

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU LOÀI NẤM LINH CHI MỚI PHÁT HIỆN Ở VƯỜN QUỐC GIA CÁT TIÊN *Tomophagus* Sp. Nov. DỰA TRÊN CÁC PHÂN TÍCH VỀ HÌNH THÁI VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ

PHẠM NGỌC DƯƠNG, NGUYỄN THỊ ANH

Vườn Quốc gia Cát Tiên

VŨ ĐÌNH DUY

Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

LÊ XUÂN THẨM

Sở Khoa học và Công nghệ, Lâm Đồng

Munill. (1905a,b) là người thành lập chi *Tomophagus* Murr từ việc tách loài *Ganoderma colossus* (Fr.) C.F. Barker., từ chi *Ganoderma* dựa trên các đặc điểm hình thái điển hình như lớp thịt nấm khác biệt của loài này so với các loài khác trong chi, lớp thịt nấm có màu vàng nhạt, đây thường trở nên xốp và sáng khi khô. Chi *Tomophagus* Murr. đã từng không được chấp nhận bởi Furtado (1965), Steyaert (1972, 1980), Corner (1983), Ryvarden (1991) và nhiều tác giả khác. Steyaert (1980) cho rằng *G. colossus* có thể chỉ là một dạng nhiệt đới của loài *G. oregonense* Murrill. Tuy nhiên các nghiên cứu gần đây của Moncalvo et al (1995, 2000) và gần hơn là của Hong và Jung (2004) về chủng loại phát sinh dựa trên sinh học phân tử đã chỉ ra rằng *G. colossus* và *G. oregonense* là cách xa nhau và các ông đều ủng hộ cho quan điểm xác lập chi *Tomophagus*.

Tomophagus colossus đã được mô tả bởi Fries (1851) từ các mẫu vật thu được ở rừng Costa Rica với tên gọi *Polyporus colossus*, sau đó được Baker (1918) chuyển vào trong chi *Ganoderma*. Đây là một loài hiếm gặp từng được ghi nhận có ở những vùng nhiệt đới từ Đông Phi theo các nghiên cứu của Ryvarden, Johansen (1980) và Ofofiele cùng cộng sự (2005). Ở Việt Nam *Tomophagus colossus* được ghi nhận lần đầu tiên bởi Patouillard (1897) với tên gọi *G. abokense* Pat., và loài này được ghi nhận lại gần đây nhất ở Việt Nam bởi Ngô Anh (2001).

Loài thứ hai của chi là *Tomophagus cattenensis* được mô tả bởi Lê Xuân Thẩm, Phạm Ngọc Dương (2011) từ các mẫu vật thu được trong các đợt điều tra khu hệ nấm lớn ở Vườn Quốc gia Cát Tiên, dựa trên việc so sánh các đặc điểm hình thái của loài này với các mẫu vật của loài *Tomophagus colossus* đã phát hiện trước đó đặc biệt có sử dụng các nghiên cứu về sinh học phân tử thông qua việc phân tích vùng gene ITS của các loài nghiên cứu đối chiếu với các dữ liệu trên ngân hàng gene (genebank) để xác lập loài thứ hai cho chi này. Các nghiên cứu đã được đăng trên tạp chí Mycol Progress năm 2011.

Báo cáo này tiến hành trình bày các kết quả nghiên cứu bước đầu của loài *Tomophagus* sp., từ các mẫu vật thu thập được từ Vườn Quốc gia Cát Tiên năm 2014, đây cũng có thể là loài thứ ba được ghi nhận cho chi này. Nếu đúng vậy thì đây sẽ là loài mới thứ hai của chi *Tomophagus* Murr. được phát hiện ở Vườn Quốc gia Cát Tiên.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Mẫu vật cho nghiên cứu

Mẫu vật của các loài trong chi nấm *Tomophagus* Murr. được phát hiện ở Vườn Quốc gia Cát Tiên gồm có các loài *Tomophagus colossus*, *Tomophagus cattienensis*, và các mẫu vật của loài *Tomophagus* sp. Mới phát hiện.

Trình tự gene của các loài gần gũi trên genebank:

Bảng 1

Danh sách các loài trên genbank sử dụng trong nghiên cứu

Stt	Tên loài/thứ	ITS
1	<i>Tomophagus cattiensis</i>	JN184398
2	<i>Tomophagus cattiensis</i>	JN184397
3	<i>Tomophagus colossus</i>	JN184396
4	<i>Tomophagus colossus</i>	JN184395
5	<i>Tomophagus colossus</i>	JX310825
6	<i>Tomophagus colossus</i>	Z37071
7	<i>Tomophagus colossus</i>	Z37091
8	<i>Tomophagus colossus</i>	FJ154769

2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân tích hình thái: Phương pháp nghiên cứu so sánh hình thái cổ điển. Các mẫu nấm thu được ở Vườn Quốc gia Cát Tiên được tiến hành mô tả so sánh hình thái với các mô tả của Murill. (1905a,b), và của Lê Xuân Thám, Phạm Ngọc Dương (2011). Sử dụng kính hiển vi quang học để quan sát các đặc điểm bào tử đảm và các đặc điểm hiển vi khác.

Giải trình tự và hiệu chỉnh trình tự: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% và tinh sạch bằng Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Đức). Sản phẩm này được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự trực tiếp hai chiều (mỗi xuôi và mỗi ngược) với mỗi ITS1/ITS4, sử dụng BigDye terminator cyclor v3.1 và đọc kết quả trên hệ thống ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ). Trình tự nucleotide của các chủng nấm được so sánh với các trình tự đã có trên Genbank, sử dụng phần mềm BLAST trong NCBI (website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Trình tự DNA sau khi đọc được hiệu chỉnh bằng mắt với sự trợ giúp của phần mềm ChromasPro1.7.6 (Technelysium, 2013) để loại bỏ các vùng tin hiệu nhiễu. Các trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần mềm Bioedit v7.0.5.2 (Hall, 1999), Clustal W (Thompson *et al.*, 1997), geneDoc 2.7 (Nicholas *et al.*, 1997). Các vùng không có khả năng sắp xếp bị loại bỏ trước khi phân tích.

Xác lập mô hình tiến hóa: Dữ liệu trình tự nucleotide sẽ được khảo sát phân bố nucleotide, kiểm tra các giả thuyết và xác định mô hình tiến hóa tối ưu bằng cách sử dụng chuẩn thông tin Akaike được hiệu chỉnh (corrected AICc-Akaike Information Criterion) trong phần mềm Modeltest v3.7 (Posada, 2005). Kết quả khảo sát sẽ được sử dụng làm tham số đầu vào để tính toán ma trận khoảng cách di truyền và 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). Đây là đại diện điển hình cho các phương pháp phân tích tiến hóa được sử dụng rộng rãi.

Xây dựng cây tiến hóa: Để xây dựng cây tiến hóa bằng phương pháp ML, MP và NJ, dữ liệu DNA được chuyển vào phần mềm Bioedit v7.0.5.2 (Hall, 1999), Clustal W (Thompson *et al.*, 1997), geneDoc 2.7 (Nicholas *et al.*, 1997) với các thông số tiến hóa (giá trị thông số gamma, giá trị tỷ lệ các điểm không biến thiên, giá trị mô hình tiến hóa,...) được lấy từ kết quả phân tích của mô hình tiến hóa Modeltest v3.7. Tất cả cây tiến hóa theo 3 phương pháp trên đều được phân tích từ phần mềm PAUP*4.0b10 (Swofford, 2003), Mega 6.0.6 (Tamura *et al.*, 2013) và chúng được thực hiện với 1.000 lần lặp lại để xác định giá trị ủng hộ (bootstrap). Phần mềm Treview được dùng để hiệu chỉnh hình ảnh cây tiến hóa (Page, 1996).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Mô tả hình thái tự nhiên của loài *Tomophagus sp.*

Thẻ quả mọc đơn lẻ trên gốc cây gỗ lớn đã chết trong thời kỳ phân hủy mạnh, thường gặp vài thẻ quả to nhỏ đang phát triển trên cùng một cây chủ, có cuống nhưng không rõ. Khi non là dạng cục mọng dạng cầu, hơi vàng, vàng bóng ở phần gốc, sau tỏa rộng dần thành dạng quạt, dạng gần tròn. Thẻ quả trưởng thành thường có dạng u móng hình quạt, dày tới 11-15 cm, chiều dài tới >15-20 cm, chiều rộng chỗ lớn nhất tới >15 cm. Đặc điểm thẻ quả thường ổn định hình thái dạng quạt tròn cũng khác biệt với *T. colossus* (loài này dễ bị dị dạng thẻ quả do quá mềm nhũn. Mép năm khi non mọng tròn. Lớp vỏ tán láng nhẵn, có thể bóng khi tươi non, vàng ươm tươi - vàng chanh - vàng cam, khá mỏng, dễ đập vỡ. Khi năm già khô lớp vỏ ít nhiều nứt dáp, tuy nhiên lớp vỏ vẫn màu vàng, vàng chanh, gần như không đổi màu, đây là một đặc điểm rất khác so với loài *Tomophagus cattienensis* chỉ khi thẻ quả còn rất non mới có màu vàng, vàng chanh còn khi thẻ quả hoàn chỉnh và trưởng thành thì chuyển sang màu vàng nâu sậm.



Hình 1: Hình ảnh ngoài tự nhiên bào tử nấm của loài *Tomophagus sp. nov.*
(ảnh: Phạm Ngọc Dương)

Lớp thịt nấm (context) rất dày xốp khá tương đồng với lớp thịt nấm của loài *Tomophagus cattienensis*, khi tươi nhũn mềm như chất bọt biển (spongy) 3-7 cm, khi khô rất nhẹ ngà màu vàng nhạt (hình 1c). Đặc điểm thịt nấm dày xốp này vốn được coi là đặc trưng rất cơ bản cho

việc xác lập chi *Tomophagus*, đồng thời cũng rất khác với các chủng ở các vùng khác. Lớp bào tâng ở gần cuống nấm rất mỏng màu vàng nâu đất.

Bào tử dạng Ganodermanoid điển hình, với lớp vỏ dày, bào tử dạng hình trứng, khá tương đồng với bào tử của hai loài trong chi *Tomophagus* đã phát hiện trước đó, bề mặt bào tử các các cột chống dạng ô lưới. Kích thước bào tử nhỏ hơn một chút và tròn hơn so với loài *Tomophagus cattienensis* phát hiện trước đó, kích thước bào tử 14-17 x 10-12 μm . Đây cũng là một bằng chứng để có thể khẳng định loài mới phát hiện là một loài khác so với *T.cattienensis*.

2. Kết quả giải mã trình tự gen nhân (ITS) với chủng nấm *Tomophagus* sp.

Kết quả xác định trình tự vùng gen nhân (ITS) cho ảnh điện di đồ với các đỉnh huỳnh quang rõ nét, cường độ mạnh và rõ ràng (kết quả không chỉ ra ở đây). Sau khi loại bỏ trình tự môi và các vùng tín hiệu nhiễu, chúng tôi đã thu được trình tự nucleotide của chủng nấm *Tomophagus* sp. có độ dài là 647 nucleotide.

Bảng 2

Khoảng cách di truyền giữa các cặp loài nghiên cứu

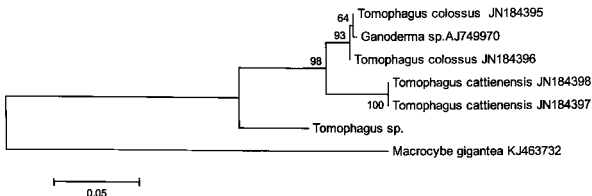
	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>Tomophagus cattienensis</i> JN184398							
2. <i>Tomophagus cattienensis</i> JN184397	0.000						
3. <i>Tomophagus colossus</i> JN184396	0.051	0.051					
4. <i>Tomophagus colossus</i> JN184395	0.053	0.053	0.002				
5. <i>Ganoderma</i> sp.AJ749370	0.055	0.055	0.004	0.002			
6. <i>Tomophagus</i> sp.	0.125	0.125	0.105	0.105	0.108		
7. <i>Macrocybe gigantea</i> KJ463732	0.411	0.411	0.395	0.392	0.388	0.385	

Trình tự thu được của chủng nấm *Tomophagus* sp. được kiểm tra tính tương đồng (similarity) với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Genbank bằng công cụ BLAST. Kết quả tìm kiếm cho thấy trình tự chủng nấm *Tomophagus* sp. tương đồng cao với các loài trong chi *Tomophagus*. Việc so sánh với cơ sở dữ liệu trên Genbank nhằm mục đích cho một kết quả tham chiếu với nhóm loài tương đồng nhất với trình tự truy vấn. Kết quả BLAST không thể kết luận chính xác về loài. Với những trường hợp BLAST có độ bao phủ và tương đồng cao (99%) cũng không thể suy ngược lại tên loài bởi kết quả BLAST chỉ hiển thị trình tự tương đồng nhất mà trên Genbank hiện có.

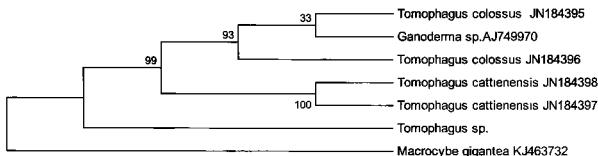
Do kết quả của BLAST cho ra những điểm nghi vấn chưa chuẩn xác, vì vậy chúng tôi sử dụng phương pháp dựng cây phát sinh chủng loại để xác định tên khoa học cho chủng nấm *Tomophagus* sp.

Mô hình tiến hóa tối ưu theo tiêu chuẩn AICc được xác định cho khối dữ liệu phân tích là TrN+G. các thông số cơ bản là $-\ln L = 2820.6282$, $AIC = 5653.2563$, $K = 6$, $\text{freqA} = 0.2305$, $\text{freqC} = 0.2438$, $\text{freqG} = 0.2318$, $\text{freqT} = 0.2938$, $R(a) [A-C] = 1.0000$, $R(b)[A-G] = 1.5207$, $R(c) [A-T] = 1.0000$, $R(d) [C-G] = 1.0000$, $R(e) [C-T] = 2.5482$, $R(f) [G-T] = 1.0000$, $\text{gamma Shape} = 0.2442$ được sử dụng để xây dựng cây tiến hóa.

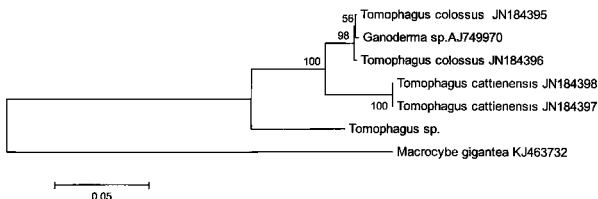
Cây tiến hóa được xây dựng theo các phương pháp MP, ML, NJ. Kết quả được biểu thị ở hình 2, 3, 4:



Hình 2: Mối quan hệ họ hàng của chủng nấm *Tomophagus* sp. với các loài/thứ trong cùng chi lấy trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS bằng phương pháp Maximum Likelihood (ML). *Macrocybe gigantea* (KJ463732) được xem như loài ngoài nhóm (outgroup)



Hình 3: Mối quan hệ họ hàng của chủng nấm *Tomophagus* sp. với các loài/thứ trong cùng chi lấy trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS bằng phương pháp Maximum Parsimony (MP). *Macrocybe gigantea* (KJ463732) được xem như loài ngoài nhóm (outgroup)



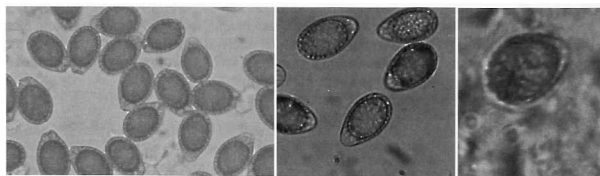
Hình 4: Mối quan hệ họ hàng của chủng nấm *Tomophagus* sp. với các loài/thứ trong cùng chi lấy trên Genbank trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS bằng phương pháp Neighbor Joining (NJ). *Macrocybe gigantea* (KJ463732) được xem như loài ngoài nhóm (outgroup)

Từ các chỉ số về khoảng cách di truyền trên cơ sở so sánh trình tự gen *ITS - rDNA*, sơ đồ mối quan hệ họ hàng của chủng nấm *Tomophagus* sp. với các loài/thứ trong cùng chi lấy trên Genbank đã được xây dựng theo cả 3 phương pháp ME (Minimum Evolution), MP (Maximum Parsimony) và NJ (Neighbor Joining) đã chỉ ra các kết quả nhận được là như nhau.

3. So sánh sự khác biệt và phân hóa của loài *Tomophagus* sp. so với hai loài còn lại trong chi *Tomophagus* Murr.

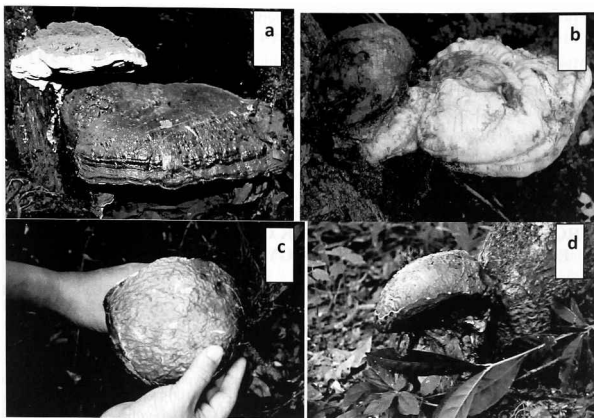
- **Những khác biệt về hình thái:** Các phân tích về hình thái ở trên cho thấy loài *Tomophagus* sp. mang những đặc điểm đặc trưng chung của các loài trong chi *Tomophagus* Murr., như lớp thịt nấm dày màu vàng nhạt, thường trở nên xốp nhẹ và sáng khi khô (Murill., 1905a,b). Tuy vậy loài mới ghi nhận được cũng có những điểm khác biệt: Về màu sắc loài *Tomophagus* sp. khi non có màu vàng chanh già chuyển sang màu vàng đậm, sáng màu khá giống với màu của loài *Tomophagus colossus* tuy nhiên màu thường đậm hơn và bề mặt thể quả thường bị nứt khi khô, trong khi đó loài *Tomophagus cattienensis* khi non có màu vàng chanh nhưng sau đó nhanh chóng chuyển thành màu vàng nâu, nâu, vàng sậm (Lê Xuân Thám & Phạm Ngọc Dương, 2011).

- **Cấu trúc bào tử nấm:** Bào tử của loài *Tomophagus* sp. khá tương đồng với hai loài đã phát hiện trước đó là *Tomophagus colossus* và *Tomophagus cattienensis* như đều có dạng Ganodermanoid điển hình với lớp vỏ dày và bề mặt gồ ghề. Tuy vậy kích thước bào tử có những khác biệt khi tiến hành so sánh. Kích thước của loài *Tomophagus* sp. nhỏ hơn so với hai loài còn lại, lớp chóp phù thường mỏng hơn, hình dạng bào tử tròn hơn. Kích thước bào tử của *Tomophagus* sp. chỉ khoảng $14-17 \times 10-12 \mu\text{m}$ trong khi kích thước bào tử của *Tomophagus cattienensis* là $17,5-21,5 \times 11,5-14,5$ và của loài *Tomophagus colossus* là $14-20 \times 9-14$ (Lê Xuân Thám & Phạm Ngọc Dương, 2011).



Hình 5: Bào tử nấm của loài *Tomophagus cattienensis*, *Tomophagus colossus* và *Tomophagus* sp. phát hiện ở Vườn Quốc gia Cát Tiên năm 2014
(ảnh: Phạm Ngọc Dương)

- **Khoảng cách di truyền:** Kết quả giải trình tự vùng gene *ITS*, kết hợp với việc so sánh với trình tự gen của các loài trong chi *Tomophagus* Murr đã phát hiện trước đó (Lê Xuân Thám, Phạm Ngọc Dương 2011) đã chỉ ra khoảng cách di truyền của loài mới phát hiện là tách biệt so với các loài nghiên cứu trước đó. Khoảng cách di truyền của *Tomophagus* sp., so với *Tomophagus cattienensis* là 0,125, so với loài *Tomophagus colossus* là 0,105-0,108 (Bảng 2). Các phân tích dựa trên phần mềm PAUP*4.0b10 theo cả ba phương pháp ML, MP, NJ cũng đã chỉ ra loài *Tomophagus* sp. mới phát hiện là hoàn toàn tách biệt với hai loài còn lại trong chi *Tomophagus* Murr., với hệ số ủng hộ (bootstrap) cao (hình 2, 3, 4).



Hình 6: So sánh hình thái thể quả của 03 loài trong chi *Tomophagus*:
 a: *Tomophagus cattienensis*; b: *Tomophagus colossus*; c, d *Tomophagus* sp. nov.
 (ảnh: Phạm Ngọc Dương)

III. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu về hình thái của loài *Tomophagus* sp., có thể kết luận rằng loài mới phát hiện ở Vườn Quốc gia Cát Tiên thuộc chi *Tomophagus* Murr., theo quan điểm của Muuril (1905) với những đặc điểm về hình thái điển hình như lớp thịt nấm dày, xốp, có màu vàng nhạt và thường trở nên xốp, sáng màu khi khô. Các phân tích về vùng gene ITS cho thấy *Tomophagus* sp. hoàn toàn tách biệt so với hai loài còn lại đã phát hiện trong chi *Tomophagus* Murr., những kết quả nghiên cứu này cho thấy loài *Tomophagus* sp. có thể là một loài mới tiếp theo được phát hiện cho chi *Tomophagus* Murr., và là loài mới cho khoa học thứ hai thuộc chi nấm hoàng chi quý giá được phát hiện ở Vườn Quốc gia Cát Tiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. **Ngo Anh, Trinh Tam Kiet, Nguyen Thi Duc Hue**, 2001. Some scarce taxa of the family Ganodermataceae Donk in Vietnam. Journal of Genetics and Applications, Special Issue: Biotechnology, Genetics Society of Vietnam, Hanoi, Vietnam, p. 52–56.
2. **Furtado, J. S.**, 1965. Ganoderma colossus and the status of Tomophagus. Mycologia, 57: 979–984.
3. **Moncalvo, J. M., H. H. Wang, R. S. Hseu**, 1995. The use of ribosomal DNA sequence data for species identification and phylogeny in the Ganodermataceae. In: Buchanan PK, Hseu RS, Moncalvo JM (eds) Ganoderma: Systematics, Phytopathology and Pharmacology, Taipei, p. 31–44.

4. **Murrill, W. A.**, 1905a. The Polyporaceae of North America: XII. A synopsis of the white and bright-colored pileate species. *Bull Torrey Bot Club*, 32: 469–493.
5. **Murrill, W. A.** 1905b. *Tomophagus* for *Dendrophagus*. *Torrey*, 5:197.
6. **Patouillard, N.** 1897. Contribution a la flore mycologique du Tonkin (3e serie). *Journal de Botanique* 11: 335–374.
7. **Xuan Tham Le, Ngoc Duong Pham, Quoc Hung Nguyen Le, Bryn T. M. Dentinger, Jean-Marc Moncalvo**, 2011. *Tomophagus cattienensis* sp. nov., a new Ganodermataceae species from Vietnam: Evidence from morphology and ITS DNA barcodes.

A NEW *Tomophagus* SPECIES FROM CAT TIEN NATIONAL PARK OF VIETNAM BASED ON THE EVIDENCE FROM MORPHOLOGY AND ITS DNA BARCODES

PHAM NGOC DUONG, NGUYEN THI ANH,
VU DINH DUY, LE XUAN THAM

SUMMARY

Ganoderma Karsten and allies (Ganodermataceae Donk, Polyporales, Agaricomycetidae) are a group of polypore fungi of significant economic importance. In 1905 Murrill created the genus *Tomophagus* to segregate *G. colossus* (Fr.) C.F. Baker from *Ganoderma* based on its unusually thick and pale context that becomes soft and light when dry. In this paper we report a third species of *Tomophagus* from Cat Tien National Park in southern Vietnam (Cat Tien is a designated UNESCO Biosphere Reserve; The MAB Programme 2007). The new species reported here is distinct from its two closest allies, i.e. *T. colossus* and *T. cattienensis* on the basis of combined evidence from morphology, and ITS rDNA barcodes.