

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Ngô Thùy Trâm

**NGHIÊN CỨU NĂM NGOẠI CỘNG SINH VỚI HỆ RỄ
THÔNG BA LÁ *Pinus kesiya* TẠI TỈNH LÂM ĐỒNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội – Năm 2026

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Ngô Thùy Trâm

**NGHIÊN CỨU NĂM NGOẠI CỘNG SINH VỚI HỆ RỄ
THÔNG BA LÁ *Pinus kesiya* TẠI TỈNH LÂM ĐỒNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9.42.01.07

**Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ**

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

Hà Nội – Năm 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "Nghiên cứu nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ thông ba lá *Pinus kesiya* tại tỉnh Lâm Đồng" 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.

Hà Nội, ngày 8 tháng 10 năm 2026

Tác giả luận án

(Ký và ghi rõ họ tên)



Ngô Thùy Trâm

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc với TS. Phạm Nguyễn Đức Hoàng – Viện trưởng Viện Công nghệ Sinh học Ứng dụng và TS. Nguyễn Hoàng Dũng – Viện Khoa học Sự sống, là hai người thầy hướng dẫn khoa học đã giúp đỡ, định hướng nghiên cứu, chỉ dẫn, hỗ trợ và tạo điều kiện để tôi có thể thực hiện và hoàn thành luận án này.

Tôi cũng xin trân trọng cảm ơn các anh chị em, cán bộ Viện Công nghệ Sinh học Ứng dụng đã tạo mọi điều kiện và hỗ trợ nhiệt tình trong quá trình tôi công tác tại Viện, để tôi có thể tiến hành nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo, các thầy cô và các anh chị em Viện Khoa học Sự Sống, Học viện Khoa học và Công nghệ đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và tạo những điều kiện tốt nhất để tôi có thể hoàn thành tốt chương trình học và nghiên cứu.

Ngoài ra, tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến Quỹ đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF) đã hỗ trợ một phần kinh phí cho nghiên cứu này. Sự hỗ trợ của Quỹ VINIF thông qua dự án VINIF.2021.DA00163 đã góp phần quan trọng giúp tôi có thể triển khai nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo, các anh chị kiểm lâm thuộc Ban quản lý rừng phòng hộ đầu nguồn Đa Nhim và Viện Khoa học Sự sống (Tp. Đà Lạt) đã hỗ trợ và tạo điều kiện để tôi thực hiện luận án này.

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

Hà Nội, ngày 8 tháng 10 năm 2026

Tác giả luận án



Ngô Thùy Trâm

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ.....	viii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. RỄ NẤM NGOẠI CỘNG SINH	4
1.1.1. Rễ nấm cộng sinh.....	4
1.1.2. Rễ nấm ngoại cộng sinh	5
1.1.3. Cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh	6
1.1.4. Sự hình thành rễ nấm ngoại cộng sinh.....	9
1.2. NẤM RỄ NGOẠI CỘNG SINH	10
1.2.1. Thành phần loài của nấm rễ ngoại cộng sinh	10
1.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến thành phần loài của nấm ngoại cộng sinh	11
1.2.3. Sự hình thành quả thể của nấm ngoại cộng sinh	14
1.3. THÀNH PHẦN THỰC VẬT NGOẠI CỘNG SINH.....	15
1.4. VAI TRÒ CỦA RỄ NẤM NGOẠI CỘNG SINH VÀ NẤM NGOẠI CỘNG SINH	17
1.5. SỰ CỘNG SINH CỦA NẤM NGOẠI CỘNG SINH VỚI CÁC KHU HỆ RỪNG THÔNG (<i>Pinus</i> spp.) TRÊN THẾ GIỚI	18
1.5.1. Mối quan hệ cộng sinh bắt buộc giữa nấm ngoại cộng sinh và chi thông	18
1.5.2. Tác động của nấm ngoại cộng sinh trong quản lý và tái sinh rừng thông	19
1.6. NGHIÊN CỨU VỀ NẤM NGOẠI CỘNG SINH VỚI THÔNG Ở KHU VỰC ĐÔNG NAM Á.....	22

Chương 2.	ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
2.1.	ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	24
2.2.	PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
2.2.1.	Nội dung nghiên cứu.....	24
2.2.2.	Địa điểm thực hiện nghiên cứu.....	24
2.2.3.	Sơ đồ các bước thực hiện trong nghiên cứu.....	25
2.2.4.	Phương pháp thực hiện nội dung 1	26
2.2.5.	Phương pháp tiến hành nội dung 2	34
2.2.6.	Phương pháp tiến hành nội dung 3	40
Chương 3.	KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	43
3.1.	KẾT QUẢ KHẢO SÁT THÀNH PHẦN LOÀI NẤM NGOẠI CỘNG SINH Ở CÁC GIAI ĐOẠN PHÁT TRIỂN KHÁC NHAU CỦA CÂY CHỦ THÔNG BA LÁ <i>P. kesiya</i>	43
3.1.1.	Kết quả khảo sát thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ cây thông ba lá trưởng thành	43
3.1.2.	Kết quả khảo sát thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ của cây con thông ba lá <i>P. kesiya</i> 6 tháng tuổi trong vườn ươm.....	67
3.1.3.	Kết quả khảo sát thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ của cây con thông ba lá <i>P. kesiya</i> 3 năm tuổi trong khu vực rừng trồng	72
3.1.4.	Kết quả so sánh về thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ của cây thông ba lá <i>P. kesiya</i> giữa các giai đoạn tuổi của chủ.....	79
3.2.	KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA NẤM NGOẠI CỘNG SINH TỚI KHẢ NĂNG PHÁT TRIỂN CỦA CÂY THÔNG CON <i>P. kesiya</i> TRONG ĐIỀU KIỆN <i>in situ</i> , <i>ex situ</i> VÀ <i>in vitro</i>	83
3.2.1.	Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nấm ngoại cộng sinh tới khả năng phát triển của cây thông con <i>P. kesiya</i> trong điều kiện <i>in situ</i>	83
3.2.2.	Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nấm ngoại cộng sinh tới khả năng phát triển của cây thông con <i>P. kesiya</i> trong điều kiện <i>ex situ</i>	87
3.2.3.	Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nấm ngoại cộng sinh tới khả năng phát triển của cây con thông ba lá <i>P. kesiya</i> trong điều kiện <i>in vitro</i>	91

3.3. KẾT QUẢ KHẢO SÁT SỰ HÌNH THÀNH QUẢ THỂ NẤM NGOẠI CỘNG SINH Ở KHU VỰC RỪNG TRỒNG CÂY THÔNG CON <i>P. kesiya</i> 3 NĂM TUỔI.....	98
3.3.1. Kết quả thu thập quả thể nấm ngoại cộng sinh.....	98
3.3.2. Kết quả phân nhóm sơ bộ dựa trên hình thái	102
3.3.3. Kết quả định danh quả thể nấm rễ ngoại cộng sinh thu thập được ở khu vực rừng thông 3 năm tuổi.....	118
3.3.4. Kết quả khảo sát khả năng ứng dụng làm thực phẩm của các loài nấm ngoại cộng sinh thu được trong khu vực rừng trồng thông ba lá <i>P. kesiya</i> 3 năm tuổi	121
Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	127
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN..	129
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	130
PHỤ LỤC.....	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu/Viết tắt	Tiếng Anh	Diễn giải
ASV	Amplicon Sequence Variants	Biến thể trình tự khuếch đại
Blast	Basic Local Alignment Search Tool	Công cụ tìm kiếm so sánh chuỗi trình tự cục bộ cơ bản
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
ECM	Ectomycorrhizae	Rễ nấm ngoại cộng sinh
EMF	Ectomycorrhizal fungi	Nấm ngoại cộng sinh
ITS	Internal transcribed spacer	Vùng sao mã bên trong
LSU	Large subunit	Vùng tiểu đơn vị lớn
NGS	Next generation sequencing	Giải trình tự thế hệ mới
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
Viện KHSS		Viện Khoa học Sự sống

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Bảng mô tả hình thái các kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong mẫu đất khu vực Đa Nhím.....	54
Bảng 3.2. Bảng mô tả hình thái các kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong mẫu đất khu vực Viện Khoa học Sự sống	58
Bảng 3.3. Bảng mô tả hình thái của các kiểu hình chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trên hệ rễ cây con thông ba lá 6 tháng tuổi.....	69
Bảng 3.4. Bảng mô tả hình thái của các kiểu hình chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trên hệ rễ cây con thông ba lá 3 tuổi	74
Bảng 3.5 Các chỉ số đa dạng giữa ba giai đoạn tuổi của cây thông ba lá	81
Bảng 3.6. Thống kê quả thể nấm ngoại cộng sinh thu được tại khu vực rừng trồng trong 24 đợt thu mẫu	99
Bảng 3.7. Bảng mô tả hình thái nấm rễ ngoại cộng sinh thu thập được thuộc nhóm nấm phiến.....	105
Bảng 3.8. Bảng mô tả hình thái nấm rễ ngoại cộng sinh thu thập được thuộc nhóm nấm ống.....	113
Bảng 3.9. Mẫu nấm rễ ngoại cộng sinh thu thập được thuộc nhóm nấm cục	118
Bảng 3.10. Dữ liệu kết về quả định danh loài nấm ngoại cộng sinh và khả năng sử dụng của chúng trong khu vực nghiên cứu.....	123

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ VÀ ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Các kiểu cấu trúc nấm rễ cộng sinh.....	5
Hình 1.2. Cấu trúc của một rễ nấm ngoại cộng sinh.....	5
Hình 1.3. Hóa thạch rễ nấm ngoại cộng sinh giữa <i>Pinus</i> và <i>Suillus/Rhizopogon</i>	6
Hình 1.4. Mặt cắt ngang của một cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh điển hình	7
Hình 1.5. Các dạng cấu trúc mạng lưới Hartig	7
Hình 1.6. Các dạng cấu trúc của lớp bao mantle	8
Hình 1.7. Các dạng hình thái của sợi nấm dạng rễ	9
Hình 1.8. Các giai đoạn hình thành rễ nấm ngoại cộng sinh giữa <i>Pinus pinaster</i> và <i>Pisolithus tinctorius</i>	9
Hình 1.9. Nuôi cấy <i>in vitro</i> <i>Populus tremula</i> và <i>Laccaria bicolor</i>	10
Hình 1.10. Các chi nấm có thể hình thành rễ nấm ngoại cộng sinh	11
Hình 1.11. Sơ đồ mạng lưới rễ nấm ngoại cộng sinh trong một khu hệ thực vật.....	12
Hình 1.12. Các yếu tố ảnh hưởng đến cộng đồng nấm ngoại cộng sinh.....	14
Hình 1.13. Quả thể trưởng thành của <i>Hebeloma cylindrosporum</i> và <i>Cantharellus anzutake</i> trong nuôi cấy <i>in vitro</i> với <i>Pinus pinaster</i> và <i>P. densiflora</i>	15
Hình 1.14. Những chi thực vật có ít nhất một loài có sự hình thành cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh	16
Hình 1.15. Sự phân bố tự nhiên của các loài thông trên thế giới.....	18
Hình 1.16. Khả năng cộng sinh của một số chi nấm rễ ngoại cộng sinh với thông .	19
Hình 1.17. Thí nghiệm về tác động tích cực giữa cây con <i>Pinus densiflora</i> và nấm ngoại cộng sinh trong nhà kính.....	20
Hình 1.18. Vai trò của nấm rễ ngoại cộng sinh trong việc tái sinh rừng sau hỏa hoạn	22
Hình 2.1. Đường thu mẫu	26
Hình 2.2 Mẫu đất và các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh có trong đất.....	27
Hình 2.3. Rễ nấm ngoại cộng sinh thu được từ mẫu đất; các kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh có thể có trong một mẫu đất	28
Hình 2.4. Một số đặc điểm cơ bản của rễ nấm ngoại cộng sinh.....	28

Hình 2.5. Khu vực rừng trồng <i>Pinus kesiya</i> 3 năm tuổi.....	31
Hình 2.6. Cây con thông ba lá 6 tháng tuổi trong vườn ươm và cây thông ba lá con 3 năm tuổi trong rừng trồng.....	33
Hình 2.7. Cây thông vô trùng sau 3 tuần gieo hạt.....	35
Hình 2.8. Cây thông con mới chuyển vào ly trồng và sau 6 tháng trồng.....	36
Hình 2.9. Mô tả sơ bộ hình thái ngoài của quả thể nấm.....	41
Hình 3.1. Tỷ lệ của các ngành nấm chính thu được nhờ phân tích NGS mẫu đất....	44
Hình 3.2. Tỷ lệ các lớp nấm và các chi nấm có trong mẫu đất ở khu vực rừng Đa Nhim	45
Hình 3.3. Tỷ lệ các lớp nấm và các chi nấm có trong mẫu đất ở khu vực rừng thuộc Viện Khoa học Sự sống	45
Hình 3.4. Biểu đồ Krona thể hiện tỷ lệ thành phần các taxon thuộc ngành Ascomycota trong các mẫu đất ở khu vực Đa Nhim.....	46
Hình 3.5. Biểu đồ Krona thể hiện tỷ lệ thành phần các taxon thuộc ngành Basidiomycota trong các mẫu đất ở khu vực Đa Nhim	47
Hình 3.6. Biểu đồ Krona thể hiện tỷ lệ thành phần các taxon thuộc ngành Ascomycota trong các mẫu đất ở khu vực Viện KHSS.....	48
Hình 3.7. Biểu đồ Krona thể hiện tỷ lệ thành phần các taxon thuộc ngành Basidiomycota trong các mẫu đất ở khu vực Viện KHSS	49
Hình 3.8. Sự khác biệt trong các chỉ số đa dạng Shannon và Pielou's giữa hai khu vực nghiên cứu.....	50
Hình 3.9. Mẫu đất thu được ở khu vực rừng Đa Nhim và ở khu vực rừng Viện Khoa học Sự sống	50
Hình 3.10. Sự khác biệt trong các chỉ số đa dạng Observed, Shannon và Pielou's đối với nhóm nấm ngoại cộng sinh giữa hai khu vực nghiên cứu.....	51
Hình 3.11. Biểu đồ Venn thể hiện mối tương quan ở cấp độ chi giữa hai khu vực Đa Nhim và Viện Khoa học Sự sống.....	52
Hình 3.12. Mức độ thay đổi tương đối về tỷ lệ phong phú của từng chi nấm ngoại cộng sinh giữa hai khu vực nghiên cứu.....	52
Hình 3.13. Một số đặc điểm của các mẫu chóp rễ ngoại cộng sinh có trong đất	53

Hình 3.14. Số lượng chóp rế nấm ngoại cộng sinh thu được ở hai khu vực nghiên cứu	54
Hình 3.15. Biểu đồ Venn thể hiện sự tương quan ở cấp độ chi giữa 2 khu vực nghiên cứu	63
Hình 3.16. Tỷ lệ chóp rế nấm ngoại cộng sinh do một loài nấm ngoại cộng sinh hình thành tại hai khu vực nghiên cứu.	64
Hình 3.17. Các chi và loài nấm ngoại cộng sinh ở hai khu vực nghiên cứu	65
Hình 3.18. Cây thông con 6 tháng tuổi.....	67
Hình 3.19. Các dạng chóp rế đặc trưng trong mẫu cây con thông ba lá 6 tháng tuổi	68
Hình 3.20. Tỷ lệ số lượng các kiểu hình của chóp rế nấm ngoại cộng sinh trong một mẫu cây con 6 tháng tuổi.....	68
Hình 3.21. Sự phong phú của các loài nấm ngoại cộng sinh trong hệ rế cây thông ba lá 6 tháng tuổi.....	72
Hình 3.22. Cây con thông ba lá tại rừng trồng 3 năm tuổi và sau khi đưa về phòng thí nghiệm	72
Hình 3.23. Các dạng chóp rế đặc trưng trong mẫu cây con thông ba lá 3 năm tuổi.	73
Hình 3.24. Tỷ lệ số lượng các kiểu hình của chóp rế nấm ngoại cộng sinh trong một mẫu cây con thông ba lá 3 tuổi	73
Hình 3.25. Số chóp rế nấm ngoại cộng sinh và số mẫu ghi nhận của các loài nấm ngoại cộng sinh có trên cây 3 năm tuổi.....	78
Hình 3.26. Tỷ lệ phần trăm các chi nấm ngoại cộng sinh xuất hiện ở 3 giai đoạn tuổi của cây thông ba lá	80
Hình 3.27. Cây con trong vườn ươm của thí nghiệm <i>in situ</i>	84
Hình 3.28. Tỷ lệ số lượng các kiểu hình của chóp rế nấm ngoại cộng sinh trong một mẫu cây con thông ba lá 6 tháng tuổi.....	85
Hình 3.29. Sự phong phú của các loài nấm ngoại cộng sinh trong hệ rế cây thông ba lá trong nghiên cứu <i>in situ</i>	86
Hình 3.30. Số lượng chóp rế nấm ngoại cộng sinh trong các nhóm cây theo tỷ lệ kiểu hình theo chiều cao cây trong thí nghiệm <i>in situ</i>	87
Hình 3.31. Cây con thông ba lá trong thí nghiệm nuôi trồng <i>ex situ</i>	88

Hình 3.32. Số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh theo chiều cao cây và số chóp rễ ngoại cộng sinh trong mỗi nhóm kiểu hình trong thí nghiệm <i>ex situ</i>	88
Hình 3.33. Chóp rễ nấm ngoại cộng sinh của các loài <i>Rhizopogon flavidus</i> ; <i>R. jiyaozi</i> ; <i>Pluveroboletus</i> sp.; <i>Cenococcum</i> sp. và <i>R. boninensis</i>	89
Hình 3.34. Sự phong phú của các loài nấm ngoại cộng sinh trong hệ rễ cây thông ba lá trong nghiên cứu <i>ex situ</i>	89
Hình 3.35. Quả thể nấm <i>R. boninensis</i> VNM00071130 thu tại rừng trưởng thành khu vực Đa Nhim và mặt cắt dọc của quả thể	92
Hình 3.36. Khuân lạc nấm <i>R. boninensis</i> VNM00071130 phân lập trên môi trường MMN sau 3 tuần và sinh khối nấm nuôi trên môi trường MMN lỏng sau 4 tuần....	93
Hình 3.37. Nghiệm thức không bổ sung <i>R. boninensis</i> và <i>P. kesiya</i> sau 1 tuần; 6 tuần; 12 tuần	93
Hình 3.38. Nghiệm thức đồng nuôi cấy <i>R. boninensis</i> và <i>P. kesiya</i> sau 1 tuần; 6 tuần; 12 tuần	94
Hình 3.39. Thí nghiệm đồng nuôi cấy <i>R. boninensis</i> và <i>P. kesiya</i>	94
Hình 3.40. Cấu trúc cộng sinh của hệ rễ <i>P. kesiya</i> và <i>R. boninensis</i>	95
Hình 3.41. Sự khác biệt về các chỉ số sinh trưởng của cây con <i>P. kesiya</i> giữa các nghiệm thức có và không bổ sung nấm <i>R. boninensis</i>	97
Hình 3.42. Hình ảnh tại khu vực nghiên cứu: từ ngoài nhìn vào; bên trong.....	98
Hình 3.43. Quả thể nấm ngoại cộng sinh ở rừng trồng thông ba lá 3 năm tuổi	98
Hình 3.44. Tương quan giữa lượng mưa, số ngày mưa trong tháng, nhiệt độ và lượng nấm thu được.....	102
Hình 3.45. Tỷ lệ các mã kiểu hình nấm thu được theo chi trong 24 đợt thu mẫu ..	119
Hình 3.46. Tỷ lệ loài trong mỗi chi nấm ngoại cộng sinh thu được	119
Hình 3.47. Sự xuất hiện của các loài nấm ngoại cộng sinh theo từng tháng trong năm	120
Hình 3.48. Tỷ lệ các loài nấm ăn được.....	122
Hình 3.49. Tỷ lệ các loài nấm ăn được trong mỗi chi.....	122

MỞ ĐẦU

Mối quan hệ cộng sinh giữa nấm và thực vật là một trong những hiện tượng cơ bản của tự nhiên, đặc trưng cho thực vật trên cạn. Hơn 90% thực vật có mạch trong hệ sinh thái có liên kết với nấm rễ cộng sinh và các bằng chứng hóa thạch cho thấy mối quan hệ này đã xuất hiện cách đây khoảng 400 triệu năm. Để chỉ ra tầm quan trọng của nấm rễ cộng sinh và hệ rễ của thực vật, Begon và cs. đã khẳng định “Hầu hết thực vật bậc cao không có rễ, chúng chỉ có rễ nấm cộng sinh” [1].

Trong nhóm nấm rễ cộng sinh, nấm rễ ngoại cộng sinh (ectomycorrhizal fungi - EMF) tuy chỉ chiếm khoảng 5% nhưng có vai trò hết sức quan trọng trong quá trình tiến hóa của thực vật, đặc biệt là thực vật rừng. Theo những ghi nhận của Brundett, có khoảng 6.000 loài thực vật và khoảng 20.000–25.000 loài nấm hình thành cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh, hỗ trợ tái sinh cây con và duy trì sự tồn tại của các quần thể cây thân gỗ ưu thế thuộc tầng tán và vượt tán trong các khu hệ thực vật như Thông (Pinaceae), Dẻ (Fagaceae), Bạch dương (Betulaceae), Dầu (Dipterocarpaceae)...[2] Trong hệ sinh thái này, nấm rễ ngoại cộng sinh thúc đẩy quá trình hấp thụ chất dinh dưỡng và nước của cây chủ, nhờ đó nâng cao khả năng chống chịu của cây đối với hạn hán, nhiệt độ, các chất độc hữu cơ và vô cơ trong đất cũng như bảo vệ cây chủ khỏi tác động của các mầm bệnh [3]. Vì vậy, sự hiện diện của nấm rễ ngoại cộng sinh, độ đa dạng và thành phần các loài nấm có ảnh hưởng rất lớn đến thành phần loài, tính đa dạng cũng như khả năng hình thành thể hệ nối tiếp của thực vật ở một khu vực rừng [4, 5]. Ngoài ra, nhiều loài nấm rễ ngoại cộng sinh có khả năng hình thành quả thể, là một trong những lâm sản ngoài gỗ có giá trị cao và là nguồn thực phẩm cho con người và động vật (*Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*, *Tuber* spp.,...). Các loại nấm rễ ngoại cộng sinh ăn được được đánh giá cao về các đặc tính ẩm thực, dinh dưỡng [6] và dược phẩm [7], ngày càng mang lại giá trị thương mại lớn trên thị trường trong nước và quốc tế [8, 9]. Tuy nhiên sự hình thành quả thể, sản lượng và độ đa dạng của quả thể nấm ngoại cộng sinh trên các khu vực rừng khác nhau chịu ảnh hưởng rất lớn từ các yếu tố môi trường như nhiệt độ, lượng mưa, pH đất,... cũng như thành phần thực vật rừng, tuổi của cây rừng... Vì vậy, việc nắm rõ các thông tin về thành phần và độ đa dạng của các loài nấm rễ ngoại cộng sinh ăn được theo độ tuổi của rừng đóng vai trò rất quan trọng trong các chiến lược khai thác, quản lý rừng bền vững kết hợp với hỗ trợ sinh kế cho cộng đồng địa phương [10].

Họ Thông (Pinaceae), bao gồm 11 chi và 215 loài, được xem là nhóm cây lá kim lớn nhất trên thế giới, có phân bố rộng khắp từ các khu vực núi cao, núi và đồi ở Bắc Mỹ, Châu Á và Châu Âu. Trong đó chi Thông (*Pinus*) là loài bản địa có phân bố

trên một khu vực rộng lớn của bắc bán cầu và cũng là loài ngoại lai hiện đang được trồng phổ biến trong các khu rừng tái sinh ở phía nam xích đạo. Sự cộng sinh bắt buộc với nấm rễ ngoại cộng sinh đã góp phần rất lớn giúp họ thông chiếm ưu thế và có phân bố rộng khắp ở hầu hết các khu vực có khí hậu theo mùa rõ rệt và đất nghèo chất dinh dưỡng [11, 12].

Tại Việt Nam, thông ba lá *Pinus kesiya* là loài cây lá kim có phân bố tự nhiên chủ yếu ở Hà Giang (nay thuộc Tuyên Quang), Điện Biên, Thừa Thiên – Huế, Quảng Nam (nay thuộc Đà Nẵng), Kon Tum (nay thuộc Quảng Ngãi), Gia Lai, Đắk Lắk, Khánh Hòa và Lâm Đồng [13]. Đây là loài cây lá kim có khả năng tái sinh mạnh mẽ, phát triển nhanh, thích nghi tốt với các điều kiện khô hạn, và mọc được ở những nơi đất xấu, nghèo dinh dưỡng [14]. Đồng thời gỗ thông ba lá còn mang lại giá trị kinh tế không nhỏ nhờ được sử dụng làm ván gỗ, vật liệu xây dựng, đồ gia dụng, đồ thủ công mỹ nghệ, bột giấy, tinh dầu...[13]. Vì vậy thông ba lá là một trong những loài cây nằm trong Danh mục những loài cây trồng lâm nghiệp chính ở Việt Nam do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn ban hành [15]. Trong quá trình đó, nấm rễ ngoại cộng sinh đóng vai trò bắt buộc để nâng cao tỷ lệ tái sinh cây con cũng như tăng khả năng sống sót và phát triển sau khi đưa cây ra môi trường tự nhiên. Mặc dù vậy, mối quan hệ giữa nấm rễ ngoại cộng sinh với thông ba lá vẫn còn chưa được quan tâm đúng mức. Hiện nay tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào ghi nhận các dữ liệu về thành phần của hệ nấm rễ ngoại cộng sinh ở đất rừng tự nhiên cũng như sự thay đổi về thành phần và độ đa dạng của các loài nấm rễ ngoại cộng sinh ở mỗi giai đoạn phát triển của cây.

Do đó, đề tài “ Nghiên cứu nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ thông ba lá *Pinus kesiya* tại tỉnh Lâm Đồng “ được thực hiện nhằm xây dựng một bộ dữ liệu cơ sở về thành phần các loài nấm rễ ngoại cộng sinh với loài thông ba lá *Pinus kesiya* tại tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam.

Mục tiêu nghiên cứu:

Xây dựng bộ dữ liệu về thành phần loài của hệ nấm rễ ngoại cộng sinh trong các giai đoạn phát triển khác nhau của thông ba lá *Pinus kesiya*. Từ đó, bước đầu ứng dụng kết quả nghiên cứu thu được trong công tác phục hồi rừng thông tự nhiên ở tỉnh Lâm Đồng.

Nội dung nghiên cứu:

- Khảo sát các đặc điểm của khu hệ nấm rễ ngoại cộng sinh ở các giai đoạn phát triển khác nhau của cây chủ thông ba lá *P. kesiya*.

- Đánh giá ảnh hưởng của khu hệ nấm rễ ngoại cộng sinh tới khả năng phát triển của cây thông con *P. kesiya* trong điều kiện *in situ*, *ex situ* và *in vitro*.
- Khảo sát sự hình thành quả thể của khu hệ nấm rễ ngoại cộng sinh với cây con *P. kesiya* 3 tuổi.

Những đóng góp mới của luận án:

1. Luận án là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam về thành phần loài nấm rễ ngoại cộng sinh trên đối tượng thông ba lá *Pinus kesiya*.
2. Đánh giá được những khác biệt về thành phần loài nấm rễ ngoại cộng sinh ở nhiều giai đoạn phát triển khác nhau của cây thông ba lá *Pinus kesiya*.
3. Ghi nhận mới về sự xuất hiện của loài *Rhizopogon boninensis* ở khu vực Đông Nam Á, phân lập và đánh giá tiềm năng ứng dụng của loài nấm này trong việc nâng cao tỷ lệ sống và tăng trưởng của cây thông con.
4. Ghi nhận mới về chi *Nothofrafnea* lần đầu tiên xuất hiện ở Bắc bán cầu.
5. Phân loại và liệt kê một số loài nấm rễ ngoại cộng sinh ăn được ở khu vực rừng thông ba lá 3 năm tuổi, có thể được sử dụng làm tiền đề để xây dựng các kế hoạch quản lý, bảo tồn rừng bền vững song song với cải thiện thu nhập của người dân địa phương tại khu vực lân cận rừng.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. RỄ NẤM NGOẠI CỘNG SINH

1.1.1. Rễ nấm cộng sinh

Năm 1885, A.B Frank, người đầu tiên nhận ra bản chất phổ biến của mối liên hệ giữa rễ thực vật và nấm rễ cộng sinh, đã đưa ra khái niệm “Mycorrhiza (Rễ nấm cộng sinh)” – bắt nguồn từ tiếng Hy Lạp “mykes = fungus” và “rhiza = root” – để mô tả các cấu trúc này [16]. Một rễ nấm cộng sinh bao gồm ba phần:

- Hệ tơ nấm bên ngoài rễ.
- Cấu trúc tơ nấm bên trong rễ.
- Cấu trúc rễ.

Dựa trên chức năng và cấu trúc hệ tơ nấm bên trong rễ, năm 1969, Peyronel và cs. đưa ra thuật ngữ ectomycorrhiza, endomycorrhiza và ectendomycorrhiza [17]:

- Ectomycorrhiza – Rễ nấm ngoại cộng sinh: hệ sợi nấm len lỏi giữa các khoảng gian bào trong cấu trúc rễ và không xâm nhập vào trong tế bào thực vật, đặc trưng bởi lớp bao và mạng lưới Hartig trong gian bào và chủ yếu hình thành ở các loài thực vật rừng (Hình 1.1a).

- Endomycorrhiza – Rễ nấm nội cộng sinh: hệ sợi nấm phát triển bên trong tế bào thực vật và không tạo thành mạng lưới Hartig, bao gồm 3 nhóm chính:

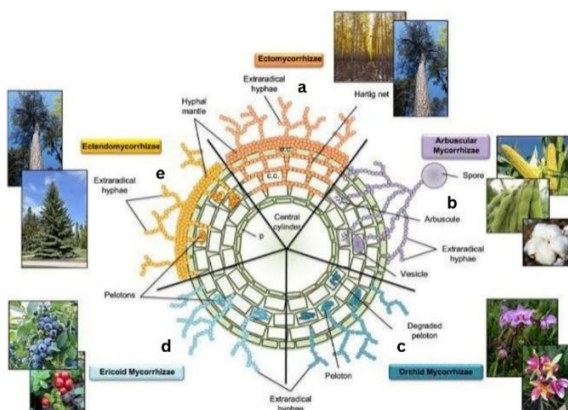
- + Vesicular-arbuscular mycorrhiza với các cấu trúc đặc trưng như giác hút (arbuscular) và cấu trúc túi (vesicles) (Hình 1.1b). Đây là kiểu phổ biến nhất, thường thấy ở nhiều loài thực vật, đặc biệt là những loài thực vật thân thảo và cũng là loại xuất hiện sớm nhất trong quá trình tiến hóa.

- + Orchid mycorrhiza là nhóm có mối quan hệ cộng sinh với các loài thực vật thuộc họ Orchidaceae (họ Phong lan) (Hình 1.1c).

- + Ericoid mycorrhiza là nhóm có mối quan hệ cộng sinh với các loài thực vật thuộc bộ Ericales (bộ Thạch nam) (Hình 1.1d). Trong nhóm này có 2 nhóm phụ là Arbutoid mycorrhiza và Monotropoid mycorrhiza.

- Ectendomycorrhiza – Rễ nấm cộng sinh dạng hỗn hợp nội – ngoại cộng sinh: hệ sợi nấm phát triển mang các đặc điểm của rễ nấm ngoại cộng sinh nhưng cũng xâm nhập vào sâu và phát triển bên trong các tế bào của rễ cây chủ (Hình 1.1e). Nhóm này về cơ bản chỉ giới hạn ở các chi thực vật như thông, vân sam và một số rất ít được ghi nhận ở thông rụng lá.

Ngoài ra, ở một số loài thực vật như bạch dương hay bạch đàn có sự hình thành của cả hai loại rễ nấm cộng sinh [11].

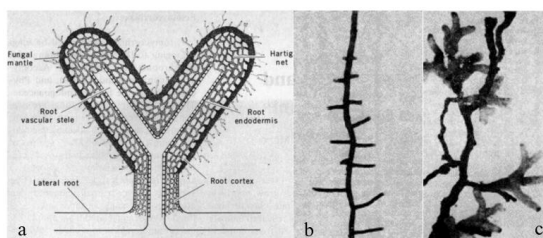


Hình 1.1. Các kiểu cấu trúc nấm rễ cộng sinh (photo by K. Garcia)

(a) *Ectomycorrhiza*; (b) *Vesicular-arbuscular mycorrhiza*; (c) *Orchid mycorrhiza*;
(d) *Ericoid mycorrhiza*; (e) *Ectendomycorrhiza*

1.1.2. Rễ nấm ngoại cộng sinh

Cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh được tìm thấy phổ biến ở các loài thực vật rừng thuộc các họ Thông (Pinaceae), Liễu (Salicaceae), Bạch dương (Betulaceae), Dầu (Dipterocarpaceae)... cũng như một số loài thuộc họ Hoa hồng (Rosaceae), Đậu (Leguminosae), Đỗ Quyên (Ericaceae) và Hồ đào (Juglandaceae) [18]. Đây là một cấu trúc kết hợp giữa nấm và rễ thực vật thường có hình thái đặc biệt dạng phình to, chẻ đôi và không có lông hút do các hormone được nấm rễ ngoại cộng sinh sản sinh ra ức chế sự phát triển của hệ thống lông hút, kích thích các rễ con phình lên và phân nhánh theo kiểu đặc trưng (Hình 1.2).

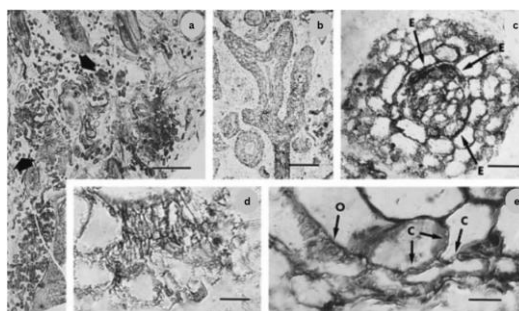


Hình 1.2. Cấu trúc của một rễ nấm ngoại cộng sinh [19]

(a) Một chóp rễ nấm ngoại cộng sinh điển hình; (b) Hình thái rễ cây gỗ không có và
(c) có nấm rễ ngoại cộng sinh

Bằng chứng lâu đời nhất của rễ nấm ngoại cộng sinh được tìm thấy ở British Columbia (Canada) trong hóa thạch rễ thông bao gồm mạng lưới Hartig, lớp nhu mô giả phủ ngoài của rễ và hệ sợi ngoài (Hình 1.3). Các đặc trưng đó kết hợp với hình

thái rễ thông phân nhánh đôi, mắt lông hút chứng minh một cách rõ ràng về mối liên kết ngoại cộng sinh đã tồn tại ít nhất cách đây hơn 50 triệu năm trước [20]. Tuy nhiên, dựa trên các ghi nhận về phân tử, Berbee và Taylor đưa ra các giả thuyết về nguồn gốc cổ xưa hơn của rễ nấm ngoại cộng sinh là trong thời gian đầu của kỷ Phấn Trắng, cách đây khoảng 130 triệu năm, cùng thời gian với các bằng chứng hóa thạch đầu tiên của chi thông [21]. Các đại diện đầu tiên của thông nhờ có sự cộng sinh với nấm rễ ngoại cộng sinh, nên có ưu thế về mặt thích nghi hơn hẳn các loài tiên phong khác. Theo diễn thế nguyên sinh, rễ nấm ngoại cộng sinh đã đóng góp vào quá trình tiến hóa và dẫn đến sự tồn tại cuối cùng của các loài này trong diễn thế [21].



Hình 1.3. Hóa thạch rễ nấm ngoại cộng sinh giữa *Pinus* và *Suillus/Rhizopogon* [20]

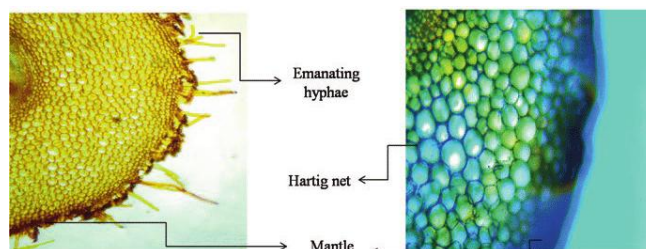
(a) *Cụm coralloid*, bar = 3 mm; (b) *Mặt cắt dọc*, bar = 500 μm ; (c) *Mặt cắt ngang*, bar = 100 μm ; (d) *Mạng lưới Hartig*, bar = 20 μm ; (e) *Lớp Hartig đơn ở phần biểu bì*, bar = 20 μm

1.1.3. Cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh

Các liên kết tương hỗ giữa nấm rễ ngoại cộng sinh và thực vật được hình thành chủ yếu ở phần rễ con của cây chủ. Rễ nấm ngoại cộng sinh có hình thái rất khác nhau tùy thuộc vào mối quan hệ giữa loài nấm và chi thực vật. Brand [22] ghi nhận các cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh trên *Fagus sylvatica* với các loại nấm khác nhau trong khi Pillukat và Agerer [23] ghi nhận cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh của *Russula ochroleuca* trên các chi thực vật khác nhau. Tuy quả thể nấm là chỉ thị vô cùng rõ ràng cho sự tồn tại hoặc vắng mặt của nấm rễ ngoại cộng sinh, sự hình thành quả thể của các loài không phải lúc nào cũng xuất hiện. Vì vậy, các phân tích về hình thái và giải phẫu cấu trúc của rễ nấm ngoại cộng sinh là những thông tin quan trọng trong quá trình định danh nấm rễ ngoại cộng sinh.

Một số nghiên cứu cho thấy hình dạng của rễ nấm ngoại cộng sinh và một số các đặc điểm giải phẫu (hình dạng và kích thước của tế bào vỏ, sự hiện diện hay vắng mặt của tế bào tanin, bề dày của mạng lưới Hartig) hầu hết được xác định bởi thực

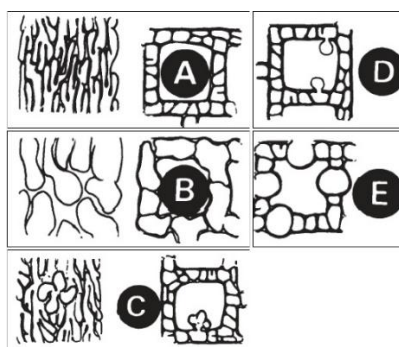
vật, trong khi các đặc điểm của lớp bao (mantle), sợi nấm dạng rễ (rhizomorphs) và sợi nấm bên ngoài (emanating hyphae) do từng loại nấm quy định [18]. Các đặc điểm giải phẫu cơ bản của 1 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh được thể hiện ở hình 1.4.



Hình 1.4. Mặt cắt ngang của một cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh điển hình [24]

1.1.3.1. Mạng lưới Hartig

Lưới Hartig được hình thành bởi các sợi nấm phát triển giữa các tế bào biểu bì ở đầu chóp rễ mà không xâm nhập vào thành tế bào. Chức năng chính của mạng lưới Hartig là hỗ trợ trao đổi hai chiều nước, các chất hòa tan và cacbohydrat trong cây [25]. Nhiều nghiên cứu cho thấy sự hình thành mạng lưới Hartig phụ thuộc nhiều vào nhóm cây chủ. Trong trường hợp của nhóm thực vật hạt trần, mạng lưới Hartig bao thành nhiều lớp quanh tế bào biểu bì và có thể xâm nhiễm vào sâu bên trong nội bì. Trong khi đó ở nhóm thực vật hạt kín, mạng lưới Hartig chỉ tạo thành một lớp giữa các tế bào biểu bì mà không xâm nhập vào sâu hơn. Khi mạng lưới Hartig chỉ bao bọc một phần các tế bào biểu bì sẽ tạo thành cấu trúc paraepidermal, thường thấy ở các chi *Alnus*, *Betula*, *Corylus* và *Populus*. Ngược lại, ở một số chi như *Fagus*, mạng lưới Hartig bao bọc hoàn toàn các tế bào biểu bì tạo thành cấu trúc periepidermal [26, 27]. Trường hợp đặc biệt là ở *Pisonia* khi mạng lưới Hartig không tồn tại, thay vào đó có những vách ngăn giữa tế bào biểu bì và vỏ [28, 29]. Ngoài ra, cấu trúc của mạng lưới Hartig cũng có thể cung cấp các đặc điểm riêng biệt của từng loài nấm. Theo Agerer [30], có 5 dạng cấu trúc của mạng lưới Hartig từ A – E (Hình 1.5), trong đó dạng A là dạng phổ biến nhất, xuất hiện ở hầu hết các loài nấm.



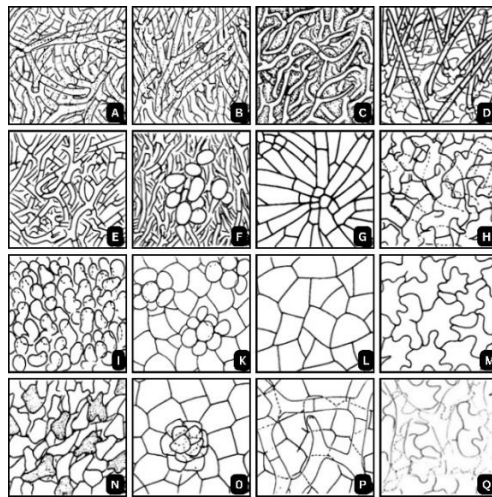
Hình 1.5. Các dạng cấu trúc mạng lưới Hartig [30]

1.1.3.2. Lớp bao mantle

Là một lớp mô nấm tạo thành cấu trúc bao bọc bên ngoài rễ, giúp rễ tăng kích thước và diện tích tiếp xúc với lớp đất bên ngoài. Đồng thời đây còn là vùng đệm giúp ngăn chặn sự xâm nhập của các tác nhân vi sinh vật gây hại từ môi trường. Các quan sát của Chilver [31] cho thấy cấu trúc của lớp mô nấm này có hai dạng chính:

- (1) Plectenchyma – sợi nấm phát triển dày tạo thành các mô giả làm rời rạc các tế bào rễ.
- (2) Pseudoparenchyma – các sợi nấm bị phình to và mất đi hình dạng góc ban đầu, vì vậy chúng giống như các tế bào nhu mô giả.

Theo Agerer [30] loại (1) có 9 dạng từ A – I, loại (2) có 7 dạng từ K – Q (Hình 1.6).

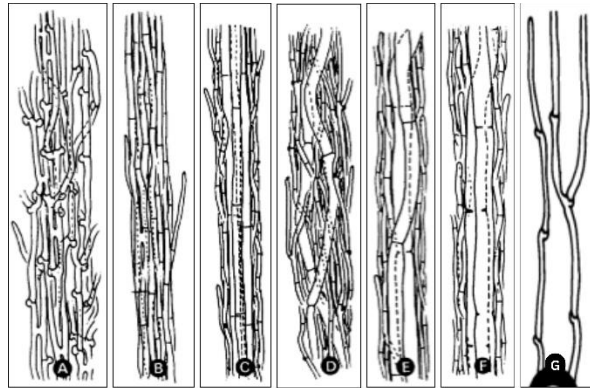


Hình 1.6. Các dạng cấu trúc của lớp bao mantle [30]

1.1.3.3 Hệ sợi nấm bên ngoài và sợi nấm dạng rễ rhizomorph

Hệ sợi nấm bên ngoài đóng một vai trò hết sức quan trọng trong cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh. Hệ sợi này phát triển trong không gian đất và có khả năng lan xa, kết nối với nhau tạo thành mạng lưới hệ sợi nấm liên kết giữa các cây trong cùng một khu vực rừng, đặc biệt phổ biến với các cây trong cùng một họ [32].

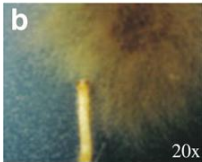
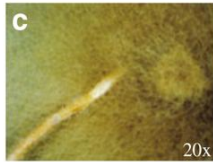
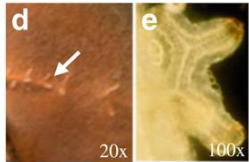
Ngoài ra, để giúp mối liên kết giữa các hệ rễ chặt chẽ hơn, hệ sợi nấm trong đất không chỉ tồn tại ở dạng sợi đơn mà còn cuộn lại với nhau tạo thành sợi nấm dạng rễ. Kiểu cấu trúc cuộn của hệ sợi nấm là đặc trưng cho từng loại nấm rễ ngoại cộng sinh khác nhau. Theo Agerer và cs. [30], có 6 dạng sợi nấm dạng rễ được đặt tên từ A-F (Hình 1.7). Tuy nhiên, một số loài không hình thành hoặc ít nhất là chưa được biến đến có hình thành sợi nấm dạng rễ (G) (Hình 1.7).



Hình 1.7. Các dạng hình thái của sợi nấm dạng rễ [30]

1.1.4. Sự hình thành rễ nấm ngoại cộng sinh

Sự hình thành rễ nấm ngoại cộng sinh được bắt đầu từ các mầm nấm rễ ngoại cộng sinh có trong đất xung quanh rễ con nảy mầm và phát triển thành hệ sợi nấm.

Tiền xâm nhiễm	Khởi đầu	Phân hóa	Chức năng
0–12 h	12–24 h	2–5 days	5–15 days
			
20x	20x	20x	20x 100x
Nhận biết tác nhân cộng sinh	Hệ sợi kết nối với rễ. Nấm xâm nhập vào biểu bì rễ	Hệ sợi nấm xâm nhập và phát triển bên trong tế bào biểu bì, hình thành lớp mantle và mạng lưới hartig	Phát triển hoàn thiện. Thực hiện chuyển đổi dinh dưỡng hai chiều giữa nấm và thực vật

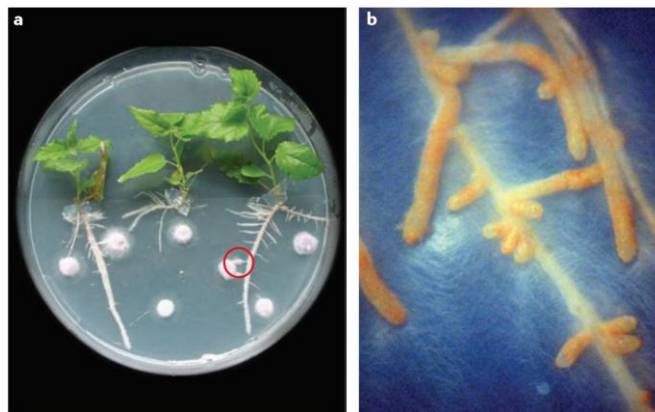
Hình 1.8. Các giai đoạn hình thành rễ nấm ngoại cộng sinh giữa *Pinus pinaster* và *Pisolithus tinctorius* [33]

Các mầm nấm này có thể là bào tử, hạch, các sợi nấm đơn hoặc các đoạn rễ nấm ngoại cộng sinh đứt ra. Trong giai đoạn này rễ thực vật sẽ tiết ra một số hợp chất hòa tan hoặc bay hơi có khả năng thu hút hệ sợi nấm rễ cộng sinh đặc trưng với cây chủ. Hệ sợi nấm sau khi tiếp xúc với bề mặt của rễ sẽ hình thành lớp mô nấm mọc lan xung quanh và bao bọc phần bên ngoài chóp rễ, tạo thành một lớp mô phủ bên ngoài gọi là lớp bao. Sau đó sợi nấm xâm nhập vào cấu trúc bên trong biểu bì của rễ, phát triển giữa các tế bào tạo thành mạng lưới sợi nấm (lưới Hartig) xung quanh tế bào vỏ rễ. Cuối cùng, để đảm nhiệm vai trò hấp thụ nước và dinh dưỡng chuyển đến hệ rễ của cây chủ, rễ nấm cộng sinh hình thành cấu trúc hệ thống sợi nấm bên ngoài (extraradical hyphal) lan tỏa vào đất (Hình 1.8) [33, 34].

1.2. NẤM RỄ NGOẠI CỘNG SINH

1.2.1. Thành phần loài của nấm rễ ngoại cộng sinh

Nấm có khả năng tạo thành cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh với thực vật được gọi là nấm rễ ngoại cộng sinh (hay nấm ngoại cộng sinh). Phần lớn nấm ngoại cộng sinh thuộc ngành nấm đảm Basidiomycota và ngành nấm túi Ascomycota, ngoài ra có một số rất ít thuộc ngành nấm tiếp hợp Zygomycota (Hình 1.10) [35], và hầu hết đều có phân bố rộng rãi trên khắp thế giới. Cấu trúc sinh sản của nấm ngoại cộng sinh bao gồm hai phần là phần quả thể nấm thường được quan sát thấy ở khu vực các cây chủ và cấu trúc hệ sợi nấm dưới mặt đất. Sự hiện diện của quả thể nấm ngoại cộng sinh là chỉ thị cho thấy sự tồn tại của một loài nấm ngoại cộng sinh trong khu vực. Tuy nhiên một số nghiên cứu phân tử trên thực địa đã cho thấy có tới 60% nấm ngoại cộng sinh không có sự hình thành quả thể rõ ràng [36]. Khi so sánh hệ nấm ngoại cộng sinh trên và dưới mặt đất ở rừng thông *Pinus muricata* tự nhiên, Gardes và Bruns đã nhận thấy một số loài như *Russula xerampelina* và *Amanita francheti* hình thành cả rễ nấm ngoại cộng sinh và quả thể, *Suillus pungens* có quả thể phổ biến trên mặt đất nhưng là thành phần hiếm gặp ở dưới mặt đất, trong khi đó một số loài như *Russula amoenolens*, *Tomentella subulilacina*... hầu như không tạo thành quả thể [37]. Ngoài ra, một số loài nấm ngoại cộng sinh có thể phát triển thành hệ sợi và tạo cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh trong điều kiện *in vitro* (Hình 1.9) [36].



Hình 1.9. Nuôi cấy *in vitro* *Populus tremula* và *Laccaria bicolor* [38]

(a) Cây con *P. tremula* và sợi nấm *L. bicolor* phát triển trên đĩa thạch. Sự cộng sinh của nấm và rễ con của cây được đánh dấu trong vòng tròn đỏ; (b) Rễ nấm cộng sinh hình thành bởi rễ con của *P. tremula* và *L. bicolor*

Chi năm hình thành ngoại
khuẩn căn (Rinaldi và cs.,
2008)

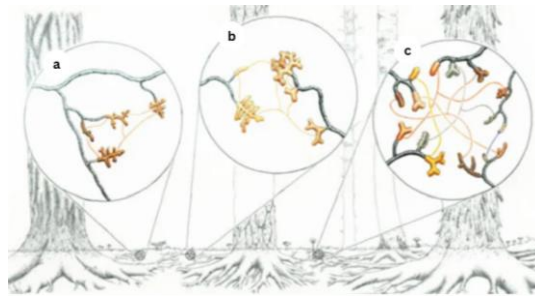
[illegible]

Hình 1.10. Các chi nấm có thể hình thành rễ nấm ngoại công sinh [39]

1.2.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến thành phần loài của nấm ngoại cộng sinh

Trong tự nhiên, trên một vị trí nền rừng, có thể có đến hàng trăm loài nấm ngoại cộng sinh cùng hiện diện và có các đặc tính sinh lý – sinh thái tương đối khác nhau [40, 41]. Hệ sợi nấm lan tỏa từ các rễ nấm ngoại cộng sinh liên kết với nhau và

hình thành nên các mạng lưới (Hình 1.11), có tác dụng hỗ trợ đối với cây chủ và chia sẻ nguồn tài nguyên với các thực vật khác trong khu vực rừng. Thành phần hệ nấm ngoại cộng sinh trong một khu hệ thực vật có thể được dự đoán thông qua thành phần hệ thực vật, tuổi của cây chủ và điều kiện môi trường [3]. Tính đặc hiệu đối với cây chủ của nấm ngoại cộng sinh đã được Molina và cs. đã mô tả, trong đó dao động từ tính đặc hiệu cao – khi nấm chỉ liên kết với các chi hoặc họ cây cụ thể, đến tính đặc hiệu trung gian và tính đặc hiệu thấp – khi nấm có khả năng liên kết với nhiều cây chủ thuộc các bộ, họ khác nhau [35]. Đồng thời trên một cây đơn lẻ có thể có nhiều loại nấm ngoại cộng sinh khác nhau trên rễ của nó [42]. Các loài nấm trong chi *Rhizopogon* là những ví dụ điển hình thể hiện tính đặc hiệu thấp, liên kết với các chi đơn trong họ Pinaceae, ví dụ như *Rhizopogon vinicolor* và *Pseudotsuga*. Tuy nhiên, một số loài nấm thuộc chi *Rhizopogon* có phổ cây chủ trung gian như *Rhizopogon salebrosus* cộng sinh với nhiều chi thực vật trong họ Pinaceae [43]. *Cenococcum geophilum*, với phạm vi phân bố toàn cầu và có khả năng liên kết với hầu hết các cây chủ, là loài nấm ngoại cộng sinh có phạm vi ký chủ rộng [44].



Hình 1.11. Sơ đồ mạng lưới rễ nấm ngoại cộng sinh trong một khu hệ thực vật [45]

Mức độ liên kết giữa các rễ nấm ngoại cộng sinh có thể trong cùng một cá thể thực vật (a), đến một cá thể rễ nấm ngoại cộng sinh nối các ngọn rễ của hai cá thể thực vật (b), đến nhiều rễ nấm ngoại cộng sinh tương tác trên nhiều loài thực vật (c)

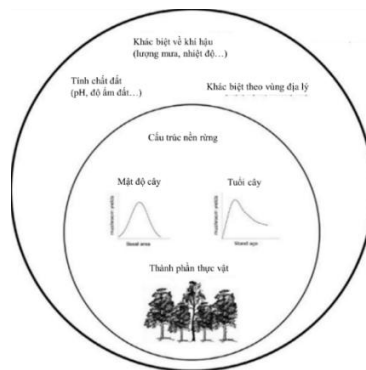
Các điều kiện môi trường như nhiệt độ, pH đất, độ ẩm, hàm lượng dinh dưỡng trong đất cũng ảnh hưởng lớn đến thành phần nấm ngoại cộng sinh trong đất. Một số loài nấm ngoại cộng sinh cho thấy khả năng thích nghi cao và là thành phần chủ đạo ở các khu vực có nhiệt độ lạnh như *Inocybe* [46]. Trong khi đó, một số loài *Amanita*, *Russula*, *Lactarius* và *Boletus* phổ biến nhiều ở các khu vực rừng nhiệt đới [47]. Thành phần và cấu trúc của quần thể nấm ngoại cộng sinh với *Pinus sylvestris* var. *mongolica* ở Trung Quốc bị ảnh hưởng đáng kể bởi nhiệt độ và lượng mưa ở các khu vực nghiên cứu [48]. Độ pH của đất cũng đã được chứng minh là có tương quan với thành phần loài nấm rễ ngoại cộng sinh với các cây chủ khác nhau và trên nhiều châu

lục, bao gồm *P. sylvestris* ở Trung Quốc [48], rừng *Fagus sylvatica*, *Picea abies*, và *P. sylvestri* ở Châu Âu [49] cũng như các khu vực rừng *P. contorta* và *P. albicaulis* thuộc Hoa Kỳ [50]. Hàm lượng chất dinh dưỡng trong đất bao gồm nitơ, photpho, các chất hữu cơ, mùn cũng ảnh hưởng rất lớn đến sự khác biệt giữa các quần xã nấm ngoại cộng sinh ở nhiều khu vực rừng tự nhiên hay rừng tái sinh được nghiên cứu [49–51]. Nhiều nghiên cứu cũng cho thấy sự thay đổi về thành phần trong hệ nấm ngoại cộng sinh theo thời gian. Tuổi của cây chủ được chứng minh là một yếu tố đóng vai trò quyết định lớn đến thành phần nấm ngoại cộng sinh có trong hệ rễ. Ở những cây chủ lâu năm, các loại nấm tiên phong chỉ giới hạn ở phần rễ non nhất nằm rìa ngoài của vùng rễ. Trong khi đó nấm cộng sinh ở giai đoạn muộn hầu như không thấy có sự cộng sinh với cây con, trừ những cây con đang phát triển trong vùng lân cận với cây lâu năm và chúng thường được tìm thấy ở các phần rễ già. Lamb đã tiến hành phân lập nấm ngoại cộng sinh từ hệ rễ của *P. elliotii* và *P. radiata* sau mỗi 5 năm từ khi cây con được trồng vào tự nhiên và thu được ngày càng nhiều loài nấm ngoại cộng sinh [52]. ChuChou đã tìm thấy nhiều quả thể của *Hebeloma shelluliniforme* trong vườn ươm, nhưng chỉ thu được rất ít sau khi cây con của *P. radiata* được đưa vào tự nhiên, trong khi đó quả thể của các loài như *Rhizopogon* spp., *Laccaria laccata*, *Inocybe* spp., *Amanita mucaria* và *Scleroderma verrucosum* bắt đầu xuất hiện [53]. Visser đã đánh giá độ đa dạng các loài nấm ngoại cộng sinh trên khu vực rừng *P. bankiana* tái sinh sau khi cháy [54]. Trong sáu năm đầu, rễ bị xâm nhiễm bởi tương đối ít loại nấm, sau đó sự đa dạng tăng lên rõ rệt ở các lâm phần 41 tuổi và 65 tuổi, giai đoạn sau cho thấy mức độ đa dạng về số lượng loài tương tự như ở lâm phần 112 năm tuổi [54]. Nghiên cứu của Rao và cs. [55] về nấm ngoại cộng sinh với *P. kesiya* trên các nền rừng 2, 4, 11 và 17 năm tuổi cho thấy có 13 loài nấm ngoại cộng sinh hình thành rễ nấm ngoại cộng sinh với loài thông này. Chỉ số đa dạng của nấm ngoại cộng sinh tỷ lệ thuận với tuổi của các gốc thông, trong đó số lượng loài nấm nhiều nhất được quan sát thấy trong khu vực rừng 17 năm tuổi. Quả thể của *Boletus luteus*, *Scleroderma aurantium*, *Tricholoma saponaceum*, và *Hygrophorus limacinus* thu được ở giai đoạn đầu của *P. kesiya*, *Russula lepida* và *Amanita phalloides* thu được ở các nền rừng lâu năm, trong khi đó *Boletus luteus* và *Scleroderma aurantium* là những loài chiếm ưu thế ở tất cả các khu vực nghiên cứu. Các quan sát của Lu và cs. cũng cho thấy sự đa dạng của quả thể nấm ngoại cộng sinh trong các khu rừng *Eucalyptus globulus* ở Tây Úc tăng đều đặn khoảng hai loài mỗi năm [56]. Mức độ đa dạng của các loài nấm ngoại cộng sinh thường tăng lên tuần tự và đạt mức cao ở giai đoạn trưởng thành. Khi hệ sinh thái bước vào giai đoạn cuối của chu kỳ diễn thế,

số lượng loài nấm ngoại cộng sinh có thể giảm, trong khi các loài nấm có mức độ chuyên hóa cao với cây chủ trở nên chiếm ưu thế [57].

1.2.3. Sự hình thành quả thể của nấm ngoại cộng sinh

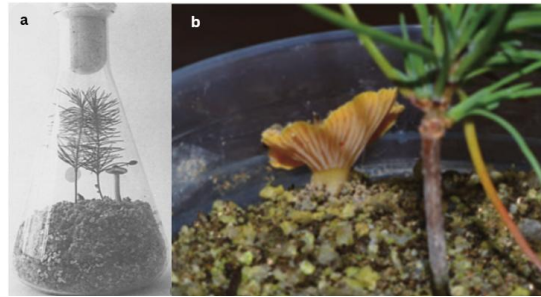
Trong tự nhiên, một số loài nấm ngoại cộng sinh có khả năng hình thành nên quả thể, tuy nhiên động học của quá trình này khá phức tạp. Hầu hết các loài nấm thuộc ngành Ascomycota và Basidiomycota có thể tạo ra quả thể dễ thấy được. Tuy nhiên, một số loài nấm thuộc chi *Rhizopogon*, *Tuber*... tạo ra quả thể ít và khó thấy. Trong khi đó, một số loài nấm ngoại cộng sinh như *Cenococcum geophilum* không hình thành quả thể [58]. Mason và cs. [57] đã đưa ra giả thuyết về sự tương tác của nấm ngoại cộng sinh với cây chủ tùy theo điều kiện môi trường và khả năng tích lũy dinh dưỡng. Sau một khoảng thời gian hình thành rễ nấm ngoại cộng sinh với cây chủ, nấm ngoại cộng sinh có thể hình thành quả thể và hoàn thành vòng đời của chúng. Ngoài ra các điều kiện về loại đất, độ pH, các yếu tố khí hậu như nhiệt độ và lượng mưa là những yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình hình thành nên quả thể của nấm ngoại cộng sinh [59, 60]. Một yếu tố quan trọng không kém ảnh hưởng đến sự hình thành quả thể nấm là tuổi và giai đoạn phát triển của cây chủ. Cây non, cây trưởng thành và cây đang suy yếu đều có thể hỗ trợ các cộng đồng nấm ngoại cộng sinh khác nhau, với sản lượng quả thể khác nhau (Hình 1.12) [60].



Hình 1.12. Các yếu tố ảnh hưởng đến cộng đồng nấm ngoại cộng sinh [61]

Ngoài ra, các hoạt động của con người như khai thác gỗ, tái trồng rừng và tỉa thưa rừng có thể tác động đến các cộng đồng nấm ngoại cộng sinh. Các hoạt động quản lý rừng bền vững, bảo tồn cây trưởng thành và duy trì cấu trúc tuổi đa dạng của nền rừng có thể cải thiện môi trường phát triển cho các loại nấm này. Ngược lại, các hoạt động làm xáo trộn đất hoặc phá bỏ cây chủ có thể làm giảm quần thể nấm [62, 63]. Ngày nay, nhiều nghiên cứu đã tiến hành đồng nuôi cấy một số loài nấm ngoại cộng sinh có giá trị cao với cây chủ và tạo điều kiện cho sự hình thành quả thể trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* (Hình 1.13) [64–66]. Tuy nhiên, trừ mô hình đối với

Tricholoma sp. và *Tuber* sp. thì hiệu quả lâu dài và khả năng mở rộng các kết quả ra thực địa đối với nhiều loại nấm khác vẫn chưa được ghi nhận đầy đủ. Lý do cho việc nấm ngoại cộng sinh ăn được rất khó trồng là vì tốc độ sinh trưởng trong ống nghiệm của sợi nấm trên môi trường dinh dưỡng chậm, không thể hình thành quả thể mà không hình thành rễ nấm ngoại cộng sinh với cây chủ và thiếu thông tin về cơ chế hình thành quả thể [67].



Hình 1.13. Quả thể trưởng thành của *Hebeloma cylindrosporum* và *Cantharellus anzutake* trong nuôi cấy *in vitro* với *Pinus pinaster* (a) [68] và *P. densiflora* (b) [65]

1.3. THÀNH PHẦN THỰC VẬT NGOẠI CỘNG SINH

Thực vật hình thành cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh chiếm không quá 5% thực vật có mạch, nhưng các loài đại diện đóng vai trò hết sức quan trọng trong các thảm thực vật khác nhau của sinh quyển [3, 69]. Một số chi thực vật có ít nhất một loài có khả năng hình thành cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh được trình bày ở hình 1.14, trong đó chủ yếu là các loại cây như thông, sồi, bạch dương, bạch đàn...[36, 39]. Các nghiên cứu về mối quan hệ ngoại cộng sinh trong môi trường rừng tự nhiên cho thấy rằng cây con tạo thành rễ nấm ngoại cộng sinh có khả năng phát triển tốt hơn những cây không có cộng sinh [3]. Ở các hệ sinh thái, số lượng thực vật cộng sinh với nấm ngoại cộng sinh có thể lên đến hàng nghìn loài [3]. Đồng thời, hàng chục loài nấm ngoại cộng sinh cũng có thể được tìm thấy trên một cây đơn lẻ hoặc trong các khu vực rừng độc canh nhỏ [70]. Khả năng tương thích giữa nấm với cây chủ là một trong những yếu tố quyết định để cây con có thể phát triển thành công. Các nghiên cứu về tính đặc hiệu của cây chủ đóng vai trò quan trọng khi nghiên cứu về các hệ sinh thái rừng khác nhau trên thế giới, ít nhất ở hai lý do: 1) làm tăng khả năng tồn tại của cây con trong môi trường sống ngoại lai, và nhờ đó có thể mở rộng khu vực phân bố của thực vật; và 2) giúp tăng khả năng tiếp cận của thực vật đối với các nguồn dinh dưỡng cả trong và giữa các khu vực khi các loài nấm riêng lẻ thích nghi linh hoạt với các môi trường sống hoặc khi có nhiều loài nấm rễ ngoại cộng sinh khác nhau có khả năng tiếp cận các nguồn dinh dưỡng khác nhau [41, 71, 72].

Family/Subfamily	Genus	Family/Subfamily	Genus	Family/Subfamily	Genus	Family/Subfamily	Genus
Angiospermae		Euphorbiaceae	<i>Poranthera</i> Rudge	Papilionoideae	<i>Eutaxia</i> R. Br.		<i>B Pyrus</i> L.
Aceraceae	<i>B Acer</i> L.		<i>B Uapaca</i> Bail.		<i>B Gompholobium</i> Sm.		<i>B Rosa</i> L.
Betulaceae	<i>B Alnus</i> Mill.	Fagaceae	<i>B Castanea</i> Mill.		<i>B Hardenbergia</i> Benth.		<i>B Sorbus</i> L.
	<i>B Betula</i> L.		<i>B Castanopsis</i> (D. Don) Spach		<i>Jacksonia</i> R.Br. ex Sm.	Salicaceae	<i>B Populus</i> L.
	<i>B Carpinus</i> L.		<i>B Fagus</i> L.		<i>Kennedya</i> DC.		<i>B Salix</i> L.
	<i>B Corylus</i> L.		<i>B Lithocarpus</i> Blume		<i>B Mirbelia</i> Sm.	Sapindaceae	<i>Allophylus</i> L.
	<i>B Ostrya</i> Scop.		<i>B Nothofagus</i> Blume		<i>B Oxylobium</i> Andrews		<i>Nephelium</i> L.
	<i>B Ostryopsis</i> Decne.		<i>B Pasania</i> Blume		<i>Platylobium</i> Sm.	Sapotaceae	<i>Glycoxyton</i> Ducke
Bignoniaceae	<i>Jacaranda</i> Juss.		<i>B Quercus</i> L.		<i>Pultenaea</i> Sm.	Sterculiaceae	<i>B Lasioptetum</i> Sm.
Caprifoliaceae	<i>B Sambucus</i> L.	Gentianaceae	<i>B Trigonobalanus</i> Forman		<i>B Robinia</i> L.		<i>Thomasia</i> J.Gay
Casuarinaceae	<i>B Casuarina</i> L.		<i>Bartonia</i> * Muhl. ex Willd.		<i>B Vicia</i> L.	Stylidiaceae	<i>B Stylidium</i> Sw.
	<i>B Allocasuarina</i> L.A.S.Johnson	Goodeniaceae	<i>Brunonia</i> * Sm. ex R. Br.		<i>B Viminaria</i> Sm.	Thymeleaceae	<i>B Pimelea</i> Banks & Sol. ex Gaertn.
	<i>B Allocasuarina</i> L.A.S.Johnson		<i>B Goodenia</i> * Sm.		<i>Comptonia</i> (L.) J. M.Coulter	Tiliaceae	<i>B Tilia</i> L.
Cistaceae	<i>B Helianthemum</i> Mill.	Hamamelidaceae	<i>Parrotia</i> (DC.) C. A. Mey.		<i>Myrica</i> L.	Ulmaceae	<i>B Ulmus</i> L.
	<i>B Cistus</i> L.	Juglandaceae	<i>B Carya</i> Nutt.	Myrtaceae	<i>B Eucalyptus</i> L'Hér.		<i>Celtis</i> L.
Compositae (Asteraceae)	<i>B Lactuca</i> * L. (incl. <i>Mycelis</i> Cass.)		<i>B Juglans</i> L.		<i>B Leptospermum</i> J.R. Forster & G. Forster	Vitaceae	<i>B Vitis</i> L.
Cyperaceae	<i>B Kobresia</i> * Willd.		<i>Pterocarya</i> Nutt. ex Moq.		<i>B Melaleuca</i> L.	Gymnospermae	
		Fabaceae – subfam. Caesalpinoideae	<i>Azelia</i> Sm.		<i>B Tristania</i> R.Br.	Cupresseceae	<i>B Cupressus</i> L.
Dipterocarpaceae	<i>B Anisoptera</i> Korth.		<i>Aldina</i> Endl.	Nyctaginaceae	<i>B Neea</i> Ruiz & Pav.		<i>B Juniperus</i> L.
	<i>B Balanocarpus</i> Bedd.		<i>Anthnota</i> P. Beauv.		<i>B Torrubia</i> Vell.	Pinaceae	<i>Abies</i> Mill.
	<i>B Cotylelobium</i> Pierre		<i>Bauhinia</i> L.		<i>B Pisonia</i> L.		<i>Cathaya</i> Chun & Kuang
	<i>B Dipterocarpus</i> C.F.Gaertn.		<i>Brachystegia</i> Benth.	Oleaceae	<i>B Fraxinus</i> L.		<i>B Cedrus</i> Trew
	<i>B Dryobalanops</i> C.F.Gaertn.		<i>Cassia</i> L.	Platanaceae	<i>B Platanus</i> L.		<i>Keteleeria</i> Carrière
	<i>B Hopea</i> Roxb.		<i>Eperua</i> Aubl.	Polygalaceae	<i>Coccoloba</i> P. Browne		<i>Larix</i> Mill.
	<i>B Monotes</i> A.DC.		<i>Gastrolobium</i> R. Br.	Polygonaceae	<i>Polygonum</i> * L.		<i>Picea</i> A. Dietr.
	<i>B Shorea</i> Roxb. ex C.F.Gaertn.		<i>Gilbertiodendron</i> J. Léonard	Rhamnaceae	<i>Cryptandra</i> Sm.		<i>Pinus</i> L.
Elaeagnaceae	<i>Shepherdia</i> Nutt.		<i>Julbernardia</i> Pellegr.		<i>Pomaderris</i> Labill.		<i>Pseudolarix</i> Gordon
Epacridaceae	<i>Astroloma</i> R.Br.		<i>Monopetalanthus</i> Hams		<i>Rhamnus</i> L.		<i>Pseudotsuga</i> Carrière
Ericaceae	<i>Arbutus</i> L.		<i>Paramacrolobium</i> J. Léonard		<i>Spyridium</i> Fenzl		<i>Tsuga</i> Carrière
	<i>Arctostaphylos</i> Adans.		<i>Swartzia</i> Schreb.		<i>Trymalium</i> Fenzl		
	<i>Chimaphila</i> Pursh		<i>Acacia</i> Mill.	Rosaceae	<i>B Crataegus</i> Tourn. ex L.	Gnetaceae	<i>Gnetum</i> L.
	<i>Gaultheria</i> Kalm ex L.		<i>Chorizema</i> Sm.		<i>B Dryas</i> L.		
	<i>Kalmia</i> L.	Fabaceae – subfam. Mimosoideae	<i>Daviesia</i> Sm.		<i>B Malus</i> Mill.		
	<i>Leucothoe</i> D.Don		<i>Dillwynia</i> Sm.		<i>B Prunus</i> L.		
	<i>Rhododendron</i> L.						
	<i>Vaccinium</i> L.						

Hình 1.14. Những chi thực vật có ít nhất một loài có sự hình thành cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh [39]

1.4. VAI TRÒ CỦA RỄ NĂM NGOẠI CỘNG SINH VÀ NĂM NGOẠI CỘNG SINH

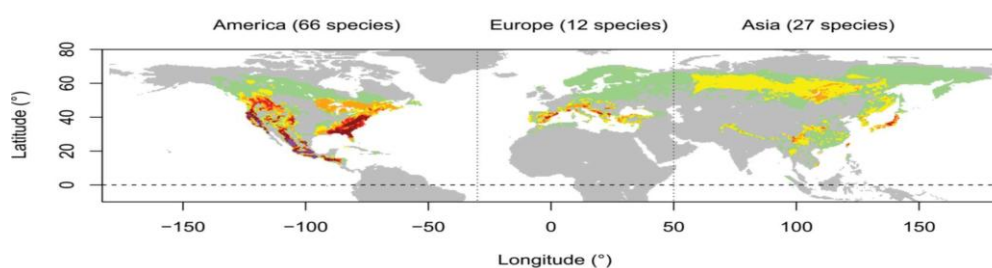
Rễ năm ngoại cộng sinh đóng một vai trò quan trọng trong các hệ sinh thái trên cạn, đặc biệt là trong các hệ sinh thái rừng nghèo dinh dưỡng. Thông qua việc hình thành mạng lưới sợi nấm bao quanh và lan rộng ra ngoài vùng rễ, chúng làm gia tăng đáng kể diện tích tiếp xúc với đất, từ đó nâng cao khả năng hấp thu các chất dinh dưỡng và khoáng chất [73]. Ngoài ra, hệ sợi nấm phát triển dày đặc trong đất tạo thành một mạng lưới liên kết các hạt đất, giúp ổn định cấu trúc đất, tăng độ tơi xốp và khả năng giữ nước cũng như hạn chế sự rửa trôi và thất thoát các chất dinh dưỡng quan trọng. Bên cạnh đó, thông qua quá trình sinh trưởng và phân giải, hệ sợi nấm có trong đất góp phần cải biến thành phần hóa học của đất, làm gia tăng hàm lượng chất hữu cơ và cải thiện độ phì nhiêu của đất. Từ đó, thực vật có thể dễ dàng khai thác được các dạng dinh dưỡng hữu cơ khó tiêu có trong môi trường đất [74, 75]. Với khả năng tích lũy và lưu trữ carbon trong đất, hệ sợi nấm cũng góp phần làm chậm quá trình phát thải carbon, có ý nghĩa quan trọng trong việc điều hòa khí hậu. Ngoài ra, hệ sợi nấm này còn góp phần cải thiện khả năng hấp thụ nước, sản sinh và cung cấp các phytohormone quan trọng [36]. Đồng thời, cấu trúc lớp bao của rễ năm ngoại cộng sinh là một cơ chế kiểm soát sinh học hiệu quả, thông qua việc hạn chế sự xâm nhập và phát triển của các tác nhân gây bệnh tấn công vào rễ [76]. Đáng chú ý, các mạng lưới sợi nấm trong đất còn kết nối hệ rễ của nhiều cây khác nhau trong cùng một khu vực sống, tạo điều kiện cho sự trao đổi carbon và các nguồn tài nguyên khác giữa các cá thể thực vật [77, 78]. Bên cạnh đó, một số loài nấm ngoại cộng sinh còn có khả năng phân hủy chất thải động vật, thúc đẩy quá trình khoáng hóa và tái chế chất dinh dưỡng trong hệ sinh thái. Nấm ngoại cộng sinh cũng thiết lập mối quan hệ tương hỗ chặt chẽ với các nhóm vi sinh vật đất khác, cùng tham gia vào các chu trình dinh dưỡng thiết yếu như chu trình nitơ và phospho, qua đó duy trì sự cân bằng sinh địa hóa [43, 56, 57]. Không chỉ dừng lại ở vai trò dưới mặt đất, quả thể và hệ sợi nấm ngoại cộng sinh còn là nguồn thức ăn giàu dinh dưỡng cho nhiều loài động vật, từ côn trùng, động vật không xương sống đến các loài thú nhỏ, đồng thời tạo ra các vi môi trường sống đặc thù cho nhiều sinh vật khác [69, 79, 80]. Ngoài ra, nhiều loài nấm ngoại cộng sinh còn là nguồn thực phẩm giàu dinh dưỡng, chứa hàm lượng protein, vitamin và khoáng chất cao, đồng thời có giá trị kinh tế đáng kể trên thị trường [9, 81]. Một số loài nấm ngoại cộng sinh còn được khai thác làm dược liệu nhờ chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học [82], hoặc được sử dụng như là thuốc nhuộm tự nhiên thân thiện với môi trường [36]. Về mặt văn hóa – xã hội, nhiều loài

nấm ngoại cộng sinh có hình thái đẹp, độc đáo, có giá trị thẩm mỹ cao và là một phần quan trọng trong các nền văn hóa dân gian ở nhiều khu vực trên thế giới [6, 9]. Đối với hệ sinh thái tự nhiên, sự đa dạng và phân bố của nấm ngoại cộng sinh còn được xem như là một chỉ thị sinh học quan trọng, phản ánh chất lượng môi trường và mức độ ổn định của hệ sinh thái rừng [67, 83]. Nấm ngoại cộng sinh đóng vai trò hết sức quan trọng trong quá trình bảo tồn và tái sinh rừng tự nhiên thông qua việc hình thành mối quan hệ cộng sinh với rễ cây, giúp tăng cường khả năng hấp thu nước và dinh dưỡng, từ đó nâng cao sức sinh trưởng và khả năng chống chịu của cây chủ với các điều kiện khắc nghiệt của môi trường [83]. Nhiều loài nấm ngoại cộng sinh còn có khả năng hỗ trợ cây trồng thích nghi với các điều kiện bất lợi, đặc biệt là trong các vùng đất bị ô nhiễm kim loại nặng hoặc các hợp chất hữu cơ độc hại [24, 84], góp phần quan trọng vào quá trình phục hồi đất và hệ sinh thái bị suy thoái [85, 86].

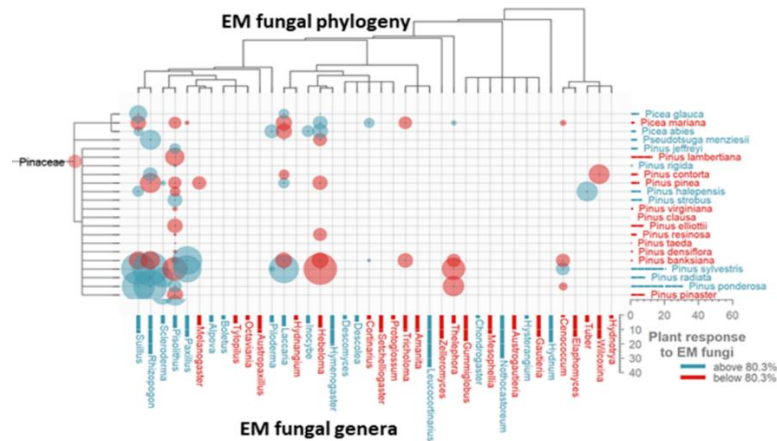
1.5. SỰ CỘNG SINH CỦA NẤM NGOẠI CỘNG SINH VỚI CÁC KHU HỆ RỪNG THÔNG (*Pinus* spp.) TRÊN THẾ GIỚI

1.5.1. Mối quan hệ cộng sinh bắt buộc giữa nấm ngoại cộng sinh và chi thông

Theo Keeley [87] chi thông (*Pinus*) xuất hiện từ giữa Đại Trung Sinh. Các hóa thạch cổ nhất của cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh với thực vật hạt trần có từ khoảng cách đây 50 triệu năm có liên quan đến *Pinus* [20]. Ngoài ra, các phân tích bức xạ ở Basidiomycetes trong kỷ Paleogene và Neogene đã phát hiện được các loài trong nhóm *Rhizopogon* và *Suillus* có hình thành cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh với các loài Pinaceae đang phân hóa [20]. Theo đó sự phát triển của cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh ở rễ thông diễn ra đồng thời với quá trình biệt hóa, hình thành và chiếm ưu thế dần dần của chi thông theo các giai đoạn tiến hóa. Các ghi nhận về khảo cổ này đã chứng minh cho quan điểm rằng sự hỗ trợ của nấm ngoại cộng sinh là yếu tố quan trọng thúc đẩy quá trình đa dạng hóa và phân bố của thông, đặc biệt là trong môi trường tiên phong khắc nghiệt. Ngoài ra, sự phân bố rộng khắp của thông qua các vĩ độ ở bắc bán cầu (Hình 1.15) và theo các độ cao ở vùng nhiệt đới được cho là nhờ vào mối liên kết đa dạng với nấm ngoại cộng sinh (Hình 1.16) [71, 88, 89].



Hình 1.15. Sự phân bố tự nhiên của các loài thông trên thế giới [88]



Hình 1.16. Khả năng cộng sinh của một số chi nấm rễ ngoại cộng sinh với thông [89]

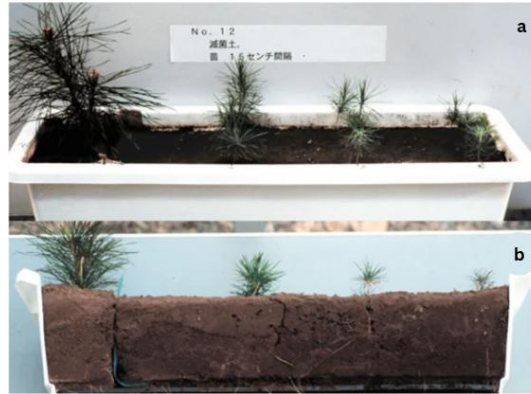
Ngày nay, ngoài bắc bán cầu, thông ngoại lai đã được trồng ở nhiều khu vực phía nam. Sau những nỗ lực ban đầu bị thất bại vào những năm 1800 và đầu những năm 1900, các nghiên cứu đã chứng minh rằng thông có mối quan hệ cộng sinh bắt buộc với nấm ngoại cộng sinh. Chúng không thể tồn tại nếu không có các mầm nấm trong đất thu từ vườn ươm hoặc khu rừng thông bản địa [90]. Các nghiên cứu tiếp theo sau này cũng cho thấy mối quan hệ cộng sinh chặt chẽ của cây thông con với hai chi nấm *Rhizopogon* [91–93] và *Suillus* [94, 95] trong môi trường sống.

1.5.2. Tác động của nấm ngoại cộng sinh trong quản lý và tái sinh rừng thông

Phần lớn hiểu biết hiện nay về chức năng của nấm ngoại cộng sinh đến từ các nghiên cứu ứng dụng trực tiếp trong lâm nghiệp. Với khoảng 115 loài, thông có phân bố bản địa ở hầu hết khu vực Bắc bán cầu và là một trong những loài được trồng phổ biến ở nhiều vùng ôn đới và cận nhiệt đới trên thế giới. Rừng thông được ưu tiên tái sinh vì đây là loài tiên phong mạnh, rất thích hợp cho công tác tái sinh và bảo tồn rừng tự nhiên. Ngoài ra, nhờ số lượng loài lớn cùng khả năng phát triển mạnh trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau, cũng như các điều kiện đất khô cằn, nghèo dinh dưỡng, bạc màu, thông thường được sử dụng phổ biến để trồng lấy gỗ. Sản lượng của một số loài thông có thể thu được rất cao ngay cả trong điều kiện địa lý không thuận lợi (<https://www.fao.org>).

Đối với một số loại thực vật thuộc họ Thông, nấm ngoại cộng sinh đã được chứng minh là điều kiện bắt buộc trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây [47] (Hình 1.17). Các cây thông con không có sự xâm nhiễm của nấm ngoại cộng sinh có thể được trồng trong nhà kính ở điều kiện giàu dinh dưỡng. Tuy nhiên phần đông trong số đó thường không thể sống sót và phát triển sau khi đưa ra môi trường tự nhiên. Cây con được bổ sung nấm ngay từ trong giai đoạn vườn ươm có thể thiết

lập một hệ thống rễ nấm ngoại cộng sinh khỏe mạnh trước khi đem trồng. Ngoài ra có thể sử dụng các nguồn bổ sung mầm nấm ngoại cộng sinh như một chế phẩm nông nghiệp bổ sung vào khu vực rừng trồng để thúc đẩy có định hướng đến sự hình thành và phát triển của cây con [96, 97].



Hình 1.17. Thí nghiệm về tác động tích cực giữa cây con *Pinus densiflora* và nấm ngoại cộng sinh trong nhà kính [98]

(a) Cây con *P. densiflora* 2 năm tuổi được trồng thành ba hàng với khoảng cách khác nhau (15, 30, 45 cm); (b) Sợi nấm ngoại cộng sinh lây từ cây mẹ (trái) sang các cây con. Sự lây nhiễm gần hơn dẫn đến khả năng tăng trưởng tốt hơn của cây. Cây cuối (phải) được trồng trong đất uơng hấp có lưới

Bất kỳ sự có mặt hoặc biến mất của các loài nấm ngoại cộng sinh đều có khả năng ảnh hưởng đến sự tồn tại, sinh trưởng, phát triển và khả năng chống chịu căng thẳng, kháng bệnh cũng như hấp thu nước của thực vật [3]. Thành phần nấm ngoại cộng sinh chịu ảnh hưởng rất lớn bởi sự biến đổi của các điều kiện tự nhiên cũng như tác động của con người [80]. Do sự suy giảm đa dạng sinh học có thể xảy ra dưới tác động của biến đổi khí hậu toàn cầu, các nghiên cứu về thành phần và sự đa dạng của nấm rễ ngoại cộng sinh trên khắp các môi trường sống là rất quan trọng để hiểu và dự đoán mối quan hệ giữa nấm – cây chủ – môi trường và ảnh hưởng của chúng đến chức năng của hệ sinh thái rừng [99]. Tầm quan trọng của nấm ngoại cộng sinh đối với sự cân bằng của hệ sinh thái rất lớn vì chúng có thể được sử dụng để tăng khả năng chống chịu của thực vật trước các áp lực sinh học hoặc phi sinh học, cải thiện sự sinh trưởng và phát triển của cây cộng sinh của nó [69].

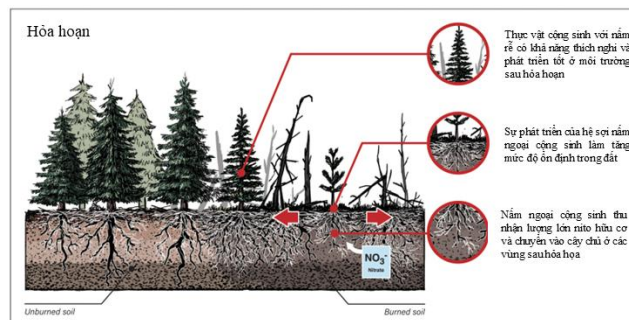
Vì vậy các nghiên cứu đánh giá mức độ đa dạng về thành phần loài nấm ngoại cộng sinh trong các hệ sinh thái rừng hết sức quan trọng. Thành phần loài của nấm ngoại cộng sinh trong một số khu hệ rừng thông *Pinus sylvestris* [100, 101], *P. kesiya* [55, 102], *P. merkusii* [103] *P. caribaea*, *P. oocarpa* [104], *P. massoniana* [51, 105],

P. ponderosa hay *P. contorta* [106] đã được nghiên cứu kỹ trên nhiều khu vực phân bố rộng khắp từ các vùng ôn đới đến nhiệt đới. Ngoài ra, phân tích thành phần nấm ngoại cộng sinh theo các vùng nhiệt độ cũng cho thấy sự phong phú và đa dạng của nấm xuất hiện cao nhất ở các khu vực lạnh. Khi đó khí hậu nóng lên có thể gây hạn chế đến sự phân bố của các loài nấm ngoại cộng sinh chỉ thích nghi với điều kiện lạnh và do đó làm giảm tính đa dạng của hệ nấm ngoại cộng sinh bản địa [107]. Tuy nhiên, có sự khác biệt đáng kể về độ nhạy nhiệt độ và khả năng thích ứng với nhiệt độ giữa các loài nấm ngoại cộng sinh khác nhau. Ví dụ chi *Cortinarius* thể hiện khả năng thích nghi cao hơn với sự gia tăng nhiệt độ [108]. Các nghiên cứu về thành phần loài nấm ngoại cộng sinh đã thực hiện có ý nghĩa rất lớn trong công tác quản lý bền vững các khu hệ rừng thông trên thế giới [60], đặc biệt ở các khu vực thông đặc hữu [109], có thể giảm bớt sự suy giảm của các loài thông dưới tác động của thay đổi khí hậu bằng cách sử dụng nguồn chế phẩm nấm ngoại cộng sinh phù hợp [97] cũng như bảo tồn nguồn nấm ưu thế và thiết lập các khu hệ rừng thông mới nhờ vào việc có chung loài nấm ngoại cộng sinh ưu thế [110].

Các hoạt động lâm nghiệp như khai thác gỗ cũng gây xáo trộn về thành phần loài và độ đa dạng của nấm rễ ngoại cộng sinh. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra các nguyên nhân cơ bản gây ra sự xáo trộn này cũng như so sánh sự khác biệt về khả năng xâm nhiễm và thành phần loài của nấm rễ ngoại cộng sinh giữa cây con trồng lại ở rừng sau khai thác và cây con mọc trong rừng tự nhiên [62, 111, 112]. Các nghiên cứu này giúp đánh giá được các hoạt động lâm nghiệp ảnh hưởng như thế nào đến năng suất và thành phần của các khu vực rừng tái sinh. Trong quản lý rừng, để thay thế cho việc chặt phá hoàn toàn, một phần lâm phần được giữ lại để duy trì sự liên tục trong đa dạng về cấu trúc và thành phần của hệ nấm rễ ngoại cộng sinh, tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển các cây con mới trồng [113]. Ngoài ra có thể sử dụng các nguồn bổ sung mầm nấm rễ ngoại cộng sinh như một chế phẩm nông nghiệp bổ sung vào khu vực rừng trồng để thúc đẩy có định hướng đến sự hình thành và phát triển của cây con [96, 97].

Bên cạnh đó, biến động về thành phần loài nấm ngoại cộng sinh trong một khu hệ thực vật thường xảy ra khi có các xáo trộn tự nhiên như khô hạn [114] hay cháy rừng [115–117]. Nghiên cứu của Pérez và cs. trên hai khu rừng thông *P. pinaster* và *P. halepensis* cho thấy mức độ đa dạng của nấm ngoại cộng sinh ở khu vực có mức độ tái phát hỏa hoạn thường xuyên thấp hơn so với các khu vực hiếm khi xảy ra hỏa hoạn [115]. Ngoài ra, cháy rừng thường xuyên làm giảm đáng kể sự xuất hiện các nấm ngoại cộng sinh ở giai đoạn cuối (như *Atheliaceae* và *Cantharellales*) trong khu

hệ thống *P. pinaster*. Trong khi đó các loài nấm ngoại cộng sinh ở giai đoạn đầu thuộc họ *Thelephoraceae* xuất hiện thường xuyên, thời gian tái phát hỏa hoạn càng ngắn số lượng *Cortinarius* và *Hebeloma* xuất hiện càng tăng lên [118]. Ở các khu rừng thông *P. sylvestri* khảo sát ở Thụy Sĩ và Ý, chỉ có *Rhizopogon roseolus* và *Cenococcum geophilum* là có nhiều ở các khu vực bị cháy và vùng lân cận [117]. Qua đó cho thấy sự thay đổi cấu trúc và chức năng của hệ nấm rễ ngoại cộng sinh liên quan đến tái phát hỏa hoạn có ý nghĩa thiết yếu đối với hoạt động quản lý bền vững các khu hệ thông dễ bị tổn thương do khí hậu và duy trì khả năng phục hồi của chúng trong các tình huống tương lai. Việc phục hồi hệ nấm ngoại cộng sinh tích cực ở các khu vực sau cháy có thể thực hiện thụ động nhờ các mầm nấm có khả năng thích nghi với lửa còn lại trong đất hoặc bổ sung các loài nấm ngoại cộng sinh chọn lọc trong vườn ươm (Hình 1.18) [119, 120, 121].



Hình 1.18. Vai trò của nấm rễ ngoại cộng sinh trong việc tái sinh rừng sau hỏa hoạn [121]

1.6. NGHIÊN CỨU VỀ NẤM NGOẠI CỘNG SINH VỚI THÔNG Ở KHU VỰC ĐÔNG NAM Á

Rừng thông tự nhiên ở Đông Nam Á bao gồm ba loài thông quan trọng về kinh tế là *Pinus kesiya*, *P. latteri* và *P. merkusii* thường được sử dụng trong trồng rừng, hai loài đặc hữu quý hiếm là *P. dalatensis* và *P. krempfii*, và một số loài thông khác có nguồn gốc từ khu vực nam Trung Hoa. *P. kesiya* được tìm thấy ở các vùng cao từ 800 đến 1.200 m từ Ấn Độ qua Myanmar, Thái Lan, Lào, Việt Nam và Campuchia đến miền nam Trung Quốc và Philippines [122]. *P. latteri* được tìm thấy ở các độ cao thấp hơn ở các quốc gia trên, ngoại trừ Trung Quốc và Ấn Độ [123], *P. merkusii* là loài tương tự như *P. latteri* nhưng chỉ xuất hiện ở các vùng đảo của khu vực Đông Nam Á như Malaya, Borneo, Phillipine kéo dài xuống sát Châu Úc. Trong khi đó *P. dalatensis* và *P. krempfii* là loài đặc hữu chỉ giới hạn ở các vùng cao phía Nam Việt Nam [124]. Trong những thập kỷ qua nạn phá rừng đã làm giảm diện tích của tất cả các loài thông ở Đông Nam Á (FAO, 2007). Việc khai thác nhựa và lấy củi không bền vững đang làm suy thoái nhiều lâm phần thông còn lại. Biến đổi khí hậu có khả

năng tạo ra các mối đe dọa bổ sung và ảnh hưởng đến quá trình tái sinh, tăng trưởng và phân bố của những khu rừng thông này. Do khả năng thích nghi cao với các điều kiện khí hậu khô hạn, đất nghèo dinh dưỡng, *P. kesiya* đang được sử dụng để tái tạo rừng theo hướng tự nhiên cũng như là loài cây quan trọng đối với rừng trồng ở các khu vực mới [125].

Tuy nhiên, trái ngược với các loài thông ở vùng ôn đới và vùng núi, các nghiên cứu về đặc điểm sinh học của thông á nhiệt đới, đặc biệt là *P. kesiya*, và tương tác của chúng với các yếu tố môi trường còn khá ít. Điều này gây thiếu hụt dữ liệu quan trọng cần cho việc xây dựng chiến lược phục hồi và trồng rừng mới trên đối tượng này. Đồng thời, thành phần hệ nấm rễ ngoại cộng sinh thay đổi đáng kể trong quá trình phát triển của cây con qua các giai đoạn. Nghiên cứu về mối quan hệ cộng sinh giữa nấm rễ ngoại cộng sinh và *P. kesiya* hiện nay mới được thực hiện ở một số nơi như Ấn Độ, Thái Lan và Philippines. Hiệu quả xâm nhiễm nấm và tác động hỗ trợ đối với cây con trong nhà kính và ngoài tự nhiên đã được chứng minh bởi Khemnark [126]. Các nghiên cứu của Sharma và cs. cũng chỉ ra sự khác biệt rõ rệt trong khả năng phát triển rễ bên cũng như hiệu quả sử dụng nước và chất dinh dưỡng của các cây con có nhiều rễ nấm cộng sinh, thúc đẩy tiềm năng khai hoang và trồng lại rừng ở các khu vực rừng bị suy thoái [127]. Ngoài ra, nghiên cứu trên các độ tuổi rừng khác nhau của Sharma cũng cho thấy chỉ số đa dạng của nấm rễ ngoại cộng sinh, các loài ưu thế trong từng độ tuổi khác nhau của *P. kesiya* và mối tương quan tích cực giữa số lượng rễ nấm cộng sinh với độ ẩm của đất, độ pH của đất, tổng lượng nitơ, photpho, kali cũng như các chất hữu cơ của đất [55].

Hiện nay tại Việt Nam, các nghiên cứu về hệ nấm rễ ngoại cộng sinh với các loại thực vật cộng sinh nói chung và thông ba lá *P. kesiya* nói riêng vẫn còn rất ít. Trong khi đó nhiều dự án trồng rừng, cải tạo và tái sinh rừng tự nhiên đang được nhà nước quan tâm đầu tư và phát triển. Trong đó, thông ba lá là một trong những loài được ưu tiên trồng tái sinh nhờ các giá trị sinh thái và kinh tế quan trọng của loài này. Để nâng cao chất lượng rừng, tăng khả năng sinh trưởng cũng như giảm thiểu tỷ lệ bệnh, chết của cây con trước khi đưa ra rừng trồng bằng các giải pháp sinh học mang lại nhiều lợi ích về mặt môi trường và đem lại hiệu quả kinh tế cao. Vì vậy, hiểu rõ về thành phần loài nấm rễ ngoại cộng sinh sinh ở mỗi khu vực rừng khác nhau về điều kiện môi trường và thành phần hệ thực vật, cũng như thành phần các loài chiếm ưu thế trong từng giai đoạn phát triển của cây có ý nghĩa quan trọng trong việc lựa chọn nguồn chủng giống ban đầu, có thể bổ sung vào đất trồng như một dạng chế phẩm sinh học giúp nâng cao hiệu quả nhân giống cây con.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là các loài nấm ngoại cộng sinh có khả năng cộng sinh với hệ rễ của cây thông ba lá *Pinus kesiya* có phân bố tại tỉnh Lâm Đồng trong các giai đoạn phát triển của cây, bao gồm:

- Giai đoạn cây con thông ba lá 6 tháng tuổi.
- Giai đoạn cây con thông ba lá 3 năm tuổi.
- Giai đoạn cây thông ba lá trưởng thành.

Ngoài ra, nghiên cứu cũng tiến hành khảo sát những loài nấm ngoại cộng sinh có khả năng hình thành quả thể trong khu vực trồng thông 3 năm tuổi.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

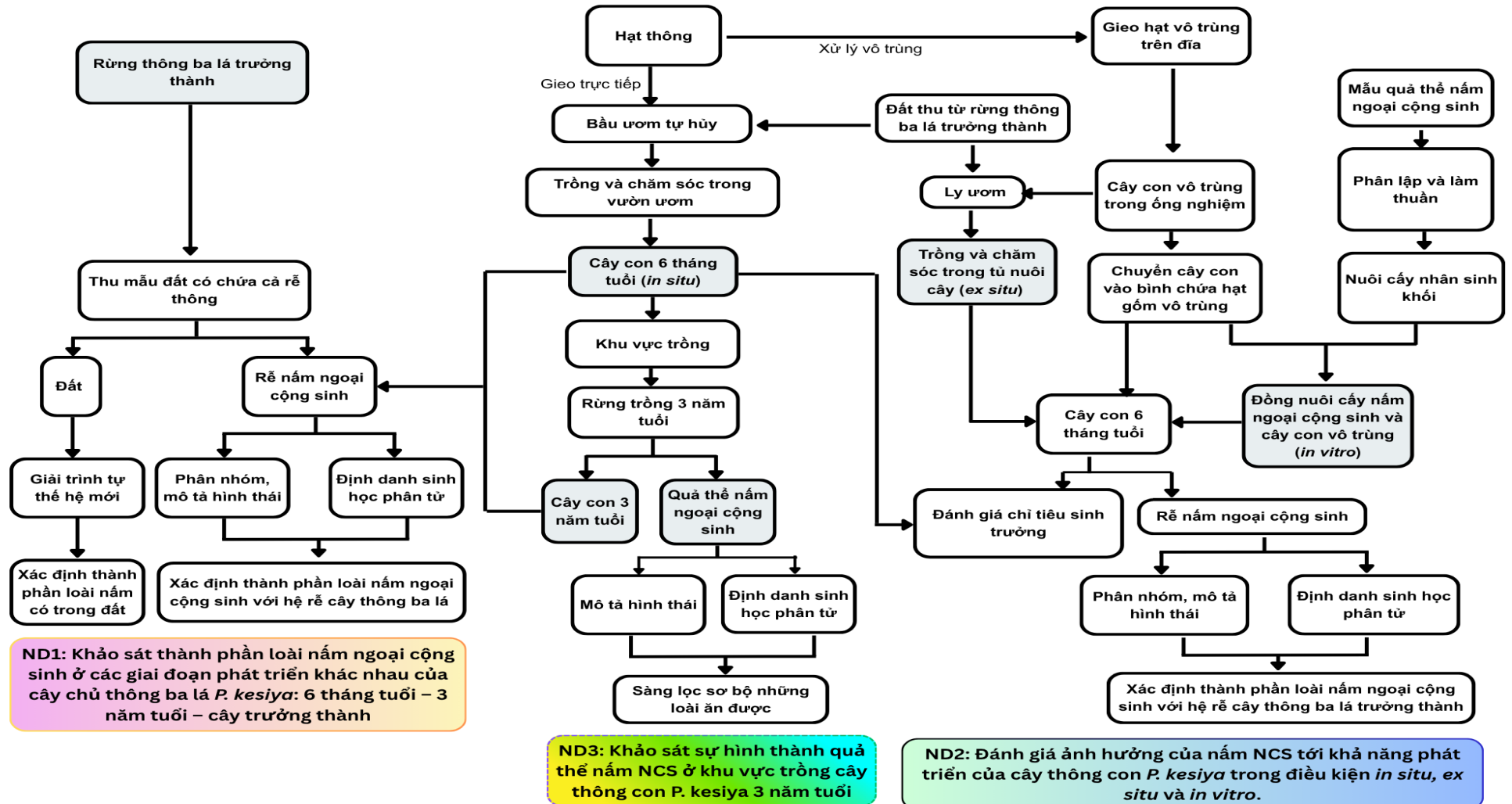
2.2.1. Nội dung nghiên cứu

- ❖ Nội dung 1: Khảo sát thành phần loài nấm ngoại cộng sinh ở các giai đoạn phát triển khác nhau của cây chủ thông ba lá *P. kesiya*: 6 tháng tuổi – 3 năm tuổi – cây trưởng thành.
- ❖ Nội dung 2: Đánh giá ảnh hưởng của nấm ngoại cộng sinh tới khả năng phát triển của cây thông con *P. kesiya* trong điều kiện *in situ*, *ex situ* và *in vitro*.
- ❖ Nội dung 3: Khảo sát sự hình thành quả thể nấm ngoại cộng sinh ở khu vực trồng cây thông con *P. kesiya* 3 năm tuổi.

2.2.2. Địa điểm thực hiện nghiên cứu

- Địa điểm thu mẫu đất để thực hiện nội dung 1 là rừng thông ba lá trưởng thành thuộc Ban quản lý rừng phòng hộ Đa Nhim, xã Lạc Dương, huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng và Viện Khoa học Sự sống (Viện KHSS), thành phố Đà Lạt, Tỉnh Lâm Đồng. Diện tích nghiên cứu ở 2 khu vực này là 4 ha/khu vực
- Cây con sử dụng để trồng rừng và thực hiện nội dung 1 - 2 (cây con *in situ*) được gieo và chăm sóc tại vườn ươm cây con của Ban quản lý rừng phòng hộ Đa Nhim, xã Lạc Dương, huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng.
- Khu vực trồng rừng được bố trí trên diện tích đất trống liền kề với địa điểm thu mẫu đất cho nội dung 1. Diện tích đất trống rừng tại khu vực này là 2 ha.
- Các thí nghiệm thu mẫu rễ nấm ngoại cộng sinh, định danh hình thái và sinh học phân tử rễ nấm ngoại cộng sinh và quả thể nấm ngoại cộng sinh, trồng và chăm sóc cây con *ex situ* và *in vitro* được thực hiện tại phòng thí nghiệm thuộc Viện Sinh học Ứng dụng, thành phố Hồ Chí Minh.

2.2.3. Sơ đồ các bước thực hiện trong nghiên cứu



2.2.4. Phương pháp thực hiện nội dung 1

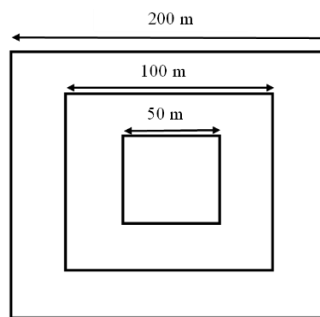
2.2.4.1 Xác định địa điểm và thiết kế ô mẫu thí nghiệm để thu mẫu đất và rễ nấm ngoại cộng sinh tại khu vực rừng thông ba lá *P. kesiya* trưởng thành

Hai khu vực có hệ thực vật ưu thế chủ đạo là thông ba lá *P. kesiya* được chọn:

- Khu vực rừng thông ba lá *P. kesiya* trưởng thành thuộc Ban quản lý rừng phòng hộ đầu nguồn Đa Nhim, xã Lạc Dương, huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng.
- Khu vực rừng thông ba lá *P. kesiya* trưởng thành giáp với đất đô thị thuộc Viện Khoa học Sự sống (tên cũ: Viện nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên), Thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng.

Mẫu rễ nấm ngoại cộng sinh và mẫu đất được thu ở rừng thông ba lá *P. kesiya* trưởng thành ở khu vực rừng phòng hộ đầu nguồn Đa Nhim, xã Đa Nhim, huyện Lạc Dương. Đồng thời, để kiểm tra sự khác biệt về thành phần loài nấm ngoại cộng sinh khi chịu sự tác động của các xáo trộn gây ra bởi quá trình đô thị hóa, rừng thông ba lá *P. kesiya* trưởng thành nằm trong khu vực đô thị thuộc Viện Khoa học Sự sống (Viện KHSS), thành phố Đà Lạt cũng được tiến hành thu một số mẫu đất để so sánh.

Tại mỗi khu vực, thiết lập 1 ô thu mẫu rộng 4 ha để thu thập mẫu đất và rễ nấm ngoại cộng sinh (Hình 2.1).



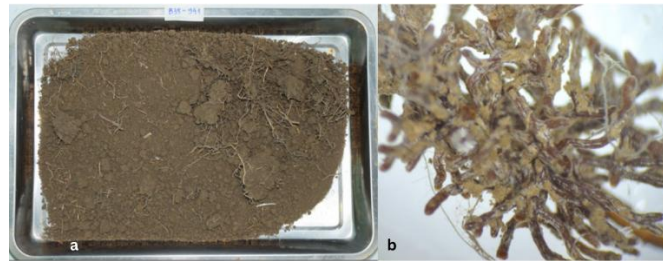
Hình 2.1. Đường thu mẫu

2.2.4.2. Thu và xử lý mẫu đất, mẫu rễ nấm ngoại cộng sinh tại khu vực rừng thông ba lá *P. kesiya* trưởng thành

- ❖ **Mục tiêu:** khảo sát thành phần và sự đa dạng của hệ nấm ngoại cộng sinh trong khu vực phân bố tự nhiên của thông ba lá *P. kesiya*. Đồng thời xác định loài nấm ngoại cộng sinh tương thích với cây chủ thông ba lá ở giai đoạn trưởng thành.
- ❖ **Các bước thực hiện:**

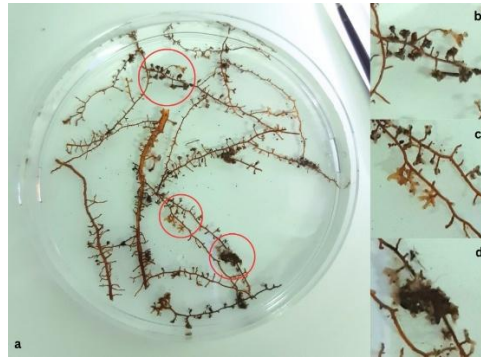
Việc lấy mẫu đất được tiến hành dọc theo đường thu mẫu (Hình 2.1) đã thiết kế trong mỗi ô thí nghiệm. Sau khi loại bỏ lớp lá mục, 50 khối đất ($15 \times 15 \times 10$ cm)

được đào từ vùng rễ dưới tán cây thông ba lá *P. kesiya* trưởng thành, với khoảng cách tối thiểu 20 m giữa hai điểm lấy mẫu. Các mẫu đất (Hình 2.2a) thu được tại khu vực rừng phòng hộ đầu nguồn Đa Nhim được đánh dấu kí hiệu từ A01 đến A50, các mẫu đất thuộc Viện Khoa học Sự sống được đánh dấu kí hiệu từ B01 đến B50. Tổng cộng 100 mẫu đất đã được thu thập ở 2 khu vực nghiên cứu, sau đó được bảo quản mát và xử lý trong thời gian sớm nhất có thể.



Hình 2.2 Mẫu đất (a) và các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh (b) có trong đất

Rễ thông trong mẫu đất được tách khỏi đất, tiến hành rửa nước nhiều lần để làm sạch các mảnh vụn đất bám bên trên. Dựa trên sự khác biệt về cấu trúc so với rễ thông thường, rễ thông có cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh (Hình 2.2b, Hình 2.3a) được tách riêng bằng nhíp. Các rễ nấm ngoại cộng sinh được phân loại thành các kiểu hình (ectomycorrhizal morphotypes, Hình 2.3b, c, d) dựa trên sự kết hợp các đặc điểm hình thái sơ bộ khi quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (SZM-2, Optika, Italia) theo phương pháp được mô tả ở mục 2.2.4.3. Những rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong cùng một mẫu đất có các đặc điểm hình thái tương đồng được xếp vào cùng một kiểu hình (morphotype) và được kí hiệu “ABI-kí hiệu mẫu đất.kí hiệu kiểu hình” (ví dụ: ABI-A01.1) để thuận tiện cho việc theo dõi và phân tích. Trong nghiên cứu này, mỗi chóp rễ nấm ngoại cộng sinh (ectomycorrhizal root tip) được xem là đơn vị lấy mẫu cơ bản để đánh giá độ phong phú của các kiểu hình. Đối với mỗi kiểu hình trong từng mẫu đất, các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thuộc kiểu hình đó được đếm toàn bộ nhằm xác định mức độ phong phú của kiểu hình trong mẫu. Đồng thời, từ 3-10 đầu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh (chóp rễ) đại diện cho mỗi kiểu hình được lựa chọn để bảo quản trong dung dịch lactoglycerol (1 Axit lactic: 1 Glycerol: 1 nước cất, v/v/v) để sử dụng cho giải phẫu hình thái (nếu cần). Ngoài ra, 3 chóp rễ đại diện cho mỗi kiểu hình cũng được giữ trong dung dịch đệm CetylTrimethylAmmonium Bromide (CTAB) ở nhiệt độ phòng để sử dụng trong phân tách DNA và định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng đệm phiên mã nội bộ (Internal Transcribed Spacer – ITS) theo phương pháp được trình bày ở mục 2.2.4.4.

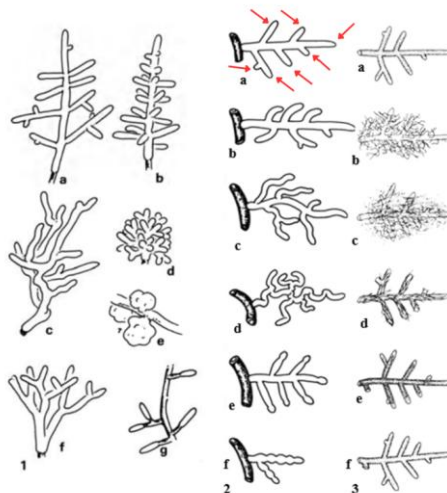


Hình 2.3. Rễ nấm ngoại cộng sinh thu được từ mẫu đất (a); các kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh có thể có trong một mẫu đất (b, c, d)

Phần đất còn lại sau khi loại bỏ đá vụn và tách lấy rễ thông từ 50 mẫu đất trong mỗi ô thu mẫu được trộn đều để tạo thành 1 mẫu hỗn hợp. Từ mỗi mẫu hỗn hợp, 5 mẫu con (1 g/mẫu) được lấy ngẫu nhiên để tách chiết DNA, tương ứng với 5 lần lặp lại của thí nghiệm. Kí hiệu mẫu: ĐA1 đến ĐA5 đối với các mẫu đất từ khu vực rừng phòng hộ đầu nguồn Đa Nhim và ĐB1 đến ĐB5 đối với các mẫu đất từ khu vực rừng thuộc Viện Khoa học Sự sống. Tổng cộng có 10 mẫu đất của cả 2 ô thu mẫu được sử dụng để tách chiết DNA phục vụ phân tích thành phần nấm có trong đất bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới (Next generation sequencing – NGS) theo phương pháp được trình bày ở mục 2.2.4.5.

2.2.4.3. Mô tả đặc điểm hình thái của rễ nấm ngoại cộng sinh

Các đặc điểm hình thái ngoài của rễ nấm ngoại cộng sinh (Hình 2.4) được mô tả trên cơ sở màu sắc, hình dạng, sự phân nhánh, bề mặt lớp bao manlê, sự hiện diện của các cấu trúc sợi nấm dạng rễ và sợi nấm bên ngoài dưới kính hiển vi soi nổi (SZM-2, Optika, Italia) theo các mô tả chi tiết của Agerer [30].



Hình 2.4. Một số đặc điểm cơ bản của rễ nấm ngoại cộng sinh [33]

1a-g: Đặc điểm phân nhánh chính của cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh (a đơn nhánh-dạng lông vũ; b đơn nhánh-dạng tháp; c phân nhánh dạng tự do; d phân nhánh dạng san hô; e dạng cục; f phân nhánh đôi; g không phân nhánh).

2a-g: Hình thái ngoài của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh (a dạng thẳng; b cong; c lượn sóng; d gấp khúc; e thắt eo ở đầu chóp; f dạng nhiều đốt). Mũi tên màu đỏ chỉ ra các đầu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh (chóp rễ).

3a-g: Bề mặt rễ nấm ngoại cộng sinh với hệ sợi nấm bên ngoài

2.2.4.4. Định danh sinh học phân tử rễ nấm ngoại cộng sinh

Thành phần nấm trong các rễ nấm ngoại cộng sinh thu được được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử dựa trên vùng trình tự ITS với cặp mồi ITS1F [128] và ITS4 [129] của rDNA. DNA bộ gen của các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trước tiên được tách chiết theo phương pháp CTAB của Winnepenninckx và cs. [130] (có hiệu chỉnh cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm). Thành phần các hóa chất sử dụng được thể hiện ở phụ lục 3 – 5. Toàn bộ các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh đại diện của mỗi kiểu hình thu được trong tất cả các mẫu đất đều được tiến hành tách chiết DNA. Các bước tách chiết được tiến hành như sau:

- Nghiền 1 đầu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trong 50 µl dung dịch CTAB 2x sau đó bổ sung thêm 450 µl CTAB và ủ ở 65 °C trong 1h.
- Thêm 500 µl dung dịch CIA, vortex đều và ly tâm ở 15.000 vòng/phút, 7 phút ở nhiệt độ phòng.
- Thu 300 µl dịch nổi cho vào 300 µl dung dịch isopropanol lạnh và ủ ở -20 °C trong 30 phút.
- Ly tâm 15.000 vòng/ phút, 7 phút, 4 °C, bỏ dịch nổi.
- Thêm 500 µl EtOH 70%, ly tâm 15.000 vòng/ phút, 7 phút, 4 °C, bỏ dịch nổi. Lặp lại bước rửa còn từ 2 - 3 lần.
- Làm khô tự nhiên trên bồn ủ khô ở 50 °C trong 30p.
- Thêm 50 µl dung dịch TE và giữ mẫu DNA tổng ở -20 °C cho đến khi sử dụng.

Phản ứng chuỗi trùng hợp (Polymerase Chain Reaction – PCR) được thực hiện trong máy luân nhiệt TurboCycler 2 (BlueRay Biotech, Trung Quốc) với các chu kỳ nhiệt được thể hiện ở phụ lục 2, sử dụng MyTaq HS Mix (Meridian BioScience, Anh) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các sản phẩm khuếch đại thành công được tinh sạch bằng ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) và gửi giải trình tự theo theo phương pháp Sanger tại công ty 1st Base (Malaysia).

Các kết quả giải trình tự chóp rễ nấm ngoại cộng sinh sau đó sẽ được hiệu chỉnh bằng phần mềm ATGC (nếu cần) và tiến hành so sánh với các dữ liệu sẵn có 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.

Ngoài ra để khẳng định chính xác các chóp rễ thu nhận là cấu trúc cộng sinh của nấm ngoại cộng sinh và rễ của thông ba lá *P. kesiya*, các mẫu DNA tổng tách chiết từ chóp rễ đồng thời được sử dụng để thực hiện phản ứng PCR khuếch đại vùng trình tự DNA lập thể *trnL* với cặp mồi trnC-D [131] để xác nhận danh tính cây chủ cộng sinh.

2.2.4.5. Giải trình tự mẫu đất bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới

10 mẫu đất từ 2 ô mẫu nghiên cứu được tách chiết DNA tổng số bằng kit tách mẫu đất PrimeWay Soil DNA Extraction Kit (1st Base, Malaysia) theo quy trình khuyến cáo của nhà sản xuất. Mẫu DNA tổng sau khi tách được điện di để kiểm tra độ toàn vẹn của DNA trên gel agarose 1% và đo hàm lượng DNA tổng bằng nanodrop (kết quả điện di và đo nanodrop được thể hiện ở phụ lục 6 – 7).

Mẫu DNA tách chiết từ đất sau đó được bảo quản ở -20 °C và gửi giải trình tự thế hệ mới tại công ty 1st Base (Malaysia). Thành phần nấm có trong đất được xác định bằng phương pháp giải trình tự vùng gen chỉ thị ITS (ITS metabarcoding). Phản ứng khuếch đại được thực hiện với cặp mồi ITS5F [129] và ITS2 [128, 129]. Các sản phẩm PCR được giải trình tự trên hệ thống Illumina MiSeq (Illumina, Hoa Kỳ) theo chế độ paired-end 2 × 300 bp, trong đó mỗi phân tử DNA được giải trình tự từ cả hai đầu, tạo ra hai đoạn đọc có chiều dài 300 bp. Tiếp theo, dữ liệu giải trình tự thu được được xử lý theo quy trình DADA2 [132] để tạo các biến thể trình tự khuếch đại (Amplicon Sequence Variants – ASVs). Mồi và adaptor được xác định và sau đó loại bỏ bằng Cutadapt 3.5 [133]. Chất lượng của các trình tự thô được đánh giá bằng phần mềm FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Sau đó, các cặp trình tự đọc hai đầu (paired-end reads) được lọc chất lượng, hiệu chỉnh sai số, ghép nối và suy luận ASVs bằng gói phần mềm DADA2 phiên bản 1.18. Các trình tự khảm (chimera) được phát hiện và loại bỏ bằng thuật toán tích hợp trong DADA2. Việc phân loại trình tự ITS được thực hiện dựa trên cơ sở dữ liệu UNITE phiên bản 9.0 [134]. Dữ liệu giải trình tự cuối cùng được lưu trữ trên cơ sở dữ liệu NCBI với mã số truy cập PRJNA1356344.

2.2.4.6. Gieo ươm cây con trong vườn ươm và chuyển cây con ra khu vực trồng

❖ **Mục tiêu:** Tạo nguồn cây chủ ở các giai đoạn phát triển khác nhau (6 tháng tuổi và 3 năm tuổi) để thu mẫu rễ phục vụ khảo sát thành phần nấm ngoại cộng sinh.

❖ **Nguyên liệu:**

Hạt thông và đất sử dụng làm giá thể gieo ươm được thu từ khu vực rừng thông ba lá trưởng thành nằm liền kề vườn ươm của Ban Quản lý rừng phòng hộ đầu nguồn Đa Nhim, xã Đa Nhim, tỉnh Lâm Đồng. Do được lấy từ rừng thông trưởng thành, đất chứa các nguồn nấm ngoại cộng sinh bản địa tương thích với thông ba lá và được xem là nguồn xâm nhiễm nấm ngoại cộng sinh tự nhiên cho cây con trong giai đoạn vườn ươm.

❖ **Các bước thực hiện:**

Hạt thông *P. kesiya* được thu từ các cây thông trưởng thành, bảo quản tối đa trong vòng 2 năm ở điều kiện mát 5 °C theo tài liệu “Kỹ thuật trồng thông ba lá” do Viện Khoa học Lâm Nghiệp Việt Nam biên soạn [135]. Hạt không cần ngâm với dung dịch xử lý nấm mà được gieo trực tiếp vào các bầu vải tự hủy đã chứa sẵn giá thể đất và chăm sóc trong vườn ươm theo tiêu chuẩn TCVN 11872-3:2020 do Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành [136]. Số lượng bầu cây con được gieo là 2.500 cây.

Sau 6 tháng sinh trưởng, 2.200 cây con được đưa ra trồng trong khu vực rừng trồng dưới sự quản lý của Ban quản lý rừng phòng hộ đầu nguồn Đa Nhim (Hình 2.5). Hố trồng có kích thước 30 cm × 30 cm × 40 cm (dài × rộng × sâu) có bón lót than hoạt tính dưới nền, khoảng cách giữa các cây từ 2–3 m. Cây con được chăm sóc dựa trên tiêu chuẩn ngành 04TCN 65-2003 – Quy trình kỹ thuật trồng rừng Thông ba lá của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn [137], nhưng không tiến hành đốt thực bì.



Hình 2.5. Khu vực rừng trồng *Pinus kesiya* 3 năm tuổi

2.2.4.7. Thu và định danh mẫu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh với cây thông con trong vườn ươm (in situ) và cây 3 tuổi

❖ **Mục tiêu:** Xác định thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ của cây thông ba lá ở các giai đoạn phát triển khác nhau của cây con (6 tháng tuổi và 3 năm tuổi)

❖ **Các bước thực hiện:**

Trong vườn ươm, 30 bầu cây được thu ngẫu nhiên khi cây con được 6 tháng tuổi. Cây được kí hiệu AS1 đến AS30 để thuận tiện cho việc theo dõi và phân tích. Tiến hành bảo quản mát nguyên bầu cây và xử lý sớm nhất có thể sau khi lấy về.

Trong khu vực rừng trồng, sau thời gian trồng và chăm sóc, khi cây thông ba lá con đạt 3 năm tuổi thì tiến hành đo chiều cao cây và đường kính tán của toàn bộ 2.200 cây (số liệu không được trình bày trong luận án). Chiều cao cây trung bình của cây con 3 năm tuổi đạt 52,6 cm, đường kính tán trung bình đạt 50 cm. Dựa trên số liệu về chiều cao cây, phân thành 3 nhóm cây: dưới 44 cm, 44 – 61 cm, trên 61 cm. Trong mỗi nhóm, lấy ngẫu nhiên 10 cây bằng cách đào quanh vùng rễ cây kích thước 1,2 m × 1 m (đường kính × độ sâu), sau đó loại bỏ bớt phần đất quanh rễ. Cây sau khi thu được bảo quản nguyên hệ thống rễ ở điều kiện mát và nhanh chóng vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành các bước xử lý tiếp theo. Tổng cộng có 30 cây thông ba lá 3 năm tuổi được thu thập, kí hiệu P1 đến P30.

Cây con trong vườn ươm và cây 3 năm tuổi (Hình 2.6) sau khi thu về được tách lấy phần rễ để xử lý. Hệ thống rễ của cây được thu thập toàn bộ bằng cách dùng nước rửa nhiều lần để làm sạch đất. Thu toàn bộ hệ rễ con và tiến hành quan sát dưới kính hiển vi soi nổi (SZM-2, Optika, Italia). Các đặc điểm hình thái của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh được mô tả theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.2.4.3. Những rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong hệ rễ của cùng một cây có các đặc điểm hình thái tương đồng sẽ được phân loại vào cùng một kiểu hình và được kí hiệu “ABI-kí hiệu cây.kí hiệu kiểu hình” (ví dụ: ABI-AS1.1; ABI-P1.1) để thuận tiện cho việc theo dõi và phân tích. Đối với mỗi kiểu hình trong từng mẫu rễ cây, các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thuộc kiểu hình đó được đếm toàn bộ nhằm xác định mức độ phong phú của kiểu hình trong mẫu. Đồng thời, từ 3-10 đầu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh đại diện cho mỗi kiểu hình được lựa chọn để bảo quản trong dung dịch lactoglycerol (1 Axit lactic: 1 Glycerol: 1 nước cất, v/v/v) để sử dụng cho giải phẫu hình thái (nếu cần). Ngoài ra, 3 chóp rễ đại diện cho mỗi kiểu hình cũng được giữ trong dung dịch đệm CTAB ở nhiệt độ phòng để sử dụng trong phân tách DNA và định danh sinh học phân tử dựa trên vùng trình tự ITS đã trình bày ở mục 2.2.4.4.



Hình 2.6. Cây con thông ba lá 6 tháng tuổi trong vườn ươm (a) và cây thông ba lá con 3 năm tuổi trong rừng trồng (b)

2.2.4.8. Xử lý số liệu

Các kết quả, số liệu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

Số liệu về thành phần loài nấm thu được bằng giải trình tự thế hệ mới được xử lý trên nền tảng phân tích Amplicon của Nova Lifetech (Singapore) (<https://microbiome.novalifetech.com/>).

Thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ cây thông ba lá *P. kesiya* trong các giai đoạn phát triển cây con 6 tháng tuổi – cây con 3 năm tuổi – cây trưởng thành được so sánh, đánh giá thông qua các chỉ số:

+ Chỉ số Shannon-Wiener: phản ánh đồng thời độ phong phú về số lượng loài và mức độ đồng đều về số lượng cá thể giữa các loài trong mẫu [1]. Trong nghiên cứu này, chỉ số Shannon-Wiener được tính theo công thức:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i \quad [138]$$

Trong đó:

S: tổng số loài nấm ngoại cộng sinh trong mỗi giai đoạn.

p_i : tỷ lệ của loài i trong mỗi giai đoạn, được tính bằng n_i/N .

n_i : số chóp rễ ngoại cộng sinh của loài i trong mỗi giai đoạn.

N: tổng số chóp rễ ngoại cộng sinh của tất cả các loài trong mỗi giai đoạn.

+ Chỉ số Pielou's (J): dùng để đo mức độ đồng đều về số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh giữa các loài trong một giai đoạn nghiên cứu

$$J' = \frac{H'}{H'_{\max}} = \frac{H'}{\ln S} \quad [139]$$

Trong đó:

H' : chỉ số đa dạng Shannon–Wiener.

S : số loài nấm ngoại cộng sinh trong mỗi giai đoạn nghiên cứu

$H'_{\max} = \ln S$ là giá trị Shannon–Wiener lớn nhất khi tất cả các loài có số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh bằng nhau.

2.2.5. Phương pháp tiến hành nội dung 2

2.2.5.1. Khảo sát sự ảnh hưởng của nấm ngoại cộng sinh đến khả năng phát triển của cây con thông ba lá *P. kesiya* trong điều kiện *in situ*

❖ **Mục tiêu:** Khảo sát thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ cây con thông ba lá *P. kesiya* và ảnh hưởng của chúng lên sự phát triển của cây trong điều kiện sinh thái tự nhiên của loài, là cơ sở so sánh với các thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện có kiểm soát.

❖ **Các bước thực hiện:**

Cây con thông ba lá *P. kesiya* 6 tháng sử dụng trong thí nghiệm này được thu từ vườn ươm ở mục 2.2.4.6. Chóp rễ nấm ngoại cộng sinh được thu nhận và xử lý theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.2.4.7. Ngoài ra, khả năng phát triển của cây con *P. kesiya* được đánh giá thông qua các chỉ tiêu:

- Chiều cao cây.
- Tỷ lệ cây con có sự cộng sinh với nấm ngoại cộng sinh.
- Số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong mỗi cây.

Các kết quả, số liệu nghiên cứu được xử lý và vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel.

2.2.5.2. Chuẩn bị cây thông con vô trùng

❖ **Mục tiêu:** Tạo nguồn cây chủ vô trùng cho thí nghiệm *ex situ* và nuôi cấy *in vitro*

❖ **Các bước thực hiện:**

Hạt thông *P. kesiya* được thu từ các cây thông trưởng thành, bảo quản tối đa trong vòng 2 năm ở điều kiện mát 5 °C theo tài liệu “Kỹ thuật trồng thông ba lá” do Viện Khoa học Lâm Nghiệp Việt Nam biên soạn [135].

Hạt được xử lý sơ bộ trước khi gieo trồng để đảm bảo vô trùng. Quy trình xử lý hạt vô trùng bao gồm các bước:

- Rửa sạch bề mặt hạt dưới vòi nước chảy trong 1 giờ.
- Ngâm hạt trong dung dịch ethanol 70% (v/v) trong 1 phút.
- Lắc kỹ hạt trong dung dịch H₂O₂ 7% (v/v) có bổ sung Tween 20 (2 giọt/500 mL dung dịch) trong 15 phút.
- Rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng.

Hạt đã xử lý bề mặt sau đó được ủ nảy mầm trên môi trường thạch nước (Water agar - WA) ở 25 °C trong điều kiện tối trong 1 tuần. Những hạt đã nảy mầm và không có dấu hiệu bị nhiễm tạp được chuyển vào ống nghiệm (180 × 18 mm) chứa môi trường Murashige-Skoog (MS) (Phyto Tech Labs, Kansas, Hoa Kỳ). Sau 2 tuần, những cây con phát triển tốt, không có dấu hiệu nhiễm nấm mốc hay khuẩn được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo (Hình 2.7).



Hình 2.7. Cây thông vô trùng sau 3 tuần gieo hạt

2.2.5.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của nấm ngoại cộng sinh đến khả năng phát triển của cây con thông ba lá *P. kesiya* trong điều kiện *ex situ*

❖ **Mục tiêu:** Khảo sát thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ và ảnh hưởng của chúng lên sự phát triển của cây con thông ba lá *P. kesiya* trong điều kiện *ex situ*. Từ đó, đánh giá được khả năng duy trì chức năng của nguồn nấm bản địa sau khi được chuyển khỏi sinh cảnh tự nhiên, làm cơ sở để phát triển các nghiên cứu sản xuất chế phẩm nấm ngoại cộng sinh phục vụ ươm giống cây lâm nghiệp.

❖ Các bước thực hiện:

- Chuẩn bị đất trồng

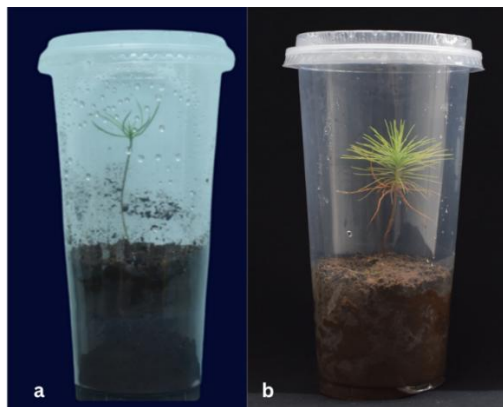
Đất sử dụng làm giá thể gieo ươm được thu từ khu vực rừng thông ba lá trưởng thành nằm liền kề vườn ươm của Ban Quản lý rừng phòng hộ Đa Nhim, xã Đa Nhim, tỉnh Lâm Đồng. Do được lấy từ rừng thông trưởng thành, đất chứa các nguồn nấm ngoại cộng sinh bản địa tương thích với thông ba lá và được xem là nguồn xâm nhiễm nấm ngoại cộng sinh tự nhiên cho cây con. Đất sau khi thu được đưa về phòng thí nghiệm và tiến hành thực hiện thí nghiệm trong thời gian ngắn nhất có thể.

Giá thể đất sau đó được phân phối vào các ly trồng cây bằng nhựa PP (Polypropylene) đã hấp tiệt trùng với khối lượng 500 g đất/ly.

- Nuôi cây thông con *ex situ*

Tiến hành chuyển 30 cây thông con vô trùng đã chuẩn bị ở mục 2.2.5.1. vào các ly trồng cây chứa giá thể đất đã chuẩn bị (1 cây/ly) (Hình 2.8a). Cây được kí hiệu ESA1 đến ESA30 để thuận tiện cho việc theo dõi và phân tích.

Cây được trồng và chăm sóc trong thời gian 6 tháng (Hình 2.8b) ở điều kiện 20 °C với cường độ ánh sáng trung bình 3000–5000 lux, chiếu sáng 12 giờ sáng/12 giờ tối.



Hình 2.8. Cây thông con mới chuyển vào ly trồng (a) và sau 6 tháng trồng (b)

- Thu cây và ghi nhận kết quả

Sau thời gian thí nghiệm, cây con được tách một cách cẩn thận khỏi đất trồng. Tiến hành đo chiều cao cây bằng cách đo khoảng cách từ cổ rễ đến đỉnh sinh trưởng của cây bằng thước có chia vạch [140], đơn vị tính là centimet (cm).

Hệ rễ của cây thông con được rửa nước nhiều lần để làm sạch các hạt đất bám trên rễ và thu nhận các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh dưới kính hiển vi soi nổi (SZM-

2, Optika, Italia). Các đặc điểm hình thái của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh được mô tả theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.2.4.3. Những rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong hệ rễ của cùng một cây có các đặc điểm hình thái tương đồng sẽ được phân loại vào cùng một kiểu hình và được kí hiệu “ABI-kí hiệu cây.kí hiệu kiểu hình” (ví dụ: ABI-ESA1.1) để thuận tiện cho việc theo dõi và phân tích. Đối với mỗi kiểu hình trong từng mẫu rễ cây, các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thuộc kiểu hình đó được đếm toàn bộ nhằm xác định mức độ phong phú của kiểu hình trong mẫu. Đồng thời, từ 3-10 đầu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh đại diện cho mỗi kiểu hình được lựa chọn để bảo quản trong dung dịch lactoglycerol (1 Axit lactic: 1 Glycerol: 1 nước cất, v/v/v) để sử dụng cho giải phẫu hình thái (nếu cần). Ngoài ra, 3 chóp rễ đại diện cho mỗi kiểu hình cũng được giữ trong dung dịch đệm CTAB ở nhiệt độ phòng để sử dụng trong phân tách DNA và định danh sinh học phân tử dựa trên vùng trình tự ITS đã trình bày ở mục 2.2.4.4.

- Xử lý số liệu

Khả năng phát triển của cây con *P. kesiya* được đánh giá thông qua các chỉ tiêu:

- Chiều cao cây.
- Tỷ lệ cây con có sự cộng sinh với nấm ngoại cộng sinh.
- Số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong mỗi cây.

Các kết quả, số liệu nghiên cứu được xử lý và vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel.

2.2.5.4. Khảo sát sự ảnh hưởng của nấm ngoại cộng sinh đến khả năng phát triển của cây con thông ba lá *P. kesiya* trong điều kiện *in vitro*

❖ **Mục tiêu:** Kiểm chứng khả năng xâm nhiễm và hình thành cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh và đánh giá hiệu quả cộng sinh của nấm ngoại cộng sinh đến khả năng phát triển của cây con thông ba lá *P. kesiya*. Kết quả thu được có thể sử dụng làm cơ sở tuyển chọn các chủng nấm ngoại cộng sinh có tiềm năng phát triển thành chế phẩm sinh học.

❖ **Các bước thực hiện:**

- Chuẩn bị nguồn sinh khối nấm ngoại cộng sinh cho thí nghiệm đồng nuôi cấy

Từ các kết quả thu nhận ở nội dung 1, loài nấm ngoại cộng sinh chiếm ưu thế xuất hiện ở cả 3 giai đoạn phát triển của cây thông ba lá, đặc biệt là trong giai đoạn cây con, sẽ được chọn để làm nguồn xâm nhiễm thuần chủng cho thí nghiệm *in vitro*.

Do thất bại trong việc phân lập nấm từ các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh, thí nghiệm sẽ sử dụng nguồn giống nấm được phân lập từ quả thể nấm ngoại cộng sinh thu được tại khu vực rừng thông ba lá trưởng thành.

Nấm được phân lập trên môi trường Modified Melin–Norkrans (MMN) [141] theo các bước [58]:

- Loại bỏ các hạt đất bám trên bề mặt quả thể nấm, sau đó cắt đôi quả thể một cách cẩn thận nhằm hạn chế nhiễm bẩn phần mô bên trong trong quá trình thao tác. Chỉ lựa chọn các vùng mô còn nguyên vẹn, tránh những vị trí bị dập nát, úng hoặc bị côn trùng gây hại.
- Tách lấy một mô nấm sạch kích thước khoảng 2 mm³ bằng dao cấy vô trùng và đặt vào giữa đĩa Petri chứa môi trường thạch MMN. Mẫu cấy được nuôi ở 25 °C trong tối.
- Cấy chuyển nhiều lần cho đến khi thu được mẫu nấm thuần không bị nhiễm tạp. Mẫu thuần sau đó được giữ giống trong ống thủy tinh nắp vặn 19 × 55 mm (Nichiden-Rika Glass CO., Nhật Bản) chứa môi trường thạch MMN ở nhiệt độ 4 °C.

Để chuẩn bị đủ nguồn sinh khối nấm ngoại cộng sinh cần thiết cho thí nghiệm đồng nuôi cấy, nguồn giống nấm ngoại cộng sinh trước tiên được hoạt hóa lại từ mẫu thuần đã giữ giống. Bước hoạt hóa giống được tiến hành bằng cách cấy chuyển một mẫu mô nấm có đường kính khoảng 4 mm từ ống giữ giống sang đĩa Petri chứa môi trường thạch MMN và ủ ở 25 °C trong bóng tối. Sau 4 tuần, một mẫu tơ nấm có đường kính 4 mm được cắt ra từ rìa khuẩn lạc bằng dụng cụ đục thạch vô trùng và chuyển vào bình Erlenmeyer (Schott, 50 mL) chứa 20 mL môi trường MMN. Mỗi bình nuôi sinh khối nấm được chuẩn bị để bổ sung vào một bình nuôi cây con. Các bình erlen được nuôi cấy trong 3–4 tuần ở 25 °C trong bóng tối để tạo ra đủ sinh khối cho các thí nghiệm đồng nuôi cấy.

➤ Chuẩn bị giá thể trồng cây

Hạt đất nung là loại giá thể trồng cây phổ biến, có giá thành thấp và dễ dàng khử trùng bằng hóa chất hoặc bằng phương pháp xử lý nhiệt. Ngoài ra, hạt đất nung có cấu trúc xốp và thoáng khí tốt, có thể hỗ trợ cho sự phát triển của hệ rễ cây con cũng như hệ sợi của nấm ngoại cộng sinh. Vì vậy, vật liệu này được chọn để làm giá thể trồng cây con cho thí nghiệm đồng nuôi cấy *in vitro* của luận án.

Quá trình tiền xử lý giá thể trồng cây được tiến hành qua các giai đoạn: Hạt đất nung (φ 6–8 mm; Popper, Thái Lan) trước tiên được rửa sạch bằng nước máy để

loại bỏ bụi trước khi sử dụng. Sau đó, hạt được xử lý bằng dung dịch HCl 1% (v/v) để điều chỉnh độ pH đến 5–5,5. Cuối cùng, hạt được sấy khô ở 105 °C đến khi đạt trọng lượng không đổi.

Để chuẩn bị bình nuôi cây, khoảng 100 g hạt đất nung khô được cho vào các bình nuôi cây thủy tinh miệng rộng có nắp polypropylene (70 × 190 mm, 500 mL; CocoBIO Solutions, Việt Nam). Mỗi bình được bổ sung 100 mL môi trường lỏng Modified Melin–Norkrans (MMN) [141] không chứa đường (pH 5), sau đó được khử trùng bằng nồi hấp ở 121 °C trong 15 phút. Các bình nuôi cây sau đó được làm nguội ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ trước khi cấy cây con.

Mỗi cây con vô trùng được cấy vào một bình nuôi cây chứa 100 mL môi trường MMN không chứa glucose. Sau đó, cây con được ổn định trong 4 tuần ở nhiệt độ 25 °C, với chu kỳ sáng/tối 12 giờ/12 giờ trước khi chuyển sang giai đoạn đồng nuôi cây.

➤ Thực hiện thí nghiệm đồng nuôi cây

Thí nghiệm đồng nuôi cây được tiến hành theo phương pháp đã được sửa đổi của Ho [142]. Sinh khối nấm trong mỗi bình erlen được chuyển hoàn toàn vào bình nuôi cây chứa cây con vô trùng. Thí nghiệm được thực hiện với 15 cây có bổ sung sinh khối nấm và 15 cây không được bổ sung nấm được sử dụng làm đối chứng.

Giá thể trong mỗi bình được bọc bằng giấy bạc để tránh ánh sáng. Giai đoạn đồng nuôi cây được thực hiện ở 25 °C với cường độ ánh sáng trung bình 3.000–5.000 lux, dưới điều kiện chiếu sáng 12 giờ sáng/12 giờ tối. Quá trình đồng nuôi cây được dừng lại sau 12 tuần.

➤ Thu cây và ghi nhận kết quả

Cây con sau thời gian đồng nuôi cây được tách một cách cẩn thận ra khỏi cơ chất trồng. Tiến hành đo chiều cao cây và chiều dài rễ của cây bằng thước có chia vạch [140], đơn vị tính là centimet (cm).

Hệ rễ của cây thông con được rửa nước để làm sạch và thu nhận các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh dưới kính hiển vi soi nổi (SZM-2, Optika, Italia). Các đặc điểm hình thái của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh được mô tả theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.2.4.3. Đồng thời, từ 3–10 đầu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở mỗi cây đồng nuôi cây với nấm được bảo quản trong dung dịch lactoglycerol (1 Axit lactic: 1 Glycerol: 1 nước cất, v/v/v) và tiến hành giải phẫu, mô tả hình thái theo phương pháp của Agerer [30]. Ngoài ra, 3 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh đại diện ở mỗi cây cũng được giữ trong dung dịch đệm CTAB ở nhiệt độ phòng để sử dụng trong phân tách DNA

và định danh sinh học phân tử dựa trên vùng trình tự ITS đã trình bày ở mục 2.2.4.4 nhằm khẳng định lại tác nhân cộng sinh đã sử dụng.

Cân toàn bộ phần thân và rễ cây còn lại bằng cân phân tích để xác định sinh khối tươi của cây. Sau đó, tiến hành sấy ở nhiệt độ 70 °C đến khối lượng không đổi và ghi nhận sinh khối khô của cây. Đơn vị tính là gam (g).

➤ Xử lý số liệu

Khả năng hình thành cộng sinh của nấm ngoại cộng sinh với rễ của cây thông ba lá *P. kesiya* con được đánh giá thông qua các chỉ tiêu:

- Tỷ lệ cây con có sự cộng sinh với nấm ngoại cộng sinh.
- Số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong mỗi cây.

Khả năng phát triển của cây thông ba lá *P. kesiya* con được đánh giá thông qua các chỉ tiêu:

- Chiều cao cây.
- Chiều dài rễ.
- Sinh khối tươi của cây.
- Sinh khối khô của cây.

Các kết quả, số liệu nghiên cứu được xử lý và vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel và phần mềm thống kê Statgraphics Plus 3.0 (Statgraphics Technologies Inc., Hoa Kỳ).

2.2.6. Phương pháp tiến hành nội dung 3

2.2.6.1. Thu mẫu quả thể nấm ngoại cộng sinh tại khu vực rừng trồng *P. kesiya* 3 năm tuổi

❖ **Mục tiêu:** xác định các loài nấm ngoại cộng sinh có khả năng hình thành quả thể trong giai đoạn rừng thông ba lá *P. kesiya* 3 năm tuổi và sàng lọc các loài có giá trị thực phẩm. Đây là cơ sở để đánh giá tiềm năng khai thác và phát triển nguồn tài nguyên nấm gắn với trồng rừng.

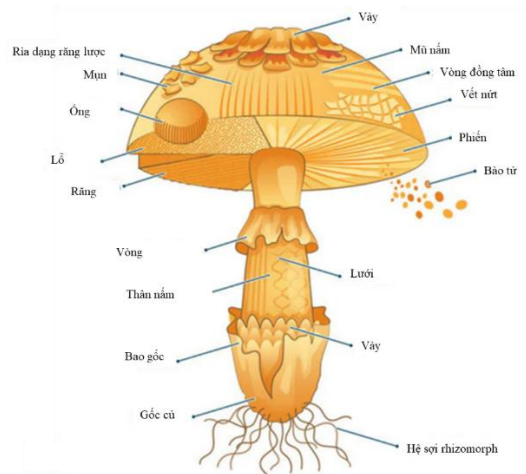
❖ **Các bước thực hiện:**

Khu vực rừng trồng thông ba lá *P. kesiya* được thiết lập ở mục 2.2.4.6 là địa điểm thu mẫu của thí nghiệm. Khi rừng trồng *P. kesiya* được 3 tuổi, tiến hành thu thập toàn bộ quả thể nấm ngoại cộng sinh xuất hiện trong khu vực trên. Tổng diện tích khu vực rừng trồng là 2 hecta. Thời gian thu từ tháng 4/2022 tới tháng 5/2023. Tổng số đợt thu mẫu là 24 đợt.

Mỗi mẫu quả thể nấm sau khi thu sẽ được ký hiệu mẫu “ABI-V-AA số thứ tự đợt thu mẫu. Số thứ tự mẫu (ví dụ ABI-V-AA01.xxx), chụp hình, ghi nhận các thông tin sơ bộ về hình thái, màu sắc, các đặc điểm về quả thể và khối lượng tươi tại nơi thu mẫu. Sau đó sẽ được bảo quản riêng trong các túi trữ mẫu để đem về phòng thí nghiệm.

2.2.6.2. Phương pháp mô tả hình thái và định danh sinh học phân tử

Hình thái đại thể của các mẫu quả thể nấm ngoại cộng sinh được mô tả theo Largent và cs. [143], bao gồm kích thước, hình dạng, màu sắc của mũ nấm, phiến nấm hoặc bề mặt sinh bào tử, cuống nấm, thịt nấm và các đặc điểm hình thái khác (Hình 2.9).



Hình 2.9. Mô tả sơ bộ hình thái ngoài của quả thể nấm
(<https://www.shutterstock.com/>)

Tiếp theo, một phần mô sạch (5 g), không bị nhiễm bẩn hoặc tổn thương ở bên trong của quả thể nấm, được tách bằng dụng cụ vô trùng và lưu trữ trong dung dịch đệm CTAB ở nhiệt độ phòng để sử dụng trong phân tách DNA và định danh sinh học phân tử dựa trên vùng trình tự ITS và LSU theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.2.4.4.

Phần quả thể còn lại được sấy khô ở nhiệt độ 60 °C trong 24 giờ để lưu giữ làm mẫu tiêu bản.

2.2.6.3. Ghi nhận khả năng sử dụng làm thực phẩm của các loài nấm ngoại cộng sinh thu được trong khu vực rừng trồng thông ba lá *P. kesiya* 3 năm tuổi

Khả năng sử dụng làm thực phẩm của những loài nấm ngoại cộng sinh thu được ở khu vực rừng trồng thông ba lá *P. kesiya* 3 năm tuổi được xác định dựa trên sự kết hợp giữa kết quả mô tả hình thái đại thể và định danh sinh học phân tử. Thông

tin về giá trị sử dụng của từng loài được tổng hợp và đối chiếu với các tài liệu chuyên khảo về nấm rừng trên thế giới [6, 83, 144], danh mục các loài nấm rừng ăn được của Trung Quốc [145], Thái Lan [146, 147], đồng thời tham khảo các nghiên cứu tại Việt Nam về các loài nấm ngoại cộng sinh có khả năng làm thực phẩm xuất hiện trong rừng thông ba lá *P. kesiya* và thông hai lá *P. merkusii* tại khu vực Đà Lạt, Lâm Đồng [148, 149]. Trên cơ sở đó, đánh giá tiềm năng khai thác và phát triển các loài nấm ngoại cộng sinh như một nguồn tài nguyên sinh học có giá trị kinh tế, góp phần cải thiện sinh kế gắn với hoạt động trồng rừng.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ KHẢO SÁT THÀNH PHẦN LOÀI NẤM NGOẠI CỘNG SINH Ở CÁC GIAI ĐOẠN PHÁT TRIỂN KHÁC NHAU CỦA CÂY CHỦ THÔNG BA LÁ *P. kesiya*

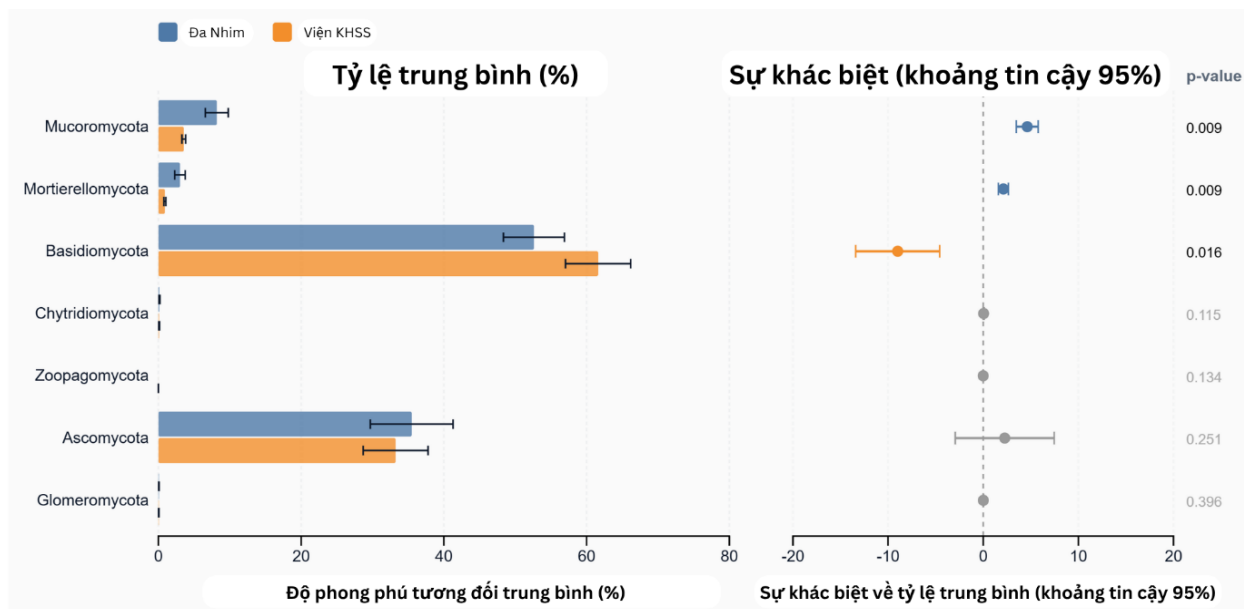
3.1.1. Kết quả khảo sát thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ cây thông ba lá trưởng thành

Thành phần và độ phong phú tương đối của nấm hiện diện trong đất vùng rễ của cây chủ thông ba lá *P. kesiya* được xác định thông qua phân tích dữ liệu giải trình tự NGS vùng gen chỉ thị ITS. Song song đó, các kết quả định danh chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được từ mẫu đất thể hiện thành phần các nhóm nấm trực tiếp tham gia hình thành liên kết ngoại cộng sinh với hệ rễ cây chủ ở khu vực nghiên cứu.

3.1.1.1. Kết quả phân tích thành phần nấm trong đất thu được ở rừng thông ba lá *P. kesiya* trưởng thành

Trong toàn bộ các mẫu đất được phân tích ở hai khu vực nghiên cứu là rừng thông ba lá *P. kesiya* trưởng thành tại Rừng phòng hộ Đa Nhim và Viện Khoa học Sự sống, tổng cộng có 1.700 ASV được ghi nhận. Trong đó hai ngành nấm có tỷ lệ hiện diện cao là Basidiomycota và Ascomycota, ngoài ra Mucoromycota và Mortierellomycota cũng xuất hiện với một tỷ lệ nhỏ. Basidiomycota là ngành nấm chiếm ưu thế ở cả hai khu vực, tương ứng với 61,6% ở Viện Khoa học Sự sống, cao hơn ở Đa Nhim với 52,6%, và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p = 0,016$. Ngược lại, Ascomycota là ngành có tỷ lệ phong phú cao thứ hai, chiếm khoảng 35,5% ở Đa Nhim và 33,2% ở Viện Khoa học Sự sống, tuy nhiên sự khác biệt giữa hai khu vực không có ý nghĩa thống kê (Hình 3.1). Tỷ lệ ngành nấm Basidiomycota chiếm ưu thế cao hơn so với ngành Ascomycota trong nghiên cứu này có thể do một trong các nguyên nhân sau: Khu vực nghiên cứu được chọn là rừng thuần loài trưởng thành với hơn 90% trữ lượng là thông ba lá *P. kesiya*. Đây là cây chủ cộng sinh bắt buộc với phần lớn các loài nấm ngoại cộng sinh, đặc biệt là những loài thuộc ngành Basidiomycota. Vì vậy, các loài này hình thành một mạng lưới phát triển dày đặc các sợi nấm trong đất và trên rễ cây. Do đó, DNA của chúng thường chiếm tỷ lệ rất lớn trong môi trường. Đặc biệt là khi mẫu đất của nghiên cứu được thu tại vùng rễ quyền của cây thông ba lá. Ngoài ra, việc lựa chọn cặp mồi trong giải trình tự NGS cũng có ảnh hưởng đến kết quả nhận được. Cụ thể, các nghiên cứu của Bellemain và cs. [150] hay Tedersoo và cs. [108] cho thấy rằng các mồi khuếch đại vùng ITS1 thường có hiệu quả cao trong việc thu nhận các trình tự Basidiomycota hơn là Ascomycota. Vì vậy, việc kết hợp sử dụng

nhiều cặp mồi hoặc đồng thời phân tích cả hai vùng ITS1 và ITS2 sẽ giúp nâng cao độ bao phủ và làm giảm thiểu sai lệch trong đánh giá đa dạng nấm. Tuy nhiên, do những hạn chế về thời gian, kinh phí và điều kiện thực hiện của luận án, nghiên cứu này chỉ giới hạn trong việc phân tích thành phần nấm thông qua các dữ liệu có được từ vùng ITS1.



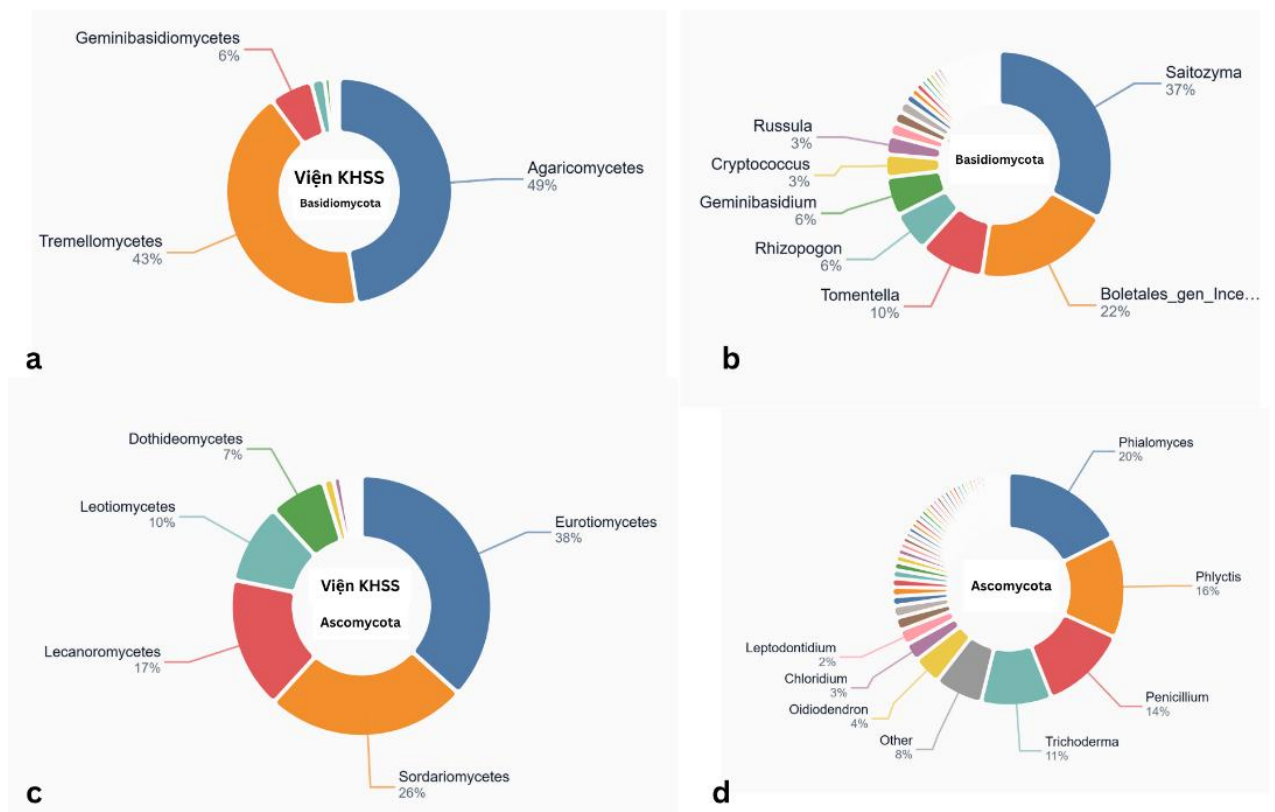
Hình 3.1. Tỷ lệ của các ngành nấm chính thu được nhờ phân tích NGS mẫu đất

Ở khu vực rừng Đa Nhim, trong ngành Basidiomycota, các chi nấm thuộc lớp nấm tán Agaricomycetes phổ biến nhất (chiếm 52%), với nhiều chi nấm thuộc nhóm nấm ngoại cộng sinh phổ biến như *Russula*, *Lactifluus*, *Sebacina*, *Inocybe*,... (Hình 3.2a, b, Hình 3.5). Ngược lại, trong ngành Ascomycota, lớp Eurotiomycetes (35%) và Sordariomycetes (22%) chiếm tỷ lệ cao với các chi nấm *Phialomyces* (18%), *Tolypocladium* (14%) và *Penicillium* (14%) là những chi nấm phổ biến (Hình 3.2c, d, Hình 3.4).

Ở khu vực rừng thuộc Viện Khoa học Sự sống, trong ngành Basidiomycetes, 49% các mẫu nấm thuộc lớp Agaricomycetes với các chi nấm ngoại cộng sinh phổ biến như các chi nấm thuộc bộ Boletales, các chi *Tomentella*, *Rhizopogon*, *Russula* (Hình 3.3a, b, Hình 3.7)...Ngoài ra, lớp nấm Tremellomycetes cũng chiếm đến 43% trong khu vực này. Trong khi đó ở ngành Ascomycota, các lớp nấm Eurotiomycetes, Sordariomycetes và Lecanoromycetes chiếm tỷ lệ cao, tương ứng với 38%, 26% và 17%, với các chi nấm *Phialomyces*, *Phlyctis*, *Penicillium* và *Trichoderma* là các chi ưu thế (Hình 3.3c, d, Hình 3.6).



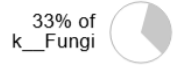
Hình 3.2. Tỷ lệ các lớp nấm (a, c) và các chi nấm (b, c) có trong mẫu đất ở khu vực rừng Đa Nhim

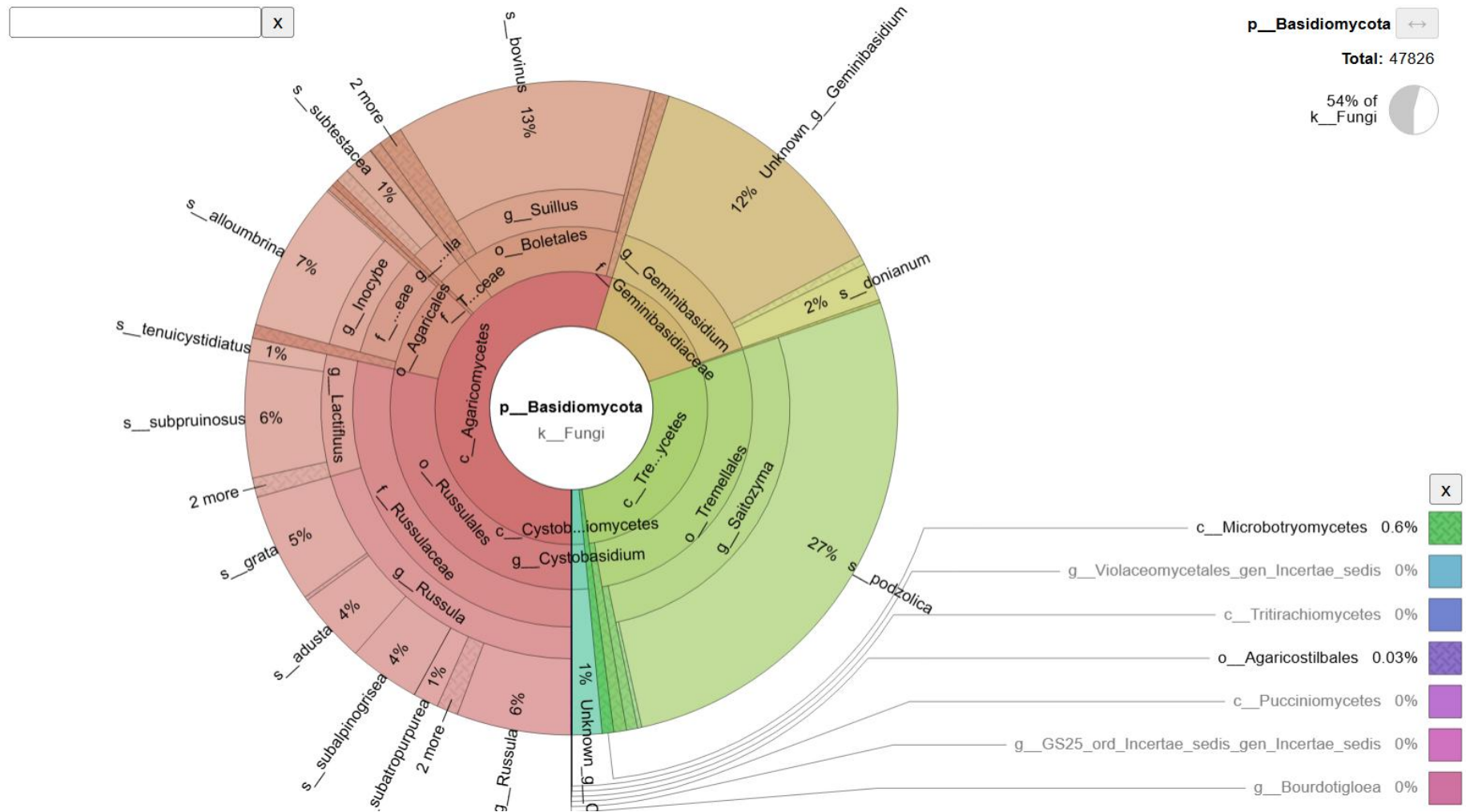


Hình 3.3. Tỷ lệ các lớp nấm (a, c) và các chi nấm (b, c) có trong mẫu đất ở khu vực rừng thuộc Viện Khoa học Sự sống

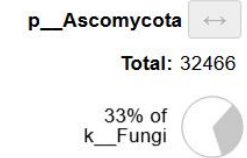


Total: 29349





Hình 3.5. Biểu đồ Krona thể hiện tỷ lệ thành phần các taxon thuộc ngành Basidiomycota trong các mẫu đất ở khu vực Đa Nhim

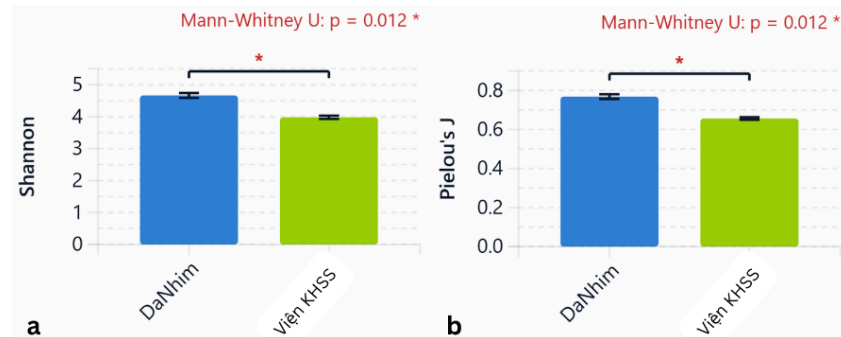


Hình 3.6. Biểu đồ Krona thể hiện tỷ lệ thành phần các taxon thuộc ngành Ascomycota trong các mẫu đất ở khu vực Viện KHSS



1

Chỉ số đa dạng Shannon và chỉ số đồng đều Pielou's J ở khu vực rừng Đa Nhim đều cao hơn với khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ở khu vực rừng thuộc Viện Khoa học Sự sống (Hình 3.8). Điều này cho thấy quần xã nấm tại khu vực Đa Nhim không chỉ có số lượng taxon lớn hơn mà sự phân bố tương đối giữa các taxon cũng cân bằng hơn.



Hình 3.8. Sự khác biệt trong các chỉ số đa dạng Shannon (a) và Pielou's (b) giữa hai khu vực nghiên cứu

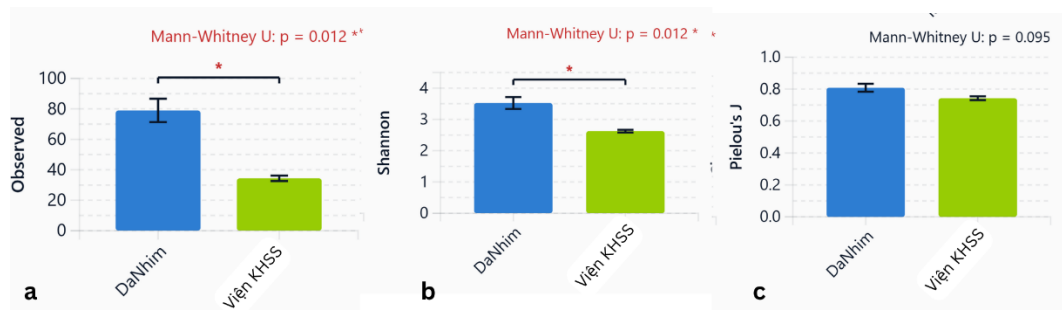
Sự khác biệt về đa dạng và mức độ đồng đều giữa hai khu vực có khả năng chịu ảnh hưởng bởi quá trình đô thị hóa tác động lên các đặc tính lý hóa của đất. Đất ở Viện Khoa học Sự sống cho thấy có lẫn đá xây dựng (bê tông, xi măng vụn, gạch vụn) với tỷ lệ khá cao, trong khi đó loại đá này không xuất hiện ở khu vực nghiên cứu thuộc rừng Đa Nhim (Hình 3.9). Sự tác động từ quá trình đô thị hóa này có thể ảnh hưởng đến quá trình hình thành và duy trì cấu trúc quần xã nấm trong đất, dẫn đến sự khác biệt về thành phần và phân bố của các nhóm nấm giữa hai khu vực nghiên cứu.



Hình 3.9. Mẫu đất thu được ở khu vực rừng Đa Nhim (a, b, c) và ở khu vực rừng Viện Khoa học Sự sống (d, e, f)

Riêng đối với nhóm nấm ngoại cộng sinh, tổng cộng có 30 chi nấm xuất hiện ở cả hai khu vực nghiên cứu, bao gồm *Amanita*, *Amphinema*, *Astrosporina*, *Boletus*,

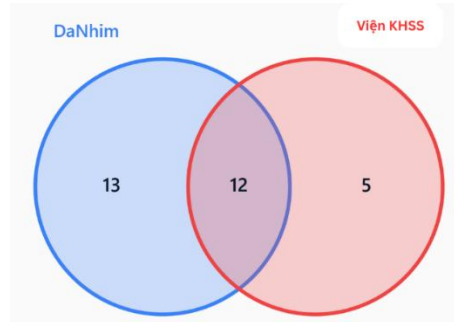
Ceratobasidium, *Clavulina*, *Clitopilus*, *Cortinarius*, *Craterellus*, *Entoloma*, *Geastrum*, *Hebeloma*, *Hydnum*, *Hygrocybe*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Lactifluus*, *Lyophyllum*, *Neoboletus*, *Ramaria*, *Rhizopogon*, *Rugiboletus*, *Russula*, *Sebacina*, *Sistotrema*, *Strobilomyces*, *Suillus*, *Thelephora*, *Tomentella* và *Tremellodendron*. Trong đó tất cả các chi được ghi nhận đều thuộc ngành Basidiomycota và không có chi nấm ngoại cộng sinh thuộc ngành Ascomycota nào được tìm thấy. Giá trị đa Shannon cao hơn có ý nghĩa thống kê tại Đa Nhim ($p = 0,012$) cho thấy thành phần loài nấm ngoại cộng sinh ở khu vực này đa dạng hơn so với tại Viện Khoa học Sự sống (Hình 3.10b). Trong khi đó, chỉ số Pielou's J không có khác biệt có ý nghĩa thống kê (Hình 3.10c) phản ánh mức độ phân bố tương đối của các loài giữa hai khu vực không thay đổi đáng kể. Đồng thời, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong chỉ số Observed ($p = 0,012$) (Hình 3.10a) đã cho thấy rằng sự khác biệt về đa dạng giữa hai khu vực có thể chủ yếu bắt nguồn từ sự khác nhau về số lượng loài hiện diện, thay vì do một số loài chiếm ưu thế làm thay đổi tính đồng đều của quần xã nấm ngoại cộng sinh.



Hình 3.10. Sự khác biệt trong các chỉ số đa dạng Observed (a), Shannon (b) và Pielou's (c) đối với nhóm nấm ngoại cộng sinh giữa hai khu vực nghiên cứu

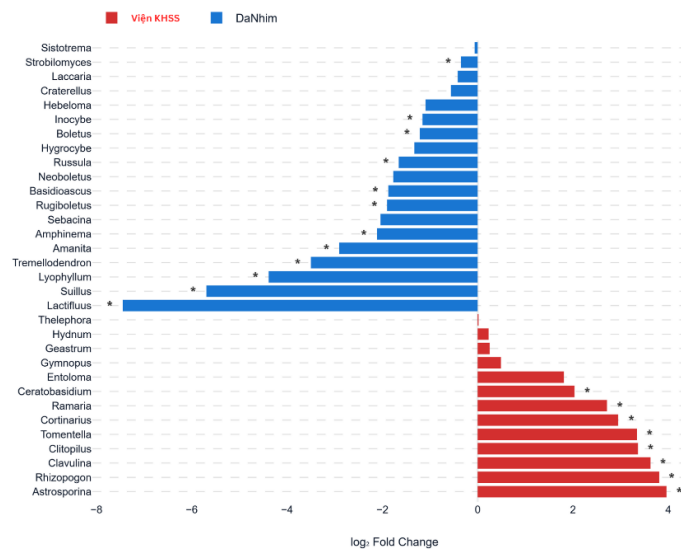
Ngoài ra, từ các kết quả phân tích cho thấy, có 12 chi nấm ngoại cộng sinh gồm *Amanita*, *Astrosporina*, *Ceratobasidium*, *Cortinarius*, *Hydnum*, *Hygrocybe*, *Inocybe*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Sebacina*, *Thelephora* và *Tomentella* xuất hiện ở cả hai khu vực nghiên cứu (Hình 3.11). Kết quả này cũng tương tự với nhiều nghiên cứu khác trên thế giới về hệ nấm ngoại cộng sinh có trong đất. Năm 2021, Tedersoo và cs. đã tiến hành nghiên cứu thành phần nấm có trong đất bằng kỹ thuật NGS với 3.200 mẫu gộp từ 3.084 khu vực tại 108 nước trên thế giới. Ở cấp độ phân loại bộ, Agaricales, Helotiales và Thelephorales là các bộ nấm ưu thế. Chi *Tomentella* và *Russula* là các chi nấm ngoại cộng sinh có tỷ lệ đa dạng cao [151]. Nghiên cứu của Edwards và cs. trên lớp đất mặt ở hai khu vực rừng hỗn hợp thực vật cộng sinh AM-EM và EM chiếm ưu thế cũng thu được kết quả tương tự, với Agaricales, Helotiales và Russulales là ba trong mười bộ có độ phong phú tương đối cao nhất ở trong cả hai khu vực [152]. Đối với các khu rừng

thông trên thế giới, *Thelephora*, *Tomentella*, *Russula*, *Cenococcum*, *Lactarius*, *Rhizopogon*, *Wilcoxina*... cũng đã được chứng minh là các chi nấm ngoại cộng sinh phổ biến, chiếm tỷ lệ cao trong các quần xã [153–157].



Hình 3.11. Biểu đồ Venn thể hiện mối tương quan ở cấp độ chi giữa hai khu vực Đa Nhim và Viện Khoa học Sự sống

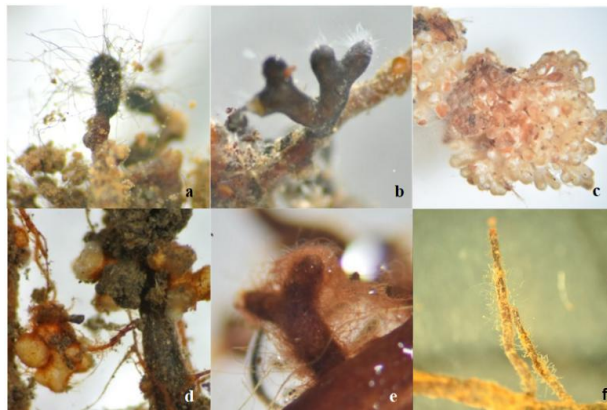
Đồng thời, mức độ thay đổi tương đối về tỷ lệ phong phú của từng chi nấm giữa hai khu vực nghiên cứu cũng cho thấy, có 18 chi nấm ngoại cộng sinh có tỷ lệ phong phú cao hơn tại khu vực Đa Nhim, trong đó 12 chi khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$), cụ thể *Lactifluus* là chi có mức độ khác biệt lớn nhất (Hình 3.12). Ngược lại, tại Viện Khoa học Sự sống, có 8/13 chi nấm ngoại cộng sinh thể hiện sự khác biệt rõ rệt, có ý nghĩa về mặt thống kê so với khu vực Đa Nhim, với *Astrosporina* là chi nấm có mức độ khác biệt lớn nhất (Hình 3.12).



Hình 3.12. Mức độ thay đổi tương đối về tỷ lệ phong phú của từng chi nấm ngoại cộng sinh giữa hai khu vực nghiên cứu

3.1.1.2. Kết quả phân tích thành phần nấm ngoại cộng sinh trong mẫu chóp rễ thu được ở rừng thông ba lá *P. kesiya* trưởng thành

Dựa trên sự khác biệt về hình thái ngoài của các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh theo mô tả của Agerer [30], có 17.324 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh được thu nhận từ mẫu đất rừng thông ba lá *P. kesiya* trưởng thành ở khu vực Đa Nhim và 34.096 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở khu vực Viện Khoa học Sự sống. Trong đó, có 3 kiểu phân nhánh chính được ghi nhận bao gồm đơn nhánh, phân nhánh đôi và dạng cụm san hô (Hình 3.13 a, b, c). Một số đặc điểm đặc trưng của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh như sợi nấm dạng rễ, hệ sợi nấm ngoài... cũng được ghi nhận (Hình 3.13d, e). Rễ không bị nấm xâm nhiễm phát triển dài với hệ thống lông hút rõ rệt (Hình 3.13f). Đồng thời, trong cùng một mẫu đất, có thể thu được nhiều hơn một kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh.



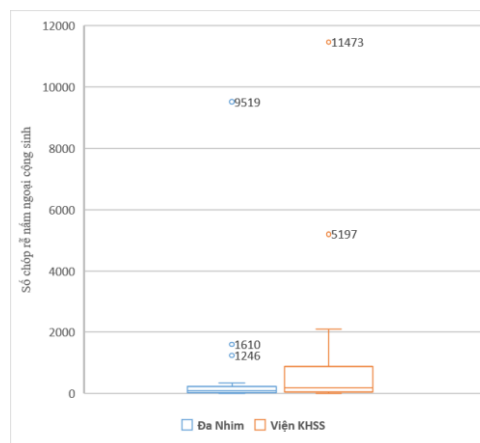
Hình 3.13. Một số đặc điểm của các mẫu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh có trong đất

(a) Dạng đơn nhánh (ABI-A17.1); (b) Phân nhánh đôi (ABI-A32.3); (c) Dạng cụm san hô (ABI-B22.1); (d) Sợi nấm dạng rễ (ABI-A28.2); (e) Phân nhánh với hệ sợi nấm bên ngoài (ABI-B16.3); (f) Rễ không có nấm xâm nhiễm

Trong 50 mẫu đất thu tại Rừng phòng hộ Đa Nhim (ký hiệu ABI-A01 đến ABI-A50), có 10% mẫu đất không thu được chóp rễ nấm ngoại cộng sinh và 14% các mẫu đất có chứa các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh già, khô không thể định danh bằng hình thái cũng như sinh học phân tử. Bên cạnh đó, số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong mỗi mẫu đất không đồng đều, dao động từ 5–331 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh/mẫu đất. Đặc biệt có 4 mẫu đất thu được số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh cao đột biến là ABI-A02, ABI-A10, ABI-A28 và ABI-A35 (tương ứng 1.268, 5.919, 1.610 và 1.246 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh/mẫu đất) (Hình 3.14). Ngoài ra, có 56 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh được ghi nhận, trong đó trong cùng một mẫu đất có thể thu được từ 1–5 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh khác nhau. Tỷ lệ các mẫu đất có thể thu nhận được từ 2 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh là 50%, với 1 mẫu đất quan sát thấy có 5 kiểu hình khác nhau.

Đối với 50 mẫu đất thu tại Viện Khoa học Sự sống (ký hiệu ABI-B01 đến ABI-B50), số mẫu đất không thu được chóp rễ nấm ngoại cộng sinh là 10% và 10% mẫu đất có chứa các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh già, khô không thể định danh. Trong khu vực này, có 50% số mẫu đất thu được trên 180 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh, trong đó 25% mẫu đất có số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh nhiều hơn 877 chóp. Ngoài ra, 2 mẫu đất là ABI-B15 và ABI-B31 số lượng các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được cao đột biến, tương ứng với 11.473 và 5.197 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh/mẫu đất (Hình 3.14). Tổng cộng có 42 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh, dao động từ 1–5 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh/mẫu đất. Trong đó có 52,5% các mẫu đất có từ 2 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trở lên. Đồng thời, cũng chỉ có 1 mẫu đất tìm được 5 kiểu hình khác nhau của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh.

Sự khác biệt trong số lượng các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh giữa hai khu vực nghiên cứu có thể xuất phát từ kiểu phân nhánh do tương tác giữa loài nấm ngoại cộng sinh với rễ tạo nên. Một số loài nấm ngoại cộng sinh có xu hướng tạo ra kiểu phân nhánh dạng san hô ở hệ rễ thông (Hình 3.13c), từ đó dẫn đến số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh của chúng trong một đơn vị mẫu tăng lên cao hơn hẳn những loài nấm ngoại cộng sinh tạo ra kiểu phân nhánh đơn (Hình 3.13a)



Hình 3.14. Số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được ở hai khu vực nghiên cứu

Các mô tả hình thái chi tiết 56 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở khu vực Đa Nhim được thể hiện ở Bảng 3.1 và 42 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở khu vực Viện Khoa học Sự sống được thể hiện trong Bảng 3.2.

Bảng 3.1. Bảng mô tả hình thái các kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong mẫu đất khu vực Đa Nhim

Mẫu đất	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
ABI-A01	02	ABI-A01.1	Chóp rẽ có màu nâu đen, phân nhánh đôi
		ABI-A01.3	Chóp rẽ có màu nâu đất nhạt, phân nhánh đôi
ABI-A02	02	ABI-A02.1	Chóp rẽ có màu nâu đất nhạt, bên ngoài có lớp bao sáng màu, phân nhánh đôi không đều, dài, thẳng
		ABI-A02.4	Chóp rẽ có màu nâu, phần đỉnh chóp có màu đen, phân nhánh đôi không đều
ABI-A03	01	ABI-A03.1	Chóp rẽ có lớp bao màu trắng, phân nhánh đôi, dài, thẳng
ABI-A04	01	ABI-A04.1	Chóp rẽ màu nâu sẫm, phân nhánh đôi, ngắn
ABI-A05	02	ABI-A05.1	Chóp rẽ có màu nâu vàng nhạt, phân nhánh đôi, ngắn
		ABI-A05.2	Chóp rẽ màu nâu nhạt, bên ngoài có lớp bao trắng bạc, có các sợi nấm mảnh cùng màu với lớp bao, phân nhánh đôi, ngắn
ABI-A06	03	ABI-A06.2	Chóp rẽ có lớp bao trắng bạc, hơi xám, phân nhánh đôi không đều
		ABI-A06.3	Chóp rẽ có màu nâu, phân nhánh đôi
		ABI-A06.4	Chóp rẽ màu nâu nhạt, đầu chóp màu trắng, dạng chóp đơn hoặc có một thân chính với các chóp xếp đối xứng
ABI-A07	02	ABI-A07.1	Chóp rẽ nâu, bên ngoài có lớp bao màu vàng sẫm, có sợi nấm dạng rẽ màu vàng
		ABI-A07.2	Chóp rẽ nâu, bên ngoài có lớp bao trắng mỏng, phân nhánh dạng san hô
ABI-A08	0	-	-
ABI-A09	01	ABI-A09.2	Chóp rẽ có màu đen, nhánh, có lông dài đen
ABI-A10	03	ABI-A10.1	Chóp rẽ có lớp bao dày màu trắng bên ngoài với các sợi nấm mảnh cùng màu, có sợi nấm dạng rẽ màu trắng, phân nhánh đôi không đều
		ABI-A10.2	Chóp rẽ màu nâu vàng nhạt, đỉnh chóp sáng màu, có các sợi nấm mảnh bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-A10.3	Chóp rẽ màu nâu, có lớp bao mỏng màu trắng nhạt bên ngoài, phân nhánh đôi, dài, thẳng
ABI-A11	04	ABI-A11.1	Chóp rẽ màu đen, có hệ sợi mảnh bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-A11.2	Chóp rẽ màu nâu đỏ sẫm, có hệ sợi nấm cùng màu phát triển từ chóp ra bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-A11.3	Chóp rẽ màu nâu, đầu chóp sáng màu, có hệ sợi nấm mảnh ở bên ngoài, phân nhánh đôi, dài, thẳng
		ABI-A11.4	Chóp rẽ màu nâu, có lớp bao mỏng màu trắng nhạt bên ngoài, phân nhánh đôi, dài, thẳng

Mẫu đất	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
ABI-A12	02	ABI-A12.1	Chóp rễ màu nâu, bên ngoài có lớp bao màu vàng sậm, có sợi nấm dạng rễ màu vàng
		ABI-A12.2	Chóp rễ màu nâu, phân nhánh đôi, dài, mảnh, thẳng
ABI-A13	02	ABI-A13.1	Chóp rễ màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
		ABI-A13.2	Chóp rễ màu nâu, trơn nhẵn, có lớp bao trong mờ bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-A14	0	-	-
ABI-A15	02	ABI-A15.1	Chóp rễ có lớp bao vàng chanh, bên ngoài có hệ sợi nấm mảnh, mỏng, cùng màu ở bên ngoài, có sợi nấm dạng rễ cùng màu, phân nhánh dạng san hô dày, dài
		ABI-A15.2	Chóp rễ có lớp bao trắng bạc, hơi xám, phân nhánh đôi không đều
ABI-A16	02	ABI-A16.1	Chóp rễ màu nâu, trơn nhẵn, có lớp bao trong mờ bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-A17	03	ABI-A17.1	Chóp rễ màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
		ABI-A17.2	Chóp rễ màu nâu hơn vàng, bên ngoài có lớp bao trong mờ, nhẵn, phân nhánh đôi, thân chính dài
		ABI-A17.6	Chóp rễ màu nâu xám sậm với lớp bao trong mờ bên ngoài, phân nhánh đôi, ngắn
ABI-A18	01	ABI-A18.3	Chóp rễ có lớp bao trắng bạc, phân nhánh đôi
ABI-A19	0	-	-
ABI-A20	0	-	-
ABI-A21	03	ABI-A21.1	Chóp rễ màu nâu hơi đỏ, đầu chóp có màu trắng trong, phân nhánh đôi
		ABI-A21.2	Chóp rễ màu nâu hơi đỏ, có lớp bao mỏng màu vàng, có hệ sợi nấm mỏng phía bên ngoài
		ABI-A21.3	Chóp rễ màu nâu, bóng, có lớp bao trong mờ bên ngoài, phân nhánh đôi, thẳng, dài
ABI-A22	0	-	-
ABI-A23	01	ABI-A23.1	Chóp rễ màu nâu sẫm, phân nhánh đôi, ngắn
ABI-A24	0	-	-
ABI-A25	0	-	-
ABI-A26	01	ABI-A26.1	Chóp rễ có gốc màu nâu, nhạt dần về phía chóp, chóp có màu vàng trắng, phân nhánh đôi
ABI-A27	0	-	-
ABI-A28	04	ABI-A28.1	Chóp rễ màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
		ABI-A28.2	Chóp rễ có màu nâu đỏ gạch, đầu chóp vàng hơi trắng, có hệ sợi nấm mảnh cùng màu bên ngoài, có sợi nấm dạng rễ cùng màu

Mẫu đất	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
		ABI-A28.3	Chóp rễ màu trắng hơi vàng, có hệ sợi mảnh phía bên ngoài, phân nhánh đôi, ngắn
		ABI-A28.4	Chóp rễ màu nâu xám bạc, có lớp bao trong mờ bên ngoài, trơn bóng, phân nhánh dạng san hô, dài
ABI-A29	01	ABI-A29.1	chóp rễ nâu, bên ngoài có lớp bao trắng mỏng, phân nhánh dạng san hô
ABI-A30	0	-	-
ABI-A31	0	-	-
ABI-A32	04	ABI-A32.1	Chóp rễ màu nâu có lớp bao mỏng màu trắng bên ngoài, phân nhánh đôi, ngắn
		ABI-A32.3	Chóp rễ màu đen, bóng, có sợi nấm trắng phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
		ABI-A32.4	Chóp rễ màu nâu nhạt, phân nhánh đôi
		ABI-A32.6	Chóp rễ màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
ABI-A33	01	ABI-A33.1	Chóp rễ màu vàng trắng trong, phân nhánh dạng san hô, ngắn
ABI-A34	01	ABI-A34.2	Chóp rễ màu vàng hơi nâu nhạt, có lớp hệ sợi mảnh ở bên ngoài
ABI-A35	05	ABI-A35.1	Chóp rễ có màu vàng, phân nhánh đôi, dài
		ABI-A35.2	Chóp rễ có màu nâu hơi vàng, phân nhánh đôi, ngắn
		ABI-A35.3	Chóp rễ có màu nâu, phân nhánh đôi, dài
		ABI-A35.5	Chóp rễ có màu đen, phân nhánh đôi
		ABI-A35.6	Chóp rễ có màu nâu, có hệ sợi nấm màu trắng mảnh phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
ABI-A36	0	-	-
ABI-A37	02	ABI-A37.2	Chóp rễ có màu nâu hơi vàng, lớp bao trong mờ, đầu chóp sáng màu, hơi trắng trong, phân nhánh đôi
		ABI-A37.4	Chóp rễ màu nâu đậm, lớp bao mỏng, màu xám bạc, có sợi nấm mảnh phát ra từ chóp, phân nhánh đôi, dài
ABI-A38	0	-	-
ABI-A39	01	ABI-A39.1	Chóp rễ màu nâu sậm, đầu chóp sáng màu, trong suốt, phân nhánh đôi
ABI-A40	02	ABI-A40.1	Chóp rễ màu nâu có lớp bao trắng bạc mỏng bên ngoài, phân nhánh đôi, ngắn
		ABI-A40.3	Chóp rễ màu nâu vàng nhạt, phân nhánh đôi
ABI-A41	01	ABI-A41.2	Chóp rễ màu nâu vàng nhạt có lớp bao màu trắng bạc và hệ sợi nấm cùng màu mỏng bên ngoài, phân nhánh đôi, dài
ABI-A42	01	ABI-A42.1	Chóp rễ màu nâu đen, bóng nhẵn, phân nhánh đôi

Mẫu đất	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
ABI-A43	01	ABI-A43.1	Chóp rễ có lớp bao màu trắng, phân nhánh đôi, dài, thẳng
ABI-A44	02	ABI-A44.1	Chóp rễ màu trắng, có hệ sợi nấm mảnh, thưa thớt, cùng màu bên ngoài, chóp đơn hoặc phân nhánh đôi, ngắn
		ABI-A44.3	Chóp rễ màu nâu nhạt, đầu chóp màu trắng, dạng chóp đơn hoặc có một thân chính với các chóp xếp đối xứng
ABI-A45	02	ABI-A45.1	Chóp rễ màu nâu vàng nhạt, phân nhánh đôi
		ABI-A45.2	Chóp rễ có lớp bao trắng bạc, hơi xám, phân nhánh đôi không đều
ABI-A46	01	ABI-A46.2	Chóp rễ có màu nâu vàng, lớp bao trong mờ bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-A47	01	ABI-A47.2	Chóp rễ màu vàng nâu, đầu chóp trong suốt, phân nhánh đôi với thân chính dài
ABI-A48	01	ABI-A48.2	Chóp rễ có màu nâu đỏ gạch, đầu chóp vàng hơi trắng, có hệ sợi nấm mảnh cùng màu bên ngoài, có sợi nấm dạng rễ cùng màu
ABI-A49	01	ABI-A49.1	Chóp rễ màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
ABI-A50	01	ABI-A50.2	Chóp rễ màu vàng hơi nâu nhạt, có hệ sợi mảnh màu trắng bên ngoài, phân nhánh đôi

Bảng 3.2. Bảng mô tả hình thái các kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong mẫu đất khu vực Viện Khoa học Sự sống

Mẫu đất	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
ABI-B01	-	-	-
ABI-B02	01	ABI-B02.1	Chóp rễ có thân màu nâu hơi đỏ, đầu chóp có màu trắng trong, phân nhánh đôi hoặc đơn
ABI-B03	-	-	-
ABI-B04	-	-	-
ABI-B05	01	ABI-B05.3	Chóp rễ màu nâu nhạt, lớp bao trắng, mỏng, phân nhánh đôi
ABI-B06	02	ABI-B06.1	Chóp rễ có lớp bao vàng trắng nhạt, phân nhánh đôi hoặc đơn, ngắn
		ABI-B06.2	Chóp rễ màu nâu sậm, có hệ sợi tơ mỏng bên ngoài, phân nhánh đôi, dài
ABI-B07	-	-	-
ABI-B08	-	-	-
ABI-B09		ABI-B09.1	Chóp rễ màu nâu nhạt, bên ngoài có lớp bao mỏng màu trắng bạc, phân nhánh đôi, dài

Mẫu đất	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
ABI-B10	-	-	-
ABI-B11	02	ABI-B11.2	Chóp rễ màu nâu, đầu chóp sáng màu, có lớp bao, hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu trắng bên ngoài, phân nhánh dạng san hô, dài
		ABI-B11.5	Chóp rễ có màu đen, có các sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi, dạng cụm
ABI-B12	04	ABI-B12.1	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu đỏ, nhám, có hệ sợi nấm bên ngoài và sợi nấm dạng rễ cùng màu, phân nhánh dạng san hô
		ABI-B12.3	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-B12.4	Chóp rễ màu trắng ở đỉnh, vàng nâu tới nâu dần đến gốc, phân nhánh đôi
		ABI-B12.6	Chóp rễ màu nâu đen, có hệ sợi nấm màu nâu đỏ phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
ABI-B13	02	ABI-B13.2	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-B13.3	Chóp rễ màu nâu đậm, phân nhánh dạng san hô, ngắn
ABI-B14	01	ABI-B14.1	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-B15	03	ABI-B15.1	Chóp rễ màu nâu nhạt, lớp bao có màu trắng, bên ngoài có hệ sợi nấm mỏng bao quanh, phân nhánh đôi, khi trưởng thành tạo thành dạng cụm san hô dày
		ABI-B15.2	Chóp rễ màu nâu sậm, bóng, phân nhánh đôi với thân chính dài
		ABI-B15.3	Chóp rễ màu nâu đỏ, có các sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi, dài
ABI-B16	02	ABI-B16.1	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-B16.3	Chóp rễ màu nâu đỏ, có các sợi nấm cùng màu bao rậm rạp bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-B17	-	-	-
ABI-B18	03	ABI-B18.1	Chóp rễ màu đen, phân nhánh đôi, thân chính dài
		ABI-B18.3	Chóp rễ màu nâu đỏ ở thân, đầu chóp phình, có màu trắng, phân nhánh đôi hoặc đơn

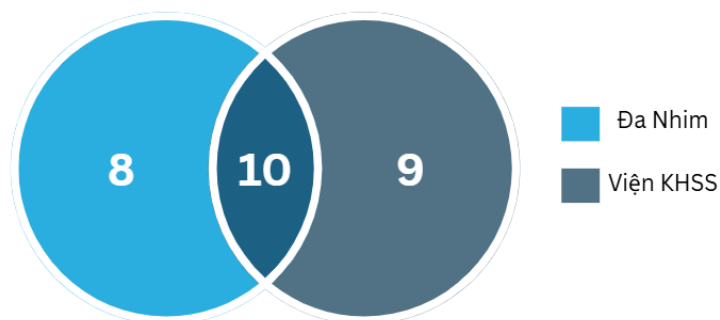
Mẫu đất	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
		ABI-B18.4	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-B19	01	ABI-B19.1	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu đỏ, nhám, có hệ sợi nấm bên ngoài và sợi nấm dạng rễ cùng màu, phân nhánh dạng san hô
ABI-B20	03	ABI-B20.1	Chóp rễ có màu nâu nhạt, đầu chóp màu trắng trong, phân nhánh đôi, dài
		ABI-B20.3	Chóp rễ có lớp bao màu trắng, phân nhánh đôi hoặc đơn
		ABI-B20.6	Chóp rễ có lớp bao màu nâu, hệ sợi nấm cùng màu bao dày bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-B21	02	ABI-B21.1	Chóp rễ màu nâu đen, phân nhánh dạng cụm san hô
		ABI-B21.3	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-B22	03	ABI-B22.1	Chóp rễ màu nâu hơi đỏ nhạt, lớp bao có màu trắng, có hệ sợi nấm cùng màu ở bên ngoài, phân nhánh dạng cụm san hô
		ABI-B22.2	Chóp rễ màu nâu, có hệ sợi cùng màu bao bên ngoài, phân nhánh đôi, dài
		ABI-B22.3	Chóp rễ màu nâu đỏ sậm, có hệ sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi, dài
ABI-B23	-	-	
ABI-B24	02	ABI-B24.1	Chóp rễ màu đen, phân nhánh đôi, thân chính dài
		ABI-B24.2	Chóp rễ màu nâu, đầu chóp sáng màu, có lớp bao, hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu trắng bên ngoài, phân nhánh dạng san hô, dài
ABI-B25	-	-	-
ABI-B26	01	ABI-B26.1	Chóp rễ màu đen, phân nhánh đôi, thân chính dài
ABI-B27	01	ABI-B27.3	Chóp rễ màu đen, phân nhánh đôi, thân chính dài
ABI-B28	04	ABI-B28.1	Chóp rễ có màu trắng hơi ngả vàng ở đỉnh, nâu ở thân, phân nhánh đôi hoặc đơn
		ABI-B28.2	Chóp rễ màu nâu đen, có hệ sợi nấm màu nâu đỏ phát ra từ chóp, phân nhánh đôi hoặc đơn
		ABI-B28.3	Chóp rễ màu nâu bóng, phân nhánh đôi, dài
		ABI-B28.4	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-B29	01	ABI-B29.2	Chóp rễ màu đen, bóng, phân nhánh đôi, thân chính dài

Mẫu đất	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
ABI-B30	01	ABI-B30.1	Chóp rễ màu nâu hơi vàng nhạt, trơn bóng, phân nhánh đôi, dài
ABI-B31	01	ABI-B31.1	Chóp rễ màu nâu hơi vàng nhạt, trơn bóng, phân nhánh đôi, dài
ABI-B32	01	ABI-B32.2	Chóp rễ màu nâu đỏ ở thân, đầu chóp phình, có màu trắng, phân nhánh đôi hoặc đơn
ABI-B33	-	-	-
ABI-B34	01	ABI-B34.1	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-B35	01	ABI-B35.4	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu trắng ngà mỏng, sợi nấm mảnh cùng màu với lớp bao bên ngoài, phân nhánh dạng cụm san hô
ABI-B36	05	ABI-B36.1	Chóp rễ màu nâu hơi đỏ nhạt, lớp bao có màu trắng, có hệ sợi nấm cùng màu ở bên ngoài, phân nhánh dạng cụm san hô
		ABI-B36.2	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu đỏ, nhám, có hệ sợi nấm bên ngoài và sợi nấm dạng rễ cùng màu, phân nhánh dạng san hô
		ABI-B36.3	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-B36.4	Chóp rễ màu nâu đỏ sậm, có hệ sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi hoặc đơn
		ABI-B36.6	Chóp rễ có màu đen, có các sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi, dạng cụm
ABI-B37	01	ABI-B37.1	Chóp rễ màu nâu hơi vàng nhạt, trơn bóng, phân nhánh đôi, dài
ABI-B38	02	ABI-B38.1	Chóp rễ màu nâu đen, phủ 1 lớp sợi nấm màu đen, phân nhánh đôi
		ABI-B38.2	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-B38	01	ABI-B39.1	Chóp rễ có lớp bao màu trắng với hệ sợi nấm bao bên ngoài dày đặc và sợi nấm dạng rễ cùng màu, phân nhánh đôi, ngắn
ABI-B40	01	ABI-B40.1	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-B41	02	ABI-B41.1	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi

Mẫu đất	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
		ABI-B41.3	Chóp rễ màu nâu đen, phủ 1 lớp sợi nấm màu đen, phân nhánh đôi
ABI-B42	02	ABI-B42.1	Chóp rễ màu nâu hơi vàng nhạt, trơn bóng, lớp bao trong mờ, phân nhánh đôi, dài
		ABI-B42.2	Chóp rễ màu nâu đỏ, có các sợi nấm cùng màu bao rậm rạp bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-B43	01	ABI-B43.1	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
ABI-B44	01	ABI-B44.3	Chóp rễ màu nâu đỏ, có các sợi nấm cùng màu bao rậm rạp bên ngoài, phân nhánh đôi hoặc đơn, thân chính dài
ABI-B45	01	ABI-B45.1	Chóp rễ có lớp bao màu vàng chanh với sợi nấm mỏng cùng màu bên ngoài, phân nhánh đôi, ngắn
		ABI-B45.5	Chóp rễ màu đen, phân nhánh đôi, ngắn
ABI-B46	03	ABI-B46.3	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu đỏ, nhám, có hệ sợi nấm bên ngoài và sợi nấm dạng rễ cùng màu, phân nhánh dạng san hô
		ABI-B46.4	Chóp rễ có màu nâu đỏ sậm với hệ sợi nấm cùng màu bên ngoài, phân nhánh đơn
		ABI-B46.5	Chóp rễ màu nâu nhạt, bên ngoài có lớp bao mỏng màu trắng bạc, phân nhánh đôi, dài
ABI-B47	01	ABI-B47.2	Chóp rễ màu nâu nhạt, nhẵn, có sợi nấm cùng màu ở bên ngoài, phân nhánh đôi, dài
ABI-B48	02	ABI-B48.1	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu vàng chanh, có hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ màu vàng hơi đỏ bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-B48.3	Chóp rễ có thân màu nâu hơi đỏ, đầu chóp có màu trắng trong, phân nhánh đôi hoặc đơn
ABI-B49	03	ABI-B49.2	Chóp rễ màu đen, phân nhánh đôi, thân chính dài
		ABI-B49.4	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu đỏ, nhám, có hệ sợi nấm bên ngoài và sợi nấm dạng rễ cùng màu, phân nhánh dạng san hô
		ABI-B49.5	Chóp rễ màu nâu với lớp bao trắng và sợi nấm dạng rễ trắng bên ngoài, phân nhánh dạng cụm san hô, dài
ABI-B50	03	ABI-B50.2	Chóp rễ màu nâu nhạt, nhẵn, có sợi nấm cùng màu ở bên ngoài, phân nhánh đôi, dài
		ABI-B50.3	Chóp rễ có màu nâu đỏ sậm với hệ sợi nấm cùng màu bên ngoài, phân nhánh đơn
		ABI-B50.5	Chóp rễ màu nâu, lớp bao màu đỏ, nhám, có hệ sợi nấm bên ngoài và sợi nấm dạng rễ cùng màu, phân nhánh dạng san hô

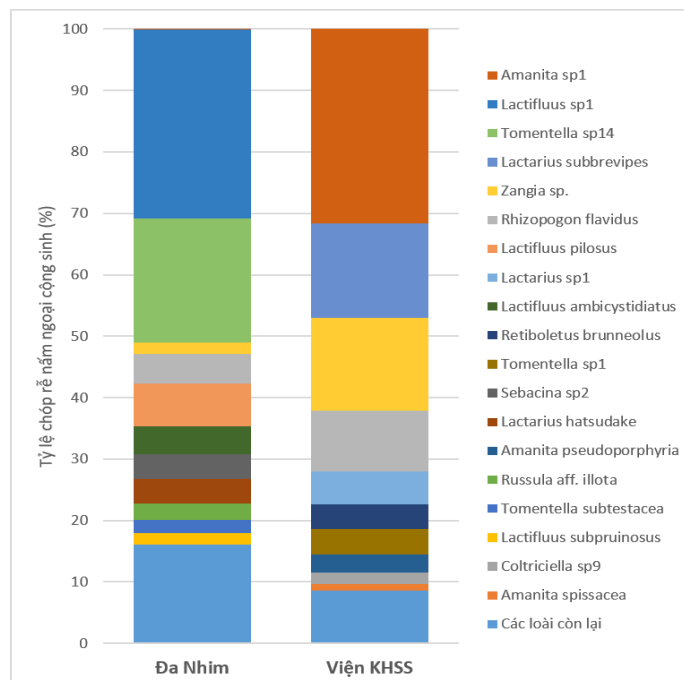
Tất cả các kiểu hình ở cả hai khu vực nghiên cứu đều được tiến hành tách DNA 3 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh điển hình và giải trình tự vùng ITS. Kết quả sau khi hiệu chỉnh trình tự (nếu cần) và tìm kiếm trình tự tương đồng trên NCBI cho thấy, tại khu vực rừng Đa Nhim ghi nhận được 18 chi nấm ngoại cộng sinh, bao gồm *Amanita*, *Boletus*, *Cenococcum*, *Coltricia*, *Hydnum*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Lactifluus*, *Macowanites*, *Pulveroboletus*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Sebacina*, *Thelephora*, *Tomentella*, *Tylospora*, *Zangia* và 1 loài nấm thuộc bộ Cantharellales. Trong đó *Lactifluus*, *Tomentella*, *Russula*, *Rhizopogon*, *Lactarius*, *Sebacina* và *Zangia*, *Cenococcum* và *Amanita* là các chi nấm ngoại cộng sinh chiếm ưu thế, với *Lactifluus*, *Tomentella* là hai chi nấm ngoại cộng sinh có số lượng chóp rễ ngoại cộng sinh thu được cao nhất, tương ứng 44,2% và 24,7%. Trong khi đó *Russula* và *Tomentella* là 2 chi nấm ngoại cộng sinh có độ thường gặp cao, xuất hiện nhiều nhất trong các mẫu đất thu thập được (trong 12 và 11 mẫu đất). Trong khi đó tại khu vực Viện Khoa học Sự sống cũng ghi nhận được 19 chi nấm ngoại cộng sinh, bao gồm *Amanita*, *Austroboletus*, *Boletus*, *Coltriciella*, *Gomphidius*, *Hourangia*, *Inocybe*, *Lactarius*, *Multifurca*, *Phylloporus*, *Pulveroboletus*, *Retiboletus*, *Rhizopogon*, *Sebacina*, *Suillus*, *Thelephora*, *Tomentella*, *Tylopilus* và *Zangia*. Trong đó, *Amanita*, *Lactarius* là hai chi nấm ngoại cộng sinh có số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được cao nhất, tương ứng 35,7% và 20,7%. Tiếp theo là các chi nấm *Zangia*, *Rhizopogon*, *Tomentella*, *Retiboletus*, *Coltriciella*, *Pulveroboletus* và *Suillus*. Ngoài ra, *Tomentella*, *Zangia* và *Coltriciella* là các chi nấm ngoại cộng sinh có độ thường gặp cao, xuất hiện nhiều nhất trong tổng số các mẫu đất thu thập được (tương ứng trong 15, 14 và 10 mẫu đất).

Từ các kết quả trên cho thấy có sự giống nhau về thành phần các chi nấm ngoại cộng sinh giữa hai địa điểm nghiên cứu, trong đó có 10 chi thường gặp ở cả 2 khu vực (Hình 3.15) bao gồm *Amanita*, *Boletus*, *Inocybe*, *Lactarius*, *Pulveroboletus*, *Rhizopogon*, *Sebacina*, *Thelephora*, *Tomentella* và *Zangia*.



Hình 3.15. Biểu đồ Venn thể hiện sự tương quan ở cấp độ chi giữa 2 khu vực nghiên cứu

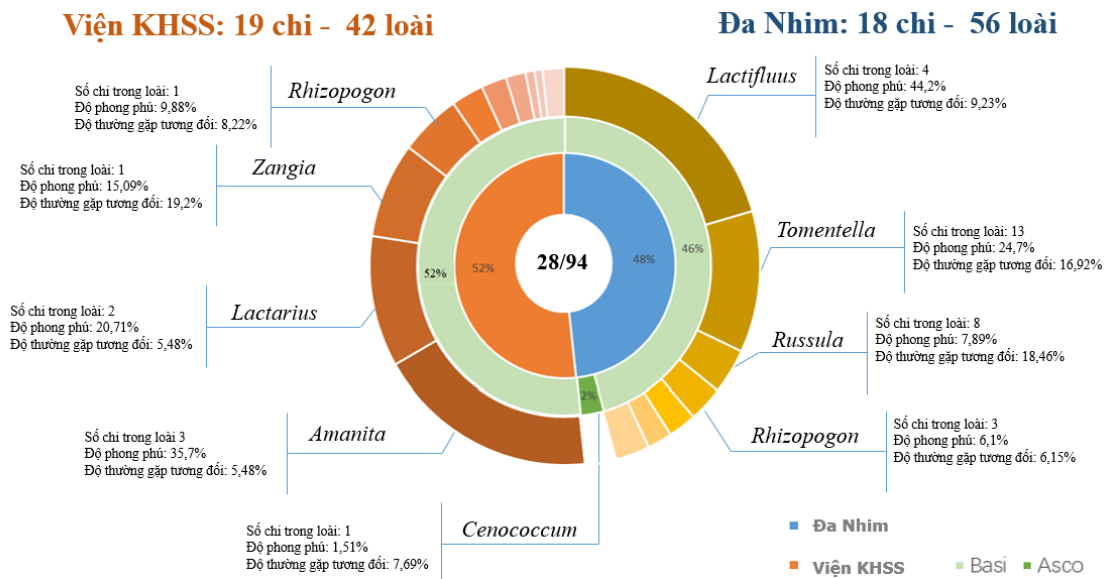
Đồng thời, ở khu vực Viện Khoa học Sự sống số lượng các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được cao gấp 1,97 lần so với ở khu vực Đa Nhim. Tuy nhiên mỗi chi và loài nấm ngoại cộng sinh có tỷ lệ số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được không đồng đều (Hình 3.16). Số lượng loài nấm ngoại cộng sinh thu được ở khu vực rừng Đa Nhim lên đến 56 loài. Trong đó *Lactifluus* sp1 là loài nấm ngoại cộng sinh có số lượng chóp rễ nấm cộng sinh cao nhất, chiếm 31,82%. Tiếp theo là *Tomentella* sp14 với 20,2%, trong khi các loài còn lại có số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được khá thấp, hầu hết dưới 2%. Ngược lại ở khu vực Viện Khoa học Sự sống, chỉ có 42 loài nấm ngoại cộng sinh xuất hiện với tỷ lệ số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được cao nhất là loài *Amanita* sp1 chiếm 31,64%. Hai loài *Lactarius subbrevipes* và *Zangia* sp. cũng có số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được khá cao, tương ứng chiếm 15,44% và 15,09%. Bên cạnh đó, hệ số tương đồng về thành phần loài so sánh giữa hai khu vực Đa Nhim và Viện Khoa học Sự sống rất thấp, chỉ có 3,2% các loài giống nhau giữa hai khu vực nghiên cứu.



Hình 3.16. Tỷ lệ chóp rễ nấm ngoại cộng sinh do một loài nấm ngoại cộng sinh hình thành tại hai khu vực nghiên cứu

Như vậy, tuy có số lượng chi nấm ngoại cộng sinh tương đồng cao (10 chi) nhưng thành phần các loài nấm ngoại cộng sinh ở hai khu vực Đa Nhim và Viện Khoa học Sự sống có khác biệt đáng kể (Hình 3.17). Đồng thời, kết quả so sánh hệ nấm rễ ngoại cộng sinh trong chóp rễ ở khu vực Đa Nhim cũng cho thấy có sự đa dạng hơn so

với ở Viện Khoa học Sự sống thông qua hệ số đa dạng Shannon-Wiener tương ứng của hai khu vực là 2,569 và 2,287.



Hình 3.17. Các chi và loài nấm ngoại cộng sinh ở hai khu vực nghiên cứu

Khi so sánh các kết quả thu được từ thành phần nấm ngoại cộng sinh trong các mẫu đất và thành phần nấm ngoại cộng sinh từ mẫu chóp rễ ta thấy có tự tương quan giữa các chi nấm ngoại cộng sinh hiện diện ở hai ô mẫu Đa Nhim và Viện Khoa học Sự sống. Các chi *Tomentella*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Lactifluus*, *Sebacina*, đồng thời xuất hiện trong mẫu đất và cả mẫu chóp rễ tại khu vực Đa Nhim với tỷ lệ phát hiện cao. Tương tự, *Tomentella*, *Rhizopogon*, *Amanita* phổ biến trong cả mẫu đất và mẫu chóp rễ ở khu vực Viện Khoa học Sự sống. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh về tầm quan trọng của các chi nấm trong họ Boletaceae, Russulaceae, Amanitaceae và Thelephoraceae đối với sự tồn tại của chi thông và sự hiện diện của những chi nấm này ở hầu hết các nền rừng thông trưởng thành với tỷ lệ cao [53, 158, 159], đặc biệt chúng đóng vai trò vô cùng quan trọng đối với các loài thông đang nguy cấp [160] cũng như trong công tác bảo tồn, tái sinh [103, 161] và trồng mới ở các khu vực chịu stress hóa học [100, 153] hoặc các xáo trộn như lũ lụt [162], hạn [163], cháy [117, 119]...

Như vậy, những kết quả thu được từ đề tài thể hiện sự tương đồng cao với các nghiên cứu trước đây về hệ nấm đất nói chung và thành phần loài nấm ngoại cộng sinh trong đất nói riêng [3, 37, 55]. Đồng thời cho thấy khả năng thiết lập quan hệ cộng sinh mạnh mẽ của những chi nấm này với hệ rễ của thông ba lá, cũng như sự hiện diện phổ biến của các mầm nấm ngoại cộng sinh trong đất tại khu vực rừng thông tỉnh Lâm Đồng. Đây là một lợi thế rất quan trọng, góp phần nâng cao khả năng tái sinh và hỗ trợ sự phát triển bền vững của những loài thực vật cộng sinh ở khu vực này. Những khác

biệt về thành phần và số lượng các loài nấm ngoại cộng sinh ở hệ rễ cũng như trong đất ở hai khu vực nghiên cứu có thể xuất phát từ đặc điểm phân bố của hai khu vực. Rừng thông ba lá *Pinus kesiya* ở Viện Khoa học Sự sống nằm cạnh khu dân cư tại trung tâm thành phố Đà Lạt. Nhiều nghiên cứu cho thấy các khu vực rừng trong lòng thành phố tuy không chịu các tác động nông nghiệp nhưng các xáo trộn gây ra do các hoạt động của quá trình đô thị hóa vẫn tác động mạnh mẽ lên thành phần hệ vi sinh vật đất [164–166]. Đặc biệt đối với hệ nấm ngoại cộng sinh, thành phần của các chi nấm tuy tương tự như ở khu vực rừng tự nhiên, độ giàu loài và độ phong phú tương đối của các chi nấm có sự khác biệt rõ rệt [167]. Trong nghiên cứu này, mỗi chi nấm ngoại cộng sinh có số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được không đồng đều. Số chóp rễ ngoại cộng sinh có kết quả định danh tương đồng với các chi nấm như *Amanita*, *Lactarius*, *Zangia*, *Rhizopogon*, *Tomentella* cao đột biến (tương ứng 12.162, 7.064, 5.145, 3.371, 1.773 chóp). Điều này có thể giải thích do tác động của các xáo trộn gây ra bởi quá trình đô thị hóa làm cho tính chất cơ giới, lý hóa của đất thay đổi, ảnh hưởng trực tiếp đến các mầm nấm ở lớp đất bề mặt. Các chi nấm ngoại cộng sinh như *Rhizopogon*, *Suillus*, *Inocybe*, *Laccaria* và *Hebeloma* thường có nhu cầu dinh dưỡng thấp trở nên ưu thế trong quá trình tái xâm nhiễm ở khu vực này [3, 80, 168]. Ngoài ra, chi nấm *Rhizopogon* đã được chứng minh có khả năng chống chịu cao với các điều kiện môi trường và bào tử có thể tồn tại lâu dài trong đất, là chi nấm ngoại cộng sinh ưu thế trong các hệ sinh thái rừng [169–171]. Ngoài ra, Agerer đưa ra giả thuyết rằng một số nhóm nấm ngoại cộng sinh như nhóm Thelephoroid thích nghi tốt với căng thẳng của môi trường nhờ nhiều loài hình thành sợi nấm dạng rễ, cho phép khai thác khối lượng đất lớn hơn để lấy nước và chất dinh dưỡng [172].

Tuy nhiên, vẫn còn một số kết quả bất thường khi so sánh thành phần loài nấm ngoại cộng sinh thu được từ mẫu đất và mẫu chóp rễ. Một số chi nấm như *Cenococcum*, *Lactarius*, *Zangia*, *Coltriciella* được ghi nhận nhiều trong các mẫu chóp rễ, tuy nhiên không thấy hiện diện trong kết quả phân tích mẫu đất ở hai khu vực nghiên cứu. Mặc dù *Cenococcum* hay *Lactarius* được cho là những chi nấm ngoại cộng sinh phổ biến, có thể tạo thành cấu trúc cộng sinh với nhiều loại thực vật có mạch và cũng là một trong các chi nấm ngoại cộng sinh ưu thế tại các khu vực rừng [44, 173–175]. Điều này có thể xuất phát từ một số hạn chế trong thiết kế lấy mẫu và phương pháp phân tích. Trong đó, số lượng mẫu đất sử dụng để tiến hành phân tích NGS ở mỗi khu vực còn ít (5 mẫu/khu vực) với khối lượng sử dụng trực tiếp để tách DNA khá thấp, vì vậy đã làm cho một số loài có mức độ hiện diện thấp hoặc phân bố không đồng đều trong mẫu đất có thể chưa được thu nhận đầy đủ. Ngoài ra, luận án đã sử dụng cặp mồi phổ quát để

khảo sát toàn bộ quần xã nấm trong mẫu đất chứ không phải cặp mỗi chuyên biệt để phát hiện nấm ngoại cộng sinh, nên dữ liệu thu được bao gồm cả các nhóm nấm hoại sinh, ký sinh, gây bệnh và nấm ngoại cộng sinh. Vì vậy, kết quả phân tích có thể chưa phản ánh đầy đủ tính đa dạng và thành phần loài của nhóm nấm ngoại cộng sinh trong quần xã nấm đất. Ngược lại, thành phần loài nấm ngoại cộng sinh được phân tích trực tiếp từ các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh giúp nhận diện một cách đặc hiệu hơn và chỉ tập trung vào các loài nấm thực sự tham gia hình thành quan hệ ngoại cộng sinh với cây chủ.

Dựa trên kết quả so sánh thành phần nấm ngoại cộng sinh thu được từ chóp rễ và từ đất tại hai khu vực Đa Nhim và Viện Khoa học Sự sống, các nghiên cứu tiếp theo của đề tài sẽ được định hướng triển khai tại khu vực rừng Đa Nhim.

3.1.2. Kết quả khảo sát thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ của cây con thông ba lá *P. kesiya* 6 tháng tuổi trong vườn ươm

3.1.2.1 Kết quả thu thập chóp rễ ngoại cộng sinh

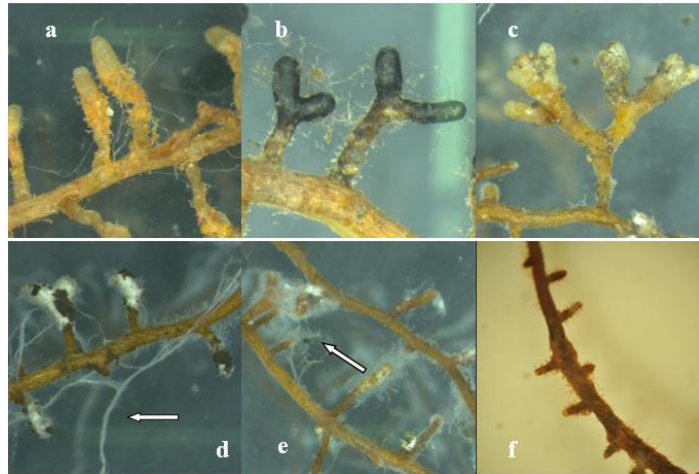
30 cây con thông ba lá *P. kesiya* được gieo trồng trong các bầu tự hủy sau 6 tháng thì tiến hành thu nhận toàn bộ bộ rễ (Hình 3.18) và quan sát sự hiện diện của các chóp rễ có sự hình thành cấu trúc ngoại cộng sinh với nấm dưới kính hiển vi soi nổi.



Hình 3.18. Cây thông con 6 tháng tuổi

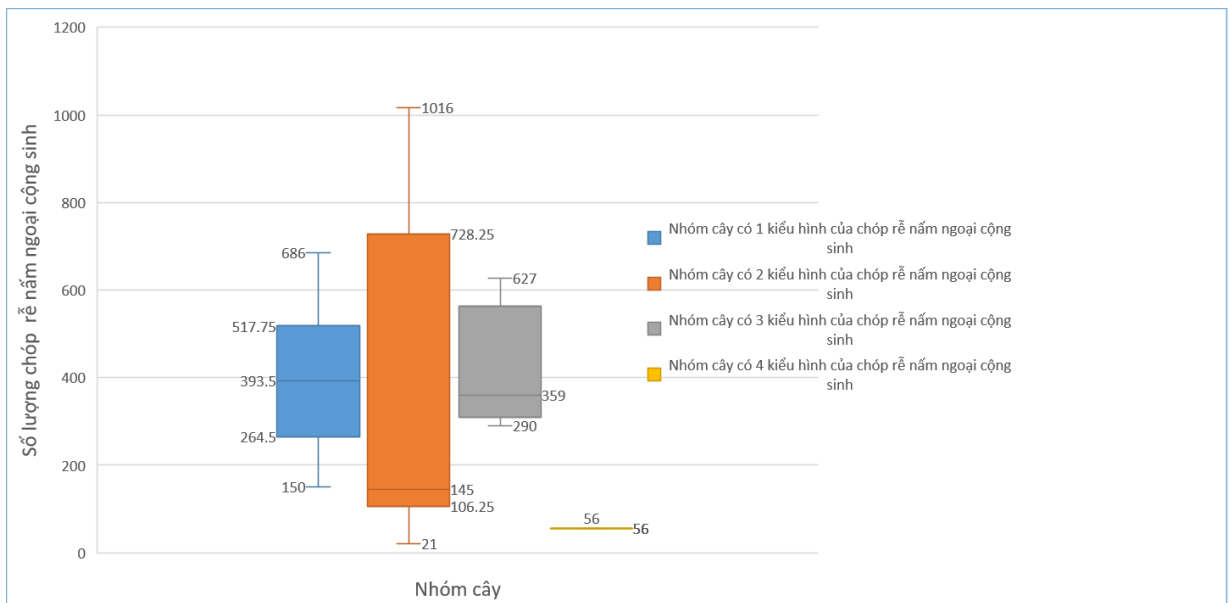
(a) cây con trong vườn ươm; (b) cây sau khi thu và loại bỏ đất trồng

Qua quan sát cho thấy, ở tất cả các cây được nghiên cứu đều có sự hiện diện của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh, hình thái của chóp rễ có nhiễm nấm có sự khác biệt rõ rệt với các rễ con không có sự xâm nhiễm của nấm (Hình 3.19).



Hình 3.19. Các dạng chóp rễ đặc trưng trong mẫu cây con thông ba lá 6 tháng tuổi
a: phân nhánh đơn, b – c: phân nhánh đôi, d: sợi nấm dạng rễ, e: hệ sợi nấm bên ngoài, f: rễ thông không nhiễm nấm rễ ngoại cộng sinh

Tổng cộng thu được 11.499 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trên tổng số 30 cây con, ở mỗi cây con có thể ghi nhận được từ 1 đến 4 kiểu hình của chóp rễ. Trong đó 53,33% số cây có sự xuất hiện 1 kiểu hình với số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trung bình ở mỗi cây là 398,18 chóp. Nhóm các cây có từ 2 kiểu hình trở lên có số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh dao động lớn, từ 21 đến 1.016 chóp rễ/cây. Chỉ có ở 1 cây con là thu được 4 kiểu hình chóp rễ nấm ngoại cộng sinh khác nhau (Hình 3.20).



Hình 3.20. Tỷ lệ số lượng các kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trong một mẫu cây con 6 tháng tuổi

Hình thái đặc trưng của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở cây con thông ba lá trong vườn ươm được mô tả ở Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Bảng mô tả hình thái của các kiểu hình chóp rẽ nấm ngoại cộng sinh trên hệ rễ cây con thông ba lá 6 tháng tuổi

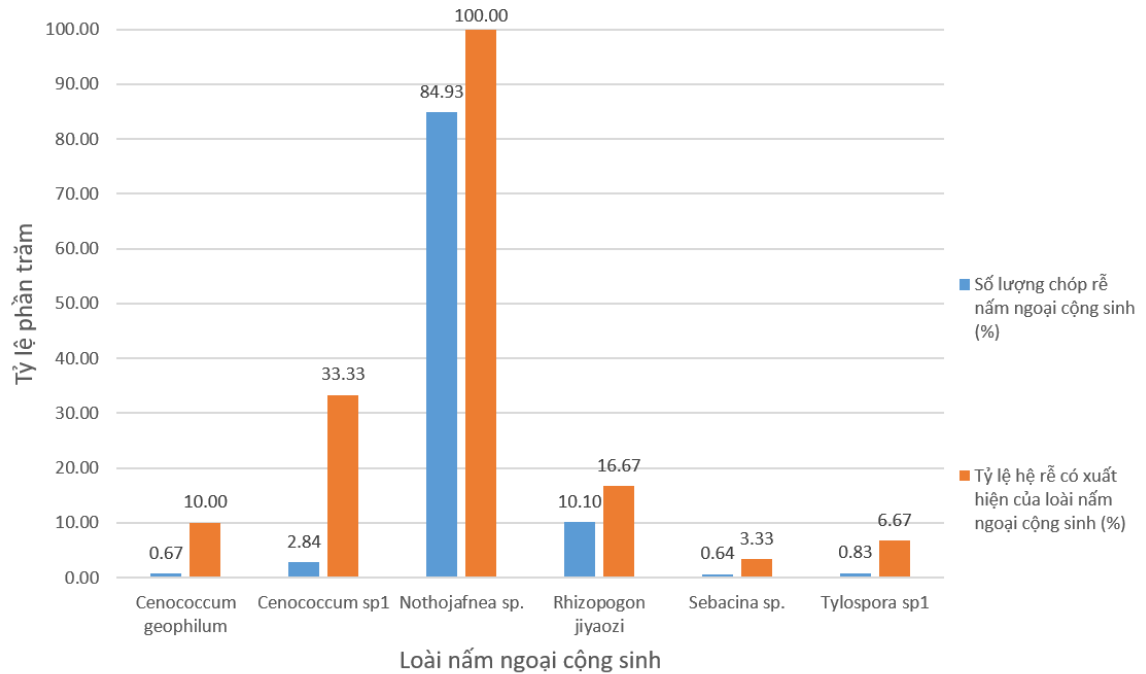
Mã cây	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
AS1	01	ABI-AS1.1	Chóp rẽ phồng, màu trắng ngà vàng, phân nhánh đơn
AS2	01	ABI-AS2.4	Chóp rẽ phồng, đầu chóp màu trắng ngà, thân nâu vàng, phân nhánh đơn
AS3	01	ABI-AS3.1	Chóp rẽ dài, đầu chóp trắng, thân nâu vàng, phân nhánh đơn
AS4	01	ABI-AS4.1	Chóp rẽ dài, đầu chóp trắng, thân nâu vàng, phân nhánh đơn
AS5	01	ABI-AS5.1	Chóp rẽ có màu nâu, hơi sáng màu ở đầu chóp, phân nhánh đôi
AS6	02	ABI-AS6.1	Chóp rẽ có gốc màu nâu sẫm, đầu chóp phình to có màu nâu vàng sáng, có lớp hệ sợi rất mỏng bên ngoài, phân nhánh đơn
		ABI-AS6.2	Chóp rẽ có màu nâu vàng sáng, bên ngoài có lớp tơ mảnh ngắn, phân nhánh đôi
AS7	01	ABI-AS7.2	Chóp rẽ có màu nâu vàng nhạt, phân nhánh đôi
AS8	01	ABI-AS8.1	Chóp rẽ phình, đầu trắng vàng, thân màu nâu vàng, dài, phân nhánh đơn
AS9	01	ABI-AS9.1	Chóp rẽ màu nâu nhạt, đầu chóp sáng màu, dài, phân nhánh đơn hoặc phân nhánh đôi
AS10	01	ABI-AS10.1	Chóp rẽ phình ở đầu, màu trắng ngà vàng, thân dài màu nâu vàng, phân nhánh đơn
AS11	01	ABI-AS11.1	Chóp rẽ phình, màu nâu vàng nhạt, đầu chóp sáng màu, phân nhánh đơn hoặc đôi
AS12	02	ABI-AS12.1	Chóp rẽ có màu đen, có các sợi tơ nấm dày cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn
		ABI-AS12.2	Chóp rẽ có đầu phình màu trắng ngà, thân dài màu nâu vàng, phân nhánh đơn
AS13	01	ABI-AS13.3	Chóp rẽ phình màu trắng ngà vàng, thân dài màu nâu vàng nhạt, phân nhánh đơn hoặc đôi
AS14	01	ABI-AS14.1	Chóp rẽ có gốc màu nâu sẫm, đầu chóp phình to có màu nâu vàng sáng, phân nhánh đơn hoặc đôi
AS15	02	ABI-AS15.1	Chóp rẽ có màu nâu sẫm, có lớp tơ mảnh bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-AS15.8	Chóp rẽ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn
AS16	01	ABI-AS16.1	Chóp rẽ có đầu chóp màu trắng ngà, thân ngắn màu nâu vàng, phân nhánh đơn
AS17	01	ABI-AS17.1	Chóp rẽ dài có màu nâu hơi vàng, đầu chóp sáng màu, phân nhánh đơn

Mã cây	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
AS18	03	ABI-AS18.1	Chóp rễ sẫm màu ở gốc, nâu vàng đến trắng ngà ở phần trên, phân nhánh đôi với một thân chính dài
		ABI-AS18.2	Chóp rễ có màu nâu, lớp bao trắng có hệ sợi nấm mảnh cùng màu bên ngoài, phân nhánh đơn hoặc phân nhánh đôi
		ABI-AS18.3	Chóp rễ có màu đen, phình to, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn
AS19	04	ABI-AS19.1	Chóp rễ có phần gốc màu nâu vàng, đầu chóp phình màu nâu vàng sáng đến trắng ngà, có hệ sợi nấm mảnh màu trắng bên ngoài, phân nhánh đơn
		ABI-AS19.2	Chóp rễ có gốc màu nâu sẫm, đầu chóp phình to có màu trắng vàng, phân nhánh đôi
		ABI-AS19.3	Chóp rễ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn
		ABI-AS19.5	Chóp rễ có gốc màu nâu sẫm, dài, lớp bao trắng với hệ sợi nấm và sợi nấm dạng rễ cùng màu ở bên ngoài, phân nhánh đôi
AS20	02	ABI-AS20.1	Chóp rễ có màu trắng ngà đến hơi vàng, phân nhánh đôi
		ABI-AS20.2	Chóp rễ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn
AS21	02	ABI-AS21.1	Chóp rễ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn hoặc phân nhánh đôi
		ABI-AS21.2	Chóp rễ màu trắng ngà, có lớp tơ mỏng cùng màu bên ngoài, phân nhánh đôi
AS22	02	ABI-AS22.1	Chóp rễ có màu trắng ngà đến hơi vàng, phân nhánh đôi
		ABI-AS22.2	Chóp rễ có lớp bao màu trắng và sợi nấm dạng rễ mảnh cùng màu bên ngoài, phân nhánh đơn hoặc phân nhánh đôi
AS23	03	ABI-AS23.1	Chóp rễ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn
		ABI-AS23.2	Chóp rễ có màu trắng ngà đến hơi vàng, phân nhánh đôi
		ABI-AS23.3	Chóp rễ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn hoặc phân nhánh đôi
AS24	02	ABI-AS24.1	Chóp rễ có màu trắng ngà đến hơi vàng, phân nhánh đôi
		ABI-AS24.3	Chóp rễ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn
AS25	02	ABI-AS25.1	Chóp rễ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn hoặc phân nhánh đôi
		ABI-AS25.3	Chóp rễ có màu trắng ngà đến hơi vàng, phân nhánh đôi
AS26	03	ABI-AS26.1	Chóp rễ có màu trắng ngà đến hơi vàng, phân nhánh đôi

Mã cây	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
		ABI-AS26.3	Chóp rễ có lớp bao màu trắng và sợi nấm dạng rễ mảnh cùng màu bên ngoài, phân nhánh đơn hoặc phân nhánh đôi
		ABI-AS26.4	Chóp rễ màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn
AS27	01	ABI-AS27.1	Chóp rễ có màu trắng ngà đến hơi vàng, có tơ nấm mảnh màu trắng bên ngoài, phân nhánh đôi
AS28	03	ABI-AS28.1	Chóp rễ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn hoặc phân nhánh đôi
		ABI-AS28.2	Chóp rễ có lớp bao màu trắng và sợi nấm dạng rễ mảnh cùng màu bên ngoài, phân nhánh đơn hoặc phân nhánh đôi
		ABI-AS28.3	Chóp rễ có màu trắng ngà đến hơi vàng, phân nhánh đôi
AS29	01	ABI-AS29.1	Chóp rễ có màu trắng ngà đến hơi vàng, có tơ nấm mảnh màu trắng bên ngoài, phân nhánh đôi
AS30	03	ABI-AS30.1	Chóp rễ có lớp bao màu trắng và sợi nấm dạng rễ mảnh cùng màu bên ngoài, phân nhánh đơn hoặc phân nhánh đôi
		ABI-AS30.2	Chóp rễ có màu trắng ngà đến hơi vàng, phân nhánh đôi
		ABI-AS30.4	Chóp rễ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn

3.1.2.2. Kết quả định danh sinh học phân tử chóp rễ nấm cộng sinh với hệ rễ cây con thông ba lá *P. kesiya* 6 tháng trong vườn ươm

Đối với cây con trong vườn ươm, thành phần loài nấm ngoại cộng sinh thu được ít đa dạng. Kết quả cho thấy chỉ ghi nhận được 5 chi nấm ngoại cộng sinh, bao gồm: *Cenococcum*, *Nothojafnea*, *Rhizopogon*, *Sebacina* và *Tylospora*. Trong đó riêng chi *Cenococcum* ghi nhận được 2 loài còn các chi còn lại chỉ có 1 loài duy nhất. Chi *Nothojafnea* là chi nấm có số lượng chóp rễ ngoại cộng sinh thu được nhiều nhất (9.766 chóp – chiếm 84,93% tổng số chóp ghi nhận được) và hiện diện trong cả 30 hệ rễ được nghiên cứu. Chi *Sebacina* và *Tylospora* có tỷ lệ xuất hiện thấp nhất, tương ứng xuất hiện trong 1 và 2 hệ rễ với số lượng chóp rễ ngoại cộng sinh thu được tương ứng 74 và 95 chóp (Hình 3.21).



Hình 3.21. Sự phong phú của các loài nấm ngoại cộng sinh trong hệ rễ cây thông ba lá 6 tháng tuổi

3.1.3. Kết quả khảo sát thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ của cây con thông ba lá *P. kesiya* 3 năm tuổi trong khu vực rừng trồng

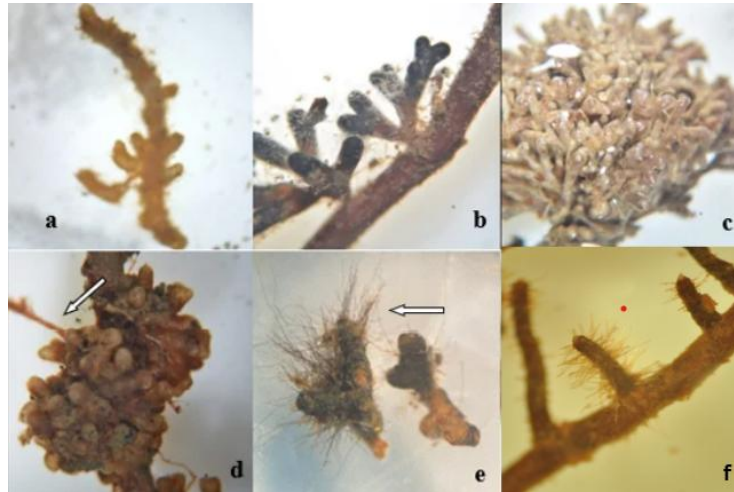
3.1.3.1 Kết quả thu thập chóp rễ nấm ngoại cộng sinh

Bộ rễ của 30 cây con thông ba lá 3 năm tuổi (ký hiệu từ P1 đến P30) được thu nhận (Hình 3.22) và quan sát sự hiện diện của các chóp rễ có hình thành cấu trúc ngoại cộng sinh với nấm dưới kính hiển vi soi nổi.



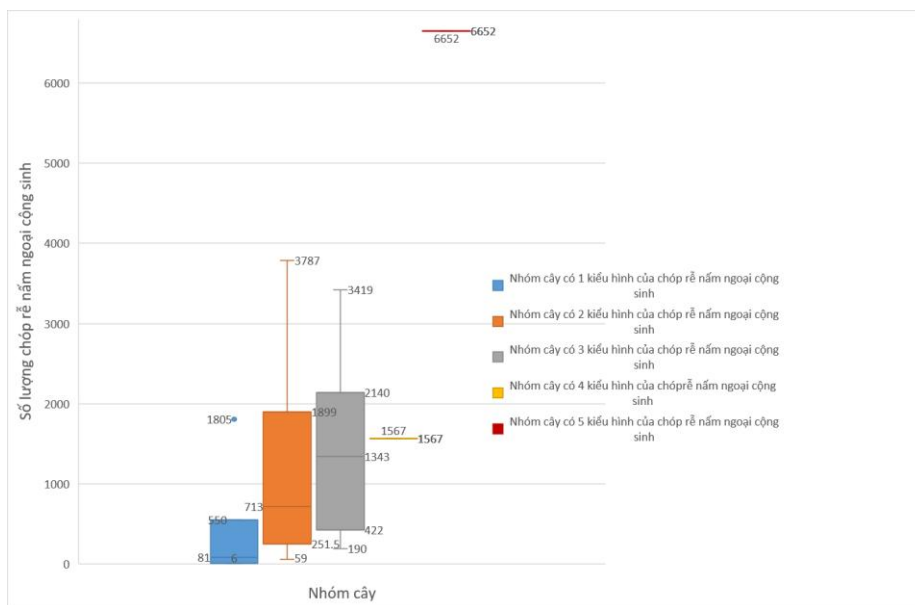
Hình 3.22. Cây con thông ba lá tại rừng trồng 3 năm tuổi (a) và sau khi đưa về phòng thí nghiệm (b)

Kết quả cho thấy chóp rễ nấm ngoại cộng sinh có ở tất cả các cây được nghiên cứu, hình thái của chóp rễ có nhiễm nấm ngoại cộng sinh có sự khác biệt rõ rệt với các rễ con không có sự xâm nhiễm của nấm (Hình 3.23).



Hình 3.23. Các dạng chóp rễ đặc trưng trong mẫu cây con thông ba lá 3 năm tuổi
(a) phân nhánh đơn, (b) phân nhánh đôi, (c) dạng san hô, (d) sợi nấm dạng rễ, (e) hệ sợi nấm ngoài (mũi tên); (f) rễ không có nấm xâm nhiễm

Tổng cộng thu được 37.361 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trên tổng số 30 cây, mỗi hệ rễ của cây con có từ 1 đến 5 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh. Trong đó 43,33% số hệ rễ xuất hiện 2 kiểu hình, 26,67% và 23,33% hệ rễ có 1 và 3 kiểu hình, chỉ có hệ rễ của 1 cây ghi nhận được 4 và 1 hệ rễ ghi nhận được 5 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh (Hình 3.24).



Hình 3.24. Tỷ lệ số lượng các kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trong một mẫu cây con thông ba lá 3 tuổi

Các hình thái đặc trưng của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở thông ba lá 3 năm tuổi được mô tả ở bảng 3.4.

Bảng 3.4. Bảng mô tả hình thái của các kiểu hình chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trên hệ rễ cây con thông ba lá 3 tuổi

Mã cây	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
P1	02	ABI-P1.1	Chóp rễ có màu nâu vàng nhạt, trắng dần về phía đỉnh chóp, phân nhánh đôi
		ABI-P1.2	Chóp rễ có màu nâu, trơn nhẵn, phân nhánh đôi
P2	02	ABI-P2.1	Chóp rễ có màu nâu, sáng màu ở phần đỉnh chóp, có hệ tơ nấm mảnh bao xung quanh, phân nhánh đôi
		ABI-P2.5	Chóp rễ có màu đen, có hệ sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn
P3	02	ABI-P3.2	Chóp rễ có màu nâu, có lớp lớp bao vàng bên ngoài, phân nhánh đôi tạo thành cụm
		ABI-P3.3	Chóp rễ có màu nâu, manlte màu trắng ngà, bên ngoài phủ lớp hệ sợi mảnh, xù dày, phân nhánh ngắn tạo thành cụm san hô
P4	03	ABI-P4.1	Chóp rễ dài, có màu nâu, lớp bao vàng, phân nhánh đôi tạo thành cụm
		ABI-P4.2	Chóp rễ dài, có màu nâu ngả cam, trơn bóng, phân nhánh đôi
		ABI-P4.3	Chóp rễ màu nâu đậm, một số phần đầu chóp hơi đen, trơn bóng, phân nhánh đôi
P5	03	ABI-P5.2	Chóp rễ có màu xanh đen, sáng màu ở phần đỉnh chóp, trơn nhẵn, phân nhánh
		ABI-P5.3	Chóp rễ có màu trắng ngà, trong suốt ở phần đỉnh chóp, có lớp bao trắng bạc rất mỏng bên ngoài, dạng phân nhánh
		ABI-P5.4	Chóp rễ có màu trắng trong, phân nhánh đôi
P6	02	ABI-P6.1	Chóp rễ có màu đen, có tơ mảnh màu nâu sậm ở bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-P6.4	Chóp rễ có màu nâu, lớp bao nâu đỏ gạch, phân nhánh đôi tạo thành cụm san hô
P7	01	ABI-P7.3	Chóp rễ có màu đen, có hệ sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
P8	02	ABI-P8.3	Chóp rễ dài, màu nâu nhạt, lớp bao màu vàng ngà, trơn nhẵn, phân nhánh đôi
		ABI-P8.5	Chóp rễ màu nâu đen, trơn nhẵn, phân nhánh đôi tạo thành cụm
P9	03	ABI-P9.1	Chóp rễ dài màu nâu đen sậm, trơn nhẵn, phân nhánh đôi

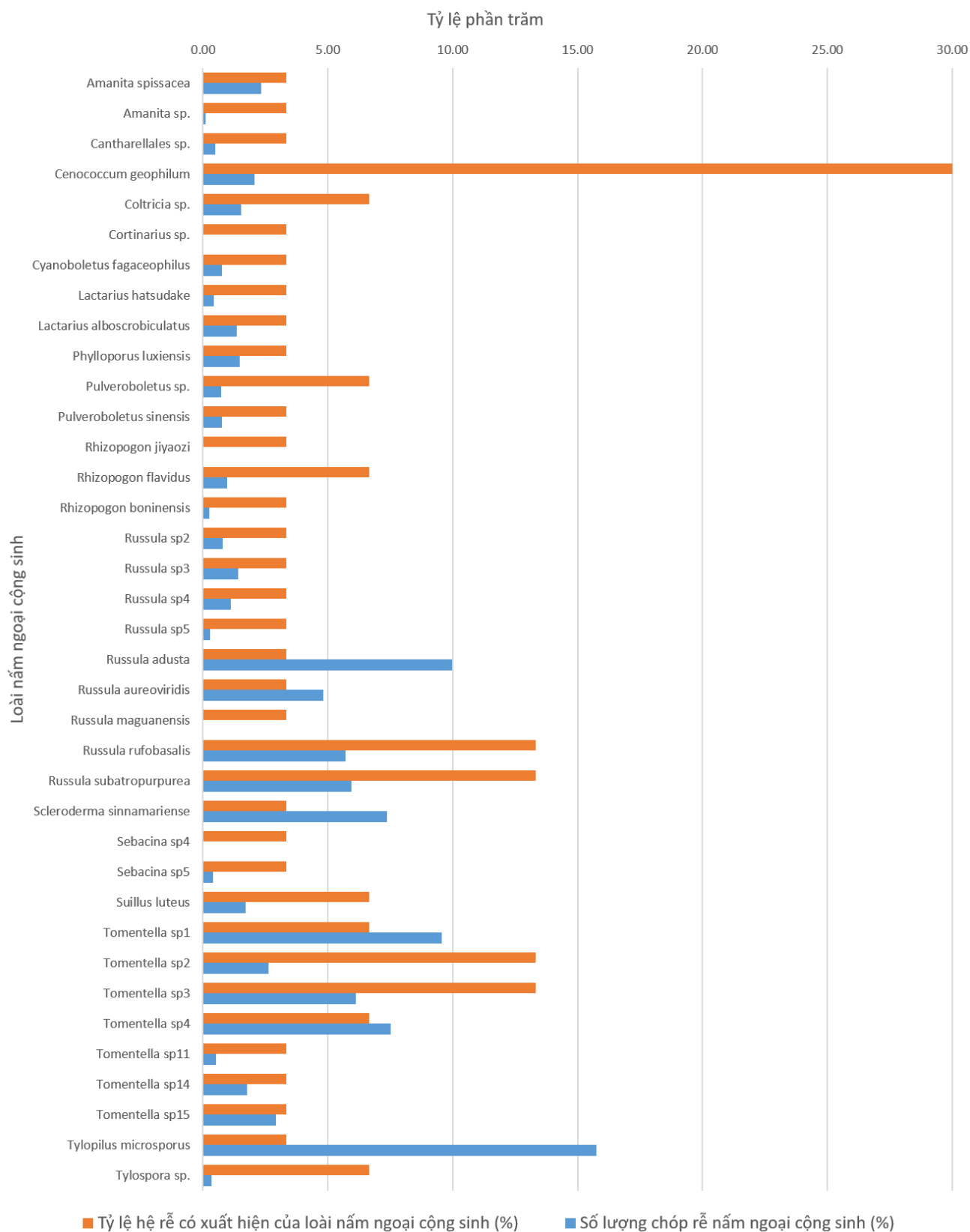
Mã cây	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
		ABI-P9.2	Chóp rễ có màu đen, đầu chóp phình và có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn hoặc đôi
		ABI-P9.4	Chóp rễ dài màu nâu, có lớp bao màu trắng ngà hơi xám, phân nhánh đôi
P10	05	ABI-P10.1	Chóp rễ có màu nâu đen sậm, trơn nhẵn, có lớp tơ nấm mảnh màu trắng bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-P10.2	Chóp rễ màu nâu, lớp bao và sợi nấm dạng rễ màu đỏ gạch, phân nhánh đôi
		ABI-P10.3	Chóp rễ dài, màu nâu có lớp bao màu trắng xám, phân nhánh đôi tạo thành cụm
		ABI-P10.5	Chóp rễ dài, có màu nâu đỏ, phân nhánh đôi tạo thành cụm
		ABI-P10.7	Chóp rễ có màu đen với sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
P11	04	ABI-P11.1	Chóp rễ có màu nâu đen sậm, có tơ mảnh màu nâu hơi ngả đỏ phía bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-P11.2	Chóp rễ dài có màu nâu nhạt, bề mặt nhẵn, phân nhánh đôi
		ABI-P11.3	Chóp rễ có màu nâu nhạt, đầu chóp sáng màu, lớp sợi nấm mỏng phía bên ngoài, phân nhánh tạo thành cụm san hô
		ABI-P11.4	Chóp rễ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
P12	01	ABI-P12.1	Chóp rễ có màu nâu đất, bên ngoài có lớp sợi nấm dày màu vàng ngà và sợi nấm dạng rễ cùng màu, chóp rễ ngắn, phân nhánh
P13	02	ABI-P13.1	Chóp rễ có màu nâu sáng hơi vàng, phần đầu chóp sáng màu, phân nhánh tạo thành cụm san hô
		ABI-P13.2	Chóp rễ có màu đen, trơn nhẵn, dài và phân nhánh
P14	01	ABI-P14.1	Chóp rễ có màu nâu đen, trơn bóng, phân nhánh
P15	02	ABI-P15.1	Chóp rễ có màu đen, có tơ nấm dày cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đôi
		ABI-P15.2	Chóp rễ có màu nâu vàng, trơn nhẵn, phân nhánh đôi
P16	03	ABI-P16.1	Chóp rễ màu nâu hơi vàng, có lớp sợi nấm mỏng mịn phía bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-P16.3	Chóp rễ có màu nâu đất, đỉnh chóp sáng màu, bên ngoài có lớp tơ mảnh cùng màu, phân nhánh tạo cụm san hô
		ABI-P16.4	Chóp rễ dài, có màu nâu, trơn nhẵn, phân nhánh
P17	01	ABI-P17.2	Chóp rễ có màu nâu đỏ sậm, bên ngoài có hệ sợi nấm dày cùng màu, phân nhánh đôi
P18	01	ABI-P18.3	Chóp rễ có màu đen ánh xanh, sáng màu dần về phía đỉnh chóp, trong suốt, nhẵn, phân nhánh

Mã cây	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
P19	03	ABI-P19.1	Chóp rễ có lớp bao màu trắng, phân nhánh tạo cụm san hô
		ABI-P19.2	Chóp rễ có màu nâu vàng, lớp bao mỏng màu trắng, phân nhánh đôi
		ABI-P19.3	Chóp rễ có màu đen, có lớp tơ mảnh màu trắng bên ngoài, phân nhánh đôi
P20	02	ABI-P20.1	Chóp rễ có màu đen, có sợi nấm cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh đơn
		ABI-P20.4	Chóp rễ có màu vàng nâu sáng, có lớp sợi nấm mảnh bên ngoài, phân nhánh đơn
P21	01	ABI-P21.3	Chóp rễ có màu nâu đen, dài, đầu chóp nhỏ, có lớp bao màu vàng chanh mỏng, phân nhánh
P22	02	ABI-P22.1	Chóp rễ có màu nâu, sáng màu về phía đỉnh chóp, phân nhánh
		ABI-P22.2	Chóp rễ có màu nâu nhạt, đầu chóp sáng màu, có lớp tơ mảnh bên ngoài, phân nhánh
P23	01	ABI-P23.1	Chóp rễ có màu nâu nhạt, ngắn, có lớp tơ mịn, ngắn màu trắng bên ngoài, phân nhánh đôi
P24	02	ABI-P24.1	Chóp rễ dài có lớp bao dày màu vàng chanh bên ngoài, phân nhánh
		ABI-P24.2	Chóp rễ có màu nâu, trơn nhẵn, phân nhánh đôi
P25	02	ABI-P25.3	Chóp rễ có màu nâu, dài, trơn nhẵn, phân nhánh
		ABI-P25.6	Chóp rễ có màu nâu vàng sáng, phân nhánh
P26	02	ABI-P26.2	Chóp rễ có màu nâu sáng, dài, có lớp manlte mỏng màu trắng bạc và sợi nấm dạng rễ mảnh cùng màu ở bên ngoài, phân nhánh
		ABI-P26.4	Chóp rễ có màu đen, có lớp hệ sợi mảnh và ngắn bên ngoài, trơn bóng, phân nhánh đôi
P27	02	ABI-P27.2	Chóp rễ có màu nâu sậm, phần đầu chóp sáng màu, trơn nhẵn, phân nhánh
		ABI-P27.3	Chóp rễ dài có màu đen, có hệ sợi dày đặc phát ra từ chóp, phân nhánh
P28	03	ABI-P28.1	Chóp rễ có màu đen, có hệ sợi nấm mảnh màu trắng bao phía bên ngoài, phân nhánh đôi
		ABI-P28.2	Chóp rễ dài có màu nâu vàng , trắng dần về phía đầu chóp, phân nhánh
		ABI-P28.3	Chóp rễ có màu đen, có hệ sợi nấm dày cùng màu phát ra từ chóp, phân nhánh
P29	01	ABI-P29.2	Chóp rễ có màu nâu, lớp bao có màu hơi vàng xám, phân nhánh
P30	03	ABI-P30.1	Chóp rễ có màu nâu sậm, dài, trơn nhẵn, phân nhánh

Mã cây	Số kiểu hình	Ký hiệu	Mô tả
		ABI-P30.2	Chóp rễ có màu cam đỏ nhạt, sáng màu dần về phía đỉnh chóp, có nhiều tơ nấm màu trắng, mảnh phủ xung quanh, phân nhánh
		ABI-P30.4	Chóp rễ có màu nâu, có lớp bao trắng và sợi nấm dạng rễ cùng màu ở bên ngoài, phân nhánh

3.1.3.2. Kết quả định danh mẫu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở cây con 3 năm tuổi

Trên hệ rễ của cây thông con *P. kesiya* 3 năm tuổi, có 16 chi nấm ngoại cộng sinh được ghi nhận, bao gồm: *Amanita*, *Cenococcum*, *Coltricia*, *Cortinarius*, *Cyanoboletus*, *Lactarius*, *Phylloporus*, *Pulveroboletus*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Scleroderma*, *Sebacina*, *Suillus*, *Tomentella*, *Tylopilus*, *Tylospora* và 1 mẫu thuộc bộ Cantharellales. Trong đó hai chi *Russula* và *Tomentella* có số lượng loài đa dạng nhất với 9 và 7 loài hiện diện tương ứng trong 14 và 13 bộ rễ cây (Hình 3.25). Đồng thời số chóp rễ ngoại cộng sinh thu được của hai chi nấm này cũng cao nhất (11.235 và 11.594 chóp). Ngược lại, chi nấm *Cortinarius* chỉ xuất hiện ở hệ rễ của 1 cây duy nhất với 7 chóp rễ nấm ngoại cộng sinh được ghi nhận.

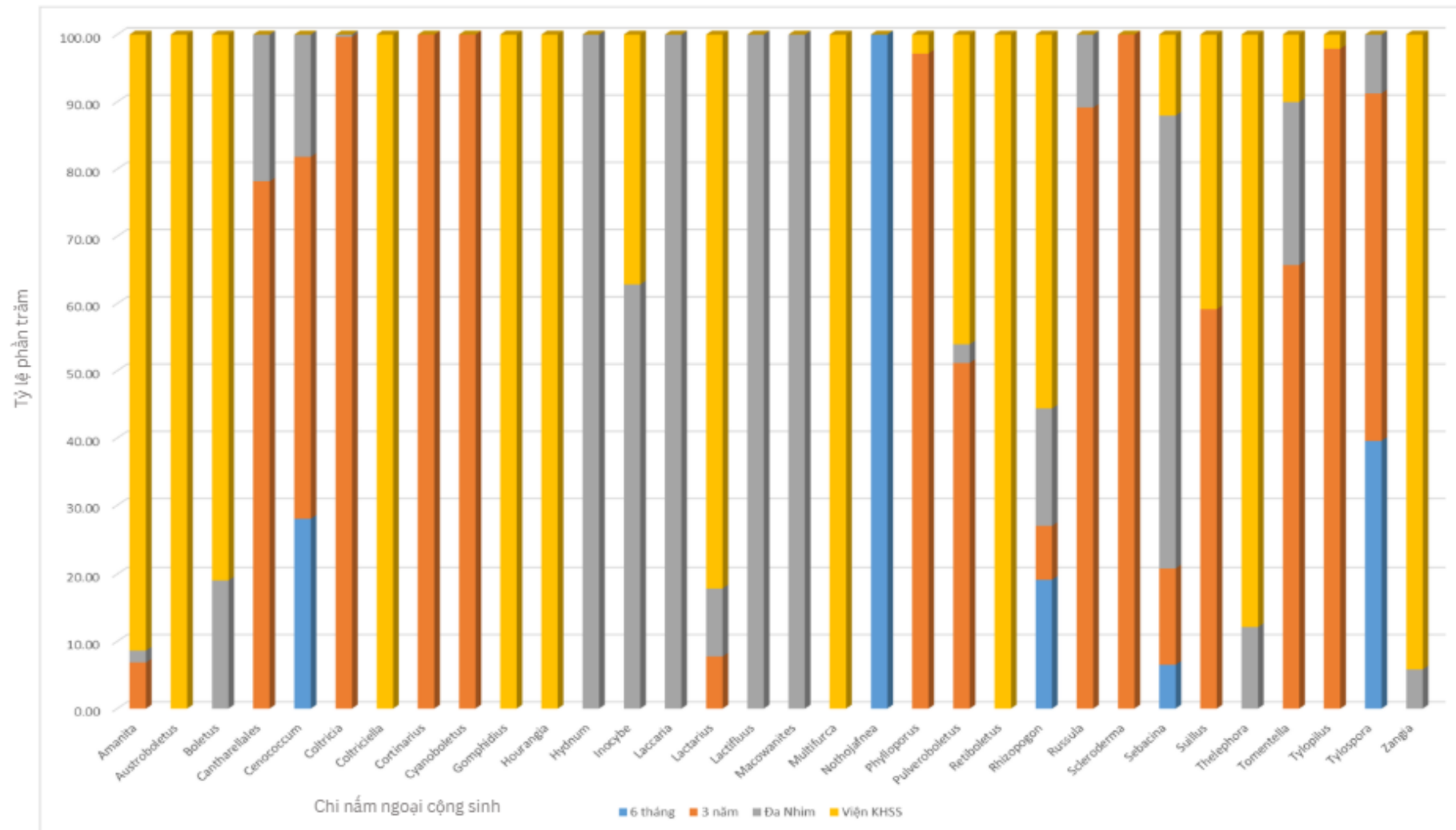


Hình 3.25. Số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh và số mẫu ghi nhận của các loài nấm ngoại cộng sinh có trên cây 3 năm tuổi

3.1.4. Kết quả so sánh về thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ của cây thông ba lá *P. kesiya* giữa các giai đoạn tuổi của chủ

Kết quả định danh sinh học phân tử dựa trên vùng trình tự ITS cho thấy đã khuếch đại thành công 70 mẫu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở khu vực rừng thông ba lá trưởng thành tại khu vực Đa Nhim, 75 mẫu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở rừng thông ba lá trưởng thành tại khu vực Viện Khoa học Sự sống, 64 mẫu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh với cây thông ba lá con giai đoạn 3 tuổi và 51 mẫu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở giai đoạn cây thông ba lá con 6 tháng tuổi trong vườn ươm. Tổng cộng có 32 chi và 116 loài nấm ngoại cộng sinh được ghi nhận trong nghiên cứu, trong đó 30 chi nấm thuộc ngành Basidiomycota và 2 chi nấm thuộc ngành Ascomycota (*Cenococcum* và *Nothojafnea*) (Hình 3.26). Ngoài ra, kết quả kiểm tra loài cây chủ cộng sinh với cặp mồi TrnC-D cho thấy các mẫu chóp rễ thu thập được đều là cấu trúc cộng sinh hình thành giữa nấm ngoại cộng sinh và rễ cây thông ba lá *P. kesiya*.

Bên cạnh đó, chỉ có hai chi nấm *Sebacina* và *Rhizopogon* xuất hiện ở cả 3 giai đoạn phát triển của cây thông ba lá (Hình 3.26). Các nghiên cứu về cộng đồng nấm ngoại cộng sinh trên thế giới cũng đã cho thấy *Sebacina* và *Rhizopogon* cùng với một số chi nấm như *Cenococcum*, *Suillus*, *Tomentella* được xem là những thành phần ưu thế, có phạm vi phân bố rộng khắp và có phổ cây chủ cực kỳ rộng, hiện diện trong đất hay hệ rễ của thực vật ở hầu hết các giai đoạn tuổi của cây [55, 109, 176, 177]. Ngược lại, độ tương đồng về thành phần các loài nấm ngoại cộng sinh xuất hiện ở 3 giai đoạn vườn ươm, 3 năm tuổi và rừng trưởng thành của thông ba lá rất thấp. Theo Mason và Last mỗi độ tuổi cây có các loài nấm ngoại cộng sinh đặc trưng riêng. Điều này là do nấm giai đoạn đầu cần ít carbohydrate nhưng phát triển nhanh hơn so với các loài nấm giai đoạn sau [178].



Hình 3.26. Tỷ lệ phần trăm các chi nấm ngoại cộng sinh xuất hiện ở 3 giai đoạn tuổi của cây thông ba lá

Ở giai đoạn 6 tháng trong vườn ươm, hệ rễ của cây con thông ba lá cho thấy có sự xuất hiện rất cao của chi nấm *Nothojafnea* thuộc ngành Ascomycota so với các chi nấm ngoại cộng sinh khác trong ngành Basidiomycota. Tuy chi này chỉ ghi nhận được 1 loài nhưng *Nothojafnea* sp. có tỷ lệ xuất hiện 100% và độ phong phú tương đối 84,93% ở hệ rễ cây con 6 tháng tuổi được thu thập. Điều này cũng được ghi nhận tương tự ở nhiều nghiên cứu trên cây giống trong vườn ươm cho thấy sự ưu thế của một đến một vài loài nấm ngoại cộng sinh ở cây con dưới 1 tuổi thu từ các vườn ươm cây giống [179–181]. Tỷ lệ này thay đổi với sự gia tăng nhanh chóng của các loài nấm thuộc ngành Basidiomycota xâm nhiễm vào rễ con sau khi được đưa ra rừng trồng. Đồng thời, thành phần các chi nấm ngoại cộng sinh thu được từ nghiên cứu ở cả 2 giai đoạn 6 tháng và 3 năm tuổi của cây thông ba lá cũng cho thấy mối tương quan với quần xã nấm ngoại cộng sinh trong giai đoạn cây con trong nhiều nghiên cứu trước đây trong các khu vực rừng mới phục hồi sau xáo trộn [162, 182] hoặc tại các khu vực rừng trồng mới [183, 184]. Ngược lại, trong thành phần loài nấm ngoại cộng sinh ở rừng trưởng thành Đa Nhim, những loài thuộc các chi nấm *Tomentella*, *Russula*, *Lactarius*, *Amanita* và các loài nấm trong bộ Cantharellales và Boletales xuất hiện với tỷ lệ cao. Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy các loài này thường biểu hiện sự phong phú và ưu thế ở các khu vực rừng già [185].

Bảng 3.5 Các chỉ số đa dạng giữa ba giai đoạn tuổi của cây thông ba lá

	Cây 6 tháng tuổi	Cây 3 năm tuổi	Rừng trưởng thành	
			Đa Nhim	Viện KHSS
Số lượng loài (S)	6	37	56	42
Số lượng chớp rễ (N)	11.499	37.361	17.324	34.096
Chỉ số Shannon-Wiener (H')	0,577	2,942	2,569	2,287
Chỉ số Pielou's (J)	0,322	0,815	0,638	0,612

Giá trị của chỉ số Shannon-Wiener từ bảng 3.5 cho thấy, thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với rễ cây con thông ba lá 3 năm tuổi và rễ cây thông ba lá ở rừng trưởng thành đa dạng hơn hẳn so với ở hệ rễ cây con 6 tháng tuổi. Giá trị đồng đều về thành phần loài nấm ngoại cộng sinh ở cây con thông ba lá 6 tháng (0,322) cho thấy có sự phân bố ít cân bằng của các cá thể thuộc các loài nấm ngoại cộng sinh khác nhau so với ở giai đoạn cây thông ba lá con 3 năm tuổi hay ở khu vực rừng thông ba lá trưởng thành. Điều này có thể là kết quả của việc giới hạn không gian vùng rễ do diện tích của bầu đất cũng như sự khác biệt về số lượng các mầm nấm có trong giá thể đất trong bầu làm hạn chế tính đa dạng của thành phần nấm ngoại cộng sinh. Ngược lại, cây con sinh

trường gần các cây trưởng thành cho thấy có sự chia sẻ về thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với nhau và với các cây khác [45, 98]. Ngoài ra, một vài nghiên cứu cũng cho thấy sự khác biệt trong thành phần và số lượng các loài nấm ngoại cộng sinh trong các điều kiện phát triển khác nhau. Southworth và cộng sự ghi nhận có tổng cộng 22 loài nấm ngoại cộng sinh, trong đó bốn loài có trên cây giống sồi trong luống ươm, năm loài trên cây giống lá kim trong luống ươm và mười ba loài trên cây giống sồi trong rừng tự nhiên [186]. Ngoài ra, một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến thành phần loài nấm ngoại cộng sinh là tuổi của cây. Số lượng các chi và loài nấm ngoại cộng sinh tăng lên theo tuổi. Điều này được ghi nhận trong các kết quả nghiên cứu về nấm ngoại cộng sinh trên các khu hệ rừng theo độ tuổi của cây chủ [4, 177]. Các tác giả đã chỉ ra rằng sự đa dạng của nấm rễ ngoại cộng sinh thấp hơn nhiều ở các quần thể cây con so với các quần thể già hơn. Tuy nhiên với các khu vực rừng từ 60 đến trên 120 tuổi thì hệ nấm rễ ngoại cộng sinh không khác biệt [51, 54, 105]. Ở đây với các điều kiện của nghiên cứu vẫn chưa thực hiện được.

Riêng trên đối tượng thông ba lá *P. kesiya*, hiện nay chỉ có một số rất ít các nghiên cứu được thực hiện tại Ấn Độ và Philippine, cho thấy các chi nấm *Boletus*, *Scleroderma*, *Lactarius*, *Amanita*, *Russula*, *Suillus* và *Cenococcum* là các chi nấm ngoại cộng sinh phổ biến ở cả mẫu chóp rễ và mẫu quả thể nấm thu được trong các khu vực nghiên cứu [55, 102, 127, 187]. Đặc biệt, trên hầu hết các khu vực rừng *P. kesiya* 2 – 4 – 11 và 17 năm tuổi đều có sự hiện diện của các chi nấm này. Đồng thời chỉ số đa dạng của nấm ngoại cộng sinh tỷ lệ thuận với tuổi của rừng thông và số lượng loài nấm tối đa được quan sát thấy ở khu vực rừng lâu đời nhất [55]. Ở Việt Nam đây là nghiên cứu đầu tiên về sự đa dạng trong thành phần loài nấm rễ ngoại cộng sinh với hệ rễ cây thông ba lá *P. kesiya*. Kết quả thu được cũng cho thấy có sự phù hợp cao với các nghiên cứu trước đây trên đối tượng này.

Bên cạnh đó, hai loài nấm *Nothojafnea* sp. và *Rhizopogon boninesis* là hai ghi nhận mới từ đề tài. *Nothojafnea* sp. chiếm ưu thế cao với tỷ lệ xuất hiện 100% và độ phong phú tương đối chiếm 84,93% ở hệ rễ cây con thông ba lá 6 tháng tuổi được thu thập. Đặc biệt là chi nấm *Nothojafnea* chỉ được ghi nhận cộng sinh với chi thực vật *Nothofagus* (sồi phương nam) và các báo cáo về chi nấm này chỉ xuất hiện tại Chile và Argentina với số lượng khá ít ỏi [188]. Tới thời điểm này vẫn chưa có nghiên cứu nào cho thấy sự cộng sinh của chi nấm *Nothojafnea* với các loài cây thuộc họ Thông nói riêng và các loài thực vật ngoại cộng sinh nói chung ở phía bắc bán cầu. Ngoài ra, loài *Nothojafnea thaxteri* thuộc chi nấm này cũng là 1 trong những loài nấm ngoại cộng sinh nằm trong Sách đỏ năm 2020. Ngược lại, *Rhizopogon* là chi nấm cực lớn nhất,

được cho là có mối quan hệ cộng sinh chuyên biệt với các loài thực vật trong họ Thông và có phân bố rộng khắp trên toàn thế giới [91, 171]. Chi nấm *Rhizopogon* đóng vai trò quan trọng trong việc tái sinh và hỗ trợ tăng tỷ lệ sống của cây thông con [93, 189]. Vì vậy đây là một trong những chi nấm được nghiên cứu xâm nhiễm phổ biến để bổ sung vào đất gieo trồng cây con trong vườn ươm trước khi đưa ra ngoài khu vực trồng [170, 190, 191]. Có khoảng 212 loài nấm thuộc chi *Rhizopogon* hiện có trên dữ liệu của Indexfungorum, trong đó loài *Rhizopogon boninensis* được cho là loài đặc hữu tại Nhật Bản [192, 193]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, *Rhizopogon boninensis* đã được tìm thấy tại rừng thông ba lá trưởng thành ở khu vực Đa Nhim cả mẫu quả thể, chóp rễ nấm ngoại cộng sinh và trong mẫu phân tích đất. Đây là một trong những phát hiện mới có giá trị khoa học cũng như khả năng ứng dụng của nghiên cứu vào thực tiễn.

Như vậy, đây là nghiên cứu đầu tiên được thực hiện tại Việt Nam có sự kết hợp giữa phân tích thành phần nấm có trong đất và những loài nấm thực sự hiện diện trên hệ rễ của cây thông ba lá *P. kesiya* theo từng giai đoạn phát triển, từ cây con 6 tháng tuổi trong vườn ươm, cây 3 năm tuổi đến cây trưởng thành trong rừng. Những kết quả này giúp bổ sung cơ sở dữ liệu về đa dạng thành phần loài nấm ngoại cộng sinh tương thích với cây chủ *P. kesiya* tại Việt Nam. Về mặt thực tiễn, kết quả của nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học cho việc tuyển chọn các loài nấm ngoại cộng sinh tiềm năng để chủ động gây nhiễm cho cây con trong vườn ươm, giúp nâng cao chất lượng cây giống, hỗ trợ quá trình trồng và phục hồi rừng thông *P. kesiya*, một loài cây có giá trị sinh thái và kinh tế quan trọng. Đồng thời, việc sử dụng các kết quả từ nghiên cứu sẽ góp phần xây dựng các giải pháp quản lý rừng bền vững theo hướng dựa trên chức năng của hệ vi sinh vật đất.

3.2. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA NẤM NGOẠI CỘNG SINH TỚI KHẢ NĂNG PHÁT TRIỂN CỦA CÂY THÔNG CON *P. kesiya* TRONG ĐIỀU KIỆN *in situ*, *ex situ* VÀ *in vitro*

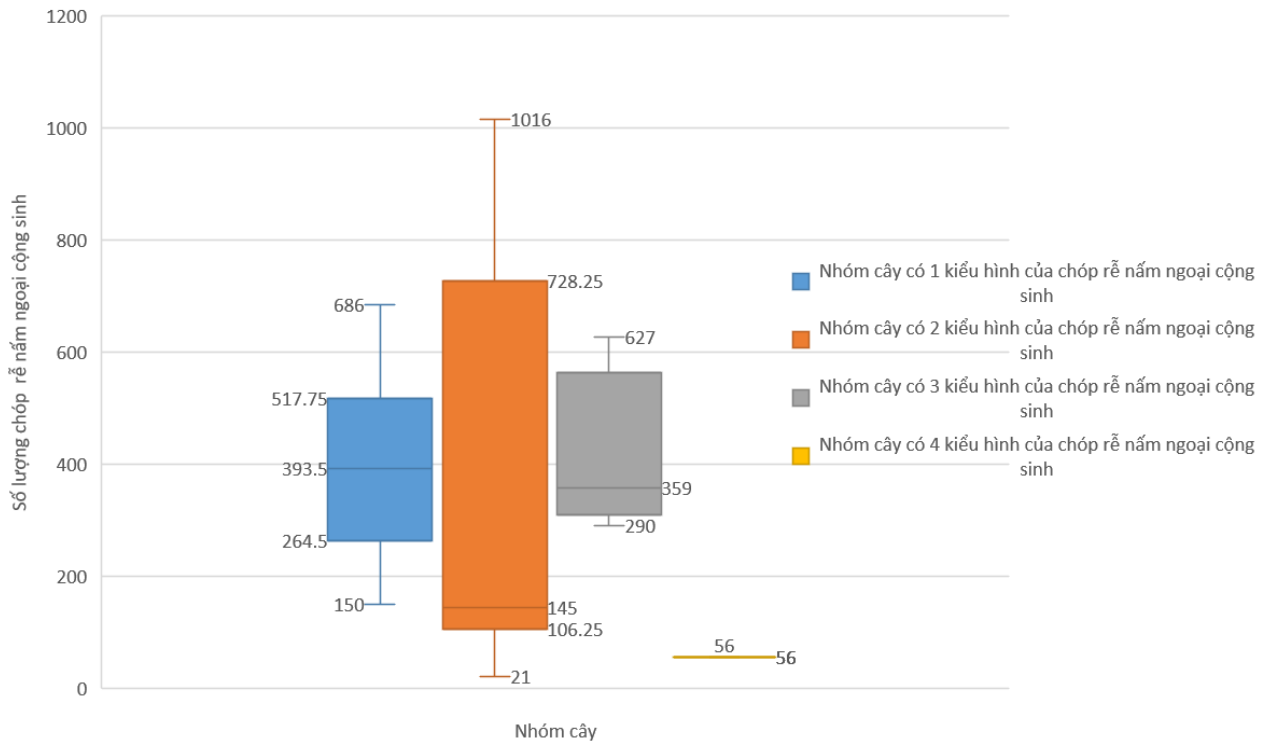
3.2.1. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nấm ngoại cộng sinh tới khả năng phát triển của cây thông con *P. kesiya* trong điều kiện *in situ*

Trong điều kiện nuôi trồng tại vườn ươm (Hình 3.27), toàn bộ hệ rễ của 30 cây con được lấy ngẫu nhiên để khảo sát đều cho thấy có sự hình thành cấu trúc ngoại cộng sinh với ít nhất một loài nấm ngoại cộng sinh. Tuy nhiên, số lượng chóp rễ ngoại cộng sinh trên hệ rễ của mỗi cây không giống nhau, cho thấy mức độ xâm nhiễm và phát triển của nấm ngoại cộng sinh trên hệ rễ có sự biến động giữa các cá thể cây con.



Hình 3.27. Cây con trong vườn ươm của thí nghiệm *in situ*

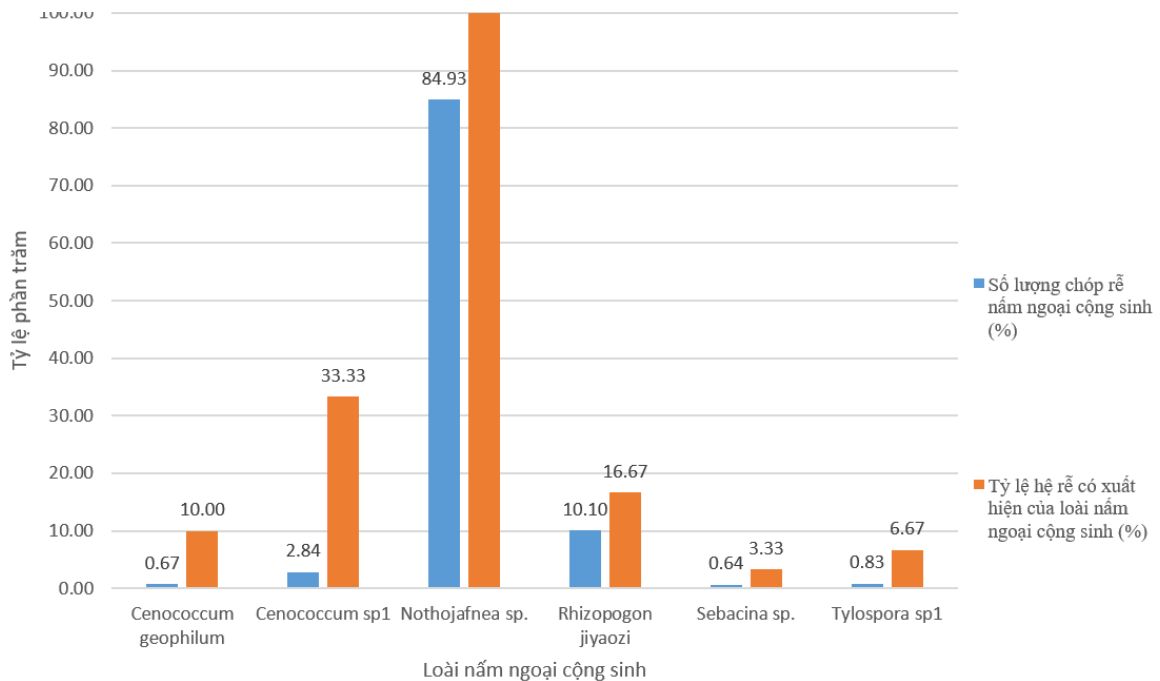
Từ hình 3.28, có thể thấy không có sự tương quan giữa số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được ở mỗi cây với số lượng kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trong mỗi cây. Hệ rễ của cây có 1 kiểu hình của rễ nấm ngoại cộng sinh với số lượng chóp rễ nhiều nhất là 544 chóp. Đồng thời, hơn 50% các cây có hệ rễ chỉ có 1 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh có số lượng chóp rễ thu được nhiều hơn 200 chóp. Trong khi đó, 50% số lượng cây mà trong hệ rễ có thể thu nhận được 2 kiểu hình với số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh dưới 150 chóp. Ngoại trừ hai cây có hệ rễ có số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh cao đột biến, tương ứng là 750 và 1.016 chóp rễ, có 2 kiểu hình thái của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh, chỉ có duy nhất 1 cây mà trong đó ghi nhận được 3 kiểu hình với số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh là 52 chóp và 1 cây có 4 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh với 56 chóp. Điều này cho thấy, trong hệ rễ của một cây thông ba lá con, mặc dù số kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh được tìm thấy tăng lên, tổng số lượng của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh tương ứng với kiểu hình đó không tăng lên tương ứng.



Hình 3.28. Tỷ lệ số lượng các kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trong một mẫu cây con thông ba lá 6 tháng tuổi

Kết quả giải trình tự các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh này cho thấy có 6 loài nấm thuộc 5 chi nấm nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ của cây thông con ba lá 6 tháng tuổi (Hình 3.29). Tuy nhiên, mặc dù có nhiều loài nấm ngoại cộng sinh khác nhau cùng hiện diện trên hệ rễ của một cây con, nhưng chúng không đóng góp đồng đều vào việc hình thành các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh. Tỷ lệ xuất hiện của loài *Nothojafnea* sp. trong các mẫu rễ cây con là 100% và chiếm đến 84,93% trong tổng số các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được ở giai đoạn này. Chi nấm *Cenococcum* với 2 loài là *C. geophilum* và *Cenococcum* sp1 xuất hiện tương ứng trong 10% và 33,33% hệ rễ các cây được nghiên cứu nhưng có tổng số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ít hơn loài *Rhizopogon jiyaozi* (10%). Hai loài còn lại là *Sebacina* sp. và *Tylospora* sp1. chiếm một tỷ lệ khá thấp trong mẫu cả về số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được và tỷ lệ xuất hiện trong các hệ rễ được khảo sát. Sự không tương ứng giữa số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh được ghi nhận và số loài nấm ngoại cộng sinh trên cùng một hệ rễ có thể xuất phát từ khả năng thích nghi và cạnh tranh tốt hơn của một số loài hoặc chi nấm, từ đó chiếm ưu thế trong quá trình thiết lập sự cộng sinh với cây chủ. Những loài nấm này có thể hình thành nhiều chóp rễ hơn hoặc phát triển mạnh hơn trên bộ rễ của thực vật, trong khi các loài khác chỉ hiện diện với tần suất thấp hoặc đóng góp hạn chế [35, 45, 79, 194]. Do đó, thành phần và độ phong

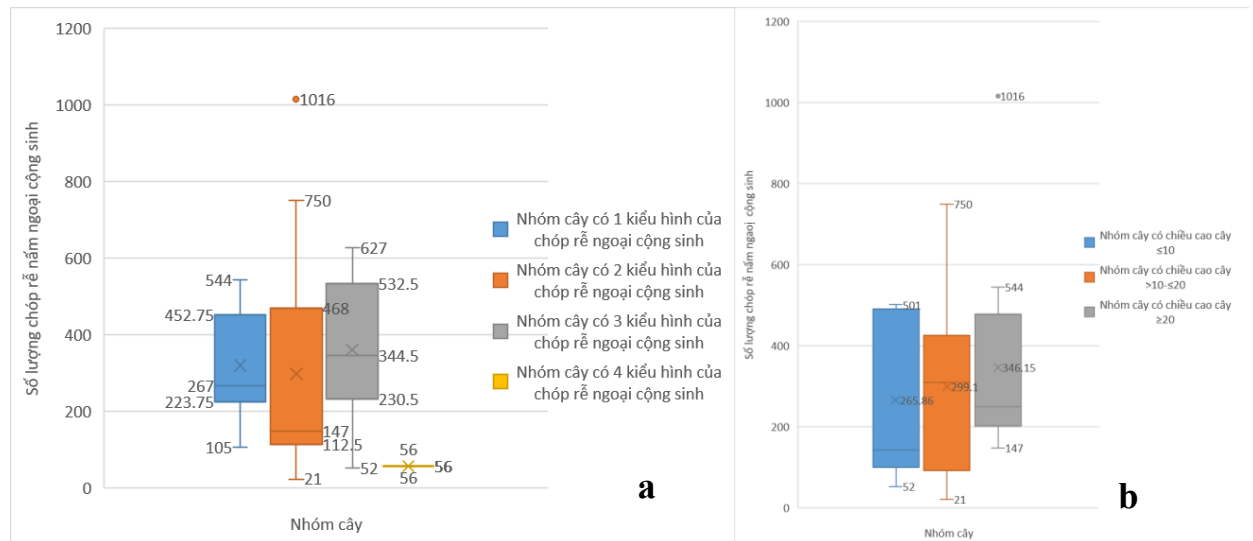
phù của hệ nấm rễ ngoại cộng sinh trên rễ của cây không chỉ phụ thuộc vào mức độ đa dạng loài, mà còn chịu ảnh hưởng bởi khả năng cạnh tranh, hiệu quả cộng sinh và sự tương thích sinh lý giữa từng loài nấm với cây chủ.



Hình 3.29. Sự phong phú của các loài nấm ngoại cộng sinh trong hệ rễ cây thông ba lá trong nghiên cứu *in situ*

Ngoài ra, từ hình 3.30 ta thấy có 23,3% các cây con có chiều cao cây ≤ 10 cm, 33,3% các cây có chiều cao > 10 đến ≤ 20 cm và 43,3% các cây con có chiều cao > 20 cm. Tuy nhiên, tỷ lệ về chiều cao cây không có sự tương quan rõ ràng với số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ghi nhận được trên mỗi cây, cũng như tỷ lệ loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ của cây con đó. Tất cả các cây có từ 3–4 loài nấm ngoại cộng sinh hiện diện trên hệ rễ đều có chiều cao cây dưới 16 cm. Điều này có thể được giải thích dựa trên hiện tượng cạnh tranh giữa các loài nấm rễ ngoại cộng sinh trên cùng một hệ rễ. Khi số lượng loài nấm ngoại cộng sinh tăng lên, sự cạnh tranh về không gian và tài nguyên có thể làm giảm hiệu quả cộng sinh tổng thể, khiến lợi ích đối với cây chủ không tăng tương ứng, thậm chí bị phân tán. Đặc biệt, giai đoạn phát triển của cây ở đây là giai đoạn cây con 6 tháng tuổi. Việc duy trì nhiều đối tác cộng sinh khác nhau trên cùng một cây đòi hỏi cây phải cung cấp nhiều carbon hơn cho nấm. Chi phí carbon từ cây chủ nếu vượt quá những lợi ích dinh dưỡng mà cây nhận lại có thể không dẫn đến tăng trưởng chiều cao, thậm chí còn làm giảm hiệu quả sinh trưởng. Tuy nhiên, trong giai đoạn này, biểu hiện rõ rệt nhất về tác động của nấm rễ ngoại cộng sinh đối với thông con 6 tháng tuổi chính là tỷ lệ sống của cây con đạt 100%

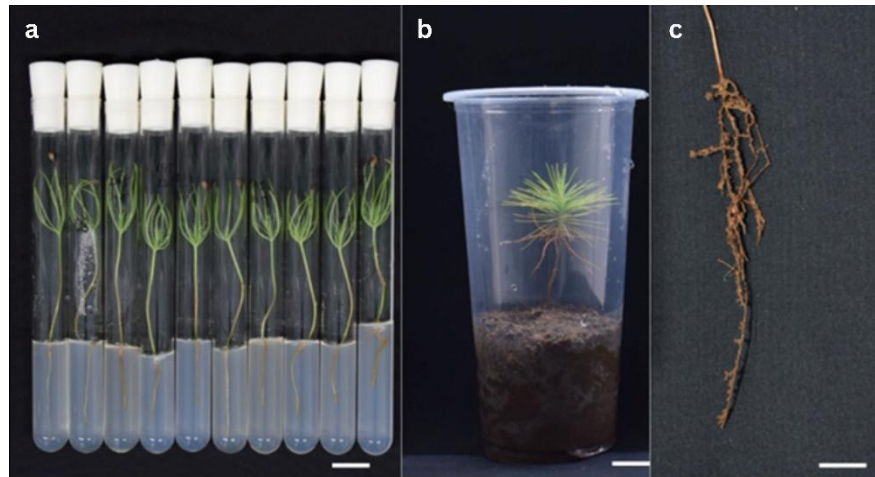
trong vườn ươm, đồng thời khả năng thích nghi và phát triển tốt sau khi đưa ra khu vực rừng trồng. Các kết quả này đã được thể hiện qua mục 3.1.3. Tương tự từ kết quả của nghiên cứu của Domínguez-Núñez và cs. cũng thấy rằng sự cộng sinh của nấm ngoại cộng sinh làm giảm chiều cao và đường kính của cây con cộng sinh. Tuy nhiên, sự bổ sung nấm rễ ngoại cộng sinh vào giai đoạn này làm cải thiện đáng kể khả năng hấp thụ nito trên giá thể nghèo dinh dưỡng [97].



Hình 3.30. Số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trong các nhóm cây (a) theo tỷ lệ kiểu hình (b) theo chiều cao cây trong thí nghiệm *in situ*

3.2.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nấm ngoại cộng sinh tới khả năng phát triển của cây thông con *P. kesiya* trong điều kiện *ex situ*

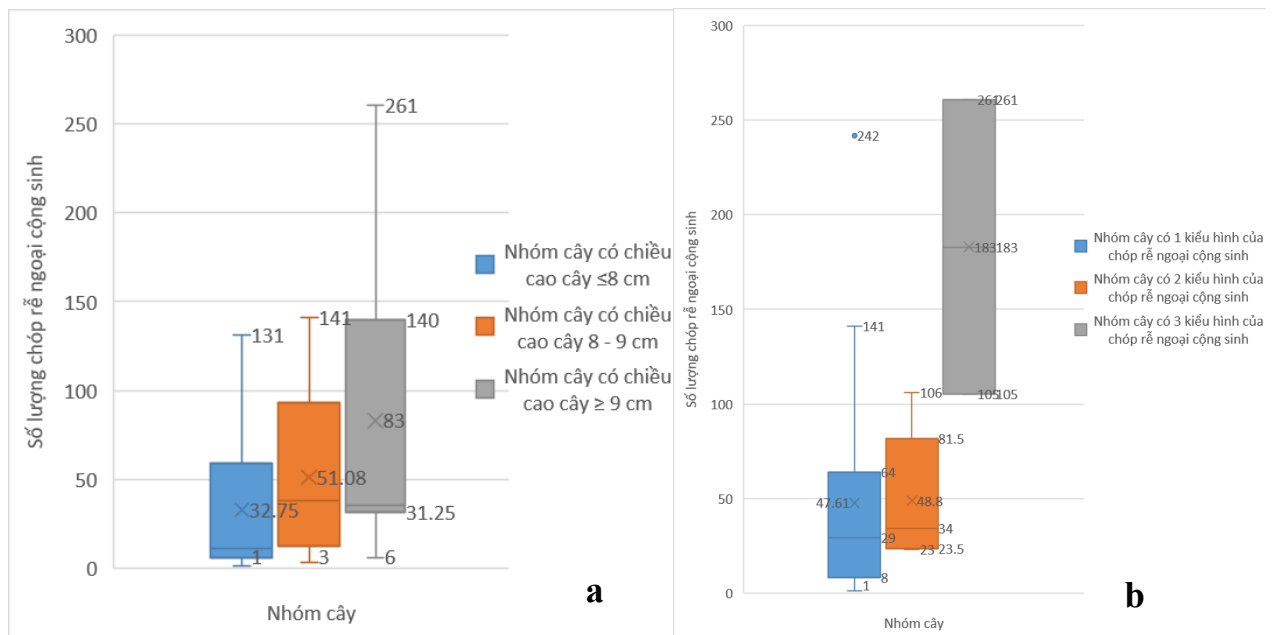
Với những cây con thông ba lá *P. kesiya* được nuôi trồng trong điều kiện *ex situ*, hạt trước khi gieo đã được xử lý vô trùng và loại bỏ các hạt đã nảy mầm nhưng có dấu hiệu nhiễm mốc và vi khuẩn (Hình 3.31). Sau thời gian 3 tuần tuổi, cây con mới được tiếp xúc với hệ nấm rễ ngoại cộng sinh trong đất. Điều này khác với các cây con trong thí nghiệm *in situ* ở mục 3.2.1, do chưa trải qua quá trình khử trùng hạt nên toàn bộ hệ vi sinh vật của hạt (seed biome) vẫn được giữ nguyên, hạt tiếp xúc với các mầm nấm rễ ngoại cộng sinh ngay từ giai đoạn nảy mầm. Trong điều kiện đó, khả năng cạnh tranh và thiết lập liên kết cộng sinh của các loài nấm ngoại cộng sinh được thể hiện rõ.



Hình 3.31. Cây con thông ba lá trong thí nghiệm nuôi trồng *ex situ*, bar 2cm

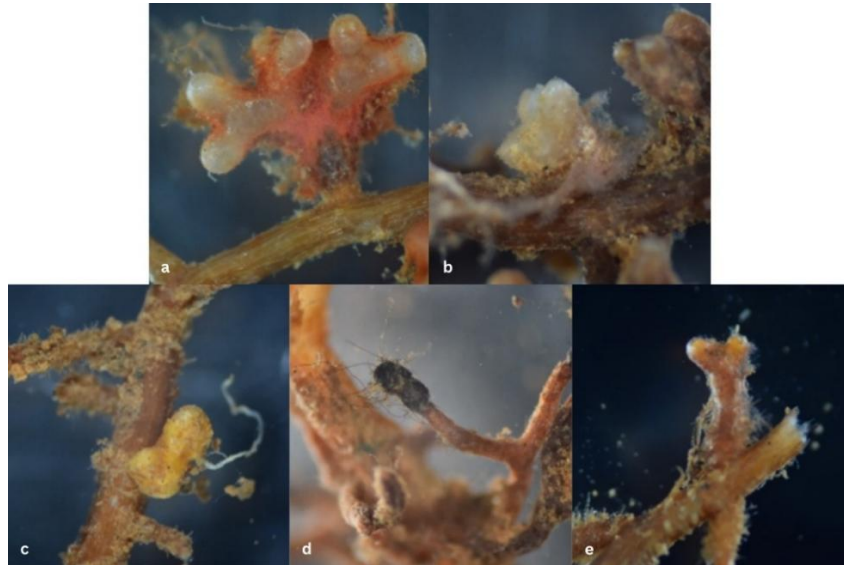
(a) Cây con 3 tuần tuổi trong ống nghiệm vô trùng; (b) cây con 6 tháng tuổi trong ly ươm; (c) hệ rễ cây con 6 tháng tuổi sau khi làm sạch đất

Kết quả sau 6 tháng nuôi cây cho thấy 100% hệ rễ của các cây con đều hình thành các cấu trúc chóp rễ nấm ngoại cộng sinh. Trong đó, 76,7% cây chỉ ghi nhận được 1 kiểu hình của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh, 16,7% cây ghi nhận được 2 kiểu hình và 6,7% các cây có 3 kiểu hình thái trên cùng 1 hệ rễ. Số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh và số kiểu hình thái tương ứng với các nhóm chiều cao cây được thể hiện ở hình 3.32.



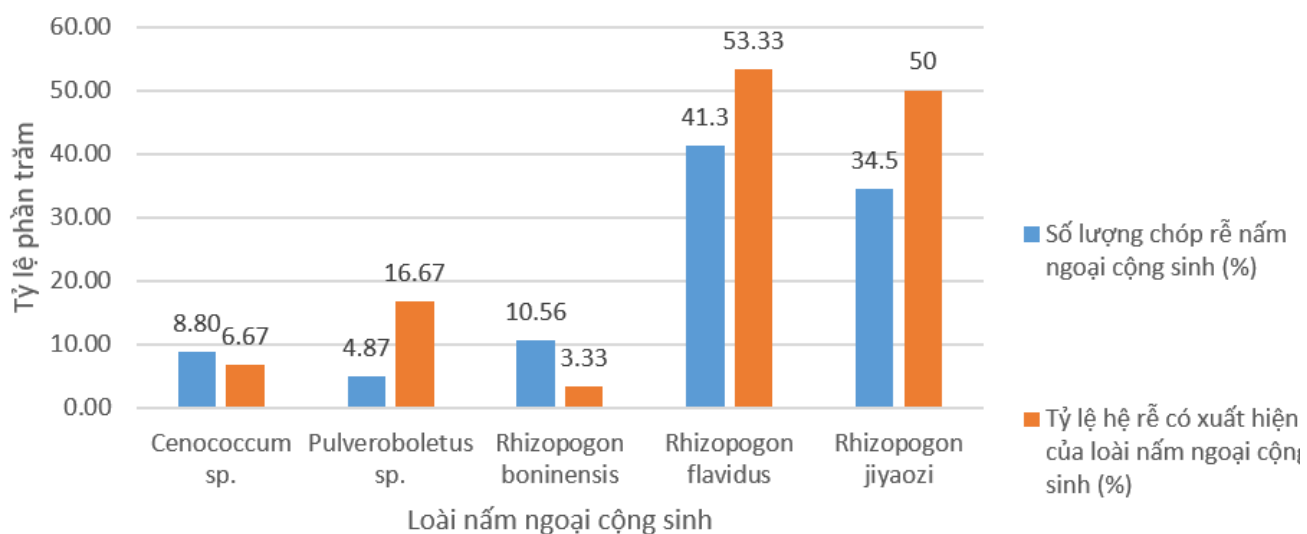
Hình 3.32. Số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh theo chiều cao cây (a) và số chóp rễ ngoại cộng sinh trong mỗi nhóm kiểu hình (b) trong thí nghiệm *ex situ*

Kết quả mô tả hình thái và giải trình tự các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở hệ rễ cây con thông ba lá 3 năm tuổi cho thấy có 5 loài nấm thuộc 3 chi nấm ngoại cộng sinh xuất hiện ở giai đoạn này (Hình 3.33).



Hình 3.33. Chóp rễ nấm ngoại cộng sinh của các loài (a) *Rhizopogon flavidus*; (b) *R. jiyaozi*; (c) *Pluveroboletus* sp.; (d) *Cenococcum* sp. và (e) *R. boninensis*

Tuy nhiên, cũng tương tự như những kết quả thu được từ thí nghiệm *in situ*, không có sự tương quan rõ ràng nào giữa sự đa dạng về thành phần loài nấm ngoại cộng sinh thông qua số lượng loài nấm ngoại cộng sinh và số lượng chóp rễ ngoại cộng sinh trên cùng một cây với chiều cao cây.



Hình 3.34. Sự phong phú của các loài nấm ngoại cộng sinh trong hệ rễ cây thông ba lá trong nghiên cứu *ex situ*

Phân tích hình thái kết hợp với dữ liệu sinh học phân tử cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về thành phần nấm ngoại cộng sinh giữa hai điều kiện thí nghiệm *in situ* và *ex situ*. Tổng số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được trong thí nghiệm *in situ* cao hơn rõ rệt, gấp khoảng 6,7 lần so với thí nghiệm *ex situ*, cho thấy mức độ hình thành cộng sinh trong điều kiện tự nhiên cao hơn đáng kể so với điều kiện có kiểm soát. Đồng thời trong điều kiện *ex situ*, phần lớn các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh được xác định thuộc chi *Rhizopogon*, chiếm 86,3% tổng số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh quan sát được, trong khi chi *Cenococcum* chỉ chiếm 6,67% (Hình 3.34). Các chi nấm này cũng được ghi nhận trong hệ rễ của cây con 6 tháng tuổi trong điều kiện *in situ*, tuy nhiên với tỷ lệ thấp hơn đáng kể, lần lượt là 10,1% và 3,5%. Ngược lại, trong điều kiện *in situ*, chi nấm *Nothojafnea* chiếm ưu thế với tỷ lệ lên đến 84,9% tổng số chóp rễ nấm ngoại cộng sinh, nhưng không được ghi nhận trong mẫu *ex situ*. Sự phân bố này cho thấy sự khác biệt rõ rệt về thành phần loài và độ đa dạng của nấm rễ ngoại cộng sinh giữa hai điều kiện thí nghiệm. Sự khác biệt về thành phần và tỷ lệ xuất hiện của các chi nấm ngoại cộng sinh giữa điều kiện *in situ* và *ex situ* phản ánh ảnh hưởng mạnh mẽ của môi trường cũng như khả năng thiết lập cộng sinh của các chi nấm đối với cây chủ. *Rhizopogon* và *Cenococcum* đều xuất hiện ở cả hai điều kiện *in situ* và *ex situ* cho thấy đây là những chi nấm có khả năng cạnh tranh cao, thích nghi tốt với điều kiện tự nhiên và dễ dàng thiết lập mối quan hệ cộng sinh với cây chủ. Điều này đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu trước đây khi mà các chi nấm này thường được ghi nhận là những loài tiên phong, có khả năng xâm nhiễm nhanh và hình thành chóp rễ hiệu quả trong các hệ sinh thái rừng [44, 171, 195, 196]. Từ đó cũng cho thấy rằng đây là hai chi nấm tiềm năng để sử dụng như là nguồn gây nhiễm hiệu quả để bổ sung cho cây con trong vườn ươm, giúp tăng khả năng phát triển và duy trì sức sống trước và sau khi chuyển cây ra khu vực rừng trồng.

Ngược lại, sự hiện diện phong phú của chi *Nothojafnea* trong điều kiện *ex situ* nhưng vắng mặt trong các cây con ở nghiệm thức *in situ* là một kết quả đáng chú ý. Điều này có thể là kết quả của quá trình xử lý vô trùng hạt trước khi gieo đã làm mất hệ vi sinh vật của hạt, nơi có chứa nhiều mầm nấm *Nothojafnea*. Trong môi trường tự nhiên, chi nấm này có khả năng thích nghi cao và dễ dàng bùng phát, từ đó cạnh tranh xâm nhiễm với các chi nấm rễ cộng sinh khác trong cùng môi trường.

Từ các kết quả trên, có thể thấy được 100% các cây con thông ba lá đều dễ dàng hình thành cấu trúc ngoại cộng sinh khi có sẵn các mầm nấm ngoại cộng sinh tồn tại sẵn trong môi trường. Mặc dù do thời gian thực hiện nghiên cứu ngắn (6 tháng), các tác động của nấm ngoại cộng sinh chưa thể hiện rõ rệt đến sự sinh trưởng và phát

triển của cây con. Tuy nhiên sự hiện diện của các loài nấm ngoại cộng sinh đã được chứng minh là có khả năng duy trì sự tồn tại của cây con sau khi đưa ra môi trường tự nhiên của rừng trồng.

3.2.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nấm ngoại cộng sinh tới khả năng phát triển của cây con thông ba lá *P. kesiya* trong điều kiện *in vitro*

Nhằm kiểm tra khả năng xâm nhiễm và hình thành cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh, đồng thời đánh giá tác động của nấm ngoại cộng sinh đến khả năng phát triển của cây con thông ba lá *P. kesiya*, thí nghiệm đồng nuôi cấy được tiến hành trong điều kiện vô trùng.

Chủng nấm được lựa chọn để tiến hành đồng nuôi cấy với cây con thông ba lá dựa trên các tiêu chí:

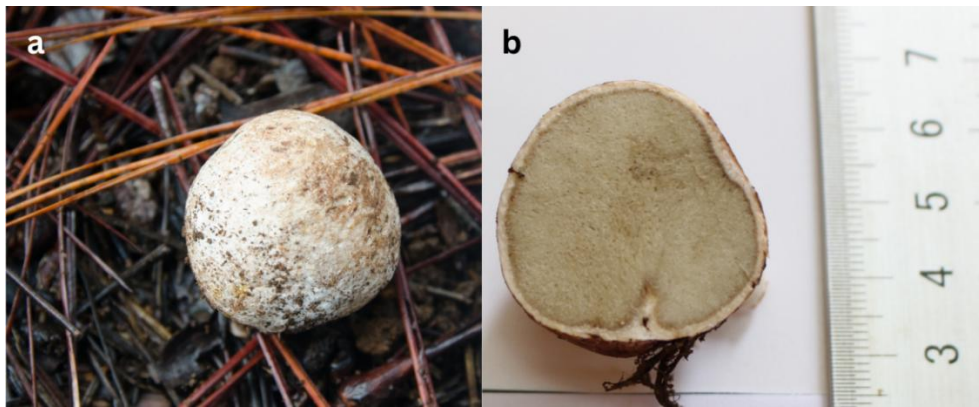
- Là loài nấm bản địa, hiện diện ở khu vực nghiên cứu và có khả năng hình thành cấu trúc rễ nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ của cây thông ba lá *P. kesiya*.
- Chiếm ưu thế trong giai đoạn cây con, thể hiện được tiềm năng hình thành cộng sinh ngay từ giai đoạn sinh trưởng ban đầu của cây.
- Có khả năng phân lập, nuôi cấy thuần và phát triển ổn định trên môi trường nhân tạo.

Từ các kết quả ở nội dung trên của nghiên cứu, chi nấm *Rhizopogon* là một trong hai chi nấm duy nhất xuất hiện ở mẫu chóp rễ trong cả 3 giai đoạn phát triển của cây thông ba lá và trong cả mẫu đất với tỷ lệ tương đối cao, đặc biệt là ở giai đoạn cây con. Các nghiên cứu trên thế giới cũng cho thấy đây là chi nấm đóng vai trò quan trọng trong việc tái sinh và nâng cao tỷ lệ sống của cây thông con [93, 189]. Vì vậy, nhiều mô hình xâm nhiễm đã được thực hiện nhằm gây nhiễm chi nấm này vào giá thể trồng cây con trong vườn ươm trước khi đem ra ngoài thực địa, qua đó đánh giá tỷ lệ sống và hiệu quả sinh trưởng của cây sau khi chuyển ra rừng [92, 170, 190, 191, 197]. Đồng thời, nhiều chế phẩm sinh học có chứa nấm rễ cộng sinh được bán và sử dụng rộng rãi trên thế giới, trong thành phần đều bao gồm các chủng nấm *Rhizopogon* spp.

Đề tài đã thử tiến hành phân lập các chủng nấm ngoại cộng sinh tiềm năng từ các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được. Tuy nhiên, trong quá trình phân lập, do chóp rễ tiếp xúc trực tiếp với đất nên mang nhiều nguồn tạp nhiễm, việc khử trùng bề mặt nếu không đủ sẽ dễ dàng nhiễm vi sinh vật ngoại lai lấn át sự phát triển của nấm ngoại cộng sinh. Ngược lại nếu khử trùng quá mạnh sẽ làm chết mô rễ và hệ sợi nấm

bên trong khiến nấm không mọc được trên môi trường phân lập. Vì vậy việc phân lập nấm từ mẫu chóp rễ ngoại cộng sinh gặp thất bại.

Tuy vậy, trong quá trình thu mẫu đất ở rừng thông ba lá trưởng thành, mẫu quả thể nấm *Rhizopogon boninensis* đã được tìm thấy (Hình 3.35). Mẫu nấm sau khi thu được ký hiệu VNM00071130, tiến hành định danh hình thái và sinh học phân tử. Kết quả định danh sinh học phân tử được lưu trữ trên cơ sở dữ liệu NCBI với mã số truy cập PP748446.

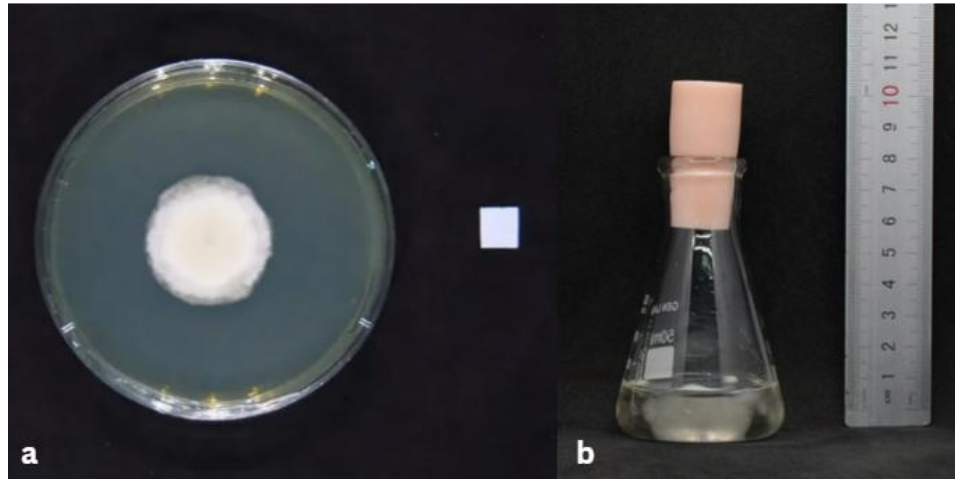


Hình 3.35. Quả thể nấm *R. boninensis* VNM00071130 thu tại rừng trưởng thành khu vực Đa Nhim (a) và mặt cắt dọc của quả thể (b)

3.2.3.1. Kết quả phân lập và nuôi nhân sinh khối chủng nấm *Rhizopogon boninensis* VNM00071130

Chủng nấm *R. boninensis* VNM00071130 cho thấy khả năng phân lập dễ dàng trên môi trường MMN, tuy nhiên tốc độ lan tơ khá chậm. Sau 3 tuần nuôi cấy ở nhiệt độ 25 °C, đường kính khuẩn lạc nấm đạt khoảng 3 – 3,2 cm trên đĩa thạch MMN. Khuẩn lạc nấm có tơ màu trắng, dày và hơi bông trên bề mặt (Hình 3.36a). Các mẫu nấm thuần sau đó được cấy giữ giống trong ống thủy tinh nắp vặn chứa môi trường MMN và giữ ở 4 °C cho đến khi sử dụng.

Để tiến hành nhân sinh khối cho thí nghiệm đồng nuôi cấy, mẫu nấm thuần *R. boninensis* sau đó được hoạt hóa lại 1 lần trên môi trường thạch MMN. Tiếp theo chuyển sang nuôi lỏng tĩnh ở 25 °C trong tối trong vòng 4 tuần (Hình 3.36b).



Hình 3.36. Khuẩn lạc nấm *R. boninensis* VNM00071130 phân lập trên môi trường MMN sau 3 tuần (a) và sinh khối nấm nuôi trên môi trường MMN lỏng sau 4 tuần (b)

3.2.3.2. Kết quả thí nghiệm đồng nuôi cây *R. boninensis* và *P. kesiya*

Để đánh giá khả năng hình thành cộng sinh và tiềm năng ứng dụng làm chế phẩm sinh học của chi nấm *Rhizopogon* trên đối tượng thông ba lá trong điều kiện nuôi trồng tại Việt Nam, đề tài đã tiến hành thực hiện thí nghiệm đồng nuôi cây *R. boninensis* với cây thông con ba lá trong điều kiện *in vitro*, nghiệm thức đối chứng là nghiệm thức không bổ sung nấm vào bình nuôi cây (Hình 3.37 và Hình 3.38).



Hình 3.37. Nghiệm thức không bổ sung *R. boninensis* và *P. kesiya* sau (a) 1 tuần; (b) 6 tuần; (c) 12 tuần; Bar 1 cm



Hình 3.38. Nghiệm thức đồng nuôi cây *R. boninensis* và *P. kesiya* sau (a) 1 tuần; (b) 6 tuần; (c) 12 tuần; Bar 1 cm

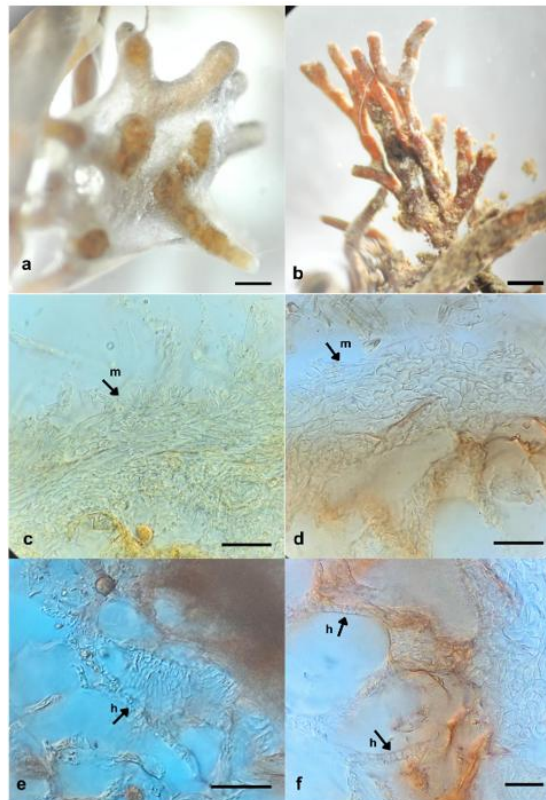
Sau 12 tuần nuôi cây (Hình 3.38), kết quả cho thấy 100% các cây con được gây nhiễm với chủng *R. boninensis* đều hình thành cấu trúc ngoại cộng sinh ở rễ, trong khi đó tỷ lệ này là 0% ở các cây con không được bổ sung nấm. Sự hiện diện của các chóp rễ ngoại cộng sinh được quan sát và đếm dưới kính hiển vi soi nổi và mô tả theo Agerer (1987–2012) (Hình 3.39).



Hình 3.39. Thí nghiệm đồng nuôi cây *R. boninensis* và *P. kesiya*

a. Cây con ở nghiệm thức không bổ sung R. boninensis. b–c. Hệ rễ của P. kesiya ở nghiệm thức không bổ sung R. boninensis. d. Cây con ở nghiệm thức có bổ sung R. boninensis sau 12 tuần. d–e. Hệ rễ của P. kesiya ở nghiệm thức có bổ sung R. boninensis sau 12 tuần. Bar: a–b, d–e 1 cm; c–f 1 mm.

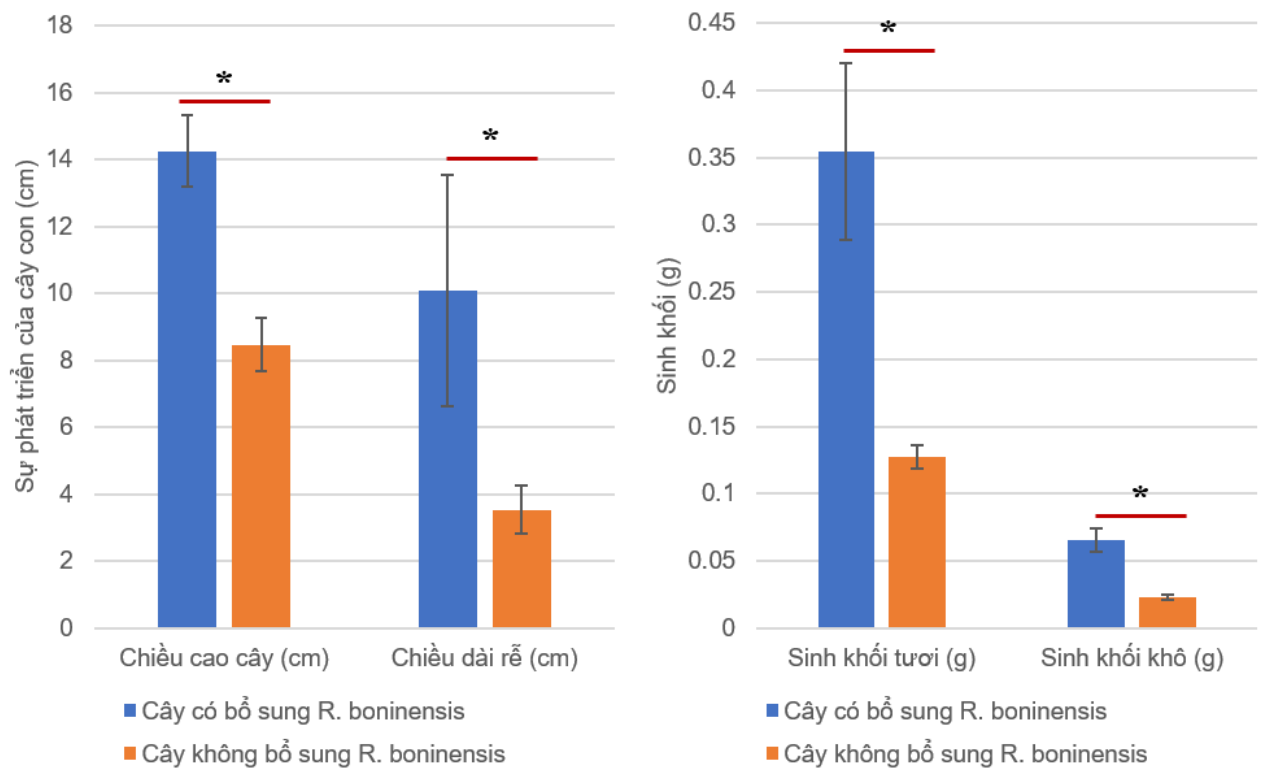
Các mô tả hình thái của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh thu được từ thí nghiệm đồng nuôi cấy cho thấy có sự tương đồng cao với các chóp rễ nấm ngoại cộng sinh của loài này được thu nhận từ môi trường rừng tự nhiên (Hình 3.40a, b). Các chóp rễ ngoại cộng sinh có dạng không phân nhánh hoặc phân nhánh đôi, hình trụ, thẳng hoặc hơi cong, phình to, bề mặt nhẵn, phần đỉnh của chóp rễ trong suốt. Hệ sợi nấm bên ngoài dày đặc, tạo thành lớp bao có cấu trúc dạng lưới như cotton bao xung quanh đầu rễ, màu trắng xám đến trắng ngả vàng. Các chóp rễ trưởng thành thường mảnh, có màu nâu vàng với lớp bao khá mỏng màu trắng bạc. Sự hiện diện của sợi nấm dạng rễ không rõ ràng. Phân tích mặt cắt ngang của chóp rễ cho thấy lớp bao có dạng plectenchymatous gồm các sợi nấm hình trụ sắp xếp không đều, thuộc kiểu hình B theo mô tả của Agerer (Hình 3.40c, d). Không thấy xuất hiện mấu nối ở hệ sợi nấm, tại vị trí vách ngăn đôi khi có sự thắt eo nhẹ hoặc không. Mạng lưới Hartig kiểu palmetti phát triển mạnh trong cấu trúc rễ (Hình 3.40e, f).



Hình 3.40. Cấu trúc cộng sinh của hệ rễ *P. kesiya* và *R. boninensis*

(a) Chóp rễ nấm ngoại cộng sinh của *P. kesiya* với *R. boninensis* trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*; (b) Chóp rễ nấm ngoại cộng sinh từ rừng *P. kesiya* trưởng thành; (c–f) Mặt cắt ngang của chóp rễ cộng sinh: c Lóp bao của chóp rễ cộng sinh trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*; d Lóp bao của chóp rễ cộng sinh từ rừng trưởng thành *P. kesiya*; (e, f) Mạng lưới Hartig của chóp rễ nấm ngoại cộng sinh trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Bar: a = 0,5 mm, b = 1 mm, c–d = 20 μ m, e–f = 10 μ m

Kết quả phân tích các chỉ số sinh trưởng của mẫu cây con thông ba lá bao gồm chiều cao cây, chiều dài rễ, khối lượng sinh khối tươi và khối lượng sinh khối khô cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nghiệm thức có và không có bổ sung chủng nấm *R. Boninensis* (Hình 3.41). Cụ thể, những cây con được bổ sung nấm sau 12 tuần phát triển trong điều kiện *in vitro* có chiều cao cây tăng hơn hẳn 1,7 lần so với những cây không được bổ sung nấm ($14,25 \pm 1,07$ so với $8,46 \pm 0,80$, $p < 0,001$), tỷ lệ chiều dài rễ ở hai nhóm khác biệt 2,9 lần ($10,08 \pm 3,44$ so với $3,53 \pm 0,72$, $p < 0,001$). Khối lượng sinh khối tươi và sinh khối khô của cây lần lượt đạt $0,35 \text{ g} \pm 0,07$ so với $0,13 \text{ g} \pm 0,009$ và $0,07 \text{ g} \pm 0,008$ so với $0,02 \text{ g} \pm 0,002$. Mặc dù tỷ lệ sống sót của cây con đạt 100% ở cả hai nghiệm thức, sự khác biệt đáng kể về đặc điểm sinh trưởng và tích lũy sinh khối cho thấy loài *R. boninensis* có hiệu quả trong việc thúc đẩy sự phát triển của cây con *P. kesiya*. Kết quả của đề tài cho thấy sự tương đồng với nhiều nghiên cứu xâm nhiễm khác khi sử dụng chi nấm *Rhizopogon* với như là một nguồn chế phẩm sinh học để cải thiện sức sống của nhiều loài thông trên thế giới. Nghiên cứu tương tự của Domínguez-Núñez và cs. khi xâm nhiễm *R. roseolus* trên đối tượng cây con *P. halepensis* cho thấy tỷ lệ xâm nhiễm của *R. roseolus* chỉ đạt 42%, nhưng khối lượng khô của rễ có sự tăng lên 1,3 lần ở những cây con có nấm rễ cộng sinh so với cây con trong nhóm đối chứng [190]. Ngoài ra, khi bổ sung một hỗn hợp các loại nấm rễ ngoại cộng sinh trong đó có *Rhizopogon* sp. vào cây con *P. pinaster*, Franco và cs. thu được kết quả khác biệt 1,5 lần giữa hai nhóm cây có và không bổ sung nấm. Đồng thời, *Rhizopogon* sp. cũng được phát hiện trong nhiều giai đoạn lấy mẫu, điều này cho thấy chúng có khả năng tồn tại bền vững trong vùng rễ ngay cả sau khi được đưa ra trồng ngoài thực địa [120]. Trong điều kiện hạn hán, nghiên cứu của Atala và cs. chỉ ra rằng việc bổ sung *R. luteolus* vào *P. radiata* làm gia tăng đáng kể tỷ lệ sống sót của cây con. Từ đó cho thấy việc bổ sung nấm rễ ngoại cộng sinh có thể là một chiến lược khả thi để đối phó với các đợt hạn hán kéo dài hay trồng rừng thông ở các khu vực khô hạn [163].



Hình 3.41. Sự khác biệt về các chỉ số sinh trưởng của cây con *P. kesiya* giữa các nghiệm thức có và không bổ sung nấm *R. boninensis*

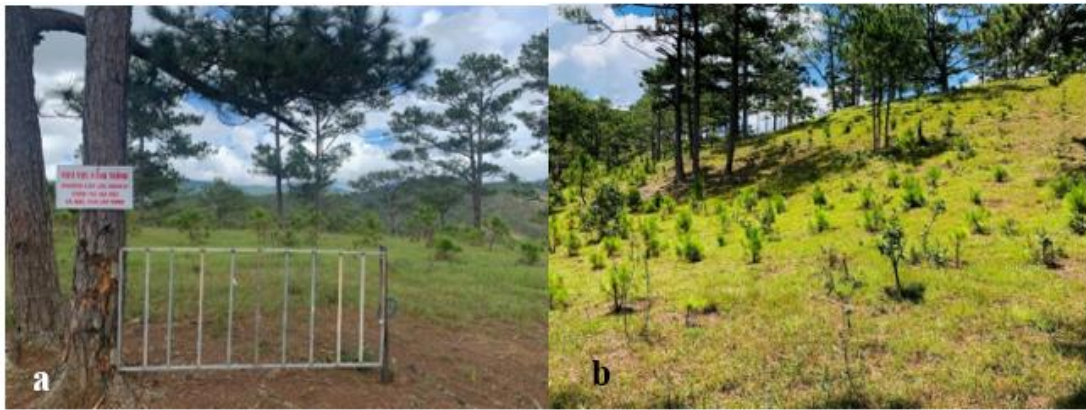
Dấu sao (*) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nghiệm thức được xác định bằng kiểm định *t*-test ($p < 0,05$).

Những kết quả trên cho thấy khả năng nuôi cấy và xâm nhiễm dễ dàng của chủng nấm *R. boninensis* vào hệ rễ của cây thông con *P. kesiya* trong điều kiện có kiểm soát. Điều này cung cấp các cơ sở khoa học cho việc tuyển chọn và sử dụng chủng nấm này trong thực tiễn sản xuất các chế phẩm sinh học sử dụng trong lâm nghiệp, trước hết là trên đối tượng thông ba lá *P. kesiya*. Ngoài ra, mô hình nuôi trồng *in vitro* được thực hiện trong nghiên cứu có thể được mở rộng để khảo sát khả năng hình thành quan hệ cộng sinh giữa nhiều loài nấm và thực vật khác nhau. Trên cơ sở đó, mô hình có thể hỗ trợ quá trình tuyển chọn các chủng nấm có hiệu quả cộng sinh cao, làm cơ sở để nghiên cứu, phát triển và hoàn thiện các chế phẩm sinh học chứa tổ hợp nấm ngoại cộng sinh có thể sử dụng được trên nhiều đối tượng cây trồng lâm nghiệp.

3.3. KẾT QUẢ KHẢO SÁT SỰ HÌNH THÀNH QUẢ THỂ NẤM NGOẠI CỘNG SINH Ở KHU VỰC RỪNG TRỒNG CÂY THÔNG CON *P. kesiya* 3 NĂM TUỔI

3.3.1. Kết quả thu thập quả thể nấm ngoại cộng sinh

Khu vực nghiên cứu có địa hình đồi dốc, trống, nằm liền kề với khu vực rừng thông ba lá *Pinus kesiya* tự nhiên lâu năm thuộc Rừng phòng hộ Đa Nhim. Bên trong rừng trồng có sẵn rải rác các cây thông ba lá trưởng thành, ít cây bụi (Hình 3.42).



Hình 3.42. Hình ảnh tại khu vực nghiên cứu: (a) từ ngoài nhìn vào; (b) bên trong

Quá trình thu thập quả thể nấm ngoại cộng sinh được thực hiện khi rừng trồng *Pinus kesiya* được 3 năm tuổi (Hình 3.43) bắt đầu từ tháng 04/2022 đến tháng 05/2023 với 24 đợt thu mẫu.



Hình 3.43. Quả thể nấm ngoại cộng sinh ở rừng trồng thông ba lá 3 năm tuổi

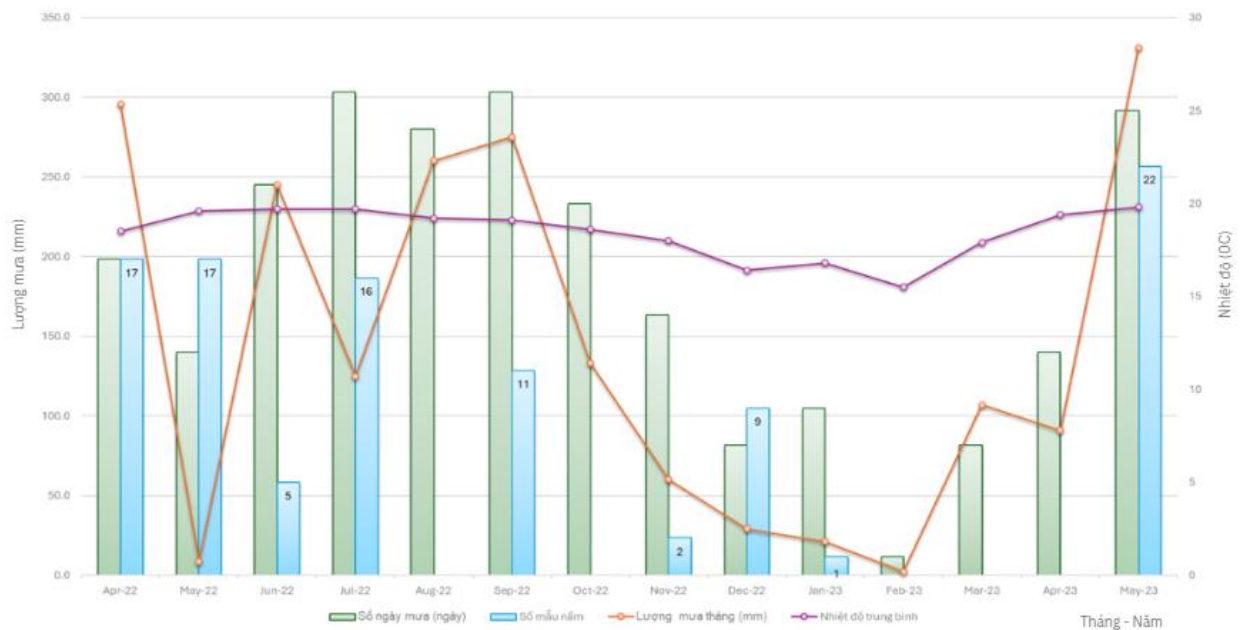
Trong cùng một đợt thu mẫu, các quả thể nấm ngoại cộng sinh có đặc điểm hình thái đại thể ngoài giống nhau được xếp vào cùng một mã kiểu hình. Tổng số mã kiểu hình thu được qua 22 đợt thu mẫu là 103 mã. Số lượng quả thể nấm ngoại cộng sinh trong từng mã mẫu của từng đợt thu mẫu và khối lượng tươi của chúng được trình bày tại bảng 3.6.

Bảng 3.6. Thống kê quả thể nấm ngoại cộng sinh thu được tại khu vực rừng trồng trong 24 đợt thu mẫu

Đợt thu mẫu	Mã kiểu hình	Số lượng quả thể nấm ngoại cộng sinh	Tổng khối lượng tươi (g)
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	ABI-V-AA07001	5	53,04
	ABI-V-AA07003	2	8,31
	ABI-V-AA07004	3	127,03
	ABI-V-AA07006	2	137,95
	ABI-V-AA07007	2	5,59
	ABI-V-AA07008	1	4,06
	ABI-V-AA07009	18	2,56
	ABI-V-AA07010	1	4,31
	ABI-V-AA07011	1	4,48
	ABI-V-AA07014	1	40,5
	ABI-V-AA07015	1	0,86
	ABI-V-AA07016	2	4,54
	ABI-V-AA07017	3	2,61
	ABI-V-AA07018	3	69,92
	ABI-V-AA07019	1	3,74
	ABI-V-AA07020	2	29,5
	ABI-V-AA07023	3	73,23
8	ABI-V-AA08101	1	82,44
	ABI-V-AA08102	2	3,04
	ABI-V-AA08103	4	61,36
	ABI-V-AA08104	1	23,81
	ABI-V-AA08105	1	10,95
	ABI-V-AA08201	3	2,41
	ABI-V-AA08203	1	1,86
	ABI-V-AA08301	6	11,35
9	ABI-V-AA09101	1	27,82

Đợt thu mẫu	Mã kiểu hình	Số lượng quả thể nằm ngoài cộng sinh	Tổng khối lượng tươi (g)
	ABI-V-AA09102	3	165,6
	ABI-V-AA09103	5	22,22
	ABI-V-AA09104	3	45,5
	ABI-V-AA09105	13	43,56
	ABI-V-AA09106	8	120,2
	ABI-V-AA09201	2	20,82
	ABI-V-AA09302	1	70,13
	ABI-V-AA09303	8	2,54
10	ABI-V-AA10102	3	14,22
11	ABI-V-AA11101	2	1,6
	ABI-V-AA11103	3	0,6
	ABI-V-AA11104	2	4,2
	ABI-V-AA11201	10	8
12	ABI-V-AA12102	3	6,33
	ABI-V-AA12103	3	2,7
	ABI-V-AA12104	8	41,9
	ABI-V-AA12105	1	9,29
	ABI-V-AA12106	5	31,05
	ABI-V-AA12107	1	10,72
	ABI-V-AA12108	1	4,74
	ABI-V-AA12109	1	0,19
13	ABI-V-AA13101	1	3,35
	ABI-V-AA13102	2	15,36
	ABI-V-AA13105	2	34,96
	ABI-V-AA13106	2	0,32
	ABI-V-AA13201	5	15,2
	ABI-V-AA13202	1	3,76
	ABI-V-AA13203	1	95,62
	ABI-V-AA13301	9	5,09
14	-	-	-
15	-	-	-
16	ABI-V-AA16101	2	26,43
	ABI-V-AA16102	1	1,91
	ABI-V-AA16103	7	2,38
	ABI-V-AA16301	1	3,52
17	ABI-V-AA17101	4	39,14
	ABI-V-AA17102	4	52,64
	ABI-V-AA17201	1	5,22
	ABI-V-AA17202	3	36,72
	ABI-V-AA17203	1	11,65
	ABI-V-AA17205	3	45,29
	ABI-V-AA17301	2	11,24

Đợt thu mẫu	Mã kiểu hình	Số lượng quả thể nấm ngoại cộng sinh	Tổng khối lượng tươi (g)
18	-	-	-
19	ABI-V-AA19101	1	3,5
	ABI-V-AA19102	2	22,74
20	ABI-V-AA20101	5	22,31
	ABI-V-AA20102	21	151,28
	ABI-V-AA20103	5	20
	ABI-V-AA20104	6	17,27
	ABI-V-AA20105	1	14,91
	ABI-V-AA20106	1	1,8
21	ABI-V-AA21101	1	1,8
	ABI-V-AA21102	5	2,45
	ABI-V-AA21103	1	4,12
	ABI-V-AA21301	3	55,52
22	ABI-V-AA22101	5	8
23	ABI-V-AA23101	6	153
	ABI-V-AA23102	1	5
	ABI-V-AA23103	1	9
	ABI-V-AA23104	1	1
	ABI-V-AA23105	16	137,48
	ABI-V-AA23106	1	16
	ABI-V-AA23107	2	6
	ABI-V-AA23108	1	7
	ABI-V-AA23110	9	33
	ABI-V-AA23111	1	11
	ABI-V-AA23112	1	11
	ABI-V-AA23113	1	6
	ABI-V-AA23114	1	10
	ABI-V-AA23201	1	20
	ABI-V-AA23203	8	32
	ABI-V-AA23204	1	3
	ABI-V-AA23205	2	1
	ABI-V-AA23206	1	4
	ABI-V-AA23207	1	27
	ABI-V-AA23301	1	70
	ABI-V-AA23302	1	11
	ABI-V-AA23303	1	3
24	ABI-V-AA24101	1	31
	ABI-V-AA24102	1	9
	ABI-V-AA24103	1	5,2



Hình 3.44. Tương quan giữa lượng mưa, số ngày mưa trong tháng, nhiệt độ và lượng nấm thu được

Hình 3.44 thể hiện số lượng mẫu kiểu hình nấm ngoại cộng sinh thu được theo các tháng, qua đó cho thấy số lượng mẫu kiểu hình nấm thu được không đồng đều. Các tháng 4, 5, 7/2022 và tháng 5/2023 thu được nhiều mẫu kiểu hình nấm nhất. Riêng các tháng 8, 10/2022 và tháng 2-4/2023 không thu được mẫu nấm nào. Các dữ liệu về thời tiết tại khu vực Lạc Dương – Đà Lạt cho thấy nhiệt độ biến động không nhiều trong giai đoạn thu mẫu, trong khi lượng mưa của các tháng có khác biệt đáng kể. Các mẫu nấm chủ yếu được thu nhiều vào các tháng mùa mưa trong năm. Tuy nhiên, những tháng mưa dầm (lượng mưa cao và số ngày mưa trong tháng nhiều) thường ít thu được nấm. Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu về nấm rừng tại các khu vực khác trên thế giới. Theo Collado và cộng sự, sản lượng và thành phần loài nấm hình thành quả thể phụ thuộc chặt chẽ bởi lượng mưa và có mối tương quan yếu hơn đối với nhiệt độ [198]. Tại các khu vực rừng thông ở Nauy, Tây Ban Nha, một số nước ở khu vực Trung Âu và Địa Trung Hải, Zimbabwe hay Trung Quốc và Nhật Bản, các kết quả điều tra nghiên cứu về sự ảnh hưởng của các điều kiện thời tiết đến sự hình thành quả thể và sản lượng một số loài nấm rễ ngoại cộng sinh cũng cho thấy mối tương quan chặt chẽ với lượng mưa [59, 199–203].

3.3.2. Kết quả phân nhóm sơ bộ dựa trên hình thái

Toàn bộ 103 mẫu kiểu hình của nấm ngoại cộng sinh thu được qua 24 đợt thu mẫu đều được mô tả hình thái đại thể tại thực địa trước khi đem về phòng thí nghiệm.

Sau đó, dựa trên kết quả tổng hợp từ các bảng mô tả, có 49 kiểu hình của nấm ngoại cộng sinh được tìm thấy ở khu vực rừng trồng thông ba lá *P. kesiya* 3 năm tuổi tương ứng:

- Kiểu hình thái 1 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07014, ABI-V-AA09302
- Kiểu hình thái 2 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23303
- Kiểu hình thái 3 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07023, ABI-V-AA08104, ABI-V-AA09101, ABI-V-AA23207
- Kiểu hình thái 4 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07008, ABI-V-AA07011, ABI-V-AA09103, ABI-V-AA12106
- Kiểu hình thái 5 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23302, ABI-V-AA12104, ABI-V-AA20105, ABI-V-AA24101
- Kiểu hình thái 6 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA16102, ABI-V-AA17201, ABI-V-AA23103, ABI-V-AA23108, ABI-V-AA23113
- Kiểu hình thái 7 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA08101, ABI-V-AA21301
- Kiểu hình thái 8 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23302
- Kiểu hình thái 9 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07020, ABI-V-AA09104, ABI-V-AA17203, ABI-V-AA23111
- Kiểu hình thái 10 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07010
- Kiểu hình thái 11 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA12108
- Kiểu hình thái 12 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA16103
- Kiểu hình thái 13 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA09303, ABI-V-AA23205
- Kiểu hình thái 14 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA13102
- Kiểu hình thái 15 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA08201
- Kiểu hình thái 16 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA08102, ABI-V-AA13106
- Kiểu hình thái 17 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA11101, ABI-V-AA12103
- Kiểu hình thái 18 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA21102
- Kiểu hình thái 19 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA08301, ABI-V-AA13301
- Kiểu hình thái 20 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA11104, ABI-V-AA20104, ABI-V-AA21101
- Kiểu hình thái 21 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA11103
- Kiểu hình thái 22 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA11201
- Kiểu hình thái 23 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA12109
- Kiểu hình thái 24 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA13202
- Kiểu hình thái 25 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23101
- Kiểu hình thái 26 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23203

- Kiểu hình thái 27 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23204
- Kiểu hình thái 28 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23112
- Kiểu hình thái 29 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07007, ABI-V-AA07019, ABI-V-AA08105, ABI-V-AA08203, ABI-V-AA12105, ABI-V-AA13101, ABI-V-AA23106
- Kiểu hình thái 30 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA09201
- Kiểu hình thái 31 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07003
- Kiểu hình thái 32 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23102
- Kiểu hình thái 33 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07001
- Kiểu hình thái 34 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07017
- Kiểu hình thái 35 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07016
- Kiểu hình thái 36 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA16101
- Kiểu hình thái 37 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07015, ABI-V-AA17101, ABI-V-AA17102, ABI-V-AA19101
- Kiểu hình thái 38 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA20103
- Kiểu hình thái 39 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA24103
- Kiểu hình thái 40 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23114
- Kiểu hình thái 41 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA20102, ABI-V-AA21103, ABI-V-AA22101
- Kiểu hình thái 42 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07004, ABI-V-AA07006, ABI-V-AA09102, ABI-V-AA17202, ABI-V-AA20101, ABI-V-AA23301
- Kiểu hình thái 43 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA13203
- Kiểu hình thái 44 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23201
- Kiểu hình thái 45 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07018
- Kiểu hình thái 46 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA09105, ABI-V-AA12102, ABI-V-AA13201, ABI-V-AA16301, ABI-V-AA17301, ABI-V-AA23110, ABI-V-AA23206
- Kiểu hình thái 47 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23104
- Kiểu hình thái 48 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA23107
- Kiểu hình thái 49 gồm các mã kiểu hình: ABI-V-AA07009, ABI-V-AA08103, ABI-V-AA09106, ABI-V-AA10102, ABI-V-AA12107, ABI-V-AA13105, ABI-V-AA17205, ABI-V-AA19102, ABI-V-AA23105, ABI-V-AA24102.

Trong đó:

- Nhóm nấm ngoại cộng sinh có thụ tầng phiến: kiểu hình thái từ 1 – 33 (Bảng 3.7).
- Nhóm nấm ngoại cộng sinh có thụ tầng ống: kiểu hình thái từ 34 – 48 (Bảng 3.8).
- Nhóm nấm ngoại cộng sinh kiểu cục: kiểu hình thái 49 (Bảng 3.9).

3.3.2.1. Nhóm nấm phiến

Bảng 3.7. Bảng mô tả hình thái nấm rễ ngoại cộng sinh thu thập được thuộc nhóm nấm phiến

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
1		Mũ nấm có dạng hình cầu, có màu xám tro, có vảy và phần màu xám, đường kính 3,2 – 4 cm. Phiến nấm màu trắng, xếp dày. Cuống nấm hình trụ, đỉnh tâm, bề mặt có vảy và phần, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 7 – 10 × 2,5 cm. Thịt nấm đặc, có màu trắng.
2		Mũ nấm có dạng lõm rộng đến phẳng, có màu nâu, sậm dần về tâm, bề mặt trơn, rìa mũ dạng răng lược, đường kính 3,5 cm. Phiến nấm có màu trắng hơi xám, xếp dày đặc, phiến đỉnh tự do. Cuống nấm đỉnh tâm, có dạng hình trụ, bề mặt có mụn, kích thước (D × R) 3,5 × 0,5 cm, rỗng ở giữa. Có bao gốc màu trắng, không có vòng. Thịt nấm màu trắng.
3		Mũ nấm có dạng hình cầu, màu xám, trơn nhẵn, đường kính mũ 4 cm. Phiến nấm có màu trắng, xếp dày đặc. Cuống nấm đỉnh tâm, có dạng hình trụ, kích thước (D × R) 9 × 1,2 – 2 cm. Có bao gốc màu trắng, không có vòng. Thịt nấm đặc, có màu trắng.

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
4		Mũ nấm có dạng lồi, màu xám, có vảy sậm màu, đường kính mũ 3,5 cm. Phiến nấm có màu trắng, xếp dày đặc. Cuống nấm dính tâm, có dạng hình trụ, phình ở gốc kích thước (D × R) 3 × 1 – 1,3 cm. Không có bao gốc, không có vòng. Thịt nấm đặc, có màu trắng.
5		Mũ nấm có dạng nón, có màu nâu, bề mặt trơn, rìa mũ dạng răng lược, đường kính 7 cm. Phiến nấm có màu trắng, xếp dày đặc, phiến dính tự do. Cuống nấm dính tâm, có dạng hình trụ, kích thước (D × R) 15 × 1,3 cm, rỗng ở giữa. Có bao gốc màu trắng, không có vòng. Thịt nấm màu trắng.
6		Mũ nấm có dạng nón, có màu xám, bề mặt trơn, rìa mũ dạng răng lược, đường kính 3,7 cm. Phiến nấm có màu trắng, xếp dày đặc, phiến dính tự do. Cuống nấm dính tâm, có dạng hình trụ, rỗng ở giữa kích thước (D × R) 5 × 1,2 cm. Có bao gốc màu trắng, không có vòng. Thịt nấm màu trắng.
7		Mũ nấm có dạng lồi, có màu xám, bề mặt có sợi mịn, rìa mũ dạng rèm, đường kính 6,5 – 8,5 cm. Phiến nấm có màu trắng, xếp dày đặc, phiến dính tự do. Cuống nấm dính tâm, có dạng hình trụ, rỗng ở giữa kích thước (D × R) 5,5 – 8 × 1 – 1,3 cm. Có bao gốc màu trắng, vòng dính ở đỉnh, hướng xuống. Thịt nấm đặc, có màu trắng.

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
8		Mũ nấm có dạng phẳng, màu trắng ngả cam, sậm màu ở tâm, có vảy màu cam hoặc nâu sậm, đường kính mũ 5,5 cm. Phiến nấm có màu trắng, xếp dày đặc. Cuống nấm dính tâm, có dạng hình trụ, hơi phình ở gốc, bề mặt có vảy màu hơn cam, kích thước (D × R) 5 × 0,7 – 1,2 cm . Bao gốc và vòng không rõ ràng. Thịt nấm đặc, có màu trắng hơi cam.
9		Mũ nấm có dạng lồi cho đến phẳng, màu nâu sáng, bề mặt có vảy màu xám đậm, đường kính mũ 4 – 5,5cm. Phiến nấm có màu trắng, xếp dày đặc. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ phình ở gốc, bề mặt có vảy, màu nâu sáng, kích thước (D × R) 4 – 5 × 1 – 1,5 cm. Không có bao gốc. Có vòng dính ở đỉnh, hướng xuống. Thịt nấm đặc, có màu trắng.
10		Mũ nấm có dạng phẳng, màu nâu, bề mặt có sợi mịn, đường kính mũ 5 cm. Phiến nấm có màu trắng, xếp dày đặc. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ hơi cong ở gốc, rỗng ở giữa, kích thước (D × R) 6 × 0,5 cm. Không có bao gốc. Có vòng dính ở giữa, hướng xuống. Thịt nấm có màu trắng.
11		Mũ nấm có dạng phẳng, hơi lõm ở giữa, màu trắng hơi ngả xám, bề mặt nhẵn, đường kính mũ 4 cm. Phiến dính, có màu trắng, xếp hơi thưa. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, màu trắng, kích thước (D × R) 3,5 × 0,5 cm. Không có bao gốc, không rõ vòng. Thịt nấm xốp, có màu trắng.

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
12		Mũ nấm có màu vàng sáng, dạng loa kèn, tron nhẵn, đường kính 1 – 3 cm. Phiến nấm dạng gân, tiếp xúc với cuống và chạy dọc theo cuống. Cuống nấm cùng màu với mũ nấm, đỉnh tâm, hình trụ, bề mặt tron nhẵn, rỗng ở giữa, kích thước (D × R) 0,5 – 2,5 × 0,2 – 0,5 cm.
13		Mũ nấm có màu nâu xám, lõm ở tâm, chuyển thành dạng loa kèn khi trưởng thành, tron nhẵn, đường kính 0,7 – 2 cm. Phiến nấm dạng gân, tiếp xúc với cuống và chạy dọc theo cuống, màu trắng ngà. Cuống nấm màu xám đậm, hơi sáng màu ở phần gốc, đỉnh tâm, hình trụ, bề mặt tron nhẵn, rỗng ở giữa, kích thước (D × R) 2 – 4 × 0,2 – 0,5 cm.
14		Mũ nấm có dạng cầu hoặc bán cầu, màu cam hơi đỏ, bề mặt có sợi mịn, đường kính mũ 4 – 5 cm. Phiến nấm cùng màu với mũ nấm, xếp hơi thưa, được bao bởi một lớp mạng lưới sợi nấm mỏng kéo dài từ mép mũ đến cuống khi còn non. Cuống nấm đỉnh tâm, dạng hình trụ, bề mặt có sợi mịn, nhạt màu hơn so với mũ và phiến nấm, kích thước (D × R) 5 × 0,5 cm. Thịt nấm đặc, có màu trắng hơi ngả vàng.
15		Mũ nấm có dạng nón, hơi u lồi, màu cam, bề mặt nhẵn, đường kính mũ 1 – 3 cm. Phiến dính, có màu vàng nhạt, xếp thưa. Cuống nấm đỉnh tâm, dạng hình trụ, rỗng ở giữa, có màu vàng sáng, kích thước (D × R) 1,5 – 3,2 × 0,3 – 0,5 cm. Thịt nấm xốp, có màu trắng.

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
16		Mũ nấm có dạng lồi khi còn non dần lồi rộng khi trưởng thành, đôi khi hơi u lồi, màu nâu, bề mặt có lớp sợi thô, sần màu, hương thơm, đường kính mũ 1,2 – 4 cm, rìa cuộn. Phiến đính, có màu nâu sẫm, xếp dày. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, có màu nâu nhạt, kích thước (D × R) 3 – 4,5 × 0,3 – 0,5 cm. Thịt nấm xốp, có màu trắng hơi ngà.
17		Mũ nấm có dạng nón, hơi u lồi, màu nâu, bề mặt có lớp sợi thô, sần màu, hương thơm, đường kính mũ 1,5 – 2 cm, rìa hơi cuộn. Phiến đính, có màu trắng ngà nâu, xếp dày. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, có màu nâu nhạt, kích thước (D × R) 2,5 – 5 × 0,3 – 0,5 cm. Thịt nấm xốp, có màu trắng hơi ngà.
18		Mũ nấm có dạng lồi, màu nâu sẫm, bề mặt có lớp sợi thô, hương thơm, đường kính mũ 1,7 cm, rìa hơi cuộn. Phiến đính, có màu trắng nâu sẫm hơn mũ nấm, xếp dày. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, có màu nâu, kích thước (D × R) 2,5 × 0,3 cm. Thịt nấm xốp, có màu nâu nhạt.
19		Mũ nấm dạng lồi rộng đến phẳng, lõm ở tâm, có màu cam đất, khi già thường bị bạc màu, bề mặt có hạt mịn, đường kính mũ 1 – 1,7 cm. Phiến nấm xếp thưa, cùng màu với mũ nấm. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ đẹp, bề mặt có sợi dọc, rỗng ở giữa, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 2,5 – 3 × 0,2 cm. Thịt nấm xốp, màu cam đất nhạt.

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
20		Mũ nấm dạng lồi rộng, lõm ở tâm, có màu cam đất, bề mặt có vảy mịn, đường kính mũ 3 – 3,5 cm. Phiến nấm xếp thưa, màu cam đất hơi hồng. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, bề mặt có sợi dọc, rỗng ở giữa, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 8 – 9 × 0,3 – 0,5 cm. Thịt nấm xốp, màu trắng hơi ngà.
21		Mũ nấm dạng lồi, hơi nhọn ở tâm, có màu nâu, bề mặt trơn, đường kính mũ 1,2 – 1,8 cm. Phiến nấm xếp xít nhau, màu nâu hơi hồng. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, bề mặt có sợi mịn, rỗng ở giữa, nhạt màu hơn mũ nấm, kích thước (D × R) 2,5 – 3 × 0,2 – 0,4 cm. Thịt nấm xốp, màu trắng hơi ngà.
22		Mũ nấm dạng lồi, lõm sâu ở tâm, có màu cam đất, càng nhạt màu khi trưởng thành, bề mặt có vảy mịn, đường kính mũ 3 – 3,5 cm. Phiến nấm xếp thưa, có màu cam đất. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, bề mặt có sợi dọc, rỗng ở giữa, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 8 – 9 × 0,3 – 0,5 cm. Thịt nấm xốp, cùng màu với cuống.
23		Mũ nấm dạng lồi, lõm ở tâm, có màu cam đất, càng nhạt màu khi trưởng thành, bề mặt trơn, đường kính mũ 0,7 cm. Phiến nấm xếp thưa, sáng màu. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, thuôn dần về đỉnh, bề mặt có sợi dọc, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 3,2 × 0,2 cm. Thịt nấm xốp, có màu trắng.

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
24		Mũ nấm dạng phễu tròn đến gần tròn, lõm sâu ở tâm, có màu cam sẫm hoặc đỏ nhạt, bề mặt có các vòng đồng tâm mờ, đường kính mũ 4 cm. Phiến nấm khá dày, có màu cam đỏ sậm, phiến dính hơi kéo dài xuống cuống. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ ngắn, bề mặt trơn nhẵn, rỗng ở bên trong, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 1,3 × 1 cm. Thịt nấm xốp, màu trắng khi còn non.
25		Mũ nấm dạng lồi đến phẳng, lõm ở tâm, có màu trắng kem hoặc cam nhạt, bề mặt hơi sần sùi, rìa mũ cuộn vào trong, đường kính mũ 4 cm. Phiến nấm hơi thưa, có màu trắng ngà, phiến dính hơi kéo dài xuống cuống, có tiết dịch màu trắng trong khi bị cắt. Cuống nấm dính tâm hoặc hơi lệch, dạng hình trụ ngắn, bề mặt trơn nhẵn, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 1,3 × 1 cm. Thịt nấm chắc, có màu trắng.
26		Mũ nấm có dạng lồi phẳng, lõm ở giữa, bề mặt có màu vàng nhạt và cam dần về tâm, rìa mũ gợn sóng, cuộn vào trong, đường kính 1,5 – 4 cm. Phiến kéo dài xuống thân, hơi dày, màu vàng nhạt, chảy nhựa màu trắng khi bị cắt. Cuống hình trụ ngắn, dính tâm hoặc hơi lệch, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 1,2 × 0,5 cm. Thịt nấm đặc, có màu trắng.

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
27		Mũ nấm có dạng phễu, lõm sâu ở giữa, bề mặt có các vòng đồng tâm, màu vàng nhạt và cam dần về tâm, rìa mũ gọn sóng, cuộn vào trong, đường kính 3,5 cm. Phiến kéo dài xuống thân, hơi dày, màu vàng nhạt hoặc cam nhạt, chảy nhựa màu trắng khi bị cắt. Cuống hình trụ ngắn, đính tâm hoặc hơi lệch, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 1,5 × 0,7 cm. Thịt nấm đặc, có màu trắng.
28		Mũ nấm có dạng phẳng, hơi lõm ở tâm, bề mặt mũ màu nâu hơi vàng, khô, xỉn màu và bị nứt, đường kính mũ 7 cm. Thụ tầng dạng phiến, kéo dài xuống cuống, có màu vàng. Cuống nấm hình trụ, hơi lệch tâm, cong, màu nâu hơi đỏ, kích thước (D × R) 3 × 0,7 cm. Thịt nấm đặc, mềm, có màu trắng.
29		Mũ nấm dạng lồi đến lồi rộng, lõm ở giữa khi càng trưởng thành, có màu ngà hơi ngả cam đất, có lớp vỏ mỏng bên ngoài có thể lột được, đường kính 4 cm. Thụ tầng dạng phiến, màu trắng, xếp xít nhau. Cuống hình trụ, tròn ở gốc, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 7,8 × 1 cm. Thịt nấm xốp, có màu trắng.
30		Mũ nấm dạng lồi đến lồi rộng, lõm ở giữa khi càng trưởng thành, có màu trắng ngà xanh lá, có lớp vỏ mỏng bên ngoài có thể lột được, đường kính 5 – 6,5 cm. Thụ tầng dạng phiến, màu trắng, xếp dày đặc. Cuống hình trụ, tròn ở gốc, màu trắng hơi hồng, kích thước (D × R) 4,3 × 1,6 cm. Thịt nấm xốp, có màu trắng.

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
31		Mũ nấm dạng lồi đến lồi rộng, lõm ở giữa, có màu nâu đất, sậm màu ở tâm, có lớp vỏ mỏng bên ngoài có thể lột được, đường kính 3,8 – 4,6 cm. Thụ tầng dạng phiến, màu trắng, xếp dày đặc. Cuống hình trụ, tròn ở gốc, màu trắng ngà, kích thước (D × R) 2,5 – 3 × 1 cm. Thịt nấm xốp, có màu trắng.
32		Mũ nấm dạng lồi rộng, hơi lõm ở giữa, có màu trắng hơi ngà vàng, sậm màu ở tâm, có lớp vỏ mỏng bên ngoài có thể lột được, mép mũ nấm có hình răng cưa, đường kính 6 cm. Thụ tầng dạng phiến, màu trắng, xếp hơi dày. Cuống hình trụ, tròn ở gốc, màu trắng, kích thước (D × R) 5,5 × 2,3 cm. Thịt nấm xốp, có màu trắng.
33		Mũ nấm dạng lồi rộng, hơi lõm ở giữa, có màu nâu đỏ, có lớp vỏ mỏng bên ngoài có thể lột được, mép mũ nấm có lượn sóng, đường kính 4 – 5,7 cm. Thụ tầng dạng phiến, màu trắng ngà, xếp hơi dày. Cuống hình trụ, tròn ở gốc, màu trắng hơi hồng, kích thước (D x R) 2,7 – 3,8 × 1,2 – 1,6 cm. Thịt nấm xốp, có màu trắng.

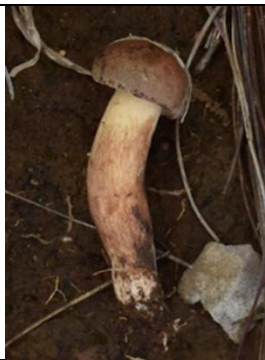
3.3.2.2. Nhóm nấm ống

Bảng 3.8. Bảng mô tả hình thái nấm rễ ngoại cộng sinh thu thập được thuộc nhóm nấm ống

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
34		Mũ nấm có dạng lồi, màu nâu, nhẵn, đường kính mũ 1,5 cm. Thụ tầng dạng ống, có màu nâu sậm, xếp dày đặc. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, kích thước (D × R) 2 × 0,4 – 0,6 cm. Thịt nấm đặc, có màu nâu sậm.
35		Mũ nấm có dạng phẳng, màu cam sẫm, nhẵn, đường kính mũ 4 cm. Thụ tầng dạng ống, cùng màu với mũ nấm, xếp dày đặc. Cuống nấm dính tâm, màu vàng cam dạng hình trụ, kích thước (D × R) 2,5 × 0,5 cm. Thịt nấm đặc, có màu vàng sáng.
36		Mũ nấm dạng bán cầu khi còn non dần chuyển sang dạng lồi khi trưởng thành, màu cam hồng, bề mặt mũ nhẵn, đường kính mũ nấm 3,5 – 4,5 cm. Thụ tầng dạng ống, bề mặt thụ tầng sẫm màu ống có màu vàng, hơi chuyển xanh khi bị cắt. Cuống nấm dính tâm, thon dần về phía gốc, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 2,7 – 4,5 × 1,1 cm. Thịt nấm đặc, phần ở mũ nấm có màu trắng, hơi chuyển xanh khi bị cắt, phần thân chuyển từ trắng sang vàng nhạt và cam dần về phía gốc.
37		Mũ nấm có dạng bán cầu đến lồi, màu vàng chanh, bề mặt có bột mịn màu vàng chanh, khô, rìa mũ có dính các mảnh màng mỏng là phần còn sót lại của bao riêng, đường kính mũ 2,7 – 7 cm. Thụ tầng dạng ống, cùng màu với mũ nấm, xếp dày đặc, có chuyển xanh khi bị thương. Cuống nấm dính tâm, hình trụ hơi thon ở phần gốc, cùng màu với mũ, phần gốc

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
		phát triển hệ sợi tạo thành sợi nấm dạng rễ có màu trắng đến hơi vàng, kích thước (D × R) 3,5 – 8 × 0,7 – 1,5 cm. Thịt nấm đặc, có màu trắng đến hơi vàng.
38		Mũ nấm có dạng báng cầu đến lồi, màu vàng chanh, bề mặt có bột mịn màu vàng chanh hơi sẫm màu, khô, rìa mũ có dính các mảnh màng mỏng là phần còn sót lại của bao riềng, đường kính mũ 4 – 7 cm. Thụ tầng dạng ống, cùng màu với mũ nấm, hóa nâu sẫm khi già, xếp dày đặc, có chuyển xanh khi bị thương. Cuống nấm dính tâm, hình trụ hơi thuôn ở phần gốc, cùng màu với mũ, phần gốc hơi có màu đỏ cam, hệ sợi ở gốc tạo thành sợi nấm dạng rễ có màu trắng đến hơi vàng, kích thước (D × R) 3 – 5,5 × 0,6 cm. Thịt nấm đặc, có màu trắng đến hơi vàng.
39		Mũ nấm có dạng báng cầu đến lồi, màu vàng chanh, bề mặt có bột mịn màu vàng chanh, rìa mũ cuộn vào trong, có dính các mảnh màng mỏng là phần còn sót lại của bao riềng, đường kính mũ 2,1 cm. Thụ tầng dạng ống, màu nâu sẫm, xếp dày đặc. Cuống nấm dính tâm, hình trụ hơi thuôn ở phần gốc, cùng màu với mũ, phần gốc hơi có màu đỏ cam, hệ sợi ở gốc tạo thành sợi nấm dạng rễ có màu trắng đến hơi vàng, kích thước (D × R) 3 × 0,8 cm. Thịt nấm đặc, có màu trắng đến hơi vàng.

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
40		Mũ nấm có dạng lồi phẳng, màu xám hơi nâu, nhẵn, đường kính mũ 4 cm. Thụ tầng dạng ống, dính vào cuống, có màu trắng ngà dần chuyển sang hồng sẫm, xếp dày đặc. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, có màu ngà, dần sẫm màu về phía gốc, bề mặt có lưới rõ phủ toàn bộ cuống, màu nâu hơi đen, kích thước (D × R) 7,8 × 1 cm. Thịt nấm đặc, có màu trắng ngà, chuyển sang hơi vàng đến hồng nâu khi bị cắt.
41		Mũ nấm có dạng bán cầu, chuyển thành dạng lồi rộng khi trưởng thành, màu nâu vàng bề mặt mũ sáng bóng, nhớt khi bị ướt, kích thước mũ 3 – 5,5 cm. Thụ tầng dạng ống, kéo dài xuống cuống, bề mặt lỗ hình đa giác, màu nâu vàng hơi xám. Cuống hình trụ, cong, màu nâu sáng hoặc hơi đỏ, kích thước (D × R) 3,5 – 6 × 0,6 – 1 cm. Thịt nấm đặc, có màu hơi vàng nhạt, dần phớt hồng khi bị cắt.
42		Mũ nấm có dạng lồi đến lồi rộng, màu nâu sáng, nhẵn, đường kính mũ 2 – 7,5 cm. Thụ tầng dạng ống, ống trắng hơi tím, bề mặt có màu tím đến hồng tím, chuyển nâu sẫm khi già, lỗ dày đặc. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, cong hoặc phình dần xuống gốc, màu nâu đến nâu sẫm, kích thước (D × R) 2,5 – 8 × 1,5 – 4 cm. Thịt nấm đặc, có màu trắng.
43		Mũ nấm có dạng lồi, màu cam sẫm, nhẵn, đường kính mũ 1,6 – 12 cm. Thụ tầng dạng ống, màu trắng ngà, lỗ dày đặc. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, hơi phình giữa thân, màu trắng

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
		ngà, kích thước (D × R) 3 – 7 × 1 – 6 cm. Thịt nấm đặc, có màu trắng hơi vàng.
44		Mũ nấm có dạng lồi, màu nâu đất, nhẵn, đường kính mũ 1,6 cm. Thụ tầng dạng ống, màu nâu sậm, lỗ dày đặc. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, thân hơi cong, màu hơi ngả vàng đến nâu đỏ và nâu, kích thước (D × R) 4,5 × 0,8 cm. Thịt nấm đặc, có màu nâu đỏ nhạt.
45		Mũ nấm có dạng lồi đến lồi rộng, màu nâu sáng, nhẵn, khi già bề mặt khô nứt, đường kính mũ 3,5 – 9 cm. Thụ tầng dạng ống, màu vàng nhạt, lỗ dày đặc. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, cùng màu với mũ nấm, kích thước (D × R) 4,5 – 6 × 1,3 – 2,5 cm. Thịt nấm đặc, có màu trắng.
46		Mũ nấm có dạng lồi, màu cam vàng nhẵn, đường kính mũ 2 cm. Thụ tầng dạng ống, màu hồng tím nhạt, lỗ dày đặc. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, nhạt màu hơn mũ nấm, có các đốm màu cam, kích thước (D × R) 3 × 1,6 cm. Thịt nấm đặc, có màu vàng cam.
47		Mũ nấm có dạng lồi rộng, màu vàng nhạt nhẵn, đường kính mũ 2 cm. Thụ tầng dạng ống, màu hồng tím nhạt, lỗ dày đặc. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, nhạt màu hơn mũ nấm, màu đậm hơn ở phần gốc cuống, kích thước (D × R) 3 × 1,6 cm. Thịt nấm đặc, có màu vàng.

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
48		Mũ nấm có dạng lõm rộng, màu cam hơi nâu nhẵn, đường kính mũ 3 cm. Thụ tầng dạng ống, màu hồng tím nhạt, lỗ dày đặc. Cuống nấm dính tâm, dạng hình trụ, màu vàng cam, kích thước (D × R) 3 × 1,6 cm. Thịt nấm đặc, có màu vàng hơi cam.

3.3.2.3. Nhóm nấm cục

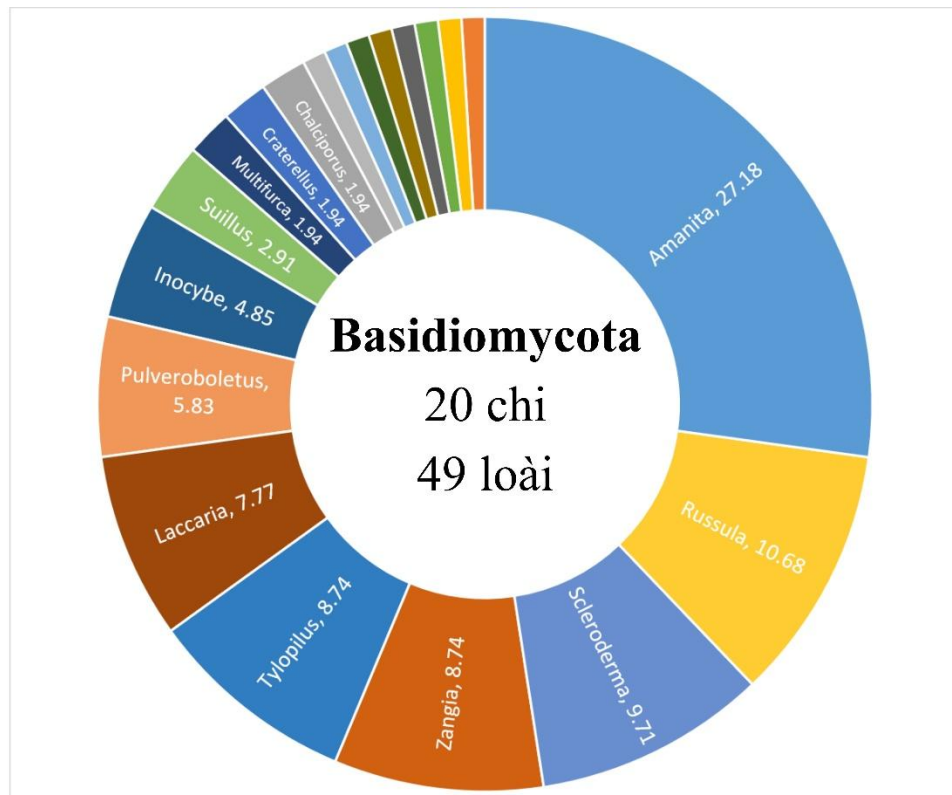
Bảng 3.9. Mẫu nấm rễ ngoại cộng sinh thu thập được thuộc nhóm nấm cục

Kiểu hình	Hình ảnh	Mô tả
49		Quả thể nấm có dạng hình cầu hoặc bán cầu, thường mọc đơn độc hoặc mọc thành cụm 2 – 5 quả thể, bề mặt có màu vàng sáng lúc còn non và chuyển sang nâu sẫm khi già, khô nứt tạo thành các vảy sần bên ngoài, kích thước 3,5 – 9 cm. Hệ sợi nấm ở gốc hình thành nên dạng rễ chùm (sợi nấm dạng rễ). Vỏ nấm (peridium) có màu vàng sáng, độ dày 0,3 – 0,5 cm. Mô sinh bào tử (gleba) có màu trắng lúc còn non và chuyển dần sang xám đen và đen sẫm khi già.

3.3.3. Kết quả định danh quả thể nấm rễ ngoại cộng sinh thu thập được ở khu vực rừng thông 3 năm tuổi

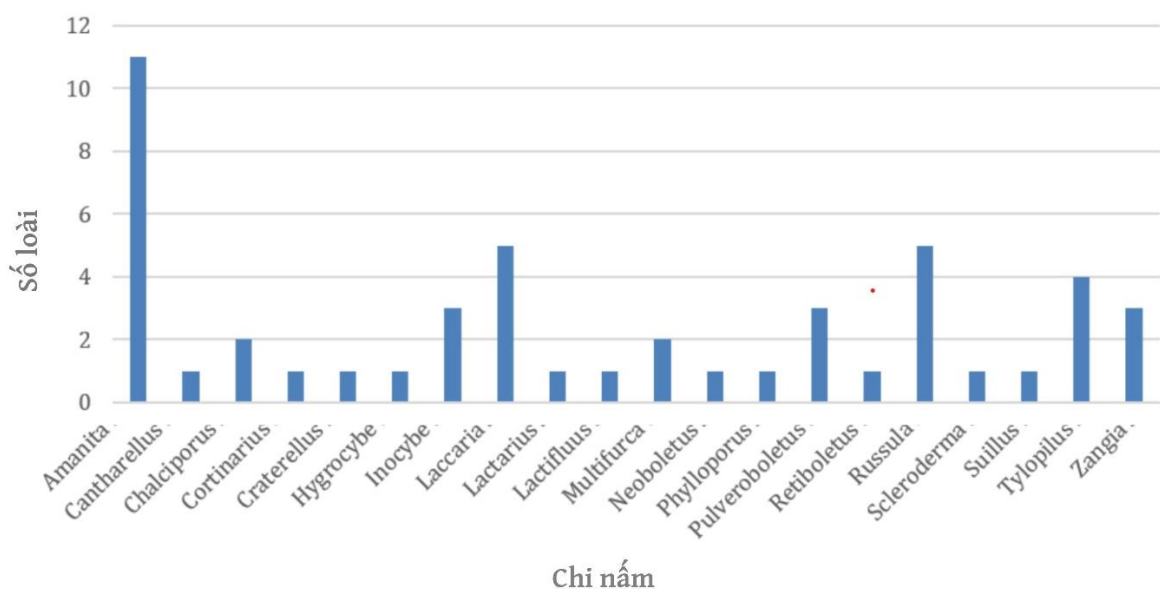
Kết quả định danh sinh học phân tử dựa trên trình tự vùng trình tự ITS của 103 mã kiểu hình cho thấy thu được 49 loài nấm ngoại cộng sinh thuộc 20 chi nấm. Tất cả đều thuộc ngành nấm đảm Basidiomycota (Hình 3.45, Bảng 3.10). Trong đó, 27,18% các mã kiểu hình thuộc chi *Amanita*, chiếm tỷ lệ cao nhất. Tiếp theo là các chi *Russula*, *Scleroderma*, *Zangia*, *Tylopilus*, *Laccaria* và *Pulveroboletus* tương ứng

10,68; 9,71; 8,74; 8,74; 7,77 và 5,83%. Các chi nấm còn lại có tỷ lệ xuất hiện khá thấp trong giai đoạn nghiên cứu.

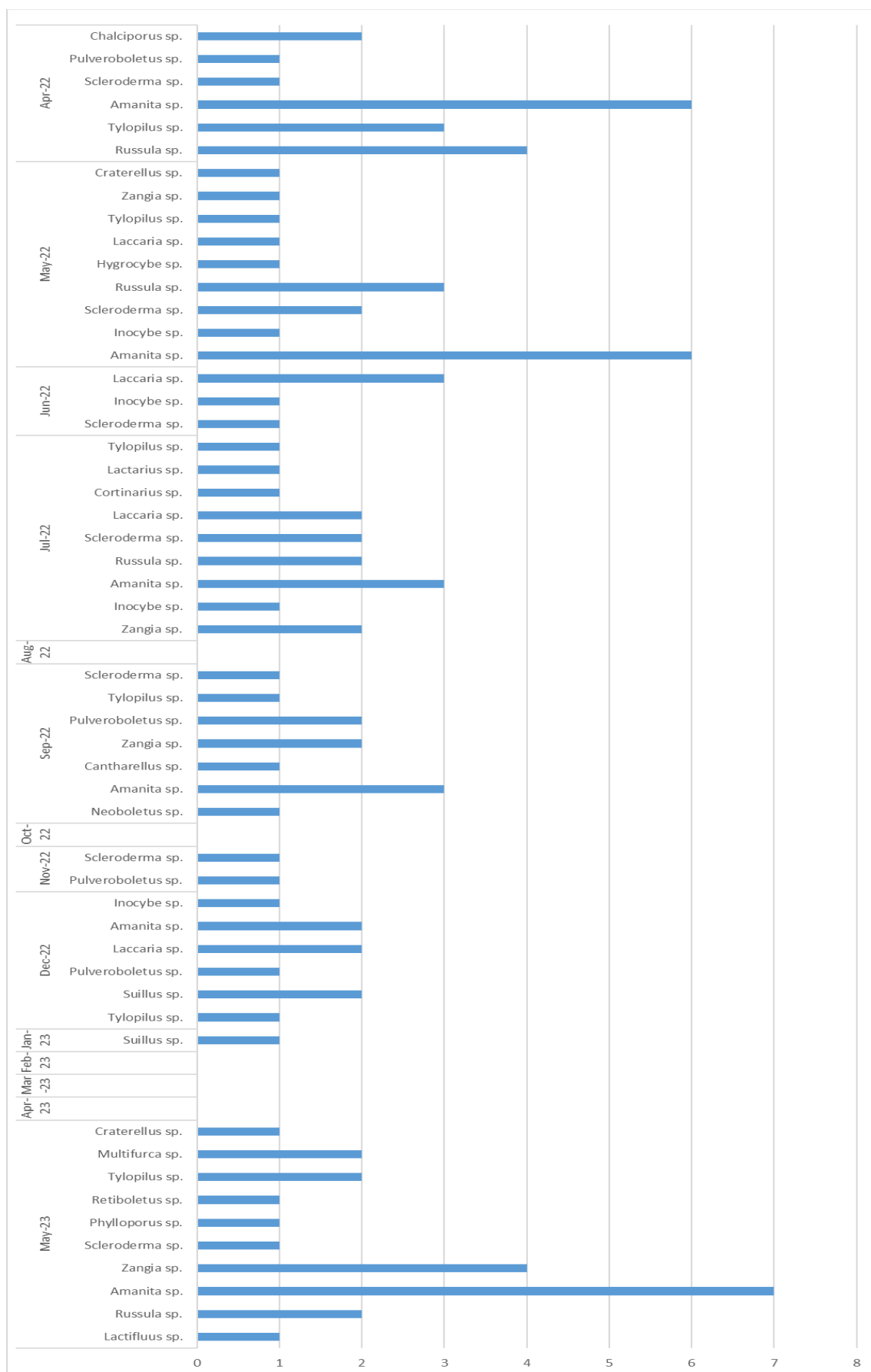


Hình 3.45. Tỷ lệ các mẫu kiểu hình nấm thu được theo chi trong 24 đợt thu mẫu

Đồng thời, các chi nấm *Amanita* (11 loài), *Russula* (5 loài) và *Laccaria* (5 loài) là các chi nấm có số lượng loài nhiều nhất được ghi nhận, trong khi đó *Scleroderma*, tuy có số lượng quả thể thu được nhiều nhưng chỉ thuộc 1 loài duy nhất (Hình 3.46).



Hình 3.46. Tỷ lệ loài trong mỗi chi nấm ngoại cộng sinh thu được

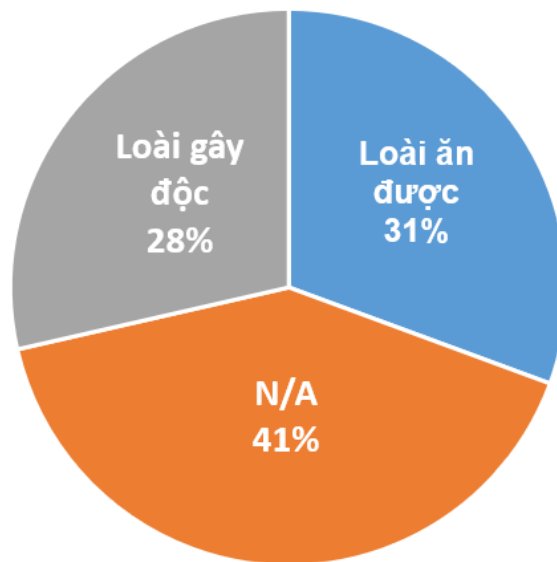


Hình 3.47. Sự xuất hiện của các loài nấm ngoại cộng sinh theo từng tháng trong năm

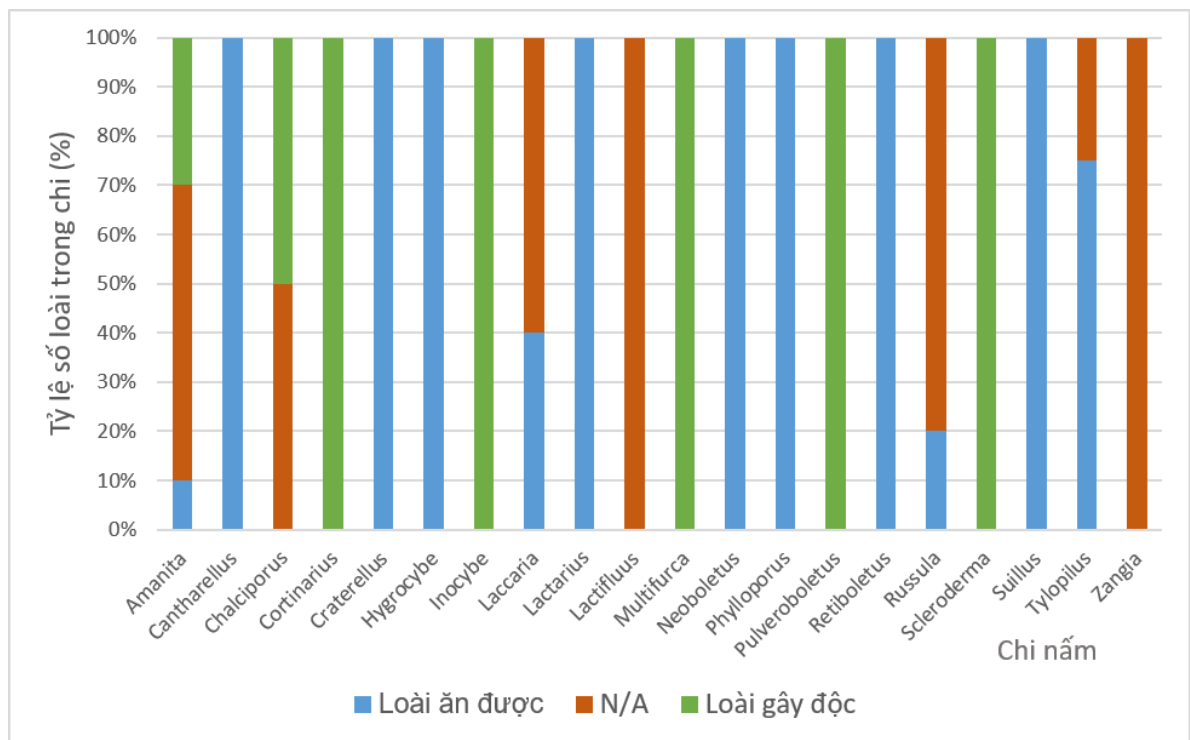
Ngoài ra, từ hình 3.47 cho thấy các loài nấm ngoại cộng sinh *Amanita* sp., *Scleroderma* sp., *Tylopilus* sp. thường xuyên xuất hiện với số lượng nhiều trong tất cả các tháng. Trong khi đó *Russula* sp. chủ yếu thu được trong các tháng 4, 5 và 7, *Zangia* sp. thu được ở các tháng 5, 7 và 9, *Pulveroboletus* sp. có thể thu được ở các tháng 4, 9, 11, 12. Nấm ngoại cộng sinh được chứng minh là hình thành nên mối quan hệ cộng sinh bắt buộc với các loài thực vật thuộc họ Thông (*Pinaceae*). Các nghiên cứu cho thấy tỷ lệ tái sinh và khả năng phát triển của cây thông con tương quan rõ rệt với sự hình thành các chóp rễ ngoại cộng sinh. Vì vậy trong các khu vực rừng tái sinh hoặc rừng trồng mới cần có các mầm nấm ngoại cộng sinh phù hợp. Một số loài nấm ngoại cộng sinh thuộc các chi nấm như *Hebeloma*, *Rhizopogon*, *Scleroderma*, *Suillus*... thường được nghiên cứu sử dụng để xâm nhiễm vào các cây con *in vitro* để tăng khả năng phát triển của cây trước khi đưa ra khu vực trồng [103, 204–206]. Ngoài ra nhiều loài nấm ngoại cộng sinh được ghi nhận có giá trị dinh dưỡng cao có thể làm thực phẩm, vì vậy việc thu hái và sử dụng nấm ngoại cộng sinh đã phổ biến từ lâu ở hầu hết các nước trên thế giới. Đây cũng là một trong những nguồn lâm sản ngoài gỗ mang lại giá trị cao, giúp tăng thêm thu nhập cho người dân tại các khu vực lân cận rừng. Nhiều loài trong các chi *Amanita*, *Russula*, *Cantharellus*, *Boletus*, *Tylopilus*... là các loài nấm ăn phổ biến [9, 60, 67, 81]. Do đó việc nắm rõ thành phần loài của các loài nấm ngoại cộng sinh bản địa cùng với thời gian thu hái của mỗi loại trong năm là hết sức quan trọng.

3.3.4. Kết quả khảo sát khả năng ứng dụng làm thực phẩm của các loài nấm ngoại cộng sinh thu được trong khu vực rừng trồng thông ba lá *P. kesiya* 3 năm tuổi

So sánh 49 loài nấm thu được ở khu vực rừng trồng thông *Pinus kesiya* 3 năm tuổi với các danh sách về nấm ngoại cộng sinh ăn được trên thế giới [6, 144, 145] và danh mục nấm ở khu vực rừng thông tỉnh Lâm Đồng [148, 149] cho thấy có 31% là các loài nấm ăn được, trong đó một số loài được người dân tại địa phương thường xuyên thu hái và sử dụng bao gồm *Amanita sinensis*, *Cantharellus* sp., *Lactarius hatsudake*, *Russula virescens*, *Neoboletus* sp., *Retiboletus brunneolus*, *Tylopilus* sp., *Suillus bovinus*. Ngoài ra, 28% các loài nấm ngoại cộng sinh thu được có khả năng gây độc, hầu hết thuộc các chi *Cortinarius*, *Inocybe*, *Multifurca*, *Pulveroboletus* và *Scleroderma*. Còn lại, 41% các loài nấm vẫn chưa xác định được chính xác khả năng sử dụng (Hình 3.48, Hình 3.49).



Hình 3.48. Tỷ lệ các loài nấm ăn được



Hình 3.49. Tỷ lệ các loài nấm ăn được trong mỗi chi

Được xem là một trong những nguồn lâm sản ngoài gỗ quan trọng, việc quản lý và khai thác nấm rừng phù hợp có khả năng thúc đẩy phát triển du lịch, kinh tế cũng như góp phần đảm bảo an ninh lương thực [9, 10, 207, 208]. Quá trình thu hái tự nhiên đã phổ biến từ xưa trên khắp thế giới, tuy nhiên sản lượng và thành phần phụ thuộc rất lớn vào các yếu tố tự nhiên, đồng thời cũng ngày càng giảm mạnh do biến đổi khí hậu và suy giảm diện tích rừng [59, 67, 203]. Vì vậy, đối với một số loài nấm ngoại cộng sinh có giá trị cao như *Tricholoma matsutake*, *Tuber* sp., *Cantharellus*

sp., *Lactarius deliciosus*... Châu Âu, Úc, New Zealand, Bắc Mỹ, Nhật Bản, Hàn Quốc đã thực hiện thành công canh tác có kiểm soát những loài nấm này với cây chủ chuyên biệt của chúng [64, 209–211]. Tuy nhiên ngoài *Tricholoma matsutake*, *Tuber* sp., việc nuôi trồng và thu hái nhiều loại nấm ngoại cộng sinh vẫn còn hạn chế trong quy mô cây con trong vườn ươm, kết quả lâu dài khi đưa ra rừng trồng tự nhiên vẫn chưa được báo cáo đầy đủ [212]. Một trong những nguyên nhân chính là do cấu trúc hệ nấm ngoại cộng sinh và thành phần, sản lượng quả thể nấm hình thành, ngoài phụ thuộc vào các yếu tố môi trường còn phụ thuộc vào từng giai đoạn sinh trưởng của cây chủ [55, 154, 213, 214]. Vì vậy, các dữ liệu về thành phần loài nấm ngoại cộng sinh trong khu vực rừng trồng thông *Pinus kesiya* 3 năm tuổi cùng với khả năng sử dụng làm thực phẩm và các giai đoạn xuất hiện trong năm của chúng có thể được sử dụng làm tiền đề để xây dựng các kế hoạch quản lý, bảo tồn rừng bền vững song song với cải thiện thu nhập của người dân địa phương tại khu vực lân cận rừng.

Bảng 3.10. Dữ liệu kết về quả định danh loài nấm ngoại cộng sinh và khả năng sử dụng của chúng trong khu vực nghiên cứu

Kiểu hình thái	Mã kiểu hình	Loài	Đặc tính
1	ABI-V-AA07014 ABI-V-AA09302	<i>Amanita sinensis</i>	E
2	ABI-V-AA23303	<i>Amanita ovalispora</i>	N/A
3	ABI-V-AA07023 ABI-V-AA08104 ABI-V-AA09101 ABI-V-AA23207	<i>Amanita pseudoporphyrina</i>	P
4	ABI-V-AA07008 ABI-V-AA07011 ABI-V-AA09103 ABI-V-AA12106	<i>Amanita sepiacea</i>	P
5	ABI-V-AA12104 ABI-V-AA20105 ABI-V-AA24101	<i>Amanita</i> sp1	N/A
6	ABI-V-AA16102 ABI-V-AA17201 ABI-V-AA23103 ABI-V-AA23108 ABI-V-AA23113	<i>Amanita</i> sp2	N/A
7	ABI-V-AA08101 ABI-V-AA21301	<i>Amanita</i> sp4	N/A

Kiểu hình thái	Mã kiểu hình	Loài	Đặc tính
8	ABI-V-AA23302	<i>Amanita</i> sp6	N/A
9	ABI-V-AA07020 ABI-V-AA09104 ABI-V-AA17203 ABI-V-AA23111	<i>Amanita spissacea</i>	P
10	ABI-V-AA07010	<i>Amanita</i> sp5	N/A
11	ABI-V-AA12108	<i>Amanita</i> sp3	N/A
12	ABI-V-AA16103	<i>Cantharellus</i> sp.	E
13	ABI-V-AA09303 ABI-V-AA23205	<i>Craterellus tubaeformis</i>	E
14	ABI-V-AA13102	<i>Cortinarius</i> sp.	N/A
15	ABI-V-AA08201	<i>Hygrocybe pseudoacutoconica</i>	E
16	ABI-V-AA08102 ABI-V-AA13106	<i>Inocybe</i> sp3	P
17	ABI-V-AA11101 ABI-V-AA12103	<i>Inocybe</i> sp1	P
18	ABI-V-AA21102	<i>Inocybe</i> sp2	P
19	ABI-V-AA08301 ABI-V-AA13301	<i>Laccaria laccata</i>	E
20	ABI-V-AA11104 ABI-V-AA20104 ABI-V-AA21101	<i>Laccaria bicolor</i>	E
21	ABI-V-AA11103	<i>Laccaria</i> sp1	N/A
22	ABI-V-AA11201	<i>Laccaria</i> sp2	N/A
23	ABI-V-AA12109	<i>Laccaria</i> sp3	N/A
24	ABI-V-AA13202	<i>Lactarius hatsudake</i>	E
25	ABI-V-AA23101	<i>Lactifluus</i> sp.	N/A

Kiểu hình thái	Mã kiểu hình	Loài	Đặc tính
26	ABI-V-AA23203	<i>Multifurca zonaria</i>	P
27	ABI-V-AA23204	<i>Multifurca</i> sp.	P
28	ABI-V-AA23112	<i>Phylloporus luxiensis</i>	E
29	ABI-V-AA07007 ABI-V-AA07019 ABI-V-AA08105 ABI-V-AA08203 ABI-V-AA12105 ABI-V-AA13101 ABI-V-AA23106	<i>Russula prasina</i>	N/A
30	ABI-V-AA09201	<i>Russula virescens</i>	E
31	ABI-V-AA07003	<i>Russula</i> sp1	N/A
32	ABI-V-AA23102	<i>Russula</i> sp2	N/A
33	ABI-V-AA07001	<i>Russula</i> sp3	N/A
34	ABI-V-AA07017	<i>Chalciporus</i> sp.	N/A
35	ABI-V-AA07016	<i>Chalciporus radiatus</i>	P
36	ABI-V-AA16101	<i>Neoboletus</i> sp.	E
37	ABI-V-AA07015 ABI-V-AA17101 ABI-V-AA17102 ABI-V-AA19101	<i>Pulveroboletus icterinus</i>	P
38	ABI-V-AA20103	<i>Pulveroboletus retipes</i>	P
39	ABI-V-AA24103	<i>Pulveroboletus</i> sp1	P
40	ABI-V-AA23114	<i>Retiboletus brunneolus</i>	E
41	ABI-V-AA20102 ABI-V-AA21103	<i>Suillus bovinus</i>	E

Kiểu hình thái	Mã kiểu hình	Loài	Đặc tính
	ABI-V-AA22101		
42	ABI-V-AA07004 ABI-V-AA07006 ABI-V-AA09102 ABI-V-AA17202 ABI-V-AA20101 ABI-V-AA23301	<i>Tylopilus neofelleus</i>	E
43	ABI-V-AA13203	<i>Tylopilus balloui</i>	E
44	ABI-V-AA23201	<i>Tylopilus brunneirubens</i>	E
45	ABI-V-AA07018	<i>Tylopilus</i> sp.	N/A
46	ABI-V-AA09105 ABI-V-AA12102 ABI-V-AA13201 ABI-V-AA16301 ABI-V-AA17301 ABI-V-AA23110 ABI-V-AA23206	<i>Zangia cintrina</i>	N/A
47	ABI-V-AA23104	<i>Zangia</i> sp1	N/A
48	ABI-V-AA23107	<i>Zangia</i> sp2	N/A
49	ABI-V-AA07009 ABI-V-AA08103 ABI-V-AA09106 ABI-V-AA10102 ABI-V-AA12107 ABI-V-AA13105 ABI-V-AA17205 ABI-V-AA19102 ABI-V-AA23105 ABI-V-AA24102	<i>Scleroderma sinnamariense</i>	P

Chương 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

- Nghiên cứu đã thu thập được 100 mẫu đất từ 2 khu vực rừng thông ba lá trưởng thành tại khu vực Đa Nhim và Viện Khoa học Sự sống, phân tích thành phần nấm có trong đất thông qua kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới cho thấy thành phần loài nấm trong đất tại rừng Đa Nhim cao hơn so với ở Viện Khoa học Sự sống.
- Thu thập, mô tả và định danh thành công 70 mẫu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở khu vực rừng trưởng thành Đa Nhim, 75 mẫu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở khu vực rừng trưởng thành Viện Khoa học Sự sống, 64 mẫu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở hệ rễ cây thông con 3 tuổi và 51 mẫu chóp rễ nấm ngoại cộng sinh ở hệ rễ cây thông con trong vườn ươm. Tổng cộng thu được 32 chi và 116 loài nấm ngoại cộng sinh được ghi nhận trong nghiên cứu, trong đó 30 chi thuộc ngành Basidiomycota và 2 chi thuộc ngành Ascomycota. Hai chi nấm *Sebacina* và *Rhizopogon* xuất hiện ở cả 3 giai đoạn phát triển của thông ba lá.
- Thành phần loài nấm ngoại cộng sinh với hệ rễ cây thông ba lá ở rừng trưởng thành và cây con 3 năm tuổi đa dạng và phân bố đồng đều hơn hẳn so với ở hệ rễ cây con 6 tháng tuổi.
- Loài nấm *Rhizopogon boninesis* lần đầu tiên được ghi nhận ở Việt Nam và đã cho thấy khả năng tăng cường sức sống của cây con thông ba lá khi được đồng nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*.
- Loài nấm *Nothojafnea* sp. lần đầu tiên được ghi nhận xuất hiện ở Bắc bán cầu.
- Không ghi nhận được mối tương quan rõ rệt giữa thành phần loài nấm ngoại cộng sinh và số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh xuất hiện ở mỗi cá thể cây con với khả năng phát triển của thông con ba lá thông qua chỉ số chiều cao cây khi khảo sát thành phần và ảnh hưởng của nấm ngoại cộng sinh trong điều kiện *in situ* và *ex situ*.
- Thu thập, định danh và phân loại được 15/49 loài nấm ngoại cộng sinh tại rừng thông ba lá ở giai đoạn 3 năm tuổi có khả năng sử dụng làm thực phẩm.

KIẾN NGHỊ

- Tăng số lượng mẫu đất cần cho nghiên cứu NGS nhằm nâng cao khả năng phát hiện các loài nấm có mức độ hiện diện thấp trong đất. Đồng thời có thể kết hợp sử dụng nhiều cặp môi khác nhau hoặc sử dụng các cặp môi chuyên biệt cho nấm ngoại cộng sinh để nâng cao độ bao phủ trong đánh giá về thành phần loài nấm nói chung và thành phần các loài nấm ngoại cộng sinh nói riêng.
- Tăng thời gian thử nghiệm 1 - 2 năm và sử dụng thêm các chỉ số đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển khác (chiều dài rễ, tỷ lệ sinh khối tươi, sinh khối khô, số lá...) để làm rõ hơn về tác động của hệ nấm rễ ngoại cộng sinh lên thông ba lá trong điều kiện *in situ* và *ex situ*.
- Tiến hành các phân tích về thành phần lý hóa của đất (pH, chất hữu cơ, N tổng số, lân, kali, độ ẩm đất, kết cấu đất (tỷ lệ sét, cát)...) để làm rõ hơn ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến thành phần loài của nấm ngoại cộng sinh cũng như sự khác biệt giữa hai khu vực Đa Nhim và Viện Sinh học Sự sống.
- Tiếp tục mở rộng khu vực nghiên cứu và bố trí thêm các ô thu mẫu tại các rừng thông ba lá trồng từ 3–5 năm tuổi nhằm theo dõi sự hình thành quả thể và ước tính sản lượng nấm ngoại cộng sinh. Đây sẽ là cơ sở để đánh giá tiềm năng khai thác nấm ngoại cộng sinh như một nguồn lâm sản ngoài gỗ có giá trị, góp phần gia tăng thu nhập từ rừng trồng và nâng cao hiệu quả quản lý, sử dụng tài nguyên rừng theo hướng bền vững.
- Mở rộng nghiên cứu theo hướng nuôi trồng một số loài nấm ngoại cộng sinh ăn được có hương vị thơm ngon và giá trị kinh tế cao.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Ngo, T.T., Le, N.T, Dang, Q.H., Nguyen, D.H., Duong, M.T.T., Ho, Q.B.T, Cai, L., Pham, H.N.D. Extended distribution of the ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon boninensis* in tropical Asia and its verified growth-promoting effect on *Pinus kesiya*. Mycol Progress 25, 32 (2026). <https://doi.org/10.1007/s11557-026-02144-0>
2. Tram, N. T., Quyen, H. D., Nhan, L. T., Hoang, N. D. P., Phung, H. P. P., Mai, T. T. D., Quyen, B. T. H. and Dung, H. N. (2026). Using the baked clay balls for the *in vitro* model of ectomycorrhization. International Journal of Agricultural Technology xx(x): XX-XX
3. Tram T. Ngo, Quyen H. Dang, Nhan T. Le, Jaturong Kumla, Dung H. Nguyen, Hoang N. D. Pham. New record of ectomycorrhizal association of the genus *Nothojafnea* in the Northern Hemisphere. Mycorrhiza 36, 74 (2026). <https://doi.org/10.1007/s00572-026-01319-7>

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Begon M., Townsend C.R., Harper J.L., 2006, *Ecology: From individuals to ecosystems*, Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom.
2. Brundrett M.C., 2009, Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: Understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis, *Plant Soil*, 320, pp. 37-77.
3. Kumar J., Atri N.S., 2018, Studies on ectomycorrhiza: An appraisal, *Botanical Review*, 84(2), pp. 108-155.
4. Martín-Pinto P., Oria-de-Rueda J.A., Dejene T., Mediavilla O., Hernández-Rodríguez M., Reque J.A., Sanz-Benito I., Santos M., Geml J., 2022, Influence of stand age and site conditions on ectomycorrhizal fungal dynamics in *Cistus ladanifer*-dominated scrubland ecosystems, *Forest Ecology and Management*, 519.
5. Jonsson L.M., Nilsson M.C., Wardle D.A., Zachrisson O., 2001, Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity, *Oikos: Advancing ecology*, 93, pp. 353-364.
6. Boa E., 2004, *Wild edible fungi: A global overview of their use and importance to people*, FAO, Rome.
7. Wang R., Herrera M., Xu W., Zhang P., Moreno J.P., Colinas C., Yu F., 2022, Ethnomycological study on wild mushrooms in Pu'er Prefecture, Southwest Yunnan, China, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 18(1), pp. 1-24.
8. Li C., Xu S., 2022, Edible mushroom industry in China: current state and perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(11), pp. 3949-3955.
9. Pérez-Moreno J., Guerin-Laguet A., Rinald A.C., Yu F., Verbeken A., Hernández-Santiago F., Martínez-Reyes M., 2021, Edible mycorrhizal fungi of the world: What is their role in forest sustainability, food security, biocultural conservation and climate change?, *Plants, People, Planet*, 3(5), pp. 471-490.
10. Kewessa G., Dejene T., Alem D., Tolera M., Martín-Pinto P., 2022, Forest type and site conditions influence the diversity and biomass of edible macrofungal species in Ethiopia, *Journal of Fungi*, 8(10), pp. 1023.

11. Marcel G.A.H., Francis M.M., Marc-André S., Ian R.S., 2015, Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future, *New Phytologist*, 205, pp. 1406-1423.
12. Singh S.P., Inderjit S.P., Singh J.S., Majumdar S., Moyano J., Nuñez M.A., Richardson D.M., 2018, Insights on the persistence of pines (*Pinus* species) in the Late Cretaceous and their increasing dominance in the Anthropocene, *Ecology and Evolution*, 8(20), pp. 10345-10359.
13. Loc P.K., The P.V., Long P.K., Regalado J., Averyanov L.V., Maslin B., 2017, Native conifers of Vietnam - a review, *Pakistan Journal of Botany*, 49(5), pp. 2037-2068.
14. Phó Đức Đình, 1996, *Nghiên cứu xúc tiến tái sinh tự nhiên rừng thông ba lá (Pinus kesiya Royle ex. Gordon) tại lâm trường Đà Lạt - Lâm Đồng*, Luận án tiến sĩ Lâm học, Viện Khoa học Lâm Nghiệp Việt Nam, Hà Nội.
15. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Quy định danh mục loài cây trồng lâm nghiệp chính; Công nhận giống và nguồn giống cây trồng lâm nghiệp.
16. Frank B., 2005, On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885), *Mycorrhiza*, 15, pp. 267-275.
17. Peyronel B., Fassi B., Fontana A., Trappe J.M., 1969, Terminology of mycorrhizae, *Mycologia*, 61(2), pp. 410-411.
18. Lakhanpal T.N., 2000, Ectomycorrhiza - An overview, *Mycorrhizal Biology*, Springer, pp. 101-118.
19. Ruehle J.L., Marx D.H., 1979, Fiber, food, fuel, and fungal symbionts, *Science*, 206(4417), pp. 419-422.
20. Lepage B.A., Currah R.S., Stockey R.A., Rothwell G.W., 1997, Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene, *American Journal of Botany*, 84(3), pp. 410-412.
21. Berbee L. M., Taylor W. J., 1993, Dating the evolutionary radiations of the true fungi, *Canadian Journal of Botany*, 71, pp. 1114-1127.
22. Brand F., 1991, Ektomykorrhizen an *Fagus sylvatica*. Charakterisierung und Identifizierung, ökologische Kennzeichnung und unsterile Kultivierung, *Libri Botanici*, 2, pp. 1-229.

23. Pillukat A., Agerer R., 1992, Studien an EktomykorrhizenXL. – Vergleichende Untersuchungen zur baumbezogenen Variabilität der Ektomykorrhizen von *Russula ochroleuca*, *Zeitschrift für Mykologie*, 58, pp. 211-242.
24. Assad R., Reshi Z.A., Rashid I., Shouche Y., Dhotre D., 2020, Role of ectomycorrhizal biotechnology in pesticide remediation, *Bioremediation and Biotechnology, Vol 3: Persistent and Recalcitrant Toxic Substances*, Springer International Publishing, pp. 315-330.
25. Blasius D., Feil W., Kottke I., Oberwinkler F., 1986, Hartig net structure and formation in fully ensheathed ectomycorrhizas, *Nordic Journal of Botany*, 6(6), pp. 837-842.
26. Godbout C., Fortin J.A., 1983, Morphological features of synthesized ectomycorrhizae of *Alnus crispa* and *A. rugosa*, *New Phytologist*, 94(2), pp. 249-262.
27. Godbout C., Fortin J.A., 1985, Synthesized ectomycorrhizae of aspen: fungal genus level of structural characterization, *Canadian Journal of Botany*, 63(2), pp. 252-262.
28. Ashford A.E., Allaway W.G., 1985, Transfer cells and Hartig net in the epidermis of the sheathing mycorrhiza of *Pisonia grandis* R. Br. from Seychelles, *New Phytologist*, 100, pp. 595-612.
29. Ashford A.E., Allaway W.G., 1982, A sheathing mycorrhiza on *Pisonia grandis* R. Br. (Nyctaginaceae) with development of transfer cells rather than a Hartig net, *New Phytologist*, 90, pp. 511-519.
30. Agerer R., 1987, *Colour atlas of ectomycorrhizae*, Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger, Schwäbisch Gmünd.
31. Chilvers G.A., 1968, Low power electron microscopy of the root cap region of eucalypt mycorrhizas, *New Phytologist*, 67.
32. Kennedy P.G., Bruns T.D., 2005, Priority effects determine the outcome of ectomycorrhizal competition between two *Rhizopogon* species colonizing *Pinus muricata* seedlings, *New Phytologist*, 166(2), pp. 631-638.
33. Rai M., Varma A., 2010, *Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae*, Springer Nature.
34. Pope P.E., 1993, Some soil fungi are beneficial to tree seedling growth, *Forestry & Natural Resources*, 104.

35. Molina R., Massicotte H., Trappe J.M., 1992, Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications, *Mycorrhizal functioning, an integrative plant-fungal process*, Chapman and Hall, pp. 357-423.
36. Brundrett M.C., Cairney J.W., 2002, Ectomycorrhizas in plant communities, *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity*, Springer, Dordrecht.
37. Gardes M., Bruns T.D., 1996, Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Above- and below-ground views, *Canadian Journal of Botany*, 74(10), pp. 1572-1583.
38. Martin F., Kohler A., Murat C., Veneault-fourrey C., Hibbett D.S., 2016, Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses, *Natural Reviews Microbiology*, 14, pp. 760-773.
39. Rinaldi A.C., Comandini O., Kuyper T.W., 2008, Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff, *Fungal Diversity*, 33, pp. 1-45.
40. Walker J.F., Miller O.K., Horton J.L., 2005, Hyperdiversity of ectomycorrhizal fungus assemblages on oak seedlings in mixed forests in the southern Appalachian Mountains, *Molecular Ecology*, 14(3), pp. 829-838.
41. Ishida T.A., Nara K., Hogetsu T., 2007, Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: Insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests, *New Phytologist*, 174(2), pp. 430-440.
42. Van der Heijden M.G.A., Klironomos J.N., Ursic M., Moutoglis P., Streitwolf-Engel R., Boller T., Wiemken A., Sanders I.R., 1998, Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity, *Nature*, 396, pp. 69-72.
43. Massicotte H.B., Molina R., Tackaberry L.E., Smith J.E., Amaranthus M.P., 1999, Diversity and host specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from three adjacent forest sites by five host species, *Canadian Journal of Botany*, 77(8), pp. 1053-1076.
44. LoBuglio K.F., 1999, *Cenococcum, Ectomycorrhizal fungi key genera in profile*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 287-309.
45. Hayward J., Horton T.R., Pauchard A., Nunez M.A., 2015, A single ectomycorrhizal fungal species can enable a *Pinus* invasion, *Ecology*, 96(5), pp. 1438-1444.

46. Miyamoto Y., Maximov T.C., Bryanin S.V., Kononov A., Sugimoto A., 2022, Host phylogeny is the primary determinant of ectomycorrhizal fungal community composition in the permafrost ecosystem of eastern Siberia at a regional scale, *Fungal Ecology*, 55.
47. Tedersoo L., Smith M.E., 2013, Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground, *Fungal Biology Reviews*, 27(3-4), pp. 83-99.
48. Guo M., Gao G., Ding G., Zhang Y., 2020, Drivers of ectomycorrhizal fungal community structure associated with *Pinus sylvestris* var. *mongolica* differ at regional vs. local spatial scales in Northern China, *Forests*, 11(3), pp. 1-20.
49. Rosinger C., Sandén H., Matthews B., Mayer M., Godbold D.L., 2018, Patterns in ectomycorrhizal diversity, community composition, and exploration types in European beech, pine, and spruce forests, *Forests*, 9(8).
50. Glassman S.I., Wang I.J., Bruns T.D., 2017, Environmental filtering by pH and soil nutrients drives community assembly in fungi at fine spatial scales, *Molecular Ecology*, 26(24), pp. 6960-6973.
51. Li X., Kang W., Liu S., Yin H., Lyu Q., Su Y., Liu J., Liu J., Fan C., Chen G., Zhao K., Li X., 2021, Diversity of ectomycorrhizal fungal communities in four types of stands in *Pinus massoniana* plantation in the west of China, *Forests*, 12(6), pp. 1-17.
52. Lamb R.J., Richards B.N., 1970, Some mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* and *P. elliottii* var. *elliottii* in Australia, *Transactions of the British Mycological Society*, 54(3), pp. 371-378.
53. Chu-Chou M., 1979, Mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* in New Zealand, *Soil Biology and Biochemistry*, 11(6), pp. 557-562.
54. Visser S., 1995, Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire, *New Phytologist*, 129(3), pp. 389-401.
55. Rao C.S., Sharma G.D., Shukla A.K., 1997, Distribution of ectomycorrhizal fungi in pure stands of different age groups of *Pinus kesiya*, *Canadian Journal of Microbiology*, 43(1), pp. 85-91.
56. Lu X., Malajczuk N., Brundrett M., Dell B., 1999, Fruiting of putative ectomycorrhizal fungi under blue gum (*Eucalyptus globulus*) plantations of different ages in Western Australia, *Mycorrhiza*, 8, pp. 255-261.

57. Mason P.A., Last F.T., Pelham J., Ingleby K., 1982, Ecology of some fungi associated with an ageing stand of birch (*Betula pendula* and *B. pubescens*), *Forest Ecology and Management*, 4, pp. 19-39.
58. Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grove T., Malajczuk N., 1996, *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*, ACIAR Monograph.
59. Kauserud H., Stige L.C., Vik J.O., Økland R.H., Høiland K., Stenseth N.C., 2008, Mushroom fruiting and climate change, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), pp. 3811-3814.
60. Dyshko V., Hilszczańska D., Davydenko K., Matić S., Moser W.K., Borowik P., Oszako T., 2024, An overview of mycorrhiza in pines: Research, species, and applications, *Plants*, 13(4), pp. 506.
61. Tomao A., Bonet J.A., De Aragón J.M., De-Miguel S., 2017, Is silviculture able to enhance wild forest mushroom resources? Current knowledge and future perspectives, *Forest Ecology and Management*, 402, pp. 102-114.
62. Jones M.D., Durall D.M., Cairney J.W.G., 2003, Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging, *New Phytologist*, 157(3), pp. 399-422.
63. Kałucka I.L., Jagodziński A.M., 2016, Successional traits of ectomycorrhizal fungi in forest reclamation after surface mining and agricultural disturbances: A review, *Dendrobiology*, 76, pp. 91-104.
64. Yamada A., 2022, Cultivation studies of edible ectomycorrhizal mushrooms: Successful establishment of ectomycorrhizal associations *in vitro* and efficient production of fruiting bodies, *Mycoscience*, 63(6), pp. 235-246.
65. Yamada A., Furukawa H., Yamanaka T., 2017, Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms in Japan, *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(4), pp. 389-390.
66. Kawai M., 1997, Artificial ectomycorrhiza formation on roots of air-layered *Pinus densiflora* saplings by inoculation with *Lyophyllum shimeji*, *Mycologia*, 89(2), pp. 228-232.
67. Savoie J.M., Largeteau M.L., 2011, Production of edible mushrooms in forests: Trends in development of a mycosilviculture, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), pp. 971-979.

68. Debaud J.C., Gay G., 1987, *In vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*, *The New Phytologist*, 105(3), pp. 429-435.
69. Futai K., Taniguchi T., Kataoka R., 2008, Ectomycorrhizae and their importance in forest ecosystems, *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*, Springer, pp. 241-285.
70. Bruns D., 1995, Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi, *Plant and Soil*, 170, pp. 63-73.
71. Tedersoo L., May T.W., Smith M.E., 2009, Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages, *Mycorrhiza*, 20(4), pp. 217-263.
72. Morris M.H., Pérez-Pérez M.A., Smith M.E., Bledsoe C.S., 2009, Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a tropical cloud forest, *FEMS Microbiology Ecology*, 69(2), pp. 274-287.
73. Marschner H., 1995, *Mineral nutrition of higher plants*, Academic Press, London.
74. Turnbull M.H., Goodall R., Stewart G.R., 1995, The impact of mycorrhizal colonization upon nitrogen source utilization and metabolism in seedlings of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Eucalyptus maculata* Hook, *Plant, Cell and Environment*, 1(8), pp. 1386-1394.
75. Näsholm T., Ekblad A., Nordin A., Giesler R., Hogberg M., Hogberg P., 1998, Boreal forest plants take up organic nitrogen, *Nature*, 392, pp. 914-916.
76. Bhat M.N., Jeyarajan R., Ramaraj B., 1997, Biocontrol of damping off of *Eucalyptus tereticornis* Sm. using ectomycorrhizae, *Indian Forester*, 123, pp. 307-312.
77. Soudzilovskaia N.A., Van Bodegom P.M., César T., Zelfde M. van't, McCallum I., McCormack M.L., Fisher J.B., Brundrett M.C., De Sá N.C., Tedersoo L., 2019, Global mycorrhizal plant distribution linked to terrestrial carbon stocks, *Nature Communications*, 10(1), pp. 1-10.
78. Simard S.W., 2018, Mycorrhizal networks facilitate tree communication, learning, and memory, *Signaling and Communication in Plants*, Springer, pp. 191-213.

79. Amend A., 2006, *The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem*, Taylor & Francis.
80. Nedelin T., 2014, Ectomycorrhiza–Nature and significance for functioning of forest ecosystems, *Forestry Ideas*, 20(1), pp. 3-29.
81. Sitta N., Davoli P., 2012, Edible ectomycorrhizal mushrooms: International markets and regulations, *Edible ectomycorrhizal mushrooms*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 355-380.
82. Pérez-Moreno J., Martínez-Reyes M., 2014, Edible ectomycorrhizal mushrooms: Biofactories for sustainable development, *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*, Springer, Cham, pp. 151-233.
83. Molina R., O'Dell T., Luoma D., Amaranthus M., Castellano M., Russell K., 1993, *Biology, ecology, and social aspects of wild edible mushrooms in the forests of the Pacific Northwest: a preface to managing commercial harvest*, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station.
84. Huang J., Nara K., Lian C., Zong K., Peng K., Xue S., Shen Z., 2012, Ectomycorrhizal fungal communities associated with Masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.) in Pb-Zn mine sites of central south China, *Mycorrhiza*, 22(8), pp. 589-602.
85. Malajczuk N., Reddell P., Brundrett M.C., 1994, Role of ectomycorrhizal fungi in minesite reclamation, *Mycorrhizae and plant health*, Amer Phytopathological Society, pp. 83-100.
86. Boroujeni D.S., Hemmatinezhad B., 2015, Review of application and importance of ectomycorrhiza fungi and their role in the stability of ecosystems, *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12(1), pp. 153-158.
87. Keeley J.E., 2012, Ecology and evolution of pine life histories, *Annals of Forest Science*, 69(4), pp. 445-453.
88. Nobis M.P., Traiser C., Roth-Nebelsick A., 2012, Latitudinal variation in morphological traits of the genus *Pinus* and its relation to environmental and phylogenetic signals, *Plant Ecology and Diversity*, 5(1), pp. 1-11.
89. Hoeksema J.D., Bever J.D., Chakraborty S., Chaudhary V.B., Gardes M., Gehring C.A., Hart M.M., Housworth E.A., Kaonongbua W., Klironomos J.N.,

- Lajeunesse M.J., Meadow J., Milligan B.G., Piculell B.J., Pringle A., Rúa M.A., Umbanhowar J., Viechtbauer W., Wang Y.W., Wilson G.W.T., Zee P.C., 2018, Evolutionary history of plant hosts and fungal symbionts predicts the strength of mycorrhizal mutualism, *Communications biology*, 1, pp. 116.
90. Richardson D.M., Allsopp N., D'antonio C.M., Milton S.J., Rejmánek M., 2000, Plant invasions – the role of mutualisms, *Biological Reviews*, 75(1), pp. 65-93.
 91. Molina R., Trappe J.M., 1994, Biology of the ectomycorrhizal genus, *Rhizopogon* I. Host associations, host-specificity and pure culture syntheses, *New Phytologist*, 126(4), pp. 653-675.
 92. Baseia I.G., Milanez A.I., 2002, *Rhizopogon* (Rhizopogonaceae): Hypogeous fungi in exotic plantations from the state of São Paulo, Brazil, *Acta Botanica Brasilica*, 16(1), pp. 55-59.
 93. Molina R., Smith J.E., McKay D., Melville L.H., 1997, Biology of the ectomycorrhizal genus, *Rhizopogon*: III. Influence of co-cultured conifer species on mycorrhizal specificity with the arbutoid hosts *Arctostaphylos uva-ursi* and *Arbutus menziesii*, *New Phytologist*, 137(3), pp. 519-528.
 94. Zhang R., Shi X.F., Liu P.G., Wilson A.W., Mueller G.M., 2022, Host shift speciation of the ectomycorrhizal genus *Suillus* (Suillineae, Boletales) and biogeographic comparison with its host Pinaceae, *Frontiers in Microbiology*, 13, pp. 1-11.
 95. Dahlberg A., Finlay R.D., 1999, *Suillus*, *Ectomycorrhizal fungi key genera in profile*, Springer, pp. 33-64.
 96. Campbell D.B., Jones M.D., Kiiskila S., Bulmer C., 2004, Two-year field performance of lodgepole pine seedlings: Effects of container type, mycorrhizal fungal inoculants, and site preparation, *Journal of Ecosystems and Management*, pp. 1-11.
 97. Domínguez-Núñez J.A., Albanesi A.S., 2020, Ectomycorrhizal fungi as biofertilizers in forestry, *Biostimulants in Plant Science*, pp. 1-18.
 98. Nara K., 1998, Composition of symbiotic fungi and their ecological roles in beech forests (in Japanese), *Bun-ichi Sogo Shuppan, Japan*, pp 79–149, pp. 79-149.

99. Koide R.T., Fernandez C., Malcolm G., 2014, Determining place and process: Functional traits of ectomycorrhizal fungi that affect both community structure and ecosystem function, *New Phytologist*, 201(2), pp. 433-439.
100. Schöll L. van, 2006, *Ectomycorrhizal fungi and Pinus sylvestris: aluminium toxicity, base cation deficiencies and exudation of organic anions*, Wageningen University.
101. Termorshuizen A.J., Schaffers A.P., 1990, Succession of mycorrhizal fungi in stands of *Pinus sylvestris* in the Netherlands, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 28, pp. 503-507.
102. Mishra R.R., Sharma G.D., 1981, Studies on mycorrhizal association of *Pinus kesiya* (Royle), *The Indian Botanical Society*, 60, pp. 168-171.
103. Imanuddin R., Hidayat A., Rachmat H.H., Turjaman M., Pratiwi, Nurfatriani F., Indrajaya Y., Susilowati A., 2020, Reforestation and sustainable management of *Pinus merkusii* forest plantation in Indonesia: A review, *Forests*, 11(12), pp. 1-22.
104. Castellano M.A., Molina R., 1989, Mycorrhizae, *The Container Tree Nursery Manual Volume 5 -The Biological Component: Nursery Pests and Mycorrhizae*, Department of Agriculture, Forest service, pp. 101-171.
105. Jiang D., Xu M., Yang Y., Zhang J., 2024, Effects of stand types on ectomycorrhizal fungal community composition and structure of *Pinus massoniana* in subtropical mountain forest ecosystems, *Forests*, 15(2), pp. 1-14.
106. Garcia M.O., Smith J.E., Luoma D.L., Jones M.D., 2016, Ectomycorrhizal communities of ponderosa pine and lodgepole pine in the south-central Oregon pumice zone, *Mycorrhiza*, 26(4), pp. 275-286.
107. Miyamoto Y., Narimatsu M., Nara K., 2018, Effects of climate, distance, and a geographic barrier on ectomycorrhizal fungal communities in Japan: A comparison across Blakiston's Line, *Fungal Ecology*, 33, pp. 125-133.
108. Tedersoo L., Bahram M., Põlme S., Kõljalg U., Yorou N.S., Wijesundera R., Ruiz L.V., Vasco-Palacios A.M., Thu P.Q., Suija A., Smith M.E., Sharp C., Saluveer E., Saitta A., Rosas M., Riit T., Ratkowsky D., Pritsch K., Põldmaa K., Piepenbring M., Phosri C., Peterson M., Parts K., Pärtel K., Otsing E., Nouhra E., Njouonkou A.L., Nilsson R.H., Morgado L.N., Mayor J., May T.W., Majuakim L., Lodge D.J., Lee S., Larsson K.H., Kohout P., Hosaka K., Hiiesalu

- I., Henkel T.W., Harend H., Guo L.D., Greslebin A., Grelet G., Geml J., Gates G., Dunstan W., Dunk C., Drenkhan R., Dearnaley J., De Kesel A., Dang T., Chen X., Buegger F., Brearley F.Q., Bonito G., Anslan S., Abell S., Abarenkov K., 2014, Global diversity and geography of soil fungi, *Science*, 346(6213).
109. Valdés R.C., García F.G., Tedersoo L., Anslan S., Oviedo E.H.C., Sánchez-Peña S.R., 2020, Profiling the community structure of ectomycorrhizal fungi at endemic pine (*Pinus greggii*) stands of northeastern Mexico, *Southern Forests*, pp. 292-302.
110. García-Rodríguez J.L., Pérez-Moreno J., Ríos-Leal D., Saez-Delgado P., Atala-Bianchi C., Sánchez-Olate M., Pereira-Cancino G., 2017, *In vitro* growth of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus radiata* plantations in Chile, *Revista Fitotecnica Mexicana*, 40(4), pp. 415-423.
111. Durall D.M., Gamiet S., Simard S.W., Kudrna L., Sakakibara S.M., 2006, Effects of clearcut logging and tree species composition on the diversity and community composition of epigeous fruit bodies formed by ectomycorrhizal fungi, *Canadian Journal of Botany*, 84(6), pp. 966-980.
112. Hagerman S.M., Jones M.D., Bradfield G.E., Gillespie M., Durall D.M., 1999, Effects of clear-cut logging on the diversity and persistence of ectomycorrhizae at a subalpine forest, *Canadian Journal of Forest Research*, 29(1), pp. 124-134.
113. Gustafsson L., Baker S.C., Bauhus J., Beese W.J., Brodie A., Kouki J., Lindenmayer D.B., Lhmus A., Pastur G.M., Messier C., Neyland M., Palik B., Sverdrup-Thygeson A., Volney W.J.A., Wayne A., Franklin J.F., 2012, Retention forestry to maintain multifunctional forests: A world perspective, *BioScience*, 62(7), pp. 633-645.
114. Valdés M., Asbjornsen H., Gómez-Cárdenas M., Juárez M., Vogt K.A., 2006, Drought effects on fine-root and ectomycorrhizal-root biomass in managed *Pinus oaxacana* Mirov stands in Oaxaca, Mexico, *Mycorrhiza*, 16(2), pp. 117-124.
115. Pérez-Izquierdo L., Zabal-Aguirre M., Verdú M., Buée M., Rincón A., 2020, Ectomycorrhizal fungal diversity decreases in Mediterranean pine forests adapted to recurrent fires, *Molecular Ecology*, 29(13), pp. 2463-2476.
116. Cairney J.W.G., Bastias B.A., 2007, Influences of fire on forest soil fungal communities, *Canadian Journal of Forest Research*, 37(2), pp. 207-215.

117. Kipfer T., Moser B., Egli S., Wohlgemuth T., Ghazoul J., 2011, Ectomycorrhiza succession patterns in *Pinus sylvestris* forests after stand-replacing fire in the Central Alps, *Oecologia*, 167(1), pp. 219-228.
118. Buscardo E., Rodríguez-Echeverría S., Martín M.P., De Angelis P., Pereira J.S., Freitas H., 2010, Impact of wildfire return interval on the ectomycorrhizal resistant propagules communities of a Mediterranean open forest, *Fungal Biology*, 114(8), pp. 628-636.
119. Sousa N.R., Franco A.R., Ramos M.A., Oliveira R.S., Castro P.M.L., 2011, Reforestation of burned stands: The effect of ectomycorrhizal fungi on *Pinus pinaster* establishment, *Soil Biology and Biochemistry*, 43(10), pp. 2115-2120.
120. Franco A.R., Sousa N.R., Ramos M.A., Oliveira R.S., Castro P.M.L., 2014, Diversity and persistence of ectomycorrhizal fungi and their effect on nursery-inoculated *Pinus pinaster* in a post-fire plantation in northern Portugal, *Microbial Ecology*, 68(4), pp. 761-772.
121. Policelli N., Horton T.R., Hudon A.T., Patterson T.R., Bhatnagar J.M., 2020, Back to roots: The role of ectomycorrhizal fungi in boreal and temperate forest restoration, *Frontiers in Forests and Global Change*, 3(August).
122. Turnbull J.W., Armitage F.B., Burley J., 1980, Distribution and ecology of the *Pinus kesiya* complex, *Tropical Forestry Paper 9. Oxford, UK, Commonwealth Forestry Institute.*, pp. 13-45.
123. Cooling E.N., 1968, *Pinus merkusii*. C.F.I. Monographs; Fast growing timber tree of the lowland tropics, *Commonwealth Forestry Institute. Department of Forestry, University of Oxford*, 4, pp. 169.
124. Richardson D.M., Rundel P.W., 1998, Ecology and biogeography of *Pinus*: an introduction. In: Richardson DM, editor. Ecology and biogeography of *Pinus*, *Cambridge (UK): Cambridge University Press*, pp. 3-46.
125. Farjon A., Thomas P., Luu N.D.T., 2004, Conifer conservation in Vietnam: Three potential flagship species, *ORYX*, 38(3), pp. 257-265.
126. Khemnark C., 1987, Study on inoculation of ECM on *P. kesiya* in Thailand, *Thai Journal of Forestry*, pp. 17.
127. Rao C.S., Sharma G.D., Shukla A.K., 1996, Ectomycorrhizal efficiency of various mycobionts with *Pinus kesiya* seedlings in forest and degraded soils, *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 62(5), pp. 427-434.

128. Gardes M., Bruns T.D., 1993, ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Molecular Ecology*, 2(2), pp. 113-118.
129. White T.J., Bruns S., Lee S., Taylor J., 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *Academic Press, Inc.*, pp. 315-322.
130. Winnepernickx B., Backeljau T., De Wachter R., 1993, Technical tips: Extraction of high molecular weight DNA from molluscs, *Trends Genet*, 9(12), pp. 407.
131. Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J., 1991, Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, *Plant Molecular Biology*, 17(5), pp. 1105-1109.
132. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P., 2016, DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data, *Nature Methods*, 13(7), pp. 581-583.
133. Martin M., 2011, Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads, *EMBnet Journal*, 17, pp. 10-12.
134. Abarenkov K., Zirk A., Piirmann T., Pöhönen R., Ivanov F., Nilsson R.H., Kõljalg U., 2022, UNITE QIIME release for fungi 2, *UNITE Community*.
135. Viện Khoa học Lâm Nghiệp Việt Nam, Kỹ thuật trồng thông ba lá.
136. Bộ Khoa học và Công nghệ, Tiêu chuẩn quốc gia, TCVN 11872-3:2020, Giống cây lâm nghiệp - Cây giống thông, Phần 3: Thông ba lá.
137. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Tiêu chuẩn ngành 04TCN 65-2003 - Quy trình kỹ thuật trồng rừng Thông ba lá.
138. Shannon C.E., Weaver W., 1949, *The mathematical theory of communication*, University of Illinois Press.
139. Pielou E.C., 1966, The measurement of diversity in different types of biological collections, *Journal of Theoretical Biology*, 13, pp. 131-144.
140. Haase D.L., 2008, Understanding forest seedling quality: Measurements and interpretation, *Tree Planters' Notes*, 52, pp. 24-30.
141. Marx D.H., 1969, The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal

- fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria, *Phytopathology*, 59(2), pp. 153-163.
142. Hồ Bảo Thùy Quyên, 2013, *Ecophysiological characteristics of ectomycorrhizal ammonia fungi in Hebelomatoid clade*, Luận án tiến sĩ Tài nguyên sinh vật, Chiba University, Chiba, Japan.
 143. Largent D., 1977, *How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic Features*, Eureka, CA, Mad River Press.
 144. Hall I.R., Lyon T., Yun W., Buchanan P., 2016, *A list of putative edible or medicinal ectomycorrhizal mushrooms*, Truffles & Mushrooms (Consulting Ltd).
 145. Wei J., Gao W., Huang C.Y., 2021, A checklist of edible ectomycorrhizal mushrooms in China, *Mycosystema*, 40(8), pp. 1938-1957.
 146. Kumla J., Suwannarach N., Liu Y.S., Tanruean K., Lumyong S., 2023, Survey of edible *Amanita* in Northern Thailand and their nutritional value, total phenolic content, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities, *Journal of Fungi*, 9(3).
 147. Yuwa-amornpitak T., Yeunyaw P.-N., 2020, Diversity wild mushrooms in the community forest of Na Si Nuan Sub-District, Thailand, *Journal of Biochemical Technology*, 11(3), pp. 28-36.
 148. Ingleby K., Thanh V.T.X., Manson P., 2004, Manual for the collection, identification and use of edible mycorrhizal mushrooms associated with forest trees, *World Publishing House. Hanoi*.
 149. Lee J.S., Park J.Y., Kim N.K., Nguyen T.B., Kim M., Woo E.J., Kim C., 2020, A survey of macrofungal diversity in Da Lat, *The Korean Journal of Mycology*, 48, pp. 135-149.
 150. Bellemain E., Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P., Kauserud H., 2010, ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases, *BMC Microbiology*, 10(1), pp. 189.
 151. Tedersoo L., Mikryukov V., Anslan S., Bahram M., Khalid A.N., Corrales A., Agan A., Vasco-Palacios A.M., Saitta A., Antonelli A., Rinaldi A.C., Verbeken A., Sulistyo B.P., Tamgnoue B., Furneaux B., Ritter C.D., Nyamukondiwa C., Sharp C., Marín C., Dai D.Q., Gohar D., Sharmah D., Biersma E.M., Cameron E.K., De Crop E., Otsing E., Davydov E.A., Albornoz F.E., Brearley F.Q.,

- Buegger F., Gates G., Zahn G., Bonito G., Hiiesalu I., Hiiesalu I., Zettur I., Barrio I.C., Pärn J., Heilmann-Clausen J., Ankuda J., Kupagme J.Y., Sarapuu J., Maciá-Vicente J.G., Fovo J.D., Geml J., Alatalo J.M., Alvarez-Manjarrez J., Monkaï J., Põldmaa K., Runnel K., Adamson K., Bråthen K.A., Pritsch K., Tchan K.I., Armolaitis K., Hyde K.D., Newsham K.K., Panksep K., Adebola L.A., Lamit L.J., Saba M., Silva Cáceres M.E. da, Tuomi M., Gryzenhout M., Bauters M., Bálint M., Wijayawardene N., Hagh-Doust N., Yorou N.S., Kurina O., Mortimer P.E., Meidl P., Nilsson R.H., Puusepp R., Casique-Valdés R., Drenkhan R., Garibay-Orijel R., Godoy R., Alfarraj S., Rahimlou S., Pölme S., Dudov S.V., Mundra S., Ahmed T., Netherway T., Henkel T.W., Roslin T., Fedosov V.E., Onipchenko V.G., Yasanthika W.A.E., Lim Y.W., Piepenbring M., Klavina D., Kõljalg U., Abarenkov K., 2021, The Global Soil Mycobiome consortium dataset for boosting fungal diversity research, *Fungal Diversity*, 111(1), pp. 573-588.
152. Edwards J.D., Krichels A.H., Seyfried G.S., Dalling J., Kent A.D., Yang W.H., 2024, Soil microbial community response to ectomycorrhizal dominance in diverse neotropical montane forests, *Mycorrhiza*, 34(1), pp. 95-105.
153. Bierza W., Bierza K., Trzebny A., Greń I., Dabert M., Ciepał R., Trocha L.K., 2020, The communities of ectomycorrhizal fungal species associated with *Betula pendula* Roth and *Pinus sylvestris* L. growing in heavy-metal contaminated soils, *Plant and Soil*, 457(1-2), pp. 321-338.
154. Dang P., Yu X., Le H., Liu J., Shen Z., Zhao Z., 2017, Effects of stand age and soil properties on soil bacterial and fungal community composition in Chinese pine plantations on the Loess Plateau, *PLoS ONE*, 12(10).
155. Wen Z., Shi L., Tang Y., Hong L., Xue J., Xing J., Chen Y., Nara K., 2018, Soil spore bank communities of ectomycorrhizal fungi in endangered Chinese Douglas-fir forests, *Mycorrhiza*, 28(1), pp. 49-58.
156. Glassman S.I., Peay K.G., Talbot J.M., Smith D.P., Chung J.A., Taylor J.W., Vilgalys R., Bruns T.D., 2015, A continental view of pine-associated ectomycorrhizal fungal spore banks: A quiescent functional guild with a strong biogeographic pattern, *New Phytologist*, 205(4), pp. 1619-1631.
157. Southam H., Stafl N., Guichon S.H.A., Simard S.W., 2022, Characterizing the ectomycorrhizal fungal community of whitebark pine in Interior British

- Columbia: Mature trees, natural regeneration and planted seedlings, *Frontiers in Forests and Global Change*, 4, pp. 1-16.
158. Murata M., Kanetani S., Nara K., 2017, Ectomycorrhizal fungal communities in endangered *Pinus amamiana* forests, *PLoS ONE*, 12(12), pp. 1-19.
 159. Dickie I.A., Bolstridge N., Cooper J.A., Peltzer D.A., 2010, Co-invasion by *Pinus* and its mycorrhizal fungi, *New Phytologist*, 187(2), pp. 475-484.
 160. Kumar S., Jishtu V., Thakur J.S., Lakhanpal T.N., 2017, Studies on mycorrhiza in *Pinus gerardiana* Wall. ex D. Don, a threatened pine of the NW Himalaya, *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*, Springer Singapore, pp. 359-389.
 161. Reverchon F., Ortega-Larrocea M.D.P., Pérez-Moreno J., 2015, Structure and diversity of ectomycorrhizal resistant propagules in *Pinus montezumae* neotropical forests and implications for seedling establishment, *Mycoscience*, 56(2), pp. 214-223.
 162. Cho Y., Yoo S., Park M.S., Kim J.S., Kim C.S., Lim Y.W., 2021, Ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* seedlings under flooding stress, *Sustainability*, 13(8), pp. 1-10.
 163. Atala C., Muñoz-Capponi E., Pereira G., Navarrete E., Oses R., Molina-Montenegro M., 2012, Impact of mycorrhizae and irrigation in the survival of seedlings of *Pinus radiata* D. Don subject to drought, *Gayana - Botanica*, 69(2), pp. 296-304.
 164. Newbound M., McCarthy M.A., Lebel T., 2010, Fungi and the urban environment: A review, *Landscape and Urban Planning*, 96(3), pp. 138-145.
 165. Abrego N., Crosier B., Somervuo P., Ivanova N., Abrahamyan A., Abdi A., Hämäläinen K., Junninen K., Maunula M., Purhonen J., Ovaskainen O., 2020, Fungal communities decline with urbanization—more in air than in soil, *ISME Journal*, 14(11), pp. 2806-2815.
 166. Wan X., Zhou R., Yuan Y., Xing W., Liu S., 2024, Microbiota associated with urban forests, *PeerJ*, 12.
 167. Hui N., Liu X., Johan Kotze D., Jumpponen A., Francini G., Setälä H., 2017, Ectomycorrhizal fungal communities in urban parks are similar to those in natural forests but shaped by vegetation and park age, *Applied and Environmental Microbiology*, 83(23).

168. Cairney J.W.G., Chambers S.M., 2001, *Ectomycorrhizal fungi key genera in profile*, CRC Press.
169. Kipfer T., Egli S., Ghazoul J., Moser B., Wohlgemuth T., 2010, Susceptibility of ectomycorrhizal fungi to soil heating, *Fungal Biology*, 114(5-6), pp. 467-472.
170. Bruns T.D., Peay K.G., Boynton P.J., Grubisha L.C., Hynson N.A., Nguyen N.H., Rosenstock N.P., 2009, Inoculum potential of *Rhizopogon* spores increases with time over the first 4 yr of a 99-yr spore burial experiment, *New Phytologist*, 181(2), pp. 463-470.
171. Molina R., Trappe J.M., Grubisha L.C., Spatafora J.W., 1999, *Rhizopogon, Ectomycorrhizal fungi key genera in profile*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
172. Agerer R., 1999, Never change a functionally successful principle: The evolution of Boletales s.l. (Hymenomycetes, Basidiomycota) as seen from below-ground features, *Sendteria*, pp. 5-91.
173. Pampolina N.M., Delacruz R.E., Garcia M.U., 1995, Ectomycorrhizal fungi in China, *Mycorrhizas for Plantation Forestry in Asia*, (62), pp. 47-50.
174. Bâ A.M., McGuire K.L., Diédhiou A.G., 2014, *Ectomycorrhizal symbioses in tropical and neotropical forests*, CRC Press.
175. Dickie I.A., Reich P.B., 2005, Ectomycorrhizal fungal communities at forest edges, *Journal of Ecology*, 93(2), pp. 244-255.
176. Dokmai P., Phosri C., Khangrang R., Suwannasai N., 2015, Above- and below-ground ectomycorrhizal diversity in a pine-oak forest in Northeastern Thailand, *Chiang Mai Journal of Science*, 42(1), pp. 80-88.
177. Odriozola I., Martinovic T., Bahnmann B.D., Ryšánek D., Mašínová T., Sedlák P., Merunková K., Kohout P., Tomšovský M., Baldrian P., 2020, Stand age affects fungal community composition in a Central European temperate forest, *Fungal Ecology*, 48.
178. Mason P.A., Last F.T., 1986, Are the occurrences of sheathing mycorrhizal fungi in new and regenerating forests and woodlands in Scotland predictable?, *Tree and wildlife in Scottish uplands*, pp. 63-70.
179. Trocha L.K., Rudawska M., Leski T., Dabert M., 2006, Genetic diversity of naturally established ectomycorrhizal fungi on Norway spruce seedlings under nursery conditions, *Microbial Ecology*, 52(3), pp. 418-425.

180. Rudawska M., Leski T., 2021, Ectomycorrhizal fungal assemblages of nursery-grown scots pine are influenced by age of the seedlings, *Forests*, 12(2), pp. 1-16.
181. Pietras M., Rudawska M., Leski T., Karliński L., 2013, Diversity of ectomycorrhizal fungus assemblages on nursery grown European beech seedlings, *Annals of Forest Science*, 70(2), pp. 115-121.
182. Mi-Yeong S., Eom A.H., 2009, Diversity of ectomycorrhizal fungi of *Pinus densiflora* Siebold et Zucc. seedlings in a disturbed forest on Mt. Songni, *Journal of Ecology and Field Biology*, 32(1), pp. 13-18.
183. Reverchon F., Pilar Ortega-Larrocea M. del, Bonilla-Rosso G., Pérez-Moreno J., 2012, Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forests, *FEMS Microbiology Ecology*, 80(2), pp. 479-487.
184. Nara K., 2006, Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession, *New Phytologist*, 169(1), pp. 169-178.
185. Bai Z., Ye J., Liu S.F., Sun H.H., Yuan Z.Q., Mao Z.K., Fang S., Long S.F., Wang X.G., 2024, Age-related conservation in plant–soil feedback accompanied by ectomycorrhizal domination in temperate forests in Northeast China, *Journal of Fungi*, 10(5).
186. Southworth D., Carrington E.M., Frank J.L., Gould P., Harrington C.A., Devine W.D., 2009, Mycorrhizas on nursery and field seedlings of *Quercus garryana*, *Mycorrhiza*, 19(3), pp. 149-158.
187. Sims K., Watling R., De La R., Biotech C., Jeffries P., 1997, Ectomycorrhizal fungi of the Philippines: a preliminary survey and notes on the geographic biodiversity of the Sclerodermatales, *Biodiversity and Conservation*, (6), pp. 45-58.
188. Truong C. Monroy Guzmán, C., Kuhar, F. & Pfister, D., 2020, *Nothojafnea thaxteri*, *IUCN Red List of Threatened Species*, International Union for Conservation of Nature.
189. Massicotte H.B., Molina R., Luoma D.L., Smith J.E., 1994, Biology of the ectomycorrhizal genus, *Rhizopogon* II. Patterns of host-fungus specificity following spore inoculation of diverse hosts grown in monoculture and dual culture, *New Phytologist*, 126(4), pp. 677-690.

190. Dominguez-Nuñez J.A., Saiz M., Calderon C., Saiz de Omeñaca J.A., 2013, Physiological effects of *Rhizopogon roseolus* on *Pinus halepensis* seedlings, *Forest Systems*, 22(3), pp. 568-572.
191. Steinfeld D., Amaranths M.P., Cazares E., 2003, Survival of ponderosa pine (*Pinus ponderosa* dougl. ex laws.) seedlings outplanted with *Rhizopogon mycorrhizae* inoculated with spores at the nursery, *Journal of Arboriculture*, 29(4), pp. 197-203.
192. Ito S., Imai S., 1937, *Fungi of the Bonin Islands I. Transactions of the Sapporo Natural History Society*.
193. Orihara T., Yamamoto K., Hosaka K., 2019, Distribution, phylogeny and taxonomic treatment of a truffle-like fungus *Rhizopogon boninensis* (Rhizopogonaceae, Boletales), *Truffology*, 2(1), pp. 10-17.
194. Tedersoo L., Bahram M., Toots M., Diédhiou A.G., Henkel T.W., Kjoller R., Morris M.H., Nara K., Nouhra E., Peay K.G., Pöhlme S., Ryberg M., Smith M.E., Kõljalg U., 2012, Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi, *Molecular Ecology*, 21(17), pp. 4160-4170.
195. Smith S.E., Read D., Structure and development of ectomycorrhizal roots, *Mycorrhizal symbiosis*, Academic Press, pp. 191-272.
196. Molina R., 1980, Ectomycorrhizal inoculation of containerized Western conifer seedlings, *Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Forest and Range Experiment Station*, 357.
197. Rusca T.A., Kennedy P.G., Bruns T.D., 2006, The effect of different pine hosts on the sampling of *Rhizopogon* spore banks in five Eastern Sierra Nevada forests, *New Phytologist*, 170(3), pp. 551-560.
198. Collado E., Bonet J.A., Camarero J.J., Egli S., Peter M., Salo K., Martínez-Peña F., Ohenoja E., Martín-Pinto P., Primicia I., Büntgen U., Kurttila M., Oria-de-Rueda J.A., Martínez-de-Aragón J., Miina J., Miguel S. de-, 2019, Mushroom productivity trends in relation to tree growth and climate across different European forest biomes, *Science of the Total Environment*, 689, pp. 602-615.
199. Vaario L.-M., Yang X., Yamada A., 2017, Biogeography of the Japanese gourmet fungus, *Tricholoma matsutake*: A review of the distribution and functional ecology of Matsutake, *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*, pp. 319-344.

200. Karavani A., De Cáceres M., Martínez de Aragón J., Bonet J.A., Miguel S. de-, 2018, Effect of climatic and soil moisture conditions on mushroom productivity and related ecosystem services in Mediterranean pine stands facing climate change, *Agricultural and Forest Meteorology*, 248, pp. 432-440.
201. Sánchez-González M., Miguel S. de-, Martín-Pinto P., Martínez-Peña F., Pasalodos-Tato M., Oria-de-Rueda J.A., Martínez de Aragón J., Cañellas I., Bonet J.A., 2019, Yield models for predicting aboveground ectomycorrhizal fungal productivity in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* stands of northern Spain, *Forest Ecosystems*, 6(1), pp. 1-13.
202. Mlambo A., Maphosa M., 2021, Ectomycorrhizal mushroom yield association with woody species and leaf litter in amiombo woodland, central Zimbabwe, *African Journal of Ecology and Ecosystems*, 8(8), pp. 1-10.
203. Procházka P., Soukupová J., Tomšík K., Mullen K.J., Čábelková I., 2023, Climatic factors affecting wild mushroom foraging in central Europe, *Forests*, 14(2), pp. 1-11.
204. Brundett M., Dell B., Malajczuk N., Mingqin G., 1994, Mycorrhizas for plantation forestry in Asia, *Mycorrhizas for Plantation Forestry in Asia*.
205. Rincón A., Parladé J., Pera J., 2005, Effects of ectomycorrhizal inoculation and the type of substrate on mycorrhization, growth and nutrition of containerised *Pinus pinea* L. seedlings produced in a commercial nursery, *Annals of Forest Science*, 62(8), pp. 817-822.
206. Ingleby K., Thuy L.T.T., Phong N.T., Mason P.A., 2000, Ectomycorrhizal inoculum potential of soils from forest restoration site in South Vietnam, *Journal of Tropical Forest Science*, 12(2), pp. 418-422.
207. Lee D.K., 2007, *Keep Asia Green Volume I "Southeast Asia"*, IUFRO Headquarters,.
208. Berch S. M., Ka K.-H., Park H., Winder R., 2007, Development and potential of the cultivated and wild-harvested mushroom industries in the Republic of Korea and British Columbia, *BC Journal of Ecosystems and Management*, 8(3), pp. 53-75.
209. Yun W., Hall I.R., 2004, Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements, *Canadian Journal of Botany*, 82(8), pp. 1063-1073.

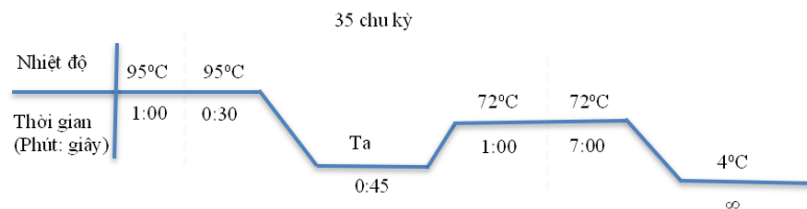
210. Park K.H., Oh S.Y., Yoo S., Park M.S., Fong J.J., Lim Y.W., 2020, Successional change of the fungal microbiome Pine seedling roots inoculated with *Tricholoma matsutake*, *Frontiers in Microbiology*, 11, pp. 1-12.
211. Guerin-Laguette A., Butler R., Wang Y., 2020, Advances in the cultivation of *Lactarius deliciosus* (Saffron milk cap) in New Zealand, *Mushrooms, humans and nature in a changing world: Perspectives from ecological, agricultural and social sciences*, Springer International Publishing, Switzerland, pp. 141-161.
212. Pilz D., Norvell L., Danell E., Molina R., 2003, *Ecology and management of commercially harvested chanterelle mushrooms*, Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, United States.
213. Ratkowsky D.A., Gates G.M., 2009, Macrofungi in early stages of forest regeneration in Tasmania's southern forests, *Tasforests*, 18, pp. 55-66.
214. Nara K., Nakaya H., Hogetsu T., 2003, Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji, *New Phytologist*, 158(1), pp. 193-206.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Trình tự mỗi sử dụng trong nghiên cứu

Primer	Trình tự	Ta	Ghi chú
ITS 1F	5'–TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3'	55	[128, 129]
ITS 4	5'– TCCTCCGCTTATTGATATGC–3'		
LR0R	5'– ACCCGCTGAACTTAAGC–3'	53	
LR5	5'– TCCTGAGGGAAACTTCG–3'		
TrnC	5'–CGAAATCGGTAGACGCTACG–3'	50	[131]
TrnD	5'–GGGGATAGAGGGACTTGAAC–3'		
ITS5F	5'–GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG–3'		[128, 129]
ITS2	5'–GCTGCGTTCTTCATCGATGC–3'		

Phụ lục 2. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR



Phụ lục 3. 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		Đủ 200 ml

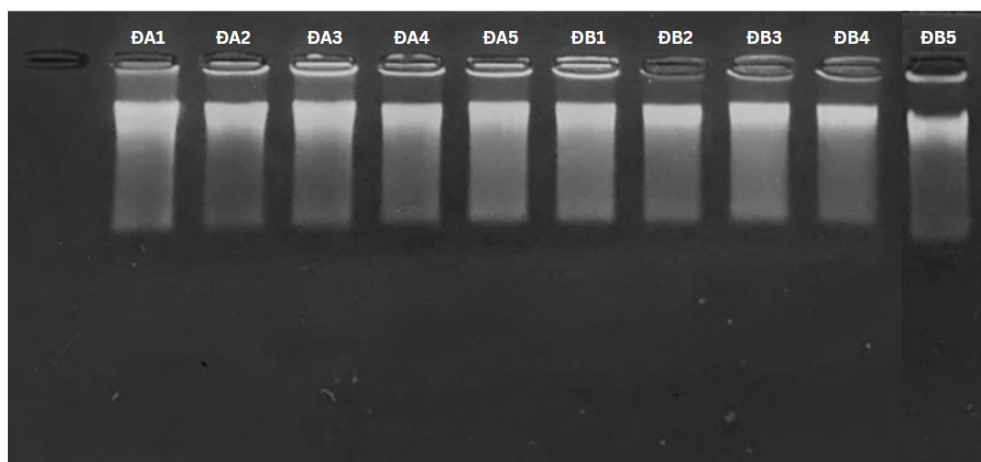
NaCl được cho vào cuối cùng sau khi các thành phần khác đã được hòa tan hoàn toàn.

Phụ lục 4. Thành phần dung dịch CIA

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

Phụ lục 5. Thành phần dung dịch TE

STT	Hóa chất	Nồng độ cuối	Số lượng
1	1M Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM	500 µl
2	0,5 EDTA (pH 8,0)	1 mM	100 µl

Phụ lục 6. Kết quả điện di DNA tổng tách chiết từ các mẫu đất**Phụ lục 7.** Bảng kết quả đo nanodrop mẫu DNA tổng được tách chiết

Mã mẫu đất	Nồng độ (ng/ul)	260/280	260/230
ĐA1	70,4	1,83	0,65
ĐA2	76,3	1,73	0,75
ĐA3	87,0	1,89	1,14
ĐA4	42,0	1,69	0,48
ĐA5	38,8	1,79	0,39
ĐB1	54,1	1,75	0,1
ĐB2	41,1	1,81	0,43
ĐB3	28,9	1,68	1,02
ĐB4	21,9	1,71	0,07
ĐB5	85,2	1,89	0,72

Phụ lục 8. Thành phần môi trường MS

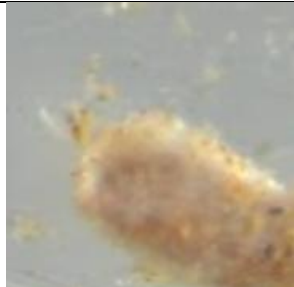
STT	Hóa chất	Nồng độ (mg/l)
1	NH ₄ NO ₃	1650
2	KNO ₃	1900
3	KH ₂ PO ₄	170
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
5	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
6	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
7	H ₃ BO ₃	6,2
8	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
9	KI	0,83
10	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
11	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
12	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
13	Pyridoxine(B6)	1
14	Thiamine	1

15	Nicotinic acid	1
16	m-Inositol	100
17	Biotine	0,01
18	D-Pantothenic acid	1
19	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
20	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3

Phụ lục 9. Thành phần môi trường MMN

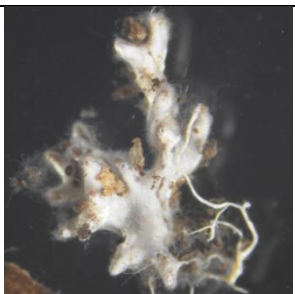
STT	Hóa chất	Khối lượng (/1000 ml)
1	(NH ₄) ₂ HPO ₄	250 mg
2	KH ₂ PO ₄	500 mg
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	150 mg
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	50 mg
5	NaCl	25 mg
6	FeEDTA	20 mg
7	Glucose	10 g
8	Malt Extract	3 g
9	Thiamine HCl	0.1 µg
10	Agar	8 - 15 g

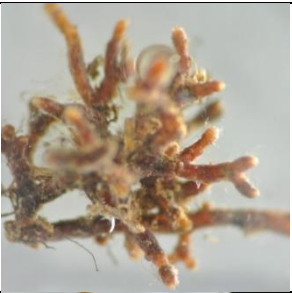
Phụ lục 10. Kết quả giải trình tự và hình ảnh chụp rế ở rừng trưởng thành Đa Nhim

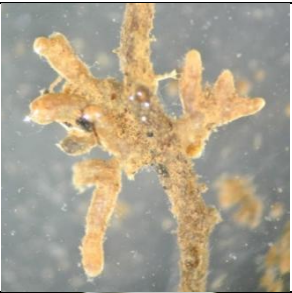
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-A01.1	<i>Russula laurocerasi</i>	
ABI-A01.3	<i>Tomentella</i> sp11	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-A02.1	<i>Lactifluus pilosus</i>	
ABI-A02.4	<i>Tomentella</i> sp12	
ABI-A03.1 ABI-A43.1	<i>Lactifluus subpruinus</i>	
ABI-A04.1 ABI-A23.1	<i>Russula subnigricans</i>	
ABI-A05.1	<i>Russula aeruginea</i>	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-A05.2	<i>Tylospora</i> sp1	
ABI-A06.2 ABI-A15.2 ABI-A45.2	<i>Russula</i> aff. <i>illota</i>	
ABI-A06.4 ABI-A44.3	<i>Laccaria japonica</i>	
ABI-A07.1 ABI-A12.1	<i>Zangia</i> sp.	
ABI-A07.2 ABI-A29.1	<i>Russula subatropurpurea</i>	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-A10.1	<i>Tomentella</i> sp14	
ABI-A10.2	<i>Sebacina</i> sp2	
ABI-A10.3 ABI-A11.4	<i>Lactifluus</i> sp1	
ABI-A11.1	<i>Tomentella stipitobasidia</i>	
ABI-A11.2	<i>Coltricia</i> sp.	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-A11.3	<i>Tomentella</i> sp15	
ABI-A12.2	<i>Tomentella badia</i>	
ABI-A13.1 ABI-A17.1 ABI-A28.1 ABI-A32.6 ABI-A49.1	<i>Cenococcum geophilum</i>	
ABI-A13.2	<i>Boletus reticulatus</i>	
ABI-A15.1	<i>Pulveroboletus</i> sp2	

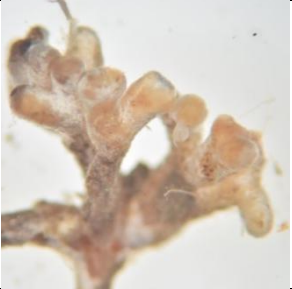
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-A16.1	<i>Sebacina</i> sp3	
ABI-A17.2	<i>Lactarius rubrocorrugatus</i>	
ABI-A17.6	<i>Macowanites</i> sp.	
ABI-A18.3	<i>Laccaria</i> sp.	
ABI-A21.1	<i>Thelephora</i> sp9	

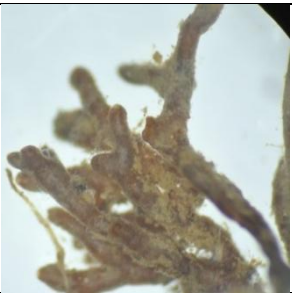
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-A21.2	<i>Tomentella</i> sp16	
ABI-A21.3	<i>Russula cyanoxantha</i>	
ABI-A26.1	<i>Sebacina</i> sp1	
ABI-A28.2 ABI-A48.2	<i>Rhizopogon flavidus</i>	
ABI-A28.3	<i>Tomentella</i> sp16	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-A28.4	<i>Lactifluus ambicystidiatus</i>	
ABI-A32.1	<i>Russula rosacea</i>	
ABI-A32.3	<i>Tomentella</i> sp17	
ABI-A32.4	<i>Sebacina</i> sp4	
ABI-A33.1	<i>Lactarius pinguis</i>	

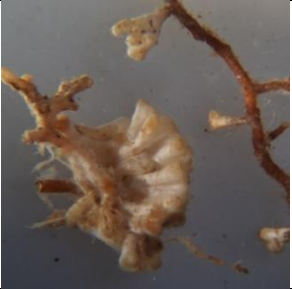
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-A34.2	<i>Rhizopogon jiyaozi</i>	

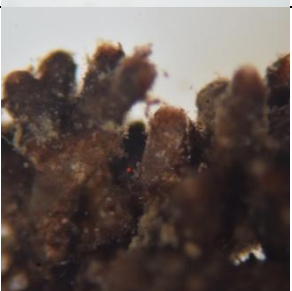
Phụ lục 11. Kết quả giải trình tự và hình ảnh mẫu chớp rễ ở rừng trưởng thành Viện Khoa học Sự sống

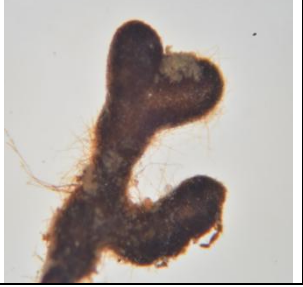
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-B02.1 ABI-B48.3	<i>Thelephora</i> sp1	
ABI-B05.3	<i>Tylopilus microsporus</i>	
ABI-B06.1	<i>Thelephora</i> sp2	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-B06.2	<i>Inocybe</i> sp3	
ABI-B09.1 ABI-B46.5	<i>Amanita pseudoporphyrina</i>	
ABI-B11.2 ABI-B24.2	<i>Pulveroboletus icterinus</i>	
ABI-B11.5 ABI-B36.6	<i>Tomentella</i> sp4	
ABI-B12.1 ABI-B19.1 ABI-B36.2 ABI-B46.3 ABI-B49.4 ABI-B50.5	<i>Rhizopogon flavidus</i>	

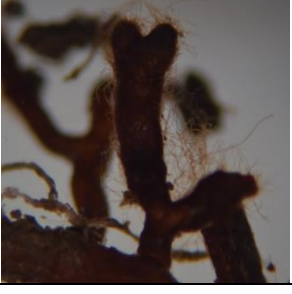
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-B12.3 ABI-B13.2 ABI-B14.1 ABI-B16.1 ABI-B18.4 ABI-B21.3 ABI-B28.4 ABI-B34.1 ABI-B36.3 ABI-B38.2 ABI-B40.1 ABI-B41.1 ABI-B43.1 ABI-B48.1	<i>Zangia</i> sp.	
ABI-B12.4	<i>Tomentella</i> sp9	
ABI-B12.6	<i>Coltriciella</i> sp5	
ABI-B13.3	<i>Boletus</i> sp.	

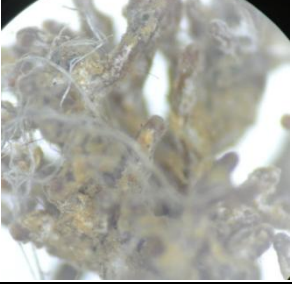
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-B15.1	<i>Amanita</i> sp3	
ABI-B15.2	<i>Tomentella</i> sp7	
ABI-B15.3	Hymenochaetaceae/ <i>Coltriciella</i> sp9	
ABI-B16.3	<i>Coltriciella</i> sp6	
ABI-B18.1 ABI-B24.1 ABI-B26.1 ABI-B27.3 ABI-B49.2	<i>Tomentella</i> sp1	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-B18.3 ABI-B32.2	<i>Tomentella</i> sp2	
ABI-B20.1	<i>Pulveroboletus</i> sp1	
ABI-B20.3	<i>Tomentella</i> sp10	
ABI-B20.6	<i>Suillus</i> sp.	
ABI-B21.1	<i>Gomphidius</i> sp.	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-B22.1 ABI-B36.1	<i>Retiboletus brunneolus</i>	
ABI-B22.2	<i>Austroboletus</i> sp.	
ABI-B22.3	<i>Coltriciella</i> sp8	
ABI-B28.1	<i>Tomentella</i> sp6	
ABI-B28.2	<i>Coltriciella</i> sp7	

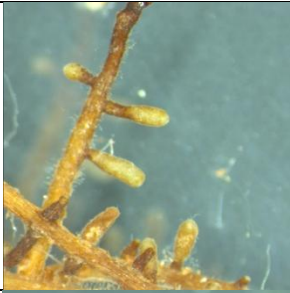
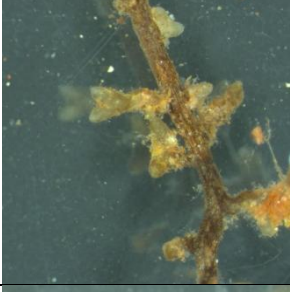
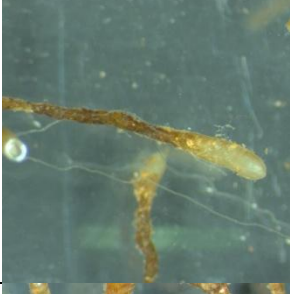
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-B28.3	<i>Tomentella</i> sp5	
ABI-B29.2	<i>Lactarius</i> sp1	
ABI-B30.1 ABI-B31.1 ABI-B37.1	<i>Lactarius subbrevipes</i>	
ABI-B35.4	<i>Hourangia nigropunctata</i>	
ABI-B36.4	<i>Coltriciella</i> sp2	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-B38.1 ABI-B41.3	<i>Suillus bovinus</i>	
ABI-B39.1	<i>Amanita spissacea</i>	
ABI-B42.1	<i>Sebacina</i> sp5	
ABI-B42.2	<i>Coltriciella</i> sp4	
ABI-B44.3	<i>Coltriciella</i> sp3	

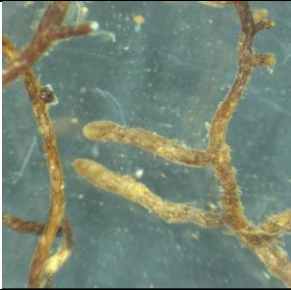
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-B45.1	<i>Phylloporus luxiensis</i>	
ABI-B45.5	<i>Tomentella</i> sp3	
ABI-B46.4 ABI-B50.3	<i>Coltriciella</i> sp1	
ABI-B47.2 ABI-B50.2	<i>Tomentella</i> sp8	
ABI-B49.5	<i>Multifurca</i> sp.	

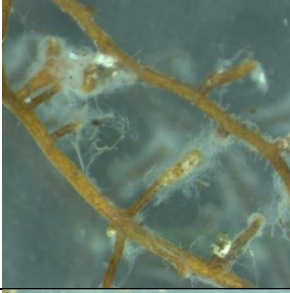
Phụ lục 12. Kết quả định danh và hình ảnh mẫu chóp rễ của cây con thông ba lá trong vườn ươm

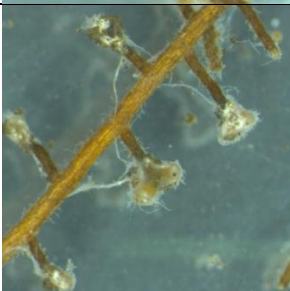
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-AS1.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS2.4	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS3.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS4.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS5.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-AS10.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS10.2	<i>Sebacina</i> sp.	
ABI-AS12.2	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS13.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS14.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-AS15.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS16.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS17.1	<i>Cenococcum</i> sp1	
ABI-AS17.2	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS19.3	<i>Nothojafnea</i> sp.	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-AS20.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS22.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS22.8	<i>Cenococcum</i> sp1	
ABI-AS23.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS27.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	

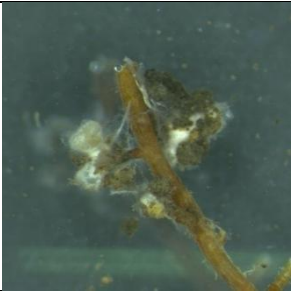
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-AS31.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS31.2	<i>Tylospora</i> sp1	
ABI-AS31.3	<i>Cenococcum</i> sp1	
ABI-AS32.1	<i>Tylospora</i> sp1	
ABI-AS32.2	<i>Nothojafnea</i> sp.	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-AS32.3	<i>Cenococcum</i> sp1	
ABI-AS32.5	<i>Rhizopogon jiyaozi</i>	
ABI-AS33.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS33.2	<i>Cenococcum</i> sp1	
ABI-AS34.1	<i>Cenococcum geophilum</i>	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-AS34.2	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS35.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS35.2	<i>Rhizopogon jiyaozi</i>	
ABI-AS36.1	<i>Cenococcum</i> sp1	
ABI-AS36.2	<i>Nothojafnea</i> sp.	

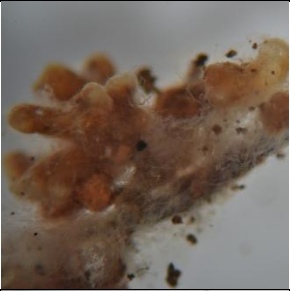
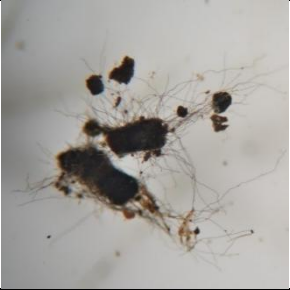
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-AS36.3	<i>Cenococcum geophilum</i>	
ABI-AS37.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS37.3	<i>Cenococcum</i> sp1	
ABI-AS39.1	<i>Cenococcum geophilum</i>	
ABI-AS39.3	<i>Nothojafnea</i> sp.	

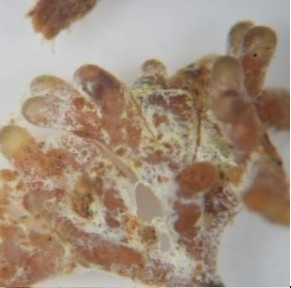
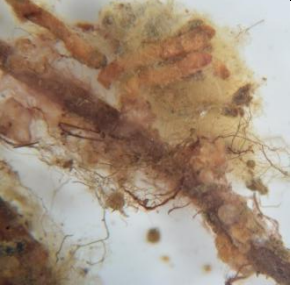
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-AS40.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS40.3	<i>Rhizopogon jiyaozi</i>	
ABI-AS40.4	<i>Cenococcum</i> sp1	
ABI-AS41.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS42.1	<i>Cenococcum</i> sp1	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-AS42.2	<i>Rhizopogon jiyaozi</i>	
ABI-AS42.3	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS43.1	<i>Nothojafnea</i> sp.	
ABI-AS44.1	<i>Rhizopogon jiyaozi</i>	
ABI-AS44.2	<i>Nothojafnea</i> sp.	

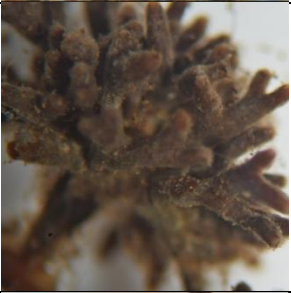
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-AS44.4	<i>Cenococcum</i> sp1	

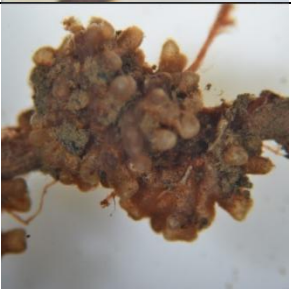
Phụ lục 13. Kết quả định danh và hình ảnh mẫu chóp rễ của cây con thông ba lá 3 tuổi

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P1.1	<i>Cantharellales</i> sp.	
ABI-P1.2	<i>Russula</i> sp3	
ABI-P2.1	<i>Tylospora</i> sp.	
ABI-P2.5	<i>Cenococcum geophilum</i>	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P3.2	<i>Pulveroboletus</i> sp.	
ABI-P3.3	<i>Suillus luteus</i>	
ABI-P4.1	<i>Pulveroboletus sinensis</i>	
ABI-P4.2	<i>Lactarius hatsudake</i>	
ABI-P4.3	<i>Russula subatropurpurea</i>	

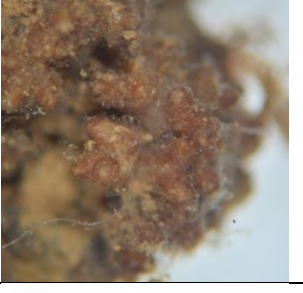
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P5.2	<i>Tomentella</i> sp2	
ABI-P5.3	<i>Russula maguanensis</i>	
ABI-P5.4	<i>Rhizopogon jiyaози</i>	
ABI-P6.1	<i>Tomentella</i> sp3	
ABI-P6.4	<i>Rhizopogon flavidus</i>	

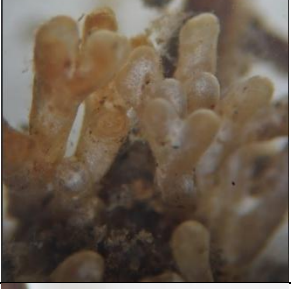
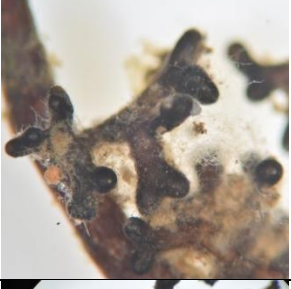
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P7.3	<i>Cenococcum geophilum</i>	
ABI-P8.3	<i>Tomentella</i> sp4	
ABI-P8.5	<i>Tomentella</i> sp3	
ABI-P9.1	<i>Tomentella</i> sp1	
ABI-P9.2	<i>Cenococcum geophilum</i>	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P9.4	<i>Rhizopogon boninensis</i>	
ABI-P10.1	<i>Tomentella</i> sp2	
ABI-P10.2	<i>Rhizopogon flavidus</i>	
ABI-P10.3	<i>Tylopilus microsporus</i>	
ABI-P10.5	<i>Russula rufobasalis</i>	

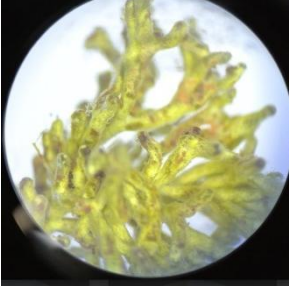
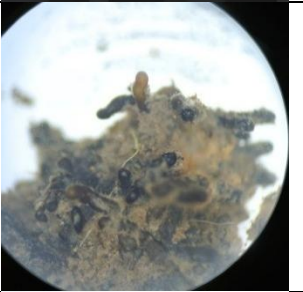
Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P10.7	<i>Cenococcum geophilum</i>	
ABI-P11.1	<i>Coltricia</i> sp.	
ABI-P11.2	<i>Russula rufobasalis</i>	
ABI-P11.3	<i>Lactarius alboscrobiculatus</i>	
ABI-P11.4	<i>Cenococcum geophilum</i>	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P12.1	<i>Russula aureoviridis</i>	
ABI-P13.1	<i>Russula</i> sp4	
ABI-P13.2	<i>Tomentella</i> sp14	
ABI-P14.1	<i>Tomentella</i> sp1	
ABI-P15.1	<i>Cenococcum geophilum</i>	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P15.2	<i>Russula adusta</i>	
ABI-P16.1	<i>Russula subatropurpurea</i>	
ABI-P16.3	<i>Suillus luteus</i>	
ABI-P16.4	<i>Russula subatropurpurea</i>	
ABI-P17.2	<i>Coltricia</i> sp.	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P18.3	<i>Tomentella</i> sp2	
ABI-P19.1	<i>Cyanoboletus fagaceophilus</i>	
ABI-P19.2	<i>Amanita spissacea</i>	
ABI-P19.3	<i>Tomentella</i> sp3	
ABI-P20.1	<i>Cenococcum geophilum</i>	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P20.4	<i>Sebacina</i> sp4	
ABI-P21.3	<i>Pulveroboletus</i> sp.	
ABI-P22.1	<i>Tomentella</i> sp2	
ABI-P22.2	<i>Russula rufobasalis</i>	
ABI-P23.1	<i>Amanita</i> sp.	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P24.1	<i>Scleroderma sinnamariense</i>	
ABI-P24.2	<i>Tomentella</i> sp3	
ABI-P25.3	<i>Russula rufobasalis</i>	
ABI-P25.6	<i>Sebacina</i> sp5	
ABI-P26.2	<i>Cortinarius</i> sp.	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P26.4	<i>Russula</i> sp5	
ABI-P27.2	<i>Russula</i> sp2	
ABI-P27.3	<i>Cenococcum geophilum</i>	
ABI-P28.1	<i>Tomentella</i> sp15	
ABI-P28.2	<i>Tomentella</i> sp4	

Kí hiệu	Kết quả định danh	Hình ảnh
ABI-P28.3	<i>Cenococcum geophilum</i>	
ABI-P29.2	<i>Phylloporus luxiensis</i>	
ABI-P30.1	<i>Russula subatropurpurea</i>	
ABI-P30.2	<i>Tylospora</i> sp.	
ABI-P30.4	<i>Tomentella</i> sp11	

Phụ lục 14. Số lượng các chóp rễ cộng sinh ở mỗi chi tại các khu vực nghiên cứu

Chi nấm ngoại cộng sinh	Cây 3 năm	Cây 6 tháng	Đa Nhim	Viện KHSS
<i>Amanita</i>	911		238	12162
<i>Austroboletus</i>				113
<i>Boletus</i>			24	102
<i>Cantharellales</i>	186		52	
<i>Cenococcum</i>	775	403	262	
<i>Coltricia</i>	567		2	
<i>Coltriciella</i>				1082
<i>Cortinarius</i>	7			
<i>Cyanoboletus</i>	287			
<i>Gomphidius</i>				136
<i>Hourangia</i>				119
<i>Hydnum</i>			6	
<i>Inocybe</i>			120	71
<i>Laccaria</i>			220	
<i>Lactarius</i>	666		870	7064
<i>Lactifluus</i>			7664	
<i>Macowanites</i>			10	
<i>Multifurca</i>				201
<i>Nothojafnea</i>		9766		
<i>Phylloporus</i>	550			16
<i>Pulveroboletus</i>	554		30	499
<i>Retiboletus</i>				1394
<i>Rhizopogon</i>	471	1161	1057	3371
<i>Russula</i>	11235		1368	
<i>Scleroderma</i>	2750			
<i>Sebacina</i>	163	74	763	137
<i>Suillus</i>	636			439
<i>Thelephora</i>			20	145
<i>Tomentella</i>	11594		4279	1773
<i>Tylopilus</i>	5885			127
<i>Tylospora</i>	124	95	21	
<i>Zangia</i>			318	5145

Phụ lục 15. Số lượng chóp rễ ngoại cộng sinh ở mỗi loài nấm thu được tại các khu vực nghiên cứu

Loài nấm ngoại cộng sinh	Cây 3 năm	Cây 6 tháng	Đa Nhim	Viện KHSS
<i>Amanita aff.pantherina</i>	0	0	182	0
<i>Amanita pseudoporphyrina</i>	0	0	0	995
<i>Amanita sepiacea</i>	0	0	27	0
<i>Amanita sp.</i>	40	0	0	0
<i>Amanita sp1</i>	0	0	10	0
<i>Amanita sp2</i>	0	0	19	0
<i>Amanita sp3</i>	0	0	0	10787
<i>Amanita spissacea</i>	871	0	0	380
<i>Austroboletus sp.</i>	0	0	0	113
<i>Boletus reticulatus</i>	0	0	24	0
<i>Boletus sp.</i>	0	0	0	102
<i>Cantharellales sp.</i>	186	0	0	0
<i>Cantharellales sp1</i>	0	0	40	0
<i>Cantharellales sp2</i>	0	0	12	0
<i>Cenococcum geophilum</i>	775	77	262	0
<i>Cenococcum sp1</i>	0	326	0	0
<i>Coltricia sp.</i>	567	0	2	0
<i>Coltriciella sp1</i>	0	0	0	127
<i>Coltriciella sp2</i>	0	0	0	10
<i>Coltriciella sp3</i>	0	0	0	27
<i>Coltriciella sp4</i>	0	0	0	133
<i>Coltriciella sp5</i>	0	0	0	12
<i>Coltriciella sp6</i>	0	0	0	140
<i>Coltriciella sp7</i>	0	0	0	5
<i>Coltriciella sp8</i>	0	0	0	4
<i>Coltriciella sp9</i>	0	0	0	624
<i>Cortinarius sp.</i>	7	0	0	0
<i>Cyanoboletus fagaceophilus</i>	287	0	0	0
<i>Gomphidius sp.</i>	0	0	0	136
<i>Hourangia nigropunctata</i>	0	0	0	119
<i>Hydnum sp.</i>	0	0	6	0
<i>Inocybe sp1</i>	0	0	114	0
<i>Inocybe sp2</i>	0	0	6	0
<i>Inocybe sp3</i>	0	0	0	71
<i>Laccaria japonica</i>	0	0	60	0
<i>Laccaria sp.</i>	0	0	160	0

Loài nấm ngoại cộng sinh	Cây 3 năm	Cây 6 tháng	Đa Nhim	Viện KHSS
<i>Lactarius alboscrobiculatus</i>	506	0	0	0
<i>Lactarius hatsudake</i>	160	0	692	0
<i>Lactarius pinguis</i>	0	0	62	0
<i>Lactarius rubrocorrugatus</i>	0	0	68	0
<i>Lactarius sp1</i>	0	0	0	1800
<i>Lactarius sp2</i>	0	0	18	0
<i>Lactarius sp3</i>	0	0	30	0
<i>Lactarius subbrevipes</i>	0	0	0	5264
<i>Lactifluus ambicystidiatus</i>	0	0	790	0
<i>Lactifluus pilosus</i>	0	0	1216	0
<i>Lactifluus sp1</i>	0	0	5339	0
<i>Lactifluus subpruinosis</i>	0	0	319	0
<i>Macowanites sp.</i>	0	0	10	0
<i>Multifurca sp.</i>	0	0	0	201
<i>Nothojafnea sp.</i>	0	9766	0	0
<i>Phylloporus luxiensis</i>	550	0	0	16
<i>Pulveroboletus icterinus</i>	0	0	0	200
<i>Pulveroboletus sinensis</i>	285	0	0	0
<i>Pulveroboletus sp.</i>	269	0	0	0
<i>Pulveroboletus sp1</i>	0	0	0	299
<i>Pulveroboletus sp2</i>	0	0	30	0
<i>Retiboletus brunneolus</i>	0	0	0	1394
<i>Rhizopogon boninensis</i>	100	0	175	0
<i>Rhizopogon flavidus</i>	360	0	820	3371
<i>Rhizopogon jiyaozi</i>	11	1161	62	0
<i>Russula adusta</i>	3726	0	0	0
<i>Russula aeruginea</i>	0	0	20	0
<i>Russula aff.illota</i>	0	0	469	0
<i>Russula aureoviridis</i>	1805	0	0	0
<i>Russula cyanoxantha</i>	0	0	70	0
<i>Russula laurocerasi</i>	0	0	204	0
<i>Russula maguanensis</i>	10	0	0	0
<i>Russula rosacea</i>	0	0	203	0
<i>Russula rufobasalis</i>	2129	0	0	0
<i>Russula sp2</i>	291	0	0	0
<i>Russula sp3</i>	527	0	0	0
<i>Russula sp4</i>	412	0	0	0
<i>Russula sp5</i>	111	0	0	0
<i>Russula subatropurpurea</i>	2224	0	224	0

Loài nấm ngoại cộng sinh	Cây 3 năm	Cây 6 tháng	Đa Nhim	Viện KHSS
<i>Russula subnigricans</i>	0	0	63	0
<i>Russula zhuzuijun</i>	0	0	115	0
<i>Scleroderma sinnamariense</i>	2750	0	0	0
<i>Sebacina</i> sp.	0	74	0	0
<i>Sebacina</i> sp1	0	0	7	0
<i>Sebacina</i> sp2	0	0	696	0
<i>Sebacina</i> sp3	0	0	44	0
<i>Sebacina</i> sp4	10	0	16	0
<i>Sebacina</i> sp5	153	0	0	137
<i>Suillus bovinus</i>	0	0	0	155
<i>Suillus luteus</i>	636	0	0	0
<i>Suillus</i> sp.	0	0	0	284
<i>Thelephora</i> sp1	0	0	0	133
<i>Thelephora</i> sp2	0	0	0	12
<i>Thelephora</i> sp9	0	0	20	0
<i>Tomentella badia</i>	0	0	62	0
<i>Tomentella</i> sp1	3566	0	0	1399
<i>Tomentella</i> sp10	0	0	4	23
<i>Tomentella</i> sp11	197	0	10	0
<i>Tomentella</i> sp12	0	0	52	0
<i>Tomentella</i> sp13	0	0	35	0
<i>Tomentella</i> sp14	659	0	3500	0
<i>Tomentella</i> sp15	1094	0	26	0
<i>Tomentella</i> sp16	0	0	21	0
<i>Tomentella</i> sp17	0	0	20	0
<i>Tomentella</i> sp18	0	0	132	0
<i>Tomentella</i> sp19	0	0	33	0
<i>Tomentella</i> sp2	982	0	0	40
<i>Tomentella</i> sp3	2286	0	0	10
<i>Tomentella</i> sp4	2810	0	0	84
<i>Tomentella</i> sp5	0	0	0	35
<i>Tomentella</i> sp6	0	0	0	5
<i>Tomentella</i> sp7	0	0	0	62
<i>Tomentella</i> sp8	0	0	0	105
<i>Tomentella</i> sp9	0	0	0	10
<i>Tomentella stipitobasidia</i>	0	0	10	0
<i>Tomentella subtestacea</i>	0	0	374	0
<i>Tylopilus microsporus</i>	5885	0	0	127
<i>Tylospora</i> sp.	124	0	0	0

Loài nấm ngoại cộng sinh	Cây 3 năm	Cây 6 tháng	Đa Nhim	Viện KHSS
<i>Tylospora</i> sp1	0	95	21	0
<i>Zangia</i> sp.	0	0	318	5145

Phụ lục 16. Thành phần nấm rễ ngoại cộng sinh và số chóp rễ thu thập được trong thí nghiệm *ex situ*

Loài nấm ngoại cộng sinh	Số lượng chóp rễ nấm ngoại cộng sinh
<i>Pulveroboletus</i> sp.	51
<i>Rhizopogon boninensis</i>	180
<i>Rhizopogon flavidus</i>	704
<i>Rhizopogon jiyaozi</i>	588
Unidentified fungi	96
<i>Cenococcum</i> sp.	86

Phụ lục 17. Kết quả phân tích thống kê ANOVA so sánh sự khác biệt về chiều cao cây ở nghiệm thức có bổ sung nấm và không bổ sung nấm ngoại cộng sinh trong thí nghiệm *in vitro*

Summary Statistics for Height			
Treatment	Count	Average	Variance
Inoculated pl	15	14.2533	1.13838
Non-Inoculate	15	8.46	0.636857
Total	30	11.3567	9.53702
Treatment	Standard deviation	Minimum	Maximum
Inoculated pl	1.06695	11.7	15.7
Non-Inoculate	0.798033	7.1	9.5
Total	3.08821	7.1	15.7
Treatment	Std. skewness	Std. kurtosis	Sum
Inoculated pl	-1.29201	0.758026	213.8
Non-Inoculate	-0.800784	-0.758852	126.9
Total	0.128609	-1.9969	340.7

ANOVA Table for Height by Treatment					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	251.72	1	251.72	283.59	0.0000
Within groups	24.8533	28	0.887619		
Total (Corr.)	276.574	29			

Multiple Range Tests for Height by Treatment				

Method: 95.0 percent LSD				
Treatment	Count	Mean	Homogeneous Groups	

Non-Inoculate	15	8.46	X	
Inoculated p1	15	14.2533	X	

Contrast			Difference	+/- Limits

Inoculated p1 - Non-Inoculate			*5.79333	0.704693

* denotes a statistically significant difference.				

Phụ lục 18. Kết quả phân tích thống kê ANOVA so sánh sự khác biệt về chiều dài rễ ở nghiệm thức có bổ sung nấm và không bổ sung nấm ngoại cộng sinh trong thí nghiệm *in vitro*

Summary Statistics for Root length			
Treatment	Count	Average	Variance
Inoculated p1	15	10.08	11.8374
Non-Inoculate	15	3.53333	0.516667
Total	30	6.80667	17.0482
Treatment	Standard deviation	Minimum	Maximum
Inoculated p1	3.44056	6.8	18.2
Non-Inoculate	0.718795	2.7	5.2
Total	4.12895	2.7	18.2
Treatment	Std. skewness	Std. kurtosis	Sum
Inoculated p1	1.84857	0.483263	151.2
Non-Inoculate	1.68257	0.434377	53.0
Total	2.51029	0.782471	204.2

ANOVA Table for Root length by Treatment					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	321.441	1	321.441	52.04	0.0000
Within groups	172.957	28	6.17705		
Total (Corr.)	494.399	29			

Multiple Range Tests for Root length by Treatment					

Method: 95.0 percent LSD					
Treatment	Count	Mean	Homogeneous Groups		

Non-Inoculate	15	3.53333	X		
Inoculated pl	15	10.08	X		

Contrast			Difference	./- Limits	

Inoculated pl - Non-Inoculate			*6.54667	1.85899	

* denotes a statistically significant difference.					

Phụ lục 19. Kết quả phân tích thống kê ANOVA so sánh sự khác biệt về khối lượng sinh khối tươi ở nghiệm thức có bổ sung nấm và không bổ sung nấm ngoại cộng sinh trong thí nghiệm *in vitro*

Summary Statistics for Fresh biomass			
Treatment	Count	Average	Variance
Inoculated pl	15	0.354907	0.00433219
Non-Inoculate	15	0.127653	0.000072727
Total	30	0.24128	0.0154827
Treatment	Standard deviation	Minimum	Maximum
Inoculated pl	0.0658194	0.2315	0.4587
Non-Inoculate	0.00852801	0.1171	0.1499
Total	0.12443	0.1171	0.4587
Treatment	Std. skewness	Std. kurtosis	Sum
Inoculated pl	-0.281486	-0.547475	5.3236
Non-Inoculate	1.94462	1.63404	1.9148
Total	0.845676	-1.74889	7.2384

ANOVA Table for Fresh biomass by Treatment					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.387331	1	0.387331	175.86	0.0000
Within groups	0.0616688	28	0.00220246		
Total (Corr.)	0.448999	29			

Multiple Range Tests for Fresh biomass by Treatment				
Method: 95.0 percent LSD				
Treatment	Count	Mean	Homogeneous Groups	
Non-Inoculate	15	0.127653	X	
Inoculated p1	15	0.354907	X	
Contrast			Difference	+/- Limits
Inoculated p1 - Non-Inoculate			*0.227253	0.0351027
* denotes a statistically significant difference.				

Phụ lục 20. Kết quả phân tích thống kê ANOVA so sánh sự khác biệt về khối lượng sinh khối khô ở nghiệm thức có bổ sung nấm và không bổ sung nấm ngoại cộng sinh trong thí nghiệm *in vitro*

Summary Statistics for Dry biomass				
Treatment	Count	Average	Variance	
Inoculated p1	15	0.0656267	0.0000688192	
Non-Inoculate	15	0.00203333	5.66667E-8	
Total	30	0.03383	0.00107914	
Treatment	Standard deviation	Minimum	Maximum	
Inoculated p1	0.00829574	0.0461	0.0762	
Non-Inoculate	0.000238048	0.0016	0.0024	
Total	0.0328503	0.0016	0.0762	
Treatment	Stnd. skewness	Stnd. kurtosis	Sum	.
Inoculated p1	-1.20164	0.506909	0.9844	
Non-Inoculate	-0.491611	-0.707842	0.0305	
Total	0.201733	-2.26368	1.0149	

ANOVA Table for Dry biomass by Treatment

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.0303308	1	0.0303308	880.74	0.0000
Within groups	0.000964263	28	0.000034438		
Total (Corr.)	0.0312951	29			

Multiple Range Tests for Dry biomass by Treatment

Method: 95.0 percent LSD

Treatment	Count	Mean	Homogeneous Groups
Non-Inoculate	15	0.00203333	X
Inoculated pl	15	0.0656267	X
Contrast	Difference		+/- Limits
Inoculated pl - Non-Inoculate	*0.0635933		0.0043894

* denotes a statistically significant difference.