

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC VÀ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM ROM *VOLVARIELLA VOLVACEA*

Trần Đông Anh, Trịnh Tam Kiệt
Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học - Đại học Quốc Gia Hà Nội
Phan Hữu Tôn
Khoa Công nghệ sinh học - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong sản xuất nuôi trồng và chọn tạo giống nấm rom ưu thế lai, nghiên cứu các đặc tính sinh học của từng chủng và đa dạng di truyền giữa chúng đóng vai trò quyết định đến năng suất, chất lượng nấm và sự thành công trong công tác chọn tạo giống. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra nấm rom *Volvariella volvacea* là loài đồng tần sơ cấp, có mũ nấm rộng, có tốc độ mọc nhanh, có khả năng hình thành hậu bào tử. Nó có thể mọc tốt ở 43°C nhưng không thể chịu được nhiệt độ lạnh dưới 10°C (S. T. Chang, 1978). Các nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng, sử dụng kỹ thuật AP-PCR đã thu được sự đa hình về các đoạn DNA được nhân lên trong các cơ thể bố mẹ và con lai của 2 loài nấm rom *V. volvacea* và *V. bombycina*. Với mỗi mẫu AP-PCR, đã thu được 4 - 10 đoạn DNA được nhân lên, các đoạn nằm trong khoảng 0,2 - 1,35 Kb (J. Zhao & S. T. Chang, 1997). Tuy nhiên các nghiên cứu về đặc điểm sinh học và đa dạng di truyền của các chủng nấm rom *V. volvacea* phổ biến ở Việt Nam phục vụ cho nuôi trồng và chọn tạo giống ưu thế lai còn nhiều hạn chế. Năng suất và chất lượng nấm rom ở nước ta còn chưa cao. Công trình này nhằm cung cấp một số đặc điểm sinh học và sự đa dạng di truyền của 5 chủng nấm rom *V. volvacea* phổ biến ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Các chủng nấm rom

5 chủng nấm rom dùng trong nghiên cứu hiện đang được lưu giữ tại Viện Di truyền Nông nghiệp và Trung tâm Công nghệ sinh học (Nay là Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học) - Đại học Quốc Gia Hà Nội có kí hiệu là VIDT, V2, V4, V23 và VT.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nuôi cấy, đánh giá về các đặc điểm sinh học thực hiện theo Trịnh Tam

Kiệt (1975), Trịnh Tam Kiệt và cộng sự (1986); đánh giá sự mọc và độ dày của nấm theo Schwantes (1971).

Phương pháp nghiên cứu đa dạng di truyền bằng chi tip AP-PCR tiến thành theo J. Zhao* and S.T. Chang (1997) có cải tiến tại Khoa Công nghệ sinh học - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

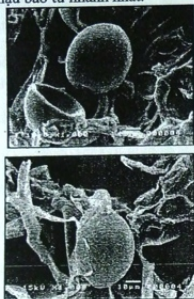
3.1. Sự mọc của nấm trên môi trường thạch

Chúng tôi tiến hành theo dõi tốc độ mọc và một số chỉ tiêu khác ở 3 mức nhiệt độ 25°C, 30°C và 35°C. Kết quả cho thấy, tốc độ mọc của các chủng đạt từ 81,13 - 576,72 µm/h. Trong đó chủng V4 có tốc độ mọc nhanh nhất ở cả 3 mức nhiệt độ. Chủng VT không quan sát thấy sự mọc ở 25°C, ở các nhiệt độ khác có quan sát thấy sự mọc tuy nhiên tốc độ mọc là rất chậm. Chủng VIDT có độ dày hệ sợi nấm cao nhất ở cả 3 nhiệt độ, chủng V23 và VT có hệ sợi thưa nhất. Các chủng nghiên cứu đều tạo thành các khuẩn lạc màu trắng trên môi trường thạch khoai tây, khi già chuyển sang màu vàng. Trên kính hiển vi quang học, sợi nấm các chủng đều có vách ngăn ngang, không có khoá, trong mỗi tế bào có nhiều nội chất và đôi khi thấy rõ cả không bào. Đường kính sợi nấm không có sự khác nhau nhiều giữa các chủng đạt 3-10µm.

Ngoại trừ chủng VT không có sự hình thành hậu bào tử, tất cả các chủng còn lại đều quan sát thấy hậu bào tử, thời gian hình thành hậu bào tử từ 5-22 ngày tùy theo chủng nấm và nhiệt độ, trong đó chủng V23 có thời gian hình thành hậu bào tử sớm nhất với lượng xuất hiện lớn nhất. Chủng VIDT có lượng hậu bào tử ít nhất và thời gian hình thành muộn nhất. Có 3 chủng xuất hiện hậu bào tử màu đỏ đến nâu đỏ, 1 chủng xuất hiện

các hậu bào từ màu trắng với sắc thái hơi vàng. Các hậu bào từ có hình cầu đến trái xoan, đường kính 40 - 54,2 μm .

Trong 3 mức nhiệt độ, các chủng không có sự khác nhau về độ dày sợi, lượng hậu bào từ cũng như màu sắc hậu bào từ. Chỉ có sự khác nhau về tốc độ mọc sợi và thời gian hình thành hậu bào từ trong đó ở 35°C tốc độ mọc diễn ra mạnh mẽ nhất và thời gian hình thành hậu bào từ nhanh nhất.



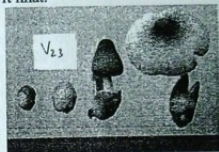
Hình 1. Hậu bào từ chủng V4

3.2. Sự mọc của nấm trên môi trường nhân giống cấp II

Sau khi nghiên cứu tốc độ mọc của các chủng trên môi trường nuôi cấy thuần khiết ở nhiệt độ khác nhau, chúng tôi nhận thấy khả năng phát triển của hệ sợi đạt tốt nhất ở 35°C. Vì vậy trong nghiên cứu sự mọc của hệ sợi trên môi trường nhân giống cấp 2 chúng tôi chỉ quan tâm ở nhiệt độ 35°C. Kết quả chỉ ra rằng, các chủng đều có tốc độ mọc trên môi trường nhân giống cấp II nhanh hơn so với trên môi trường nuôi cấy thuần khiết, đạt 351,85 - 642,39 $\mu\text{m}/\text{h}$ trong đó chủng V23 và VT có sự tăng tốc độ mọc lớn nhất. Giữa 5 chủng nghiên cứu, chủng V4 vẫn đạt tốc độ mọc nhanh nhất, chủng VT đạt tốc độ mọc thấp nhất. Chủng V23 xuất hiện các hậu bào từ màu đỏ nâu với thời gian hình thành và lượng xuất hiện lớn nhất. Chủng VIDT xuất hiện các hậu bào từ màu trắng có sắc thái hơi vàng với lượng ít nhất và thời gian hình thành lâu nhất. Chủng VT không quan sát thấy sự hình thành hậu bào từ.

3.3. Sự hình thành quả thể của các chủng nấm nghiên cứu

Chúng tôi tiến hành nuôi trồng các chủng trên bông hạt trong cùng một điều kiện như nhau. Kết quả chủng VT chỉ quan sát thấy sự mọc trên giá thể nuôi trồng mà không quan sát thấy sự hình thành quả thể. Giữa các chủng không có sự chênh lệch lớn về thời gian mọc kín mô giá thể. Chủng V23 có thời gian xuất hiện mầm mỏng quả thể ngắn nhất (6 ngày) và lượng mầm quả thể nhiều nhất, tổng thời gian sinh trưởng, phát triển ít nhất.



Hình 2. Quả thể chủng V23

Chủng VIDT có thời gian hình thành mầm mỏng quả thể lâu nhất, lượng mầm quả thể ít nhất và tổng thời gian sinh trưởng phát triển dài nhất.



Hình 3. Quả thể chủng VIDT

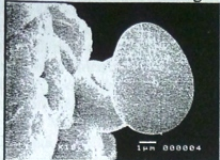
Đặc điểm bào tử hữu tính của các chủng có sự khác nhau khi quan sát trên kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 7500 - 10000 lần. Bào tử các chủng đạt kích thước 4,8 - 5,06 x 6,53 - 8,8 μm .



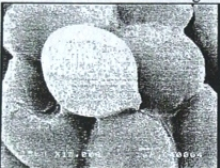
Hình 4. Bào tử hữu tính chủng VIDT



Hình 5. Bào tử hữu tính chủng V2



Hình 6. Bào tử hữu tính chủng V4



Hình 7. Bào tử hữu tính chủng V23

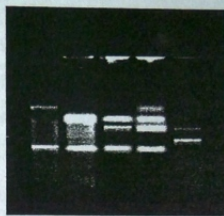
3.4. Đa dạng di truyền các chủng nấm nghiên cứu

Chúng tôi đã tách chiết thành công DNA các chủng nấm rom nghiên cứu. Kết quả kiểm tra độ nguyên vẹn, độ tinh sạch và nồng độ DNA cho thấy các mẫu DNA tách chiết được đều đảm bảo tiêu chuẩn cho tiến hành phản ứng PCR.

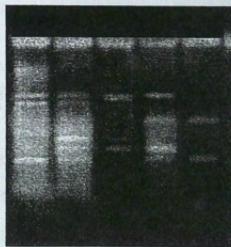


Hình 8. ADN các chủng nấm rom khi điện di trên gel agarose 2%

Kết quả phản ứng PCR với 2 mỗi M13-5' CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC 3' và EcoRI-Ext-5'TAGGCGTATCACGAGGCCCT 3' đã thu được các băng ADN đa hình khi điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2%. (Hình 9 - 10).



Hình 9. Kết quả điện di sản phẩm PCR của mỗi M13 (giếng 1-chủng V1DT, giếng 2-chủng V2, giếng 3-chủng V4), giếng 4 chủng V23, giếng 5-chủng VT



Hình 10. Kết quả điện di sản phẩm PCR của mỗi EcoRI-Ext (giếng 1-chủng V1DT, giếng 2-chủng V2, giếng 3-chủng V4), giếng 4 chủng V23, giếng 5-chủng VT

Hình ảnh điện di cho thấy, mỗi M13 đã nhận được ở các chủng nấm từ 1 - 4 băng DNA đa hình. Còn mỗi EcoRI-Ext nhận được 1-5 băng DNA đa hình. Số lượng này là khá ít so với nghiên cứu của J. Zhao & S. T. Chang tiến hành năm 1997. Trong nghiên cứu của mình các ông đã thu được 4 - 10 băng DNA ở mỗi giếng điện di.

Kết quả thu được từ phản ứng PCR và điện di được dùng cho các phân tích bằng chương trình NTSYS Spc 2.02h. Hệ số đồng

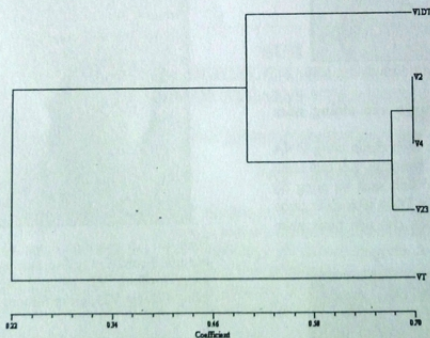
dạng di truyền S_{ij} của các mẫu nấm nghiên cứu được chỉ ra trên bảng 1.

Bảng 1. Hệ số đồng dạng di truyền của các mẫu nấm nghiên cứu

	VID T	V2	V4	V23	VT
VID T	1,00				
V2	0,54	1,00			
V4	0,40	0,70	1,00		
V23	0,56	0,69	0,67	1,00	
VT	0,16	0,27	0,14	0,31	1,00

Dựa vào hệ số đồng dạng di truyền, sau khi phân tích bằng chương trình NTSYS Spc

2.02h chúng tôi thu được sơ đồ cây phân loại của 5 chủng nấm nghiên cứu (hình 11).



Hình 11. Cây phân loại các mẫu nấm nghiên cứu

Trên cây phân loại, chúng ta có thể chia 5 chủng nấm rơm thành 2 nhóm khác nhau ở mức tương đồng 0,22. Nhóm 1 gồm 4 chủng là VIDT, V2, V4 và V23. Nhóm 2 là chủng VT. Khoảng cách di truyền giữa VT với các chủng còn lại là khá lớn, khi lai với nhau sẽ

không thu được ưu thế lai. Trong 4 chủng còn lại có sự phân biệt nhau thành 2 nhóm ở mức tương đồng di truyền 0,5. Nhóm thứ nhất là chủng VIDT. Nhóm thứ hai gồm 3 chủng V2, V4 và V23. Khoảng cách di truyền của hai nhóm này là 0,5, do đó khi lai

hai nhóm này với nhau, khả năng đạt được ưu thế lai sẽ cao hơn.

IV. KẾT LUẬN

1. Ở 35°C, các chủng có tốc độ mọc và thời gian hình thành hậu bào tử nhanh hơn so với ở 25 và 30°C. Chủng VT không xuất hiện hậu bào tử ở cả 3 mức nhiệt độ. Chủng V23 hình thành nhiều hậu bào tử nhất, ít nhất là chủng V1DT. Hệ thống sợi nấm của các chủng không có sự khác nhau nhiều.
2. Trên môi trường nhân giống cấp 2, chủng V4 có tốc độ mọc nhanh nhất. Chủng V23 có thời gian hình thành hậu bào tử sớm nhất và lượng hậu bào tử nhiều nhất.
3. Chủng V23 có thời gian mọc và hình thành quả thể trên bông nhanh nhất. Chậm nhất là chủng V1DT. Chủng VT không thấy hình thành quả thể trên bông.
4. DNA của các chủng nấm đều đảm bảo độ nguyên vẹn và độ tinh sạch cho phản ứng PCR. Kết quả điện di sản phẩm PCR với hai mẫu đều cho các băng DNA đa hình. Hai chủng V4 và VT là hai chủng xa nhau nhất về di truyền. Còn hai chủng V2 và V4 là hai

chủng gần nhau nhất về mặt di truyền. Khi lai chủng V1DT với một trong 3 chủng V2, V4, V23 thì khả năng ưu thế lai đạt được là cao hơn cả so với các cặp lai khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chang S. T. The biology and cultivation of edible fungi. New York :Academic Press, 1978, pp573-605.
2. J. Zhao* and S.T. Chang (1997), "Interspecific hybridization between *Volvariella volvacea* and *V. bombycina* by PEG-induced protoplast fusion", World Journal of Microbiology & Biotechnology 13, 145-151.
3. Trịnh Tam Kiệt (1981), Năm lớn ở Việt Nam, Tập 1, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 1981.
4. Schwantes, H. O. und Salttler, P. W. (1971), "Methoden zur Messung der Wachstumsgeschwindigkeit von Pilzmycelien", Oberhess. Naturwiss. Zeitschr. 38.

SUMARY

STUDIES ON BIOLOGICAL CHARACTERISTIC AND GENETIC VARIABILITY OF STRAINS *VOLVARIELLA VOLVACEA*

Tran Dong Anh, Trinh Tam Kiet

Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi

Phan Huu Ton

Faculty of Biotechnology, Hanoi University Agriculture

Five strains Paddy straw mushroom were used for studied bio-character and genetic variability. Four strains are able to produce chlamydo spores on agar medium and fruit bodies on cotton waste substratum. The morphology of chlamydo spores as well as basidiospores were observed under scanning microscope. Two primers M13 Primer: 5' cgccagggtttccaccgacagc 3', EcoRI-Ext Primer: 5' tagcggtatcaccaggccct 3' were used as the AP-PCR primers. AP-PCR reactions were determined genetic variability of these strains paddy straw mushroom.

* Người thẩm định: TS. Nguyễn Trung Thành.