รหัสโครงการ SUT3-304-38-24-13

รายงานการวิจัย

การใช้ gus ยีนเพื่อศึกษาพฤติกรรมของไรโซเบียมในระบบนิเวศ

Using gus gene for study rhizobial behavior in ecosystem

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ศาสตราจารย์.ดร.นันฟกร บุญเกิด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2538-2539

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2545

บทคัดย่อ

ได้ทำการคัดเลือกชนิดของยีนที่จะนำมาใช้โคลนเข้าสู่แบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียม ได้แก่ ยีนคลอเรสเตอรอลออกซิเดส (Chloresterol oxidase) ยีนโปรตีนสีเขียวเรืองแสง (GFP : Green Flvorescent Protein gene) และยีนบีต้ากูลคูโรนิเดส (β-glucuronidase, *gus* gene) ในการเลือกใช้ยีนคลอเรสเตอรอลออกซิเดสที่ทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิด PCKM1 โดยเลือก constiturive promotor จาก megaplasmid ของ *Mesorhizobium huakii* bv. Renge สายพันธุ์ B3 จนได้พลาสมิดลูกผสมใหม่ที่ชื่อ pCBBR1 จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่ *E. coli* DH5α พบว่ามีการแสดงออกที่ของเอนไซม์ที่สมบรูณ์แต่คาดว่าไม่น่าจะเหมาะสม เมื่อนำไปใช้กับไรโซเบียมเพราะลักษณะสีของการแสดงออกที่ปรากฏมีมีแดงเหมือนสีของ leghaemoglobin ในปมที่สมบูรณ์ของถั่วซึ่งทำให้ยากต่อการจำแนกว่าสายพันธุ์มดเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นหรือสายพันธุ์ที่ใส่ลงไป ส่วนยีนชุดที่สองคือ *gfp* gene ได้ทำการเชื่อมชุดยีนลงไปในพลาสมิด pBBR 122 ที่มี Ptac promotor จนได้พลาสมิดลูกผสม pBBR-TGFPuv จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่ *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ B34 ด้วยวิธี electroporation ผลการแสดงออกสามารถตรวจสอบได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ทำให้เห็นโคโลนีเป็นสีเขียวเรืองแสง ซึ่งสามารถตรวจสอบพฤติกรรมการอยู่รอดได้ ในส่วนของ *gus* gene นั้นได้ใช้กับ *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ TAL 1000 จากถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) และ *B. japonicum* TAL 379 ซึ่งแยกได้จากถั่วเหลือง (*Glycine max*) โดยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. ที่เป็น conjugants แล้วจะนำมาทำเป็นหัวเชื้อเพื่อคลุกกับเมล็ดถั่วที่เหมาะสมในแต่ละพืชอาศัย โดยหลังจากปลูกไปแล้ว 30 วัน จะเก็บรากถั่วมาย้อมด้วย x-gluc ในการทดสอบการเข้าไปอาศัยอยู่ในปมรากถั่วของ *Bradyrhizobium* sp. ครั้งนี้จะทดสอบโดยใช้ตัวอย่างดินหลายชนิด เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไรโซเบียมที่สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในปมรากถั่ววิเคราะห์จากจำนวนเนื้อเยื่อของปมที่ปรากฏเป็นสีฟ้าจากการย้อมด้วย x-gluc ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าดินที่เก็บจากบริเวณที่ปลูกต้นยูคาลิปตัสพบว่ามีการแก่งแย่งกับไรโซเบียมที่ใส่ลงไปน้อยที่สุดในขณะที่ดินบริเวณที่ปลูกต้นสักมีการแข่งขันสูงสุดในการเข้าไปสร้างปมมากกว่าดินจากบริเวณอื่น ๆ ซึ่งดูเหมือนจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณอินทรีย์ที่มีน้อยในดินชุดนี้

Abstract

To monitor the rhizobial behavior, three reporter genes as chloesterol oxidase (*cho*A), green fluorescent protein (*gfp*) and β–glucoronidase (gus) were selected. ChoA gene was cloned into pCKM1 habouring constitutive promotor which was derived from megaplasmid of Mesorhizobium huakii bv. Renge strain B3. The hybrid plasmid was named as pCBBR1 then transformed into E. coli DH5α. The complete expression was achieved. However, red-developing colour from transformant was not appropriate to apply with rhizobium since presence the same colour of leghaemoglobin in plant nodule. For using *gfp* gene, it was pBBR-TGFPuv. Plasmid was transformed in *Bradyrhizobium* sp. B64 by electroporation technique. The expression of transformant was detected under UV-illuminator which gave the bright green colony. To investigate the behavior of Bradyrhizobia inocula in the field, *Bradyrhizibium* sp. TAL1000 isolated from *Arachis hypogaea* and B. japonicum TAL379 from *Glycine max* were choosen in this