ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การจำแนกสายพันธุ์ของ *Bradyrhizobium* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ยีน *nodC*

ชื่อผู้เขียน นางสาววรอนงค์ มาภักดี

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หทัยชนก เนียมทรัพย์	ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร.เขมิกา สงแจ้ง	กรรมการ
นางสาวอรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง	กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนก *Bradyrhizobium* สายพันธุ์พื้นเมืองในภาคเหนือของไทยจำนวน 12 ตัวอย่างโดยใช้ยีน *nodC* ซึ่งมีบทบาทสำคัญสำหรับการอยู่ร่วมกันระหว่างพืชและไรโซเบียม เริ่มต้นโดยการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับส่วนหนึ่งของยีน *nodC* ที่ค้นหาจากฐานข้อมูล GenBank โดยการทำ multiple alignment เพื่อใช้ในปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ผลการทดลองพบว่าเชื้อตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่างเกิดผลผลิตจาก PCR ที่มีขนาดแถบของดีเอ็นเอตามที่คาดหมายคือ ขนาดประมาณ 400 คู่เบส เพียง 8 ตัวอย่าง และ พบเชื้อตัวอย่างบางชนิดเกิดแถบดีเอ็นเออื่น ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า 5 กิโลเบสนอกเหนือจากแถบดีเอ็นเอที่คาดหมาย สำหรับ *Bradyrhizobium elkanii* สายพันธุ์อ้างอิง USDA31 และ USDA94 และ *Bradyrhizobium japonicum* สายพันธุ์อ้างอิง USDA110, USDA122 และ USDA123 ที่ใช้ในการทดลองเกิดผลผลิตจาก PCR เพียง 3 ชนิดคือ USDA94, USDA122 และ USDA123 โดยที่ USDA94 และ USDA123 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 5 กิโลเบสด้วย

ผลผลิตจาก PCR เมื่อผ่านการย่อยสลายด้วย restriction enzyme 3 ชนิด คือ เอนไซม์ *Hha*I, *Mbo*I และ *Taq*I โดยอาศัยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าเชื้ออ้างอิง และ เชื้อตัวอย่างทุกชนิดสามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์อย่างน้อยหนึ่งชนิด ไม่พบเชื้อตัวอย่างและเชื้ออ้างอิงใดๆ ที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เอเหมือนกันทั้งหมดเมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสามชนิด แม้แต่ USDA122 และ USDA123 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิงของสปีชีส์ *Bradyrhizobium japonicum* พบว่ามีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสามชนิดแตกต่างกันอย่างชัดเจน เชื้อตัวอย่างที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสามชนิดคล้ายคลึงกับรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์อ้างอิงมากที่สุด คือ NA6371 ซึ่งคล้ายคลึงกับ USDA94 สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ว่า USDA94, NA6264, NA6367 และ NA6371 จัดเป็นเชื้อในกลุ่มที่ผลิต indole acetic acid (IAA) และ เชื้อทั้งสี่ชนิดนี้เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Mbo*I จะมีแถบดีเอ็นเอที่พบร่วมกันคือ แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 150 คู่เบส จากผลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าส่วนหนึ่งของยีน *nodC* ที่ได้จากเทคนิค PCR มีลำดับเบสแตกต่างกันมาก เมื่อใช้ในเทคนิค PCR-RFLP จึงให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่หลากหลาย ดังนั้นวิธีนี้จึงใช้จำแนก *Bradyrhizobium* สายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันมากออกจากกันได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Classification of *Bradyrhizobium* by PCR Technique Based on a *nodC* Gene

Author Miss Wora-anong Mapakdee

M.S. Biotechnology

Examining Committee

Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup	Chairman
Lect. Dr. Khemika Songjang	Member
Miss Arawan Shutsrirung	Member

Abstract

Classification of 12 native *Bradyrhizobium* isolated from northern Thailand was performed by designing primers specific to a partial sequence of a *nodC* gene that plays important role in inducing symbiosis between plant and rhizobia. Primers were designed by alignment of *nodC* genes retrieved from GenBank database. Polymerase chain reaction (PCR) using obtained primers with purified genomic DNA of 12 native strains showed that only 8 samples gave expected bands of approximately 400 bp and some of them showed unexpected bands of approximately 5 Kb. Of the 2 reference strains of *Bradyrhizobium elkanii* (USDA31, USDA94) and the 3 reference strains of *Bradyrhizobium japonicum* (USDA110, USDA122, USDA123), only 3 strains (USDA94, USDA123 and USDA122) yielded the expected band and the unexpected band was found in PCR patterns of the first 2 strains.

All reference strains and native isolates can be cut by at least one restriction endonuclease when amplified products from PCR was digested with 3 restriction endonucleases, namely *Hha*I, *Mbo*I and *Taq*I, in a technique collectively called PCR-RFLP.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

None of reference strain and native isolate showed the same PCR-RFLP pattern even USDA122 and USDA123, the reference strains of the same species, *Bradyrhizobium japonicum*, showed the distinct DNA patterns. The reference strain and native isolate that had the most similar DNA patterns were NA6371 and USDA94, in agreement with recent research that USDA94, NA6264, NA6367 and NA6371 were in the same indole acetic acid (IAA) producing group. We also found that these 4 isolates shared the 150 bp band in PCR-RFLP pattern when treated with *Mbo*I. The overall results showed that PCR-RFLP targeting to partial *nodC* genes yielded variable DNA patterns suggesting that partial *nodC* genes had variable sequences. Thus this method can be used to identify the closely related *Bradyrhizobium.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved