



PHÂN LẬP GIỐNG NẤM MỐI *Termitomyces clypeatus*

Nguyễn Thị Ngọc Nhi^{1,2} và Trần Nhân Dũng²

¹Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Thủ Dầu Một

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 07/03/2016

Ngày chấp nhận: 26/10/2016

Title:

Isolation of *Termitomyces clypeatus* species

Từ khóa:

ITS (Internal transcribed spacer), nấm mối, PCR (Polymerase chain reaction), *Termitomyces clypeatus*

Keywords:

ITS (Internal transcribed spacer), Termite mushroom, PCR (Polymerase chain reaction), *Termitomyces clypeatus*

ABSTRACT

Termite mushroom samples used for isolation of *Termitomyces clypeatus* were collected in An Linh Ward, Phu Giao District and Dinh Hiep Ward, Dau Tieng District Binh Duong Province. The tissue culture method of fruiting body was used to produce pure seed in vitro. *T. clypeatus* isolation process was carried out on 5 different media, the results showed that the best medium for growing of Termite mushroom was MT5 with glucose as a carbon source and salts of sulphate, phosphate. Termite mushroom was slowly growing on the basic culture media with added chloramphenicol (200 mg/l). Based on morphological characteristics associated with DNA sequencing of ITS1, 5.8S, ITS2, 28S regions, results of comparing these DNA sequences with the known ones on GenBank (NCBI) showed that the new isolate adopted 99% similarity with known *T. clypeatus* strains. Combination with the morphological characteristics could be finally defined that the isolated Termite mushroom in this study was *T. clypeatus*.

TÓM TẮT

Mẫu nấm mối dùng để phân lập được thu hái ở xã An Linh huyện Phú Giáo và xã Định Hiệp, huyện Dầu Tiếng, tỉnh Bình Dương. Phương pháp nuôi cấy mô quả thể nấm đã được sử dụng để tạo nguồn giống thuần khiết trong ống nghiệm. Quá trình phân lập nấm mối được thực hiện trên 5 môi trường khác nhau. Kết quả cho thấy mô nấm sinh trưởng tốt nhất trên môi trường MT5 với nguồn cacbon là glucose và các muối sulphate, phosphate. Sự sinh trưởng của nấm mối trên các môi trường nuôi cấy cơ bản và thông dụng có bổ sung chloramphenicol (200mg/l) cho thấy, nấm mối *T. clypeatus* phải mất một thời gian dài khoảng 12-15 ngày mới thích nghi được trên môi trường này. Mẫu giống nấm mối thuần khiết phân lập được định danh dựa trên đặc điểm hình thái kết hợp với giải trình tự DNA vùng ITS1, 5.8S, ITS2, 28S. Kết quả so sánh trình tự DNA cho thấy nấm mối phân lập được thuộc loài *T. clypeatus* với mức độ gene tương đồng trên 99%. Kết hợp với các đặc điểm hình thái của nấm mối, có thể kết luận loại nấm mối đã phân lập trong nghiên cứu này là *T. clypeatus*.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Ngọc Nhi và Trần Nhân Dũng, 2016. Phân lập giống nấm mối *Termitomyces clypeatus*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 46b: 17-22.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm mốc *Termitomyces* là loại nấm có giá trị dinh dưỡng rất cao. Nó chứa đầy đủ các axit amin không thay thế và khoáng chất (Ca, Mg, K, Zn, Fe) với hàm lượng cao (Masamba and Kazombo-Mwale, 2010; Nakalembe and Kabasa, 2013; Devi *et al.*, 2014), đồng thời có hương vị thơm ngon hơn rất nhiều so với các loài nấm ăn khác. Một số loài nấm mốc được sử dụng làm dược liệu như *T. robustus*, *T. striatus* với tác dụng chống lão hóa (Adewusi *et al.*, 1993); *T. heimii* chứa axit béo ergosterol, linoleic tăng cường hệ thống miễn dịch, ngăn ngừa bệnh cao huyết áp (Malek *et al.*, 2012); *T. microcarpus* giàu dinh dưỡng chứa 40% protein và 55% carbohydrate trên trọng lượng khô (Chandra *et al.*, 2009), ngoài ra trong nấm mốc còn có nhiều β -D-glucan có khả năng ức chế tế bào ung thư (Villares *et al.*, 2012).

T. clypeatus chứa 31,4 % protein, 32,4% carbohydrate và 14,1 % axit ascorbic (Ogundana and Fagade, 1982). Một số enzyme được tìm thấy trong nấm mốc *T. clypeatus* như hemicellulase, amylases có khả năng làm tăng độ tơi xốp của bánh mì; pectinase làm trong các loại thức uống từ trái cây và một số loại rượu (Ghorai *et al.*, 2009). Đặc biệt, *T. clypeatus* có thể kháng trực khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* (Giri *et al.*, 2012) và hỗ trợ điều trị bệnh thủy đậu (Acharya *et al.*, 2014). Cho đến nay, con người vẫn chưa thể trồng được nấm mốc, hằng năm nấm này chỉ mọc một mùa duy nhất vào tháng 6 đến tháng 8 và được dân thu hái làm thực phẩm với tên thường gọi là nấm mốc trắng nhằm phân biệt với nấm mốc than (màu đen). Trong thời gian gần đây thời tiết không thuận lợi đồng thời với tình trạng ô nhiễm môi trường do hoạt động sản xuất nông nghiệp nên sản lượng nấm mốc đã giảm hơn nhiều so với trước (Nguyễn Thị Ngọc Nhi và Trần Nhân Dũng, 2016).

Hiện nay, Việt Nam vẫn chưa có nhiều công trình nghiên cứu về nấm mốc, vì vậy đề tài được thực hiện nhằm cung cấp giống nấm mốc phục vụ cho công tác nghiên cứu cũng như bảo vệ nguồn gen quý hiếm của loài nấm này.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu nấm mốc được thu hái tại xã An Linh, huyện Phú Giáo (vĩ độ: 11°27'57,5; kinh độ: 106°43'42,2) và xã Định Hiệp, huyện Dầu Tiếng (vĩ độ: 11°20'16,07''; kinh độ: 106°28'21,81'') tỉnh Bình Dương.

2.2 Môi trường dùng cho phân lập

Môi trường: MT1: 15 g agar, 200 g khoai tây, 20 g glucose, 1000 ml nước cất. MT2: 15 g agar,

10g pepton, 5 g CMC, nước cất vừa đủ 1000 ml. MT3: 15 g agar, 15g tinh bột tan, 2 g pepton, 0,46 g KH_2PO_4 , 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g MgSO_4 , 1000 ml nước cất và 0,01 mg Thiamin (Vitamin B1). MT4: 15g agar, 0,9g K_2HPO_4 ; 0,7 g KH_2PO_4 ; 0,75 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g KCl; 2 g Soytone; 10 g khoai tây, 1000 ml nước cất. MT5: 15g agar; 10g glucose; 1g yeast extract; 0,5g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5 giọt FeCl_3 1%; 1000 ml nước cất.

Tất cả các môi trường đều được bổ sung chloramphenicol với hàm lượng 200 mg/l môi trường và khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Các môi trường nuôi cấy này được cải biến từ các môi trường nuôi trồng nấm kinh điển: PDA, Chang, Czapek-Dox, môi trường HM, YESS (Eicker and Botha, 1991).

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Phương pháp phân lập

Quả thể nấm mốc thu hái về, rửa sạch bề mặt bằng nước cất vô trùng, ngâm trong cồn 70° trong 05 phút, lấy ra để khô tự nhiên, sau đó ngâm mẫu trong dung dịch javel 0,1% trong 1 phút, lau khô, bỏ đôi quả thể nấm trong buồng cấy vô trùng, dùng dao cắt mẫu mô nấm phía trong cấy lên các môi trường thạch vô trùng đã được chuẩn bị trước. Mẫu cấy được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng (28°C) và được kiểm tra mỗi ngày, đảm bảo không nhiễm các vi sinh vật khác.

2.3.2 Phương pháp định danh

Giống nấm nghiên cứu được định danh dựa trên khóa định loại và các đặc điểm hình thái: Sử dụng khóa định loại của Mossebo *et al.* (2009). Đây là khóa định loại đã được sửa đổi và bổ sung từ khóa định loại của Heim (1977) và Pegler (1977). Dựa theo mô tả về hình dạng, màu sắc, kích thước của mũ nấm, cuống nấm, thân nấm, kích thước bào tử... của Tibuhwa (2012), Karun and Sridhar (2013).

Giống nấm nghiên cứu được định danh trên cơ sở giải trình tự DNA: DNA được ly trích từ mẫu nấm thuần đã được phân lập. Nồng độ DNA (25-500ng/phản ứng) được xác định trên máy Biophotometer (Eppendorf). 5ul DNA được sử dụng cho phản ứng PCR để khuếch đại đoạn DNA đặc hiệu trong khoảng 900-1200 bp trên vùng rDNA ITS1, 5.8S, ITS2, 28S của nấm bằng thiết bị PCR Thermal Cycler (Bio-Rad). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%, gel được chụp hình lại bằng thiết bị Gel Doc (Bio –Rad). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit QIA quick PCR Purification Kit của QIAGEN, sau đó điện di trên bộ điện di Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent

Technologies). PCR sản phẩm đã tinh sạch trước khi giải trình tự trên hệ thống máy ABI 3130XL (Applied Biosystems). Kết quả được phân tích bằng phần mềm sequencing analysis 5.3 và so sánh với các trình tự đã biết trên cơ sở dữ liệu NCBI.

Các bước thực hiện phản ứng PCR

Sử dụng cặp mồi ITS1 và ITS4 (White *et al.*, 1990) để thực hiện Phản ứng PCR.

Trình tự cặp mồi:

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Thành phần hóa chất, nguyên liệu bao gồm: H₂O khử ion, PCR buffer 1X, dNTPs 200μM, MgCl₂ 2,5 mM, các mồi (ITS1 và ITS4) 100 pmol/μl, Taqpolymerase 0,5 U/μl, DNA 50 ng/μl. Thực hiện phản ứng PCR với 30 chu kỳ ở nhiệt độ và thời gian như sau: 95°C: 50 giây, 57°C: 1 phút 05 giây, 72°C: 1 phút 20 giây. Điện di kiểm tra sản

phẩm PCR trên gel agarose 1,5% với dòng điện 90 V trong khoảng 60 phút.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

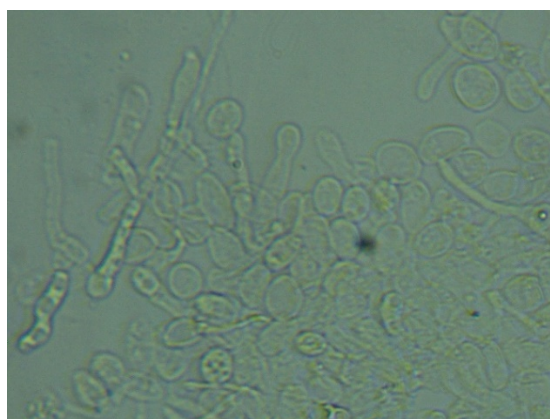
3.1 Đặc điểm hình thái của nấm mốc *T. clypeatus*

Mẫu nấm mốc thu ở hai khu vực có các đặc điểm hình thái giống nhau. Mũ nấm có đường kính 5 – 10 cm, dạng nón, có màu nâu xám, viền mũ có màu nâu nhạt và uốn cong vào trong, mép nứt tạo thành các khía. Phiến nấm gấp nếp, dày, tách rời màu trắng, khi mới nhú lên khỏi mặt đất mũ nấm thường có màu nâu xám, càng lớn thì màu này càng nhạt dần, chóp nấm nhọn. Thịt nấm nạc màu trắng, vị dịu ngọt của thịt gà. Chiều dài thân nấm trung bình từ 8 - 16 cm (Hình 1). Khi quan sát bào tử dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400X cho thấy bào tử có dạng cầu hoặc hơi bầu dục, kích thước khá đồng nhất khoảng 8x10μm, có màu xám đục (Hình 2).



Hình 1: Hình dạng nấm mốc *T. clypeatus*

(a.nhìn từ trên đỉnh mũ nấm., b: nhìn ngang thân và mũ nấm, c: mặt dưới mũ nấm)



Hình 2: Bào tử nấm mốc *T. clypeatus* dưới kính hiển vi quang học, độ phóng đại 400X

3.2 Kết quả phân lập tơ nấm

Theo dõi sự phát triển của mô nấm mốc trên 5 môi trường MT1, MT2, MT3, MT4, MT5 cho thấy môi trường MT5 phù hợp cho sự sinh trưởng mạnh

của nấm mốc với hình thái khuẩn lạc trơn, sáng, gấp nếp dày, đường kính sau 20 ngày nuôi cấy là 4,5 cm, trong khi đó trên môi trường MT4 là 3,5 cm và trên môi trường MT1 là 2,5 cm. Ở 2 môi trường MT1, MT4 khuẩn lạc sau 20 ngày nuôi cấy

ở cùng điều kiện có hình thái thô, sần sùi, mỏng, bề mặt trắng dạng bột bào tử (Hình 3). Nấm *T. clypeatus* không phát triển trên các môi trường MT2, MT3, các mẫu mô cây bị nhũn, hóa nâu, có thể do môi trường dinh dưỡng chứa nguồn cacbon là CMC hay tinh bột tan, nguồn cacbon mà nấm mốc khó đồng hóa được. Điều này cũng có thể liên quan đến hoạt tính enzyme amylase và cellulase ở nấm mốc. Hoạt tính các enzyme này ở nấm mốc rất yếu, vì vậy nấm mốc rất khó phát triển được trên môi trường với nguồn cacbon là các đa phân tử như

cellulose hay tinh bột. Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Zeleke *et al.* (2013) về hoạt độ enzyme nấm mốc trên các môi trường khác nhau.

Từ những kết quả thu được cho thấy sự phát triển của hệ sợi nấm phụ thuộc rất nhiều vào nguồn cacbon có trong môi trường. Đặc biệt, loài nấm mốc *T. clypeatus* phải mất một thời gian dài, khoảng 12-15 ngày mới thích nghi và sinh trưởng được trên môi trường phân lập trong phòng thí nghiệm.



Hình 3: Hình thái khuẩn lạc *T. clypeatus* trong các môi trường MT1, MT4, MT5 sau 20 ngày

Theo dõi hình thái khuẩn lạc sau khi cấy chuyên cho thấy, hệ sợi nấm sinh trưởng tạo thành một lớp dày, lan rộng và hình thành nhiều bào tử

sinh sản vô tính sau khi cấy chuyên được 45 ngày (Hình 4).



Hình 4: Hình thái khuẩn lạc *T. clypeatus* sau khi cấy chuyên 45 ngày

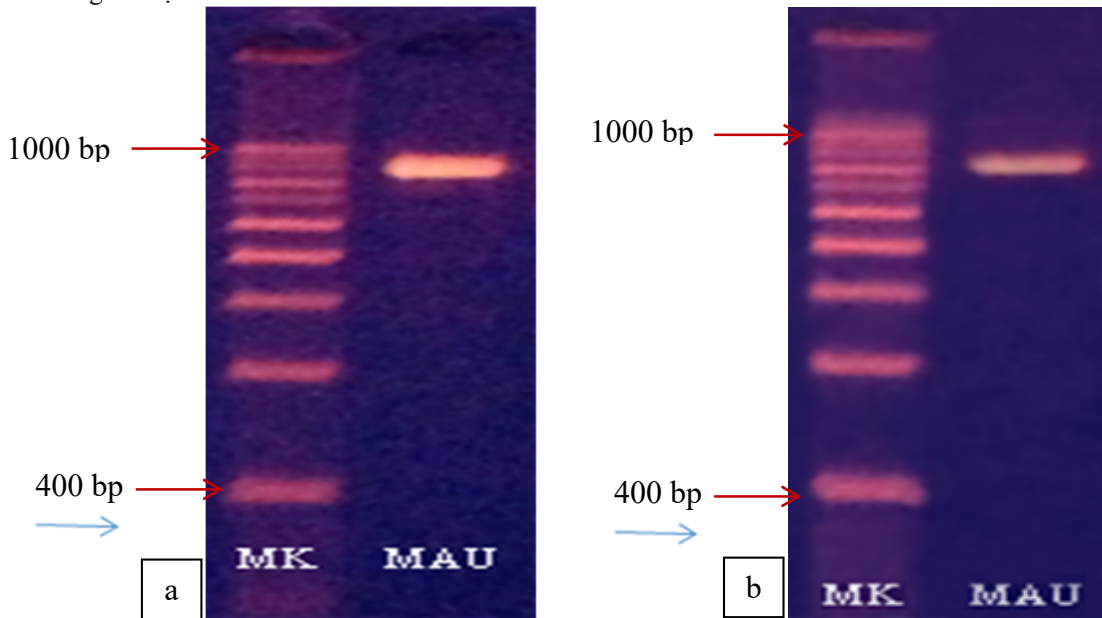
Mặc dù tốc độ phát triển của tơ nấm mốc là khác nhau trên 3 môi trường MT1, MT3, MT4, từ ngày thứ 10 – 30, hình thái khuẩn lạc trên 3 môi

trường khá đồng nhất, với màu, nâu nhạt, bề mặt khuẩn lạc gồ ghề với nhiều nếp gấp. Từ sau 40 ngày cấy chuyên, hình thái trở nên thô, ráp, khuẩn

lạc có màu trắng bột, hoặc hóa nâu ở giữa. Trên môi trường MT1 khuẩn lạc phát triển chậm nhất, có thể do thiếu thành phần dinh dưỡng muối khoáng so với môi trường MT4, MT5 và điều này đã ảnh hưởng đến quá trình biến dưỡng của tơ nấm mốc. Đặc biệt khuẩn lạc được cấy chuyển trên môi trường MT5 hóa nâu nhanh hơn khuẩn lạc trên hai môi trường còn lại do cạn kiệt nguồn dinh dưỡng trước bởi tốc độ sinh trưởng tơ nấm mốc nhanh hơn hai môi trường còn lại.

3.3 Kết quả định danh trên cơ sở giải trình tự DNA

Mẫu nấm được phân lập ở 2 khu vực đều được giải trình tự DNA. Sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt với một băng đặc trưng cho đoạn rDNA ITS1, 5.8S, ITS2, 28S của nấm mốc trên gel điện di (Hình 5).

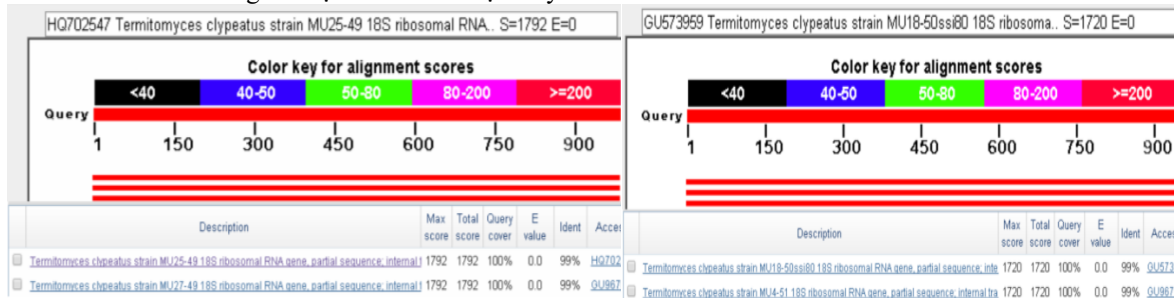


Hình 5: Kết quả điện di sản phẩm PCR

(a. Mẫu nấm mốc ở huyện Phú Giáo; b. Mẫu nấm mốc ở huyện Dầu Tiếng)

Kết quả sau khi giải trình tự DNA vùng ITS1, 5.8S, ITS2, 28S của mẫu nấm mốc phân lập được và so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen NCBI, cho thấy trình tự 980 bp của nấm mốc thu ở xã An Linh, huyện Phú Giáo và trình tự 938 bp của mẫu nấm mốc thu ở xã Định Hiệp, huyện Dầu Tiếng có mức tương đồng trên 99% với loài *T. clypeatus* của Sawhasan *et al.* không có đột biến mất đoạn hay

thêm đoạn xảy ra (mã truy cập trên NCBI: HQ702547.1 và GU573959.1) (Hình 6). Dựa trên kết quả giải trình tự DNA trên vùng ITS1, 5.8S, ITS2, 28S của mẫu nấm mốc, kết hợp với đặc điểm về hình thái của nấm mốc có thể kết luận hai chủng nấm mốc này thuộc loài *T. clypeatus* (có mã truy cập trên ngân hàng gen NCBI là: KU569480.1).



Hình 6: Kết quả so sánh trình tự DNA của mẫu nấm mốc phân lập được với các trình tự từ ngân hàng gene NCBI

4 KẾT LUẬN

Đề tài đã phân lập được chủng nấm mốc thuần khiết *T. clypeatus* từ quả thể nấm. Sự phát triển của mô nấm mốc phụ thuộc rất nhiều vào nguồn cacbon, mô nấm mốc có thể phát triển được trên môi trường có tinh bột hoặc cellulose là nguồn cacbon. Khảo sát sự sinh trưởng của tơ nấm mốc trên 5 môi trường chứa thành phần dinh dưỡng thông dụng, nhận thấy mô nấm mốc sinh trưởng tốt trên môi trường MT5 (15g agar; 10g glucose; 1g yeast extract; 0,5g KH₂PO₄; 0,5g MgSO₄.7H₂O; 0,5g (NH₄)₂SO₄; 5 giọt FeCl₃ 1%; 1000 ml nước cất).

Việc phân lập thành công giống nấm mốc đã góp phần vào việc chủ động nguồn cung cấp giống nấm mốc *T. clypeatus* trong điều kiện nguồn giống từ tự nhiên ngày càng khan hiếm nhằm phục vụ cho công tác nhân giống, tạo ra sinh khối và làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Acharya, K. and Dutta, A. K., 2014. Traditional and Ethno-medicinal knowledge of mushrooms in west Bengal, India. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7 (3): 35-41.
- Adewusi, S. R. A., Alofe, F. V., Odeyemi, O., Afolabi, O. A. and Oke, O. L., 1993. Studies on some edible wild mushrooms from Nigeria: 1. Nutritional, teratogenic and toxic considerations. *Plant foods for human nutrition*, 43(2): 115-121.
- Botha, W. J. and Eicker, A., 1991. Cultural studies on the genus *Termitomyces* in South Africa. I. Macro-and microscopic characters of basidiome context cultures. *Mycological Research*, 95(4): 435-443.
- Chandra, K., Ghosh, K., Ojha, A. K. and Islam, S. S., 2009. A protein containing glucan from an edible mushroom, *Termitomyces microcarpus* (var). *Natural product communications*, 4(4): 553-556.
- Devi, M. B., Singh, S. M. and Singh, N. I., 2014. Nutrient analysis of indigenous *Termitomyces eurrhizus* (Berk.) Heim of Manipur, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(6): 491-496.
- Ghorai, S., Banik, S. P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S. and Khowala, S., 2009. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food research international*, 42(5): 577-587.
- Giri, S., Biswas, G., Pradhan, P., Mandal, S. C. and Acharya, K., 2012. Antimicrobial activities of basidiocarps of wild edible mushrooms of West Bengal, India. *International Journal of PharmTech Research*, 4(4):1554-1560.
- Karun, N. C. and Sridhar, K. R., 2013. Occurrence and distribution of *Termitomyces* (*Basidiomycota, Agaricales*) in the Western Ghats and on the west coast of India. *Czech Mycology*, 65(2): 233-254.
- Malek, S. N.A., Kanagasabapathy, G., Sabaratnam, V., Abdullah, N. and Yaacob, H., 2012. Lipid components of a Malaysian edible mushroom, *Termitomyces heimii* Natarajan. *International Journal of Food Properties*, 15(4): 809-814.
- Masamba, K. G. and Kazombo-Mwale, R., 2010. Determination and comparison of nutrient and mineral contents between cultivated and indigenous edible mushrooms in Central Malawi. *African Journal of Food Science*, 4(4): 176-179.
- Mossebo, D. C., Njounkou, A. L., Piatek, M., Kengni, B. and Diasbe, M. D. (2009). *Termitomyces striatus f. pileatus f. nov. and f. brunneus f. nov.* from Cameroon with a key to central African species. *Mycotaxon*, 107(1): 315-329.
- Nakalembe, I. and Kabasa, J. D., 2013. Fatty and amino acids composition of selected wild edible mushrooms of Bunyoro Sub-region, Uganda. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 13(1): 7225-7241.
- Nguyễn Thị Ngọc Nhi và Trần Nhân Dũng, 2016. Phân lập giống nấm mốc *Termitomyces* sp. In: Nguyễn Lân Hùng Sơn (Editor). Báo cáo khoa học về nghiên cứu và giảng dạy Sinh học ở Việt Nam. Hội nghị Khoa học Quốc gia lần thứ 2, 20/05/2016, Đà Nẵng. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội. Hà Nội, 601-606.
- Ogundana, S. K. and Fagade, O. E., 1982. Nutritive value of some Nigerian edible mushrooms. *Food chemistry*, 8(4): 263-268.
- Tibuhwa, D. D., 2012. *Termitomyces* species from Tanzania, their cultural properties and unequalled basidiospores. *Journal of Biology and Life Science*, 3(1): 31-45.
- Villares, A., Mateo-Vivaracho, L. and Guillamón, E., 2012. Structural features and healthy properties of polysaccharides occurring in mushrooms. *Agriculture*, 2(4): 452-471.
- Zelege, J., Gessesse, A. and Abate, D., 2013. Substrate-utilization Properties of *Termitomyces* Culture Isolated from Termite Mound in the Great Rift Valley Region of Ethiopia. *Journal of Natural Sciences Research* 3(1):16-21.