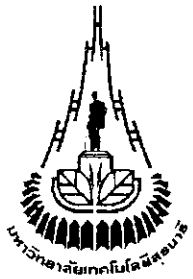
รหัสโครงการ SUT3-304-46-24-17



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ frankia ในประเทศไทย

(Genetics Diversity of Frankia in Thailand)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนตร

ดร. อัจฉรา นันทกิจ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2546-2547

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2550

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มอบทุนอุดหนุนการวิจัย ขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และขอขอบคุณบุคลากร ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ให้ความช่วยเหลือ จนทำให้คณะผู้วิจัยสามารถดำเนินโครงการสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ผู้วิจัย

30 มกราคม 2550

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างดิน 2 ลักษณะ ได้แก่ แถบชายฝั่งทะเล และแผ่นดินใหญ่พบว่าจำนวนประชากรของ *Frankia* จากดินทรายแถบชายฝั่งทะเลมีจำนวนของ *Frankia* ที่สร้างปมให้กับสนทะเล และสนประดิพัทธ์ ได้มากกว่าจากดินในแผ่นดินใหญ่ โดยจำนวนปมที่พบเมื่อการทำการปลูกสนทั้งสองชนิด ในดินที่มีปริมาณเท่ากันจากบริเวณชายฝั่งทะเล มีจำนวนปมอยู่ในช่วง 7-370 ปม/ต้น ในขณะที่จากแผ่นดินใหญ่พบจำนวนปมอยู่ในช่วง 0-155 ปม/ต้น จากตัวอย่างที่สุ่มเก็บมาจากปมที่สร้างขึ้นในตัวอย่างดินชนิดต่าง ๆ จำนวน 315 ปม/ต้น สามารถนำมาแยกและเพาะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้เพียง 18 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA (Acetylene Reduction Assay) พบว่าให้ประสิทธิภาพอยู่ในช่วง 40-90 μmol C_2H_4/g-dw/h ในการทดลอง cross inoculation กับสนทั้งสองชนิดของเชื้อ *Frankia* ที่แยกได้พบว่าไม่มีนัยที่บอกถึง host specificity นั่นคือ *Frankia* ที่แยกได้จากสนทะเล สามารถสร้างปมได้ในสนประดิพัทธ์ โดยให้จำนวนปมไม่แตกต่างกัน และเช่นเดียวกันกับเมื่อนำ *Frankia* จากสนประดิพัทธ์ปลูกลงไปในสนทะเล

จากผลการทดลองทาง DNA พบว่า *Frankia* ในดินประเทศไทยน่าจะมีความหลากหลายสูงมาก โดยดูจากจำนวนตัวอย่างที่สุ่มมา และสามารถเพิ่มจำนวนได้ 29 ตัวอย่าง ไม่มีตัวอย่างใดที่ให้แถบ DNA เป็นแบบเดียวกันเลย เมื่อทำการตรวจสอบจาก BOX-PCR เทคนิค และ Dendogram ที่ได้จากการทำ BOX-PCR นี้ไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ของ *Frankia* กับแหล่งอาศัยได้ จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่าง *Frankia* มาอ่านลำดับเบสของยีนชุด 16S rRNA พบว่า *Frankia* ที่แยกได้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ซึ่ง *Frankia* บางสายพันธุ์มีความใกล้ชิดกับ *Frankia* ที่แยกได้จากพืช *Alnus viridis* มากกว่าบางสายพันธุ์ที่แยกได้จากสนทะเล (ที่รวบรวมไว้ใน Genbank) ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ลำดับของ *nif* H gene พบว่า *Frankia* ที่แยกได้จากการทดลองครั้งนี้แยกได้ 2 กลุ่ม ซึ่งคล้ายกับ Phylogenetic tree ที่ได้จากลำดับเบสของ 16S rDNA กลุ่มที่แรกจะมีลำดับเบสของ *nif* H gene ใกล้เคียงกับ *Frankia* ใน Genbank (*Frankia* sp. Nodule FE37 : 0.36252) ในขณะที่อีกกลุ่มจะมีความคล้ายกับ *Frankia* สายพันธุ์อื่น ๆ ตัวอย่างที่ได้จากกลุ่มนี้ เช่น นครสวรรค์ ชุมพร ระยอง กระบี่ และประจวบคีรีขันธ์ จากผลการศึกษาครั้งนี้สิ่งที่แสดงให้เห็นชัดเจน คือ ดินในประเทศไทยมีความหลากหลายของ *Frankia* ที่สร้างปมและตรึงไนโตรเจนให้กับสนทะเล และสนประดิพัทธ์สูงมาก แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตร และสร้างองค์ความรู้ของ *Frankia* ให้มากขึ้น

Abstract

In order to investigate the population of *Frankia*, the soil samples were collected from both main land and coast sites in Thailand. The population numbers of *Frankia* isolated from coast sites generally showed higher amount than that of mainland sites. The nodule numbers from both *Casuriana equisetifolia* and *C. junghuniana* when trapped in both soil types were also investigated. The amount of nodules formed in soil sample from coast sites was in the range between 7-370 nodules while from mainland sites was 0-155 nodules.

The 315 nodules were obtained from various soil samples, only 18 isolated could be cultured. The nitrogenase activity (on the basis of Acetylene Reduction Assay : ARA) from these isolates was in the range between 40-90 μmol C_2 H_4/g-dw/h. The cross inoculation between both *Casuarianas* was conducted. The results suggested that host specificity was no significantly be observed. In order to, investigate the biodiversity of *Frankia* on basis of DNA technique, BOX-PCR technique was used. The results demonstrated that among 29 nodule samples, their DNA fingerprints were different. When the dendogram was generated along with their DNA fingerprint, the relationship between *Frankia* strain and habitat was not found.

When *Frankia* strains were analyzed on the basis of 16S rDNA, they could be divided into 2 main subgroups. Some strains showed more closely related to *Alnus viridis* Frankia than those of isolated from *C. equisetifolia*. On the other hand, when *nif*H regions were sequenced, it was also found 2 subgroups. The first subgroup was closely related to *Frankia* sp. Nodule FE37:0.36252 while the another subgroup showed similarity with other Frankia strains collected from Nakhonsawan, Chumporn, Rayong, Krabi ans Prajuabkirikhan provinces. From this study demonstrated the high diversity of *Frankia* as well as the potential to sue in agriculture practical.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	8
ขอบเขตของการวิจัย	8
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	8
การนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	8
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
แหล่งที่มาของข้อมูล	9
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	9
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	11
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
จำนวนประชากรของ *Frankia* ในสนทะเลและสนประดิพัทธ์ในดิน	12
การทดสอบยืนยันการแยกเชื้อ *Frankia* จากปมสนทะเลและสนประดิพัทธ์	15
การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Frankia* โดยใช้เทคนิค DNA	17
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย	
สรุปผลการวิจัย	21
ข้อเสนอแนะ	23
บรรณานุกรม	24
ภาคผนวก	27
ประวัติผู้วิจัย	28

สารบัญตาราง

ตารางที่	ชื่อตาราง	หน้า
1	สกุลของพืชกลุ่ม Actinorhizal	1
2	ภาวะการพึ่งพาแบบ Symbiosis ของเชื้อ *Frankia* ในปมรากของพืชอื่นที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว	4
3	รูปร่างลักษณะที่ใช้แยกชนิดของ *Frankia*	7
4	แสดงจำนวนปมของสนทะเลและสนประดิพัทธ์ที่เกิดจาก *Frankia* จากแหล่งดินต่าง ๆ	13
5	การทดสอบยืนยันการแยก *Frankia* จากปมและประสิทธิภาพการสร้างปมของสนทะเลและสนประดิพัทธ์	15

สารบัญภาพ

ภาพที่	ชื่อภาพ	หน้า
1	แสดง Dendogram ความหลากหลายของ *Frankia* เมื่อใช้ Box primer	17
2	แสดง PCR-product ของยีน 16S rDNA จากบางตัวอย่างของปุ่มต้นสน	18
3	แสดง Phylogenetic tree ของยีน 16S rDNA ของ *Frankia* ที่สุ่มทดสอบ	19
4	แสดง Dendogram จากการอ่านลำดับเบสของ *nif* H gene จากตัวอย่าง *Frankia*	20

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Frankia เป็นแบคทีเรียในพวก Actinomycetes มีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยมีความสามารถในการอยู่ร่วมอาศัยโดยก่อให้เกิดปมกับรากของพืชกลุ่มที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว (Non-leguminous) รวมถึงที่เป็นกลุ่ม Angiosperm กว่า 20 สกุล (Schwintzer และ Tjepkema, 1990) ดังนั้น การอยู่ร่วมกันระหว่าง *Frankia* กับกลุ่มพืชเหล่านี้บางครั้งเรียกว่า Actinorhizal -symbiosis ส่วนพืชกลุ่มนี้เรียกว่า Actinorhizal plant (Wall, 2000) ดังรวบรวมไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สกุลของพืชกลุ่ม Actinorhizal (ที่มา Torry, 1990)

Genus	Family	Number of Nodulated Species	Principal Geographic Distribution
Allocasuarina	Casuarinaceae	58	Aus
Alnus	Betulaceae	42	NAm, SAm, Eur, NAs, SAs
Casuarina	Casuarinaceae	18	Aus, SAs, NAf, NAm, SAm
Ceanothus	Rhamnaceae	31	NAm
Cercocarpus	Rosaceae	4	NAm
Ceuthostoma	Casuarinaceae	2*	Aus
Chamaebatia	Rosaceae	1	NAm
Colletia	Rhamnaceae	3	Eur, NAf, SAm
Comptonia	Myricaceae	1	NAm
Coriaria	Coriariaceae	16	NAm, SAm
Cowania	Rosaceae	1	NAm
Datisca	Datiscaceae	2	NAm, SAm
Discaria	Rhamnaceae	5	Sam, Eur, NZ
Dryas	Rosaceae	3	NAm, Eur
Eleagnus	Eleaegnaceae	35	NAs, NAm, Eur, SAs
Gymnostoma	Casuarinaceae	18	Aus

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Genus	Family	Number of Nodulated Species	Principal Geographic Distribution
Hippophae	Eleaegnaceae	2	Eur, NAs
Kentrothamus	Rhamnaceae	1	SAm
Myrica	Myricaceae	28	SAf, NAm, SAm, Aus, SAs, NAs
Purshia	Rosaceae	2	NAm
Retanilla	Rhamnaceae	1	SAm
Shepherdia	Eleaegnaceae	2	NAm
Talguenea	Rhamnaceae	1	SAm
Trevoa	Rhamnaceae	2	SAm

หมายเหตุ

Aus = Australia and/or Oceania, Eur = Europe, NAf = North Africa, NAm = North America, NAs = Northern Asia, SAf = Southern Africa, SAm = Aouth America, SAs = Southern Asia

* Lack of adequate collection make inclusion these taxa tentative.

นักวิทยาศาสตร์ได้จำแนก *Frankia* ให้อยู่ใน

Division Procaryotes

Class Bacteria

Order Actinomycetales

Family Frankiaceae

Genus *Frankia*

Frankia มีลักษณะเป็น pleomorphic organism ที่มีลักษณะเป็น multicellular และมีกระบวนการ differentiation ปกติแล้ว *Frankia* มีรูปร่างแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดใน 3 รูปแบบ คือ แบบ endophyte formed ซึ่งเป็นเส้นใยที่มีผนังกั้นแต่ละเซลล์ (branching septate hypha) โดยผนังเซลล์จะมี 2 ชั้น นอกจากนี้ยังพบว่า ในส่วนที่สอง *Frankia* ที่แยกออกจากปมรากพืช *Alnus glutinosa* เมื่ออยู่ในขั้นเจริญเติบโตเต็มที่ (mature stage) มีรูปร่างยาวหรือรี หรือเป็นรูปค่อนข้างกลม เรียก elongated หรือ spherical sporangia ตามลำดับ ลักษณะเซลล์มีผนังหนา ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 μm ขนาดความยาวประมาณ 60 μm แต่จะมีลักษณะแตกต่างกันหลายรูปแบบขึ้นกับสภาพ และอาหารเลี้ยงเชื้อ (media) คือ จะเป็นทั้ง spindle, granulated bodies และ bacteroide Braker และคณะ, 1979 แยกชนิดของ *Frankia* ตามลักษณะที่ปรากฏได้ 2 แบบ คือ แบบเส้นใย

(hyphae) และรูปแบบที่เป็นเหมือนเซลล์แบคทีเรีย (bacteroides) โดยจะดูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง รูปร่างที่ปรากฏแบบที่สามเป็นแบบ vesicle ที่เป็นส่วนที่ differentiate จากปลายของ hyphae ภายใต้สภาวะที่ขาดแหล่งอาหารไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย vesicle มีรูปร่างเป็นแบบกระบอง (club-shaped) หรือทรงกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 μm ปกติ vesicle เป็นส่วนที่เกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจนมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ภายในโดย vesicle มีลักษณะพิเศษคือ มีผนังหนาป้องกันก๊าซออกซิเจนไม่ให้แพร่เข้าไปในปริมาณที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Gauthier และคณะ, 1981) องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญที่พบใน vesicle ได้แก่ pentacyclic hopanoid lipid ที่คาดว่ามีบทบาทในการป้องกันการแพร่ผ่านของออกซิเจน (Barry, 1994)

***Frankia* และการอาศัยอยู่ร่วมกับพืช**

จากการศึกษาพบว่าพืชใบเลี้ยงคู่ตระกูล Casuarinaceae ที่ประกอบไปด้วยกว่า 90 ชนิด ซึ่งเป็นทั้งไม้พุ่ม ไม้ยืนต้น พบกระจายทั่วไปในธรรมชาติของทวีปออสเตรเลีย บางส่วนของทวีปเอเชีย และแถบโอโซเนีย (Torrey และ Berg, 1988) ได้แพร่กระจายปลูกในแถบเขตร้อน (Tropical) และกึ่งร้อน (Subtropical) ของโลก สำหรับใช้ประโยชน์หลาย ๆ ด้าน เช่น ปลูกเป็นแนวกันลม มีสมบัติพิเศษในการทนทานต่อความแห้งแล้ง แม้จะปลูกในพื้นที่ที่ไม่เหมาะสม รากของสนตระกูล Casuarinaceae ซึ่งรวมถึงสนทะเล (*Casuarina equisetifolia* J.R. & G Frost) และสนประดิพัทธ์ (*Casuarina junghuhniana*, Miq.) พบว่ามี *Frankia casuarinae* มาอาศัยอยู่ และทำให้เกิดปมรากขึ้นที่รากสน ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (Nitrogen fixing symbiosis) (Kathryn และคณะ, 1985; Torrey และ Racette, 1989) นำมาให้สนใช้ประโยชน์ได้ เมื่อต้นอ่อน (Seeding) ถูกย้ายไปปลูกพื้นที่แห่งใหม่ เชื้อ *Frankia* ก็จะถูกเคลื่อนย้ายไปด้วย โดยอยู่ในรูปของปมรากที่ปนไปกับดินหรือติดปมรากในต้นกล้าที่ถูกเคลื่อนย้าย (Lundquist และ Torrey, 1984) Bond (1976) พบว่า *Frankia* สามารถเข้าไปในรากไม้ยืนต้นประเภทใบเลี้ยงคู่ได้ถึง 7 ตระกูล (ตารางที่ 2) และสามารถทำให้เกิดการสร้างปม โดย *Frankia* จะอยู่อาศัยในภาวะ Symbiotics กับต้นพืชที่อาศัยอยู่ และยังพบว่าเชื้อ *Frankia* มีความจำเพาะเจาะจง (host specific) ในการเข้าไปอาศัยอยู่กับรากสน ด้วย (Reddell และ Bowen, 1986)

ตารางที่ 2 ภาวะการพึ่งพาแบบ Symbiosis ของเชื้อ *Frankia* ในปมรากของพืชอื่นที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว

Plant order	Plant family	Plant genus	*Frankia* species
Fagales	Betulaceae	*Alnus*	*1. F. alni*
Rhamnalas	Elaeagenaceae	*Hippophae*	*2. F. elaegni*
		Shepherdia	
	Rhamnaceae	*Discaria*	*3. F. discariae*
		Ceanothus	*4. F. ceanothi*
Coriariales	Coriariaceae	*Coriaria*	*5. F. coriaria*
Rosales	Rosaceae	*Dryas*	*6. F. dryalis*
		Purshia	*7. F. purshiae*
		Cercocarpus	*8. F. cercocarpi*
Myricales	Myricaceae	*Myrica*	*9. F. brunchorstii*
		Gale	
		Comptonia	
Casuarinales	Casuarinceae	*Casuarina*	*10. F. casuarine*

ที่มา : Bond (1976)

กระบวนการที่ *Frankia* เข้าสู่รากพืชนั้น เริ่มจากบริเวณดินโดยรอบรากของพืช (Rhizosphere) ซึ่งพบว่าสมบัติทางกายภาพที่มีผลในการส่งเสริมการเข้าสู่รากพืชคือค่า pH (Barry และ Sunell, 1990) โดยที่ค่า pH ที่ค่อนข้างต่ำจะยับยั้งการเข้าสร้างปมในพืช *Myrica gale* (Bond, 1951) นอกจากนี้ ปริมาณของไนเตรทที่สูงก็มีผลยับยั้งด้วยเช่นกัน (Benoit และ Berry, 1990) ในขณะที่ธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณเพียง 6 mM มีความจำเป็นมากต่อการเข้าปม (Jha และคณะ, 1993) แต่สารที่หลั่งออกมาจากรากพืชหรือที่เรียก Host root exudates ที่มากระตุ้น *Frankia* เองยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามตำแหน่งหน้าที่ *Frankia* จะเข้าสู่รากพืชได้มีเพียง 2 ตำแหน่ง ได้แก่ เข้าที่รากฝอย และบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ของราก เมื่อ *Frankia* เข้าสู่รากจะทำให้รูปร่างของรากเปลี่ยนไป เริ่มจากการเกิดเป็นกิ่งก้านมากขึ้น บวม พับซ้อนกันไปมา คาดว่าน่าจะเริ่มเกิดจากเอนไซม์ของ *Frankia* เอง (Berry และ Sumell, 1990) จากนั้นเซลล์ของพืชจะห่อหุ้มเซลล์ของ *Frankia* ไว้จนมีลักษณะที่เรียกว่า Encapsulation (Lechavelier และ Lechaelier, 1990)

ไม้สนทะเลและไม้สนประดิพัทธ์ : กลุ่มพืชที่งานวิจัยนี้ให้ความสำคัญ

ไม้สนทะเล ชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Casuarina equisetifolia* J.R. & G. Frost . ที่มีชื่อเรียกพื้นเมืองว่าสนทะเล กู (จำลองและคณะ, 2515) จัดอยู่ในตระกูล Casuarinaceae ลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ ความสูง 10-25 เมตร โตเต็มที่ความสูงถึง 50 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร ลำต้นเปลาตรง เรือนยอดรูปกรวยคว่ำ กิ่งย่อยสีเขียวเรียงเล็ก กิ่งทำมุมป้าน หรือตั้งฉากกับลำต้นและไม่เป็นระเบียบเหมือนสนประดิพัทธ์ เปลือกนอกสีน้ำตาลปนเทาคล้ายสนประดิพัทธ์ เปลือกแตกเป็นร่องตื้น ๆ ทำให้ลอกออกเป็นแผ่นเล็ก ๆ ห้อยตามลำต้น หรือแตกเป็นสะเก็ดเล็ก ๆ เปลือกในสีน้ำตาลแดง กระพี้สีน้ำตาลอ่อน แก่นสีอมน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตัวเป็นแบบช่อรอบกิ่งย่อย (whorl) มีจำนวน 5-8 ใบ ใบเป็นเกล็ด (scale like) ลักษณะคล้ายหนามแหลม ๆ รูปสามเหลี่ยมใบสีขาวอมเขียว ปลายกิ่งอ่อนมีสีเหลือง (สนประดิพัทธ์มีสีแดง) ไม่ผลัดใบ

สนทะเลเป็นไม้ท้องถิ่นของซีกโลกตอนใต้ตั้งแต่ อินเดีย โพลินีเซีย ออสเตรเลีย อินโดนีเซีย มาเลเซีย ศรีลังกา และไทย ในประเทศไทยจะพบสนทะเลขึ้นทั่วไปตามป่าชายหาดริมทะเล โดยเฉพาะทางภาคใต้ทั้งทางชายฝั่งตะวันออกและชายฝั่งตะวันตก ชอบขึ้นในที่ที่เป็นดินทรายและมีการระบายน้ำได้ดี มีประโยชน์ทั้งทางเนื้อ และลำต้น เช่น ทำเสาเข็ม เสาโป๊ะ เสากระโดง เสาสะพาน ทำแจวพาย ด้ามเครื่องมือ ใช้ในการก่อสร้าง ทำฟืน เผาถ่าน เปลือกให้สีน้ำตาลแกมแดง ใช้ย้อมผ้า อาบน้ำยา ทำไม้หมอนรางรถไฟ ปลูกเป็นไม้ประดับ และไม้ให้ร่ม

สนประดิพัทธ์ ชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Casuarina junghuhniana* Miq. มีชื่อเรียกพื้นเมืองว่า สนประดิพัทธ์ (จำลองและคณะ, 2515) จัดอยู่ในตระกูลเดียวกันกับไม้สนทะเล คือ ตระกูล Casuarinaceae ลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ ความสูง 15-25 เมตร ลำต้นเปลาตรง เรือนยอดเป็นรูปกรวยแหลม กิ่งขนาดเล็กทำมุมแหลมกับลำต้น และแตกเป็นระเบียบกว่าสนทะเล เปลือกนอกสีน้ำตาลปนเทาเหมือนสนทะเล เปลือกแตกเป็นสะเก็ดเล็ก ๆ หรือแตกเป็นร่องตื้น ๆ ทำให้เปลือกลอกเป็นแผ่นเล็ก ๆ ห้อยตามลำต้น เปลือกในสีน้ำตาลแดง กระพี้สีเหลืองอ่อน แกนสีน้ำตาล กิ่งย่อยสีเขียวเรียงเป็นรูปเข็มต่อกันเป็นปล้อง ๆ แต่ละกิ่งย่อยยาว 10-25 เซนติเมตร และไม่แยกแขนงต่อไป ใบเป็นแบบใบเดี่ยวเรียงตัวเป็นช่อ (whorl) มีจำนวน 8-10 ใบ (สนทะเล 5-8 ใบ) รอบกิ่งย่อยใบรูปร่างคล้าย ๆ เกล็ด ลักษณะเป็นหนามแหลม ๆ รูปสามเหลี่ยม ใบสีขาวอมเขียวปลายกิ่งอ่อนมีสีแดง (สนทะเลสีเหลือง) เป็นไม้ต่างประเทศโดยพระยาประดิพัทธ์ภูบาล นำเข้ามาปลูกในปี พ.ศ. 2433 จากประเทศออสเตรเลียเฉพาะต้นตัวผู้เท่านั้น สนประดิพัทธ์จึงมีเฉพาะต้นตัวผู้ ซึ่งจะออกดอกเพศผู้ประมาณเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม และเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน ผลในประเทศไทยสนประดิพัทธ์ไม่มีผล เพราะมีเฉพาะตัวผู้ สำหรับสนประดิพัทธ์ต้นตัวเมียมีใน

อินโดนีเซีย ศรีลังกา แต่เป็นพุ่ม แตกกิ่งก้านสาขาคล้ายสนทะเล การขยายพันธุ์ทำได้ด้วยการปักชำ โดยใช้ฮอร์โมน IBA (Indole Butyric Acid) เร่งราก (Lundquist และ Torrey, 1984; บุญชุบ และพิศาล, 2523) ประโยชน์เช่นเดียวกันกับไม้สนทะเล เนื้อไม้แข็ง ใช้ทำเสาเข็ม เสาโป๊ะ เสาสะพาน เสากระโดงเรือ ทำฟืน เผาถ่าน ปลูกเป็นไม้ประดับ และไม้ให้ร่ม

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของ *Frankia* โดยใช้เทคนิคทาง DNA

แต่เดิมการจำแนกชนิดของ *Frankia* หรือการทำอนุกรมวิธานก็ดี ได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ตารางที่ 3) เป็นส่วนใหญ่ แต่เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่า *Frankia* เป็นแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงค่อนข้างลำบาก บางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญในอาหารสังเคราะห์ได้ ประกอบกับเทคโนโลยีทาง DNA เข้ามามีบทบาทมากขึ้นในปัจจุบัน ดังนั้น การจำแนกหรือการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพจึงได้หันมาใช้เทคนิคทางด้านนี้มากขึ้น ดังเช่นในปี 1991 Simonet และคณะ ได้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *Frankia* โดยใช้บริเวณ IGS (Intergenic space) ที่อยู่ระหว่างยีนที่ควบคุมการตรึงไนโตรเจน *nif H* และ *nif D* หรือ *nif D-K* (Jamann และคณะ 1993) ในการวิเคราะห์ หาความแตกต่างของลำดับเบสในบริเวณดังกล่าว จากนั้นในปี 1996 Normound และคณะ ได้ทำการเปรียบเทียบหาลำดับเบสจากยีนชุด 16S rDNA ของ *Frankia* ใน pure culture และจากปมของรากพืชกลุ่ม Actinorrhizal ต่าง ๆ พบว่าในปมของรากพืชเหล่านี้ล้วนเป็นแต่จีนัส *Frankia* ทั้งสิ้น หรือแม้กระทั่งการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP (Restriction Frangment Length Polymorphism) ร่วมกับ 16S rDNA-PCR (McEwan และคณะ, 1994) หรือ IGS ของ 16-23SrDNA (Maggia และคณะ 1992) ก็ได้เคยนำมาใช้ศึกษาหาความหลากหลายของ *Frankia* กับรากต้นสนทะเลในบริเวณแอฟริกาตะวันตก Huguet และคณะ 2000 ได้ศึกษาความหลากหลาย และความจำเพาะเจาะจงต่อพืชโดยการวิเคราะห์ยีนที่ถูกเพิ่มจำนวนจากปมโดยตรง พบว่าพืชในกลุ่ม *Myrica gale* มักพบ *F. alni* อาศัยอยู่และมีความหลากหลายต่ำ ในขณะที่ *Frankia* จากปมพืช *Alnus incana* สามารถเกิดปมรวมไปถึงพืชกลุ่ม *Casuarina* ได้เป็นต้น

ในส่วนของประเทศไทยเองจัดได้ว่าการศึกษาในเรื่องของ *Frankia* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชตระกูล *Casuarina* มีน้อยมากโดยเฉพาะในประเด็นของการแยก และเก็บรักษารวบรวมเชื้อ (Culture collection) ความหลากหลายทางชีวภาพทั้งในระดับสัณฐานวิทยาและชีววิทยาอนู ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นสร้างฐาน และองค์ความรู้ของทรัพยากรในประเทศที่ยังไม่เคยมีใครทำมาก่อน เพื่อที่จะได้เป็นข้อมูลสำคัญในการอนุรักษ์ และการใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 3 รูปร่างลักษณะที่ใช้แยกชนิดของ *Frankia*

Species	Hyphae				Bacteria like cells or "bacteroids" μm
	Terminal swellinge				
	Diameter μm	Spherical (s) or Club-shaped (Sc)	Diameter[2] μm	Length μm	
A. Nodule Coralloid					
1. *F.alni*	0.3-0.5	s	3.0-5.0		0.5-1.5
			6.0-8.0[3]		
2. *F. elaeagni*[1]	0.3-5.0	s	2.5-4.0		0.3-0.9
			1.8-2.2[3]		
3. *F discariae*[1]	0.3-0.4	s	ca 4.0		not know
4. *F. cearothi*	0.3-0.4	sc	1.5-3.0[4]		not know
5. *F. cariariae*	0.4-0.7	c	1.2-1.3	9.0-12.0	not know
6. *F. dryadis*	0.5-0.8	c	1.5-2.0	1.5-5.0	1.0-2.0
7. *F. purshiae*[1]	0.3-0.5	sc	2.2-4.4	2.2-5.5	not know
8. *F. cercarpi*[1]	0.3-0.5	c	3.0	4.0	not know
B. Rhizothamia produced					
9. *F. bruncharstii*	1.2-2.8	c	1.6-2.4	7.5-12.5	1.5-2.5
10. *F. casuarinae*	0.3-0.5	c	0.6-1.5	3.0-4.0	0.4-1.0

[1] สปีชีส์ที่ 2, 3, 7 และ 8 ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscopy) เท่านั้น ชนิดอื่น ๆ ใช้กล้องแบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Light and electron microscopy)

[2]. ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ spherical cell (vesicle) เส้นผ่าศูนย์กลางของ club-shaped ในส่วนที่กว้างที่สุด

[3] ขนาดที่พบได้ยากมาก

[4]. รูปร่างแบบทรงกระบอก (club-shaped) ในระยะแรกเริ่ม ต่อมากลายเป็นแบบถุง (vesicle)

ที่มา : Becking (1974)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสร้างฐานและองค์ความรู้ทางความหลากหลายทางชีวภาพของ *Frankia* โดยมุ่งเน้นการใช้เทคนิคทางชีววิทยาอณูหรือ DNA
2. เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของ *Frankia* กับชนิดของพืชตระกูล *Casuariana* ในประเทศ และนิเวศวิทยาของพืชรวมไปถึงกลุ่มของ *Frankia* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ได้
3. เพื่อสร้าง Culture collection ของ *Frankia* ในประเทศไว้ให้กับแหล่งรวมรวบสายพันธุ์จุลินทรีย์ในประเทศไทย

ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างปมรากสนและดิน บริเวณใกล้เคียงในระบบนิเวศชายทะเลและแผ่นดินใหญ่ มาเปรียบเทียบความหลากหลายทางชีวภาพว่ามีความสัมพันธ์กันเพียงใด โดยใช้เทคนิคด้าน DNA และการอ่านลำดับเบสบนยีนกลุ่ม 16S rDNA ในขณะเดียวกันจะทำการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ เพื่อส่งต่อให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องต่อไป ในส่วนของการหาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในต้นสนคาดว่าจะทำได้เมื่อได้สายสายพันธุ์ *Frankia* ในปริมาณหนึ่ง โดยอาจจะเขียนเป็นโครงการต่อยอดในปีต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้องค์ความรู้ใหม่ของทรัพยากร *Frankia* ในประเทศที่ยังไม่เคยมีผู้ศึกษาในระดับชีววิทยาอณูมาก่อน
2. สามารถเพิ่มกลุ่มของจุลินทรีย์ให้กับหน่วยงานที่เก็บรักษาเชื้อของประเทศ
3. สามารถรวบรวมสายพันธุ์ที่ในอนาคตจะสามารถนำไปใช้ประยุกต์ในเชิงปุ๋ยชีวภาพกับการปลูกต้นสนทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ (มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูง)

การนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ส่งมอบให้กรมวิชาการเกษตร และกรมพัฒนาที่ดินจะสามารถนำสายพันธุ์ *Frankia* ประสิทธิภาพสูงไปใช้ในส่วนที่เกี่ยวข้อง
2. ส่งมอบเชื้อให้แก่หน่วยงานที่เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ของประเทศ เช่น ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แหล่งที่มาของข้อมูล

การเก็บตัวอย่างดินและปมรากสนทะเลและสนประดิพัทธ์

ทำการเก็บตัวอย่างดินและปมรากของสนทะเล และสนประดิพัทธ์จากบริเวณต่าง ๆ ในประเทศเพียงครั้งเดียวในบริเวณ ดังต่อไปนี้

ก. บริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออก (จ. ชลบุรี)

ข. บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย (จ. ประจวบคีรีขันธ์)

ค. บริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน (จ. ระนอง)

ง. บริเวณแผ่นดินใหญ่ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้ (ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5)

ปริมาณของดินที่เก็บแต่ละตัวอย่างให้ได้น้ำหนัก 1 กิโลกรัม ทำการเก็บรักษาในถังน้ำแข็งขณะเดินทาง

2. วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

2.1 การหาจำนวนประชากรและรวบรวมสายพันธุ์

การแยกเชื้อ *Frankia* จากปมรากพืชดำเนินการโดย

วิธีที่หนึ่ง นำปมรากพืชที่ล้างสะอาด และผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสารละลาย Cholrox 25% 3 นาทีตามด้วย 95% เอธานอล 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2-3 ครั้ง จากนั้นนำมาเลี้ยงในสูตรอาหาร Yeast Extract Medium (YEM) แล้วคัดเอาแต่ละหลอดที่ไม่มีการปนเปื้อน (contaminate) ซึ่งจะเป็นหลอดที่ใส จากนั้นนำปมที่ไม่มีการปนเปื้อนมาบดแล้วเลี้ยงในอาหารสำหรับแยกเชื้อ *Frankia* เกิดขึ้น ซึ่งจะต้องนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Defined Propionate Media (DPM) บ่มเชื้อในอุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเพิ่มปริมาณมากขึ้น (Braker และคณะ 1979a, b, Boonkerd และคณะ, 1985)

วิธีที่สอง แยกโดยการอาศัยความหนาแน่นของน้ำตาล (Sucrose fractionation gradient) จะใช้ปมที่สะอาดและผ่านการฆ่าเชื้อตามวิธีที่ 1 0.5 กรัมมาบดให้ละเอียดแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร แล้วนำมาแยกในหลอดทดสอบที่มีสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับในสัดส่วนที่แตกต่างกันดังนี้ ชั้นล่างสุดความเข้มข้น 2.5 โมล 3 ส่วน ชั้นถัดขึ้นมา ความเข้มข้น 1.6 โมล 3 ส่วน และชั้นถัดขึ้นมา ความเข้มข้น 1.0 โมล 2 ส่วน ชั้นบนสุดเป็นสารละลายของปม

ตัวอย่าง 2 ส่วน จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (centrifuge) ในอัตรา 1,500 รอบต่อนาที (rpm) 8-10 ชั่วโมง สารละลายจะแยกเป็นชั้น ๆ โดยสารละลายของปมตัวอย่างจะแยกอยู่ในชั้นที่ 2 สารละลายน้ำตาลชั้นแรกจะถูกดูดทิ้งไปซึ่งจะเหลือแต่สารละลายของปมตัวอย่าง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร DPM ผสมวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ไว้ประมาณ 4-8 สัปดาห์ซึ่ง colony ของเชื้อ *Frankia* จะเริ่มปรากฏปะปนกับ colony ของเชื้อราและแบคทีเรีย จากนั้นก็เลือกเอา colony ที่เป็น *Frankia* โดยอาศัยการเรืองแสงเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร DMP บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนเชื้อเพิ่มปริมาณมากขึ้น จากนั้นทำการตรวจนับและคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป และเก็บรักษาไว้ในอาหารสูตรเดิมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของ *Frankia* ที่แยกได้และที่อาศัยในปมรากโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาอณู

ก. *การสกัด Chromosomal DNA ของ Frankia ที่แยกได้*

นำ *Frankia* ที่เพาะแยกเก็บไว้ในอาหารรูป slant มาขูด spore เพื่อเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตรเดียวกันแต่ไม่ใส่วุ้น จากนั้นเมื่อได้เซลล์ที่มีปริมาณพอสมควรจึงสกัด Chromosomal DNA โดยอาศัยหลักการตามวิธีการของ Binch และ Cullum (1985) แล้วจึงนำไปใช้ร่วมกับเทคนิค PCR ต่อไป

ข. *การสกัด Chromosomal DNA ของ Frankia* โดยตรงจากปมรากสน

นำปมที่เก็บมาได้ทำการฆ่าเชื้อรอบผิวปม ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มี Tween 80 เป็นเวลา 4-5 นาที จากนั้นตามด้วยสารละลายที่มี 10% H_2O_2, 25% Ethanol และ 0.5% Tween 80 ด้วยการเขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อซ้ำอีกครั้ง นำปมที่ล้างแล้วมาบดใน liquid nitrogen ทำการสกัดโดยใช้ SDS และ Proteinase-K จากนั้นตามด้วยการสกัดโดย Phenol-chloroform ตกตะกอน DNA ด้วย absolute ethanol จนได้ตะกอน DNA แล้วจึงกำจัด RNA โดย RNase A แล้วนำไปเป็น DNA template ในการวิเคราะห์ PCR ต่อไป

ค. *Primer ที่ใช้และสภาพการเพิ่มจำนวนชุดของ DNA*

ในการทดลองนี้จะเลือกใช้ Primer และสภาพการทำ PCR ที่มีผู้ทำวิจัยมาก่อนแล้วเพื่อที่จะได้ข้อมูลมาตรฐานและสามารถทำการเปรียบเทียบได้ใน Genbank โดยใช้ Primer ชุด FGPS 849', 5'-GCCTTGGGAGTACGGCGGCCGA-3' และ Primer ชุด FGPS 1146', 5'-GCGGCA TGATGACTTGACGTC-3' ใช้เพิ่มจำนวนชุดของยีน 16S rDNA ในส่วน BOX A1R primer มีลำดับดังนี้ 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGAC-3' และ *nif* H primer มีลำดับดังนี้ primer 1: 5'-AT(GC)AGGT(TCGA)AC(TCGA)GCCTT-3' และ primer 2 : 5'-AT(GC)GA(AG)T

(AT)CAACTTCTCCGG-3' สำหรับการเพิ่มจำนวนชุดของยีน 16S rDNA กระทำโดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 µl ประกอบไปด้วย template DNA, reaction buffer (10mM Tris-HCl [pH 8.3], 1.5 mM Mg Cl_2, 50 mM KCl) 200 µM ของแต่ละ deoxynucleoside triphosphate, 1 µM primers และ 2 U ของ Tag I DNA polymerase ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนใช้ทั้งสิ้น 30 รอบ โดยเริ่มจากกระบวนการ Denaturation ที่ 93 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, Annealing ที่ 57 องศาเซลเซียส 1 นาที และ Extension ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

การเพิ่มจำนวนชุดของยีน BOXAIR ใช้ Reaction mixture เช่นเดียวกับการเพิ่มจำนวนชุดของยีน 16S rDNA ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนชุด DNA ทำโดย denature ที่ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 1 รอบ, อีก 30 รอบทำโดย 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที, 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 65 องศาเซลเซียส 8 นาทีอีก 1 รอบ

ส่วนการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *nif* H ใช้ DNA template ในปริมาณ 50 mg , primer 1 และ 2 ในปริมาณ 0.95 และ 1.025 pm ตามลำดับ, Deoxynucleoside triphosphate 200 µM, $MgCl_2$ 1.5 mM และ reaction buffer ปฏิกิริยาที่ใช้เพิ่มจำนวนประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที ในรอบแรก, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 35 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 60 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 5 รอบ ตามด้วย 35 องศาเซลเซียส 3 นาที และ 60 องศาเซลเซียส 2 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ ตามด้วย 1 รอบที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที การเพิ่มจำนวนชุดของ DNA ใช้เครื่อง PCR Sprint Temperature Cycling System ของ Hybrid, UK. จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งหมดมาตรวจสอบใน 1.0% Agarose โดยวิธี Electrophoresis ที่ 80 Volt ย้อม DNA เพื่อตรวจสอบโดยใช้ Ethidiumbromide (Normand และ Chapelnon 1997)

3. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 ทำการอ่านลำดับเบสของ PCR-product โดยใช้ DNA Sequance ของ Applied Biosystem รุ่น 310

3.2 นำลำดับเบสที่ได้วิเคราะห์กับข้อมูลใน Genbank โดยโปรแกรม BLAST

3.3 สร้าง Phylogenetic tree แบบ Neighbor Joining โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL ประกอบกับ Bootstraping analysis

3.4 นำผลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์และหาความสัมพันธ์ตามวัตถุประสงค์ข้อที่ 2 และทำการเปรียบเทียบเพื่อดูความแตกต่างของ *Frankia* ที่เพาะได้กับ *Frankia* ในปม

4. การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

หลังจากทำการปลูกกล้าต้นสนเป็นเวลา 45 วัน ทำการถอนออกจากกระถาง นำต้นและรากมาใส่ในหลอดบรรจุก๊าซ จากนั้นฉีดก๊าซ acetylene (บริษัท Thai Industrial Gas จำกัด) เข้าไปให้ได้ปริมาตร 10% ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างก๊าซไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ Gas Chromatography (GC) โดยใช้ porapak N-column

บทที่ 3

ผลการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Frankia* ที่สร้างปมในพืชตระกูลสนทะเล และสนประดิพัทธ์ในประเทศไทย

ผลการศึกษามีรายละเอียดดังนี้

1. จำนวนประชากรของ *Frankia* ในสนทะเลและสนประดิพัทธ์ในดิน

นำยอดอ่อนของสนทะเล และสนประดิพัทธ์ ความยาวประมาณ 7 เซนติเมตร มาทำการเพาะให้เกิดรากในสารละลาย Hoagland'solution ที่เติมฮอร์โมน IBA (Indole Butaric acid) ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 45 วัน จนมีรากงอก จากนั้นนำไปปลูกในดินที่เก็บมาใต้ชั้นควบคุมแสง 300 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ ให้แสงช่วง 6.00-18.00 อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) ทำการปลูกตัวอย่างดินละ 3 ซ้ำ ใน Leonard's Jar โดยใช้ดิน 250 กรัมต่อกระถาง เมื่อครบเวลา 60 วัน ทำการถอนและนับจำนวนปม ดังแสดงผลในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนปมของสนทะเลและสนประดิพัทธ์ที่เกิดจาก *Frankia* จากแหล่งดินต่าง ๆ

สนทะเล		สนประดิพัทธ์	
แหล่งดิน	จำนวนปม/ต้น	แหล่งดิน	จำนวนปม/ต้น
พื้นที่ป่า		**พื้นที่ป่า**	
1. จันทบุรี	35	1. จันทบุรี	40
2. ระยอง	25	2. ระยอง	17
3. ชลบุรี	10	3. ชลบุรี	10
4. เพชรบุรี	155	4. เพชรบุรี	92
5. ประจวบคีรีขันธ์	87	5. ประจวบคีรีขันธ์	50
6. ระนอง	29	6. ระนอง	40
7. สุราษฎร์ธานี	40	7. สุราษฎร์ธานี	32
8. นครศรีธรรมราช	76	8. นครศรีธรรมราช	68
9. พังงา	47	9. พังงา	55
10. กระบี่	-	10. กระบี่	30
11. ภูเก็ต	-	11. ภูเก็ต	10

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สนทะเล		สนประดิพัทธ์	
แหล่งดิน	จำนวนปม/ต้น	แหล่งดิน	จำนวนปม/ต้น
12. ชุมพร	26	12. ชุมพร	180
13. กำแพงเพชร	-	13. กำแพงเพชร	60
14. ชัยนาท	40	14. ชัยนาท	60
15. นครสวรรค์	145	15. นครสวรรค์	72
16. เชียงใหม่	69	16. เชียงใหม่	40
17. ลำปาง	30	17. ลำปาง	10
18. ลำพูน	67	18. ลำพูน	42
พื้นที่ชายฝั่งทะเล		**พื้นที่ชายฝั่งทะเล**	
1. จันทบุรี	378	1. จันทบุรี	210
2. ระยอง	71	2. ระยอง	82
3. ชลบุรี	234	3. ชลบุรี	190
4. เพชรบุรี	129	4. เพชรบุรี	165
5. ประจวบคีรีขันธ์	95	5. ประจวบคีรีขันธ์	110
6. ระนอง	152	6. ระนอง	124
7. สุราษฎร์ธานี	125	7. สุราษฎร์ธานี	90
8. นครศรีธรรมราช	133	8. นครศรีธรรมราช	140
9. พังงา	47	9. พังงา	80
10. กระบี่	129	10. กระบี่	140
11. ภูเก็ต	72	11. ภูเก็ต	80
12. ชุมพร	81	12. ชุมพร	120

จากผลการทดลอง เมื่อใช้เทคนิค Plant Trap แล้วนับจำนวนปมเพื่อบ่งบอกถึงประชากรของ *Frankia* ทางอ้อม พบว่าโดยทั่วไปจำนวนประชากรของ *Frankia* ที่สามารถเข้าอาศัยสร้างปมกับสนทะเลและสนประดิพัทธ์ในดินแต่ละตัวอย่างมีจำนวนไม่แตกต่างกัน ในขณะที่จำนวนประชากรของ *Frankia* ที่เข้าอาศัยกับสนทั้งสองชนิด มีจำนวนค่อนข้างมากจากตัวอย่างดินที่เก็บจากชายฝั่งทะเล (ช่วง 40-370 ปม/ต้น) ในขณะที่มีประชากรค่อนข้างน้อยจากตัวอย่างดินบนแผ่นดินใหญ่ (ช่วง 0-150 ปม/ต้น)

2. การทดสอบยืนยันการแยกเชื้อ *Frankia* จากปมสนทะเลและสนประดิพัทธ์

นำปมที่เก็บได้จากผลการทดลองในตารางที่ 4 และที่เก็บจากปมของต้นสนมาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการทดสอบย้อนกลับว่าเชื้อที่แยกได้เป็น *Frankia* ที่สร้างปมได้หรือไม่ พร้อมกับตรวจสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ในการทดลองได้แยกเชื้อจากทุกตัวอย่างดินและปมที่เก็บมา จำนวนปมทั้งสิ้น 315 ปม/ต้น แต่สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งสิ้น จำนวน 18 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างปมได้ทั้งสนทะเลและสนประดิพัทธ์ ผลการทดลองดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การทดสอบยืนยันการแยก *Frankia* จากปมและประสิทธิภาพการสร้างปมของสนทะเลและสนประดิพัทธ์

ตัวอย่างดิน/ชนิดของสน	จำนวนปม (ต่อต้น)	Nitrogenase activity (μmolCH$_4$/gDW/h)	ลักษณะปม
1. จันทบุรี (ประดิพัทธ์) (ชายฝั่งทะเล)	122	68 $\pm$7.2	ขนาดเล็กความยาวประมาณ 0.2 เซนติเมตร แต่ละปมมักประกอบด้วย 3 lobes
2. จันทบุรี (ทะเล) (ชายฝั่งทะเล)	149	72 $\pm$2.1	ขนาดเล็ก มีทั้ง single lobe และ 2-3 lobes
3. จันทบุรี (ทะเล) (แผ่นดินใหญ่)	138	80 $\pm$6.1	ขนาดใหญ่มีความยาวประมาณ 0.3 เซนติเมตร เกาะกันเป็นกลุ่ม
4. ระยอง (ทะเล) (แผ่นดินใหญ่)	380	69 $\pm$2.8	ขนาดใหญ่ เกาะกันเป็นกลุ่ม
5. ระยอง (ประดิพัทธ์) (แผ่นดินใหญ่)	200	44 $\pm$1.5	ขนาดใหญ่ เกาะกันเป็นกลุ่ม
6. ชลบุรี (ทะเล) (ชายฝั่งทะเล)	140	68 $\pm$2.5	ขนาดใหญ่ เกาะกันเป็นกลุ่ม
7. ชลบุรี (ประดิพัทธ์) (ทะเล)	160	82 $\pm$1.6	ขนาดเล็ก มีทั้ง single lobe และ เกาะกันเป็นกลุ่ม
8. เพชรบุรี (ทะเล) (ชายฝั่งทะเล)	170	92 $\pm$4.1	ขนาดเล็ก ส่วนใหญ่เป็น single lobe

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ตัวอย่างดิน/ชนิดของสน	จำนวนปม (ต่อต้น)	Nitrogenase activity ($\mu molCH_4/gDW/h$)	ลักษณะปม
9. เพชรบุรี (ประดิพัทธ์) (ชายฝั่งทะเล)	200	70 $\pm$1.6	ขนาดเล็ก ส่วนใหญ่เป็น single lobe
10. ประจวบคีรีขันธ์ (ทะเล) (ชายฝั่งทะเล)	160	84$\pm$2.3	ขนาดเล็ก ส่วนใหญ่เป็น single lobe
11. ประจวบคีรีขันธ์ (ทะเล) (แผ่นดินใหญ่)	100	39$\pm$4.5	ขนาดใหญ่ เกาะกันเป็นกลุ่ม
12. สุราษฎร์ธานี (ประดิพัทธ์) (ชายฝั่งทะเล)	70	48 $\pm$3.5	ขนาดใหญ่ เกาะกันเป็นกลุ่ม
13. พังงา (ทะเล) (ชายฝั่งทะเล)	150	85$\pm$2.7	ขนาดเล็ก เกาะกันเป็นกลุ่ม
14. พังงา (ประดิพัทธ์) (ชายฝั่งทะเล)	120	76 $\pm$3.1	ขนาดเล็ก เกาะกันเป็นกลุ่ม
15. นครสวรรค์ (ทะเล)	80	44 $\pm$4.6	ขนาดเล็ก เกาะกันเป็นกลุ่ม
16. เชียงใหม่ (ประดิพัทธ์)	100	47 $\pm$5.4	ขนาดกลาง เกาะกันเป็นกลุ่ม
17. ลำพูน (ทะเล)	20	54$\pm$6.5	ขนาดเล็ก เป็น single lobe
18. ลำพูน (ประดิพัทธ์)	35	39$\pm$1.2	ขนาดเล็ก เป็น single lobe

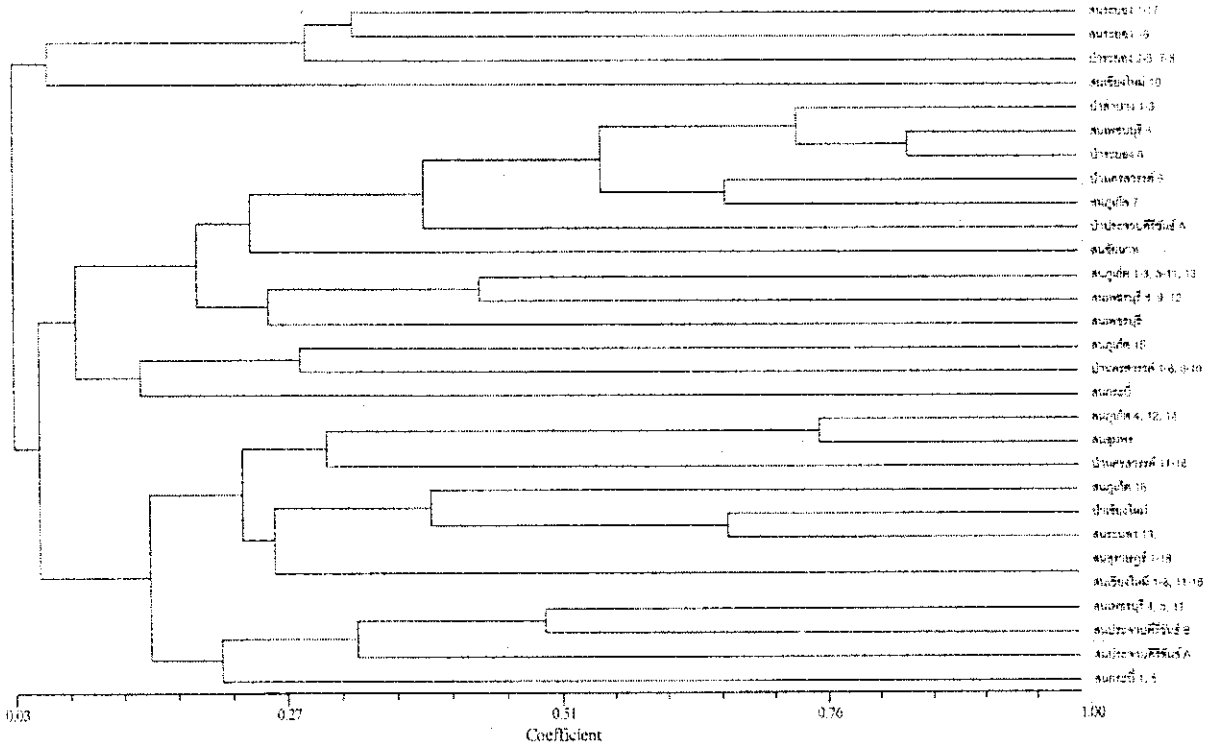
หมายเหตุ ขนาดเล็ก กว้าง x ยาว = <0.1-<0.5 เซนติเมตร
ขนาดกลาง กว้าง x ยาว = 0.1- 0.5 เซนติเมตร
ขนาดใหญ่ กว้าง x ยาว = 0.3 - 1.0 เซนติเมตร

จากการทดลองนี้พบว่าปัญหาอุปสรรค ซึ่งพบทั่วไปในการวิจัย *Frankia* คือการแยกเชื้อบริสุทธิ์ทำได้ลำบาก เนื่องจาก *Frankia* เจริญได้ช้าในอาหารสังเคราะห์ (บางไอโซเลทใช้เวลากว่า 3 เดือน) เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมด สามารถสร้างปมได้อยู่ในช่วงตั้งแต่ 20-200 ปมต่อต้น ซึ่งอยู่กับลักษณะจำเพาะของแต่ละไอโซเลท และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 39-92 $\mu molCH_4/gDW/h$

นอกจากนี้ ยังทำการทดสอบ Cross Nodulation ระหว่างพืชอาศัยสนทะเลและสนประดิพัทธ์ พบว่าไม่มีความจำเพาะเจาะจง (Host Specificity) ระหว่าง *Frankia* และสนทั้งสองชนิด รวมไปถึงจำนวนปมก็ไม่แตกต่างกัน (ไม่ได้แสดงผลเพราะข้อมูลมีลักษณะคล้ายในตารางที่ 4)

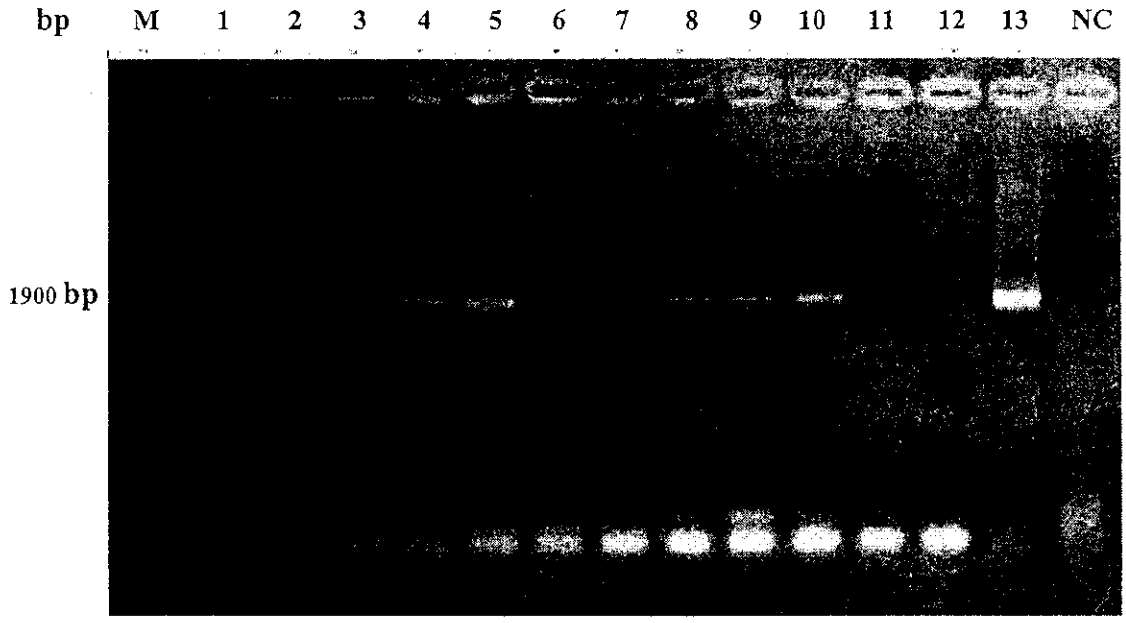
3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Frankia* โดยใช้เทคนิค DNA

ทำการสกัด DNA โดยตรงจากปมของสนทั้งสองชนิด จากนั้นศึกษาความหลากหลายโดยใช้ Box DNA primer พบว่าขนาดและจำนวนของแถบ DNA ที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 5 kb จนถึง 300 kb มีจำนวนอยู่ในช่วง 4-12 แถบ ทั้งนี้ มีจำนวนตัวอย่างปมจำนวนมากที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ อย่างไรก็ตาม จำนวนปมที่เพิ่มจำนวน DNA ได้ในการทดลองครั้งนี้มี 29 ตัวอย่าง และพบว่าทั้ง 29 ตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน และ Dendogram ที่ได้ไม่สามารถแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกับแหล่งอาศัยของเชื้อ



ภาพที่ 1 แสดง Dendogram ความหลากหลายของ *Frankia* เมื่อใช้ Box primer

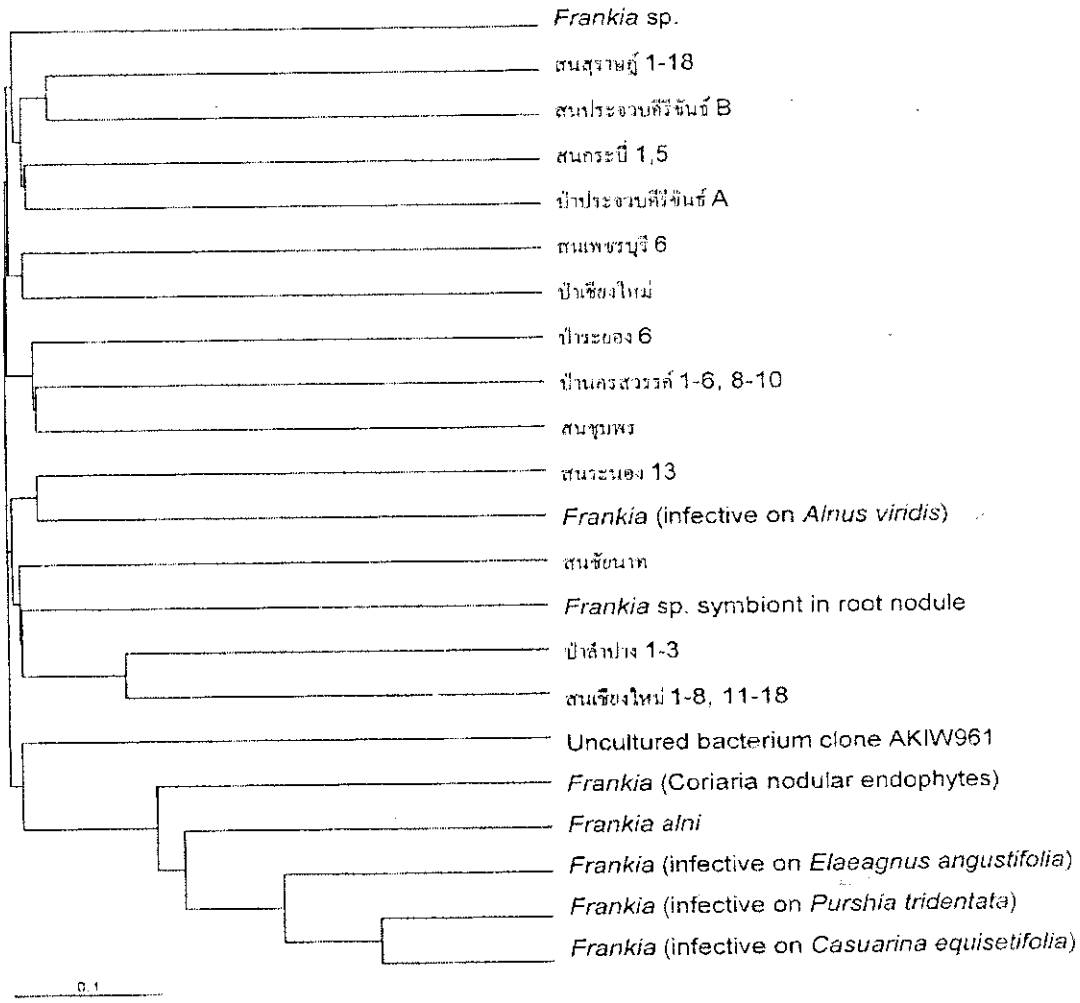
จากนั้นทำการสุ่มเลือกตัวอย่างไอโซเลทจาก Dendogram มาทำการอ่านลำดับเบสของยีน 16S rDNA ตัวอย่างที่คัดเลือกมาจากแต่ละ cluster ได้แก่ 1) เชียงใหม่ (สนทะเล) 2) ลำปาง (สนประดิพัทธ์) 3) ระยอง (สนทะเล/แผ่นดินใหญ่) 4) ชัยนาท (ประดิพัทธ์) 5) นครสวรรค์ (สนทะเล) 6) ชุมพร (สนทะเล/ชายฝั่งทะเล) 7) ระนอง (ประดิพัทธ์/ชายฝั่งทะเล) 8) สุราษฎร์ธานี (สนทะเล/ชายฝั่งทะเล) และ 9) กระบี่ (สนทะเล/ชายฝั่งทะเล) ขนาดของ PCR-product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชุดยีน 16S rDNA พบว่าทุกตัวอย่างมีขนาดที่ 1500 bp บางตัวอย่างพบว่ามียีนนี้มากกว่า 1 copy เช่น จากปมที่ได้จากดินในจังหวัดเชียงใหม่ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดง PCR-product ของยีน 16S rDNA จากบางตัวอย่างของปมต้นสน

หมายเหตุ lane 1 = SU5 (สุราษฎร์ธานี 1-8), lane 2 = CM (ป่าเชียงใหม่), lane 3 = RN13 (สนระนอง 13), lane 4 = NS7 (ป่านครสวรรค์ 1-6, 8-10), lane 5 = CMU (สนเชียงใหม่), lane 6 = PR 6 (สนเพชรบุรี 6), lane 7 = RY 6 (ป่าระยอง 6), lane 8 = LP1 (ป่าลำปาง 1-3), lane 9 = HHB (สนราษฎร์ธานี 1-8), lane 10 = SU5 (สุราษฎร์ธานี 1-8), lane 11 = SU5 (สุราษฎร์ธานี 1-8), lane 12 = SU5 (สุราษฎร์ธานี 1-8), lane 13 = CN (สนชัยนาท)

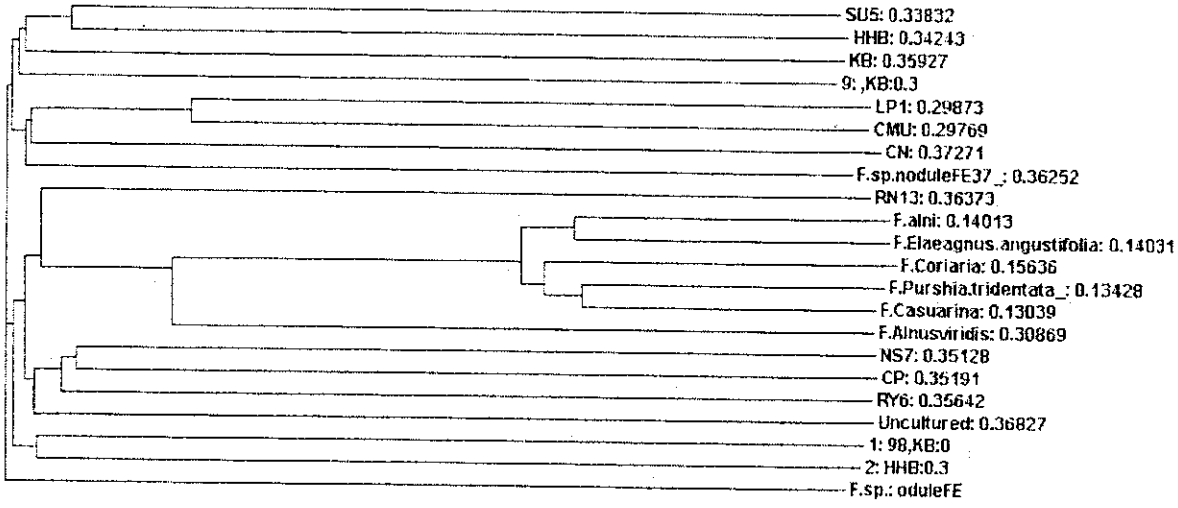
จากนั้นนำ PCR-product ที่ได้ไปอ่านลำดับเบส และจึงไปวิเคราะห์สร้าง Phylogenetic tree (ภาพที่ 3) พบว่าตัวอย่าง *Frankia* ที่แยกได้จากจังหวัดลำปาง เชียงใหม่ ชัยนาท และระนอง มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Frankia* ที่อยู่ใน Data base (Genkank) คือ *Frankia* ที่แยกได้จากปมของ Alnus และ *Frankia* sp. ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นกลุ่ม species เดียวกันและเมื่อทำการสุ่มบางไอโซเลทมาตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่พบลักษณะของ Hyphae หรือ Vesicle ที่แตกต่างกันชัดเจน ในขณะที่ตัวอย่างที่เหลือจะมีความสัมพันธ์ที่แยกออกไปชัดเจนกว่ากลุ่มข้างต้น และพบว่าแตกต่างไปจาก *Frankia* ที่เคยแยกได้ (ในฐานข้อมูล DNA)



ภาพที่ 3 แสดง Phylogenetic tree ของยีน 16S rDNA ของ *Frankia* ที่สุ่มทดสอบ

Uncultured bacterium clone AKIW96 (Accession No.= 126944), *Frankia* (Coriaria nodular endophyte) : S70679, *Frankia alni* : M74475, *Frankia* (infective on *Elaeagnus angustifolia* : M74479, *Frankia* (infective on *Purshia tridentate*) : M74487, *Frankia* (infective on *Casuarina equisetifolia*) : M74486, *Frankia* sp. : L18982, *Frankia* sp. Symbiont in root nodule : AF063641 และ *Frankia* (infective on *Alnus viridis*) : S72447

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของชุดยีน *nif* H ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Nitrogenase แล้วนำมาสร้าง Dendogram (ภาพที่ 4) พบว่าเมื่อจัดกลุ่มตามลำดับเบสของ *nif* H สามารถแยก *Frankia* ในประเทศไทยได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มแรกจะเป็นตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ประจวบคีรีขันธ์ กระบี่ ลำพูน เชียงใหม่ และชัยนาท ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลำดับเบสของ *nif* H gene จาก *Frankia* sp. ในฐานข้อมูล Genbank ในขณะที่กลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นตัวอย่างมากจังหวัดนครสวรรค์ ชุมพร ระยอง กระบี่ และประจวบคีรีขันธ์ มีความสัมพันธ์กับ *Frankia* species ต่าง ๆ แต่มีความแตกต่าง และแยกเป็นกลุ่มออกมาชัดเจน



ภาพที่ 4 แสดง Dendogram จากการอ่านลำดับเบสของ *nif*H gene จากตัวอย่าง *Frankia*

SU5; สนสุราษฎร์ธานี 1-18; สนหัวหิน B, KB; สนกระบี่ 1, 5, 9; ป่าหัวหิน A, LP1; ป่าลำปาง 1-3, CMU; สนเชียงใหม่, CN; สนชัยนาท, F. sp. Nodule FE37_; *Frankia* sp. Symbiont in root nodule, RN13; สนระนอง 13, F. alni; *Frankia alni*, F. Eleagnus.angustifolia; *Frankia* (infective on *Eleagnus angustifolia*), F. coriaria; *Frankia* (Coriaria nodular endophytes), F. Pushia. Tridentate_; *Frankia* (infective on *Purshia tridentate*), F. Casuarina; *Frankia* (infective on *Casuarina equisetifolia*), F. Alnusviridis; *Frankia* (infective on *Alnus viridis*), NS7; ป่านครสวรรค์ 1-6, 8-10, CP; สนชุมพร, RY6; ป่าระยอง 6, Uncultured; Uncultured bacterium clone AKIW961, 1; สนเพชรบุรี 6, 2; สนเชียงใหม่ 1-8, 11-18, F. sp; *Frankia* sp.

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างดิน 2 ลักษณะคือ แถบชายฝั่งทะเล และแผ่นดินใหญ่ พบว่าจำนวนประชากรของ *Frankia* จากดินทรายแถบชายฝั่งทะเลน่าจะมีจำนวนประชากรของ *Frankia* ที่สร้างปมให้กับสนทะเล และสนประดิพัทธ์ ได้มากกว่าดินในแผ่นดินใหญ่ โดยจำนวนปมที่พบเมื่อการทำการปลูกสนทั้งสองชนิด ในดินที่มีปริมาณเท่ากันจากบริเวณชายฝั่งทะเล มีจำนวนปมอยู่ในช่วง 7-370 ปม/ต้น ในขณะที่จากแผ่นดินใหญ่พบจำนวนปมอยู่ในช่วง 0-155 ปม/ต้น ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการสำรวจของ Lawrie (1982) ซึ่งทำการสำรวจปมที่เกิดขึ้นในพืชตระกูล *Casuarina* และ *Allocasuarine* ใน Victoria ประเทศออสเตรเลีย พบว่าจากพืชทั้งหมด 336 ต้น สามารถเกิดปมได้เพียง 15 % และจากพื้นที่สำรวจ 77 จุด มีเพียง 17% ของพื้นที่ที่พบว่ามีการสร้างปมได้ และที่สำคัญคือพบว่าบริเวณที่ไกลจากทะเลไปประมาณ 70 กิโลเมตร มักไม่พบการสร้างปมเลย จากนั้นในปี 1989 J.O. Dawson และคณะ ได้ทำการพิสูจน์ปรากฏการณ์ดังกล่าวในประเทศออสเตรเลีย พบว่าดินแถบชายฝั่งทะเลซึ่งเป็นดินทราย เป็นบริเวณที่พบปริมาณปมในต้นสนได้มากกว่า 2-3 เท่า เมื่อเทียบกับสนที่ทำการปลูกในดินร่วนและดินเหนียว นอกจากนี้ยังพบว่าความชื้น การถ่ายเทอากาศ จากบริเวณชายฝั่งทะเลจะส่งเสริมประสิทธิภาพการเกิดปมได้ดี

อย่างไรก็ตาม จากตัวอย่างที่สุ่มเก็บมาจากปมที่สร้างขึ้นในตัวอย่างดินชนิดต่าง ๆ จำนวน 315 ปม/ต้น สามารถนำมาแยกและเพาะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้เพียง 18 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA (Acetylene Reduction Assay) พบว่าให้ประสิทธิภาพอยู่ในช่วง 40-90 μmol C_2H_4/g-dw/h ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับการทดสอบกับสนทะเล โดย Sellstedt (1995) ได้ทำการทดสอบพบว่าการตรึงอยู่ในช่วง 63.5-43.5 μmol C_2H_4/g-dw/h อย่างไรก็ตามจากการสังเกตุประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนกับลักษณะของปมที่สร้าง ไม่สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์กันได้

ในการทดลอง cross inoculaton กับสนทั้งสองชนิดของเชื้อ *Frankia* ที่แยกได้พบว่าไม่มีนัยที่บอกถึง host specificity นั่นคือ *Frankia* ที่แยกได้จากสนทะเล สามารถสร้างปมได้ในสนประดิพัทธ์ โดยให้จำนวนปมไม่แตกต่างกัน และเช่นเดียวกันกับเมื่อนำ *Frankia* จากสนประดิพัทธ์ปลูกลงไปในสนทะเล ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Simonet และคณะ 1999 ที่พบว่า *Frankia* ที่แยกได้จากสนทะเลอย่างน้อย 4 กลุ่ม (จำแนกตาม IGS-RFLP) สามารถสร้างปมได้กับพืชในกลุ่ม Casuariana ด้วยกันเอง และยังพบว่าใน lobe เดี่ยวหรือ 1 ปม มี *Frankia* มากกว่า

1 สายพันธุ์ หรือจากการทดสอบการปลูก *Frankia* กับพืชตระกูลสนทะเล Casuariana (*C. equisetifolia* สนทะเล กับ *C. cunninghamiana*) ก็ไม่พบ host specificity เช่นเดียวกัน (Reddell และ Bowen, 1985)

ปรากฏการณ์สำหรับ *Frankia* ในพืชอื่นก็พบเช่นเดียวกัน ได้แก่ พืชกลุ่ม *Ceoenothus* พบว่าไม่มีความจำเพาะเจาะจงของ *Frankia* ในระหว่างพืชตระกูลนี้ (*C. velutinces*, *C. sanquineus* (Pursh) และ *C. integrrimus* (H.&A.) (Jeong and Myrold, 2001) ทำการตรวจสอบความหลากหลาย ของ *Frankia* โดยทำการเพิ่มจำนวนชุดของ DNA โดยใช้หลักการการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ที่เป็น repetitive sequence โดยใช้ BOX primer พบว่าการตรวจสอบโดยตรงจากปม เป็นวิธีที่มี ประสิทธิภาพรวดเร็วแต่มีข้อจำกัด คือ สารสำคัญบางตัวจากพืช เช่น Tannin สามารถยับยั้งการเพิ่ม จำนวนของ DNA ได้ จากผลการทดลองพบว่า *Frankia* ในดินประเทศไทยน่าจะมีความหลากหลาย สูงมาก โดยดูจากจำนวนตัวอย่างที่สุ่มมา และสามารถเพิ่มจำนวนแถบ DNA โดยใช้ BOX primer จาก 29 ตัวอย่าง ไม่มีตัวอย่างใดที่ให้แถบ DNA เป็นแบบเดียวกันเลย และ Dendogram ที่ได้จากการ ทำ BOX-PCR นี้ไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ของ *Frankia* กับแหล่งอาศัยได้

จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่าง *Frankia* มาอ่านลำดับเบสของยีนชุด 16S rDNA พบว่า *Frankia* ที่แยกได้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ซึ่ง *Frankia* บางสายพันธุ์มีความใกล้ชิดกับ *Frankia* ที่แยกได้ จากพืช *Alnus viridis* มากกว่าบางสายพันธุ์ที่แยกได้จากสนทะเล (ที่รวบรวมไว้ใน Genbank) ซึ่งผล การทดลองนี้สอดคล้องกับผลของ Benson และคณะ 1996 ที่รายงานว่าเมื่อนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA มาวิเคราะห์ทำให้แยก *Frankia* ได้เป็น 3 กลุ่ม (subclades) คือ กลุ่มที่สร้างปมในพืชกลุ่ม Elaeagnaceae และ Rhamnaceae กลุ่มที่สองคือ พืชกลุ่ม Rosaceae และ Coriariaceae และกลุ่มที่ สามคือ Betulaceae (สกุล *Alnus*) Casuarina และ Myricaceae ซึ่งผลของ Benson และคณะ ก็ สอดคล้องกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชอาศัย โดยพบว่าเมื่อทำการอ่านลำดับเบสของยีน *rbCL* (RubisCo enzyme) พบว่าพืชในกลุ่ม Betulaceae Casuarinaceae และ Myricaceae มี ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกว่าพืชกลุ่มอื่นที่สร้างปมได้โดย *Frankia* (Jeong และคณะ 1999) และที่ ยืนยันถึงความสอดคล้องไปกว่านั้น คือ เมื่อนำลำดับเบสของยีน 16S rDNA มาร่วมวิเคราะห์กับ ลำดับเบสของยีน *gln* A (glutamine synthetase) พบว่า *Frankia* ที่ได้จากพืชกลุ่ม *Myrica*, *Alnus*, *Casuariana*, *Allocasuariana*, *Gymnostoma* และ *Camptonia* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และมีความ แตกต่างไปจากพืชกลุ่ม Cucurbitales, Urticales และ Rosaceae (Clawson และคณะ 2004)

ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ลำดับของ *nif* H gene พบว่า *Frankia* ที่แยกได้จากการ ทดลองครั้งนี้แยกได้ 2 กลุ่ม ซึ่งคล้ายกับ Phylogenetic tree ที่ได้จากลำดับเบส 16SrRNA กลุ่มที่ แรกจะมีลำดับเบสของ *nif* H gene ใกล้เคียงกับ *Frankia* ใน Genbank (*Frankia*. sp. Nodule FE37 : 0.36252) ในขณะที่อีกกลุ่มจะมีความคล้ายกับ *Frankia* สายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งดูเหมือนว่าจากตัวอย่างที่

ได้จากกลุ่มนี้ เช่น นครสวรรค์ ชุมพร ระยอง กระบี่ และประจวบคีรีขันธ์ น่าจะมีวิวัฒนาการถัดต่อมาจาก *F. alni* 14013 ซึ่งผลคล้ายกับรายงานที่ว่า ถ้าเปรียบเทียบกลไกการเข้าสู่ปมของ *Frankia* กับพืชตระกูล Casuariana ที่เป็นแบบ direct intercellular และลำดับเบสของ *nif* H-D ยีน พบว่า *Frankia* จากตระกูล Casuariana มีวิวัฒนาการมาจาก *Frankia* ที่เข้าสร้างปมในพืชกลุ่ม *Alnus* (Cournoyer และคณะ, 1993)

2. ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาครั้งนี้สิ่งที่แสดงให้เห็นชัดเจน คือ ดินในประเทศไทยมีความหลากหลายของ *Frankia* ที่สร้างปมและตรึงไนโตรเจนให้กับสนทะเล และสนประดิพัทธ์สูงมาก แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตร และสร้างองค์ความรู้ของ *Frankia* ให้มากขึ้น

ปัญหาที่สำคัญของการศึกษาครั้งนี้ คือ *Frankia* หลายไอโซเลท ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (unculturable) และมีปัญหาการปนเปื้อนสูงเพราะมี doubling time ที่นานและเก็บรักษายาก สายพันธุ์บางส่วนที่ทำให้บริสุทธิ์ได้เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DPM ที่มี glycerol ในปริมาณ 30% ที่อุณหภูมิ -70 °C

บรรณานุกรม

จำลอง เพ็งคล้าย, จรัล ฉ.เจริญผล, ลีนา ผู้พัฒนพงษ์ และ ธวัชชัย สันติสุข. 2515. ไม้มีค่าทางเศรษฐกิจของไทย ตอนที่ 1. กองค้นคว้า, กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ 246 น.

บุญชุบ บุญทวี และ พิศาล วสุวานิช. 2523. สนประดิพัทธ์. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ ฉบับที่ 8 ฝ่ายวิจัยป่าไม้ กองบำรุง กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ. 40 น.

Baker, D.D. 1990. Actinorhizal plants : Underexploited Trees and shrubs for forestry and agroforestry. Nitrogen Fixing Tree. RES. Rep. 8:3-7.

Baker, D.D., G.H. Kidd and J.G. Rorrey. 1979aSeparation of actinomycete nodule endophytes from crushed nodule suspension by sephadex fractionation. Bot. Gaz. 140:49-51.

Becking, J.H. 1970. Plant-endophyte symbiosis in non-leguminous plants. Plant and Soil 32:611-654.

Benoit L.F. and A.M. Berry. 1990. Actinorhizal plants in Forestry, Landscapes and Revegetation. In "The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants" Eds., Dwight D. Baker, John D, Tjiepkema, and Christa R. Schwintzer, Academic Press, Inc., San Diego.

Berry A.M. 1994. Recent developments in the actinorhizal symbioses. Plant Soil. 16(1), 135-145

Benson D.R., D.W. Stephens, M.L. Clawson and W.B. Silvester, 1996. Amplification of 16SrRNA genes from *Frankia* strains in root nodules of *Ceanothus grisens*, *Coriaria plumose*, *Discaria taumatau* and *Purshia tridentate*. Appl. Envi. Microb. 62. 2904-2909.

Bond, G. 1951. The fixation of nitrogen associated with the root nodules of *Myrica* gale L., with special reference to its pH relation and ecological significance. Ann. Bot. (London)., 15, 447-459.

Bond, G. 1976. Fixation of nitrogen by higher plants other than legumes. Ann. Rev. Plant Physiol. 18:107-126.

Cournoyer B., M. Gony and P. Normand. 1993. Molecular Phylogeny of the symbiotic actinomycetes of the genes *Frankia* matches host-plant infection-processes. Mol. Biol. Evol. 10, 1303-1316.

Gauthier D.L., H.G. Diem and Y. Dommergues. 1981. In vitro nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from *Casuarinanodules*. Appl. Env. Microbiol., 41, 306-308.

Jamann, S., M.P. Fernandez, and P. Normand, 1993. Typing method for N2-fixing bacteria based on PCR-RFLP-application to the characterization of *Frankia* strains. Mol. Ecol. 2, 17-26.

Jeong S.C. and D.D. Myrold, 2001. Population size and diversity of Frankia in soils of Ceanothus velutinus and Douglas-fir stands. Soil. Biol. Biochem. 33, 931-941.

Jeong S.C., N. J. Ritchie, and D.D. Myrold. 1999. Molecular phylogenies of plants and *Frankia* support multiple origins of actinorhizal symbioses. Mol. Phylo and Evol. 13, 493-503.

Dawson J.O., D.G. Kowalski and P.J. Dart, 1989. Variation with soil deph, topographic position and host specificies in the capacity of soil from Australian local to nodulate *Casuarine* and *Allocasuariana* seedlings. Plant and Soil, 118, 1-11

Kathryn, A., V. Bosch and J.G. Torry. 1985. Development of endophytic *Frankia* sporangia in field and laboratory-grown nodules of *Comptonia peregrine* and *Myrica gale*. Am. J.Bot. 72(1):99-180.

Lawrie, A.C. 1982. Field nodulation of nine species of *Casuarina* in Victoria. Aust. J. Bot. 30,447-460.

Lechevalier M.P. and H.A. Lechevalier. 1990. Systematics, isolation and culture of *Frankia*. In "The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants" Eds., Dwight D. Baker, John D, Tjiepkema, and Christa R. Schwintzer, Academic Press, Inc., San Diego.

Lundquist. R., and J.G. Torrey. 1984. The propagation of *Casuarina* species from rooted stem cuttings. Bot. Gaz. 145(3):378-384.

Clawson M.L., A. Bourret and D.R. Benson. 2004. Assessing the phylogeny of *Frankia*-actinorhizal plant nitrogen-fixing root nodule symbioses with *Frankia* 16SrRNA and glutamine syntheses gene sequences. Mol. Phylo. And Evol. 31, 131-138.

Maggia, L., S. Nazaret, and P. Simonet. 1992. Molecular characterization of cultured and symbiotic *Frankia* isolates from *Casuarina equisetifolia* root nodules harvested in West Africa (Senegal and Gambia). Acta. Ecol. 13,453-461.

McEwan, N.R., C.T. Wheeler, and J.J. Milner. 1994. Strain discrimination of cultured and symbiotic Frankia by RFLP-PCR. Soil Biol. Biochem. 26, 541-545.

Normand, P., S.Orso, B.Cournoyer, P. Jeannin, C. Chapelon, J.Dawson, L. Evtushenko, and A.K. Misra. 1996. Molecular phylogeny of the genus Frankia and related genera and emendation of the family Frankiaceae. Int. J. Syst. Bacteriol. 46,1-9.

Reddell, P. and G.D. Bowen. 1986. Host Frankia specificity within Casuarinaceae. Plant and Soil 93:293-298.

Schwintzer, C.R. and J.D. Tlepkema, 1990. The Biology of Frankia and actinorhizal Plants. Academic Press, San Diago, CA.

Sellstedt, A. 1995, Specificity and effectively in nodulation by *Frankia* on southern hemisphere actinorhiza. FEMS Micro Lett. 125, 231-236.

Simonet, P., E. Navarro, C. Rouvier, P. Reddel, J. Zimpfer, Y. Dommergues, R. Bardien, P. Combarro, J. Hammelin, A.M., Domenach, F. Goubier, Y. Prin, J.O., Dawson and P. Normand. 1999. Co-evolution between *Frankia* populations and host plants in the family Casuarinaceae and Consequent pattern of global dispersal. Envi. Micro. 1, 525-533.

Simonet, P., M.C.Grosjean, A.K. Misra, S.Nazaret, B.Cournoyer and P. Normand. 1991. Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 57, 3278-3286.

Torrey, J.G. and R.H. Berg. 1988. Some morphological features for genetic characterization among the Casuarinaceae. Am. J. Bot. 75:864-874.

Torrey, J.G. and S. Racette. 1989. Specificity among the Casuarinaceae in root nodulation by *Frankia*. Plant and Soil. 118:157-164.

Torrey, J.G. 1990. Cross-Inoculation Groups within *Frankia*. In "The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants" Eds., Dwight D. Baker, John D, Tjiepkema, and Christa R. Schwintzer, Academic Press, Inc., San Diego.

ภาคผนวก

1. สูตรสารละลาย Hoagland's micronutrient solution

H_3BO_3	2.86	กรัม/ลิตร
$MnCl_2.4H_2O$	1.81	กรัม/ลิตร
$ZnSO_4.7H_2O$	0.22	กรัม/ลิตร
$CuSO_4.5H_2O$	0.08	กรัม/ลิตร
$Na_2M_0O_4.2H_2O$	0.025	กรัม/ลิตร
$CaCl_2.6H_2O$	0.025	กรัม/ลิตร

2. Hoagland's chelated ion stock solution

$FeSO_4.7H_2O$	5.56	กรัม/ลิตร
Na_2EDTA	7.45	กรัม/ลิตร

3. สูตรอาหาร YEM (trap contaminate)

K_2HPO_4	0.5	กรัม/ลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม/ลิตร
NaCl	0.1	กรัม/ลิตร
Yeast extract	0.5	กรัม/ลิตร
Deionized water	1.0	ลิตร
pH	6.8	

4. สูตรอาหาร DPM

K_2HPO_4	1.0	กรัม/ลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม/ลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.1	กรัม/ลิตร
Hoagland's micronutrient	1.0	มล./ลิตร
Hoagland's chelated iron	1.8	มล./ลิตร
Propionic (sodium salt)	1.2	มล./ลิตร
Deionized water	1	ลิตร
pH	6.8	

ประวัติผู้วิจัย

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@sut.ac.th Fax : 66-44-224150, 66-44-224154

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- present)
: 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.

Tittabutr P., W. Payakapong, N. Teaumroong and N. Boonkerd (2005) Cassava as a cheap source of carbon for rhizobial inoculant production using amylase-producing fungus and glycerol-producing yeast. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21:823-829.

Innok, S., Matsumura, M., Boonkerd, N., and N. Teaumroong (2005) Detection of *Microcystis* in Lake Sediment using Molecular Genetic Techniquies. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21,1559-1568.

Manassila, M., T., Sooksa-Nguan, N. Boonkerd, S. Rodtong and N. Teaumroong (2005) Phylogenetic diversity of wild edible *Russula* from North-eastern Thailand on the basis of internal transcribed spacer sequence. Science Asia, 31(4), 323-328.

Tittabutr P., W. Payakapong, N. Teaumroong N. Boonkerd Paul W. Singleton and D. Borthakur (2006) A histidine kinase sensor protein gene is necessary for induction of low pH tolerance in *Sinorhizobium* sp. strain BL3. Antonie van Leeuwenhoek. 89(1):125-134.

Tittabutr P., W. Payakapong, N. Teaumroong N. Boonkerd and Paul W. Singleton (2006) The Cloned *rpoH2* gene of Sinorhizobium strain BL3 restores both exopolysaccharide and nodulation defects of *rpoH2* mutants of *Rhizobium* sp. Strain TAL 11425. Symbiosis. (accepted).

Waraporn Payakapong, Panlada Tittabutr, Neung Teaumroong, Nantakorn Boonkerd, Paul W. Singleton and Dulal Borthakur. (2006). Indentification of two clusters of genes involved in salt tolerance in *Sinorhizobium* sp. Strain BL3. Symbiosis. 41, 47-53.

INVITED BOOK CHAPTER : Neung Teaumroong and Nantakorn Boonkerd (2006). Rhizobial Production Technology. In: Microbial Biotechnology in Agriculture and Aquaculture. Vol. 2 (eds.) R.C. Ray, Science Publishers, USA, pp. 77-110.

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 Proceeding 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

Kotepong S., A. Nuntagij, S. Jitacksorn, N. Teaumroong and N. Boonkerd (2001) Application of Tree Legume Rhizobia for Reforestratiion Programme in Thailand. In Proceeding of the 13th International Congress on Nitrogen Fixation, Ontario, Canada (2-7 July 2001), p. 512.

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.

Manassila M., A. Nantagij, S. Kotepong, N. Boonkerd and N. Teaumroong (2004). Characterization and Monitoring Selected Rhizobial Strains Isolated from Tree Legumes in Thailand. Proceeding in the 6th European Nitrogen Fixation Conference (24th -27th July), Tolouse, France.

Teaumroong, N., Sooksa-nguan, T., Thies, E.J., and Boonkerd N. (2004). Comparison of Bacterial Activities Involved in Nitrogen Cycling Between Conventional Rice Cultivation and the System of Rice Intensification (SRI). Proceeding in the 14th International Congress on Nitrogen Fixation (Oct. 27- Nov. 1), Beijing, China.

Payakapong, W., Titabutr, P., Teaumroong, N. Borthakur, D., and Boonkerd, N. (2004). Isolation of Genes for Salt Tolerant form *Sinorhizobium* LT11. Proceeding in the 14th International Congress on Nitrogen Fixation (Oct. 27- Nov. 1), Beijing, China.

Namanusart, W., N. Teaumroong, S. Rodthong, O. Nopamornbodi and N. Boonkerd. (2004). Genetic of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Infected *Acacia mangium* WillD. The IV Asia-Pacific Mycological Congress and the IX International Marine and Freshwater Mycology Symposium (14-19 Nov. 2004). P. 127

Innok, S., Chunleuchanon, S., N. Boonkerd and N. Teaumroong. (2006). Application of Akinete Forming N_2-fixing Cyanobacteria for Rice Cultivation. Proceeding in 11th International Symbiosium on Microbial Ecology (ISME) (August 20-25, 2006) Vienna, Austria.

INSTRUCTIONAL EXPERTISE

- *Applied Microbiology*
- Man and Environment
- Environmental Microbiology
- Agricultural Biotechnology
- *Biosafety*
- Food Microbiology
- Plant and Microbe Interaction
- Molecular Biology and Recombinant DNA Technology

PROFESSIONAL SOCIETIES AND COMMITTEE

: Thai Society of Biotechnology
: Thai Inventor Association
: Central Biosafety Committee (CBC)
: Subcommitte of Central Biosafety Committee (CBC) in Microbiology

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.")
- The 14th International Congress on Nitrogen Fixation. Oct. 27- Nov. 1 2004., Beijing, China (**Oral presentation** : in "Isolation of Genes for Salt Tolerance from *Sinorhizobium* LT11"

- **INTERNATIONAL INVITED SPEAKER** : "Biofertilizer Technology" at Gansu Agricultural University, China (2-3 Nov. 2004)
- JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC Joint Seminar "Sustainable Development of Biotechnology in Tropics". 3-4 December 2004, Bali, Indonesia. (**Oral presentation** : in "10th Year Biofertilizer Research at Suranaree University of Technology : from Gene to Farmers")
- **LICENSING** : "Cyanobacterial Akinete Induction as Biofertilizer" Neung Teaumroong, et al., 2005 No. 105617

FELLOWSHIPS

- "The Royal Golden Jubilee program" (2000-2005)
- "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 Leadership Southeast Asia
  : Technical training on Biofertilizer Inoculant Production