ผลของการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (*Klebsiella* sp.) และข้าว ต่อเลกตินในข้าว

นางสาวเจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2535

ISBN 974-582-037-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018328

ASSOCIATION EFFECT OF NITROGEN-FIXING *KLEBSIELLA* SP. AND RICE ON RICE LECTIN

MISS CHETSADAPORN PITAKSUTHEEPONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1992

ISBN 974-582-037-7

Thesis Title Association effect of nitrogen-fixing *Klebsiella* sp. and rice on rice lectin

By Miss Chetsadaporn Pitaksutheepong

Department Biochemistry

Thesis Advisor Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

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

Thavorn Vajrabhaya
..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Sanha Panichajakul
..... Chairman

(Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.)

Jariya Boonjawat
..... Member

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

Preeda Chaisiri
..... Member

(Assistant Professor Preeda Chaisiri, Ph.D.)

J. Limpananont
..... Member

(Associate Professor Jiraporn Limpananont, Ph.D)

Nantakorn Boonkerd
..... Member

(Nantakorn Boonkerd, Ph.D)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์ : ผลของการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน (*Klebsiella* sp.) และข้าว ต่อเลกตินในข้าว (ASSOCIATION EFFECT OF NITROGEN-FIXING *KLEBSIELLA* SP. AND RICE ON RICE LECTIN)
อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.จริยา บุญญวัฒน์, 76 หน้า. ISBN 974-582-037-7

จากการศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันระหว่าง *Klebsiella* R15 และข้าวพันธุ์ กข 7 นางมลเอส 4 และ ขาวดอกมะลิ 105 ต่อเลกตินในข้าวภายใต้สภาวะขาดไนโตรเจน พบว่าการใส่เชื้อ 10^9 เซลล์ ต่อต้น ให้กับต้นข้าวอายุ 7 วัน มีผลทำให้ปริมาณเลกตินเฉพาะในรากข้าวทั้ง 3 พันธุ์เพิ่มขึ้นประมาณ 2-3 เท่า ในขณะที่ปริมาณเลกตินในใบไม่เพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณเลกตินที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญนี้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด และเป็นผลจากการสังเคราะห์เลกติน ทั้งนี้เพราะผลการวิเคราะห์เลกตินโดยวิธี Immunoblot ของสารสกัดจากรากข้าวพบว่ามีปริมาณเลกตินโพลีเพบไทด์ขนาด 23 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโพลีเพบไทด์ต้นตอ และเลกตินโพลีเพบไทด์ขนาด 18 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโพลี-เพบไทด์ระยะพัฒนาการเต็มที่ เพิ่มขึ้นในสารสกัดจากรากข้าวทั้ง 3 พันธุ์ที่อยู่ร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 7 14 และ 21 วัน การกระจายของเลกตินในรากที่ศึกษาโดยวิธีติดฉลากทอง-โปรตีนเอ พบการสังเคราะห์เลกตินที่เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมแบบไม่เรียบ แล้วผ่านเข้ากอลไจ บอดี ก่อนที่จะเข้าสู่แวคคูโอล และ ส่งออกไปที่ผิวของเซลล์ผิวราก ผลการทดลองยืนยันว่าเลกตินที่ปลดปล่อยออกมาเป็นปัจจัยสำคัญในการยึดเกาะระหว่างเชื้อ *Klebsiella* R15 กับเซลล์ผิวราก เนื่องจากพบว่ามีเลกตินล้อมรอบเซลล์แบคทีเรียที่เข้าไปอยู่ภายในรากบริเวณ exodermis แสดงว่าเลกตินภายในรากน่าจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการบุกรุกของแบคทีเรียเข้าไปในช่องว่างระหว่างเซลล์รากด้วย ในต้นกล้าข้าวควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อการกระจายของเลกตินในเนื้อเยื่อใบและรากจะเหมือนกับในต้นข้าวที่ใส่เชื้อคือ นอกจากในแวคคูโอลแล้ว พบเลกตินเฉพาะในไซเลม และ โฟลเอม โดยมีมากในผนังเซลล์ ส่วนที่อยู่คั่นอยู่ตรงกลาง และ ช่องว่างระหว่างเซลล์เหล่านี้ รูปแบบการกระจายนี้บ่งว่าหน้าที่ทางสรีรวิทยาของเลกตินน่าจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับการขนส่งเมตาบอไลท์หรือสารอาหารบางอย่างโดยอาศัยสมบัติการจับกับน้ำตาลได้อย่างจำเพาะ หรือโดยอ้อมเลกตินอาจทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ของสารโมเลกุลใหญ่ที่มีเอน-อะเซทีลกลูโคซามีน หรือ โอลิโกเมอร์ ของน้ำตาลชนิดนี้เป็นองค์ประกอบ ความสัมพันธ์ระหว่าง *Klebsiella* R15 กับข้าว มีผลทำให้การตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นมากกว่าแบคทีเรียที่อยู่อย่างอิสระ (2,500-3,000 นาโนโมล/หลอด/วัน) ซึ่งไม่สัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเลกตินที่เพิ่มขึ้นเพียง 2-3 เท่า และจากการวัดน้ำหนักแห้งเปอร์เซนต์ไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของต้นข้าวที่อยู่ร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ายังไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างข้าวที่ใส่เชื้อกับไม่ใส่เชื้อ

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

C225647 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: LECTIN / RICE / *Klebsiella* / NITROGEN FIXATION

CHETSADAPORN PITAKSUTHEEPONG : ASSOCIATION EFFECT OF NITROGEN-FIXING *KLEBSIELLA* SP. AND RICE ON RICE LECTIN. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph.D. 76 pp. ISBN 974-582-037-7

Study on the association effect between *Klebsiella* R15 and rice cv. RD7, NMS4 and KDML105 on rice lectin under N-deficient condition shows that, inoculation of approximately 10^9 cells/plant on day 7 after germination results in the specific increase about 2-3 fold of internal root lectin content in all 3 rice cultivars while there is no effect on shoot lectin. These significant increase is independent on total protein concentration and resulted from *de novo* synthesis, because the immunoblot analysis of lectin in the root extracts have revealed a significant increase in 23-kDa, lectin precursor polypeptide and 18-kDa, lectin mature polypeptide in the root extracts of associative rice seedlings 7, 14 and 21 days after inoculation in all 3 cultivars. Internal root lectins are specifically localized by immunogold-protein A labeling technique, to be synthesized on rough endoplasmic reticulum, and processed by Golgi body into vacuolar lectin and transported to the epidermal cell surface. The function of secretory lectin as a necessary associative factor in the adhesion between *Klebsiella* R15 and epidermal cells of rice root has been confirmed. Since some N_2-fixing bacteria were observed in the root exodermis surrounded by lectins, it is most likely that internal root lectin should be involved in the invasion of bacteria into the intracellular spaces. In control rice seedlings' root and leaf without *Klebsiella* R15 inoculation distribution of lectins are similar to those inoculated plants. Both, in the root and leaf tissues, beside the vacuoles, specific localization of lectins have been found in the xylem and phloem, especially in the cell wall, middle lamella and intercellular spaces among these cells. This pattern of lectin distribution implies that, one of the physiological function of lectin might be involved direct as carrier of some metabolites or nutrients according to its sugar specificity or indirectly as receptors of some macromolecular containing N-acetylglucosamine or its oligomer as component. Interaction between *Klebsiella* R15 and rice results in the significant increase of nitrogenase activity (2,500-3,000 nmol/tube x day) over the free-living *Klebsiella* R15 within 2 weeks after inoculation, which has no direct correlation with the 2-3 fold increase of root lectin, and the measurement of plant dry weight, % nitrogen and total nitrogen of rice plants 2 weeks after inoculation show no significant difference between inoculated and non-inoculated rice seedlings.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Dr. Jariya Boonjawat, for her invaluable supervision, encouragement, and supports throughout my study.

My appreciation is also expressed to Dr. Sanha Panichajakul, Dr. Preeda Chaisiri, Dr. Jiraporn Limpananont, and Dr. Nantakorn Boonkerd for serving as thesis committee, for their constructive comments and valuable suggestion.

I wish to thank all staff members of the Biochemistry Department for their help in the laboratory. My thank is extended to the students of the Biochemistry Department and Biotechnology Department for their sincerity and friendship, and thanks are also expressed to Mrs. Haumchan Srisopa for preparing the manuscript.

I wish to acknowledge the contributions of the National Genetic Engineering and Biotechnology, Ministry of Science Technology and Energy for financial support.

Finally I would like to express my most gratitude 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

LISTS OF TABLES..... x

LISTS OF FIGURES.....xi

ABBREVIATION.....xiii

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

1.1 Biological nitrogen fixation in paddy rice fields.....1

1.2 Interaction between N_2-fixing bacteria and rice.....3

1.3 Involvement of rice lectin in associative relationship.....5

1.4 Characteristics of rice lectin.....5

1.4.1 Rice lectin : cellular, subcellular localization and other physiological role.....7

1.4.2 Biosynthesis, processing and introcellular transport of rice lectin.....8

1.4.2.1 Lectin synthesis in developing embryos and rice seedlings.....8

1.4.2.2 Processing and intracellular transport of rice lectin.....9

Page

1.5 The aim of thesis.....9

II MATERIALS AND METHODS.....11

2.1 Bacterial strain.....11

2.2 Rice seeds.....11

2.3 Media.....11

2.4 Bacterial culture.....13

2.5 Plant growth and inoculation of *Klebsiella* R15 13

2.6 Tissue extraction.....14

2.7 Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA.....14

2.8 Protein determination.....15

2.9 Nitrogenase activity.....15

2.10 Total nitrogen content.....16

2.11 Immunoblot analysis.....17

2.12 Preparation of colloidal gold.....18

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

2.14 Tissue preparation inspection by electron microscope.....19

2.15 Immunogold staining.....20

III RESULTS.....22

3.1 Effect of *Klebsiella* R15 inoculation on root lectin and total proteins.....22

3.2 Effect of *Klebsiella* R15 inoculation on shoot lectin and total proteins.....24

3.3 Relationship between nitrogen-fixing activity and root lectin content.....28

3.4 Effect of bacterial inoculation on total nitrogen content of rice plant.....30

Page

3.5 Molecular forms of root and shoot lectins characterized by Western blot analysis.....30

3.6 Immunogold localization of lectin in rice root and leaf tissues.....34

3.6.1 Localization of rice lectin in root tissues..34

3.6.1.1 In the presence of bacterial inoculation.....34

3.6.1.2 In the absence of bacterial inoculation.....38

3.6.2 Localization of lectin in leaf tissues.....44

IV DISCUSSION.....51

V CONCLUDING REMARKS.....59

REFERENCES.....62

APPENDIX.....71

BIOGRAPHY.....76

LIST OF TABLES

Table | Page

3.1 Effect of *Klebsiella* R15 on root lectin concentration at different stage of growth.....25

3.2 Effect of *Klebsiella* R15 on shoot lectin concentration at different stage of growth.....27

3.3 Effect of *Klebsiella* R15 on total nitrogen content of rice plants two weeks after inoculation.....31

LIST OF FIGURES

Figure Page

1.1 Sequence similarity of chitin binding domains in the family of chitin-binding proteins....6

3.1 Effect of *Klebsiella* R15 on root lectin content and Total proteins....23

3.2 Effect of *Klebsiella* R15 on shoot lectin content and total proteins....26

3.3 Relationship between nitrogenase activity and root lectin content....29

3.4 Western blot analysis with antilectin of crude extracts from rice root and shoot fractions....32

3.5 Ultrathin sections of control root and shoot tissues treated with non-immune serum....35

3.6 Diagram of cross section of rice root and leaf....36

3.7 Specific localization of lectins in *Klebsiella* inoculated rice root....37

3.8 Immunogold staining of lectins on inoculated *Klebsiella* R15 in the rhizosphere of rice root....39

3.9 Subcellular localization of lectin in the vacuoles adjacent to Golgi apparatus in epidermal cells of inoculated root....41

3.10 Distribution of lectins in vacuoles, inclusion bodies of epidermis of inoculated root....42

3.11 Localization of lectins in the glycocalyx on the surface of non-inoculated epidermal cells....43

Figure

Page

3.12 Localization of lectin in the endoplasmic reticulum of endodermis root.....45

3.13 Localization of lectin in and around the xylem of rice leaf....47

3.14 Leaf lectins are sporadically present in the vacuoles problem and intecellular space.....49

3.15 Localization of lectins in the bulliform cells and stoma of rice leaf.....50

ABBREVIATION

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmole	Millimole
ng	Nanogram
POPOP	Phenyl-oxazolylphenyl-oxazolylphenyl
PPO	2,5-Diphenyl oxazole
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNase I	Ribonuclease I
rpm	Revolution per minute
Tc	Tetracycline
V	Volume