



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003597

(51) **A01G 1/04; C12N 1/14; A01H 15/00**
2006.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00408

(22) 14/07/2017

(67) 1-2017-02690

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/01/2019 370A

(73) Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh (VN)
2374 Quốc lộ 1, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Lê Thị Thùy Nhi (VN); Phan Mỹ Hạnh (VN); Trần Chí Hiếu (VN); Bùi Văn Tân (VN); Đạo Nữ Diệu Hồng (VN); Phạm Nguyễn Đức Hoàng (VN).

(54) **QUY TRÌNH NUÔI TRỒNG TẠO QUẢ THỂ NẤM PHLEBOPUS SPONGIOSUS**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nuôi trồng tạo quả thể nấm *Phlebopus spongiosus* bao gồm các bước: a) phân lập và bảo quản giống nấm *Phlebopus spongiosus*; b) nhân giống nấm *Phlebopus spongiosus*; c) nhân nuôi meo lỏng nấm *Phlebopus spongiosus*; d) nhân nuôi phôi nấm *Phlebopus spongiosus*; e) phủ đất; và f) cảm ứng tạo quả thể nấm *Phlebopus spongiosus*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình nuôi trồng tạo quả thể nấm *Phlebopus spongiosus*, sử dụng trong nông nghiệp, công nghiệp nuôi trồng nấm ăn, nấm dược liệu.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Có khoảng 20.000 đến 25.000 loài nấm ngoại cộng sinh đã được ghi nhận (Rinaldi và cộng sự, 2008), trong đó có hơn 1.000 loài nấm ngoại cộng sinh ăn được (Hall và cộng sự, 2011), đây là nguồn thực phẩm quan trọng và có giá trị kinh tế cao, tuy nhiên hiện nay nguồn tài nguyên này mới chỉ được khám phá một phần. Nấm ngoại cộng sinh ăn được (Edible Ectomycorrhizal Mushroom – EEMM) là nguồn thực phẩm cao cấp có giá trị về mặt dinh dưỡng, dược liệu, hương vị thơm ngon; thị trường thương mại hằng năm lên tới vài tỷ USD (Zambonelli và Bonito, 2012). Các loại nấm này đa số có quả thể lớn, mùi vị thơm ngon đặc trưng và hầu hết đều khan hiếm, đắt đỏ, được bán với giá cao hơn nhiều loại nấm khác trên thị trường quốc tế (Zambonelli và Bonito, 2012). Rất nhiều loài nấm ngoại cộng sinh ăn được có giá trị đã được biết đến trên thế giới như: nấm cục (truffle, *Tuber* spp.), nấm Matsutake (*Tricholoma matsutake*), nấm *Cantherellus cibarius*, *Boletus edulis*, *Amanita caesarea*, *Lactarius sanguifluus*, v.v.

Nấm ngoại cộng sinh ăn được sống cộng sinh trong đất, được nuôi dưỡng bởi rễ cây trồng và cây bụi như các nấm ngoại cộng sinh khác, đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ và làm đa dạng hệ sinh thái. Hơn nữa, nấm cộng sinh ăn được tương tác với các vi khuẩn khác trong hệ sinh vật đất góp phần hình thành đất và cố định nitơ. Nhiều loài nấm cộng sinh ăn được cũng góp phần bảo tồn sinh thái và khử độc đất bằng cách cô lập các kim loại nặng. Ngoài ra, nấm cộng sinh với rễ cây trồng còn đóng vai trò quan trọng trong hệ vi sinh vật vùng rễ, giúp cây chủ hút nước, muối khoáng và bảo vệ vùng rễ trước các vi sinh vật gây bệnh (Barbieri và cộng sự, 2012). Nấm cộng sinh ăn được không chỉ cung cấp các lợi ích về sinh thái giữa cây với nấm rễ, mà còn các lợi ích kinh tế và xã hội thông qua việc sản xuất và thu hoạch nấm có giá trị kinh tế cao. Hiện nay, việc nuôi trồng nhân tạo các loài nấm cộng sinh gặp rất nhiều khó khăn, do vậy thu hái tự nhiên là nguồn cung cấp chính cho thị trường. Từ cuối thế kỷ XX tới nay, nguồn thu hái ngoài tự nhiên ngày càng giảm mạnh do ảnh hưởng của

biến đổi khí hậu và phá rừng (Hall và Wang, 1998; Boddy, 2014) trong khi nhu cầu sử dụng ngày một tăng, thúc đẩy sự quan tâm nghiên cứu nuôi cấy nhân tạo những loài nấm này (Giomaro và cộng sự, 2005).

Khó khăn trong việc nuôi trồng nhân tạo các loài nấm cộng sinh do sự liên kết sinh lý, sinh thái giữa nấm và hệ rễ cây chủ cũng như tương tác giữa nấm với sinh vật khác trong đất (Hall và cộng sự, 2005; Zambonelli và Bonito, 2012). Nuôi trồng bán tự nhiên bằng việc chủ động cho giống nấm tiếp cận và xâm nhiễm vào hệ rễ của cây chủ ngoài tự nhiên, điển hình như việc nuôi trồng nấm cục (*Tuber spp.*) mọc dưới mặt đất tại Châu Âu (Hall và cộng sự, 2003). Những năm 1800, việc nuôi trồng nấm cục (truffle) được thực hiện bán tự nhiên bằng kỹ thuật của Taylor, trong đó gieo hạt trồng cây ở chỗ cây sồi mọc nấm cục, sau 5 - 10 năm cây trồng cũng lây nhiễm và mọc nấm cục. Tuy nhiên với kỹ thuật này cây trồng cũng tiếp xúc với tất cả các vi sinh vật trong vùng rễ của cây chủ và có thể bị nhiễm nấm ngoại cộng sinh cạnh tranh như *Scleroderma*, hoặc các tác nhân gây bệnh, tuyến trùng và côn trùng gây hại. Do đó, kỹ thuật thay thế được phát triển bằng cách nuôi cây con với phần rễ bị nhiễm nấm có thể tạo được cây con có hệ rễ cộng sinh với nấm cục sạch bệnh, thích nghi hệ sinh thái đất, khí hậu. Tuy nhiên, do tuổi cây chủ ảnh hưởng tới việc ra quả thể của nấm cộng sinh nên kéo dài thời gian chờ để thu quả thể. Hiện nay, nuôi ủ cây chủ với bào tử nấm vẫn là phương pháp phổ biến nhất cho sản xuất thương mại nấm cục (Giomaro và cộng sự, 2005).

Việc nghiên cứu nuôi trồng bán tự nhiên các nấm ngoại cộng sinh ăn được mọc trên mặt đất cũng được nghiên cứu và có những thành công nhất định. Hiện có ba loài đã được trồng thương mại là *Lactarius deliciosus*, *Rhizopogon rubescens* và *Lyophyllum shimeji*. Cây chủ cũng được lây nhiễm tương tự như phương pháp nhiễm của nấm cục. Một số nghiên cứu khác cũng được tiến hành trên các loài nấm *Boletus badius*, *Boletus porosporus*, *Boletus subtomentosus*, *Suillus piperatus* và *Boletus edulis* tuy nhiên không tạo được quả thể trưởng thành (Giomaro và cộng sự, 2005).

Một số nấm ngoại cộng sinh ăn được cũng có thể tạo nụ nấm hoặc quả thể *in vitro* như: *Boletus reticulatus* (Yamanaka và cộng sự, 2000), *Lyophyllum shimeji* (Ohta, 1994) và *Phlebopus portentosus* (Sanmee và cs, 2010). Một loạt các môi trường nuôi cấy đã được sử dụng cho nấm ngoại cộng sinh như MMN, PDA, Hamada. Điều thú vị là *T. matsutake* tăng trưởng tốt hơn khi môi trường có một ít dịch của rễ cây chủ *Pinus densiora* và hệ sợi *T. matsutake* nuôi cấy chìm trong bồn lên men (biofermenter) phát triển nhanh hơn nuôi trên đĩa

và trong chai (Giomaro và cộng sự, 2005). *Hebeloma radicosum* nuôi cấy trong chai 500 ml chứa 90 g mật cưa, đại mạch và 150 ml môi trường dinh dưỡng, phôi nuôi ủ ở 22°C từ 35 - 45 ngày và tạo quả thể ở 17°C trong 21 - 32 ngày (Ohta, 1998). *Boletus* sp. cũng tạo quả thể khi nuôi cấy với mật cưa và đại mạch trong chai 500 ml, nuôi phôi ở 22°C, 92 ngày trong tối và tạo quả thể ở 26°C từ 30 - 46 ngày với độ ẩm cao và chiếu sáng, khi có phủ thêm đá xốp thì tăng sản lượng nấm (Ohta và Fujiwara, 2003).

Năm 2015, công ty King Hong Hongzhen Agricultural Science and Technology Co., Ltd., ở Trung Quốc sau ba năm nghiên cứu, đã nghiên cứu thành công quy trình nuôi cấy nhân tạo nấm ngoại cộng sinh ăn được *Phlebopus portentosus* ở quy mô công nghiệp, không cần có cây chủ, với sản lượng có thể lên đến 2.000 tấn/năm. *P. portentosus* là loài nấm ngoại cộng sinh ăn được có giá trị, nên ở Thái Lan và Trung Quốc đã có rất nhiều quan tâm nghiên cứu về nấm *P. portentosus*, từ những nghiên cứu cơ bản về thành phần dinh dưỡng, đến giá trị dược liệu, cũng như nghiên cứu nuôi trồng thành công loài nấm này ở quy mô công nghiệp (Sanmee và cộng sự, 2010; Ji và cộng sự, 2014). Các đơn đăng ký sáng chế về phương pháp nuôi trồng nấm *Phlebopus portentosus* nộp tại Trung Quốc, như CN 101491195A, CN 103766137A, CN103011935A. Loài nấm *P. portentosus* có quan hệ loài gần với nấm *Phlebopus spongiosus* của Việt Nam. Ở Việt Nam, *P. spongiosus* mới được phát hiện nên chưa được biết đến rộng rãi, cũng như chưa có nhiều quan tâm nghiên cứu về thành phần dinh dưỡng, giá trị dược liệu tiềm năng của loài nấm ngoại cộng sinh ăn được này.

Phlebopus spongiosus thuộc giới nấm (Fungi), ngành Basidiomycota, lớp Basidiomycetes, bộ Boletales, họ Boletaceae, chi *Phlebopus*, loài *Phlebopus spongiosus* Pham & Har. Takah. *P. spongiosus* là loài nấm mới của thế giới, được phát hiện ở một số vườn cây ăn quả ở Đông Nam Bộ và Tây Nam Bộ bởi Pham và cộng sự vào năm 2012. *P. spongiosus* được tìm thấy mọc nhiều ở vườn bưởi (nên được gọi là Nấm bưởi), thường được người dân sử dụng làm thực phẩm. Loài nấm này thích nghi với điều kiện sinh thái nóng ẩm tại phía nam và là loài nấm ăn đặc hữu của Việt Nam. *P. spongiosus* được phát hiện cộng sinh với nhóm cây có múi, là nấm ngoại cộng sinh ăn được (Edible Ectomycorrhizal Mushrooms). *P. spongiosus* có mũ nấm có màu nâu tới nâu vàng, đôi khi nâu đỏ khi trưởng thành, đường kính khoảng 50 - 120 mm, dạng bán cầu khi còn non với phần rìa mũ cuộn lại sau đó mở rộng với phần rìa mũ thẳng, bề mặt khô có lớp lông rất mịn khi còn non sau đó trơn nhẵn khi trưởng thành.

Thí nghiệm của Pham (2012) khi nuôi cấy *P. spongiosus* trên môi trường PDA cùng với nấm *Trichoderma viride*, *P. spongiosus* bị bao phủ hoàn toàn sau 2 - 3 tuần, tuy nhiên *P. spongiosus* xâm lấn và bao phủ khuẩn lạc nấm *Aspergillus niger* và *Penicillium citrinum* sau 3 tuần, như vậy *P. spongiosus* có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh trong đất, khi kết hợp nuôi trồng với cây ăn quả, sẽ tăng sức đề kháng của cây, tăng năng suất cây trồng. Bên cạnh đó, 5% và 10% dịch chiết *P. spongiosus* nuôi trong môi trường Ohta lỏng có tác dụng ức chế sự phát triển của một số vi khuẩn, bao gồm cả vi khuẩn G⁺ và G⁻. Dịch chiết *P. spongiosus* cũng ức chế tăng trưởng của tế bào bạch cầu cấp tính dòng MOLM13 và MOLM14, chứng minh *P. spongiosus* có khả năng kháng tế bào ung thư như nhiều loài nấm khác, nhờ hoạt tính sinh học của các polysacarit. *P. spongiosus* có khả năng kháng vi khuẩn và kháng tế bào ung thư, do đó có tiềm năng sử dụng làm dược phẩm.

Hiện nay, trên thế giới chưa có bất kỳ nghiên cứu nào về nuôi trồng tạo quả thể nấm *P. spongiosus* và ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về nuôi trồng tạo quả thể nấm ngoại cộng sinh ăn được mà không cần nuôi cấy với cây chủ. Do đó, vẫn có nhu cầu về việc nghiên cứu nuôi trồng loài nấm này góp phần bảo tồn nguồn gen quý, khai thác và tận dụng nguồn tài nguyên của đất nước, góp phần cho sự phát triển ngành trồng nấm trên thế giới.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để giải quyết nhu cầu nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nuôi trồng tạo quả thể nấm *Phlebopus spongiosus*, sử dụng trong nông nghiệp, công nghiệp nuôi trồng nấm ăn, nấm dược liệu, quy trình này bao gồm các bước:

a) Phân lập và bảo quản giống nấm *Phlebopus spongiosus*:

giống nấm *Phlebopus spongiosus* được phân lập từ quả thể nấm *Phlebopus spongiosus* thu hái tự nhiên trên môi trường PDA, nuôi cấy trong tối ở nhiệt độ 28 - 32°C, và được bảo quản trong các ống giữ giống ở nhiệt độ 4°C hoặc -80°C;

b) Nhân giống nấm *Phlebopus spongiosus*:

- giống nấm *Phlebopus spongiosus* đã phân lập được chuyển vào bình tam giác chứa môi trường lỏng MPSB có các thành phần (g/l): 2 - 4 g NH₄H₂PO₄, 0,5 - 1,5 g KH₂PO₄, 0,5 - 1,5 g MgSO₄, 0,6 - 1,5 g CaCl₂, 0,1 - 1 g cao nấm men, 0,0375 - 0,075 g Na₂EDTA, 0,0278 - 0,556 g FeSO₄, 30 - 50 g đường sucroza; điều chỉnh pH=4, nuôi cấy trong tối ở nhiệt độ 28 - 32°C, trong điều kiện lắc với tốc độ 150-200 vòng/phút, sau 7 ngày thu được các hạt sinh khối nấm;

- nhân giống tiếp các hạt sinh khối nấm trên đĩa petri chứa môi trường thạch MPSA có độ pH=5,8, ở nhiệt độ 28 - 32°C, nuôi cấy trong tối, thời gian từ 7 - 10 ngày, trong đó môi trường MPSA có các thành phần (g/l): 1 - 3 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5 - 1,5 g KH_2PO_4 , 0,5 - 1,5 g MgSO_4 , 0,6 - 1,5 g CaCl_2 , 0,1 - 1 g cao nấm men, 0,0375 - 0,075 g Na_2EDTA , 0,0278 - 0,556 g FeSO_4 , 30 - 50 g đường sucroza, 8 - 15 g aga;

c) Nhân nuôi meo lỏng nấm *Phlebopus spongiosus*:

giống nuôi cấy trên môi trường thạch nêu trong bước b) được cấy chuyển sang môi trường nhân nuôi meo lỏng MPSB ở nhiệt độ 28 - 32°C, nuôi cấy lắc với tốc độ 150-200 vòng/phút, nuôi cấy trong tối từ 7-10 ngày;

d) Nhân nuôi phôi nấm *Phlebopus spongiosus*:

cấy meo lỏng nấm thu được ở bước c) vào các bịch chứa môi trường nuôi phôi nấm MPSP theo tỷ lệ 10% (theo khối lượng), nuôi cấy trong tối ở nhiệt độ 28 - 32°C, thời gian từ 30 - 35 ngày; trong đó môi trường nuôi phôi nấm MPSP bao gồm các thành phần khối lượng mặt cưa : gạo lức với tỷ lệ 2:1, bổ sung thêm 3,5% cám, 0,15 % MgSO_4 , 0,05% KH_2PO_4 (tính theo khối lượng mặt cưa), độ ẩm 60 - 70%; và các bịch chứa môi trường MPSP được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 90 phút trước khi sử dụng;

e) Phủ đất:

sau khi hệ sợi lan hết bịch phôi, tiến hành mở nắp bịch phôi, phủ một lớp đất dày khoảng 3 cm, độ ẩm 60 - 70% lên trên các bịch phôi, nuôi ủ tiếp các bịch này trong phòng tối có độ ẩm 80 - 90%, ở nhiệt độ 28 - 32°C, sau 7 ngày nuôi ủ, hệ sợi nấm sẽ lan đều trên bề mặt lớp đất phủ;

f) Cảm ứng tạo quả thể nấm:

chuyển bịch phôi vào nhà nuôi trồng sau khi hệ sợi lan khoảng $\frac{2}{3}$ lớp đất phủ, duy trì độ ẩm nhà nuôi trồng 80 - 90%, chiếu sáng 12 giờ/ngày với cường độ 1000 - 4500 lux, nhiệt độ 26 - 30°C, sau khoảng 7 ngày các nụ nấm bắt đầu xuất hiện, tiếp tục duy trì độ ẩm và tưới nhẹ để nụ nấm phát triển thành quả thể nấm, sau 10 ngày tiếp theo có thể thu hái nấm quả thể còn ở dạng nón chưa xòe rộng, thịt nấm chắc và giòn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1A mô tả giống nấm có tơ nấm bị biến màu, giống bị thoái hoá và hình 1B mô tả nấm được hoạt hoá từ phương pháp bảo quản lỏng.

Hình 2A mô tả nấm nuôi trên môi trường MPSA và hình 2B mô tả nấm có hiện tượng chẻ quạt (sectoring).

Hình 3 mô tả nấm nuôi cấy lỏng trong môi trường MPSB.

Hình 4 mô tả phôi nấm đã lan hết bịch.

Hình 5 mô tả hệ sợi nấm lan trên bề mặt lớp đất phủ.

Hình 6 mô tả nụ nấm xuất hiện lần đầu tiên.

Hình 7A mô tả cây nấm với mũ nấm xoè rộng và hình 7B mô tả cây nấm với mũ nấm hình nón.

Hình 8 mô tả nấm cấy trên môi trường PDA làm môi trường hoá nâu.

Hình 9A và hình 9B mô tả nhiều nụ nấm phát triển trên bịch phôi.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nuôi trồng tạo quả thể nấm *Phlebopus spongiosus*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Phân lập và bảo quản giống nấm *Phlebopus spongiosus*:

Giống nấm *Phlebopus spongiosus* được phân lập từ quả thể nấm *Phlebopus spongiosus* thu hái tự nhiên trên môi trường PDA, nuôi cấy trong tối ở nhiệt độ 28 - 32°C, và được bảo quản trong các ống giữ giống ở nhiệt độ 4°C hoặc -80°C.

Các phương pháp bảo quản để lưu giữ giống nấm thường được sử dụng là phương pháp cấy trên môi trường thạch, lưu trữ ở 4°C. Tuy nhiên đối với các loại nấm ăn, phương pháp này bảo quản ở dạng hệ sợi không có bào tử dẫn đến thời gian bảo quản ngắn (chỉ lưu trữ được 4 - 5 tháng), tơ nấm bị biến đổi màu, giống dễ bị thoái hóa, giống già, yếu, chết (Hình 1A). Do đó, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp bảo quản giống nấm ở dạng các hạt sinh khối nấm *P. spongiosus* bằng cách nuôi cấy nấm trong môi trường lỏng lắc, thu các hạt sinh khối, bảo quản các hạt sinh khối trong các ống giữ giống chứa nước cất vô trùng, lưu trữ ở 4°C, phương pháp này có thể bảo quản được giống nấm ăn trong 9 tháng, hệ sợi của giống vẫn giữ nguyên được hình thái ban đầu, tơ nấm không bị biến màu, không bị thoái hóa, không bị chết, thời gian hoạt hóa giống nhanh (Hình 1B).

Theo một phương án khác, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp bảo quản giống nấm *P. spongiosus* trên hạt lúa bằng cách nuôi cấy nấm trên hạt lúa vô trùng, đến khi tơ nấm lan hết

các hạt lúa, thu hạt, và bảo quản các hạt này trong ống giữ giống ở nhiệt độ -80°C , phương pháp này có thể bảo quản được giống nấm ăn với thời gian trên 18 tháng, hệ sợi của giống vẫn giữ nguyên được hình thái ban đầu, tơ nấm không bị biến màu, không bị thoái hóa, không bị chết.

Giống nấm *Phlebopus spongiosus* được phân lập và bảo quản tại phòng Công nghệ vi sinh, Trung tâm Công nghệ sinh học, có địa chỉ số 2374, quốc lộ 1, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, thành phố Hồ Chí Minh.

b) Nhân giống nấm *P. spongiosus*:

Giống nấm *Phlebopus spongiosus* đã phân lập được cấy chuyển vào bình tam giác chứa môi trường lỏng MPSB có các thành phần (g/l): 2 - 4 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5 - 1,5 g KH_2PO_4 , 0,5 - 1,5 g MgSO_4 , 0,6 - 1,5 g CaCl_2 , 0,1 - 1 g cao nấm men, 0,0375 - 0,075 g Na_2EDTA , 0,0278 - 0,556 g FeSO_4 , 30 - 50 g đường sucroza; điều chỉnh pH=4, nuôi cấy trong tối ở nhiệt độ $28 - 32^{\circ}\text{C}$, trong điều kiện lắc với tốc độ 150-200 vòng/phút, sau 7 ngày thu được các hạt sinh khối nấm;

Nhân giống tiếp các hạt sinh khối trong đĩa petri chứa môi trường thạch được chọn từ môi trường MPSA hoặc MPSA2 có độ pH=5,8, ở nhiệt độ $28 - 32^{\circ}\text{C}$, nuôi cấy trong tối, thời gian từ 7 - 10 ngày, trong đó môi trường MPSA có các thành phần (g/l): 1 - 3 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5 - 1,5 g KH_2PO_4 , 0,5 - 1,5 g MgSO_4 , 0,6 - 1,5 g CaCl_2 , 0,1 - 1 g cao nấm men, 0,0375 - 0,075 g Na_2EDTA , 0,0278 - 0,556 g FeSO_4 , 30 - 50 g đường sucroza, 8 - 15 g aga; môi trường MPSA2 có các thành phần (g/l): 1,65 - 3,3 g NH_4NO_3 , 1,9 - 2,5 g KNO_3 , 0,17 - 0,35 g KH_2PO_4 , 0,44 - 0,65 g CaCl_2 , 0,37 - 0,43 g MgSO_4 , 0,0062 - 0,0072 g H_3BO_3 , 0,0223 - 0,034 g MnSO_4 , 0,0086 - 0,0095 g ZnSO_4 , 0,00083 - 0,00098 g KI, 0,00025 - 0,00037 g Na_2MoO_4 , 0,000025 - 0,000038 g CuSO_4 , 0,00025 - 0,00035 g CoCl_2 , 0,0373 - 0,039 g Na_2EDTA , 0,0278 - 0,045 g FeSO_4 , 0,001 - 0,002 g axit nicotinic, 0,001 - 0,002 g pyridoxin, 0,001 - 0,002 g thiamin, 0,0001 - 0,0002 g biotin, 0,001 - 0,002 g pantothe -Ca, 30 - 50 g đường sucroza và 8 - 15 g aga;

Khi nuôi cấy trên môi trường MPSA2 hệ sợi nấm lan nhanh hơn môi trường MPSA, tuy nhiên thành phần môi trường MPSA2 phức tạp với nhiều hợp chất, bên cạnh đó các chất gốc NO_3^- là loại hóa chất khan hiếm trên thị trường. Do đó, nếu có đủ các thành phần môi trường MPSA2 có thể sử dụng môi trường này để nhân giống, hoặc vẫn có thể nhân giống bằng MPSA với thành phần đơn giản, để kiểm.

Giống nấm *P. spongiosus* là nấm ngoại cộng sinh nên có thời gian sinh trưởng chậm hơn rất nhiều so với các loại nấm ăn thông thường khi nuôi cấy trên các loại môi trường nuôi cấy nấm PDA (Potato Dextro Agar), MYA (Malt Yeast extract Agar), v.v.. Khi nuôi cấy trên

các loại môi trường này hệ sợi nấm sẽ làm hóa nâu môi trường, môi trường hóa nâu gây ức chế sự sinh trưởng của hệ sợi, làm hệ sợi sinh trưởng rất chậm, hệ sợi nấm lan hết đĩa petri sau 35 - 45 ngày nuôi cấy. Môi trường MPSA và MPSA2 cho thời gian nhân giống nấm *P. spongiosus* nhanh hơn gấp ba lần so với các loại môi trường thông thường, sau 7 - 10 ngày nuôi cấy hệ sợi nấm đã lan hết đĩa petri. Hệ sợi nấm sinh trưởng trên môi trường MPSA mà không làm hóa nâu môi trường (Hình 2A).

Phương pháp nhân giống theo cách cấy chuyển giống từ giống lỏng qua môi trường thạch, thay cho phương pháp truyền thống cấy chuyển giống từ môi trường thạch qua thạch cho hiệu suất nhân giống lớn, thời gian nhân giống nhanh, giống ít bị thoái hóa. Khi cấy chuyển giống từ thạch qua thạch nhiều lần dễ làm cho giống bị thoái hóa, giống xuất hiện vùng chẻ quạt trên môi trường (sectoring), vùng chẻ quạt là các vùng tơ dạng bông xen lẫn với tơ dạng rễ (Hình 2B), tơ dạng rễ là tơ khỏe có khả năng tạo quả thể tốt hơn tơ dạng bông, quan sát hình thái hệ sợi trên môi trường thạch để chọn giống tốt cho quá trình nhân giống.

Giai đoạn nhân giống nấm trên môi trường thạch là giai đoạn cần thiết trong quy trình nhân giống cho nuôi trồng tạo quả thể nấm. Khi nhân giống trên môi trường thạch có thể quan sát được hình thái, màu sắc của hệ sợi nấm từ đó kiểm soát được chất lượng giống, loại bỏ giống già, giống yếu, giống bị thoái hóa, đồng thời kiểm soát được tình trạng nhiễm của giống để có thể xử lý kịp thời cho bước nhân giống lỏng tiếp theo.

c) Nhân nuôi meo lỏng nấm *Phlebobus spongiosus*:

giống nuôi cấy trên môi trường thạch nêu trong bước b) được cấy chuyển sang môi trường nhân nuôi meo lỏng MPSB ở nhiệt độ 28 - 32°C, nuôi cấy lắc với tốc độ 150-200 vòng/phút, nuôi cấy trong tối từ 7-10 ngày; Khi nuôi cấy lỏng trong điều kiện lắc nấm *P. spongiosus* trong các môi trường thông thường như: PDB, MYB, Ohta, v.v., nấm làm dịch môi trường hóa nâu, dẫn đến sinh khối nấm thu được thấp hơn so với môi trường MPSB, nấm không làm hóa nâu môi trường MPSB (Hình 3).

Phương pháp nhân meo nấm ăn truyền thống là cấy nấm trên môi trường hạt lúa, sau đó cấy chuyển lúa qua cọng khoai mì, từ cọng khoai mì cấy chuyển qua bịch phôi hoặc cấy trực tiếp lúa vào bịch phôi, phương pháp này có thời gian nhân giống dài 30 ngày trên môi trường hạt lúa và 30 ngày trên cọng khoai mì, giống rất dễ bị thoái hóa vì hệ sợi bị đứt gãy khi cấy chuyển nhiều lần qua môi trường lúa và cọng mì. Phương pháp nhân giống bằng môi trường lỏng trong điều kiện lắc cho hiệu suất nhân giống cao, thời gian nuôi cấy ngắn, chất

lượng giống đồng đều, ổn định, giống ít bị thoái hóa khi cấy chuyển nhiều lần. Nuôi cấy lỏng trong điều kiện lắc, nấm thu được các hạt sinh khối riêng lẻ có sức sống mạnh, sinh trưởng nhanh, các hạt sinh khối nguyên vẹn không bị đứt gãy khi cấy chuyển nhiều lần, do đó đảm bảo được chất lượng giống ổn định. Tuy nhiên phương pháp nhân nuôi meo lỏng nấm đòi hỏi điều kiện nuôi cấy vô trùng khắt khe hơn các phương pháp nhân giống truyền thống, vì vậy cần kiểm soát được tình trạng nhiễm của giống, tránh nhiễm hàng loạt từ giống qua bịch phôi.

d) Nhân nuôi phôi nấm *Phlebotomus spongiosus*:

Cấy meo lỏng nấm thu được ở bước c) vào các bịch nylon chứa môi trường nuôi phôi nấm MPSP theo tỷ lệ 10% (theo khối lượng), nuôi cấy trong tối ở nhiệt độ 28 - 32°C, thời gian từ 30 - 35 ngày. Môi trường nuôi phôi nấm MPSP bao gồm các thành phần chính là mật cưa và gạo lứt có độ ẩm 60 - 70%, trong đó tỷ lệ khối lượng mật cưa: gạo lứt là 2:1, bổ sung thêm 3,5% cám, 0,15 % $MgSO_4$, 0,05% KH_2PO_4 (tính theo khối lượng mật cưa). Độ ẩm môi trường nuôi phôi nấm là 60 - 70%.

Các loại nấm ăn phổ biến là nấm hoại sinh, môi trường nuôi phôi của các loại nấm này thường sử dụng thành phần chính là mật cưa, không phối trộn với gạo. Tuy nhiên *P. spongiosus* là nấm ngoại cộng sinh, khi nuôi cấy trên môi trường 100% mật cưa, hệ sợi nấm không sinh trưởng. Do đó, môi trường để nuôi phôi nấm cộng sinh ngoài thành phần chính là xenluloza cần phải bổ sung thêm thành phần tinh bột từ các loại hạt (lúa, gạo, đại mạch, v.v.). Kết quả khảo sát cho thấy nuôi phôi nấm *P. spongiosus* với thành phần môi trường: mật cưa phối trộn gạo lứt tỉ lệ 2:1 cho hệ sợi lan nhanh và tỉ lệ nhiễm thấp nhất, mật cưa phối trộn các loại hạt khác ở các tỉ lệ khác khi nuôi phôi hệ sợi nấm phát triển chậm hơn và tỉ lệ nhiễm cao hơn.

Các bịch chứa môi trường MPSP thường có trọng lượng 250 g/bịch, được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 90 phút trước khi sử dụng. Khi sử dụng giống lỏng để cấy phôi, thời gian nuôi phôi nhanh hơn so với các loại meo hạt, meo cọng, tuy nhiên phôi dễ bị nhiễm hơn so với các loại meo giống thông thường khác, do đó thời gian vô trùng môi trường cấy giống phải kéo dài.

e) Phủ đất

Các bịch phôi thu được ở bước d) sau khi hệ sợi lan hết bịch phôi (Hình 4), tiến hành mở nắp bịch và phủ đất các bịch phôi. Đất phủ được sử dụng có thể là đá núi lửa (vermiculite, perlite, v.v.), đất sạch, đất thu ở vườn cây, v.v, đất phủ được chọn phải giữ được độ ẩm 60 - 70%. Có thể phối trộn thêm từ 5 -30% các loại phân hữu cơ, phân chuồng hoặc phân hóa học

với lớp phủ để rút ngắn thời gian tạo quả thể. Tuy nhiên cần lưu ý khi sử dụng các loại phân hữu cơ, phân chuồng chưa được xử lý ủ nhiệt kỹ, dễ mang mầm bệnh, các ấu trùng côn trùng gây hại nấm, hoặc khi sử dụng các loại phân có phối trộn nấm *Tricoderma*, nấm *Tricoderma* sẽ phát triển xâm nhiễm toàn bộ bịch phôi nấm. Đất phủ tối ưu là đất thu trong vườn cây ăn quả, không có chứa xác bã động thực vật do đó ít bị côn trùng, ấu trùng xâm nhập, phát triển gây hại nấm, đất vườn cần được phơi xử lý để loại bỏ nấm bệnh.

Đất phủ đạt độ ẩm 60 - 70% được phủ lên bịch phôi một lớp dày khoảng 3 cm, nuôi ủ tiếp các bịch này trong phòng tối có độ ẩm 80 - 90%, ở nhiệt độ 28 - 32°C. Nếu phòng không đủ ẩm có thể phủ một lớp nilon lên trên để lớp phủ không bị mất ẩm. Sau 7 ngày nuôi ủ, hệ sợi nấm sẽ lan đều trên bề mặt lớp phủ (Hình 5).

f) Cảm ứng tạo thể quả nấm

Sau khi hệ sợi lan khoảng 2/3 lớp đất phủ ở bước e), tiến hành di chuyển bịch phôi vào nhà nuôi trồng, nhà nuôi trồng luôn giữ độ ẩm 80-90%, chiếu sáng 12 giờ/ngày với cường độ 1000 - 4500 lux, nhiệt độ 26- 30°C. Độ ẩm trên bề mặt lớp phủ và độ ẩm trong không khí là yếu tố quan trọng cảm ứng tạo nụ nấm. Sau một tuần di chuyển vào nhà nuôi trồng, các nụ nấm bắt đầu xuất hiện (Hình 6). Sau khi nụ nấm xuất hiện, hai tuần tiếp theo đó nụ nấm sẽ phát triển thành cây nấm trưởng thành với phần mũ nấm xòe rộng (Hình 7A), thời điểm thích hợp để thu hái nấm là khi mũ nấm còn ở dạng nón chưa xòe rộng (Hình 7B) (khoảng 10 ngày), thịt nấm chắc và giòn, khi mũ nấm đã xòe lớn thịt mềm và mùi vị giảm.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và bảo quản giống nấm *Phlebopus spongiosus*

Nấm *P. spongiosus* được thu hái ngoài tự nhiên, phân lập nấm ngay sau khi thu hái để đảm bảo chất lượng giống. Cắt một phần thịt nấm từ quả thể cấy trên môi trường PDA, nuôi cấy trong tối, ở nhiệt độ 28 - 32°C. Sau 5 ngày tơ nấm bắt đầu lan từ thịt nấm, sau 35 - 40 ngày nấm lan hết đĩa petri. Cấy chuyển nấm từ môi trường PDA vào bình tam giác 150 ml có chứa lúa đã được hấp vô trùng, sau 30 ngày hệ sợi nấm lan hết các hạt lúa, thu các hạt lúa vào ống giữ giống, bảo quản giống ở -80°C. Giống phân lập được ở trên sử dụng cho quá trình nhân giống nấm, nếu giống phân lập qua quá trình cấy chuyển nhiều lần bị thoái hóa giống, có thể lấy giống đã bảo quản để hoạt hóa lại giống. Ống giống bảo quản ở -80°C được rửa đông từ từ, sau đó cấy trên môi trường MPSA để hoạt hóa giống, giống sau 1,5 năm bảo quản vẫn

giữ được chất lượng giống như ban đầu và có thể sử dụng cho quá trình nhân giống nấm.

Ví dụ 2: Nhân giống nấm *Phlebopus spongiosus*

Giống nấm đã phân lập được cấy vào bình tam giác chứa môi trường lỏng MPSB, nuôi cấy ở 28 - 32°C, nuôi cấy lắc với tốc độ 150 - 200 vòng/phút, nuôi cấy trong tối, sau 7 ngày thu sinh khối, đổ các hạt sinh khối vào đĩa petri chứa môi trường thạch MPSA, một bình tam giác chứa 150 ml giống có thể cấy được 30 đĩa petri. Sau 5 ngày nuôi cấy trên đĩa petri, hệ sợi nấm bắt đầu lan từ các hạt sinh khối, quan sát màu sắc hệ sợi, nếu hệ sợi bị hóa nâu là giống đã già, hệ sợi xù tơi rời dạng bông là giống đã bị thoái hóa, hệ sợi có màu khác xen lẫn là giống bị nhiễm, cần loại bỏ các đĩa giống này. Các đĩa có hệ sợi màu vàng bình thường, tơi dạng rễ là giống tốt, sau 7 ngày nuôi cấy hệ sợi giống lan đều và ổn định, có thể sử dụng các đĩa giống này cho giai đoạn nhân giống lỏng.

Ví dụ 3: Nhân nuôi meo lỏng nấm *Phlebopus spongiosus*

Từ một đĩa petri giống có thể cấy chuyển vào hai bình tam giác chứa 600 - 800 ml môi trường MPSB, nuôi cấy ở 28 - 32°C, nuôi lắc với tốc độ 150 - 200 vòng/phút, nuôi trong tối, sau 7 ngày nuôi cấy sinh khối nấm sẽ nhân đều lên trong môi trường, sau đó để yên 2 - 3 ngày, quan sát tơ nấm lan trên bề mặt môi trường, nếu không xuất hiện tơ nấm trên môi trường là chai giống bị yếu, xuất hiện tơ khác lạ, có màu sắc hình thái khác thường là chai giống bị nhiễm, loại bỏ các chai giống này. Chai giống có tơ nấm lan trên bề mặt môi trường, hệ sợi vàng đều là giống tốt, có thể sử dụng cho giai đoạn nhân phôi giống.

Ví dụ 4: Nhân nuôi phôi nấm *Phlebopus spongiosus*

Chuẩn bị môi trường nhân nuôi phôi nấm, trộn đều các loại nguyên liệu theo công thức: 5 kg gạo lứt (gạo đã bổ sung nước để đạt độ ẩm khoảng 60%), 10 kg mật cưa (mật cưa đã bổ sung nước để đạt độ ẩm khoảng 60%), 15 g MgSO₄, 5 g KH₂PO₄, và 350 g cám. Điều chỉnh độ ẩm môi trường nhân nuôi 60-70%. Sau đó, phân phối vào các bịch nylon, mỗi bịch 250 g, hấp khử trùng ở 121°C trong 90 phút. Sau khi môi trường nguội, phân phối 25 ml giống meo lỏng vào mỗi bịch, nuôi ủ trong tối ở 28 - 32°C, sau khoảng 30 ngày tơ nấm lan sẽ hết bịch phôi, tiến hành mở nắp bịch và phủ đất.

Ví dụ 5: Phủ đất và cảm ứng tạo quả thể *Phlebopus spongiosus*

Sử dụng đất sạch để trồng cây có bán trên thị trường, thêm nước để đạt độ ẩm 60 - 70%, sau đó phủ lên bịch phôi một lớp dày khoảng 3 cm, nuôi ủ trong tối, ở 28 - 32°C. Sau 7

ngày nuôi ủ, hệ sợi nấm sẽ lan đều trên bề mặt lớp đất. Sau khi hệ sợi lan khoảng $\frac{2}{3}$ lớp đất, di chuyển bịch phôi vào nhà nuôi trồng, nhà nuôi trồng thoáng khí, luôn luôn giữ độ ẩm 80 - 90%, chiếu sáng 12 giờ/ngày với cường độ 1000 - 4500 lux, nhiệt độ 26 - 30°C, phun sương nhẹ lên bịch phôi để giữ ẩm bề mặt, kích thích tạo nụ nấm. Sau một tuần di chuyển vào nhà nuôi trồng, các nụ nấm bắt đầu xuất hiện. Cần duy trì độ ẩm và tưới nhẹ để nấm phát triển, mỗi bịch phôi sẽ có một cây nấm trưởng thành và các nụ nấm khác sẽ teo nhỏ rồi chết đi. Khoảng 10 ngày sau khi nụ nấm xuất hiện, nấm đã trưởng thành và có thể thu hái, mũ nấm còn ở dạng nón chưa xòe rộng, thịt nấm chắc và giòn, nấm có mùi thơm nồng đặc trưng.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình nuôi trồng nấm *Phlebopus spongiosus* theo giải pháp hữu ích từ lúc nhân giống trên thạch đến khi thu hái quả thể có thời gian là 68 - 75 ngày, nhanh hơn so với các loại nấm ngoại cộng sinh ăn được đã biết khác như *Lyophyllum shimeji* HY1L, *Boletus* SF-Bo1 là 150 ngày (Ohta, 1994; 2003), *Phlebopus portentosus* CMU51-320-2 là 130 ngày (Kumla và cộng sự, 2014) *Phlebopus portentosus* H-01-3-1 là 95 ngày (Ji và cộng sự, 2011). Quy trình nuôi trồng đơn giản có thể áp dụng ở quy mô công nghiệp với môi trường nhân giống gồm các hợp chất vô cơ thông dụng và nguyên liệu nuôi phôi rẻ tiền dễ kiếm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nuôi trồng tạo quả thể nấm *Phlebopus spongiosus* bao gồm các bước:

a) Phân lập và bảo quản giống nấm *Phlebopus spongiosus*:

giống nấm *Phlebopus spongiosus* được phân lập từ quả thể nấm *Phlebopus spongiosus* thu hái tự nhiên trên môi trường PDA, nuôi cấy trong tối ở nhiệt độ 28 - 32°C, và được bảo quản trong các ống giữ giống;

b) Nhân giống nấm *Phlebopus spongiosus*:

- giống nấm *Phlebopus spongiosus* đã phân lập được chuyển vào bình tam giác chứa môi trường lỏng MPSB có các thành phần (g/l): 2 - 4 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5 - 1,5 g KH_2PO_4 , 0,5 - 1,5 g MgSO_4 , 0,6 - 1,5 g CaCl_2 , 0,1 - 1 g cao nấm men, 0,0375 - 0,075 g Na_2EDTA , 0,0278 - 0,556 g FeSO_4 , 30 - 50 g đường sucroza; điều chỉnh pH=4, nuôi cấy trong tối ở nhiệt độ 28 - 32°C, trong điều kiện lắc với tốc độ 150-200 vòng/phút, sau 7 ngày thu được các hạt sinh khối nấm;

- nhân giống tiếp các hạt sinh khối nấm trên đĩa petri chứa môi trường MPSA có độ pH=5,8, ở nhiệt độ 28 - 32°C, nuôi cấy trong tối, thời gian từ 7 - 10 ngày, trong đó môi trường MPSA có thành phần (g/l): 1 - 3 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5 - 1,5 g KH_2PO_4 , 0,5 - 1,5 g MgSO_4 , 0,6 - 1,5 g CaCl_2 , 0,1 - 1 g cao nấm men, 0,0375 - 0,075 g Na_2EDTA , 0,0278 - 0,556 g FeSO_4 , 30 - 50 g đường sucroza, 8 - 15 g aga;

c) Nhân nuôi meo lỏng *Phlebopus spongiosus*:

giống nuôi cấy trên môi trường thạch nêu trong bước b) được cấy chuyển sang môi trường nhân nuôi meo lỏng MPSB ở nhiệt độ 28 - 32°C, nuôi cấy lắc với tốc độ 150-200 vòng/phút, nuôi cấy trong tối từ 7-10 ngày;

d) Nhân nuôi phôi nấm *Phlebopus spongiosus*:

cấy meo lỏng nấm thu được ở bước c) vào các bịch chứa môi trường nuôi phôi nấm MPSP theo tỷ lệ 10% (theo khối lượng), nuôi cấy trong tối ở nhiệt độ 28-32°C, thời gian từ 30 - 35 ngày; trong đó môi trường nuôi phôi nấm MPSP bao gồm các thành phần khối lượng mặt cưa: gạo lức với tỷ lệ 2:1, bổ sung thêm 3,5% cám, 0,15 % MgSO_4 , 0,05% KH_2PO_4 (tính theo khối lượng mặt cưa), thêm nước cho đủ độ ẩm 60 - 70%; và các bịch chứa môi trường MPSP được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 90 phút trước khi sử dụng;

e) Phủ đất:

sau khi hệ sợi lan hết bịch phôi, tiến hành mở nắp bịch phôi, phủ một lớp đất dày khoảng 3 cm, độ ẩm 60 - 70% lên trên các bịch phôi, nuôi ủ tiếp các bịch này trong phòng tối có độ ẩm 80 - 90%, ở nhiệt độ 28 - 32°C, sau 7 ngày nuôi ủ, hệ sợi nấm sẽ lan đều trên bề mặt lớp đất phủ;

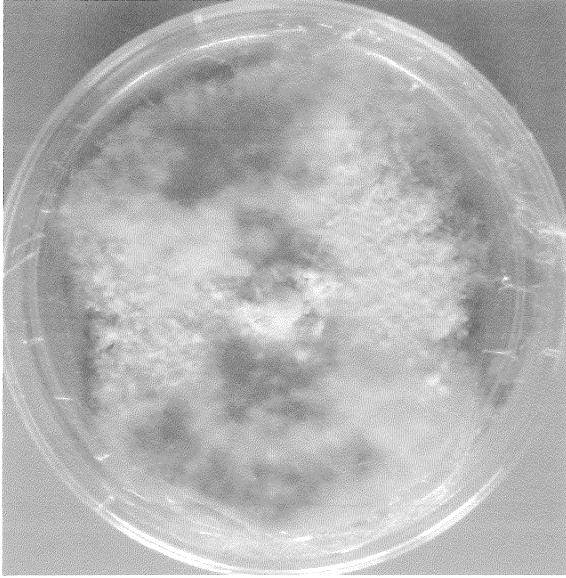
f) Cảm ứng tạo quả thể nấm:

chuyển bịch phôi vào nhà nuôi trồng sau khi hệ sợi lan khoảng 2/3 lớp đất phủ, duy trì độ ẩm nhà nuôi trồng 80 - 90%, chiếu sáng 12 giờ/ngày với cường độ 1000 - 4500 lux, nhiệt độ 26 - 30°C, sau khoảng 7 ngày các nụ nấm bắt đầu xuất hiện, tiếp tục duy trì độ ẩm và tưới nhẹ để nụ nấm phát triển thành quả thể nấm, sau 10 ngày tiếp theo có thể thu hái nấm khi quả thể nấm còn ở dạng nón chưa xòe rộng, thịt nấm chắc và giòn.

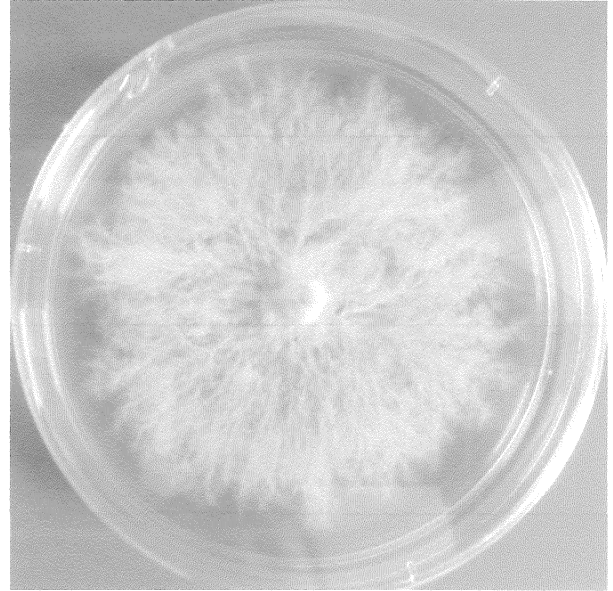
2. Quy trình nuôi trồng tạo quả thể nấm *Phlebopus spongiosus* theo điểm 1, trong đó việc bảo quản giống nấm là ở dạng hạt sinh khối và được thực hiện bằng cách nuôi cấy nấm đã phân lập trong môi trường lỏng lắc, thu các hạt sinh khối, và bảo quản các hạt sinh khối trong các ống giữ giống chứa nước cất vô trùng ở nhiệt độ 4°C.

3. Quy trình nuôi trồng tạo quả thể nấm *Phlebopus spongiosus* theo điểm 1, trong đó việc bảo quản giống nấm là trên hạt lúa và được thực hiện bằng cách nuôi cấy nấm đã phân lập trên hạt lúa vô trùng cho đến khi tơ nấm lan hết các hạt lúa, thu các hạt lúa này, và bảo quản các hạt lúa này trong các ống giữ giống ở nhiệt độ -80°C.

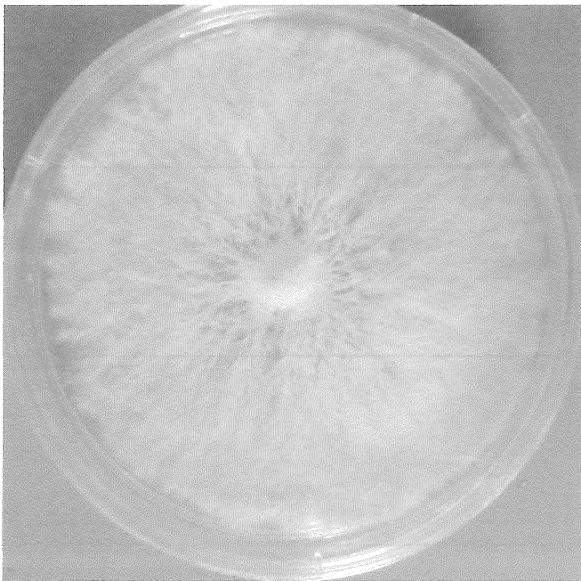
Hình 1A



Hình 1B



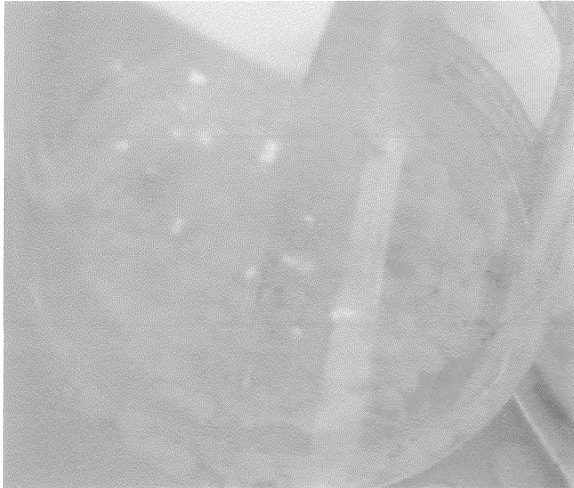
Hình 2A



Hình 2B



Hình 3



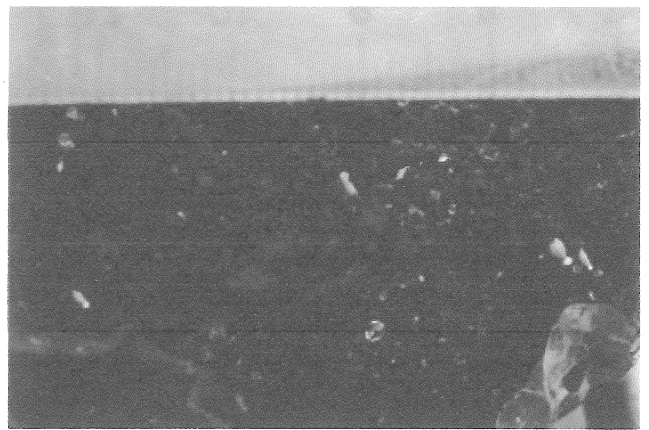
Hình 4



Hình 5



Hình 6



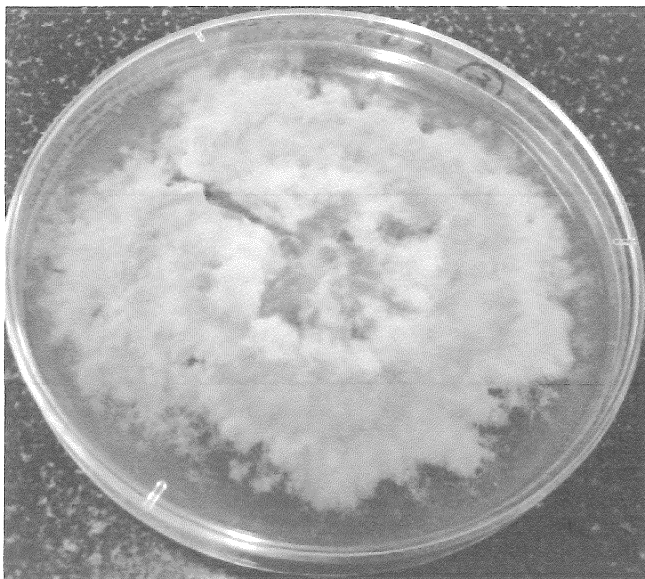
Hình 7A



Hình 7B



Hình 8



Hình 9A



Hình 9B

