

PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ ĐÁNH GIÁ VAI TRÒ CỦA NẤM NỘI SINH GIỐNG *Rhizoctonia* TỪ RỄ LAN THỦY TIỀN MỖ GÀ (*Dendrobium thyrsiflorum*) TRONG NẤY MẦM HẠT

Trần Gia Tường^{1,2}, Hồ Hoàn Hảo^{1,2},

Lương Thị Hoài Thu², Phạm Ngọc Dương³, Nguyễn Hữu Hoàng^{1,2,*}

¹ Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Công nghệ cao trong nông nghiệp,
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

² Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

³ Vườn Quốc gia Cát Tiên

* Email: nhhoang@hcmus.edu.vn

TÓM TẮT

Dendrobium thyrsiflorum là một loài lan có giá trị, đang được khai thác nhiều ở Việt Nam cho mục đích dược liệu và cảnh quan. Việc phân lập và đánh giá ảnh hưởng của nấm nội sinh trên *D. thyrsiflorum* cho phép tìm hiểu sâu hơn về sự tương tác giữa lan và nấm trong môi trường. Bằng bốn cách phân lập khác nhau, nghiên cứu đã thu được 14 chủng nấm giống với *Rhizoctonia* từ rễ cây con và protocorm của *D. thyrsiflorum* từ Vườn Quốc gia Cát Tiên. Trong đó, 5 chủng nấm có ảnh hưởng tích cực đến nảy mầm của hạt khi được đồng nuôi cấy trên môi trường OMA. Sau 30 ngày, hạt đã phát triển tới giai đoạn 2 của quá trình nảy mầm với tỷ lệ protocorm từ 50,84 - 91,89%. Trên môi trường ½ MS, hạt đã phát triển đến giai đoạn 3. Nồng độ khoáng thấp trong môi trường OMA có thể là nguyên nhân cản trở quá trình nảy mầm. Việc bổ sung khoáng bằng cách thêm 1/10 MS vào OMA đã giúp hạt phát triển đến giai đoạn 3 sau 30 ngày đồng nuôi cấy với chủng nấm TTP1C3 và F7C1, với tỷ lệ protocorm lần lượt là 1,61 và 2,67%. Sự phát triển của protocorm đến giai đoạn 4 và 5 cũng được quan sát thấy, sau 90 ngày đồng nuôi cấy. Bên cạnh đó, sự xuất hiện của peloton trong rễ cây con đồng nuôi cấy với TTP1C3 và F7C1 đã được ghi nhận. Kết quả định danh phân tử dựa trên trình tự vùng gen nhân (ITS-DNA) cho thấy, hai chủng nấm có quan hệ gần với các loài thuộc chi *Hypoxylon* và *Daldinia*. Đây là những chi nấm nội sinh lần đầu tiên được báo cáo xuất hiện trên chi *Dendrobium*. Mặc dù chúng chưa thể được xem là nấm nội cộng sinh đặc hiệu, hai chủng này cho thấy tiềm năng kích thích nảy mầm và phát triển phôi, đồng thời góp phần làm phong phú hệ nấm nội sinh của *Dendrobium* và hỗ trợ bảo tồn nguồn gen lan dược liệu quý hiếm này.

Từ khóa: Nấm giống với *Rhizoctonia*, nấm nội cộng sinh, bảo tồn, tái du nhập loài, công nghệ sinh học, họ Lan.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dendrobium thyrsiflorum Reichb.f. in Andre, được biết đến với tên thường gọi là Thủy tiên mõ gà, là một loài lan dược liệu có giá trị sinh học cao. Loài này chứa các hợp chất coumarin và scoparone, có tác dụng thư giãn cơ, mở rộng khí huyết mạch, hoạt động như một chất chống đông máu [1]. Chiết xuất từ thân còn thể hiện tiềm năng

chống ung thư [2, 3]. Tuy nhiên, tương tự như nhiều loài lan dược liệu khác, việc khai thác quá mức đã làm giảm số lượng quần thể *D. thyrsiflorum* trong tự nhiên.

Các kỹ thuật nhân giống *in vitro* đã góp phần giảm nguy cơ tuyệt chủng cho các loài quý [4]. Trong đó, việc kết hợp sử dụng nấm cộng sinh với nhân giống *in vitro* là hướng đi hiệu quả, giúp

tăng tỉ lệ sống sót khi cây được chuyển ra môi trường tự nhiên. Các nghiên cứu cho thấy, cây lan nuôi cấy *in vitro* khi được chuyển ra ngoài môi trường có tỉ lệ chết cao (trên 90%), nhưng kết quả được cải thiện rõ rệt khi đồng nuôi cấy với nấm *Rhizoctonia* [5].

Không chỉ giúp cây con thích nghi tốt hơn khi ra môi trường, nấm cộng sinh còn đóng vai trò quan trọng ngay từ giai đoạn nảy mầm của hạt. Giống như các loài lan khác, hạt *D. thyrsiflorum* trong tự nhiên cũng cần sự hỗ trợ nảy mầm của nấm, còn gọi là sự nảy mầm hạt cộng sinh [6]. Hạt của các loài thuộc họ lan rất nhỏ, phôi chưa phát triển hoàn chỉnh và chỉ chứa lipid, do đó phụ thuộc vào nấm để hấp thu nước, khoáng thiết yếu và chất dinh dưỡng khác như: Đường, thiamine và axit pholic giúp thúc đẩy sự nảy mầm và phát triển protocorm [7 - 10].

Tại Việt Nam, hiện chưa có công bố nào về sự cộng sinh của nấm trên *D. thyrsiflorum*. Việc sàng lọc các chủng nấm nội sinh (endophyte) và xác định vai trò của chúng trong quá trình nảy mầm hạt vẫn chưa được triển khai rộng rãi. Do đó, nghiên cứu này nhằm phân lập và định danh các chủng nấm nội sinh từ rễ *D. thyrsiflorum*, đồng thời đánh giá khả năng thúc đẩy nảy mầm hạt của chúng. Kết quả sẽ góp phần cung cấp cơ sở khoa học cho việc ứng dụng nấm cộng sinh trong nhân giống và bảo tồn loài lan được liệu quý này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Quả (capsules chưa nứt), protocorm và cây con *D. thyrsiflorum* bám trên thân cây gỗ lớn được thu thập từ Vườn Quốc gia Cát Tiên. Trong đó, các mẫu rễ và protocorm được sử dụng cho phân lập nấm nội sinh. Quả lan được khử trùng bề mặt bằng dung dịch NaClO 5% trong 15 phút, rồi đốt cháy hai lần với ethanol 96°. Cuối cùng, hạt được thu bằng cách rạch trái, sau đó được sấy khô 24 giờ trong lọ thủy tinh bằng hạt silica và bảo quản ở nhiệt độ 4°C [11].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập nấm giống *Rhizoctonia*

Các mẫu rễ lan được tách rời khỏi thân cây gỗ bằng dao vô trùng, sau đó rửa dưới vòi nước chảy và tiến hành khử trùng bề mặt bằng dung dịch javel và ethanol 96° trong 2 phút. Mẫu rễ được rửa lại 4 lần với nước khử ion vô trùng, sau

đó cấy lên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) có bổ sung 100 µg/ml Streptomycin để ngăn vi khuẩn [12, 13]. Bốn phương pháp phân lập được tham khảo và hiệu chỉnh từ các nghiên cứu trước: Đặt trực tiếp rễ trên đĩa môi trường [12], đổ đĩa [14], trải dịch ngâm của rễ được cắt nhuyễn đã ủ qua đêm với Streptomycin [13] và không ủ với streptomycin lên đĩa PDA chứa kháng sinh. Các đĩa được ủ trong tối ở 27°C. Sau khi phân lập và làm thuần, sợi nấm được nhuộm đặc hiệu cho thành tế bào bằng lactophenol cotton blue và quan sát hình thái dưới kính hiển vi. Những chủng có hình thái sợi nấm giống với *Rhizoctonia* sẽ được chọn lọc và lưu giữ để thử nghiệm tiếp theo [15].

2.2.2. Gieo hạt *in vitro* và đồng nuôi cấy với nấm

Hạt lan *D. thyrsiflorum* được huyền phù với 2 mL nước. Sau đó 50 µl dịch huyền phù (trung bình 50 - 100 hạt) được gieo lên tấm giấy lọc 1 x 4 cm đặt sẵn trên đĩa môi trường thạch yến mạch (OMA: 4 g/L rolled oats, 8 g/L agar). Thạch chứa sợi nấm cũng được đặt lên đĩa trên để khảo sát ảnh hưởng của nấm lên sự nảy mầm của hạt lan. Các đĩa đồng nuôi cấy được ủ ở 27°C với quang kỳ sáng/tối là 16/8 giờ trong 30 ngày. Các chủng nấm giống *Rhizoctonia* đã phân lập được thử nghiệm nhằm chọn ra chủng có ảnh hưởng tích cực lên sự nảy mầm của hạt lan. Đối chứng là hạt lan được gieo tương tự lên đĩa môi trường Murashige và Skoog nồng độ một nửa (1/2 MS) (chứng dương) và OMA (chứng âm) không đồng nuôi cấy với nấm. Mỗi nghiệm thức bao gồm 5 lần lặp (n = 5).

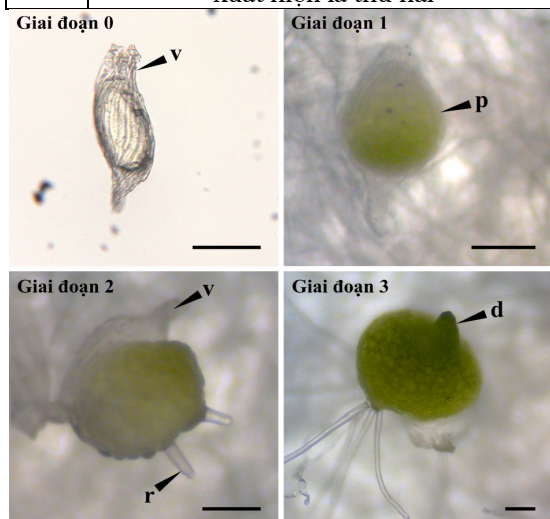
Các chủng nấm có ảnh hưởng tích cực lên sự nảy mầm của hạt sau đó được đồng nuôi cấy tương tự với hạt lan trên môi trường OMA và OMS (OMA bổ sung 1/10 MS) nhằm kiểm tra ảnh hưởng của khoáng lên sự nảy mầm của hạt lan. Đối chứng gieo hạt không đồng nuôi cấy với nấm vẫn sử dụng đĩa môi trường 1/2 MS (chứng dương), OMA và OMS (chứng âm). Mỗi nghiệm thức đồng nuôi cấy có 2 lần lặp (n = 2).

Sau 30 ngày đồng nuôi cấy, sự nảy mầm và các giai đoạn của protocorm được xác định theo mô tả tại bảng 1, được sửa đổi từ các mô tả của Arditti (1967) [16] và thực tế quan sát tại hình 1. Tỉ lệ protocorm ở các giai đoạn được tính bằng cách chia số protocorm ở mỗi giai đoạn phát triển còn

sống (không bị ngả vàng hoặc đen) sau khi ủ cho tổng số hạt ban đầu.

Bảng 1. Các giai đoạn nảy mầm của hạt *Dendrobium thyrsiflorum*

Giai đoạn	Mô tả đặc điểm
0	Hạt không nảy mầm
1	Phôi màu xanh phát triển lớn nhưng vẫn được bao bọc bởi vỏ hạt (hình thành protocorm)
2	Phôi phát triển lớn với vỏ hạt bị vỡ, hình thành rễ giả (rhizoids)
3	Phôi đang biệt hoá với sự xuất hiện của tiền mô phân sinh (protomeristem)
4	Cây con với sự xuất hiện của sinh mô lá (leaf primordia) đầu tiên
5	Sự kéo dài của lá đầu tiên, bắt đầu xuất hiện lá thứ hai



Hình 1. Sự nảy mầm không cộng sinh của hạt *D. thyrsiflorum* sau 30 ngày gieo trên môi trường 1/2 MS

Ghi chú: p là phôi, r là rễ giả (rhizoid), v là vỏ, d là đỉnh sinh trưởng (còn gọi là tiền mô phân sinh promeristem), bar = 100 µm.

2.2.3. Đồng nuôi cấy cây con và nấm để quan sát sự xâm nhiễm trên rễ

Cây *D. thyrsiflorum* 2 tháng tuổi gieo từ hạt (cao 1 - 2 cm, có ít nhất 2 rễ) được đồng nuôi cấy trên môi trường OMA với các chủng nấm. Theo đó, 3 cây được cấy cách đều nhau khoảng 2 cm trong lọ môi trường rồi đặt thạch nấm 0,5 x 0,5 cm

vào chính giữa. Quá trình đồng nuôi cấy diễn ra ở 27°C trong 30 ngày (quang kỳ sáng tối 16/8, 600 lux). Mỗi nghiệm thức có 5 lần lặp (n = 5). Đối chứng không đồng nuôi cấy sử dụng ba môi trường 1/2 MS (chứng dương), OMA và OMS (chứng âm).

Sự xâm nhiễm được quan sát dưới kính hiển vi bằng cách cắt lát mỏng rễ theo chiều ngang và nhuộm với toluidin blue. Sự xâm lấn của nấm được quan sát dựa vào phương pháp sửa đổi từ một công bố trước đây [17]. Theo đó, mẫu rễ sau khi đồng nuôi cấy được ngâm trong dung dịch KOH 10% và hấp ở 121°C trong 15 phút rồi được nhuộm bằng trypan blue 0,05% và khử nhuộm với dung dịch glycerol axetic trong 20 phút. Cuối cùng, rễ được quan sát dưới kính hiển vi. Đối chứng âm sử dụng cây con không đồng nuôi cấy với nấm.

2.2.4. Định danh phân tử

Sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA, sợi nấm được nghiền bằng nitơ lỏng và tách ADN tổng số theo phương pháp R-kit [18]. Vùng ITS được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) và ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) [19]. Phản ứng PCR với thể tích 20 µl chứa 2 µl ADN khuôn, 2 µl mỗi mồi 4 µM, 10 µl Mastermix 2X (Phù Sa Genomic) và 4 µl nước khử DEPC. Các phản ứng được biến tính ban đầu ở 95°C trong 3 phút; theo sau bởi 30 chu kỳ: Tách mạch 60 giây ở 94°C, bắt cặp mồi 50 giây ở 52°C và kéo dài 60 giây ở 72°C; cuối cùng là kéo dài 7 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự Sanger hai chiều (Công ty VNDAT). Trình tự ITS của chủng nấm mục tiêu được phân tích bằng công cụ nucleotide BLAST (NCBI) để định danh chi nấm.

2.2.5. Phân tích thống kê

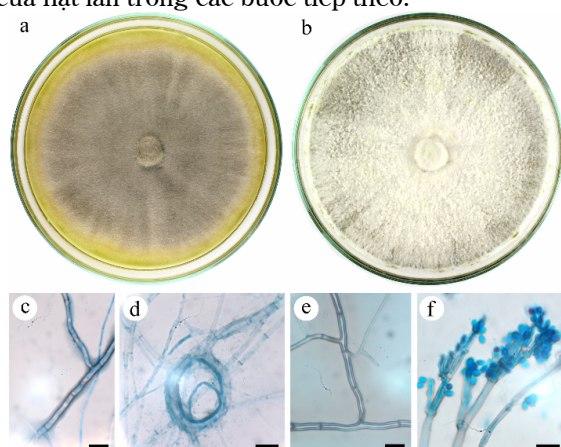
Vị trí của các bản sao trong buồng tăng trưởng đã được phân bố ngẫu nhiên bằng phần mềm Microsoft Excel. Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm R (phiên bản 4.2.2) [20], với kiểm định Chi-square test được áp dụng cho dữ liệu tỷ lệ protocorm tại các giai đoạn phát triển của hạt để xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập nấm giống *Rhizoctonia*

Các mẫu rễ *D. thyrsiflorum* đã được phân lập bằng 4 phương pháp khác nhau nhằm tìm ra những chủng nấm giống với *Rhizoctonia* từ nhiều phần khác nhau của rễ. Kết quả thu được 14 chủng

nấm có đặc điểm hình thái đặc trưng: Sợi nấm phân nhánh vuông góc, có eo thắt và vách gần vị trí phân nhánh, tương tự như mô tả của Suryantini và cs (2015) [21] (Hình 2). Những đặc điểm này phù hợp với đặc trưng của nhóm nấm *Rhizoctonia*, do đó 14 chủng này được giữ lại cho các thí nghiệm đánh giá khả năng kích thích nảy mầm của hạt lan trong các bước tiếp theo.



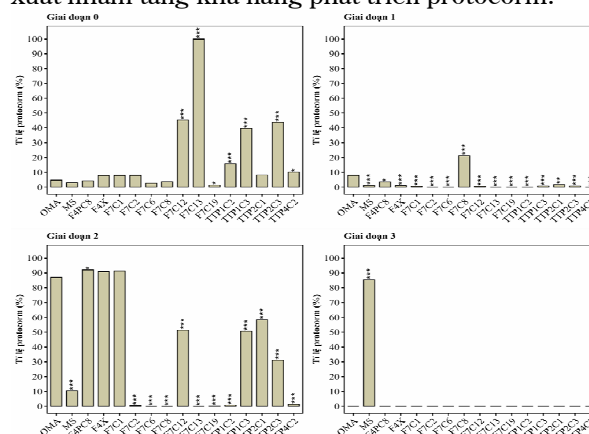
Hình 2. Đặc điểm hình thái của chủng nấm TTP1C3 (a, c, d) và chủng F7C1 (b, e, f)

Ghi chú: (a), (b): Khuẩn lạc của nấm trên đĩa môi trường PDA sau khi ủ 2 tuần ở 25°C; (c), (e): Phân nhánh vuông góc của sợi nấm với vách ngăn gần vị trí phân nhánh; (d): Hình thái sợi nấm của chủng TTP1C3; (f) tế bào conidiogenous với bào tử hình trứng của chủng F7C1; bar = 10 µm.

3.2. Ảnh hưởng của các chủng nấm giống *Rhizoctonia* lên các giai đoạn nảy mầm của hạt *D. thyrsiflorum*

Sau 30 ngày đồng nuôi cấy, 14 chủng nấm được đánh giá về khả năng ảnh hưởng đến sự nảy mầm của hạt *D. thyrsiflorum*. Trên đối chứng 1/2 MS, hạt đạt tỷ lệ nảy mầm > 96%, trong đó 85,28% protocorm phát triển đến giai đoạn 3. Trong khi đó, tất cả các nghiệm thức còn lại, bao gồm đối chứng OMA (nghèo dinh dưỡng) và đồng nuôi cấy với nấm đều chỉ dừng ở giai đoạn 2 (Hình 3). Trong số 14 nghiệm thức đồng nuôi cấy với chủng nấm, đa số chủng thể hiện khả năng ức chế nảy mầm rõ rệt ở hạt *D. thyrsiflorum*, nhất là chủng F7C13 với 100% hạt không nảy mầm (giai đoạn 0) (Hình 3). Ngược lại, 5 nghiệm thức đồng nuôi cấy với chủng F4PC8, F4X, F7C1, TTP1C3 và TTP2C1

cho tỷ lệ hạt nảy mầm và tỷ lệ protocorm giai đoạn 2 cao nhất. Trong đó, chủng F4PC8 có khả năng thúc đẩy rõ rệt sự nảy mầm của hạt, vì nghiệm thức đồng nuôi cấy với chủng nấm này cho tỷ lệ protocorm giai đoạn 2 cao hơn đáng kể so với đối chứng trên môi trường OMA. Tuy nhiên, hạt ở tất cả nghiệm thức đồng nuôi cấy đều chỉ đạt đến giai đoạn 2 sau 30 ngày gieo trên môi trường OMA. Điều này cho thấy, dinh dưỡng khoáng có thể cần thiết để tiếp tục hoàn thành quá trình phát triển của protocorm. Nhiều nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng, các giai đoạn phát triển của hạt lan đòi hỏi hàm lượng dinh dưỡng phù hợp trong môi trường cũng như loại nấm thích hợp [22 - 24]. Do đó, bổ sung khoáng vào môi trường OMA được đề xuất nhằm tăng khả năng phát triển protocorm.

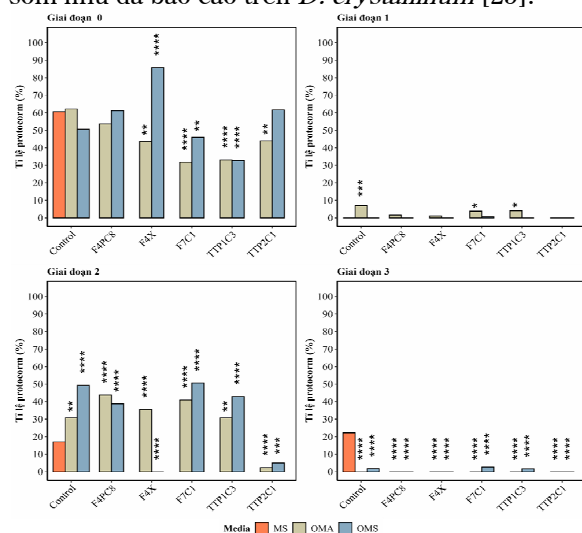


Hình 3. Ảnh hưởng của 14 chủng nấm giống với *Rhizoctonia* lên sự nảy mầm của hạt *D. thyrsiflorum* trên môi trường OMA sau 30 ngày gieo

Ghi chú: Các dấu “*” đại diện cho sự khác biệt có ý nghĩa bởi chi-square test giữa các nghiệm thức so với đối chứng OMA (0,00001 “****” 0,0001 “***” 0,001 “**” 0,01 “*” 0,05).

Năm chủng nấm có tác động tích cực nhất từ thí nghiệm đầu tiên đã được đồng nuôi cấy 30 ngày với hạt trên môi trường OMS. Trong điều kiện không có nấm, tỷ lệ nảy mầm của hạt trên môi trường OMS cao hơn lần lượt 10,02% và 11,56% so với môi trường 1/2 MS và OMA. Kết quả này cho thấy, sự nảy mầm của hạt *D. thyrsiflorum* không phụ thuộc hoàn toàn vào mức độ giàu dinh dưỡng của môi trường. Trên môi trường OMS, protocorm giai đoạn 3 xuất hiện ở F7C1 (2,67%) và

TTP1C3 (1,61%) (Hình 4), song không khác biệt đáng kể so với đối chứng OMS, và thấp hơn rõ rệt so với 1/2 MS (22,28%). Ngoài ra, tỷ lệ protocorm giai đoạn 2 không tăng mà còn giảm nhẹ so với đối chứng (Hình 4). Đáng chú ý, tỷ lệ hạt không nảy mầm (protocorm giai đoạn 0) ở hầu hết nghiệm thức F4PC8, F4X, F7C1, TTP2C1 trên môi trường OMS đều tăng so với môi trường OMA, điển hình ở nghiệm thức F4X tăng hơn 42% (Hình 4). Do đó, việc bổ sung các chủng nấm này không cho thấy có tác dụng trong việc hỗ trợ sự phát triển của cây con ở giai đoạn sớm (giai đoạn 1 - 2) và thậm chí ức chế sự nảy mầm trong điều kiện dinh dưỡng cao hơn có thể do sự phát triển quá mức của nấm. Điều này cũng có thể ngụ ý rằng hạt *D. thyrsiflorum* đã tích trữ đủ chất dinh dưỡng hoặc có thể chuyển hóa chất dự trữ sẵn cho sự nảy mầm của hạt và sự phát triển của protocorm giai đoạn sớm như đã báo cáo trên *D. crystallinum* [25].

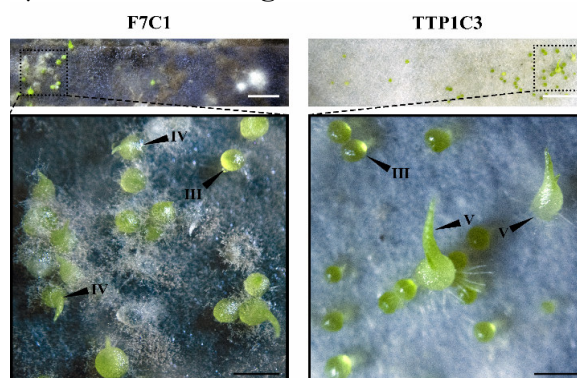


Hình 4. Ảnh hưởng của việc bổ sung khoáng vào môi trường đồng nuôi cấy với nấm lên sự nảy mầm của hạt *D. thyrsiflorum* sau 30 ngày gieo

Ghi chú: Các dấu “” đại diện cho sự khác biệt có ý nghĩa bởi chi-square test giữa các nghiệm thức so với đối chứng MS (0,00001 “****” 0,0001 “***” 0,001 “**” 0,01 “*” 0,05).*

Sau 90 ngày đồng nuôi cấy, tại các nghiệm thức F7C1 và TTP1C3, protocorm phát triển đến giai đoạn 4 và 5 (Hình 5). Điều này cho thấy, hai chủng nấm F7C1 và TTP1C3 không ảnh hưởng hoặc có thể ảnh hưởng tích cực lên sự phát triển của cây lan con ở các giai đoạn sau, khi cây cần

nhiều dinh dưỡng hơn. Điều này có thể lý giải, vì các chủng nấm này đều được phân lập từ rễ cây con. Trên thực tế, các loại nấm nội sinh không phải nấm cộng sinh thường được báo cáo trong rễ lan và các nhóm nấm này đã cho thấy vai trò tích cực trong sự phát triển của cây lan từ khi nảy mầm hạt đến khi sinh trưởng [26 - 28].

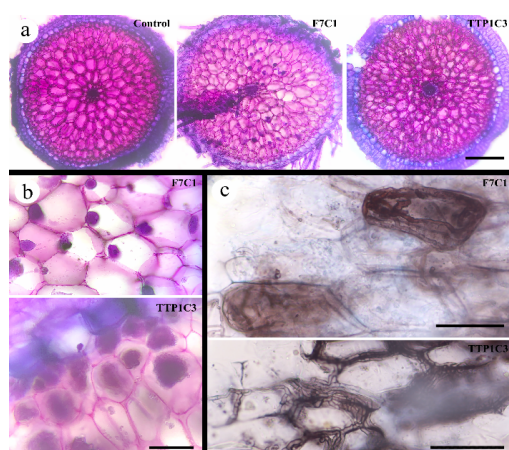


Hình 5. Ảnh hưởng của hai chủng nấm F7C1 và TTP1C3 lên sự phát triển protocorm của *D. thyrsiflorum* sau 90 ngày gieo trên môi trường OMS

Ghi chú: Ký tự “III”, “IV” và “V” chỉ các giai đoạn phát triển lớn hơn của protocorm (giai đoạn 3, 4, 5 được quy định trong Bảng 1), bar (trắng) = 4 mm, bar (đen) = 1 mm.

3.3. Xác nhận khả năng xâm nhiễm của nấm vào rễ *D. thyrsiflorum*

Các loại nấm hỗ trợ sự nảy mầm hạt cộng sinh thường hình thành cấu trúc cuộn nội bào (peloton) trong tế bào vỏ rễ của cây con [29]. Hai chủng nấm F7C1 và TTP1C3 đã được đồng nuôi cấy với cây con *D. thyrsiflorum* để kiểm tra sự xâm nhiễm của chúng vào rễ. Sau 30 ngày, cây con được đồng nuôi cấy với nấm vẫn phát triển tốt, trong khi đối chứng trên môi trường OMA không đồng nuôi cấy bị vàng lá và đen gốc. Kết quả nhuộm toluidin blue cho thấy, có sự xuất hiện của cấu trúc giống với peloton trong rễ của cây lan đồng nuôi cấy với nấm (Hình 6a và Hình 6b). Đây là cấu trúc thường thấy của nấm nội sinh trên họ lan (Orchidaceae) nhằm cung cấp chất dinh dưỡng cho nhóm cây này [30]. Đồng thời, sợi nấm cũng được quan sát thấy trong gian bào của rễ được nhuộm với trypan blue (Hình 6c). Các kết quả trên chứng minh rằng, hai chủng nấm F7C1 và TTP1C3 có khả năng xâm nhiễm vào rễ *D. thyrsiflorum* và tạo cấu trúc giống peloton trong tế bào rễ.



Hình 6. Sự xâm nhiễm của hai chủng nấm F7C1 và TTP1C3 trong rễ *D. thyrsiflorum* được đồng nuôi cấy

Ghi chú: (a) Lát cắt rễ nhuộm bằng toluidin blue; (b) Cấu trúc giống peloton tạo ra bởi sợi nấm trong tế bào rễ được nhuộm bằng toluidin blue; (c) Sợi nấm xâm nhiễm bên trong gian bào và rễ được nhuộm bằng trypan blue. bar (a) = 100 μ m, bar (b, c) = 50 μ m.

3.4. Định danh phân tử

Bảng 2. Kết quả định danh phân tử dựa trên vùng trình tự ITS-rDNA của hai chủng nấm F7C1 và TTP1C3

Chủng	Chi/Loài tương đồng nhất	Mã số GenBank	Độ tương đồng trình tự
F7C1	<i>Daldinia</i>	MN153853.1	100,00%
TTP1C3	<i>Hypoxyton anthochroum</i>	KU204542.1	99,80%

4. KẾT LUẬN

Việc sử dụng kết hợp nhiều phương pháp phân lập đã cho phép thu được nhiều chủng nấm nội sinh có đặc điểm giống với *Rhizoctonia* từ rễ của cây con *D. thyrsiflorum*. Trong đó, hai chủng nấm nội sinh TTP1C3 và F7C1 có ảnh hưởng tích cực lên sự tăng trưởng và phát triển của phôi. Tuy nhiên, hai loại nấm nội sinh ở trạng thái đơn lẻ trong điều kiện thí nghiệm (có bổ sung khoáng và không bổ sung khoáng) không giúp phôi phát triển hoàn chỉnh nên chưa thể xem là nấm nội cộng sinh (endomycorrhizae). Việc phân lập được hai chủng nấm chưa từng công bố trên *Dendrobium* và các thử nghiệm *in vitro* thể hiện sự phức tạp và tính phong phú của hệ vi sinh vật nội sinh trong quá trình phát triển của nhóm lan này.

Vùng trình tự ITS (600 - 750 bp) của hai chủng nấm F7C1 và TTP1C3 đã được giải trình tự Sanger và phân tích bằng nucleotide BLAST nhằm xác định chi hoặc loài của chúng. Kết quả định danh phân tử cho thấy, trình tự ITS của chủng F7C1 (GenBank: PX459928) tương đồng 100% với chi *Daldinia*, trong khi chủng TTP1C3 (GenBank: PX459934) tương đồng cao (99,80%) với chi *Hypoxyton*, cụ thể là loài *Hypoxyton anthochroum* (Bảng 2). Do đó, 2 chủng nấm phân lập được có khả năng thuộc chi *Daldinia* và chi *Hypoxyton*. Các phương pháp định danh sâu hơn về sinh hoá hoặc kết hợp với các trình tự khác, chẳng hạn như LSU, TUB2 và TEF1 là cần thiết để phân loại chính xác hơn.

Nấm nội sinh giống *Rhizoctonia*, chủ yếu là *Tulasnellales*, *Sebacinales*, *Cantharellales* đã được báo cáo trên nhiều loài *Dendrobium* [31, 32]. Trong khi chi nấm nội sinh *Daldinia* chỉ được báo cáo rất ít trên họ lan, cụ thể là *D. eschscholtzii* trên *Paphiopedilum exul* [33] và chưa từng được công bố trên *Dendrobium*. Riêng nấm *Hypoxyton anthochroum* tuy đã được phân lập từ nhiều đối tượng thực vật khác [34 - 36], nhưng đây là lần đầu tiên được phát hiện trên Orchidaceae.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh thông qua số đề tài C2020-18-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. T. C. Wrigley (1960). Ayapin, scopoletin and 6,7 - Dimethoxycoumarin from *Dendrobium thyrsiflorum* (Reichb. f.). *Nature*, 188(4756), 1108 - 1108. Doi: 10.1038/1881108a0.
2. L. Xie, J. Huang, T. Xiong and Y. Ma (2023). Secondary metabolomic analysis and *In vitro* bioactivity evaluation of stems provide a comprehensive comparison between *Dendrobium chrysotoxum* and *Dendrobium thyrsiflorum*. *Molecules*, 28(16), 6039. Doi: 10.3390/molecules28166039.

3. G. N. Zhang *et al.* (2005). Bi-bicyclic and bi-tricyclic compounds from *Dendrobium thyrsiflorum*. *Phytochemistry*, 66(10), 1113 - 1120. Doi: 10.1016/j.phytochem.2005.04.001.
4. P. Bhattacharyya, S. Kumaria, N. Job and P. Tandon (2015). Phyto-molecular profiling and assessment of antioxidant activity within micropropagated plants of *Dendrobium thyrsiflorum*: A threatened, medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3), 535 - 550. Doi: 10.1007/s11240-015-0783-6.
5. S. Aggarwal, C. Nirmala, S. Beri, S. Rastogi and A. Adholeya (2012). *In vitro* symbiotic seed germination and molecular characterization of associated endophytic fungi in a commercially important and endangered Indian orchid *Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl.. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 33 - 42. Doi: 10.14712/23361964.2015.36.
6. H. N. Rasmussen, K. W. Dixon, J. Jersáková and T. Těšitelová (2015). Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Ann Bot*, 116(3), 391 - 402. Doi: 10.1093/aob/mcv087.
7. T. W. Yam and J. Arditti (2009). History of orchid propagation: A mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnol Rep*, 3(1), 1 - 56. Doi: 10.1007/s11816-008-0066-3.
8. T. W. Yam, J. Arditti and K. M. Cameron (2009). The orchids have been a splendid sport - An alternative look at Charles Darwin's contribution to orchid biology. *Am J Bot*, 96(12), 2128 - 2154. Doi: 10.3732/ajb.0900122.
9. J. Arditti (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33(1), 1 - 97. Doi: 10.1007/BF02858656.
10. R. L. Dressler and H. N. Rasmussen (1996). Terrestrial orchids: From seed to mycotrophic plant. *Syst Bot*, 21(4), 625. Doi: 10.2307/2419622.
11. X. M. Zi, C. L. Sheng, U. M. Goodale, S. C. Shao and J. Y. Gao (2014). In situ seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 24(7), 487 - 499. Doi: 10.1007/s00572-014-0565-8.
12. S. Nontachaiyapoom, S. Sasirat and L. Manoch (2010). Isolation and identification of Rhizoctonia-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium* and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. *Mycorrhiza*, 20(7), 459 - 471. Doi: 10.1007/s00572-010-0297-3.
13. G. S. Zhu, Yu, Y. Gui, Z. Y. Liu, Z. N. Gui and Y. Liu (2008). A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Diversity*, 33, 123 - 137.
14. N. H. Hoang, M. E. Kane, E. N. Radcliffe, L. W. Zettler and L. W. Richardson (2017). Comparative seed germination and seedling development of the ghost orchid, *Dendrophylax lindenii* (Orchidaceae) and molecular identification of its mycorrhizal fungus from South Florida. *Ann Bot*, 119(3), 379 - 393. Doi: 10.1093/aob/mcw220.
15. B. Sneh, L. Burpee and A. Ogoshi (1991). *Identification of Rhizoctonia species*. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota.
16. J. Arditti (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33(1), 1 - 97. Doi: 10.1007/BF02858656.
17. G. H. Ma, X. G. Chen, M. A. Seloosse and J. Y. Gao (2022). Compatible and incompatible mycorrhizal fungi with seeds of *Dendrobium* species: The colonization process and effects of coculture on germination and seedling development. *Front Plant Sci*, 13. Doi: 10.3389/fpls.2022.823794.
18. Trương Thị Huỳnh Như, Huỳnh Thị Ngọc Mai, Lê Hồng Kông, Trần Trung Chánh, Phạm Thị Nhạn, Lê Khanh, Phạm Quốc An, Nguyễn Hữu Hoàng (2022). Bước đầu nghiên cứu sự hiện diện của *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* (SLCMV) trên sắn (*Manihot esculenta* Crantz 1766). *Tạp chí Khoa học Đại học Mở thành phố Hồ Chí Minh - Kỹ thuật và Công nghệ*, 17(2), 5 - 20. Doi: 10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.17.2.2194.2022.

19. T. J. White, T. Bruns, S. Lee and J. Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, Elsevier, 315 - 322. Doi: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
20. R. Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for statistical computing. *Vienna*: 4.2.2. [Online]. Available: <https://www.R-project.org>
21. R. Suryantini, R. S. Wulandari and R. S. Kasiamdari (2015). Orchid mycorrhizae fungi: Identification of *Rhizoctonia* in West Kalimantan. *Microbiol Indones*, 9(4), 157 - 162. Doi: 10.5454/mi.9.4.3.
22. H. N. Rasmussen, K. W. Dixon, J. Jersáková and T. Těšitelová (2015). Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Ann Bot*, 116(3), 391 - 402. Doi: 10.1093/aob/mcv087.
23. B. Kunakhonnuruk, P. Inthima and A. Kongbangkerd (2018). *In vitro* propagation of *Epipactis flava* Seidenf., an endangered rheophytic orchid: A first study on factors affecting asymbiotic seed germination, seedling development and greenhouse acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 135(3), 419 - 432. Doi: 10.1007/s11240-018-1475-9.
24. W. Pakum, S. Watthana, K. orn Srimuang and A. Kongbangkerd (2016). Influence of medium component on *in vitro* propagation of Thai's endangered orchid: *Bulbophyllum nipondhii* Seidenf. *Plant Tissue Cult Biotechnol*, 26(1), 37 - 46. Doi: 10.3329/ptcb.v26i1.29765.
25. P. Swangmaneecharern, P. Serivichyaswat and S. Nontachaiyapoom (2012). Promoting effect of orchid mycorrhizal fungi *Epulorhiza* isolates on seed germination of *Dendrobium* orchids. *Sci Horti*, 148, 55 - 58. Doi: 10.1016/j.scienta.2012.09.013.
26. P. Bayman and J. T. Otero (2006). Microbial endophytes of orchid roots. *Microbial Root Endophytes*, 9, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 153 - 177. Doi: 10.1007/3-540-33526-9_9.
27. P. Bayman, A. T. Mosquera-Espinosa, C. M. Saladini-Aponte, N. C. Hurtado-Guevara and N. L. Viera-Ruiz. Age-dependent mycorrhizal specificity in an invasive orchid, *Oeceoclades maculate*. *Am J Bot*, 103(11), 1880 - 1889. Doi: 10.3732/ajb.1600127.
28. M. A. Seloosse, F. Martos, B. Perry, P. Maj, M. Roy and T. Pailler (2010). Saprotrophic fungal symbionts in tropical achlorophyllous orchids. *Plant Signal Behav*, 5(4), 349 - 353. Doi: 10.4161/psb.5.4.10791.
29. S. E. Smith and D. Read (2008). The mycorrhizas of green orchids. *Mycorrhizal Symbiosis*, Third., Elsevier, 12, 419 - 457. Doi: 10.1016/B978-012370526-6.50014-3.
30. C. D. Zelmer, L. Cuthbertson and R. S. Currah (1996). Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience*, 37(4), 439 - 448. Doi: 10.1007/BF02461001.
31. J. H. Warcup (1981). The mycorrhizal relationships of australian orchids. *New Phytologist*, 87(2), 371 - 381. Doi: 10.1111/j.1469-8137.1981.tb03208.x.
32. J. Chen, H. Wang and S. X. Guo (2012). Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 22(4), 297 - 307. Doi: 10.1007/s00572-011-0404-0.
33. E. C. Barnes, J. Jumpathong, S. Lumyong, K. Voigt and C. Hertweck (2016). Daldionin, an unprecedented binaphthyl derivative and diverse polyketide congeners from a fungal orchid endophyte. *Chemistry - A European Journal*, 22(13), 4551 - 4555. Doi: 10.1002/chem.201504005.
34. Á. Ulloa-Benítez, Y. M. Medina-Romero, R. E. Sánchez-Fernández, P. Lappe-Oliveras, G. Roque-Flores, G. Duarte Lisci, T. Herrera Suárez, M. L. Macías-Rubalcava (2016). Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile and semi-volatile organic compounds from the endophyte *Hypoxyton anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia* (Burseraceae). *J Appl Microbiol*, 121(2), 380 - 400. Doi: 10.1111/jam.13174.
35. R. E. Sánchez-Fernández, R. Sánchez-Fuentes, H. Rangel-Sánchez, S. Hernández-Ortega, J. G. López-Cortés and M. L. Macías-Rubalcava

(2020). Antifungal and antioomycete activities and modes of action of isobenzofuranones isolated from the endophytic fungus *Hypoxylon anthochroum* strain Gseg1. *Pestic Biochem Physiol*, 169, 104670. Doi: 10.1016/j.pestbp.2020.104670.

36. R. Mishra, J. S. Kushveer, D. Majumder and V. V. Sarma (2020). Stimulation of secondary metabolite production in *Hypoxylon anthochroum* by naturally occurring epigenetic modifiers. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2), 946 - 962. Doi: 10.1007/s11694-019-00345-8.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND EVALUATION OF THE INFLUENCE OF *Rhizoctonia*-LIKE ENDOPHYTIC FUNGI ASSOCIATED WITH ROOTS OF *Dendrobium thyrsiflorum* REICHB.F. IN ANDRE ORCHID ON THEIR SEED GERMINATION

Tran Gia Tuong^{1,2}, Ho Hoan Hao^{1,2},

Luong Thi Hoai Thu², Pham Ngoc Duong³, Nguyen Huu Hoang^{1,2}

¹ *Research Center for High-Tech Application in Agriculture (RCHAA),*

University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh city

² *Faculty of Biology and Biotechnology, University of Sciences,*

Vietnam National University Ho Chi Minh city

³ *Cat Tien National Park*

Abstract

Dendrobium thyrsiflorum is a valuable orchid species extensively exploited in Vietnam for medicinal and ornamental purposes. Isolating and evaluating the effects of endophytic fungi on *D. thyrsiflorum* could offer insights into the orchid-mycorrhizal fungus interactions. Using four isolation methods, this study obtained fourteen *Rhizoctonia*-like fungi from the roots of seedlings and protocorms of *D. thyrsiflorum* in Cat Tien National Park. Among these, five fungal isolates exhibited positive effects on seed germination when co-cultured on OMA medium. After 30 days, the seeds developed to stage 2 of the germination process, which was slower compared to the control seeds sown on 1/2 MS medium (stage 3). Mineral deficiency of the OMA medium may be the cause of hindered germination. Mineral supplementation by adding 1/10 MS to OMA medium facilitated seed development to stage 3 after 30 days, and stage 5 after 90 days of co-cultivation with fungal isolates TTP1C3 and F7C1. Furthermore, the presence of pelotons in the roots of seedlings co-cultured with TTP1C3 and F7C1 was observed. Molecular identification based on the nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS-DNA) region sequence revealed that the two target fungal isolates belonged to genus *Hypoxylon* and *Daldinia*. This is the first time that these fungal genera have been reported in *Dendrobium*. Although they cannot yet be considered specific Endomycorrhizae, these two strains show the potential to stimulate seed germination and embryo development, while also contributing to the enrichment of the endophytic fungal system of *Dendrobium* and supporting the conservation of this rare medicinal orchid germplasm.

Keywords: *Rhizoctonia-like fungi, Endophytic fungi, conservation, reintroduction, biotechnology, Orchidaceae.*

Ngày nhận bài: 19/5/2025

Ngày chuyển phản biện: 16/6/2025

Ngày thông qua phản biện: 14/8/2025

Ngày duyệt đăng: 14/10/2025