CONSTRUCTION OF CHROMOSOMAL ENGINEERED *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVAR *AIZAWAI* EXPRESSING A TRANSCRIPTIONALLY FUSED CHITINASE GENE DURING SPORULATION

SURANG THAMTHIANKUL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003**

ISBN 974-04-3826-1
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การสร้างสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสในระยะเซลล์สร้างสปอร์ (CONSTRUCTION OF CHROMOSOMAL ENGINEERED *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVAR *AIZAWAI* EXPRESSING A TRANSCRIPTIONALLY FUSED CHITINASE GENE DURING SPORULATION)

สุรางค์ ธรรมเธียรกุล 4337110 SCBT/D

ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D.Eng, ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, Ph.D., ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D., สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, ปร.ด.

บทคัดย่อ

ได้ทำการแทรกยีนไคติเนสจากเชื้อ *Bacillus licheniformis (chiBlA* gene) ซึ่งไม่มีโปรโมเตอร์แต่ได้ทำ transcriptionally fused ให้อยู่ภายใต้การควบคุมของ *P19* promoter จาก *cry11Aa* operon เข้าไปในโครโมโซมของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ *aizawai* BTA1 โดยเทคนิค homologous recombination เชื้อ BTA1 transformants ที่ได้ (INT1) มีการเจริญและการสร้างสปอร์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น สายพันธุ์ INT1 สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ทั้งหมด 4 ขนาด (66, 55, 39 และ 36 kDa) โดยไคติเนสขนาด 66, 55 และ 36 kDa ได้มาจาก *chiBlA* gene ที่นำเข้าไปในโครโมโซม ในขณะที่ไคติเนสขนาด 39 kDa เป็นไคติเนสที่เชื้อ BTA1 สร้างขึ้น จากการเปรียบเทียบความสามารถในการฆ่าหนอน *Spodoptera exigua* โดยวิธี Surface Contamination Bioassay เมื่อใช้ Whole culture broth ที่ทำแห้ง พบว่าเชื้อ INT1 มีประสิทธิภาพสูงกว่าเชื้อ BTA1 โดยลดค่า LC_{50} ลงจาก 30.8 μg/cm^2 เป็น 12.2 μg/cm^2 ในการทดลองโดยใช้ Filtered culture supernatant ที่ทำแห้งของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ ร่วมกับ Cry1C ที่ความเข้มข้น 110 μg/cm^2 พบว่า Filtered culture supernatant ของเชื้อ INT1 เมื่อผสมกับ Cry1C ฆ่าหนอนได้ 75% ขณะที่เมื่อผสม Cry1C กับ filtered culture supernatant ของเชื้อ BTA1 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ฆ่าหนอนได้ 56.7%

จากการศึกษาผลของ Crude และ Purified chitinase ต่อ Peritrophic membrane ที่แยกจากหนอน *S. exigua* ระยะที่ 5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า ไคติเนสทั้งสองประเภทสามารถย่อย Peritrophic membrane ทำให้เกิดรูบน membrane และจากผลการศึกษาโดยการเลี้ยงหนอนระยะที่ 1 จนถึงระยะที่ 5 ด้วย Purified chitinase แล้วจึงแยก Peritrophic membrane ออกมา พบว่าเกิดรูรั่วเช่นกัน จึงสรุปได้ว่า ไคติเนสย่อย Peritrophic membrane ได้ และสามารถทำงานได้ในสภาวะแวดล้อมที่อยู่ในตัวหนอน

การศึกษานี้ยืนยันบทบาทของไคติเนสในการเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าหนอนของ δ-endotoxin จาก *B. thuringiensis* และคาดว่าวิธีการนำยีนใส่เข้าในโครโมโซมโดยที่ยีนยังคงแสดงออกได้ เป็นวิธีการที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อสร้างสายพันธุ์ *B. thuringiensis* ใช้ในทางการค้าได้ในอนาคต

165 หน้า. ISBN 974-04-3826-1

CONSTRUCTION OF CHROMOSOMAL ENGINEERED *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVAR *AIZAWAI* EXPRESSING A TRANSCRIPTIONALLY FUSED CHITINASE GENE DURING SPORULATION

SURANG THAMTHIANKUL 4337110 SCBT/D

Ph.D. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: WATANALAI PANBANGRED, D.Eng., WILLIAM J MOAR, Ph.D., M.R. JISNUSON SVASTI, Ph.D., CHUENCHIT BOONCHIRD, Ph.D., SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D.

ABSTRACT

A transcriptionally fused chitinase gene comprising the *P19* gene from the *Bacillus thuringiensis cry11Aa* operon fused with a promoterless *chiBlA* gene from *Bacillus licheniformis* was integrated into the *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* BTA1 genome by homologous recombination. The resulting *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* strain (INT1) showed growth and sporulation comparable to that of the wild type strain. INT1 produced four chitinases of different molecular masses (i.e., 66, 55, 39 and 36 kDa). Three of these (66, 55 and 36 kDa) were derived from the cloned *chiBlA* gene whereas the 39 kDa chitinase originated from BTA1. Using surface contamination bioassays, the LC_{50} of lyophilized whole culture broth of INT1 against *Spodoptera exigua* neonate larvae was 12.2 µg/cm^2 compared to 30.8 µg/cm^2 for BTA1. Bioassays using filtered culture supernatant of INT1 (110 µg/cm^2) together with trypsin-activated purified Cry1C protein of *B. thuringiensis* (1,280 ng/cm^2) showed 75.0% mortality compared to 56.7% mortality for Cry1C combined with BTA1 at the same concentration. Using scanning electron microscopy, clear perforations were observed in *S. exigua* 5th instar peritrophic membranes incubated with either crude or purified chitinase, or isolated from 5th instar *S. exigua* fed purified chitinase since the first instar. These results help clarify the role of chitinase in enhancing *B. thuringiensis* δ-endotoxin insecticidal activity and suggest that expressing heterologous proteins chromosomally may provide a method for increasing the insecticidal activity of commercial applications of *B. thuringiensis*-based products.

KEY WORDS: CHITINASE / *BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP. AIZAWAI* / INSECTICIDAL ACTIVITY / BIOASSAY /

165 P. ISBN 974-04-3826-1