Thesis Title Distribution and Efficiency of Endophytic Diazotrophic Bacteria in Local Rice

Author Mr. Chakrapong Rangjaroen

Degree Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)

Thesis Advisory Committee Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Advisor

Prof. Dr. Benjavan Rerkasem Co-advisor

Prof. Dr. Neung Teaumroong Co-advisor

ABSTRACT

Community structures of endophytic and endophytic diazotrophic bacteria in plant tissues of 5 highland local rices grown in different stages of growth at northern Thailand were compared using PCR-DGGE profiling of 16S rRNA and *nifH* genes. Community's richness, diversity index, evenness, and stability using both genes profiling data were varied depending on the plant tissues, stages of growth, and rice cultivars. These indices of endophytic bacteria obtained from individual rice cultivars were not different significantly (P = 0.0001) while those of endophytic diazotrophic bacteria obtained from rice cultivar Bue Wah Bo differed significantly (P = 0.001) to the others. Cluster analyses of the band profiles revealed greater diversity of endophytic bacterial community with 7 clusters compared to those 3 clusters of endophytic diazotrophic bacteria. In addition, the communities of endophytic bacteria across all rice cultivars exhibited higher stability with well-fitting 2-dimensional plots graphed by principal component analysis than those of endophytic diazotrophic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

bacteria. Most selected band sequences were determined as uncultured bacteria, while higher variety in generic level was observed in *nifH* sequences. These differences of both bacterial communities might be influenced either by genetic variation of rice cultivars or rice cultivation system, where chemical nitrogen input could strongly affect the community structure of endophytic diazotrophic bacteria.

Population density of the endophytic diazotrophic bacteria (EDB) was highest in the rice landrace root tissues at nursery stage. Indole-3-acetic acid (IAA) production (0.85-16.66 μg mL^{-1}) was found in 21 strains tested. More than 80% (18 isolates) of the isolates solubilized phosphate, while only 28.57% (6 isolates) of selected strains produced siderophore. Seventy-one percent of tested isolates produced ammonia. The effects of EDB isolated from rice landraces on seed and on the growth of commercial jasmine rice cultivar Khao Dawk Mali 105 were evaluated in greenhouse. Inoculation of all EDB on rice seeds significantly increase nitrogen content in roots (P = 0.05). The potentially useful isolates belonged to 4 different genera *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Novosphingobium* and *Sphingomonas*.

Colonization and location of rice by *Burkholderia* sp. SS5, *Klebsiella* sp. SS2, *Novosphingobium sp.* TR4 and *Sphingomonas* sp. PS5 were confirmed using commercial rice cultivars Khao Dawk Mali 105 as a host model. Rice seedlings cultured gnotobiotically in nitrogen-free medium were inoculated with the GUS-, GFP- or DsRed-marked selected diazotrophs. Observation using inverted fluorescence microscope showed that the bacterial cells initially colonized at root hairs and epidermal cells. The bacterial invasion occurs at the site of emerging lateral roots and at elongation and differentiation zones of root tip. Then, the bacterial cells

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

spread further through the root cortex, xylem and pith, where the bacteria migrated to stems and leaves. The bacterial cells were found to locate in both inter- and intra-cellular spaces. The expression of *nifH* genes were detected by RT-PCR. The expression of *nifH* gene at 3 and 14 day after inoculation with and without nitrogen condition could be shown analyzed transcriptional expression of *nifH* gene in symbiotic stage at stem and root rice during *Burkholderia* sp. SS5, *Klebsiella* sp. SS2 and *Sphingomonas* sp. PS5 colonized on rice.

Application of these plant-microbe interaction data particularly in case of endophytic diazotrophic bacteria might be an alternative way to reduce chemical inputs, to improve soil quality and to sustain organic farming system for future agriculture of rice.

Keywords: bacterial community; 16S rRNA gene; *nifH* gene**;** cluster analyses; principal component analysis; plant growth promoter; symbiotic colonization

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การกระจายตัวและประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในข้าวพื้นเมือง

ผู้เขียน นายจักรพงษ์ หรั่งเจริญ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ. ดร. สายสมร ลำยอง อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ศ. ดร. เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ และแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจน ในแต่ละช่วงการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อข้าวพื้นเมืองที่ปลูกในที่สูงทางภาคเหนือของประเทศไทย โดยการเปรียบเทียบยีน 16S rRNA และ ยีน *nifH* ด้วยเทคนิค PCR-DGGE และวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนโดยใช้หลักการวัดความหลากหลายทางชีวภาพได้แก่ ดัชนีความหลากชนิด (diversity index) จำนวนชนิดที่แตกต่างกัน (richness) ความสม่ำเสมอของสิ่งมีชีวิต (evenness) และความสมดุลของสิ่งมีชีวิต (stability) พบว่า รูปแบบโครงสร้างชุมชนขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช ช่วงการเจริญเติบโต และสายพันธุ์ของข้าวพื้นเมือง โดยโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น $P = 0.0001$ ในขณะที่ แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในข้าวสายพันธุ์บือวาโบมีความแตกต่างกับข้าวสายพันธุ์อื่นที่ระดับความเชื่อมั่น $P = 0.001$ นำรูปแบบโครงสร้างชุมชนมาวิเคราะห์แบบกลุ่มตามความหลากหลายที่ปรากฏ พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารถแบ่งได้ 7 กลุ่ม ในขณะที่แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนสามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม เมื่อนำโครงสร้างชุมชนที่ปรากฏไปวิเคราะห์องค์ประกอบหลักพบว่ารูปแบบขององค์ประกอบมีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *nifH* ในระดับสูง อีกทั้งความแตกต่างของโครงสร้างแบคทีเรียอาจเป็นผลมาจากความผันแปรทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวหรือระบบการปลูกปลูกข้าวโดยเฉพาะอย่างยิ่งไนโตรเจนที่ใส่ลงไปในระบบปลูก มีผลกับโครงสร้างแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความหนาแน่นของประชากรแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนพบว่า มีค่าสูงในส่วนของรากที่อยู่ในระยะกล้าของข้าวพื้นเมือง การผลิต Indole-3-acetic acid หรือ IAA พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ สายพันธุ์ที่คัดเลือกสามารถผลิต IAA ได้อยู่ในช่วง 0.85 ถึง 16.66 $\mu g\ mL^{-1}$ และพบแบคทีเรียจำนวน 18 สายพันธุ์ (80 %) มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต ในขณะที่แบคทีเรียสามารถผลิตไซเดอโรฟอร์มีเพียง 6 สายพันธุ์ (28.57 %) ความสามารถในการผลิตแอมโมเนียของแบคทีเรียพบว่า มีแบคทีเรียที่มีความสามารถดังกล่าวคิดเป็น 71 % ประสิทธิภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากข้าวพื้นเมืองต่อการเจริญเติบโตของข้าวปลูกสายพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าแบคทีเรียทดสอบทุกสายพันธุ์เพิ่มปริมาณไนโตรเจนในส่วนของรากข้าวสายพันธุ์ทดสอบ เมื่อนำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนไปจำแนกชนิด ประกอบไปด้วย4 จีนัส ได้แก่ *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Novosphingobium* และ *Sphingomonas*

ศึกษาการเข้าครอบครอง และตำแหน่งที่อยู่อาศัยของ *Burkholderia* sp. SS5, *Klebsiella* sp. SS2, *Novosphingobium* sp. TR4 และ *Sphingomonas* sp. PS5 โดยติดฉลากด้วย GUS-, GFP- หรือ DsRed ปลูกเชื้อลงในข้าวสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และนำไปข้าวไปเจริญต่อในสารละลายธาตุอาหารพืชที่ปราศจากไนโตรเจนพบว่า ในช่วงต้นแบคทีเรียทดสอบเข้าครอบครองข้าวบริเวณขนราก และส่วนของเนื้อเยื่อชั้นเอพิเดอร์มิส จากนั้นยังพบในส่วนของรากบริเวณรอยต่อรากแขนงรวมไปถึงบริเวณที่มีการแบ่งตัวของปลายราก แบคทีเรียสามารถเข้าสู่ข้าวได้ในชั้น คอร์เทกซ์ และระบบท่อลำเลียง เพื่อไปสู่บริเวณลำต้น และใบ จากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าสามารถพบแบคทีเรียได้ทั้งภายในเซลล์ และภายนอกเซลล์ของเนื้อเยื่อพืช การแสดงออกของยีน *nifH* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า หลังจากปลูกเชื้อลงสู่ข้าวที่ย้ายปลูกในสารละลายธาตุอาหารพืชที่มีแหล่งไนโตรเจน และปราศจากไนโตรเจน มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวจากเชื้อ *Burkholderia* sp. SS5, *Klebsiella* sp. SS2 and *Sphingomonas* sp. PS5 ในส่วนของต้น และ ราก ระหว่างเข้าครอบครองภายในราก

จากความสัมพันธุ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ จำพวกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนอาจจะเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ในระบบเกษตรเพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมี ตรวจสอบคุณภาพของดิน และเพื่อรักษาไว้ซึ่งระบบเกษตรอย่างยั่งยืน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คำสำคัญ: ชุมชนแบคทีเรีย; ยีน 16S rRNA; ยีน *nifH*; การวิเคราะห์แบบกลุ่ม; การวิเคราะห์แบบองค์ประกอบหลัก; สารส่งเสริมการเจริญของพืช; ความสัมพันธ์แบบการอยู่ร่วมกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved