วิทยานิพนธ์

การโคลนยีนไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เข้าสู่ยีสต์ (*Pichia pastoris*) และการประเมินประสิทธิภาพของสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของถั่วฝักยาว

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

นางสาวจิตติมา เอื้องกิตติกุล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร | โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การโคลนยีนไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เข้าสู่ยีสต์ (*Pichia pastoris*) และการประเมินประสิทธิภาพของสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของถั่วฝักยาว

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

นามผู้วิจัย นางสาวจิตติมา เอื้องกิตติกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณวิไล อินทนู, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์จิระเดช แจ่มสว่าง, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์กนกวรรณ รมยานนท์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา .....

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนยีนไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เข้าสู่ยีสต์ (*Pichia pastoris*) และการประเมินประสิทธิภาพของสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของถั่วฝักยาว

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

โดย

นางสาวจิตติมา เอื้องกิตติกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2551

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

ได้นำยีน chi42 ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไคติเนส (endochitinase) ซึ่งมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 42 กิโลดาลตัน ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด ไปเชื่อมต่อกับ pQE80L expression vector เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ *E. coli* แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการแยกสกัดโปรตีนในรูป soluble protein จึงได้โคลนยีนไคติเนสเข้าไปใน pCR®8/GW/TOPO cloning vector เพื่อเตรียมยีนไคติเนสเข้าสู่พลาสมิด pPIC9 ซึ่งเป็น expression vector ของยีสต์ *Pichia pastoris* ที่ตำแหน่ง*Stu*I ทำการตรวจสอบผลของการนำยีน *chi42* เข้าสู่ระบบรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ยีสต์จากโคลนของยีสต์ที่คัดเลือกได้จำนวน 72 ตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับข้อมูลยีนไคติเนสที่มีรายงานมาก่อน (phylogenetic tree) พบว่ายีน*chi42* ที่อยู่ใน พลาสมิดลูกผสม pPIC9 จากโคลนของยีสต์ที่คัดเลือกได้จำนวน 23 ตัวอย่างโดย ยีน *chi42* ที่ตรวจพบมีขนาดเท่ากับ 1275 คู่เบสและมีความสัมพันธ์มากกว่า 90%homology กับยีนไคติเนสจากเชื้อรา *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* แต่ในทางตรงกันข้ามจากการตรวจผลการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ด้วยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในอาหารเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *chi42* พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนสสูงกว่าตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทำให้สามารถยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่ได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเอนไซม์ไคติเนสได้อย่างสมบูรณ์ การแช่เมล็ดถั่วฝักยาวเป็นเวลา 30 วัน ในสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร MD เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำไปปลูกในดินที่มีเชื้อรา *Rhizoctonia solani* พบว่าสามารถควบคุมโรคเน่าระดับดินของถั่วฝักยาวได้สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อโรค 62.5 เปอร์เซ็นต์หลังปลูก 10 วัน โดยมีการเกิดโรคเท่ากับ 35.0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อราไตรโคเดอร์มา สารเคมีคาร์บอกซิน และสารกรองจากยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 22.5 20.0 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อโรคเกิดโรค 97.5 เปอร์เซ็นต์

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

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 *Stu*I 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 soked 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.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณวิไล อินทนู อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่กรุณาอบรมสั่งสอน ให้ความรู้และคำปรึกษา ในด้านการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดียิ่งตลอดมา ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.จิระเดช แจ่มสว่าง และ ดร.กนกวรรณ รมยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร. วันเพ็ญ ศรีทองชัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม ที่ให้ความรู้และคำแนะนำทั้งการศึกษาการทำวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนการศึกษาและทุนวิจัย ขอขอบคุณ ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ให้ความรู้และความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ทำงานทดลองในครั้งนี้ และขอขอบคุณทุกๆ คนในห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และเป็นมิตรที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่สนับสนุนการศึกษาและคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

จิตติมา เอื้องกิตติกุล

เมษายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลและวิจารณ์การทดลอง	29
สรุปและข้อเสนอแนะ	50
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	51
ภาคผนวก	57
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	69

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	งานวิจัยเพื่อศึกษาและพัฒนาการสร้างเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราไตรโคเดอร์มาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นด้วยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ	11
2	กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่ย่อยสลาย colloidal chitin จากตัวอย่าง supernatant ของการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มียีนไคติเนส	44
3	การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าถั่วฝักยาวสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*	47

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	scFv production ที่แสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* และแบคทีเรีย *E. coli*	14
2	เวกเตอร์ pCR®8/GW/TOPO เป็น cloning vector สำหรับการสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีนไคติเนสบรรจุอยู่	19
3	ลำดับเบสแสดงรายละเอียดของบริเวณที่เป็น multiple cloning site ใน pPIC9 vector	21
4	เวกเตอร์ pPIC9 เป็น expression vector สำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์	21
5	การแยกยีนไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 โดยเทคนิค RT-PCR จากไพรเมอร์ ChiE1 และ ChiN2	30
6	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก cDNA ของยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 (http://www.ncbi.com)	31
7	การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มียีนไคติเนสสอดแทรกอยู่	32
8	การเพิ่มปริมาณยีนไคติเนสที่สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสมโดยเทคนิค PCR	33
9	การแยกยีนไคติเนสที่ตัดออกจากพลาสมิด pCR®8/GW/TOPO ด้วย restriction enzymes ที่ตำแหน่งของ *Eco*Rl และ *Not*l	34
10	ยีนไคติเนสเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pPIC9 ในตำแหน่ง restriction enzymes คือ *Eco*Rl และ *Not*l (*Pichia* expression kit, Invitrogen)	35
11	การตรวจสอบเซลล์ *E. coli* ที่มียีนไคติเนสที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดของเวกเตอร์ pPIC9 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 5'AOX1 และ 3'AOX1	36
12	Phylogenetic tree แสดงการจัดจำแนกความสัมพันธ์ของ cDNA clones ของยีนไคติเนสด้วยโปรแกรม ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw)	37
13	การตรวจสอบยีนไคติเนสโดยนำโคโลนียีสต์ *Pichia pastoris* มาเป็นแม่แบบและไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนไคติเนส (ChiE1 และ ChiN2) ด้วยเทคนิค PCR	38
14	รูปแบบของ Chitinase Gene Insertion บนโครโมโซมของยีสต์ *Pichia pastoris*	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของยีนไคติเนสจากโคโลนียีสต์ *Pichia pastoris* ตัวอย่างที่ 62-67 ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization เปรียบเทียบกับเจล PCR product.	40
16	การตรวจสอบโปรตีนของยีสต์ *P. pastoris* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนส เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ยีสต์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	42
17	การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสมของเวกเตอร์ pQE80L กับยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ที่มีโปรตีนขนาด 42 กิโลดาลตัน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ใน supernatant และใน pellet	43
18	ต้นกล้าถั่วฝักยาวในกระถางหลังปลูก 5 วัน (A) และต้นกล้าถั่วฝักยาวที่ถอนขึ้นจากดินปลูก หลังปลูก 10 วัน (B)	48

ภาพผนวกที่

1	กราฟมาตรฐานระหว่าง N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 586 นาโนเมตร	68

การโคลนยีนไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เข้าสู่ยีสต์ (*Pichia pastoris*) และการประเมินประสิทธิภาพของสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของถั่วฝักยาว

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

คำนำ

เชื้อสาเหตุโรคพืชนับว่าเป็นปัญหาสำคัญยิ่งประการหนึ่งของการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจ เนื่องจากการป้องกันกำจัดทำได้ค่อนข้างยากและเมื่อพืชเป็นโรคแล้วจะเกิดความเสียหายอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเกิดปัญหากับพืชผักในระยะที่กำลังให้ผลผลิต การป้องกันกำจัดที่เกษตรกรนิยมใช้กันคือการใช้สารเคมี ซึ่งนอกจากจะทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้นแล้ว ยังส่งผลทำให้มีสารพิษตกค้างในผลผลิต เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้ผลิตเองและผู้บริโภค รวมถึงทำลายสภาพแวดล้อมอีกด้วย ประเด็นดังกล่าวได้ถูกนำมาเป็นเงื่อนไขทางการค้าระหว่างประเทศ ทำให้การส่งออกผลผลิตพืชผักทำได้ยากขึ้น การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biological control) ด้วยการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคพืชนับเป็นอีกแนวทางหนึ่งเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี เนื่องจากเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดนี้มีกลไกในการเข้าทำลายเชื้อโรคได้หลายกลไก เช่น การเป็นปรสิตต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasitism) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อราไตรโคเดอร์มาผลิตขึ้นมาย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค เช่น chitinase หรือ chitinolytic enzyme อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในการเป็นปฏิปักษ์ยังคงถูกจำกัดอยู่ เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อราไตรโคเดอร์มาใช้เวลานาน 5-7 วัน เกษตรกรจึงจะนำไปใช้ในการควบคุมและกำจัดโรคพืชได้ และเชื้อราไตรโคเดอร์มามียีนที่จะผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้เมื่อมีการกระตุ้นด้วยการบุกรุกของเชื้อโรค นอกจากนี้จากการศึกษายีนที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราไตรโคเดอร์มา พบว่าไม่สามารถแสดงออกในเซลล์แบคทีเรียได้เนื่องจากไม่มีกลไกการปลดปล่อยโปรตีนได้ แม้ว่าแบคทีเรียเจริญได้อย่างรวดเร็วภายใน 2 วัน แต่ในขณะที่ยีสต์บางชนิดมียีนอื่นที่ควบคุมให้เกิดการปลดปล่อยโปรตีนนี้ได้ด้วย ดังนั้นจึงมีการนำความรู้ด้านเทคโนโลยี ชีวภาพ

เกษตรมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มศักยภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคนี้ให้มีประสิทธิภาพสูงและมีความหลากหลายมากขึ้น

การศึกษาด้านรีคอมบิแนนท์ยีสต์มีความก้าวหน้ามาก และมีการใช้เทคนิคนี้มาใช้ในการดัดแปลงและปรับปรุงตัวนำดีเอ็นเอของยีสต์เช่นเดียวกับที่ทำกับ *Escherichia coli* อย่างไรก็ตาม ยีสต์มีความได้เปรียบ *E. coli* หลายด้าน เช่น ยีสต์มีระบบการหลั่งสารออกนอกเซลล์และยีสต์สามารถเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่สร้างขึ้นภายหลังการสังเคราะห์โปรตีนแล้ว ซึ่งระบบนี้คล้ายคลึงกับระบบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงและไม่พบระบบนี้ใน *E. coli*

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งที่จะนำเทคนิคการโคลนและถ่ายยีนไคติเนสของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเข้าสู่ยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อให้ยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้มีประสิทธิภาพอย่างรวดเร็วและนำไปใช้ควบคุมโรคพืชได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการโคลนยีนไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เข้าสู่ยีสต์ (*Pichia pastoris*)

2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนในรีคอมบิแนนท์ยีสต์

3. การประเมินประสิทธิภาพของสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของถั่วฝักยาว

ตรวจเอกสาร

1. เชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคเน่าระดับดิน

เชื้อรา *Rhizoctonia solani* จัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina ไม่สร้าง asexual spore มีเพียงเส้นใยและ resistant structure ที่เรียกว่า microsclerotium หรือ sclerotium ซึ่งเกิดจากการพันตัวของเส้นใยอย่างหลวมๆ การเข้าทำลายของเชื้อราชนิดนี้ในระยะแรกจะสร้าง appressorium ที่ผิวพืช จากนั้นจึงสร้างเส้นใยแทงผ่านเข้าสู่เซลล์พืช เชื้อราสามารถปรับตัวให้คงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวยได้นานถึง 4 ปี และเมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสม กล่าวคือ ความชื้นในดินสูงและอุณหภูมิเหมาะสม เชื้อราจะเจริญและแพร่ระบาดทำความเสียหายกับพืชได้อย่างรวดเร็วโดยเฉพาะกับพืชเศรษฐกิจ เช่น วงศ์กะหล่ำ (Cruciferae), ข้าว (Gramineae), ถั่ว (Leguminosae), มะเขือ (Solanaceae), ฝ้าย (Malvaceae) และพืชในวงศ์อื่นๆอีกหลายชนิด

การควบคุมโรคนี้ทำได้ยาก เนื่องจากเชื้อราสามารถอยู่ในดินได้นานและมีพืชอาศัยกว้าง โดยส่วนใหญ่เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีคลุกเมล็ดก่อนปลูก เช่น Carboxin และ thiabendazole เริ่มมีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคด้วย เช่น การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์เข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยการใช้เส้นใยพันรัดเชื้อราสาเหตุโรคแล้วผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะเอนไซม์ไคติเนสออกมาย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคซึ่งมีส่วนประกอบไคตินอยู่ทำให้เกิดการสลายตัวของผนังเส้นใยและลดกิจกรรมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคลง ส่งผลต่อการขยายพันธุ์และทำให้เชื้อโรคตายไปในที่สุด

เกรียงศักดิ์ (2546) รายงานผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ร่วมกับเชื้อรา *Gliocladium* sp. สายพันธุ์ Gv.81 ว่าสามารถควบคุมเชื้อรา *R. solani* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าระดับดินในกระเจี๊ยบเขียวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยช่วยให้มีต้นงอก 88 เปอร์เซ็นต์

Harman และคณะ (1981) พบว่าการใช้เชื้อรา *T. hamatum* คลุกเมล็ดถั่ว (pea) และผักกาดหัว (radish) สามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium* spp. และ *R. solani* ได้ผลดี ในขณะที่มีการทดสอบในเรือนกระจกโดยใช้เชื้อรา *T. harzianum* คลุกเมล็ดถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) พบว่าสามารถลดการเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ได้ร้อยละ 32-65 (Chet *et al*., 1984)

เช่นเดียวกับ Elad และคณะ (1983) ได้ใช้เชื้อรา *T. harzianum* คลุกเมล็ดฝ้าย พบว่าสามารถป้องกันโรคเน่าระดับดินที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ได้ดีเช่นกัน

นอกจากนี้ Elad และคณะ (1981) ศึกษาพบว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมโรคของไม้ดอก เช่น คาร์เนชั่น (carnation) ที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ได้ผลดี อีกด้วย

2. เชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นิยมใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2475 จึงมีการวิจัยและศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. อย่างกว้างขวางจนถึงปัจจุบัน เชื้อรา *T. harzianum* เป็นเชื้อราจำพวก saprophyte ที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน อาศัยเศษซากพืช ซากสัตว์และแหล่งอินทรียวัตถุเป็นอาหาร พบได้ทั่วไปในดินทุกแห่งทั้งในเศษซากไม้เนื้ออ่อนและเนื้อแข็ง

การจำแนกอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

Kingdom Fungi
Division Eumycota
Subdivision Deuteromycotina
Class Hyphomycetes
Order Moniliales , Hypocrea
Family Moniliaceae
Genus *Trichoderma*
Species *harzianum*

ลักษณะของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เป็นเส้นใย มีการสร้างสปอร์ (conidia) จาก conidiophore ที่เป็นก้านยาวมีการแตกแขนงทางด้านข้าง มีการสร้างกลุ่มของ phialide สั้น ๆ conidium มี 1 เซลล์ ผลิตอย่างต่อเนื่องจากส่วนปลายของ phialide ซึ่งสามารถรวมกันเป็นกลุ่ม ในลักษณะ wetmass เล็กๆ โคโลนีสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว มีสีขาว เขียวและเหลือง (วิจัย, 2531) การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphs) มีการสร้างสปอร์ได้ปริมาณมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีคือสีเหลืองอ่อน (buff), สีเหลือง (yellow), สีน้ำตาลเหลือง (amber) และสีเหลืองอมเขียว (yellow-green) บางสายพันธุ์สร้าง chlamydospore ระหว่างเส้นใยหรือปลายเส้นใย ซึ่งเป็น

โครงสร้างที่อยู่ในดินได้ดี ส่วนระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorphs) เชื้อรา *T. harzianum* Rifai จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota Order Hypocrea Family Hypocreaceae และใน Genus *Hypocrea* ซึ่งเชื้อรา *T. harzianum* สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Hypocrea lixii* ที่มีการสร้าง ascospore โดยส่วนมากไม่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งในธรรมชาติจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นจะมาจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมโรค Weindling (1932) พบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถทำลายเชื้อ *Rhizoctonia solani* โดยการเป็นปรสิตด้วยการสร้างเส้นใยพันรัด (coiling around) เส้นใยของเชื้อโรค นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่ามีเชื้อราอีกหลายชนิด เช่น เชื้อรา *Phytophthora*, เชื้อรา *Pythium*, เชื้อรา *Rhizopus* และเชื้อรา *Sclerotium* ที่สามารถควบคุมการแพร่กระจายด้วยการเข้าทำลายของเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดนี้

จิระเดช และวรรณวิไล (2542) ได้ศึกษาและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อราไตรโคเดอร์มาไว้ว่ามีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ โดยมีกลไกในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช คือ

1.) Mycoparasitism เป็นการควบคุมโรคพืชโดยการเป็นปรสิต (parasite) ต่อเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคพืช ด้วยการเจริญพันรัดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.ไปสัมผัสกับเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคแล้วย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเพื่อเจริญเข้าไปใช้อาหาร และเจริญเติบโตสร้างส่วนขยายพันธุ์ออกมาจากเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจนเป็นเหตุให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชแตกสลายหรือเหี่ยวแห้ง (lysis) และตายในที่สุด จากการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อรา *Tricoderma* spp. ผลิตขึ้นเพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค เช่น chitinase หรือ chitinolytic enzyme, β-1,3-glucanase, β-1,6-glucanase, peptaibol antibiotics สามารถทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น เชื้อรา *Rhizoctonia, Sclerotium, Helminthosporum, Fusarium, Verticillium, Pythium, Phytophthora, Colletotrichum*.

2.) Competition and rhizosphere competence เป็นการแข่งขันการใช้อาหารและการครอบครองพื้นที่ระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. กับเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น ในกรณีที่เชื้อรา *T. koningii* สามารถเจริญเติบโตและครอบครองรากหอม และทำลายเชื้อรา *Sclerotium cepivorum* เชื้อสาเหตุโรคพืชได้ โดยที่เชื้อรา *T. harzianum* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในรูปของ dextrose, fructose, mannose, galactose, xylose, ribose, trehalose และ cellobiose ได้ดีและสามารถใช้

ไนโตรเจนในรูปของยูเรีย และ casamino acid ได้ Sivan และ Chet (1989) ได้แสดงให้เห็นว่าเมล็ดพืชที่คลุกด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มาแล้วปลูกในดินที่มีความชื้นสม่ำเสมอ ช่วยให้เชื้อราไตรโคเดอร์มาในบริเวณรอบๆราก(rhizosphere) มีปริมาณสูงขึ้นมาก ในขณะที่เชื้อรา *Fusarium* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวมีปริมาณลดลง

3.) Antibiotics เป็นการสร้างปฏิชีวนสารโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp.บางสายพันธุ์ เพื่อยับยั้งหรือทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น สารไตรโคเดอร์มิน (Trichodermin) ที่เป็นปฏิชีวนสารในกลุ่ม sesquiterpene (Godtfredsen และ Vangedal, 1965) และสารไตรโคลิน (Tricholin) ที่ผลิตโดยเชื้อรา *T. viride* มีผลในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (Lin, 1994)

4.) Tolerance to biotic and abiotic stresses through enhanced root development and plant growth promoting การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ช่วยให้พืชมีความคงทนต่อสภาพที่ไม่เหมาะสมทั้งทาง biotic และ abiotic stresses เช่น ช่วยให้พืชทนแล้ง ทนต่อแมลงและโรค โดยส่งเสริมการพัฒนาระบบราก เช่น การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp.สายพันธุ์ fusant T-22 ซึ่งสามารถเจริญครอบครองรากพืชได้ดี ทำให้พืชทดสอบที่ปลูกในสภาพแห้งแล้ง (drought stress) มีความยาวของรากมากขึ้นและยับยั้งอาการม้วนงอของใบได้

5.) Solubilization and sequestration of inorganic plant nutrients เชื้อรา *T. harzianum* ช่วยละลายแร่ธาตุในดินซึ่งอยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถดูดซึมได้ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถดูดซึมได้ โดยเฉพาะธาตุแมงกานีสที่มีบทบาทต่อการเจริญของพืชและกระบวนการต้านทานต่อโรคได้ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ได้ดีคือ Mn^{2+} และส่งเสริมการใช้แร่ธาตุในพืชชนิดอื่นๆ เช่น ส่งเสริมการใช้ธาตุไนโตรเจน, rock phosphate, Zn metal (Zn^{0}), Mn^{4+}, Fe^{3+} และ Cu^{2+} เช่น เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ fusant T-22 สามารถผลิตสารที่ลด oxidation ของไอออนและผลิต siderophores ที่เป็นตัว chelate ไอออนได้

6.) Induced resistance in plant เป็นกลไกการชักนำความต้านทานต่อโรคพืชด้วยเชื้อรา *T. harzianum* มีการศึกษาการชักนำความต้านทานด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1997 โดยการแสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-39 ลงในดินสามารถลดการเกิดโรคบนใบของถั่วที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* และเชื้อรา *Collettrichum lindemuthianum* ได้ แม้ว่าจะตรวจพบเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-39 เฉพาะบริเวณราก เท่านั้นไม่พบในส่วนใบ

ของพืชเลย De Meyer และคณะ (1998) อธิบายการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ว่าสามารถควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* ในมะเขือเทศ, ผักกาดหอม, พริก, ถั่ว และยาสูบได้ โดยลดอาการ grey mold ลงถึง 25-100% รวมทั้งชะลอหรือยับยั้งการแพร่กระจายของโรคได้ Kloepper และคณะ (1992) ให้คำจำกัดความของ induced resistance ว่าเป็นการนำสิ่งที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิตมาชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทด์ ทำให้เกิดความเสียหายเฉพาะจุด ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและกลไกต่างๆ โดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงในพืชเมื่อถูกชักนำนั้นมักมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น callose, lignin และ phenolic มีการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ต่างๆ เช่น chitinase, peroxidase, polyphenol oxidase และ phenylalanine ammonia มีการเพิ่มอัตราการผลิต phytoalexin และมีการแสดงออกของ stress-related gene (Whipps, 2001) มีรายงานการชักนำให้เกิดความต้านทานโรคไว้ในพืชหลายชนิด ประกอบด้วย แตงกวา, แตงโม, ถั่ว, ยาสูบ, มันฝรั่ง, องุ่น, กาแฟ, ข้าวบาร์เลย์, ข้าวสาลี, ลูกแพร, แอปเปิ้ล, ลูกพลัม และคาร์เนชั่น

เชื้อราไตรโคเดอร์มาบางสายพันธุ์อาจมีกลไกการเป็นปฏิปักษ์ได้มากกว่าหนึ่งแบบ แต่โดยทั่วไปมักพบว่ามีการสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อโรคภายหลังจากเกิดกระบวนการเป็นปรสิตแล้ว จากการศึกษาโครงสร้างอย่างละเอียดและวิธีการทางเคมีของเซลล์ ได้แก่ การย้อมด้วยฟลูออเรสเซน ไอโซไธโอไซยาเนตที่เชื่อมต่อกับเลคทิน (fluorescent isothiocyanate-conjugated lectins) หรือแคลคอฟลูออร์ (calcofluor) ก่อนนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่าผนังเซลล์ถูกย่อยสลายตรงบริเวณที่ผนังเซลล์ของเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อโรคสัมผัสกัน โดยเอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ β-1,3-glucanases, chitinases, proteases และ lipase ซึ่งถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ขณะกำลังเจริญร่วมกับเชื้อโรค นอกจากนี้ยังพบว่าในกรณีเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยสลายไคติน (chitinolytic system) อาจมีเอนไซม์ที่ตรวจพบ 5-7 ชนิด ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มา (Carsolio *et al*., 1999)

ในกระบวนการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์นั้น นอกจากการมีจุลินทรีย์ที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพสูงแล้ว รูปแบบและวิธีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์นับเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่จะกำหนดความสำเร็จของการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม วิธีการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควรมุ่งเน้นการใช้เพื่อการป้องกันการเกิดโรคมากกว่าการใช้เพื่อรักษาโรค ความนิยมใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดมีมาก เนื่องจากพบว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคพืชเพราะเชื้อสดเป็นเชื้อที่อยู่ในสภาพพร้อมที่จะเจริญอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา

ไม่ว่าพืชจะอยู่ในระยะกล้า ระยะกำลังเจริญเติบโต กำลังให้ผลผลิต จนถึงหลังการเก็บเกี่ยว แต่การผลิตและการใช้เชื้อสดมีปัญหาคือ ไม่สามารผลิตเชื้อสดให้เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกรได้เพราะตลอดขั้นตอนในการขยายปริมาณเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดนั้นรวมระยะเวลาของการบ่มเชื้อค่อนข้างนาน คือ 7 วัน

3. เอนไซม์ไคติเนส (chitinase)

เอนไซม์ไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน (chitin) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสายพอลิเมอร์ (polymer) ที่ไม่มีกิ่ง (unbranch) ของ β-1,4-N-acetylglucosamide (GlcNAc) เอนไซม์ไคติเนสที่พบในเชื้อรานั้นเมื่อแบ่งตามลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) จะเป็นกลุ่มที่ 3 (class III chitinase) และเป็นแฟมิลี (family) ที่ 18 ของเอนไซม์ไกลคอซิลไฮดรอเลส (glycosyl hydrolase) (Cohen-Kupiec และ Chet, 1998) เอนไซม์ไคติเนสที่พบในเชื้อรานี้มีหน้าที่อยู่หลายอย่างด้วยกัน เช่น มีบทบาทเกี่ยวกับการได้รับสารอาหาร, กระบวนการพัฒนาและการเปลี่ยนรูปร่างเนื่องจากไคตินเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อรา นอกจากนั้นยังมีความสำคัญในกระบวนการการเป็นปรสิตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในการควบคุมโดยชีววิธีด้วย เอนไซม์ไคติเนสในเชื้อรานี้ส่วนมากจะเป็นสายเพปไทด์สายเดียว (single peptide) ที่อาจจะมีบริเวณจับของไคติน (chitin binding domain) อยู่ด้วย

จากงานวิจัยที่มีมาก่อนพบว่าเอนไซม์ไคติเนสนั้น มีบทบาทหลักในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพราะผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ประกอบด้วยไคติน งานทดลองในปี ค.ศ. 2002 โดย Pappinen และคณะ รายงานการถ่ายยีนไคติเนสเข้าต้นเบิช (*Betula pendula)* โดยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม พบว่าพืชผลิตโปรตีนไคติเนส และแสดงความต้านทานต่อเชื้อรา *Pyrenopeziza betulicola* ที่ก่อโรคใบจุดได้ และ Ornatawski และคณะ (2004) ทดลองถ่ายยีนไคติเนสที่ได้จาก tobacco hornworm (*Manduca texta*) โดยการยิงอนุภาคเข้าสู่แคลลัสของถั่วเหลือง (*Glycine max* L. Merrill) เพื่อสร้างความต้านทานต่อแมลง

เชื้อราไตรโคเดอร์มานั้นเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดหนึ่งที่มียีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์นี้ด้วย โดยยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้สามารถเพิ่มปริมาณและโคลนได้ มีนักวิทยาศาสตร์หลายๆท่านทำการศึกษายีนไคติเนสต่างชิ้นกันไปซึ่งเป็นผลมาจากเชื้อราไตรโคเดอร์มามีหลาย

สปีชีส์และหลายไอโซเลต เช่น ยีน*chitinase, chi33, chi37, chi42, chi46* และ *ech42* (Cruz *et al*., 1992, Limon *et al*., 1995, Lorito, 1999 และ Carsolio *et al*., 1999)

สุวิตาและคณะ (2549) ได้โคลนยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส จาก 3 โคลนของเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. erinaceum* โดยพบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *chit-HAR2* endochitinase และ *ech*42 ส่วนเชื้อรา *T. asperellum* นั้น มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *T. viride* ซึ่งยีนไคติเนสที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปศึกษาต่อในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศเพื่อให้ต้านทานต่อโรค Fusarium wilt

วารุณี (2546) ได้ทดสอบเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไคติเนสและกลูคาเนสได้ดี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคเน่าระดับดิน (dampling-off) ของแตงกวา คะน้า มะเขือเทศ และถั่วเหลืองได้

การศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของเชื้อราไตรโคเดอร์มายังคงดำเนินอยู่อย่างต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชให้มากขึ้น ทั้งโดยเทคนิคการเชื่อมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) การพัฒนาเชื้อสายพันธุ์กลายด้วยวิธีฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ตลอดจนการใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาช่วย เช่น การศึกษาบทบาทของเอนไซม์ในระดับโมเลกุลของเชื้อราไตรโคเดอร์มา ได้มีผู้ศึกษาในงานวิจัยที่แตกต่างกันออกไป ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 งานวิจัยเพื่อศึกษาและพัฒนาการสร้างเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราไตรโคเดอร์มาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นด้วยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

เชื้อราไตรโคเดอร์มา	เอนไซม์	ยีน	เอกสารอ้างอิง
T. harzianum IMI206040	endochitinase	*ech42*	Carsolio *et al*., 1999
T. harzianum P1	endochitinase	*ech42*	Woo *et al*., 1999
T. harzianum CECT 2413	Chitinase	*chit33*	Limon *et al*., 1999
T. harzianum CECT 2413	Chitinase	*chit33*	de las Mercedes Dana *et al*., 2001
T. harzianum CECT 2413	chitinase	*chit42*	Limon *et al*., 2001
T. atroviride P1	chitinase	*ech42*	Lutz *et al*., 2004

Park และคณะ (2002) ศึกษาพบว่าการนำ chitinase gene (*chi54*) ของเชื้อแบคทีเรีย *Chromobacterium* sp. สายพันธุ์ C-61 และสายพันธุ์กลาย C61-A, -B, -C และ-D ไปสอดแทรกพลาสมิดภายในเซลล์ของ *E. coli* นั้นมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสมาควบคุมเชื้อโรค *Rhizoctonia solani* ต่ำมาก จากนั้นในปี 2004 มีการศึกษาต่ออีกพบว่าบริเวณ chitin-binding domain (ChBD) ของ chitinase gene (*chi54*) ของเชื้อ *Chromobacterium* sp. สายพันธุ์ C-61 มีความสำคัญในการปลดปล่อยโปรตีนออกนอกเซลล์ในแบคทีเรีย *E. coli* และใน chitinase gene *(Then-42)* ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไม่สามารถปลดปล่อยโปรตีนออกนอกเซลล์ได้เนื่องจากไม่มีบริเวณ ChBD แต่มณฑล (2006) สรุปได้ว่าการแสดงออกของยีนอาจจะขึ้นอยู่กับกลไกควบคุมภายในเซลล์ต่างชนิดกัน เช่น โปรโมเตอร์ ตำแหน่งที่ให้ไรโบโซมมาเกาะหรือการเลือกใช้รหัสพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกันในแต่ละเชื้อด้วย จากการทดลองการโคลนชิ้นยีนไคติเนสจากแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus circulans* No. 4.1 เข้าใน *Enterococcus faecalis* JCM8726 และ *Lactococcus lactis* L14 ที่แยกได้จากหมูหมัก ปรากฏว่าไม่มีการแสดงออกของยีนไคติเนสในเชื้อทั้งสองชนิด และยังเกิดลักษณะที่พลาสมิดหลายชนิดไม่สามารถอยู่ร่วมกันได้ในเซลล์เดียวกันที่เรียกว่า plasmid incompatibility ดังนั้นในการแสดงออกของยีนไคติเนสจึงต้องอาศัยกลไกการปลดปล่อยโปรตีนออกนอกเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านด้วย

4. เทคนิค Recombinant Yeast

ปัจจุบันมีเทคนิคการตัดต่อยีนในจุลินทรีย์ ที่เรียกว่า เทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA technology) หรือพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ทำให้สามารถตัดต่อยีนที่ต้องการจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งและนำไปใส่ในสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมักเป็นจุลินทรีย์ทำให้เพิ่มยีนนั้นขึ้นมากมายและเพิ่มผลผลิตได้ตามต้องการ

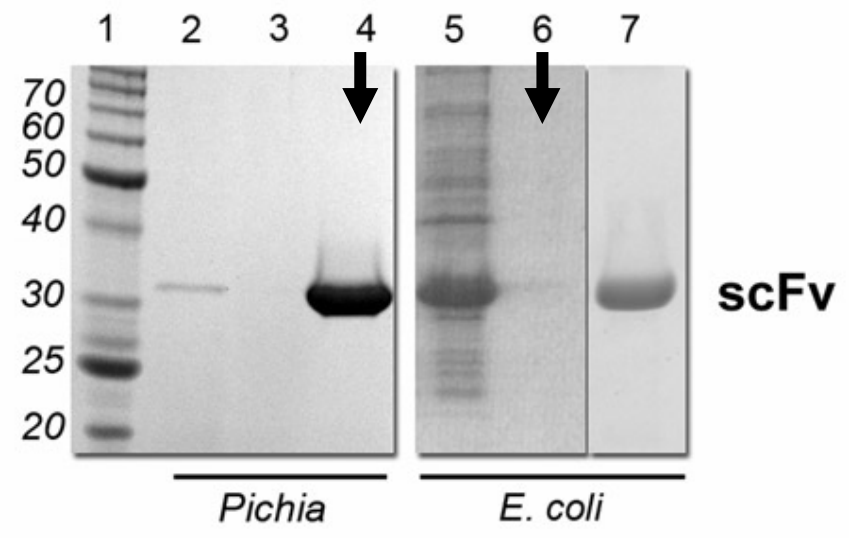
เทคนิคพันธุวิศวกรรมเป็นการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมโดยการตัดต่อยีนหรือดีเอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีลำดับเบสเฉพาะเจาะจง เอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดจะทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอตรงจุดตัดจำเพาะต่างๆกัน ดังนั้นจึงอาจนำยีนของคน สัตว์ พืช จุลินทรีย์ มาตัดต่อกับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตบางชนิด เช่น แบคทีริโอเฟจ (ไวรัสของแบคทีเรีย) พลาสมิดของแบคทีเรีย (พลาสมิด คือ ดีเอ็นเอวงกลมขนาดเล็กที่อยู่นอกโครโมโซมปกติของแบคทีเรีย) ซึ่งทำหน้าที่เป็นพาหะ (vector) ให้ได้ดีเอ็นเอลูกผสมหรือรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ แล้วจึงนำดีเอ็นเอลูกผสมใส่เข้าไปในสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง (ซึ่งมักเป็นแบคทีเรีย) เพื่อให้สิ่งมีชีวิตนั้นสร้างสารผลิตภัณฑ์หรือโปรตีนที่ต้องการในปริมาณมาก

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณถึงกับมีผู้กล่าวว่ายีสต์นั้นเป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้ รายงานแรกเกี่ยวกับการใช้ยีสต์ คือการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 7,000 ปีก่อนคริสตศักราช คนไทยรู้จักใช้ประโยชน์จากยีสต์ในการทำอาหารหมักบางชนิด ได้แก่ ข้าวหมาก ปลาเจ่า เครื่องดองของเมาหลายชนิด เช่น สาโทและกระแช่ และใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เป็นต้นว่าการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี้ การผลิตน้ำส้มสายชูหมัก และการผลิตยีสต์ทำขนมปัง (Demain *et al*., 1998) ยิ่งไปกว่านั้นมีการใช้ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอเพื่อผลิตโปรตีนที่สำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภท (Demain *et al*., 1998 และ Walker, 1998) เช่น การผลิตเอนไซม์ การผลิตฮอร์โมนที่สำคัญบางชนิด และมีความต้องการใช้สูง เช่น อินซูลินจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่ใช้รักษาโรคเบาหวานและโกรทฮอร์โมนจากยีสต์ *Pichia pastoris* การผลิต interferon และ interleukin จากยีสต์ S*accharomyce scerevisiae* และจากเซลล์แมลง เพื่อรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง ให้ร่างกายมีความต้านทานต่อไวรัส การผลิตสารปฏิชีวนะที่มีกลไกและมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโรคสูงขึ้นจากแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรม (Brierley, 1992)

ดร.ลิลี่ เอื้อวิไลจิตร นักวิจัยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) ประสบความสำเร็จในการพัฒนาทางพันธุวิศวกรรมยีสต์ฮอร์โมนในการแก้ปัญหาโรคคนแคระ (Human Growth Hormone) โดยใช้เทคโนโลยีที่เรียกว่า Recombinant Yeast หรือการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ ขึ้นมาใหม่จากการเลียนแบบการผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของยีสต์ *Pichia pastoris*

ยีสต์สายพันธุ์นี้ให้เป็นระบบเซลเจ้าบ้านสำหรับสังเคราะห์โปรตีนที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูลพบว่าเพียงไม่กี่ปีที่ผ่านมาระบบการสังเคราะห์โปรตีนโดยอาศัยยีสต์สายพันธุ์นี้ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ผลิตโปรตีนด้วยระบบนี้คือ ให้ผลผลิตสูง, ใช้อาหารที่มีราคาถูกและการเพิ่มขนาดการผลิตทำได้ง่าย นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถดัดแปลงอณูของโปรตีนภายหลังการสังเคราะห์ด้วยขบวนการที่ซับซ้อนเช่นเดียวกับที่พบในเซลสัตว์ชั้นสูงทั่วไป เมื่อกลางปีที่ผ่านมานี้ได้มีผู้รายงานผลงานวิจัยที่แสดงว่าสามารถที่จะผลิตโปรตีนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ ซีโรไทป์หนึ่ง สายพันธุ์สิงคโปร์ได้ในยีสต์ *P. pastoris* โดยเมื่อทำการผลิตโปรตีนที่เป็นโครงสร้างหลักคือ แคปซิด พรีเอ็ม และ อี ร่วมกัน ผลทำให้ได้อนุภาคที่คล้ายไวรัสแต่ขนาดเล็กกว่าสะสมภายในเซลที่สร้างขึ้น นอกจากนี้โปรตีน อี ที่ผลิตขึ้นมีการดัดแปลงอณูของโปรตีนภายหลังการสังเคราะห์ด้วยการเติมน้ำตาลเช่นเดียวกับที่พบตามธรรมชาติ นอกจากนี้สำหรับเหตุผลที่ใช้ยีสต์เป็นเซลล์ให้อาศัยสำหรับการแสดงออกของยีนจากแหล่งอื่น Walker (1998) ได้รวบรวมไว้มีดังนี้คือ ยีสต์และผลิตภัณฑ์จากยีสต์เป็นที่ยอมรับในสาธารณะ เนื่องจากเป็น GRAS (generally regarded as safe) ไม่เป็นเชื้อโรค การใช้เซลล์เจ้าบ้านที่เป็น eukaryotes นั้นมีศึกษากันมากทางด้านชีวเคมีและพันธุกรรมและมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้แบคทีเรีย เนื่องจากเซลล์เหล่านี้สามารถนำมาใช้ผลิต recombinant proteins ที่ต้องอาศัยกระบวนการเปลี่ยนแปลงหลังการแปลรหัส (post- translational modifications)ของโปรตีนในแบบต่างๆ เช่น กระบวนการ glycosylation, phosphorylation หรือ proteolysis เป็นต้น (Jahic, 2002) และการหลั่งโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ที่ค่อนข้างมีประสิทธิภาพ และควบคุมได้โดยลำดับสัญญาณภายใน

ในงานทดลอง Cereghino และคณะ (2002) นำยีน scFv ถ่ายเข้าสู่ยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อดูความแตกต่างการปลดปล่อยโปรตีนออกนอกเซลล์ ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรีย *E. coli* นั้น พบว่าในภาพที่ 1 ช่องที่ 4 มีการแสดงออกของโปรตีนที่ชัดเจนมากกว่าในช่องที่ 6



ภาพที่ 1 scFv production ที่แสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* และแบคทีเรีย *E. coli*

ช่อง 4 : elution ของ scFv from column

ช่อง 6 : soluble fraction จาก *E. coli* lysate

ผลิตภัณฑ์ของยีนซึ่งประสบความสำเร็จมีการแสดงออกที่มีการปรับใช้ประโยชน์และมีศักยภาพนั้นมีแหล่งที่มาได้หลากหลายชนิด เช่น ยีนจากโพรคารีโอต, ไวรัส, โปรโตซัว, สัตว์, พืช และมนุษย์ ผลิตภัณฑ์จาก Recombinant Yeast ซึ่ง Cereghino และคณะ (2002) ได้รวบรวมไว้ เช่น heavy-chain fragment C ของนิวโรทอกซินบาดทะยัก (Botulism neurotoxin), human antithrombin lll, human bile salebstimulated lipase, human chitinase, human cystatin-C, human insulin, human serum albumin, human type I collagen และ malaria vaccine antigen. Cabral และคณะ (2003) รายงานการแสดงออกของดีเฟนซิน (defensin) จากถั่วใน *Pichia pastoris* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคพืช Crepin และคณะ (2003) ทำการผลิตรีคอมบิแนนต์เอนไซม์ feruloyl esterase ที่มีความจำเพาะกับซับสเตรตหลายชนิดจาก *Talalomyces stipitatus* โดยใช้ยีสต์ *P. pastoris* เป็นราเส้นใยที่ชอบอุณหภูมิปานกลางที่มักพบในดิน มูลสัตว์ หรือส่วนของพืชที่กำลังย่อยสลาย และเอนไซม์ชนิดนี้เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ร่วมในการทำลายพันธะระหว่างอะราบิโนสและกรดฟีรูลิก เพื่อปล่อยลิกนินจากเฮมิเซลลูโลส

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคติเนสและออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน

ยีนไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เป็นยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่มีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 42 กิโลดาลตัน (1275 คู่เบส) การออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw) ทำ multiple sequence alignment เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เป็นเบสอนุรักษ์ของยีนไคติเนสของเชื้อรา *T. harzianum* ที่มีรายงานไว้ใน GenBank ได้ไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ คือ ChiE1: AAT AAT GAA TTC TTG GGC TTC CTC GGA AAA TCC GTG GC และ ChiN2: AAT AAT GCG GCC GCC TAG TTG AGA CCG CTT CGG ATG TTA TC และออกแบบไพรเมอร์อีกจำนวน 1 คู่ ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเวกเตอร์ pPIC9 คือ 5'AOX1: GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC และ 3'AOX1: CAA ATG GCA TTC TGA CAT CC

2. การเตรียมและสกัดแยกยีนไคติเนส

นำเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มาเลี้ยงในอาหารแข็ง (potato dextrose agar: PDA) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนจะใช้ cork borror เจาะเส้นใยและสปอร์ที่กำลังเจริญมาใส่ลงในอาหารเหลว (potato dextrose broth: PDB) เลี้ยงต่ออีก 16-20 ชั่วโมง บน rotary shaker ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเช่นเดิม แล้วนำมากรองเอาแต่เส้นใยไปสกัด genomic RNA เพื่อนำมาใช้ในการแยกหาส่วนของยีนไคติเนส จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA จาก genomic RNA ด้วยเทคนิค Reverse transcription และการเพิ่มปริมาณ DNA จาก cDNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ One Step RT-PCR

เตรียม Master mix ที่ประกอบไปด้วย

- RNase free water	11.2 ไมโครลิตร
- 5x One Step RT-PCR buffer	4.0 ไมโครลิตร
- dNTP Mix	0.8 ไมโครลิตร
- 20 μM ChiE1 Primer	1.6 ไมโครลิตร
- 20 μM ChiN2 Primer	1.6 ไมโครลิตร

- One Step RT-PCR enzyme mix 0.8 ไมโครลิตร

มาผสมกับ Template RNA 5 ไมโครลิตร รวมเป็น 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา RT-PCR ดังนี้

- Reverse transcription	เป็นเวลา 30 นาที	ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- Initial PCR activation step	เป็นเวลา 15 นาที	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส
- 3 step cycling (number of cycle: 35 cycles)		
Denaturation	เป็นเวลา 1 นาที	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส
Annealing	เป็นเวลา 1 นาที	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส
Extension	เป็นเวลา 1 นาที	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส
- Final extension	เป็นเวลา 5 นาที	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบขนาดและปริมาณของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ใน 1x TAE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber)

3. การโคลนยีนไคติเนส

เตรียม Cloning reaction

- PCR product ขนาดประมาณ 1275 คู่เบส	1 ไมโครลิตร
- pCR®8/GW/TOPO vector ขนาด 2817 คู่เบส (ภาพที่ 2)	1 ไมโครลิตร
- Sterile water	3 ไมโครลิตร
- Salt Solution	1 ไมโครลิตร

และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และย้ายไปวางบนน้ำแข็ง

การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำปฏิกิริยาที่ได้มาผสมกับ competent cell ของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α และวางบนน้ำแข็งต่ออีกเป็นเวลา 30 นาที ถ่ายทอดพลาสมิดโดยวิธี $CaCl_2$ transformation ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำกลับมาวางบนน้ำแข็งทันทีต่ออีกเป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติมอาหาร 2xYT broth ปริมาตร 800 ไมโครลิตรลงไป

เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที และดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือปริมาตรในหลอดประมาณ 70 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้ตะกอนกระจายทั่วทั้งหมดและ spread บนอาหารคัดเลือก 2xYT agar ที่เติม spectinomycin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา16-18 ชั่วโมง

การตรวจสอบยีนไคติเนส

นำโคโลนีที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร 2xYT agar มาเลี้ยงในอาหาร 2xYT broth ที่เติม spectinomycin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis (Sambrook *et al.*, 1989) และทำการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ใน 1x TAE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber)

ตรวจสอบยีนไคติเนสด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนไคติเนส (ChiE1 และ ChiN2) โดย

เตรียม Master mix ที่ประกอบไปด้วย

- dH_2O 19.75 ไมโครลิตร
- 10x PCR buffer+20mM $MgCl_2$ 2.50 ไมโครลิตร
- 10mM dNTPs 0.25 ไมโครลิตร

- 20 μM ChiE1 Primer 0.50 ไมโครลิตร
- 20 μM ChiN2 Primer 0.50 ไมโครลิตร
- *Taq* DNA Polymerase 0.50 ไมโครลิตร

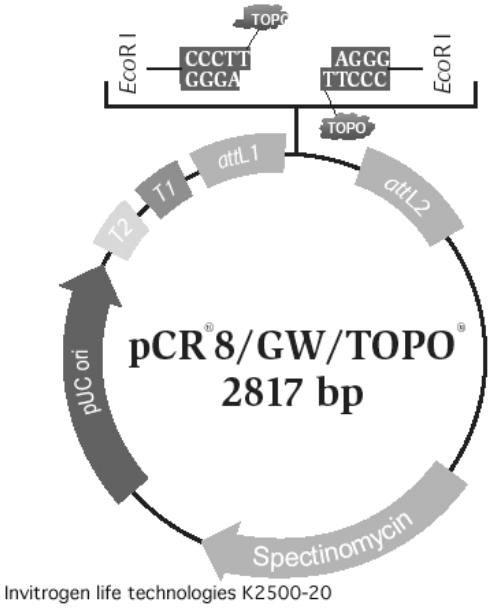
มาผสมกับพลาสมิด (Template DNA) 1 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

- Initial PCR activation step	เป็นเวลา 5 นาที	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส
- 3 step cycling (number of cycle :35 cycles)		
Denaturation	เป็นเวลา 1 นาที	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส
Annealing	เป็นเวลา 1 นาที	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส
Extension	เป็นเวลา 1 นาที	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส
- Final extension	เป็นเวลา 5 นาที	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบขนาดและปริมาณของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ใน 1x TAE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber)

และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคติเนสที่แยกสกัดได้ โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU), สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ



ภาพที่ 2 เวกเตอร์ pCR®8/GW/TOPO เป็น cloning vector สำหรับการสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีนไคติเนสบรรจุอยู่

4. การ subclone ที่มียีนไคติเนสเข้าสู่เวกเตอร์ pPIC9 ในเซลล์แบคทีเรีย

ทำการตัดยีนไคติเนสออกจากพลาสมิด pCR®8/GW/TOPO ด้วย restriction enzymes : *EcoR*l และ *Not*l

โดยเตรียม Digestion reaction

- dH_2O	34 ไมโครลิตร
- Plasmid	50 ไมโครลิตร
- 10x Buffer O	10 ไมโครลิตร
- restriction enzymes : *EcoR*l	3 ไมโครลิตร
- restriction enzymes : *Not*l	3 ไมโครลิตร

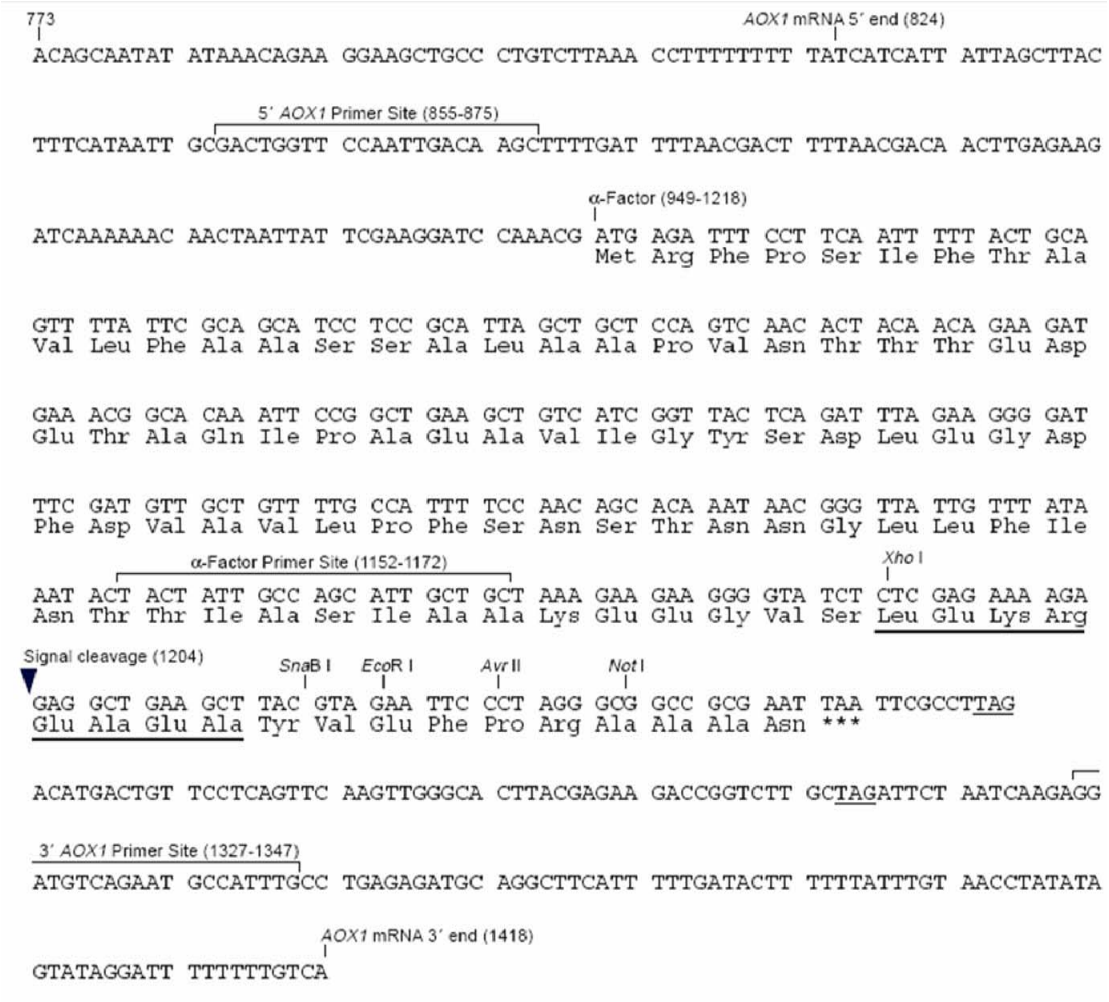
และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำ Digestion product มาทำการแยกสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบดีเอ็นเอ ใน 0.8% agarose gel ใน 1x TAE buffer แล้วตัด gel ในตำแหน่งที่ดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 1275 คู่เบส มาใส่หลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปชั่งน้ำหนักของ gel แล้วนำมาเติม 6M NaI ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนัก

gel ก่อนนำไป gel ไปหลอมในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาผ่าน silica column (Promaga) และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วล้างด้วย Wash solution (10 mM Tris, 1mM EDTA, 100mM NaCl, และ 50% ethanol, pH 7.5) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร 2 ครั้ง และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำ silica column มาวางบนหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม dH_2O ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อล้างดีเอ็นเอที่ติดบน silica column และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1นาที

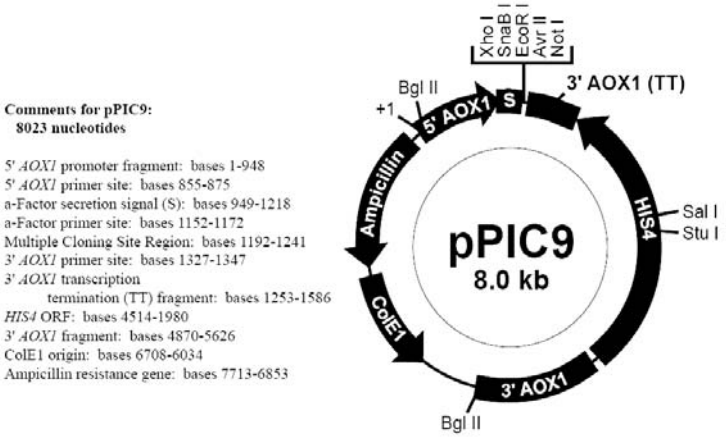
จากนั้นนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดของเวกเตอร์ pPIC9 ขนาด 8.0 กิโลเบส ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ในตำแหน่ง restriction enzymes: *EcoR*I และ *Not*I (ภาพที่ 3 และ 4) เช่นกัน แล้วถ่ายทอดเข้าสู่ competent cell ของ *Escherichia coli* โดยวิธี Electroporation transformation และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก 2xYT agar ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา16-18 ชั่วโมง

หลังจากนั้นย้ายโคโลนีที่ปรากฏขึ้นมาเลี้ยงในอาหาร 2xYT broth ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis และทำการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบยีนไคติเนสที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดของเวกเตอร์ pPIC9 แล้ว ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 5'AOX1 และ 3'AOX1 และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU), สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ แล้วทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคติเนสที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank โดยอาศัยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด เพื่อยืนยันว่าโคลนที่ได้มียีนไคติเนสอยู่จริง



ภาพที่ 3 ลำดับเบสแสดงรายละเอียดของบริเวณที่เป็น multiple cloning site ใน pPIC9 vector



ภาพที่ 4 เวกเตอร์ pPIC9 เป็น expression vector สำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์

5. การ subclone ยีนไคติเนสเข้าสู่เวกเตอร์ pPIC9 ในเซลล์ยีสต์

นำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนไคติเนสที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดของเวกเตอร์ pPIC9 แล้วมาตัดด้วย restriction enzymes: *Stu*I ให้เป็น linearized DNA ก่อนนำไปถ่ายทอดเข้าสู่ competent cell ของยีสต์ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ GS115 โดยวิธี Electroporation transformation และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก MD agar ที่ไม่เติม histidine ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส จนกว่าโคโลนีจะปรากฏและมีขนาดของโคโลนีที่เหมาะสม

ใช้โคโลนีของยีสต์ที่ปรากฏเป็นแม่แบบในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนไคติเนส (ChiE1 และ ChiN2) โดย

เตรียม Master mix ที่ประกอบไปด้วย

- dH_2O 19.75 ไมโครลิตร
- 10x PCR buffer+20mM $MgCl_2$ 2.50 ไมโครลิตร
- 10mM dNTPs 0.25 ไมโครลิตร
- 20 μM ChiE1 Primer 0.50 ไมโครลิตร
- 20 μM ChiN2 Primer 0.50 ไมโครลิตร
- *Taq* DNA Polymerase 0.50 ไมโครลิตร

มาผสมกับพลาสมิด (Template DNA) 1 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

- Initial PCR activation step	เป็นเวลา 5 นาที	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส
- 3 step cycling (number of cycle:35 cycles)		
Denaturation	เป็นเวลา 1 นาที	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส
Annealing	เป็นเวลา 1 นาที	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส
Extension	เป็นเวลา 1 นาที	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส
- Final extension	เป็นเวลา 5 นาที	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบขนาดและปริมาณของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ใน 1x TAE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber)

และเทคนิค Southern blot hybridization hybridization โดยการ denature ดีเอ็นเอด้วย 0.25xSSC และ 0.25N NaOH และปล่อยให้แผ่นเมมเบรนแห้ง จากนั้นยึดให้ดีเอ็นเอติดอยู่ในแผ่นเมมเบรนโดยใช้ UV เป็นเวลา 2 นาทีและนำแผ่นเมมเบรนไปทำการ Pre –hybridizations ใน hybridization solution (5xSSC, 0.1% (w/v) N-lauroylsacosine, 0.02% (w/v)SDS, 1% (w/v) blocking reagent, Roche®) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ hybridization ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง ใน hybridization solution ที่เติม probe โดยที่ probe นั้นถูก denature แล้วด้วยความร้อน

จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วย washing solution I (2xSSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และล้างด้วย washing solution II (0.1xSSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 2 ครั้งๆละ 15 นาที และเข้าสู่ขั้นตอนการตรวจสอบโดยล้างด้วย washing buffer (100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH 7.5, 0.3% Tween 20) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนมาเติม 1% blocking reagent ใน blocking solution (0.1M Malic acid, 0.15M NaCl pH 7.4), 1% blocking reagent) และนำไปเขย่าเบาๆที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาเติม 1% blocking reagent ใน blocking solution ที่เติม Anti-DIG และเขย่าเบาๆที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย washing buffer จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และล้างแผ่นเมมเบรนอีกครั้งด้วย detection buffer (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl; pH9.5) เป็นเวลา 5 นาที

และในขั้นตอนสุดท้าย ตรวจสอบปฏิกิริยาโดยใช้ chemiluminescent โดยเติม CDP star (Roche®) จำนวน 1 ไมโครลิตร ใน detection buffer 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำ detection buffer ที่ผสม CDP star มาเกลี่ยบนผิวหน้าของแผ่นเมมเบรนโดยใช้เวลาประมาณ 3 วินาที และเอาออกจากแผ่นเมมเบรน จากนั้นทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยนำไปประกบกับแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ (Kodak, Green 400 screen)

6. การตรวจสอบโปรตีนจากยีนไคติเนสในรีคอมบิแนนท์ยีสต์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide eletrophoresis (SDS-PAGE)

เลี้ยงยีสต์ *Pichia pastoris* ที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ที่เลี้ยงในอาหาร MM (Minimal Methanol Medium – Histidine) และเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนสที่เลี้ยงในอาหาร MMH (Minimal Methanol Medium + Histidine) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บน rotary shaker ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยชักนำการแสดงออกของยีนด้วย 0.5% (v/v) methanol ที่เวลา 6, 18 และ 30 ชั่วโมง จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยมาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำ supernatant ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปเติม 20% (v/v) TCA (trichloroacetic acid) ก่อนนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้มาล้างด้วย 95% ethanol ที่แช่เย็น เติมน้ำกลั่นไปละลายตะกอนโปรตีนปริมาตร 25 ไมโครลิตร ถ้าสปอร์แขวนลอยที่ได้มีสีเหลืองให้เติม 1N NaOH หรือ 1M Tris-HCl (pH 8.5) จนกว่าจะได้สีน้ำเงิน จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยที่ได้มาผสมกับ 2x loading dye (0.125M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 16% glycerol และ 5% 2-mercaptoethanol) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แช่น้ำแข็งทันที แยกขนาดของโปรตีนด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacryamide gel โดยใช้ 5% staking gel และ 12.5% separating gel ด้วยเครื่อง Mini PROTIEN BIO RAD เติมตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยมี molecular weight marker ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของโปรตีนที่ได้ ย้อมสีเจลด้วย 0.2% Coomassie brilliant blue R-250 ล้างเจลด้วย destaining solution จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่เจลในน้ำ (Sambrook *et al*., 2001)

7. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่ย่อยสลาย colloidal chitin โดยนำ supernatant ของยีสต์ *Pichia pastoris* ที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย 5% colloidal chitin ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และ buffer2 (0.2M sodium formate, 0.1M NaCl และ 0.2 mg/ml bovine serum albumin) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10

นาที เติม borate solution ปริมาตร 55 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ในน้ำเดือดเพื่อหยุดปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที ก่อนวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นเติม p-Dimethylaminobenzaldehyde (DAB solution) ปริมาตร 750 ไมโครลิตรก่อนนำไปแช่ใน water bath 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำ supernatant ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 586 นาโนเมตร (Jose *et al.,* 1955) นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ N-acetylglucosamine จากกราฟแสดงค่ามาตรฐาน

1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินเป็น N-acetylglucosamine 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

8. ทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินมีสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของต้นกล้าถั่วฝักยาว

การเตรียมสปอร์แขวนลอยจากเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด ใช้หัวเชื้อรา *T. harzianum* (ยูนิเซฟ) สายพันธุ์CB-Pin-01 ซึ่งอยู่ในรูปผงแห้งมีปริมาณเชื้อรา 10^8 หน่วยโคโลนีต่อกรัม นำไปขยายเพื่อเพิ่มปริมาณโดยใช้ปลายข้าวหรือข้าวสารหุงด้วยหม้อหุงข้าวไฟฟ้า (ข้าว 3 ส่วนต่อน้ำ 2 ส่วน) ใส่ในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 8 * 12 นิ้ว (250 กรัมต่อถุง) เจาะถุงพลาสติกด้วยเข็มแล้วบ่มเชื้อไว้ 7 วัน ที่อุณหภูมิ ห้องตามวิธีการของ (จิระเดช และวรรณวิไล, 2545) จากนั้นนำเชื้อสดมา 1 ถุง เติมน้ำลงไปในถุง 300 มิลลิลิตรหรือพอท่วมตัวเชื้อ แล้วขยำเนื้อข้าวให้แตกออกจนได้น้ำเชื้อสีเขียวเข้ม กรองน้ำเชื้อด้วยผ้าหรือกระชอนตาถี่ ล้างกากที่เหลือบนกระชอนด้วยน้ำอีกจำนวนหนึ่งจนเชื้อหลุดจากเมล็ดข้าวหมด เติมน้ำให้ครบ 50 ลิตร ก่อนนำไปใช้

การเตรียมสารกรองจากยีสต์ โดยเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์บนอาหาร MDA เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ก่อนนำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MD broth นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บน rotary shaker ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยแบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ แบบที่1 เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน แบบที่ 2 เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน และแบบที่ 3 เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาแช่น้ำร้อน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman’s No.1 จำนวน 1 ครั้ง และนำไปกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน จำนวน 1 ครั้ง จนได้สารกรอง

การเตรียมสารกรองจากยีสต์ โดยเลี้ยงยีสต์ *Pichia pastoris* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* บนอาหาร YPDA เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ก่อนนำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD broth นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บน rotary shaker ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman's No.1 จำนวน 1 ครั้ง และนำไปกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน จำนวน 1 ครั้ง จนได้สารกรอง

การเตรียมสารกรองจากเชื้อราไตรโคเดอร์มา โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้นประมาณ 10 ชิ้น ใส่ลงในอาหาร PDB นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องบน rotary shaker ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน ปรับปริมาณเชื้อให้ได้เซลล์แขวนลอยประมาณ 10^{8} หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมากรองเอาเส้นใยและสปอร์เชื้อราออก โดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman's No.1 จำนวน 1 ครั้ง และกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน จำนวน 1 ครั้ง จนได้สารกรอง

การเตรียมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยเลี้ยงเชื้อรา *R. solani* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นจึงใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้นประมาณ 4 ชิ้น ใส่ลงในถุงที่มีเมล็ดข้าวเปลือก 300 กรัม ที่ผ่านการต้มในน้ำเดือดจนเมล็ดข้าวปริแตก ผึ่งจนสะเด็ดน้ำ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดก็นำไปผสมดินปลูกในอัตราเชื้อ 20 กรัมต่อดิน 4 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้เข้ากันอย่างสม่ำเสมอ ใส่ในกระถางพลาสติกขนาด 4 นิ้ว กระถางละ 200 กรัม (ยกเว้นกระถางที่เป็นกรรมวิธีควบคุม ที่ไม่ใส่เชื้อรา *R. solani*)

การตรียมดินปลูก ใช้สูตร ขี้เถ้าแกลบ: ทราย: ดินขุยไผ่ ในอัตราส่วน 1: 1: 1 โดยปริมาตร นำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง โดยมีการปรับความชื้นให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม

การเตรียมเมล็ดถั่วฝักยาว นำเมล็ดถั่วฝักยาวที่มีความงอก 90-100 เปอร์เซ็นต์ แช่ใน Clorox 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด แล้วล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที นำไปผึ่งให้แห้งก่อนนำไปแช่ในสารต่างๆที่เตรียมไว้แต่ละกรรมวิธี

ในการทดสอบนี้จะแบ่งเป็น 9 กรรมวิธีๆละ 8 กระถางๆละ 5 เมล็ด ดังนี้คือ

กรรมวิธีที่ 1 แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 30 นาที ก่อนปลูกในดินที่ไม่มีเชื้อรา *R. solani* (Control1)

กรรมวิธีที่ 2 แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 30 นาที ก่อนปลูกในดินที่มีเชื้อรา *R. solani* (Control2)

กรรมวิธีที่ 3 แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารเคมี Carboxin ที่มีความเข้มข้นในอัตรา 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักเมล็ด นาน 30 นาที ก่อนปลูกในดินที่มีเชื้อรา *R. solani*

กรรมวิธีที่ 4 แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสปอร์แขวนลอยจากเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด นาน 30 นาที ก่อนปลูกในดินที่มีเชื้อรา *R. solani*

กรรมวิธีที่ 5 แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร MD (Minimal Dextrose Medium – Histidine) เป็นเวลา 5 วัน นาน 30 นาที ก่อนปลูกในดินที่มีเชื้อรา *R. solani*

กรรมวิธีที่ 6 แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร MD (Minimal Dextrose Medium – Histidine) เป็นเวลา 2 วัน นาน 30 นาที ก่อนปลูกในดินที่มีเชื้อรา *R. solani*

กรรมวิธีที่ 7 แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร MD (Minimal Dextrose Medium – Histidine) เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาแช่น้ำร้อน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นาน 30 นาที ก่อนปลูกในดินที่มีเชื้อรา *R. solani*

กรรมวิธีที่ 8 แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารกรองจากเชื้อราไตรโคเดอร์มานาน 30 นาที ก่อนปลูก

ในดินที่มีเชื้อรา *R. solani*

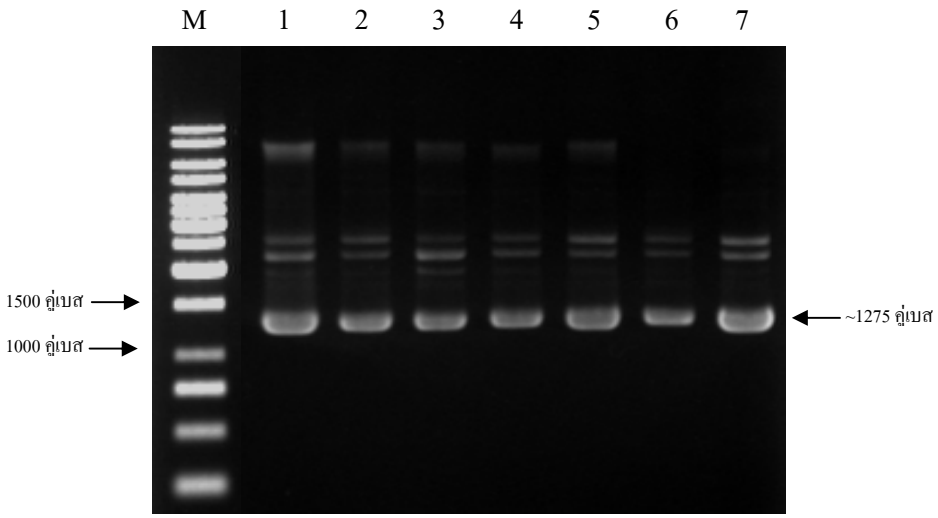
กรรมวิธีที่ 9 แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารกรองจากยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนสที่เลี้ยงในอาหาร YPD borth เป็นเวลา 2 วันนาน 30 นาที ก่อนปลูกในดินที่มีเชื้อรา *R. solani*

บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในวันที่ 5 และ 10 หลังจากปลูกและวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (P=0.05) โดยเปรียบเทียบกับการแช่เมล็ดในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วปลูกในดินที่ไม่มีเชื้อรา *R . solani* (Control 1) และดินที่มีเชื้อรา *R . solani* (Control 2)

ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. การเตรียมยีนไคติเนส

ผลการสังเคราะห์ cDNA จาก total mRNA ที่แยกสกัดจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ด้วยเทคนิค Reverse transcription และการเพิ่มปริมาณ DNA จาก cDNA โดยใช้ One Step RT-PCR พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนไคติเนสจากเชื้อรา *T. harzianum* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนไคติเนส คือ ChiE1 และ ChiN2 และตรวจสอบขนาดและปริมาณของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1275 คู่เบส (ภาพที่5) แสดงว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไคติเนสนี้มีความจำเพาะเจาะจงมากพอสมควร วิเคราะห์ได้จากความเข้มและหนาแน่นของแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1275 คู่เบส ที่มีขนาดใหญ่และเข้มกว่าแถบดีเอ็นเออื่นๆที่ปรากฏในภาพมาก หรือมีแถบที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นน้อยมาก ในการศึกษาขั้นต่อไปของการโคลนยีนนั้น จะต้องทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอ จาก PCR product นี้จากเจลไปแยกให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Gel Purification kit นอกจากจะเลือกตัดเจลในบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการโดยมิให้มีแถบอื่นติดไปด้วยแล้ว ยังสามารถปรับแต่ง PCR profile โดยการเปลี่ยนอุณหภูมิ Annealing ให้เหมาะสมกับการทำงานของไพรเมอร์ในเทคนิค PCR มากขึ้น ทำให้สามารถลดแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความจำเพาะออกไปได้ และผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคติเนสจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ซึ่งมีขนาด 1275 คู่เบส พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคติเนสตรงกันกับข้อมูลยีนไคติเนสที่มีรายงานไว้ใน GenBank (accession DQ166035) ดังแสดงในภาพที่ 6 ซึ่งมีการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคติเนสที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้กับข้อมูลยีนไคติเนสที่มีรายงานมาก่อนใน GenBank ในหัวข้อที่ 3



ภาพที่ 5 การแยกยีนไคติเนส ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 โดยเทคนิค RT-PCRจากไพรเมอร์ ChiE1 และ ChiN2

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 kb ladder (Fermentus)

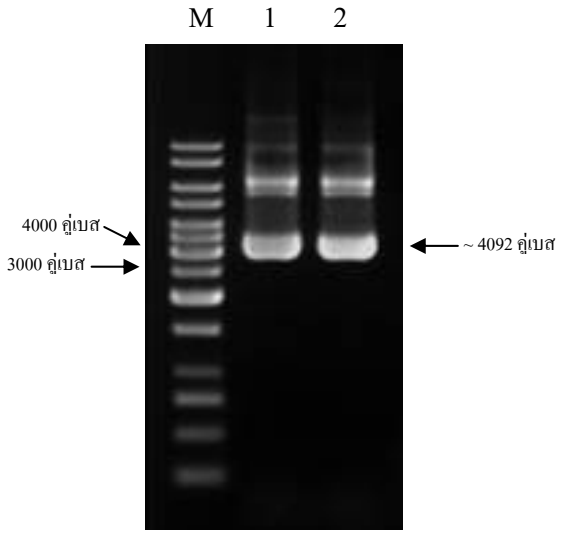
ช่องที่1-7 : ดีเอ็นเอของยีนไคติเนสจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธ์ CB-Pin-01 ตัวอย่างที่1-7

```
     M  L  G  F  L  G  K  S  V  A  L  L  A  A  L  Q  A  T  L  T
   1 ATGTTGGGCTTCCTCGGAAAATCCGTGGCCCTGCTTGCTGCGCTGCAGGCCACTCTCACC
     S  A  T  P  V  S  T  N  D  V  S  V  E  K  R  A  S  G  Y  T
  61 TCTGCAACTCCTGTGTCTACAAACGACGTCTCAGTTGAGAAGAGAGCCAGCGGATACACA
     N  A  V  Y  F  T  N  W  G  I  Y  G  R  N  F  Q  P  Q  D  L
 121 AACGCTGTCTACTTCACCAACTGGGGTATCTATGGCCGCAACTTTCAACCCCAGGACCTG
     V  A  S  D  I  T  H  V  I  Y  S  F  M  N  F  Q  A  D  G  T
 181 GTGGCGTCGGACATCACTCATGTCATCTACTCTTTCATGAACTTCCAAGCAGACGGCACT
     V  V  S  G  D  A  Y  A  D  Y  Q  K  H  Y  S  D  D  S  W  N
 241 GTTGTCTCTGGAGATGCCTACGCCGATTATCAGAAGCACTATTCCGACGATTCCTGGAAT
     D  V  G  N  N  A  Y  G  C  V  K  Q  L  F  K  L  K  K  A  N
 301 GACGTCGGAAACAACGCATACGGCTGTGTGAAGCAGCTGTTTAAGTTGAAGAAGGCCAAT
     R  N  L  K  V  M  L  S  I  G  G  W  T  W  S  T  N  F  P  S
 361 CGCAACTTGAAGGTTATGCTCTCTATCGGTGGCTGGACCTGGTCCACCAACTTCCCTTCT
     A  A  S  T  D  A  N  R  K  N  F  A  K  T  A  I  T  F  M  K
 421 GCAGCAAGCACCGATGCCAACCGCAAGAACTTTGCCAAGACGGCCATCACCTTCATGAAG
     D  W  G  F  D  G  I  D  V  D  W  E  Y  P  A  D  D  T  Q  A
 481 GACTGGGGTTTTGATGGTATTGACGTCGACTGGGAGTACCCTGCCGATGACACTCAGGCC
     T  N  M  V  L  L  L  K  E  I  R  S  Q  L  D  A  Y  A  A  Q
 541 ACCAACATGGTTCTTCTGCTCAAGGAGATCCGATCTCAACTAGATGCCTATGCTGCGCAA
     Y  A  P  G  Y  H  F  L  L  S  I  A  A  P  A  G  P  E  H  Y
 601 TACGCTCCAGGCTACCACTTCCTTCTCTCCATCGCTGCCCCCGCTGGACCAGAGCACTAC
     S  A  L  H  M  A  D  L  G  Q  V  L  D  Y  V  N  L  M  A  Y
 661 TCTGCCCTGCACATGGCCGACCTTGGTCAAGTTCTCGACTATGTCAACCTTATGGCCTAT
     D  Y  A  G  S  W  S  S  Y  S  G  H  D  A  N  L  F  A  N  P
 721 GACTATGCTGGTTCTTGGAGCAGCTACTCTGGACACGATGCCAACTTGTTTGCCAACCCG
     S  N  P  N  F  S  P  Y  N  T  D  Q  A  I  K  A  Y  I  N  G
 781 TCCAATCCCAACTTTTCACCATACAACACCGATCAGGCTATCAAGGCTTATATCAACGGA
     G  V  P  A  S  K  I  V  L  G  M  P  I  Y  G  R  S  F  E  S
 841 GGCGTTCCCGCAAGCAAGATCGTTCTTGGCATGCCTATCTATGGACGATCTTTCGAGAGC
     T  N  G  I  G  Q  T  Y  N  G  I  G  S  G  S  W  E  N  G  I
 901 ACTAATGGCATTGGCCAAACCTACAATGGAATTGGATCTGGAAGCTGGGAGAACGGTATC
     W  D  Y  K  V  L  P  K  A  G  A  T  V  Q  Y  D  S  V  A  Q
 961 TGGGACTACAAGGTTCTTCCCAAGGCCGGCGCTACAGTCCAGTACGACTCTGTCGCACAG
     A  Y  Y  S  Y  D  S  S  S  K  E  L  I  S  F  D  T  P  D  M
1021 GCGTACTACAGCTATGATTCTAGCAGCAAGGAGCTCATCTCTTTCGATACCCCTGACATG
     V  S  K  K  V  S  Y  L  K  N  L  G  L  G  G  S  M  F  W  E
1081 GTCAGCAAAAAGGTCTCTTACCTCAAGAATCTCGGCCTGGGAGGCAGTATGTTCTGGGAG
     A  S  A  D  K  T  G  S  D  S  L  I  G  T  S  H  R  A  L  G
1141 GCTTCTGCTGACAAGACTGGCTCCGACTCCTTGATCGGAACAAGCCACAGAGCGCTGGGA
     S  L  D  S  T  Q  N  L  L  S  Y  P  N  S  Q  Y  D  N  I  R
1201 AGCCTGGACTCAACTCAGAACTTGCTGAGCTACCCCAACTCCCAGTATGATAACATCCGA
     S  G  L  N  *
1261 AGCGGTCTCAACTAG
```

ภาพที่ 6 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก cDNA ของยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 (http://www.ncbi.com)

2. การโคลนยีนไคติเนสในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli*

เมื่อนำยีนไคติเนสที่ได้จากการเตรียมยีนในขั้นต้นไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pCR®8/GW/TOPO (Invitrogen) จากนั้นนำเข้าสู่ competent cell ของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก 2xYT agar ที่เติม spectinomycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วหลังจากนั้นอีก 18 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีแบคทีเรีย *E. coli* ที่ผ่านการคัดเลือก สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกได้ จากนั้นจึงทำการตรวจสอบยืนยันว่าโคโลนีที่ปรากฏมียีนไคติเนสอยู่จริง โดยคัดเลือกโคโลนีที่เจริญปกติมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis (Sambrook *et al*., 1989) และทำการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ซึ่งพบว่ามีแถบพลาสมิดขนาดประมาณ 4092 คู่เบส (ภาพที่ 7) แสดงว่า พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนไคติเนสสอดแทรกอยู่จะมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยแถบของพลาสมิดลูกผสมจะเคลื่อนที่ช้ากว่า และปรากฏอยู่ที่ตำแหน่งประมาณ 4 กิโลเบส ซึ่งเป็นลักษณะปกติของพลาสมิดที่เป็น supercoil ที่มีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับขนาดจริง แต่สามารถประมาณได้ว่าเป็นขนาดที่ถูกต้อง เนื่องจาก Cloning vector ชนิดที่เป็นเวกเตอร์ pCR®8/GW/TOPO (Invitrogen) นั้นมีคุณสมบัติที่ได้เปรียบคือ ไม่เกิดการเชื่อมต่อกันเองของเวกเตอร์ เพราะฉะนั้นโคโลนีส่วนใหญ่ที่ได้จะมียีนสอดแทรกอยู่จริง

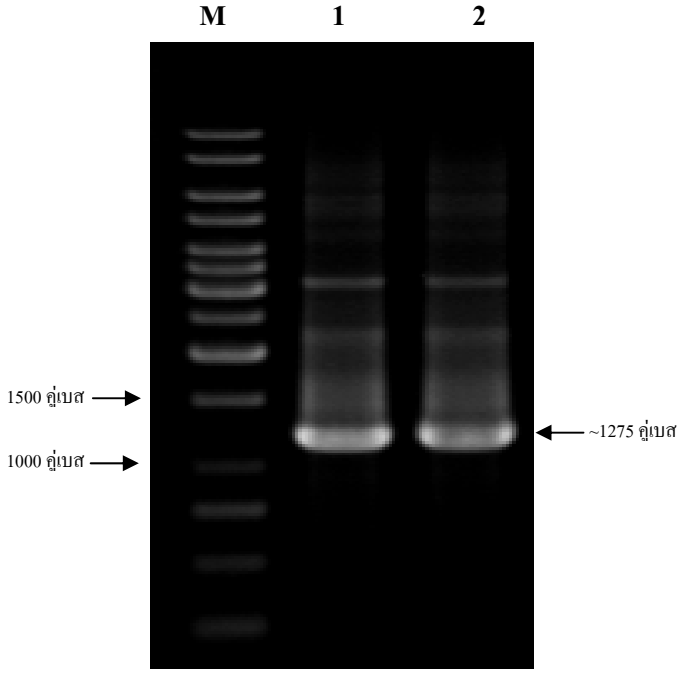


ภาพที่ 7 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่มียีนไคติเนสสอดแทรกอยู่

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 kb ladder (Fermentus)

ช่องที่1-2 : สกัดพลาสมิดของโคโลนีตัวอย่างที่1-2

และหลังการตรวจสอบยีนไคติเนสในพลาสมิดแล้วเตรียมยีนไคติเนสโดยการเพิ่มปริมาณยีนไคติเนสด้วยเทคนิค PCR และใช้ไพรเมอร์ ChiE1 และ ChiN2 ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับยีนให้ได้ปริมาณยีนมากๆ เพื่อใช้ในการโคลนยีนต่อไป ซึ่งได้ผลดังแสดงในภาพที่ 8 คือ หลังการตรวจสอบขนาดและปริมาณของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1275 คู่เบสเช่นเดิม



ภาพที่ 8 การเพิ่มปริมาณยีนไคติเนสที่สอดแทรกอยู่ในพลาสมิดลูกผสมโดยเทคนิค PCR

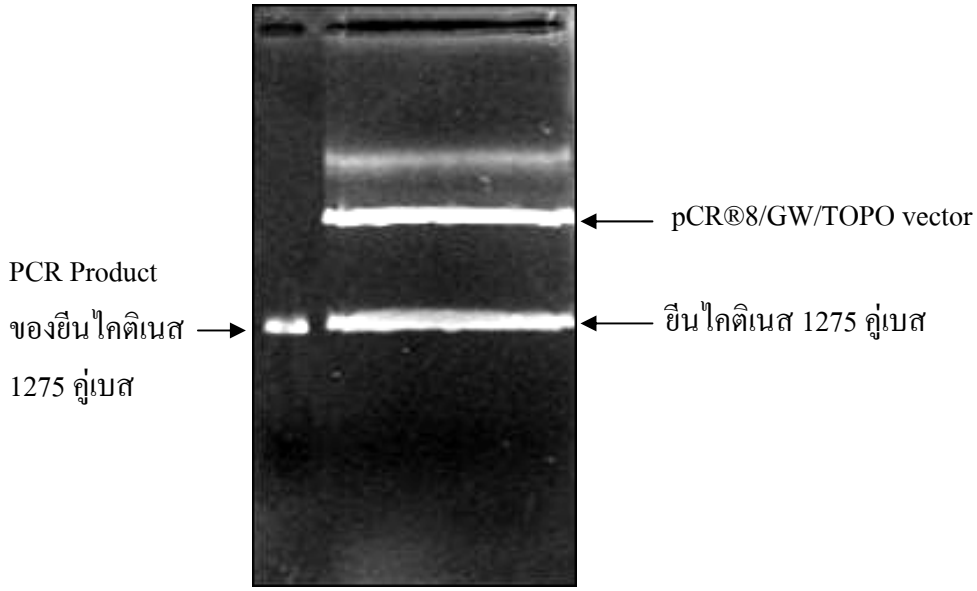
M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 kb ladder (Fermentus)

ช่องที่1-2 : ดีเอ็นเอของยีนไคติเนสจากพลาสมิดของโคโลนีตัวอย่างที่1-2

3. การ subclone ที่มียีนไคติเนสเข้าสู่เวกเตอร์ pPIC9

หลังจากการคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มียีนไคติเนสและเพิ่มปริมาณยีนได้แล้ว ทำการตัด (Digestion) ยีน ไคติเนสออกจากพลาสมิดของเวกเตอร์ pCR®8/GW/TOPO ด้วย restriction enzymes คือ *EcoR*I และ *Not*I ในการโคลนยีนต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ(restriction enzymes) เพื่อตัดสายดีเอ็นเอที่ต้องการให้มีตำแหน่งจดจำบนดีเอ็นเอที่แน่นอนและเข้าเชื่อมต่อกับพาหะ (vector) ในตำแหน่งจดจำเดียวกันแล้วจึงถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Host cell) ซึ่งในการทดลองนี้นำไปเชื่อมต่อ

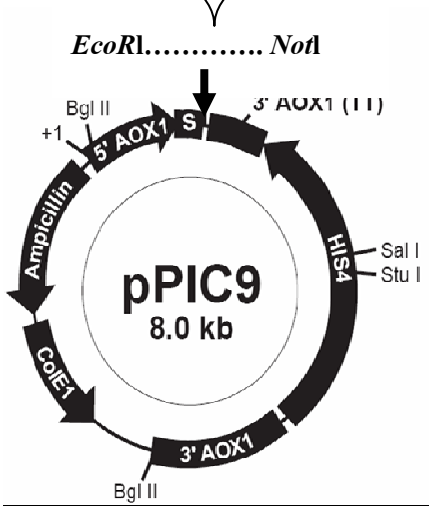
กับเวกเตอร์ใหม่ คือ pPIC9 ซึ่งเป็น expression vector ของยีสต์ *Pichia pastoris* และตรวจพบการแสดงออกของยีนไคติเนสนี้ นอกจากนี้พบว่าหลังจากได้ Digestion product มาแล้วและทำการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1275 คู่เบส (ภาพที่ 9) จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่มีขนาดถูกต้องไว้เพื่อนำไปโคลนเข้าสู่ยีสต์ต่อไป



ภาพที่ 9 การแยกยีนไคติเนสที่ตัดออกจากพลาสมิด pCR®8/GW/TOPO ด้วย restriction enzymes ที่ตำแหน่งของ *Eco*Rl และ *Not*l

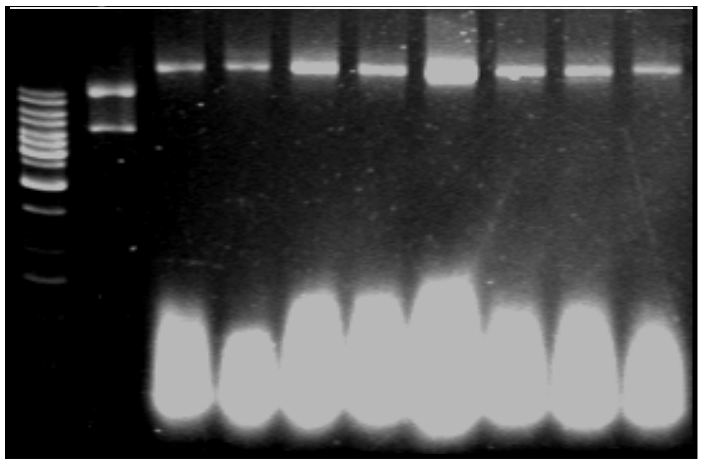
เมื่อนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ของยีนไคติเนสมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pPIC9 ขนาด 8.0 กิโลเบส ในตำแหน่ง restriction enzymes คือ *Eco*Rl และ *Not*l (ภาพที่ 10) เช่นกัน แล้วถ่ายทอดเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี Electroporation transformation ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหนี่ยวนำโดยสนามไฟฟ้าจากภายนอก ซึ่งเป็นกระแสตรงสั้นๆ เพื่อทำให้เกิดรูในเยื่อหุ้มเซลล์ให้โมเลกุลหรือดีเอ็นเอจากภายนอกเซลล์ผ่านเข้าไปได้ เมื่อเอาสนามไฟฟ้าภายนอกออก รูที่เกิดขึ้นจะถูกปิดลง ทำให้เซลล์ผู้รับยังคงมีชีวิตอยู่ได้ (Prasnna และ Panda, 1997) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก 2xYT agar ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีโคโลนีปรากฏขึ้นบนอาหารคัดเลือกนี้เป็นจำนวนมาก จึงสุ่มมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis และนำพลาสมิดมาเป็นแม่แบบในการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 5'AOX1 และ 3'AOX1 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 9275 คู่เบส อยู่ 8 ตัวอย่างจากทั้งหมด 9 ตัวอย่าง (ภาพที่ 11)

5’atgttgggcttcctcggaaaatccgtggccctgcttgctgcgctgcaggccactctcacctctgcaactcctgtgtctacaaacgacgtctca
gttgagaagagagccagcggatacacaaacgctgtctacttcaccaactggggtatctatggccgcaactttcaaccccaggacctggtggc
gtcggacatcactcatgtcatctactctttcatgaacttccaagcagacggcactgttgtctctggagatgcctacgccgattatcagaagcact
attccgacgattcctggaatgacgtcggaaacaacgcatacggctgtgtgaagcagctgtttaagttgaagaaggccaatcgcaacttgaag
gttatgctctctatcggtggctggacctggtccaccaacttcccttctgcagcaagcaccgatgccaaccgcaagaactttgccaagacggcc
atcaccttcatgaaggactggggttttgatggtattgacgtcgactgggagtaccctgccgatgacactcaggccaccaacatggttcttctgct
caaggagatccgatctcaactagatgcctatgctgcgcaatacgctccaggctaccacttccttctctccatcgctgcccccgctggaccaga
gcactactctgccctgcacatggccgaccttggtcaagttctcgactatgtcaaccttatggcctatgactatgctggttcttggagcagctactc
tggacacgatgccaacttgtttgccaacccgtccaatcccaacttttcaccatacaacaccgatcaggctatcaaggcttatatcaacggaggc
gttcccgcaagcaagatcgttcttggcatgcctatctatggacgatctttcgagagcactaatggcattggccaaacctacaatggaattggatc
tggaagctgggagaacggtatctgggactacaaggttcttcccaaggccggcgctacagtccagtacgactctgtcgcacaggcgtactac
agctatgattctagcagcaaggagctcatctctttcgataccctgacatggtcagcaaaaaggtctcttacctcaagaatctcggcctgggag
gcagtatgttctgggaggcttctgctgacaagactggctccgactccttgatcggaacaagccacagagcgctgggaagcctggactcaact
cagaacttgctgagctaccccaactcccagtatgataacatccgaagcggtctcaactag3’



ภาพที่ 10 ยีนไคติเนสเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pPIC9 ในตำแหน่ง restriction enzymes คือ *EcoR*I และ *Not*I (*Pichia* expression kit, Invitrogen)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

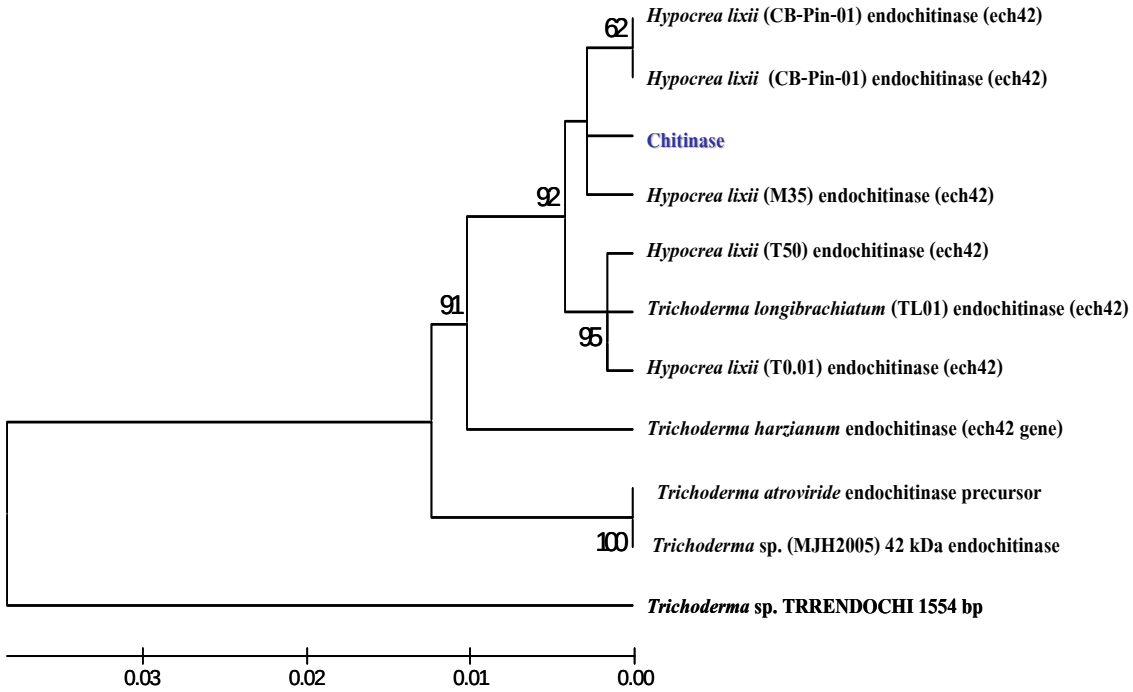


ภาพที่ 11 การตรวจสอบเซลล์ *E. coli* ที่มียีนไคติเนสที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดของเวกเตอร์ pPIC9 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 5'AOX1 และ 3'AOX1

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 kb ladder (Fermentus)

ช่องที่1-9 : ดีเอ็นเอจากการสกัดพลาสมิดของโคโลนีตัวอย่างที่ 1-9

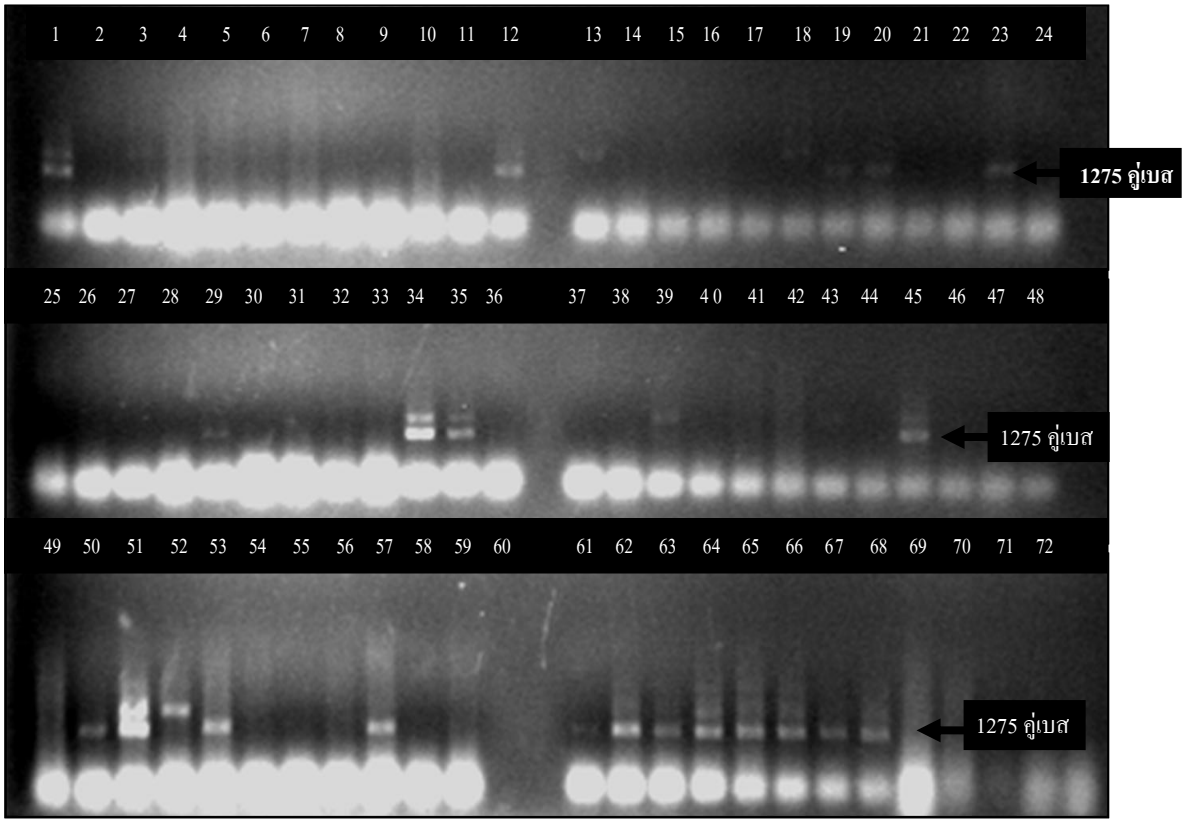
และหลังจากได้ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU), สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคติเนสที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank โดยอาศัยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) และจัดความสัมพันธ์ของยีนไคติเนสจากแหล่งต่างๆที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด (ภาพที่ 12) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนไคติเนส (*endochitinase*) ในการศึกษาครั้งนี้มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับยีนไคติเนสจากเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดและสายพันธุ์อื่นๆและยืนยันว่าโคลนที่ได้มียีนไคติเนสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้อง



ภาพที่ 12 Phylogenetic tree แสดงการจัดจำแนกความสัมพันธ์ของ cDNA clones ของยีนไคติเนส ด้วยโปรแกรม ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw)

4. การสร้าง transformation constructs ในเซลล์ยีสต์

จากการนำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนไคติเนสที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดของ pPIC9 แล้วมาตัดด้วย restriction enzymes คือ *Stu*I ให้เป็น linearized DNA ทำให้การทรานสฟอร์มมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากปลายอิสระของดีเอ็นเอมีความสามารถในการรวมกันมากกว่า ก่อนนำไปถ่ายทอดเข้าสู่ competent cell ของ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ GS115 โดยวิธี Electroporation transformation จะทำให้เกิดการรวมเข้าไปในจีโนมของยีสต์ เกิดรีคอมบิเนชันของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างยีนไคติเนสกับโครโมโซมของยีสต์และเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก MD agar ที่ไม่เติม histidine พบว่าโคโลนีของยีสต์ขึ้นในเวลา 48 ชั่วโมง จึงได้นำโคโลนีเหล่านั้นมาสุ่มตรวจสอบด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนไคติเนส (ChiE1 และ ChiN2) จำนวน 72 โคลน พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1275 คู่เบส อยู่ 23 ตัวอย่าง นอกจากนั้นยังพบว่าบางตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจากการรีคอมบิเนชันนี้ มีบริเวณ □ Factor เชื่อมอยู่ที่ด้าน 5’ ของยีนไคติเนสอยู่ ดังแสดงในภาพที่ 3 และ



ภาพที่ 13 การตรวจสอบยีนไคติเนสโดยนำโคโลนียีสต์ *Pichia pastoris* มาเป็นแม่แบบ และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนไคติเนส (ChiE1 และ ChiN2) ด้วยเทคนิค PCR ช่องที่1-72 : ดีเอ็นเอจากโคโลนียีสต์ตัวอย่างที่ 1-72

5’CGACTTTTAACGACAACTTGAGAAGATCAAAAAACAACTAATTATTCGAAGGATCC

α Factor

AAACGATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATT

AGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAG

CTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCC

AACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTA

***EcoR* I**

AAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTACGTAGAATTCTTG

GGCTTCCTCGGAAAATCCGTGGCCCTGCTTGCTGCGCTGCAGGCCACTCTCACCTCTG

CAACTCCTGTGTCTACAAACGACGTCTCAGTTGAGAAGAGAGCCAGCGGATACACAA

ACGCTGTCTACTTCACCGACTGGGGTATCTATGGCCGCAACTTTCAACCCCAGGACCT

GGTGGCGTCGGACAT----------CHITINASE GENE----------

AGCAAGGAGCTCATCTCTTTCGATACCCCTGACATGGTCAGCAAAAAGGTCTCTTAC

CTCAAGAATCTCGGCCTGGGAGGCAGTATGTTCTGGGGGGCTTCTGCTGGCAAGACT

GGCTCCGACTCCTTGATCGGAACAAGCCACAGAGCGCTGGGAAGCCTGGACTCAACT

CAGAACTTGCTGAGCTACCCCAACTCCCAGTATGATAACATCCGAAGCGGTCTCAAC

TAGGCGCGCATTATTAAGGGCGAATTCCCTAGGGCGGCCGCGAATTAATTCGCCTTA

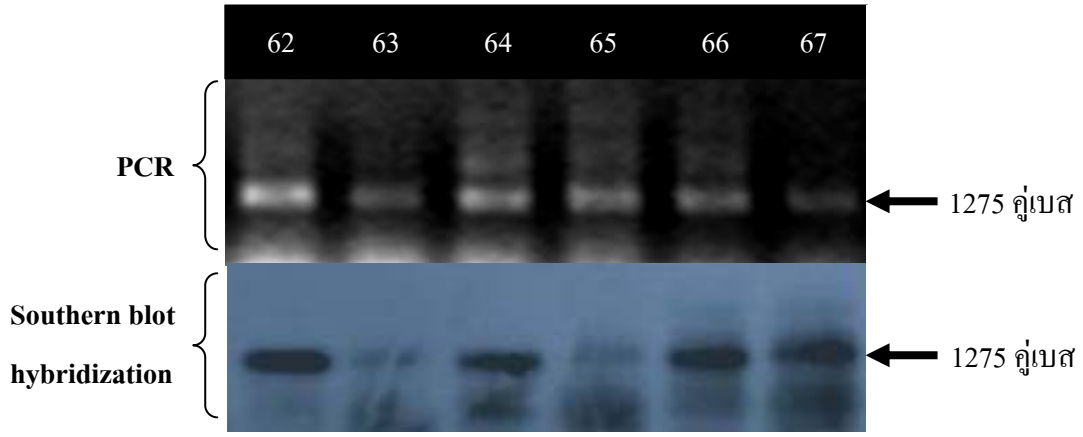
***Not* I**

GACATGACTGTTCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCG 3’

ภาพที่ 14 รูปแบบของ Chitinase Gene Insertion บนโครโมโซมของยีสต์ *Pichia pastoris*

เพื่อยืนยันผลจากเทคนิค PCR จึงนำผลผลิต PCR มาตรึงกับแผ่น nitrocellulose หรือ แผ่น nylon แล้วนำมาตรวจสอบด้วย Southern blot hybridization โดยอาศัยตัวติดตาม (probe) ที่จำเพาะกับเบสคู่สมของยีนไคติเนส ซึ่งติดฉลากด้วยสารไร้รังสี แล้วจึงนำผลไปตรวจการจับของผลผลิต PCR กับตัวติดตาม

และพบว่ามีแถบดีเอ็นเอปรากฏในตำแหน่งเดียวกับบนเจลจากเทคนิค PCR (ภาพที่ 15) คือ ขนาด 1275 คู่เบส ซึ่งเป็นผลยืนยันว่าโคโลนียีสต์ *Pichia pastoris* ที่ได้ มีการสอดแทรกยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ในจีโนมของยีสต์

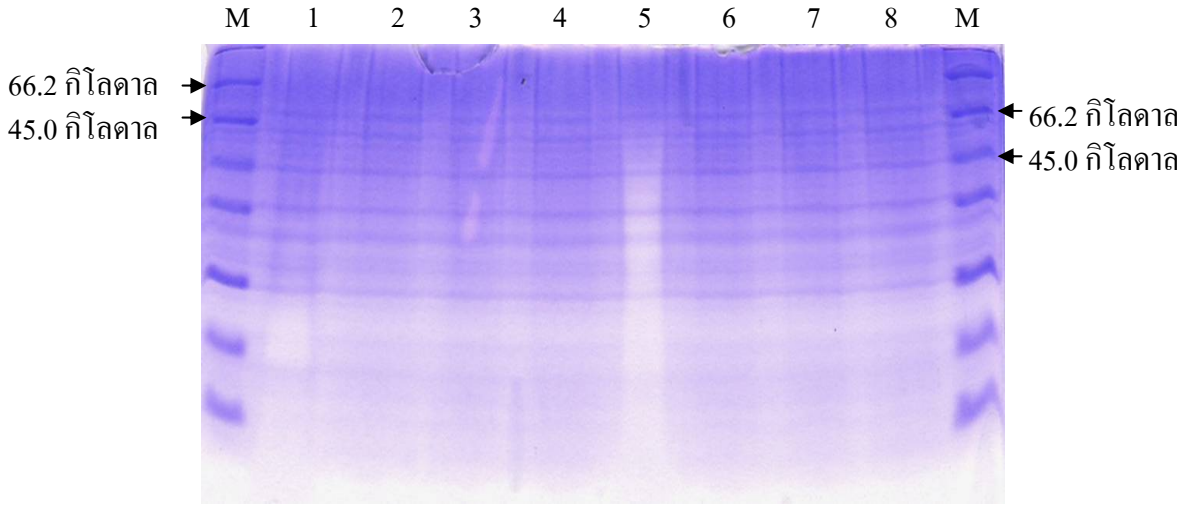


ภาพที่ 15 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของยีนไคติเนสจากโคโลนียีสต์ *Pichia pastoris* ตัวอย่างที่ 62-67 ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization เปรียบเทียบกับเจล PCR product.

5. การตรวจสอบโปรตีนจากยีนไคติเนสในรีคอมบิแนนท์ยีสต์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide eletrophoresis (SDS-PAGE)

หลังจากการตรวจสอบโปรตีนของยีสต์ *P. pastoris* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนส เปรียบเทียบกับยีสต์ *P. pastoris* ที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ทั้งในส่วนที่เป็น supernatant กับ pellet นั้น พบว่าตรวจไม่พบโปรตีนที่มีขนาด 42 กิโลดาลตัน จากยีสต์ทั้งสองชนิด (ภาพที่ 16) เพราะโปรตีนที่นำมาตรวจสอบมีปริมาณน้อยเกินไป รวมทั้งยีสต์มีสภาวะการเจริญเติบโตที่ยังไม่เหมาะสมมากนัก เนื่องจากมีการชักนำการแสดงออกด้วย methanol ที่น้อยเกินไป จึงไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นการสร้างโปรตีน ซึ่งจากการทดลองของจันทรพร (2006) พบว่ายีสต์สร้างไลเปสที่ทำงานได้โดย

เอนไซม์ถูกสร้างออกมานอกเซลล์และถูก glycosylated รวมทั้งการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดย *P. pastoris* เพิ่มขึ้นกว่า *Candida thermophila* 12-21 เท่า เมื่อถูกกระตุ้นด้วยการเติม 0.5%-2.0% methanol นอกจากนี้การตกตะกอนโปรตีนด้วย 20% (v/v) TCA (trichloroacetic acid) อาจยังไม่มีประสิทธิภาพในการตกตะตอนจากยีสต์ *P. pastoris* มากพอ จากการตรวจสอบก่อนหน้านี้ด้วยทั้งเทคนิค PCR และ Southern blot hybridization ยืนยันได้ว่าในยีสต์ที่คัดเลือกได้มียีนไคติเนสอยู่จริง คือ พบดีเอ็นเอขนาด 1275 คู่เบส และยีสต์ *P. pastoris* มีระบบการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ ดังนั้นหากยีสต์มีการเจริญเติบโตดีหลังการตรวจสอบควรจะพบโปรตีนขนาด 42 กิโลดาลตัน ใน supernatant ด้วยและจากในงานทดลอง Cereghino และคณะ (2002) ที่นำยีน scFv ถ่ายเข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* เพื่อศึกษาความแตกต่างของการปลดปล่อยโปรตีนออกนอกเซลล์ พบว่าในยีสต์มีการแสดงออกของโปรตีนที่ชัดเจนมากกว่าจากแบคทีเรีย *E. coli* เนื่องมาจากในแบคทีเรีย *E. coli* ไม่มีระบบการหลั่งสารออกนอกเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับในรายงานการศึกษาโปรตีนจากยีนไคติเนสที่บรรจุอยู่ในพลาสมิด pQE80L ในแบคทีเรีย *E. coli* ที่ตรวจไม่พบโปรตีนใน supernatant แต่ตรวจพบโปรตีนขนาด 42 กิโลดาลตันใน pellet (ภาพที่ 17, ข้อมูลเบื้องต้นจากโครงการวิจัย “การศึกษาศักยภาพของยีนไคติเนสจากเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อนำมาผลิตเอนไซม์ไคติเนสสำหรับใช้ในการควบคุมโรคราดอกสนิมในกล้วยไม้”, 2548)



ภาพที่16 การตรวจสอบโปรตีนของยีสต์ *P. pastoris* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนส เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ยีสต์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentus, USA)

ช่อง 1: โปรตีนจาก supernatant ของยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลี้ยง 6 ชั่วโมง

ช่อง 2: โปรตีนจาก supernatant ของยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลี้ยง 28 ชั่วโมง

ช่อง 3: โปรตีนจาก supernatant ของยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลี้ยง 30 ชั่วโมง

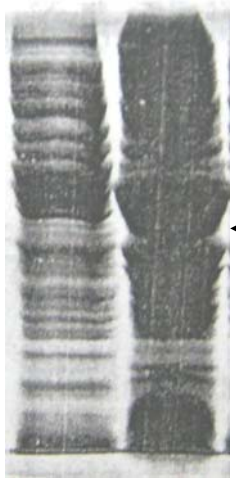
ช่อง 4: โปรตีนจาก pellet ของยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลี้ยง 30 ชั่วโมง

ช่อง 5: โปรตีนจาก supernatant ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ เลี้ยง 6 ชั่วโมง

ช่อง 6: โปรตีนจาก supernatant ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ เลี้ยง 18 ชั่วโมง

ช่อง 7: โปรตีนจาก supernatant ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ เลี้ยง 30 ชั่วโมง

ช่อง 8: โปรตีนจาก pellet ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ เลี้ยง 30 ชั่วโมง



ภาพที่17 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนของแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสมของเวกเตอร์ pQE80L กับยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ขนาดโปรตีนเท่ากับ 42 กิโลดาลตัน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากตัวอย่างใน supernatant และใน pellet

ช่อง 1: โปรตีนจาก supernatant ของ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนส

ช่อง 2: โปรตีนจาก pellet ของ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนส

6. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

หลังการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่ย่อยสลาย colloidal chitin โดยเปรียบเทียบตัวอย่างจาก supernatant ของยีสต์ *Pichia pastoris* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนสที่เลี้ยงในอาหาร YPD broth ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน (Treatment 1, control), และตัวอย่างจาก supernatant ของยีสต์ *P. pastoris* ที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ที่เลี้ยงในอาหาร MD (Minimal Dextrose Medium – Histidine) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน(Treatment 2) และ 5 วัน (Treatment 3) พบว่าตัวอย่างรีคอมบิแนนท์ยีสต์ใน Treatment 3 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่ย่อยสลาย colloidal chitin สูงสุดเท่ากับ 21.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและใน Treatment 2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 18.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ Treatment 1, การทดลองควบคุมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 4.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) เนื่องจากยีสต์มีระบบการหลั่งโปรตีนออกนอกเซลล์ด้วยจึงตรวจสอบพบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสได้มากกว่ายีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนส นอกจากนี้ระยะเวลาใช้เลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่นานขึ้นกว่า 2 วันทำให้ยีสต์มีการผลิตเอนไซม์ได้ใน

ปริมาณที่มากขึ้นด้วย ทำให้สามารถยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่ได้รับในการศึกษาครั้งนี้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการได้อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่ย่อยสลาย colloidal chitin จากตัวอย่าง supernatant ของการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มียีนไคติเนส

Treatment	ปริมาณกิจกรรมไคติเนส[1/] (U/ml)
Treatment 1	4.1
Treatment 2	18.5
Treatment 3	21.3

หมายเหตุ [1/] 1 ยูนิต เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินเป็น N-acetylglucosamine 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7. การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าถั่วฝักยาวสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

จากผลการทดสอบกรรมวิธีต่างๆหลังปลูกถั่วฝักยาวเป็นเวลา 5 วัน ด้วยการแช่เมล็ดถั่วฝักยาวที่มีเปอร์เซ็นต์การงอก 90-100 เปอร์เซ็นต์ ในสารเคมี carboxin, สปอร์แขวนลอยจากเชื้อสดของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน, สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน, สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน นำมาแช่น้ำร้อน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรอง, สารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และสารกรองจากยีสต์ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน นาน 30 นาที แล้วปลูกในดินที่มีเชื้อรา *R. solani* เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่แช่เมล็ดในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 30 นาที ก่อนปลูกลงดินที่ไม่มีเชื้อรา *R. solani* (control-) และกรรมวิธีควบคุมที่แช่เมล็ดในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 30 นาที แล้วปลูกลงดินที่มีเชื้อรา *R. solani* (control+) ปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ในกรรมวิธีที่ใช้สปอร์แขวนลอยจากเชื้อสดของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB–Pin–01 มีการเกิดโรคเน่าระดับดินน้อยเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี carboxin และกรรมวิธีควบคุม(control-) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 17.5, 10.0 และ 2.5

เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของบรรเจิด (2530) ที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* และสารเคมี carboxin ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าฝ้ายหลังปลูก 14 วัน แล้วมีประสิทธิภาพดีและการทดสอบในห้องปฏิบัติการก็พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถเจริญข้ามโคโลนีของเชื้อรา *R. solani* ไปพันรัดและสลายส่วนของเส้นใยของเชื้อโรคได้ กรณีการสลายส่วนของเส้นใยของ เชื้อรา *R. solani* นั้น Hadar และคณะ (1979) ได้ให้เหตุผลว่าเกิดจากเอนไซม์ไคติเนสและกลูคาเนสที่เชื้อรา *T. harzianum* สร้างขึ้นไปย่อยสลายผนังเซลล์ทำให้เกิดเป็นรูและเส้นใยเกิดการ lysis ซึ่งแม้จะไม่ได้ทำลายเชื้อรา *R. solani* จนตายหมด แต่สามารถยับยั้งการเจริญหรือทำให้เชื้อมีปริมาณน้อยลงจนไม่ก่อโรคกับพืชได้ (สมานและคณะ, 2516)

ส่วนกรรมวิธีที่ใช้สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน, สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน และสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำมาแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรอง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเรียงจากน้อยไปมากเท่ากับ 22.5, 30.0 และ 37.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่พบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน มีเอนไซม์ไคติเนส มากกว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน จึงส่งผลให้ควบคุมโรคได้มากกว่า แต่ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เอนไซม์เสื่อมไปบางส่วนจึงทำให้ควบคุมโรคได้น้อยลงแม้ว่าจะใช้เวลาเลี้ยงเชื้อ 5 วันเท่ากัน แต่อย่างไรก็ตามสารกรองจากการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วันก็ยังมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สารกรองจากยีสต์ปกติที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 42.5 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มียีนไคติเนสของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ผลดีกว่ายีสต์ปกติที่ไม่มียีนไคติเนสนี้ และจากผลการทดลองนี้คาดว่า หากเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ในสภาพที่มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ในปริมาณมากขึ้นหรือระยะเวลาการเลี้ยงนานขึ้นเพื่อให้มีเอนไซม์หลั่งออกมาอยู่ในอาหารมากขึ้นแล้ว การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อฆ่าเซลล์รีคอมบิแนนท์ยีสต์จะเป็นแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ที่สะดวกกว่าการนำสปอร์แขวนลอยของรีคอมบิแนนท์ยีสต์มากรอง ส่วนการใช้สารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคน้อยกว่าการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องการทดลองของอารีรัตน์ (2550) ที่พบว่าการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ให้ผลในการควบคุมโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวายที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ดีกว่าการใช้สารกรอง เนื่องจากสปอร์ของเชื้อรา *T. harzianum* แขวนลอยอยู่ในเซลล์ที่มีชีวิตที่สามารถงอกและเจริญเป็น

เส้นใยเพื่อดำเนินกิจกรรมในการควบคุมโรคพืชได้หลายกลไก เช่น การเป็นปรสิตภายในของเชื้อสาเหตุโรคพืช การแข่งขันกับเชื้อรา *R. solani* ในการใช้อาหารและครอบครองพื้นที่ การสร้างปฏิชีวนสารรวมทั้งเอนไซม์อีกหลายชนิด และการชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน นอกเหนือจากเอนไซม์ไคติเนสที่มาทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเหี่ยวสลายและตายเท่านั้น (จิระเดช และวรรณวิไล, 2542) อย่างไรก็ตามทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเมล็ดในดินที่มีเชื้อรา *R. solani* (control+) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

และจากผลการทดสอบกรรมวิธีต่างๆหลังปลูกถั่วฝักยาวเป็นเวลา 10 วัน ปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมีผลใกล้เคียงกันกับเมื่อ 5 วัน โดยกรรมวิธีที่ใช้สปอร์แขวนลอยจากเชื้อสดของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB–Pin–01 มีการเกิดโรคเน่าระดับดินเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี carboxin ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 22.5 และ 20.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (control-) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีที่ใช้สารกรองจากยีสต์ซึ่งได้รับการถ่ายยีนไคติเนสที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน, สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน, สารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, สารกรองจากยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน และสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน นำมาแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรอง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเรียงจากน้อยไปมากเท่ากับ 35.0, 45.0, 50.0, 55.0 และ 60.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งทำให้เห็นว่าประสิทธิภาพของสารกรองในการควบคุมโรคลดลงเมื่อระยะเวลาหลังปลูกเพิ่มขึ้นจาก 5 วัน เป็น 10 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้เฉพาะสารกรองที่ไม่มีเซลล์ที่ยังมีชีวิตทำให้ไม่มีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น อีกทั้งในสภาพแวดล้อมภายนอกไม่เหมาะสมในการคงสภาพของเอนไซม์ด้วย อาจเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นเพราะความร้อนจากแสงแดด การชะล้างโดยน้ำ หรือซึมลงไปใต้ดิน เป็นต้น เพราะการทดลองปลูกถั่วฝักยาวในสภาพโรงเรือนแบบเปิด แต่อย่างไรก็ตามทุกกรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ในดินมีเชื้อรา *R. solani* (control+) (ตารางที่ 3, ภาพที่ 18A)

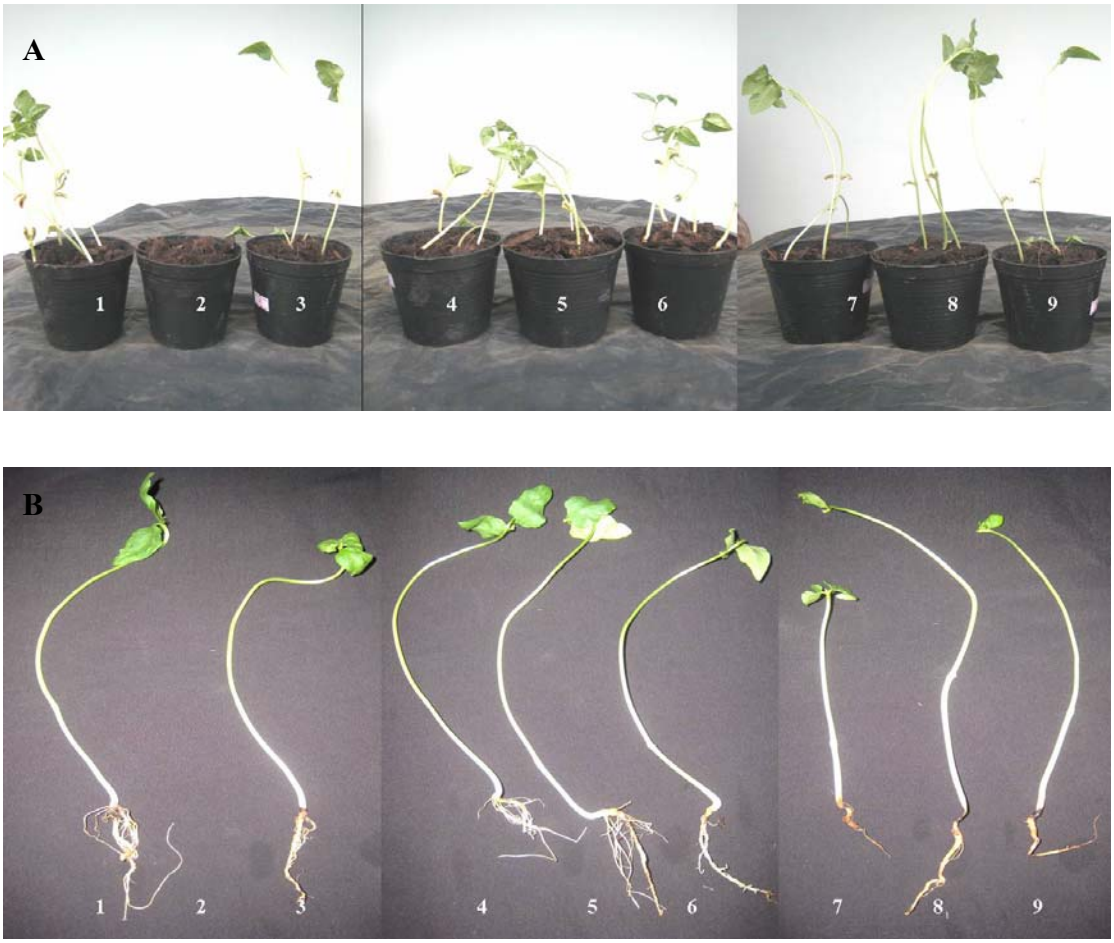
นอกจากนี้ยังพบว่าหลังปลูก 10 วัน ในกรรมวิธีควบคุมที่แช่เมล็ดในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 30 นาที แล้วปลูกลงดินที่ไม่มีเชื้อรา *R. solani* บริเวณโคนและรากของต้นกล้าถั่วฝักยาวมีสีขาวและยาวสมบูรณ์เป็นปกติดี ส่วนกรรมวิธีที่ในดินมีเชื้อรา *R. solani* แล้วใช้สารเคมี carboxin, สปอร์แขวนลอยจากเชื้อสดของเชื้อรา *T. harzianum* (CB–Pin–01), สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน และ สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ในการควบคุมโรค

เน่าระดับดินนั้น บริเวณโคนต้น มีรอยช้ำที่โคนเป็นสีน้ำตาล และรากไม่สมบูรณ์ ส่วนการใช้สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน นำมาแช่น้ำร้อน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรอง, สารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และสารกรองจากยีสต์ปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน นั้นส่วนมากต้นกล้ามีอาการของโรคเน่าระดับดินค่อนข้างชัดเจน และมีเปอร์เซ็นการเกิดโรคมีมากกว่า (ภาพที่ 18B) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์นั้น ไม่อาจสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีเท่ากับการใช้สปอร์หรือเส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 แม้จะมีกลไกการสร้างเอนไซม์ไคติเนสที่ไปทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราและทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชเหี่ยวสลายได้ แสดงให้เห็นว่ากลไกในการควบคุมโรคพืชนั้น กลไกการสร้างเอนไซม์ไม่ใช่กลไกเดียวที่สำคัญในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค แต่จำเป็นต้องมีกลไกการควบคุมโรคอย่างอื่นที่มีประสิทธิภาพร่วมด้วย

ตารางที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าถั่วฝักยาวสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

กรรมวิธี	การเกิดโรค (%) หลังปลูก	
	5 วัน	10 วัน
กรรมวิธีควบคุมไม่มีเชื้อโรค (control-)	2.5 a[1/]	5.0 a
กรรมวิธีควบคุม มีเชื้อโรค (control+)	90.0 f	97.5 g
สารเคมี carboxin	10.0 ab	20.0 b
เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ชนิดสด	17.5 a-c	22.5 bc
สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยง 5 วัน	22.5 b-d	35.0 cd
สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยง 2 วัน	30.0 c-e	45.0 de
สารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยง 5 วัน + ความร้อน	37.5 de	60.0 f
สารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01	37.5 de	50.0 fe
สารกรองจากยีสต์ปกติที่เลี้ยง 2 วัน	42.5 e	55.0 fe

หมายเหตุ [1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งของตารางซึ่งตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เปรียบเทียบโดย Duncan's multiple rang test (P=0.05)



ภาพที่ 18 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าถั่วฝักยาว ซึ่งเป็นต้นกล้าถั่วฝักยาวในกระถางหลังปลูก 5 วัน (A) และต้นกล้าถั่วฝักยาวที่ถอนขึ้นจากดินปลูก หลังปลูก 10 วัน (B)

1: แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ไม่มีเชื้อรา *R. solani*

2: แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ มีเชื้อรา *R. solani*

3: แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารเคมี Carboxin มีเชื้อรา *R. solani*

4: แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสปอร์แขวนลอยจากเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด มีเชื้อรา *R. solani*

5: แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร MD เป็นเวลา 5 วัน มีเชื้อรา *R. solani*

6: แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร MD เป็นเวลา 2 วัน มีเชื้อรา *R. solani*

7: แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารกรองจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร MD เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาแช่น้ำร้อน 60 องศาเซลเซียส มีเชื้อรา *R. solani*

8: แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารกรองจากเชื้อราไตรโคเดอร์มามีเชื้อรา *R. solani*

9: แช่เมล็ดถั่วฝักยาวในสารกรองจากยีสต์ปกติที่เลี้ยง เป็นเวลา 2 วัน มีเชื้อรา *R. solani*

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. สามารถแยกยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ขนาดประมาณ 1275 คู่เบส จากการเตรียม cDNA พบว่าได้ยีนไคติเนสทั้งหมดอย่างถูกต้องตามลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการยืนยันจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานไว้ใน GenBank รวมทั้งการนำข้อมูลยีนที่แยกได้ไปจัดจำแนกและเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับยีนไคติเนสจากกลุ่มเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีรายงานมาก่อนแล้ว

2. สามารถโคลนยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เข้าสู่ยีสต์ *Pichia pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของยีนโดยเวกเตอร์ pPIC9 ได้สำเร็จและสมบูรณ์ ตรวจสอบยืนยันผลด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนไคติเนส (ChiE1 และ ChiN2) และการตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern blot hybridization ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1275 คู่เบส ส่วนการตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีขนาด 42 กิโลดาลตัน จากยีสต์ทั้งสองชนิด แม้ว่าโปรตีนที่นำมาตรวจสอบมีปริมาณน้อยเกินไปจนไม่เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน แต่ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์นั้นมีมากกว่ายีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนส

3 ส่วนการนำสารกรองของรีคอมบิแนนท์ยีสต์มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของถั่วฝักยาวจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* นั้นแม้ว่าจะมีประสิทธิภาพดีไม่เทียบเท่าการใช้สารเคมีและสปอร์แขวนลอยของเชื้อไตรโคเดอร์มาชนิดสด แต่ก็มีแนวโน้มในการนำไปประยุกต์ใช้ควบคุมโรคพืชได้ต่อไป เนื่องจากมีประสิทธิภาพดีกว่าสารกรองจากเชื้อราไตรโคเดอร์มาเมื่อเปรียบเทียบกับสารกรองจากยีสต์ปกติ (*Pichia pastoris)* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

โดยควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านสภาพแวดล้อมหรือสารที่เหมาะสมในการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ให้มากขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคโดยชีววิธีต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ แสงศรีดำ. 2546. **การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ร่วมกับเชื้อรา *Gliocladium* sp. เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในดินโดยชีววิธี.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จันทรพร ทองเอกแก้ว. 2549. **การโคลนยีนและการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสที่หลั่งออกมานอกเซลล์จากยีสต์ทนร้อน *Candida thermophila*** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรรณวิไล อินทนู. 2542. **การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช.** โครงการเกษตรกู้ชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 90น.

บรรเจิด อินหว่าง. 2530. **การควบคุมเชื้อรา Rhizoctonia solani ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากดินเกษตรกรรม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. 2549. **การโคลนยีนไคติเนสจาก *Bacillus circulans* เข้าสู่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก**. วิทยาสารวิจัย. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 11(4): 287-294 .

วารุณี มณีนาค. 2546. **การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสและไคติเนสได้สูงและการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2531. **คู่มือปฏิบัติการราวิทยา**. ภาควิชาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ.

สมาน บุญแก้วเรือง ทวี เก่าศิริ และ เกษกานดา แสงสุวรรณ์ . 2516. **การคลุกเมล็ดฝ้ายด้วยสารเคมีเพื่อป้องกันโรคเน่าคอดินของต้นกล้า**. ในรายงานผลการค้นคว้าวิจัย กองวิจัยโรคพืชและกองเคมี กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ น. 122-125

สุวิตา แสไพศาล, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ พรเทพ ถนนแก้ว. 2549. **การโคลนยีนไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ**. วิทยาศาสตร์เกษตร. 37(6): 1021-1024 .

อารีรัตน์ เทียนขาว. 2550**. ประสิทธิภาพของเชื้อรา Trichroderma spp. ในการยังยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และควบคุมโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Brierley, R.A., C. Bussineau, R. Kosson, A. Melton and R.S. Siegel. 1992. **Fermentation Development of Recombinant *Pichia pastoris* Expression the HeterologousGene: Bovine Lysozyme**. Annals New York Academy of Sciences. 350-362 .

Cabral, K.M.S., M.S. Almerida, A.P. Valente, F.C.L. Almeida and E. Kurtenbach. 2003. **Production of the active antifungal *Pisum sativum* defen1 (Psd1) in *Pichia pastoris* : overcoming the inefficiency of the STEB protease. Protein Expression and Purification**. Available online at http://www. sciencedirect.com

Carsolio, C., N. Benhamou, S. Haran, C. Cortés, A. Gutiérrez, I. Chet and A. Herrera-Estrella. 1999. **Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene *ech42*, in mycoparasitism**. Applied and Environmental Microbiology. 65(3): 929-935 .

Cereghino, G.P.L., J.L. Cerghino, C. Llgen and J.M. Cregg. 2002. **Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris***. Curr Opin Biotechnol. 13: 329-332 .

Cohen-Kupiec, R. and I. Chet. 1998. **The molecular biology of chitin digestion**. Current Opinion in Biotechnology. 9: 270-277 .

Chet, l., G. E. Harman and R. Baker. 1984. ***Trichoderma harzianum* : its hyphal interaction whit *Rhizoctonia solani* and *Pythium* sp.**. Microbiology. 7: 29 .

Crepin, V.F., B.B. Faulds and I.F. Connerton. 2003. **Production and characterization of the *Talaromyces stipitatus* feruloyi esterase FAEC in *Pichia pastoris*. : identification of the nucleophillic serine**. Prot. Exp.Puri. 26: 176-184 .

De las Mercedes Dana, M., M. C. Limon, R. Mejias, R. L. Mach, T. Benitez, J. A. Pintor-Toro and C. P. Kubicek. 2001. **Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma hazianum*.** Current Genetics. 38: 335-342 .

Demain, A.L., H.J. Phaff and C.P. Kurtzman. 1998. **The industrial and agricultural significance of yeasts.** In C.F. Robinow. A Taxonomic Study. 4th edition. Elsevier, Amsterdam.

De la Cruz, J., A. Hidalgo-Gallego, J.M. Lora, T. Benitez, J.A. Pintor-Toro and A. Llobell. 1992. **Isolation and characterization of three chitinase from *Trichoderma harzianum***. Eur. J. Biochem. 206: 859-867 .

De Meyer, G., J. Bigirimana, Y. Elad and M. Hofte. 1998. **Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T-39 biocontrol of *Botrytis cinerea***. Eur. J. Plant Pathol. 104: 279-286 .

Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Hennis. 1983. **Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy.** Phytopathology. 73: 85 .

Elad, Y., Y. Hadar, I. Chet, and Y. Henis. 1981. **Biological control of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum***. In carnation. Plant Dis. 65: 675-677 .

Godtfredsen, W.O. and S. Vangedal. 1965. **Trichodermin a new sesquiterpene antibiotic**. Acta. Chem. Scand. 19:1088 .

Hadar, Y., Chet, I. and Henis, Y. 1979. **Biological control of *Rhizoctonia solani* damping off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum***. Phytopathlo. 69: 64-68.

Harman, G. E., I. Chet and R. Baker. 1981. **Factors affecting *Trichoderma harzianum* applied to seeds as a biocontrol agent**. Phytopathology. 71: 569 .

Jahic, M., J.C. Rotticci-Mulder, M. Martinelle and K. Hult and S-O. Enfors. 2002. **Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein**. Bioprocess Biosyst Eng. 24 pp. 385–393 .

Jose, L.R., L.S. Jack and F.L., Luis 1955. **A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugar** J. Biol. Chem. 217: 959-966.

Kleopper, J., S. Tuzun and J. Kuc. 1992. **Proposed definitions related to induced disease resistance**. Biocon. Sci. techno. 2: 347-349 .

Limon, M.C., J.M. Lora and J.D. Cruz. 1995. **Primery structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*** , *Current Genetic*. Springer. Berlin/Heidelberg. 478- 483.

Limon, M. C., J. A. Pintor-Toro and T. Benítez. 1999. **Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase**. Phytopathology. 89(3): 254-261 .

Limon, M. C., E. Margolles-Clark, T. Benítez, and M. Penttila. 2001. **Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum***. FEMS Microbiology Letters. 198: 57-63 .

Lin, A. 1994. **Trichodermin a new antifungal agent from *Trichoderma viride* and its action in biological control of *Rhizoctonia solani***. Journal of Antibiotic. 47(7): 799-805 **.**

Lutz, M. P., S. Wenger, M. Maurhofer, G. Defago and B. Duffy. 2004. **Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture.** FEMS Microbiology Ecology. 40: 447-455 .

Ornatowski, W., J. Jayaraj, T.C. Todd, W.T. Schapaugh, S. Muthukrishnan and H.N. Trick. 2004. **Introduction and constitutive expression of tobacco hornworm (*Manduca sexta*) chitinase gene in soybean**. *In vitro* Cell. and Dev. Biol. Plant 40(3): 260-265 .

Prasnna, G.L. and T. Panda. 1997. **Electroporation: basic principles, practical considerations and application in molecular biology.** Bioprocess Eng. 16: 261-264 .

Pappinen, A.,Y. Degefu, L. Syrjala, K. Keinonen and K. von Weissenberg. 2002. **Transgenic silver birch (*Betula pendula*) expressing sugarbeet chitinase 4 shows enhanced resistance to *Pyrenopeziza betulicola***. Plant Cell Rept. Available Source: http://link.Spinger.de/search.htm , November 27, 2002.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd E.D. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, New York.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd E.D. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, New York.

Sivan, A. and I. Chet. 1989. **The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization**. Phytopathology. 79:198-203

Walker, G.M. 1998. **Yeast Physiology and Biotechnology**. John. Wiley and Sons, Chiehest.

Weindling, R. 1932. ***Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi**. Phytopathology. 22: 837-845

Whipps, JM. 2001. **Effect of media on growth and interactions between a range of soilborne glasshouse pathogens and antagonistic fungi** . New phytologist. 107: 127-142 .

Woo, S. L., B. Donzelli, F. Scala, R. Mach, G. E. Harman, C. P. Kubicek, G. Del Sorbo and M. Lorito. 1999. **Disruption of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1**. Molecular Plant-Microbe Intractions. 12(5): 419-429 .

ภาคผนวก

การเตรียมสารสำหรับแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

1. Separating buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

Tris-base	45.50	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 250 มิลลิลิตร

2. Stacking buffer (1.0 M Tris-HCl , pH 6.8)

Tris-base	30.30	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 250 มิลลิลิตร

3. Acrylamide solution

Acrylamide	30.00	กรัม
Bis-acrylamide	0.80	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4. 12.5% Separating gel (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

Acrylamide solution	4.75	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.60	มิลลิลิตร
10% SDS	0.10	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	0.15	มิลลิลิตร
TEMED	0.005	มิลลิลิตร

5. 5% Stacking gel (ปริมาตร 4 มิลลิลิตร)

Acrylamide solution	0.60	มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	1.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.33	มิลลิลิตร
10% SDS	0.04	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	0.05	มิลลิลิตร
TEMED	0.005	มิลลิลิตร

6. Loading buffer 2 เท่า

2-mercaptonethanol	0.20	มิลลิลิตร
Glycerol	2.00	มิลลิลิตร
2% SDS	2.00	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	0.25	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M Tris-HCl ให้ครบ 10 มิลลิลิตร เก็บในที่มืด

7. Running buffer 10 เท่า, pH 8.3

Tris-base	30.00	กรัม
Glycine	144.00	กรัม
10% SDS	100.00	กรัม

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

8. Staining solution

0.25%	commissie brilliant blue-R 250
45.0%	methanol
10.0%	acetic acid

ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

9. Destaining solution

25.0%	methanol
7.0%	acetic acid

ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

10. Transfer buffer, pH 8.3

25 mM	Tris-base
150 mM	glycine

ปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.02% SDS

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

LB (Luria-Bertani) Medium

1% Tryptone

0.5% Yeast Extract

1% NaCl pH 7.0

1. For 1 liter, dissolve 10 g tryptone 5 g yeast extract 10 g NaCl in 950 ml deionized water

2. Adjust the pH of the solution to 7.0 with NaOH and bring the volume up to 1 liter.

3. Autoclave for 20 minutes at 15 lb/sq. in. Let cool to ~55°C and add desired antibiotics at this point.

4. Store at room temperature or at +4°C.

LB agar plates

1. Make LB Medium above and add 15 g/liter agar before autoclaving.

2. Autoclave for 20 minutes at 15 lb/sq. in.

3. Let cool to ~55°C and add desired antibiotics at this point. Pour into 10 cm Petri plates. Let the plates harden, then invert, and store at +4°C.

Stock Solutions

10X YNB

(13.4% Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate without amino acids)

Dissolve 134 g of yeast nitrogen base (YNB) with ammonium sulfate and without amino acids in 1000 ml of water and filter sterilize. Heat the solution to dissolve YNB completely in water. Store at +4°C. Alternatively, use 34 g of YNB without ammonium sulfate and amino acids and 100 g of ammonium sulfate. The shelf life of this solution is approximately one year. Note: If you are using the YNB pouch included in the Original Pichia Expression Kit, follow the directions on the pouch.

500X B (0.02% Biotin)

Dissolve 20 mg biotin in 100 ml of water and filter sterilize. Store at +4°C. The shelf life of this solution is approximately one year.

100X H (0.4% Histidine)

Dissolve 400 mg of L-histidine in 100 ml of water. Heat the solution, if necessary, to no greater than 50°C in order to dissolve. Filter sterilize and store at +4°C. The shelf life of this solution is approximately one year.

10X D (20% Dextrose)

Dissolve 200 g of D-glucose in 1000 ml of water. Autoclave for 15 minutes or filter sterilize. The shelf life of this solution is approximately one year.

10X M (5% Methanol)

Mix 5 ml of methanol with 95 ml of water. Filter sterilize and store at +4°C. The shelf life of this solution is approximately two months.

10X GY (10% Glycerol)

Mix 100 ml of glycerol with 900 ml of water. Sterilize either by filtering or autoclaving. Store at room temperature. The shelf life of this solution is greater than one year.

100X AA (0.5% of each Amino Acid)

Dissolve 500 mg each of L-glutamic acid, L-methionine, L-lysine, L-leucine, and Lisoleucine in 100 ml of water. Filter sterilize and store at +4°C. The shelf life of this solution is approximately one year.

1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0:

Combine 132 ml of 1 M K_2HPO_4, 868 ml of 1 M KH_2PO_4 and confirm that the pH = 6.0 ± 0.1 (if the pH needs to be adjusted, use phosphoric acid or KOH). Sterilize by autoclaving and store at room temperature. The shelf life of this solution is greater than one year.

YPD or YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

1% yeast extract

2% peptone

2% dextrose (glucose)

Note: If you are using the YP Base Medium or the YP Base Agar medium pouches included with the Original Pichia Expression Kit, follow the directions on the pouch.

1. Dissolve 10 g yeast extract and 20 g of peptone in 900 ml of water. Note: Add 20 g of agar if making YPD slants or plates.

2. Autoclave for 20 minutes on liquid cycle.

3. Add 100 ml of 10X D.

The liquid medium is stored at room temperature. YPD slants or plates are stored at +4°C. The shelf life is several months.

MD and MDH (Minimal Dextrose Medium + Histidine)

1.34% YNB

4 x 10-5 % biotin

2% dextrose

1. For medium, autoclave 800 ml of water for 20 minutes on liquid cycle.

2. Cool to about 60°C and then add:100 ml of 10X YNB, 2 ml of 500X B,

100 ml of 10X D

3. To make MDH, add 10 ml of 100X H stock solution. Mix and store at +4°C.

4. For plates, add 15 g agar to the water in Step 1 and proceed.

5. If preparing plates, pour the plates immediately. MD stores well for several months at +4°C.

MGY and MGYH (Minimal Glycerol Medium + Histidine)

1.34% YNB

1% glycerol

4 x 10-5% biotin

+ 0.004% histidine

1. Combine aseptically 800 ml autoclaved water with 100 ml of 10X YNB, 2 ml of 500X B, and 100 ml of 10X GY.

2. For growth of *his4* strains in this medium, a version can be made that contains histidine (called MGYH) by adding 10 ml of 100X H stock solution.

Store at +4°C. The shelf life of this solution is approximately two months.

RD and RDH Liquid Media (Regeneration Dextrose Medium + Histidine)

1 M sorbitol

2% dextrose

1.34% YNB

4 x 10-5% biotin

0.005% amino acids

+ 0.004% histidine

1. Dissolve 186 g of sorbitol in 700 ml of water and proceed to Step 2.

2. Autoclave 20 minutes on liquid cycle.

3. Cool and maintain the liquid medium in a 45°C water bath.

4. Prepare a prewarmed (45°C) mixture of the following stock solutions:

100 ml of 10X D

100 ml of 10X YNB

2 ml of 500X B

10 ml of 100X AA

88 ml of sterile water

Add to sorbitol solution.

5. For growth of *his4* strains you must add histidine to the media. Add 10 ml of 100X H (histidine) to the prewarmed mixture in Step 4. Store liquid medium at +4°C.

RDB and RDHB Agar Plates

1. Dissolve 186 g of sorbitol in 700 ml of water and add 20 g of agar.

2. Autoclave 20 minutes on liquid cycle.

3. Place the autoclaved solution in a 60°C water bath prior to addition of prewarmed

mixture of stock solutions. This will keep the medium from becoming too thick to mix reagents.

4. Prepare the prewarmed (45°C) mixture from RD and RDH Liquid Media, Step 4, above. Add to sorbitol/agar solution. If you are selecting for His+ transformants, do not add histidine.

5. Pour the plates immediately after mixing the solutions in Step 4. The plates should be stored at +4°C and should last for several months.

MM and MMH Minimal Methanol + Histidine (1 liter)

1.34% YNB

4 x 10-5% biotin

0.5% methanol

1. For medium, autoclave 800 ml of water for 20 minutes on liquid cycle

2. Cool autoclaved water to 60°C and add:

100 ml of 10X YNB

2 ml of 500X B

100 ml of 10X M

3. To make MMH, add 10 ml of 100X H stock solution. Mix and store at +4°C.

4. For plates, add 15 g agar to the water in Step 1 and proceed.

5. After mixing, pour the plates immediately. MM and MMH stores well for several months at +4°C.

BMG and BMM Buffered Minimal Glycerol

Buffered Minimal Methanol (1 liter)

100 mM potassium phosphate, pH 6.0

1.34% YNB

4 x 10-5% biotin

1% glycerol or 0.5% methanol

1. Autoclave 700 ml water for 20 minutes on liquid cycle.

2. Cool to room temperature, then add the following and mix well:

100 ml 1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0

100 ml 10X YNB

2 ml 500X B

100 ml 10X GY

4. For BMM, add 100 ml 10X M instead of glycerol.

5. Store media at +4°C. The shelf life of this solution is approximately two months.

BMGY and BMMY

Buffered Glycerol-complex Medium

Buffered Methanol-complex Medium (1 liter)

1% yeast extract

2% peptone

100 mM potassium phosphate, pH 6.0

1.34% YNB

4 x 10-5% biotin

1% glycerol or 0.5% methanol

1. Dissolve 10 g of yeast extract, 20 g peptone in 700 ml water.

2. Autoclave 20 minutes on liquid cycle.

3. Cool to room temperature, then add the following and mix well:

100 ml 1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0

100 ml 10X YNB

2 ml 500X B

100 ml 10X GY

4. For BMMY, add 100 ml 10X M instead of glycerol.

5. Store media at +4°C. The shelf life of this solution is approximately two months.

Breaking Buffer 50 mM sodium phosphate, pH 7.4

1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride or other protease inhibitors)

1 mM EDTA

5% glycerol

1. Prepare a stock solution of your desired protease inhibitors and store appropriately.

Follow manufacturer's recommendations.

2. For 1 liter, dissolve: 6 g sodium phosphate (monobasic)

    372 mg EDTA

    50 ml glycerol

    in 900 ml deionized water.

3. Use NaOH to adjust pH and bring up the volume to 1 liter. Store at +4°C.

4. Right before use, add the protease inhibitors.

การวิเคราะห์ปริมาณ N-acetylglucosamine

1. สารเคมีที่ใช้

Stock solution

NAG/colloidal chitin 5 mg/ml

Buffer 2

0.2M Sodium formate

0.1M Sodium chloride

0.2mg Bovine serum albumin (BSA)

ปรับ pH ด้วย formic acid

Borate solution

A:	น้ำกลั่น	100 ml
	H_3BO_3	17.3 g
	KOH	7.8 g
B:	น้ำกลั่น	40 ml
	K_2CO_3	32 g

ก่อนนำไปใช้ผสมอัตราส่วน A:B เท่ากับ 9:1

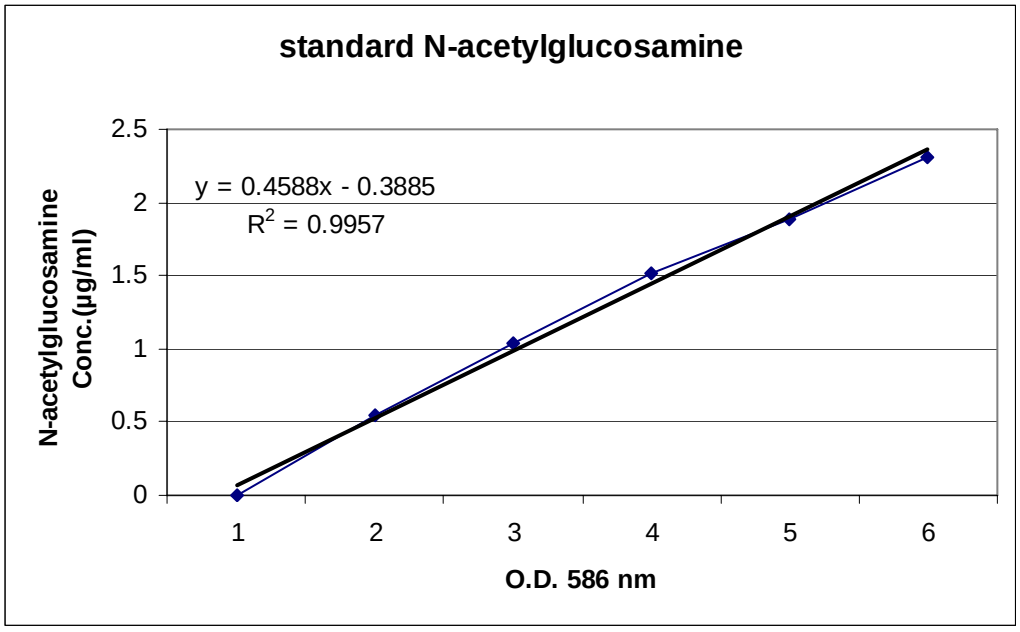
p-Dimethylamino bezaldehyde (DAB solution)

DAB	20 g
HCl (concentrated)	25 ml
glacial acetic acid	75 ml

ก่อนนำไปใช้เจือจางใน glacial acetic acid อัตราส่วน 4:1

2. การวิเคราะห์ปริมาณ N-acetylglucosamine

การเตรียม standard curve ของ N-acetylglucosamine เตรียมสารละลาย N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั้นปริมาตร 300, 250, 200, 150, 100 และ 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ เติม buffer2 (0.2M sodium formate, 0.1M NaCl และ 0.2 mg/ml bovine serum albumin) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม borate solution ปริมาตร 55 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ในน้ำเดือดเพื่อหยุดปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที ก่อนวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นเติม p-Dimethylaminobenzaldehyde (DAB solution) ปริมาตร 750 ไมโครลิตรก่อนนำไปแช่ใน water bath 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำ supernatant ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 586 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่าง N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 586 นาโนเมตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวจิตติมา เอื้องกิตติกุล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 27 พฤษภาคม 2526
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2548 วท.บ.(เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนค่าวัสดุวิจัยและบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร