ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E41025

ความหลากหลายของไรโซเบียมถั่วเหลืองใน 16 ตำบลของจังหวัดพิษณุโลก

นางสุธิดารัตน์ มณีรัฐอินแปลง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b00255014

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E41025

ความหลากหลายของไรโซเบียมถั่วเหลืองใน 16 ตำบลของจังหวัดพิษณุโลก

นางสุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 9 7 3 8 5 2 3 2 3

DIVERSITY OF SOYBEAN RHIZOBIA IN 16 SUBDISTRICTS OF PHITSANULOK PROVINCE

Mrs. Sujidkanlaya Maruekarajtinplaeng

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	DIVERSITY OF SOYBEAN RHIZOBIA IN 16 SUBDISTRICTS OF PHITSANULOK PROVINCE
By	Mrs Sujidkanlaya Maruekarajtinplaeng
Field of Study	Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Kanjana Chansa-ngavej, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University, in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy.

S. Hannongbua
..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr. rer. nat)

THESIS COMMITTEE

Suthep Thaniyavarn
..... Chairman
(Associate Professor Suthep Thaniyavarn, Ph. D.)

K. Chansongavej
..... Thesis Advisor
(Associate Professor Kanjana Chansa-ngavej, Ph.D.)

Wanchai Assavalapsakul
..... Examiner
(Assistant Professor Wanchai Assavalapsakul, Ph.D.)

Lerluck Chitradon
..... External Examiner
(Associate Professor Lerluck Chitradon, Ph.D)

Wipa Homhaul
..... External Examiner
(Assistant Professor Wipa Homhaul, Ph.D)

สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง : ความหลากหลายของไรโซเบียมถั่วเหลืองใน 16 ตำบลของจังหวัดพิษณุโลก (DIVERSITY OF SOYBEAN RHIZOBIA IN 16 SUBDISTRICTS OF PHITSANULOK PROVINCE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา ชาญสง่าเวช, 172 หน้า

E41025

ไรโซเบียมถั่วเหลืองเป็นแบคทีเรียย้อมติดสีแกรมลบที่ตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่วเหลือง ปัจจุบันยังมีข้อมูลไม่มากด้านอนุกรมวิธานแบบพอลิฟาสิกของไรโซเบียมถั่วเหลืองในประเทศไทย วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อแยกและใช้อนุกรมวิธานแบบพอลิฟาสิกจำแนกชนิดสายพันธุ์ไรโซบียมถั่วเหลืองที่แยกจากดิน 16 ตำบลของจังหวัดพิษณุโลก โดยใช้ถั่วเหลืองจำนวน 5 พันธุ์เป็นกับดักล่อให้ไรโซเบียมถั่วเหลืองเข้าสร้างปม (Host trapping method) และนำปมมาแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมดจำนวน 340 ไอโซเลต แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า ตามลักษณะการปรากฏของโคโลนีบนอาหารวุ้นสูตร YM ที่มีคองโกเรด 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่ามี 138 ไอโซเลต และ 202 ไอโซเลต ที่จัดเป็นประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า ตามลำดับ เปรียบเทียบความเหมือนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก RAPD-PCR พบว่าแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้า 202 ไอโซเลตประกอบด้วย 121 สายพันธุ์ การพิสูจน์ว่าแบคทีเรียที่แยกได้เป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองหรือไม่โดยใช้ถั่วเหลือง 5 พันธุ์ พบว่าแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วทั้ง 138 ไอโซเลตไม่สร้างปมที่รากถั่วเหลือง ดังนั้น จึงไม่จัดว่าเป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว ในทางตรงกันข้าม แบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้าทั้ง 121 สายพันธุ์ สร้างปมที่รากถั่วเหลือง แสดงว่าเป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ปฏิกิริยาบรอมไทมัลบลูบนอาหารวุ้นบรอมไทมัลบลูแสดงให้เห็นว่ามีไรโซเบียมถั่วเหลือง 2 แบบ แบบที่ 1 ขับสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างหลังจากบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นจะขับสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดหลังจากบ่มต่อที่ 30°C เป็นเวลาอีก 5 วัน แบบที่ 2 ขับสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างตลอดระยะเวลาการบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 10 วัน ผลการจำแนกชนิดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า 20 สายพันธุ์ที่เลือกแบบสุ่ม พบว่า ไรโซเบียมถั่วเหลืองจำนวน 12 สายพันธุ์ (STB8, STB119, STB120, STB147, STB173, STB176, STB179, STB185, STB220, STB238, STB245 และ STB327) มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *B. ellkanii* ไรโซเบียมถั่วเหลืองจำนวน 6 สายพันธุ์ (STB30, STB54, STB67, STB96, STB250 และ STB310) มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Bradyrhizobium japonicum* ไรโซเบียมถั่วเหลืองจำนวน 2 สายพันธุ์ (STB169 และ STB264) มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *B. yuanmingense* และ ผลการทดลองพบว่าไม่สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nodY* และผลการใช้/ไม่ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจำนวน 95 แหล่งในการจำแนกชนิดไรโซเบียมถั่วเหลือง นอกจากนี้ผลการสร้างเดนโดรแกรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองจำนวน 121 สายพันธุ์ พบความหลากหลายด้านดีเอ็นเอ งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่พบ *B. yuanmingense* ในประเทศไทยและเป็นรายงานแรกที่พบว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองในประเทศไทยประกอบด้วย natural variants

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2553

4973852323 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEYWORDS : soybean rhizobia / polyphasic taxonomy / diversity / Phitsanulok province

SUJIDKANLAYA MARUEKARAJTINPLAENG : DIVERSITY OF SOYBEAN RHIZOBIA IN 16 SUBDISTRICTS OF PHITSANULOK PROVINCE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KANJANA CHANSA-NGAVEJ, Ph.D., 172 pp.

E 41025

Soybean rhizobia are Gram negative bacteria that fix nitrogen in root nodules of soybeans. At present, there is not much information on polyphasic taxonomy of soybean rhizobia in Thailand. The aim of the experiments is to isolate and characterize, by polyphasic taxonomy, soybean rhizobium strains in soils from 16 subdistricts in Phitsanulok province. Host trapping method was used to isolate bacteria from root nodules of 5 soybean cultivars grown in soils from the 16 subdistricts. A total of 340 isolates were purified and categorized into fast- and slow-growers based on their visible growth on yeast extract mannitol with 0.25 $\mu g.ml^{-1}$ Congo red agar plates. The results indicated there were 138 and 202 isolates of fast- and slow-growers, respectively. Identical RAPD-PCR fingerprints revealed the 202 slow-growing isolates consisted of 121 strains. Authentication tests employing 5 soybean cultivars showed all the 138 fast-growing isolates did not nodulate soybean roots. Thus, they were not fast-growing soybean rhizobia. On the contrary, all the 202 slow-growing isolates were found to nodulate soybean roots. Therefore, they were slow-growing soybean rhizobia. Bromthymol blue (BTB) reactions on BTB agar plates showed there were two types of slow-growing soybean rhizobia. Type 1 secreted alkali product(s) after 5-day incubation then secreted acidic product(s) upon prolonged incubation for another 5 days. Type 2 secreted only alkali product(s) after 10-day incubation. Results from nucleotide sequences of 16S rDNA of randomly-selected 20 slow-growing strains revealed 12 strains (STB8, STB119, STB120, STB147, STB173, STB176, STB179, STB185, STB220, STB238, STB245 and STB327) were related to *B. ellkanii*. 6 strains (STB30, STB54, STB67, STB96, STB250 and STB310) were closely related to *Bradyrhizobium japonicum*, and 2 strains (STB169 and STB264) were related to *B. yuanmingense*. The results indicated that *nodY* sequences and results on utilization/non-utilization of 95 carbon and nitrogen sources could not be used to identify soybean rhizobium strains. In addition, dendrograms constructed from DNA fingerprints of the 121 soybean rhizobium strains revealed genetic diversity. This research is the first report on the findings of *B. yuanmingenseas* as well as natural variants of soybean rhizobia in Thailand.

Department : Microbiology Student's Signature M. Sujidkanlaya

Field of Study : Microbiology Advisor's Signature K. Chansa-ngavej

Academic Year : 2010

Acknowledgements

I wish to express sincere thanks and gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Dr Kanjana Chansa-ngavej, for her tireless efforts as well as valuable advice and comments throughout the course of research for this thesis.

I would also like to thank Associate Professor Dr Suthep Thaniyavarn for serving as the thesis committee chairperson, Associate Professor Dr Lerluck Chitradon, Assistant Professor Dr Wipa Homhaul and Assistant Professor Dr Wanchai Assavalapsakul, for serving as thesis committee members and their recommendations for the improvement on the writing of the thesis.

This research was partially funded by a research grant from "The 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund" (Ratchadaphiseksomphot Endownment Fund). The author wishes to acknowledge the grant.

The kind permission of the Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphangsaen Campus, Nakorn Pathom Province, to use the Biolog processing unit, and the kind permission of the Bio-Rad Laboratories (Thailand) Co. Ltd. to use the Fingerprinting II Informatix software are greatly appreciated.

Special thanks are expressed to friends and student members in Laboratory 404, and all staff members of the Department of Microbiology, especially, Mr. Weerasak Chongfuengprinya, for their help and friendship during my study.

The last, but most important, is my sincere and deepest gratitude to my parents and every member in my family for their great love, constant support, understanding and heartfelt encouragement extended throughout my study.

Contents

page

Abstract (in Thai)..... iv

Abstract (in English)..... v

Acknowledgements..... vi

Contents..... vii

List of Tables ix

List of Figures xi

Chapter

I. Introduction..... 1

II. Literature Survey..... 4

III.Materials & Methods..... 15

3.1 Soil collection sites..... 15

3.2 Isolation of bacteria from root nodules..... 16

3.3 RAPD-PCR fingerprinting of bacteria isolated from root nodules..... 16

3.3.1 Chromosomal DNA isolation..... 17

3.3.2 RAPD-PCR fingerprinting..... 17

3.3.3 Assigning bacterial isolates with identical RAPD-PCR fingerprints to the same strain..... 18

3.4 Determination of fast - and slow - growing bacterial strains and determination of colony morphology..... 18

3.5 Authentication tests of fast- and slow-growing bacterial strains..... 18

3.6 Polyphasic taxonomy of 25 selected strains of slow – growing soybean rhizobia..... 19

3.6.1 Colony morphology..... 19

3.6.2 Bromthymol blue reactions 19

3.6.3 Negative staining of flagella..... 20

3.6.4 Growth rates at different temperatures..... 20

3.6.5 Ability / inability to utilize carbon and nitrogen sources.... 21

3.6.6 Sequencing of 16S rDNA..... 22

Chapter

3.6.7 Sequencing of *nodY*..... 23

3.6.8 Identification of slow - growing soybean rhizobia using sequences of 16S rDNA and *nodY*..... 24

3.6.9 Construction of dendrograms from 16S rDNA and *nodY* sequences..... 24

3.6.10 Construction of dendrograms from DNA fingerprints of 121 slow-growing soybean rhizobia..... 25

IV. Results..... 26

V. Discussion..... 116

VI.Conclusion..... 122

References..... 123

Appendices..... 132

Appendix A : Bacterial growth media and plant nutrient solutions..... 133

Appendix B : Chemicals and solutions..... 136

Appendix C : RAPD - PCR Fingerprints of 202 slow - growing soybean rhizobium isolates grouped as the same strains..... 137

Appendix D : 16S rDNA and *nodY* sequences..... 145

Appendix E : Summary of ability/inability of three reference strains and three representative STB strains to use 95 carbon and nitrogen sources..... 159

Biography..... 172

List of Tables

		Page
Table 1.1	Some properties of fast- and slow-growing soybean rhizobia.....	1
Table 3.1	Buffering capacity of buffers	20
Table 4.1	Chemical and physical properties of soils collected in 2006 A.D. from the collection sites in 16 subdistricts in Phitsanulok province.....	27
Table 4.2	Concentrations of metals in soil samples collected in 2006 A.D. from the collection sites in 16 subdistricts in Phitsanulok province.....	28
Table 4.3	Bacteria isolated from root nodules of 5 soybean cultivars grown in soils from 16 subdistricts in Phitsanulok province.....	30
Table 4.4	Slow-growing soybean rhizobium isolates with identical RAPD-PCR fingerprints were grouped into the same strains.....	57
Table 4.5	Colony morphology and BTB reactions of 121 strains of slow-growing soybean rhizobia isolated from soils from 16 subdistricts of Phitsanulok province.....	66
Table 4.6	Responses of *B. elkanii* strain NA7 and *B. japonicum* strain S76 grown in yeast extract mannitol broth (YMB) with and without 30 mM NEDA buffer at the initial pH of 4.0.....	71
Table 4.7	Responses of *B. liaoningense* strain SK3 and *B. yuanmingense* strain STB264 grown in yeast extract mannitol broth (YMB) with and without 30 mM NEDA buffer at the initial pH of 4.0.....	72
Table 4.8	Responses of *B. elkanii* strain NA7 and *B. japonicum* strain S76 grown in yeast extract mannitol broth (YMB) with and without 30 mM NEDA buffer at the initial pH of 5.0.....	73
Table 4.9	Responses of *B. liaoningense* strain SK3 and *B. yuanmingense* strain STB264 grown in yeast extract mannitol broth (YMB) with and without 30 mM NEDA buffer at the initial pH of 5.0.....	74
Table 4.10	Responses of *B. elkanii* strain NA7 and *B. japonicum* strain S76 grown in yeast extract mannitol broth (YMB) with and without 30 mM MES	

Page

buffer at the initial pH of 6.0..... 75

Table 4.11 Responses of *B. liaoningense* strain SK3 and *B. yuanmingense* strain STB264 grown in yeast extract mannitol broth (YMB) with and without 30 mM MES buffer at the initial pH of 6.0..... 76

Table 4.12 Responses of *B. elkanii* strain NA7 and *B. japonicum* strain S76 grown in yeast extract mannitol broth (YMB) with and without 30 mM HEPES buffer at the initial pH of 7.0..... 77

Table 4.13 Responses of *B. liaoningense* strain SK3 and *B. yuanmingense* strain STB264 grown in yeast extract mannitol broth (YMB) with and without 30 mM HEPES buffer at the initial pH of 7.0..... 78

Table 4.14 Responses of *B. elkanii* strain NA7 and *B. japonicum* strain S76 grown in yeast extract mannitol broth (YMB) with and without 30 mM HEPES buffer at the initial pH of 8.0..... 79

Table 4.15 Responses of *B. liaoningense* strain SK3 and *B. yuanmingense* strain STB264 grown in yeast extract mannitol broth (YMB) with and without 30 mM HEPES buffer at the initial pH of 8.0..... 80

Table 4.16 indicated that the 20 STB strains consisted of 12 *B. elkanii* strains, 6 *B. japonicum* strains, one *B. yuanmingense* strain and one *B. liaoningense/yuanmingense* strain..... 86

Table 4.17 Identification of 20 slow-growing soybean rhizobium STB strains based on sequences of *nodY*..... 94

Table 4.18 Specific growth rates of 5 slow-growing STB strains 102

Table 4.19 Ability/Inability to utilize 95 carbon and nitrogen sources as determined by the Biolog™ test kit of the 20 slow-growing soybean rhizobium STB strains and three reference strains..... 102

List of Figures

		Page
Figure 2.1	Percentages of soybean cultivation areas in different provinces of Thailand in the crop year 2008	4
Figure 2.2	Nucleotide sequence of the REP and ERIC primers	7
Figure 2.3	Dendrogram constructed by using combined banding patterns of the fingerprints obtained from using each of the set of primers (REP, ERIC, and RAPD)	8
Figure 2.4	Dendrogram of 29 soybean rhizobia strains constructed with UPGMA method using the PHYLIP software	9
Figure 2.5	Synthesis of Nod factors catalysed by enzymes encoded by *nodC*, *nodB* and *nodA*	12
Figure 2.6	Summary of the various chito-oligosaccharides nodulation signals produced by *B. japonicum* strains USDA110 and USDA135 and *B. elkanii* strain USDA61	12
Figure 2.7	Nod factors structures and their specific substitutions in fast- and slow- growing soybean rhizobia	13
Figure 3.1	Map of Phitsanulok province which consists of 9 districts	15
Figure 3.2	Diagrammatic representation of a Leonard jar	18
Figure 3.3	Layout of carbon and nitrogen sources in the 96 wells of a 96-well Biolog™ GN2 MicroPlate	21
Figure 4.1	Colony morphology of some representative fast- and slow- growing bacteria isolated from root nodules of soybeans	29
Figure 4.2	Bromthymol blue reactions	43
Figure 4.3	Representative authentication test results of fast-growing bacterial isolates grown in Leonard jars with two germination seeds per jar	43
Figure 4.4	Representative authentication test results of slow-growing bacterial isolates grown in Leonard jars with two germinating seeds per jar	46

Page

Figure 4.5 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Ban Pa and Hua Ro subdistricts, Phitsanulok province..... 50

Figure 4.6 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Wat Phrik and Wang Ithok subdistricts, Phitsanulok province..... 50

Figure 4.7 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Wang Ithok, Mathong and Sri Phirom subdistricts, Phitsanulok province..... 51

Figure 4.8 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Sri Phirom and Tha Chang subdistricts, Phitsanulok province..... 51

Figure 4.9 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Tha Chang and Ban Dong subdistricts, Phitsanulok province..... 52

Figure 4.10 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Ban Dong, Ban Phrao and Nakhon Chum subdistricts, Phitsanulok province..... 52

Figure 4.11 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Nakhon Chum and Nong Kathao subdistricts, Phitsanulok province..... 53

Figure 4.12 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Nong Kathao and Chaiyanam subdistricts, Phitsanulok province..... 53

Figure 4.13 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Chaiyanam and Kang Sopha subdistricts, Phitsanulok province..... 54

Figure 4.14 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Kang Sopha and Nong Phra subdistricts, Phitsanulok province..... 54

Page

Figure 4.15 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Nong Phra and Tha Muen Ram subdistricts, Phitsanulok province..... 55

Figure 4.16 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from Tha Muen Ram subdistrict, Phitsanulok province..... 55

Figure 4.17 PCR-DNA fingerprints of slow-growing soybean rhizobium isolates obtained from several subdistricts of Phitsanulok province which have distinct individual fingerprints..... 56

Figure 4.18 Colony morphology of representative slow-growing soybean rhizobia isolated from soils from 16 subdistricts in Phitsanulok province..... 65

Figure 4.19 PCR-DNA fingerprints using either RPO1 or CRL-7 as the primer..... 82

Figure 4.20 Dendrograms constructed with sequences of 16S rDNA of the slow-growing soybean rhizobium STB strains..... 88

Figure 4.21 Dendrogram obtained from *nodY* sequences of 20 selected slow-growing strains as well as some reference strains..... 95

Figure 4.22 Distribution of 12 *Bradyrhizobium elkanii* STB strains 6 *Bradyrhizobium japonicum* STB strains and 2 *Bradyrhizobium yuanmingense* in 16 subdistricts in Phitsanulok province, Thailand. 99

Figure 4.23 Transmission electron micrographs of 5 slow-growing soybean rhizobium STB strains..... 100

Figure 4.24 Growth at different temperatures in terms of CFU/ml of 5 selected strains of isolated slow-growing soybean rhizobium..... 101

Figure 4.25 Dendrogram constructed from DNA fingerprints..... 110