CONSTRUCTION OF TRANSFORMATION VECTORS EXPRESSING THE *Bacillus thuringiensis* CRY4Ba TOXIN IN CHLOROPLASTS OF TOBACCO (*Nicotiana tabacum*) AND ANALYSIS OF PUTATIVE TRANSPLASTOMIC LINES

JANEJIRA DUANGJIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2009

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

CONSTRUCTION OF TRANSFORMATION VECTORS EXPRESSING THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN IN CHLOROPLASTS OF TOBACCO (*Nicotiana tabacum*) AND ANALYSIS OF PUTATIVE TRANSPLASTOMIC LINES

JANEJIRA DUANGJIT 5036566 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: YUN-KIAM YAP, Ph.D., CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., KITTISAK YOKTHONGWATTANA, Ph.D., SITTHICHOKE TANGPHATSORNRUANG, Ph.D.

ABSTRACT

Cry4Ba, a toxin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis (Bti), is specific against *Aedes* and *Anopheles* mosquitos' larvae. In this study, we explore the potential of using the tobacco plant to produce this biopesticide. Plastid transformation has a high level of transgene expression and advantage in transgene containment. In order to accomplish plastid transformation, pT1T2 containing *trnI-trnA* targeting regions required for homologous recombination that will facilitate transgene integration into chloroplast gemome was first constructed. The *aadA* ORF (aminoglycoside adenyltransferase conferring resistance to spectinomycin and streptomycin) and *rbcL* terminator (3'*rbcL*) (derived from *Chlamydomonas*) was cloned to pT1T2, and resulted in promotorless *aadA* containing plasmid, pT1T2*aadA*-I. Then, pT1T2*aadA*-C plasmid containing *aadA* cassette was obtained by cloning 5'*rbcL* into pT1T2*aadA*-I. Both pT1T2*aadA*-I and pT1T2*aadA*-C were introduced into tobacco leaf explants by particle bombardment, and three putative transplastomic lines (PU1, PU2, and PU3) were obtained from 45 bombarded leaves. All of them conferred resistance to spectinomycin dihydrochloride and streptomycin sulfate. However, none of the putative line showed the integration of the *aadA* gene into the chloroplast genome. The result from phenotype observations and genomic analyses suggested that all three putative transplastomic lines are likely to be mutants. The construction of a final transformation vector containing Cry4Ba cassette, *aadA* cassette, and *trnI-trnA* targeting regions was performed. However, no desired plasmid construct was obtained, even when many cloning optimization strategies were attempted.

KEY WORDS: TOBACCO PLASTID TRANSFORMATION/Cry4Ba/MOSQUITO LARVICIDAL TOXIN

152 pages.

Copyright by Mahidol University

การสร้างพาหะเพื่อการแสดงออกของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Ba ในคลอโรพลาสต์ของต้นยาสูบและการตรวจหาต้นยาสูบที่เป็นทรานซ์พลาสโตมิก

CONSTRUCTION OF TRANSFORMATION VECTORS EXPRESSING THE *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba TOXIN IN CHLOROPLASTS OF TOBACCO (*Nicotiana tabacum*) AND ANALYSIS OF PUTATIVE TRANSPLASTOMIC LINES

เจนจิรา ดวงจิต 5036566 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: YUN-KIAM YAP, Ph.D., ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D., กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา, Ph.D., สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง, Ph.D.

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ต้นยาสูบเป็นแหล่งสำหรับผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Ba ซึ่งสามารถฆ่าลูกน้ำยุงในกลุ่ม *Aedes* และ *Anopheles* พลาสมิด pT1T2 ซึ่งมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณเป้าหมาย (*trnI* และ *trnA*) ซึ่งช่วยในการเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชั่นถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้เป็นพาหะในการแทรกของยีน *aadA* ซึ่งเป็นยีนที่ผลิตโปรตีน aminoglycoside adenyltransferase ที่มีฤทธิ์ต้านทานต่อยาสเปกติโนมัยซินและสเตรปโตมัยซินเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์โดยการโคลนยีน *aadA* และเทอร์มิเนเตอร์ของ *rbcL* เข้าไปยังพลาสมิด pT1T2 ได้เป็นพลาสมิด pT1T2*aadA*–I ซึ่งไม่มีโปรโมเตอร์ของ *aadA* สุดท้าย 5'*rbcL* จึงถูกโคลนเข้าสู่พลาสมิดดังกล่าวเพื่อให้ได้เป็นพลาสมิด pT1T2*aadA*–C ซึ่งมีคาสเซ็ตของ *aadA* อยู่ระหว่างดีเอ็นเอบริเวณเป้าหมาย (*trnI* และ *trnA*) เพื่อให้โปรตีนข้างต้นแสดงออกในต้นยาสูบ พลาสมิด pT1T2*aadA*–I และ pT1T2*aadA*–C จึงถูกนำเข้าสู่ต้นยาสูบโดยการยิงอนุภาคเข้าสู่เนื้อเยื่อใบยาสูบ ผลการศึกษาพบว่าเกิดต้นยาสูบสามสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ PU1, สายพันธุ์ PU2 และสายพันธุ์ PU3) ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มียาสเปกติโนมัยซินและสเตรปโตมัยซิน แต่ในการทดสอบโดยใช้ PCR และ Southern blot ผลบ่งชี้ว่าไม่มีการแทรกของยีนเข้าสู่คลอโรพลาสจีโนม จากการสังเกตลักษณะทางฟีโนไทป์ประกอบกับผลดังกล่าวสันนิษฐานได้ว่าสายพันธุ์ทั้งสามนั้นอาจจะเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ของดีอีน็อเอในคลอโรพลาสจีโนม ในการศึกษาครั้งนี้การสร้างพลาสมิดที่ใช้ในการนำยีน Cry4Ba เข้าสู่คลอโรพลาสจีโนมไม่ประสบผลสำเร็จ

152 หน้า

Copyright by Mahidol University