

คุณสมบัติการละลายฟอสเฟตและสังเคราะห์ไซเดอโรฟอรัสของ *Burkholderia caribensis* RE230 มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

Phosphate Solubility and Siderophore Synthesis Properties of *Burkholderia caribensis* RE230 Involve in Rice Growth Promoting

วารารณีย์ ปานอยู่^{1,2} สุจินต์ ภัทรภาดล^{1,2,3} และ วิชัย ไชยสิทธิ์^{1,2,3}
Waraporn Panyoo^{1,2}, Sujin Patarapuwadol^{1,2,3} and Wichai Kositratana^{1,2,3}

บทคัดย่อ

การกลายพันธุ์ของไรโซแบคทีเรีย *Burkholderia caribensis* RE230 Wild type(WT) ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว โดยการถ่าย EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ เข้าสู่เซลล์ ด้วยวิธี electroporation คัดเลือกแบคทีเรียกลายพันธุ์ได้จำนวน 106 โคลน ในจำนวนนี้พบเชื้อที่กลายพันธุ์ 8 โคลนที่เกี่ยวข้องกับการละลายฟอสเฟตจำนวน 4 โคลน และกับการสังเคราะห์ไซเดอโรฟอรัส อีก 4 โคลน ทั้ง 8 โคลน ให้ผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ลดลงจากเดิม แสดงว่ากลไกของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในส่วนการละลายฟอสเฟตและสร้างสารไซเดอโรฟอรัสมีความเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของ mutants และเปรียบเทียบกับธนาคารยีน พบยีนต่างๆหลายยีน และที่สำคัญ Mutant 085 ที่กลายพันธุ์ในการละลายฟอสเฟต มี Tn5 transposon เข้าแทรกที่ยีน ATP phosphoribosyltransferase (*hisG*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของยีนต่างๆ ต่อสภาวะอาหารและสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เช่นการขาดธาตุอาหาร หรือสภาวะแล้งได้

คำสำคัญ: ไรโซแบคทีเรีย การละลายฟอสเฟต การสังเคราะห์ไซเดอโรฟอรัส ทรานโพซอน การกลายพันธุ์

Abstract

Mutagenesis of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) of rice, *Burkholderia caribensis* RE230 with EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ by electroporation, was investigated. One hundred and six of Tn5 transposon mutants were screened. Four of each Tn5 transposon mutants, which abolished phosphate solubility or siderophore synthesis properties, were selected and tested for plant growth promoting potential on rice (*Oryza sativa* CV. KDML105) in pot experiment under greenhouse condition. All of mutants gave lower the growth promoting potential than wild type. These were indicated that phosphate solubilization and siderophore production involved in plant growth promoting of *B. caribensis* RE230. Transposon tagging sites were characterized by sequencing and comparing with the GenBank. Several genes were identified and mutant 085 which deficient on phosphate solubility was tagged on the ATP phosphoribosyltransferase (*hisG*) gene, that involves transcriptional regulation based primarily on nutrient and environment conditions such as nutrient deficiency and drought condition, was also identified.

Keywords : rhizobacteria, phosphate solubilization, siderophore synthesis, Tn5 transposon, mutation

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานับพันดิจิทัลศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

คำนำ

Burkholderia caribensis RE 230 แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนตรง แยกเชื้อได้จากดินรอบรากที่เก็บจากแปลงนาปลูกข้าวชาวดอกมะลิ 105 ตั้งอยู่ที่พิกัด N15°40'13"/E103°48'55.3" ตำบลหัวโทน อำเภอสุวรรณภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด จากการศึกษาพบว่ามีความสมบัติเป็นไรโซแบคทีเรียที่ไปส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวได้อย่างมีนัยสำคัญ สามารถละลายฟอสเฟต (phosphate solubilization) และสังเคราะห์ไซเดอโรฟอรัส (siderophore synthesis) ที่ช่วยจับอนุมูลธาตุเหล็กในดินที่มีอยู่อย่างจำกัด ทำให้ต้นข้าวได้รับธาตุเหล็กและยังจับอนุมูลธาตุโลหะอื่นๆ เช่น ทองแดง และสังกะสีไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ (วรารภรณ์, 2560) เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ จึงทำการกลายพันธุ์เชื้อ *B. caribensis* RE230 ด้วย EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ คัดเลือกเชื้อที่กลายพันธุ์ที่มีการละลายฟอสเฟต และการสังเคราะห์ไซเดอโรฟอรัสในระดับที่ลดลง หรือตรวจไม่พบการสังเคราะห์บนอาหารทดสอบ และศึกษาลำดับเบสของยีนดังกล่าว โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (Hoffman and Jendrisak, 1999) เพื่อระบุชนิดของยีน และวิเคราะห์ความเชื่อมโยงของกลไกที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

อุปกรณ์และวิธีการ

การกลายพันธุ์เชื้อด้วย EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™

การเตรียม competent cells โดยใช้วิธีจาก Instruction Manual of Gene Pulser Xcell™ Electroporation System, (Bio-Rad Laboratories, USA) และดัดแปลงจากของ Mack and Titball (1996) นำ competent cells ที่ได้ มาชักนำการกลายพันธุ์ด้วยระบบ EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ (Epicentre®, illumina® company, USA) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำ โดยเติมส่วนของ Transposon ที่ยีน kanamycin resistance (Kan^r; KAN-2) และที่ปลายสองข้างมีลำดับเบสสั้นๆ จำนวน 19 bp ที่ให้ transposase มาจับ (19 bp mosaic end (ME) Tn5 transposase recognition sequences) กับเอนไซม์ Tn5 transposase ทำให้จับตัวเป็น Transposome (EZ-Tn5 Transposome™) ซึ่งสามารถเข้าไปแทรกบนโครโมโซมของแบคทีเรียโดยสุ่ม ถ่ายยีนเข้าสู่ *B. caribensis* RE230 โดย electroporation ด้วยเครื่อง Gene Pulser Xcell™ Electroporation System นำไปเลี้ยงคัดเลือกบนอาหารแข็ง Luria-Bertani medium (LB) ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 ppm บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน *B. caribensis* RE230 mutant จะเจริญได้บนอาหารแข็ง LB ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 ppm ได้นำ mutant ไปคัดเลือกทดสอบคุณสมบัติที่ต้องการต่อไป (Figure 1)

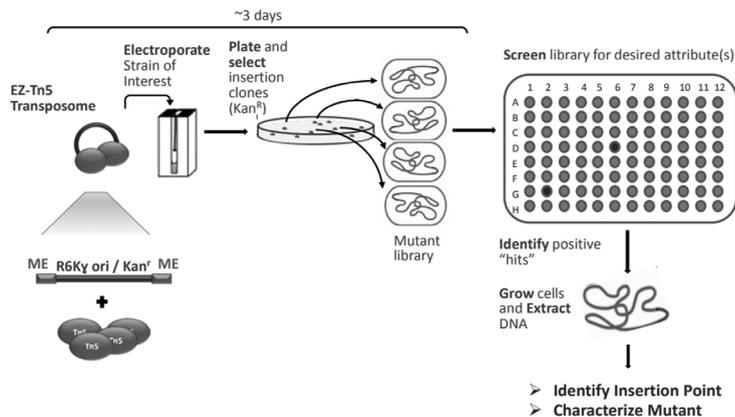


Figure 1 EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ protocol for bacterial gene mutation (Epicentre®, USA)

การตรวจสอบคุณสมบัติของไรโซแบคทีเรียสายพันธุ์กลายในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

การละลายฟอสเฟต ตรวจสอบด้วยอาหาร National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium (NBRIP) (Nautiyal, 1999) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5-7 วัน จำนวน 3 ซ้ำ เชื้อที่ละลายฟอสเฟตได้จะเกิดวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย (Nautiyal, 1999) บันทึกผลขนาดวงใส (halo size) รอบโคโลนีของแบคทีเรีย วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม R โดยการตรวจสอบค่าเฉลี่ยแบบต้นแคณ (Duncan's New Multiple Range Test, DMRT)

ตรวจการสังเคราะห์ไซโตโครฟลูออโรฟลูออโร ทดสอบบนอาหาร chrome azurol S (CAS) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24-48 ชม. จำนวน 3 ซ้ำ ถ้าเชื้อผลิตไซโตโครฟลูออโร สีอาหารจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีส้มรอบโคโลนี (Alexander and Zuberer, 1991) บันทึกผลขนาดวงสีส้ม (orange halo size) รอบโคโลนีของแบคทีเรีย วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม R โดยการตรวจสอบค่าเฉลี่ยแบบต้นแคณ (Duncan's New Multiple Range Test, DMRT)

การทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในระดับโรงเรือน

เตรียม *B. caribensis* RE230 mutant เพาะเลี้ยงใน LB ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 ppm และอาหาร LB สำหรับ *B. caribensis* RE230 WT บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 - 48 ชม. นำมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเชื้อที่ความเร็วรอบ 5,000 x g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl จำนวน 2 ครั้ง ละลายด้วย 0.85% NaCl ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสง 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 nm (Mack and Titball, 1996)

เตรียมเมล็ดข้าวสำหรับการทดสอบ นำเมล็ดข้าวเปลือกขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 50 เมล็ด ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นให้ท่วม นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แบบน้ำวน อุณหภูมิ 57 °C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นย้ายไปแช่ด้วย 70% ethanol เป็นเวลา 1 นาที และสารละลาย 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 10 นาที จึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 5 ครั้ง (Patten and Glick, 2002) นำเมล็ดข้าวที่ได้เก็บใส่ภาชนะที่ฆ่าเชื้อ

เติมสารละลายเชื้อ *B. caribensis* RE230 ที่เตรียมไว้ปริมาณ 13 ml ลงในขวดแก้วที่มีเมล็ดข้าว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชม. สำหรับกรรมวิธีควบคุมแบบลบ (negative control) ใช้แช่ใน 0.85% NaCl 13 ml จากนั้นย้ายเมล็ดข้าว วางบนกระดาษเพาะเมล็ดที่ขึ้น ในจานแก้วเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. จะเห็นตุ่มสีขาวของรากงอกจากเมล็ด ย้ายไปปลูกลงดิน 800 g ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งด้วยไอน้ำ (autoclave) ในกระถางพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 ซม. ความสูง 10.5 ซม. จำนวน 5 เมล็ดต่อกระถาง จำนวน 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (completely randomized design) ให้น้ำด้วยน้ำกลั่นพอชุ่มเป็นเวลา 7 วัน จึงเติมน้ำกลั่นให้ท่วมเหนือผิวดินประมาณ 1 ซม. เป็นเวลา 15 วัน (Ng *et al.*, 2012) จากนั้นเก็บต้น ใบ และรากข้าว อบแห้ง วิเคราะห์เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งและความยาวของต้น ใบ และราก ด้วยโปรแกรม R โดยตรวจสอบค่าเฉลี่ยแบบต้นแคณ

การตรวจสอบยีน kanamycin resistance (KAN-2)

เพาะเลี้ยง *B. caribensis* RE230 mutant ในอาหาร LB ที่เติม kanamycin ความเข้มข้น 50 ppm นำเซลล์ที่ได้มาสกัด genomic DNA ด้วย Presto™ Mini gDNA Bacteria kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *Pst* I (บนส่วน Tn5 Transposon) และ *EcoR* I (ส่วนของโครโมโซม) นำ DNA มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย phenol/chloroform (1:1) ตกตะกอนด้วย absolute ethanol ล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol และละลายด้วยน้ำกลั่น นำชิ้น DNA ที่ตัดแล้ว (linear DNA) มาเชื่อมต่อเป็น DNA วงกลม (circular DNA) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (Martin and Mohn, 1999; Fernandes *et al.* 2001; Rouws *et al.* 2008) ตรวจสอบยีน kanamycin resistance (KAN-2) ของ genomic DNA และ DNA วงกลม โดยเทคนิค PCR ด้วย primer KAN-2 forward และ KAN-2 reverse ตามวิธีการของผู้ผลิตแนะนำ โดยผลผลิตยีน KAN-2 มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส (bp) เพื่อยืนยันว่าเป็นโคลนที่กลายพันธุ์ (mutant)

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ถูกแทรกด้วย EZ-Tn5™ transposome

วิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ถูกแทรกด้วย EZ-Tn5™ transposome โดยเทคนิค inverse polymerase chain reaction (IPCR) ด้วยคู่ไพรเมอร์ KAN-2 FP-1 forward และ KAN-2 RP-1 reverse ด้วยปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการของผู้ผลิตแนะนำ นำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย ชุด GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) โดยผลผลิตของปฏิกิริยา PCR จะมีขนาดมากกว่า 123 bp

ส่งผลผลิต PCR วิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้บริการจากบริษัท First Base Laboratories, Sdn Bhd (Malaysia) นำลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่ได้ มาทำการเชื่อมต่อกับลำดับเบสของยีนที่สนใจ โดยโปรแกรม Seqman ของ DNA Star software และ โปรแกรม Contig Express project ของ Vector NTI software แล้วนำข้อมูลลำดับเบสของยีนที่ได้ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อระบุชนิดของยีนและวิเคราะห์ความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการละลายฟอสเฟต และการสังเคราะห์ไซโตโครฟอรัสของ *B. caribensis* RE230 mutant

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสร้างสายพันธุ์กลายด้วยวิธี electroporation

โดยการถ่าย EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ เข้าสู่เซลล์ *B. caribensis* RE230 ด้วยวิธี electroporation เพื่อศึกษากลไกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการละลายฟอสเฟตและสังเคราะห์ไซโตโครฟอรัส คัดเลือก *B. caribensis* RE230 mutant ได้ จำนวน 106 โคลน ซึ่งมีจำนวนต่ำกว่าจากการศึกษาของ Fernandes *et al.* (2001) และ Rouws *et al.* (2008) โดย Fernandes *et al.* (2001) ศึกษาการกลายพันธุ์ของ *Rhodococcus rhodochrous* CW25 โดยการถ่าย Tn5 transposon ด้วย Transposome (Epicentre Technologies) ระบบเดียวกัน คัดเลือกโคลนที่มี Tn5 transposon ได้ทั้งหมด 1,500 โคลน พบโคลนที่มีการกลายพันธุ์เกี่ยวกับความต้องการสารอาหาร (auxotrophic mutant) จำนวน 20 โคลน และ Rouws *et al.* (2008) ศึกษาการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 จากอ้อย โดยวิธีการเดียวกัน พบแบคทีเรียจำนวน 1 โคลนที่มีการกลายพันธุ์ในส่วนของยีน *flgA*-homologous จากจำนวน 31 โคลนที่กลายพันธุ์ ซึ่งคาดว่าจำนวน mutant จากการศึกษานี้ใน *B. caribensis* RE230 ที่มีต่ำ อาจเนื่องมาจากเตรียมเชื้อเป็น competent cells จากเชื้อที่อยู่ในระยะช่วงท้ายของ log phase ซึ่งการเตรียมเซลล์ที่เป็น electrocompetent cell ควรอยู่ในช่วงต้นถึงช่วงกลาง ของ log phase (Dower *et al.*, 1988) ประกอบกับ *B. caribensis* เป็นแบคทีเรียที่สร้าง extracellular polysaccharide จำนวนมาก จึงส่งผลให้มีประสิทธิภาพการถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ลดลง

การตรวจสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของไรโซแบคทีเรียที่เรียกว่าสายพันธุ์

การละลายฟอสเฟตตรวจสอบด้วยอาหาร NBRIP พบว่า *B. caribensis* RE230 mutants มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตได้ต่ำกว่า *B. caribensis* RE230 WT และพบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) มีจำนวน 66 โคลน โดย *B. caribensis* RE230 mutants ที่ละลายฟอสเฟตน้อยที่สุด จำนวน 4 โคลน ได้แก่ โคลน Mutant 082 มีขนาดวงใส รอบโคโลนี 4.33 ± 0.29 มม. โคลน Mutant 085 มีขนาดวงใส 4.33 ± 0.29 มม. โคลน Mutant 088 มีขนาดวงใส 4.33 ± 0.29 มม. และ โคลน Mutant 097 มีขนาดวงใส 4.17 ± 0.29 มม. (Table 1)

การสังเคราะห์สารไซโตโครฟอรัสตรวจสอบด้วยอาหารแข็งสูตร CAS บันทึกผลขนาดวงสีส้ม รอบโคโลนีของแบคทีเรีย พบว่า *B. caribensis* RE230 mutants มีประสิทธิภาพในการสร้างสารไซโตโครฟอรัสได้น้อยกว่า *B. caribensis* RE230 WT และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ มีจำนวน 29 โคลน โดยไรโซแบคทีเรียที่เรียกว่าสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารไซโตโครฟอรัสได้น้อยที่สุด จำนวน 4 โคลน ได้แก่ โคลน Mutant 008 มีขนาดวงสีส้มรอบโคโลนี 0.80 ± 0.10 ซม. โคลน Mutant 049 มีขนาดวงสีส้ม 1.33 ± 0.25 ซม. โคลน Mutant 066 มีขนาดวงสีส้ม

0.65±0.56 ซม. และโคลน Mutant 076 มีขนาดวงสีส้ม 1.41±0.42 ซม. (Table 1)

Table 1 *Burkholderia caribensis* RE230 mutants evaluation on phosphate solubility (NBRIP medium) and siderophore production (CAS medium) properties.

Clone	NBRIP medium	CAS medium
	Halo size (mm)	Orange halo size (cm)
Wild type (RE230)	6.37±0.19	2.11±0.22
Mutant 008	6.33±0.29	0.80±0.10
Mutant 049	6.25±0.25	1.33±0.25
Mutant 066	6.00±0.00	0.65±0.56
Mutant 076	6.00±0.00	1.41±0.42
Mutant 082	4.33±0.29	2.10±0.22
Mutant 085	4.33±0.29	2.26±0.38
Mutant 088	4.33±0.29	1.78±0.32
Mutant 097	4.17±0.29	1.91±0.25

The experiment was done with 3 replicates per treatment.

การทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว

คัดเลือก *B. caribensis* RE230 mutants ที่มีประสิทธิภาพในการละลายฟอสเฟตต่ำที่สุด จำนวน 4 โคลน ได้แก่ โคลน Mutant 082, 085, 088 และ 097 และ *B. caribensis* RE230 mutants ที่มีการสังเคราะห์สารไซโตโครฟอริน้อยที่สุด จำนวน 4 โคลน ได้แก่ โคลน Mutant 008, 049, 066 และ 076 นำไปทดสอบในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่า *B. caribensis* RE230 mutants จำนวน 3 โคลน ทำให้มีน้ำหนักแห้งของต้นและใบ น้อยกว่าชุดควบคุมแบบบวก *B. caribensis* RE230 WT ได้แก่ Mutant 082 (3.35%) Mutant 008 (5.52%) และ Mutant 049 (10.69%) และมีน้ำหนักแห้งของรากที่ลดลง 5 โคลนดังนี้ Mutant 049 (1.38%) Mutant 088 (3.28%) Mutant 082 (3.97%) Mutant 008 (5.17%) และ Mutant 066 (10.17%) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติจากชุดควบคุม (Table 2) โดยโคลนที่ทำให้ผลรวมทั้งน้ำหนักแห้งของต้นและใบ และของรากข้าว ต่ำกว่าชุดควบคุมแบบบวก จำนวน 3 โคลนคือ Mutant 008 และ 049 ที่การกลายพันธุ์ในการสังเคราะห์ไซโตโครฟอริน และ Mutant 082 ที่กลายพันธุ์ในการละลายฟอสเฟตพบว่า *B. caribensis* RE230 mutants จำนวน 6 โคลน ทำให้ความยาวของต้นและใบลดลงจากการทดสอบด้วย Wild type ได้แก่ Mutant 097 (0.06%) Mutant 066 (0.25%) Mutant 085 (0.76%) Mutant 008 (1.23) Mutant 076 (1.91%) และ Mutant 082 (1.92%) ส่วนความยาวของราก พบว่า *B. caribensis* RE230 mutants จำนวน 4 โคลนทำให้ความยาวของรากสั้นกว่าชุดควบคุม ได้แก่ Mutant 008 (0.22%) Mutant 049 (0.39%) Mutant 066 (3.16%) และ Mutant 088 (5.77%) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ (Table 3) โดย Mutants 008 และ 066 ทำให้ความยาวของต้น ใบ และของราก สั้นกว่าชุดควบคุม ทั้ง 2 โคลนเป็นการกลายพันธุ์ที่การสังเคราะห์ไซโตโครฟอริน แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ อาจเนื่องจากการตรวจผลในขณะที่ยังมีอายุเพียง 15 วัน ซึ่งอยู่ในช่วงที่ข้าวเริ่มต้นการเจริญเติบโต

Table 2 Effects of *Burkholderia caribensis* RE230 mutants on shoot and root dry weight of inoculated rice plants, 15 days after planting.

Treatment	Shoot dry weight (mg/pot)		Root dry weight (mg/pot)	
	Mean±SD	% Increase	Mean±SD	% Increase
Positive control (<i>B. caribensis</i> RE230)	56.73±10.00 a	-	38.67±3.14 ab	-
Negative control (0.85% NaCl)	48.93±3.19 a	-13.75	32.47±3.83 b	-16.03
Mutant 008	53.60±15.76 a	-5.52	36.67±1.81 ab	-5.17
Mutant 049	50.67±6.91 a	-10.69	38.13±0.58 ab	-1.38
Mutant 066	57.80±8.70 a	1.88	34.73±2.76 ab	-10.17
Mutant 076	62.40±6.16 a	9.99	42.80±1.74 a	10.69
Mutant 082	54.73±12.09 a	-3.53	37.13±3.16 ab	-3.97
Mutant 085	63.13±5.95 a	11.28	39.13±2.66 ab	1.21
Mutant 088	62.40±3.60 a	9.99	37.40±2.46 ab	-3.28
Mutant 097	64.40±7.03 a	13.51	38.67±11.23 ab	0

Means with the same letter are not significantly different by DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) at $P \leq 0.05$. The experiment was done with 3 replications per treatment, 5 plants per replication.

Table 3 Effects of *Burkholderia caribensis* RE230 mutants on shoot and root length of inoculated rice plants, 15 days after planting.

Treatment	Shoot length (cm)		Root length (cm)	
	Mean±SD	% Increase	Mean±SD	% Increase
Positive control (<i>B. caribensis</i> RE230)	36.47±0.96 a	-	14.40±0.51 ab	-
Negative control (0.85% NaCl)	34.80±2.28 a	-4.56	13.11±1.55 b	-8.96
Mutant 008	36.02±0.40 a	-1.23	14.37±1.33 ab	-0.22
Mutant 049	36.72±0.30 a	0.71	14.34±1.07 ab	-0.39
Mutant 066	36.37±2.84 a	-0.25	13.95±1.22 ab	-3.16
Mutant 076	35.77±2.37 a	-1.91	15.56±0.77 a	8.04
Mutant 082	35.76±0.46 a	-1.92	14.94±0.43 ab	3.74
Mutant 085	36.19±1.64 a	-0.76	14.49±0.51 ab	0.65
Mutant 088	37.14±1.29 a	1.86	13.57±0.43 ab	-5.77
Mutant 097	36.44±2.23 a	-0.06	15.63±2.07 a	8.52

Means with the same letter are not significantly different by DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) at $P \leq 0.05$. The experiment was done with 3 replications per treatment, 5 plants per replication.

การตรวจสอบยีน kanamycin resistance (KAN-2)

การตรวจสอบยีน KAN-2 ซึ่งเป็นยีนต้านทานต่อ kanamycin บน EZ-Tn5™ <KAN-2> transposon ที่จะถูกแทรกอยู่ใน genomic DNA ของ *B. caribensis* RE230 mutants จำนวน 8 โคลน ได้แก่ Mutant 082 085 088 และ 097 ซึ่งมีการกลายพันธุ์ในส่วนการละลายฟอสเฟต และ Mutant 008 049 066 และ 076 ที่กลายพันธุ์ในการสังเคราะห์ไฮเดรโอโรฟอร์ และมีผลให้การเจริญเติบโตของข้าวที่ลดลงดังกล่าวข้างต้นแล้ว บน genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ PstI และ EcoRI และจาก DNA ที่เชื่อมเป็นวงกลมด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (DNA วงกลม) ด้วยเทคนิค PCR พบว่า *B. caribensis* RE230 mutants ทั้ง 8 โคลน มียีน KAN-2 ของ Tn5 transposon ขนาดประมาณ 400 คู่เบส แทรกอยู่ (Figure 2)

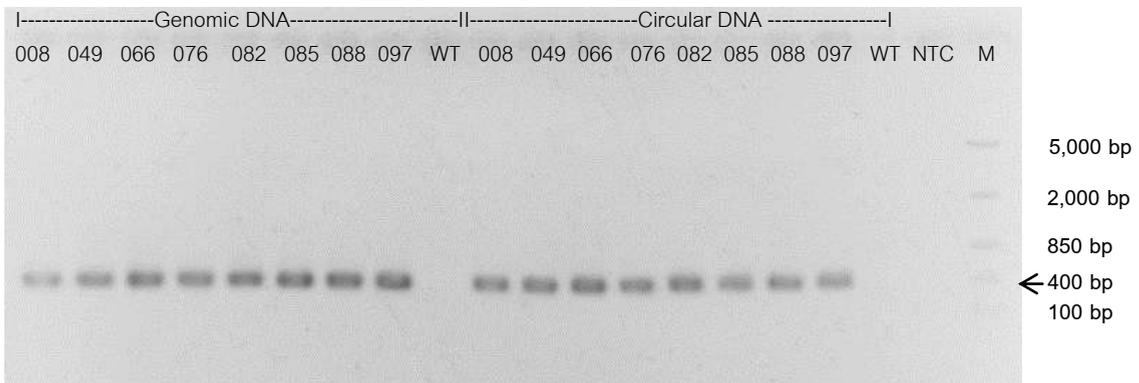


Figure 2 PCR amplification of kanamycin resistance (KAN-2) gene (400 bp) of genomic DNA and circular DNA from eight Tn5 transposon mutants of *Burkholderia caribensis* RE230 WT: wild type; NTC: non template control; M: DNA Marker.

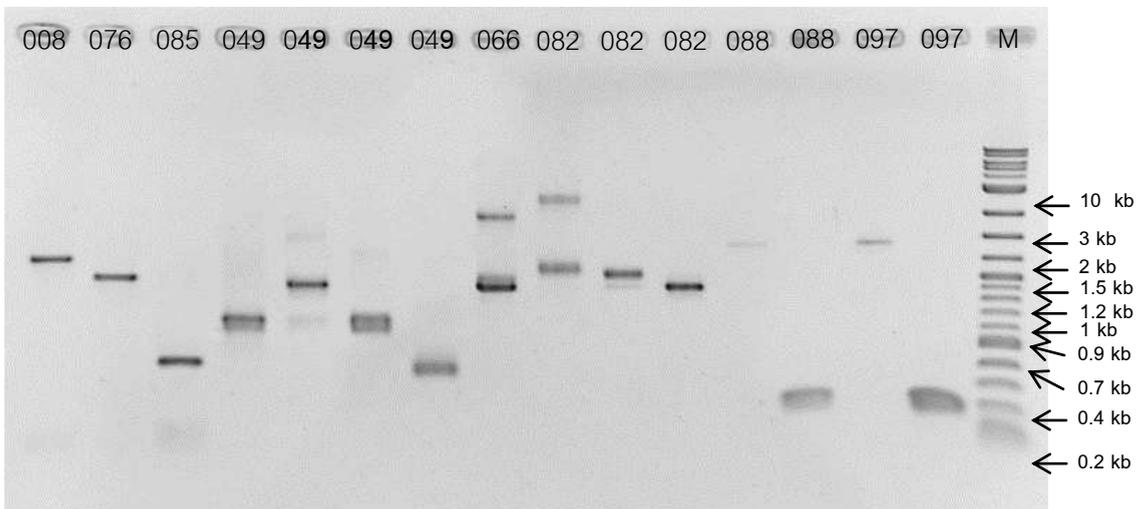


Figure 3 Inverse polymerase chain reaction (IPCR) products of eight Tn5 transposon mutants of *Burkholderia caribensis* RE230 by KAN-2 FP-1 forward and KAN-2 RP-1 reverse primers.

Table 4 Characteristics of identity of inserted sequences of the mutants.

Clone	Inserted sequence size (bp)	Identity of inserted sequence	Accession number	Identity (%)
Mutant 008	1,029	50S ribosomal protein L28 (<i>rpmB</i>) and L33 (<i>rpmG</i>), L-aspartate oxidase <i>B. caribensis</i> strain MWAP64 chromosome 1	CP013102.1	99
Mutant 049	516	Guanosine-3',5'-bis (diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase <i>B. caribensis</i> strain MWAP64 chromosome 1	CP013102.1	98
	794	30S ribosomal protein S12 and S7 <i>B. caribensis</i> strain MWAP64 chromosome 1	CP013102.1	99
Mutant 066	794	30S ribosomal protein S12 and S7 <i>B. caribensis</i> strain MWAP64 chromosome 1	CP013102.1	99
Mutant 076	843	Formyltransferase <i>B. caribensis</i> strain MWAP64 chromosome 1	CP013102.1	99
Mutant 082	850	O-succinylhomoserine sulfhydrylase <i>B. caribensis</i> strain MWAP64 chromosome 2	CP013103.1	99
	794	30S ribosomal protein S12 and S7 <i>B. caribensis</i> strain MWAP64 chromosome 1	CP013102.1	99
Mutant 085	265	ATP phosphoribosyltransferase (<i>hisG</i>) <i>B. caribensis</i> strain MWAP64 chromosome 1	CP013102.1	99
Mutant 088	50	Gamma-glutamyl kinase <i>B. caribensis</i> strain MWAP64 chromosome 1	CP013102.1	100
Mutant 097	50	Gamma-glutamyl kinase <i>B. caribensis</i> strain MWAP64 chromosome 1	CP013102.1	100

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ถูกแทรกด้วย EZ-Tn5™ transposon

จากการพบว่า *B. caribensis* RE230 mutants ทั้ง 8 โคลน มียีน kanamycin resistance (KAN-2) ของ Tn5 transposon แทรกอยู่ใน genomic DNA และ DNA วงกลม นำมาเพิ่มผลผลิตยีนด้วยเทคนิค inverse polymerase chain reaction (IPCR) พบว่ามีผลผลิตจาก IPCR ที่มีขนาดประมาณ 200-2,500 คู่เบส (Figure 3) และส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส นำผลเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่า Mutant 085 ตำแหน่งที่แทรกเป็นยีน ATP phosphoribosyltransferase (*hisG*) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกของกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน histidine มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Piszkiwicz *et al.*, 1979; Lohkamp *et al.*, 2003) โดยยีน *hisG* มีความสำคัญต่อการตอบสนองของแบคทีเรียต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงทั้งภายในเซลล์ (intracellular) และภายนอกเซลล์ (extracellular) ที่แตกต่างกันมากกว่า 30 ระบบ (Pirung, 1999) เช่น สภาวะขาดสารอาหาร การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง โดยอาจควบคุมการปลด

ปลดปล่อยกรดอินทรีย์ gluconic acid ละลายฟอสเฟตที่จะเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของข้าวได้ (Bhattacharyya and Jha, 2012) พบว่า siderophore mutants ได้แก่ Mutant 008 ให้ผลจำแนกเป็นยีน 50S ribosomal protein L28 and L33 และ L-aspartate oxidase ที่พบใน *B. caribensis* strain MWAP64 ซึ่งเกี่ยวข้องกับกาการสังเคราะห์ nicotinic acid และ nicotinamide metabolism ที่เป็นโมเลกุลสัญญาณ (Marinoni *et al.*, 2008) Mutant 049 มีขนาดผลผลิต PCR 516 คู่เบส ให้ผลจำแนกเป็นยีน Guanosine-3',5'-bis (diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase (spoT) พบใน *B. caribensis* strain MWAP64 เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ppGpp (guanosine 3'-diphosphate 5'- diphosphate) ควบคุมการตอบสนองต่อสภาวะเปลี่ยนแปลงสภาพของอาหาร และขนาด 794 คู่เบส ของยีน 30S ribosomal protein S12 and S7 พบใน *B. caribensis* strain MWAP64 chromosome โคลน Mutant 066 ยีนที่ถูกแทรกมีขนาด 794 คู่เบส ของยีน 30S ribosomal protein S12 and S7 พบใน *B. caribensis* strain MWAP64 และ โคลน Mutant 076 มีผลทำให้ความยาวของต้นและใบ น้อยกว่าชุดควบคุมแบบวง ยีนที่ถูกแทรกมีขนาด 843 คู่เบส คือยีน Formyltransferase พบใน *B. caribensis* strain MWAP64 (Table 4)

ในขณะที่ยังไม่พบว่ายีนของโคลน Mutant 066 และ 076 มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับกลไกของการสังเคราะห์ ไชเดอโรฟอร์ และยีนของโคลน Mutant 082 ไม่พบความเกี่ยวข้องโดยตรงกับกลไกของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชผ่านกระบวนการละลายฟอสเฟต โคลน Mutant 088 และ 097 มีขนาด 50 คู่เบส ของยีน gamma-glutamyl kinase (GK)(Fujita *et al.*, 2003) มีปฏิสัมพันธ์เป็นตัวตรวจจับกับกรดอะมิโน proline และควบคุมการสังเคราะห์ proline ซึ่งตอบสนองต่อสภาพเครียดต่างๆ เช่น สภาพแห้ง ความเค็ม เป็นต้น อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังมีจำนวนเชื้อที่กลายพันธุ์ไม่มากพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์ความเชื่อมโยงการทำงานของยีนในการทำให้มีคุณสมบัติการละลายฟอสเฟตและการสังเคราะห์ไชเดอโรฟอร์ของ *B. caribensis* RE230

สรุป

การทำให้กลายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว *Burkholderia caribensis* RE230 ที่มีคุณสมบัติการละลายฟอสเฟต และการสังเคราะห์ไชเดอโรฟอร์ ด้วย ระบบ EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ พบเชื้อที่กลายพันธุ์ (mutants) ต่อคุณสมบัติทั้งสอง อย่างละ 4 โคลน รวม 8 โคลน เมื่อทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อดั้งเดิม พบว่าให้ผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อข้าวขาวดอกมะลิ 105 ลดลง แสดงว่า คุณสมบัติการละลายฟอสเฟตและการสังเคราะห์ไชเดอโรฟอร์ในแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว ผลการวิเคราะห์พบว่าบางยีนเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงของอาหารและสภาพแวดล้อม เช่น ยีน ATP phosphoribosyltransferase (*hisG*) ยีน Guanosine-3',5'-bis (diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase (*spoT*) และยีน gamma-glutamyl kinase (*proB*)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2558 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

- วรภรณ์ ปานอยู่. 2560. การคัดเลือกแบคทีเรียบริเวณรากข้าวที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าว และกลไกของการส่งเสริม. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- Alexander, D.B. and D.A. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 12: 39-45.
- Bhattacharyya, P.N. and D.K. Jha. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350.
- Dower W.J., J.F. Miller and C.W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.
- Fernandes, P.J., J.A.C. Powell, and J.A.C. Archer. 2001. Construction of *Rhodococcus* random mutagenesis libraries using Tn5 transposition complexes. *Microbiol.* 147: 2529-2536.
- Fujita, T., A. Maggio, M. Garcia-Rios, C. Stauffacher, R. A. Bressan and L. N. Csonka. 2003. Identification of regions of the tomato gamma-glutamyl kinase that are involved in allosteric regulation by proline. *J. Biol. Chem.* 278: 14203-14210.
- Hoffman, L. and J. Jendrisak. 1999. Use of EZ::TN transposomes for genetic analysis and direct sequencing of bacterial genomic DNA. *Epicentre Forum* 6: 1-4.
- Instruction manual of gene pulser xcell™ electroporation system, Bio-Rad. Cited A.W. Smith and B.H. Iglewski. 1989. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* 17: 10509.
- Lohkamp, B., G. Mc Dermott, S.A. Campbell, J.R. Coggins and A.J. Laphorn. 2003. The structure of *Escherichia coli* ATP-phosphoribosyltransferase: identification of substrate binding sites and mode of AMP inhibition. *J. Mol. Biol.* 336: 131-144.
- Mack, K., and R.W. Titball. 1996. Transformation of *Burkholderia pseudomallei* by electroporation. *Anal. Biochem.* 242: 73-76.
- Marinoni I, S. Nonnis, C. Monteferrante, P. Heathcote, E. Härtig, L.H. Böttger, A.X. Trautwein, A. Negri, A.M. Albertini and G. Tedeschi. 2008. Characterization of L-aspartate oxidase and quinolinate synthase from *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* 275: 5090-5107.
- Martin, V.J.J. and W.W. Mohn. 1999. An alternative inverse PCR (IPCR) method to amplify DNA sequences flanking Tn5 transposon insertions. *J. Microbiol. Meth.* 35: 163-166.
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiology growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Letters* 170: 265-270.
- Ng, L.C., M. Sariah, O. Sariam, O. Radziah and M.A. Zainal Abidin. 2012. Rice seed bacterization for promoting germination and seedling growth under aerobic cultivation system. *Aust. J. Crop Sci.* 6: 170-175.
- Patten, C.L. and B.R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3795-3801.
- Pirrung, M.C. 1999. Histidine kinases and two-component signal transduction systems. *Chem. & Biol.* 6: 167-175.
- Piszkiwicz, D., B. E. Tilley, T. Rand-Meir and S.M. Parsons. 1979. Amino acid sequence of ATP phosphoribosyl transferase of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(4): 1589-1592.
- Rouws, L.F.M., J.L. Simões-Araújo, A.S. Hemery and J.I. Baldani. 2008. Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of flagellar mutant. *Arch. Microbiol.* 189: 397-405.