บทคัดย่อ

T138131

การถ่ายโอนยีนที่สังเคราะห์โปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein gene, *gfp*) จาก *B. subtilis* CW335 และ CW347 เข้าสู่ *B. subtilis* NSRS89-24 และ *Bacillus* sp. MK176-0 ได้สำเร็จโดยใช้วิธีการหลอมโปรโตพลาสท์และการถ่ายโอนยีนด้วยวิธีธรรมชาติตามลำดับ ในขณะที่ใน *Bacillus* sp. MK007 ไม่สามารถถ่ายโอนยีน *gfp* แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *gfp* แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืช เช่น โรคกาบใบแห้ง (*Pyricularia grisea*) และโรคขี้กลากในส้ม (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) ได้ใกล้เคียงกับ *Bacillus* สายพันธุ์เดิม นอกจากนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียเหล่านี้ด้วยคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะชนิด kanamycin และการเรืองแสงของ GFP ในเซลล์ที่ต่างกันคือ เอนโดสปอร์และเซลล์ปกติโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์หรือ UV light transilluminator แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายโอนยีนหลังจากเพาะเลี้ยงไปจำนวน 10 รุ่น โดยไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะ พบว่าการแสดงออกของการเรืองแสงของ GFP และการต้านยา kanamycin มีความเสถียรสูงแสดงว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการทดลองระยะยาว การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค repetitive PCR สามารถบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ศึกษาได้ โดยสามารถบ่งชี้แบคทีเรียที่เกิดจากการหลอมโปรโตพลาสท์แต่ไม่สามารถแยกแบคทีเรียที่ได้จากการถ่ายโอนยีนด้วยวิธีธรรมชาติ การติดตามแบคทีเรียโดยอาศัยการเรืองแสงของ GFP ใน *Bacillus* ทำได้ทั้งในระดับห้องทดลองและภาคสนาม สามารถติดตามและหาจำนวนของ *Bacillus* sp. AP042 ได้ในต้นข้าวในช่วงระยะเวลาหนึ่ง

Abstract

TE138131

Transformation of *B. subtilis* NSRS89-24 and *Bacillus* sp. MK176-0 with the green fluorescent protein gene (*gfp*) from *B. subtilis* CW335 and CW347 were successfully performed by protoplast fusion and natural transformation, respectively. Whereas the transformation of *Bacillus* sp. MK007 was unable to be carried out. The properties to inhibit fungi and bacteria causing plant diseases i.e., rice blast (*Pyricularia grisea*) and Citrus Canker (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) were evaluated in the *gfp* transformants in the same manners as in the original *Bacilli* which were the *gfp* cell recipients. In addition, the transformed bacteria were selected by kanamycin resistance as well as the GFP marked cells were visualized in the forms of forespores and mother cells under fluorescent microscope or using UV light transilluminator. High stabilities of the *gfp* gene and kanamycin resistance gene were shown after at least 10 generations of growth without adding kanamycin. These suggest that these transformed bacteria are suitable for long-term experiment without selective pressure. The DNA fingerprinting carried out by the repetitive PCR technique demonstrated the identity of bacteria. The *gfp* transformed bacilli produced by the protoplast fusion were distinguishable, but not in the transformed bacteria obtained from the natural transformation method. The applications of the GFP as a marker for monitoring bacteria in a laboratory scale and in the natural environments were demonstrated. *Bacillus* sp. AP042 was detectable after inoculating onto the rice plants for an extent of time.