



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

สาขา

พันธุศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง การคัดแยกแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่ผลิตฮอร์โมน indole-3-acetic acid
และหาชิ้นที่เกี่ยวข้อง

Screening indole-3-acetic acid Producing Endophytic Actinomycetes and Cloning
Genes Involved in its Production

นามผู้วิจัย นางสาวภาวิณี สุทธิวิริยะ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สรัญญา วัชรโรทัย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดแยกแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่ผลิตฮอร์โมน indole-3-acetic acid และหาชิ้นที่เกี่ยวข้อง

Screening indole-3-acetic acid Producing Endophytic Actinomycetes and Cloning Genes
Involved in its Production

โดย

นางสาวภาวิณี สุทธิวิริยะ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์ศาสตร์)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาวิณี สุทธิวิริยะ 2553: การคัดแยกแอสโคไมซีตที่ผลิตอินโดล-3-อะซิติกแอซิด และหาชนิดที่เกี่ยวข้อง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขา พันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ อรินทิพย์ ธรรมชัยพินิต, Ph.D. 90 หน้า

ศึกษาแอสโคไมซีต 57 สายพันธุ์จาก Genetics-Microbiology Kasetsart University (GMKU) Culture Collection พบว่ามีความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่การละลายฟอสเฟต ผลิตอินโดล-3-อะซิติกแอซิด (IAA) ผลิตแอมโมเนีย และผลิตไซโคโรฟอร โดยสายพันธุ์ GMKU 103 มีสมบัติครบทั้ง 4 แบบ ขณะที่สายพันธุ์ GMKU 134 ไม่มีสมบัติดังกล่าว เมื่อเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต IAA ในระดับสูงคือ GMKU 118 มาหาลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA พบว่าอยู่ในสกุล *Streptomyces* เลือกศึกษา ยีน amino oxidase ที่มีความคล้ายคลึงกับยีน tryptophan-2-monooxygenase (*iaaM*) ในวิถี Indole-3-acetamide (IAM) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการสังเคราะห์ IAA โดยออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ เพื่อเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธีพีซีอาร์และหาลำดับเบสแล้วพบว่า ได้ยีนขนาด 926 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 308 กรดอะมิโน ซึ่งโปรตีนนี้มีความคล้ายคลึงกับ tryptophan-2-monooxygenase ของ *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 (ความเหมือน 46 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 62 เปอร์เซ็นต์) และ *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 (ความเหมือน 22 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 43 เปอร์เซ็นต์) และคล้ายคลึงกับ amino oxidase ของ *Streptomyces* sp. C (ความเหมือน 79 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 85 เปอร์เซ็นต์) เมื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีนด้วยการทำยีนดิสรัปชัน โดยส่งถ่ายพลาสมิด pATT502 (ที่มีชิ้นพีซีอาร์ยีน amino oxidase) เข้าสู่โครโมโซมของ *Streptomyces* sp. GMKU118 โดยอาศัยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุล ด้วยสภาวะที่เหมาะสมคือกระตุ้นการงอกของสปอร์ของ *Streptomyces* sp. GMKU 118 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนทำคอนจูเกชันกับ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pATT502) บนอาหารแข็ง MS ที่มี $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ เมื่อตรวจสอบการผลิตอินโดล-3-อะซิติกแอซิดของสายพันธุ์กลายพบว่ายังคงสามารถผลิตอินโดล-3-อะซิติกแอซิด (IAA) ได้เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ปกติ จึงเป็นไปได้ว่า *Streptomyces* sp. GMKU118 สังเคราะห์ IAA ผ่านวิถีอื่นที่ไม่ใช่วิถี IAM

Pavinee Suttiviriya 2010: Screening indole-3-acetic acid Producing Endophytic Actinomycetes and Cloning Genes Involved in its Production. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Associate Professor Arinthip Thamchaipenet, Ph.D. 90 pages.

Fifty-seven isolates of actinomycetes from Genetics-Microbiology Kasetsart University (GMKU) Culture Collection were tested for plant growth promoting properties such as phosphate solubilization and the production of indole-3-acetic acid (IAA), ammonia and siderophore. The results indicated that only strain GMKU 103 carried all properties of plant growth promoting agents whereas, strain GMKU 134 had none. Strain GMKU 118 was selected as one of the high IAA producers to study gene involved in IAA production. Partial 16S rRNA gene sequencing of strain GMKU 118 revealed that it belongs to genus *Streptomyces*. Primers were specifically designed from amino oxidase gene which was similar to tryptophan-2-monooxygenase gene (*iaaM*) in Indole-3-acetamide (IAM) pathway. The amino oxidase gene was amplified by PCR and the nucleotide sequences revealed 926 basepairs encoding 308 amino acids. Its protein was similar to tryptophan-2-monooxygenase of *Pseudomonas syringae* pv. T1 (46 % identity, 62 % similarity) and *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 (22 % identity, 43 % similarity) and similar to amino oxidase of *Streptomyces* sp. C (79 % identity, 85 % similarity). The amino oxidase gene was then verified its function via gene disruption by transferring pATT502 (containing PCR fragment of amino oxidase gene) into *Streptomyces* sp. GMKU 118 chromosome. Intergeneric conjugation was employed using optimum condition by conjugated heated spore of *Streptomyces* sp. GMKU 118 at 40° C for 10 minutes with *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pATT502) on MS containing 10 mM MgCl₂. The mutants were characterized and showed the level of IAA production similar to that of wildtype. It can be concluded that *Streptomyces* sp. GMKU 118 is likely to produce IAA via other pathways not IAM.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้โอกาสในการทำงานวิจัยนี้ พร้อมทั้งให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สรัญญา วัชรโรทัย กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ.ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ประธานการสอบ และ ดร.ชญญา พุทธิจันทร์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร.พิทักษ์ เชื้อวงศ์ และ รศ.ดร.อภิสิทธิ์ สงตะเสน ภาควิชาเคมี ที่ได้ให้คำปรึกษาทางด้านวิธีการทางเคมีต่าง ๆ ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์และพฤกษศาสตร์ทุก ๆ ท่านที่ได้อบรม สั่งสอน ให้ความรู้ ตลอดจนให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิจัย ขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการ ที่ได้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบพระคุณคุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ และทุก ๆ คนใน ครอบครัว ที่ได้ให้ข้อคิด ให้ความช่วยเหลือ และ ให้กำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณ รศ.ดร.สุริยา ดันติวิวัฒน์ รศ.ดร.นิตยา เลาหจินดา และ ผศ.อรรณพ หอมจันทร์ ที่ได้ข้อคิดในด้านต่าง ๆ คุณรัฐพันธ์ ตรงวิวัฒน์ คุณชนิกา ไหล่แท้ ที่ช่วยเหลือด้านต่าง ๆ รวมไปถึงเพื่อน ๆ ทุก ๆ คนที่คอยเป็นกำลังใจให้อย่างเสมอมา

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและระดับนานาชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาวิณี สุทธิวิริยะ

เมษายน 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	42
สรุป	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ภาคผนวก	87
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	90

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	25
2	พลาสติกที่ใช้ในงานวิจัย	25
3	ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยง <i>Streptomyces</i> และ <i>E. coli</i>	27
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย	32
5	ความเข้มข้นของ IAA ในอาหารเลี้ยง TSB เมื่อวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer	47
6	ความเข้มข้นของ IAA ในอาหารเลี้ยง glucose beef extract เมื่อวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer	49
7	ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแอคติโนไมซีไทเอนโคไฟต์	51
8	ความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA จากการวิเคราะห์ผล HPLC	53
9	ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยกระตุ้นการงอกของสปอร์ของสายพันธุ์ GMKU 118 ที่อุณหภูมิต่างๆ	57
10	ความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA เมื่อวัดด้วย spectrophotometer	65
11	ความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA จากการวิเคราะห์ผล HPLC	68

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 วงจรชีวิตของ <i>Streptomyces</i>	6
2 โครงสร้างสาร indole-3-acetic acid (IAA)	11
3 วิธีการสังเคราะห์ IAA ในพืช	13
4 วิธีการสังเคราะห์ IAA ในจุลินทรีย์	15
5 พลาสมิดสำหรับทำคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง <i>E. coli</i> กับ <i>Streptomyces</i>	22
6 แผนที่พลาสมิด pIJ8600 ที่ใช้สำหรับทำคอนจูเกชันต่างสกุล	35
7 พลาสมิด pTZ57R/T	38
8 แผนที่พลาสมิด pIJ8671 ที่ใช้สำหรับทำอินดิสรปชัน	39
9 การตรวจสอบการผลิตแอมโมเนียด้วย Nessler's reagent	42
10 ความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya agar	44
11 การผลิตไซเดอร์โรฟอร์โดยสายพันธุ์ GMKU 169	45
12 แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการผลิต IAA เมื่อเลี้ยงในอาหาร TSB	46
13 กราฟแสดงสารละลายมาตรฐาน IAA ที่ใช้ในการคำนวณความเข้มข้นในอาหาร TSB	48
14 กราฟแสดงสารละลายมาตรฐาน IAA ที่ใช้ในการคำนวณความเข้มข้นในอาหาร glucose beef extract	50
15 ผลการวิเคราะห์ HPLC	52
16 บริเวณอนุรักษ์ของ amino oxidase ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	54
17 ผลการทำพีซีอาร์แบบ gradient ด้วยไพรเมอร์ ATT072F และ ATT072R จากโครโมโซมของจุลินทรีย์ GMKU 118	55
18 กราฟการอยู่รอดของสปอร์และประสิทธิภาพในการคอนจูเกชันเมื่อกระตุ้นการงอกของสปอร์ของสายพันธุ์ GMKU 118 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	57
19 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูเกนต์ GMKU 118/pIJ8600 ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยการเพิ่มปริมาณยีนต้านยาปฏิชีวนะอะพราไมซิน	59
20 การแทรกตัวของพลาสมิด pIJ8600 เข้าไปในโครโมโซมของ GMKU 118	59
21 ลักษณะโคโลนีของ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 118 บนอาหาร MS	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	ผลการทำพีซีอาร์ยืน 16S rRNA ของ <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 118	60
23	ผลการทดสอบโคลน pATT501 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	61
24	ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน amino oxidase จาก <i>Streptomyces</i> sp. GMKU 118 ในพลาสมิด pATT501	62
25	ผลการทดสอบโคลน pATT502 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	63
26	ตรวจสอบสายพันธุ์กลายโดยการเพิ่มปริมาณยีนต้านยาปฏิชีวนะอะพราไมซิน ด้วยวิธีพีซีอาร์	64
27	ตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วย Salkowski' s reagent	65
28	ผลการวิเคราะห์สารสกัดด้วยวิธี HPLC	66

การคัดแยกแอคติโนไมซีตเอนโดไฟต์ที่ผลิตฮอร์โมน indole-3-acetic acid
และหาพื้นที่เกี่ยวข้อง

Screening indole-3-acetic acid Producing Endophytic Actinomycetes and Cloning
Genes Involved in its Production

คำนำ

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีผู้นำนามาศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลาย ถึงประโยชน์ของจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวในด้านต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นการสร้างสารปฏิชีวนะ หรือการผลิตสารต้านมะเร็งและไวรัส ซึ่งเป็นประโยชน์ทางการแพทย์ หรือการป้องกันพืชจากแมลงศัตรูพืช หรือจากจุลินทรีย์ศัตรูพืช ซึ่งเป็นประโยชน์ที่นำมาใช้ด้านเกษตรกรรมควบคุมโรคด้วยชีววิธี (biocontrol) นอกจากนั้นยังมีผู้ศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มนี้ เพื่อช่วยในเรื่องเพิ่มผลผลิตทางเกษตรโดยช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ช่วยจัดหาแร่ธาตุ ลำเลียง หรือผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตที่จำเป็นให้แก่พืช ดังนั้นแอคติโนไมซีตเอนโดไฟต์จึงมีความน่าสนใจอย่างมากที่จะนำมาศึกษาวิจัย เพราะจุลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าวเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในดิน ดังนั้นจึงน่าจะสามารถพบอิงอาศัยในพืชได้มาก ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงสนใจคัดแยกแอคติโนไมซีตเอนโดไฟต์ที่สามารถผลิตฮอร์โมน indole-3-acetic acid (IAA) เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยจะตรวจหาและศึกษาพื้นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ความรู้ที่ได้จะเพิ่มความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างแอคติโนไมซีตเอนโดไฟต์กับพืชที่อิงอาศัยได้ดียิ่งขึ้นและอาจนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคตเพื่อการส่งเสริมทางด้านการเกษตร

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความสามารถของแอคติโนไมซีทเอนโดไฟต์ในการผลิตฮอร์โมน IAA
2. เพื่อศึกษาอินที่เกี่ยวเนื่องกับกระบวนการผลิตฮอร์โมน IAA จากแอคติโนไมซีทเอนโดไฟต์



การตรวจเอกสาร

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (endophytic microorganism) หมายถึงจุลินทรีย์ที่สามารถอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช หรือมีช่วงใดช่วงหนึ่งในวงจรชีวิตอาศัยอยู่ภายในส่วนต่าง ๆ ของพืช (Azevedo *et al.*, 2000; Strobel, 2003) การอยู่ร่วมกันของเอนโดไฟต์กับพืชเป็นแบบพึ่งพาอาศัยกันซึ่งอาจพบว่าเป็นแบบ symbiosis หรือ mutualism โดยจุลินทรีย์เอนโดไฟต์มีส่วนช่วยปกป้องพืชจากจุลินทรีย์ก่อโรค หรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งจุลินทรีย์เอนโดไฟต์พบได้ทั้งที่เป็นราและแบคทีเรีย แต่ที่พบมากที่สุดคือจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่เป็นรา แต่จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีความน่าสนใจคือ กลุ่มแอคติโนมัยสีท เนื่องจากมีรายงานการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด (Strobel, 2003)

ความสำคัญของจุลินทรีย์เอนโดไฟต์

1. การผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ

เอนโดไฟต์มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้โดยมีรายงานการวิจัยนำสารไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย ไม่ว่าจะเป็นทางการเกษตรและการแพทย์ ดังต่อไปนี้

1.1 สารปฏิชีวนะ

เอนโดไฟต์สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือกำจัดจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่ก่อให้เกิดโรคในพืช หรือในมนุษย์หลายชนิด ecomycin เป็นสารที่ผลิตโดย *Pseudomonas viridiflava* ซึ่งพบจากส่วนใบของพืชวงศ์หญ้า (Miller *et al.*, 1998) เป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ *Cryptococcus neoformans* และ *Candida albicans* ส่วนสาร colletotric acid ผลิตโดยราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่คัดแยกได้จากพืช *Artemisia mongolica* พบว่าสามารถต่อต้านได้ทั้งราและแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืช (Zou *et al.*, 2000) สาร phomopsichalasin ผลิตโดยเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. (Hu *et al.*, 2001) มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* และ *Staphylococcus aureus* ราเอนโดไฟต์

Colletotrichum sp. ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรจีนชิงเฮา (*Artemisia annua*) สามารถสังเคราะห์สาร astemisinin ใช้รักษาโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่า *Colletotrichum* sp. สามารถต่อต้านแบคทีเรียและราที่ก่อโรคในมนุษย์ได้ (Lu *et al.*, 2000) *Tripterigeum wilfordi* เป็นพืชสมุนไพรพบว่ามีราเอนโดไฟต์ *Cryptosporiopsis quercina* อาศัยอยู่ภายในซึ่งสามารถผลิตสาร cryptocandin ซึ่งเป็นสารประกอบที่ต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์หลายชนิด ได้แก่ *C. albicans* และ *Trichophyton* spp. และยังสามารถต่อต้านราที่ก่อโรคพืช *Sclerotinia sclerotiorum* และ *Botrytis cinerea* ได้เช่นกัน ปัจจุบันได้มีการนำ cryptocandin มาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อทางผิวหนังและเล็บที่เกิดจากเชื้อรา (Strobel *et al.*, 1999)

1.2 การผลิตสารต้านมะเร็งและต้านไวรัส

ราเอนโดไฟต์ *Taxomyces andreanae* ที่อาศัยในพืช *Taxus brevifolia* สามารถผลิตสาร paclitaxel (Strobel *et al.*, 1999) ซึ่งสาร paclitaxel มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์มะเร็ง (Schiff and Horowitz, 1980) และ *Cytonaema* sp. ซึ่งเป็นราเอนโดไฟต์ สามารถผลิตสารชื่อ cytonic acid A และ B ที่สามารถต้านเอนไซม์ไวรัสได้ในมนุษย์ (Guo *et al.*, 2000) ในประเทศไทย ได้มีงานวิจัยคัดแยกราเอนโดไฟต์ และทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ ยับยั้งการเกิดมะเร็ง และต่อการเกิดมะเร็ง จากพืชสมุนไพรไทยจำนวน 81 ชนิด ซึ่งพบว่าราเอนโดไฟต์ ที่แยกได้ สามารถยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* และ *Plasmodium falciparum* และยังยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้อีกด้วย (Wiyakrutta *et al.*, 2004)

2. การปกป้องพืชจากแมลงศัตรูพืช

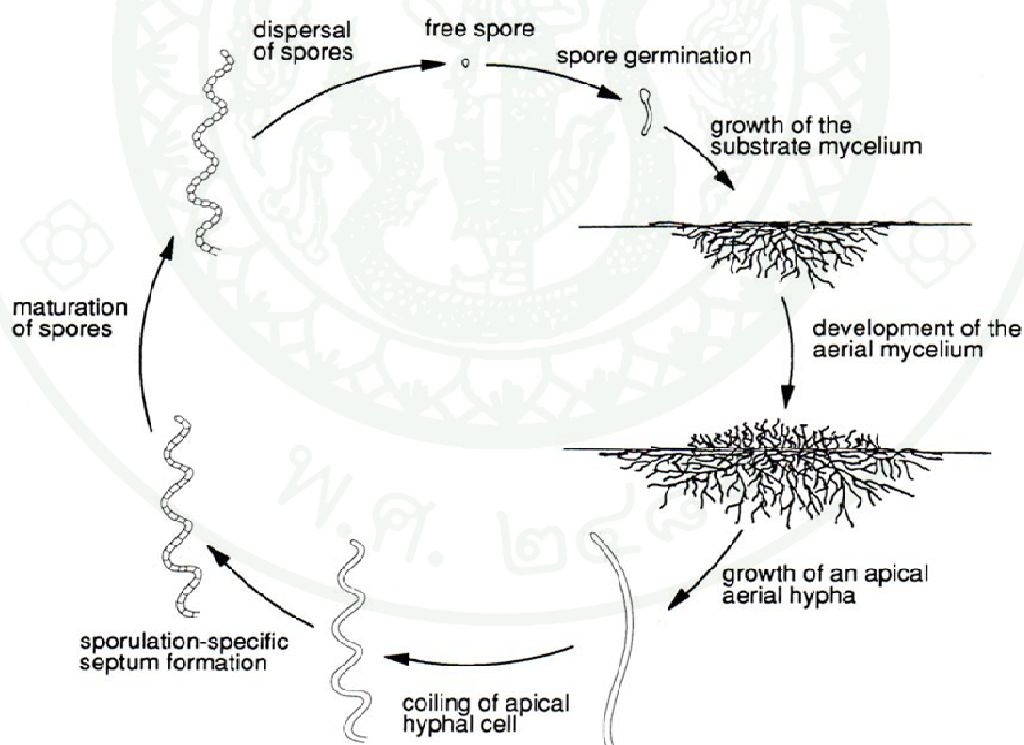
ราเอนโดไฟต์ สามารถลดการงู้น้ำของพืชจากแมลงได้ เช่น *Phomopsis oblonga* สามารถป้องกันต้นเอล์มจากการโจมตีของด้วงหนวดยาว *Physocnemum brevilineum* ได้ (Webber, 1981) และราเอนโดไฟต์ ที่อยู่ในวงศ์ Xylariaceae สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิให้พืชสกุล *Fagus* ซึ่งป้องกันการเข้ามาอาศัยของหนอนเต่าทองซึ่งเป็นศัตรูของพืชดังกล่าว (Claydon *et al.*, 1985)

3. การส่งเสริมการเจริญของพืช

Gluconacetobacter diazotrophicus เป็นจุลินทรีย์เอนโดไฟต์จำพวกแบคทีเรีย diazotroph สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชโดยการตรึงไนโตรเจน และละลายสารประกอบเชิงซ้อนของสังกะสีเพื่อให้พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยพบว่าเกิดสารละลายของสังกะสีไอออนมากในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน (Saravanan *et al.*, 2007) จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ *Delftia tsuruhatensis* strain HR4 คัดแยกได้จากรากของข้าว *Oryza sativa* L., cv. Yueguang สามารถระงับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Rhizoctonia solani* และ *Pyricularia oryzae* ดังนั้นจึงส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดี นอกจากนั้นยังแสดงความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ในปริมาณที่สูง (Han *et al.*, 2005) จากการคัดแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์จากต้นถั่วเหลือง และนำมาทดสอบการผลิตฮอร์โมน indole-3-acetic acid (IAA) พบว่าจุลินทรีย์เอนโดไฟต์สามารถผลิตฮอร์โมน IAA จำนวน 34 % จากทั้งหมดที่แยกได้ และมีความสามารถละลายหินฟอสเฟตได้ 49 % (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004) *Pantoea agglomerans* เป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ ประเภท diazotroph ที่แยกได้จากเมล็ดข้าว เมื่อนำไปทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ nitrogenase ผลิตฮอร์โมน IAA และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ ดังนั้นจึงมีส่วนในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Verma *et al.*, 2001) แบคทีเรียเอนโดไฟต์ *Paenibacillus polymyxa* ที่อาศัยในดินและในรากของพืชสามารถผลิตฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินได้ (Timmuska *et al.*, 1999) จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ *Bacillus polymyxa* strain Pw-2R และ *Pseudomonas fluorescens* strain Sm3-RN ซึ่งโดยปกติแล้วเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยในดินและสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เมื่อนำเชื้อไปปลูกลงในเมล็ดของสนและบ่มเป็นเวลา 5 เดือนพบว่าจุลินทรีย์ทั้งสอง สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชต้นสนได้ และสามารถเพิ่มขนาดของเนื้อเยื่อพืชและไม่ก่อให้เกิดโรคแก่ต้นสน ดังนั้น *B. polymyxa* strain Pw-2R และ *P. fluorescens* strain Sm3-RN จึงเป็นเอนโดไฟต์ที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (Shishido *et al.*, 1999) ราเอนโดไฟต์ไมคอร์ไรซาช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช โดยไมซีเลียมของราจะช่วยในการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุต่าง ๆ ให้แก่พืช (Duponnois *et al.*, 2000) ในการปลูกราเอนโดไฟต์ *Piriformospora indica* ลงในในเมล็ดของข้าวโพดและยาสูบ ก่อนที่จะนำเมล็ดไปปลูก พบว่ามีน้ำหนักมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อเทียบกับพืชปกติที่ไม่ได้ถักราดราเอนโดไฟต์ (Verma *et al.*, 1999) ในประเทศจีน ได้มีรายงานการวิจัยเรื่องของฮอร์โมนพืชที่ส่งเสริมการเจริญของพืช ซึ่งผลิตจากราเอนโดไฟต์ ที่คัดแยกได้จากพืชสมุนไพรในวงศ์กล้วยไม้ เมื่อตรวจสอบผลโดยเทคนิค HPLC พบว่าเป็นฮอร์โมนพืชจริง ดังนั้นราเอนโดไฟต์ จึงมีส่วนสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Zhang *et al.*, 1999)

แอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีท (actinomycete) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่พบเจริญได้ทั่วไปในดินและแหล่งน้ำ จัดอยู่ในอันดับ (Order) Actinomycetales ประกอบด้วย 8 วงศ์ (Family) ได้แก่ Actinomycetaceae, Mycobacteriaceae, Frankiaceae, Actinoplanaceae, Dermatophilaceae, Nocardiaceae, Streptomycetaceae และ Micromonosporaceae (Williams *et al.*, 1989) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เป็นกลาง และต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต แอกติโนมัยสีทจัดว่าเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ยาปฏิชีวนะต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์และสารกำจัดศัตรูพืช (Goodfellow *et al.*, 1988) แอกติโนมัยสีทที่พบโดยส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Streptomyces* มีการเจริญเป็นเส้นใย เรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) จุลินทรีย์กลุ่มนี้เมื่อเจริญบนอาหารแข็งจะสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ซึ่งฝังลงในเนื้อวุ้น และเส้นใยชูขึ้นเรียกว่าเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งจะมีการสร้างสปอร์อยู่ที่ปลายของเส้นใยอากาศ โดยมีวงจรชีวิตดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของ *Streptomyces*

ที่มา: Chater *et al.* (1996)

ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสิทเป็นแบบกระจาย (discrete) คล้ายไลเคน (lichenoid) คล้ายแผ่นหนัง (leathery) หรือคล้ายเนยเหลว (butterous) ผิวโคโลนีมีลักษณะเรียบ หรือขรุขระ มีหลายสีได้แก่ ขาว เทา แดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน ส่วนด้านล่างของโคโลนีจะมีสีตามสีของเส้นใยอาหาร ในระยะแรกของการเจริญโคโลนีมีผิวเรียบ ต่อมาพัฒนาเส้นใยอากาศจนปรากฏกลุ่มก้อนคล้ายแป้ง (powdery) หรือ กำมะหยี่ (velvet) (Williams *et al.*, 1989) จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์พบว่า *Streptomyces* มีโครโมโซมเป็นเส้นตรง (linear) (Birch *et al.*, 1990) มีขนาดจีโนมประมาณ 8 เมกะเบส (Huang *et al.*, 1998) มีปริมาณเบส กวานีน (Guanine) และไซโตซีน (Cytocine) ในปริมาณสูง ประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ (Williams *et al.*, 1989)

การจำแนกแอคติโนมัยสิท

ในปัจจุบันสามารถจำแนกแอคติโนมัยสิท โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ศึกษาจากลักษณะเส้นใยที่เจริญบนอาหารแข็ง ลักษณะของสปอร์ การจัดเรียงตัวของสปอร์ และลักษณะโคโลนี (Williams *et al.*, 1989) และวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีของเซลล์ได้แก่ ศึกษาชนิดของกรด diaminopimic (DAP) ในผนังเซลล์ ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ และวิเคราะห์รูปแบบของกรดไขมันและฟอสโฟลิพิด หากนำข้อมูลที่ได้จากทั้งทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีมาวิเคราะห์ร่วมกัน จะสามารถจำแนกแอคติโนมัยสิทในระดับสกุลได้ (Lechevalier and Lechevalier, 1970) ปัจจุบันใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ร่วมด้วย (Masakazu *et al.*, 1997)

แอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์

Frankia เป็นแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ที่พบว่าสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในพืชชั้นสูง ที่ไม่ได้อยู่ในวงศ์ถั่ว (non-legumeinous plant) โดยมีการค้นพบครั้งแรกจากปมของพืชวงศ์สน (Williams *et al.*, 1989; Benson and Silvester, 1993) ต่อมาได้มีการค้นพบแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์สกุลอื่นๆ ทั้งสกุลที่พบได้ง่าย และสกุลที่หายาก (rare-actinomycete) โดยมีรายงานการค้นพบแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์ครั้งแรก คือ *Actinosynnema* ซึ่งแยกได้จากพืชวงศ์หญ้า (Hesegawa *et al.*, 1978) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์สายพันธุ์ใหม่ *Agromyces albus* จาก *Androsace* sp. (Dorofeeva *et al.*, 2003) *Kribbella solani* จากหัวมันฝรั่ง (Song *et al.*, 2004) และ *Micromonospora coriariae* จาก *Coriaria myrtifolia* (Trujillo *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีการพบ พลาสมิดตามธรรมชาติในแอคติโนมัยสิทเอนโดไฟต์สกุล *Streptomyces* จากข้าวสาลี ซึ่งคาดว่าจะมีขึ้นที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการเข้าไปอาศัยในพืชของ

เอนโดไฟต์ (Coombs *et al.*, 2003) ดังนั้นพืชจึงน่าจะเป็นแหล่งของแอคติโนมัยสีทอีกแหล่งหนึ่ง (Okazaki, 2006)

แอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์สามารถพบได้ทั้งจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าว (Tian *et al.*, 2004; Indananda *et al.*, 2010) ข้าวสาลี (Coombs *et al.*, 2004) ข้าวโพด (Seghers *et al.*, 2004) ถั่ว (Cao *et al.*, 2005) และจากพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น มะเขือเทศ (Cao *et al.*, 2004); มันฝรั่ง (Song *et al.*, 2004) พืชวงศ์ขิง (Taechowisan *et al.*, 2005) กระถินณรงค์ (Duangmal *et al.*, 2009; Thamchaipenet *et al.*, 2010) และยังสามารถพบแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ได้ทั้งจากในส่วนราก ลำต้นและใบของพืช (Igarashi *et al.*, 2002; Hasegawa *et al.*, 2006)

แอคติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาผลิตยาปฏิชีวนะได้ถึงร้อยละ 80 ของยาปฏิชีวนะโดยสกุล *Streptomyces* เป็นสกุลที่พบว่าการผลิตมากที่สุด (Baltz, 1998) ดังนั้นการค้นพบแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์จึงน่าจะเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ (Igarashi, 2004) โดยมีรายงานการค้นพบ ดังนี้

การศึกษาแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ในประเทศบราซิลและแอฟริกาใต้ พบว่าภายในเนื้อไม้ของพืชวงศ์ Celastraceae นั้นมี *Streptomyces* อาศัยอยู่ภายใน โดยแยกออกมาได้ 2 สายพันธุ์ คือ *S. setonii* และ *S. sampsonii* ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบแล้วพบว่ามีการสร้างสารสำคัญคือ chloropyrrol และ chlorinated anthracyclinone ซึ่งออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และต่อต้านเชื้อก่อโรคในกลุ่ม mycobacteria ได้ (Pullen *et al.*, 2002)

ในประเทศออสเตรเลีย ได้มีการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ จากลำต้นของสมุนไพรพื้นเมืองที่ชื่อ *Kennedia nigricans* หรือ snakevine ที่ชนเผ่าอะบอริจิน นำมาใช้ประโยชน์ในการสมานแผล เมื่อนำมาแยกเชื้อพบว่าได้จุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ ซึ่งภายหลังมีชื่อว่า *Streptomyces munumbi* ซึ่งสามารถสร้างสาร munumbicins ที่ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวกและลบที่ก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Mycobacterium tuberculosis* (Castillo *et al.*, 2002)

ในข้าวพบว่ามี แอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์สกุล *Streptomyces* สายพันธุ์ *S. griseofuscus* และ *S. hygroscopicus* เป็นส่วนมาก และแอคติโนมัยสีทที่แยกได้นั้นสามารถต้านทานเชื้อราก่อโรคข้าว (Tian *et al.*, 2004)

ในรากข้าวสาลีพบว่ามีแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์หลายสกุล ได้แก่ *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora* และ *Nocardioidea* โดยในสกุล *Streptomyces*, *Microbispora* และ *Nocardioidea* สามารถต้านทาน *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ซึ่งเป็นราก่อโรคในข้าวสาลี (Coombs *et al.*, 2004)

ในรากมะเขือเทศพบเอนโดไฟต์ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งสามารถสร้างสารต้านรา *Rhizoctonia solani* ที่ก่อโรคในมะเขือเทศได้ และยังพบว่าช่วยในการเจริญของมะเขือเทศ (Cao *et al.*, 2004)

ในรากของขิง *Zingiber officinale* Rosc. พบว่ามี *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 อาศัยอยู่ และพบว่าจุลินทรีย์นี้ออกฤทธิ์ในการยับยั้ง *Colletotrichum musae* และ *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในกล้วยและข้าวสาลี (Taechowisan *et al.*, 2005)

ในกล้วยพบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์จากรากของกล้วย ซึ่งแยกได้หลายสกุลคือ *Streptoverticillium* และ *Streptosporangium* ซึ่งพบว่าสามารถต้านทานการเกิดโรคในกล้วยได้จากเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ (Cao *et al.*, 2005)

มีรายงานว่าแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชที่จังหวัดโตยามา และมิยาเกะ ประเทศญี่ปุ่นบางสายพันธุ์ สามารถสร้างสารต้านเชื้อรา *Alternaria brassicicola* TP-F0423 ที่ก่อให้เกิดโรคในผักกาดขาว และยังพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ได้แก่ cedarmycins และ novobiocin (Igarashi *et al.*, 2002; Igarashi, 2004) ดังนั้นแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่สามารถผลิตสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชต่าง ๆ จึงมีประโยชน์อย่างมากทางการเกษตร (Kunoh, 2002)

การส่งเสริมการเจริญของพืชโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่อาศัยในดิน (rhizobacterium) สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promotion) ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยการส่งเสริมทางตรงได้แก่ การที่จุลินทรีย์เหล่านั้นสังเคราะห์ ลำเลียง สารอาหารหรือแร่ธาตุต่าง ๆ เข้าสู่พืช ได้แก่ การตรึงไนโตรเจนให้แก่พืช การละลายฟอสฟอรัสที่อยู่ในดินให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ได้ และการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน จิบเบอเรลลิน การลดความเข้มข้นของเอทิลีนในพืช การสร้างโครงสร้าง

ไซเคอร์โรเฟอร์ซึ่งจะช่วยในการนำธาตุเหล็กเข้าสู่พืช สำหรับการส่งเสริมการเจริญให้แก่พืชทางอ้อม ได้แก่ การกำจัดจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ก่อโรคแก่พืช (Glick and Bashan, 1997)

ไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญของพืช และเป็นธาตุที่มีมากในบรรยากาศ แต่ก็ยังพบว่าพืชยังมีการขาดแคลนธาตุอาหารดังกล่าว เนื่องจากพืชไม่สามารถนำไนโตรเจนไปใช้ได้โดยตรง อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ในหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการตรึงก๊าซไนโตรเจน (N_2) ให้อยู่ในรูปที่ใช้ประโยชน์ได้ โดยจุลินทรีย์ที่รู้จักกันดีได้แก่ จุลินทรีย์ไรโซเบียมซึ่งจะอาศัยอยู่ในรากของพืชวงศ์ถั่ว (Hansen, 1994) และต่อมาพบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น ๆ มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชได้ เช่น จุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน (Ahmad *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2007) หรือจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (Saravanan *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2001) รวมไปถึงแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ *Frankia* (Williams *et al.*, 1989; Benson and Silvester, 1993) โดยจุลินทรีย์จะตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสเปลี่ยนไนโตรเจนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย (Saikia and Jain, 2007) ดังสมการ



ดังนั้นในการทดลองที่ศึกษาการผลิตไนโตรเจนจากจุลินทรีย์ จึงอาจจะตรวจวัดการผลิตแอมโมเนีย (Ahmad *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2007) หรือตรวจวัดเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Husen, 2003)

ฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัส เป็นหนึ่งในธาตุอาหารหลัก (macronutrient) ที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช และเป็นธาตุอาหารที่พบได้มากในดินแต่โดยส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ เนื่องจากฟอสฟอรัสจัดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนอยู่กับธาตุอื่น ๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม (Stewart *et al.*, 1980, Hinsinger, 2001) ในรูปของหินฟอสเฟต ในการศึกษาจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่าจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการละลายหินฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น *Aspergillus tubingensis* และ *A. niger* ที่แยกได้จากดิน มีความสามารถในการละลายหินฟอสเฟต (Reddy *et al.*, 2002) *Penicillium* spp. สามารถละลาย

ฟอสเฟตได้ (Wakelin *et al.*, 2004) แบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณที่มีการปลูกพริกไทยดำ พบว่าส่งเสริมการเจริญของต้นพริกไทยดำได้โดยการละลายฟอสเฟต (Ramachandran *et al.*, 2002) Hamdali *et al.* (2008) รายงานว่าจุลินทรีย์ในสกุลแอคติโนมัยซีท์มีความสามารถในการละลายหินฟอสเฟตเช่นกัน

ไซโตโครโครม

เหล็กเป็นธาตุที่สำคัญสำหรับพืชและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แต่ธาตุเหล็กที่อยู่ในดินนั้นมักจะอยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ แต่จุลินทรีย์บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารไซโตโครโครมซึ่งสามารถจับกับธาตุเหล็ก (Fe^{3+}) และนำเข้าสู่พืช นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตโครงสร้างดังกล่าวสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชทางอ้อมโดยการไปยับยั้งการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ก่อโรคพืชเนื่องจากจุลินทรีย์ก่อโรคพืชมีความสามารถในการนำธาตุเหล็กไปใช้ได้น้อยกว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตไซโตโครโครม (Glick and Bashan, 1997)

ออกซิน

ออกซิน เป็นสารควบคุมการเจริญที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือเรียกว่าฮอร์โมนพืช สารชนิดนี้มีส่วนช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช จึงได้ตั้งชื่อสารชนิดนี้ว่า ออกซิน ซึ่งเป็นคำมาจากภาษากรีก ‘auxein’ แปลว่า การเติบโต (to grow) ออกซินที่พืชสังเคราะห์ขึ้นอยู่ในรูปของสารเคมีที่ชื่อว่า indole-3-acetic acid (IAA) (Went and Thimann, 1937) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โครงสร้างสาร indole-3-acetic acid (IAA)

ออกซินถูกสร้างขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ปลายราก ตาที่กำลังเจริญ ใบอ่อน และเอ็มบริโอ โดยออกซินจะถูกลำเลียงจากส่วนยอดหรือส่วนตาที่เป็นแหล่งสร้างไปยังส่วนอื่นๆ อย่างมีทิศทาง จากบริเวณที่สร้างไปสู่ส่วนล่างเสมอ โดยอาศัยพลังงานในการเคลื่อนย้ายแบบ แอทีฟ

ทรานสปอร์ต (active transport) ออกซินมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อแสง (phototropism) และตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วงของโลก (geotropism) ออกซินยังเกี่ยวข้องกับการ กระตุ้นให้พืชเกิด การแบ่งเซลล์ (cell division) การยืดตัวของเซลล์พืช (cell elongation) ยับยั้งการเจริญเติบโตของตา ข้าง (apical dominance) กระตุ้นการเกิดราก (adventitious root) และยับยั้งการหลุดร่วงของ ใบ ดอก ผล ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (Teale *et al.*, 2006)

การสังเคราะห์ IAA โดยพืช

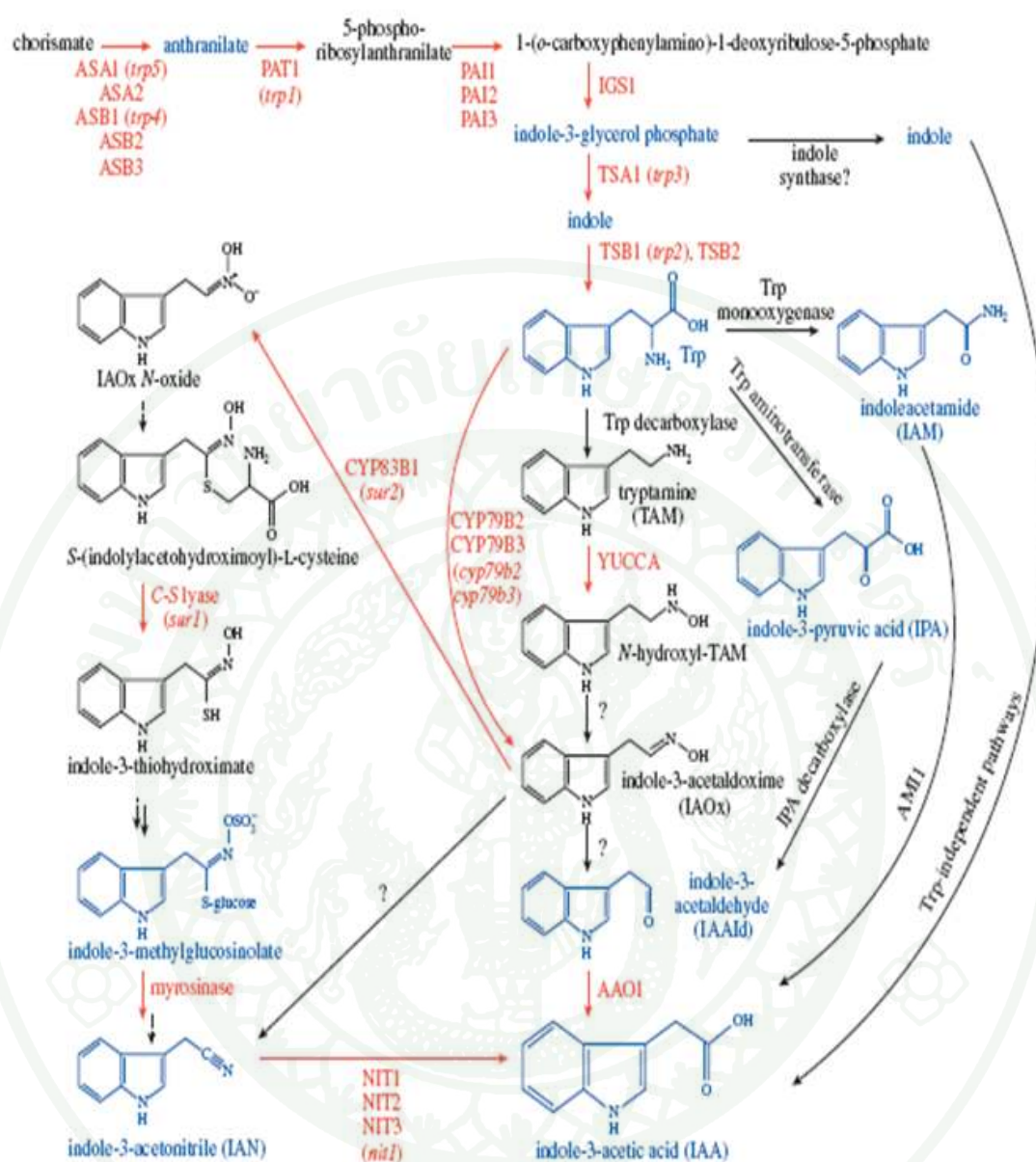
พืชสามารถสังเคราะห์ IAA ได้โดยการใช้ ทริปโทเฟน (Trp) เป็นสารตั้งต้น (Trp-dependent IAA biosynthesis) และไม่ใช่ทริปโทเฟนเป็นสารตั้งต้น (Trp-independent IAA biosynthesis) (Woodward and Bartel, 2005) วิธีการสังเคราะห์ IAA ในพืชนั้นโดยส่วนใหญ่ ผ่านทางวิธีที่มีการใช้ทริปโทเฟนเป็นสารตั้งต้น ดังนี้ (Woodward and Bartel, 2005)

วิธี Indole-3-pyruvic acid (IPA)

วิธีนี้จะมิเอนไซม์ Trp aminotransferase มาเปลี่ยน ทริปโทเฟน เป็น indole-3-pyruvic acid (IPA) จากนั้นเอนไซม์ IPA decarboxylase เปลี่ยน indole-3-pyruvic acid ให้เป็น indole-3-acetaldehyde (IAAld) จากนั้นเอนไซม์ IAAld specific aldehyde oxidase protein (AAo1) จะเปลี่ยน IAAld ให้เป็น IAA (ภาพที่ 3) จากวิธีนี้ ยังไม่มีรายงานการค้นพบเอนไซม์ IPA decarboxylase ใน พืช แต่อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ก็เป็นวิธีสำคัญในการสังเคราะห์ IAA จากจุลินทรีย์ด้วย (Koga *et al.*, 1992)

วิธี Indoleacetamide (IAM)

ในวิธีนี้เอนไซม์ Trp monooxygenase เปลี่ยน ทริปโทเฟน เป็น indoleacetamide (IAM) จากนั้นเอนไซม์ arabidopsis amidohydrolase (AMI1) เปลี่ยน IAM เป็น IAA ในหลอดทดลอง (Pollmann *et al.*, 2002)



ภาพที่ 3 วิธีการสังเคราะห์ IAA ในพืช

ที่มา: Woodward and Bartel (2005)

วิถี Tryptamine (TAM)

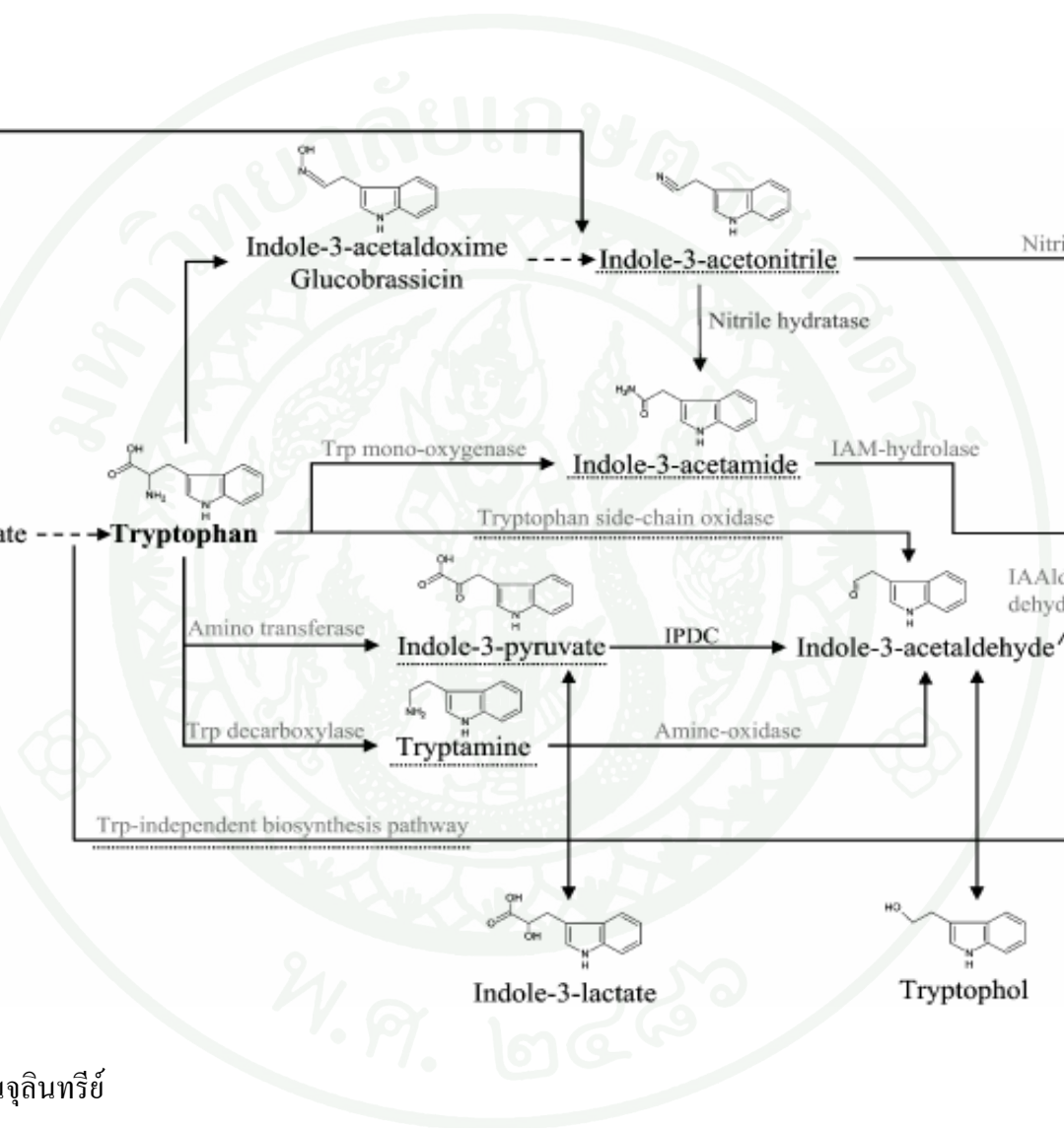
วิถีนี้เริ่มต้นโดยเอนไซม์ Trp decarboxylase เปลี่ยน ทริปโทเฟน เป็น tryptamine (TAM) จากนั้นเอนไซม์ของ *YUCCA* ยีน จะออกซิไดซ์ tryptamine เป็น *N*-hydroxyl-TAM จากนั้นจึงเกิดการดัดหมู่ไฮโดรเจนด้วยเอนไซม์ dehydrogenase ไปเป็น indole-3-acetaldoxime (IAOx) และเกิดการสลายต่อไปเป็น IAAld ซึ่งยังไม่พบเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ดังกล่าว จากการศึกษานี้พบว่ามีการสังเคราะห์ IAA โดย *Yucca-like* gene (*OsYUCCA*) โดยผ่านวิถีนี้เช่นกัน (Yamamoto *et al.*, 2007)

วิถี Indole-3-acetonitrile

วิถีนี้เอนไซม์ nitrilase เป็นเอนไซม์หลักในการสังเคราะห์ IAA (Bartling *et al.*, 1992) ควบคุมโดยยีน *NIT* จะเปลี่ยน indole-3-acetonitrile (IAN) ให้เป็น IAA พบว่าพืชหลายชนิดมีการสังเคราะห์ผ่านวิถีนี้ เช่น หูก้า (Thimann and Mahadevan, 1964) ข้าวโพด (Park *et al.*, 2003) เป็นต้น

การสังเคราะห์ IAA ในจุลินทรีย์

Thimann (1935) พบว่าเชื้อรา *Rhizopus suinus* สามารถสังเคราะห์ IAA ได้ โดยใช้ ทริปโทเฟนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ มีการค้นพบต่อมาว่า จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ก็สามารถผลิต IAA ได้เช่นกัน โดยจุลินทรีย์มีกระบวนการสังเคราะห์ IAA ทั้งหมด 5 วิธี (ภาพที่ 4) ได้แก่วิถี Indole-3-acetamide (IAM), วิถี Indole-3-pyruvate (IPyA), วิถี Tryptamine (TAM), วิถี Tryptophan side-chain oxidase (TSO) และวิถี Indole-3-acetonitrile (IAN) (Spaepen *et al.*, 2007)



ภาพที่ 4 วิธีการสังเคราะห์ IAA ในจุลินทรีย์

ที่มา: Spaepen *et al.* (2007)

การสังเคราะห์ IAA โดยจุลินทรีย์ที่พบโดยส่วนมากจะผ่านทางวิถี IAM และวิถี IPyA โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืชหลายชนิดเช่น *Agrobacterium tumefaciens* และ *Pseudomonas savastanoi* มีการสังเคราะห์ IAA ผ่านทางวิถี IAM โดยมีเอนไซม์ tryptophan-2-monooxygenase (IaaM) ซึ่งมีการกำหนดรหัสโดยยีน *iaaM* เปลี่ยน ทริปโทเฟนเป็น indole-3-acetamide และจากนั้นเอนไซม์ IAM hydrolase (IaaH) ซึ่งมีการกำหนดรหัสโดยยีน *iaaH* มาเปลี่ยน indole-3-acetamide ให้เป็น IAA มีรายงานว่า *Bradyrhizobium* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีการสร้างปม สำหรับตรึงไนโตรเจน มีการสังเคราะห์ IAA ผ่านทางวิถีนี้เช่นกัน (Comai and Kosuge, 1980; Sekine *et al.*, 1989) รา *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* ก็มีรายงานการสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถีนี้เช่นกัน (Robinson *et al.*, 1998; Maor *et al.*, 2004) โดยที่จริงแล้ววิถีการสังเคราะห์นี้จัดว่าเป็นวิถีเฉพาะในแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามก็มีความเชื่อที่ว่าพืชน่าจะสังเคราะห์ IAA โดยผ่านทางวิถีนี้ได้เช่นกัน ดังเช่นที่ Pollmann และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาใน *Arabidopsis*

วิถี Indole-3-pyruvate (IPyA)

กระบวนการสังเคราะห์ IAA โดยผ่านทางวิถี Indole-3-pyruvate เริ่มจากการใช้ทริปโทเฟนเป็นสารตั้งต้น เอนไซม์ aminotransferase เปลี่ยนเป็น indole-3-pyruvate โดยจากนั้นเอนไซม์ indole-3-pyruvate decarboxylase (IPDC) เปลี่ยน indole-3-pyruvate ให้เป็น indole-3-acetaldehyde (IAAld) แล้วจึงจะเปลี่ยนเป็น IAA โดยเอนไซม์ IAAld decarboxylase (ภาพที่ 4) จากวิถีนี้ IPDC ถูกพบว่าเป็นเอนไซม์หลัก (key enzyme) ในการสังเคราะห์ IAA โดยมีการศึกษายีน *ipdC* จากแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* (Koga *et al.*, 1992) จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าแบคทีเรีย *Erwinia herbicola* มีการสังเคราะห์ IAA โดยวิถี IPyA โดยเมื่อทำให้เกิดการกลายที่ยีน *ipdC* พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้จะผลิต IAA ได้ลดลง (Brandl and Lindow, 1996) *Azospirillum brasilense* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน และมีสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช พบว่ามีการสังเคราะห์ IAA ผ่านทางวิถีนี้ (Vanderbroek *et al.*, 1999) ดังนั้นแบคทีเรียที่อยู่อาศัยร่วมกับพืชมีการสังเคราะห์ IAA เพื่อส่งเสริมการเจริญของรากพืช น่าจะเกิดกระบวนการสังเคราะห์ผ่านทางวิถี IPyA ตัวอย่างเช่น มีการทดลองนำยีน *ipdC* ที่เกิดการกลายกลับเข้าสู่ *Pseudomonas putida* GR12-2 สายพันธุ์กลายแบบ IAA-deficient mutant มีผลให้รากของพืชเจริญได้ดีเท่ากับการถ่ายยีน *ipdC* ปกติ แสดงว่าวิถี IPyA น่าจะมีความสำคัญต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชในแบคทีเรียเอนโดไฟต์ (Patten and Glick, 2002)

วิธี TAM

มีรายงานว่า *Bacillus cereus* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ผ่านวิธีนี้ โดยมีการสร้างเอนไซม์ tryptophan decarboxylase ในการเปลี่ยน ทริปโทเฟนให้เป็น tryptamine (Spaepen *et al.*, 2007)

วิธี TSO

วิธีนี้มีรายงานการพบใน *Pseudomonas fluorescens* CHA0 โดยจะมีการเปลี่ยนทริปโทเฟนไปเป็น IAA ได้โดยตรง (Oberhansli *et al.*, 1991) ซึ่งไม่มีรายงานการพบวิธีนี้ในพืช

วิธี IAN

วิธีนี้มีการศึกษากันอย่างมากในพืช โดยมีเอนไซม์สำคัญคือ เอนไซม์ nitrilase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ในแบคทีเรีย *Alcaligenes faecalis* (Kobayashi *et al.*, 1993) และนอกจากนั้นยังพบว่า *Agrobacterium tumefaciens* สามารถเปลี่ยนกระบวนการสังเคราะห์ IAA จากวิธี IAN ไปสู่วิธี IAM ได้ (Kobayashi *et al.*, 1995) นอกจากวิธีต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ยังมีรายงานว่าจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ IAA ได้โดยไม่ต้องใช้ทริปโทเฟนเป็นสารตั้งต้นได้เช่นกัน

จากการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีการสังเคราะห์ IAA พบว่าโดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ ยังไม่ได้มีข้อมูลการศึกษามากนักในจุลินทรีย์แกรมบวก แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีผู้ศึกษาใน *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 ที่เป็นจุลินทรีย์แกรมบวกและมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช โดยมีความสามารถในการสังเคราะห์สารต่อต้านเชื้อรา และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในพืช และพบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้สามารถสังเคราะห์ IAA ได้จากหลายวิธี เมื่อศึกษาหน้าที่ของยีนในวิธีต่าง ๆ ด้วยวิธีการยีนดิสรัปชัน (Idris *et al.*, 2007)

การสังเคราะห์ IAA โดยแอคติโนมัยสีท

จากรายงานการศึกษาพบว่า *Streptomyces* หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *S. violaceus*, *S. scabies*, *S. griseus*, *S. exfoliates*, *S. coelicolor* และ *S. lividans* สามารถผลิต IAA ได้ ซึ่ง *Streptomyces* สามารถสังเคราะห์ IAA ได้จากหลายวิธี โดย เมื่อนำ *S. violaceus* และ *S. exfoliates* มาตรวจสอบด้วย HPLC พบว่าสามารถสังเคราะห์ IAA ผ่านทางวิถี IAM และอาจจะสังเคราะห์ผ่านทางวิธีอื่นได้เช่นกัน เนื่องจากพบเอนไซม์จากวิธีอื่น (Manulis *et al.*, 1994)

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ในอาหาร glucose beef extract ที่มีการเติมทริปโทเฟน ลงไป และตรวจสอบความสามารถในการผลิต IAA ด้วย Salkowski's reagent (Gordon and Webber, 1951) พบว่า *S. kasugaensis* NBRC 13852, *S. purpureascens* NBRC 13977, *S. coelicolor* A3(2) M140 และ *S. oliveceus* NBRC 12850 สามารถสังเคราะห์ IAA ได้ 51.1 µg/ml, 28.4 µg/ml, 21.8 µg/ml และ 14.2 µg/ml ตามลำดับ (Matsukawa *et al.*, 2007)

จากการศึกษา *Streptomyces* ที่คัดแยกได้จากดินรอบข้างของพืชสมุนไพรไทย พบว่าสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA เมื่อมีการเติมทริปโทเฟน ลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยง โดยพบว่า *Streptomyces* CMU-H009 มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ได้ดีที่สุด (Khamna *et al.*, 2010)

แอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ด้วยเช่นกันจึงสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ ในปี ค.ศ. 2002 Igarashi *et al.* ได้แยกเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* TP-A045 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตสาร pteric A และ pteric B สามารถช่วยกระตุ้นการเกิดรากของถั่วได้ โดยมีคุณสมบัติที่คล้ายกับฮอร์โมนออกซิน แอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ *Streptomyces* sp. MBR-52 ที่คัดแยกได้จากกุหลาบพันปี (rhododendron) พบว่าสร้างสารซึ่งออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนออกซิน โดยเมื่อนำจุลินทรีย์ดังกล่าวปลูกเข้าไปในดินอ่อนของกุหลาบพันปี พบว่าสามารถกระตุ้นให้ดินอ่อนนั้นเกิดราก (adventitious root) ได้มากกว่าดินอ่อนที่ไม่ได้ปลูกเข้าไป นอกจากนี้ยังช่วยให้รากยืดยาวและมีจำนวนมากขึ้นอีกด้วย ดังนั้น *Streptomyces* sp. MBR-52 จึงมีความสามารถในการเร่งการเจริญของราก (root-growth accelerate) (Meguro *et al.*, 2006) แอคติโนมัยสีทหลายสกุลที่แยกได้จากดินกฤษณา ก็พบว่ามีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ด้วยเช่นกัน (Nimnoi *et al.*, 2009)

การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces*

การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces* สามารถทำได้หลายวิธี เช่น ทรานสฟอร์เมชัน (transformation) ทรานสดักชัน (transduction) และคอนจูเกชัน (conjugation) เนื่องจาก *Streptomyces* หลายชนิดมีระบบการป้องกัน โดยการทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอม (restriction-modification system) (Sanchez *et al.*, 1985; MacNeil, 1988) ดังนั้นสิ่งสำคัญสำหรับการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces* คือการหาวิธีที่เหมาะสมในการส่งถ่ายพลาสมิด ซึ่งได้มีการศึกษาและพัฒนาวิธีการต่างๆ ดังต่อไปนี้

วิธีการทรานสฟอร์เมชันของ *Streptomyces* ได้รับการพัฒนาโดย Bibb *et al.* (1978) โดยอาศัยการเหนี่ยวนำของโพลิเอทิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) เรียกว่าวิธี PEG-mediated transformation เป็นการนำพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces* โดยใช้ไลโซไซม์ (lysozyme) ทำให้เส้นใยอยู่ในรูปโพรโทพลาสต์ (protoplast) แล้วนำดีเอ็นเอเข้าสู่โพรโทพลาสต์โดยอาศัยการเหนี่ยวนำของ PEG หลังจากนั้นจึงชักนำให้เกิดการคืนสภาพ (regeneration) ของโพรโทพลาสต์เจริญกลับเป็นเส้นใย (Matsushima and Baltz, 1985) วิธีนี้พบว่าใช้ได้ผลกับ *Streptomyces* สายพันธุ์ *S. coelicolor* และ *S. lividans* (Hopwood *et al.*, 1985) แต่เมื่อมีการศึกษากับ *Streptomyces* สายพันธุ์อื่นๆ เพิ่มขึ้นพบว่าไม่สามารถใช้วิธีดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากความเปราะบางของโพรโทพลาสต์ หรือบางสายพันธุ์ก็ไม่สามารถเตรียมโพรโทพลาสต์ได้ ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาวิธีการทรานสฟอร์เมชันโดยอาศัยอิเล็กโทรโพรเซชัน (electroporation) โดยใช้ไฟฟ้าทำให้น้ำเซลล์เป็นรู เพื่อให้ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ วิธีนี้มีขั้นตอนในการเตรียมเซลล์ได้ง่ายกว่าสามารถใช้เส้นใยได้โดยตรง แต่จะต้องใช้กระแสไฟฟ้าและระยะเวลาที่เหมาะสม ถ้าไม่เช่นนั้นอาจจะทำให้เซลล์ตายได้ (Pigac and Schrempf, 1995)

วิธีทรานสดักชันเป็นวิธีที่อาศัยฟาจของแอคติโนมัยสิท (actinophage) เช่น OC31 (Matsushima *et al.*, 1989) แต่วิธีการนี้ทำได้ไม่แพร่หลายเนื่องจากมีข้อจำกัดคือ ขาดแคลนฟาจที่สามารถใช้กับเชื้อได้หลายชนิด (Kieser *et al.*, 2000)

วิธีการคอนจูเกชันต่างสกุล (intergeneric conjugation) เป็นการส่งพลาสมิดจาก *E. coli* ผู้ให้ (donor) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ขาดสมบัติการเดิมหมุมเมธิล ไปยัง *Streptomyces* ผู้รับ (recipient) โดยวิธีการนี้จะใช้ พลาสมิดแบบ mobilization (Mazodier *et al.*, 1989) วิธีการนี้นิยมใช้กันเป็นอย่างมาก

มาก ในการศึกษาหน้าที่ของยีนด้วยวิธียีนดิสรัปชัน (gene disruption) การแทนที่ยีน (gene replacement) และวิธีคอมพลีเมนต์ (complementation) (Kieser *et al.*, 2000)

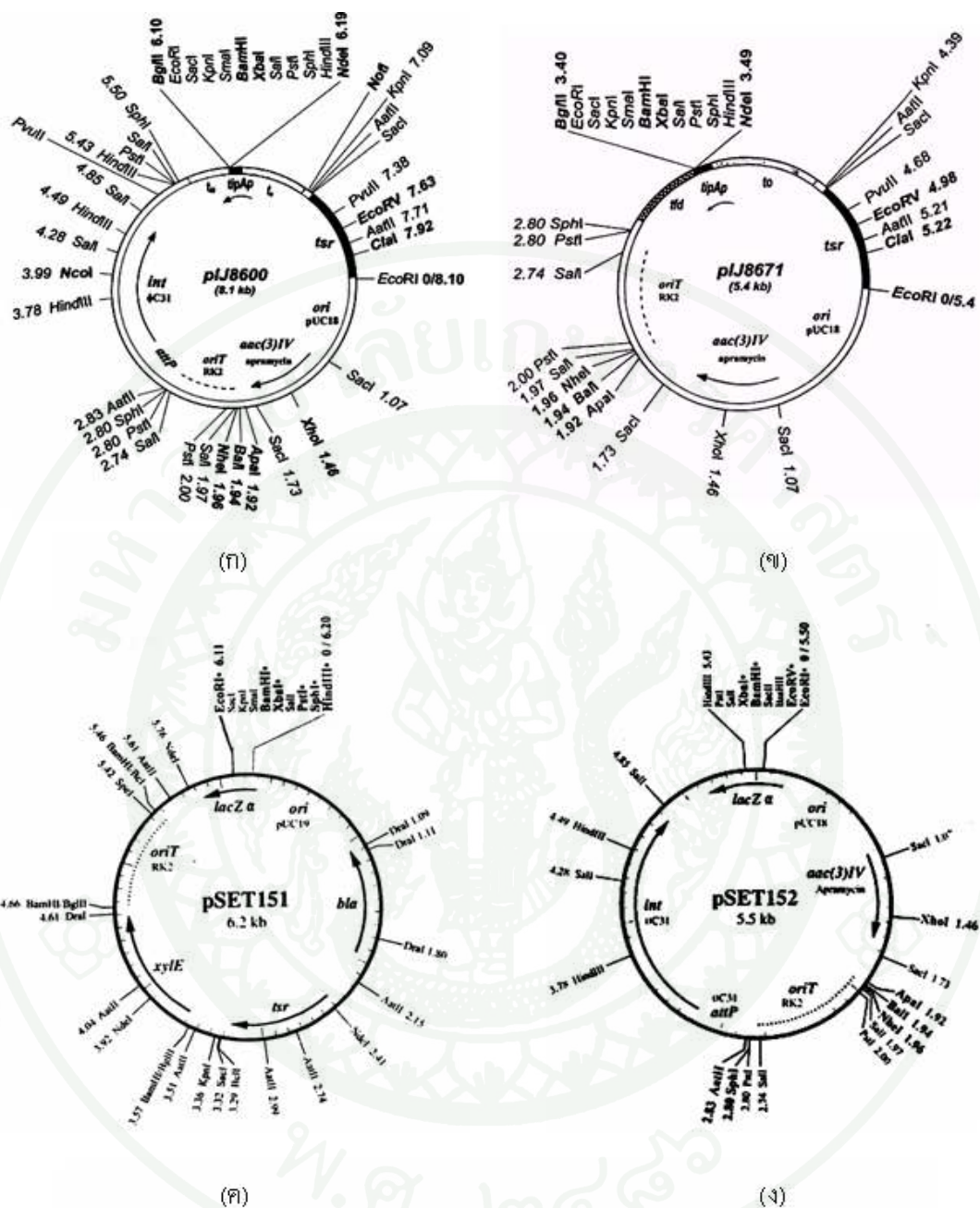
การคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces*

การคอนจูเกชันของแบคทีเรียสามารถพบได้โดยทั่วไปตามธรรมชาติ เกิดได้ทั้งกับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ทำให้สามารถส่งถ่ายพลาสมิดจากผู้ให้ไปยังผู้รับได้ สำหรับการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces* ด้วยวิธีการคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* มีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1989 โดย Mazodier *et al.* จากนั้นได้มีการทำคอนจูเกชันต่างสกุลได้สำเร็จใน *Streptomyces* อีกหลายสายพันธุ์ (Bierman *et al.*, 1992; Flett *et al.*, 1997; Fouces *et al.*, 2000) ในการทำคอนจูเกชัน *E. coli* เป็นเซลล์ผู้ให้ ส่งถ่ายพลาสมิดไปยัง *Streptomyces* ที่เป็นผู้รับ โดยอาศัยการทำงานของยีนที่สำคัญในพลาสมิด 2 ส่วน คือ กลุ่มยีน *tra* ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการส่งถ่ายพลาสมิด และ *oriT* (origin of transfer) ซึ่งทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้นและเป็นปลายที่จะกลับมาเชื่อมกันของพลาสมิดในการส่งถ่าย เรียก พลาสมิดที่มีสมบัติเช่นนี้ว่า self-transmissible plasmid ซึ่งสามารถเกิดการส่งถ่ายพลาสมิดได้ด้วยตัวเอง ถ้าขาดยีน *tra* จะเรียกเป็น mobilisable plasmid คือไม่สามารถส่งถ่ายพลาสมิดได้ด้วยตัวเอง ต้องอาศัยยีน *tra* ที่อยู่ในส่วนอื่น เช่น บนโครโมโซม หรือบน non-transmissible plasmid ตัวอย่างสายพันธุ์ *E. coli* ที่ใช้เป็นเซลล์ผู้ให้ ได้แก่ *E. coli* S17-1 ที่มียีน *tra* อยู่บนโครโมโซม (Mazodier *et al.*, 1989) และสายพันธุ์ ET12567 มียีน *tra* อยู่บนพลาสมิด pUZ8002 ซึ่งเป็นพลาสมิดแบบ non-transmissible plasmid (Sia *et al.*, 1996) และนอกจากนั้น *E. coli* สายพันธุ์ ET12567 ยังเป็นสายพันธุ์ที่ขาดการเติมหมู่เมทิลเนื่องจากมีจีโนไทป์เป็น *dam*⁻ และ *dcm*⁻ จึงทำให้สามารถส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ *Streptomyces* ที่มีระบบการป้องกันได้ดีกว่าสายพันธุ์ S17-1 ซึ่งมีการเติมเมทิลตามปกติ (Flett *et al.*, 1997)

พลาสมิดที่ใช้ทำคอนจูเกชันมีคุณสมบัติเป็น mobilisable plasmid คือไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยตัวเอง ต้องอาศัยพลาสมิดที่มีกลุ่มยีน *tra* แต่ไม่มี *oriT* เช่น พลาสมิด pUZ8002 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของพลาสมิด RK2 (Paget *et al.*, 1999) แต่ใน mobilisable plasmid จะมี *oriT* เป็นองค์ประกอบ พลาสมิดประเภทนี้ได้แก่ pIJ8600 (ภาพที่ 5 ก; Sun *et al.*, 1999), pIJ8671 (ภาพที่ 5 ข; Sun *et al.*, 1999), pSET151 (ภาพที่ 5 ค; Bierman *et al.*, 1992), pSET152 (ภาพที่ 5 ง; Bierman *et al.*, 1992) การสร้างพลาสมิดแบบ mobilisable นี้จะทำให้พลาสมิดมีขนาดเล็กลง สามารถนำขึ้นดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาใส่เข้าไปได้ขนาดใหญ่มากขึ้น ซึ่งพลาสมิดที่ใช้ในการทำคอนจูเกชันส่วน

ใหญ่มีสมบัติเป็น non-replicative plasmid ก็นำตัวเองได้เฉพาะใน *E. coli* ไม่สามารถจำลองตัวเองได้ใน *Streptomyces* จึงทำให้พลาสมิดดังกล่าวต้องแทรกเข้าไปในโครโมโซมโดยการเกิด site specific recombination ของตำแหน่ง attachment site (*attP*) ของฟาจ ϕ C31 ที่อยู่บนพลาสมิดนั้นๆ กับตำแหน่ง *attB* บนโครโมโซมของ *Streptomyces* หรือโดยการเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน (homologous recombination) จากยีนที่สนใจซึ่งโคลนเข้าไปในพลาสมิด (Bierman *et al.*, 1992)

การคอนจูเกชันต่างสปีชีส์ระหว่าง *E. coli* และ *Streptomyces* สามารถทำได้โดยใช้สปอร์ (Mazodier *et al.*, 1989; Kitani *et al.*, 2000; Fouces *et al.*, 2000; Phornphisutthimas *et al.*, 2010) ผสมกับ *E. coli* ผู้ให้ ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นนำไปเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และคัดเลือกผู้รับที่มีพลาสมิดหรือเอกซ์คอนจูแกนต์ (exconjugant) โดยใช้ยาปฏิชีวนะ (Kieser *et al.*, 2000) จากการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของอาหารแข็งที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (Kitani *et al.* 2000; Phornphisutthimas *et al.* 2010) อัตราส่วนของสปอร์ *Streptomyces* ผู้รับต่อเซลล์ *E. coli* ผู้ให้ (Kitani *et al.*, 2000) และการกระตุ้นการงอกของสปอร์ของ *Streptomyces* โดยบ่มสปอร์ในอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม สามารถช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันได้ใน *Streptomyces* (Mazodier *et al.*, 1989) บางสายพันธุ์ นอกจากการใช้สปอร์ในการทำคอนจูเกชันต่างสปีชีส์แล้ว ยังสามารถใช้ไมซีเลียม ในการทำคอนจูเกชันต่างสปีชีส์ได้เช่นกัน (Bierman *et al.*, 1992; Paranthaman and Dharmalingum, 2003; Phornphisutthimas *et al.*, 2010)



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

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

ที่มา: Kieser *et al.* (2000)

ยีนดิสรัปชัน

วิธียีนดิสรัปชัน เป็นการทำให้เกิดการกลายวิธีหนึ่งที่ตำแหน่งยีนจำเพาะบนโครโมโซม จึงนิยมใช้ศึกษาหน้าที่ของยีน โดยการแทรกชิ้นดีเอ็นเอเข้าไปเพื่อยับยั้งการทำงานของยีน (insertional inactivation) โดยการนำเอาส่วนของชิ้นยีนเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งมีสมบัติเป็น non-replicative เมื่อพลาสมิดถูกส่งผ่านเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านแล้ว จะเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน ที่ตำแหน่งของยีนนั้น จึงทำให้พลาสมิดที่เป็นพาหะแทรกเข้าไประหว่างยีนบนโครโมโซม จึงสามารถขัดขวางการทำงานของยีนดังกล่าว ซึ่งทำให้ยีนนั้นไม่สามารถแสดงออกได้ โดยทั่วไปการเกิดครอสซิงโอเวอร์ตำแหน่งเดียว (single crossing over) จะเกิดขึ้นได้ง่ายกว่า จึงนิยมใช้ในการศึกษายีนที่ทำงานร่วมกันเป็นกลุ่ม (cluster) เนื่องจากเมื่อมีการเกิด single crossing over บนยีนใดยีนหนึ่งของกลุ่มยีนจะทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของยีนที่อยู่ถัดไป (down stream gene) จึงทำให้ยีนกลุ่มดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้อย่างสมบูรณ์ แต่ในกรณีที่ต้องการศึกษายีนเดี่ยว (single gene) โดยวิธีดิสรัปชันจะต้องสร้างยีนกลายด้วยการแทรกยีนเครื่องหมาย (marker gene) บนยีนที่ต้องการศึกษาเพื่อให้เกิดการกลายบนยีนนั้นก่อนที่จะเชื่อมเข้ากับพาหะ เมื่อพลาสมิดสายผสมถูกนำเข้าสู่เซลล์ จะเกิดครอสซิงโอเวอร์สองตำแหน่ง (double crossing over) ทำให้เกิดการแทนที่ระหว่างยีนกลายกับยีนปกติบนโครโมโซม แล้วจึงศึกษาสายพันธุ์กลายที่ได้ การทำยีนดิสรัปชัน นิยมใช้กันมากในการศึกษายีนใน *Streptomyces* และยังเป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีน IAA เช่นกัน

จากรายงานการศึกษาหน้าที่ของยีนจาก *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42 ด้วยวิธียีนดิสรัปชัน โดยเมื่อดิสรัปยีนที่ทำหน้าที่ในวิธีการสังเคราะห์ทริปโทเฟน ได้แก่ยีน *trpED* และ *trpAB* พบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้มีความสามารถในการผลิต IAA ได้ลดลงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ปกติ โดยสายพันธุ์กลายสามารถผลิต IAA ได้เพียง 15 % เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ปกติ และเมื่อนำไปทดสอบกับพืช พบว่าพืชเจริญได้ลดลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นวิธีในการสังเคราะห์ IAA ของ *B. amyloliquefaciens* FZB 42 นี้จึงเป็นวิธีที่มีการใช้ทริปโทเฟนเป็นสารตั้งต้น (Idris *et al.*, 2007)

จากการศึกษาหน้าที่ของยีนซึ่งเป็นตัวแทนของวิถีต่าง ๆ ของ *B. amyloliquefaciens* FZB 42 ที่ใช้ในการสังเคราะห์ IAA ได้แก่ยีน *dhaS* ยีน *ysnE* และยีน *yhxC* ด้วยวิธียีนดิสรัปชัน พบว่าให้ผลการศึกษาดังนี้

ยีน *dhaS* เป็นยีนที่มีความคล้ายคลึงกันกับยีน indole-3-acetaldehyde dehydrogenase จากวิธี IPyA ของ *Ustilago maydis* พบว่าเมื่อศึกษาหน้าที่ของยีนโดยการทำยีนดิสรัปชันแล้ว สายพันธุ์กลายยังมีความสามารถในการผลิต IAA ได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ปกติ ดังนั้นในการสังเคราะห์ IAA จึงไม่มีการสังเคราะห์ผ่านวิธีนี้ (Idris *et al.*, 2007)

เมื่อดิสรัปยีน *ysnE* ซึ่งคล้ายกับยีน IAA acetyltransferase จาก *Azospirillum brasilense* พบว่าสายพันธุ์กลาย สามารถผลิต IAA ได้เพียง 28% เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ปกติ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่ามีการสังเคราะห์ IAA ผ่านทางวิธีนี้ (Idris *et al.*, 2007)

ยีน *yhcX* ซึ่งเป็น putative nitrilase ที่คล้ายคลึงกับยีน nitrilase ในวิธี IAN ของ *Arabidopsis thaliana* เมื่อทำยีนดิสรัปชัน พบว่าสามารถผลิต IAA ลดลงครึ่งหนึ่งของสายพันธุ์ปกติ ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการสังเคราะห์ IAA (Idris *et al.*, 2007) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ได้จากหลายวิธี

อุปกรณ์และวิธีการ

1. จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ทำการวิจัยแสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

สายพันธุ์	สมบัติ	แหล่งที่มา/ เอกสารอ้างอิง
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>Sup E44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI^f</i> ZΔM15Tn10 (Tet ^r)]	Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002)	<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdS Km^r</i> (<i>tra Cm^r</i>)	MacNeil <i>et al.</i> (1992); Sia <i>et al.</i> (1996)
GMKU culture collection	รหัส GMKU 1xx จำนวน 57 สายพันธุ์	ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ม. เกษตรศาสตร์

หมายเหตุ Km = Kanamycin, Cm = Chloramphenicol และ Tet = Tetracycline

ตารางที่ 2 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

พลาสมิด	สมบัติ	แหล่งที่มา/เอกสารอ้างอิง
pTZ57R/T	Amp ^r <i>lacZ</i>	Fermentus, USA
pIJ8600	ColE1 replicon <i>oriT attP int Apr^r Thio^r</i>	Sun <i>et al.</i> (1999)
pIJ8671	ColE1 replicon <i>oriT Apr^r Thio^r</i>	Sun <i>et al.</i> (1999)

หมายเหตุ Amp = Ampicilin, Apr = Apramycin, Thio = Thiostrepton

2. สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อจากบริษัท Amresco (USA), Ajax Finechem (Australia) APS Finechem (Australia), Becton Dickinson (USA), Fluka (Switzerland), Himedia (India), Hispanlab (Spain), Macherey-Nagel (Germany), Merck (Germany), Scharlau (Spain), Sigma (Germany)

ชุด kit จากบริษัท Geneaid Biotech Ltd. (Korea) เอนไซม์ตัดจำเพาะจากบริษัท Fermentas (USA) เอนไซม์ไลโซไซม์จากบริษัท Amresco (USA) และ Fluka (Switzerland) เอนไซม์ RNaseA จากบริษัท Amresco (USA) เอนไซม์ T4 DNA ligase จากบริษัท Fermentas (USA) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จากบริษัท Fermentas (USA) ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb DNA ladder) จากบริษัท Fermentas (USA)

3. วิธีการพื้นฐานสำหรับ *Streptomyces*

วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *Streptomyces* ใช้วิธีการตาม Kieser *et al.* (2000)

3.1 อาหารและสภาวะที่ใช้เลี้ยง

การเลี้ยง *Streptomyces* บนอาหารแข็ง ทำโดยเชื้อสปอร์จาก stock culture มาเกลี่ยบนจานอาหารแข็ง mannitol soya flour (MS, 1 L: 20 g soya flour, 20 g manitol, 20 g agar; Hobbs *et al.*, 1989) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน ในอาหารเหลวจะเลี้ยงใน tryptone soya broth (TSB; Himedia, India) เขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน โดยใส่สารละลายสปอร์ ในอัตราส่วน 1:100 เมื่อเลี้ยง *Streptomyces* ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะทำได้โดยเติมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมลงในอาหาร ให้มีความเข้มข้นดังตารางที่ 3

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

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

3.2 การเก็บสปอร์

เก็บจากเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS จนสปอร์ขึ้นเต็มที่ เติมน้ำกลั่นหรือสารละลายกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารแข็ง แล้วใช้ก้านไม้พันสำลีถูสปอร์บนผิวอาหารให้หลุดออกมา จากนั้นนำก้อนสำลีวางลงให้ซับน้ำและสปอร์ไว้ แล้วใช้หลอดดูดยาคูดสารละลายสปอร์ผ่านก้อนสำลี เพื่อกรองเส้นใยออก นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วแขวนลอยสปอร์ในกลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *Streptomyces* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นนำไมซีเลียมมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Hopwood *et al.* (1985) โดยเติม lysis solution (0.3 M sucrose, 25 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0) ที่มี lysozyme เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-60 นาที ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเป็นครั้งคราวเพื่อให้เซลล์กระจาย เติมน้ำ 2% sodium dodecyl sulfate (SDS)

ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาทันที เดิม phenol: chloroform: isoamylalcohol (25: 24: 1) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมด้วยเครื่อง vortex แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ในกรณีที่ส่วนของสารละลายชั้นบนยังขุ่นหรือยังมีชั้นของตะกอนโปรตีนมาก ให้ทำตามขั้นตอนสกัดซ้ำอีกครั้งจากนั้นดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่เดิม 3M sodium acetate pH 4.8 ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลายที่เก็บใส่หลอดใหม่ และเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายที่เก็บใส่หลอดใหม่กลับหลอดไปมา ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง เดิมเอทานอล 70% ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งหมด ๆ ที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย บัฟเฟอร์ TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8] ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ตามขนาดของ ตะกอนและดีเอ็นเอ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียสในระยะยาว

4. วิธีการพื้นฐานสำหรับ *E. coli*

วิธีการพื้นฐานที่ใช้สำหรับ *E. coli* ใช้วิธีการตาม Sambrook *et al.* (2001)

4.1 อาหารและภาวะที่ใช้เลี้ยง

การเลี้ยง *E. coli* บนอาหารแข็ง จะเจือจางลงบนอาหารแข็ง Lubia-Bertani (LA 1 L; 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 15 g agar, pH 7.2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน การเลี้ยงในอาหารเหลว จะเจือจางลงในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB; สูตรเหมือน LA แต่ไม่เติม agar) เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เมื่อเลี้ยง *E. coli* ที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะทำได้โดยเติมยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมลงในอาหาร ในความเข้มข้นตามตารางที่ 3

4.2 การสกัดพลาสมิด

ใช้วิธี alkaline lysis ของ Sambrook *et al.* (2001) โดยนำเชื้อ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหาร LB เป็นเวลาข้ามคืน ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารทิ้ง จากนั้นแขวนลอยตะกอนใน Solution I [50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8.0)] ที่เย็นจัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10-15 นาที เติม Solution II [0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS] ที่เตรียมสำหรับใช้งานทันที 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาทันทีจนของเหลวผสมกันดี แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปเติม Solution III (5 M CH₃COOK 60 ml, glacial acetic 17.5 ml ในน้ำกลั่น 28.5 ml) ที่เย็นจัด ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมสารโดยใช้ vortex แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติม RNaseA ความเข้มข้นปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ เติม phenol: chloroform: isoamylalcohol (25: 24: 1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ ผสมสารโดยใช้ vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมเอทานอลสัมบูรณ์ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ พลิกหลอดไปมาเบา ๆ นำไปแช่ใน -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 1 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดผึ่งตะกอนให้แห้งหมาด ๆ ที่อุณหภูมิห้องละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตรตามขนาดของตะกอนดีเอ็นเอ เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.3 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ (competent cell)

ทำตามวิธีของ Chung *et al.* (1989) ขยายเชื้อ *E. coli* ที่เลี้ยงข้ามคืนในอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิตร ในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิตร เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส จนมีค่าดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) เท่ากับ 0.3-0.4 (ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) ถ่ายใส่หลอดขนาด 50 มิลลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารทิ้ง แล้วเติม transformation and storage solution [TSS; 10 % (w/v) polyethylene glycol (PEG) MW=8000, 5% dimethylsulphoxide (DMSO), 50 mM MgCl₂, pH 6.5] ที่เย็นจัด ปริมาตร 5 มิลลิตร ใช้ปิเปตต์ขนาด 1000 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงเบา ๆ ให้เซลล์แขวนลอยดีในสารละลาย โดยแบ่งเก็บในหลอดขนาด 1.5 มิลลิตร ที่เย็นหลอดละ 100 ไมโครลิตร ถ้ายังไม่นำไปใช้ให้เก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

4.4 การทรานสฟอร์เมชัน (transformation)

ใช้วิธี heat-shock (Sambrook *et al.*, 2001) โดยเติมพลาสมิด 1-10 ไมโครลิตร ใน คอมพิเทนต์เซลล์ 100 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตผสมเบา ๆ แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที เติมหาอาหาร LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงแบ่งเซลล์ 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยลงอาหาร LA ซึ่งมียาปฏิชีวนะตามความเหมาะสมเพื่อ คัดเลือก กรณีที่คัดเลือกการทำงานของยีน *lacZ* จะเกลี่ยทับอาหารแข็งไว้ก่อนด้วย X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน dimethylformamide ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 7 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน โคโลนีที่มี พลาสมิดสายผสมจะมีสีขาว ขณะที่โคโลนีที่ไม่มีพลาสมิดจะมีสีฟ้า คัดเลือกโคโลนีที่เจริญไป ตรวจสอบการได้รับพลาสมิดต่อไป

5. เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

5.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6x loading buffer [0.25% (W/V) bromophenol blue, 0.25% (W/V) xylene cyanol, 30% glycerol] อัตราส่วน 5:1 แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb DNA ladder) โดยใช้ 0.8% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1x TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ขั้วลบในเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอและถ่ายภาพได้แสงอัลตราไวโอเล็ต

5.2 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล

ใช้ชุดอุปกรณ์ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (Geneaid, Korea) และทำตาม ขั้นตอนในกลุ่มมือ โดยตัดเจลในตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร หลอดละประมาณ 300 มิลลิกรัม เติม DF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จนกว่าเจลละลายหมด กลับหลอดไปมาระหว่างที่ทำการบ่ม 2-3 ครั้ง ทิ้งไว้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใส่ลงใน DF column

ที่วางอยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ถ้ายังมีสารละลายเหลือให้ดูดมาใส่ใน DF column แล้วทำตามขั้นตอนข้างต้น หลังจากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 15-50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บสารละลายดีเอ็นเอ นาน 2 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5.3 การทำสารละลายดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดอุปกรณ์

ใช้ชุดอุปกรณ์ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (Geneaid, Korea) และทำตามขั้นตอนในคู่มือ โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอในหลอด 1.5 ไมโครลิตร หลอดละประมาณ 50 ไมโครลิตร เติม DF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ดูดสารละลายใส่ลงใน DF column ที่วางอยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทของเหลวทิ้ง หลังจากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 15-50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเก็บสารละลายดีเอ็นเอ นาน 2 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

การทำพีซีอาร์ใช้ ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม และไพรเมอร์อย่างละ 0.05 พิโคโมล สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 10 % DMSO, 0.5 unit *Taq* DNA polymerase ในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะดังนี้

รอบที่ 1	94	องศาเซลเซียส	4	นาที
รอบที่ 2-29	94	องศาเซลเซียส	30	วินาที
อุณหภูมิ annealing ตามชนิดของไพรเมอร์				
	72	องศาเซลเซียส	1	นาที
รอบที่ 30	94	องศาเซลเซียส	30	วินาที
อุณหภูมิ annealing ตามชนิดของไพรเมอร์				
	72	องศาเซลเซียส	4	นาที

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ไพรเมอร์	Ta (°C)	เอกสารอ้างอิง
Apr C-1 5'GACGTCGCGGTGAGTTCAGGC3'	65	Choi <i>et al.</i> (2004)
Apr N-2 5'CCCCGGCGGTGTGCT G3'		
ATT072F 5'ATGGGSGCSATGCGSTTCCC3'	60	งานวิจัยนี้
ATT072R 5'ACSCCCCACACSGCGTTCAG3'		
STR 1F 5' TCACGGAGAGTTTGATCCTG 3'	55	Kataoka <i>et al.</i> (1997)
STR 1530 R 5' AAGGAGATCCAGCCGCA 3'		

หมายเหตุ W=A/T; S=G/C; Y=C/T

5.5 การหาลำดับเบส

สกัดพลาสมิดและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดอุปกรณ์ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (Geneaid, Korea) ตามวิธีในข้อ 5.2 หรือ 5.3 และส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

5.6 การตัดและเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

การตัดดีเอ็นเอ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม โดยเตรียมส่วนผสม และบ่มตามสภาวะที่แนะนำในคู่มือ โดยตัดพลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกับที่ใช้ตัดดีเอ็นเอที่จะนำมาเชื่อม ในการเชื่อมดีเอ็นเอเพื่อสร้างพลาสมิดสายผสมใช้อัตราส่วนพลาสมิดต่อชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 1 ต่อ 3 ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยพลาสมิด 1 ส่วน ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ส่วน 10x ligation buffer 2 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (1U/μl) 1 ไมโครลิตรในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทรานสฟอร์มเมชันตามข้อ 4.4

5.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโน

การแปลรหัสลำดับเบสเป็นลำดับกรดอะมิโนใช้โปรแกรม Six-Frame Translation (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/sixframe.html>) การค้นหาลำดับที่มีความคล้ายกันในฐานะข้อมูลใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul *et al.*, 1990) เปรียบเทียบลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี multiple alignment, clustering และใช้โปรแกรม ClustalX 1.81 (Thompson *et al.*, 1994) การหาคำแนะนำของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับเบสอาศัยโปรแกรม NEBcutter 2.0 (<http://tool.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

6. การตรวจสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

6.1 การตรวจสอบการผลิตแอมโมเนีย

นำแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์มาเลี้ยงบนอาหาร MS บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญดี นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว peptone water (1 L: 10 g peptone, 10 g NaCl) เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน นำมาตรวจสอบการผลิตแอมโมเนีย โดยนำสารละลายส่วนใสด้านบน 0.5 มิลลิลิตร มาทดสอบด้วยการเติม Nessler's reagent (1 L: 100 g HgI₂, 70 g KI, 160 g NaOH; Cappuccino and Sherman, 1992) 0.5 มิลลิลิตร ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเป็นสีเหลือง-ส้มหรือมีตะกอนสีน้ำตาลเกิดขึ้น

6.2 การตรวจสอบการละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์บนอาหาร MS บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญดี นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาหยดบนอาหารแข็ง Pikovskaya (1 L: 10 g glucose, 5 g Ca₃(PO₄)₂, 0.5 g (NH₄)₂SO₄, 0.2 g NaCl, 0.1 g MgSO₄·7H₂O, 0.2 g KCl, 0.5 g yeast extract, 0.002 g MnSO₄·H₂O, 0.002 g FeSO₄·7H₂O, 15 g agar, pH 7; Gaur, 1990) เป็นเวลา 14 วัน โดยตรวจสอบบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

6.3 การตรวจสอบการผลิตไซเดอร์โรฟอว์ (siderophore production)

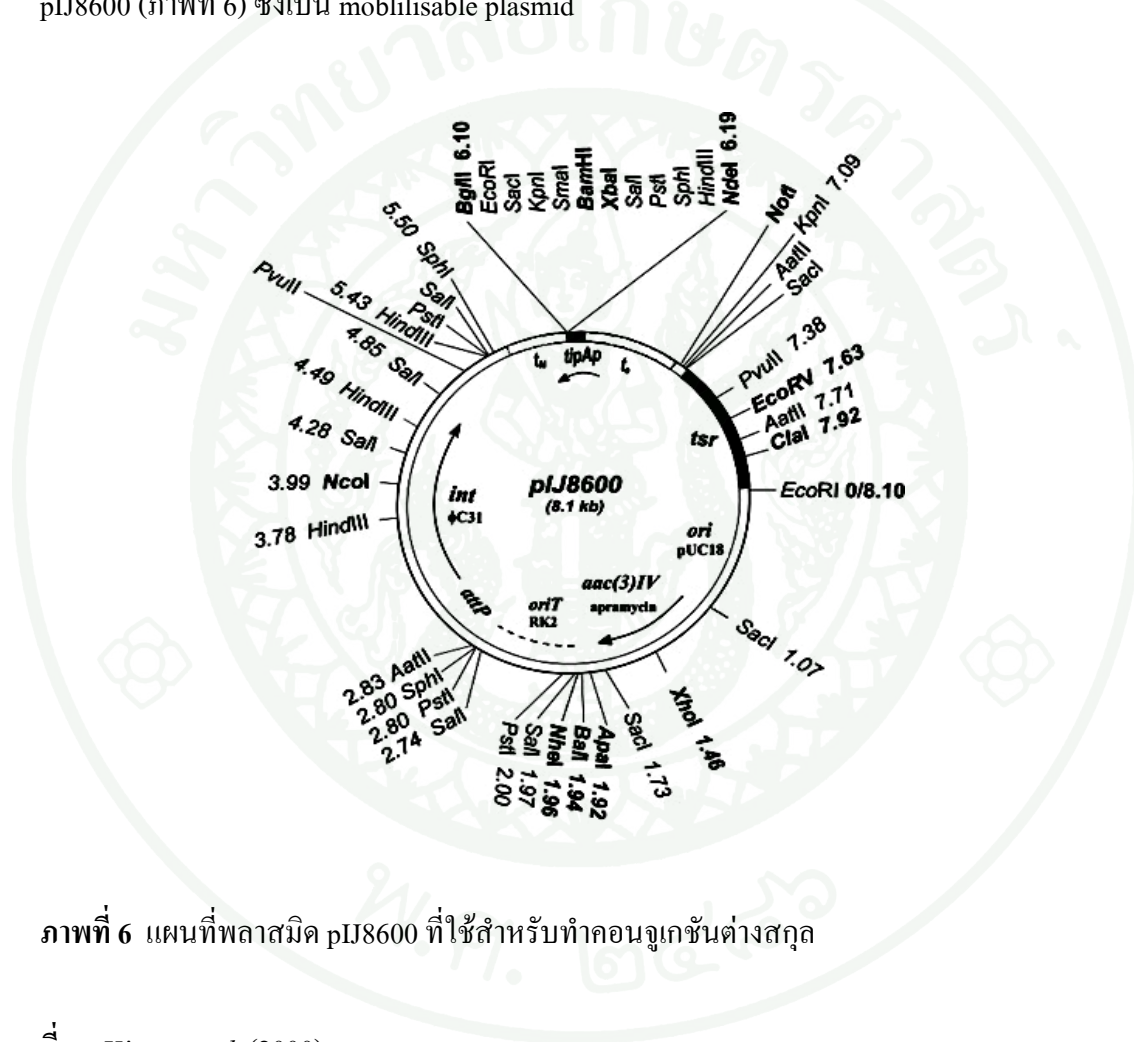
ในการตรวจสอบไซเดอร์โรฟอว์นั้น ทำโดย เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ บนอาหาร MS บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อเจริญดีแล้ว นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จนเชื้อเจริญได้ดี นำเชื้อมาหยดลงบนอาหาร Chrom azurol S (CAS) agar ตามวิธีการตรวจสอบของ Schwyn and Neiland (1987) ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังต่อไปนี้ การเตรียมสารละลาย CAS indicator ชั่ง CAS 60.5 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงไป และเติมสารละลายเหล็ก Fe^{3+} (100 ml: 27 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 83.3 μl conc HCl) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติม 72.9 มิลลิกรัม Hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) ที่ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตรลงไป ซึ่งสารละลาย CAS indicator ที่ได้จะมีสีน้ำเงิน และเตรียมอาหาร basal agar medium (88 ml: 3 g MOPS, 0.05 g NaCl, 0.03 g KH_2PO_4 , 0.01 g NH_4Cl , 0.05 g L-asparagine, 1.5 g agar, pH 6.8) นำ CAS indicator และ basal agar medium ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย 50% กลูโคสลงในอาหาร basal agar medium 2 มิลลิลิตร คนจนละลายเข้ากันและเติม CAS indicator ลงไป 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทดสอบการผลิตไซเดอร์โรฟอว์โดยตรวจดูการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีน้ำเงินเป็นสีส้ม

6.4 การตรวจสอบการผลิตฮอร์โมน indole-3-acetic acid

นำแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ จาก GMKU culture collection มาทดสอบการผลิตฮอร์โมน IAA โดยคัดแปลงมาจากวิธีการของ Ahmad *et al.* (2008) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์บนอาหาร MS บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อเจริญดีแล้ว นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB หรือในอาหาร glucose-beef extract (1 % glucose, 1 % beef extract) ตามวิธีการเลี้ยงของ Matsukawa *et al.* (2007) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม 2.5 mM L-tryptophan (500 $\mu\text{g/ml}$) เขย่า 200 รอบต่อนาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนของสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง และเติม Salkowski's reagent (0.5 M FeCl_3 , 1 ml, 35% HClO_4 50 ml; Gordon and Webber, 1951) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบการผลิตฮอร์โมน IAA โดยตรวจดูการเกิดสีชมพูของสารละลาย จากนั้นนำไปวัดหาปริมาณ IAA ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยทำ standard curve ของฮอร์โมน IAA ที่ความเข้มข้น 5-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดคอนจูชันต่างสกุลระหว่างแอคติโนมัยสีท เอนโดไฟต์และ *E. coli* ET12567 (pUZ8002)

ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของการส่งถ่ายพลาสมิด ในการเกิด
คอนจูชันต่างสกุลระหว่างแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟต์ และ *E. coli* ET12567 (pUZ8002) ซึ่ง
ดัดแปลงวิธีการมาจาก Mazodier *et al.* (1989) และ Phonphisutthimas *et al.* (2010) โดยใช้พลาสมิด
pIJ8600 (ภาพที่ 6) ซึ่งเป็น mobilisable plasmid



ภาพที่ 6 แผนที่พลาสมิด pIJ8600 ที่ใช้สำหรับทำคอนจูชันต่างสกุล

ที่มา: Kieser *et al.* (2000)

7.1 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการงอกของสปอร์

ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ใช้ขั้นตอนตาม Kieser *et al.* (2000) โดยเก็บสปอร์ของแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ปรับให้สปอร์มีความเข้มข้น 10^{16} สปอร์ต่อมิลลิลิตรในอาหาร 2x YT (1 L: 16 g tryptone, 10 g yeast extract, 5 g NaCl) แล้วนำสปอร์ไปกระตุ้นการงอกที่อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง บ่มเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แวนลอคตะกอนใน 2x YT ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง MS ที่มี 10 mM $MgCl_2$ บ่มไว้ที่ 28 องศาเซลเซียส 3 วัน บันทึกจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร

7.2 คอนจูเกชันต่างสกุล

การทำคอนจูเกชันต่างสกุล อาศัยวิธีการของ Kieser *et al.* (2000)

7.2.1 การเตรียม *E. coli* ผู้ให้

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pIJ8600) ข้ามคืนในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะอะพราไมซิน กานามัยซิน และคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้นดังตารางที่ 3 เจือจางเซลล์ 1:100 ด้วยอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ แล้วเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิม จนมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 (OD_{600}) อยู่ระหว่าง 0.4-0.6 จึงนำเชื้อที่ได้ 500 ไมโครลิตรลิตร ไปล้าง 2 ครั้งด้วยอาหาร LB ตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงแล้วละลายในอาหาร LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

7.2.2 การเตรียมแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ บนอาหาร MS ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เก็บสปอร์ตามข้อ 3.2 โดยให้สปอร์มีความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร 2x YT ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปกระตุ้นการงอกของสปอร์โดยการบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเย็นลงก่อนนำไปใช้

7.2.3 การทำคอนจูเกชันต่างสกุล

ผสมผู้ให้และผู้รับเข้าด้วยกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ละลายตะกอนในอาหาร 2x YT ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมด้วยอาหาร 2x YT แล้วเกลี่ยส่วนผสมดังกล่าวปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อจานอาหาร บนอาหาร MS ที่มี 10 mM MgCl₂ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ก่อนเททับด้วยสารละลาย 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยยาปฏิชีวนะอะพราไมซิน และกรคนาลิซิก ความเข้มข้นตามตารางที่ 3 เพื่อคัดเลือก *Streptomyces* ที่ได้รับพลาสมิดหรือเอกซ์คอนจูแกนต์ (ex-conjugant) และกำจัด *E. coli* ตามลำดับ

7.3 การศึกษาประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่างแอกติโนมัยสียเอนโดไฟต์ และ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pIJ8600)

การทดลองนี้จะทำคอนจูเกชันต่างสกุลโดยใช้ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pIJ8600) เป็นผู้ให้ ตามวิธีในข้อ 7.2 โดยใช้สปอร์ของแอกติโนมัยสียเอนโดไฟต์เป็นผู้รับ คำนวณหาประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างจำนวนเอกซ์คอนจูแกนต์กับจำนวนสปอร์ของผู้ให้ที่ใช้ทั้งหมด

7.4 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนต์

นำโคโลนีเอกซ์คอนจูแกนต์ ไปเจียลงบนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะดังกล่าว อีก 10 รอบ เพื่อยืนยันผลการต้านทานยาปฏิชีวนะจากพลาสมิดรวมทั้งกำจัด *E. coli* ที่อาจหลงเหลืออยู่ นำโคโลนีเอกซ์คอนจูแกนต์ที่เจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะไปสกัดดีเอ็นเอตามข้อ 3.3 และตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณยีนต้านยาอะพราไมซิน โดยใช้ไพรเมอร์ Apr C-1 และ AprC-2 (ตารางที่ 4) ตามวิธีข้อ 5.4

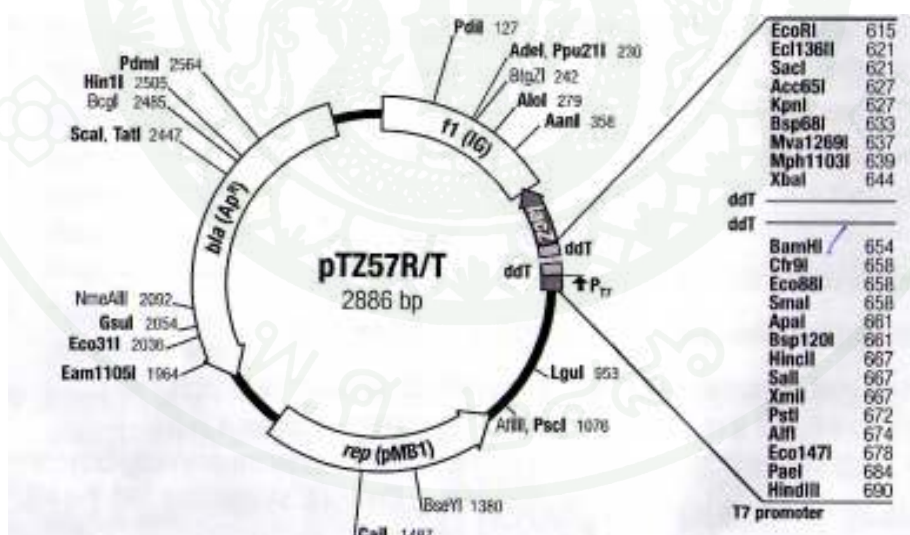
8. การตรวจหาและโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมน IAA

8.1 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาชิ้นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมน IAA

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมน IAA โดยการรวบรวมข้อมูลของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในฐานข้อมูล GenBank และนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ดังกล่าวมาทำ multiple alignments ด้วยโปรแกรม ClustalW 1.82 วิเคราะห์หาบริเวณอนุรักษ์ของยีน (conserve region) เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์

8.2 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮอร์โมน IAA

เพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมน IAA โดยการทำพีซีอาร์ตามวิธีการในข้อ 5.4 ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้จากข้อ 8.1 และนำผลที่ได้ไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีในข้อ 5.1 จากนั้นโคลนยีนที่ได้จากพีซีอาร์เข้าสู่พลาสมิด pTZ57R/T (ภาพที่ 7) และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* XL-1 Blue ตามวิธีในข้อ 4.4



ภาพที่ 7 พลาสมิด pTZ57R/T

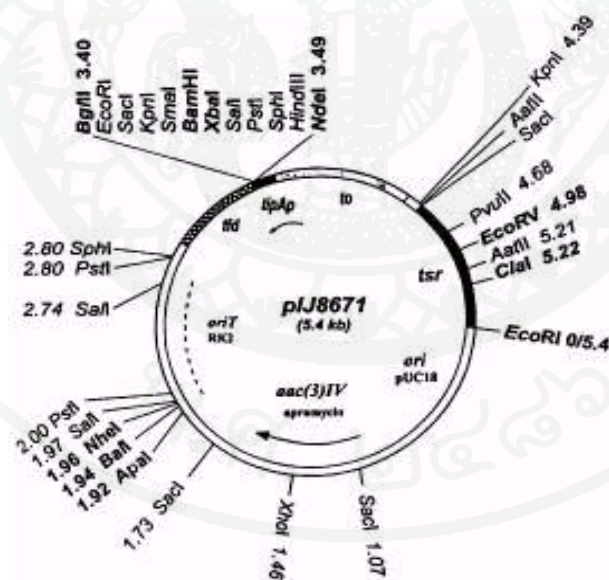
ที่มา: Fermentus (USA)

ตรวจสอบโคลนที่ได้โดยการสกัดพลาสมิดตามวิธีในข้อ 4.2 และพิสูจน์โคลนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม จากนั้นแยกขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อได้โคลนที่ต้องการ นำโคลนนั้นไปหาลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมน IAA ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

9. การศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมน IAA ของแอคติโนไมซีเอนโดไฟต์ด้วยวิธียีนดิสรัปชัน

9.1 การสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อทำยีนดิสรัปชัน

หลังจากโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต IAA เข้าพลาสมิด pTZ57R/T ตามต้องการแล้ว จะย้ายชิ้นดีเอ็นเอ ดังกล่าวเข้าสู่พลาสมิด pIJ8671 (Sun *et al.*, 1999) (ภาพที่ 8) ซึ่งเป็นพลาสมิดแบบ mobilisable แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* ET12567 (pUZ8002) สำหรับทำคอนจูกันต่างสกุลต่อไป



ภาพที่ 8 แผนที่พลาสมิด pIJ8671 ที่ใช้สำหรับทำยีนดิสรัปชัน

ที่มา: Sun *et al.* (1999)

9.2 การทำยีนดิสรัปชัน

นำ *E. coli* ET 12567 (pUZ8002) ที่มีพลาสมิดสายผสมจากข้อ 9.1 ไปทำคอนจูเกชันกับแอสคิโนมัยซีทอนโคไฟต์ตามวิธีการในข้อ 7

9.3 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วยวิธีพีซีอาร์

นำสายพันธุ์กลายที่ได้จากข้อ 9.2 ไปสกัดดีเอ็นเอตามข้อ 3.3 และตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณยีนด้านยาปฏิชีวนะอะพราไมซิน (*apr*) โดยใช้ไพรเมอร์ AprC-1 และ AprN-2 (ตารางที่ 4) เพื่อยืนยันการส่งถ่ายพลาสมิด ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

9.4 การตรวจสอบการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ของสายพันธุ์กลาย

9.4.1 ตรวจสอบการสังเคราะห์ IAA ด้วย Salkowski's reagent ตามวิธีการในข้อ 6.4

9.4.2 การตรวจสอบการสังเคราะห์ IAA ด้วยวิธี HPLC

เลี้ยงแอสคิโนมัยซีทอนโคไฟต์และสายพันธุ์กลายในอาหารเหลว glucose beef extract ที่เติม 2.5 mM L-tryptophan ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มีดื่มน้ำเลี้ยงเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นส่งน้ำเลี้ยงไปตรวจสอบการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA โดย HPLC ที่กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ซึ่งวิธีการเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC นั้นใช้วิธีการซึ่งพัฒนาโดยสุพิศสา และคณะ (2551) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ นำน้ำเลี้ยง 2 มิลลิลิตร ผสมกับ mobile phase (45% methanol ใน 0.02M ammonium acetate, pH 3.5) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จนได้ปริมาตรรวมเป็น 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นกรองผ่าน เมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงนำเข้าเครื่อง HPLC วิเคราะห์สารสกัดด้วย HPLC Fluorescent Detector โดยใช้ column uBondapak C18 3.9 × 300 mm โดยใช้ mobile phase (45% methanol ใน 0.02M ammonium acetate, pH 3.5) ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่เป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 10 นาที โดยฉีดสารปริมาตร 10 ไมโครลิตรเปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ปกติ โดยเทียบความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA กับสารละลายฮอร์โมน IAA มาตรฐาน

10. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตบางเขน ในระหว่างเดือนตุลาคม 2550 – เมษายน 2553



ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

นำแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ จาก GMKU culture collection จำนวน 57 สายพันธุ์มาทดสอบสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืชได้แก่ การผลิตแอมโมเนีย ความสามารถในการละลายฟอสเฟส การผลิตไซโตไคน์ รือฟอร และการผลิตฮอร์โมน IAA โดยได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

1.1 การตรวจสอบการผลิตแอมโมเนีย (NH_3 production)

จุลินทรีย์แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์จำนวน 50 สายพันธุ์จาก 57 สายพันธุ์ มีความสามารถในการผลิตแอมโมเนียได้ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 9



(ก)

102 +++	103 +++	104 +++	105 +++	106 ++	107 +++	108 +++	C
109 +++	110 +++	112 +	113 +++	115 +++	116 ++	117 ++	C
119 +++	120 +	121 +	123 +++	127 ++	128 +++	131 +++	C
136 ++	137 +	141 ++	144 ++	145 -	147 +++	148 +++	C
149 +	150 +	151 +++	152 +++	153 -	154 -	155 +++	C
165 +	166 ++	167 +++	168 +++	169 +++	100 +++		C
156 -	157 -	158 ++	159 ++	161 +++	162 ++	163 +	C

(ข)

ภาพที่ 9 การตรวจสอบการผลิตแอมโมเนียด้วย Nessler's reagent

(ก) การเกิดสีเหลือง-ส้ม หรือตะกอนสีน้ำตาลใน microtiter plate

(ข) แสดงชื่อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ในภาพ

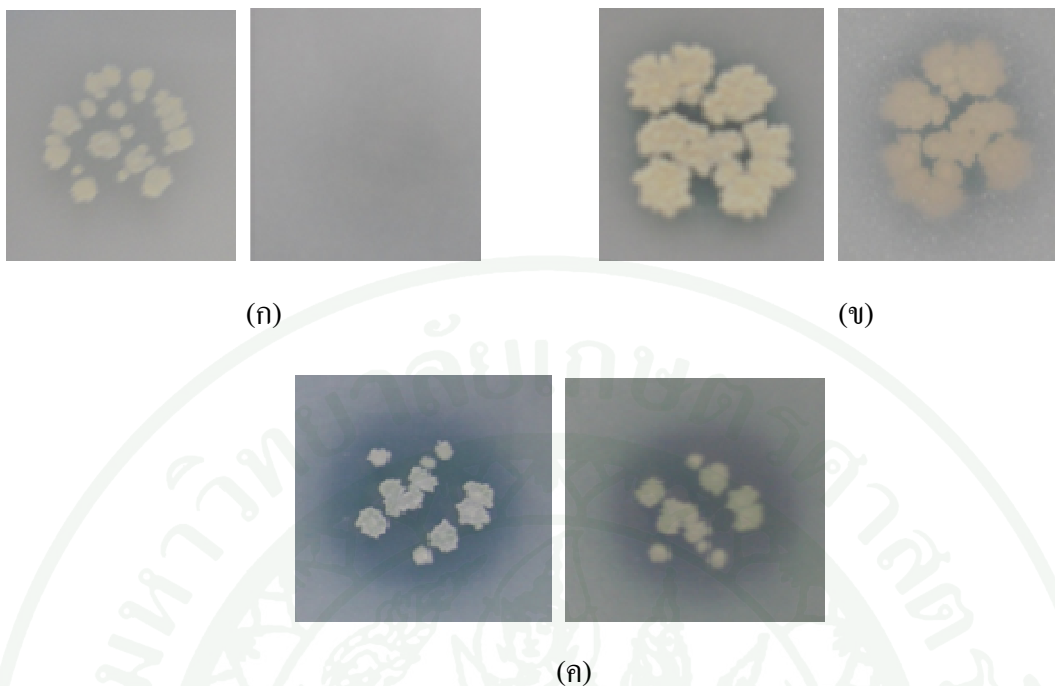
+++ ผลิตได้ดีมาก, ++ ผลิตได้ปานกลาง, + ผลิตได้น้อย, C = อาหาร peptone water

จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์ GMKU102, GMKU103, GMKU 104, GMKU 105, GMKU 107, GMKU 108, GMKU 109, GMKU 110, GMKU 113, GMKU 114, GMKU 115, GMKU 118, GMKU 119, GMKU 123, GMKU 128, GMKU 131, GMKU 147, GMKU 148, GMKU 151, GMKU 152, GMKU 155, GMKU 160, GMKU 161, GMKU 167, GMKU 168, GMKU 169 สามารถผลิตแอมโมเนียได้สูงมาก (+++) สายพันธุ์ GMKU 100, GMKU 106, GMKU 116, GMKU 117, GMKU 127, GMKU 129, GMKU 132, GMKU 133, GMKU 136, GMKU 141, GMKU 144, GMKU 158, GMKU 159, GMKU 162, GMKU 166 มีความสามารถในการผลิตแอมโมเนียได้ปานกลาง (++) สายพันธุ์ GMKU 112, GMKU 120, GMKU 121, GMKU 135, GMKU 137, GMKU 149, GMKU 150, GMKU 163, GMKU 165 สามารถผลิตแอมโมเนียได้น้อย (+) และ GMKU 122, GMKU 134, GMKU 145, GMKU 153, GMKU 154, GMKU 156 และ GMKU 157 ไม่สามารถผลิตแอมโมเนียได้

แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ ที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่ สามารถผลิตแอมโมเนียได้ เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญของพืชที่แยกได้จากดิน (Ahmad *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2007) นอกจากนี้จุลินทรีย์เอนโดไฟต์มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่นไรโซเบียม *Frankia* และจุลินทรีย์เอนโดไฟต์อื่น ๆ ก็มีรายงานในการผลิตแอมโมเนียเช่นกัน (Williams *et al.*, 1989; Han *et al.*, 2005)

1.2 การตรวจสอบการละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization)

ฟอสฟอรัสเป็นหนึ่งในธาตุอาหารหลักที่สำคัญของพืช ซึ่งโดยปกติแล้ว แม้ว่าจะพบฟอสฟอรัสในดิน แต่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เนื่องจากจะอยู่ในรูปของสารประกอบกับธาตุอื่น ๆ เช่น แคลเซียม ซึ่งเป็นรูปที่ละลายน้ำได้น้อยมาก (Stewart *et al.*, 1980) ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการทำให้สารประกอบฟอสเฟตเปลี่ยนเป็นสารละลายฟอสฟอรัสได้จึงจัดเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญของพืช ดังที่มีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดรวมไปถึงจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต เพื่อให้พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Sperber, 1958; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Madhaiyan *et al.*, 2004)



ภาพที่ 10 ความสามารถในการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya agar

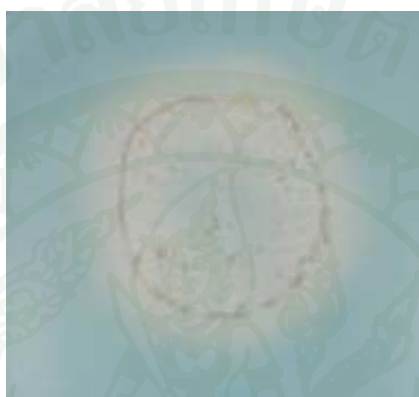
- (ก) สายพันธุ์ GMKU 115 สามารถละลายได้น้อย (+)
- (ข) สายพันธุ์ GMKU 148 สามารถละลายได้ปานกลาง (++)
- (ค) สายพันธุ์ GMKU 151 สามารถละลายได้ดีมาก (+++)

จากการทดลองปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีทอนโดไฟต์ 57 สายพันธุ์ลงบนอาหาร Pikovskaya agar พบว่า 20 สายพันธุ์ มีความสามารถในการละลายฟอสเฟต ซึ่งสังเกตได้จากการเกิดวงใส (clear zone) รอบเชื้อที่ปลูก โดยสายพันธุ์ GMKU 103, GMKU 117, GMKU 127, GMKU 128, GMKU 131, GMKU 136, GMKU 137, GMKU 145, GMKU 151, GMKU 153, GMKU 156, GMKU 161 และ GMKU 168 มีความสามารถในการละลายฟอสเฟตได้ดีมาก (+++) สายพันธุ์ GMKU 121, GMKU 148, GMKU 154, GMKU 155 และ GMKU 159 สามารถละลายฟอสเฟตได้ปานกลาง (++) และสายพันธุ์ GMKU 115 และ GMKU 157 สามารถละลายฟอสเฟตได้น้อย โดยแสดงตัวอย่างความสามารถในการละลายฟอสเฟส (ภาพที่ 10)

1.3 การตรวจสอบการผลิตไซเดอร์โรฟออร์ (siderophore)

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชหลายชนิด พบว่าสามารถผลิตไซเดอร์โรฟออร์ได้ ซึ่งช่วยให้พืชสามารถดูดธาตุเหล็ก และยังช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโต

ของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้อีกด้วย (Glick and Bashan, 1997) ซึ่งการผลิตไซเดอร์โรฟอร์นี้พบว่า แอคติโนมัยสีทเอนโคไฟต์ สามารถผลิตโครงสร้างดังกล่าวได้เช่นกัน (Nimnoi *et al.*, 2009) ดังนั้น เมื่อทดลองปลูกแอคติโนมัยสีทเอนโคไฟต์บนอาหาร Chrom azurol S reagent พบว่ามีเอนโคไฟต์ จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ GMKU 103, GMKU 110, GMKU 112, GMKU 135, GMKU 155, GMKU 168, GMKU 169 ที่สามารถผลิตไซเดอร์โรฟอร์ได้บนอาหารดังกล่าว โดยให้วงสีส้มในอาหาร ดังเช่นที่แสดงตัวอย่างในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 การผลิตไซเดอร์โรฟอร์โดยสายพันธุ์ GMKU 169

1.4 การตรวจสอบการผลิตฮอร์โมน indole-3-acetic acid (IAA)

IAA เป็นฮอร์โมนที่สำคัญของพืช ในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้พบว่า IAA สังเคราะห์ได้โดยพืชแล้ว ยังมีรายงานการศึกษาว่า จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ก็มีความสามารถในการผลิต IAA เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น *Pseudomonas putida* และ *Trichoderma atroviride* สามารถสังเคราะห์ IAA ซึ่งส่งเสริมการเจริญของต้นมะเขือเทศได้ในหลอดทดลอง (Gravel *et al.*, 2007) *Pseudomonas putida* GR12-2 สามารถสังเคราะห์ IAA ได้โดยวิธี IPyA (Patten and Glick, 2002) และในจุลินทรีย์เอนโคไฟต์หลายสายพันธุ์พบว่าสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA เพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชได้เช่นกัน เช่น *Pantoea agglomerans* (Verma *et al.*, 2001) ราเอนโคไฟต์ที่แยกได้จากต้นถั่วเหลือง (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004) และจุลินทรีย์ในสกุล *Streptomyces* มีรายงานว่าสามารถผลิต IAA ได้ (Manulis *et al.*, 1994; Matsukawa *et al.*, 2007)

จากการศึกษาพบว่าแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ จำนวน 18 สายพันธุ์ ที่นำมาเลี้ยงในอาหาร TSB ที่เติม 2.5 mM L-tryptophan มีความสามารถในการผลิต IAA ได้เมื่อทดสอบด้วย Salkowski's reagents โดยการเปลี่ยนสีของสารละลายใสไปเป็นสีส้ม-แดงเมื่อเทียบกับอาหาร TSB ที่เติม 2.5 mM L-tryptophan (control)

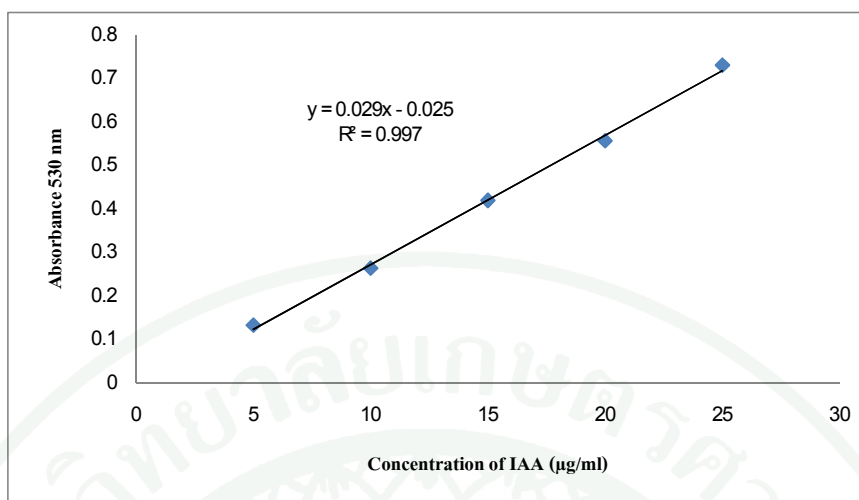


ภาพที่ 12 แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการผลิต IAA เมื่อเลี้ยงในอาหาร TSB ตัวเลขแสดงสายพันธุ์ GMKU, M145= *S. coelicolor* M145, C = อาหาร TSB ที่เติม 2.5 mM L-tryptophan (control), S= สารละลาย Salkowski's reagent

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทดสอบความสามารถในการผลิต IAA ของ *Streptomyces coelicolor* M145 ตามที่ Matsukawa *et al.* (2007) ได้รายงานไว้ว่า *Streptomyces* สายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการผลิต IAA ได้ ดังนั้นจึงได้เลือกมาใช้เป็นตัวควบคุม (positive control) และเมื่อนำจุลินทรีย์ทุกตัวที่นำมาทดลองไปตรวจสอบความเข้มข้นของ IAA โดยการตรวจสอบด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่ามีความเข้มข้นของ IAA ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของ IAA ในอาหารเลี้ยง TSB เมื่อวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer

GMKU	Absorbance 530 nm	Concentration of IAA (ppm)
103	0.157	1.03
104	0.241	3.93
106	0.216	3.07
113	0.667	18.62
114	0.549	14.55
116	0.572	15.35
118	0.468	11.76
120	0.211	2.90
121	0.23	3.55
122	0.147	0.69
128	0.422	10.17
135	0.306	6.17
144	0.162	1.20
151	0.086	7.71
154	0.156	1.00
160	0.233	2.76
161	0.169	1.45
163	0.369	8.35
<i>S. coelicolor</i> M145	0.152	0.86



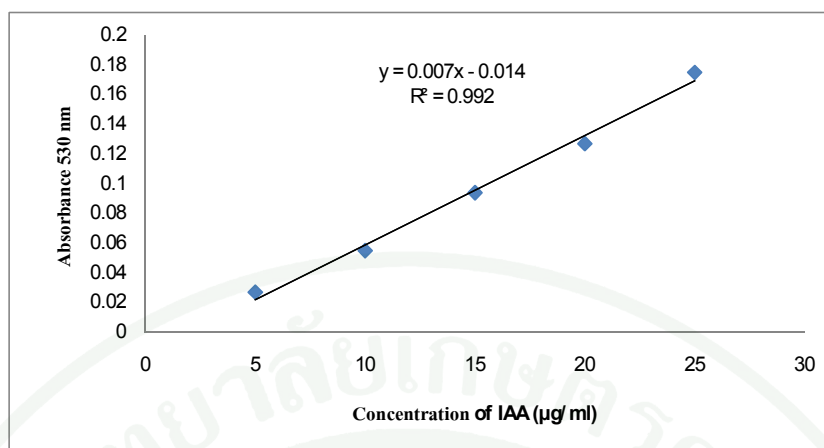
ภาพที่ 13 กราฟแสดงสารละลายมาตรฐาน IAA ที่ใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นในอาหาร TSB

จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าจุลินทรีย์แอคติโนมัยซีทเอนโคไฟต์ หลายสายพันธุ์มีการผลิต IAA ความเข้มข้น สูงกว่า *S. coelicolor* เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง spectrophotometer ดังที่แสดงในตารางที่ 5 อย่างไรก็ตามการทดลองดังกล่าวอาจให้ผลที่คลาดเคลื่อนได้เนื่องจากแอคติโนมัยซีทบางสายพันธุ์ มีการสร้างรงควัตถุในอาหารเหลว เช่น GMKU 113 และ GMKU 128 ดังนั้นจึงทำให้การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อทดสอบด้วย Salkowski's reagent ไม่แน่นอนเนื่องจากสีของรงควัตถุไปรบกวน จากรายงานการทดลองของ Crozier *et al.* (1988) ซึ่งตรวจสอบการผลิตฮอร์โมน IAA ของจุลินทรีย์ *Azospirillum brasilense* 703 Ebc โดย Salkowski's reagent และ HPLC พบว่าค่าความเข้มข้นที่วัดได้จากทั้ง 2 การทดลองนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมาก ดังนั้นการวัดความเข้มข้นของ IAA ด้วย Salkowski's reagent นั้นอาจให้ค่าที่ผิดพลาดได้ จึงควรตรวจสอบด้วย HPLC ต่อไป

เนื่องจากอาหาร TSB เป็นอาหารที่มีสีเข้ม อาจรบกวนการเกิดสีเมื่อทดสอบการสร้าง IAA ได้ จึงทดลองตรวจวัดฮอร์โมน IAA โดยเลี้ยงแอคติโนมัยซีทเอนโคไฟต์ 18 สายพันธุ์ในอาหาร glucose beef extract ตามที่ Matsukawa *et al.* (2007) ได้นำมาใช้ในการทดลอง ผลแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของ IAA ในอาหารเลี้ยง glucose beef extract เมื่อวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer

GMKU	Absorbance 530 nm	Concentration of IAA (ppm)
103	0.051	2.70
104	0.070	5.43
106	0.035	7.00
113	0.319	47.57
114	0.234	35.43
116	0.117	18.71
118	0.126	13.43
120	0.233	28.71
121	0.435	57.57
122	0.464	61.71
128	0.362	47.14
135	0.065	4.71
144	0.042	1.43
151	0.086	7.71
154	0.120	12.57
160	0.058	3.71
161	0.483	64.43
163	0.047	2.14
<i>S. coelicolor</i> M145	0.042	1.43



ภาพที่ 14 กราฟแสดงสารละลายมาตรฐาน IAA ที่ใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นในอาหาร glucose beef extract

จากการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน IAA ในอาหารเหลว glucose beef extract พบว่าค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้นั้นมีความแตกต่างจากค่าที่คำนวณได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว TSB และเชื้อจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างรงควัตถุในอาหาร glucose beef extract ได้แก่ GMKU 113, GMKU114, GMKU 120, GMKU 121, GMKU 122 และ GMKU 128 มีค่าความเข้มข้นที่ได้จากการตรวจวัดมีปริมาณสูงมาก ดังนั้นการตรวจสอบด้วย Salkowski's reagent จึงอาจจะไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างรงควัตถุในอาหารที่ใช้เลี้ยง

จากการศึกษาเรื่องการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ พบว่า GMKU 103 มีความสามารถในการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชได้ทั้ง 4 ชนิด ขณะที่ GMKU 134 ไม่สามารถผลิตสารดังกล่าวได้เลยโดยความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ ทั้งหมดได้สรุปไว้ในตารางที่ 7 แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่นำมาทดลองครั้งนี้ มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ที่มีรายงานการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Mesorhizobium* และ *Bacillus* ที่แยกจากดิน พบว่าสามารถผลิต IAA ผลิตแอมโมเนีย ผลิตไซเคอร์โรฟอร์และ ละลายฟอสเฟตได้ (Joseph *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2008) ในการทดลองของ Husen (2003) พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกจากดิน 14 สายพันธุ์ พบว่า 12 สายพันธุ์ผลิต IAA 4 สายพันธุ์ละลายฟอสเฟต 7 สายพันธุ์ผลิต

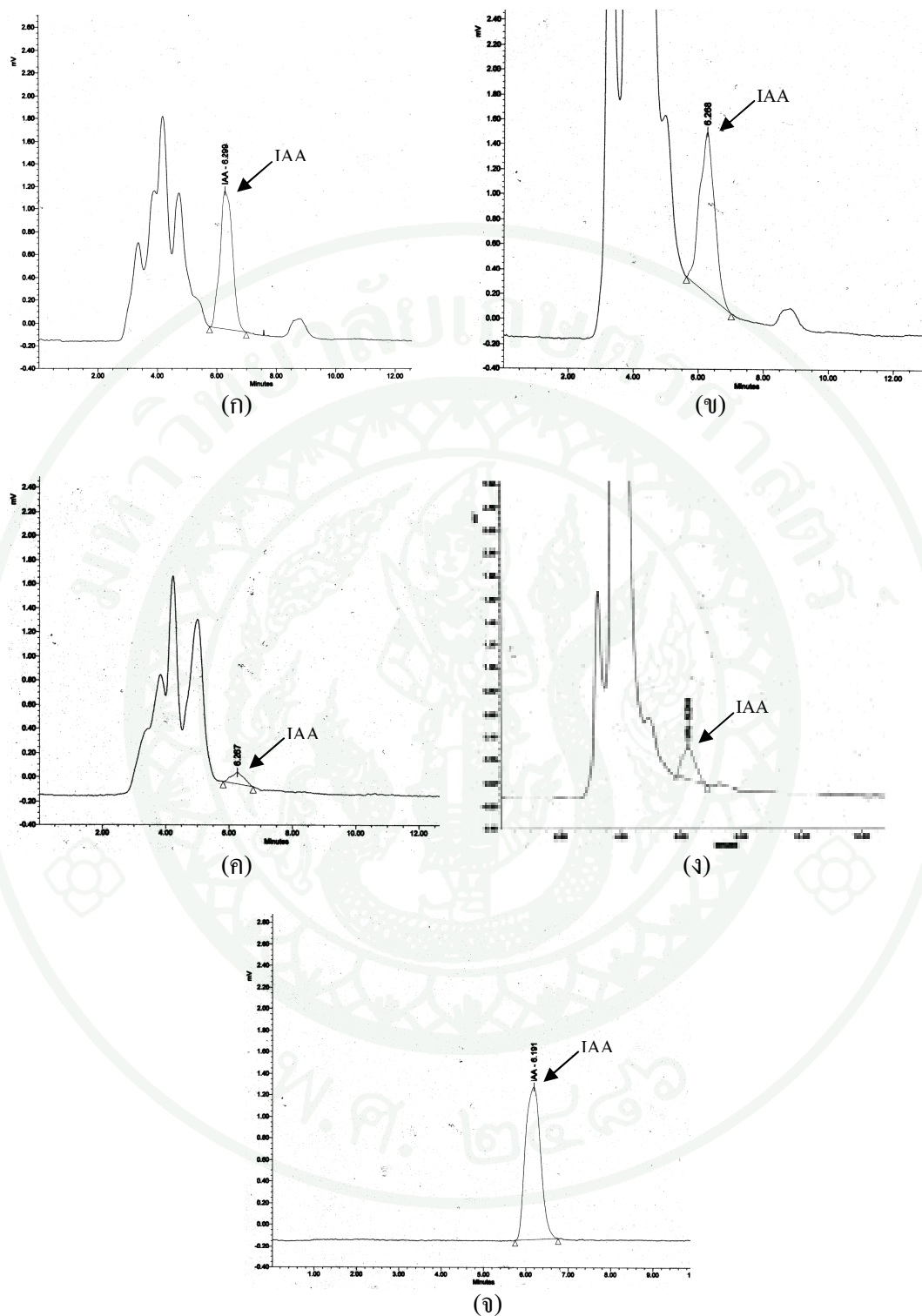
โครงสร้างไซเดอร์โรฟอร์ แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ในโตรจีนัส ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจน

ตารางที่ 7 ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชโดยแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์

NH ₃ production	Phosphate solubilization	Siderophore production	IAA production	Numbers of GMKU
+	-	-	-	21
-	+	-	-	4
-	-	-	+	1
+	+	-	-	8
+	-	+	-	3
+	-	-	+	10
-	+	-	+	1
+	+	+	-	2
+	+	-	+	4
+	-	+	+	1
+	+	+	+	1
-	-	-	-	1

2. การโคลนและการวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ IAA แอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์

จากการศึกษาการสังเคราะห์ IAA ด้วย Salkowski's reagent พบว่าแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์หลายสายพันธุ์ มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ได้ ดังนั้นจึงเลือกแอคติโนมัยซีทบางสายพันธุ์ ได้แก่ GMKU 118, GMKU 154, GMKU 160 และ *S. coelicolor* M145 ไปส่งวิเคราะห์ผล HPLC (ภาพที่ 15) ซึ่งความเข้มข้นฮอร์โมน IAA แสดงในตารางที่ 8



ภาพที่ 15 ผลการวิเคราะห์ HPLC, (ก) = GMKU 118, (ข) = GMKU 154, (ค) = GMKU 160, (ง) = *S. coelicolor* M145, (จ) = สารละลาย IAA 1 ppm

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA จากการวิเคราะห์ผล HPLC

แอสติโนมัยสัท	ความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA (ppm)
GMKU 118	5.07
GMKU 154	5.48
GMKU 160	0.45
<i>S. coelicolor</i> M145	1.24

จากการตรวจสอบความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA ด้วย HPLC พบว่า *S. coelicolor* M145 มีความเข้มข้นของ IAA 1.24 ppm ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Matsukawa *et al.* (2007) ที่รายงานว่า *S. coelicolor* สามารถผลิต IAA ได้ สายพันธุ์ GMKU 154 มีความสามารถในการสังเคราะห์ IAA ได้ดีที่สุดคือ 5.07 ppm รองลงมาคือสายพันธุ์ GMKU 118 มีความเข้มข้น 5.07 ppm และสายพันธุ์ GMKU 160 มีความเข้มข้น 0.45 ppm ดังนั้นจึงนำจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มาศึกษาขึ้นที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ IAA ในการทดลองต่อไป

2.1 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง IAA

เนื่องจากวิถีในการสังเคราะห์ IAA มีหลายวิถี และไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่าแอสติโนมัยสัท สามารถสังเคราะห์ IAA ได้จากวิถีใด แต่จากการตรวจสอบทางเคมีของ Manulis *et al.* (1994) พบว่า *Streptomyces* สามารถสังเคราะห์ IAA โดยผ่านทางวิถี IAM ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ของยีนหลักในวิถีนี้ ซึ่งคือยีน tryptophan-2-mono oxygenase (*iaaM*) ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่ายีนของแอสติโนมัยสัทที่มีความคล้ายคลึงกับยีน *iaaM* คือยีน amino oxidase ดังนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ยีน amino oxidase จากแอสติโนมัยสัท โดยนำลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลมาทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW 1.82 แล้วหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ พบว่าบริเวณอนุรักษ์ที่บริเวณ N-terminal คือ MGAMRFP และที่ C-terminal คือ LNAVWGV แล้วเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเลือกใช้ codon usage ของ *Streptomyces* พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์แบบ forward คือ ATT072F และแบบ reverse คือ ATT072R (ภาพที่ 16)

<i>S. coelicolor</i>	5' FDGCDPSLTAE	MGAMRFF	PSSTALQHYIDLVLGRLTRAFFNPPLAEATPSTV	3' 141
<i>S. avermitilis</i>	FDGCDPALSAE	MGAMRFF	PSSTALQHYIDLVLGLETRFPNPLAETPSTV	141
<i>S. griseus</i>	FDGCDPSLTAE	MGAMRFF	PSSTALQHYIDLVLGLETRFPNPLSPATPSTV	141
<i>S. aizunensis</i>	FPG-QPGLVAE	MGAMRFF	LSARSLFHYIDLLGLRTSPFPNPLAANTPSTL	130
<i>Kinococcus radiotolerans</i>	FPG-VPGAVAD	LGGMRFF	ASGRAFFHYVDALGLRTSPFPNPLAPQTPSTV	149
	* * *	* : *	* : *	* : *

Consensus (M/L)G(A/G)MRFP

Nucleotide 5' ATGGG(G/C)GC(G/C)ATGCG(G/C)TTCCC 3'

(ATT072F) (ก)

<i>S. coelicolor</i>	5' LNAVWGV	MHHLGGETDATNPGPGDLYEEIAPVELPED-	3' 565
<i>S. avermitilis</i>	LNAVWGV	MHQLGGTTDATNPGPGDVYDEIAPVELPED-	565
<i>S. griseus</i>	LNAVWGV	MHQFGGATDATNPGPGDVDFEIAVELPED-	564
<i>S. aizunensis</i>	LNAVWGV	LDHLGGATPPGNPGGDLFDALAPLDLPYDS	553
<i>Kinococcus radiotolerans</i>	LNAVWGV	VHQLGGSSAPGNPGPGDRFAELQPLRLP---	580
	*****	: : : * : . ***** : : * : *	

Consensus LNAVWGV

Nucleotide 5' CTGAACGC(G/C)GTGTGGGG(G/C)GT 3'

Reverse complement 5' AC(G/C)CCCCACAC(G/C)GCGTTCAG 3'

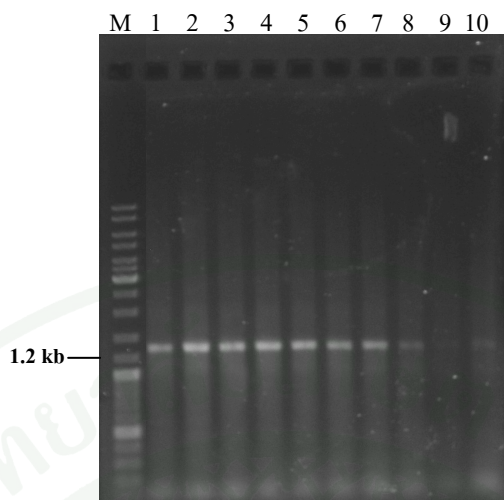
(ATT072R) (ข)

ภาพที่ 16 บริเวณอนุรักษ์ของ amino oxidase ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

(ก) บริเวณอนุรักษ์ N-terminal (ข) บริเวณอนุรักษ์ C-terminal

2.2 การเพิ่มปริมาณยีน amino oxidase ด้วยวิธีพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณยีน amino oxidase จากโครโมโซมของ GMKU 118, GMKU 154 และ GMKU 160 โดยการทำให้ยีนด้วยไพรเมอร์ ATT072F และ ATT072R โดยใช้สภาวะตามวิธีข้อ 5.4 โดยทำให้ยีนแบบ gradient เพื่อหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม โดยแปรอุณหภูมิ annealing ระหว่าง 57-68 องศาเซลเซียส พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการขนาดประมาณ 1250 คู่เบส (ภาพที่ 17) ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส มาใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน amino oxidase จากโครโมโซมของจุลินทรีย์สายพันธุ์ GMKU 118, GMKU 154 และ GMKU 160



ภาพที่ 17 ผลการทำพีซีอาร์แบบ gradient ด้วยไพรเมอร์ ATT072F และ ATT072R จากโครโมโซมของจุลินทรีย์ GMKU 118, M = 1 kb DNA ladder, แถวที่ 1-10 = อุณหภูมิ annealing ที่ 57.4, 58, 59.2, 60.5, 62.1, 63.6, 65.3, 67.1, 68.2 และ 68.8 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

2.3 การวิเคราะห์ชนิดเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์

สกัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 2.2 ออกจากเจลตามวิธีข้อ 5.2 จากนั้นส่งหาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ ATT072F พบว่าในสายพันธุ์ GMKU 118 ได้ลำดับเบสจำนวน 926 คู่เบส (ภาคผนวก) สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 308 กรดอะมิโน เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BlastP พบว่ามีความเหมือนกับยีน tryptophan-2-monooxygenase ของ *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 46 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 62 เปอร์เซ็นต์ และ *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 ความเหมือน 22 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 43 เปอร์เซ็นต์ และคล้ายคลึงกับ amino oxidase ของ *Streptomyces* sp. C ความเหมือน 79 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 85 เปอร์เซ็นต์ ในสายพันธุ์ GMKU 154 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ อาจจะเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์ GMKU 154 ไม่ได้สังเคราะห์ IAA ผ่านวิถี IAM และในสายพันธุ์ GMKU 160 ได้ลำดับเบสจำนวน 930 คู่เบส (ภาคผนวก) แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 309 กรดอะมิโนเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BlastP พบว่ามีความเหมือนกับยีน tryptophan-2-monooxygenase ของ *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 45 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 63 เปอร์เซ็นต์ และ *Agrobacterium tumefaciens* ความเหมือน 24 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 45 เปอร์เซ็นต์ และคล้ายคลึงกับ amino oxidase ของ *Streptomyces coelicolor* A3(2) ความเหมือน

78 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 83 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ GMKU 118 และสายพันธุ์ GMKU 160 น่าจะมีถิ่นที่เกี่ยวเนื่องในการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ผ่านวิถี IAM

3. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดคอนจูเกชันต่างสกุลระหว่าง แอคติโนมัยสีทและ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pIJ8600)

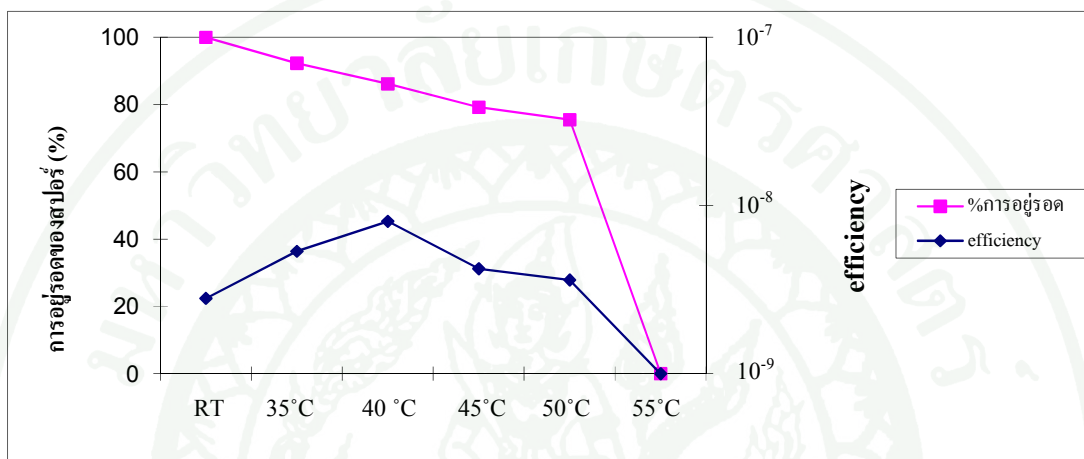
ในการศึกษาหน้าที่ของยีน amino oxidase ในแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ GMKU118 และสายพันธุ์ GMKU 160 จะเลือกใช้วิธียีนดิสรัปชันโดยส่งผ่านรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธีการคอนจูเกชันต่างสกุล จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับทำคอนจูเกชันระหว่าง *E. coli* ET12567 (pUZ8002) ซึ่งเป็นผู้ให้ (donor) และแอคติโนมัยสีททั้งสองสายพันธุ์ซึ่งเป็นผู้รับ (recipient) โดยใช้พลาสมิด pIJ8600 ซึ่งเป็นพลาสมิดแบบ conjugative เป็นพลาสมิดทดสอบ พลาสมิดนี้จะถูกส่งเข้าไปใน *Streptomyces* และจะแทรกเข้าไปในโครโมโซมที่บริเวณ attachment site ระหว่าง attP ของพลาสมิดและ attB บนโครโมโซม

3.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการอยู่รอดของสปอร์

การกระตุ้นให้สปอร์ของแอคติโนมัยสีทงอก โดยให้ความร้อนก่อนทำคอนจูเกชันกับ *E. coli* พบว่าทำให้การคอนจูเกชันมีประสิทธิภาพสูง วิธีการนี้ใช้ได้ดีใน *Streptomyces* หลายสายพันธุ์ (Flett *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 2000) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมนี้ต้องทำให้สปอร์มีชีวิตรอดอยู่ได้สูงด้วย การทดลองนี้จึงได้หาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่กระตุ้นการงอกของสปอร์แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ GMKU 118 และสายพันธุ์ GMKU 160

ศึกษาอุณหภูมิในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ของสายพันธุ์ GMKU 118 และสายพันธุ์ GMKU 160 ตามวิธีการในข้อ 7.1 โดยใช้เวลาบ่มสปอร์เป็นเวลา 10 นาที แปรอุณหภูมิที่ 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง (RT) ทำการทดลอง 2 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ยพบว่าสายพันธุ์ GMKU 160 ไม่สามารถทำการคอนจูเกชันได้ ในขณะที่สายพันธุ์ GMKU 118 พบการอยู่รอดของสปอร์ดีที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยมีการอยู่รอดของสปอร์ ร้อยละ 92.25 และ 86.12 ตามลำดับ (ภาพที่ 18 และ ตารางที่ 9) จากผลการทดลองพบว่าสปอร์ของสายพันธุ์ GMKU 118 สามารถทนความร้อนได้ดีถึง 50 องศาเซลเซียส โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดถึงร้อยละ 75 ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ และทำให้สปอร์อยู่รอดมากกว่าร้อยละ 80 คือที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำคอนจูเกชันควร

เป็นอุณหภูมิที่ต่ำที่สุดที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ได้และมีการอยู่รอดสูงที่สุด โดยจากรายงานอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ของ *Streptomyces* โดยทั่วไปจะอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส เช่น *S. lividans* (Mazodier *et al.*, 1989) และ *S. coelicolor* (Kieser *et al.*, 2000) หรือที่ 40 องศาเซลเซียส เช่น *S. lavendulae* FRI-5 (Kitani *et al.*, 2000) และ *S. rimosus* R7 (Phornphisutthimas *et al.*, 2010)



ภาพที่ 18 กราฟการอยู่รอดของสปอร์และประสิทธิภาพในการคอนจูเกชันเมื่อกระตุ้นการงอกของสปอร์ของสายพันธุ์ GMKU 118 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยกระตุ้นการงอกของสปอร์ของสายพันธุ์ GMKU 118 ที่อุณหภูมิต่างๆ

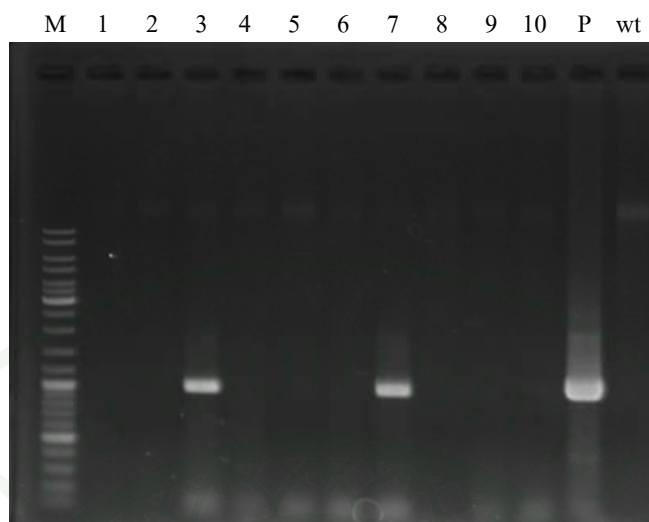
อุณหภูมิ (°C)	จำนวนสปอร์เริ่มต้น	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์	ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชัน (เอกซ์คอนจูเกนต์ต่อผู้รับ)
RT	1.23×10^{10}	100	2.80×10^{-9}
35	1.13×10^{10}	92.25	5.35×10^{-9}
40	1.06×10^{10}	86.12	8.05×10^{-9}
45	0.97×10^{10}	79.18	4.20×10^{-9}
50	0.93×10^{10}	75.51	3.6×10^{-9}
55	1.52×10^{10}	0.0	0.0

3.2 ประสิทธิภาพของการคอนจูเกชันโดยใช้สปอร์ของสายพันธุ์ GMKU 118 เป็นผู้รับ

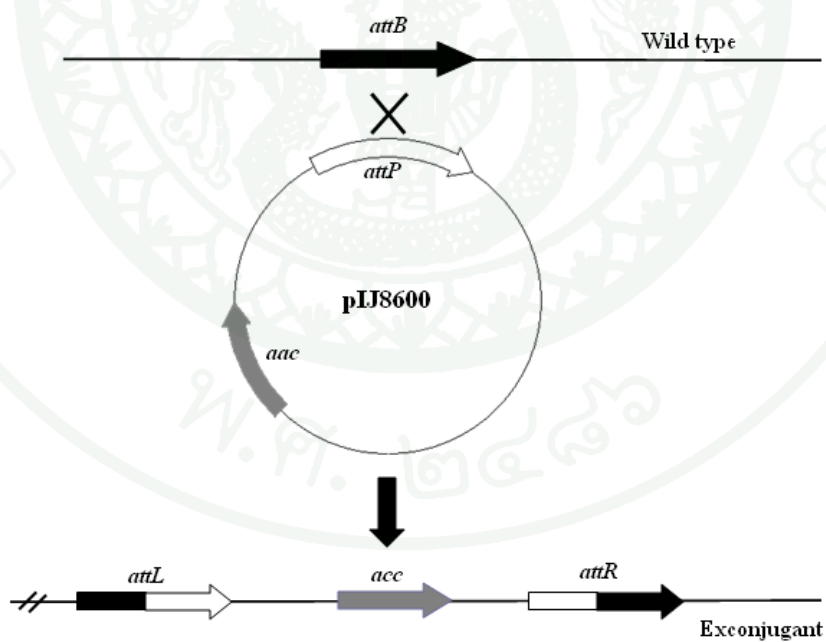
การใช้สปอร์ของ สายพันธุ์ GMKU118 เป็นผู้รับ โดยมีความเข้มข้นสปอร์อยู่ในช่วง 10^{16} สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^{10} สปอร์ นำไปกระตุ้นการงอกของสปอร์โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำคอนจูเกชันกับ *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pIJ8600) ตามวิธีการข้อ 7.2 หลังจากทำคอนจูเกชัน เมื่อคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิด pIJ8600 โดยการเททับด้วยยาปฏิชีวนะอะพราไมซิน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้บนอาหาร และคำนวณประสิทธิภาพการคอนจูเกชันต่างสกุล พบว่าการทำคอนจูเกชันบนอาหาร MS ที่มี $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ ให้ประสิทธิภาพดีใกล้เคียงกันตั้งแต่สปอร์ที่ไม่ได้ให้ความร้อนไปจนถึงให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส โดยให้ประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อบ่มสปอร์ที่ 40 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพอยู่ที่ 8.05×10^{-9} เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ (ตารางที่ 9) ซึ่งมีความน้อยกว่าการคอนจูเกชันต่างสกุลของ *S. lavendulae* FRI-5 โดยประสิทธิภาพบนอาหาร MS อยู่ที่ 10^{-6} เอกซ์คอนจูแกนต์ต่อผู้รับ (Kitani *et al.*, 2000) ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์นั้นมีผลต่อการคอนจูเกชัน เช่นใน *S. lividans* พบว่าการกระตุ้นสปอร์โดยบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ประสิทธิภาพการคอนจูเกชันสูงขึ้น 5-10 เท่า (Mozodier *et al.*, 1989) หรือใน *S. rimosus* R7 พบว่าประสิทธิภาพการคอนจูเกชันดีที่สุดเมื่อกระตุ้นสปอร์โดยบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Phornphisutthimas *et al.*, 2010) แต่ใน *Streptomyces* บางสายพันธุ์ไม่ทนต่อความร้อน ดังนั้นหากนำมากระตุ้นสปอร์ด้วยความร้อนจะทำให้ประสิทธิภาพลดลง (Voeykova *et al.*, 1998)

3.3 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนต์โดยวิธีฟิชอาร์

การทดลองนี้จะตรวจสอบว่าพลาสมิด pIJ8600 ได้เข้าไปอยู่ในสายพันธุ์ GMKU 118 จริง โดยใช้วิธีฟิชอาร์ตรวจหาชิ้นด้านยาอะพราไมซินที่อยู่บนพลาสมิด นำโคโลนีเอกซ์คอนจูแกนต์ที่เจริญได้บนอาหาร TSA ที่มียาปฏิชีวนะไปเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่มียาปฏิชีวนะอะพราไมซิน เพื่อสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบโดยการทำฟิชอาร์ เพิ่มปริมาณยีนที่ด้านยาปฏิชีวนะอะพราไมซิน โดยใช้ไพรเมอร์ Apr C-1 และ Apr N-2 (ตารางที่ 4) พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 975 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดตามต้องการในสายพันธุ์กลายที่ 3 และ สายพันธุ์กลายที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับการทำฟิชอาร์ของ pIJ8600 ซึ่งใช้เป็น positive control และไม่พบผลิตภัณฑ์ฟิชอาร์ดังกล่าวใน GMKU 118 (ภาพที่ 19) ซึ่งสามารถแสดงเป็นแผนภาพการแทรกตัวของพลาสมิด pIJ8600 ได้ดังภาพที่ 20



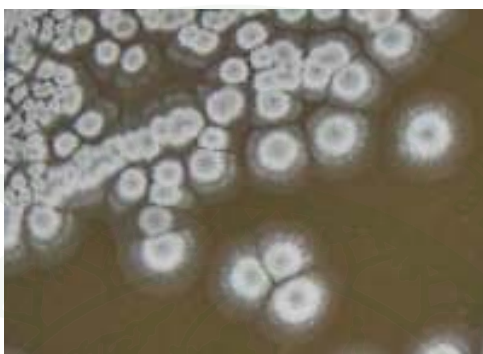
ภาพที่ 19 การตรวจสอบเอกซ์คอนจูแกนส์ GMKU 118/pIJ8600 ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่ด้านขาปฏิชีวนะอะพราไมซิน, M = 1 kb DNA ladder, แถวที่ 1-10 = เอกซ์คอนจูแกนส์ที่ 1-10, wt = GMKU118, P = pIJ8600



ภาพที่ 20 การแทรกตัวของพลาสมิด pIJ8600 เข้าไปในโครโมโซมของ GMKU 118

4. *Streptomyces* sp. GMKU 118

เมื่อนำเอนโดไฟต์ GMKU 118 มาเลี้ยงบนอาหาร MS พบว่า มีการสร้างสปอร์สีเทา เส้นใยอาหารสีน้ำตาล และมีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล ดังที่แสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces* sp. GMKU118 บนอาหาร MS

เมื่อนำจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวมาจัดจำแนกโดยเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยไพรเมอร์ STR1F และ STR1530R (ตารางที่ 4) ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่าได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1500 คู่เบส (ภาพที่ 22) เมื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนปลาย 5' ด้วยไพรเมอร์ STR1F พบว่าได้จำนวน 427 คู่เบส (ภาคผนวก) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และ Eztaxon (ฐานข้อมูล wild type ของแอกติโนมัยซีต) (Chun *et al.*, 2007) พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces racemochromogenes* NRRL B-5430^T (87.05%)



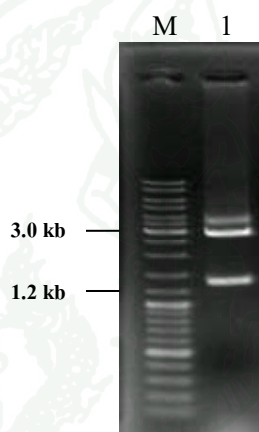
ภาพที่ 22 ผลการทำพีซีอาร์ยีน 16S rRNA ของ *Streptomyces* sp. GMKU 118,

M = 1 kb ladder, 1 = GMKU 118

5. การโคลนยีน amino oxidase ใน *Streptomyces* sp. GMKU 118

5.1 การเชื่อมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้าสู่พลาสมิด

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน amino oxidase ขนาด 1250 คู่เบส เชื่อมต่อพลาสมิด pTZ57R/T นำไป ทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* XL1-Blue ตรวจสอบโคลนที่ได้ โดยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Xba*I แยกขนาดโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 23) ให้ ชื่อพลาสมิดว่า pATT501 แล้วนำโคลนที่เลือกได้ ไปหาลำดับเบสและเปรียบเทียบกับยีน amino oxidase ที่มีในฐานข้อมูล



ภาพที่ 23 ผลการทดสอบโคลน pATT501 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

M = 1 kb ladder, 1 = pATT501/*Hind*III/*Xba*I

จากการส่งพลาสมิด pATT501 หาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ ATT072F ได้ลำดับเบส จำนวน 875 คู่เบส (ภาพที่ 24) สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 291 กรดอะมิโน เมื่อนำลำดับ กรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BlastP พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ ยีน amino oxidase โดยลำดับแรกมีค่าความเหมือน 88 เปอร์เซ็นต์ และความคล้าย 92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง ได้แก่อยีน amino oxidase ของ *Streptomyces* sp. C และมีความคล้ายคลึงกับยีน tryptophan-2-monooxygenase ในวิถี IAM ของ *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 (ความเหมือน 53 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 69 เปอร์เซ็นต์) และ *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 (ความเหมือน 22 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 40 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นจึงนำพลาสมิดดังกล่าวไปทดลองในขั้นต่อไป

1: CCGCTGGCCGAGGCCACCCCGTCGACCGTCGTCGACCTCAAGGGCGAGACC
 1: P L A E A T P S T V V D L K G E T

 52: CACTACGCCGAGACCATCGACGACCTGCCGAGATCTACCGCGACGTCGCC
 18: H Y A E T I D D L P Q I Y R D V A

 103: GAGGCGTGGAACGCCTGCCTCGACGAGGGCGCCGACTTCTCCGACATGAAC
 35: E A W N A C L D E G A D F S D M N

 154: CGGGCGATGCGCGAGCGGACGTCGCCGCGCATCCGCGAGATCTGGGCCGAG
 52: R A M R E R D V P R I R E I W A E

 205: CTCGTCGCGAAGCTCGACGACGAGACCTTCTACGGCTTCCTCTGCAAGTCC
 69: L V A K L D D E T F Y G F L C K S

 256: GAGGCCTTCCAGTCCTTCCGCAAGCGCGAGATCTTCGGCCAGGTCGGCTTC
 86: E A F Q S F R K R E I F G Q V G F

 307: GGCACCGGCGGCTGGGACACCGACTTCCCGAACTCCATCCTGGAGATCCTC
 103: G T G G W D T D F P N S I L E I L

 358: CGGGTCGTCTACACCGAGGCGGACGACCAACCGCGGCATCGTCGGCGGC
 120: R V V Y T E A D D H H R G I V G G

 409: TCGCAGCAGCTGCCGCTGCGCCTGTGGGAGCGCGAGCCGAGAAGATCGTC
 137: S Q Q L P L R L W E R E P E K I V

 460: CACTGGGCCCAGGGCACCTCGCTGAGCTCCCTGCACGAGGGCACCCCGCGC
 154: H W A Q G T S L S S L H E G T P R

 511: CCGGCCGTGACCCGGCTGACCCGCGCCCGCGCAACCGGATCACCGTCACC
 171: P A V T R L T R A A G N R I T V T

 562: GACGCCTCCGGCGACATCCGCACCTACCGCGCCGCGATCTTCACGGCCCAG
 188: D A S G D I R T Y R A A I F T A Q

 613: TCCTGGATGCTGCTGTCCAAGATCGCGTGCGACGACTCGCTGTTCCCCATC
 205: S W M L L S K I A C D D S L F P I

 664: GACCACTGGACGGCGATGGAGCGGACCCACTACATGGAGTCCTCGAAGCTC
 222: D H W T A M E R T H Y M E S S K L

 715: TTCGTGCCGGTGGACCGGACGTTCTGTCTGGACAAGGACGAGAGACTGGCC
 239: F V P V D R T F C L D K D E R L A

 766: GCGAACGTCATGTCGATGACGCCTCATCGACGGATGACGCGCGGCACCTAC
 256: A N V M S M T P H R R M T R G T Y

 817: CTGCTGGACGACTGCCGCGACAAGCGGACACCATCTGCCTCTCGTACCTT
 273: L L D D C R D K R T P F C L S Y L

 868: TGGTGCGA
 290: W C

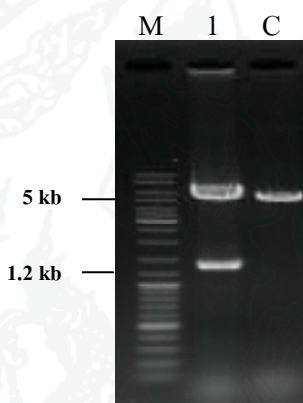
ภาพที่ 24 ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน amino oxidase จาก *Streptomyces* sp.

GMKU 118 ในพลาสมิด pATT501

6. การศึกษาหน้าที่ของยีน *amino oxidase* ของ *Streptomyces* sp. GMKU 118 ด้วยวิธียีนดัดแปลง

6.1 การสร้างพลาสมิดสายผสมเพื่อทำยีนดัดแปลง

พลาสมิดสายผสมสำหรับทำยีนดัดแปลง สร้างโดยการตัดยีน *amino oxidase* ขนาด 1250 คู่เบส ด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Xba*I จากพลาสมิด pATT501 เชื่อมกับพลาสมิด pIJ8671 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันได้เป็นพลาสมิด pATT502 ตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Xba*I (ภาพที่ 25) จากนั้นจึงทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* ET12567 (pUZ8002) ซึ่งเป็นผู้ให้สำหรับทำคอนจูเกชันต่อไป

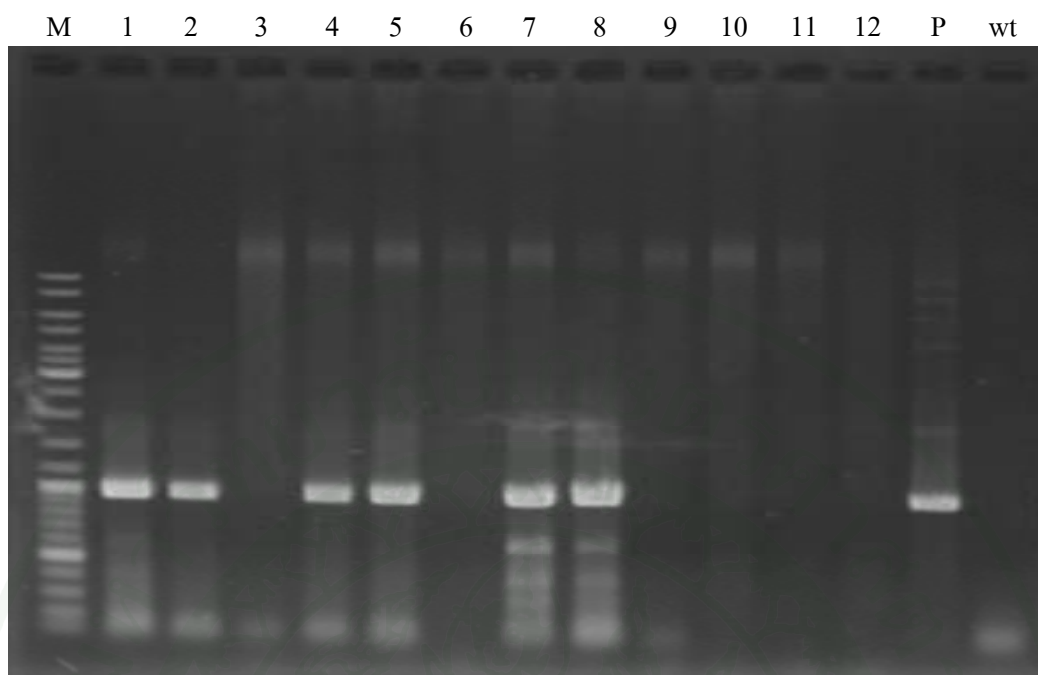


ภาพที่ 25 ผลการทดสอบโคลน pATT502 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

M = 1 kb DNA ladder, 1 = pATT502/*Hind*III/*Xba*I, C = pIJ8671/*Hind*III/*Xba*I

6.2 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วยวิธีพีซีอาร์

สุ่มเลือกสายพันธุ์กลายมาทั้งหมด 12 โคลน แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะอะพราไมซิน และกรดนาลิซิซิก เพื่อคัดเลือก แล้วนำสายพันธุ์กลายมาสกัดดีเอ็นเอแล้วนำมาทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Apr C-1 และ Apr N-2 (ตารางที่ 4) ซึ่งจำเพาะต่อยีนด้านยาอะพราไมซินซึ่งอยู่บนพลาสมิด pATT502 พบว่าสายพันธุ์กลายจำนวน 6 โคลน ได้แก่โคลนที่ 1 โคลนที่ 2 โคลนที่ 4 โคลนที่ 5 โคลนที่ 7 และ โคลนที่ 8 มียีนอะพราไมซินแทรกอยู่ โดยให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 975 คู่เบส (ภาพที่ 26) แสดงสายพันธุ์กลายดังกล่าวได้รับพลาสมิด pATT502



ภาพที่ 26 ตรวจสอบสายพันธุ์กลายโดยการเพิ่มปริมาณยีนด้านยาอะพราไมซินด้วยวิธีพีซีอาร์

M = 1 kb DNA ladder, 1-12 = สายพันธุ์กลายที่ 1-12, P = pATT502,

wt = *Streptomyces* sp. GMKU 118

6.3 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วย Salkowski's reagent

เมื่อนำ *Streptomyces* sp. GMKU 118 สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ปกติมาตรวจสอบการผลิตฮอร์โมน IAA ตามวิธีการในข้อ 6.4 พบว่าในสายพันธุ์กลายยังคงมีความสามารถในการผลิตฮอร์โมน IAA ได้เช่นเดียวกันสายพันธุ์ปกติ ดังแสดงในภาพที่ 27 และเมื่อนำไปตรวจวัดความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA พบว่ามีความเข้มข้นตามที่แสดงในตารางที่ 10



ภาพที่ 27 ตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วย Salkowski's reagent

1-6 = สายสายพันธุ์กลายที่ 1, 2, 4, 5, 7 และ 8 ตามลำดับ,

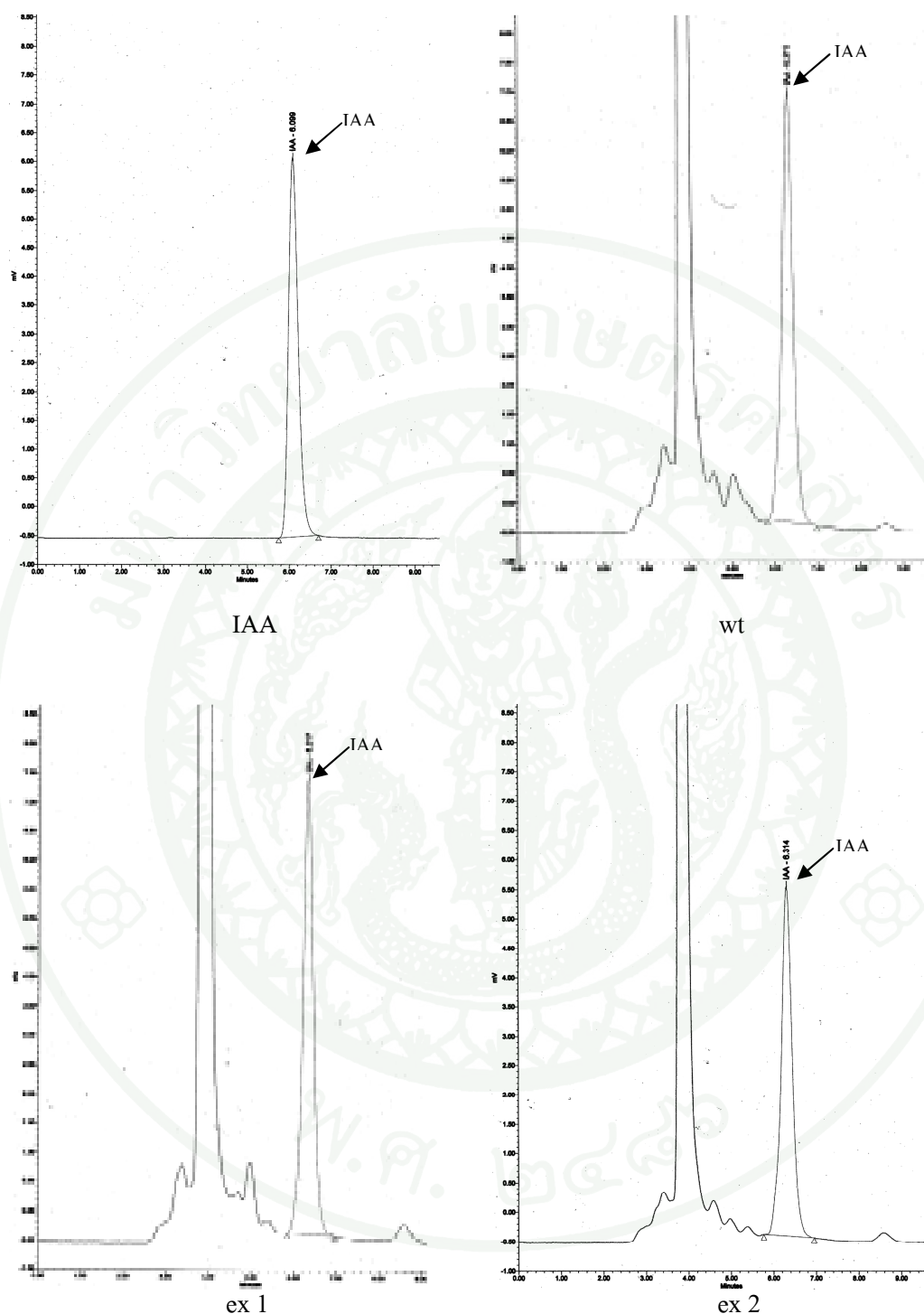
wt = *Streptomyces* sp. GMKU 118

ตารางที่ 10 ความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA เมื่อวัดด้วย spectrophotometer

<i>Streptomyces</i> sp. GMKU118	Absorbance 530 nm	Concentration of IAA (ppm)
สายพันธุ์ปกติ	0.136	14.857
สายพันธุ์กลายที่ 1	0.146	16.286
สายพันธุ์กลายที่ 2	0.140	15.429
สายพันธุ์กลายที่ 4	0.113	11.571
สายพันธุ์กลายที่ 5	0.149	16.714
สายพันธุ์กลายที่ 7	0.153	17.286
สายพันธุ์กลายที่ 8	0.130	14.000

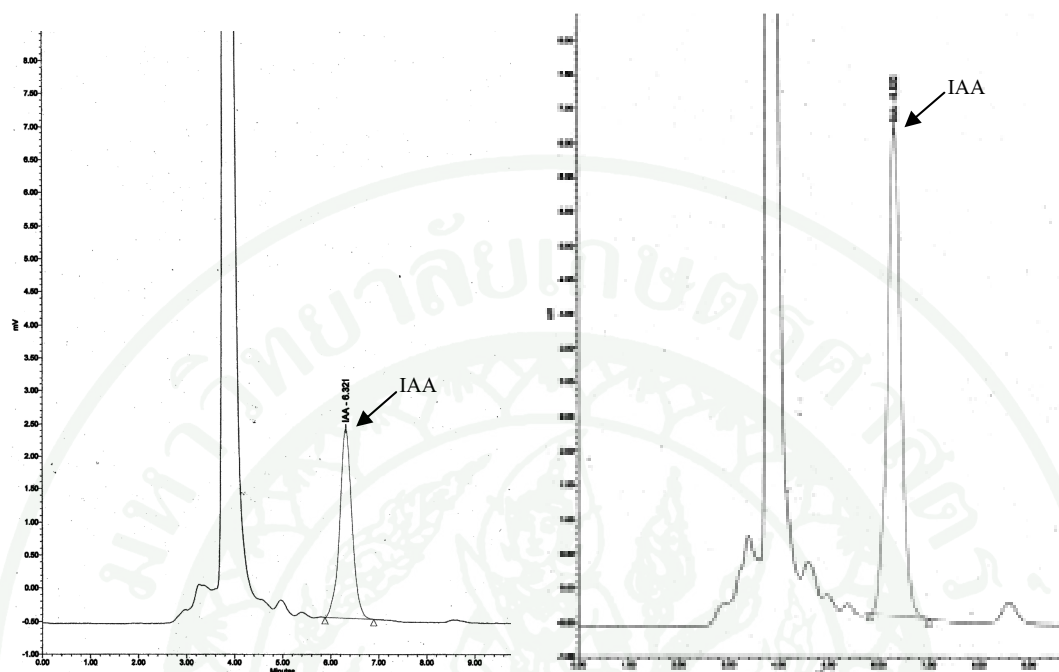
6.4 การตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วย HPLC

เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. GMKU 118 สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลายและส่งน้ำเลี้ยงไปวิเคราะห์ฮอร์โมน IAA ตามวิธีการข้อ 9.4.2 จากผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า *Streptomyces* sp. GMKU 118 สายพันธุ์กลาย ยังคงสามารถผลิตฮอร์โมน IAA ได้เช่นเดียวกับสายพันธุ์ปกติ ดังที่แสดงในภาพที่ 28 และแสดงผลความเข้มข้นในตารางที่ 1



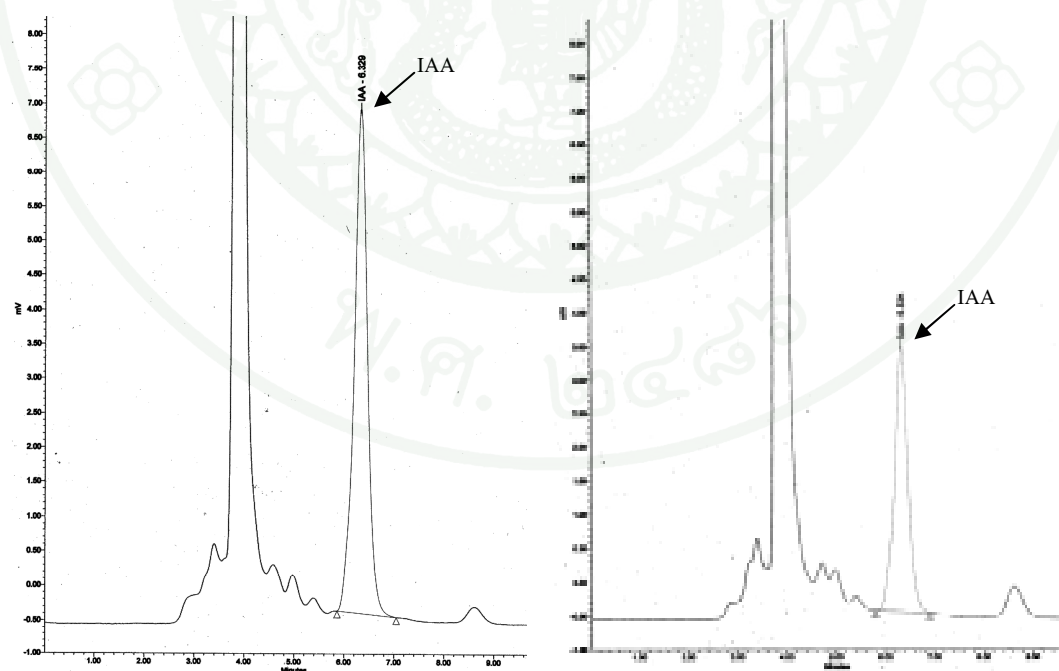
ภาพที่ 28 ผลการวิเคราะห์สารสกัดด้วยวิธี HPLC, IAA= ฮอร์โมน IAA เข้มข้น 3 ppm ,
 wt = *Streptomyces* sp. GMKU118, ex1 สายพันธุ์กลายที่ 1, ex2 สายพันธุ์กลายที่ 2, ex4
 สายพันธุ์กลายที่ 4, ex5 สายพันธุ์กลายที่ 5, ex7 สายพันธุ์กลายที่ 7 และ ex8 สายพันธุ์
 กลายที่ 8

ภาพที่ 28 (ต่อ)



ex 4

ex 5



ex 7

ex 8

ตารางที่ 11 ความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA จากการวิเคราะห์ผล HPLC

<i>Streptomyces</i> sp. GMKU 118	ความเข้มข้นฮอร์โมน IAA (ppm)
สายพันธุ์ปกติ	18.86
สายพันธุ์กลายที่ 1	18.97
สายพันธุ์กลายที่ 2	15.14
สายพันธุ์กลายที่ 4	6.41
สายพันธุ์กลายที่ 5	18.32
สายพันธุ์กลายที่ 7	18.80
สายพันธุ์กลายที่ 8	10.59

จากการตรวจสอบผลการศึกษาน้ำที่ของยีน amino oxidase ในการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA พบว่าสามารถสร้างสายพันธุ์กลายได้ จากผลการทำพีซีอาร์ของยีนด้านยาปฏิชีวนะอะพราไมซิน แต่เมื่อตรวจสอบสายพันธุ์กลายด้วย Salkowski's reagent และ HPLC แล้ว พบว่า ในสายพันธุ์กลายนั้นยังสามารถผลิตฮอร์โมน IAA ได้ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติ อาจเนื่องจากว่า *Streptomyces* sp. GMKU 118 นั้นมีวิธีการสังเคราะห์ IAA ได้หลายวิธี ดังที่แสดงในรูปที่ 4 และมีรายงานว่าในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42 สามารถสังเคราะห์ IAA ได้โดยผ่านหลายวิธี เมื่อศึกษาน้ำที่ของยีนในวิธีการสังเคราะห์ IAA (Idris *et al.*, 2007) หรือใน *Streptomyces* มีรายงานว่าน่าจะมีการสังเคราะห์ IAA ผ่านทางวิถี IAM แต่ก็พบเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ IAA จากวิถีอื่นอีกเช่นกัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ *Streptomyces* อาจจะมีการสังเคราะห์ IAA ผ่านทางวิถี IPyA ตามที่ Manulis *et al.* (1994) ได้รายงานการตรวจพบสาร Indole-3-lactic acid (ILA) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น Indole-3-pyruvate ในวิถีดังกล่าวด้วยวิธีการทางเคมี และมีรายงานว่าวิถีนี้เป็นอีกหนึ่งวิถีที่จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ใช้ในการสังเคราะห์ IAA แต่เนื่องจากข้อมูลยีน *ipdC* นี้ยังไม่มีรายงานในแอคติโนมัยซิต จึงทำให้ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์จากวิถีดังกล่าวได้ ดังนั้นวิถีนี้จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาการสังเคราะห์ IAA โดย *Streptomyces* เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจสอบการผลิตฮอร์โมน IAA จาก Salkowski's reagent และจาก HPLC พบว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกับที่ Crozier *et al.* (1988) ได้รายงานไว้ว่า เมื่อวิเคราะห์การผลิต IAA ในจุลินทรีย์ *Azospirillum brasilense* ด้วย Salkowski's reagent และ HPLC นั้นให้ค่าความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยการตรวจสอบด้วย Salkowski's reagent นั้นให้ค่าความเข้มข้นของ IAA สูงกว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC แต่ค่าจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC นั้นมีความน่าเชื่อถือมากกว่าการวิเคราะห์ด้วย Salkowski's reagent

สรุป

แอสทรีโนมัยซีทอนโคไฟต์จาก Genetics-Microbiology Kasetsart University (GMKU) Culture Collection 57 สายพันธุ์ มีสมบัติการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชได้ 56 สายพันธุ์ โดยส่วนใหญ่มีความสามารถในการผลิตแอมโมเนียได้ร้อยละ 87.70 พบ 18 สายพันธุ์สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA (คิดเป็นร้อยละ 31.58) พบ 20 สายพันธุ์สามารถละลายฟอสเฟตได้ (คิดเป็นร้อยละ 35.08) และอีก 7 สายพันธุ์สามารถผลิตไซโตไคน์ได้ (คิดเป็นร้อยละ 12.30) โดยพบว่าสายพันธุ์ GMKU 103 สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชได้ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ ขณะที่สายพันธุ์ GMKU 134 ไม่สามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืชได้

ในการศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ได้เลือกแอสทรีโนมัยซีทอนโคไฟต์ *Streptomyces* sp. GMKU 118 มาศึกษา โดยเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วส่งหาลำดับเบส พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าว มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces racemochromogenes* NRRL B-5430^T (87.05%) จากนั้นนำจุลินทรีย์ดังกล่าวไปโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมน IAA ในวิถี IAM ได้แก๊ยีน amino oxidase ที่มีความคล้ายคลึงกับยีน tryptophane-2-monooxygenase (*iaaM*) โดยการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะและทำพีซีอาร์แล้วนำไปหาลำดับเบส พบว่าเป็นยีน amino oxidase โดยเหมือนกับ tryptophane-2-monooxygenase ของ *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 (ความเหมือน 46 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 62 เปอร์เซ็นต์) และ *Agrobacterium tumefaciens* str. C58 (ความเหมือน 22 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 43 เปอร์เซ็นต์) และเหมือนกับ amino oxidase ของ *Streptomyces* sp. C (ความเหมือน 79 เปอร์เซ็นต์ ความคล้าย 85 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นจึงโคลนชิ้นพีซีอาร์เข้าพลาสมิด pTZ57R/T และตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดว่า pATT501

การศึกษาการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Streptomyces* sp. GMKU 118 โดยอาศัยวิธีคอนจูเกชันต่างสกุลกับ *E. coli* ET12567(pUZ8002) เพื่อใช้ในการสร้างสายพันธุ์กลายและศึกษาหน้าที่ของยีน amino oxidase ใน *Streptomyces* sp. GMKU 118 พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือกระตุ้นการออกของสปอร์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนผสมกับ *E. coli* โดยมีประสิทธิภาพการคอนจูเกชันอยู่ที่ 8.05×10^{-9} เอกซ์คอนจูเกนต์ต่อผู้รับ

จากนั้นศึกษาหน้าที่ของยีน amino oxidase โดยการทำยีนดิสรัปชัน โดยย้ายส่วนของยีน amino oxidase จาก pATT501 เข้าสู่พลาสมิด pIJ8671 ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดชื่อว่า pATT502

แล้วส่งผ่านจาก *E. coli* ET12567 (pUZ8002) เข้าสู่ *Streptomyces* sp. GMKU 118 ด้วยวิธี
คอนจูเกชันต่างสกุล พบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้ยังคงสามารถสร้างฮอร์โมน IAA ได้เช่นเดียวกับ
สายพันธุ์ปกติ เมื่อทดสอบด้วย Salkowski's reagent และวิเคราะห์ด้วย HPLC จึงสามารถสรุปได้ว่า
Streptomyces sp. GMKU 118 น่าจะมีการสังเคราะห์ IAA ผ่านวิถีอื่นที่ไม่ใช่วิถี IAM



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

สุพิศสา ทองเขียว, นันทกานต์ ชุนโหระ และ มนต์ชัย อินทร์ท่าอิฐ. 2551. ผลการปฏิบัติงาน ประจำปีงบประมาณ 2551 เล่มที่ ๒ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, กรุงเทพฯ.

Ahmad, F., I. Ahmad and M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiol. Res.** 163: 173-181.

Azevedo, J.L., W. Maccheroni, Jr., J.O. Pereira and W.L. Araujo. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB.** 3: 40-62.

Baltz, R.H. 1998. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. **Trends Microbiol.** 6: 76-83.

Bartling, D., M. Seedorf, A. Mithofer and E.W. Weiler. 1992. Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. **Eur. J. Biochem.** 205: 417-424.

Benson, D.R. and W.B. Silvester. 1993. Biology of *Frankia* strains actinomycete symbionts of actinorhizal plant. **Microbiol.** 57: 293-319.

Bibb, M.J., 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. O'Brien, 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: 39-43.

- Birch, A., A. Hausler and R. Hutter. 1990. Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. **J. Bacteriol.** 172: 4138-4142.
- Brandl, M. and S.E. Lindow. 1996. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 4121-4128.
- Bullock, W.O., J.M. Fernandez and J.M. Short. 1987. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. **Biotechniques** 5: 367-379.
- 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.
- _____, _____, _____ and _____. 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiol Lett.** 247: 147-152.
- Cappuccino, J.C. and N. Sherman. 1992. **In: Microbiology: A Laboratory Manual**, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co., New York.
- Castillo, U.F., G.A. Strobel, E.J. Ford, W.M. Hess, H. Porter, J.B. Jensen, H. Albert, R. Robison, M.A. Condon, D.B. Teplow, D. Stevens and D. Yaver. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiol.** 148: 2675-2685.
- Chater, K.F., E. Takano and N.J. Ryding. 1996. The life cycle of *Streptomyces coelicolor* A3(2), p. 200. *In* S. Miyadoh, M. Hamada, K. Hotta, T. Kudo, A. Seino, G. Vobis and A. Yokota, eds. **Atlas of Actinomycetes**. The Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing Co., Ltd., Japan.

- Choi, S.U., C.K. Lee, Y.I. Hwang, H. Kinoshita and T. Nihira. 2004. Cloning and functional analysis by gene disruption of a gene encoding a γ -butyrolactone autoregulator receptor from *Kitasatospora setae*. **J. Bacteriol.** 186: 3423-3430.
- Chun, J., J.H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B.K. Kim and Y.W. Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. **Int J Syst Evol Microbiol.** 57: 2259-2261.
- Chung, C.T., S.L. Niemela and R.H. Miller. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86: 2172-2175.
- Claydon, N., J.F. Grove and M. Pople. 1985. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. **Phytochemistry** 24: 937-943.
- Comai, L. and T. Kosuge. 1980. Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. **J. Bacteriol.** 143: 950-957.
- Coombs, J.T., C.M.M. Franco and R. Loria. 2003. Complete sequencing and analysis of pEN2701, a novel 13-kb plasmid from an endophytic *Streptomyces* sp. **Plasmid** 49: 86-92.
- _____, 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.
- Crozier, A., P. Arruda, J.M. Jasmim, A.M. Monteiro and G. Sandberg. 1988. Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Related Indoles in Culture Medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 2833-2837.

- 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 roots of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 59: 1478-1491.
- Duponnois, R., H. Founoune, D. Lesueur, J. Thioulouse and M. Neyra. 2000. Ectomycorrhization of six *Acacia auriculiformis* provenances from Australia, Papua New Guinea and Senegal in Glasshouse conditions: effect on the plant growth and on the multiplication of plant parasitic nematodes. **Aust. J. Ecp. Agr.** 40: 443-450.
- Flett, F., V. Mersinias and C.P. Smith. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. **FEMS Microbiol. Lett.** 155: 223-229.
- Fouces, R., M. Rodriguez, E. Mellado, B. Diez and J.L. Barredo. 2000. Conjugation and transformation of *Streptomyces* species by tylosin resistance. **FEMS Microbiol. Lett.** 186: 319-325.
- Gaur, A.C. 1990. **Physiological functions of phosphate solubilizing micro-organisms.** Omega Scientific Publishers, New Delhi.
- Glick, B.R. and Y. Bashan. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnol. Adv.** 15: 353-378.
- Goodfellow, M., S.T. Williams and M. Mordarski. 1988. **Actinomycetes in Biotechnology.** Academic Press, London.
- Gordon, S.A. and R.P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiol.** 26:192-195.

- Gravel, V., H. Antoun and R.J. Tweddell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato. **Soil Biol. Biochem.** 39: 1968-1977.
- Guo, B., J. Dai, S. Ng, Y. Huang, C. Leong, W. Ong and B.K. Carte. 2000. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species. **J. Nat. Prod.** 63: 602-604.
- Hamdali, H., M. Hafidi, M.J. Viorle and Y. Ouhdouch. 2008. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 2565-2575.
- Han, J., L. Suna, X. Dongc, Z. Caia, X. Suna, H. Yangd, Y. Wange and W. Songa. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. **Syst. Appl. Microbiol.** 28: 66-76.
- Hansen, A. 1994. **Symbiotic N₂ fixation of crop legumes**. Margraf Verlag, Germany.
- Hasegawa, S., A. Meguro, M. Shimizu, T. Nishimura and H. Kunoh. 2006. Endophytic actinomycetes and their interaction with host plants. **Actinomycetologica** 20: 72-81.
- Hasegawa, T., M.P. Lechevalier and H.A. Lechevalier. 1978. A new genus of the *Actinomycetales*, *Actinosynnema* gen. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 28: 304-310.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. **Plant and 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.

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.

Hu, Y., L. Chaomin, B. Kulkarni, G. Strobel, E. Lobkovsky, R. Torczynski and J. Porco. 2001. Exploring chemical diversity of epoxyquinoid natural products: synthesis and biological activity of jesterone and related molecules. **Org. Lett.** 3: 1649-1652.

Huang, C.H., Y.S. Lin, Y.L. Yang, S. Huang and C.W. Chen. 1998. The telomerase of *Streptomyces* chromosome contain conserved palindromic sequence with potential to form complex secondary structures. **Mol. Microbiol.** 28: 905-916.

Husen, E. 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. **Indonesis Journal of Agriculture Science** 4: 27-31.

Idris, E.E., D.J. Iglesias, M. Talon and R. Borriss. 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **MPMI.** 20: 619-626.

Igarashi, Y., T. Iida, T. Sasaki, N. Saito, R. Yoshida, and T. Furumai. 2002. Isolation of actinomycetes from live plants and evaluation of antiphytopathogenic activity of their metabolites. **Actinomycetologica** 16: 9-13.

_____. 2004. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. **Actinomycetologica** 18: 63-66.

Indananda, C., A. Matsumoto, Y. Inahashi, Y. Takahashi, K. Duangmal and A. Thamchaipenet. 2010. *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov., isolated from the roots of Thai glutinous rice plants, a new member of the family *Pseudonocardaceae*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 60: 1141-1146.

- Joseph, B., R.R. Patra and R. Lawrence. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.) **International Journal of Plant Production** 1: 141-151.
- Kataoka, M., K. Ueda, K. Takuji, S. Tatsuji and Y. Toshimi. 1997. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in genus *Streptomyces*. **FEMS Microbiol Lett.** 151: 249-255.
- Khamna, S., A. Yokota, J.F. Peberdy and S. Lumyong. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. **EurAsia J. BioSci.** 4: 23-32.
- Kieser, T., M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater and D.A. Hopwood. 2000. **Practical Streptomyces Genetics**. The John Innes Foundation, Norwich.
- 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.
- Kobayashi, M., H. Izui, T. Nagasawa and H. Yamada. 1993. Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile - cloning of the *Alcaligenes* gene and sitedirected mutagenesis of cysteine residues. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 247-251.
- _____, T. Suzuki, T. Fujita, M. Masuda and S. Shimizu. 1995. Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3- acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92: 714-718.

- Koga, J., T. Adachi and H. Hidaka. 1992. Purification and characterization of indolepyruvate decarboxylase a novel enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. **J. Biol Chem.** 267: 15823-15828.
- Kuklinsky-Sobral, J., W.L. Araújo, R. Mendes, I.O. Geraldi, A. Aparecida, P. Kleine and J.L. Azevedo. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environ. Microbiol.** 12: 1244-1251.
- Kunoh, H. 2002. Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. **J. Gen. Plant Pathol.** 68: 249-252.
- Lechevalier, H.A. and M.P. Lechevalier. 1970. **The Actinomycetales**. Gustav Fischer Publication, Jenua.
- Lu, H., W.X. Zou, J.C. Meng, J. Hu and R.X. Tan. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Sci.** 151: 67-73.
- MacNeil, D.J. 1988. Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. **J. Bacteriol.** 170: 5607-5612.
- _____, K.M. Gewain, C.L. Ruby, G. Dezeny, P.H. Gibbons and T. MacNeil. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. **Gene** 111: 61-68.
- Madhaiyan, M., V.S. Saravanan, D.B. Silba Sandal Jovi, H. Lee, R. Thenmozhi, K. Hari and T. Sa. 2004. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. **Microbiol. Res.** 159: 233-243.
- Manulis, S., H. Shafir, E. Epstein, A. Lichter and I. Barash. 1994. Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. **Microbiology** 140: 1045-1050.

- Maor, R., S. Haskin, H. Levi-Kedmi and A. Sharon. 2004. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 1852-1854.
- Masakazu, E., T. Seki, K. Ueda, T. Kudo and T. Yoshida. 1997. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in genus *Streptomyces*. **FEM Microbiol. Lett.** 151: 249-255.
- Matsukawa, E., Y. Nakagawa, Y. Iimura and M. Hayakawa. 2007. Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. **Actinomycetologica** 21: 32-39.
- Matsushima, P., M.A. McHenney and R.H. Baltz. 1989. Transduction and transformation of plasmid DNA in *Streptomyces fradiae* strains that express different levels of restriction. **J. Bacteriol.** 171: 3080-3084.
- _____, 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 *Escherichia 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.
- Miller, R.V., C.M. Miller, D. Garton-Kinney, B. Redgrave, J. Sears, M. Condrón, D. Teplow and G.A. Strobel. 1998. Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. **J. Appl. Microbiol.** 84: 937-944.

- Nimnoi, P., N. Pongsilp and S. Lumyong. 2009. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 26: 193-203.
- Oberhansli T., G. Defago and D. Haas. 1991. Indole-3-acetic-acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens* - role of tryptophan side-chain oxidase. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 137: 2273-2279.
- Okazaki, T. 2006. Intrigued by actinomycete diversity. **Actinomycetologica** 20: 15-22.
- Paget, M.S.B., L. Chamberlin, A. Atrih, S.J. Foster and M.J. Buttner. 1999. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **J. Bacteriol.** 181: 204-211.
- Paranthaman, S. and K. Dharmalingum. 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.** 60: 84-91.
- Park, W.J., V. Kriechbaumer, A. Möller, M. Piotrowski, R.B. Meeley, A.E. Gierl and E. Glawischnig. 2003. The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. **Plant Physiol.** 133: 794-802.
- Patten, C.L. and B.R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 3795-3801.
- 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.

- Pigac, J. and H. Schrepf. 1995. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other streptomycetes by electroporation. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 352-356.
- Pollmann, S., A. Muller, M. Piotrowski and E.W. Weiler. 2002. Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. **Planta** 216: 155-161.
- Pullen, C., P. Schmitz, K. Meurer, D.D.V. Bamberg, S. Lohmann, S.D.C. Franca, I. Groth, B. Schlegel, U. Mollmann, F. Gollmick, U. Grafe and E. Leistner. 2002. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae. **Planta** 216: 162-167.
- Ramachandran, K., V. Srinivasan, S. Hamza and M. Anandaraj. 2002. Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cutting. **First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilizing** 102: 326-331.
- Reddy, M.S., S. Kumar, K. Babita and M.S. Reddy. 2002. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technol.** 84: 187-189.
- Robinson, M., J. Riov and A. Sharon. 1998. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 5030-5032.
- Saikia, S.P. and V. Jain. 2007. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma?. **Curr. Sci.** 92: 317-322.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 2001. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3rd 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.
- Saravanan, V.S., M. Madhaiyan and M. Thangaraju. 2007. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere** 66: 1794-1798.
- Schiff, P.B. and S.B. Horowitz. 1980. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77: 1561-1565.
- Schwyn, B. and J.B. Neiland. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Anal Biochem.** 160: 47-56.
- 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.
- Sekine, M., K. Watanabe and K. Syono. 1989. Molecular cloning of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum*. **J. Bacteriol.** 171: 1718-1724.
- Shishido, M., C. Breuil and C.P. Chanway. 1999. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiol. Ecol.** 29: 191-196.
- Sia, L.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.
- Song, J., B.Y. Kim, S.B. Hong, H.S. Cho, K. Sohn, J. Chun and J.W. Suh. 2004. *Kribbella solani* sp. nov. and *Kribbella jejuensis* sp. nov., isolated from potato tuber and soil in Jeju, Korea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 1345-1348.

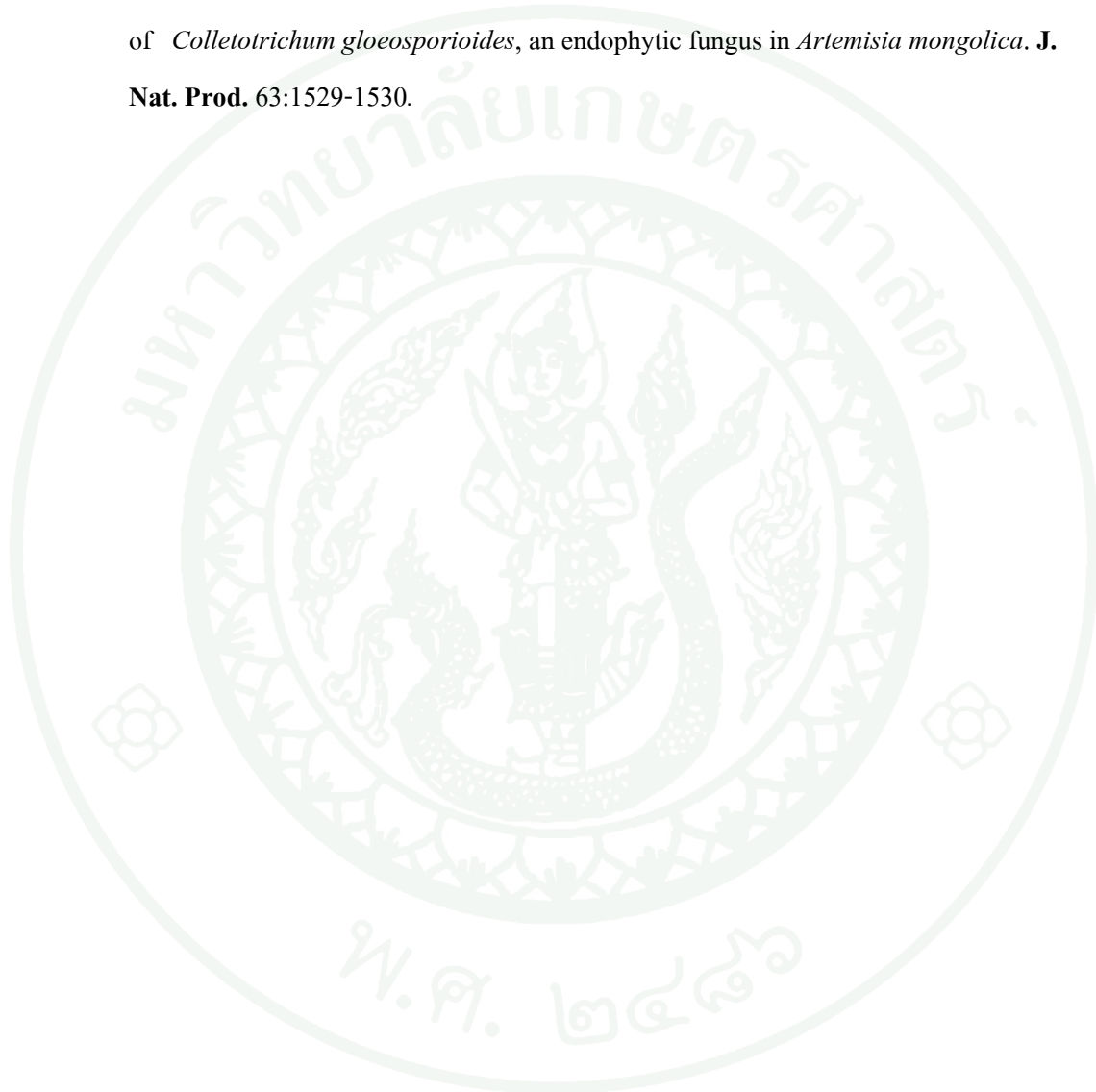
- Spaepen, S., J. Vanderleyden and R. Remans. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS. Microbiol. Rev.** 4: 425-448.
- Sperber, J.I. 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. **Aust. J. Agric. Res.** 9: 782-787.
- Stewart, J.W.B., M.J. Hedley and B.S. Chauhan. 1980. The immobilization and redistribution of phosphorus in soils, 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.
- Strobel, G.A., A. Stierle, D. Stierle, and W.M. Hess. 1999. *Taxomyces andreanae* a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew. **Mycotaxon**. 47: 71-78.
- _____. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes Infect.** 5: 535-544.
- Sun, J., G.H. Kelemen, J.M. Fernandez-Abalos and M.J. Bibb. 1999. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Microbiology** 145: 2221-2227.
- Taechowisan, T., C. Lu, Y. Shen and S. Lumyong. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology** 151: 1691-1965.
- Teale, W.D., I.A. Paponov and K. Palme. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 7: 847-859.
- Thaiman, K.V. 1935. On The Plant Growth Hormone Produced By *Rhizopus suinus*. **J. Biol. Chem.** 109: 279-291.

- Thamchaipenet, 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.
- Thimann, K.V. and S. Mahadevan. 1964. Nitrilase. I. Occurrence, preparation, and general properties of the enzyme. **Arch. Biochem. Biophys.** 105: 133-141.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acids Res.** 22: 4673-4680.
- 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.
- Timmuska, S., B. Nicandera, U. Granhallb and E. Tillberga. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. **Soil Biol. Biochem.** 31: 1847-1852.
- Trujillo, M.E., R.M. Kroppenstedt, C. Ferná'ndez-Molinero, P. Schumann and E. Martí'nez-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.
- Vanderbroek, A., M. Lambrecht, K. Eggermont and J. Vanderleyden. 1999. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** 181: 1338-1342.
- Verma, A., S.V. Sudha, N. Sahay and B. Butehorn. 1999. *Piriformospora indica*, a cultible plant-growth-promoting root endophyte. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 2741-2744.

- Verma, S.C., K.L. Jagdish and K.T. Anil. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **J. Biotechnol.** 91: 127-141.
- Voeykova, T., L. Emelyanova, V. Tabakov and N. Mkrtumyan. 1998. Transfer of plasmid pT01 from *Escherichia coli* to various representatives of the order Actinomycetales by intergeneric conjugation. **FEMS Microbiol. Lett.** 162: 47-52.
- Wakelin, S.A., R.A. Warren, P.R. Harvey and M.H. Ryder. 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biol Fertil Soils.** 40: 36-43.
- Webber, J. 1981. A natural control of Dutch elm disease. **Nature** 292: 449-451.
- Went, F.W. and K.V. Thimann. 1937. **Phytohormone**. Macmillan, New York.
- William, S.T., M.E. Sharpe and J.G. Holt. 1989. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Vol 4. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Wiyakrutta, S., N. Sriubolmas, W. Panphut, N. Thongon, K. Danwisetkanjana, N. Ruangrungsi and V. Meevootisom. 2004. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 20: 265-272.
- Woodward, A. and B. Bartel. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. **Ann. Bot.** 95: 707-735.
- Yamamoto, Y., N. Kamiya, Y. Morinaka, M. Matsuoka and T. Sazuka. 2007. Auxin biosynthesis by the YUCCA genes in rice. **Plant physiol.** 143: 1362-1371.

Zhang, J., C. Wang, S. Guo, J. Chen and P. Xiao. 1999. Studies on the plant hormones produced by 5 species of endophytic fungi isolated from medicinal plants (Orchidaceae). **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao** 21: 460-465.

Zou, W.X., J.C. Meng, H. Lu, G.X. Chen, G.X. Shi, T.Y. Zhang and R.X. Tan. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **J. Nat. Prod.** 63:1529-1530.





ลำดับเบสขนาด 427 คู่เบสของยีน 16S rRNA จาก *Streptomyces* sp. GMKU118

```

1   GCGGGCGTGC TTACACATGC AAGTCGAACG ATGAAGCCCT TCGGGGTGGA
51  TTAGTGCGCA ACGGGTGAGT AACACGTGGG CAATCTGCCC TTCACTCTGG
101 GACAAGCCCT GGAAACGGGG TCTAATACCG GATACGACTG CGGGAGGCAT
151 CTCCTATGGT GGAAAGCTCC GCGGGTGAAG GATGAGCCCG CGGCCTATCA
201 GCTTGTGGT GAGGTAACGG CTCACCAAGG CGACGACCGG TAGGCGGCCT
251 GAGAGGGCGA CCGGCCACAC TGGAACATGAT ACACGGACCA GACTCCTACC
301 GGAGGCAGCC ATGGGGAGTA TTTAACGATG GGGTTGAGAA TGTTTGACGG
351 GTGCTCCCTT CGTGCTGAAC GACTTCCGTC GGTTTTGTA TTTCTTCAG
401 TTA CTGTCAA ACGAAAGAGA TTGCCTC

```

ลำดับเบส 926 คู่เบส จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ATT072F และ ATT072R จากโครโมโซม *Streptomyces* sp. GMKU 118

```

1   CTGGTCGGCC GAGACCACGC CGTTCCTGAC CCGCTGGCCG AGGCCACGCC
51  GTCGACCGTC GTCGACCTCA AGGGCGAGAC CCACTACGCC GAGACCATCG
101 ACGACCTGCC GCAGATCTAC CGCGACGTCG CCGAGGCGTG GAACGCCTGC
151 CTCGACGAGG GCGCCGACTT CTCCGACATG AACC GGCGA TGC GCGAGCG
201 CGACGTCCCG CGCATCCGCG AGATCTGGGC CGAGCTCGTC GCGAAGCTCG
251 ACGACGAGAC CTTCTACGGC TTCTCTGCA AGTCCGAGGC CTTCCAGTCC
301 TTCCGCAAGC GCGAGATCTT CGGCCAGGTC GGCTTCGGCA CCGGCGGCTG
351 GGACACCGAC TTCCCGA ACT CCATCCTGGA GATCCTCCGG GTCGTCTACA
401 CCGAGGCGGA CGACCACCAC CGCGGCATCG TCGGCGGCTC GCAGCAGCTG
451 CCGCTGCGCC TGTGGGAGCG CGAGCCGGAG AAGATCGTCC ACTGGGCCCA
501 GGGCACCTCG CTGAGCTCCC TGCACGAGGG CACCCGCGC CCGGCCGTGA
551 CCCGGCTGAC CCGCGCCGCC GGCAACCGGA TCACCGTCAC CGACGCCTCC
601 GCGACATCC GCACCTACCG CGCCGCGATC TTCACGCCC AGTCCTGGAT
651 GCTGCTGTCC AAGATCGCGT GCGACGACTC GCTGTTCCC ATCGACCACT
701 GGACGGCGAT GGGAGCGGAC CCACTACATG GAGTCCTCGA AGCTCTTCGT
751 GCCGGTGGAC CGGGCCGTTT TGGCTGGACA AGTGACGATG AAGACGGGCC
801 GCGACGTCAT GTCGATGACG CTCACCGACC TGGACGACGC GCGGCTACCT
851 ACTTACTGGA CGACGGGACT GAAAAAGGCG AGTCACATCT TCTTCTCGTA
901 CTCGTGTTGC GACCACGTCT GAAGAG

```

ลำดับเบส 930 คู่เบส จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ATT072F และ ATT072R จากโครโมโซม

Streptomyces sp. GMKU 160

```

1   GGTGTGGGGG GGGCTGGGAG ATCGGCACTA CCCAACCGTC TGGCCGAGGC
51  GACCCCTTCG ACCGTCGTCG ACCTCAGGGC GAGTCGCACT ACGCGGAGAC
101 GATGGCCGAT CTGCCGCAGG TCTACCGTGA CGTGGCCGAC GCCTGGGCGC
151 GGTGCCTGGA GGAGGGGGCC GACTTCTCCG ACATGAACCG GGCCCTGCGC
201 GAGCGGGACG TGCCGCGGAT CCGGGAGATC TGGTCGCGGC TGGTGGAGAA
251 GCTCGACAAC CAGACCTTCT ACGGGTTCCT GTGCGAGTCG GAGACCTTCA
301 GGTCCCTCCG GCACCGGGAG ATCTTCGGGC AGGTCGGGTT CGGGACCGGG
351 GGATGGGACA CCGACTTCCC GAACTCCATC CTGGAGATCC TGCAGATCGT
401 CTACACCGAG GCCGACGACC ACCACCGCGG GATCGTCGGC GGGTCGCAGC
451 AGCTTCCGCT CCGGCTGTGG GAGCGGGAGC CCGAGAAGAT CGTCCACTGG
501 CCGTACGGCA CCTCGCTGAA GGCCTGCAC GTGGACGGGA ACCCGCGGCC
551 GGCCGTCACG CGGCTCGGGC GGACCGCCGG CAACGGGATC ACCGTGACGG
601 ACGCGCGCGG CGACATCCGT ACCTACCGTG CGGCCGTGTT CACCGCGCAG
651 TCCTGGATGC TCCTGTCGAA GATCGACTGC GACGACTCGC TCTTCCCCAT
701 CGACCACTGG ACCGCCATCG AGCGCACCCA CTACATGGGA GAGCTCCTAG
751 CTCTTCGTGC CCGTGGACTG GTCGTTCTGT CTGGACGAGG ACGAGACAAC
801 CGGGCGGGAC GTCATGTCAT GACGCTCACA GACGCACGAC CCGCGGCACG
851 TACCTGCTGG ACACGGCCCG GACAAGCCCG CGTGATCTGC CTGTCATACA
901 CTGGTGCGAC TACAGTCCGA GTGCTGCCCT

```

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ	นางสาวภาวิณี สุทธิวิริยะ
เกิดวันที่	1 กุมภาพันธ์ 2526
สถานที่เกิด	ปัตตานี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. ชีววิทยา (พฤกษศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับที่ 2 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	Suttiviriya, P., Vajrodaya, S., Thamchaipenet, A. (2008). Production of plant growth promoting agents from endophytic actinomycetes. The 34th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 34). 31 October- 2 November 2008, Bangkok, Thailand. Thamchaipenet, A., Kung, S., Suttiviriya, P., Duangmal, K., Kitani, S., Nihira, T. and Igarashi, Y. (2008). Potential bioactive compounds and plant growth promoting agents from endophytic actinomycetes isolated from Thai plants. The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for biotechnology. 14-17 October 2008, Maha Sarakham, Thailand.
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนการสนับสนุนงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและระดับนานาชาติ บัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทุนผู้ช่วยสอน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีการศึกษา 2551