

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย

-

2. ชื่อโครงการวิจัย

การศึกษาศักยภาพการรับไนโตรเจนทางชีวภาพ กลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่สำคัญ และปฏิกิริยสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับอ้อยในอ้อยสายพันธุ์ไทย
Study on nitrogen derived from biological nitrogen fixing ability, N₂-fixing bacterial community structure and interaction between sugar cane and N₂-fixing bacteria on commercial sugar cane varieties in Thailand

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)

การศึกษาลักษณะกลุ่มและปริมาณประชากรของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ในอ้อยพันธุ์ไทยโดยเทคนิค Real-Time PCR

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)

Study of N₂-fixing bacterial community structure of Thai sugarcane varieties by Real-Time PCR techniques.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง

นายพงศกร สรรค์วิทยากุล

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน

นางสาวอรุณทัย ซาววา

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นางสาวกัลยกร โปรงจันทิก

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะกลุ่มและปริมาณประชากรของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอ้อยพันธุ์ไทยโดยเทคนิค Real-Time PCR ทำการศึกษาในอ้อยพันธุ์ไทยที่นิยมปลูก 5 สายพันธุ์ คือ ขอนแก่น 3 อุ่ทอง 84-12 สอน.92-11 สอน.88-92 สอน.95-84 อ้อยสายพันธุ์บราซิล (Sp70-1284) หญ้าเนเปียปากช่อง อ้อยป่าTH99-132 (*S. spontaneum*) และหญ้ากินนีสีม่วง โดยศึกษาการ Colonization ของแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า มีการ Colonize ของแบคทีเรียอย่างน้อย 2 ชนิดในใบและลำต้นอ้อย พบ *Gluconacetobacter diazotrophicus* ในใบของอ้อยพันธุ์บราซิล พบ *Azospirillum brasilense* ในลำต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 สอน.92-11 สอน.88-92 สอน.95-84 พันธุ์บราซิล และอ้อยป่า และพบ *Herbaspirillum seropedicae* ในลำต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 สอน.92-11 สอน.88-92 สอน.95-84 พันธุ์บราซิล อ้อยป่าและหญ้ากินนีสีม่วง นอกจากนี้ยังพบ *Azospirillum brasilense* และ *Herbaspirillum seropedicae* ในบริเวณ rhizosphere ของ

อ้อยพันธุ์อุทอง 84-12 แต่ไม่พบในลำต้น จึงอาจสรุปได้ว่าลำต้นอ้อยสายพันธุ์อุทอง 84-12 ไม่เอื้อต่อการอยู่อาศัยของแบคทีเรียดังกล่าว แต่อาจมีระบบที่เอื้อต่อการอยู่อาศัยบริเวณรากและ rhizosphere

A Study of N₂-fixing bacterial community structure of Thai sugarcane varieties by Real-Time PCR techniques. Five commercial Thai varieties (KK3 UT84-12 LK92-11 K88-92 and K95-84) and Brazilian sugarcane varieties (Sp70-1284 TH99-132 (*S. spontaneum*)) Napeir Pak Chong 1 (*Pennisetum purpureum* cv. pakchong1) and purple guinea grass were tested. The results of colonization of bacteria showed at least two types of bacteria colonize the leaves and stems of sugarcane, found *Gluconacetobacter diazotrophicus* in leaves of Sp70-1284, *Azospirillum brasilense* in stems of KK3 LK92-11 K88-92 K95-84 and Sp70-1284 and *Herbaspirillum seropedicae* in stems of LK92-11 K88-92 K95-84 Sp70-1284 and purple guinea grass. Moreover, *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in rhizosphere of UT 84-12 but not found in stems. It may be concluded that stem of UT84-12 not conducive to the habitat of the bacteria but may have a system that is conducive to living roots and rhizosphere.

6. คำนำ

การศึกษาลักษณะกลุ่ม (Community) และปริมาณประชากร (Population Rate) ของแบคทีเรีย PGPR ซึ่งเป็น Endophytic แบคทีเรีย ในเนื้อเยื่อต้นอ้อย มีความจำเป็นเพื่อศึกษาลักษณะการปฏิสัมพันธ์พื้นฐานของแบคทีเรียและอ้อยแต่ละสายพันธุ์ หากต้องการพัฒนาสายพันธุ์อ้อยที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูง ให้น้ำตาลมาก เพราะลักษณะของกลุ่มและปริมาณประชากรของแบคทีเรีย PGPR มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของอ้อย (Valeria *et al.*, 2012.) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและความสามารถในการช่วยละลายแร่ธาตุที่จำเป็นต่ออ้อยในดิน แปรผันไปตามลักษณะของสายพันธุ์อ้อย (Bashan and Levany, 1990) ทั้งนี้เราจะต้องไม่คัดเลือกเพียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียเท่านั้นแต่ต้องคัดเลือกสายพันธุ์อ้อยด้วย (Munos-Rojas and Caballero-Mellado, 2003).

ปัจจุบันเทคนิค Real-time PCR สามารถใช้ตรวจสอบชนิดเชื้อแบบเฉพาะเจาะจงถึงระดับ Species และ Subspecies (Schaad *et al.* 2001a) ได้แล้ว ยังได้เปรียบ Conventional PCR ซึ่งไม่สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ได้ แม้ว่าจะมีการพัฒนา PCR รูปแบบต่างๆ แต่ส่วนใหญ่จะมีวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก ในทางปฏิบัติไม่เหมาะสม โดยโอกาสเกิดความผิดพลาดในการทำและหรือความถูกต้องแม่นยำมีมาก และมี reproductively ต่ำ นอกจากนี้ Real-time PCR ยังมี Sensitivity สูงกว่า วิธีการทาง Serology และประหยัดเวลาในส่วนที่ต้องใช้สร้างแอนติบอดีจำเพาะสำหรับแบคทีเรียกว่ามากอีกด้วย (Ozakman and Schaad, 2003)

7. วิธีดำเนินการ

1. ค้นคว้าข้อมูลทาง Bioinformatic จีโนมของแบคทีเรียในดิน 7 ชนิดคือ *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Klebsiella* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Herbaspirillum* sp. จากฐานข้อมูล NCBI
2. ศึกษาข้อมูลยีน nifH ของแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิด โดยจัดกลุ่มวิวัฒนาการของยีน สร้าง Phylogenetic dendrogram หรือ gene evolutionary dendrogram
3. สืบค้น Homology position ระหว่าง Genus และภายใน Species
4. ออกแบบ โพรเมอร์ เพื่อใช้ทดสอบชนิดสายพันธุ์ของ Bacteria
5. ทดสอบ sensitivity และ specificity ของ โพรเมอร์ ที่ออกแบบไว้กับแบคทีเรีย culture
6. เมื่อได้ โพรเมอร์ ที่เหมาะสม จึงนำ PCR product ไป Sequence เพื่อนำรหัสพันธุกรรมที่ได้มาออกแบบ probe สำหรับ Quantitative PCR
7. สังเคราะห์ probe สำหรับ Quantitative PCR ที่จะใช้ทดสอบแบคทีเรียที่ต้องการ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การค้นคว้าและวิเคราะห์ข้อมูลทาง Bioinformatic ยีน NifH ของแบคทีเรียทั้ง 7 genus

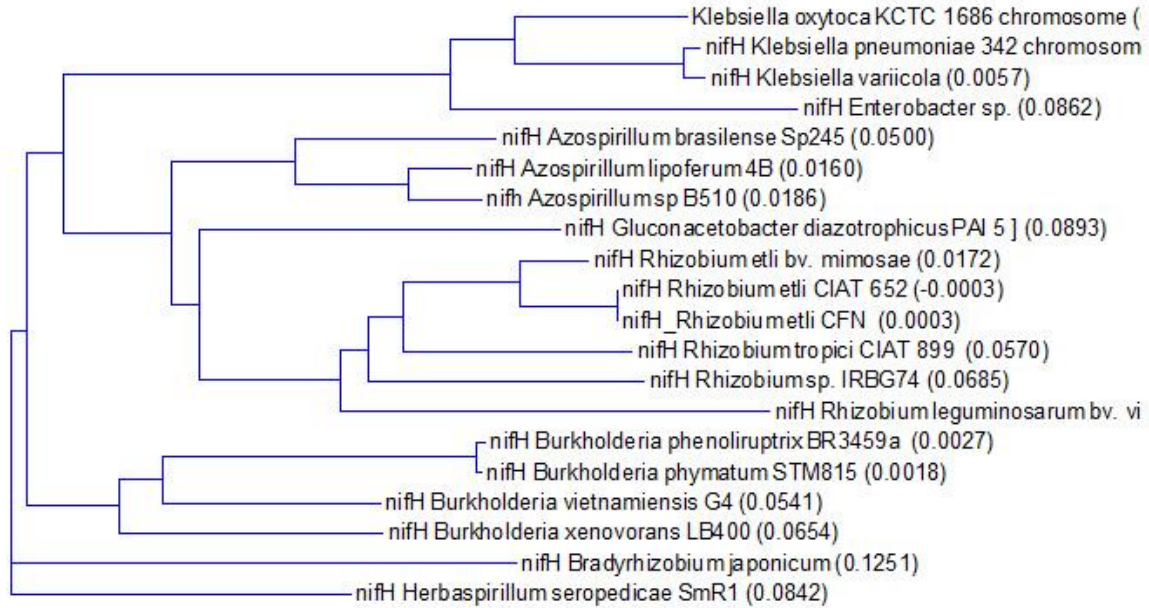
สืบค้นข้อมูล nifH จากฐานข้อมูล NCBI ของแบคทีเรียทั้ง 7 genus คือ *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter* และ *Herbaspirillum* ได้ข้อมูลสายรหัสพันธุกรรมของยีน nifH จากแบคทีเรียทั้งหมด 19 species

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ Homology และ สร้าง gene evolutionary dendrogram (ภาพที่ 2) พบว่ามี Consensus position 90.9% และมี identity position 45% (ภาพที่ 1)

จากการวิเคราะห์ dendrogram พบว่า แบคทีเรียแต่ละ Genus มีการแบ่งแยกกลุ่มค่อนข้างชัดเจน และ species ภายใน Genus เดียวกันมีความแตกต่างกัน จึงสามารถนำ ยีน nifH มาใช้ในการออกแบบ Specific โพรเมอร์ ซึ่งใช้แบ่งแยกระหว่าง Genus และ species ของแบคทีเรียได้

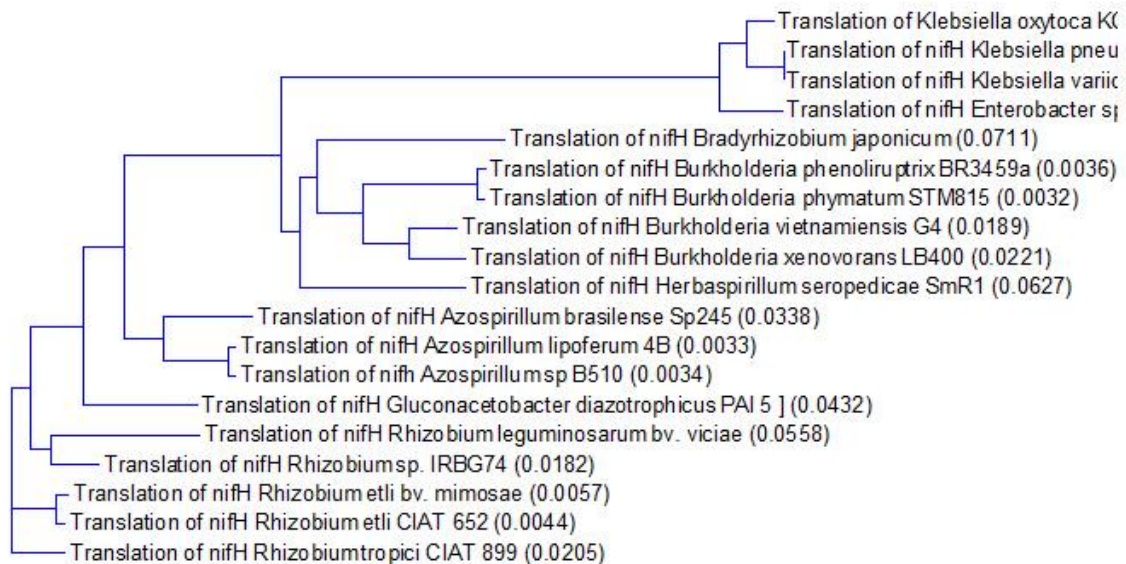
nifH <i>Azospirillum</i> brasiliense Sp245	387	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
nifH <i>Azospirillum</i> lipoferum 4B	396	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
nifH <i>Azospirillum</i> sp. B5110	396	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
nifH <i>Gluconacetobacter</i> diazotrophicus PAI 5 1	390	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
nifH <i>Rhizobium</i> etli bv. mimosae	390	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
nifH <i>Rhizobium</i> etli CIAT 652	390	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
nifH <i>Rhizobium</i> tropici CIAT 899	390	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
nifH <i>Rhizobium</i> sp. IRB674	390	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
nifH <i>Rhizobium</i> leguminosarum bv. viciae	390	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
nifH <i>Enterobacter</i> sp.	390	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
nifH <i>Klebsiella</i> pneumoniae 342 chromosome	390	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
nifH <i>Burkholderia</i> phenoliruetrix BR3459a	390	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG
Consensus	399	CTGTGTGTCGGGCGGCTTCGCCATGCCGATCCGCGAAGCAAGGCCAGGAATCTACATCGTCATGTCCGGGAGATGATGGCGCTGACGGCCGCAACCAACATCCCAAGGCAATCTGAATATCCG

ภาพที่ 1 แสดง Alignment (บางส่วน) ของยีน nifH จากแบคทีเรีย 19 species



ภาพที่ 2 nifH gene evolutionary dendrogram ของแบคทีเรีย 19 species

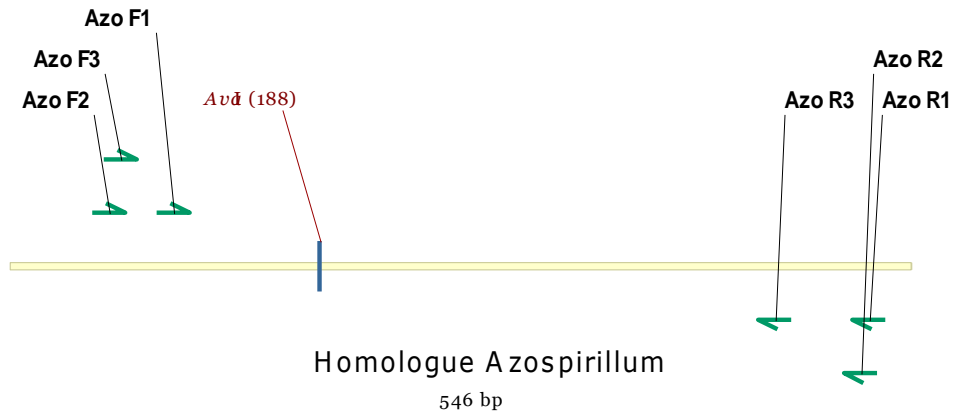
นำข้อมูลยีนทั้งหมดมาจำลองการ Translation เพื่อวิเคราะห์ วิวัฒนาการระดับ Proteomic ของโปรตีน nifH พบว่าจากการวิเคราะห์ Homology สายเปปไทด์ consensus position 93.7% และมี identity position 56.5% จากการวิเคราะห์ protein evolutionary dendrogram พบว่ามีการแบ่งกลุ่มของโปรตีนระหว่าง Genus ค่อนข้างชัดเจนแต่ยังมีบาง Genus ที่มีวิวัฒนาการของโปรตีน NifH ใกล้เคียงกันเช่นในกลุ่ม *Enterobacter* และ *Klebsiella* กลุ่ม *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* และ *Herbaspirillum* (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 nifH gene evolutionary dendrogram ของ *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* และ *Herbaspirillum*

2. การออกแบบ โพรเบอ์ เพื่อใช้ทดสอบชนิดสายพันธุ์ของ Bacteria

นำข้อมูล nifH gene alignment ทั้งหมดของแบคทีเรียมาวิเคราะห์ตำแหน่งที่ได้ 100% Homology ของแต่ละสายพันธุ์ภายใน genus เดียวกัน (ภาพที่ 5) และวิเคราะห์ Thermodynamic property ของบริเวณสายรหัสพันธุกรรมเพื่อหาบริเวณที่เหมาะสมในการออกแบบโพรเบอ์ (ภาพที่ 4) และสังเคราะห์โพรเบอ์ (ตารางที่ 1) เพื่อเตรียมนำไปทดสอบ Sensitivity และ Specificity ต่อไป



ภาพที่ 4 ตำแหน่ง โพรเบอ์ ที่เหมาะสมบนยีน nifH ของ genus *Azospirillum*

H <i>Azospirillum brasiliense</i> Sp245	265	TCCGGCGGTCCGGAGCCGGGGGTCGGCTGCGCCGGCCGCGCGCGTGATCACCTCGATCAA
nifH <i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	274	TCCGGCGGTCCGGAGCCGGGGGTCGGCTGCGCCGGCCGCGCGCGTGATCACCTCGATCAA
nifH <i>Azospirillum</i> sp B510	274	TCCGGCGGTCCGGAGCCGGGGGTCGGCTGCGCCGGCCGCGCGCGTGATCACCTCGATCAA

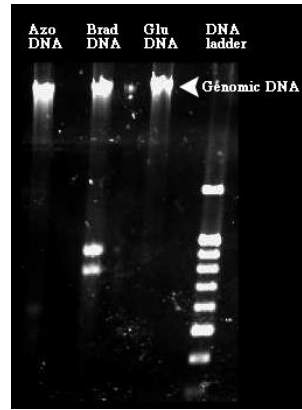
ภาพที่ 5 แสดง Conserve region ของยีน nifH ใน *Azospirillum* อย่างน้อย 3 สายพันธุ์

ตารางที่ 1 โพรเมอร์ ที่ได้รับการออกแบบสำหรับแบคทีเรียแต่ละ Genus และ/หรือ species

หมายเหตุ	Name	Sequence(5'-3')	Size(bp)
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Gluconacetobactor</i>	Glu_F1	ATCGGCTACAAGGGCATCAA	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Gluconacetobactor</i>	Glu_R1	AGGGCTTGTTTCATCGGTCTT	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Herbaspirillum</i>	Herb_F1	TCACTCAGACAAATCGCCTT	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Herbaspirillum</i>	Herb_R1	ATTCATCAACGACAGGCATC	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Burkhoderia</i>	Burk_F1	GACGTGATGAAGATCGG	17
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Burkhoderia</i>	Burk_F2*	TGCTCGGCGACGTGGTGT	18
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Burkhoderia</i>	Burk_R1*	ACACCACGTCGCCGAGCA	18
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Burkhoderia</i>	Burk_R2*	CATCGTGATCGGCGTCGG	18
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Burkhoderia</i>	Burk_R3*	TCCATCGTGATCGGCGTC	18
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Klebsiella</i>	Kleb_F1	GATGGGTAAGAAAGTGATGA	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Klebsiella</i>	Kleb_R1	AATGATGCTGGTGTCTTCTT	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Enterobacter</i>	Ent_F1	CGAAAGCGCAGAACACCATT	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Enterobacter</i>	Ent_R1	TGCAGGTCGGGTCATATTCG	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Bradyrhizobium</i>	Brad_F1	ACAAATCGCCTTCTACGGGA	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Bradyrhizobium</i>	Brad_R1	ACGCGGCACGAAGTAGATCA	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_F1	ATCCGAAGGCCGACTCGACC	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_F2	TGGTCGAGCTGGATCAGAAG	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_F3	GCTGGATCAGAAGATCCTGA	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_R1	CGCTCGTTGCAGATCAGGCC	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_R2	GTTGCAGATCAGGCCGCCGA	20
ใช้แอมป์นิน nifH <i>Azospirillum</i>	Azo_R3	ATGCCCTTGGCGATGTTGTT	20

3. การทดสอบ sensitivity และ specificity ของ โพรเมอร์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร) และดำเนินการสกัดจีโนมแบคทีเรีย 3 สกุล *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Gluconacetobactor* (Genomic DNA mini kit, blood and culture cell – geneaid) ทดสอบความบริสุทธิ์โดย run agarose gel 2% พบว่า genomic DNA ของแบคทีเรียทั้งสามชนิดมีความบริสุทธิ์ในระดับที่น่าพอใจแต่ในส่วนของ *Bradyrhizobium* พบว่ามีลักษณะของ DNA fragment เกิดขึ้นจึงอาจต้องดำเนินการเลี้ยงเซลล์ใหม่และสกัดใหม่อีกครั้ง (ภาพที่ 6) จากนั้นทดสอบ Genomic DNA ด้วย โพรเมอร์ 4 คู่ AzoF1+AzoR3 และ AzoF2+AzoR3 สำหรับ *Azospirillum* genomic DNA, BradF1+BradR1 สำหรับ *Bradyrhizobium* genomic DNA, GluF1+GluR1 สำหรับ *Gluconacetobactor* genomic DNA (ตารางที่ 2,3)



ภาพที่ 6 การทดสอบความบริสุทธิ์ของ Genomic DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย 3 ชนิด

Azo DNA : Azospirillum genomic DNA, Brad DNA : Bradyrhizobium genomic DNA,

Glu DNA : Gluconacetobactor genomic DNA

ตารางที่ 2 แสดงส่วนผสมของ Conventional PCR สำหรับตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงของ ไพรเมอร์

Recipe	Volume (μ l)
GoTaq®Green Master Mix	12.5
Forward ไพรเมอร์ (Final concentration: 500 nM)	1.25
Reverse ไพรเมอร์ (Final concentration: 500 nM)	1.25
H ₂ O	9
DNA	1
Total	25

ตารางที่ 3 กระบวนการทำ PCR สำหรับ ไพรเมอร์ 4 คู่

Cycle		State	
94°C	5 minutes	Denaturation	
94°C	30 second	25 cycles	
54°C	30 second		Anealing
72°C	30 second		Elongation
72°C	7 minutes	Elongation	
4 °C	∞	Conservation	

จากผล PCR พบว่า ไพรเมอร์ AzoF1+AzoR3 และ AzoF2+AzoR3 สำหรับ *Azospirillum* genomic DNA มีความเฉพาะเจาะจงสูงและสามารถตรวจพบ DNA ของแบคทีเรียในตระกูล *Azospirillum* ได้ โดยในส่วนของ ไพรเมอร์ AzoF1+AzoR3 ได้ PCR product ที่ขนาด 385 bp ไม่พบปฏิกิริยา PCR ใน NTC (Negative control) และพบ Unspecific PCR product ใน control genomic DNA ของแบคทีเรียชนิดอื่นซึ่งสามารถบอกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ในส่วนของ ไพรเมอร์ AzoF2+AzoR3 ได้ PCR product ที่ขนาด 424 bp ไม่พบปฏิกิริยา PCR ใน NTC (Negative control) และพบ Unspecific PCR product ใน control genomic DNA ใน *Gluconacetobactor* genomic DNA มีขนาดใหญ่กว่า 424 bp เล็กน้อยแต่สัญญาณอ่อนมากและไม่พบ Unspecific PCR product ใน *Bradyrhizobium* genomic DNA

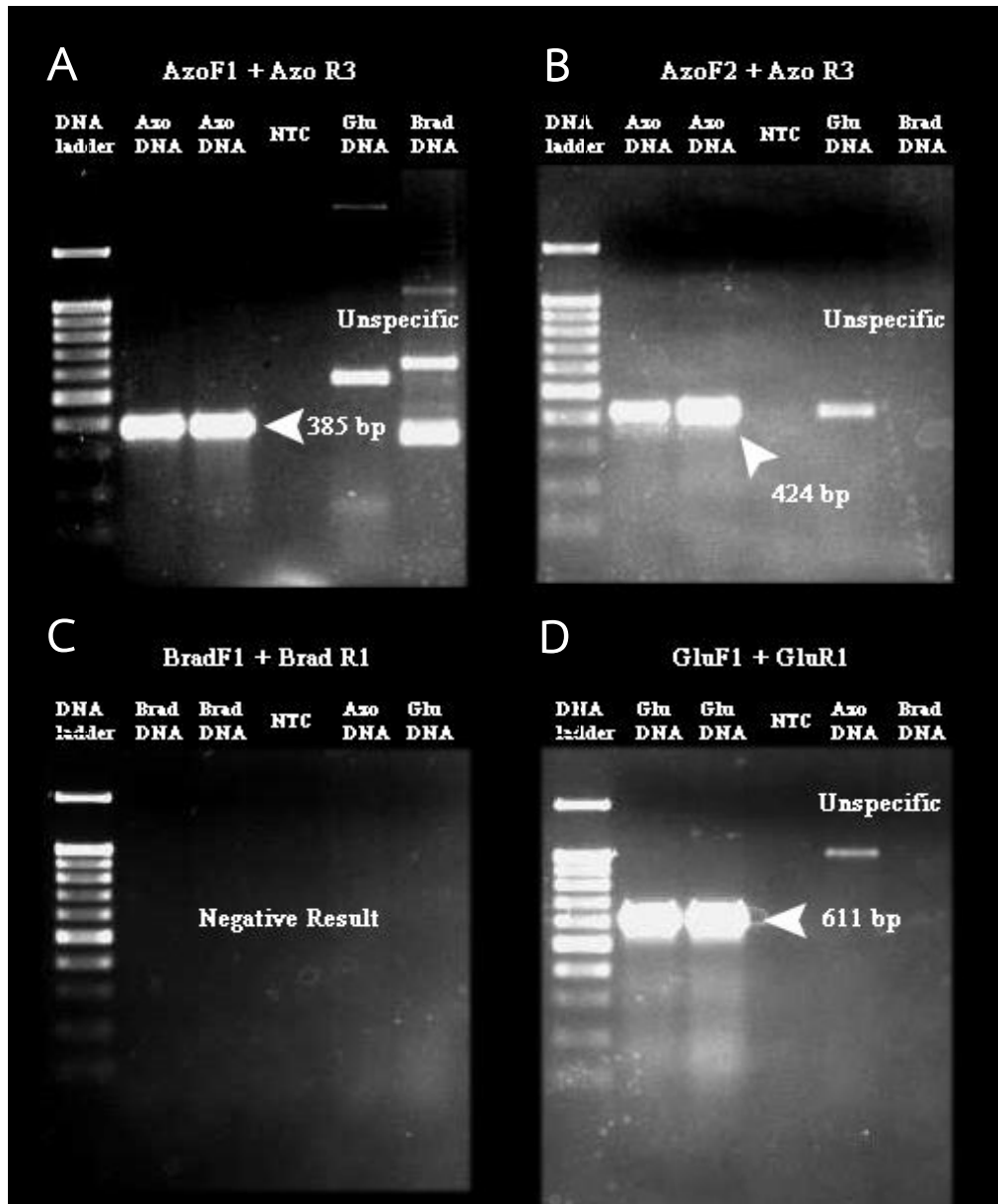
ในส่วนของ ไพรเมอร์ BradF1+BradR1 สำหรับ *Bradyrhizobium* genomic DNA ไม่พบปฏิกิริยาใดๆ เกิดขึ้น (ภาพที่ 7,C) ซึ่งอาจจะเกิดปัญหาจาก ไพรเมอร์ หรือ จาก *Bradyrhizobium* genomic DNA ซึ่งพบว่ามีลักษณะของการ Fragment เกิดขึ้น (ภาพที่ 6) ต้องดำเนินการเลี้ยงเชื้อและสกัด DNA ใหม่เพื่อตรวจสอบผลการทดลองอีกครั้ง

สำหรับ ไพรเมอร์ GluF1+GluR1 ใน *Gluconacetobactor* genomic DNA มีความเฉพาะเจาะจงสูงและสามารถตรวจพบ DNA ของแบคทีเรียในตระกูล *Gluconacetobactor* ได้ โดยในส่วนของ ไพรเมอร์ AzoF1+AzoR3 ได้ PCR product ที่ขนาด 611 bp ไม่พบปฏิกิริยา PCR ใน NTC (Negative control) และพบ Unspecific PCR product ใน control genomic DNA ของแบคทีเรียชนิดอื่นซึ่งสามารถบอกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน

เมื่อทดสอบการ Screening เบื้องต้นแล้วพบว่าวิธีการออกแบบ ไพรเมอร์ ได้ผลดีและสามารถตรวจพบแบคทีเรียตามที่ต้องการได้ด้วยความเฉพาะเจาะจง ทั้งนี้ในขั้นต่อไปจะเป็นการเลี้ยงและสกัด Genomic DNA เพิ่มเติมจากแบคทีเรียอีก 5 ตระกูลคือ *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium japonicum* และนำมาตรวจวิเคราะห์กับ ไพรเมอร์ ที่เหลือ

4. การถอดรหัสพันธุกรรม PCR product และการออกแบบ probe สำหรับ Quantitative realtime PCR

ดำเนินการทำ Conventional PCR ใน ไพรเมอร์ AzoF1+AzoR3 และ AzoF2+AzoR3 สำหรับ *Azospirillum* genomic DNA และ ไพรเมอร์ GluF1+GluR1 ใน *Gluconacetobactor* genomic DNA จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการ run 2% gel agarose และตัดเจล จากนั้นส่งวิเคราะห์สายรหัสพันธุกรรม เพื่อเตรียมออกแบบ probe (Solegent, Korea)



ภาพที่ 7 (A,B) แสดงผลการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์ AzoF1+AzoR3 และ AzoF2+AzoR3 ใน *Azospirillum* genomic DNA (C) แสดงผลการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์ BradF1+BradR1 ใน *Bradyrhizobium* genomic DNA (D) แสดงผลการทำ PCR ของคู่ไพรเมอร์ GluF1+GluR1 ใน *Gluconacetobacter* genomic DNA (หมายเหตุ NTC : Negative control, Azo DNA : *Azospirillum* genomic DNA, Brad DNA: *Bradyrhizobium* genomic DNA, Glu DNA : *Gluconacetobacter* genomic DNA)

9. สรุปผลการทดลอง

ศึกษาข้อมูลทาง Bioinformatic ของยีน NifH ในแบคทีเรียในดิน 7 ชนิดคือ *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Klebsiella* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Herbaspirillum* sp. จาก Database NCBI เมื่อนำยีน NifH มาวิเคราะห์ พบว่ามี Consensus position 90.0%

และมี Identity position อยู่ 45 % เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาสร้าง Phylogenetic dendrogram ยีน nifH สามารถจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจนหากเป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน genus ที่แตกต่างกันและสามารถจัดกลุ่ม species ให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้หากเป็น Genus เดียวกัน จึงสรุปได้ว่าสามารถใช้ยีน nifH ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์นี้ได้จึงดำเนินการออกแบบและสังเคราะห์ ไพโรเมอร์ จาก Identity position ภายในแต่ละ species รวมถึงทดลองออกแบบ universal ไพโรเมอร์ ของทุก species

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ไพโรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียในตระกูล *Azospirillum* และ *Gluconacetobacter* สายพันธุ์ไทย
2. ได้ข้อมูลแบคทีเรียและปริมาณซึ่งตรวจพบในอ้อยสายพันธุ์ไทย ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปศึกษาต่อในเชิงลึก

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

12. เอกสารอ้างอิง

- Bashan, Y. and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36:591-608.
- Munos-Rojas, J. and J. Caballero-Mellado, 2003. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and effect on plant grow. Microbiol. Ecol., 46: 454-464.
- Ozakman M. and N.W. Schaad. A real-time BIO-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in asymptomatic potato tubers1. Can. J. Plant Pathol. 25: 232-239 (2003)
- Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. (Editors). 2001a. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn.
- Valeria R. L., J. C. Bessalho-Filho, Luiza M. A., Fabio V. R., E. Daros and Ricardo A. O., 2012. The Selection of Sugarcane Families That Display Better Associations with Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Journal of Agronomy, 11: 43-52.