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

จิตติมา เอื้องกิตติกุล — 2 / มิ.ย. / 2551

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก