

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ

TRG478004

ชื่อโครงการ

การสร้างและวิเคราะห์ทางสรีรวิทยาของแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ที่สูญเสียยีน *fur* ต่อการตอบสนองต่อสภาวะ oxidative stress

ชื่อนักวิจัย

ดร. รจนา สุขสวัสดิ์

E-mail addresss

rojana@tubtim.cri.or.th

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

แบคทีเรียกลายพันธุ์ *Agrobacterium tumefaciens* ที่สูญเสียยีน *fur* ได้ถูกสร้างขึ้น เพื่อศึกษาบทบาทและความสำคัญของยีน *fur* (ferric uptake regulator) ของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ต่อการตอบสนองต่อสภาวะ oxidative stress และโลหะ ผลการทดสอบความไวของแบคทีเรีย *Fur⁻ mutant* ต่อสาร oxidants ได้แก่ H_2O_2 , menadione และ *tert*-butyl hydroperoxide พบว่าแบคทีเรีย *Fur⁻ mutant* มีความไวเพิ่มขึ้นต่อสาร oxidant ทั้งสามชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ปกติ (wild-type NTL4) และเมื่อทดสอบความไวต่อโลหะ ได้แก่ $FeCl_3$, $MnCl_2$, $ZnSO_4$ และ $NiCl_2$ พบว่าแบคทีเรีย *Fur⁻ mutant* มีความไวเพิ่มขึ้นต่อโลหะ $FeCl_3$, $MnCl_2$ และ $ZnSO_4$ แต่มีความต้านทานเพิ่มขึ้นต่อโลหะ $NiCl_2$ เมื่อเปรียบเทียบกับ wild-type NTL4 เอนไซม์ catalase (KatA) เป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเพื่อสลาย H_2O_2 ให้เป็นน้ำและออกซิเจนและมีบทบาทสำคัญต่อกลไกของ plant-pathogen interaction เนื่องจาก H_2O_2 เป็นสารพิษที่พืชสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งแบคทีเรียที่มารุกราน ผลการวิเคราะห์พบว่าระดับเอนไซม์ catalase ใน *Fur⁻ mutant* มีระดับต่ำกว่าในแบคทีเรียสายพันธุ์ปกติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความไวต่อ H_2O_2 นอกจากนี้จากการทดสอบโดยวิธี promoter probe-lacZ fusion พบว่าการที่เอนไซม์ catalase ใน *Fur⁻ mutant* มีระดับลดลงเนื่องมาจากการแสดงออกของยีน *kata* ลดลงในระดับ transcription แม้แบคทีเรีย *Fur⁻ mutant* จะมีความไวเพิ่มขึ้นต่อสาร menadione ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระจำพวก superoxide anion แต่กลับพบว่าไม่มีความเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ superoxide dismutase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการทำลายสารอนุมูลอิสระจำพวก superoxide anion ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *A. tumefaciens* มีกลไกอื่นนอกเหนือจากเอนไซม์ superoxide dismutase ในการต้านทานต่อสารอนุมูลอิสระจำพวก superoxide anion และกลไกนี้ถูกควบคุมโดยยีน *fur* ผลการทดสอบการก่อพยาธิสภาพในพืชพบว่าแบคทีเรีย *Fur⁻ mutant* มีความสามารถลดลงในการก่อให้เกิด tumor ในพืชใบยาสูบเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของยีน *A. tumefaciens fur* ต่อการตอบสนองต่อสภาวะ oxidative stress และโลหะ ซึ่งมีผลต่อ virulence ของแบคทีเรียชนิดนี้ และการก่อพยาธิสภาพในพืช

คำหลัก: *fur*, metal response, oxidative stress, virulence

Abstract

Project Code: TRG478004

Project Title: Construction and physiological analysis of *Agrobacterium tumefaciens fur* mutant in response to oxidative stress

Investigator: Dr. Rojana Sukchawalit

E-mail addresss rojana@tubtim.cri.or.th

Project Period: 2 years

To determine the roles of *fur* in the response of *A. tumefaciens* to oxidative stress and metal responses, a *fur* mutant (Fur⁻) was constructed. Sensitivity of Fur⁻ mutant to oxidants (H₂O₂, MD: menadione, tBOOH: *tert*-butyl hydroperoxide) and metals (FeCl₃, MnCl₂, ZnSO₄, NiCl₃) compared to wild-type NTL4 were determined. Fur⁻ mutant was more sensitive to oxidant compounds, including peroxide (H₂O₂), superoxide (MD), and organic hydroperoxide (tBOOH), than wild-type NTL4. Fur⁻ mutant showed increased sensitivity to iron, manganese, and zinc whereas an increase in nickel resistance was observed. Catalase encoded by *kata* is known to detoxify H₂O₂. The results showed that Fur⁻ mutant had lower catalase activity compared to that of wild-type NTL4, which is in accord with the results of H₂O₂ sensitivity. Furthermore, promoter probe-*lacZ* fusion assays showed that decrease in catalase level of Fur⁻ mutant was due to decreased transcription of *kata*. Although Fur⁻ mutant showed increased sensitivity to menadione, a superoxide generator, relative to wild-type NTL4, but levels of SOD, an important enzyme in detoxifying superoxide radicals, in both wild-type NTL4 and Fur⁻ mutant were similar. This suggested that, as yet unidentified, Fur-regulated mechanism(s) are involved in conferring menadione resistance in *A. tumefaciens*. Tumor formation assay on tobacco leaf showed that Fur⁻ mutant was highly attenuated in tumor-inducing ability compared to those of wild-type NTL4. In this study, *A. tumefaciens fur* has been shown to play an important role in resistance to metals, oxidative stress and its full virulence.

Keywords: *fur*, metal response, oxidative stress, virulence