



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุ์วิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลการส่งเสริมการเจริญของพืชโดย *Streptomyces* เอนโดไฟต์ที่ผลิตไซเดอร์โรฟอร์และ  
สายพันธุ์กลาย

Plant Growth Promoting Effects by A Siderophore-Producing Endophytic

*Streptomyces* and its Mutant

นามผู้วิจัย นางสาวศิริวรรณ รุ่งอินทร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( รองศาสตราจารย์อริณทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( อาจารย์ พัทธย์ เชื้อวงศ์, Ph.D. )

ประธานสาขาวิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลการส่งเสริมการเจริญของพืชโดย *Streptomyces* เอนโดไฟต์ที่ผลิตไซเดอร์โรฟอร์  
และสายพันธุ์กลาย

Plant Growth Promoting Effects by A Siderophore-Producing Endophytic *Streptomyces* and  
its Mutant

โดย

นางสาว ศิริวรรณ รุ่งอินทร์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

พ.ศ. 2555

ศิริวรรณ รุ่งอินทร์ 2555: ผลการส่งเสริมการเจริญของพืชโดย *Streptomyces* เอนโดไฟต์ที่  
ผลิตไซเคอร์โรฟอร์และสายพันธุ์กลาย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)  
สาขาพันธุ์วิศวกรรมโครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์อรุณทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D. 131 หน้า

ไซเคอร์โรฟอร์เป็นสารที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ สามารถจับเหล็กในดินให้อยู่ในรูปที่พืช  
สามารถนำไปใช้ได้ เป็นการส่งเสริมการเจริญของพืชและยังช่วยควบคุมโรคพืชได้อีกด้วย งานวิจัย  
นี้นำเชื้อแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ทั้งหมด 56 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการสร้างไซ  
เคอร์โรฟอร์และละลายฟอสเฟต พบเชื้อ 36 สายพันธุ์สามารถสร้างไซเคอร์โรฟอร์ และ 12 สายพันธุ์  
สร้างได้ทั้งไซเคอร์โรฟอร์และละลายฟอสเฟต เลือกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่สร้างไซ  
เคอร์โรฟอร์ได้ดี มาทำให้เกิดการกลายที่ยีน *desD* โดยการเพิ่มปริมาณยีน *desD* ด้วยพีซีอาร์ แล้วโคลน  
เข้าพลาสมิด pIJ8671 ได้เป็นพลาสมิด pIJ8671/*desD* เมื่อทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli*  
ET12567/pUZ8002 แล้วส่ง pIJ8671/*desD* เข้าสู่ GMKU 100 ด้วยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุล พบว่าสาย  
พันธุ์กลายที่ได้ไม่มีการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ แสดงว่ายีน *desD* ใน *Streptomyces* sp. GMKU 100  
เกี่ยวข้องกับการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ นำ *Streptomyces* sp. GMKU 100 วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยของ  
ยีน 16S rDNA พบว่ามีความคล้ายคลึง 99.9% กับ *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916<sup>T</sup> และ  
*Streptomyces albidoflavus* DSM 40455<sup>T</sup> เมื่อปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ในเมล็ดถั่ว  
เขียวและข้าว ในสถานะที่มีและไม่มีเหล็ก (10  $\mu$ M ferric citrate) พบว่า *Streptomyces* sp. GMKU  
100 ช่วยให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง และพบการเจริญของความยาวรากและลำต้น รวมทั้งน้ำหนักสด  
และน้ำหนักแห้งของรากและลำต้น โดยรวมของต้นถั่วและข้าวเมื่อปลูกเป็นระยะ 2-4 สัปดาห์  
มากกว่าการปลูกด้วยสายพันธุ์กลายและไม่ปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าไซเคอร์โร  
ฟอร์จาก *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่แยกได้จากข้าวสามารถส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวได้ดี  
และยังมีผลต่อต้นถั่วเขียวซึ่งเป็นพืชต่างชนิดได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังสามารถแยก *Streptomyces* sp.  
GMKU 100 ที่ปลูกในต้นข้าวและต้นถั่วเขียวกลับออกมาได้ โดยพบทั้งในส่วนรากและลำต้นของ  
พืชทั้งสองชนิด แสดงว่า *Streptomyces* sp. GMKU 100 เป็นเอนโดไฟต์ที่แท้จริง

Siriwan Rungin 2012: Plant Growth Promoting Effects by A Siderophore-Producing Endophytic *Streptomyces* and its Mutant. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Arinthip Thamchaipenet, Ph.D. 131 pages.

Siderophores are ferric iron chelating naturally produced by microorganisms. They can help scavenge iron in soil into a form that plants can use. They can promote plant growth and increase resistance against plant pathogens. In this study, 56 endophytic actinomycetes from GMKU culture collection were investigated for siderophore production and phosphate solubilization. The results showed that 36 strains produced siderophores and 12 strains could produce siderophores and solubilized phosphate. The siderophore-producing *Streptomyces* sp. GMKU 100 was selected to disrupt *desD* gene involved in siderophore production. DesD gene was amplified by PCR and subsequently cloned into conjugative vector, pIJ8671, to obtain pIJ8671/*desD*. Gene disruption was performed by intergeneric conjugation between *E. coli* ET12567/pIJ8671/*desD* and *Streptomyces* sp. GMKU 100. The mutant was obtained which does not produce siderophore indicated that *desD* is involved in siderophore production of *Streptomyces* sp. GMKU 100. Analysis of 16S rDNA gene of *Streptomyces* sp. GMKU 100 revealed 99.9% similarity to *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916<sup>T</sup> and *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455<sup>T</sup>. From effect of plant growth promotion, *Streptomyces* sp. GMKU 100 enhanced seed germination when inoculated in seeds of mungbean and rice with or without iron (10  $\mu$ M ferric citrate) and increased root and shoot elongation as well as fresh/dry weights of root and shoot from both mungbean and rice plants growing at 2-4 weeks. The enhancement of plant growth was statistically significance when compared to plants inoculated with siderophore-deficient mutant and uninoculated plants. The result indicated that siderophore produced from *Streptomyces* sp. GMKU 100 isolated from rice plant could promote growth not only for rice plant but also for mungbean plant. Furthermore, *Streptomyces* sp. GMKU 100 could be re-isolated from roots and shoots of both plants which supported that it is a true endophyte.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ประธานกรรมการที่ปรึกษา และ ดร. พัทธ์ชัย เชื้อวงษ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ อย่างเต็มที่ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งระยะเวลาในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณ ดร. ณัฐฎิภา แสงกริช ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก และ ดร. ธาณี ศรีวงศ์ชัย ประธานการสอบที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ศ. ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท จังหวัดชัยนาท ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวและถั่วเขียว และ รศ. รัชฎิณี ภาควิชาไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์สถิติ

ขอบคุณสมาชิกทุกคนในห้องปฏิบัติการ 4503 และเพื่อนๆ ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว และ ผศ. จีรพันธ์ วรพงษ์ ที่สนับสนุนทั้งด้านทุนทรัพย์ และโอกาสทางการศึกษาของผู้วิจัย ตลอดจนให้กำลังใจจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุน โครงการทุนวิจัย ดีพิมพ์วารสารนานาชาติ บัณฑิต วิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สกว.

ศิริวรรณ รุ่งอินทร์

เมษายน 2555

## สารบัญ

### หน้า

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| สารบัญ                      | (1) |
| สารบัญตาราง                 | (2) |
| สารบัญภาพ                   | (4) |
| คำนำ                        | 1   |
| วัตถุประสงค์                | 2   |
| การตรวจเอกสาร               | 3   |
| อุปกรณ์และวิธีการ           | 25  |
| ผลและวิจารณ์                | 47  |
| สรุปและข้อเสนอแนะ           | 103 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง        | 106 |
| ภาคผนวก                     | 126 |
| ประวัติการศึกษา และการทำงาน | 131 |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                                | หน้า |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย                                                                                                     | 25   |
| 2        | พลาสติกที่ใช้ในงานวิจัย                                                                                                        | 26   |
| 3        | ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยง <i>E. coli</i> และแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์                                             | 28   |
| 4        | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย                                                                                   | 33   |
| 5        | ตัวอย่างสายพันธุ์ของแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ GMKU ที่สามารถละลายฟอสเฟต                                                           | 49   |
| 6        | ตัวอย่างการทดสอบชนิดของไซเคอร์โรฟอร์                                                                                           | 54   |
| 7        | สมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยการสร้างไซเคอร์โรฟอร์และการละลายฟอสเฟตของแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์                              | 55   |
| 8        | เปรียบเทียบโปรตีน Type C siderophore synthetases (DesD) ของ GMKU 100 และ GMKU 169 กับ โปรตีน DesD ฐานข้อมูล                    | 59   |
| 9        | ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยกระตุ้นการงอกของสปอร์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส                                                 | 68   |
| 10       | ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยใช้ไมซีเลียมของ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100                                                 | 70   |
| 11       | เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพันธุ์หลังได้รับการปลูกเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100                                         | 79   |
| 12       | การเจริญของต้นอ่อนของถั่วเขียวและข้าวแสดงความยาวรากและลำต้นหลังได้รับการปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน                                | 81   |
| 13       | การเจริญของต้นข้าวขาวดอกมะลิ ที่ 14 วันหลังได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลายของ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 | 86   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ |                                                                                                                           | หน้า |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 14       | การเจริญของต้นถั่วเขียว ที่ 14 วันหลังได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลายของ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 | 91   |
| 15       | การเจริญของต้นถั่วเขียว ที่ 28 วันหลังได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลายของ <i>Streptomyces</i> sp GMKU 100  | 95   |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |                                                                                                                                                    | หน้า |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | วงจรชีวิตของ <i>Streptomycin</i>                                                                                                                   | 4    |
| 2      | โครงสร้างไซเคอร์โรฟอร์                                                                                                                             | 11   |
| 3      | กลุ่มยีน <i>des</i> EFABCD และ การสังเคราะห์ Desferrioxamine                                                                                       | 17   |
| 4      | โครงสร้าง ferrioxamine                                                                                                                             | 18   |
| 5      | พลาสมิดสำหรับทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง <i>E. coli</i> กับ <i>Streptomyces</i>                                                                    | 23   |
| 6      | แผนที่พลาสมิด pIJ8600 ที่ใช้สำหรับหาสถานะในการทำคอนจูเกชันต่างสกุล                                                                                 | 37   |
| 7      | พลาสมิด pJET1.2/blunt                                                                                                                              | 41   |
| 8      | ตัวอย่างการละลายฟอสเฟต บนอาหาร Pikovskaya ของสายพันธุ์ GMKU 154                                                                                    | 48   |
| 9      | การสร้างสารไซเคอร์โรฟอร์ Chrom azurol S บนอาหารแข็งและในสารละลาย                                                                                   | 51   |
| 10     | ทดสอบชนิดของไซเคอร์โรฟอร์                                                                                                                          | 53   |
| 11     | บริเวณอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>desD</i> ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์                                                                        | 57   |
| 12     | การเพิ่มปริมาณยีน <i>desD</i> ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ATT083F และ ATT083R ที่อุณหภูมิ annealing 68 องศาเซลเซียส จาก GMKU collection         | 58   |
| 13     | ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการการเปรียบเทียบโปรตีน DesD จาก GMKU 100 และ GMKU 169 กับ <i>Streptomyces</i> สายพันธุ์อื่นในฐานข้อมูล                      | 60   |
| 14     | ตรวจสอบโคลนพลาสมิด pJET/ <i>desD</i> โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bgl</i> II และ <i>Xba</i> I แยกด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส                | 61   |
| 15     | ตรวจสอบโคลนพลาสมิดสายผสม pIJ8671/ <i>desD</i> ได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Pst</i> I และ <i>Xba</i> I แยกขนาดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส | 62   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่                                                                                                                                                            | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 16 ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของโคลน pIJ8671/ <i>desD</i> ของ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 โดยใช้ไพรเมอร์ ATT083 F                                             | 63   |
| 17 ลักษณะโคโลนีของ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 บนอาหาร MS                                                                                                    | 64   |
| 18 การแทรกตัวของพลาสมิด pIJ 8600 เข้าไปในโครโมโซมของ <i>Streptomyces</i>                                                                                          | 65   |
| 19 กราฟแสดงการอยู่รอดของสปอร์ของ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 และ GMKU169 เมื่อต้มสปอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ                                                       | 66   |
| 20 การทำคอนจูกันข้ามสกุลระหว่าง <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 และ <i>E. coli</i> ET12567(pUZ8002)/pIJ8671/ <i>desD</i>                                         | 71   |
| 21 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนส์โดยการเพิ่มปริมาณยีนต้านยา thiostrepton ด้วยวิธีพีซีอาร์                                                                              | 72   |
| 22 แผนภาพการเกิด homologous recombination ระหว่างยีน <i>desD</i> บนพลาสมิด pIJ8671/ <i>desD</i> และยีน <i>desD</i> บนโครโมโซมของ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 | 73   |
| 23 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 ด้วยวิธีพีซีอาร์                                                                        | 74   |
| 24 การตรวจสอบสร้างไซเคอร์โรฟอรัของสายพันธุ์กลายด้วยวิธี CAS assay                                                                                                 | 75   |
| 25 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วย HPLC                                                                                                                               | 77   |
| 26 ต้นอ่อนของถั่วเขียวและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ หลังจากการเพาะเมล็ดที่ปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน                                                                           | 82   |
| 27 การเจริญของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิในกระถางที่ 14 วัน หลังการปลูกเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 และสายพันธุ์กลายและเติมสาร deferoxamine mesylate salt   | 87   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | หน้า                                                                                                                                                    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 28     | ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิที่ 14 วันหลังได้รับการปลูกเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 และสายพันธุ์กลายและเติมสาร deferoxamine mesylate salt 88 |
| 29     | การเจริญต้นถั่วเขียวในกระถางที่ 14 วัน หลังได้รับการปลูกเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 และสายพันธุ์กลายและเติมสาร deferoxamine mesylate salt 92 |
| 30     | การเจริญต้นถั่วเขียวในกระถางที่ 28 วันหลังได้รับการปลูกเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 และสายพันธุ์กลายและเติมสาร deferoxamine mesylate salt 96  |
| 31     | การเจริญต้นถั่วเขียวที่ 28 วันหลังได้รับการปลูกเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 และสายพันธุ์กลาย และเติมสาร deferoxamine mesylate salt 97         |
| 32     | การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับการปลูกเชื้อและ ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 100                 |
| 33     | การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากต้นถั่วเขียว ที่ได้รับการปลูกเชื้อและไม่ได้รับการปลูก เชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 100 102                                |

## ผลการส่งเสริมการเจริญของพืชโดย *Streptomyces* เอนโดไฟต์ที่ผลิตไซเดอร์โรฟอร์ และสายพันธุ์กลาย

### Plant Growth Promoting Effects by A Siderophore-Producing Endophytic *Streptomyces* and its Mutant

#### คำนำ

เอนโดไฟต์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์รวมทั้ง เชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสิท ที่อาศัยอยู่ในพืช พบได้ทั้งส่วน ราก ลำต้น และใบ โดยช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชและป้องกันพืชจากโรคต่างๆ จึงไม่เป็นอันตรายต่อพืช กลุ่มจุลินทรีย์ประเภทนี้เป็นที่น่าสนใจ และยังมีผู้ศึกษากันน้อยคือ กลุ่มแอคติโนมัยสิท เอนโดไฟต์ เนื่องจากสามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิรวมทั้งกลุ่มยาปฏิชีวนะ หลากหลายชนิด จากการศึกษาพบว่าแอคติโนมัยสิทบางชนิดมีความสามารถในการสร้างสารกลุ่มไซเดอร์โรฟอร์ ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting) ในการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง และ สามารถควบคุมโรคพืชได้ เนื่องจากสามารถแข่งขันใช้ธาตุเหล็กได้ดีกว่ากลุ่มเชื้อรา และ แบคทีเรียที่ก่อโรคพืช ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคเจริญได้ไม่เต็มที่ และแสดงอาการของโรคไม่รุนแรง จึงถือว่าเป็นการควบคุมโรคพืชได้โดยทางอ้อม แอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ในสกุล *Streptomyces* พบว่าสามารถสร้างสารไซเดอร์โรฟอร์กระตุ้นการเจริญ และควบคุมโรคพืชได้ การนำแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ มาใช้ในการเกษตรจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการใช้เป็นชีวควบคุม (biocontrol) และ ปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) เพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืช ปุ๋ยเคมี รวมถึงการใช้สารกระตุ้นการเจริญ และ ลดการเกิดสารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรที่จะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค และ ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม การสร้างจุลินทรีย์สายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์ไซเดอร์โรฟอร์และ นำมาศึกษาผลการส่งเสริมการเจริญของพืชเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ที่สร้างไซเดอร์โรฟอร์จะทำให้เข้าใจถึงการสร้างไซเดอร์โรฟอร์จากแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ ที่มีปฏิสัมพันธ์กับพืช และสามารถนำเชื้อแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์มาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการเกษตรอย่างยั่งยืน

## วัตถุประสงค์

1. ตรวจสอบสมบัติของแอคติโนมายส์เทนโคไฟต์ ที่สามารถสังเคราะห์ไฮเดรอร์โรฟอร์
2. สร้างสายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์ไฮเดรอร์โรฟอร์ ด้วยวิธียีนดัดแปรพันธุกรรม
3. ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างแอคติโนมายส์เทนโคไฟต์ที่สร้างไฮเดรอร์โรฟอร์และสายพันธุ์กลายกับพืชในระดับกระถาง

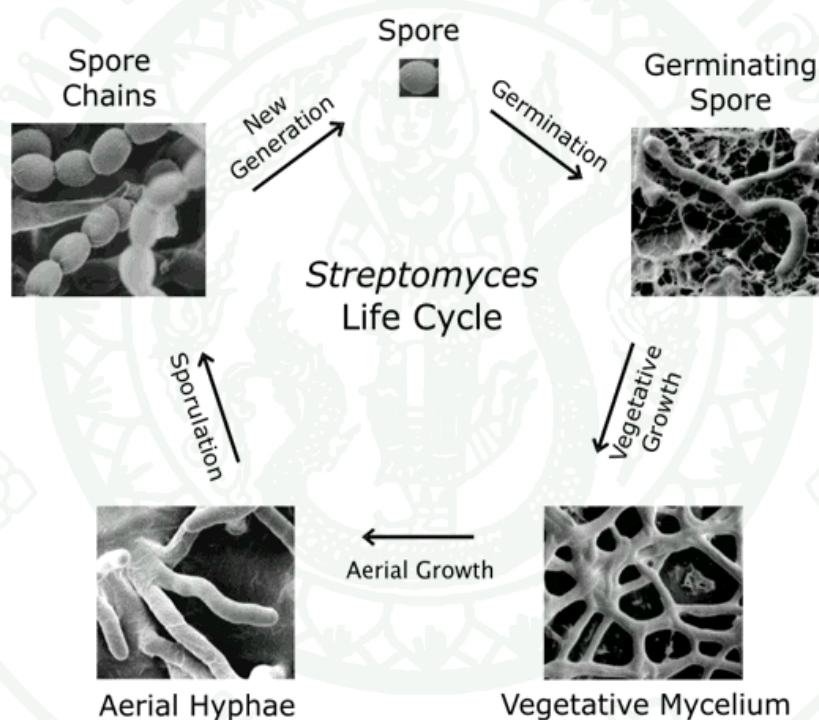
## การตรวจเอกสาร

### แอกติโนมัยสิทเอนโดไฟต์

เอนโดไฟต์ เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย และ แอกติโนมัยสิท ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรคพืชหรือความเสียหายแก่พืชเจ้าบ้าน เชื้อเอนโดไฟต์จะอาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualistic symbiosis) โดยพืชให้อาหารและที่อยู่อาศัยให้แก่เอนโดไฟต์ ในขณะที่เดียวกันเอนโดไฟต์จะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งสารกระตุ้นการเจริญของพืช หรือ สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช

แอกติโนมัยสิทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ในอันดับ Actinomycetales (Buchanan and Gibbon, 1974) เป็นแบคทีเรียที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย ตั้งแต่ลักษณะที่เป็นเซลล์เดี่ยวทรงกลม (coccol) ท่อน (rod) หรือสร้างเส้นใยคล้ายเชื้อราที่มีการแตกแขนง มีการสร้างสปอร์บนเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และสปอร์บนเส้นใยที่ชูในอากาศ (aerial mycelium) สปอร์อาจถูกสร้างแบบไม่มีถุงหุ้ม (condia) มีเพียงสปอร์เดี่ยวหรือเรียงต่อกันเป็นสาย นอกจากนี้ยังมีการสร้างสปอร์อยู่ในออสปอร์ (ภาพที่ 1) แอกติโนมัยสิทที่พบโดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ พบมากที่สุด在地ดินและแหล่งน้ำ จัดเป็นแบคทีเรียจำพวกกินซาก (saprophyte) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ การจัดจำแนกอาศัยวิธีการทางเคมีอนุกรมวิธาน (chemotaxonomy) และลักษณะทางฟิโนไทป์ ในปัจจุบันนิยมใช้ยีน 16S rDNA ร่วมวิเคราะห์เพื่อระบุสายพันธุ์ (Williams *et al.*, 1989; Wellington *et al.*, 1992) *Streptomyces* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส pH 6.5-8.0 ลักษณะการเจริญของเส้นใยมีการกระจายตัวมากที่สุด เมื่อเจริญบนอาหารแข็งจะสร้างเส้นใยอาหาร ซึ่งจะฝังลงในเนื้อวุ้น และสร้างเส้นใยอากาศที่ประกอบด้วยสปอร์รูปต่างๆ ในกรณีที่สร้างสปอร์มากพอจะเห็นสายสปอร์เป็นตรง (rectiflexible) รูปลูป (rectina culiapti) หรือ รูปเกลียว (spiral) ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกระจาย (discrete) คล้ายไลเคน (lichenoid) แข็งคล้ายแผ่นหนัง (leathery) หรือคล้ายเนยเหลว (butterous) ผิวโคโลนีมีลักษณะเรียบ หรือขรุขระ มีหลายสีได้แก่ ขาว เทา แดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน ส่วนเส้นใยอาหารที่อยู่ด้านล่างของโคโลนีส่วนใหญ่มีสีน้ำตาลแต่อาจพบสีอื่นๆ ได้ในระหว่างการเจริญ โคโลนีจะพัฒนาสร้างเส้นใยอากาศจนปรากฏเป็นกลุ่มก้อนคล้ายแป้ง (powdery) หรือ กำมะหยี่ (velvet) ส่วนเส้นใยของอาหารอาจสร้างรงควัตถุสีต่างๆ แพร่ไปในอาหาร (Williams *et al.*, 1989)

จีโนมของ *Streptomyces* มีขนาดประมาณ 7.8-8.0 Mb (Leblond *et al.*, 1993; Lezhava *et al.*, 1995) ซึ่งประกอบไปด้วยปริมาณเบสกวานีนและไซโทซีนในอัตราสูง (high GC content) ประมาณ 70-74 เปอร์เซ็นต์ (Tewfik and Bradley, 1967) โดยโครโมโซมของ *Streptomyces* ส่วนใหญ่เป็นเส้นตรง (linear chromosome) (Lin *et al.*, 1993; Leblond *et al.*, 1993; Pandza *et al.*, 1997) ซึ่งคาดว่าทำให้โครโมโซมมีความไม่เสถียรทางพันธุกรรม (genetic instability) เกิดการขาดหาย การเพิ่มปริมาณ และการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอ ซึ่งก่อให้เกิดลักษณะทางจีโนไทป์ และ ฟีนไทป์ที่เปลี่ยนไปจากเดิม ปัจจุบันมีการหาลำดับเบสทั้งจีโนมครบแล้วในหลายสปีชีส์ เช่น *Streptomyces coelicolor* และ *Streptomyces avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของ *Streptomyces*

ที่มา: Kieser *et al.* (2000)

*Frankia* เป็นแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ที่พบว่าสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในพืชชั้นสูง ที่ไม่ได้อยู่ในวงศ์ถั่ว (non-legumeinous plant) โดยมีการค้นพบครั้งแรกจากปมของพืชวงศ์สน (Williams *et al.*, 1978; Benson and Silvester, 1993) ต่อมาได้มีการค้นพบแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์สกุลอื่นๆ โดยมีรายงานการค้นพบเป็นครั้งแรกคือ *Actinosynnema* ซึ่งแยกได้จากพืชวงศ์หญ้า (Hasegawa *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ *Agromyces albus* จาก *Androsace* sp. (Dorofeeva *et al.*, 2003) และ *Micromonospora coriariae* จาก *Coriaria myrtifolia* (Trujillo *et al.*, 2007)

นอกจากนี้ยังมีการพบแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ โดยเฉพาะ *Streptomyces* จากพืชอีกหลายชนิด เช่น จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ข้าว (Tian *et al.*, 2004; Indananda *et al.*, 2010) ข้าวสาลี (Coombs *et al.*, 2003) ข้าวโพด (Seghers *et al.*, 2004) และ จากพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น มะเขือเทศ (Cao *et al.*, 2004) พืชวงศ์ขิง (Taechowisan., 2005) กระถินณรงค์ (Duangmal *et al.*, 2009; Thamchaipenet *et al.*, 2010) และ ยังสามารถพบแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ได้ทั้งจากส่วนราก ลำต้น และ ใบของพืช (Igarashi *et al.*, 2002; Hasegawa *et al.*, 2006)

### ความสำคัญของจุลินทรีย์แอกติโนมัยสีทเอนโดไฟต์

แอกติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด พบว่า 2 ใน 3 ของยาปฏิชีวนะที่ผลิตได้ในปัจจุบันมาจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ (Berdy *et al.*, 1995) ได้แก่ สารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส สารต้านมะเร็ง สารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant). *Streptomyces* ในธรรมชาติมีความสำคัญในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ มีการนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น ทางเกษตร พบว่าสามารถใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biological control agent) ตัวอย่างเช่น ในกรณีของการให้ *S. griseus* ลงในดินเพื่อควบคุมโรครากเน่า (black root rot) จากเชื้อ *Phomopsis sclerotoides* ในแตงกวาซึ่งเพาะปลูกในโรงเรือน (Ebben and Spencer, 1978) การต่อต้านราก่อโรค *Rhizoctonia solani* ที่ทำให้เกิดโรครากเน่าของเมล็ด, ราก, และ ผล ในข้าว ข้าวโพด และ มะเขือเทศ (Cao *et al.*, 2004; Seghers *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2004) การควบคุมโรครากเน่าจากเชื้อ *Phytophthora* ในถั่วอัลฟาลฟา (alfalfa) และ ถั่วเหลือง (Xiao *et al.*, 2002) ทางด้านการย่อยสลายสาร *Streptomyces* มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไคติน (chitin) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบมากเป็น

อันดับสองในธรรมชาติ จึงถูกนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ไคทิเนส (chitinase) (Miyashita *et al.*, 1991)

กลุ่มแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* สร้างสารไซเคอร์โรฟอร์ช่วยในการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์พืชซึ่งธาตุเหล็กมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์และพืช โดยเฉพาะในพืชเป็นส่วนประกอบสำคัญของ cytochrome ต่างๆ และ เป็น co-factor ของเอนไซม์หลากหลายชนิด (Macagnan *et al.*, 2008) การนำธาตุเหล็กเข้าพืชสามารถควบคุมโรคพืชได้ เนื่องจากมีความสามารถในการแข่งขันใช้ธาตุเหล็กได้ดีกว่ากลุ่มเชื้อรา และ แบคทีเรียที่ก่อโรคพืช ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคเจริญได้ไม่เต็มที่ และ แสดงอาการของโรคไม่รุนแรง จึงถือว่าเป็นการควบคุมโรคพืชได้ (Teaumroog *et al.*, 2000)

#### การส่งเสริมการเจริญของพืชโดยเชื้อจุลินทรีย์

กลุ่มจุลินทรีย์ที่อาศัยในดิน rhizobacteria และ มีความสามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช เรียกว่า plant growth promoting bacteria หรือ PGPR จะส่งเสริมการเจริญของพืช โดยการตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสฟอรัส สร้างไซเคอร์โรฟอร์ไปจับเหล็ก ที่อยู่ในดินให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ สังเคราะห์ฮอร์โมน IAA การสร้างเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase เพื่อลดระดับเอทิลีนในพืช (Penrose and Glick, 2002; Tank and Saraf, 2003; Dimkpa *et al.*, 2008) เช่น *Pantoea agglomerans* T21 ที่แยกได้จากข้าว *Oryza rufipogon* และมีความสามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชดังกล่าว พบว่าเมื่อปลูกเชื้อลงไป ในข้าว *Oryza sativa* สามารถเพิ่มความยาว น้ำหนักของลำต้น และรากได้ดี (Zeng *et al.*, 2012) จากการศึกษาพบว่ากลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชและป้องกันกลุ่มเชื้อก่อโรคพืชได้ โดยการสร้างปฏิชีวนะ หรือ เอนไซม์ย่อยไคติน เพื่อยับยั้งกลุ่มเชื้อราก่อโรคพืช ดังนั้นจึงเป็นที่สนใจนำไปเป็นตัวควบคุมโรคพืช (Coombs *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2005; Zin *et al.*, 2007; Quecine *et al.*, 2008; El-Taraabily *et al.*, 2009; Misk and Franco, 2011)

### การละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization)

ฟอสฟอรัส เป็นธาตุอาหารหลัก (macronutrient) ที่สำคัญต่อการเจริญของพืช และเป็นธาตุอาหารหลักที่พบมากในดินแต่ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ เนื่องจากฟอสฟอรัสจัดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนอยู่กับธาตุอื่นๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และในรูปของหินฟอสเฟต (Stewart *et al.*, 1980, Hinsinger, 2011) PGPR สามารถละลายฟอสเฟตได้โดยการสร้างกรดอินทรีย์ หรือเอนไซม์ phosphatase มาสลายธาตุฟอสฟอรัสในดิน กลุ่มแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดีเช่น *Pseudomonas*, *Bacillus* และ *Rhizobium* สามารถกระตุ้นให้พืชมีการดูดซึมธาตุฟอสฟอรัสได้เพิ่มขึ้น (Rodriguez and Fraga, 1999) เช่น *P. putida* และ *P. fluorescens* สามารถเพิ่มความยาวราก และ ลำต้นในต้น canola ผักกาดหอมและ มะเขือเทศ (Hall *et al.*, 1996 ; Glick *et al.*, 1997) การปลูกเชื้อ *B. megaterium* ที่มีสมบัติละลายฟอสเฟตได้ในมะเขือเทศพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการงอกและการเจริญมะเขือเทศในสภาวะที่มีสารละลาย 30-90 mM NaCl (Chookietwattana and Maneewan, 2012) นอกจากนี้พบว่า *Streptomyces griseus* มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ดี และสามารถกระตุ้นการเจริญของข้าวสาลีได้มากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ในสภาวะที่มีหินฟอสเฟตเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองที่ไม่ได้ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว (Hamdali *et al.*, 2008)

### Indole-3-acetic acid (IAA)

ออกซินเป็นสารควบคุมการเจริญที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเองตามธรรมชาติ เป็นฮอร์โมนหลักของพืช จะกระตุ้นการเจริญของพืช ได้แก่ indole-3-acetic acid (IAA) (Went and Thimann, 1937) จากการศึกษาพบว่า แอคติโนไมซีตเอนโดไฟต์สามารถสังเคราะห์ IAA และช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ เช่น *Streptomyces* sp. MBR-52 ช่วยให้รากของต้นอ่อนกุหลาบยืดยาวขึ้น ช่วยเร่งการเจริญของราก (Meguro *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีแอคติโนไมซีตหลายสกุลที่แยกได้จากต้นกุหลาบ มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ได้เช่นกัน (Nimnoi *et al.*, 2010)

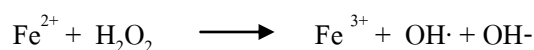
## 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase

กลุ่มจุลินทรีย์พวก PGPR ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase จะเปลี่ยน ACC ที่เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างเอทิลีนในพืช ให้ได้เป็น  $\alpha$ -ketobutyrate และแอมโมเนีย ซึ่งจะช่วยให้พืชสามารถทนต่อเอทิลีนในพืช (Glick *et al.*, 1998; 2007) มีการนำเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ CHA0 ที่มีความสามารถสร้าง ACC deaminase ได้ดี มาใช้ในการควบคุมเชื้อ *Pythium ultimum* และเชื้อ *Erwinia carotovora* ที่ก่อโรคน้ำในแตงกวาและมันฝรั่ง โดยทำให้พืชสามารถต้านทานต่อเชื้อก่อโรคพืชดังกล่าว เนื่องจากมีระดับ เอทิลีนลดลง และยังเพิ่มความยาวรากอีกด้วย (Wang *et al.*, 2000) จากการศึกษาการปลูกเชื้อ *Burkholderia phytofirmans* PSJN ที่สังเคราะห์ ACC deaminase ในต้น canola พบว่า มีการเจริญเนื้อเยื่อลำต้น และรากอ่อนได้ดีกว่าการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสร้าง ACC deaminase ได้ (Sun *et al.*, 2009) ดังนั้นจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่สามารถสังเคราะห์ ACC deaminase จึงสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้

## ธาตุเหล็ก

ธาตุเหล็กจัดเป็นธาตุอาหารมีปริมาณมากที่สุดในดิน มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์แทบทุกชนิด (Krewulak and Vogel, 2008) กลุ่มจุลินทรีย์จะมีการเจริญภายใต้สภาวะที่ต้องการธาตุเหล็กเพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP ปฏิกริยารีดักชันไรโบไทด์ของดีเอ็นเอ และใช้สังเคราะห์สารต่างๆ ระดับธาตุเหล็กที่จุลินทรีย์ต้องการเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตน้อยที่สุดคือ 1 ไมโครโมลาร์ โดยเหล็กที่สามารถละลายได้จะอยู่ในรูปของ hydroxyl iron ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความจำเพาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Neilands, 1995)

แต่โดยทั่วไปธาตุเหล็กอยู่ในรูปของสารประกอบที่ละลายน้ำได้ยาก หรือไม่สามรถละลายน้ำได้ ทำให้ไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้เจริญของจุลินทรีย์และพืช โดยมากเหล็กจะอยู่ในรูปของ Fe (II) (ferrous iron) และ Fe (III) (ferric iron) ในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน Fe (II) จะไม่เสถียร ซึ่งเกิดปฏิกิริยา ออกอกซิไดซ์ไปอยู่ในรูปของ Fe (III) ซึ่งจะตกตะกอน และไม่ละลายน้ำจะอยู่ในรูปของ ferric hydroxide ดังสมการ (Bullen and Griffiths., 1999)



ในสภาวะที่มีออกซิเจน และ มีค่า pH เป็นกลาง เหล็กมีความสามารถในการละลายต่ำ คือ มีความเข้มข้นน้อยกว่า 10-18 โมลาร์ เนื่องจากสามารถรวมตัวกับไฮดรอกไซด์ ซิลิเกต และฟอสเฟต เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายน้ำได้น้อย ดังนั้น จุลินทรีย์จะผลิตไซเดอร์โฟร์หลังจากออกมา นอกเซลล์ ทำให้เกิดเข้าจับเหล็กและการลำเลียงเหล็ก จากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเจริญของพืช เหล็กมีบทบาทสำคัญในขบวนการสังเคราะห์ คลอโรฟิลล์ และการพัฒนาคลอโร พลาสต์ (Miller *et al.*, 1995) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเอนไซม์ catalase และ peroxidase เป็นตัวชี้วัดปริมาณธาตุเหล็ก (Holm *et al.*, 1996)

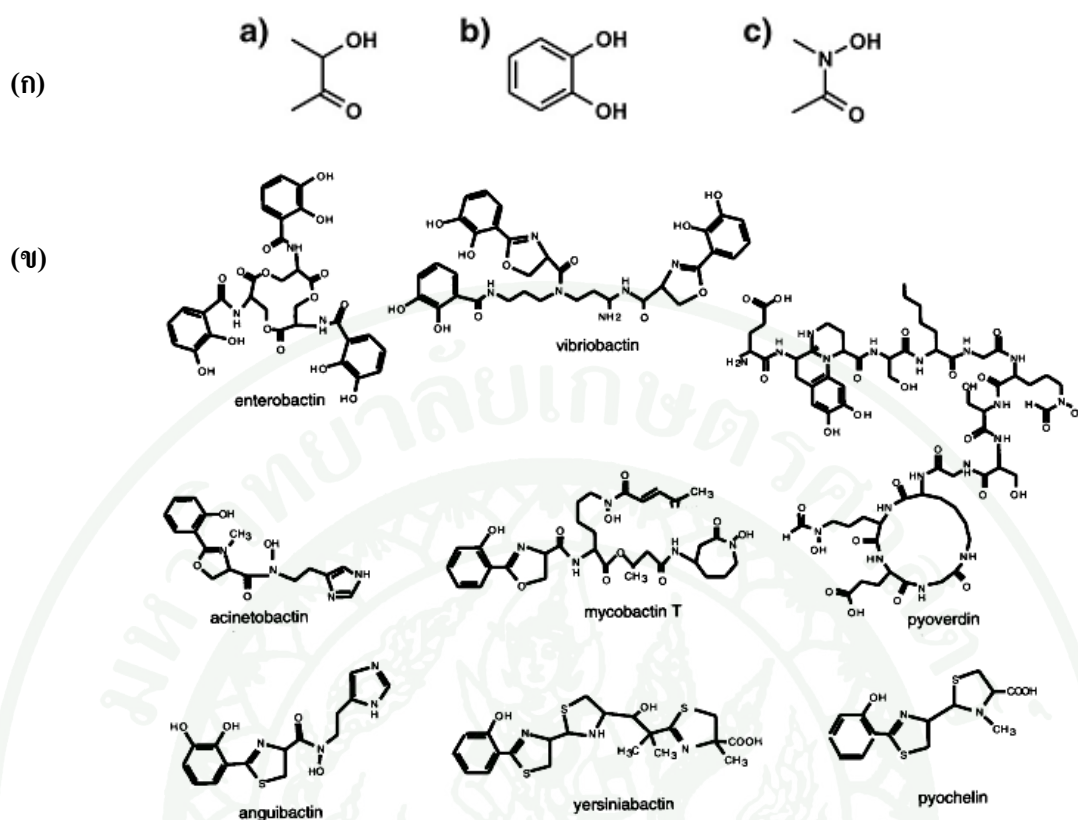
### ไซเดอร์โฟร์ (siderophore)

สารกลุ่มไซเดอร์โฟร์ เป็นสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ ช่วยในการนำธาตุเหล็ก ( $\text{Fe}^{3+}$ ) เข้าสู่เซลล์ ในสภาวะที่ขาดธาตุเหล็ก กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจะสังเคราะห์ไซเดอร์โฟร์มีหน้าที่จับธาตุเหล็กจากภายนอกเซลล์แล้วนำเข้าสู่เซลล์ เนื่องจากเหล็กเป็นสารที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ และเป็น co-factor ของเอนไซม์ ที่มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (Neiland, 1995) ถึงแม้ว่าโครงสร้างทางเคมีโดยรวมของไซเดอร์โฟร์จะแตกต่างกันมาก แต่หมู่ฟังก์ชันที่จะเชื่อมกับอะตอมของธาตุเหล็กจะไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งจะประกอบไปด้วยหมู่  $\alpha$ -hydroxycarboxylic acid หรือ hydroxamic acid และ catechol (Krewulak and Vogel, 2008) (ภาพที่ 2 ก)

โครงสร้างทางเคมีของไซเดอร์โฟร์สามารถจัดแบ่งได้ 3 ชนิด ได้แก่ hydroxamate หรือ thiohydroxamate, catecholate และ phenolate ซึ่งในส่วนใหญ่โครงสร้างที่พบมากที่สุด คือ ชนิด hydroxamate ในปัจจุบันรูปแบบ และโครงสร้างไซเดอร์โฟร์ที่พบใหม่ส่วนมากมีลักษณะโครงสร้างที่หลากหลายมากขึ้นเป็นผลมาจากโครงสร้างทางเคมีอย่างน้อยสองชนิดมาผสมกันในหนึ่งโมเลกุลของไซเดอร์โฟร์ที่เรียกกันว่า Mixed-Type เช่น Heterobactin B (*Rhodococcus erythropolis*), Mycobactin T (*Mycobacterium tuberculosis*), Petrobactin (*Bacillus anthracis*) และ Aerobactin (*Enterobacter spp.*) ( Miethke and Marahiel, 2007)

ไซเคอร์โรฟอ์ที่พบเป็นชนิดแรก คือ enterobactin ที่แยกได้จาก *Salmonella enteric* และ *Escherichia coli* (O' Brien and Gibson, 1970) ปัจจุบันพบสารกลุ่มไซเคอร์โรฟอ์ได้มากกว่า 500 ชนิดที่ผลิตโดยเชื้อรา และ แบคทีเรีย เช่น ferrichrom (*Ustilago sphrarogena*), enterobactin (*Escherichia coli*), pseudobactin (*Pseudomonas* ), ornibactin (*Burkholderia cepacia*) vibriobactin (*Vcholera*), acinetobactin (*Acinetibacter calcoaceticus*), mycobactin (*Microbacterium tuberculosis*), pyoverdin และ pyochelin (*Pseudomonas aeruginosa*), anguibactin (*Vibrio anguillarum*) และ yersiniabactin (*Yersinia pestis.*) (Challis, 2005; Crosa and Walsh, 2002) (ภาพที่ 2, ข)

แอคติโนมัยสีทในกลุ่ม *Streptomyces* มีความสามารถในการสร้างไซเคอร์โรฟอ์ ที่เรียกว่า desferal หรือ desferrioxamine ได้แก่ *S. avermitillis*, *S. scabies*, และ *S. ambofaciens* (Barona-Gomez *et al.*, 2006) และพบว่า *S. coelicolor* สามารถสร้างไซเคอร์โรฟอ์ ชนิด desferrioxamine และ coelichelin (Lautra *et al.*, 2007) สำหรับ *Streptomyces* sp. Tu 6125 และ *S. tendae* Tu 901/8c นอกจากจะสร้างไซเคอร์โรฟอ์ชนิด tri-hydroxamate deferrioxamine B และ E แล้ว ยังสามารถสร้างไซเคอร์โรฟอ์ชนิด enterobactin ได้ (Fiedler *et al.*, 2001)



ภาพที่ 2 โครงสร้างไซเคอร์โรฟอร์ชนิดต่างๆ

(ก) กลุ่ม functional group ของไซเคอร์โรฟอร์ a) hydroxycarboxylic acid, b) catechol, c) hydroxamic acid.

ที่มา: Krewulak and Vogel (2008)

(ข) โครงสร้างไซเคอร์โรฟอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย ได้แก่ enterobactin จาก *E. coli*, vibriobactin จาก *Vibrio. cholerae*, acinetobactin จาก *Acinetobacte. calcoaceticus*, mycobactin จาก *Microbacterium tuberculosis*, pyoverdine และ pyochelin จาก *Pseudomonas aeruginosa*, anguibactin จาก *Vibrio anguillarum* และ yersiniabactin จาก *Yersinia pestis*.

ที่มา: Crosa and Walsh (2002)

## ความสำคัญของไซเดอร์โรฟอร์กับพืช

PGPR สามารถสนับสนุนการเจริญของพืชทั้งทางตรง และทางอ้อม การสนับสนุนการเจริญในทางตรง จะมีการสร้างสารประกอบที่เป็นประโยชน์ต่อพืชหรือสารที่ช่วยให้พืชมีการดูดซึมอาหารจากสภาวะแวดล้อมได้ดี เช่น การตรึงไนโตรเจน, การช่วยให้เหล็กและฟอสฟอรัสในดินละลายได้ รวมทั้งการสร้างฮอร์โมน (phytohormone) เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน และ จิบเบอเรลลิน เป็นต้น การสนับสนุนการเจริญในทางอ้อมคือกลุ่ม PGPR จะไปลดความรุนแรงของโรคพืชโดยกลุ่มแบคทีเรียในดินที่สนับสนุนการเจริญของพืชทั้งทางตรง และทางอ้อมจะถูกเรียกว่า Plant growth-promoting bacteria (PGPB) (Holguin and Bashan, 1996) สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคพืช และสนับสนุนการเจริญของพืชโดยผ่านกระบวนการสร้างไซเดอร์โรฟอร์ แล้วปลดปล่อยไซเดอร์โรฟอร์ไปจับกับ  $Fe^{3+}$  บริเวณดินที่อยู่รอบรากพืช และ ส่งผลไม่ให้เชื้อก่อโรคพืชเจริญได้เนื่องจากขาดธาตุเหล็ก (O' Sullivan and O'Gara, 1992)

ถึงแม้ว่ากลุ่มเชื้อก่อโรคพืชจะสามารถสร้างไซเดอร์โรฟอร์ได้ แต่พบว่ามีประสิทธิภาพในการจับเหล็กต่ำกว่า ไซเดอร์โรฟอร์ที่สร้างจากเชื้อกลุ่ม PGPR ดังนั้นปริมาณเหล็กบริเวณรอบรากพืชจะลดลงซึ่งจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช ดังนั้นจึงไม่แสดงอาการของโรคหรือทำให้พืชเสียหายเนื่องจาก PGPR มีการสร้างไซเดอร์โรฟอร์ที่เข้าไปจับเหล็กในสภาวะแวดล้อมได้เป็นโครงสร้างที่เรียกว่า iron- siderophore complex พืชจะมีกลไกการจับโครงสร้างดังกล่าว และถูกลำเลียงเข้าไปในเซลล์พืช และปลดปล่อยเหล็กออกจากโครงสร้างของไซเดอร์โรฟอร์ ดังนั้นพืชจะสามารถนำเหล็กเข้าไปใช้ เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชได้ (Bar-Ness *et al.*, 1991; 1992)

การสร้างไซเดอร์โรฟอร์ชนิด desferrioxamine ในหลายสายพันธุ์ ซึ่งเป็นไซเดอร์โรฟอร์ชนิด hydroxamate โดยอาศัยกลุ่มยีน *desABCD* (Barona-Gomez *et al.*, 2004 ; Kadi *et al.*, 2007) กลุ่มยีน *desABCD* และ *cchA-cchO* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซเดอร์โรฟอร์ชนิด desferrioxamine และ coelichelin ที่พบใน *S. coelicolor* A3(2) และ *S. ambofacien* ATCC 23877 (Barona-Gomez *et al.*, 2006) จากการศึกษาใน *S. coelicolor* และ *S. pilosus* มีโปรตีน divalent metal-dependent regulatory protein (DmdR) ควบคุมการแสดงออกของ ยีน *desABCD* ในกระบวนการสังเคราะห์ไซเดอร์โรฟอร์ (Tunca *et al.*, 2007)

*S. coelicolor* A3(2) มีกลุ่มยีน *desEFABCD* ที่ตำแหน่งบนโครโมโซม Sco 2780-Sco2785 (Tierrafría *et al.*, 2011) กลุ่มยีน *desABCD* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซเดอร์โรฟอร์ชนิด desferrioxamine โดยสร้างโปรตีน DesA, DesB, DesC และ DesD ซึ่งมีหน้าที่เป็น L-Lysine decarboxylase, 1,5 –diaminopentane monooxygenase, acyl coA acyltransferase และ Type C siderophore synthetase ตามลำดับ ยีน *desE* จะสร้างโปรตีน DesE มีหน้าที่เป็น ferric-siderophore lipoprotein receptor ควบคุมกลไกการดูดซึมโครงไซเดอร์โรฟอร์จับกับเหล็กเข้าสู่เซลล์ ยีน *desF* สร้างโปรตีน DesF มีหน้าที่เป็น hydrolase เพื่อปลดปล่อยเหล็กออกจากโครงสร้างไซเดอร์โรฟอร์ (Butterton and Calderwood, 2004)

จากการศึกษาหน้าที่ของยีนโดยวิธียีนดิสรัปชัน ยีน *desE* และ ยีน *cdtABC* ถอดรหัสให้โปรตีน DesE และ CdtB ใน *S. coelicolor* A3(2) พบว่าเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะในการจดจำต่อโครงสร้างไซเดอร์โรฟอร์ชนิด desferrioxamine B และ E ในการนำเหล็กกลับเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (Tierrafría *et al.*, 2011) กลุ่มยีน *cchA-cchO* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ การลำเลียง และการย่อยสลายของไซเดอร์โรฟอร์ชนิด coelichelin โดยยีน *cchA* และ *cchB* ทำหน้าที่สังเคราะห์ L-5-hydroxyornithine 5-formyl transferase และ L-ornithine 5- monooxygenase ตามลำดับ และยีน *cchC*, *cchD*, *cchE*, *cchF*, *cchG*, *cchI* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกับ siderophore binding lipoprotein หรือ siderophore ABC transporter (Barona-Gomez *et al.*, 2006) นอกจากนี้ในจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น *V. cholera* มีการสร้างไซเดอร์โรฟอร์ชนิดที่เรียกว่า vibriobactin ที่ใช้ในการจับเหล็กอยู่ในรูปที่เรียกว่า ferri-vibriobactin complex (Stoebner *et al.*, 1992) โดยกลุ่มยีน *viuA-B* จะช่วยนำโครงสร้างที่จับเหล็กแล้วเข้าสู่เซลล์ และ ยีน *viuF* ทำหน้าที่สังเคราะห์ vibriobactin (Butterton *et al.*, 1994) และ *P. aeruginosa* สร้างไซเดอร์โรฟอร์ 2 ชนิด คือ pyochelin และ pyoverdine (Merriman *et al.*, 1995) สังเคราะห์โดยกลุ่มยีน *pch* DCBA และ *pch* EF ตามลำดับ (Reimann *et al.*, 1998)

## กลไกการสังเคราะห์ไซเคอร์โรฟอร์

ไซเคอร์โรฟอร์หลายชนิดเป็นกลุ่มของสายพอลิเพปไทด์ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์ non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) ซึ่งเป็นเอนไซม์พบในการสังเคราะห์ (multimodular enzymes) NRPS สังเคราะห์สายพอลิเพปไทด์โดยปราศจาก RNA template ซึ่งในแต่ละกรดอะมิโนจะถูกกระตุ้นอย่างจำเพาะเจาะจงในแต่ละโดเมนของ NRPS โดยมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนโปรตีนที่เรียกว่า โมดูล (module) (Crosa and Walsh, 2002; Doekel *et al.*, 2000) ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีนหลายชนิดได้แก่ acyl carrier protein (ACP) หรือ peptidyl carrier protein (PCP) ทำหน้าที่สังเคราะห์โครงสร้างหลักของสายพอลิเพปไทด์, adenylation domain (A), condensation domain (C) และ epimerization domain (E) จะเป็นโดเมนที่กระตุ้นให้ต่อสายพอลิเพปไทด์ขึ้น การสังเคราะห์ไซเคอร์โรฟอร์โดยใช้เอนไซม์ NRPS มี 3 ขั้นตอนดังนี้ (Keating and Walsh, 1999)

### ขั้นตอน post translation หรือ priming

กลุ่มโปรตีน PCP จะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ที่เรียกว่า apo enzyme ซึ่งจะถูกระตุ้นให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้เรียกว่า โฮโลเอนไซม์ holo enzyme โดย coenzyme-A-phosphopantetheine สร้างพันธะโควาเลนต์กับกรดอะมิโน เซอร์รีน (serine) ของ PCP โมเลกุลของ carboxylic acid และ กรดอะมิโน ถูกกระตุ้นโดย phosphopentetheinyl transferase และลำเลียงสายเพปไทด์มายังโดเมน A ซึ่งเอนไซม์ aminoacyl tRNA synthetase ใช้ ATP เพื่อเปลี่ยนโมเลกุลของกรดอะมิโนให้อยู่ในรูปของ aminoacyl AMP เพื่อที่จะสร้างพันธะโควาเลนต์กับ PCP

### ขั้นตอน chain elongation

เอนไซม์ NRPS สังเคราะห์สายพอลิเพปไทด์ให้ยาวขึ้น โดยการทำงานของโดเมน C ซึ่งจะเริ่มสังเคราะห์จากปลายทาง upstream ไปยังบริเวณปลายสุดของ downstream บน PCP จากนั้นเอนไซม์ peptide synthase จะสร้างพันธะเพปไทด์สังเคราะห์เป็นสายยาวในแต่ละโมดูลเอนไซม์ NRPS จะต้องรวมตัวกันทั้ง 3 โดเมนคือ C-A-PCP ซึ่งจะมีหน้าที่การสังเคราะห์สายพอลิเพปไทด์ในโมดูลตัวต่อไป

## ขั้นตอน chain termination

เมื่อสังเคราะห์สายโพลีเพปไทด์หรือสายของไซเคอร์โรฟอร์ เกิดขึ้นเรียบร้อยแล้ว บริเวณ downstream ของ PCP โมดูลสุดท้าย thioesterase (TE) จะมีหน้าที่ตัดสายโพลีเพปไทด์ โดยเกิดกระบวนการดึงโมเลกุลน้ำออก เรียกว่า intermolecular hydrolysis บริเวณหมู่ OH หรือ  $\text{NH}_2$  ในการสังเคราะห์ไซเคอร์โรฟอร์บางชนิดอาจมีการสร้างวงของ thiazoline หรือ oxazoline โดยการเกิด cyclization แล้วจึงเกิดกระบวนการดึงโมเลกุลน้ำออก (dehydration) เช่น การสังเคราะห์ไซเคอร์โรฟอร์ชนิด yersiniabactin และ pyochelin เป็นต้น

## การสังเคราะห์ไซเคอร์โรฟอร์ชนิด desferrioxamine

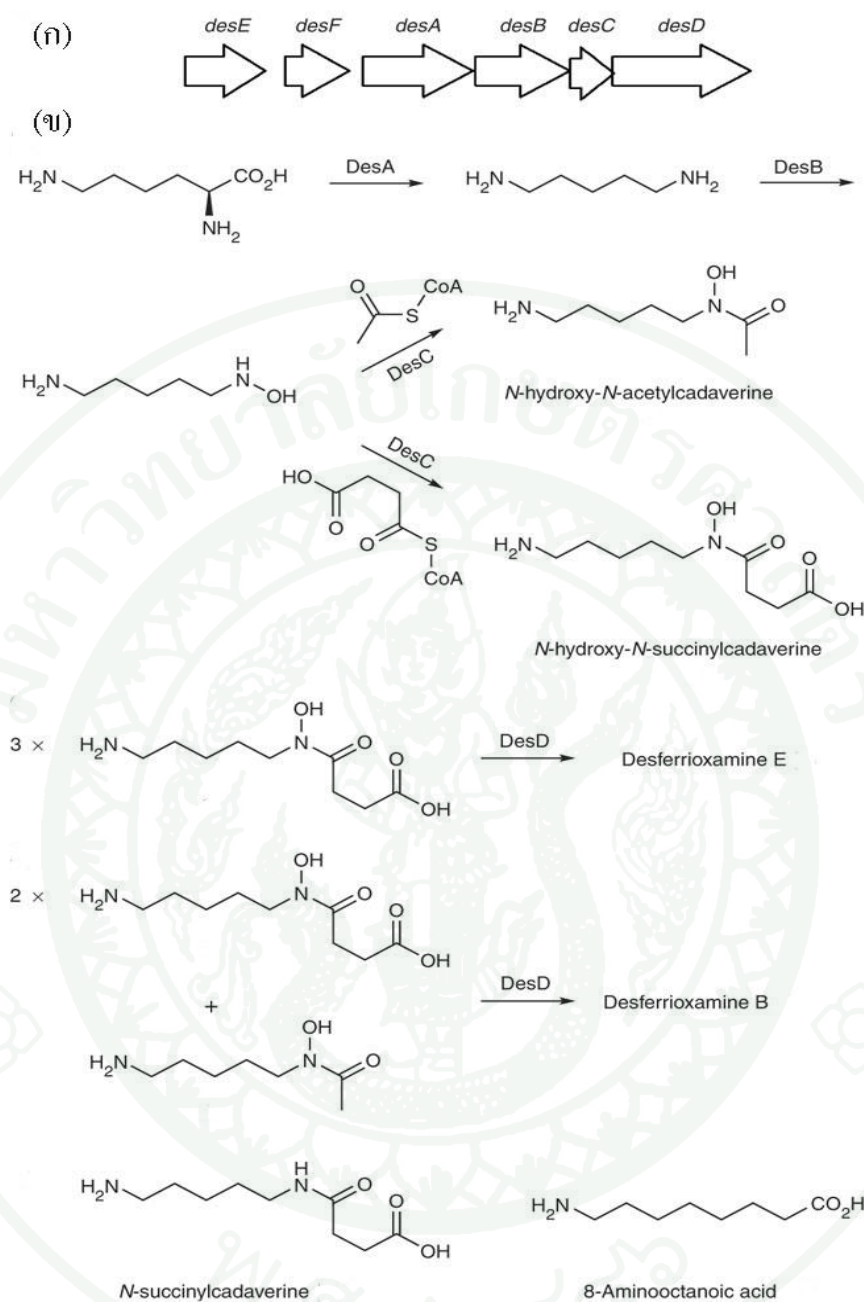
Desferrioxamine (DFO) ถูกสังเคราะห์มาจากกลุ่มยีน *desEFABCD* มีโปรตีนควบคุมการแสดงออกที่เรียกว่า divalent metal-dependent regulatory protein (DmdR1 และ DmdR2) ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ไซเคอร์โรฟอร์ desferrioxamin B และ E ใน *S. coelicolor* (Flores and Martin, 2004) โปรตีน DesA กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา decarboxylation นำหมู่คาร์บอนออกหนึ่งโมเลกุลในรูปของ  $\text{CO}_2$  จึงสามารถ เปลี่ยน L-lysine เป็น cadavarine (Tunca *et al.*, 2006) โปรตีน DesB กระตุ้นเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ซึ่งจะเปลี่ยน cadavarine เป็น *N*-hydroxycadavarine จากนั้นโปรตีน DesC จะเติมหมู่ succinyl-CoA ได้เป็นสารประกอบ succinyl-*N*-hydroxycadavarine (Barona-Gomez *et al.*, 2004) และขั้นสุดท้ายยีน *desD* อยู่ทางด้าน upstream ของยีน *desABC* จะกำหนดการสังเคราะห์ DesD ซึ่งเป็นโปรตีน กระตุ้นการใช้ ATP และ  $\text{Mg}^{2+}$  ให้เกิดกระบวนการ oligomerization โดยการรวมโครงสร้างของ *N*-hydroxy-*N*-succinyl-cadavarinec (HSC) และ *N*-acetyl-*N*-hydroxy-cadavarinec (AHC) ได้โครงสร้างของ desferrioxamine B, E และ G1 (Barry and Challis, 2009) (ภาพที่ 3) desferrioxamine (DFO) มีโครงสร้างที่หลากหลายในแต่ละชนิดของเชื้อก็อาจมีความสามารถในการสร้าง desferrioxamine หลายโครงสร้างด้วยกัน (ภาพที่ 3)

## กลไกการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์โดยไซโตโครโครม

กลไกทั่วไปของการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์โดยออสไซไซโครโครมนั้นประกอบไปด้วย ขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ

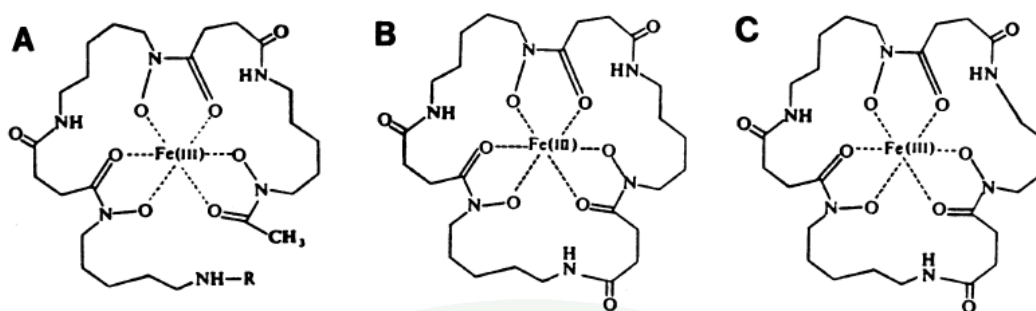
1. เริ่มการสังเคราะห์โมเลกุลของไซโตโครโครมจากนั้นจึงแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปสู่สิ่งแวดล้อม
2. ไซโตโครโครมเข้าจับกับธาตุเหล็ก แล้วถูกดึงกลับเข้าสู่เซลล์ โดยกระบวนการ active transport
3. ปลดปล่อยโมเลกุลของไซโตโครโครมที่ดึงธาตุเหล็กออกแล้ว คืนสู่ภายนอกเซลล์

เมื่อโมเลกุลของไซโตโครโครมเข้าจับกับธาตุเหล็กแล้วนั้น โมเลกุลของไซโตโครโครมจะจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์ซึ่งทำหน้าที่เป็น receptor จากนั้นจะถูกขนย้ายผ่านเข้ามายังผนังเซลล์ โดยกระบวนการ active transport กล่าวคือ ATP ที่ผนังเซลล์จะเป็นตัวกระตุ้น โดยการส่งผ่านพลังงาน ทำให้ธาตุเหล็กเข้าสู่ภายในส่วนของไซโตพลาสซึมได้ ทั้งนี้ชนิดของไซโตโครโครมมีความจำเพาะจะแตกต่างกันไปกับโปรตีนที่ผนังเซลล์ เมื่อโมเลกุลของไซโตโครโครมที่จับธาตุเหล็กถูกนำผ่านเข้ามายังผนังเซลล์แล้ว ธาตุเหล็กก็จะถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลของไซโตโครโครม และปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ไปสู่สิ่งแวดล้อมเพื่อจับกับธาตุเหล็กต่อไป



ภาพที่ 3 (ก) กลุ่มยีน *desEFABCD* ใน *S. coelicolor* (ข) การสังเคราะห์ desferrioxamine (DFO)

ที่มา: Kadi *et al.* (2007)



ภาพที่ 4 โครงสร้าง ferrioxamine B และ D<sub>1</sub> (A) (ferrioxamine B, R = H; ferrioxamine D<sub>1</sub>, R = COCH<sub>3</sub>), ferrioxamine E (B) และ ferrioxamine D<sub>2</sub> (C) จาก *Streptomyces pilosus*

ที่มา: Muller and Raymond (1984)

#### การตรวจหาชนิดของสารไฮเดรอร์ฟอร์

การตรวจหาโดยโครงสร้างของไฮเดรอร์ฟอร์ทำได้ด้วย วิธี ferric perchlorate assay วิธี Csaky assay และวิธี Arnow assay

วิธี ferric perchlorate assay สารประกอบ hydroxamate ไฮเดรอร์ฟอร์สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ ferric ในสารละลาย perchlorate ในสถานะที่มีพีเอชต่ำ ให้สารละลายที่เป็นกรดมีสีม่วงหรือสารละลาย สีส้มที่มีพีเอชเป็นกลาง ในอัตราส่วนต่างกัน ส่วน วิธี Csaky assay เป็นการตรวจวัดกลุ่ม hydroxamate ที่มีความไวมากกว่าวิธี ferric perchlorate โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนไปเป็น nitrite แล้วเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีชมพู (Csaky, 1948) วิธี Arnow assay เป็นการตรวจวัด catecholate โดยการเปลี่ยนสีเขียว-เหลืองของสารละลายส่วนไฮโปเป็นสีแดงเมื่อเติมกรดไฮโดรคลอริก และไนไตรท์โมลิบเดต เป็นต้น (Arnow, 1937) การส่องภายใต้แสง UV หากพบว่าสารละลายมีการเรืองแสงภายใต้แสง UV ไม่ว่าจะเป็นสีขาวยELLOW เขียว ฟ้า ขึ้น อาจจะเป็นไปได้คือไฮเดรอร์ฟอร์ การเติมสารละลายหลัก: การเกิดสีของสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งมีสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นเมื่อเติมเกลือเฟอร์ริก (ferric salt) เป็นวิธีที่ให้รายละเอียดน้อยและให้ความแม่นยำต่ำ

### การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces*

การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces* สามารถทำได้หลายวิธี อาทิ ทรานสฟอร์เมชัน (transformation) ทรานสดักชัน (transduction) และคอนจูเกชัน (conjugation) ซึ่งจะพบข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น การทรานสฟอร์เมชันจะมีประสิทธิภาพต่ำ การทรานสดักชัน ทำได้ไม่แพร่หลาย เนื่องจากขาดแคลนฟาจ (phage) ที่สามารถใช้กับเชื้อได้หลายชนิด (Kieser *et al.*, 2000)

*Streptomyces* หลายชนิดมีระบบป้องกัน โดยการทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอม (restriction-modification system) (Sanchez *et al.*, 1985; MacNeil, 1988; Rodicio and Chater, 1988) ดังนั้นการส่งถ่ายดีเอ็นเอที่ไม่มีการเติมหมู่เมธิลโดยผ่านดีเอ็นเอนั้นเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ที่ขาดการเติมหมู่เมธิล เช่น สายพันธุ์ ET12567 (MacNeil *et al.*, 1992) เสียก่อนแล้วจึงนำมาถ่ายเข้าสู่ *Streptomyces* จะทำให้ประสิทธิภาพในการส่งถ่ายพลาสมิดสูงขึ้น (MacNeil *et al.*, 1992; Flett *et al.*, 1997)

### วิธีการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces* ในปัจจุบัน

Bibb *et al.* (1978) ได้พัฒนาวิธีการทรานสฟอร์เมชันของ *Streptomyces* โดยใช้ไลโซไซม์ (lysozyme) ทำให้เส้นใยอยู่ในรูปโพรโทพลาสต์ (protoplast) แล้วนำดีเอ็นเอเข้าสู่โพรโทพลาสต์ โดยอาศัยการเหนี่ยวนำของ polyethylene glycol (PEG) ซึ่งได้มีการดัดแปลงนำไปใช้อย่างกว้างขวาง วิธีนี้ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโพรโทพลาสต์และการทำให้คืนสภาพ (regeneration) ซึ่งมีความแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ โดยความถี่ของการเกิดทรานสฟอร์เมชันอยู่ระหว่าง  $10^6$ - $10^7$  ทรานสฟอร์แมนต์ต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ (Matsushima and Baltz, 1985; Kieser *et al.*, 2000)

อย่างไรก็ตาม *Streptomyces* บางสายพันธุ์ไม่สามารถใช้วิธีดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากมีความเปราะบางของโพรโทพลาสต์ หรือบางสายพันธุ์ก็ไม่สามารถเตรียมโพรโทพลาสต์ได้ Pigac and Schrepf (1995) จึงได้พัฒนาวิธีการทรานสฟอร์เมชันเข้าสู่เส้นใยโดยอาศัยอิเล็กโทรโพรเรชัน (electroporation) ซึ่งให้ความถี่ของการเกิดทรานสฟอร์แมนต์สูงกว่าวิธีการทรานสฟอร์เมชันของโพรโทพลาสต์  $10^2$ - $10^3$  เท่า โดยแสดงให้เห็นว่าสามารถนำดีเอ็นเอเข้าสู่ *S. venezulae* 13S และสายพันธุ์กลาย 554W, 601 และ 615 ของ *S. rimosus* R6 ได้ทั้ง 4 สาย อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็ยังคงจำเป็นต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ และต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาสูง

ต่อมา Mazodier *et al.* (1989) ได้นำเสนอวิธีการส่งถ่ายพลาสมิดโดยการทำคอนจูเกชันต่างสกุล (intergeneric conjugation) ระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* ซึ่งนิยมใช้กันมากในการศึกษาหน้าที่ของยีนด้วยวิธียีนดิสรัปชันและการแทนที่ยีน (gene replacement) และวิธีคอมพลีเมนต์ (Kieser *et al.*, 2000)

### คอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces*

การเกิดคอนจูเกชันสามารถเกิดได้โดยทั่วไปในแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก ซึ่งจะเกิดการส่งถ่ายพลาสมิดจากเซลล์ของผู้ให้ (donor) ไปยังเซลล์ผู้รับ (recipient) การเกิดคอนจูเกชันอาศัยการทำงานของยีนที่สำคัญของพลาสมิด 2 ส่วน คือ กลุ่มยีน *tra* ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการส่งถ่ายพลาสมิด และ *oriT* (origin of transfer) ซึ่งมีหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นและเป็นปลายที่จะกลับมาเชื่อมกันของพลาสมิดในการส่งถ่าย เรียกพลาสมิดที่มีสมบัติ เช่น นี้ว่า self-transmissible plasmid ซึ่งสามารถเกิดการส่งถ่ายพลาสมิดได้ด้วยตัวเอง ถ้าขาดยีน *tra* จะเรียกเป็น mobilisable plasmid ซึ่งไม่สามารถส่งถ่ายพลาสมิดได้ด้วยตัวเอง ต้องอาศัยยีน *tra* ที่อยู่ในส่วนอื่น เช่น ในโครโมโซมใน self-transmissible plasmid หรือใน non-transmissible plasmid และ การเกิดคอนจูเกชันใน *E. coli* จะมีการสร้าง sex pilus เพื่อใช้ในการส่งถ่าย ซึ่งไม่มีรายงานในแบคทีเรียแกรมบวก (Snyder and Champness, 1997)

การทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* เดิม shuttle plasmid ที่มีจุดเริ่มต้นของการจำลองดีเอ็นเอ origin of replication ของทั้ง *E. coli* และ *Streptomyces* จากพลาสมิด pBR322 และ pIJ101 ตามลำดับ ซึ่งการส่งถ่ายพลาสมิดจะเกิดขึ้นโดยอาศัย *oriT* [จากพลาสมิด RK2(IncP)] บนพลาสมิด และการทำงานของยีน *tra* จากพลาสมิด RP4 ที่อยู่ใน *E. coli* (Mazodier *et al.*, 1989)

การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่โครโมโซมของ *Streptomyces* ที่นิยมใช้กันมากในการทำยีนดิสรัปชัน คือ การทำคอนจูเกชันต่างสกุล (intergeneric conjugation) ระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* (Mazodier *et al.*, 1989) *E. coli* ที่นิยมใช้ในการทำคอนจูเกชันต่างสกุล คือ สายพันธุ์ ET12567 (*dam<sup>-</sup>, dcm<sup>-</sup>*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ขาดการเติมหมู่เมทิลและมียีน *tra* อยู่บนพลาสมิด pUZ8002 ซึ่งเป็นพลาสมิดแบบ non-transmissible plasmid (Sia *et al.*, 1996) ซึ่งทำให้ ET12567 มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Streptomyces* ที่มีระบบการป้องกัน โดยการทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอมที่มีการเติมหมู่เมทิลได้ดีกว่า (Flett *et al.*, 1997) พลาสมิดที่ใช้สำหรับการทำคอนจูเกชันในปัจจุบันล้วน

เป็นพลาสมิดที่ไม่สามารถจำลองตัวเองได้ใน *Streptomyces* (non-replicative plasmid) ซึ่งจะสามารถเข้าไปแทรกตัวกับโครโมโซมได้ก็ต่อเมื่อเกิด site-specific recombination ของตำแหน่ง attachment site (*attP*) ของฟาจ  $\phi$ C31 ที่อยู่บนพลาสมิดนั้นกับตำแหน่ง *attB* บนโครโมโซม (Bierman *et al.*, 1992; Thorpe *et al.*, 2000) หรือโดยการเกิดสอมอโลกัสรีคอมบิเนชันของซันดีเอ็นเอจาก *Streptomyces* ที่โคลนเข้าไปใน พลาสมิดกับยีนบนโครโมโซม (Bierman *et al.*, 1992) วิธีการทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* ทำได้โดยการเตรียมเซลล์ *E. coli* ผู้ให้ และการเตรียมสปอร์ของ *Streptomyces* ผู้รับ แล้วนำมาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นนำไปเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และคัดเลือกผู้รับที่มีพลาสมิดหรือเอกซ์คอนจูเกนต์ (exconjugant) โดยใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดมีสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่างกัน ทำให้ต้องศึกษาวิธีการให้เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด ได้แก่ ความเข้มข้นของสปอร์ *Streptomyces* ผู้รับ ชนิดของอาหารแข็งที่ใช้คอนจูเกชัน อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นการออกของสปอร์ (Kitani *et al.*, 2000) เป็นต้น

### การศึกษาหน้าที่ของยีนโดยวิธียีนดิสรัปชัน

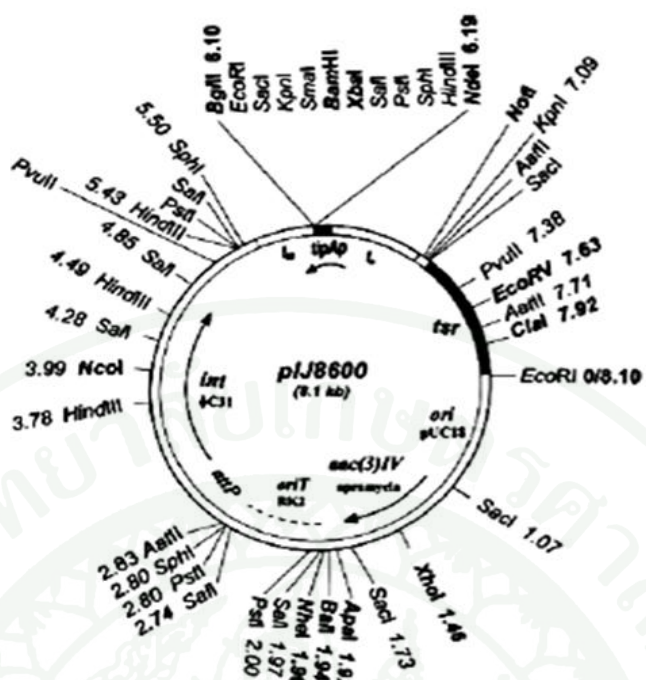
ยีนดิสรัปชัน (gene disruption) เป็นวิธีการทำให้เกิดการกลายที่บริเวณที่ต้องการศึกษาเพื่อใช้ศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนนั้น หรือเรียกว่า gene knockout โดยการใช้เวกเตอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *Streptomyces* (non-replicative vector) เชื่อมต่อกับซันดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจ เมื่อนำ พลาสมิดสายผสมเข้าสู่ *Streptomyces* แล้ว ซันดีเอ็นเอจะเกิดสอมอโลกัสรีคอมบิเนชันกับบริเวณที่ลำดับเบสเหมือนกันบนโครโมโซม ทำให้เวกเตอร์เข้าไปแทรกอยู่บนโครโมโซมของ *Streptomyces* ไปขัดขวางการทำงานของยีนนั้น ซึ่งวิธีนี้เกิดได้โดย single crossover สำหรับการทำยีนดิสรัปชันเฉพาะตำแหน่งยีนที่เราสนใจ จะใช้วิธีแทรกยีนต้านยาปฏิชีวนะเข้าไปขัดขวางการทำงานของยีนโดยทำให้เกิด double crossover แลกเปลี่ยนชิ้นส่วนยีนกลายบนเวกเตอร์กับยีนปกติบนโครโมโซม ทำให้ *Streptomyces* ไม่สามารถสร้างโปรตีนชนิดนั้นๆมาได้

วิธียีนดิสรัปชันนิยมใช้ศึกษาหน้าที่ของยีน โดยได้มีรายงานว่า นำวิธีดังกล่าวมาใช้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ไซเดอร์โรฟอร์และกลไกการลำเลียงไซเดอร์โรฟอร์เข้าออกเซลล์ เช่น การทำให้กลายของยีน *des* และ *cch* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง desferrioxamine E, B และ coelichilin ใน *S. ambifaciens* ATCC23877 และ *S. coelicolor* โดยการนำยีนด้านยาปฏิชีวนะเข้าไปขัดขวางการทำงานของยีน *desE-desD*, *desD*, *cchA-cchk* และระหว่างยีน *cchH* โดยกระตุ้นให้เกิด double crossover แลกเปลี่ยนชิ้นยีนบนเวกเตอร์กับยีนปกติบนโครโมโซม ซึ่งพบว่าสายพันธุ์กลายไม่มีการสร้าง coelichilin, desferrioxamine E และ desferrioxamine B และพบว่ากลุ่มยีนที่สร้าง coelichilin และ desferrioxamine เป็นอิสระต่อกัน หรือถูกสร้างมาจากกลุ่มยีนคนละชนิดกัน (Barona-Gomez *et al.*, 2004; 2006)

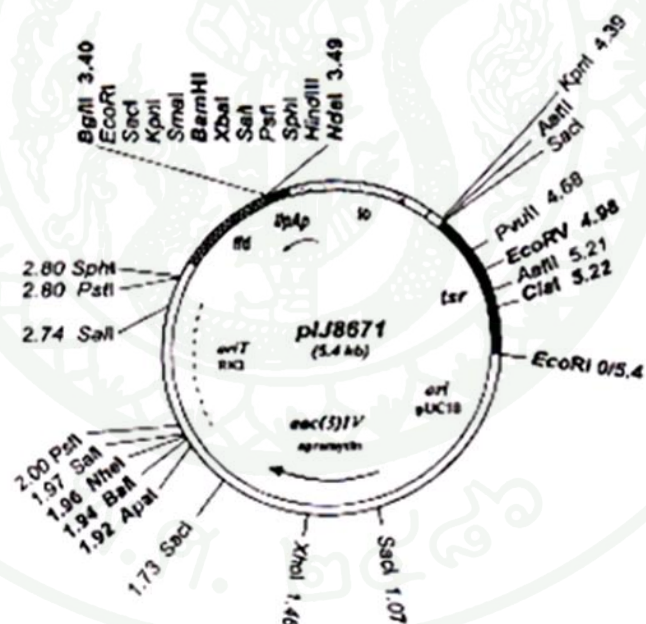
การใช้วิธียีนดิสรัปชันศึกษาหน้าที่ของยีน *dmdR1* และ *dmdR2* เป็นยีนที่สร้างโปรตีน divalent metal-dependent regulatory (DmdR) ใน *S. coelicolor* พบว่า ยีน *dmdR1* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมและสร้างโปรตีน DmdR1 มีผลต่อการควบคุมกลุ่มยีน *desABCD* ที่เกี่ยวข้องกับการบวนการสังเคราะห์ไซเดอร์โรฟอร์ desferrioxamine (Flores *et al.*, 2004)

ใน *S. coelicolor* และ *S. pilosus* ที่มีการศึกษาแล้วว่า มีการสร้างไซเดอร์โรฟอร์โดยกลุ่มยีน *desABCD* ได้ใช้วิธีการยีนดิสรัปชัน เป็นการกระตุ้นให้เกิด double-crossover บนยีน *desA* ซึ่งถอดรหัสให้โปรตีน L-lysine decarboxylase ทำให้ศึกษาหน้าที่ของยีน *desA* ได้ว่า เกี่ยวข้องกับการสร้าง desferrioxamine อยู่ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรตีน DmdR1 และพบว่าในสายพันธุ์กลายที่ได้มีการแทนที่ยีน *desA* ด้วยยีนด้านยาปฏิชีวนะ apramycin นั้น ไม่มีการสร้างไซเดอร์โรฟอร์เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติ (Tunca *et al.*, 2006)

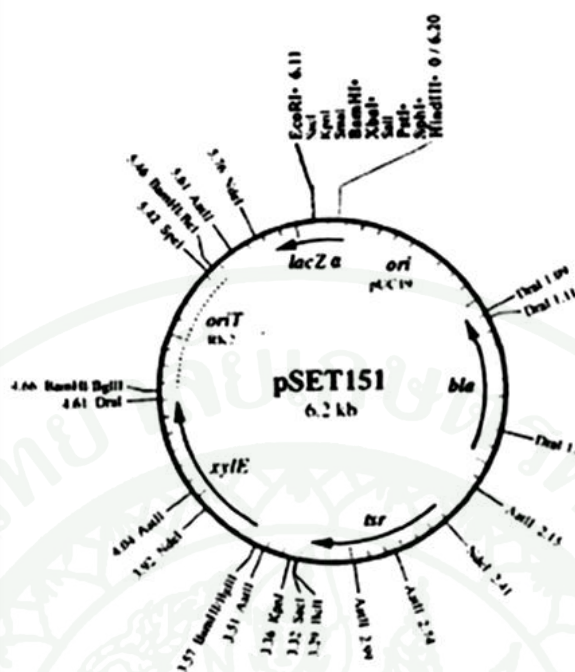
(ก)



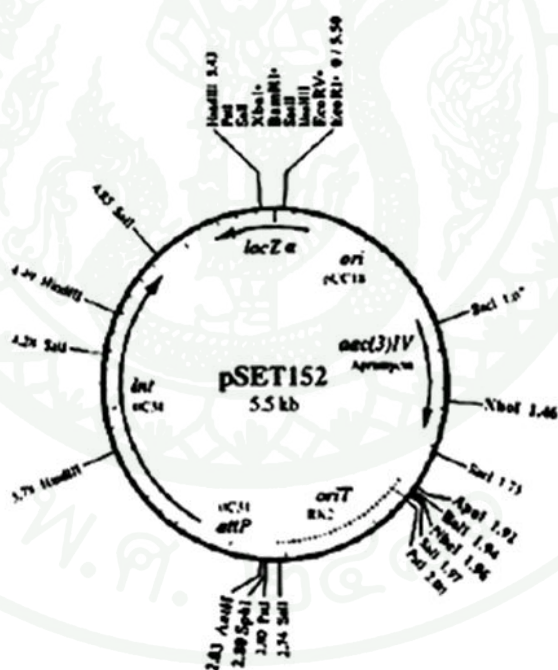
(ข)



(ก)



(ง)



ภาพที่ 5 พลาสมิดสำหรับทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* กับ *Streptomyces*

(ก) pIJ8600 (ข) pIJ8671 (ค) pSET151 (ง) pSET152

ที่มา: Kieser *et al.* (2000)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. จุลินทรีย์ พลาสมิด และพืชที่ใช้ในงานวิจัย

#### 1.1 จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในการวิจัยแสดงสรุปไว้ในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

| สายพันธุ์                         | คุณสมบัติ                                                                                                                                                                           | แหล่งที่มา/เอกสารอ้างอิง                                                                              |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> ET12567/ pUZ8002   | <i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdS</i> Km <sup>r</sup><br>( <i>tra</i> Cm <sup>r</sup> )                                                                                                | MacNeil <i>et al.</i> (1992)<br>Sia <i>et al.</i> (1996)                                              |
| <i>E. coli</i> XL1-blue           | <i>Sup E44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA</i><br><i>thi relA1 lac-F'</i> [ <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>f</sup> <i>lacZ</i><br>$\Delta$ M15 Tn10( <i>tet</i> <sup>r</sup> )] | Bullock <i>et al.</i> (1987)                                                                          |
| <i>S. coelicolor</i> M145<br>GMKU | Desferrioxamine producer<br>endophytic actinomycetes                                                                                                                                | John Innes Centre, UK<br>Genetic-Microbiology<br>Kasetsart University<br>(GMKU) culture<br>collection |

## ตารางที่ 2 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

| พลาสมิด       | คุณสมบัติ                                                                                   | อ้างอิง                  |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| pIJ8600       | conjugative plasmid, ColE1 replicon <i>oriT attP int</i> Apr <sup>r</sup> Thio <sup>r</sup> | Sun <i>et al.</i> (1999) |
| pIJ8671       | conjugative plasmid, ColE1 replicon <i>oriT</i> Apr <sup>r</sup> Thio <sup>r</sup>          | Sun <i>et al.</i> (1999) |
| pJET1.2/blunt | cloning plasmid, Amp <sup>r</sup>                                                           | Fermentas, USA           |

หมายเหตุ Amp = Ampicillin, Cm = chloramphenicol, Apr = apramycin, Km = kanamycin,  
Thio = thiostrepton

### 1.2 พืชที่ใช้ในการงานวิจัย

ถั่วเขียว สายพันธุ์ชัชนาท 72 (*Vigna radiata* (L.) Wilczek Chai Nat 72) ได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัชนาท และ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) ได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์จาก ศ. ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

### 2. สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อจากบริษัท Ameresco (USA), Amersham Pharmacia Biotech (UK), APS Finechem (Australia), Becton Dickinson (USA), Fluka (Switzerland), FMC bioproduct (USA), Himedia (India), Hispanlab (Spain), Qiagen (Germany), 25 Macherey-Nagel (Germany), Merck (Germany), Promega (USA), Scharlau (Spain), Sigma (Germany) ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb DNA Ladder) Fermentas (USA) เอนไซม์ตัดจำเพาะจากบริษัท Fermentas (USA) เอนไซม์ RNase A จากบริษัท Fermentas (USA) และ AppliChem (Germany) เอนไซม์ T4 DNA ligase จากบริษัท Fermentas (USA) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากบริษัท Fermentas (USA) เอนไซม์ ชุด kit และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานทางพันธุวิศวกรรมจากบริษัท GeneAid (Taiwan), G-biosciences (USA) และชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Phusion (Finland)

### 3. วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับแอคติโนมัยสียเอนโดไฟต์

วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับแอคติโนมัยสียเอนโดไฟต์ใช้ตามวิธีการของ Kieser *et al.* (2000)

#### 3.1 อาหารและสภาวะที่ใช้เลี้ยง

การเลี้ยงแอคติโนมัยสียเอนโดไฟต์บนอาหารแข็งทำโดยใช้เข็มเย็บเชื้อ (loop) ที่ปลอดเชื้อเย็บสปอร์จาก stock culture มาเกลี่ยบนจานอาหารแข็ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน อาหารแข็งที่ใช้ได้แก่ อาหาร mannitol soya (MS; 1 L: 20 g mannitol, 20 g soya flour, 20 g agar; Hobbs *et al.*, 1989) tryptone soya gar (TSA) ISP medium No.3 [1 L: 20 g oat meal, 18 g agar, 1 ml (trace salt solution; 0.1g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.1g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); pH 7](Shirling and Gottlieb, 1966)

การเลี้ยงแอคติโนมัยสียเอนโดไฟต์ ในอาหารเหลวเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีขวดลดสปริงวนรอบกันขวด เขย่า 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยใส่เชื้อตั้งต้นลงในอาหารเหลวในอัตราส่วน 2.5:100 อาหารเหลวที่ใช้ได้แก่ tryptone soya broth (TSB; Merck) และ Yest malt extract (YM; 4.0 g yeast extract, 10 g malt extract, 4.0 g dextrose) การเลี้ยงแอคติโนมัยสียเอนโดไฟต์ที่สามารถด้านทานยาปฏิชีวนะทำได้โดยเติมยาปฏิชีวนะความเข้มข้นที่เหมาะสมในอาหาร ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยง *Streptomyces* และ *E. coli*

| Antibiotic stock solution<br>(mg/ml) | Final concentration in media (µg/ml) |       |                   |                |       |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-------|-------------------|----------------|-------|
|                                      | Actinomycete                         |       |                   | <i>E. coli</i> |       |
|                                      | Agar                                 | Broth | Overlay(µg/plate) | Agar           | Broth |
| Ampicillin (100)                     | -                                    | -     | -                 | 100            | 50    |
| Apramycin (50)                       | 100                                  | 50    | 100 (2000)        | 100            | 50    |
| Chloramphenicol (200)                | -                                    | -     | -                 | 50             | 25    |
| Kanamycin (50)                       | -                                    | -     | -                 | 50             | 25    |
| Nalidixic acid (25)                  | 50                                   | -     | 25 (500)          | -              | -     |
| Thiostrepton (50 in DMSO)            | 50                                   | 5     | 50 (1000)         | -              | -     |

### 3.2 การเก็บสปอร์ของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์

เก็บสปอร์จากเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เป็นเวลาประมาณ 5 วัน โดยเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารแข็ง แล้วใช้ไม้ปั่นสำลีสปอร์บนผิวอาหารให้หลุดออกเบาๆ จากนั้นดูดสารละลายสปอร์ลงในหลอดฉีดยาที่มีสำลี เพื่อกรองเส้นใยออก นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-5 นาที เทสารละลายทิ้ง แวนลอสสปอร์ในกริเซอร์อลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

### 3.3 การเก็บรักษาเชื้อ

เก็บรักษาเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 5-7 วัน โดยเก็บในกริเซอร์อลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

### 3.4 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยชุดไมซีเลียมประมาณ 50 ไมโครกรัม มาใส่หลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Kieser *et al.* (2000) โดยบ่มไมซีเลียมใน lysozyme solution 500 ไมโครลิตร (10 µg/µl lysozyme, 0.3 M sucrose, 25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8.0, 50 µg/ml RNase A) ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจาย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง โดยใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงระหว่างบ่ม 2-3 ครั้ง จากนั้นเติม 2 % sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้ของเหลวผสมกันทันที เติมสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแบบ vortex นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนถ่ายลงสู่หลอดใหม่ อาจทำซ้ำ 2-3 ครั้ง ถ้ามีตะกอนโปรตีนระหว่างชั้นมาก) เติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลาย เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่า ผสมโดยพลิกหลอดไปมาเบาๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายออก แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดูดสารละลายออกให้หมด ทิ้งให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ้าต้องการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานจะเก็บที่ 20 องศาเซลเซียส

#### 4. วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *E. coli*

วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *E. coli* ใช้ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)

##### 4.1 อาหารและสภาวะที่ใช้เลี้ยง

การเลี้ยง *E. coli* บนจานอาหารแข็ง ทำได้โดยเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LA; 1L: 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 15 g agar, pH 7.2) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน

การเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเติมเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว อัตราส่วน 1:100 โดยใช้อาหารเหลว (สูตรเหมือน LA แต่ไม่เติมน้ำ) นำไปเขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืนในกรณีที่ต้องการคัดเลือกยีนด้านทานยาจะเติมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมในอาหารให้มีความเข้มข้นดัง (ตารางที่ 3)

## 4.2 การสกัดพลาสมิด

ใช้วิธี alkaline lysis (Sambrook และ Russel, 2001) โดยนำเชื้อ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหาร LB เป็นเวลาข้ามคืน ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครพิพม์ ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเก็บเซลล์ เทอาหารทิ้ง จากนั้นแขวนลอยตะกอนใน Solution I [(50 mM glucose, 25mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8.0)] ที่เย็นจัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10-15 นาที เติม Solution II [0.2 NaOH, 1%(w/v) SDS] ที่เตรียมสำหรับใช้ทันที 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาทันที จนของเหลวผสมกันดี แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปเติม Solution III (5M potassium acetate, 100% glacial acetic acid) ที่เย็นจัด ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมทันทีแบบ vortex แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติม RNaseA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยง 12000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ เติมน้ำตาลละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่า ของสารละลายที่ดูดได้ ผสมแบบ vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมเอทานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ พลิกหลอดไปมาเบาๆ นำไปแช่ใน 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วย เอทานอล 70% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมด ทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง จึงละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตรตามความเหมาะสม เก็บรักษาไว้ที่ 20 องศาเซลเซียส

## 4.3 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์

ทำตามวิธีของ Chung *et al.* (1989) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนในอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส จนมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) เป็น 0.3-0.4 (ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) ถ่ายในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารทิ้งแล้วเติม transformation and storage solution [TSS; 10%(w/v) polyethylene glycol (PEG) MW = 8000, 5% dimethylsulphoxide (DMSO), 50 mM  $MgCl_2$ , ใน LB pH 6.5] ที่เย็นจัด ปริมาตร 5 มิลลิลิตรแขวนลอยเซลล์ในสารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์แล้วแขวนลอยเซลล์ใน TSS

ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แบ่งเก็บในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เย็น หลอดละ 100 ไมโครลิตร แช่หลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ถ้ายังไม่ใช้นำไปเก็บที่ 80 องศาเซลเซียส

#### 4.4 การทรานสฟอร์ม (transformation)

ใช้วิธี heat-shock (Sambrook and Russell, 2001) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ 100 ไมโครลิตรมาเติม พลาสมิด 1-10 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ผสมเบาๆ ทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำกลับไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที เติมหอาหาร LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วบ่มแบบเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จึงแบ่งเซลล์ 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยลงอาหาร LA ที่มียาปฏิชีวนะตามความเหมาะสมดังตารางที่ 3 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีที่เจริญไปตรวจสอบการได้รับพลาสมิดต่อไป

### 5. เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

#### 5.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6x loading buffer [0.25% (w/v) bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol, 30% glycerol] ในอัตราส่วน 5:1 แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน [1 Kb DNA Ladder Mix จาก Fermentus (USA)] โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 0.8 % ในบัฟเฟอร์ 0.5x TAE (40mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการย้อมในเอซีเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอและถ่ายภาพภายใต้แสง UV

#### 5.2 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลและการทำสารละลายดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

ใช้ชุดสกัด GeneAid Gel/PCR DNA fragments extraction (GeneAid, Taiwan) ทำตามขั้นตอนในคู่มือ โดยตัดอะกาโรสเจลในตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติบบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-15 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด โดยต้องพลิกหลอดเป็นครั้งคราว (ในกรณีการทำสารละลายดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เติบบัฟเฟอร์ DF ลงไป 5 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอโดยไม่ต้องนำ

ไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส) ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน DF column ที่วางอยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวใน collection tube ที่เติมบัฟเฟอร์ washing ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวใน collection tube ที่ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาทีเพื่อกำจัดของเหลวทั้งหมด จากนั้นย้าย DF column ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติimbuffer Elution หรือน้ำกลั่น ปริมาตร 15-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ 20 องศาเซลเซียส

### 5.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

การทำ PCR ใช้ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม และไพรเมอร์อย่างละ 10 พิโคโมล (ตารางที่ 4) ในปฏิกิริยาที่มี 10X PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 5% DMSO, 0.5 unit *Taq* DNA polymerase ในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะดังนี้

|             |    |                                       |           |
|-------------|----|---------------------------------------|-----------|
| รอบที่ 1    | 95 | องศาเซลเซียส                          | 3 นาที    |
| รอบที่ 2-29 | 95 | องศาเซลเซียส                          | 30 วินาที |
|             |    | อุณหภูมิ annealing ตามชนิดของไพรเมอร์ | 30 วินาที |
|             | 72 | องศาเซลเซียส                          | 1 นาที    |
| รอบที่ 30   | 95 | องศาเซลเซียส                          | 30 วินาที |
|             |    | อุณหภูมิ annealing ตามชนิดของไพรเมอร์ | 30 วินาที |
|             | 72 | องศาเซลเซียส                          | 4 นาที    |

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

| ไพรเมอร์                             | ยีน                    | Ta (°C) | เอกสารอ้างอิง                             |
|--------------------------------------|------------------------|---------|-------------------------------------------|
| Apr C-1 5' GACGTCGCGGTGAGTTCAGGC 3'  | Apr <sup>r</sup>       | 65      | Choi <i>et al.</i> (2004)                 |
| Apr N-2 5' CCCC GGCGGTGTGCT 3'       |                        |         |                                           |
| ATT012 5' TGA CTGAGTTGGACACCATCGC 3' | Thio <sup>r</sup>      | 58      | Phornphisutthimas<br><i>et al.</i> (2010) |
| ATT013 5' CCTGTCGATCCTCTCGTG CAG 3'  |                        |         |                                           |
| STR1F 5' TCACGGAGAGTTTGATCCTG 3'     | 16SrDNA                | 55      | Kataoka <i>et al.</i><br>(1997)           |
| 1530R 5' AAGGAGATCCAGCCGCA 3'        |                        |         |                                           |
| ATT026 5' TGGACTACCAGGGTATCTAATC 3'  | Internal<br>Sequence   |         | Tajima <i>et al.</i><br>(2001)            |
| 926F 5' AA ACTCAAAGGAATTGACGG 3'     |                        |         |                                           |
| ATT083F 5'-TGCTTCGTCGCCAACAACGG 3'   | 16SrDNA<br><i>desD</i> | 68      | งานวิจัยนี้                               |
| ATT083R 5'-CTGGAGCCGGTTGAGGCAGGA 3'  |                        |         |                                           |

หมายเหตุ S= G/C; W= A/T; Y= C/T;

#### 5.4 การตัดดีเอ็นเอ

การตัดดีเอ็นเอพลาสมิดใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม โดยเตรียมส่วนผสมตามคู่มือ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 3 ชั่วโมง จากนั้นทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 5.1 และสกัดดีเอ็นเอขึ้นที่ต้องการจากอะกาโรสเจลตามวิธีในข้อ 5.2

### 5.5 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเพื่อให้ได้พลาสมิดสายผสมจะนำสารละลายดีเอ็นเอเชื่อมต่อโดยใช้อัตราส่วนระหว่างชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิดเท่ากับ 3:1 ทำปฏิกิริยาร่วมกับเอนไซม์ T4 DNA ligase 5 ยูนิต และ 10x T4 DNA ligation buffer บ่มที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทรานฟอร์มเมชัน

### 5.6 การหาลำดับเบส

สกัดพลาสมิดหรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด GeneAid Gel/PCR DNA fragments extraction (GeneAid, Taiwan) ตามวิธีในข้อ 5.2 และส่งหาลำดับเบสที่ Macrogen (Korea)

### 5.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโน

การแปลรหัสลำดับเบสเป็นลำดับกรดอะมิโนใช้โปรแกรม ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>) และ Six-Frame Translation (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/sixframe.html>) BCM Search Launcher แปลี่ยนลำดับเบสเป็นสายคู่สมโดยโปรแกรม Reverse Complement (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/util/Options/revcomp.html>) การค้นหาลำดับที่มีความคล้ายกันในฐานะข้อมูลใช้โปรแกรม blast (Altschul *et al.*, 2005) เปรียบเทียบลำดับเบสหรือกรดอะมิโนด้วยวิธี multiple sequence alignment และ โปรแกรม ClustalW 1.81 (Thomson *et al.*, 1994) การหาตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับเบสอาศัยโปรแกรม NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003) การรวมลำดับเบสอาศัยโปรแกรม CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>)

## 5.8 การสร้าง phylogenetic tree

การสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) โดยคำนวณตามวิธี Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1986) ด้วยค่า bootstrap 1,000 ครั้ง

## 6. การตรวจสอบการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

### 6.1 การทดสอบการสร้างไซเดอร์โรฟอร์

มาทดสอบ Chrom azurol S (CAS) ตามวิธีการของ (Schwyn and Neilands, 1987) เตรียมสารละลาย CAS indicator โดยชั่ง CAS 60.5 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงไป และเติมสารละลายเหล็ก (100 ml; 27 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 83.3  $\mu\text{l}$ ) conc HCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติม Hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) 72.9 มิลลิกรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้เป็นสีน้ำเงิน จากนั้นเตรียมส่วนของ basal agar medium (88 ml: 3 g MOPS, 0.05 g NaCl, 0.03 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.01 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.05 g L-asparagine, 1.5 g agar, pH 6.8) นำ CAS indicator และ basal agar medium ไปนึ่งฆ่าเชื้อ เติมสารละลาย 50% กลูโคสลงในอาหาร basal agar medium 2 มิลลิลิตร CAS indicator ลงไป 10 มิลลิลิตร จะได้ เป็นอาหารทดสอบ Chrom azurol S agar

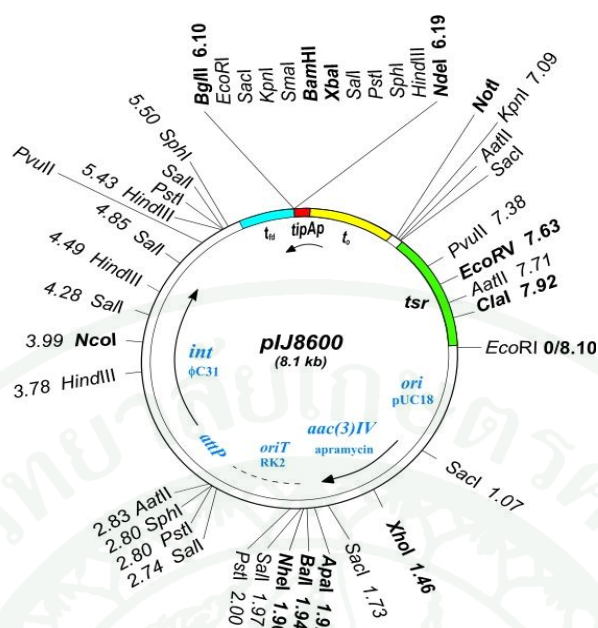
เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทอนโคไฟต์ บนอาหาร MS และ YM บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนเชื้อเจริญดี ใช้ cork ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเชื้อไปวางบน CAS agar บ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 วัน เชื้อที่สร้างไซเดอร์โรฟอร์จะให้วงสีส้มรอบ plug ในกรณี นำเชื้อมาเลี้ยง ในอาหาร TSB เขย่าที่ 180 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน จากนั้นนำเชื้อไปทดสอบกับสารละลาย CAS indicator สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีน้ำเงินเป็นสีส้ม และการตรวจสอบชนิดของไซเดอร์โรฟอร์โดยวิธี Csaky assay เป็นการตรวจวัดกลุ่ม hydroxamate โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนไปเป็น nitrite แล้วเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีชมพู (Csaky, 1948) วิธี Arnow assay: เป็นการตรวจวัด catecholates โดยการเปลี่ยนสีเขียวเหลืองของสารละลายส่วนไฮ- ไปเป็นสีแดงเมื่อเติมกรดไฮโดรคลอริก และไนไตรท์โมลิบเดต เป็นต้น (Arnow, 1937)

## 6.2 การละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์บนอาหาร MS ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อเจริญดี นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง Pikovskaya (Pikovskaya.,1948) (1L; 10 g glucose, 5 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 0.5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 g, NaCl, 0.1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g KCl, 0.5 g yeast extract, 0.002 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.002  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 g agar, pH7; Gaur, 1990) เป็นเวลา 10 วัน โดยตรวจสอบวงไฮรอปโคโลนี

## 7. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่างแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์และ *E. coli* ET12567/pUZ8002

ศึกษาปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของการส่งถ่ายพลาสมิดในการเกิดคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่างแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์และ *E. coli* ET12567/pUZ8002 ซึ่งดัดแปลงวิธี การมาจาก Mazodier *et al.* (1989) และ Phonphisutthimas *et al.* (2010) โดยใช้พลาสมิด pIJ8600 (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แผนที่พลาสมิด pIJ8600 ที่ใช้สำหรับหาสถานะในการทำคอนจูกันต่างสกุล

ที่มา: Kieser *et al.* (2000)

### 7.1 การทดสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์

เลี้ยงแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์บนอาหารแข็ง MS ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จนเจริญดี แล้วจึงเชื้อโคลนของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ลงบนอาหารแข็ง MS ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ เพื่อเป็นตัวควบคุม และเลี้ยงลงบนอาหาร MS ที่เติมยาปฏิชีวนะ thiostrepton หรือ apramycin ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน สังเกตการเจริญของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์เปรียบเทียบกับตัวควบคุม

## 7.2 การคอนจูเกชันต่างสกุล

### 7.2.1 การเตรียม *E. coli* เซลล์ผู้ให้ (donor)

ถ่ายพลาสมิด pIJ8600 จาก *E. coli* ET12567/pUZ8002 โดยวิธีทรานส์ฟอร์เมชันตามข้อ 4.4 แล้วนำ *E. coli* ดังกล่าวเลี้ยงข้ามคืนในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ apramycin (คัดเลือก pIJ8600) kanamycin (คัดเลือก *Tn9* ที่ทำให้ *E. coli* มีจีโนมไทป์เป็น *dam*<sup>-</sup>) และ chloramphenicol (คัดเลือก pUZ8002) ความเข้มข้น ตามตารางที่ 3 เจือจางเซลล์ 1:100 ด้วยอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะเช่นเดิม แล้วเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิม จนมีค่าดูดแสงที่ OD<sub>600</sub> อยู่ระหว่าง 0.4-0.6 (ประมาณ 3 ชั่วโมง) นำเชื้อ 500 ไมโครลิตร ไปล้างด้วยอาหาร LB ปริมาตรเท่ากัน 2 ครั้ง ตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วกระจายเซลล์ในอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

### 7.2.2 การเตรียมแอกติโนมัยซีตเซลล์ผู้รับ (recipient)

ชุดสปอร์และเส้นใยของแอกติโนมัยซีตที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็ง TSA ลงในอาหารเหลว TSB ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ที่ใส่ขวดคลดสปริง เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อเป็นหัวเชื้อ จากนั้นจึงปลูกหัวเชื้อ ด้วยความเข้มข้นของหัวเชื้อ 10% v/v ลงในอาหารเหลว TSB ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ที่ใส่ขวดคลดสปริง เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 7.2.3 การทำคอนจูเกชันต่างสกุล

ผสมผู้ให้และผู้รับอย่างละ 500 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แวนล่อยตะกอนในอาหาร LB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ ตามความเหมาะสมด้วยอาหาร LB ก่อนเกลี่ยของผสมลงบนจานอาหารแข็ง ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อจานอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เททับจานอาหารที่บ่มแล้วด้วยสารละลาย 1 มิลลิลิตร ที่มี thiostrepton ปริมาณตามการศึกษาในข้อ 7.1 และ nalidixic acid 500 ไมโครกรัม เพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยซีตที่ได้รับพลาสมิดหรือเอกซ์คอนจูแกนต์ (exconjugant) และกำจัด *E. coli* ตามลำดับ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ต่อไปอีก 2-3 สัปดาห์ เชื้อโคโลนีของเชื้อเจริญไปเขียนลงบนอาหารแข็ง MS ที่มียาปฏิชีวนะ thiostrepton และ nalidixic acid ความเข้มข้นตามตารางที่ 3 ซ้ำอีก 4-

5 รอบ เพื่อยืนยันผลการต้านยาปฏิชีวนะจากพลาสมิดที่ได้รับรวมทั้งกำจัด *E. coli* ที่อาจหลงเหลืออยู่

### 7.3 การศึกษาผลของอายุของเส้นใย

ทำคอนจูเกชันตามวิธีการในข้อ 7.2 ศึกษาผลของอายุของเส้นใยที่ใช้ต่อประสิทธิภาพของคอนจูเกชัน โดยใช้เส้นใยของแอกติโนมัยซีที่อายุ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเกลี่ยลงบนอาหาร MS และ ISP4 ที่มี  $MgCl_2$  10 มิลลิโมลาร์ (Foulston and Bibb, 2010)

### 7.4 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนส์

สกัดจีโนมดีเอ็นเอของเอกซ์คอนจูแกนส์ตามวิธีการในข้อ 3.3 แล้วนำมาเพิ่มปริมาณยีนต้านยาปฏิชีวนะthiostrepton เพื่อพิสูจน์สายพันธุ์กลาย โดยใช้ไพรเมอร์ ATT012 กับ ATT013 และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติ

### 7.5 การคำนวณหาประสิทธิภาพของการเกิดคอนจูเกชัน

คำนวณจากอัตราส่วนของจำนวนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดกับจำนวนเซลล์ที่ใช้ทั้งหมดที่เจริญจากการเจือจางเส้นใยที่ใช้ในการทำคอนจูเกชันบนอาหารแข็งที่มี  $MgCl_2$  เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยนับโคโลนีเอกซ์คอนจูแกนส์ และจำนวนเซลล์ที่ใช้ทั้งหมดคำนวณได้จากการนับจำนวนโคโลนี ที่ได้มาคำนวณตามสูตรประสิทธิภาพการเกิดคอนจูเกชัน คือ จำนวนโคโลนีเอกซ์คอนจูแกนส์หารด้วย จำนวนโคโลนีเซลล์ผู้รับจำนวนเซลล์ที่ใช้ทั้งหมดคำนวณ

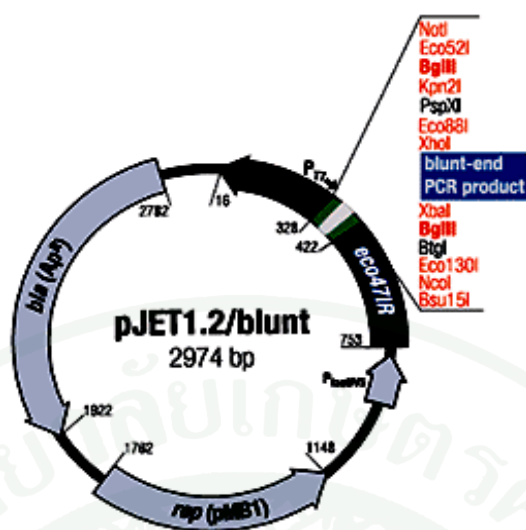
## 8. การศึกษายีน *desD* จาก *Streptomyces*

### 8.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์จากยีน *desD* โดยการนำลำดับกรดอะมิโน DesD แอคติโนมัยซีตสกุล *Streptomyces* จากฐานข้อมูล GenBank มาทำ multiple alignment และเลือกบริเวณอนุรักษ์มาออกแบบไพรเมอร์

### 8.2 การโคลนยีน *desD*

เพิ่มปริมาณยีน *desD* โดยการทำพีซีอาร์ตามวิธีการในข้อ 5.3 ด้วยไพรเมอร์ ATT083F และ ATT083R ที่ออกแบบ (ดูผลการทดลอง) และนำไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีในข้อ 5.1 จากนั้นโคลนยีนจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เข้าสู่พลาสมิด pJET1.2/blunt และทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* XL1-blue ตามวิธีในข้อ 4.4 ตรวจสอบโคลนที่ได้โดยการสกัดพลาสมิดตามวิธีในข้อ 4.2 และตรวจสอบโคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม จากนั้นแยกขนาดด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อได้โคลนที่ต้องการ นำโคลนนั้นไปหาลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสกับยีน *desD* ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 พลาสมิด pJET1.2/blunt

ที่มา: Fermentas (USA)

### 8.3 การสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อทำยีนดิสรัปชัน

หลังจากโคลนยีน *desD* เข้าพลาสมิด pJET1.2/blunt แล้วย้ายยีนดิสรัปชันเข้าสู่พลาสมิด pIJ8671 (Sun *et al.*, 1999) (ภาพที่ 5) ซึ่งเป็นพลาสมิดแบบ conjugative ได้พลาสมิดเป็น pIJ8671/*desD* แล้วทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* ET12567/pUZ8002 สำหรับทำคอนจูกันชันต่างสกุล

## 9. การสร้างสายพันธุ์กลายที่ไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ด้วยการทำยีนดิสรัปชันของยีน *desD*

### 9.1 การทำยีนดิสรัปชัน

ถ่ายพลาสมิด pIJ8671/*desD* เข้าสู่ แอคติโนมัยซีทเอนโคไฟต์โดยวิธีคอนจูกันชันต่างสกุลโดยใช้ *E. coli* ET1256 (pUZ8002)/ pIJ8671/*desD* ที่มีพลาสมิดสายผสมเป็นผู้ให้และสายพันธุ์แอคติโนมัยซีทเอนโคไฟต์เป็นผู้รับ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมคัดเลือกสายพันธุ์กลายด้วยการต้านยา thiostrepton

## 9.2 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วยวิธีพีซีอาร์

นำสายพันธุ์กลายที่ได้จากข้อ 9.1 ไปสกัดดีเอ็นเอตามข้อ 3.3 และ ตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณยีนต้านยาปฏิชีวนะ thiostrepton และยีน *desD* โดยใช้ไพรเมอร์ ATT012 กับ AprN-2, ATT012 กับ ATT013 และ ATT083FกับATT083R เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติ และ พลาสมิด pIJ8671 เพื่อยืนยันการส่งถ่ายพลาสมิดและการเกิด homologous recombination ของพลาสมิดที่แทรกเข้าไปในโครโมโซมของสายพันธุ์กลาย โดยการทำ PCR ใช้ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม และไพรเมอร์อย่างละ 10 พิโคโมล ในปฏิกิริยาที่มี 5X PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 2% DMSO, 1 unit DNA polymerase ในปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะดังนี้

|             |      |              |           |
|-------------|------|--------------|-----------|
| รอบที่ 1    | 98   | องศาเซลเซียส | 3 นาที    |
| รอบที่ 2-29 | 98   | องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
|             | 69.3 | องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
|             | 72   | องศาเซลเซียส | 3 นาที    |
| รอบที่ 30   | 98   | องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
|             | 69.3 | องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
|             | 72   | องศาเซลเซียส | 5 นาที    |

## 9.3 การตรวจสอบการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ของสายพันธุ์กลาย

นำสายพันธุ์กลายที่ได้จากข้อ 9.1 ไปเลี้ยงบนอาหาร MS และ YM เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการทดสอบความสามารถในการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ตามข้อ 6.1

## 9.4 การตรวจสอบการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ของสายพันธุ์กลายด้วยวิธี (HPLC)

เลี้ยง *Streptomyces* และสายพันธุ์กลายลงในอาหาร YM เป็นเวลา 7 วัน แล้วย้ายลงไปเลี้ยงในอาหาร ILMM (iron-limited minimal medium ; ที่มีการเติม 0.1 %CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O, 2.5 g/l glucose 0.05 g/l yeast extract ปริมาตร 200 มิลลิลิตร) (Muller and Raymond., 1984) เขย่าที่ 250 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในที่มีด จากนั้นนำน้ำเลี้ยง นำมากรอง แล้วนำไป freeze-dried ให้ได้เป็นผง แล้วละลายกลับด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร แยกส่วนที่ไม่ละลายออกด้วยวิธีการปั่นตกตะกอน ที่ 12,000 รอบต่อนาที หลังจากนั้นกรองผ่านเมมเบรน

ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงฉีดเข้าเครื่อง HPLC และวิเคราะห์ด้วย HPLC ปริมาตร 50  $\mu$ l โดยใช้ คอลัมน์ ChromSep 5 C18 250x4.6 mm, reverse-phase silica gel column มีอัตราการไหลที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวทำละลายเป็น 0.1% formic acid และ methanol ตรวจสอบไฮดรอกซีโรฟอร์ที่ ความยาวคลื่น 435 นาโนเมตร เปรียบเทียบระหว่าง สายพันธุ์ปกติกับสายพันธุ์กลาย โดยเทียบกับ กับสารละลาย deferoxamine mesylate salt ที่ความเข้มข้น 2,500 ppm (Tunca *et al.*, 2006)

## 10. การศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญในพืช

การทดลองนี้จะศึกษาผลของไฮดรอกซีโรฟอร์ ในสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลาย ที่มีผล การสนับสนุนการเจริญของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ ถั่วเขียวพันธุ์ ชัยนาท 72 มีวิธีการดังนี้

### 10.1 การฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดพืช

แช่เมล็ดข้าวในน้ำก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเมล็ดข้าวและเมล็ดถั่ว นำมาล้างด้วย เอทานอล 70 % พร้อมเขย่า เป็นเวลา 1 นาที แล้วตามด้วยสารละลาย 0.1 % sodium hypochlorite เป็น เวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 6 ครั้ง นำเมล็ดไปเพาะในขวดเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อที่มีพิษขูเปือก ปราศจากเชื้อ เพื่อทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และการปลูกเชื้อในชั้นต่อไป

### 10.2 การปลูกเชื้อ *Streptomyces*

นำเชื้อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลาย เลี้ยงลงในอาหาร MS เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น ทำเก็บสปอร์ตามข้อ 3.2 นำสารละลายสปอร์มาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่  $10^8$  สปอร์ จากนั้นนำเมล็ดที่ได้รับการฆ่าเชื้อแล้วตามข้อ 10.1 มาผสมกับสารละลายสปอร์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สำหรับการ ทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอก สำหรับการศึกษาศักยภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อพืช จะนำสารละลาย สปอร์ของสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลาย ใส่ลงไปในการเพาะเมล็ด TSB แล้วเลี้ยง *Streptomyces* ตามข้อ 3.1 จากนั้น นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดอายุ 2 วัน ตามข้อ 10.1 ตัดปลายรากของต้น อ่อนด้วยมีดปลอดเชื้อ (Musson *et al.*, 1995) แล้วจุ่มรากปลูกเชื้อที่มีความเข้มข้น  $10^6$  เซลล์ เป็น เวลา 4 ชั่วโมงก่อนนำไปทดสอบในชั้นตอนต่อไป

### 10.3 การทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพันธุ์

นำเมล็ดพันธุ์ข้าว และ ถั่วเขียว ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและปลูกเชื้อตามข้อ 10.1 และ 10.2 อย่างละ 50 เมล็ด มา เพาะในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีทึบชูเปียก ปราศจากเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยแบ่งการทดลอง เป็น 6 การทดลอง คือ

- (1) Control = เมล็ดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ
- (2) Control+ Fe = เมล็ดผสม 10  $\mu$ M ferric citrate
- (3) WT = เมล็ดที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ
- (4) WT+ Fe = เมล็ดที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติผสม 10  $\mu$ M ferric citrate
- (5) MT = เมล็ดที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์กลาย
- (6) MT+ Fe = เมล็ดที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายผสม 10  $\mu$ M ferric citrate

บ่มที่อุณหภูมิห้องในความมืดและนับจำนวนเมล็ดที่งอกของแต่ละวันแล้วนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การงอก พร้อมทั้งวัดความยาวรากและความยาวลำต้น

### 10.4 การทดสอบผลการส่งเสริมการเจริญของพืช

นำดินอ่อนของข้าวและถั่ว ที่ได้จากข้อ 10.2 ปลูกลงบนวัสดุปลูก vermiculite ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาปลูกในกระถางขนาด 6x6x5 นิ้ว กระถางละ 10 ต้น โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด

- (1) ชุดการทดลองที่รดด้วยสารละลาย Hoagland's solution ผสม 10  $\mu$ M ferric citrate
- (2) ชุดการทดลองที่รดด้วยสารละลาย Hoagland's solution ไม่ผสม 10  $\mu$ M ferric

citrate

โดยแต่ละชุดการทดลองมีการทดลองย่อย 6 ชุดดังต่อไปนี้

- (1) Control = ต้นอ่อนที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ
- (2) WT = ต้นอ่อนปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ
- (3) WT + DFO = ต้นอ่อนปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ 50  $\mu$ M Deferoxamine mesylate salt
- (4) MT = ต้นอ่อนที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์กลาย
- (5) MT + DFO = ต้นอ่อนปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายผสม 50  $\mu$ M Deferoxamine mesylate salt
- (6) DFO = ต้นอ่อนผสม 50  $\mu$ M Deferoxamine mesylate salt

ปลูกเชื้อในเรือนทดลอง รดน้ำในเวลาเย็นของทุกวันเก็บผลการทดลองที่ 14 วันสำหรับต้นข้าว และ เก็บผลการทดลองที่ 28 วันสำหรับต้นถั่ว

#### 10.5 การวิเคราะห์อัตราการเจริญของพืชโดยวิธีทางสถิติ

ตรวจวัดอัตราการเจริญของต้นถั่วเขียว และต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ โดยชั่งน้ำหนักแห้ง น้ำหนักสด วัดความยาว ของรากและลำต้น นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (version 11.5 ) โดยเลือกวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณแบบ One-way ANOVA ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 วิเคราะห์ผลความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยโดยเลือก แบบ Tukey

#### 10.6 การแยกแอกติโนมัยซีทเอนโดไฟต์จากตัวอย่างพืช หลังได้รับการปลูกเชื้อ

การแยกเอนโดไฟต์จากรากพืชตัดแปลงจากวิธีการของ Coombs and Franco (2003a) และวิธีการของ Indananda *et al.* (2010) โดยแช่รากในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่มี 0.1% Tween20 ในขวดรูปชมพู่ เขย่าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ราก และลำต้นใน เอธานอล 70% เขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายมาแช่ใน 1% NaOCl และ 0.1% Tween20 เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 15 นาที ล้างรากด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อที่มี 0.1% Tween20 3 ครั้ง นำน้ำล้างครั้งสุดท้ายมา 100 ไมโครลิตร เกลี่ยบนอาหาร starch casein agar (SCA, 1L: 10 g soluble starch, 0.3 g vitamin free casein, 2 g KNO<sub>3</sub>, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 g MgSO<sub>4</sub>, 0.02 g CaCO<sub>3</sub>, 0.01 g FeSO<sub>4</sub>, 15 g agar; Küster and Williams, 1964) ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร penicillin G 2.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร amphotericin B 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ cyclohexamide 50 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 1-2 สัปดาห์เพื่อทดสอบว่าไม่มีการปนเปื้อนที่ส่วนของรากและลำต้น

นำส่วนของรากและลำต้นมาตัดเป็นชิ้นยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร ใส่ลงในโถงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมสารละลาย  $\frac{1}{4}$  Ringer (0.9 % NaCl, 0.042 % KCl, 0.048 %  $\text{CaCl}_2$ , 0.02 %  $\text{NaHCO}_3$ ) 2-3 มิลลิลิตร บดรากด้วยโถงให้ส่วนรากแตก จากนั้นดูดส่วนของสารละลายดังกล่าวเกลี่ย บนอาหาร SCA ที่เติมยาปฏิชีวนะดังกล่าวข้างต้น บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 1-2 สัปดาห์ เก็บโคโลนีแอคติโนไมซีตที่เจริญขึ้นมาเลี้ยงบนอาหาร MS จนเชื้อบริสุทธิ์ ส่วนของรากและลำต้นที่ผ่านการบดแล้ว นำมาวางบนอาหาร SCA ที่เติมยาปฏิชีวนะดังกล่าวข้างต้น และบนอาหาร water agar (1.5% agar) ที่เติมยาปฏิชีวนะเช่นเดียวกับอาหาร SCA บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 1-2 สัปดาห์ เก็บโคโลนีแอคติโนไมซีตที่เจริญขึ้นมาเลี้ยงบนอาหาร MS จนเชื้อบริสุทธิ์ และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่ได้ เพื่อตรวจสอบกับลักษณะของเชื้อที่ปลูก

## 11. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ในระหว่างเดือนตุลาคม 2551- เมษายน 2555

## ผลและวิจารณ์

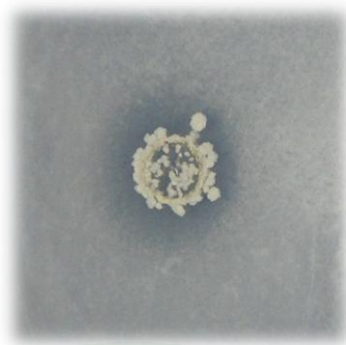
### 1. การศึกษาคุณสมบัติการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

นำแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์จาก GMKU (Genetic – Microbiology Kasetsart University) culture collection จำนวน 56 สายพันธุ์ได้แก่ GMKU 100, GMKU102, GMKU103, GMKU104, GMKU105, GMKU106, GMKU107, GMKU108, GMKU109, GMKU110, GMKU112, GMKU113, GMKU114, GMKU115, GMKU116, GMKU117, GMKU118, GMKU119, GMKU120, GMKU121, GMKU122, GMKU123, GMKU127, GMKU128, GMKU129, GMKU131, GMKU132, GMKU133, GMKU134, GMKU135, GMKU136, GMKU137, GMKU141, GMKU143, GMKU144, GMKU145, GMKU147, GMKU148, GMKU149, GMKU150, GMKU151, GMKU152, GMKU153, GMKU154, GMKU155, GMKU158, GMKU159, GMKU160, GMKU161, GMKU162, GMKU163, GMKU165, GMKU166, GMKU167, GMKU168, GMKU169 มาทดสอบการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoting) ได้แก่ ความสามารถในการละลายฟอสเฟต และการสร้างไซโตไคน์ได้ออกฤทธิ์ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

#### 1.1 การละลายฟอสเฟต

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักของพืช แต่พบว่าฟอสฟอรัสในดินส่วนใหญ่นั้นอยู่ในรูปสารประกอบธาตุอื่นๆ หรืออยู่ในรูปหินฟอสเฟต จึงทำให้พืชไม่สามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญได้ (Stewart *et al.*, 1980) ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถละลายฟอสเฟตให้เป็นฟอสฟอรัสได้จึงจัดเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช

ทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต โดยนำเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่เจริญบนอาหาร MS เป็นเวลา 5 วัน นำไปเลี้ยงในอาหาร TSB เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วนำมาทดสอบบนอาหารแข็ง Pikovskaya เป็นเวลา 14 วัน โดยตรวจสอบบริเวณวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ตัวอย่างการละลายฟอสเฟต โดยเกิดวงใส บนอาหาร Pikovskaya ของสายพันธุ์ GMKU

154

จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์ GMKU ทั้งหมด 56 สายพันธุ์ มีความสามารถละลายฟอสเฟตทั้งหมด 18 สายพันธุ์ โดยพบว่า 11 สายพันธุ์สามารถละลายฟอสเฟตได้ในปริมาณสูง โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสระหว่าง 1.50 - 2.00 เซนติเมตร (ให้สัญลักษณ์ +++ ) พบ 5 สายพันธุ์ที่ละลายฟอสเฟตได้ปานกลาง โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสระหว่าง 1.00 – 1.50 เซนติเมตร (ให้สัญลักษณ์ ++ ) มี 2 สายพันธุ์ที่ละลายฟอสเฟตได้น้อย โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส ระหว่าง 1.00 – 0.50 เซนติเมตร (ให้สัญลักษณ์ + ) ตัวอย่างสายพันธุ์ที่ละลายฟอสเฟตแสดงใน ตารางที่ 5

จากการศึกษาความสามารถละลายฟอสเฟตกลุ่มแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟท์ มีรายงานว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่ม *Streptomyces* โดยเฉพาะ *S. griseus* มีความสามารถละลายฟอสเฟตได้ในปริมาณสูง (Hamdali *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยัง พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ดี คือ *Bacillus* ที่สามารถละลายฟอสเฟตได้ ซึ่งนอกจากเชื้อ *B. cereus* และ *Enterobacter cancerogens* ที่แยกได้จากต้นถั่วแระ (Usha Rani *et al.*, 2012) ยังพบรายงานเชื้อ *Bacillus* อีกหลายชนิด ได้แก่ *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmis*, *B. licheniformis*, *B. mesentericus*, *B. mycoides*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. pulvifaciens* และ *B. subtilis* (Tilak *et al.*, 2005) ที่มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตทั้งในรูปของสารประกอบฟอสเฟตอนินทรีย์ หรือ หินฟอสเฟต เชื้อเหล่านี้สามารถแยกได้จากธรรมชาติ ทั้งจากดิน บริเวณรอบรากพืชหลายชนิด และหินฟอสเฟต เป็นต้น

ตารางที่ 5 ตัวอย่างสายพันธุ์ของแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟต์ GMKU ที่สามารถละลายฟอสเฟต

| สายพันธุ์ | การละลายฟอสเฟต |
|-----------|----------------|
| GMKU103   | +++            |
| GMKU115   | +              |
| GMKU117   | +              |
| GMKU121   | ++             |
| GMKU127   | +++            |
| GMKU128   | +++            |
| GMKU131   | +++            |
| GMKU136   | +++            |
| GMKU137   | +++            |
| GMKU145   | +++            |
| GMKU148   | ++             |
| GMKU151   | +++            |
| GMKU153   | +++            |
| GMKU154   | ++             |
| GMKU155   | ++             |
| GMKU159   | ++             |
| GMKU161   | +++            |
| GMKU168   | +++            |

## 1.2 ทดสอบการสร้างสารไซเดอร์โรฟอร์

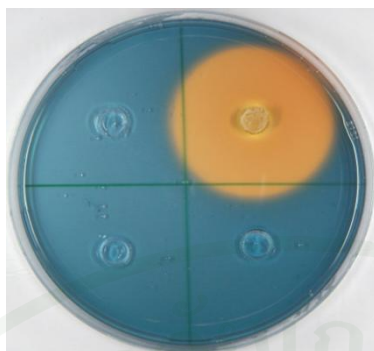
สารกลุ่มไซเดอร์โรฟอร์ เป็นสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ ที่ช่วยในการนำธาตุเหล็ก ( $\text{Fe}^{3+}$ ) เข้าสู่เซลล์ในสภาวะที่ขาดธาตุเหล็ก เนื่องจากเหล็กเป็นสารที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ และเป็น co-factor ของเอนไซม์ หลายชนิด (Neiland, 1995)

จากการศึกษาพบว่าแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟต์บางชนิดมีความสามารถในการสร้างสารกลุ่มไซเดอร์โรฟอร์ ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช ในการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์พืชโดยตรง และสามารถควบคุมโรคพืชได้ ดังนั้นจึงนำแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟต์มาทดสอบการสร้างไซเดอร์

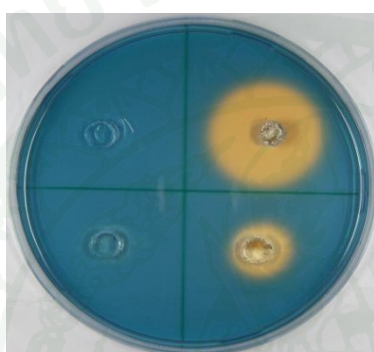
โรฟอ์บนอาหาร (CAS) agar รวมทั้งในอาหารเหลว ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอาหาร CAS จากสีน้ำเงินเป็นสีส้ม

เชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ GMKU ทั้งหมด 56 สายพันธุ์ พบว่า 9 สายพันธุ์สร้างไฮเดอร์โรฟอร์ได้ในปริมาณสูงโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีส้มมากกว่า 2.00 เซนติเมตร (ให้สัญลักษณ์ +++ ) ได้แก่ GMKU103, GMKU104, GMKU105, GMKU121, GMKU 123, GMKU152, GMKU161, GMKU163 และ GMKU169 พบ 13 สายพันธุ์ที่สร้างได้ในปริมาณปานกลางโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงสีส้ม ระหว่าง 1.50 – 2.00 เซนติเมตร (ให้สัญลักษณ์ ++ ) ได้แก่ GMKU100, GMKU102, GMKU106, GMKU107, GMKU108, GMKU112, GMKU141, GMKU147, GMKU153, GMKU154, GMKU159, GMKU162 และ GMKU168 มี 29 สายพันธุ์ที่สร้างได้ในปริมาณน้อยโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 1.00 – 1.50 เซนติเมตร (ให้สัญลักษณ์ + ) ได้แก่ GMKU110, GMKU113, GMKU115, GMKU116, GMKU117, GMKU118, GMKU119, GMKU120, GMKU122, GMKU127, GMKU129, GMKU131, GMKU132, GMKU 133, GMKU134, GMKU135, GMKU143, GMKU144, GMKU145, GMKU148, GMKU149, GMKU150, GMKU151, GMKU155, GMKU158, GMKU160, GMKU165, GMKU166 และ GMKU167 (ภาพที่ 9) พบ 5 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างไฮเดอร์โรฟอร์ ได้แก่ GMKU 109, GMKU114, GMKU128, GMKU136 และ GMKU137

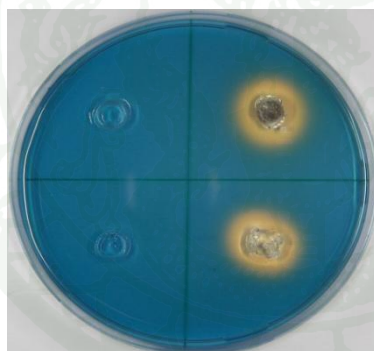
(ก)



(ข)



(ค)



ภาพที่ 9 ตัวอย่างสายพันธุ์ที่สร้างสารไซเดอร์โรเฟอร์ บนอาหารแข็ง และ อาหารเหลว Chrom azurol S

(ก) สายพันธุ์ GMKU 103 สามารถสร้างไซเดอร์โรเฟอร์ได้มาก (+++)

(ข) สายพันธุ์ GMKU 100 สามารถสร้างไซเดอร์โรเฟอร์ได้ปานกลาง (++)

(ค) สายพันธุ์ GMKU 154 สามารถสร้างไซเดอร์โรเฟอร์ได้น้อย (+)

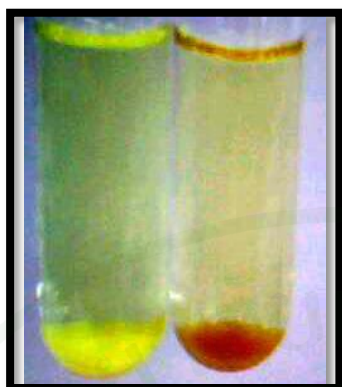
จากการศึกษาการสร้างไฮเดรอร์โรฟอร์ พบว่า แอคติโนมัยซีทเอนโคไฟด์ GMKU collection ส่วนใหญ่มีความสามารถสร้างไฮเดรอร์โรฟอร์ ได้ในปริมาณมาก โดยเฉพาะกลุ่ม *Streptomyces* ที่มีรายงานว่า *S. albovinaceus*, *S. caviscabies*, *S. griseus*, *S. setonii* และ *S. virginiae* ที่สามารถสร้างไฮเดรอร์โรฟอร์และสามารถยับยั้งการออกสปอร์ของเชื้อ *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* ที่เป็นสาเหตุเกิดโรคในต้นโกโก้ (Macagnan *et al.*, 2008 ) เช่นเดียวกับกลุ่มแบคทีเรียเอนโคไฟด์ ที่แยกได้มาจากต้นพริก และมะเขือเทศ พบว่า นอกจากจะสามารถสร้างไฮเดรอร์โรฟอร์ได้ ยังสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคพืช *Ralstonia solanacearum* และสามารถส่งเสริมการเจริญของต้นมะเขือเทศ และพริกเมื่อมีการปลูกในโรงเรือนได้ (Amaresan *et al.*, 2012)

### 1.3 การทดสอบชนิดของไฮเดรอร์โรฟอร์

ไฮเดรอร์โรฟอร์แบ่งเป็น 2 ชนิดตามโครงสร้างคือ แบบ hydroxamate และ catecholate การทดลองนี้จะตรวจหา ชนิดไฮเดรอร์โรฟอร์ที่แอคติโนมัยซีทเอนโคไฟด์สร้าง โดยนำสารละลายส่วนใส supernatant ซึ่งได้จากการแยกเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ มาตรวจสอบโดย วิธี Csaky assay สำหรับตรวจสอบชนิด hydroxamate และวิธี Arnow assay สำหรับตรวจสอบชนิด catecholate (ภาพที่ 10)

กลุ่มแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟด์ ที่มีการสร้างไฮเดรอร์โรฟอร์มาทั้งหมด 17 สายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบชนิดของไฮเดรอร์โรฟอร์ พบว่า 11 สายพันธุ์สามารถสร้างไฮเดรอร์โรฟอร์ที่มีโครงสร้างแบบ hydroxamate และพบสายพันธุ์ที่สร้างโครงสร้างแบบ catecholate ทั้งหมด 2 สายพันธุ์ ได้แก่ GMKU 152 และ GMKU154 โดยสายพันธุ์ GMKU152 มีความสามารถในการสร้างไฮเดรอร์โรฟอร์ได้ทั้ง 2 โครงสร้าง (ตารางที่ 6)

(ก)



(ข)



ภาพที่ 10 การทดสอบชนิดของไฮเดอร์โรฟอร์

- (ก) ทดสอบโครงสร้าง chetacolate ของสายพันธุ์ GMKU 152 ด้วยวิธี Arnow assay
- (ข) ทดสอบโครงสร้าง hydroxamate ของสายพันธุ์ GMKU 100 ด้วยวิธี Csaky assay

นอกจากนี้ยังได้มีการนำเชื้อ *Streptomyces* สายพันธุ์อื่นมาทดสอบการสร้างไฮเดอร์โรฟอร์ ได้แก่ *S. coelecolor* M145, *S. rimus* R7, *S. venezulae* และ *S. lividans* 1326 พบว่ามีสมบัติในการสร้างไฮเดอร์โรฟอร์ได้ดี เช่นเดียวกับที่มีรายงาน ว่า *S. coelecolor* A3(2), *S. lividans*, *S. viridosporus* และ *S. ambofaciens* มีความสามารถในการสร้างไฮเดอร์โรฟอร์ ชนิด coelichelin และ desferrioxamine ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้ว *S. coelecolor* และ *S. lividans* จะสร้างไฮเดอร์โรฟอร์ชนิด desferrioxamine ที่เป็นโครงสร้างแบบ hydroxamate (Imbert *et al.*, 1995; Challis and Ravel, 2000) นอกจากนี้พบว่า enterobactin เป็นไฮเดอร์โรฟอร์ชนิด catecholate จะสร้างจากเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และยังพบว่า เชื้อ *S. tendae* สามารถสร้างไฮเดอร์โรฟอร์ชนิดดังกล่าวได้ (Fiedler *et al.*, 2001)

ตารางที่ 6 ตัวอย่างการทดสอบชนิดของไซเคอร์โรฟอร์

| สายพันธุ์ | การสร้างไซเคอร์โรฟอร์ | Catechols | Hydroxamates |
|-----------|-----------------------|-----------|--------------|
| GMKU100   | ++                    | -         | +            |
| GMKU103   | +++                   | -         | +            |
| GMKU104   | +++                   | -         | +            |
| GMKU105   | +++                   | -         | +            |
| GMKU106   | ++                    | -         | +            |
| GMKU112   | ++                    | -         | +            |
| GMKU117   | +                     | -         | +            |
| GMKU121   | +++                   | -         | +            |
| GMKU123   | +++                   | -         | +            |
| GMKU131   | +                     | -         | +            |
| GMKU141   | ++                    | -         | +            |
| GMKU147   | ++                    | -         | +            |
| GMKU152   | +++                   | +         | +            |
| GMKU154   | ++                    | +         | -            |
| GMKU161   | +++                   | -         | +            |
| GMKU163   | +++                   | -         | +            |
| GMKU169   | +++                   | -         | +            |

#### 1.4 สมบัติการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ และ ละลายฟอสเฟต

สำหรับการสร้างไซเคอร์โรฟอร์และละลายฟอสเฟต เชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ 12 สายพันธุ์ สามารถสร้างทั้งไซเคอร์โรฟอร์และละลายฟอสเฟตได้ดี ได้แก่ GMKU103, GMKU115, GMKU121, GMKU145, GMKU148 GMKU151, GMKU153, GMKU154, GMKU155, GMKU159, GMKU161 และ GMKU168 มี 6 สายพันธุ์ที่ละลายฟอสเฟตได้ แต่สร้างไซเคอร์โรฟอร์ได้เล็กน้อย ได้แก่ GMKU117, GMKU127, GMKU128, GMKU131, GMKU136

และ GMKU137 พบว่า 36 สายพันธุ์ที่สร้างไซเคอร์โรเฟอร์ไม่ละลายฟอสเฟต ได้แก่ GMKU100, GMKU102, GMKU104, GMKU105, GMKU106, GMKU107, GMKU108, GMKU110, GMKU112, GMKU113, GMKU116, GMKU118, GMKU119, GMKU120, GMKU122, GMKU123, GMKU129, GMKU132, GMKU133, GMKU134, GMKU135, GMKU141, GMKU143, GMKU144, GMKU147, GMKU149, GMKU150, GMKU152, GMKU158, GMKU160, GMKU162, GMKU163, GMKU165, GMKU166, GMKU167 และ GMKU169 และ 2 สายพันธุ์คือ GMKU109 และ GMKU114 ไม่มีสมบัติทั้งสองชนิด โดยสรุปผลการทดลองทั้งหมดไว้ใน ตารางที่ 7

ตารางที่ 7 สมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยการสร้างไซเคอร์โรเฟอร์และการละลายฟอสเฟตของแอคติโนไมซีโทนาโคไฟต์

| การสร้างไซเคอร์โรเฟอร์ | การละลายฟอสเฟต | จำนวนสายพันธุ์<br>GMKU |
|------------------------|----------------|------------------------|
| +                      | +              | 12                     |
| +                      | -              | 39                     |
| -                      | +              | 6                      |
| -                      | -              | 2                      |

จากตารางที่ 7 แสดงถึงความสามารถของแอคติโนไมซีโทนาโคไฟต์ GMKU ทั้ง 56 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบการสร้างไซเคอร์โรเฟอร์บน CAS agar plate และ CAS solution พบว่าเชื้อ 51 สายพันธุ์มีการสร้างไซเคอร์โรเฟอร์ได้โดยคิดเป็นร้อยละ 91.07 มี 18 สายพันธุ์ที่สามารถละลายฟอสเฟต โดยคิดเป็นร้อยละ 32.14 ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถทั้งสองชนิดมีเพียง 2 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 3.57 จากการทดลองดังกล่าวพบว่าเชื้อ แอคติโนไมซีโทนาโคไฟต์ GMKU collection ส่วนมากมีความสามารถสร้างไซเคอร์โรเฟอร์ชนิด hydroxamate และ ความสามารถละลายฟอสเฟตได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการนำเชื้อกลุ่ม rhizobacteria มาทดสอบความสามารถสร้างไซเคอร์โรเฟอร์และละลายฟอสเฟต ที่พบว่า เชื้อส่วนใหญ่สร้างไซเคอร์โรเฟอร์ชนิด hydroxamate และสามารถละลายฟอสเฟตได้ในปริมาณมาก และพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของต้นถั่ว chickpea (Patel *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน เช่น *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Mesorhizobium* และ *Burkholderia* ที่มีความสามารถในการสร้างไซเคอร์โรเฟอร์ และ

ละลายฟอสเฟตได้ดี และยังสามารถสร้าง แอมโมเนีย และฮอร์โมนพืชเช่น IAA ที่จะสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ (Buyer and Sikora, 1990; Ahmad *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2010)

จากผลการทดลองนี้จะนำเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ GMKU collection ดังกล่าวที่มีความสามารถสร้างไซเดอร์โรฟอร์มาโคลนยีนและวิเคราะห์ยีน ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไซเดอร์โรฟอร์ต่อไป

## 2. การโคลนและการวิเคราะห์ยีน *desD* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซเดอร์โรฟอร์ จากแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์

นำเชื้อ GMKU 5 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างไซเดอร์โรฟอร์และมีโครงสร้างทางเคมีชนิด hydroxamate ได้แก่ GMKU100, GMKU121, GMKU152, GMKU163 และ GMKU169 มาวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไซเดอร์โรฟอร์โดยการโคลนยีนและสร้างสายพันธุ์กลาย

### 2.1 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *desD*

เนื่องจากวิธีการสังเคราะห์ไซเดอร์โรฟอร์ มีหลายวิธี และมีรายงานว่าในจุลินทรีย์แอคติโนมัยซีทได้แก่ *S. Coelicolor* และ *S. ambofaciens* และ *S. pilosus* มีการสร้างไซเดอร์โรฟอร์กลุ่ม hydroxamate ชนิดที่เรียกว่า desferrioxamine ที่ถูกถอดรหัสมาจากกลุ่มยีน *desABCD* (Barona-Gomez *et. al.*, 2004) โดยยีนที่เลือกนำมาศึกษาคือยีน *desD* กำหนดการสังเคราะห์โปรตีน DesD ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า Type C siderophore synthase ทำหน้าที่เชื่อมโครงสร้าง desferrioxamine เข้าด้วยกันให้เป็นวง (oligomerization) ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของวิธีการสังเคราะห์ไซเดอร์โรฟอร์ (Barry and Challis, 2009) ดังนั้น จึงออกแบบไพรเมอร์ยีน *desD* จากเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* โดยการนำลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลมาทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW1.82 แล้วเลือกบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) ที่ N-terminal คือ CFVANNG และที่ C-terminal คือ SCLNRLQ แล้วเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ codon usage ของ *S. coelicolor* พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์แบบ forward คือ ATT083F (5' TGCTTCGTCGCCAACAAC GG 3') และ แบบ reverse คือ ATT083R (5' CTG(G/C)AGCCG GTT(G/C)AGGCAGGA 3') (ภาพที่ 11)

(ก)

```

S.griseus      5' EVLPVYLEEISSTLAGTAYKLTKEPATSGQLVAAG-FQAIETGMTEGHPCFVANNGRIGF 3'
165
S.roseosporus EILPVYLEEISSTLAGTAYKLTKEPATSGQLVAAG-FQAVETGMTEGHPCFVANNGRLGF
95
S.albus        AILPVYLEEISSTLSGAANKLAQARPSAAELARAG-FQAIETGMTEGHPCFVANNGRIGF
179
S.coelicolor   EILPVYLEEISSTLSGTCYKLTQQLSSAELARSGDFQAVETGMTEGHPCFVANNGRLGF
168
S.avermitilis  EVLPVYLEEISSTLSGTCFKLTQIPVAELAEAG-FQAIETGMTEGHPCFVANNGRLGF
163
:*****:*:..*: : . :* :* :*****:

```

Consensus

C F V A N N G

Nucleotide (ATT083F)

5' TGC TTC GTC GCC AAC AAC GG 3'

(ข)

```

S.griseus      5' AACVRDYQESVPYLADKFRQYDLFEPEFALSCLNRLQLRDNQQMVLDNDPAGALQLVGRL 3'
585
S.roseosporus  AACVRDYQESVPYLAEKFAQYDLFEPEFALSCLNRLQLRDNQQMVLDNDPSGALQLVGRL
515
S.albus        AESVRAYQESMPQLADKFAQYDMFAPSFPILSCLNRLQLRNNQQMVLDADPSGALQLVGDL
599
S.coelicolor   AEVTREYQESVPYELADKFERYDMFAPEFALSCLNRLQLRDNQQMVLDADPSGALQLVGTL
588
S.avermitilis  AESVREYQESTPELADKFRQYDMFAPEFALSCLNRLQLRDNQQMVLDADPSGALQLVGNL
583
* . * * * * * * : * : * * * . * . * * * * * : * : * * * * * *

```

Consensus

S C L N R L Q

Nucleotide

5' TCC TGC CT(G/C) AAC CGG CT(C/G) CTG 3'

Reverse complement (ATT083R) 5' CTG (G/C)AG CCG GTT (G/C)AG GCA GGA3'

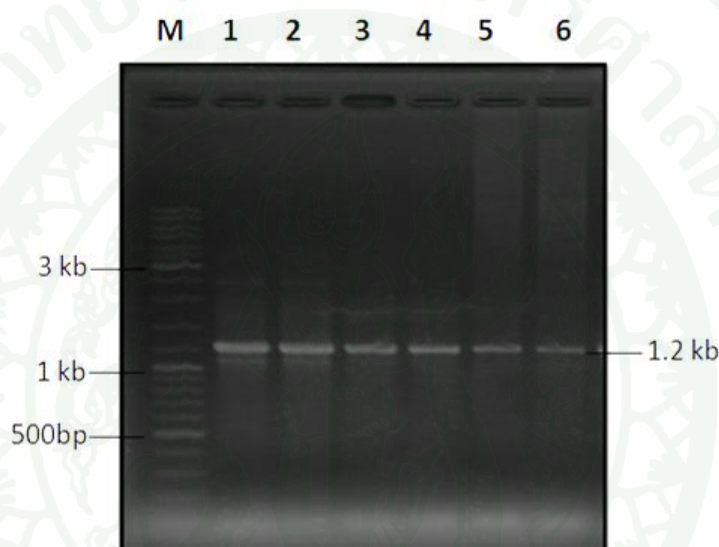
ภาพที่ 11 บริเวณอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนของยีน *desD* ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

(ก) บริเวณอนุรักษ์ที่ N-terminal

(ข) บริเวณอนุรักษ์ที่ C-terminal

## 2.2 การเพิ่มปริมาณยีน *desD* ด้วยวิธีพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณยีน *desD* จากโครโมโซมของ GMKU 100, GMKU 121, GMKU152, GMKU163, GMKU169 และ *S. coelicolor* โดยการทำพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ ATT083F และ ATT083R โดยใช้สภาวะตามข้อ 5.3 โดยทำพีซีอาร์แบบ gradient เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสม พบว่าได้อุณหภูมิที่เหมาะสม ที่ 68 องศาเซลเซียส โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส (ภาพที่12)



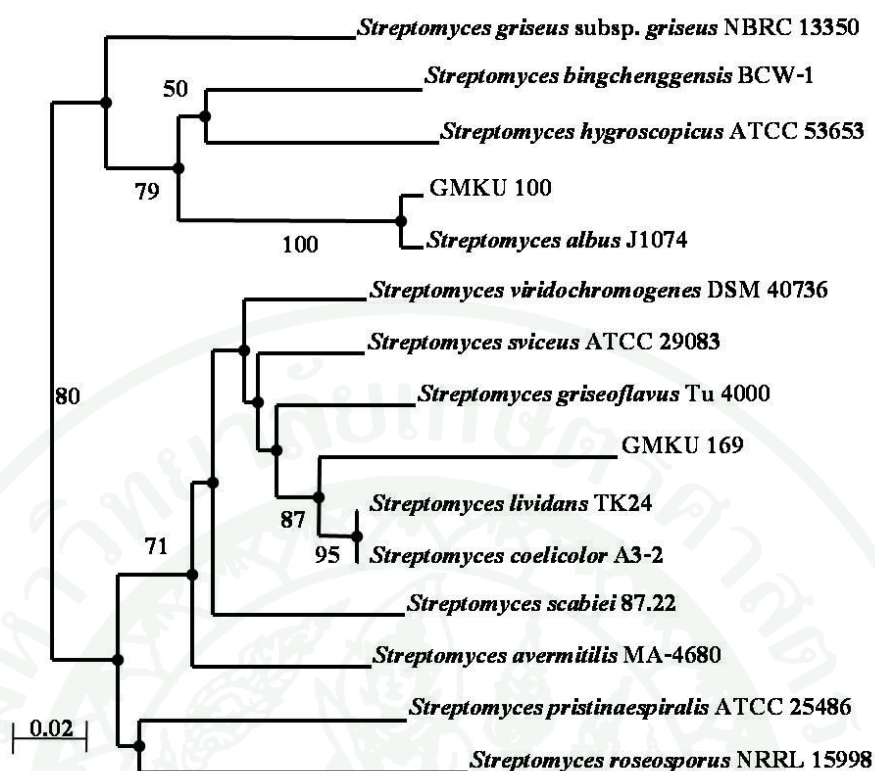
**ภาพที่ 12** การเพิ่มปริมาณยีน *desD* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ ATT083F และ ATT083R ที่อุณหภูมิ annealing 68 องศาเซลเซียส M = 1 kb DNA ladder, แถวที่ 1 – 6 = ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1.2 kb ของ *S. coelicolor* M145, GMKU100, GMKU121, GMKU152, GMKU163 และ GMKU169 ตามลำดับ

### 2.3 การวิเคราะห์ขั้นต้นที่ได้จากการทำพีซีอาร์

กลุ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากสายพันธุ์ GMKU100 และ GMKU169 ตัดออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีข้อ 5.2 จากนั้นส่งหาลำดับเบสด้วยไพโรเมออร์ ATT083F พบว่าสายพันธุ์ GMKU 100 ได้ลำดับเบสจำนวน 885 คู่เบส แปลเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 295 กรดอะมิโน เมื่อนำกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BlastP พบว่า มีความเหมือนกับโปรตีน DesD ของ *Streptomyces albus* J1074 ที่เปอร์เซ็นต์ความคล้าย 99% และเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 89% สายพันธุ์ GMKU 169 ได้ลำดับเบสจำนวน 590 คู่เบส แปลเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 194 กรดอะมิโน มีความเหมือน *S. lividans* TK24 และ *S. coelicolor* A3(2) เปอร์เซ็นต์ความคล้าย 87% และเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 81% (ตารางที่ 8) นำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับ DesD จาก *Streptomyces* จากฐานข้อมูล (ภาพที่ 13) พบว่า DesD ทั้งสองสายพันธุ์มีความใกล้ชิดกับ DesD จาก *Streptomyces* ในฐานข้อมูลสอดคล้องกับผลในตารางที่ 8

**ตารางที่ 8** เปรียบเทียบโปรตีน Type C siderophore synthetases (DesD) ของ GMKU 100 และ GMKU 169 กับ โปรตีน DesD ในฐานข้อมูล

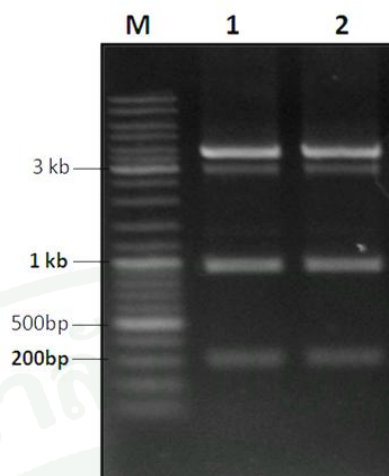
| GMKU | Strain                                       | Accession No. | Identity | Similarity |
|------|----------------------------------------------|---------------|----------|------------|
| 100  | <i>Streptomyces albus</i> J1074              | ZP_04702116   | 89%      | 98%        |
|      | <i>Streptomyces hygroscopicus</i> ATCC 53653 | ZP_05515379   | 80%      | 89%        |
|      | <i>Streptomyces bingchenggensis</i> BCW-1    | ADI09573      | 80%      | 89%        |
| 169  | <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)         | NP_627015     | 81%      | 87%        |
|      | <i>Streptomyces lividans</i> TK24            | ZP_06530853   | 81%      | 87%        |
|      | <i>Streptomyces griseoflavus</i> Tu400       | ZP_05541110   | 81%      | 83%        |



ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเปรียบเทียบ โปรตีน DesD จาก GMKU 100 และ GMKU 169 กับ *Streptomyces* สายพันธุ์อื่นในฐานข้อมูล

#### 2.4 การโคลนนิ่ง *desD* ในแอสดีโนมัยซีทเอนโดไฟต์

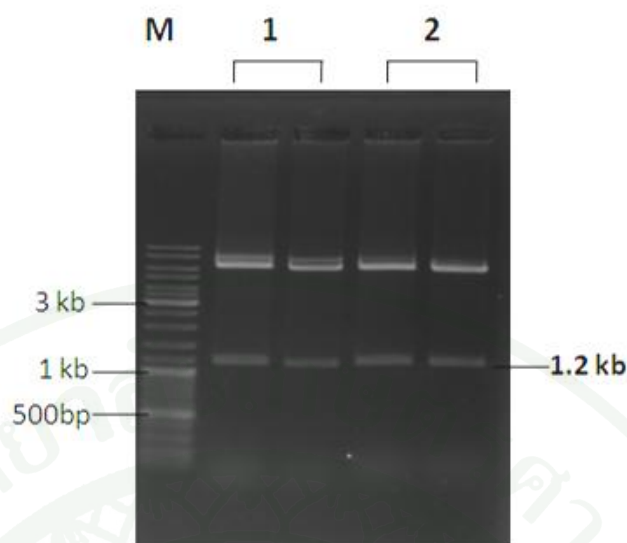
นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1.2 กิโลเบส จากข้อ 2.2 ของเชื้อ GMKU100 และ GMKU169 เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pJET1.2/blunt ได้เป็นพลาสมิด pJET/*desD* นำไปทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* XL1-Blue ตรวจสอบโคลนที่ได้ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*III และ *Xba*I แยกขนาดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าชิ้นยีนดีเอ็นเอที่โคลนได้ มีขนาด 1200 คู่เบส (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 ตรวจสอบโคลนพลาสมิด pJET/*desD* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และ *Xba*I แยกด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส M= 1 kb DNA ladder, แถวที่ 1-2 GMKU100 และ GMKU169

## 2.5 การสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อทำยีนดิสรัปชัน

การสร้างพลาสมิดสายผสมสำหรับทำยีนดิสรัปชัน นำพลาสมิด pJET/*desD* ของสายพันธุ์ GMKU 100 และ GMKU169 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และ *Xba*I นำชิ้นยีนที่ได้จากตัดทั้งหมดมาเชื่อมกับพลาสมิด pIJ8671 และนำไปทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* XL1-Blue คัดเลือกโคลน บนอาหาร LA ที่มียาปฏิชีวนะ apramycin โคลนที่ได้จะชื่อว่า pIJ8671/*desD* สุ่มโคลนที่ได้มาสกัดพลาสมิดเพื่อหาพลาสมิดสายผสมที่ได้รับยีน *desD* พบว่าได้พลาสมิด pIJ8671/*desD* ของสายพันธุ์ GMKU 100 และ GMKU 169 โดยสามารถตรวจสอบโคลนที่ได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Xba*I ได้ขนาด 1.2 กิโลเบส (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ตรวจสอบโคลนพลาสมิดสายผสม pIJ8671/*desD* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Xba*I แยกขนาดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส M = 1 kb DNA ladder, แถวที่ 1 = พลาสมิดสายผสมที่มียีน *desD* จาก GMKU100 และ แถวที่ 2 = พลาสมิดสายผสมที่มียีน *desD* จาก GMKU169

นำพลาสมิด pIJ8671/*desD* ของ GMKU 100 ที่ได้นั้นวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ไพโรเมอร์ ATT083 F พบตำแหน่งตัดเอนไซม์ *Bgl*II สองตำแหน่ง นำลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่า siderophore biosynthesis enzyme และเพื่อให้ทราบทิศทางการเข้าแทรกของยีนบนพลาสมิด pIJ8671 (ภาพที่ 16) จากนั้นนำโคลนที่ได้มาทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* ET12567/pUZ8600 เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนต่อไป

1: TCGCGAGTACCACAGTACGCCCCGAGACCGCTCCCCGGTCCGGCTGCT  
 1: R E Y H Q Y A P E T A S P V R L L  
  
 52: CTGGCTCGCCGCCCCGCGACCGCTCCACCTTCACCAGCGGCGCGGGCT  
 18: W L A A R R D R S T F T S G A G L  
  
 103: CGACTACGACACGCTGGTCAAGGGCGAGCTGGACCGGCGACGCTGGCCCC  
 35: D Y D T L V K G E L D P A T L A R  
  
 154: GTTCGCCGCCACCTGGCCGGCCAGGGGCTCGACCTGGCCGACTACCACCT  
 52: F A A T L A G Q G L D L A D Y H L  
  
 205: GCTGCCGGTCCACCCCTGGCAGTGGTGGAAACAAGCTCTCCGTCTCCTTCGC  
 69: L P V H P W Q W W N K L S V S F A  
  
 256: CGCCGAGGTGCGCCAGCAGCGCCTGGTCCTGCTCGGCGAGGGCGACGACGC  
 86: A E V A Q Q R L V L L G E G D D A  
  
 307: GTACCTCGCGCAGCAGTGCATCCGGACCTTCTTCAACACCAGCCACCCGA  
 103: Y L A Q Q S I R T F F N T S H P D  
  
 358: CAAGCACTACGTGAAGACCGGATGTCGGTGCTGAACATGGGCTTCATGCG  
 120: K H Y V K T A M S V L N M G F M R  
  
 409: GGGCCTGTGCGCCGCTACATGGAGGCCACCCGCGGATCAACGACTGGCT  
 137: G L S A A Y M E A T P A I N D W L  
  
 460: GGCCAGCTCATCGCCGGTGACGAGGTCTTCCGGGCGCGGCTTCTCGAT  
 154: A Q L I A G D E V F R A A R F S I  
  
 511: CATCCGCGAGCGCGCCCATCGGCTACCACCACCGCCAGTACGAGCGGGC  
 171: I R E R A A I G Y H H R Q Y E R A  
  
 562: CACCGACCGGTACTCGCCGTACCGCAAGATGCTGGCCGCGCTCTGGCGGGA  
 188: T D R Y S P Y R K M L A A L W R E  
  
 613: GAGCCCGGTGCGCGAGCTCGGCGAGGGACAGCGGCTGGCCACCATGGCCTC  
 205: S P V P Q L G E G Q R L A T M A S  
  
 664: GCTGCTCCACACCGACGCCGACGGCGCCTCGCTGGCGGGCGCGCTGATCGC  
 222: L L H T D A D G A S L A G A L I A  
  
 715: CGAGTCGGGGCTGGCACCCGAGGTGTGGCTGCGCCGCTACCTGGACGCCTA  
 239: E S G L A P E V W L R R Y L D A Y  
  
 766: CCTCGTGCCGGTGCTGCACTCCTTCTACCAGTACGACCTGGTGTACATGCC  
 256: L V P V L H S F Y Q Y D L V Y M P  
  
 817: GCACGGCGAGAACGTATCCTCGTCATCGAGGACGGCGCGGTGACCGGGT  
 273: H G E N V I L V I E D G A V D R V  
  
 868: GATCTTCAAGGACATCGC  
 290: I F K D I A

ภาพที่ 16 ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน *desD* ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 โดย  
 ใช้ไพรเมอร์ ATT083 F

### 3. การระบุชนิดของสายพันธุ์ GMKU 100 โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA

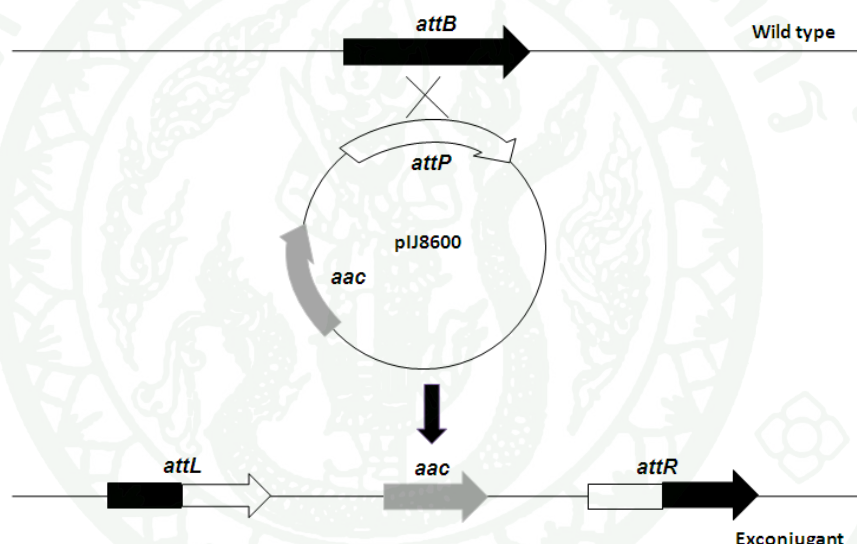
เมื่อนำสายพันธุ์ GMKU 100 มาเลี้ยงบนอาหาร MS เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีพบว่าการสร้างเส้นใยสีขาว และมีการสร้างสปอร์สีเหลืองอ่อน ไม่มีการสร้างรงควัตถุ (ภาพที่ 17) เมื่อนำจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวมาจัดจำแนกโดยหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ด้วยไพรเมอร์ STR1F, STR1530R, ATT025, ATT026 และ 926F (ตารางที่ 4) พบว่า ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1,506 คู่เบส (accession number JQ922248) เมื่อนำลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และ EzTaxon (Chun *et al.*, 2007) พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916<sup>T</sup> (accession number AB184243) และ *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455<sup>T</sup> (accession number Z76676) ร้อยละ 99.9



ภาพที่ 17 ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 บนอาหาร MS

#### 4. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดคอนจูกันข้ามสกุลของสายพันธุ์ GMKU 100 และ GMKU169

ศึกษาการนำพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces* sp. GMKU100 และ GMKU169 ด้วยวิธีการคอนจูกันระหว่าง *E. coli* ET12567 (pUZ8002) ซึ่งเป็นผู้ให้ และ *Streptomyces* เป็นผู้รับ (recipient) โดยใช้พลาสมิด pIJ8600 ซึ่งเป็นแบบพลาสมิด conjugative เป็นพลาสมิดทดสอบ พลาสมิดนี้จะถูกส่งเข้าสู่ *Streptomyces* และสอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมที่บริเวณ attachment site ระหว่าง *attP* ของพลาสมิดและ *attB* บนโครโมโซม ด้วยวิธี site-specific recombination (ภาพที่ 18) การทดลองนี้เพื่อหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการทำคอนจูกันข้ามสกุลเพื่อทำยีนดิสรัปชันต่อไป



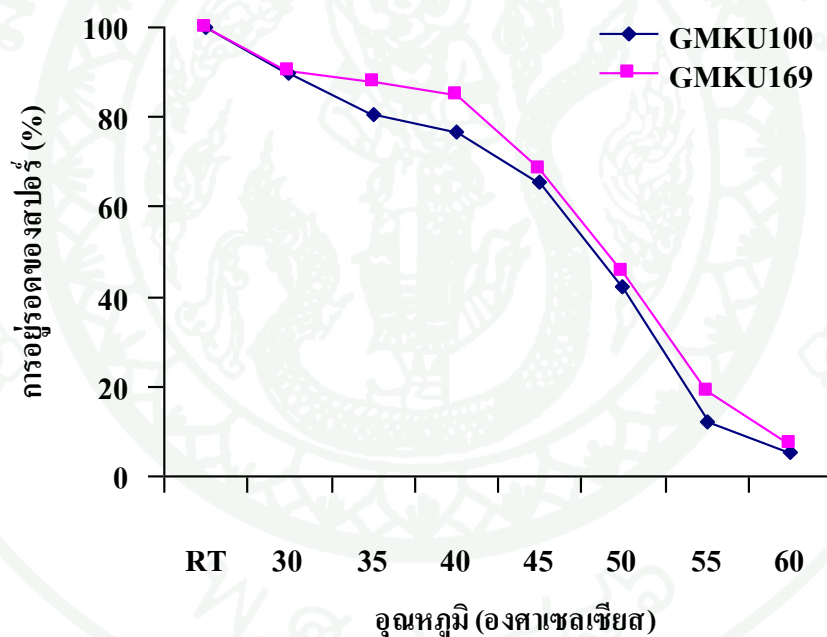
ภาพที่ 18 การแทรกตัวของพลาสมิด pIJ8600 เข้าไปในโครโมโซมของ *Streptomyces*

##### 4.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการงอกของสปอร์ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU169

การทำคอนจูกันข้ามสกุล จำเป็นต้องมีการศึกษาสถานะที่เหมาะสมซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญ ก่อนที่จะนำสปอร์ของ *Streptomyces* ผสมเข้ากับเซลล์ของ *E. coli* ET12567(pUZ8002/pIJ8600) โดยต้องกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ (pre-germination) โดยวิธีให้ความร้อน ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกล่าวคืออุณหภูมิที่พอเหมาะ โดยสปอร์ยังมีชีวิตอยู่ จากรายงานอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ของ *Streptomyces* โดยทั่วไป จะอยู่ที่ 50 องศา

เซลเซียส เช่น *S. lividans* (Mazodier *et al.*, 1989), *S. coelicolor* (Flett *et al.*, 1997) และ *S. peucetius* (Paranthaman and Dharmalingam, 2003) เป็นต้น

เมื่อศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU 169 ตามวิธีการในข้อ 7 บ่มสปอร์เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ แล้วหาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ พบว่าการงอกของสปอร์เริ่มลดลงโดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส *Streptomyces* sp. GMKU100 เหลือการงอกของสปอร์คิดเป็นร้อยละ 76.86 และ *Streptomyces* sp. GMKU169 เหลือการงอกของสปอร์คิดเป็นร้อยละ 84.7 (ภาพที่ 19) จากนั้นการงอกของสปอร์จะลดลงอย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 19 กราฟแสดงการงอกของสปอร์ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU 169 เมื่อบ่มสปอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นการงอกสปอร์ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU 169 อยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส โดยจากรายงานอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ของ *Streptomyces* โดยทั่วไปจะอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส แต่สำหรับ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU 169 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่าการงอกของสปอร์เป็น 42.29

และ 45.81 ตามลำดับ แสดงว่าสปอร์ไม่สามารถทนความร้อนได้ อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมจึงควรเป็นอุณหภูมิต่ำที่สุด และระยะเวลาสั้นที่สุดที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Kitani *et al.* (2000) พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่เริ่มทำให้การอยู่รอดของสปอร์ลดลงสามารถกระตุ้นการงอกของสปอร์ได้ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาใน *S. rimosus* R7 ซึ่งพบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการงอกของสปอร์คือ บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Phornphisutthimas *et al.*, 2010) ซึ่งเป็นสภาวะเช่นเดียวกับ *S. lavendulae* FRI-5 (Kitani *et al.*; 2000) แต่แตกต่างจากสภาวะที่ใช้สำหรับ *S. lividans* (Mazodier *et al.*, 1989) และ *S. coelicolor* (Kieser *et al.*, 2000) ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งการกระตุ้นการงอกของสปอร์ด้วยความร้อนนี้จะทำให้ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันต่างสกุลสูงขึ้น (Mazodier *et al.*, 1989)

#### 4.2 ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันต่างสกุล *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU169

จากการศึกษาความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ thiostrepton เพื่อใช้ในการคัดเลือกเอกซ์คอนจูแกนต์ เมื่อ *Streptomyces* รับพลาสมิด pIJ8600 ซึ่งจะใช้เป็นเวกเตอร์สำหรับการศึกษากการเกิดคอนจูเกชันต่างสกุล พบว่าปริมาณของยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้คัดเลือกเอกซ์คอนจูแกนต์ คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองนี้จะทำการคอนจูเกชันต่างสกุลโดยใช้ *E. coli* ET12567 (pUZ8002)/pIJ8600 เป็นผู้ให้ ตามวิธีในข้อ 7.2 โดยจะศึกษาสองสภาวะคือการใช้สปอร์และใช้ไมซีเลียมของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU169

##### 4.2.1 ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยใช้สปอร์ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU169 เป็นผู้รับ

เตรียมสปอร์ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU169 ความเข้มข้น  $10^9$ - $10^{10}$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง  $10^5$ - $10^6$  สปอร์ แล้วนำไปกระตุ้นการงอกของสปอร์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำคอนจูเกชัน นำไปเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง 4 ชนิด คือ MS, ISP2, ISP3 และ ISP4 ที่มี  $MgCl_2$  เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงราดทับด้วย thiostrepton 500 ไมโครกรัม และ

nalidixic acid 1000 ไมโครกรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นับโคโลนีของเอกซ์คอนจูแกนส์ที่ได้

จากการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพของการคอนจูแกนซ์ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 บนอาหาร MS และ ISP2 ที่มี  $MgCl_2$  10 มิลลิโมลาร์ ให้ประสิทธิภาพสูงสุดที่  $3.54 \times 10^{-4}$  และ  $3.66 \times 10^{-4}$  เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับ ตามลำดับ ส่วน *Streptomyces* sp. GMKU 169 ประสิทธิภาพของการคอนจูแกนซ์บนอาหาร MS และ ISP2 ที่มี  $MgCl_2$  10 มิลลิโมลาร์ ให้ประสิทธิภาพสูงสุดที่  $3.85 \times 10^{-5}$  และ  $2.20 \times 10^{-5}$  เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับ (ตารางที่ 9) พบว่า ประสิทธิภาพการคอนจูแกนซ์บนอาหาร MS และ ISP2 ดีกว่าบนอาหาร ISP3 และ ISP4 ที่มี  $MgCl_2$  10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งให้ประสิทธิภาพอยู่ในช่วง  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับแสดงว่า ISP3 และ ISP4 เป็นอาหารที่ไม่เหมาะสมในการเกิดคอนจูแกนซ์ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU169 กับ *E. coli* ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ รายงานพบว่าประสิทธิภาพการคอนจูแกนซ์บนอาหาร MS อยู่ในช่วง  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับ ผู้รับ (Kitani *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการส่งถ่ายพลาสมิด pIJ8600 เข้าสู่ *Streptomyces* sp. GMKU 100 นั้น มีค่าใกล้เคียงกับการเกิดคอนจูแกนซ์ของ *S. rimosus* R7 ที่ให้ประสิทธิภาพการเกิดคอนจูแกนซ์ได้ดีที่สุดบนอาหาร TSA (Oxiod) ซึ่งให้ประสิทธิภาพ  $4.21 \times 10^{-3}$  เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับ และบนอาหาร MS ซึ่งให้ประสิทธิภาพ  $3.86 \times 10^{-4}$  เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับ (Phornphisutthimas *et al.*, 2010)

**ตารางที่ 9** ประสิทธิภาพของการคอนจูแกนซ์โดยกระตุ้นการออกของสปอร์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

| สายพันธุ์<br>(ผู้รับ) | ประสิทธิภาพของการคอนจูแกนซ์ (เอกซ์คอนจูแกนส์ต่อผู้รับ) |                       |                       |                       |
|-----------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                       | MS+10mM $MgCl_2$                                       | ISP2+10mM $MgCl_2$    | ISP3+10mM $MgCl_2$    | ISP4+10mM $MgCl_2$    |
| GMKU100               | $3.54 \times 10^{-4}$                                  | $3.66 \times 10^{-4}$ | $1.21 \times 10^{-5}$ | $1.43 \times 10^{-5}$ |
| GMKU169               | $3.85 \times 10^{-5}$                                  | $2.20 \times 10^{-5}$ | $1.15 \times 10^{-6}$ | $1.60 \times 10^{-6}$ |

จากการศึกษาการคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *Streptomyces* sp. M095 ที่แยกจากทะเลความสามารถสร้าง holomycin กับ *E. coli* ET12567 (pUZ8002) เป็นผู้นำให้ประสิทธิภาพในการคอนจูเกชัน  $1.9 \times 10^{-4}$  เอกซ์จูแกนต์ต่อเซลล์ผู้รับ ซึ่งพลาสมิด pIJ8600 จะสามารถแทรกเข้าไปอยู่บนโครโมโซมของ *Streptomyces* sp. M095 โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะ หรือ การสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของการถ่ายยีนด้วยวิธีคอนจูเกชันโดยพบว่า สามารถถ่ายยีน allophycocyanin (*apc*) จาก *Anacystis nidulans* UTEX625 เข้า *Streptomyces* sp. M095 และมีการแสดงออกอย่างมีประสิทธิภาพ (Hou et al., 2006)

#### 4.2.2 ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยการใช้ไมซีเลียมของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 เป็นผู้รับ

จากผลประสิทธิภาพการคอนจูเกชันโดยใช้สปอร์ จึงเลือก *Streptomyces* sp. GMKU 100 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพในการคอนจูเกชันได้ดีกว่าสายพันธุ์ GMKU 169 มาทำการทดลองต่อ เลี้ยง *Streptomyces* sp. GMKU 100 โดยใส่สปอร์ลงในอาหารเหลว เป็นเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นของไมซีเลียมที่นำมาใช้เท่ากับ  $10^9$ - $10^{10}$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง  $10^5$ - $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรจากนั้นทำคอนจูเกชันกับ *E. coli* ET12567(pUZ8002)/pIJ8600 แล้วนำไปเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง MS และ ISP2 ที่มี  $MgCl_2$  10 มิลลิโมลาร์ พบว่าการทำคอนจูเกชันบนอาหาร MS ที่มี  $MgCl_2$  10 มิลลิโมลาร์ มีประสิทธิภาพการคอนจูเกชันได้ดีกว่าอาหาร ISP2 ที่มี 10 mM  $MgCl_2$  เล็กน้อย (ตารางที่ 10) โดยมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้ไมซีเลียมที่อายุ 24 ชั่วโมงที่  $4.55 \times 10^{-4}$  เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ ผลการทดลองสอดคล้องกับการพัฒนาส่งถ่ายพลาสมิดด้วยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุลในเชื้อ *S. rimosus* ที่มีความสามารถในการสร้าง rimocidin พบว่าประสิทธิภาพในการคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *S. rimosus* มีประสิทธิภาพสูงทั้งการคอนจูเกชันโดยใช้สปอร์ ที่ได้รับการกระตุ้นการงอกที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และไมซีเลียมอายุเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง (Phornphisutthimas et al., 2010)

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยใช้ไมซีเลียม ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100

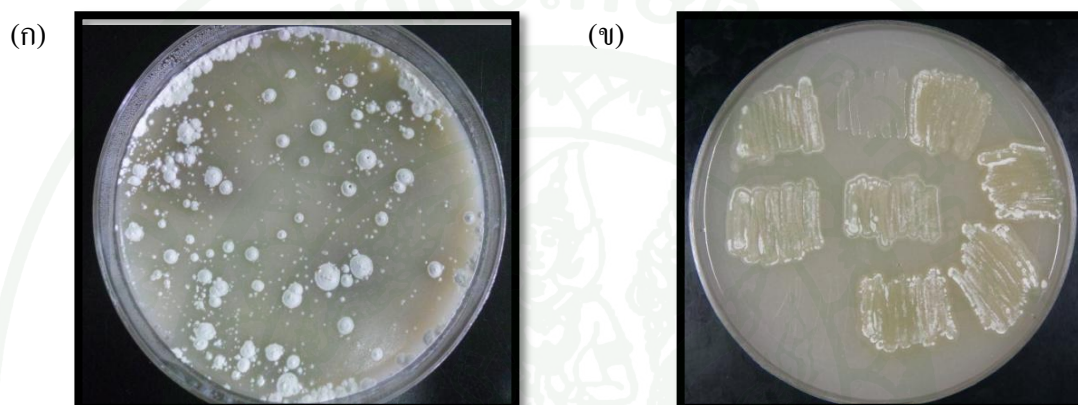
| อายุเชื้อ (ชั่วโมง) | ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชัน (เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ) |                             |
|---------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------|
|                     | MS+10mM MgCl <sub>2</sub>                              | ISP2+10mM MgCl <sub>2</sub> |
| 12                  | 4.16x10 <sup>-4</sup>                                  | 1.83x10 <sup>-4</sup>       |
| 24                  | 4.55x10 <sup>-4</sup>                                  | 3.68x10 <sup>-4</sup>       |
| 36                  | 4.33x10 <sup>-5</sup>                                  | 3.52x10 <sup>-5</sup>       |
| 48                  | 3.69x10 <sup>-5</sup>                                  | 3.08x10 <sup>-5</sup>       |

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการคอนจูเกชันต่างสกุลโดยการใช้สปอร์ และไมซีเลียม ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 พบว่าประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันมาก อยู่ที่ 10<sup>-4</sup> เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ เช่นเดียวกับการคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *S. fradiae* และ *E. coli* S17-1 (Bierman *et al.*, 1992) แต่จากรายงานการคอนจูเกชันระหว่าง *S. toyocaensis* และ *E. coli* S17-1 พบว่าการคอนจูเกชันโดยใช้ไมซีเลีย นั้นมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้สปอร์ (Matsusshima and Baltz, 1996) และ พบว่าการใช้ไมซีเลียมของ *S. natalensis* ไม่ประสบความสำเร็จในการคอนจูเกชัน (Enriquez *et al.*, 2006)

จากการทดลองเรื่องการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการคอนจูเกชันต่างสกุล ดังที่กล่าวมานั้นทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการคอนจูเกชันระหว่าง *Streptomyces* sp. GMKU 100 กับ *E. coli* ET12567(pUZ8002)/pIJ8600 โดยใช้ไมซีเลียม ที่อายุ 24 ชั่วโมง บนอาหาร MS ที่มี MgCl<sub>2</sub> 10 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากการใช้สปอร์มีวิธีการเตรียมที่ยุ่งยาก และจากผลการทดลองดังกล่าว การคอนจูเกชันโดยใช้ไมซีเลียสของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการใช้สปอร์เป็นผู้รับ

## 5. การสร้างสายพันธุ์กลาย ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ด้วยการทำดิสรักชันของยีน *desD*

นำพลาสมิดสายผสม pIJ8671/*desD* ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* ET12567(pUZ8002) ได้เป็น *E. coli* ET12567(pUZ8002)/pIJ8671/*desD* จากนั้นทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *Streptomyces* sp. GMKU 100 คัดเลือกเอกซ์คอนจูแกนส์ บนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะ thiostrepton และ nalidixic acid เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ได้รับพลาสมิด pIJ8671/*desD* (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 การทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ *E. coli*

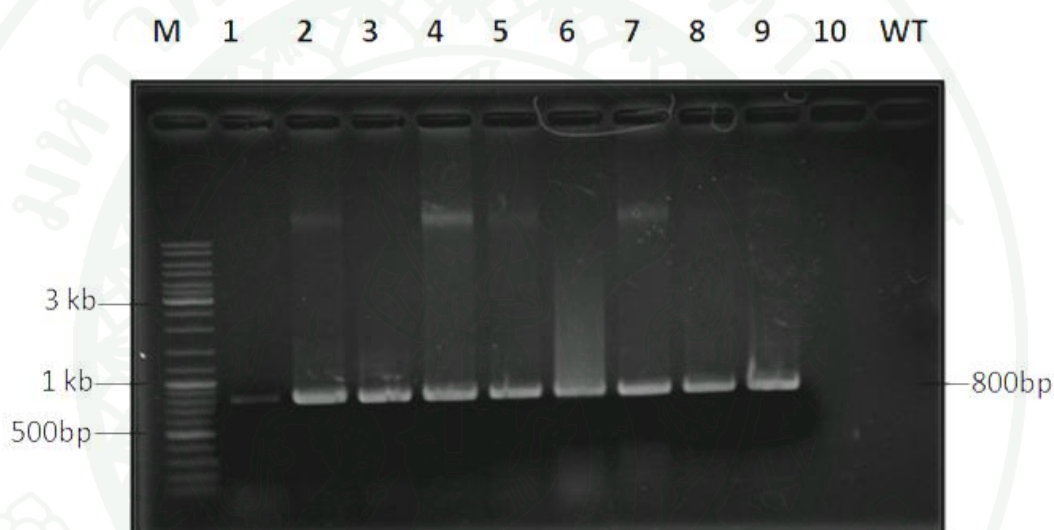
ET12567(pUZ8002)/pIJ8671/*desD* และการคัดเลือกเอกซ์คอนจูแกนส์บนอาหาร MS ที่มี 10 มิลลิโมลาร์  $MgCl_2$  หลังจากบ่มไว้ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

(ก) เอกซ์คอนจูแกนส์ที่ได้จากการคอนจูเกชันบนอาหาร MS ที่มี 10 มิลลิโมลาร์  $MgCl_2$  หลังจากเททับด้วย thiostrepton 1,000 ไมโครกรัม และ nalidixic acid 500 ไมโครกรัม

(ข) การคัดเลือกเอกซ์คอนจูแกนส์ที่ได้รับพลาสมิด pIJ8671/*desD* บนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะ thiostrepton 1,000 ไมโครกรัม และ nalidixic acid 500 ไมโครกรัม

### 5.1 การตรวจสอบสายพันธุ์กลาย

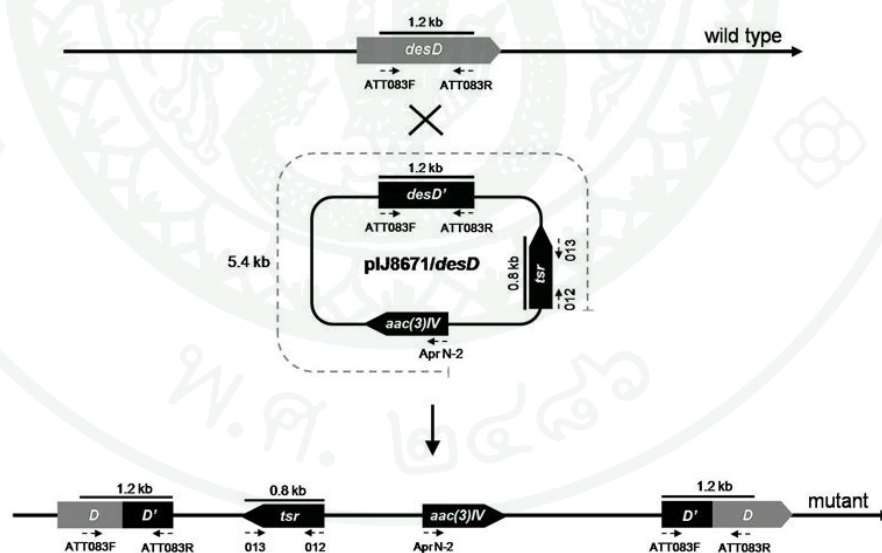
นำเอกซ์คอนจูแกนต์มาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะ thiostrepton และ nalidixic acid คัดเลือกสายพันธุ์ที่ได้รับพลาสมิด pIJ8671/*desD* สุ่มเลือกมาทั้งหมด 10 โคโลนีมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วทำพีซีอาร์เพิ่มปริมาณยีนต้านยาปฏิชีวนะ thiostrepton ด้วยไพรเมอร์ ATT012 และ ATT013 พบว่าเอกซ์คอนจูแกนต์ 9 โคโลนี มียีนต้านยาปฏิชีวนะ thiostrepton ที่อยู่บนพลาสมิด pIJ8671/*desD* ได้ผลิตผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 21) ซึ่งไม่พบใน *Streptomyces* sp. GMKU 100 แสดงว่าเอกซ์คอนจูแกนต์ดังกล่าวได้รับพลาสมิด pIJ8671/*desD*



**ภาพที่ 21** การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนต์โดยการเพิ่มปริมาณยีนต้านยา thiostrepton ด้วยวิธีพีซีอาร์ M = 1kb DNA ladder, แถวที่ 1-10 = เอกซ์คอนจูแกนต์ที่ 1- 10, WT = *Streptomyces* sp. GMKU 100

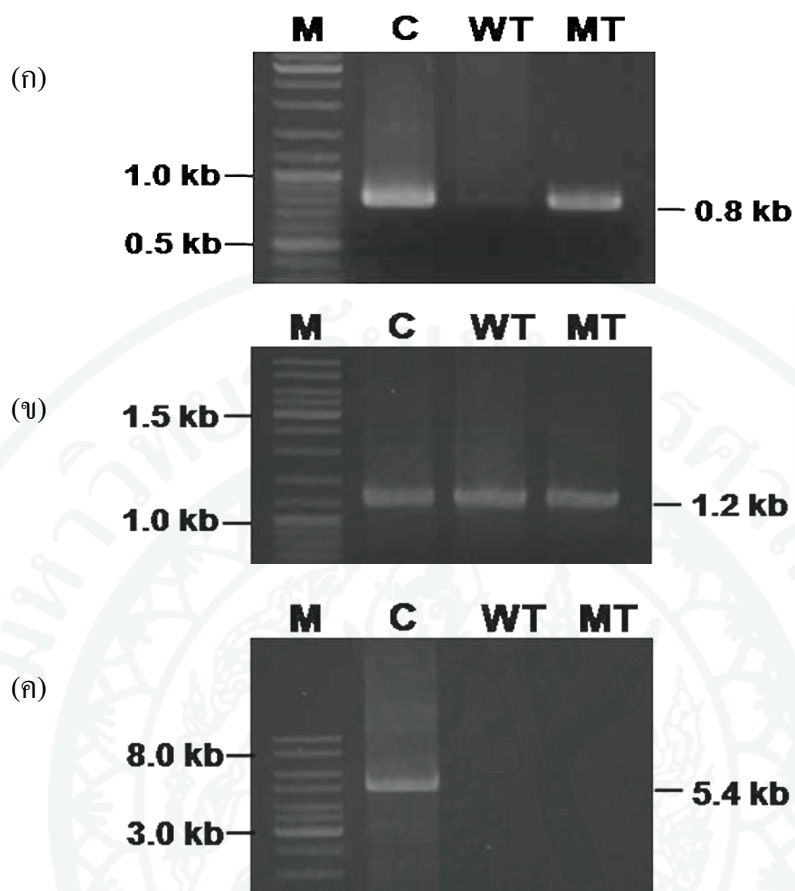
### 5.1.1 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติ

เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าพลาสมิด pIJ8671/*desD* ได้แทรกเข้าไปในโครโมโซมของสายพันธุ์ปกติจริง โดยเกิด homologous recombination ระหว่างยีน *desD* บน พลาสมิด pIJ8671/*desD* กับยีน *desD* บนโครโมโซมของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 แบบ single crossing over (ภาพที่ 22) จึงใช้วิธีพีซีอาร์ในการตรวจสอบ โดยเพิ่มปริมาณยีนด้านยาปฏิชีวนะ thiostrepton โดยใช้ไพรเมอร์ ATT012 และ ATT013 พบว่าพลาสมิดสายผสม pIJ8671/*desD* และ สายพันธุ์กลาย ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส และไม่พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ปกติ (ภาพที่ 23 ก) ผลการเพิ่มปริมาณยีน *desD* ด้วยไพรเมอร์ ATT083F และ ATT083 พบว่า ทั้งสายพันธุ์ปกติ สายพันธุ์กลาย และ พลาสมิดสายผสม pIJ8671/*desD* ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบส (ภาพที่ 23 ข) เมื่อเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอขนาด 5.4 กิโลเบส ด้วยไพรเมอร์ Apr N-2 และ ATT012 ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เฉพาะพลาสมิด pIJ8671/*desD* (ภาพที่ 23 ค) แสดงว่าสายพันธุ์กลายได้รับพลาสมิดสายผสม pIJ8671/*desD* แทรกเข้าไปในโครโมโซมของสายพันธุ์ปกติซึ่งทำให้ไพรเมอร์ทั้งคู่หั่นคนละทิศ จากผลการทำพีซีอาร์ทั้งหมด แสดงว่าสายพันธุ์กลายได้รับพลาสมิดสายผสม pIJ8671/*desD* แทรกเข้าไปในโครโมโซมของ *Streptomyces* sp. GMKU 100



ภาพที่ 22 แผนภาพการเกิด homologous recombination ระหว่างยีน *desD* บนพลาสมิด

pIJ8671/*desD* และยีน *desD* โครโมโซมของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ลูกศรระบุไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบ



ภาพที่ 23 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับ *Streptomyces* sp. GMKU 100 โดยวิธีพีซีอาร์

(ก) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ขนาด 0.8 กิโลเบสของยีนต้านยา thiostrepton ด้วยไพรเมอร์ ATT012 และ ATT013

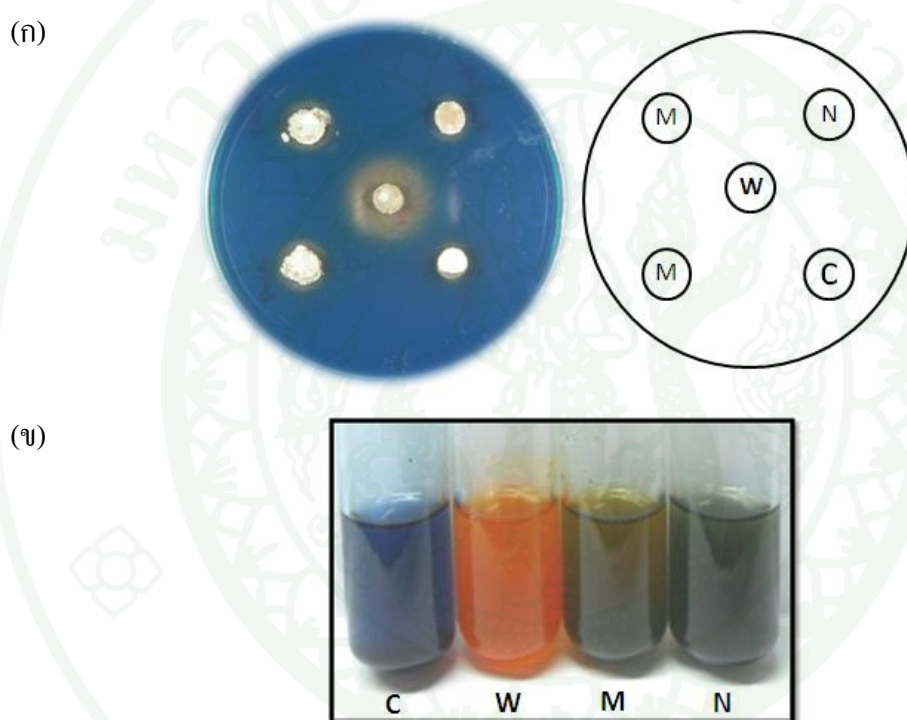
(ข) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ขนาด 1.2 กิโลเบสของ ยีน *desD* ด้วยไพรเมอร์ ATT083F และ ATT083R

(ค) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ขนาด 5.4 กิโลเบส ในพลาสมิด pIJ8671/*desD* ด้วยไพรเมอร์ Apr-N2 และ ATT012

M = 1 kb DNA ladder, C = pIJ8671/*desD*, WT = *Streptomyces* sp. GMKU 100, MT = สายพันธุ์กลาย ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100

## 5.2 การตรวจสอบการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ในสายพันธุ์กลาย

นำ *Streptomyces* sp. GMKU 100 สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลาย มาตรวจสอบการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ด้วยวิธี CAS assay ตามวิธีการในข้อ 6.1 พบว่าสายพันธุ์กลายไม่มีความสามารถสร้างไซเคอร์โรฟอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ control และ สายพันธุ์ GMKU 114 ที่ได้ทดสอบแล้วว่าไม่สามารถสร้างไซเคอร์โรฟอร์ ขณะที่สายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 สามารถสร้างไซเคอร์โรฟอร์ได้ดี (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 การตรวจสอบสร้างไซเคอร์โรฟอร์ของสายพันธุ์กลายด้วยวิธี CAS assay

(ก) การทดสอบการสร้างไซเคอร์โรฟอร์บนอาหารแข็ง

(ข) การทดสอบการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ในสารละลาย

C = Control อาหารเหลว YM

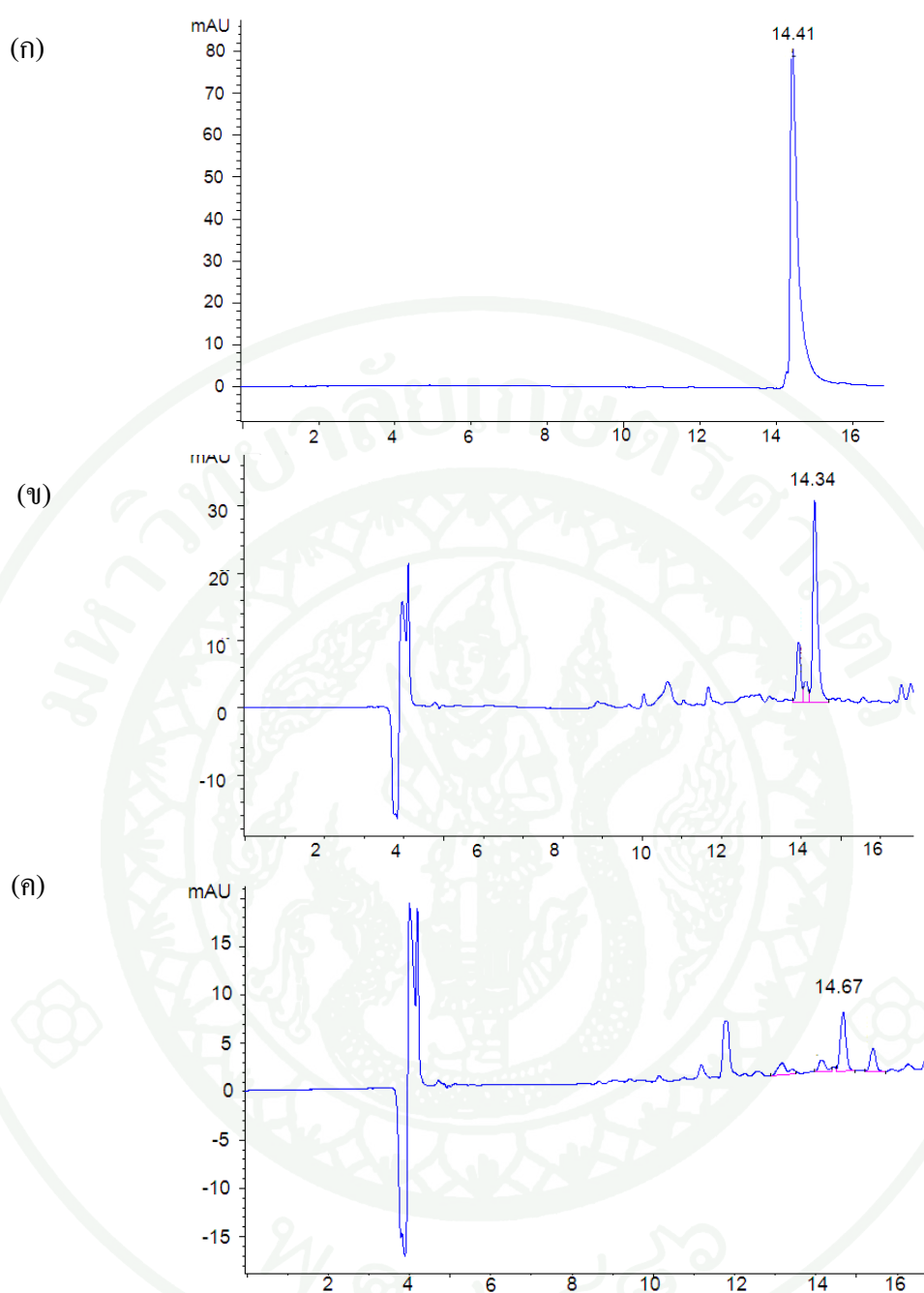
W = *Streptomyces* sp. GMKU 100

M = สายพันธุ์กลาย, N= negative control *Streptomyces* sp. GMKU 114

## 5.3 การตรวจสอบการสังเคราะห์ไซเคอร์โรฟอร์ของสายพันธุ์กลายด้วยเทคนิค HPLC

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลาย ในอาหาร ILMM (iron-limited minimal medium) แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดสารวิธีข้อ 9.4 และวิเคราะห์โดย HPLC วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 435 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ โดยใช้ deferoxamine mesylate salt ความเข้มข้น 2,500 ppm เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารมาตรฐานให้ peak ช่วง ที่ 14.41 นาที สายพันธุ์ปกติ ให้ peak ช่วงที่ 14.43 นาที ขณะที่สายพันธุ์กลาย พบ peak ขนาดเล็กที่ 14.67 นาที ซึ่งอาจจะเป็นสารอื่นที่ให้ค่าดูดกลืนแสงในช่วงเวลาเดียวกัน หรือแสดงว่ามี การสร้างไซเคอร์โรฟอร์ได้ในปริมาณน้อยมาก (ภาพที่ 25)

จากการศึกษาการสังเคราะห์ไซเคอร์โรฟอร์ใน *Streptomyces* พบว่าอาจมีการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ได้ มากกว่า 1 ชนิด ในหลายวิธี เช่นเดียวกับ รายงานพบว่าใน *S. coelicolor* A3(2) มีการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ desferrioxamine ที่สร้างมาจากวิถีของกลุ่มยีน *desABCD* และ ไซเคอร์โรฟอร์ coelichelin ที่สร้างมาจากวิถีของกลุ่มยีน *cchA-cchK* (Barona-Gomez *et al.*, 2006) ซึ่งจากการทดลองนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า *Streptomyces* sp. GMKU 100 สร้างไซเคอร์โรฟอร์ได้กี่ชนิด แต่อย่างไรก็ตามอาจกล่าวได้ว่าน่าจะไม่มีการสร้างไซเคอร์โรฟอร์ในสายพันธุ์กลาย



ภาพที่ 25 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ด้วย HPLC

(ก) Deferoxamine mesylate salt ความเข้มข้น 2,500 ppm

(ข) *Streptomyces* sp. GMKU 100

(ค) สายพันธุ์กลาย ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100

## 6. การศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช

การทดลองนี้จะวิเคราะห์ผลการตอบสนองการเจริญของพืช เมื่อพืชได้รับการปลูก เชื้อจุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์เปรียบเทียบกับระหว่างสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ สายพันธุ์กลาย มีรายงานว่าแอคติโนมัยซีทสกุล *Streptomyces* เป็นแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรอบรากพืช (free-living soil และ rhizosphere bacteria) มีประโยชน์ต่อพืช จัดเป็นกลุ่ม plant growth-promoting rhizobacteria หรือ PGPR (Kloepper *et al.*, 1989; Glick, 1995a) จากการศึกษาพบว่าการสร้างไซเคอร์โรฟอร์จากเชื้อจุลินทรีย์แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชตระกูลถั่ว (Sharma *et al.*, 2003; Joshi *et al.*, 2006, 2008) ดังนั้นการทดลองนี้ จึงคัดเลือกถั่วเขียว สายพันธุ์ ชัยนาท 72 (*Vigna radiata* (L.) Wilczek Chai Nat 72) และ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) มาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช โดยสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ซึ่งคัดแยกมาจากรากข้าวหอมมะลิ (Indananda *et al.*, 2010)

### 6.1 การทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพันธุ์หลังได้รับการปลูกเชื้อ

นำเมล็ดถั่วเขียวและเมล็ดข้าวมาฆ่าเชื้อที่ผิวตามข้อ 10.1 ทำการปลูกเชื้อตามข้อ 10.2 โดยความเข้มข้นของสปอร์อยู่ที่  $10^8$  สปอร์ต่อมิลลิตร และเพาะเมล็ดพันธุ์เพื่อทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกตามข้อ 10.3 และสังเกตจำนวนเมล็ดพันธุ์ที่งอกในแต่ละวัน คำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด พบว่าเมล็ดถั่ว ที่มีการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ และ สายพันธุ์กลาย ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ทั้งในสภาวะที่มีเหล็ก ( $10 \mu\text{M}$  ferric-citrate) และ ไม่มีเหล็ก ที่ 24 ชั่วโมง มีอัตราการงอกของเมล็ด 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงกว่าในการทดลองที่ปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์กลายและการทดลองควบคุม ในการทดลองที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายพบว่าอัตราการงอกที่ต่ำกว่าการทดลองควบคุม โดยมีอัตราการงอกต่ำสุดในสภาวะมีเหล็กและไม่มีเหล็กที่ 70 และ 64 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 11) เมื่อตรวจอัตราการงอกของเมล็ดที่ 48 ชั่วโมงพบว่าการทดลองที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติในเมล็ดถั่วเขียวมีอัตราการงอกเพิ่มขึ้นถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่อัตราการงอกในการทดลอง ปลูกเชื้อสายพันธุ์กลาย ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดเพียง 84 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์ปกติมีความสามารถกระตุ้นให้เมล็ดถั่วเขียวมีอัตราการงอกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่ปลูกเชื้อ ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีสารละลายเหล็กแตกต่างกันอย่างชัดเจน

ส่วนอัตราการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ 24 ชั่วโมงทั้งในสถานะที่มีเหล็กและไม่มีเหล็กมีอัตราการงอกที่ 32 และ 36 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ขณะที่เมื่อปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ มีอัตราการงอกที่ 56 และ 66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเพาะเมล็ดข้าวต่อเป็นเวลาภายใน 48 ชั่วโมง เมล็ดที่ปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์ปกติ ในสถานะที่มี และไม่มีเหล็ก มีอัตราการงอกเพิ่มขึ้นถึง 96 -100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การทดลองที่ไม่ปลูกเชื้อ ทั้งสถานะที่มีและไม่มีเหล็กมีอัตราการงอกที่ 94- 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการทดลองปลูกเชื้อในสายพันธุ์กลายซึ่งมีอัตราการงอกที่ 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11)

**ตารางที่ 11** เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพันธุ์หลังได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และสายพันธุ์กลาย

| เมล็ดพืช  | เวลา<br>(ชั่วโมง) | เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพืช |     |    |                            |     |    |
|-----------|-------------------|------------------------------|-----|----|----------------------------|-----|----|
|           |                   | +10 $\mu$ M ferric-citrate   |     |    | -10 $\mu$ M ferric-citrate |     |    |
|           |                   | Control                      | WT  | MT | Control                    | WT  | MT |
| ถั่วเขียว | 24                | 80                           | 80  | 70 | 78                         | 90  | 64 |
|           | 48                | 94                           | 100 | 84 | 90                         | 100 | 80 |
| ข้าว      | 24                | 42                           | 56  | 32 | 44                         | 66  | 36 |
|           | 48                | 96                           | 96  | 90 | 94                         | 100 | 90 |

**หมายเหตุ** Control = เมล็ดที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ  
 WT= เมล็ดที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100  
 MT = เมล็ดที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100

## 6.2 ผลการเจริญหลังการงอกของเมล็ดถั่วเขียวและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

เมื่อเพาะเมล็ดถั่วเขียวและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิจากข้อ 6.2 อายุการเจริญครบ 7 วัน แล้วนำมาวัดความยาวรากและลำต้นเพื่อวิเคราะห์อัตราการเจริญ ในระยะต้นอ่อนหลังการปลูกเชื้อ อัตราการเจริญของต้นอ่อนของถั่วเขียว ในสถานะที่มีเหล็ก พบว่าในการทดลองที่ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ให้อัตราการเจริญโดยวัดค่าความยาวรากที่  $8.32 \pm 0.22$  เซนติเมตรต่อต้น และความยาวลำต้น  $17.04 \pm 0.26$  เซนติเมตรต่อต้น ซึ่งให้อัตราการเจริญที่สูงกว่า ปลูกด้วยสายพันธุ์กลายและไม่ปลูกเชื้ออย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยเมื่อปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายมีความยาวรากที่  $7.17 \pm 0.26$  เซนติเมตรต่อต้น และความยาวลำต้น  $14.70 \pm 0.36$  เซนติเมตรต่อต้น (ตารางที่ 12) ซึ่งต้นที่ปลูกด้วยสายพันธุ์กลาย มีอัตราการเจริญที่ไม่แตกต่างกับการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ในสถานะที่ไม่มีเหล็ก พบว่าในการทดลองที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ให้อัตราการเจริญโดยวัดค่าความยาวรากได้ที่  $9.17 \pm 0.24$  เซนติเมตรต่อต้น และความยาวลำต้น  $17.18 \pm 0.22$  เซนติเมตรต่อต้น ซึ่งให้อัตราการเจริญที่สูงกว่า ในการทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายซึ่งวัดความยาวรากได้ที่  $6.80 \pm 0.28$  เซนติเมตรต่อต้น และความยาวลำต้น  $13.69 \pm 0.41$  เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับการทดลองที่ไม่ปลูกเชื้อ (ตารางที่ 12) จากการทดลองปลูกเชื้อลงในเมล็ดถั่วเขียวด้วยเชื้อสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 สามารถส่งเสริมการเจริญได้ดีในระยะต้นอ่อนของถั่วเขียวซึ่งน่าจะเกิดจากผลของไซเคอร์โรฟอรั (ภาพที่ 26 ก)

อัตราการเจริญเติบโตของต้นอ่อนของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ หลังได้รับการปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ทั้งในสถานะที่มีเหล็ก พบว่าเมื่อปลูกด้วยสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 มีความยาวรากที่  $8.79 \pm 0.36$  เซนติเมตรต่อต้น และ ความยาวลำต้น  $17.03 \pm 0.20$  เซนติเมตรต่อต้น ซึ่งให้อัตราการเจริญที่สูงกว่าอย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายซึ่งมีความยาวรากที่  $5.59 \pm 0.39$  เซนติเมตรต่อต้น แสดงความยาวลำต้น  $7.84 \pm 0.30$  เซนติเมตรต่อต้น (ตารางที่ 12) ในสถานะที่ไม่มีเหล็ก การทดลองปลูกสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 มีความยาวรากที่  $10.52 \pm 0.37$  เซนติเมตรต่อต้น และ ความยาวลำต้น  $17.11 \pm 0.19$  เซนติเมตรต่อต้น ซึ่งให้อัตราการเจริญที่สูงกว่าอย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์กลายซึ่งมีความยาวรากที่  $7.80 \pm 0.45$  เซนติเมตรต่อต้น และความยาวลำต้นที่  $8.68 \pm 0.26$  เซนติเมตรต่อต้น ที่น้อยกว่าการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12) อัตราการเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วย สายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญได้ดีโดยให้

ค่าความยาวรากและลำต้นที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวดอกมะลิที่ปลูกด้วยสายพันธุ์กลายและที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (ภาพที่ 26 ข)

**ตารางที่ 12** การเจริญของต้นอ่อนของถั่วเขียวและข้าวแสดงความยาวรากและลำต้นหลังได้รับการปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

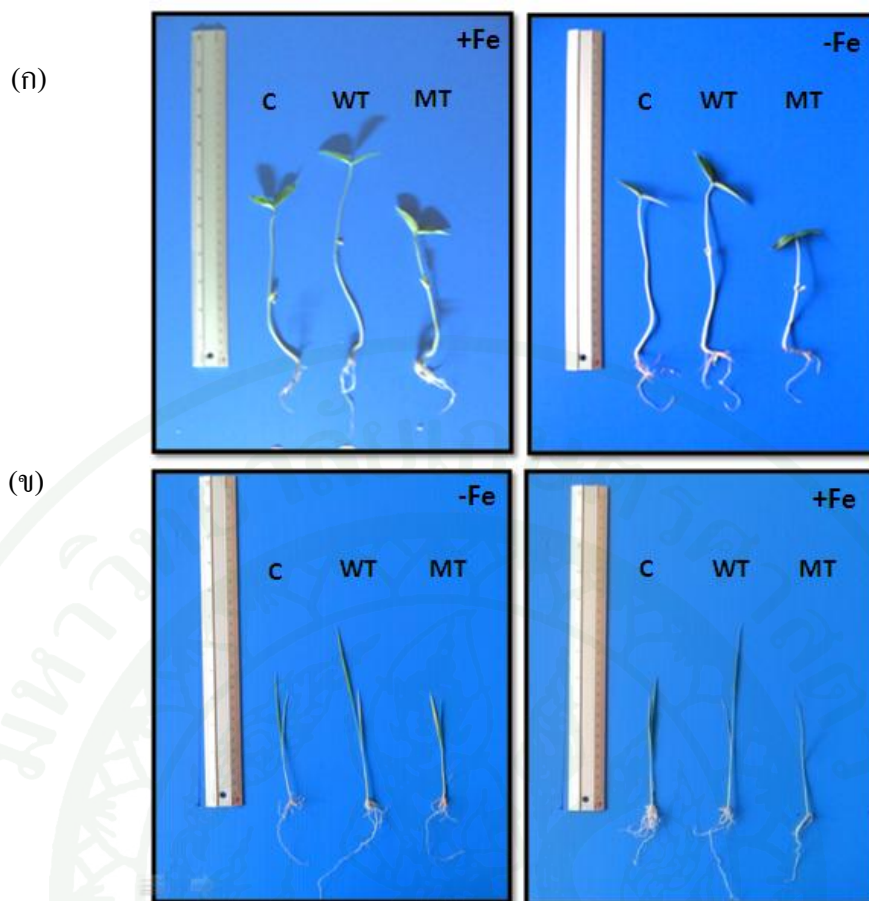
| การทดลอง  |                             | ความยาวราก (ซม.) | ความยาวลำต้น (ซม.) |                    |
|-----------|-----------------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| ถั่วเขียว | + 10 $\mu$ M Ferric-citrate | Control          | 4.80 $\pm$ 0.20c   | 16. 37 $\pm$ 0.29a |
|           |                             | WT               | 8.32 $\pm$ 0.22a   | 17.04 $\pm$ 0.26a  |
|           |                             | MT               | 7.17 $\pm$ 0.26b   | 14.70 $\pm$ 0.36b  |
|           | - 10 $\mu$ M Ferric-citrate | Control          | 6.80 $\pm$ 0.25b   | 13.72 $\pm$ 0.32b  |
|           |                             | WT               | 9.17 $\pm$ 0.24a   | 17.18 $\pm$ 0.22a  |
|           |                             | MT               | 6.80 $\pm$ 0.28b   | 13.72 $\pm$ 0.41b  |
| ข้าว      | + 10 $\mu$ M Ferric-citrate | Control          | 6.78 $\pm$ 0.39b   | 13.0 1 $\pm$ 0.24b |
|           |                             | WT               | 8.79 $\pm$ 0.36a   | 17.03 $\pm$ 0.20a  |
|           |                             | MT               | 5.59 $\pm$ 0.39b   | 7.84 $\pm$ 0.30c   |
|           | - 10 $\mu$ M Ferric-citrate | Control          | 8.67 $\pm$ 0.48b   | 12.51 $\pm$ 0.26b  |
|           |                             | WT               | 10.52 $\pm$ 0.37a  | 17.11 $\pm$ 0.19a  |
|           |                             | MT               | 7.80 $\pm$ 0.45b   | 8.68 $\pm$ 0.26c   |

หมายเหตุ

Control = ต้นอ่อนที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

WT = ต้นอ่อนที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100

MT = ต้นอ่อนที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU



ภาพที่ 26 ต้นอ่อนของถั่วเขียวและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ หลังจากการเพาะเมล็ดที่ปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน

(ก) การเจริญของต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเขียวหลังได้รับการปลูกเชื้อที่มี 10  $\mu$ M Ferric-citrate (+Fe) และไม่มีเหล็ก (-Fe)

(ข) การเจริญในต้นอ่อนของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิหลังได้รับการปลูกเชื้อที่มี 10  $\mu$ M ferric-citrate (+Fe) และไม่มีเหล็ก (-Fe)

C = ต้นอ่อนที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ, WT = ต้นอ่อนที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ MT = ต้นอ่อนที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100

จากการทดลองการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่มีความสามารถสร้างไซเคอร์โรฟอ์พบว่าสามารถกระตุ้นอัตราการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 สูงกว่า การทดลองที่ปลูกด้วยสายพันธุ์กลายและที่ไม่ปลูกเชื้อ และเมื่อมีการเจริญต่อไปจนครบ 7 วัน สามารถกระตุ้นให้ต้นอ่อนของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 สูงกว่าการทดลองที่ไม่ปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการทดลองที่กล่าวมานั้นให้ผลสอดคล้องกับรายงาน การปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. AzR แยกได้จากต้นสะเดาอินเดีย ที่สร้างไซเคอร์โรฟอ์ได้สูงและยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืช *Alternaria alternate* ได้ดี พร้อมทั้งยังกระตุ้นให้มีอัตราการงอกของเมล็ดและกระตุ้นการเจริญ ความยาวราก และ ลำต้นของมะเขือเทศได้สูงกว่ากับการทดลองที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Verma *et al.*, 2011)

## 8. การส่งเสริมเจริญของต้นถั่วเขียวชัยนาท 72 และ ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิโดยการปลูกด้วย *Streptomyces* sp. GMKU 100 ในระดับกระถาง

### 8.1 การส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อปลูกเป็นเวลา 14 วัน

นำต้นข้าวปลูกในกระถางที่มี vermiculite ภายในโรงเรือนเป็นเวลา 14 วัน เมื่อปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ในสภาวะที่เติมสาร deferoxamine mesylate salt ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม ลงไปในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland's ที่ผสมและไม่ผสมเหล็ก ( $10 \mu\text{M}$  ferric-citrate) ในแต่ละการทดลองมีจำนวนต้น 10 ต้น ตามข้อ 10.4 พบว่า

การทดลองที่มีเหล็ก เมื่อปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 พบว่าได้น้ำหนักแห้งรากที่  $0.0098 \pm 0.0003$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดรากที่  $0.0402 \pm 0.0043$  กรัมต่อต้น ความยาวรากที่  $7.10 \pm 1.10$  เซนติเมตรต่อต้น ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ซึ่งมีน้ำหนักแห้งรากที่  $0.0140 \pm 0.0015$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดรากที่  $0.2572 \pm 0.0137$  กรัมต่อต้น และ ความยาวรากที่  $13.96 \pm 1.72$  เซนติเมตรต่อต้น เมื่อเทียบกับต้นข้าวที่ปลูกด้วยสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. GMKU 100 กับการทดลองควบคุมพบว่าต้นข้าวมีน้ำหนักแห้งเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 142.8 น้ำหนักสดเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 322.3 และความยาวรากมากขึ้นคิดเป็นร้อยละ 125.1 ผลการเจริญของลำต้นข้าวเมื่อปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์กลายของ

*Streptomyces* sp. GMKU 100 พบว่ามีน้ำหนักแห้งลำต้นที่  $0.0119 \pm 0.0008$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดลำต้นที่  $0.0851 \pm 0.0018$  กรัมต่อต้น และความยาวลำต้นที่  $16.46 \pm 1.35$  เซนติเมตรต่อต้น ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการทดลองปลูกเชื้อ ด้วยสายพันธุ์ปกติ โดยมีน้ำหนักแห้งลำต้นที่  $0.0285 \pm 0.0011$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดลำต้นที่  $0.1491 \pm 0.0181$  กรัมต่อต้น และ ความยาวลำต้นที่  $28.70 \pm 0.47$  เซนติเมตรต่อต้น เมื่อเทียบการปลูกด้วย *Streptomyces* sp. GMKU 100 กับการทดลองควบคุมพบว่าต้นข้าวมีน้ำหนักแห้งเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 200.7 น้ำหนักสดเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 202.9 และความยาวลำต้นเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 162.1 สำหรับผลการเจริญในสถานะที่ไม่มีเหล็กให้ผลไปในทางเดียวกัน แต่ให้ค่าการเจริญของต้นข้าวน้อยกว่าในสถานะที่มีเหล็ก (ภาพที่ 27,28 และตารางที่13)

การทดลองการผสม deferroxamine mesylate salt 0.5 ไมโครกรัมลงในกระถางปลูกพบว่า การทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ให้ค่าน้ำหนักราก ความยาวราก น้ำหนักลำต้น และความยาวลำต้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และการทดลองควบคุม โดยให้ผลการเจริญใกล้เคียงกัน แต่มีผลการเจริญน้อยกว่าการปลูกเชื้อด้วยสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่ไม่เติม deferroxamine mesylate salt (ภาพที่ 27,28 และ ตารางที่ 13) แสดงให้เห็นว่าในสถานะที่มีเหล็กนั้น การทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 มีความสามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวได้ดี กว่า การทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่ไม่มีการสร้างไซเคอร์โรเฟอร์ แต่เมื่อมีการผสม deferroxamine mesylate salt ซึ่งเป็นสารไซเคอร์โรเฟอร์ พบว่าการไปกระตุ้นในต้นข้าวเจริญได้ดีไม่แตกต่างจากการปลูกเชื้อในสายพันธุ์ปกติ แสดงว่าไซเคอร์โรเฟอร์มีการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิจริง (ภาพที่ 28) แต่ทั้งนี้หากมีปริมาณไซเคอร์โรเฟอร์มากเกินไป อาจทำให้พืชมีการเจริญชะงักลง ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้จากการทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 เปรียบเทียบกับการทดลองการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่มี deferroxamine mesylate salt พบว่า ให้น้ำหนักราก น้ำหนักลำต้น ความยาวราก และความยาวลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13) ต้นข้าวที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ผสม deferroxamine mesylate salt นั้นเมื่อปลูกต่อไปพบว่า มีจุดเหลือง เนื่องจากการได้รับธาตุเหล็กมากเกินไป

สำหรับการทดลองที่ไม่มีเหล็ก พบว่าการทดลองการปลูกด้วยเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ให้ค่าน้ำหนักราก น้ำหนักลำต้น ความยาวราก และความยาวลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับทุกการทดลอง แสดงว่า สายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 มีสมบัติส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว ในสถานะที่มีเหล็กได้ดีกว่าสถานะที่ไม่มีเหล็ก (ภาพที่ 28)

การปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่สามารถสร้างไซเดอร์โรฟอร์จึงสามารถส่งเสริมการเจริญของข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ การนำแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ กลุ่ม *Streptomyces* ซึ่งส่วนใหญ่แยกได้จากลำต้นและรากข้าว เช่น *S. caviscabies*, *S. scabies* และ *S. turgidiscabies* ไปทดสอบความสามารถการส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของราก และ ลำต้นข้าว (Tian *et al.*, 2007) รวมทั้ง กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ PGPR เช่น *Pantoea agglomerans*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* ที่แยกได้จากข้าว นอกจากจะสามารถ ชัยยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในข้าวได้แล้วยังเพิ่มความยาว น้ำหนักของ ลำต้นและรากซึ่งมีผลส่งเสริมการเจริญของข้าวได้เช่นกัน (Vijay Krishna Kumar *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2012)

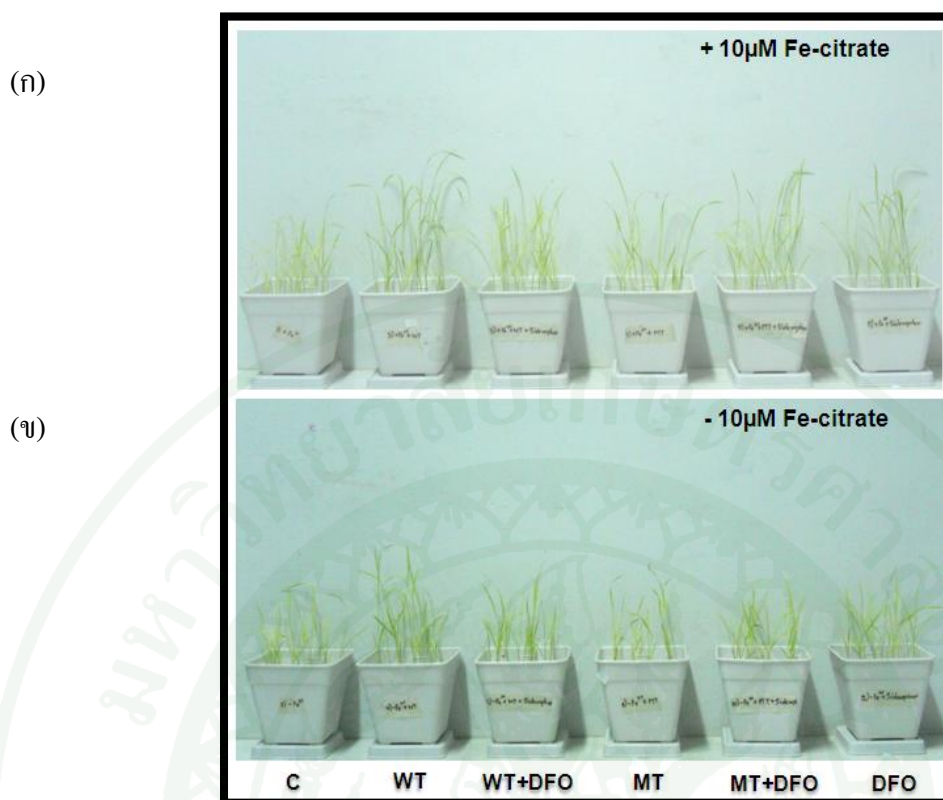
ตารางที่ 13 การเจริญของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิที่ 14 วันหลังได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU

100

| การทดลอง                  | การเจริญของราก            |                         |                     | การเจริญลำต้น             |                         |                       |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|
|                           | น้ำหนักแห้ง<br>(กรัม/ต้น) | น้ำหนักสด<br>(กรัม/ต้น) | ความยาวราก<br>(ซม.) | น้ำหนักแห้ง<br>(กรัม/ต้น) | น้ำหนักสด<br>(กรัม/ต้น) | ความยาวลำต้น<br>(ซม.) |
| +10 $\mu$ M Feric-citrate |                           |                         |                     |                           |                         |                       |
| Control                   | 0.0098 $\pm$ 0.0008b      | 0.0798 $\pm$ 0.0071ab   | 11.16 $\pm$ 0.96ab  | 0.0142 $\pm$ 0.0017bc     | 0.0735 $\pm$ 0.0030c    | 17.70 $\pm$ 0.27cd    |
| WT                        | 0.0140 $\pm$ 0.0015a      | 0.2572 $\pm$ 0.0137a    | 13.96 $\pm$ 1.72a   | 0.0285 $\pm$ 0.0011a      | 0.1491 $\pm$ 0.0181a    | 28.70 $\pm$ 0.47a     |
| WT+DFO                    | 0.0109 $\pm$ 0.0003ab     | 0.0899 $\pm$ 0.0086ab   | 9.80 $\pm$ 0.66ab   | 0.0170 $\pm$ 0.0005b      | 0.1031 $\pm$ 0.0061bc   | 21.90 $\pm$ 0.66b     |
| MT                        | 0.0098 $\pm$ 0.0003b      | 0.0402 $\pm$ 0.0043b    | 7.10 $\pm$ 1.10b    | 0.0119 $\pm$ 0.0008c      | 0.0851 $\pm$ 0.0018bc   | 16.46 $\pm$ 1.35d     |
| MT+DFO                    | 0.0108 $\pm$ 0.0010ab     | 0.1950 $\pm$ 0.1176ab   | 9.20 $\pm$ 1.31ab   | 0.0168 $\pm$ 0.0006b      | 0.1177 $\pm$ 0.0069ab   | 22.88 $\pm$ 0.32b     |
| DFO                       | 0.0098 $\pm$ 0.0002b      | 0.0678 $\pm$ 0.0081ab   | 9.50 $\pm$ 1.11ab   | 0.0150 $\pm$ 0.0030bc     | 0.1030 $\pm$ 0.0037bc   | 20.76 $\pm$ 0.59bc    |
| -10 $\mu$ M Feric-citrate |                           |                         |                     |                           |                         |                       |
| Control                   | 0.0098 $\pm$ 0.0004b      | 0.0664 $\pm$ 0.0028c    | 6.70 $\pm$ 0.70b    | 0.0103 $\pm$ 0.0009c      | 0.0795 $\pm$ 0.0073b    | 16.48 $\pm$ 1.05b     |
| WT                        | 0.0136 $\pm$ 0.0009a      | 0.1427 $\pm$ 0.0059a    | 11.50 $\pm$ 0.84a   | 0.0241 $\pm$ 0.0022a      | 0.1376 $\pm$ 0.0141a    | 23.32 $\pm$ 1.00a     |
| WT+DFO                    | 0.0103 $\pm$ 0.0008b      | 0.0796 $\pm$ 0.0034bc   | 11.80 $\pm$ 0.87a   | 0.0165 $\pm$ 0.0007b      | 0.1124 $\pm$ 0.0077ab   | 23.22 $\pm$ 1.02a     |
| MT                        | 0.0101 $\pm$ 0.0003b      | 0.0778 $\pm$ 0.0047bc   | 6.84 $\pm$ 0.75b    | 0.0116 $\pm$ 0.0012bc     | 0.0814 $\pm$ 0.0052b    | 16.82 $\pm$ 1.02b     |
| MT+DFO                    | 0.0095 $\pm$ 0.0009b      | 0.0902 $\pm$ 0.0085b    | 8.70 $\pm$ 1.69ab   | 0.0130 $\pm$ 0.0015bc     | 0.0790 $\pm$ 0.0038b    | 16.78 $\pm$ 0.46b     |
| DFO                       | 0.0087 $\pm$ 0.0007b      | 0.0710 $\pm$ 0.0038bc   | 7.50 $\pm$ 0.82ab   | 0.0114 $\pm$ 0.0004bc     | 0.0906 $\pm$ 0.0082b    | 17.18 $\pm$ 0.31b     |

ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่วัดตามด้วยอักษรต่างกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.05 โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

แบบ Tukey



ภาพที่ 27 การเจริญของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิในกระถาง ที่ 14 วันในกระถาง หลังได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และสายพันธุ์กลาย และเพิ่มสาร deferoxamine mesylate salt

(ก) ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิในสภาวะที่มีเหล็ก 10 $\mu$ M ferric-citrate

(ข) ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิในสภาวะที่ไม่มีเหล็ก

C = ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

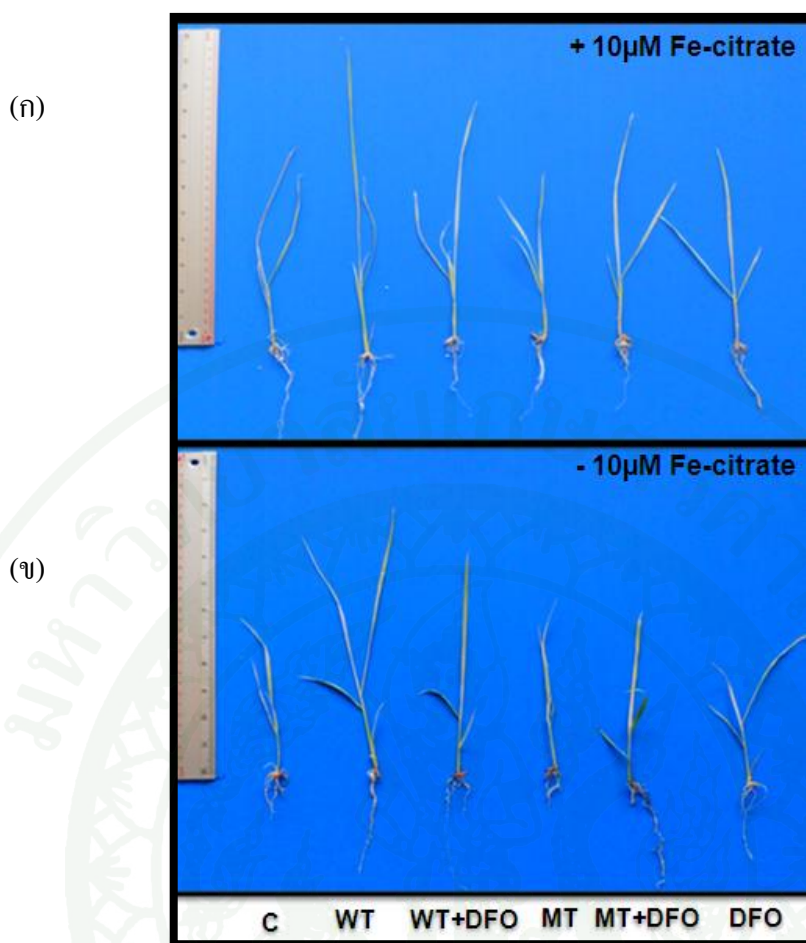
WT = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100

WT+DFO = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และเติม 0.5 ไมโครกรัม deferoxamine mesylate salt (DFO)

MT = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลาย

MT+DFO = ต้นข้าวได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายและเติม DFO 0.5 ไมโครกรัม

DFO = ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อแต่เติม DFO 0.5 ไมโครกรัม



ภาพที่ 28 ลักษณะต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ที่ 14 วัน หลังได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp.

GMKU 100 และ สายพันธุ์กลาย และเติมสาร deferoxamine mesylate salt

(ก) ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิในสภาวะที่มีเหล็ก 10  $\mu$ M ferric-citrate

(ข) ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิในสภาวะที่ไม่มีเหล็ก

C = ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

WT = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100

WT+DFO = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และเติม 0.5 ไมโครกรัม deferoxamine mesylate salt (DFO)

MT = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลาย

MT+DFO = ต้นข้าวได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายและเติม DFO 0.5 ไมโครกรัม

DFO = ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อแต่เติม DFO 0.5 ไมโครกรัม

8.2 การส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเขียวสายพันธุ์ชยันนาท 72 เมื่อปลูกเป็นเวลา 14 วัน

นำต้นถั่วเขียวปลูกในกระถางที่มี vermiculite ภายในโรงเรือนเป็นเวลาทั้งหมด 14 วัน เมื่อปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ในสถานะที่เติมสาร deferoxamine mesylate salt ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม ลงไปในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland's ที่ผสมและไม่ผสมเหล็ก ( $10\ \mu\text{M}$  ferric-citrate) ในแต่ละการทดลองมีจำนวนต้น 10 ต้น ตามข้อ 10.4 พบว่า การทดลองที่มีเหล็ก เมื่อปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ได้น้ำหนักแห้งรากที่  $0.02 \pm 0.00$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดรากที่  $0.30 \pm 0.02$  กรัมต่อต้น ความยาวรากที่  $12.20 \pm 1.02$  เซนติเมตรต่อต้น ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 พบว่า โดยมีน้ำหนักแห้งรากที่  $0.09 \pm 0.02$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดรากที่  $0.58 \pm 0.06$  กรัมต่อต้น และ ความยาวรากที่  $13.50 \pm 0.87$  เซนติเมตรต่อต้น (ตารางที่ 14) เมื่อเทียบกับการปลูกด้วยสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. GMKU 100 กับการทดลองควบคุมพบว่าต้นถั่วน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 300 น้ำหนัก สดเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 145 และความยาวรากเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 178.6

ผลการเจริญลำต้นถั่วเขียว เมื่อปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 พบว่าได้น้ำหนักแห้งลำต้นที่  $0.07 \pm 0.01$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดลำต้นที่  $0.69 \pm 0.11$  กรัมต่อต้น และความยาวลำต้นที่  $26.10 \pm 1.11$  เซนติเมตรต่อต้น ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกเชื้อด้วยสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 โดยมีน้ำหนักแห้งลำต้นที่  $0.53 \pm 0.09$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดลำต้นที่  $0.87 \pm 0.19$  กรัมต่อต้น และ ความยาวลำต้นที่  $32.30 \pm 1.16$  เซนติเมตรต่อต้น เมื่อเทียบการปลูกด้วย *Streptomyces* sp. GMKU 100 กับการทดลองควบคุมพบว่าต้นข้าวมี น้ำหนักแห้งเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 757.1 น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 106.1 และความยาวลำต้นเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 130.8 สำหรับผลการเจริญในสถานะที่ไม่มีเหล็กให้ผลไปในทางเดียวกัน แต่ให้ค่าการเจริญของต้นถั่วเขียวน้อยกว่าในสถานะที่มีเหล็ก (ภาพที่ 29 และ ตารางที่ 14)

เมื่อเติม deferoxamine mesylate salt 0.5 ไมโครกรัม ซึ่งเป็นสารไซเคอร์โรฟอร์ลง ในกระถางปลูก พบว่า เมื่อปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ให้ค่าน้ำหนักราก ความยาวราก น้ำหนักลำต้น และความยาวลำต้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกเชื้อด้วยสายพันธุ์ปกติ และการทดลองควบคุม โดยให้ผลการเจริญได้ใกล้เคียงกัน แต่มีผลการเจริญน้อยกว่าการทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU

100 ที่ไม่เติม deferoxamine mesylate salt (ภาพที่ 29 และ ตารางที่ 14) แสดงให้เห็นว่าในสถานะที่มีเหล็กนั้น การปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ มีความสามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วเขียวได้ดีกว่าการปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่ไม่มีการสร้างไซเดอร์โรเฟอร์ แต่เมื่อมีการเติม deferoxamine mesylate salt พบว่ามีการกระตุ้นในต้นถั่วเขียวเจริญได้ดีไม่แตกต่างจากการปลูกเชื้อในสายพันธุ์ปกติ แสดงว่าไซเดอร์โรเฟอร์สามารถส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเขียวจริง แต่ทั้งนี้หากมีปริมาณไซเดอร์โรเฟอร์มากเกินไปจะทำให้พืชมีการเจริญชะงักลงซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้จากผลการทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 เปรียบเทียบกับการทดลองการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่เติม deferoxamine mesylate salt พบว่า ให้น้ำหนักราก น้ำหนักลำต้น ความยาวราก และความยาวลำต้นมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( ภาพที่ 29 และ ตารางที่ 14) ต้นถั่วเขียวที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่เติม deferoxamine mesylate salt นั้นเมื่อปลูกต่อไปพบว่ามีจุดเหลือง เนื่องจากการได้รับธาตุเหล็กมากเกินไปเช่นเดียวกับการทดลองในข้าว สำหรับการทดลองที่ไม่มีเหล็ก พบว่าการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ ให้น้ำหนักราก น้ำหนักลำต้น ความยาวราก และความยาวลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับทุกการทดลอง แสดงว่าสายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 มีสมบัติส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเขียวที่ 14 วัน ในสถานะที่มีเหล็กได้ดีกว่าสถานะที่ไม่มีเหล็ก (ภาพที่ 29)

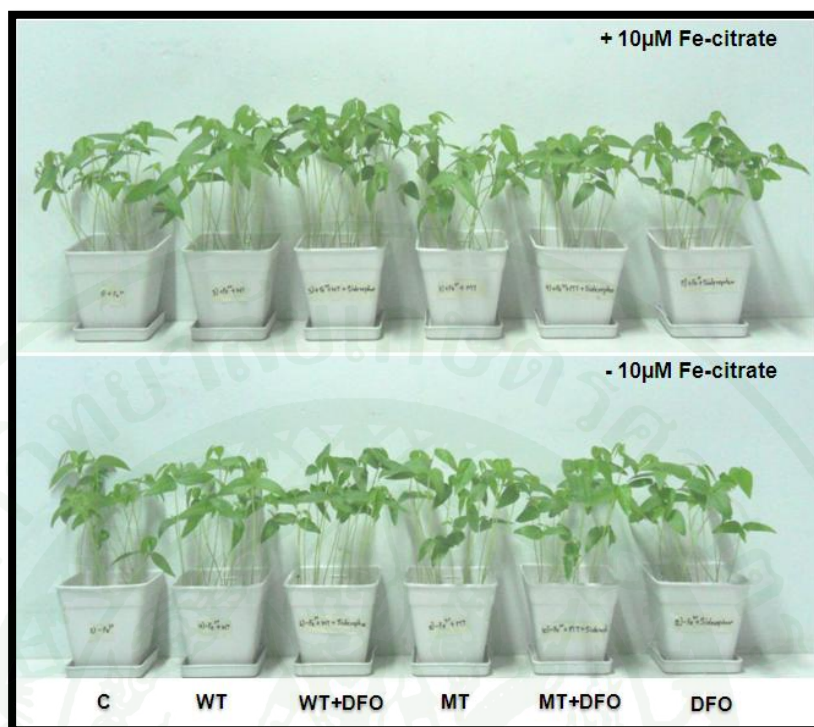
ตารางที่ 14 การเจริญของต้นถั่วเขียว ที่ 14 วันหลังได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100

| การทดลอง                  | การเจริญของราก            |                         |                     | การเจริญของลำต้น          |                         |                       |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|
|                           | น้ำหนักแห้ง<br>(กรัม/ต้น) | น้ำหนักสด<br>(กรัม/ต้น) | ความยาวราก<br>(ซม.) | น้ำหนักแห้ง<br>(กรัม/ต้น) | น้ำหนักสด<br>(กรัม/ต้น) | ความยาวลำต้น<br>(ซม.) |
| +10 $\mu$ M Feric-citrate |                           |                         |                     |                           |                         |                       |
| Control                   | 0.03 $\pm$ 0.01b          | 0.40 $\pm$ 0.09ab       | 7.56 $\pm$ 0.70b    | 0.07 $\pm$ 0.02b          | 0.82 $\pm$ 0.24ab       | 24.70 $\pm$ 0.43c     |
| WT                        | 0.09 $\pm$ 0.02a          | 0.58 $\pm$ 0.06a        | 13.50 $\pm$ 0.87a   | 0.53 $\pm$ 0.09a          | 0.87 $\pm$ 0.19ab       | 32.30 $\pm$ 1.16a     |
| WT+DFO                    | 0.04 $\pm$ 0.01b          | 0.60 $\pm$ 0.03a        | 12.60 $\pm$ 1.36a   | 0.40 $\pm$ 0.05a          | 1.04 $\pm$ 0.22a        | 32.90 $\pm$ 0.93a     |
| MT                        | 0.02 $\pm$ 0.00b          | 0.30 $\pm$ 0.02b        | 12.20 $\pm$ 1.02a   | 0.07 $\pm$ 0.01b          | 0.69 $\pm$ 0.11b        | 26.10 $\pm$ 1.11c     |
| MT+DFO                    | 0.02 $\pm$ 0.00b          | 0.43 $\pm$ 0.04ab       | 13.70 $\pm$ 0.72a   | 0.17 $\pm$ 0.03b          | 0.87 $\pm$ 0.20ab       | 30.10 $\pm$ 1.49ab    |
| DFO                       | 0.02 $\pm$ 0.00b          | 0.43 $\pm$ 0.04ab       | 13.70 $\pm$ 0.72a   | 0.17 $\pm$ 0.03b          | 0.87 $\pm$ 0.20ab       | 30.10 $\pm$ 1.49ab    |
| -10 $\mu$ M Feric-citrate |                           |                         |                     |                           |                         |                       |
| Control                   | 0.01 $\pm$ 0.01ns         | 0.41 $\pm$ 0.08ab       | 8.50 $\pm$ 0.80b    | 0.06 $\pm$ 0.01c          | 0.56 $\pm$ 0.03d        | 22.60 $\pm$ 1.43c     |
| WT                        | 0.03 $\pm$ 0.01ns         | 0.62 $\pm$ 0.11ab       | 14.30 $\pm$ 1.14a   | 0.19 $\pm$ 0.02ab         | 0.95 $\pm$ 0.05a        | 30.60 $\pm$ 1.29a     |
| WT+DFO                    | 0.02 $\pm$ 0.01ns         | 0.65 $\pm$ 0.05a        | 12.00 $\pm$ 0.85ab  | 0.23 $\pm$ 0.02a          | 0.75 $\pm$ 0.05dbcd     | 31.30 $\pm$ 1.11a     |
| MT                        | 0.01 $\pm$ 0.00ns         | 0.36 $\pm$ 0.04b        | 13.50 $\pm$ 1.00a   | 0.06 $\pm$ 0.00c          | 0.62 $\pm$ 0.03cd       | 24.50 $\pm$ 1.32cb    |
| MT+DFO                    | 0.01 $\pm$ 0.00ns         | 0.43 $\pm$ 0.03ab       | 13.50 $\pm$ 0.50a   | 0.15 $\pm$ 0.02ab         | 0.69 $\pm$ 0.02bcd      | 28.50 $\pm$ 1.32ab    |
| DFO                       | 0.02 $\pm$ 0.00ns         | 0.53 $\pm$ 0.02ab       | 11.44 $\pm$ 0.83ab  | 0.15 $\pm$ 0.01b          | 0.81 $\pm$ 0.04ab       | 27.04 $\pm$ 0.95abc   |

ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่วัดตามด้วยอักษรต่างกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $P = 0.05$ , ns = ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $P = 0.05$  โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Tukey

(ก)

(ข)



ภาพที่ 29 การเจริญต้นกล้าข้าวในกระถางที่ 14 วัน หลังได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และสายพันธุ์กลาย และเติมสาร deferoxamine mesylate salt

(ก) ต้นกล้าข้าวในสภาวะที่มีเหล็ก 10  $\mu$ M ferric-citrate

(ข) ต้นกล้าข้าวในสภาวะที่ไม่มีเหล็ก

C = ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

WT = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100

WT+DFO = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และเติม 0.5 ไมโครกรัม deferoxamine mesylate salt (DFO)

MT = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลาย

MT+DFO = ต้นข้าวได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายและเติม DFO 0.5 ไมโครกรัม

DFO = ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อแต่เติม DFO 0.5 ไมโครกรัม

### 8.3 การส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเขียวพันธุ์ชยันต 72 เมื่อปลูกเป็นเวลา 28 วัน

เมื่อต้นถั่วเขียวมีอายุครบ 28 วัน การทดลองที่มีหลัก พบว่าต้นถั่วที่ปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ได้ น้ำหนักแห้งรากที่  $0.07 \pm 0.01$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดรากที่  $1.40 \pm 0.25$  กรัมต่อต้น ความยาวรากที่  $18.30 \pm 1.11$  เซนติเมตรต่อต้น ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ แต่แตกต่างอย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติเมื่อปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 โดยพบว่าน้ำหนักแห้งรากที่  $0.18 \pm 0.02$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดรากที่  $2.40 \pm 0.14$  กรัมต่อต้น และ ความยาวรากที่  $22.90 \pm 0.87$  เซนติเมตรต่อต้น (ตารางที่ 15) เมื่อเทียบกับการปลูกด้วยสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. GMKU 100 กับการทดลองควบคุมพบว่าน้ำหนักแห้งของต้นถั่วเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 200 น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 233 และ ความยาวรากเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 121.2 ผลการเจริญลำต้นถั่วเขียวพบว่าเมื่อปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 มีน้ำหนักแห้งลำต้นที่  $0.24 \pm 0.02$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดลำต้นที่  $1.29 \pm 0.07$  กรัมต่อต้น และความยาวลำต้นที่  $34.90 \pm 0.64$  เซนติเมตรต่อต้น ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ โดยมีน้ำหนักแห้งลำต้นที่  $0.40 \pm 0.03$  กรัมต่อต้น น้ำหนักสดลำต้นที่  $2.10 \pm 0.14$  กรัมต่อต้น และ ความยาวลำต้นที่  $40.90 \pm 0.83$  เซนติเมตรต่อต้น (ตารางที่ 15) เมื่อเทียบการปลูกด้วย *Streptomyces* sp. GMKU 100 กับการทดลองควบคุมพบว่าต้นถั่วมีน้ำหนักแห้งเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 190.5 น้ำหนักสดเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 169.4 และความยาวลำต้นเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นร้อยละ 116.2 สำหรับผลการเจริญในสภาวะที่ไม่มีเชื้อให้ผลไปในทางเดียวกัน แต่ให้ค่าการเจริญของต้นถั่วเขียวน้อยกว่าในสภาวะที่มีเชื้อ (ตารางที่ 15)

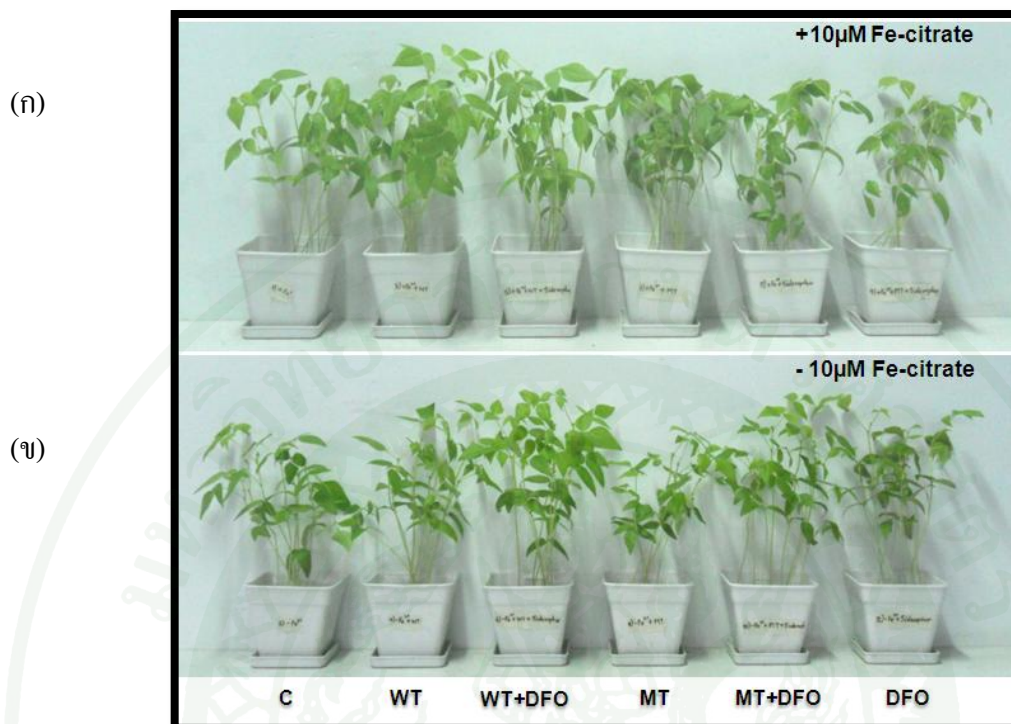
เมื่อเติม deferoxamine mesylate salt 0.5 ไมโครกรัมลงในกระถางปลูก พบว่า เมื่อปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ให้ค่าน้ำหนักราก ความยาวราก น้ำหนักลำต้น และความยาวลำต้นไม่แตกต่างที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และการทดลองควบคุม โดยให้ผลการเจริญได้ใกล้เคียงกัน แต่มีผลการเจริญน้อยกว่าการทดลองการทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ ที่เติม deferoxamine mesylate salt (ภาพที่ 31 และ ตารางที่ 15) แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่มีเชื้อนั้น การทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 มีความสามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วเขียวได้ดี กว่าทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่ไม่มีการสร้างไซเดอร์ฟออร์ แต่เมื่อมีการผสม deferoxamine mesylate salt ซึ่งเป็นสารไซเดอร์โร

ฟอร์ พบว่ามีการไปกระตุ้นในต้นถั่วเขียวเจริญได้ดีนั้นไม่แตกต่างจากการปลูกเชื้อในสายพันธุ์ปกติ แสดงว่าไซเดอร์โรฟอร์มีการส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเขียวจริง แต่ทั้งนี้หากมีปริมาณไซเดอร์โรฟอร์มากเกินไปอาจทำให้พืชมีการเจริญชะงักลงซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้จากการทดลองปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 เปรียบเทียบกับการทดลองการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่มี deferoxamine mesylate salt พบว่า ให้น้ำหนักราก น้ำหนักลำต้น ความยาวราก และความยาวลำต้นแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 30, 31 และ ตารางที่ 15) ต้นถั่วเขียวที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ผสม deferoxamine mesylate salt นั้นเมื่อปลูกต่อไปพบว่ามีจุดเหลือง เนื่องจากการได้รับธาตุเหล็กมากเกินไป สำหรับการทดลองที่ไม่มีเหล็ก พบว่าการทดลองการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ให้น้ำหนักราก น้ำหนักลำต้น ความยาวราก และความยาวลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับทุกการทดลอง แสดงว่า *Streptomyces* sp. GMKU 100 มีสมบัติส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเขียวที่ 28 วัน ในสถานะที่มีเหล็กได้ดีกว่าสถานะที่ไม่มีเหล็ก (ภาพที่ 31)

ตารางที่ 15 การเจริญของต้นถั่วเขียว ที่ 28 วันหลังได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp GMKU 100

| การทดลอง                  | การเจริญของราก    |                   |                    | การเจริญของลำต้น  |                   |                    |
|---------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|                           | น้ำหนักแห้ง       | น้ำหนักสด         | ความยาวราก         | น้ำหนักแห้ง       | น้ำหนักสด         | ความยาวราก         |
|                           | (กรัม/ต้น)        | (กรัม/ต้น)        | (ซม.)              | (กรัม/ต้น)        | (กรัม/ต้น)        | (ซม.)              |
| +10 $\mu$ M Feric-citrate |                   |                   |                    |                   |                   |                    |
| Control                   | 0.09 $\pm$ 0.01bc | 1.03 $\pm$ 0.05b  | 18.90 $\pm$ 0.97b  | 0.21 $\pm$ 0.02c  | 1.24 $\pm$ 0.02b  | 35.20 $\pm$ 1.66b  |
| WT                        | 0.18 $\pm$ 0.02a  | 2.40 $\pm$ 0.14a  | 22.90 $\pm$ 0.87a  | 0.40 $\pm$ 0.03a  | 2.10 $\pm$ 0.14a  | 40.90 $\pm$ 0.83a  |
| WT+DFO                    | 0.19 $\pm$ 0.02a  | 2.33 $\pm$ 0.07a  | 20.20 $\pm$ 0.49ab | 0.31 $\pm$ 0.02b  | 2.00 $\pm$ 0.05a  | 41.10 $\pm$ 1.09a  |
| MT                        | 0.07 $\pm$ 0.01c  | 1.40 $\pm$ 0.25b  | 18.30 $\pm$ 1.11b  | 0.24 $\pm$ 0.02bc | 1.29 $\pm$ 0.07b  | 34.90 $\pm$ 0.64b  |
| MT+DFO                    | 0.09 $\pm$ 0.01bc | 1.64 $\pm$ 0.12b  | 23.30 $\pm$ 0.93a  | 0.22 $\pm$ 0.01bc | 1.29 $\pm$ 0.05b  | 35.50 $\pm$ 0.76b  |
| DFO                       | 0.14 $\pm$ 0.01ab | 1.34 $\pm$ 0.14b  | 20.90 $\pm$ 0.44ab | 0.24 $\pm$ 0.01bc | 1.33 $\pm$ 0.04b  | 36.60 $\pm$ 1.08ab |
| -10 $\mu$ M Feri-citrate  |                   |                   |                    |                   |                   |                    |
| Control                   | 0.08 $\pm$ 0.01bc | 1.03 $\pm$ 0.15b  | 20.50 $\pm$ 2.00ab | 0.21 $\pm$ 0.02bc | 1.27 $\pm$ 0.06b  | 32.70 $\pm$ 0.94b  |
| WT                        | 0.15 $\pm$ 0.01a  | 1.66 $\pm$ 0.19a  | 23.84 $\pm$ 1.70a  | 0.35 $\pm$ 0.01a  | 1.82 $\pm$ 0.20a  | 39.70 $\pm$ 1.27a  |
| WT+DFO                    | 0.13 $\pm$ 0.01a  | 1.47 $\pm$ 0.19ab | 21.40 $\pm$ 0.66ab | 0.35 $\pm$ 0.01a  | 1.82 $\pm$ 0.15a  | 40.10 $\pm$ 1.00a  |
| MT                        | 0.06 $\pm$ 0.00c  | 1.35 $\pm$ 0.11ab | 24.20 $\pm$ 1.81a  | 0.19 $\pm$ 0.01bc | 1.21 $\pm$ 0.03b  | 31.40 $\pm$ 1.71b  |
| MT+DFO                    | 0.06 $\pm$ 0.01c  | 1.03 $\pm$ 0.04b  | 16.60 $\pm$ 1.04b  | 0.16 $\pm$ 0.01c  | 1.37 $\pm$ 0.10ab | 31.40 $\pm$ 0.83b  |
| DFO                       | 0.12 $\pm$ 0.01ab | 1.09 $\pm$ 0.14b  | 21.70 $\pm$ 0.66ab | 0.24 $\pm$ 0.02b  | 1.02 $\pm$ 0.06b  | 35.60 $\pm$ 1.04ab |

ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่วัดตามด้วยอักษรต่างกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น  $P = 0.05$  โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Tukey



ภาพที่ 30 การเจริญต้นถั่วเขียวในกระถางที่ 28 วัน หลังได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU

100 และสายพันธุ์กลาย และเติมสาร deferoxamine mesylate salt

(ก) ต้นถั่วเขียวในสภาวะที่มีเหล็ก 10  $\mu$ M ferric-citrate

(ข) ต้นถั่วเขียวในสภาวะที่ไม่มีเหล็ก

C = ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

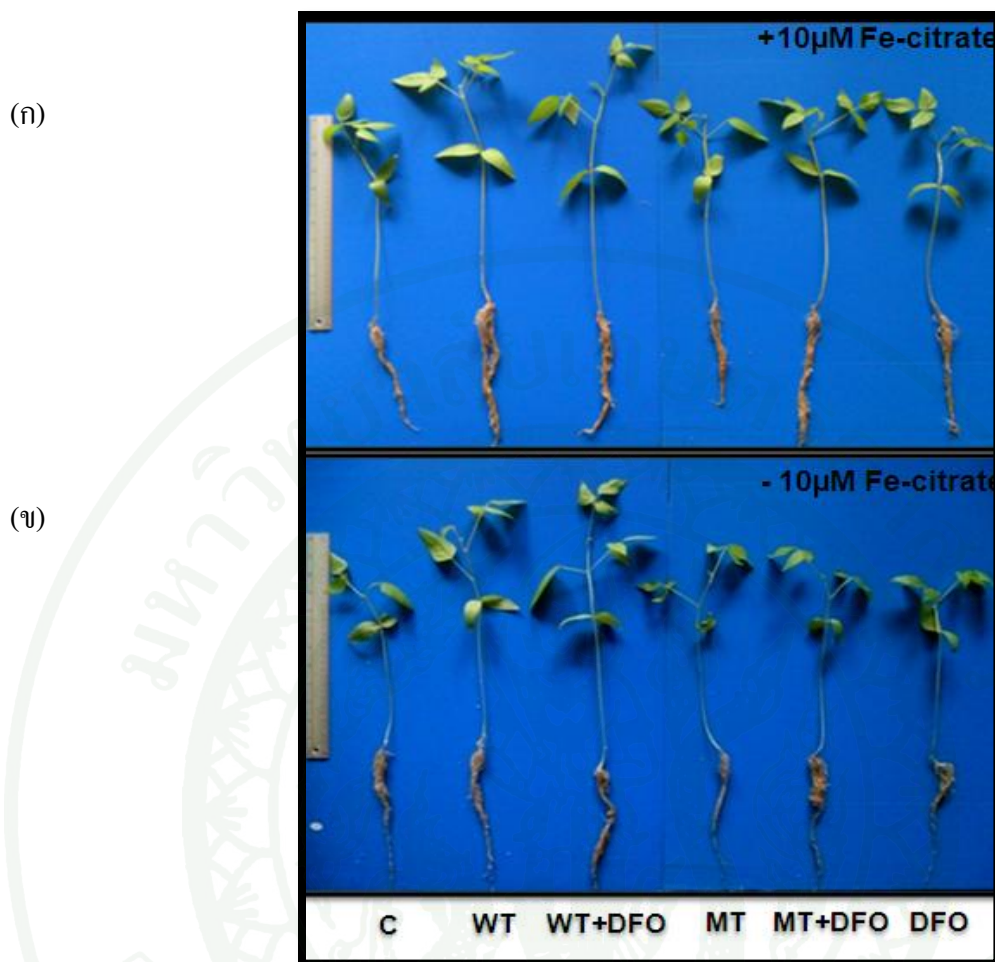
WT = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100

WT+DFO = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และเติม 0.5 ไมโครกรัม deferoxamine mesylate salt (DFO)

MT = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลาย

MT+DFO = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายและเติม DFO 0.5 ไมโครกรัม

DFO = ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อแต่เติม DFO 0.5 ไมโครกรัม



ภาพที่ 31 การเจริญต้นถั่วเขียวที่ 28 วัน หลังได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และสาย

พันธุ์กลาย และ เติมสาร deferoxamine mesylate salt

(ก) ต้นถั่วเขียวในสภาวะที่มีเหล็ก 10 μM ferric-citrate

(จ) ต้นถั่วเขียวในสภาวะที่ไม่มีเหล็ก

C = ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

WT = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100

WT+DFO = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และเติม 0.5 ไมโครกรัม deferoxamine mesylate salt (DFO)

MT = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลาย

MT+DFO = ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์กลายและเติม DFO 0.5 ไมโครกรัม

DFO = ต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อแต่เติม DFO 0.5 ไมโครกรัม

จากการศึกษาผลการเจริญของต้นถั่วเขียวที่ 14 และ 28 วัน พบว่าการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่สามารถสร้างไซเคอร์โรฟอรินั้น กระตุ้นการเจริญของลำต้น และรากของต้นถั่วเขียว แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการปลูกเชื้อที่ไม่มีความสามารถสร้างไซเคอร์โรฟอรินั้น ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าผลของการเจริญต้นถั่วเขียวพันธุ์ชัชนาท 72 เป็นผลมาจากการที่เชื้อมีการสร้างไซเคอร์โรฟอรินซึ่งมีสมบัติเป็นสารส่งเสริมการเจริญของพืช มีรายงานในปี ค.ศ. 2003 ของ Sharma *et al.* พบว่า ในสถานะที่มีความเข้มข้นของสารละลายเกลือแตกต่างกัน การปลูกเชื้อ *Pseudomonas* sp. GRP3 ที่มีความสามารถสร้างไซเคอร์โรฟอริน สามารถส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเขียว และ เชื้อ *P. striata* สามารถส่งเสริมการเจริญได้ในทั้งข้าวโพดและถั่วเขียว (Singh *et al.*, 2009)

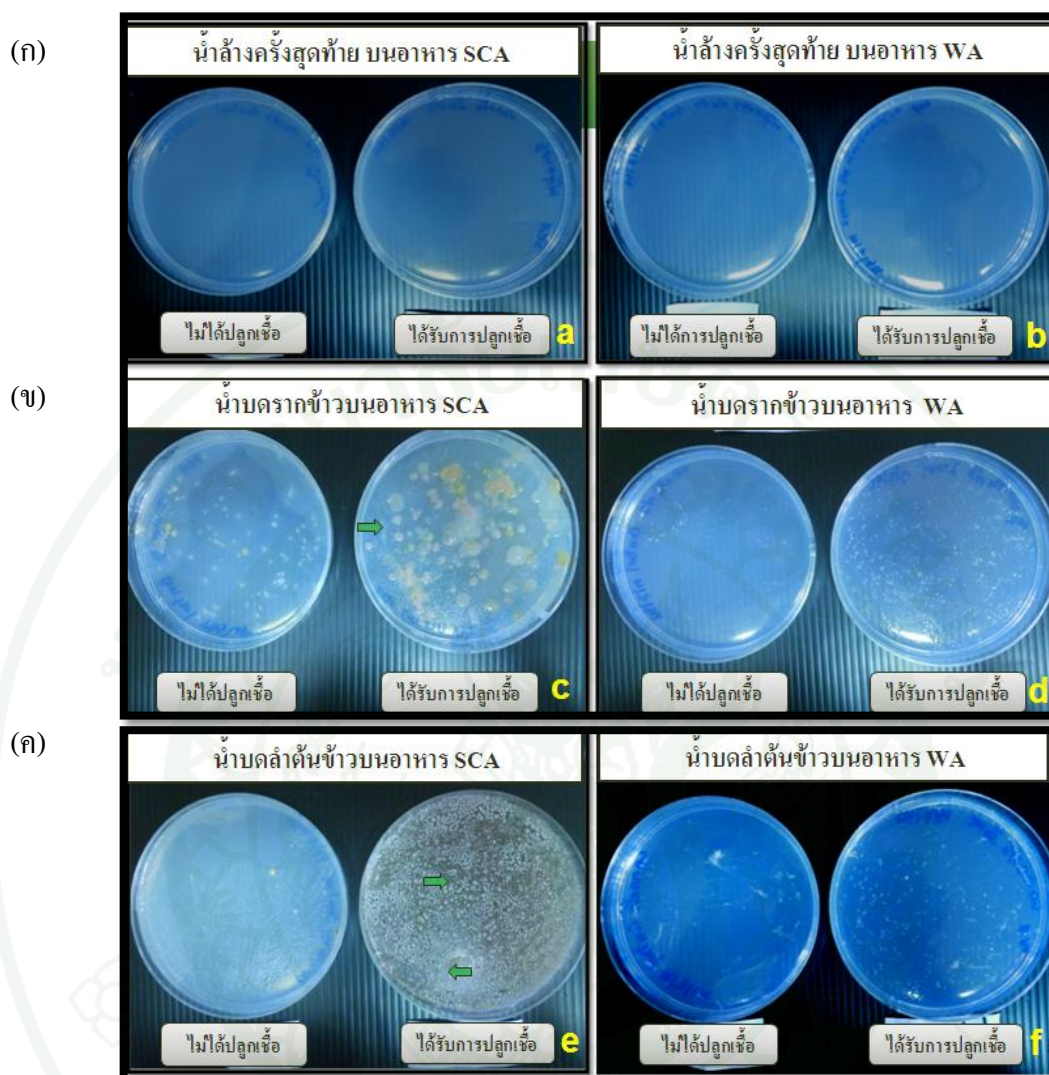
จากการศึกษาผลการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ ต้นถั่วเขียวพันธุ์ชัชนาท 72 ที่ได้รับการปลูก เชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่สร้างไซเคอร์โรฟอรินสามารถส่งเสริมการเจริญได้ดีทั้งในต้นข้าวและถั่วเขียว มีผลการรายงานพบว่ากลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ ที่สร้างไซเคอร์โรฟอริน พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของ มะเขือเทศ (Tan *et al.*, 2006) ถั่วพุ่ม (Dimkpa *et al.*, 2008) ถั่วแระ (Misk and Franco, 2011) ต้นสะเดาอินเดีย (Verma *et al.*, 2011) และข้าวสาลี (Sadeghi *et al.*, 2012) และยังพบเชื้อจุลินทรีย์ PGPR สายพันธุ์อื่นๆ เช่น *B. subtilis* CAS15 นอกจากจะสร้างไซเคอร์โรฟอรินที่สามารถยับยั้ง *Fusarium oxysporum* ยังส่งเสริมการเจริญของต้นพริกไทยได้อีกด้วย (Yu *et al.*, 2011)

## 9. การทดสอบสมบัติในการเป็นแอคติโนไมซีทเอนโดไฟต์ของ *Streptomyces* sp. GMKU 100

### 9.1 การปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 กลับเข้าสู่ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มาฆ่าเชื้อที่ผิวตามข้อ 10.1 และเพาะเมล็ดพันธุ์ตามข้อ 10.3 เมื่อต้นข้าว เจริญเป็นต้นอ่อนที่ 5 วัน นำเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่ความเข้มข้น  $3.25 \times 10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร ปลูกกลับเข้าสู่ต้นข้าวตามวิธีข้อ 10.2 นำต้นข้าวที่ได้และไม่ได้รับการปลูกเชื้อ มาการคัดแยกจุลินทรีย์จากต้นข้าวตามวิธีข้อ 10.6 พบว่าสามารถแยก เชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ในส่วนน้ำราก บดและน้ำลำต้นบด บนอาหาร SCA (ภาพที่ 32) โดยพบโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 เป็นจำนวนมาก แต่ไม่พบเชื้อบน WA และ น้ำล้างครั้งสุดท้าย ส่วนต้นข้าวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อนั้น ไม่พบ เชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 จากผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อ กลับออกมาได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 มีความสามารถเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อพืชในส่วนของลำต้นและรากได้ ซึ่งมีสมบัติในการเป็นเอนโดไฟต์

จากผลการทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 กลับออกมาได้ แสดงให้เห็นว่า GMKU 100 ที่แยกได้จากข้าว มีความสามารถเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อพืชในส่วนของลำต้นและรากได้ ทั้งในต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และต้นถั่วเขียวพันธุ์ชยันโท 72 ได้ แสดงว่า *Streptomyces* sp. GMKU 100 สามารถเข้าไปอยู่ในพืชได้หลายชนิดและมีคุณสมบัติในการเป็นเอนโดไฟต์ที่แท้จริง



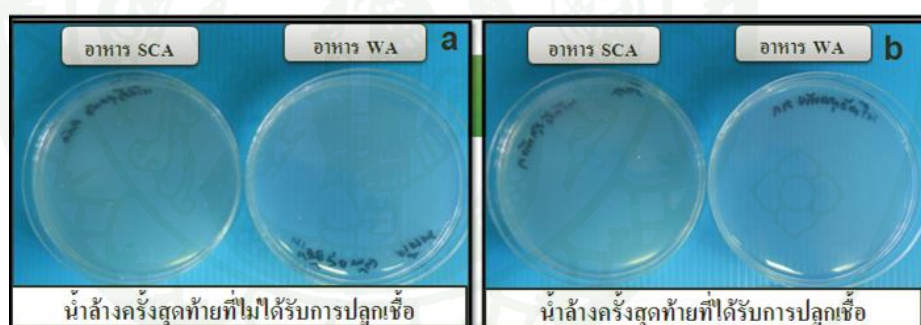
ภาพที่ 32 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ และไม่ได้  
รับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน  
(ก) น้ำล้างครั้งสุดท้ายบนอาหาร SCA และ WA, (ข) น้ำบดรากข้าวบนอาหาร SCA และ  
WA และ (ค) น้ำบดลำต้นข้าวบนอาหาร SCA และ WA  
ลูกศร = ตำแหน่งโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100

## 9.2 การปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 กลับเข้าสู่ต้นถั่วเขียวพันธุ์

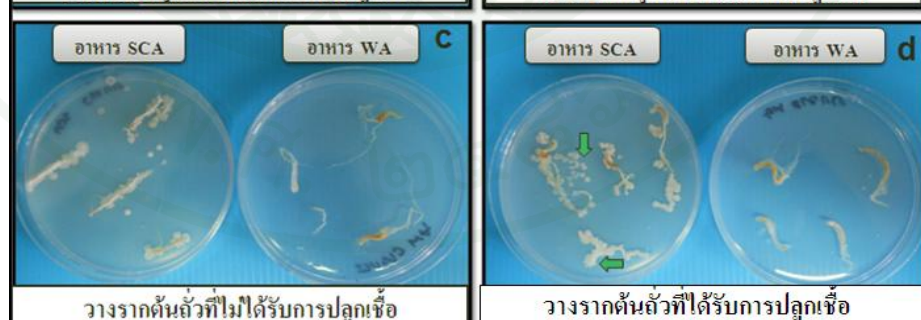
ชัยนาท 72

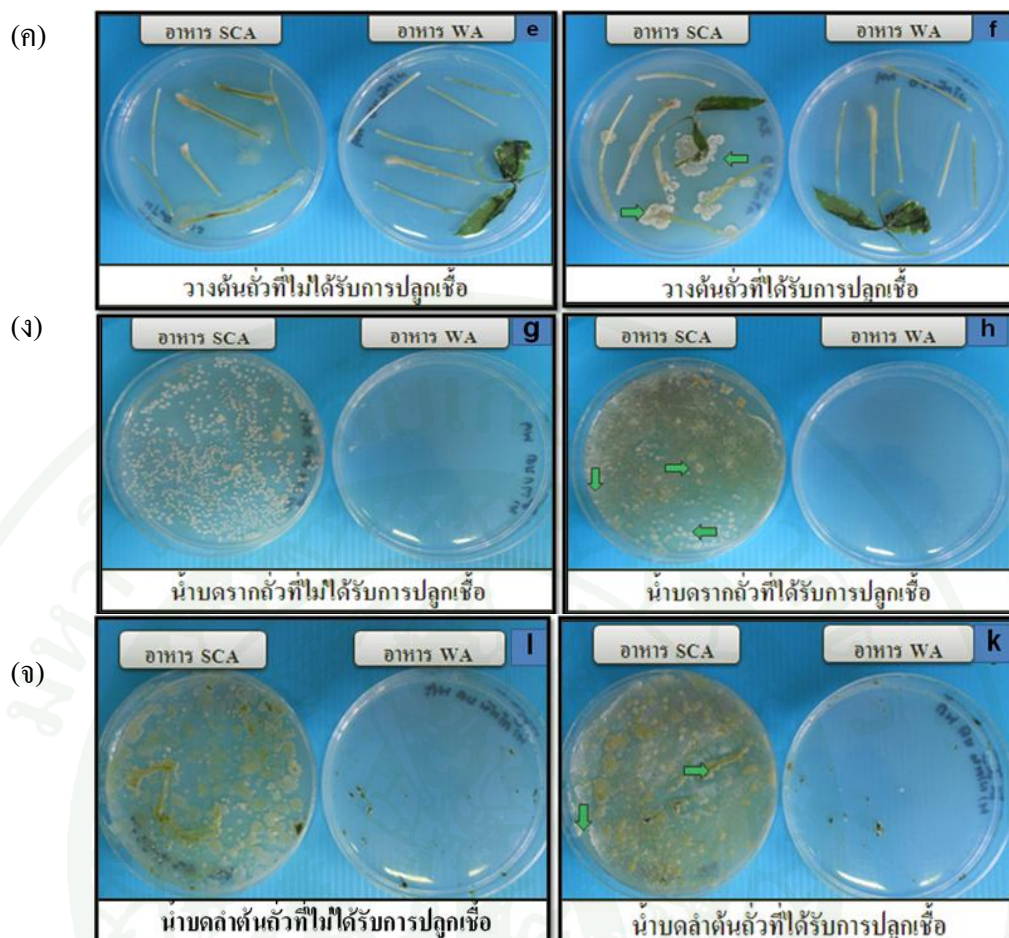
นำเมล็ดถั่วเขียวมาฆ่าเชื้อที่ผิวตามข้อ 10.1 และเพาะเมล็ดพันธุ์ตามข้อ 10.3 เมื่อต้นถั่วเขียวเจริญเป็นต้นอ่อนที่ 3 วัน นำเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ที่ความเข้มข้น  $3.85 \times 10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร ปลูกกลับเข้าสู่ต้นถั่วเขียวตามวิธี 10.2 คัดแยกจุลินทรีย์จากต้นถั่วเขียวที่ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ พบว่าสามารถคัดแยก เชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ในส่วนที่วางลำต้นและวางรากบนอาหาร SCA และ WA (water agar) (ภาพที่ 33 ขด,คฟ) พบเชื้อที่คาดว่าเป็น *Streptomyces* sp. GMKU 100 บริเวณผิวชั้นพืช และเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำรากบด และน้ำลำต้นบด บนอาหาร SCA พบโคโลนีของเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 เป็นจำนวนมาก แต่ไม่พบเชื้อบน WA (ภาพที่ 33 จห,จก ) และน้ำล้างครั้งสุดท้ายสำหรับสายพันธุ์ที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อนั้นพบว่า ไม่พบแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์สายพันธุ์ *Streptomyces* sp. GMKU 100

(ก)



(จ)





## สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ การสร้างไซเคอร์โรฟอร และการละลายฟอสเฟตของแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์จาก GMKU (Genetic – Microbiology Kasetsart University) culture collection จำนวน 56 สายพันธุ์ มีความสามารถในการสร้างไซเคอร์โรฟอรได้ทั้งหมด 39 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 64.3 มี 12 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างไซเคอร์โรฟอร และ ละลายฟอสเฟตได้ คิดเป็นร้อยละ 21.4 และสายพันธุ์ที่ละลายฟอสเฟตได้แต่ไม่สร้างไซเคอร์โรฟอรมีทั้งหมด 6 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 10.7 โดยพบว่ามีความสามารถในการสร้างไซเคอร์โรฟอรได้ดีมาก 9 สายพันธุ์ ขณะที่ 2 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างไซเคอร์โรฟอรและละลายฟอสเฟตได้เลย

เมื่อวิเคราะห์ยีน *desD* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซเคอร์โรฟอร จากแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ GMKU 100 และ GMKU 169 โดยการทำให้ยีนอาร์ด้วยไพรเมอร์จำเพาะพบว่าโปรตีน DesD ที่ได้ เป็นกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า Type C siderophore synthase โดย DesD ของสายพันธุ์ GMKU 100 เหมือนกับของ *S. albus* J1076 ที่เปอร์เซ็นต์ความคล้าย 99% และสายพันธุ์ GMKU 169 มีความเหมือนกับของ *S. lividans* TK24 และ *S. coelicolor* A3(2) ที่เปอร์เซ็นต์ความคล้าย 87% แสดงว่ายีน *desD* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซเคอร์โรฟอร จึงนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้ไปโคลน เข้าพลาสมิด pJET1.2/blunt แล้วโคลนเข้าสู่พลาสมิด pIJ8671 ได้พลาสมิด pIJ8671/*desD*

การศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU169 เพื่อใช้ในการส่งถ่ายพลาสมิดระหว่าง *E. coli* ET12567(pUZ8002) pIJ8671/*desD* กับ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และ GMKU169 พบว่าสถานะที่เหมาะสม ได้ประสิทธิภาพสูงสุดคือการคอนจูเกชันโดยใช้ไมซีเลียมที่อายุ 24 ชั่วโมง บนอาหาร MS ที่มี 10mM  $MgCl_2$  โดยสายพันธุ์ GMKU 100 มีประสิทธิภาพสูงสุดอยู่ที่  $4.55 \times 10^{-4}$  เอกซ์คอนจูเกนต์ต่อผู้รับ ส่วนสายพันธุ์ GMKU169 ให้ประสิทธิภาพต่ำกว่า 10 เท่า คัดเลือก *Streptomyces* sp. GMKU 100 มาทำดิสรัปชันของยีน *desD* โดยทำคอนจูเกชันต่างสกุล พบว่าสายพันธุ์กลายของ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ไม่สามารถสร้างไซเคอร์โรฟอรเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี CAS assay และ HPLC จึงสรุปได้ว่า ยีน *desD* ที่ศึกษานั้นมีผลต่อการสังเคราะห์ไซเคอร์โรฟอร ใน *Streptomyces* sp. GMKU 100

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของสายพันธุ์ GMKU 100 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916<sup>T</sup> และ *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455<sup>T</sup> (99.9%) เมื่อทดสอบอัตราการงอกของเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์ชยันโท 72 และ เมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลายของเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 ในสภาวะที่มีและไม่มีเหล็ก พบว่าอัตราการงอกของเมล็ดถั่วเขียวที่ปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกตินั้นมีอัตราการงอกได้สูงสุด ซึ่งสูงกว่าการปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์กลายและเมล็ดไม่ปลูกเชื้อ ส่วนอัตราการงอกของเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลินั้น ให้ผลสอดคล้องกัน แสดงว่าไซเคอร์โรฟอร์จาก *Streptomyces* sp. GMKU 100 ส่งเสริมการงอกของเมล็ด เมื่อเพาะเมล็ดทิ้งอกต่อเป็นเวลา 7 วัน พบว่าต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเขียวที่ได้รับการปลูกเชื้อสายพันธุ์ปกติมีอัตราการเจริญที่ดีกว่าการปลูกเชื้อด้วยสายพันธุ์กลาย โดยให้ความยาวรากและลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อแยกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 จากต้นข้าวและต้นถั่วเขียว พบว่าสามารถแยก เชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 กลับออกมาได้และ มีสมบัติเป็นเอนโดไฟต์เข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อพืชได้จริง พร้อมทั้งยังส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญของพืชได้ การทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวยังสามารถปลูกเข้าถั่วเขียวและส่งเสริมการเจริญในถั่วเขียวซึ่งเป็นพืชต่างชนิดกันได้ด้วย

เมื่อปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 เข้าสู่ต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของต้นข้าว โดยส่งผลต่อน้ำหนักและความยาวของราก และลำต้นข้าวได้ดีกว่าการปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์กลาย และเมื่อมีการเติม deferoxamine mesylate salt ลงไปพบว่าให้ค่าน้ำหนักราก ความยาวราก น้ำหนักลำต้น และความยาวลำต้นไม่แตกต่างจากการปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์ปกติ แสดงว่าไซเคอร์โรฟอร์มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญของข้าว เมื่อเปรียบเทียบกับทุกการทดลอง พบว่าการปลูก *Streptomyces* sp. GMKU 100 ช่วยสนับสนุนการเจริญของต้นข้าวที่ 14 วัน ในสภาวะที่มีเหล็กได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีเหล็ก

สำหรับการปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 100 และสายพันธุ์กลายใน ต้นถั่วเขียวเป็นเวลา 14 และ 28 วันในสภาวะที่มีและไม่มีเหล็ก ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเขียว ในส่วนของน้ำหนักราก น้ำหนักลำต้น และ ความยาวลำต้น และผลของการเติม deferoxamine mesylate salt ก็ให้ผลสอดคล้องกับในข้าว แสดงว่าไซเคอร์โรฟอร์มีผลต่อการเจริญของถั่วเขียวเช่นเดียวกับต้นข้าว ดังนั้น *Streptomyces* sp. GMKU 100 จึงช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเขียวและต้นข้าวได้ดีทั้งในสภาวะมีและไม่มี ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไซเคอร์โรฟอร์สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ทั้งในส่วนของลำต้นและราก

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟต์ที่สามารถสร้างไซเคอร์โรฟอร์และสายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสร้างไซเคอร์โรฟอร์โดยทดสอบกับเชื้อก่อโรคพืช และศึกษาผลการเจริญของพืช เพื่อเป็นแนวทางการนำไปประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญ และควบคุมโรคพืชให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด

2. ควรทดสอบปริมาณของไซเคอร์โรฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของพืชในสภาวะพืชสามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญได้สูงสุด โดยที่ไม่ส่งผลต่อพืช เมื่อได้รับไซเคอร์โรฟอร์และหลักในปริมาณมากเกินไป

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชาคริต บุญอยู่. 2553. การวิเคราะห์ลักษณะและติดตามแอกติโนไมซีตเอนโดไฟต์ที่คัดแยกจากกระถินณรงค์ (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.) โดยเทคนิคทางโมเลกุล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัชนิวรรณ แจ่มแสง. 2551. การโคลนและการศึกษาหน้าที่ของยีน *aroE* ในวิถี shikimate ของ *Streptomyces venezuelae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภาวิณี สุทธิวิริยะ. 2553. การคัดแยกแอกติโนไมซีตเอนโดไฟต์ที่ผลิตฮอร์โมน indole-3-acetic acid และหาพื้นที่เกี่ยวข้อง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภันตรี ธนิตไธสง. 2548. การวิเคราะห์กลุ่มยีนโพลีไทด์ซินเนสชนิดที่ 1 จาก *Streptomyces rimosus* R7 ที่สร้างสาร rimocicin. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiol Res (Pavia)**. 163: 173-181.
- Amareesan, N., V. Jayakumar, K. Kumar and N. Thajuddin. 2012. Endophytic bacteria from tomato and chilli, their diversity and antagonistic potential against *Ralstonia solanacearum*. **Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz**. 45: 344-355.
- Arnold, L.E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. **J. Biol. Chem.** 118: 531-537.

- Barona-Geoez, F., S. Lautru, F. Xavier Francou, P. Leblond, J. L. Pernodet and G. L. Challis. 2006. Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambifaciens* ATCC 23877. **Microbiology**. 152: 3355-3366.
- \_\_\_\_\_, U. Wong, A.E. Giannakopoulos, P.J. Derrick and G.L. Challis . 2004. Identification of a Cluster of Genes that Directs Desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. **J. AM. CHEM. SOC.** 126: 16282-16283.
- Bar-Ness, E., Y. Chen, Y. Hadar, H. Marschner and V. Römhelt. 1991. Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants. **Plant Soil**. 30: 231-241.
- \_\_\_\_\_, E., Y. Hada, Y. Chen, V. Römhelt and H. Marschner. 1992. Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. **Plant Pathol J.** 100: 451-456.
- Barry, S.M. and G.L Challis. 2009. Recent advances in siderophore biosynthesis. **Curr Opin Chem Biol** . 13: 205-215.
- Benson, D.R. and W.B. Silvester. 1993. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. **Microbiol. Rev.** 57: 293-319.
- Berdy, J. 1995. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites ? pp. 13-14. In V. Debabov, Y. Dudnikand V. Danlenko, eds. **Proceeding of the 9<sup>th</sup> International Symposium on the Biology of Actinomycetes**. All-Russia Scientific Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia.
- Bib, J.M. Ward and D.A. Hopwood. 1978. Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. **Nature**. 274: 398-400.

- Bierman, M., R. Logan, K. Obrien, E. T. Seno, R.N. Rao and B.E. Schoner. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces spp.* **Gene**. 116: 43-49.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Williams and Wilkins, Baltimore. 8: 747-842.
- Bullen, J.J. and E. Griffiths. 1999. Iron and Infection, Molecular, Physiological and Clinical Aspects. **Second edition John Wiley and Sons.**
- Bunet, R., A. Brock , H.-U.Rexer and E.Takano. 2006. Identification of genes involved in siderophore transport in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **FEMS Microbiol. Lett.** 262: 57-64.
- Butterton, J.R.and Calderwood, S.B. 1994. Identification, cloning, and sequencing of a gene required for ferric vibriobactin utilization by *Vibrio cholerae*. **J Bacteriol.** 176: 5631-5638.
- Buyer, J.S. and L.J.Sikora . 1990. Rhizosphere interactions and siderophores. **Plant Soil.** 129: 101-107.
- Cao, L., Z. Qiu, J. You, H. Tan and S. Zhou. 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Lett. Appl. Microbiol.** 39: 425-430.
- \_\_\_\_\_, L., Z. Qiu, J. You, H. Tan, S. Zhou. 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiol Lett.** 247:147–152.

- Challis, G.L. and J. Ravel. 2000. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non ribosomal peptide synthetase. **FEMS. Microbiol. Lett.** 187: 111-114.
- \_\_\_\_\_. 2005. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. **ChemBioChem.** 6: 601–611.
- Chookietwattana, K and Maneewan K. 2012 Screening of efficient halotolerant phosphate solubilizing bacterium and its effect on promoting plant growth under saline conditions. **World Appl Sci J.** 16: 1110-1117.
- Chung, C.T., S.L. Niemela and R.H. Miller. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia Coli*: Transformation and storage of bacteria cells in the same solution. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** 86: 2172-2175.
- Coombs, J. T. and C. M. M. Franco. 2003a. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 5603-5608.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 2003b. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 4260-4262.
- \_\_\_\_\_, J.T, P.P Michelsen and C.M.M. Franco. 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici in wheat. **Biol Control.** 29:359–366.
- Crosa, J.H. and C.T. Walsh. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 66: 223-249.
- Csaky, T.Z. 1948. On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials . **Acta Chem. Scand.** 2: 370-386.

- Dimkpa C, A. Svatoš, D. Merten, G. Büchel, E. Kothe. 2008. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna.unguiculata* L.) under nickel stress. **Can J Microbiol** 54:163–172.
- Doekel, S. and Marahiel M.A. 2000. Biosynthesis of Natural Products on Modular peptide Synthetases. **Metab. Eng.** 3: 64-77.
- Dorofeeva, L.V., V.I. Krausova, L.I. Evtushenko and J.M.Tiedje. 2003. *Agromyces albus* sp. nov., isolated from a plant (*Androsace* sp.). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 1435-1438.
- Duangmal, K., A. Thamchaipenet, A. Matsumoto and Y. Takahashi. 2009. *Pseudonocardia acaciae* sp. nov., isolated from *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 59: 1487-1491.
- Ebben, M.H. and D.M. Spencer. 1978. The use of antagonistic organisms for control of black root rot of cucumber, *Phomopsis sclerotoides*. **Annu. Appl. Biol.** 89:103-106.
- El-Tarabily K.A., A.H. Nassar, G.E.S.J Hardy and K. Sivasithamparam. 2009. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. **J Appl Microbiol.** 106: 13–26.
- Enriquez, L.L., M.V. Mendes, N. Anton, S. Tunca, S.M. Guerra and J.F Martín. 2006. An efficient gene transfer system for the pimarin producer *Streptomyces natalensis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 257: 312-318.
- Expert, D., C. Enard, and C. Masclaux. 1996. The role of iron in plant host-pathogen interactions. **Trends Microbiol.** 4: 232-237

Faraldo-Gomez, J.D. and M.S.P. Sansom. 2003. Acquisition of siderophore in gram-negative.

**Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 4: 105-116.

Fiedler, H.-P., P. Krastel, J. Müller, K. Gebhardt and A. Zeeck. 2001. Enterobactin: The characteristic catecholate siderophore of Enterobacteriaceae is produced by *Streptomyces* species.

**FEMS Microbiol. Lett.** 196: 147-151.

Flett, F., V. Mersinias and C.P. Smith. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting *Streptomyces*. **FEMS Microbiol. Lett.** 155: 223-229.

Flores, F.J. and J.F Martin. 2004 . Iron-regulatory proteins DmdR1 and DmdR2 of *Streptomyces coelicolor* from two different DNA-protein complexes with iron boxes. **Biochem J.** 380: 497-503.

\_\_\_\_\_, F.J., C.Barreiro , J.J.R. Coque and J.F Martín. 2004. Functional analysis of two divalent metal-dependent regulatory genes dmdR1 and dmdR2 in *Streptomyces coelicolor* and proteome changes in deletion mutants. **FEBS J.** 272: 725-735.

Foulston, L.C., Bibb, M.J. 2010. Microbisporicin gene cluster reveals unusual features of lantibiotic biosynthesis in actinomycetes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 107: 13461-13466.

Glick, B.R. and Y.Bashan. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnol. Adv.** 15: 353-378.

\_\_\_\_\_, B.R., L. Changping, G. Sibdas and E.B. Dumbroff. 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Soil Biol Biochem.** 29:1233–1239.

- \_\_\_\_\_, B.R., D.M. Penrose and J. Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **J. Theor. Biol.** 190: 63-68.
- \_\_\_\_\_, B.R., Z. Cheng, J. Czarny and J. Duan. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **Eur. J. Plant Pathol.** 119.: 329-339.
- Goodfellow, M., S.T. Williams and M. Mordaski. 1988. **Actinomycetes in Biotechnology.** Academic Press, London.
- Guan, D. and G.S. Pettis. 2009. Intergeneric conjugal gene transfer from *Escherichia coli* to the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoeae*. **Lett. Appl. Microbiol.** 49: 67-72.
- Gunter, K., C. Toupet and T. Schupp. 1993. Characterization of an iron-regulated involved in desferrioxamine B synthesis in *Streptomyces pilosus* repressor binding site and homology to the diphtheria toxin gene promoter. **J Bacteriol.** 175: 3295-3302.
- Haas, H. 2003. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophore in iron uptake and storage. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 62:316-330.
- Hall, J.A, D. Pierson, S. Ghosh and B.R Glick. 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growthpromoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Isr J Plant Sci.** 44: 37-42.
- Hamdali, H., M. Hafidi, M.J. Virolle and Y. Ouhdouch, 2008. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: Screening for plant growth-promoting activities. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 2565-2575.
- Hasegawa, S., A. Meguro, M. Shimizu, T. Nishimura and H. Kunoh. 2006. Endophytic actinomycetes and their interaction with host plants. **Actinomycetologica** 20: 72-81.

- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. **Plant Soil**. 237: 173-195.
- Hobbs, G., C.M. Frazer, D.C.J. Gardner, J.A. Cullum and S.G. Oliver. 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 31: 272-277.
- Holguin, G. and Bashan Y. 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* CD is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). **Soil Biol. Biochem.** 28: 1651-1660.
- Holm, R.H., P. Kenne and E.I. Solomon. 1996. Structural and functional aspects of metal sites in biology. **Chemical Reviews**. 96. 2239-2314.
- Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chapter, T. Kieser, C.T. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward and H. Schrempf. 1985. **Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual**. The John Innes Foundation, Norwich, 356 p.
- Hou, Y.-H., F.-C. Li, S.-J. Wang, S. Qin, and Q.-F. Wang. 2008. Intergeneric conjugation in holomycin-producing marine *Streptomyces* sp. strain M095. **Microbiol Res.** 163: 96-104.
- Ikeda, H., T. Nonomiya, M. Usami, T. Ohta and S. Omura. 1999. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 96: 9509-9514.
- \_\_\_\_\_, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori and S. Omura. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of industrial Microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nat. Biotechnol.** 21: 526-531.

- Igarashi, Y., T. Iwashita, T. Fujita, H. Naoki, T. Yamakawa, R. Yoshida and T. Furumai. 2002. Clethramycin, a new inhibitor of pollen tube growth with antifungal activity from *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0623. II. Physico-chemical properties and structure determination. **J. Antibiot.** 56: 705-706.
- Imbert, M., M. Bechet and R. Blondeau. 1995. Comparison of the main siderophores produced by some species of *Streptomyces*. **Curr. Microbiol.** 31:129-133.
- Indananda, C., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Takahashi, Y., Duangmal, K. and Thamchaipenet, A. 2010. *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov., isolated from the roots of Thai glutinous rice plants, a new member of the family Pseudonocardiaceae. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 60:1141-1146.
- \_\_\_\_\_, A. Thamchaipenet, A. Matsumoto, K. Duangmal and Y. Takahashi. 2010. *Actinoallomurus oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from root of Thai jasmine rice plant. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 61:737-741.
- Joshi, F.R., G. Archana and A. Desai. 2006. Siderophore cross-utilization amongst rhizospheric bacteria and the role of their differential affinities for Fe<sup>3+</sup> on growth stimulation under iron-limited conditions. **Curr. Microbiol.** 53: 141-147.
- \_\_\_\_\_, F.R., S.P. Kholiya, G. Archana. and A.J. Desai. 2008. Siderophore crossutilization amongst nodule isolates of the cowpea miscellany group and its effect on plant growth in the presence of antagonistic organisms. **Int J Microbiol Res.** 163: 564-570.
- Kadi, N., D.Oves-Costales, F. Barona-Gomez, and G.L. Challis. 2007. A new family of ATP-dependent oligomerization-macrocyclization biocatalysts. **Nat. Chem. Biol.** 3: 652-656.

- Kang, Y., J. Cheng, L. Mei and S. Yin. 2010. Screening and identification of plant growth-promoting rhizobacteria. **Wei Sheng Wu Xue Bao**. 50: 853-861.
- Keating, T.A., and C.T. Walsh. 1999. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. **Curr Opin Chem Biol**. 3: 598-606.
- Khaled, A. El-Tarabily K.A., Giles E. St. J. Hardy and K. Sivasithamparam. 2010. Performance of three endophytic actinomycetes in relation to plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber under commercial field production conditions in the United Arab Emirates. **Eur. J. Plant Pathol**. 128: 527-539.
- Krewulak, K. D. and J. Hans. Vogel. 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochim. Biophys. Acta**. 9: 1781-1804.
- Kieser, H.M., T. Kieser, M.J. Buttner, K.F. Chater and D.A. Hopwood. 2000. **Practical Streptomyces Genetics**. The John Innes Foundation, Norwich. 613 p.
- Kitani, S., M.J. Bibb, T. Nihira and Y. Yamada. 2000. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces lavendulae* FRI-5. **J. Microbiol. Biotechnol**. 10: 535-538.
- Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teintze, and M.N. Schroth. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease- suppressive soils . **Curr. Microbiol**. 4: 317-320.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform**. 5: 150-163.
- Küster, E. and S.T. Williams. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature** 202: 928-929.

- Lautru, S., D. Oves-Costales, J.L. Pernodet and G.L. Challis. 2007. MbtH-like protein-mediated cross-talk between non-ribosomal peptide antibiotic and siderophore biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* M145 . **Microbiology**. 153: 1405-1412.
- Leblond, P., M. Redenbach and J. Cullum. 1993. Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2) **J. Bacteriol.** 175: 3422-3429.
- Lezhava, A., T. Mizukami, T. Kajitani, D. Kameoka, M. Redenbach, H. Shinkawa, O. Nimi and H. Kinashi. 1995. Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. **J. Bacteriol.** 177: 6492-6498.
- Lin, T.S., H.M. Kieser, D.A. Hopwood and C.W. Chen. 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. **Mol. Microbiol.** 10: 923-933.
- Macagnan, D., R.d.S. Romeiro , A.W.V. Pomella and J.T. deSouza . 2008. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex. *Crinipellis*) *perniciosa* by phylloplane actinomycetes. **Biol. Control.** 47:309-314.
- MacNeil, D.J., K.M. Gewain, C.L. Ruby, G. Dezeny, P.H. Gibbons and T. and MacNeil. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. **Gene**. 111: 61-68.
- \_\_\_\_\_, D.J. 1988. Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. **J. Bacteriol.** 170: 5607-5612.
- Matsushima, P. and R.H. Baltz . 1985. Efficient plasmid transformation of *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae* protoplasts. **J. Bacteriol.** 163: 180-185.
- Mazodier, P., R. Petter and C. Thompson. 1989. Intergeneric conjugation between *E.coli* and *Streptomyces* species. **J. Bacteriol.** 171: 3583-3585.

- Meguro, A., Y. Ohmura, S. Hasegawa, M. Shimizu, T. Nishimura and H. Kunoh. 2006. An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. MBR-52, that accelerates emergence and elongation of plant adventitious roots. **Actinomycetologica**. 20: 1-9.
- Merriman, T.R., M.E. Merriman and I.L. Lamont. 1995. Nucleotide sequence of *pvdD*, a pyoverdine biosynthetic gene from *Pseudomonas aeruginosa*: PvdD has similarity to peptide synthetases. **J Bacteriol**. 177: 252-258.
- Miethke, M. and Marahiel, M.A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control . **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 71: 413-451.
- Miller, G.W., I.J Huang, G.W. and J.C. Pushmik. 1995. Function of iron in plants with special emphasis on chloroplasts and photosynthetic activity. In: Abadia, J., (Ed.), Iron nutrition in soils and Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 19-28.
- Misk A. and C. Franco. 2011. Biocontrol of chickpea root rot using endophytic actinobacteria. **Bio Control** 56:811–822.
- Miyashita, K., T. Fujii and Y. Sawada. 1991. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. **J. Gen. Microbiol.** 137: 2065-2072.
- Mossialos, D. and G.D. Amoutzias. 2009. Role of siderophore in cystic fibrosis pathogenesis. **Int. J. Med. Microbiol.** 299: 87-98.
- Muller, G. and K.N.Raymond. 1984. Specificity and mechanism of ferrioxamine-mediated iron transport in *Streptomyces pilosus*. **J Bacteriol**. 160: 304-312.
- Musson, G., J.A. McInroy and J.W. Kloepper. 1995. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. **Biocontrol Sci Technol**.5: 407-416.

- Neilands, J. B. 1995. Siderophore: Structure and function of microbial iron transport compound. **J. Biol. Chem.** 270: 26723-26726.
- Nimnoi P., N. Pongsilp and S. Lumyong. 2010. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. **World J Microbiol Biotechnol.** 26: 193–203.
- O'Brien, I.G., Gibson, F. 1970. The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoyne conjugates from *Escherichia Coli*. **Biochim. Biophys. Acta.** 215: 393-402.
- O'Sullivan, D.J. and F. O'Gara. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. **Microbiol. Rev.** 56: 662-676.
- Patel, D., C.K. Jha , N.Tank, and M. Saraf, 2012. Growth Enhancement of Chickpea in Saline Soils Using Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. **J. Plant Growth Regul.** 31:53-62.
- Pandza, K., G. Pfalzer, J. Cullum and D. Hranueli. 1997. Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. **Microbiology.** 143: 1493-1501.
- Paranthaman, S. and K. Dharmalingam. 2003. Intergeneric conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. strain C5: Chromosomal integration and expression of recombinant plasmids carrying the *chiC* gene. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 84-91.
- Penrose, D.M. and B.R. Glick . 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiol Plant.** 118: 10-15.

- Phornphisutthimas, S., N. Sudtachat, C. Bunyoo, P. Chotewutmontri, B. Panijpan and A. Thamchaipenet. 2010. Development of an intergeneric conjugal transfer system for rimocidin-producing *Streptomyces rimosus*. **Lett. Appl. Microbiol.** 50: 530-536.
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya** 17:362–370.
- Pigac, J. and H. Schrempf. 1995. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other streptomycetes by electroporation. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 352-356.
- Quecine, M.C., W.L Araujo, J. Marcon, C.S. Gai, J.L. Azevedo and A.A. Pizzirani-Kleiner. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. **Lett Appl Microbiol.** 47:486–491.
- Reimann, C., L. Serino, M. Beyeler and D. Haas. 1998. Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the *pchEF* genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa* **Microbiology.** 144: 3135-3148.
- Rodríguez, H. and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol. Adv.** 17: 319-339.
- Rodicio, M.R, and K.F. Chater. 1988. The SalI (SalGI) restriction-modification system of *Streptomyces albus* G. **Gene.** 74:39-42.
- Sadeghi A, E. Karimi, P.A. Dahaji, M.G. Javid, Y. Dalvand and H. Askari. 2012. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. **World J Microbiol Biotechnol.** 28:1503–1509.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4: 406-425.

- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, J., C. Barbes, A. Hernandez, C.R. de los Reyes Gavilan and C. Hardisson. 1985. Restriction-modification systems in *Streptomyces antibioticus*. **Can. J. Microbiol.** 31: 942-946.
- Schwyn, B. and J.B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Anal Biochem** 160: 47-50.
- Seghers, D., L. Wittebolle, E.M. Top and W. Verstraete. 2004. Impact of agricultural practices on *Zea mays* L. endophytic community. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 1475-1482.
- Sharma, A., B.N.Johri, A.K.Sharma and B.R. Glick. 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). **Soil Biol. Biochem.** 35: 887-89
- Sia, E.A., D.M. Kuehner and D.H. Figurski. 1996. Mechanism of retrotransfer in conjugation: prior transfer of the conjugative plasmid is required. **J. Bacteriol.** 178: 1457-1464.
- Singh, G., N. Singh and T.S. Marwaha. 2009. Crop genotype and a novel symbiotic fungus influences the root endophytic colonization potential of plant growth promoting rhizobacteria. **Physiol Mol Biol Plants.** 15: 87-92.
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 16: 3313-3340.
- Snyder, L. and W. Champness. 1997. **Molecular Genetics of Bacteria**. American Society for Microbiology Press, Washington.

- Stewart, J.W.B., M.J. Hedley and B.S. Chauhan. 1980. The immobilization and redistribution of phosphorus in soil, pp 276-306. In **Western Canadian Phosphate Symposium** Proceeding. 12-20 March 1980, Western Canada Soils Co-ordinating Committee and the Western Canada Fertilizer Association. Alberta, Canada.
- Stoebner, J.A., J.R. Butters, S.B. Calderwood and S.M. Payne. 1992. Identification of the vibriobactin receptor of *Vibrio cholerae*. **J Bacteriol.** 174: 3270-3274.
- Sun, Y., Z. Cheng and B.R. Glick. 2009. The presence of a1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **FEMS Microbiol. Lett.** 296: 131-136.
- Taechowisan, T., C. Lu, Y. Shen and S. Lumyong. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology.** 151: 1691-1695.
- Tan, H.M., L.X Cao, Z.F. He, G.J. Su, B. Lin and S.N. Zhou. 2006. Isolation of endophytic actinobacteria from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* in vitro. **World J Microbiol Biotechnol** 22:1275–1280.
- Tank, N. and M. Saraf. 2003. Phosphate solubilization, exopolysaccharide production and indole acetic acid secretion by rhizobacteria isolated from *Trigonella foenum-graecum*. **Indian J. Microbiol.** 43: 37-40.
- Tansupo, S., M. Sriutha, S. Chanthai and C. Ruangviriyachai. 2005. The application of siderophore for remediation of some heavy metals. **Sursnaree J. Sci. Technol.** 1847-1850.
- Teaumroog, N., N. Boonkerd and K. Haselwandter. 2000. Effect of the iron sources on the siderophore produced from *Bacillus Polymyxa*. **Sursnaree J. Sci. Technol.** 3: 1333-1337.

- Tewfik, E.M. and S.G. Bradley. 1967. Characterization of deoxyribonucleic acids from streptomycetes and nocardia. **J. Bacteriol.** 94: 1994-2000.
- Thamchaipenat, A., C. Indananda, C. Bunyoo, K. Duangmal, A. Matsumoto and Y. Takahashi. 2010. *Actinoallomurus acaciae* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 60: 554-559.
- Thorpe, H.M., S.E Wilson and M.C.M. Smith. 2000. Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage  $\phi$ C31. **Mol. Microbiol.** 38: 232-241.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22: 4673-4680.
- Tierrafría, V.H., H.E. Ramos-Aboites , G. Gosset and F. Barona-Gómez. 2011. Disruption of the siderophore-binding desE receptor gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2) results in impaired growth in spite of multiple iron-siderophore transport systems. **Microb Biotechnol.** 4 :275-285.
- Tian, X.L., L.X. Cao, H.M. Tan, Q.G. Zeng, Y.Y. Jia, W.Q. Han and S.N. Zhou. 2004. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 20: 303-309.
- Tian, X., Cao L, Tan H, Han W, Chen M, Liu Y, Zhou S. 2007. Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. **Microbial Ecol.** 53:700–707.

- Tilak, K.V.B.R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A.K. Saxena, C.S. Nautiyal, S. Mittal, A.K. Tripathi and B.N. Johri. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. **Curr. Sci.** 89:136-150.
- Trujillo, M.E., R.M.Kroppenstedt, C. Fernández-Molinero, P. Schumann and E. Martínez-Molina. 2007. *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57: 2799-2804.
- Tunca, S., C. Barreiro, A. Sola-Landa, J. J. R. Coque and J. F. Martin. 2006. Transcription regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the *desA* gene. **FEBS J.** 274: 1110-1122.
- Usha Rani, M., Arundhathi and G. Reddy. 2012. *Bacillus cereus* and *Enterobacter cancerogenus* screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soils of Pigeon Pea. **Afr J Microbiol Res.** 5: 2090-2094.
- Venturi, V., P. Weisbeek and. M. Koster, 1995. Gene regulation of siderophore mediate iron Acquisition in *Pseudomonas*: not only the fer repressor. **Mol. Microbiol.** 17: 603-610.
- Verma, V.C., Singh, S.K. and Prakash, S. 2011. Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. **J. Basic Microbiol.** 51:550-556.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil.** 255: 571-586.

- Vijay Krishna Kumar, K., M.S Reddy, J.W. Kloepper, K.S. Lawrence, S.Kr. Yellareddygar, X.G. Zhou, H. Sudini, E.C. Surendranatha Reddy, D.E. Groth and M.E. Miller. 2012. Screening and selection of elite plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for suppression of *Rhizoctonia solani* and enhancement of rice seedling vigor. **J Pure Appl Microbiol.** 5: 641-651.
- Wang, C., E. Knill, B. R. Glick and G. De'fago. 2000. Effect of transferring 1- aminocyclopropane-1- carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities. **Can. J. Microbiol.** 46: 898–907.
- Wellington, E.M.H., N. Cresswell and P.R. Herron. 1992. Gene transfer between streptomycetes in soil. **Gene** 115: 193-198.
- Went, F.W. and K.V. Thimann. 1937. **Phytohormone**. Macmillan, New York.
- Williams, S.T., M.E. Sharpe and J.G. Holt. 1989. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams and Wikins, Baltimore.
- Xiao, K., L.L. Kinkel and D.A. Samac. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. **Biol. Control** 23: 285-295.
- Yu, X., Ai C., L. Xin and Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **Eur. J. Soil Biol.** 47:138-145.
- Zeng, Q., F. Luo , Z. Zhang , R. Yan and D. Zhu. 2012. Phosphate solubilizing rhizosphere bacterial T21 isolated from Dongxiang wild rice species promotes cultivated rice growth. **Applied Mechanics and Materials.** 108: 167-175.

Zin N.M., N.I.M Sarmin, N. Ghadin, D.F. Basri, N.M. Sidik, W.M. Hess and G.A. Strobel. 2007.

Bioactive endophytic streptomycetes from the Malay Peninsula. **FEMS Microbiol Lett.**

274:83–88.





ภาคผนวก

# ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยการเพิ่มปริมาณยีน *desD* ด้วยไพรเมอร์ ATT083F และ ATT083R

GMKU100

LOCUS 091028-14\_L18\_GMKU\_100-ATT083F 851 bp  
 DEFINITION 091028-14\_L18\_GMKU\_100-ATT083F.ab1 851, 851 bases, 840  
 checksum.  
 ORIGIN

```

1   TCGCGAGTAC CACCAGTACG CCCCCGAGAC CGCCTCCCCG GTCCGGCTGC
51  TCTGGCTCGC CGCCCGCCGC GACCGCTCCA CCTTCACCAG CGGCGCCGGG
101 CTCGACTACG ACACGCTGGT CAAGGGCGAG CTGGACCCGG CGACGCTGGC
151 CCGGTTTCGCC GCCACCCTGG CCGGCCAGGG GCTCGACCTG GCCGACTACC
201 ACCTGCTGCC GGTCCACCCC TGGCAGTGGT GGAACAAGCT CTCCGTCTCC
251 TTCGCCGCCG AGGTCGCCCA GCAGCGCCTG GTCCTGCTCG GCGAGGGCGA
301 CGACGCGTAC CTCGCGCAGC AGTCGATCCG GACCTTCTTC AACACCAGCC
351 ACCCCGACAA GCACTACGTG AAGACCGCGA TGTCGGTGCT GAACATGGGC
401 TTCATGCGGG GCCTGTCGGC CGCCTACATG GAGGCCACCC CGGCGATCAA
451 CGACTGGCTG GCCCAGCTCA TCGCCGGTGA CGAGGTCTTC CGGGCCGCGC
501 GCTTCTCGAT CATCCGCGAG CGCGCCGCCA TCGGCTACCA CCACCGCCAG
551 TACGAGCGGG CCACCGACCG GTACTCGCCG TACCGCAAGA TGCTGGCCGC
601 GCTCTGGCGG GAGAGCCCGG TGCCGCAGCT CGGCGAGGGA CAGCGGCTGG
651 CCACCATGGC CTCGCTGCTC CACACCGACG CCGACGGCGC CTCGCTGGCG
701 GGCGCGCTGA TCGCCGAGTC GGGGCTGGCA CCCGAGGTGT GGCTGCGCCG
751 CTACCCTGGA CGCCTACCTC GTGCCGGCGC TGTATTCCTT TTTACCAGTA
801 CGACCTTGTG TATTGCCGCA CGGCGAGGAA TGTTA
  
```

## GMKU121

LOCUS 091028-14\_M18\_GMKU\_121-ATT083F 574 bp  
 DEFINITION 091028-14\_M18\_GMKU\_121-ATT083F.ab1 574, 574 bases,  
 2117 checksum.  
 ORIGIN

```

1 AGTACCTGTC GTACGCGCCG GAGACGGCGA ACCCGGTCCG GCTCGTCTGG
51 CTCGCGGCGC ACCGCTCCCC TGCCGCGTTC ACGGCCGGGG TCGGCATCGA
101 GTACAAGTCG TTCCTGCGCG AGGAGCTGGG CGAACGGACC GTCAAGCGCT
151 TCCACAGGGC CCTGCCCACC CGTATCCTGG CCCCCTGGGA TGAACGGATG
201 ATACCAGTGC TTCCCCGATG CCGAACCCTT AATCCCGTGA TCAATGTCGT
251 CAAATTGTCT GCCCTATTG TCGTGCTATT GAACGACTCC ACACATCTGT
301 GGTATCGGTT CCTTTGGGTT GCGTGGGATA TCTTCTCTTG GTCCGGGTTT
351 AACGATATTG CATATTCGAA TAAGGGACCA AAGAGAACGA CGCCTATAAA
401 TTCCATGCTC TGGGGGATCA GTCCGAGTGC CCTATTTTTC ATTAACTTTT
451 TTGCCTACCG GTTTGGTTTC TTCCTAATTG GATTAGGTAC AATACGAGTG
501 GACGACTCTA TCAAATCCCT CTTTGCCTTT TTATTTAGGG TTCTTTTCCT
551 CCGTATT

```

## GMKU 152

LOCUS GMKU\_152-ATT083F.515 515 bp  
 DEFINITION GMKU\_152-ATT083F.515, 515 bases, 2431 checksum.  
 ORIGIN

```

1 GAGTACGGCA GTACGCCCCG GAGGCCGCGA ACCCGGTGAG GCTGGTGTGG
51 CTGGCCGCCC ACCGCTCCCC GGCCGCGTTC ACGGCCGGCG TGGGCATCGA
101 GTACGAGTCG TTCGTCCGCG AGGAGCTGGG CGAGGATACC GTCAAGGGCT
151 TCCACGACGT CCTGCGCGGC GCATGACCTG GACCCCGCCT ACTACCTCCA
201 CATAACGGTC CACCCCTGGC AGCGGTGTAA CTAGTCCCGT GAAAGTCTCG
251 GCATACTTGG CTCCAGCTAT GGGTGTTCTC TTGAGGCAAA TCTATTGCAG
301 TATGTTGTTA TTTATTGGGA TACGAATTAA ATCATCTTCT TGTGGCGTGT
351 TTATGAACGA TTCACTTTAT GGGTACCACA AAACGCAAC CTTTAGAATA
401 CCTGGTCACT TACAACGGA CAGCCCTCTC TTGAAAACCT CAATTTTGTG
451 TTTACCTGTT GTTCCCTTTC TAACTATATT ACACCTATTA GATTGGAC

```

GMKU 163

LOCUS GMKU\_163-ATT083F 387 bp  
 DEFINITION GMKU\_163-ATT083F sequence exported from chromatogram file,  
 387 bases, 1552 checksum.  
 ORIGIN

```

1  GGGGAATTCT AGTCGGCGAG TTCACCAGTA CGCCCCCGAG ACCGCCTCCC
51  CCGTCCGGCT GCTCTGGTCG CCGCCCGCCG CGACCGCTCC ACCTTCACCA
101 GCGGCGCCGG GTTCGACTAC GACACCCTGG TCAAGGGCTC GGTGGAGGCG
151 GCCAGGTTGG ACCGGCTCCC GGACTCCCTG TACCACCCTT ATCGGGACCC
201 CCTGGGATGG ATGGATCCGA CGGCGGCTTG CACCGTGAAG TACCCCTAAT
251 CCCGTGACAA ACGTCATAAA GTTGTCTTCA CCTATGGGTG TTCTATTGAG
301 CGACACCCCA CACCGGAGGT ATCGGTCCCA TTGACTTGCG TGCCAAATAG
351 ACTTCTTGGG CCGTGTTTAA TAAAGGAAAC AAAA

```

*S.coelicolor* M145

LOCUS 091028-14\_J19\_Scoelicolor-ATT0 589 bp  
 DEFINITION 091028-14\_J19\_Scoelicolor-ATT083F.ab1 589, 589 bases,  
 1AF7 checksum.  
 ORIGIN

```

1  CCCTAATTCC TGTCGTACGC CCCCAGAGACC GCGAGCCCGG TCCGGCTGGT
51  GTGGCTGGCC GCGCACCCTG CGCGGGCGGC GTTCACGGCG GGCGTGGGCA
101 TCTAGTACTA TTCCTTCGTC CGGGACGAGC TGGGCGCGGC CACCTTCGAG
151 CGTTTCTGCG GCGTGTTCCT CGGGCGCGGC CTGCACCGAG TCGACTTCCT
201 GGTCATTCCA GCCCTCCCTT GGTAAGTATG GCACTCTAAC CCTATCTATT
251 TGAAATAGGG CGATGCTTAA CATTTTCTGC GTAGTAATTA TGAAGAGAAC
301 TTTGATTAGA GGGTGATTAG TACGTTTCTC TTTTCAATAG AACTTTTGTC
351 GTTGTAATTG TCCTACCAGA CCGCATCCTT TGGATGGGGG ATTTAGCTAA
401 AATACATGGA CCACTTCACC CGTGTTTTAT ATTCTTGTTT GATACTGCCT
451 GTCTAAACTG AAGACTGCTC TCTTTGACTA CGATGCTCGC ATCATGACCT
501 TCGCCACCCG TCTTGACGAA CCGCAATAAG ATTTCTACTC ATCGGTGATG
551 CTCCTGCTG TCTGCCTAAT AAATTATTAT

```

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยการทำยีน 16s rRNA ของ *Streptomyces sp* GMKU 100

GMKU100

GMKU100 Length: 1506 (today) Check: 8413 ..

```

1  TGATCCTGGC TCAGGACGAA CGCTGGCGGC GTGCTTAACA CATGCAAGTC
51  GAACGATGAA CCGCTTTCGG GCGGGGATTA GTGGCGAACG GGTGAGTAAC
101 ACGTGGGCAA TCTGCCCTGC ACTCTGGGAC AAGCCCTGGA AACGGGGTCT
151 AATACCGGAT ATGACTATCC ATCGCATGGT GGATGGTGTA AAGCTCCGGC
201 GGTGCAGGAT GAGCCCGCGG CCTATCAGCT TGTGTTGGT GATAGTGGCTC
251 ACCAAGGCGA CGACGGGTAG CCGGCCCTGAG AGGGCGACCG GCCACACTGG
301 GACTGAGACA CGGCCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG GGAATATTG
351 CACAATGGGC GAAAGCCTGA TGCAGCGACG CCGCGTGAGG GATGACGGCC
401 TTCGGGTGTG AAACCTCTTT CAGCAGGGAA GAAGCGAAAG TGACGGTACC
451 TGCAGAAGAA GCGCCGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA
501 GGGCGCAAGC GTTGTCCGGA ATTATTGGGC GTAAAGAGCT CGTAGGCGGC
551 TTGTCACGTC GGTGTGTAAG GCCCGGGGCT TAACCCCGGG TCTGCAGTCG
601 ATACGGGCAG GCTAGAGTTC GGTAGGGGAG ATCGGAATTC CTGGTGTAGC
651 GGTGAAATGC GCAGATATCA GGAGGAACAC CGGTGGCGAA GCGGATCTC
701 TGGGCCGATA CTGACGCTGA GGAGCGAAAG CGTGGGGAGC GAACAGGATT
751 AGATACCCCTG GTAGTCCACG CCGTAAACGG TGGGCACTAG GTGTGGGCAA
801 CATTCACAGT TGTCCGTGCC GCAGCTAACG CATTAAAGTG CCCGCCTGGG
851 GAGTACGGCC GCAAGGCTAA AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA
901 AGCGGCGGAG CATGTGGCTT AATTGACGCG AACGCGAAGA ACCTTACCAA
951 GGCTTGACAT ACACCGGAAA CGTCTGGAGA CAGGCGCCCC CTTGTGGTGC
1001 GTGTACAGGT GGTGCATGGC TGTCGTCAGC TCGTGTCTGT AGATGTTGGG
1051 TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCCTTGTC CCGTGTGGCC AGCAGGCCCT
1101 TGTGGTGTCT GGGACTCACG GGAGACCGCC GGGGTCAACT CGGAGGAAGG
1151 TGGGGACGAC GTCAAGTCAT CATGCCCTTT ATGTCTTGGG CTGCACACGT
1201 GCTACAATGG CCGGTACAAT GAGCTGCGAT ACCGCGAGGT GGAGCGAATC
1251 TCAAAAAGCC GGTCTCAGTT CGGATTGGGG TCTGCAACTC GACCCCATGA
1301 AGTCGGAGTC GCTAGTAATC GCAGATCAGC ATTGCTGCGG TGAATACGTT
1351 CCCGGGCCTT GTACACACCG CCCGTCACGT CACGAAAGTC GGTAACACCC
1401 GAAGCCGGTG GCCCAACCCC TTGTGGGAGG GAGCTGTCGA AGGTGGGACT
1451 GGCGATTGGG ACGAAGTCGT AACAAGGTAG CCGTACCGGA AGGTGCGGCT
1501 GGATCT

```

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อ                 | นางสาวศิริวรรณ รุ่งอินทร์                                                                                                                                                                                                                                           |
| เกิดวันที่           | 12 มิถุนายน 2529                                                                                                                                                                                                                                                    |
| สถานที่เกิด          | กรุงเทพฯ                                                                                                                                                                                                                                                            |
| ประวัติการศึกษา      | วท.บ. เทคโนโลยีชีวภาพ (สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร)<br>มหาวิทยาลัยมหิดล                                                                                                                                                                                                 |
| ตำแหน่งปัจจุบัน      | -                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| สถานที่ทำงานปัจจุบัน | -                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| ผลงานทางวิชาการ      | Rungin, S. and Thamchaipenet, A., (2012). Cloning and Studying Function of genes Involved in siderophore Biosynthesis from Endophytic Actinomycetes. 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 20-24 September, 2010, Miyazaki, JAPAN. |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ | ทุนผู้ช่วยสอน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์<br>ปีการศึกษา 2552<br><br>โครงการทุนสนับสนุนการตีพิมพ์วารสารระดับนานาชาติบัณฑิต<br>วิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์                                                                                               |





