ไคบี้ โจว : การวิเคราะห์จีโนมของคลอโรพลาสต์ โปรไฟล์ของสารเมตาโบไลท์ การสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ การประเมินความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและกิจกรรมการต้านสารอนุมูลอิสระของ *Mussaenda pubescens*. (THE CHLOROPLAST GENOME ANALYSIS, METABOLITE PROFILES, FLAVONOID BIOSYNTHESIS, HERBAL TEA ACUTE TOXICITY EVALUATION, AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Mussaenda pubescens*.) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ เกิดไทย, 122 หน้า.

Mussaenda pubescens เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีคุณค่าทางยา โดยเฉพาะลำต้นและใบที่นิยมใช้เป็นยารักษาโรคหรือตากแห้งเพื่อใช้แทนชา อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการเจริญและพัฒนาการหรือการใช้ประโยชน์จากพืชดังกล่าว งานวิจัยนี้ จึงเป็นการศึกษาที่ครอบคลุมครั้งแรก ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โปรไฟล์ของเมตาโบไลท์ การสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ และการประเมินการป้องกันความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน และความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของ *M. pubescens* งานวิจัยประกอบด้วย 4 งานทดลองดังนี้ งานทดลองที่ 1. การทดลองนี้ ดำเนินการเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจีโนมของคลอโรพลาสต์ ของ *M. pubescens* ทำการทดลองโดยการตรวจลำดับเบสของจีโนมในคลอโรพลาสต์โดยใช้ Illumina NovaSeq 6000 platform จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. pubescens* พบว่า *M. pubescens* และ *M. hirsutula* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ขนาดจีโนมของคลอโรพลาสต์ของ *M. pubescens* มีความยาวทั้งหมด 155,122 คู่เบส (bp) ผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าสปีชีส์ในสกุลเดียวกัน มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม นอกจากนี้ *M. hirsutula* ยังมีความเชื่อมโยงทางพันธุกรรมอย่างใกล้ชิดกับ *M. pubescens* โดยทั้งสองสปีชีส์มีการกระจายที่ทับซ้อนกันในบางพื้นที่ของประเทศจีน งานทดลองที่ 2. การศึกษานี้ใช้เทคนิค ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารเคมี และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารเมตาบอไลต์และความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของใบ *M. pubescens* ผลการศึกษาพบว่าใบของ *M. pubescens* มีสารเมตาบอไลต์ถึง 957 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดฟีนอลิก ไขมัน และเทอร์พีนอยด์ และพบว่า มีความแตกต่างของการสะสมสารเมตาบอไลต์ (DAMs) 317 ชนิดในใบ ความเข้มข้นของฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานินทั้งหมดลดลงเมื่อใบ *M. pubescens* เติบโตและพัฒนาในขณะที่เทอร์พีนอยด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ และแอนโทไซยานินเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อปฏิกิริยาการต้านสารอนุมูลอิสระของใบ *M. pubescens* งานทดลองที่ 3. การศึกษานี้ใช้การวิเคราะห์เมตาโบโลมและทรานสคริปโตมเพื่อตรวจสอบสารเมตาโบไลต์และการแสดงออกของยีนที่สำคัญของตาใบ ใบอ่อน และใบแก่ของ *M. pubescens* ผลการทดลองพบสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 81 ชนิดในใบของ *M. pubescens* และมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น (HCT, CHS, E5.5.1.6 และ PGT1) นอกจากนี้ ยังพบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ flavonoid 3'-monooxygenase (CYP75B1), anthocyanidin synthase (ANS), naringenin 3-dioxygenase (F3H), bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavanone 4-reductase (DFR) และ flavanone 7-*O*-glucoside 2"-*O*-beta-*L*-rhamnosyltransferase (C12RT1) มีความสัมพันธ์สูงกับสารเมตาโบไลต์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ตลอดวงจรการเจริญเติบโตของใบ งาน

ทดลองที่ 4. ในการศึกษานี้ ใบสดของ *M. pubescens* ถูกผลิตเป็นชาดำ (MpBT) โดยใช้กระบวนการแปรรูปชาดำแบบดั้งเดิม ตัวอ่อนของปลาม้าลายถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาผลการป้องกันความเสียหายจากออกซิเดชันที่เกิดจากสาร $CuSO_4$ ผลการทดลองพบว่า MpBT สามารถเพิ่มอัตราการฟัก อัตราการรอดชีวิต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลดอัตราการเกิดความผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกนากนั้น MpBT ยังสามารถยับยั้งการสะสมของสาร reactive oxygen species (ROS) กระตุ้นการทำงานของเอมไซน์ต้านอนุมูลอิสระและทำงานของยีนที่เกี่ยวข้อง นอกจากนั้น MpBT ยังป้องกันไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบ และส่งเสริมยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร $CuSO_4$ ในเอมบริโอของปลาม้าลาย ซึ่งรายงานนี้ เป็นรายงานฉบับแรกเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา จีโนมของคลอโรพลาสต์ โปรไฟล์ของสารเมตาโบไลต์ของของ *M. pubescens* ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับกลไกการควบคุมระดับโมเลกุลของการเปลี่ยนแปลงสีใบการพัฒนาการและการใช้ประโยชน์จาก *M. pubescens*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา.....
ปีการศึกษา 2566 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

CAIBI ZHOU : THE CHLOROPLAST GENOME ANALYSIS, METABOLITE PROFILES, FLAVONOID BIOSYNTHESIS, HERBAL TEA ACUTE TOXICITY EVALUATION, AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Mussaenda pubescens*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. DR. TEERAYOOT GIRDTHAI, 122 PP.

Morphological characteristics/*Mussaenda pubescens*/*Chloroplast genomes*/ Phylogenetic relationship/Metabolome/Antioxidants/Quality traits/ Transcriptome/Flavonoids biosynthesis/Acute Toxicity/*Zebrafish*

Mussaenda pubescens is a valuable source of medicinal natural products, particularly stems and leaves, which have been used medicinally or dried as a tea substitute. However, no research on their growth and development or their utilization has been reported. This was the first comprehensive research aimed to investigate the genetic relationship, metabolite profiles, flavonoid biosynthesis, and evaluation of its protective effect from acute toxicity and antioxidant properties of *M. pubescens*. This research included four experiments. Experiment 1: This experiment was conducted to investigate the morphological characteristics and complete chloroplast (cp) *genome* of *M pubescens*. The cp was sequenced using the Illumina NovaSeq 6000 platform. According to the morphological characteristics of *M pubescens*, there is a close relationship between *M. pubescens* and *M. hirsutula*. The *cp genome* of *M. pubescens* spanned a total length of 155,122 bp. The results of phylogenetic analyses demonstrated that species within the same genus displayed a tendency to group closely together. Furthermore, *M. hirsutula* showed a close genetic connection to *M pubescens*, with the two species having partially overlapping distributions in China. Experiment 2: This study used ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) technique to investigate substance changes and the relationship between metabolites and antioxidant capacity in *M. pubescens* leaves. The results showed that *M. pubescens* leaves contained 957 metabolites, the majority of which were phenolic acids, lipids, and terpenoids. A total of 317 differentially accumulated metabolites (DAMs) in leaves were screened. Total phenolics, flavonoids, and anthocyanin concentrations decreased as *M. pubescens* leaves grew and developed, whereas terpenoids increased significantly. Phenolics, flavonoids, terpenoids, and anthocyanins were the primary factors influencing the antioxidant activity of leaves. Experiment 3: This study used metabolome and transcriptome analyses to investigate the key metabolites and genes from bud leaves, tender leaves, and mature leaves in *M pubescens*. The results showed a total of 81 individual

flavonoids in *M. pubescens* leaves. The expression of flavonoid biosynthesis genes (HCT, CHS, E5.5.1.6, and PGT1) were up-regulated. Additionally, the expression of genes involved in flavonoid 3'-monooxygenase (CYP75B1), anthocyanidin synthase (ANS), naringenin 3-dioxygenase (F3H), bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavanone 4-reductase (DFR), and flavanone 7-O-glucoside 2"-O-beta-L-rhamnosyltransferase (C12RT1), exhibited a highly correlative relationship with metabolites in the flavonoid biosynthesis across the whole growth cycle of *M. pubescens* leaves. Experiment 4: In this study, the fresh leaves of *M. pubescens* were produced into black tea (MpBT) using traditional black tea processing procedures. Zebrafish embryos were used to study the protective effects of $CuSO_4$-induced oxidative damage. The results showed that MpBT significantly improved hatching, survival rates, morphological characteristics, and decreased malformation rates ($p < 0.05$). Furthermore, MpBT inhibited the generation of reactive oxygen species (ROS), recovered the activities of antioxidant enzymes, and increased oxidative stress-associated genes. Other than that, MpBT also prevented pro-inflammatory cytokines and improved apoptosis-associated genes induced by $CuSO_4$ in *zebrafish* embryos. This first report on the morphological characteristics, *cp genome*, and metabolite profiles of *M. pubescens* provides a reference value for the molecular regulation mechanism of leaf color alteration and the development and utilization of *M pubescens*.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Crop Production Technology
Academic Year 2023

Student's Signature Caibi Zhou
Advisor's Signature Tawatchai Gisdhai