

ปราณีต ว่างไธสง : บทบาทของระบบ Type IV secretion system (T4SS) ต่อการอาศัยอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว (ROLE OF TYPE IV SECRETION SYSTEM (T4SS) IN *Bradyrhizobium*-LEGUME SYMBIOSIS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 104 หน้า.

คำสำคัญ : *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2/การอาศัยอยู่ร่วมกัน/Type IV secretion system

Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยที่สามารถเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วได้หลายชนิด ดังนั้นเชื้อสายพันธุ์นี้จึงถูกเลือกโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของระบบ type IV secretion system (T4SS) ที่มีต่อความสัมพันธ์แบบการอยู่ร่วมกันระหว่าง *Bradyrhizobium* และพืชตระกูลถั่ว เนื่องจาก *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 มี 2 ชุดยีนของ T4SS อยู่บนโครโมโซมที่จัดอยู่ในกลุ่ม *tra/trb* operon และมีการจัดเรียงตัวของกลุ่มยีน *copG*, *traG* และ *virD2* ที่เป็นเอกลักษณ์ภายในทั้งสอง operon จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ของยีน *traG* แสดงให้เห็นหลักฐานการถ่ายโอนยีนแบบแนวนอน (horizontal gene transfer) ของยีน *traG* ที่เป็นยีนในระบบ T4SS ระหว่างสกุล *Bradyrhizobium* และ *Mesorhizobium* อย่างไรก็ตามไม่พบยีน *virD2* ในกลุ่ม *Mesorhizobium* ยกเว้นใน *M. opportunistum* WSM2075 แสดงให้เห็นถึงการจัดเรียงของกลุ่มยีน *copG*, *traG* และ *virD2* ที่มีลักษณะเฉพาะในสกุล *Bradyrhizobium* จากการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของกลุ่มยีน *copG*, *traG* และ *virD2* ของ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 แสดงให้เห็นว่าชุดยีนที่ 1 และชุดยีนที่ 2 ถูกจัดกลุ่มอยู่ในกลุ่มที่แตกต่างกันภายในสกุล *Bradyrhizobium* โดย T4SS copy 1 (T4SS₁) ของ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 มีความคล้ายคลึงกันอย่างมีนัยสำคัญกับสายพันธุ์ *Bradyrhizobium* ที่สำคัญสองสายพันธุ์ ได้แก่ *B. diazoefficiens* USDA110 ซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับถั่วเหลืองที่นำมาใช้ในทางการค้า และ *B. yuanmingense* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ไรโซเบียมหลักที่เกี่ยวข้องกับถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata*) และถั่วเขียว (*V. radiata*) ในพื้นที่กึ่งเขตร้อน ดังนั้นจึงได้ศึกษาบทบาทของ T4SS₁ ในการปฏิสัมพันธ์ทางชีวภาพระหว่าง *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 และพืชตระกูลถั่ว เพื่อให้บรรลุเป้าหมายนี้จึงได้ทำลายชิ้นยีน T4SS₁ ประกอบด้วยยีน *copG*, *traG* และ *virD2* รวมทั้งนำยีน T4SS₁ ดังกล่าวกลับเข้ามายังเชื้อกลายพันธุ์อีกครั้งหรือที่เรียกว่า complementation (T4SS₁_{compl}) และทดสอบกับพืชตระกูลถั่วที่เป็นตัวแทนจาก Dalbergioids, Millettoids และ Genistoids ผลลัพธ์แสดงให้เห็นผลในเชิงบวกของ T4SS₁ ต่อการเข้าสร้างปม เนื่องจากการทำลายยีน T4SS₁ ออกไปนั้นส่งผลให้ทั้งจำนวนปมลดลง และประสิทธิภาพของเอนไซม์ไนโตรจีเนสก็ลดลงเช่นกัน ในทางตรงกันข้ามประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปมจะได้รับการฟื้นฟูอย่างสมบูรณ์โดยเชื้อ T4SS₁_{compl} ในระดับที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อ

PRANEET WANGTHAISONG : ROLE OF TYPE IV SECRETION SYSTEM (T4SS) IN
Bradyrhizobium-LEGUME SYMBIOSIS. THESIS ADVISOR : PROF. NEUNG
TEAUMROONG, Ph.D., 104 PP.

Keyword: *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2/symbiosis/Type IV secretion system

Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 is a broad host range strain capable of nodulating with various legume hosts. This strain was selected with the specific purpose to examine the role of the type IV secretion system (T4SS) in the symbiotic process between *Bradyrhizobium* and legumes. This is due to the chromosome of *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 which carries 2 copies of T4SS containing the *tra/trb* operon and a unique gene arrangement of the *copG*, *traG*, and *virD2* gene cluster was discovered within both operons. A *traG* gene phylogenetic tree analysis revealed evidence of horizontal gene transfer of the *traG* gene in T4SS between the genera *Bradyrhizobium* and *Mesorhizobium*. However, the *virD2* gene was not found in *Mesorhizobium*, except for a specific case in *M. opportunistum* WSM2075. This finding suggested an arrangement of the *copG*, *traG*, and *virD2* gene cluster that is unique to the *Bradyrhizobium* genus. Phylogenetic analyses of *copG*, *traG*, and *virD2* of *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 showed that copies 1 and 2 of these genes grouped in different clades within genus *Bradyrhizobium*. Interestingly, T4SS copy 1 (T4SS₁) of *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 exhibited significant similarity to two important *Bradyrhizobium* strains including *B. diazoefficiens* USDA110, a commercial soybean inoculant, and *B. yuanmingense*, the primary rhizobia species associated with *Vigna unguiculata* and *V. radiata* plants in subtropical regions. As a result, this study aimed to investigate the role of T4SS₁ in the symbiotic interactions between *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 and leguminous plants. To achieve this, the construction of T4SS₁ (*copG*₁, *traG*₁, and *virD2*₁ genes) deletion and their complementation (T4SS₁_{compl}) were performed and tested with the representative legumes from the Dalbergioids, Millettiods, and Genistoids. The results demonstrated a positive effect of T4SS₁ on nodulation, as in the deletion of T4SS₁, both nodule number and nitrogenase activity were reduced. In contrast, nodulation efficiency was successfully restored by T4SS₁_{compl} resembling levels observed in the wild type (WT).

These findings emphasize the important role of T4SS in the symbiotic interaction between *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 and its leguminous hosts.

Furthermore, the role of each *copG*, *traG*, and *virD2* genes within T4SS1 fragment of *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 was further investigated. Mutants were constructed and tested on *V. radiata* cv. SUT4. It was discovered that $\Delta traG_1$ and $\Delta virD2_1$ reduced infection efficiency in the early stage of infection, but they regained their invasion abilities over time. As opposed to $\Delta copG_1$ which exhibited a complete loss of the ability in nodule organogenesis and nitrogenase activity, highlighting the critical role of the *copG_1* gene in symbiotic interactions. Although the $\Delta copG_2$ showed a slightly negative effect on nodulation by increasing nodule numbers but lower nitrogenase activity when compared to the WT. Moreover, the expression of nodulation genes (*nodD2*, *nodA*, and *nodC*) were not detected in the $\Delta copG_1$, while high expression levels of T4SS₁ structural genes including *traG₁* and *trbE₁* were observed. These results suggested that the *copG₁* gene played multiple crucial roles in the symbiotic interaction, including contributing to bacterial viability, involvement in nodulation and most likely acting as a repressor for T4SS structural genes. Meanwhile, *traG₁* and *virD2₁* were essential in the early stages of symbiotic interaction between *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 and leguminous plants. This novel approach might create opportunities for future research on the role of *copG₁* and its interactions with other genes and other pathways involved in symbiosis. Furthermore, the research underscores the importance of T4SS in the symbiotic interaction between *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 and leguminous hosts, deepening our understanding of successful legume-*Rhizobium* symbiosis. This understanding has the potential to be applied in agriculture, improving nodulation efficiency and nitrogen fixation in legume crops leading to enhanced agricultural productivity and sustainability.

School of Biotechnology
Academic Year 2022

Student's Signature Praneet Wangthaisong
Advisor's Signature N. W. C.
Co-advisor's Signature P.
Co-advisor's Signature Manee P.