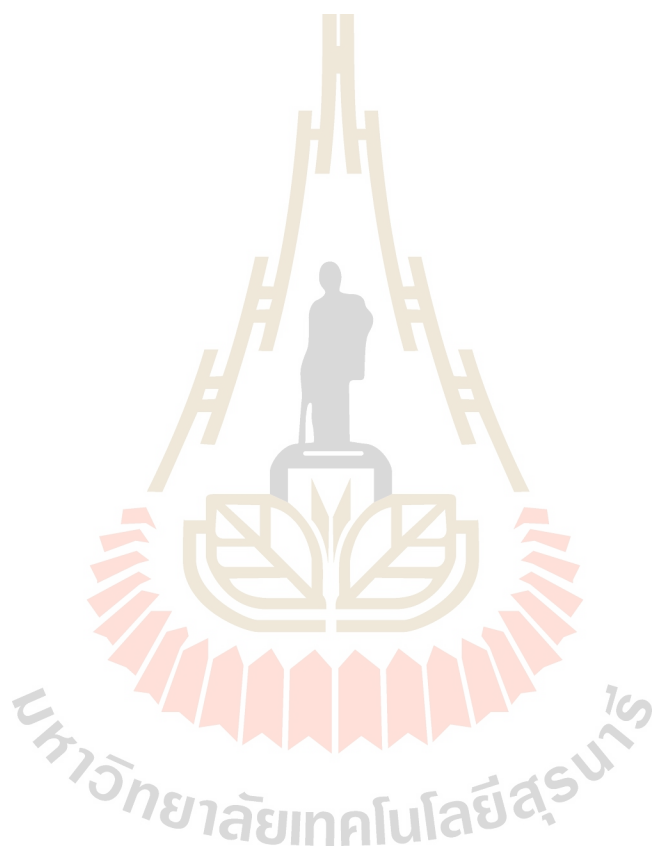


ผ่องพรรณ ทรงวัฒนา : การวิเคราะห์หน้าที่ของยีน *nod* และระบบ Type 3 secretion ใน *Bradyrhizobium* สายพันธุ์ DOA9 ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว (FUNCTIONAL ANALYSES OF NOD GENES AND TYPE 3 SECRETION SYSTEMS IN *BRADYRHIZOBIUM* SP. DOA9 INVOLVED IN LEGUME NODULATION)  
อาจารย์ที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 81 หน้า.

แบคทีเรีย *Bradyrhizobium* sp. DOA9 ที่แยกได้จากปมรากของพืชตระกูลถั่ว *Aeschynomene americana* นำไปทดสอบการสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนกับพืชตระกูลถั่ว ในวงศ์ Palbergioids Millitioid และ Genistioids พบว่าสามารถสร้างปม และตรึงไนโตรเจนได้ทั้งหมด เมื่อทำการวิเคราะห์ชุดยีนที่ควบคุมการสร้างปม (*nod*) โดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization พบว่า DOA9 มีพลาสมิดขนาดใหญ่ 736,085 bp ที่มีชุดยีนควบคุมการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน และกัน โดยมียีน *nodA* จำนวน 2 ยีนที่แตกต่างกัน (*nodA<sub>1</sub>* และ *nodA<sub>2</sub>*) และยีนเดี่ยวของยีน *nodB* *nodC* และ *nifH* และยังพบว่า *nifH* อีกหนึ่งชุดยีนอยู่บนโครโมโซมอีกด้วย ยีน *nodA<sub>1</sub>* พบในบริเวณใกล้เคียงกับยีน *nodBC* ส่วนยีน *nodA<sub>2</sub>* พบที่ด้านหน้าของยีน *nodIJ* สายพันธุ์กลายของยีน *nodA<sub>2</sub>* พบว่าสูญเสียความสามารถในการชักนำให้เกิดปมในทุกพืชที่ใช้ทดสอบอย่างสิ้นเชิง โดยลักษณะที่แสดงออกดังกล่าว มีลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อสายพันธุ์กลายของยีน *nodB* ในทางตรงกันข้าม เมื่อทำให้ *nodA<sub>1</sub>* กลายพันธุ์ พบว่ามีผลต่อลักษณะที่แสดงออกแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชเจ้าบ้าน กลุ่มแรก สายพันธุ์กลายของยีน *nodA<sub>1</sub>* ไม่ส่งผลกระทบต่อ การสร้างปมกับถั่ว *Aeschynomene* (*A. americana* *A. afraspera*) *Indigofera tinctoria* และ *Desmodium tortuosum* กลุ่มที่สอง พบว่าลดความสามารถการสร้างปมกับถั่ว *Arachis hypogaea* cv. Thai Nan *Macroptilium atropurpureum* และ *Stylosanthes hamata* และเมื่อนำสายพันธุ์กลายมาเติมเต็มด้วยยีน *nodA1* (pMG103-*nodA1*) พบว่า สามารถคืนประสิทธิภาพการสร้างปมกับ *M. atropurpureum* และ *S. hamata* ได้ ผลเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่ายีน *nodA<sub>1</sub>* และ *nodA<sub>2</sub>* ทำหน้าที่แตกต่างกัน และอาจส่งในการเพิ่มความหลากหลายของ nod-factors acyl chain ซึ่งอาจทำให้เกิดความหลากหลายในการเข้าอาศัยในพืชให้มากขึ้น

สายพันธุ์กลายของระบบ Type 3 secretion ( $\Delta$ *rhcN*) ส่งผลกระทบต่อ การสร้างปม ในถั่วต่าง ๆ ยกเว้นการสร้างปมกับถั่ว *Vigna radiata* cv. SUT4 และ *Crotalaria juncea* โดยพบว่ามีจำนวน และลักษณะปมดีขึ้นจากสายพันธุ์กลาย  $\Delta$ *rhcN* ผลทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่า การที่ DOA9 มียีน

*nodA 2* ชุด ที่แตกต่างกัน สนับสนุนให้แบคทีเรียสามารถเข้าสร้างปมกับพืชอาศัยที่หลากหลาย ในขณะที่ T3SS อาจกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืชอาศัย โดยขึ้นกับสายพันธุ์ของพืชนั้นๆ



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนักศึกษา \_\_\_\_\_  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา \_\_\_\_\_  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม \_\_\_\_\_  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม \_\_\_\_\_

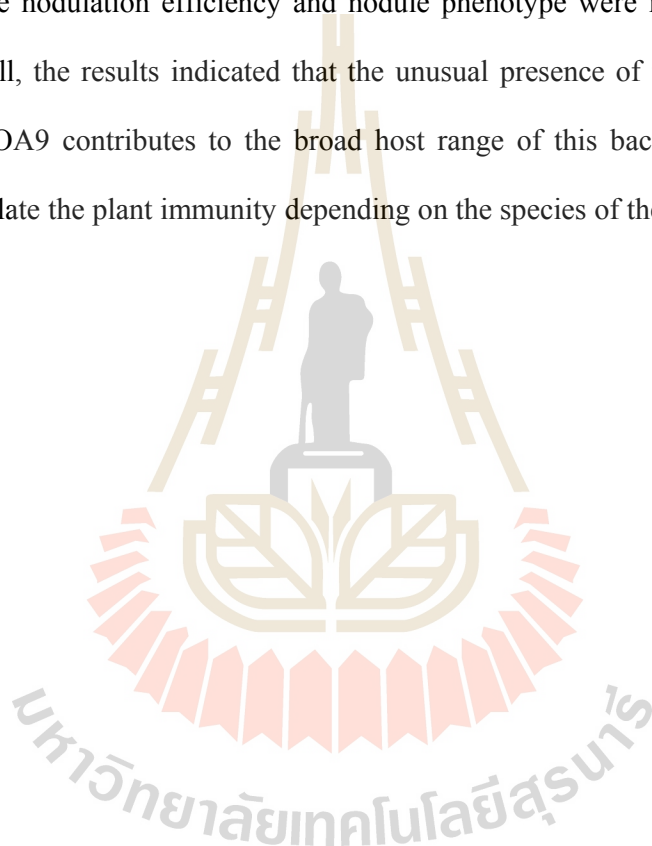
PONGPAN SONGWATTANA : FUNCTIONAL ANALYSES OF NOD  
GENES AND TYPE 3 SECRETION SYSTEMS IN *BRADYRHIZOBIUM* SP.  
DOA9 INVOLVED IN LEGUME NODULATION. THESIS ADVISOR :  
PROF. NEUNG TEAUMROONG, Dr.rer.nat. 81 PP.

#### NODULATION/NOD GENES/TYPE 3 SECRETION SYSTEM

The *Bradyrhizobium* sp. DOA9 was originally isolated from the root nodules of the *Aeschynomene americana*, which is able to induce nitrogen-fixing nodules on legumes belonging to Dalbergioid, Millettioid and Genistioids tribes. In order to analyze the symbiotic genes in DOA9, Southern blot hybridization was employed. The unique property of DOA9 DNA was observed. DOA9 contains megaplasmid (736,085-bp) which comprises two different copies of *nodA* genes (*nodA<sub>1</sub>* and *nodA<sub>2</sub>*), a single of *nodB* and *nodC* genes, and a single copy of *nifH*. Another one copy of *nifH* was found on the chromosome. *NodA<sub>1</sub>* is found at the vicinity of the *nodBC* genes, and *nodA<sub>2</sub>* was found just upstream the *nodIJ* genes. Mutation in *nodA<sub>2</sub>* gene completely lost the ability to induce nodulation in all plants tested. These phenotypes were also observed in *nodB* mutant strain. In contrast, mutation in *nodA<sub>1</sub>* led to distinct phenotypes according to the host plant species. Firstly, no effect of the *nodA<sub>1</sub>* mutation on nodulations of *Aeschynomene* (*A. americana* and *A. afraspera*), *Indigofera tinctoria* and *Desmodium tortuosum* was found. Secondly, *nodA<sub>1</sub>* mutation drastically decreased the ability to form nodules on *Arachis hypogaea* cv. Thai Nan, *Macroptilium atropurpureum* and *Stylosanthes hamata*. The complementation of *nodA<sub>1</sub>* strain (pMG103-nodA1) was able to restore the nodulation ability in *M.*

*atropurpureum* and *S. hamata* inoculation. These results implied that the divergent *nodA*<sub>1</sub> and *nodA*<sub>2</sub> were likely to expand the diversity of Nod-factor acyl chains, and might broaden the host range of the DOA9.

The Type 3 secretion system (T3SS) mutation ( $\Delta rhcN$ ) slightly affected the nodule formation except for those nodulating *Vigna radiata* cv. SUT4 and *Crotalaria juncea*. The nodulation efficiency and nodule phenotype were improved by  $\Delta rhcN$  strain. In all, the results indicated that the unusual presence of two divergent *nodA* genes in DOA9 contributes to the broad host range of this bacterium, while T3SS might stimulate the plant immunity depending on the species of the plant.



School of Biotechnology

Academic Year 2016

Student's Signature \_\_\_\_\_

Advisor's Signature \_\_\_\_\_

Co-advisor's Signature \_\_\_\_\_

Co-advisor's Signature \_\_\_\_\_