

ĐỊNH DANH CHỦNG NẤM HƯƠNG THU NHẬN TẠI VƯỜN QUỐC GIA BẠCH MÃ BẰNG SINH HỌC PHÂN TỬ VÀ KHẢO SÁT MÔI TRƯỜNG NHÂN GIỐNG NHẪM BẢO TỒN NGUỒN GEN

Lê Thị Như Ngọc¹, Nguyễn Vũ Linh¹, Trần Thiện Ân¹, Võ Đình Ba², Nguyễn Việt Thắng², Nguyễn Minh Trí^{2*}

¹Vườn Quốc gia Bạch Mã

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Mẫu nấm Hương (Ký hiệu BM01) được thu hái tại vùng rừng núi của Vườn Quốc gia Bạch Mã, huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên Huế vào tháng 01/2024 khi đang phát triển trên các thân cây mục. Các đặc điểm hình thái bên ngoài của quả thể như: màu nâu sậm khi tiếp xúc với nước, chuyển sang nâu nhạt khi khô, đường kính mũ nấm trung bình từ 2,5-6,5 cm, mặt trên của mũ nấm có các vảy sợi thô màu trắng, lõi nhẹ khi còn non, phẳng dần khi trưởng thành, mép mũ mỏng dễ rách. Bào tử có màu vàng nhạt, kích thước: 3-5 μm , có hình dạng từ bầu dục đến hình elip, vách mỏng nhẵn, với một vài hạt nhỏ bên trong. Các dẫn liệu phân tích đoạn gen ITS của mẫu nấm Hương trên cho thấy đây là loài *Lentinula edodes*. Giống thuần của chủng nấm này đã được phân lập từ mô thịt quả thể, phát triển tốt trên môi trường nhân giống cấp 1 là PGA (Potato Glucose Agar) và môi trường cấp 2 là thóc nấu chín có bổ sung 1% CaCO_3 .

Từ khóa: Bạch Mã, nấm Hương, giải trình tự, ITS (Internal transcribed spacer), *Lentinula edodes*, nhân giống.

MỞ ĐẦU

Nấm Hương có thành phần dinh dưỡng cao và hương vị đặc biệt nên được xem là một loại nấm thực phẩm cao cấp (Hui *et al.*, 2004). Ngoài ra, nấm Hương còn có những giá trị về mặt y dược như: hoạt tính kháng sinh, hoạt tính chống ung thư, chống virus, tăng cường miễn dịch, khả năng loại trừ cholesterol... Do đó, tại các nước như Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc... nấm Hương đã được nuôi trồng trên quy mô lớn và cho hiệu quả kinh tế cao (Nguyễn Lân Dũng, 2005).

Hiện nay, công nghệ sản xuất nấm Hương ở các nước như Việt Nam, Nhật Bản, Hàn Quốc... đang phụ thuộc nhiều vào điều kiện tự nhiên (Chan, 2005). Vì thế, việc tìm kiếm, sưu tập các nguồn gene bản địa và kiểm định danh pháp của chúng ở mức độ phân tử là rất quan trọng, đặt nền tảng cho công tác tạo giống và xây dựng công nghệ nuôi trồng nấm Hương.

Vào tháng 01/2024, chúng tôi đã phát hiện và thu hái một số quả thể nấm phát triển trên các thân cây lá rộng đang mục tại khu vực rừng của Vườn Quốc gia Bạch Mã, huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên Huế. Dựa vào các đặc điểm hình thái bên ngoài cho thấy đây là mẫu nấm thuộc một loài trong chi *Lentinula* (Earle), chúng tôi nhận định sơ bộ đây là một chủng nấm hoang dại quý, cần phải định danh và nhân giống để tạo ra chủng nấm để nuôi trồng phù hợp với điều kiện tự nhiên của địa phương.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Mẫu nấm ký hiệu BM01 được thu hái vào tháng 1/2024 trên thân cây gỗ lớn đang mục tại khu vực Vườn Quốc gia Bạch Mã ở vị trí độ cao 1370 m so với mặt nước biển có tọa độ X: 00592127; Y: 01791358 (Tọa độ GPS: VN 2000, KT 107, múi 3°).

Môi trường phân lập: PGA (Potato Glucose Agar): 200 g khoai tây; 20 g glucose; 20 g agar; nước cất đủ 1000 mL.

Môi trường nhân giống cấp 1:

- PGA: 200 g khoai tây; 20 g glucose; 20 g agar; nước cất đủ 1000 mL.

- PGA - nước dừa: 200 g khoai tây; 20 g glucose; 20 g agar; nước dừa đủ 1000 mL.

- Raper: 2 g pepton; 2 g dịch chiết nấm men; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,46 g KH_2PO_4 ; 1 g K_2HPO_4 , 20 g glucose, 20 g agar; nước cất đủ 1000 mL.

Môi trường nhân giống cấp 2: thóc (lúa) là nguyên liệu chính để nhân giống nấm cấp 2; sau khi rửa nhiều lần bằng nước sạch, thóc được nấu chín cho đến khi tách vỏ và để ráo nước, phối trộn theo các công thức sau:

- Công thức 1 (CT1): 99% thóc lứt + 1% CaCO₃
- Công thức 2 (CT2): 69% thóc lứt + 30% mùn cưa + 1% CaCO₃
- Công thức 3 (CT3): 39% thóc lứt + 60% mùn cưa + 1% CaCO₃

Phân phối các công thức môi trường nhân giống cấp 2 vào các chai thủy tinh và khử trùng ở 121°C trong thời gian 30 phút.

Phương pháp

Phân lập và thuần khiết mẫu

Mẫu được đưa về phòng thí nghiệm và khử trùng bằng cồn 70° để phân lập bằng phương pháp cấy mô. Trong điều kiện vô trùng, mẫu nấm được cắt dọc từ cuống đến phần mũ và tách một mảnh mô có kích thước 0,5x0,5x0,1cm tại vị trí giữa mũ và cuống nấm rồi cho vào các đĩa petri có chứa môi trường PGA đã được khử trùng để tạo nguồn giống thuần dùng cho tách chiết DNA và các nghiên cứu về đặc điểm sinh trưởng của loài nấm này (Nguyễn Lân Dũng, 2005).

Phương pháp định danh khoa học

Phương pháp so sánh hình thái: Mẫu quả thể nấm thu từ tự nhiên được phân tích các đặc điểm hình thái theo phương pháp của Trịnh Tam Kiệt (2012). Cấu trúc hiển vi của sợi nấm, bào tử... được quan sát và chụp hình dưới kính hiển vi quang học Olympus BX51.

Phương pháp sinh học phân tử: Hệ sợi nấm được sử dụng cho tách chiết DNA theo phương pháp của Gardes và Bruns (1993): 50mg sợi nấm được nghiền trong 5 phút, thêm 500µl dung dịch trích ly, vortex và để ở nhiệt độ phòng 10 phút, sau đó ly tâm rồi thu lấy dung dịch phía trên. DNA được rửa bằng cồn 96° và rửa 2 lần bằng cồn 70°. DNA sau đó được sấy chân không 10 phút ở 45°C rồi hòa tan trong 100 µL TE 0.1X. Cuối cùng DNA được kiểm tra chất lượng thông qua quá trình đo quang phổ và điện di trên gel agarose 0,8%. Những sản phẩm đạt yêu cầu được bảo quản ở -20°C cho những bước tiếp theo.

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi ITS1 và ITS4 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCC GCTTATTG ATATGC-3') theo phương pháp của White và đồng tác giả (1990). Sản phẩm PCR sẽ được phân tích trên gel agarose và sau đó giải trình tự. Trình tự này sau đó sẽ được dùng để dò tìm trình tự tương đồng trên ngân hàng dữ liệu gene bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment search tool) (Altschul *et al.*, 1990).

Các trình tự được sắp giống bằng phần mềm ClustalW. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa mẫu nghiên cứu và các loài thuộc chi *Lentinula* hiện có trên dữ liệu GenBank được xây dựng bằng phần mềm MEGA 11 theo phương pháp Maximum Parsimony với hệ số tin tưởng (bootstrap) 100%.

Các phân tích được thực hiện trong ba lần lặp lại, kết quả là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Tất cả các số liệu được xử lý bằng chương trình MS. Excel 2016 (Đặng Văn Giáp, 2000)

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm hình thái

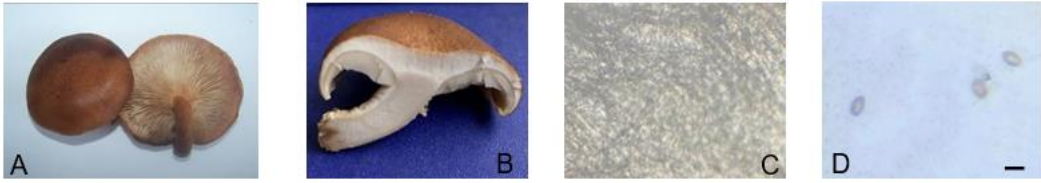
Mẫu nấm Hương phân bố tại Vườn Quốc gia Bạch Mã mọc riêng lẻ trên các thân gỗ mục của nhóm cây lá rộng ở khu vực có độ cao 1300-1400 m so với mặt nước biển, nhiệt độ: 23°C và độ ẩm 86%.

Quả thể có dạng hình cái dù bao gồm mũ nấm và cuống nấm (Hình 1). Mũ nấm có dạng tròn, khum, màu nâu sậm khi tiếp xúc với nước, chuyển sang nâu nhạt khi khô, đường kính: 2,5-6,5cm, mặt trên của mũ nấm có các vảy sợi thô màu trắng, lồi nhẹ khi còn non, phẳng dần khi trưởng thành, mép mũ mỏng dễ rách (Hình 2A). Phần thịt mũ nấm mỏng: 0,3-0,5cm, dai, cấu tạo bởi các lớp sợi kết hợp khá lỏng lẻo, thường phân nhánh và có khóa ở hầu hết các vách ngăn (Hình 2C), quả thể sau khi sấy khô có mùi thơm đặc trưng.

Bào tăng dạng phiến, dính rời, màu trắng, nằm ở mặt dưới của mũ nấm (Hình 2B). Cuống nấm có dạng hình trụ, đặc chắc, màu trắng ở phần trên gần mũ nấm, màu nâu ở phía dưới gần giá thể; dài: 3-5cm; đường kính: 0,5-1,5cm; cuống nấm dính vào mũ nấm ở giữa hoặc hơi lệch tâm; bề mặt cuống nấm có vảy thô, chất thịt màu trắng, mềm (Hình 2A, B).



Hình 1. Mẫu nấm Hương tại Vườn Quốc gia Bạch Mã



Hình 2. Giải phẫu quả thể nấm Hương Bạch Mã

A: Quả thể (mặt trên và mặt dưới); B: Bào tầng dạng phiến; C: Hệ sợi trong thịt mũ nấm; D: Bào tử đằm.

Bào tử có màu màu vàng nhạt, kích thước: 3-5µm, có hình dạng từ bầu dục đến hình elip, trong suốt không chứa tinh bột, vách mỏng nhẵn, với một vài hạt nhỏ bên trong (hình 2D).

Về hình thái và cấu tạo giải phẫu của mẫu nấm Hương thu tại Bạch Mã có các đặc điểm tương đồng với mẫu nấm Hương *Lentinula edodes* thu nhận Sa Pa của Lê Xuân Thám và đồng tác giả (2010) và của Lê Huyền Ái Thủy và đồng tác giả (2012).

Dựa vào hình dạng của bào tử quan sát được và các đặc điểm hình thái bên ngoài của nấm so với những mô tả của Trình Tam Kiệt (2012) cho thấy đây là mẫu nấm thuộc một loài trong chi *Lentinula* (Earle). Tuy nhiên cần định danh chính xác, chúng tôi tiến hành giải trình tự gen bằng phương pháp PCR để định danh khoa học.

Kết quả phân tích vùng gene ITS

Các ứng dụng sinh học phân tử để xác định nguồn gốc phát sinh của các loài nấm đã được tiến hành từ những năm 1990. Kết quả xác định trình tự vùng gene ITS sau khi loại bỏ trình tự mỗi và các vùng tín hiệu nhiễu, chúng tôi đã thu được trình tự nucleotide như sau:

```
GGGTGAANFTTGGNGGGGGTGTGTGCTGGCCTTTGGGTATGTGCACATCCTCCTCCGATTTCTATTCATCCACCTGTGCACFTTTTGTAGGAGT
TCTTTCATCGGGTFTTTGAAGGGTGTCTATTATGAGTTACTTGAAGAAGACTAGTTGACAAGGCCTTCTATGTTCTTATAAACCATTGAAGTATGT
TATAGAATGATCTGTATTATTGGGACTTTATTGACCCTTTAAACTTAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCCCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTCTGGTATTCGGAGGGGCAT
GCCTGTTTGGAGTGCATTAAATTTCTCAACTTTATAAGTFTTTACTTATCAAAGCTTGGATGTTGGAGGCTTGCAGGCGTTTGTGAGCTCCTCTT
AAATTGATTAGTGGGAACCCTGTTTGTAGTTCTAACCTTGGTGTGATAATATCTACATTTTGGTGGAACTTACAATAATAAAGCTCTATT
GGTTGGGTGTTGCATTTAGTTTGTCTCAATCTGTTCTATTTCATTGGAGCACAAAGGGAAGTCCCGCTTTCTAACTGTCTTGATTGACTATATAT
AACTTATTTGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA
```

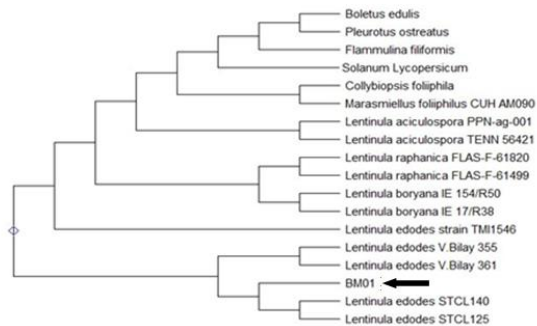
Hình 3. Kết quả giải trình tự vùng gen ITS

Bảng 1. Mức độ tương đồng của trình tự loài nấm thu thập với loài *Lentinula edodes* trên cơ sở dữ liệu NCBI

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<i>Lentinula edodes</i> strain HA-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	1312	1312	98%	0.0	99.45%	MK940842.1
<i>Lentinula edodes</i> voucher 520521MF228-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	1312	1312	98%	0.0	99.45%	MZ172422.1

Kết quả giải trình tự vùng gen ITS được so sánh với cơ sở dữ liệu trên Ngân hàng gen NCBI. Đoạn gen rRNA 729 bps vùng ITS của nấm có tỷ lệ tương đồng là 99,45% so với loài *Lentinula edodes* trên cơ sở dữ liệu NCBI (Accession number: MK940842.1).

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự ITS của chủng nghiên cứu và các chủng có quan hệ họ hàng gần thuộc loài *Lentinula edodes* (Berk) Pegler được thể hiện qua hình 4.



Hình 4. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền của loài *Lentinula edodes* (BM01)

(Ghi chú: Chủng nghiên cứu được đánh dấu bằng mũi tên)

Theo kết quả phân tích phả hệ dựa theo trình tự ITS1 của Lê Huyền Ái Thúy và đồng tác giả (2012) về mẫu nấm Hương thu tại Sa Pa thì chủng nấm Hương tại Bạch Mã mà chúng tôi phân tích vùng ITS1 có độ tương đồng với nhau và cùng tương đồng với loài *Lentinula edodes* STCL 125 với giá trị bootstrap lặp lại 1000 lần. Từ so sánh kết quả mô tả hình thái theo Trịnh Tam Kiệt (2012) và kết hợp phân tích rRNA vùng ITS, chúng tôi nhận thấy mẫu nấm Hương thu được ở Vườn Quốc gia Bạch Mã là loài *Lentinula edodes* (Berk) Pegler.

Khảo sát môi trường nhân giống

Kết quả phân lập trên môi trường PGA cho thấy sợi nấm sinh trưởng khá mạnh, hệ sợi đồng đều, phát triển dày đặc. Khi nuôi sợi nấm trên ba loại môi trường được khảo sát để nhân giống cấp 1 gồm PGA, PGA - nước dừa và Raper cho thấy giữa hai môi trường PGA và PGA - nước dừa không có sự khác biệt về mật thống kê về quá trình phát triển của sợi nấm (bảng 2). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Phạm Nữ Kim Hoàng và đồng tác giả (2014) về khi tăng lượng peptone trong môi trường nuôi đã làm giảm tốc độ phát triển của sợi nấm Hương hoang dã Len 003 được thu tại rừng cây lá rộng núi Langbiang, Lâm Đồng.

Bảng 2. Kết quả khảo sát môi trường nhân giống cấp 1

STT	Công thức thí nghiệm	Độ lan sợi nấm sau 3 ngày (mm)	Độ lan sợi nấm sau 5 ngày (mm)
1	PGA	4,1 ^a	6,2 ^a
2	PGA - nước dừa	3,8 ^a	5,9 ^a
3	Raper	2,5 ^c	3,9 ^c



Hình 5. Sợi nấm phát triển trên các loại môi trường dinh dưỡng sau 5 ngày

Kết quả khảo sát này cho thấy khi cấy chuyển nấm Hương thì môi trường PGA là phù hợp nhất vì môi trường này có đầy đủ chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của sợi nấm. Đồng thời cũng dễ dàng chuẩn bị môi trường nuôi cấy, chi phí thấp hơn so với môi trường PGA có bổ sung nước dừa và Raper. Vì vậy chúng tôi sử dụng môi trường PGA để nhân giống nấm Hương cấp 1.

Trong công nghệ nuôi trồng nấm, giống cấp 2 được sử dụng để nhân nhanh số lượng giống cũng như giúp cho giống thích nghi dần với môi trường nuôi trồng (Đình Xuân Linh và đồng tác giả, 2012). Hiện nay tại các cơ sở nghiên cứu và sản xuất giống nấm ở nước ta đang sử dụng các hạt ngũ cốc như thóc, lúa mì, gạo lức, ngô... có bổ sung CaCO₃ 1% để nhân giống cấp 2.

Tiến hành đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi nấm trên các môi trường cấp 2 được phối trộn, kết quả nghiên cứu ở bảng 3 cho thấy: Thời gian sợi nấm mọc lan đều 100% trong chai nuôi ở CT1 là 5,8 ngày; cao hơn so với các công thức sử dụng thóc có bổ sung mùn cưa với các tỷ lệ khác nhau, theo chúng tôi trong thóc nấu chín có chứa các thành phần dinh dưỡng thích hợp cho sợi nấm Hương sử dụng để phát triển.

Bảng 3. Kết quả khảo sát môi trường nhân giống cấp 2

STT	Thành phần	Số ngày sợi nấm mọc lan 50%	Số ngày sợi nấm mọc lan 100%	Đặc điểm hệ sợi nấm
CT1	99% thóc luộc + 1% CaCO ₃	3,6 ^a	5,8 ^a	Hệ sợi nấm dày, trắng, dạng bông xốp, đồng đều, mọc nhanh
CT2	69% thóc luộc + 30% mùn cưa + 1% CaCO ₃	4,3 ^b	6,4 ^b	Hệ sợi nấm nhiều, màu trắng, dạng bông xốp, mọc bình thường
CT3	39% thóc luộc + 60% mùn cưa + 1% CaCO ₃	2,6 ^c	3,5 ^c	Hệ sợi nấm ít, màu trắng ngà, dạng bông xốp, mọc chậm

KẾT LUẬN

Với các đặc điểm hình thái, giải phẫu và phân tích sinh học phân tử cho thấy mẫu nấm thu tại Vườn quốc gia Bạch Mã chính là chủng nấm Hương (*Lentinula edodes*), thuộc chi *Lentinula* (Earle), họ Marasmiaceae, bộ Agaricales. Môi trường nhân giống cấp 1 tốt nhất là PGA (Potato Glucose Agar) cho hệ sợi nấm sinh trưởng và phát triển mạnh. Môi trường thóc luộc có bổ sung 1% CaCO₃ là môi trường nhân giống cấp 2 tối ưu từ 5-6 ngày cho hệ sợi nấm mọc nhanh, dày và đồng đều.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hui FL, Wei MH, & Liu ZH (2004). Assay study on amino acid, trace elements and toxic heavy metals of the fruit bodies of *Lentinus edodes*. *Shipin Kexue* (Beijing, China), 25, 161-163.
- Nguyễn Lâm Dũng (2005). *Công nghệ nuôi trồng nấm*. NXB Nông Nghiệp Hà Nội.
- Chan AW (2005). *Shiitake bag cultivation*. In *Mushroom growers handbook 2*. Seoul, Korea: MushWorld.
- Trịnh Tam Kiệt (2012). *Nấm lớn Việt Nam*. Tập 1. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Gardes M and TD Bruns (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2: 113-118.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, and Taylor JW (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics*. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. US. 482pp.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410
- Đặng Văn Giáp (2000). *Phân tích dữ liệu khoa học bằng Microsoft Excel*. Hà Nội: NXB Giáo dục Hà Nội.
- Lê Xuân Thám, Nguyễn Như Chương, Phạm Ngọc Dương, Bùi Hoàng Thiêm (2011). The biogeographical speciations of shiitake *Lentinula edodes* and a new species *Lentinula platinedodes* sp.nov. found in Cat Tien, South Vietnam. *Acad J Biol* 33 (3):29-39.
- Lê Huyền Ái Thủy, Lao Đức Thuận, Nguyễn Hoàng Mai, Phan Hoàng Đại, Nguyễn Trương Kiến Khương, Trương Bình Nguyên (2021). Bổ sung dẫn liệu phân tử và khảo sát đặc điểm nuôi trồng của chủng nấm Hương Sapa *Lentinula edodes*. *HCMCOUJS-Kỹ thuật và Công nghệ*, 16(1), 102-111
- Phạm Nữ Kim Hoàng, Trương Bình Nguyên, Lê Xuân Thám, Phan Hữu Hùng, Hoàng Ngọc Ánh, Đỗ Thị Thiên Lý (2014). Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng nấm Hương lai từ núi Langbiang, Lâm Đồng và chủng thương mại Nhật Bản. *Tạp chí Sinh học*, 36(1se): 158-164
- Đình Xuân Linh Thân Đức Nhã, Nguyễn Hữu Đống, Nguyễn Thị Sơn (2012). *Kỹ thuật trồng, chế biến nấm ăn và nấm dược liệu*. NXB Nông Nghiệp Hà Nội.

IDENTIFICATION OF MUSHROOM SPECIES RECEIVED IN BACH MA NATIONAL PARK USING MOLECULAR BIOLOGY AND SURVEYING THE BREAKING ENVIRONMENT TO CONSERVE GENETIC RESOURCES

Le Thi Nhu Ngoc¹, Nguyen Vu Linh¹, Tran Thien An¹, Vo Dinh Ba², Nguyen Viet Thang², Nguyen Minh Tri^{2*}

¹Bach Ma National Park

²Hue University of Science, Hue University

SUMMARY

The sample (Symbol BM01) was collected in the mountainous areas of Bach Ma National Park, Phu Loc district, Thua Thien Hue province in January 2024 while growing on rotten tree trunks. The external morphological characteristics of the fruit body are dark brown when exposed to water, turning light brown when dry, the average diameter of the mushroom cap is from 2.5-6.5 cm, the upper surface of the mushroom cap has scales. The coarse fibers are white, slightly convex when young, gradually flatten when mature, the thin edge of the cap easily tears. Spores are light yellow in color, size: 3-5µm, shaped from oval to elliptical, with thin, smooth walls, with a few small seeds inside. Analysis of the ITS gene segment of the above Shiitake mushroom sample shows that this is *Lentinula edodes* species. Pure varieties of this mushroom strain have been isolated from fruiting body flesh tissue, growing well on the level 1 propagation medium, PGA (Potato Glucose Agar), and the level 2 medium, cooked rice supplemented with 1% CaCO₃.

Keywords: Bachma, mushroom, sequencing, ITS (Internal transcribed spacer), *Lentinula edodes*, breeding.

* Author for correspondence: Tel: 0914031085; Email: nguyeminhtri@husc.edu.vn