Thesis Title Effects of Fermented Rice Straw Broth Using 5-Aminolevulinic Acid Producing-Photosynthetic Bacteria Starter on Rice Growth and Gene Expression Under Salt Stress Condition

Author Miss Thanawan Kantha

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Chaiyavat Chaiyasut	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Duangporn Kantachote	Co-advisor
Asst. Prof. Pol. Capt. Dr. Suchada Sukrong	Co-advisor
Dr. Amorntip Muangprom	Co-advisor

ABSTRACT

Rice is the most important food crop in the world. Almost half of the world's population depends on rice as their staple food. However, there are major environmental limitations on rice production such as salinity. Recently, there has been an increased awareness of food safety worldwide, including Thailand, that has resulted in developing alternative ways to produce crops by organic agriculture. The use of artificial fertilizers is not allowed in organic farming and thus biofertilizers like photosynthetic bacteria that can produce aminolevulinic acid (ALA) would be of interest for use in organic saline paddy fields. In this study, soil samples from organic saline paddy fields from 14 provinces of the northeast region of Thailand were

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

collected and used for isolating photosynthetic bacteria (PB). Four isolates (tk35, tk85, tk103 and tk123) were selected and all were identified as *Rhodopseudomonas palustris*. A fermented rice straw broth (FRSB) was prepared with sterile soil, straw and a selected photosynthetic bacterium, *Rhodopseudomonas palustris* (tk123) producing ALA of 2.96 mM. Using MRS agar medium, a total of 46 lactic acid bacteria (LAB) were isolated from the same source as the PB. LAB strain L35 showed the highest ability to grow in MRS broth with added 0.25% NaCl. Therefore, it was selected for co-culture with the PB strain tk123. This synergistic between LAB and PB occurred in a commercial complex medium (TSB) with high salinity. It is therefore most likely that a co-culture in rice straw broth will be possible for use as a tool for producing biofertilizers for use in organic saline paddy fields. Effects of 200 fold dilution of FRSB with tk123 and 1mM of commercial ALA on physiological traits such as height, root length, fresh weight of shoot and root were studied under normal and salt stress condition. The result indicated that all genotypes included IR17494-32-3-1-1-3, IR29725-21-1-3-2, Pathumthani1 (PTT1) and Surin1 (SRN1), FRSB slightly increased the root length (18.38%, 15.53%, 10.60% and 13.73%, respectively) and fresh weight of root (0.30%, 40.93%, 20.82% and 12.41%, respectively) under normal condition, while under salt stress, FRSB significantly increased the root length (24.62%, 16.05%, 8.64% and 13.80%, respectively) and fresh weight of root (4.33%, 47.52%, 39.65% and 23.11%, respectively). Interestingly, ALA increased the plant height, root length and fresh weight of shoot and root of all genotypes under normal and salt stress conditions. Salt reduced physiological traits of rice higher in all sensitive genotypes than in tolerant genotypes. Differences of gene expression between tolerant and sensitive genotypes grown in 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

mM ALA under normal and salt stress were observed. At least 3 genes, Os08g43050 (RGA2), Os10g34390 (thioredoxin) and CAT1 (catalase) were identified as regulators for salt tolerance in rice because they showed difference in expression between the groups of tolerant and sensitive genotypes under salt stress condition. Under ALA treatment, two genes Os04g31120 and Os07g07050 encoding OsFBK14-F-box domain and aldehyde oxidase, respectively, were down-regulated in all tolerant genotypes, while they were up-regulated in all sensitive genotypes. Interestingly, this difference is hardly observed in ALA under salt stress.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของน้ำหมักฟางข้าวที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกต่อการเจริญเติบโตของข้าวและการแสดงออกของยีนภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม

ผู้เขียน นางสาวธนวันต์ กันทา

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ไชยวัฒน์ ไชยสุต	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. ดวงพร คันธโชติ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ร.ต.อ. หญิง ดร. สุชาดา สุขหร่อง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. อมรทิพย์ เมืองพรหม	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญที่สุดในโลก เกือบครึ่งหนึ่งของประชากรโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก อย่างไรก็ตาม มีข้อจำกัดที่สำคัญของการปลูกข้าว ได้แก่ ความเค็ม เมื่อเร็ว ๆ นี้ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยได้มีการตระหนักถึงความปลอดภัยของอาหารมากยิ่งขึ้น จึงทำให้เกิดการพัฒนาทางเลือกในการปลูกพืชโดยการใช้เกษตรอินทรีย์ สำหรับการทำเกษตรอินทรีย์จะไม่อนุญาตให้ใช้ปุ๋ยเคมี ดังนั้น จึงมีการส่งเสริมการใช้ปุ๋ยชีวภาพในการทำเกษตรอินทรีย์ งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการใช้แบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงที่สามารถผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA) เพื่อใช้กับนาข้าวอินทรีย์ในพื้นที่ดินเค็ม ในการศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินจาก 14 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อใช้แยกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง จากผลการทดลอง

พบว่า แยกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงได้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ tk35, tk85, tk103 และ tk123 และทั้ง 4 สายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็น *Rhodopseudomonas palustris* สำหรับการเตรียมน้ำหมักฟางข้าว (FRSB) ที่ประกอบด้วยดิน และฟางข้าว รวมทั้งแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสายพันธุ์ tk123 พบว่ามีการผลิตสาร ALA ได้ 2.96 mM. ส่วนการแยกแบคทีเรียแลกติกจากตัวอย่างดินเช่นเดียวกับที่ใช้แยกแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสง พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 46 สายพันธุ์ และแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L35 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงสุดในการเจริญภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อ (MRS) ที่มี 0.25% NaCl ดังนั้น จึงเลือกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L35 และแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงสายพันธุ์ tk123 มาทดสอบการอยู่ร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ (TSB) ที่มีส่วนประกอบของ NaCl จากผลการทดลองพบว่า การเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงร่วมกันนั้น มีความเป็นไปได้ในการใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพสำหรับใช้ในการเกษตรอินทรีย์ในพื้นที่ดินเค็ม สำหรับการศึกษาลักษณะทางกายภาพของข้าว ได้แก่ ความสูง ความยาวราก น้ำหนักสดของลำต้น และราก โดยน้ำหมักฟางข้าวที่เจือจาง 200 เท่า และสาร 1mM ALA พบว่าในสภาพปกติของข้าว 4 สายพันธุ์ ได้แก่ IR17494 - 32 - 3 - 1 - 1 - 3, IR29725 - 21 - 1 - 3 - 2, Pathumthani1 (PTT1) และ Surin1 (SRN1) การให้น้ำหมักฟางข้าวช่วยเพิ่มความยาวราก (18.38%, 15.53 %, 10.60% และ 13.73% ตามลำดับ) และเพิ่มน้ำหนักสดของราก (0.30%, 40.93%, 20.82% และ 12.41% ตามลำดับ) ส่วนในภาวะเครียดจากความเค็ม น้ำหมักฟางข้าวช่วยเพิ่มความยาวราก (24.62%, 16.05 %, 8.64% และ 13.80% ตามลำดับ) และเพิ่มน้ำหนักสดของราก(4.33%, 47.52%, 39.65% และ 23.11% ตามลำดับ) สำหรับการให้สาร 1mM ALA กับข้าว 4 สายพันธุ์ในภาวะปกติและภาวะเครียดจากความเค็ม ทำให้ความสูง ความยาวราก น้ำหนักสดของลำต้นและรากเพิ่มขึ้น นอกจากนั้น พบว่า ความเค็มมีผลต่อการลดลงของลักษณะทางกายภาพของกลุ่มข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็มมากกว่าพันธุ์ทนเค็ม ส่วนการศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มข้าวพันธุ์ทนเค็ม และไม่ทนเค็ม โดยใช้สาร 1 mM ALA ภายใต้ภาวะปกติ และภาวะเครียดจากความเค็ม พบว่า ยีนอย่างน้อย 3 ยีน ได้แก่ Os08g43050 (RGA2), Os10g34390 (thioredoxin) และ CAT1 (catalase) เป็นยีนที่ควบคุมความสามารถในการทนเค็มของข้าว เพราะทั้ง 3 ยีนแสดงให้เห็นความแตกต่างในการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มข้าวพันธุ์ทนเค็ม และไม่ทนเค็มภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็ม สำหรับการศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มข้าวพันธุ์ทน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เค็ม และไม่ทนเค็มเมื่อได้รับสาร ALA พบว่า ยีน 2 ยีน ได้แก่ Os04g31120 (OsFBK14 - F - box domain) และ Os07g07050 (aldehyde oxidase) เป็นยีนที่มีการแสดงออกของยีนลดลงในกลุ่มข้าวพันธุ์ทนเค็ม และมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นในกลุ่มข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม ส่วนการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มข้าวพันธุ์ทนเค็ม และไม่ทนเค็มเมื่อได้รับสาร ALA ภายใต้ภาวะเครียดจากความเค็มนั้น พบว่า ไม่สามารถแบ่งลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มข้าวทั้งสองกลุ่มดังกล่าวได้อย่างชัดเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved