Thesis Title	Enhancing the Propagation Success of Thai Terrestrial Orchids with Mycorrhizal Fungi
Author	Mr. Ruangwut Chutima
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Advisor
	Prof. Dr. Bernard Dell Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Goro Takata Co-advisor
	Dr. Suyanee Vessabutr Co-advisor

Abstract

This study describes the mycorrhizal fungi and some endophytic fungi isolated from roots of six Thai terrestrial orchids (*Doritis pulcherrima* Lindl, *Eulophia spectabilis* (Dennst.) Suresh, *Paphiopedilum bellatulum* (Rchb. f.) Stein, *Pecteilis susannae* (L.) Raffin, *Phiaus tankervilleae* (Banks ex l'Heliter) Bl, and *Spathoglottis affinis* de Vries) and effects of mycorrhizal fungi on symbiotic seed germination of *P. susannae* and seedling growth of *D. pulcherrima*. In addition, the indole-3-acetic acid (IAA) and siderophores production by orchid mycorrhizal fungi and some endophytic fungi were studied.

All sixty-six fungal isolates were isolated from the roots of six terrestrial orchid samples. Based on morphology and the Internal Transcribed Spacer (ITS) regions of nuclear rDNA. Of the 17 fungal taxa 23% were found to be *Epulorhiza*,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

21% *Fusarium*, 14% *Cladosporium*, 8% *Xylaria*, 5% each of *Colletotrichum*, *Trichocladium* and *Tulasnella*, 3% each of *Dothiodeomycete* and *Pestalotiopsis*, 2% each of *Gloeotulasnella* and *Phomopsis*, 1% each of *Chaetomium*, *Cladophilophora*, *Eupenicillium*, *Gibberella*, *Nodulis*, and *Phoma* and the remaining 3% were sterilia mycelia.

The symbiotic seed germination of *P. susannae* revealed that the most suitable agar media for symbiotic seed germination was Oatmeal agar. The effect of different fungal isolates on seed germination was evaluated after sowing for 133 days (12 hours of photo period, light (1,000 Lux): dark, 12: 12 hours, for 63 days after excluding light for 70 days). The protocorm development advanced up to stage 5 when seeds were inoculated with *Epulorhiza* isolates CMU-AUG 028 (4.3%), CMU-AUG 007 (4.2%), CMU-STE 014 (3.9%) and CMU-AUG 013 (2.2%). Without fungi, protocorm development was arrested at stage 3.

To produce mycorrhizal inoculum, the growth optimization of mycorrhizal fungi on agar, grain and potting media was determined. The optimal fungal growth temperature and pH on Potato dextrose agar (PDA) was 30˚C and pH 6 -8, respectively. Coconut husk submerged in Potato dextrose broth (PDB) had the best growth of fungal mycelium and was used as a substrate for mycorhizal inoculum and mixed with potting media for cultivation of *D. pulcherrima* seedlings. Then, the effects of two mycorrhizal fungi (CMU-DP 506, *Epulorhiza* sp., and CMU-DP 514, *Tulasnella* sp.) on growth of *D. pulcherrima* seedlings showed that both fungal inocula could promote the growth and survival rate of seedlings when compared with the control (non mycorhizal potting media). Moreover, these two fungal isolates extensively colonized in roots of orchid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

seedlings when compared with cultivated seedlings using non-mycorhizal potting media.

In addition, the IAA and siderophores production from all fungal isolates was determined. The IAA produced by 33 fungal isolates including all mycorrhizal fungi and some fungal endophytes were detected. High level of fungal IAA production were obtained from three fungal isolates, *C. gloeosporioides* CMU-AU 006 (214.83 µg/ml), *Epulorhiza* sp. CMU-SLP 007 (149.35 µg/ml) and *Epulorhiza* sp. CMU-NUT 013 (101.00 µg/ml). These three fungal isolates produced maximum levels of IAA when cultured in a culture medium supplemented with 4 mg/ml of L-tryptophan (CMU-AU 006 and CMU-SLP 007) and 6 mg/ml of L-tryptophan (CMU-NUT 013). The effect of incubation period on fungal IAA production showed that the maximum of IAA production was detected when the fungi were grown in a stationary phase. Thin layer chromatography revealed that all fungal IAA had the same R_f value as the standard IAA. In addition, the biological activity of fungal IAA showed that all fungal IAA could promote root initiation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), seed germination of corn (*Zea mays*) and elongation of rice (*Oryza sativa*) coleoptiles.

The siderophore production from 21 fungal endophytes was detected using the Chrome Azurol S (CAS) agar plate assay. None of the mycorrhizal fungi isolates could produce siderophores using this methodology. All of these fungal endophytes produced hydroxamates type of siderophores (0.69 – 34.74 µg/ml) while the highest level of siderophores was produced by *C. gloeosporioides*, CMU-AU 006.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Keywords: Endophytic fungi, indole-3-acetic acid, orchid mycorrhiza, siderophores, symbiotic seed germination, terrestrial orchid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเพิ่มความสำเร็จในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดินของไทยด้วยเชื้อราไมคอร์ไรซา

ผู้เขียน นายเรืองวุฒิ ชุติมา

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. สายสมร ลำยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
Prof. Dr. Bernard Dell	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Assoc. Prof. Dr. Goro Takata	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. สุญาณี เวสสบุตร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษา และอธิบายถึงเชื้อราไมคอร์ไรซา และเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกจากกล้วยไม้ดินของไทย 6 ชนิด ได้แก่ *Doritis pulcherrima* Lindl *Eulophia spectabilis* (Dennst.) Suresh *Paphiopedilum bellatulum* (Rchb. f.) Stein *Pecteilis susannae* (L.) Raffin *Phiaus tankervilleae* (Banks ex l'Heliter) Bl และ *Spathoglottis affinis* de Vries และผลของเชื้อราไมคอร์ไรซาต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *P. susannae* รวมถึงผลของเชื้อราไมคอร์ไรซาต่อการเจริญของต้นอ่อนกล้วยไม้ *D. pulcherrima* นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) และ siderophores จากเชื้อราไมคอร์ไรซา และเชื้อราเอนโดไฟท์อีกด้วย

ในงานวิจัยนี้แยกเชื้อราจากรากตัวอย่างกล้วยไม้ดินทั้ง 6 ชนิดได้จำนวน 66 ไอโซเลท จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และอณูชีววิทยาโดยใช้ลำดับเบสในส่วนของ Internal Transcribed Spacer (ITS) ของ nuclear rDNA พบว่าเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดแบ่งออกได้ 17 taxa ดังนี้ *Epulorhiza* 23% *Fusarium* 21% *Cladosporium* 14% *Xylaria* 8% *Colletotrichum Trichocladium* และ *Tulasnella* ชนิดละ 5% *Dothiodeomycete* และ *Pestalotiopsis* ชนิดละ 3% *Gloeotulasnella* และ *Phomopsis* ชนิดละ 2% *Chaetomium Cladophilophora Eupenicillium Gibberella Nodulis* และ *Phoma* ชนิดละ 1% และที่เหลืออีก 3% จัดเป็นพวก sterilia mycelia

จากการศึกษาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *P. susannae* ร่วมกับเชื้อราพบว่า อาหาร Oatmeal agar มีความเหมาะสมมากที่สุด เมื่อทำการตรวจสอบการงอก และการพัฒนาของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรโตคอมของกล้วยไม้ด้วยการเพาะเมล็ดร่วมกับเชื้อรานาน 133 วัน โดยบ่มในที่มืดเป็นเวลา 70 วัน ตามด้วยการให้แสง (1,000 Lux) สลับมืด (สว่าง: มืด 12:12 ชั่วโมง) เป็นเวลา 63 วัน พบว่าโปรโตคอมสามารถพัฒนาได้ถึงระยะที่ 5 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อราในจีนัส *Epulorhiza* ได้แก่ CMU-AUG 028 (4.3%) CMU-AUG 007 (4.2%) CMU-STE 014 (3.9%) และ CMU-AUG 013 (2.2%) ในขณะที่เมล็ดกล้วยไม้ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อรานั้นมีการพัฒนาของโปรโตคอมในระยะที่ 3 เพียง 3.5% เท่านั้น

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราไมคอร์ไรซาบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เมล็ดธัญพืช และวัสดุปลูกเพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อราไมคอร์ไรซา พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 30˚C และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่สุดอยู่ระหว่าง pH 6 - 8 ขณะที่เส้นใยของที่เชื้อราไมคอร์ไรซาสามารถเจริญได้ดีที่สุดในกาบมะพร้าวสับที่แช่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) ดังนั้นกาบมะพร้าวสับแช่ด้วย PDB จึงมีความเหมาะสม และถูกนำไปใช้ในการผลิตหัวเชื้อไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการปลูกต้นอ่อนของกล้วยไม้ *D. pulcherrima* ซึ่งเมื่อทำการศึกษาผลของเชื้อราไมคอร์ไรซา 2 ชนิด คือ CMU-DP 506, *Epulorhiza* sp. และ CMU-DP 514, *Tulasnella* sp. ต่อการเจริญของต้นอ่อนกล้วยไม้ *D. pulcherrima* พบว่า เชื้อราไมคอร์ไรซาทั้งสองชนิดสามารถช่วยเร่งการเจริญ และเพิ่มอัตราการอยู่รอดของต้นอ่อนกล้วยไม้ได้เมื่อเทียบกับต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อราไมคอร์ไรซา นอกจากนี้แล้วเมื่อทำการตรวจการเข้ายึดครองของเชื้อราทั้งสองในรากต้นอ่อนกล้วยไม้พบว่า เชื้อราไมคอร์ไรซาทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเข้ายึดครองรากของต้นอ่อนกล้วยไม้ได้ในปริมาณที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นอ่อนที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อไมคอร์ไรซาในวัสดุปลูก

ในการตรวจหาการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) และ siderophores จากเชื้อราที่แยกได้พบว่า เชื้อราจำนวน 33 ไอโซเลทซึ่งประกอบด้วยเชื้อราไมคอร์ไรซาทั้งหมด และเชื้อราเอนโดไฟท์บางชนิดสามารถตรวจพบการผลิต IAA โดยที่เชื้อรา 3 ชนิด คือ *C. gloeosporioides* CMU-AU 006 (214.83 µg/ml), *Epulorhiza* sp. CMU-SLP 007 (149.35 µg/ml) และ *Epulorhiza* sp. CMU-NUT 013 (101.00 µg/ml) ผลิต IAA ได้ปริมาณมากที่สุด ซึ่งเชื้อรา CMU-AU 006 และ CMU-SLP 007 ผลิต IAA มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของ L-tryptophan 4 mg/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่เชื้อรา CMU-NUT 013 ผลิต IAA มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มขึ้นของ L-tryptophan ที่ 6 mg/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต IAA ของเชื้อรานั้นพบว่า เชื้อราผลิต IAA มากที่สุดเมื่อเชื้อราเจริญในระยะ stationary phase และเมื่อนำ IAA ที่ได้จากการผลิตของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อราดังกล่าวมาทำการตรวจสอบการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางพบว่าค่า R_f ของ IAA จากเชื้อรานั้นมีค่าเดียวกันกับ IAA มาตรฐาน นอกจากนี้ IAA ที่ผลิตจากเชื้อราดังกล่าวนี้ยังมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการสร้างรากของต้นถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris*) การงอกของเมล็ดข้าวโพด (*Zea mays*) และการขยายตัวของ coleoptiles ในต้นข้าว (*Oryza sativa*) ได้อีกด้วย

นอกจากนี้พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 21 ไอโซเลทตรวจพบการผลิต siderophore ด้วยวิธี Azurol S (CAS) agar plate assay ขณะที่เชื้อราไมคอร์ไรซานั้นไม่สามารถตรวจพบการผลิต siderophore ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ ซึ่งเชื้อราทั้งหมดที่ตรวจพบนั้นผลิต siderophore ชนิด hydroxamate ในปริมาณ (0.69 – 34.74 µg/ml) โดยที่เชื้อรา *C. gloeosporioides* CMU-AU 006 ตรวจพบการผลิต siderophore ในปริมาณมากที่สุด

คำสำคัญ: เชื้อราเอนโดไฟท์, กรดอินโดทรีแอซิติก, ไมคอร์ไรซากล้วยไม้, ไซเดอโรฟอร์, การงอกของเมล็ดร่วมกับเชื้อรา, กล้วยไม้ดิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved