ห 92790

รหัสโครงการ SUT3-304-44-24-15

รายงานการวิจัย

ความหลากหลายและการคัดเลือกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสูงในต้นข้าว

(Biodiversity and Selection of High Efficiency Nitrogen Fixing Bacterial Endophyte in Rice)

ผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2544-2545

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2547

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มอบทุนอุดหนุนการวิจัย ขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมวิชาการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และขอขอบคุณบุคลากร ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ให้ความช่วยเหลือจนทำให้คณะผู้วิจัยสามารถดำเนินโครงการสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ผู้วิจัย

30 มิถุนายน 2547

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มที่คาดว่าอาศัยในเนื้อเยื่อของต้นข้าว ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Rennie medium (RMR) ที่ไม่ใส่แหล่งอาหารไนโตรเจน จำนวนทั้งสิ้น 256 ไอโซเลท จากต้นข้าวที่ทำการปลูกในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา นครสวรรค์ เชียงใหม่ และจังหวัดนครราชสีมา พบว่าจำนวนประชากรของแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ ที่ใบและราก ซึ่งมีจำนวนประชากรอยู่ในช่วง 10^6 เซลล์/น้ำหนักสด (กรัม) ส่วนที่ลำต้นมีเพียง 10^4-10^5 เซลล์/น้ำหนักสด (กรัม) ประชากรส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและมีรูปร่างแบบแท่ง การวิเคราะห์ทางชีวเคมีแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่มีความสามารถในการใช้มาเลทเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน แต่สามารถใช้แมนนิทอล, กลูโคส และอะราบิโนส เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถผลิต เอ็นไซม์เซลลูเลสและเพคติเนสด้วย

การศึกษาครั้งนี้ได้เลือก 5 สายพันธุ์ ซึ่งมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงมาทำการศึกษาต่อ โดยกลุ่มที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 66-753 นาโนโมลเอซิลิน ต่อจำนวนประชากรที่มีชีวิต 10^6 เซลล์ พบว่ามี 3 สายพันธุ์จากที่คัดเลือก 4 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิต Indole Acetic Acid (IAA) จากนั้นทำการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA บางส่วนของสายพันธุ์ดังกล่าว พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Acc. No. AF391127), *Azospirillum* sp. (Acc. No. AB049109), low G + C gram-positive (Acc. No. AB002342) และ *B. licheniformis* (Acc. No. NC000964.1) นอกจากนี้ยังยืนยันผลการแสดงออกของสายพันธุ์ดังกล่าวในเนื้อเยื่อข้าวโดยใช้ Green Fluoresent Protein (GFP) และ *gus* เป็น reporter gene ด้วยเทคนิค electroporation แล้วนำไป inoculate ร่วมกับการปลูกข้าวในสภาวะปลอดเชื้อ พบว่าแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกับ *B. licheniformis* สามารถเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อของต้นข้าวได้จริง นอกจากนี้ ทำการทดสอบยืนยันโดยสำรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าผลเป็นไปในทำนองเดียวกัน และยังพบพัฒนาการทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ กันไปตามช่วงอายุของต้นข้าวด้วย

Abstract

Isolation of putative N_2-fixing endophytic bacteria from rice was conducted on basis of culturing on Rennie-N-free medium (RMR). Total 256 bacterial isolates were obtained from rice specimens collected from Ayudhaya, Nakhon-Sawan, Chieng Mai and Nakhon Ratchasima. The main number population of bacteria was established in root and leaf approximately 10^6 cells/g fresh weight. Whilst, few population number in the range between 10^4-10^5 cells/g fresh weight was found in the stem. Most of bacterial isolates were gram-positive and rod-shaped. The carbon source utilization indicated that most of the isolates cpuld not to use malate as sole carbon source. However, other sources of carbon as manitol, glucose and arabinose could be utilized. In addition, cellulase and pectinase enzymes production was also be detected.

The top five bacterial isolate have high efficiency in N_2-fixation were selected. The range of N_2-fixing efficiency was in the range 66-753 $nMC_2H_4/10^6$ cells. Three of four isolates showed IAA production capability. From partical 16S rRNA gene analysis, they have similarity with *Bacillus subtilis* (Acc. No. AF391127), *Azospirillum* sp. (Acc. No. AB049109), Low G+C gram-positive bacteria (Acc. No. AB002342) and *B. licheniformis* (Acc. No. NC 000964.1). In addition, to confirm establishment of bacterial isolates in rice tissue, electroporation of green fluorescent protein (GFP) and *gus* gene was carried out prior to inoculate to rice. Only bacterial isolate which has similarity with *B. licheniformis* showed endophytic property. Cell differentiation of this strain inside the rice tissue was also elucidated by scaning electron microscope. Its different morphological changes were observed along with the rice age.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
บทที่ 1 บทนำ	
- วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
1. อาหารเลี้ยงเชื้อ	3
2. การวิเคราะห์ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน	3
3. ตัวอย่างข้าว	3
4. Surface sterilization และการแยกเชื้อ	4
5. การศึกษาลักษณะสำคัญบางประการของจุลินทรีย์	4
6. การปลูกข้าวร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้	5
7. การเตรียม cell lysate เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสบน 16S rDNA	6
8. การเพิ่มจำนวนโดย PCR และการหาลำดับเบสบน 16S rDNA	6
9. การเตรียม competent cell และการทำ electroporation	7
10. การตรวจสอบการเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อข้าวของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด	7
11. การติดตามการเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อของข้าวของแบคทีเรียที่ถูกใส่ reporter gene, GFP และ GUS	8
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	
1. การนับจำนวนของ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนในต้นข้าว	9
2. ลักษณะทางชีวเคมีบางประการของ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนได้	10
3. ผลของ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนได้กับการเจริญเติบโตของข้าว	13
4. การยืนยันการเข้าอยู่ร่วมอาศัยในเนื้อเยื่อพืชของแบคทีเรีย	14

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	18
เอกสารอ้างอิง	19
ประวัตินักวิจัย	21

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	แสดงการใช้แหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดย endophytic bacteria ที่แยกได้จากต้นข้าว	10
2	แสดงผลการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสและเซลลูเลสโดย endophytic bacteria ที่แยกได้จากต้นข้าว	11
3	การเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของข้าวเมื่อ inoculate ด้วยบางสายพันธุ์ของ endophytic bacteria ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้	13
4	การแสดงออกของยีน gfp แบคทีเรียไอโซเลท A-10 (ก) และ R_2D (ข) โดยดูจากการเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescent	14
5	แสดงสีของ gus gene expression ในเซลล์แบคทีเรียเมื่อเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อของรากต้นข้าว	15
6	แสดงพัฒนาการของรูปร่างเซลล์ในเนื้อเยื่อของรากต้นข้าวที่อายุ 10, 20, และ 30 วัน	16

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนประชากรของ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนในต้นข้าว	9
2	คุณลักษณะของ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนได้	12

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพเป็นการจัดสรรไนโตรเจนให้กับสิ่งมีชีวิต ซึ่งกระบวนการนี้จะพบเฉพาะในแบคทีเรีย และพวกแบคทีเรียโบราณ (Archaeabacteria) บางชนิดเท่านั้น ในขณะที่พืชและสัตว์จะได้รับประโยชน์โดยตรงโดยการอยู่ร่วมกันกับแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (diazotrophs) หรือโดยทางอ้อมจากขบวนการ mineralization แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนที่อยู่ร่วมกับพืชที่รู้จักกันอย่างกว้างขวาง คือ การอยู่รวมกันของไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า endosymbionts เนื่องจากพบแบคทีเรียเหล่านี้ได้ในปมของรากพืชตระกูลถั่ว จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้นั้นสามารถพบได้ในหญ้าบางชนิดเช่นกัน นอกจากนี้ ยังพบได้ใน gramineous crops เช่น Brazilian sugarcane ซึ่งมีการเจริญเติบโตได้ดีโดยไม่ต้องใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนที่ความเข้มข้นสูง นั่นคือ ได้รับแหล่งไนโตรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย

ได้มีการประมาณการไว้ว่า อ้อยสามารถได้รับธาตุไนโตรเจนจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนด้วยจุลินทรีย์ถึง 70% นอกจากนี้ในกลุ่มหญ้าก็พบว่ามีแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวด้วยเช่นกัน เช่น แบคทีเรียในจีนัส *Azoarcus, Herbaspirillum* และ *Acetobacter* อย่างไรก็ดี แบคทีเรียในกลุ่ม *Azoarcus* ได้มีการศึกษากันมาก โดยครั้งแรกพบว่าอาศัยอยู่ในหญ้าที่ชื่อ Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) ซึ่งพบครั้งแรกในประเทศปากีสถานบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ มีน้ำท่วมขัง และไม่เคยมีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนใด ๆ มาก่อน แต่กลับพบว่ามีการเจริญงอกงามสมบูรณ์ดี แบคทีเรีย *Azoarcus* นั้นพบว่าอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของราก และมีการแสดงออกของ *nif* gene ในเนื้อเยื่อรากด้วยเช่นเดียวกัน และเมื่อนำมาทดสอบเป็นหัวเชื้อร่วมกับการปลูกหญ้าชนิดนี้ พบว่าภายหลังทำการปลูกไปแล้ว 8 เดือน หญ้าให้ผลผลิตสูงขึ้น และมีการสะสมไนโตรเจนมากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Reinhold-Hurek และ T. Hurek , 1998)

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นหนึ่งในพืชไร่ที่มีความสำคัญในประเทศที่กำลังพัฒนา ผลผลิตจะสูง แต่จะต้องใช้ปริมาณของปุ๋ยไนโตรเจนที่สูงเช่นกัน การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณสูงจะทำให้เกิดการตกค้างของไนโตรเจนในดินและน้ำใต้ดิน ซึ่งจะมีผลต่อ สุขภาพและเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

แม้จะสามารถแยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้หลายสายพันธุ์จากรากข้าว แต่การศึกษาส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นในกระบวนการตรึงไนโตรเจน ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเข้าไปอยู่ของแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในข้าวต่างชนิดกันมากนัก เช่น endophytic bacteria ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้คือ *Herbaspirillum seropediaceae* เป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่แยกได้จากผิวของรากและมีการเข้าไปอยู่ในรากข้าว (Baldani และคณะ, 1986, Boddey และคณะ, 1995 และ james และคณะ, 1998) ปัจจุบันการวิจัยได้เห็นความสำคัญของ endophytic bacteria ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ฉะนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกที่จะศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าวที่ทำการปลูกในประเทศไทย เพื่อที่จะได้มาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ของทรัพยากรในประเทศ เพื่อเป็นพื้นฐานในการนำไปพัฒนาประยุกต์เป็นหัวเชื้อในพื้นที่นาข้าวต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์รวมของงานวิจัยมุ่งที่จะให้ทราบถึงความหลากหลายทางชีวภาพของกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในต้นข้าวในประเทศไทย โดยประกอบไปด้วยวัตถุประสงค์จำเพาะดังนี้

1. เพื่อให้ทราบถึงจำนวนประชากรและชนิดของกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนรวมไปถึงกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงในต้นข้าวที่มีอยู่ในแต่ละภาคของประเทศ
2. เพื่อให้ทราบถึงกลไกเบื้องต้นของชนิดแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่มีความสามารถดำรงชีวิตอยู่ในต้นข้าว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน ที่จำเพาะต่อการเข้าสู่เนื้อเยื่อของต้นข้าว
2. นำไปประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อในรูปของปุ๋ยชีวภาพสำหรับต้นข้าว
3. ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกลุ่ม endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนของข้าวในประเทศไทย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและวิธีการ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับการแยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ในข้าว ในการทดลองครั้งนี้ใช้อาหาร Rennie medium, RMR (Rennie, 1981) ซึ่งอาหาร RMR ประกอบด้วย

ก. สารละลาย A ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.8 กรัม, KH_2PO_4 0.2 กรัม, NaCl 0.1 กรัม, $Na_2FeEDTA$ 28 มิลลิรัม, $Na_2MoO_4 . 2H_2O$ 25 มิลลิกรัม, yeast extract 100 มิลลิกรัม, manitol 3.0 กรัม, sucrose 5.0 กรัม, sodium lactate 60% โดยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร, sodium malate 2.0 กรัม, วุ้น 2.0 กรัม (สำหรับอาหารกึ่งแข็งในหลอดทดลอง) หรือ 15 กรัม (สำหรับอาหารแข็งในจานเลี้ยงเชื้อ) และน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข. สารละลาย B ประกอบด้วย $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม, $CaCl_2.H_2O$ 0.06 กรัม, และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลายแต่ละชนิดจะแยกนึ่งฆ่าเชื้อ และจะนำมารวมกันหลังจากที่ทำให้เย็นแล้ว นอกจากนี้จะต้องเติม biotin และ para-aminobenzoic acid (ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร) ซึ่งทำให้ปลอดเชื้อใช้แผ่น membrane ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรู 0.45 ไมครอน โดยความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2. การวิเคราะห์ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

การวิเคราะห์ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนทำได้โดยวิธี Acytelene Reduction Assay (ARA) โดยการเตรียมอาหารกึ่งแข็ง RMR ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 27 มิลลิลิตร โดยจะฉีดแก๊สอะเซทิลีนเข้าไปในหลอดให้ได้ความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร และบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะทำการวัดแก๊สแอททีลีนที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี กับ Porapak คอลัมน์

3. ตัวอย่างข้าว

พันธุ์เพาะปลูก *(Oryza sativa* L.) ได้รับพันธุ์ข้าวจากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี นำข้าวที่ได้มาปลูกในกระถางทดลองในสภาวะ greenhouse ที่สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และเริ่มทำการศึกษาเมื่อข้าวเข้าสู่ระยะ heading stage ส่วนตัวอย่างข้าวที่ปลูกโดยเกษตรกร ทำการเก็บตัวอย่างที่จังหวัดนครราชสีมา อยุธยา นครสวรรค์ และจังหวัดเชียงใหม่

4. Surface Sterilization และการแยกเชื้อ

นำตัวอย่างข้าวที่เข้าสู่ระยะ heading stage จากทั้งที่ปลูกและเก็บตัวอย่างมาแยกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ โดยการเลือกชิ้นส่วนของลำต้น, เปลือกใบ และราก มาล้างด้วยน้ำประปา นำตัวอย่างเนื้อเยื่อข้าวมาทำ surface sterile ด้วย 70% แอลกอฮอล์ 30 วินาที และ 2% sodium hypochloride 5 นาที จากนั้นล้างตัวอย่างเนื้อเยื่อ 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ตัดเนื้อเยื่อดังกล่าวให้ยาวประมาณ 1-2 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปใส่ในโกร่งปลอดเชื้อ เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร พร้อมทั้งทรายที่ฆ่าเชื้อแล้ว บดตัวอย่างเนื้อเยื่อให้ละเอียด ดูดส่วนใสไปใส่ในอาหารกึ่งแข็ง RMR บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำตัวอย่างไปวัด ARA

หลอดที่ให้ผลการวัด ARA เป็นบวกจะถูกนำไปเขี่ยลงบนอาหารแข็ง RMR หลังจากบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำโคโลนีที่เกิดขึ้นไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง RMR และนำไปตรวจสอบ ARA เพื่อยืนยันความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอีกครั้งหนึ่ง โคโลนีให้ผลการทดลองเป็นบวก จะถูกเก็บไว้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5. การศึกษาลักษณะสำคัญบางประการของจุลินทรีย์

5.1 ลักษณะทางกายภาพ สัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา

แยกโคโลนีของแบคทีเรียที่พบบนจานเพาะเชื้อ มาเลี้ยงบนอาหาร RMR จากนั้น นำมาย้อมแกรม และสังเกตลักษณะของแบคทีเรียโดยประยุกต์จากวิธีของ Huckers (Cowan, 1974) นอกจากนี้ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน ได้แก่ แรมโนส, แมนนิทอล, มาเลท, กลูโคส และอะราบิโนส บนอาหาร ammonium mineral salt agar ซึ่งมี bromophenol blue pH เป็น indicator

5.2 การวิเคราะห์เอ็นไซม์เพคติเนสและเซลลูเลส

นำแต่ละไอโซเลทของ endophytic bacteria ที่แยกได้มาศึกษากิจกรรมของเอ็นไซม์เพคติเนสและเซลลูเลส โดยที่เอ็นไซม์เพคติเนสจะทดสอบบนอาหาร Ammonium Mineral Agar (AMA) โดยประยุกต์จากวิธีของ Plazinski และ Rolfe (1985) อาหารประกอบด้วย 2.0 กรัม/ลิตรของ $(NH_4)_2SO_4$, 3.0 กรัม/ลิตร ของ KH_2PO_4, 4.5 กรัม/ลิตรของ Na_2HPO_4 , 1.5 กรัม/ลิตรของ yeast extract, 5.0 กรัม/

ลิตรของ apple pectin (Sigma), 0.3 กรัม/ลิตรของ H_3BO_3, 0001 กรัม/ลิตรของ $MnSO_4$ 0.00017 กรัม/ลิตรของ $ZnSO_4.7H_2O$, 0.0005 กรัม/ลิตรของ $CuSO_4.8H_2O$, 0.0001 กรัม/ลิตรของ $Na_2MoO_4 . 2H_2O$, 15.0 กรัม/ลิตรของ Noble agar (Difco) pH 7.2, $MgSO_4.7H_2O$ และ $CaCl_2$ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-12 วัน ตกตะกอน unhydrolyzed pectins ด้วย สารละลาย 2% hexadecyltrimethylammonium bromide ส่วนการวิเคราะห์เอ็นไซม์เซลลูเลสจะนำมาทดสอบตามวิธีของ Andro และคณะ (1984) อาหารประกอบด้วยสารละลาย 4 ชุด (A-D) : สารละลาย A ประกอบด้วย NaCl 0.25 กรัม, K_2HPO_4 1.5 กรัม และ carboxy methyl cellulose (CMC : viscosity 10.55 cps; Aldrich Chemical Co.) ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร (เติม CMC ช้า ๆ เพื่อไม่ให้เกิดการจับกันเป็นก้อน) สารละลาย B คือ 1 M ของ $MgSO_4 . 7H_2O$ สารละลาย C ประกอบด้วย Na_2HPO_4 3.0 กรัม, NH_4Cl 5 กรัม, glycerol 2.5 กรัม, yeast extract .0.5.กรัม, Noble Agar (Difco) 6.5 กรัม และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร สารละลาย D คือ 7.5% (w/v) $CaCl_2$ โดยที่สารละลายทั้ง 4 ต้องแยกกันทำให้ปลอดเชื้อ นำสารละลาย A และ C มาผสมกันในขณะที่ยังร้อนอยู่ จากนั้นเติม สารละลาย B และ D อย่างละ 1 มิลลิลิตร สำหรับเซลลูโลสจะทดสอบโดยเติม 0.1%(w/v) Congo-red ให้ท่วมจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ 15-30 นาที แล้วจึงตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยเติมสารละลาย 1 M NaCl สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแบคทีเรีย

5.3 การผลิต IAA และการวัดกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน

ตรวจวัดการผลิต IAA (indole-3-acetic acid) โดยสังเกตจากสีที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Minamizawa และคณะ (1992) โดยใช้ L-trytophan เป็น precursor จากนั้นตรวจสอบการสร้างโดยตรวจสอบการเกิดสี เทียบกับ IAA มาตรฐาน

6. การปลูกข้าวร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำเมล็ดข้าวพันธุ์เพาะปลูกมาแกะเปลือก แล้วทำ surface sterilization ด้วย chlorox 20% ผสมกับ tween 20 เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นแช่ใน chlorox 10% ผสมกับ tween 20 เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดที่ได้วางบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษซับเปียกน้ำ (ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้ว) เก็บไว้ในที่มืด 2 วัน จนกระทั่งเมล็ดงอก

การเตรียมหัวเชื้อ ทำได้โดยเลี้ยง Endophytic bacteria ในอาหารเหลว RMR จนกระทั่งถึง logarithmic phase โดยการวัดความขุ่นที่ 660 nm จะได้ค่าประมาณ 0.9 หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง และละลายเซลล์ที่ได้ในน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนที่จะนำไปปลูกลงในเมล็ดข้าวที่งอกแล้ว โดยจะใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ 1 เมล็ด นำเมล็ดข้าวที่ใส่เชื้อแล้วไปปลูกในทรายปลอดเชื้อที่เติมสารละลายที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน N-free solution และนำไปวางไว้ในที่

ชั้นแสง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน หลังจาก 45 วัน จะนำต้นข้าวที่ได้มาหาน้ำหนักแห้ง (DW) ของราก ใบ และลำต้น

7. การเตรียม cell lysate เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสบน 16S rDNA

นำเซลล์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเลี้ยงใน อาหารเหลว RMR 5 มิลลิลิตร และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์เจริญอยู่ในช่วง log phase เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง แล้วล้างด้วยสารละลาย (1% w/v) NaCl 1 มิลลิลิตร ที่ 15,000 รอบ/นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร และเก็บรักษาไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส นำสารละลายเซลล์แบคทีเรีย 40 ไมโครลิตรมาทำให้แตกโดยเติมสารละลาย proteinase K ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในปริมาณ 10 ไมโครลิตร และ BL buffer (pH 8.0) 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 40 mM Tris (hydroxymethyl aminimethane), 1% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40 และ 1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid จากนั้นนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง นำสารละลายส่วนใสที่ได้ซึ่งมี crude DNA มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

10. การเพิ่มจำนวนโดย PCR และการหาลำดับเบสบน 16S rDNA

เพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ primer ที่ทำการออกแบบจาก ตำแหน่ง 28 ถึง 518 และ 28 ถึง 784 ของยีน 16S rDNA ของ *E. coli* โดยเทคนิค PCR primer ที่ใช้คือ 27fR, 519rU และ 785rU ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

27fR: 5'CAGGAAACAGCTATGACCAGAGTTTGATCACTGGCTCAG-3'

519Ru: 5'-TGTAAAACGACGGCCAGTG(AT)ATTCCGCGGC(GT)GCTG-3'

785Ru: 5'-TGTAAAACGACGGCCAGTACTACC(AC)GGGTATCTAATCC-3'

ซึ่งที่ปลาย 5' 18 nucleotides ของ primer เป็นตำแหน่งที่พบใน 16S rRNA gene ของ eubacteria (Lane, 1991) ปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 50 pmol ของ primer แต่ละชนิด, dNTPs ความเข้มข้น 200 mM, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 mM และ Taq polymerase 1.25 ยูนิต โดยทำการ denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 1 รอบ จากนั้น denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, annealing ที่ 53 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ หลังจากได้ PCR product แล้วจึงนำมาหาลำดับเบสโดยตรงด้วย 373A DNA sequencer และ Taq diprimer Cycle sequencing kits สำหรับ –21M13 และ M13 Rev. (Applied biosystem Co.) นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับ DNA database ของ DDBJ/EMBL/ GenBank

9. การเตรียม competent cell และการทำ electroporation

นำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร RMR แล้วบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส โดยเขย่าตลอดเวลาที่ 200 รอบ/นาที เพื่อเตรียม competent cell จนกระทั่งวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรได้ในช่วง 0.4 ถึง 0.6 นำสารละลายเซลล์ (1 มิลลิลิตร) ไปแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ที่ได้มาละลายใน milli-q water (เย็น) 1 มิลลิลิตร และล้างโดยการปั่นเหวี่ยง แล้วละลายด้วย milli-q water 0.5 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 0.2 มิลลิลิตรที่มี 10% glycerol จากนั้นนำเซลล์มาละลายใน 10% glycerol 40 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส

สกัดพลาสมิด pBBR-TGRPuv ซึ่งมีขนาด 6.4 กิโลเบส ซึ่งมียีนต้านทาน kanamycin, GFPuv กับ Ptac promotor, *rep* และ *mob* ยีนจาก พลาสมิด pBBR122 ที่แยกได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5-α สำหรับ reporter gene ที่เป็น GUS จะสกัดพลาสมิด mTn5 SS gusA ซึ่งมียีนต้านทาน ampicillin, gusA กับ Ptac promoter ยีนจากพลาสมิด pcm110 ที่แยกได้จาก *E .coli* โดยวิธี alkaline lysis สำหรับ electroporation Electro cell Manipulator ® 600 (BTX) กับ gap cuvette ขนาด 1 มิลลิเมตร ผสมดีเอ็นเอพลาสมิด (500 นาโนกรัม – 1 ไมโครกรัม หรือ 3-5 ไมโครลิตร) แล้วเปลี่ยนไปใส่ใน cuvette (เย็น) กระแสไฟฟ้าที่ใช้จะอยู่ในสนามที่มีค่า 13.5 กิโลโวลล์/เซนติเมตร ค่าความต้านทาน 129 โอห์ม และกระแส 5.5 เมตร. วินาที นำเซลล์มาละลายทันทีในอาหาร RMR 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย gluconic acid 5 กรัม, glutamic acid 1 กรัม และ yeast exract 1 กรัม/ลิตร จากนั้นวางบนน้ำแข็งจนกระทั่งนำตัวอย่างไปกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า หลังจากกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว นำเซลล์มาบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ 200 รอบ/นาที แล้วจึงนำมา spread บนอาหารแข็ง RMR ที่มี 10 mM IPTG และ kanamycin ตรวจผล transformant cell โดยใช้กล้อง fluorescent

10 ารตรวจสอบการเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อข้าวของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

หลังจากปลูกข้าวและปลูกเชื้อด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว เก็บตัวอย่างต้นข้าวที่เวลา 10, 20 และ 30 วัน เพื่อนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, Model JSM 6400 บริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น) ซึ่งมีวิธีการเตรียมตัวอย่าง ดังนี้

1. ตัดตัวอย่างให้มีขนาดเล็กกว่า 3 มิลลิเมตร
2. แล้วนำตัวอย่างไปแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 1 ชั่วโมง
3. ล้างด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

4. แช่ตัวอย่างใน 1% OsO_4 ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 เป็นเวลา...10..นาที
5. ล้างด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที
6. สกัดน้ำออกจากตัวอย่างด้วยแอลทิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 90%, 95% และ 100% (2 ครั้ง) ตามลำดับขั้นตอนละ 10-15 นาที
7. ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต ด้วยเครื่องทำให้แห้ง (Critical point dryer)
8. ติดตัวอย่างบนฐานรองรับตัวอย่าง (stub)
9. นำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทอง (Ion sputter) แล้วนำไปศึกษาด้วย SEM

11. การติดตามการเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อของข้าวของแบคทีเรียที่ถูกใส่ reporter gene, GFP และ GUS

การตรวจสอบการเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อของข้าวของ Endophytic bacteria ที่มี reporter gene, GFP จะทำโดยการใช้กล้อง Fluorescent (รุ่น BX50-32E01 ยี่ห้อ Olympus ประเทศญี่ปุ่น) ส่วนการตรวจสอบ Endophytic bacteria ที่มี reporter gene, GUS จะทำได้โดยจะนำรากและลำต้นของข้าวไปแช่ใน Staining buffer ตามวิธีของ GUS Gene Marking Kit เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การนับจำนวนของ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนในต้นข้าว

นับจำนวน endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนจากต้นข้าว ที่ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนพฤศจิกายน/ธันวาคม พ.ศ. 2543 พบประชากรแบคทีเรียมากกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัมของน้ำหนักสดของราก ในขณะที่มีประชากร $10^4 - 10^5$ ในเนื้อเยื่อของลำต้นและใบ ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนประชากรของ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนในต้นข้าว

Rice Organ	N_2-fixing Epiphyte cells/g rice	Total N_2-fixing Endophytic (A)	Putative-N_2-fixing Endophytic (B)	% Incidence of N_2-fixing bacteria (B/A)× 100
Root	$2.83\times10^4 \pm 1.2$	1.35×10^6 $\pm 0.6(10^6)$	1.36×10^6 $\pm 0.6(9.72\times10^5)$	97.93 (97.2)
Stem	$1.13\times10^3 \pm 0.9$	5×10^4 $\pm 2.6(10^4)$	4.887×10^4 $\pm 1.9(8.87\times10^3)$	97.74 (88.7)
Leaf	$8.1\times10^4 \pm 2.2$	1.1×10^6 $\pm 0.9(10^5)$	1.09×10^6 $\pm 0.6(9.91\times10^4)$	99.09 (91.9)

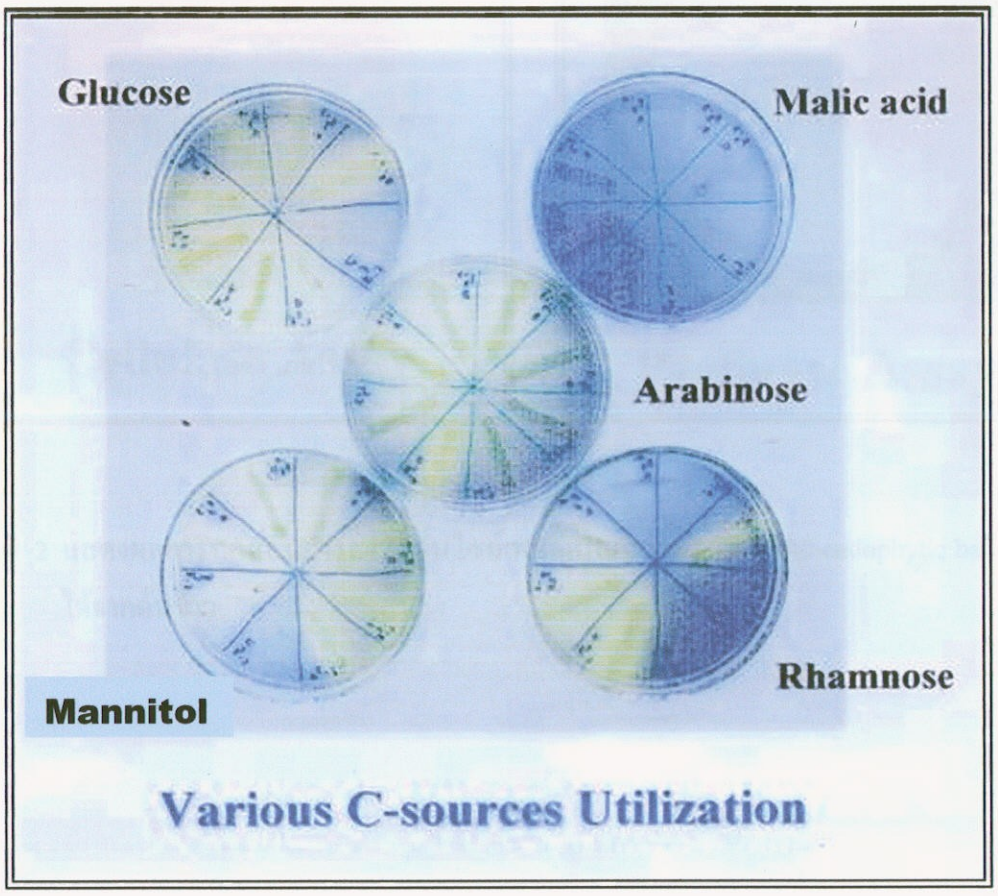
หมายเหตุ : จำนวนในวงเล็บเท่ากับจำนวนที่นับโดยดูผลบวกบนกิจกรรมของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสกับค่าที่ได้จากเทคนิค MPN โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารกึ่งแข็ง RMR

ผลการศึกษาคล้ายกับจำนวนประชากรของ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนได้ (MPN กรัม/น้ำหนักแห้ง) ใน wetland rice ในประเทศฟิลิปปินส์ ซึ่งพบจำนวนประชากรอยู่ในช่วง 7.94×10^7 เซลล์/กรัม ในรากและ 2.57×10^6 เซลล์/กรัม ในลำต้นจากประชากรของ endophytic bacteria ทั้งหมดในเนื้อเยื่อมีความแตกต่างกันทาง genotype ของข้าว และมีประชากรอยู่ในช่วง $10^5 - 10^8$ และ $10^4 - 10^9$ เซลล์/กรัม ในรากและลำต้นตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามจำนวนประชากรของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ในข้าวที่มี genotype ต่างกัน พบว่ามีประชากรของแบคทีเรียอยู่ในช่วง $10^3 - 10^7$ เซลล์/กรัม ในรากและ $10^4 - 10^6$ เซลล์/กรัม ในลำต้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบกับในอ้อยจะพบว่า *Acetobacter diazotrophicus* มีจำนวนประชากรประมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัมน้ำหนักสดของรากและลำต้น (Gillis และคณะ, 1989) ในกรณีของพืชไร่อื่น ๆ เช่น *Pinnisetum purpureum* ในบราซิล มี

ประชากรสูงถึง 10^5–10^6 และ 10^4-10^5 เซลล์ต่อกรัมของน้ำหนักสดของรากและส่วนที่สัมผัสอากาศ ตามลำดับ (Silva และคณะ, 1995)

2. ลักษณะทางชีวเคมีบางประการของ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนได้

นำ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนได้จากข้าวหลากหลายชนิดได้ทั้งสิ้น 256 สายพันธุ์ มาตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่าง ๆ จากผลการศึกษา พบว่าส่วนใหญ่ของสายพันธุ์ที่แยกได้เหล่านี้ ไม่สามารถใช้กรดมาลิคเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่ทุกไอโซเลทสามารถใช้กลูโคสได้ ส่วนแหล่งอาหารคาร์บอนอื่น ๆ ได้แก่ แมนนิทอล, แรมโนส, อะราบิโนส กลูโคส และกรดมาลิค พบว่า 91, 67, 86, 66 เปอร์เซนต์ของจำนวนไอโซเลททั้งหมด สามารถใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนได้ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงการใช้แหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดย endophytic bacteria ที่แยกได้จากต้นข้าว

นอกจากนี้ การผลิตเอ็นไซม์สำคัญที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องต่อการเข้าอาศัยในเซลล์พืชส่วนใหญ่สามารถผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส และเพคติเนส ซึ่งเป็น hydrolytic enzymes อยู่ในผนังเซลล์และแพร่กระจายอยู่ภายในเซลล์ของ endophytic bacteria เช่น *Azoarcus* sp. (Andro และคณะ, 1994) และ *Azospirillum* (Plazinski และ Polfe, 1985) อย่างไรก็ตาม hydrolytic enzyme จะพบว่าก่อให้เกิดโรคในพืช เช่น กลุ่มของ *Erwinia* (Andro และคณะ, 1984) ดังนั้น จึงทำการวิเคราะห์เพคตินและเซลลูโลสที่ถูกสร้างจากแบคทีเรียที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า 67% ของจำนวนไอโซเลทั้งหมด สามารถผลิตเอนไซม์แพคติเนส และ 72% ของทั้งหมดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 2)

รูปที่ 2 แสดงผลการทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสและเซลลูเลสโดย endophytic bacteria ที่แยกได้จากต้นข้าว

ตารางที่ 2 คุณลักษณะของ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนได้

สายพันธุ์	กิจกรรมของเอ็นไซม์ไนโตรจิเนส (นาโนโมล C_2H_4 / 10^6 เซลล์)	การย้อมแกรม	การสร้างเอนไซม์เซลลูเลส	การสร้างเอนไซม์เพคติเนส	แรมโนส	แมนนิทอล	กรดมาลิค	กลูโคส	อะราบิโนส	การผลิต IAA
A-10	165.6	+	+++	+	+	+	-	+	+	+
A-13	753.94	+	+	+	+	+	-	+	+	-
E-13	334.80	+	+++	++	+	+	-	+	+	+
R_2D	66.24	+	+++	++	+	+	-	+	+	+++
Beijerinkia sp.	432.00	-	+	++	-	+	-	+	+	+

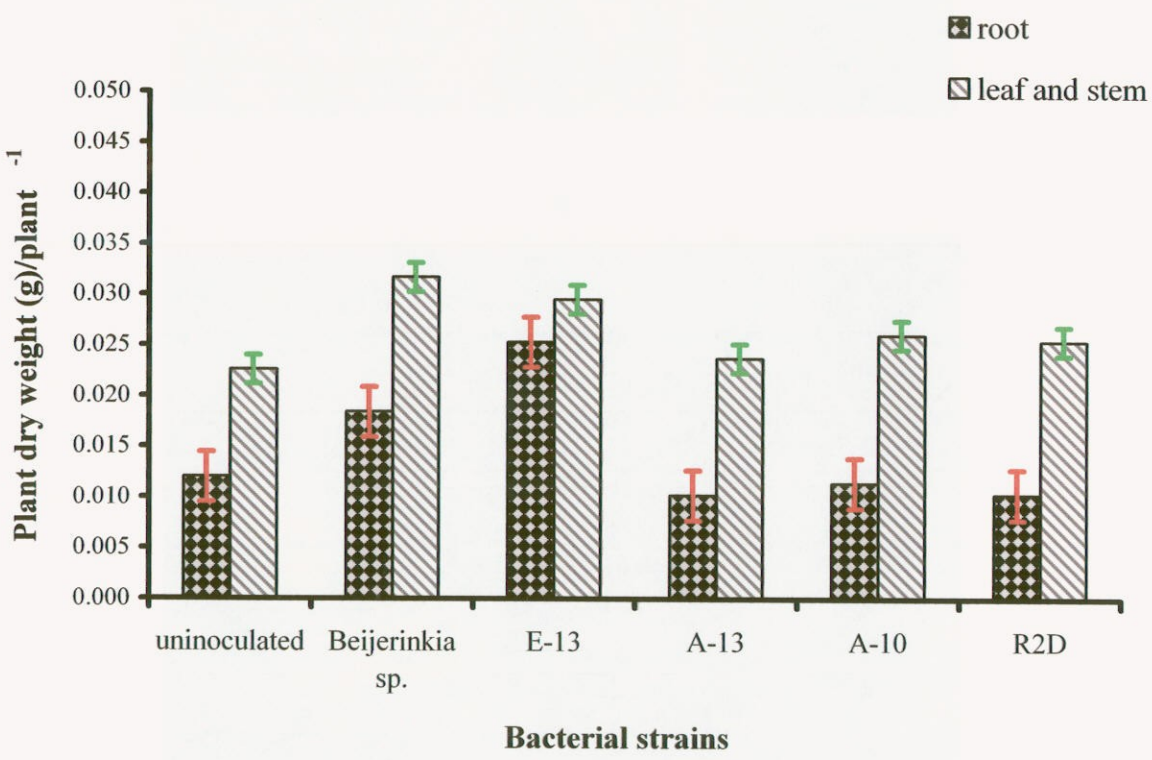
เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมด 256 ไอโซเลท ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง RMR และตรวจสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ด้วยเทคนิค ARA พบว่ามีเพียง 120 ไอโซเลท ที่ให้ผลการตรึงไนโตรเจนที่ชัดเจน จากนั้นทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีแนวโน้มที่จะตรึงไนโตรเจนได้สูงมาทำการศึกษาต่อไป ซึ่งสุดท้ายคัดเลือกไว้เพียง 4 สายพันธุ์

ไอโซเลทที่คัดเลือกมา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ A-10, A-13, E-13 และ R_2D โดยทำการทดสอบการผลิต IAA เพิ่มเติม ดังแสดงผลในตารางที่ 2 จากนั้นทำการอ่านลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท ได้ผลดังต่อไปนี้ ไอโซเลท A-10 มี % homology = 89% กับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Acc. No. AF391127), A-13 มี % homology = 95% กับแบคทีเรีย *Azospirillum* sp. สายพันธุ์ B52 (Acc. No. AB049109), E-13 มี % homology = 88% กับกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มีค่า G+C ต่ำ (Acc. No. AB002342) และ R_2D มี % homology = 99% กับ *B. licheniformis* (Acc. No. NC000964.1)

ผลการทดลองครั้งนี้พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Song และคณะ (2000) ซึ่งพบว่า *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่พบว่าเป็น endophytic ที่สามารถตรึงไนโตรเจนในต้นข้าวได้

3. ผลของ endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจนได้กับการเจริญเติบโตของข้าว

เมื่อนำ Endophytic bacteria ที่ตรึงไนโตรเจน ได้แก่ E-13, A-13, A-10, R_2D และ *Beijerinkia* sp. (สายพันธุ์ที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ) มาใส่ร่วมกับการปลูกข้าวซึ่งปลูกในทรายปลอดเชื้อที่มีน้ำยาปลูกพืช ที่ไม่มีแหล่งอาหารไนโตรเจนเป็นเวลา 45 วัน หลังจากที่ต้นข้าวเจริญแล้ว นำมาหาน้ำหนักแห้ง (DW) ของราก, ใบ และลำต้น (ผลแสดงดังรูปที่ 3) พบว่าไอโซเลท E-13 ให้น้ำหนักแห้งของข้าวสูงสุด โดยให้เพิ่มขึ้นมากกว่า 100% ในน้ำหนักแห้งของราก และเพิ่มขึ้น 20% ในน้ำหนักของลำต้นและใบ แสดงว่าศักยภาพของแบคทีเรียไอโซเลท E-13 น่าจะมีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญของข้าว จากผลการศึกษานี้สามารถบ่งบอกถึงความคิดใหม่ ๆ ในการที่จะใช้ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และฮอร์โมน เพื่อร่วมส่งเสริมการเจริญของข้าวแทน ซึ่งจากรายงานของ Baldani และคณะ, 2000 พบว่า Endophytic bacteria ที่คัดแยกได้จากข้าวได้แก่ *Herbaspirillum seropedical* และ *Burkholderia* มีความสำคัญในการเพิ่มไนโตรเจน โดยผ่านขบวนการตรึงไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าฮอร์โมน IAA ที่ผลิตได้จาก Endophytic bacteria บางชนิดนั้นมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวในอีกทางหนึ่งด้วย

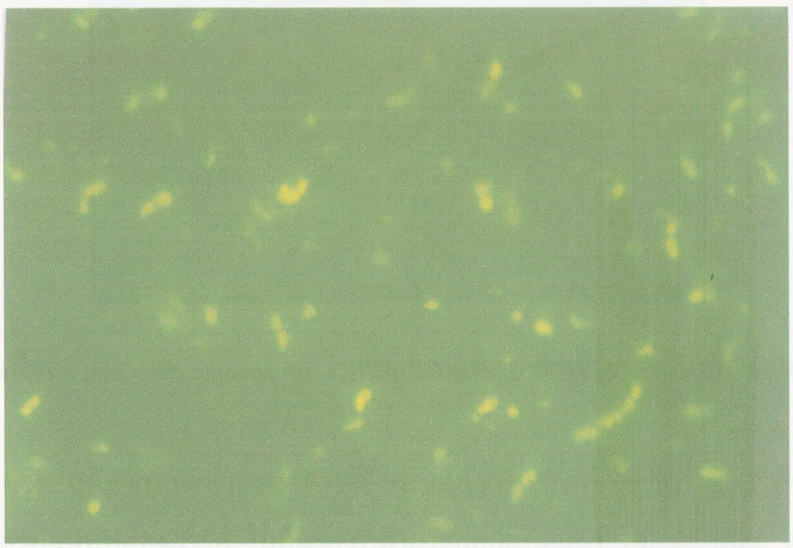


รูปที่ 3 การเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของข้าวเมื่อ inoculate ด้วยบางสายพันธุ์ของ endophytic bacteria ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

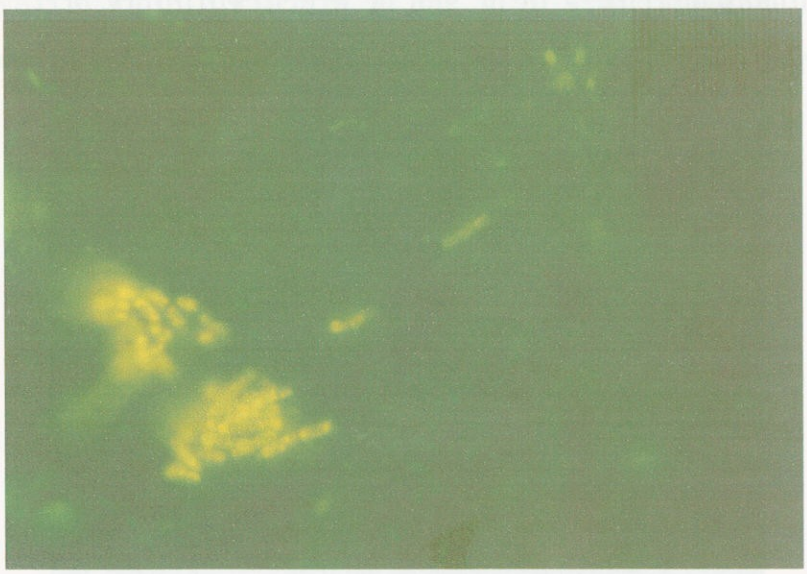
4. การยืนยันการเข้าอยู่ร่วมอาศัยในเนื้อเยื่อพืชของแบคทีเรีย

ศึกษาการเข้าอยู่ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในพืช โดยนำแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท มาทำการถ่าย report gene ด้วยเทคนิค electroporation โดยยีสต์ที่ใช้ ได้แก่ *gfp* และ *gus* gene ที่มียีนที่ควบคุมการสร้าง GFP protein พบว่าทุกไอโซเลทมีการแสดงออกเมื่อทดสอบดูการเรืองแสง (ดังแสดงในรูปที่ 4) แต่เมื่อนำไปปลูกร่วมกับต้นข้าว แล้วนำเนื้อเยื่อข้าวมาทดสอบพบว่า ไม่สามารถเห็นภาพที่ชัดเจน เนื่องจากแสดง Background จากพืชรบกวนความชัดเจนของเซลล์แบคทีเรีย

ก.



ข.

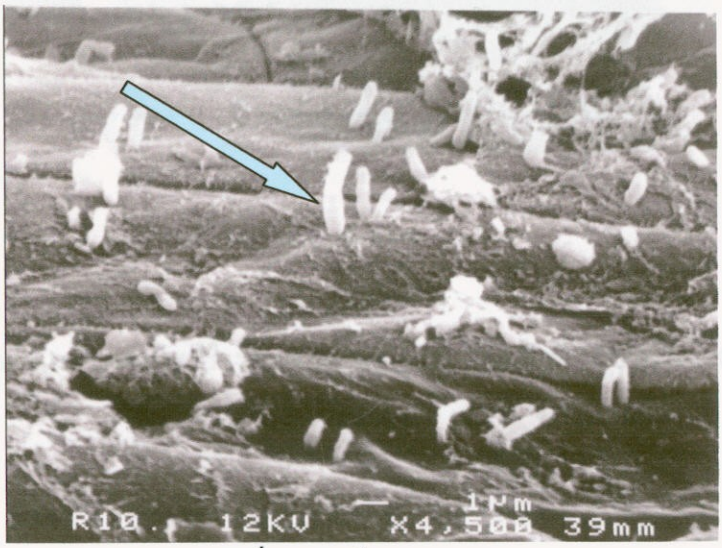


รูปที่ 4 การแสดงออกของยีน gfp แบคทีเรียไอโซเลท A-10 (ก) และ R_2D (ข) โดยดูจากการเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescent

ในส่วนของ Transformant ที่มี gus gene ให้ผลการแสดงออกของยีนในทุกไอโซเลท แต่เมื่อนำไปปลูกร่วมกันกับข้างแล้วนำมาทดสอบด้วย gus staining activity พบว่ามีเพียงไอโซเลทเดียว คือ R_2D ที่สามารถเข้าอยู่ร่วมกับข้าว และโดยเฉพาะที่รากเท่านั้น (ดังแสดงในรูปที่ 5)

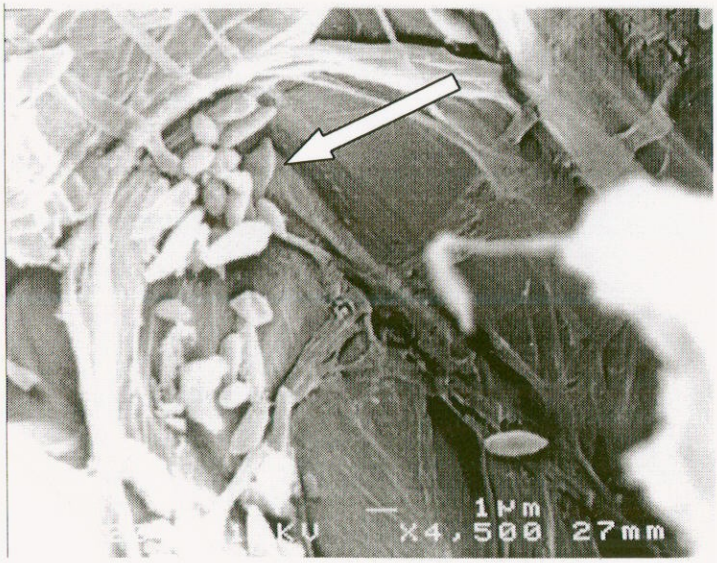
รูปที่ 5 แสดงสีของ gus gene expression ในเซลล์แบคทีเรียเมื่อเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อของรากต้นข้าว

เพื่อทำการยืนยันขั้นสุดท้ายของการเข้าสู่เซลล์รากของไอโซเลท R_2D ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ในต้นข้าวที่ทำการปลูกเป็นเวลา 10, 20 และ 30 วัน ตามลำดับ ผลดังแสดงในรูปที่ 6 ในช่วง 10 วันแรกพบว่า แบคทีเรียจะเริ่มเข้าสัมผัสที่ผิวราก และแสดงการเจาะผนังเซลล์ของราก จากนั้นในช่วงเวลาที่ 20 และ 30 วัน จะพบว่าเมื่อเซลล์แบคทีเรียเริ่มเข้าสู่เซลล์รากข้าว พบว่ามีเซลล์แบคทีเรียมีการ differentiate รูปร่างอย่างเห็นได้ชัด คือ มีลักษณะอ้วนป้อม



รูปที่ 6 ก. ข้าวอายุ 10 วัน

รูปที่ 6 ข. ข้าวอายุ 20 วัน



รูปที่ 6 ค. ข้าวอายุ 30 วัน

รูปที่ 6 แสดงพัฒนาการของรูปร่างเซลล์ในเนื้อเยื่อของรากต้นข้าวที่อายุ 10, 20, และ 30 วัน

จากการศึกษาการเข้าไปอยู่ในพืชของสายพันธุ์ R2D ด้วย scanning electron microscope และการใช้ gus เป็น reporter gene แสดงว่า แบคทีเรียดังกล่าวน่าจะเป็นแบคทีเรีย endophyte ในต้นข้าว เนื่องจากพบว่าแบคทีเรียอยู่ในเซลล์ของพืชที่มีความใกล้เคียงกับข้าว เช่นเดียวกับ *Azoarcus* sp., *Herbaspirillum* spp. และ *Acetobacter diazotrophicus* ที่สามารถเข้าไปอยู่ใน gramineous plants (มักพบใน root cortex และสามารถแทงเข้าไปใน stelar tissue ได้) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Elbeltagy และคณะ, 2001 ที่ได้ทำการติดตามการเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อของข้าวของ *Herbaspirillum* sp. สายพันธุ์ B501 ซึ่งเป็น diazotrophic endophyte ชนิดหนึ่ง โดยใช้ *gfp* gene และพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้เข้าไปอยู่ในบริเวณรากและยอดของต้นข้าว โดยเฉพาะจะพบมากที่บริเวณ intercellular spaces ของใบ และสามารถตรวจสอบการตรึงไนโตรเจนได้ โดยเฉพาะในพันธุ์ข้าวพื้นเมือง

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

Endophytic bacteria ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในต้นข้าวที่ทำการคัดเลือก โดยในขั้นแรกไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแบคทีเรียและชนิดของข้าว เป็นแบคทีเรียที่สามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของข้าวได้ โดยที่ไม่ทำให้ข้าวแสดงอาการเกิดโรคและมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่มจีนัส *Bacillus* แต่พบว่าสามารถเข้าอยู่อาศัยในเซลล์ของรากได้เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส และเพคติเนส ซึ่งคาดว่าจะเป็นกลไกที่ช่วยย่อสลายผนังเซลล์ของผนังเซลล์พืชเพื่อการเคลื่อนเข้าสู่เซลล์ราก ไม่สามารถใช้กรดมาลิคเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน ส่วนสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกับ *B. licheniformis* (R_2D) สามารถสร้าง IAA ได้มากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ และเมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติที่จะใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ พบว่ายังขาดความเหมาะสม กล่าวคือ ไม่พบผลต่อการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวเมื่อใส่แบคทีเรียไอโซเลท R_2D อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ควรจะมีการศึกษาคัดเลือกเชื้อกลุ่มนี้เพิ่มเติม พร้อมไปกับการศึกษาการแสดงออกยีน *nif* ที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจนของต้นข้าวควบคู่กันไป ก่อนที่จะมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างจริงจังต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Andro, T., J. P. Chambost, A. Kotoujansky, J. Cattano, Y. Bertheau, F. Barrarras, F. VanGijsegem and A. Coleno. 1984. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. J. Bacteriol. 160 : 1199 – 1203.

Baldani, J.I., V.L. D. Baldani, L. Seldin, and J. Dobereiner. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 86-93.

Boddey, R.M., O.C. Oliveira, S. Urquiage, V.M. Reis, F.L. de Olivares, V.L., D. Baldani and J. Dobereiner. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice : contributions and prospects for improvement. Plant Soil. 174 : 195 – 209.

Cowan, S.T. 1974. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University press. Cambridge. U.K.

Elbeltagy, A., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui and K. Minamisawa. 2001. Endophytic Colonization and Planta Nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from wild rice species. AEM. 67(11): 5285

Gillis M., K. Kersters, B. Hoste, D. Janssen, R.M. Kroppenstedt, M.P. Stephan K.R.S. Teixera, J. Dobereiner and J. Deley. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 361-364.

Hurek, T., B. Reinhold-Hurek, M. van Montagu and E. Kellenberg. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses., J. Bacteriol. 176:1913-1923.

James, E.K. and F. L. Oliveres. 1998. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Crit. Rev. Plant Sci. 17:77-119.

Kirchhof Gl, V.M. Reis, J.I. Baldani, B. Eckert, J. Dobereiner and A. Hartman. 1997. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. Plant and Soil. 194: 45-55.

Lane, D.J. 1991. 16s/23s rRNA sequencing. In : E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.), Nucleic acid Technoques in Bacterial systematics, John Wiley and Sons Chichester. pp. 115-175.

Minamisawa, K., T. Seki, S. Onodera, M. Kubota and T. Asami. 1992. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 2832-2839.

Plazinski, J. and G.B.Rolfe. 1985. Analysis of proteolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens*. J. Plant Physiol. 120 : 181-187.

Rennie, R.J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogene fixing) bacteria from soils. Can. J. Microbiol. 27 : 8-14.

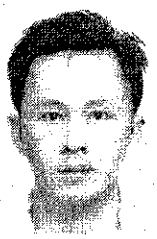
Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. 1998. Life in grasses : diazotrophic endophytes. Trends in Microbiol. 6:139-143.

Saito, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.

Silva, M.M.P., V.M. Reis, S. Urquiaga, R.M. Boddey, D.F. Xavier and J. Dobereiner. 1995. Screening Pennisetum ecotypes (*Pennisetum purpureum*, Schum) for Biological Nitrogen Fixation. In Int. Symp. Of Sustainable Agriculature for the Tropices-The Role of Nitrogen Fixation (Book of abstracts). Eds. R.M. Boddey and A S. de Resende. pp 236-237. Angra dos Reis, Brazil.

Song, W., Shen, H. Yang, X. Sun, Y. Wang, X. Dong and M. Cai. 2000. The dominant endophytes with rice. 8th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non legumes (book of abstract). Eds. I.R. Kennedy, Sydney, Australia.

ประวัตินักวิจัย



NAME	: Associate Professor Dr. Neung Teaumroong
NATIONALITY	: Thai
SEX	: Male
ID-Code	: 5-1006-00046-81-8
DATE AND PLACE OF BIRTH	: July 21 1965, Bangkok
POSITION	: Head of Research Department Institute of Agicultural Technology (April 1999-present)
ADDRESS	: School of Biotechnology Institute of Agricultural Technology Suranaree University of Technology Nakhon Ratchasima, THAILAND 30000 E-mail : neung@ccs.sut.ac.th Fax : 66-44-224150, 216345

EDUCATION

1987	B.Sc.	Microbiology, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
1989	M.Sc.	Industrial Microbiology, Chulalongkorn University, Thailand
1990	Dipl.	Microbiology and Biotechnology, University of Tokyo, Japan
1993	Dr.rer.nat	Microbiology and Molecular Biology, University of Innsbruck, Austria

RESEARCH OF INTERESTS

: Molecular Microbial Ecology
: Molecular Biology of N2-fixation and VAM

RESEARCH FUNDING

: Monbusho (1993-1994)
: International Atomic Energy Agency (IAEA) (1993-1995)
: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand (JSPS-NRCT) (1995-1998)
: Biodiversity Research&Training Program (BRT)(1996-1999)
: HRH Princess Sirindhorn Plant Conservation Project (1996-2000)
: Suranaree University of Technology (1993-2003)
: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand (JSPS-NRCT) (2000-2003)
: Thailand Research Fund (2004-2006)
: Commission on Higher Education (2004-2005)

PEER-REVIEWED PUBLICATION

Teaumroong, N., and S. Pichayangura. (1989). Detection of Polysaccharides from some Mushrooms. J. of Microbial Utilization of Renewable Resources. Vol.6, P.126-128.

Chung, S.-Y., Yokoyama, K., Gomo, M., Teaumroong, N., Ishii, M., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1994). Purification and some properties of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Pseudomonas hydrogenothermophila* strain TH-1. J. Ferment. Bioeng., 78, 469-47.

Teaumroong, N., Y. Murooka and N. Boonkerd. (1995) Acid Tolerance and Antibiotic Resistance of Some Strains of *Bradyrhizobium* applied in Thailand. Suranaree J. Sci. Technol Vol.2, P. 75-80.

Teaumroong N. and N. Boonkerd (1996). Iron Element, Siderophores and Microbes. Suranaree J. Sci.Technol. 3:95-100.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1996). Symbiotic Relationship Between Rhizobia and Legumes in Molecular Genetic Aspect. Suranaree J. Sci. Technol. 3:15-20

Teaumroong, N., N. Boonkerd and K. Haselwandter (1996) Effect of the iron sources on the siderophore produced from *Bacillus polymyxa*. Suranaree J. Sci. Technol. 3:133-137

Teaumroong, N.,C. Schuarzer, B. Auer and K. Haselwandter. 1997. A non-radioactive DNA probe for detecting dicyandiamide - degrading soil bacteria. Biology and Fertility of Soils.25,159 - 161.

Teaumroong, N., K. Teamtisong, M. Manassila and N. Boonkerd.(1998). Preliminary Study of The Competition and Persistence of Applied *Bradyrhizobia* Strains Using Reporter Gene in Soil. Suranaree J. Sci. Technol 5:18-23.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd (1998). Detection of *Bradyrhizobium* spp. and *B. japonicum* in Thailand by Primer-Based Technology and Direct DNA Extraction. Plants and Soil. 204:127-134.

Chumkhunthod P., S. Rodtong, N. Teaumroong and N. Boonkerd (2001). Bioconversion of Cassava Roots to High Protein Product for Animal Feed. Thai J. Biotechnol., September 2001, p.17-25.

Teaumroong N., W. Sattayapisut, T. Teekachunhatean and N. Boonkerd (2002). Using Agricultural Wastes for *Tricholoma crassum* (Berk.) Production. H. Insam, N. Riddech, S. Klammer (Eds.) Microbiology of composting., p.231-236.

Pongsilp N., N. Teaumroong, A. Nuntagij, N. Boonkerd and M. J. Sadowsky. (2002). Genetic Structure of Indigenous Non-nodulating and Nodulating Populations of Bradyrhizobium in Soils from Thailand. Symbiosis, 33:39-58

Teaumroong N., S. Innok, S. Chunleuchanon and N. Boonkerd. (2002). Diversity of Nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: I Morphology, physiology and genetic diversity. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 18:673-682.

Chunleuchanon S. A. Sooksawang, N. Teaumroong and N. Boonkerd. (2003). Diversity of Nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: II Population dynamics as affected by environmental factors. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 19: 167-173.

Payakapong W., P. Tittabutr, N. Teaumroong and N. Boonkerd. (2004) Soybean cultivars affect nodulation competition of *Bradyrhizobium japonicum* strains. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 20: 311-315

Minamizawa K., K. Nishioka, T. Miyaki, B. Ye, T. Miyamoto, M. You, A. Saito, M. Saito, W. L. Barraquio, N. Teaumroong, T. Sein and T. Sato. (2004) Anaerobic Nitrogen-Fixing Consortia Consisting of Clostridia Isolated from Gramineous Plants. Applied and Environmental Microbiology, 70:3096-3102.

Tittabute P., W. Payakapong, N. Teaumroong N. Boonkder Paul W. Singleton and Dulal Borthakur (2004) Ahistidine kinase sensor protein gene is necessary for induction of low pH tolerance in *Sinorhizobium* sp. Strain LT11. Journal of Applied Microbiology. (submitted).

Tittabute P., W. Payakapong, N. Teaumroong and N. Boonkder (2004) Cassava as a cheap source of carbon for rhizobial inoculant producting using amylase-producing fungus and glycerol-producing yeast. World Journal of Microbiology & Biotechnology, (accepted).

PROCEEDING AND ANNUAL REPORT

Teaumroong, N., N. Boonkerd and Y. Murooka. (1995) Application of primer based technology to fingerprint the genomes of *Bradyrhizobium* spp. Used in Thailand :In Processding of the 10th International Congress on Nitrogen fixation, St. Petersburg, Russia May 28-June 3, p. 741.

Boonkerd N., N. Teaumroong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong and A. Nantagij. 1996. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in Thailand; Isolation of forage legume rhizobia. Annual Report of IC Biotech. 19:839-844.

Teaumroong N, K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. 1997. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in forage legumes; Screening of high effective rhizobial strains. Annual Report of IC Biotech. 20:955-962.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1998). Using reporter gene system to monitor applied *Bradyrhizobium* in Thailand. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 660

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Effect of inoculation methods on nodulation, N_2 fixation and yield of soybeans under field condition. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 631

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Nitrogen Fixation (^{15}N Dilution) in Soybean as Affected by Inoculation Methods : In Asian Network on Microbial Researches. Gadjah Mada University (GMU), The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Science and Technology Agency, Japan. P. 165-171.

Rodtong, S., N. Teaumroong and P. Chooklay (1998). A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawieng plant genetic forest: In proceeding of the Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 july 1999, Hua-Hin, Thailand. P.281-284.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. (1999). Strain selection and characterization of rhizobia isolated from forage legumes grown in Thailand. Annual Report of IC Biotech.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, A. Nantagij, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, and N. Boonkerd. (2000). Diversification of some forage legumes rhizobia isolated in Thailand. In:Proceeding of the 12th International congress on nitrogen fixation [F.O. Pedrosa et al. (eds.)], Foz do Iguacu, Parana, Brazil. September 12-17, 1999.Kluwer Academic Publishers. p.196

Teaumroong, N., M. Manassila, N. Boonkerd, and S. Rodtong. (2000). ITS-RFLP analyses of Edible mushrooms in genera Russula and Boletus collected from North Easter part of Thailand. Abstracts of the Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China: 115.

Teaumroong N., K. Teaumroong, T. Sooksa-nguan and N. Boonkerd. (2001). The Diazotrophic endophytic Bacteria in Thai Rice. The Fifth ESAFA International Conference on Rice Environments and Rice Products, 27-31 May 2001. Krabi, Thailand. P. 147-160

Rodtong, S. Burom, C., Teaumroong, N., and Boonkerd N. (2003) Bioconversion of cassava starch to nutrient sources for slow-growing Rhizobium cultivation. Abstracts of the Bio Thailand 2003 on Technology for life, 17-20 July 2003, Pattaya, Chonburi, Thailand, p. 258.

Teamtisong, K., Okazaki, S., Minamisawa, K., Teaumroong, N., Saeki, K., Kaneko, T., and Tabata, S. (2003). Rhizobial determinants for nodulation and nitrogen fixation with bred soybean. Nippon Doji Hiryo Gakkai Koen Yoshishu (Abstracts of the Meeting, Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition), 49:58.

Nuntagij, A. Kotepong, S., Jitaksorn, S., Chengaksorn, C., Teaumroong, N., Boonkerd, N., and Abe, M. (2003). Selection and management of rhizobia for tree legumes in reforestation. Biotechnol Sustain Util Biol Resour Trop. 16:193-197.

Tittabutr, P., Payakapong, W., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2003). Development of rhizobial inoculant production and formulation : dilution technique and solid state fermentation. Biotechnol Sustain Util Bio Resour Trop. 16:105-112.

INSTRUCTIONAL EXPERTISE

- Applied Microbiology
- Man and Environment
- Environmental Microbiology
- Agricultural Biotechnology
- Biosafety
- Food Microbiology
- Fermented Food Products
- Molecular Biology and Recombinant DNA Technology

PROFESSIONAL SOCIETIES

: Thai Society of Biotechnology : Thai Inventor Association

ORAL PAPER PRESENTATION

- NRCT; NUS; DOST-JSPS. Joint Seminar on Biotechnology. December 22-24 1988, Chiang Mai University. (**Oral presentation:** in "Detection of Polysaccharides From Some Edible Mushrooms.")
- The 3rd FAO/IAEA Research co-ordination meeting on " Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of *Rhizobium*". (**Oral presentation** in " Using Molecular Biology to Detect Rhizobia in Agro-Ecosystem"). University de Geneve, Geneva, Switzerland. August 15-19, 1994.
- Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development (BRASD). Central Plaza Hotel, Bangkok, Thailand. August 7-10, 1996. (**Oral presentation** : in "Using Molecular Biology Techniques to Fingerprint the Genomes and Study Behavior of *Bradyrhizobium* in Agro-Ecosystem.")
- Research co-ordination meeting on "Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of Rhizobium" (FAO/IAEA). 2-6 Sep. 1996, UN, Vienna, Austria (**Oral presentation** : "The Detection System to Monitor Applied *Bradyrhizobium* in Soil")
- Project of JSPS-NRCT "Seminear on Cooperative research of biotechnology between Thailand and Japan". Nov. 27, 1996. (**Oral presentation** : in "Application of Reporter Gene System to Detect Rhizobial Behavior.")
- JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC "Sustainable Development of Biotechnology in Tropics". 3-4 November 1998, Manila, Philipines. (**Oral presentation** : in "Characterization of *Desmanthus virgatus* Rhizobial Strains Isolated from Thai Soil.")
- 10th Annual Meeting of TSB and NCGEB "Biotechnology for A Self-Sufficient Economy". 25-27 November 1998, Bangkok, Thailand. (**Oral Presention** : in "The Prospectus of School of Biotechnology, SUT, Towards N_2-fixing Microbes Research in Thailand.")
- 8th International Symposium on Nitrogen fixation with Non Legumes. 3-7 December 2000, The University of Sydney, NSW, Australia. (**Oral presentation** : in "Diversity of nitrogen fixing cyanobacteria under ecosystems of Thailand.")
- The Fifth ESAFS International Conference on Rice Environments and Rice Products 27-31 May 2001, Krabi, Thailand. (**Oral presentation** : in "The Diazotrophic Endophytic Bacteria In Thai Rice.")

FELLOWSHIPS

- "The Royal Golden Jubilee program" (2000-2003)
- "UNESCO" : Post Graduate Programme (1989-1990) in Microbiology and Biotechnology. University of Tokyo.
- "MONBUSHO" : Research in "Molecular Genetic of Acid Tolerance *Rhizobium*". Hiroshima University, Hiroshima, Japan. (October 24-December 23, 1994.)
- "AUSTRIA GOVERNMENT" : Research in "Investigation of Siderophores from Bacteria". University of Innsbruck, Austria. (May 1-June 30 1995)
- "JSPS" : Research in "Construction of Cholesterol Oxidase Gene for Using as Rhizobium Reporter Gene". Osaka University, Japan (12 Jan-25 Feb 1998)
- "MONBUSHO" : Research in "Construction of Green Fluorescent Protein Gene for Detecting Rhizobium" Osaka University, Japan.(December 7, 1998 - January 21, 1999)
- "JSPS" : Research in "Homologous recombination of GFP in Rhizobium" Osaka University, Japan (March 13, 2000- March 31, 2000)
- "JSPS" : Research in "Effect of Rhizobitoxine Forwards Legume Nodulation". Tohoku University, Japan (November 7,- December 21, 2002)
- ISNAR and W.K. Kellogg Foundation, Training in "Monitoring, Evaluation and Impact Assessment of R&D Investments in Agriculture" (9-20 June 2003), Pretoria, Republic of South Africa.
- InWEnt (2003-2004) Training programme
  : Bioorganic Fertilizer Production from Agro-Industrial Wastes and Entrepreneurship Development for Rural Women Leadersin Southeast Asia
  : Technical training on Biofertilizer Inoculant Production