นางสาวตีรณา กรีธาธร : กลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ของแบรดดีไรโซเบียมในเนื้อเยื่อข้าวและบทบาทต่อการตรึงไนโตรเจน (MECHANISMS OF RICE ENDOPHYTIC BRADYRHIZOBIAL CELL DIFFERENTIATION AND ITS ROLE ON NITROGEN FIXATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 128 หน้า.

Bradyrhizobium sp. สายพันธุ์ SUTN9-2 สามารถอาศัยอยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่ว และพืชที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว เช่น ข้าว เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า SUTN9-2 ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยมีคุณสมบัติในการสร้างโมเลกุลที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืชมากขึ้น เช่น indole-3-acetic acid (IAA), เอนไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase, และการตรึงไนโตรเจน การศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของ SUTN9-2 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวที่ระยะการเจริญเติบโตแตกต่างกันร่วมกับการใส่ N-free และ NH_4NO_3 ภายใต้สภาวะ *in vivo* พบว่า ข้าวที่มีการใส่เชื้อ SUTN9-2 ร่วมกับ N-free และ NH_4NO_3 มีน้ำหนักแห้ง และปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระยะต้นกล้า (7 และ 14 วันหลังการใส่เชื้อ) ผลจากการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณของ IAA และ เอนไซม์ ACC deaminase พบว่าไม่สอดคล้องกับผลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต IAA (*nit*) and ACC deaminase (*acdS*) โดยผลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า IAA และ ACC deaminase ที่ผลิตโดย SUTN9-2 ไม่ได้ส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของข้าว แต่อาจมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องในการผลิต IAA และ ACC deaminase ในข้าวด้วย นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนของ SUTN9-2 ในข้าว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งไนโตรเจน NH_4NO_3 และการตรึงไนโตรเจนของ SUTN9-2 อาจมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้ด้วย นอกจากนี้ในด้านการศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เมื่ออาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อต้นข้าว ที่ส่งผลให้เซลล์มีการขยายขนาด (cell differentiation) จากการตรวจสอบพบว่า SUTN9-2 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย rice extract ทำให้เซลล์มีขนาด ปริมาณ DNA และประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า rice extract สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ใน SUTN9-2 ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ และการตรึงไนโตรเจน โดยจากวิธีการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อ SUTN9-2 พบว่า ทั้งยีน *bclA* และ *nifV* ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และเมื่อทำการวิเคราะห์ transcriptome ของ SUTN9-2 พบว่า rice extract และการกลายพันธุ์ของยีน *bclA* มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ของ SUTN9-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยีนที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญคือยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ oxidoreductase ซึ่งทำปฏิกิริยากับอะตอมของออกซิเจน โดยอาจมีบทบาทต่อการลด และควบคุมสภาวะออกซิเจนให้เหมาะสมต่อการตรึงไนโตรเจน และยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ GroESL chaperonins ซึ่งมีความสำคัญต่อ proteins folding และการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ผลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่การตรึงไนโตรเจนของ SUTN9-2 มีความสัมพันธ์กับ rice extract นอกจากนี้

ยังพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ antimicrobial peptides transporter (*sapADF*) ของ SUTN9-2 โดยส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ แม้ว่าจะทำการกลายพันธุ์ยีน *bclA* (*sapDF*) แล้วก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวสามารถผลิต defensin-like antimicrobial peptides (DEFs) ซึ่งคล้ายคลึงกับ NCR peptide ที่พบในพืชตระกูลถั่ว ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย โดยมีขนาดยาวขึ้นเมื่ออาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

TEERANA GREETATORN : MECHANISMS OF RICE ENDOPHYTIC BRADYRHIZOBIAL CELL DIFFERENTIATION AND ITS ROLE ON NITROGEN FIXATION. THESIS ADVISOR : PROF. NEUNG TEAUMROONG, Dr.rer.nat., 128 PP.

RICE/ENDOPHYTE/CELL DIFFERENTIATION/NITROGEN FIXATION

Bradyrhizobium sp. strain SUTN9-2 is rice endophytic diazotrophic bacterium that can live in symbiotic and endophytic associations with legume plants and non-legume plants such as rice. SUTN9-2 was reported as a rice growth promotion agent, showing the capability of plant growth promotion charecteristics, such as indole-3-acetic acid (IAA), 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase productions and nitrogen fixation. In this study, the ability of SUTN9-2 to stimulate rice growth was investigated at different stages with N-free and NH_4NO_3 under *in vivo* condition. The rice dry weight and chlorophyll content could be enhanced when SUTN9-2 was inoculated in N-free, and NH_4NO_3 especially at seedling stage (7 and 14 dai). The results of the quantitative analysis of IAA and ACC deaminase were inconsistent with the expression of genes involved in IAA (*nit*) and ACC deaminase (*acdS*) productions. This inconsistency could imply that IAA and ACC deaminase produced from SUTN9-2 did not directly affect rice growth, but other factors resulting from the production of IAA and ACC deaminase could be involved. Moreover, the expression of genes involved in nitrogen fixation (*nifH* and *nifV*) of SUTN9-2 was also induced in rice tissues. This finding suggested that rice growth promotion may be supported by NH_4NO_3 together with nitrogen fixation by SUTN9-2. On the other hand,

this study revealed the presence of cell differentiation (enlarged size) and increased DNA content and nitrogen fixation ability of SUTN9-2 in response to rice extract. Moreover, rice extract also induced the expression of genes involved in cell cycle and nitrogen fixation of SUTN9-2. Based on the mutation of genes *bclA* and *nifV* in SUTN9-2, it was found that these two genes were involved in nitrogen fixation efficiency. The transcriptome results suggested that SUTN9-2 was affected by rice extract and Δ*bclA* mutant, according to differentially expressed genes (DEGs) were observed. The upregulated DEGs encoding the class of oxidoreductase, acting with oxygen atoms, which might play a role in reducing and controlling the oxygen level to be appropriate for nitrogenase activity, followed by GroESL chaperonins, require proteins folding and nitrogenase function. These results indicated the possibility that nitrogen fixation of SUTN9-2 might be induced by the rice extract. Also, the sensitivity to antimicrobial peptides transporter (*sapADF*) was upregulated, resulting in cell differentiation even the *bclA* (*sapDF*) was mutated. Interestingly, this implied similarities in the production of defensin-like antimicrobial peptides (DEFs) by rice and nodule-specific cysteine rich (NCR) peptides in legume plants, which affect bacterial cell elongation.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2019

Student's Signature Teerang Greetatorn

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature