

IDENTIFICATION OF A MYCORRHIZA ISOLATE FROM *PAPHIOPEDILUM*
BARBATUM (LINDL.) PFITZER FROM *EX SITU* LOCATION AND
DETERMINATION OF ITS GROWTH-ENHANCING CAPABILITIES

NURUL ALIAA IDRIS

MASTER OF SCIENCE
UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA

2010

**IDENTIFICATION OF A MYCORRHIZA ISOLATE FROM *PAPHIOPEDILUM
BARBATUM* (LINDL.) PFITZER FROM *EX SITU* LOCATION AND
DETERMINATION OF ITS GROWTH-ENHANCING CAPABILITIES**

By

NURUL ALIAA IDRIS

**Thesis Submitted to the School of Graduate Studies, Universiti Putra Malaysia, in
Fulfilment of the Requirements for the Degree of Master of Science**

December 2010

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Putra Malaysia in fulfilment of the requirement for the degree of Master of Science

IDENTIFICATION OF A MYCORRHIZA ISOLATE FROM *PAPHIOPEDILUM BARBATUM* (LINDL.) PFITZER FROM *EX SITU* LOCATION AND DETERMINATION OF ITS GROWTH-ENHANCING CAPABILITIES

By

NURUL ALIAA IDRIS

December 2010

Chairman: Faridah Qamaruz Zaman, PhD

Faculty: Institute of Bioscience

Orchids and mycorrhiza are known to have a symbiotic relationship that function particularly in seed germination and also in promoting overall plant growth. It is believed that a certain orchid mycorrhiza that functions to enhance plant growth also lives symbiotically in the roots of *Paphiopedilum barbatum*. Thus, the objectives of this research are to identify the mycorrhizal fungi that form a symbiosis with the terrestrial tropical orchid, *P. barbatum* and evaluate its capabilities to enhance growth in certain *in vitro* *Paphiopedilum* seedlings. Mycorrhizal fungi were isolated from the roots of *P. barbatum* collected from five different locations in Peninsular Malaysia. Isolation of fungi was carried out according to the Currah method for initial morphological identification and then through molecular identification using the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA of the isolates. The identified

mycorrhiza was then inoculated on *in vitro* selected *Paphiopedilum* seedlings on a double slanting media to observe mycorrhization and the occurrence of enhancement of plant growth. Only one mycorrhiza was isolated and identified; namely *Tulasnella calospora* (anamorph: *Rhizoctonia repens*) which is a ubiquitous orchid mycorrhiza. Phylogenetic analyses with sequences originating from different hosts from different countries indicated a close genetic relatedness of the sequences studied. *In vitro* inoculation of *T. calospora* on seedlings from the *Paphiopedilum* genus after incubation for 24 weeks showed a significant 1.1% increase in fresh weight in *P. rothschildianum* with 68% root mycorrhization. However, no significant growth was observed in the seedlings of *P. sanderianum*, *P. gigantifolium* x *P. rothschildianum* and *P. esquirolei* x *P. rothschildianum* when inoculated with *T. calospora* after incubation for 24 weeks even though each had 32%, 24% and 13% root mycorrhization. This preliminary finding present an insight into the orchid mycorrhiza of the *Paphiopedilum* but a more extensive study is needed to further explore this symbiotic relationship and furthermore contribute in developing a beneficial application whether commercially or for the conservation of this genus.

Abstrak thesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Putra Malaysia sebagai memenuhi keperluan untuk ijazah Master Sains

**PENGENALPASTIAN SEJENIS MIKORIZA TERPENCIL DARI
PAPHIOPEDILUM BARBATUM (LINDL.) PFITZER DARI LOKASI *EX SITU*
DAN PENENTUAN KEBOLEHAN UNTUK MENINGKATKAN
PERTUMBUHAN**

Oleh

NURUL ALIAA IDRIS

Disember 2010

Pengerusi: Faridah Qamaruz Zaman, PhD

Fakulti: Institut Biosains

Orkid dan mikoriza diketahui mempunyai hubungan simbiotik yang berfungsi terutamanya dalam percambahan biji benih dan juga merangsang keseluruhan pertumbuhan pokok. Di percayai bahawa terdapat mikoriza orkid tertentu membantu dalam pertumbuhan pokok yang hidup secara simbiotik di dalam akar *Paphiopedilum barbatum*. Maka, objektif kajian ini adalah untuk mengenalpasti mikoriza yang boleh membina hubungan simbiotik dengan orkid terrestrial *P. barbatum* dan menguji kebolehannya merangsangkan pertumbuhan dalam anak pokok tertentu dari genus *Paphiopedilum* secara *in vitro*. Kulat mikoriza telah dipencilkan dari akar *P. barbatum* yang dikumpulkan dari lima lokasi yang berbeza di Semenanjung Malaysia. Pemencilan telah dilakukan menggunakan kaedah Currah untuk pengenalpastian awal

secara morfologi dan kemudian menggunakan kaedah molekul dengan menggunakan bahagian Internal Transcribed Spacer (ITS) dari DNA ribosom nukleus kulat tersebut. Mikoriza yang telah dikenalpasti itu kemudiannya telah diinokulasi kepada anak pokok *Paphiopedilum* yang terpilih secara *in vitro* di atas media dua sendeng untuk memerhatikan mikorisasi dan kesannya ke atas pertumbuhan. Hanya satu mikoriza iaitu *Tulasnella calospora* (anamorf: *Rhizoctonia repens*) iaitu mikoriza orkid yang telah dipencilkan dan dikenalpasti. Analisis filogenetik bersama jujukan DNA yang diperolehi daripada perumah yang berbeza dan negara yang berbeza menunjukkan perkaitan genetic yang rapat antara jujukan yang telah diuji. Inokulasi secara *in vitro*, *T. calospora* ke atas anak pokok dari genus *Paphiopedilum* selepas inkubasi selama 24 minggu menunjukkan peningkatan signifikan dari segi berat basah sebanyak 1.1% bagi *P. rothschildianum* dengan 68% mikorisasi akar. Namun begitu, tiada peningkatan pertumbuhan yang signifikan dapat dilihat bagi anak pokok *P. sanderianum*, *P. gigantifolium* x *P. rothschildianum* dan *P. esquirolei* x *P. Rothschildianum* yang diinokulasi dengan *T. calospora* selepas diinkubasi selama 24 minggu walaupun masing-masing menunjukkan 32%, 24% dan 13% mikorisasi akar. Pertemuan awal ini memberi maklumat awal tentang mikoriza orkid dalam *Paphiopedilum* tetapi kajian yang lebih menyeluruh diperlukan untuk mendalami hubungan simbiotik ini dan seterusnya menyumbang dalam pembangunan aplikasi yang berguna sama ada secara komersial atau bagi tujuan konservasi genus ini.