วราภรณ์ พยัคฆพงษ์ : กลไกการสร้างความสามารถในการแข่งขันของแบรดดีไรโซเบียม (COMPETITION MECHANISMS OF *Bradyrhizobium*) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.นันทกร บุญเกิด, 232 หน้า ISBN 974-533-445-6

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยทางชีวภาพ และกายภาพต่อความสามารถในการแข่งขันการสร้างปมในรากต้นถั่วเหลืองของแบรดดีไรโซเบียม และปรับปรุงสายพันธุ์แบรดดีไรโซเบียมให้มีความสามารถในการทนเกลือได้สูงขึ้นเพื่อเพิ่มคุณสมบัติในการแข่งขัน ณ สภาวะแวดล้อมที่มีปริมาณเกลือสูง ปัจจัยทางชีวภาพที่ทำการศึกษาได้แก่ สายพันธุ์ของถั่วเหลือง สายพันธุ์และจำนวนเซลล์ของแบรดดีไรโซเบียมที่ใช้ ผลการทดลองพบว่าทั้งสามปัจจัยมีผลต่อความสามารถในการแข่งขันการสร้างปมของแบรดดีไรโซเบียม โดยความสามารถในการแข่งขันโดยรวมของแบรดดีไรโซเบียมทั้งสี่สายพันธุ์พบว่า สายพันธุ์ USDA110 มีความสามารถสูงที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์ THA6, SEMIA5019 และ THA5 ตามลำดับ

อิทธิพลของปัจจัยทางกายภาพต่อความสามารถในการแข่งขันการสร้างปมในการศึกษาครั้งนี้คือปัจจัยของเกลือ ขั้นแรกของการศึกษาได้คัดเลือก *Sinorhizobium* สายพันธุ์ BL3 ซึ่งมีความสามารถในการทนเกลือจากบริเวณพื้นที่ที่มีผลกระทบจากเกลือในเขตจังหวัดนครราชสีมา และได้ทำการคัดเลือกยีนส์ที่ควบคุมคุณสมบัติดังกล่าว โดยใช้เทคนิคการคัดเลือกคอสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนส์ที่ควบคุมการทนเกลือ การทำให้ยีนส์นั้นไม่แสดงออกโดยการกลายพันธุ์ และการหาลำดับเบสของยีนส์ คอสมิดที่คัดเลือกออกมาได้ประกอบด้วยกลุ่มของยีนส์จากสองบริเวณของโครโมโซม จากการวิเคราะห์ลำดับเบส และวิเคราะห์หน้าที่ของยีนส์จากความคล้ายคลึงของโปรตีนอื่น ๆ ในฐานข้อมูลพบว่าคอสมิดชุดที่หนึ่ง (pUHR307) ประกอบไปด้วย antirestriction protein, ATPase, xanthine dehydrogenase, transcriptional regulator syrB (AraC family), DNA methylase, partitioning protein และ conserved hypothetical protein คอสมิดชุดที่สอง (pUHR310) มีความคล้ายกับ choline dehydrogenase และ betaine aldehyde dehydrogenase ของ *S. meliloti* จากนั้นนำคอสมิดทั้งสองชุดนี้ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์แบรดดีไรโซเบียมสายพันธุ์ THA6 ซึ่งแบรดดีไรโซเบียมที่ได้ (RUH161 และ RUH162) มีความสามารถในการทนเกลือได้สูงขึ้นกว่า THA6 สายพันธุ์เดิม อย่างไรก็ตามความสามารถที่เพิ่มขึ้นนี้ไม่มีผลช่วยปรับปรุงความสามารถในการแข่งขันการสร้างปม ณ สภาวะที่มีเกลือ

นอกจากนี้ได้ศึกษาถึงการตอบสนองของ *Sinorhizobium* สายพันธุ์ BL3 ต่อสภาวะที่มีเกลือ ในระดับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน โดยเน้นถึงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่แสดงออกที่ผิวเซลล์ จากการวิเคราะห์พบว่าโปรตีนหลายชนิดมีการกระตุ้นหรือลดการแสดงออกในระดับ 1.5 เท่า ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือ และระยะเวลาที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมนั้น กลุ่ม

โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน การสร้างและซ่อมแซมดีเอ็นเอ และกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่านสารที่ทำหน้าที่ควบคุมระดับความเข้มข้นของเซลล์และส่งผ่านไอออนต่าง ๆ เข้าและออกนอกเซลล์ มีการเพิ่มระดับความเข้มข้นขึ้นทั้งการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมอย่างฉับพลันหรือภายหลังระยะปรับตัว ดังนั้นเมมเบรนโปรตีนจึงเป็นส่วนสำคัญส่วนหนึ่งในกลไกการป้องกันตัวเองต่อสภาวะที่มีเกลือสูง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

WARAPORN PAYAKAPONG : COMPETITION MECHANISMS OF *Bradyrhizobium.* THESIS ADVISOR : PROF. NANTAKORN BOONKERD, Ph.D. 232 PP. ISBN 974-533-445-6

COMPETITION/BRADYRHIZOBIUM/SALT TOLERANCE GENE/MEMBRANE PROTEOMIC

The objectives of this experiment were to examine the influences of biotic and abiotic factors on nodulation competitiveness of bradyrhizobia and the construction of salt tolerant bradyrhizobia in order to achieve the highly nodulation competitor under salt stress condition. The emphasized biotic factors are soybean cultivars, bradyrhizobial strains and proportion of inoculation. These biotic factors exhibited the influence on nodulation competitiveness of *Bradyrhizibium*. Bradyrhizobial strain USDA110 had the highest general competitive ability (GCA), followed by THA6, SEMIA5019 and THA5, respectively.

The abiotic factors affecting nodulation competitiveness was emphasized on salt stress. The salt tolerant *Sinorhizobium* strain BL3 was isolated from salt affected area of Nakhon Ratchasima province of Thailand. In order to investigate salt tolerant mechanism, salt tolerant genes were isolated by the cosmid library isolation technique, random mutagenesis, and DNA sequencing. Cosmid clones containing two different regions of LT11 chromosome were identified. The sequence analysis of first region (pUHR307) exhibited the homology with antirestriction protein, ATPase, xanthine dehydrogenase, transcriptional regulator syrB (AraC family), DNA methylase, partitioning protein and conserved hypothetical protein. Second region of clones (pUHR310) showed a relatively high homolog with choline dehydrogenase and

betaine aldehyde dehydrogenase of *S. meliloti*. Recombinant *Bradyrhizobium japonicum* THA6 (RUH161 and RUH 162) was constructed by introducing such salt tolerant cosmids. Salt tolerant ability of RUH161 and RUH162 was elevated over THA6 wild type. However, nodulation competitiveness under salt stress environment was not improved.

The salt stress response of *Sinorhizobium sp.* BL3 was also analyzed at the protein expression level. Determination of membrane protein expression changes under salt stress using quantitative proteomic analysis revealed that several membrane proteins exhibited up- or down regulation by more than 1.5 folds with the level depend upon salt concentration and exposure time. A group of protein relating to energy metabolism, DNA repair and synthesis, and transportation proteins involved in compatible solute and ion transport across membranes were up-regulated in either immediate or late response. Therefore, membrane proteins are most likely play an important role in salt stress response mechanism.

School of Biotechnology

Academic Year 2005

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____