Thesis Title	Molecular Characterization of Three cDNAs Encoding Stress-Related Proteins from Patumma (*Curcuma alismatifolia* Gangnep. cv. Chiang Mai Pink)	
Author	Mister Ruangwit Porruan	
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Somsorn Singkharat	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Kobkiat Saengnil	Co-advisor

ABSTRACT

In this study, we had constructed the cDNA library of Patumma or Siam tulip (*C. alismatifolia Gangnep. cv. Chiang Mai Pink*) from cold-treated bract tissues. Thirty clones were selected randomly then sequenced analyzed. Three members of genes having stress responses/defense mechanisms were characterized. The first gene was encoded CaPMP3 protein. CaPMP3 was grouped into PMP3 from rice OsLTI6A, potato StLTSR and Arabidopsis RCI2A and RCI2B which were reported as stress inducible gene. The second gene encoded CaRNS. CaRNS was in the group of S-like RNases from rice OsRNS2, bindweed CsRNS, Arabidopsis AtRNS2 and Antirrhinum AhRNAse28 which involved in plant response to wounding, phosphate limitation and pathogen. The last gene was encoded CaCPI. CaCPI was classified into the group of cystetins from amaranth, wheat and strawberry which have antifungal property. RT PCR revealed that *CaPMP3* expressed in bract and it can be induced by salt, cold and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

drough. While the expression of *CaRNS* was found in flower, stem and leaves. The cystatin *CaCPI* gene showed high expression in stem. Consequencely, *CaCPI* was chosen to investigate its function. Over expression of the *CaCPI* gene was presented in *E. coli* strain BL21-Star using pDEST17 vector under T7 strong promoter. Using SDS-PAGE showed that the recombinant CaCPI protein from the cell lysate was about 12 kDa in size as predicted from CaCPI amino acids sequence. For the CaCPI papain inhibitor property, pre-incubation of the CaCPI protein samples with papain demonstrated to inhibit the papain activity. And antifungal activity of the purified recombinant CaCPI protein was tested against three phytopathogenic fungi, *Fusarium oxysporum, Colletotrichum capsici, Sclerotium rofsii* and *Pyricularia grisea.* It was shown that the CaCPI protein could suppress mycelium growth of all the phytopathogenic fungi. In future experperiment, the CaCPI protein will be to test its antifungal activity and against other phytopathogenic fungi. Finally, *CaCPI* gene will be introduced into other compatible plant species to improve their antifungal activity.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การหาลักษณะเฉพาะระดับโมเลกุลของสามซีดีเอ็นเอที่เข้ารหัสโปรตีนที่เกี่ยวกับความเครียดจากปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gangnep. cv. Chiang Mai Pink)

ผู้เขียน นายเรืองวิทย์ พ่อเรือน

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รองศาสตราจารย์ ดร. สมศร สิงขรัตน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบเกียรติ แสงนิล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้สร้างห้องสมุดยีนของปทุมมาหรือสยามทิวลิป (*C. alismatifolia* Gangnep. cv. Chiang Mai Pink) ขึ้นจากเนื้อเยื่อใบประดับที่ถูกกระตุ้นด้วยความเย็น โคลนที่ได้รับการคัดเลือกแบบสุ่มจำนวนสามสิบโคลนถูกนำไปหาวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่ามียีนจำนวนสามยีนที่เข้ารหัสการสังเคราะห์โปรตีนที่อาจเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดหรือกลไกกระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อความเครียดในพืชได้ ยีนแรกเข้ารหัสสร้าง CaPMP3 ซึ่งพบว่าอยู่ในกลุ่มของ PMP3 ที่พบในข้าว (OsLTI6A) มันฝรั่ง (StLTSR) และอะราบิดอปซิส (RCI2A และ RCI2B) ซึ่งทั้งหมดนี้มีรายงานว่าตอบสนองต่อความเครียด ยีนต่อมาเข้ารหัสสร้าง CaRNS ซึ่งถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ S-like RNase กลุ่มเดียวกับ OsRNS2จากข้าว CsRNS จาก bindweed AtRNS2จากอะราบิดอปซิส และ AhRNase28 จากหน้าวัว ซึ่งทำหน้าที่ตอบสนองต่อการเกิดบาดแผล การขาดแคลนฟอสเฟตและเชื้อโรค ยีนสุดท้ายเข้ารหัสสร้าง CaCPI ซึ่งเป็นซีสเตตินหรือตัวยับยั้งเอนไซม์ซีสเตอีนโปรทีเอสกลุ่มเดียวกับผักโขม ข้าวสาลีและสตรอเบอรี่ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค RT-PCR พบว่ายีน *CaPMP3* แสดงออกในใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประดับและสามารถกระตุ้นการแสดงออกได้ด้วยเกลือ ความเย็นและความแล้ง ขณะที่ยีน *CaRNS* ถูกพบในดอก ก้านดอกและใบ และสุดท้ายยีน *CaCPI* แสดงออกในก้านดอก ซึ่งต่อมาได้เลือกยีน *CaCPI* มาทำการศึกษาต่อ เพื่อหาคุณสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ ดังนั้น ยีน CaCPI จึงถูกโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pDEST17 ภายใต้ T7 promoter และส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21-Star จากการหาขนาดของโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งพบว่าโปรตีนที่สร้างขึ้นมานี้ขนาดประมาณ 12 kDa ตรงตามที่พยากรณ์ไว้จากลำดับกรดอะมิโน และเมื่อนำโปรตีนนี้ไปบ่มกับเอนไซม์ปาเปน (papain) พบว่าทำให้อัตราการการทำงานของเอนไซม์ปาเปนลดลง และเมื่อนำโปรตีนซีสเตตินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช ได้แก่ *Fusarium oxysporum, Colletotrichum capsici*, *Sclerotium rofsii* และ *Pyricularia grisea* ก็พบว่าโปรตีนซีสเตตินสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืชเหล่านี้ได้ ในอนาคตโปรตีน CaCPI จะถูกทดสอบฤทธิ์การต่อต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชชนิดอื่นๆ อีกและท้ายที่สุดจะมีการส่งถ่ายยีนนี้เพื่อให้แสดงออกในพืชที่เหมาะสมเพื่อให้มีความสามารถในการต้านทานเชื้อราต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved