การตรึงไนโตรเจนและแอมโมเนียมแอสซิมิเลชัน ในข้าวที่เติม *Klebsiella oxytoca* R15

นางสาวมาลี แซ่ก๊วย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2537

ISBN 974-631-006-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16965417

NITROGEN FIXATION AND AMMONIUM ASSIMILATION IN RICE INOCULATED WITH *Klebsiella oxytoca* R15.

MISS MALEE SAEGUAY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-631-006-2

Thesis Title Nitrogen fixation and ammonium assimilation in rice inoculated with Klebsiella oxytoca R15

By Miss Malee Saeguay

Department Biochemistry

Thesis Advisor Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

Accepted by Graduated School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

....Santi Thoongsuwan.....Dean of graduate school

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis committee

.....Suganya Soontaros.....Chairman

(Assistant Professor Suganya Soontaros, Ph.D.)

.....Jariya Boonjawat.....Member

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

.....J. Limpananont.....Member

(Associate Professor Jiraporn Limpananont, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

มาลี แซ่ก๊วย : การตรึงไนโตรเจนและแอมโมเนียมแอสซิมิเลชั่น ในข้าวที่เติม *Klebsiella oxytoca* R 15 (NITROGEN FIXATION AND AMMONIUM ASSIMILATION IN RICE NOCULATED WITH *Klebsiella oxytoca* R 15) อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. จริยา บุญญวัฒน์, 87 หน้า. ISBN 974-631-006-2

การศึกษาผลการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อ *Klebsiella oxytoca* R 15 กับต้นกล้าข้าว พันธุ์ กข 7 พบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และทางกายภาพในต้นข้าว และเชื้อเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบส่องกราด พบว่าหลังจากเติมเชื้อ 7-21 วัน พบการโค้งงอของปลายรากและการแตกแขนงของราก แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในใบ เมื่อวัดกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีอะเซทีลีนรีดักชันของเชื้อ *K. oxytoca* R 15 บริเวณรากข้าว พบว่ากิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ เพิ่มขึ้นในระหว่างวันที่ 2-10 หลังจากอยู่ร่วมกับต้นข้าว โดยกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นประมาณ 50 เท่าในวันที่ 10 และ เมื่อวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ กลูตามีนซินเทเทส (GS) พบกิจกรรมจำเพาะของ GS เชิงทรานสเฟอเรส ในส่วนไซโตซอลของใบเพิ่มขึ้นประมาณ 30 % ในวันที่ 7-21 หลังจากเติมเชื้อ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลง ของเอนไซม์นี้ ในราก และปริมาณโปรตีนทั้งหมดไม่แตกต่างกันในข้าวที่เติมเชื้อและไม่เติมเชื้อ ซึ่งได้ผลตรงกับการศึกษาด้วยวิธี Westernblot ซึ่งพบว่าโปรตีน GS ซึ่งมีขนาด 48 กิโลดาลตัล เพิ่มขึ้นในใบของข้าวที่เติมเชื้อ นอกจากนี้การศึกษาตำแหน่งของโปรตีน GS ด้วยวิธี Immunogold-protein A labelling โดยใช้แอนติบอดีต่อ GS ของใบข้าวโพดที่ทำปฏิกิริยาข้ามกับ GS ในส่วน ไซโตซอลของใบและรากข้าว ยังพบผลการทดลองสนับสนุนกันอีกด้วย ผลการศึกษานี้แสดงว่าไนโตรเจนที่ถูกตรึง ถูกใช้ประโยชน์ในเซลล์ของเชื้อ *Klebsiella* ที่ยึดเกาะกับรากข้าวและเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน จากนั้นจึงมีการถ่ายเท ไปยังใบข้าวเพื่อใช้ประโยชน์ในรูปของกรดอะมิโน

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C325882 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: GLUTAMINE SYNTHETASE/ *Klebsiella oxytoca* R 15/ RICE/ NITROGEN FIXATION

MALEE SAEGUAY : NITROGEN FIXATION AND AMMONIUM ASSIMILATION IN RICE INOCULATED WITH *Klebsiella oxytoca* R 15. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. JARIYA BOONJAWAT. Ph.D. 87 pp. ISBN 974-631-006-2

Biochemistry and physical alteration were demonstrate in *Klebsiella*-rice association using *Klebsiella oxytoca* R 15 and rice cv. RD7 as model of study. Colonization of rice roots by *K. oxytoca* R 15 were shown to produce root curling, branching and root hair proliferation on day 7-21 after inoculation as demonstrate by stereomicroscopic and scanning electron microscopic techniques. Nitrogen-fixing cativity of associative *K. oxytoca* R 15 as determined by acetylene reduction assay significantly increased on day 2-10 after inoculation, about 50 fold on day 10 wheras in associative rice plants, ammonium assimilation via root cytosolic GS remains more or less similar with or without bacterial colonization, but in the leaf, the specific activity of cytosolic GS determined by transferase activity increased about 30% above control non-inoculated rice plant, while the root GS and total proteins of root and leaf were not affected by bacterial inoculation. The root and leaf cytosolic proteins of the subunit molecular weight 48 kDa, which cross-reacts with anti-GS of maize were demonstrated by SDS-PAGE and Westernblot analysis to be slightly increased with time after inoculation. Specific localization of rice cytosolic GS by immunogold-protein A labeling technique showed the same result. This studies indicate that the fixed-nitrogen was assimilated by associative *Klebsiella* and most likely was transferred to the leaf in certain form of amino acids.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest appreciation to Associate Professor Dr. Jariya Boonjawat for her kindness, understanding, invaluable supervision, encouragement, and financial supports throughout my study.

My appreciation is also expressed to Assist. Prof. Dr. Suganya Soontaros, Assoc. Prof. Dr. Jiraporn Limpananont for serving as thesis committee, for their constructive comments and valuable suggestion.

I with to thank the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (THAILAND)and the Rockefeller Foundation for financial support.

Thanks are also expressed to all staff and member students of Biochemistry Department for their helps in the laboratory with sincerity and friendship.

Finally, I am most grateful to my parents and members of my family for their love, understanding and encouragement.

CONTENTS

page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLE.....x

LIST OF FTGURE.....xi

ABBREVIATION.....xiv

CHAPTER

I INTRODUCTION

1.1 Ammonium assimilation in nitrogen-fixing bacteria.....1

1.2 Ammonium assimilation in plant.....3

1.3 Ammonium assimilation in plants-microbe interaction.....6

1.3.1 Symbiotic condition.....6

1.3.2 Associative condition.....9

1.4 problem.....10

II MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacteria.....12

Page

2.2 Rice.....12

2.3 Media and growth condition.....12

2.4 Maintenance of bacterial culture.....14

2.5 Bacteria-rice association.....15

2.6 Tissue preparation for stereomicropic study.....17

2.7 Tissue preparation inspection by electron microscope 17

2.8 Preparation of colloidal gold-protein A complex.....18

2.8.1 Optimum amount of protein A to stabllize colloidal gold.....19

2.8.2. Optimum pH for adsorption.....19

2.9 Immunogold staining.....20

2.10 GS in bacteria-rice association.....21

2.11 Determination of GS actlvity by transferase assay.....22

2.12 Polyacrylamide gel electrophoresis.....23

2.13 Western blot analysis of GS protein by GS antibody.....24

page

2.13.1 Antibody-antigen reaction on the membrane filter.....24

2.13.2 Detection of antibody-binding polypeptide 25

2.14 Determination of nitrogenase activity.....25

III RESULTS

3.1 The comparative study of ultrastructure of non-inoculated and inoculated rice by stereomicroscope.....28

3.2 The comparative study of ultrastructure of non-inoculated and inoculated rice by SEM.....32

3.3 Distribution of GS in leaf and root of rice with and without R15 inoculation.....41

3.4 The effect of association on nitrogen-fixing activity and cell numbers of *K.oxytoca* R15.....54

page

3.5 Effect of *K. oxytoca* R15 inoculation on root and leaf GS specific activity and total proteins.....58

3.6 Molecular form of root and leaf GS characterized by Westernblot analysis.....63

IV DISCUSSION

4.1 Effect of *Klebsiella* inoculation on ultra-structure of the root and leaf.....65

4.2 Effect of association on nitrogen fixing-activity and cell numbers of *K. oxytoca* R15.....66

4.3 Effect of *K.oxytoca* R15 on GS specific activity and total proteins of rice leaf and root.....68

V CONCLUSION.....71

REFERENCES.....72

APPENDIX.....84

BIOGRAPHY.....87

LIST OF FIGURES

Figure page

Figure 3.1 The morphology of root of inoculated and non-inoculated rice 28

Figure 3.2 The morphology of leaf of inoculated and non-inoculated rice.....30

Figure 3.3 The ultrastructure of roots of inoculated and non-inoculated rice.....33

Figure 3.4 The ultrastructure of leaves of inoculated and non-inoculated rice.....37

Figure 3.5 Cross-section of root and leaf of rice.....42

Figure 3.6 The control section of immuonogold-protein A staining.....43

Figure 3.7 The distribution of GS enzyme in rice root leaf.....46

Figure 3.8 The distribution of GS enzyme in rice leaf.....50

Figure 3.9 The nitrogen-fixing activity in various conditions.....56

Figure Page

Figure 3.10 The number of bacteria in associative and free-living condition.....57

Figure 3.11 The average value of GS specific activity versus total protein.....61

Figure 3.12 The GS activity staining of non-inoculated and inoculated rice root and leaf extract.....62

Figure 3.13 Western blot analysis of root and leaf.....64

LIST OF TABLES

Table page

Table 3.1 The number of gold particles/cm², observed by TEM.....45

Table 3.2 GS specific activity versus total protein.....60

ABBREVIATIONS

ARA	Acetylene Reduction Activity
ELISA	Enzyme-link immunosorbent assay
g	Gram
GS	Glutamine synthetase
GDH	Glutamate dehydrogenase
GOGAT	Glutamate syntase
h	Hour
l	Litre
LB	Luria broth
M	Molar
NF	Nitrogen free
ng	Nanogram
mg	Milligram
PBS	Phosphate buffer saline
TBS	Tris buffer saline
ug	Microgram
ul	Microlitre