

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

★★★★★★★★



NGUYỄN NHƯ QUỲNH

**TÌM HIỂU VỀ MỘT LOẠI NẤM LINH CHI
THU HÁI TẠI THỦ ĐỨC – TP. HỒ CHÍ MINH**

**LUẬN VĂN KỸ SƯ
CHUYÊN NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★



**TÌM HIỂU VỀ MỘT LOẠI NẤM LINH CHI
THU HÁI TẠI THỦ ĐỨC – TP. HỒ CHÍ MINH**

**LUẬN VĂN KỸ SƯ
CHUYÊN NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Giáo viên hướng dẫn
TS. TRẦN THỊ DUNG
CN. LƯU PHÚC LỢI**

**Sinh viên thực hiện
NGUYỄN NHƯ QUỲNH
KHÓA: 2002 - 2006**

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY**

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★



**FINDING OUT ABOUT A KIND OF
GANODERMA PICKED IN THU DUC DISTRICT,
HO CHI MINH CITY**

**GRADUATION THESIS
MAJOR: BIOTECHNOLOGY**

**Professor
Dr. TRAN THI DUNG
LUU PHUC LOI**

**Student
NGUYEN NHU QUYNH
TERM: 2002 - 2006**

HCMC, 09/2006

LỜI CẢM ƠN



Xin chân thành cảm ơn:

- * Ban giám hiệu trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ chí Minh đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt thời gian học tập tại trường.
- * TS. Trần Thị Dung và CN. Lưu Phúc Lợi đã hết lòng hướng dẫn và động viên tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài tốt nghiệp.
- * Các thầy cô và các anh chị trong bộ môn Công nghệ sinh học đã giúp đỡ và góp ý cho tôi trong suốt thời gian làm đề tài.
- * TS. Bùi Minh Trí - Trung tâm phân tích thí nghiệm hóa sinh Đại học Nông Lâm Tp. HCM.
- * KS. Nguyễn Minh Khang - cựu sinh viên lớp CNSH 27 và nhóm bạn thực hiện đề tài nghiên cứu khoa học về nấm Linh chi đỏ lớp CNSH29 đã giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài.
- * Các bạn lớp CNSH28 đã luôn ở bên tôi, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài.

Cuối cùng xin ghi nhớ công lao Ba, Mẹ, và anh trai đã lo lắng, chăm sóc, tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề tài vừa qua.

Tp. Hồ Chí Minh, tháng 8 năm 2006

Nguyễn Như Quỳnh

TÓM TẮT

NGUYỄN NHƯ QUỲNH, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. Tháng 8/2006.

Đề tài “**Tìm hiểu về một loại nấm Linh chi thu hái tại Thủ Đức – Tp. Hồ Chí Minh**” được thực hiện tại Bộ môn Công Nghệ Sinh Học, trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM.

Hội đồng hướng dẫn

TS. TRẦN THỊ DUNG

CN. LƯU PHÚC LỢI

Đối tượng nghiên cứu là một loại nấm Linh chi thu thập tại trường Đại học Nông Lâm – Thủ Đức – Tp. Hồ Chí Minh.

Nội dung nghiên cứu

- Định danh sơ bộ một loại nấm Linh chi đở mọc tự nhiên tại trường Đại học Nông Lâm. Phân lập và trồng thử nghiệm loại nấm này trên các loại môi trường giá thể.
- Nuôi cấy tơ nấm Linh chi đở trên các môi trường khảo sát lan tơ, môi trường nhân giống, môi trường nhân sinh khối (môi trường lỏng).
- Thử nghiệm sinh hóa đối với những thành phần dược chất có trong tơ nấm và quả thể nấm Linh chi đở.

Kết quả thu được

- Định danh sơ bộ giống Linh chi đở thu hái ở trường Đại học Nông Lâm là giống *Ganoderma lucidum*.
- Xác định được các môi trường tốt nhất cho sự phát triển của nấm Linh chi đở
 - Môi trường cấp một : PGA có bổ sung 10% dịch chiết cà rốt.
 - Môi trường nhân giống cấp 2: Lúa 95% + 5% mạt cưa + 5% cám gạo.
 - Hai môi trường sản xuất có hiệu suất cao:
 - 1) Mùn cưa 65%, Cám gạo 15%, Cám bắp 10%, Trấu 10%, Vôi 1%, SA 5‰, Lân 1‰, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 ‰.
 - 2) Mùn cưa 75%, Trấu 25%, SA 2‰, Vôi 1‰.
- Các dược chất có trong tơ nấm và trong quả thể nấm: Saponine, saponin triterpenoid, acid béo và polysaccharide.

MỤC LỤC

∞ ★ ∞

	TRANG
Trang tựa	
Lời cảm ơn.....	iii
Tóm tắt.....	iv
Mục lục	v
Danh sách các bảng	ix
Danh sách các hình và các biểu đồ	x
Phần 1: MỞ ĐẦU	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích đề tài	2
1.3. Yêu cầu đề tài	2
Phần 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
2.1. Nấm	3
2.1.1. Khái quát về nấm	3
2.1.2. Hình thái học của sợi nấm	4
2.1.2.1. Hình thái sợi nấm.....	4
2.1.2.2. Hình thái thể quả.....	5
2.1.3. Các giai đoạn phát triển của nấm.....	6
2.1.3.1. Giai đoạn tăng trưởng	6
2.1.3.2. Giai đoạn phát triển.....	6
2.1.4. Đặc điểm biến dưỡng của nấm	7
2.1.5. Điều kiện sinh trưởng của nấm.....	7
2.1.5.1. Chất dinh dưỡng.....	7
2.1.5.2. Ảnh hưởng của các yếu tố vật lý lên sự sinh trưởng hệ sợi nấm.....	8
2.2. Nấm Linh chi	9
2.2.1. Phân loại.....	9
2.2.2. Linh chi và tác dụng trị liệu của Linh chi	9
2.2.2.1. Giới thiệu về nấm Linh chi	9

2.2.2.2. Tác dụng trị liệu của nấm Linh chi	11
2.2.3. Hoạt chất sinh học của nấm Linh chi.....	14
2.2.3.1. Ganoderma polysaccharide (GLPs)	15
2.2.3.2. Ganoderic Acid	16
2.2.3.3. Ganoderma Adenosine.....	16
2.2.3.4. Alcaloid.....	17
2.2.3.5. Hợp chất Saponin.....	17
2.2.3.6. Germanium hữu cơ	18
2.2.4. Đặc điểm hình thái – cấu trúc – sinh thái	18
2.2.4.1. Về hình thái.....	18
2.2.4.2. Về sinh thái	19
2.3. Điều kiện sinh trưởng và phát triển của nấm Linh chi	20
2.4. Nguyên liệu trồng nấm Linh chi.....	21
Phần 3: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM.....	23
3.1. Thời gian, địa điểm.....	23
3.2. Vật liệu thí nghiệm	23
3.2.1. Giống.....	23
3.2.2. Môi trường phân lập giống	23
3.2.5. Môi trường khảo sát lan tơ.....	24
3.2.3. Môi trường nhân giống	24
3.2.4. Giá thể tổng hợp trồng nấm	25
3.2.6. Môi trường nhân sinh khối	25
3.2.7. Dụng cụ.....	26
3.2.8. Hóa chất sử dụng	26
3.3. Phương pháp thí nghiệm.....	26
3.3.1. Quan sát hình thái giải phẫu quả thể và định danh nấm Linh chi đỏ bằng bào tử dưới kính hiển vi	26
3.3.1.1. Hình thái giải phẫu quả thể nấm	26
3.3.1.2. Quan sát hệ sợi nấm.....	26
3.3.1.3. Định danh nấm Linh chi đỏ bằng bào tử dưới kính hiển vi.....	26
3.3.2. Phân lập nấm Linh chi đỏ mọc tự nhiên	27

3.3.3. Khảo sát khả năng lan toả của nấm Linh chi trên các môi trường agar	27
3.3.4. Khảo sát sự sinh trưởng của sợi nấm trên môi trường nhân giống.....	28
3.3.5. Khảo sát sự tăng trọng của tơ nấm Linh chi trong môi trường lỏng	28
3.3.6. Khảo sát sự sinh trưởng và phát triển của nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể	29
3.3.7. Trọng lượng tươi của nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể	30
3.3.8. Hiệu suất sinh học của nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể	30
3.3.9. Thực hiện kiểm tra sinh hóa để định tính các dược chất có trong tơ nấm và trong quả thể nấm Linh chi đỏ	30
3.3.9.1. Phương pháp định tính Alcaloid	30
3.3.9.2. Phương pháp định tính hợp chất Saponin.....	31
3.3.9.3. Phương pháp định tính Triterpenoid (bằng phản ứng Liebermann – burchard).....	32
3.3.9.4. Phương pháp định tính Acid hữu cơ.....	33
3.3.9.5. Phương pháp định lượng polysaccharide (GLPs).....	33
3.3.10. So sánh các thành phần dược chất giữa quả thể và tơ nấm	33
3.3.11. Phương pháp xử lý số liệu thống kê	33
Phần 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	34
4.1. Quan sát hình thái giải phẫu quả thể và định danh sơ bộ nấm Linh chi đỏ mọc tự nhiên tại trường Đại học Nông Lâm bằng bào tử dưới kính hiển vi	34
4.1.1. Hình thái giải phẫu quả thể nấm Linh chi đỏ.....	34
4.1.2. Hệ sợi nấm Linh chi đỏ.....	35
4.1.3. Cấu trúc bào tử nấm Linh chi đỏ	35
4.1.4. Định danh sơ bộ nấm Linh chi đỏ mọc tự nhiên	35
4.2. Sự sinh trưởng và phát triển của nấm Linh chi đỏ	36
4.2.1. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên môi trường agar	36
4.2.2. Sự sinh trưởng của sợi nấm trên môi trường nhân giống	37
4.2.3. Khả năng tích lũy sinh khối của nấm Linh chi đỏ trong môi trường lỏng ...	39
4.2.4. Sự sinh trưởng và phát triển của nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể	40
4.2.4.1. Sự tăng trưởng của sợi nấm Linh chi đỏ.....	43

4.2.4.2. Giai đoạn phát triển của nấm Linh chi	44
4.3. Trọng lượng nấm tươi trên các môi trường giá thể	45
4.4. Hiệu suất sinh học của nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể	46
4.5. Định tính các dược chất có trong hệ sợi nấm và trong quả thể nấm	47
4.5.1. Định tính Alcaloid	47
4.5.2. Định tính Saponin	59
4.5.2.1. Thử nghiệm tính chất tạo bọt	49
4.5.2.2. Thử nghiệm Fontan – Kaudel	49
4.5.3. Định tính Triterpenoid	50
4.5.4. Định tính Acid hữu cơ	50
4.5.5. Định lượng Polysaccharide thô từ quả thể nấm Linh chi đỏ	51
4.6. So sánh thành phần dược chất có trong quả thể và trong tơ nấm Linh chi đỏ	51
Phần 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	53
5.1. Kết luận	53
5.2. Đề nghị	53
TÀI LIỆU THAM KHẢO	54
PHỤ LỤC	57

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Lục bảo Linh chi và các tác dụng trị liệu (Lý Thời Trân, 1590)	11
Bảng 2.2. Một số bài thuốc chữa bệnh có nấm Linh chi	14
Bảng 2.3. Hàm lượng các chất có trong mũn cưa	21
Bảng 2.3. Thành phần dinh dưỡng trong cám	21
Bảng 3.1. Bố trí thí nghiệm khảo sát khả năng lan tơ của nấm Linh chi trên các môi trường agar	27
Bảng 3.2. Bố trí thí nghiệm khảo sát sự sinh trưởng của sợi nấm trên môi trường nhân giống.....	28
Bảng 3.3. Bố trí thí nghiệm khảo sát sự sinh trưởng và phát triển của nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể	29
Bảng 4.1. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên môi trường agar	36
Bảng 4.2. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên các môi trường nhân giống.....	38
Bảng 4.3. Khả năng tích lũy hệ sợi nấm của nấm Linh chi đỏ trong môi trường lông	39
Bảng 4.4. Trọng lượng quả thể tươi trên mỗi loại môi trường giá thể	45
Bảng 4.5. Hiệu suất sinh học đạt được trên các giá thể trồng nấm	46
Bảng 4.6. So sánh các dược chất có trong quả thể và trong tơ nấm Linh chi đỏ	52

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 2.1. Vòng đời của nấm.....	6
Hình 2.2. Chu trình phát triển của nấm Linh chi.....	19
Hình 3.1. Nấm Linh chi đỏ mọc tự nhiên tại trường Đại học Nông Lâm	23
Hình 4.1. Hình thái thể quả nấm Linh chi đỏ được nuôi trồng	34
Hình 4.2. Hình thái cấu trúc giải phẫu nấm Linh chi đỏ	34
Hình 4.3. Hình thái sợi nấm Linh chi đỏ (x100)	35
Hình 4.4. Cấu trúc bào tử nấm Linh chi đỏ (x100)	35
Hình 4.5. Hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên các môi trường agar	36
Hình 4.6. Biểu đồ sự sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên các môi trường agar	37
Hình 4.7. Biểu đồ sự sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên các môi trường nhân giống	38
Hình 4.8. Sự lan sâu của nấm Linh chi đỏ.....	39
Hình 4.10. Biểu đồ khả năng tích lũy sinh khối của nấm Linh chi đỏ trong môi trường lỏng.....	41
Hình 4.11. Sinh khối của nấm Linh chi đỏ trong môi trường lỏng	39
Hình 4.12. Quy trình trồng và thu hoạch nấm Linh chi đỏ	41
Hình 4.13. Quả thể nấm trồng thí nghiệm tại nhà lưới.....	42
Hình 4.14. Biểu đồ tỉ lệ sinh trưởng hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể trồng nấm	43
Hình 4.15. Quá trình hình thành quả thể nấm	44
Hình 4.16. Quả thể nấm mọc từ đường rọc hông bịch	45
Hình 4.17. Biểu đồ tỉ lệ khối lượng quả thể nấm tươi trên các môi trường giá thể	46
Hình 4.18. Biểu đồ hiệu suất sinh học nuôi trồng nấm Linh chi	47
Hình 4.19. Định tính alcaloid với thuốc thử Mayer	47
Hình 4.20. Định tính alcaloid với thuốc thử Dragendorff.....	48
Hình 4.21. Thử nghiệm tính tạo bọt từ sinh khối nấm Linh chi đỏ.....	49
Hình 4.22. Thử nghiệm Saponin toàn phần theo Fontan – Kaudel	49

Hình 4.23. Định tính triterpenoid bằng phản ứng Liebermann – Burchard	51
Hình 4.24. Định tính acid hữu cơ có trong quả thể nấm Linh chi đỏ	51
Hình 4.25. Sản phẩm bột polysaccharide thô từ quả thể nấm Linh chi đỏ	52

Phần 1. MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Cách đây hàng ngàn năm, nấm Linh chi đã được dùng để làm thuốc. Các sách dược thảo của nhiều triều đại ở Trung Quốc đều ghi nhận Linh chi được sử dụng làm thuốc từ lâu đời. Sách “Thần nông bản thảo” đã nói: “Linh chi là thuốc kết tinh được cái quý của mây mưa trên núi cao, cái tinh của ngũ hành trong ngày đêm mà khoe năm sắc nên có thể giữ sức khỏe cho các bậc đế vương”. Đến đời Minh (năm 1590) trong sách “Bản thảo cương mục”, tác giả Lý Thời Trân đã phân nấm Linh chi thành “Lục bảo Linh chi” theo sáu màu sắc xanh, trắng, đỏ, vàng, đen, tím và khái quát tác dụng trị liệu của Linh chi theo từng màu. Nhưng nói chung các loại Linh chi đều có tính bình, không độc, có tác dụng chữa trị tốt đối với những bệnh về tim mạch, phổi, gan...

Đến nay với sự phát triển Khoa học – kỹ thuật, nấm Linh chi còn được chứng minh tác dụng hữu ích trong việc điều trị bệnh: ung thư, cao huyết áp, tiểu đường, tim mạch, HIV, viêm gan siêu vi... Chính vì thế, việc nghiên cứu, phát triển và sử dụng nấm Linh chi vẫn đang được chú trọng.

Việc nuôi trồng cũng như thu hoạch quả thể nấm Linh chi tốn khá nhiều thời gian. Chính vì thế, việc nghiên cứu để tìm ra một phương pháp hữu hiệu nhằm nâng cao hiệu quả sản xuất nấm Linh chi là một việc hết sức cần thiết để phục vụ nhu cầu sử dụng cho con người.

Những năm gần đây, tại Việt Nam, trên thị trường thuốc y học cổ truyền dân tộc (YHCTDT) cả nước, đặc biệt tại TP.HCM, xuất hiện nhiều loại thuốc mới mang tên Linh chi với giá bán rất đắt (mắc hơn nhân sâm). Hiện nay, nhu cầu sử dụng nấm Linh chi làm thuốc chữa bệnh trong nước và xuất khẩu ngày càng tăng. Nhiều cơ sở đã tiến hành chế biến nuôi trồng, nghiên cứu thăm dò những dược chất có trong nấm Linh chi. Các thành phần hóa học có trong nấm Linh chi rất phong phú bao gồm các nhóm: acid béo, steroid, alkaloid, protein, polysaccharide.... Trong đó thành phần có tác dụng dược lý quý báu, đặc trưng cho nấm Linh chi phần lớn thuộc nhóm triterpenoid.

Việt Nam với vị trí địa lý tự nhiên nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới. Điều kiện thiên nhiên rất thuận lợi cho phát triển của các loại nấm nói chung

và nấm Linh chi nói riêng. Tại trường Đại học Nông Lâm chúng tôi cũng phát hiện rất nhiều nấm Linh chi đở mọc hoang. Điều này chứng tỏ rằng đã có giống nấm Linh chi thích hợp phát triển với điều kiện tự nhiên ở khu vực Thủ Đức, TP. HCM. Do đó, chúng tôi quyết định phân lập và trồng loại nấm Linh chi này trên những môi trường khác nhau để xác định môi trường tốt nhất cho sự phát triển của chúng ở điều kiện khí hậu tại vùng đất của trường Nông Lâm nói riêng và Quận Thủ Đức nói chung. Xuất phát từ tình hình thực tế trên, được sự đồng ý của Bộ môn Công Nghệ Sinh học trường Đại học Nông Lâm TP.HCM và dưới sự hướng dẫn của TS.Trần Thị Dung và cử nhân Lưu Phúc Lợi, chúng tôi thực hiện đề tài **“Tìm hiểu về một loại nấm Linh chi thu hái tại Thủ Đức – Tp. Hồ Chí Minh”**.

1.2. Mục đích đề tài

- Phân lập và nuôi trồng được loại nấm Linh chi đở thích nghi tốt với điều kiện khí hậu tại vùng Thủ Đức.
- Tiến hành những nghiên cứu về một công nghệ mới hiện nay, nhân sinh khối tơ nấm trong môi trường dịch lỏng nhằm rút ngắn thời gian nuôi trồng.
- Tìm được môi trường tối ưu cho việc nhân sinh khối tơ nấm chọn ra được giống nấm Linh chi phát triển tốt trong điều kiện khí hậu địa phương và có thể ứng dụng rộng rãi để sản xuất theo qui mô lớn, phục vụ cho quá trình bào chế sản phẩm dược liệu với giá thành rẻ.

1.3. Yêu cầu đề tài

- Định danh sơ bộ nấm Linh chi đở mọc tự nhiên tại trường đại học Nông Lâm bằng bào tử. Xác định giá thể tổng hợp thích hợp nhất để chúng phát triển tạo quả thể khi nuôi trồng trong điều kiện khí hậu ở khu vực Quận Thủ Đức.
- Xác định các môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi đở: môi trường nhân giống, môi trường khảo sát lan tơ, môi trường nhân sinh khối (môi trường lỏng).
- Định tính và so sánh những thành phần dược chất có trong quả thể và tơ nấm Linh chi đở.

Phần 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Nấm

2.1.1. Khái quát về nấm

Theo khái niệm cũ, nấm là thực vật, như các loại cây cỏ khác, nhưng là thực vật không có sắc tố xanh (diệp lục tố). Tuy nhiên những nghiên cứu ngày càng nhiều trên sinh lý và biến dưỡng cho thấy nấm có nhiều điểm khác với thực vật [8]: không có lục lạp, không có sự phân hóa thành rễ, thân, lá, không có hoa, phần lớn không chứa cellulose trong thành tế bào, không có một chu trình phát triển chung như thực vật. Nấm chỉ có thể hấp thu chất dinh dưỡng cần thiết cho cơ thể từ cơ thể khác hay từ đất qua bề mặt của tế bào hệ sợi nấm. Chính vì thế, tất cả hệ thống phân loại sinh giới hiện nay đều coi nấm là một giới riêng, tương đương với giới thực vật và động vật.

- R.H. Whittaker (1969) đã đưa ra hệ thống phân loại 5 giới (Kingdom).
 - Giới khởi sinh (*Monera*): gồm vi khuẩn và tảo lam.
 - Giới nguyên sinh (*Protista*): gồm một số tảo đơn bào, nấm đơn bào có khả năng di động nhờ lông roi (tiên mai) và các động vật nguyên sinh.
 - Giới nấm (*Fungi* hay *Mycetozoa*, *Mycota*).
 - Giới thực vật (*Plantae* hay *Vegetabilia*).
 - Giới động vật (*Animalia*).
- A.L. Takhtadjan (1973) đưa ra hệ thống phân loại như sau:
 - Giới *Mycota*: gồm vi khuẩn và vi khuẩn lam.
 - Giới nấm.
 - Giới thực vật.
 - Giới động vật.
- Woese (1980) căn cứ vào trật tự nucleotid trong acid ribonucleid (ARN) của ribosome 16S và 5S để tách vi khuẩn ra làm hai giới.
 - Giới vi khuẩn thật (*Eubacteria*).
 - Giới vi khuẩn cổ (*Archaeobacteria*).

Ông đã gộp nấm, thực vật, động vật thành một giới chung gọi là sinh vật có nhân thật (*Eukaryota*).

Hiện nay, các nghiên cứu về nấm thường dựa vào hệ thống phân loại của R.H. Whitaker (1969) và hệ thống phân loại của A.L. Takhtadjan (1973). [2]

- Khóa phân loại nấm hiện đại bao gồm các ngành như sau: (Allexopolous, 1962).
 - Ngành nấm nhầy (*Exomycotina*): loài nấm này có cả hai tính chất động vật và thực vật, chúng sinh sản bằng bào tử, nhưng tế bào lại là khối sinh chất không có vách ngăn bao bọc, di chuyển và nuốt thức ăn như động vật (amib).
 - Ngành nấm thật (*Eumycotina*): chiếm số lượng lớn, bao gồm các tế bào với nhân tương đối hoàn chỉnh. Tế bào nấm có vách bao bọc như tế bào thực vật, đa số cấu tạo bởi chitin. Nhiều tế bào nấm còn tích trữ đường ở dạng glycogen, giống như động vật. Một số loài sinh sản theo lối tạo những giao tử có lông roi để di động (động bào tử), nhưng hợp tử lại phát triển theo một kiểu chung của nấm. [8]
- Dựa theo tổ chức hình thái, nấm có thể được sắp xếp thành 4 lớp chính:
 - Lớp Phycomycetes (Lớp nấm tảo): sợi không có vách ngăn ngang, có động bào tử, gồm 2 lớp phụ:
 - Lớp phụ Oomycetes (Nấm noãn).
 - Lớp phụ Zygomycetes (Nấm tiếp hợp).
 - Lớp Ascomycetes (Lớp nấm túi): sợi nấm có vách ngăn, sinh sản vô tính bằng bào tử túi, sinh sản hữu tính theo kiểu tạo túi (nang) và bào tử túi (ascospore).
 - Lớp Basidiomycetes (Lớp nấm đảm): sinh sản hữu tính theo kiểu tạo đảm bào tử (basidiospore). Thường gặp ở những nấm lớn có tai nấm (nấm rơm, nấm hương...)
 - Lớp Deuteromyceter (Lớp nấm bất toàn – Fungi imperfect): không có khả năng sinh sản hữu tính. [12]

2.1.2. Hình thái học của nấm

2.1.2.1. Hình thái học sợi nấm

Tuyệt đại đa số nấm được cấu tạo bởi những sợi nấm (hyphae). Sợi nấm có dạng ống, chứa đầy tế bào chất và dịch bào. Sợi nấm có hai loại, một loại không có vách ngăn, nhiều nhân, một loại có vách ngăn, trên màng vách ngăn có lỗ thông để truyền thông tin và trao đổi chất. Vách tế bào chủ yếu được cấu tạo bởi kitin – glucan. Sợi nấm có thể có thể phát triển từ bào tử hay từ một đoạn sợi nấm và có đặc điểm sinh trưởng về phía ngọn, phân nhánh. Sợi nấm trong nhiều năm có thể tiếp xúc với nhau hình thành một khối gọi là thể sợi nấm.

Đối với nấm đảm thì sự hình thành sợi nấm trải qua 3 giai đoạn:

- Sợi nấm sơ sinh: sau khi bào tử nảy mầm, hình thành ống mầm rồi phân nhánh thành sợi nấm. Những sợi nấm này thường không có vách ngăn hoặc có vách ngăn nhưng đều là một nhân.
- Sợi nấm song nhân: do thể sợi nấm cùng nhân hay khác nhân kết hợp với nhau tạo nên sợi nấm có vách ngăn nhiều tế bào, mỗi tế bào chứa hai nhân còn gọi là sợi nấm song nhân (dicaryotic hyphae).
- Sợi nấm thứ sinh: những sợi nấm này phân hóa và kết thành quả thể gồm tán nấm, cuống nấm, mô nấm.[6,11, 12]

Đối với nấm túi: sợi nấm song nhân chỉ sinh ra trước khi hình thành túi. Sự hình thành quả thể ở nấm túi là sự phối hợp giữa sợi nấm cấp một và sợi nấm song nhân.

Một số loại nấm có hình thái liên hợp dạng móc (clamp connection), tế bào đỉnh sợi nấm (2 nhân) mọc ra một mấu nhỏ, một trong hai nhân chui vào mấu này. Mỗi nhân phân cắt thành hai, hai thành bốn nhân, hai nhân giữ lại đỉnh tế bào, một nhân chui vào mấu, một nhân nằm ở gốc tế bào. Tế bào đỉnh ban đầu xuất hiện hai vách ngăn, chia thành ba tế bào. Sau đó vách ngăn giữa mấu và tế bào gốc bị khai thông, tế bào gốc tiếp nhận nhân từ mấu chuyển xuống và trở thành tế bào song nhân. Như vậy từ một tế bào song nhân trở thành hai tế bào song nhân và giữa hai tế bào còn lưu lại một cái móc. [10]

2.1.2.2. Hình thái thể quả

Tân hay cơ thể của nấm là những tế bào đơn hay dạng sợi kéo dài. Phần lớn các sợi phân nhánh. Khi các sợi nấm bện lại với nhau tạo thành thể sinh bào tử, gọi là quả thể hay tai nấm. Đặc trưng của nấm lớn là có cơ quan sinh sản bào tử kích thước lớn, có thể nhìn thấy bằng mắt thường, do sự kết bện của sợi nấm khi gặp điều kiện thuận lợi. Thường có hai kiểu quả thể trong nhóm nấm lớn:

- *Kiểu 1*: bào tử thường được sinh ra trong những thể hình cầu, như những nấm thuộc *Gasteromycetes*.
- *Kiểu 2*: bào tử sinh ra ở một phần của quả thể nấm. Những nấm này thuộc *Basidiomycetes*. Có thể bào tử ở phần phiến hay không thuộc phiến (*Aphyllorphorales*).

Ở nhóm này ta thường gặp hai kiểu quả thể như sau:

- Quả thể lật ngược, phiến ở phía trên hay không có phiến, thường không có hình dạng nhất định. Chúng rất mỏng, đôi khi dày nhất đạt 2 mm.
- Quả thể thẳng đứng, gặp ở nhóm *Basidiomycetes* hay *Discomycetes*. Các sợi nấm phủ lên nhau ở mặt ngoài hay chỉ một phần bên trên. Những kiểu này quả thể rất khác nhau ở các phần chân nấm, mũ nấm, phiến nấm.[2, 3]

2.1.3. Các giai đoạn phát triển của nấm [9]

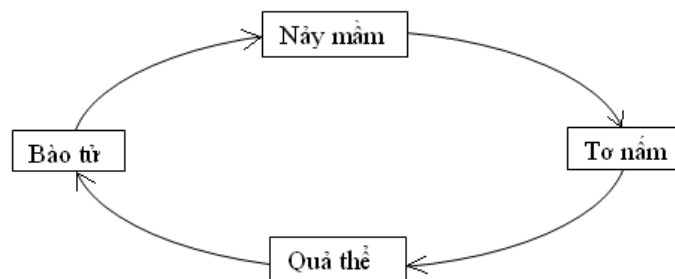
2.1.3.1. Giai đoạn tăng trưởng

Giai đoạn này thường dài, nấm ở giai đoạn này chủ yếu là dạng sợi. Sợi nấm (hypha) mỏng manh và gồm 2 nhân, có nguồn gốc từ 2 bào tử khác nhau nảy mầm và phối hợp lại. Hệ sợi nấm (mycelium), còn gọi là hệ sợi dinh dưỡng (vegetative mycelium), len lỏi trong cơ chất để rút lấy thức ăn thông qua màng tế bào. Khi khối sợi đạt đến mức độ nhất định về số lượng, gặp điều kiện thích hợp, chúng sẽ bện kết lại tạo thành quả thể nấm. Trong trường hợp bất lợi, sẽ hình thành các bào tử tiềm sinh hay hậu bào tử (chlamydospore).

2.1.3.2. Giai đoạn phát triển

Giai đoạn này thường ngắn, lúc bấy giờ sợi nấm đan vào nhau, hình thành 1 dạng đặc biệt, gọi là quả thể nấm hay tai nấm (fruit body). Quả thể thường có kích thước lớn và là cơ quan sinh sản của nấm. Trên quả thể có 1 cấu trúc, nơi tập trung các đầu ngọn sợi nấm, đó là thụ tầng (hymenium). Chính ở đây 2 nhân của tế bào sẽ nhập lại thành 1. Sau đó sẽ chia thành 4 nhân con hình thành các bào tử hữu tính (sexual spore), đảm bào tử (basidiospore) hoặc nang bào tử (ascospore). Khi tai nấm trưởng thành, bào tử được phóng thích, chúng nảy mầm và chu trình lại tiếp tục.

Vòng đời của nấm được mô tả bằng sơ đồ sau:



Hình 2.1. Vòng đời của nấm

2.1.4. Đặc điểm biến dưỡng của nấm [8]

Nấm chủ yếu sống dị dưỡng, lấy thức ăn từ các nguồn hữu cơ (động vật hoặc thực vật). Nấm có hệ men (enzyme) phân giải tương đối mạnh, giúp chúng có thể sử dụng các dạng thức ăn phức tạp. Dựa theo cách dinh dưỡng của nấm, có thể chia thành 3 nhóm:

- Hoại sinh: thức ăn là xác bã thực vật hay động vật. Ở nhóm nấm này, chúng có khả năng biến đổi những chất khó phân hủy thành những chất đơn giản dễ hấp thu, nhờ hệ men ngoại bào.
- Ký sinh: chủ yếu các loài nấm gây bệnh, chúng sống bám vào cơ thể sinh vật khác để hút thức ăn của sinh vật chủ.
- Cộng sinh: lấy thức ăn từ cơ thể sinh vật chủ nhưng không làm tổn hại sinh vật chủ, ngược lại còn giúp cho chúng phát triển tốt hơn (như nấm *Tuber* hay *Boletus* cộng sinh với cây thông sồi...).

2.1.5. Điều kiện sinh thái của nấm

2.1.5.1. Chất dinh dưỡng [1, 7, 10]

- Các hợp chất cacbon hữu cơ: như cellulose, hemicellulose, lignin, tinh bột, pectin, acid hữu cơ... để tổng hợp nên các chất như: hydratcacbon, amino acid, acid nucleic, lipid... cần thiết cho sự phát triển của nấm. Đối với các loài nấm khác nhau thì nhu cầu cacbon cũng khác nhau, nhưng hầu hết chúng dùng nguồn đường đơn giản là glucose, với nồng độ đường là 2%.
- Các chất chứa nitơ: như protein, ure, muối NH_4 và NO_3 . Protein phải qua enzyme phân giải mới dùng được.
- Các muối vô cơ: là những chất cung cấp nguồn đạm cho nấm. Hệ sợi nấm sử dụng nguồn đạm để tổng hợp các chất hữu cơ như: purin, pyrimidin, protein, tổng hợp chitin cho vách tế bào. Nguồn đạm sử dụng trong các môi trường ở dạng muối: muối nitrat, muối amon.
- Các chất khoáng: là những chất không thể thiếu được trong hoạt động sống của nấm, chúng chiếm 5 – 10% trọng lượng khô. Các chất cần cho nấm bao gồm P, K, Mg, S, Cu, Fe, Co, Mn, Zn. Trong đó K, P, Mg là 3 nguyên tố quan trọng nhất, cần đến 100 – 500 mg/l. Các chất Cu, Fe, Co, Mn, Zn là những nguyên tố vi lượng, chỉ cần 1ppm.

- Vitamin: những phân tử hữu cơ này được dùng với lượng rất ít, chúng không phải là nguồn cung cấp năng lượng cho tế bào. Vitamin cần thiết và giữ chức năng đặc biệt trong hoạt động của enzym. Hầu hết nấm hấp thụ nguồn vitamin từ bên ngoài và chỉ cần một lượng rất ít nhưng không thể thiếu. Hai nguồn vitamin cần thiết cho nấm là biotine (vitamine H) và thiamine (vitamine B1).

2.1.5.2. Ảnh hưởng của các yếu tố vật lý lên sự sinh trưởng hệ sợi nấm

- *Nhiệt độ*: ảnh hưởng trực tiếp đến các phản ứng sinh hóa bên trong tế bào, kích thích hoạt động các chất sinh trưởng, các enzym và chi phối toàn bộ các hoạt động sống của nấm. Mỗi loại nấm có một khoảng nhiệt độ khác nhau thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Nhiệt độ nuôi ủ hệ sợi bao giờ cũng cao hơn so với khi nấm ra quả thể vài độ. Nhiệt độ cao hoặc thấp hơn nhiệt độ thích hợp sẽ làm cho hệ sợi nấm sinh trưởng chậm lại hoặc chết hẳn.
- *Nước và độ ẩm*: nếu nước không đủ, sợi nấm sinh trưởng chậm, nếu nước quá nhiều thì dễ mọc nấm mốc làm thối quả thể. Các loại nấm ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau có nhu cầu về độ ẩm khác nhau. Một số loài thuộc nấm đảm cần độ ẩm thích hợp cho sự sinh trưởng tối ưu của sợi nấm là 80 – 90%. Nhưng hầu hết các loài nấm cần độ ẩm để sinh trưởng hệ sợi là 50 – 60% (Flegg, 1962).[7, 10]
- *Ánh sáng*: vì không có diệp lục nên nấm không cần ánh sáng liên tục. Trong thời kỳ sinh trưởng sợi nấm thì không cần ánh sáng. Nhưng thời kỳ phân hóa thể quả cần cường độ chiếu sáng khác nhau tùy theo loài.
- *O₂ và CO₂*: nấm luôn phải hô hấp nên không thể thiếu O₂ và CO₂. Khi nấm phân hóa thể quả thì lượng O₂ không lớn lắm, nhưng khi hình thành thể quả thì lượng O₂ tăng lên. Nồng độ CO₂ trong không khí tăng cao sẽ ức chế hình thành thể quả.
- *Độ pH*: hầu hết các nhóm nấm mọc trên thực vật hay ký sinh thì thích hợp đối với môi trường pH thấp. Các loài nấm mọc trên mùn bã hay trên đất thì thích hợp với môi trường pH trung tính hay môi trường kiềm. Nhưng một số loại nấm có khả năng mọc được ở biên độ pH khá rộng. Một số loài nấm có khả năng tự điều chỉnh pH môi trường về pH thích hợp cho sự sinh trưởng chính chúng. [7, 10]

2.2. Nấm Linh chi

2.2.1. Phân loại

Nấm Linh chi có vị trí phân loại rộng rãi hiện nay. [3]

- Ngành: *Mycota*
- Ngành phụ: *Basidiomycotina*
- Lớp: *Basidiomycetes*
- Lớp phụ: *Holobasidiomycotidae*
- Bộ : *Polyporales*
- Họ: *Ganodermataceae*
- Họ phụ: *Ganodermoidae*
- Giống : *Ganoderma*
- Loài : *Ganoderma lucidum*

2.2.2. Linh chi và tác dụng trị liệu của Linh chi

2.2.2.1. Giới thiệu về nấm Linh chi

Linh chi có nhiều tên gọi khác nhau như Bất Lão Thảo, Vạn Niên Thảo, Trần Tiên Thảo, Chi Linh, Đoạn Thảo, Nấm Lim... Mỗi tên gọi của Linh chi gắn liền với một giá trị dược liệu của nó. Tên gọi Linh chi bắt nguồn từ Trung Quốc, hay theo tiếng Nhật là *Reishi* hoặc *mannentake*, tên gọi Latinh: *Ganoderma lucidum*. [14]

- Nấm Linh chi trong thiên nhiên

Linh chi (*Ganoderma*) là các loài nấm gỗ mọc hoang trong thiên nhiên, có hàng trăm loài khác nhau cùng họ nấm gỗ (*ganodermataceae*).

Có 2 nhóm lớn là Linh chi và cổ Linh chi.

Cổ Linh chi: là các loài nấm gỗ không cuống (hoặc cuống rất ngắn) có nhiều tầng (mỗi năm thụ tầng lại phát triển thêm một lớp mới chồng lên). Mũ nấm hình quạt, màu từ nâu xám đến đen sẫm, mặt trên sù sì thô ráp. Nấm rất cứng (cứng như gỗ lim nên còn gọi là nấm lim).

Chúng sống ký sinh và hoại sinh trên cây gỗ trong nhiều năm (đến khi cây chết thì nấm cũng chết). Vì vậy các nhà bảo vệ thực vật xếp cổ Linh chi vào nhóm các tác nhân gây hại cây rừng, cần khống chế. Cổ Linh chi mọc hoang từ đồng bằng đến miền núi ở khắp nơi trên thế giới. Trong rừng rậm, độ ẩm cao, cây to thì nấm phát triển

mạnh, tán lớn. Ở Việt Nam đã phát hiện trong rừng sâu Tây Nguyên có những cây nấm cổ Linh chi lớn, có cây tán rộng tới hơn 1 mét, nặng hơn 40kg.

Tên khoa học: *Ganoderma applanatum* (Pers) Past. Cổ Linh chi có hàng chục loài khác nhau. [17]

Linh chi: là các loài nấm gỗ mọc hoang ở những vùng núi cao và lạnh ở các tỉnh Tứ Xuyên, Quảng Tây, Quảng Đông (Trung Quốc). Nấm có cuống, cuống nấm có màu (mỗi loài có một màu riêng như nâu, đỏ vàng, đỏ cam). Thụ tầng màu trắng ngà hoặc màu vàng. Mũ nấm có nhiều hình dạng, phổ biến là hình thận, hình tròn, mặt trên bóng. Nấm hơi cứng và dai.

Tên khoa học: *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr) Kart (Linh chi có rất nhiều loài khác nhau). Sách Bản thảo cương mục (in năm 1595) của Lý Thời Trân, đại danh y Trung Quốc đã phân loại Linh chi theo màu sắc thành Lục bảo Linh chi (6 loại), và khái quát tác dụng trị liệu của Linh chi. Linh chi đều có tính bình, không độc, có tác dụng làm tăng trí nhớ, dưỡng tim, bổ gan khí, an thần, chữa trị tức ngực. Với hệ hô hấp có tác dụng ích phổi, thông mũi, chữa ho nghịch hơi, an thần, ích tỳ khí. Nấm Linh chi còn có các tác dụng chữa trị chứng bí tiểu, bổ thận khí, chữa trị đau nhức khớp xương, gân cốt... Nấm Linh chi được Lý Thời Trân coi như một thần dược, ăn nhiều lần cơ thể nhẹ đi mà không già, sống lâu như thần tiên. [1, 17]

Linh chi có tới 2000 loại và phổ biến nhất là *Ganoderma lucidum* và *Ganoderma zaponicum*. Ngoài ra các loại cổ Linh chi *Ganoderma applanatum* có hiệu lực chống khối u cao nên rất được Hàn Quốc chú trọng. Thêm vào đó loài *Ganoderma boninense* thường được mọc trên cây cọ dầu (*Eleais guineensis*) cũng được Malaysia chú trọng để cải tiến quy trình trồng ngắn ngày (có thể thu hoạch sau 40 ngày). Ở Thái Lan nuôi trồng cả *Ganoderma lucidum* và *Ganoderma capense* (Linh chi sò). Ở New Orleans (Hoa Kỳ) lại có chủng *Ganoderma meredithiae*.

Ở Việt Nam, loài chuẩn Linh chi *Ganoderma lucidum* mới được nuôi trồng thành công trong phòng thí nghiệm (1978). Năm 1994 loài nấm Lim – một chủng Linh chi đỏ đặc sắc của các rừng Lim Bắc Việt Nam đã được Phạm Quang Thụ đưa vào nuôi trồng chủ động. [4, 17]

2.2.2.2. Tác dụng trị liệu của Năm Linh chi

Ở các nước Đông Nam Á, (Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài Loan...) việc nghiên cứu, phát triển và sử dụng Linh chi đang được công nghiệp hóa với qui mô lớn về phân loại, nuôi trồng chủ động, chế biến và bào chế dược phẩm, đồng thời nghiên cứu hóa dược các hoạt chất, tác dụng dược lý và phương cách điều trị lâm sàng. Giá trị dược lý của Linh chi càng được khẳng định khi Hội nghị Năm học thế giới thành lập Viện nghiên cứu Linh chi Quốc tế tại New York. [14]

Bảng 2.1. Lục bảo Linh chi và các tác dụng trị liệu (Lý Thời Trân, 1590)

Tên gọi	Màu sắc	Đặc tính dược lý
Thanh chi (Long Chi)	Xanh	Vị chua, tính bình, không độc chữa trị sáng mắt, bổ gan khí, an thần, tăng trí nhớ.
Hồng chi (xích chi)	Đỏ	Vị đắng, tính bình, không độc, tăng trí nhớ, dưỡng tim, bổ trung, trị tức ngực.
Hoàng chi (kim chi)	Vàng	Vị ngọt, tính bình, không độc, an thần, ích tì khí.
Bạch chi (ngọc chi)	Trắng	Vị cay, tính bình, không độc, ích phổi, thông mũi, an thần, chữa ho nghịch hơi.
Hắc chi (huyền chi)	Đen	Vị ngọt, tính bình, không độc, trị bí tiểu, ích thận khí.
Tứ chi	Tím	Vị ngọt, tính ôn, không độc, trị đau nhức xương khớp, gân cốt.

- Theo cách diễn đạt truyền thống của người phương Đông, các tác dụng cụ thể của năm Linh chi được tập hợp vào những mặt tác dụng lớn như sau:
 - Kiện não (làm sáng suốt, minh mẫn).
 - Bảo can (bảo vệ gan).
 - Cường tâm (thêm sức cho tim).
 - Kiện vị (củng cố dạ dày và hệ tiêu hoá).
 - Cường phế (thêm sức cho phổi, hệ hô hấp).
 - Giải độc (giải toả trạng thái nhiễm độc).
 - Giải cảm (giải toả trạng thái bị cảm).

- Trường sinh (sống lâu, tăng tuổi thọ).
- Qua phân tích các hoạt chất về mặt dược tính, dược lý và sử dụng nấm Linh chi, người ta thấy Linh chi có tác dụng rất tốt với các bệnh:
 - *Đối với bệnh về hệ tim mạch*: nấm Linh chi có tác dụng điều hoà, ổn định huyết áp. Khi dùng cho người huyết áp cao, nấm Linh chi không làm tăng mà làm giảm bớt, dùng nhiều thì huyết áp ổn định. Đối với những người suy nhược cơ thể, huyết áp thấp thì nấm Linh chi có tác dụng nâng huyết áp lên gần mức dễ chịu nhờ cải thiện, chuyển hoá dinh dưỡng. Đối với bệnh nhiễm mỡ, xơ mạch, dùng nấm Linh chi có tác dụng giảm cholesterol toàn phần, làm tăng nhóm lipoprotein tít trọng cao trong máu, làm giảm hệ số sinh bệnh. Nấm Linh chi làm giảm xu thế kết bờ của tiểu cầu, giảm nồng độ mỡ trong máu, giảm co tắc mạch, giải tỏa cơn đau thắt tim.
 - *Đối với các bệnh về hô hấp*: nấm Linh chi đem lại kết quả tốt, nhất là với những ca điều trị viêm phế quản dị ứng, hen phế quản tới 80% có tác dụng giảm và làm nhẹ bệnh theo hướng khởi hẳn. [16]
 - *Khả năng miễn dịch*: nấm Linh chi có chứa một lượng lớn Germanium hữu cơ, Polysaccharides và Triterpenes. Những thành phần này đã được chứng minh là tốt hơn cho hệ miễn dịch và cải thiện hệ miễn dịch của chúng ta. [18]
 - *Chữa bệnh gan*: ở Trung Quốc, Linh chi thường được kê vào đơn thuốc cho những bệnh nhân bị viêm gan mãn tính. Trong điều trị lâu dài từ 2 – 15 tuần thì tỉ lệ chữa hiệu quả là từ 70,7 – 98 %. Ở Nhật, phần chiết nấm Linh chi đã được báo cáo là có hiệu quả đối với những bệnh nhân suy gan.
 - *Hiệu quả chống ung thư*: Linh chi được xem là một chất rất có triển vọng trong việc chữa trị và ngăn chặn một phần nào đó đối với bệnh ung thư. Trong một nghiên cứu cho thấy nấm Linh chi có thể ngăn chặn sự bám dính và sự di căn của những tế bào ung thư tuyến vú và tuyến tiền liệt. Bằng việc kết hợp các phương pháp xạ trị, hoá trị, giải phẫu với trị liệu nấm trên các bệnh nhân ung thư phổi, ung thư vú và ung thư dạ dày có thể kéo dài thời gian sống trên 5 năm cao hơn nhóm không dùng nấm. Nhiều thông tin ở Đài Loan cho biết nếu dùng nấm Linh chi trồng trên gỗ long não điều trị cho các bệnh nhân ung thư cổ tử cung đạt kết quả tốt - khối u tiêu biến hoàn toàn. Trên cơ sở nguyên lý hiệu dụng là do nấm Linh chi làm tăng và khôi phục

hệ miễn dịch. Hàng năm doanh thu của các chế phẩm chống ung thư điều chế từ các loài nấm Linh chi ở Đài Loan đạt trên 350 triệu USD. [1, 4, 16, 21]

Công trình của Zhibin Lin (1994) đã chỉ ra nguyên lý hiệu dụng là tăng khôi phục hệ miễn dịch, nhờ đó các phác đồ trị liệu: xạ trị, hóa trị, giải phẫu đạt kết quả cao hơn.

– *Khả năng kháng HIV*: để khảo sát khả năng kháng HIV của các hợp chất trong nấm *Ganoderma lucidum*, người ta đã sử dụng dịch chiết từ quả thể trong thử nghiệm kháng virus HIV – 1 trên các tế bào lympho T ở người. Sự nhân lên của virus được xác định qua hoạt động phiên mã ngược trên bề mặt các tế bào lympho T đã được gây nhiễm HIV – 1. Kết quả cho thấy có sự ức chế mạnh mẽ hoạt động sinh sản của loại virus này (Gau J.P, 1990; Kim, 1996). Do đó, nhiều quốc gia đã đưa Linh chi vào phác đồ điều trị tạm thời, nhằm tăng cường khả năng miễn dịch và nâng đỡ thể trạng cho các bệnh nhân trong khi AZT, DDI, DDC, còn hiếm và rất đắt [4]. Các nghiên cứu tại Nhật Bản đã chứng minh các hoạt chất từ nấm Linh chi có tác dụng như sau: (Masao Hattori, 2001).

- Ganoderiol F và ganodermanontiol có hoạt tính chống HIV – 1.
- Ganoderdic acid B và lucidumol B có tác động ức chế hữu hiệu protease HIV– 1.
- Ganodermandiol và lucidumol A ức chế phát triển tế bào Meth – A (mouse sarcoma) và LLC (mouse lung carcinoma).

Ngoài ra các ganoderma alcohol là lanostane triterpene với nhóm hydroxol (- OH) ở vị trí C₂₅ có khả năng chống HIV – 1, Meth – A và LLC ở chuột. [4, 10]

– *Khả năng antioxydant*: nhiều thực nghiệm chỉ ra vai trò của các saponine và triterpenoid, mà trong đó Ganoderic acid được coi là hiệu quả nhất (Wang C.H, 1985). Những nghiên cứu gần đây đang đẩy mạnh theo hướng làm giàu Selenium - một yếu tố khoáng có hoạt tính antioxydant rất mạnh – vào nấm Linh chi. Chính vì vậy con người có thể chờ đợi vào một dược phẩm tăng tuổi thọ, trẻ hoá từ nấm Linh chi nói chung và Linh chi Việt Nam nói riêng. [4]

Các hoạt chất sinh học trong nấm Linh chi có khả năng khử một số gốc tự do sinh ra trong quá trình lão hóa cơ thể hay sau khi bị nhiễm xạ. Chúng làm phục hồi các tổ chức bị tổn thương và không gây hiệu ứng phụ nào cho cơ thể. [3, 10]

Để sử dụng nấm Linh chi chữa bệnh, người ta thường dùng một số cách như sau: [15]

- Ngâm rượu: nấm Linh chi thái mỏng, ngâm trong rượu mạnh 40°-45°C, sau 20 ngày có thể sử dụng (ngày uống 2 lần, mỗi lần một chén con).
- Sắc nước uống: lấy một khối lượng Linh chi khoảng 3 – 16 gam cho 1 lần sắc (đổ 3 bát nước đun sôi cô đặc để lấy một bát, làm 3 lần như vậy). Sau đó đổ trộn lẫn với nhau để uống
- Uống dạng trà: sấy nấm Linh chi, nghiền nát thành bột, mỗi lần uống 3-7 gam (cho vào 200ml nước sôi) hãm lại sau 10 phút rồi uống.
- Bào chế ở dạng chè, thuốc viên...

Bảng 2.2. Một số bài thuốc chữa bệnh có nấm Linh chi [7]

Tác dụng điều trị	Pha chế	Cách dùng
Suy nhược thần kinh, nhức đầu, chóng mặt, ngứa ban đêm.	Linh chi 1 – 3g	Sắc uống mỗi ngày 3 lần
Viêm gan mãn tính, suyễn phế quản, viêm thận	Linh chi 50g	Nghiền bột uống mỗi lần 1 – 1.5g, ngày uống 3 lần
Bệnh tim dài	Bột Linh chi 30, bột đậu 90g	Nghiền bột 9 – 15g uống với nước sôi, ngày uống 3 lần
Cao huyết áp, viêm gan mãn tính	Linh chi 10g	Sắc nước uống, mỗi ngày 3 lần
Đau dạ dày	Linh chi 30g, rượu vang 250g	Ngâm rượu 14 ngày, ngày uống 2 lần, mỗi lần 15ml

2.2.3. Hoạt chất sinh học của nấm Linh chi

Ganoderma lucidum thuộc loại nấm đảm có lịch sử lâu đời trong nền y học cổ truyền các nước phương Đông. Nhiều thành phần có hoạt tính sinh học đã được xác định trong quả thể, tơ nấm, bào tử và trong cả môi trường nuôi cấy. Polysaccharide và triterpenes là hai hoạt chất sinh học chính trong số đó. Polysaccharide từ *Ganoderma lucidum* được tìm thấy trước tiên trong phòng thí nghiệm có tác dụng chống lại ung thư theo con đường điều biến miễn dịch. Một vài nghiên cứu cho rằng triterpenes có

hoạt chất sinh học chống lại sự oxy hóa, cân bằng lượng cholesterol, chống tăng huyết áp, bảo vệ gan, tổng hợp cholesterol...[18]

Nghiên cứu mới nhất của Viện Nghiên cứu Linh chi hoang dại của Trung Quốc cho thấy, Linh chi có lượng germanium (một chất giúp khí huyết lưu thông, thúc đẩy sự hấp thụ oxy của tế bào) cao hơn nhân sâm 8 lần. Lượng polysaccharide cao trong Linh chi giúp tăng cường miễn dịch, làm mạnh gan, cô lập và diệt các tế bào ung thư. Các hoạt chất của Linh chi còn có tác dụng chống dị ứng, chống viêm, chữa trị các bệnh liên quan đến tim và huyết áp, làm mạnh thận, bổ phổi, mạnh gân xương, tăng trí nhớ, chống lão hóa...[3]

2.2.3.1. Ganoderma polysaccharide (GLPs) [3, 10]

Polysaccharide là một trong những thành phần hữu hiệu nhất chứa trong Linh chi, rất được các nhà y dược học coi trọng. Thành phần Polysaccharide ở Linh chi (*Ganoderma lucidum* Polysaccharide) nay đã được phân ly thành hơn 200 loại, trong đó phần lớn là chất thuộc loại kết cấu, tồn tại ở thành tế bào, và một số ít là chất tồn trữ, tồn tại ở trong tế bào.

Các Polysaccharide có cấu tạo lập thể dạng xoắn ốc, giữa lớp xoắn ốc chủ yếu định vị cố định bằng hydrogen bond, phân tử lượng mấy trăm đến mấy ngàn vạn, ngoài một số ít tiểu phân tử đa đường, đại đa số không hòa tan ở trong rượu nồng độ cao, nhưng có thể hòa tan trong nước nóng. Hoạt tính dược lý của Polysaccharide ở Linh chi có liên quan đến kết cấu lập thể, cấu hình lập thể dạng xoắn ốc bị phá hủy thì hoạt tính của Polysaccharide giảm đi nhiều.

- Vai trò dược học
 - Kích thích hệ miễn dịch cơ thể.
 - Gia tăng khả năng dung nạp oxygen.
 - Giảm gốc tự do hydroxyl.
 - Ưc chế khối u phát triển.
 - Bảo vệ cơ thể chống lại tia bức xạ.
 - Tăng chức năng gan.
 - Duy trì khả năng tái sinh tủy và cơ một cách bình thường.
 - Tham gia tổng hợp ADN, ARN và protein.

2.2.3.2. Ganoderic Acid

Ganoderic acid được định hướng là một cyclopropene hoặc cyclopentene. Hàm lượng ganoderic acid thay đổi theo giống Linh chi, môi trường nuôi trồng, giai đoạn bào tử ganodermal. Chính sự thay đổi này làm cho mức độ đắng bị ảnh hưởng. Hàm lượng G.acid cao thì có nhiều vị đắng. [22, 23]

Triterpenoid là những hợp chất được tổng hợp từ 6 đơn vị isopren. Các triterpen có bộ khung chính từ 27 – 30 nguyên tử carbon ($C_{38}H_{48}$) rất thường gặp trong thực vật. Các triterpenoid tồn tại dưới dạng tự do (không có phần đường), có cấu trúc vòng, mang một số nhóm chức như: -OH; -Oac; eter -O-; Carbanil C=O; nối đôi C=C. Đặc tính chung là có tính thân dầu (tan tốt trong eter dầu hỏa, hexan, eter ethyl, cloroform), ít tan trong nước ngoại trừ khi chúng kết hợp với đường để tạo thành glycosid. [10, 15]

- Vai trò dược học

- Hạ huyết áp nhờ tác dụng của ganoderic acid B, D, F, H, K, Y và ganodermaditol.
- Ức chế tổng hợp Cholesterol do Ganoderic acid, Ganodermic acid M, F, T, O.
- Ức chế giải phóng Histamine có Ganoderic acid R, S.
- Chức năng bảo vệ gan do tác dụng của Lucidone A, Lucidenol.
- Chống khối u có Ganosporelacton A, B.

Điểm đặc biệt chú ý ở nhóm hoạt chất dược lý triterpenoid là sử dụng từng triterpenoid tinh khiết riêng rẽ thì hoạt lực thấp hơn khi dùng các phân đoạn tách chưa tinh chế. Có nghĩa là khi sử dụng tổ hợp các đồng phân của chúng sẽ có hiệu quả hơn. Nên việc sử dụng nấm Linh chi thường được dùng dùng toàn bộ dịch chiết từ nấm.

2.2.3.3. Ganoderma Adenosine

Adenosine thuộc nhóm purine và là thành phần chính trong cấu trúc nucleic acid. Nấm Linh chi có nhiều dẫn xuất adenosine, tất cả chúng đều có hoạt tính dược liệu mạnh.

- Vai trò dược học

- Giảm độ nhớt máu.
- Ức chế kết dính tiểu cầu.
- Ngăn chặn hình thành cục nghẽn.
- Tăng lượng lipoprotein 2 – 3 phosphricglycerine.
- Gia tăng khả năng vận chuyển oxygen, tăng lưu lượng máu cung cấp cho não.
- Lọc máu và tăng tuần hoàn máu trong cơ thể. [22, 23]

2.2.3.4. Alkaloid

Alkaloid là những hợp chất hữu cơ có chứa nitơ, đa số có nhân dị vòng, có phản ứng kiềm, chúng có cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học rất đa dạng. Tuy nhiên cũng có một số alkaloid không có nhân dị vòng với nitơ và một số alkaloid không có phản ứng kiềm. Một số alkaloid còn có thể có phản ứng acid yếu do có nhóm chức acid trong phân tử. [10, 15]

Đa số alkaloid không màu, ở trạng thái kết tinh rắn. Một vài alkaloid ở dạng nhựa vô định hình, một vài alkaloid ở dạng lỏng và có màu.

Các alkaloid ở dạng tự do hầu như không tan trong nước, nhưng thường tan trong dung môi hữu cơ: chloroform, ether diethyl, alcol bậc thấp. Các muối của alkaloid thì tan trong nước, alcol và hầu như không tan trong dung môi hữu cơ. Chính vì thế, tính hòa tan của các alkaloid đóng vai trò quan trọng trong việc ly trích alkaloid ra khỏi nguyên liệu và trong kỹ nghệ dược phẩm điều chế dạng thuốc để uống.

- Vai trò dược học

Alkaloid là những chất có hoạt tính sinh học, nhiều ứng dụng trong ngành y dược và nhiều chất rất độc. Các alkaloid có tác dụng khác nhau tùy thuộc vào cấu trúc.

- Tác dụng lên hệ thần kinh.
- Tác dụng lên huyết áp.
- Tác dụng trị ung thư.

2.2.3.5. Hợp chất saponin

Saponin là một nhóm chất trao đổi thứ cấp quan trọng trong thế giới thực vật. Tên gọi saponin bắt nguồn từ từ *Sapo* trong tiếng latin, có nghĩa là xà phòng. Saponin có tính chất đặc trưng: khi hòa tan vào nước sẽ có tác dụng làm giảm sức căng bề mặt của dung dịch và tạo nhiều bọt. Saponin thường ở dạng vô định hình, có vị đắng. Saponin rất khó tinh chế, có điểm nóng chảy cao từ 200°C trở lên và có thể trên 300°C. Saponin bị tủa bởi chì acetate, hydroxide barium, sulfate amonium nên lợi dụng tính chất này để cô lập saponin.

Về phương diện hóa học, saponins được xác định gồm những cấu trúc khác nhau: triterpenoids, glycosylated steroids và steroidal alkaloids.

- Saponin triterpenoid: phần aglycon của saponin triterpenoid có 30 cacbon, cấu tạo bởi 6 đơn vị hemiterpen và chia làm 2 nhóm: saponin triterpenoid pentacyclic và saponin triterpenoid tetracyclic.
- Saponin steroid: gồm các nhóm chính: spirostan, furostan, aminofurostan, spiroalan, solanidan. [10, 19]
- Vai trò dược học.
 - Trị long đờm, chữa ho.
 - Là chất phụ gia trong một số vắc xin.
 - Tác dụng thông tiểu.
 - Tác dụng kháng viêm, chống khối u.

2.2.3.6. Germanium hữu cơ

Germanium là nguyên tố hiếm, do nhà khoa học người Đức khám phá vào năm 1885. Nó có những đặc tính dược lý rất tốt như:

- Có thể cung cấp một lượng lớn oxygen và thay thế chức năng của oxygen. Nó kích thích khả năng vận chuyển oxygen tuần hoàn máu trong cơ thể lên đến 1,5 lần. Vì thế, làm tăng mức độ trao đổi chất và ngăn chặn quá trình lão hóa.
- Germanium hữu cơ sẽ duy trì mức năng lượng một cách bình thường trong cơ thể và bảo vệ sức khỏe.
- Điều hoà và kiểm soát quá trình trao đổi chất bị xáo trộn khi tế bào ung thư xuất hiện, từ đó ngăn chặn tế bào ung thư phát triển. [22, 23]

2.2.4. Đặc điểm hình thái – cấu trúc – sinh thái

2.2.4.1. Về hình thái

Nấm Linh chi là dạng thể quả. Thể quả có cuống dài hoặc ngắn, thường dính bên, đôi khi dính tâm. Cuống nấm thường hình trụ hoặc thanh mảnh (cỡ 0.3 – 0.8 cm đường kính), hoặc mập khỏe (2 – 3.5 cm đường kính), ít khi phân nhánh, dài từ 2.7 – 22 cm, đôi khi có uốn khúc cong queo. Lớp vỏ cuống láng đỏ – nâu đỏ – nâu đen, bóng, không có lông, phủ suốt lên bề mặt tán nấm.

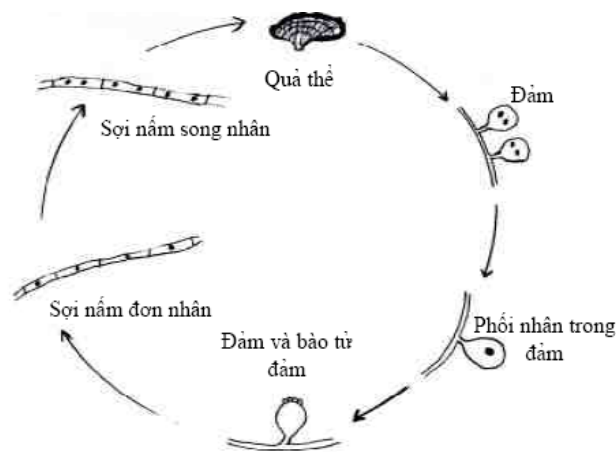
Mũ nấm khi non có hình trứng, lớn dần có dạng thận, gần tròn, đôi khi xòe hình quạt hoặc có hình dạng khác thường. Trên mặt nấm có vân gợn đồng tâm và có chia rãnh phóng xạ, màu sắc đỏ nâu, nâu tím, nâu đen, nhẵn bóng, láng như veni, thường sẫm màu dần khi già. Kích thước tán biến động lớn từ 2 – 36 cm, dày 0.8 – 3.3 cm.

Phần đỉnh cuống gồ lên hay lõm. Phần thịt nấm màu vàng kem – nâu nhạt, phân chia theo kiểu lớp trên và lớp dưới.

Khi nấm đến tuổi trưởng thành thì phát tán bào tử từ phiến có màu nâu sẫm. Bào tử nấm thường có dạng hình trứng cụt đầu màu rỉ sắt. Cấu tạo vỏ ngoài bào tử gồm hai lớp, có thể quan sát được dưới kính hiển vi. Lớp ngoài nhẵn, lớp trong có nhiều gai nhỏ, nối liền hai lớp vỏ. Bào tử nấm Linh chi có kích thước trung bình $4,5 - 6,5 \times 8,5 - 11,5 \mu\text{m}$

Khi nuôi cấy tơ nấm lúc đầu có màu trắng, sau chuyển sang màu vàng, sợi nấm ngăn thành nhiều phần và hình thành các bào tử vô tính. Chu kỳ sống của nấm Linh chi giống như hầu hết các loại nấm khác, nghĩa là cũng bắt đầu từ các bào tử, bào tử nảy mầm phát triển thành hệ mạng sợi tơ nấm. Gặp điều kiện thuận lợi sợi nấm sẽ kết thành nụ nấm, nụ phát triển thành chồi, rồi tán và thành tai trưởng thành. Trên tai sinh ra các bào tử, bào tử phóng thích ra ngoài và chu trình lại tiếp tục. [1, 3, 4]

- Chu trình sống của nấm Linh chi. [10]



Hình 2.2. Chu trình phát triển của nấm Linh chi

2.2.4.2. Về sinh thái

Nấm Linh chi mọc trên cây thân gỗ (thuộc bộ đậu *fabales*) sống hay đã chết. Nấm mọc tốt dưới bóng rợp, ánh sáng khuếch tán nhẹ.

Ở Việt Nam, nấm Linh chi phân bố khắp từ Bắc chí Nam, tùy theo từng vùng mà có các chủng loại khác nhau. Ở những vùng thấp có độ cao dưới 500 m, có các chủng chịu được nhiệt độ cao ($28 - 35^{\circ}\text{C}$) như vùng châu thổ sông Hồng, vùng trung du Bắc Bộ, vùng đồng bằng sông Cửu Long. Ở vùng cao như Đà Lạt, Sapa, Tam Đảo... lại có các chủng loại ôn hòa, thích hợp nhiệt độ thấp ($20 - 26^{\circ}\text{C}$).

2.3. Điều kiện sinh trưởng và phát triển của nấm Linh chi

– Dinh dưỡng

Nguồn cacbon: nguồn cacbon chủ yếu là đường glucose, saccharose, maltose, tinh bột, pectin, lignin, cellulose, hemicellulose, từ đó chúng tổng hợp năng lượng và tạo thành các chất cần thiết.

Nguồn nitơ hữu cơ: protein, pepton, acid amin, ngoài ra có thể hấp thu ure, muối amon, sulphate amon. Nitơ không được quá nhiều làm cho sợi nấm mọc nhiều khó hình thành thể quả.

Trong giai đoạn sinh trưởng sợi nấm, tỉ lệ C/N là 25/1. Giai đoạn hình thành thể quả, tỉ lệ là 30/1 hoặc 40/1.

Nguyên tố vi lượng: Ca, P, Mg, K. Nguồn vi lượng đó chỉ thêm trong quá trình nuôi cấy giống mẹ, còn khi trồng thì chúng có trong các nước và nông sản phẩm.

– Nhiệt độ

Thích hợp nhất là 22 – 28°C. Khi cấy tầng sâu nhiệt độ thích hợp là 28°C, không thấp hơn 27°C. Thông thường nhiệt độ thích hợp cho Linh chi phát triển là 24 – 28°C. Nhiệt độ không nên thay đổi lớn, nếu thay đổi nấm Linh chi khó phát triển thành tán mà ở dạng sừng hươu, dạng đuôi gà.

– Độ ẩm

Hàm lượng nước môi trường thường 65% là vừa, quá nhiều hoặc quá ít sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển của sợi nấm. Độ ẩm không khí nên giữ ở 85 – 95%, nuôi cấy trong phòng cần giải quyết vấn đề về độ ẩm và thông thoáng gió.

– Không khí

Nấm Linh chi là loài hiếu khí vì vậy cần thông gió, giữ độ ẩm và nhiệt độ thích hợp. Khi nuôi cấy nấm trong tầng lỏng cần phải lắc 100 – 150 vòng/phút. Lắc mạnh để làm sợi nấm đứt đoạn.

– Ánh sáng

Nấm Linh chi cần ánh sáng tán xạ. Sợi nấm nuôi trong điều kiện tối là tốt nhất.

– Trị số pH

pH của môi trường nuôi nấm Linh chi là 3 – 7.5, thích hợp nhất là 5 – 6. Trong môi trường lỏng là 4.5 – 5. Trong vật liệu trồng nấm điều chỉnh pH từ 5.8 – 6 là vừa.

2.4. Nguyên liệu trồng nấm Linh chi

Linh chi sử dụng nguyên liệu chủ yếu là mùn cưa tươi, khô của các loại gỗ mềm, không có tinh dầu và độc tố. Hoặc có thể trồng Linh chi từ nguyên liệu là thân gỗ, các cây thuộc họ thân thảo. Ngoài ra có thể trồng Linh chi trên rom, rạ, bã mía... Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa, giàu phế liệu cellulose đặc biệt là mùn cưa cây cao su, tạo điều kiện cho nghề trồng nấm phát triển mạnh. [10, 16]

Bảng 2.3. Hàm lượng các chất có trong mùn cưa [2]

Thành phần	Hàm lượng %
Protein thô	1,5
Lipid thô	1,1
Celulose và lignin	71,2
Hydrat cacbon hòa tan	25,4

Các loại bột cám ngũ cốc, bột bánh dầu được xem là nguồn dinh dưỡng cơ bản cho nấm, hàm lượng bổ sung của chúng khá cao, từ 15 – 20% so với tổng lượng cơ chất. Đây là nguồn cung cấp vitamine và đạm hữu cơ quan trọng cho nấm Linh chi – loại nấm đòi hỏi tỉ lệ C/N nhỏ, nhất là trong những giai đoạn đầu của quá trình sinh trưởng (Trịnh Tam Kiệt, 1983; Lý Kiện, 1992). [4]

Bảng 2.4. Thành phần dinh dưỡng trong cám [2]

Thành phần	Hàm lượng (%)	
	Cám gạo	Bột bắp
Protein thô	10,88	9,6
Lipid thô	11,7	5,6
Cellulose thô	11,5	3,9
Hydrat cacbon có thể hòa tan	45	69,6

Trong sản xuất người ta bổ sung thêm vào cơ chất chủ yếu là đạm. Tùy từng loại nấm, đạm cho vào phải cân đối với cacbon thì nấm mới phát triển tốt. Mối liên hệ giữa nguồn đạm (N) và cacbon (C) được biểu thị bằng tỉ lệ C/N. Thường tỉ lệ C/N trong giai đoạn nuôi tơ là 25/1 và trong thời kỳ ra quả thể là 30/1 – 40/1. [7]

Một thành phần không thể thiếu nữa đó là khoáng: P, K Na, Mg, Ca, Mo, Zn...với lượng rất ít. Việc bổ sung muối khoáng sẽ làm thay đổi pH hoặc gây các tác dụng ngược khác và làm tăng giá thành sản phẩm.

Các muối khoáng được sử dụng [2]

- Super lân ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{CaSO}_4$), có chứa 14 – 20% P_2O_5 .
- Calxi cacbonate (CaCO_3).
- Magie sunphate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Việc sử dụng phân bón hóa học làm tăng lượng đạm đáng kể nhờ sử dụng các amon có chứa nitơ. Khi nitơ được nắm biến dưỡng thì thành phần còn lại của hợp chất bị biến đổi và làm thay đổi pH của cơ chất. Ngoài ra, người ta còn trộn cám gạo hoặc cám bắp chứa 1,18% nitơ. [7]

Phần 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

3.1. Thời gian, địa điểm

- Thời gian: từ 6/2 – 7/2006
- Địa điểm: tại Bộ môn Công Nghệ Sinh Học, trường Đại học Nông Lâm TP. HCM.

3.2. Vật liệu thí nghiệm

3.2.1. Giống



Hình 3.1. Nấm Linh chi đỏ mọc tự nhiên tại trường Đại học Nông Lâm

Nấm Linh chi đỏ được hái tại khu công nghệ thông tin, trường đại học Nông Lâm. Nấm mọc quanh gốc cây khô, có cái lâu năm rất to và cứng (chịu được sức nặng khoảng 60 kg). Sau đó, nấm được đem phân lập và làm thuần giống.

3.2.2. Môi trường phân lập giống

Theo T. Mizuno (1998), môi trường phân lập nên có maltose để làm thuần giống. Ngoài ra, môi trường còn có thể thêm kháng sinh Ampicillin 1% để quá trình phân lập tránh nhiễm khuẩn.

Công thức môi trường:

Pepton	10 g
NaCl	5 g
Glucose	25 g
Maltose	50 g
Agar	20 g
Nước chiết	1000 ml

3.2.5. Môi trường khảo sát lan tơ

– Môi trường PGA

Khoai tây	200 g
Glucose	20 g
Maltose	15 g
Agar	20 g
Nước cất	1000 ml

– Môi trường PGA + 10 % dịch chiết cà rốt (100 ml)

– Môi trường PGA + 10 % nước dừa già (100 ml)

– Môi trường Mizuno

Pepton	1 g
Cao men	1 g
Glucose	15 g
Maltose	15 g
Agar	20 g
Nước chiết	1000 ml

– Môi trường Raper – dox

Pepton	2 g
Cao men	2 g
Glucose	20 g
KH_2PO_4	0.46 g
K_2HPO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Agar	20 g
Nước cất	1000 ml

3.2.3. Môi trường nhân giống

Lúa gạo tốt, nấu nát nhanh, vớt ra để ráo, trộn chung với mật cưa, cám gạo và cám bắp với những tỉ lệ khác nhau.

Độ ẩm của môi trường nhân giống khoảng 60 – 65 %

3.2.4. Giá thể tổng hợp trồng nấm

- Giá thể 1 (GT1) (Lê Xuân Thám, 1996)

Mùn cưa gỗ tạp	65 %
Cám gạo	15 %
Cám bắp	10 %
Trấu	10 %
Vôi	1%
SA	5 ‰
Lân	1%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 ‰
- Giá thể 2 (GT2) (Trần Văn Mão, 2004)

Mùn cưa	75 %
Trấu	25 %
SA	2 ‰
Vôi	1%
- Giá thể 3 (GT3) (Nguyễn Lâm Dũng, 2002)

Mùn cưa	75 %
Cám gạo	25 %
Vôi	0.25 %
- Giá thể 4 (GT4) (Nguyễn Minh Khang, 2005)

Mùn Cưa	100 %
SA	5 ‰
DAP	2.5 ‰
Vôi	0.25 %

Trộn đều mỗi loại giá thể, thêm nước để đạt độ ẩm 60 – 65 %. Đóng vào bịch. Tổng số là 120 bịch, 30 bịch cho mỗi loại giá thể.

3.2.6. Môi trường nhân sinh khối

Môi trường lỏng (không có agar) tương ứng với môi trường agar có khả năng lan tở nhanh nhất trong 5 loại môi trường khảo sát lan tở.

3.2.7. Dụng cụ

- Đĩa petri, chai thủy tinh (500 ml), bao nylon (PP 15 x 25 cm), ống nghiệm
- Nồi hấp, tủ sấy, cân phân tích, tủ cấy, máy đo pH, kính hiển vi quang học.

3.2.8. Hóa chất sử dụng

- Hóa chất vô cơ: AgNO_3 , $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, HCl , HgCl_2 , HNO_3 , H_2SO_4 , KI , NaOH , NH_4OH .
- Các hóa chất hữu cơ: anhydric acetic, chloroform, diethyl ether, ethanol.

3.3. Phương pháp thí nghiệm

3.3.1. Quan sát hình thái giải phẫu quả thể và định danh nấm Linh chi đỏ mọc tự nhiên bằng bào tử dưới kính hiển vi

3.3.1.1. Hình thái giải phẫu quả thể nấm

Quan sát hình dạng, màu sắc, kích thước của tất cả quả thể nấm Linh chi trồng thử nghiệm. Sau đó, cắt đôi quả thể và quan sát hình thái giải phẫu của chúng.

3.3.1.2. Quan sát hệ sợi nấm

- Lấy một ít sợi nấm dàn đều vào 1 giọt nước có trên lam kính.
- Cố định sợi nấm trên lam kính bằng cách hơi nhẹ mặt dưới lam kính qua lại trên ngọn lửa đèn cồn.
- Nhuộm bằng dung dịch fushsin trong 5 – 10 phút.
- Rửa thuốc nhuộm bằng cồn 95 %.
- Rửa ngay với nước cất để chấm dứt công đoạn tẩy màu.
- Quan sát mẫu vật dưới vật kính 100x.

3.3.1.3. Định danh nấm Linh chi đỏ bằng bào tử dưới kính hiển vi

- Lấy quả thể nấm Linh chi đỏ trong giai đoạn phóng thích bào tử, đặt lên 1 tờ giấy trắng để thu bào tử.
- Dùng khayên cấy lấy ít bào tử rồi dàn đều vào 1 giọt nước trên lam kính.
- Cố định bào tử trên lam kính bằng cách hơi nhẹ mặt dưới của lam kính qua ngọn lửa đèn cồn đến khô.
- Quan sát bào tử nấm dưới vật kính 100x.
- Các chỉ tiêu định danh bằng bào tử:
 - Hình dạng.
 - Màu sắc.

3.3.2. Phân lập nấm Linh chi đỏ mọc tự nhiên

Theo các nhà nghiên cứu hiện có hai phương pháp phân lập cơ bản: phân lập từ bào tử và phân lập từ hệ sợi quả thể nấm.

Theo đánh giá thì phân lập từ hệ sợi quả thể vừa đơn giản, hiệu quả mà vẫn đảm bảo chất lượng của giống. Cho nên chúng tôi chọn phương pháp này để thực hiện. Các bước thực hiện như sau:

- Lấy mẫu, lấy cả quả thể nấm từ tự nhiên sau đó rửa bằng nước sạch, tránh cọ xát mạnh làm xây xát quả thể dễ bị nhiễm khuẩn.
- Dùng dao vô trùng cắt quả thể thành những miếng nhỏ 2 – 3 cm³, ngâm nước javel 2 phút, rồi rửa bằng nước vô trùng, cho vào cồn 70^o ngâm 2 – 5 phút. Sau đó, rửa 1 – 2 lần với 70^o trong tủ cấy vô trùng.
- Để mẫu khô tự nhiên trên giấy thấm vô trùng.
- Rửa mẫu bằng nước vô trùng.
- Để mẫu khô tự nhiên trên giấy thấm vô trùng.
- Tiến hành cắt mẫu thành từng miếng nhỏ rồi cấy vào môi trường agar.

3.3.3 Khảo sát khả năng lan tơ của nấm Linh chi trên các môi trường agar

Để xác định môi trường thích hợp nhất cho việc bảo quản và nhân giống cấp 1 phù hợp với loại nấm Linh chi đỏ mọc tự nhiên tại khu vực Thủ Đức, Tp. Hồ Chí Minh, chúng tôi tiến hành thí nghiệm sau:

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 10 đĩa. Mỗi lần thực hiện trên 50 đĩa petri. Tổng số đĩa sử dụng trong 3 lần là 150 đĩa.

Bảng 3.1. Bố trí thí nghiệm khảo sát khả năng lan tơ của nấm Linh chi trên các môi trường agar

Nghiệm thức	Môi trường nuôi cấy
1	PGA
2	PGA + 10 % dịch chiết cà rốt
3	PGA + 10 % nước dừa già
4	Mizuno
5	Raper – dox

- Các chỉ tiêu theo dõi
 - Tốc độ lan tơ (cm/ngày).
 - Màu sắc và hình thái sợi nấm (hệ tơ dày hay mỏng, có màu sắc gì).
- Cách tiến hành thí nghiệm: các môi trường đều hấp khử trùng ở 121°C trong 25 phút. Đổ môi trường vào đĩa petri vô trùng, để nguội, cấy giống vào đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng (28 – 30°C). Sau khi cấy 2 ngày, đo đường kính của tơ nấm mỗi ngày 1 lần cho tới khi tơ lan hết đĩa (khoảng 1 tuần).

3.3.4. Khảo sát sự sinh trưởng của sợi nấm trên môi trường nhân giống

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 10 ống.

Bảng 3.2. Bố trí thí nghiệm khảo sát sự sinh trưởng của sợi nấm trên môi trường nhân giống

Nghiệm thức	Môi trường nuôi cấy
1	Lúa 90 % + mạt cưa 5 % + cám gạo 5 %
2	Lúa 50 % + mạt cưa 25 % + cám gạo 25 %
3	Mạt cưa 50 % + cám bắp 50 %
4	Lúa 50 % + cám bắp 25 % + cám gạo 25 %

Tổng số ống nghiệm cấy trong 3 lần là 120 ống.

- Các chỉ tiêu theo dõi
 - Đo tốc độ lan sâu của sợi nấm 3 ngày 1 lần (cm/ngày).
 - Quan sát màu sắc, đặc điểm sợi nấm.
- Cách tiến hành thí nghiệm: tiến hành phối trộn môi trường theo các nghiệm thức thí nghiệm sao cho độ ẩm đạt khoảng 60 %, cho môi trường vào khoảng 3/4 chiều dài ống nghiệm, khử trùng 121°C trong 30 phút, để nguội và cấy giống vào. Theo dõi và đo độ lan sâu của sợi nấm theo định kỳ 3 ngày một lần, bắt đầu từ ngày thứ 6.

3.3.5. Khảo sát sự tăng trọng của tơ nấm Linh chi trong môi trường lỏng

Quá trình nuôi cấy được chia làm 3 đợt, mỗi đợt cấy 30 chai. Tổng số chai trong 3 đợt là 90 chai. Tiến hành thu nhận sinh khối ở các ngày 10, 15, 20, mỗi lần thu 10 chai. Tơ nấm thu được, đem sấy khô ở 50°C và cân trọng lượng.

- Chỉ tiêu theo dõi: khoảng thời gian tơ nấm Linh chi tăng trọng mạnh nhất khi nuôi trồng trong môi trường lỏng.

- Cách tiến hành: đổ 50 ml môi trường lỏng vào chai thủy tinh. Hấp khử trùng ở 121°C trong 25 phút, để nguội và cấy một lượng giống nhất định vào. Giống lấy trên môi trường cấp 1, mỗi lần cấy cắt một miếng nhỏ (0,5 cm³) nhẹ nhàng cho vào chai (tránh để mẫu chìm xuống nếu không tơ nấm sẽ rất khó phát triển). Chai đã cấy được ủ ở nhiệt độ phòng và đặt ở nơi tránh ánh sáng.

3.3.6. Khảo sát sự sinh trưởng và phát triển của nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trên 4 loại giá thể, mỗi giá thể cấy 10 bịch mẫu. Tổng cộng 120 bịch.

Giống: nấm Linh chi đỏ mọc tự nhiên tại Đại học Nông Lâm đã được phân lập và nhân giống trên môi trường nhân giống (môi trường cấp hai).

Bảng 3.3. Bố trí thí nghiệm khảo sát sự sinh trưởng và phát triển của nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể

Nghiệm thức	Giá thể
1	Mùn cưa gỗ tạp 65 % + Cám gạo 15 % + Cám bắp 10 % + Trấu 10 % + Vôi 1 % + SA 5 ‰ + Lân 1 % + MgSO ₄ .7H ₂ O 0.5 ‰
2	Mùn cưa 75 % + Trấu 25 % + SA 2 ‰ + Vôi 1 %
3	Mùn cưa 75 % + Cám gạo 25 % + Vôi 0.25 %
4	Mùn Cưa 100 % + SA 5 ‰ + DAP 2.5 ‰ + Vôi 0.25 %

- Chỉ tiêu theo dõi
 - Theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi, mầm quả thể và quả thể để tìm ra giá thể thích hợp nhất, đánh giá hiệu suất sinh học nuôi trồng trên giá thể tổng hợp.
 - Tiến hành giải phẫu quả thể để quan sát cấu trúc hệ sợi của quả thể, bào tử và so sánh các nguồn tư liệu.

- Phương pháp tiến hành: hấp khử trùng các bịch giá thể ở 121°C/1 giờ, hấp 2 lần, cách nhau 1 ngày. Sau đó, dùng giống trên môi trường nhân giống để cấy vào bịch. Độ tuổi thích hợp của giống là 10 – 15 ngày. Chuyển các bịch đã cấy vào buồng ủ ở nhiệt độ 28 – 31°C. Khi hệ sợi bắt đầu kết bện thì ta đưa ra nhà lưới, duy trì nhiệt độ 27 – 31°C, ẩm độ 80 – 90 %, ánh sáng khuếch tán nhẹ.

3.3.7. Trọng lượng tươi của nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể

Khi nấm Linh chi đỏ thành thực, ta tiến hành thu hái nấm. Dùng dao hoặc kéo cắt sát chân mỗi quả thể, cân trọng lượng tươi rồi sấy khô để bảo quản.

Chỉ tiêu theo dõi: trọng lượng quả thể tươi trên 4 loại giá thể trong từng đợt.

3.3.8. Hiệu suất sinh học của nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể

Đánh giá hiệu suất sinh học (HSSH) nuôi trồng trên giá thể tổng hợp là tỉ lệ giữa trọng lượng của quả thể tươi chia cho trọng lượng cơ chất khô.

$$\text{HSSH} (\%) = \frac{\text{Trọng lượng quả thể tươi}}{\text{Trọng lượng cơ chất khô}} * 100$$

Ghi chú: trọng lượng cơ chất khô là 340 g/bịch.

3.3.9. Thực hiện kiểm tra sinh hóa để định tính các dược chất có trong tơ nấm và trong quả thể nấm Linh chi đỏ

Thử nghiệm được tiến hành song song giữa hai mẫu nấm có nguồn gốc khác nhau.

- Mẫu đối chứng là tơ nấm Linh chi đỏ có nguồn gốc ở trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên đã được định danh cụ thể là loài *Ganoderma lucidum*.
- Mẫu nấm Linh chi được thu hái từ trường Đại học Nông Lâm được định danh sơ bộ là loài *Ganoderma lucidum*.

• Chuẩn bị mẫu thử

- Quả thể nấm Linh chi đỏ được phơi khô rồi xay thành bột hoặc thu dịch chiết sau khi ngâm với những dung dịch thích hợp.
- Tơ nấm nuôi trong môi trường lỏng, sau đó được lọc, rửa, sấy khô rồi xay thành bột hoặc dịch chiết sau khi ngâm với những dung dịch thích hợp.

3.3.9.1. Phương pháp định tính alkaloid

- Chuẩn bị dịch nấm Linh chi đỏ để thử nghiệm.

Áp dụng nguyên tắc thử của Webb với cách thử gồm 2 phần như sau:

- Phần 1: bột nấm xay nhuyễn (10 – 20 g) và dung dịch H₂SO₄ 1 % được cho vào erlen, đun nhẹ trong 1 giờ. Lọc lấy dịch để thử nghiệm với cả 2 loại thuốc thử: Mayer và Dragendorff.

Quan sát kết tủa, nếu có kết tủa màu vàng theo qui định là dương tính. Tuy nhiên, nếu không có kết tủa, chưa thể kết luận là không có alkaloid mà phải tiếp tục thử nghiệm phần 2.

– Phần 2: bột xay nhuyễn (10 – 20 gam) ngâm nguội trong dung dịch prollius trong 24 giờ, ở nhiệt độ phòng, thỉnh thoảng lắc trộn.

Lọc và đun dung môi đến cạn, thu được cặn. Hòa tan cặn trong dung dịch HCl 1% đun ấm cho dễ tan. Lọc và lấy dịch lọc để thử nghiệm với 2 loại thuốc thử: Mayer và Dragendorff.

Dung dịch prollius là hỗn hợp gồm: chloroform : ethanol 95° : NH₄OH đậm đặc, theo tỉ lệ là 8 : 8 : 1 (môi trường phải có tính baz).

- Thuốc thử định tính alkaloid

– Thuốc thử Mayer: hòa tan 1,36 g HgCl₂ trong 60 ml nước cất và 5 g KI trong 10 ml nước cất. Thu hỗn hợp 2 dung dịch này lại và thêm nước cất cho đủ 100 ml.

Nhỏ vài giọt thuốc thử Mayer vào dung dịch acid loãng có chứa alkaloid, nếu có alkaloid sẽ xuất hiện tủa màu trắng hoặc vàng nhạt. Cần lưu ý vì tủa tạo thành có thể hòa tan trở lại trong lượng thừa thuốc thử hoặc hòa tan bởi ethanol có sẵn trong dung dịch thử.

– Thuốc thử Dragendorff: hòa tan 8 g Nitrat bismuth Bi(NO₃)₃ trong 25 ml HNO₃ 30% (D = 1,18). Hòa tan 28 g KI và 1 ml HCl 6N trong 5 ml nước cất. Hỗn hợp 2 dung dịch này lại để yên trong tủ lạnh 5°C sẽ thấy tủa màu sậm xuất hiện và tan trở lại, lọc và thêm nước cho đủ 100 ml. Dung dịch màu cam – đỏ được chứa trong chai màu nâu để che sáng, cất trong tủ lạnh, có thể giữ lâu vài tuần.

Nhỏ vài giọt thuốc thử Dragendorff vào dung dịch acid loãng có chứa alkaloid, nếu có alkaloid sẽ xuất hiện tủa màu cam – nâu.

3.3.9.2. Phương pháp định tính hợp chất saponin

Chiết 10 g dược liệu với cồn 70% bằng cách ngâm trong 24 giờ rồi lọc. Cô dịch lọc bốc hơi đến gần khô. Dùng cồn để làm các phản ứng định tính.

- Thử nghiệm tính tạo bọt

Saponin có tính tạo bọt, nên đây là một trong những phương pháp chính xác để định tính sự hiện diện của saponin.

Phương pháp tiến hành: hòa tan một lượng căn tương ứng với 1 g dược liệu vào 5 ml nước nóng. Lọc vào một ống nghiệm 1,6 – 16 cm và để nguội, thêm nước cho đủ 10 ml, lắc mạnh dọc theo chiều ống nghiệm trong 1 phút. Để yên ống nghiệm, quan sát lớp bọt và đánh giá kết quả.

- Bọt bền trong 15 phút: +
- Bọt bền trong 30 phút: ++
- Bọt bền trong 60 phút: +++

- *Thử nghiệm Fontan – Kaudel*

Lấy một lượng căn tương ứng với 1g bột dược liệu, đun nóng nhẹ trên cách thủy để hòa tan với 10 ml nước. Chia đều vào 2 ống nghiệm.

- Ống 1: thêm 2 ml HCl 0.1N (pH =1)
- Ống 2: thêm 2 ml NaOH 0.1N (pH =13)

Lắc mạnh dọc theo chiều ống nghiệm trong 1 phút và để yên, quan sát các cột bọt trong cả 2 ống nghiệm.

- Nếu cột bọt trong cả 2 ống cao ngang nhau và bền như nhau, thì sơ bộ xác định là có saponin triterpenoid.
- Nếu ống pH = 13 có cột bọt cao hơn nhiều so với ống pH = 1, sơ bộ xác định là có saponin steroid.

3.3.9.3. Phương pháp định tính triterpenoid (bằng phản ứng Liebermann – Burchard)

Chiết 10 – 20 g bột nấm bằng diethylether trong bình tam giác, lắc đều trong 10 – 20 phút (cho tới khi dịch chiết sau khi bốc hơi không còn để lại lớp cặn mờ trên mặt kính đồng hồ). Gộp các dịch chiết, lọc và cô lại đến khi còn khoảng 50 ml.

Lấy 5 ml dịch chiết cho vào chén sứ, bốc hơi tới cặn. Hòa tan cặn với 0,5 ml anhydrid acetic, thêm vào dung dịch 0,5 ml chloroform. Chuyển dung dịch vào 1 ống nghiệm nhỏ khô, dùng pipet pasteur thêm 1 – 2 ml H₂SO₄ đậm đặc lên thành ống nghiệm để nghiêng cho acid chảy từ từ xuống đáy ống nghiệm. Nơi tiếp xúc giữa 2 lớp dung dịch có màu đỏ nâu hay đỏ đến tím, lớp dung dịch phía trên dần dần chuyển thành màu xanh lục hay tím. Kết luận trong nấm Linh chi đỏ có chứa triterpenoid.

3.3.9.4. Phương pháp định tính acid hữu cơ

Lấy 2 ml dịch chiết nước cho vào một ống nghiệm. Thêm vào dung dịch một ít tinh thể natri Na_2CO_3 , hơ nhẹ qua ngọn lửa. Nếu có các bọt khí nhỏ sủi lên từ các tinh thể Na_2CO_3 thì kết luận là có acid hữu cơ.

3.3.9.5. Phương pháp định lượng polysaccharides (GLPs)

Polysaccharide có nhiều dạng và nhiều qui trình chiết khác nhau. Chiết GLPs ở 100°C trong 16 giờ, cho năng suất ly trích cao, nhưng làm biến đổi cấu trúc sinh học các polysaccharides có trong nấm Linh chi. Một qui trình thứ hai được ứng dụng rộng rãi để chiết các GLPs ở nhiệt độ thấp, nhằm ổn định cấu trúc sinh học của các GLPs.

- Qui trình chiết suất polysaccharides từ nấm Linh chi (Yihuai Gao và ctv, 2001)

Quả thể nấm Linh chi thái mỏng hoặc tơ nấm đã sấy khô đem ngâm nước ở 70°C trong 3 giờ, tiến hành chiết thu được dịch chiết lần 1 và bã chiết lần 1. Lặp lại quá trình ngâm và chiết với bã chiết lần 1 ta thu được dịch chiết và bã chiết lần 2. Bã chiết lần 2 ngâm với cồn 80 % ở 70°C trong hai giờ ta thu được dịch chiết lần 3. Thu nhận cả 3 dịch chiết và lọc. Thu phần cặn, sấy khô và cân trọng lượng. Từ đó đánh giá hàm lượng polysaccharide thô có trong quả thể nấm Linh chi đỏ.

3.3.10. So sánh các thành phần dược chất giữa quả thể và tơ nấm

So sánh sự giống và khác nhau giữa tơ nấm và quả thể nấm Linh chi đỏ về sự tồn tại của các thành phần dược chất.

3.3.11. Phương pháp xử lý số liệu thống kê

Số liệu được xử lý và vẽ biểu đồ trên phần mềm Excel. Tốc độ sinh trưởng trung bình của hệ sợi nấm trên các môi trường được tính như sau:

$$X_i = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots}{n_i}$$

Ghi chú:

- x_i : tốc độ sinh trưởng trên các môi trường (cm/ngày)
- n_i : số quan sát

Sử dụng phần mềm Statgraphics Ver. 7.0 để so sánh sự khác biệt về tốc độ tăng trưởng hệ sợi nấm trên các nghiệm thức thí nghiệm ở mức $\alpha = 0,05$ hay LSD (95 %) (Least Significant Difference).

Phần 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Quan sát hình thái giải phẫu quả thể và định danh sơ bộ nấm Linh chi đỏ mọc tự nhiên tại trường Đại học Nông Lâm bằng bào tử dưới kính hiển vi

4.1.1. Hình thái giải phẫu quả thể nấm Linh chi đỏ



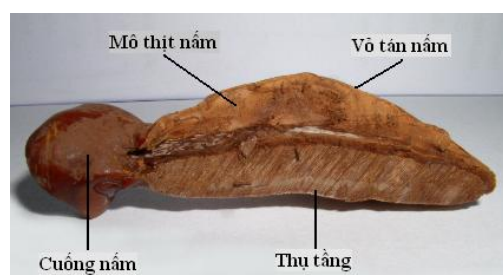
Hình 4.1. Hình thái quả thể nấm Linh chi đỏ trồng thí nghiệm

A. Mặt trên quả thể nấm

B. Mặt dưới quả thể nấm

Thể quả của nấm Linh chi đỏ có cuống ngắn, thường dính bên, đôi khi dính tâm do quá trình liền tán mà thành. Cuống nấm hình trụ hoặc thanh mảnh (cỡ 0.3 – 0.8 cm đường kính), hoặc mập khỏe (tới 2 – 3.5 cm đường kính), đôi khi có uốn khúc cong queo. Lớp vỏ cuống láng bóng, màu đỏ – nâu đỏ phủ suốt lên bề mặt tán nấm. Chỗ dính cuống hoặc lồi lên, hoặc lõm xuống như lõm rón.

Mầm nấm có hình tròn, màu trắng. Sau 20 – 25 ngày thì mầm nấm chuyển thành hình quạt và có màu đỏ - đỏ nâu, mép nấm có màu trắng. Sau 30 – 35 ngày tiếp theo thì mép nấm màu trắng chuyển dần thành màu đỏ. Mũ nấm dạng thận – gần tròn, đôi khi xòe hình quạt hoặc ít nhiều dị dạng. Trên mặt mũ có những vân gợn đồng tâm và những rãnh nhỏ lồi lõm không đồng nhất, mép nấm tròn hoặc uốn lượn. Tán nấm rộng từ 4 – 13cm, dày khoảng 1 – 2,5cm. Mặt trên mũ nấm có lớp vỏ cứng màu nâu đỏ nhẵn bóng hoặc gò gề. Mặt dưới nấm là lớp bào tầng màu trắng đục, có nhiều lỗ nhỏ tiếp giáp vào tầng sinh bào tử.



Hình 4.2. Hình thái cấu trúc giải phẫu nấm Linh chi đỏ

4.1.2. Hệ sợi nấm Linh chi đỏ

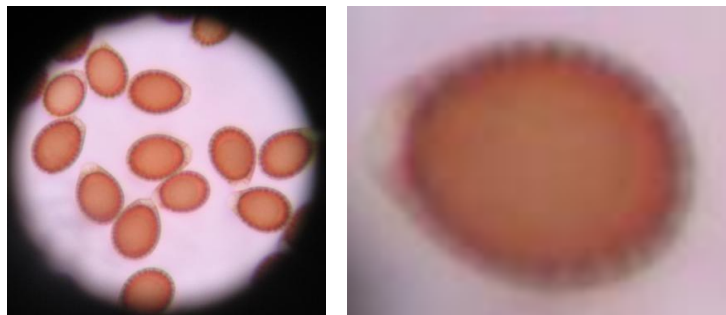
Sợi nấm hình trụ, có phân nhánh, mọc đan xen nhau tạo thành hệ sợi chằng chịt, khi kết thành hệ sợi thì rất dai



Hình 4.3. Hình thái sợi nấm Linh chi đỏ (100x)

4.1.3. Cấu trúc bào tử nấm Linh chi đỏ

Bào tử đảm (Basidiospores) có màu nâu quế, hình trứng. Bào tử có cấu trúc lớp vỏ kép, bên trong chứa dịch trong suốt, có thể quan sát được dưới kính hiển vi quang học. Lớp vỏ ngoài nhẵn. Lớp vỏ trong có nhiều gai nhỏ, nối liền hai lớp vỏ và mỏng hơn lớp ngoài, thường cản quang mạnh, do vậy đậm màu hơn dưới kính hiển vi quang học. Bào tử nấm có kích thước trung bình $4,5 - 6,5\mu\text{m} \times 8,5 - 11,5\mu\text{m}$



Hình 4.4. Cấu trúc bào tử nấm Linh chi đỏ (100x)

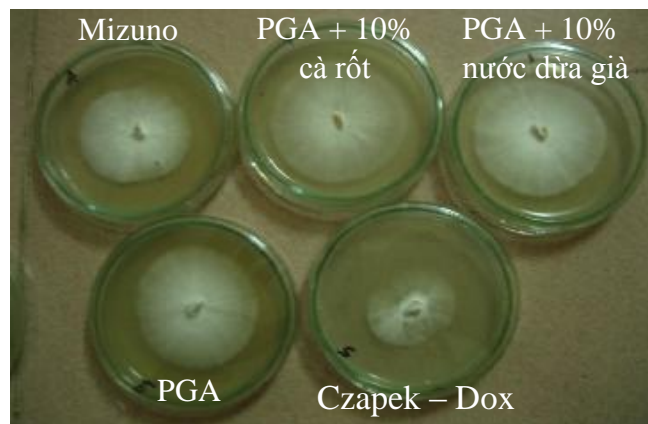
4.1.4. Định danh sơ bộ nấm Linh chi đỏ mọc tự nhiên

Dựa vào những đặc điểm về hình thái quả thể, hình thái sợi nấm và cấu trúc bào tử của nấm Linh chi mọc tự nhiên ở trường Đại học Nông Lâm, thấy rằng chúng có những đặc điểm và cấu trúc tương đồng với loại nấm *Ganoderma lucidum* đã được nhiều nhà nghiên cứu mô tả (Lê Xuân Thám, 1996. *Nấm Linh chi – Dược liệu quý ở Việt Nam*; Đỗ Tất Lợi, Lê Duy Thắng, Trần Văn Luyến. *Nấm Linh chi – nuôi trồng và sử dụng*). Từ đây, chúng tôi có thể kết luận sơ bộ rằng đây là giống *Ganoderma lucidum* (Linh chi đỏ), một loại nấm mà từ lâu đã được coi là một loại “thượng dược” trong y học.

4.2. Sự sinh trưởng và phát triển của nấm Linh chi đỏ

4.2.1. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên môi trường agar

Trên môi trường agar, hệ sợi nấm Linh chi đỏ phát triển dưới dạng hình rế khá sớm và tốc độ tương đối nhanh. Trong quá trình theo dõi sự sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi đỏ, chúng tôi nhận thấy trong 2 ngày đầu hệ sợi tăng trưởng rất chậm. Sau 3 ngày, trên môi trường PGA và PGA bổ sung phát triển khá nhanh. Xung quanh rìa mẫu cấy là hệ sợi nấm đang tăng trưởng, màu trắng đục.



Hình 4.5. Hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên các môi trường agar

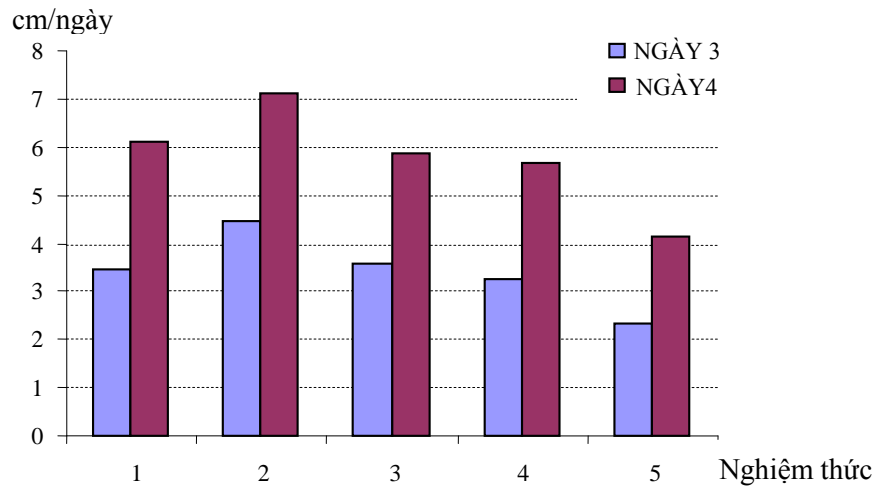
Trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau, tốc độ tăng trưởng của sợi nấm Linh chi đỏ khác nhau. Trên môi trường PGA + 10 % dịch chiết cà rốt có tốc độ lan rất nhanh và sau 5 ngày đa số sợi nấm đã phủ kín mặt thạch trên đĩa petri. Mặt khác, mật độ hệ sợi nấm trên các môi trường PGA, PGA bổ sung và Mizuno rất dày, hệ sợi phân nhánh, nhô lên bề mặt thạch, nhìn như một lớp bông. Trên môi trường Czapek – Dox, hệ sợi nấm rất mỏng và tốc độ tăng trưởng sợi nấm trên môi trường Czapek – Dox rất chậm, sau 7 ngày hệ sợi nấm mới phủ kín mặt thạch trên đĩa petri.

Bảng 4.1. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên môi trường agar

Ngày	Nghiệm thức	Đường kính tơ nấm (cm)				
		1	2	3	4	5
3		3,44 ^b	4,46 ^c	3,58 ^b	3,26 ^b	2,33 ^a
4		6,1 ^{bc}	7,1 ^c	5,86 ^b	5,68 ^b	4,16 ^a

Ghi chú: Những kí tự theo sau trong cùng hàng giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê

$P_{3 \text{ ngày}} = 0,0001$; $P_{4 \text{ ngày}} = 0,0081$ dựa theo trắc nghiệm phân hạng LSD



Hình 4.6. Biểu đồ sự sinh trưởng hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên các môi trường agar

Ghi chú: Nghiệm thức: 1 – môi trường PGA

2 – môi trường PGA + 10 % dịch chiết cà rốt

3 – môi trường PGA + 10 % nước dừa già

4 – môi trường Mizuno

5 – môi trường Czapek – Dox

Nhận xét: theo kết quả Bảng 4.4, tốc độ sinh trưởng sợi nấm trên các môi trường 1, 3 và 4 tương đương nhau. Ở môi trường 2 (PGA có bổ sung 10 % dịch chiết cà rốt), hệ sợi nấm phát triển mạnh nhất. Điều này cho thấy hàm lượng chất dinh dưỡng trong môi trường 2 phù hợp nhất cho sự phát triển của tơ nấm. Môi trường 5 tơ nấm phát triển yếu nhất. Chứng tỏ, hệ sợi nấm kém phát triển trên môi trường không có chứa maltose và dịch chiết khoai tây.

4.2.2. Sự sinh trưởng của sợi nấm trên môi trường nhân giống

Tơ nấm Linh chi có thể mọc lan sâu vào trong môi trường nhân giống. Tốc độ lan sâu tương đối chậm, nhưng khá đồng đều về mọi phía. Trong 3 ngày đầu tốc độ lan sâu rất chậm. Sau đó tốc độ lan sâu nhanh hơn. Sau 13 – 15 ngày thì tơ nấm sẽ lan kín ống nghiệm.

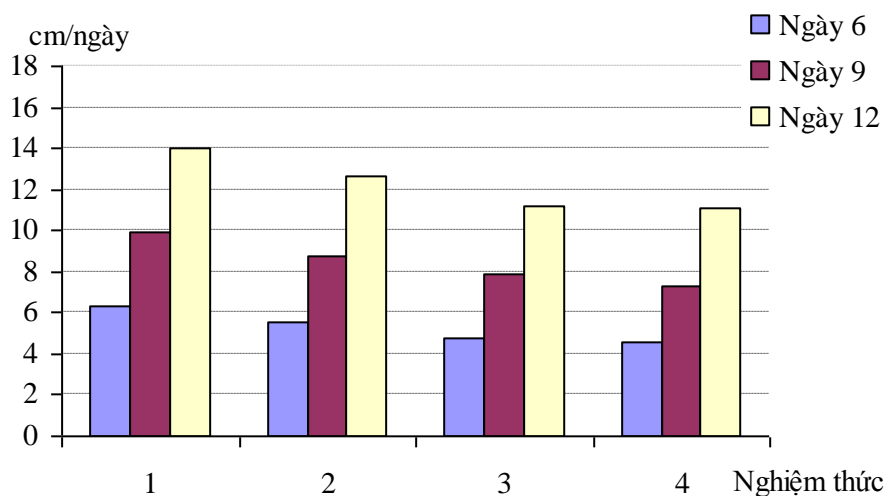
Đối với những môi trường nhân giống khác nhau thì tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm cũng khác nhau. Trên môi trường 3 (mùn cưa và cám gạo) hệ sợi tơ mỏng hơn những môi trường còn lại. Tốc độ lan hệ sợi nấm sau 12 ngày nuôi cấy (Bảng 4.2).

Bảng 4.2. Tốc độ sinh trưởng của hệ sợi nấm trên các môi trường nhân giống.

Ngày	Nghiệm thức	Chiều sâu tơ nấm (cm)			
		1	2	3	4
6		6,34 ^b	5,51 ^{ab}	4,72 ^a	4,54 ^a
9		9,96 ^c	8,74 ^b	7,88 ^{ab}	7,3 ^a
12		13,97 ^c	12,67 ^b	11,2 ^a	11,1 ^a

Ghi chú: Những kí tự theo sau trong cùng hàng giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê.

$P_{6\text{ ngày}} = 0,0317$; $P_{9\text{ ngày}} = 0,0011$; $P_{12\text{ ngày}} = 0,0011$ dựa theo trắc nghiệm phân hạng LSD

**Hình 4.7. Biểu đồ sự sinh trưởng của hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên các môi trường nhân giống**

Ghi chú: Nghiệm thức: 1 – Lúa 90 % + mạt cưa 5 % + cám gạo 5 %
 2 – Lúa 50 % + mạt cưa 25 % + cám gạo 25 %
 3 – Mạt cưa 50 % + cám bắp 50 %
 4 – Lúa 50 % + cám bắp 25 % + cám gạo 25 %

Nhận xét: tốc độ lan sâu hệ sợi nấm trên các môi trường nhân giống không giống nhau. Tốc độ lan sâu hệ sợi nấm trên môi trường 1 là nhanh nhất và ở môi trường 4 là chậm nhất. Điều này chứng tỏ, hệ sợi nấm phát triển tốt trên môi trường chứa 90 % lúa, bổ sung thêm mạt cưa và cám gạo. Đây là môi trường nhân giống cấp hai tốt nhất cho sự phát triển của hệ sợi nấm. Tốc độ lan sâu của tơ nấm ở môi trường 3 và 4 là thấp nhất, hầu như có rất ít sự khác biệt với nhau.



Hình 4.8. Sự lan sâu của hệ sợi nấm Linh chi đỏ

4.2.3. Khả năng tích lũy sinh khối của nấm Linh chi đỏ trong môi trường lỏng

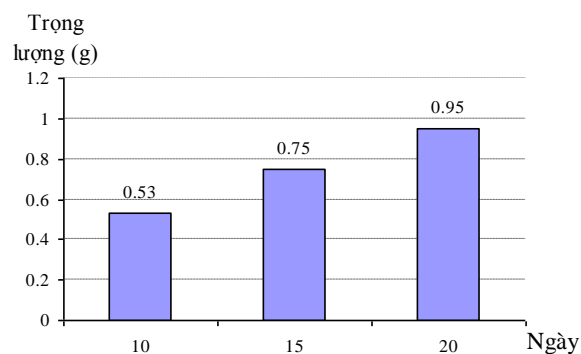
Sau khi khảo sát sự phát triển của hệ sợi nấm trên môi trường rắn, ta chọn được môi trường cho hệ sợi nấm phát triển tốt nhất là môi trường PGA có bổ sung 10% dịch chiết cà rốt. Từ đó ta pha chế được môi trường lỏng PGB có bổ sung 10% dịch chiết cà rốt dùng để khảo sát khả năng tích lũy sinh khối của nấm Linh chi đỏ trong môi trường lỏng. Lấy một mẫu giống nhỏ cấy vào môi trường nuôi cấy lỏng sao cho giống cấy vào phải nổi trên mặt môi trường. Nếu giống cấy bị chìm thì hệ sợi nấm sẽ không phát triển được. Sự phát triển của hệ sợi nấm (Bảng 4.3).

Bảng 4.3. Khả năng tích lũy hệ sợi nấm của nấm Linh chi đỏ trong môi trường lỏng

Thời gian (ngày)	Sinh khối (gam)
10	0,53 ^a
15	0,75 ^b
20	0,95 ^b

Ghi chú: Những kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê.

$P_{\text{lỏng}} = 0,0103$ dựa theo trắc nghiệm phân hạng



Hình 4.9. Biểu đồ khả năng tích lũy sinh khối của nấm Linh chi đỏ trong môi trường lỏng

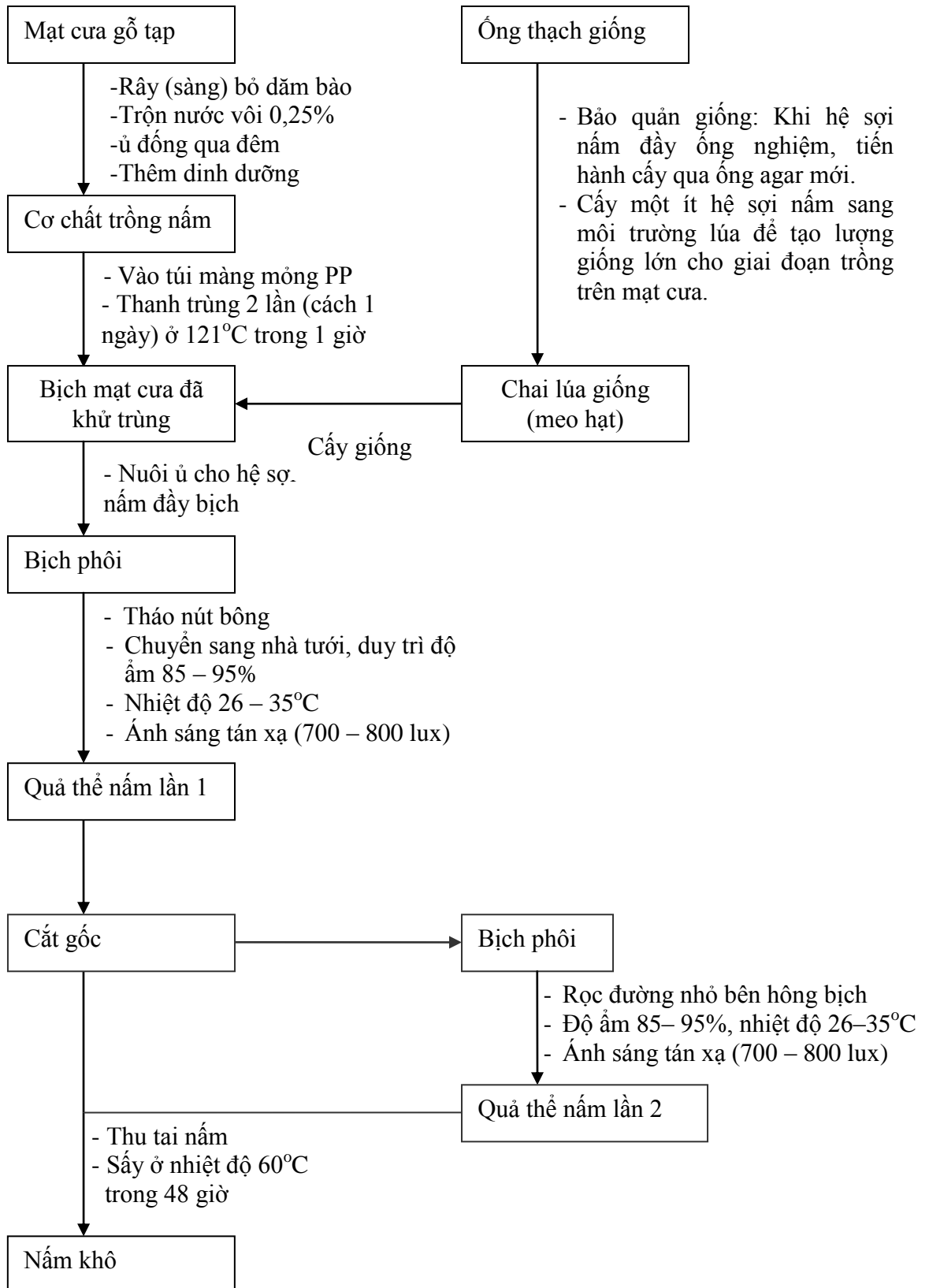
Nhận xét: hai ngày sau khi cấy giống, hệ sợi nấm bắt đầu phát triển và lan dần ra xung quanh. 15 ngày đầu hệ sợi nấm phát triển rất nhanh, sau đó thì phát triển chậm dần. Sau 12 – 15 ngày thấy xuất hiện màu nâu đỏ quanh mẫu cấy, vòng sắc tố lan dần và đậm dần theo thời gian nuôi cấy.



Hình 4.10. Sinh khối của nấm Linh chi đỏ trong môi trường lỏng

4.2.4. Sự sinh trưởng và phát triển nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể

Linh chi là loại cây phá gỗ nên việc tận dụng các chất phế thải nông, lâm, công nghiệp để trồng nấm rất dễ dàng và rất có ích cho việc loại bỏ chất phế thải làm sạch môi trường. Trong đó, mật cưa là nguồn nguyên liệu có nguồn carbon rất cao, thích hợp cho việc trồng nấm. Tuy nhiên chất dinh dưỡng trong mật cưa rất thấp do đó nhất thiết phải phối trộn thêm những thành phần khác có chứa các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của nấm để có thể rút ngắn thời gian trồng và tăng hiệu suất trồng nấm. Các chất phối trộn thường là cám gạo, cám bắp, bột khoai... Các nguyên liệu này sẽ cung cấp vitamin hay acid amin cho hệ sợi nấm sinh trưởng nhanh. Ngoài ra, các loại phân hóa học như: Urê, DAP, NPK... cũng được sử dụng rất nhiều trong nuôi trồng. Thực tế cho thấy khi bổ sung nguồn nitơ với hàm lượng rất thấp nhưng lại có tác dụng tốt rõ rệt đối với sự phát triển của nấm. Chúng tôi đã tiến hành khảo sát sinh trưởng nấm Linh chi đỏ (*Ganoderma lucidum*) trên giá thể mật cưa gỗ tạp, sử dụng bịch PP kích thước 15 x 25 cm, chứa 340 gam cơ chất khô / bịch (Hình 4.11)



Hình 4.11. Quy trình trồng và thu hoạch nấm Linh chi đỏ

Cấy giống sau 20 - 25 ngày thì trên GT1, GT2 và GT3 hầu như tơ đều lan kín bịch, còn GT4 thì tơ lan kín các bịch sau đó 5 – 7 ngày. Nhưng ở M1 và M2 lớp tơ rất dày còn ở M3 và M4 thì mỏng và yếu hơn. Sau 25 ngày tất cả các bịch đều được chuyển ra ngoài nhà lưới và tháo nút bông ở cổ bịch ra. Sau 10 – 15 ngày thì ở M1, M2 và M3 xuất hiện mầm nấm dạng núp tròn, mập, màu trắng. Môi trường M4 thì xuất hiện sau đó 5 – 7 ngày.

Qua quá trình khảo sát chúng tôi nhận thấy rằng pha ủ sợi kéo dài 20 – 25 ngày, khi hệ sợi bắt đầu bện kết, đưa các bịch nấm đã mọc trắng ra nhà lưới, tiến hành tưới phun sương để duy trì độ ẩm 80 – 95%, ánh sáng nhẹ (700 – 800 lux), độ thông khí cao.

Pha phát triển thể quả: ngày thứ 35 – 40 thì mầm quả thể bắt đầu hình thành, ngày thứ 45 – 70 thì mầm nấm đang trong giai đoạn tăng trưởng. Từ ngày 100 – 120 quả thể nấm bắt đầu già. Ta tiến hành thu hái quả thể.

Sau khi thu quả thể, dùng một con dao nhọn rọc một đường nhỏ trên hông bịch nấm sao cho đường rạch không phạm vào phần cơ chất trồng nấm. Tiếp tục duy trì độ ẩm, nhiệt độ và ánh sáng thích hợp để đón quả thể nấm đợt hai. Sau 5 – 10 ngày thì từ các vết rọc và từ cổ của một số bịch hình thành mầm quả thể. Từ ngày 50 – 70 thì quả thể nấm đợt hai bắt đầu già, có thể thu hái được.

Trong quá trình chăm sóc cần tưới nước dạng phun sương đều đặn, đảm bảo độ ẩm, nhiệt độ, khống chế ánh sáng và tránh gây tổn thương cơ học do ruồi, muỗi, chích hút... Đặc biệt trong giai đoạn phát triển của thể quả nếu nhiệt độ cao, cường độ ánh sáng mạnh, có độ thoáng khí kém sẽ gây ức chế sự hình thành và phát triển của quả thể. Sau khi thu hái cần có phương pháp bảo quản thể quả tốt hay chế biến ngay để bảo đảm chất lượng và độ cảm quan của nấm.

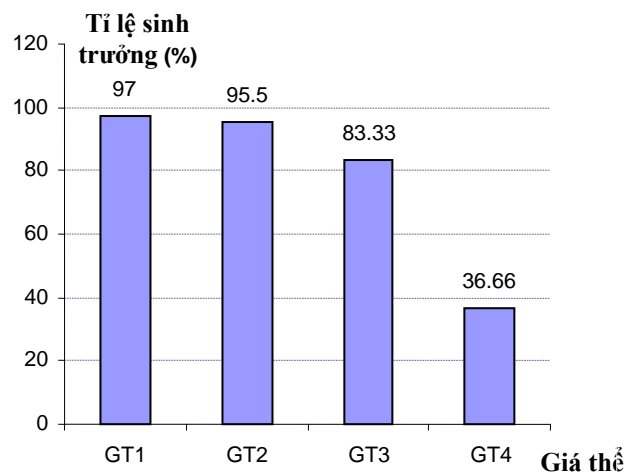


Hình 4.12. Quả thể nấm trồng thí nghiệm tại nhà lưới

4.2.4.1. Sự tăng trưởng của sợi nấm *Linh chi đỏ*

Sau khi mang ra nhà lưới, các bịch nấm được gỡ nút bông và được chăm sóc để hệ sợi nấm phát triển thành quả thể. Đây là giai đoạn dễ bị nhiễm nấm mốc và các côn trùng gây hại. Nếu hàm lượng nước trong môi trường quá cao, nấm mốc rất dễ phát triển, còn nếu quá thấp thì hệ sợi nấm sẽ khó phát triển. Do đó phải tùy vào điều kiện khí hậu cũng như vị trí thí nghiệm mà có phương pháp chăm sóc hiệu quả nhất.

Nhà lưới trồng nấm của chúng tôi được đặt ngoài trời, có che mái và cây che bóng mát. Do đó khi trời âm u hay mưa thì độ ẩm rất cao không phải tưới. Tuy nhiên, phải thường xuyên thu dọn nhà lưới khi trời mưa vì nước mưa tạt trong nhà lưới sẽ khiến hàm lượng nước trong môi trường tăng cao, nấm mốc phát triển, ức chế sự phát triển của hệ sợi nấm.



Hình 4.13. Biểu đồ tỷ lệ sinh trưởng hệ sợi nấm *Linh chi đỏ* trên các môi trường giá thể trồng nấm.

- Ghi chú:*
- GT1: Mùn cưa gỗ tạp 65% + Cám gạo 15% + Cám bắp 10% + Trấu 10% + Vôi 1% + SA 5% + Lân 1% + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 %
 - GT2: Mùn cưa 75% + Trấu 25% + SA 2% + Vôi 1%
 - GT3: Mùn cưa 75% + Cám gạo 25% + Vôi 0.25%
 - GT4: Mùn Cưa 100% + SA 5% + DAP 2.5% + Vôi 0.25%

Nhận xét: tỷ lệ sinh trưởng của nấm trên giá thể 1 và 2 là rất mạnh. Chỉ sau 20 ngày mà hệ sợi tơ hầu như lan kín hết các bịch. Còn ở giá thể 4 rất chậm phát triển. Điều đó chứng tỏ rằng những giá thể có phối trộn với cám gạo, cám bắp và có bổ sung nguồn đạm SA được nấm hấp thụ tốt hơn là sử dụng 100% mùn cưa và SA. Từ đó, chúng ta

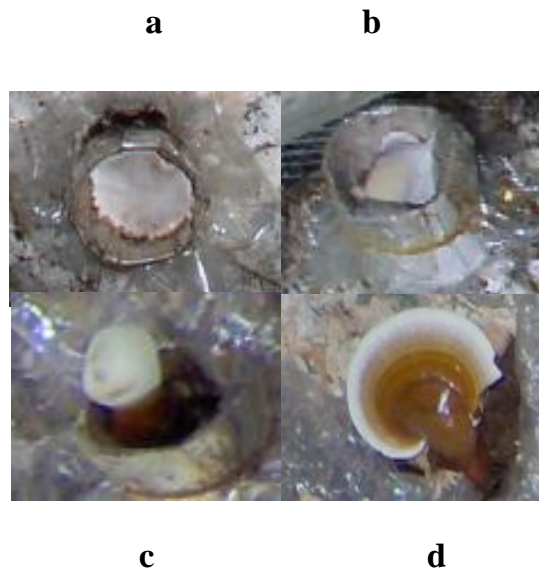
có thể lựa chọn được giá thể trồng nấm sao cho sợi nấm phát triển nhanh và kết quả thể sớm.

4.2.4.2. Giai đoạn phát triển quả thể nấm Linh chi đỏ

- *Giai đoạn phát triển quả thể nấm đợt 1*

Sau khi hệ sợi nấm phủ đầy bịch (giai đoạn sinh trưởng), chúng bắt đầu chuyển sang giai đoạn phát triển. Trong giai đoạn mới, hệ sợi nấm đan vào nhau và bắt đầu kết mầm nấm. Thời gian kết mầm ở môi trường M1, M2 và M3 vào 35 – 40 ngày, riêng môi trường M4 thì thời gian kết mầm tương đối lâu 45 – 50 ngày.

Nhìn chung các bịch môi trường sau khi cấy giống vào đều xuất hiện mầm quả thể và thời gian xuất hiện mầm giữa các môi trường chênh lệch nhau 7 – 10 ngày. Khi hệ sợi không bện kết được ở đầu cổ bịch phôi, phải dùng dao tạo vết rạch ở đáy hoặc ở gốc bịch giúp cho mầm nấm xuất hiện. Trong quá trình nuôi trồng, hầu hết các môi trường không có hiện tượng sợi nấm không bện kết ở đầu cổ bịch phôi và mỗi bịch phôi thường chỉ tạo ra một quả thể.



Hình 4.14. Quá trình hình thành quả thể nấm

- Hệ sợi bện kết (sau 25 – 30 ngày).
- Mầm nấm (sau 35 – 40 ngày)
- Mầm nấm tăng trưởng (sau 45 – 60 ngày) .
- Hình thành quả thể (sau 70 – 80 ngày)

Theo dõi quá trình tạo quả thể nấm Linh chi đỏ, chúng tôi nhận thấy hình dạng quả thể ở các môi trường rất đồng nhất: quả thể nấm hình quạt, cuống ngắn. Riêng quả

thể ở môi trường 1 và 2 có một số dị dạng. Về kích thước thì ở môi trường 1, 2, 3 khá đồng đều, còn ở môi trường 4 quả thể rất nhỏ và thời gian phát triển cũng chậm hơn các môi trường còn lại.

- *Giai đoạn phát triển quả thể nấm đợt 2*



Hình 4.15. Quả thể nấm mọc từ đường rọc hông bịch

Phần lớn các giá thể 1, 2 và 3 đều tiếp tục ra quả thể. Riêng ở giá thể 4 chỉ một nửa số bịch có thể tiếp tục ra quả thể và quả thể rất nhỏ. Quả thể đợt hai nhỏ hơn và mau già hơn.

4.3. Trọng lượng nấm tươi trên các môi trường giá thể

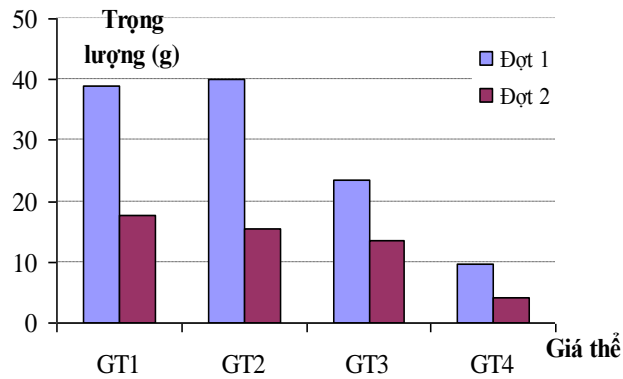
Trọng lượng của nấm tươi trên mỗi loại giá thể và trong từng đợt khác nhau. Trong đợt 1 quả thể nấm to, mập khác hẳn với đợt 2 có quả thể nhỏ, gầy. Điều này là do các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi trồng đã cạn dần sau giai đoạn ra quả thể đợt 1. Mặt khác, do một số bịch vừa ra quả thể từ vết rạch, vừa ra quả thể từ cổ bịch nên chất dinh dưỡng không đủ cung cấp cho 2 quả thể cùng phát triển mạnh. Kết quả là quả thể đợt 2 nhỏ hơn nhiều so với quả thể đợt 1.

Bảng 4.4. Trọng lượng nấm tươi trên các môi trường giá thể

Môi trường giá thể	Trọng lượng nấm tươi đợt 1 (g)	Trọng lượng nấm tươi đợt 2 (g)
GT 1	39 ^c	17,7 ^a
GT 2	40,15 ^c	15,52 ^b
GT 3	23,37 ^b	13,53 ^{bc}
GT 4	9,62 ^a	4,24 ^d

Ghi chú: Những kí tự theo sau trong cùng cột giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê.

$P_{\text{đợt 1}} = 0,0000$; $P_{\text{đợt 2}} = 0,0000$; dựa theo trắc nghiệm phân hạng



Hình 4.16. Biểu đồ tỉ lệ trọng lượng nấm tươi trên các môi trường giá thể

Ghi chú: GT1: Mùn cưa gỗ tạp 65% + Cám gạo 15% + Cám bắp 10% + Trấu 10% + Vôi 1% + SA 5‰ + Lân 1% + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 ‰
 GT2: Mùn cưa 75% + Trấu 25% + SA 2‰ + Vôi 1%
 GT3: Mùn cưa 75% + Cám gạo 25% + Vôi 0.25%
 GT4: Mùn Cưa 100% + SA 5‰ + DAP 2.5‰ + Vôi 0.25%

Nhận xét: trọng lượng quả thể thu được giữa hai đợt là khác nhau. Đợt 1 trọng lượng quả thể thu được gấp đôi đợt hai. Trọng lượng quả thể ở GT1 và GT2 tương đương nhau và lớn nhất. Còn trọng lượng quả thể ở GT4 thấp nhất trong cả hai đợt.

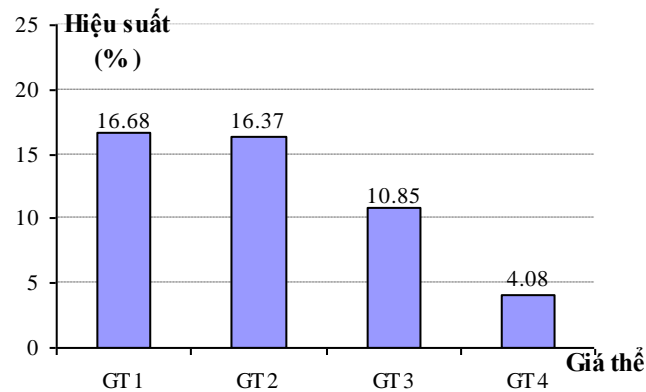
Trong khi GT4 là môi trường tối ưu nhất cho sự phát triển của nấm Linh chi đen (Nguyễn Minh Khang, 2005) thì đối với nấm Linh chi đỏ nó là giá thể xấu nhất. Rõ ràng là GT4 không thích hợp cho sự phát triển của loại nấm Linh chi đỏ này. Vì vậy, khi chọn giá thể để trồng loại nấm này nên chọn GT1 hoặc GT2 là tốt nhất.

4.4. Hiệu suất sinh học của nấm Linh chi đỏ trên các môi trường giá thể

Sau mỗi lần thu hoạch nấm, tất cả quả thể nấm được cân trọng lượng tươi để đánh giá hiệu suất sinh học mà nấm Linh chi đạt được sau quá trình nuôi cấy trên các môi trường giá thể khác nhau. Sau đó, đem tất cả nấm đi sấy khô ở nhiệt độ 60°C trong 2 ngày để bảo quản nấm khỏi hư và mốc.

Bảng 4.5. Hiệu suất sinh học đạt được trên các giá thể trồng nấm

Môi trường giá thể	Hiệu suất sinh học (%)
GT 1	16,68
GT 2	16,37
GT 3	10,85
GT 4	4,08



Hình 4.17. Biểu đồ hiệu suất sinh học nuôi trồng nấm Linh chi

- Ghi chú:* GT1: Mùn cưa gỗ tạp 65% + Cám gạo 15% + Cám bắp 10% + Trấu 10% + Vôi 1% + SA 5‰ + Lân 1% + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 ‰
 GT2: Mùn cưa 75% + Trấu 25% + SA 2‰ + Vôi 1%
 GT3: Mùn cưa 75% + Cám gạo 25% + Vôi 0.25%
 GT4: Mùn Cưa 100% + SA 5‰ + DAP 2.5‰ + Vôi 0.25%

Nhận xét: như vậy, hiệu suất nuôi trồng nấm trên giá thể 1 và 2 có hiệu suất cao nhất (16,68 và 16,37 %). Hiệu suất nuôi trồng trên giá thể 4 là rất thấp, không đạt tới 10%.

4.5. Định tính các dược chất có trong hệ sợi nấm và trong quả thể nấm

4.5.1. Định tính alkaloid

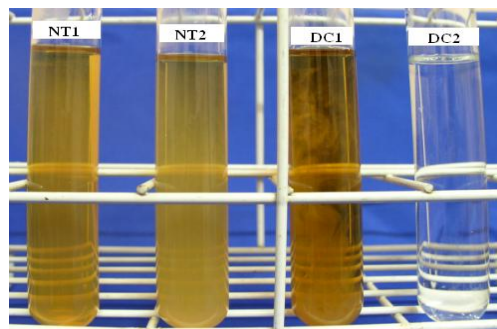
Cho dịch chiết bột nấm Linh chi đỏ tác dụng với thuốc thử Mayer thì nhận thấy xuất hiện kết tủa vô định hình màu trắng ngà.

Ống NT1: dịch chiết quả thể nấm với nước acid + thuốc thử Mayer

Ống NT2: dịch chiết tơ nấm với nước acid + thuốc thử Mayer

Ống DC1: dịch chiết tơ nấm đối chứng với nước acid + thuốc thử Mayer

Ống DC2: nước cất + thuốc thử Mayer



Hình 4.18. Định tính alkaloid với thuốc thử Mayer

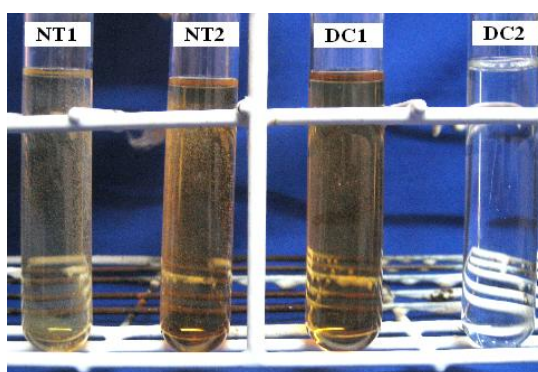
Cho dịch chiết bột nấm Linh chi đỏ tác dụng với thuốc Dragendorff nhận thấy chỉ có ống chứa dịch chiết tơ nấm đối chứng (DC1) có xuất hiện kết tủa màu cam - nâu dạng tủa bông, từ từ lắng xuống đáy ống nghiệm.

Ống NT1: dịch chiết quả thể với nước acid + thuốc thử Dragendorff

Ống NT2: dịch chiết tơ nấm với nước acid + thuốc thử Dragendorff

Ống DC1: dịch chiết tơ nấm đối chứng với nước acid + thuốc thử Dragendorff

Ống DC2: nước cất + thuốc thử Dragendorff



Hình 4.19. Định tính alkaloid với thuốc thử Dragendorff

Nhận xét: dịch chiết nấm Linh chi đỏ ở phần 1 đem thử nghiệm với 2 LOẠI thuốc thử Mayer VÀ Dragendorff thì nhận thấy kết quả là dương tính. Đối với dịch chiết ở phần 2 đem thử nghiệm thì kết quả là âm tính

Bột dược liệu trích với nước – acid: có thể trích hết các alkaloid ở dạng baz tự do (N sẽ biến thành NH^+ tan trong nước), alkaloid dạng thứ cấp N^+ , dạng N – oxid ($\text{N}^+ \rightarrow \text{O}$), dạng glycosid, alkaloid loại có tính phân cực mạnh, nhưng sẽ trích luôn những hợp chất có chứa nitơ (protein, glycoprotein, nucleotide)... là những hợp chất không phải là alkaloid nhưng có thể cho kết quả dương tính với thuốc thử. Do đó, nếu trong dịch chiết phần 1 không có alkaloid thì có thể sẽ cho kết quả dương tính giả.

Bột dược liệu trích với dung môi hữu cơ – kiềm sẽ không trích được những alkaloid dạng N–oxid, dạng N tứ cấp, dạng tan tốt trong nước. Phương pháp này trích tốt các alkaloid dạng baz tự do có tính phân cực kém và tính baz yếu, cũng như các alkaloid có cấu trúc đặc thù $-\text{C}=\text{C}-\text{N}-$.

Như vậy, có thể kết luận sơ bộ là trong nấm Linh chi đỏ không có chứa Alkaloid hoặc có nhưng ở hàm lượng rất thấp mà phản ứng định tính không thể quan sát được.

4.5.2. Định tính saponin

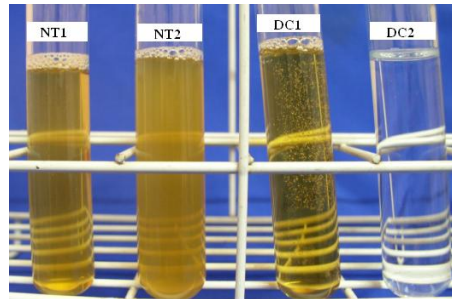
4.5.2.1. Thử nghiệm tính chất tạo bọt

Ống NT1: dịch chiết quả thể nấm sau khi lắc

Ống NT2: dịch chiết tơ nấm sau khi lắc

Ống DC1: dịch chiết tơ nấm đối chứng sau khi lắc

Ống DC2: nước cất sau khi lắc



Hình 4.20. thử nghiệm tính tạo bọt từ sinh khối nấm Linh chi đỏ

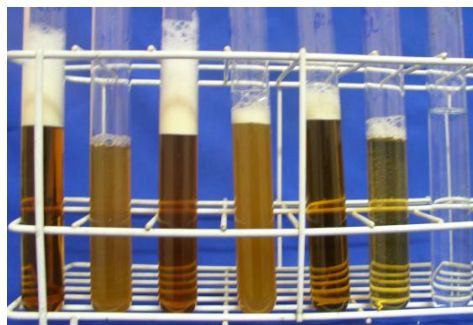
Kết quả ghi nhận như sau:

Độ bền của bọt	Kết quả
Sau 15 phút	+
Sau 30 phút	++
Sau 60 phút	+++

Như vậy dược liệu từ sinh khối và quả thể nấm Linh chi đỏ có chứa hoạt chất saponin

4.5.2.2. Thử nghiệm Fontan – Kaudel

1 2 3 4 5 6 7



Hình 4.21. Thử nghiệm saponin toàn phần theo Fontan – Kaudel

Ống 1: dịch chiết bột quả thể nấm sau khi cho baz vào

Ống 2 : dịch chiết bột quả thể nấm sau khi cho acid vào

Ống 3 : dịch chiết bột tơ nấm sau khi thêm baz vào

Ống 4: dịch chiết bột tơ nấm sau khi thêm acid vào

Ống 5: dịch chiết bột tơ nấm đối chứng sau khi thêm baz vào

Ống 6: dịch chiết bột tơ nấm đối chứng sau khi thêm acid vào

Ống 7: nước cất đối chứng

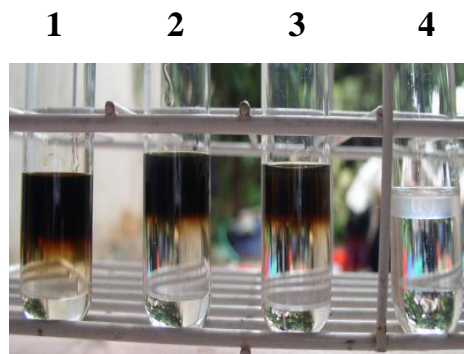
Kết quả ghi nhận:

- Bột trong cả 2 ống nghiệm bền hơn 15 phút

- Cột bột trong ống nghiệm chứa dịch chiết với baz cao hơn cột bột trong ống nghiệm chứa dịch chiết và acid. Như vậy, sơ bộ kết luận trong tơ nấm trong quả thể nấm Linh chi đỏ có saponin steroid.

4.5.3. Định tính triterpenoid

Khi cho acid H_2SO_4 đậm đặc vào từ từ thì ta nhận thấy xuất hiện vòng đỏ nâu nơi tiếp giáp giữa 2 lớp dung dịch, lớp dung dịch phía trên lớp ngăn cách dần chuyển sang nâu xanh dương đậm. Kết quả thí nghiệm nhận thấy sinh khối và quả thể nấm Linh chi đều có chứa hoạt chất triterpenoid.



Hình 4.22. Định tính triterpenoid bằng phản ứng Liebermann – Burchard

Ống 1: dịch chiết quả thể + acid đậm đặc

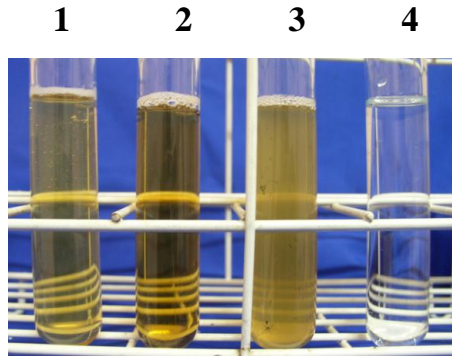
Ống 2: dịch chiết tơ nấm + acid đậm đặc

Ống 3: dịch chiết tơ nấm đối chứng + acid đậm đặc

Ống 4: đối chứng nước cất + acid

4.5.4. Định tính acid hữu cơ

Sau khi cho dịch chiết nước bột nấm Linh chi đỏ tác dụng với tinh thể Na_2CO_3 và hơi nóng thì nhận thấy có hiện tượng sủi bọt khí. Như vậy, dịch chiết nước từ quả thể nấm Linh chi đỏ có chứa thành phần acids hữu cơ.



Hình 4.23. Định tính acid hữu cơ có trong quả thể Linh chi đỏ

Ống 1: dịch chiết nước quả thể nấm + tinh thể Na_2CO_3

Ống 2: dịch chiết nước tơ nấm + tinh thể Na_2CO_3

Ống 3: dịch chiết nước tơ nấm đối chứng + tinh thể Na_2CO_3

Ống 4 (đối chứng) : nước cất + tinh thể Na_2CO_3

4.5.5. Định lượng polysaccharide thô từ quả thể nấm Linh chi đỏ

Tiến hành ly trích polysaccharides từ 20 gam nấm Linh chi đã sấy khô. Sau quá trình lọc và sấy khô thu nhận được 0.25 gam polysaccharide thô. Như vậy hàm lượng polysaccharide thô có trong quả thể nấm Linh chi đỏ chỉ đạt khoảng 1.25%.



Hình 4.24. Sản phẩm bột polysaccharide thô từ quả thể nấm Linh chi đỏ

4.5. So sánh thành phần dược chất có trong quả thể và trong tơ nấm Linh chi đỏ

Sau khi kiểm tra sinh hóa, chúng tôi nhận thấy rằng những dược chất có trong quả thể và tơ nấm là như nhau. Nghĩa là, so với quả thể thì tơ nấm cũng có tác dụng chữa bệnh như nhau. Tuy nhiên, chúng có thể chứa hàm lượng khác nhau, điều này cần xác định cụ thể bằng những phương pháp định lượng để cho ra kết luận chính xác hơn.

Bảng 4.6. So sánh các dược chất có trong quả thể và trong tơ nấm Linh chi đỏ

Dược chất	Phương pháp định tính	Kết quả	
		Quả thể	Tơ nấm
Alkaloid	- Thử nghiệm với 2 loại thuốc thử Mayer và Dragendorff.	-	-
Saponin	- Thử nghiệm tính tạo bọt - Thử nghiệm Fontan – Kaudel (xác định có saponin triterpenoid hay saponin steroid)	+ (Saponin triterpenoid)	+ (Saponin triterpenoid)
Triterpenoid	- Thử nghiệm bằng phản ứng Liebermann – Burchard	+	+
Acid hữu cơ	- Cho vài tinh thể Na_2CO_3 vào dịch chiết nấm, hơi nóng. Nếu có bọt khí sủi lên thì kết luận có acid hữu cơ	+	+

Phần 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết Luận

- Định danh sơ bộ giống Linh chi đỏ mọc tự nhiên ở trường Đại học Nông Lâm là giống *Ganoderma lucidum*
- Môi trường cấp một tốt nhất là môi trường PGA có bổ sung 10% dịch chiết cà rốt.
- Môi trường nhân giống cấp 2 thích hợp: Lúa 95% + 5% mật cưa + 5% cám gạo.
- Trên môi trường lỏng PGB hệ sợi nấm phát triển tốt.
- Môi trường sản xuất có hiệu suất cao: gồm 2 môi trường có hiệu suất tương đương.
 - 1) GT1: Mùn cưa gỗ tạp 65 % + Cám gạo 15 % + Cám bắp 10 % + Trấu 10% + vôi 1% + SA 5‰ + Lân 1% + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 ‰
Hiệu suất sinh học đạt được : 16,68 %
 - 2) GT2: Mùn cưa 75 % + Trấu 25 % + SA 2 ‰ + Vôi 1%.
Hiệu suất sinh học đạt được: 16,37 %
- Các thành phần dược chất có trong sinh khối hệ sợi và quả thể Linh chi đỏ mọc tự nhiên ở trường Đại học Nông Lâm so với nấm Linh chi đỏ (*Ganoderma lucidum*) của trường Khoa Học Tự Nhiên là giống nhau, bao gồm: alkaloid, saponine, saponin triterpenoid, triterpenoid và acid béo.
- Trong quả thể nấm Linh chi đỏ có chứa hàm lượng polysaccharide thô khoảng 1,25%.

5.2. Đề nghị

- Nhằm hoàn thiện quy trình trồng và có thể ứng dụng trong ngành dược chúng ta cần khảo sát sâu hơn về kỹ thuật nuôi trồng, về thành phần hóa học và tác dụng dược lý, lâm sàng của loại nấm này.
- Dùng phương pháp sắc ký lỏng để định lượng hàm lượng dược chất có trong quả thể và tơ nấm, từ đó có thể suy ra tác dụng chữa trị tốt nhất cho từng loại bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Hữu Đông, Đinh Xuân Linh, Nguyễn Thi Sơn, Zani Federico, 2000. *Nấm ăn – cơ sở khoa học và công nghệ nuôi trồng*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
2. Nguyễn Lâm Dũng, 2002. *Công nghệ nuôi trồng nấm – Tập 1, 2*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
3. Lê Xuân Thám, 1996. *Nấm Linh chi – dược liệu quý ở Việt Nam*. Nhà xuất bản mũi Cà Mau.
4. Lê Xuân Thám, 1996. *Nghiên cứu đặc điểm sinh học và đặc điểm hấp thu khoáng nấm Linh chi Ganoderma lucidum (Leyss.ex Fr) Karst. bằng phân tích hạt nhân, đánh dấu đồng vị và kỹ thuật liên hợp*. Luận án phó tiến sĩ khoa học sinh học, Đại học Khoa Học Tự Nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Việt Nam.
5. Đỗ Tất Lợi, Lê Duy Thắng, Trần Văn Luyến, 2001. *Nấm Linh chi – Nuôi trồng và sử dụng*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
6. Nguyên tác: Trần Quốc Lương, Trần Huệ, Trần Hiếu Thanh, 1998 - Biên dịch: Công Diễm. *Linh chi phòng và trị bệnh*. Nhà xuất bản mũi Cà Mau.
7. Trần Văn Mão, 2004. *Sử dụng vi sinh vật có ích – Tập 1: Nuôi trồng chế biến nấm ăn và nấm làm thuốc chữa bệnh*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
8. Lê Duy Thắng, 1999. *Kỹ thuật trồng nấm – Tập 1: Nuôi trồng một số nấm ăn thông dụng ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, TP.HCM.
9. Lê Duy Thắng, Trần Văn Minh, 2001. *Sổ tay hướng dẫn trồng nấm*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
10. Nguyễn Minh Khang, 2005. Đề tài “Trồng nấm Linh chi đen”. Khóa luận tốt nghiệp khoa Công Nghệ Sinh Học, trường Đại học Nông Lâm, Tp. HCM.
11. Phạm Thị Trân Châu – Nguyễn Thị Hiền – Phùng Gia Tường, 2000. *Thực hành sinh hóa học*. Nhà xuất bản Giáo dục.
12. Tô Minh Châu, Vương Thị Việt Hoa, Vũ Thị Lâm An, Lâm Thanh Hiền, Nguyễn Thị Ngọc Diệp, Nguyễn Thúy Hương, 1999. *Vi sinh vật học đại cương*. Đại học Quốc gia TP.HCM – Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM

13. Trần Thanh Thu Thủy, 2004. Đề tài “*Tận dụng bã thải mụn dừa để làm nguyên liệu trồng nấm mèo (Auricularia polytricha)*”. Khóa luận cử nhân sinh học, khoa sinh học, trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, Tp. HCM.
14. Huỳnh Thị Lệ Duyên, 1999. Đề tài: “*Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của cao Linh chi Ganoderma lucidum trên chủng Staphylococcus aureus – Vibrio cholerae và trong mô hình bệnh lý ở Mus Musculus Var. Albino*”. Tiểu luận tốt nghiệp, khoa sinh học, trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, Tp. HCM.
15. Trần Hùng, 2004. *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*. Đại học Y Dược TP.HCM.
16. Báo Nông nghiệp (ngày 27/04/2004) – *Công nghệ nuôi trồng nấm Linh chi (Ganoderma lucidum)*, (Theo Cơ sở Khoa học & Công nghệ nuôi trồng - NXB Hà Nội 2002)
17. DS. Trần Xuân Thuyết. Tạp chí Sức khỏe và đời sống (số 224, 225). Bài viết: *Thực hư về nấm Linh chi*. (www.vietlinh.com.vn nong nghiep & nong thon - agriculture & rural rau an toan, rau sach - safe vegestable)

Tài liệu tiếng Anh

18. Shwu-Bin Lin, Chyi-Hann Li, Shih-Sheng Lee, Lou-Sing Kan, 2003. *Triterpene-enriched extracts from ganoderma lucidum inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase c, activating mitogen-activated protein kinases and g2-phase cell cycle arrest*. Life Sciences 72 (2003) 2381 – 2390.
19. Kosmas Haralampidis, Miranda Trojanowska and Anne E. Osbourn, 2001. *Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants*. Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK, e-mail: annie.osbourn@bbsrc.ac.uk

Tài liệu từ Internet

20. [http://www. Ganoderma Lucidum \(Reishi\).htm](http://www.GanodermaLucidum(Reishi).htm)
21. [http://www. Reishi Mushroom by Ray Sahelian, M D , Benefits, Dosage, Side effects.htm](http://www.ReishiMushroombyRaySahelian,MD,Benefits,Dosage,Sideeffects.htm)
22. [http://www.About Lingzhi.htm](http://www.AboutLingzhi.htm)
23. [http://www .activeCompoundsReishi.html](http://www.activeCompoundsReishi.html)

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: ĐƯỜNG KÍNH TỜ NĂM NGÀY 3

One-Way Analysis of Variance

Data: DIA1.dkinh

Level codes: DIA1.mtr

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	6.9786267	4	1.7446567	20.660	.0001
Within groups	.8444667	10	.0844467		
Total (corrected)	7.8230933	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for DIA1.dkinh by DIA1.mtr

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	3	3.4333333	.0520683	.1677763	3.1689259	3.6977408
2	3	4.4633333	.1166667	.1677763	4.1989259	4.7277408
3	3	3.6100000	.2400694	.1677763	3.3455925	3.8744075
4	3	3.2533333	.2034153	.1677763	2.9889259	3.5177408
5	3	2.3366667	.1594086	.1677763	2.0722592	2.6010741
Total	15	3.4193333	.0750318	.0750318	3.3010867	3.5375799

Multiple range analysis for DIA1.dkinh by DIA1.mtr

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
5	3	2.3366667	X
4	3	3.2533333	X
1	3	3.4333333	X
3	3	3.6100000	X
2	3	4.4633333	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	-1.03000		0.52881 *
1 - 3	-0.17667		0.52881
1 - 4	0.18000		0.52881
1 - 5	1.09667		0.52881 *
2 - 3	0.85333		0.52881 *
2 - 4	1.21000		0.52881 *
2 - 5	2.12667		0.52881 *
3 - 4	0.35667		0.52881

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục 2: ĐƯỜNG KÍNH TỜ NĂM NGÀY 4

One-Way Analysis of Variance

Data: DIA2.dkinh

Level codes: DIA2.mtruong

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	13.440440	4	3.3601100	6.391	.0081
Within groups	5.257533	10	.5257533		
Total (corrected)	18.697973	14			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for DIA2.dkinh by DIA2.mtruong

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	3	6.1266667	.2210078	.4186300	5.4669257	6.7864076
2	3	7.1100000	.1417745	.4186300	6.4502590	7.7697410
3	3	5.5200000	.8029944	.4186300	4.8602590	6.1797410
4	3	5.6766667	.2186575	.4186300	5.0169257	6.3364076
5	3	4.1900000	.3386739	.4186300	3.5302590	4.8497410
Total	15	5.7246667	.1872170	.1872170	5.4296215	6.0197118

Multiple range analysis for DIA2.dkinh by DIA2.mtruong

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
5	3	4.1900000	X
3	3	5.5200000	X
4	3	5.6766667	X
1	3	6.1266667	XX
2	3	7.1100000	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	-0.98333		1.31948
1 - 3	0.60667		1.31948
1 - 4	0.45000		1.31948
1 - 5	1.93667		1.31948 *
2 - 3	1.59000		1.31948 *
2 - 4	1.43333		1.31948 *
2 - 5	2.92000		1.31948 *
3 - 4	-0.15667		1.31948

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục 3: ĐỘ LAN SÂU CỦA TỔ NĂM NGÀY 6

One-Way Analysis of Variance

Data: ONGN6.csau

Level codes: ONGN6.mtr

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	5.6707667	3	1.8902556	4.927	.0317
Within groups	3.0693333	8	.3836667		
Total (corrected)	8.7401000	11			

22 missing value(s) have been excluded.

Table of means for ONGN6.csau by ONGN6.mtr

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	3	6.3400000	.2916048	.3576156	5.7567120	6.9232880
2	3	5.5133333	.1826046	.3576156	4.9300454	6.0966213
3	3	4.7200000	.1900000	.3576156	4.1367120	5.3032880
4	3	4.6466667	.5975599	.3576156	4.0633787	5.229954
Total	12	5.3050000	.1788078	.1788078	5.0133560	5.5966440

Multiple range analysis for ONGN6.csau by ONGN6.mtr

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
4	3	4.6466667	X
3	3	4.7200000	X
2	3	5.5133333	XX
1	3	6.3400000	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	0.82667		1.16658
1 - 3	1.62000		1.16658 *
1 - 4	1.69333		1.16658 *
2 - 3	0.79333		1.16658
2 - 4	0.86667		1.16658
3 - 4	0.07333		1.16658

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục 4: ĐỘ LAN SÂU CỦA TỜ NĂM NGÀY 9

One-Way Analysis of Variance

Data: ONGN9.csau

Level codes: ONGN9.mtr

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	12.024625	3	4.0082083	15.441	.0011
Within groups	2.076667	8	.2595833		
Total (corrected)	14.101292	11			

20 missing value(s) have been excluded.

Table of means for ONGN9.csau by ONGN9.mtr

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	3	9.9600000	.2900000	.2941560	9.4802175	10.439782
2	3	8.7366667	.1386042	.2941560	8.2568842	9.216449
3	3	7.8800000	.1513275	.2941560	7.4002175	8.359782
4	3	7.3000000	.4689350	.2941560	6.8202175	7.779782
Total	12	8.4691667	.1470780	.1470780	8.2292754	8.709058

Multiple range analysis for ONGN9.csau by ONGN9.mtr

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
4	3	7.3000000	X
3	3	7.8800000	XX
2	3	8.7366667	X
1	3	9.9600000	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	1.22333		0.95956 *
1 - 3	2.08000		0.95956 *
1 - 4	2.66000		0.95956 *
2 - 3	0.85667		0.95956
2 - 4	1.43667		0.95956 *
3 - 4	0.58000		0.95956

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục 5: ĐỘ LAN SÂU CỦA TỔ NĂM NGÀY 12

One-Way Analysis of Variance

Data: ONGN12.csau

Level codes: ONGN12.mtr

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	17.020367	3	5.6734556	15.280	.0011
Within groups	2.970400	8	.3713000		
Total (corrected)	19.990767	11			

20 missing value(s) have been excluded.

Table of means for ONGN12.csau by ONGN12.mtr

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	3	13.966667	.0825295	.3518049	13.392856	14.540477
2	3	12.673333	.0437163	.3518049	12.099523	13.247144
3	3	11.200000	.0529150	.3518049	10.626190	11.773810
4	3	11.046667	.6953736	.3518049	10.472856	11.620477
Total	12	12.221667	.1759024	.1759024	11.934761	12.508572

Multiple range analysis for ONGN12.csau by ONGN12.mtr

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
4	3	11.046667	X
3	3	11.200000	X
2	3	12.673333	X
1	3	13.966667	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	1.29333		1.14762 *
1 - 3	2.76667		1.14762 *
1 - 4	2.92000		1.14762 *
2 - 3	1.47333		1.14762 *
2 - 4	1.62667		1.14762 *
3 - 4	0.15333		1.14762

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục 6: TRỌNG LƯỢNG TỖ NẤM NUÔI TRONG MÔI TRƯỜNG LỎNG

One-Way Analysis of Variance

 Data: LONG1.kluong
 Level codes: LONG1.ngaythu
 Labels:
 Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	.2658516	2	.1329258	10.781	.0103
Within groups	.0739787	6	.0123298		
Total (corrected)	.3398302	8			

 0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for LONG1.kluong by LONG1.ngaythu

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
10	3	.5293333	.1005938	.0641087	.4183770	.6402896
15	3	.7540000	.0094516	.0641087	.6430437	.8649563
20	3	.9500000	.0460579	.0641087	.8390437	1.0609563
Total	9	.7444444	.0370132	.0370132	.6803838	.8085051

Multiple range analysis for LONG1.kluong by LONG1.ngaythu

 Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
10	3	.5293333	X
15	3	.7540000	X
20	3	.9500000	X

contrast	difference	+/-	limits
10 - 15	-0.22467		0.22191 *
10 - 20	-0.42067		0.22191 *
15 - 20	-0.19600		0.22191

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục 7: TRỌNG LƯỢNG NĂM LINH CHI TUỔI ĐỘT 1

One-Way Analysis of Variance

Data: NAMTUOI1.KLUONG

Level codes: NAMTUOI1.GIAHTE

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	1884.1541	3	628.05136	152.782	.0000
Within groups	32.8862	8	4.11077		
Total (corrected)	1917.0403	11			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for NAMTUOI1.KLUONG by NAMTUOI1.GIAHTE

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	3	39.000000	1.3095037	1.1705803	37.090728	40.909272
2	3	40.153333	.4285765	1.1705803	38.244061	42.062605
3	3	23.373333	1.8483897	1.1705803	21.464061	25.282605
4	3	9.616667	.4074446	1.1705803	7.707395	11.525939
Total	12	28.035833	.5852902	.5852902	27.081197	28.990469

Multiple range analysis for NAMTUOI1.KLUONG by NAMTUOI1.GIAHTE

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
4	3	9.616667	X
3	3	23.373333	X
1	3	39.000000	X
2	3	40.153333	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	-1.15333		3.81854
1 - 3	15.6267		3.81854 *
1 - 4	29.3833		3.81854 *
2 - 3	16.7800		3.81854 *
2 - 4	30.5367		3.81854 *
3 - 4	13.7567		3.81854 *

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục 8: TRỌNG LƯỢNG NĂM LINH CHI TƯỚI ĐỢT 2

One-Way Analysis of Variance

Data: TUOI2.KLUONG

Level codes: TUOI2.GTH

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
Between groups	315.54056	3	105.18019	40.242	.0000
Within groups	20.90953	8	2.61369		
Total (corrected)	336.45009	11			

0 missing value(s) have been excluded.

Table of means for TUOI2.KLUONG by TUOI2.GTH

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	3	17.700000	1.1111406	.9333973	16.177585	19.222415
2	3	15.516667	1.4664053	.9333973	13.994251	17.039082
3	3	13.526667	.3155066	.9333973	12.004251	15.049082
4	3	4.240000	.0200000	.9333973	2.717585	5.762415
Total	12	12.745833	.4666987	.4666987	11.984626	13.507041

Multiple range analysis for TUOI2.KLUONG by TUOI2.GTH

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
4	3	4.240000	X
3	3	13.526667	X
2	3	15.516667	XX
1	3	17.700000	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	2.18333		3.04483
1 - 3	4.17333		3.04483 *
1 - 4	13.4600		3.04483 *
2 - 3	1.99000		3.04483
2 - 4	11.2767		3.04483 *
3 - 4	9.28667		3.04483 *

* denotes a statistically significant difference.