

**CLONING AND CHARACTERIZATION OF GENES INVOLVED  
IN RUBBER TREE TRUNK PHLOEM NECROSIS**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(BIOTECHNOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

**CLONING AND CHARACTERIZATION OF GENES INVOLVED IN RUBBER TREE TRUNK PHLOEM NECROSIS**

CHUTIMA CHAROENWUT 4837131 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc.,  
PANIDA KONGSAWADWORAKUL, Ph.D., UNCHERA VIBOONJUN, Ph.D.,  
HERVE CRESTIN, Ph.D.**ABSTRACT**

Trunk Phloem Necrosis (TPN) is a complex physiological syndrome widely found in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). TPN is characterized by accumulation of various stresses, leading to irreversible cessation of latex flow. However, the initial molecular and cellular events leading to TPN remain unclear. To investigate the molecular mechanism of this disease, an analysis of differentially expressed genes in TPN and healthy trees using the Suppression Subtractive Hybridization (SSH) technique was performed. After EST sequencing, the differentially enriched cDNA fragments were analyzed and classified into 10 categories according to their functions (i.e., cell rescue, gene expression, cell organization, primary metabolism, secondary metabolism, cell cycle, protein regulation, respiration, signal transduction, and transportation). Macroarray analysis confirmed that some genes were up-regulated in the phloem of trees afflicted by the TPN disease. Genes (*N6A02* and *N3B11*), and a stress and disease-related protein (*Sdrp*) gene, showing the highest expression level in TPN trees, were selected as the best candidates for further characterization. The *N6A02* and *N3B11* genes, exhibited similar nucleotide sequences and expression patterns, suggesting they belong to the same gene family. Later these two genes were identified through full-length screening as the dehydrin (*HbDhn*) gene (SK<sub>n</sub>-type). The expression of *HbDhn* transcript is enhanced by the TPN-disease, which suggested water-deficit as one of the factors that can induce TPN. The expression levels of *HbDhn* were varied according to the developmental stage of the disease. The highest expression level was detected in the early TPN-affected trees, whereas the expression level decreased as the severity of the disease increased. The expression of *Sdrp* can be induced by many factors such as drought, pathogens and wounding. However, the expression of *HbSdrp* cannot be induced by wounding or exogenous abscisic acid, auxin, jasmonic acid, or salicylic acid. The knowledge acquired from this study give more insight into the initial molecular and cellular mechanisms leading to TPN development, however further investigation is needed.

KEY WORDS: DEHYDRINS / *Hevea brasiliensis* / PR-10 PROTEIN / SSH / TPN

157 p.

การโคลนและศึกษาลักษณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเปลือกแห้งในยางพารา  
CLONING AND CHARACTERIZATION OF GENES INVOLVED IN RUBBER  
TREE TRUNK PHLOEM NECROSIS

ชุตินา เจริญวุฒิ 4837131 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จรัญญา ณรงค์ชวานะ, D.Agr.Sc., พนิดา คงสวัสดิ์วรกุล, Ph.D., อัญชรีรา  
วิบูลย์จันทร์, Ph.D., Hervé Chrestin, Ph.D.

บทคัดย่อ

โรคเปลือกแห้งแบบมีอาการเรื้อรัง (TPN) เกิดจากความผิดปกติทางสรีรวิทยาของต้นยางพารา โดยมีสาเหตุจากการสะสมของสภาวะเครียดต่างๆ ในต้นยาง แล้วส่งผลให้เกิดการหยุดไหลของน้ำยางอย่างถาวร ซึ่งทำให้สูญเสียผลผลิตน้ำยาง สาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรคเปลือกแห้งแบบ TPN ในระดับโมเลกุลและระดับเซลล์ยังไม่สามารถระบุได้ ในงานวิจัยนี้ ได้นำเทคนิคการศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งจีโนมมาใช้ค้นหายีนที่มีแนวโน้มว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค เพื่อทำความเข้าใจในกระบวนการเกิดโรคเปลือกแห้งในระดับโมเลกุลและระดับเซลล์ เทคนิค Suppression Subtractive Hybridization ได้ถูกเลือกมาใช้ เพื่อค้นหายีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในต่อลำเลียงอาหารด้านในของลำต้นยางพาราที่มีอาการเปลือกแห้งเปรียบเทียบกับต้นปกติ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่พบการแสดงออกที่แตกต่างกันนั้น ปรากฏว่าสามารถแบ่งยีนตามหน้าที่การทำงานเป็น 10 กลุ่ม ได้แก่ cell rescue, gene expression, cell organization, primary metabolism, secondary metabolism, cell cycle, protein regulation, respiration, signal transduction และ transportation จากการใช้เทคนิค Macroarray ตรวจวัดเพื่อยืนยันผลการแสดงออกของยีนต่างๆ ได้เลือก 3 ยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้นในต้นยางพาราที่มีอาการเปลือกแห้งมาเพื่อวิเคราะห์อย่างละเอียด ซึ่งได้แก่ ยีน *N6A02*, ยีน *N3B11* และ ยีน stress and disease-related protein (*Sdrp*) เมื่อทำการแยกยีน *N6A02* และ ยีน *N3B11* ที่มีความยาวบางส่วน (partial sequence) แล้วเปรียบเทียบกัน ปรากฏว่าทั้งสองยีนมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันมาก มีแนวโน้มว่าจะมาจาก gene family เดียวกัน และพบว่า เป็นยีนในกลุ่ม dehydrin (*HbDhn*) ประเภท SK<sub>n</sub>-type ซึ่งมีการแสดงออกสูงมากเมื่อต้นยางเริ่มมีอาการเปลือกแห้ง เมื่อพิจารณาพร้อมกับหน้าที่ของ dehydrin ที่ตอบสนองในสภาวะขาดน้ำ ทำให้คาดว่า การขาดน้ำเป็นสภาวะเริ่มแรกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเปลือกแห้ง ส่วนการแสดงออกของยีน *Sdrp* พบว่าสามารถถูกกระตุ้นด้วยหลายปัจจัยทั้งสภาวะแล้ง การถูกนกกินด้วยเชื้อก่อโรค รวมทั้งการทำให้เกิดบาดแผล อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของยีน *HbSdrp* ไม่สามารถกระตุ้นได้ด้วยการทำให้เกิดบาดแผล หรือ การให้ abscisic acid, auxin, jasmonic acid และ salicylic acid จากภายนอก องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ช่วยให้เข้าใจกลไกการเกิดโรคเปลือกแห้งในระดับโมเลกุลและระดับเซลล์ของต้นยางพารามากขึ้น อย่างไรก็ตาม จะต้องมีการศึกษาในรายละเอียดที่เกี่ยวข้องต่อไป

คำสำคัญ: DEHYDRINS / *Hevea brasiliensis* / PR-10 PROTEIN / SSH / โรคเปลือกแห้ง