

TRƯỜNG ĐẠI HỌC LÂM NGHIỆP
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC LÂM NGHIỆP



KHOÁ LUẬN TỐT NGHIỆP

**PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH MỘT SỐ CHỦNG NẤM TỬ THÂN
CÂY DÓ BÀU TẠO TRÀM TỰ NHIÊN TẠI KHÁNH HOÀ**

NGÀNH : CÔNG NGHỆ SINH HỌC
MÃ SỐ : 7420201

Giáo viên hướng dẫn : TS. Nguyễn Thị Hồng Gám
Sinh viên thực hiện : Trần Thị Thu Hồng
Mã sinh viên : 1653070344
Lớp : 61 – CNSH
Khoá học : 2016 - 2020



Hà Nội, 2020

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành đề tài tốt nghiệp, với tình cảm chân thành, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới trường Đại học Lâm nghiệp đã tạo điều kiện cho tôi có môi trường học tập tốt trong suốt thời gian tôi học tập, nghiên cứu tại trường.

Trước tiên tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới giáo viên hướng dẫn **TS. Nguyễn Thị Hồng Gấm** đã tận tình hướng dẫn, truyền đạt kiến thức, kinh nghiệm cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và thực hiện khóa luận tốt nghiệp này.

Đồng thời, tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn tới thầy cô trong Viện Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp đã giúp đỡ, tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành khóa luận tốt nghiệp lần này.

Sau cùng xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, bạn bè và các bạn sinh viên lớp K61_CNSH đã luôn động viên, giúp đỡ tôi hoàn thành tốt luận văn tốt nghiệp này.

Vì điều kiện thời gian và khả năng của bản thân còn hạn chế nên đề tài không tránh khỏi những thiếu sót nhất định, tôi mong nhận được những ý kiến đóng góp quý báu của các thầy cô giáo cũng như các bạn để khóa luận tốt nghiệp được hoàn thiện hơn.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 09 tháng 5 năm 2020

Sinh viên thực hiện

Trần Thị Thu Hồng



MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	1
MỤC LỤC.....	ii
DANH MỤC KÝ HIỆU TỪ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC BẢNG.....	v
DANH MỤC HÌNH	vi
ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
PHẦN 1 TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	3
1.1 Giới thiệu về cây Trâm hương (<i>Aquilaria crassna</i>).....	3
1.1.1 Phân loại.....	3
1.1.2 Sự phân bố cây Trâm hương trong tự nhiên	5
1.1.3 Đặc điểm hình thái	7
1.2 Tổng quan về sản phẩm Trâm hương	8
1.2.1 Phân loại sản phẩm Trâm hương	8
1.2.2 Khai thác, chế biến và bảo quản Trâm hương	11
1.2.3 Thành phần chính của Trâm hương	13
1.2.4 Công dụng của Trâm hương	14
1.3 Giới thiệu về một số chủng nấm cộng sinh ở cây Trâm hương.....	17
1.3.1 Giới thiệu về loài nấm <i>Aspergillus</i>	17
1.3.2 Giới thiệu về loài nấm <i>Penicillium</i>	18
1.3.3 Giới thiệu về loài nấm <i>Fusarium</i>	20
1.4 Một số công trình nghiên cứu cây tạo trầm	21
PHẦN 2 MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	24
2.1 Mục tiêu nghiên cứu.....	24
2.1.1 Mục tiêu chung.....	24
2.1.2 Mục tiêu cụ thể.....	24
2.2 Nội dung nghiên cứu.....	24
2.3 Vật liệu nghiên cứu	24
2.4 Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.4.1 Tiến hành xử lý mẫu	25
2.4.2 Chuẩn bị môi trường phân lập	26
2.4.3 Tiến hành cấy mẫu và theo dõi	27

2.4.4	Tiến hành cấy chuyên (truyền).....	27
2.4.5	Phương pháp định danh nấm.....	27
2.4.6	Môi trường dinh dưỡng để nhân sinh khối sợi nấm.....	30
2.4.7	Tiến hành cấy nấm vào môi trường lỏng	30
2.4.8	Tạo công thức phối trộn các dòng nấm.....	31
2.4.9	Thí nghiệm cấy chế phẩm vi sinh vào thân cây Dó bầu	31
2.5	Phương pháp thu thập và xử lý số liệu.....	32
PHẦN 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN		33
3.1	Kết quả phân lập các chủng nấm từ cây Dó bầu.....	33
3.2	Kết quả định danh tên loài các chủng nấm phân lập được.	34
3.2.1	Kết quả sơ bộ định danh thông qua các đặc điểm hình thái nấm	34
3.2.2	Kết quả định danh tên loài bằng sinh học phân tử.....	37
3.3	Kết quả thử nghiệm chế phẩm vi sinh kích thích tạo trầm hương trên cây Dó bầu	45
KẾT LUẬN, TỒN TẠI VÀ KIẾN NGHỊ.....		48
1.	Kết luận	48
2.	Tồn tại.....	48
3.	Kiến nghị.....	48
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....		49



DANH MỤC KÝ HIỆU TỪ VIẾT TẮT

DNA	Deoxyribonucleic acid
NCBI	National Centerfor Biotechnology Information
ITS	internal transcribed spacer
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Potato dextrose agar
PEC	2- (2-phenylethyl)
STT	Số thứ tự



DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1: Công thức phối trộn các dòng nấm.....	31
Bảng 3.1: Kết quả phân lập các chủng nấm từ cây Dó bầu	33
Bảng 3.2: Kết quả thử nghiệm chế phẩm vi sinh kích thích tạo trầm hương trên cây Dó bầu.....	46



THU VIÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC LÂM NGHIỆP

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Hình thái cây và lá Trầm hương	8
Hình 1.2: Cây Dó bầu đã có trầm.....	10
Hình 1.3: Bộ khung phân tử cơ bản của các Sesquiterpenes (A).....	13
Hình 1.4: Cấu trúc hóa học của các hợp chất sesquiterpene thường tồn tại trong nhựa trầm hương.	14
Hình 1.5: Nấm Aspergillus với khuẩn ty, cộng bào tử, túi và thể bình	18
Hình 1.6: Nấm Penicillium với cộng bào tử, đính bào tử, cán, thể bình vẽ, thể bình.....	19
Hình 1.7: Đính bào tử của Fusarium.....	21
Hình 2.1: Thân cây Dó bầu đã có trầm trong tự nhiên ở Khánh Hòa	26
Hình 2.2: Địa môi trường đã được cấy mẫu (A) và mẫu sau 7 ngày nuôi cấy (B)	27
Hình 2.3: Môi Trường trước khi cấy chủng nấm (A) và sau khi cấy chủng nấm (B).....	31
Hình 2.4: Sơ đồ bố trí lỗ khoan cấy chế phẩm vi sinh trên thân cây Dó bầu	32
Hình 3.1: Chủng nấm M4.1a trên đĩa thạch (A) và trên kính hiển vi (B).....	34
Hình 3.2: Chủng nấm M4.3 trên đĩa thạch (A) và trên kính hiển vi (B)	35
Hình 3.3: Chủng nấm M4.5a trên đĩa thạch (A) và trên kính hiển vi (B).....	36
Hình 3.4: Chủng nấm M4.7 trên đĩa thạch (A) và trên kính hiển vi (B)	36
Hình 3.5: Chủng nấm M4.13 trên đĩa thạch (A) và trên kính hiển vi (B)	37
Hình 3.6. Kết quả so sánh trình tự gen chủng M4.1a trên BLAST NCBI.....	38
Hình 3.7: Sơ đồ cây di truyền của chủng M4.1a.....	38
Hình 3.8: Kết quả so sánh trình tự gen chủng M4.3 trên BLAST NCBI	39
Hình 3.9: Sơ đồ cây di truyền của chủng M4.3	39
Hình 3.10: Kết quả so sánh trình tự gen chủng M4.5a trên BLAST NCBI.....	41
Hình 3.11: Sơ đồ cây di truyền của chủng M4.5a.....	41
Hình 3.12: Kết quả so sánh trình tự gen chủng M4.7 trên BLAST NCBI	42
Hình 3.13: Sơ đồ cây di truyền của chủng M4.7	43
Hình 3.14: Kết quả so sánh trình tự gen chủng M4.13 trên BLAST NCBI	44
Hình 3.15: Sơ đồ cây di truyền của chủng M4.13	44

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trầm dó, dó bầu, dó núi (Danh pháp khoa học: *Aquilaria crassna*) là một loại thực vật thuộc họ Trâm - *Thymelaeaceae*. Loài này phân bố ở Đông Nam Á và đảo New Guinea. Trầm hương được sinh ra từ vết thương của cây Dó Bầu. Thế nhưng, không phải cây Dó bầu nào cũng có thể sinh ra trầm hương. Chính vì vậy, Trầm hương đã quý lại càng hiếm hơn bao giờ hết.

Vết thương từ cây dó sau khi đọng nước vì trời mưa thì cây dó bầu sẽ tiết ra một chất nhựa tự vệ xung quanh vết thương. Thông thường, trên thân cây dó sẽ có những vết do côn trùng đục, người ta hay gọi là mắt trên thân cây. Nhựa cây tiết ra một thời gian sẽ trở nên đậm đặc hơn, mùi thơm hương và dĩ nhiên sẽ thu hút một loài kiến đến ăn, những phân tử của một loài nấm mà kiến mang đến vô tình được “cấy” vào lớp nhựa trên cây dó. Trải qua một thời gian rất dài và chịu ảnh hưởng bởi nhiều tác động từ thiên nhiên và sinh ra một loại sản phẩm đặc biệt được gọi là Trầm hương hay Kỳ nam. Trầm hương từ ngàn đời nay vẫn được xem là vị thuốc quý chữa nhiều bệnh tật. Trước đây chỉ hàng vua quan, quý tộc mới có điều kiện dùng. Chính vì vậy mà Trầm hương có giá trị kinh tế rất cao trên thị trường, điều này đã làm cho cây Dó bầu trở thành loài thực vật đặc biệt được nhiều nhà khoa học và người dân chú ý, có giá trị đặc biệt về mặt nghiên cứu khoa học ở Việt Nam nói riêng và các nước trên thế giới nói chung.

Trong khi đó cùng với sự mất rừng thì nguồn Trầm hương tự nhiên cũng ngày càng cạn dần. Cùng với đó là sự khai thác quá mức và bừa bãi của con người làm cho các loài thuộc chi *Aquilaria* có khả năng cho Trầm bị cạn kiệt. Ở Việt Nam những người khai thác Trầm chặt đốn bừa bãi những cây Dó bầu ở bất kỳ độ tuổi nào vì vậy mà trong một thời gian ngắn những cây thuộc họ Trâm gần như bị tuyệt chủng. Trước tình hình đó hiện nay ở nước ta đã và đang có rất nhiều tổ chức, cơ quan, cá nhân trồng cây Dó bầu đại trà, nhằm mục đích cải thiện kinh tế, phủ xanh đất trống đồi trọc, góp phần xóa đói giảm nghèo v.v... Tuy nhiên, việc tạo trầm ngoài tự nhiên hay bằng các biện pháp thủ công thì khả năng tạo trầm hương vẫn còn hạn chế. Với biện pháp cơ học, phương pháp này có ưu điểm là đơn giản, dễ thực hiện nhưng có nhược điểm là xác suất thành công thấp. Đối với phương pháp dùng hoá chất có ưu điểm là rất hiệu quả, có thể tạo được nhiều trầm trong thời gian ngắn, nhưng nhược điểm của phương pháp này là trong sản phẩm

còn dư thừa các thành phần hoá chất độc hại như Cl^- , SO_4^{2-} , NO_2 và PO_4 ,... sẽ ảnh hưởng đến sản phẩm và không được người tiêu dùng ưa chuộng. Phương pháp mang tính khả quan nhất là sử dụng các chủng nấm có khả năng kích thích tạo trầm cây trực tiếp vào thân cây, với các ưu điểm như tỷ lệ thành công cao và không để lại lượng hoá chất độc hại tồn dư trong sản phẩm.

Xuất phát từ những thực tế trên, dưới sự hướng dẫn của TS. Nguyễn Thị Hồng Gấm, tôi đã thực hiện đề tài khoá luận “**Phân lập và định danh một số chủng nấm từ thân cây Dó bầu tạo trầm tự nhiên tại Khánh Hoà**”



PHẦN 1

TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1 Giới thiệu về cây Trầm hương (*Aquilaria crassna*)

Cây Trầm hương (Dó bầu) thuộc:

Lớp (*Class*): *Magnoliopsida*

Bộ (*Order*): *Myrtales*

Họ (*Family*): *Thymelaeaceae*

Chi *Aquilaria* có tất cả 24 loài (*Species*) khác nhau.

Tiến sĩ Lê Công Kiệt (Việt Nam) và tiến sĩ Paul Kessler (Hà Lan) vừa phát hiện loài thứ 25 ở cao nguyên Trung Bộ trong năm 2005 có tên khoa học là *Aquilaria rugosa* L.C.Kiet & P.J.A.

Cây Dó bầu thuộc loài *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte.

1.1.1 Phân loại

Aquilaria thuộc họ thực vật hạt kín *Thymelaeaceae*, là loài đặc hữu của vương quốc Indomalaya. Cho đến nay, có tổng cộng 21 loài *Aquilaria* đã được ghi nhận và 13 trong số chúng được công nhận là loài sản xuất trầm hương. Trầm hương (còn được gọi là *gaharu* ở Đông Nam Á, *oud* ở Trung Đông, *chen xiang* ở Trung Quốc, *jinkoh* ở Nhật Bản và *agar* ở Ấn Độ) là một loại gỗ nhựa thơm tối có giá trị cao. Ở Việt Nam cách gọi tên tiếng Việt cho mỗi loài rất khác nhau giữa các địa phương. Ở đảo Phú Quốc người ta chia cây Dó ra thành hai loài khác nhau, cây Dó nghệ gỗ có màu vàng nhạt và hơi cứng còn cây Dó bầu gỗ màu trắng và mềm. Ở các tỉnh Miền Trung thì chia cây Dó ra 4 loài: Dó bầu hương, Dó me, Dó dây và Dó bầu thường. Ngoài ra, ở một số địa phương khác người ta còn chia cây Dó ra các loài như: Dó bầu, Dó niệt, Dó me, Dó gạch... Với cách phân chia nêu trên chúng ta khó xác định được tên khoa học của mỗi loài [1][2].

Mặc dù cách phân loại và đặt tên còn nhiều điểm bất đồng, chưa có khoa học, nhưng ở Việt Nam hiện nay cây Dó bầu (Tên khoa học: *Aquilaria Crassna* pierre ex Lecomte) được nông dân ưa chuộng và nhân giống rộng rãi vì có khả năng cho Trầm nhiều và chất lượng Trầm tốt nhất.

Dó bầu còn có tên gọi khác dựa vào những sản phẩm của chúng như cây Tóc, cây Trâm, cây Trâm hương, cây Kỳ Nam.v.v... Theo Nguyễn Hiền và Võ Văn Chi (1991) cây Dó bầu chính thức được đặt tên khoa học và công bố dựa vào những mẫu vật do nhà thực vật học người Pháp là Pierre thu nhập tại Phú Quốc (Việt Nam) và núi Aral tỉnh Samrongtong (Campuchia) vào tháng 05 năm 1870. Pierre đã dựa vào tên Campuchia là Karasna để đặt cho cây Dó bầu *Aquilaria crassna* nhưng nó chỉ là tên trần chưa có bảng mô tả và việc công bố chưa được chính thức hóa. Sau đó Henri Lecomte trong bộ sách Thực Vật Chí Đông Dương lần đầu tiên mô tả các loài thuộc chi *Aquilaria* ở Đông Dương và công bố chính thức trong thực vật học của Pháp năm 1914 và xếp chi này vào họ Trâm. Phạm Hoàng Hộ (1992) trong công trình gần đây nhất xác nhận ở Việt Nam, chi *Aquilaria* thuộc họ Trâm hương có ba loài được định danh là:

+ *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte: Dó bầu, Trâm; ghi nhận ở Phú Khánh, Bảo Lộc và Phú Quốc.

+ *Aquilaria baillonii* Pierre ex Lecomte: Dó baillon; ghi nhận ở rừng dây ảm Bình Trị Thiên, Quảng Nam, Đà Nẵng.

+ *Aquilaria banaensae* Phạm Hoàng: Dó Bà Na; ghi nhận ở rừng dây ảm Quảng Nam, Đà Nẵng.

Và mới đây, tiến sĩ Lê Công Kiệt (Việt Nam) và tiến sĩ Paul Kessler (Hà Lan) vừa phát hiện loài thứ tư ở cao nguyên Trung Bộ trong năm 2005 có tên khoa học là *Aquilaria rugosa* L.C.Kiet & P.J.A Kessler [3].

Các tác giả khác như GS. Lê Văn Kí (1993), các tác giả trong quyển “Cây Gỗ Rừng Việt Nam Tập IV” (1991); “Phân Loại Thực Vật” (Nxb Giáo dục, 1972) và “Danh Mục Thực Vật Tây Nguyên” của đoàn điều tra thực vật (1984) đã ghi nhận cây Dó bầu với tên khoa học *Aquilaria agallocha* Roxd. Tuy nhiên, theo Vũ Văn Chiên (1976) trong “Tóm tắt đặc điểm họ cây thuốc” thì *Aquilaria agallocha* Roxd chỉ có ở Ấn Độ không có ở Việt Nam, không ghi nhận trong quyển “Thực Vật Chí Đông Dương” của Henri Lecomte. Một số công trình nghiên cứu khác “Định danh Dược thảo và Dược liệu Đông y” của đoàn Dược sĩ Việt Nam và “Những cây thuốc vị thuốc Việt Nam” lại cho rằng *Aquilaria agallocha* Roxd là đồng danh của *Aquilaria crassna* Pierre [1].

1.1.2 Sự phân bố cây Trầm hương trong tự nhiên

Trong tự nhiên giống cây *Aquilaria*, tức cây Trầm hương, phân bố khắp các nước vùng Châu Á từ Trung - Cận Đông, Nam Á, Trung Quốc cho đến các nước Đông Nam Á...

- Ở vùng Trung - Cận Đông cây Trầm hương mọc nhiều trên những rặng núi hiểm trở phía Nam Ả Rập.
- Ở Trung Quốc Trầm hương mọc tập trung ở một số tỉnh Miền Nam, nhiều nhất là Quảng Đông và Hải Nam, nhưng chất lượng trầm không cao (Thổ Trầm). Vùng này có 3 loài chính, đó là: *Aquilaria grandiflora* Bth, *Aquilaria sinensis* Merr, *Aquilaria yunnanensis* S.C. Huang.
- Ở vùng Nam Á cây Trầm hương có nhiều ở Ấn Độ, chủ yếu là loài *Aquilaria khasiana* H. Hallier.
- Vùng Đông Nam Á bao gồm các quốc gia:
 - + Malaysia: Có 4 loài: *Aquilaria beccariana* van Tiegh, *Aquilaria microcarpa* Baill, *Aquilaria hirta* Ridl và *Aquilaria rostrata* Ridl.
 - + Thái Lan: Chủ yếu là loài *Aquilaria subintegra* Ding Hou.
 - + Indonesia (Tập trung chủ yếu ở đảo Sumatra) có 4 loài: *Aquilaria beccariana* van Tiegh, *Aquilaria hirta* Ridl, *Aquilaria microcarpa* Baill, *Aquilaria moszkowskii* Gilg.
 - + Philippin: Bao gồm các loài: *Aquilaria cumingiana* (Decne) Ridl, *Aquilaria filaria* (Oken) Merr, *Aquilaria apiculata* Merr, *Aquilaria acuminata* (Merr.) Quis.
 - + Singarpore: Chủ yếu là loài *Aquilaria hirta* Ridl.
 - + Campuchia, Trầm hương thường mọc phân tán trong các khu rừng nằm ven biển, có 2 loài chính là: *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte, *Aquilaria baillonii* Pierre ex Lecomte.
 - + Việt Nam Trầm hương có tất cả 4 loài, đó là: *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte, *Aquilaria baillonii* Pierre ex Lecomte, *Aquilaria banaense* Pham-hoang-Ho và loài *Aquilaria rugosa* L.C.Kiệt & P.J.A Kessler (do tiến sĩ Lê Công Kiệt (Việt Nam) và tiến sĩ Paul Kessler (Hà Lan) tìm thấy ở cao nguyên Trung Bộ). Đây là loài thứ 4 ở Việt Nam và thứ 25 trên thế giới [12].

Ở Việt Nam cây Trâm hương phân bố tại các địa bàn như:

- + Phía Bắc: Hoàng Liên Sơn, Vĩnh Phú, Hòa Bình, Hà Tây, Quảng Ninh, Cao Bằng, Lạng Sơn, Hà Bắc.
- + Miền Trung: Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên, Quảng Nam, Đà Nẵng, Quảng Ngãi, Bình Định, Phú yên, Bình Thuận, Khánh Hòa.
- + Tây Nguyên: Gia Lai, Kontum, ĐăLăk, Lâm Đồng.
- + Miền Nam: Bình Phước, Đồng Nai, Tây Ninh, An Giang, Kiên Giang, Đảo Phú Quốc. Đặc biệt thấy nhiều trên suốt chiều dài của dãy Trường Sơn, song do sự khai thác bừa bãi của dân, đến nay chỉ còn thấy cây Dó bầu ở những vùng xa xôi, đầu nguồn rừng già.

Trong những năm gần đây, một số tác giả đã đề cập rải rác trong nhiều báo cáo nghiên cứu các vấn đề sinh thái và phân bố của cây Dó bầu (Vũ Văn Cầu và Vũ Văn Dũng, 1987). GS. Lê Văn Ký cho biết Dó bầu phân bố ở nhiều nơi trên lãnh thổ Việt Nam, và nhiều nước Châu Á nhiệt đới khác như Lào, Cambodia, Ấn Độ v.v... Ở Việt Nam cây Dó bầu mọc rải rác ở nhiều tỉnh từ Bắc đến Nam như: Lạng Sơn, Quảng Ninh, Hà Tuyên, Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị, Huế, Quảng Nam, Đà Nẵng và hầu hết các tỉnh phía Nam. Nhưng tập trung nhiều nhất là ở các tỉnh Duyên Hải và huyện đảo Phú Quốc.

Trong tự nhiên cây Dó bầu thường mọc trong vùng rừng nhiệt đới ẩm trên địa hình có độ cao so với mực nước biển từ 300 - 1000m, nhưng tập trung nhiều nhất ở độ cao 700m và rất thích hợp ở những nơi có độ dốc từ 250 trở lên. Tuy nhiên trong thực tế cây Dó bầu vẫn sinh trưởng tốt ở những nơi có độ cao trên dưới 40m so với mực nước biển. Nhìn chung, Dó bầu là loài thực vật ưa sáng, mọc rải rác trong các khu rừng nhiệt đới, mọc ở độ cao 50 - 1200m. Nơi cao nhất được tìm thấy ở núi Chu Yang Sinh thuộc tỉnh Đăklăk của Việt Nam. Thường thì cây Dó bầu mọc riêng lẻ nhưng cũng có khi tìm thấy một nhóm 5 - 6 cây mọc gần nhau. Theo Lê Mộng Chân (1995), Dó bầu là cây mọc nhanh, lượng tăng trưởng được ghi nhận là 1 - 1,2m/năm về chiều cao, và 1,2 - 1,5cm/năm về đường kính. Cây được 8 tuổi trở lên có khả năng cho hoa kết quả. Dưới tán rừng thứ sinh cây Dó bầu tái sinh kém. Thường thì gặp cây Dó bầu tái sinh ở những khoảng trống trong rừng như bìa rừng ven những con đường mòn... Ngoài ra thì Dó bầu cũng

có khả năng tái sinh bằng chồi rất tốt. Việc nhân giống bằng phương pháp chiết cành, ghép cành, có tác động của thuốc kích thích cũng được thực hiện, và phương pháp nuôi cấy mô cũng phổ biến rộng rãi [2].

1.1.3 Đặc điểm hình thái

Dó bầu là một loại cây gỗ lớn, thường xanh, tán thưa, cao khoảng 15 - 20m, có thể cao tới 20 - 30m, đường kính ngang ngực 40 - 50m (có thể đạt 80cm). Thân thường thẳng, đôi khi có rãnh dạng lòng máng. Vỏ cây nhẵn có màu xám, mỏng khoảng 2 - 4mm, có vết nứt dọc theo thân cây, thịt vỏ màu trắng, có xơ hay tơ mịn dày, dễ bóc và tước ngược từ gốc lên. Cành non phủ lông mềm màu vàng xám, thường mảnh, cong queo. Lá cây mỏng, hình bầu dục hoặc lưỡi mác, mọc đối. Mặt trên của lá có màu xanh bóng, mặt dưới có xanh nhạt hơn và có lông mịn, lá trầm hương có gân hình lông chim nổi rõ ở mặt dưới, hợp lại ở mép, cuống lá dài 2 - 5mm. Gỗ có màu trắng hoặc vàng nhạt, không phân biệt rác lõi, gỗ nhẹ, mềm. Trong gỗ có cấu tạo đặc biệt là Libe xen gỗ (Đây là một trong những hiện tượng đặc biệt để nghiên cứu tạo Trâm) [4].

Cây trên 3 năm tuổi có thể ra hoa. Hoa lưỡng tính, hoa tự hình tán hay chùm mọc ở nách lá, hoa màu trắng tro. Đài hoa hình chuông (loa kèn) có lông ở miệng [5]. Cụm hoa dạng tán hoặc ở đầu cành, cuống cụm hoa mảnh, dài 2 - 3cm. Hoa nhỏ, mặt trong gần như nhẵn, có 10 đường gân rõ, có 5 thùy dài hình trứng thuôn, dài 12 - 15mm. Phần phụ dạng cánh hoa, dính gần họng dài, nhị 10, bầu hình trứng 2 ô, có lông rậm, gốc bầu có tuyến mật. Quả nang gần hình trứng ngược hay hình quả lê, dài 3 - 4cm, đường kính 2,5 - 3cm, có lông mềm, ngắn, có mang đài tồn tại, khi khô nứt thành hai mảnh. Mỗi quả thường cho một đến hai hạt [6].

Hạt có hai phần, phần chính ở phía trên hình nón, phần kéo dài ở phía dưới. Hạt khi chín có màu nâu, phần vỏ ngoài cùng hoá gỗ cứng, bên trong mềm có chứa nhiều dầu. Tuy nhiên, hạt Trâm hương có đời sống rất ngắn, không lưu trữ lâu ngày được. Trong tự nhiên khi hạt chín và rụng xuống đất nếu gặp điều kiện, độ ẩm thích hợp là nảy mầm ngay. Việc lưu trữ hạt kéo dài quá một tuần lễ, tỷ lệ nảy mầm sẽ giảm 80% hoặc không nảy mầm.



Hình 1.1: Hình thái cây và lá Tràm hương

1.2 Tổng quan về sản phẩm Tràm hương

1.2.1 Phân loại sản phẩm Tràm hương

Đứng đầu bảng xếp hạng, được coi là loại tràm hương có giá trị cao nhất, đắt tiền nhất và chất lượng nhất. Người xưa có câu, Việt Nam là đất nước “rừng vàng biển bạc”. Tràm Hương là loại cây sinh sôi và phát triển ở vùng có khí hậu nhiệt đới và Việt Nam lại mang rõ những đặc trưng của kiểu khí hậu này.

Theo Vũ Văn Cần và Vũ Văn Dũng (1978) có thể phân loại nguồn gốc hai loại Tràm là Tràm sinh (Tràm lấy từ cây sống) và Tràm rục (Tràm lấy từ cây đốn hay cây đã chết lâu ngày). Tràm sinh lấy từ cây còn sống thường có màu sáng, ngược lại Tràm rục được lấy từ cây có màu tối đen xỉ hay màu cánh dán thường người ta lấy Tràm rục từ gốc hoặc rễ của cây. Giá Tràm sinh cao hơn Tràm rục 2 - 3 lần và mỗi cây có Tràm có thể thu được 5 - 10kg Tràm. Ngoài ra phần gỗ xung quanh khối Tràm kỳ cũng bị biến đổi ít nhiều so với sự xuất hiện rải rác của các chi Tràm xen kẽ các sợi gỗ thường gọi là Tok trong tiếng Khmer. Tok khi cháy có mùi hương thơm đặc biệt được dùng làm nhang. Theo Phillipir (1997) các dạng Tràm và sản phẩm của Tràm được ghi nhận trên thị trường là Tràm mảnh, Tràm bóng, Tràm vụn, Tràm bánh, tinh dầu Tràm dùng làm hương liệu và dược liệu.

Việc phân tích Tràm và tinh dầu Tràm đã được Erhardt và cộng sự

Hopwood (1997) thực hiện bằng phương pháp sắc khí kết hợp với phổ (*Gas Chromatogasraphy/ Mass Spectrometry*). Ghi nhận có hai sesquiterpen tồn tại phổ biến trong gỗ cũng như trong tinh dầu đó là *Armodendrene* và *Selinene*. Tuy nhiên *Selinene* không xuất hiện trong mẫu gỗ Tràm chất lượng thấp. Mặt khác, Guaiene và một số sesquiterpen có trong mẫu gỗ Tràm tự nhiên nhưng chỉ gặp trong mẫu tinh dầu trong khi Guaiene - một đồng phân của *Aromadenderne* có nhiều trong mẫu tinh dầu nhưng không có trong mẫu gỗ tự nhiên [6].

Tràm hương hiện nay được chia làm 2 loại: Tràm hương tự nhiên và Tràm hương nhân tạo.

a. Tràm hương tự nhiên

Sự tạo tràm trong tự nhiên của cây Dó bầu là sự biến đổi của các phân tử gỗ do tác động bệnh lý bởi vết nứt gãy, sự xâm nhập của các loài nấm vi sinh... xảy ra một cách tự nhiên năm này sang năm khác. Cây tràm dưới ảnh hưởng của các vi sinh vật và khoáng chất trong đất, sản sinh ra tràm hương. Khi cây tràm hương mới bắt đầu kết tràm, cần 1 thời gian dài để tạo tràm hương tốt. Do điều kiện hình thành phức tạp, nên không phải cây nào cũng tạo được tràm. Khi bị nhiễm bệnh ở một vùng nào đó cây sẽ tích tụ nhựa đến đây để tự băng bó vết thương, xem như một khả năng tự đề kháng để chống lại bệnh nên tạo ra tràm, kỳ. Ở Việt Nam có cây Dó bầu hương, loại cây có khả năng tạo thành tràm.

Trong tự nhiên không phải bất kỳ thân cây Dó bầu nào cũng có tràm - kỳ, chỉ có những cây bị bệnh mới chứa tràm ở phần lõi thân. Ở phần này nếu quan sát kỹ qua kính lúp ta thấy các tế bào gỗ thoái hóa, biến dạng mất một phần, chứa một chất nhựa thơm (tinh dầu) biến thành những khối hình thể không đều, lồi lõm có rãnh dọc, trong trong màu sậm đó là kỳ nam. Chung quanh kỳ nam gỗ cũng biến chất ít nhiều đó là tóc. Khi đốt cháy tóc tỏa ra mùi thơm (dùng làm nhang đốt).

Tràm kỳ thường tìm thấy ở những cây Dó bầu bị bệnh sau thời gian từ 10 - 20 năm hoặc lâu hơn. Cây bị bệnh lá có màu vàng và nhỏ dần, thân cây có nhiều u bướu, xuất hiện những điểm nâu đỏ. Gỗ cây trở thành một chất bóng như đá sỏi có những nếp nhăn giống như cánh chim ưng, đó là những cây có tràm và kỳ.

Tràm hương thiên nhiên có giá cả trăm triệu đồng 1 kg.

Dó bầu hương sẵn chứa một nguồn tinh dầu với hương thơm đặc biệt quý

rữ các loại côn trùng, vi sinh, vi nấm. Chúng thích cộng sinh và phát triển trong thân cây, thuận lợi cho việc tăng tiết một số chất cần thiết để kích thích sự tụ Trâm. Dó bầu hương có thớ gỗ mềm hơn các loại Dó bầu khác, giúp các côn trùng dễ đục khoét, các vi sinh vật khác dễ tạo vết thương nơi thân cây, mọt tổ dễ bị thoái biến khi tinh dầu Trâm tích tụ. Đó yếu tố thuận lợi cho việc kết Trâm chất lượng cao.



Hình 1.2: Cây Dó bầu đã có trâm

b. Trâm hương nhân tạo

Khi lượng cung không đủ cầu, nhu cầu về trâm hương ngày càng lớn và quá trình tìm trâm hương tự nhiên đầy rủi ro đã buộc người ta phải đi tìm lời giải và đó chính là trâm hương nhân tạo. Trâm hương nhân tạo không phải là trâm hương giả mà trâm hương nhân tạo cũng phải trải qua nhiều giai đoạn như trâm hương tự nhiên nhưng có bàn tay con người tác động trong sự tạo trâm trong quá trình phát triển của cây dó bầu. Người ta sử dụng phương pháp cấy tạo trâm để tạo ra trâm hương nhân tạo. Cây Dó bầu được người ta nuôi trồng, sau đó dùng các biện pháp như khoan lỗ cấy trâm, chế phẩm vi sinh... để kích thích sự tạo trâm. Có nơi người ta dùng đinh hoặc mẫu sắt hình tam giác được cắt ra từ thùng phuy cũ đóng trực tiếp vào thân cây hoặc dùng khoan điện khoan vào thân cây ở nhiều vị trí khác nhau, sau đó bơm hóa chất vào các lỗ đã khoan. Các hóa chất đó có thể là H_2SO_4 loãng, $KMnO_4$, HCl , $NaHSO_3$, $FeCl_3$ hoặc $FeSO_4$... Điều này cũng không hề đơn giản, tỉ lệ những cây được cấy tạo trâm thành công cũng khá thấp và trâm hương nhân tạo tuy không đắt đỏ như trâm hương tự nhiên nhưng vẫn có giá trị kinh tế cao.

Sự can thiệp của khoa học kỹ thuật qua bàn tay của con người đã giúp giải quyết phần nào nhu cầu trầm hương đang mạnh mẽ. Việc nuôi trồng cây dó bầu và cấy tạo trầm đã mở ra những cơ hội lớn cho nhiều người dân Việt Nam kiếm thêm thu nhập và làm giàu bằng sản vật này. Trầm hương nhân tạo không khác biệt nhiều so với trầm hương tự nhiên về mùi hương, cân nặng và những lợi ích của trầm hương vẫn được bảo đảm khá toàn vẹn.

Hiện nay, trầm hương nhân tạo Việt Nam được đánh giá rất cao trong nước cũng như quốc tế. Việc xuất khẩu trầm hương nhân tạo ngày càng được đẩy mạnh tại các nước như: các tiểu vương quốc Ả Rập, Kuwait, Oman, Qatar... với lượng tiêu thụ đáng kể [7].

1.2.2 Khai thác, chế biến và bảo quản Trầm hương

Trong tự nhiên thường chỉ gặp trầm ở một số rất ít cá thể già hoặc bị bệnh. Theo kinh nghiệm của một số người chuyên đi tìm kiếm, khai thác trầm ở các tỉnh miền Trung nước ta, trầm có thể là những cây già, lâu năm (ước tính phải trên 30 năm tuổi), thân cong queo, sinh trưởng yếu ớt, ngọn sinh trưởng chậm lại, cả thân không nhánh, có nhiều u bướu và thường có các loại kiến đen hoặc kiến nâu. Ngoài ra còn thấy các hiện tượng khác nữa là lá thường có màu xanh lá mạ hay hơi vàng.

Sau khi chặt hạ, người ta cưa cắt, đục đẽo, vạc bỏ gỗ ở phía ngoài chỉ chọn lấy các mẫu trầm hoặc các u bướu. Các thỏi trầm khai thác từ những cây sống là trầm sinh, còn trầm được khai thác từ thân hoặc gốc rễ của những cây đã chết gọi là trầm rục. Giữa hai loại, trầm rục có chất lượng thấp hơn.

Ở Việt Nam, việc khai thác và sử dụng Trầm hương đã có từ rất lâu đời. Vào thời Bắc thuộc, nhà nước phong kiến phương Bắc hàng năm buộc nhân dân ta phải cống nạp các sản vật quý giá như Ngà Voi, Sừng Tê Giác, Ngọc Trai, Yến Sào... trong đó có cả Trầm hương [6].

Dưới triều nhà Nguyễn, việc khai thác Trầm hương được nhà nước quản lý hết sức chặt chẽ. Đối với những vùng có nguồn Trầm hương để khai thác, triều đình cắt đặt các đội canh tuần và buộc những người đi điếu vào rừng lấy Trầm về cống nạp.

Sau năm 1975, do chiến tranh các khu rừng gỗ quý bị bom đạn tàn phá nặng, nhiều cây Trầm hương bị bệnh, bị bom đạn huỷ hoại lại sản sinh ra những

loại Trầm kỳ rất tốt. Các địa phương có trữ lượng Trầm hương tương đối tập trung tại vùng Quảng Nam, Quảng Ngãi, Bình Định, Phú Yên, Hà Tĩnh,... được chính phủ cho phép khai thác và xuất khẩu Trầm hương để thu hút ngoại tệ và đổi một số máy móc thiết bị mà địa phương cần. Từ đó mà những đội công nhân chuyên nghiệp được thành lập để khai thác Trầm hương, nhưng thực tế cho số lượng những đội khai thác lâm sản của nhà nước tại các địa phương lại quá ít ỏi so với nhu cầu. Trong thời kỳ này, sự khai thác Trầm hương phần lớn qua đường dây của thương buôn cá thể.

Trầm hương của nhà nước thu mua, một phần được sửa dụng để sản xuất dược liệu phần khác thì được xuất khẩu. Đến cuối thập niên 1990, nguồn Trầm hương tự nhiên ở Việt Nam gần như cạn kiệt và để bảo vệ tài nguyên quốc gia chính phủ đã cấm hẳn việc khai thác, mua bán Trầm hương và xem đó là hàng quốc cấm.

Trong tự nhiên không phải bất kỳ cây Trầm hương nào cũng có khả năng tạo được Trầm và Kỳ. Thông thường chỉ có 1/10 cây trưởng thành có đường kính trên 20cm là có khả năng tạo Trầm, đó là những cây bị bệnh sau một thời gian từ 10 - 20 năm hoặc lâu hơn. Do đó từ xưa đến nay công việc tìm kiếm Trầm hương là một công việc khó khăn. Những người tìm Trầm mất nhiều thời gian vào tận rừng sâu núi thẳm để tìm trầm. Đôi khi họ trở về tay không hoặc phải bỏ mạng trong rừng sâu.

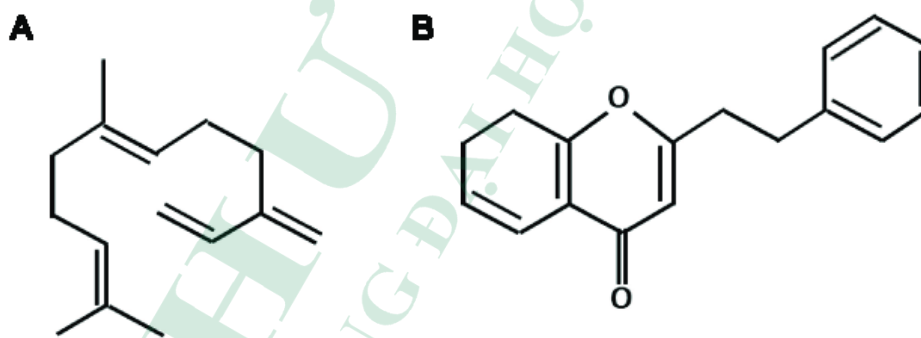
Tới nay, người ta đã đưa ra một số phương pháp tạo Trầm như dùng chế phẩm vi sinh hoặc dùng hoá chất để bôi vào các lỗ khoan nhân tạo trên thân cây hoặc cành. Sau 1 - 2 năm, quanh vết thương sẽ hình thành dạng “trầm tóc”. Loại này chỉ dùng cấp tinh dầu làm hương hoặc làm trầm cảnh. Cần tiếp tục nghiên cứu theo dõi để có kết luận đối với các phương pháp tạo trầm này [8][14].

Trên thị trường, thường mua bán trầm nguyên liệu ở dạng nguyên khối hoặc cả miếng sau khi chọn lọc và phân loại theo chất lượng, các thỏi Trầm thường cứng, nặng, giòn, trong có chứa nhựa màu nâu đậm hoặc đen. Tùy thuộc vào chất lượng, trong thương mại người ta thường chia trầm thành 8 - 9 loại. Loại cao nhất (từ 1 đến loại 3) có màu nâu đen gọi là “Kỳ nam”. Các loại 7, 8, 9 là thấp nhất có chất lượng kém.

Để chưng cất, tách chiết tinh dầu, người ta thường chỉ sử dụng các mẫu trầm vụn, mùn cưa hoặc các loại trầm có lẫn tạp chất có chất lượng thấp. Tinh dầu trầm là chất lỏng, sánh, nhớt, có màu vàng hoặc màu hổ phách đậm với hương thơm dịu của Trầm. Các thành phần chính của tinh dầu thường bốc hơi ở nhiệt độ cao (khoảng 200°C), nên việc chưng cất tinh dầu trầm cần có các thiết bị áp lực hoặc hoà tan trong các dung môi thích hợp, với công nghệ và quy trình đặc biệt [8].

1.2.3 Thành phần chính của Trầm hương

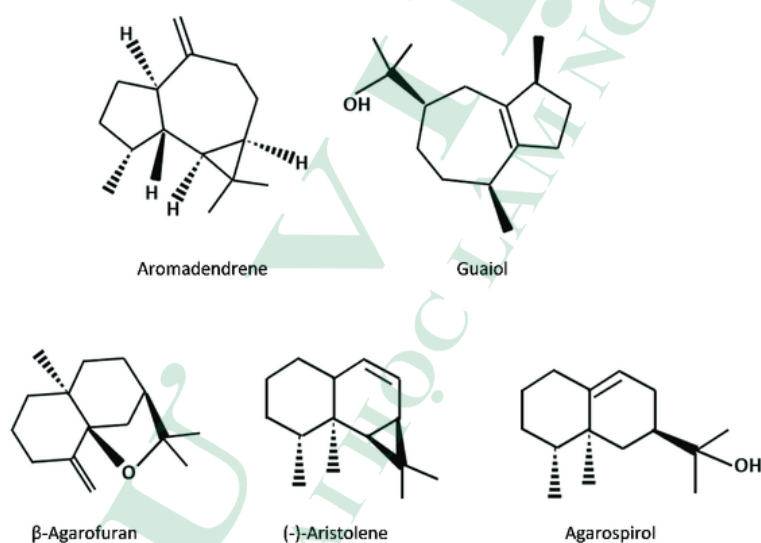
Điểm thu hút chính của ngành gỗ trầm hương là giá trị thị trường cực kỳ cao. Người ta đã kết luận rằng thành phần của nhựa cây trầm hương chủ yếu bao gồm các hỗn hợp của Sesquiterpenes và 2- (2-phenylethyl) (PECs). Trong khi đó, thành phần của tinh dầu trầm hương chủ yếu là Sesquiterpenoids. Tất cả các hợp chất chính này và một số chất chuyển hoá thơm dễ bay hơi đã tạo thành tính chất độc đáo và có mùi thơm của gỗ Trầm hương [25].



Hình 1.3: Bộ khung phân tử cơ bản của các Sesquiterpenes (A) và 2- (2-phenylethyl) (B).

Số lượng và loại thành phần các chất có trong trầm hương của mỗi nghiên cứu được báo cáo khác nhau tùy thuộc vào nguồn gốc gỗ trầm hương. Tuy nhiên, có hơn 150 hợp chất được xem xét bởi Naef (2011) đã được xác định cho đến nay trong gỗ trầm hương từ các nguồn khác nhau. Trong số các hợp chất này, có 70 Sesquiterpen và khoảng 40 loại PEC đã được công nhận trong gỗ trầm hương và cấu trúc của chúng đã được Naef làm sáng tỏ (2011). Một số sesquiterpene đã được quan sát được thường xuyên hơn hiện diện trong trầm hương từ các nghiên cứu khác nhau, bao gồm aromadendrene, agarospirol, β -agarofuran, guaiol và (-)

- aristolene. Sesquiterpen được báo cáo là đặc trưng cho loài, chẳng hạn như jinkoh-eremol và epi- γ -eudesmol chỉ có ở *A. malaccensis*, trong khi baimuxinal chỉ tồn tại ở *A. crassna* và *A. sinensis*. Điều đáng nói là trong nghiên cứu của Pasaribu et al. (2015), hàm lượng aromadendrene đã được tìm thấy nhiều hơn trong gỗ trầm hương cao cấp và do đó nó được đề xuất như là một dấu hiệu hóa học hiệu quả để phân loại gỗ trầm hương. Ngoài aromadendrene, Jayachandran et al. (2014) sau đó đã đề xuất một valencene đánh dấu bổ sung có thể quan trọng trong việc phân loại dầu trầm hương.



Hình 1.4: Cấu trúc hóa học của các hợp chất sesquiterpene thường tồn tại trong nhựa trầm hương.

Các loại và dẫn xuất của các hợp chất chính trong gỗ trầm hương rất rộng và đa dạng, cho thấy tính chất hương liệu của gỗ trầm hương từ các loài khác nhau và các nguồn khu vực. Cái nhìn sâu sắc hơn về các chất chuyển hóa gỗ trầm hương chắc chắn sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc xác định để phân loại gỗ trầm hương. Số lượng các hợp chất được phát hiện trong gỗ trầm hương chắc chắn sẽ còn tăng thêm trong tương lai [1].

1.2.4 Công dụng của Trầm hương

Trầm hương từ ngàn đời nay vẫn được xem là vị thuốc quý chữa trị nhiều bệnh tật. Trước đây chỉ hàng vua quan, quý tộc mới có điều kiện dùng. Đó là những công dụng sau:

a. Tác dụng an thần

Người Việt chúng ta từ xưa đã biết cách đốt trầm để xông hơi cho những bộ lễ phục đắt tiền của các bậc vua chúa, công hầu, khanh tướng, các vương tôn, công tử,... trong những dịp lễ hội long trọng. Người ta cho rằng quần áo xông trầm sẽ tránh được phong sương, lại làm tăng phần cao sang đài các nhờ có mùi trầm quý giá [9].

Mùi hương toả ra từ trầm hương có tác dụng rất tốt cho hệ thần kinh. Khi đốt trầm, hương thơm nhẹ nhàng giúp tạo cảm giác khoan khoái, lâng lâng rất dễ chịu. Nó giống như một phương pháp giúp giải toả căng thẳng sau quãng thời gian làm việc.

Đặc biệt, nếu là người hay bị mất ngủ thì trầm hương chính là giải pháp cải thiện giấc ngủ hiệu quả. Theo Đông y, hương trầm có khả năng làm cho tinh thần của người dùng thư giãn hơn. Mùi hương từ trầm còn giúp cho bầu không khí thêm thanh tịnh, giúp ngủ được sâu và ngon, ít bị giật mình thức giấc bất chợt.

b. Tác dụng giảm đau

Trầm hương đã được nhiều nghiên cứu chứng minh có khả năng sản sinh ra các chất chống lại chứng viêm khớp. Chúng sẽ giúp hạn chế các tổn thương liên quan đến mô sụn. Từ đó làm giảm đáng kể các triệu chứng đau nhức khớp do thời tiết thay đổi hoặc do một số bệnh lý khác.

Trầm hương còn được sử dụng để làm thuốc giải nhiệt và trừ sốt rét, làm thuốc trừ đau bụng và chữa bệnh đường tiêu tiện.

c. Tăng khả năng hoạt động cho tiêu hoá

Trầm hương hay tinh dầu của nó có tác dụng rất tốt trong việc kích thích sự hoạt hoá của hệ tiêu hoá. Thường xuyên sử dụng trầm sẽ có thể tăng cường các chức năng giải độc cho cơ thể. Đồng thời làm giảm triệu chứng buồn nôn hay kích ruột.

Mặt khác, các hoạt chất có trong trầm còn giúp cơ thể đào thải đi một lượng nước dư thừa. Do đó, bạn sẽ đi tiểu nhiều hơn. Hệ cơ của hệ bài tiết và tiêu hoá nhờ vậy mà có được sự co giãn tốt. Hoạt động tiêu hoá cũng từ đó có sự cải thiện tích cực.

Đặc biệt một số thành phần trong tinh dầu trầm còn hỗ trợ tốt cho người

mắc các chứng bệnh liên quan đến đại tràng. Ví dụ như viêm đại tràng co thắt, viêm đại tràng mãn tính, chứng bệnh Crohn.

d. Làm giảm các ảnh hưởng của tiền mãn kinh ở nữ giới

Đối với phụ nữ đã và sắp bước sang giai đoạn tiền mãn kinh, cơ thể sẽ có nhiều thay đổi. Chẳng hạn như kinh nguyệt không đều, suy giảm ham muốn sinh lý, nhan sắc không còn tươi trẻ như trước. Đó là bởi hàm lượng hormone cơ thể của chị em không ổn định và chính các biến đổi thất thường của lượng hormone sẽ làm ảnh hưởng rất lớn tới đời sống sinh hoạt. Trâm hương hay những chất trong trâm có thể giúp cân bằng lượng hormone. Cụ thể, các hoạt chất có trong trâm sẽ điều chỉnh quá trình sản sinh estrogen. Điều này không chỉ có tác dụng làm giảm đi các triệu chứng của tiền mãn kinh mà còn nhiều hơn thế. Đó là việc làm giảm đi nguy cơ hình thành các khối u hoặc các nang.

e. Phòng ngừa ung thư hiệu quả

Trong y học phương Tây, ở Ấn Độ và Trung Quốc, hương trâm được sử dụng để điều trị bệnh ung thư, đặc biệt là với bệnh ung thư tuyến giáp trạng. Y học cổ truyền Trung Quốc coi trâm là vị thuốc có tác dụng chữa các bệnh đau bụng, tiêu chảy, hen suyễn, kích dục, tráng dương và tiêu hoá tốt [6].

Vào năm 2012, các nhà nghiên cứu đã tìm thấy hợp chất AKBA có trong trâm hương. Và cũng trong nghiên cứu này họ cũng chứng được sự liên hệ của AKBA với quá trình điều trị một số căn bệnh ung thư.

Bên cạnh đó, từ lâu nay trâm hương vẫn được đánh giá cao về khả năng giúp cơ thể tăng cường các chức năng miễn dịch. Nhờ vậy, cơ thể sẽ có sức kháng cự lại với bệnh tật tốt hơn, ngay cả bệnh ung thư.

f. Làm giảm các triệu chứng cảm cúm

Trâm hương có thành phần hỗ trợ đắc lực trong việc giảm đi những triệu chứng cảm cúm thông thường. Khả năng diệt khuẩn cao giúp tiêu diệt đi các loại virus gây cảm cúm. Đường hô hấp cũng được vệ sinh tốt.

g. Trâm hương là vật dâng cúng thiêng liêng nhất trong các tôn giáo.

Trâm hương có tính chất cháy cao, khi đốt tỏa mùi rất thơm và được cho là hương thơm hữu ích bậc nhất. Nhiều nước phương Đông có tập quán đốt trâm

hương hoặc nhang sản xuất từ trầm hương trong dịp cúng lễ tổ tiên, đất trời, thần thánh; đốt trầm hương để chữa bệnh, trừ tà, tạo sự may mắn, hưng phấn. Một số tôn giáo đốt trầm hương trong các nghi lễ được xem là vật giao lưu truyền cảm giữa con người của thế giới thực tại với thế giới thần linh, là hình thức dâng cúng linh thiêng cao quý nhất. Ở Nhật Bản ngày xưa cũng như ngày nay, sử dụng trầm hương là thể hiện nét thẩm mỹ, quyền lực kinh tế và chính trị.

Trầm hương còn sử dụng vào các mục đích khác như: Làm vật cất giữ có giá trị, quà biếu, vật trang trí đặc biệt nơi ở của vua chúa, của các vị chức sắc tôn giáo cấp cao; mang theo bên mình hoặc cất giữ trong nhà để phòng gió độc, tạo sự may mắn. Trầm hương còn dùng để chế tác đồ thủ công mỹ nghệ và một số vật dụng khác...[6]

1.3 Giới thiệu về một số chủng nấm cộng sinh ở cây Trầm hương

1.3.1 Giới thiệu về loài nấm *Aspergillus*.

a. Đặc điểm phân loại

Tên khoa học: *Aspergillus*

Ngành: Ascomycota

Lớp: Eurotiomycetes

Bộ: Eurotiales

Họ: Trichocomaceae

Chi: *Aspergillus*

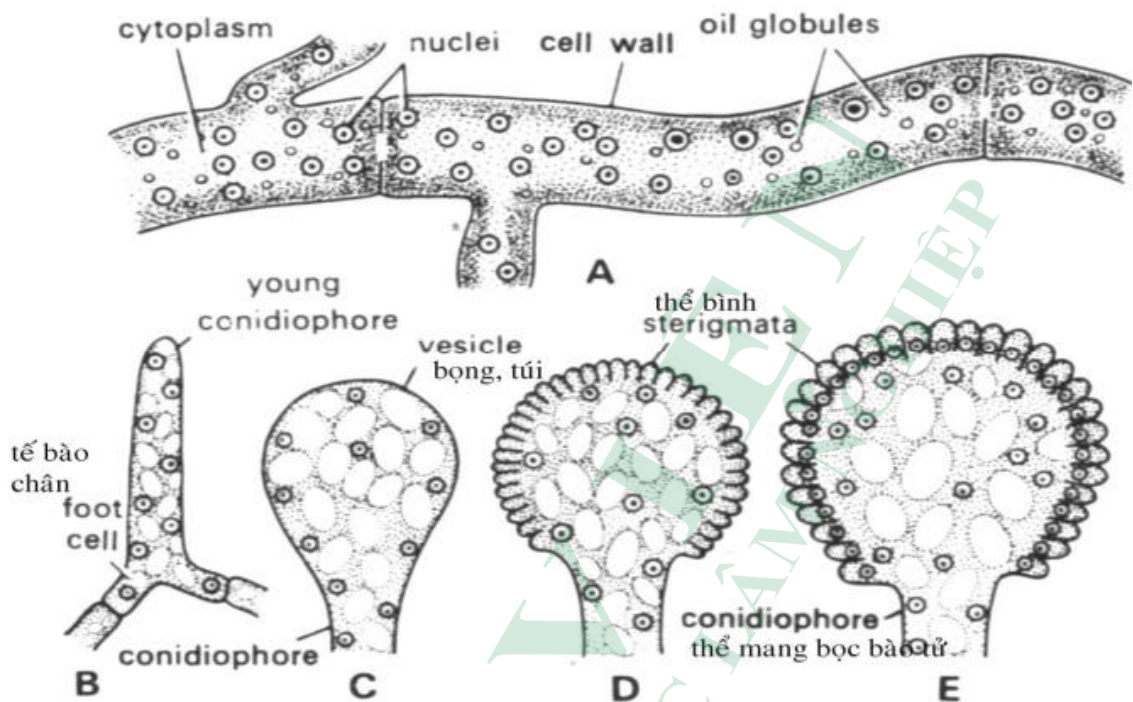
b. Đặc điểm hình thái

Sợi nấm có vách ngăn, cuống mang bào tử bụi phồng lên ở ngọn. Các chuỗi bào tử bụi từ đầu phồng mọc tỏa khắp mọi hướng. Bào tử bụi có thể màu vàng (*Aspergillus flavus*), màu đen (*Aspergillus niger*).

Khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn ngang hoàn chỉnh, nhiều khuẩn ty phát triển trên bề mặt cơ chất để hấp thu chất dinh dưỡng; đặc biệt ở vách ngăn ngang có một lỗ nhỏ để cho tế bào chất thông thương qua lại giữa hai tế bào; Khuẩn ty đứt thành khúc và mỗi khúc hay đoạn có thể phát triển cho ra một khuẩn ty mới.

Mỗi bào tử có đường kính khoảng 5 μm , vỏ bào tử có một đai mỏng bên

ngoài và mỗi bào tử nang nẩy mầm cho một khuẩn ty mới [10].



Hình 1.5: Nấm *Aspergillus* với khuẩn ty, cộng bào tử, túi và thể bình

1.3.2 Giới thiệu về loài nấm *Penicillium*

a. Đặc điểm phân loại

Tên khoa học: *Penicillium*

Ngành: Ascomycota

Lớp: Eurotiomycetes

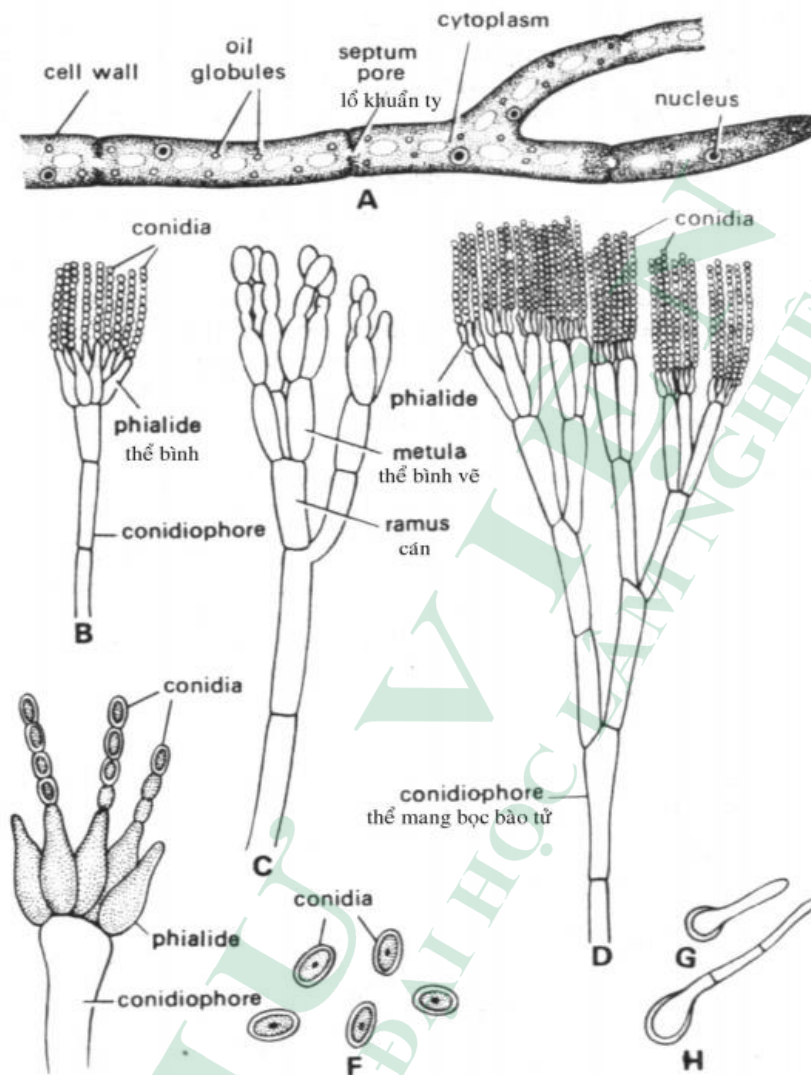
Bộ: Eurotiales

Họ: Trichocomaceae

Chi: *Penicillium*

b. Đặc điểm hình thái

Có hơn 100 loài được mô tả trong giống này, *Penicillium* có những đặc điểm chung với *Aspergillus* nhưng chúng có những đặc thù đã khiến cho nhiều nhà phân loại xếp chúng riêng hay đặt tên khác như *Talaromyces*, *Carpenteles*.



Hình 1.6: Nấm *Penicillium* với cộng bào tử, đỉnh bào tử, cán, thể bình vẽ, thể bình

Khuẩn ty của *Penicillium* phân nhánh, nhiều khuẩn ty có vách ngăn ngang và ngay chính khuẩn ty này có khả năng hấp thu chất dinh dưỡng để tạo ra cộng bào tử và đỉnh bào tử. Mỗi tế bào thường có một nhân nhưng nhiều khi có những tế bào có nhiều nhân, mỗi đoạn khuẩn ty có thể phát triển thành sợi khuẩn ty mới.

Penicillium sinh sản vô tính với cộng bào tử và đỉnh bào tử, cộng bào tử có thể không phân nhánh, phân nhánh bậc 1, 2 hay 3... và tận cùng của cộng bào tử là các thể bình, nếu cộng bào tử không phân nhánh thì tận cùng là các thể bình và các chuỗi đỉnh bào tử giống như cây cọ vẽ của các họa sĩ nên còn gọi là **thể bình vẽ** (metulae), **cán** (ramus) và **cọ vẽ** (penicillus). Đỉnh bào tử có dạng tròn có vách láng hay xần xùi nhưng chỉ có đơn nhân nhưng cũng có khi chúng có đa nhân.

Penicillium có đỉnh bào tử mang màu xanh đặc trưng và phát tán dễ dàng bởi gió và không khí.

Chỉ có một vài loài trong giống này có sinh sản hữu tính như *Penicillium vermiculatum*, *Penicillium stipitatum*.

Khuẩn ty chứa những tế bào đơn nhân phát triển thành túi noãn đơn nhân, túi noãn kéo dài và phân chia nhiều lần để cho ra khoảng 64 nhân, đồng thời, một túi đực cũng phát triển và quán lấy túi noãn đa nhân đó [10].

1.3.3 Giới thiệu về loài nấm *Fusarium*

Tên khoa học: *Fusarium*

Ngành: Ascomycota

Lớp: Ascomycetes

Bộ: Hypocreales

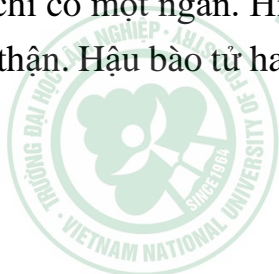
Họ: Nectriaceae

Chi: *Fusarium*

a. Đặc điểm hình thái

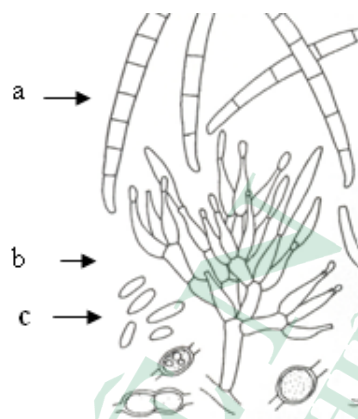
Sợi nấm phát triển mạnh, nấm biến đổi màu trắng đến màu tím violet, tản nấm thường sinh sắc tố màu hồng đến màu tím đậm trên môi trường PDA.

Bào tử lớn hình thành trên môi trường PDA có kích thước ngắn trung bình hoặc dài, phần lớn có 3 vách ngăn mỏng, một đầu nhọn hoặc thon nhọn, một đầu hình bàn chân, bào tử nhỏ hình thành trên cành bào tử phân sinh đơn nhánh thường không có màng ngăn ngang, đôi khi chỉ có một ngăn. Bào tử nhỏ hình thành trên cành bào tử phân sinh đơn nhánh ngắn thường không có màng ngăn ngang, đôi khi chỉ có một ngăn. Hình dạng bào tử thay đổi từ hình ovan, hình elip hoặc hình quả thận. Hậu bào tử hay bào tử vách dày rất bền và tồn tại độc lập trong thời gian dài.



Fusarium eumartii
(theo Von Arx, 1995)

- a. đại bào tử đỉnh
- b. tiểu bào tử đỉnh
- c. bào tử vách dày



Hình 1.7: Đỉnh bào tử của *Fusarium*

1.4 Một số công trình nghiên cứu cây tạo trầm

a. Trong nước

Trước nhu cầu ngày càng cao trên thế giới về Trầm hương nguyên liệu, cộng với giá cả ngày một tăng, thiên nhiên ưu đãi,... Hiện nay có rất nhiều dự án của các tổ chức và cá nhân trong và ngoài nước đầu tư vào trồng cây Dó bầu để tạo Trầm. Như ông Nguyễn Ngọc Toàn, chủ tịch Hội đồng quản trị công ty Fongsan đã đầu tư trồng 60 hecta Dó bầu tại xã An Khương, huyện Bình Long, tỉnh Bình Phước. Đến nay đã được 5 năm tuổi. Hiện nay ông Toàn và ông Sơn đã và đang gây tạo Trầm hương trên những cây Dó bầu này và bước đầu cũng đã thu được thành công. Chính vì vậy mà công ty này đã nhân rộng mô hình này tại nhiều tỉnh thành trong cả nước như: Quảng Nam, Đà Nẵng, Quảng Ngãi, Phú Yên, Lâm Đồng, Gia Lai,...

Ngoài ra ở nhiều tỉnh thành khác trên cả nước nhiều bà con nông dân cũng phát triển và trồng Dó bầu ngay tại những vùng đất của nhà mình. Theo kinh nghiệm dân gian họ truyền nhau và mày mò tìm cách tạo Trầm sao cho hiệu quả. Như cấy bột sắn vào cây, cấy mảnh bom, đạn, cho dầu vào các vết thương để dẫn dụ kiến. Khi kiến lên ăn dầu vô tình làm tổn thương cây. Qua quá trình thời gian cây sẽ tạo ra Trầm mắt kiến...

Đề tài điều tra số liệu khai thác Trầm ngoài tự nhiên của 59 cây Dó bầu của Viện khoa học Lâm nghiệp. Trong đó, 13 cây cho Trầm hương có khả năng xuất khẩu chiếm 21%, 21 cây có dấu hiệu hình thành Trầm hương ở các vị trí khác nhau trên cây chiếm 35,6% còn lại 25 cây không có Trầm hương [6].

Đề tài gây tạo Trầm hương bằng tác động cơ giới của Kỹ sư Nguyễn Hồng Lam - Trung tâm nghiên cứu Lâm đặc sản. Đề tài đã thực hiện trên 54 cây Dó bầu ở độ tuổi từ 6 đến 18 tuổi. Kết quả đối với 27 cây chỉ tác động cơ giới làm tổn thương cây mà không gây tác động gì thêm. Và theo định kỳ 2 năm quan sát một lần. Đối với 27 cây còn lại thì sau khi tác động cơ giới gây tổn thương cho cây, sau đó ta tiến hành phun dung dịch phòng bệnh Benlat 1%. Phun theo định kỳ 2 tháng một lần, và phun trong 3 lần. Kết quả cho thấy đối với 27 cây chỉ tác động cơ giới làm tổn thương mà không phun Benlat thì 2 năm đầu không thấy có dấu hiệu gì. Sau 4 năm, 6 năm, 8 năm có 2 cây tạo Trầm hương. Còn 27 cây sau khi gây chấn thương có sử dụng Benlat để phun thì không cho kết quả tạo Trầm hương. Vậy việc tạo Trầm có liên quan đến bệnh lý của cây.

Đề tài nghiên cứu khả năng tạo Trầm bằng chế phẩm sinh học (Lt) (Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam). Sau khi gây chấn thương bằng tác động cơ giới như đục khoan vào thân cây ở vị trí 0,8m, 1,2m, 1,5m so với mặt đất. Sau đó đưa chế phẩm sinh học vào vết thương. Đề tài tiến hành trên 3 nhóm tuổi khác nhau của cây Dó bầu. Nhóm 1 từ 4 – 8 tuổi. Nhóm 2 từ 10 – 14 tuổi. Nhóm 3 từ 16 đến 20 tuổi. Ngoài ra trong phạm vi đề tài còn đánh giá sự tạo Trầm ở rừng trồng tập trung và phân tán.

Kết quả cho thấy sự hình thành Trầm ở các nhóm lứa tuổi là như nhau. Sự tạo Trầm bằng chế phẩm sinh học không phụ thuộc vào độ tuổi. Tuy nhiên, cây có độ tuổi cao hơn đường kính gốc lớn hơn thì cho sản lượng Trầm nhiều hơn.

Từ năm 1996 đến năm 1998 GS.TS Trịnh Tam Kiệt (Đại Học Quốc Gia TP HCM) đã phối hợp với tổ chức rừng mưa nhiệt đới quốc tế và các sở Lâm nghiệp các tỉnh Kiên Giang, Lâm Đồng và Quảng Nam triển khai dự án gây tạo Trầm hương trên cây Dó bầu. Dự án đã sử dụng một số chế phẩm sinh học, hoá học để gây tạo Trầm hương trên cây Dó bầu trên cơ sở gây vết thương cơ giới. Cho đến nay các tác giả nay vẫn chưa công bố kết quả đạt được [2].

Huỳnh Văn Mỹ (1997) cho biết ở Tiên Phước (Quảng Nam) nông dân đã tự nghiên cứu xử lý kỹ thuật để tạo Trầm trên cây Dó bầu từ 10 năm tuổi trở lên. Kết quả sự tạo Trầm theo ý muốn. Đây là vấn đề mà các nhà khoa học cần nghiên cứu đánh giá và nhân rộng để có thể sản xuất đại trà [2].

b. Ngoài nước

Trên thế giới, việc nghiên cứu cấy tạo trầm đã được các nhà khoa học theo đuổi hơn 40 năm qua và đã có những thành công đáng kể. Ở Mỹ, trường Đại học Harvard đã nghiên cứu thành công phương pháp cấy tạo trầm vào những năm 80 của thế kỷ 20. Đến năm 1994 - 1995 trường ĐH Kyoto (Nhật), nghiên cứu thành công phương pháp cấy tạo trầm bằng men vi sinh và phương pháp này tiếp tục được GS. Gishi Honda thử nghiệm tại Trung Quốc với tỉ lệ thành công trên 80%. Những năm gần đây, GS. Gishi Honda (Nhật) và GS.TS Trần Kim Qui (Việt Nam) đã ứng dụng quy trình công nghệ sinh học này để gây tạo trầm trên thân gỗ của cây Dó bầu tại Lâm Đồng - Việt Nam, kết quả bước đầu cho thấy sau cấy men từ 6 - 12 tháng lượng trầm thu được trên một cây vào khoảng 700gr [2].

Ở Ấn Độ TS. Shiva thì cho rằng kết quả hình thành Trầm hương trong tự nhiên có liên quan đến bệnh lý của cây. Nhưng nguồn gốc gây bệnh thì tác giả chưa có kết luận.

Ở Malaysia sau khi tìm hiểu và nghiên cứu về vấn đề tạo Trầm hương ngoài tự nhiên thì tiến sĩ khoa học Julajudin đã đi đến kết luận. Quá trình hình thành Trầm ngoài tự nhiên có liên quan đến bệnh lý của cây. Nguồn gốc hình thành Trầm là do sự cộng sinh của loài nấm *Criptophoerica Mangifera* với thân gỗ mà thành.

Năm 1989 tiến sĩ Naiyna Thongijem và các cộng sự (Thái Lan) nghiên cứu về vấn đề tạo Trầm cho rằng quá trình hình thành Trầm hương trên cây Dó bầu là kết quả cộng sinh của các loài nấm *Cephalos Potrium*, *Fusarium*, *Botriodiplodia*, *Chactomium* [6].



PHẦN 2

MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Mục tiêu nghiên cứu

2.1.1 Mục tiêu chung

Phân lập và định danh được một số dòng nấm từ thân cây Dó bầu có trầm tự nhiên ở Khánh Hoà. Bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh có khả năng kích thích tạo trầm hương.

2.1.2 Mục tiêu cụ thể

- Phân lập và định danh được 3 - 5 chủng nấm từ thân cây Dó bầu có trầm tự nhiên ở Khánh Hoà.
- Bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh có khả năng kích thích tạo trầm hương.

2.2 Nội dung nghiên cứu

- Phân lập một số chủng nấm từ thân cây Dó bầu có trầm tự nhiên ở Khánh Hoà.
- Định danh các dòng nấm phân lập được: Định danh thông qua hình thái và định danh thông qua sinh học phân tử.
- Bước đầu nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh có khả năng kích thích tạo trầm hương:
 - + Nghiên cứu môi trường dinh dưỡng để nhân sinh khối sợi nấm.
 - + Nghiên cứu công thức phối trộn các dòng nấm.

2.3 Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu: Thân cây Dó bầu có trầm tự nhiên ở Khánh Hoà.
- Các thiết bị:
 - + Tủ cấy vô trùng
 - + Máy đo pH
 - + Máy lắc
 - + Nồi hấp
 - + Máy xay
- Dụng cụ:

- + Bình tam giác, bình trụ
- + Đĩa petri
- + Lam kính
- + Que cấy
- + Pipet, đầu côn
- + Túi nilon bịt miệng bình
- + Đèn cồn
- + Panh kéo
- + Kéo, bông sạch
- + Nồi, dao
- Hoá chất:
 - + Cồn 96⁰, cồn 70⁰
 - + Lugol, xanh metylen
 - + Kháng sinh Cefotaxime
 - + Pepton, cao nấm men
 - + Bột ngô hoặc bắp ngô tươi
 - + Đường sucrose, Glucose
 - + Agar
 - + Khoai tây
 - + NaOH 10% , NaCl 5%
 - + Dầu soi kính

2.4 Phương pháp nghiên cứu

2.4.1 Tiến hành xử lý mẫu

Sau khi mẫu được đưa về phòng thí nghiệm, tiến hành bảo quản mẫu ở tủ mát và tiến hành xử lý. Mẫu là khối thân gỗ Dó bầu đã hình thành Trầm trong thân gỗ vậy nên để phân lập được thì phải là lộ phần gỗ nhiễm Trầm ra ngoài bằng cách dùng dao hay cưa chặt để có thể thấy phần gỗ bị nhiễm Trầm.

Khi phần thân cây có Trầm đã lộ ra thì tiếp tục làm vô trùng để loại bỏ hết phần mẫu bị nhiễm từ bên ngoài bằng cách cạo bỏ lớp gỗ và lớp Trầm hình thành ở bề mặt ngoài. Khi đã lọc sạch lớp vỏ bên ngoài thì tiến hành lấy mẫu, trước khi lấy mẫu thì lấy bông tẩm cồn 70⁰ lau vào phần gỗ mà cần lấy mẫu sau đó dùng

dao dùng dao cắt mỏng phần gỗ khoảng 2 - 3 mm phần có màu nâu sẫm hoặc đen để cấy vào môi trường phân lập nấm.

Có thể cắt mẫu thành nhiều miếng nhỏ cho bình thủy tinh rửa bằng nước cất vô trùng sau đó lại rửa lại bằng cồn 70⁰ một lần nữa rồi tiếp tục rửa lại bằng nước cất để sạch cồn sau đó lấy mẫu để lên giấy cho khô rồi đem cấy lên môi trường phân lập nấm.



Hình 2.1: Thân cây Dó bầu đã có trâm trong tự nhiên ở Khánh Hòa

2.4.2 Chuẩn bị môi trường phân lập

Các môi trường phân lập có bổ sung kháng sinh cefotaxime:

(1) Môi trường PDA:

Thành phần:	Hàm lượng (g/l)
Khoai	100
Sucrose	20
Agar	16

(2) Môi trường PT:

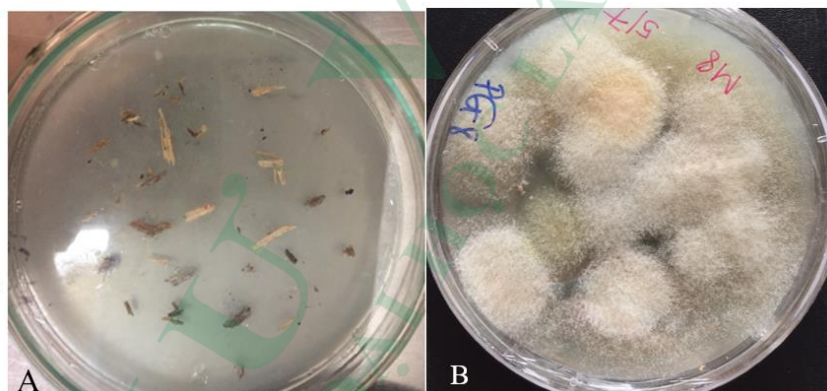
Thành phần:	Hàm lượng (g/l)
Pepton	10
Cao nấm men	5
Sucrose	20
Agar	16

(3) Môi trường NG:

Thành phần:	Hàm lượng (g/l)
Ngô nếp tươi	100
Sucrose	20
Agar	16

2.4.3 Tiến hành cấy mẫu và theo dõi

Sau khi môi trường đã chuẩn bị xong tiến hành cấy mẫu như sau: những mẫu đã được cắt nhỏ và được xử lý ta tiến hành cấy lên môi trường trên đĩa petri. Cấy cho môi trường đĩa 5 - 10 mẫu rải đều trên đĩa petri, cấy như vậy với tất cả các mẫu khi cấy xong thì bảo quản trong ở nhiệt độ phòng ở 25⁰C. Sau đó theo dõi hàng ngày các đĩa đã cấy của từng loại môi trường.



Hình 2.2: Đĩa môi trường đã được cấy mẫu (A) và mẫu sau 7 ngày nuôi cấy (B)

2.4.4 Tiến hành cấy chuyển (truyền)

Là bước trung gian giữa phân lập mẫu và làm thuần các dòng nấm phân lập được. Giai đoạn này giúp ta xác định riêng từng dòng nấm được phân lập. Kiểm tra các đĩa đã cấy và quan sát sự phát triển của sợi nấm từ các miếng mẫu cấy.

Xác định xem có nhiều loại nấm mọc lên hay không. Cấy chuyển (truyền) khi sợi nấm đã mọc lan được 5mm đến 1cm.

Cứ cấy chuyển nhiều lần cho tới khi các sợi nấm giống nhau về đặc điểm hình thái thì thôi cấy và đưa những mẫu đã thuần bảo quản để tiện cho nghiên cứu các thí nghiệm sau.

2.4.5 Phương pháp định danh nấm

2.4.5.1. Phương pháp sơ bộ định danh thông qua các đặc điểm hình thái nấm

Sau nhiều lần cấy chuyển các chủng nấm đã phân lập thu được các chủng nấm đã thuần khiết không bị nhiễm tạp với các chủng nấm khác. Tiến hành quan sát đặc điểm khuẩn lạc, hình thái sợi, sự hình thành bào tử và biến đổi màu sắc của bào tử nấm bằng mắt thường.

Khi hệ sợi nấm bắt đầu sinh bào tử ta tiến hành quan sát bào tử nấm dưới kính hiển vi phóng đại 100 lần để nhận biết đặc điểm bào tử và hệ sợi của các chủng nấm đã phân lập được.

Nhận xét đặc điểm khuẩn lạc, hình thái sợi nấm, sự thay đổi sắc tố và hình ảnh hiển vi của các chủng nấm để tiến hành định danh sơ bộ các chủng nấm đã phân lập.

2.4.5.2. Phương pháp định danh tên loài bằng sinh học phân tử

a. Tách chiết DNA tổng số

Nguyên lý tách chiết ADN từ tế bào vẫn gồm các bước cơ bản sau:

- Phá màng tế bào

Phá màng tế bào, màng nhân: nghiền tế bào, mô trong dung dịch chất tẩy (SDS) và proteinase để phá vỡ màng tế bào, màng nhân, giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA.

Chất tẩy là phân tử lưỡng cực, sẽ kết hợp với protein màng và các phân tử phospholipid làm phá vỡ cấu trúc màng. Chất tẩy ion hóa có tác dụng phá màng mạnh, chất tẩy không ion hóa có tác dụng phá màng nhẹ hơn.

- Loại protein

Sau khi phá vỡ tế bào, DNA sẽ được trộn lẫn với các thành phần khác của tế bào chủ yếu là protein trong dung dịch. Việc quan trọng lúc này là tách DNA ra khỏi thành phần protein của tế bào. Để thực hiện bước này người ta chủ yếu sử dụng hỗn hợp Phenol/Chloroform. Phenol-Chloroform không tan trong nước nhưng có khả năng làm biến tính protein. Do đó, protein sẽ bị tủa lại khi gặp phenol. Trong khi đó DNA thì không bị tủa bởi phenol nên vẫn tan trong nước. Khi ly tâm Phenol/Chloroform nặng sẽ lắng xuống dưới, protein tủa sẽ nằm tại

đang giới của nước và phenol, còn DNA thì nằm lại trong pha nước ở phía trên. Thu pha nước chứa DNA này để thực hiện các bước tiếp theo.

- Tủa Nucleic acid

Sau bước tủa protein, DNA thu được nằm trong dung dịch với dung môi là nước. Sử dụng Ethanol hoặc Isopropanol để tủa DNA trong dung dịch. Sau đó ly tâm để thu cặn DNA. Cặn DNA này có thể được rửa trong Ethanol 70% một hoặc hai lần để làm sạch mẫu. Tiếp theo để cho bay hơi cồn và huyền dịch hóa cặn DNA thu được trong đệm.

b. Tiến hành PCR

PCR là quá trình tổng hợp sợi DNA mới dựa trên DNA khuôn nhờ hoạt động xúc tác của enzyme DNA polymerase.

Thành phần của phản ứng PCR:

- DNA mẫu (template) chứa mảnh DNA cần khuếch đại.
- Cặp mồi (primer) là các đoạn DNA ngắn (dưới 50bp) để xác định điểm bắt đầu và kết thúc vùng cần khuếch đại.

Tên mồi	Trình tự (5' - 3')	Kích thước sản phẩm PCR
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	~700 bp
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
16sF	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~1400 bp
16sR	GGTTACCTTGTTACGACTT	

- DNA-polymerase enzym xúc tác cho việc nhân lên của DNA.
- Nucleotides (dNTP) là nguyên liệu cho DNA - polymerase tổng hợp DNA mới.
- Dung dịch đệm, cung cấp môi trường hóa học cho DNA -polymerase.

Các bước thực hiện:

- Bước 1: Khởi đầu: Đun hỗn hợp ở 96⁰C trong vòng 5 phút để đảm bảo sợi

DNA cũng như mồi được làm nóng.

- Bước 2: Biến tính (Melting): DNA khuôn ở dạng sợi đôi được tách thành 2 sợi đơn.
- Bước 3: Gắn mồi (Annealing): Mồi được gắn vào DNA khuôn ở vị trí có trình tự bổ sung, bắt đầu quá trình tổng hợp.
- Bước 4: Kéo dài (Elongation): Các nucleotide được gắn vào chuỗi theo nguyên tắc bổ sung với DNA khuôn.
- Bước 5: Lặp lại bước 2 - 4 (số lần lặp lại là số chu trình nhiệt, tùy thuộc vào từng loại phản ứng PCR).

c. Phân tích giải trình tự và xác định tên loài nấm

Trình tự nucleotide của các chủng nấm được so sánh với các trình tự đã có trên Genbank, sử dụng phần mềm BLAST trong NCBI (website the National Center for Biotechnology Information). Trình tự các mẫu nấm thu được và các mẫu tương đồng trên ngân hàng gen được sử dụng để phân tích trình tự và phá hệ bằng các phần mềm BioEdit 7.0, Clustal X2 và MEGA7.0.

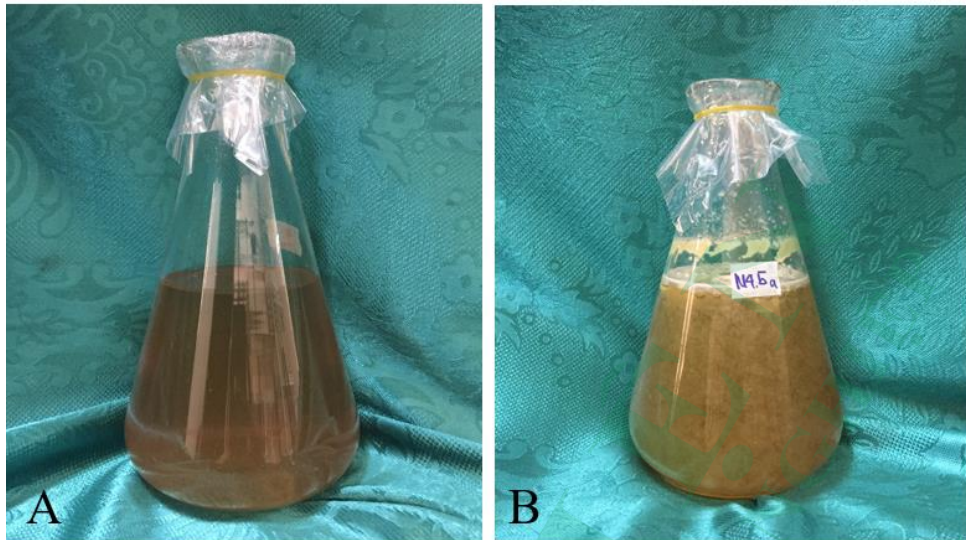
2.4.6 Môi trường dinh dưỡng để nhân sinh khối sợi nấm

Sử dụng môi trường lỏng có bổ sung kháng sinh cefotaxime:

Thành phần:	Hàm lượng (g/l)
Dịch chiết khoai, giá đỗ	100
Pepton	6
Cao nấm men	3
Sucrose	20

2.4.7 Tiến hành cấy nấm vào môi trường lỏng

Nấm sau khi đã phân lập và định danh được cấy vào môi trường lỏng. Nuôi cấy trong điều kiện thường. Quan sát màu sắc dịch thay đổi trong các bình tam giác sau 24 giờ đến 48 giờ nuôi.



Hình 2.3: Môi trường trước khi cấy chủng nấm (A) và sau khi cấy chủng nấm (B)

2.4.8 Tạo công thức phối trộn các dòng nấm

Các dòng nấm nuôi trong môi trường lỏng 48h được sử dụng để phối trộn thành các công thức khác nhau, cụ thể các công thức như trong bảng 2.1.

Bảng 2.1: Công thức phối trộn các dòng nấm

Thể tích Chủng nấm	Công thức		
	G5	G7	G8
M4.1a (ml)	10	30	20
M4.3 (ml)	30	20	10
M4.5a (ml)	10	20	30
M4.7 (ml)	30	20	10
H4.13 (ml)	20	10	30
Tổng dịch nấm	100ml	100ml	100ml

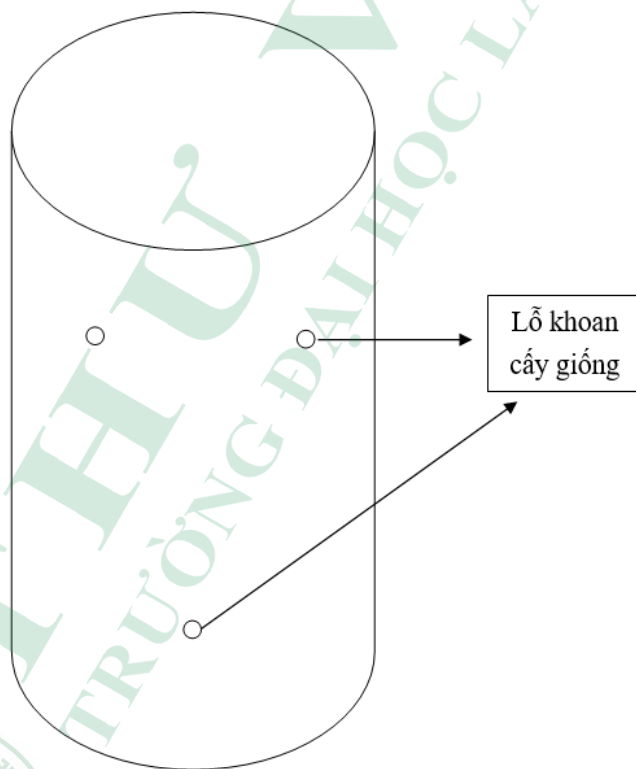
2.4.9 Thí nghiệm cấy chế phẩm vi sinh vào thân cây Dó bầu

Sau khi đã chuẩn bị đủ các công thức phối trộn thì tiến hành bố trí thí nghiệm cấy chế phẩm vi sinh vào thân cây Dó bầu ở Khánh Hoà.

Các cây Dó bầu đã được chọn để bố trí thí nghiệm được đánh dấu và khoan những vị trí được đánh dấu. Bố trí các lỗ khoan sole nhau. Sao cho mỗi mũi khoan

cách nhau 50cm theo chiều dài thân cây. Các lỗ sole nhau 20 - 25cm theo chiều ngang thân. Với bố trí mũi khoan như vậy thì tất cả các mũi khoan, từng đôi một sẽ không nằm trên một đường thẳng của mạch gỗ. Khi đã tính toán và đánh dấu chính xác vị trí các lỗ cần khoan thì tiến hành khoan. Mũi khoan có đường kính 1,2 - 1,5cm, và khoan sâu vào thân cây khoảng 8 - 10cm.

Tiến hành pha loãng chế phẩm với nước sạch theo tỉ lệ 1:2, dùng ống truyền dịch y tế để chuyển dịch vi sinh vào trong các lỗ đã khoan với thể tích 100ml dịch đã pha/lỗ. Tốc độ truyền dịch 200ml/h. Sau khi đã bố trí xong thí nghiệm thì tiếp tục theo dõi sự phản ứng của cây với chế phẩm vi sinh cũng như sự sinh trưởng và phát triển của cây. Lấy số liệu sau 03 tháng cấy chế phẩm vi sinh vào thân cây Dó bầu.



Hình 2.4: Sơ đồ bố trí lỗ khoan cây chế phẩm vi sinh trên thân cây Dó bầu

2.5 Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần và số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng.

PHẦN 3

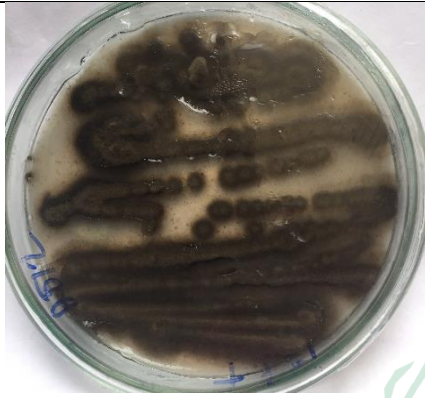
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập các chủng nấm từ cây Dó bầu

Tiến hành phân lập mẫu thân cây Dó bầu đã có trầm tự nhiên trên các môi trường khác nhau. Sau nhiều lần cấy chuyển liên tục để tạo được các dòng thuần, kết quả thu được các chủng nấm tạo Trầm hương, được ký hiệu là M4.1a, M4.3, M4.5a, M4.7 và M4.13 (Bảng 3.1).

Bảng 3.1: Kết quả phân lập các chủng nấm từ cây Dó bầu

STT	Tên mẫu	Hình ảnh	Mô tả
1	M4.1a		Sợi nấm màu trắng, bào tử màu xanh bột. Có sắc tố màu vàng tiết ra môi trường. Bào tử tập trung ở tâm, sau đó lan dần theo vòng tròn.
2	M4.3		Sợi nấm màu trắng, bông, xốp. Sợi mọc theo hình tròn. Bào tử màu đen.
3	M4.5a		Sợi nấm màu trắng, khi già có bào tử màu vàng xốp.

4	M4.7		<p>Sợi nấm màu đen, mọc theo kiểu từng khuẩn lạc hình tròn.</p>
5	M4.13		<p>Sợi nấm có màu trắng. Khi già có bào tử xanh bột mịn, mọc từ tâm sau đó lan dần theo vòng tròn. Có tiết sắc tố màu vàng ra môi trường.</p>

3.2 Kết quả định danh tên loài các chủng nấm phân lập được.

3.2.1 Kết quả sơ bộ định danh thông qua các đặc điểm hình thái nấm

3.2.1.1. Đặc điểm hình thái của chủng M4.1a

Hình thái bên ngoài: Sợi nấm màu trắng, bào tử màu xanh bột. Có sắc tố màu vàng tiết ra môi trường. Bào tử tập trung ở tâm, sau đó lan dần theo vòng tròn.

Hình thái hiển vi: hệ sợi nấm mang bào tử trần trên cụm sợi nấm. Có vách ngăn giữa hai tế bào.



Hình 3.1: Chủng nấm M4.1a trên đĩa thạch (A) và trên kính hiển vi (B)

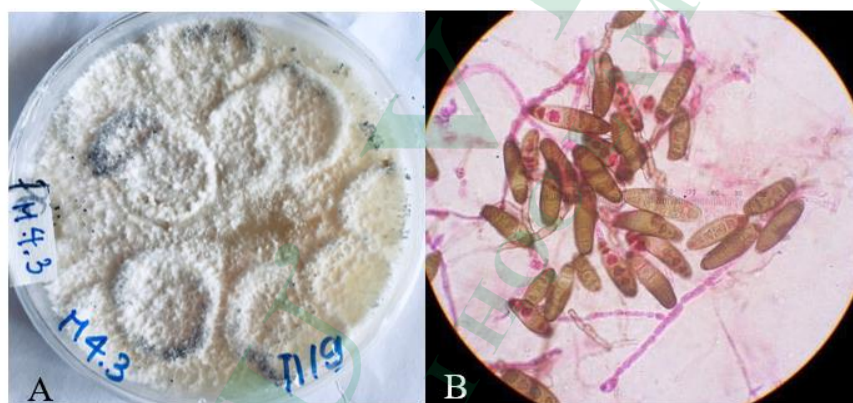
Theo như (*Jaladaddin*) năm 1997 thì chủng có ký hiệu M4.1a mang tương đối đầy đủ đầy đủ các đặc điểm hình thái về bào tử, hình thái về màu sắc của chủng nấm *Penicillium*

Dựa vào khoá phân loại, so sánh các đặc điểm đã quan sát được, kết luận sơ bộ chủng nấm có ký hiệu M4.1a thuộc chi *Penicillium*.

3.2.1.2. Đặc điểm hình thái của chủng M4.3

Hình thái bên ngoài: Sợi nấm màu trắng, bông, xốp. Mọc theo hình tròn. Bào tử màu đen.

Hình thái hiển vi: Bào tử có màu nâu nhạt, hình ovan hẹp hai đầu.



Hình 3.2: Chủng nấm M4.3 trên đĩa thạch (A) và trên kính hiển vi (B)

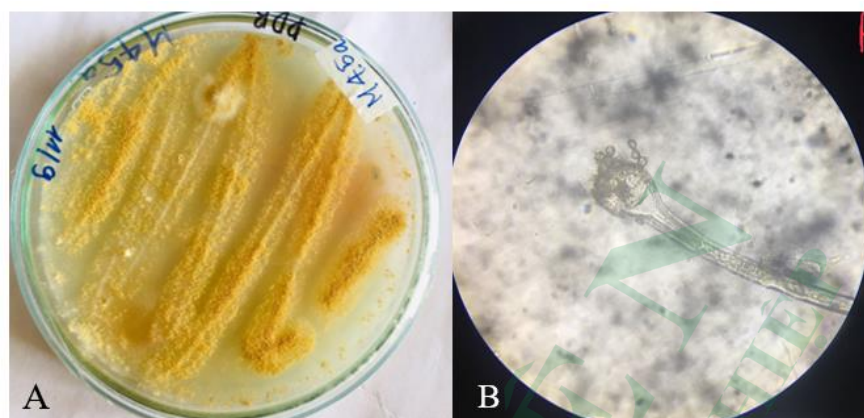
Dựa vào khoá phân loại, so sánh các đặc điểm đã quan sát được, kết luận sơ bộ chủng nấm có ký hiệu M4.3 thuộc chi *Pestalotiopsis*. Barr (1990), Nag Raj (1993) cũng đã mô tả chi *Pestalotiopsis* có đầy đủ các đặc điểm như trên.

3.2.1.3. Đặc điểm hình thái của chủng M4.5a

Hình thái bên ngoài: Sợi nấm màu trắng, khi già có bào tử màu vàng xốp.

Hình thái hiển vi: có cọng mang túi bào tử, chùy và thể bình đính bào tử.





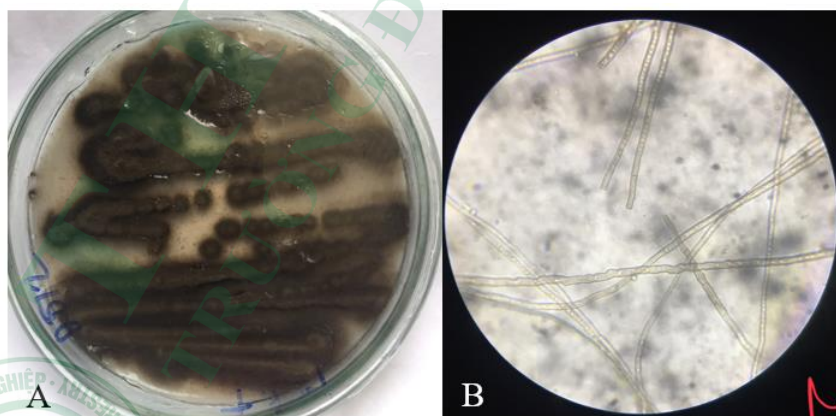
Hình 3.3: Chủng nấm M4.5a trên đĩa thạch (A) và trên kính hiển vi (B)

Dựa vào khoá phân loại, so sánh các đặc điểm đã quan sát được, kết luận sơ bộ chủng nấm có kí hiệu M4.4a thuộc chi *Aspergillus*. Muthuraj Sangareswari Nagajothi và các cộng sự (2016) cũng đã phân lập thành công chủng *Aspergillus* mang các đặc điểm tương tự [11].

3.2.1.4. Đặc điểm hình thái của chủng M4.7

Hình thái bên ngoài: Sợi nấm màu đen, mọc theo kiểu từng khuẩn lạc hình tròn.

Hình thái hiển vi: Sợi nấm có các vách ngăn rõ.



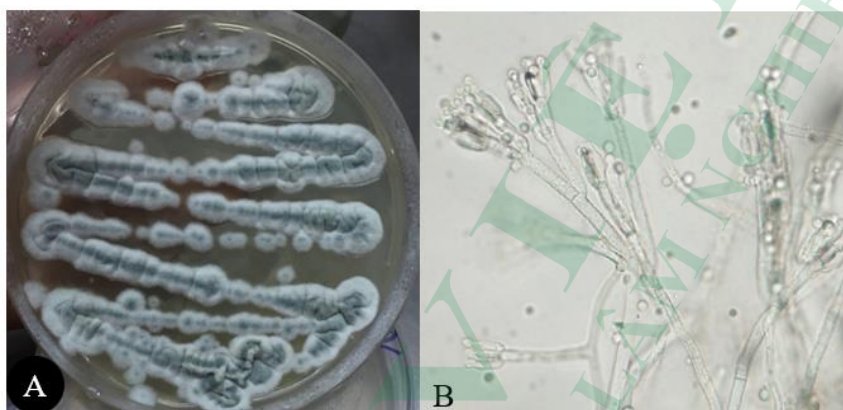
Hình 3.4: Chủng nấm M4.7 trên đĩa thạch (A) và trên kính hiển vi (B)

Dựa vào khoá phân loại, so sánh các đặc điểm đã quan sát được, kết luận sơ bộ chủng nấm có kí hiệu M4.7 có thể thuộc chi: *fonsecaea*. Claudio Guedes Salgado và các cộng sự đã phân lập được chủng *fonsecaea pedrosoi* từ gai của cây *Mimosa pudica* L. với hình thái bên ngoài và hiển vi giống như chủng M4.7 [12].

3.2.1.5. Đặc điểm hình thái của chủng M4.13

Hình thái bên ngoài: Sợi nấm có màu trắng. Khi già có bào tử xanh bột mịn, mọc từ tâm sau đó lan dần theo vòng tròn. Có tiết sắc tố màu vàng ra môi trường.

Hình thái hiển vi: hệ sợi nấm mang bào tử trần trên cụm sợi nấm. Có vách ngăn giữa hai tế bào.



Hình 3.5: Chủng nấm M4.13 trên đĩa thạch (A) và trên kính hiển vi (B)

Dựa vào khoá phân loại, so sánh các đặc điểm đã quan sát được, kết luận sơ bộ chủng nấm có kí hiệu M4.13 thuộc chi *Penicillium*. Muthuraj Sangareswari Nagajothi và các cộng sự (2016) cũng đã phân lập thành công chủng *Penicillium* trên thân cây Dó bầu với các đặc điểm giống như chủng M4.13 [11].

3.2.2 Kết quả định danh tên loài bằng sinh học phân tử

3.2.2.1. Chủng nấm M4.1a

Kết quả giải trình tự gen chủng nấm M4.1a, với 559 nucleotid có trình tự dưới đây:

```
GCGGGGGGGTAGGGACCTCTGGGTCCACCTCCCACCCGTGTTTATTT  
TACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAATGGCCGCCAAGGGGGCT  
TACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAATACACCCTCGAACTCTGTCT  
GAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAAC  
AACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  
ATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAAC  
GCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGT  
CATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGAT
```

CTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTC
 CTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCG
 CTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTA
 GGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Sequences producing significant alignments

Download Manage Columns Show 100

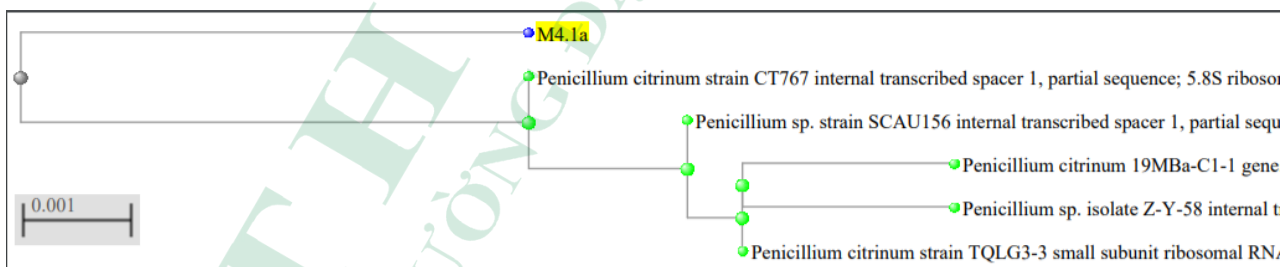
select all 0 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum strain CT767 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c	904	904	96%	0.0	98.82%	KX056227.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum strain ZSF5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	904	904	97%	0.0	98.63%	KT844552.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum isolate T20-16 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2,	902	902	96%	0.0	98.82%	GU134892.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum strain OY30207 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and i	902	902	96%	0.0	98.63%	FJ571468.1
<input type="checkbox"/> Penicillium sp. strain SCAU156 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, cc	900	900	97%	0.0	98.44%	MF135519.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum isolate SRG8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2,	898	898	97%	0.0	98.43%	MK748316.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum isolate P.H.S4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,	898	898	97%	0.0	98.43%	MN535093.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum 19Mba-C1-1 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	898	898	97%	0.0	98.43%	LC514694.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum strain AKF2-KU small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA ge	898	898	97%	0.0	98.43%	MN879404.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum strain yx-001 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	898	898	97%	0.0	98.43%	MN826202.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum strain DTO 390-F2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RN	898	898	97%	0.0	98.43%	MN788102.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum isolate RSO_OC17_74 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed	898	898	97%	0.0	98.43%	MN634643.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum strain TQLG3-3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA ge	898	898	96%	0.0	98.62%	MN396684.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum strain QJF-22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	898	898	97%	0.0	98.43%	MN319561.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum strain NG12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c	898	898	96%	0.0	98.62%	MN272406.1
<input type="checkbox"/> Penicillium citrinum isolate Amrita2K18 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spac	898	898	97%	0.0	98.43%	MN243683.1

Hình 3.6. Kết quả so sánh trình tự gen chủng M4.1a trên BLAST NCBI

Xây dựng cây di truyền:



Hình 3.7: Sơ đồ cây di truyền của chủng M4.1a

Kết quả xây dựng cây tiến hóa, xác định loài cho thấy chủng M4.1a có quan hệ gần gũi với loài *Penicillium citrinum* với mức độ tương đồng là 98,82%.

Năm 2016, Muthuraj Sangareswari Nagajothi và các cộng sự đã phân lập gỗ Tràm hương trong tự nhiên, thấy sự hiện diện của các chủng nấm *Aspergillus*, *Lasiodiplodia*, *Chaetomium*, *Fusarium* và *Penicillium*[11].

Vậy, chủng M4.1a thuộc chi *Penicillium*.

3.2.2.2. Chủng nấm M4.3

Kết quả giải trình tự gen chủng nấm M4.3, với 515 nucleotid có trình tự dưới đây:

GGGGGTTTTAACTCCCACCCATGTGGACTTACCTTTTGTTCCTCGGC
 AGAAGTTATAGGTCTTCTTATAGCTGCTGCCGGTGGACCATTAACT
 CTTGTTATTTTATGTAATCTGAGCGTCTTATTTTAATAAGTCAAACCT
 TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
 AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC
 TTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTC
 GAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTTGGGAATCTACTT
 CTTTATAGTTGTAGTTCCTGAAATACAACGGCGGATTTGTAGTATCCT
 CTGAGCGTAGTAATTTTTTCTCGCTTTTGTAGGTGCTATAACTCCC
 AGCCGCTAAACCCCAATTTTTTGTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
 AATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Sequences producing significant alignments

Download Manage Columns Show 100

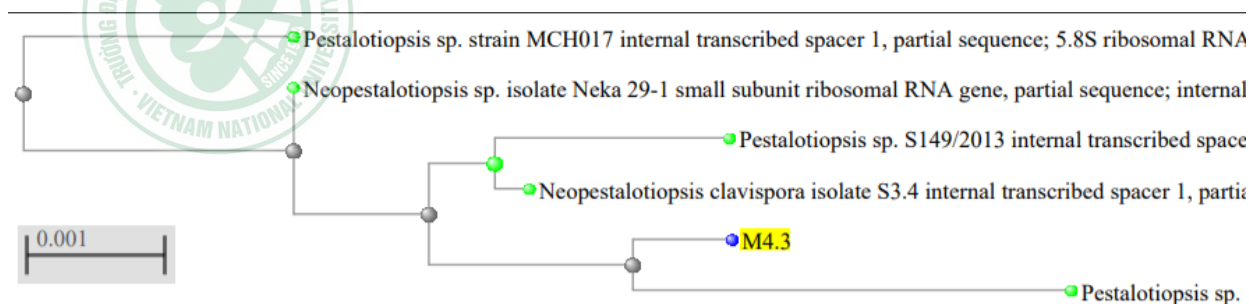
select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis sp. S149/2013 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	935	935	100%	0.0	99.42%	KM041695.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis microspora strain IRNHM-PS1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe	933	933	99%	0.0	99.42%	KU720061.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis sp. DBT119/2013 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, co	928	928	99%	0.0	99.22%	KM041690.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis sp. strain MCH036 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, ..	926	926	99%	0.0	99.41%	MT102584.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis sp. strain MCH014 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, ..	926	926	99%	0.0	99.22%	MT102573.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis sp. S120/2013 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	926	926	99%	0.0	99.41%	KM041694.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis sp. strain MCH040 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, ..	924	924	100%	0.0	99.03%	MT102586.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis sp. strain MCH005 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, ..	924	924	99%	0.0	99.22%	MT102567.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis mangiferae isolate PM small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	924	924	98%	0.0	99.61%	MN888956.1
<input checked="" type="checkbox"/> Neopestalotiopsis sp. isolate FX24 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA ge	924	924	98%	0.0	99.61%	MK026896.1
<input checked="" type="checkbox"/> Neopestalotiopsis sp. isolate FX12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA ge	924	924	98%	0.0	99.61%	MK026889.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis sp. IDEA_FITOPAT_D102 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed sp	924	924	98%	0.0	99.61%	KU377508.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fungal endophyte isolate 6314 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, co	924	924	98%	0.0	99.61%	KR016379.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis mangiferae strain BPC88 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, i	924	924	98%	0.0	99.61%	KM510410.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fungal endophyte culture-collection STRI/ICBG-Panama TK1524 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5	924	924	98%	0.0	99.61%	KF436383.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pestalotiopsis sp. DBT137/2013b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, ..	924	924	99%	0.0	99.22%	KM041693.1

Hình 3.8: Kết quả so sánh trình tự gen chủng M4.3 trên BLAST NCBI

Xây dựng cây di truyền:



Hình 3.9: Sơ đồ cây di truyền của chủng M4.3

Kết quả xây dựng cây tiến hóa, xác định loài cho thấy chủng M4.3 có quan hệ gần gũi với *Pestalotiopsis sp.* với mức độ tương đồng là 99,42%.

Nutan Kaushik và cộng sự đã phân lập được cộng đồng nấm và vi khuẩn cư trú bên trong thân cây *A. malaccensis* và đất lách, các mẫu được thu thập từ 21 địa điểm khác nhau của bang Assam ở Đông Bắc Ấn Độ. Chi *Pestalotiopsis* và *Penicillium* rất thích hợp để kích thích sản xuất gỗ trầm hương nhanh chóng trong vòng 3 tháng sau thời gian nhiễm bệnh [12].

Vậy, chủng M4.3 thuộc chi *Pestalotiopsis*

3.2.2.3. Chủng nấm M4.5a

Kết quả giải trình tự gen chủng nấm M4.5a, với 571 nucleotid có trình tự dưới đây:

```
CGGAGCATAGTCATTCGATCGAGCCTCCACCCGTGTATAACCGTACCT
TGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCGGCGAAGCGTAGCTAAACCAAGCTTTT
TATCCACAGTCCCAAGGGTTTTATTATTGAATAGTCAAACCTTTCACCTG
TCTGTCTTTTGTTCCTCGCGTCCATTTGTAACGCAGCCAGATAAAACT
TTAACATGGATTGCCTAGATTCCGGAATCATTGAATATTTGAACGA
AATTTGATAATTTTGGTATTTTGCAGAATTCGCTGGATTGAGCGTCCT
TTCACCCTCAATCCCCCCCCTTGGTATTCGGGGGATACGCCAGGTCCG
ATCGTCATAGTTTCCCTTAAGAACGTATTGTGTGTGGGTTAGGCTTCC
CCCCGGGGCCGATTTTGATAGTGGGGCGCCACAACCTGATTCCGTACCT
TGGACGTATGGTCCTGTACCACCCGCCCTTGTACTCCAGCCTGGCGCT
GGCCGAAGCAAAAAGCAACCAACTGTTTCTCCAGGTTGACCTCGGA
TCAGGAAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATTAACGGGGAG
GA
```



Sequences producing significant alignments							Download	Manage Columns	Show	100	
select all 100 sequences selected							GenBank	Graphics	Distance tree of results		
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus subramaninii strain AsH47Z01 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed	182	266	85%	2e-41	74.72%	MK952340.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus sclerotiorum strain ASH4602 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed sp	182	266	85%	2e-41	74.72%	MK952335.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus sp. CLMG-2020b culture FRR-6049 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcr	176	260	85%	1e-39	74.49%	MT179307.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus subramaninii strain 1901NT-1.40.2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcr	176	176	76%	1e-39	74.49%	MN577309.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Microascus sp. strain M.H47Z02 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, comple	176	260	83%	1e-39	74.65%	MK952341.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus subramaninii strain AsH46S01 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed	176	260	85%	1e-39	74.49%	MK952336.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus sclerotiorum isolate PJM2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spac	176	260	85%	1e-39	74.49%	MK762556.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus sp. strain Bdf-5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, anc	176	260	85%	1e-39	74.49%	MH681595.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus sclerotiorum strain SCAU092 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed sp	176	260	85%	1e-39	74.49%	MF061754.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus subramaninii NRRL 6161 ITS region, from TYPE material	176	260	85%	1e-39	74.49%	NR_135385.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus subramaninii strain DTO:266-I5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g	176	260	85%	1e-39	74.49%	KP329839.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus subramaninii strain DTO:129-G4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	176	260	83%	1e-39	74.49%	KP329826.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus subramaninii strain DTO:129-E6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	176	260	85%	1e-39	74.49%	KP329614.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus sp. LHS 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri	176	260	85%	1e-39	74.49%	HQ832844.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus sclerotiorum strain SCSGAF0124 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	176	260	85%	1e-39	74.49%	JN851035.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus sclerotiorum strain SCSGAF0053 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	176	260	85%	1e-39	74.49%	JN851004.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus sclerotiorum strain SCSGAF0034 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	176	260	85%	1e-39	74.49%	JN850994.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus sp. FppMV22 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, comple	176	260	85%	1e-39	74.49%	HQ647311.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus sp. CCF 3110 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), culture collection CCF<CZE>-3	176	260	85%	1e-39	74.49%	FR733828.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Aspergillus subramaninii isolate NRRL 5170 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, comple	176	260	85%	1e-39	74.49%	EF661402.1				

Hình 3.10: Kết quả so sánh trình tự gen chủng M4.5a trên BLAST NCBI

Xây dựng cây di truyền:



Hình 3.11: Sơ đồ cây di truyền của chủng M4.5a

Kết quả xây dựng cây tiến hóa, xác định loài cho thấy chủng M4.5a có mức độ tương đồng với loài *Aspergillus subramaninii* với mức độ tương đồng là 74,72%.

Tian et al. (2013) đã báo cáo sự hiện diện của các loài *Phomopsis*, *Botryosphaeria*, *Aspergillus* và *Colletotrichs* trong cây *Aquilaria* bị thương [13]

Vậy, chủng M4.5a thuộc chi *Aspergillus*.

3.2.2.4. Chủng nấm M4.7

Kết quả giải trình tự gen chủng nấm M4.7, với 596 nucleotid có trình tự dưới đây:

CATAGGCCGACCTCCACCCTTTGTTTACTAGACCTCAGTTGCTTCGGC
 AGGTCCGTCTTAATAGAACGCTGGAGGACCGCTCAATGCGGGGCGTTG
 CCTCTGGCCAGTGTCTGCCGATAGCCTAATCTCCTAACTCTGGATCAA
 TCATGATTTACAATGTCTAAGTGATTTTATTCAATTAAGCAAAA
 CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
 GAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCCAGTGAGTCATCGA
 ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTG
 TTCGAGCGTCATTATCACCCCTCAAGCCCCTGTGCTTGGTGTGGAC
 GGCTTGGTGGAGCAAGTTCACACTTTCCACCCCTCCTAAAGACAATG
 ACGGCGGCCTGCGGAACCCCGGTACACTGAGCTTCTTAACTGAGCA
 CGTATCGGATGAAGGGTGCCCGGGACCCGGTCTTCTCCCTCACGGGA
 AACTTTTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACGCGCT
 GAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

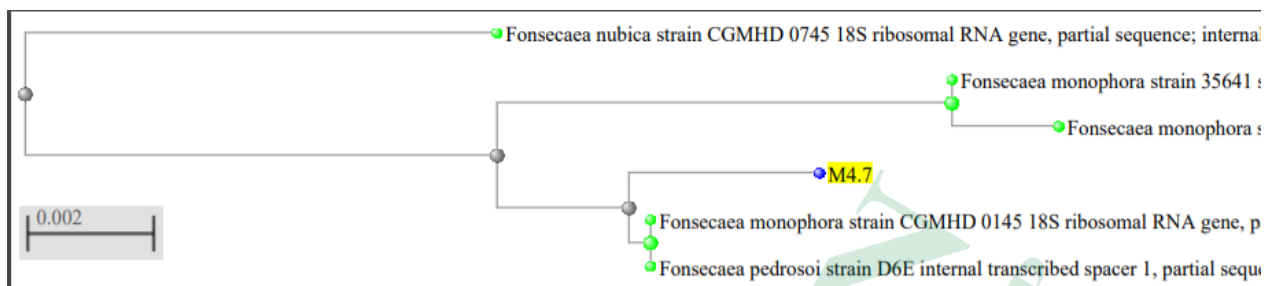
Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain CGMHD_0145 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1062	1062	99%	0.0	98.83%	KY432476.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain CMCCF D6h 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1062	1062	99%	0.0	98.83%	FJ595996.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain IFM 58108	1062	1062	99%	0.0	98.83%	AB566420.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain PWQ2244 isolate ISHAM-ITS_ID MITS1783 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1055	1055	98%	0.0	98.82%	KP132197.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea pedrosoi strain D6E internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1053	1053	99%	0.0	98.50%	MH010950.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain CGMHD_0013 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1046	1046	99%	0.0	98.33%	KY432473.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, strain Kw-In-8252-1	1046	1046	99%	0.0	98.33%	LN626652.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain SUMS0013 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1044	1044	99%	0.0	98.33%	EF513760.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain SUMS0012 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1044	1044	99%	0.0	98.33%	EF513759.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain CBS 129967 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1042	1042	97%	0.0	98.81%	MH865495.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea pedrosoi strain D6O internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1042	1042	97%	0.0	98.81%	MH010948.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain 35641 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1040	1040	99%	0.0	98.16%	MH382070.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain 69704 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1040	1040	99%	0.0	98.16%	MH382069.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain 43456 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1040	1040	99%	0.0	98.16%	MH382068.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain 74 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1040	1040	99%	0.0	98.16%	MH382067.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain 49 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1040	1040	99%	0.0	98.16%	MH382066.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain 46422 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1040	1040	99%	0.0	98.16%	MH382065.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain AR4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1040	1040	99%	0.0	98.16%	MH382064.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain 44327 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1040	1040	99%	0.0	98.16%	MH382063.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain 18IV small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1040	1040	99%	0.0	98.16%	MH382062.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fonsecaea monophora strain ICE95_47 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1040	1040	99%	0.0	98.16%	MH382061.1

Hình 3.12: Kết quả so sánh trình tự gen chủng M4.7 trên BLAST NCBI

Xây dựng cây di truyền:



Hình 3.13: Sơ đồ cây di truyền của chủng M4.7.

Kết quả xây dựng cây tiến hóa, xác định loài cho thấy chủng M4.7 có quan hệ gần gũi với loài *Fonsecaea monophora* với mức độ tương đồng là 98,83%.

Sakon Monggoot (2016) và các cộng sự đã phân lập được ba mươi ba chủng nấm nội sinh và tiếp tục được xác định ở cấp độ gen dựa trên các đặc điểm hình thái. Trong đó, chủng nấm *Fonsecaea* có khả năng kích thích tạo trầm hương và cho ra sản phẩm có chất lượng cao [14].

Vậy, chủng M4.7 thuộc chi *Fonsecaea*.

3.2.2.5. Chủng nấm M4.13

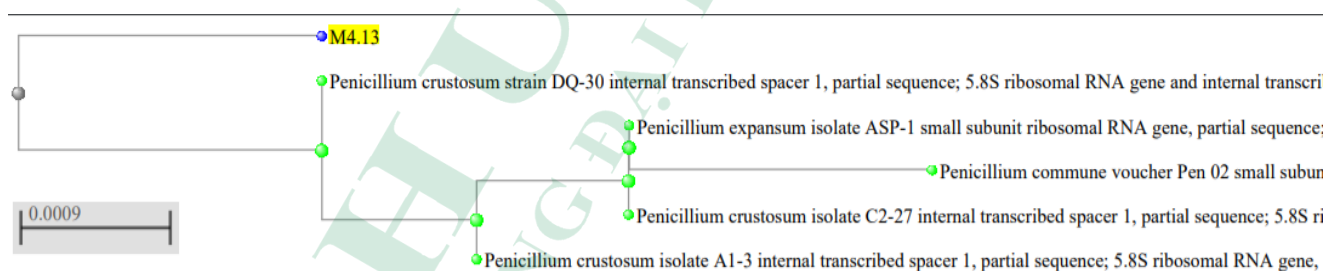
Kết quả giải trình tự gen chủng nấm M4.13, với 559 nucleotid có trình tự dưới đây:

GCGGGGGGTAGGGACCTCTGGGTCCACCTCCCACCCGTGTTT
 ATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAATGGCCGCCAAGGG
 GGCTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAATACACCCTCGAACTCT
 GTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTT
 CAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
 TGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT
 GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGA
 GCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCC
 CGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCC
 GGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCC
 GGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATC
 AGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

Sequences producing significant alignments		Download	Manage Columns	Show	100	?	
select all 0 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results			
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum strain DQ-30 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer	992	992	98%	0.0	99.10%	KY022755.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum isolate RT25 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer	983	983	97%	0.0	99.27%	MG975627.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum isolate stored seeds small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	981	981	98%	0.0	98.91%	MK578185.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium expansum isolate ASP-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	981	981	98%	0.0	98.91%	MH679835.1
<input type="checkbox"/>	Fungal sp. strain A232D internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	981	981	98%	0.0	98.91%	KU837789.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum strain NW-39 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer	981	981	97%	0.0	99.26%	MG596635.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum strain AI-144 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	981	981	98%	0.0	98.91%	MG009431.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium commune strain 2.5.4.5.18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and	981	981	98%	0.0	98.91%	KX674626.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium sp. isolate PKp1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	981	981	98%	0.0	98.91%	KX290777.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium commune strain GHAI86 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RN	981	981	98%	0.0	98.91%	KY174328.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum isolate 130 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2,	981	981	98%	0.0	98.91%	KU847869.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum isolate F36-03 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spac	981	981	98%	0.0	98.91%	KX664385.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum isolate F33-02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	981	981	98%	0.0	98.91%	KX664375.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, strain DI16-101	981	981	98%	0.0	98.91%	LT558923.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, strain DI16-98	981	981	98%	0.0	98.91%	LT558920.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum strain HSF3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	981	981	98%	0.0	98.91%	KR425648.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum isolate A1-3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and interne	981	981	97%	0.0	99.09%	KT876719.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum isolate A3-4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and interne	981	981	97%	0.0	99.26%	KT876714.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium sp. AQG11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete seq	981	1110	98%	0.0	98.91%	KP857656.1
<input type="checkbox"/>	Penicillium crustosum internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete s	981	981	98%	0.0	98.91%	KM457630.1

Hình 3.14: Kết quả so sánh trình tự gen chủng M4.13 trên BLAST NCBI

Xây dựng cây di truyền:



Hình 3.15: Sơ đồ cây di truyền của chủng M4.13

Kết quả xây dựng cây tiến hóa, xác định loài cho thấy chủng M4.13 có quan hệ gần gũi với loài *Penicillium crustosum* với mức độ tương đồng là 99,1%.

Nhiều nhà khoa học đã phân lập được một số endophytes từ cây trầm hương (Chhipa et al., 2017). Chỉ có 31% vi khuẩn và 23% nấm cho thấy khả năng sản xuất Agarospirol bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo. Vi khuẩn *Pantoea phân tán* và nấm *Penicillium polonicum* cho thấy sản lượng cao nhất so với các chủng phân lập khác [13].

Vậy, chủng M4.13 thuộc chi *Penicillium*.

Như vậy, kết quả xác định loài bằng sinh học phân tử cho kết quả được tổng hợp ở bảng 3.2 dưới đây.

Bảng 3.2: Kết quả xác định loài bằng sinh học phân tử của các chủng nấm



STT	Ký hiệu chủng	Quan hệ gần gũi với loài	Mức độ tương đồng	Kết luận
1	M4.1a	<i>Penicillium citrinum</i>	98,82%	M4.1a thuộc chi <i>Penicillium</i>
2	M4.3	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	99,42%	M4.3 thuộc chi <i>Pestalotiopsis</i>
3	M4.5a	<i>Aspergillus subramanianii</i>	74,72%	M4.5 thuộc chi <i>Aspergillus</i>
4	M4.7	<i>Fonsecaea monophora</i>	98,83%	M4.7 thuộc chi <i>Fonsecaea</i>
5	M4.13	<i>Penicillium crustosum</i>	99,1%	M4.13 thuộc chi <i>Penicillium</i>

3.3 Kết quả thử nghiệm chế phẩm vi sinh kích thích tạo trầm hương trên cây Dó bầu

Sau khi cấy chế phẩm vi sinh vào các cây Dó bầu 03 tháng, chúng tôi thực hiện việc đánh giá kết quả thử nghiệm chế phẩm vi sinh xem các chế phẩm vi sinh đó có khả năng kích thích tạo trầm hương cho các cây Dó bầu thử nghiệm hay không?

Tiến hành đục sâu vào các lớp gỗ ở trong, quan sát màu sắc vết tạo trầm và diện tích vết trầm tạo được. Lấy một mảnh gỗ tại vết tạo trầm và đốt để đánh giá mùi thơm sau khi đốt mẫu gỗ. Việc đánh giá mùi trầm được thực hiện bởi chuyên gia thuộc Công ty Cổ phần Trúc lâm Quán Tuệ - một đơn vị chuyên sản xuất và kinh doanh các sản phẩm từ trầm hương ở Việt Nam. Kết quả thu được ở bảng 3.3 dưới đây:

Bảng 3.3: Kết quả thử nghiệm chế phẩm vi sinh kích thích tạo trầm hương trên cây Dó bầu

Công thức chế phẩm	Hình ảnh	Mô tả	Mùi trầm
ĐC		Không thấy hình thành trầm hương.	Không
G5		Xuất hiện màu nâu đậm quanh vết khoan và lan dài xuống dưới khoảng 15 cm.	Thơm ngát mùi trầm



G8		Xuất hiện màu nâu đậm quanh vết khoan và lan rộng khoảng 0,5 - 1,2cm.	Thơm ngát mùi trầm
G7		Xuất hiện màu nâu đậm quanh vết khoan và lan rộng khoảng 0,2 - 0,7 cm	Thơm ngát mùi trầm

Như vậy dựa vào bảng số liệu và quan sát hình ảnh vị trí được thử nghiệm trên cây Dó bầu ta kết luận được rằng: những chủng nấm cộng sinh đã phân lập được đều có khả năng tạo trầm trên cây Trầm hương. Các mẫu gỗ được lấy từ các vị trí thử nghiệm lây nhiễm nấm trên cây Dó bầu ngoài tự nhiên khi đốt đều cho mùi thơm của Trầm hương. Trong đó công thức G5 cho kết quả tạo trầm tốt nhất trong các công thức nghiên cứu.

Một nghiên cứu trước đây về *Aquilaria malaccensis* được Chong et al. (2015) thử nghiệm cho thấy gỗ hương trầm hình thành trong thân cây 18 tháng sau khi cấy nấm. Pojanagaroon và Kaewrak (2005) đã kết luận rằng vết thương cơ học gây ra tạo trầm hương đã bắt đầu trong cây *Aquilaria crassma* 4 tuổi [3].

KẾT LUẬN, TỒN TẠI VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Từ mẫu gỗ cây Dó bầu đã có trầm tự nhiên thu thập tại Khánh Hoà đã tiến hành phân lập và định danh được 5 chủng nấm có quan hệ gần gũi với các chi *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Aspergillus*, *Fonsecaea*.

Dựa trên các đặc điểm về hình thái và màu sắc hệ sợi cũng như bào tử của 5 chủng nấm quan sát được trên kính hiển vi, có thể định danh sơ bộ chủng M4.1a và M4.13 thuộc chi *Penicillium*, chủng nấm M4.3 thuộc chi *Pestalotiopsis*, chủng nấm M4.5a thuộc chi *Aspergillus* và chủng nấm M4.7 thuộc chi *Fonsecaea*. Cả 5 chủng nấm đã được định danh bằng phương pháp phân tích trình tự vùng gen ITS. Căn cứ vào kết quả so sánh trên ngân hàng GenBank kết luận chủng nấm M4.1a và M4.13 thuộc chi *Penicillium*, chủng nấm M4.3 thuộc chi *Pestalotiopsis*, chủng nấm M4.5a thuộc chi *Aspergillus* và chủng nấm M4.7 thuộc chi *Fonsecaea*.

Kết quả nghiên cứu khả năng kích thích tạo Trầm hương trên cây Dó bầu của các chủng nấm phân lập được đều cho kết quả là các vùng gỗ biến đổi màu từ vàng đậm đến nâu đen. Khi đốt phần gỗ biến đổi màu này thì thấy có mùi thơm đặc trưng của Trầm hương. Ngoài ra quanh vùng gỗ biến đổi màu còn có các chỉ có màu nâu đen chạy dọc theo sớ gỗ của thân cây và ăn sâu vào thân.

2. Tồn tại

Do thời gian thực hiện còn hạn chế nên chưa thể thử nghiệm chế phẩm vi sinh trên nhiều cây Dó bầu và chưa đánh giá được khả năng kích thích tạo trầm của chế phẩm vi sinh trên cây Dó bầu trong thời gian dài hơn.

3. Kiến nghị

Tiếp tục nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh có khả năng kích thích tạo trầm hương trên cây Dó bầu.

Tiếp tục đánh giá khả năng kích thích tạo trầm của chế phẩm vi sinh trên cây Dó bầu trong thời gian dài hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Đinh Trung Chánh, Vi nhân giống cây dó bầu (*Aquilaria crassna* Piere ex. Lecomte) bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, Luận án thạc sĩ khoa học Nông nghiệp, Đại học Nông Lâm TP HCM, 1998.
2. Hoàng Đăng Hiếu, Sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trong phân tích đa dạng và định danh loài ở tập đoàn cây Dò bầu (*Aquilaria* sp) tại Hà Tĩnh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 2012
3. Lã Đình Mới, Lưu Đàm Cư, Trần Minh Hợi và cộng sự, Tài nguyên thực vật có tinh dầu ở Việt Nam, Tập I, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
4. Ngân Trâm Hương, “Nghiên cứu gây tạo Trâm hương”, 2018.
5. Phạm Quang Hộ, Cây cỏ Việt Nam, An Illustrated Flora of Viet Nam 2, Nxb Trẻ, Hà Nội.
6. Phạm Tiến Lợi, Nghiên cứu gây tạo Trâm hương trên cây Dó bầu bằng phương pháp vi sinh và hoá học, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, 2006.
7. PGS. TS. Cao Ngọc Điệp, TS. Nguyễn Văn Thành, Giáo trình môn Nấm học, 2009.
8. Trần Văn Minh, Bùi Thị Tường Thu, Đinh Trung Chánh, Bùi Cách Tuyến (1998), Nhân giống cây Trâm qua đỉnh sinh trưởng, Tạp chí Lâm nghiệp.

TIẾNG ANH

9. Akter S., Islam M. T., Zulkefeli M., Khan S. I. (2013). Agarwood production- a multidisciplinary field to be explored in Bangladesh. Int. J. Pharm. Life Sci.
10. Chen H., Yang Y., Xue J., Wei J., Zhang Z., Chen H.f. (2011). Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees.
11. Cheng Seng Tan, Nurulhikma Md Isa, Ismanizan Ismail and Zamri Zainal, "Agarwood Induction: Current Developments and Future Perspectives."
12. Claudio Guedes Salgado, Jorge Pereira and partner, Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis, 2004.

13. Cong Kiet, "A New Species of *Aquilaria* in Viet Nam.," Le Seminar, University of Natural Sciences Ho Chi Minh City..
14. Hai L. E., Shyun C. Y., Yusoff A. M. (1999). Early survival and growth in field trials of *Aquilaria malaccensis* (karas) and *Azadirachta excelsa* (sentang). *J. Trop. For. Sci.*
15. Hemraj Chhipa and Nutan Kaushik, Fungal and Bacterial Diversity Isolated from *Aquilaria malaccensis* Tree and Soil, Induces Agarospirol Formation within 3 Months after Artificial Infection, 2017.
16. Gao, Z.H., Wei, J.H., Yang, Y., Zhang, Z. and Zhao, W.T. (2012) Selection and Validation of Reference Genes for Studying Stress-Related Agarwood Formation of *Aquilaria sinensis*. *Plant Cell Reports*
17. N. K. T. P. Muthuraj Sangareswari, "Fungal Microbes Associated with Agarwood Formation," *American Journal of Plant Sciences*, 2016.
18. N. Raj, "Redisposals and redescrptions in the Monochaetia-Seiridium, Pestalotia-Pestalotiopsis complexes. II. Pestalotiopsis besseyii (Guba) comb. nov. and Pestalosphaeria varia sp. nov. Mycotaxon.," 1985.
19. Novriyanti, K., Santosa, E., Syafii, W., Turjaman, M. and Sitepu, I.R. (2010) Antifungal Activity of Wood Extract of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte against Agarwood-Inducing Fungi, *Fusarium solani*. *Journal of Forestry Research*
20. Tamuli P., Boruah P., Nath S. C., Samanta R. (2000). Fungi from diseased agarwood tree (*Aquilaria agallocha* Roxb.): two new records. *Adv. Forestry Res.*
21. Zhang Z., Zhang X., Yang Y., Wei J. H., Meng H., Meng Z. H., et al. (2014). Hydrogen peroxide induces vessel occlusions and stimulates sesquiterpenes accumulation in stems of *Aquilaria sinensis*. *Plant Growth Regul.*

Trang web

22. <https://tramhuongviet.com/nghien-cuu-cay-tram-huong-phan-1>
23. <http://www.tramhuonghg.com/su-khac-biet-giua-tram-huong-tu-nhien-va-tram-huong-nhan-tao/>
24. <https://caythuocdangian.com/tram-huong/>.