Thesis Title Biodiversity, Host Range, and Growth of Edible Ectomycorrhizal Fungi in Upper Northern Thailand

Author Miss Rarunee Sanmee

Degree Doctor of Philosophy (Biology)

Thesis Advisory Committee
Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Bernard Dell Member
Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai Member
Dr. Uraporn Sardsud Member

ABSTRACT

This study was initiated to provide wide ranging data on the forest fungi of upper northern Thailand with particular emphasis on edible species of commercial value. From this survey, twelve popular edible ectomycorrhizal fungi (ECMF) were selected and analyzed for their nutritive value. Furthermore, Hed Har or *Phaeogyroporus portentosus* and Hed Phor or *Astraeus hygrometricus* were chosen to investigate optimal growth conditions and host range. DNA primers for these two ECMF were developed and used for confirming mycorrhizas. Basidiomes of Hed Har were successfully formed *in vitro* without a host.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Three hundred species of 41 families were collected of which 15 species or 5% were Ascomycetes, and 285 species or 95% were Basidiomycetes. Of these, almost 70% are likely to be ectomycorrhizal fungi (ECMF). The most abundant family was *Russulaceae* (64 species), followed by *Boletaceae* (53 species) and *Amanitaceae* (21 species). Only 4 species of hypogeous fungi, *Austrogautieria* spp. (3 species) and *Aroramyces* sp. (1 species) were found in this survey. One new combination, *Mycoamaranthus cambodgensis*, was made. Twenty six taxa of edible fungi collected by local people living near the study sites were studied in detail.

Twenty one taxa of *Amanita* were identified. The presence of five previously reported taxa, *A. angustilamellata*, *A. hemibapha s.l.*, *A. mira*, *A. princeps*, and *A. sculpta* was confirmed. Another fifteen taxa, *A. alboflavescens, A. avellaneosquamosa, A. chepangiana, A. flavipes, A. fritillaria, A. fuliginea, A. hongoi, A. manginiana sensu* W. F. Chiu, *A. obsita, A. ovalispora, A. rubrovolvata, A. sinensis, A. sinocitrina, A. subglobosa,* and *A. virgineoides* were new records for Thailand. Furthermore, one new species, *A. siamensis*, was described and named after the country where the mushroom was collected. A key to the species of *Amanita* is provided.

The nutritive and market value of sporocarps of selected edible wild ECMF was determined. Protein, fat, crude fibre and carbohydrate concentrations were 14.0-24.2, 2.7-9.5, 8.3-16.8, and 41.6-65.1% dry weight, respectively. Mineral contents were: macronutrients (mg g^{-1} dry weight) P 2.1-8.1, K 12.8-45.2, S 1.1-6.1, Ca 0.1-2.4, Mg 0.5-1.6; micronutrients (mg kg^{-1} dry weight) Fe 161.9-3253.5, Zn 37.8-252.5, Mn 13.0-329.4, Cu 11.6-81.1, B 1.6-7.1, and Se 0-12.6. The main sporocarp sugars were D-glucose, D-fructose, trehalose, D-mannose, D-arabinose, D-xylose, D-fucose,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

L-rhamnose, and D-galactose. The sugar alcohol components were mannitol, glycerol, myo-inositol, meso-erythritol, D-arabitol, dulcitol, xylitol, and D-sorbitol.

Phaeogyroporus portentosus strain WPPH2 and *Astraeus hygrometricus* strain PHOR5 were isolated from sporocarps and used for all experiments. Culture conditions for the growth of *P. portentosus* and *A. hygrometricus* were studied. The effects of culture media, temperature, pH, agar concentration, salinity, and solid substrate were examined to determine optimal conditions. Both ECMF had capability to grow in all tested culture media. Gamborg, MMN, and MS medium were considered to be the best media for WPPH2 and Fries medium was considered to be appropriate for vegetative growth of PHOR5. Growth of WPPH2 was optimal at 30 °C whereas *A. hygrometricus* grew equally well at 30 and 37 °C. A pH of 4 was optimal for both ECM and growth was inhibited at pH 2 and >7. Maximum biomass production in *P. portentosus* occurred in still liquid culture and growth was reduced by more than 25% in shaking culture. By contrast, shaking did not reduce growth in *A. hygrometricus*. Biomass of *P. portentosus* increased linearly with NaCl whereas NaCl had no effect on yield of *A. hygrometricus*. *P. portentosus* grew in all types of grain media. Peat-vermiculite was the only medium tested that was suitable for *A. hygrometricus*. *P. portentosus* was able to degrade starch and skim milk; and a clear zone was clearly visible. *A. hygrometricus* shown very poor ability to degrade starch.

Production of fruit bodies without a host plant was investigated under laboratory conditions. Four fruit bodies of *P. portentosus* WPPH2 formed on sorghum grain medium 17 days after plates were transferred from 26±1 °C in the dark to 12 hr light/12 hr dark and 24±1 °C.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Five native tree species (*Castanopsis tribuloides, Dipterocarpus alatus*, *Dimocarpus longan, Pinus kesiya* and *Syzygium cumini*) were used for evaluating host range with *P. portentosus* and *A. hygrometricus* under greenhouse conditions. *Eucalyptus camaldulensis*, an exotic tree from Australia, was challenged with the two fungi *in vitro*. Both experiments were run for 8 months. *E. camaldulensis* showed typical incompatible interactions with the two fungi (Hartig nets and fungal mantles did not form). In the greenhouse, diverse ectomycorrhiza morphotypes formed on all kind of native tree species. However, only *P. kesiya* inoculated with *P. portentosus* showed a positive reaction with the designed primer HAR2A. This mycorrhiza had a distinct mantle and Hartig net.

The research findings are discussed in relation to the need for research on edible forest fungi in Thailand.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายทางชีวภาพ พืชอาศัยและการเจริญของเชื้อรา เอกโตมายคอไรซาในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

ผู้เขียน นางสาวรารุณี แสนหมี่

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. สายสมร ลำยอง	ประธานกรรมการ
Assoc. Prof. Dr. Bernard Dell	กรรมการ
รศ.ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย	กรรมการ
ดร. อุราภรณ์ สอาดสุด	กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เริ่มจากการสำรวจรวบรวมข้อมูลความหลากหลายของเชื้อราในป่าภาคเหนือตอนบนโดยได้มุ่งเน้นในชนิดที่กินได้และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ รวมถึงการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเห็ดในกลุ่มเอกโตมายคอไรซาที่ได้รับความนิยมในการรับประทาน 12 ชนิด จากนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกเห็ดเอกโตมายคอไรซา เห็ดห้า *Phaeogyroporus portentosus* และเห็ดเผาะ *Astraeus hygrometricus* เพื่อทำการศึกษาหาสภาพที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโตของเห็ดทั้งสองชนิดโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการผลิตกล้าเชื้อสำหรับใช้ในงานทดลองในส่วนของการตรวจสอบหาขอบเขตของพืชอาศัยของเชื้อราทั้งสองชนิด และได้ทำการสร้าง primer ที่มีความจำเพาะสำหรับเชื้อราในแต่ละชนิดขึ้นเพื่อใช้ในการยืนยันผลที่ได้ และดอกเห็ดของเชื้อเห็ดห้าได้ถูกเพาะขึ้นสำเร็จในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการสำรวจพบเชื้อราขนาดใหญ่ทั้งหมด 300 species จาก 41 families โดยพบว่า 5% หรือ 15 species คือเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes ส่วนอีก 95% หรือ 285 species คือเชื้อราในกลุ่ม Basidiomycetes และพบว่าเชื้อราทั้งหมดนั้นจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อราเอกโตมายคอไรซาถึง 70% โดยกลุ่มที่พบมากที่สุดคือ *Russulaceae* (64 species) รองลงมาคือเชื้อราในกลุ่ม *Boletaceae*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(53 species) และ *Amanitaceae* (21 species) ตามลำดับ ส่วนเชื้อราที่อยู่ใต้พื้นดินนั้นพบเพียง 4 species เท่านั้น ได้แก่ *Austrogautieria* spp. (3 species) และ *Aroramyces* sp. (1 species) พบเห็ดที่กินได้โดยได้รับการยืนยันจากชาวบ้านที่อาศัยอยู่บริเวณที่เก็บตัวอย่างเห็ดทั้งหมด 26 species ซึ่งรวมหนึ่งชนิดที่เป็น new combination นั่นคือ *Mycoamaranthus cambodgensis*

พบเห็ดในกลุ่ม Amanita ทั้งหมด 21 ชนิด โดยมี 5 ชนิดที่เคยมีรายงานในประเทศไทย คือ *A. angustilamellata*, *A. hemibapha s.l.*, *A. mira*, *A. princes* และ *A. sculpta* และอีก 15 ชนิดนั้นยังไม่เคยมีการรายงานในประเทศไทย คือ *A. alboflavescens, A. avellaneosquamosa, A. chepangiana, A. flavipes, A. fritillaria, A. fuliginea, A. hongoi, A. manginiana sensu* W. F. Chiu, *A. obsita, A. ovalispora, A. rubrovolvata, A. sinensis, A. sinocitrina, A. subglobosa* และ *A. virgineoides* และเป็นเห็ดชนิดใหม่ 1 ชนิด โดยได้ตั้งชื่อของเห็ดตามประเทศที่ได้พบเห็ดชนิดนี้ เห็ดชนิดนี้ คือ *A. siamensis* และ key ของเห็ดในกลุ่มนี้ได้ถูกจัดทำขึ้น

ในการศึกษาหาคุณค่าทางอาหารและทางเศรษฐกิจของเห็ดเอกโตมายคอไรซาที่กินได้ พบว่า โดยรวมแล้วเห็ดมีองค์ประกอบของโปรตีน 14.0-24.2% ไขมัน 2.7-9.5% เส้นใย 8.3-16.8% และคาร์โบไฮเดรต 41.6-65.1% น้ำหนักแห้ง และในส่วนของธาตุอาหารโดยรวมพบว่ามีองค์ประกอบของธาตุอาหารหลัก (ในหน่วย mg g^{-1} dry weight) ได้แก่ ฟอสฟอรัส 2.1-8.1 โพแทสเซียม 12.8-45.2 กำมะถัน 1.1-6.1 แคลเซียม 0.1-2.4 แมกนีเซียม 0.5-1.6 และธาตุอาหารรอง (ในหน่วย mg kg^{-1} dry weight) ได้แก่ เหล็ก 161.9-3253.5 สังกะสี 37.8-252.5 แมงกานีส 13.0-329.4 ทองแดง 11.6-81.1 โบรอน1.6-7.1 ซิลีเนียม 0-12.6 และพบว่าในเห็ดมีองค์ประกอบของน้ำตาล คือ D-glucose, D-fructose, trehalose, D-mannose, D-arabinose, D-xylose, D-fucose, L-rhamnose และ D-galactose และ พบองค์ประกอบของน้ำตาลแอลกอฮอล์ คือ mannitol, glycerol, myo-inositol, meso-erythritol, D-arabitol, dulcitol, xylitol และ D-sorbitol

เส้นใยบริสุทธิ์ *Phaeogyroporus portentosus* สายพันธุ์ WPPH2 และ *Astraeus hygrometricus* สายพันธุ์ PHOR5 เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในงานทดลองทั้งหมดในการศึกษานี้ โดยในการศึกษาหาสภาพที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญนั้นได้ทำการศึกษาถึงชนิดของอาหาร อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของวุ้น (สำหรับทำอาหารแข็ง อาหารเหลว อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว) ความเค็ม และ solid substrate และพบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารทุกชนิดที่นำมาใช้ในการทดลอง อย่างไรก็ตามพบว่าอาหาร Gamborg, MMN และ MS เหมาะสมที่สุดสำหรับ WPPH2 และอาหาร Fries เหมาะสำหรับ PHOR5 ส่วนในเรื่องของอุณหภูมิพบว่า WPPH2 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C ส่วน *A. hygrometricus* นั้นพบว่าสามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิ 30 °C เช่นเดียวกับเจริญในที่อุณหภูมิ 37 °C ในส่วนของค่าความเป็นกรดด่างพบว่าที่ pH

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4 จัดเป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดและพบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดไม่สามารถเจริญได้ใน pH 2 และ >7 และพบว่าความแข็งเหลวของอาหารและลักษณะการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่าหรือไม่มีการเขย่านั้นมีผลต่อการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิดไม่เหมือนกัน นั่นคือ สำหรับเห็ด *P. portentosus* พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อลดลง มากกว่า 25% ในการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าเมื่อเปรียบเทียบกับการตั้งทิ้งไว้ แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในเห็ด *A. hygrometricus* ความเค็มไม่มีผลต่อการเจริญของ *A. hygrometricus* แต่มีผลแบบเส้นตรงในการเจริญของ *P. portentosus* นั่นคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl เชื้อราก็จะเจริญได้ดียิ่งขึ้น ส่วนในเรื่องของ solid substrate พบว่า *P. portentosus* สามารถเจริญได้ในอาหารเมล็ดธัญญพืชทุกชนิดและชนิดที่เหมาะสมที่สุดคือเมล็ดข้าวฟ่าง ส่วน *A. hygrometricus* นั้นพบว่าสามารถเจริญได้ใน peat-vermiculite เท่านั้น นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถในการย่อยสารในกลุ่มที่มีโครงสร้างเชิงซ้อนคาร์บอนและไนโตรเจน ได้แก่ แป้ง เซลลูโลส ลิกนิน แมนแนน ไซแลน และหางนม พบว่า *P. portentosus* มีความสามารถในการใช้แป้งและหางนมโดยแสดงลักษณะ clear zone ที่ชัดเจน ในขณะที่ *A. hygrometricus* สามารถใช้แป้งได้เล็กน้อย

การผลิตดอกเห็ดของเชื้อราเอกโตมายคอไรซาโดยปราศจากพืชอาศัยได้ถูกทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถพบดอกเห็ดทั้งหมดสี่ดอกขึ้นบนอาหารเมล็ดข้าวฟ่างโดยพบในวันที่ 17 หลังจากที่ได้ทำการย้ายเปลี่ยนสภาพของห้องเพาะเลี้ยงคือเปลี่ยนจากการเจริญภายใต้อุณหภูมิ 26±1 °C ในที่มืด มาอยู่ที่อุณหภูมิ 24±1 °C ในที่สว่างสลับมืดอย่างละ 12 ชั่วโมง

ในการศึกษาหาพืชอาศัยของเห็ด *P. portentosus* และ *A. hygrometricus* ได้ทำการทดลองกับพืชทั้งหมด 6 ชนิด คือ *Castanopsis tribuloides, Dipterocarpus alatus, Dimocarpus longan, Eucalyptus camaldulensis, Pinus kesiya* และ *Syzygium cumini* โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 งานทดลอง คือ งานทดลองในห้องปฏิบัติการ เป็นการทดลองกับ *E. camaldulensis* และงานทดลองในโรงเรือนกับพืชที่เหลือ 5 ชนิด โดยงานทดลองทั้งสองได้ทำการเก็บผลในเดือนที่ 8 หลังจากการปลูกเชื้อ พบว่าในส่วนของการทดลองภายใต้สภาพปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการนั้นพบลักษณะรากบวมสั้นสีน้ำตาลซึ่งแตกต่างจากรากของ *E. camaldulensis* โดยทั่วไป แต่หลังจากที่ได้ทำการตัด section ไม่พบลักษณะ Hartig net หรือ mantle sheet ส่วนในงานทดลองในโรงเรือนนั้น พบรากมายคอไรซาลักษณะแตกต่างกันหลายชนิดและไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้ ซึ่งพบว่า DNA จากรากมายคอไรซาจาก *P kesiya* ที่ปลูกเชื้อด้วย *P. portentosus* เท่านั้นที่ให้ผลบวก เมื่อใช้ primer ที่สร้างขึ้น คือ HAR2A และพบลักษณะ mantle และ Hartig net

ผลของงานวิจัยที่ได้จะมีส่วนสำคัญในการพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อราที่กินได้ที่มีอยู่ในธรรมชาติของประเทศไทย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved