รุจิเรข น้อยเสงี่ยม : การถ่ายโอนชุดยีนที่ควบคุมภาวะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันของแบคทีเรียกลุ่ม *BRADYRHIZOBIACEAE* ที่คัดแยกจากดินในประเทศไทย (SYMBIOTIC GENES TRANSFER OF *BRADYRHIZOBIACEAE* STRAINS ISOLATED STRAINS ISOLATED FROM SOIL IN THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 172 หน้า

แบคทีเรีย *Bradyrhizobium* ที่แยกโดยตรงจากแหล่งดินในประเทศไทย จำแนกออกเป็นกลุ่มของ symbiont และ nonsymbiont โดยนีลวรรณและคณะวิจัยในปีพ.ศ. 2545 งานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธี polyphasic ในการจัดจำแนกตัวแทนกลุ่ม nonsymbiont ที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อย่างชัดเจนจำนวนสี่สายพันธุ์ การวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทพ์พบว่า nonsymbiont สามารถต้านทานโลหะหนักได้ในปริมาณที่สูงมาก และมีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่คาบเกี่ยวอยู่ระหว่าง *Bradyrhizobium* และ *Rhodopseudomonas palustris* ในทำนองเดียวกันเมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธี multilocus sequence analysis จากยีน 16S rRNA และ housekeeping genes ได้แก่ *atpD recA* และ *glnII* พบว่า nonsymbiont ทั้งสี่จัดกลุ่มแยกออกมาจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน โดยมีตำแหน่งในแต่ละ phylogenetic tree ที่แตกต่างกันไป โดยรวมแล้วมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับทั้ง *Bradyrhizobium* และ *Rhs. palustris* ดังนั้นจึงได้เสนอให้เป็นแบคทีเรียในสกุลใหม่ชื่อ *Metalliresistens boonkerdii* ความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างแบคทีเรีย *Bradyrhizobium spp. Rhs. palustris* และ nonsymbiont ทั้งสี่สายพันธุ์ ก่อให้เกิดสมมุติฐานเกี่ยวกับบทบาทของการถ่ายโอนในแนวราบของยีนที่ควบคุมภาวะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันที่มีต่อวิวัฒนาการและการปรับตัวของแบคทีเรียเหล่านี้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาความสามารถในการถ่ายโอน symbiosis island ของ *Mesorhizobium loti* ไปสู่แบคทีเรียกลุ่ม *Bradyrhizobiaceae* พบว่า integrative vector ที่ประกอบไปด้วยส่วนของ *attP* และยีน *intS* สามารถรวมเข้าในโครโมโซมของ *Bradyrhizobium Rhs. palustris* และ nonsymbiont ที่ตำแหน่งยีน *phe*tRNA ความสามารถของเอนไซม์ IntS ในการเร่งกระบวนการ integrative recombination ต่อลำดับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีความแตกต่าง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ IntS สามารถทำงานได้ในแบคทีเรียเจ้าบ้านที่มีความหลากหลาย และการศึกษาการแสดงออกของโพรโมเตอร์สันนิษฐานของยีน intS ยืนยันว่าเอนไซม์ IntS สามารถทำงานได้ในแบคทีเรียกลุ่ม *Bradyrhizobiaceae* ถึงแม้ว่ามีระดับการแสดงออกต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ *M. loti* ที่น่าสนใจคือ symbiosis island สามารถรวมเข้าในโครโมโซมของ *B. yuanmingense* S7 อย่างไรก็ตามพบว่าการถ่ายโอน symbiosis island ไม่ได้ช่วยเพิ่มความสามารถในการอยู่ร่วมกันกับพืช *Lotus* และยังเป็นสาเหตุของการสูญเสียความสามารถในการอยู่ร่วมกันกับถั่วเหลืองที่เป็นพืชอาศัยเดิม นอกจากนี้ยังตรวจพบว่ามีการลบทิ้งยีนใน symbiosis island บางส่วนออกไปหลังจากกระบวนการถ่ายโอน เป็นไปได้ว่าการลบทิ้งยีนเหล่านี้เพื่อรักษาความสามารถในการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับพืชอาศัยเดิมเอาไว้ หรือเพื่อกำจัดส่วนที่ไม่เป็นประโยชน์ออกไป การศึกษาครั้งนี้ได้ค้นพบผลกระทบของการถ่ายโอนในแนวราบของยีนที่ควบคุมภาวะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรียหัวเชื้อ ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้อาจสูญเสียความสามารถในพื้นที่ปลูกซึ่งมีแบคทีเรียที่มียีนควบคุมภาวะพึ่งพา

อาศัยซึ่งกันและกันที่ไม่เสถียร นอกจากนี้ได้วิเคราะห์หาจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส ตำแหน่งโพรโมเตอร์ และบริเวณที่จำเป็นต่อโพรโมเตอร์ของยีน *intS* เพื่อที่จะเข้าใจระบบการควบคุมการแสดงออกของยีน *intS* พบว่าจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสตั้งอยู่ที่ตำแหน่งเหนือรหัสพันธุกรรมเริ่มต้น ATG 16 นิวคลีโอไทด์ และบริเวณเหนือจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส 200 นิวคลีโอไทด์ มีความจำเป็นต่อการถอดรหัส จึงเป็นไปได้ว่าบริเวณนี้เป็นที่ตั้งของตำแหน่งจับของโปรตีนควบคุมการถอดรหัส

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

RUJIREK NOISANGIAM : SYMBIOTIC GENES TRANSFER OF *BRADYRHIZOBIACEAE* STRAINS ISOLATED FROM SOIL IN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NEUNG TEAUMROONG, Dr. rer. nat, 172 PP.

BRADYRHIZOBIACEAE/*MESORHIZOBIUM LOTI*/PHYLOGENETIC ANALYSIS/ SYMBIOSIS ISLAND/MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS/SITE-SPECIFIC INTEGRATION

Bradyrhizobium strains directly isolated from soybean field soil in Thailand were classified into symbiotic and non-symbiotic groups. Polyphasic study was performed to determine taxonomic positions of four representatives of unidentified nonsymbiotic strains. Phenotypic analyses showed that the nonsymbiotic strains were found to be highly resistant to heavy metals and had characteristics intermediate between *Bradyrhizobium* species and *Rhodopseudomonas palustris*. Moreover, from the multilocus sequence analysis of 16S rRNA gene and housekeeping genes (*atpD*, *recA*, and *glnII*), the nonsymbiotic strains represented an independent phylogenetic lineage that was inconsistently related to the *Bradyrhizobium* species and *Rhs. palustris*. Therefore, the nonsymbiotic strains were proposed as a novel genus and species, named *Metalliresistens boonkerdii* gen. nov., sp. nov. The close relationship among *Bradyrhizobium* species, *Rhs. palustris* and the nonsymbiotic strains led to the hypothesis that horizontal transfer of symbiotic or photosynthetic regulatory perhaps played an important role in evolution and adaptation of these bacteria. Therefore, the

ability of *Mesorhizobium loti* symbiosis island to transfer to *Bradyrhizobiaceae* bacteria was determined in this study. The integrative vector containing *attP* and *intS* was found to integrate into a *phe*tRNA gene in the chromosome of *Bradyrhizobium* strains, *Rhs. palustris* and the nonsymbiotic *Bradyrhizobiaceae* strains. The ability of the *intS* to catalyze the integrative recombination with mismatches of the core sequence suggests that the *intS* has a broad host range. Analysis of integration sites provided a proposal of staggered cleavage sites of the *intS*. Expression analysis of putative *intS* promoter confirmed that *intS* could function in *Bradyrhizobiaceae* bacteria, although the levels of expression were lower than that of *M. loti*. Interestingly, symbiosis island was found to integrate into the chromosome of *B. yuanmingense* strain S7. However, the integration did not provide symbiotic ability on *Lotus* plants and caused symbiotic deficiency on its own soybean host plant. The symbiosis island genes were deleted after integrative recombination in all transconjugants, probably to maintain their symbiotic ability or to eliminate disadvantage parts. This study reveals the impact of horizontal transfer of symbiotic genes on the efficiency of inoculated strains. One thing possible is the inoculated strain may lose the symbiotic potential in field soil containing the bacteria that have unstable symbiotic properties. In addition, transcription start site, promoter region and essential regions for promoter of *intS* were determined to understand the regulatory expression system of the *intS*. The transcription start site was found to locate at 16 nt upstream of the first ATG start codon. The 200-nt region upstream of

the transcription start site were essential for the transcription. Probably, the region is the location of the transcription factor-binding sites.

School of Biotechnology

Academic Year 2010

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____