รหัสโครงการ SUT3-302-49-24-20

**รายงานการวิจัย**

# การศึกษาลักษณะ และวิเคราะห์ยีนสำคัญใน PGPR ประสิทธิภาพสูง ที่เกี่ยวข้องต่อการทนทานในสภาวะกดดัน

# (Characterization and analysis of important stress tolerant genes in high efficiency PGPR)

**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก**
**มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี**

**ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว**

รหัสโครงการ SUT3-302-49-24-20

# รายงานการวิจัย

## การศึกษาลักษณะ และวิเคราะห์ยีนสำคัญใน PGPR ประสิทธิภาพสูง ที่เกี่ยวข้องต่อการทนทานในสภาวะกดดัน

## (Characterization and analysis of important stress tolerant genes in high efficiency PGPR)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
ดร. โสภณ วงศ์แก้ว
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย
รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นีลวรรณ พงศ์ศิลป์
ดร. วาริน อินทนา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2550
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว
กุมภาพันธ์ 2556

# กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยการสนับสนุนจาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่งทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

11 กุมภาพันธ์ 2556

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**บทคัดย่อ**

แบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมจัดเป็น PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) อีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถอยู่ร่วมอาศัยแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับพืชตระกูลถั่ว โดยสามารถเข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ เปลี่ยนเป็นปุ๋ยไนโตรเจนให้กับถั่วได้ในที่สุด อย่างไร ก็ตามในสภาพการเพาะปลูกอาจต้องเผชิญกับสภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น ดินกรด ดินเค็ม สภาพแล้ง เป็นต้น ซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อความสามารถในการเข้าสร้างปม และตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วได้ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ มุ่งที่จะศึกษากลไกของแบคทีเรียกลุ่มไรโซเบียมเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด ได้แก่ สภาพที่เป็นกรด และสภาพที่มีเกลือ ได้ทำการเลือกตัวแทนแบคทีเรียในจีนัส *Bradyrhizobium* มาศึกษากลไกการปรับตัวของเชื้อในสภาวะที่เป็นกรด โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อให้ปรับตัวจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เป็นกลางแล้วค่อย ๆ ถ่ายเชื้อสู่อาหารที่มีค่า pH ต่ำลงเรื่อย ๆ (pH 7, pH 5.5 และ pH 4.5 ตามลำดับ) จากนั้นวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องด้วยเทคนิค 2D-gel และ proteomic

ผลการทดลองพบว่า มีโปรตีนที่เกี่ยวข้องอยู่ 29 ชนิด สามารถจำแนกได้ 8 ประเภท และโปรตีน Hypothetical, โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงและการจับเกาะ, และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแปลรหัสถูกสร้างมากกว่าปกติในสภาวะที่เซลล์เจริญในอาหารที่มีค่า pH 4.5 ในขณะที่เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ค่อย ๆ ปรับค่า pH ไปเป็น 4.5 พบว่า โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ในเซลล์ การแปลรหัส การสร้างพลังงาน การควบคุมหน้าที่ต่าง ๆ เมตาบอลิซึมของนิวคลีโอไทด์และนิวคลีโอไซด์ และ Hypothetical ถูกสร้างมากกว่าในสภาวะที่มีค่า pH ที่เป็นกลาง การศึกษาครั้งนี้ทำให้เห็นแนวโน้มที่จะพัฒนาหัวเชื้อโดยใช้เทคนิคดังกล่าวไปใช้ในสภาพจริงได้ ส่วนในสภาวะเครียดที่มีเกลือได้เลือกใช้แบคทีเรียจีนัส *Sinorhizobium* เป็นตัวแทน โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 M และ 0.5 M เป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาการตอบสนองของโปรตีนที่เซลล์เมมเบรน โดยเทคนิค Nano flow liquid Chromatography ร่วมกับ mass spectrometry (LC-MS/MS) ผลการทดลองพบว่า สามารถจำแนกโปรตีนที่เกี่ยวข้องได้ 105 ชนิด จำแนกได้ 17 ประเภท ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน และกลุ่มที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ การใช้เทคนิคดังกล่าวข้างต้นทั้งหมดนี้ สามารถทำให้เข้าใจกลไกของแบคทีเรียที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างดี และมีศักยภาพในการที่จะพัฒนาให้เป็นหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อไป

## Abstract

Rhizobia are one group of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) that can elicit the formation of nitrogen-fixing nodules on the legumes. Environmental conditions usually affect symbiosis between rhizobia and their host. The stress conditions as soil acidity, salinity, draught etc. may adversely affect the survival or growth of rhizobia and symbiosis. Therefore, this study focused on elucidation of rhizobial mechanisms in stress conditions as acidity and salinity. In case of mechanisms in acidity condition, Bradyrhizobia was selected as model. The bacterial cultivation approach was conducted in the manner of adaptive acid tolerance. The inoculum preparation was started at pH 6.8 and then subsequently inoculated into the medium at pH 5.5 and 4.5. The 2D-gel and proteomic analyses were used to investigate the protein regulation. The 29 identified proteins were grouped into 8 categories. Hypothetical protein, transport and binding proteins, and translation proteins were up-regulated at pH 4.5 (non-adaptive). While up-regulated proteins found during growth at pH 4.5 (adaptive) consisted of proteins in cellular processes, translation, energy metabolism, regulatory functions, interconversions and salvage of nucleosides and nucleotides, and hypothetical proteins. These results suggested that the use of adaptive response in acid condition could provide an improvement in the inoculant production. For salt stress tolerant mechanism, *Sinorhizabium* was selected. The cell cultivation in salt conditions were 0.4 M, 0.5M of NaCl for 1 and 6 h. The protein contents of membrane were analyzed by nanoflow liquid chromatography interfaced with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LS-MS/MS). A lot all 105 membrane proteins were identified. These proteins could be classified into 17 functional categories, the two biggest of which were energy production and conversion, and unknown proteins. These techniques would be useful for further comparative analysis of bacterial mechanisms against stress conditions in environment.

# สารบัญ


| | | หน้า |
|---|---|---|
| บทคัดย่อ (ภาษาไทย) | | ก |
| บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) | | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | | ค |
| สารบัญ | | ง |
| บทที่ 1 | บทนำ | |
| | 1.1 ความสำคัญของปัญหา | 1 |
| | 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย | 1 |
| | 1.3 ขอบเขตของการวิจัย | 2 |
| | 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| บทที่ 2 | ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| บทที่ 3 | วิธีการดำเนินการวิจัย | 6 |
| บทที่ 4 | ผลการศึกษาวิจัย | 7 |
| บทที่ 5 | สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง | 8 |
| บรรณานุกรม | | 10 |
| ภาคผนวก | | 11 |
| ประวัตินักวิจัย | | |


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญของปัญหา

ไรโซเบียมจัดเป็น PGPR อีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญต่อระบบการเกษตร โดยเฉพาะการนำมาซึ่งธาตุอาหารไนโตรเจนให้กับพืช โดยผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (Biological Nitrogen Fixation = BNF) ให้กับพืชตระกูลถั่ว อย่างไรก็ตามสภาวะเครียดในดิน เช่น ค่า pH อุณหภูมิ และความเค็ม เป็นปัจจัยสำคัญที่ลดประสิทธิภาพของการสร้างปุ๋ยไนโตรเจนให้กับพืชได้

เมื่อทำการปล่อยหัวเชื้อที่คัดเลือกแล้วลงสู่ระบบการเพาะปลูก ปัญหาที่มักพบว่าประสิทธิภาพของเชื้อที่คัดเลือกได้ไม่เป็นไปตามเป้าหมาย ซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่จะเกิดมาจากปัจจัยหลัก 2 ประการ คือ เกิดการแข่งขันกับจุลินทรีย์ดั้งเดิมในดิน (indigenous microbes) และหัวเชื้อไม่สามารถปรับตัวเข้ากับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมได้ เช่น ความแล้ง ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และธาตุอาหารที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น อย่างไรก็ตามในชุดโครงการนี้ ได้ทำการคัดเลือกกลุ่ม PGPR ที่มีลักษณะทนทานต่อสภาวะกดดันดังกล่าวเพิ่มเติมไว้ด้วย โดยได้ทำการเลือกแบคทีเรียในกลุ่มไรโซเบียมมาทำการศึกษากลไกการตอบสนองของโปรตีน และยีนเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะที่มีความเป็นกรด และเค็ม ประกอบกับเทคนิคการเลี้ยงเชื้อในลักษณะที่เป็น Adaptive Tolerance จะสามารถทำให้เชื้อค่อย ๆ ปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้หรือไม่ และมีการควบคุมการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องอย่างไร ซึ่งจะทำให้ทราบแนวทางในการจัดการและการปรับปรุงสายพันธุ์ของหัวเชื้อได้อย่างเหมาะสมต่อไปในอนาคตสำหรับระบบการเกษตรที่มีสภาวะเครียดดังกล่าวข้างต้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อทราบชนิดของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนทานในสภาวะกดดันต่าง ๆ ของเชื้อ PGPR

1.2.2 เพื่อยืนยันหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนทานในสภาวะกดดันต่าง ๆ ของเชื้อ PGPR

1.2.3 เพื่อทราบผลกระทบต่อชนิดของยีนที่ควบคุมลักษณะที่เป็นประโยชน์ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย Rhizobium

1.2.4 เพื่อให้ได้องค์ความรู้พื้นฐานด้านอณูพันธุศาสตร์ เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์ในอนาคต

**1.3 ขอบเขตของการวิจัย**

ทำการศึกษากลไกการสร้างโปรตีนในแบคทีเรียในกลุ่มไรโซเบียม เมื่อทำการเพราะเลี้ยงในสภาวะเครียดที่มีความเป็นกรด และเกลือ โดยใช้เบคทีเรียในจีนัส *Bradyrhizobium* และ *Sinorhizobium* เป็นตัวแทนในการศึกษาตามลำดับ

การวิเคราะห์กลไกการสร้างโปรตีนใช้เทคนิคในด้าน Mass spectrometry เป็นหลัก LC-MS/MS และ MALDI-TOF MS

**1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1.4.1 ได้ข้อมูลและชนิดของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนทานในสภาวะกดดันต่าง ๆ ของเชื้อ PGPR

1.4.2 ได้องค์ความรู้พื้นฐานด้านอณูพันธุศาสตร์ เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์ในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 2
# ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ได้มีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการทนทานสภาวะกดดันในจุลินทรีย์ดินค่อนข้างมาก โดยเฉพาะกลุ่มไรโซเบียม ดังตัวอย่างเช่น van Dillewijn ในปี 2001 พบว่า putA gene ซึ่งควบคุมการสร้าง praline dehydrogenase ที่ควบคุมการ oxidative praline ไปเป็น glutamate มีผลต่อการทนเกลือใน *Sinorhizobium meliloti* การค้นพบกลุ่มยีน MCP ที่มีผลต่อการตอบสนองต่อการเข้าอาศัยในรากพืชของ R. leguminosarum VF39 (Hynes, 2002) หรือยีนที่ควบคุมการทนกรดใน *S. meliloti* ได้แก่ actS, actR, phrR และ lpiA ยีน แต่ยังไม่ทราบระบบการควบคุมแน่ชัด (Dilworth, 2001) หรือแม้แต่ยีนที่ควบคุมการสร้าง lipopolysaccharide (LPS) ใน *R. etli* มีผลต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรครากเน่าในมันฝรั่งด้วย (Reitz และคณะ, 2000) นอกจากนี้ ยีนที่ควบคุมการสร้าง flagella ใน PGPR กลุ่ม Azospirillum ก็พบว่ามีความสำคัญต่อ root colonization (Broek และคณะ, 1998) อย่างไรก็ตาม ถ้าทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ค่อย ๆ ปรับตัวเข้าสู่สภาวะที่เป็นกรด (Adaptive Acid Tolerant Response : ATR) สามารถทำให้ไรโซเบียมบางจีนัส เช่น *Rhizobium Mesorhizobium* มีความสามารถในการทนกรดได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังขาดการศึกษาในกลุ่มจีนัส *Bradyrhizobium japonicum* ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้กับถั่วเหลือง ดังนั้น การปรับตัวในลักษณะดังกล่าวจะได้ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้

ในสภาวะดินเค็มทำให้จำนวนเซลล์ของไรโซเบียมที่เข้าอาศัยกับพืชตระกูลถั่วมีจำนวนลดลง โดยพบว่า membrane protein เป็นส่วนสำคัญที่มีบทบาทในการรักษาปริมาตรของน้ำในเซลล์ รวมไปถึงสมดุลของอิออนภายในเซลล์ ทำให้ไรโซเบียมบางสปีชีส์มีความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะดินเค็มได้ ตัวอย่างของ membrane protein ของไรโซเบียมที่ตอบสนองต่อสภาวะดินเค็ม ได้แก่ glucine betaine/proline betaine transporter (สร้างขึ้นจากยีน *bet* S), potassium uptake system protein (สร้างจากยีน *kup*) และ outer membrane lipopertein (สร้างจากยีน *omp*10) นอกจากนี้ ยังได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งระบบใน *Sinorhizobium meliloti* โดยวิธีการทาง transcriptome พบว่ามีชุดยีน 15 ชุด ที่เกี่ยวข้องกับการนำอิออนเข้าสู่เซลล์, 14 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเข้าสู่เซลล์ เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเหล่านี้จะสมบูรณ์ได้ต้องมีข้อมูลการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องประกอบด้วย โดยเฉพาะเทคนิคด้าน proteomic เพราะการแสดงออกของยีนบางครั้งไม่ได้สะท้อนถึงการสร้างโปรตีนนั้น ๆ เสมอไป ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษา membrane protein ของ *Sinorhizobium* sp. Strain BL3 ภายใต้สภาวะเค็ม โดยใช้เทคนิค Nanoflow liquid chromatography/trandem mass spectrometry (nLC-

MS/MS) ในการจำแนกโปรตีน (รายละเอียดดังปรากฏในผลงานตีพิมพ์แนบท้ายภาคผนวก : Waraporn, T., et.al., 2010)

# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินการวิจัย

## 3.1 การศึกษากลไกการทนสภาวะเครียดที่เป็นกรดของไรโซเบียม

3.1.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Bradyrhizobium* sp. DASA 1007 (ทนกรด) และ *B. japonicum* USDA 110 ซึ่งเป็นหัวเชื้อทางการค้า

3.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นกรด ทำ 2 ลักษณะ ได้แก่ การปลูกพืชโดยตรงลงในอาหารที่มีค่า pH 6.8, 5.5 และ 4.5 กับแบบที่เรียกว่า Adaptive Acid Tolerance Response (ATR) โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่า pH เป็นกลาง (6.8) เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นปลูกเชื้อลงในอาหารที่มีค่า pH 5.5 เป็นเวลา 4 วัน แล้วจึงปลูกเชื้อลงในอาหารที่มีค่า pH 4.5 จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงทั้ง 2 ลักษณะไปปลูกกับถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 เพื่อตรวจสอยประสิทธิภาพของเชื้อ ณ ค่า pH ต่าง ๆ

3.1.3 ทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2D-gel และจำแนกโปรตีนโดยเทคนิค LC-MS/MS

## 3.2 การศึกษากลไกการทนสภาวะเครียดที่เป็นเกลือของไรโซเบียม

3.2.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Sinorhizobium* sp. BL3

3.2.2 การสกัด membrane fraction ทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารขนาด 1 ลิตร ทำให้เซลล์แตกด้วย French press แยก fraction ด้วย Ultracentrifuge ละลายใน 9 M Urea และ Trypsin จากนั้นทำการแยก peptide โดย SCX

3.2.3 การทำ peptide mass finger printing (PMF) ใช้วิธี matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

3.2.4 การจำแนกชนิด peptide โดย nanoflow loquid chromatography ทำโดยใช้ automated nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry ข้อมูลดิบนำมาวิเคราะห์โดยใช้ fast de-convolution algorithm ในฐานข้อมูล protein Lynx Server V.2.0.5 ร่วมกับการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของโปรตีนของเชื้อ *S. meliloti* 1021 ที่ http:gehome.kazusa.or.jp/rhizobase/sinorhizobium/genes.faa

(รายละเอียดเพิ่มเติมในบทความวิจัย 2 ฉบับ ตามแนบในภาคผนวก)

# บทที่ 4
# ผลการศึกษาวิจัย

ผลการศึกษาวิจัยโดยละเอียดได้แสดงไว้ในผลงานวิจัยตีพิมพ์ จำนวน 2 เรื่อง ดังนี้

1. Tanthanuch, W., Tittabutr, P., Mohammed, S., Matthisen, R., Yamabhai, M., Manassila, M., Jensen, O. N., Boonkerd, N. and Teaumroong, N. (2010). Identify of salt-tolerant Sinorhizobium sp. Strain BL3 membrane proteins based on proteomics. Microbes Environ. 25(4): published onlined doi:10.1264/jsme2. ME09185.
2. Monchai Manassila, Achara Nuntagij, Panlada Tittabutr, Nantakorn Boonkerd, Neung Teaumroong. (2012). Growth, symbiotic, and proteomics studies of soybean Bradyrhizobium in response to adaptive acid tolerance. African Journal of Biotechnology. Vol. 11(83) : 14899-14910.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 5
# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

## 5.1 การศึกษากลไกการทนต่อสภาวะเครียดที่เป็นกรดของไรโซเบียม

ในลำดับแรกได้ทำการศึกษาการเจริญของเชื้อ และประสิทธิภาพของเชื้อกับถั่วเหลืองภายใต้สภาวะที่เป็นกรด พบว่าไรโซเบียมมีการเจริญลดลงในสภาวะที่เป็นกรด และไม่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีค่า pH เป็น 4.5 ในขณะที่ *Bradyrhizobium sp.* DASA 01007 ส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองได้ดีกว่าเชื้อที่ใช้เป็นการค้า (*B. japonicum* USDA 110) ที่ค่า pH 4.5 ดังนั้น จึงเลือกใช้สายพันธุ์ DASA 01007 ในการทดลองต่อไป

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง DASA 01007 ในสภาวะที่เป็นกรด พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงแบบ ATR สามารถส่งเสริมการเจริญของ DASA 01007 ที่ pH 4.5 ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงปกติ จากนั้น จึงทำการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ pH 4.5 ทั้งสองแบบ พบว่ามีโปรตีนที่เกี่ยวข้อ 29 ชนิด สามารถแบ่งได้ 8 กลุ่ม ได้แก่ 1) cellular process 2) conserved hypothetical 3) transport และ binding 4) translation 5) energy metabolism 6) regulatory function 7) interconversion และ salvage nucleoside และ nucleotide และ 8) อื่น ๆ

โดยโปรตีนที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้น (up-regulate) ในสภาวะ ATR ที่ pH 4.5 ได้แก่ โปรตีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับ cellular process เช่น chaperonin, conserved hypothetical, translation เช่น 30S ribosomal protein, energy metabolism เช่น ATP synthase, Regulatory function เช่น Two-component response regulator และ nucleoside diphosphate kinase จะเห็นได้ว่ากลุ่มโปรตีนเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับสภาวะเครียดโดยเฉพาะที่เป็นกรด ดังเช่น Chaperonin ถูกสร้างขึ้นในปริมาณค่อนข้างมาก ซึ่งหน้าที่ของโปรตีนจะเกี่ยวข้องกับการปรับปรุงแก้ไข การจับตัวของโมเลกุลของโปรตีน เช่น เอนไซม์ไนโตรจีเนส, 30S ribosomal protein หรือโปรตีน L7/L12 เป็นกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็น translation factor ในการสร้างโปรตีน, peroxiredoxin ก็เป็นอีกชนิดหนึ่งของโปรตีนที่มีบทบาทเป็น antioxidant ดังนั้น การใช้เทคนิค ATR ประกอบกับความเข้าใจในเรื่องของกลไกของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในสภาวะเครียดที่เป็นกรด ก็จะสามารถนำไปพัฒนาให้เป็นหัวเชื้อที่เหมาะสมในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดได้ต่อไป

## 5.2 การศึกษากลไกการทนต่อสภาวะเครียดที่เป็นเกลือของไรโซเบียม

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง Sinorhizobium sp BL3 ซึ่งพบว่าเป็นไรโซเบียมที่มีความสามารถทนต่อสภาวะเกลือในปริมาณสูงถึง 600 mM (NaCl) มาทดสอบว่า membrane protein มีกลไกการตอบสนองต่อสภาวะเกลืออย่างไร โดยใช้เทคนิค amine-reactive stable isotope labeling

reagent (Lys-Tag) ร่วมกับ off-line strong cationic microcolumns (SCX) และ nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry (γ LC-MS/MS) พบว่ามี spectra อยู่ 12,685 spectra เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทั้ง 3 แบบ ได้แก่ TopPred II, TMHMM 2.0 และ SPOCTOPUS พบว่ามีโปรตีนที่เป็น transmembrane protein อยู่ 105 ชนิด เมื่อนำมาจำแนกสามารถจำแนกได้ 17 กลุ่ม ในกลุ่มที่พบมากที่สุดเป็นกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับ การสร้างพลังงาน ซึ่งเกี่ยวกับกระบวนการขนถ่ายอิเล็กตรอน นอกจากนี้ ยังพบโปรตีนกลุ่มอื่น ๆ เช่น กลุ่มโปรตีนลำเลียงกรดอะมิโน ได้แก่ ABC Transporter/permease, glycine betaine transporter, L-amino acid transport permease รวมไปถึงกลุ่ม protease ซึ่งมีความสำคัญต่อโครงข่ายการควบคุมกระบวนการเมทาบลิซึมของแบคทีเรียเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด

นอกจากนั้น เมื่อทำการวิเคราะห์ membrane protein ของ BL3 ในสภาวะ 0.4 M (NaCl) 0.5 M (NaCl) เป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง พบว่ามี membrane protein 8 ชนิดที่ถูกสร้างขึ้นในสภาวะดังกล่าว เช่น ATP synthase subunit B, peptidoglycan-associated lipoprotein precursor เป็นต้น จะเห็นได้ว่าเทคนิคดังกล่าวนี้ เหมาะที่จะพัฒนานำไปใช้ในการศึกษาทำความเข้าใจหน้าที่ของ membrane protein รวมไปถึงกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องของเชื้อในสภาวะเครียดต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บรรณานุกรม


Dillewijn, van P., Soto, M. J., Villadas, P. J. and Toro, N. (2001). Construction and environmental release of Sinorhizobium meliloti strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation. Applied and Environmental Microbiology 67, 3860-3865.

Dilworth, M. J., Ruve, W. G., Tiwari, R. P., Vicas-Marfisi, A. I., Fenner, B. J. and Glenn, A. R. (2001). Understanding acid tolerance in root nodule bacteria. 13th International Congress on Nitrogen Fixation, Hamilton, Ontario, Canada, July 2001.

Hynes, M. F., Yost, C. K., Oresnik, I. J., Garcia de los Santos, A., Clark, S. R. D. And Macintosh, J. E. (2002). Catabolic and chemoreceptor genes and their role in rhizobial ecology. 13th International Congress on Nitrogen Fixation, Hamilton, Ontario, Canada, July 2001.

Reitz, M., Rudolph, K., Schroder, I., Hoffmann-Hergarten, S., Hallmann, J. and Sikora, R. A. (2002). Lopopolysaccharide of Rhizobium etli strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode Globodera pallida. Applied and Environmental Microbiology 66, 3515-3518.

Tanthanuch, W., Tittabutr, P., Mohammed, S., Matthisen, R., Yamabhai, M., Manassila, M., Jensen, O. N., Boonkerd, N. and Teaumroong, N. (2010). Identify of salt-tolerant Sinorhizobium sp. Strain BL3 membrane proteins based on proteomics. Microbes Environ. 25(4): published onlined doi:10.1264/jsme2. ME09185.

Monchai Manassila, Achara Nuntagij, Panlada Tittabutr, Nantakorn Boonkerd, Neung Teaumroong. (2012). Growth, symbiotic, and proteomics studies of soybean Bradyrhizobium in response to adaptive acid tolerance. African Journal of Biotechnology. Vol. 11(83) : 14899-14910.