รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแสดงออกของยีนไคติเนสในองุ่นเพื่อต้านทานโรคราน้ำค้าง

(The expression of chitinase gene in transformed grape for downy mildew resistance)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-46-36-12

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแสดงออกของยีนไคติเนสในองุ่นเพื่อต้านทานโรคราน้ำค้าง

(The expression of chitinase gene in transformed grape for downy mildew resistance)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร. โชคชัย วนภู

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2546

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2551

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในการทำวิจัย และจาก สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) เพื่อเป็นทุนสนับสนุนค่าใช้จ่ายของนักศึกษาบัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโท กระผมขอขอบคุณ รศ. ดร. James Ketudat-Cairns ที่อนุญาตให้ใช้ยีนไคติเนสเพื่อการวิจัย และขอขอบคุณ ศ. ดร. นันทกร บุญเกิด และ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว ที่ได้ช่วยเหลือเป็นที่ปรึกษาและให้ข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์อย่างยิ่ง

ผศ. ดร. โชคชัย วนภู

บทคัดย่อ

การแสดงออกของยีนไคติเนสในองุ่นเพื่อต้านทานโรคราน้ำค้าง

แคลลัส / ไคติเนส / องุ่น / องุ่นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

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

ABSTRACT

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

CALLUS /CHITINASE/ GRAPE /TRANSGENIC GRAPE

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

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค

สารบัญ..... ง

บทที่1 บทนำ..... 1

1.1 องุ่น..... 1

1.2 สกุล *Vitis*..... 1

1.3 พื้นที่การปลูกองุ่น..... 2

1.4 ผลผลิตขององุ่น..... 3

1.5 โรคองุ่น..... 3

1.6 เอนไซม์ไคติเนส..... 9

1.7 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและพืชดัดแปลงพันธุกรรม..... 12

บทที่ 2 วัสดุและวิธีการทดลอง..... 15

2.1 วัสดุ อุปกรณ์..... 15

2.2 วิธีการทดลอง..... 17

2.2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 17

2.2.2 ประเมินความสามารถของเอนไซม์ไคติเนสต่อการทำลาย สปอร์ของเชื้อรา *Plasmopara viticola*..... 18

2.2.3 การถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่เวคเตอร์ pET39b(+), pBI121 และ แคลลัสขององุ่น..... 19

2.2.4 การค้นหายีนในแคลลัสขององุ่นที่ดัดแปลงพันธุกรรม..... 24

บทที่3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 26

3.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 26

3.2 ประเมินความสามารถของเอนไซม์ไคติเนสต่อการทำลาย สปอร์ของเชื้อรา *Plasmopara viticola*..... 28

3.3 การถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่เวคเตอร์ pET39b(+), pBI121 และ แคลลัสขององุ่น..... 30

3.4 การสกัดดีเอ็นเอและตรวจหายีนไคติเนสในแคลลัสขององุ่นด้วยเทคนิค PCR 35
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 37
เอกสารอ้างอิง 38
ภาคผนวก 41

บทที่ 1
บทนำ

1.1 องุ่น

องุ่นอยู่ในวงศ์ของ Vitaceae และในวงศ์นี้มีสิ่งมีชีวิตอยู่ถึง 14 สกุล และ ฟอสซิล 2 สกุล รวมทั้งมีสายพันธุ์มากกว่าพัน พืชในวงศ์นี้ได้แก่ พวกพืชลำต้นอ่อน (herbaceous) ที่มีมือจับและอยู่ตรงข้ามกับส่วนของใบ ซึ่งพืชเหล่านี้อาจเป็นพวกที่สมบูรณ์เพศหรือไม่สมบูรณ์เพศก็ได้ (Pearson และ Goheen 1988)

1.2 สกุล *Vitis*

องุ่นเป็นไม้ยืนต้นประเภทไม้เลื้อยและมีมือจับ ส่วนของกลุ่มดอกจะอยู่ตรงกันข้ามกับมือจับ มีทั้งพวกที่สมบูรณ์เพศและไม่สมบูรณ์เพศ องุ่นถูกพบครั้งแรกในซีกโลกเหนือ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีลักษณะอากาศสบาย ๆ ในเอเชีย อเมริกาเหนือ อเมริกากลาง และตอนใต้ของตะวันตกเฉียงเหนือของอเมริกา ในเทือกเขาแอนดิส ประเทศโคลัมเบียและ เวเนซูเอล่า ในปัจจุบันมีการปลูกองุ่นอยู่ 5 ทวีป ซึ่งมีภูมิอากาศที่อำนวยต่อการเจริญเติบโต ส่วนในเขตร้อนและกึ่งร้อนนั้นสามารถปลูกองุ่นได้เช่นกันและ เก็บผลผลิตได้มากกว่า 1 ครั้งต่อปี

องุ่นแบ่งได้ 2 หมวดหมู่ คือ *Vitis* (*Euvitis*) และ *Muscadinia* ซึ่งจะมีโครโมโซมอยู่ n =19 หรือ 2n =38 นอกจากนี้ยังมีการแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 3 กลุ่ม คือ 1. พันธุ์เอเชีย 2. พันธุ์ยุโรป 3. พันธุ์อเมริกา ซึ่งองุ่นที่เป็นพันธุ์เอเชีย ได้แก่ *V. amurensis, V. davidii, V. armata, V. romanetii, V. piasezkii* และ *V. oignetiae* เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อ Phylloxera ส่วนพันธุ์อเมริกาอ่อนแอต่อโรครา ดำ รา น้ำค้าง และราแป้ง แต่บางสายพันธุ์ คือ *V. amurensis* ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองจากแม่น้ำ Amur ทางตอนเหนือของไซบีเรีย ตอนเหนือของจีน และเกาหลี ถูกนำมาใช้ในการผสมพันธุ์เพื่อให้องุ่นทนต่อสภาพอากาศที่หนาวเย็นได้ และบางพันธุ์ของอเมริกาก็เช่นกันถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทางด้านพันธุศาสตร์ นอกจากนี้ก็ยังมีการนำพันธุ์ที่เป็นต้นตอที่มีลักษณะต้านทานต่อแมลงในดินหรือสภาพแวดล้อมมาผสมพันธุ์กับพันธุ์ที่ต้องการให้มีลักษณะต้านทานและทนทานต่อสภาพแวดล้อม รวมทั้งนำพันธุ์อเมริกามาผสมกับพันธุ์ยุโรปหรือลูกผสมฝรั่งเศส ทำให้มีลักษะที่ต้านทานต่ออากาศที่หนาวเย็น ต้านทานต่อ phylloxera และโรคที่เกิดจากเชื้อรา

V. vinifera L.

เป็นพันธุ์ที่เก่าแก่ พบในบันทึกคัมภีร์คริสต์ศาสนา เป็นองุ่นสำหรับทานผลสด ทำลูกเกดและทำไวน์ ซึ่งองุ่นที่นิยมปลูกกันมากมาจากสายพันธุ์นี้ ต้นกำเนิดของ *V. vinifera* มาจากพื้นที่ที่อยู่ระหว่างและทางตอนใต้ของทะเลดำในเอเชีย (Weaver, 1976) ซึ่งสายพันธุ์นี้มีการปลูกมากกว่า

90 % ทั่วโลก ทั้งนี้อาจเป็นสายพันธุ์แท้ของ vinifera หรือสายพันธุ์ลูกผสมกับหนึ่งหรือมากว่าหนึ่งสายพันธุ์อเมริกา และประมาณ 85% ขององุ่นที่ปลูกในประเทศอเมริกาจะอยู่ในรัฐแคลิฟอร์เนีย

1.3 พื้นที่การปลูกองุ่น

ทั่วโลกมีพื้นที่การปลูกองุ่นมาก รวมพื้นที่ทั้งหมดประมาณ 10 ล้านเฮกแต (Pearson และ Goheen, 1988) ซึ่งมีการปลูกทั้งในพื้นที่ที่มีลักษณะภูมิอากาศที่สบาย ๆ และพื้นที่เขตร้อน แต่ในพื้นที่เขตร้อนมีการปลูกองุ่นมากกว่าในพื้นที่ที่มีอากาศสบาย ๆ ในปี 2001 มีพื้นที่การปลูกองุ่นถึง 19.6 ล้านเอเคอร์ ซึ่งมากกว่าในช่วงปี 1997-2000 นั่นคือมีการปลูกองุ่นเพิ่มขึ้น และประเทศที่มีการปลูกองุ่นเพิ่มมากขึ้นคือ ประเทศจีน เพิ่มขึ้น 57.9 % ออสเตรเลีย 31.6% นิวซีแลนด์ 28.7% ชิลี 17.0% และอเมริกา คือ 9.7% รวมทั้งประเทศอิหร่านที่มีพื้นที่การปลูกองุ่นเพิ่มขึ้นถึง 8.5% แต่ยังมีบางประเทศที่มีพื้นที่การปลูกองุ่นลดลง เช่น อะเซอไบจาน ลดลง 74.9% เลบานอน 25.5% และฮังการี ลดลง 20.6%

ในปี 2001 ประเทศสเปนเป็นประเทศที่มีพื้นที่การปลูกองุ่นมากที่สุดคือ 3,052,000 เอเคอร์ คิดเป็น 15.6 % ของพื้นที่การปลูกองุ่นทั่วโลก รองลงมาคือ ฝรั่งเศส มี 2,258,000 เอเคอร์ และประเทศอิตาลี มี 2,244,000 เอเคอร์ ส่วนประเทศอเมริกานั้นเป็นประเทศที่มีการปลูกองุ่นมากเป็นอันดับที่ 4 มีทั้งหมด 971 เอเคอร์ ซึ่งคิดเป็น 4.96% ของพื้นที่การปลูกองุ่นทั่วโลก (Ivie International 2003)

สำหรับประเทศไทย องุ่นถูกนำเข้ามาในช่วงรัชกาลที่ 5 ของกรุงรัตนโกสินทร์ ข้อมูลถูกบันทึกไว้โดยกรมวิชาการเกษตร และในปี 1963 ประวิน ปุนนาศรี และคณะ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร ได้พยายามศึกษาและแก้ปัญหาเกี่ยวกับการปลูกองุ่น จนปัจจุบันนี้องุ่นในประเทศไทยได้ปลูกขึ้นเพื่อการค้าแล้ว ซึ่งสายพันธุ์องุ่นมีมากกว่า 1 พัน สายพันธุ์ และมีหลายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีในประเทศไทย ปัจจุบันองุ่นมีการปลูกเกือบทุกภาคในประเทศไทย รวมทั้งที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ที่มีการเก็บรวบรวมพันธุ์องุ่นไว้หลากหลายพันธุ์ (นันทกร บุญเกิด, 2000) โดยในปี 1998 ประเทศไทยมีพื้นที่การปลูกองุ่นประมาณ 2,717 เฮกแต ซึ่งผลิตได้ 31,677 ตัน/ปี พื้นที่หลัก ๆ ที่ปลูกองุ่นในประเทศไทยจะอยู่ในภาคกลาง คือ ราชบุรี สมุทรสาครและนครปฐม จะปลูกองุ่นทานผลสดเป็นส่วนใหญ่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะปลูกทั้งองุ่นทานผลสดและองุ่นทำไวน์ คือจังหวัดเลย และนครราชสีมา ภาคเหนือจังหวัดที่มีการปลูกองุ่นทานผลสดมากที่สุดคือ เชียงใหม่ และน่าน ส่วนจังหวัดพิจิตรจะปลูกองุ่นสำหรับทำไวน์ (Papademetriou และ Dent, 2001)

1.4 ผลผลิตขององุ่น

องุ่นเป็นพืชผลที่มีประโยชน์มากมาย ผลที่ได้นำมาหมักเป็นไวน์และบรั่นดี หรือทานผลสด องุ่นจึงถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามวัตถุประสงค์ที่ใช้

1.3.1 องุ่นทานผลสด

องุ่นทานผลสดเป็นองุ่นที่มีประโยชน์สำหรับทำเป็นอาหาร และสำหรับการตกแต่ง ซึ่งจะมีลักษณะที่ดึงดูด น่าสนใจมาก รสชาติอร่อย ขนส่งง่าย และเก็บรักษาคุณภาพได้นาน และทนทานต่อการสัมผัสจากมือได้ ไม่มีแผลเกิดขึ้นที่ผลขององุ่น

1.3.2 องุ่นทำไวน์

องุ่นทำไวน์สามารถปลูกได้ในบางพื้นที่เท่านั้น แต่องุ่นที่ปลูกส่วนใหญ่เป็นองุ่นสำหรับทำไวน์ และนำมาผลิตเป็น dry wine และ table wine ซึ่งเป็นองุ่นที่มีกรดสูง ความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ในระดับปานกลาง ส่วนพวกที่มีระดับน้ำตาลสูง และกรดอยู่ในระดับกลาง ๆ คือองุ่นที่นำมาผลิตเป็นไวน์แบบหวาน และ ไวน์ทานเป็นของว่าง พันธุ์ที่นำมาผลิตไวน์ได้แก่ พันธุ์ชีราส คาบาเน่ เซอวียอง ไรซ์ริ่ง และ พิโนนัว ซึ่งมีกลิ่นและรสชาติที่เหมาะสมมากสำหรับการทำไวน์ที่มีคุณภาพสูงเป็นพิเศษ

1.3.3 องุ่นทำลูกเกด

องุ่นแห้งก็รวมอยู่ในกลุ่มขององุ่นที่ทำลูกเกดด้วยเช่นกัน ซึ่งลักษณะของลูกเกดที่ดีจะต้องแห้งและมีเนื้อที่นุ่มและไม่ติดกันเป็นก้อนเมื่อเก็บรวมกัน พันธุ์ที่ผลิตเป็นลูกเกดที่ดีได้นั้นมีน้อย เช่น ทอมสัน ซีดเลส, แบลค โคลิน และ มัสแคส ของ อเล็กซานเดรีย โดยเมล็ดจะถูกนำออกตจากเนื้อองุ่นโดยเครื่องจักร

1.3.4 องุ่นทำน้ำองุ่น

โรงงานที่ผลิตน้ำองุ่นที่มีคุณภาพนั้น ในขั้นตอนการผลิตและการเก็บรักษาต้องไม่ทำลายรสชาติเดิม ๆ ขององุ่น ในประเทศอเมริกาที่มีการผลิตน้ำองุ่นจะใช้พันธุ์คอนคอด หรือเป็นพันธุ์คอนคอดที่ผสมกับพันธุ์อื่นที่เหมาะสมสำหรับการทำน้ำองุ่น

1.3.5 องุ่นทำองุ่นกระป๋อง

องุ่นที่ไม่มีเมล็ดเท่านั้นถึงจะเหมาะสำหรับการทำองุ่นกระป๋อง นั่นคือ พันธุ์ทอมสัน ซีดเลส ซึ่งนิยมนำมาทำองุ่นกระป๋องมาก และอาจจะนำผลไม้อื่น ๆ มารวมไว้ด้วย เป็นสลัดผลไม้หรือเป็นเครื่องดื่มคอคเทล

1.5 โรคองุ่น

องุ่นก็เช่นกันกับพืชอื่น ๆ คือมีเชื้อสาเหตุของโรคมาจาก เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัสและนีมาโทส ซึ่งการเกิดโรคส่งผลให้สูญเสียผลผลิตมาก ทั้งในช่วงการเก็บเกี่ยว ขั้นตอนการผลิต รวมทั้งส่งผลกระทบต่อการตลาด ทำให้คุณภาพขององุ่นต่ำ ผลผลิตที่ได้ต่ำ ทำให้ต้นทุนในการผลิตเพิ่มขึ้น

ประเทศไทยมีปัญหาเกี่ยวกับโรคขององุ่นเช่นเดียวกันกับประเทศอื่น ๆ ซึ่งมีหลายโรคมาก เช่น โรคแอนแทรคโนส โรคราแป้ง และโรคราน้ำค้าง ซึ่งโรคนี้เป็นปัญหามากสำหรับการปลูกองุ่นในประเทศไทย ซึ่งรายละเอียดจะกล่าวต่อไป

1.5.1 โรคแอนแทรคโนส

โรคแอนแทรคโนสมีเชื้อสาเหตุมาจาก *Elsinoe ampelina* จะพบมากในช่วงฤดูฝน อากาศมีความชื้นสูง อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อนี้ คือ 24-26 องศาเซลเซียส ขนาดของแผลที่ปรากฏให้เห็นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-5 มิลลิเมตร มีสีน้ำตาลถึงสีดำรอบ ๆ ใบและมุมใบขององุ่น อยู่รวม ๆ กัน ตรงกลางของแผลจะมีสีเทาอมขาวและแห้ง และขาดเป็นรู ต้นอ่อนหรือใบอ่อนจะถูกทำลายด้วยเชื้อนี้มาก แผลจะเกิดทั่วทั้งใบและส่วนที่เป็นกิ่งได้ (Perason และ Goheen, 1988)

1.5.2 โรคราแป้ง

โรคราแป้งมีเชื้อสาเหตุมาจาก *Uncinula necator* ความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อรานี้คือ 40-100 % และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 20-27 องศาเซลเซียส และเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 6 -32 องศาเซลเซียส เชื้อราชนิดนี้จะสามารถเข้าทำลายทุกส่วนที่เป็นสีเขียวขององุ่น โดยจะแทงเข้าไปผ่านเซลล์ epidermal ใช้ haustoria แทงเข้าไปดูดเอาอาหารมาใช้ ส่วนที่เป็น mycelia และ conidia จะอยู่บนพื้นผิวของใบองุ่นมีลักษณะสีเทาอมขาวทำให้มองเห็นเป็นฝุ่นผงเหมือนแป้ง ทุกช่วงอายุของใบองุ่นจะถูกทำลายด้วยเชื้อนี้ได้ง่าย รวมทั้งส่วน petioles ลำต้น และช่อดอก ถ้าเชื้อนี้เข้าทำลายในช่วงก่อนหรือหลังดอกบาน อาจจะทำให้ช่อดอกเจริญไปเป็นผลขององุ่นที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้ผลผลิตลดลง

1.5.3 โรคราน้ำค้าง

โรคราน้ำค้างเกิดจากเชื้อราชนิด *Plasmopara viticola* ซึ่งจะเข้าทำลายใบเป็นส่วนแรกและจะกระจายไปอย่างรวดเร็วในส่วนที่ยังอ่อน ๆ และส่วนสีเขียว ทั้งส่วนใบ มือจับ และผลองุ่น ความรุนแรงของโรคนี้จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำที่อยู่ในพืช ความชื้นในอากาศ ณ เวลานั้นมีมากหรือน้อย ในสภาพภูมิอากาศเย็นและอบอุ่น แต่ไม่ใช่อากาศร้อน การเข้าทำลายจะเร็วและรุนแรงมาก ใช้เวลาแค่ช่วงสั้น ๆ ทำให้ส่วนใบ ผล และกิ่งขององุ่นถูกทำลายไปมาก ส่งผลให้คุณภาพขององุ่นต่ำ ซึ่งถ้าตาองุ่นเริ่มแตกและอุณหภูมิอยู่ในช่วง 10 องศาเซลเซียส เชื้อราจะเข้าทำลายทำให้เสียหายได้ 50-70 % ของแปลงปลูกในฤดูนั้น

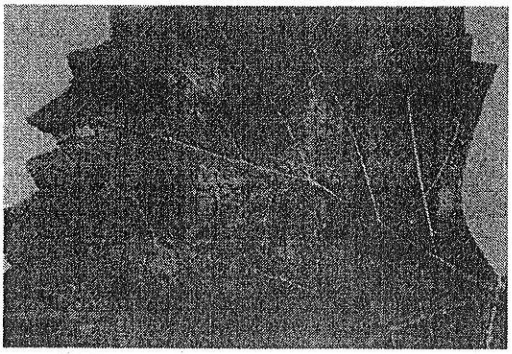
ลักษณะของโรคราน้ำค้าง

เชื้อรา *P. viticola* จะเข้าทำลายทุกส่วนที่เป็นสีเขียวขององุ่น โดยเฉพาะส่วนใบจะถูกเข้าทำลายมากที่สุด โดยจะเห็นเป็นแผลสีเหลืองหรือสีน้ำตาลแดงบนส่วนด้านใบบนและมีสีขาวอยู่ด้านใต้ใบ สีขาวคือเชื้อรา ซึ่งจะเจริญอยู่ด้านใต้ใบองุ่น บางครั้งแผลจะเหมือนน้ำมัน และอยู่

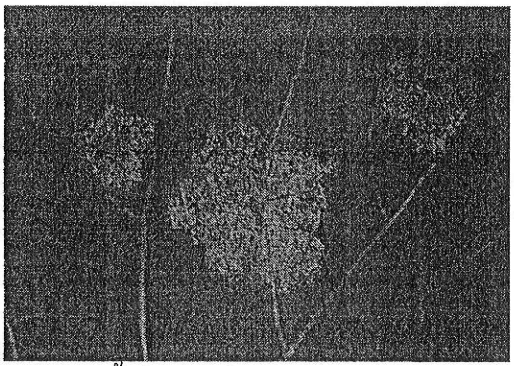
ระหว่างเส้นกลางใบ และเมื่อนานไป แผลจะเป็นสีน้ำตาลและแห้งตาย โดยเฉพาะในหน้าหนาว เชื้อนี้เข้าทำลายรุนแรงมาก

ก. อาการบนใบอ่อน

ระยะเริ่มแรกจะเป็นจุดสีเหลืองอมเขียวเล็ก ๆ ซึ่งยากที่จะสังเกตุเห็นได้ และเมื่อแผลใหญ่ขึ้นจะปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจนด้านบนของใบอ่อน ลักษณะแผลเป็นสีเหลืองซีดไปจนถึงสีเหลืองอมเขียวเป็นจุดๆ ประมาณ1/4 นิ้ว หรืออาจมีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่านี้ ดังรูปที่ 1.1 ส่วนด้านใต้ใบของอ่อนจะมีไมซีเลียมของเชื้อรา จึงเรียกว่า downy mildew มีลักษณะขาว หนาแน่นไปด้วยสีขาวนุ่มของไมซีเลียมเหมือนกับปุยฝ้าย ดังรูปที่ 1.2 เมื่อระยะเวลาการเข้าทำลายนานขึ้น แผลที่ใบอ่อนจะมีสีน้ำตาลดำ ใบจะไม่สามารถคงรูปร่างอยู่ได้และจะเปราะ แตกง่าย โดยปกติสปอร์เชื้อราจะอยู่ใต้ใบและอยู่ในช่วงสภาพอากาศเปียกชื้นและมีความชื้นสูง (Ellis, 2004)



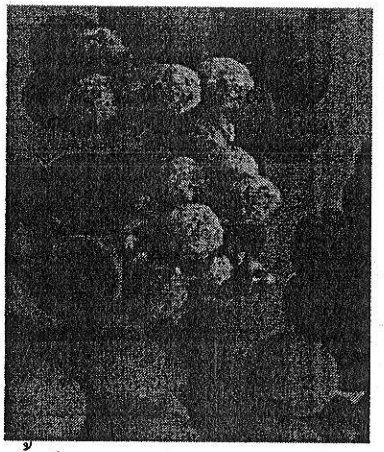
รูปที่ 1.1 โรคราน้ำค้างบนด้านบนใบอ่อน (Ellis and Nita, 2005).



รูปที่ 1.2 ลักษณะของโรคราน้ำค้างบนด้านล่างของใบอ่อน (Ellis and Nita, 2005).

ข. อาการบนผลองุ่น

การเข้าทำลายที่ผลองุ่นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วงใหญ่ ๆ คือ ช่วงแรกเมื่อผลองุ่นมีอายุน้อย ลูกเล็ก ๆ เมื่อเข้าทำลายในช่วงนี้ ผลองุ่นจะมีสีน้ำตาลอ่อน ผลนุ่ม แตกง่าย และมีปุยสีขาวของเชื้อราอยู่ทั่วผลองุ่น ดังรูปที่ 1.3 ส่วนในช่วงที่สอง คือเมื่อผลองุ่นโต จะไม่เห็นปุยสีขาวของราเจริญอยู่บนผลองุ่น ผลจะไม่นุ่ม แต่ผลองุ่นจะเป็นสีเขียวมัว ๆ และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มจนเป็นสีม่วงอมน้ำตาล ผลอาจจะเหี่ยว แตกง่าย และเน่าเปื่อยจนไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นผลองุ่นที่สมบูรณ์ได้



รูปที่ 1.3 โรคราน้ำค้างบนผลอ่อนขององุ่น (Ellis, 2004).

ค. อาการบนยอดและมือจับองุ่น

ลักษณะอาการเริ่มแรกจะเห็นเหมือนยอดหรือมือจับชุ่มไปด้วยน้ำ ยอดตกโน้มลงสู่ดิน และมีปุยสีขาวของเชื้อราเกิดขึ้นให้เห็นอย่างหนาแน่น ดังรูปที่ 1.4 ยอดอ่อนจะมีลักษณะอ้วนสั้นและแคระแกรน ทำให้รูปร่างผิดจากปกติ จนทำให้ยอดและมือจับตาย

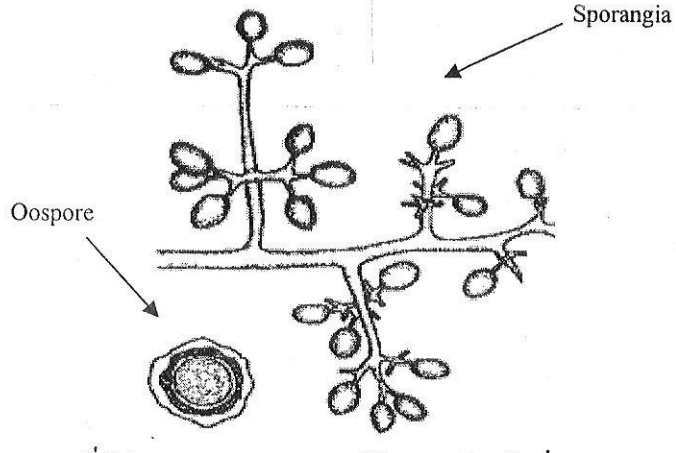
รูปที่ 1.4 ลักษณะของโรคราน้ำค้างบนยอดองุ่น (Babadoost, 2001)

เชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้าง

เชื้อรา *P. viticola* จัดเป็นราชั้นต่ำ เป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น อยู่ในอาณาจักร Chromista และไฟลัม Oomycota ซึ่งมีไมซีเลียมที่ยาว ผลิตส่วนของ Zoospores ใน

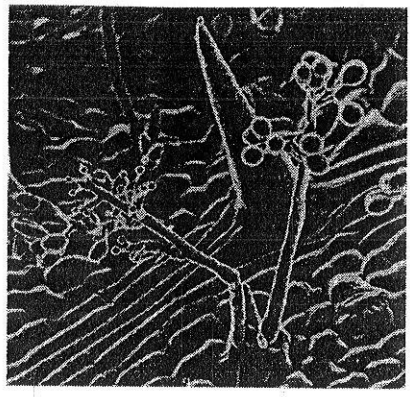
Zoosporangia และ Zoospores มีแฟลกเจลล่า 2 อัน และอยู่ในวงศ์ Peronosporaceae ซึ่ง sporangiophores จะอยู่บนส่วนที่เป็น sporangium นอกจากนี้ยังมีลักษณะที่พิเศษคือ ราทั้งหมดในวงศ์นี้จะเป็นพวกปรสิตแบบถาวร (Obligate parasite) จะใช้ส่วนที่เป็น haustoria แทงเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านผ่านผนังเซลล์และบุกเข้าไปในส่วนของ plasma membrane ไมซีเลียมจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1 ถึง 60 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดไม่แน่นอน ตามขนาดของช่องว่างนั้น ไมซีเลียมจะเจริญอยู่ระหว่างเซลล์แต่จะส่งส่วนที่เป็นตะขอหรือ haustoria รูปร่างแบบ globose เข้าไปในเซลล์ เชื้อราชนิดนี้จะมีการสืบพันธุ์แบบทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ดังนี้

1. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เริ่มต้นในช่วงฤดูร้อน โดย antheridium และ oogonium จะผสมกันได้เป็นoospore ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-120 ไมโครเมตร ถูกหุ้มด้วยชั้นของเนื้อเยื่อ 2 ชั้น ดังรูปที่ 1.5 และผนังเซลล์ของ oogonium เป็นแบบพับและย่น ส่วนของ oospores ที่อยู่ในใบจะสามารถผ่านเข้าไปตามเนื้อเยื่อของพืช ส่วนฤดูใบไม้ผลิ ส่วนของ oospores จะงอกในน้ำ เป็น germ tube และผลิต zoospore ได้ถึง 30-56 zoospores (Pearson และ Goheen, 1988)



รูปที่ 1.5 เชื้อรา *P. viticola* ที่มีส่วนของ oospore รูปด้านล่างซ้ายมือซึ่งมีลักษณะของผนังเซลล์ที่หนาและส่วนของ sporangia ที่อยู่บน sporangiopore มีลักษณะเหมือนผลมะนาว (Babadoost, 2001).

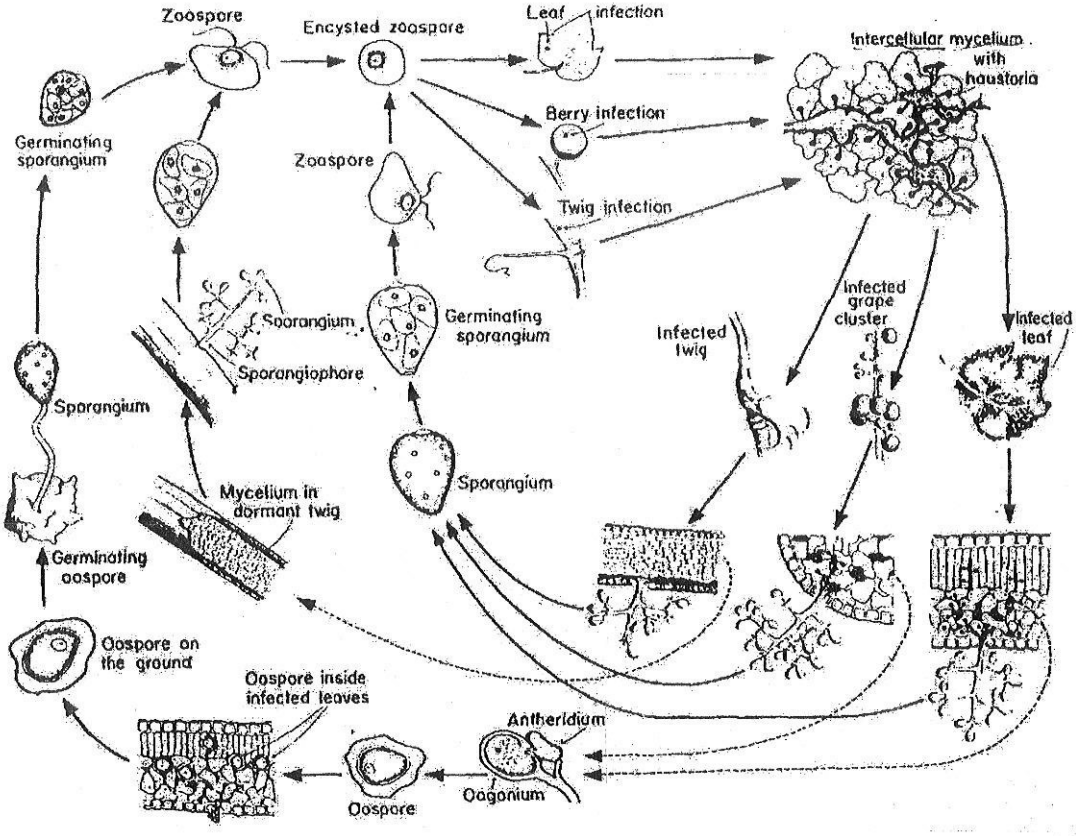
2. การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เกิดขึ้นในรูปของ sporangia ซึ่งมีรูปร่างกลมรีและใส เหมือนแก้ว ขนาด 14x11 ไมโครเมตร sporangia จะอยู่บน sporangiophores ซึ่งเหมือนกิ่งก้านของต้นไม้ มีความยาว 140-250 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 1.6 ซึ่งแต่ละ sporangia จะให้ zoospores ตั้งแต่ 1-10 อัน มีขนาด 6-8x4-5 ไมโครเมตร (Pearson และ Goheen, 1988)



รูปที่ 1.6 ส่วนของ sporangia ของเชื้อรา P. viticola บนกิ่งที่แตกแขนงเหมือนต้นไม้ของ sporangiophores ในใบองุ่น (Pearson and Goheen, 1988).

วงจรชีวิตของโรค

เชื้ออยู่ข้ามฤดูในรูปของ oospores ในเศษซากพืชหรือในบางสถานที่อาจอยู่ในรูปเส้นใยอาศัยอยู่ในพืชที่เป็นโรค เมื่อเข้าฤดูฝน oospores จะงอกเป็น sporangia และให้กำเนิด zoospores ซึ่งทั้ง sporangia หรือ zoospores อาจปลิวไปตามลม น้ำที่ใบเปียกบริเวณใกล้ดิน การเข้าสู่พืชจะผ่านทางปากใบด้านใต้ใบ (primary infection) แล้วเจริญเป็นเส้นใยอยู่ระหว่างเซลล์พืช และได้รับอาหารผ่านทาง haustoria ที่ส่งเข้าไปในเซลล์ เส้นใยเจริญกระจายเข้าไปในเนื้อเยื่อของช่องว่างใต้ปากใบรวมกันสร้าง sporangiophores งอกผ่านทาง lenticel ที่ปลาย sporangiophores เกิด sporangia มีรูปร่างเหมือนผลมะนาว สปอร์นี้เมื่อแก่จะหลุดปลิวไปตามลมหรือน้ำ โดย sporangia งอกเป็น zoospores ว่ายน้ำได้ชั่วระยะหนึ่ง แล้วเข้า cyst งอกเป็น germ tube และเข้าทำลายพืช เมื่อมีความชื้นเหมาะสม ส่วนอีกแนวทางคือ sporangiophores สามารถงอกได้โดยตรงเป็น germ tube และเข้าทำลายพืชได้เช่นกัน (secondary infection) การเข้าทำลายพืชจะเข้าทางปากใบ หรือ lenticel ระยะเวลาตั้งแต่การติดเชื้อจนถึงสร้าง sporangia ใหม่ ประมาณ 5-18 วัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิความชื้น จนถึงปลายฤดูเชื้อจะสร้าง antheridium และ oogonium ผสมกัน (homothallic) ได้ oospore ซึ่งจะเกิดในส่วนของพืชที่เป็นโรค เช่น ใบแก่ ยอดและผล ดังแสดงในรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 วงจรชีวิตของเชื้อ *P. viticola* (Balasubramaniam, Harvey, Braithwaite, and Jordan, 2005).

1.6 เอนไซม์ไคติเนส

ไคติเนส (EC3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคตินที่เชื่อมต่อกันของ N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) ตรงตำแหน่งของ Beta-1,4 ดังรูปที่ 1.8 และเอนไซม์นี้อยู่ในกลุ่มของ pathogenesis related proteins (PR-Proteins) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แสดงออกตลอดเวลา และจะมีการสะสมหรือการแสดงออกด้วยเช่นกันในช่วงที่โรคเข้าทำลายในพืช โดนแสงยูวี เกิดบาดแผลในพืช โดนสารเคมี การทดสอบด้วยเอทิลีน เป็นต้น พืชจะมีกลไกการโต้ตอบเมื่อถูกเข้าทำลายโดยเชื้อโรค ในรูปของโปรตีนที่มีการแสดงออกที่มากขึ้น ซึ่งถือได้ว่าเป็นกลไกการป้องกันตนเองของพืช ซึ่งไคติเนสสามารถพบได้ในพืช เชื้อรา แบคทีเรีย แมลง ปลา และโปรโตซัว (Henrissat, 1991 อ้างถึงใน Datta และ Muthukrishman, 1999)

ไคติเนสสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม (Class) ตามลำดับของเบสที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 1.9 หรืออาจแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ถ้าแบ่งตาม family ของ glycosyl hydrolases นั่นคือ family 18 และ family 19 (Henrissat, 1991 อ้างถึงใน Datta และ Muthukrishman, 1999) ไคติเนสจาก class I, II และ IV พบครั้งแรกในพืชและอยู่ใน family 19 ของ glycosyl hydrolases คือจะมีส่วนของ catalytic domain ที่เหมือนกันและทุกกลุ่มจะมี signal peptide ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ส่วน family 18

แบ่งออกได้เป็น class III, V และ VI พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด รวมทั้งพวกแบคทีเรีย เชื้อรา พืช แมลง สัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม และ ไวรัส

Class I ไคติเนสจากต้นยาสูบเป็นพืชที่เป็นพื้นฐานของไคติเนสกลุ่มนี้ ส่วนของ N-terminal มี cystein-rich chitin binding domain (CBD) มีส่วนของ glycine และ proline-rich domain (hinge region) นอกจากนี้ยังมีส่วนที่เป็น catalytic domain ที่เหมือนกันมาก โดยไคติเนสจะถูกสังเคราะห์ขึ้นเริ่มจากส่วนที่เป็น N-terminal signal sequence

Class II พบในยาสูบ พิทูเนีย และ *Arabidopsis* ไม่มีส่วนของ CBD และ proline-rich region แต่จะมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกันมากกับไคติเนส class I

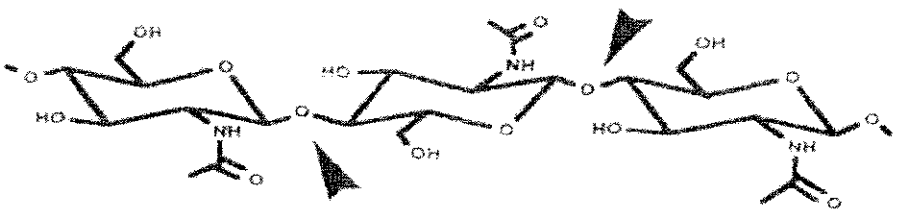
Class III พบในแตงกวา, *Heaver* และ *Arabiodopsis* ไคติเนสกลุ่มนี้จะไม่มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับ class I และ classII เลย แต่จะมีลำดับอะมิโนที่สามารถแต่จำแนกได้อย่างชัดเจนระหว่างยีสต์และ zygomycetes ซึ่งไคติเนสกลุ่มนี้ไม่มี cystein-rich domain และ hinge region

Class IV พบไคติเนสกลุ่มนี้ในหัวบีท, rape และถั่ว ซึ่งมีส่วนของ cystein-rich domain และโครงสร้างหลักจะเหมือนกันมาก แต่จะต่างจาก class I คือส่วนที่เป็น catalytic domain จะถูกตัดออกไปทำให้มีขนาดที่เล็กกว่า

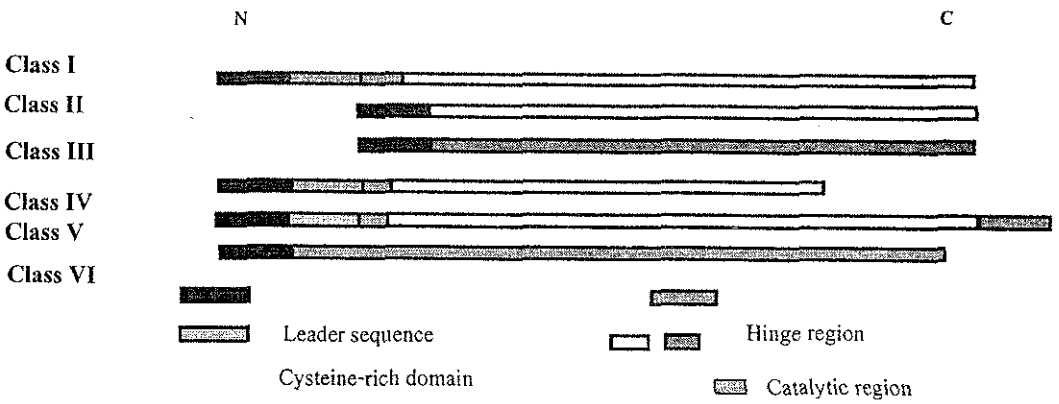
Class V ไคติเนสจากกลุ่มนี้พบใน single protein ซึ่งโครงสร้างไม่เหมือนกับ class I, II และ IV

Class VI ไคติเนสในกลุ่มนี้ถูกพบในหัวบีทชนิดเดียวเท่านั้น ไม่มีส่วนของลำดับอะมิโนเหมือนกับกลุ่มใด ๆ เลยตั้งแต่ class I-V แต่มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับ exochitinase ของแบคทีเรียมาก

ไคติเนสจะอยู่ในส่วนของ apoplast ทุกกลุ่ม ยกเว้นใน class I บางครั้งจะอยู่ในแวคิวโอล (Collinge et al.,1993) น้ำหนักของไคติเนสที่พบในพืชจะมีขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน (Hahn, Schlersier, และ Hohne 2000) นอกจากนี้ยังมีขนาดตั้งแต่ 40-90 กิโลดาลตัน และอาจสูงถึง 120 กิโลดาลตัน ซึ่งพบในสัตว์ที่มีขาปล้อง และ สัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนขนาดของโมเลกุล 30 ถึง 120 กิโลดาลตัน พบในแบคทีเรียและเชื้อรา ค่า pI อยู่ในช่วงกว้าง ๆ คือ 3.0-10.0 ในพืชชั้นสูง และสาหร่าย ส่วนแมลง สัตว์ที่มีกระดองและพวกที่มีเปลือกหุ้ม รวมทั้งปลา อยู่ในช่วง 4.7-9.3 รวมทั้งพวกจุลินทรีย์มีค่า pI อยู่ในช่วง 3.5-8.8 ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมของไคติเนสคือ 4-9 สำหรับพืชชั้นสูงและสาหร่าย ในสัตว์คือ 4.8-7.5 และจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 3.5-8.0 (Jolles และ Muzzarelli, 1999) ไคติเนสจากพืช เช่น กระถินบ้าน (*Leucaena leucocephala* de Wit) มีน้ำหนักโมเลกุล 46 กิโลดาลตัน และค่า isoelectric point (pI) คือ 7.5 ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมคือ 4.5 และค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 55 องศาเซลเซียส (Mana Kaomek, Poonsuk Sriyotha, Mizuo, Fujimara, และ Ketudat Cairns, 2003)



รูปที่ 1.8 โครงสร้างของไคตินและตำแหน่งที่ไคตินถูกไคติเนสตัดตรงตำแหน่ง beta-1,4 ที่ถูกศรชี้ (Datta and Muthukrishman, 1999).



รูปที่ 1.9 รูปแบบจำลองของไคติเนสแต่ละกลุ่ม (class) (Datta และ Muthukrishman, 1999).

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกไคติเนสมาทำการทดลอง เพราะคุณสมบัติของเอนไซม์ไคติเนสสามารถย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่ของผนังเซลล์จุลินทรีย์และเชื้อรามีไคตินเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ 3-60% (Bartnicki-Farci, 1968 Wessels และ Sietsma, 1981 อ้างถึงใน Mana Kaomek, 2001) นอกจากนี้ไคติเนสยังมีกลไกในการป้องกันตัวเองในพืช ซึ่งไคติเนสถูกสกัดจากพืชหลายชนิด เช่น ข้าวฟ่าง ถั่ว ข้าวโพด มันฝรั่ง ข้าว ถั่วเหลือง ยาสูบ ข้าวสาลี และองุ่น เป็นต้น ซึ่งจากงานวิจัยของ Verburg และ Huynh ในปี1991 ได้นำไคติเนสจาก Arabidopsis มายับยั้งการเจริญของ *Trichoderma reesei* ได้ และในปี 1992 Huynh และคณะพบว่าเอนไซม์ไคติเนสจากข้าวโพดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ซึ่งก่อให้เกิดโรคใบเหี่ยวในมันฝรั่ง และ *Alternaria solani* ซึ่งก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในมะเขือเทศ นอกจากนี้ในปี 1993 Ponstein และคณะได้ทำการทดลองในห้องทดลอง โดยนำไคติเนสจากยาสูบมาหยดลงบนแผ่นกระดาษบนสปอร์ของเชื้อรา *F. solani* ในอาหารเทียมชนิด PDA แล้วทำการบ่มนาน 2 ชั่วโมง พบว่าส่วนที่เป็น germling ถูกทำลายให้แตกได้ รวมทั้งงานวิจัยในปี 1994 ของ Leo และคณะเช่นกัน รายงานว่าเอนไซม์ไคติเนสสามารถทำลายและยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. viride* ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม

ต่อช่องทดลองได้อย่างสมบูรณ์และในเชื้อ *A. radicina* ก็เช่นกัน ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส 5-10 ไมโครกรัมต่อช่องการทดลอง และงานวิจัยของมานะ ขาวเมฆ และคณะ (2003) พบว่าไคติเนสจากกระถินบ้านสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ถึง 13 สายพันธุ์ ดังนั้นจากงานวิจัยเหล่านี้จึงสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าเอนไซม์ไคติเนสมีบทบาทในเรื่องกลไกการป้องกันตนเองของพืชจากเชื้อโรคหรือเป็นโปรตีนในกลุ่ม pathogenesis-related protein

1.7 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและพืชดัดแปลงพันธุกรรม

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นสิ่งที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในการดัดแปลงพันธุกรรมพืช คือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเทียมเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นแคลลัส ยอดจำนวนมาก และต้นพืช ซึ่งการที่จะเหนี่ยวนำให้เป็นแคลลัส ยอดจำนวนมาก และต้นพืชได้นั้นต้องใช้อาหารเทียมในการเพาะเลี้ยงและอยู่ในสภาพแวดล้อมจำลองที่เหมือนจริงมากที่สุด อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีหลายชนิด ซึ่งอาหารสูตร MS (Muradhige & Skoog) นิยมใช้กันมาก อาหารนี้ประกอบไปด้วยธาตุอาหารหลาย ๆ ชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม คือ 1. ธาตุอาหารหลัก (Major inorganic) 2. ธาตุอาหารรอง (Trace element) 3. แหล่งของเหล็ก (Iron source) 4. อินทรีย์วัตถุ เช่น วิตามิน 5. แหล่งคาร์บอน เช่น น้ำตาลซูโครส และ 6. ฮอร์โมนพืช เช่น BAP

งานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการศึกษามานาน โดยในปี 1989 Yilaphla และ Mullins ได้นำส่วนตาขององุ่นสายพันธุ์ Sultana (syn. Thomson seedless), Grenache และพันธุ์ Gloryvine เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Nitsch & Nitsch (NN) ที่เติมฮอร์โมนพืช BAP ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ได้ยอดองุ่นแล้วทำการย้ายลงในอาหารเพื่อชักนำให้เป็นต้นองุ่น หลังจากนั้น Marchenko (1991) ได้นำใบและลำต้นขององุ่นมาเพาะเลี้ยงเป็นเอมบริโอเจเนซิส (Embryogenesis) แคลลัสเกิดขึ้นภายใน 20-60 วันหลังจากย้ายลงในอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม 1 มิลลิกรัม/ลิตร ของฮอร์โมนพืชชนิด 2,4-D และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ของฮอร์โมนพืชชนิด BAP และในปี 1994 Emershad และ Ramming ได้นำองุ่นไร้เมล็ดเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด Emershas/Ramming นาน 2 เดือนได้เป็นโซมาติกเอมบริโอ (Somatic embryo) และเมื่อย้ายลงในอาหารชนิดเดียวกันที่มีฮอร์โมนพืช BAP ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ พร้อมกับเติมวุ้นชนิด TC ลงไป 0.65% ได้ยอดจำนวนมากและเจริญไปเป็นต้นองุ่นหลังจากย้ายลงไปในอาหารสำหรับพืชพวกไม้ (woody plant) ที่มีการเติมซูโครสลงไป 1.5% ฮอร์โมนพืชชนิด BAP ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ผงถ่าน 0.3% และวุ้น 0.65%

ในปี 1995 Harst ได้พัฒนาขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นเพื่อให้ได้เป็นต้น โดยนำส่วนใบขององุ่นจากแปลงปลูก สายพันธุ์ Seyval blanc เพาะเลี้ยงในอาหาร NN69 ที่เติม NOA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ และ TDZ ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ได้เป็นโซมาติกเอมบริโอ และปี 1999 Salunkhe และคณะได้นำเกสรตัวผู้ขององุ่น *V. lantifolia* L. ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมือง เพาะเลี้ยงใน

อาหารสูตร NN ที่มีฮอร์โมนพืช 2,4-D ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ และ BAP ที่ความเข้มข้น 9 ไมโครโมลาร์ เจริญเป็นแคลลัสใน 4-6 สัปดาห์ แล้วนำแคลลัสที่ได้นี้ย้ายลงในอาหารชนิดเดิมที่มีฮอร์โมนพืช NAA ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ได้เป็นโซมาติกเอมบริโอใน 6 สัปดาห์ แล้วย้ายลงในอาหารชนิดเดิมที่ไม่มีฮอร์โมนพืช ทำให้ได้ต้นองุ่น รวมทั้งในปี 2004 Singh, Khawale และ Sigh ได้นำข้ออองุ่นสายพันธุ์ Pusa Urvashi และ Pusa Navrang เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีฮอร์โมนพืชชนิด BAP ที่ความเข้มข้น 2.0 หรือ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ของฮอร์โมนพืชชนิด BAA ได้ยอดจำนวนมาก แล้วทำการย้ายลงในอาหาร ½ MS ที่มีฮอร์โมน IBA ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และผงถ่าน 200 มิลลิกรัม/ลิตร ยอดสูงขึ้นพร้อมกับเกิดราก หลังจากนั้น 6-7 สัปดาห์ทำการตัดต้นองุ่นให้เหลือ 2 ข้อแล้วทำการย้ายลงในอาหารเพื่อการขยายจำนวนให้มากขึ้น และย้ายลงปลูกในดินที่มี peat:soilrite ในอัตรา 1:1 ได้เป็นต้นองุ่นที่พร้อมปลูกลงในแปลงปลูกต่อไป

สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับการดัดแปลงพันธุกรรมพืชขององุ่นก็มีมากเช่นกันกับพืชอื่น ๆ โดยเฉพาะการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้พืชต้านทานต่อโรคโดยใช้ยีนไคติเนส เช่น งานวิจัยของ Nakano, Hoshino, และ Mii (1994) Scorza, Cordts, Ramming, และEmershad (1995) Kikkert, Wallance, Striem และ Hebert-soule (1996) Kikkert, Wallance, Striem Reisch, และ Ali (1997) Tabei และคณะ (1998) Yang, Ingelbrecht, Lonzada, Skaria และ Mirkov (2000)

ในปี 2000 Yamamoto และคณะ ได้นำยีนไคติเนสจากข้าว class I มาถ่ายเข้าสู่โซมาติกเอมบริโอขององุ่นพันธุ์ Neo Muscat โดยใช้ *Agrobacterium* ในการถ่ายยีนนี้ ผลปรากฏว่า มี 2 ตัวอย่างขององุ่นที่ต้านทานต่อโรคราแป้งที่มีเชื้อสาเหตุมาจาก *U. necator* โดยปรากฏโรคนี้น้อยมากที่บริเวณใบเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่มีการถ่ายยีนและเมื่อใช้กล้อง Scanning electron microscope ตรวจดูการเจริญของไมซีเลียม และการงอกของ conidial พบว่าสิ่งเหล่านี้ถูกยับยั้งไม่ให้เจริญหรืองอกได้ในต้นองุ่นที่มีการถ่ายยีน นอกจากนี้ต้นองุ่นยังสามารถต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนสได้บ้างเล็กน้อย ซึ่งมีเชื้อสาเหตุมาจาก *U. ampelina* นอกจากนี้งานวิจัยของ Harst, Bornhoff, Zyprain และ Topper ในปี 2000 รายงานว่าได้โซมาติกเอมบริโอที่ได้มาจากเกสรตัวผู้จากการถ่ายยีนขององุ่น *V. vinifera* พันธุ์ Dornfelder, Muller-Thurgau และ พันธุ์ Reisling หลังจากบ่มกับ *Agrobacterium tumefaciences* สายพันธุ์ LBA4404 นาน 2 วัน แล้วย้ายลงในอาหารเหลวสูตร NN69 ที่มีสารปฏิชีวนะชนิด kanamycin เพื่อใช้คัดเลือกองุ่นที่ได้รับการถ่ายยีนและสาร cefotaxime เพื่อการกำจัดแบคทีเรีย หลังจากนั้นทำการย้ายลงในอาหารแข็งในอาหารสูตรเดิมที่ไม่มี cefotaxime ได้เอมบริโอที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและได้ต้นองุ่นที่มีการถ่ายยีน ในปีเดียวกันนี้ Kikkert, Ali, Wallance, และ Riesch ได้ทำการถ่ายยีนไคติเนสจาก *T. harzianum* สายพันธุ์ P-1เข้าสู่องุ่นพันธุ์ Metlot และพันธุ์ Chardonnay ได้สำเร็จโดยวิธี biolistic transformation จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ embryogenic โดยการแสดงออกของยีนนั้นมีสูงและยังมีกิจกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อ *Botrytis cinerea*

และ *U. necator* ด้วย ต่อมาในปี 2002 งานวิจัยของ Mezzetti, Pandolfini, Navacci และ Landi ได้ต้นองุ่นที่ดัดแปลงพันธุกรรมแล้ว คือพันธุ์ Thomson seedless และพันธุ์ Silcora โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP ทำให้ได้ยอดจำนวนมาก หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือนได้เป็น meristematic bulk tissue แล้วทำการตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อทำการถ่ายยีนและบ่มกับ *Agrobacterium* ที่มียีน DefH9-iaaM แล้วย้ายลงปลูกในแปลง ได้ต้นองุ่นที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม

สำหรับพืชชนิดอื่น ๆ ก็มีการดัดแปลงพันธุกรรมเช่นกัน เช่น แตงกวา ถั่วพุ่ม ยาสูบ ถั่วเหลืองและมันเทศ โดยในปี 1998 Tabei และคณะได้นำไคติเนสจากข้าวถ่ายเข้าไปในแตงกวาโดยใช้ *Agrobacterium* ช่วยในการถ่ายยีน ผลปรากฏว่า มียอดองุ่นมากกว่า 200 ต้นที่สามารถโตได้บนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะชนิด kanamycin และได้นำมาทดสอบการต้านทานต่อเชื้อ *B. cinerea* พบว่า 15 ต้นใน 20 ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนนี้สามารถต้านทานการเจริญของ conidia ได้สูงกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมาก นอกจากนี้ในปี 2001 ยังมีงานวิจัยของ Rohini และ Rao ต้นถั่วพุ่มที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนสนั้นมีกิจกรรมที่สูงมากและเมื่อทดสอบในแปลงปลูกพบว่า ต้นถั่วพุ่มนี้สามารถต้านทานต่อเชื้อรา *Cercospora arachidicola* ได้ ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดในถั่วพุ่ม

ดังนั้นจุดประสงค์สำหรับงานวิจัยนี้คือ

1. เพื่อให้ได้ข้อมูลสายพันธุ์องุ่นที่ปลูกในประเทศที่มีคุณสมบัติต้านทานและอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์
2. เพื่อหาเทคนิคในการโคลนนิ่งยีนไคติเนสและหาคุณสมบัติของเอนไซม์
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนไคติเนสในส่วนต่างๆขององุ่น
4. เพื่อให้ได้แคลลัสองุ่นสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคราน้ำค้างโดยการถ่ายโอนยีนไคติเนส
5. ประเมินความสามารถของเอนไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้านในการทำลายสปอร์ของเชื้อรา *Plasmopara viticola*

บทที่2

วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ

2.1.1 พืช

องุ่น (*Vitis vinifera*) พันธุ์ ชีราส, ลูสเพอเล็ต, คริมสัน ซีดเล็ต, คาโรไลน่า แบลคโรส, รูบี้เรด และไรซ์ลิ่ง ถูกนำมาจากแปลงปลูกของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ถูกนำมาสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และสำหรับถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่องุ่น

กระถินบ้าน *(Leucaena leucocephala)* ถูกรวบรวมมาจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ยอดของกระถินบ้านถูกนำมาสกัดโปรตีนเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และสำหรับทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ต่อการทำลายสปอร์ของเชื้อราน้ำค้าง (*Plasmopara viticola*)

2.1.2 สปอร์ของเชื้อราน้ำค้าง (*Plasmopara viticola*)

เก็บรวบรวมจากแปลงปลูกของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมาโดยเก็บจากใบองุ่นที่มีการเกิดโรคราน้ำค้างมาเลี้ยงและขยายจำนวนของเชื้อราน้ำค้าง ภายใต้สภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น

2.1.3 เวคเตอร์ที่ใช้สำหรับการโคลนยีนและเป็นเซลล์เจ้าบ้าน

ยีนไคติเนสได้มาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจมส์ เกตุทัต-คาร์น สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งยีนนี้ถูกโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pUC19 ส่วนเวคเตอร์ pET-39b(+) ได้มาจากบริษัท Novagen (Madison, W1, USA) แบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ถูกนำมาใช้สำหรับเป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อการโคลนยีน และ *Agrobacterium tumefacients* สายพันธุ์ LBA4404 ถูกนำมาใช้สำหรับการถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่แคลลัสขององุ่น นอกจากนี้ยังมีเวคเตอร์ pBI121 ถูกนำมาใช้สำหรับเป็นเวคเตอร์เพื่อการแสดงออกในพืช

2.1.4 อุปกรณ์

ลำดับที่	ชื่อ	รุ่น
1	เครื่อง PCR	GeneAmp PCR system 2400 9700 of PERKIN ELMER
2	เครื่องหาลำดับเบส (DNA sequencer)	ABI Prism 310 Genetic Analyser
3	Gel electrophoresis	Gel mate 2000 (Toyobo) PAC3000 (Bio-rad)
4	UV-transmittance	White/Ultraviolet Transilluminator
5	Electroporator	Gene Pulser II (Bio-rad)
6	ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ	

7	เครื่องปั่นเหวี่ยง	Labofuge 400R SORVAL RC5C PLUS 5414c
8	Water bath	Maxi-shake Comport Heto master shake
9	ตู้เพาะเลี้ยง (Growth chamber)	Contherm
10	ตู้อบ (Hot air oven)	
11	ตู้เย็น (Refrigerator)	
12	ตู้แช่ที่ -20 และ -70 ^{0}C (Freezer)	
13	ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow hood)	
14	เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	
15	กล้องจุลทรรศน์	
16	อุปกรณ์พื้นฐานทางด้านจุลินทรีย์, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และอุปกรณ์ทางด้านอณูพันธุศาสตร์	

2.1.5 ไพรเมอร์สำหรับทำ PCR

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ สั่งซื้อมาจากบริษัท Bio Basic ประเทศแคนาดา ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการค้นหายีนที่ถูกถ่ายเข้าสู่แคลลัสขององุ่น คือ ไคติเนส และ NPTII แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ไพเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อไพร์เมอร์	**ลำดับเบส**	**Tm (^{o}ซ)**	**GC (%)**
Chitinase forward	5' ACGTAAGGGATGACGCACAA3'	61.3	50
Chitinase reverse	5' CAAATGTTTGAACGATCGGG3'	61.1	45
NPTII forward	5' CCATAAATTCCCCTCGGTATCC3'	62.6	50
NPTII reverse	5' CCGCTCAGAAGAACTCGTCAA3'	62.8	52.4

2.1.6 สารเคมีและอื่น ๆ

สารเคมีที่ใช้มีทั้งเกรด analytical และ เกรด Molecular นอกจากนี้ยังมี restiriction endonuclease (*Bam*HI, *Eco*RI, *Nde*I และ *Sac*I), T_4 DNA ligase, QIA Prep Spin Miniprep kit, Taq polymerase และ สารปฏิชีวนะชนิด คานามัยซิน คาร์เบนนิซิลิน ซีโฟทาซีมและแอมพิซิลิน ซึ่งทั้งหมดที่กล่าวมานี้สั่งซื้อมาจากบริษัท Fluka Chemika, Across, Sigma, Bio-Basic, Promega และ บริษัท Phyto Technology Laboratories

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ยอดขององุ่นพันธุ์ ชีราส ถูกนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 10 วินาที แล้วฟอกฆ่าเชื้ออีกรอบด้วย 1% โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ พร้อมกับ Tween 20 จำนวน 2-3 หยด นาน 10 นาที เขย่าเบาๆ หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำที่ปลอดเชื้อจำนวน 3 รอบ นาน 10 นาที 5 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ เมื่อยอดขององุ่นถูกล้างแล้ว ทำการตัดให้เหลือแต่ส่วนปลายยอดแล้ววางลงในอาหารแข็งที่มีฮอร์โมนพืชเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากและเป็นเนื้อเยื่อแบบ Meristematic Bulk (MB) โดยอาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดขององุ่นคือ IM ประกอบด้วย KNO_3 (1,050 มิลลิกรัม/ลิตร), NH_4NO_3 (400 มิลลิกรัม/ลิตร), KH_2PO_4 (200 มิลลิกรัม/ลิตร), $MgSO_4 7H_2O$ (400 มิลลิกรัม/ลิตร), $CaNO_3$ (750 มิลลิกรัม/ลิตร), NaH_2PO_4 (200 มิลลิกรัม/ลิตร), พร้อมกับสารอาหารรอง (microelement) และวิตามินใช้สูตรของอาหารชนิด MS น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร และ ผงวุ้น 7 กรัม/ลิตร ปรับ pH ที่ 5.8 ซึ่งปลายยอดขององุ่นหลังจากตัดจะนำมาวางบนอาหารคือ IM ที่มีการใส่ฮอร์โมนพืช BAP ที่ความเข้มข้น 4.4 µM พร้อมกับฮอร์โมนพืช NAA ที่ความเข้มข้น 0.05 µM นาน 30 วัน (Mezzetti et al., 2002) หลังจากนั้น ทำการย้ายปลายยอดเหล่านี้ลงในอาหาร IM ที่มีการเติมฮอร์โมนพืช BAP ที่ความเข้มข้น 8.8 µM พร้อมกับฮอร์โมนพืช NAA ที่ความเข้มข้น 0.05 µM นาน 30 วันเช่นกัน แล้วทำการย้ายส่วนของปลายยอดอีกครั้งหนึ่งเพื่อให้เกิดเป็น MB โดยจะนำไปวางในอาหารชนิดเดิมแต่เพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP อีก เป็น 13.2 µM ส่วนฮอร์โมน NAA ยังคงใส่ในระดับความเข้มข้นเช่นเดิม และวางไว้บนอาหารนี้นาน 30 วัน เมื่อครบ 90 วันแล้วนับจากเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็จะได้ยอดจำนวนมาก แล้วทำการตัดยอดแต่ละยอดย้ายลงไปบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นและราก โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมนพืช NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 µM และ ไคเนติน ที่ความเข้มข้น 0.5 µM เช่นกัน โดยเติมน้ำตาลซูโครสลงไปจำนวน 30 กรัม/ลิตร และผงวุ้น 15 กรัม/ลิตร ที่ pH 5.8 หลังจากนั้นทำการย้ายต้นองุ่นลงในกระถางปลูกเพื่อใช้สำหรับการขยายพันธุ์ต่อไป

2.2.2 ประเมินความสามารถของเอนไซม์ไคติเนส (Crude extract) จากกระถินบ้านต่อการทำลายสปอร์ของเชื้อรา *Plasmopara viticola*

2.2.2.1 การสกัดเอนไซม์ไคติเนสหรือสารสกัด (Crude extract) จากยอดของกระถินบ้าน

ยอดของกระถินบ้าน 5 กรัมถูกนำมาบดละเอียดด้วยครกพร้อมกับไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปใส่ในหลอดขนาด 30 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ NaoAc แช่เย็น ที่ pH 5.0 เสร็จแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนใสด้านบน (Crude extract) มาเก็บไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ต่อการทำลายสปอร์ของเชื้อรา และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

2.2.2.2 การสกัดเอนไซม์ไคติเนสหรือสารสกัด (Crude extract) จากยอดของอุ่น

ยอด ลำต้นระหว่างข้อ และใบของอุ่น 7 พันธุ์ ได้แก่ ชีราส ลูสเพอเล็ต คริมสันซีดเล็ต คาโลไลน่าแบลคโรส รูบี้เรด ไรซ์ลิ่ง และ พันธุ์ 1613 จำนวน 1 กรัมถูกนำมาบดละเอียดด้วยครกพร้อมกับไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปใส่ในหลอดขนาด 30 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ NaoAc แช่เย็น ที่ pH 5.0 เสร็จแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนใสด้านบน (Crude extract) มาเก็บไว้เพื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ และวัดปริมาณของโปรตีนด้วยวิธี Bradford

2.2.2.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

วิธีวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ประยุกต์มาจากงานวิจัยของ Krishnaveni, Liang, Muthukrishman และ Manichkarm (1999) โดยใช้การวิเคราะห์แบบ Colorimetric assay ซึ่งมี Carboxymethyl-Chitin- Remazol Brilliant Violet (CM-Chitin-RBV) เป็นซับสเตรท (chitin azure) สำหรับการเตรียมสารซับสเตรท ทำได้โดย ชั่งสาร chitin azure 1 มิลลิกรัมแล้วละลายใน 1 มิลลิลิตรของสารละลาย McIlvane's Buffer ที่ pH 5.5 ซึ่ง McIlvane's Buffer ประกอบไปด้วย 82 มิลลิลิตรของสาร Na_2HPO_4 ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และ 18 มิลลิลิตรของกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มจากนำตัวอย่างมา 400 ไมโครลิตรแล้วเติมซับสเตรทลงไป 200 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ NaoAc pH 5.0 ที่ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ลงไปจำนวน 200 ไมโครลิตรแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย 2N HCl จำนวน 200 ไมโครลิตร วางในน้ำแข็งนาน 10 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้นี้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ส่วนใสที่อยู่ด้านบนถูกนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2.2.2.4 การวัดปริมาณโปรตีน

ปริมาณของโปรตีนถูกวัดโดยวิธี Bradford โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตรแล้วเติมสารละลาย Bradford ลงไปจำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที หลังจากนั้นก็นำไปวัดปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

2.2.2.5 ประเมินความสามารถของสารสกัด (Crude extract) จากกระถินบ้านต่อการทำลายสปอร์ ของเชื้อราน้ำค้าง (*Plasmopara viticola*)

สปอร์ของราน้ำค้างถูกเก็บมาจากใบของอุ่นที่เป็นโรคราน้ำค้างแล้วนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยเริ่มจากการฉีดพ่นด้วยน้ำเพื่อให้เชื้อราที่อยู่บนใบของอุ่นหลุดออกมาอยู่ในน้ำ แล้วนำน้ำที่ได้มาฉีดพ่นใส่ใบอุ่นที่อยู่ในกล่องที่มีความชื้น (แสดงดังภาคผนวก) พร้อมกับนำไปเก็บในตู้บ่มเพาะ หรือ

growth chamber ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ ความชื้น 98 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน นาน 7 วัน แล้วนำสปอร์เชื้อราที่ได้มาทำเป็นสารละลายในน้ำ จำนวน 300 ไมโครลิตร (4.15x104 สปอร์/มิลลิลิตร) จำนวน 4 หลอด แล้วเติมสารสกัดจากกระถินบ้านลงไปที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.011, 0.021, 0.042 Unit ตามลำดับ พร้อมกับใช้สารละลายบัพเฟอร์ NaOAc เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน โดยในแต่ละวันนำตัวอย่างจากแต่ละหลอดมานับจำนวนสปอร์ที่ยังคงสภาพเดิม (Normal sporangia) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 3 ซ้ำ ด้วย hematocytometer แล้วนับจำนวนของ Normal sporangia มาคำนวณหาจำนวนสปอร์ที่ถูกทำลายไปในแต่วันเป็นความสามารถของสารสกัดจากกระถินบ้านต่อการทำลายสปอร์ของเชื้อราน้ำค้าง ซึ่งจำนวนของ Normal sporangia/ ml = Number of normal sporangia x 2,000 (Tuite, 1969)

2.2.3 การถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่เวคเตอร์ pET39b(+), pBI121 และ แคลลัสขององุ่น

2.2.3.1 การถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่เวคเตอร์ pET39b(+)

ก. การเตรียมพลาสมิด

แบคทีเรียชนิด *E. coli* ที่มีเวคเตอร์ pUC19 และ pET39b(+) ถูกนำมาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะชนิดแอมพิซิลิน และคานามัยซิน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่านานข้ามคืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิดแบบขนาดเล็ก (1-2 มิลลิลิตร) ด้วยวิธี Alkaline lysis กับ SDS (Sambrook และ Russel, 2001) แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนบนทิ้ง ละลายเซลล์ด้วยสารละลาย alkaline lysis I ที่เย็น (50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl, pH 8.0, and 10 mM EDTA, pH 8.0) จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วตามด้วย alkaline lysis II (0.2 N NaOH, and 1% SDS) จำนวน 250 ไมโครลิตร หลังจากนั้นคว่ำ-หงายหลอดเบา ๆ 4-6 ครั้ง แล้วเติม alkaline lysis III (5 mM potassium acetate and glacial acetic acid) ที่แช่เย็นไว้ จำนวน 150 ไมโครลิตร แล้วคว่ำ-หงายหลอดเบา ๆ เช่นเดิม วางตัวอย่างทั้งหมดในน้ำแข็งนาน 3-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมฟีนอล: คลอโรฟอร์ม (25:25) ลงไปเท่ากับจำนวนของส่วนใสที่อยู่ในหลอดพร้อมกับปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที นำส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่หลอดใหม่เพื่อทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมแอลกอฮอล์ลงไปจำนวน 2 เท่าของส่วนใสที่มีอยู่พร้อมกับปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ตะกอนที่ได้ทำการล้างด้วย 70% แอลกอฮอล์ จำนวน 1 มิลลิลิตร พร้อมกับปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พลาสมิดดีเอ็นเอนำมาละลายด้วย TE (pH 8.0) จำนวน 50 ไมโครลิตร แล้วทำการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis พร้อมกับเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ข. การตัดชิ้นดีเอ็นเอไคติเนสและนำชิ้นดีเอ็นเอออกมาจากวุ้น (gel purified fragement)

นำดีเอ็นเอมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว พร้อมกับเติมเอนไซม์ *Eco*RI และบัพเฟอร์ ดังนี้ พลาสมิด pUC19 จำนวน 40 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Eco*RI จำนวน 3

ไมโครลิตร (10 ยูนิต/ไมโครลิตร) NE บัฟเฟอร์จำนวน 6 ไมโครลิตร 100XBSA จำนวน 0.6 ไมโครลิตร และน้ำ จำนวน 10.4 ไมโครลิตร รวมทั้งสิ้น 60 ไมโครลิตร แล้วนำปฏิกิริยานี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทำการตรวจผลการทดลองโดย gel electrophoresis แล้วนำวุ้นที่มีชิ้นดีเอ็นเอไคติเนสมาแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากวุ้น (gel purified fragment) โดยใช้ชุด kit ชนิด QIAGEN quick kit หลังจากนั้นทำการตัดเจลพร้อมชิ้นไคติเนสมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยทำการชั่งน้ำหนักหลอดก่อนที่จะใส่วุ้น หลังจากนั้นก็นำหลอดพร้อมเจลไปชั่งน้ำหนัก หาน้ำหนักที่แท้จริงของเจล โดยลบออกจากน้ำหนักของหลอด แล้วเติม QG บัฟเฟอร์ลงไปจำนวน 3 เท่าของน้ำหนักเจล แล้วทำให้เจลละลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารไอโซโพรพานอลลงไปจำนวน 1 เท่าของตัวอย่างพร้อมเขย่า ย้ายตัวอย่างทั้งหมดนี้ลงไปในหลอดที่มาจากชุด kit ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อให้ดีเอ็นเอถูกดักไว้ นำหลอดนี้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที พร้อมกับเทส่วนที่ผ่านตัวจับหรือคอลัมน์ดีเอ็นเอทิ้ง (อยู่ด้านล่าง) แล้วเติมบัฟเฟอร์ PE จำนวน 750 ไมโครลิตร และทำการปั่นเหวี่ยง 2 ครั้ง ด้วยความเร็วรอบ13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที หลังจากนั้นนำส่วนที่เป็น QIA quick คอลัมน์ย้ายไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมบัฟเฟอร์ EB ลงไป จำนวน 50 ไมโครลิตร เพื่อนำดีเอ็นเอออกมาจากคอลัมน์ โดยเติมบัฟเฟอร์ตรงกลางคอลัมน์ วางทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจผลด้วย gel electrophoresis ส่วนดีเอ็นเอที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ค. การเตรียมดีเอ็นเอเวคเตอร์

พลาสมิด pET-39b(+) ถูกนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธีของ Sambrook และ Russel, 2001 พร้อมกับตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดอธิบายไว้ในส่วน ก. และ ข. ของหัวข้อ 2.2.3.1 หลังจากนั้นตรวจผลการตัดชิ้นพลาสมิดโดย agarose gel electrophoresis และเก็บดีเอ็นเอเวคเตอร์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ง. การเตรียม competent cell

E. coli สายพันธุ์ DH5α ถูกนำมาใช้สำหรับเตรียม competent cell โดยดัดแปลงวิธี $RbCl_2$ ของ Hanahan, 1968 อ้างถึงใน Sambrook and Russel, 2001 เริ่มจากการนำโคโลนี 1 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ในปริมาณ 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าแรง ๆ ด้วยเครื่องเขย่านานข้ามคืน หลังจากนั้นนำ 1 มิลลิลิตรของเซลล์มาเลี้ยงต่อในอาหารชนิดเดิมปริมาณ 50 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าจนกว่าจะได้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ (OD_{600}) ประมาณ 0.5 เมื่อได้เซลล์ในระยะนี้แล้วทำการถ่ายเชื้อใส่ในหลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 50 มิลลิลิตร แล้ววางในน้ำแข็งนาน 15 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเซลล์ หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาละลายด้วยสารละลาย TFBI ที่เย็น ในปริมาณ 5 มิลลิลิตร และวางในน้ำแข็งนาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเหมือนเดิม นำเซลล์ที่ได้นำมาละลายด้วยสารละลาย TFBII ที่เย็น จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วทำการแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรในปริมาณที่เท่า ๆ กัน คือ 100 ไมโครลิตร จำนวน 5 หลอด และเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส

จ. การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอไคติเนสกับเวคเตอร์และการโคลนยีน

นำเวคเตอร์ pET-39b(+) ไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้ววางไว้ในน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที เสร็จแล้วนำไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 1 ไมโครลิตร พร้อมกับ ชิ้นดีเอ็นเอไคติเนส จำนวน 11 ไมโครลิตร T_4 DNA ligase จำนวน 1 ไมโครลิตร 10Xligation buffer จำนวน 1.5 ไมโครลิตร และ น้ำ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร เสร็จแล้วเขย่าเบา ๆ เพื่อให้ตัวอย่างผสมกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนได้เป็น ligation mixture หลังจากนั้นนำ competent cell ออกมาจาก -70 องศาเซลเซียส ปล่อยให้ละลายในน้ำแข็ง นาน 5 นาที แล้วเติม ligation mixture ลงไป 15 ไมโครลิตร พร้อมกับเขย่าเบา ๆ แล้ววางในน้ำแข็งทันทีนาน 30 นาที เสร็จแล้วนำตัวอย่างไปวางใน heat box ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที และนำไปวางในน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที พร้อมกับเติมอาหารเหลว LB จำนวน 800 ไมโครลิตร นำตัวอย่างไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเบา ๆ เพื่อให้ตกตะกอน แล้วนำส่วนที่เป็นตะกอน 200 ไมโครลิตรไปเลี้ยงในอาหารแข็ง ที่มีสารปฏิชีวนะชนิด kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนเพื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีเวคเตอร์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอไคติเนสอยู่ พร้อมกับนำดีเอ็นเอมาตรวจผลด้วย agarose gel electrophoresis หลังจากทำการตัดเวคเตอร์ดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Nde*I

2.2.3.2 การโคลนยีนไคติเนสเข้าสู่เวคเตอร์ pBI121

ยีนไคติเนสอยู่ในเวคเตอร์ pET-39b(+) ดังนั้นจึงต้องเตรียมพลาสมิดอีกครั้ง โดยการสกัดพลาสมิด ของ pET-39b(+) กับดีเอ็นเอของเวคเตอร์ pBI121 โดยวิธี Alkanline lysis กับ SDS (Sambrook และ Russel, 2001) พร้อมกับตัดชิ้นยีนไคติเนสด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Sac* I จากเวคเตอร์ pET-39b(+) และตัดดีเอ็นเอของเวคเตอร์ pBI121 ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Sac* I เช่นกัน โดยดีเอ็นเอของเวคเตอร์ pBI121 นั้นนำมา 40 ไมโครลิตร และ เอนไซม์ *Eco*RI และ *Sac* I จำนวน 2 ไมโครลิตร พร้อมกับ 10X multiple core buffer จำนวน 6 ไมโครลิตร, 100X BSA จำนวน 0.6 ไมโครลิตร และ น้ำ 9.4 ไมโครลิตร ตัวอย่างที่ได้นี้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงและนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบผลการตัดด้วย agarose gel eletrophoresis หลังจากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอไคติเนสทั้งหมดที่ได้จากการตัดมาผ่านวุ้นด้วยวิธีการเช่นเดิม แล้วตัดชิ้นดีเอ็นเอที่มีไคติเนสออกมาแล้วนำวุ้นที่มีชิ้นไคติเนสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAGEN quick kit เมื่อได้ชิ้นไคติเนสที่บริสุทธิ์แล้ว นำมารวมกันกับเวคเตอร์ pBI121 ที่ตัดแล้ว ซึ่งประกอบด้วยเวคเตอร์ pBI121 จำนวน 2 ไมโครลิตร และไคติเนส นวน 5.4 ไมโครลิตร T_4 DNA ligase จำนวน 1 ไมโครลิตร 10X ligation buffer จำนวน 1 ไมโครลิตร และ น้ำ จำนวน 0.6 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนทำให้ได้ ligation mixture หลังจากนั้นนำ ligation mixture ที่ได้นี้ไปทำการถ่ายยีนกับ competent cell ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้และ วิธีการในการถ่ายยีนเช่นเดียวกันกับที่อธิบายไว้ในหัวข้อก่อนหน้านี้ นำปฏิกิริยาที่ได้นี้ไปคัดเลือกในอาหาร LB ที่มีสารปฏิชีวนะชนิด kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วนำแต่ละโคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือกไปทำการสกัดพลาสมิด และตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Sac* I พร้อมกับนำไปเช็คผลด้วย gel electrophoresis

2.2.3.3 การหาลำดับเบสของไคติเนสในเวคเตอร์ pBI121 โดยใช้ไพร์เมอร์ chitinase forward

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีเวคเตอร์ pBI121:chitinase ในอาหารเหลวชนิด LB ที่มีสารปฏิชีวนะชนิดคานามัยซินที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/ลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดชื่อ QIA Prep Spin Miniprep Kit (Germany) หลังจากนั้นนำพลาสมิดที่ได้มาจำนวน 7.72 ไมโครลิตร (ประมาณ 193 นาโนกรัม) รวมกันกับ terminator ready reaction mix จำนวน 2 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ของ 5X big dye buffer จำนวน 1 ไมโครลิตรและไพร์เมอร์ของ chitinase forward จำนวน 1.28 ไมโครลิตร (ประมาณ 3.2 พิโคโมล) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR รุ่น GeneAmp PCR system 9700 จำนวน 25 รอบ ที่ 96 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที และที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เมื่อปฏิกิริยาของ PCR สิ้นสุดลง นำมาตกตะกอนด้วย sodium acetate/etanol โดยเติม sodium acetate ที่ความเข้มข้น 3 โมลาร์ จำนวน 3 ไมโครลิตร ที่ pH 5.0 แอลกอฮอล์ 95% จำนวน 62.5 ไมโครลิตร และน้ำจำนวน 14.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ส่วนใสที่อยู่ด้านบนถูกดูดออกทิ้งด้วย pipette tip แล้วล้างตะกอนที่ติดอยู่ก้นหลอดด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70 % จำนวน 250 ไมโครลิตรพร้อมกับปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ส่วนใสที่อยู่ด้านบนถูกดูดออกทิ้งด้วย pipette tip อีกครั้ง แล้วทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝาในเครื่อง heat block ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที พร้อมกับเติม TSR จำนวน 15 ไมโครลิตรเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอไปแยกสายด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที ก่อนที่จะนำตัวอย่างที่ได้ย้ายไปใส่ในหลอดสำหรับเครื่องหาลำดับเบส แล้วปิดฝาหลอด นำตัวอย่างไปวางในเครื่องหาลำดับเบสรุ่น ABI PRISM 310 Genetic Analyzer แล้วตั้งค่าการทำงานของเครื่องเพื่อให้เครื่องอ่านค่าลำดับเบส

2.2.3.4 การถ่ายยีน pBI121: chitinase เข้าสู่ *Agrobacterium tumefacienes* สายพันธุ์ LBA4404

ก. การเตรียม electro-competent cell

โคโลนีของ *Agrobacterium* ถูกนำไปใส่ในอาหารเหลว LB ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ที่มีสารปฏิชีวนะชนิดคานามัยซิน และ ไรแฟมพิซินที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ พร้อมกับนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า นานข้ามคืน หลังจากนั้นนำเซลล์ที่เลี้ยงได้นี้จำนวน 1.5 มิลลิลิตรย้ายไปในอาหาร LB ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่มีสารปฏิชีวนะดังที่

กล่าวมาแล้ว และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า นานจนกว่าจะได้ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 0.5 (OD600) หลังจากนั้นย้ายเซลล์ที่ได้นี้ไปในหลอดที่แช่เย็นขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมกับปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและเย็นในปริมาณ 50 มิลลิลิตร พร้อมกับปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง หลังจากนั้นทำการละลายเซลล์ด้วยน้ำที่เย็นและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีกครั้งที่ปริมาณ 100 มิลลิลิตร พร้อมกับปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติม 10 % กลีเซอรอลที่เย็น จำนวน 100 มิลลิลิตร พร้อมกับปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 4,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้ว เติม10 % กลีเซอรอลที่เย็น จำนวน 500ไมโครลิตร พร้อมกับแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรในปริมาณ 80 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น electro-competent cell และเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

ข. การถ่ายเวคเตอร์ pBI121 ที่มียีนไคติเนสเข้าสู่ *Agrobacterium* โดยเครื่อง electroporator

นำ electro-competent cell ที่เตรียมไว้จำนวน 80 ไมโครลิตรออกมาจาก -70 องศาเซลเซียส วางในน้ำแข็งเพื่อให้ละลาย แล้วเติมเวคเตอร์ที่มียีนไคติเนส (pBI121:chitinase) จำนวน 1 ไมโครลิตรลงไป พร้อมกับผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นย้ายตัวอย่างที่ได้นี้ลงไปใน electroporation cuvette ที่เย็น (ขนาดความกว้างของช่องว่างคือ 1 มิลลิเมตร) ก่อนที่จะนำตัวอย่างไปใส่ในเครื่อง ต้องทำการเช็ด cuvette ให้แห้งเสียก่อน แล้วจึงนำ cuvette ไปใส่ในเครื่อง electroporator โดยทำการเปิดเครื่องพร้อมกับเริ่มทำการถ่ายเวคเตอร์เข้าสู่ Agrobacterium ที่ 2500 โวลต์ 25 ไมโครฟารัด 50 โอห์ม และ ใช้แรงกระตุ้นที่ 1.3 มิลลิลิตร/วินาที หลังจากนั้นเติมอาหารเหลวชนิด LB จำนวน 900 ไมโครลิตร ลงไปใน cuvette พร้อมกับผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว แล้วย้ายตัวอย่างที่ได้นี้ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปเลี้ยงต่อที่เครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นแบ่งตัวอย่างที่ได้ จำนวนละ 200 ไมโครลิตร และนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะชนิด กานามัยซิน ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร และไรแฟมพิซิน ที่ความเข้มข้น20 มิลลิกรัม/ลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน เพื่อนำโคโลนีที่เกิดขึ้น นำไปหาพลาสมิดที่มียีนไคติเนส และตรวจผลโดยนำดีเอ็นเอไปตัดโดยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I

2.2.3.5 การถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่แคลลัสขององุ่น

นำ *Agrobacterium* ที่มีเวคเตอร์ที่มียีนไคติเนส (pBI121:chitinase) มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะชนิด กานามัยซิน และไรแฟมพิซิน ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบ/นาที นานข้ามคืน หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้นี้ย้ายไปใส่ในอาหารชนิดเดิม ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่มีสารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นเหมือนเดิม เลี้ยงต่อจนกว่าจะได้ความขุ่นของเซลล์ประมาณ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโน

เมตร นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้ตะกอนของเซลล์ นำไปละลายกับอาหารเหลวชนิด NN ปริมาณ 200 มิลลิลิตร พร้อมกับ acetosyringone ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ใบของอ่อนถูกเตรียมเพื่อการถ่ายยีน โดยนำใบอ่อนพันธุ์ชีราสมาจากแปลงปลูก แล้วทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนำไปฟอกกับแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70% นาน 10 วินาที และสารโซเดียมไฮเปอร์คลอไรซ์ ที่ความเข้มข้น 1% พร้อมกับหยด ทวีน 20 ลงไป 1-2 หยด เขย่าเบา ๆ นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปล้างในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 น้ำ นาน 10, 5 และ 5 นาที ตามลำดับ ในตู้ปลอดเชื้อ นำใบมาตัดให้ได้ขนาดประมาณ 0.5 ตร.ซม. และนำไปแช่ในขวดที่มี *Agrobacterium* ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำชิ้นใบอ่อนไปวางบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อซับให้แห้ง แล้วนำชิ้นใบอ่อนไปวางไว้บนอาหารชนิด NN ที่เติมฮอร์โมนพืชชนิด 2,4-D ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ และ ฮอร์โมน 4-CPPU ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ พร้อมกับใส่วุ้นที่ความเข้มข้น 0.8% และ ซูโครส 30 กรัม/ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ paH 5.8 นำทั้งหมดนี้ไปวางไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำใบอ่อนที่มี *Agrobacterium* นี้ ไปล้างในน้ำที่มีสารปฏิชีวนะชนิด คาร์เบนนิซิลิน และ ซีโฟทาซีม ที่ความเข้นข้น 250 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 5 นาที เพื่อกำจัด *Agrobacterium* ที่อยู่รอบ ๆ ชิ้นอ่อน แล้วซับชิ้นอ่อนให้แห้งก่อนนำไปวางในอาหารชนิดเดิมแต่มีสารปฏิชีวนะชนิด คาร์เบนนิซิลิน และ ซีโฟทาซีม ที่ความเข้นข้น 250 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 7 วัน เมื่อครบ 7 วัน เพื่อกำจัด *Agrobacterium* อีกครั้ง หลังจากนั้นย้ายชิ้นใบอ่อนลงในอาหารชนิดเดิมแต่เพิ่มสารปฏิชีวนะชนิดกานามัยซินที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อใช้ในการคัดเลือกแคลลัสที่มียีนไคติเนส นาน 30 วัน ซึ่งทั้งหมดนี้นำไปไว้ในห้องที่ปลอดเชื้อ และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน และทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4-5 สัปดาห์ เพื่อทำการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนส

2.2.4 การค้นหายีนในแคลลัสของอ่อนที่ดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic callus)

นำแคลลัสมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี DNA-minipreparation (Lin, Ding, Li, and Kuang, 2001) แคลลัส น้ำหนัก 25-100 มิลลิกรัมถูกนำมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาพร้อมกับวางไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 10 วินาที บดด้วยปลาย tip ขนาด 200 ไมโครลิตรให้เป็นผงอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปละลายกับสารสกัดดีเอ็นเอจำนวน 600 ไมโครลิตร (100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH8.0), 500 mM NaCl, 2% SDS (w/v), 2% β-mercaptoethanol (v/v), and 1% PVP (w/v)) ผสมให้เข้ากัน บ่มในเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่อยู่ด้านบนย้ายใส่หลอดใหม่ แล้วทำการเติม RNase A จำนวน 10 ไมโครลิตรลงไปในหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติม ฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (25:24:1) ลงไปเท่ากับตัวอย่างที่มีอยู่ พร้อมกับนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้ง แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมไอโซ

โพรลานอลที่เย็นในปริมาณ 0.6 เท่าของตัวอย่างที่มีอยู่ แล้วนำไปวางใน -20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมกับนำส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง เหลือตะกอนของดีเอ็นเอติดอยู่ที่ก้นหลอด แล้วล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น70% ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE (pH 8.0) จำนวน 30 ไมโครลิตร

สำหรับคู่ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการทดลองนี้ เพื่อใช้สำหรับการตรวจหายีนเป้าหมายนั่นคือ ยีนไคติเนส และ ยีน NPTII แสดงดังตารางที่ 2.1 ซึ่งใช้เทคนิคทาง PCR ในการตรวจหายีนเหล่านี้และปริมาณที่ใช้สำหรับทำ PCR ทั้งหมดคือ 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1.5 มิลลิโมลาร์ของ $MgCl_2$ 0.2 มิลลิโมลาร์ของ dNTP และไพรเมอร์จำนวน 25 พิโคโมล รวมทั้งจีโนมิกดีเอ็นเอจำนวน 5 ไมโครลิตร (ประมาณ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ 0.5 ยูนิตของ Taq polymerase (Phytotech Inc, Canada) โดยปฏิกิริยาที่ใช้ในงานวิจัยนี้เพื่อแยกสายดีเอ็นเอคือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอ และเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาคือ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ แล้วนำตัวอย่างทั้งหมดมาตรวจดูยีนทั้งสองด้วย gel electrophoresis

บทที่ 3
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

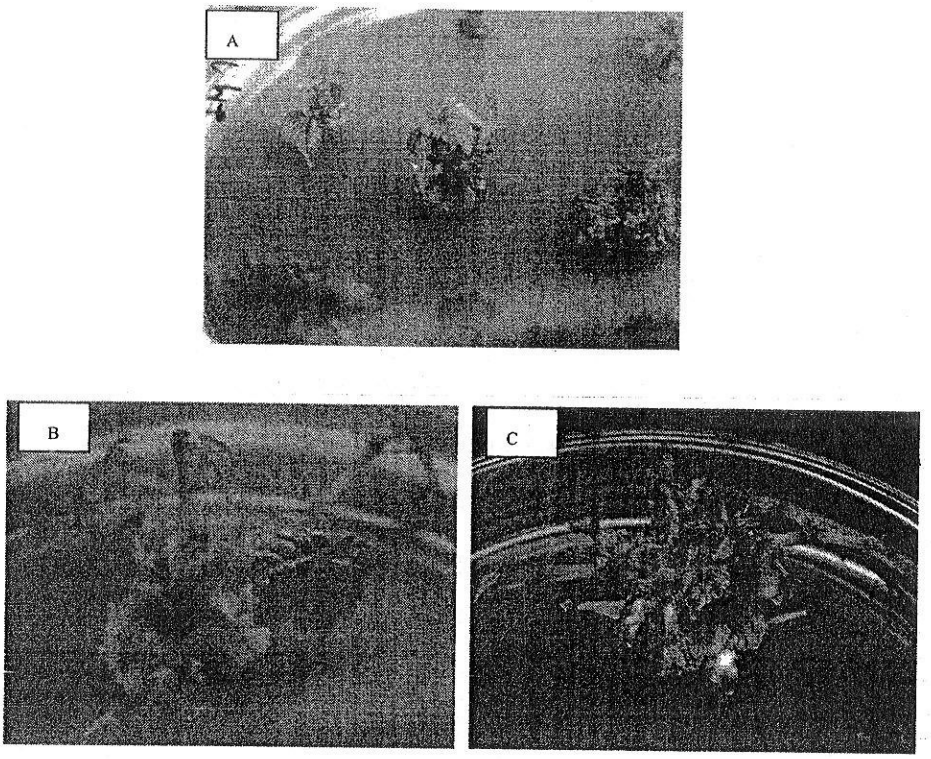
3.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่น

องุ่นพันธุ์ชีราส (Shiraz) ถูกนำมาสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้เป็นเนื้อเยื่อแบบ meristermatic bulk (MB) เพื่อการขยายพันธุ์องุ่น ซึ่งการที่จะทำให้เป็น MB นั้นต้องทำทั้งหมด 3 ระยะ โดยเริ่มจากระยะแรก นำส่วนของปลายยอดองุ่นสายพันธุ์ ชีราส มาเลี้ยงในอาหารที่เรียกว่า IM1 ที่มีฮอร์โมนพืชชนิด BAP และ NAA ที่ความเข้มข้น 4.4 ไมโครโมลาร์ และ 0.5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นาน 30 วัน จะปรากฏเห็นยอดมีขนาดยาวเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 3.1 A หลังจากนั้นย้ายส่วนยอดนี้ลงไปในอาหารที่เรียกว่า IM2 (ระยะที่ 2) ซึ่งมีฮอร์โมนพืชชนิด BAP ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 8.8 ไมโครโมลาร์ ส่วน NAA ใส่ลงในอาหารระดับความเข้มข้นเท่าเดิม นาน 30 วัน ผลปรากฏว่ายอดขององุ่นเริ่มแตกออกมีมากกว่า 1 ยอด ดังแสดงในรูปที่ 3.1B ระยะที่สาม เพิ่มระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP ขึ้นอีกในอาหารเป็น 13.2 ไมโครโมลาร์ และระดับความเข้มข้นของ NAA ยังคงเท่าเดิม ย้ายส่วนยอดที่อยู่ในระยะที่สองลงในอาหารระยะที่สามนาน 30 วันเช่นเดิม ผลที่ได้คือ จะเกิดยอดขององุ่นจำนวนมาก เป็นกลุ่มที่เรียกว่าเนื้อเยื่อ meristematic bulk (MB) ดังรูปที่ 3.1C หลังจากที่ได้ยอดจำนวนมากแล้ว ทำการตัดส่วนยอดแต่ละยอดย้ายลงไปในอาหารชนิด MS ที่มีฮอร์โมนชนิด NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ Kinetin ที่ความเข้มข้น 0.9 ไมโครโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดและราก ดังรูปที่ 3.2A แสดงต้นองุ่นที่มีอายุ 3-4 สัปดาห์ หลังจากต้นองุ่นถูกย้ายลงปลูกในกระถาง ดังรูปที่ 3.2 B

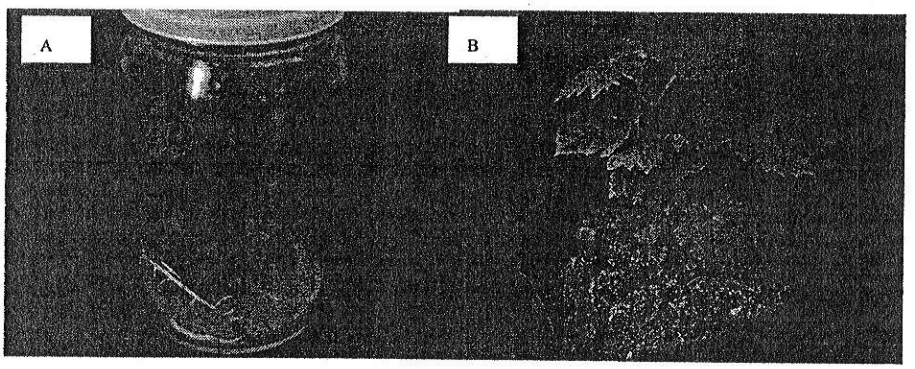
จากการทดลองนี้ ใช้ระยะเวลาทั้งหมด 3 เดือนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เป็นยอดจำนวนมาก แต่ในการทดลองของ Salunkhe และคณะ ในปี 1999 ใช้เกสรตัวผู้ในการชักนำให้เกิดยอด พบว่าใช้ระยะเวลาทั้งหมดประมาณ 5 เดือน ซึ่งก่อนที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดยอดนั้นต้องผ่านขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสก่อน ทำให้การทดลองใช้ระยะเวลาที่นานถึง 5 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ ซึ่งใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่า คือ ประมาณ 3 เดือน ในการเหนี่ยวนำให้เป็นยอดจำนวนมาก ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการทดลองนี้ไม่ต้องเหนี่ยวนำให้เป็นแคลลัสก่อนแต่เหนี่ยวนำจากยอดให้เป็นต้นองุ่น อย่างไรก็ตามในปี 2004 Singh และคณะ รายงานว่าใช้กิ่งองุ่นแล้วตัดให้เหลือประมาณ 2 ตาต่อ 1 ท่อน นำไปเลี้ยงในอาหารเพื่อชักนำให้เป็นต้น ผลปรากฏว่าใช้ระยะเวลา 12 สัปดาห์ ได้ยอดองุ่นจำนวนมาก ซึ่งเพียงพอสำหรับความต้องการกิ่งพันธุ์ของผู้ปลูกองุ่นที่ต้องการมาก

อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองนี้สามารถนำยอดองุ่นที่ได้ไปใช้สำหรับการขยายพันธุ์องุ่น หรือสำหรับการตัดแต่งทางพันธุกรรมก็ได้ ซึ่งสำหรับการขยายพันธุ์องุ่นนั้น ใช้ระยะเวลาแค่ 90 วัน ส่วนการตัดแต่งทางพันธุกรรม ทำได้โดยการตัดชิ้น MB ให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร และ

หนาประมาณ 2 มิลลิเมตร เพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ตามการทดลองของ Mezztti และคณะ ในปี 2002



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแบบ Meristematic bulk (MB) ที่เจริญจากยอดขององุ่น; (A) ยอดที่เจริญบนอาหารหลังจากเลี้ยงนาน 30 วัน ; (B)ยอดจำนวนมากเกิดขึ้นหลังจาก 60 วัน ; (C) ลักษณะเนื้อเยื่อแบบ Meristematic bulk เกิดขึ้นหลังจาก 90 วัน

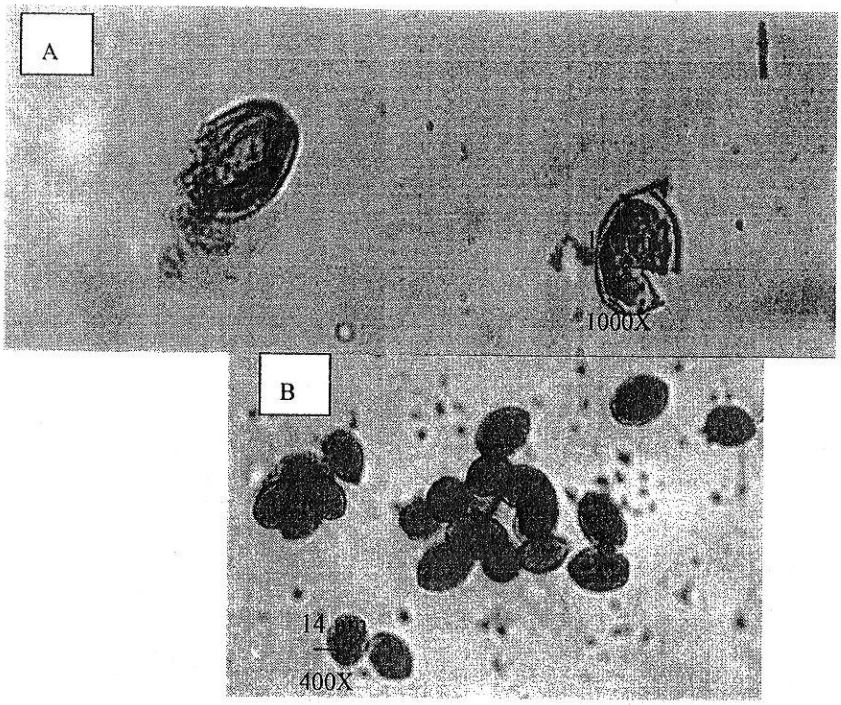


รูปที่ 3.2 ยอดและรากเกิดขึ้นหลังจากเลี้ยงในอาหารชนิด MS (A) และการเจริญเติบโตขององุ่นเมื่อเพาะเลี้ยงในกระถาง(B).

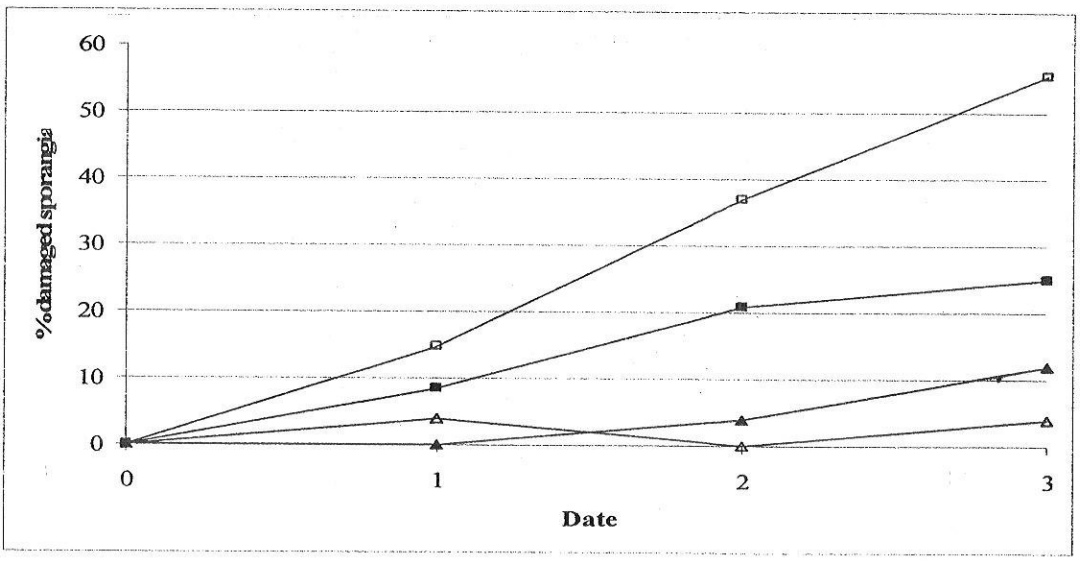
3.2 การประเมินความสามารถของเอนไซม์ไคติเนส (สารสกัด) จากกระถินบ้านในการทำลายสปอร์เชื้อรา *Plasmopara viticola*

สารสกัดจากกระถินบ้านถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอ็นไซม์ไคติเนสโดยวิธี Colorimetric assay โดยวัดที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ปรากฏว่าได้ค่าความจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้าน 0.024 ยูนิต/มิลลิกรัมของโปรตีน หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้นี้ไปทดสอบการทำลายต่อสปอร์เชื้อรา *P. viticola* โดยนำมาผสมกันระหว่างสารสกัดกับสปอร์ ซึ่งสปอร์ของเชื้อรานี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายจำนวนเป็นเวลา 7 วัน ในตู้เพาะเลี้ยง (Growth Chamber) แสดงใน Appendix หลังจากผสมกันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับตรวจผลการทดลองทุกวัน โดยนับจำนวนสปอร์ที่มีลักษณะรูปร่างที่เป็นสปอร์ของเชื้อรา *P. viticola* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กับเชื้อราน้ำค้างที่ถูกทำลาย แสดงในรูปที่ 3.3 และAPPENDIX หลังจากนั้นทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสปอร์ที่ถูกเอนไซม์ไคติเนสทำลายเพื่อประเมินความสามารถของเอนไซม์ไคติเนสในการทำลายสปอร์ของเชื้อรา *P. viticola* ดังแสดงในรูปที่ 3.4 และ APPENDIX

เปอร์เซ็นต์ของสปอร์เชื้อรา *P. viticola* ที่ถูกทำลายในวันที่ 3 มีดังนี้คือ 4%, 25%, และ 55% หลังจากทดสอบกับเอนไซม์ไคติเนสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส 0.011, 0.021, และ 0.042 ยูนิต ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้แสดงว่าค่าทางสถิติของ Control (น้ำ) กับ 0.011 ยูนิตของสารสกัดนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ที่ 0.021 และ 0.042 ยูนิต นั้นมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงใน APPENDIX ดังนั้นกล่าวได้ว่าเปอร์เซ็นต์ของสปอร์ที่ถูกทำลายเพิ่มมากขึ้น เมื่อจำนวนของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกันกับงานวิจัยของมานะ ขาวเมฆ และคณะในปี พ.ศ. 2546 ที่พบว่าเอนไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้านที่เป็น recombinant นั้นสามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อราได้ถึง 13 สายพันธุ์ รวมทั้งจากงานวิจัยของพูนศุข ศรีโยธาและ Peberdy ในปี พ.ศ. 2539 รายงานว่าสารสกัดเอ็นไซม์ไคติเนสจากเมล็ดของ *Acacia mangium* และ *Gliricidia sepium* นั้นสามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อราทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบได้ ซึ่งพืชเหล่านี้อยู่ในตระกูลถั่ว (Leguminosae) ซึ่งเหมือนกันกับกระถินบ้านที่อยู่ในตระกูลถั่วเช่นกัน ดังนั้นจากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าเอ็นไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้านสามารถทำลายสปอร์ของเชื้อราน้ำค้าง *P. viticola* ได้



รูปที่ 3.3 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *P. viticola* (A) รูปร่างที่ถูกทำลาย (B) รูปร่างปกติ



รูปที่ 3.4 เปอร์เซ็นต์สปอร์ของเชื้อรา *P. viticola* ที่ถูกทำลายหลังจากทดสอบด้วยสารสกัดเอนไซม์ไคติเนสของกระถินบ้าน; control (▲), 0.011 unit (△), 0.021 unit (■), and 0.042 unit (□)

3.2.1 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในองุ่น

สารสกัดจากยอด ลำต้นระหว่างข้อ และส่วนใบขององุ่นถูกนำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส โดยวิธี Colorimetric ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1 โดยรวมแล้วจะพบว่าเอนไซม์ไคติเนสจะพบได้ต่ำในทุกส่วนขององุ่น แต่มักพบปรากฏการณ์ของโรคตามใต้ใบมากกว่าเนื่องจากมีปากใบที่มีโอกาสให้เชื้อราเข้าทำลายได้ง่าย ดังนั้นการพิจารณาความอ่อนแอของการเกิดโรคด้วยการใช้เอนไซม์ไคติเนสนั้นจึงพิจารณาในส่วนของใบมาเป็นอันดับแรก ตามด้วยยอด และข้อ ตามลำดับ โดยต้นตอพันธุ์ 1613 นั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด คือ 0.200 ยูนิตในใบ และ 0.147 ยูนิตในยอด ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพคือ เป็นพันธุ์ที่สามารถต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้ดี ส่วนพันธุ์ Crimson seedless นั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุดคือ 0.001 ยูนิตในใบและ 0.051 ยูนิตในยอด และพันธุ์ชีราสก็ต่ำเช่นกัน คือ 0.014 ยูนิตในใบและ 0.085 และ 0.025 ยูนิตในยอดและข้อ ตามลำดับ ซึ่งพันธุ์เหล่านี้ก็จะอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้างมาก จากผลการทดลองนี้และลักษณะที่ปรากฏทางกายภาพขององุ่นพันธุ์ชีราสที่แสดงออกถึงความอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง จึงได้เลือกองุ่นพันธุ์ชีราสมาทำการถ่ายยีนเพื่อให้ต้านทานต่อโรค รวมทั้งเพื่อเป็นต้นแบบสำหรับองุ่นพันธุ์อื่นๆ ที่ต้องการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วย นอกจากนี้ยังมีอีกปัจจัยหนึ่งที่เลือกองุ่นพันธุ์ชีราสมาทำงานวิจัย เพราะเป็นพันธุ์ที่ปลูกมากในประเทศไทย และนิยมนำมาทำไวน์แดงมาก ดังนั้นเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมจึงน่าเป็นอีกหนทางหนึ่งที่จะรักษาคุณภาพและคุณสมบัติขององุ่นพันธุ์ชีราสเพื่อการผลิตไวน์แดง

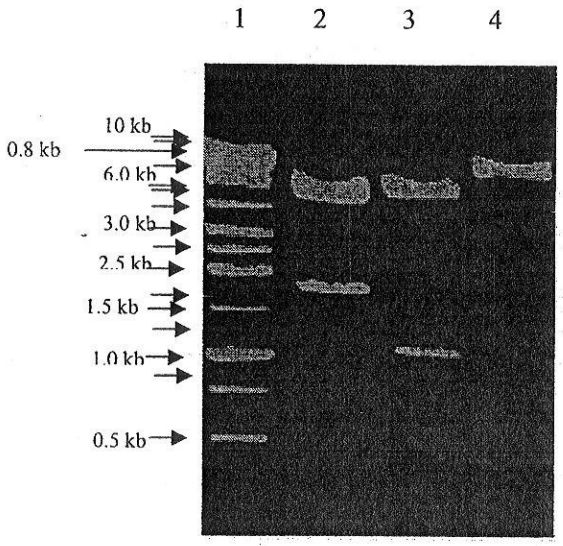
ตารางที่ 3.1 แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ไคติเนสจากองุ่นแต่ละพันธุ์ ของแต่ละส่วน

พันธุ์องุ่น	Specific activity (Unit/mg)		
	ใบ	ยอด	ข้อ
ลูสเพอเลส	0.014	0.051	0.017
ครีมสัน ซีดเลส	0.001	0.053	0.076
คาร์โรไลน่า แบลคโรส	0.056	0.025	0.083
รูบี้เรด	0.075	0.128	0.221
ชีราส	0.014	0.085	0.025
ไรซ์ริ่ง	0.009	0.092	0.012
ต้นตอพันธุ์ 1613	0.200	0.147	0.042

3.3 ถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่เวคเตอร์ pET-39b(+), pBI121 และแคลลัสอ่อน

3.3.1 ถ่ายไคติเนสเข้าสู่เวคเตอร์ pET-39b(+)

ยีนไคติเนสที่อยู่ในพลาสมิด pUC19 ถูกนำมาถ่ายใส่เวคเตอร์ pET-39b(+) แล้วทำการตรวจสอบผลการโคลนยีนด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ*Nde*I ดูขนาดของไคติเนสบน gel electrophoresis ขนาดของยีนไคติเนสคือ 1.0 กิโลเบส และ ขนาดของเวคเตอร์ pET-39b(+) คือ 6.1 กิโลเบส ซึ่งหลังจากที่ทำการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI และ*Nde*I พบว่าได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ คือ 1.0 กิโลเบส (เลนที่ 3) และ 1.8 กิโลเบส (เลนที่ 2) ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.5 ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ ยีนไคติเนสถูกโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pET-39b(+)แล้ว นอกจากนี้จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I สามารถบอกได้ว่ายีนไคติเนสอยู่ในทิศทางที่ถูกต้องที่จะสามารถแสดงออกได้

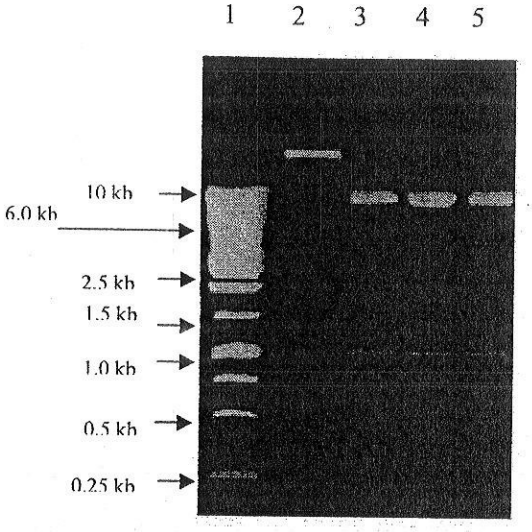


รูปที่ 3.5 เวคเตอร์ pET-39b(+) และยีนไคติเนสหลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Nde*I บน 1% gel electrophoresis ช่องที่ 1: 1 kb DNA marker, ช่องที่ 2: recombinant plasmid ที่ถูกตัดด้วย *Nde*I, ช่องที่ 3: recombinant plasmid ที่ถูกตัดด้วย *Eco*RI, ช่องที่ 4: พลาสมิดที่ยังไม่ได้ตัด

3.3.2 ถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่เวคเตอร์ pBI121

ยีนไคติเนสอยู่ในเวคเตอร์ pET-39b(+) ถูกถ่ายเข้าสู่เวคเตอร์ pBI121 ซึ่งเป็นเวคเตอร์สำหรับแสดงออกของยีน โดยยีนไคติเนสจะเข้าไปแทนที่ยีน GUS ในเวคเตอร์ pBI121 ตรงตำแหน่งของเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I หลังจากถ่ายยีนแล้วนำโคโลนี 1 โคโลนีที่ได้จากการถ่ายยีนนี้มาสกัดดีเอ็นเอพร้อมกับตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I เพื่อตรวจสอบการถ่ายยีน แล้วนำมาตรวจสอบผลการตัดด้วย gel electrophoresis ได้ผลดังนี้ ขนาดของพลาสมิดที่มีการถ่ายยีนไคติเนสมีขนาดประมาณ 11.1 กิโลเบส (ช่องที่ 2) หลังจากทำการตัดด้วยเอ็นไซม์แล้วพบว่ายีนไคติเนสมีขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส (ช่องที่ 3-5) ดังรูปที่ 3.6 ซึ่งแสดงถึงขนาดที่ถูกต้องว่าไคติเนสถูกถ่ายเข้าสู่เวคเตอร์ pBI121 ดังนั้นจาก

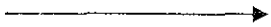
ผลการทดลองนี้แสดงว่า cDNA ของไคติเนสจากกระถินบ้านถูกตัดต่อเข้าสู่เวคเตอร์ pBI121 โดยเข้าไปแทนที่ตำแหน่งของยีน GUS (APPENDIX)



รูปที่ 3.6 เวคเตอร์ pBI121:chitinase หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I บน 1% agarose gel electrophoresis ช่องที่ 1: 1 kb DNA marker , ช่องที่ 2: พลาสมิดที่ยังไม่ได้ตัด, ช่องที่3-5: พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI and *Sac*I

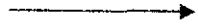
3.3.3 หาลำดับดีเอ็นเอในเวคเตอร์ pBI121:chitinase โดยใช้ไพรเมอร์ chitinase forward

ไพรเมอร์ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เป็น chitinase forward ถูกออกแบบจากลำดับเบสที่อยู่ปลายสุดของโปรโมเตอร์ CaMV35s เพื่อหาลำดับเบสของไคติเนส โดยส่วนที่เป็น start codon ของไคติเนสจากกระถินบ้านถูกนำเข้าไปอยู่ในเวคเตอร์ pBI121 ที่ตำแหน่งของเอนไซม์ *Bam*HI แสดงดังรูปที่ 3.7 จากลำดับดีเอนเอนี้ชี้ให้เห็นว่ายีนไคติเนสจากกระถินบ้านถูกโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pBI121 แล้วและอยู่ในทิศทางที่ถูกต้องที่พร้อมจะแสดงออก



CaMV35s Promoter.....AGACCCTTCCTCTATCTAAAGGAAGTTCATTTCATTTGGA

Luecaena chitinase



*Xba*I *Bam*HI *Eco*RI 1

GAGAACACGGGGGACTCTAGAGGATCCGAATTCAAATCCAAGAGATGGATAAC 9

M D N 3

ATGAACAAGATGCGGGTGCTCTTGTGTGTGCTGCTGTACAGCTTCATGGTGGGA 63

M N K M R V L L C V L L Y S F M V G 21

GGCTTAGCGGAGCAATGCGGCAGGCAGGCAGGGGGTGCCTTGTGCCCCGGCCGC 117

G L A E Q C G R Q A G G A L C P G R 39

CTCTGCTGCAGCCAATTCGGCTGGTGTGGTTCCACTAACGATTACTGCGGCCCC 171

L C C S Q F G W C G S T N D Y C G P 57

GGTTGCCAGAGCCAGTGTGGCGGAAGTGGCCCAGGCCCAGCCCCTCCCTCCGGT 225

G C Q S Q C G G S G P G P A P P S G 75

GGCCTCACCGGCATCATCTCCAGGGACACCTTCAACCAGATGCTCAAGCACCGC 279

G L T G I I S R D T F N Q M L K H R 93

AACGACGCCGCCTGCCCGGCCAATGGCTTCTACACCTACGACGCCTTCATTCAG 333

N D A A C P A N G F Y T Y D A F I 111

GCCGCCAAGTCTTTCCCCGCCTTCGGTAGTACCGGCGATGATGCCACGCGCAAG 387

A A K S F P A F G S T G D D A T R K

AGGGAGGTGGCAGCTTTCCTCGGCCAAACTTCACACGAGACCACCGGCGGTTGG 441

R E V A A F L G Q T S H E T T G G W

CCCAGCGCTCCCCACGTCCTTACGCCTGGGGTTACTGCTTTCAAACAGGA..... 489

P S A P H V L T P G V T A F K Q E

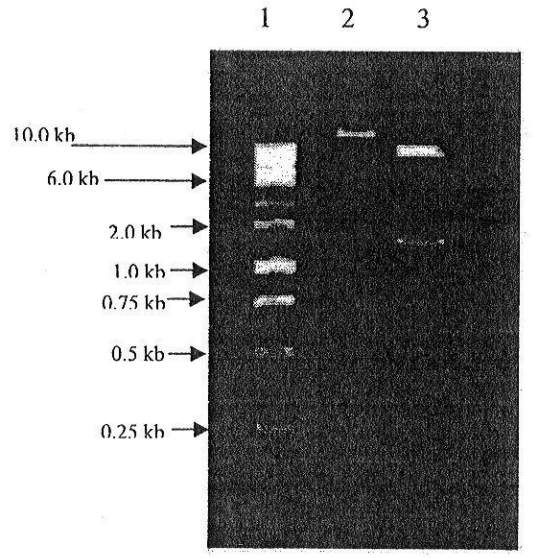
.....NOS Terminator

รูปที่3.7 ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนไคติเนสจากกระถินบ้านในเวคเตอร์ pBI121

3.3.4 ถ่ายเวคเตอร์ pBI121:chitinase เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciences* LBA4404

ชิ้นส่วนของยีน GUS ที่มีขนาด 3.0 กิโลเบสถูกตัดออกด้วยเอ็นไซม์ *Bam*HI/*Sac*I จากเวคเตอร์ pBI121 ทำให้เวคเตอร์มีขนาดเหลืออยู่ 10.0 กิโลเบส ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนของ T-DNA และส่วนของ T-DNA นั้นประกอบไปด้วยยีน NPTII ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดคานามัยซิน และเป็น selectable marker เพื่อใช้ค้นหายีน ซึ่งส่วนของเวคเตอร์ pBI121:chitinase ถูกนำเข้าสู่ *A. tumefaciences* LBA4404 ด้วยวิธี electroporation โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 25 uF และ 2.5 kV ของเครื่อง Gene-Pulser (Bio-rad) นำโคลนที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหายีนไคติเนสในเวคเตอร์ pBI121 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I เพื่อตรวจสอบหายีนที่ถูกถ่ายเข้าไป ผลปรากฏว่า ได้ขนาดของยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปคือ 1.1 กิโลเบสและขนาดของเวคเตอร์ pBI121 คือ 10.0 กิโลเบส ดังรูปที่ 3.8 และจากผลนี้สามารถบอกได้ว่า cDNA ไคติเนสของกระถินบ้านถูกนำเข้าสู่ *Agrobacterium* แล้ว

สำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ *Agrobacterium* นั้นมีหลายวิธี แต่สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธี electroporation ในการถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่ *Agrobacterium* เพราะว่าเป็นวิธีที่ดีและใช้เวลาที่เร็ว รวมทั้งไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียพวก *E.coli* ซึ่งดีกว่าวิธี Tri-parental mating (Singh et al., 1993) นอกจากนี้ขั้นตอนที่ใช้ก็น้อยกว่าและเป็นการถ่ายยีนเข้าสู่ *Agrobacterium* โดยตรง อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนนั้นต่ำ คือ 1.056×10^3 cfu/ไมโครกรัม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB เพราะจากงานวิจัยของ Lin ในปี 2004 รายงานไว้ว่าประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงที่สุดคือ >1.0x107 cfu/ug เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร YM ซึ่งสูงถึง 40 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการถ่ายยีนโดยการเลี้ยงเชื้ออาหาร LB

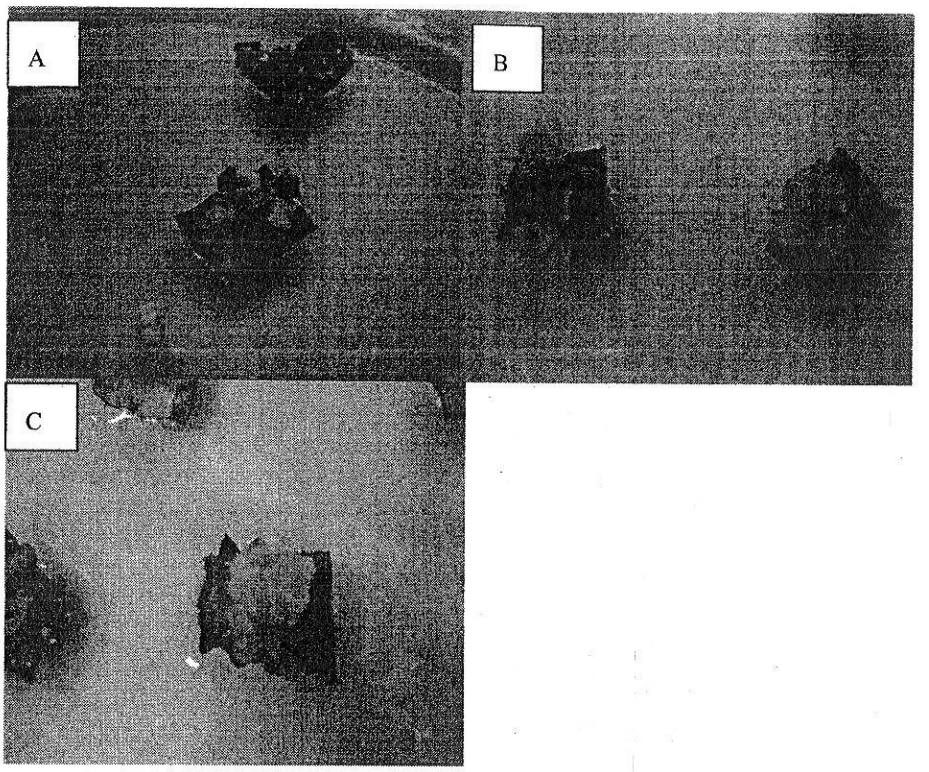


รูปที่ 3.8 เวคเตอร์ pBI121:chitinase หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Sac*I บน1% agarose gel electrophoresis ช่องที่ 1: 1 kb DNA marker, ช่องที่ 2: พลาสมิดที่ไม่ได้ตัด, ช่องที่ 3: พลาสมิดที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* และ *Sac*I

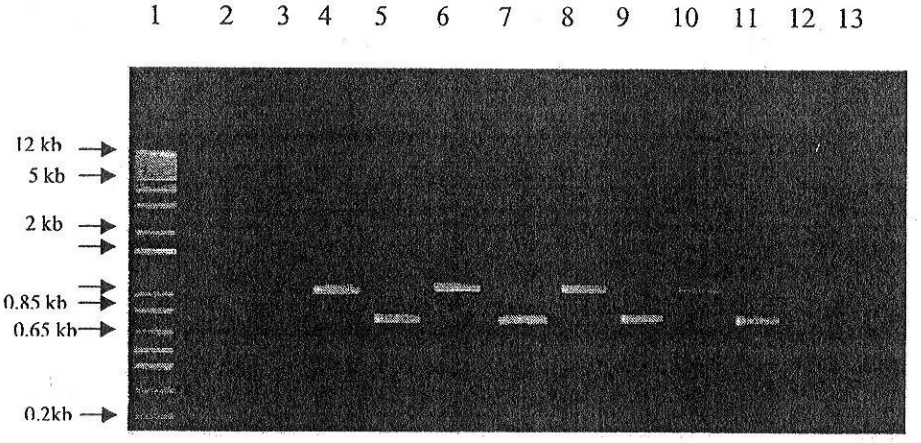
3.4 การสกัดดีเอ็นเอและตรวจหายีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในแคลลัสขององุ่นด้วยเทคนิค PCR

ใบขององุ่นถูกบ่มกับเชื้อ *Agrobacterium* ที่มีเวคเตอร์ pBI121:chitinase แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกชนิด NN ที่มีสารปฏิชีวนะชนิด cefotaxime, carbenicillin ปริมาณ 250 มิลลิกรัม/ลิตร และ kanamycin ปริมาณ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผลปรากฏว่าหลังจาก 14 วัน ใบองุ่นพันธุ์ชีราสถูกชักนำให้เป็นแคลลัส ดังรูปที่ 3.9a และแคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารนาน 1 เดือน และ 2 เดือน ดังรูปที่ 3.9b และ 3.9c ตามลำดับ หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนแคลลัสนี้มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบหายีนไคติเนสและยีน NPTII

ส่วนของจีโนมิกดีเอ็นเอขององุ่นถูกสกัดด้วยวิธี DNA-mini-preparation แล้วนำไปตรวจสอบหายีนด้วยเทคนิค PCR ผลปรากฏว่า จาก 4 โคลนที่นำมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจหายีนไคติเนสและยีน NPTII ผลปรากฏว่าพบทั้งยีนไคติเนสและยีน NPTII จากทั้ง 4 โคลน ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส และ 0.8 กิโลเบน ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.10 ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ cDNA ไคติเนสถูกถ่ายเข้าสู่แคลลัสขององุ่น วิธีที่ใช้ในการทดลองนี้ยังสามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ภายใน 14 วัน และใช้ *Agrobacterium* ในการถ่ายยีนเพื่อให้ได้แคลลัสองุ่นที่เป็น Tranasgenic สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yamamoto และคณะ ในปี 2000 รายงานว่าไคติเนสจากข้าวถูกถ่ายเข้าสู่องุ่นพันธุ์ Neo Muscat โดยใช้รังไข่ขององุ่นเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและใช้ *Agrobacterium* ในการถ่ายยีน ผลที่ได้คือหลังจาก 4 เดือน ได้ต้นองุ่นที่เป็น Transgenic ต้นที่เป็น Transgenic นี้สามารถยับยั้งการเจริญของไมซีเลียมของเชื้อ *U. necator* ได้เมื่อดูผ่านกล้อง Scanning electron microscope เปรียบเทียบกับ control และในปี 2002 Mezzetti และคณะได้รายงานว่า ได้ต้นองุ่นที่เป็น Transgenic คือพันธุ์ Silcora และ Thomson seedless จากการถ่ายยีนด้วยวิธี *Agrobacterium* และใช้เวลาทั้งหมด 7 เดือน โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงองุ่นที่เป็นเนื้อเยื่อแบบ Meristematic Bulk แล้วนำเนื้อเยื่อส่วนนี้มาถ่ายยีน เพื่อให้ได้ต้นองุ่นที่เป็น Transgenic ทั้ง 2 พันธุ์ นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Nakano และคณะในปี 1994 พบว่าส่วนใบขององุ่นพันธุ์ Koshusanjaku ถูกชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส แล้วนำมาถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *A. rhizogenes* หลังจากนั้นส่วนของแคลลัสถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอหายีนที่ถ่ายเข้าไป ผลปรากฏว่าทุกแคลลัสมีชิ้นส่วนของยีนที่ถ่ายเข้าไปในองุ่นพันธุ์ Koshusanjaku



รูปที่ 3.9 แคลลัสขององุ่นพันธุ์ชีราสบนอาหารคัดเลือกที่มีอายุ14 วัน (A) 1 เดือน (B) และ 2 เดือน (C)



รูปที่ 3.10 แสดงผลจาก PCR ของยีนไคติเนสและยีน NPTII จากแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนบน 1% agarose gel electrophoresis.

ช่องที่ 1: 1 kb DNA Ladder marker

ช่องที่ 2: แคลลัสองุ่นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนกับไพร์เมอร์ไคติเนส

ช่องที่ 3: แคลลัสองุ่นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนกับไพร์เมอร์ NPTII

ช่องที่ 4, 6, 8, และช่องที่10: แคลลัสองุ่นที่ได้รับการถ่ายยีนกับไพร์เมอร์ไคติเนส

ช่องที่ 5,7,9 และช่องที่ 11: แคลลัสองุ่นที่ได้รับการถ่ายยีนกับไพร์เมอร์ NPTII

ช่องที่ 12 และ 13 เป็น negative control ของไพร์เมอร์ไคติเนสและ NPTII ตามลำดับ

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

องุ่น (*Vitis sp.*) เป็นพืชที่มีการปลูกเพื่อทำการค้าทั่วโลกและมีมากกว่า 60 ประเทศ รวมทั้งประเทศไทยด้วย การปลูกองุ่นเป็นที่นิยมกันมาก แต่ปัญหาที่พบมากในการปลูกองุ่น นั่นก็คือ โรคราน้ำค้าง ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา ชนิด *Plasmopara viticola* ทำให้สูญเสียผลผลิตเป็นจำนวนมากในแต่ละปี รวมทั้งคุณภาพขององุ่นก็ลดลงมากเช่นกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบความสามารถของสารสกัดเอ็นไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้านในการทำลายสปอร์ของเชื้อรา *P. viticola* ซึ่งพบว่าสามารถทำลายสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้ได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อองุ่นในอาหาร IM และ MM ที่มีฮอร์โมนพืชชนิด NAA และ BAP ได้ยอดจำนวนมากได้ภายใน 60 วัน เพื่อทำการถ่ายยีนเข้าสู่องุ่น ให้ได้ต้นองุ่นที่เป็น Transgenic และนี่คืออีกแนวทางหนึ่งที่จะทำให้องุ่นมีคุณสมบัติต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้

ซึ่งในการทดลองนี้ ได้องุ่นที่เป็น Transgenic ที่เป็นแคลลัส โดยใช้ *Agrobacterium* ช่วยในการถ่ายยีนโดยเริ่มจากการโคลนยีนไคติเนสของกระถินบ้านเข้าสู่เวคเตอร์ pET-39b(+) และถ่ายยีนเข้าสู่เวคเตอร์นี้เข้าสู่เวคเตอร์ pBI121 ต่อเพื่อให้เกิดการแสดงออกในพืช และได้ใช้เทคนิค Electroporation ในการถ่ายยีนไคติเนสที่อยู่ในเวคเตอร์ pBI121 เข้าสู่ *Agrobacterium* เพื่อให้ *Agrobacterium* ช่วยในการถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่องุ่น และชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส ส่วนของแคลลัสถูกนำมาตรวจหายีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในพืช โดยใช้เทคนิค PCR ผลปรากฏว่าพบทั้งยีน NPTII และยีนไคติเนส คือ 0.8 กิโลเบส และ 1.0 กิโลเบส จากทั้งหมด 4 โคลนที่นำมาตรวจสอบหายีน ซึ่งเป็นขนาดที่ถูกต้องของทั้งสองยีนนี้ ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้ ชี้ให้เห็นว่าการใช้ *Agrobacterium* ช่วยในการถ่ายยีนในองุ่นเป็นวิธีการที่ดีอีกวิธีหนึ่งและการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชนิด NN ที่มีฮอร์โมนพืชชนิด 2,4-D และ 4-CPPU นั้นเหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนของใบองุ่น ซึ่งเป็นแคลลัสได้ภายใน 14 วัน

โครงการวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ไคติเนสจะสามารถช่วยทำลายเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคราน้ำค้างในองุ่นได้ แต่ยังไม่สามารถกระตุ้นให้เปลี่ยนแคลลัสที่ได้รับยีนไคติเนสมาเป็นต้นองุ่นได้ ทั้งๆ ที่ระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสขององุ่นปกติสามารถชักนำให้เกิดรากและต้นได้ก็ตาม ซึ่งอาจเกิดจากอิทธิพลของยาปฏิชีวนะที่ใช้หรือสารอาหารที่ยังไม่เหมาะสมก็ได้ จึงควรมีการทดสอบเพิ่มเติม และอาจพิจารณาเลือกยีนเอนไซม์กลูคาเนสร่วมด้วย ซึ่งจะทำให้มีฤธิ์ในการทำลายผนังเซลล์ของราได้ดีมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Bordoli, L., Falquet, L., and Ioannisdis, B. (2004). **iPCR product extractor** [On-line]. Available: http://www.ch.embnet.org/software/iPCR_form.html

Balasubramaniam, R., Harvey, I.C., Braithwaite, M., and Jordan, D. (2005). **Grapevine disease in New Zealand** [On-line]. Available:http://www.hortnet.co.nz/publications/hortfacts/images/90502003.gif

Bartnicki-Garoia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphologenesis, and taxonomy of fungi. **Annu. Rev. Microbial**. 22:87-108 Quoted in

Kaomek M. (2001). **Cloning, expression, and usage of chitinase form *Leucaena leucocephala* de Wit**. Ph.D. Dissertation, Suranaree University of Technology, Thailand.

Bobadoost, M. (2001). **Report on plant disease RPD No. 705: Downy mildew of grape.** USA: The University of Illinois.

Boonkerd N. 2000. **Manual of vineyard.** Nakhon Ratchasima: Suraree University of Technology.

Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., and Vad, K. (1993). Plant chitinase. **The Plant J.** 3(1): 31-40.

Datta, S.K., and Muthukrishnan, S. (1999). **Pathogenesis-related proteins in plants.** USA: CRC press.

Ellis, M.A. (2004). **Plant pathology** [On-line]. Available: http://www.ohioline.ag.ohiostate.edu.html.

Ellis, M.A., and Nita, M. (2005). **Integrated management of grape diseases** [On-line].Available:http://www.oardc.ohio-state.edu/fruitpathogy/organic/grape/All-grapes.html

Emershad, R.L., and Ramming, D.W. (1994). Somatic embryogenesis and plant
development from immature zygotic embryos of seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Rep.** 14: 6-12.

Harst, M. (1995). Development of a regeneration protocol for high frequency somatic embryogenesis from explants of grapevine (*Vitis* spp.). **Vitis.** 34(1):27-29.

Harst, M., Bornhoff, B.A., Zyprian, E., and Topper, R. (2000). Influence of culture technique and genotype on the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos (*Vitis vinifera*) and their conversion to transgenic plants. **Vitis.** 36(3): 99-102.

Hahn, M., Hennig, M., Schlesier, B., and Hohne, W. (2000). Structure of jack bean chitinase. **Acta Cryst.** 56: 1096-1099.

Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** 280:309. Quoted in Datta S.K., and Muthukrishnan; S. (1999). **Pathogenesis-related proteins in plants.** New York: CRC press.

Hanahan, D. (1968). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. **J.Mol.Biol.** 166: 557-560 Quoted in Sambrook, J. And Russell D.W. (2001). **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: CSHL Press.

Huynh, Q.K., Hironaka, C.M., Levine, E.B., Smith, C.E., Borgmeyer, J.R., and Shah, D.M. (1992). Antifungal proteins from plants. **The J. Bio. Chem.** 267: 6635-6640.

Ivie International. (2003). **World vineyard, grape and wine report 2003: World wine production 1951-2001.** California : IvieInternatinal.

Jayasankar, S., Gray, D.J., and Litz, R.E. (1999). High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine. **Plant Cell Rep.** 18: 533-537.

Jollès, P., and Muzzarelli, R.A.A. (1999). **Chitin and Chitinases.** Berlin: Birkhauser Verlag Press.

Kaomek, M., Mizuo, K., Fujimura, T., Sriyotha, P., and Ketudat Cairns, J. (2003). Cloning, Expression, and Characterization of an Antifungal Chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 67(2):667-676.

Kikkert, J.R., Ali, G.S., Striem, M.J., Martens, M.H., Wallace, P.G., Molino, L., and Reisch, B.I. (1997). Genetic engineering of grapevine (*Vitis* sp.) for enhancement of disease resistance. **Acta Hort.** 447: 273-279.

Kikkert, J.R., Ali, G.S., Wallance, P.G., and Reisch, B. (2000). Expression of a fungal chitinase in *V. vinifera* L. "Merlot" and "Chadonay" plants produced by biolistic transformation. **Acta Hort.** 528: 297-303.

Kikkert, J.R., Hebert-soule, D., Wallance, P.G., Striem, M.J., and Reisch, B.I. (1996). Transgenic plantlets of Chancellor grapevine (*Vitis* sp.) from biolistic transformation of embryogenic cell suspensions. **Plant Cell Rep.** 15: 311-316.

Krishnaveni, S., Liang, G.H., Muthukrishnan, S., and Manickam, A. (1999). Purification and partial characterization of chitinase from sorghum seeds. **Plant Sci.** 144: 1-7.

Leo, S.M., et al. (1994). A new class of tobacco chitinase homologous to bacterial exo-chitinase displays antifungal activity. **The Plant J.** 5(4): 469-480.

Lin, J-J. (2004). A new expression medium for *Agrobacterium tumefaciens* following electroporation. **Focus.** 16(1): 18-19.

Lin, R.C., Ding, Z.S., Li, L.B., and Kuang, T.Y. (2001). A rapid and efficiency DNA minipreparation suitable for screening transgenic plants. **Plant Mol. Bio. Reporter**. 19: 379a-379e.

Marchenko, A.O. (1991). Induction of embryogenesis in primary calluses from grape stem and leaves. **Fiziologiya Rastenii.** 38 (3):580-590.

Mhatre, M., and Salunkhe, C.K. (2000). Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. **Scientia Horticultureae.** 84: 357-363.

Mezzetti, B., Pandolfini,T., Navacchi, O., and Landi, L. (2002). Genetic transformation of *Vitis vinifera a* via organogenesis. **BMC Biotech.** 2 (18) :1-10.

Nakano, M., Hoshino, Y., and Mii, M. (1994). Regeneration of transgenic plants of grapevine (*Vitis vinifera* L.) via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of embryogenic calli. **J. Experimental Botany.** 45(274): 649-656.

Papademetriou, M.M., and Dent, F.J. (2001). **Grape production in the Asia-Pacific region.** Bangkok: RAP Publication.

Pearson, R.C., and Goheen, A.C. (1988). **Compendium of grape disease.** USA: APS press.

Ponstein, A.S., Sela-Buurlage, M.B., Bres-Vloemans, S.A., Melchers, L.S., Van Der Elzen, P.J.M., and Corelissen, B.J.C. (1993). Only specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and β–1,3-glucanases exhibit antifungal activity. **Plant Physiol.** 101: 857-863.

Rohini, V. K. and Rao, K.S. (2001). Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. **Plant Sci.** 160: 889-898.

Salunkhe, C. K., Rao, P. S., and Mhatre, M. (1999). Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in anther callus of *Vitis latifola* L. **Plant Cell Reports**. 18: 670-673.

Salunkhe, C. K., Rao, P. S., and Mhatre, M. (1997). Induction of somatic embryogenesis and plantlet in tendril of *Vitis vinifera* L. **Plant Cell Rep.** 17: 65-67.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). **Molecular cloning: A laboratory manual.** USA: CSHL press.

Scorza, R., Cordts, J.M., Ramming, D.W., and Emershad, R.L. (1995). Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Rep**. 14:589-59.

Sigh, A., Kao, T.H., and Lin, J.J. (1993). **Focus** 15, 84. Quoted in Lin J.J (2004). A new expression medium for *Agrobacterium tumefaciens* following electroporation. **Focus.** 16(1): 18-19.

Singh, S. K., Khawale, R. N., and Sigh, S. P. (2004). Technique for rapid in vitro multiplication of *Vitis vinifera* L. cultivars. **J. Hort. Sci. & Biotech.** 79(2): 267-272.

Sriyotha P., and Peberdy, J. 1996. **Research report: Chitin degrading enzymes and their catalytic proproties.** Nakhon Ratchasima: Suranaree University of Technology.

Tebei, Y., et al. (1998). Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). **Plant Cell Rep.** 17: 159-164.

Verburg, J.G., and Huynh, Q.K. (1991). Purification and characterization of an antifungal chitinase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** 95: 450-455.

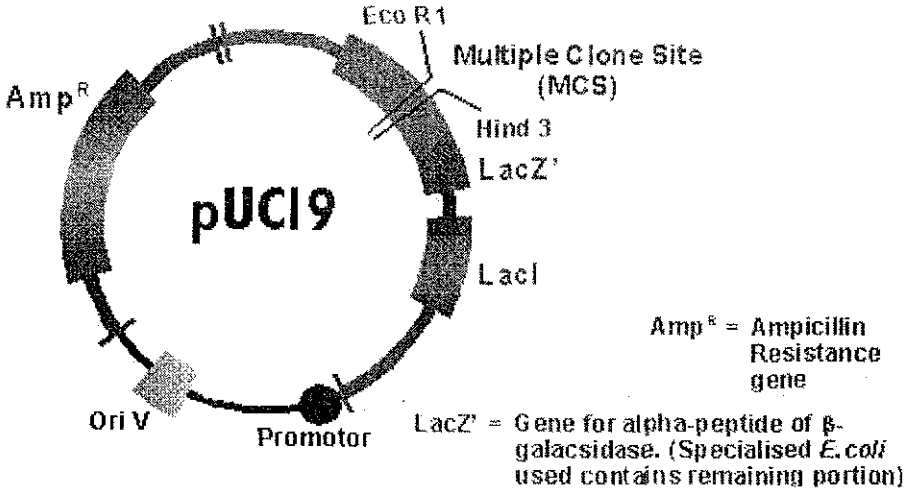
Vilaplana, M., and Mullins, M. G. (1989). Regeneration of grapevines (*Vitis* spp.) in vitro: Formation of adventitious buds on hypocotyls and cotyledons of somatic embryos. **J. Plant Physiol.** 134: 413-419.

Wessels, J.H.G., and Sietma, J.H. (1981). Fungi cell well: A survey. In Tanner, W., and Loewus, F.A., (eds.). **Encyclopedia of plant physiology (volume 13B),** pp. 352-394. Berlin: Springer-Verlag.

Weaver, R.J. (1976). **Grape growing.** New York: John Wiley& Sons.

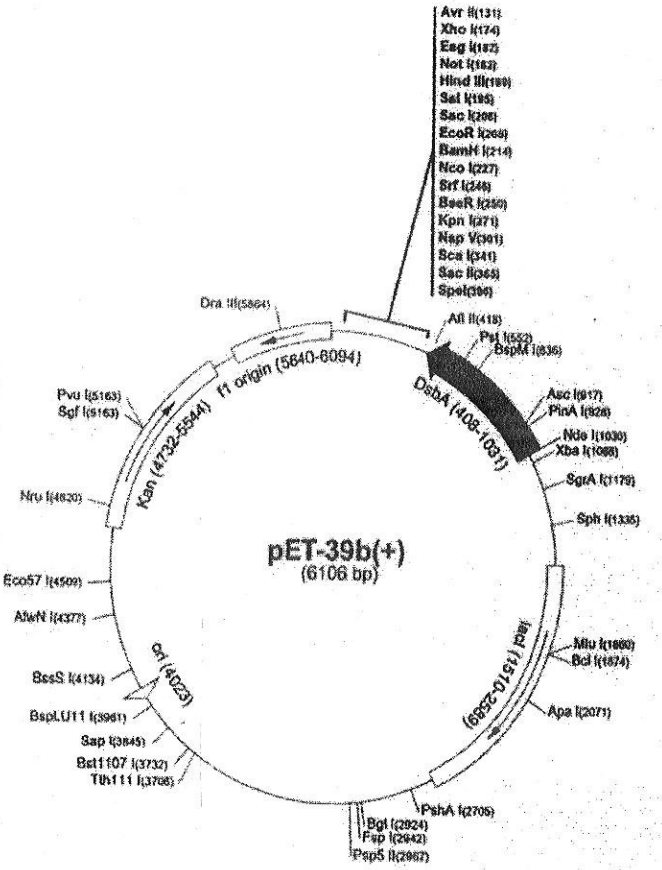
Yamamoto, T., et al. (2000). Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Rep.** 19: 639-646.

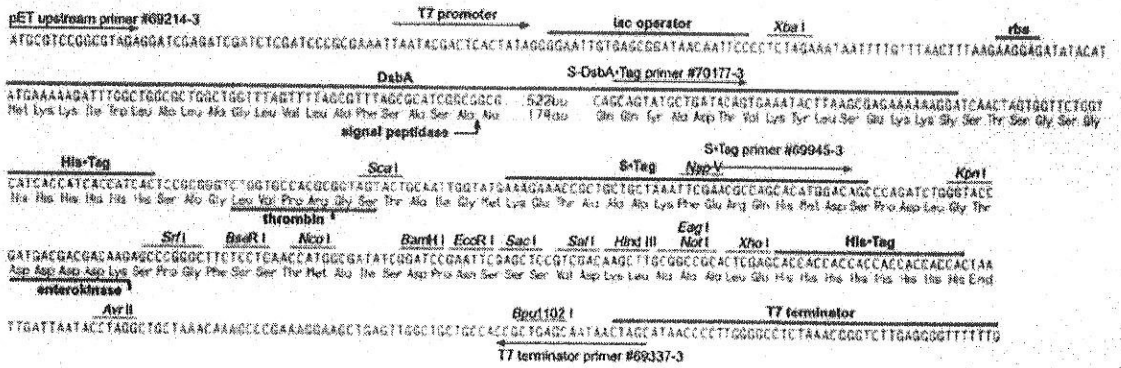
Yang, Z.N., Ingelbrecht, I.L., Louzada, E., Skaria, M., and Mirkov, T.E. (2000). *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). **Plant Cell Rep.** 19: 1203-1211.



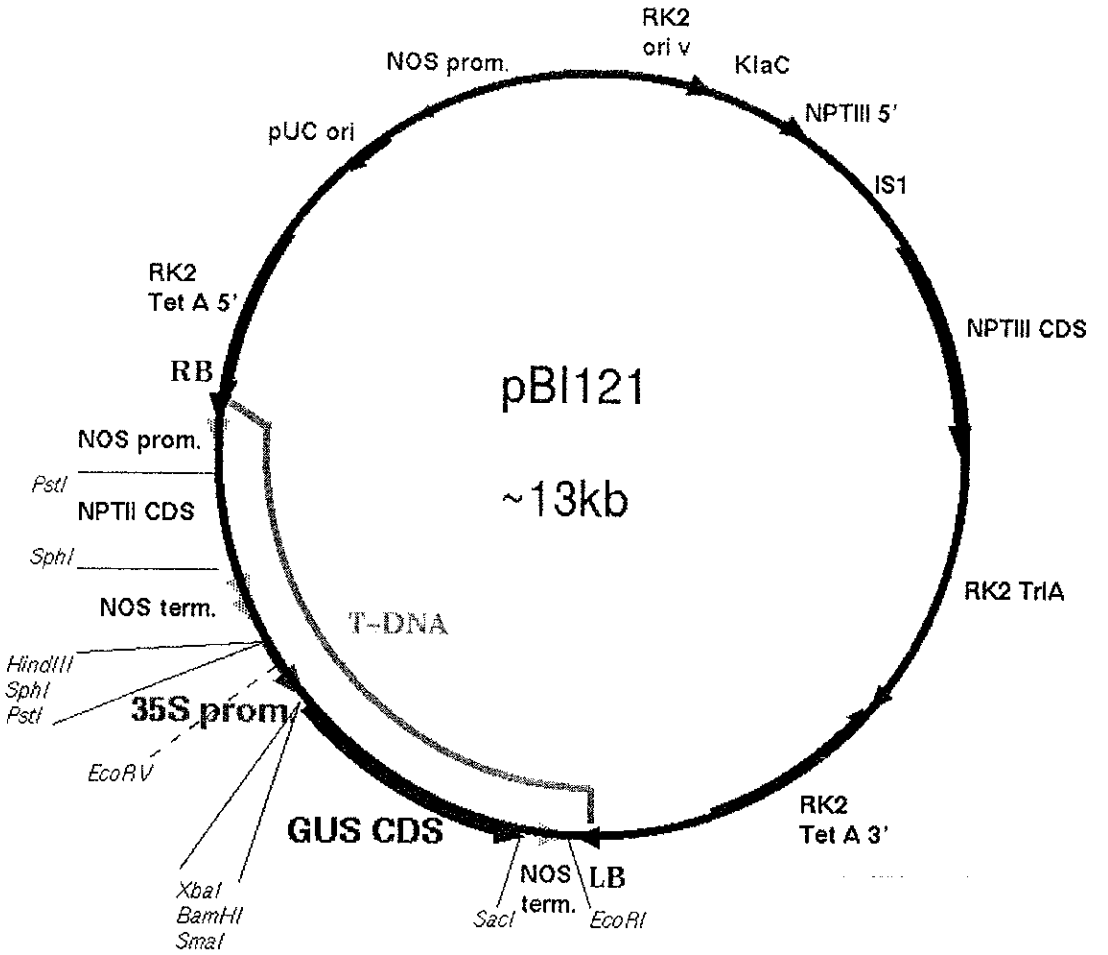
รูปที่ A1 ไดอาแกรม pUC19 vector

pET-39b(+) sequence landmarks	
T7 promoter	1103-1119
T7 transcription start	1102
DsbA•Tag™ coding seq.	408-1031
His•Tag® coding sequence	369-386
S•Tag™ coding sequence	282-326
Multiple cloning sites	
(*Srf* I - *Xho* I)	174-250
His•Tag coding sequence	150-173
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	1510-2589
pBR322 origin	4023
Kan coding sequence	4732-5544
f1 origin	5640-6094

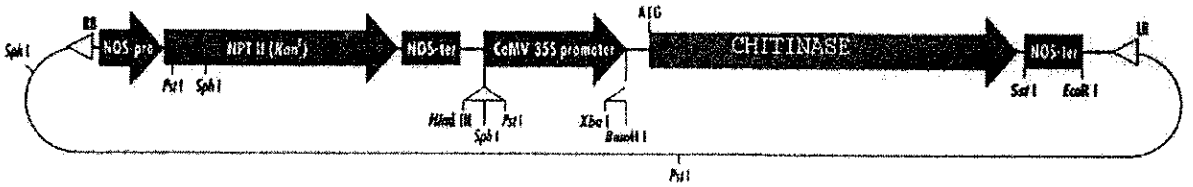




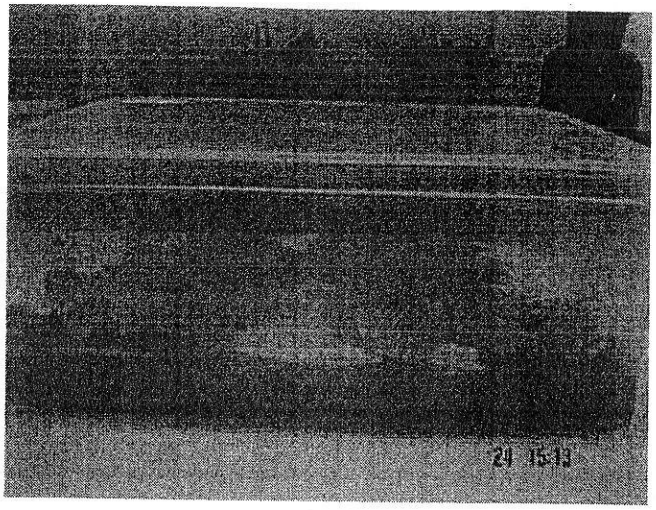
รูปที่ A2 ไดอาแกรม pET-39b(+) vector



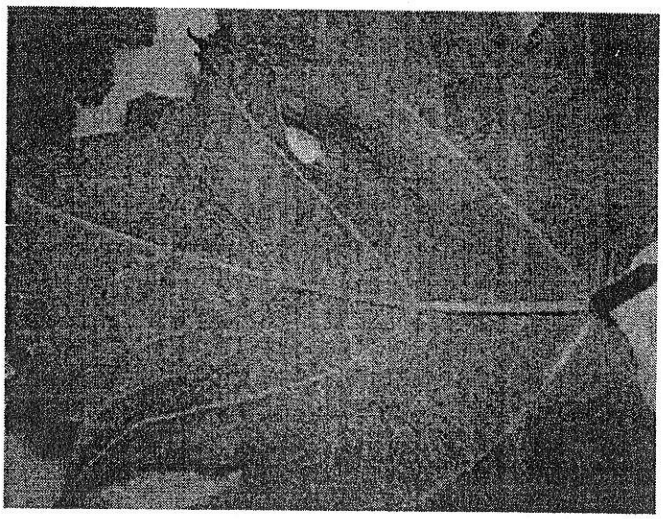
รูปที่ A3 ไดอาแกรม pBI121 expression vector



รูปที่ A4 ไดอาแกรมพลาสมิดที่ได้รับยีนไคติเนส (pBI121-chitinase)



รูปที่ A5 การทดสอบความไวขององุ่นต่อเชื้อ *P. viticola*



รูปที่ A6 ใบองุ่นที่เกิดโรค นาน 7 วัน

ตารางที่ A1 ผลการทดสอบการถูกทำลายของสปอร์เชื้อรา *P. viticola* ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้านความเข้มข้นต่างๆ

Date	0		1		2		3	
Sample (Unit)	Normal sporangia /ml(x10⁴)	% damaged sporangia	Normal sporangia /ml (x10⁴)	% damaged sporangia	Normal sporangia /ml (x10⁴)	% damaged sporangia	Normal sporangia /ml (x10⁴)	% damaged sporangia
Control[(1)]	1.67	0.00	1.73	0.00[a]	1.60	4.00[a]	1.47	12.00[a]
0.011	1.76	0.00	1.60	8.86[a]	1.67	5.06[a]	1.60	8.86[a]
0.021	1.60	0.00	1.47	8.33[a]	1.27	20.83[a]	1.20	25.00[ab]
0.042	1.80	0.00	1.53	14.81[a]	1.13	37.04[a]	0.80	55.56[b]

(1) Means in a columns followed by the different letter are significantly different (P ≥ 0.05)

Curriculum vitae

Name: **Chokchai Wanapu (Intapruk)**

Sex: Male

Nationality: Thai

Religion: Buddhism

Date of Birth: September 15, 1959

Home Address: 114/246 Ratchsima-Pakthongchai Road, Nong Ja Bok, Muang, Nakhon ratchasima 30000, Thailand.

Present Status: Assistant Professor in Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Education Background and Experience:

From 1978 - 1982: B.Sc. (Chemistry) from Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.

From 1982 - 1984: M.Sc. (Biochemistry) from Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

From 1991 - 1994: Ph.D. (Engineering in Biotechnology) from Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

From 1996 – 1997: Head of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkla 90110, Thailand.

From 1997 – 1999: Director of Center of Scientific and Equipment, Walailak University, Nakonsritummarat 80000, Thailand.

From 1999 – 2001: Director of Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

From 2002 – 2005: Manager of SUT's Farm, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

From 2006 – : Chair, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Scientific Experients:

Plant and microbial molecular genetics.

Fermentation Techniques

Biopolymers

Scientific Publication:

Intapruk, C., Tirawanchai, N., Wilairat, P. and Panyim, S. (1984) Application of cloned malaria parasite DNA in strain identification. Mahidol University Annual Research Abstracts 11, 297.

Intapruk, C. (1984) in Manual for international laboratory workshop "Genetic engineering techniques in tropical diseases research" to be published by WHO special programme for research and training in tropical diseases, 195-204.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradubkul, S. and Panyim, S. (1984) Strain characterization of human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by the use of a cloned parasite DNA probe. Microbial utilization of renewable resources. 4, 210-213.

Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Wilairat, P., Yuthavong, Y. and Panyim, S. (1985) Cloning of repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* and its use in strain and species identification. Mahidol University Annual Research Abstracts, 12, 250.

Intapruk, C. (1985) in Manual for national laboratory workshop "DNA cloning techniques" (in Thai) to be published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Ministry of Science and Technology, 172-188.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradabkul, S., Sertsrivanich, R., Panyim, S., Yuthavong, Y. (1985) Recombinant DNA techniques as potential diagnostic means. Ann. Ist. Super. Sanita. 21, 299-305.

Sriroongrueng, W. and **Intapruk, C.** (1989) The prenatal diagnosis of thalassemias (in Thai). Songkla Med J. 6, 428-435.

Intapruk C, Higashimura N, Yamamoto K, Okada N, Shinmyo A and Takano M (1991) Nucleotide sequences of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana*. Gene 98: 237-241.

Intapruk C, Yamamoto K, Fujiyama K, Shinmyo A and Takano M (1993) Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana*. J Ferment Bioeng 75: 166-172.

Shinmyo A, Fujiyama K, Kawaoka A and **Intapruk C** (1993) Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. *In*: KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds, Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology. Univ Geneva, Switzerland, pp 222-228.

Intapruk C, Yamamoto K, Sekine M, Shinmyo A and Takano M (1994) Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 13: 123-129.

Intapruk C, Takano M and Shinmyo A (1994) Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 104: 285-286.

Wanapu C and Shinmyo A (1996) *cis*-Regulatory of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root specific expression and responsiveness to high-salt stress. Ann New York Acad Sci. 782 (12): 107-114.

Rodtong, S.; **Wanapu, C.** and Ishizaki, A. (2000) Starch-utilizing bacteria for L-lactic acid production. The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 52.

Kanchanatawee S., **Wanapu, C.** and Ketudat-Cairns, M. (2000) Biotechnology postgraduate program in Thailand. Thai J. Biotechnol. 2, 55-62.

Sripo, T., Phongdara, A., **Wanapu, C.** and Caplan, A.B. (2002)Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. J. Biotech. 95, 171-179.

Kuapunyakoon, T. and **Wanapu, C.** (2003) Effects of diammonium phosphate (DAP) supplementation on growth rate and ethanol production of *Saccharomyces cereviseae* K1-V1116 in tamarind wine. Suranaree J. Sci. Technol. 10: 147-151.

Sripunya, P., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of β-glucosidase enzyme in Saccharomyces cerevisiae on Aroma production during mango (Chok-anan) wine fermentation. Thai J. Biotechnol. 6: 50-56.

Usansa, U., Sompong, N., **Wanapu, C.**, Boonkerd N. and Teaumroong **N.** (2009) The influences of steeping duration and temperature on the α- and β- amylase activities of six Thai rice malt cultivars (*Oryza sativa* L. indica). J. Inst. Brew. 105 (2) (in press).

Usansa, U. Burberg, F., Geiger, E., Back, W., **Wanapu, C.**, Arendt, K. E., Kreisz, S.,Teaumroong, N. and Zarnkow, M. (2009). Optimization of maltingc for two black rice varieties, Black non-waxy rice and Black waxy rice (*Oryza sativa* L. Indica). J. Inst. Brew. (submitted).

Wanapu, C., Boonkerd, N. and Sripunya, P. (2009) Purification and Characterization of β-glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* lead to an increase in the aroma of wine. (Submitted).

Symposium:

Krongjai, T. and **Wanapu, C.** (2004) The transformation of chitinase gene into grape plants. The 4th National Symposium on Graduate Research. 94.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd. N. (2004) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. The 4th National Symposium on Graduate Research. 124.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2004) Selection of maolactic bacteria for wine fermentation. The 4th National Symposium on Graduate Research. 128.

Kuapunyakoon, T., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N. and Chervin,C. (2004) What is the gene which expression depends ethylene receptor inhibition in berry of Carbernet Sauvignon at veraison. The 4th National Symposium on Graduate Research. 93.

Cheunkum, O. and **Wanapu, C.** (2002) Production of Lactic acid from cassava solid waste.The 3rd National Symposium on Graduate Research.633-634.

Sripunya, P. and **Wanapu, C.** (2005) Selection of Yeast Strains Containing β-glucosidase for improving Aroma in Grape Wine. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0100.

Tasing, K., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N., Wongkaew, S. (2005) Transformation of grape calli variety shiraz with Leucaena chitinase cDNA. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0109.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2005) Selection of malolactic bacteria for wine fermentation. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0116.

Lertpinyochaithaworn, N., Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2005) Ma-Maow wine production. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0139.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, F0028.

Wanapu, C., Rattana, P., Teaumroong, N. and Boonkerd, N. (2005) Success stories of stainable factory Management for the Thai traditional alcoholic beverage enterprises. In International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-3: 1-8.

Boonkerd N., Teaumroong, N., **Wanapu C.** and Chankhun Y. (2005) Application of Bio and Bioorganic fertilizers in organic farming systems for sustainable agriculture. In International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-4: 1-7.

Muaenjang, T. and **Wanapu, C.** (2006) The study of ethanol production of thermotolerant yeast S1 strain. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.

Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2006) Isolation and classification of thermotolerant yeast for ethanol production. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.

Wasuwan, R., Boonkerd, N. and **Wanapu, C.** (2006) Classification and nitrogen fixation efficiency analysis of *Azolla* species in rice fields of Thailand. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.

Usansa, U., Wanapu, C. and N. Boonkerd (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand, Chaing Mai, 2005.

Usansa U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C.** Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2008) The use of response surface methodology to optimize malting conditions of two black rice varieties (*Oryza sativa* L. indica) as a raw material for gluten- free foods. First International Symposium on Gluten-Free Products and Beverages, Cork, Ireland, September 2008.

Usansa, U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C.** Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2009) The optimization of malting condition for Thai rice. 10th RGJ- Congress. Pattaya, April 2009.

Usansa, U, Geiger, E., **Wanapu, C.** and Teaumroong, N. (2009) Improvement of nitrogenous content in wort produced from rice malt. ASBC Annual Meeting. Arizona, USA June 6-10, 2009.

Patents: 2 Thai patents

Current Research Works:

1. Organic and Bioorganic Fertilizers Production.
2. The Bioprocess Control of Microbial Alginates for Industrial Production.
3. Composition of Biopolymer and Filmogenics.
4. Improvement of Bioethanol Production by Using Thermotolerant Yeasts and Bioconversion.
5. Thai Rice Beer Production.