**Thesis Title** Diazotroph Endophytic Bacteria in Cultivated and Wild Rice in Thailand

**Author** Mrs. Chanikarn Koomnok

**Degree** Doctor of Philosophy (Biology)

**Thesis Advisory Committee** Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Chairperson
Pro. Dr. Benjavan Rerkasem Member
Assoc. Prof. Neung Teaumroong Member

## ABSTRACT

This thesis describes a study of diazotroph endophytic bacteria found in cultivated and wild plants growing in Thailand. It comprises an enumeration of diazotroph population in leaf, stem and root tissues of rice plants, the isolation and characterization of diazotroph isolates, the screening of diazotroph isolates for their $N_2$ fixing ability and an evaluation of the effects of effective $N_2$ fixing diazotroph isolates on growth of rice. The endophytic bacteria were isolated from three cultivated rice cultivars, Khao Dawk Mali 105, Kum Doi Saket and Bue Po Lo, and four wild rice populations, *Oryza rufipogon*, *O. rufipogon* 18883, *O. nivara* 18852 and *O. granulata*. It was found that the number of endophytic bacteria (per gram fresh weight of plant tissues) in different tissues were similar among the three cultivated rice cultivars. The population size of diazotroph endophyte found in the roots and stem tissues were more than that in the leaf samples. The population size of the bacteria was estimated by most probable number (MPN) method making isolation on semisolid N free medium at various stages of growth of the plants. It was found that the numbers ranged from $10^2$ to $10^5$ organisms per gram of fresh tissues. The maximum number was found at 60 days

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

after transplanting. The population size of diazotroph endophytes in wild rice was greater in the roots than in stems and leaves. The largest population of bacteria, about $5x10^6$ organisms per one gram of fresh root, was found in *O. rufipogon*. All of the wild rice species contained endophytic bacteria in the stem about $10^4$ organisms per gram fresh weight.

The typical characteristics of 114 purified isolates of diazotroph endophytic bacteria obtained from both cultivated and wild rice were studied. *Azospirillum* was the dominant with 53 isolates identified as while 35, 14 and 12, respectively, were *Herbaspirillum*, *Beijerinckia* and *Pseudomonas*. All isolates were motile gram negative bacteria and could decompose pectin and cellulose.

The nitrogen fixing ability of these endophytic bacteria was evaluated using the acetylene reduction assay (ARA). There were 11 isolates showing high nitrogenase activity (> 100 nmol $C_2H_4$ /mg protein/h). Sixty six isolates exhibited intermediate nitrogenase activity (50.1-100 nmol $C_2H_4$ /mg protein/h), while 37 isolates showed low rate (0-50 nmol $C_2H_4$ /mg protein/h). Representative isolates from each group of these endophytic bacteria were selected for testing of $N_2$ fixing ability in association with rice, rice root colonization and phytohormone production. It was found that isolate *Azospirillum* CM15 had the highest nitrogenase activity. The endophytic bacterial isolates which had high nitrogenase activity in pure culture also expressed high activity and colonization when associated with rice roots. Most isolates (20) produced more than 20 µg/ml of IAA especially the groups having intermediate and high $N_2$ fixing rates. The optimum temperature and pH for growth and $N_2$ fixation of 15 isolates of endophytic bacteria with high rate of nitrogenase activity and IAA production were studied. It was found that the optimum temperature for each group were as follows: *Azospirillum* 30-35°C, *Herbaspirillum* 30-35°C, *Beijerinckia* 25-35°C. The optimum pH for each group were; 6-7 for *Azospirillum*, 6.0-7.5 for all isolates of *Herbaspirillum* group except *Herbaspirillum* CM8 isolates, 6.0-7.5 for *Beijerinckia* group. The optimum pH for *Herbaspirillum* CM8 was 4.0-8.0. The suitable carbon

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

sources for growth and $N_2$ fixation of all tested endophytic bacterial isolates were combination of glucose and sucrose and sodium malate. All tested nitrogen compounds, $NH_4Cl$, $NH_4NO_3$, $KNO_3$ and $Ca(NO_3)_2$ supported growth but inhibited $N_2$ fixation of all of the bacteria.

Fifteen high $N_2$ fixing diazotroph endophytic bacterial isolates were selected for evaluation of their effects on growth of Kha Dawk Mali 105 rice cultivar in both laboratory and green house experiments. In the laboratory testing, rice plants were grown in N-free Hoagland medium containing 0.6% agar in a controlled environment while under green house testing, the plants were grown in sterilized soil. At 30 days after transplanting, there were 13 isolates were found to increase shoot dry weight significantly compared to the uninoculated control, while 12 isolates had significant positive effect in the greenhouse experiment. The first five endophytic isolates (*Azospirillum* CM15, *Azospirillum* CM23, *Azospirillum* CM44, *Beijerinckia* CM12 and *Beijerinckia* CM35), which had the greatest stimulation effect on rice growth were selected for further testing at 45 days after transplanting. It was found that rice plants inoculated with *Azospirillum* CM15 and *Azospirillum* CM44 were the tallest and had the highest shoot and root biomass. These two isolates increased significantly the number of tillers per plant at 45 and 75 day after transplanting. Observation of the bacterial population in the rice plant at 75 days after transplanting, revealed that there was a larger number of these bacteria in the stem than in the root. The population of *Azospirillum* CM15 of $10^5$ cells per gram of fresh root and about $10^4$ cells per gram of fresh weight of stem were found. There were about $10^4$ cells of *Azospirillum* CM44 found in one gram of fresh stem and about $10^3$ cells per gram of fresh root.

This study has shown that diazotroph bacteria are present in the tissues of both cultivated and wild rice with a larger population in the former. Eleven of the isolates were found to have high $N_2$ fixing ability as well as stimulating effect on rice growth. The isolates grew and fixed $N_2$ over the range of temperature (30 -35$^{\circ}$C) and pH (5.5-8.0) using the combination of glucose and sucrose and sodium malate as carbon source.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

An interesting exception was *Herbaspirillum* CM8 which could grow and fix $N_2$ at a pH as low as 4.0. Two isolates, *Azospirillum* CM15 and *Azospirillum* CM44 had the highest stimulating effect on the rice plant. They should be further investigated.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | |
|---|---|
| **ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** | แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวป่าในประเทศไทย |
| **ผู้เขียน** | นางชนิกานต์ คุ้มนก |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา) |
| **คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** | รศ.ดร. สายสมร ลำยอง ประธานกรรมการ<br>ศ. ดร. เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม กรรมการ<br>รศ.ดร. หนึ่ง เตียอำรุง กรรมการ |

## บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้ทำการศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวป่าในประเทศไทย ประกอบด้วยการศึกษาปริมาณของเชื้อในใบ ลำต้น และรากข้าว การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี ตลอดจนการตรึงไนโตรเจน การแยกและคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีกับต้นข้าว ข้าวพันธุ์ปลูก *(O. sativa)* ที่ใช้แยกเชื้อแบคทีเรีย 3 พันธุ์ได้แก่ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวก่ำดอยสะเก็ด และข้าวบือโปะโละ ส่วนข้าวป่ามี 4 กลุ่มประชากรได้แก่ *O. rufipogon*, *O. rufipogon* 18883, *O. nivara* 18852 และ *O. granulata* ผลการศึกษาพบว่า ข้าวพันธุ์ปลูกมีขนาดของประชากรแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (ต่อ 1 กรัมน้ำหนักสด) ในแต่ละส่วนของข้าวปริมาณใกล้เคียงกันทั้งสามพันธุ์คือข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวก่ำดอยสะเก็ด และข้าวบือโปะโละ ประชากรที่พบในรากและลำต้นมีมากกว่าที่พบในใบ ประชากรของแบคทีเรียเหล่านี้ผันแปรไปตามอายุของต้นข้าว ศึกษาโดยใช้วิธี Most pobable number (MPN) และใช้อาหารกึ่งแข็งที่ปราศจากไนโตรเจน คือมีอยู่ในช่วงตั้งแต่ $10^2$-$10^5$ MPN ต่อน้ำหนัก 1 กรัม และมีปริมาณสูงสุดที่ระยะ 60 วันหลังย้ายปลูก สำหรับประชากรของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนที่พบในข้าวป่า พบว่าในรากข้าวมีมากกว่าในลำต้นและในใบ ข้าวป่า *O. rufipogon* มีประชากรของแบคทีเรียเหล่านี้มากที่สุดคือประมาณ $5x10^6$ MPN ต่อรากสด 1 กรัม ทุกกลุ่มประชากรของข้าวป่ามีประชากรของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในลำต้นประมาณ $10^4$ MPNต่อกรัม

จากการศึกษาลักษณะเฉพาะของเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวป่า ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 114 ไอโซเลต พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

*Azospirillum* 53 ไอโซเลต *Herbaspirillum* 35 ไอโซเลต *Beijerinckia* 14 ไอโซเลต และ *Pseudomonas* 12 ไอโซเลต ทุกไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เคลื่อนที่ได้ และสามารถย่อยเพคตินและเซลลูโลสได้ เมื่อประเมินความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วยวิธีอะเซทธิลีนรีดักชัน (Acetylene reduction assay, ARA) พบว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 11 ไอโซเลต สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูง (มากกว่า 100 นาโนโมลของเอทธิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) ในขณะที่แบคทีเรีย 66 ไอโซเลต มีอัตราการตรึงไนโตรเจนได้ปานกลาง (50.1-100 นาโนโมลของเอทธิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) และอีก 37 ไอโซเลตมีอัตราการตรึงไนโตรเจนได้ต่ำ (0-50 นาโนโมลของเอทธิลีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) เมื่อศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ได้เลือกเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มในสภาพที่อยู่ร่วมกับพืช การเข้าสู่พืชอาศัย และการผลิตฮอร์โมน IAA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลตที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงสุดคือ *Azospirillum* sp. CM15 แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงเมื่ออยู่ร่วมกับพืชอาศัย เป็นแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงในสภาพเชื้อบริสุทธิ์ อีกทั้งยังสามารถเข้าสู่พืชอาศัยได้ดีด้วย ปริมาณ IAA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ส่วนมาก (20 สายพันธุ์) มีค่ามากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเฉพาะมักพบในแบคทีเรียกลุ่มที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนได้สูงและปานกลาง เมื่อศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนและผลิต IAA ได้สูงจำนวน 15 ไอโซเลต พบว่าอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการตรึงไนโตรเจน ของแบคทีเรียกลุ่ม *Azospirillum* เท่ากับ 30 และ 35 องศาเซลเซียสและ pH 6-7 แบคทีเรียกลุ่ม *Herbarspirillum* ทุกไอโซเลตที่ใช้ศึกษามีอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 30 และ 35 องศาเซลเซียส สำหรับ pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 6.0-7.5 ยกเว้นไอโซเลต *Herbarspirillum* sp. CM8 ซึ่งมีระดับ pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 4.0-8.0 สำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม *Beijerinckia* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 25 และ 35 องศาเซลเซียส และระดับ pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 6.0-7.5 แหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ทุกไอโซเลต คือ กลูโคสร่วมกับซูโครสและโซเดียมมาเลต ในขณะที่สารประกอบไนโตรเจนที่ใช้ทดสอบ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท โปแตสเซียมไนเตรท และแคลเซียมไนเตรท ทั้งสี่ชนิดสามารถสนับสนุนการเจริญของแบคทีเรีย แต่ยับยั้งกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์

เมื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงจำนวน 15 ไอโซเลต สำหรับศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยทดลองปลูกข้าวในอาหาร Hoagland ที่มีวุ้น 0.6% ที่ปราศจากไนโตรเจนภายใต้สภาพห้องทดลอง และปลูกข้าวในดินที่ปราศจากเชื้อภายใต้สภาพโรงเรือนทดลอง พบว่าในช่วง 30 วันของการย้ายปลูกต้นกล้า เชื้อแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนที่สามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้นของข้าวที่ปลูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในอาหาร Hoagland มีจำนวน 13 ไอโซเลต ส่วนเชื้อที่สามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินของข้าวปลูกในดิน มีจำนวน 12 ไอโซเลต เมื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลดีในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าว 5 อันดับแรก ( *Azospirillum* sp CM15, *Azospirillum* sp CM23, *Azospirillum* sp CM44, *Beijerinckia* sp. CM12 และ *Beijerinckia* sp.CM35) ไปทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของข้าวในระยะ 45 วันหลังย้ายปลูก พบว่า การปลูกเชื้อ *Azospirillum* sp CM15 และ *Azospirillum* sp CM44 ทำให้ข้าวมีความสูง น้ำหนักแห้งของลำต้นและของรากมากที่สุด และเชื้อทั้งสองไอโซเลตยังสามารถเพิ่มจำนวนกอของข้าวที่ปลูกในดินได้อย่างมีนัยสำคัญที่ระยะ 45 และ 75 วันหลังย้ายปลูกอีกด้วย และการศึกษาปริมาณเชื้อในลำต้นและรากข้าวที่ระยะ 75 วันหลังย้ายปลูก พบว่าจำนวนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในส่วนของลำต้นมากกว่าในส่วนของราก โดยที่ในลำต้นมีปริมาณเชื้อ *Azospirillum* sp CM15 ประมาณ $10^5$ เซลล์ต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ส่วนในรากมีประมาณ $10^4$ เซลล์ต่อน้ำหนักสด 1 กรัม สำหรับเชื้อ *Azospirillum* sp CM44 มีปริมาณเชื้อในลำต้นประมาณ $10^3$ เซลล์ต่อน้ำหนักสด 1 กรัม ส่วนในรากมีประมาณ $10^3$ เซลล์ต่อน้ำหนักสด 1 กรัม

การศึกษานี้พบว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในส่วนต่าง ๆ ของข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวป่า โดยจำนวนประชากรแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบในข้าวป่าพบว่ามีมากกว่าข้าวพันธุ์ปลูก มีแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 11 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้สูงอีกทั้งยังกระตุ้นการเจริญของข้าวได้ดี แบคทีเรียเอนโดไฟท์นี้เจริญและตรึงไนโตรเจนที่อุณหภูมิระหว่าง 30 -35 องศาเซลเซียส และpH ระหว่าง 5.5-8.0 และใช้กลูโคสร่วมกับซูโครสและโซเดียมมาเลต เป็นแหล่งของคาร์บอน ที่น่าสนใจคือมีแบคทีเรีย *Herbarspirillum* sp. CM8 สามารถเจริญและตรึงไนโตรเจนได้ดีที่ pH 4.0 ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลตคือ *Azospirillum* sp CM15 และ *Azospirillum* sp CM44 กระตุ้นการเจริญของต้นข้าวได้ดี จึงควรนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved