

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU NUÔI TRỒNG NẤM ĐÙI GÀ KHÔNG LÒ *Macrocybe gigantea* PHÁT HIỆN Ở BÌNH DƯƠNG, VIỆT NAM

NGUYỄN NHƯ CHƯƠNG, LÊ XUÂN THẨM

Sở Khoa học và Công nghệ Lâm Đồng

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG

Trường Đại học Đà Lạt

Chi nấm *Tricholoma* (Singer, 1986) gồm nhiều loài liên nhiệt đới (Pantropical species), phân bố ở Ấn Độ, Nepal, Sri Lanka, Pakistan, Tây Bengal... Trước đây chi nấm này thuộc giới Nấm (Mycota), ngành phụ Nấm đảm (Basidiomycota), lớp Hymenomycetes, bộ Agaricales, họ Nấm thông (Tricholomataceae) và được tách ra thuộc chi mới *Macrocybe*. D. N. Pegler *et al.*, 1998 trên cơ sở phân tích ribosomal DNA, kết hợp với giải phẫu hình thái và sinh thái học của chi nấm *Macrocybe* đã xây dựng khóa phân loại gồm 7 loài: *Macrocybe titans*, *M. crassa*, *M. gigantea*, *M. spectabilis*, *M. lobayensis*, *M. pachymeres*, *M. praegrans* [1, 4, 5, 12].

Ở Việt Nam được ghi nhận có phân bố của một số loài nấm thuộc chi *Macrocybe* còn gọi là nấm Đùi gà. Trịnh Tam Kiệt (1996) phát hiện loài nấm *Macrocybe crassa* (Berk.) Pegler & Lodge ở Vĩnh Phúc; Ngô Anh (2001) ghi nhận nấm *Macrocybe gigantea* (Massee) Pegler & Lodge có phân bố ở Vườn Quốc gia Bạch Mã, Thừa Thiên Huế; Lê Xuân Thẩm (2000-2004) phát hiện nấm *Macrocybe crassa* (Berk.) Pegler & Lodge tại thành phố Hồ Chí Minh và năm 2007 đã phát hiện nấm *Macrocybe gigantea* (Massee) Pegler & Lodge và *Macrocybe crassa* (Berk.) Pegler & Lodge tại Vườn Quốc gia Cát Tiên và gần đây nhất là tại Đà Lạt [1, 3, 4].

Gần đây loài nấm *Macrocybe gigantea* (Massee) Pegler & Lodge xuất hiện ở thị xã Lái Thiêu, huyện Thuận An, tỉnh Bình Dương do chị Trương Anh Đào phát hiện vào ngày 06/6/2011 và tặng cho Sở Khoa học và Công nghệ Lâm Đồng nghiên cứu. Đây là mẫu nấm được ghi nhận có kích thước lớn với đường kính tán nấm khoảng 50cm, chiều dài cuống nấm khoảng 50cm, đường kính cuống nấm khoảng 15cm, trọng lượng khoảng 5,5kg. Như vậy khả năng phân bố của hai loài nấm *Macrocybe gigantea* (Massee) Pegler & Lodge và *Macrocybe crassa* (Berk.) Pegler & Lodge đại diện cho chi nấm *Macrocybe* tại Việt Nam là khá rộng (Ngô Anh, 2003). Đây là hai loài nấm ăn quý với thành phần dinh dưỡng phong phú và chứa một số chất có dược tính, có tác dụng chống khối u, tăng cường hệ miễn dịch,... Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có công bố nghiên cứu sâu về loài nấm này ở Việt Nam. Vì vậy, công trình này là bước kế tiếp có ý nghĩa trong việc lưu giữ, bảo tồn nguồn gen quý và xây dựng quy trình nuôi trồng hoàn chỉnh để phát triển nghề nuôi trồng nấm tại địa phương và một số tỉnh lân cận.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

Nguồn mẫu nấm *Macrocybe gigantea* (Massee) Pegler & Lodge, ký hiệu MG do chị Trương Anh Đào phát hiện vào ngày 06/6/2011 ở thị xã Lái Thiêu, huyện Thuận An, tỉnh Bình Dương cung cấp.



Hình 1. Mẫu thể quả khổng lồ nấm *Macrocybe gigantea* (Massee) Pegler & Lodge phát hiện ở Lái Thiêu, Thuận An, Bình Dương; Bào tử nấm chụp dưới kính hiển vi (vật kính dầu 100x)

Môi trường phân lập, thuần khiết giống và khảo sát tốc độ lan tở trên môi trường PGA cải tiến: Nước chiết 1.000mL (200g khoai tây, 100g cà rốt, 100g giả đỗ); 3g peptone; 3g cao nấm men; 3g KH_2PO_4 ; 1,5g MgSO_4 ; 15g glucose; 20g agar. Môi trường PGA được hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Môi trường nhân giống cấp II và khảo sát tốc độ lan tở trên môi trường hạt thóc: Hạt thóc: 99%; CaCO_3 1%. Hạt thóc được ngâm trong nước trước 24 giờ, đun sôi đến khi tách vỏ. Sau đó vớt để ráo, để nguội, trộn với CaCO_3 , cân khoảng 100g vào các bình tam giác 250mL, đem hấp khử trùng ở 121°C trong 60 phút.

Nuôi trồng ra quả thể trên mùn cưa cao su có bổ sung 10% cám gạo; 5% cám bắp; 0,1% KNO_3 ; 1% CaCO_3 và nước sao cho độ ẩm đạt 50-60%. Sau đó cơ chất được cho vào bịch nylon $\approx 2.000\text{g}$, hấp khử trùng ở 121°C trong 240 phút và hấp lại lần hai sau 24 giờ.

2. Phương pháp

Phân tích hình thái

Mẫu được phân tích, mô tả hình thái, định danh trên cơ sở dẫn liệu của D. N. Pegler *et al.*, 1998; Lê Xuân Thám *et al.* [5].

Phân tích rRNA

Mẫu nấm được gửi phân tích rRNA 25S (vùng D1/D2) tại Viện Công nghệ Sinh học-Hà Nội với mỗi NL1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'; NL4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'. Sau đó kết quả trình tự được so sánh với trình tự chuẩn trong GenBank. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng trên phần mềm BioEdit 7.0.

Tách phân lập, nhân giống nấm

Mẫu nấm được tách phân lập, thuần khiết giống, khảo sát phát triển hệ sợi trên môi trường PGA, nhân giống cấp II và khảo sát phát triển hệ sợi trên môi trường hạt thóc theo Nguyễn Lân Dũng, 2004.

Nuôi trồng

Bịch phôi sau khi cấy giống được đưa vào nhà ù tở ở $23-26^\circ\text{C}$, tối, thoáng. Sau khi hệ sợi nấm lan kín hết mùn cưa, bịch phôi được mở nút cổ, phủ một lớp đất mùn và đưa vào nhà nuôi trồng ở nhiệt độ trang trại dao động $21-26^\circ\text{C}$ với độ ẩm không khí 85-90%.

Đánh giá năng suất sinh học

Thu hái chùm quả thể nấm, cân trọng lượng tươi để xác định năng suất sinh học sơ bộ trong đợt thu hái đầu tiên.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phát hiện và mô tả nấm *Macrocybe gigantea* (Masse) Pegler & Lodge

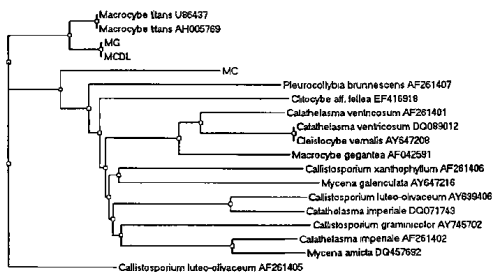
Tán nấm có đường kính 30-35cm, giãn ra, bề mặt ban đầu có màu trắng, sau đó chuyển nhanh sang màu xám và xanh xám, màu nhạt hơn ở mép, nhẵn và láng mịn nhưng khi khô thì nứt; mép hơi cong, có vẩy và thường nứt rạn cưa. Phiến nấm có khía lượn sóng, màu vàng rom, phồng lên, dày đặc. Cuống nấm có kích thước 15-18 × 6cm, hình trụ, thường thon dài, rắn chắc và phình ra ở phần cuống; bề mặt có màu giống tán nấm, có khía sợi nhỏ. Cuống nấm dày đến 3cm, trắng chắc, bao gồm các sợi nấm vách mỏng, đường kính 2-8μm, phồng ra đến 25μm, có liên kết chặt chẽ, mùi ù bia. Bào tử màu trắng, có kích thước 5,7-7,5 × 4,0-5,3 (6,7±0,90 × 4,60±0,38)μm, bào tử dạng trứng elip ngắn, trong suốt, vách mỏng. Đâm có kích thước 25-37 × 5-8μm, đâm hình chùy hẹp, gần giống hình trụ, mạng 4 cuống nhỏ với liên kết chặt chẽ. Phiến nấm phát triển ở rìa; thiếu liệt bào. Cấu trúc lớp bất thụ đồng đều xếp song song với mô sợi vách mỏng, đường kính 2-5μm, với liên kết chặt chẽ. Bào tầng hẹp, có bề rộng 5-9μm, xếp xen kẽ với nhau [4], [5], [6].

Kết quả giám định DNA

Trình tự rRNA 25S của *Macrocybe gigantea* (ký hiệu chủng MG) được xác định như sau:

```
GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCTTAGTAAGTGCAG
GTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTAAATCTGACAGCCTTTGGCTGTTTCAATTGT
AATCTAGAGAGAAGTGTTATCCGCGCTGGACCGGTGACAAGTCTCCTGGAATGGAACA
TCATAGAGGGTGAGAAATCCCGTCTTTGACACCGACTTCAGGGCTTTTGTGATACG
CTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTCAT
CTAAAGCTAAATATTGGCGAGGGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAAGA
TGAAAAGAACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAA
CGCTTGAAGTCAGTCGCATTGACTAGGGATCAACCTTTGCTTTTGTCTTGGTGACT
TCCTAGTTGATGGGCCAGCATCAATTTTGACCAAGTGGATAAAGGTCAAAGGAATGT
GGCATCTCCGGATGTGTTATAGCCTTTGATTGTATACATTGGTTGGGATTGAGGAAC
TCAGCACGCCGCAAGGCCGGGTTTCGACCACGATCGTGCTTAGGATGCTGGCATAA
TGGCTTTAATCGACCCGCTTGAAACACGGACC.
```

Độ tương đồng trình tự rRNA 25S của chủng MG so với dẫn liệu đã có về *M. gigantea* trong GenBank là ≈ 99%. Tổng hợp các dẫn liệu cho phép xây dựng quan hệ chủng loại phát sinh trong các nhóm gần gũi:



0.1

Hình 2. Quan hệ chủng loại phát sinh của chủng MG (*Macrocybe gigantea*) và các loài có quan hệ họ hàng gần dựa vào trình tự rRNA 25S (trên nền dẫn liệu của Anmirati et al., 2007)

Từ mô tả giải phẫu hình thái theo D. N. Pegler *et al.*, 1998 và Lê Xuân Thám, 2001 kết hợp với giám định rRNA 25S có thể khẳng định rằng mẫu nấm thu được ở Lái Thiêu, Bình Dương là loài nấm *Macrocybe gigantea* (Massee) Pegler & Lodge.

2. Khảo sát phát triển hệ sợi nấm

Trên môi trường PGA cải tiến

Kết quả phân lập và nuôi cấy thuần khiết cho phép khảo sát khả năng sinh trưởng khá mạnh của hệ sợi trên môi trường PGA thông dụng. Tốc độ lan tỏa của hệ sợi đồng đều, đặc biệt hệ sợi phát triển khi sinh mạnh, tạo nên khuẩn lạc dạng tơ bông dày đặc. Trên môi trường hạt lúa chúng sinh trưởng chậm lại, ăn sâu vào khối cơ chất (bảng 1).

Bảng 1

Tốc độ phát triển hệ sợi nấm trên môi trường PGA cải tiến

Thời gian (ngày)	Đường kính khuẩn lạc (mm)	Tốc độ phát triển hệ sợi trung bình (mm/ngày)
3	20,4±1,1	6,8
5	35,2±0,8	
7	45,2±1,3	
9	60,8±0,8	
11	74,4±1,1	



Hình 3. Hình thái khuẩn lạc tơ nấm *Macrocybe gigantea* sau 3, 7, 11 ngày

Trên môi trường hạt thóc

Bảng 2

Tốc độ phát triển hệ sợi nấm trên môi trường hạt thóc

Thời gian (ngày)	Chiều dài tơ lan (mm)	Tốc độ phát triển hệ sợi trung bình (mm/ngày)
5	10,4±0,5	3,2
7	19,4±1,1	
9	26,8±0,8	
11	36,4±1,1	
13	43,6±1,1	
15	48,4±0,5	

3. Nuôi trồng hình thành quả thể

Trên môi trường cơ chất mùn cưa hỗn hợp với các chất dinh dưỡng bổ sung hệ sợi lan khi nhanh, song thời gian ủ tơ lại rất dài. Sau khoảng 60 ± 5 ngày hệ sợi nấm lan kín bịch phối mùn cưa. Sau khoảng 8 tháng nấm hình thành quả thể.

4. Đánh giá năng suất sinh học

Nấm mọc từng chùm, trọng lượng khoảng 200g/bịch phối với mỗi đợt thu hái. Đường kính tán nấm 7-12cm; đường kính cuống nấm 1,0-2,5cm; chiều dài cuống nấm 10-16cm. Năng suất sinh học tương đương so với nuôi trồng ở Nhật Bản (M. Yoshikazu và M. Takashi, 1997).

Bảng 3

Năng suất sinh học của nấm *Macrocybe gigantea*

Trọng lượng chùm quả thể trung bình tổng thu hoạch (g)	Năng suất sinh học (%)
$404 \pm 5,2$	40,4



Hình 4. Quả thể nấm *Macrocybe gigantea* nuôi trồng tại Đà Lạt

III. KẾT LUẬN

1. Mẫu nấm Đùi gà phát hiện ở thị xã Lái Thiêu, huyện Thuận An, tỉnh Bình Dương đã được giám định là loài *Macrocybe gigantea* (Massee) Pegler & Lodge trên cơ sở phân tích hình thái và dẫn liệu rRNA 25S.

2. Đã nghiên cứu tách, phân lập, thuần khiết giống trên môi trường PGA cải tiến và nhân giống trên môi trường hạt thóc.

3. Bước đầu đã nuôi trồng thành công tại Đà Lạt trên môi trường mùn cưa cao su có bổ sung cám gạo, cám bắp và một số phân khoáng. Khẳng định khả năng thuần hóa nấm *Macrocybe gigantea* từ hoang dại để nuôi trồng nhân tạo, từng bước hoàn thiện quy trình nuôi trồng để phát triển thành nấm ăn thương phẩm có giá trị kinh tế, có khả năng cạnh tranh với nấm Trung Quốc đang tràn vào thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Anh, 2003. Nghiên cứu thành phần loài nấm lớn ở Thừa Thiên Huế. Luận án Tiến sỹ Sinh học. Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.
2. Nguyễn Lân Dũng, 2004. *Công nghệ nuôi trồng nấm*, tập 1, 2. NXB. Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Trịnh Tam Kiệt, Ngô Anh, 2001. Nghiên cứu chi nấm trắng khổng lồ *Macrocybe* Pegler & Lodge mới được tìm thấy cho khu hệ nấm lớn của Việt Nam. Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng, Chuyên san Công nghệ Sinh học: 56-60.
4. Lê Xuân Thám *et al.*, 2001. Ghi nhận đầu tiên về nấm Shimeji thuộc chi *Lyophyllum* (họ nấm Thông *Tricholomataceae*) ở Việt Nam. Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng, số 12, Hà Nội.
5. Ammirati J. F. *et al.*, 2007. *Cleistocybe*, a new genus of *Agaricales*. Mycoscience 48. 282-289.
6. Kinjo K. and T. Miyagi, 2006. Nutritional Requirements for Mycelial growth and Artificial cultivation of *Tricholoma giganteum*. Journal of the Japan Wood Research Society 52 (5): 320-326.
7. Hong-Min T. *et al.*, 2008. DNA identification of *Tricholoma giganteum* isolates [J]. Acta Microbiologica Sinica 27 (2): 230-236.
8. Li T. *et al.*, 2008. Spectrometric determination of trace elements in *Tricholoma giganteum* Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi 28 (2): 450-2.
9. Liu H. G. *et al.*, 2007. Determination of selenium in *Tricholoma giganteum* by flow injection-hydride generation-Atomic Absorption spectrometry. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi 27 (9): 1851-3.
10. Mizuno T. *et al.*, 1995. Antitumor-active Heteroglycans from *Niotsshineji* Mushroom, *Tricholoma giganteum* 59 (4): 568-571.
11. Malinee T. and R. Arce, 2005. Mating System and Genetic Variations of *Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc. in Some Area of Thailand by Isozyme Electrophoresis and PCR-RFLP Method. IntJMedMushr 7 (3).
12. Pegler D. N. *et al.*, 1998. The pantropical genus *Macrocybe* gen. nov. Mycologia 90 (3): 494-504.
13. Petcharat, V., 1996. Cultivation of wild mushroom: VIII. Hed Tin Raed [*Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc.]. Onklanakarin. Journal of Science and Technology 18 (4): 397-406.
14. Yoshikazum. and M. Takashi, 1997. Cultivation of nioshimeji (*Tricholoma giganteum*). Food Reviews International 13 (3): 413-418.

**PRELIMINARY STUDY OF CULTIVATION OF GIANTIC MUSHROOM
Macrocybe gigantea NEWLY FOUND IN BINH DUONG PROVINCE, VIET NAM**

NGUYEN NHU CHUONG, LE XUAN THAM, NGUYEN THI PHUONG

SUMMARY

The giant mushroom *Macrocybe gigantea* (Massee) Pegler & Lodge, newly found in Lai Thieu, Thuan An, Binh Duong province, determined by conventional and molecular methods. Molecular method specified that used specimen has rDNA data at 99% similar with that of GenBank. The mycelial growth reached up to 6,8mm/d on modified PGA and 3,2mm on rice grain media, respectively. Fruitful cultivations have been done in Dalat with bags containing 2000g of rubber tree sawdust, supplemented with 10% rice, 5% corn bran, 1% CaCO_3 , 0,1% KNO_3 , 60±5d for filling mycelia and 240d for incubation to form cluster primordia and numerous fruit bodies. The biological efficiency was about 40%.