ปราณีต วังไธสง : บทบาทของระบบ Type IV secretion system (T4SS) ต่อการอาศัยอยู่ ร่วมกันของแบรดี้ไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว (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 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยที่สามารถเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว ได้หลายชนิด ดังนั้นเชื้อสายพันธุ์นี้จึงถูกเลือก<mark>โด</mark>ยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของระบบ type IV secretion system (T4SS) ที่มีต่อความสัม<mark>พัน</mark>ธ์แบบการอยู่ร่วมกันระหว่าง *Bradyrhizobium* และ พืชตระกูลถั่ว เนื่องจาก Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 มี 2 ชุดยีนของ T4SS อยู่บนโครโมโซมที่ จัดอยู่ในกลุ่ม tra/trb operon และมีก<mark>า</mark>รจัดเรี<mark>ย</mark>งตัวของกลุ่มยืน copG, traG และ virD2 ที่เป็น เอกลักษณ์ภายในทั้งสอง operon จ<mark>ากการวิ</mark>เคร<mark>าะห์</mark>ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ของยืน *traG* แสดงให้เห็นหลัก<mark>ฐาน</mark>การถ่ายโอ<mark>นยื</mark>นแบบแนวนอน (horizontal gene transfer) ของยืน traG ที่เป็นยืนในระบบ T4SS ระหว่างสกุล Bradyrhizobium และ Mesorhizobium ้อย่างไรก็ตามไม่พบยีน virD2 ใน<mark>กลุ่ม Mesorhizobium ยกเว้นใน</mark> M. oppotunistum WSM2075 แสดง ให้เห็นถึงการจัดเรียงของกลุ่<mark>ม</mark>ยืน copG, traG และ virD2 ที่มีลักษณะเฉพาะในสกุล Bradyrhizobium จากการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของกลุ่มยืน copG, traG และ virD2 ของ Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 แสดงให้เห็น<mark>ว่าชุด</mark>ยีนที่ 1 และชุดยืนที่ 2 ถูกจัดกลุ่<mark>มอยู่ใ</mark>นกลุ่มที่แตกต่างกันภายในสกุล Bradyrhizobium โดยT4SS copy 1 (T4SS₁) ของ Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 มีความคล้ายคลึง กันอย่างมีนัยสำคัญกับสายพันธุ์ Bradyrhizobium ที่สำคัญสองสายพันธุ์ ได้แก่ B. diazoefficiens USDA110 ซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับถั่วเหลืองที่นำมาใช้ในทางการค้า และ *B. yuanmingense* ซึ่งเป็น สายพันธุ์ไรโซเบียมหลักที่เกี่ยวข้องกับถั่วฝักยาว (Vigna unguiculata) และถั่วเขียว (V. radiata) ในพื้นที่กึ่งเขตร้อน ดังนั้นจึงได้ศึกษาบทบาทของ T4SS₁ ในการปฏิสัมพันธ์ทางชีวภาพระหว่าง Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 และพืชตระกูลถั่ว เพื่อให้บรรลุเป้าหมายนี้จึงได้ทำลายชิ้นยีน T4SS $_1$ ประกอบด้วยยืน copG, traG และ virD2 รวมทั้งนำยืน T4SS $_1$ ดังกล่าวกลับเข้ามายังเชื้อ กลายพันธุ์อีกครั้งหรือที่เรียกว่า complementation (T4SS_{1compl}) และทดสอบกับพืชตระกูลถั่วที่ เป็นตัวแทนจาก Dalbergioids, Millettiods และ Genistoids ผลลัพธ์แสดงให้เห็นผลในเชิงบวก ของ T4SS $_1$ ต่อการเข้าสร้างปม เนื่องจากการทำลายยืน T4SS $_1$ ออกไปนั้นส่งผลให้ทั้งจำนวนปม ลดลง และประสิทธิภาพของเอนไซม์ในโตรจีเนสก็ลดลงเช่นกัน ในทางตรงกันข้ามประสิทธิภาพใน การเข้าสร้างปมจะได้รับการฟื้นฟูอย่างสมบูรณ์โดยเชื้อ $T4SS_{1compl}$ ในระดับที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อ

ดั้งเดิม จึงเป็นการเน้นย้ำถึงบทบาทที่สำคัญของ T4SS ที่มีปฏิสัมพันธ์ทางชีวภาพระหว่าง *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 และพืชตระกูลถั่ว

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาบทบาทของแต่ละยืนภายในชิ้นส่วน $\Delta T4SS_1$ ที่ประกอบด้วย $copG_1$, $traG_1$, และ $virD2_1$ ของ Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 อีกด้วย โดยการสร้างเชื้อกลายพันธุ์ของ แต่ละยืนข้างต้นและทดสอบกับถั่วเขียวสายพันธุ์ มทส.4 พบว่า $\Delta traG_1$ และ $\Delta virD2_1$ มีผลให้ประสิทธิภาพ การเข้าสร้างปมลดลงในช่วงเริ่มต้นของการติดเชื้อ แต่สามารถฟื้นคืนความสามารถในการเข้าสร้างปม ใหม่เมื่อเวลาผ่านไป ในทางตรงกันข้าม $\triangle copG_1$ แสดงการสูญเสียความสามารถในสร้างปมและการ ตรึงในโตรเจนโดยสิ้นเชิง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของ $copG_1$ ที่มีต่อความสัมพันธ์แบบการ อยู่ร่วมกัน Bradyrhizobium sp. SUTN9- $\frac{2}{2}$ และพืชอาศัย ถึงแม้ว่า $\Delta copG_2$ จะแสดงผลเชิงลบ เล็กน้อยต่อการเข้าสร้างปมด้วยจำนวนปมที่เพิ่มขึ้น แต่กิจกรรมของเอนไซม์ในโตรจีเนสกลับลดลง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากนี้ใน $\Delta copG_1$ ไม่พบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ สร้างปม ได้แก่ nodD2, nodA และ nodC ในขณะที่มีระดับการแสดงออกของยีนโครงสร้าง T4SS $_1$ ประกอบด้วย $traG_1$ และ $trbE_1$ ในระ<mark>ดับที่</mark>สูง ผลลั<mark>พธ์</mark>การทดลองแสดงให้เห็นว่ายืน $copG_1$ มีบทบาท สำคัญหลายอย่างในการปฏิสัมพันธ์ท<mark>างชี</mark>่วภาพ ซึ่งร<mark>ว</mark>มถึงความมีชีวิตของแบคทีเรีย การเข้าสร้างปม และมีแนวโน้มที่จะทำหน้าที่เป็น<mark>ตัวยั</mark>บยั้ง (repressor) <mark>ยืนโค</mark>รงสร้าง T4SS ในขณะที่ยืน $traG_1$ และ ${\it virD2}_1$ มีความสำคัญในเริ่มต้นของกระบวนการการอาศัยอยู่ร่วมกันทางชีวภาพระหว่าง ${\it Bradyrhizobium}$ sp. SUTN9-2 และพืชตระกูลถั่ว <mark>จากองค์ความรู้ใหม่นี้สา</mark>มารถ<mark>สร้</mark>างโอกาสสำหรับการวิจัยในอนาคต เกี่ยวกับบทบาทของ $copG_1$ และปฏิสัมพันธ์กับยีนและกระบวนการอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องที่เกี่ยวข้องกับ กระบวนการอาศัยอยู่ร่ว<mark>มกัน น</mark>อกจากนี้งานวิจั<mark>ยยังเน้นย้</mark>ำถึงคว<mark>ามสำ</mark>คัญของ T4SS ต่อการปฏิสัมพันธ์ ทางชีวภาพระหว่าง Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 และพืชตระกูลถั่ว เพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับ ความสัมพันธ์ระหว่างพืชตระกูลถั่วกับ<mark>ไรโซเบียมอย่างถ่อง</mark>แท้ ความเข้าใจนี้มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ใน การเกษตร ปรับปรุงประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนการเข้าสร้างปม และการตรึงในโตรเจนในพืชตระกูล ถั่ว ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรอย่างยั่งยืน

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ปีการศึกษา 2565 ลายมือชื่อนักศึกษา ปกณีก กังไรสว
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

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 general 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 (T4SS_{1compl}) 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 T4SS_{1compl} 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 ΔvirD2₁ reduced infection efficiency in the early stage of infection, but they regained their invasion abilities over time. As opposed to $\triangle copG_1$ 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 $\triangle copG_1$, while high expression levels of T4SS₁ structural genes including $traG_1$ and $trbE_1$ were observed. These results suggested that the $copG_1$ 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, $traG_1$ and $virD2_1$ 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 $copG_1$ 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 Prancet Wangthaisong

Advisor's Signature V. Lar C

Co-advisor's Signature_

Co-advisor's Signature & Marater For