



BUILDING A PROCESS FOR ISOLATION AND SPAWN PRODUCTION OF STORK'S NECK REISHI MUSHROOM FROM PHU QUOC

*Ha Minh Hien*¹, *Vi Dai Lam*², *Tran Dieu Linh*²

¹*Ho Chi Minh City Drug Testing Institute, Viet Nam*

²*Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Viet Nam*

Email address: vilamcns@gmail.com

<https://doi.org/10.51453/2354-1431/2024/1082>

Article info

Received: 12/01/2024

Revised: 15/02/2023

Accepted: 25/4/2024

Keywords:

Stork's neck reishi mushroom, isolation, sequencing, sub-culture, media, spawn

Abstract:

Stork's neck reishi mushroom is the common name for a type of medicinal mushroom in Vietnam, with limited research available. A few articles showed that this type of reishi mushroom has positive effects on cancer cell lines, diabetes, anti-inflammation and antioxidants tests. In this research, sample of stork's neck reishi mushroom collected from Phu Quoc National Park, Kien Giang province, Vietnam are isolated and prepared for production trial of spawn. The result indicated that the mycelium grew well on PGA medium, and covered the surface of the culture plate after 10 days of culture. Sequencing of the 18S rRNA gene showed that the fungal sample was related to the species *Ganoderma neojaponicum*. The isolation process should be carried out when the mushroom fruit body is young, white, and soft. Mushroom culture temperature ranges from 20-28 °C. The spawn grow well on rice substrate supplemented with 1,5% CaCO₃, 0,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L K₂HPO₄ (g/L), 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O. Mycelium inoculation should be conducted at the middle of substrate bags, time to cover substrate is around 18-20 days.



XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÂN LẬP, NHÂN GIỐNG LINH CHI CỔ CÒ PHÚ QUỐC

Hà Minh Hiền¹, Vi Đại Lâm², Trần Diệu Linh²

¹Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, Việt Nam

Địa chỉ email: vilamcns@gmail.com

<https://doi.org/10.51453/2354-1431/2024/1082>

Thông tin bài viết

Ngày nhận bài: 12/01/2024

Ngày sửa bài: 15/02/2024

Ngày duyệt đăng: 25/4/2024

Từ khóa:

Linh chi cổ cò, phân lập, giải trình tự, cấy truyền, môi trường nuôi cấy, giống cấp II

Tóm tắt

Linh chi cổ cò là cách gọi thông thường của một loài nấm có giá trị y dược học ít được nghiên cứu. Một số ít các công bố cho thấy nấm có tác dụng tích cực trên các dòng tế bào ung thư, các thử nghiệm với bệnh tiểu đường, kháng viêm và chống ô xy hóa. Trong nghiên cứu này mẫu nấm linh chi cổ cò thu nhận từ Vườn Quốc gia Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang, Việt Nam được phân lập và thử nghiệm nhân giống nấm cấp I, cấp II. Kết quả cho thấy nấm phát triển tốt trên môi trường PGA, lan phủ kín bề mặt đĩa nuôi sau 10 ngày nuôi cấy. Kết quả giải trình tự gene 18S cho thấy mẫu nấm có mối quan hệ với loài *Ganoderma neojaponicum*. Quá trình phân lập nên tiến hành vào giai đoạn thể quả nấm còn non, màu trắng, mềm. Nhiệt độ nuôi cấy nấm trong khoảng 20-28 °C. Giống nấm cấp II phát triển tốt với cơ chất thóc bổ sung 1,5% CaCO₃, 0,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L K₂HPO₄ (g/L), 0,5 g/L MgSO₄·7H₂O. Có thể cấy giống tại vị trí giữa bịch, thời gian lan phủ kín cơ chất khoảng 18-20 ngày.

1. Mở đầu

Linh chi cổ cò là một trong các loại nấm linh chi bản địa ở đảo Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang, Việt Nam. Nấm có hình thái đặc trưng với phần thân nấm dài, phần mũ như chiếc muống vì vậy còn được gọi là nấm muống hay nấm cổ cò. Do các nghiên cứu về định danh, nuôi trồng nấm linh chi cổ cò ở Việt Nam còn rất hạn chế, tên gọi thường có tính tự phát và chưa thống nhất ở

các địa phương. Bên cạnh đó việc phân biệt nấm linh chi cổ cò và các loài nấm linh chi thường gặp cũng đòi hỏi nhiều kinh nghiệm. Vì vậy cần có thêm nhiều nghiên cứu để so sánh, đối chiếu các mẫu nấm linh chi cổ cò tại các vùng miền khác nhau.

Những phân tích sinh học phân tử gần đây nhất cho thấy nấm linh chi cổ cò có nhiều điểm tương đồng với chủng nấm *Ganoderma neo-*

japonicum thường gặp ở các nước Đông Nam Á như Việt Nam, Malaysia. Các phân tích sinh hóa và các phương thức sử dụng nấm linh chi cổ cò trong nước và trên thế giới đều có những nhận định tích cực về tác dụng dược học của nấm như hỗ trợ điều trị bệnh ung thư hoặc ức chế dòng tế bào ung thư (Vikineswary Sabaratnam, 2020), có hoạt tính tương tự insulin (Sarasvathy Subramaniam et al, 2020), có tiềm năng ứng dụng trong điều trị bệnh đái tháo đường, kháng viêm và chống ô xy hóa (Rui-rui Zhang et al, 2023; Wee-Cheat Tan et al, 2015).

Hiện nay có rất nhiều báo cáo, thí nghiệm khoa học về quy trình nhân giống và nuôi trồng linh chi ở Việt Nam, tập trung chủ yếu trên nhóm nấm linh chi đỏ như hồng chi, thanh chi (Mai Gharib et al, 2022; Alaa O Aboraya, 2022). Khi áp dụng các quy trình này cho giống nấm linh chi khác như chủng nấm hắc chi sẽ có sự khác biệt về tốc độ phát triển và thời gian hình thành thể quả. Điều này cho thấy các chủng nấm linh chi cần có quy trình nuôi cấy riêng biệt để tối ưu hóa hiệu quả sản xuất. Xuất phát từ thực tế trên, nhiệm vụ “xây dựng quy trình phân lập, nhân giống linh chi cổ cò Phú Quốc” được đề xuất và thực hiện.

2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu kỹ thuật phân lập giống linh chi cổ cò từ mô thể quả

Thu nhận các mẫu nấm linh chi cổ cò, rửa sạch, chuyển vào tủ cấy vô trùng. Tiến hành tách đôi quả thể nấm bằng dao vô trùng, cắt và thu nhận 30 mẫu mô nấm kích thước 1-2 mm. Mỗi mẫu mô được cấy vào một đĩa petri (đường kính 9 cm) chứa môi trường PGA thành phần gồm dịch chiết khoai tây 200 g/L, glucose 20 g/L, agar 20 g/L (Bich Thuy Thi Nguyen et al, 2019). Nuôi trong điều kiện ít ánh sáng, nhiệt độ phòng, kiểm tra hàng ngày.

Thu nhận DNA và giải trình tự gene 18S

Định danh nấm bằng phương pháp giải trình tự gene mã hóa ribosome 18S. Phương pháp chiết tách: Sử dụng DNA Dneasy Plant Mini Kit

- Qiagen (Đức). Kiểm tra kết quả tách chiết bằng phương pháp điện di trên gel. Khuếch đại gene bằng cặp mồi ITS, cụ thể:

Primer names	sequence	authors	loci
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. (1990)	ITS1-5,8S-ITS2
-ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

Nồng độ thành phần tham gia phản ứng

Thành phần phản ứng	Thể tích
10mmM dNTPs	0,4 µL
Phire Hot Start II DNA polymerase	0,4 µL
Buffer Phire 5x	4 µL
Primer F	0,5 µL
Primer R	0,5 µL
template	1-3 µL
Nước	Vừa đủ 23 µL

Chương trình chạy cho primer ITS1-ITS4

Các bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
Khởi đầu	98	5 phút	1
Biến tính	98	30 giây	35
Bắt cặp	56	40 giây	
Kéo dài	72	1 phút	
Kết thúc	72	10 phút	1

Kiểm tra kết quả khuếch đại gen bằng phương pháp điện di. Sản phẩm phản ứng khuếch đại gene được giải trình tự bằng phương pháp Sanger và tra cứu kết quả trên NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự sinh trưởng và tốc độ phát triển của hệ sợi nấm linh chi cổ cò

Các mẫu mô nấm linh chi cổ cò được thu nhận và nuôi cấy trên môi trường PGA, tại các điều kiện nhiệt độ khác nhau gồm: $20 \pm 2^\circ\text{C}$, $24 \pm 2^\circ\text{C}$, $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Tiến hành kiểm tra sự phát triển của hệ sợi từ mẫu mô nấm hàng ngày.

Nghiên cứu ảnh hưởng của độ tuổi quả thể nấm tới quy trình phân lập giống gốc

Quả thể nấm linh chi cổ cò ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau được dùng để phân lập giống nấm (Xuanwei Zhou et al, 2011). Giai đoạn 1: Quả thể vừa nhú mầm (bud-breaking stage); Giai đoạn 2: Quả thể nấm còn non, chưa xòe rộng (bud-developing stage); Giai đoạn 3: Quả thể nấm trưởng thành nhưng chưa phát sinh bào tử (development stage); Giai đoạn 4: Quả thể nấm chuyển sang giai đoạn già, phát sinh bào tử (Maturity stage). Nuôi trong điều kiện ít ánh sáng, kiểm tra hàng ngày.

Nghiên cứu thành phần dinh dưỡng thích hợp cho giai đoạn cấy truyền

Môi trường khoai tây (PGA) là môi trường phổ biến cho các quy trình trồng nấm nói chung. Trong nghiên cứu này, sợi nấm linh chi cổ cò thu nhận từ giai đoạn nuôi cấy mô được cấy thử nghiệm trên môi trường PGA và các công thức (CT) phát triển từ môi trường PGA, bổ sung các cơ chất chứa nguồn Carbon, Nitrogen cho nấm như dịch chiết nấm ăn, cám gạo, cám ngô (Bảng 1). Đánh giá khả năng thích nghi và phát triển của hệ sợi nấm trên các công thức thử nghiệm (Vi Dai Lam et al, 2018).

Bảng 1: Thành phần môi trường agar nuôi cấy thử nghiệm hệ sợi nấm linh chi cổ cò

Công thức Thành phần	CT 1	CT 2	CT 3	CT 4	CT 5
Khoai tây (g/L)	200	200	200	200	200
Glucose (g/L)	20	20	20	20	20
Nấm tươi (g/L)	-	50	100	150	200
Cám gạo (g/L)	-	-	10	20	3
Cám ngô (g/L)	-	-	10	20	30
Agar (g/L)	20	20	20	20	20
pH	6,5				

Xây dựng quy trình kỹ thuật nhân giống cấp II linh chi cổ cò Phú Quốc trên thóc

Giống nấm linh chi cổ cò cấp II được thử nghiệm trên cơ chất thóc. Tiến hành ngâm thóc 12h, luộc tới khi xuất hiện các vết nứt trên vỏ hạt, để ráo nước. Khối lượng thóc chiếm 97% tổng khối lượng túi cơ chất, bổ sung 1,5% CaCO₃, 0,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L K₂HPO₄ (g/L), 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O, khử trùng 121°C trong 3h, để nguội 24h. Cây giống nấm là hệ sợi nấm trên môi trường agar với kích thước khoảng 2-3 mm. Cây thử nghiệm tại hai vị trí gồm vị trí trên bề mặt và vị trí giữa túi giá thể. Nuôi trong điều kiện ít ánh sáng. Theo dõi và đánh giá khả năng phát triển của hệ sợi.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Nghiên cứu kỹ thuật phân lập giống linh chi cổ cò từ mô thể quả

Để đánh giá kỹ thuật phân lập giống, các mảnh mô thể quả nấm linh chi cổ cò được thu nhận và nuôi trong điều kiện ít ánh sáng, nhiệt độ phòng. Sau 2-3 ngày nuôi cấy quát sát thấy các sợi nấm màu trắng đều mọc từ mảnh mô (Hình 1). Tỷ lệ nhiễm 23%, tập trung chủ yếu ở các mảnh mô thu nhận từ vị trí gốc nấm. Đối tượng nhiễm bao gồm vi khuẩn và nấm mốc vàng, mốc xanh. So sánh với quá trình thu nhận mẫu mô từ thể quả nấm linh chi khác như nấm lim xanh, nấm hồng chi, nấm cổ cò yêu cầu phức tạp hơn. Phần thân nấm dài và nhỏ vì vậy quá trình thu nhận mảnh mô ở vị trí này đòi hỏi nhiều kỹ năng và thời gian so với những loại nấm linh chi kích thước lớn khác. Phần gốc nấm là vị trí bám nhiều dị vật như bùn, đất vì vậy là khu vực có nhiều yếu tố lây nhiễm trong thí nghiệm. Sau khoảng 10 ngày nuôi cấy hệ sợi nấm tại các đĩa nuôi lan phủ kín bề mặt môi trường.



Hình 1. Nuôi cấy mô lõi thể quả linh chi cổ cò sau 4 ngày nuôi cấy

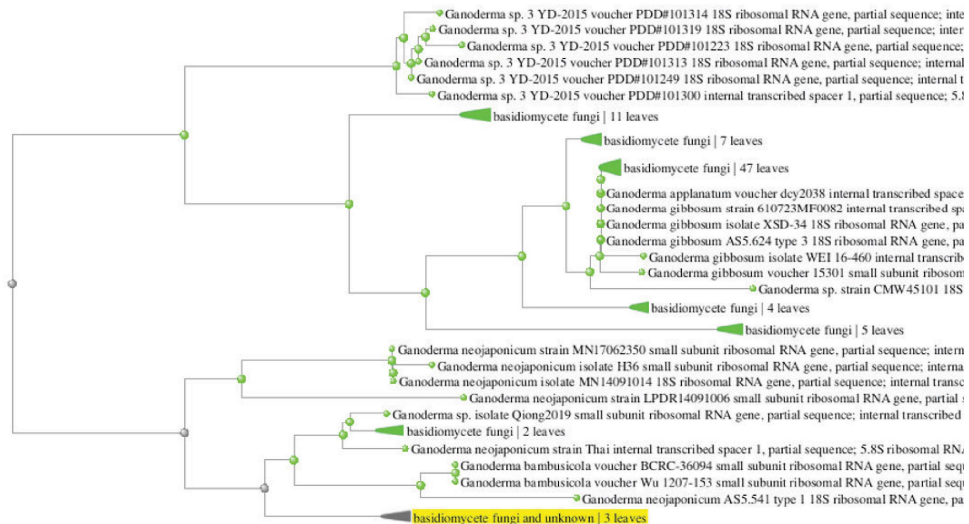
Thu nhận DNA và giải trình tự gene 18S

Mẫu nấm linh chi cổ cò thu nhận từ Vườn Quốc gia Phú Quốc được tách chiết DNA và giải trình tự gene 18S, kết quả thu được trình tự gene như sau:

GAGCGAACAAACGTACCTGATTTGAGGTC
AGAGGTCATAAAAGTTGTCTCTGAAGCGAG
ACG GTTGGAAGCTCGTTCAAGGACGCTTC
ACGGT CGCGGCGTAGACATTATCACACCG
ACAGCCGATCCGCAAGGAATCAAGCTAATG
CATTGAGAGGAGCCGACCATTTAAAGGCC
GACAAACACCTCCAAGTCCAAGCCTGCAA
ACCACATAAAAAGCTTGCAGGTTGAAGAT
TTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCG
GAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAA
AGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATT
CACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTT
CATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTG
CTGAAAGTTGTATATAGATGCGTTACATCG

CAATACACATTCTGATACTTTTAAAGAGTTT
GTGATAAACGCAGGCCCCGAACGGCTCGG
ACAACAACAGGCCGGCTCCGGATCCATAA
CCCCAGGAAGGGGACCGGGGGAAAAGG
GATGGACAGGGGGGGGACATGGCTCGGA
AGGGCCAGTACCACCCGGGCAAAAACCTCG
AATATGGATCCTCCGCAGGGTCCCCCAAC
GGAAGGATATTATTCAGTTTTTTACCGGGTT
TTAACTGGCCTTTCGAAGCATTTTCACCCC
CTGCTCATTCCCTCCACACCTTTTCACCTA
CTTTTGTTATTGATTCCCAAGCCGGCTTT
TTGTCGTTCAAGCCCTTTCTCCTCCGTTTA
TATCACACTCTTTAGAAAAGTGTCAAATG
TATATTGATATAACACATCATATATAACTT
TCAGCAAACAACATCTCTTGTCTCTCGC
ATCATATATGGAAACAACAGCAGAAATAAT
GATAAAAAATAATGTATTTTCACAAATTAC
AGCTGTGTCTTCATAAATCATTTTTTTACGA
CACCATTTTCGGCTTCCTCTTTTTTTATTAC
TTCGAGGAAGCATATCCCCGTTTTTTTAGA
GTCATCAATAAAAATATTCTTACAACGCTGA
CACGTTTTTTGTTGAGTGGTGTGTCTCACCA
CATATACGAGAAAGGAGATGTGTCTCTCGC
TGCACGCTAGATAGAAGGAGGAGGCTCCC
TGCACCAGCACTAACTAATCATGATGTA
TATGATCTTCTGATGC

3.2. Sử dụng trình tự thu nhận được xây dựng cây phát sinh loài



Kết quả so sánh bằng công cụ BLAST:

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Ganoderma sp. isolate Qlong2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma sp.	898	898	50%	0.0	93.71%	647	MN871859.1
Ganoderma neojaponicum ASS.541 type 2 1.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma neo...	898	898	50%	0.0	93.71%	670	AY553867.1
Ganoderma bambusicola voucher BCRC-36094 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma bam...	894	894	50%	0.0	93.56%	650	MT367535.1
Ganoderma bambusicola voucher Wu 1207-153 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma bam...	894	894	50%	0.0	93.56%	618	MN957783.1
Ganoderma neojaponicum ASS.541 type 1 1.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma neo...	872	872	50%	0.0	92.90%	673	AY553866.1
Ganoderma neojaponicum strain Thai Internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	Ganoderma neo...	846	846	46%	0.0	93.15%	576	MV1159789
Ganoderma bambusicola voucher BCRC-36049 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma bam...	841	841	49%	0.0	92.20%	587	MT367534.1
Ganoderma neojaponicum isolate H36 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma neo...	832	832	50%	0.0	91.76%	653	MW750241
Ganoderma bambusicola voucher Wu 1207-151 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	Ganoderma bam...	819	819	37%	0.0	99.55%	456	MN957781.1
Ganoderma bambusicola voucher Wu 1207-152 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	Ganoderma bam...	809	809	37%	0.0	99.77%	441	MN957782.1
Ganoderma neojaponicum strain LPDR14091086 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma neo...	761	761	47%	0.0	91.37%	581	MK345443.1
Ganoderma australe genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence, isolate 1-3	Ganoderma austr...	691	691	50%	0.0	87.81%	775	LC068465.1
Ganoderma sp. strain TJY2021-7-3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma sp.	689	689	51%	0.0	87.20%	648	OK586710.1
Ganoderma neojaponicum strain MN17062352 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma neo...	688	688	43%	0.0	91.21%	574	MK345444.1
Ganoderma neojaponicum isolate MN14091014 1.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma neo...	688	688	43%	0.0	91.21%	532	KT318596.1
Ganoderma sp. 3 YD-2015 voucher PDDH101313 1.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1	Ganoderma sp. 3...	688	688	37%	0.0	94.64%	656	KM229613.1

Kết quả quá trình giải trình tự cho thấy mẫu nấm linh chi cổ cò Phú Quốc có mối quan hệ với loài *Ganoderma neojaponicum* với giá trị Total score: 898; Percent Identity (Phần trăm nucleotide giống hệt nhau giữa chuỗi truy vấn được căn chỉnh và cơ sở dữ liệu): 93,71%. Đây là căn cứ để gọi ý rằng mẫu nấm phân tích có mối quan hệ gần với loài *Ganoderma neojaponicum* trong cơ sở dữ liệu.

3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự sinh trưởng và tốc độ phát triển của hệ sợi nấm linh chi cổ cò

Các mẫu mô nấm linh chi cổ cò được thu nhận và nuôi cấy trên môi trường PGA, tại các điều kiện nhiệt độ khác nhau gồm: 20 ± 2 °C, 24 ± 2 °C, 28 ± 2 °C. Kết quả cho thấy các mức nhiệt độ này không ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và tốc độ phát triển của hệ sợi nấm linh chi cổ cò. Sợi nấm lan kín bề mặt các đĩa petri thí nghiệm sau 9,10 ngày nuôi cấy. Những nghiên cứu về Công nghệ nuôi trồng nấm ở Việt Nam cũng cho thấy khoảng nhiệt độ từ 20-28 °C là phù hợp cho hầu hết các loại nấm linh chi (Nguyen Lan Dung, 2003). Vì vậy có thể định hướng phát triển, nhân rộng các mô hình nuôi trồng nấm linh chi cổ cò ra nhiều địa phương trên cả nước.

3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ tuổi quả thể nấm tới quy trình phân lập giống gốc

Quả thể nấm linh chi cổ cò được phân lập từ các giai đoạn khác nhau. Kết quả cho thấy giai

đoạn 1, thể quả nhú mầm và giai đoạn 2, thể quả còn non chưa xòe rộng, sợi nấm xuất hiện sớm nhất, sau 24h có thể quan sát thấy sợi nấm tạo thành một lớp mỏng trên bề mặt mảnh mô và trở nên rõ ràng sau 3 ngày nuôi cấy. Giai đoạn này thể quả có màu trắng, rất mềm, dễ thao tác. Giai đoạn 3 và giai đoạn 4 có thể quan sát thấy sợi nấm sau 2 ngày thu nhận mảnh mô. Tuy nhiên thể quả lớn sẽ có độ cứng tăng dần đồng thời phần thân kéo dài, hẹp, bám nhiều dị vật (Hình 2) làm tăng độ khó cho quá trình phân lập.



Hình 2: Nấm cổ cò giai đoạn đã hình thành bào tử

3.5. Nghiên cứu thành phần dinh dưỡng thích hợp cho giai đoạn cấy truyền

Môi trường khoai tây (PGA) là môi trường phổ biến cho các quy trình trồng nấm nói chung. Trong nghiên cứu này, sợi nấm linh chi cổ cò được cấy thử nghiệm trên 5 môi trường ký hiệu CT1,

CT2, CT3, CT4, CT5. Những môi trường này đã được thử nghiệm nuôi cấy thành công với nhiều loại nấm ăn và dược liệu như nấm lim xanh, nấm hương, nấm rơm và cả loại nấm rất khó nuôi trồng là nấm hắc chi. Kết quả đánh giá khả năng thích nghi và phát triển của hệ sợi nấm trên các công thức thử nghiệm cho thấy sợi nấm linh chi cổ cò có thể phát triển trên cả 5 công thức, bao gồm cả CT1 là môi trường chỉ chứa 2 thành phần dinh dưỡng gồm dịch chiết khoai tây và đường glucose. CT4 và CT5 có độ đục cao vì vậy không thuận lợi cho quá trình quan sát, theo dõi mức độ nhiễm của thí nghiệm. Môi trường PGA là môi trường đơn giản nhất mà vẫn đảm bảo được những nhu cầu cần thiết để có thể nuôi cấy thành công nấm linh chi cổ cò giai đoạn cấy truyền.

3.6. Xây dựng quy trình kỹ thuật nhân giống cấp II linh chi cổ cò Phú Quốc trên thóc

Giống nấm linh chi cổ cò cấp II được thử nghiệm trên cơ chất thóc. Vị trí cây giống trên bề mặt túi cơ chất 300g có thời gian lan phủ kín cơ chất khoảng 25 ± 2 ngày. Cây thử nghiệm tại vị trí giữa túi giá thể có thời gian lan phủ nhanh hơn từ 18-20 ngày do sợi nấm phát triển đồng thời từ vị trí cây tới các phía vì vậy khoảng cách di chuyển của sợi nấm ngắn hơn so với khoảng cách từ bề mặt tới đáy.

4. Kết luận

Quy trình phân lập và nhân giống nấm linh chi cổ cò được thử nghiệm thành công bằng phương pháp nuôi cấy mô thể quả. Sau 2-3 ngày nuôi cấy quát sát thấy các sợi nấm màu trắng. Thu nhận mẫu mô từ góc thể quả có tỉ lệ nhiễm cao do tiếp xúc nhiều dị vật. Mẫu mô nấm linh chi cổ cò có kích thước nhỏ, dài, hẹp nhưng có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện thí nghiệm, lan phủ kín đĩa nuôi sau 10 ngày nuôi cấy. Kết quả thu nhận DNA và giải trình tự gene 18S cho thấy mẫu nấm phân tích có thể có mối quan hệ gần với loài *Ganoderma neojaponicum* trong cơ sở dữ liệu với Total score: 898; Percent Identity: 93,71%. Nấm thích nghi được trong khoảng nhiệt độ từ $20-28 \pm 2$ °C. Giai đoạn thể quả còn non, màu trắng, chưa xòe rộng cho hệ sợi nấm có tốc độ sinh trưởng

nhanh nhất, thời gian xuất hiện sợi nấm sau 24h, dễ thao tác. Nấm linh chi cổ cò có thể cấy truyền trên nhiều môi trường trong đó PGA chứa khoai tây 200 g/L, glucose 20 g/L, agar 20 g/L là môi trường hiệu quả, đơn giản và dễ chuẩn bị nhất trong điều kiện thí nghiệm. Giống cấp II được thử nghiệm thành công trên cơ chất thóc, bổ sung CaCO_3 1,5%, KH_2PO_4 0,5 g/L, K_2HPO_4 (g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L. Giống nên được cấy tại vị trí giữa bịch cơ chất 300g để có thời gian sản xuất giống nhanh và hiệu quả, thời gian lan phủ khoảng 18-20 ngày.

Lời cảm ơn

Kết quả nghiên cứu là sản phẩm của nhiệm vụ khoa học công nghệ nhà nước “Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen dược liệu Kỳ nam kiến (*Hydnophytum formicarum* Jack.) và Linh chi cổ cò Phú Quốc”, mã số: NVQG-2019/ĐT.15, thời gian thực hiện từ 2019 - 2023, nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Bộ KH-CN đã tạo điều kiện hỗ trợ kinh phí để nhóm tác giả thực hiện thành công nghiên cứu này.

REFERENCES

- Alaa O. Aboraya, Yousif Elhassaneen, Olfat M. Nassar (2022) *Reishi Mushroom (Ganoderma lucidum) Intervention Improves Lipids Profile and Paraoxonase/Arylesterase Activities in Serum as well as Enhances Haemostatic Effects in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats*, Alexandria Science Exchange Journal 43(4):593-608.
- Bich Thuy Thi Nguyen, Nghien Xuan Ngo, Ve Van Le, Luyen Thi Nguyen, Ry Kana, Huy Duc Nguyen (2019) *Optimal culture conditions for mycelial growth and fruiting body formation of Ling Zhi mushroom Ganoderma lucidum strain GA3*, Life Sciences | Biotechnology; Doi: 10.31276/VJSTE.61(1).62-67
DOI:10.21608/asejaiqsae.2022.271965
- Mai Gharib, Yousif Elhassaneen, Hanan Radwan (2022) *Nutrients and Nutraceuticals Content*

- and In Vitro Biological Activities of Reishi Mushroom (Ganoderma lucidum) Fruiting Bodie*, Alexandria Science Exchange Journal 43(2):301-316, DOI:10.21608/asejaiqsae.2022.245271 Authors:
- Nguyen Lan Dung (2003). *Mushroom Cultivation Technology*, Volume 1. Agricultural Publishing House.
- Rui-rui Zhang, Jing Zhang, Xu Guo, Ying-ying Chen, Jin-yue Sun, Jia-lin Miao, M. Carpena, M.A. Prieto, Ning-yang Li, Qing-xin Zhou, Chao Liu (2023) *Molecular mechanisms of the chemical constituents from anti-inflammatory and antioxidant active fractions of Ganoderma neo-japonicum Imazeki*, Current Research in Food Science, Volume 6, 2023, 100441; <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100441>
- Sarasvathy Subramaniam, Vikineswary Sabaratnam, Chua Kek Heng, Umah Rani Kuppasamy (2020) *The Medicinal Mushroom Ganoderma neo-japonicum (Agaricomycetes) from Malaysia: Nutritional Composition and Potentiation of Insulin-Like Activity in 3T3-L1 Cells*, Int J Med Mushrooms, Volume 22, Issue 1, pp. 65-78; DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2020033250
- Vi Dai Lam, Nguyen Xuan Vu, Dinh Van Thien, Vu Dinh Hoi, Bui Thanh Ngoc (2018). *Isolation and Experimental Production of Leopard Skin Mushroom Strain at Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry*. Journal of Science and Technology - Thai Nguyen University, page 180, No. 04.
- Vikineswary Sabaratnam (2020) *In vitro and in silico anticancer evaluation of a medicinal mushroom, Ganoderma neo-japonicum Imazeki, against human colonic carcinoma cells*, Biotechnology and Applied Biochemistry; https://www.academia.edu/110186165/In_vitro_and_in_silico_anticancer_evaluation_of_a_medicinal_mushroom_Ganoderma_neo_japonicum_Imazeki_against_human_colonic_carcinoma_cells
- Wee-Cheat Tan, Umah Rani Kuppasamy, Chia-Wei Phan, Yee-Shin Tan, Jegadeesh Raman, Azliza Mad Anuar, Vikineswary Sabaratnam (2015) *Ganoderma neo-japonicum Imazeki revisited: Domestication study and antioxidant properties of its basidiocarps and mycelia*, SCIENTIFIC RepoRts | 5:12515 | DOI: 10.1038/srep12515
- Xuanwei Zhou, Kai-Qi Su, Yong-Ming Zhang (2011) *Applied modern biotechnology for cultivation of Ganoderma and development of their products*, Applied Microbiology and Biotechnology, 93(3):941-63 DOI:10.1007/s00253-011-3780-7.