

วิจิตร ไขบุญ 2554: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม การสร้างจีโนมย่อ และการทดสอบการก่อโรคของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ สายพันธุ์สมุทรสาคร (PRSV-SMK) ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ศรีเมธ ขาวโพธิ์, Ph.D. 217 หน้า

เชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างจุดวงแหวนคือ เชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) เป็นเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus มี 2 biotype คือ PRSV-W เข้าทำลายพืชตระกูลแตงเท่านั้น และ PRSV-P เข้าทำลายได้ทั้งมะละกอและพืชตระกูลแตง PRSV เป็นไวรัสที่มีจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยวชนิด + ขนาด 10,323 นิวคลีโอไทด์ เป็นสาเหตุโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงถึง 100% มาตรการการควบคุมโรคทำได้โดยกำจัดต้นที่เป็นโรค และกำจัดแมลงที่เป็นพาหะโรคกลุ่มเพลี้ยอ่อนนั้นไม่ได้ผล และไม่มียีนต้านทานโรคนี้ในมะละกอที่ปลูกเป็นการค้า การใช้มะละกอดัดแปรพันธุกรรมยังไม่เป็นที่ยอมรับ การใช้เชื้อสายพันธุ์ PRSV ที่อ่อนกำลังเพื่อควบคุมโรคยังไม่มีประสิทธิภาพเนื่องจากสายพันธุ์มีความต่างกันในแต่ละพื้นที่ ดังนั้นการสร้าง infectious clone ที่รวดเร็วจะเป็นการผลิตเชื้ออ่อนกำลังที่เหมาะสมแต่ละพื้นที่ และนำไปสู่การควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้ทำการโคลนจีโนมของ PRSV-P จากสายพันธุ์สมุทรสาคร (SMK) โดยใช้ชุด RNeasy kits ของ Qiagen และสังเคราะห์ cDNA ด้วยชุด Omniscript (Qiagen) โดยใช้ reverse ไพรเมอร์ T26-3UTR2 ได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมของ PRSV-P จากฮาวาย (X67673), ใต้หวัน (X97215) และไทย (AY162218) เพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เต็มจีโนมโดยใช้ ไพรเมอร์ 7 คู่ จะได้ผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 7 ชิ้น ครอบคลุมทั้งจีโนม ซึ่งจะมีขนาดตั้งแต่ 500 ถึง 2,700 คู่เบส ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แต่ละชิ้นเชื่อมต่อเข้ากับโคลนนิงเวกเตอร์ แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าจีโนม PRSV-SMK มีขนาด 10,323 คู่เบส ที่แปลรหัสโพลีเปปไทด์ 3,343 กรดอะมิโน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ มีความคล้ายคลึง 83-89 เปอร์เซ็นต์ และลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึง 90-93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่มีรายงานบนฐานข้อมูล GenBank 12 accessions การสร้าง infectious clone ของ PRSV-SMK แบ่งเป็น 3 โคลนย่อย (subgenome 1; P1, HC-Pro, subgenome 2; P3, 6K1, CI, 6K2 และ subgenome 3; VPg, NIa, NIb, CP) โดยแต่ละโคลนจะมี T7 Promoter, 5'UTR, ยีนของไวรัสที่แบ่งเป็น 3 ชิ้น และ 3'UTR โดยที่ T7 promoter เป็นตัวขั้วยีนเพื่อสร้าง RNA transcript ในหลอดทดลองนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปร่วมปลูกถ่ายกับเชื้อ PRSV-SMK ในต้นกล้ามะละกอเพื่อทดสอบความสามารถในการทิวจีโนมย่อในต้นมะละกอ