สุกัลยา สารพัฒน์ : การปรับปรุงเอนไซม์ 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) DEAMINASE ในเชื้อแบรดี้ไรโซเบียมเพื่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (IMPROVEMENT OF 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) DEAMINASE ENZYME IN BRADYRHIZOBIA FOR PLANT GROWTH PROMOTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 115 หน้า.

การตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะพึ่งพาอาศัยระหว่างจุลินทรีย์และรากพืชเป็นความสามารถของเชื้อแบรดี้ไรโซเบียม/ไรโซเบียมโดยการสร้างปมที่รากและ/หรือลำต้นของพืชตระกูลถั่ว การตรึงไนโตรเจนดังกล่าวเป็นการเตรียมแหล่งไนโตรเจนให้กับถั่วและพืชอาศัย โดยเชื้อแบรดี้ไรโซเบียม/ไรโซเบียมทำการตรึงไนโตรเจนที่อยู่ในอากาศด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase enzyme) ส่งให้พืชอาศัยในรูปของแอมโมเนีย (NH_3) นอกจากนี้ เชื้อแบรดี้ไรโซเบียม/ไรโซเบียมบางสายพันธุ์ยังสามารถสร้างเอนไซม์ Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase ที่สามารย่อยสาร ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทิลีนให้เป็นแอมโมเนียและแอลฟา-คีโตบูทีเรต (α-ketobutyrate) เอทิลีนจัดเป็นฮอร์โมนพืชชั้นสูงและมีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการมีชีวิตรอดของพืชเมื่อพืชต้องเผชิญกับสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม ฮอร์โมนเอทิลีนทำให้เกิดผลด้านลบต่อพืชได้เมื่อถูกผลิตในปริมาณที่สูง แต่ปริมาณที่สูงของการผลิตฮอร์โมนดังกล่าวสามารถทำให้ลดลงได้โดยการควบคุมสาร ACC ด้วยกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ที่มีอยู่ในแบคทีเรีย ดังนั้น เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ที่มีอยู่ในเชื้อแบรดี้ไรโซเบียม SUTN9-2 ได้ดำเนินการสองวิธี คือ พันธุวิศวกรรม และ Adaptive Laboratory Evolution (ALE) การถ่ายทอด plasmid ที่มียีน *acdR* และ *acdS* จากเชื้อแบรดี้ไรโซเบียม SUTN9-2 เข้าไปในเชื้อ Wild type ทำให้ได้สายพันธุ์ปรับปรุงชื่อ SUTN9-2:pMG103::*acdRS* ในขณะที่การปรับปรุงกิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี ALE ดำเนินการบนหลักการของการปรับตัว และเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องในสภาวะแวดล้อมที่ความเข้มข้นของACC สูง (3 mM ACC) ทำให้ได้สายพันธุ์ปรับปรุงชื่อ SUTN9-2 (ACCDadap) การปรับปรุงกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase สามารถเพิ่มประสิทธิภาพกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ได้ 8.9 เท่าในเชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2:pMG103::*acdRS* และ 1.4 เท่า ในเชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2 (ACCDadap) เมื่อเทียบกับเชื้อ Wild type อิทธิพลของการเพิ่มประสิทธิภาพให้กับกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อ SUTN9-2:pMG103::*acdRS* และ SUTN9-2 (ACCDadap)ได้ทำการทดสอบกับถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek SUT1) พบว่า การเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์ ACC deaminase สามารถส่งเสริมการเข้า

สร้างปมในช่วง 12 วันแรกหลังจากการปลูกเชื้อ โดยเฉพาะการใช้เชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2:pMG103::*acdRS* และสายพันธุ์ดังกล่าวยังช่วยให้การตรึงไนโตรเจนในถั่วเขียวสามารถดำเนินอยู่ได้มากกว่าสายพันธุ์อื่น ภายใต้สภาวะขาดน้ำ และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเขียวหลังจากการรดน้ำกลับ (Rehydration) นอกจากนี้ สายพันธุ์ SUTN9-2 (ACCDadap) พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งที่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างในส่วนที่คาดว่าเป็นบริเวณที่ใช้จับสารตั้งต้น (ACC binding site) การกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ อาจเป็นสาเหตุนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อสายพันธุ์ SUTN9-2 (ACCDadap) นอกจากนี้ การปรับปรุงกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อ SUTN9-2:pMG103::*acdRS* สามารถส่งเสริมปฏิสัมพันธ์แบบพึ่งพา (Symbiosis) และเพิ่มความทนทานต่อการขาดน้ำ รวมทั้งยังส่งเสริมการฟื้นตัวจากการขาดน้ำให้กับถั่วเขียวได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ที่ต่ำกว่า และยังสามารถลดการสังเคราะห์เอทิลีนในข้าว (*Oryza sativa* L.) ซึ่งนำไปสู่การลดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ และปริมาณคลอโรฟิลล์ เมื่อต้นข้าวได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ ในขณะเดียวกัน การปลูกเชื้อที่มีกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ทั้งสายพันธุ์ Wild type และสายพันธุ์ที่ปรับปรุงกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ได้เพิ่มปริมาณน้ำภายในใบ (Relative water content (RWC)) และอัตราการรอดชีวิตของข้าว รวมทั้งอัตราการฟื้นตัวของต้นข้าวให้เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเผชิญกับสภาวะขาดน้ำ ในขณะเดียวกัน ภายใต้การปลูกในสภาพแปลงและขาดน้ำ การปลูกเชื้อ SUTN9-2 (ACCDadap) สามารถปรับปรุงผลผลิตข้าวได้มากกว่าเชื้อ Wild type และไม่ได้ปลูกเชื้อ ดังนั้น ความทนทานต่อความเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำในต้นข้าวและถั่วเขียว สามารถบรรเทาได้ด้วยการลดการสังเคราะห์เอทิลีนผ่านกิจกรรมเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อ SUTN9-2 โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงประสิทธิภาพของเอนไซม์ ACC deaminase นอกจากนี้ แบคทีเรียสายพันธุ์ SUTN9-2 (ACCDadap) มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นหัวเชื้อชีวภาพที่ปลูกข้าวในสภาวะแปลงนา เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต ผลผลิต และความทนทานต่อความการขาดน้ำให้กับพืชอีกด้วย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

SUKANLAYA SARAPAT : IMPROVEMENT OF 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) DEAMINASE ENZYME IN BRADYRHIZOBIA FOR PLANT GROWTH PROMOTION. THESIS ADVISOR : PROF. NEUNG TEAUMROONG, Dr. rer. nat, 115 PP.

ACC DEAMINASE/DROUGHT/*Bradyrhizobium*/*Oryza sativa*/*Vigna radiata*

Symbiotic nitrogen-fixation is an ability of *Bradyrhizobium/Rhizobium* by forming nodules in host legume roots and/or stem, which provide a nitrogen source as the ammonia (NH_3) form to the host plant from nitrogen-fixation process. Moreover, some bacterial strains in *Bradyrhizobium/Rhizobium* also produce 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase enzyme, which can degrade the ethylene precursor, ACC, converts to ammonia and α-ketobutyrate. Ethylene is a higher plant hormone and plays a vital role in plant survival when plants encounter unfavorable conditions. However, the hormone can present negative effects when it is produced in high concentration. Nevertheless, the significant amount of ethylene production can be decreased by controlling its substrate (ACC) by ACC deaminase activity contain in bacteria. Therefore, to improve the efficiency of ACC deaminase activity contained in *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2, two methods for improving, genetic engineering and adaptive laboratory evolution (ALE) based methods, were used. The transfer of a plasmid containing *acdR* and *acdS* into SUTN9-2 was genetic engineering improvement, while the ALE method was performed based on accumulation of an adaptive bacterial population that continuously grew in a specified growth condition for a long period of time. The improved strains succeeded in increasing ACC deaminase enzyme activity as 8.9–fold

in SUTN9-2:pMG103::*acdRS* and 1.4–fold in SUTN9-2 (ACCDadap) when compared with the wild type strain. The influences of the higher activity were observed in the host plant (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek SUT1). Both improved strains could enhance nodulation in the early stage of plant growth. Additionally, SUTN9-2:pMG103::*acdRS* could also maintain nitrogen fixation in water deficit conditions as well as promote plant biomass after rehydration. Moreover, the changes of nucleotide and amino acid in AcdS protein in SUTN9-2 (ACCDadap) were investigated. Some nucleotides were predicted to be located in the ACC binding site which was mutated. This mutation may lead to increasing ACC deaminase activity, which enhanced symbiotic interaction and drought tolerance, as well as have better recovery after rehydration than lower ACC deaminase activity. Moreover, these bacterial strains also reduce ethylene synthesis, lead to decreasing membrane destruction and chlorophyll contents in rice (*Oryza sativa* L.) when confronted with a water deficit situation. Meanwhile, the leaf relative water content (RWC), survival and recovery rates were improved as well as crop yield in field conditions. Therefore, drought stress tolerance in rice and mung bean plants could be improved by a controlling the ethylene synthesis via the ACC deaminase improvement in SUTN9-2. Moreover, the SUTN9-2 (ACCDadap) strain can be used as a bio-inoculant in field conditions to enhance growth, rice yield, and drought tolerance.

School of Biotechnology

Academic Year 2019

Student's Signature Sukanlaya Sarapat

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature