

พงษ์เดช ภิรมย์อยู่: กลไกการอยู่อาศัยแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันของแบคทีเรียไรโซเบียม  
ในข้าวและศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในระดับแปลงปลูก (SYMBIOTIC  
MECHANISMS OF CULTIVATED RICE ENDOPHYTIC BRADYRHIZOBIA AND  
THEIR POTENTIAL FOR FIELD APPLICATION) อาจารย์ที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์ ดร.  
หนึ่ง เตียอำรุง 109 หน้า.

การเข้าอยู่อาศัยของแบคทีเรียในสกุลแบคทีเรียไรโซเบียม ไม่เพียงพบในพืชตระกูลถั่ว แต่ยังพบในพืชชนิดอื่น เช่น ข้าว เพื่อที่จะเข้าใจวิวัฒนาการของการอยู่อาศัยแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันของแบคทีเรียในสกุลแบคทีเรียไรโซเบียมในระบบนิเวศการปลูกข้าวมีผลต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์กับพืชจึงเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่ต้องพิจารณาทำการเก็บตัวอย่างข้าว (*Oryza sativa*) จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ในระบบการปลูกข้าวแบบหมุนเวียน เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียในสกุลแบคทีเรียไรโซเบียม เชื้อที่แยกมาได้สามารถแบ่งออกเป็น กลุ่มแบคทีเรียไรโซเบียมที่สังเคราะห์ด้วยแสง และแบคทีเรียไรโซเบียมที่ไม่สังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธุ์ที่แยกได้จากในประเทศไทยสามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวสายพันธุ์ไทยได้ดีกว่าข้าวสายพันธุ์ญี่ปุ่น ทำให้สันนิษฐานได้ว่าสายพันธุ์ข้าวเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อปฏิสัมพันธ์ของข้าวและจุลินทรีย์ เป็นที่น่าสนใจว่าในทุกสายพันธุ์ของแบคทีเรียไรโซเบียมมีความคล้ายคลึงของลำดับเบส *nodABC* ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 และ *Bradyrhizobium* sp. ORS285 จากผลการทดลองนี้ จึงทำการตรวจสอบวิวัฒนาการของการอยู่ร่วมกันของพืชและแบคทีเรียไรโซเบียมรวมไปถึงการเข้าอาศัยกับพืชที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว โดยให้ความสำคัญกับประเด็นการมีสมบัติสังเคราะห์ด้วยแสง และการเข้าอาศัยอยู่กับพืชโดยไม่ใช้กลุ่มยีน *nod* ต่อไป

กลไกที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึม การปรับตัว และคุณสมบัติอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ของแบคทีเรียสกุลไรโซเบียมในพืชตระกูลถั่วเป็นที่เข้าใจค่อนข้างมาก แต่กลไกของแบคทีเรียไรโซเบียมที่อาศัยในต้นข้าวนั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจ ดังนั้นจึงได้ศึกษาถึงกลไกการเข้าอาศัยและระบบของยีนของแบคทีเรียไรโซเบียมในเนื้อเยื่อข้าว โดยเลือกเชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2 เพื่อศึกษาการเข้าสู่เนื้อเยื่อข้าวจากการศึกษา การแสดงออกของยีนในแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธุ์ SUTN9-2 ระหว่างที่มีปฏิสัมพันธ์กับข้าว โดยวิธี RT-PCR พบว่า การแสดงออกของยีน *rhcJ*, *virD4* และ *peces* แสดงออกเมื่อมีการกระตุ้นด้วยสารคัดหลั่งจากรากข้าว เมื่อทดสอบระบบ T3SS ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเข้าบุกรุกเนื้อเยื่อข้าวของเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียม จากการปลูกเชื้อ SUTN9-2 สายพันธุ์เดิม และสายพันธุ์ที่ถูกทำลายระบบ T3SS ได้แก่สายพันธุ์  $\Delta rhcJ-3B$ ,  $\Delta rhcJ-18A$  และ  $\Delta rhcJ-27A$  ของ SUTN9-2 สายพันธุ์เดิมในพืชอาศัยดั้งเดิม (โสนชน: *Aeschynomene americana*) และข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 1 (*O. sativa*)

cultivar Pathum Thani 1) พบว่า สายพันธุ์ที่ถูกทำลายระบบ T3SS มีความสามารถในการเข้าบุกรุกสู่เนื้อเยื่อข้าวลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิม แต่ไม่ส่งผลต่อการเข้าปมของพืชตระกูลถั่ว *A. americana* จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า T3SS เป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมการอยู่อาศัยแบบพึ่งพาอาศัยกันและกันของแบคทีเรียไรโซเบียมกับข้าว



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนักศึกษา\_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา\_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม\_\_\_\_\_

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม\_\_\_\_\_

PONGDET PIROMYOU : SYMBIOTIC MECHANISMS OF  
CULTIVATED RICE ENDOPHYTIC BRADYRHIZOBIA AND THEIR  
POTENTIAL FOR FIELD APPLICATION. THESIS ADVISOR : PROF.  
NEUNG TEAUMROONG, Dr.rer.nat., 109 PP.

RICE/ENDOPHYTIC *Bradyrhizobium*/RICE GROWTH/PROMOTION/  
ENDOPHYTIC MECHANISM

Bradyrhizobia colonization in plant is found not only in leguminous plants but also in non-leguminous species such as rice. To understand the evolution of endophytic symbiosis of bradyrhizobia, its association with ecosystems of rice plantations was investigated. Samples were collected from various rice (*Oryza sativa*) tissues in crop rotation systems to obtain bradyrhizobial strains. The isolates were separated into photosynthetic bradyrhizobia (PB) and non-photosynthetic bradyrhizobia (Non-PB). Thai bradyrhizobial strains promoted rice growth of Thai rice cultivars better than the Japanese strains. This implies that the rice cultivars have the factors governing rice-bacteria associations. Interestingly, all of these bradyrhizobial strains seemed to exhibit low similarity of *nodABC* genes to those of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *Bradyrhizobium* sp. ORS285. From these results, the evolution of plant-bradyrhizobia association including non-legume in terms of photosynthetic lifestyle and *nod*-independent interactions were further investigated.

The metabolic processes, adaptations and beneficial characteristics of rhizobia with leguminous plants are clearly understood whilst the mechanisms of endophytic

bradyrhizobia in rice have not been elucidated so far. Therefore, the determination of the infection process and genetic system of bradyrhizobia in rice tissues was further emphasized. The SUTN9-2 was selected for further determination of rice-*Bradyrhizobium* interactions. The expression of SUTN9-2 genes was examined during the association with rice plants by RT-PCR. The *rhcJ*, *virD4* and *peces* genes of the bacterium were only up-regulated when rice roots exudate was added in to the culture. To examine whether T3SS is involved in bradyrhizobial infection to rice plants, wild-type SUTN9-2 and three T3SS mutant strains ( $\Delta rhcJ$ -3B,  $\Delta rhcJ$ -18A and  $\Delta rhcJ$ -27A of SUTN9-2) were inoculated to the original host plant (*Aeschynomene americana*) and rice plant (*O. sativa* cultivar Pathum Thani 1). The T3SS mutants reduced their ability to invade rice tissues as compared with the wild-type strain, although the phenotypes in *A. americana* was not changed by T3SS mutations. These results suggest that T3SS-dependent effectors are a factor that controls the compatibility of rice-bradyrhizobial association.

School of Biotechnology

Academic Year 2014

Student's Signature\_\_\_\_\_

Advisor's Signature\_\_\_\_\_

Co-advisor's Signature\_\_\_\_\_

Co-advisor's Signature\_\_\_\_\_