การแสดงออกของยีนไคติเนสในองุ่นเพื่อต้านทานโรคราน้ำค้าง

แคลลัส / ไคติเนส / องุ่น / องุ่นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

ปลายยอดขององุ่นสายพันธุ์ชีราสถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร IM1, IM2 และ MM โดยเพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP (4.4 ไมโครโมลาร์, 8.8 ไมโครโมลาร์ และ 13.2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ) พร้อมกับฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ ยอดองุ่นจำนวนมากถูกชักนำให้เกิดขึ้นภายใน 90 วัน ยอดและรากถูกชักนำโดยฮอร์โมน NAA ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และฮอร์โมน Kinetin ความเข้มข้น 0.9 ไมโครโมลาร์ในอาหาร MS จากนั้นย้ายต้นองุ่นนี้ลงในกระถางเพื่อใช้สำหรับการขยายพันธุ์ต่อไป ยีนไคติเนสจากกระถินบ้าน (*Leucaena leucocephala*) ที่อยู่ในพลาสมิด pUC19 ถูกโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pET-39b(+) ตรงตำแหน่ง *Eco*RI จากนั้นยีนไคติเนสที่มีขนาด 1.1 กิโลเบสจะถูกตัดที่ตำแหน่ง *Sac*I และ *Bam*HI เพื่อนำไปโคลนต่อในเวคเตอร์ pBI121 โดยนำเข้าไปแทนที่ยีน GUS จากนั้นจึงนำ pBI121:chitinase นี้เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404 ด้วยวิธี Electroporation แล้วถ่ายโอนยีนนี้เข้าสู่เซลล์ใบองุ่นสายพันธุ์ชีราส โดยวิธี *Agrobacterium*-mediated transformation ใบองุ่นที่มี *Agrobacterium* นี้จะถูกนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่มีฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์และฮอร์โมน 4-CPPU ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์ นาน 2 วันในที่มืด แล้วจึงย้ายลงมาเลี้ยงต่อในอาหารสูตรเดียวกันที่มีสารปฏิชีวนะ ชนิด carbenicillin ความเข้มข้น 250 มก./ล. และ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มก./ล. เพื่อกำจัด *Agrobacterium* จากนั้นคัดเลือกแล้วย้ายแคลลัสไปเลี้ยงต่อในอาหารสูตรเดิมแต่เพิ่มสารปฏิชีวนะชนิด kanamycin ความเข้มข้น 100 มก./ล. จากนั้นทำการทดสอบเพื่อยืนยันการถ่ายยีนด้วยการตรวจสอบยีนไคติเนสขนาด 1.1 กิโลเบส และยีน NPTII ขนาด 0.8 กิโลเบส พบว่ายีนทั้งสองชนิดนี้มีอยู่ในแคลลัสขององุ่นที่ถูกถ่ายโอนยีน ยืนยันได้ว่าแคลลัสขององุ่นได้รับยีนไคติเนสของกระถินบ้าน นอกจากนี้ เอนไซม์สกัดของกระถินบ้านสามารถทำลายสปอร์ของเชื้อรา *Plasmopora viticola* ได้สูงถึง 55%

THE EXPRESSION OF CHITINASE GENE IN TRANSFORMED GRAPE FOR DOWNY MILDEW RESISTANCE.

CALLUS /CHITINASE/ GRAPE /TRANSGENIC GRAPE

Apical shoots of grape cultivar Shiraz were cultured on IM1, IM2 and MM medium with increased concentration of BAP (4.4 μM, 8.8 μM and 13.2 μM, respectively) and 0.05 μM NAA. The proliferated shoots were obtained in 90 days. The shoot and root were induced by 0.5 μM NAA and 0.9 μM Kinetin on MS medium and transferred into pots for propagation. The pUC19 contained chitinase gene of *Leucaena leucocephala* was transformed to pET-39b(+) vector at *Eco*RI site. About 1.1 kb of chitinase gene at *Sac*I and *Bam*HI sites were cut and replaced on GUS gene in pBI121. The electroporation method was used to transformed pBI121: chitinase to *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. This vector was transformed by *Agrobacterium* mediated transformation. Grape leaves were soaked with *Agrobacterium*, and put them on NN medium supplemented with 5.0 μM 2,4-D and 5.0 μM 4-CPPU for 2 days in dark and transferred to the same medium with 250 mg/l carbenicillin and 250 mg/l cefotaxime in order to eliminate *Agrobacterium*. The transgenic grape was selected on the same medium containing 100 mg/l kanamycin. The 1.1 kb of chitinase gene and 0.8 kp of NPTII selectable marker gene were found in transgenic callus. This indicated that leucaena chitinase was successfully introduced into grape callus. Furthermore, crude extract from *L. leucocephala* show high damage to *Plasmopara viticola* sporangia up to 55%.