

NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG VỀ HÌNH THÁI QUẢ THỂ VÀ SO SÁNH THÀNH PHẦN HOÁ SINH CƠ BẢN CỦA MỘT SỐ CHỦNG LINH CHI

Nguyễn Huỳnh Minh Quyền, Khuất Hữu Trung, Nguyễn Hữu Toàn
Trần Thị Nguyệt Lan, Nguyễn Hữu Đồng
Viện Di truyền nông nghiệp, Bộ NN&PTNT
Lê Xuân Thám
Trung tâm Kỹ thuật hạt nhân Tp HCM
Ngô Anh
Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

ĐẶT VẤN ĐỀ

Linh chi với các đặc tính quý báu về dược học đã, đang và sẽ là đối tượng của nhiều nghiên cứu sinh học và dược học [1-12]. Để góp phần đánh giá bảo tồn nguồn gen quý báu này, với sự hỗ trợ một phần kinh phí của chương trình nghiên cứu cơ bản giai đoạn 2001-2003, chúng tôi đã tiến hành thu thập một số chủng Linh chi hoang dại ở một vài địa phương trong cả nước cũng như một số chủng nhập ngoại. Các chủng thu được, sau đó được phân lập, nhân và nuôi trồng với cùng một điều kiện để đánh giá so sánh những sai khác về hình thái quả thể và một số thành phần hoá sinh cơ bản của chúng. Đây là bước đầu tiên nhằm tạo vật liệu khởi đầu cho việc chọn tạo những chủng Linh chi có giá trị để đưa ra sản xuất trên diện rộng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

8 chủng Linh chi thu thập được có nguồn gốc như sau:

- Chủng Linh chi DT đã được chọn lọc từ mẫu hoang dại thu tại Bắc giang và nuôi trồng nhiều năm tại Trung tâm Công nghệ Sinh học Thực vật - Viện Di truyền nông nghiệp, ký hiệu I_1 .
- Chủng Linh chi Đà Lạt ký hiệu I_2 .
- Chủng Linh chi nhập nội từ Trung Quốc, ký hiệu I_3 .
- Chủng Linh chi hoang dại thu thập tại Tây nguyên (năm 2001), ký hiệu I_4 .
- Chủng Linh chi nhập nội từ Nhật bản ký hiệu I_5 .
- Chủng Linh chi hoang dại thu thập tại Huế (năm 2001), ký hiệu I_6 .
- Hai chủng Linh chi hoang dại thu thập tại thành phố Hồ Chí Minh (năm 2001), ký hiệu I_7 và I_8 .

Phương pháp

Phân lập: Mẫu nấm tươi thu thập được rửa sạch bằng xà phòng, khử trùng nhẹ bằng cồn 90° trong 30 giây, sau đó khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 5-10 phút, rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng rồi cấy vào ống nghiệm (1,6x18 cm) có môi trường thạch nghiêng PGA có các thành phần: dịch chiết: 1000 ml (200 g khoai tây, 100 g giá đỗ, 75 g cà rốt); đường glucose: 20 g; agar: 20 g.

Nuôi trồng: Các chủng Linh chi được nuôi trồng thu quả thể trên cơ chất mùn cưa với kích thước bịch giá thể 25x35 cm, trọng lượng bịch từ 1,3-1,5 kg. Sau khoảng 17-20 ngày kể từ ngày cấy giống thì rạch bịch để tạo điều kiện cho việc ra quả thể.

Các phương pháp phân tích thành phần hoá sinh

- Nitơ tổng số và polysaccharide tổng số được xác định theo TCVN 42 95-86.
- Protein tổng số được tính bằng nitơ tổng số x 5,8
- Thành phần, hàm lượng axit amin được xác định trên máy phân tích tự động HP-amino Quant Series II.

• Polyphenol tổng số sau khi chiết bằng cồn etylic 70° , được chiết lại bằng etyl acetat. Phân tích định tính polyphenol được thực hiện qua ba phản ứng với iếm, clorua sắt III và phản ứng Shinoda.

• Alcaloid: các mẫu được kiểm hoá bằng amoniac đặc sau đó chiết bằng clorofoc (5 lần). Sau khi bay hơi một phần dung môi, dịch chiết được lắc với axit clohydric 0,1N (5 lần). Dịch chiết axit được kiểm hoá rồi chiết lại bằng clorofoc (5 lần) để thu alcaloid tổng số (nếu có). Để kết luận trong mẫu thực sự có alcaloid hay không, các chất chiết thu được hoà tan lại trong cồn 90° rồi thử với các phản ứng đặc trưng cho alcaloid như phản ứng với axit silicofungstic 2%, phản ứng với thuốc thử Munier và một số phản ứng đặc trưng khác.

• Saponozit: cũng được chiết sơ bộ bằng cồn etylic 70°, rồi thủy phân bằng axit sunfuric 3% trong 3 giờ. Sau khi trung hoà bằng kiềm, mẫu được chiết bằng clorofoc (5 lần). Để phân tích định tính các mẫu đã chiết được thử với phản ứng Salkovski, Lieberman-Bourchardt và phản ứng đặc trưng nhất của các dẫn xuất Saponin.

• Các chiết đoạn flavonoid được sử dụng để tiến hành sắc ký lớp mỏng trên silicagel GF 245 với tỷ lệ các dung môi: ethylacetate: Methanol: H₂O (100: 17: 13).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự đa dạng hình thái quả thể của 8 chủng Linh chi

Linh chi trong tự nhiên có thể thấy mọc ở nhiều loại cây khác nhau, hình thái quả thể của chúng biến dạng rất khác nhau. Tùy thuộc vào nhiệt độ, ánh sáng, vị trí mọc trên cây, gỗ, đất, vách đá... lâu ngày, linh chi thường tái sinh tạo thành nhiều tầng hoặc khối khổng lồ, nhiều khi còn bị chuột, bọ, côn trùng làm biến dạng. Do đó việc so sánh các đặc điểm hình thái quả thể các chủng hoang dại là không dễ dàng. Hơn nữa hiện nay, quả thể Linh chi nuôi trồng trong các điều kiện nhân tạo chiếm thị phần đáng kể không chỉ ở nước ta mà còn ở nhiều nơi trên thế giới. Đó là lý do chúng tôi tiến hành so sánh các đặc điểm hình thái

Bảng 1. Một số đặc điểm hình thái quả thể của 8 chủng Linh chi nghiên cứu

Đặc điểm hình thái			
Mẫu	Cuống và kiểu đính cuống	Hình dạng	Màu sắc
1 ₁	Dài 3-5 cm, to, dẹt, đường kính 2-3,5 cm, ít phân nhánh, vỏ láng đỏ, đính bên.	Dạng thận hoặc dạng quạt to, mỏng, rắn chắc, có những vân đồng tâm. Mép mỏng không tròn tạo thành răng cưa. Phần đính cuống thường gồ lên.	Mặt trên có màu nâu vàng láng bóng, càng già màu càng sẫm, kính 5-15 cm, độ dày 1-3 cm
1 ₂	Dài 7-15 cm, to tròn, đường kính 2,5-5 cm, phân thành 2-3 nhánh, mỗi nhánh có 1 tán, vỏ cuống láng đỏ, đính bên.	Dạng thận, to trung bình, dày, rắn chắc, mặt trên có vân thưa đồng tâm. Mép tròn, có những vân ngang khi khô tạo thành răng cưa.	Mặt trên có màu vàng láng bóng, càng già màu càng sẫm, kính 5-12 cm, độ dày 2-3 cm
1 ₃	Rất ngắn (1-2 cm), to, đường kính 4-5 cm. Nhiều cuống đính bên.	Dạng quạt, mỏng, kích thước trung bình, rắn chắc. Mặt trên có nhiều chỗ gồ lên, có vân đồng tâm, mép mỏng. Có dạng phân tầng tán, thường có 1-3 tán.	Mặt trên có màu nâu đen láng bóng phủ hết cuống, phía dưới có màu trắng đục màu hơi nâu, phần đính cuống lõm xuống có 2-2,5 cm màu đen
1 ₄	Ngắn (1-3 cm), to (đường kính 2-4 cm), ít phân nhánh, vỏ cuống láng đỏ. Cuống đính bên, phần đính cuống thường lõm xuống.	Dạng quạt không đều, kích thước trung bình đôi khi rất to do có hiện tượng liên tán. Quả thể mỏng, mềm, có 8-10 vân đồng tâm. Mép mỏng không tròn tạo thành răng cưa, luôn luôn tái sinh mô non.	Mặt trên có màu vàng láng bóng, càng già màu càng sẫm, kính 5-12 cm, độ dày 1-1,5 cm
1 ₅	Ngắn (4-5 cm), thô, to, đường kính 3-5 cm, phân thành 2-3 nhánh, mỗi nhánh có 1 tán, vỏ màu láng đỏ. Cuống đính bên.	Dạng quạt không đều, to, dày, rất rắn chắc, mặt trên có nhiều u, cục nhỏ gồ ghề, vân thưa 1-1,5 cm; đồng tâm, nổi rõ. Sau khi đã phát tán bào tử, từ mép quả thể tiếp tục phát triển to ra, hoặc tạo thành tán mới ngay phía trên tạo thành nhiều tầng tán	Mặt trên có màu nâu láng bóng, càng già màu càng sẫm, mép kính 5-18 cm, độ dày 2-3 cm
1 ₆	Rất to, ngắn (3-6 cm), tròn, đường kính 3-6 cm, phân thành 2-3 nhánh, mỗi nhánh có 1 tán, sau đó có xu hướng liên tán. Cuống đính bên hoặc đính tâm.	Hình tròn do nhiều tán liên lại, quả thể to, phẳng, đẹp, rất dày, xốp, nhẹ, trên mũ có những vân thưa, vân rất nhỏ đồng tâm. Phần đính cuống lõm xuống. Mép tròn, không tạo thành răng cưa.	Mặt trên có màu vàng không bóng, mép màu vàng. Mặt kính 5-15 cm, độ dày 2,5-4 cm

Bảng 1. tiếp				
Đặc điểm hình thái				
Mẫu	Cường và kiểu đỉnh cường	Hình dạng	Màu sắc	Kích thước
I_7	To (đường kính 3-5 cm), rất dài (6-10 cm), phân nhiều nhánh, không có hiện tượng liên tán, màu vàng nâu láng bóng. Cường đỉnh bên.	Hình thận, nhỏ, mỏng, xốp, nhẹ, trên mũ có rất ít vân thưa, vân rất nhỏ đồng tâm, phần đỉnh cường lõm xuống.	Mặt trên có màu vàng láng, nhạt dần từ trong ra, màu sẫm dần khi già, mép màu vàng non. Mặt dưới có màu vàng, xung quang mép (1-2 cm) màu vàng chanh.	Đường kính 3-9 cm dày 1-1,5 cm
I_8	Rất ngắn (1-2 cm), to (đường kính 3-5 cm), đỉnh bên. Phần đỉnh cường thường lõm xuống. Nhiều trường hợp không có cường.	Thường có 1 tán duy nhất. Dạng quạt, rất dày, rắn chắc, kích thước trung bình. Mặt trên có những vân đồng tâm, càng già càng nhiều vân. Mép rất dày, vân rất mau.	Mặt trên màu nâu đen láng bóng phủ hết cường, mặt dưới có màu trắng đục.	Đường kính 5-10 cm, dày 3-6 cm



Ảnh 1. Hình thái quả thể của 8 chủng Linh chi (mặt trên-trái và mặt dưới-phải)

Bảng 2. Hàm lượng một số thành phần hoá sinh của các mẫu nấm Linh chi (tính theo chất khô tuyệt đối)							
Mẫu	Độ ẩm	Protein tổng số	Nitơ tổng số	Glucide tổng số	Polyphenol (flavonoid)	Saponozid	Alcaloid
I_1	2,688	13,15	2,27	31,05	0,548	0,130	không có
I_2	1,984	12,01	2,07	35,04	0,938	0,087	không có
I_3	4,541	13,85	2,39	26,45	0,440	0,105	không có
I_4	1,565	11,73	2,02	29,93	0,721	0,137	không có
I_5	2,721	11,20	1,93	32,72	0,622	0,221	không có
I_6	2,749	15,66	2,70	29,14	0,689	0,216	không có
I_7	2,075	14,88	2,56	23,88	0,521	0,128	không có
I_8	3,217	14,01	2,42	26,92	0,630	0,114	không có
I_9	3,764	11,10	1,91	32,28	0,821	0,151	không có
I_{10}	3,827	9,85	1,69	31,66	0,951	0,156	không có

Ghi chú: Mẫu I_9 : quả thể Linh chi Hàn quốc mua tại phố Lãn ông, Hà nội
Mẫu I_{10} : quả thể Linh chi Trung quốc mua tại phố Lãn ông, Hà nội

quả thể của 8 chủng Linh chi thu được trong cùng một điều kiện phân lập, nhân và nuôi trồng. Kết quả được trình bày ở bảng 1. Sự đa dạng về hình thái quả thể của các chủng Linh chi được minh hoạ ở ảnh 1.

Họ Linh chi được các tác giả [3, 9] đánh giá là họ non trẻ đang trong giai đoạn phát triển nên chúng ta có thể quan sát thấy sự đa dạng về hình thái quả thể của của chúng. Qua quan sát cảm quan, chúng tôi nhận thấy chủng I_6 (có nguồn gốc từ Huế), I_5 (có nguồn gốc Nhật bản) và I_2 (có nguồn gốc Đà Lạt) tỏ ra có các đặc điểm quả thể tương đối phù hợp với thị hiếu của người tiêu dùng.

So sánh một số thành phần hóa sinh cơ bản của các chủng Linh chi nghiên cứu

Tiếp theo việc nghiên cứu đa dạng hình thái quả thể, chúng tôi đã tiến hành phân tích để so sánh hàm lượng và thành phần một số hợp chất hoá sinh thường được đề cập đến trong các nghiên cứu về Linh chi. Cùng với quả thể của 8 chủng Linh chi thu thập được, chúng tôi còn phân tích các thành phần đó ở hai loại

Bảng 3. Hàm lượng acid amin có trong các mẫu nấm Linh chi (g acid amin /100g mẫu)

TT	Acid amin	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆	I ₇	I ₈	I ₉	I ₁₀
1	Aspartic acid	0.71	0.83	0.68	0.80	0.47	0.76	0.93	0.86	0.77	0.77
2	Glutamic acid	0.70	0.81	0.70	0.80	0.74	0.66	0.75	0.61	0.75	0.55
3	Serine	0.46	0.55	0.40	0.50	0.48	0.47	0.54	0.46	0.45	0.45
4	Histidine	0.21	0.25	0.21	0.20	0.20	0.23	0.22	0.23	0.20	0.20
5	Glycine	0.37	0.41	0.35	0.48	0.40	0.43	0.45	0.43	0.42	0.40
6	Threonine	0.38	0.55	0.32	0.40	0.46	0.45	0.42	0.48	0.53	0.51
7	Alanine	2.10	2.18	1.72	1.70	1.63	2.60	2.32	2.50	1.23	1.59
8	Arginine	1.76	2.23	1.88	1.65	1.84	2.62	2.28	2.60	1.50	1.73
9	Tyrosine	0.20	0.21	0.20	0.18	0.19	0.22	0.25	0.21	0.21	0.17
10	Cysteine+cystine	0.21	0.24	0.21	0.29	0.28	0.29	0.29	0.35	0.32	0.30
11	Valine	0.40	0.45	0.32	0.39	0.37	0.37	0.44	0.37	0.40	0.40
12	Methionine	0.19	0.20	0.15	0.19	0.19	0.21	0.22	0.22	0.20	0.21
13	Phenylalanine	0.28	0.37	0.28	0.27	0.27	0.28	0.32	0.32	0.28	0.30
14	Isoleucine	0.30	0.38	0.30	0.29	0.30	0.30	0.36	0.35	0.25	0.38
15	Leucine	0.49	0.56	0.42	0.47	0.47	0.44	0.57	0.54	0.56	0.54
16	Lysine	0.38	0.42	0.34	0.31	0.32	0.32	0.43	0.37	0.39	0.44
17	Proline	0.28	0.28	0.26	0.25	0.26	0.30	0.31	0.30	0.26	0.26
	Tổng số	9.43	10.92	8.74	9.17	9.14	10.95	11.10	11.20	8.72	9.20

quả thể nhập nội từ Hàn quốc và Trung quốc hiện đang được bán rất phổ biến ở Hà nội. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 2 và 3.

Qua bảng 2 và 3 cho thấy, trong điều kiện phân tích như đã nêu, các quả thể Linh chi mà chúng tôi sưu tầm được không có khác biệt đáng kể nào về thành phần hoá sinh cơ bản so với quả thể nhập nội từ Hàn quốc và Trung quốc. Kết quả sắc ký lớp mỏng các phân đoạn chiết flavonoid cũng khẳng định sự tương tự ấy. Tuy nhiên, để việc đánh giá chính xác hơn, cần có các phân tích với kỹ thuật hiện đại hơn. Hai chủng I₂, I₅ và I₆ có hàm lượng các hợp chất tương đối cao so với các chủng Linh chi nghiên cứu.

Ngoài ra, chúng tôi còn thăm dò khả năng chống oxy hoá trong điều kiện in vitro của dịch chiết các chủng Linh chi nghiên cứu. Kết quả thu được đã khẳng định rằng các chủng Linh chi thu thập được có khả năng dọn gốc tự do và chống oxy hoá lipid màng tế bào. Tuy nhiên, trong khuôn khổ quy định hạn chế của báo cáo chúng tôi không trình bày chi tiết phần kết quả này.

KẾT LUẬN

1. Tám chủng Linh chi thu thập được có sự đa dạng về đặc điểm hình thái quả thể. Chúng thể hiện qua các đặc điểm: kích thước, độ dài cuống, kiểu đính cuống, hình dạng, màu sắc mặt trên, mặt dưới quả thể, kích thước, độ dày quả thể.
2. Trong số tám chủng nghiên cứu, các chủng có nguồn gốc từ Huế và Đà Lạt, Nhật bản có hình thái quả thể tương đối phù hợp với thị hiếu của người tiêu dùng.
3. Không thấy sự khác biệt lớn nào về thành phần và hàm lượng một số hợp chất hoá sinh cơ bản giữa quả thể các chủng Linh chi nghiên cứu và quả thể Linh chi nhập nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Anh, 1999. *Nghiên cứu họ nấm Linh chi (Ganodermataceae Donk) ở Thừa Thiên - Huế*. Báo cáo Hội nghị Sinh học Toàn quốc, Hà nội, 1999, Tr.1043-1049.
2. Jong, S.C., and J.M. Birmingham, 1992. *Medicinal benefits of the mushroom Ganoderma*. Adv. Appl Microbiol. 37: 101-134.
3. Hibbett, D.S., 1992. *Ribosomal RNA and fungal systematics*. Trans. Mycol. Soc. Japan 33: 533-556.
4. Liu, G.T., Bao, T. T, Niu, X. Y, Li, S. Z. and Sung, Z. Y., 1979. *Some pharmacological actions of the spores of Ganoderma lucidum and the mycelium of Ganoderma capense cultivated by submerged fermentation*. Chinese Medical. J. 92, 1979, pp. 496-500.
5. Đỗ Tất Lợi, Trần Văn Luyến, Cổ Đức Trọng, 1992. *Nghiên cứu thành phần, hàm lượng và sự phân bố các nguyên tố vi lượng trong nấm Linh chi Ganoderma lucidum trồng ở Việt Nam*. Tạp chí Dược học. Số 1 - 1992, Tr. 21-24.
6. Đỗ Tất Lợi, Lê Duy Thắng, Trần Luyến, 1994. *Nấm Linh chi nuôi trồng và sử dụng*. Nxb Nông nghiệp, 1994.
7. Trần Văn Mão, Trần Quang Thu, 1993. *Linh chi - một loài nấm chữa bệnh*. Tạp chí Lâm nghiệp, 1993.
8. Đỗ Tất Lợi, 1977. *Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nxb KHKT Hà Nội, 1977.
9. Nguyễn Huỳnh Minh Quyền, Khuất Hữu Trung, Nguyễn Hữu Đồng và các cộng sự khác, 2002. *Bước đầu nghiên cứu một số thành phần hoá học, hoạt tính sinh học, marker phân tử và tác dụng điều trị bệnh tăng huyết áp của một số chủng giống nấm Linh chi*. Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn. Số 7/ 2002. Tr. 574-576.
10. Ryvarden, L., 1991. *Genera of polypores. Nomenclature and taxonomy*. Synopsis fungorum 5. Fungiflora, Oslo, Norway. 363pp.

11. Lê Xuân Thám, 1996. *Nấm Linh chi - Dược liệu quý ở Việt Nam*. Nxb Mũi Cà Mau, 1996.
12. Lê Xuân Thám, 1998. *Nấm Linh chi cây thuốc quý, những vấn đề sinh lý dinh dưỡng trong nuôi trồng*. Nxb KHKT, TP Hồ Chí Minh, 1998.
13. Lê Xuân Thám, 1996. *Giả thuyết tiến hóa hình thái trong phát sinh chủng loại họ Linh chi (Ganodermataceae Donk)*. Tạp chí Dược học. Số 10 - 1996, Tr. 11-15.

SUMMARY

STUDY ON FRUITBODY POLYMORPHISM AND COMPARISON OF BIOCHEMICAL COMPONENT OF SEVERAL STRAINS OF GANODERMA

Nguyen Huynh Minh Quyen, Khuat Huu Trung
Nguyen Huu Toan, Tran T. Nguyet Lan, Nguyen Huu Dong
Agricultural Genetics Institute, Ministry of Agriculture and Rural Development
Le Xuan Tham
Centre for Nuclear technique
Ngo Anh
University of Sciences, Hue University

Six *Ganoderma* strains originated from Bacgiang, Dalat, Hue, Hochiminh city, Taynguyen and two from China and Japan were observed the polymorphism of their fruitbodies. Fruitbodies of 8 strains were harvested in the same conditions of spawn isolation, multiplication and cultivation. The fruitbodies of strains of I_2 (from Dalat), I_5 (from Japan) and I_6 (from Hue) had good appearances seemed to be met the liking of consumers. They also had relatively higher biochemical components than the rest.