

บิฑู อภัยโส : บทบาทของโปรตีนเอฟเฟกเตอร์ชนิดที่ 3 p0903 จาก *Bradyrhizobium* sp.

DOA9 ในการเข้าสร้างปมและการตรึงไนโตรเจน ใน *Arachis hypogaea* L.

อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง, 105 หน้า

คำสำคัญ : แบคทีเรียไรโซเบียม DOA9/ระบบหลั่งประเภทที่ 3/เอนไซม์ SUMO/ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและจุลินทรีย์

โปรตีนเอฟเฟกเตอร์ที่หลั่งผ่านระบบหลั่งประเภทที่ 3 (type III secretion system: T3SS) ของไรโซเบียมที่ตรึงไนโตรเจนได้เป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดความเหมาะสมเพื่อการอยู่ร่วมกันพืชตระกูลถั่ว รายงานก่อนหน้านี้พบว่า T3SS ของ *Bradyrhizobium* sp. DOA9 มีผลเชิงลบต่อการอยู่ร่วมกันกับถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ศึกษาบทบาทของโปรตีนเอฟเฟกเตอร์ 4 ชนิด (p0490, p0871, SkP48, และ p0903) ที่มีโดเมนโปรตีเอสแบบ small ubiquitin-like modifier (SUMO) ซึ่งพบใน DOA9 โปรตีเอสแบบ SUMO ทั้ง 4 ชนิดของ DOA9 ถูกจัดกลุ่มภายใน clade 1 ซึ่งแบ่งย่อยเป็น 2 subclades โดยโปรตีน p0490 และ p0871 อยู่ใน subclade 1-1 ขณะที่ p0903 และ SkP48 อยู่ใน subclade 1-2 โปรตีเอสเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสน้อย โดยมีความเหมือนกันเพียง 57% ระหว่าง p0490 และ p0871 และ 35% ระหว่าง p0903 และ SkP48 ถึงแม้ว่าจะมีโดเมน Ubiquitin-like protease 1 (ULP1) แบบเดียวกันที่ C-terminal แต่บริเวณ N-terminal ไม่มีการทำงานของโดเมน การทำงานนั้นมีความแตกต่างกันมากระหว่างโปรตีเอสเหล่านี้ โดย p0903 และ SkP48 มีโดเมนซ้ำ (repeat domains: RDs) ที่แตกต่างกัน 2 โดเมน ขณะที่ p0490 และ p0871 ไม่มี RDs ขณะที่เชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม *Bradyrhizobium* sp. DOA9 (WT) และการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ SUMO โปรตีเอส p0490 และ p0871 กระตุ้นการเกิดปมรากใน *A. hypogaea* อย่างไม่มีประสิทธิภาพ การกลายพันธุ์ของเอนไซม์ SUMO โปรตีเอส SkP48 หรือ p0903 ทำให้เกิดการอยู่ร่วมกันอย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิม *B. arachidis* CCBAU051107 นอกจากนี้ การลบยีน *p0903* ออกทั้งหมดทำให้การเกิดปมรากและการเจริญเติบโตของพืชฟื้นคืนกลับมาใน *A. hypogaea* 4 สายพันธุ์ ขอนแก่น 5 (KK5), ไทยนาน 9 (TN9), กาฬสินธุ์ 2 (KS2), และสุโขทัย 38 (SK38) การศึกษาการนำกลับเข้าไปของยีน *p0903* ไปยังสายพันธุ์ DOA9- Δ p0903 ที่กลายพันธุ์ ทำให้เห็นความสำคัญของโดเมนโปรตีน ULP1 ในการยับยั้งการเกิดปมรากใน *A. hypogaea* นอกจากนี้ การชักนำด้วยสารฟลาโวนอยด์ กลุ่ม naringenin ยังเพิ่มการแสดงออกของยีน *p0903* อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้ชักนำด้วยฟลาโวนอยด์ของเชื้อ WT และสภาวะที่ถูกชักนำด้วยฟลาโวนอยด์ กลุ่ม genistein ที่ 3 วันหลังการปลูกเชื้อ ตรวจพบการสะสมของกรดจัสโมนิก (jasmonic acid: JA) ในรากถั่วลิสงเป็น 2.32, 1.27 และ 0.64 เท่า ในเชื้อสายพันธุ์ WT, DOA9- Δ p0903 และ Δ p0903-p0903-ULP-lack ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ที่มีความเข้มข้นของ JA 49.56 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดของราก การแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของพืช (defense-related genes) รวมถึง transcription factor (*Myc2*), โปรตีน pathogenesis-related protein 4 (*PR4*) และ defensin (*Def2-2*) ในการส่งสัญญาณ JA/ethylene (ET) ในระยะเริ่มต้นของเชื้อรากที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยเชื้อสายพันธุ์ WT เมื่อเทียบกับที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยเชื้อสายพันธุ์ DOA9- $\Delta p0903$ นอกจากนี้ p0903 ยังถูกระบุว่าเป็นโปรตีนควบคุมสำคัญของการส่งสัญญาณการอยู่ร่วมกันในระยะเริ่มต้นในถั่วลิสงสายพันธุ์ KK5 โดยผลต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับระยะต่างๆ ของการส่งสัญญาณในระยะเริ่มต้นของการอยู่อาศัยร่วมกัน เช่น cyclic nucleotide-gated (*CNGC*), symbiotic remorins (*SYMREM*), และ E3 ubiquitin-protein ligase LIN-1 (*CERBERUS*) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโปรตีน SUMO ในระหว่างการมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียไรโซเบียมและถั่วลิสง ซึ่งอาจมีประโยชน์ในการพัฒนาการผลิตหัวเชื้อที่ประสิทธิภาพสูงเพื่อเพิ่มผลผลิตถั่วลิสง



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2567

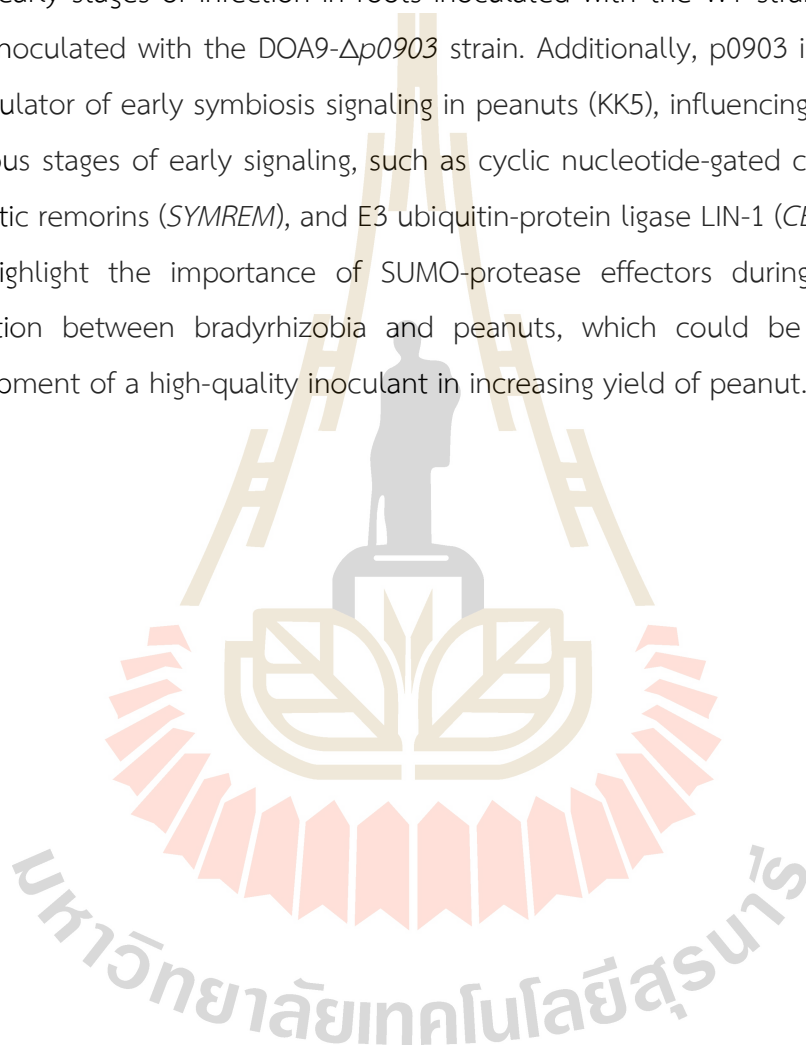
ลายมือชื่อนักศึกษา Bong
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ร.ต.พ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ร.

BEEDOU APHAISO : THE ROLE OF TYPE III EFFECTOR PROTEIN p0903 FROM *Bradyrhizobium* sp. DOA9 ON NODULATION AND NITROGEN FIXATION IN *Arachis hypogaea* L. THESIS ADVISOR : NEUNG TEAUMROONG, Ph.D. rer. nat., 105 PP.

Keyword : *Bradyrhizobium* sp. DOA9/Type III Secretion System/SUMO proteases/
Plant- microbe Interaction.

Effector proteins secreted via the type III secretion system (T3SS) of nitrogen-fixing rhizobia are key determinants of symbiotic compatibility in legumes. However, a previous report revealed that the T3SS of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 has negative effects on *Arachis hypogaea* symbiosis. In this study, it was found that the symbiotic role of 4 effector proteins (p0490, p0871, SkP48, and p0903), which contain the small ubiquitin-like modifier (SUMO) protease domain identified in DOA9 during symbiosis, were characterized. The four DOA9 SUMO proteases are clustered within clade 1, which is further divided into two subclades. Proteins p0490 and p0871 are grouped in subclade 1-1, while p0903 and SkP48 fall within subclade 1-2. These proteases exhibit low sequence similarity, with only 57% identity between p0490 and p0871, and 35% identity between p0903 and SkP48. Despite sharing a common Ubiquitin-like protease 1 (ULP1) domain typically located at the C-terminal, the N-terminal regions, which lack functional domains, are highly divergent among these proteases. Notably, p0903 and SkP48 each contain two distinct repeat domains (RDs), whereas p0490 and p0871 lack RDs. While the *Bradyrhizobium* sp. DOA9 wild type (WT) strain and mutation of SUMO-proteases p0490 and p0871 induced inefficient nodulation in *A. hypogaea*, mutation of the SUMO-proteases SKP48 or p0903 restored an efficient symbiosis comparable to that of the type of strain *B. arachidis* CCBAU051107. Additionally, the complete deletion of p0903 restored nodulation and plant growth in four peanut cultivars (KK5, TN9, KS2, and SK38). A complementation study of DOA9- Δ p0903 with various mutated forms of p0903 highlighted the importance of the ULP1 domain in the restriction of nodulation in *A. hypogaea*. Furthermore, naringenin significantly induced the expression of the p0903 gene compared to both the WT non-induced and genistein-induced conditions. At 3 dpi, the accumulation of jasmonic acid (JA) in peanut roots

was 2.32-, 1.27-, and 0.64-fold higher in the WT, DOA9- $\Delta p0903$, and $\Delta p0903$ -p0903-ULP-lack strains, respectively, compared to non-inoculated plants, which had a JA concentration of 49.56 $\mu\text{g/g}$ root fresh weight. The upregulation of several defense-related genes, including the transcription factor (*Myc2*), pathogenesis-related protein 4 (*PR4*), and defensin (*Def2-2*), was observed in the JA/ethylene (ET) signaling pathway at the early stages of infection in roots inoculated with the WT strain, compared to those inoculated with the DOA9- $\Delta p0903$ strain. Additionally, p0903 is identified as a key regulator of early symbiosis signaling in peanuts (KK5), influencing genes involved in various stages of early signaling, such as cyclic nucleotide-gated channels (*CNGC*), symbiotic remorins (*SYMREM*), and E3 ubiquitin-protein ligase LIN-1 (*CERBERUS*). These data highlight the importance of SUMO-protease effectors during the symbiotic interaction between bradyrhizobia and peanuts, which could be useful for the development of a high-quality inoculant in increasing yield of peanut.



School of Biotechnology
Academic Year 2024

Student's Signature _____
Advisor's Signature _____
Co-advisor's Signature _____