รหัสโครงการ SUT3-304-47-24-17

รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในการปลูกข้าว

(Application of Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Rice)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ศาสตราจารย์ ดร.นันทกร บุญเกิด

นางสาวจันทร์เพ็ญ ประกำแหง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2547

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2551

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2547

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับ Prof. Kiwamu Minamisawa จากมหาวิทยาลัย Tohoku ประเทศญี่ปุ่นที่ได้ให้คำปรึกษา และข้อชี้แนะในการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมพร ชุณห์ลือชานนท์ ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำในการเก็บตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณนางสาวกมลลักษณ์ เทียมไธสง เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับความช่วยเหลือในการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าว

บทคัดย่อ

การศึกษาโครงสร้างของชุมชนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในแต่ละส่วนของต้นข้าว และช่วงการเจริญเติบโตของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในดินแบบต่างๆ พบว่ามีจำนวนประชากรระหว่าง 10^3 - 10^6 CFU ต่อกรัมน้ำหนักสดเนื้อเยื่อข้าว จากเชื้อที่แยกได้คิดเป็นกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้เป็น 56% ของประชากรทั้งหมด เมื่อแยกเป็นไอโซเลทเดี่ยวจากแต่ละชุมชนของเชื้อ พบว่าแต่ละไอโซเลทมีคุณสมบัติทั้งยับยั้ง และส่งเสริมการตรึงไนโตรเจนซึ่งกันและกัน เมื่อวิเคราะห์ถึงระดับสายพันธุ์ด้วยวิธีเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์กลุ่มดังกล่าวได้แก่ *Enterobacter dissolvens, Brevundimonas aurantiaca, Pantoea agglomerans, Pseudomonas* spp. และ *Enterobacteriaceae bacterium* นอกจากนี้ได้ศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน, การผลิต indole-3-acetic acid หรือ IAA และการผลิตเอนไซม์ pectinase และ cellulase ตรวจสอบตำแหน่งการอยู่อาศัยของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อข้าวโดยวิธียีนรายงาน (GUS gene reporter) พบว่ามีการอาศัยที่บริเวณราก ต้น และใบ โดยพบมากที่รากขนอ่อนและรากแขนง จากนั้นวิเคราะห์ชุมชนแบคทีเรียในเนื้อเยื่อข้าวด้วยวิธี PCR-DGGE โดยตรงจากต้นข้าวด้วย 16S rRNA primer สามารถวิเคราะห์ชุมชนจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ได้ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์หลักในชุมชนจุลินทรีย์นี้ได้แก่ *E. dissolvense, B. aurantiaca, P. agglomerans,* และ *Pseudomonas* spp. ในขณะที่ชุมชนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนสามารถแสดงให้เห็นโดยเทคนิค nested PCR-DGGE ร่วมกับ *nifH* primer การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์สามารถวิเคราะห์ได้โดยวิธี RT-PCR ด้วย *nifH* primer สามารถพบความแตกต่างได้ในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว ในแต่ละช่วงการเจริญเติบโต

ABSTRACT

The aims of this study were to determine the community structure and the *nifH* gene expression of endophytic diazotroph bacteria within each part and growing stage of cultivated rice in different soil conditions. The total population of the viable endophytic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L. cultivar KDML-105) was in the range between 10^3 to 10^6 CFU g^{-1} fresh weight of rice tissue. The fifty-six percent from the total isolates was most likely diazotroph. The interaction between a single isolate from each diazotrophic consortium was observed. Both the inhibition and promotion of N_2-fixation from each diazotrophic consortium were found. Some chosen isolates were identified at the species level, based on the nearly full sequence analysis of the 16S rRNA gene. The results showed that they are closely related to *Enterobacter dissolvens, Brevundimonas aurantiaca, Pantoea agglomerans, Pseudomonas* spp., and *Enterobacteriaceae bacterium*. The carbon sources utilization, and production of indole-3-acetic acid, pectinase and cellulase were also determined. The bacterial localization in the rice tissue was detected in roots, stems and leaves. The most intense color on some of the root hair and younger lateral roots were observed on the basis of GUS reporter gene. The PCR-DGGE analysis conducted directly from the rice tissue using 16S rRNA primer could elucidate the endophytic bacterial communities. The major bacterial strains in this community belong to *E. dissolvense, B. aurantiaca, P. agglomerans,* and *Pseudomonas* spp. In addition, the community of diazotrophic bacteria inside the rice tissue was demonstrated using nested PCR-DGGE analysis with *nifH* primer. In order to detect the bacterial nitrogen fixing activity in the rice tissue, RT-PCR approach was carried out. The results displayed that the *nifH* gene expression could be detected in different parts and growing stages of rice plants.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญภาพ ..... ช

คำอธิบายสัญลักษณ์ ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
3. ขอบเขตของการวิจัย 2
4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 2

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างข้าวและดิน 3
2. ศึกษาลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ที่แยกจากข้าวได้ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ 4
   - 2.1 การแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์จากข้าว 4
   - 2.2 วัดการตรึงไนโตรเจนด้วย Acetylene Reduction Assay (ARA) 4
   - 2.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาบางประการ 4
   - 2.4 IAA production Assay 4
   - 2.5 Plant polymer hydrolyzing activities 5
3. การสร้าง dendrogram 5
4. การทดสอบเพื่อยืนยันความเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ 5
   - 4.1 การเลี้ยงแบคทีเรียและรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 5
   - 4.2 Triparental mating 5
   - 4.3 การเตรียมเมล็ดข้าวและการ inoculate ด้วยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ 5
   - 4.4 Gus staining 6

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5. การวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ 6
5.1 การสกัด DNA ของ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์จากข้าว 6
5.2 การเพิ่มจำนวนของยีน 16S rRNA และยีน *nifH* โดยเทคนิค PCR 6
5.3 การวิเคราะห์โดย Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 6
5.4 การอ่านลำดับผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จาก DGGE และเซลล์ 7
6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nifH* ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) 7
7. Nucleotide sequence accession numbers 7

บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์

1. จำนวนประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าว 8
2. ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในข้าว 9
3. การศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าว 11
4. การวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในข้าวด้วยเทคนิค PCR-DGGE 13
5. การวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ด้วยเทคนิค nested PCR-DGGE 14
6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nifH* ด้วยเทคนิค RT-PCR 16
7. การศึกษาการอยู่อาศัย (Localization) ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในเนื้อเยื่อข้าว 17

บทที่ 4 บทสรุป 19

บรรณานุกรม 20

ประวัติผู้วิจัย 26

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1.	ลักษณะทางเคมีและกายภาพของดินที่ใช้ในการปลูกข้าว	3
2.	จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อเยื่อข้าว	8
3.	การวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอนเอของยีน16S rRNA (full length) ของไอโซเลทผสม และไอโซเลทเดี่ยวของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าว	10

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1.	กิจกรรมการต่อต้านจุลชีพย์ของ culture filtrate ของไอโซเลท VFR3-1 ต่อการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งแสดงให้เห็นจาก clear zone บนอาหารแข็ง โดย culture filtrate ของ VFR3-1-2 ที่หยดบน VFR3-1-1 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งที่ปราศจากไนโตรเจน ที่ 1 µl (A), 2 µl (B), 3 µl (C) และ 4 µl (D)	10
2.	แสดง Dendrogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ UPGMA cluster จากข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอน การผลิต IAA, pectinase และ cellulose และข้อมูล antibiotic resistant ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไฟท์ทั้ง 51 ไอโซเลท	12
3.	รูปแบบ PCR-DGGE ของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าว ลูกศรชี้ตำแหน่งเจลที่ถูกตัดและหาลำดับเบสดีเอนเอ (a-d) Azt., *Azotobacter* sp.; Asp., *Azospirillum* sp.; R, root; S, stem; L, leaf	14
4.	รูปแบบ Nested PCR-DGGE ของยีน *nifH* ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าว (R, root; S, stem; L, leaf)	15
5.	RT-PCR fingerprinting ของยีน *nifH* ด้วยเทคนิค Reverse transcriptase และ nested PCR ร่วมกับไพร์เมอร์ *nifH* (A). RT-PCR fingerprinting ของยีน 16S rRNA ใช้เป็นมาตรฐานในการวัดจำนวนของ RNA (B) R, root; S, stem; L, leaf; Azt., *Azotobacter* sp.; +1, rice inoculated with *Azotobacter* sp. as positive control; +2, Positive Control; -, negative control (no-template)	16
6.	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของราก ลำต้น และใบของข้าว ที่อายุ 5 วันหลังการปลูกถ่ายเชื้อ VFR5-3 ที่ติดฉลากด้วย GUS ตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อที่ราก (A) ลำต้น (B) และใบ (C) ลูกศรชี้บริเวณที่มีความหนาแน่นของกิจกรรม GUS ที่รากขนอ่อน (D) รอยต่อระหว่างราก (E) ลำต้น (F) และใบ (G)	18

คำอธิบายสัญลักษณ์

°ซ	องศาเซลเซียส
ชม.	ชั่วโมง
มล.	มิลลิลิตร
µg	microgram
µl	microlitre
bp	base pair
DEPC	Diethylpyrrocarbonate
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide 5' triphosphate
et al.	Et alia (and other)
g	gram
l	litre
M	molarity
mg	milligram
min	minute
mM	millimolar
N	normality
ng	nanogram
PCR	polymerase chain reaction
pmol	picomol
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolution per minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
UV	ultraviolet
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การตรึงไนโตรเจนโดยชีววิธี (Biological nitrogen fixation: BNF) เป็นกระบวนการตรึงไนโตรเจนตามธรรมชาติจากกิจกรรมของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ระหว่างพืชและจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนที่มีการศึกษาอย่างดี คือพืชตระกูลถั่วกับไรโซเบียม (Mylona et al. 1995) สำหรับในพืชกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชตระกูลหญ้า (Grameneous plants) ที่มีบทบาทสำคัญในการเกษตร เช่น อ้อย (*Saccharum* sp.) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) และข้าวโพด (*Zea mays*) พบว่ามีการอาศัยอยู่ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ (endophytic diazotroph bacteria) หรือแบคทีเรียที่ใช้ชีวิตทั้งหมดหรือบางช่วงอยู่ในเนื้อเยื่อพืช แล้วสามารถตรึงไนโตรเจน และเป็นประโยชน์แก่พืชเจ้าบ้านนั้นได้ โดยไม่ทำอันตรายหรือก่อให้เกิดโรคแก่พืช (Ladha et al., 1997) ตัวอย่างของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว เช่น *Gluconacetobacter diazotrophicus, Herbaspirillum* spp. และ *Azospirillum* spp. การอาศัยของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์กับพืชนั้น ไม่มีความจำเพาะเจาะจง แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์สามารถขยายเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชบริเวณไซเลมแล้วกระจายไปทั่วต้นพืชได้ (James and Olivares 1998) ซึ่งแตกต่างกับพืชประเภทถั่ว ที่สามารถตรึงไนโตรเจนที่บริเวณปมราก (Roncato-Maccari et. al., 2003) ดังนั้น ความสำคัญของแบคทีเรียเอนโดไฟท์คือความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (Diazotrophic) สู่พืชโดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชตระกูลหญ้า แต่อย่างไรก็ตาม กลไกและความสัมพันธ์ของแบคทีเรียดังกล่าวกับพืชเจ้าบ้านยังคงไม่ชัดเจน (Reinhold-Hurek and Hurek 1998).

ข้าวปลูก (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารที่สำคัญในโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นอาหารหลักของประเทศไทย ซึ่งในการปลูกข้าวต้องใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนจำนวนมากเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าว ส่งผลให้เกิดปัญหาทางเศรษฐกิจ สิ่งแวดล้อมต่อดินและน้ำ เพื่อที่จะลดปริมาณการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนดังกล่าว การใช้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ นับว่าเป็นทางเลือกที่ดี เพราะสามารถช่วยตรึงไนโตรเจนให้แก่พืชเพื่อการเจริญเติบโตได้ เป็นที่ทราบกันดีว่า ในนาข้าวจะมีแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอาศัยอยู่ (Balandreau 1986) แต่พบว่าปุ๋ยไนโตรเจนในนา หรือพันธุ์ข้าวปลูกเอง มีผลต่อการอาศัยของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ (Barraquio et al. 1997; Stoltzfus et al. 1997) อย่างไรก็ตาม ในกรณีของข้าวชุ่มน้ำ แม้ว่าจะมีความหลากหลายของสายพันธุ์ข้าว แต่แบคทีเรียดังกล่าวก็สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Ladha et al. 1997) แม้ว่าจะยากในการที่จะแยกแบคทีเรียดังกล่าวด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากมีแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่

ปราศจากไนโตรเจนได้ กลับพบว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Barraquio et al. 1997) และแบคทีเรียบางส่วนยังไม่สามารถระบุชนิดได้ (Stoltzfus et al. 1997)

แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าว จะอาศัยอยู่เป็นลักษณะชุมชนจุลินทรีย์ และมีความซับซ้อนมาก ดังนั้น ก่อนที่จะประยุกต์แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์เป็นหัวเชื้อสำหรับการปลูกข้าว จึงจำเป็นต้องศึกษาถึงโครงสร้างของชุมชนจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ดั้งเดิมในข้าว ในแต่ละส่วนและแต่ละช่วงอายุการเจริญเติบโตของข้าว รวมถึงลักษณะดินที่ใช้ปลูกข้าว

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อนำผลการวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนมาแล้วทำการต่อยอดในเชิงประยุกต์ เพื่อให้ทราบถึงศักยภาพที่ชัดเจน ในการที่จะนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อและใช้ได้ในสภาพไร่นาจริง โดยมีลำดับวัตถุประสงค์ย่อย ดังต่อไปนี้

1. เพื่อทราบความหลากหลาย และลักษณะสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่สำคัญบางประการ
2. เพื่อทราบปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย

3. ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ ส่วนโครงสร้างของชุมชนจุลินทรีย์ รวมถึงการแสดงออกของยีนตรึงไนโตรเจน (ยีน *nifH*) ในแต่ละส่วนและแต่ละช่วงอายุการเจริญเติบโตของข้าว รวมถึงลักษณะดินที่ใช้ปลูกข้าว ด้วยเทคนิคที่ไม่ใช่การเพาะเลี้ยงเชื้อ

4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ทราบสภาพและศักยภาพที่จะพัฒนากลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้ ใช้เสริมหรือทดแทนปุ๋ยไนโตรเจนสำหรับการปลูกข้าว
2. ได้ใช้ทรัพยากรทางชีวภาพอย่างเหมาะสมกับภูมิประเทศจริง รวมไปถึงองค์ความรู้ใหม่ให้กับประเทศที่จะใช้ในการพัฒนาตนเองอย่างยั่งยืน
3. สามารถได้ผลงานตีพิมพ์ 1 เรื่อง และสามารถผลิตมหาบัณฑิตได้ 1 คน

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างข้าวและดิน

ฟอกฆ่าเชื้อที่บริเวณเปลือกเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* cultivar KDML105) ด้วย 70% ethanol 1 นาที แล้วแช่ในสารละลาย 10% (w/v) NaOCl นาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นย้ายต้นกล้าอายุ 7 วัน ไปปลูกในกระถางซีเมนต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 120 ซม. สูง 60 ซม. ที่บรรจุดินประมาณ 3 ประเภท ดังนี้

- Fertilizer soil (ดินผสมระหว่างดินที่นำมาจากนาข้าว 7 แหล่ง ในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา แล้วใส่ปุ๋ยเคมีเสมือนการปลูกข้าวในนาของเกษตรกร คือในวันที่ 7 หลังย้ายต้นกล้าใส่ปุ๋ย N:P:K (16-20-0) 100 กรัมต่อกระถาง และวันที่ 15 และ 50 ใส่ปุ๋ยยูเรีย N:P:K (46-0-0) 50 กรัมต่อกระถาง
- No-fertilizer soil (ดินผสมระหว่างดินที่นำมาจากนาข้าวในพื้นที่ต่างๆ แต่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมีใดๆ)
- Undisturbed soil (ดินจากพื้นที่ที่ไม่เคยถูกรบกวนจากการทำการเกษตร โดยนำมาจากบริเวณป่าเสื่อมโทรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมาและไม่ใส่ปุ๋ยเคมี)

คุณสมบัติของดินวิเคราะห์โดยคณะปฏพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ดังแสดงในตารางที่ 1 เก็บตัวอย่างข้าวแบบสุ่ม ใน 3 ระยะ คือ ระยะเริ่มงอก (seedling stage) ระยะเติบโตทางลำต้นและใบ (vegetative stage) และระยะสืบพันธุ์ (reproductive stage) โดยทดสอบใน 3 ส่วนของต้นข้าวคือ ราก ลำต้น และใบ

ตารางที่ 1 ลักษณะทางเคมีและกายภาพของดินที่ใช้ในการปลูกข้าว

Original	pH	Soil Texture				Organic matter		Phosphorus		Potassium		Calcium		Magnesium	
		%Sand	%Silt	%Clay	Texture*	%	Rate*	ppm	rate	ppm	Rate	ppm	Rate	ppm	Rate
Paddy soil	7.8	65	16	19	SL	0.9	VL	39	H	70	L	3520	H	420	H
Forrest soil	7.7	51	14	35	SC	2	M	11	M	330	VH	7600	H	1180	H

Texture; SL = sandy loam soil, SC = sandy clay soil

Rate = ระดับธาตุอาหารพืช; VH = Very high; H = high; M = Medium; L = Low; VL = Very low

2. ศึกษาลักษณะทางกายภาพและชีวเคมี ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแอนโดไฟท์ที่แยกจากข้าวได้ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ

2.1 การแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแอนโดไฟท์จากข้าว

ล้างตัวอย่างต้นข้าวด้วยน้ำให้สะอาด แล้วแยกออกเป็นใบ ลำต้น และราก ตัดแต่ละส่วนให้ได้ขนาดประมาณ 7 ซม. แล้วล้างด้วย 70% ethanol ฆ่าเชื้อบริเวณผิวของตัวอย่างพืชด้วยเปลวไฟ ตัดส่วนปลายของตัวอย่างออกด้านละ 1 ซม. ฟอกฆ่าเชื้อที่พื้นผิวด้วย 1% NaOCl นาน 0.5 นาทีสำหรับใบ และ 2% CaOCl นาน 15 นาทีสำหรับรากและลำต้น แล้วล้างด้วย 0.1% Tween 80 ที่ปลอดเชื้ออีก 3 ครั้ง และล้างน้ำปลอดเชื้ออีก 2 ครั้ง และเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีแบคทีเรียที่พื้นผิว นำตัวอย่างข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อกลิ้งบนอาหาร NA (Difco, Detroit, Mich.) แล้วบ่ม 30°ซ 7 วัน ตรวจสอบว่าไม่มีโคโลนีบนอาหารดังกล่าว (Miyamoto et al. 2004) จึงเลือกตัวอย่างดังกล่าวเพื่อศึกษาต่อไป

บดตัวอย่างข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย 0.8% saline solution และ quartz sand แล้วเจือจางด้วย 0.8% saline solution ก่อนที่จะใส่ไปในหลอดทดลองขนาด 21 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ RMR แบบกึ่งเหลว 7 มล. (Elbeltagy et al. 2001) บ่ม 5 วัน เลือกหลอดที่มีเยื่อ หรือฝ้าเจริญที่บริเวณ subsurface ไปวัดการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA)

2.2 วัดการตรึงไนโตรเจนด้วย Acetylene Reduction Assay (ARA)

ฉีด ก๊าซ Acetylene ในหลอดที่มีการเจริญเติบโตให้ได้ความเข้มข้น 5% (v/v) บ่ม 30°ซ 24 ชั่วโมง แล้ววัดความเข้มข้นของ Ethylene ด้วยเครื่อง gas chromatograph ด้วยคอลัมน์ PE-Alumina ขนาด 50 ม. x 0.32 มม. x 0.25 ไมโครเมตร (Perkin Elmer, USA) (Elbeltagy et al. 2001).

2.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาบางประการ

นำเชื้อจากหลอดที่มีการตรึงไนโตรเจนมาเขี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง RMR เพื่อแยกแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแอนโดไฟท์ โดยบ่มที่ 30°ซ แล้วนำโคโลนีเดี่ยวมาย้อมแกรม และศึกษารูปร่างใต้กล้องจุลทรรศน์ (Doetsch 1981) วิเคราะห์การใช้แหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร M70 minimal ที่ใส่ 1% (w/v) ของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ดังนี้ lactose, xylose, rhamnose, manitol, glycerol, glucose, sorbitol, myo-inositol, arabinose, tartaric acid และ fumaric acid ศึกษา Antibiotic resistance profile โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง RMR ที่มี kanamycin, chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, ampicillin, spectinomycin, และ erythromycin (Sigma- Aldrich, USA). ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 µg มล.$^{-1}$

2.4 IAA production Assay

วัดการผลิต indole-3-acetic acid โดยเลี้ยงแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแอนโดไฟท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 10 mM NH_4Cl และ 100 µg tryptophan มล.$^{-1}$ บ่มที่ 30°ซ 48 ชม. (Minamisawa et al. 1992) จากนั้นผสม supernatant 1 มล. กับ 5 มล. ของ Salkowsky reagent (0.01M $FeCl_2$ ใน $HClO_4$) แล้วดูการเปลี่ยนสีโดยเปรียบเทียบกับสาร indole-3-acetic acid (Sigma, USA) บริสุทธิ์ (Costacurta et al. 1998)

2.5 Plant polymer hydrolyzing activities

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase โดยเลี้ยงแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NFB ที่มี 0.25% carboxymethyl cellulose (CMC) (Verma et al. 2001) บ่มที่ 30°ซ 48 ชม. จากนั้นเทสารละลาย congo red (1 mg มล.$^{-1}$) ให้ท่วมเชื้อ ทิ้งไว้ 30 นาที เทสารละลาย congo red ออก 1 M NaCl ดู clear zone รอบๆ โคลีนี (Andro et al. 1984) สำหรับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ pectinase โดยเลี้ยงแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มี 0.5% pectin บ่มที่ 30°ซ 5 วัน เทสารละลาย 2% hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) ให้ท่วมเชื้อ ทิ้งไว้ 30 นาที เทสารละลาย CTAB ออก ล้างด้วย 1 M NaCl ดู clear zone รอบๆ โคลีนี (Mateos et al. 1992)

3. การสร้าง dendrogram

สร้าง dendrogram จากข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอน การผลิต IAA, pectinase, cellulose และ antibiotic resistance โดยใช้ค่า 1 และ 0 แทน มีหรือไม่มีข้อมูลในการสร้าง binary matrix ด้วยวิธี unweighted-pair group method with arithmetic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1

4. การทดสอบเพื่อยืนยันความเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์

4.1 การเลี้ยงแบคทีเรียและรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

เลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5α (ตัวให้) ซึ่งมีพลาสมิด pBBR_nifHGUS ขนาด 7,600 bp และทนต่อ kanamycin มี gus translational และยีน *nifH* จากเชื้อ *Mesorhizobium huakii* (อนุเคราะห์จาก Prof. Y. Murooka, Department of Engineering, Osaka University, Japan) และแบคทีเรียตัวช่วย (helper) *E. coli* HB101 ซึ่งมีพลาสมิด pRK2013 ซึ่งมียีน tra และทนต่อ kanamycin ในอาหารเหลว LB (10 g Tryptone, 5 g yeast extract (Difco), 10 g NaCl, and 50 μg มล.$^{-1}$ kanamycin) ที่ 37°ซ 24 ชม. ส่วนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เป็นตัวรับคือ VFR5-3 เลี้ยงในอาหารเหลว RMR ตามที่กล่าวมาในข้างต้น

4.2 Triparental mating

นำแบคทีเรียตัวให้ ตัวช่วย และตัวรับ มาอย่างละ 1 มล. ปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm 2 นาที ล้างเซลล์ด้วยอาหารเหลว RMR แล้วละลายในอาหารดังกล่าว 0.5 ไมโครลิตร ก่อนที่จะผสมในอัตราส่วน 3:2:1 (donor, helper, recipient) เทเซลล์ผสมดังกล่าว 100 มล. บนเยื่อกรองที่อยู่บนอาหารแข็ง RMR บ่ม 28°ซ 3 วัน ขูดเอาเซลล์ที่เจริญบนเยื่อกรองใส่หลอด microcentrifuge แล้วเติม อาหารเหลว RMR 1 มล. Spread บนอาหารแข็ง RMR ที่มี 50 μg/มล. of kanamycin, 50 μg มล.$^{-1}$ X-gluc and 50 μg มล.$^{-1}$ amplicillin แล้วบ่ม 28°ซ 5-7 วัน เลือกโคโลนี transconjugant ที่ให้สีฟ้า

4.3 การเตรียมเมล็ดข้าวและการ inoculate ด้วยแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์

ฟอกฆ่าเชื้อที่บริเวณเปลือกของเมล็ดข้าวด้วย 70% ethanol 1 นาที แช่ย่าใน 10% (w/v) calcium hypochlorite 30 นาที ล้างด้วยน้ำฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที เพาะเมล็ดข้าวดังกล่าวบนกระดาษทิชชูเปียกที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้น 7 วันนำต้นกล้าไปปลูกในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารแข็ง Fahreaus 20 มล. (Elbeltagy et al. 2001) หลังจากนั้น 3 วัน inoculate ด้วย transconjugant ที่มี Gus-tagged ปริมาณ 10^5- 10^6

cell/มล. ตรวจสอบการเข้าอยู่ (Colonization) ที่ราก ลำต้น และใบ ด้วยวิธี GUS (ß-glucuronidase) staining

4.4 Gus staining

วัดการอยู่อาศัยของแบคทีเรีย โดยแยกราก ลำต้นและใบของตัวอย่างข้าวอายุ 1 เดือน ด้วยแช่ตัวอย่างใน GUS assay solution (40 µl X-Gluc 20mg/มล. ใน N, N-Dimethylformamide, 20 mg SDS, 2 มล. methanol, 0.2 มล. 1M sodium phosphate buffer และน้ำกลั่น 7.76 มล.) ใน vacuum 120 นาที แล้วบ่มที่ 28°ซ 24 ชม. จากนั้นล้างตัวอย่างข้าวด้วย phosphate buffer จุ่มใน 5% (w/v) calcium hypochlorite 30 วินาที และล้างด้วยน้ำ 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นตรวจดูการอยู่อาศัยของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Manassila et al. 2007)

5 การวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์

5.1 การสกัด DNA ของ แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์จากข้าว

การสกัด Total DNA ด้วยวิธี modified potassium acetate (Dellaporta et al. 1983) ด้วยการบดตัวอย่างข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วย้ายไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. ที่มี pre-heated extraction buffer (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl และ1.25 % (w/v) SDS) 720 มล. จากนั้นบ่ม 65 °ซ 15 นาที ตกตะกอนโปรตีนด้วย 5M potassium acetate 225 µl แช่น้ำแข็งนาน 20 นาที นำส่วนบนของหลอดมาตกตะกอน DNA ด้วย 2/3 volume isopropanol เย็น แล้วล้างด้วย 70% ethanol เย็น แล้วละลาย DNA ใน TE buffer และเก็บที่ -20°C

5.2 การเพิ่มจำนวนของยีน 16S rRNA และยีน *nifH* โดยเทคนิค PCR

ทำ PCR ของ 16S rRNA gene โดยใช้ universal primers PRBA338F (forward) ที่มี GC-clamp (5' GCGCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG 3') ต่อที่ปลาย 5' และ PRUN518R (reverse) (Ovreas et al. 1997)

ส่วนยีน *nifH* ใช้วิธี Nested-PCR ซึ่งพัฒนาจากวิธีของ Poly *et al.* (2001) และ Roesch *et al.* (2006) ในรอบแรกของการทำ PCR จะใช้ PolF เป็น forward primer และ PolR เป็น reverse primer ในรอบที่สองของการทำ PCR ใช้ forward primer คือ nifHFor ที่มี GC-clamp ต่อที่ปลาย5' (5'CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGACCCGCCTGATCCTGCACG CCAAGG 3') และ nifHRev เป็น reverse primer ซึ่งจะได้ผลผลิตรวม GC clamp ขนาดประมาณ ~320 bp ตรวจผลผลิต PCR ทั้งหมดด้วยวิธี electrophoresis ใน 1 % (w/v) agarose gel ใน 1X TAE buffer และเก็บผลผลิตดังกล่าวที่ -20°ซ ก่อนวิเคราะห์ด้วยวิธี DGGE

5.3 การวิเคราะห์โดย Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

เตรียมสารเคมีสำหรับ DGGE ตามคู่มือ Bio-Rad D Gene และใช้เครื่อง BIO RAD DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA) บ่มผลผลิต PCR ที่ 95°ซ 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อลดการจับกลับแบบ non-complementary ของ DNA จากนั้น load ที่เจล DGGE ที่มี

10% polyacrylamide gel (40%-acrylamide and N, N-methylenebisacrylamide solution (37.5:1, v/v), 40% (v/v) formamide, 7 M urea และ1X TAE) ใน denaturing gradient gels หนา 1 มม. 40-60% denaturant โดยจะทำอิเล็กโตรโฟรีซิส นาน 12 ชั่วโมง ที่ 120 V ด้วย 1XTAE running buffer ควบคุมอุณหภูมิที่ 60°ซ จากนั้นย้อมเจลด้วย ethedium bromide (0.5 µg/มล.) เพื่อถ่ายภาพด้วย Gel documentation and analysis (Ultra Violet Product, USA)

5.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จาก DGGE และเซลล์

การวิเคราะห์ลำดับเบสจาก DGGE และเซลล์ใช้วิธีของ Sanger โดยตัดแต่ละ band ที่สนใจจาก DGGE gels ใส่ใน sterilized vials เติม sterilized distilled H_2O 20 มล. บ่ม 4°ซ 24 ชม. แล้วใช้เป็น DNA template สำหรับทำ PCR ของแต่ละ primer จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลผลิต PCR ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส วิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วน DNA ดังกล่าวโดย Macrogen Corp., South Korea ผลลำดับเบสที่ได้นำไปเปรียบเทียบ homologous sequence ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN 2.0.13

6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nifH* ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

สกัด Total RNA จากตัวอย่างข้าวโดยใช้ RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA) แล้วลดการปนเปื้อนของ DNA ด้วย DNase แล้วละลาย RNA ใน diethylpyrocarbonate-treated water การทำ Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) แบบ two-step RT-PCR ของยีน *nifH* โดยบ่ม total RNAs ด้วย 1 U ของ RNase free DNase (Promega, USA) 37°ซ 30 นาที จากนั้นเติม stop solution (20 mM EGTA [pH8.0] ที่ 25°ซ) 1 มล. บ่มที่ 70°ซ. 15 นาที จากนั้นเติม 25 ng/µl of $Oligo(dT)_{15}$ primer หรือ 2.5 ng/µl random hexamers แล้ว บ่มที่ 70°ซ 5 นาที เติม Reverse transcription reaction (4 µl ImProm-II™ 5X reaction buffer, 3 mM $MgCl_2$, 0.67 mM dNTP mix, 20 U ribonuclease inhibitor, 1 µl ImProm-II™ reverse transcriptase (Promega, USA)) แล้วปรับปริมาตรด้วย nuclease-free water ให้ได้ 15 µl จากนั้นนำ RNA และ primer 5 µl เติมไปใน reverse transcription reaction mixture จะได้ปริมาตร 20 µl แล้วบ่มที่ 25°ซ 5 นาที และ extended ที่ 42°ซ 60 นาที และหยุดการทำงานของ reverse transcriptase ที่ 70°ซ 15 นาที จากนั้นทำ PCR โดยใช้ cDNA เป็น DNA ต้นแบบ และใช้เงื่อนไขการทำ PCR ของยีน *nifH* ตามที่กล่าวมาแล้ว และใช้ยีน 16S rRNA เป็นมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณของ RNA การทำ PCR ทั้งหมดใช้เครื่อง Thermal cycler GeneAmp®PCR System 9700 (Perkin Elmer, USA) วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส 1% agarose gels และย้อมด้วย 0.5 µg/มล. ethidium bromide

7 Nucleotide sequence accession numbers

ศึกษาลำดับเบสยีน 16S rRNA โดยส่งเข้าฐานข้อมูลของ GenBank ภายใต้ accession numbers EU195902 - EU195912 ส่วนลำดับเบสจาก DGGE band ภายใต้ accession numbers EU195913 - EU195916

บทที่ 3
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. จำนวนประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าว

ประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ ที่แยกโดยตรงจากเนื้อเยื่อข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว (ราก ลำต้น และใบ) พบว่ามีจำนวนระหว่าง 10^3 - 10^6 CFU ต่อกรัมน้ำหนักสดเนื้อเยื่อข้าว (ตารางที่ 2) โดยพบประชากรมากที่สุดในราก (2×10^5 - 3×10^6 CFU ต่อกรัมน้ำหนักสดเนื้อเยื่อข้าว) เมื่อเปรียบเทียบกับทั้งช่วงอายุการเจริญเติบโต และประเภทของดินที่ปลูก จำนวนประชากรแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในลำต้นมีจำนวน 4×10^3 - 3×10^5 CFU ต่อกรัมน้ำหนักสดเนื้อเยื่อข้าว ส่วนในใบพบจำนวนประชากรน้อยที่สุด คือ 1×10^3 - 2.7×10^4 CFU ต่อกรัมน้ำหนักสดเนื้อเยื่อข้าว

ตารางที่ 2 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อเยื่อข้าว

ตัวอย่าง	CFU g^{-1} fresh weight	ตัวอย่าง	CFU g^{-1} fresh weight	ตัวอย่าง	CFU g^{-1} fresh weight
ราก					
SFR	1.09×10^6	VFR	5.10×10^5	RFR	2.65×10^5
SNR	2.25×10^6	VNR	3.51×10^6	RNR	1.81×10^5
SUR	1.11×10^6	VUR	1.42×10^6	RUR	1.27×10^6
ลำต้น					
SFS	1.02×10^5	VFS	1.01×10^4	RFS	2.11×10^4
SNS	3.03×10^5	VNS	1.39×10^4	RNS	1.51×10^5
SUS	2.28×10^5	VUS	3.71×10^3	RUS	2.43×10^4
ใบ					
SFL	2.40×10^3	VFL	2.10×10^3	RFL	1.66×10^3
SNL	2.72×10^4	VNL	3.78×10^3	RNL	2.58×10^3
SUL	6.06×10^3	VUL	1.28×10^3	RUL	2.62×10^3

อักษรย่อ อักษรตัวแรกคือระยะการเจริญเติบโตของข้าว (S; seedling stage, V; vegetative stage, R; reproductive stage), อักษรตัวที่ 2 คือชนิดของดิน (F; fertilizer amendment, N; no-fertilizer experiment, U; undisturbed experiment) และอักษรตัวที่ 3 คือส่วนของต้นข้าว (R; root, S; stem, L; leaf)

จากผลการทดลองพบว่า บริเวณที่มีการอยู่อาศัยของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าวปลูกนั้น พบที่บริเวณรากหนาแน่นที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Zinniel *et al* (2002) แม้ว่าการอยู่อาศัยของแบคทีเรียนั้นมีความแตกต่างและหลากหลาย ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อายุของพืช ลักษณะของเนื้อเยื่อ เวลาในการเก็บตัวอย่าง รวมถึงสิ่งแวดล้อมด้วย โดยปกติแล้ว มักพบประชากรแบคทีเรียจำนวนมากที่สุดที่บริเวณราก รองมาคือลำต้นและใบตามลำดับ จากการทดลองของ Muthukumaeasamy และคณะ (2005) พบว่าทั้ง *Gluconacetobacter diazotrophicus* และ *Acetobacter peroxydans* ที่แยกได้จากรากและลำต้นของข้าวปลูกในนาน้ำขังในทางใต้ของประเทศอินเดีย มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 10^2–10^3 CFU g^{-1} น้ำหนักสดของข้าว ซึ่งคล้ายกับการศึกษาในข้าวสายพันธุ์ Hwsanbyeo ที่ประเทศเกาหลีใต้ ที่พบว่า *G. diazotrophicus* มีจำนวน 10^4 CFU g^{-1}น้ำหนักสดของข้าว (Muthukumarasamy et al. 2007)

2. ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในข้าว

จากตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกจากข้าวจำนวน 135 หลอด (ชุมชนหรือ consortium) พบว่ามี 75 หลอดที่มีการตรึงไนโตรเจน ซึ่งมีค่ากิจกรรม ARA มากกว่า 10 nm C_2H_4 $h^{-1}tube^{-1}$ จากเชื้อที่แยกได้คิดเป็นกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้เป็น 56% ของประชากรทั้งหมด โดยค่าการตรึงไนโตรเจนสูงสุดพบที่ชุมชนในกลุ่มราก (40-4,000 nmol C_2H_4 $h^{-1}tube^{-1}$) ตามด้วยชุมชนในลำต้น (180–5,800 nmol C_2H_4 $h^{-1}tube^{-1}$) และพบในชุมชนกลุ่มใบน้อยที่สุด (300–900 nmol C_2H_4 $h^{-1}tube^{-1}$) และพบว่าชุมชน VNS3-1 ที่แยกมาจากลำต้นของระยะเริ่มงอก (Seedling stage) ของดินที่ไม่ใส่ปุ๋ย (No-fertilizer soil) มีการตรึงไนโตรเจนสูงสุดคือ 5,840.07 nmol C_2H_4 $h^{-1}tube^{-1}$ (ตารางที่ 3) ส่วนชุมชนที่มีการตรึงไนโตรเจนต่ำสุดพบในชุมชนใบ และเมื่อนำแต่ละชุมชนมาแยกเป็นไอโซเลทเดี่ยว แล้ววัดการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี ARA อีกครั้ง พบว่าแต่ละไอโซเลทมีคุณสมบัติทั้งยับยั้งและส่งเสริมการตรึงไนโตรเจนซึ่งกันและกัน (ตารางที่ 3) จากผลการทดลองความสามารถในการตรึงไนโตรเจนที่พบว่ามีที่บริเวณใบด้วยนั้น แม้ว่าบริเวณดังกล่าวเป็นเนื้อเยื่อส่วนที่เป็น aerial ที่สามารถให้และรับอากาศและ O_2 สำหรับการสังเคราะห์แสง แต่พบว่าบางครั้งแบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารถเจริญเติบโตหรืออยู่อาศัยได้ในบริเวณที่เป็น anoxic microzones ซึ่งเกิดจากชุมชนแบคทีเรียเองหรือเกิดจากการหายใจของพืช ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของ O_2 สูงก็ตาม (Minamisawa et al. 2004)

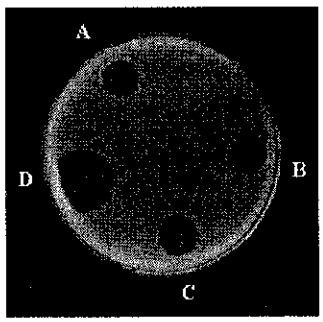
การยับยั้งการตรึงไนโตรเจนนี้ เกิดจากบางไอโซเลทในชุมชนยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอีกตัว ซึ่งเห็นได้จากเกิด clear zone ของ culture filtrate บนเชื้ออีกตัว จากรูปที่ 2 พบว่าไอโซเลท VFR3-1-2 จะทำให้เกิด clear zone บนพื้นผิวของไอโซเลท VFR3-1-1 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตาม พบว่ากลุ่มชุมชน SFS2-2, SNA3-1, SNS2-3, และ RUL2-2 กลับไม่พบ clear zone รอบๆ หยด culture filtrate ของแต่ละไอโซเลทเดี่ยวเลย

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอนเอของยีน16S rRNA (full length) ของไอโซเลทผสมและไอโซเลทเดี่ยวของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าว

Consortium Isolate	N_2-fixing activity	Single Isolate	N_2-fixing activity	Putative identity
SFS2-2	2,201.67	SFS2-2(1)	1,738.50	99% *Enterobacter dissolvens* LMG 2683
		SFS2-2(2)	7,395.70	98% *Brevundimonas aurantiaca*
VNS3-1	5,840.70	VNS3-1(1)	18.34	99% *Pantoea agglomerans* WAB1927
		VNS3-1(2)	23,319.17	99% *Enterobacter dissolvens* LMG 2683
RUL2-2	949.24	RUL2-2(1)	6,123.88	99% *Pseudomonas sp.* BWDY-42
		RUL2-2(2)	6,355.38	99% *Enterobacteriaceae bacterium* ZHS050721

N_2-fixing activity = Ethylene concentration (nmol C_2H_4 $h^{-1}tube^{-1}$)

อักษรย่อ อักษรตัวแรกคือระยะการเจริญเติบโตของข้าว (S; seedling stage, V; vegetative stage, R; reproductive stage), อักษรตัวที่ 2 คือชนิดของดิน (F; fertilizer amendment, N; no-fertilizer experiment, U; undisturbed experiment) และอักษรตัวที่ 3 คือส่วนของต้นข้าว (R; root, S; stem, L; leaf) ตัวเลขหลังอักษรคือ dilution factor และ replication number



รูปที่ 1 กิจกรรมการต่อต้านจุลชีพของ culture filtrate ของไอโซเลท VFR3-1 ต่อการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งแสดงให้เห็นจาก clear zone บนอาหารแข็ง โดย culture filtrate ของ VFR3-1-2 หยดบน VFR3-1-1 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งที่ปราศจากไนโตรเจน ที่ 1 µl (A), 2 µl (B), 3 µl (C) และ 4 µl (D)

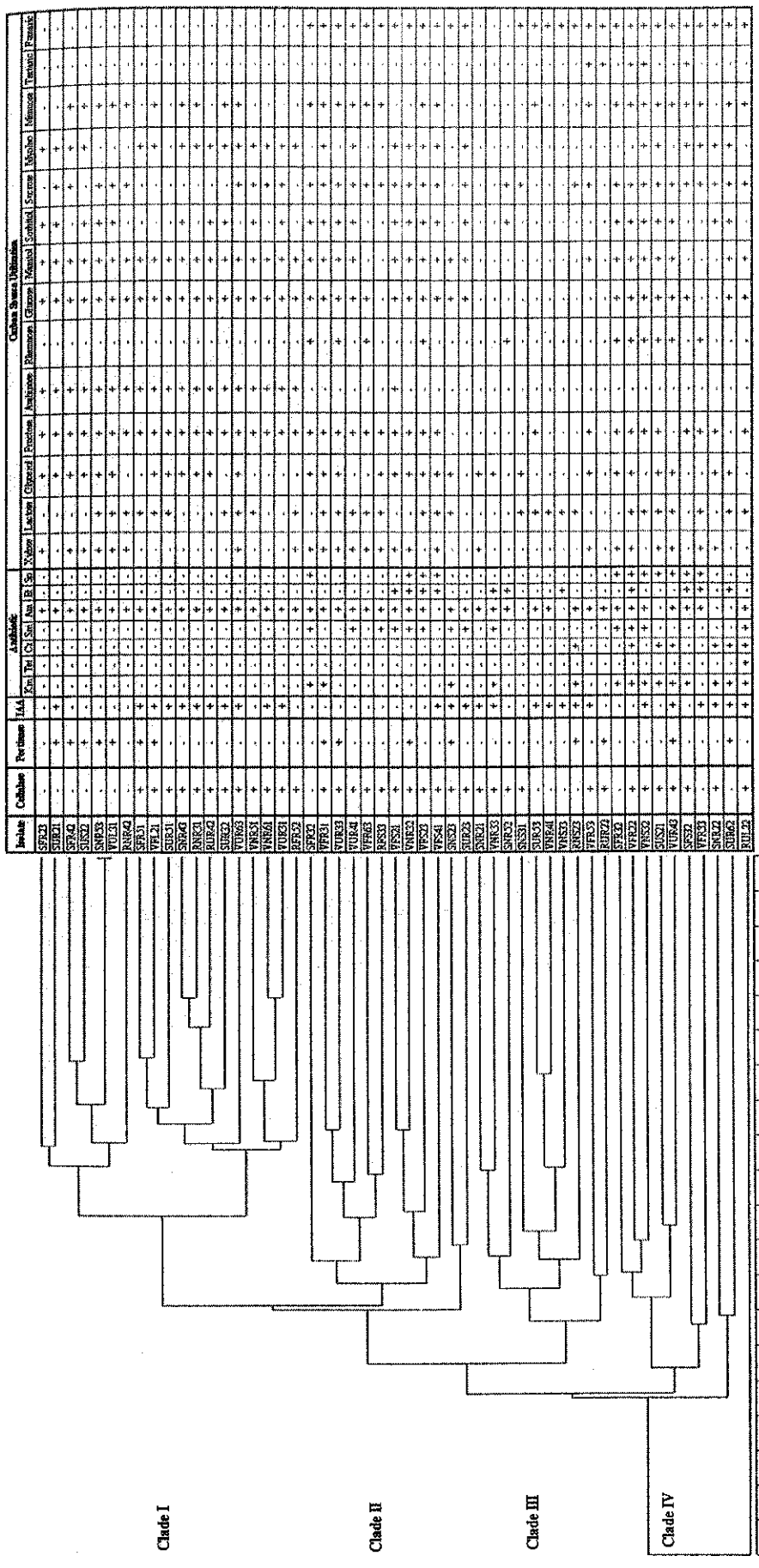
การที่เชื้อผสมหรืออยู่กันแบบชุมชนในหลอดอาหาร แล้วแสดงความสามารถในการตรึงไนโตรเจนนั้น เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน ได้มีส่วนช่วยกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนในชุมชนแบคทีเรียดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Minamisawa *et al.* (2004) ที่พบว่าชุมชน anaerobic nitrogen-fixing consortia (ANFICOs) ประกอบด้วย clostridia กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้ และกลุ่มที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยพบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ สามารถเหนี่ยวนำให้ clostridia เกิดการตรึงไนโตรเจนได้ในสภาวะที่อยู่แบบผสม คาดว่าเกิดจากแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้นี้ ได้ผลิตสาร หรือ metabolites บางประการ ที่

สามารถส่งเสริมหรือยับยั้งการตรึงไนโตรเจนได้ จากผลของการทดลอง culture filtrate ของไอโซเลท VFR3-1 นั้น เกิดจากไอโซเลทเดี่ยวบางตัวอาจมีผลต่อไอโซเลทตัวอื่นที่อยู่ชุมชนดียวกันในแง่ของการผลิตสารที่สามารถฆ่าแบคทีเรียตัวอื่นได้ (bactericidal effect) หรือผลิตสารที่สามารถยับยั้งกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนได้ (bacteriostatic effect)

เมื่อนำบางไอโซเลทที่น่าสนใจไปจำแนกถึงระดับสปีชีส์ ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน16S rRNA แบบเต็มสาย (ตารางที่ 3) พบว่าไอโซเลทมีความเหมือนมากที่สุดกับ *Enterobacter dissolvens, Brevundimonas aurantiaca, Pantoea agglomerans, Pseudomonas* spp. และ *Enterobacteriaceae bacterium* ดังแสดงในตารางที่ 3 จากการศึกษาของ Hoffmann และคณะ (2005) พบว่า *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* comb. nov. เป็นแบคทีเรียที่หมายถึง *E. dissolvens* และพบว่าเป็นเอนโดไฟท์ที่แยกมาจากพืชตระกูลส้ม (Araujo et al. 2002) และข้าว (Fujii et al. 1987) ส่วน *Brevundimonas aurantiaca* พบว่าเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่แยกมาจากปมรากของต้น *Dalbergia* ใน Madagascar (Rasolomampianina et al. 2005) การศึกษาของ Ruppel *et al.* (1992) พบว่า *Pantoea agglomerans* อาศัยอยู่ที่ช่องว่างของ intercellular ของรากข้าวโพด และลำต้นของข้าวสาลี และยังพบที่ลำต้นของมันเทศสายพันธุ์ Koganesengan ด้วย (Asis and Adachi 2004) นอกจากนี้ยังสามารถแยกออกมาได้จากลำต้นของอ้อยที่ปลูกโดยไม่ใช้ปุ๋ยเคมีในประเทศคิวบา (Loiret et al. 2004) สำหรับ *Pseudomonas* sp. นั้น สามารถตรึงไนโตรเจนและมีการแสดงออกของยีน *nif* ได้ในข้าวที่ปลูกบริเวณ Yangtze River Plain (Xie et al. 2006)

3. การศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าว

เมื่อนำข้อมูลของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์จำนวน 51 ไอโซเลทมาสร้าง Dendrogram พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 4 clade (รูปที่ 2) แสดงว่าชุมชนจุลินทรีย์นี้มีความหลากหลาย ซึ่งมี 60.8% ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ pectinase ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ cellulose พบถึง 96.08% เนื่องจากกิจกรรมของ pectinolytic ที่ทำให้ *Azospirillum* spp. สามารถเข้าสู่บริเวณ middle lamella ของราก และรอยแยกของรากฝอยได้ (Bekri et al. 1999) จึงมีการตรวจสอบการผลิต cellulose หรือ pectinase ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในการทดลองนี้ จากผลการทดลองแสดงว่าแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว มีความสามารถในการที่จะเข้าอยู่อาศัยทั้งบริเวณ intercellular และ intracellular ของข้าวได้ อย่างไรก็ตามมีการทดลองที่พบว่า endoglucanase ทำให้แบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Azoarcus* Sp. strain BH72 สามารถเข้าอาศัยอยู่ในรากข้าวได้ โดยคุณลักษณะ not-cellulose-metabolizing (Reinhold-Hurek et al. 2006) นอกจากนี้ type IV pili ยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยของแบคทีเรียดังกล่าว ในขั้นตอนการเข้าสู่และอาศัยในหญ้าด้วยเช่นกัน (Doerr et al. 1998)


Clade I
Clade II
Clade III
Clade IV
Coefficient

รูปที่ 2 แสดง Dendrogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ UPGMA cluster จากข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอน การผลิต IAA, pectinase และ cellulose และข้อมูล antibiotic resistant ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนไฟท์ทั้ง 51 ไอโซเลท

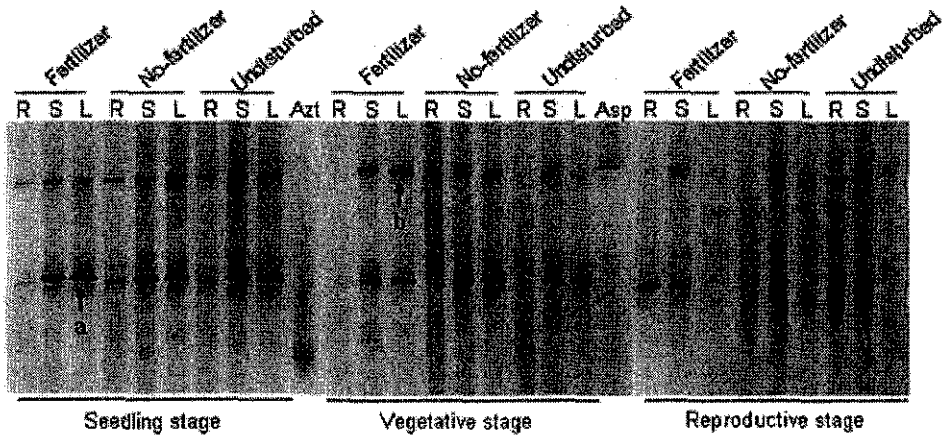
จากรูปที่ 2 พบว่าใน clade ที่ 1 และ 3 มีแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์กลุ่มที่มาจากรากและสามารถผลิต IAA ได้ และจากแบทที่เรียทั้งหมด 51 ไอโซเลท พบว่ามี 62.75% ที่สามารถผลิต IAA ได้ เช่นไอโซเลท SUR5-3 SNR2-1 และ VNS3-3 แบคทีเรียในดิน และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในพืชหลายชนิด มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น *Azospirillum* spp., *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella*, *E. cloacae*, *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* (Costacurta et al. 1998) เช่นเดียวกับการทดลองนี้ที่พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ (62.75%) สามารถผลิต IAA ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Teaumroong และคณะ (2001) ที่พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวไทยที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ก็สามารถผลิต IAA ได้เช่นกัน

เมื่อศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการต้านทานต่อ antibiotic พบว่า 28.57% ของไอโซเลททั้งหมดไวต่อ antibiotic ในความเข้มข้นต่างๆ และพบว่าไอโซเลทส่วนมาก (88.24%) สามารถต้านทานต่อ ampicillin แต่ไวต่อ chloramphenicol (86.27%) erythromycin (78.43%) และ spectinomycin (78.43%) ส่วนความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ นั้น พบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนส่วนมากสามารถใช้กลูโคสและ arabinose ได้ดีที่สุดจากคาร์บอนทั้งหมด 14 ชนิด ในขณะที่ rhamnose, manose และ tartaric acid ไม่ใช่แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (รูปที่ 2) ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่แยกจากข้าวชุ่มน้ำในประเทศเกาหลี ที่พบว่ามักใช้ malate และ azelaic acids เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ใช้ sucrose น้อย (Muthukumarasamy et al. 2007) ในการทดลองนี้ยังพบว่า บางไอโซเลทสามารถใช้น้ำตาล 2 ชนิด เช่น sucrose และ glucose ซึ่งเป็น exudates ที่มักพบบริเวณรากของพืช การมีปริมาณ exudation ที่เป็น labile carbon compounds เพิ่มขึ้นบริเวณรากพืช อาจเป็นสิ่งที่คัดเลือกประชากรที่มี *nifH* genotypes และกลไกนี้อาจเป็นสาเหตุสำคัญ ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของชุมชนจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนได้ มีรายงานว่า arabinose สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ *G. diazotrophicus* ได้ แต่ไม่สำหรับ *G. johannae* และ *G. azotocaptans* (Muthukumarasamy et al. 2002) ซึ่งคล้ายกับการศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกจากลำต้นของ *Zea mays* L. และ *Zea luxurians* ที่พบว่าสามารถใช้ arabinose และ rhamnose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Palus et al. 1996)

4. การวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในข้าวด้วยเทคนิค PCR-DGGE

การใช้เทคนิค PCR-DGGE ร่วมกับ 16S rRNA primer สามารถแสดงถึงโครงสร้างของชุมชนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในข้าวได้ (รูปที่ 3) จาก DGGE fingerprinting พบว่าตัวอย่างชุมชนส่วนมากจะมี 2 แถบหลักๆ ยกเว้นในตัวอย่างที่มาจากระยะสืบพันธุ์ (reproductive stage) ในระยะเริ่มงอกพบว่า มี

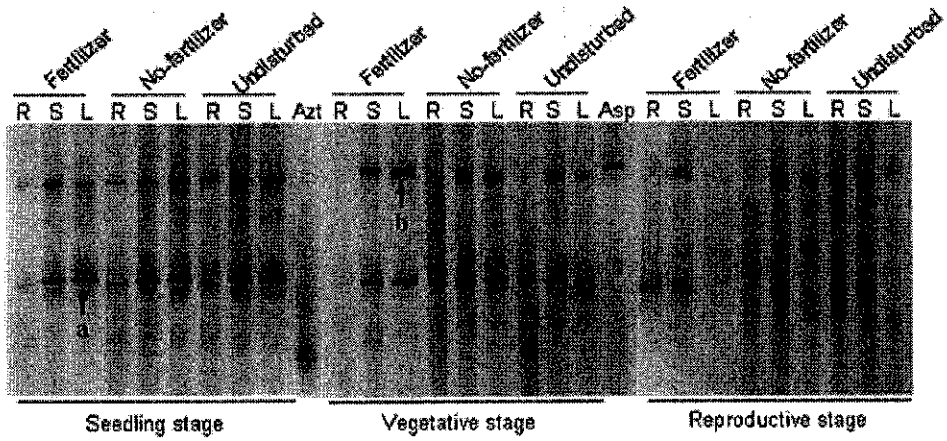
ลักษณะของแถบหลัก 2 แถบ ในทุกๆ ตัวอย่างดิน ในระยะสืบพันธุ์จะมีลักษณะคล้ายกับระยะเริ่มงอก ยกเว้นในราก อย่างไรก็ตาม ลักษณะของรูปแบบแถบ DGGE ไม่สามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจน ยกเว้นจากตัวอย่างที่มาจากดินที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี และพบว่าข้าวในระยะสืบพันธุ์จะมีผลต่อชุมชนจุลินทรีย์มากกว่าระยะอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากดินที่ไม่ผ่านการรบกวน (Undisturbed soil) จากผลของ 16S rRNA DGGE fingerprinting พบว่า คุณสมบัติของดินมีอิทธิพลน้อยกว่าระยะการเจริญเติบโตของข้าว และส่วนของต้นข้าว ต่อชุมชนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ อย่างไรก็ตาม พบว่าบางไอโซเลทที่แยกได้จากใบในดินที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยเคมีในทุกๆ ระยะการเจริญเติบโต (SNL, VNL, RNL) รวมทั้ง SFL, RFS, RFL, SUL และ RUS ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค ARA (ตารางที่ 1) เนื่องจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์บางไอโซเลทไม่สามารถแยกได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (nonculturable strain) และบางแถบจาก DGGE fingerprinting ตรงกับผล culturable approach ของไอโซเลทนั้นๆ จาก16S rRNA DGGE fingerprinting นี้สามารถเปรียบเทียบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในข้าวได้ สอดคล้องกับหลายการทดลอง ที่ศึกษา กลุ่มแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมต่างๆ (Yang et al. 2001; Araujo et al. 2002; Dar et al. 2005; James et al. 2006)



รูปที่ 3 รูปแบบ PCR-DGGE ของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าว ลูกศรชี้ตำแหน่งเจลที่ถูกตัดและหาลำดับเบสดีเอนเอ (a-d) Azt., *Azotobacter* sp.; Asp., *Azospirillum* sp.; R, root; S, stem; L, leaf

เมื่อแยกแถบที่สนใจจากเจล DGGE และนำไปอ่านลำดับเบส DNA พบว่า แถบ a มีความคลายคลึงสูงสุดกับ *Enterobacter dissolvens* (99%) แถบ b กับ *Brevundimonas aurantiaca* (98%) แถบ c กับ *Pantoea agglomerans* (99%) และแถบ d กับ *Pseudomonas* sp. (99%)

ลักษณะของแถบหลัก 2 แถบ ในทุกๆ ตัวอย่างดิน ในระยะสืบพันธุ์จะมีลักษณะคล้ายกับระยะเริ่มงอก ยกเว้นในราก อย่างไรก็ตาม ลักษณะของรูปแบบแถบ DGGE ไม่สามารถตรวจสอบได้อย่างชัดเจน ยกเว้นจากตัวอย่างที่มาจากดินที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี และพบว่าข้าวในระยะสืบพันธุ์จะมีผลต่อชุมชนจุลินทรีย์มากกว่าระยะอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากดินที่ไม่ผ่านการรบกวน (Undisturbed soil) จากผลของ 16S rRNA DGGE fingerprinting พบว่า คุณสมบัติของดินมีอิทธิพลน้อยกว่าระยะการเจริญเติบโตของข้าว และส่วนของต้นข้าว ต่อชุมชนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ อย่างไรก็ตาม พบว่าบางไอโซเลทที่แยกได้จากใบในดินที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยเคมีในทุกๆ ระยะการเจริญเติบโต (SNL, VNL, RNL) รวมทั้ง SFL, RFS, RFL, SUL และ RUS ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค ARA (ตารางที่ 1) เนื่องจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์บางไอโซเลทไม่สามารถแยกได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (nonculturable strain) และบางแถบจาก DGGE fingerprinting ตรงกับผล culturable approach ของไอโซเลทนั้นๆ จาก16S rRNA DGGE fingerprinting นี้สามารถเปรียบเทียบโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในข้าวได้ สอดคล้องกับหลายการทดลอง ที่ศึกษา กลุ่มแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมต่างๆ (Yang et al. 2001; Araujo et al. 2002; Dar et al. 2005; James et al. 2006)

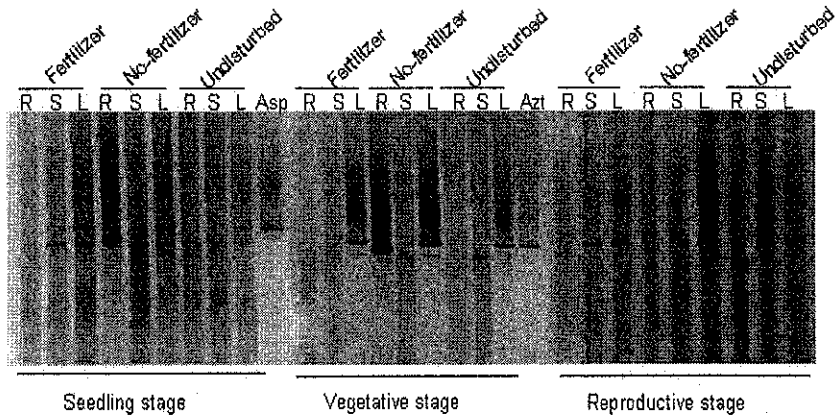


รูปที่ 3 รูปแบบ PCR-DGGE ของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าว ลูกศรชี้ตำแหน่งเจลที่ถูกตัดและหาลำดับเบสดีเอนเอ (a-d) Azt., *Azotobacter* sp.; Asp., *Azospirillum* sp.; R, root; S, stem; L, leaf

เมื่อแยกแถบที่สนใจจากเจล DGGE และนำไปอ่านลำดับเบส DNA พบว่า แถบ a มีความคลายคลึงสูงสุดกับ *Enterobacter dissolvens* (99%) แถบ b กับ *Brevundimonas aurantiaca* (98%) แถบ c กับ *Pantoea agglomerans* (99%) และแถบ d กับ *Pseudomonas* sp. (99%)

5. การวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ด้วยเทคนิค nested PCR-DGGE

ในการวิเคราะห์โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียนี้ ได้ใช้เทคนิค PCR-DGGE ร่วมกับไพร์เมอร์ *nifH* ซึ่งจำเพาะกับแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ จาก DGGE fingerprinting พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ DGGE fingerprinting ของ 16S rRNA primer (รูปที่ 4) ซึ่งมีแถบหลักจำนวน 2-3 แถบในแต่ละช่วงของการเจริญของต้นข้าว โดยพบแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในรากของข้าวที่มีการใส่ปุ๋ยเคมีในทุกๆ ช่วงของการเจริญเติบโต



รูปที่ 4 รูปแบบ Nested PCR-DGGE ของยีน *nifH* ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในข้าว (R, root; S, stem; L, leaf)

ในตัวอย่างลำต้นของข้าวระยะสืบพันธุ์จะไม่พบแถบของยีน *nifH* ในทุกตัวอย่างดิน แต่พบว่ามีแถบของยีน *nifH* ในรากซึ่งเหมือนกับข้าวในระยะเริ่มงอก อย่างไรก็ตาม พบว่ามีแถบของยีนดังกล่าวในใบของตัวอย่างข้าวที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยและดินที่ไม่ผ่านการรบกวนมากกว่าข้าวในระยะเริ่มงอก ซึ่งรูปแบบของแถบในใบของข้าวระยะสืบพันธุ์นี้มีความแตกต่างจากข้าวระยะอื่นในทุกรูปแบบของดินที่ใช้ปลูก

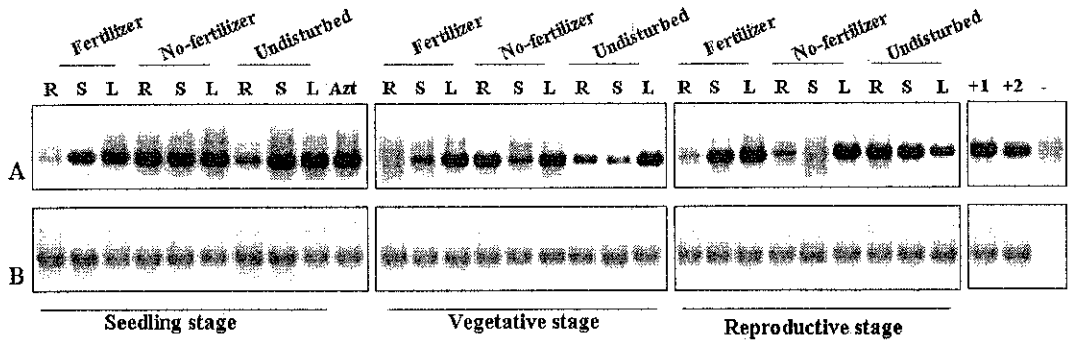
ลักษณะของประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในแต่ละส่วนของต้นข้าว ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน ระหว่างการเจริญเติบโตของข้าวหรือเวลาในการเก็บตัวอย่างข้าว สำหรับตัวอย่างข้าวที่มาจากดินที่ใส่ปุ๋ยเคมี และดินที่ไม่ผ่านการรบกวนจะมีรูปแบบของยีน *nifH* ที่หลากหลายน้อยกว่าตัวอย่างที่มาจากดินที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี และพบว่าตัวอย่างรากที่มาจากดินที่มีการใส่ปุ๋ยเคมีนั้นจะไม่พบแถบของยีน *nifH* เลย ในทุกๆ ช่วงการเจริญเติบโตของต้นข้าว อย่างไรก็ตามในลำต้นของระยะเติบโตทางลำต้นและใบในทุกๆ ตัวอย่างดินที่ใช้ปลูกนั้น ก็ไม่พบแถบของยีน *nifH* เช่นกัน แต่พบในใบของทุกช่วงของการเจริญเติบโตของต้นข้าว

ในดินที่ไม่ผ่านการรบกวน พบว่ารูปแบบของ *nifH* DGGE ขึ้นอยู่กับส่วนของต้นข้าว (ราก ลำต้น และใบ) เช่นเดียวกับชุมชนแบคทีเรีย nitrifyers ที่มีความหลากหลาย เมื่ออยู่ในรากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ

(Briones et al. 2002) การเปลี่ยนแปลงของยีน *nifH* เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์พืชหรือสิ่งแวดล้อมนั้น ซึ่งยืนยันได้จากการศึกษาแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในข้าวในประเทศเนปาล และฟิลิปปินส์ โดยพบว่าสิ่งแวดล้อมมีผลต่อโครงสร้างของประชากรแบคทีเรียดังกล่าวมากกว่าพันธุ์พืช (Tan et al. 2003) นอกจากนี้ในพืชที่มีการสังเคราะห์แสงสูง อาจมีผลต่อระดับคาร์โบไฮเดรตในรากและจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรากได้ (Feng et al. 2006)

6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nifH* ด้วยเทคนิค RT-PCR

กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์นั้น สามารถตรวจสอบได้โดยใช้ เทคนิค RT-PCR ร่วมกับ *nifH* primer ที่จำเพาะกับแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 RT-PCR fingerprinting ของยีน *nifH* ด้วยเทคนิค Reverse transcriptase และ nested PCR ร่วมกับไพร์เมอร์ *nifH* (A). RT-PCR fingerprinting ของยีน 16S rRNA ใช้เป็นมาตรฐานในการวัดจำนวนของ RNA (B) R, root; S, stem; L, leaf; Azt., *Azotobacter* sp.; +1, rice inoculated with *Azotobacter* sp. as positive control; +2, Positive Control; -, negative control (no-template)

การแสดงออกของยีน *nifH* มีความแตกต่างทั้งในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว และระยะการเจริญเติบโต และพบว่าในรากของทุกช่วงระยะการเจริญเติบโตในดินที่มีการใส่ปุ๋ยเคมีไม่มีการแสดงออกของยีน *nifH* แต่พบในใบของทุกช่วงระยะการเจริญเติบโตไม่ว่าดินจะมีการใส่ปุ๋ยหรือไม่ก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่า มีการแสดงออกของยีน *nifH* ในลำต้นของทุกตัวอย่าง ยกเว้นในตัวอย่างที่มาจากดินที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยเคมีในระยะสืบพันธุ์

โดยปกติแล้ว การแสดงออกของยีน *nif* มักเกิดขึ้นในสภาวะที่มี O_2 ต่ำ ซึ่งมักพบในข้าวที่ปลูกในนาน้ำขังหรือข้าวชุ่มน้ำ แต่ในการทดลองนี้ ดูเหมือนว่าไนโตรเจนจากปุ๋ยเคมีจะมีผลต่อการแสดงออกของยีนดังกล่าวมากกว่า ประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในราก จะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อดินที่ปลูกไม่มีการใส่ปุ๋ยเคมี มากกว่าดินที่ใส่ปุ๋ยเคมี และในระยะเริ่มงอกชุมชนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นและเพิ่มสูงสุดที่ระยะเติบโตทางลำต้นและใบ และจะลดลงเมื่อถึงระยะสืบพันธุ์ หากเปรียบเทียบเฉพาะระยะเริ่มงอก แบคทีเรียมีความหลากหลายมากในรากที่ได้จากดินที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยเคมี แต่มีความ

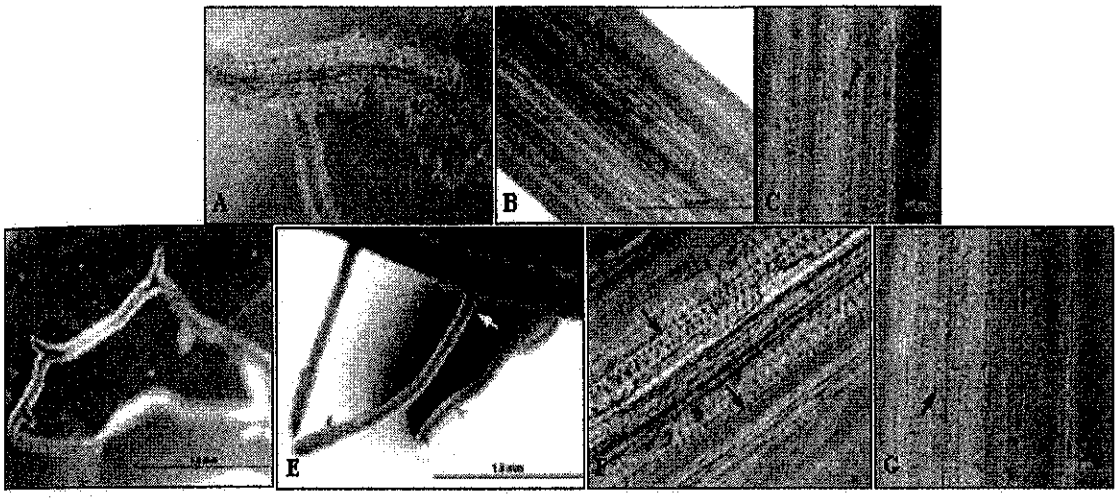
หลากหลายต่ำในรากที่ได้จากดินที่ใส่ปุ๋ยเคมี และดินที่ไม่ผ่านการรบกวน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงในลำต้นและใบของดินทุกรูปแบบ นั่นหมายความว่า ชุมชนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการพัฒนา หรือการเจริญเติบโตของข้าว และเป็นที่น่าสนใจที่พบว่า มีแบคทีเรียอาศัยอยู่ที่บริเวณใบ เป็นเพราะบริเวณดังกล่าวเป็นแหล่งอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งคาร์บอนที่พืชให้กับแบคทีเรียดังกล่าว และการตอบสนองต่อการรับและให้ไนโตรเจนระหว่างพืชกับแบคทีเรีย และส่งผลต่อการเพิ่ม carbon sink และการสังเคราะห์แสง (Gyaneshwar et al. 2002) นอกจากนี้ แสงหรือการสังเคราะห์แสงยังไม่กระทบหรือยับยั้ง *nifH* transcription (You et al. 2005)

จากผล culturable approach พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน ระยะการเจริญเติบโตและส่วนของต้นข้าว รวมถึงปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ ล้วนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ได้ ปุ๋ยไนโตรเจนนับว่าเป็นปัจจัยหลักในการยับยั้งยีน nitrogenase และหยุดกิจกรรมของ nitrogenase ของแบคทีเรียกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจน (Egener et al. 1999; Fuentes-Ramirez et al. 1999; Martin and Reinhold-Hurek 2002) แต่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในข้าวมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างรวดเร็วได้หลังการใส่ปุ๋ย การทดลองของ Roesch และคณะ (2006) พบว่า เมื่อมีการใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน (18.5 mg Kg^{-1}) ในช่วงแรกของระยะการเจริญเติบโต จะยับยั้งการเข้าอยู่อาศัยของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในข้าวโพด แต่กลับไม่มีผลต่อระยะการเจริญเติบโตต่อไป ในขณะที่การทดลองของ Muthukumarasamy และคณะ (2007) พบว่าการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ 148 mg Kg^{-1} จะยับยั้งจำนวนแบคทีเรียได้เมื่อมีการใส่ปุ๋ยหมักร่วมด้วย ในการทดลองนี้พบว่า เมื่อมีการใส่ปุ๋ยที่ระดับปกติของเกษตรกร (35.9 mg Kg^{-1}) ทำให้ความหลากหลายของรูปแบบยีน *nifH* น้อยลง และในดินที่ไม่ผ่านการรบกวน พบว่ามีความหลากหลายน้อยกว่าดินที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยเคมี เนื่องด้วยปุ๋ยไนโตรเจนไม่ได้มีผลเสียโดยตรงต่อประชากรแบคทีเรียในทุกๆ ระยะการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับ *Herbaspirillum* spp. ที่แยกได้ทั้งจากตัวอย่างที่มีการใส่และไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (Muthukumarasamy et al. 1999) จากการศึกษาต่างๆ พบว่าไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักในพืช มีผลต่อการอาศัยอยู่ของประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ (Muthukumarasamy et al. 1999; Reis et al. 2000) นั่นคือชุมชนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนดั้งเดิมที่อยู่ในพืช ประกอบด้วยกลุ่มแบคทีเรียดั้งเดิมที่เป็น N-depletion ซึ่งจะเป็นตัวคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มอื่น จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ในชุมชนจุลินทรีย์ของข้าวมีการเปลี่ยนแปลงสูง เนื่องจากการเปลี่ยนของ microenvironment

7. การศึกษาตำแหน่งอาศัย (Localization) ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ในเนื้อเยื่อข้าว

เนื่องจากไอโซเลท VFR5-3 ได้แสดงถึงความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การผลิต IAA และสามารถผลิตเอนไซม์ cellulase และ pectinase ซึ่งสามารถช่วยในการเข้าสู่เนื้อเยื่อข้าวได้ ดังนั้นไอโซเลทดังกล่าวจึงถูกเลือกเพื่อศึกษาการเข้าอยู่อาศัยในข้าว หลังจากใส่หัวเชื้อไอโซเลท VFR5-3 ที่มียีน GUS ได้ 5 วัน พบว่ามีการอยู่อาศัยของ VFR5-3 ที่ราก ซึ่งพบความหนาแน่นสูงที่บริเวณปลายราก (รูปที่ 6D) และ

ส่วนต่อของราก (รูปที่ 6E) นอกจากนี้ยังพบการสร้างสีของ GUS ที่บริเวณลำต้นและใบด้วย (รูปที่ 6F และ 6G) ส่วนตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่หัวเชื้อนั้นไม่พบสีของ X-Gluc ที่แสดงถึงการอยู่อาศัยของแบคทีเรียแต่อย่างใด (รูปที่ 6A-C)



รูปที่ 6 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของราก ลำต้น และใบของข้าว ที่อายุ 5 วันหลังการปลูกถ่ายเชื้อ VFR5-3 ที่ติดฉลากด้วย GUS ตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อที่ราก (A) ลำต้น (B) และใบ (C) ลูกศรชี้บริเวณที่มีความหนาแน่นของกิจกรรม GUS ที่รากขนอ่อน (D) รอยต่อระหว่างราก (E) ลำต้น (F) และใบ (G)

รากข้าวที่ย้อมสีเพื่อดูกิจกรรมของ GUS จากไอโซเลท VFR5-3 พบมากที่บริเวณรากขนอ่อน เนื่องจากแบคทีเรียจะเริ่มเข้าสู่พืชที่บริเวณรอยต่อของรากขนอ่อนกับรากแขนง ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการที่แบคทีเรียจะเข้าสู่รากแก้วผ่านรอยแยก (crack entry) และการขยายเข้าสู่รากฝอย การเข้าสู่พืชด้วยวิธีการเช่นนี้ สามารถพบได้ในแบคทีเรียเอนโดไฟท์อื่นๆ เช่น *G. diazotrophicus* ในอ้อย (James and Olivares 1998) *Azoarcus* spp. ในข้าว และหญ้า Kallar (Hurek et al. 1991) *Herbaspirillum* spp. ในอ้อยและข้าว (James and Olivares 1998; James 2000; James et al. 2002) จากผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท VFR5-3 มีความคล้ายคลึง 99% กับ *Rheinheimera* sp. J3-AN42 มีรายงานว่า *R. baltica* เป็นแบคทีเรียที่เพิ่งค้นพบมีสีน้ำเงิน แยกได้จากทะเลบอลติก (Brettar et al. 2002) และมหาสมุทรแปซิฟิก (Romanenko et al. 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า *Rheinheimera* sp. อยู่อาศัยร่วมกับสปอร์ของ arbuscular mycorrhizal fungi (Roesti et al. 2005) และรากของมะเขือเทศ (Kim et al. 2006) แต่ยังไม่มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ จากผลการทดลองนี้ เป็นรายงานครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลท VFR5-3 มีคุณสมบัติของการเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ คือสามารถเข้าสู่พืช แล้วแสดงการตรึงไนโตรเจนได้

บทที่ 4
บทสรุป

จากผลการทดลอง culturable approach สามารถเข้าใจสมบัติของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในข้าว และเมื่อประมวลกับข้อมูลการแสดงออกของยีน *nif*H เป็นองค์ความรู้ที่สำคัญที่จะเข้าใจว่า ชุมชนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์จะไปอาศัยอยู่กับข้าวเมื่อใดและอาศัยอย่างไร ซึ่งองค์ความรู้ดังกล่าวมีความสำคัญในการที่จะประมวลความสามารถของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเอนโดไฟท์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธ์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ว่าจะสามารถแข่งขันกับแบคทีเรียเอนโดไฟท์อื่นๆ ในการที่จะเข้าสู่ข้าวและการตรึงไนโตรเจนสู่พืชเจ้าบ้านได้ ก่อนที่จะพัฒนาเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับข้าวต่อไป

บรรณานุกรม

Andro, T., J. P. Chambost, A. Kotoujansky, J. Cattaneo, Y. Bertheau, F. Barras, F. Van Gijsegem and A. Coleno (1984). Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. J Bacteriol **160**(3): 1199-1203.

Araujo, W. L., J. Marcon, W. Maccheroni, Jr., J. D. van Elsas, J. W. L. van Vuurde and J. L. Azevedo (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Appl Environ Microbiol **68**(10): 4906-4914.

Asis, C. A. and K. Adachi (2004). Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. Lett Appl Microbiol **38**(1): 19-23.

Balandreau, J. (1986). Ecological factors and adaptive processes in N_2-fixing bacterial populations of the plant environment. Plant Soil **90**(1): 73-92.

Barraquio, W. L., L. Revilla and J. K. Ladha (1997). Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. Plant Soil **194**(1): 15-24.

Bekri, M. A., J. Desair, V. Keijers, P. Proost, M. Searle-van Leeuwen, J. Vanderleyden and A. Vande Broek (1999). *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. J Bacteriol **181**(2440-2447).

Brettar, I., R. Christen and G. Hoflem (2002). *Rheinheimera baltica* gen. nov., sp. nov., a blue-coloured bacterium isolated from the central Baltic Sea. Int J Syst Evol Microbiol **52**: 1851-1857.

Briones, A. M., S. Okabe, Y. Umemiya, N. B. Ramsing, W. Reichardt and H. Okuyama (2002). Influence of different cultivars on populations of ammonia-oxidizing bacteria in the root environment of rice. Appl Environ Microbiol **68**(6): 3067-3075.

Costacurta, A., P. Mazzafera and Y. B. Rosato (1998). Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri is increased in the presence of plant leaf extracts. FEMS Microbiol Lett **159**(2): 215-220.

Dar, S. A., J. G. Kuenen and G. Muyzer (2005). Nested PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. Appl Environ Microbiol **71**(5): 2325-2330.

Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983). A plant DNA minipreparation: version II. Plant Mol Biol Rep **1**(4): 19-21.

Doerr, J., T. Hurek and B. Reinhold-Hurek (1998). Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. Mol Microbiol **30**(1): 7-17.

Doetsch, R. N. (1981). Determinative methods of light microscopy. Manual of Methods for General Bacteriology. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilowet al. Washington, DC, American Society for Microbiology: 21-33.

Egener, T., T. Hurek and B. Reinhold-Hurek (1999). Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. MPMI **12**(9): 813-819.

Elbeltagy, A., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui and K. Minamisawa (2001). Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Appl Environ Microbiol **67**(11): 5285-5293.

Feng, Y., D. Shen and W. Song (2006). Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. J Appl Microbiol **100**(5): 938-945.

Fuentes-Ramirez, L. E., J. Caballero-Mellado, J. Sepulveda and E. Martinez-Romero (1999). Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. FEMS Microbiol. Ecol. **29**(2): 117-128.

Fujii, T., Y. D. Huang, A. Higashitani, Y. Nishimura, S. Iyama, Y. Hirota, T. Yoneyama and R. A. Dixon (1987). Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* on dinitrogen fixation by rice-bacteria associations. Plant Soil **103**(2): 221-226.

Gyaneshwar, P., E. K. James, P. M. Reddy and J. K. Ladha (2002). *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. New Phytol **154**: 131-145.

Hoffmann, H., S. Stindl, W. Ludwig, A. Stumpf, A. Mehlen, J. Heesemann, D. Monget, K. H. Schleifer and A. Roggenkamp (2005). Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. System Appl Microbiol **28**(3): 196-205.

Hurek, T., B. Reinhold-Hurek, M. van Montagu and E. Kellenberger (1991). Infection of intact roots of Kallar grass and rice seedlings by *Azoarcus*. Nitrogen Fixation. M. Polsinelli, et al. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 235–242.

James, E. K. (2000). Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Res **65**(2-3): 197-209.

James, E. K., P. Gyaneshwar, N. Mathan, W. L. Barraquio, P. M. Reddy, P. P. M. Iannetta, F. L. Olivares and J. K. Ladha (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. MPMI **15**(9): 894-906.

James, E. K. and F. L. Olivares (1998). Infection and colonization of sugarcane and other Graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Crit Rev Plant Sci **17**(1): 77-119.

James, J. B., T. D. Sherman and R. Devereux (2006). Analysis of bacterial communities in seagrass bed sediments by double-gradient denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified 16S rRNA genes. Microb Ecol **V52**(4): 655-661.

Kim, J. S., R. S. Dungan, S. W. Kwon and H. Y. Weon (2006). The community composition of root-associated bacteria of the tomato plant. World J Microbiol Biotechnol **22**(12): 1267-1273.

Ladha, J. K., F. J. de Bruijn and K. A. Malik (1997). Introduction: Assessing opportunities for nitrogen fixation in rice-a frontier project. Plant Soil **194**(1): 1-10.

Loiret, F. G., E. Ortega, D. Kleiner, P. Ortega-Rod; eacute, R. Rod, eacute and Z. Dong (2004). A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. J Appl Microbiol **97**: 504-511.

Manassila, M., A. Nuntagij, S. Kotepong, N. Boonkerd and N. Teaumroong (2007). Characterization and monitoring of selected rhizobial strains isolated from tree legumes in Thailand. Afr J Biotechnol **6**(12): 1393-1402.

Martin, D. E. and B. Reinhold-Hurek (2002). Distinct roles of PII-like signal transmitter proteins and *amtB* in regulation of *nif* gene expression, nitrogenase activity, and posttranslational modification of NifH in *Azoarcus* sp. strain BH72. J Bacteriol **184**(8): 2251-2259.

Mateos, P., J. Jiminez-Zurdo, A. Chen, S. Squatrini, E. Haack, P. Martinez-Molina, D. Hubbel and F. B. Dazzo (1992). Cell associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Appl Environ Microbiol **58**: 1816-1822.

Minamisawa, 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. Appl Environ Microbiol **70**(5): 3096-3102.

Minamisawa, K., T. Seki, S. Onodera, M. Kubota and T. Asami (1992). Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. Appl Environ Microbiol **58**(9): 2832-2839.

Miyamoto, T., M. Kawahara and K. Minamisawa (2004). Novel endophytic nitrogen-fixing Clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism analysis. Appl Environ Microbiol **70**(11): 6580-6586.

Muthukumarasamy, R., I. Cleenwerck, G. Revathi, M. Vadivelu, D. Janssens, B. Hoste, K. Ui Gum, K.-D. Park, C. Young Son, T. Sa and J. Caballero-Mellado (2005). Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. System Appl Microbiol **28**(3): 277-286.

Muthukumarasamy, R., U. G. Kang, K. D. Park, W. T. Jeon, C. Y. Park, Y. S. Cho, S. W. Kwon, J. Song, D. H. Roh and G. Revathi (2007). Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. J Appl Microbiol **102**(4): 981-991.

Muthukumarasamy, R., G. Revathi and C. Lakshminarasimhan (1999). Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. Biol Fertil Soils **29**(2): 157-164.

Muthukumarasamy, R., G. Revathi, S. Seshadri and C. Lakshminarasimhan (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. Curr Sci **83**(2): 137-145.

Mylona, P., K. Pawlowski and T. Bisseling (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. Plant Cell **7**: 869-885.

Ovreas, L., L. Forney, F. L. Daae and V. Torsvik (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **63**(9): 3367-3373.

Palus, J. A., J. Borneman, P. W. Ludden and E. W. Triplett (1996). A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. Plant Soil **186**(1): 135-142.

Poly, F., L. Ranjard, S. Nazaret, F. Gourbiere and L. J. Monrozier (2001). Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. Appl Environ Microbiol **67**(5): 2255-2262.

Rasolomampianina, R., X. Bailly, R. Fetiarison, R. Rabevohitra, G. Bena, L. Ramaroson, M. Raherimandimby, L. Moulin, P. De Lajudie, B. Dreyfus and J. C. Avarre (2005). Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. Mol Ecol **14**(13): 4135-4146.

Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek (1998). Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. Crit Rev Plant Sci **17**(1): 29-54.

Reinhold-Hurek, B., T. Maes, S. Gemmer, M. Van Montagu and T. Hurek (2006). An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. MPMI **19**(2): 181-188.

Reis, V. M., J. I. Baldani, V. L. D. Baldani and J. Dobereiner (2000). Biological dinitrogen fixation in *Gramineae* and palm trees. Critical Reviews in Plant Sciences **19**(3): 227-247.

Roesch, L. F. W., F. L. Olivares, L. M. Pereira Passaglia, P. A. Selbach, E. L. S. de Sa and F. A. O. de Camargo (2006). Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. World J Microbiol Biotechnol **22**(9): 967-974.

Roesti, D., K. Ineichen, O. Braissant, D. Redecker, A. Wiemken and M. Aragno (2005). Bacteria associated with spores of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. Appl Environ Microbiol **71**(11): 6673-6679.

Romanenko, L. A., M. Uchino, E. Falsen, N. V. Zhukova, V. V. Mikhailov and T. Uchimura (2003). *Rheinheimera pacifica* sp. nov., a novel halotolerant bacterium isolated from deep sea water of the Pacific. Int J Syst Evol Microbiol **53**(6): 1973-1977.

Ruppel, S., C. Hecht-Buchholz, R. Remus, U. Ortmann and R. Schmelzer (1992). Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: An investigation using ELISA and transmission electron microscopy. Plant Soil **145**(2): 261-273.

Stoltzfus, J. R., R. So, P. P. Malarvithi, J. K. Ladha and F. J. de Bruijn (1997). Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. Plant Soil **194**(1): 25-36.

Tan, Z., T. Hurek and B. Reinhold-Hurek (2003). Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. Environ Microbiol **5**: 1009-1015.

Teaumroong, N., K. Teamtaisong, T. Sooksa-ngun and N. Boonkerd (2001). The dizotrophic endophytic bacteria in Thai rice. Proceeding of the Fifth ESAFS International Conference on Rice Environments and Rice Products, Krabi, Thailand.

Verma, S. C., J. K. Ladha and A. K. Tripathi (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. J Biotechnol **91**(2-3): 127-141.

Xie, G. H., Z. Cui, J. Yu, J. Yan, W. Hai and Y. Steinberger (2006). Identification of *nif* genes in N_2-fixing bacterial strains isolated from rice fields along the Yangtze River Plain. J Basic Microbiol **46**(1): 56-63.

Yang, C. H., D. E. Crowley and J. A. Menge (2001). 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. FEMS Microbiol Ecol **35**(2): 129-136.

You, M., T. Nishiguchi, A. Saito, T. Isawa, H. Mitsui and K. Minamisawa (2005). Expression of the *nifH* gene of a *Herbaspirillum* endophyte in wild rice species: daily rhythm during the light-dark cycle. Appl Environ Microbiol **71**(12): 8183-8190.

Zinniel, D. K., P. Lambrecht, N. B. Harris, Z. Feng, D. Kuczmarski, P. Higley s, C. A. Ishimaru, A. Arunakumari, R. G. Barletta and A. K. Vidaver (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and Prairie plants. Appl Environ Microbiol **68**(5): 2198-2208.

ประวัติผู้วิจัย

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, 216345

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 (2004-2008)

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 N. Boonkerd Paul W. Singleton and Dulal Borthakur (2004) A histidine kinase sensor protein gene is necessary for induction of low pH tolerance in *Sinorhizobium* sp. Strain LT11. Journal of Applied Microbiology. (submitted).

Tittabutr P., W. Payakapong, N. Teaumroong and N. Boonkerd (2004) Cassava as a cheap source of carbon for rhizobial inoculant production using amylase-producing fungus and glycerol-producing yeast. World Journal of Microbiology & Biotechnology, (accepted).

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, (accepted).

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 Processding 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.

roong 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

roong, 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.

roong 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

ɔng 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.

ıg, 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.

ısong, 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.

ʒij, 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.

ıtr, 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.

ısila 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.

ıroong, 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.

apong, 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

PROFESSIONAL SOCIETIES

: Thai Society of Biotechnology : Thai Inventor Association

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"

Invited speaker at Gansu Agricultural University, China (2-3 Nov. 2004) (Topic : Biofertilizer Technology)

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")

FELLOWSHIPS

- "The Royal Golden Jubilee program" (2000-2003)
- "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

Prof.Dr.NANTAKORN BOONKERD

Date of Birth : October 15, 1942

Position : Lecturer, Suranaree University of Technology

Address : Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000,
Thailand ; Tel. & Fax No. (66 44) 224750
E-mail : nantakon@sut.ac.th

Subject of Research : Development of inoculant production and formulation
Biological N_2 fixation
Grape production Technology
Wine making

Education : Ph.D. Soil Microbiology 1981-Texas A&M University, May 1981
M.S. Soil Microbiology 1972-University of Maryland, USA., December 1972
B.S. Soil Science 1966-Kasetsart University Thailand, 1996

EMPLOYMENT :

Feb. 1993-Present	School of Biotechnology, Institute of Agricutural Technology, Suranaree University of Technology
1966-1993	Department of Agricuture, Bangkok, Thailand.
1985-1993	Director of Biological Nitrogen Fixation Resource Center for South and Southeast Asia. Chief of Soil Microbiology Research Group and Research Leader in BNF. Responsible for researches in biological nitrogen fixation, especially in rhizobia and inoculant production.
1981-1985	Research Leader in *Rhizobium* and *Frankia.* Supervisor in industrial rhizobial inoculant production and quality control. Develope large scale inoculant production (200 tons/year) as well as small scale production.
1879-1981	Graduate Research Assistant study for Ph.D. at Texas A&M University College Station, Texas.
1973-1979	Research Leader in *Rhizobium* and inoculant production.
1970-1973	FAO Fellowship study for M.S. at Univetsity of Maryland, USA.
1966-1973	Research Leader in the use of *Rhizobium* to increase yield of economic legumes and green manuring legumes.

RESEARCH GRANTS AWARDED :

USAID-Collabrative Research Support Program (CRSP) in peanut rhizobia, 1983-1988.

Methods to culture, maintain, and propagate *Azolla* under troical conditions, 1985-1988.

Awarded by BOSTID, US national Academy of Sciences.

The enhancement of the biological nitrogen fixation by genetic engineering technique. NCGEB, 1985-1988

Screening with nuclear and other techniques for yield and N_2 fixation in mungbean. IAEA 1986-1987.

Molecular indentification of *Frankiae* using cross inoculation group specific DNA sequences. PSTC 1987-1989.

Increasing biological nitrogen fixation of peanuts in developing countries. US-ISRAEL CDR Program, 1987-1990.

Indentification of rhizobium strains by genetic engineering for enhancement of N_2 fixation and inoculant production. NCGEB 1987-1989.

Exploitation of new technologies to monitor the survival and nodulating effectiveness of *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strains of soybean. Commission of the European Communities. 1989-1993.

Ecologically based models for prediction of legume inoculation requirement. USAID-PSTC 1989-1992.

On-farm optimization of biological nitrogen fixation of grain legumes. Commission of the European Communities. 1990-1993.

Screening with nuclera and other techniques for yield and N_2 fixation in grain legumes. IAEA 1990-1994.

Breeding of nitrogen-fixing bacteria in southeast asia. Monbusho International Scientific Research Program. 1994-1997.

CONSULTANCIES :

Rhizobial inoculant production in Burma, USAID. July 2-8, 1985.

Biologycal nitrogen fixation traning course in Bangladesh, Winrock International. February 14-21, 1986 and February 14-19, 1987.

Rhizobial inoculant production in Indonesia, Eurindo Combine Pt., April 20-30, 1986.

ACIAR Project on micronutrient enhancing nitrogen fixation. Australia Goverment. February 19-21, 1986.

Biotechnology. Faculty of Tecnology, Khon Kaen University, 1986.

Rhizobial inoculant production in Chiang Mai, Thailand. Appropriate Technology International, January 4-April 30, 1987.

Rhizobial technology and design field experiments to assess N_2 fixation in soybean using N-15 techniques to the Democratic People's Republic of Korea. IAEA, February 1-March 2, 1990.

Rhizobial technology and inoculant production to Anambra State University of Technology, Enugu, Nigeria. IAEA, April 1-21, 1990.

Rhizobial technology and design field experiments to assess N_2 fixation in soybean using N-15 techniques to the Democratic People's Republic of Korea. IAEA, July 11-Auguust 3, 1991.

Increased yield and N_2 fixation in beans and soybeans to Kawanda Research Station, Uganda IAEA, November 18-December 23, 1991.

Review of ACIAR Project 8829 : Biological nitrogen fixation by soybean in rotation with rice, Indonesia. April 26-30, 1993.

Financial and envionmental impact of use of biologically fixed nitrogen for soybean production in the People's Republic of China. June 28-July 14, 1993.

ANSAB Research Grant on Biofertilizer Production, Philippines, Sir-Lanka, India, June 1-15, 1993.

BNF Technology and ^{15}N technique for measuring N_2 fixation to the Mongolian National Agricultural University by IAEA from August 25 to September 15, 1994.

Nuclear techniques to improve agricultural production : Inoculant Production to BINA, Bangladesh, by IAEA from January 12-22, 1995.

Isotope and nuclear techniques in crop production : Biological nitrogen fixation, to MAS Myanma by INEA from January 24-February 8, 1995.

Nuclear techniques to improve agricultural production : Inoculant Production to BINA, Bangkok, by IAEA from July 1-15, 1996.

ADVISORY COMMITTEES AND SUPERVISOR OF MS AND PhD STUDENTS AT :

- Biochemistry Department, Chulaongkorn University
- Microbiology Department, Kasetsart University
- Agronomy Department, Kasetsart University
- Soil Sciences Department, Kasetsart University
- Botany Department, Kasetsart University
- Forestry Department, Kasetsart University
- Faculty of Environmemt and Natural Resources, Mahidol University
- Biology Department, Srinakarinwirote University at Prasarnmit

OTHER EXPERIENCES :

Organizing International Training Course and Workshops :

- NifTAL International Training Course on Legume Rhizobium Technology. November 1-December 10, 1982.
- FAO International Training Course on Blue Green Algae, February 3-25, 1983.
- NifTAL-BNFRC International Training Course on Inoculant Production, March 28, 1985.
- IAEA-Research Coordination Meeting on Improving Yield and N_2 Fixation in Grain Legumes, November 17-21, 1986.
- FAO-NifTAL International Training Course on Rhizobial Technology and Inoclant Production, March 2-27, 1987.
- EC-ASEAN Workshop on Biological Nitrogwn Fixation, May 23-26, 1988.
- FAO-NifTAL-BNFRC International Training Course on Rhizobial Technology and Inoclant Utilization, March 6-31, 1989.
- NifTAL International Training Course on legume Rhizobial Technology. November 1-28, 1989.

- International Training on Biological Nitrogen Fixation Technology for Extension works. USAID-NifTAL. March 26-April 6, 1990.
- FAO-NifTAL-BNFRC International Training Course on Rhizobial Technology and Inoclant Production. September 14-October 16, 1992.
- FAO-NifTAL-BNFRC International Training Course on Legume-Rhizobial Technology for Research and Application. July 26-August 27, 1993.
- AIT, IDRC, BNDRC International Training Course on Applied Legume BNF Technology. July 18-24, 1994.

TECHNICAL SKILL IN AGRICULURAL BIOTECHNOLOGY :

- Inoculant Production and Quality Control
  - -Develop technology for commercial inoculant production
  - -Establish method for controling the quality of inoculant
  - -Implementing technology transfer for inoculant production
- Serological Techniques including
  - -Agglutination & Immunodiffusion
  - -Immunofluoresent
  - -ELISA
  - -Immunoblot
  - -Monoclonal antibody production
- Methods for Measuring N_2 Fixation
  - -Total N
  - -Acetylene reduction assay
  - -Ureide assay
  - -^{15}N technique
- DNA isolation and restriction mapping
- Extensive experience involving BNF in the field
- Plant tissue culture of nitrogen fixing trees
- Mushroom production

PUBLICATION :

Sloger, C., D.F. Bezdicek, R. Milberg, and N. Boonkerd. (1975). Seasonal and diunal variations in nitrogen fixing activity in field soybeans. In : Nitrogen Fixation by Free-Living Micro-Great Britain. 83.

Boomkerd, N., D.F. Weber and D.F. Bezdicek. (1978.) Influence of *Rhizobium japonicum* strains and inoculation methods on soybeans grown in rhizobia-populated soil. Agron.J. 70 : 547-549.

Boonkerd, N., D.F. Bezdicek and D.F. Weber. (1978). Comparative evaluation of *Rhizobium japonicum* strains by acetylene reduction and other methods. Legume Research. 2 : 1-10.

Boonkerd, N. and Y. Vasuvat. (1979). Effects of defoliation on nitrogen fixation and yield of soybeans. Agron. Abst. 1979. P.155.

Boonkerd, N., W. Rungrattanakasin, P. Wadesirisuk and Y. Vasuvat. (1979). *Rhizobium japonicum* strains selection in Thailand. In: Proceedings of Symposium Somiplan held in Kuala Lumper, Eds. W.J. Broughton *ed al.* The University of Malaya Press, Kuala Lumper. 213-228.

Boonkerd, N., W. Rungrattanakasin, P. Wadesirisuk and Y. Vasuvat. (1979). Effect of nitrogen fertilizer application on the growth, nodulation, nitrogen fixation and yield of soybeans. In: Proceedings of Symposium Somiplan held in Kuala Lumper, Eds. W.J. Broughton *ed al.* The University of Malaya Press, Kuala Lumper. 182-183.

Boonkerd, N., W. Rungrattanakasin, P. Wadesirisuk, S. Kotepongse, and Y. Vasuvat. (1979). Studies on increasing yield of soybeans with inoculants, fertilizer and lime. In: Proceedings of Symposium Somiplan held in Kuala Lumper, Eds. W.J. Broughton *ed al.* The University of Malaya Press, Kuala Lumper. 375-380.

Morris, D.R., N. Boonkerd and Y. Vasuvat. (1980). Effects of N-serve on soybeans and soil nitrogen transformations. Plant & Soil. 57: 31-39.

Boonkerd, N. (1982). Evaluation of *Rhizobium japonicum* in field grown soybeans. In: Recent Advances in Nitrogen Fixation Research : Their Implications for Thailand. Chulalongkorn University, Bangkok Thailand.

Boonkerd, N. and R.W. Weaver. (1982). Cowpea Rhizobia: Comparison of plant infection and plate counts. Soil Biol & Biochem 14: 305-308.

Boonkerd, N. and R.W. Weaver. (1982). Effectiveness stability of cowpea rhizobia as affected by soil temperature and moisture. Proceedings of 8th North American Rhizobium Conference, University of Manitoba, Winnepeg, Canada.

Boonkerd, N. and R.W. Weaver. (1982). Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. Appl. Envir. Microbiol 43: 585-589.

Tangcham, B., S. Choonluchanon, N. Boonkerd, and Y. Vasuvat. (1982). Study on The Increasing Yield of *Azolla* Suitable for Use as Greenmanure in the Rice Field. In: Recent Advances in Nitrogen Fixation Research : Their Implication for Thailand. Chulalongkorn University, Bangkok Thailand.

Boonkerd, N., C. Arunsri, W. Rungrattanakasin and Y. Vasuvat. (1985). Effects of post-emergence inoculation on field grown soybeans. MIRCEN, J. 1: 115-161.

Boonkerd, N., V. Thananusont, J. Poodpong and Y. Vasuvat. (1985). Isolation and characterization of *Frankia* from nodules of *Casuarina*. In: Nitrogen Fixation Research Progress-Proceedings of 6th International Symposium on Nitrogen Fixation OSU Corvallis. Eds. Evans et al. Martinus Nifhoff Publishers. P. 700.

Boonkerd, N. (1986). Problems and propects of BNF in agricultural development in Thailand. In: Biotechnology of Nitrogen Fixation. Eds. Z.H. Shamsudin et al. University Pertanian Malaysia. P. 321-327.

Thomson, J.S., A. Bhomsiri and N. Boonkerd. (1986). Soybean rhizobia from Northern Thailand. In: Biotechnology of Nitrogen Fixation. Eds. Z.H. Shamsudin et al. University Pertanian Malaysia. P. 165-167.

Wadisirisuk, P., O. Nopamornbodi, S. Thamsurakul, V. Thananusont, N. Boonkerd, B. Thoonsan and Y. Vasuvat. (1986). Interaction between mycorrhizal fungi and cowpea rhizobia on peanut cultivar Taiwan 9. In: Biotechnology of Nitrogen Fixation in the Tropics, Eds. Z.H. Shamsudin et al. University Pertanian Malaysia. P. 255-257.

Weaver, R.W., D.R. Morris, N. Boonkerd and J. Sij. (1987). Populations of *Bradyrhizobium japonicum* in field cropped with soybean-rice rotations. Soil. Sci. Soc. Am. J. 51: 90-92.

Boonkerd, N., P. Wadisirisuk, W. Thananusont, T. Arayangkul, P. Chaiwanakupt and R.W. Kucey. (1988). Competition for nodule sites between inoculated and indigenous *Bradyrhizobium japonicum* strains. In: Proceedings of the 7th International Congress on N=Nitrogen Fixation. Eds H. Bothe et al. Gustav Fischer, Stuttgart, New York. P. 778.

Chaiwanakupt, P., P. Snitwongse, N. Boonkerd, C. Siripabool, R.J. Rennie and R.M.N. Kucey. (1988). Nitrogen fixation by soyberns in Thailand using the N-15 isotope dilution method. In: 83 Proceedings of the 7th International Congress on N=Nitrogen Fixation. Eds H. Bothe et al. Gustav Fischer, Stuttgart, New York. P. 810.

Choonluchanon, S., N. Boonkerd and P. Swatdee. (1988). Adaptation of exotic *Azolla* to tropical environments of Thailand. Plant and Soil. 108: 67-70.

Kucey, R.M.N., P. Chaiwanakupt, P. Snitwongse, B. Toomsan, N. Boonkerd, C. Siripaibool, B. Rennie,W. Rungrattanakasin and P. Wadisirisuk. (1988). Nitrogen fixation (N-15 dilution) with soybean under Thai field conditions. III. Effect of *Bradyrhizobium japonicum* strains and herbicides in Northeast Thailand. J. Gen Appl. Microbial. 34: 243-253.

Kucey, R.M.N., P. Snitwonge, N. Boonkerd, P. Chaiwanakupt, P. Wadisirisuk, C. Siripaibool, T. Arayangkool and R.J. Rennie. (1988d). Nitrogen fixation (15-N dilution) with soybean under Thai field conditions : I Effect of *Bradyrhizobium japonicum* strain. Plant and Soil. 108: 33-41.

Kucey, R.M.N., P. Chaiwanakupt, T. Arayangkool, P. Snitwong, C. Siripaibool and N. Boonkerd. (1988). Nitrogen fixation (N-15 dilution) with soybean under Thai field conditions. II. Effect of herbicides and water application schedule. Plant and Soil 108:87-92.

O'Hara, G.W., M.J. Dilworth, N. Boonkerd and P. Parkpian. (1988). Iron-deficiency specifically limits nodule development in peanut inoculated with *Bradyrhizobium sp.* New Phytol. 108: 51-57.

O'Hara, G.W., N. Boonkerd and M.J. Dilworth. (1988). Mineral constraints to nitrogen fixation. Plant and Soil. 108: 93-110.

Rennie, R.J., D.A. Rennie, C. Siripaibool, N. Boonkerd and P. Snitwongse. (1988). N_2 fixation in Thai soybean : Effect of tillage and inoculation on ^{15}N-determined N_2 fixation in recommended cultivars and advanced lines. Plant and Soil. 112: 183-193.

Sinitwongse, P., C. Siripaiboon, P. Chaiwanakupt, N. Boonkerd and R.M. Kucey. (1988). Use of ARA and 15-N dilution techniques to measure N_2 fixation by soybean cultivars. In: Biotechnology of Nitrogen Fixation. Eds. Z.H. Shamsudin et al. University Pertanian Malaysia. P. 127-135.

Wadisirisuk, P., N. Boonkerd, V. Thananusont and A. Nitayajarn. (1988). Rhizobial strains selection for mungbean c.v. Kampang saen 1 and 2. In: Proceedings of the 7th International Congress on N=Nitrogen Fixation. Eds H. Bothe et al. Gustav Fischer, Stuttgart, New York. P. 789.

Boonkerd, N and D. Baker. (1989). Interactions between plants and microorganisms in nitrogen-fixation symbioses. In: Interractions Between Plants and Microorganisms. Proceedings of a JSPS-NUS Inter-faculty Seminar, Singapore. Eds. G. Lim and K. Katsuya. Science Faculty, National University of Singapore. P. 160-169.

Boonkerd, N. (1989). The use of biological nitrogen fixation for soil fertilty improvement. In: Proceedings of International Symposium on Application of Biotechnological Methods and Recent Accomplichments of Economic Value in Asia. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Boonkerd, N., P. Wadisirisuk and V. Thananusont. (1989). Application of moclonal antibodies for indentification of rhizobial strains. In: Proceeding Celebration of Chiangmai University 25th Aniversary Workshop on AID-SCI Funded Research in Immunology in Thailand. p. 134-137.

Kucey, R.M.N., P. Chaiwanakupt, N. Boonkerd, P. Snitwongse, C. Siripaibool, P. Wadisirisuk and T. Arayangkool. (1989). Nitrogen fixation (N-15 dilution) with soybean under Thai field conditions. IV. Effect of N addition is soils with indigenous *Bradyrhizobium japonicum* populations. J. Appl. Bacteriol. (in press).

Boonkerd, N., P. Wadisirisuk and V. Thananusont. (1990). Effectiveness of indigenous peanut rhizobia in relation to croping system and their population sizes. In: Proceedings of Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Bangkok.

Yoneyama, T., T. Murakami, N. Boonkerd, P. Wadisirisuk, S. Siripin and K.Kouno. (1990). Natural ^{15}N abundance in shrub and tree legumes, Casuarina and non N_2 fixing plants in Thailand. Plant and soil. 128: 287-292.

Boonkerd, N. (1991). Inoculant quality control standards in Thailand. In: Report in Expert Consultation on Legume Inoculant Production and Quality Control. FAO Rome, Italy. P. 121-129.

Boonkerd, N. (1992). The application of bio and organic fertilizer in Thailand. P. 88-101. In: Proceedings of National Conference on the Conversion of Agro-Industrial Wastes in to Fertilizers Ayola Center, Manila, Philipines.

Sekiya, J., T. Matoh, Y. Matsu, P. Swatdee and N. Boonkerd. (1992). Characterization of nitrogen metabolism in Azolla-Anabacna associates. Annual Reports of IC Biotech Japan. 15: 374-375.

Boonkerd, N. and S. Promsiri. (1993). Effectiveness in N_2 fixation of *Sesbania speciosa* and *Sesbania rostrata* rhizobia isolated from different locations. The Kasetsart Journal. 27 : 292-302.

Boonkerd, N., P. Wadisirisuk and V. Thananusont. (1993). Survey on indigeous population of peanut rhizobia under different cropping sustems. Thai Agr. Res. J. 11 : 114-119.

Boonkerd, N., P. Wadisirisuk and V. Thananusont. (1993). Survey on indigenous population of peanut rhizobia under different cropping system. Thai Agri. Res. J. 11 : 114-119.

Boonkerd, N., P. Wadisirisuk, A. Nantakij, S. Siripin and T. Murakami. (1993). Screening with nuclear and other techniques for yield and N_2 fixation in mungbean. The Kasetsart Journal. 27 : 162-176.

Boonkerd, N., P. Wadisirisuk, G. Meromi and B.D. Kishinevsky. (1993). Quantity, symbiotic performance and serological properties of native peanut rhizobia in soils of Thailand. P. 589. In: Proceedings 9th International Congress on Nitrogen Fixation. (R. Palacio, J. Mora and W.E. Newton eds). Kluwer Academic Publishers.

Boonkerd, N., P. Wadisirisuk, G. Meromi and B.D. Kishinevsky. (1993). Population size and N_2 fixing activity of native peanut rhizobia in soils of Thailand. Biol. Fertil. Soils. 15 : 275-278.

Boonkerd, N., P. Wadisirisuk, S Kotepong and O. Nopamornbodi. (1993). Internation between VAM fungi on N_2 Fixation in nitrogen fixing trees. P. 711. In: Proceedings 9th International Congress on N_2 Fixation. (R. Palacio, J. Mora and W.E. Newton eds). Kluwer Academic Publishers.

Boonkerd, N., S. Choonluchanon and P. Swadee. (1993). Propagation of *Azolla* through sporocarbs. Thai Agri. Res. J. 11 : 53-59.

Kishinevsky, D,B., D. Gurfel, N. Boonkerd and C. Nemas. (1993). Serological grouping of indigenous *Bradyrhizobium sp.* (Arachis) isolated from various soil og Thailand. World J. Microbiology and Biotechnology. 9 : 635-640.

Aveline, A., T. Arayangkul, N. Boonkerd, J.C. Cleyet-Marel, Y. Crozat, A.M. Dominach, A. Kamnalrut, X. Pinochet and S. Suthipradut. (1994). P nutrition, N_2 fixation and grain yield of soybean grown on P deficient soils: Role of P concentration at R1 stage. In: World Soybean Research Conference V. Chaigmai, Thailand.

Boonkerd, N. and B. Rerkasem. (1994). Soybean : Environmentally friendly. In: Proceedings of World Soybean Research Conference V. Chiangmai, Thailand.

Boonkerd, N. and P. Singleton. (1994). Options to facilitate legume inoculant production and adoption. Suranaree J. Sci. Technol. 1 : 35-38.

Boonkerd, N., and Singleton, P. (1994). Options to Facilitate Legume Inoculant Production and Adoption. Suranaree J. Sci Technol. 1: 35-38.

Hoben, H.J., P. Somasegarm, N. Boonkerd and Y.D. Gaur. (1994). Ploycloñat antisera production by immunization with mixed cell antigens of dfferent rhizobial species. World J. Microbial & Biotech 10 : 538-542.

Boonkerd. N., P. Laosuwan, C. Saeng-un and W. Panuwas. (1995). ^{15}N-determined N_2 fixation in recommended mungbean cultivars and advanced breeding lines. Suranaree J. Sci. Technol. 2: 21.25.

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. 2: 75-80.

Boonkerd, N. (1996). Biofertilizer Development. In: proceedings of the Thrid Asia-Pacific Conference on Agricutural Biotechnology : Issue and Choises. Biotech. Bangkok, Thailand.

Boonkerd, N. (1996). Exploitation of microbial biotechnology in pacific rim and southeast asia. In: Proceedings of Agricultural Biotechnology International Conference. Saskatoon, Saskascheman, Canada.

Boonkerd, N. (1996). Symbiotic association between *Frankia* and actionshizal plants. In: Proceedings of 7th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-legumes. NIBGE, Faisalabad, Pakistan.

Boonkerd, N., C. Suwalee and F. Willem. (1966). Effect of chitin on nodulation and N_2 fixation in rhizobia symbiosis. In: Proceedings of the Second Asia-Pacific Symposium on Chitin and Chitoson, AIT., Thailand.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1996). Iron element, sideropores 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.

Nuntagij, A., Abe, M., Uchiumi, T., Seki, Y., Boonkerd, N., and Higashi, S. (1997). Characterization of Brandyrhizobium strains isolated from soybean cultivation in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 43 : 183-187.

Boonkerd, N. (1998). Symbiotic association between *Frankia* and actinorhizal plants. Nitrogen Fixation with Non-Legumes, 327-331.

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 Soy bean 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.

Boonkerd, N., Teaumroong, N., and Hardarson, G. (1998). Nitrogen fixation (15N dilution in soybean as affected by inoculation methods. Proceeding of International Conference on Asian Network on Microbial Researches: held at Auditorium Graha Sabha Pramana (First Floor) Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia 23th - 25th February, 1998.

Boonkerd, N., Wadisirisuk, P., Sirpin, S., Murakami, T., Danso, S.K.A. (1998). Screening with nuclear techniques for yield and N_2 fixation in mung bean in Thailand. IAEA-TECDOC-1027, July, 1998.

Teaumroong, N., Teamtaisong, K., Wadisirisuk, P., Kotepong, S., Nantagij, A., and Boonkerd, N. (1998). Strain selection and caracterization of rhizobia isolated from forage legumes grown in Thailand. IC Biotech Vol. 21: 1998. Osaka, Japan. P1005-1014.

Boonkerd, N. (1999). Simple method for inoculant production. . Proceeding of the Evaluation of Nitrogen-Fixing Bacteria in Southeast Asia. Osaka University, Japan. March, 1999. P.208-214.

Innok, S., Choonluchanon, S., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (1999). Diversity of nitrogen fixing cyanobacteria from cultivated soil in Thailand. Proceedings of the Nitrogen Fixation under JSPS Programme. December 1-5, 1999. Chiangmai, Thailand.

Matpatawee, D., Kotepong, S., Nantagij, A., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (1999). Detection of dominant native rhizobium in field crop cultivation area on basis of direct PCR from root nodule. . Proceedings of the Nitrogen Fixation under JSPS Programme. December 1-5, 1999. Chiangmai, Thailand.

Nuntakij, A., Wadisirisuk, P., Kotepong, S., Panuvas, V., and Boonkerd, N. (1999). Selection *of Bradyrhizobium japonicum* strains for effectively fixed N_2 under acid soil condition. . Proceeding of the Evaluation of Nitrogen-Fixing Bacteria in Southeast Asia. Osaka University, Japan. March, 1999. P.263-271.

Piyaboon, O., Siripin, S., Teaumroong, N., and Boonkerd, B. (1999). Determination and characterization of free-living nitrogen fixing baceria in Thai soil. . Proceedings of the Nitrogen Fixation under JSPS Programme. December 1-5, 1999. Chiangmai, Thailand.

Pongsilp, N., Tittabutr, P., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (1999). Inoculant formulations and strains of *Bradyrhizobium japonicum* on field grown soybean. Proceedings of the Nitrogen Fixation under JSPS Programme. December 1-5, 1999. Chiangmai, Thailand.

Rodtong, S., Burom, C., Teaumroong, N., and Boonkerd B. (1999). Clycerol and mannitol production from yeasts for rhizobium inoculum cultivation. Proceedings of the Nitrogen Fixation under JSPS Programme. December 1-5, 1999. Chiangmai, Thailand.

Suksanguan, T., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (1999). Improvement of direct extraction and detection bacteria DNA from soil on basis of DNA techniques. Proceedings of the Nitrogen Fixation under JSPS Programme. December 1-5, 1999. Chiangmai, Thailand.

Teaumroong, N., Kotepong, S., Nuntakij, A., Wadisirisuk, P., and Boonkerd, N. (1999) Rhizobium strain improvemen and on farm management for high N_2 fixation in forage legumes : interaction of rhizobia and VAM. Proceedings of the Nitrogen Fixation under JSPS Programme. December 1-5, 1999. Chiangmai, Thailand.

Teaumroong, N., Teamtaisong, K., Wadescrisuk, P., Nantakij, A., Kotepong, S., and Boonkerd, N. (1999). Characterization of *Desmanthus virgatus* rhizoial strains isolated from Thai soil. Proceeding of the Evaluation of Nitrogen-Fixing Bacteria in Southeast Asia. Osaka University, Japan. March, 1999. P. 322-328.

Wadisirisuk, P., Boonkerd, N., Nuntakij, A., Kotepong, S., and Teaumroong, N. (1999). Selection of rhizobia strains for forage legumes. Proceeding of the Evaluation of Nitrogen-Fixing Bacteria in Southeast Asia. Osaka University, Japan. March, 1999. P.165-177.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2000). Bioconversion of cassava and its waste for animal feed. First National Symposium on Grad-Research Chiang Mai University 10-11 June 2000, P219-225.

Dithavibol, L., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2000). Production and quality of wine produced from grape varieties grown on Suranaree University of Tehnology Farm. First National Symposium on Grad-Research Chiang Mai University 10-11 June 2000, P328-332.

Kotepong, S., Nuntagij, A., Jitacksorn S., Teaumroong, N., Boonkerd, N., and Abe, M. (2000). Selection and management of rhizobia for tree legumes in reforestation. Workshop on the Development of Nitrogen Fixing Symbionts and Mycorrhizae Bali-Lombok, 11-15 October 2000.

Ngamjun, P., Teaumroong, N., Boonkerd, N., and Ketudat-Cairns, M. (2000). Tilapia sex chromosome identification DNA probe. First National Symposium on Grad-Research Chiang Mai University 10-11 June 2000, P206-211.

Nuntagij, A., Kotepong, S., Teaumroong, N., Boonkerd, N., Fukuda, S., Abe, M., and Higashi, S. (2000). Identification of *Bradyrhizobium japonicum* by serological techniques, hydrogenase phenotypes and RAPD-PCR techniques. Workshop on the Development of Nitrogen Fixing Symbionts and Mycorrhizae Bali-Lombok, 11-15 October 2000.

Sattayaphisut, W., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2000). Genetic instability of mushroom as affected by continuous subculturing for production. First National Symposium on Grad-Research Chiang Mai University, 10-11 June 2000. P345-350.

Sooksa-Nguan, T., Boonkerd, B., and Teaumroong, N. (2000). Improvement of bacterial detection system from soil basis of DNA technique. First National Symposium on Grad-Research Chiang Mai University 10-11 June 2000, P125-13.

Sukthumrong, A., Boonkerd, N., Khumlert, R., Feungchan, S., Luksanawimol, P., Prasittikhet, J., and Suriyapan, O. (2002). Plant nutrient and distibution under different fertilizer management in Nam Dok Mai Mango. Proc. Sixth Int'l Mango Symp. Eds. S. Subdadrabandhu-A. pichakum Acta Hort. 509, ISHS 2000.

Teamtisong, K., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2000). Rhizobium strain improvement for high N_2 fixation in forage legume. First National Symposium on Grad-Research Chiang Mai University, 10-11 June 2000. P22-27.

Teaumroong, N., Manasila, M., and Boonkerd, N. (2000). Genetic diversity in tree legumes rhizobia isolated from Thai soils. Workshop on the Development of Nitrogen Fixing Symbionts and Mycorrhizae Bali-Lombok, 11-15 October 2000.

Tittabutr, P., Payakapong, W., and Boonkerd, N. (2000). Inoculant production: utilization of carbon compounds by different rhizobia. Workshop on the Development of Nitrogen Fixing Symbionts and Mycorrhizae Bali-Lombok, 11-15 October 2000.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2001). Bioconversion of cassava roots to high protein product for animal feed. Thai J. Biotechnol., September 2001. P.17-25.

Koolkoksong, T., Sooksa-nguan, T., Teamtisong, K., Boonkerd, N. and Teaumroong, N. (2001). Establishment and characterization of endophytic nitrogen fixing bacteria in variety of Thai rice. Second National Symposium on Graduate Research Mahidol University, 26-27 April 2001.

Manassila, M., Boonkerd, N., and Teaumroong, N. (2001). Molecular genetic of tree legume rhizobium in Thailand. Second National Symposium on Graduate Research Mahidol University, 26-27 April 2001.

Payakapong, P., Tittabutr, P., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2001). Antibody production and soybean root nodule preservation for typing by FA technique. Second National Symposium on Graduate Research Mahidol University, 26-27 April 2001.

Teaumroong, N., Teamsaisong, K., Sooksa-nguan, T, and Boonkerd, N. (2001). The diazotrophic endophytic bacteria in Thai rice. The fifth ESAFS International Conference on Rice Environments and Rice Products 27-31 May 2001. Krabi, Thailand.

Titabute, P., Payakapong, W., Teaumroong, Boonkerd, N. (2001). Development of rhizobial inoculant production and formulation: carbon sources utilization and sugar producting from various raw starch materials by using amylase-producing fungi. IC Biotech Vol. 15: 2001. Osaka, Japan. P197-267.

Tittabutr, P., Payakapong, W., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2001). Development of rhizobial inoculant production and formulation: carbon utilization by rhizobia. Second National Symposium on Graduate Research Mahidol University, 26-27 April 2001.

Boonkerd, N. (2002). Development of inoculant production and utilisation in Thailand. ACIAR Conference on Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam. P.95-104.

Inok, S., Chunleuchanon, S., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2002). Diversity of nitrogen fixing cyanobacteria under various ecostems of Thailand. World Congress of Soil Science, Queen Sirikit National Convention Center, 14-21 August 2002, Thailand. Abstract Vol. 1, Symposia-12.

Jittayasothorn, Y., Thipyaphong, P. and Boonkerd, N. (2002). Using SSR Analysis for Grape Cultivar Identification. Oral Presentation on The 3rd National Symposium on Graduste Research, 18-19 July, 2002, Suranaree University of Technology, Nakhin Ratchasima.

Matpattawee, D., Teaumroong, N., Kotepong, S., Nuntagij, A., Choonluchanon, S., Siripin, S., and Boonkerd, N. (2002). Polygenetic diversity of rhizobial strains isolated from diversed ecosystems in Thailand. World Congress of Soil Science, Queen Sirikit National Convention Center, 14-21 August 2002, Thailand. Abstract Vol. 1, Symposia-12.

Nuntakij, A., Kotepong, S., Jitaksorn S., Chengaksorn, C., Teaumrong, N., Boonkerd, N., and Abe, M. (2002). Selection and management of rhizobia for tree legumes in reforestation. JSPS Workshop on Development of Biomanure Based on the Symbiotic System, 2-6 October 2002, Putrajaya, Malaysia.

Payakapong, W. and Boonkerd N. (2002). Competitiveness ability of *bandyrhizobium japonicum* strains in relation to soybean cultivars. Oral Presentation on The 3rd National Symposium on Graduste Research, 18-19 July, 2002, Suranaree University of Technology, Nakhin Ratchasima.

Payakapong, W., Tittabutr, P., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2002). Soybean root nodule preservation for typing by FA technique and evaluation of competitive ability of *Bradyrhizobium* strains. (2002). World Congress of Soil Science, Queen Sirikit National Convention Center, 14-21 August 2002, Thailand. Abstract Vol. 1, Symposia-12.

Piyaboon O., Siripin, S., Tiaumroong, N., and Boonkerd, N. (2002). Diversity of free-living nitrogen fixing bacteria isolated from diversed ecosystems of Thailand. Proceedings of 9th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes. September 1-5, 2002. Leuven, Belgium.

Piyaboon, O., Teaumroong, N., Kotepong, S., Nuntagij, A., Choonluchanon, S., Siripin, S., and Boonkerd, N. (2002). Polygenetic diversity of free-living nitrogen fixing bacteria isolated from diversed ecosystem of Thailand. World Congress of Soil Science, Queen Sirikit National Convention Center, 14-21 August 2002, Thailand. Abstract Vol. 1, Symposia-12.

Pongsilp, N., Teaumroong, N., Nuntagij, A., Boonkerd, N., and Sadowsky M. (2002). Genetic structure of indigenous non-nodulating and nodulating populations of Bradyrhizobium in soils from Thailand. Symbiosis, 33 p39-58.

Teamtisong, K., Teaumroong, N., Kotepong, S., Nuntagij, A., Wadisirisuk, P., and Boonkerd, N. (2002). Some physiological and molecular biology aspects of high effiency N_2-fixation rhizobial strains in forage legume. World Congress of Soil Science, Queen Sirikit National Convention Center, 14-21 August 2002, Thailand. Abstract Vol. 1, Symposia-12.

Teaumroong, N., Sattayapisut, W., Teekachunhatean, T., and Boonkerd, N. (2002). Using agricultural wastes for *Tricoloma crassum* (Berk) Sacc. production. Microbiology of Composting. P231-236.

Titabutr, P., Payakapong, W., Teaumroong, N., and Boonkerd B. (2002). Rhizobial inoculant production by dilution technique and solid state fermentation. Proceedings of International Symposium on Tropical Bioresources and Green Chemistry. October 28-30, 2002, Osaka, Japan.

Titabutr, P., Payakapong, W., Teaumroong, N., and Boonkerd B. (2002). Development of rhizobial inoculant production and formulation: dilution technique and solid state fermentation. JSPS Workshop on Development of Biomanure Based on the Symbiotic System Putrajaya Malaysia Oct. 02-06, 2002.

Tittabutr, P., Payakapong, W., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2002). Development of rhizobial inoculant production and formulation: carbon utilization by rhizobia. World Congress of Soil Science, Queen Sirikit National Convention Center, 14-21 August 2002, Thailand. Abstract Vol. 1, Symposia-12.

Boonkerd, N., Lawsuwan, P., Sangoon, C., and Panuwas, V. (1995). Nitrogen fixation (^{15}N dilution) in recommended mungbean cultivars. Suranaree Journal of Science and Technology 2: 21-25.

Payakapong, W., Tittabutr, P., and Boonkerd. N. (2003). Strain-specific antisera to identify Thai Bradyrhizobium japonicum strains in preserved soybean nodules. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19 (9): 981-983.

Payakapong, W., Tittabutr, P., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2004). Soybean cultivars affect nodulation competition of Bradyrhizobium japonicum strains. World Journal of Microbiology 20 (3):311-315.

Miss JANPEN PRAKAMHANG

PERSONAL DATA;

Birth date October 20, 1975 **Nationality** Thai

ADDRESS;

66 Moo 4, Dong-ejarn, Nonsuwan, Burirum, 31110, THAILAND

Tel. 044-223389, 084-8303369

Email address: j_sai@hotmail.com

EDUCATIONAL BACKGROUND;

Present	Ph.D (Biotechnology), Suranaree University of Technology
2007	M.Sc (Biotechnology), Suranaree University of Technology
1998	B.Sc. (Animal Production Technology), Suranaree University of Technology

EMPLOYMENT;

2002-2003	Research Assistant, School of Animal Production Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima
1998-2001	Animal Husbandman Technician, The Regional Bureau of Department of Livestock Development 3, Nakhon Ratchasima

RESEARCH FUND;

The Thailand Research Fund (TRF)-Master Research Grants

Strategic Scholarships Fellowships Frontier Research Networks, Commission on Higher Education

PROCEEDING AND ANNUAL REPORT;

Prakamhang, J., Minamisawa, K., Teamtaisong, K., Boonkerd, N., Teaumroong, N. (2008). Microbial Communities of Endophytic Diazotroph Bacteria in Cultivated Rice (*Oryza sativa)* (Poster presentation). The 11th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes, September, 4, 2008. Gent, Belgium.

Prakamhang, J., N. Boonkerd and N. Teaumroong (2007). Microbial communities and their *nifH* gene expression of rice endophytic diazotroph bacteria (Oral presentation). Proceedings of the International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (ICIST) "Biological Diversity, Food and Agricultural Technology". April, 26-27, 2007. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Thailand.

Prakamhang, J., N. Boonkerd and N. Teaumroong (2006). Microbial Communities of Rice Endophytic Diazotroph Bacteria (Poster presentation). The 6th National Symposium on Graduate Research, October, 13 -14, 2006. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.