

NGHIÊN CỨU PHÂN LOẠI VÀ NUÔI TRỒNG NẤM BẠCH NGỌC (*Macrocybe titans*) PHÁT HIỆN Ở VƯỜN QUỐC GIA CÁT TIÊN

Phạm Ngọc Dương¹, Vũ Đình Duy^{2,5*}, Nguyễn Thị Anh¹,
Bùi Thị Tuyết Xuân^{3,5}, Lê Xuân Thám⁴

¹Vườn Quốc gia Cát Tiên, Tân Phú, Đồng Nai, Việt Nam

²Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

³Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

⁴Sở Khoa học và Công nghệ Lâm Đồng, Lâm Đồng, Việt Nam

⁵College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, P.R China

TÓM TẮT: Chi nấm *Macrocybe* Pegler & Lodge, được ghi nhận có 7 loài trên thế giới: *Macrocybe crassa*, *M. gigantea*, *M. lobayensis*, *M. pachymeres*, *M. praegrans*, *M. spectabilis* và *M. titans*. Phần lớn các loài được phát hiện trong chi nấm này được sử dụng làm thực phẩm, hai loài đã được nghiên cứu nuôi trồng thành công trên thế giới như *M. crassa* và *M. gigantea* cũng được ghi nhận ở Việt Nam. Bài báo này trình bày các đặc điểm hình thái của *M. titans*, một loài nấm được ghi nhận mới cho khu hệ nấm lớn Việt Nam được phát hiện ở Vườn quốc gia Cát Tiên. Các kết quả nghiên cứu về sinh học phân tử theo dữ liệu từ Genbank cũng cho phép khẳng định mẫu vật của loài *M. titans* thu được ở Vườn quốc gia Cát Tiên có chung nguồn gốc với các loài *M. titans* khác trên thế giới. Kết quả nuôi trồng thử nghiệm thành công loài nấm này lần đầu tiên ở Việt Nam đã tìm ra công thức môi trường bước đầu phù hợp cho việc nuôi trồng ra thể quả làm cơ sở cho việc phát triển công nghệ nuôi trồng thương mại ở Việt Nam.

Từ khóa: Tricholomataceae, *Macrocybe*, *Macrocybe titans*, gene 28S-ribosomal RNA, nấm bạch ngọc.

MỞ ĐẦU

Chi *Macrocybe* Pegler & Lodge là một chi nấm có giá trị làm thực phẩm quý nhưng chưa được nghiên cứu nhiều ở Việt Nam. Trên thế giới, đã ghi nhận được 7 loài là *Macrocybe crassa*, *M. gigantea*, *M. lobayensis*, *M. pachymeres*, *M. praegrans*, *M. spectabilis* và *M. titans* (Pegler et al., 1998). Ở Việt Nam, đã ghi nhận hai loài thuộc chi nấm này đó là *M. crassa* (Berk.) Pegler & Lodge (Trịnh Tam Kiệt & Ngô Anh, 2001) và *M. gigantea* (Masse) Pegler & Lodge (Ngô Anh, 2003).

Những nghiên cứu sinh hóa gần đây đều cho thấy, những hoạt chất chống ôxi hóa được chiết xuất từ loài *M. gigantea* có ý nghĩa đáng kể trong quá trình peroxide lipid và có ảnh hưởng lớn đến quá trình hydroxyl và superoxide, giúp ngăn chặn sự hình thành các gốc tự do trong cơ thể và kìm hãm sự phát triển của các tế bào ung thư (Banerjee et al., 2007). Các hoạt chất được chiết xuất từ *M. crassa* cũng được chứng minh có ảnh hưởng lên quá trình phenol> flavonoid> ascorbic acid>β-carotene> lycopene

(Somanjana Khatua & Krishnendu Acharya, 2014). Như vậy, có thể thấy ngoài giá trị làm thực phẩm, các loài trong chi *Macrocybe* còn có giá trị dược liệu giúp nâng cao sức khỏe con người.

Yoshikazum & Takashi (1997) đã nghiên cứu nuôi trồng được *M. gigantea* ở Nhật Bản, ít thấy có các nghiên cứu về nuôi trồng chủ động các loài nấm này ở nước Việt Nam. Việc tìm ra những loài đại diện của chi *Macrocybe* ở Vườn quốc gia Cát Tiên mở ra triển vọng lớn về nghiên cứu công nghệ nuôi trồng loài nấm này ở Việt Nam. Điều này cho phép nghiên cứu phân lập nguồn giống từ tự nhiên thông qua quá trình thuần hóa để phù hợp với điều kiện sản xuất trong nước.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu được thu tại Vườn quốc gia (VQG) Cát Tiên tháng 7/2014, kí hiệu mẫu *Macrocybe* VQGCT 19092014. Tại thực địa, mẫu thu để nghiên cứu DNA mang cùng số hiệu với mẫu tiêu bản, được bảo quản trong silicagel, sau đó

chuyên về phòng Phân loại thực nghiệm và Đa dạng nguồn gen, Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và giữ trong tủ lạnh sâu (-40°C) cho đến khi mẫu được lấy ra để phân tích DNA. Mẫu tiêu bản thu thập được sử dụng để nghiên cứu xác định tên, sau đó được lưu giữ tại Phòng Khoa học và Hợp tác quốc tế, VQG Cát Tiên.

Phương pháp phân tích hình thái

Các mẫu thu thập ngoài tự nhiên được ghi chép các đặc điểm tự nhiên, màu sắc, kích thước, tọa độ địa lý (Nguyễn Lâm Dũng, 2004). Mẫu được sưu tập sẽ được sấy khô bằng máy sấy chuyên dụng ở 45°C , và được làm mềm khi quan sát các đặc điểm hiển vi trong KOH 5% tiến hành quan sát ghi nhận các đặc điểm hiển vi như bào tử, đằm, hệ sợi trên kính hiển vi quang học. Các mẫu nấm thu được ở VQG Cát Tiên được tiến hành mô tả so sánh hình thái với các mô tả của các loài trong chi *Macrocybe* Pegler & Lodge.

Phân lập giống nấm

Môi trường PGA (Potato Glucose Agar) cải tiến là môi trường tách giống thuần khiết và khảo sát hệ sợi trên môi trường thạch có thành phần cho một lít môi trường: 200g khoai tây, 100g cà rốt, 1g peptone, 1g giá đỗ, 15g glucose, 15g agar. Khoai tây, cà rốt được gọt vỏ và giá đỗ được rửa sạch đun sôi khoảng 15-20 phút, lọc lấy nước chiết, bỏ xác bã. Môi trường PGA được hấp khử trùng ở 121°C , 1 Atm trong 30 phút. Môi trường cấy chuyên giống cấp hai và khảo sát hệ sợi trên môi trường hạt: 1000g thóc, 600-700 ml nước, 0,5g CaCO_3 . thóc được nấu chín rồi trộn với CaCO_3 cho vào ống nghiệm và hấp khử trùng ở 121°C , 1 Atm trong 30 phút.

Nghiên cứu môi trường nuôi trồng thích hợp

Mùn cưa và rơm là hai nguyên liệu chính được chúng tôi lựa chọn để tiến hành nghiên cứu nuôi trồng thử nghiệm nấm bạch ngọc, môi trường được phối trộn theo các công thức sau:

Môi trường sử dụng mùn cưa tiến hành nuôi trồng trên các công thức: MTMC1 (môi trường mùn cưa 1): Mùn cưa gỗ cao su 93%, Diamon Phosphate 0,8%, Vôi 1%, cám gạo 5%; MTMC2 (môi trường mùn cưa 2): Mùn cưa gỗ cao su 88,2%, Diamon Phosphate 0,6%, NPK

0,2%, CaCO_3 1%, cám gạo 10%; MTMC3 (môi trường mùn cưa 3): Mùn cưa gỗ cao su 82,2%, Diamon Phosphate 0,5%, NPK 0,3%, CaCO_3 1%, cám gạo 10%, cám ngô 5%. Mùn cưa sau khi được phối trộn được đóng vào các bịch nilong sao cho đạt khối lượng 1,4 kg, hấp khử trùng bằng hơi nước ở nhiệt độ 100°C trong 3 tiếng, để nguội và cấy giống.

Môi trường nuôi trồng trên rơm: MTR1 (môi trường rơm 1): Rơm 93,2%, Diamon Phosphate 0,8%, CaCO_3 1%, cám gạo 5%; MTR2 (môi trường rơm 2): Rơm 88,2%, Diamon Phosphate 0,6%, NPK 0,2%, CaCO_3 1%, cám gạo 10%; MTR3 (môi trường rơm 3): Rơm 82,2%, Diamon Phosphate 0,5%, NPK 0,3%, CaCO_3 1%, cám gạo 10%, cám ngô 5%.

Cách xử lý rơm: rơm khô được nhúng qua nước cho tới khi rơm ngấm đều nước rồi vớt ra, trộn đều cùng các thành phần dinh dưỡng khác, đổ thành các đống lớn khoảng 1 m^3 /đống, ủ trong 1-2 ngày cho rơm mềm và thấm đều dinh dưỡng, sau đó cho rơm vào các bịch nilon với khối lượng 1,2 kg/bịch, hấp khử trùng bằng hơi nước ở nhiệt độ 100°C trong 3 tiếng, để nguội và cấy giống.

Nuôi trồng ra thể quả

Khi sợi nấm lan kín ở cả hai môi trường mùn cưa và môi trường rơm, bịch nấm được cho ra nhà trồng nấm tiến hành phủ đất. Với ba môi trường đất phủ được lựa chọn là: MTĐ 1 (môi trường đất 1) gồm 100% đất; MTĐ 2 (môi trường đất 2) gồm 70% đất 25% phân hữu cơ, 5% phân trâu bò ủ mục bằng chế phẩm sinh học; MTĐ 3 (môi trường đất 3) gồm 100% phân hữu cơ.

Đất được lấy từ lớp đất ở tầng mặt, đập nhỏ, sàng để loại bỏ các tạp chất, rễ cây, phơi qua nắng để loại bỏ nấm mốc và tạp khuẩn. Phân hữu cơ sử dụng phân bón hữu cơ Sông Gianh (loại thay thế cho phân chuồng). Phân trâu bò ủ mục bằng chế phẩm men vi sinh TKS-M.2 (ủ phân), Công ty TNHH SX-XD-TM-DV Hòa Lạc, tp. Hồ Chí Minh.

Điều kiện môi trường nuôi trồng chung cho các công thức môi trường: pH các môi trường được đo bằng máy đo pH và điều chỉnh ở mức pH 6-7, nhiệt độ phòng từ $28-32^{\circ}\text{C}$, khi nhiệt độ cao điều chỉnh hạ nhiệt độ bằng hệ thống phun

nước mái để hạ nhiệt độ, độ ẩm không khí được điều chỉnh ở mức 80% đến 90% bằng máy phun sương trong giai đoạn nuôi trồng hình thành thể quả, ánh sáng khuếch tán khoảng từ 300 lux đến 400 lux, kín gió.

Phương pháp nghiên cứu sinh học phân tử

Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết theo protocol CTAB của Doyle & Doyle (1990) có cải tiến của Phòng Phân loại học thực nghiệm & Đa dạng nguồn gen, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam. Tinh sạch sản phẩm DNA bằng bộ hóa chất Genomic DNA Purification kit của Fermentas. Tinh sạch sản phẩm PCR bằng Kit Extraction Gel của QIAGEN.

Nhân bản PCR và đọc trình tự: Phản ứng nhân gen được thực hiện trong thể tích 25 µl với các thành phần: Master mix 2X (Hãng QIAGEN): 12,5 µl; MgCl₂ 25 mM: 1 µl; Taq polymerase 5 u/µl: 0,5 µl; DNA mẫu: 2 µl; Mỗi xuôi 10 pM: 1,25 µl, Mỗi ngược 10 pM: 1,25 µl, thêm H₂O cho đủ thể tích 25 µl. Cặp mồi LROR (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3' và LR7: 5'-TACTACCACCAAGATCT-3' (Vilgalys & Hester, 1990) được sử dụng để xác định trình tự nucleotide vùng gen 28S-ribosomal RNA cho loài nghiên cứu.

Chu trình nhiệt của mỗi phản ứng PCR: 95°C 4 phút, sau đó là 35 chu kỳ lặp lại: 95°C 45 giây; 55°C 45 giây; 72°C 45 giây. Cuối cùng là 72°C trong 10 phút để kết thúc phản ứng và giữ mẫu ở 4°C. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR system 9700. Sản phẩm được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%, nhuộm gel bằng ethidium bromide và chụp ảnh trên hệ thống máy ảnh a UV Transilluminator camera (Cleaver Sci. Ltd.). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PCR Purification Kit (Hãng QIAGEN). Đọc trình tự nucleotide vùng gen 28S-ribosomal RNA được xác định với kit BigDye Terminator v.3.1 và máy đọc trình tự ABI 3700 genetic Analyzer (Applied Biosystems) tại công ty Macrogen, Hàn Quốc. Mỗi xuôi và mỗi ngược đều được sử dụng để giải mã vùng gen 28S-ribosomal RNA.

Xử lý số liệu: Dữ liệu trình tự thu được đem so sánh, sắp xếp bằng phần mềm ChromasPro1.7.6 (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Queensland, Australia), Bioedit

v7.0.5.2 (Hall, 1999), Clustal X (Thompson et al., 1997), Mega 6.0.6 (Tamura et al., 2013) và chương trình Blast trên ngân hàng Genbank. Xây dựng cây phát sinh chủng loại theo các phương pháp: tiết kiệm tối đa MP (Maximum Parsimony), xác suất tối đa ML (Maximum Likelihood) và kết nối liền kề NJ (Neighbor Joining) được thực hiện trong chương trình phân tích di truyền Mega 6.0.6 (Tamura et al., 2013), kiểm tra giá trị bootstrap với số lần lặp lại (replicate) là 1000 lần. Trình tự nucleotide của các loài/thứ trong cùng chi lấy trên Genbank *M. titans* (U86437); *M. titans* (AH005769), *M. titans* (KC913200); *M. gigantea* (JX193694, KF360837); *Mycena amicta* (DQ457692) được sử dụng trong bài báo này.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu hình thái giải phẫu

Macrocybe titans (H. E. Bigelow & Kimbr) Pegler Lodge & Nakasone

Tên địa phương: Nấm Bạch ngọc

Thể quả nấm mọc thành cụm trên nền đất rừng ẩm ướt ở VQG Cát Tiên (hình 1 a, b), được ghi nhận mọc với mật độ cao vào tháng 6 đến tháng 7 hàng năm, đặc biệt ở những nơi rừng bị phá tán đôi chút và ánh sáng có thể chiếu xuống phía dưới. Khi non nấm có dạng hình dùi trống, phình to ở gốc; khi già, tán nấm xòe hình ô rộng, thường mọc thành từng cụm từ 3-10 thể quả lớn nhỏ chen chúc nhau, hiếm khi thấy mọc đơn lẻ.

Tán nấm có đường kính 8-15 cm, lõi hình chảo, rìa gọn sóng khi tán nấm xòe hết; mặt trên của tán nấm có màu nâu vàng da bò, màu sẫm hơn ở khu vực trung tâm tán nấm. Khi tán nấm già, màu trên tán nhạt dần, khu vực phía rìa mép chuyển thành màu nâu nhạt đến trắng đục. Phiến nấm mỏng, dạng phiến kép, có màu trắng đến xám nhạt, rộng từ 1-2 cm. Lớp thịt tán nấm màu trắng, đến trắng kem, xốp, có độ dày từ 2-3 cm (hình 1a, b). Nấm có mùi thơm dịu, dễ chịu đặc trưng gần giống với mùi của nấm mỡ.

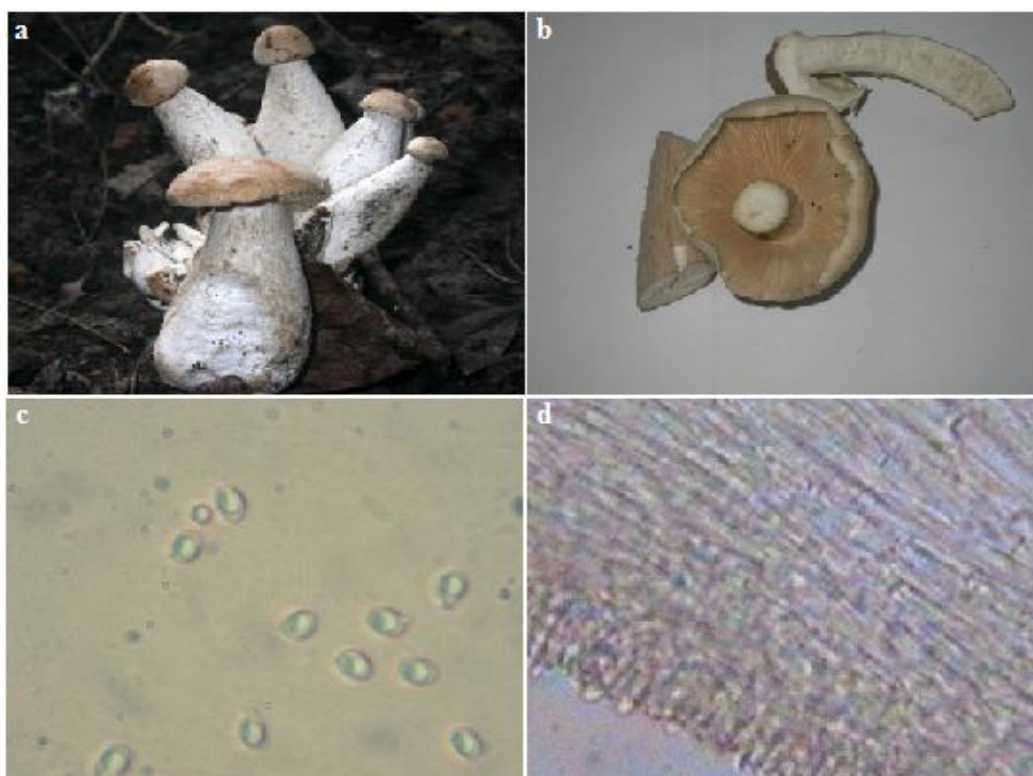
Cuống 6 -15 cm × 1,5-4 cm, hình trụ đến hình chùy, bề mặt trắng trong đến hơi xám, nhiều cùi chắc và cứng. Đặc biệt khi già hoặc bị tác động ngoại lực bên ngoài cuống nấm thường

chuyển sang màu xám đến nâu vàng da bò nhạt gần giống màu của tán nấm. Cuống nấm thường phình to ở phần gốc cuống, đây cũng là một trong những đặc điểm điển hình của chi *Macrocybe* (hình 1a, b).

Bụi bào tử màu kem, bào tử có kích thước 5,5-7,0 μm \times 4,0-5,0 μm , hình cầu đến dạng trứng trong suốt, vách mỏng, có mấu lồi ở đáy, thường chứa 1 nhân lớn có thể dễ dàng nhìn thấy dưới kính hiển vi quang học (hình 1c). Đám 25-38 μm \times 6,5-10 μm , hình chùy hẹp cuống nhỏ, mô bào tầng trong suốt bao gồm vách mỏng (hình 1d).

Từ các kết quả nghiên cứu hình thái cho

thấy các mẫu vật thu được ở VQG Cát Tiên tương đồng với các mô tả của Pegler et al. (1998) về loài *M. titans*. Mẫu vật thu được ở Cát Tiên có kích thước nhỏ hơn và có một số khác biệt về màu sắc như màu xám xanh thường không rõ rệt ở phía rìa mép như trong các mô tả của Pegler et al. (1998), tuy vậy các cấu trúc bào tử, đám và hệ sợi nấm lại rất tương đồng. Để có thêm bằng chứng chúng tôi tiến hành nghiên cứu các đặc điểm di truyền của loài nấm này, đặc biệt nghiên cứu giải mã vùng gene 28S-ribosomal RNA của các mẫu vật thu được ở VQG Cát Tiên với loài thuộc chi *Macrocybe*. và so sánh chúng với các loài/thứ trong cùng chi này trên Genbank.



Hình 1. Nấm Bạch ngọc (*M. titans*) (a: Nấm Bạch ngọc mọc ngoài tự nhiên trên nền đất rừng; b, Lớp thịt nấm cùng cấu trúc phiến nấm; c,d: Các đặc điểm hiển vi bào tử, đám)

Kết quả phân tích sinh học phân tử

DNA tổng số sau khi tinh sạch được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR để nhân đoạn gen 28S-ribosomal RNA với cặp mồi LROR/LR7. Kết quả sản phẩm PCR đã nhân được đoạn

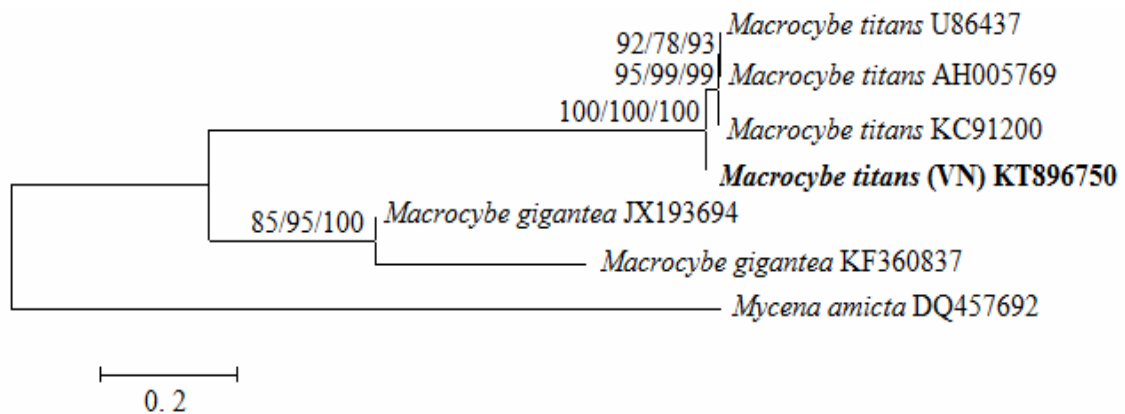
DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 650bp. Sau đó, sản phẩm PCR tiếp tục được gửi sang công ty Macrogen-Hàn Quốc để giải trình tự nucleotide theo hai chiều.

Bảng 1. Mức độ tương đồng nucleotide (dưới) và khoảng cách di truyền (trên) của loài *M. titans* ở các vùng địa lý khác nhau

	<i>Macrocybe titans</i> (VN) KT896750	<i>M. titans</i> U86437	<i>M. titans</i> AH005769	<i>M. titans</i> KC913200
<i>Macrocybe titans</i> (VN) KT896750	-	94,8	94,8	97,9
<i>M. titans</i> U86437	2,3	-	100	96,2
<i>M. titans</i> AH005769	2,3	0	-	96,2
<i>M. titans</i> KC913200	2,4	0,6	0,6	-

Trình tự nucleotide của loài nấm Bạch Ngọc được ký hiệu là *M. titans* VQGCT19092014. Sau khi phân tích với cặp mồi LROR/LR7 thu được trình tự nucleotide có độ dài là 600bp thuộc gen 28S-ribosomal RNA và đã được đăng ký trên ngân hàng GenBank với mã số KT896750. So sánh trình tự gen 28S-ribosomal RNA của loài nấm Bạch Ngọc thu được tại VQG Cát Tiên với các trình tự gen 28S-ribosomal RNA cùng loài trên ngân hàng GenBank được công bố của các tác giả khác (với mã số U86437 (Pegler et al., 1998);

AH005769 (Nakasone et al., 1998); KC913200 (Brewer & DeLong, 2013)) thì kết quả chỉ ra rằng trong loài nấm Bạch Ngọc thu được từ các vùng địa lý khác nhau có độ tương đồng di truyền cao (từ 94,8% đến 100%). Sự khác nhau giữa các vị trí nucleotide được thể hiện trong loài nấm Bạch Ngọc là 13 vị trí nucleotide, cụ thể tại vị trí nucleotide thứ 40 (C) được thay bằng (T), 76 (T-C), 110 (T-C), 176 (T-C),... tương ứng và đây có thể là nucleotide đặc trưng cho vùng địa lý (autapomorphis).



Hình 2. Mối quan hệ họ hàng của loài nấm Bạch Ngọc với các loài/thứ trong cùng chi lấy trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen 28S- ribosomal RNA bằng phương pháp MP/MP/NJ dựa trên mô hình thay thế nucleotide HKY (Hasegawa-Kishino-Yano). Số ở gốc nhánh là giá trị bootstrap với 1000 lần. *Mycena amicta* (DQ457692) được xem như loài ngoài nhóm (outgroup)

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo 3 phương pháp: tiết kiệm tối đa (MP), xác suất tối đa (ML) và kết nối liền kề (NJ) dựa trên mô hình thay thế nucleotide HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) có chỉ số (BIC = 2221,851, AICc = 1823,837, -lnL = 858,707, R=4,79 Base frequencies (A = 0,272, C = 0,367, G = 0,135, T

= 0,226) đã chỉ ra các kết quả nhận được là như nhau (hình 2). Loài nấm *M. titans* và *M. gigantea* đều hình thành một nhánh tiến hóa riêng và loài nấm Bạch ngọc thu được ở VQG Cát Tiên và loài nấm *M. titans* (U86437; AH005769; KC91200) tạo thành một nhóm riêng có mức độ tương đồng di truyền cao (trên

94,8%) và có quan hệ mật thiết với nhau với giá trị bootstrap trên 78%. Kết quả này cho phép nhận định nấm Bạch ngọc VQG Cát Tiên có chung nguồn gốc với loài *M. titans* được công bố bởi các tác giả khác trên thế giới.

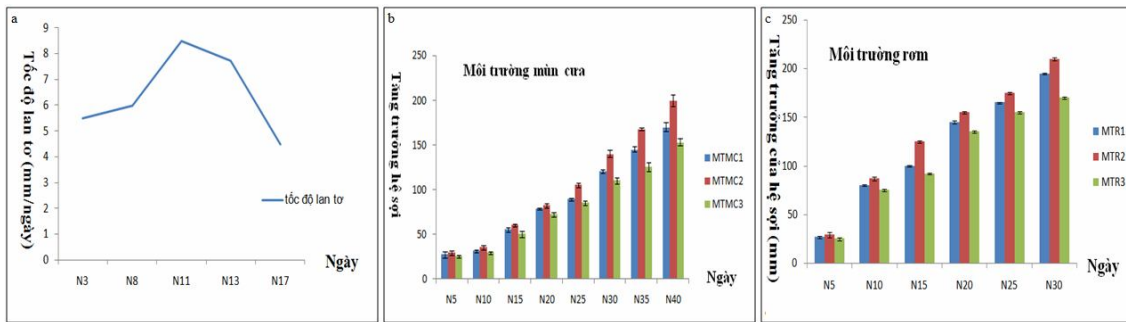
Kết quả tách phân lập giống bảo tồn giống nấm

Nấm phát triển tốt trên môi trường PGA, sau một ngày cấy giống tơ nấm đã bắt đầu phát triển quanh mô nấm, sau ngày hai tơ nấm đã lan xuống bề mặt thạch, tốc độ phát triển tơ nấm tăng dần trong những ngày tiếp theo. Tốc độ lan tơ cao nhất trong khoảng thời gian từ ngày thứ 8 đến ngày 11 tại thời điểm này tốc độ lan tơ đạt 8,5 mm/ngày, sau đó tốc độ lan tơ giảm dần

trong các ngày sau (bảng 2, hình 3a). Vì vậy, chúng tôi cho rằng nên sử dụng giống nấm cấy trên môi trường thạch trong khoảng từ ngày thứ 8 đến ngày thứ 11 cho nhân giống và cấy chuyển sang các môi trường khác.

Bảng 2. Tăng trưởng của hệ sợi nấm trên môi trường nhân giống (Môi trường PGA)

Ngày	N3	N8	N11	N13	N17
Đường kính khuẩn lạc (mm)	15,5	35,5	61	76,5	94,5
Tốc độ lan tơ (mm/ngày)	5,5	6	8,5	7,75	4,5



Hình 3. Tốc độ lan tơ nấm trên môi trường thạch (a), tăng trưởng hệ sợi trên các công thức môi trường mùn cưa (b), tăng trưởng hệ sợi nấm trên các công thức môi trường rơm (c)

Kết quả nghiên cứu nuôi trồng thử nghiệm

Kết quả nuôi trồng trên giá thể mùn cưa

Ở môi trường mùn cưa 2 (MTMC2), tơ nấm lan kín bịch nhanh và tơ nấm khô nhất. Môi trường 1 tơ nấm lan kín bịch nhanh nhưng tơ nấm mảnh và chậm bện kết. Ở môi trường 3 tơ

nấm bện chặt, phân nhánh nhiều nhưng thời gian lan tơ chậm (bảng 3, hình 3b). Vì vậy, chúng tôi cho rằng trong ba công thức môi trường thử nghiệm, môi trường phối trộn cơ chất 2 (MTMC2) phù hợp nhất. Công thức môi trường này được lựa chọn cho nghiên cứu nuôi trồng ra thể quả nấm.

Bảng 3. Tăng trưởng của hệ sợi (mm) của nấm trên các công thức môi trường giá thể mùn cưa

Môi trường	Ngày theo dõi							
	N5	N10	N15	N20	N25	N30	N35	N40
MTMC1	27±3,8	31±1,2	55±2,7	78±1,1	89±1,8	120±1,8	145±2,8	170±5,3
MTMC2	29±2,2	35±2,7	60±1,3	82±2,4	105±2,3	140±3,8	168±1,4	200±6,4
MTMC3	25±1,1	29±1,6	50±3,8	72±2,6	85±2,8	110±3,7	125±5,2	153±3,7

Kết quả nuôi trồng trên giá thể rơm

Trên môi trường giá thể rơm có bổ xung dinh dưỡng, tơ nấm phát triển nhanh và thời gian lan kín bịch cơ chất nhanh hơn so với môi

trường giá thể mùn cưa gỗ cao su. Trong ba công thức môi trường phối trộn với rơm chúng tôi nhận thấy ở công thức môi trường 3 (MTR3) tơ nấm phát triển chậm, tơ mảnh và độ bện kết

không cao so với công thức môi trường 1 (MTR1) và công thức môi trường 2 (MTR2), tỷ lệ nhiễm tạp nhiều. Đặc biệt, ở môi trường 2 (MTR2) tơ nấm phát triển tốt nhất phần lớn các bịch lan kín bịch cơ chất ở ngày thứ 30, tơ nấm

khỏe và có độ bền kết cao (bảng 4, hình 3c). Vì vậy, chúng tôi lựa chọn môi trường 2 (MTR2) làm công thức môi trường cho công đoạn nghiên cứu nuôi trồng ra thể quả tại trại nấm thực nghiệm VQG Cát Tiên.

Bảng 4. Tăng trưởng của hệ sợi (mm) trên các công thức môi trường giá thể rơm

Môi trường	Ngày theo dõi					
	N5	N10	N15	N20	N25	N30
MTR1	27±1,1	80±0,8	100±1,1	145±1,3	165±1,0	195±1,1
MTR2	29±2,8	87±1,7	125±1,2	155±1,1	175±1,1	210±1,8
MTR3	25±1,6	75±1,3	92±1,0	135±1,2	155±1,2	170±1,3

Kết quả nuôi hình thành thể quả, đánh giá năng suất

Quá trình nghiên cứu tốc độ lan tơ trong các công thức môi trường cho phép chúng tôi xác định được công thức môi trường tối ưu cho nuôi trồng ra quả thể, qua đó môi trường MTMC2 và môi trường MTR2 được lựa chọn để nghiên cứu nuôi trồng tại trại nấm thực nghiệm VQG Cát Tiên. Tơ nấm lan kín bịch được tiến hành đưa ra nhà nuôi trồng tiến hành chăm sóc. Với các loài trong chi *Macrocybe*, để có thể hình thành thể quả trong nuôi trồng nhân tạo cần có một lớp đất phủ bề mặt để tạo môi trường gần với tự nhiên giúp nấm dễ hình thành thể quả. Lớp đất phủ được lựa chọn theo 3 công thức khác nhau nhằm tìm ra phương thức hình thành thể quả tối ưu. Ba môi trường đất phủ được lựa chọn, đó là MTĐ 1 (môi trường đất 1), MTĐ 2 (môi trường đất 2), MTĐ 3 (môi trường đất 3). Các bịch nấm được mở miệng, xé bỏ một phần lớp nilon bên ngoài xếp thành từng luống, mỗi luống gồm 200 bịch nấm, tương ứng mỗi luống là một lô thí nghiệm. Với hai công thức môi trường giá thể đã được lựa chọn là MTMC2, MTR2 và 3 công thức phối trộn môi trường đất chúng tôi thiết lập 6 lô thí nghiệm để theo dõi sự hình thành thể quả nấm. Đất sau khi được xử lý, phối trộn theo các công thức khác nhau, được phủ lên bề mặt bịch nấm với độ dày từ 4-5 cm. Độ ẩm được điều khiển bằng máy phun sương để độ ẩm trong phòng nuôi luôn đạt từ 85% đến 90%, vào mùa mưa khi độ ẩm không khí lớn hơn 90% không cần điều khiển độ ẩm mà chỉ cần tưới ướt đều lớp đất phủ hàng ngày. Ánh sáng nhà nuôi được duy trì ở mức 300 lux-400 lux vào ban

ngày, ánh sáng được đo bằng máy đo cường độ ánh sáng và điều chỉnh bằng các cửa lấy sáng. Kết quả hình thành mầm thể quả, thời gian thể quả trưởng thành, năng suất bình quân trên bịch ở mỗi nhóm môi trường sau đợt thu hoạch đầu tiên được chúng tôi ghi nhận và đánh giá (bảng 5).

Với môi trường nuôi trồng trên mùn cưa gỗ cao su, kết quả nuôi trồng thử nghiệm cho thấy ở nhóm môi trường nuôi trồng và đất phủ MTMC2-MTĐ2, mầm thể quả xuất hiện sớm nhất, thể quả tạo thành đồng đều ở 30-32 ngày, tỷ lệ hình thành thể quả ở các bịch là 95%, các cụm thể quả ở môi trường này hình thành dày đặc, có kích thước lớn là một trong những lợi thế cho sản xuất thương phẩm (hình 4). Ở môi trường MTMC2-MTĐ1, nấm hình thành thể quả ở 40-45 ngày, tỷ lệ bịch hình thành thể quả chỉ đạt khoảng 60%. Ở môi trường MTMC2-MTĐ3 tơ nấm lan kín bề mặt môi trường đất nhanh nhưng không thấy có sự hình thành thể quả, sau khi lan kín bề mặt tơ nấm có dấu hiệu bị chết dần.

Trong công thức nuôi trồng sử dụng giá thể rơm ở hai nhóm môi trường: MTR2-MTĐ1, MTR2-MTĐ2 có sự hình thành mầm thể quả sớm chỉ sau từ 25 đến 28 ngày (bảng 5), thời gian hình thành mầm thể quả nhanh hơn nhiều so với nuôi trồng trên giá thể mùn cưa gỗ cao su. Năng suất thu được ở MTR2-MTĐ2 cao hơn so với năng suất thu được ở MTR2-MTĐ1 và tương đương với năng suất nấm thu được khi nuôi trồng trên giá thể mùn cưa gỗ cao su.

Ở môi trường phối trộn cơ chất MTMC2-MTĐ2, mỗi bịch cơ chất mùn cưa gỗ cao su 1,4

kg cho năng suất mỗi bịch đạt 175g, tỷ lệ bịch đạt cao trên 90%. Mỗi bịch rom 1,2kg ở môi trường MTR2-MTĐ2 cho năng suất 170g, thời gian hình thành mầm thể quả nhanh hơn trên môi trường mùn cưa gỗ cao su, tuy nhiên trồng

trên giá thể rom tỷ lệ bịch nhiễm tạp cao khoảng 30%, ngoài ra kỹ thuật trồng bằng rom đòi hỏi phức tạp và tốn công hơn cũng là một trong những trở ngại.

Bảng 5. So sánh thời gian hình thành thể quả và năng suất ở từng loại môi trường nuôi trồng

Môi trường	MTMC2-MTĐ1	MTMC2-MTĐ2	MTMC2-MTĐ3	MTR2-MTĐ1	MTR2-MTĐ2	MTR2-MTĐ3
Thời gian hình thành mầm thể quả (ngày)	40-45	30-32	không hình thành thể quả	25-28	25-27	Không hình thành thể quả
Thời gian thể quả trưởng thành (ngày)	7-10	7-10	-	7-10	7-10	-
Năng suất bình quân ở mỗi môi trường (g/bịch)	150	175	-	145	170	-



Hình 4. Hình ảnh nuôi trồng nấm Bạch ngọc (*M. titans*) ở VQG Cát Tiên (a,b: mầm thể quả hình thành dày đặc trên môi trường nhân tạo; c: cụm thể quả trưởng thành đạt kích thước lớn)

KẾT LUẬN

Nấm bạch ngọc, *M. titans*, là loài ghi nhận mới cho khu hệ nấm lớn Việt Nam. Kết quả phân tích hình thái và hiển vi cho thấy các mẫu vật của loài này có sự tương đồng cao với các mô tả chuẩn của loài *M. titans*. Có một số khác biệt hình thái ngoài như màu sắc và kích thước mẫu thu được nhỏ hơn so với các mô tả của Pegler et al. (1998). Kết quả phân tích trình tự vùng gene 28S-ribosomal RNA có thể khẳng định loài thu được ở VQG Cát Tiên chính xác là loài *M. titans*.

Môi trường nuôi trồng nấm tốt nhất được xác định trong nghiên cứu này là hai môi trường: mùn cưa gỗ cao su 88,2% + Diamon Phosphate 0,6% + 0,2 NPK + CaCO₃ 1% + cám gạo 10% và MTR2 (môi trường rom 2) gồm rom 88,2% + Diamon Phosphate 0,6% +

0,2NPK + CaCO₃1% + cám gạo 10%. Môi trường đất 2 (MTĐ 2) gồm 70% đất, 25% phân hữu cơ, 5% phân trâu bò ủ mục bằng chế phẩm sinh học là tốt nhất cho quá trình hình thành thể quả. Loài nấm này có khả năng nuôi trồng nhân tạo tốt, nếu được đầu tư nghiên cứu đầy đủ có thể trở thành một chủng nấm thương mại có giá trị cao.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu này được hỗ trợ một phần kinh phí từ chương trình bảo tồn các loài nấm thực phẩm và dược liệu quý ở Vườn quốc gia Cát Tiên, dự án bảo vệ phát triển rừng, Tổng Cục Lâm nghiệp Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ngô Anh, 2003. Nghiên cứu thành phần loài nấm lớn ở Thừa Thiên - Huế. Tạp chí Sinh học, 25: 1-7

- Banerjee A., Biswas G., Rai M., Saha G. K., Acharya K., 2007. Antioxidant and Nitric Oxide Synthase activation properties of *Macrocybe gigantea*. *Globe journal of Biotechnology & Biochemistry*, 2(2): 40-44.
- Brewer M. T., DeLong J. A., 2013. First report of *Macrocybe titans* in Georgia. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KC913200>
- ChromasPro1.7.6 (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Queensland, Australia)
- Doyle J. J., Doyle J. L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Nguyễn Lâm Dũng, 2004. Công nghệ trồng nấm, tập 1, 2. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
- Hall T. A., 1999. BioEdit v7.0.5.2: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Trịnh Tam Kiệt, Ngô Anh, 2001. Nghiên cứu chi nấm trắng không lò *Macrocybe* Pegler & Lodge mới được tìm thấy cho khu hệ nấm lớn của Việt Nam. *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng*. 56-60.
- Nakasone K. K., Lodge D. J., Rentmeester R., 1998. *Macrocybe titans* and the pantropical genus *Macrocybe* gen. nov. [Zhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AH005769](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AH005769)
- Pegler D. N., Lodge D. J., Nakasone K. K., 1998. The pantropical genus *Macrocybe* gen. nov. *Mycologia*, 90(3): 494-504.
- Somanjana Khatua., Krishnendu Acharya., 2014. Antioxidant and Antimicrobial Potentiality of Quantitatively Analysed Ethanol Extract from *Macrocybe crassa*. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 29(2), Article No. 11: 53-60 .
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. Filipinski A., Kumar S., 2013. MEGA6.0.6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.6. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Vilgalys R., Hester M., 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 172: 4238-4246.
- Yoshikazum., Takashi M., 1997. Cultivation of nioshimeji (*Tricholoma giganteum*). *Food Reviews International*, 13(3): 413-418.

STUDYING IDENTIFICATION AND CULTIVATION *Macrocybe titans*, A NEW RECORD SPECIES FOR VIET NAM COLLECTING IN CAT TIEN NATIONAL PARK SOUTH OF VIETNAM

**Pham Ngoc Duong¹, Vu Dinh Duy^{2,5*}, Nguyen Thi Anh¹,
Bui Thi Tuyet Xuan^{3,5}, Le Xuan Tham⁴**

¹Cat Tien National Park, Tan Phu, Dong Nai, Vietnam

²Vietnam National Museum of Nature, VAST

³Institute of Ecology and Biological Resources, VAST

⁴Technical & Science Department of Lam Dong Province, Vietnam

⁵College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, P.R China

SUMMARY

Seven species of Genus *Macrocybe* Pegler have been recorded in the world. These include: *Macrocybe crassa*, *M. gigantea*, *M. lobayensis*, *M. pachymeres*, *M. praegrandis*, *M. spectabilis*, *M. titans*. Most of species in this genus are edible; culture technology for some species such as *M. crassa* and *M. gigantea* have been studied. In Vietnam only two species, *M. crassa* and *M. gigantea*, have been recorded, but not much studies have been done on this genus especially on cultivation. In this study we describe the third species of this genus, *M. titans*, in Viet Nam which was collected in Cat Tien National Park, the world natural biosphere reserve in Vietnam. We also study about cultivation of this species in laboratory of fungi in Cat Tien National Park. Our researches in morphology showed that specimens collected in Cat tien National park are similar with Pegler about description of *M. titans*. Our molecular biology analyze at gene 28S-ribosomal RNA also showed that sequence of specimens collected in Cat Tien National Park have high similar to the sequence of other species in genus *Macrocybe* Pegler. from Genbank.

Our cultivation researchs also show that mycelium of *M. titans* can grows very well in PGA medium including potato, glucose, and agar. We found the best recipes of medium for fruitbody cultivation: sawdust, straw and added nutrient. This result gives a good opportunity for commercial culture this species in Viet Nam.

Keywords: *Macrocybe*, *Macrocybe titans*, Gene 28S-ribosomal RNA, Tricholomataceae.

Citation: Pham Ngoc Duong, Vu Dinh Duy, Nguyen Thi Anh, Bui Thi Tuyet Xuan, Le Xuan Tham, 2017. Studying identification and cultivation *Macrocybe titans*, a new record species for Vietnam collecting in Cat Tien National Park South of Vietnam. Tap chi Sinh hoc, 39(2): 172-181. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n2.8367

*Corresponding author: netnhatrang2001@yahoo.com; duydinhv87@gmail.com

Received 2 June 2016, accepted 20 March 2017