ตีรณา กรีธาธร : แบรดดีไรโซเบียมเอนโดไฟท์ในข้าว และศักยภาพในการปลูกข้าวและพืชตระกูลถั่วแบบหมุนเวียน (RICE ENDOPHYTIC BRADYRHIZOBIA AND THEIR POTENTIALS FOR RICE-LEGUME CROP ROTATION)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 88 หน้า.

แบคทีเรียในสกุลแบรดดีไรโซเบียม สามารถอาศัยอยู่แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับพืชตระกูลถั่ว และเป็นเอนโดไฟท์ในพืชที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว เช่น ข้าว ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าแบรดดีไรโซเบียมเอนโดไฟท์ในข้าว สามารถนำไปใช้ในระบบการปลูกข้าว และพืชตระกูลถั่วแบบหมุนเวียนได้ แบรดดีไรโซเบียมเอนโดไฟท์ถูกคัดเลือกมาจากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของข้าว (*Oryza sativa* L.) โดยเชื้อทั้ง 8 สายพันธุ์มีความสามารถในการผลิต IAA, เอนไซม์ ACC deaminase และ nitrogenase เมื่อทำการทดสอบประเภทของปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่มีผลต่อการเจริญของข้าว พบว่าเกิดผลกระทบทั้งเชิงลบ และบวกจากการใช้แหล่งของไนโตรเจนและแบรดดีไรโซเบียมเอนโดไฟท์ที่แตกต่างกัน น้ำหนักแห้งของข้าวเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับโพแทสเซียมไนเตรท หรือแอมโมเนียมไนเตรท ร่วมกับเชื้อสายพันธุ์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ SUTN9-2 นอกจากนี้ผลของการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมกับเชื้อแบรดดีไรโซเบียม สามารถเพิ่มการสะสมไนโตรเจนในต้นข้าวได้สูงกว่าการไม่ใส่เชื้อ หรือไม่มีปุ๋ยไนโตรเจน เชื้อสายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าว (SUT-PR48, SUT-PR64 และ ORS285) พบว่ามีการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ในรากข้าวเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีการย้อม DAF FM-DA ผลเหล่านี้สอดคล้องกับผลการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ ได้แก่ ยีน *nirK* และ *norB* เมื่อใช้เทคนิค RT-PCR การใส่เชื้อสายพันธุ์ SUT-PR48 กับไนเตร ท พบว่าเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *nirK* สูงกว่ายีน *norB* ในทางตรงกันข้าม จากการใส่เชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2 พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *nirK* ต่ำกว่ายีน *norB* แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ SUT-PR48 มีการสะสมไนตริกออกไซด์มากกว่าเชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2 ซึ่งส่งผลให้เกิดผลกระทบเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของข้าว นอกจากนี้ผลจากการสะสมไนโตรเจนก็มีความสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนด้วย (ยีน *nifH*) การแสดงออกของยีน *nifH* ของเชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2 ถูกชักนำภายใต้เงื่อนไขการใส่ไนโตรเจนและเป็นเอนโดไฟท์ในข้าว เชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2 จึงใช้เป็นหัวเชื้อไรโซเบียมสำหรับทดสอบกับถั่วเขียวในรูปแบบของตอซังข้าว ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2 ยังคงมีชีวิตอยู่ในเนื้อเยื่อข้าวจนถึงฤดูเก็บเกี่ยวข้าว เมื่อทำการเก็บเกี่ยวข้าวได้ปลูกถั่วเขียวในกระถางเดียวกันกับข้าวที่เก็บเกี่ยวไปแล้วและใช้ตอซังข้าวที่มีเชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2 เป็นหัวเชื้อในรูปตอซัง ผลการทดลองพบว่า

เชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2 ที่อาศัยอยู่ในตอซังสามารถสร้างปมได้ในถั่วเขียว ทั้งนี้ ยืนยันโดยผลการทดลองจากการใช้ยีนติดตาม GUS ดังนั้นวิธีการใช้ตอซังข้าวที่มีแบรดดีไรโซเบียมเอนโดไฟท์สามารถใช้เป็นหัวเชื้อในระบบการปลูกข้าว และพืชตระกูลถั่วแบบหมุนเวียนได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

TEERANA GREETATORN : RICE ENDOPHYTIC BRADYRHIZOBIA AND THEIR POTENTIALS FOR RICE-LEGUME CROP ROTATION. THESIS ADVISOR : PROF. NEUNG TEAUMROONG, Dr.rer.nat., 88 PP.

ENDOPHYTIC BRADYRHIZOBIA/RICE/MUNG BEAN/ RICE-LEGUME CROP ROTATION

Bradyrhizobium encompasses a variety of bacteria that can live in symbiotic and endophytic associations with leguminous plants and non-leguminous plants such as rice. Therefore, it can be expected that rice endophytic bradyrhizobia can be applied in the rice-legumes crop rotation system. In this study, endophytic bradyrhizobial strains were isolated from various rice (*Oryza sativa* L.) tissues. The selected 8 endophytic bradyrhizobial strains had the capability of IAA, ACC deaminase and nitrogenase enzymes productions. The rice growth promotion showed both of negative and positive impacts by supplying different nitrogen sources and inoculation of endophytic bradyrhizobia. The rice biomass could be enhanced when supplied with KNO_3 or NH_4NO_3 and inoculated with positive rice growth promotion strains especially, SUTN9-2. In addition, the effect of nitrogen fertilizer and bradyrhizobial inoculation could increase nitrogen accumulation in rice plant higher than that of uninoculation or without nitrogen fertilizer. The strains which suppressed rice growth (SUT-PR48, SUT-PR64 and ORS285) were also found to produce nitric oxide (NO) in the rice root when detected with DAF-FM DA staining method. These results were accordance with the expression of genes involved in NO production including *nirK* and *norB* genes when RT-PCR technique was conducted. The

inoculation of SUT-PR48 with nitrate enhanced the expression level of *nirK* gene better than that of *norB* gene. In contrast, the expression level of *nirK* gene in inoculation of SUTN9-2 was lower than that of *norB* gene. These results taken together suggested that SUT-PR48 possibly accumulated NO more than SUTN9-2 did, resulting in the negative effect on rice growth. Furthermore, the results from nitrogen accumulation were also in accordance with the expression of nitrogen fixation gene (*nifH* gene). The expression of *nifH* genes of SUTN9-2 was induced under nitrogen treatment in endophytic association with rice. The strain SUTN9-2 was selected and then used as rhizobium inoculum for mung bean in the form of rice stubble. The results revealed that SUTN9-2 still persisted in rice tissues until harvest. After harvesting the rice, the mung bean was planted to the same pot for 3 weeks. The results showed nodulation of GUS-tagging bradyrhizobia SUTN9-2 in mung bean. Therefore, it is possible that rice stubble can be used as inoculum in the rice-legume crop rotation system.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2014

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____