เรสทริกชัน แฟรกเมนท์ เลงธ์ โพลีมอฟิซึม ของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน

Bradyrhizobium japonicum

นางสาว ณัฐพร สุนทรวิจารณ์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-902-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018049 i17228918

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM IN NITROGEN FIXING BACTERIA *Bradyrhizobium japonicum*

Miss Nattaporn Sunthornvicharana

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-579-902-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เรสทริกชันแฟรกเมนท์ เลงธ์ โพลิมอพิซึม ของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน Bradyrhizobium japonicum
โดย	นางสาวณัฐพร สุนทรวิจารณ์
หลักสูตร	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. นันทกร บุญเกิด

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต)

.....ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. นันทกร บุญเกิด)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ณัฐพร สุนทรวิจารณ์ : เรสทริกชัน แฟรกเมนต์ เลงธ์ โพลีมอฟิซึม ในแบคทีเรียที่ตรึง-ไนโตรเจน Bradyrhizobium japonicum (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLY-MORPHISM (RFLP) IN NITROGEN FIXING BACTERIA Bradyrhizobium japonicum) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ศิริพร สิทธิประณีต. 98 หน้า. ISBN 974-579-902-2

การศึกษานี้เป็นการศึกษารูปแบบ RFLP ระหว่างสายพันธุ์ B. japonicum 23 สายพันธุ์ โดยการทำ Southern blot และ hybridize กับ nif structural genes และ common nod genes และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน การเกิดปม, ลักษณะการเกิดปมกับจีนที่เกี่ยวข้องคือ nif และ nod genes ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน การเกิดปมกับถั่วเหลือง สจ.5 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ทั้ง 23 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ และพบว่าสายพันธุ์ส่วนใหญ่ให้ปมอยู่ในระดับสูง 30-43 ปมต่อต้น และในระดับปานกลาง 24-26 ปมต่อต้น และในระดับต่ำมีเพียง 1 สายพันธุ์ 20 ปมต่อต้น ลักษณะการเกิดปมแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่ม 1 มีการกระจายตามรากแก้วและรากแขนงมี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ THA2, THA5 และ USDA 117 และอีกกลุ่มปมจะเกิดตามรากแก้วซึ่งได้แก่สายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่เหลืออีก 20 สายพันธุ์

ผลจากการศึกษาจากรูปแบบการย่อยโครโมโซมัลดีเอนเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (restriction pattern) โดยใช้เอนไซม์ EcoRI, HindIII, PstI, BamHI พบว่าจำแนกความแตกต่างจากรูปแบบที่เกิดขึ้นทั้ง 9 รูปแบบ ความแตกต่างจากรูปแบบจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ 4 สายพันธุ์ คือ USDA76, USDA94, USDA142 และ TAL 432 อีก 19 สายพันธุ์จำแนกได้เป็นกลุ่ม ๆ ผลจากการศึกษารูปแบบของ nifHDK ไฮบริไดเซชันพบว่ารูปแบบที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบจากการย่อยด้วย EcoRI และจำแนกได้เป็น 5 รูปแบบจากการย่อยด้วย PstI จากรูปแบบของ nod ABC และ D ไฮบริไดเซชันกับโครโมโซมัลดีเอนเอ ที่ได้จากการย่อยด้วย BamHI ยกเว้นสายพันธุ์ USDA35, USDA184 และ TAL377 พบว่าจำแนกได้ 8 รูปแบบ

จากผลพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง nitrogenase activity กับรูปแบบที่ได้จากการใช้ nif HDK เป็นตัวติดตามจำนวนปมที่เกิดขึ้นไม่มีความสัมพันธ์กับรูปแบบที่ได้จากการใช้ nod ABC และ D นั่นแสดงถึงประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน การเกิดปมนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับ nif และ nod โดยตรง ซึ่งอาจจะมี gene ตัวอื่น ๆ ที่มีความสัมพันธ์หรือมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจนและเกิดปม

ผลจากการจัดจำแนกโดย restriction pattern พบว่ามีความสัมพันธ์กับการจัดแบ่งกลุ่มโดยวิธี ELISA ที่ดำเนินการทดลองโดย ดร.นันทกร และคณะ. 1989 และจากการใช้ nod ABC และ D เป็นตัวติดตามที่จำแนกความแตกต่างได้สัมพันธ์กับ restriction pattern

ภาควิชา .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2534

ลายมือชื่อนิสิต ณัฐพร สุนทรวิจารณ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

NATTAPORN SUNTHORNVICHARANA : RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) IN NITROGEN FIXING BACTERIA Bradyrhizobium japonicum. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SIRIPORN SITHIPRANEED, Ph.D. 98 PP.
ISBN 974-579-902-2

The objective of this study was to classify Bradyrhizobium japonicum strains by RFLP which utilized southern blot hybridization with nif structural genes and common nod genes and to determine the relationship between the RFLP groups and their efficiency in nodulation and nitrogen fixation. Twenty three strains of B. japonicum were used in the RFLP analysis and tested on soybean SJ.5 cultivar. It was found that enzyme nitrogenase activities from nodules as measured by ARA of 23 strains were not significantly different. Nodulation by different strains were, however, different. Majority of strains formed 30-43 nodules per plant, some strains formed medium of 24-26 nodules only one strain formed the lowest number of 20 nodules per plant. It was also found that the 23 rhizobial strains formed two types of nodule pattern. The strains THA2, THA5 and USDA 117 formed nodules scatter on lateral root while the rest of 20 strains formed nodules mainly on tap root.

Restriction patterns using EcoRI, HindIII, PstI, BamHI could classify 23 strains into 9 groups. Among the 9 groups, strain USDA76, USDA94, USDA142 and TAL 432 were grouped seperately; eg, USDA76 in group 6, USDA94 in group 7, USDA142 in group 8 and TAL 432 in group 9. Hybridization with nif probe on EcoRI and PstI digests one could group 23 strains into 4 and 5 groups respectively. However, when nod ABC and D probe was used to hybridize with total DNA digested with BamHI the rhizobial strains except USDA 35, USDA184, and TAL 377, could be classified into 8 groups.

From these results, no relationship between nitrogenase activity and RFLP grouping by nif HDK probe to the effectiveness in nitrogen fixation of rhizobial strain on SJ.5 soybean was shown. Furthermore, there was no relationship of RFLP grouping by nod ABC and D probe and nodulation detected. The probable explanation may due to the probe used were not sensitive to identify effectiveness in rhizobia.

It was found that there was relationship of grouping between restriction pattern and ELISA analysis. RFLP grouped by nod ABC and D probe were classified and results were more different than the one of nif HDK grouping ; however, they resulted to serological grouping by ELISA (Boonkerd,N.,et.al.,1989)

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา Biotechnology ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 1991 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต และ ดร. นันทกร บุญเกิด ที่กรุณาเป็นผู้ควบคุมการวิจัย และให้คำแนะนำจนวิทยานิพนธ์ที่สำเร็จลงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์ครั้งนี้อันเป็นประโยชน์อย่างมาก

กราบขอบพระคุณอย่างยิ่งต่อรองศาสตราจารย์ ดร.จริยา บุญญวัฒน์ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ อาจารย์ ดร. วิเชียร ริมพณิชกิจ

กราบขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีที่ได้ให้ความกรุณาและคำชี้แนะตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

กราบขอบพระคุณพี่ ๆ และเพื่อนทุกคนในติกไรโซเบียม ที่ช่วยเป็นกำลังใจให้กับผู้เขียนตลอดมา

ขอบคุณหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม ภาควิชาชีวเคมี กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดินติกไรโซเบียมกรมวิชาการเกษตร

ขอบคุณเพื่อน ๆ ในภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุก ๆ คน

ขอบคุณเพื่อนเก่าจากมหาวิทยาลัยมหิดลที่ช่วยเป็นกำลังใจและให้งานพิมพ์วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี

ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยและขอบคุณโครงการ EEC ที่ให้ทุนการวิจัยผ่าน ดร. นันทกร บุญเกิด

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ฉ
กิตติกรรมประกาศ		ช
สารบัญตาราง		ซ
สารบัญรูป		ฌ
บทที่		
1	บทนำ	1
2	วิธีการทดลอง	18
3	ผลการทดลอง	32
4	วิจารณ์ผลการทดลอง	69
5	สรุปผลและข้อเสนอแนะ	74
เอกสารอ้างอิง		76
ภาคผนวก		
ประวัติผู้เขียน		

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สมบัติของ Mo Fe proteins จากแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สกุลต่าง ๆ	8
2	สมบัติของ Fe proteins จากแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สกุลต่าง ๆ	9
3	โปรตีนต่าง ๆ จากจีนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส พร้อมทั้งหน้าที่ได้จากการถอดรหัสของจีนไนโตรจิเนสของ Klebsiella pneumoniae M5a1 (จาก Kennedy และคณะ, 1981)	10
4	สายพันธุ์ของ Bradyrhizobium japonicum และแหล่งที่มา	25
5	การวิเคราะห์ค่า ARA, จำนวนปม,น้ำหนักปมแห้งจากการทดสอบ B. japonicum strains กับถั่วเหลืองสจ. 5 โดยวิธี Leonard jar	38
6	การจัดกลุ่ม B. japonicum สายพันธุ์ต่างๆ โดยการวิเคราะห์จากรูปแบบ RFLP ใช้ nifHDK เป็นตัวติดตาม และแสดงขนาดในแต่ละรูปแบบ	56
7	การจัดกลุ่ม B. japonicum สายพันธุ์ต่างๆ โดยการวิเคราะห์จากรูปแบบ RFLP ใช้ nod ABC และ D1 เป็นตัวติดตามและแสดงขนาดในแต่ละรูปแบบ	60
8	การจัดกลุ่ม B. japonicum สายพันธุ์ต่างๆ โดยการวิเคราะห์จาก restriction pattern, RFLP จากการใช้ nif HDK, RFLP จากการใช้ nod ABC และ D เป็นตัวติดตาม	63
9	การจัดจำแนกกลุ่มของ B. japonicum 23 สายพันธุ์ต่างๆ โดยการทดสอบจากปฏิกิริยา ELISA	68

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	จีนไนโตรจิเนสจาก Klebsiella pneumoniae M5a1 ขนาดประมาณ 24 kb แสดงการเรียงตัวของ 17 จีน ลูกศรแสดงทิศทาง M5 transcription ของโอเปอรอนทั้ง 7	6
2	การควบคุมการถอดรหัสจีนไนโตรจิเนส	7
3	ขั้นตอนแสดงการเกิดปมในถั่วเหลือง	16
4	ตำแหน่งการจัดเรียงตัวของ nodulation genes ที่พบใน R. meliloti	17
5	การควบคุมการถอดรหัสของ common nod genes (nod ABC) และ specific nod genes (nod FEG และ nod H)	18
6	กราฟแสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ B. japonicum กับถั่วเหลือง สจ. 5 โดยวิธี leonard jar	37
7	ตำแหน่งการเกิดปมของเชื้อ B. japonicum กับถั่วเหลือง สจ. 5	39
8	ผลการสกัดโครโมโซมัลดีเอนเอของ B. japonicum สายพันธุ์ต่าง ๆวิเคราะห์ผลบน 0.7 เปอร์เซนต์ อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส	43
9	ผลจากการย่อยโครโมโซมัลดีเอนเอแต่ละสายพันธุ์ของ B. Japonicum ด้วย EcoRI วิเคราะห์ผลบน 0.7 เปอร์เซนต์อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส	44
10	ผลจากการย่อยโครโมโซมัลดีเอนเอแต่ละสายพันธุ์ของ B. Japonicum ด้วย BamHI วิเคราะห์ผลบน 0.7 เปอร์เซนต์ อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส	45

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
11	ผลจากการย่อยโครโมโซมัลดีเอนเอแต่ละสายพันธุ์ของ B. Japonicum ด้วย HindIII วิเคราะห์ผลบน 0.7 เปอร์เซนต์อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส	46
12	ผลจากการย่อยโครโมโซมัลดีเอนเอแต่ละสายพันธุ์ของ B. Japonicum ด้วย PstI วิเคราะห์ผล บน 0.7 เปอร์เซนต์อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส	47
13	ผลจากการย่อยโครโมโซมัลดีเอนเอของ B. Japonicum สายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ กัน BamHI, EcoRI, HindIII และ PstI วิเคราะห์ผล บน 0.7 เปอร์เซนต์อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส	48
14	ผลจากการย่อยโครโมโซมัลดีเอนเอแต่ละสายพันธุ์ของ B. Japonicum ย่อยด้วย EcoRIวิเคราะห์ผล บน 0.7 เปอร์เซนต์อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส	49
15	การตรวจสอบพลาสมิดดีเอนเอ pSA 30 โดยการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์	51
16	การตรวจสอบพลาสมิดดีเอนเอ pSL 42 โดยการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์	52
17	ผลการวิเคราะห์ Kinetic of Nick Translation ของพลาสมิด pSA 30 และ pSL 42	53
18	รูปแบบของ nif hybridization ที่ได้จากการทำ Southern blot hybridization กับพลาสมิด pSA 30 ของสายพันธุ์ต่าง ๆ ย่อยด้วย EcoRI	54
19	รูปแบบของ nif hybridization ที่ได้จากการทำ Southern blot hybridization กับพลาสมิด pSA 30 ของสายพันธุ์ต่าง ๆ ย่อยด้วย PstI	55

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
20	รูปแบบของ nod hybridization ที่ได้จากการทำ Southern blot hybridization กับพลาสมิด pSL 42 ของสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อย่อยด้วย BamHI	59
21	รูปแบบของ M13 hybridization ที่ได้จากการทำ Southern blot hybridization กับ M13 ของสายพันธุ์ต่างเมื่อย่อยด้วย EcoRI	62