Thesis Title Molecular Cloning of cDNA Encoding ACC Synthase and Application of Antagonistic Bacteria for Disease Control in *Curcuma alismatifolia* Gagnep.

Author Miss. Supuk Mahadtanapuk

Degree Doctor of Philosophy (Biology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai		Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Somsorn Singkarat		Member
Assis. Prof. Dr. Vicha Sardsud		Member

ABSTRACT

The present research deals with maintaining of curcuma flower quality by cloning 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and biocontrol of Anthracnose disease by antagonistic bacteria. Initial application of low energy ion beam for induction of mutant antagonistic bacteria was also studied.

In order to reduce ethylene production, resulting in delay of flower senescence by antisense technology, the cDNA fragments encoding ACC synthase and ACC oxidase from *Curcuma alismatifolia* Gapnep. were isolated and its expression were

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

analyzed. Primers were designed from highly conserved domains of ACC synthase and ACC oxidase from various plant species from GeneBank database. PCR products in length of 600 bp. were subcloned into pGEM T-easy vector resulting in p*Ca-ACS1* and p*Ca-ACO1*. The deduced amino acid sequences of the cDNA were highly homologous to those gene isolated from other plants. Northern blot analysis shows that *Ca-ACS1* gene was detectable in bract of curcuma and increased at 2 days after harvesting while *Ca-ACO1* was expressed at petal and bract of curcuma and highly accumulated at 1 day in petal and 3 days in bract after harvesting of cut curcuma. Genomic DNA gel blot analysis confirmed that *Ca-ACS1* presence as a single copy. In addition, efficient plant regeneration and transgenic plant with antisense technique using retarded shoot were established. The *in vitro* retarded shoots were transformed by using *Agrobacterium tumefaciens* strain AGLO harbouring binary vectors (pBI121 and pBI121-*Ca-ACS1*). Transformation events were confirmed by PCR analysis, a histochemical GUS assay and southern blotting of the transgenic plants, respectively. Transgenic plants within 3 months from co-cultivation with bacteria and the transgenic frequency exceeded 14% were obtained.

For maintaining quality of curcuma during preharvest stage, over 400 bacterial strains isolated from leaf surfaces of *Curcuma* and hot springs in the Chiang Mai province were screened *in vitro* for antagonistic activity against *Colletotrichum* sp., an anthracnose fungus. Three isolated bacteria shown growth inhibition of the fungus *in vitro* and were identified as *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* and *B.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

subtilis. Using *in planta* tests, *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis* were shown statistically significant growth suppression of *Colletotrichum* sp. over that of *B. licheniformis*. This was most likely due to the inability of *B. licheniformis* to thrive *in planta*. When *B. licheniformis* was co-inoculated in combination with the either *B. amyloliquefaciens* or *B. subtilis*, the ability to suppress the fungal disease of *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis* was dramatically reduced. To investigate the antagonistic mechanism of these bacteria, the extra-cellular metabolites were tested for the presence of the cyclic-antibiotic iturin A. The presence of an isoform of iturin A was demonstrated for both *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis* and was not found in *B. licheniformis.* To investigate the antagonistic mechanism of *B. licheniformis* strains for suppression of *Colletotrichum* sp., an application of low energy ion beam was used for mutation induction. The mutant of *B. licheniformis* was conducted to locate gene(s) involved in their antipathogenic ability. The result shown that one of their antifungal gene is related to lipase.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การโคลนซีดีเอ็นเอที่เข้ารหัสเอซีซีซินเทสและการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคในปทุมมา

ผู้เขียน นางสาวสุภัค มหัทธนพรรค

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย ประธานกรรมการ
รศ.ดร. สมศร สิงขรัตน์ กรรมการ
ผศ.ดร. วิชชา สอาดสุด กรรมการ

บทคัดย่อ

ในการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อรักษาคุณภาพของปทุมมา โดยการโคลนยีนที่เข้ารหัสเอซีซีซินเทส การใช้ชีววิธีในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสโดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์และการประยุกต์ใช้ไอออนบีมพลังงานต่ำในการชักนำการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียปฏิปักษ์

ในการลดการผลิตเอทธีลีนโดยใช้เทคนิค antisense เพื่อชะลอการเสื่อมสภาพของดอกนั้น ได้โคลนยีนที่เข้ารหัสเอซีซีซินเทสและเอซีซีออกซิเดสจากปทุมมา *Curcuma alismatifolia* Gapnep. ตลอดจนศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าว ในการโคลนซีดีเอ็นเอโดยใช้ไพเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ conserved domain ของยีนที่เข้ารหัสเอซีซีซินเทสและเอซีซีออกซิเดสจากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งผลของ PCR product มีขนาด 600 bp. และถูก subclone เข้าสู่พลาสมิด pGEM T-easy ได้ชื่อว่า p*Ca-ACS1* และ p*Ca-ACO1* เมื่อแปลรหัสของซีดีเอ็นเอเป็นรหัสกรดอะมิโนพบว่ามีความเหมือนกับยีนจากพืชชนิดอื่น ในการวิเคราะห์โดยใช้ Northern blot นั้นยีน *Ca-ACS1* ตรวจพบในส่วนของกลีบเทียมปทุมมาและเด่นชัดเมื่อ 2 วัน หลังการเก็บเกี่ยว ขณะที่ยีน *Ca-ACO1* แสดงออกที่กลีบดอกเมื่อ 1 วัน และกลีบเทียมปทุมมาเมื่อ 3 วัน หลังเก็บเกี่ยว เมื่อวิเคราะห์ Genomic DNA พบว่ายีน *Ca-ACS1* เป็น single copy นอกจากนี้ได้ทำการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อ retarded shoot ในทิศทาง antisense การส่งถ่ายยีนนั้นใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ซึ่งบรรจุ พลาสมิด pBI121 และ pBI121-*Ca-ACS1* ในการตรวจสอบการส่งถ่ายยีนใช้เทคนิค PCR การแสดงออกของยีน GUS และเทคนิค southern blotting พบว่าประสิทธิภาพในการส่งถ่ายคือ 14% นับจากหลังการ co-cultivation เป็นเวลา 3 เดือน

สำหรับการรักษาคุณภาพดอกปทุมมาในระยะก่อนเก็บเกี่ยวโดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์นั้นได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากผิวใบปทุมมาและจากน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่จำนวนมากกว่า 400 ตัวอย่าง นำมาคัดเลือกเพื่อใช้ต้านทาน *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรค anthracnose ในปทุมมา พบว่าเชื้อ 3 ตัวอย่างคือ *Bacillus licheniformis, B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าว ในการทดสอบบนต้นปทุมมา *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* แสดงการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* sp. ได้มากกว่า *B. licheniformis* โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้ *B. licheniformis* ผสมกับ *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* พบว่าทำให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของ *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* ลดลง ในการศึกษากลไกการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของแบคทีเรียดังกล่าว โดยการทดสอบสาร extra-cellular metabolite พบว่าเป็น cyclic-antibiotic พวก iturin A ซึ่งพบทั้ง *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* แต่ไม่พบใน *B. licheniformis* จากนั้นได้ใช้ไอออนบีมพลังงานต่ำในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อศึกษากลไกการต้านเชื้อ *B. licheniformis* ต่อเชื้อ *Colletotrichum* sp. โดยเชื้อ *B. licheniformis* ที่กลายพันธุ์นั้นจะใช้ในการชี้นำตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการต้านทานโรคและผลที่ได้แสดงว่าหนึ่งในยีนเหล่านั่นเกี่ยวข้องกับยีนที่สร้าง lipase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved