เจนจิรา วงษ์ดี : การศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ และการควบคุม การทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่อยู่บนโครโมโซม และพลาสมิดของเชื้อแบรดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DOA9 (CHARACTERIZATION OF GENES INVOLVED IN NITROGENASE SYNTHESIS AND REGULATION LOCATED ON BOTH CHROMOSOME AND PLASMID OF *Bradyrhizobium* sp. DOA9)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร, 141 หน้า.

เชื้อแบรดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DOA9 ประกอบด้วยดีเอ็นเอจำนวน 2 ชุด คือ โครโมโซม และเมกะพลาสมิดอย่างละ 1 ชุด การวิเคราะห์ลำดับเบสแสดงให้เห็นว่า เชื้อชนิดนี้มียีนที่ใช้ในการสังเคราะห์โครงสร้างหลักของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ทั้งบนโครโมโซม (*nifDKc*) และบนเมกะพลาสมิด (*nifDKp*) อย่างละ 1 ชุด และพบยีนที่ใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่บนโครโมโซม (*nifAc*) และบนเมกะพลาสมิด (*nifAp*) อย่างละ 1 ชุด เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบยีน *nifV* ที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ homocitrate synthase จึงสันนิษฐานได้ว่าเชื้อ DOA9 สามารถตรึงไนโตรเจนเมื่อเจริญในสภาวะแบบอิสระได้ ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบบทบาทหน้าที่ของยีนต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในเชื้อ DOA9 ภายใต้สภาวะการเจริญแบบพึ่งพาอาศัยกับพืช และแบบอิสระ ทั้งนี้การทดลองเพื่อติดตามการแสดงออกของยีนโดยใช้ *gusA* เป็นยีนเครื่องหมาย พบว่าทั้ง *nifDKc* และ *nifDKp* มีการแสดงออกเมื่อเจริญในสภาวะพึ่งพาอาศัยกับพืช แต่เมื่อเจริญในสภาวะแบบอิสระพบว่ายีน *nifDKc* มีการแสดงออกที่สูงกว่า และเมื่อทำการกลายพันธุ์เชื้อ DOA9 (Δ*nifDKc* หรือ Δ*nifDKp*) แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนพบว่า ยีนทั้งสองทำงานร่วมกันเมื่อเจริญภายใต้สภาวะพึ่งพาอาศัยกับพืช *Aeschynomene americana* แต่พบว่ายีน *nifDKc* ทำหน้าที่หลักในการตรึงไนโตรเจนเมื่อเจริญแบบอิสระ อย่างไรก็ตามพบว่าการทำงานของ NifDKp ต้องการเอนไซม์ที่ได้จากการแสดงออกของยีน *nifENX* ซึ่งถูกถอดรหัสแบบต่อเนื่องในชุดยีนเดียวกันกับ *nifDKc* สำหรับบทบาทของยีน *nifA* ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน ผลจากการตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนของ NifAc และ NifAp พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันเพียงร้อยละ 53 ซึ่งเกิดจากการที่โครงสร้างโปรตีนของ NifAp ไม่มีส่วนของ N-terminal domain และเมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนทั้งสอง พบว่ายีนทั้งสองมีการแสดงออก โดยยีน *nifAp* มีการแสดงออกมากกว่ายีน *nifAc* เมื่อเจริญภายใต้สภาวะพึ่งพาอาศัยกับพืช *A. americana* อย่างไรก็ตาม พบว่าภายใต้สภาวะนี้ ยีน *nifAc* และ *nifAp* สามารถทำงานทดแทนกันได้ แต่กลับ

พบว่ามีเพียง *nifAc* ที่จำเป็นต่อการตรึงไนโตรเจนของเชื้อภายใต้สภาวะการเจริญแบบอิสระ และเมื่อทดสอบเชื้อกลายพันธุ์ของ DOA9 ที่ปราศจากทั้งยีน *nifAc* และ *nifAp* (Ω*nifAc*::Δ*nifAp*) ช่วยยืนยันถึงความสำคัญของ NifA ในการควบคุมยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน อย่างไรก็ตามในสภาวะการเจริญแบบอิสระพบว่า มีเพียงยีน *nifAc* เท่านั้น ที่สามารถทดแทนการทำงานในเชื้อกลายพันธุ์ Δ*nifAc* ได้ ในขณะที่การใช้ยีน *nifAp* และยีน *nifA* hybrid ที่สร้างจากการนำส่วน N-terminal domain ของ *nifAc* เชื่อมต่อกับส่วนกลาง และส่วน C-terminal domain ของ *nifAp* ไม่สามารถช่วยให้เชื้อกลายพันธุ์ Δ*nifAc* กลับมามีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนได้ สำหรับการตรวจสอบบทบาทของ *nifA* ในการควบคุมการแสดงออกของยีนอื่น ๆ โดยใช้วิธี qRT-PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจในเชื้อ DOA9 ดั้งเดิม เชื้อกลายพันธุ์ Δ*nifAc* และเชื้อกลายพันธุ์ Δ*nifAp* ในสภาวะการเจริญแบบอิสระพบว่า NifAc ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนที่มีตำแหน่งอยู่ทั้งบนโครโมโซม และเมกะพลาสมิด ในขณะที่ทั้ง NifAc และ NifAp สามารถข้ามไปควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนที่มีตำแหน่งอยู่ทั้งบนโครโมโซม หรือบนเมกะพลาสมิดได้ภายใต้สภาวะพึ่งพาอาศัยกับพืช และเมื่อตรวจสอบการทำงานของยีน *nifV* โดยการสร้างเชื้อกลายพันธุ์ของยีนนี้ คือ Ω*nifV* และ Δ*nifV* แล้วทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะการเจริญแบบอิสระ พบว่าเชื้อกลายพันธุ์มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อดั้งเดิม และเนื่องจาก *nifV* มีความสำคัญในการสร้างสารโฮโมซิเทรต จึงได้ทดสอบเติมสารโฮโมซิเทรตลงไปในอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อกลายพันธุ์นี้ ซึ่งพบว่าสามารถทำให้เชื้อกลายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะการเจริญแบบอิสระได้ดังเดิม และเมื่อทดสอบในสภาวะพึ่งพาอาศัยกับพืช พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในพืชอาศัยที่ใช้ทดสอบส่วนใหญ่ แต่เมื่อทดสอบกับพืช *Indigoferra tinctoria* และ *Stylosanthes hamata* พบว่าปมที่ถูกสร้างโดยเชื้อกลายพันธุ์นี้มีการตายของแบคทีรอยด์มากกว่าเมื่อเทียบกับปมที่ถูกสร้างโดยเชื้อ DOA9 ดั้งเดิมซึ่งพบแบคทีรอยด์ที่ยังมีชีวิต ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการขาดยีน *nifV* ส่งผลให้ปมเข้าสู่ระยะเสื่อมสภาพเร็วขึ้นกว่าปกติ ทั้งนี้ความรู้ที่ได้จากงานในวิทยานิพนธ์นี้สามารถนำมาปรับปรุงการใช้ปุ๋ยชีวภาพให้มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นได้เมื่อนำไปใช้ในการเกษตร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

JENJIRA WONGDEE : CHARACTERIZATION OF GENES INVOLVED IN NITROGENASE SYNTHESIS AND REGULATION LOCATED ON BOTH CHROMOSOME AND PLASMID OF *BRADYRHIZOBIUM* sp. DOA9. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PANLADA TITTABUTR, Ph.D., 141 PP.

nifDK/*nifA*/*nifV*/ NITROGEN FIXATION/SYMBIOSIS/FREE-LIVING STATE

Bradyrhizobium sp. DOA9 contained 2 replicons of a chromosome and mega-plasmid. Genome analysis of DOA9 indicated that both chromosome (c) and mega-plasmid (p) harbor a set of nitrogenase structural genes named *nifDKc* and *nifDKp*, respectively. Similarly, a *nifA* regulatory gene was also found in one copy on both chromosome (*nifAc*) and mega-plasmid (*nifAp*). DOA9 also contained a *nifV* gene encoded homocitrate synthase suggesting that DOA9 may be able to fix nitrogen under free-living condition. Thus, this thesis aimed at investigating the role of these genes on the nitrogen fixing ability of DOA9 under symbiotic and free-living states. Transcriptional analysis using *gusA* reporter strains showed that both *nifDKc* and *nifDKp* were highly expressed under symbiosis, where *nifDKc* expressed more predominantly under the free-living condition. The gene mutation indicated that both *nifDKc* and *nifDKp* are required for fully function of nitrogenase activity during symbiosis with the host plant *Aeschynomene americana*, while, *nifDKc* was the major contributor for nitrogenase activity during the free-living state. However, the function of NifDKp required the product of *nifENX* genes which are co-transcribed from the *nifDKc* operon. In the case of NifAc and NifAp, both showed only 53% similarity in the amino acid sequence due to the lack of the N-terminal domain in NifAp. Under the symbiosis condition, both *nifAc* and *nifAp* genes expressed where *nifAp* expressed slightly higher than *nifAc*. NifAc and NifAp could replace each other for symbiotic

nitrogen fixing ability. However, only NifAc contributed to a free-living nitrogen fixation. Obviously, the double *nifA* mutation (Δ*nifAp*::Ω*nifAc*) strain could not fix nitrogen neither both symbiotic and free-living conditions. Complementation of the Δ*nifAc* mutant with *nifAc* led to successful nitrogen fixation under free-living condition. However, neither *nifA*p nor the chimeric *nifA* hybrids could complement the nitrogenase activity. The transcriptional profiles under three different backgrounds of wild-type, Δ*nifAc* and Δ*nifAp* strains suggested that NifAc, but not NifAp regulated the expression of other nitrogen fixing genes on both chromosome and mega-plasmid under the free-living condition. Whereas, NifAc and NifAp could cross regulate the expression of nitrogen fixing genes located along the chromosome and mega-plasmid during symbiosis with *A. americana*. To explore the role of *nifV*, two mutants of Ω*nifV* and Δ*nifV* were constructed. The acetylene reduction activity of both mutant strains decreased when compared to wild-type under the free-living condition. Supplementing homocitrate into the culture of Δ*nifV* could restore the nitrogenase activity. Under the symbiotic state, most plant species were not affect when inoculated with mutant strain. However, the high content of dead bacteroids was observed inside the nodule of *Indigofera tinctoria* and *Stylosanthes hamata*. It may be speculated that the lack of *nifV* leads to early senescence of nodules. Knowledge obtained from this study would improve the efficiency of biofertilizer when applied in agriculture.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2017

Student's Signature Jenjira Wongdee

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature