ครองใจ ตะสิงห์ : การส่งถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่แคลลัสขององุ่น (THE TRANSFORMATION OF GRAPE CALLUS WITH CHITINASE GENE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนภู, 70 หน้า. ISBN 974-533-437-5

ปลายยอดขององุ่นสายพันธุ์ชีราสถูกเพาะเลี้ยงลงในอาหาร IM1, IM2 และ อาหารMM โดยเพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมน BAP (4.4 ไมโครโมลาร์, 8.8 ไมโครโมลาร์ และ 13.2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ) พร้อมกับฮอร์โมน NAA ที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ ยอดขององุ่นจำนวนมากถูกชักนำให้เกิดขึ้นภายใน 90 วัน ยอดและรากถูกชักนำโดยฮอร์โมน NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ ฮอร์โมน Kinetin ที่ความเข้มข้น 0.9 ไมโครโมลาร์ ของอาหาร MS แล้วย้ายต้นองุ่นนี้ลงในกระถางเพื่อใช้สำหรับการขยายพันธุ์ต่อไป ยีนไคติเนสจากกระถินบ้านที่อยู่ในพลาสมิด pUC19 ถูกโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pET-39b(+) ตรงตำแหน่ง *Eco*RI จากนั้นยีนไคติเนสที่มีขนาด 1.1 กิโลเบส ถูกตัดที่ตำแหน่ง *SacI* และ *Bam*HI เพื่อโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pBI121 โดยนำเข้าไปแทนที่ยีน GUS จากนั้นจึงนำ pBI121: ไคติเนสนี้เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ด้วยวิธี Electroporation แล้วถ่ายโอนยีนนี้เข้าสู่องุ่นสายพันธุ์ชีราส โดยวิธี *Agrobacterium*-mediated transformation ใบองุ่นที่มี *Agrobacterium* ถูกเลี้ยงบนอาหารสูตร NN ที่มีฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์ และ ฮอร์โมน 4-CPPU ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์ นาน 2 วันในที่มืด แล้วจึงย้ายลงในอาหารสูตรเดียวกันนี้ที่มีสารปฏิชีวนะ ชนิด carbenicillin ความเข้มข้น 250 มก./ล. และ cefotaxime ความเข้มข้น 250 มก./ล. เพื่อกำจัด *Agrobacterium* จากนั้นคัดเลือกแคลลัสในอาหารสูตรเดิมแต่เพิ่มสารปฏิชีวนะชนิด kanamycin ความเข้มข้น 100 มก./ล. เข้ามาในอาหาร จากการทดสอบการถ่ายยีนด้วยการตรวจสอบยีนไคติเนสขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส และยีน NPTII ขนาด 0.8 กิโลเบส พบทั้งสองยีนนี้ในแคลลัสขององุ่นที่ถูกถ่ายยีน ชี้ให้เห็นว่าได้แคลลัสขององุ่นที่มียีนไคติเนสของกระถินบ้าน นอกจากนี้ เอนไซม์สกัดของกระถินบ้านสามารถทำลายสปอร์ของเชื้อรา *Plasmopara viticola* ได้สูงถึง 55%

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

KRONGJAI TASING : THE TRANSFORMATION OF GRAPE CALLUS WITH CHITINASE GENE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHOKCHAI WANAPU. Ph.D. 70 PP. ISBN 974-533-437-5

CALLUS /CHITINASE/ GRAPE /TRANSFORMATION/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 *Agrobaterium* 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%.

School of Biotechnology
Academic Year 2005

Student's Signature Krongjai Tasing
Advisor's Signature
Co-advisor's Signature
Co-advisor's Signature