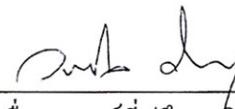


จิตติมา เอื่องกิตติกุล 2551: การโคลนยีนไคตินเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เข้าสู่ยีสต์ (*Pichia pastoris*) และการประเมินประสิทธิภาพของสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของถั่วฝักยาว ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณวิไล อินทนู, วท.ค. 69 หน้า

ได้นำยีน *chi42* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส (endochitinase) ซึ่งมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 42 กิโลดาลตัน ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด ไปเชื่อมต่อกับ pQE80L expression vector เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ *E. coli* แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการแยกสกัดโปรตีนในรูป soluble protein จึงได้โคลนยีนไคตินเนสเข้าไปใน pCR@8/GW/TOPO cloning vector เพื่อเตรียมยีนไคตินเนสเข้าสู่พลาสมิด pPIC9 ซึ่งเป็น expression vector ของยีสต์ *Pichia pastoris* ที่ตำแหน่ง *Stul* ทำการตรวจสอบผลของการนำยีน *chi42* เข้าสู่ระบบรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ยีสต์จากโคลนของยีสต์ที่คัดเลือกได้จำนวน 72 ตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับข้อมูลยีนไคตินเนสที่มีรายงานมาก่อน (phylogenetic tree) พบว่ายีน *chi42* ที่อยู่ในพลาสมิดลูกผสม pPIC9 จากโคลนของยีสต์ที่คัดเลือกได้จำนวน 23 ตัวอย่าง โดยยีน *chi42* ที่ตรวจพบมีขนาดเท่ากับ 1275 คู่เบสและมีความสัมพันธ์มากกว่า 90% homology กับยีนไคตินเนสจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นตรวจวิเคราะห์ยีน *chi42* ในรีคอมบิแนนท์ยีสต์จำนวน 6 ตัวอย่างจากโคลนของยีสต์ทั้งหมดจำนวน 23 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization พบว่าเซลล์ยีสต์จากตัวอย่างทั้งหมดมียีน *chi42* เข้ารวมอยู่ในโครโมโซมยีสต์อย่างถาวร ตรวจสอบผลของการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนขนาด 42 กิโลดาลตันที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ที่ไม่มียีน *chi42* แต่ในทางตรงกันข้ามจากการตรวจผลการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ด้วยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสในอาหารเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *chi42* พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสในอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ได้รับการถ่ายยีนไคตินเนสสูงกว่าตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทำให้สามารถยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่ได้รับการศึกษาในครั้งนี้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเอนไซม์ไคตินเนสได้อย่างสมบูรณ์ การแช่เมล็ดถั่วฝักยาวเป็นเวลา 30 วัน ในสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร MD เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปปลูกในดินที่มีเชื้อรา *Rhizoctonia solani* พบว่าสามารถควบคุมโรคเน่าระดับดินของถั่วฝักยาวได้สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อโรค 62.5 เปอร์เซ็นต์หลังปลูก 10 วัน โดยมีการเกิดโรคเท่ากับ 35.0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อราไตรโคเดอร์มา สารเคมีคาร์บอซิม และสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 22.5 20.0 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อโรคเกิดโรค 97.5 เปอร์เซ็นต์

จิตติมา เอื่องกิตติกุล  
ลายมือชื่อนิติกร

  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

2 / มี.ช. / 2551

Jittima Aeungkittikul 2008: Cloning of Endochitinase Gene from *Trichoderma harzianum* into Yeast (*Pichia pastoris*) and Efficacy Evaluation of Recombinant Yeast Culture Filtrate for The Control of Yard Long Bean Damping-Off . Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Wanwilai Intanoo, Ph.D. 69 pages.

The chitinase enzyme by *Trichoderma* species is of interest in relation to their use in biocontrol and as a source of mycolytic enzyme. The *chi42* gene encoded a 42 kDa endochitinase was cloned into the *E. coli* cloning vector but a result of the expression in *E. coli* expression vector, pQE80L, was undesirable because of an insoluble protein. Therefore, in this study, production of a soluble secreted molecule from the recombinant yeast expression system for expressing a soluble protein into the medium was investigated and evaluated for its application in the biological control of yard long bean damping-off. Endochitinase (*chi 42* gene) encoding cDNA was isolated from total RNA of *T. harzianum* strain CB-Pin-01 by RT-PCR. The *chi42* cDNA coded for an endochitinase of 1275 nucleotide sequences. The *chi42* gene from *T. harzianum* was cloned in pCR®8/GW/TOPO cloning vector, prior to subclone into *StuI* site in the *Pichia pastoris* expression vector, pPIC9. From 72 transformed yeast clones, the integration of chitinase gene (1275 bp in nucleotide sequence) in the genome of recombinant yeast was successfully confirmed by PCR (23 positive clones) and Southern blot hybridization in 6 recombinant yeast clones. From phylogenetic tree, sequence comparison showed that *chi 42* gene from this study and other chitinases available in GenBank had more than 90% similarity in nucleotide sequences. Although the analysis of recombinant protein using SDS-PAGE can not examine the expressed 42 kDa protein in the culture medium of recombinant yeast, endochitinase activity from the supernatant of recombinant yeast culture was clearly detected, comparing to the control treatment (non-transformed *P. pastoris*). From an evaluation of disease-control efficacy, yard long bean seed soaked in culture filtrate from the recombinant yeast showed higher efficiency by 62.5% for controlling yard long bean damping-off caused by *Rhizoctonia solani*, comparing to the control treatment with pathogen only. The use of culture filtrate secreted from the recombinant yeast, however, gave less efficient inhibition to the fungal disease when compared to the application of *T. harzianum* suspension and Carboxin. The efficient production of recombinant chitinase from the biocontrol agent was achieved when the disease incident between a recombinant yeast and non-transformed yeast was exhibited, 35% and 50%, respectively.

Jittima Aeungkittikul  
Student's signature

Wanwilai Intanoo  
Thesis Advisor's signature

2 / June / 2008