KAMONLUCK TEAMTISONG : SOME PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGY ASPECTS OF HIGH EFFIENCY N_2-FIXATION RHIZOBIAL STRAINS IN FORAGE LEGUMES
THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR NEUNG TEAUMROONG, Dr. rer. nat, 93 PP.
ISBN

Forage legumes rhizobia in this study were isolated from four tropical forage legumes; *Desmanthus virgatus, Stylosanthes hamata, Chamaecrista rotundifolia* (Wynn cassia) and *Centrosema pubescens*. The high efficiency N_2-fixation rhizobial strain were obtained from Department of Agriculture, Bangkok. Characterizations of these strains were conducted along with their physiological properties such as acid-base production, IAA production, intrinsic antibiotic resistance profiles and 19 different substrates utilization (APIZYM-test). Genetic relatedness was also determined. Using *nif* and *nod* probes for Southern blot hybridization analyses and RAPD, REP-PCR for distinguishing among the strains were employed. In addition, *nif*H and *nod*A PCR-RFLP and 16S rDNA sequences were used to investigate the phylogenic relationships. Characterization of effective *D. virgatus* rhizobia, it was found that most of them were belong to fast-grower group. By using antibiotic resistant it was clearly showen that most of them were susceptible to erythromycin. Moreover, among these strains non of them produced α-monosidase and α-fucosidase. In case of *D. virgatus* rhizobia, one of them seemed to be the *Rhizobium tropici* and the rest were closely related in intraspecies level. This was confirmed by doing cross nodulation test between rhizobial strains and host plants, *Phaseolus vulgaris,* prior to detecting with direct nodule PCR approach, *nif*H and *nod*A PCR-RFLP and 16S rDNA sequences. However, when distinguish the other host plant rhizobia isolated from *C. pubescens*, *S. hamata* and *Ch. rotundifolia* by using random primers and RFLP of nod-PCR products, the result suggested that there were great divergents in each plant host. For *C pubescens* rhizobia, DASA24008 and DASA24015, sequences were aligned with the *B. japonicum* 83% identities and 100% identities but DASA24016 were aligned with *Rhizobium spp*. 16S rRNA gene, respectively. In case of *S. hamata* rhizobia both of DASA25005 and 25015 were aligned with *B. japonicum*, 94% identities, on the other hand strain DASA25005 were aligned with *R. etli*, 98%. *Ch.*

rotundifolia rhizobia, DASA29007 were aligned with *B. japonicum*, 96% identities, but DASA29015 were aligned with *Pseudomonas reactans*, 98% identities.

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนักศึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กมลลักษณ์ เทียมไธสง : คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีววิทยาอณูบางประการของไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูงในพืชอาหารสัตว์ตระกูลถั่ว
(SOME PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGY ASPECTS OF HIGH EFFIENCY N_2-FIXATION RHIZOBIAL STRAINS IN FORAGE LEGUMES) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. หนึ่ง เตียอำรุง, 93 หน้า, ISBN

พืชอาหารสัตว์ตระกูลถั่วเป็นแหล่งอาหารสัตว์ที่มีความสำคัญสำหรับการปศุสัตว์ เนื่องจากมีราคาถูกและมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูง ซึ่งได้รับการคัดเลือกจากกรมวิชาการเกษตรโดยพืชอาหารสัตว์ตระกูลถั่วสี่ชนิด ได้แก่ ถั่วไมยรา (*Desmanthus virgatus*),ถั่วฮามาตา (*Stylosanthes hamata*), ถั่วลาย (*Centrocema pubescens*) และถั่ววินแคสเซีย (*Chamaecrista rotundifolia*, Wynn Cassia) จากนั้นทำการศึกษาลักษณะของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยใช้ทั้งเทคนิคทางสรีรวิทยาและทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

เทคนิคทางสรีรวิทยาได้แก่ การผลิตกรดและเบส, ความสามารถในการผลิตกรดอินโดล (Indole Acetic Acid: IAA), ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ และความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 19 ชนิด ส่วนเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ได้แก่ การตรวจสอบ *nif* gene และ *nod* gene ด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่น, การใช้เทคนิคทาง PCR โดยใช้ REP และ RAPD เป็น primer, การใช้ *nif*H และ *nod*A เป็น primer สำหรับศึกษาโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และการใช้เทคนิคการหาลำดับเบสของ 16S rDNA

จากการศึกษาทั้งลักษณะทางสรีรวิทยาและการใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล พบว่าไรโซเบียมที่แยกได้จาก *D. virgatus* ทั้งหมดจะเป็นกลุ่มที่เจริญเร็ว และสามารถผลิต IAA ได้ ส่วนที่แยกได้จากพืชอาหารสัตว์ตระกูลถั่วชนิดอื่นจะพบทั้งที่เจริญเร็วและเจริญช้า ส่วนผลการศึกษาการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะพบว่า ส่วนมากจะมีความไวต่อ erythromycin นอกจากนี้ยังพบว่าเกือบทุกสายพันธุ์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ α-manosidase และ α-fucosidase โดยพบว่าไรโซเบียมที่แยกได้จาก *D. virgatus* บางสายพันธุ์จะมีความคล้ายคลึงกับ *R. tropici* มาก ซึ่งจากผลการปลูกเชื้อไขว้กับพืชอาศัย 2 ชนิดได้แก่ถั่วไมยรา และถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*) แสดงให้เห็นว่า DASA23047 คล้ายคลึงกับ *R. tropici* นอกจากนี้ผลของ *nif*H และ *nod*A PCR-RFLP แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า DASA23015, DASA23076, DASA23079 และ *R. tropici* มีความคล้ายคลึงกันมาก ซึ่งสามารถยืนยันจากผลของการหาลำดับเบสของ 16S rDNA

ส่วนไรโซเบียมที่แยกได้จากพืชอาหารสัตว์ชนิดอื่น พบว่า ในแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันค่อนข้างมากในพืชอาศัยชนิดเดียวกัน อย่างไรก็ตามเมื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนในพืชแต่ละชนิดมาศึกษาลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่า ไรโซเบียมที่แยกได้จากถั่วลาย สายพันธุ์ DASA24008 และ DASA24015 มีความคล้ายคลึงกับ *Bradyrhizobium japonicum* ถึง 83 และ 100% ตามลำดับ ส่วน DASA24016 มีความใกล้เคียงกับ *Rhizobium spp.* 93% ในกรณีของไรโซเบียมที่แยกได้จากถั่วฮามาตาพบว่าสายพันธุ์ DASA25005 และ DASA25015 มีความคล้ายคลึงกับ *B. japonicum* ถึง 94% ส่วนสายพันธุ์ DASA25008 มีความใกล้เคียงกับ *R. etli* ถึง 98% สำหรับไรโซเบียมที่แยกได้จากถั่ววินแคสเซีย จากผลการทดลองพบว่า DASA29015 นั้นไม่มีความคล้ายคลึงกับไรโซเบียมกลุ่มใดเลย แต่มีความใกล้เคียงกับ *Pseudomonas reactans* ถึง 98%

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนักศึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....