Lee B.-E., Song H.-Y., 2012, Mating relationship between the parent and the mutant strains in *Pleurotus ostreatus*, *Journal of Mushroom Science and Production*, 10(3), pp. 101–108.
224. Kimura M., 1980, A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), pp. 111–120.
225. Zervakis G.I., Ntougias S., Gargano M.L., Besi M.I., Polemis E., Typas M.A., Venturella G., 2014, A reappraisal of the *Pleurotus eryngii* complex—New species and taxonomic combinations based on the application of a polyphasic approach,

- and an identification key to *Pleurotus* taxa associated with Apiaceae plants, *Fungal Biology*, 118(9-10), pp. 814–834.
226. Vũ Thị Bích Huyền, Lê Thị Bích Thủy, Nguyễn Anh Dũng, Hoàng Bá Tiến, Nguyễn Đức Thành, 2013, Đánh giá đa dạng di truyền một số giống lúa bằng kỹ thuật SSR phục vụ cho chọn cặp lai tạo giống chịu hạn, *Tạp chí Sinh học*, 35(1), tr. 80-91.
227. Jusuf M., 2010, Amplified fragment length polymorphism diversity of cultivated white oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*, *Hayati Journal of Biosciences*, 17(1), pp. 21–26.
228. Barakat O.S., Sadik M.W., 2014, Mycelial growth and bioactive substance production of *Pleurotus ostreatus* in submerged culture, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3, pp. 1073–1085.
229. Bhattacharjya D.K., Paul R.K., Miah M.N., Ahmed K.U., 2014, Effect of different sawdust substrates on the growth and yield of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 7, pp. 38–46.
230. Patel Y., Patel A.K., Sharma M., Maurya A., Singh V.K., 2015, Biochemical diversity in monokaryons produced from *Pleurotus ostreatus*, *International Journal of Advanced Biological Research* 5(4), pp. 411–421.
231. Anderson N.A., Wang S.S., Schwandt J.W., 1973, The *Pleurotus ostreatus-sapidus* species complex, *Mycologia*, 65(1), pp. 28–35.
232. Eugenio C.P., Anderson N.A., 1968, The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*, *Mycologia*, 60, pp. 627–634.
233. Anderson N.A., Furnier G.R., Wang A.S., Schwandt J.W., 1991, The number and distribution of incompatibility factors in natural populations of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sapidus*, *Canadian Journal of Botany*, 69(10), pp. 2187–2191.
234. Yan P.-S., Jiang J.-H., Li G.-F., Deng C.-L., 2003, Mating system and DNA polymorphism of monokaryons with different mating type of *Stropharia rugoso-annulata*, *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 19(7), pp. 737–740.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Thành phần môi trường PDA (potato dextrose agar)

| Stt | Thành phần | Số lượng |
|------------|-------------------|-----------------|
| 1 | Potato extract | 4 g |
| 2 | Đường D-glucose | 20 g |
| 3 | Agar | 15 g |
| 4 | Nước cất | cho đủ 1000 ml |
| pH: 6,0 | | |

Phụ lục 2. Thành phần môi trường MYA (malt yeast agar)

| Stt | Thành phần | Số lượng |
|-------------|-------------------|-----------------|
| 1 | Yeast extract | 2 g |
| 2 | Malt extract | 10 g |
| 3 | Agar | 15 g |
| 4 | Nước cất | cho đủ 1000 ml |
| pH tự nhiên | | |

Phụ lục 3. Thành phần môi trường PDB (potato dextrose broth)

| Stt | Thành phần | Số lượng |
|------------|-------------------|-----------------|
| 1 | Potato extract | 4 g |
| 2 | Đường D-glucose | 20 g |
| 4 | Nước cất | cho đủ 1000 ml |
| pH: 6,0 | | |

Phụ lục 4. Môi trường thạch hoàn chỉnh MCM (mushroom complete medium)

| STT | Thành phần | Số lượng |
|------------|---------------------------------|-----------------|
| 1 | Dextrose | 20 g |
| 2 | Peptone | 2 g |
| 3 | Cao nấm men | 2 g |
| 4 | Thiamine HCl | 12 μ g |
| 5 | MgSO ₄ | 0,5 g |
| 6 | K ₂ HPO ₄ | 1 g |
| 7 | KH ₂ PO ₄ | 0,46 g |
| 8 | Agar | 20 g |
| 9 | Nước cất | cho đủ 1000 ml |
| pH: 6,5 | | |

Phụ lục 5. Thành phần môi trường YBLB (yeast bromothymol blue lactose broth)

| Stt | Thành phần | Số lượng |
|------------|-------------------|-----------------|
| 1 | Yeast extract | 4,5 g |
| 2 | Pepton | 7,5 g |
| 3 | Bromothymol blue | 0,025 g |
| 4 | Lactose | 5 g |
| 5 | Nước cất | cho đủ 1000 ml |
| pH: 7,5 | | |

Phụ lục 6. Thành phần dung dịch CTAB 2x

| STT | Hóa chất | Nồng độ cuối | Số lượng |
|------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| 1 | CTAB | 2% | 4 g |
| 2 | 1M Tris-HCl (pH 8,0) | 100 mM | 20 ml |
| 3 | 0,5M EDTA (pH 8,0) | 20 mM | 8 ml |
| 4 | DTT | 0,125% | 0,25 g |
| 5 | NaCl | 1,4 M | 13,36 g |
| 6 | Nước cất | | cho đủ 200 ml |

Cho các thành phần từ 1 – 4 hòa tan trong khoảng 100 ml nước cất sau đó bổ sung NaCl. Cuối cùng, bổ sung thêm nước cất để điều chỉnh thể tích và khuấy đều để tạo thành dung dịch đồng nhất; bảo quản dung dịch ở nhiệt độ phòng.

Phụ lục 7. Thành phần dung dịch CIA

| STT | Hóa chất | Thể tích (ml) |
|------------|-----------------|----------------------|
| 1 | Chloroform | 192 |
| 2 | Iso-amylalcohol | 8 |

Phụ lục 8. Thành phần dung dịch TE

| STT | Hóa chất | Nồng độ cuối | Thể tích |
|------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| 1 | 1M Tris-HCl (pH 8,0) | 10mM | 500 μ l |
| 2 | 0,5M EDTA (pH 8,0) | 1mM | 100 μ |

Phụ lục 9. Trình tự các đầu tiếp hợp và môi trong phân tích AFLP

| STT | Tên gọi | Trình tự |
|------------|------------------------|-----------------------|
| 1 | Oligonucleotide PstIAF | CTCGTAGACTGCGTACATGCA |
| 2 | Oligonucleotide PstIAR | TGTACGCAGTCTAC |
| 3 | Môi PstIAAG | GACTGCGTACATGCAGAAG |
| 4 | Môi PstICAA | GACTGCGTACATGCAGCAA |
| 5 | Môi PstIG | GACTGCGTACATGCAGG |
| 6 | Môi PstIGC | GACTGCGTACATGCAGGC |

Phụ lục 10. Thành phần thuốc nhuộm lactophenol cotton blue

| STT | Hóa chất | Số lượng |
|------------|-----------------|-----------------|
| 1 | Cotton blue | 0,05 g |
| 2 | Phenol tinh thể | 20 g |
| 3 | Glycerin | 40 ml |
| 4 | Lactic acid | 20 ml |
| 5 | Nước cất | 20 ml |

Hòa tan cotton blue vào nước cất và để qua đêm. Sau đó lọc dung dịch cotton blue để loại bỏ phần cặn không tan. Cho phenol tinh thể vào dung dịch lactic acid và khuấy trên máy khuấy từ cho đến khi tan hết. Cuối cùng cho các dung dịch glycerin và cotton đã lọc vào hỗn hợp phenol – axit lactic khuấy đều. Thuốc nhuộm được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Phụ lục 11. Thông tin trình tự của các cặp mồi sử dụng khảo sát nội dung 4

| STT | Cặp mồi | Trình tự mồi xuôi (5' → 3') | Trình tự mồi ngược (5' → 3') |
|-----|---------|-----------------------------|------------------------------|
| 1 | 1 | GGTGTGACATCCGCTGCGC | GGCATTCTTCGATGGGCGAGATT |
| 2 | 2 | CTGGAAGGATGACCGCTCCGAA | CGCTTCGATTTCTTTAGCAGACG |
| 3 | 3 | TGAAGGAGGCGGTGTAGA | AGGAAGGTGTGCAATTGGGG |
| 4 | 4 | ATGGCTGATCCTCTTTATCCTCT | CGACAGATATGAAAGGTTTTGTGC |
| 5 | 5 | GACCTCACCTACCCACTGTA | TCATATGGCTATGGCTACAGATTG |
| 6 | 6 | ATGGCCATCGAGCTACCCA | CGAATGGATAAACGTTGGGGCTG |
| 7 | 7 | ATGCGTCCCGAGTTTGCCC | CCTTCTGCTGATGCATGGC |
| 8 | 8 | GACCTCACCTACCCACTGTA | GCTACAGCGTGTTTTTCTGGG |
| 9 | 9 | CTCGTATTGTTTGAGACTCCGATTTC | GAAAGTGGTATACCGTGGTATTCAT |
| 10 | 10 | GGCCACATGTATGAGATGAA GTA | TTCATCAATTCCGTTGTGTGGCAC |

Phụ lục 12. Trình tự nucleotide đoạn ITS các chủng nấm

>**ABI-F000201** (661 nucleotide)

GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTCACACTATGGAGTTGTTGCTGGC
 CTCTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGTGAACCTTTG
 ATAGATCTGTGAAGTCGTCTCTCAAGTCGTCAGACTTGGTTGCTGGGATTTAA
 ACGTCTCGGTGTGACTCGCAGTCTATTTACTTACACACCCCAAATGTATGTCT
 ACGAATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTTTAAACCATAATACTTTCAAC
 AACGGATCTTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG
 TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCG

CCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAAAC
TCACTTTGGTTTCTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGCTGCTGGCCT
TGACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCG
CATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCT
CTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

//

>**ABI-F000219** (671 nucleotide)

CTTCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTCCCTATGGAGTT
GTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGT
GAACTTTTGATAGATCTGTGAAGTCGTCTCTCAAGTCGTCAGACTTGGTTGCT
GGGATTTAAACGTCTCGGTGTGACTACGCAGTCTATTTACTTACACACCCCAA
ATGTATGTCTACGAATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTTTAAACCATAATAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACCTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTA
AATTCTCAAACACTCTTTGGTTTCTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTGGGG
GCTGCTGGCCTTGACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCA
TTGCCTCTGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATA
GAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAAAT
CAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

//

>**ABI-F000222** (662 nucleotide)

GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTCCTATGGAGTTGTTGCTGGC
CTCTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGTGAACTTTG
ATAGATCTGTGAAGTCGTCTCTCAAGTCGTCAGACTTGGTTGCTGGGATTTAA
ACGTCTCGGTGTGACTACGCAGTCTATTTACTTACACACCCCAAATGTATGTC
TACGAATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTTTAAACCATAATACAACCTTTCAA
CAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGC
GCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAA
CTCACTTTGGTTTCTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGCTGCTGGCC
TTGACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGC
GCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGC
TCTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGG
ACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

//

>**ABI-F000223** (676 nucleotide)

CCTTCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTCCTATGGAGTT
GTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGT
GAACTTTTGATAGATCTGTGAAGTCGTCTCTCAAGTCGTCAGACTTGGTTGCT
GGGATTTAAACGTCTCGGTGTGACTACGCAGTCTATTTACTTACACACCCCAA
ATGTATGTCTACGAATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTTTAAACCATAATAC

AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCACCTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCTTA
AATTCTCAAACACTCACTTTGGTTTCTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTGGGG
GCTGCTGGCCTTGACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCA
TTGCCTCTGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGMACGCATGAAT
AGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAA
ATCATGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAACGG

//

>**ABI-F000224** (662 nucleotide)

GGTGACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTCACTATGGAGTTGTTGCTGGCCT
CTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGTGAACTTTTGAT
AGATCTGTGAAGTCGTCTCTCAAGTCGTCAGACTTGGTTGCTGGGATTTAAAC
GTCTCGGTGTGACTACGCAGTCTATTTACTTACACACCCCAAATGTATGTCTA
CGAATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTTTAAACCATAATACAACCTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC
CCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCTTAAATTCTCAAAC
CACTTTGGTTTCTTTCCAATTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGCTGCTGGCCTT
GACAGGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCGC
ATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCT
CTAATCGTCCGCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACT
ACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAA

//

>**ABI-F000241** (649 nucleotide)

AACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTCACTATGGAGTTGTTGCTGGCCTCTA
GGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGTGAACTTTTGATAGA
TCTGTGAAGTCGTCTTCAAGTCGTCAGACTTGGTTTCTGGGATTTAAACGT
CTCGGTGTGACAACGCAGTCTATTTACTTAAACACACCCCAAATGTATGTCTAC
GAATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTATAAACCATAATACAACCTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCC
CCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCTTAAATTCTCAAAC
ACATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGTTGCTGGCTGTAACAAGTCGG
CTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCGCATGATGTGAT
AATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCC
GCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAA
CTTAAGCATATCATA

//

>**ABI-F000248** (654 nucleotide)

CCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTCACTATGGAGTTGTTGCTGGCCTCTAGG
GGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGTGAACTTTTGATAGATC
TGTGAAGTCGTCTTCAAGTCGTCAGACTTGGTTTCTGGGATTTAAACGTCT

CGGTGTGACAACGCAGTCTATTTACTTAAACACACCCCCAAATGTATGTCTACGA
ATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTATAAACCATAATAACAACCTTTCAACAACG
GATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCC
TTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGTGAGTGTGATTAAATTCTCAAACCTCAC
ATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGTTGCTGGCTGTAACAAGTCGGCT
CCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCGCATGATGTGATAA
TTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCGC
AAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACT
TAAGCATATCAATAGTCGGA

//

>**ABI-F000252** (638 nucleotide)

AAGGATCATTAATGAATTCACTATGGAGTTGTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGT
GCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGTGAACTTTTGATAGATCTGTGAAG
TCGTCCTTCAAGTCGTCAGACTTGGTTTGTGCTGGGATTTAAACGTCTCGGTGTG
ACAACGCAGTCTATTTACTTAAACACACCCCCAAATGTATGTCTACGAATGTCAT
TTAATGGGCCTTGTGCCTATAAACCATAATAACAACCTTTCAACAACGGATCTCT
TGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCCTTGGTAT
TCCGAGGGGCATGCCTGTTTGTGAGTGTGATTAAATTCTCAAACCTCACATTTATT
TGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGTTGCTGGCTGTAACAAGTCGGCTCCTCTTA
AATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCGCATGATGTGATAATTATCAC
TCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCGCAAGGAC
AATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCG
AGGAA

//

>**ABI-F000253** (654 nucleotide)

GACCTGCGGAAGGATCATTAATGAATTCACTATGGAGTTGTTGCTGGCCTCTA
GGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTACCACCTGTGAACTTTTGATAGAT
CTGTGAAGTCGTCCTTCAAGTCGTCAGACTTGGTTTGTGCTGGGATTTAAACGTC
TCGGTGTGACAACGCAGTCTATTTACTTAAACACACCCCCAAATGTATGTCTACG
AATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTATAAACCATAATAACAACCTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCC
CTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGTGAGTGTGATTAAATTCTCAAACCTCA
CATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGTTGCTGGCTGTAACAAGTCGGC
TCCTATTAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCGCATGATGTGATA
ATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCG
CAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCAATAGTCGGA

//

>**ABI-F000254** (608 nucleotide)

AAGGATCATTAATGAATTCACTATGGGAGTTGTTGCTGGCCTCTAGGGGCAT
GTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGTGAACTTTTGATAGATCTGTGA
AGTCGTCCTTCAAGTCGTCAGACTTGGTTTGCTGGGATTTAAACGTCTCGGTG
TGACAACGCAGTCTATTTACTTAAACACACCCCAAATGTATGTCTACGAATGTC
ATTTAATGGGCCTTGTGCCTATAAACCATAATACAACCTTTCAACAACGGATCT
CTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGT
ATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATTCTCAAACCTCACATTTA
TTTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGTTGCTGGCTGTAACAAGTCGGCTCCTCT
TAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCGCATGATGTGATAATTATC
ACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCGCAAGG
ACAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAG

//

>**ABI-F000255** (650 nucleotide)

AACCTGCGGAAGGATCATTAATGAATTCACTATGGAGTTGTTGCTGGCCTCTA
GGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGTGAACTTTTGATAGA
TCTGTGAAGTCGTCCTTCAAGTCGTCAGACTTGGTTTGCTGGGATTTAAACGT
CTCGGTGTGACAACGCAGTCTATTTACTTAAACACACCCCAAATGTATGTCTAC
GAATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTATAAACCATAATACAACCTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCC
CCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATTCTCAAACCTC
ACATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGTTGCTGGCTGTAACAAGTCGG
CTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCGCATGATGTGAT
AATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCC
GCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAA
CTTAAGCATATCATAG

//

>**ABI-F000256** (819 nucleotide)

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT
TAATGAATTCACTATGGAGTTGTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCTTC
ACTAGTCTTTCAACCACCTGTGAACTTTTGATAGATCTGTGAAGTCGTCCTTC
AAGTCGTCAGACTTGGTTTGCTGGGATTTAAACGTCTCGGTGTGACAACGCA
GTCTATTTACTTAAACACACCCCAAATGTATGTCTACGAATGTCATTTAATGGG
CCTTGTGCCTATAAACCATAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGG
GCATGCCTGTTTGGATTGTTGGGGGTTGCTGGCTGTAACAAGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTA
GCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATA
GCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTTGACA
ATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA

GCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCG
GGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGTGGTCTTTGGCCATCCGAGTTGTAATCT
AGAGAAGTGTTATCCGCGCTGGACCGTGTA

//

>**ABI-F000257** (583 nucleotide)

TATGGGAGTTGTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTC
AACCACCTGTGAACTTTTGATAGATCTGTGAAGTCGTCCTTCAAGTCGTCAGA
CTTGGTTTGCTGGGATTTAAACGTCTCGGTGTGACAACGCAGTCTATTTACTT
AACACACCCCAAATGTATGTCTACGAATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTAT
AAACCATAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTT
TGAGTGTCATTAAATTCTCAAACCTCACATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTTGG
GGGTTGCTGGCTGTAACAAGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCT
CATTGCCTCTGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAA
TAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAA
A

//

>**ABI-F000259** (798 nucleotide)

GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAATTC
ACTATGGGAGTTGTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTT
TCAACCACCTGTGAACTTTTGATAGATCTGTGAAGTCGTCCTTCAAGTCGTCA
GACTTGGTTTGCTGGGATTTAAACGTCTCGGTGTGACAACGCAGTCTATTTAC
TTAACACACCCCAAATGTATGTCTACGAATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCT
ATAAACCATAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGT
TTGAGTGTCATTAAATTCTCAAACCTCACATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTTG
GGGTTGCTGGCTGTAACAAGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTC
TCATTGCCTCTGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGA
ATAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCA
AATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAA
GAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCA
AATTTAAAATCTGGTGGTCTTTGGCCATCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGTT
ATCCGCG

//

>**ABI-F000261** (622 nucleotide)

CTATGGGAGTTGTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTT
CAACCACCTGTGAACTTTTGATAGATCTGTGAAGTCGTCCTTCAAGTCGTCAG
ACTTGGTTTGCTGGGATTTAAACGTCTCGGTGTGACAACGCAGTCTATTTACT
TAACACACCCCAAATGTATGTCTACGAATGTCATTTAATGGGCCTTGTGCCTA
TAAACCATAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAA

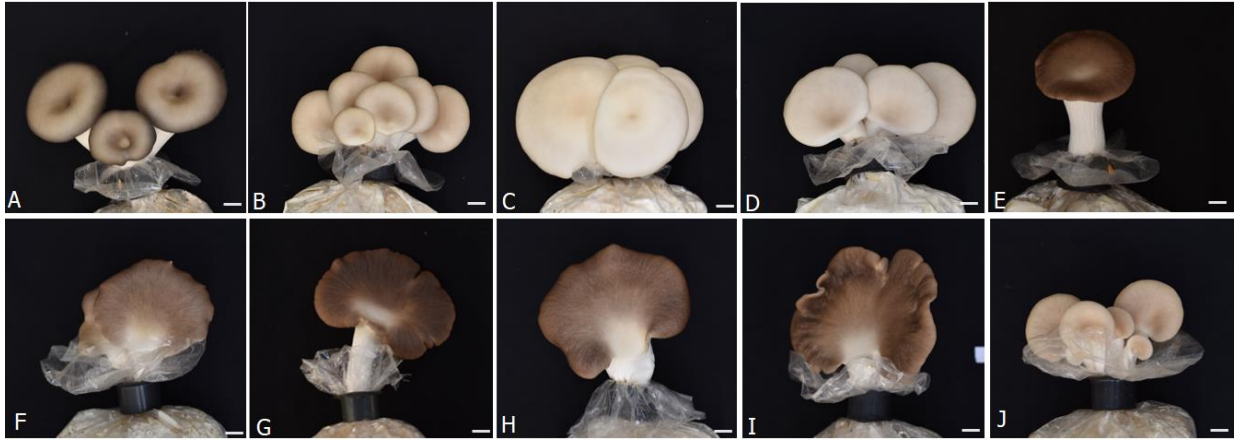
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
 CGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTT
 TGAGTGTCATTAAATTCTCAAACCTCACATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTTGG
 GGGTTGCTGGCTGTAACAAGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCT
 CATTGCCTCTGCGCATGATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAA
 TAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAA
 ATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

//

Phụ lục 13. Năng suất nuôi trồng: khối lượng tươi (gam) trên mỗi túi

| STT túi | ABI-F000259 | ABI-F000261 | ABI-F000252 | ABI-F000253 | ABI-F000224 | ABI-F000256 | ABI-F000201 | ABI-F000219 | ABI-F000222 | ABI-F000241 |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 52 | 95 | 93 | 88 | 188 | 85 | 171 | 209 | 187 | 84 |
| 2 | 80 | 109 | 91 | 59 | 211 | 53 | 154 | 225 | 174 | 79 |
| 3 | 42 | 78 | 77 | 78 | 169 | 61 | 173 | 194 | 198 | 83 |
| 4 | 57 | 125 | 102 | 74 | 191 | 63 | 192 | 182 | 212 | 81 |
| 5 | 64 | 79 | 78 | 54 | 207 | 65 | 149 | 216 | 228 | 78 |
| 6 | 45 | 113 | 98 | 89 | 179 | 76 | 156 | 199 | 231 | 77 |
| 7 | 48 | 88 | 95 | 76 | 248 | 101 | 144 | 177 | 210 | 79 |
| 8 | 37 | 120 | 95 | 88 | 236 | 69 | 135 | 221 | 206 | 77 |
| 9 | 65 | 96 | 105 | 60 | 239 | 52 | 157 | 183 | 225 | 80 |
| 10 | 57 | 105 | 98 | 77 | 247 | 98 | 189 | 184 | 202 | 81 |
| 11 | 77 | 99 | 91 | 99 | 191 | 95 | 193 | 174 | 185 | 83 |
| 12 | 83 | 112 | 95 | 79 | 242 | 77 | 157 | 170 | 179 | 87 |
| 13 | 37 | 83 | 84 | 71 | 204 | 71 | 133 | 172 | 175 | 83 |
| 14 | 67 | 98 | 83 | 53 | 201 | 61 | 133 | 181 | 175 | 87 |
| 15 | 77 | 108 | 93 | 77 | 226 | 67 | 165 | 195 | 202 | 80 |
| 16 | 41 | 98 | 101 | 80 | 237 | 54 | 131 | 193 | 151 | 80 |
| 17 | 67 | 87 | 95 | 90 | 177 | 80 | 154 | 211 | 167 | 81 |
| 18 | 53 | 112 | 108 | 76 | 189 | 74 | 168 | 187 | 207 | 81 |
| 19 | 50 | 115 | 102 | 59 | 224 | 58 | 142 | 199 | 183 | 83 |
| 20 | 60 | 78 | 83 | 57 | 218 | 53 | 176 | 212 | 171 | 74 |
| 21 | 71 | 105 | 93 | 83 | 235 | 57 | 165 | 198 | 229 | 79 |
| 22 | 66 | 121 | 100 | 65 | 195 | 67 | 191 | 179 | 171 | 78 |
| 23 | 49 | 79 | 88 | 97 | 209 | 44 | 157 | 217 | 235 | 84 |
| 24 | 63 | 105 | 85 | 96 | 196 | 68 | 165 | 210 | 183 | 76 |
| 25 | 64 | 89 | 98 | 59 | 182 | 54 | 142 | 172 | 166 | 85 |
| 26 | 66 | 81 | 84 | 83 | 227 | 72 | 144 | 180 | 201 | 76 |
| 27 | 46 | 80 | 108 | 55 | 228 | 48 | 179 | 220 | 203 | 79 |
| 28 | 83 | 101 | 102 | 89 | 215 | 47 | 139 | 201 | 146 | 80 |
| 29 | 49 | 88 | 105 | 89 | 163 | 55 | 188 | 199 | 208 | 85 |
| 30 | 84 | 105 | 85 | 63 | 192 | 93 | 150 | 202 | 192 | 81 |

Phụ lục 14. Hình ảnh quả thể nấm trên bịch phôi



(A: ABI-F000201; B: ABI-F000219; C: ABI-F000222; D: ABI-F000224; E: ABI-F000241; F: ABI-F000252; G: ABI-F000253; H: ABI-F000256; I: ABI-F000259; J: ABI-F000261; thước: 1 cm)