



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0038765

(51)^{2020.01} A01G 18/00

(13) B

(21) 1-2021-05460

(22) 06/09/2021

(45) 26/02/2024 431

(43) 25/01/2022 406

(73) Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Thái Nguyên (VN)

Tổ 10 Xã Quyết Thắng, Thành Phố Thái Nguyên, Tỉnh Thái Nguyên

(72) Nguyễn Mạnh Tuấn (VN); Hoàng Văn Hưng (VN).

(54) QUY TRÌNH NUÔI TRỒNG NHÂN TẠO QUẢ THỂ NẤM THƯỢNG HOÀNG
(TROPICOPORUS LINTEUS NTH-PL4) SỬ DỤNG MÙN CUA CÂY KEO

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng, trong đó giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 là chủng nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 có mã số truy nhập gen 18S rRNA, ITS 1 - 5,8S rRNA - ITS 2, 28S rRNA trên GenBank là MW757264, chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 này được phân lập từ quả thể nấm thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam, khuẩn ty của chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 trên môi trường PDA ở 25°C, 7 ngày có màu vàng, và giá thể nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng là mùn cưa cây keo được chọn từ nhóm bao gồm mùn cưa cây keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd.), mùn cưa keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) hoặc mùn cưa keo lai (keo tai tượng × keo lá tràm - *Acacia hybrid*).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ nuôi trồng nấm dược liệu. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chủng nấm Thượng Hoàng (*Tropicoporus linteus* NTH-PL4) được phân lập từ quả thể thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn và quy trình nhân giống, nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng (*Tropicoporus linteus* NTH-PL4) từ nguồn nguyên liệu đơn giản, sẵn có và giá trị thấp ở nước ta, bao gồm mùn cưa keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd.), mùn cưa keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) hoặc mùn cưa keo lai (keo tai tượng × keo lá tràm - *Acacia hybrid*), bột ngô, cám gạo, bột đậu tương, vôi và bột CaCO_3 . Quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng trong điều kiện nhân tạo chứa hoạt chất sinh học polysacarit và hispidin. Đây là các hoạt chất sinh học tiềm năng trong hỗ trợ sức khỏe con người. Quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng mô tả trong sáng chế này tương đối đơn giản và có khả năng áp dụng ở quy mô công nghiệp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nấm Thượng Hoàng được mô tả và phân loại đầu tiên năm 1858 với danh pháp khoa học *Polyporus linteus* bởi Berk. & M.A. Curtis. Sau đó được phân loại lại với tên khoa học *Fomes linteus* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1815, *Scindalma linteum* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1898, *Pyropolyporus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1903, *Inonotus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1992, *Fulvifomes linteus* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1915, *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1963. Từ năm 2015, các nhà khoa học thống nhất danh pháp nấm Thượng Hoàng với tên khoa học *Tropicoporus linteus* (Berk. & M.A. Curtis). Như vậy, nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) = *Polyporus linteus* = *Fomes linteus* = *Scindalma linteum* = *Pyropolyporus linteus* = *Inonotus linteus* = *Phellinus linteus* (Dữ liệu MYCOBANK Database, <https://www.mycobank.org/>).

Tropicoporus linteus (Berkeley & M.A. Curtis) là một trong những loại nấm dược liệu tiêu biểu nhất của nhóm nấm Đấm (*Basidiomycetes*), bắt đầu được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm từ năm 1968, khi Tetsuro Ikekawa và cộng sự công bố kết quả nghiên cứu về hoạt chất tách chiết từ các loại nấm dược liệu cho thấy rằng hoạt chất sinh học từ nấm Thượng Hoàng có khả năng ức chế 96,7% tế bào ung thư Sarcama-180, cao nhất so với các loại nấm dược liệu khác như nấm Linh chi *Ganoderma applanatum* (64,9%), nấm Vân chi *Coriolus versicolor* (65,0-77,5%),... (Xem tài liệu: Tetsuro

Ikekawa, Miyako Nakanishi, Nobuaki Uehara, Goro Chihara, Fumiko Fukuoka. 1968. “Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*”. GANN Japanese Journal of Cancer Research, 59, pp 155-157). Cho đến nay, rất nhiều bằng chứng khoa học công bố cho thấy nấm Thượng Hoàng có chứa rất nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng, đặc biệt là khả năng phòng chống các bệnh ung thư như ung thư gan, ung thư phổi, biểu mô tuyến vú, tế bào ung thư ruột kết,... (Xem tài liệu: T Zhu, J Guo, L Collins, J Kelly, Z J Xiao, S-H Kim, C-Y Chen. 2007. “*Phellinus linteus* activates different pathways to induce apoptosis in prostate cancer cells”. British Journal of Cancer, 96, pp 583–590; Tianqi Yu, Suthakar Ganapathy, Ling Shen, Bo Peng, Sung-Hoon Kim, Alexandros Makriyannis, Changyan Chen. 2018. “A lethal synergy induced by *phellinus linteus* and camptothecin11 in colon cancer cells”. Oncotarget, 9, pp 6308-6319; Wenhua Chen, Huiying Tan, Qian Liu, Xiaohua Zheng, Hua Zhang, Yuhong Liu. 2019. “A Review: The bioactivities and pharmacological applications of *Phellinus linteus*”. Molecules, 24, 1888; Ayesha Sarfraz, Azhar Rasul, Iqra Sarfraz, Muhammad Ajmal Shah, Ghulam Hussain, Nusrat Shafiq, Muqaddas Masood, Sevki Adem, Satyajit D. Sarker, Xiaomeng Li. 2020. “Hispolon: A natural polyphenol and emerging cancer killer by multiple cellular signaling pathways”. Environmental Research, 190, 110017).

Trong tự nhiên, nấm Thượng Hoàng phân bố ở một số quốc gia nhiệt đới và cận nhiệt đới, cần từ 3 đến 4 năm sinh trưởng có thể thu hái quả thể nấm, nhưng chất lượng nấm hoàn toàn phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên. Điều này dẫn tới, không chủ động được nguồn cung cấp và đảm bảo chất lượng nấm Thượng Hoàng. Chính vì vậy, các nhà khoa học đã tiến hành nghiên cứu, nuôi trồng nhân tạo nấm Thượng Hoàng. Đến nay, một số quốc gia đã nuôi trồng nhân tạo thành công quả thể nấm Thượng Hoàng như Hàn Quốc, Nhật Bản, Trung Quốc. Tiêu biểu, (i) tại Hàn Quốc đã nuôi trồng nhân tạo thành công quả thể nấm Thượng Hoàng *Phellinus linteus* bằng cách sử dụng các loại đoạn gỗ của cây dâu (*Mulberry*), cây sồi (*Oak*), cây táo (*Malus*). Khi hệ sợi đã phát triển phủ kín các đoạn gỗ này, tiến hành vùi đất, quả thể nấm Thượng Hoàng sẽ hình thành ở mặt trên của đoạn gỗ (Xem tài liệu sáng chế: KR100328312B1 công bố ngày 16.3.2002; KR20000037407A công bố ngày 22.11.2020; KR20030058463A công bố ngày 07.7.2003). (ii) tại Trung Quốc, có một số công bố giá thể thích hợp cho nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng bằng phương pháp túi, tiêu biểu: các túi chứa đựng giá thể gồm dăm gỗ sồi 78% khối lượng, cám lúa mì 17% khối lượng, bột đậu tương 3% khối lượng, vôi bột 1% khối lượng và thạch cao 1% khối lượng cho nấm Thượng Hoàng *Phellinus baumii* Pilat (Xem

tài liệu sáng chế: CN101485262B, công bố ngày 15.6.2011); hoặc sử dụng túi giá thể gồm các thành phần: 70 - 80% khối lượng cành cây dâu (có chiều dài từ 13 đến 16 cm), 20 - 30% khối lượng bột ngô và 1 - 3% khối lượng bột thạch cao cho nấm Thượng Hoàng *Phellinus igniarius* (Xem tài liệu: CN102523909A công bố ngày 04.7.2012); hoặc giá thể gồm các thành phần: dăm cây dâu (*Ramulus mori*) 40 - 80% khối lượng, bột lá cây dâu 5 - 20% khối lượng, cám gạo 10 - 30% khối lượng, đường 0,5 - 2% khối lượng, vôi 1% khối lượng - 5% khối lượng, KH_2PO_4 0,1 - 2% khối lượng, MgSO_4 0,1 - 2% khối lượng, để cho nuôi trồng nấm Thượng Hoàng *Phellinus igniarius* (Xem tài liệu sáng chế: CN102786333B công bố ngày 6.11.2013). Như vậy, giá thể cây dâu, sồi và táo được xem là những loại thích hợp nhất cho nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng đang áp dụng ở các nước trên thế giới hiện nay. Tuy nhiên, đây lại là giá thể không chủ động hoặc không dồi dào ở nước ta, điều này dẫn đến khó áp dụng ở quy mô công nghiệp.

Ở nước ta với điều kiện tự nhiên rất thuận lợi cho nuôi trồng các loại nấm dược liệu. Chúng ta đã chủ động công nghệ nuôi trồng quả thể các loại nấm dược liệu quý (nấm Linh chi, nấm Đông trùng Hạ thảo, nấm Đầu khỉ, nấm Vân chi, nấm Hương,...) và rất nhiều loại nấm ăn khác. Tuy nhiên, thành tựu về nghiên cứu công nghệ nuôi trồng nấm Thượng Hoàng còn rất hạn chế, có một vài công bố khoa học về nuôi trồng thành công hệ sợi nấm Thượng Hoàng (Xem tài liệu: Phạm Quang Thu. 2016. “Đặc điểm sinh học của nấm Thượng Hoàng (*Phellinus linteus*) trong nuôi cấy thuần khiết”. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, 1, pp 4231-4237; Trần Thị Lua, Vũ Văn Hạnh. 2017. “Nghiên cứu điều kiện nhân sinh khối nấm Thượng Hoàng (*Phellinus baumi*)”. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam, 8, pp 106-108; Trần Thị Hiền, Trần Văn Tuấn, Nguyễn Thị Lý, Trần Thị Hoa, Nguyễn Thị Minh Huyền. 2020. “Ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường đến sự phát triển sinh khối nấm Thượng Hoàng (*Phellinus linteus*)”. Khoa học Công nghệ-Tạp chí Công Thương, 42, pp 20-23). Trong khi, không có công bố chính thức về nuôi trồng thành công quả thể nấm Thượng Hoàng trong điều kiện nhân tạo. Thêm nữa, các nghiên cứu gần đây cho thấy có rất nhiều hoạt chất sinh học tiềm năng chỉ tìm thấy ở quả thể nấm Thượng Hoàng hoặc với hàm lượng cao hơn so với ở hệ sợi nấm Thượng Hoàng. Điều này dẫn đến khả năng ức chế tế bào ung thư của dịch chiết từ quả thể nấm cao hơn so với từ hệ sợi nấm Thượng Hoàng (Huawei Zeng và cộng sự, 2016; Wenhua Chen và cộng sự, 2019; Ayesha Sarfraz và cộng sự, 2020).

Tỷ lệ ung thư và mắc mới hàng năm ở nước ta có xu hướng tăng nhanh trong những năm trở lại đây. Theo ước tính của Bộ Y tế, có 182.563 ca mắc mới và 122.690 ca tử

vong do ung thư trong năm 2020, trong đó ung thư gan, phổi, vú, dạ dày và đại trực tràng là các loại thường gặp. Do đó, nhu cầu sử dụng nấm Thượng Hoàng trong phòng chống bệnh ung thư của người dân ngày càng tăng mạnh. Tuy nhiên, phần lớn các sản phẩm nấm Thượng Hoàng trên thị trường trong nước hiện nay đều từ nguồn ngoại nhập với giá thành cao, khó kiểm soát về chất lượng.

Cây keo là một trong những loại cây chủ lực trong phát triển kinh tế rừng, được trồng phổ biến ở hầu khắp các tỉnh thành trong cả nước, với tổng diện tích khoảng hơn 1,6 triệu ha, chiếm hơn 45% diện tích rừng trồng cả nước, cung cấp hàng triệu m³ hàng năm. Bên cạnh đem lại giá trị xuất khẩu gỗ, quá trình chế biến gỗ cũng tạo ra nguồn phụ phẩm (mùn cưa) rất dồi dào, tuy nhiên phần lớn nguồn phụ phẩm này thường được bỏ đi, gây lãng phí.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng giải quyết các vấn đề còn tồn tại nêu trên.

Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng bao gồm các công đoạn:

(a1) cấy giống nấm và ươm hệ sợi nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, trong đó:

giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 là chủng nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 có mã số truy nhập gen 18S rRNA, ITS 1 – 5, 8S rRNA – ITS 2, 28S rRNA trên GenBank là MW757264, chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 này được phân lập từ quả thể nấm thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam,

cấy đều 0,5-1,5% khối lượng giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 so với khối lượng giá thể vào bề mặt của bịch giá thể bao gồm các thành phần (tính theo % khối lượng):

mùn cưa cây keo:	59-74%, tốt hơn là 65-70%, tốt hơn là độ ẩm mùn cưa 55-65%
vôi tôi (Ca(OH) ₂):	1-3%
cám gạo:	8-13%
bột ngô:	12-16%
bột đậu tương:	4-7%
bột CaCO ₃ :	1-2%,

trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm mùn cưa cây keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd.), mùn cưa keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) hoặc mùn cưa keo lai (keo tai tượng × keo lá tràm - *Acacia hybrid*),

uơm hệ sợi trên bịch đã cấy giống ở 25-30°C, độ ẩm không khí 60-70% trong phòng tối, cho đến khi hệ sợi đã phủ kín đáy bịch và hệ sợi có màu vàng sẫm hoặc vàng cam;

(a2) xử lý bịch hệ sợi nấm và chăm sóc quả thể nấm

rạch và loại bỏ lớp màng dai ở phần vai bịch nấm, tốt hơn là rạch theo hình chữ U, với độ sâu 0,2-0,4 cm, chiều dài 4-5 cm, chiều rộng 2,5-3 cm và rạch thêm hai đường hình chữ X bên trong vết rạch nêu trên, mỗi đường rạch có độ sâu 0,2-0,4 cm;

duy trì điều kiện nuôi trồng quả thể nấm ở độ ẩm không khí 97-100%, ánh sáng 300-400 lux, nhiệt độ 25-35°C, lượng khí CO₂ 0,03-0,05% cho đến khi quả thể nấm non hình thành hoàn chỉnh sau 2,5-3 tháng sau khi rạch bịch nấm và loại bỏ màng dai;

khi quả thể nấm non hoàn chỉnh sau 2,5-3 tháng, điều chỉnh điều kiện nuôi trồng với độ ẩm không khí 90-93%, ánh sáng 300-400 lux, nhiệt độ 25-35°C, lượng khí CO₂ 0,03-0,05% cho đến khi quả thể nấm đến độ tuổi thu hái.

Theo một phương án thực hiện của quy trình, trong đó giá thể cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng bao gồm các thành phần (tính theo % khối lượng):

mùn cưa keo:	68%
vôi tôi:	1%
cám gạo:	10%
bột ngô:	15%
bột đậu tương:	5%
bột CaCO ₃ :	1%.

Theo một phương án thực hiện của quy trình, trong đó quy trình này còn bao gồm công đoạn:

(a) chuẩn bị giá thể mùn cưa cây keo cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 trước khi tiến hành công đoạn (a1), bao gồm các bước:

phối trộn mùn cưa cây keo với vôi tôi, nước sạch, ủ trong vòng 18-24 ngày, tốt hơn là cứ 6-8 ngày tiến hành đảo trộn khối ủ một lần, duy trì độ ẩm của khối ủ ở 55-65%; và

sau 18-24 ngày ủ, bổ sung các thành phần dinh dưỡng gồm cám gạo, bột ngô, bột đậu tương, bột CaCO₃ vào khối ủ, trộn đều, thu được giá thể mùn cưa cây keo cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4.

Theo một phương án thực hiện của quy trình, trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo là mùn cưa cây keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd.).

Theo một phương án thực hiện của quy trình, trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo là mùn cưa keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth).

Theo một phương án thực hiện của quy trình, trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo là mùn cưa keo lai (keo tai tượng × keo lá tràm - *Acacia hybrid*).

Theo một phương án thực hiện của quy trình, trong đó giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 là giống nấm cấp 3 được nhân như sau:

(i) chuẩn bị môi trường dinh dưỡng sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 được chọn từ nhóm bao gồm PDA, MCM, MEA, YMA cải tiến, trong đó:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết khoai tây:	4g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
aga:	20g,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết thô men:	2g,
pepton:	1g,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5g,
KH ₂ PO ₄ :	0,46g,
K ₂ HPO ₄ :	1g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
aga:	20g,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng MEA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết mạch nha:	20g,
pepton:	1g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),

nước cất vừa đủ: 1 lít,

pH: 6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng YMA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 10g,

chất chiết thô men: 3g,

chất chiết mạch nha: 3g,

pepton: 5g,

aga: 20g,

dịch tách chiết cây dâu: 10-15 ml,

ampicillin: 40-70mg (tùy ý),

nước cất vừa đủ: 1 lít,

pH: 6-6,5;

trong đó, tốt hơn là dịch tách chiết cây dâu được bổ sung vào các môi trường trên khi môi trường có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 đến 65°C, tốt hơn là khoảng 60°C;

Theo một phương án thực hiện cụ thể của công đoạn (i), các môi trường dinh dưỡng PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 có thành phần như sau:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 20g,

chất chiết khoai tây: 4g,

dịch tách chiết cây dâu: 10ml,

ampicillin: 50mg,

aga: 20g,

nước cất vừa đủ: 1 lít,

pH: 6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 20g,

chất chiết thô men: 2g,

pepton: 1g,

MgSO₄.7H₂O: 0,5g,

KH₂PO₄: 0,46g,

K₂HPO₄: 1g,

dịch tách chiết cây dâu: 10ml,

ampicillin: 50mg,
 aga: 20g,
 nước cất vừa đủ: 1 lít,
 pH: 6,5;

- môi trường dinh dưỡng MEA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 20g,
 chất chiết mạch nha: 20g,
 pepton: 1g,
 aga: 20g,
 dịch tách chiết cây dâu: 10ml,
 ampicillin: 50mg,
 nước cất vừa đủ: 1 lít,
 pH: 6,5;

- môi trường dinh dưỡng YMA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 10g,
 chất chiết thô men: 3g,
 chất chiết mạch nha: 3g,
 pepton: 5g,
 aga: 20g,
 dịch tách chiết cây dâu: 10ml,
 ampicillin: 50mg,
 nước cất vừa đủ: 1 lít,
 pH: 6,5;

(ii) nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, bao gồm các bước:

giã đông giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 gốc (giống nấm F_0) bảo quản lạnh sâu -86°C ở nhiệt độ phòng trong 4-6 giờ, rồi cấy sang môi trường thạch nghiêng PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở $25-30^{\circ}\text{C}$, từ 7-10 ngày, thu được giống nấm cấp 1 hay còn gọi F_1 ,

cấy giống nấm cấp 1 theo hình dạng và kích thước nhất định, rồi cấy chuyển sang môi trường MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở $25-30^{\circ}\text{C}$ trong 7-10 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA này, thu được giống nấm cấp 2 hay còn gọi là F_2 ,

sau khi hệ sợi (giống nấm cấp 2) của chủng NTH-PL4 sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA, cắt hệ sợi nấm theo hình dạng và kích thước nhất định, cấy chuyển sang môi trường thóc đựng trong chai nhựa hoặc chai thủy tinh, và

nuôi các chai thóc chứa giống nấm ở 25-30°C, độ ẩm 60-70%, trong phòng tối từ 35 đến 40 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín phần thóc ở đáy chai, thu được giống nấm cấp 3 hay còn gọi là giống sản xuất hoặc F₃, để dùng cho công đoạn (a1) cấy giống nấm và ươm hệ sợi nấm.

Theo một phương án thực hiện, trong đó ở bước (ii), môi trường được sử dụng để nhân giống nấm cấp 2 khác với môi trường được sử dụng để nhân giống cấp 1.

Quy trình nuôi trồng nấm Thượng Hoàng theo sáng chế có các đặc trưng sau:

Quy trình theo sáng chế sử dụng chủng nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 được phân lập từ quả thể nấm thu thập tại Vườn Quốc gia Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam có trình tự đoạn gen 18S rRNA, Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) – 5,8S rRNA – ITS 2 và 28S rRNA với độ dài 755 nucleotide có mức độ tương đồng 99,87% với nấm Thượng Hoàng *Phellinus linteus* KCTC 6190 (AF077678). Chủng thuần khiết về mặt sinh học được lưu giữ trong điều kiện lạnh sâu (-86°C) tại Viện Khoa học Sự sống – Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Mã số truy nhập gen 18S rRNA, Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) – 5,8S rRNA – ITS 2 và 28S rRNA của chủng NTH-PL4 trên ngân hàng GenBank là MW757264.

Quy trình theo sáng chế xử lý giá thể mùn cưa cây keo và bổ sung thêm các thành phần dinh dưỡng cho nuôi trồng nấm Thượng Hoàng. Nguồn nguyên liệu này sẵn có và dồi dào ở nước ta.

Quy trình theo sáng chế đã đề xuất phương pháp xử lý các bịch sợi nấm và kiểm soát điều kiện nuôi trồng gồm nhiệt độ, độ ẩm không khí, nồng độ khí CO₂ cho quá trình hình thành và sinh trưởng quả thể nấm Thượng Hoàng được tối ưu.

Quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng theo sáng chế có thể áp dụng được ở quy mô công nghiệp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện quy trình phân lập và định danh nấm Thượng Hoàng.

Hình 2 thể hiện sơ đồ phả hệ phát sinh của chủng nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 với các chủng nấm Thượng Hoàng đã công bố, chủng *Inonotus lonicericola* TAA105317 (JN642572) được sử dụng ngoài nhóm nấm Thượng Hoàng.

Hình 3 thể hiện quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4.

Hình 4 thể hiện sơ đồ quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4.

Hình 5 thể hiện việc rạch và loại bỏ hệ sợi bạch nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4.

Hình 6 thể hiện việc nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 sau 4 tháng từ khi quả thể nấm bắt đầu hình thành.

Hình 7 thể hiện hoạt chất hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng, trong đó 1: hispidin chuẩn và 2: hoạt chất hispidin tách chiết từ quả thể nấm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các khía cạnh theo sáng chế và các phương án thực hiện ưu tiên của chúng sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn. Tuy nhiên, lưu ý rằng phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể được mô tả dưới đây dưới dạng ví dụ minh họa cho sáng chế và cần hiểu rằng phạm vi của sáng chế sẽ bao gồm tất cả các cải biến, các thay đổi tương đương khác của chúng như được xác định bởi phần yêu cầu bảo hộ.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4” còn được đề cập tất là “nấm Thượng Hoàng NTH-PL4” hoặc đơn giản là “nấm Thượng Hoàng”.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, như được minh họa trên Hình 4.

Theo một phương án thực hiện, quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 theo sáng chế bao gồm các công đoạn:

(a1) Cây giống nấm và uơm hệ sợi nấm Thượng Hoàng NTH-PL4

Giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 được sử dụng trong sáng chế là chủng nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 có mã số truy nhập gen 18S rRNA, ITS 1 – 5,8S rRNA – ITS 2, 28S rRNA trên GenBank là MW757264, chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 này được phân lập từ quả thể nấm thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam, khuẩn ty của chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 trên môi trường PDA ở 25-30°C, 7-10 ngày có màu vàng.

Khoảng 0,5-1,5% khối lượng giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 so với khối lượng giá thể được cấy đều vào bề mặt của bịch giá thể bao gồm các thành phần (tính theo % khối lượng):

mùn cưa cây keo:	59-74%, tốt hơn là 65-70%, và tốt hơn là độ ẩm mùn cưa 55-65%
vôi tôi ($\text{Ca}(\text{OH})_2$):	1-3%
cám gạo:	8-13%
bột ngô:	12-16%
bột đậu tương:	4-7%
bột CaCO_3 :	1-2%,

trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm mùn cưa cây keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd.), mùn cưa keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) hoặc mùn cưa keo lai (keo tai tượng $\times$ keo lá tràm - *Acacia hybrid*).

Lượng giống nấm Thượng Hoàng để cấy vào nguyên liệu cho thích hợp; nếu lượng giống được cấy nhỏ hơn 0,5% (cấy ít giống nấm) sẽ làm tăng thời gian và tỷ lệ nhiễm bệnh của các bịch nguyên liệu sau khi cấy giống ở giai đoạn ươm sợi; nếu lượng giống nấm lớn hơn 1,5% (cấy nhiều giống nấm) có thể dẫn tới các hạt giống nấm bên trên (ở những vị trí không tiếp xúc trực tiếp với nguyên liệu) bị chết và là nguyên nhân cho các bệnh thứ phát hình thành, đặc biệt là nấm mốc.

Nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 sinh trưởng tốt ở nguyên liệu có độ ẩm từ 55-65%; nếu độ ẩm nguyên liệu thấp hơn 55% sẽ dẫn tới giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 sinh trưởng chậm hoặc không sinh trưởng; ngược lại nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 sẽ xuất hiện hiện tượng co hệ sợi (hay còn gọi là ngừng sinh trưởng) và tăng tỷ lệ nhiễm bệnh trong trường hợp độ ẩm nguyên liệu lớn hơn 65%.

Vôi tôi ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) và bột CaCO_3 là hai thành phần có vai trò tạo pH của nguyên liệu trong khoảng 6-7 (khoảng pH thích hợp cho nấm Thượng Hoàng NTH-PL4); nếu bổ sung hai thành phần này không thích hợp sẽ làm cho pH của nguyên liệu nhỏ 6 (nguyên liệu có tính axit) hoặc lớn 7 (nguyên liệu có tính kiềm), nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 sinh trưởng yếu đối với cả hai trường hợp nguyên liệu trên.

Dinh dưỡng bổ sung (cám gạo, bột ngô và bột đậu tương) có vai trò tăng dinh dưỡng cho mùn cưa khi nuôi trồng nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 trong điều kiện nhân tạo. Hàm lượng dinh dưỡng bổ sung ít sẽ ảnh hưởng đến năng suất nấm Thượng Hoàng nuôi trồng; ngược lại khi hàm lượng dinh dưỡng bổ sung quá nhiều sẽ làm tăng tỷ lệ nhiễm bệnh (chủ yếu mốc xanh và mốc đen) ở quá trình ươm hệ sợi sau khi cấy giống nấm.

Theo một phương án thực hiện, giá thể cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng bao gồm các thành phần (tính theo % khối lượng):

mùn cưa keo:	68%
--------------	-----

vôi tôi (Ca(OH)_2):	1%
cám gạo:	10%
bột ngô:	15%
bột đậu tương:	5%
bột CaCO_3 :	1%.

Sau đó, bịch đã cấy giống được ươm hệ sợi ở 25-30°C (không nên ươm sợi ở nhiệt độ trên 30°C), độ ẩm không khí 60-70% trong phòng tối. Đến ngày thứ 45-55, khi hệ sợi đã phủ kín đáy bịch và hệ sợi có màu vàng sẫm hoặc vàng cam, thì chuyển bịch hệ sợi nấm tới nhà nuôi trồng quả thể nấm để xử lý hệ sợi và chăm sóc ở công đoạn tiếp theo.

Ở giai đoạn ươm hệ sợi tốt nhất duy trì ở khoảng nhiệt độ từ 25-30°C; hệ sợi nấm ngừng sinh trưởng (không sinh trưởng) hoặc sinh trưởng chậm ở nhiệt độ thấp hơn 25°C; trong trường hợp nhiệt độ ươm sợi nằm khoảng lớn hơn 30 và nhỏ hơn 40°C thì hệ sợi nấm vẫn sinh trưởng nhưng thường tạo ra một lớp nước phủ ở bề mặt (do hiện tượng bay hơi nước từ giá thể) trên của bịch nấm, lớp nước này hoặc (i) gây chết sợi nấm, gây ra các bệnh thứ phát; (ii) hoặc làm ướt nút bông ở cổ nút tạo điều kiện cho các bệnh thứ phát thâm nhập từ ngoài vào bên trong nguyên liệu; hoặc (iii) làm giảm độ ẩm của nguyên liệu (phần bên dưới) dẫn đến hệ sợi nấm sinh trưởng chậm hơn.

Đối với độ ẩm không khí, nên duy trì độ ẩm bằng hoặc lớn hơn độ ẩm của nguyên liệu để tránh hiện tượng mất nước của giá thể khi độ ẩm không khí thấp; tuy nhiên nếu độ ẩm không khí phòng ươm sợi lớn hơn 70% sẽ làm tăng mật độ vi sinh vật gây bệnh (chủ yếu là nấm mốc), kết quả là làm tăng tỷ lệ nhiễm bệnh cho các bịch nấm trong giai đoạn ươm sợi.

(a2) Xử lý bịch hệ sợi nấm và chăm sóc quả thể nấm

Đặt các bịch hệ sợi nấm lên giá, khoảng cách giữa các bịch nấm tốt hơn là từ 3 đến 5 cm (không đặt các bịch nấm chồng lên nhau). Để thúc đẩy quá trình hình thành quả thể nấm Thượng Hoàng, tiến hành xử lý hệ sợi ở vị trí vai các bịch hệ sợi nấm để hình thành quả thể nấm bằng dao sắc, ví dụ dao rọc giấy deli 2057, lau dao bằng cồn ví dụ 70° trước và trong quá trình rạch. Cụ thể, rạch và loại bỏ lớp màng dai ở phần vai bịch nấm, tốt hơn là rạch theo hình chữ U, với độ sâu 0,2-0,4 cm, chiều dài 4-5 cm, chiều rộng khoảng 2,5-3 cm (lưu ý: không cắt bỏ lớp túi nylon); tiếp đến dùng dao rạch thêm hai đường hình chữ X bên trong vết rạch nêu trên, mỗi đường rạch có độ sâu 0,2-0,4 cm, rồi đặt miếng lớp nylon lại (Hình 5).

Màng dai được hình thành do các hệ sợi sơ cấp sinh trưởng từ giống nấm ban đầu bện chặt lại với nhau, để chồi quả thể nấm hình thành cần phải có sự kết hợp của ít nhất hai loại hệ sợi thứ cấp với nhau. Việc rạch và loại bỏ màng dai (hay còn gọi là sợi sơ cấp) sẽ tạo điều kiện hình thành sợi thứ cấp, từ đó hình thành chồi quả thể nấm.

Tốt hơn là, quá trình rạch các bịch hệ sợi nấm trong khu vực nuôi trồng nhân tạo diễn ra trong 1-2 ngày.

Sau khi rạch xong tất cả các bịch hệ sợi nấm, duy trì điều kiện nhà nuôi trồng quả thể nấm với độ ẩm không khí 97-100% ví dụ bằng máy phun sương mù, ánh sáng 300-400 lux, nhiệt độ 25-35°C, lượng khí CO₂ trong nhà nuôi trồng 0,03-0,05% nhằm thúc đẩy quá trình hình thành quả thể nấm Thượng Hoàng. Tốt hơn là, đến ngày thứ 4-7 sau khi rạch bịch nấm, tiến hành mở miệng lớp túi nylon ở vết rạch nhằm tạo điều kiện cho nấm sinh trưởng tốt hơn để hình thành nấm non. Quả thể nấm non (hay còn gọi chồi nấm) của nấm Thượng Hoàng bắt đầu xuất hiện từ 25 đến 35 ngày tiếp theo sau rạch bịch. Sau khi quả thể nấm Thượng Hoàng non hình thành, tiếp tục duy trì điều kiện nuôi trồng với độ ẩm không khí 97-100%, ánh sáng 300-400 lux, nhiệt độ 25-35°C, lượng khí CO₂ 0,03-0,05% cho đến khi quả thể nấm hình thành hoàn chỉnh có đặc điểm hình móng ngựa hoặc elíp, mặt trên có màu vàng, viền xung quanh màu trắng sữa và không có cuống nấm. Khi quả thể nấm non hình thành hoàn chỉnh sau 2,5-3 tháng kể từ lúc rạch và loại bỏ lớp màng dai, duy trì điều kiện nuôi trồng với độ ẩm không khí 90-93%, ánh sáng 300-400 lux, nhiệt độ 25-35°C, lượng khí CO₂ 0,03-0,05% cho đến khi nấm đến độ tuổi thu hái.

Quả thể nấm non khi mới hình thành chứa đựng khoảng hơn 95% là nước và được bao bọc bởi một lớp màng mỏng (hay còn gọi da nấm), các phân tử nước từ không khí được vận chuyển thụ động qua lớp màng mỏng vào bên trong quả thể nấm non giúp đảm bảo các phản ứng sinh lý, sinh hóa của các tế bào bên trong diễn ra bình thường; nếu độ ẩm không khí xuống thấp sẽ làm cho các phân tử nước có trong quả thể nấm non bị mất nước thụ động qua lớp màng mỏng, điều này dẫn đến quả thể nấm bị teo và chết, do vậy cần duy trì độ ẩm không khí dao động từ 97-100% từ khi rạch và loại bỏ lớp dai đến 2,5-3 tháng tiếp theo. Sau khi quả thể nấm Thượng Hoàng hình thành hoàn chỉnh, lượng nước có trong quả thể nấm chiếm khoảng 85-90% do vậy nên giảm độ ẩm không khí dao động từ 90-93% để đảm bảo hiệu quả sản xuất, cũng như giảm vi sinh vật có thể gây hại cho quả thể nấm.

Theo một phương án thực hiện, quy trình theo sáng chế có thể còn bao gồm công đoạn:

(a3) Thu hái quả thể nấm Thượng Hoàng

Khoảng 175-215 ngày (tương đương khoảng 6-7 tháng) sau khi rạch bịch, quả thể nấm Thượng Hoàng có hình móng ngựa hoặc hình elíp, có màu vàng sẫm đồng nhất (không còn viền ngoài màu trắng), tiến hành thu quả thể nấm.

Tốt hơn là, quả thể nấm sau thu hoạch được sấy khô đến độ ẩm 6-8% và được bảo quản trong túi nylon kín ở nơi khô ráo và tránh ánh sáng trực xạ.

Theo một phương án thực hiện, quả thể nấm sau thu hoạch được sấy theo chu trình nhiệt bao gồm:

Giai đoạn 1: 38-42°C trong 2-4 giờ.

Giai đoạn 2: 53-57°C trong 14-16 giờ.

Giai đoạn 3: 63-67°C trong 1,5-2,5 giờ.

Theo một phương án thực hiện, trong đó quy trình theo sáng chế còn bao gồm công đoạn:

(a) Chuẩn bị giá thể mùn cưa cây keo cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4.

Công đoạn này được tiến hành trước khi tiến hành công đoạn (a1). Mùn cưa tốt hơn là được loại bỏ các sinh khối thực vật lớn có thể sẽ làm thủng/rách túi nylon trong quá trình phân phối nguyên liệu vào túi, rồi được bổ sung vôi tôi, nước sạch, trộn đều, ủ trong vòng 18-24 ngày, tốt hơn là cứ 6-8 ngày tiến hành đảo trộn khối ủ một lần. Kiểm tra và duy trì độ ẩm của khối ủ ở 55-65%. Nếu thời ủ thấp hơn 18 ngày, không đủ thời gian để vôi thấm đều vào mùn cưa, cũng như tiêu diệt một phần mầm bệnh vốn có trong mùn cưa nhờ nhiệt độ khối ủ cao (khoảng 60-65°C); nếu thời gian ủ kéo dài hơn 24 ngày thì mùn cưa có thể bị mục và giảm dinh dưỡng.

Sau 18-24 ngày ủ, bổ sung các thành phần dinh dưỡng gồm cám gạo, bột ngô, bột đậu tương, bột CaCO_3 vào khối ủ nêu trên. Trộn đều các thành phần dinh dưỡng bổ sung với mùn cưa đã ủ, thu được giá thể mùn cưa cây keo cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4.

Theo một phương án thực hiện, công đoạn (a) còn bao gồm bước tạo ra bịch giá thể bằng cách phân phối giá thể mùn cưa thu được vào túi nylon, ví dụ túi nylon chịu nhiệt có kích thước 22 × 35 cm (chiều rộng × chiều dài), theo đó mỗi bịch giá thể có trọng lượng 1,5-1,8 kg. Tạo cổ nút nhồi bông không thấm nước và đóng nắp lại trước khi khử trùng ở 95-100°C trong 14-16 giờ. Sau đó, tốt hơn là chờ đến khi nhiệt độ trong buồng

khử trùng khoảng 70°C, chuyển bịch giá thể đến phòng cấy giống, để bịch giá thể nguội tự nhiên trong một ngày trước khi cấy giống nấm.

Như được đề cập ở bước (a1) nêu trên, chủng giống nấm Thượng Hoàng được sử dụng trong quy trình theo sáng chế được phân lập, định danh phân tử từ quả thể nấm thu thập trong tự nhiên.

Quá trình phân lập và định danh được minh họa trên Hình 1.

Môi trường dinh dưỡng PDA (Potato Dextrose Agar) gồm các thành phần (g/l): dextroza 20; chất chiết khoai tây 4; aga 15-20. Môi trường này được khử trùng ướn ở 121°C trong 15 phút, sau đó được bổ sung kháng sinh ampicillin với lượng để có nồng độ cuối là 50 mg/L vào môi trường PDA có nhiệt độ 60°C trước khi phân phối môi trường vào đĩa petri.

Quả thể nấm Thượng Hoàng thu thập trong tự nhiên được lau sạch bề mặt trên và dưới bằng etanol 70%. Tiếp đến loại bỏ viền xung quanh (có thể chứa nhiều tạp nhiễm vi sinh vật từ môi trường sống trong tự nhiên) có độ dày 2 mm, cắt nhỏ phần bên trong quả thể nấm thành các mẫu có kích thước 0,5 × 0,5 cm (chiều dài × chiều rộng) rồi đặt lên bề mặt môi trường PDA thạch đĩa đã chuẩn bị có bổ sung kháng sinh ampicillin. Sau đó, các đĩa thạch đã cấy mẫu được nuôi ở 25°C trong 10 đến 14 ngày. Khuẩn ty tinh khiết của chủng NTH-PL4 có màu vàng chanh trên môi trường PDA ở 25°C, 10 ngày (Hình 1) và được bảo quản trong glyxerol có nồng độ cuối cùng 10% ở -86°C (giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 gốc hay còn gọi là giống nấm F₀) tại Viện Khoa học Sự sống – Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.

Quá trình định danh phân tử chủng nấm NTH-PL4 được thực hiện như sau: Khuẩn ty tinh khiết của chủng NTH-PL4 được nuôi cấy trong môi trường lỏng đường khoai tây (Potato Dextrose) ở 25°C, 160 vòng/phút trong 48 giờ. Ly tâm ở 13.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, tiếp đến rửa sinh khối ba lần với dung dịch đệm TE 1X (Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid). Khoảng 30 mg hệ sợi sau khi được đồng nhất trong nitor lỏng được hòa vào trong 0,5 ml dung dịch đệm TE trong ống eppendorf, trộn đều bằng micro-pipet, tiếp đến bổ sung thêm 15 µL lysozym có nồng độ 10 mg/mL, ủ ở 37°C trong 45 phút. Sau đó, 20 µL natri dodexyl sulfat 10%, 10 µL proteinaza K nồng độ 20 mg/mL được bổ sung vào ống eppendorf chứa mẫu, ủ trong 30-45 phút ở 37°C. Tiếp theo 100 µL NaCl 5M và 80 µL hỗn dịch hexadexyltrimetylamonium bromua 10%/NaCl 5M (1:1, thể tích/thể tích) được bổ sung vào mẫu, trộn đều, ủ 65°C trong 10 phút. Sau 10 phút, bổ sung thêm hỗn dịch phenol/chloroform/rượu iso-amyl (25/24/1, thể tích/thể

tích), lắc nhẹ bằng tay từ 3 đến 5 phút, ly tâm 13.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút; hút phần dịch nổi chứa đựng DNA tổng số sang ống eppendorf mới, rồi bổ sung hai lần thể tích etanol lạnh có nồng độ từ 95% đến khan tuyệt đối, ly tâm 13.000 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút. Thu cặn DNA tổng số và rửa từ 2 đến 3 lần bằng etanol 70%, làm khô, hòa trong dung dịch đệm TE, giữ ở -20°C.

Đoạn gen 18S rRNA, Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) – 5,8S rRNA – ITS 2 và 28S rRNA của chủng NTH-PL4 được khuếch đại bằng phản ứng PCR (Polymerase chain reaction) sử dụng cặp mồi ITS1 xuôi (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và mồi ITS4 ngược (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White và cộng sự, 1990) với các thành phần của phản ứng PCR được liệt kê ở Bảng 1 dưới đây. Chu trình của phản ứng PCR được tiến hành như sau: (i) Biến tính DNA tổng số ở 96°C trong 5 phút; (ii) 30 chu trình sau được cài đặt: biến tính DNA mẫu ở 95°C trong 1 phút, gắn mồi ở 55°C trong 1 phút và kéo dài trình tự DNA đích ở 72°C trong 1 phút; và (iii) chu trình kéo dài chuỗi ở 72°C trong 10 phút.

Bảng 1. Thành phần của phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích sử dụng (μl)
Đệm PCR 1X chứa 2 mM MgCl ₂	2,5
dNTPs 2mM mỗi loại	2,5
Mồi ITS1 xuôi (10μM)	1
Mồi ITS4 ngược (10μM)	1
Taq polymerase (5U/μl)	1
DNA mẫu (10 ng)	2
Nước khử ion	15
<i>Tổng thể tích</i>	<i>25</i>

Sự tương đồng về trình tự gen 18S rRNA, Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) – 5,8S rRNA – ITS 2 và 28S rRNA của chủng NTH-PL4 với các chủng nấm đã công bố được so sánh dựa trên phần mềm NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Bảng 2) và được đăng ký trên ngân hàng GenBank với mã số truy nhập là MW757264. Sơ đồ phả hệ của chủng NTH-PL4 sử dụng trong sáng chế này được xây dựng dựa trên phần mềm chuyên biệt, ví dụ như MEGA 7 (Hình 2).

Bảng 2. So sánh sự tương đồng về trình tự gen 18S rRNA, ITS 1 – 5, 8S rRNA – ITS 2, 28S rRNA của chủng NTH-PL4 (MW757264) với các chủng nấm công bố trên ngân hàng dữ liệu GenBank

Chủng nấm gần nhất	Mức độ tương đồng (%)
<i>Phellinus linteus</i> KCTC 6190 (AF077678)	99,87
<i>Phellinus linteus</i> Namsan No.1 (AF080457)	99,73
<i>Inonotus linteus</i> FS656161 (HM584806)	99,60
<i>Inonotus linteus</i> PL0801 (FJ940906)	99,60
<i>Phellinus linteus</i> DGUM 25003 (AF082102)	99,60
<i>Sanghuangporus sanghuang</i> S3 (MN153568)	99,60
<i>Inonotus linteus</i> KFDA 016 (AY436626)	99,60
<i>Tropicoporus linteus</i> HN5530 (MW714847)	99,59
<i>Tropicoporus linteus</i> HN5222 (MT904657)	99,59
<i>Inonotus linteus</i> FS656160 (GU903004)	99,47
<i>Inonotus linteus</i> KAB-PL-01 (DQ462333)	99,47
<i>Phellinus linteus</i> DGUM 25004 (AF080458)	99,47

Theo một phương án thực hiện của công đoạn (a1), trong đó giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 là giống nấm cấp 3 được nhân như sau:

(i) Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 được chọn từ nhóm bao gồm PDA, MCM, MEA, YMA cải tiến với thành phần như trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Thành phần môi trường dinh dưỡng cải tiến sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4

Thành phần (Tính theo 1 lít môi trường)	Môi trường dinh dưỡng cải tiến			
	PDA	MCM	MEA	YMA
Dextroza (g)	20	20	20	10
Chất chiết khoai tây (g)	4			
Chất chiết thô men (g)		2		3
Chất chiết mạch nha (g)			20	3
Pepton (g)		1	1	5
MgSO ₄ .7H ₂ O (g)		0,5		
KH ₂ PO ₄ (g)		0,46		

K ₂ HPO ₄ (g)		1		
Aga (g)	20	20	20	20
Dịch tách chiết cây dâu (ml)	10-15	10-15	10-15	10-15
Ampicillin (mg; tùy ý)	40-70	40-70	40-70	40-70
Nước cất vừa đủ (lít)	1	1	1	1
pH	4-8, tốt nhất là 6-6,5	4-8, tốt nhất là 6-6,5	4-8, tốt nhất là 6-6,5	4-8, tốt nhất là 6-6,5

Trong Bảng trên, MCM (Mushroom Complete Medium): môi trường nấm hoàn chỉnh, MEA (Malt Extract Agar): môi trường mạch nha, YMA (Yeast Malt Agar): môi trường mạch nha-nấm men.

Theo một phương án thực hiện cụ thể để làm ví dụ, trong đó các môi trường dinh dưỡng PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 có thành phần như sau:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 20g,
 chất chiết khoai tây: 4g,
 dịch tách chiết cây dâu: 10ml,
 ampicillin: 50mg,
 aga: 20g,
 nước cất vừa đủ: 1 lít,
 pH: 6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 20g,
 chất chiết thô men: 2g,
 pepton: 1g,
 MgSO₄.7H₂O: 0,5g,
 KH₂PO₄: 0,46g,
 K₂HPO₄: 1g,
 dịch tách chiết cây dâu: 10ml,
 ampicillin: 50mg,
 aga: 20g,
 nước cất vừa đủ: 1 lít,

pH: 6,5;

- môi trường dinh dưỡng MEA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 20g,

chất chiết mạch nha: 20g,

pepton: 1g,

aga: 20g,

dịch tách chiết cây dâu: 10ml,

ampicillin: 50mg,

nước cất vừa đủ: 1 lít,

pH: 6,5;

- môi trường dinh dưỡng YMA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 10g,

chất chiết thô men: 3g,

chất chiết mạch nha: 3g,

pepton: 5g,

aga: 20g,

dịch tách chiết cây dâu: 10ml,

ampicillin: 50mg,

nước cất vừa đủ: 1 lít,

pH: 6,5.

Theo sáng chế, dịch tách chiết cây dâu được bổ sung vào các môi trường trên khi môi trường có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 đến 65°C, tốt hơn là khoảng 60°C, không nên bổ sung khi nhiệt độ của môi trường trên 60°C vì một số hoạt chất dễ biến tính bởi nhiệt độ (ví dụ như vitamin) sẽ bị phá hủy.

Giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 gốc (giống nấm F₀) sử dụng trong quy trình theo sáng chế được bảo ở điều kiện -86°C (để duy trì trạng thái tiềm sinh hay còn gọi là ngừng sinh trưởng hoặc sinh trưởng rất chậm). Tuy nhiên, theo thời gian bảo quản, giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 gốc thường xảy ra hiện tượng bị thoái hóa giống, với biểu hiện như sinh trưởng chậm hoặc hoạt chất sinh học giảm so với thời điểm ban đầu. Để đảm bảo về chất lượng giống nấm, thành phần dinh dưỡng của vật chủ mà ở đó nấm Thượng Hoàng được phát hiện trong tự nhiên nên được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Trong tự nhiên, vật chủ của nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 được sử dụng trong sáng chế

là cây dâu (*Morus alba*)), theo đó dịch tách chiết cây dâu sẽ được bổ sung vào các môi trường nuôi cấy nêu trên như một thành phần dinh dưỡng.

Để minh họa cho tác động của dịch tách chiết cây dâu đến sinh trưởng và hoạt chất sinh học của hệ sợi nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 gốc (giống nấm F₀) bảo quản ở -86°C trong 24 tháng được cấy chuyển đến môi trường, ví dụ, PDA và PDA cải tiến, nuôi lắc ở 25°C, 7 ngày; thu nhận sinh khối hệ sợi nấm Thượng Hoàng và sấy khô ở nhiệt độ 65-70°C trong 36 giờ; xác định khối lượng hệ sợi và hoạt chất sinh học có trong hệ sợi khô (hệ sợi khô có độ ẩm 7%). Các kết quả tương ứng được thể hiện ở Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Tác động của dịch tách chiết cây dâu đến sinh trưởng và hoạt chất sinh học của hệ sợi nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 bảo quản ở -86°C trong 24 tháng

Chỉ tiêu đánh giá	Môi trường	
	PDA	PDA cải tiến
Sinh khối hệ sợi (mg khô/100 ml môi trường)	0,71 [*]	0,88 [*]
β -glucan (%)	0,63 ^{**}	0,71 ^{**}
Hispidin (%)	0,05 ^{***}	0,08 ^{***}

* $P=0,039$; ** $P=0,037$; *** $P=0,015$.

Theo một phương án thực hiện để làm ví dụ, trong đó dịch tách chiết cây dâu thu được bằng quy trình tách chiết như sau:

Thân và cành cây dâu tươi, tốt hơn là 3-5 năm tuổi, được cắt thành các phoi mỏng có độ dày 1-3 mm, dài từ 2-5 cm, làm khô ở nhiệt độ phòng 2-3 ngày đến độ ẩm khoảng 40-50% (không làm khô dưới ánh nắng trực xạ, điều này có thể dẫn tới một số chất bị ôxy hóa dưới tác động của tia UV).

Tiếp đến, thành phần dinh dưỡng của phoi cây dâu được tách chiết qua đêm bằng dung dịch axetonitril trong nước có nồng độ 60-80% thể tích, tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước được sử dụng nằm trong khoảng từ 1,1 đến 1,5 lít trên mỗi kg phoi cây dâu, lắc đều, tốt hơn là ở 100-120 vòng/phút, ở nhiệt độ phòng.

Quá trình tách chiết được thực hiện thêm ít nhất một lần nữa, nhưng mỗi lần trong thời gian lắc 1-1,5 giờ và tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước được sử dụng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,3 lít trên mỗi kg phoi cây dâu.

Dịch tách chiết của mỗi lần thực hiện được lọc qua giấy lọc, ví dụ giấy lọc whatman có đường kính 90mm.

Trộn lẫn các dịch tách chiết thu được và tiến hành bay hơi ở nhiệt độ dưới 50°C bằng máy cô quay chân không.

Hòa cạn thu được trong hỗn dịch nước:dimetyl sulfoxit theo tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng (5-7):(3-5), trong đó tỷ lệ hỗn dịch được sử dụng nằm trong khoảng từ 2 đến 3 ml trên mỗi g cặn, sau đó tốt hơn là lọc bỏ cặn bẩn qua màng lọc, ví dụ có đường kính lỗ màng 0,22 μm , thu được dịch tách chiết cây dâu.

Theo một phương án thực hiện để làm ví dụ, trong đó thành phần dinh dưỡng của phôi cây dâu được tách chiết qua đêm bằng dung dịch axetonitril trong nước có nồng độ 70% thể tích, tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước là 1,3 lít trên mỗi kg phôi cây dâu. Quá trình tách chiết được thực hiện một lần nữa, nhưng trong thời gian lắc 1-1,5 giờ và tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước là 1 lít trên mỗi kg phôi cây dâu. Dịch tách chiết của mỗi lần thực hiện được lọc qua giấy lọc whatman có đường kính 90mm. Trộn lẫn hai dịch tách chiết thu được và tiến hành bay hơi ở nhiệt độ dưới 40°C bằng máy cô quay chân không. Hòa cạn thu được trong 40 ml hỗn dịch nước:dimetyl sulfoxit theo tỷ lệ 6:4 (thể tích/thể tích) và lọc bỏ cặn bẩn qua màng lọc có đường kính lỗ màng 0,22 μm , thu được dịch tách chiết cây dâu.

Do trong quá trình nuôi cấy, vi khuẩn từ môi trường ngoài không khí, từ dịch chiết tách cây dâu, từ thao tác trong quá trình thực hiện có thể lây nhiễm vào môi trường nuôi cấy, do đó để giải quyết vấn đề này, sáng chế đề xuất việc bổ sung ampicillin có nồng độ 40-70mg/lít môi trường.

(ii) Nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, bao gồm các bước, như được minh họa trên Hình 3:

giã đông giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 (giống nấm F_0) bảo quản lạnh sâu - 86°C ở nhiệt độ phòng trong 4-6 giờ, rồi cấy sang môi trường thạch nghiêng PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở 15-40°C, tốt nhất là 25-30°C, từ 7-10 ngày, thu được giống nấm cấp 1 hay còn gọi F_1 , giống nấm cấp 1 này có thể bảo quản được ở 4-6°C trong 3 tháng,

cắt giống nấm cấp 1 theo hình dạng và kích thước nhất định, ví dụ cắt bằng dao thành các hình vuông có kích thước 1-1,5 $\times$ 1-1,5 cm (chiều dài $\times$ chiều rộng), rồi cấy chuyển sang môi trường MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở 25-30°C trong 7-10 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA này, thu được giống nấm cấp 2 hay còn gọi là F_2 ,

sau khi hệ sợi (giống nấm cấp 2) của chủng NTH-PL4 sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA, cắt hệ sợi nấm theo hình dạng và kích thước nhất định, ví dụ bằng dao thành các hình vuông có kích thước $1,5-2 \times 1,5-2$ cm (chiều dài $\times$ chiều rộng), cấy chuyển sang môi trường thóc đựng trong chai nhựa hoặc chai thủy tinh chẳng hạn, và

nuôi các chai thóc chứa giống nấm ở $25-30^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 60-70%, trong phòng tối từ 35 đến 40 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín phần thóc ở đáy chai, thu được giống nấm cấp 3 hay còn gọi là giống sản xuất hoặc F_3 , để dùng cho công đoạn (a1) cấy giống nấm và ương hệ sợi nấm.

Theo một phương án thực hiện, trong đó ở bước (ii), môi trường được sử dụng để nhân giống nấm cấp 2 khác với môi trường được sử dụng để nhân giống cấp 1.

Theo một phương án thực hiện để làm ví dụ, trong đó cơ chất thóc, ví dụ thóc Khang dân, được sử dụng để nhân giống nấm cấp 3 được xử lý bằng cách:

ngâm thóc trong nước sạch 24-48 giờ ở nhiệt độ phòng, tốt hơn là sau đó loại bỏ thóc lép và rửa sạch nhiều lần, ví dụ 3 lần bằng nước,

luộc thóc sau khi ngâm cho tới khi hạt thóc nứt vỏ áo trấu, tiếp đến để thóc ráo nước và nguội tự nhiên, tốt hơn là để qua đêm, và

bổ sung vào thóc thành phần dinh dưỡng dextroza và bột CaCO_3 , trộn đều, tạo thành giá thể thóc cho nuôi giống nấm cấp 3 - giống nấm sản xuất.

Theo một phương án thực hiện, trong đó giá thể thóc còn được xử lý bằng cách:

cho giá thể thóc vào chai, ví dụ với lượng 300-350g thóc/chai,

khử trùng ở 121°C trong 2 giờ hoặc $95-100^{\circ}\text{C}$ trong 14-16 giờ, và

tốt hơn là, để nguội tự nhiên giá thể thóc qua đêm trước khi cấy giống nấm cấp 2.

Theo một phương án thực hiện, trong đó các thành phần của giá thể thóc bao gồm (tính theo % khối lượng):

Thóc đã luộc	96-98,8%
Dextroza	1-3%
Bột CaCO_3	0,2-1%

Theo một phương án thực hiện, các thành phần của giá thể thóc bao gồm (tính theo % khối lượng):

Thóc đã luộc	98%
Dextroza	1,5%
Bột CaCO_3	0,5%.

Trên cơ chất thóc, giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 có màu vàng nhạt (Hình 3).

Theo một phương án thực hiện của bước (ii) nêu trên, trong đó bước này còn bao gồm việc phân lập chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 từ quả thể nấm thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam, để thu được giống nấm gốc F_0 như nêu trên, trong đó việc phân lập này được thực hiện theo quy trình phân lập đã mô tả ở trên.

Theo khía cạnh khác thứ hai, sáng chế đề xuất quả thể nấm Thượng Hoàng thu được từ phương án bất kỳ trong số các phương án của quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 theo khía cạnh thứ nhất nêu trên. Quả thể nấm Thượng Hoàng thu được có màu vàng sẫm, hình móng ngựa hoặc elíp. Trọng lượng, kích thước và thành phần hoạt chất của quả thể nấm là như sau: trọng lượng khô 19,2-20,8 gram, chiều dài 7,1-7,5 cm, chiều rộng 4,8-5,1 cm, độ dày 2,2-2,3 cm, chứa hoạt chất polysacarit và hispidin lần lượt là 1,18-1,21 và 0,07-0,08%.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất giá thể mùn cưa cây keo cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, quy trình này bao gồm các bước:

phối trộn mùn cưa cây keo với vôi tôi, nước sạch, ủ trong vòng 18-24 ngày, tốt hơn là cứ 6-8 ngày tiến hành đảo trộn khối ủ một lần, duy trì độ ẩm của khối ủ ở 55-65%;

sau 18-24 ngày ủ, bổ sung các thành phần dinh dưỡng gồm cám gạo, bột ngô, bột đậu tương, bột CaCO_3 vào khối ủ nêu trên, trộn đều, thu được giá thể mùn cưa cây keo cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, trong đó:

các thành phần của giá thể được phối trộn ở các bước nêu trên bao gồm (tính theo % khối lượng):

mùn cưa cây keo:	59-74%, tốt hơn là 65-70%, tốt hơn là độ ẩm mùn cưa 55-65%
vôi tôi ($\text{Ca}(\text{OH})_2$):	1-3%
cám gạo:	8-13%
bột ngô:	12-16%
bột đậu tương:	4-7%
bột CaCO_3 :	1-2%,

trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm mùn cưa cây keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd.), mùn cưa keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) hoặc mùn cưa keo lai (keo tai tượng $\times$ keo lá tràm - *Acacia hybrid*).

Theo một phương án thực hiện của quy trình theo khía cạnh thứ ba, trong đó các thành phần của giá thể được phối trộn ở các bước nêu trên bao gồm (tính theo % khối lượng):

mùn cưa keo:	68%
vôi tôi:	1%
cám gạo:	10%
bột ngô:	15%
bột đậu tương:	5%
bột CaCO ₃ :	1%.

Theo một phương án thực hiện của quy trình theo khía cạnh thứ ba, trong đó quy trình này còn bao gồm bước:

tạo ra bịch giá thể bằng cách phân phối giá thể mùn cưa thu được vào túi nylon, tạo cổ nút nhồi bông không thấm nước và đóng nắp lại trước khi khử trùng ở 95-100°C trong 14-16 giờ, sau đó tốt hơn là chờ đến khi nhiệt độ trong buồng khử trùng khoảng 70°C, chuyển bịch giá thể đến phòng cấy giống, để bịch giá thể nguội tự nhiên trong một ngày trước khi cấy giống nấm.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất giá thể mùn cưa cây keo cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, thu được bởi phương án bất kỳ trong số các phương án của quy trình theo khía cạnh thứ ba nêu trên.

Theo một phương án thực hiện của giá thể theo khía cạnh thứ tư, trong đó các thành phần của giá thể bao gồm (tính theo % khối lượng):

mùn cưa cây keo:	59-74%, tốt hơn là 65-70%, tốt hơn là độ ẩm mùn cưa 55-65%
vôi tôi (Ca(OH) ₂):	1-3%
cám gạo:	8-13%
bột ngô:	12-16%
bột đậu tương:	4-7%
bột CaCO ₃ :	1-2%,

trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm mùn cưa cây keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd.), mùn cưa keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) hoặc mùn cưa keo lai (keo tai tượng × keo lá tràm - *Acacia hybrid*).

Theo một phương án thực hiện của giá thể theo khía cạnh thứ tư, trong đó các thành phần của giá thể bao gồm (tính theo % khối lượng):

mùn cưa keo:	68%
vôi tôi:	1%
cám gạo:	10%
bột ngô:	15%

bột đậu tương: 5%

bột CaCO_3 : 1%.

Theo một phương án thực hiện của giá thể theo khía cạnh thứ tư, trong đó giá thể này được đóng trong túi nylon dưới dạng bịch giá thể.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, quy trình này bao gồm các công đoạn:

(i) Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 được chọn từ nhóm bao gồm PDA, MCM, MEA, YMA cải tiến với thành phần như trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Thành phần môi trường dinh dưỡng cải tiến sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4

Thành phần (Tính theo 1 lít môi trường)	Môi trường dinh dưỡng cải tiến			
	PDA	MCM	MEA	YMA
Dextroza (g)	20	20	20	10
Chất chiết khoai tây (g)	4			
Chất chiết thô men (g)		2		3
Chất chiết mạch nha (g)			20	3
Pepton (g)		1	1	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g)		0,5		
KH_2PO_4 (g)		0,46		
K_2HPO_4 (g)		1		
Aga (g)	20	20	20	20
Dịch tách chiết cây dâu (ml)	10-15	10-15	10-15	10-15
Ampicillin (mg; tùy ý)	40-70	40-70	40-70	40-70
Nước cất vừa đủ (lít)	1	1	1	1
pH	4-8, tốt nhất là 6-6,5	4-8, tốt nhất là 6-6,5	4-8, tốt nhất là 6-6,5	4-8, tốt nhất là 6-6,5

Theo một phương án thực hiện của quy trình theo khía cạnh thứ năm, trong đó ở công đoạn (i), các môi trường PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 có thành phần như sau:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết khoai tây:	4g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
aga:	20g,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết thô men:	2g,
pepton:	1g,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5g,
KH ₂ PO ₄ :	0,46g,
K ₂ HPO ₄ :	1g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
aga:	20g,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng MEA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết mạch nha:	20g,
pepton:	1g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng YMA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	10g,
chất chiết thô men:	3g,
chất chiết mạch nha:	3g,
pepton:	5g,

aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5.

(ii) Nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, bao gồm các bước, như được minh họa trên Hình 3:

giã đông giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 gốc (giống nấm F_0) bảo quản lạnh sâu -86°C ở nhiệt độ phòng trong 4-6 giờ, rồi cấy sang môi trường thạch nghiêng PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở $15-40^{\circ}\text{C}$, tốt nhất là $25-30^{\circ}\text{C}$, từ 7-10 ngày, thu được giống nấm cấp 1 hay còn gọi F_1 , giống nấm cấp 1 này có thể bảo quản được ở $4-6^{\circ}\text{C}$ trong 3 tháng,

cắt giống nấm cấp 1 theo hình dạng và kích thước nhất định, ví dụ cắt bằng dao thành các hình vuông có kích thước $1-1,5 \times 1-1,5$ cm (chiều dài $\times$ chiều rộng), rồi cấy chuyển sang môi trường MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở $25-30^{\circ}\text{C}$ trong 7-10 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA, thu được giống nấm cấp 2 hay còn gọi là F_2 ,

sau khi hệ sợi (giống nấm cấp 2) của chủng NTH-PL4 sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA, cắt hệ sợi nấm theo hình dạng và kích thước nhất định, ví dụ bằng dao thành các hình vuông có kích thước $1,5-2 \times 1,5-2$ cm (chiều dài $\times$ chiều rộng), cấy chuyển sang môi trường thóc đựng trong chai nhựa hoặc chai thủy tinh chẳng hạn, và

nuôi các chai thóc chứa giống nấm ở $25-30^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 60-70%, trong phòng tối từ 35 đến 40 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín phần thóc ở đáy chai, thu được giống nấm cấp 3 hay còn gọi là giống sản xuất hoặc F_3 , để dùng cho công đoạn (a1) cấy giống nấm và ươm hệ sợi nấm.

Theo một phương án thực hiện của quy trình theo khía cạnh thứ năm, trong đó ở công đoạn (ii), môi trường được sử dụng để nhân giống nấm cấp 2 khác với môi trường được sử dụng để nhân giống cấp 1.

Theo một phương án thực hiện của quy trình theo khía cạnh thứ năm, trong đó ở công đoạn (ii), cơ chất thóc, ví dụ thóc Khang dân, được sử dụng để nhân giống nấm cấp 3 được xử lý bằng cách:

ngâm thóc trong nước sạch 24-48 giờ ở nhiệt độ phòng, tốt hơn là sau đó loại bỏ thóc lép và rửa sạch nhiều lần, ví dụ 3 lần bằng nước,

luộc thóc sau khi ngâm cho tới khi hạt thóc nứt vỏ áo trấu, tiếp đến để thóc ráo nước và nguội tự nhiên, tốt hơn là để qua đêm, và

bổ sung vào thóc thành phần dinh dưỡng dextroza và bột CaCO_3 , trộn đều, tạo thành giá thể thóc cho nuôi giống nấm cấp 3 - giống nấm sản xuất.

Theo một phương án thực hiện của quy trình theo khía cạnh thứ năm, trong đó công đoạn (ii) còn bao gồm các bước:

cho giá thể thóc vào chai, ví dụ với lượng 300-350g thóc/chai,

khử trùng ở 121°C trong 2 giờ hoặc $95-100^\circ\text{C}$ trong 14-16 giờ, và

tốt hơn là, để nguội tự nhiên giá thể thóc qua đêm trước khi cấy giống nấm cấp 2.

Theo một phương án thực hiện của quy trình theo khía cạnh thứ năm, trong đó ở công đoạn (ii), các thành phần của giá thể thóc bao gồm (tính theo % khối lượng):

Thóc đã luộc 96-98,8%

Dextroza 1-3%

Bột CaCO_3 0,2-1%

Theo một phương án thực hiện của quy trình theo khía cạnh thứ năm, trong đó ở công đoạn (ii), các thành phần của giá thể thóc bao gồm (tính theo % khối lượng):

Thóc đã luộc 98%

Dextroza 1,5%

Bột CaCO_3 0,5%.

Theo một phương án thực hiện của quy trình theo khía cạnh thứ năm, trong đó công đoạn (ii) còn bao gồm bước phân lập chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 từ quả thể nấm thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam, để thu được giống nấm F0 như nêu trên, trong đó bước phân lập này được thực hiện theo quy trình phân lập như đã mô tả ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Thực hiện với mùn cưa của keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd).

Mùn cưa keo tai tượng (Độ ẩm 60%) 340kg, vôi 5kg, phủ bạt và ủ trong vòng 21 ngày. Sau 21 ngày bổ sung thêm cám gạo 50kg, bột ngô 75kg, bột đậu tương 25kg và bột CaCO_3 5kg được trộn vào nguyên liệu đã ủ. Phân phối nguyên liệu vào các túi nylon chịu nhiệt có kích thước 22×35 cm (chiều rộng $\times$ chiều dài), mỗi bịch giá thể có trọng lượng 1,5-1,8 kg. Tạo cổ nút nhồi bông không thấm nước và đóng nắp cho các bịch giá thể

trước khi khử trùng ở 95°C trong 15 giờ. Sau đó, tốt hơn là chờ đến khi nhiệt độ trong buồng khử trùng khoảng 70°C, chuyển các bịch nguyên liệu đến phòng cấy giống, để các bịch nguyên liệu nguội tự nhiên trong một ngày trước khi cấy giống nấm.

Khoảng 10g giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 được cấy đều vào bề mặt của các bịch giá thể. Sau đó, các bịch đã cấy giống được ươm hệ sợi ở 25°C (không nên ươm sợi ở nhiệt độ trên 30°C), độ ẩm 60% trong phòng tối. Ở giai đoạn này, có khoảng 4,5% số bịch bị nhiễm bệnh (thường nhiễm mốc đen, mốc xanh và mốc vàng hoa cau) xuất hiện chủ yếu từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 15 sau khi cấy giống.

Đến ngày thứ 47 sau khi cấy giống nấm, khi hệ sợi đã phủ kín đáy bịch và hệ sợi có màu vàng sẫm hoặc vàng cam, thì chuyển bịch hệ sợi nấm sang nhà nuôi trồng quả thể. Đặt bịch hệ sợi nấm trên giá theo chiều thẳng đứng (không xếp chồng bịch nấm lên nhau), cổ nút quay lên trên, khoảng cách giữa các bịch nấm từ 3 đến 5 cm.

Dùng dao sắc rạch ở phần vai các bịch sợi nấm theo vết rạch hình chữ u với độ sâu khoảng 0,2 cm, chiều dài khoảng 4 cm, chiều rộng khoảng 2,5 cm (lưu ý: không cắt bỏ lớp túi nylon); tiếp đến dùng dao rạch thêm hai đường hình chữ X bên trong vết rạch hình chữ U, mỗi đường rạch có độ sâu khoảng 0,2 cm, rồi đặt lại miếng lớp nylon (Hình 5). Duy trì điều kiện nuôi trồng với ánh sáng 300 lux, độ ẩm không khí 97%, nhiệt độ 28°C, lượng khí CO₂ luôn ở mức 0,03-0,05% nhằm thúc đẩy quá trình hình thành hạch quả thể nấm Thượng Hoàng. Ở giai đoạn này, khoảng 3,1% số bịch bị nhiễm mốc đen, mốc xanh ở vết rạch. Loại bỏ các bịch nấm bị nhiễm nấm mốc ra khỏi nhà nuôi trồng. Có khoảng 95,1% số bịch nấm hình thành hạch nấm từ 25 đến 35 ngày tiếp theo sau khi rạch bịch. Khi đó, quả thể nấm Thượng Hoàng có kích thước 0,3-1 cm, màu trắng sữa hoặc vàng nhạt bắt đầu hình thành. Tiếp tục duy trì điều kiện nuôi trồng với ánh sáng 300 lux, độ ẩm không khí 97%, nhiệt độ 25°C, lượng khí CO₂ trong nhà nuôi trồng 0,03-0,05% đến 2,5-3 tháng sau khi quả thể nấm bắt đầu hình thành. Quả thể nấm hình thành hoàn chỉnh có đặc điểm hình móng ngựa hoặc elíp, mặt trên có màu vàng nhạt, viền xung quanh màu trắng sữa và không có cuống nấm.

Sau khi quả thể nấm non hình thành hoàn chỉnh, điều chỉnh độ ẩm không khí 90%, nhiệt độ 25°C, lượng khí CO₂ 0,03-0,05% cho đến khi nấm Thượng Hoàng đến độ tuổi thu hái.

Quan sát quả thể nấm Thượng Hoàng có hình móng ngựa hoặc elíp, màu nâu sẫm đồng nhất tiến hành thu hái nấm (khoảng 6-7 tháng sau khi quả thể nấm bắt đầu hình

thành). Quả thể nấm Thượng Hoàng khô có trọng lượng, kích thước trung bình 20,8 gram, chiều dài 7,5 cm, chiều rộng 5,1 cm, độ dày 2,3 cm.

Quả thể nấm Thượng Hoàng được sấy khô và nghiền thành bột để kiểm tra chất lượng nấm nuôi trồng.

Tách chiết và xác định hàm lượng polysacarit và hispidin có trong quả thể nấm: Bột quả thể nấm Thượng Hoàng khô có độ ẩm 7% (0,1kg) được cắt thành các mảnh nhỏ có độ dày 2 mm và cho vào chai trung tính Duran dung tích 2 lít chứa đựng 1 lít etanol 90%, vặn chặt nắp, đặt trong bể ổn nhiệt ở 60°C qua đêm. Lọc dịch chiết qua giấy lọc giấy lọc whatman đường kính 150 mm. Hoạt chất sinh học trong nấm Thượng Hoàng được tiến hành tách chiết thêm hai lần nữa trong 1 lít etanol 90%, 60°C, 3 giờ. Loại bỏ etanol và nước trong dịch chiết (khoảng 2 lít) bằng máy cô quay chân không ở 50°C. Hòa cạn hoạt chất sinh học tổng số trong 30 ml nước và lọc qua màng lọc 0,45 µm và đông khô ở -54°C, thu được hoạt chất sinh học tổng số. Bảo quản hoạt chất trong lọ tối màu ở 4-6°C. Hàm lượng hoạt chất hispidin có trong mẫu được xác định thông qua hệ thống sắc ký lỏng cao áp (HPLC) (I-Chen Li và cộng sự, 2020) và hàm lượng polysacarit được xác định bằng máy quang phổ UV-VIS. Hàm lượng polysacarit và hispidin có trong mẫu lần lượt là 1,21 và 0,07%. Hoạt chất hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng theo ví dụ này được thể hiện trên Hình 7 (a), trong đó đường 1 là của chất chuẩn hispidin và đường 2 là của quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng.

Mật độ các loại vi sinh vật có trong quả thể nấm Thượng Hoàng cũng được kiểm tra, các chỉ tiêu phân tích bao gồm *Coliform* được tiến hành theo phương pháp TCVN 4882:2007, *Escherichia coli* (TCVN 6846: 2007), *Clostridium perfringens* (TCVN 4991:2005), tổng số bào tử nấm men, nấm mốc (TCVN 8275:2010) và tổng số vi khuẩn hiếu khí (TCVN 4884-1:2015. Kết quả phân tích thể hiện ở Bảng 6 dưới đây.

Ví dụ 2

Thực hiện như ví dụ 1, chỉ khác thay mùn cưa keo tai tượng bằng mùn cưa keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.)

Hệ sợi nấm Thượng Hoàng sẽ phủ kín đáy các bịch nguyên liệu trong khoảng 50 ngày sau khi cấy giống nấm. Giai đoạn ươm sợi, có 5% số bịch nấm bị nhiễm nấm mốc. Khi đó hệ sợi nấm có màu vàng sẫm hoặc vàng cam. Khoảng 92,9% số bịch nấm hình thành quả thể nấm non sau khi rạch bịch ở điều kiện nuôi trồng với ánh sáng 350 lux, độ ẩm không khí 98%, nhiệt độ 30°C, lượng khí CO₂ dao động 0,03-0,05%. Quả thể nấm Thượng Hoàng non sinh trưởng trong khoảng từ 6-7 tháng tiếp theo. Khi quan sát thấy

quả thể nấm Thượng Hoàng có màu nâu vàng đồng nhất (không còn viền trắng ở quả thể nấm) tiến hành thu hái. Quả thể nấm Thượng Hoàng khô có trọng lượng, kích thước trung bình 19,2 gram, chiều dài 7,1 cm, chiều rộng 4,8 cm, độ dày 2,2 cm.

Hàm lượng hoạt chất polysacarit và hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng lần lượt là 1,19 và 0,08%. Hoạt chất hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng theo ví dụ này được thể hiện trên Hình 7 (b), trong đó đường 1 là của chất chuẩn hispidin và đường 2 là của quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng. Kết quả phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật thể hiện ở Bảng 6 dưới đây.

Ví dụ 3

Thực hiện như ví dụ 1, chỉ khác thay mùn cưa keo tai tượng bằng mùn cưa keo lai (Keo tai tượng × Keo lá tràm - *Acacia hybrid*).

Khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm Thượng Hoàng trên cơ chất mùn cưa keo lai khá tương đồng với ví dụ 1 và 2. Hệ sợi nấm phủ kín đáy bịch nấm trong khoảng 48 ngày sau khi cấy giống với tỷ lệ nhiễm bệnh ở giai đoạn ươm hệ sợi là 6,5%. Sau khi rạch nấm, tỷ lệ các bịch nấm hình thành quả thể nấm non đạt 93,4%. Quả thể nấm ở độ tuổi thu hái có màu vàng sẫm, hình móng ngựa hoặc elíp. Quả thể nấm Thượng Hoàng khô có trọng lượng, kích thước trung bình 19,7 gram, chiều dài 7,3 cm, chiều rộng 5,2 cm, độ dày 2,3 cm.

Hàm lượng hoạt chất polysacarit và hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng lần lượt là 1,18 và 0,08%. Hoạt chất hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng theo ví dụ này được thể hiện trên Hình 7 (c), trong đó đường 1 là của chất chuẩn hispidin và đường 2 là của quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng. Kết quả phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật thể hiện ở Bảng 6 dưới đây.

Bảng 6. Kết quả phân tích vi sinh vật có trong quả thể khô nấm Thượng Hoàng nuôi trồng nhân tạo

Nấm Thượng Hoàng	Mật độ vi sinh vật (CFU/g)				
	<i>Coliform</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	Tổng số vi khuẩn hiếu khí
Ví dụ 1	0	0	0	$6,5 \times 10^1$	$6,4 \times 10^2$
Ví dụ 2	0	0	0	$5,8 \times 10^1$	$3,9 \times 10^2$
Ví dụ 3	0	0	0	$5,7 \times 10^1$	$7,1 \times 10^2$

Bảng 6 cho thấy rằng quả thể nấm khô thu được sau sấy không phát hiện một số vi khuẩn *Coliform*, *Escherichia coli* và *Clostridium perfringens*.

Ví dụ so sánh 1

Thực hiện như ví dụ 1, khác là chỉ cắt lớp nylon phủ ngoài ở phần vai bịch nấm sau khi hệ sợi nấm đã phủ kín đáy các bịch nấm, vết cắt hình chữ U có kích thước chiều dài khoảng 5 cm, chiều rộng khoảng 3 cm và không tiến hành rạch đứt hệ sợi nấm. Sau khi cắt lớp túi nylon phủ ngoài duy điều kiện nuôi trồng với độ ẩm 97%, ánh sáng 300 lux, nhiệt độ 25°C, lượng khí CO₂ dao động từ 0,03-0,05%. Quả thể nấm non bắt hình thành chậm hơn, sau 55-65 ngày tiếp theo thay vì ngày thứ 25 sau khi rạch bịch như ví dụ 1. Tuy nhiên tỷ lệ số bịch hình thành quả thể nấm chỉ có 21,8%, thấp hơn nhiều 4,36 lần so với ví dụ 1. Quả thể nấm ở độ tuổi thu hái cần từ 7-8 tháng sau khi cắt lớp nylon. Như vậy, nếu không tiến hành rạch và bóc lớp màng dai cho các bịch nấm Thượng Hoàng sẽ ảnh hưởng đến tỷ lệ các bịch hình thành quả thể và thời gian nuôi trồng, cũng như tăng chi phí sản xuất nấm Thượng Hoàng. Quả thể nấm Thượng Hoàng trưởng thành có hình móng ngựa hoặc elíp, trọng lượng khô 13,5 gram, chiều dài 6,2 cm, chiều rộng 4,1 cm, độ dày 1,8 cm.

Ví dụ so sánh 2

Tiến hành như ví dụ 1, chỉ khác là độ ẩm không khí nhà nuôi trồng duy trì từ 85 đến 90% sau khi rạch, loại bỏ màng dai cho các bịch nấm có hệ sợi phủ kín đáy bịch. Tỷ lệ số bịch nấm hình thành quả thể nấm thấp là 22,7%. Thời gian để quả thể nấm non hình thành hoàn chỉnh kéo dài hơn (từ 3,5-4 tháng sau khi quả thể nấm bắt đầu hình thành). Tiếp tục duy trì độ ẩm không khí dao động từ 85-90% sau khi quả thể nấm hình thành hoàn chỉnh, quả thể nấm Thượng Hoàng cần từ 7-8 tháng sinh trưởng sau khi rạch bịch nấm đến độ tuổi thu hái, có hình móng ngựa hoặc elíp. Tuy nhiên, quả thể nấm nhỏ hơn và mỏng hơn so với ví dụ 1. Quả thể nấm Thượng Hoàng khô có trọng lượng 6,5 gram, chiều dài 4,2 cm, chiều rộng 3,4 cm, độ dày 1,8 cm.

Ví dụ so sánh 3

Giống với ví dụ 1, chỉ khác nhiệt độ nhà nuôi trồng quả thể nấm sau khi rạch các bịch nấm có hệ sợi phủ kín đáy, được điều chỉnh ở 15-20°C. Mặc dù hệ sợi thứ cấp hình thành và phủ kín vết rạch sau 4-5 ngày, nhưng không hình thành quả thể nấm non. Phần lớn vết rạch của các bịch nấm chuyển từ màu nâu vàng sang màu đen sau khoảng 30-35 ngày sau khi rạch bịch nấm, không hình thành quả thể nấm Thượng Hoàng trong suốt quá trình nuôi trồng.

Ví dụ so sánh 4

Giống với ví dụ 1, chỉ khác nhiệt độ nhà nuôi trồng được điều chỉnh từ 37-40°C. Số bịch nấm hình thành quả thể nấm non chiếm 50,3%, cao hơn so với ví dụ so sánh 1, 2 nhưng thấp hơn 1,89 lần so với ví dụ 1. Quả thể nấm trưởng thành ở độ tuổi thu hái có hình móng ngựa hoặc elíp sau 6-7 tháng khi rạch bịch. Quả thể nấm có trọng lượng khô 11,8 gram, chiều dài 5,7 cm, chiều rộng 4,3 cm, độ dày 1,8 cm.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đã đề xuất quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng sử dụng chủng nấm *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 được phân lập từ quả thể nấm thu thập tại Vườn Quốc gia Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam trên giá thể mùn cưa cây keo được tạo ra từ nguồn nguyên liệu sẵn có và dồi dào ở nước ta. Quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng trong điều kiện nhân tạo chứa hoạt chất sinh học polysacarit và hispidin, là các hoạt chất sinh học tiềm năng trong hỗ trợ sức khỏe con người.

Quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng theo sáng chế tương đối đơn giản và có khả năng áp dụng ở quy mô công nghiệp, cung cấp sản phẩm có chất lượng đáp ứng nhu cầu trong và ngoài nước.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng bao gồm các công đoạn:

(a1) cấy giống nấm và ương hệ sợi nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, trong đó:

giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 là chủng nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 có mã số truy nhập gen 18S rRNA, ITS 1 – 5,8S rRNA – ITS 2, 28S rRNA trên GenBank là MW757264, chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 này được phân lập từ quả thể nấm thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam,

cấy đều 0,5-1,5% khối lượng giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 so với khối lượng giá thể vào bề mặt của bịch giá thể bao gồm các thành phần (tính theo % khối lượng):

mùn cưa cây keo:	59-74%, tốt hơn là 65-70%, tốt hơn là độ ẩm mùn cưa 55-65%
vôi tôi ($\text{Ca}(\text{OH})_2$):	1-3%
cám gạo:	8-13%
bột ngô:	12-16%
bột đậu tương:	4-7%
bột CaCO_3 :	1-2%,

trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm mùn cưa cây keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd.), mùn cưa keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) hoặc mùn cưa keo lai (keo tai tượng × keo lá tràm - *Acacia hybrid*),

ương hệ sợi trên bịch đã cấy giống ở 25-30°C, độ ẩm không khí 60-70% trong phòng tối, cho đến khi hệ sợi đã phủ kín đáy bịch và hệ sợi có màu vàng sẫm hoặc vàng cam;

(a2) xử lý bịch hệ sợi nấm và chăm sóc quả thể nấm

rạch và loại bỏ lớp màng dai ở phần vai bịch nấm, tốt hơn là rạch theo hình chữ U, với độ sâu 0,2-0,4 cm, chiều dài 4-5 cm, chiều rộng 2,5-3 cm và rạch thêm hai đường hình chữ X bên trong vết rạch nêu trên, mỗi đường rạch có độ sâu 0,2-0,4 cm;

duy trì điều kiện nuôi trồng quả thể nấm ở độ ẩm không khí 97-100%, ánh sáng 300-400 lux, nhiệt độ 25-35°C, lượng khí CO_2 0,03-0,05% cho đến khi quả thể nấm non hình thành hoàn chỉnh sau 2,5-3 tháng sau khi rạch bịch nấm và loại bỏ màng dai;

khi quả thể nấm non hoàn chỉnh sau 2,5-3 tháng, điều chỉnh điều kiện nuôi trồng với độ ẩm không khí 90-93%, ánh sáng 300-400 lux, nhiệt độ 25-35°C, lượng khí CO_2 0,03-0,05% cho đến khi quả thể nấm đến độ tuổi thu hái.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó giá thể cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng bao gồm các thành phần (tính theo % khối lượng):

mùn cưa keo:	68%
--------------	-----

vôi tôi:	1%
cám gạo:	10%
bột ngô:	15%
bột đậu tương:	5%
bột CaCO ₃ :	1%.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó quy trình này còn bao gồm công đoạn:

(a) chuẩn bị giá thể mùn cưa cây keo cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 trước khi tiến hành công đoạn (a1), bao gồm các bước:

phối trộn mùn cưa cây keo với vôi tôi, nước sạch, ủ trong vòng 18-24 ngày, tốt hơn là cứ 6-8 ngày tiến hành đảo trộn khối ủ một lần, duy trì độ ẩm của khối ủ ở 55-65%; và

sau 18-24 ngày ủ, bổ sung các thành phần dinh dưỡng gồm cám gạo, bột ngô, bột đậu tương, bột CaCO₃ vào khối ủ, trộn đều, thu được giá thể mùn cưa cây keo cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4.

4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo là mùn cưa cây keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd.).

5. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo là mùn cưa keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth).

6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo là mùn cưa keo lai (keo tai tượng × keo lá tràm - *Acacia hybrid*).

7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 là giống nấm cấp 3 được nhân như sau:

(i) chuẩn bị môi trường dinh dưỡng sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 được chọn từ nhóm bao gồm PDA, MCM, MEA, YMA cải tiến, trong đó:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết khoai tây:	4g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
aga:	20g,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
-----------	------

chất chiết thô men:	2g,
pepton:	1g,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5g,
KH ₂ PO ₄ :	0,46g,
K ₂ HPO ₄ :	1g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
aga:	20g,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng MEA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết mạch nha:	20g,
pepton:	1g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng YMA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	10g,
chất chiết thô men:	3g,
chất chiết mạch nha:	3g,
pepton:	5g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6-6,5;

trong đó, dịch tách chiết cây dâu được bổ sung vào các môi trường trên khi môi trường có nhiệt độ nằm trong khoảng 55-65°C, tốt hơn là khoảng 60°C; và

(ii) nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, bao gồm các bước:

giã đông giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 (giống nấm F₀) bảo quản lạnh sâu - 86°C ở nhiệt độ phòng trong 4-6 giờ, rồi cấy sang môi trường thạch nghiêng PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở 25-30°C, từ 7-10 ngày, thu được giống nấm cấp 1 hay còn gọi F₁,

cắt giống nấm cấp 1 theo hình dạng và kích thước nhất định, rồi cấy chuyển sang môi trường MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở 25-30°C trong 7-10 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA này, thu được giống nấm cấp 2 hay còn gọi là F₂,

sau khi hệ sợi (giống nấm cấp 2) của chủng NTH-PL4 sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA, cắt hệ sợi nấm theo hình dạng và kích thước nhất định, cấy chuyển sang môi trường thóc đựng trong chai nhựa hoặc chai thủy tinh, và

nuôi các chai thóc chứa giống nấm ở 25-30°C, độ ẩm 60-70%, trong phòng tối từ 35 đến 40 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín phần thóc ở đáy chai, thu được giống nấm cấp 3 hay còn gọi là giống sản xuất hoặc F₃, để dùng cho công đoạn (a1) cấy giống nấm và ươm hệ sợi nấm.

8. Quy trình theo điểm 7, trong đó các môi trường PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 có thành phần như sau:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết khoai tây:	4g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
aga:	20g,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết thô men:	2g,
pepton:	1g,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5g,
KH ₂ PO ₄ :	0,46g,
K ₂ HPO ₄ :	1g,

dịch tách chiết cây dâu: 10ml,
 ampicillin: 50mg,
 aga: 20g,
 nước cất vừa đủ: 1 lít,
 pH: 6,5;

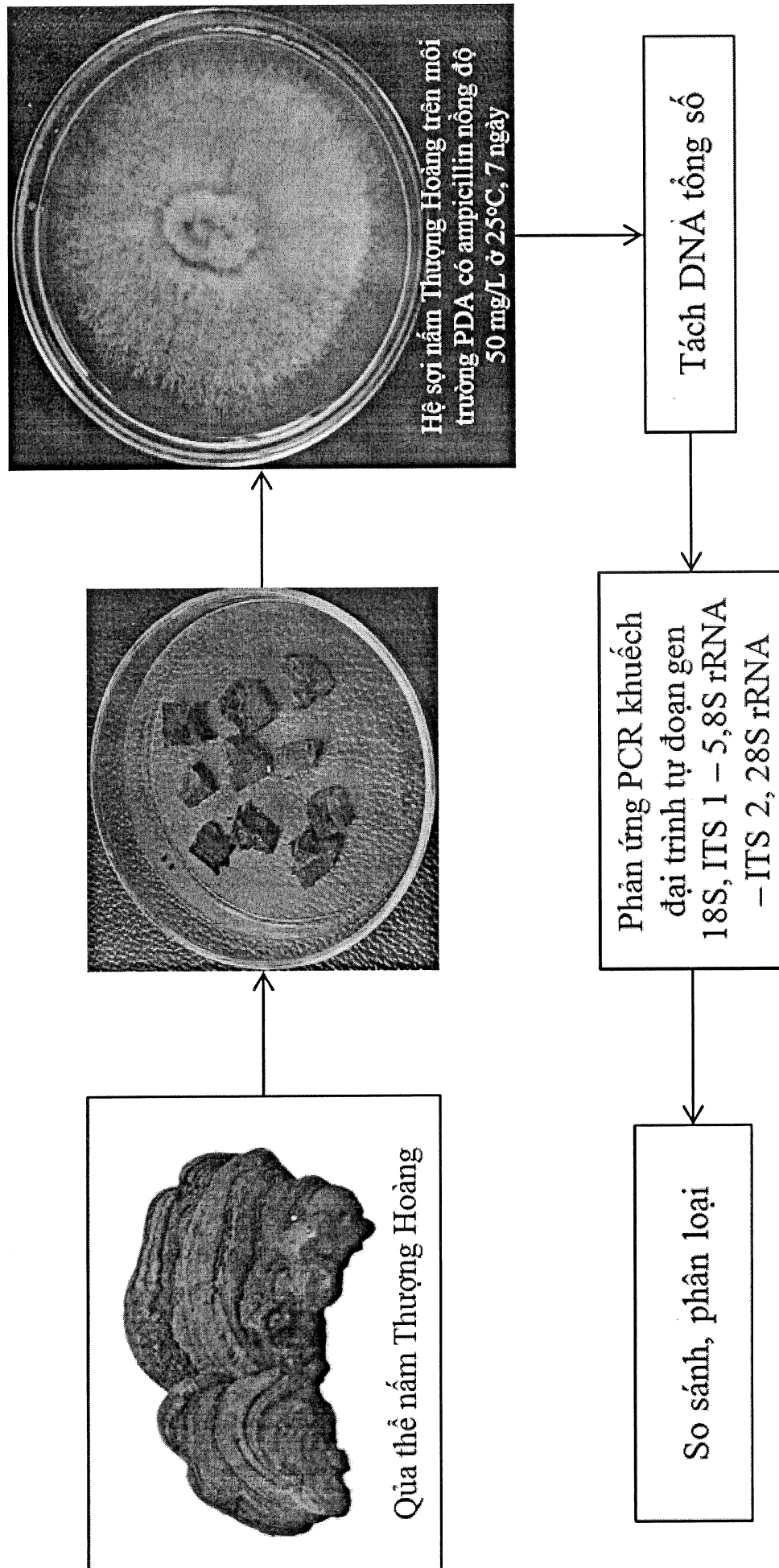
- môi trường dinh dưỡng MEA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 20g,
 chất chiết mạch nha: 20g,
 pepton: 1g,
 aga: 20g,
 dịch tách chiết cây dâu: 10ml,
 ampicillin: 50mg,
 nước cất vừa đủ: 1 lít,
 pH: 6,5;

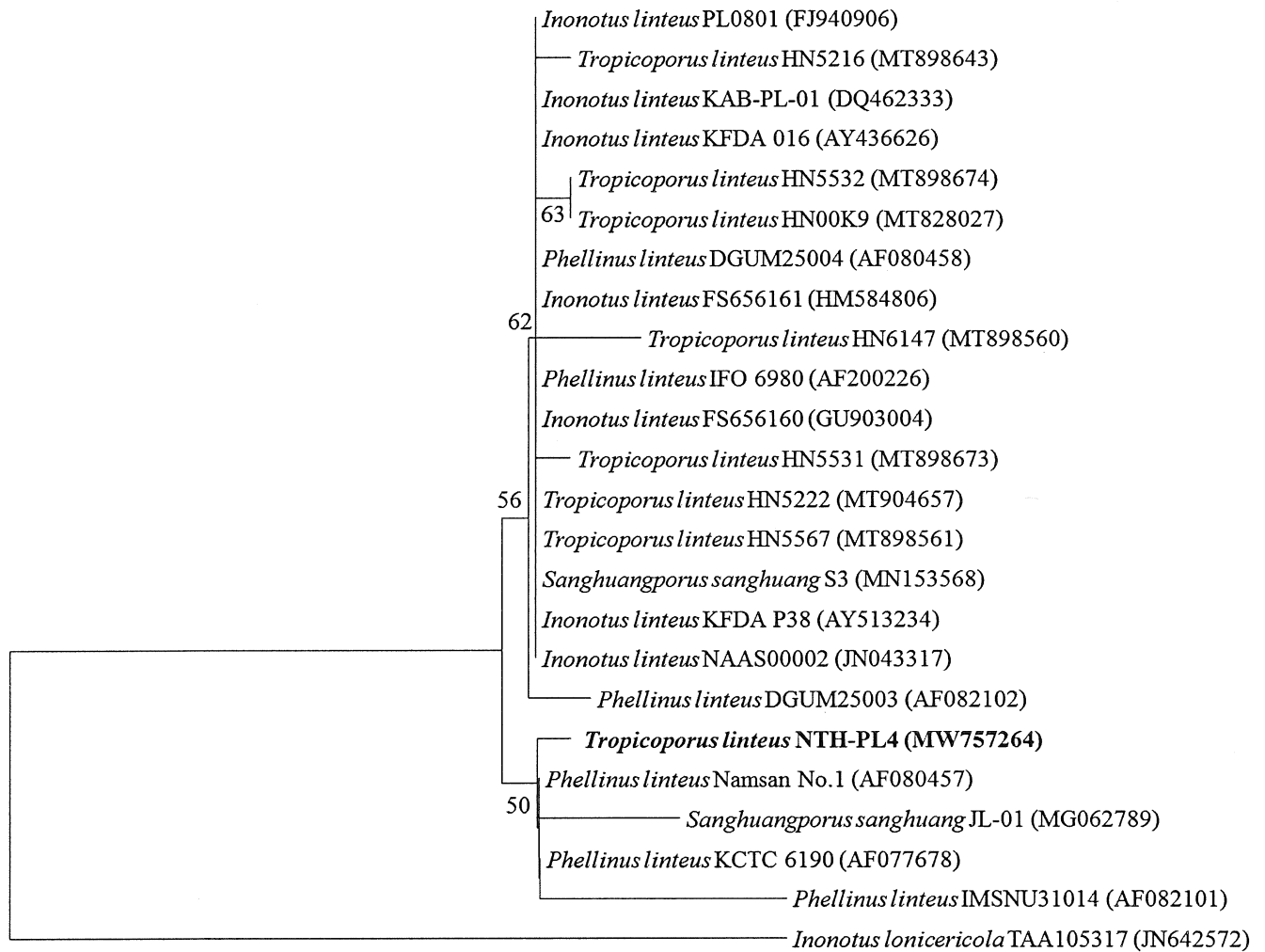
- môi trường dinh dưỡng YMA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 10g,
 chất chiết thô men: 3g,
 chất chiết mạch nha: 3g,
 pepton: 5g,
 aga: 20g,
 dịch tách chiết cây dâu: 10ml,
 ampicillin: 50mg,
 nước cất vừa đủ: 1 lít,
 pH: 6,5.

9. Quy trình theo điểm 7 hoặc 8, trong đó ở bước (ii), môi trường được sử dụng để nhân giống nấm cấp 2 khác với môi trường được sử dụng để nhân giống cấp 1.

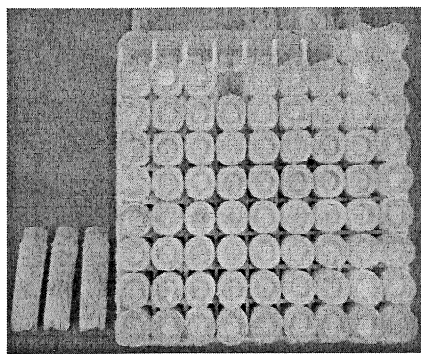


Hình 1

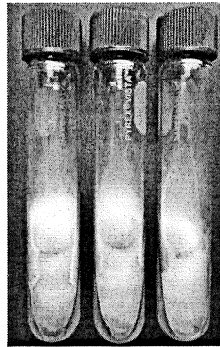


0,005

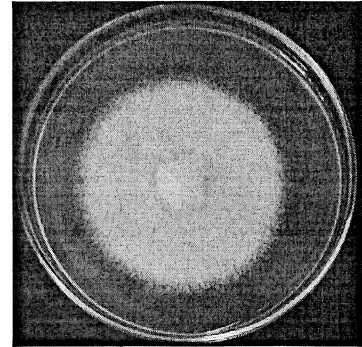
Hình 2



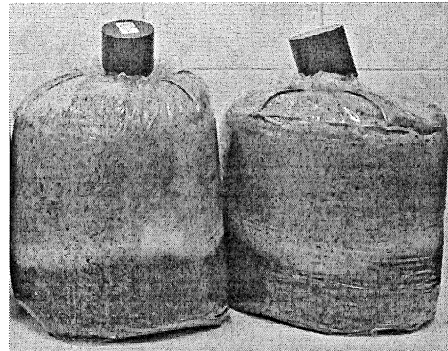
Giống nấm gốc F₀ (-86°C)



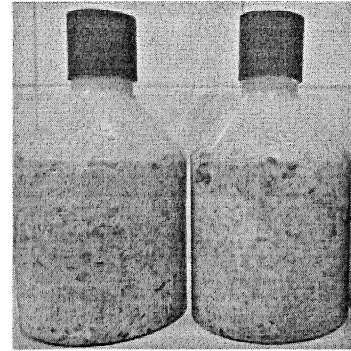
Giống nấm F₁ trên môi trường PDA



Giống nấm F₂ trên môi trường MCM

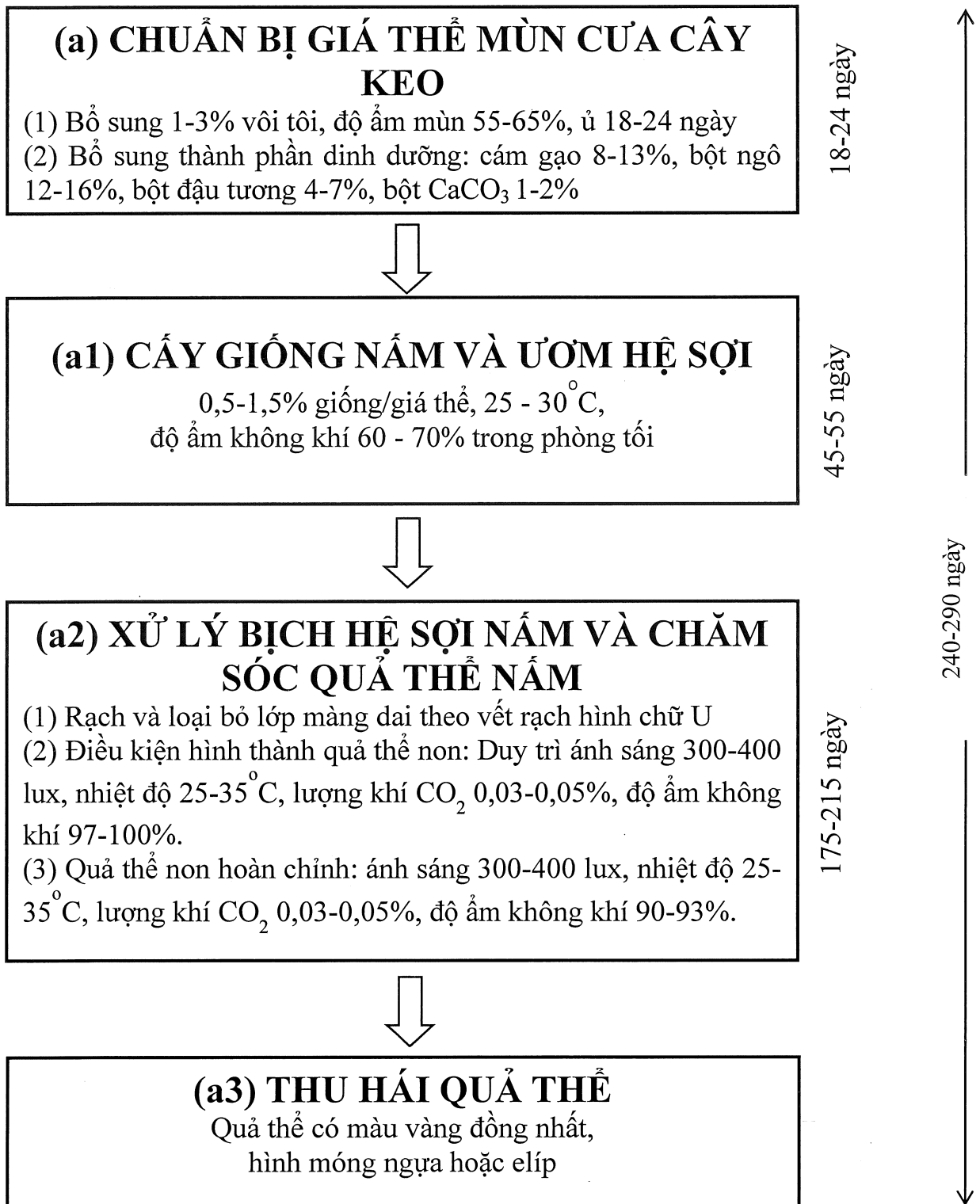


Hệ sợi nấm trên mùn cưa

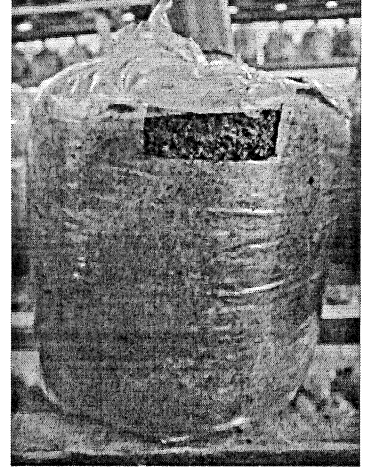


Giống nấm F₃ trên cơ chất thóc

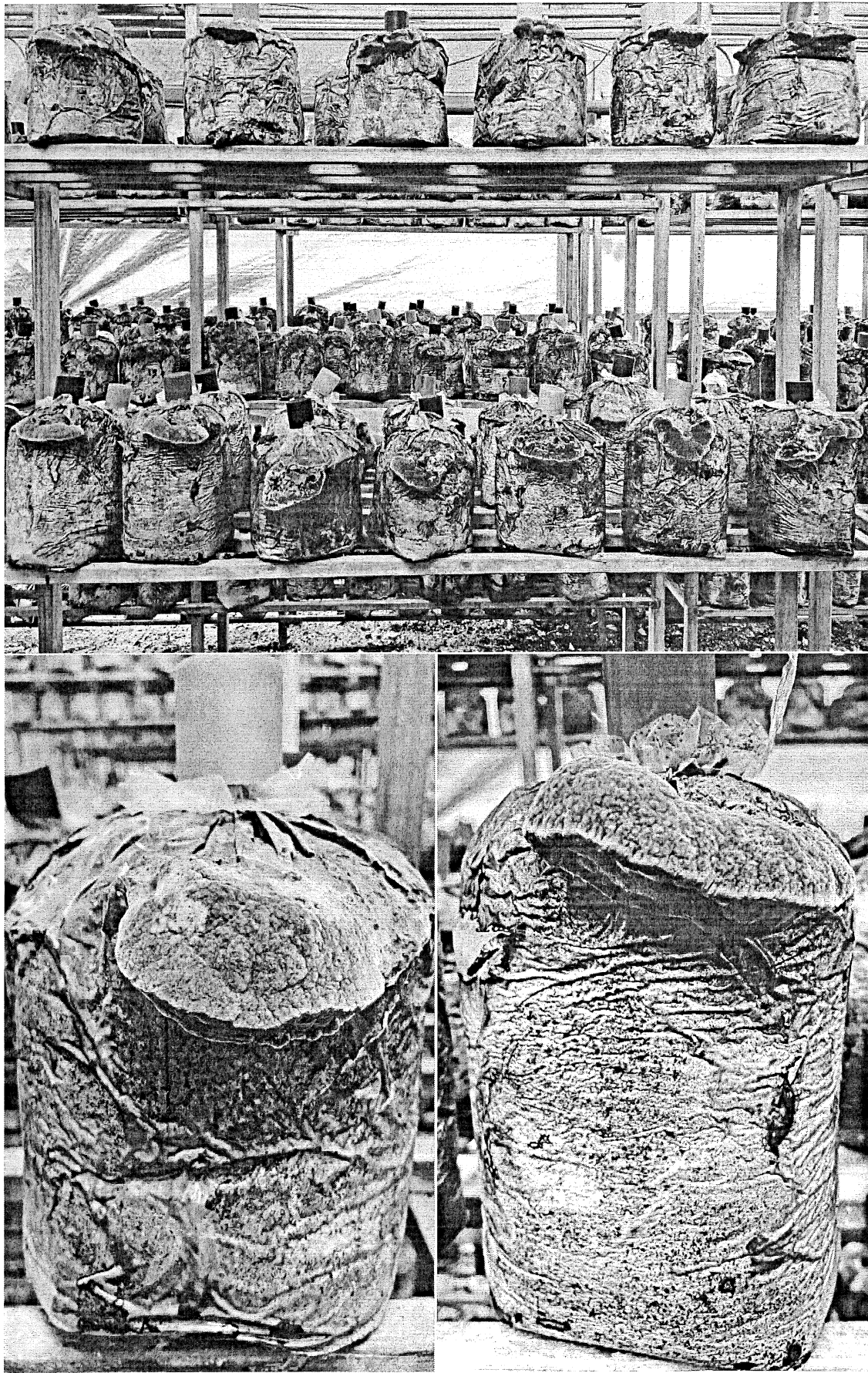
Hình 3



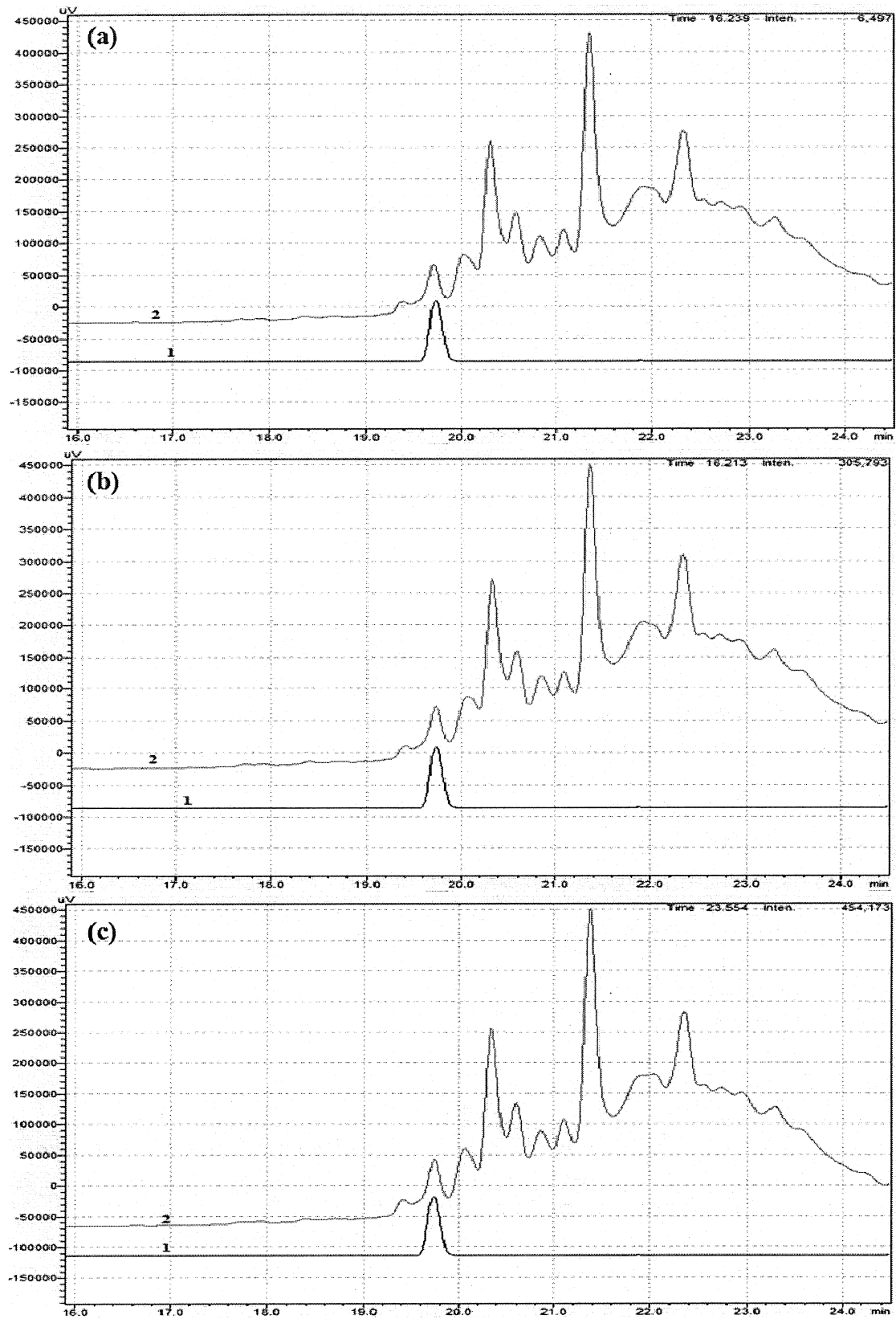
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7