based on the internal transcribed spacers of the ribosomal region. *FEMS microbiology letters,* 189(1), 97-101.

Mongkolporn, O., Montri, P., Supakaew, T. & Taylor, P. W., 2010. Differential Reactions on Mature Green and Ripe Chili Fruit Infected by Three *Colletotrichum* spp. *Plant Disease* 94, 306-310.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Miller, A. N., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 109 (16), 6241-6246.

Sharma, G. & Shenoy, B. D., 2013. *Colletotrichum* fructicola and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. *Archives of Phytopathology And Plant Protection* 47, 1179-1194.

Silva, D. N., Talhinhas, P., Várzea, V., Cai, L., Paulo, O. S., & Batista, D., 2012. Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum* gloeosporioides complex: an example from coffee (Coffea spp.) hosts. *Mycologia,* 104(2), 396-409.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution,* 30(12), 2725-2729.

Than, P. P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P. W. & Hyde, K. D., 2008. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University Science* B 9, 764-778.

Weir, B. S., Johnston, P. R. & Damm, U., 2012. The *Colletotrichum* gloeosporioides species complex. *Studies in Mycology* 73, 115-180.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: *a guide to methods and applications* 18, 315-322.

Identification of *Colletotrichum* causing anthracnose of chilli in the Red River Delta

Nguyen Duy Hung, Ha Viet Cuong,
Hoang Chung Lam, Nguyen Duc Huy

Abstract

This study presents the identification of *Colletotrichum* infecting chilli in the Red River Delta based on the morphological and molecular charaterization. The sequence analyses of Internal Transcribed Spacer (ITS) and ApMat regions identified at least 5 species, including *C. truncatum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* (sensu stricto), C. aeschynomenes and *C. siamense*, from chili samples collected in the Red River Denta, of which, the 4 latter species are recognized in Vietnam for the first time.

Keywords: Anthracnose, chilli, *Colletotrichum*, Internal Transcribed Spacer, Red River Delta

Ngày nhận bài: 16/11/2017
Ngày phản biện: 21/11/2017
Người phản biện: TS. Hà Minh Thanh
Ngày duyệt đăng: 11/12/2017

PHÂN LẬP, XÁC ĐỊNH VÀ NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA VI KHUẨN GÂY BỆNH TRÊN NẤM LINH CHI *(Garnoderma lucidum)*

Nguyễn Xuân Cảnh[1], Trần Đông Anh[1], Trần Thị Hương[1], Lê Hương Giang[1]

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này đã tiến hành phân lập và xác định các chủng vi khuẩn có khả năng gây bệnh cho nấm linh chi. Phân lập từ các mẫu nấm linh chi nhiễm bệnh đã thu được 13 chủng vi khuẩn. Khảo sát khả năng gây bệnh bằng phương pháp lây nhiễm trực tiếp lên quả thể nấm linh chi, thu được 2 chủng có khả năng gây bệnh cho quả thể là các chủng LC10, LC11. Cả hai chủng LC10 và LC11 đều là trực khuẩn gram dương, sinh nội bào tử, có khả năng sinh catalase và đồng hóa glucose sinh axit, sinh trưởng và phát triển tốt trong khoảng 25 - 35^{0}C. Chúng có khả năng sinh chitinase và cellulase ngoại bào với hoạt tính khá cao. Phân tích trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn LC10 cho thấy có độ tương đồng lên tới 99% với loài *Bacillus flexus*. Kết hợp các đặc điểm hình thái, sinh hóa và sinh học phân tử có thể kết luận chủng vi khuẩn gây bệnh trên nấm linh chi LC10 thuộc vào loài *Bacillus flexus*.

Từ khóa: *Ganoderma lucidum,* 16S rARN, *Bacillus flexus*

[1] Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) là một loại dược liệu quý hiếm, được sử dụng từ rất lâu trong y học cổ truyền. Giá trị dược liệu của nấm linh chi được ghi nhận từ trong những thư tịch cổ của Trung Quốc, cách đây hơn 2000 năm (Wasser *et al.*, 2005). Cho đến nay đã có nhiều công trình nghiên cứu về các hoạt chất ở nấm linh chi có vai trò quyết định trong việc điều trị các bệnh về tim mạch, gan mật, ung thư, chống oxy hóa và tăng cường khả năng miễn dịch (Liu *et al.,* 2016). Do giá trị về mặt dược liệu cao nên giá trị về kinh tế của nấm linh chi cũng rất cao, phát sinh nhu cầu nuôi trồng nấm để thay thế nguồn nấm trong tự nhiên đang dần trở nên khan hiếm (Pooja *et al.*, 2014). Tuy nhiên, trong điều kiện nuôi trồng có một số nguyên nhân gây bệnh làm giảm sản lượng và chất lượng, trong đó có các tác nhân là vi khuẩn. Các bệnh do vi khuẩn gây ra thường làm cơ chất bị hỏng, cạnh tranh chất dinh dưỡng, sinh ra độc tố làm nấm không phát triển được, khô xác hoặc thối nhũn, gây thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế nếu không có biện pháp ngăn chặn, phòng trừ hiệu quả (John *et al.*, 2008). Từ đó xuất phát yêu cầu cần phân lập, nghiên cứu đặc điểm sinh học, xác định chính xác vi khuẩn gây bệnh trên nấm linh chi để phát hiện cũng như tìm ra giải pháp phòng trừ bệnh một cách hiệu quả nhất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu nấm linh chi, nghi ngờ bị nhiễm vi khuẩn tại trại trồng nấm khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ tháng 2 đến tháng 4 năm 2016.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn gây bệnh trên nấm linh chi

Các mẫu bệnh được nghiền trong nước cất vô trùng, pha loãng dịch nghiền ở các nồng độ khác nhau. Sử dụng 100µl dung dịch để cấy trang trên đĩa petri có chứa môi trường MPA (5g cao thịt, 10g pepton, 5g NaCl, 20g agar, 1 lít nước cất, pH 6,8 - 7), ủ ở 30^{o}C, sau 48 giờ quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn.

2.2.2. Phương pháp lây nhiễm nhân tạo chủng vi khuẩn gây bệnh trên nấm Linh chi

Các chủng vi khuẩn đã phân lập được nuôi trên môi trường MPB lỏng trong thời gian 2 ngày, dùng dao gây vết thương nhân tạo trên các quả thể nấm linh chi, sau đó phun dịch vi khuẩn lên trên. Mẫu đối chứng chỉ xử lý với nước vô trùng. Theo dõi kết quả khả năng lây nhiễm của các chủng thử nghiệm sau 5 ngày lây nhiễm, chọn các chủng có khả năng lây nhiễm nhanh và mạnh cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.3. Kiểm tra khả năng sinh enzyme ngoại bào của vi khuẩn

Thu dịch vi khuẩn sau 2 ngày nuôi cấy, ly tâm 8000 vòng/ phút, ở 4^{o}C, trong vòng 10 phút, thu dịch trong nhỏ vào các giếng trên môi trường đĩa thạch chứa cơ chất tương ứng. Giữ các đĩa này 16 để trong 4 tiếng, sau đó ủ qua đêm ở 30^{o}C. Xác định hoạt tính enzym nhờ vòng phân giải cơ chất quanh giếng thạch (Nguyễn Đức Lượng và *ctv.,* 2004).

2.2.4. Xác định một số đặc điểm sinh học của hai chủng vi khuẩn LC10 và LC11

Các phương pháp xác định hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào, nhuộm gram và kiểm tra khả năng sinh nội bào tử được tiến hành như mô tả của Nguyễn Lân Dũng và cộng tác viên (1998).

Thử nghiệm khả năng sinh enzyme catalase: sử dụng que cấy đầu tròn lấy 1 lượng vi khuẩn từ khuẩn lạc thuần đặt lên phiến kính sạch và nhỏ 1 giọt H_2O_2 30%. Thử nghiệm là (+) khi có hiện tượng sủi bọt khí do O_2 được tạo ra từ phản ứng phân giải H_2O_2, ngược lại là (-) với khi không có sủi bọt khí.

Xác định khả năng lên men đường glucose bằng cách nhỏ 2 - 3 giọt dung dịch methyl đỏ 0,5% (trong cồn 60%) lên dịch vi khuẩn, quan sát sự chuyển màu.

Xác định nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng: Các chủng vi khuẩn LC10, LC11 được cấy trên môi trường MPA và được nuôi ở các mức nhiệt độ khác nhau gồm 4^{o}C, 25^{o}C, 30^{o}C, 35^{o}C, 40^{o}C, 50^{o}C, kiểm tra khả năng sinh trưởng của vi khuẩn sau 02 ngày.

2.2.5. Định danh chủng vi khuẩn bằng phương pháp phân tích trình tự 16S rRNA

ADN từ chủng vi khuẩn LC1 và LC2 được tách chiết theo phương pháp mô tả bởi Marmur (Marmur, 1961). Phản ứng PCR khuếch đại vùng bảo thủ của 16S rRNA với cặp mồi 27F và 1492R có trình tự: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% sau đó gửi đi đọc trình tự tại công ty 1tsBASE (Malaysia). Mức độ tương đồng về trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng nghiên cứu được so sánh với các chủng đã công bố trên ngân hàng gen thế giới sử dụng công cụ tra cứu Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

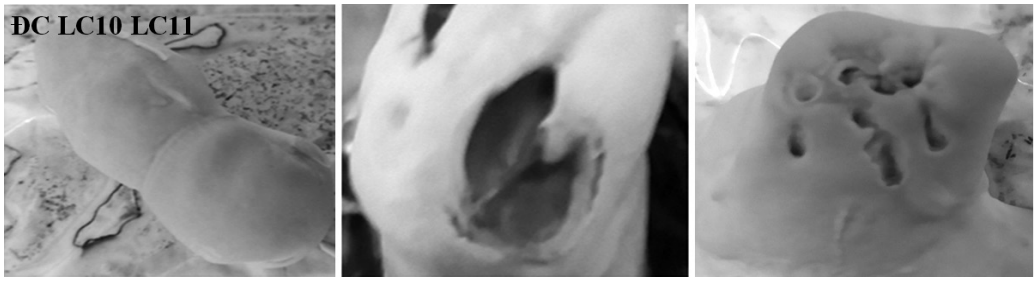
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ tháng 1 năm 2016 đến tháng 6 năm 2017.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và xác định các chủng vi khuẩn gây bệnh trên nấm linh chi

Từ các mẫu nấm và bịch nấm bị nhiễm bệnh khác nhau, đã phân lập được 13 chủng vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn này được tiến hành lây nhiễm lên quả thể nấm linh chi để xác định khả năng gây bệnh. Tiến hành nuôi cấy 13 chủng vi khuẩn trong 24 h sau đó dùng dao vô trùng tạo từ 2 - 3 vết thương nhỏ, phun dịch vi khuẩn vào quả thể đã tạo vết thương, sử dụng nước cất vô trùng cho mẫu đối chứng. Khi quan sát sự phát triển của vết bệnh trên các vị trí lây nhiễm trong khoảng thời gian 3 - 5 ngày. Kết quả cho thấy trong số 13 chủng vi khuẩn phân lập có hai chủng là LC10 và LC11 có khả năng gây bệnh sau quá trình lây nhiễm. So với mẫu đối chứng chúng kìm hãm sự sinh trưởng và phát triển của quả thể và làm hỏng quả thể nấm (Hình 1). Hai chủng này được sử dụng để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo.



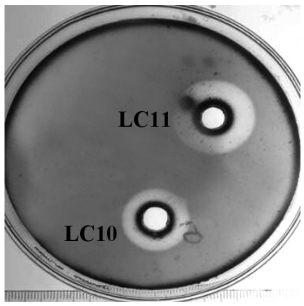
Hình 1. Vết bệnh gây ra bởi hai chủng vi khuẩn LC10 và LC11 sau quá trình lây nhiễm nhân tạo

3.2. Khảo sát khả năng sinh enzyme chitinase và cellulase ngoại bào của hai chủng LC10 và LC11

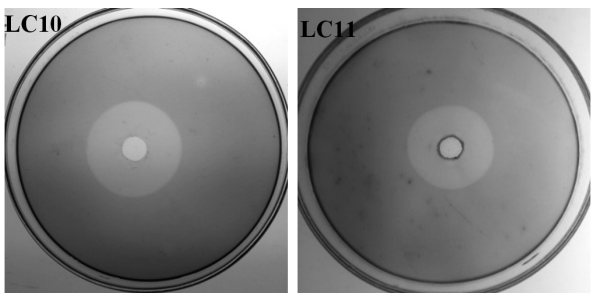
Thành tế bào nấm linh chi có thành phần chủ yếu là chitin và một phân nhỏ là cellulose (Mengjiao Li *et al*., 2015), vi khuẩn muốn gây bệnh phải phá hủy được lớp thành tế bào này. Do đó chúng có thể sinh ra enzym chitinase và cellulase. Để kiểm tra khả năng này, hai chủng vi khuẩn LC10 và LC11 được nuôi cấy, loại bỏ tế bào và thu dịch, dịch này được nhỏ trên giếng thạch có chứa cơ chất là chitin và cellulose. Hoạt tính enzym được kiểm tra như mô tả trong nội dung phương pháp. Kết quả thử nghiệm khả năng sinh enzyme chitinase và cellulase của hai chủng LC10 và LC11 được thể hiện trên hình 2 và 3. Kết quả này cho thấy cả hai chủng vi khuẩn đều có khả năng sinh enzyme chitinase và cellulase với kích thước vòng phân giải khá lớn với đường kính vòng phân giải dao động từ 1,5 - 3,0 cm. Điều này có thể giải thích được tại sao hai chủng này có khả năng tấn công và gây bệnh trên nấm linh chi. Trong quá trình lây nhiễm, hai chủng vi khuẩn này sẽ xâm nhập vào vết thương cơ giới sau đó chúng sẽ phát triển đồng thời sinh ra enzym ngoại bào tấn công các tế bào xung quanh để lan rộng vết bệnh.

3.3. Xác định một số đặc điểm sinh học của hai chủng LC10 và LC11

Một số nghiên cứu về hình thái khuẩn lạc và tế bào, khả năng sinh enzyme catalase, nhuộm Gram, xác định nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng cho hai chủng LC10 và LC11 được thực hiện, kết quả được trình bày trong bảng 1.



Hình 2. Khả năng sinh enzyme chitinase của hai chủng vi khuẩn LC10 và LC11



Hình 3. Khả năng sinh enzyme cellulase của hai chủng vi khuẩn LC10 và LC11

Bảng 1. Một số đặc điểm sinh học của hai chủng vi khuẩn LC10 và LC11

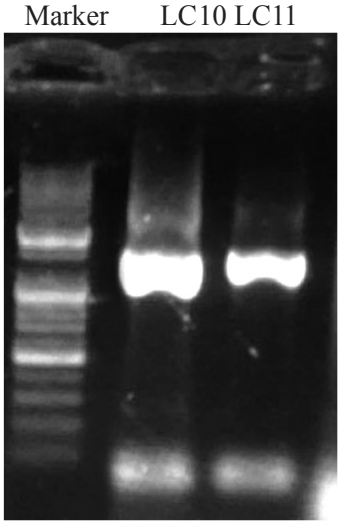
Đặc điểm nghiên cứu	Chủng LC10	Chủng LC11
Hình thái khuẩn lạc	Hình tròn kích thước 0,3 - 0,5 cm, có màu trắng sữa, bề mặt khuẩn lạc hơi khô, mép khuẩn lạc liền, có tâm nhô lên	Hình tròn kích thước 0,1 - 0,3 cm, màu hồng nhạt, bề mặt khuẩn lạc khô, mép khuẩn lạc hình răng cưa
Hình thái tế bào	Hình que	Hình que
Khả năng sinh nội bào tử	Sinh nội bào tử	Sinh nội bào tử
Nhuộm Gram	Bắt màu Gram dương	Bắt màu Gram dương
Khả năng lên men đường glucose	Tốt	Tốt
Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu	25 - 30^{0}C	25 - 35^{0}C

Kết quả nghiên cứu cho thấy cả hai chủng LC10 và LC1 đều là trực khuẩn, bắt màu nhuộm gram dương, có khả năng sinh nội bào từ, đều sinh catalase và lên men đường glucose tạo axit. Các đặc điểm này cho thấy hai chủng LC10 và LC11 có khả năng thuộc vào chi Bacillus. Mỗi vi sinh vật khác nhau sẽ thích nghi với các điều kiện nhiệt độ môi trường khác nhau, nó ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất và sinh trưởng mỗi loài. Trong dải nhiệt độ nghiên cứu, nhận thấy chủng LC10 có khả năng sinh trưởng tốt ở nhiệt độ từ 25 - 30℃, trong khi đó chủng LC11 có dải nhiệt độ tối ưu cao hơn ở 25 - 35℃. Đây cũng là khoảng nhiệt độ tối ưu trong nuôi trồng nấm linh chi, chính vì vậy hai chủng này có khả năng gây bệnh cao trên nấm linh chi khi lây nhiễm nhân tạo.

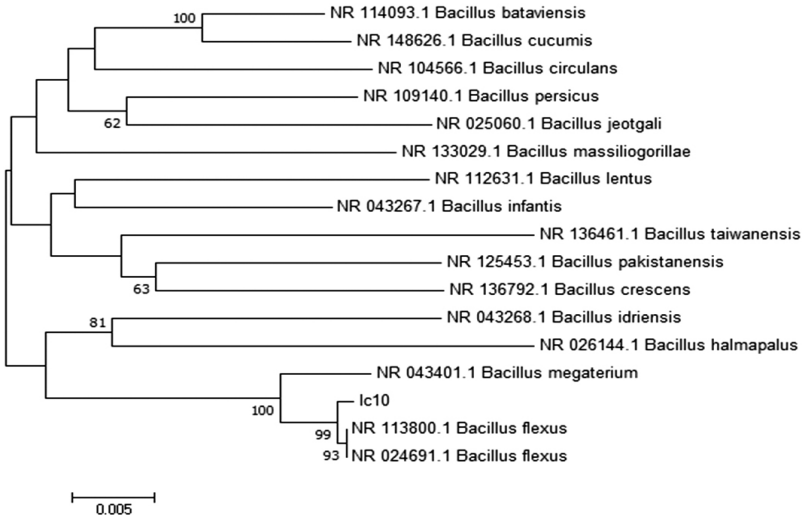
3.4. Định danh chủng vi khuẩn phân lập bằng phương pháp sinh học phân tử

Để định danh các chủng vi khuẩn, nghiên cứu này đã sử dụng phương pháp sinh học phân tử dựa trên độ tương đồng của đoạn gen 16S rRNA của các chủng này với các chủng đã được công bố trên ngân hàng gen. Sau khi tiến hành tách chiết DNA tiến hành quá trình chạy PCR để khuyếch đại 16S rRNA của hai chủng LC10 và LC11, sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả cho thấy đoạn gen 16S rRNA từ hai chủng vi khuẩn đều đã được khuếch đại với một băng rõ nét (Hình 4).

Sản phẩm PCR được tinh sạch và đọc trình tự tại công ty 1tsBASE (Malaysia). Tuy nhiên trong quá trình đọc trình tự gặp một số lý do khách quan nên chỉ thu nhận được trình từ đoạn gen 16S rRNA của chủng LC10. Kết quả đọc trình tự được xử lý bằng phần mềm Bioedit và so sánh với dữ liệu của NCBI bằng công cụ Blast đã xác định chủng LC10 và chủng *Bacillus flexus* có mức độ tương đồng về nucleotide đạt 99%. So sánh trình tự thu được với các trình tự khác trong ngân hàng gen và xây dựng cây phát sinh loài cho chủng LC10, kết quả được thể hiện trong hình 5.



Hình 4. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng gen 16S rRNA từ hai chủng vi khuẩn LC10 và LC11



Hình 5. Cây phát sinh chủng loài của các chủng và các loài có liên quan dựa trên sự phân tích so sánh trình tự rRNA 16S RNA

Kết quả này cho phép xác định chủng LC10 thuộc vào loài *Bacillus flexus*.

IV. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 13 chủng vi khuẩn trên các mẫu nấm linh chi bị nhiễm bệnh và xác định được 2 chủng LC10, LC11 có khả năng gây bệnh hại trên nấm linh chi. Hai chủng này sinh trưởng và phát triển tốt trong khoảng 25- 35, có khả năng sinh một số enzym ngoại bào như chitinase, celullase, catalase. Kết hợp các đặc điểm hình thái, sinh hóa và sinh học phân tử có thể xác định chủng vi khuẩn gây bệnh trên nấm linh chi LC10 thuộc vào loài *Bacillus flexus*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí từ đề tài sinh viên nghiên cứu khoa học mã số SV2017-12-15MST và đề tài trọng điểm cấp Học viện Nông nghiệp Việt Nam mã số T2017-12-05TĐ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty, 1998. *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo dục. Hà Nội.

Nguyễn Đức Lượng, Cao Cường, Nguyễn Ánh Tuyết, 2004. *Công nghệ Enzyme*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

John T.F., Richard H., 2008. *Mushroom Pest And Disease Control: A colour handbook*. 1st edition. CRC Press. United States.

Liu Z., Jie X., Yee H., Ruonan B., Sisi Z., Li L., Yale N., Yan Z., Yuanliang H., Jiaguo L., Yi W., Deyun W., 2016. Activation effect of Ganoderma lucidum polysaccharides liposomes on murine peritoneal macrophages. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82: 973-978.

Marmur J., 1961. A Procedure for the Isolation of Deoxiribonucleic Acid from Microorganisms. *Journal of Molecular Biology*, 3: 208-218.

Mengjiao L., Tianxi C., Tan G., Zhigang M., Ailiang J., Liang S., Ang R., Mingwen Z., 2015. UDP-glucose pyrophosphorylase influences polysaccharide synthesis, cell wall components, and hyphal branching in *G. lucidum* via regulation of the balance between glucose-1-phosphate and UDP-glucose. *Fungal Genetics and Biology*, 82: 251-263.

Pooja K. and Sharma B.M., 2014. Studies on different growth parameters of *Ganoderma lucidum, International Journal of Science and Technology*, 3 (4): 1515-1524.

Wasser S.P., Coates P., Blackman M., Cragg G., Levine M., Moss J., White J., 2005. *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 1st edition. New York: Marcel Dekker Reishi or Lingzhi (Ganoderma lucidum).

Isolation, classification and identification of pathogenic bacteria causing disease on Lingzhi (*Ganoderma lucidum*)

Nguyen Xuan Canh, Tran Dong Anh, Tran Thi Huong, Le Huong Giang

Abstract

In this study, we have conducted to isolate and identify the bacteria strains that were capable of causing disease on the Lingzhi mushrooms. Initially, 13 bacteria strains from infected Lingzhi mushroom were isolated. Through artificial infection or re-infection directly on the cap of Lingzhi mushrooms, LC10, LC11 strains were identified as the cause of Lingzhi mushroom's disease. Both of LC10 and LC11 were gram-positive, rod-shaped bacteria, producing endospore, capable of releasing catalase, converting glucose to produce acid, and the suitable temperature for growth and development was 25 - 35°C. They had the ability to releasing extracellular enzymes, chitinase and cellulase, with high activity. The results of 16S rRNA sequence analysis showed that LC10 strain had a similarity of 99% with *Bacillus flexus*. LC10 strain was identified to belong to *Bacillus flexus* species based on morphology, biochemical characteristics and molecular biological analysis.

Keywords: *Ganoderma lucidum,* 16S rARN, *Bacillus flexus*

Ngày nhận bài: 9/10/2017
Ngày phản biện: 14/10/2017
Người phản biện: TS. Nguyễn Thanh Hải
Ngày duyệt đăng: 10/11/2017

HIỆU QUẢ THAY THẾ MÙN CƯA CÂY CAO SU BẰNG CÙI BẮP ĐỂ TRỒNG NẤM VÂN CHI ĐỎ (*Pycnoporus sanguineus*)

Trần Đức Tường[1], Dương Xuân Chữ[2], Bùi Thị Minh Diệu[3]

TÓM TẮT

Nấm nghiên cứu được xác định thuộc loài *Pycnoporus sanguineus* (L.: Fr.) Murr.. Hệ sợi giống cấp 1 có tốc độ phát triển nhanh nhất (1,78 cm/ngày) trên môi trường PDA bổ sung 10% nước dừa. Hạt lúa hấp chín là cơ chất tối ưu cho sự phát triển hệ sợi giống cấp 2 (0,800 cm/ngày). Cọng khoai mì là môi trường tốt nhất cho sự phát triển của hệ sợi giống cấp 3 (0,544 cm/ngày). Công thức phối trộn chứa 50% cùi bắp và 50% mùn cưa cây cao su không bổ sung dinh dưỡng được xem là cơ chất phù hợp nhất cho sự sinh trưởng, phát triển của nấm Vân Chi đỏ đạt năng suất cao (103 g/bịch phôi).

Từ khóa: Cơ chất, cùi bắp, mùn cưa cây cao su, Vân Chi đỏ

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm Vân Chi được xem là một trong 25 loài nấm dược liệu chính trên thế giới có giá trị dược tính rất cao được người tiêu dùng ở nhiều quốc gia trên thế giới ưa chuộng (Boa, 2004). Nấm Vân Chi mang lại hiệu quả cao trong phòng và hỗ trợ điều trị một số bệnh như ung thư, đái tháo đường, rối loạn lipid máu, các bệnh lý về tim mạch, hô hấp, đồng thời giúp tăng cường hệ miễn dịch, bảo vệ gan, ức chế HIV type 1 (Collins and Ng, 1997). Nấm Vân Chi thường được trồng chủ yếu trên mùn cưa cao su, loại cơ chất phổ biến ở vùng Đông Nam bộ. Tuy nhiên, các phế phụ phẩm nông nghiệp ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) chứa hàm lượng cellulose cao (cùi bắp, vỏ trấu…) có tiềm năng được tận dụng để thay thế mùn cưa cao su, vừa mang lại hiệu quả kinh tế cao vừa giảm thiểu ô nhiễm môi trường. Theo Tổng cục Thống kê Việt Nam (2015), ĐBSCL có diện tích trồng bắp khá lớn khoảng 38,1 nghìn ha, với năng suất 59,1 tạ/ha, tỷ lệ hạt/bắp trung bình đạt 75 - 80%. Do vậy, lượng cùi bắp thải ra môi trường hằng năm rất lớn mà chưa được tận dụng hiệu quả, gây ô nhiễm môi trường. Đặc biệt, ĐBSCL với khí hậu ôn hòa, lưu lượng mưa lớn, ẩm độ không khí khá cao, lại có trữ lượng cùi bắp dồi dào, dễ thu mua, giá thành rất thấp… được xem là thuận lợi và giàu tiềm năng để phát triển nghề trồng nấm Vân Chi đỏ. Nhằm mục tiêu đánh giá hiệu quả sử dụng cùi bắp thay thế cho mùn cưa cao su để trồng nấm Vân Chi đỏ ở ĐBSCL, ngoài việc tạo ra nguồn dược liệu có giá trị dược tính cao với giá thành thấp để điều trị bệnh còn có thể tạo thêm việc làm cho người lao động tăng thu nhập, góp phần phát triển kinh tế địa phương.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu giống nấm Vân Chi đỏ (nguyên tai) được thu thập tại Tây Ninh. Mùn cưa cao su, lúa, cọng khoai mì, vôi (Công ty ACI group Cần Thơ). Cùi bắp (Bắp nếp lai F1 HMT 55, được cung cấp bởi Phan Văn Trung, xã Tân Long, Thanh Bình, Đồng Tháp). Cám gạo, bột bắp, bột đậu nành (Cơ sở thức ăn gia súc Hồng Phước, Cần Thơ)...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và định danh chủng nấm Vân Chi đỏ

Giống gốc được phân lập trên môi trường PDA (Potatoes-D-glucose-Agar). ADN của nấm được ly trích bằng kỹ thuật sốc nhiệt. Đoạn trình tự ITS được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi (White *et al*., 1990):

ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC

Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự bằng máy tự động ABI 3130 (Applied Biosystems, USA) theo phương pháp Sanger sequencing. Trình tự đoạn ITS của nấm Vân Chi đỏ được so sánh để xác định độ tương đồng với trình tự của các chủng nấm khác trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng chương trình Nucleotide BLAST. Loài Vân Chi đỏ trong nghiên cứu được xác định dựa vào kết quả này, kết hợp với đặc điểm hình thái.

2.2.2. Khảo sát môi trường nhân giống nấm Vân Chi đỏ

a) Khảo sát môi trường nhân giống cấp 1

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 nghiệm thức (NT) tương ứng với 3 loại môi trường, được lặp lại 3 lần, gồm NT1: PDA; NT2: PDA + 10%

[1] Đại học Đồng Tháp; [2] Đại học Y Dược Cần Thơ; [3] Đại học Cần Thơ