

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ ĐẶC ĐIỂM NÔNG SINH HỌC MỘT SỐ CHỦNG NẤM MỘC NHỈ (*Auricularia spp*) THU THẬP TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Thị Giang¹, Hoàng Thị Đào², Kiều Thị Dung¹,
Trần Thu Hà¹, Lê Thanh Uyên¹, Nguyễn Thị Hằng¹,
Đỗ Thị Hạnh³, Khuất Hữu Trung¹, Phạm Xuân Hội¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, đa dạng di truyền và đặc điểm nông sinh học của 9 mẫu nấm mộc nhĩ trong đó có 5 mẫu thu thập ngoài tự nhiên (Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà) và 4 mẫu thu thập từ các cơ sở nuôi trồng nấm (tại Bắc Giang, Đồng Nai, Đắk Lắk và Hà Nội) đã được đánh giá. Trình tự vùng ITS (Internal transcribed spacer) của gen ribosom nhân đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy hệ số tương đồng di truyền của 9 mẫu giống mộc nhĩ dao động trong khoảng 54,4% (giữa mẫu giống Aucg5 và Aucg6) đến 99,83% (giữa mẫu giống Au8 và Au9). Dựa vào cây quan hệ phát sinh loài của 9 mẫu nấm mộc nhĩ và các mẫu tham chiếu, đã xác định được: Aucg1 và Aucg4 thuộc loài *Auricularia delicata*, Aucg6 thuộc loài *Auricularia polytricha*; Aucg7, Au8, Au9 và Au1 thuộc loài *Auricularia cornea*. Kết quả đánh giá đặc điểm nông sinh học cho thấy chủng Aucg2 và Aucg6 không bung sợi trên cơ chất nuôi trồng nên không hình thành mầm quả thể, 7 chủng còn lại có khả năng hình thành và phát triển mầm quả thể. Chủng Aucg5, Aucg7 và Au8 có năng suất nấm tươi cao lần lượt là 720,6; 715,6 và 680,3 kg nấm tươi/tấn nguyên liệu, cao hơn giống đối chứng Au1 (610,5 kg nấm tươi/ tấn nguyên liệu) khoảng 11,5-18,1%; có thể đưa vào nuôi trồng để khảo nghiệm hương vị phục vụ sản xuất.

Từ khóa: Mộc nhĩ, *Auricularia sp*, đa dạng di truyền, ITS, đặc điểm nông sinh học.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm mộc nhĩ (*Auricularia sp*) phân bố rộng từ vùng ôn đới đến vùng nhiệt đới, chúng sống trên những thân cây lá rộng, gốc cây mục nát hoặc các khúc gỗ (Imazeki và Hongo, 1965; Reichard et al., 2005). Nấm Mộc nhĩ là một trong những loại nấm được liệu quan trọng có một số tác dụng như thúc đẩy tuần hoàn máu, điều trị bệnh trĩ giảm đau, chống ung thư, kích thích miễn dịch và tác dụng hạ đường huyết (Dai et al., 2009, 2010). Do nhu cầu tiêu thụ nấm mộc nhĩ trên thế giới ngày càng tăng nên diện tích trồng nấm ngày càng được mở rộng, dẫn đến nguồn giống nấm trở nên thiếu hụt. Ngoài ra, do quá trình canh tác và sử dụng nhiều nên tên của các chủng giống nấm luôn có sự nhầm lẫn rất nghiêm trọng, hiện tượng cùng một chủng với tên gọi khác nhau hay các chủng khác nhau lại có cùng tên gọi. Chính vì thế nhiều chủng giống đã già và thoái hóa lại được đưa vào sản xuất là một hiện tượng phổ biến ở các giống nấm nuôi trồng (Yu et al., 2008). Các chủng giống mộc nhĩ khác nhau không chỉ khác

nhau về năng suất, chu kỳ canh tác, hình dạng và hương vị, mà còn khác nhau trong các tác dụng dược lý, việc đánh giá sự đa dạng di truyền sẽ thúc đẩy sử dụng hiệu quả các đặc điểm di truyền phục vụ cho chọn tạo giống nấm và ngành dược phẩm (Paterson et al., 1991). Chính vì thế, việc thiết lập hệ gen thông qua phân tích đa dạng kết hợp với đánh giá đặc tính sinh học của các chủng giống nấm sẽ là tiền đề quan trọng trong công tác chọn tạo các chủng giống nấm mới mang các đặc điểm mong muốn.

Phân loại thực vật dựa trên đặc điểm hình thái được sử dụng từ rất sớm, tuy nhiên phương pháp này có thể không chính xác vì có hiện tượng đồng quy tính trạng và không phân biệt được các loài đồng hình (He et al., 2011). Suốt những thập kỷ qua, việc sử dụng các chỉ thị phân tử để xác định đa hình ở mức độ DNA. Những chỉ thị phân tử dựa trên cơ sở DNA có thể phân biệt thành 2 kiểu, thứ nhất là các chỉ thị không dựa trên cơ sở PCR (như RFLP) và thứ hai là kiểu chỉ thị dựa trên cơ sở PCR (như RAPD, AFLP, SSR, SNP, ITS,...) (Kumar et al., 2009).

Ở Việt Nam, nấm mộc nhĩ được nuôi trồng phổ biến do loại nấm này có khả năng thích ứng rộng nên có thể trồng từ Bắc vào Nam, tuy nhiên việc sử dụng vùng ITS để nhận dạng và đánh giá sự đa dạng di truyền của nấm mộc nhĩ chưa từng được nghiên cứu

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

² Học viên Nông nghiệp Việt Nam

³ Đại học Công nghiệp Hà Nội

E.mail: xuanhoi.pham@gmail.com

trước đây. Việc nghiên cứu đánh giá sự đa dạng di truyền của các chủng nấm mốc nhĩ dựa trên đặc điểm hình thái và chỉ thị phân tử ITS làm cơ sở cho việc bảo tồn nguồn gen và chọn tạo giống nấm mới.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu được sử dụng trong các thí nghiệm bao gồm 9 mẫu giống nấm nhĩ trong đó có 5 mẫu (Aucg1, Aucg2, Aucg4, Aucg5 và Aucg6) được thu thập ngoài tự nhiên tại Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng và 4 mẫu giống còn lại là Aucg7, Au8, Au9 và Au1 được thu thập từ các cơ sở nuôi trồng cụ thể Aucg7 thu tại tỉnh Bắc Giang, Au8 thu tại Đồng Nai, Au9 thu tại Đắk Lắk, còn mẫu giống Au1 là giống nấm mốc nhĩ đã được công nhận giống sản xuất được lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nấm, Viện Di truyền Nông nghiệp (Bảng 1).

Bảng 1. Các mẫu nấm mốc nhĩ thu thập

STT	Kí hiệu mẫu	Nguồn gốc mẫu
1	Aucg ₁	Vườn QG Bidoup - Núi Bà, Lâm Đồng
2	Aucg ₂	Vườn QG Bidoup - Núi Bà, Lâm Đồng
3	Aucg ₄	Vườn QG Bidoup - Núi Bà, Lâm Đồng
4	Aucg ₅	Vườn QG Bidoup - Núi Bà, Lâm Đồng
5	Aucg ₆	Vườn QG Bidoup - Núi Bà, Lâm Đồng
6	Aucg ₇	Bắc Giang
7	Au ₉	Đắk Lắk
8	Au1	Hà Nội (Trung tâm Nghiên cứu và PT Nấm)
9	Au8	Đồng Nai

Hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu là các hóa chất thông dụng dùng trong sinh học phân tử của các Hãng Sigma, Merck,... CTAB, Tris base, Boric acid, NaCl, dNTPs, EDTA, 6X orange loading dye solution, Taq Polymerase, cồn, 2-propanol, axit acetic glacial, phenol, chloroform, isoamylalcohol, agarose, các môi ITS.

Môi trường nuôi cấy nấm mốc nhĩ: gồm mùn cưa, bột nhẹ CaCO₃, cám ngô, cám gạo, túi nylon chịu nhiệt, bông không thấm nước...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- *Phương pháp tách chiết ADN tổng số*: DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp CTAB của Doyle và Doyle (1987) có một số cải tiến nhỏ. Nghiền 0,3 gam mẫu nấm bằng chày cối sứ trong

nitơ lỏng đến khi thành dạng bột mịn. Cho mẫu vào ống eppendorf và bổ sung 800 µl đệm chiết gồm 60 µl SDS 10%, Tris-bazơ 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 2% và PVP 1%. Ủ mẫu ở 65°C trong bể ổn nhiệt trong 30 phút. Bổ sung thể tích tương đương chloroform-isoamylalcohol (24:1), lắc nhẹ cho tới khi thành dạng nhũ sữa. Ly tâm 11.000 vòng/phút trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Hút dung dịch phía trên chuyển sang ống mới. Tiếp tục chiết lần 2 bằng chloroform-isoamylalcohol (24:1), thu được dịch chiết chứa ADN. Tủa ADN bằng isopropanol đã làm lạnh. Để ở -20°C trong 1 giờ. Ly tâm thu tủa 11.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Rửa tủa bằng ethanol 70%, ly tâm thu tủa. Làm khô và hòa tan ADN, loại ARN bằng RNase, hòa tan ADN trong đệm TE.

- *Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng PCR*: Phản ứng PCR được tiến hành trên máy Veriti 96 well Thermal cycler với cặp môi ITS4/ITS5: TCCTCCGCTTATTGATATGC/ GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG. Tổng thể tích của phản ứng PCR là 15 µl bao gồm: 1,5 µl Đệm PCR (có Mg²⁺) 25 mM; 0,3 µl dNTP 10mM; 0,2 µl Taq polymerase 5U; 1,0 µl mỗi 10mM (mỗi môi); 2,0 µl ADN; 10 µl nước cất hai lần khử ion. Các phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: 94°C (5 phút), 35 chu kỳ lặp lại [94°C (1 phút); 58°C (45s), 72°C (50s)] và kết thúc ở 72°C (7 phút).

- *Điện di sản phẩm PCR*: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%, chạy điện di ở hiệu điện thế 130 V trong thời gian 45 phút và được soi dưới đèn tử ngoại, ADN sẽ được phát sáng nhờ liên kết với ethidium bromide.

- *Phương pháp phân tích gel*: Sản phẩm PCR được điện di và tinh sạch đoạn băng khuếch đại bằng kit Qiagen theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Giải trình tự

Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch, được giải trình tự trực tiếp sử dụng môi ITS 4 tại Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự được so sánh với các trình tự tương đồng trên NCBI. Sau đó, các trình tự được tập hợp lại và phân tích bằng chương trình MEGA 6.06 để tạo cây phát sinh loài.

- *Đánh giá khả năng sinh trưởng và năng suất các chủng nấm mốc nhĩ*

+) Nuôi trồng nấm mốc nhĩ: Nguyên liệu mùn cưa được làm ướt bằng nước vôi có pH = 12-13, kiểm tra độ ẩm đạt 65-70%, ủ hiếu khí từ 5-7 ngày tiến hành đảo đống ủ, ủ tiếp 5-7 ngày thì đóng túi nylon chịu nhiệt kích thước 19 x 37 cm, được khử trùng bằng nồi hơi

công nghiệp ở nhiệt độ 120°C - 125°C trong thời gian 180 phút, sau đó để nguội ở nhiệt độ phòng rồi tiến hành cấy giống và nuôi ở nhiệt độ phòng 25-30°C, ánh sáng yếu hoặc không cần ánh sáng.

+) Đánh giá đặc điểm nông sinh học theo Trịnh Tam Kiệt (2012). Thời gian xuất hiện quả thể nấm (ngày) là thời gian tính từ khi cấy giống đến khi xuất hiện mầm quả thể đầu tiên. Năng suất sinh học (NSSH):

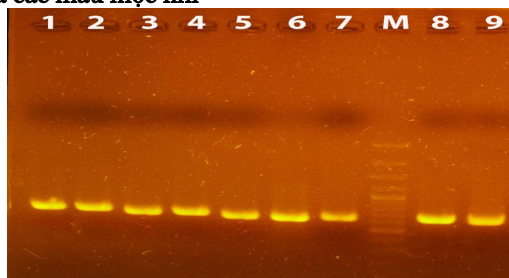
$$\text{NSSH (kg/tấn nguyên liệu)} = \frac{\text{Khối lượng nấm tươi (kg)}}{\text{Khối lượng nguyên liệu khô (tấn)}}$$

*) Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 và excel.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại PCR của các mẫu nấm nhĩ



Hình 1. Ảnh điện di sản phẩm PCR của 09 mẫu nấm nhĩ với cặp mồi ITS4/ITS5

M: chuẩn DNA 1kb

1. *Aucg*₁; 2. *Aucg*₂; 3. *Aucg*₄; 4. *Aucg*₅; 5. *Aucg*₆; 6. *Aucg*₇; 7. *Au*₉; 8. *Au*₁; 9. *Au*₈

ADN tổng số của 9 mẫu nấm nấm nhĩ sau tách chiết đều cho nồng độ và độ tinh sạch cao các băng

gọn sắc nét đảm bảo cho các bước thí nghiệm tiếp theo.

Thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi ITS4/ITS5, kết quả khuếch đại PCR tạo ra băng đơn hình với kích thước khoảng 600-650 bp (Hình 1).

3.2. Giải trình tự vùng ITS-rDNA của các mẫu nấm nấm nhĩ

Sản phẩm PCR với cặp mồi ITS4/ITS5 sau khi tinh sạch được phân tích trực tiếp trên máy giải trình tự ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biotech) của Công ty Macrogen (Hàn Quốc) và phần mềm MEGA 6.06. Trình tự cùng ITS của 9 mẫu nấm nhĩ được so sánh với trình tự tham chiếu đã được công bố trên NCBI (số genbank KR605643.1, KX022020.1, KF297965.1, LC373492.1 và MG732993.1).

Kết quả tổng hợp ở bảng 1 cho thấy, do có sự mất đoạn hay thêm đoạn (InDel) ở một số vị trí trên đoạn gen nên số lượng nucleotide tổng số của mỗi đoạn trình tự khác nhau giữa các mẫu nghiên cứu. Chiều dài vùng ITS gồm ITS1-5,8SrRNA-ITS2 có sự khác biệt giữa các mẫu dao động từ 561 nucleotit (mẫu *Aucg*₃) đến 628 nucleotit (mẫu *Aucg*₆). Hai mẫu nấm nhĩ *Au*₉ và *Au*₁ có cùng độ dài là 599 nucleotit.

Khảo sát thành phần nucleotide vùng ITS của 9 mẫu nấm nấm nhĩ cho thấy thành phần của bốn loại nucleotit Guanin, Cytosine, Adenine và Thymine giữa các chủng nghiên cứu có tỉ lệ sai khác không nhiều. Trong đó, thành phần Thymine có tỉ lệ phần trăm trung bình cao nhất trong bốn loại nucleotit là 26,4%, hệ số trung bình thấp nhất là thành phần Guanin là 23,9%. Mẫu *Aucg*₂ có thành phần Adenine là 21,6%, thấp nhất và thành phần Cytosine là 26,8%, cao nhất trong các mẫu nghiên cứu (Bảng 2).

Bảng 2. Tỉ lệ phần trăm thành phần nucleotide của 9 mẫu nấm nấm nhĩ nghiên cứu

Tên giống	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	Tổng số Nucleotide
<i>Aucg</i> ₁	25,7	26,1	24,0	24,2	595,0
<i>Aucg</i> ₂	27,5	26,8	21,6	24,1	556,0
<i>Aucg</i> ₄	26,0	26,7	23,3	24,0	562,0
<i>Aucg</i> ₅	26,9	25,3	24,6	23,2	561,0
<i>Aucg</i> ₆	27,5	24,0	25,6	22,8	628,0
<i>Aucg</i> ₇	26,9	26,0	23,2	23,9	569,0
<i>Au</i> ₉	26,4	25,2	24,5	23,9	599,0
<i>Au</i> ₁	26,4	25,5	24,2	23,9	599,0
<i>Au</i> ₈	26,4	25,3	24,4	23,9	598,0
Trung bình	26,4	25,2	24,5	23,9	599,0

3.3. Kết quả phân tích đa dạng di truyền giữa 09 mẫu giống nấm nhĩ nghiên cứu

Sự khác biệt về trình tự vùng ITS1-rRNA-ITS2 giữa các mẫu nghiên cứu và 5 mẫu tham chiếu (KR605643.1 *Auricularia delicata*; KX022020.1

Auricularia delicata; KF297965.1 *Auricularia delicata*; LC373492.1 *Auricularia cornea* và MG732993.1 *Auricularia polytricha*) được thể hiện thông qua hệ số tương đồng thu được sau khi sử dụng phần mềm CLC v8.0, số liệu thu được tổng hợp trong bảng 3.

Bảng 3. Hệ số tương đồng di truyền giữa 9 mẫu giống mộc nhĩ nghiên cứu

	Aucg1	KF297965.1 <i>Auricularia delicata</i>	Aucg6	Au9	Au1	Au8	MG732993.1 <i>Auricularia polytricha</i>	Aucg2	LC373492.1 <i>Auricularia cornea</i>	Aucg4	Aucg5	KX022020.1 <i>Auricularia delicata</i>	KR605643.1 <i>Auricularia delicata</i>	Aucg7
Aucg1														
KF297965.1 <i>Auricularia delicata</i>	97.99													
Aucg6	63.13	62.44												
Au9	95.49	93.83	62.65											
Au1	94.82	93.67	62.35	98.66										
Au8	95.65	93.99	62.50	99.83	98.50									
MG732993.1 <i>Auricularia polytricha</i>	61.58	61.86	97.45	60.71	60.71	60.80								
Aucg2	86.43	86.87	56.40	84.19	84.19	84.33	57.45							
LC373492.1 <i>Auricularia cornea</i>	94.17	95.81	61.52	97.67	97.50	97.83	60.93	84.78						
Aucg4	93.79	94.93	58.57	89.83	89.83	89.98	59.67	90.81	90.77					
Aucg5	86.07	87.16	54.40	82.50	82.50	82.64	55.40	84.63	83.39	91.47				
KX022020.1 <i>Auricularia delicata</i>	95.97	96.28	60.21	92.17	92.17	92.32	61.34	88.47	92.62	95.85	88.26			
KR605643.1 <i>Auricularia delicata</i>	61.85	62.16	45.87	61.10	61.10	61.20	46.75	64.96	61.41	64.60	59.12	63.84		
Aucg7	90.50	91.28	58.10	94.18	94.18	94.33	59.18	88.79	95.47	95.08	87.35	92.62	64.32	

Số liệu thu được trong bảng 3 cho thấy, hệ số tương đồng di truyền của 9 mẫu giống mộc nhĩ dao động trong khoảng 54,4% (giữa hai mẫu giống Aucg5 và Aucg6) đến 99,83% (giữa mẫu giống Au8 và Au9).

Từ các trình tự nucleotid vùng ITS1-rRNA-ITS2 của 9 mẫu giống, tiến hành xây dựng cây quan hệ phát sinh bằng phần mềm Mega 6.06 theo phương pháp Maximum likelihood, kết quả thể hiện ở hình 2.

Kết quả từ cây phân loại cho thấy 9 mẫu giống mộc nhĩ và 5 mẫu tham chiếu là KF297965.1 *Auricularia delicata*, MG732993.1 *Auricularia polytricha*, LC373492.1 *Auricularia cornea*, KX022020.1 *Auricularia delicata* và KR605643.1 *Auricularia delicata* được chia thành 4 nhóm chính:

Nhóm thứ nhất: gồm mẫu giống mộc nhĩ Aucg6 và mẫu tham chiếu MG732993.1 *Auricularia polytricha*. Mẫu giống này có mức tương đồng về trình tự nucleotide với giống tham chiếu MG732993.1 là 97,45%.

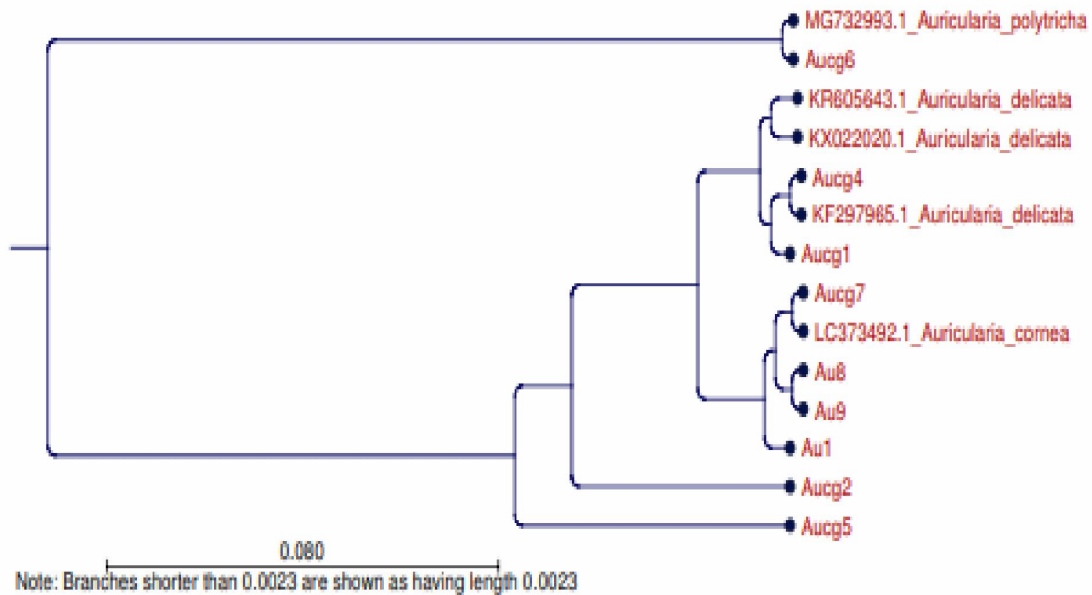
Nhóm thứ 2: gồm 6 mẫu giống mộc nhĩ được chia thành 2 phân nhóm phụ.

Phân nhóm phụ 2.1 gồm 2 mẫu giống Aucg1 và Aucg4 có mức tương đồng về trình tự nucleotide cao nhất với giống tham chiếu KF297965.1 *Auricularia delicata* là 94,93% (Aucg4 - KF297965.1) đến 97,99% (Aucg1 - KF297965.1).

Phân nhóm phụ 2.2 gồm 4 mẫu giống là Aucg7, Au8, Au9 và Au1. Bốn mẫu giống này có mức tương đồng về trình tự nucleotide cao nhất với giống tham chiếu LC373492.1 *Auricularia cornea* dao động từ 95,47% (Aucg7 - LC373492.1) đến 97,83 (Au8 - LC373492.1).

Nhóm thứ 3: gồm duy nhất mẫu giống Aucg2 có mức tương đồng về trình tự nucleotide cao nhất với giống tham chiếu KX022020.1 *Auricularia delicata* là 88,47%.

Nhóm thứ 4: gồm duy nhất mẫu giống Aucg5 có mức tương đồng về trình tự nucleotide cao nhất với giống tham chiếu KX022020.1 *Auricularia delicata* là 88,26%.



Hình 2. Sơ đồ cây quan hệ di truyền của 9 mẫu giống mộc nhĩ trên cơ sở trình tự vùng ITS

3.4. Kết quả nhận dạng một số mẫu mộc nhĩ

Kết quả so sánh trình tự nucleotide vùng ITS1-rRNA-ITS2 của 9 mẫu giống mộc nhĩ với trình tự vùng ITS của 5 loài tham chiếu cho thấy có nhiều vị trí biến đổi nucleotide giữa các mẫu giống mộc nhĩ với loài tham chiếu. Trong đó, duy nhất mẫu giống Aucg6 có mức tương đồng về trình tự nucleotide với tham chiếu MG732993.1 là loài *Auricularia polytricha* (97,45%). Hầu hết trình tự nucleotide của mẫu giống Aucg6 đều tương đồng với trình tự nucleotide của mẫu tham chiếu MG732993.1, ngoại trừ một số vị trí như: vị trí 566 T thay bằng C, vị trí 660 A thay bằng T so với giống tham chiếu. Dựa vào trình tự nucleotide vùng ITS1-rRNA-ITS2 có thể thấy mẫu giống Aucg6 tương đồng cao với giống tham chiếu MG732993.1 và khác với các giống tham chiếu còn lại. Như vậy có thể nhận dạng được mẫu giống Aucg6 thuộc loài *Auricularia polytricha* (Bảng 3).

Hai mẫu giống Aucg1 và Aucg4 có mức tương đồng về trình tự nucleotide rất cao với 2 mẫu tham chiếu của loài *Auricularia delicata* là KF297965.1 và KX022020.1. Mẫu giống Aucg1 có mức tương đồng về trình tự nucleotide với giống tham chiếu KF297965.1 là 97,99%. Hầu hết trình tự nucleotide của mẫu giống Aucg1 đều tương đồng với trình tự nucleotide của giống tham chiếu KF297965.1, ngoại

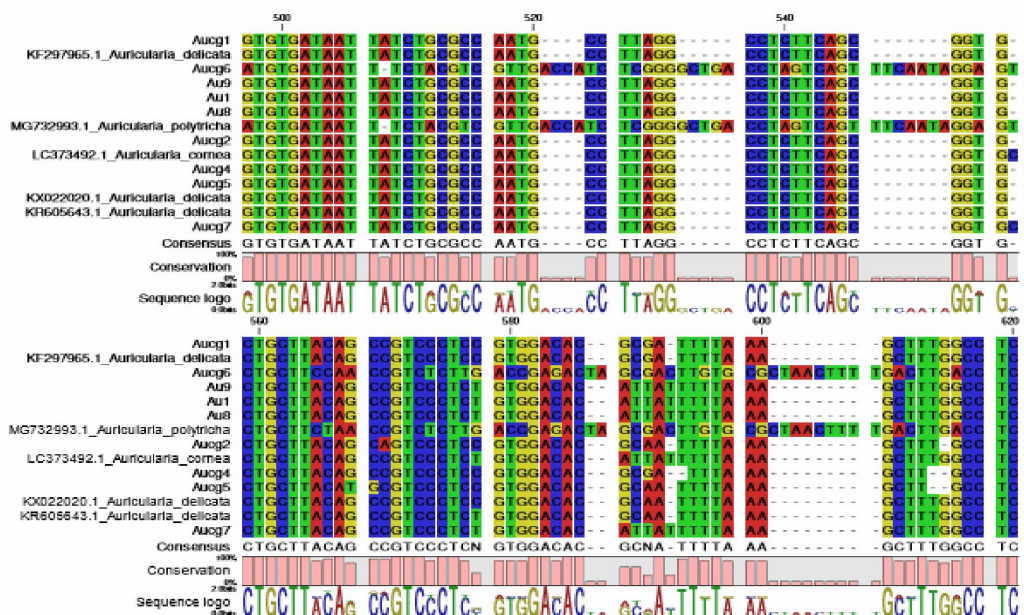
trừ một số vị trí như: vị trí 8 Indel nucleotide A, vị trí 86 A thay bằng C so với giống tham chiếu. Tương tự, Aucg4 có mức tương đồng về trình tự nucleotide với giống tham chiếu KF297965.1 là 94,93%. Trình tự nucleotide của mẫu giống Aucg4 hầu hết đều tương đồng với trình tự nucleotide của giống tham chiếu KF297965.1, ngoại trừ một số vị trí như: vị trí 594 Indel nucleotide T, vị trí 614-615 Indel nucleotide TG so với giống tham chiếu. Như vậy dựa vào trình tự nucleotide vùng ITS1-rRNA-ITS2 có thể nhận dạng được mẫu giống Aucg1 và Aucg4 thuộc loài *Auricularia delicata*. Dựa vào các vị trí biến đổi nucleotide của 2 mẫu giống Aucg1 và Aucg4 so với giống tham chiếu KF297965.1 có thể nhận dạng được 2 mẫu giống này (Bảng 4).

Bốn mẫu giống Aucg7, Au8, Au9 và Au1 có mức tương đồng về trình tự nucleotide cao nhất với loài *Auricularia cornea* (95,47%-97,83%). Ở các vị trí 83-87, 101, 103, 114, 128, 172, 196-200, 394, 418, 578, 589-591, 593 tất cả 4 mẫu giống này đều tương đồng với mẫu tham chiếu LC373492.1 *Auricularia cornea* và khác với các giống tham chiếu còn lại. Như vậy dựa vào trình tự nucleotide vùng ITS1-rRNA-ITS2 có thể nhận dạng được mẫu giống Aucg7, Au8, Au9 và Au1 thuộc loài *Auricularia cornea* (Bảng 4).

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

Bảng 4. Một số vị trí nucleotide sai khác trên vùng gen ITS giữa các mẫu mộc nhĩ và các mẫu tham chiếu

Vị trí sai khác	Tên giống													
	KF297965.1	KX022020.1	KR605643.1	Aucg1	Aucg4	MG732993.1	Aucg6	LC373492.1	Au9	Au1	Au8	Aucg7	Aucg2	Aucg5
83	C	.	.	.	.	.	.	T	T	T	T	T	.	.
84	-	-	-	-	-	-	-	C	C	C	C	C	-	-
85	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	A	A	-	-
86	A	C	-	C	.	.	.	C	C	C	C	C	C	.
87	C	.	-	.	.	.	.	A	A	A	A	A	.	.
122	G	.	-	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.
125	C	.	-	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.
126	A	.	-	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.
127	C	.	-	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.
172	T	.	-	.	.	C	C	A	A	A	A	A	.	.
220	A	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.
221	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
388	C	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	T
389	-	-	-	-	-	T	T	-	-	-	-	-	-	-
390	-	-	-	-	-	G	G	-	-	-	-	-	-	-
391	-	-	-	-	-	A	A	-	-	-	-	-	-	-
392	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
393	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
394	C	.	T	.	.	T	T	T	T	T	T	T	.	.
442	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
471	G	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.
472	C	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.
473	G	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.
566	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
568	G	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	T
569	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
570	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
589	G	.	.	.	.	.	.	A	A	A	A	A	.	.
590	C	.	.	.	.	.	.	T	T	T	T	T	.	.
591	G	A	A	.	.	.	.	T	T	T	T	T	A	A
592	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
593	-	-	-	-	-	C	C	T	T	T	T	T	-	-
594	T	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.
598	A	.	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.
599	A	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.
614	T	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	-
615	G	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	-
660	T	-	-	.	-	A	.	.	.	A	.	-	-	-



Hình 3. Một đoạn trình tự và vị trí sai khác nucleotit vùng ITS của 9 mẫu giống mộc nhĩ so với các mẫu tham chiếu

3.5. Đánh giá đặc điểm nông sinh học của các mẫu nấm mộc nhĩ nghiên cứu

3.5.1. Sinh trưởng hệ sợi trên cơ chất nuôi trồng

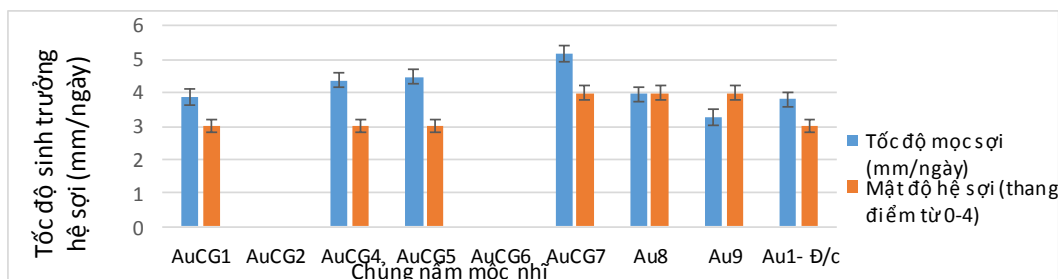
Để đánh giá tiềm năng nuôi trồng, các chủng nấm mộc nhĩ được nuôi trồng trên giá thể mùn cưa có bổ sung 10% dinh dưỡng. Tốc độ mọc sợi và đặc điểm hệ sợi của các chủng nấm mộc nhĩ được ghi nhận ở hình 4 và hình 5. Trong số 5 chủng nấm mộc nhĩ được thu thập từ Vườn Quốc gia Bidoup-Núi Bà

có 02 chủng nấm là Aucg2 và Aucg6 hệ sợi nấm hầu như không phát triển, điều này có thể là do điều kiện nuôi trồng nhân tạo chưa thích hợp để các chủng nấm này sinh trưởng và phát triển, cần có thời gian nghiên cứu và thuần hóa; các chủng nấm còn lại sinh trưởng bình thường có hệ sợi trắng và phát triển đều trên bề mặt cơ chất nuôi trồng, chủng có tốc độ mọc nhanh nhất và mật độ sợi dày là chủng Aucg7, tiếp theo là các chủng Aucg1, Aucg4 và Aucg5.



Hình 4. Đặc điểm hệ sợi của các chủng nấm mộc nhĩ trên giá thể nuôi trồng

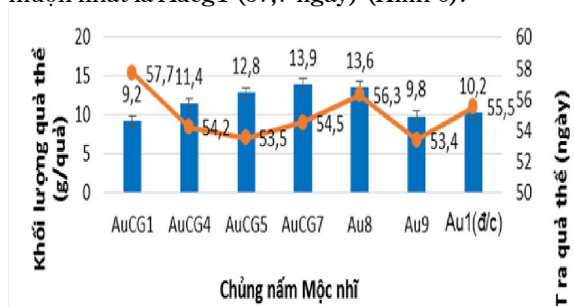
a. Au1; b. Aucg1; c. Aucg2; d. Aucg4; e. Aucg5; f. Aucg6; g. Aucg7; h. Au8; i. Au9 (AuMN)



Hình 5. Sinh trưởng hệ sợi của các chủng nấm mộc nhĩ trên giá thể nuôi trồng

3.5.2. Khả năng hình thành và phát triển quả thể của các chủng nấm mộc nhĩ trên giá thể nuôi trồng

Trong số 9 chủng nấm mộc nhĩ nghiên cứu chỉ có 7 chủng nấm có khả năng hình thành và phát triển mầm quả thể trên cơ chất nuôi trồng. Thời gian hình thành mầm quả thể của các chủng giống dao động từ 53,4 -57,7 ngày; chủng có thể ra quả thể sớm nhất là Au9 (53,4 ngày) và chủng xuất hiện mầm quả thể muộn nhất là Aucg1 (57,7 ngày) (Hình 6).

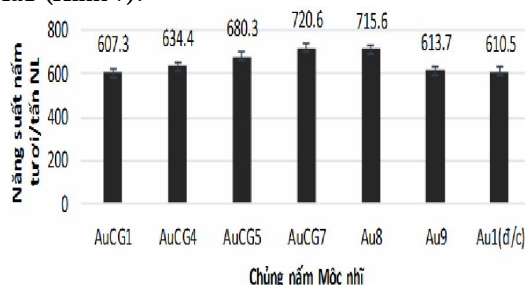


Hình 6. Thời gian ra quả thể và khối lượng quả thể của các chủng nấm mộc nhĩ

Năng suất nấm mộc nhĩ phụ thuộc chặt chẽ vào rất nhiều các yếu tố như: nhiệt độ, ẩm độ, ánh sáng và cơ chất nuôi trồng (Krishnan *et al.*, 2011). Trong nghiên cứu này, các chủng nấm mộc nhĩ được nuôi trồng trong cùng một điều kiện. Khối lượng quả thể nấm là một trong các chỉ tiêu quan trọng nhất quyết định đến năng suất của các chủng mộc nhĩ. Kết quả chỉ ra các chủng nấm mộc nhĩ có khối lượng quả thể có sự sai khác có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%; 4 chủng là Aucg4, Aucg5, Aucg7 và Au8 có khối lượng quả thể đạt từ 11,4-13,9 g/quả cao hơn giống đối chứng Au1; 02 giống còn lại là Aucg1 và Au9 có khối lượng quả thể thấp nhất dao động từ 9,2-9,8 g/quả.

Năng suất các mẫu giống nấm mộc nhĩ có sự khác nhau rõ rệt. Hai mẫu nấm Aucg7 và Au8 cùng thuộc loài *Auricularia cornea* và Aucg5 thuộc loài *Auricularia delicata* có năng suất nấm tươi cao và khác biệt có ý nghĩa $\alpha=0,05$ so với các chủng còn lại

và so với giống đối chứng. Năng suất nấm tươi thu được ở 03 chủng này lần lượt là 720,6; 715,6 và 680,3 kg nấm tươi/tấn nguyên liệu, cao hơn giống đối chứng Au1 (610,5 kg nấm tươi/ tấn nguyên liệu) khoảng 11,5-18,1%. Các chủng giống nấm còn lại đều có năng suất thấp hơn hoặc tương đương và không có sự khác biệt có ý nghĩa so với giống đối chứng Au1 (Hình 7).



Hình 7. Năng suất của các chủng nấm mộc nhĩ

3.6. Đặc điểm hình thái quả thể nấm mộc nhĩ

Các chủng nấm Aucg7, Au8, Au9 và Au1 tại nấm dai có cấu trúc hình cái tai, trên bề mặt tai nấm có phủ dày những sợi lông ngắn, phía trong tai nấm có màu xám đến hơi nâu, đây là đặc điểm đặc trưng của các chủng nấm mộc nhĩ thuộc loài *Auricularia cornea* (Trịnh Tam Kiệt và cs, 2008) (Hình 8A); các chủng Aucg1, Aucg2, Aucg4 và Aucg5 thuộc loài *A. delicata* (Fr.) Henn (Hình 8B) là loài nấm hoang dã được thu thập ở vùng nhiệt đới gió mùa của tỉnh Lâm Đồng. Kết cấu tai nấm của nó nhẵn và có gân (lưới), tai nấm mềm hơn nhiều so với loài *A. polytricha* và giòn hơn so với *A. auricular-judae*, loài nấm này từng được phát hiện ở Vườn Quốc gia Cát Tiên năm 2012; và duy nhất chủng Aucg6 thuộc loài *Auricularia polytricha*, loài nấm này được thu thập trên thân cây gỗ tại Vườn Quốc gia Bidoup – Núi Bà và tai nấm có màu hồng xám (Hình 8C).



Hình 8. Đặc điểm hình thái quả thể của các chủng nấm mộc nhĩ

A. Aucg7; B. Au8; C. Au9; D. Au1; E. Aucg1; F. Aucg2; G. Aucg4; H. Aucg5; I. Aucg6

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

9 mẫu giống mộc nhĩ nghiên cứu rất đa dạng về hình thái và phân tử các chủng nấm Aucg7, Au8, Au9 và Au1 thuộc loài *A. cornea* có tai nấm dai và dày, phía trong tai có màu xám hơi nâu, trên tai có phủ lớp lông trắng mịn; còn các chủng nấm Aucg1, Aucg2, Aucg4 và Aucg5 thuộc loài *A. delicata* lại có cấu trúc tai nấm nhẵn nhéo, có gân lưới phía mặt dưới, tai nấm mềm và nhũn; duy nhất chủng Aucg6 thuộc loài *A. polytricha* tai nấm có màu hồng đặc trưng. Hệ số tương đồng di truyền của các mẫu giống mộc nhĩ dao động trong khoảng 54,4% (giữa mẫu giống Aucg5 và Aucg6) đến 99,83% (giữa mẫu giống Au8 và Au9). Dựa vào cây quan hệ phát sinh của 9 mẫu giống mộc nhĩ thu thập và các mẫu tham chiếu có thể chia thành 4 nhóm chính.

Kết quả so sánh trình tự nucleotide vùng ITS1-rRNA-ITS2 được tạo ra bằng cặp mỗi ITS4/ITS5 có thể nhận dạng được mẫu giống Aucg6 thuộc loài *Auricularia polytricha*; hai mẫu giống Aucg1 và Aucg4 thuộc loài *Auricularia delicata*; bốn mẫu giống Aucg7, Au8, Au9 và Au1 thuộc loài *Auricularia cornea*.

Trong 9 chủng giống nghiên cứu có 02 chủng giống là Aucg2 và Aucg6 không hình thành và phát triển quả thể trên cơ chất nuôi trồng. 3 chủng giống là Aucg5, Aucg7 và Au8 có thời gian hình thành quả thể sớm hơn hoặc tương đương và cho năng suất sinh học cao hơn giống đối chứng Au1 từ 11,5-18,1%; có thể đưa vào nuôi trồng để khảo nghiệm hướng tới phục vụ sản xuất.

LỜI CẢM ƠN

Công trình này là sản phẩm của đề tài "Nghiên cứu chọn tạo giống nấm ăn và nấm dược liệu có giá trị hàng hóa cao" thuộc chương trình Sản phẩm quốc gia đến năm 2020, do Viện Di truyền Nông nghiệp chủ trì. Các tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã cấp kinh phí để nhóm nghiên cứu thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trịnh Tam Kiệt, 2012. *Nấm lớn ở Việt Nam*, Tập 2. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.
2. Trịnh Tam Kiệt, Đoàn Văn Vệ, 2008. Nghiên cứu thành phần loài nấm mộc nhĩ *Auricularia* của

Việt Nam. *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng*, (4): 47-51.

3. Dai YC, Yang ZL, Cui BK, Yu CJ, Zhou LW, 2009. Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China. *Int. J. Med. Mushrooms*, 11: 287-302.

4. Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH, 2010. A revised checklist of edible fungi in China. *Mycosystema*, 29: 1-21.

5. Doyle, J. J. and J. L. Doyle, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

6. He, Y., Hou, P., Fan, G., Song, Z., Liu, H., Li, Y., & Zhang, Y., 2011. Internal Transcribed Spacers (ITS) identification of *Angelica anomala* Lallem Chuanbaizhi (in Chinese) cultivars collected in Sichuan and their molecular phylogenetic analysis with other *Angelica* L. species. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 3653-3659.

7. Imazeki R, Hongo T, 1965. Colored illustrations of fungi of Japan. Hoikusya, Osaka, II, Plate 57, p. 172.

8. Krishnan, M. Gopi and S. Amerjothy, 2011. Morphological diversity and some newly recorded plant galls in Tamil Nadu, India. *Indian Journal of Science and Technology*, 4 (9): 1067-1073.

9. Kumar P., Gupta V. K., Misra A. K., Modi D. R. and Pandey B. K., 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2 (4): 141-162.

10. Paterson AH, Tanksley SD, Sorrells ME, 1991. DNA markers in plant improvement. *Adv. Agron.*, 46: 39-90.

11. Reichard BM, Evaristo AA, Apolonia LL, Renato GR, 2005. Four species of wild *Auricularia* in Central Luzon, Philippines as sources of cell lines for researchers and mushroom growers. *J. Agric. Sci. Technol.*, 1: 279-300.

12. Yu MY, Ma B, Luo X, Zheng LY, Xu XY, Yang ZR, 2008. Molecular diversity of *Auricularia polytricha* revealed by inter-simple sequence repeat and sequence-related amplified polymorphism markers. *Curr. Microbiol.*, 56: 240-245.

**GENETIC DIVERSITY AND AGRO-BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOME ISOLATES
OF WOOD EAR MUSHROOM (*Auricularia sp.*) IN VIETNAM**

**Nguyen Thi Giang, Hoang Thi Dao, Kieu Thi Dung,
Tran Thu Ha, Le Thanh Uyen, Nguyen Thi Hang,
Do Thi Hanh, Khuat Huu Trung, Pham Xuan Hoi**

Summary

In this study, genetic diversity and agro-biological characteristics of 9 isolates of *Auricularia* species were evaluated. In which, 5 isolates were collected from natural populations in Bidoup Nui Ba Forest and 4 isolates from cultivation Units? in Vietnam. Genetic diversity was evaluated using internal transcribed spacer (ITS) sequences of the ribosomal DNA. The coefficient of genetic similarity between 9 isolates of *Auricularia sp* ranged from 54.4% (between Aucg5 and Aucg6) to 99.83% (between Au8 and Au9). From phylogenetic tree based on ITS sequences from different species of the *Auricularia sp* and sequences of the known strains were obtained from the GenBank, we were able to identify two isolated strains (Aucg1 and Aucg4) as *Auricularia delicata*; one strain (Aucg6) as *Auricularia polytricha* and four remaining strains (Aucg7, Au8, Au9 and Au1) as *Auricularia cornea*. For agro-biological characteristics, the mycelium of Aucg2 and Aucg6 did not grow on the cultivation substrates, so fruiting could not formed, the seven remaining strains were able to form and develop fruiting body normally. The Aucg5, Aucg7 and Au8 strains having significantly higher yield, about 11.5-18.1% compared with Au1 control strain (610.5 kg/ton dry substrates) and reached 720.6; 715.6 and 680.3 kg/ton dry substrates, respectively. These strains had potential for cultivation in future.

Keywords: Wood ear mushroom (*Auricularia sp.*), ITS, genetic diversity, agro-biological characteristics.

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Khiêm

Ngày nhận bài: 18/9/2020

Ngày thông qua phản biện: 19/10/2020

Ngày duyệt đăng: 26/10/2020