

การพัฒนาไพรเมอร์เพื่อจำแนกแบคทีเรียที่เจริญเร็วหรือช้าที่แยกได้จากปมรากถั่วเหลือง



นางสาว ดวงพร เอมอำไพวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2601-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF PRIMERS FOR IDENTIFICATION OF FAST- OR SLOW- GROWING  
BACTERIA ISOLATED FROM SOYBEAN ROOT NODULES

Miss Duangporn Emampaiwong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

ISBN 974-14-2601-1


Copyright of Chulalongkorn University

**490152**

Thesis Title            DEVELOPMENT OF PRIMERS FOR IDENTIFICATION OF FAST- OR  
                                 SLOW- GROWING BACTERIA ISOLATED FROM SOYBEAN ROOT  
                                 NODULES  
By                            Miss Duangporn Emampaiwong  
Field of Study            Industrial Microbiology  
Thesis Advisor           Associate Professor Kanjana Chansa-ngavej, Ph.D.

---

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillments of the Requirements for the Master's Degree

  
.....Dean of the Faculty of Science  
(Professor Piamsak Menasveta, Ph. D.)

THESIS COMMITTEE

*WANCHAI ASSAVALAPSAKUL*  
..... Chairperson  
(Dr. Wanchai Assavalapsakul Ph. D.)

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

*Lerluck Chitradon*  
..... Member  
(Associate Professor Lerluck Chitradon, Ph. D.)

*Wipa Homhaul*  
..... Member  
(Dr. Wipa homhaul, Ph. D.)

ดวงพร เอมอำไพวงศ์ : การพัฒนาไพรเมอร์เพื่อจำแนกแบคทีเรียที่เจริญเร็วหรือช้าที่แยกได้จากปมรากถั่วเหลือง (DEVELOPMENT OF PRIMERS FOR IDENTIFICATION OF FAST-OR SLOW-GROWING BACTERIA ISOLATED FROM SOYBEAN ROOT NODULES)

อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช, 90 หน้า. ISBN : 974-14-2601-1

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียซึ่งตรึงไนโตรเจนที่ปมรากถั่วเหลืองแบ่งเป็นสามประเภทได้แก่ ประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว ประเภทเพิ่มจำนวนช้า และประเภทที่มีเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนต่างๆ กัน วิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในการระบุประเภทไรโซเบียมที่ปมรากถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว และประเภทเพิ่มจำนวนช้า ใช้เวลานาน งานวิจัยนี้จะใช้ multiplex PCR reactions ในการตรวจหาไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า โดยออกแบบ forward และ reverse primers ของ *nodY* ซึ่งเป็นยีนที่พบเฉพาะใน ไรโซเบียมเพิ่มจำนวนช้า และออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวน *nodD1* ซึ่งมีขนาดต่างกันไนโซเบียมถั่วเหลืองที่เพิ่มจำนวนเร็วและเพิ่มจำนวนช้า เพื่อใช้ในการทำ multiplex PCR ในการทดลองนี้ได้แยก 525 ไอโซเลตจากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในดินจาก 15 ตำบลในจังหวัดพิษณุโลก หลังจากนั้นใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หาได้โดยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ RPO1 หรือ CRL-7 ระบุสายพันธุ์ 105 ไอโซเลต ได้จำนวนแบคทีเรีย 66 สายพันธุ์ (ประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว 9 สายพันธุ์ และเพิ่มจำนวนช้า 57 สายพันธุ์) ผลการใช้ multiplex PCR โดยใช้ forward and reverse primers ของ *nodY* และ *nodD1* ที่ออกแบบขึ้นพบว่าสามารถใช้ multiplex PCR ในการระบุการมีไรโซเบียมในปมรากถั่วเหลืองดังนี้ ถ้าตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 1300 คู่เบส หรือตรวจพบ 3 ขนาด ได้แก่ 500, 700, 1500 คู่เบส เป็นการตรวจพบไรโซเบียมถั่วเหลืองที่เพิ่มจำนวนเร็ว หากตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 340 คู่เบส หรือ 317 คู่เบส กับ 340 คู่เบส หรือ 317 คู่เบส และ 340 คู่เบส พร้อมกับ 657 คู่เบส หรือ 317 คู่เบส กับ 657 คู่เบส หรือ 340 คู่เบส พร้อมกับ 657 คู่เบส เป็นการตรวจพบไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ทั้งนี้ multiplex PCR ที่พัฒนามีความจำเพาะเจาะจงต่อไรโซเบียมถั่วเหลือง เพราะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ต่างกัน หรือไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ดีเอ็นเอของ *Agrobacterium tumefaciens* TISTR 507 , *Xanthomonas campestris* TISTR 786 และ *Proteus vulgaris* ในการทดลอง อย่างไรก็ตามไม่สามารถใช้ multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้น ในการแยกระหว่างไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วบางสายพันธุ์ (D11, D301, D 384) และไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าบางสายพันธุ์ (D291, D481) เพราะเมื่อใช้ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองเหล่านี้ในการทำ multiplex PCR ผลการทดลองได้ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 317 คู่เบส ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ *nodY* หรือไพรเมอร์ *nodD1* ในการทำปฏิกิริยา PCR กับดีเอ็นเอของไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ หากไม่ตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ *nodY* เป็นไพรเมอร์ และตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 1300 คู่เบส หรือตรวจพบ 3 ขนาด ได้แก่ 500, 700, 1500 คู่เบส แสดงว่าดีเอ็นเอเป็นของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว หากตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 340 คู่เบส เมื่อใช้ *nodY* เป็นไพรเมอร์ และตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 317 คู่เบส เมื่อใช้ *nodD1* เป็นไพรเมอร์ แสดงว่าดีเอ็นเอเป็นของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า

ภาควิชา จุลชีววิทยา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....ดวงพร เอมอำไพวงศ์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ดร. กัญจนา.....

# #4772596323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORDS : NODULATION GENES, NITROGEN FIXATION GENES, *Sinorhizobium fredii* ,  
*Bradyrhizobium japonicum*, MULTIPLEX PCR

DUANGPORN EMAMPAIWONG : DEVELOPMENT OF PRIMERS FOR IDENTIFICATION  
OF FAST- OR SLOW-GROWING BACTERIA ISOLATED FROM SOYBEAN ROOT  
NODULES

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KANJANA CHANSA-NGAVEJ, Ph.D. 90 pp.

ISBN : 974-14-2601-1

Soybean rhizobia which fix nitrogen in root nodules of soybeans could be grouped into three groups, the fast- growers, the slow- growers, and soybean rhizobia with variable generation times. Tradition method for detecting soybean rhizobia is time consuming. In this research multiplex PCR reactions will be used to detect the presence of slow - and fast- growers based on the information that fast- growers lack *nodY* and the sizes of *nodD1* of fast and slow- growers differ. In this research 525 bacterial isolates were obtained from root nodules of seven soybean cultivars grown separately in soil samples from 15 subdistricts in Phitsanulok province. Identical RAPD-PCR fingerprints using either RPO1 or CRL-7 as the primer of 105 isolates revealed they constituted 66 strains with 9 strains of fast- growers and 57 strains of slow- growers. Multiplex PCR using forward and reverse primers of *nodY* and *nodD1* genes could be used to detect the presence of fast- and of slow- growing soybean rhizobia as follows : fast- growing soybean rhizobial DNA yielded either 1300 bp or a combination of 500, 700, and 1500 bp while slow- growing soybean rhizobia yielded either 340 bp, or 317 bp with 340 bp, or 317 bp with 340 bp and 657 bp, or 317 bp with 657 bp, or 340 bp with 657 bp. The developed multiplex PCR was found to be specific for soybean rhizobia because when DNAs of *Agrobacterium tumefaciens* TISTR 507 , *Xanthomonas campestris* TISTR 786 and *Proteus vulgaris* were used in the reactions, different or no PCR products were found. However, the developed multiplex PCR could not be used to distinguish certain groups of soybean rhizobia (fast-growing D11, D301, D384) and slow- growing soybean rhizobia (D291 and D481), because the 317 bp fragments formed in multiplex PCR reactions were found to have identical nucleotide sequence. In order to detect if the five strains are fast- or slow- growing soybean rhizobia, it is necessary to carry out PCR reactions using DNA of each of the five strains as target DNA. If no PCR product is obtained when *nodY* is used as the primers, or 1300 bp or a combination of 500, 700, 1300 bp is obtained when *nodD1* is used as the primer, the target DNA belongs to a fast- growing soybean rhizobium. On the other band, if 340 bp PCR product is obtained when *nodY* is used as the primer, and 317 bp PCR product is obtained when *nodD1* is used as the primer, the target DNA belongs to a slow- growing soybean rhizobium.

Department     Microbiology  
Field of Study   Industrial Microbiology  
Academic Year  2006

Student's signature... *D. Emampaiwong*  
Advisor's signature... *K. Chansa-ngavej*

## Acknowledgements

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

I would also like to thank Dr. Wanchai Assavalapsakul for serving as the thesis committee chairperson, Associate Professor Lerluck Chitradon and Dr. Wipa Homhaul for serving as thesis committee members and their recommendations for the research.

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

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

## CONTENTS

	page
Abstract (in Thai).....	iv
Abstract (in English).....	v
Acknowledgements.....	vi
List of Tables .....	ix
List of Figures .....	x
Chapters	
I. Introduction.....	1
II. Literature Survey.....	5
III. Materials & Methods.....	15
3.1 Analysis of soil samples.....	15
3.2 Isolation of bacteria from root nodules of soybeans grown in three districts in Phitsanulok Province.....	15
3.3 Growth of isolates in yeast extract mannitol medium (YMB).....	16
3.4 RAPD-PCR fingerprinting.....	16
3.4.1 Isolation of chromosomal DNA.....	16
3.4.2 RAPD-PCR fingerprinting.....	17
3.5 Multiplex PCR.....	18
3.5.1 Design of primers.....	18
3.5.2 Optimization of multiplex PCR conditions.....	18
IV. Results.....	19
V. Discussion.....	50
VI. Conclusion.....	61
References.....	62
Appendix A : Bacterial Growth Media .....	68
Appendix B : Chemicals and Solutions .....	70
Appendix C : Analysis of soil samples.....	71

Appendix D : RAPD-PCR fingerprints of isolates with identical fingerprints..... 75  
Appendix E : Sequencing data ..... 79  
Biography : ..... 90



## LIST OF TABLES

	Page
Table 2.1	Sequences of the 20-mer primers that specifically amplify the <i>noIXWBTUV</i> locus of <i>S.fredii</i> and the <i>RS<math>\alpha</math></i> repetitive sequence of <i>B. japonicum</i> ..... 10
Table 4.1	Determination of pH of soil samples collected in 2005..... 19
Table 4.2	Code of bacteria isolated from root nodules of seven soybean cultivars grown in soils from districts in Phitsanulok Province..... 20
Table 4.3	Bacterial isolates used for RAPD-PCR fingerprinting..... 21
Table 4.4	Grouping of root nodule bacterial isolates according to extent of turbidity..... 28
Table 4.5	Soybean root nodule bacterial isolates from 15 subdistricts that were the same strains..... 44
Table 4.6	Properties of forward and reverse primers used in multiplex PCR for detection of fast-growing and slow-growing soybean rhizobia isolated from Chart Trakarn, Bang Rakam and Prom Piram districts, Phitsanulok Province. PCR products obtained in multiplex PCR reactions when chromosomal DNAs of fast- growing soybean rhizobia were used as templates and forward and reverse primers of <i>nodD1</i> and <i>nodY</i> were used as primers..... 52
Table 5.1	PCR products obtained in multiplex PCR reaction when chromosomal DNAs of slow- growing soybean rhizobia were used as templates and forward and reverse primers of <i>nodD1</i> and <i>nodY</i> were used as primers..... 55
Table 5.2	

## LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1.1	Diagrammatic representations of early nodulation processes..... 2
Figure 2.1	Soybean cultivation areas in Thailand..... 5
Figure 2.2	Dendrogram of the <i>R. galegae</i> strains derived from the combined data of different probe groups..... 8
Figure 2.3	Amplification of (A) the 260 bp <i>noIBT</i> fragments from nodule extracts isolated from plants inoculated with <i>S. fredii</i> or (B) amplification of the 900 bp <i>RSO<math>\alpha</math></i> fragments from nodule extracts isolated from plants inoculated with <i>B. japonicum</i> . .... 9
Figure 2.4	PCR products when primers for <i>RSO<math>\alpha</math></i> and/or <i>noIBT</i> were used for DNA templates derived from <i>B. japonicum</i> or <i>S. fredii</i> . .... 11
Figure 2.5	Synthesis of Nod factors catalysed by enzymes encoded by <i>nodC</i> , <i>nodB</i> and <i>nodA</i> (Stacey, 1995)..... 12
Figure 2.6	Summary of the various chito-oligosaccharides nodulation signals produced by <i>B. japonicum</i> strains USDA110 and USDA135 and <i>B. elkanii</i> strain USDA61..... 12
Figure 2.7	Nod factors structures and their specific substitutions..... 13
Figure 4.1 (a) - (f)	Growth curves of 105 selected bacterial isolates from root nodules of soybean cultivars separately grown in soil samples from 15 subdistricts in Phitsanulok province..... 23
Figure 4.2	Viable plate counts of all the 11 fast-growers and three representatives of slow-growers..... 29
Figure 4.3	Representative colony morphology of (A) fast-growing and (B) slow-growing root nodule bacterial isolates..... 30
Figure 4.4	Colonies of fast-growing bacteria isolates from root nodules of soybeans.... 31
Figure 4.5	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Chart Trakarn

	subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	32
Figure 4.6	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Pa Dang subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	32
Figure 4.7	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Suan Miang subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	33
Figure 4.8	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Bang Rakam subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	33
Figure 4.9	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Pluk Raed subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	34
Figure 4.10	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Pan Sao subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	34
Figure 4.11	Figure 4.11 RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Bung Kok subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	35
Figure 4.12	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Nong Ku-la subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	35
Figure 4.13	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Chum Saeng Songkram subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	36
Figure 4.14	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Pa Bou Thong subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	36

Figure 4.15	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Kui Muang subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	37
Figure 4.16	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Wong Kong subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	37
Figure 4.17	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Ta Look Team subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	38
Figure 4.18	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Wang Won subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was as the primer.....	38
Figure 4.19	RAPD-PCR fingerprints of root nodule bacterial isolates from Dong Pa Kam subdistrict, Phitsanulok Province, when (A) RPO1 or (B) CRL-7 was used as the primer.....	39
Figure 4.20	RAPD-PCR fingerprints of distinct root nodules bacteria with 1 PRO1-PCR product fragment.....	40
Figure 4.21	RAPD-PCR fingerprints of distinct root nodules bacteria with 2 PRO1-PCR product fragments.....	41
Figure 4.22	RAPD-PCR fingerprints of distinct root nodules bacteria with 3 PRO1-PCR product fragments .....	41
Figure 4.23	RAPD-PCR fingerprints of distinct root nodules bacteria with 4 PRO1-PCR product fragments .....	42
Figure 4.24	RAPD-PCR fingerprints of distinct root nodules bacteria with 5 PRO1-PCR product fragments .....	42
Figure 4.25	RAPD-PCR fingerprints of distinct root nodules bacteria with more than 5 PRO1-PCR product fragments .....	43
Figure 4.26	Colony morphology of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> TISTR 507, <i>Xanthomonas campestris</i> TISTR 786, and <i>Proteus vulgaris</i> used in	

	multiplex PCR.....	47
Figure 4.27	PCR products obtained from multiplex PCR reactions.....	49
Figure 5.1	Alignment of sequences of 317 bp fragment obtained from multiplex PCR reactions when primers <i>nodD1F</i> , <i>nodD1R</i> , <i>nodYF</i> , <i>nodYR</i> were used. Template DNA was from fast growing strain D11 and slow- growing strain D345.....	54
Figure 5.2	Alignment of sequence of 657 bp fragment obtained from multiplex PCR reactions when primers <i>nodD1F</i> , <i>nodD1R</i> , <i>nodYF</i> , <i>nodYR</i> were used. Template DNA was from slow- growing strain D345 . Sequences of <i>nodD1</i> and <i>nodY</i> for comparison were downloaded from Genbank.....	57