

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46254

ENHANCING THE PROPAGATION SUCCESS OF THAI  
TERRESTRIAL ORCHIDS WITH  
MYCORRHIZAL FUNGI

RUANGWUT CHUTIMA

DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN BIOTECHNOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY  
FEBRUARY 2012

600256961

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46254

**ENHANCING THE PROPAGATION SUCCESS OF THAI  
TERRESTRIAL ORCHIDS WITH  
MYCORRHIZAL FUNGI**



**RUANGWUT CHUTIMA**

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN  
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN BIOTECHNOLOGY**

**THE GRADUATE SCHOOL  
CHIANG MAI UNIVERSITY  
FEBRUARY 2012**

**ENHANCING THE PROPAGATION SUCCESS OF THAI TERRESTRIAL  
ORCHIDS WITH MYCORRHIZAL FUNGI**

RUANGWUT CHUTIMA

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED  
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN BIOTECHNOLOGY

**EXAMINING COMMITTEE**

.....*B. Tunc*.....CHAIRPERSON

Assoc. Prof. Dr. Neung Teaumroong

.....*Saisamorn Lumyong*.....MEMBER

Prof. Dr. Saisamorn Lumyong

.....*Banya*.....MEMBER

Prof. Dr. Benjavan Rerkasem

.....*S. Vessabutr*.....MEMBER

Dr. Suyanee Vessabutr

.....*S. Youpensuk*.....MEMBER

Asst. Prof. Dr. Somchit Youpensuk

**THESIS ADVISORY COMMITTEE**

.....*Saisamorn Lumyong*.....ADVISOR

Prof. Dr. Saisamorn Lumyong

.....*B. Dell*.....CO-ADVISOR

Prof. Dr. Bernard Dell

.....*G. Takata*.....CO-ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Goro Takata

.....*S. Vessabutr*.....CO-ADVISOR

Dr. Suyanee Vessabutr

1 February 2012

## ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis would have not been possible without the support of my great advisors and thesis examining committee, Prof. Dr. Saisamorn Lumyoung, Prof. Dr. Bernard Dell, Assoc. Prof. Dr. Goro Takata, Dr. Suyanee Vessabutr, Prof. Dr. Benjavan Rerkasem, Assoc. Prof. Dr. Neung Teaumroong, and Asst. Prof. Dr. Somchit Youpensuk, I am extremely grateful for their excellent supervision and valuable concern.

The author wish to acknowledge the financial support from The Office of the Higher Education Commission, Thailand under the program Strategic Scholarship for frontier Research Network for Joint Ph.D. Program and National Research University, Japan Student Services Organization (JASSO), short-term exchange student, scholarship for one year support at Kagawa University in Japan, Graduate School of Chiang Mai University and the Conservation and Utilization of Biodiversity Project, Biology Department, Faculty of Science, Chiang Mai University.

Special thanks to Dr. Uraporn Sardud who give the excellent recommendation and kindness assistance, Buasoy Mala for providing orchid samples at queen Sirikit Botanic Garden and field sites, Dr. Boonsom Bussaban for molecular and phylogenetic analysis assistance, Prof. Dr. Ken Izumori, Dr. Wayoon Poonperm and Mr. Tanikuji Yamaguchi for their help during the research

in Rare Sugar Research Center at Kagawa University, and Mr. Nakarin Suwannarat for fungal identification assistance.

The warm thanks for Saran Promsai, Paisalinee Chanthiboon, Jiraporn Palee, Anon Chawapun, Ranu Yucharean, Pawalee Srisuksomwong, Pongpun Leelahakriengkrai and Chayakon Punmas for the special friendship, the encouragement and for all their help.

The author would like to thank Dr. Sutthinun Khamna, Nittaya Boontim, Jaturong Kumla, Amornrat Jaiyasen, Keerati Tunreun, Kritsapong Veerarithipun, Natnaphat Rittipornlertrak and other colleagues in the Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University for laboratory assistance and I am also grateful to Mr. Keegan Hailer Kennedy for English language improving.

Finally, the special thanks to my family who provide their love, continual encouragement and help.

Ruangwut Chutima

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

### Abstract

**E46254**

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*,

46254

21% *Fusarium*, 14% *Cladosporium*, 8% *Xylaria*, 5% each of *Colletotrichum*, *Trichocladium* and *Tulasnella*, 3% each of *Dothiideomycete* 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 mycorrhizal 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 mycorrhizal potting media). Moreover, these two fungal isolates extensively colonized in roots of orchid

**E46254**

seedlings when compared with cultivated seedlings using non-mycorrhizal 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  $\mu\text{g/ml}$ ), *Epulorhiza* sp. CMU-SLP 007 (149.35  $\mu\text{g/ml}$ ) and *Epulorhiza* sp. CMU-NUT 013 (101.00  $\mu\text{g/ml}$ ). 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  $\mu\text{g/ml}$ ) while the highest level of siderophores was produced by *C. gloeosporioides*, CMU-AU 006.

**E46254**

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

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเพิ่มความสำเร็จในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดินของไทยด้วยเชื้อราไมคอร์ไรซา	
ผู้เขียน	นายเรืองวุฒิ ชูติมา	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. สายสมร ถ้ายอง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	Prof. Dr. Bernard Dell	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	Assoc. Prof. Dr. Goro Takata	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. สุญานี เวสสบุตร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

#### บทคัดย่อ

E16254

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 ไอโซเลทจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และอนุชีววิทยาโดยใช้ลำดับเบสในส่วนของ 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% *Dothiideomycete* 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

**E46254**

โปรโตคอมของกล้วยไม้ด้วยการเพาะเมล็ดร่วมกับเชื้อรานาน 133 วัน โดยบ่มในที่มืดเป็นเวลา 70 วัน ตามด้วยการให้แสง (1,000 Lux) สลับมืด (สว่าง: มืด 12:12 ชั่วโมง) เป็นเวลา 63 วัน พบว่าโปรโตคอมสามารถพัฒนาได้ถึงระยะที่ 5 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อราในจีส *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 และเพิ่มอัตราการรอดของต้นอ่อนกล้วยไม้ได้เมื่อเทียบกับต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเชื้อราไมคอร์ไรซา 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 มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของ L-tryptophan ที่ 6 mg/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต IAA ของเชื้อรานั้นพบว่า เชื้อราผลิต IAA มากที่สุดเมื่อเชื้อราเจริญในระยะ stationary phase และเมื่อนำ IAA ที่ได้จากการผลิตของ

**E16254**

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

นอกจากนี้พบว่าเชื้อราแอนโดไฟท์จำนวน 21 ไอโซเลทตรวจพบการผลิต siderophore ด้วยวิธี Azurol S (CAS) agar plate assay ขณะที่เชื้อราไมคอร์ไรซานั้นไม่สามารถตรวจพบการผลิต siderophore ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ ซึ่งเชื้อราทั้งหมดที่ตรวจพบนั้นผลิต siderophore ชนิด hydroxamate ในปริมาณ (0.69 – 34.74  $\mu\text{g/ml}$ ) โดยที่เชื้อรา *C. gloeosporioides* CMU-AU 006 ตรวจพบการผลิต siderophore ในปริมาณมากที่สุด

**คำสำคัญ:** เชื้อราแอนโดไฟท์, กรดอินโดทรีแอซิดิก, ไมคอร์ไรซากล้วยไม้, ไซเคอโรฟอร์, การงอกของเมล็ดร่วมกับเชื้อรา, กล้วยไม้ดิน

**TABLE OF CONTENTS**

	<b>Page</b>
<b>Acknowledgements</b>	iii
<b>Abstract (English)</b>	v
<b>Abstract (Thai)</b>	ix
<b>List of tables</b>	xxi
<b>List of figures</b>	xxv
<b>Abbreviations and symbols</b>	xxxv
<b>Chapter 1 General introduction and thesis outline</b>	1
<b>Chapter 2 Literature review</b>	
2.1 Orchid	5
2.2 Terrestrial orchid	8
2.3 Orchid seed	8
2.4 Orchid in Thailand	13

**TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)**

	<b>Page</b>
2.5 Mycorrhiza	15
2.6 Orchid mycorrhiza	19
2.7 Orchid mycorrhizal interactions	21
2.8 Isolation and identity of orchid mycorrhizal fungi	21
2.9 Roles of mycorrhizal associations	28
2.10 Siderophores production	30
2.11 Plant growth hormone, Indole-3-acetic acid (IAA), production	34
 <b>Chapter 3 Isolation and identification of orchid mycorrhizal fungi</b>	
3.1 Introduction	39
3.2 Materials and methods	40
3.2.1 Orchid source and root sampling	40
3.2.2 Orchid roots observation and mycorrhizal colonization	41

**TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)**

	<b>Page</b>
3.2.3 Fungal isolation	41
3.2.4 Fungal identification	45
3.2.4.1 Morphological observation	45
3.2.4.2 Molecular analysis	45
3.3 Results	47
3.3.1 Orchid roots observation and mycorrhizal colonization	47
3.3.2 Fungal isolation and identification	51
3.4 Discussion	59
 <b>Chapter 4 Effects of orchid mycorrhizal fungi on symbiotic seed germination</b>	
4.1 Introduction	62
4.2 Materials and methods	64
4.2.1 Orchid seed collection	64

## TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)

	<b>Page</b>
4.2.2 Orchid seed viability test	64
4.2.3 Symbiotic seed germination study of <i>P.susannae</i>	65
4.2.3.1 Effects of agar media on symbiotic seed germination	65
4.2.3.2 Effects of endophytic fungi recovered from <i>P. susannae</i> on symbiotic seed germination	66
4.2.3.3 Effects of mycorrhizal fungi on symbiotic seed germination	67
4.3 Results	71
4.3.1 Symbiotic seed germination of <i>P. susannae</i>	71
4.3.1.1 Effects of agar media on symbiotic seed germination	71
4.3.1.2 Effects of endophytic fungi recovered from <i>P. susannae</i> on symbiotic seed germination	73

**TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)**

	<b>Page</b>
4.3.1.3 Effects of mycorrhizal fungi on symbiotic seed germination	76
4.4 Discussion	80
 <b>Chapter 5 Screening for indole-3-acetic acid (IAA) and siderophores production by endophytic fungi</b>	
5.1 Introduction	85
5.2 Materials and methods	87
5.2.1 Colorimetric assay for IAA determination	87
5.2.2 Effect of L-tryptophan concentration on IAA production	88
5.2.3 Effect of incubation period on IAA production	88
5.2.4 Extraction of fungal IAA and thin layer chromatography	88
5.2.5 Evaluation of IAA biological activity	89
5.2.5.1 Kidney bean root cutting	89

**TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)**

	<b>Page</b>
5.2.5.2 Corn seed germination	90
5.2.5.3 Elongation of rice coleoptiles	90
5.2.6 Siderophores production	91
5.2.6.1 Screening for siderophores production	91
5.2.6.2 Chemical determination of produced siderophores	91
5.2.7 Statistic analysis	92
5.3 Results	92
5.3.1 Determination of fungal IAA	92
5.3.2 Effect of L-tryptophan concentration on IAA production	94
5.3.3 IAA extraction and thin layer chromatography	97
5.3.4 Evaluation of IAA biological activities of fungal IAA	97
5.3.4.1 Kidney bean root cutting	97
5.3.4.2 Corn seed germination	99
5.3.4.3 Elongation of rice coleoptiles	101

**TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)**

	<b>Page</b>
5.3.4 Detection for siderophores production	102
5.4 Discussion	105
 <b>Chapter 6 Optimization of orchid mycorrhizal fungi on media</b>	
6.1 Introduction	109
6.2 Materials and methods	110
6.2.1 Effects of temperature on fungal growth on PDA	110
6.2.2 Effects of pH on fungal growth on PDA	110
6.2.3 Evaluation of suitable grain and potting media for fungal inoculum production	112
6.3 Results	113
6.3.1 Effects of temperature on fungal growth on PDA	113
6.3.2 Effects of pH on fungal growth on PDA	118

**TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)**

	<b>Page</b>
6.3.3 Evaluation of suitable grain and potting media for fungal inoculum production	122
6.4 Discussion	124
 <b>Chapter 7 Mycorrhizal colonization and effects of mycorrhizal fungi on growth of orchid seedlings</b>	
7.1 Introduction	127
7.2 Materials and methods	129
7.2.1 Fungal inoculum	129
7.2.2 Symbiotic cultivation of orchid seedlings	129
7.2.3 Evaluation of symbiotic orchid seedlings	130
7.2.4 Determination of mycorrhizal colonization	131
7.2.5 Statistic analysis	132
7.3 Results	132

**TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)**

	<b>Page</b>
7.3.1 Evaluation of symbiotic orchid seedlings	132
7.3.2 Determination of mycorrhizal colonization	132
7.4 Discussion	135
<b>Chapter 8 General discussion</b>	<b>138</b>
<b>References</b>	<b>146</b>
<b>Appendices</b>	<b>166</b>
<b>Appendix A</b>	<b>167</b>
<b>Appendix B</b>	<b>171</b>
<b>Appendix C</b>	<b>173</b>
<b>Appendix D</b>	<b>175</b>
<b>Appendix E</b>	<b>177</b>
<b>Curriculum Vitae</b>	<b>179</b>

## LIST OF TABLES

<b>Table</b>	<b>Page</b>
2.1 Seed germination and protocorm developmental stages use for determination of growth and development of terrestrial orchid <i>in vitro</i>	12
2.2 Some terrestrial orchid species in Thailand	14
2.3 Types of mycorrhizal associatuions	18
2.4 The major members of orchid mycorrhizal fungi	20
2.5 Classification of the Rhizoctonia-forming heterobasidiomycetes	26
2.6 Types of interspecies antagonisms leading to biological control of plant pathogens	33
2.7 Predominant siderophore types in major mycorrhizal types	34
2.8 Several microorganisms which are able to converted L-tryptophan to indole-3-acetic acid (IAA)	37
3.1 Collection site and time of collection of six terrestrial orchid samples	47
3.2 Endophytic fungi isolated from roots of six terrestrial orchids	53

## LIST OF TABLES (CONTINUED)

Table	Page
4.1 Mycorrhizal fungi isolated from roots of <i>Pecteilis susannae</i> and used to determined effects of agar media on symbiotic seed germination	68
4.2 Seed germination and protocorm developmental stages use for determination of growth and development of <i>Pecteilis susannae</i> <i>in vitro</i>	68
4.3 Endophytic fungi isolated from roots of <i>Pecteilis susannae</i> and used in symbiotic seed germination	69
4.4 Mycorrhizal fungi isolated from roots of <i>Pecteilis susannae</i> , <i>Eulophia spectabilis</i> , <i>Paphiopedilum</i> , and <i>Spathoglottis affinis</i> and used in symbiotic seed germination	70
4.5 Effects of 3 agar media (Oatmeal agar, Cellulose agar and Vacin and Went agar) on symbiotic seed germination and protocorm development of <i>Pecteilis susannae</i> 70 days after sowing	73
4.6 Effects of 11 endophytic fungi on seed germination and protocorm development of <i>Pecteilis susannae</i> 133 days after sowing	78

## LIST OF TABLES (CONTINUED)

Table	Page
5.1 Selected endophytic fungi isolated from root of Thai native terrestrial orchids, <i>Spathoglottis affinis</i> , <i>Paphiopedelum bellatulum</i> and <i>Phaius tankervilleae</i>	92
5.2 IAA production by endophytic fungi isolated from root of six terrestrial orchids	93
5.3 Effect of IAA produced by <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CMU-AU 006, <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-SLP 007 and <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-NUT 013 on root to shoot ratio of corn	101
5.4 Siderophores production by endophytic fungi isolated from root of six terrestrial orchids	103
6.1 Orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of six terrestrial orchids and used in optimization of fungal growth temperature and pH	111
6.2 Grain and potting media used for evaluation of suitable material for fungal inoculum production	112

## LIST OF TABLES (CONTINUED)

Table	Page
6.3 The optimal growth pH evaluated from fungal dry weight and fungal colony diameter of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of six terrestrial orchids after cultured on PDA for 10 days	119
7.1 Effects of mycorrhizal inoculum of fungal isolates CMU-DP 506, <i>Epulorhiza</i> sp., and CMU-DP 514, <i>Tulasnella</i> sp., used for potting media on growth and survival rate of <i>Doritis pulcherrima</i> seedlings after cultivation for 90 days	133
D Absorbance at 530 nm of various concentration of standard IAA	176
E Absorbance at 480 nm of various concentration of deferoxamine mesylate by iron-perchlorate assay	178

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Structure of the thesis	4
2.1 The schematic overview of epiphytic orchid and terrestrial orchid	7
2.2 Orchid capsule and seed, the mature capsule of <i>Calanthe tricarina</i> , seed of <i>Calanthe tricarina</i> , and seed of <i>Liparis loeselii</i>	10
2.3 Growth stage used to determine germination and development of orchid seed <i>in vitro</i>	12
2.4 Mycorrhizal associations; the interaction of plant roots, soil (nutrients in soil) and fungi (Brundrett <i>et al.</i> 1996)	16
2.5 A schematic overview of the different forms of mycorrhizas	17
2.6 The coils of fungal hyphae, pelotons, of orchid mycorrhizal fungi within cortex cells of orchid roots	20
2.7 Drawing of a typical orchid mycorrhizal fungi, <i>Rhizoctonia repen</i> ( <i>Tulasnella calospora</i> ), isolated in pure culture	23

## LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure	Page
2.8 Internal transcribed spacer (ITS) regions and recognized sites of ITS primers and Large subunit (LSU) RNA and recognized sites of LSU primers	27
2.9 Mechanism of iron acquisition by microbial siderophore	32
2.10 Pathways for the microbial biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) from tryptophan	36
3.1 Collection sites of terrestrial orchid samples	43
3.2 Location of Chiang Mai province, in northern part of Thailand	44
3.3 <i>Doritis pulcherrima</i>	48
3.4 <i>Eulophia spectabilis</i>	48
3.5 <i>Paphiopedilum bellatulum</i>	49
3.6 <i>Pecteilis susannae</i>	49
3.7 <i>Phaius tankervilleae</i>	50
3.8 <i>Spathoglottis affinis</i>	50

## LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure	Page
3.9 Isolation of fungal endophytes from roots of <i>Pecteilis susannae</i>	52
3.10 Percentages of the occurrence of endophytic fungal taxa isolated from roots of six terrestrial orchids	56
3.11 <i>Epulorhiza</i> isolates	57
3.12 Maximum-parsimony trees based on an alignment of internal transcribed spacer1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 of 19 fungal endophytes isolated from roots of six terrestrial orchids	58
4.1 <i>Pecteilis susannae</i> in natural habitat (site 2: Sa-Lunag, Chiang Mai, Thailand)	65
4.2 Viable seed with the embryo stained red and hyaline embryo of dead seed of <i>Pecteilis susannae</i> after being treated with tetrazolium	72
4.3 Effects of 8 endophytic fungi on seed germination and protocorm development of <i>Pecteilis susannae</i> 70 days after sowing	75

## LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure	Page
4.4 Symbiotic seed germination and protocorm developmental stages of <i>Pecteilis susannae</i> using fungal endophyte <i>Epulorhiza</i> sp., CMU-AUG 013, cultured on Oatmeal agar 70 days after sowing	76
4.5 Symbiotic seed germination and protocorm developmental stages of <i>Pecteilis susannae</i> using mycorrhizal fungi <i>Epulorhiza</i> sp., CMU-AUG 007, cultured on Oatmeal agar 133 days after sowing	77
4.6 Effects of 11 endophytic fungi on seed germination and protocorm development of <i>Pecteilis susannae</i> 133 days after sowing	79
5.1 Effect of L-tryptophan concentration on IAA production by <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CMU-AU 006, <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-SLP 007 and <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-NUT 013	95
5.2 Effect of incubation period on IAA production by <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CMU-AU 006	96

## LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure	Page
5.3 Effect of incubation period on IAA production by <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-SLP 007	96
5.4 Effect of incubation period on IAA production by <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-NUT 013	97
5.5 Effect of IAA produced by <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CMU-AU 006, <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-SLP 007 and <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-NUT 013 on root formation of kidney bean root cutting	98
5.6 Effect of IAA produced by <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CMU-AU 006, <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-SLP 007 and <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-NUT 013 on corn seed germination and the length of root	100
5.7 Effect of IAA produced by <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CMU-AU 006, <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-SLP 007 and <i>Epulorhiza</i> sp. CMU-NUT 013 on elongation of rice coleoptiles	102
5.8 The Chrome Azurol S (CAS) agar plate assay showing the purplish-red and yellow halo after inoculated with the active fungal isolates for 14 days	105

## LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure	Page
6.1 Effects of temperature on growth of fungal isolate CMU-AUG 028, <i>Epulorhiza</i> sp., after culturing on PDA and incubation at 20°C for 10 days	113
6.2 Effects of temperature on growth (dry weight) of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of <i>Pecteilis susannae</i> after cultured on PDA for 10 days	114
6.3 Effects of temperature on growth (colony diameter) of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of <i>Pecteilis susannae</i> after cultured on PDA for 10 days	114
6.4 Effects of temperature on growth (dry weight) of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of <i>Eulophia spectabilis</i> after cultured on PDA for 10 days	115
6.5 Effects of temperature on growth (colony diameter) of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of <i>Eulophia spectabilis</i> after cultured on PDA for 10 days	115

## LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure	Page
6.6 Effects of temperature on growth (dry weight) of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of <i>Paphiopedilum bellatullum</i> and <i>Phaius tankervilleae</i> after cultured on PDA for 10 days	116
6.7 Effects of temperature on growth (colony diameter) of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of <i>Paphiopedilum bellatullum</i> and <i>Phaius tankervilleae</i> after cultured on PDA for 10 days	116
6.8 Effects of temperature on growth (dry weight) of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of <i>Doritis pulcherrima</i> and <i>Spathoglottis affinis</i> after cultured on PDA for 10 days	117
6.9 Effects of temperature on growth (colony diameter) of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of <i>Doritis pulcherrima</i> and <i>Spathoglottis affinis</i> after cultured on PDA for 10 days	117
6.10 Effects of pH on growth of fungal isolate CMU-AUG 028, <i>Epulorhiza</i> sp.	118

## LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure	Page
6.11 Effects of pH on growth (dry weight) of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of six terrestrial orchids after culturing on PDA for 10 days	120
6.12 Effects of pH on growth (colony diameter) of orchid mycorrhizal fungi isolated from roots of six terrestrial orchids after culturing on PDA for 10 days	121
6.13 Mycelium growth of orchid mycorrhizal fungi, <i>Epulorhiza</i> sp. (CMU-AUG 007), isolated from roots of <i>Pecteilis susanne</i> in grain and potting media after incubation at 30°C for 15 days	122
6.14 Mycelium growth of orchid mycorrhizal fungi, <i>Epulorhiza</i> sp. (CMU-AUG 028), isolated from roots of <i>Pectelis susannae</i> in grain and potting media after incubation at 30°C for 15 days	123
6.15 Mycelium growth of orchid mycorrhizal fungi, <i>Epulorhiza</i> sp. (CMU-AUG 014), isolated from roots of <i>Eulophia spectabilis</i> in grain and potting media after incubation at 30°C for 15 days	123

## LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure	Page
6.16 Growth of mycelium of orchid mycorrhizal fungi, <i>Epulorhiza</i> sp. (CMU-AUG 028), isolated from roots of <i>Pectelis susannae</i> , in grain and potting media	124
7.1 Orchid mycorrhizal inocula of fungal isolates CMU-DP 506, <i>Epulorhiza</i> sp. and CMU-DP 514, <i>Tulasnella</i> sp.	130
7.2 Seedlings of <i>Doritis pulcherrima</i> after cultivation using non mycorrhizal potting medium, potting medium with fungal isolate CMU-DP 506, <i>Epulorhiza</i> sp. and CMU-DP 514, <i>Tulasnella</i> sp. for 90 days	133
7.3 Peloton structures, coiled hyphae, in cortical cells of <i>Doritis pulcherrima</i> seedlings	134
7.4 Root and crop colonization by mycorrhizal fungi of <i>Doritis pulcherrima</i> seedlings after cultivation using potting media mixed with mycorrhizal inoculum of CMU-DP 506, <i>Epulorhiza</i> sp., and CMU-DP 514, <i>Tulasnella</i> sp., for 90 days	135
D Standard curve of IAA concentration against absorbance at 530 nm	176

**LIST OF FIGURES (CONTINUED)**

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
E Standard curve for hydroxamate concentration determination using deferoxamine mesylate as standard	178

## ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

AM	arbuscular mycorrhiza
anam.	anamorph
<i>Asco-</i>	<i>Ascomycetes</i>
<i>Basidio-</i>	<i>Basidiomycetes</i>
cm	centimeter
DNA	deoxyribonucleic acid
E	embryo
ECM	ectomycorrhiza
g	gram
IAA	indole-3-acetic acid
ITS	internal transcribed spacer
L	liter
LSU	large subunit
mg	milligram
min	minute

ml	milliliter
mm	millimeter
M	molar (mol per liter)
mM	milli Molar
MW	molecular weight
n	number
nm	nanometer
No.	number
P	probability
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
ppm	part per million
rh	rhizosphere soil
rt	root
sec	second
TLC	thin layer chromatography

rpm	rotation per minute
UV	ultraviolet
VAM	vesicular-arbuscular mycorrhiza
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume
w/w	weight by weight
°C	degree Celsius
μg	microgram
μl	microlitre
μm	micrometer
μmol	micromole