จันทร์เพ็ญ ประกำแหง : ชุมชนจุลินทรีย์และการแสดงออกของยีน *nifH* ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าว (MICROBIAL COMMUNITIES AND THEIR *nifH* GENE EXPRESSION IN RICE ENDOPHYTIC DIAZOTROPH BACTERIA) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 112 หน้า

การศึกษาโครงสร้างของชุมชนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในแต่ละส่วนของต้นข้าว และช่วงการเจริญเติบโตของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในดินแบบต่างๆ พบว่ามีจำนวนประชากรระหว่าง 10^3 - 10^6 CFU ต่อกรัมน้ำหนักสดเนื้อเยื่อข้าว จากเชื้อที่แยกได้คิดเป็นกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้เป็น 56% ของประชากรทั้งหมด เมื่อแยกเป็นไอโซเลทเดี่ยวจากแต่ละชุมชนของเชื้อ พบว่าแต่ละไอโซเลทมีคุณสมบัติทั้งยับยั้งและส่งเสริมการตรึงไนโตรเจนซึ่งกันและกัน เมื่อวิเคราะห์ถึงระดับสายพันธุ์ด้วยวิธีอ่านลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์กลุ่มดังกล่าวได้แก่ *Enterobacter dissolvens, Brevundimonas aurantiaca, Pantoea agglomerans, Pseudomonas* spp. และ *Enterobacteriaceae bacterium* ศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน, การผลิต indole-3-acetic acid หรือ IAA การผลิตเอนไซม์ pectinase และ cellulase โดยแบคทีเรียที่สามารถผลิต cellulase, pectinase และ IAA สูง ได้แก่ *Rheinheimera* sp., *Brevundimonas* sp., *Citrobacter freundii*, และ *Pseudomonas mendocina* ตำแหน่งการอยู่อาศัยของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อข้าวพบที่บริเวณราก ต้น และใบ โดยพบมากที่รากขนอ่อน ด้วยวิธียีนรายงาน GUS จากนั้นวิเคราะห์ชุมชนแบคทีเรียในเนื้อเยื่อข้าวด้วยวิธี PCR-DGGE โดยตรงจากต้นข้าวด้วย 16S rRNA primer สามารถวิเคราะห์ชุมชนจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ได้ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์หลักในชุมชนจุลินทรีย์นี้ได้แก่ *E. dissolvense, B. aurantiaca, P. agglomerans,* และ *Pseudomonas* spp. ในขณะที่ชุมชนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนสามารถแสดงให้เห็นโดยเทคนิค nested PCR-DGGE ร่วมกับ *nifH* primer สำหรับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์สามารถวิเคราะห์ได้โดยวิธี RT-PCR ด้วย *nifH* primer สามารถพบความแตกต่างได้ในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว ในแต่ละช่วงการเจริญเติบโต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

JANPEN PRAKAMHANG : MICROBIAL COMMUNITIES AND THEIR *nifH* GENE EXPRESSION IN RICE ENDOPHYTIC DIAZOTROPH BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NEUNG TEAUMROONG, Dr.rer.nat. 112 PP.

ENDOPHYTIC DIAZOTROPH BACTERIA/MICROBIAL COMMUNITY/RICE/ *nifH* GENE

The community structure of endophytic diazotroph bacteria within each part, and growing stages of rice (*Oryza sativa* L. cultivar KDML-105) for each soil condition was determined. The population of the endophyte was in the range between 10^3 to 10^6 CFU g^{-1} fresh weight of rice tissue. The fifty-six percent from the total isolates was most likely diazotroph. The interaction between a single isolate from each diazotrophic consortium was determined. Both the inhibition and promotion of N_2-fixation from each individual strain were found. Some interested isolates were identified at the species level based on the full sequence analysis of the 16S rRNA gene. The results showed that they are closely related to *Enterobacter dissolvens*, *Brevundimonas aurantiaca*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* spp., and *Enterobacteriaceae bacterium*. The carbon sources utilization, the production of indole-3-acetic acid, pectinase and cellulase were determined. Some of the highly-produced cellulase, pectinase, and IAA strains were identified as *Rheinheimera* sp., *Brevundimonas* sp., *Citrobacter freundii*, and *Pseudomonas mendocina*. The bacterial localization in the rice tissue was detected in roots, stems and leaves and most intensely on some of the younger lateral roots on the basis of GUS reporter gene. The

PCR-DGGE analysis directly from the rice tissue using 16S rRNA primer could elucidate the endophytic bacterial communities. The major bacterial strains in this community belong to *E. dissolvense, B. aurantiaca, P. agglomerans,* and *Pseudomonas* spp. The community of diazotrophic bacteria inside the rice tissue was exhibited using nested PCR-DGGE analysis with *nifH* primer. In order to detect the bacterial nitrogen fixing activity in the rice tissue, RT-PCR approach was carried out. The results demonstrated that the *nifH* gene expression could be detected in different parts and growing stages of rice plants.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2007 Advisor's Signature_____