บทคัดย่อ

T164759

ไวรัสโรคใบด่างจุดวงแหวนเป็นสาเหตุของโรคระบาดร้ายแรงในมะละกอ การควบคุมโรคด้วยวิธีดั้งเดิมไม่ประสบความสำเร็จ มีเพียงวิธีการสร้างมะละกอโดยวิธีทางพันธุกรรมวิศวกรรม เท่านั้นที่สามารถสร้างมะละกอต้านทานต่อไวรัสนี้ได้ คณะผู้วิจัยได้นำยีนสร้างโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสของไวรัสนี้เข้าสู่มะละกอแขกดำ พบว่ามีมะละกอดัดแปรพันธุกรรม 4 สายพันธุ์ (G2, G3, G5 และ T3) จาก 11 สายพันธุ์ (G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6 และ T7) สามารถต้านทานไวรัสนี้ได้ ในการวิจัยนี้จึงทำการศึกษาวิธีการป้องกันมะละกอจากโรคใบด่างจุดงวงแหวนโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม เพื่อให้สามารถเข้าใจกลไกการต้านทานไวรัสและนำไปใช้พัฒนาวิธีการป้องกันไวรัสให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

การตรวจวิเคราะห์ยีนสร้างโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี *Southern blot* และ PCR พบว่ามีการจัดเรียงตัวใหม่เกิดขึ้นภายในชุดของยีนสร้างโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสในมะละกอต้านทานไวรัสทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยมีการแทรกตัวของชิ้นส่วนของพลาสมิด pSA1006, การแทรกตัวของดีเอ็นเอของพืช, การเรียงตัวใหม่ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสและยีนรายงาน *uidA* และมียีนสร้างโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสหลายชุด บางชุดมีส่วนที่ขาดหายไปไม่สมบูรณ์ และการเรียงตัวแบบกลับกันของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ซึ่งการจัดเรียงตัวที่มีลักษณะแบบกลับกัน ของยีนไวรัสโปรตีนเปลือกหุ้มที่ถ่ายฝากอาจจะมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดกลไกการต้านทาน ไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมได้ จากการตรวจสอบโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Pac* I และ *Stu* I พบการแทรกตัวของยีนสร้างโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสในดีเอ็นเอมะละกอเป็นชิ้นใหญ่ชิ้นเดียวมีขนาดใหญ่กว่า 23 กิโลเบส ซึ่งแสดงว่าการแทรกตัวของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสน่าจะเกิดขึ้นที่ตำแหน่งเดียว การตรวจสอบความต้านทานไวรัสและการแทรกตัวของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอรุ่น R1 และ R2 ของมะละกอสายพันธุ์ G2 พบว่ามีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปยังมะละกอรุ่นต่อๆไป และพบว่ามีรูปแบบการเรียงตัวของยีนเหมือนรุ่น R0

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *cp* โดยวิธี RT-PCR, northern blot และ western blot analyses พบว่ามะละกอต้านทานไวรัส ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ และตรวจพบการสร้าง siRNAs จากยีน *cp* ซึ่งบ่งชี้ว่าความต้านทานไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม น่าจะเกิดจากกระบวนการหยุดยั้งการทำงานของยีน กระบวนการนี้ทำให้มะละกอต้านทานไวรัสได้ดี แต่มีความจำเพาะสูง เนื่องจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสามารถต้านทานกับไวรัสที่ระบาดที่จังหวัด ราชบุรีและบางจังหวัดเท่านั้น ไม่สามารถต้านทานกับไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่พบระบาดในทุกแหล่งได้ การศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสและยีนสร้างโปรตีน *Helper component* พบว่าไวรัสที่มีความคล้ายกันของยีนทั้งสองในระดับ 95-97% และ 93-95% สามารถเอาชนะความต้านทานไวรัส และก่อโรคได้

Abstract

TE164759

Papaya ringspot virus (PRSV) causes a serious disease in papaya (*Carica papaya* L.). The conventional methods failed to control PRSV infection. Only genetically engineered papayas of which transformed with PRSV *cp* gene can confer resistance against PRSV. In our previous work we transformed Khak Dum papaya with the plasmid containing the *cp* gene isolated from PRSV Ratchaburi isolate. Four (G2, G3, G5 and T3) out of eleven transgenic papaya lines (G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6 and T7) showed resistance against PRSV. In this work we analyzed the *cp* transgene in these transgenic papayas and studied the mechanism of PRSV resistance in these transgenic plants. We aimed to study the correlation between PRSV resistance and transformed *cp* gene in transgenic papaya, in order to understand the resistant mechanism which can be used for development of an effective method for protecting the plant against PRSV.

The *cp* gene in transgenic papayas was analyzed by Southern blot and PCR technique. The results showed extensive rearrangement of DNA within the CP cassette in the genome of the all four PRSV resistant transgenic papaya lines. It comprised of an insertion of plasmid vector pSA1006 backbone, insertion of plant genomic DNA sequences, and rearrangement of the *cp* and *uidA* transgenes. The rearrangement includes the deletion and insertion of the *cp* gene in the inverted repeat manner. This rearranged *cp* gene in the inverted repeat manner may trigger the resistant mechanism against PRSV in transgenic papayas. Restriction analysis of *cp* transgene integration using *Pac* I and *Stu* I restriction enzymes exhibited a single band of DNA over 23 kb in size. It was implied that the integration of *cp* transgene might occur at a single genetic locus in the papaya genome of the transgenic papayas. Analysis of the PRSV resistance and *cp* transgene insertion in transgenic papaya line G2 progenies (R1 and R2) revealed the inheritance to the next generation. The *cp* transgene insertion in G2 progenies showed identical band pattern as in the R0 plants.

Determination of *cp* gene expression in transgenic papayas by RT-PCR amplification, northern blot and western blot analyses revealed that all four resistant transgenic papaya lines express very low level of the *cp* gene. The detection of high level of short interfering RNAs (siRNAs) of the *cp* transgene in all four resistant transgenic papaya lines indicated the gene silencing-mediated virus resistance conferred by the *cp* transgene. This process generates efficient PRSV resistance in transgenic papaya in a high specific manner. These transgenic papayas are highly resistance to PRSV Ratchaburi isolate and some other PRSV isolates but not all. The comparison of the *cp* and *Hc-Pro* genes from several PRSV isolates from different parts of Thailand showed that PRSV isolate with sequence similarity of 95-97% in *cp* gene and 93-95% of the *Hc-Pro* genes can break down the resistance in transgenic papaya.