

รหัสโครงการ: BGJ4580009

ชื่อโครงการ: โครงการ การจำแนกชนิดของ *Bacillus thuringiensis* และศึกษาลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของยีน *cry* ที่มีผลกระทบต่อน้ *Spodoptera exigua* ในประเทศไทย

นักวิจัย และสถาบัน: ผศ. ดร. พัฒนา ศรีฟ้า สุรนรินทร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

fscipns@ku.ac.th

นางสาวเบญจวรรณ เลิศวิริยะวงศ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

I_benjawan@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 1 เมษายน 2546 – 8 กุมภาพันธ์ 2554

บทคัดย่อ

Bacillus thuringiensis JC190 ที่ตรวจสอบแล้วว่าสร้างสารที่เป็นพิษต่อหนอนกระทู้หอม ได้นำมาใช้ศึกษาเพื่อหาชนิดของยีน *cryIE(a)* โดยนำลำดับเบสบางส่วนที่โคลนได้จากยีน *cry* ของ JC190 ไปเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูลแล้วพบว่ามีความเหมือนกับยีน *cryIE(a)* ดังนั้นในการทดลองนี้จึงสังเคราะห์ไพรเมอร์จากหัวและท้ายของยีนทั้งสอง การโคลนยีนด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับเบสพบว่า ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 3,532 เบส และพบรหัสที่สมบูรณ์ของยีนขนาด 3,516 เบส แปลเป็นกรดอะมิโน 1,171 เรซิดิว จากการเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่โคลนได้กับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลพบว่ามีความสัมพันธ์กับกรดอะมิโนจากยีน *cryIE(a)* และมีความเหมือนกับโปรตีน CryIE(a) ของ *B. thuringiensis* อยู่ 98% ยีนที่โคลนได้นี้คาดว่า จะมีประโยชน์สำหรับการสร้างความต้านทานหนอนกระทู้หอมของไทยในอนาคต

Project Code : BGJ4580009

Project Title : Identification and nucleotide sequence of the *cry* gene of *Bacillus thuringiensis* that affecting to *Spodoptera exigua* in Thailand.

Investigator : Assist. Prof. Dr. Pattana Srifah Huehne, Kasetsart University

fscipns@ku.ac.th

Miss Benjawan Lertwiriawong,

Kasetsart University

l_benjawan@hotmail.com

Abstract

The endotoxin genes from 28 *Bacillus thuringiensis* strains which have been isolated and tested for their effecting to *Spodoptera exigua* in Thailand were identified for *cry1* type gene by PCR-RFLP. Two pairs of universal oligonucleotide primers were amplified *cry*-type gene fragments of the DNA template from *B.thuringiensis*. The RFLP patterns of PCR-amplified fragments from 28 *B. thuringiensis* Thai isolates revealed 8 possible distinct *cry*-type genes. These *cry*-type genes include *cry1A(a)*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1C(b)*, *cry1D*, *cry1E* and *cry1F*. One of unidentified isolates from RFLP pattern, JC190, was selected for analysis partial DNA sequencing. The result showed that it contains 2 *cry*-type genes including *cry1C* and *cry1E*. The *cry1E* specific primer was amplified the 3.5 kb fragment, then cloned for analysis. The result showed that the DNA sequence of 3,516 bp encoded for one protein of 1,171 amino acid residues in length. The amino acid sequence has 98% homology with CryIE(a) protein of *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (accession number AAA22345.1) when compared its sequence with 13 other reported BT proteins in database. This JC190 isolate was submitted in the GenBank as *cryIE(a)7* accession number AY894137. The cloned gene would be further used to improve Thai economic crops for insect resistance.

Keywords: endotoxin gene, *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera exigua*, *cry1E* and PCR-RFLP