รหัสโครงการ SUT3-304-38-24-13

รายงานการวิจัย

การใช้ gus ยีนเพื่อศึกษาพฤติกรรมของไรโซเบียมในระบบนิเวศ

Using gus gene for study rhizobial behavior in ecosystem

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ศาสตราจารย์.ดร.นันฟกร บุญเกิด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2538-2539

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2545

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ในการวิเคราะห์ผลการวิจัย และขอขอบคุณ คุณกุลฒี สูบโคกสูง คุณอภิญญา รัตนะจิตร ที่ช่วยรวบรวมและจัดพิมพ์ข้อมูลของโครงการ

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2545

บทคัดย่อ

ได้ทำการคัดเลือกชนิดของยีนที่จะนำมาใช้โคลนเข้าสู่แบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียม ได้แก่ ยีนคลอเรสเตอรอลออกซิเดส (Chloresterol oxidase) ยีนโปรตีนสีเขียวเรืองแสง (GFP : Green Flvorescent Protein gene) และยีนบีต้ากูลคูโรนิเดส (β-glucuronidase, *gus* gene) ในการเลือกใช้ยีนคลอเรสเตอรอลออกซิเดสที่ทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิด PCKM1 โดยเลือก constiturive promotor จาก megaplasmid ของ *Mesorhizobium huakii* bv. Renge สายพันธุ์ B3 จนได้พลาสมิดลูกผสมใหม่ที่ชื่อ pCBBR1 จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่ *E. coli* DH5α พบว่ามีการแสดงออกที่ของเอนไซม์ที่สมบรูณ์แต่คาดว่าไม่น่าจะเหมาะสม เมื่อนำไปใช้กับไรโซเบียมเพราะลักษณะสีของการแสดงออกที่ปรากฏมีมีแดงเหมือนสีของ leghaemoglobin ในปมที่สมบูรณ์ของถั่วซึ่งทำให้ยากต่อการจำแนกว่าสายพันธุ์มดเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นหรือสายพันธุ์ที่ใส่ลงไป ส่วนยีนชุดที่สองคือ *gfp* gene ได้ทำการเชื่อมชุดยีนลงไปในพลาสมิด pBBR 122 ที่มี Ptac promotor จนได้พลาสมิดลูกผสม pBBR-TGFPuv จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่ *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ B34 ด้วยวิธี electroporation ผลการแสดงออกสามารถตรวจสอบได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ทำให้เห็นโคโลนีเป็นสีเขียวเรืองแสง ซึ่งสามารถตรวจสอบพฤติกรรมการอยู่รอดได้ ในส่วนของ *gus* gene นั้นได้ใช้กับ *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ TAL 1000 จากถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) และ *B. japonicum* TAL 379 ซึ่งแยกได้จากถั่วเหลือง (*Glycine max*) โดยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. ที่เป็น conjugants แล้วจะนำมาทำเป็นหัวเชื้อเพื่อคลุกกับเมล็ดถั่วที่เหมาะสมในแต่ละพืชอาศัย โดยหลังจากปลูกไปแล้ว 30 วัน จะเก็บรากถั่วมาย้อมด้วย x-gluc ในการทดสอบการเข้าไปอาศัยอยู่ในปมรากถั่วของ *Bradyrhizobium* sp. ครั้งนี้จะทดสอบโดยใช้ตัวอย่างดินหลายชนิด เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไรโซเบียมที่สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในปมรากถั่ววิเคราะห์จากจำนวนเนื้อเยื่อของปมที่ปรากฏเป็นสีฟ้าจากการย้อมด้วย x-gluc ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าดินที่เก็บจากบริเวณที่ปลูกต้นยูคาลิปตัสพบว่ามีการแก่งแย่งกับไรโซเบียมที่ใส่ลงไปน้อยที่สุดในขณะที่ดินบริเวณที่ปลูกต้นสักมีการแข่งขันสูงสุดในการเข้าไปสร้างปมมากกว่าดินจากบริเวณอื่น ๆ ซึ่งดูเหมือนจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณอินทรีย์ที่มีน้อยในดินชุดนี้

Abstract

To monitor the rhizobial behavior, three reporter genes as chloesterol oxidase (*cho*A), green fluorescent protein (*gfp*) and β–glucoronidase (gus) were selected. ChoA gene was cloned into pCKM1 habouring constitutive promotor which was derived from megaplasmid of Mesorhizobium huakii bv. Renge strain B3. The hybrid plasmid was named as pCBBR1 then transformed into E. coli DH5α. The complete expression was achieved. However, red-developing colour from transformant was not appropriate to apply with rhizobium since presence the same colour of leghaemoglobin in plant nodule. For using *gfp* gene, it was pBBR-TGFPuv. Plasmid was transformed in *Bradyrhizobium* sp. B64 by electroporation technique. The expression of transformant was detected under UV-illuminator which gave the bright green colony. To investigate the behavior of Bradyrhizobia inocula in the field, *Bradyrhizibium* sp. TAL1000 isolated from *Arachis hypogaea* and B. japonicum TAL379 from *Glycine max* were choosen in this

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	
การใช้ *gus* gene	4
การใช้ *cho* A gene	5
การใช้ *gfp* gene	8
บทที่ 3 ผลการทดลอง	
การใช้ *gus* gene	11
การใช้ *cho* A gene	16
การใช้ *gfp* gene	18
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	22
บรรณานุกรม	23
ประวัติผู้วิจัย	

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 Soil Characterization 13

ตารางที่ 2 The percent of nodule occupancy in soil sample 15

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 Construction of pBCBBR1 vector with *cho*A as reporter gene. pCBBR1 were constructed as broad-host-range replication gene (*rep*), *Cho*A, multiple cloning sites and Km^r. The resultant plasmid has size 5.625 kb. 6

รูปที่ 2 แสดงแผนที่พลาสมิดลูกผสม pBBR-TGFPuv 9

รูปที่ 3 Conjugant colonies (blue colour) of 11
(A) *B. japonicum* TAL 379 and
(B) *Bradyrhizobium* sp. TAL 1000 on B&D minimal medium containing Spectionmycin IPTG and X-gluc

รูปที่ 4 Comparision of effect between conjugant and non-conjugant with host plants 12
(A) *Glyine max* with TAL379 (1; inoculated with TAL 379 and 2; inoculated with TAL 379 gus+)
(B) *Arachis hypogaea* with TAL1000 (1: inoculated with TAL 1000 and 2: inoculated with TAL 1000 gus+)

รูปที่ 5 Nodules occpied by both the marked and unmarked inoculum strains 13

รูปที่ 6 The colour differences of nodules used in determination of percent occupancy 14

รูปที่ 7 Partial digestion of megaplasmid pRhYM from *R. huakii* bv. renge strain B3. Lane1; λ-DNA marker digested with the Hind III and EcoRI, Lane 2-8; varied amount of the restriction enzyme Sau 3A I (10 folds dilution; incubated at 37°C 1 hr and stop reaction by additional of 1 μl 0.5 MEDTA) with pRhYM, and lane9; pRhYM without Sau 3A I. The black frame indicated the partially digested DNA fragment in average size of 1 kb which were further extracted from the agorose gel 17

รูปที่ 8 แสดงโคโลนีสีน้ำตาลแดงของการแสดงออกของยีน *cho*A 18

รูปที่ 9 Growth pattern and pH changed during cultivation of six *Bradyrhizobial* strain in varied pH values 19

รูปที่ 10 (A) Transluminescent pGFP-transformant colonies of *Bradyrhizobium japonicum* strain THA 122 (indicated with arrows) (B) transluminescent cell suspension of equal optical density (600 nm ; A = 0.2) of *Bradyrhizobium* sp. Strain B64. Left-hand tube is normal strain while right-hand tube is the pGFP transformant 20

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

สำหรับประเทศไทยนั้นการนำปุ๋ยชีวภาพมาใช้ เช่น ไรโซเบียม หรือ *Bradyrhizobium* sp. สำหรับเป็นหัวเชื้อสามารถเพิ่มผลผลิตได้เป็นที่น่าพอใจ โดยเฉพาะในพืชตระกูลถั่วชนิดต่าง ๆ แต่ปัญหาสำคัญที่จะต้องคำนึงถึงก็คือสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้เป็นหัวเชื้อนั้นจะต้องสามารถรอดชีวิตจากการแข่งขันกับเชื้อแบคทีเรียในดินอยู่ดั้งเดิม ในการที่จะเข้าไปสร้างปมในพืชตระกูลถั่วโดยทั่ว ๆ ไป การแข่งขันในการเข้าไปสร้างปมในพืชตระกูลถั่วจะเกิดขึ้นหลายระยะดังนี้ คือ ระยะที่เป็นอิสระอยู่ภายนอกปม ระยะที่เกาะอยู่บริเวณรอบ ๆ รากและเริ่มบุกรุกเข้าไปในราก ระยะที่เริ่มสร้างปมในต้นถั่วแล้วและเริ่มตรึงไนโตรเจน ซึ่งพบว่าปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับความคงอยู่ คือแบคทีเรียในดินที่มีอยู่ดั้งเดิมและวิธีในการเพาะปลูก ดังนั้นประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและความสามารถในการแข่งขัน คือกุญแจที่สำคัญในการคัดเลือกสายพันธุ์ของไรโซเบียมที่เหมาะสมสำหรับใช้ทำเชื้อและการนำไปใช้

ในการศึกษาคุณสมบัติและการติดตามเชื้อไรโซเบียมนั้น วิธีที่เหมาะสมที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษา ได้แก่ ความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะและ ELISA ซึ่งพบว่าวิธีนี้ค่อนข้างจะมีความน่าเชื่อถือค่อนข้างน้อยทั้งในด้านความจำเพาะและความไว ดังนั้นเทคนิคที่ใช้หลักการของชีววิทยาโมเลกุลก็คือการใช้ "Marker gene" ที่มีข้อได้เปรียบมากจึงถูกนำมาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ดังกล่าว "Marker gene" เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป ดังนั้นวิธีนี้จึงสามารถจะทำได้อย่างสะดวกรวดเร็ว และทำได้ง่ายจึงมีความเป็นไปได้ดีที่จะนำไปใช้ในแปลงทดลอง จากการศึกษาโดยการติดตามการเข้าสร้างปมของหัวเชื้อ (incula) ของสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ใส่ในแปลงทดลอง พบว่า ความสามารถในการแข่งขันของสายพันธุ์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดผลประโยชน์ที่จะได้รับจากการใช้หัวเชื้อ ดังนั้นเมื่อติดตามศึกษาคุณสมบัติของไรโซเบียมที่ใส่เข้าไปในดินจึงได้มีการศึกษาเพื่อหา marker ยีนที่เหมาะสมเพื่อจะนำมาใช้มากขึ้น โดย marker ที่นำมาใช้มีทั้งที่ใช้ลักษณะทางฟีโนไทน์ เช่น รูปแบบที่เกิดจากความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ การตรวจสอบทางอมูโนวิทยาโดยวิธี ELISA การศึกษาลักษณะของพลาสมิด ลักษณะเฉพาะของลำดับดีเอ็นเอ RFLP หรือ PCR นอกจากนี้ระบบ marker หลักที่เคยใช้และได้รับการพัฒนา ตัวอย่างเช่น ยีนของ betagalactosidase (*lacz*), alkaline phosphatase (*phoA*), catechol 2, 3-dioxygenase (*xylE*), luciferase (*lux* or *lue*), beta-glucoronidase (*uid A* or *gusA*) และ bataglucosidase (*celB*) เป็นต้น นอกจากนี้ก็มีการนำยีนชนิดอื่นที่มีประโยชน์ในการใช้สูงมาใช้ซึ่งมีชื่อว่า green fluorescent protein (*gfp*) ซึ่ง ยีนชนิดนี้จะแยกได้จากแมงกระพรุน *Aequoria victoria* ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จะสามารถเรืองแสงได้เมื่อส่องภายใต้แสง uv หรือแสงสีฟ้าช่วงคลื่นสั้น และ

เคยถูกใช้เป็นตัวติดตามจุลินทรีย์ดินชนิดอื่น เช่น *Psedomonas fluorescene* รวมทั้งนำมาใช้ในการศึกษาขบวนการเข้าสร้างปมในถั่วอัลฟาฟาโดย *Rhizobium meliloti* และยังสามารถนำมาใช้เป็น marker อย่างดีสำหรับศึกษาระบบนิเวศของจุลินทรีย์ทั่ว ๆ ไปด้วย ได้แก่ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ยีน *gus*A จาก *Escherichia coli* ซึ่งยีน *gus*A จะควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase (GUS) ซึ่งยีนนี้จะไม่พบในเนื้อเยื่อของพืชและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในต้นพืช ยีนชนิดนี้จะถูกใส่เข้าไปในไรโซเบียมที่ต้องการทดสอบก่อนที่จะนำไปทดลองในแปลงทดสอบ โดยในการทดลองครั้งนี้จะใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ คือ *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ TAL 1000 ซึ่งแยกได้จากถั่วลิสงและ *B. japonicum* สายพันธุ์ TAL 379 ซึ่งแยกได้จากถั่วเหลือง ทั้งสองสายพันธุ์จะถูกทำเครื่องหมายโดยใส่ *gus*A ยีนเข้าไปเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น ความสามารถในการแข่งขันและความคงอยู่เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ในดินที่มีอยู่ดั้งเดิมชนิดอื่น ๆ โดยจะดูจำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สามารถสร้างปมในต้นถั่วสำหรับตัวอย่างดินที่แตกต่างกัน นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบการใช้ยีน chorestarol oxidase (cho) สำหรับเป็น reporter ยีนซึ่ง cholesterol oxidase (EC1.1 3.6) จะกระตุ้นกระบวนการ oxidation ของ cholesterol (5-cholester-3-β-ol) จนได้ 4-cholesten-3-one ด้วยการ reduction ให้ oxygen ไปเป็น hydrogen peroxide โดยยีนของเอนไซม์ชนิดนี้จะถูกโคลนจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ SA-COO โดยเซลล์ที่ถูกโคลนแล้วจะสามารถตรวจสอบได้ง่าย ๆ โดยจะเกิดสีแดงเนื่องจากการรวมตัวของสี quinoneimine บนอาหารที่เหมาะสม ดังนั้นการพัฒนา *cho* ยีนเพื่อนำมาใช้เป็นระบบ reporter ในการติดตามนั้นคาดว่าไม่เพียงสามารถศึกษาคุณสมบัติของไรโซเบียมในแปลงทดลองเท่านั้น แต่ยังสามารถศึกษาคุณสมบัติของไรโซเบียมในขณะที่เป็น bacterioid ในปมรากถั่วโดยใช้การสร้าง recombinant พลาสมิด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาพฤติกรรมของสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ผลิตใช้เป็นหัวเชื้อในระบบนิเวศ โดยใช้เทคนิคการถ่ายทอดยีน โดยสามารถแสดงให้เห็นถึงอัตราการแก่งแย่งระหว่างสายพันธุ์ของไรโซเบียมที่ผลิตเป็นการค้า กับสายพันธุ์ของไรโซเบียมอื่น ๆ ที่อยู่ในดิน
2. พัฒนาระบบตรวจสอบที่สามารถหลีกเลี่ยงหรือเลือกใช้สายพันธุ์ของไรโซเบียมที่คัดเลือกแล้วในพื้นที่ต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพและแม่นยำ

ขอบเขตงานวิจัย

1. สร้าง conjugant จาก *E. coli* ที่มี *gus*A ยีนกับไรโซเบียมสายพันธุ์ที่ต้องการจะศึกษา
2. เก็บตัวอย่างดินต่าง ๆ ที่ใช้ปลูกถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง
3. ศึกษาเปอร์เซ็นต์การสร้างปมของไรโซเบียมสายพันธุ์ที่ต้องการจะศึกษาในภาพควบคุมและในระบบนิเวศของดิน

ระโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. สามารถเลือกไรโซเบียมที่ผลิตเป็นตัวสำหรับถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วเขียวกับพื้นที่เพาะปลูกได้อย่างถูกต้อง
2. ลดความสูญเปล่าของการใช้ไรโซเบียมในพื้นที่เพาะปลูกนั้น ๆ และก่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด
3. เพิ่มแนวทางในการคัดเลือกไรโซเบียมสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงให้จำเพาะเจาะจงกับดินที่มีลักษณะต่าง ๆ

บทที่ 2
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การใช้ gus gene

1. สายพันธุ์ของแบคทีเรีย

ในการทดลองครั้งนี้จะใช้ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 lambda pir/pUT mTn 5SS gus A31 (ซึ่ง *gus*A ยีนจะสามารถแสดงออกเมื่ออยู่ในปมที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เท่านั้น) ส่วนสายพันธุ์แบคทีเรียที่จะใช้เป็นผู้ให้ (donor strain) ก็คือ *Bradyrhizobium nif*H-*gus*A-*trp*A ter translational ที่ถูกนำไปรวม (fusion) ใน mini-Tn5 sm-sp หลังจากนั้นจะนำไปเลี้ยงบนอาหาร LB ซึ่งเติม spectinomycin 50 mg/ml ส่วนสายพันธุ์ที่เป็นตัวรับพลาสมิดดีเอ็นเอ (recepient strains) ตลอดการศึกษาในครั้งนี้ก็คือ *Bradyrhizobium* sp. TAL 1000 และ *B. japonicum* TAL 379 จะเลี้ยงและเก็บรักษาในอาหาร YM ทั้งที่เป็นของเหลวและของแข็ง

2. การถ่ายโอนยีนโดยเทคนิค conjugation

การทำ conjugation ของ *Bradyrhizobium* sp. TAL 1000 และ *B. japonicum* TAL 379 กระทำตามขั้นตอนที่มีอยู่ในคู่มือสำหรับ *gus*A gene marking kit ของ IAEA Laborotorics: Soil unit และ CAMBIA สำหรับสูตรอาหาร The Brown and Dilworth (B&D) ประกอบไปด้วย (0.36 g KH_2PO_4, 1.4 g K_2HPO_4, 0.25 g $MgSO_4.7H_2O$, 0.02 g $CaCl\ 2H_2O$, 0.2 g NaCl, 0.7 g NH_4Cl และ 15 g วุ้นในน้ำกลั่น 1 ลิตร หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อและจะเติมสารละลายต่างๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการกรองแล้วให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ 6.6 mg $FeCl_3$. H_2O, 1.5 mg EDTA, 1 mg Thiamine HCl, 2 mg calcium panthothenate และ 1 mg biotin) โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหาร B&D โดยการเติม 10% กลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการทำ conjugation นั้นช่วงระยะเวลาในการบ่มเชื้อจะใช้เวลา 3-5 วัน ซึ่งสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มี *gus*A อยู่จะปรากฏโคโลนีสีฟ้าบนอาหาร B&D ซึ่งมีการเติม 100 mg/ml spectinomycin, 40 mg/ml IPTG และ 50 mg/ml x/gluc โดยสายพันธุ์ที่เกิดการ conjugation กับ *gus*A แล้วเก็บไว้ในอาหาร YM

3. วิธีการปลูกและการใส่ inoculation ในพืช

ในการปลูกถั่วครั้งนี้จะใช้เมล็ดถั่วเหลือง (*Glycine max*) เมล็ดถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) โดยฆ่าเชื้อที่อยู่รอบเมล็ดดังนี้ แช่ใน 0.1% HgCl เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หลังจากนั้นแต่ละเมล็ดจะถูกใส่ด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^6-10^7 เซลล์ต่อเมล็ด โดยในการทดลองครั้งนี้จะทำการทดลอง 3 ซ้ำและตรวจผลหลังจากปลูกไปแล้ว 30 วัน

4. *การติดตามการเข้าไปอาศัยอยู่ในปมรากถั่วของเชื้อ Bradyrhizobium sp.*

หลังจาก 30 วันปมรากถั่วที่ได้รับเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. จะถูกเก็บเกี่ยวและล้างหลาย ๆ ครั้งด้วย 50 nM Sodium phosphate buffer pH 7.0 จากนั้นรากจะถูกนำไปแช่ในบัพเฟอร์ชนิดเดียวกันที่มีการเติม 500 mg/ml x-gluc, 0.02% sodium azide และ 100 mg/ml chloramphenicol เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง โดยจะมีการให้อากาศตลอดเวลาซึ่งเมื่อปรากฏเห็นว่าปมมีการติดสีฟ้าแล้ว จึงทำให้สีปรากฏชัดเจนขึ้นโดยการนำรากถั่วมาแช่ใน 25% Sodium hypochloride เป็นเวลา 30 นาทีซึ่งเปอร์เซ็นต์ของเชื้อไรโซเบียมแต่ละชนิดที่เข้าไปอาศัยอยู่ในถั่วแต่ละปมของตัวอย่างดินแต่ละชนิดคำนวนจาก จำนวนของปมที่เห็นเป็นสีฟ้าทั้งหมด ปมที่มีสีฟ้าบางส่วนและปมที่มีสีขาว

การใช้ *cho*A gene

1. *สายพันธุ์แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้*

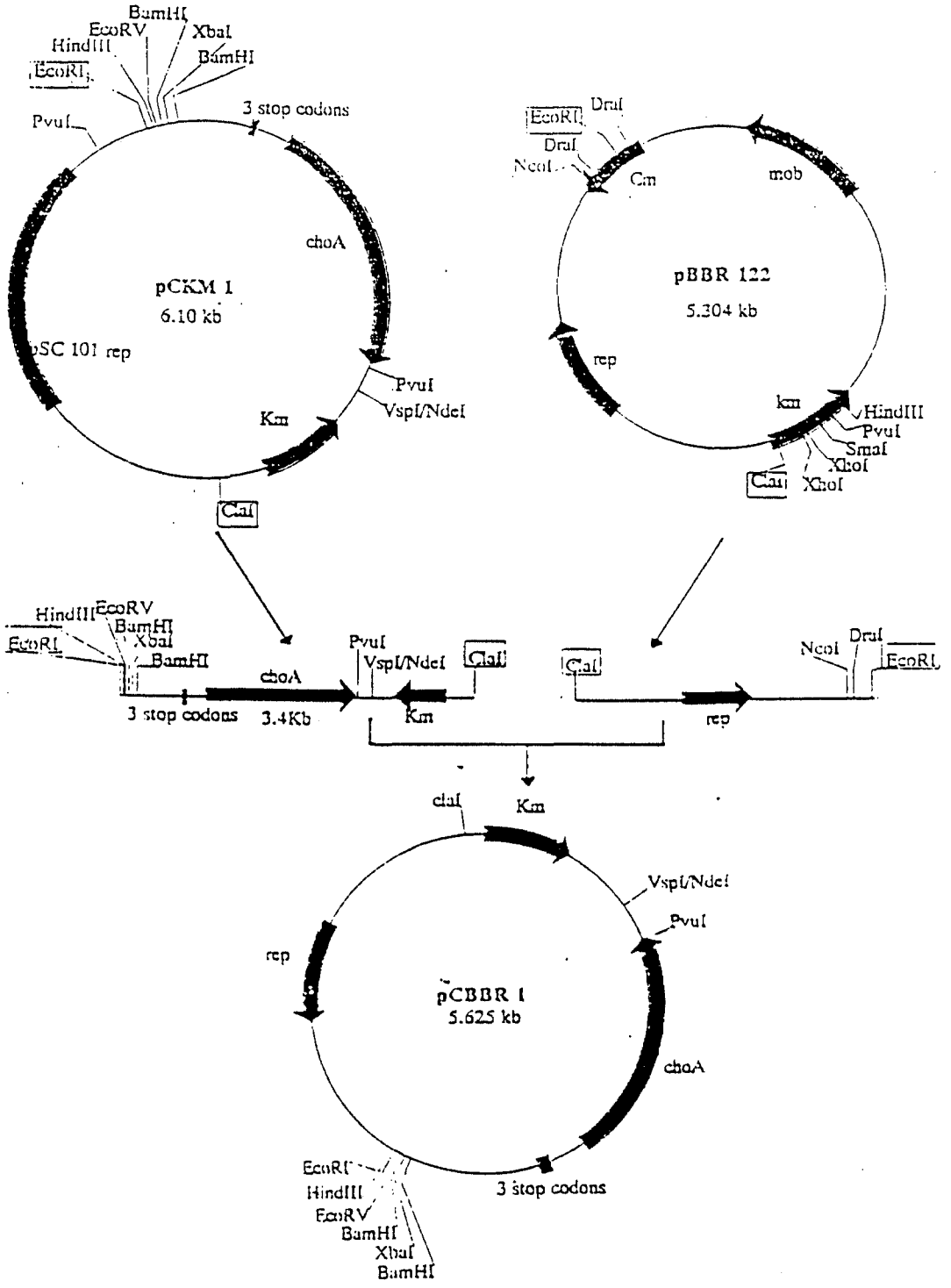
สายพันธุ์แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ที่มีพลาสมิด pBBR 12 ขนาด 5.304 kb โดยในพลาสมิดจะมียีน rep ซึ่งแยกได้จาก *Bordetella bronchiseptica* 578 ยีนชนิดนี้จะทำให้สามารถเพิ่มจำนวน (replicate) ได้ใน host หลายชนิดและนอกจากนี้ยังมียีนที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ chloramphenicol และ kanamycin (Cm^r และ Km^r) และยีน mobilization (*mob*) พลาสมิด pCKMI ซึ่งมี promoter probe vector ขนาด 6.10 kb โดยจะมียีน *cho*A ซึ่งแยกจาก *Steptomyces* sp. สายพันธุ์ SA COO พร้อมกับจุด replicon ที่แยกมาจากพลาสมิด pSC 101 พร้อมทั้งมียีนต้านทาน kanamycin (ดังแสดงในรูปที่ 1 ในส่วนผลการทดลอง) จะถูก transform เข้าไปใน *E. coli* DH 10 B ส่วน random promoter fragment จะแยกจากพลาสมิดขนาดใหญ่ของ *Rhizobium huakii* bv. renge สายพันธุ์ B3 ซึ่งมีขนาด 416.3 kb

2. *อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ*

อาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดต่างชนิดกันนั้นจะใช้อาหาร LB (ประกอบด้วย : Peptone 10g, Yeast Extract5 g, Sodium Chloride 5 g และน้ำกลั่น 1 ลิตร) ที่จะเติมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมของแต่ละพลาสมิด (โดย chloramphenicol ใช้ 20 μg/ml และ Kanamycin 25 μg/ml ส่วน *R. huakii* bv. renge สายพันธุ์ B3 ทำการเลี้ยงและเก็บในอาหาร YM

3. *เอนไซม์และสารเคมี*

สำหรับ restriction endonuclease เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ T4 DNA ligase และเอนไซม์ที่เป็น DNA-modifying ชนิดอื่น ซึ่งจะซื้อจากบริษัท Takara shuzo และบริษัท Toyobo



รูปที่ 1 Construction of pBCBBR1 vector with *cho*A as reporter gene. pCBBR1 were constructed as broad-host-range replication gene (*rep*), *Cho*A, multiple cloning sites and Km^r. The resultant plasmid has size 5.625 kb.

4. การสร้างคอมมิแนนพลาสมิดและการทำทรานสฟอร์เมชั่น

การสกัดพลาสมิดจะใช้วิธี alkali lysis การตัดยีนส่วนที่ต้องการคือยีน cholesterol oxidase จาก promoter probe vector pCKM1 และส่วนที่เป็น pSC101 rep regent จะใช้ restriction เอนไซม์ EcoRI และ ClaI ซึ่งจะทำให้ได้ส่วนที่มีความยาวประมาณ 3.4 kb ซึ่งส่วนนี้ก็ยังจะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็น Km^r และ *cho*A หลังจากนั้น fragment ที่ตัดได้จะนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBBR 122 ซึ่งจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI และ ClaI เช่นเดียวกัน ส่วนพลาสมิด pBBR 122 ที่นำมาใช้จะมี fragment ขนาด 2.2 kb และประกอบด้วยส่วน rep region สำหรับการเชื่อมต่อซึ่งทำในเจล (in-gel ligation method) พลาสมิดที่ผ่านการทำรีคอมมิแนนส์ (recombinant) จะใช้ชื่อว่าพลาสมิด pCBBR1 ซึ่งจะมีขนาด 5.625 kb หลังจากนั้นจะถูก transform เข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α วิธีการค้นหา constitutive promoter ในไรโซเบียมนั้นทำโดยการแยกพลาสมิดขนาดใหญ่จาก *R. haukii* bv. regen สายพันธ์ B3 และย่อยแบบไม่สมบูรณ์ (partial digest) ด้วยเอนไซม์ Sau3AI หลังจากนั้นส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย restriction enzymes ซึ่งมีขนาดประมาณ 1 kb จะถูกสกัดออกมาจากเจลและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Geneclean DNA purifikation kit (Bio 101 Inc. CA, USA) และนำไปเชื่อมต่อกับบริเวณ multiple cloning site ของพลาสมิด pCBBR1 ที่บริเวณ BamHI site และหลังจากนั้นจะนำพลาสมิดที่เชื่อมต่อแล้วไป transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α อีกครั้ง

5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน cholesterol oxidase

ในการคัดเลือกโคลนที่ให้ผลเป็นบวกของยีน cholesterol oxidase จะใช้วิธี filter paper โดยอาศัยพื้นฐานของการตรวจสีที่เกิดขึ้นของคลอเลสเตอรอล โดยเอนไซม์ cholesterol oxidase และเอนไซม์ peroxidase นอกจากนี้ยังได้ตรวจตรวจสอบโคลนที่เป็นบวก (positive clone) โดยการใช้วิธี cholesterol plate ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้ นำสารละลายคลอเลสเตอรอล 2 มล. (สารละลายคลอเลสเตอรอลประกอบด้วยคลอเลสเตอรอล 0.4% w/v, 1-propanol 10% v/v และ 10% polyoxyethylene 9 laurylether) ผสมกับ 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 จำนวน 53.0 มล.และเติมวุ้น 0.72 กรัม ส่วนผสมทั้งหมดจะถูกนำไปต้มและนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนจะนำไปเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากที่อาหารคลอเลสเตอรอลแข็งตัวแล้วสารละลาย *o*-dianisdine 1.5 มล. จะถูกเกลี่ยให้กระจาย (spread) บนผิวหน้าอาหาร (สารละลาย *o*-dianisidine ประกอบด้วย 0.1 มก. ของ *o*-dianisidine 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 10 มล. และ 1.0 มล. ของสารละลายเอนไซม์ peroxidase (เอนไซม์ peroxidase 150 ng ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, 100 ml) และจะวางไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นโคโลนีที่ผ่าน recombinant แล้วจะถูก transfer โดยใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อลงไปบนอาหารคลอเลสเตอรอลซึ่งโคโลนีที่เป็นที่เป็นบวกจะสังเกตได้จากโคโลนีที่เป็นสีน้ำตาลแดง หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4-24 ชม.

การใช้ *gft* gene

1. สายพันธุ์แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Bradyrhizobium sp. สายพันธุ์ TAL216, THA122, THA6, THA7 และ THA202 ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ และสายพันธ์ B64 ซึ่งสามารถสร้างปมได้ดีกับถั่วเหลืองและถั่ว *Parascrianthes falcataria* สถาบันวิทยาศาสตร์แห่งอินโดนีเซีย โดยไรโซเบียมจะเก็บรักษาบนอาหาร YEM (ประกอบด้วย : Manitol 5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.1 g และ Yeast Extract 0.5 g) ส่วน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ซึ่งมีพลาสมิด pBBR-TGFP uv จะเลี้ยงบนอาหาร LB ทั้งที่เป็นอาหารแข็งและอาหารเหลว ซึ่งจะเติม kanamycin และ IPTG สำหรับการลดโพลีแซคคาไรด์ในระหว่างการเจริญของ *Bradyrhizobium* sp. นั้นจะใช้อาหาร HM (ประกอบด้วย : Na_2HPO_4 0.125g , Na_2SO_4 0.25g, NH_4Cl 0.32 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.18 g, $FeCl_3$ 0.004 g, $CaCl_2.2H_2O$ 0.013 g, HEPES 1.3 g, MES 1.1 g, yeast extract 0.25 g และ L-Arabinose 1.0 g ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร pH ของอาหาร 6.8) ซึ่ง HM จะเป็นอาหารที่ใช้ตลอดการทดลองนี้

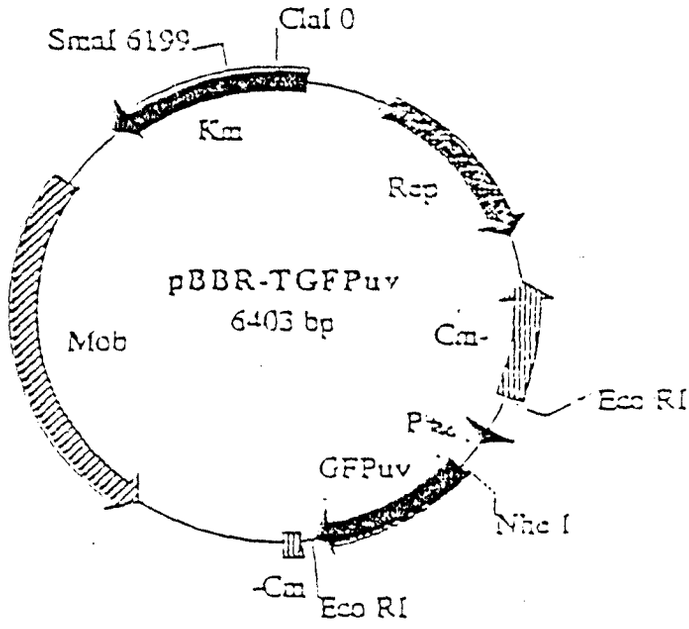
2. การเลี้ยงแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มี pH ที่แตกต่างกัน

ในการศึกษาลักษณะการเจริญภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่แตกต่างกันนั้นจะใช้อาหารเหลว YEM ซึ่งจะปรับค่า pH ต่าง ๆ ดังนี้ pH 3.5 4.0 และ 4.5 และหลังจากนั้นจะเขี่ยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. หนึ่งลูปเต็มใส่ลงไปในอาหารก่อนที่จะนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm หลังจากนั้นจะวัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดความขุ่น ซึ่งจะใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ทุก ๆ 3 วันจนกว่าจะมีการเปลี่ยนแปลง pH ในระหว่างการเจริญ

3. การเตรียม Competent เซลล์และวิธีในการทำ Electroporation

Bradyrhizobium sp. แต่ละสายพันธุ์จะถูกเลี้ยงในอาหาร HM จนได้ความขุ่นที่ OD600 nm ประมาณ 0.4 - 0.6 ที่อุณหภูมิ 28°C โดยมีการเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ก่อนที่จะนำไปเตรียมเป็น competent cell ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ คือ นำสารละลายเซลล์ (1 มล.) ไปแช่เย็นเป็นเวลา 15-30 นาทีบนน้ำแข็ง หลังจากนั้นจะนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิต่ำ (4°C) ด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที โดยเซลล์และสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองนี้จะต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° C ตลอดเวลาจนเสร็จสิ้นการทดลอง หลังจากนั้นเซลล์จะถูกนำไปละลายในน้ำ milli-q เย็น 1 มล. ซึ่งผ่านการฆ่าแล้วและนำไป centrifuge เพื่อล้างเซลล์และละลายในน้ำ milli-q เหมือนขั้นตอนที่แล้ว โดยใช้ปริมาตร 0.2 มล. สุดท้ายเซลล์จะถูกละลายใน. 0.4 µl ของ 10% กลีเซอรอล และเก็บที่อุณหภูมิ -70°C

ส่วนพลาสมิด pBBR-TGRPuv ซึ่งมีขนาด 6.4 kb (ดังแสดงในรูปที่ 2) จะมียีนที่ควบคุมการต้านทาน kanamycin ส่วนยีน GFP uv ซึ่งมี Ptac promoter, rep และ mob จะได้จาก พลาสมิด pBBR122 ซึ่งแยกได้จาก *E.coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี alkaline lysis สำหรับการทำ electroporation นั้นจะใช้เครื่อง electro cell Manipulator®600 (BTX) และใช้ cuvette ขนาดกว้าง 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีขั้นตอนการทำดังนี้ พลาสมิดดีเอ็นเอ ความเข้มข้น (500 ng-1 μl หรือ 3-5 μl) นำมารวมอย่างดีกับ competent เซลล์ หลังจากนั้นจะนำไปใส่ใน cuvette ที่แช่เย็นไว้ สภาวะที่ใช้ในการยิงด้วยกระแสไฟฟ้าก็คือ ใช้สนามไฟฟ้า 13.0 kv/cm ความต้านทาน 129Ω และช่วงเวลา 5.5 m sec ต่อจากนั้นเซลล์จะถูกละลายทันทีในอาหาร HM เย็น 1 มิลลิลิตร และต้องเก็บน้ำแข็งตลอดจนกว่าจะยิงครบทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นเซลล์ถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ตลอดเวลาก่อนที่จะนำไป spread บนอาหาร HM ซึ่งเติม 10 mM IPTG และ kanamycin จะนับจำนวนโคโลนี (CFU) หลังจากที่เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 2 แสดงแผนที่พลาสมิดลูกผสม pBBR-TGFPuv

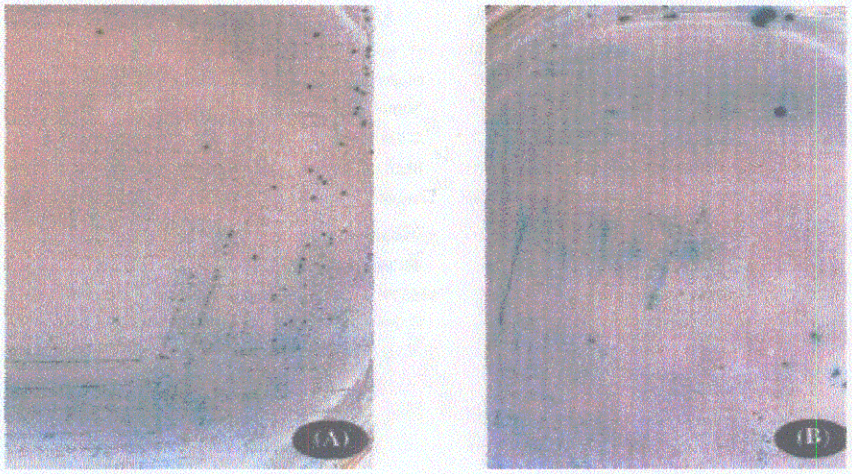
4. *การตรวจวัดเซลล์ทรานฟอร์แมนท์ที่มีการแสดงออกของยีน gfp*

นำโคโลนีหรือเซลล์ซีสเพนชั่นที่คาดว่าเป็นทรานส์ฟอร์แมนท์ ตรวจสอบใต้เครื่อง UV-transillceminator โดยทรานส์ฟอร์แมนท์จะให้ลักษณะที่เป็นสีเขียวเรืองแสง เมื่อเทียบกับโคโลนีหรือเซลล์ปกติ

บทที่ 3
ผลการทดลอง

1. การใช้ *gus* ยีน

เพื่อที่จะแยกไรโซเบียมที่ใช้เป็นหัวเชื้อที่ใส่ลงไปในแปลงทดลองซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ *Bradyrhizobium* sp. TAL 1000 และ *B. japonicum* TAL 379 ออกจากสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีอยู่ในตัวอย่างดินนั้นจึงได้มีการนำวิธี marker gene มาใช้ ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ที่นำมาใช้ศึกษาจะถูกใช้เป็นสายพันธุ์ตัวรับพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 lamda *pir/pUT* mTn 5SS *gus* A 30 mTn 5SS *gus*A 31 ซึ่งในพลาสมิดชนิดนี้ Symbiotic promoter จะพัฒนามาจากโปรโมเตอร์ของ *Bradyrhizobium nif*H โดยสามารถทำงานได้เมื่ออยู่ในปมที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เท่านั้น ดังนั้นจึงถูกนำมาวิเคราะห์การเข้าไปอาศัยอยู่ในปมรากถั่วของสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ต้องการศึกษาได้ ส่วนโคโลนีที่เกิด conjugent แล้วจะแยกได้โดยการเกิดโคโลนีสีฟ้าบนอาหาร B&D ซึ่งเติม spectincmycin , IPTG และ x-glu (แสดงในรูปที่ 3)



รูปที่ 3 Conjugant colonies (blue colour) of

(A) *B. japonicum* TAL 379 and

(B) *Bradyrhizobium* sp. TAL 1000 on B&D minimal medium containing Spectionmycin IPTG and X-gluc

ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้พบว่าถ้าใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนที่กูลโคสจะสามารถกระตุ้นการเจริญของ *Bradyrhizobium* sp. ได้ดีกว่า โดยเฉพาะในขั้นตอนการทำ mating นอกจากนี้ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของการใช้สายพันธุ์ไรโซเบียมที่ผ่านการทำ conjugation โดย gus

ยีนกับสายพันธุ์ไรโซเบียมดั้งเดิมที่ไม่ผ่านการทำ conjugation ว่าแต่ละชนิดจะมีการเจริญเติบโตของต้นถั่วอย่างไร (แสดงในรูปที่ 4)

รูปที่ 4 Comparision of effect between conjugant and non-conjugant with host plants

(A) *Glyine max* with TAL379 (1; inoculated with TAL 379 and 2; inoculated with TAL 379 gus+)

(B) *Arachis hypogaea* with TAL1000 (1: inoculated with TAL 1000 and 2: inoculated with TAL 1000 gus+)

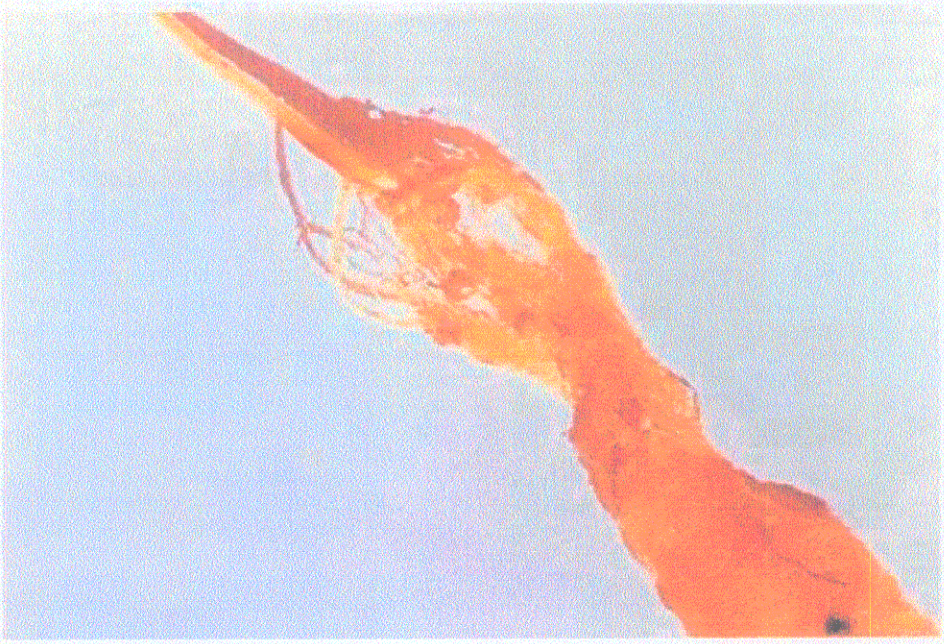
จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าไรโซเบียมที่นำมาใช้ทั้ง 2 ชนิดให้ผลที่ไม่มีความแตกต่างกันทั้งระหว่างน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของถั่วที่นำมาศึกษา (ไม่ได้แสดงข้อมูลในครั้งนี้) ซึ่งผลการทดลองก็สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้ศึกษาแล้วในถั่วชนิดอื่น (Pigeonpea และ Siratro) ที่ inoculate ด้วยไรโซเบียมสายพันธุ์เดิมคือ *Rhizobium* sp. NOR 234 และ *R. tropici* (IAT 899 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีการนำมาผ่านการทำ conjugation แล้วโดยใช้ gus เป็น marker gene ก็จะพบว่าน้ำหนักที่ได้ไม่ได้มีความแตกต่างกัน

ส่วนในการศึกษาในการแข่งขันของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. ที่มีอยู่ในดินดั้งเดิมรวมทั้งแบคทีเรียในดินชนิดอื่นๆ จากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแต่ละสถานที่เปรียบเทียบกับเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ที่นำมาทำเป็นการค้าแล้ว (ได้แก่สายพันธุ์ TAL 1000 และสายพันธุ์ TAL 379) ซึ่งครั้งนี้ตัวอย่างดินที่นำมาใช้ทดลองจะเป็นดินที่มีความแตกต่างกัน 5 ตัวอย่างที่เก็บมาจากแต่ละที่ แล้วนำมาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ซึ่งผลการทดลองลักษณะต่างๆ ของดินจะแสดงอยู่ในตารางที่ 1

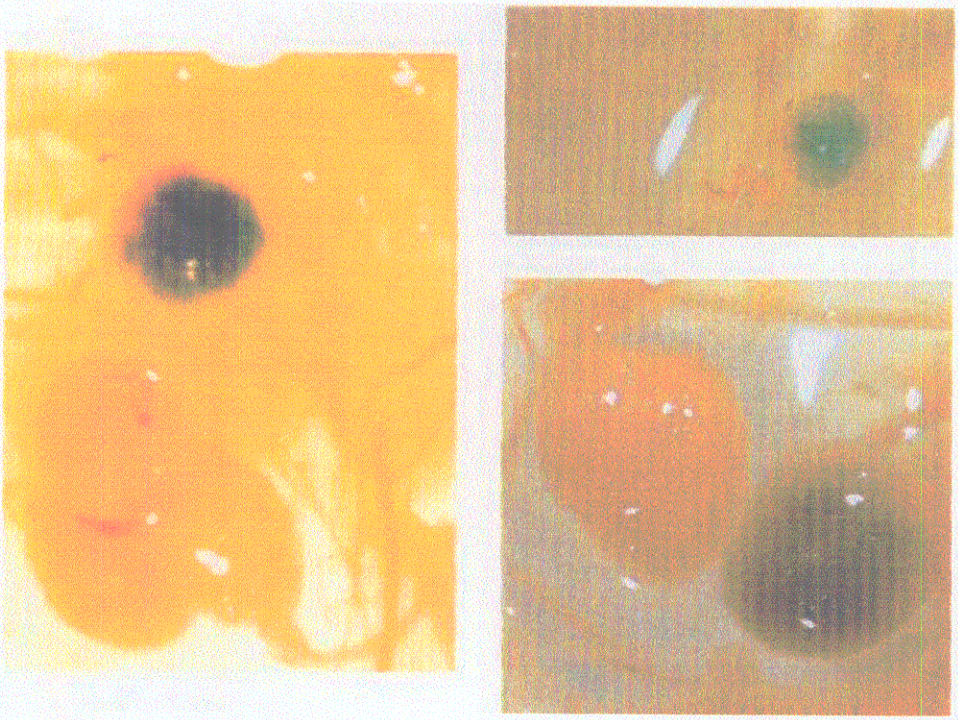
ตารางที่ 1 Soil Characterization

Soil sample	pH	% organic matter	C/N ratio	Total bacterial viable count (CFU/g soil)
A	6.87	1.01	13.72	$1.75x10^6$
B	5.85	0.47	12.27	$7x10^4$
C	6.82	0.70	13.23	$3.3x10^5$
D	8.25	0.63	12.00	$2.35x10^5$
E	6.27	0.36	13.125	$1.67x10^5$

ซึ่งจากประวัติการใช้ดินในแต่ละพื้นที่ของตัวอย่างดินที่เก็บในจังหวัดนครราชสีมา พบว่าไม่เคยมีการใช้ไรโซเบียมเพิ่มเติมลงไปในดินบริเวณนี้มาก่อน (ซึ่งสัญลักษณ์ของตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแต่ละที่ได้แก่ A: ดินจากบริเวณปลูกมะม่วง B: ดินจากบริเวณที่ปลูกมันสำปะหลัง C: ดินจากบริเวณที่ปลูกถั่วลิสง D: ดินจากบริเวณที่ปลูกยูคาลิปตัส และ E: ดินบริเวณที่ปลูกต้นสัก) ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของการเข้าไปสร้างปมของไรโซเบียมแต่ละชนิดในพืชตระกูลถั่วจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการแข่งขันระหว่างสายพันธุ์ที่มีการใส่เพิ่มลงไปกับสายพันธุ์ดั้งเดิมชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในดิน (แสดงในรูปที่ 5) ซึ่งผลการทดลองจะดูจากจำนวนของปมที่จะปรากฏสีแตกต่างกัน 3 ลักษณะคือ ปมที่เป็นสีฟ้าทั้งปม ปมที่เป็นสีฟ้าบางส่วน และปมที่เป็นสีขาว (แสดงในรูปที่ 6) ซึ่งปมสีฟ้าจะแสดงให้เห็นถึงการเข้าไปอาศัยทั้งสายพันธุ์ที่ถูก conjugant แล้วพันธุ์ดั้งเดิมในปมเดียวกัน



รูปที่ 5 Nodules occpied by both the marked and unmarked inoculum strains



รูปที่ 6 The colour differences of nodules used in determination of percent occupancy

ความแตกต่างในการแข่งขันของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิมและแบคทีเรียที่มีอยู่ในดินดั้งเดิมตัวอื่น ๆ ในดินตัวอย่างแต่ละชนิดจะมีเปอร์เซ็นต์การแข่งขันที่แตกต่างกัน โดยเปอร์เซ็นต์การแข่งขันสูงสุดคือประมาณ 60% จนถึงค่อนข้างต่ำประมาณ 14% ซึ่งจากชุดควบคุมการทดลองของแต่ละพืชอาศัย (host) คือถั่วเหลือง (*G. max*) และถั่วลิสง (*A. hypora*) พบว่าความสามารถในการทำให้เกิดปมที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในระบบปลอดเชื้อคือ 32% และ 27% ตามลำดับ ส่วนผลการทดลองจากตัวอย่างดิน B (ตัวอย่างดินที่บริเวณปลูกมันสำปะหลัง) ที่พบว่ามีจุลินทรีย์ดั้งเดิมในดินต่ำ ซึ่งน่าจะเกิดจากจำนวนสารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินต่ำด้วย (แสดงในตารางที่ 1) แต่ผลการทดลองไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนจุลินทรีย์ดั้งเดิมในดินค่อนข้างต่ำ เพราะพบว่าเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อที่เป็น inoculant จะค่อนข้างสูง (แสดงในตารางที่ 2) ดังเช่น ดินในตัวอย่าง D ที่มีแบคทีเรียดั้งเดิมอยู่ 2.35×10^5 เซลล์/กรัมดิน ความสามารถของไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมมีสูงถึง 85.2% แต่ในขณะที่ดินตัวอย่าง A มีจำนวนแบคทีเรียดั้งเดิมสูงถึง 1.75×10^6 เซลล์/กรัมดิน แต่ไรโซเบียม มีความสามารถเข้าปมได้เพียง 60%

ตารางที่ 2 The percent of nodule occupancy in soil sample

Soil sample	Conjugant of *B. japonicum* TAL 397 in *Glycine max*				Conjugant of *Bradyrhizobium* sp. TAL 1000 in *Arachis hypogaea*			
	No. of Blue nodules	*No. of partial Blue nodule*	*No. of white nodules*	*% nodule occupancy*	*No. of Blue nodules*	*No. of partial Blue nodule*	*No. of white nodules*	*% nodule occupancy*
A (Mango)	9	1	1	86.36	5	2	3	60
B (Cassava)	13	2	3	77.77	12	6	4	68.18
C (*Acacea mangium*)	3	1	2	58.33	7	2	2	72.72
D (Eucaryptus)	11	1	-	95.83	22	49	5	85.2
E (Teak)	1	16	12	31.03	2	12	4	44.4
Control (sterilized sand)	32	-	-	100	27	-	-	100

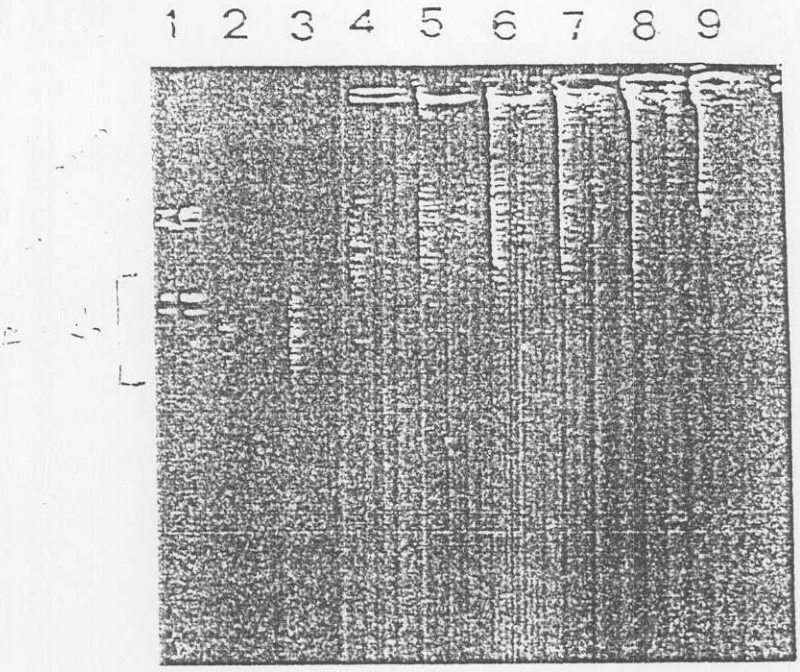
นอกจากนี้ ข้อมูลสามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างดินที่มีเปอร์เซ็นต์สารอินทรีย์อยู่น้อย เช่น ตัวอย่างดิน E จะทำให้เกิดจำนวนปมของ inoculant ที่ใส่ลงไปน้อยด้วย สำหรับสายพันธุ์ที่ผ่านการทำ conjugant แล้วจะสามารถทำให้เกิดปมได้จำนวนมากในตัวอย่างดิน D (ดินที่เก็บจากบริเวณที่ปลูกยูคาลิปตัส) ซึ่งพบว่ามากกว่าตัวอย่างดินที่ใช้ปลูกพืชชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามปัจจัยอื่น ๆ เช่น สารที่พืชหลั่งออกมาก็จะเกี่ยวข้องกับการเข้าไปสร้างปมในรากถั่วของไรโซเบียมด้วย จากรายงานของ Brockman และคณะ (1991) การใช้ *R. leguminosarum* bv. phaseoli ที่ใช้ Tn-marker ในการทำ transposon insertion พบว่าจะลดความสามารถในการแข่งขันที่แตกต่างกันของแต่ละสายพันธุ์ซึ่งจะนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

จากการศึกษาครั้งนี้โมเดลที่ใช้ *gus* ในการเป็น reporter ยีนจะได้รับการพัฒนาขึ้นไปอีก สำหรับในระบบปลูกที่มีการใช้ *Bradyrhizobium* sp. เป็นหัวเชื้อกับถั่วชนิดต่าง ๆ เช่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง นั้นการใช้เทคนิคที่กล่าวมาแล้วจะทำให้มีข้อมูลเกี่ยวกับผลกระทบของสายพันธุ์จุลินทรีย์ดั้งเดิมที่เหมาะสมสำหรับต้นถั่วชนิดนั้นก่อนที่จะทำการปลูก ซึ่งจะทำให้เกิดการวางแผนที่ดีกว่าสำหรับเกษตรกรในการเพาะปลูก ในอีกทางหนึ่งสายพันธุ์ที่เรานำมาใช้เป็นการค้า (ประมาณ 25 สายพันธุ์) ซึ่งเหมาะสมกับพืชอาศัยที่แตกต่างกัน 3 ชนิดควรจะศึกษาต่อไป

2. การใช้ *cho* ยีน

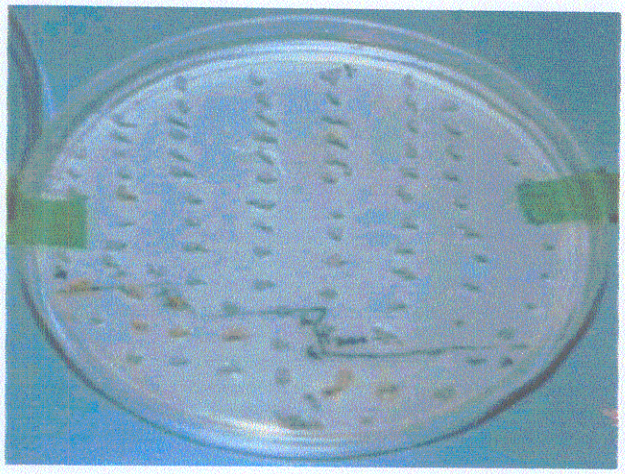
การที่จะใช้ *cho*A เป็น reporter ยีนนั้นได้มีการคัดเลือกพลาสมิดที่มีจำนวน copy number ต่ำสำหรับเป็น promoter-probe vector ชื่อว่า pCKM1 ซึ่งประกอบไปด้วย pSC 101-replication origin ยีนที่ต้านทาน kanamycin ยีน cholesterol oxidase และมี translation stop codons ในทุก ๆ 3 reading flames ซึ่งจะอยู่ระหว่าง multiple cloning site (MSC) และจุดเริ่มต้นของการ translation ของยีน *cho*A ซึ่ง fragment ที่ประกอบด้วย MSC, *cho*A และ Km^r จะแยกออกมาโดยการตัดพลาสมิด pCMK1 ด้วยเอนไซม์จำเพาะ (restriction enzyme) EcoRI และ *Cla* I โดยการใช้ fragment ที่มีขนาด 3.4 kb โดยที่บริเวณ pSC 101 rep ในพลาสมิด pCMK1 จะสามารถเพิ่มจำนวน (replication) ได้แก่ *E. coli* เท่านั้น และจะได้จำนวน copy ที่ต่ำ ดังนั้นจึงได้มีการใช้พลาสมิด pBBR 122 ซึ่งสามารถ replication ได้ใน host หลายชนิดมาแทนซึ่งมีรายงานว่าพลาสมิด pBBR 122 ที่ประกอบด้วยบริเวณที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน host หลายชนิด (board-host-range replicon) โดยจะสามารถเพิ่มจำนวนได้ในแบคทีเรียแกรมลบหลายสายพันธุ์ เช่น *Acetobacter xylinum, R. meliloti* และ *R. leguminosarum* เป็นต้น (3, 6, 10) ดังนั้น fragment ของพลาสมิด pBBR 122 ที่ประกอบด้วยยีน rep จะถูกแยกออกมาโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ *Cla* I ก่อนที่จะนำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่มีขนาด 3.4 kb จากพลาสมิด pCMK1 หลังจากเชื่อต่อแล้วจะได้พลาสมิดที่มีชื่อว่า pCBBR1 ซึ่งมีขนาด 5.625 kb (แสดงในรูปที่ 1)

ส่วนในการตรวจสอบว่า pCBBR1 ได้รับ fragment ที่ถูกต้องตามที่ต้องการหรือไม่ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ (ได้แก่ EcoRI, *Cla*I และ *Vsp*I) ส่วนการหาค่าการแสดงออกของยีน *cho*A ในพลาสมิด pBBR1 ในไรโซเบียมหลาย ๆ สายพันธุ์โดยจะมุ่งเน้นไปที่ constitutive promoter เช่น บริเวณ *nif* หรือ *nod* จากข้อมูลที่ได้ศึกษามาแล้วของพลาสมิดขนาดใหญ่ (416.3 kb) ที่มีอยู่แล้วใน *R. huakii* bv. renge สายพันธุ์ B3 ที่มีชื่อว่า pRhYM นั้นสามารถที่จะระบุบริเวณของยีน *nod* และ *nif* ได้ และพบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากของลำดับเบสระหว่างยีน *nif* และ *nod* ของพลาสมิด pRhYM และ pNGR. 6E ของ *Rhizobium* sp. นอกจากนี้ยังพบว่าระหว่างพลาสมิด NGR 234 และ PSA 30 ของ *Klebsiella pheumoniae* ตามลำดับ ดังนั้น constitutive promoter ที่เหมาะสมเช่น *nif* หรือ *nod* บนพลาสมิดขนาดใหญ่ pRhYM จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ดังนั้นพลาสมิด pRhYM จะถูกตัดแบบไม่สมบูรณ์ (partial digestion) โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sau 3AI จะทำให้ได้ DNA ขนาด 1.0 kb โดยเฉลี่ย (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 Partial digestion of megaplasmid pRhYM from *R. huakii* bv. renge strain B3. Lane1; λ-DNA marker digested with the Hind III and EcoRI, Lane 2-8; varied amout of the restriction enzyme Sau 3A I (10 folds dilution; incubated at 37°C 1 hr and stop reaction by additional of 1 μl 0.5 MEDTA) with pRhYM, and lane9; pRhYM without Sau 3A I. The black frame indicated the partially digested DNA fragment in average size of 1 kb which were further extracted from the agarose gel.

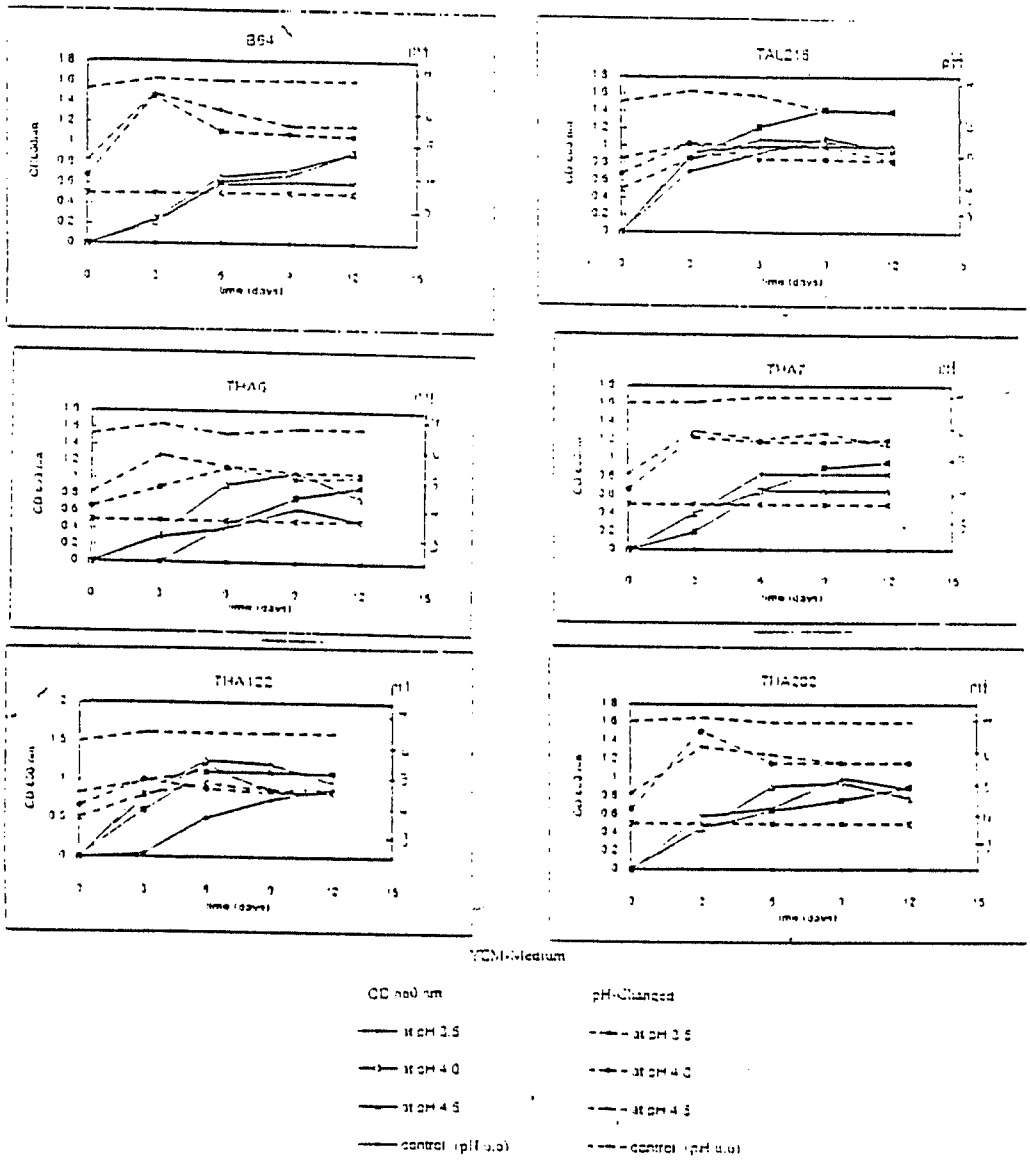
โดย fragment ที่ตัดด้วยเอนไซม์แล้วจะแยกออกจากอะกาโรสเจลและนำไปเชื่อมต่อที่บริเวณ multiple cloning site (MSC) หลังจากนั้นจะนำมา transform เข้าสู่ *E. coli* DH5α และนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มี kanamycin เมื่อเกิดโคโลนีแล้วจะนำไปเลี้ยงต่อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร cholesterol เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ *cho*A ผลการทดลองพบว่า จาก 80 โคโลนีมีเพียง 17 โคโลนีที่เกิดสีน้ำตาลแดง (รูปที่ 8) ซึ่งจะนำทั้ง 17 โคโลนีมาเก็บไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป สำหรับแผนการในอนาคตนั้นคือการประยุกต์ใช้ยีน cholesterol oxidase สำหรับเป็นระบบติดตามในไรโซเบียมบางสายพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษ เช่น *Bradyrhizobium* sp. strain BTCC-B64 ซึ่งแยกจากปมถั่วเหลืองในประเทศอินโดนีเซียซึ่งมีรายงานว่าเป็นสายพันธุ์ที่ทนกรดได้ดี ได้ถูกนำมาศึกษาขั้นต้นโดยเฉพาะการใช้วิธี Electroporation สำหรับการศึกษาต่อไปก็จะศึกษาลักษณะต่างๆ ของ *Bradyrhizobium* sp. BTCC-B64 อย่างละเอียดชัดแจ้งพร้อมกับสร้าง reporter gene โดยใช้ยีน *cho*A สำหรับติดตามศึกษาเมื่อนำไปใช้ในแปลงทดลอง



รูปที่ 8 แสดงโคโลนีสีน้ำตาลแดงของการแสดงออกของยีน *cho*A

3. การใช้ *gfp* ยีน

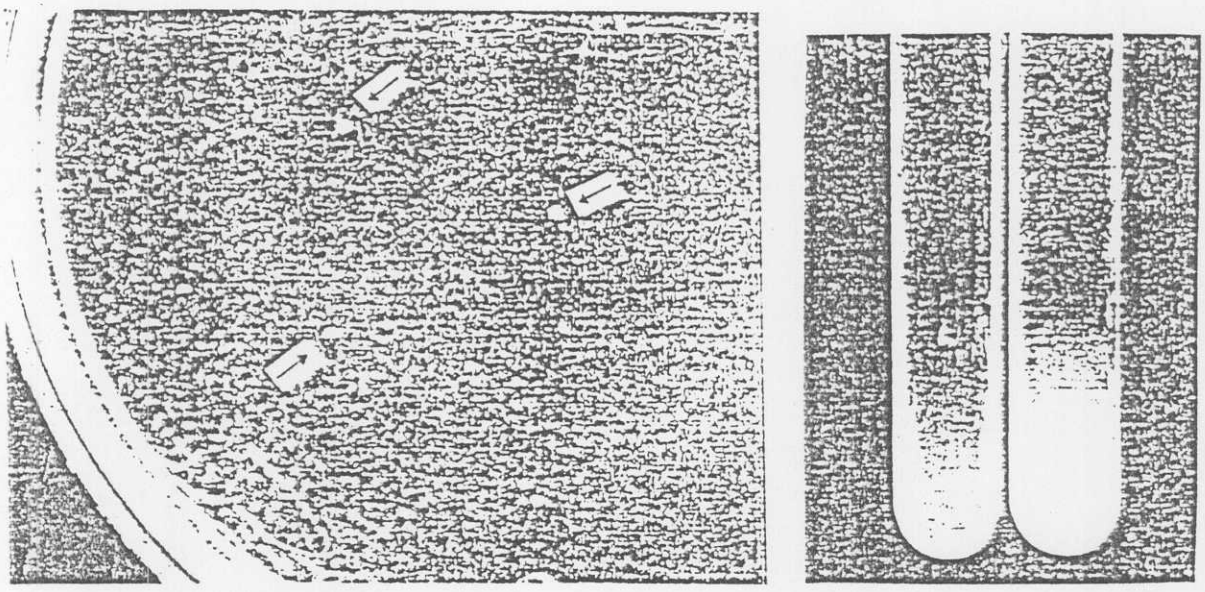
ในขั้นต้นได้ลองใช้ *gfp* ยีนเป็น marker gene เป็นระบบจำลองในการศึกษาคุณสมบัติในการเจริญเติบโตของ *Bradyrhizobium* sp. 6 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนกรดได้ดี โดยใช้เป็นสภาพจำลองที่จะตรวจวัดอัตราหรือพฤติกรรมการแบ่งชั้นในสภาวะกดดัน โดยสังเกตการเจริญของแต่ละสายพันธุ์โดยดูจากความขุ่น โดยจะมีการปรับค่า pH ของอาหารที่มีค่าต่าง ๆ ก่อนที่จะนำมาใช้ศึกษาการเจริญของเชื้อ (แสดงในรูปที่ 9) ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาส่วนมากจะเจริญได้ดีที่ pH 4 และ 4.5 มากกว่าบนอาหารที่ไม่มีการปรับ pH (อาหารปกติจะมีค่า pH ที่ 6.6) จะมีเพียงสายพันธุ์ TAL 126 และ THA 122 ที่สามารถเจริญได้ดีที่ pH ต่ำถึง 3.5 โดยในระหว่างการเจริญเติบโตของแต่ละสายพันธุ์ในสภาวะที่เป็นกรดนั้น ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะรักษาระดับอยู่ในช่วง 4.5-5 อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของ *Bradyrhizobium* sp. ทั้ง 6 สายพันธุ์นั้นพบว่าสายพันธุ์ B64 ค่อนข้างจะมีการเจริญได้ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ ในขณะที่สายพันธุ์ TAL 216 และ THA 122 สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ



รูปที่ 9 Growth pattern and pH changed during cultivation of six *Bradyrhizobial* strain in varied pH values.

จากจุดประสงค์ที่ต้องการติดตามความคงอยู่ของการเข้าสร้างปมในพืชตระกูลถั่วของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. ที่ทนกรดได้ดีเมื่อนำไปใช้ในแปลงทดลอง ดังนั้นการทำ transformation โดยใช้ reporter gene ชนิดต่าง ๆ เช่น green fluorescent protein (*gfp*) โดยใช้เทคนิค electroporation จึงได้รับการพัฒนาขึ้นมา ซึ่งยีน *gfp* จะถูกนำไปรวมกับพลาสมิด pBBR-TGFP uv หลังจากนั้นจะถูก transform เข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จากการทดลองในครั้งแรกโดยเลี้ยงเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. ในอาหาร YEM หรือแม้แต่การลดความเข้มข้นของสูตรอาหารลงครึ่งหนึ่งในการเลี้ยงเชื้อก็ยังไม่ประสบความสำเร็จในการลดปริมาณ exopolysaccharide เนื่องจากจำนวน exopolysaccharide ที่มีเป็นจำนวน

มากจะลดประสิทธิภาพในการทำ transformation พลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของ *Bradyrhizobium* sp. โดยวิธี Electroporation ได้มีการทดลองเพื่อหาความสามารถในการต้านทาน (ค่า Ω) ของเซลล์ โดยจะทดสอบที่ค่าต่าง ๆ กันจาก 125Ω (4-5 m วินาที) 246Ω (5-9 m วินาที) 480Ω (15-12 m วินาที) และ 720Ω (30-32 m วินาที) ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจากการทดสอบความต้านทานในแต่ละช่วงเวลาที่จะให้ค่าที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (ประมาณ 10^7 CFU/มิลลิลิตร จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^{12} CFU/มิลลิลิตร) ก่อนการนำมาทำ electroporation กับพลาสมิดนั้น *Bradyrhizobium* sp. ทั้ง 6 สายพันธุ์จะถูกนำมาทดสอบความสามารถในการต้านทาน kanamycin ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ THA 202 และ THA 7 สามารถเจริญได้บนอาหารที่มี kanamycin โดย *Bradyrhizobium* sp. ที่เลี้ยงบนอาหาร HM จะใช้จำนวนความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ $5\text{-}6\times10^{12}$ เซลล์/มิลลิลิตร และหลังจากผ่านการทำ transformation แล้วพบว่าเซลล์ที่รอดชีวิตจะอยู่ระหว่าง $2\text{-}4\times10^{4}$ เซลล์/ไมโครกรัม ของพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่ 125 Ω (4-5 วินาที) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบโคโลนีที่ผ่านการทำ transformation แล้วภายใต้แสง UV ก็ค่อนข้างยากที่จะแยกออกจากโคโลนีของเชื้อตั้งต้น (เชื้อที่ไม่ผ่านการทำ transformation) เนื่องจากความบางของอาหารแข็งที่ใช้ ดังนั้นการตรวจสอบโคโลนีที่ผ่านการทำ transformation จะทดสอบในอาหาร HM ที่เป็นอาหารเหลวดังแสดงในรูปที่ 10



A B

รูปที่ 10 (A) Transluminescent pGFP-transformant colonies of *Bradyrhizobium japonicum* strain THA 122 (indicated with arrows) (B) translumìnescent cell suspension of equal optical density (600 nm ; A = 0.2) of *Bradyrhizobium* sp. Strain B64. Left-hand tube is normal strain while right-hand tube is the pGFP transformant.

จาก *Bradyrhizobium* sp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีเพียงสายพนธุ์ B64 TAL 216 และ THA 122 เท่านั้นที่สามารถทำ transformation ได้และเป็นที่น่าสนใจมากกว่าสายพันธุ์ B64 ไม่สามารถทำ transform กับพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดจาก *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ซึ่งสาเหตุอาจจะเกิดเนื่องจากระบบการ modification ที่จำกัดของสายพันธุ์ B64 ที่เป็นตัวรับพลาสมิดเอง ดังนั้นจึงได้พยายามทำอีกครั้งโดยนำพลาสมิด pBBR-TGFP uv มาทำ transformation เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ HB 101 ซึ่งมีระบบ methytransferase ก่อนที่จะนำไปทำ electrotransformation กับสายพันธุ์ B64 อีกครั้ง ซึ่งแนวทางนี้ก็ทำให้สามารถสร้าง transformants ของสายพันธุ์ B64 ได้จำนวนเล็กน้อย (4-6 CFU/ ไมโครกรัมของพลาสมิดดีเอ็นเอ) เพื่อยืนยันว่า transformants ที่พบได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอที่เราต้องการจริง ๆ ก็จะทดสอบโดยใช้วิธี alkaline lysis ซึ่งจากการทดลองเราก็พบว่าวิธี alkaline lysis ไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้กับสายพันธุ์ *Bradyrhizobium* sp. แม้เมื่อใช้กับ transformants ตัวอื่น ๆ เช่น *Mesorrhibium huakii* สายพันธุ์ B3 ซึ่งเป็น positive control ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีการสกัดพลาสมิดโดยวิธีอื่น ๆ ที่เหมาะสมสำหรับไรโซเบียมที่มี

พลาสมิดขนาดเล็ก สำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไปในอนาคตของการทดลองครั้งนี้ก็จะมุ่งเน้นไปที่การนำผลของ transforment ที่ได้ไปใช้ในถั่วเหลืองและศึกษาการแสดงออกและการคงอยู่ในปมของถั่วเหลือง

สรุปผลการทดลอง

ได้ทำการคัดเลือกชนิดของยีนที่จะนำมาใช้โคลนเข้าสู่แบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียม ได้แก่ ยีนคลอเรสเตอรอลออกซิเดส (Chloresterol oxidase) ยีนโปรตีนสีเขียวเรืองแสง (GFP : Green Flvorescent Protein) และยีนบีต้ากูลคูโรนิเดส (β-glucuronidase) ในการเลือกใช้ยีนคลอเรสเตอรอลออกซิเดสที่ทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCKM1 โดยเลือก constritutive promotor จาก megaplasmid ของ *Mesorhizobium huakii* bv. renge สายพันธุ์ B3 จนได้พลาสมิดลูกผสมใหม่ที่ชื่อ pcBBR1 จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่ *E. coli* DH5α พบว่ามีการแสดงออกที่ของเอนไซม์ที่สมบรูณ์แต่คาดว่าไม่น่าจะเหมาะสมเมื่อนำไปใช้กับไรโซเบียมเพราะลักษณะสีของการแสดงออกที่ปรากฏมีแดงเหมือนสีของ leghaemoglobin ในปมที่สมบูรณ์ของถั่วซึ่งทำให้ยากต่อการจำแนกว่าสายพันธุ์ใดเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นหรือสายพันธุ์ที่ใส่ลงไป ส่วนยีนชุดที่สองคือ *gfp* gene ได้ทำการเชื่อมชุดยีนลงไปในพลาสมิด pBBR 122 ที่มี Ptac promotor จนได้พลาสมิดลูกผสม pBBR-TGFPuv จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่ *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ B64 ด้วยวิธี electroporation ผลการแสดงออกสามารถตรวจสอบได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ทำให้เห็นโคโลนีเป็นสีเขียวเรืองแสง ซึ่งสามารถตรวจสอบพฤติกรรมการอยู่รอดได้ ในส่วนของ *gus* gene นั้นได้ใช้กับ *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ TAL 1000 จากถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) และ *B. japonicum* TAL 379 ซึ่งแยกได้จากถั่วเหลือง (*Glycine max*) โดยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. ทั้ง 2 สายพันธุ์จะถูกนำ conjuate กับ *E. coli* สายพันธุ์ S-17-1 lambda pir/pUT mTn 5SS gus A31 โดย *Bradyrhizobium* sp. ที่เป็น conjugants แล้วจะนำมาทำเป็นหัวเชื้อเพื่อคลุกกับเมล็ดถั่วที่เหมาะสมในแต่ละพืชอาศัย โดยหลังจากปลูกไปแล้ว 30 วัน จะเก็บรากถั่วมาย้อมด้วย x-gluc ในการทดสอบการเข้าไปอาศัยอยู่ในปมรากถั่วของ *Bradyrhizobium* sp. ครั้งนี้จะทดสอบโดยใช้ตัวอย่างดินหลายชนิด เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไรโซเบียมที่สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในปมรากถั่ววิเคราะห์จากจำนวนเนื้อเยื่อของปมที่ปรากฏเป็นสีฟ้าจากการย้อมด้วย x-glu ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าดินที่เก็บจากบริเวณที่ปลูกต้นสักมีการแข่งขันสูงสุดในการเข้าไปสร้างปมมากกว่าดินจากบริเวณอื่น ๆ

บรรณานุกรม

Alvarez-Morales. A, Betancourt-Alvarez, M., Kaluza, K. & Hennecke. 1986. Activation of the *Bradyrhizobium japonicum nif H* and *nif DK* operons is dependent on promotor-upstream DNA sequences. Nucl. Acids Res 14, 4207 4227.

A. Sessitsch, 1996. Manual for the *gus* gene marking kit. IAEA. Laboratories: Soils unit; Seibersdorf, Austrain.

Berger J.A., May S. N., Berger L.R. and Bohlool B.B. 1979. Colorimetric enzyme linked immunosorbent assay for the Identification of strains of *Rhizobium* in culture and in the nodules of lentils. Appl. Envi. Micro. 37, 642-646.

Brockman F.J., Forse L.B., Bezdicek D.F. and Frederickson J.K. 1991. Impairment of transposon-iduced matants of *Rhizobium leguminosarum* Soil Biology & Biochemistry 23, 861-876.

Brown, C.M. and Dilworth M.J. 1975. Ammonia assimilation by Rhizobium cultures and bacteroids. J. Gen Microbiol 122, 61-67.

Bushby H.V.A. 1981. Quantitative estimation of rhizobia in non-sterile soil using antibiotics and fungicides. Soil Biology & biochemistry 13, 2377-239.

Jefferson, R.A., Burgess, S.M. and Hirsh, D. 1986. β-glucuronidase from E. coli as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acid. Sci. USA. 83: 8447-8451.

Josey D.P., Beynon J.L., Johnston A.W.B. and Beringer J.E. 1979. Strain identification of *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. Journal of Applied Bacteriology 46, 343-350.

K.J. Wilson. 1995. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the fleld. Soil. Biol. Biochem. Vol 27. No. 415, 501-504.

Wilson, K.J., K.E. & Jefferson, R.A. 1991, β-glucuronidase (GUS) operon fusions as a tool for studying plant-microbe interaction. *In Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe interaction*, vol. L. p.226-229. Edited by H. Hennecke and D.P.zS. Verma. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

CURRICULUM VITAE

NAME	: Neung Teaumroong
NATIONALITY	: Thai
SEX	: Male
DATE AND PLACE OF BIRTH	: July 21 1965, Bangkok
POSITION	: Head of Research Department Institute of Agicultural Technology (April 1999-present:Associate Professor)
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

CURRENT RESEARCH

: Development of Detection System for Soil Bacteria by Using DNA Direct Extraction Method
: Application of Primer-Based Technology to Fingerprint the Genomes of Rhizobia
: Study of Rhizobial Behavior By Using the Molecular Genetics Approaches
: Biodiversity of N_2-Fixing Microorganisms and VAM in Thailand
: Biodiversity of Wild Mushrooms in North-East Area of Thailand
: Mannitol Production for Rhizobium Cultivation from Agricultural Waste

RESEARCH FUNDING

: Monbusho (1993-1994)
"Breeding of Nitrogen Fixing Bacteria in Southeast Asia"
: International Atomic Energy Agency (IAEA) (1993-1995)
"Using Molecular Biology Techniques to Detect Rhizobium in Thailand"
: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand (JSPS-NRCT) (1995-1998)
"Rhizobial Strain Improevment and on Farm Management for High N_2 Fixation in Forage Legumes"
: Biodiversity Research&Training Program (BRT)(1996-1999)
"Population Changes in N_2-Fixing Microorganisms as Affected by Changing in Ecosystem Process"
: HRH Princess Sirindhorn Plant Conservation Project (1996-2000)
"Mushroon Diversity in Tub-Lan National Park"
: Suranaree University of Technology (1993-1997)
"Using Gus Gene for Studying Rhizobial Behavior in Ecosystem"
"Development of Detection System for Soil Bacteria Using DNA Probe Technique"
"DNA Fingerprint of Wild Edible Mushrooms in Northeastern Part of Thailand"

: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand (JSPS-NRCT) (2000-2003)
"Development of techniqe for nitrogen fixing and phosphorus uptake microorganisms in legumes by using molecular genetics approaches."

PUBLICATIONS

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., 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.

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

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.,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. 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

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.

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.

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

SELECTED 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.")
- International Symposium on Microbial Ecology (ISME-6), September 6-11, 1992. Barcelona, Spain. (**Poster presentation** in "DNA Direct Extraction from Soil to Detect DCD-Degrading Soil Bacterium.")
- 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.
- 10th International Congress on Nitrogen Fixation. ST. Petersburg, Russia. May 28-June 3, 1995. (**Poster presentation:** in "Application of Primer-Based Technology to Fingerprint the Genomes of *Bradyrhizobium* spp. in Thailand")
- 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.")
- 11th International Congress on Nitrogen Fixation. 20-25 Jul.1997 Institue Pasteur, Paris (**Poster presentation:** in "Using Gus Reporter Gene to Detect Applied *Bradyrhizobium* in the Field and Effect of Inoculantion Methods on Nodulation, N_2 fixation and Yield of Soybeans Under Field Condition.")
- Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 Junly 1998. Hua-Hin, Thailand. (**Poster presentation** : in "A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawieng plant genetic forest.")

- 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.")
- 10th Annual meeting of TSB and NCGEB "Biotechnology for A Self-Sufficient Economy. 25-27 November 1998, Bangkok. (**Poster presentation** : in "Characterization of Rhizobial Isolated from *Desmanthus virgatus*")
- 12th International Congress on N_2-fixation 12-17 September 1999, Iguacu, Brazil. (**Poster presentation** : in "Diversification of some forage legumes rhizobia isolated 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.")
- 8th International Symposium on Nitrogen fixation with Non Legumes. 3-7 December 2000, The University of Sydney, NSW, Australia. (**Poster presentation** : in "Population dynamics and polygenetic diversity of free-living nitrogen fixing bacteria isolated from diversed soil ecosystems in Thailand.")
- Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, University of Hong Kong, Hong Kong, Chaina. (**Poster presentation** : in "Using Agricultural Wastes For *Tricholoma crassum* Production.")
- 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

- "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 GFPin Rhizobium" Osaka University, Japan (March 13, 2000- March 31, 2000)
- "The Royal Golden Jubilee program" (2000)