



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การป้องกันมะละกอจากโรคใบด่างจุดวงแหวนโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม”

“Protection of papaya against detrimental effect of papaya ringspot virus
by genetic engineering”

โดย นางสาวสุณี เกิดบัณฑิต และคณะ
สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

16 พฤษภาคม 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การป้องกันมะละกอจากโรคใบด่างจุดวงแหวนโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม”

“Protection of papaya against detrimental effect of papaya ringspot virus

by genetic engineering”

คณะผู้วิจัย

1. นางสาวสุณี เกิดบัณฑิต
2. Dr. Miloslav Juricek
3. นางสาวพงโสภี อุตศาสตร์
4. นางนวลวรรณ พึ่งถนอม

สังกัด: สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive Summary

Papaya (*Carica papaya* L.) is one of the important fruit crop in Thailand. However, a destructive disease caused by papaya ringspot virus (PRSV) is a major limiting factor for commercial production of papaya. The papaya production drastically decreased from 5,807 tons in 1989 to 34 tons in 1998 as a result of PRSV infection. The major cultivars of papaya grown in Thailand, Khak Dum and Khak Nuan are very susceptible for this virus. The infected area increased each year and it is now endemic throughout Thailand.

Papaya ringspot virus (PRSV) is a positive single stranded RNA virus in potyvirus group. The virions are flexuous, filamentous particles of 780x12 nm. The infected papaya plants show a range of symptoms: yellowing and vein-clearing of younger leaves, yellow mottling of the leaves, one or more lobes of infected leaves may become severely distorted and narrow, ringed spot on the fruit and dark green streaks may develop on the petioles and stems. Infected papaya plants show reduction in both quality and quantity of fruit production. Several techniques have been previously applied to control the disease in Thailand including mild strain cross protection and conventional breeding programs. However these techniques were not successful.

The pathogen derived resistance technique (PDR) has been used successively to produce transgenic plants resistant to viruses (Balcombe, 1996, Beachy, 1997). This technique was used to produce transgenic papaya resistant to PRSV (Fitch *et al*, 1990; Fitch *et al*, 1992, Cabrera-Ponce *et al*, 1995; Yang *et al*, 1996, Cheng *et al*, 1996). Transgenic plants of papaya cultivar "Sunset" containing the coat protein gene (*cp* gene) of mild strain HA 5-1 of PRSV isolate Hawaii showed resistance to the severe strain of PRSV isolated from Hawaii (HA) but not to PRSV isolated from Thailand and other countries (Tennant *et al*, 1994). For the research concerns with papaya ringspot virus at the Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, we compared the sequences of the coat protein gene and the 3' non-translated region of papaya ringspot virus isolates from Thailand and other countries (Kertbundit *et al*, 1998). We found very high degree of similarity among PRSV Thai isolates (95-99%) and 91% similarity with PRSV Hawaiian isolate. The high variability in the N terminus may play an important role in overcoming CP mediated resistance against PRSV generated by Hawaiian strain HA5-1.

In our previous work, we successfully used the coat protein gene of one PRSV Thai isolate Ratchaburi to generate transgenic papaya. Four of eleven transgenic papaya lines bearing the *cp* gene obtained from our experiments are resistant to PRSV. In this work these transgenic papayas had been analyzed in detail to gain the more information of resistance conferred by the *cp* transgene. The virus resistance is inherited to the next generation of transgenic papaya. The analysis of the coat protein insertion and expression in these PRSV resistant papayas revealed that the *cp* gene was integrated into the plant genome as rearrangement multiple copies in one loci. The rearrangement *cp* transgene triggers the gene silencing process in transgenic papayas and diminishes the transcription and expression of the *cp* transgene and generates the PRSV resistance. However this resistance in these transgenic papayas is very high specific. The transgenic papayas are resistance to some of PRSV isolates but not all. The sequence comparison of the *cp* gene

and the *Hc-Pro* of some PRSV isolates demonstrated that the PRSV isolates that can break down the resistance have sequence similarity of 95-97% in *cp* gene and 93-95% of the *Hc-Pro*. The *cp* genes of PRSV Khon Khan and Chumporn isolates were used to develop more transgenic papaya resistance to PRSV. The results from this study provide us more information of the use of genetic engineering to generate transgenic papaya resistance to PRSV which will be very useful to improve and maintain high the resistance ability of transgenic papaya in the future.

Abstract

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.

บทคัดย่อ

ไวรัสโรคใบด่างจุดวงแหวนเป็นสาเหตุของโรคร้ายแรงในมะละกอ การควบคุมโรคด้วยวิธีดั้งเดิมไม่ประสบความสำเร็จ มีเพียงวิธีการสร้างมะละกอโดยวิธีทางพันธุกรรมวิศวกรรม เท่านั้นที่สามารถสร้างมะละกอด้านทานต่อไวรัสนี้ได้ 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 ในการวิจัยนี้จึงทำการศึกษาวิธีการป้องกันมะละกอจากโรคใบด่างจุดวงแหวนโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม เพื่อให้สามารถเข้าใจกลไกการต้านทานไวรัสและนำไปใช้พัฒนาวิธีการป้องกันไวรัสให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

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

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

บทนำ

ความสำคัญของมะละกอและโรคใบด่างจุดวงแหวน

มะละกอเป็นพืชที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเป็นไม้ผลที่สามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคในประเทศ ผลสามารถใช้รับประทานได้ทั้งผลดิบและผลสุก แหล่งเพาะปลูกใหญ่เพื่อการค้าและอุตสาหกรรม ได้แก่ ราชบุรี นครปฐม ชุมพร สุราษฎร์ธานี กระบี่ จันทบุรีและสระแก้ว จากข้อมูลของกองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร ปี 2541 รายงานว่าในประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกมะละกอทั้งสิ้น 170,753 ไร่ ผลผลิตรวม 367,861 ตัน โดยมะละกอพันธุ์แขกดำมีผลผลิตมากที่สุด (61.20%) แขกนวล (22.83%) และพันธุ์อื่นๆ (15.97%) ผลผลิตมะละกอส่วนใหญ่นอกจากใช้บริโภคภายในประเทศแล้ว ยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญของ อุตสาหกรรมแปรรูป เพื่อนำไปผลิตเป็นมะละกอบรรจุกระป๋อง มะละกอบแห้ง และใช้เป็นส่วน ประกอบที่สำคัญของฟรุทสลัด ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกฟรุทสลัดที่สำคัญรายหนึ่ง ของโลก ข้อมูลของกรมเศรษฐกิจการพาณิชย์ในปี 2540 รายงานมูลค่าการส่งออกมะละกอ และผลิตภัณฑ์รวมประมาณ 30.4 ล้านบาท (ไม่รวมส่วนของมะละกอ ที่อยู่ในฟรุทสลัด) ถ้าคิดส่วนของมะละกอที่ใช้ผสมอยู่ในฟรุทสลัด ซึ่งมีส่วนผสมอยู่ประมาณ 20% จากมูลค่าส่งออกฟรุทสลัดทั้งสิ้น 979.4 ล้านบาท จะคิดเป็นส่วนของมะละกามีมูลค่า 195.88 ล้านบาท รวมทั้งสิ้นจะมีมูลค่าการส่งออกมะละกอทั้งหมดประมาณ 226.3 ล้านบาท

ถึงแม้ว่ามะละกอจะเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญดังกล่าว แต่ในปัจจุบันพบว่ามีโรคระบาดที่สำคัญ คือ โรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวน ซึ่งเกิดจากไวรัส papaya ringspot virus (PRSV) โรคนี้พบระบาดรุนแรงในทุกภาคของประเทศไทยที่มีการปลูกมะละกอ โรคระบาดนี้ได้ทำลายผลผลิตมะละกอในประเทศ ทำให้ปริมาณลดลงและมีคุณภาพต่ำไม่สามารถส่งผลผลิตออกจำหน่ายในตลาดต่างประเทศได้ ปริมาณการส่งออกมะละกอของประเทศไทยลดลงอย่างชัดเจน ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 เป็นต้นมา (ตารางที่ 1)

Year	Exports (Mt)	Exports (Val 1000\$)
1985	5,807	2720
1986	3,766	870
1987	4,179	971
1988	4,132	1,002
1989	1,235	334
1990	247	86
1991	89	37
1992	75	58
1993	94	61
1994	355	89
1995	8	10
1996	5	8
1997	34	31
1998	34	31

ตารางที่ 1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกมะละกอของประเทศไทย ปี 1985-1998
(ข้อมูลจาก FAOSTAT)

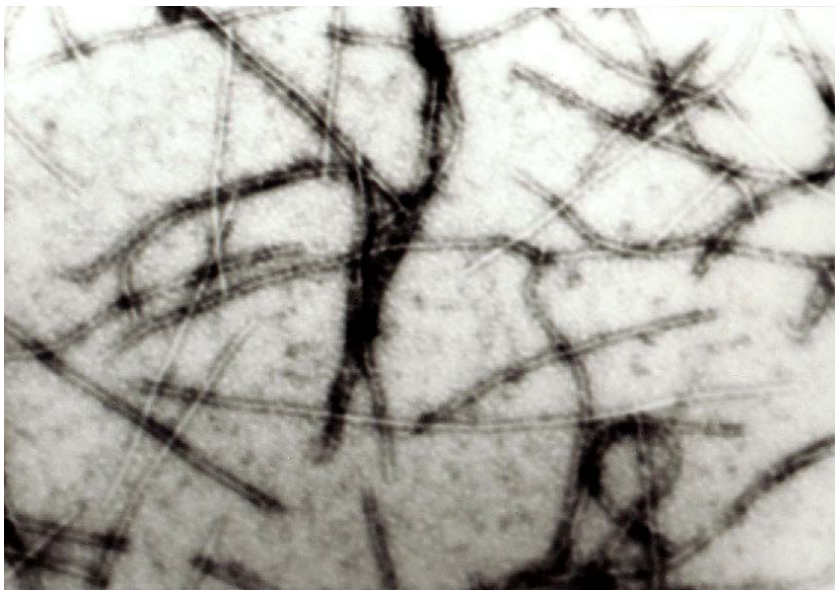
โรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอ

เกิดจากไวรัส papaya ringspot virus (PRSV) สามารถแพร่ระบาดโดยมีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ ไวรัสนี้สามารถเข้าทำลายมะละกอได้ทุกระยะ ตั้งแต่ในระยะที่เป็นต้นอ่อนจนถึงระยะที่มะละกอเติบโตเต็มที่ อาการเริ่มแรกของโรคจะเห็นชัดที่ใบมีลักษณะของใบด่าง หักงอผิดรูปร่าง มีขีดซ้ำๆตามลำต้น ถ้ามะละกอเป็นโรคในระยะที่เป็นต้นอ่อน จะมีอาการรุนแรงมาก ต้นจะแคระแกรน ไม่ติดผลเลย ถ้ามะละกอเป็นโรคในระยะต้นโต มะละกอสามารถให้ผลได้ แต่จะทำให้ปริมาณผลผลิตและคุณภาพของมะละกอลดลงเป็นอย่างมาก เนื่องจากที่ผลมะละกอจะมีรอยขีดเป็นวงแหวนไปทั่วทั้งผล เนื้อในจะแข็งกระด้าง เมื่อมะละกอสุกบริเวณรอยขีดดังกล่าวจะมีเนื้อเป็นไต แข็ง มีรสขม ขายไม่ได้ราคา

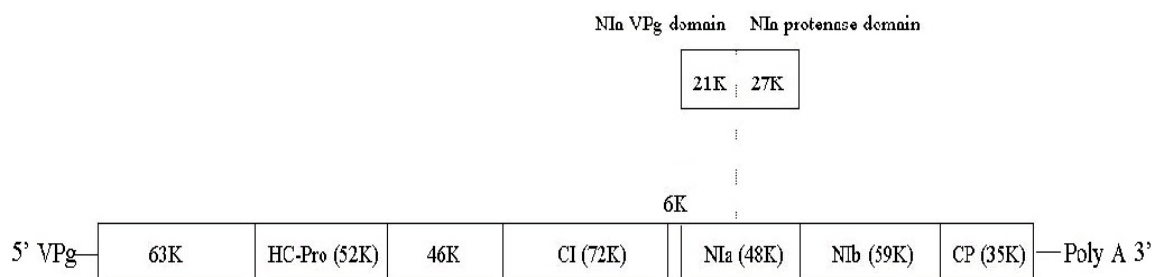


รูปที่ 1 และ 2 ลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับใบและผลของมะละกอที่เป็นโรคใบด่างจุดวงแหวน

ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอ หรือ PRSV จัดอยู่ในกลุ่มของ potyvirus ซึ่งเป็นไวรัสกลุ่มใหญ่ที่สุดที่ก่อโรคในพืช ลักษณะของไวรัสนี้เป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) มีขนาดประมาณ 780x12 nm. และมีลักษณะบิดคด เป็นเกลียว (flexuous) มีความยาวของจีโนมประมาณ 10 kb การแปลรหัสโปรตีนของไวรัสจะแปลเป็นโปรตีนเดี่ยวเส้นยาว (polyprotein) ซึ่งจะถูกย่อยออกเป็นโปรตีนย่อยอีกหลายชนิด รวมทั้ง helper component protein, replicase และ coat protein (โปรตีนเปลือกไวรัส) ด้วย



รูปที่ 3. รูปร่างของไวรัส PRSV เมื่อดูด้วยกล้อง transmission electron microscope (40,000x)



รูปที่ 4. จีโนมของไวรัส PRSV ประกอบด้วย VPg-5' leader-63K (NT)-52K (HC-Pro)-46K-72K (CI)-6K-48K (Nla)-59K (Nlb)-35K (coat protein)-3' non coding region-poly(A) tract

การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการสร้างมะละกอข้ามสายพันธุ์ (transgenic papaya) ต้านทานโรคไวรัส

มีรายงานการวิจัยพบว่าการใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ตัดต่อยีนของไวรัสใส่เข้าไปในพืช ทำให้สามารถสร้างพืชตัดแปรพันธุกรรม(transgenic plant) ที่ต้านทานไวรัสได้ ยีนของไวรัส ที่ใช้ตัดต่อใส่เข้าไปในพืชมีหลายยีน เช่น ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (coat protein : CP), ยีนสร้าง cytoplasmic inclusion protein (CI) และยีนถ่ายแบบ (replicase gene) เทคนิคในการตัดต่อยีนไวรัสใส่เข้าไปในพืช เพื่อสร้างพืชต้านทานไวรัสนี้ เรียกว่า pathogen derived resistance (PDR) กลไกในการต้านทานไวรัสโดยวิธีนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในระดับของการสร้างโปรตีน (protein mediated) และในระดับของการสร้างอาร์เอ็นเอ (RNA mediated or gene silencing) โดยในระดับของการสร้างโปรตีนจะมีการสร้างโปรตีนจากยีนไวรัสที่ใส่เข้าไปในเซลล์ซึ่งโปรตีนนี้จะรบกวนขบวนการแบ่งตัวของไวรัสเมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์ ทำให้ไวรัสไม่สามารถแบ่งตัวแล้วทำให้เกิดโรคได้ การสร้างความต้านทานไวรัสในระดับของการสร้างอาร์เอ็นเอเกิดขึ้นจากการสร้างอาร์เอ็นเอจากยีนของ ไวรัสที่ใส่เข้าไปในเซลล์พืช อาร์เอ็นเอที่สร้างขึ้นจะมาจับกับยีนของไวรัสที่เข้าสู่เซลล์แล้วเกิดการเหนี่ยวนำ ให้มีการทำลายยีนที่จับกับอาร์เอ็นเอดังกล่าว กลไกการต้านทานโดยวิธี RNA mediated นี้ จะมีความจำเพาะสูงกับลำดับเบสของไวรัส (for reviews see Balcombe, 1996, Beachy, 1997)

มีการนำวิธี PMD มาใช้ในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานโรคไวรัสใบด่าง จูดวงแหวน (Fitch, *et al*, 1992, 1993) โดยทำการตัดต่อยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากจีโนมของ ไวรัสใบด่างจูดวงแหวนสายพันธุ์ฮาวายใส่เข้าไปในพลาสมิดพาหะ (vector) แล้วนำพลาสมิดที่มียีน ของไวรัสใส่เข้าไปในมะละกอสายพันธุ์ฮาวาย พบว่ามะละกอข้ามสายพันธุ์ที่ได้จากการทดลองสามารถ ต้านทานไวรัสใบด่างจูดวงแหวนสายพันธุ์ฮาวายได้ กลไกการต้านทานต่อไวรัสใบด่างจูดวงแหวน ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แต่ความต้านทานที่เกิดขึ้นนี้มีความจำเพาะสูงกับสายพันธุ์ของไวรัส กล่าวคือ มะละกอที่ได้สามารถต้านทานเฉพาะกับไวรัสชนิดที่ใช้นามาสกัดยีนใส่เข้าไปในมะละกอเท่านั้น ไม่ สามารถต้านทาน

ต่อไวรัสใบด่างจูดวงแหวนที่พบระบาดในที่อื่นๆ ได้ ดังนั้นมะละกอที่ได้รับยีน สร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจูดวงแหวนสายพันธุ์ฮาวาย จึงไม่สามารถต้านทานต่อไวรัสใบด่าง จูดวงแหวนที่พบระบาดในประเทศไทยได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมามะละกอด้านทานไวรัสที่ได้จาก ฮาวายมาใช้ปลูกในประเทศไทยเพื่อช่วยแก้ปัญหาโรคไวรัสใบด่างจูดวงแหวนในประเทศไทยได้

สำหรับการวิจัยในส่วนของมหาวิทยาลัยมหิดล ได้เริ่มดำเนินการศึกษาเกี่ยวกับไวรัส ใบด่างจูดวงแหวนเพื่อให้ได้ข้อมูลรายละเอียดที่ถูกต้องตั้งแต่ในระดับพื้นฐานไปจนถึงการนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันมะละกอจากโรคไวรัส โดยในขั้นต้นได้เริ่มทำการศึกษา ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ของไวรัสใบด่างจูดวงแหวนที่พบระบาดในแหล่งเพาะปลูกภาคต่างๆ ในประเทศ ได้แก่ ราชบุรี ขอนแก่น ชุมพร เชียงใหม่ ชลบุรี พบว่ายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจูดวงแหวน ที่พบระบาดในประเทศไทยมีความคล้ายคลึงของลำดับเบส (sequence identity) สูงประมาณ 95%-99% และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจูดวงแหวนที่มี รายงานจากประเทศอื่นๆ พบว่ามีความแตกต่างจากที่พบในสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลียและเวียดนาม ในระดับต่างกันจนถึงประมาณ 13% (Kertbundit *et al*, 1998) โดยพบว่าลำดับเบสทางปลายด้าน 5' มีความแตกต่างกันมากกว่าปลายด้าน 3' และยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสที่พบระบาด ในประเทศไทยมีกรดอะมิโนไลซีนที่ขาดหายไป 1 ตัว ทางปลายด้าน 5' สันนิษฐานว่าความแตกต่าง ของลำดับเบสทางปลายด้าน 5' นี้ อาจเกี่ยวข้องกับความจำเพาะของการใช้ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ในการต้านทานต่อไวรัส ข้อมูลที่ได้จากศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการเลือกใช้ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไวรัสมีความสำคัญมาก ความแตกต่างของ ลำดับเบสของยีนเปลือกไวรัสเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้การใช้นี้ในการป้องกันโรคไม่ได้ผล ดังนั้น มะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่สามารถต้านทานไวรัสที่ระบาดในแหล่งปลูกหนึ่งก็อาจจะไม่ต้านทานกับ ไวรัสที่พบระบาดในแหล่งอื่นที่มีความแตกต่างกัน และหากเกิดการกลายพันธุ์ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจูดวงแหวนซึ่งเป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอเส้นเดี่ยว (single stranded RNA) ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสสูงกว่าไวรัสชนิดดีเอ็นเอ (DNA virus) ก็อาจทำให้มะละกอดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไวรัสที่สร้างขึ้นไม่สามารถต้านทานกับไวรัสที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ ดังนั้นในการ สร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไวรัส นอกจากจะต้องคำนึงถึงการใช้นีสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากไวรัสที่พบระบาดในท้องถิ่นนั้นๆ แล้ว ยังจำเป็นต้องศึกษาถึงกลไกของการใช้นีสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจูดวงแหวนในการสร้างความต้านทานต่อไวรัส และศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับเบสในยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสควบคู่ไปกับการตรวจสอบความต้านทานไวรัส ในมะละกอข้ามสายพันธุ์ที่สร้างขึ้นด้วย เพื่อให้ได้ความต้านทานต่อไวรัสที่ยั่งยืน และเพื่อให้สามารถนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการป้องกันไวรัสให้ได้ผลในระยะยาว

การดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยในวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ คือ

1. การศึกษากลไกการต้านทานไวรัสโดยใช้ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส

1.1 การตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

1.2 การตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Southern Blot analysis

1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในระดับของการสร้าง อาร์เอ็นเอ (transcription) โดยวิธี RT-PCR

1.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในระดับของการสร้าง อาร์เอ็นเอ (transcription) โดยวิธี northern blot analysis

1.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยวิธี western blot analysis

1.6 การศึกษายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (coat protein gene: *cp* gene) ของไวรัสใบด่างจูดงแหวนที่พบในแหล่งปลูกมะละกอต่างๆในประเทศไทย

1.7 การศึกษายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อไวรัสจากจีโนมของ มะละกอดัดแปรพันธุกรรม

1.8 การศึกษาลำดับเบสของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่แทรกเข้าไปในจีโนมของมะละกอ ดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2

1.9 การพัฒนาพลาสมิดที่มียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่ใช้สร้างความต้านทานในมะละกอนำยีนที่สร้างขึ้นเข้าสู่มะละกอ

1.10 การศึกษาและเปรียบเทียบยีนสร้างโปรตีน Helper component (Hc-Pro) ในไวรัสใบด่าง จูดงแหวนที่ระบาดในแหล่งปลูกมะละกอ

1.11 การตรวจสอบหา samll interference RNA ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานและ ไม่ต้านทานต่อไวรัส

2. การตรวจสอบประสิทธิภาพของมะละกอในการป้องกันโรคระบาดไวรัสใบด่างจุดวงแหวน

- 2.1 การทดสอบความต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม
- 2.2 การทดสอบความต้านทานของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน สายพันธุ์ต่างๆที่เก็บจากแหล่งปลูกมะละกอในประเทศไทย
- 2.3 การทดสอบความต้านทานไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมรุ่นลูกและหลาน (R1, R2 และ R3)
- 2.4 การศึกษาการถ่ายทอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสไปยังมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่นลูกและหลาน (R1, R2 และ R3) โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)
- 2.5 การตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่นลูกและหลาน (R1, R2 และ R3) โดยใช้วิธี Southern Blot analysis
- 2.6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปร พันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R1 โดยวิธี western blot analysis
- 2.7 การตรวจสอบการสร้างโปรตีนจากยีนเปลือกไวรัสของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 โดยวิธี RT-PCR

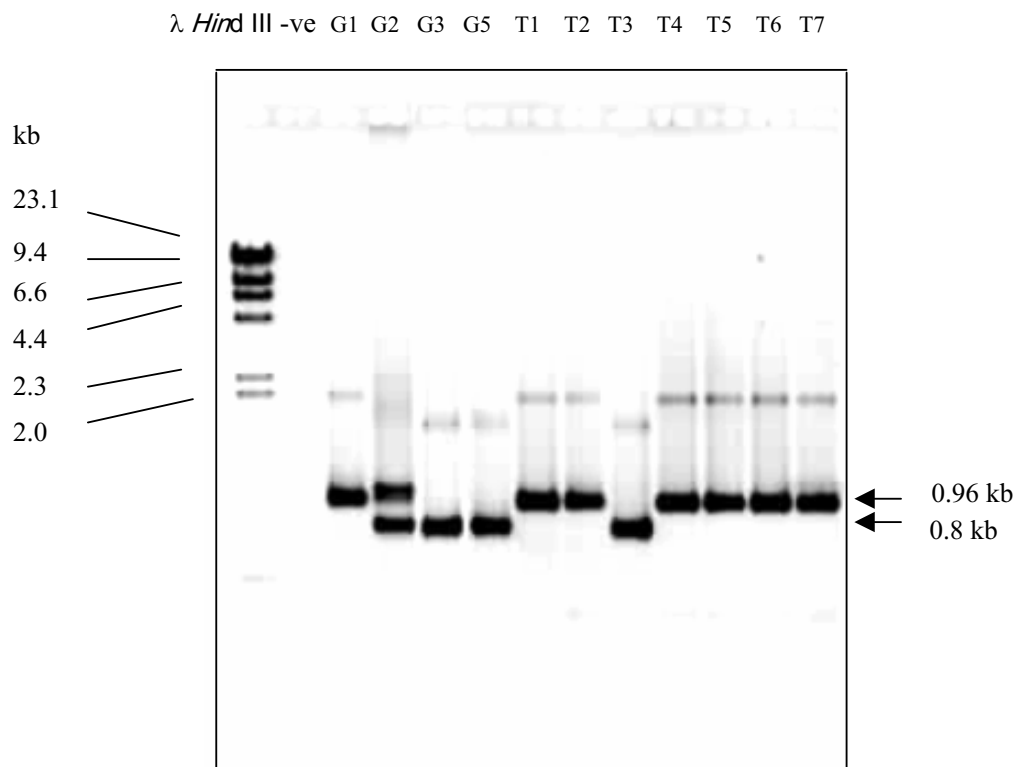
1. การศึกษากลไกการต้านทานไวรัสโดยยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส

1.1 การตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยใช้ เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ทำการสกัด DNA จากใบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 โดยวิธี CTAB method (Rogers. and Bendich., 1994) แล้วใช้ primers ที่จำเพาะกับลำดับเบส ด้านปลาย 5' และด้านปลาย 3' ของ coat protein gene (5' PRV และ 3' PRV) ทำการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสโดยใช้วิธี PCR โดยในปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 50 μ l มีส่วนประกอบ คือ DNA template จำนวน 100 ng, forward and reverse primers จำนวน 50 pmol, dNTPs mix จำนวน 200 μ M, 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM $MgSO_4$, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Triton x-100 และ 100 μ g/ml nuclease-free BSA), *Pfu* DNA polymerase จำนวน 0.5 μ l (1.5 units) และน้ำปลอด DNase นำ DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยใช้เครื่อง gene amplification system 2400 thermal cycle (Perkin-Elmer) โดยทำปฏิกิริยา 35 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที, 50°C นาน 30 วินาที และ 72°C นาน 2 min นำ DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

ผลการทดลอง

พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้งหมดมียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสแทรกอยู่ เนื่องจาก สามารถใช้ primers ที่จำเพาะ 5' PRV และ 3' PRV ทำการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีน เปลือกไวรัสได้โดยใช้วิธี PCR ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เพิ่มจำนวนได้ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, T1, T2, T4, T5, T6 และ T7 มีขนาด 0.96 kb ในขณะที่ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เพิ่มจำนวนได้ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G3, G5 และ T3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อไวรัสที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรี มีขนาด 0.8 kb และยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เพิ่มจำนวนได้ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ ที่ต้านทานต่อไวรัสที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรีเช่นกัน มี 2 ชั้น ขนาด 0.96 kb และ 0.8 kb (รูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 แสดงผลการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยวิธี PCR นำไปแยกขนาดบน 0.8 % agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 negative control ในการทำ PCR amplification (ไม่มีใส่ template)

แถวที่ 3-13 PCR amplification จาก DNA ที่สกัดจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5, T1, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 ตามลำดับ

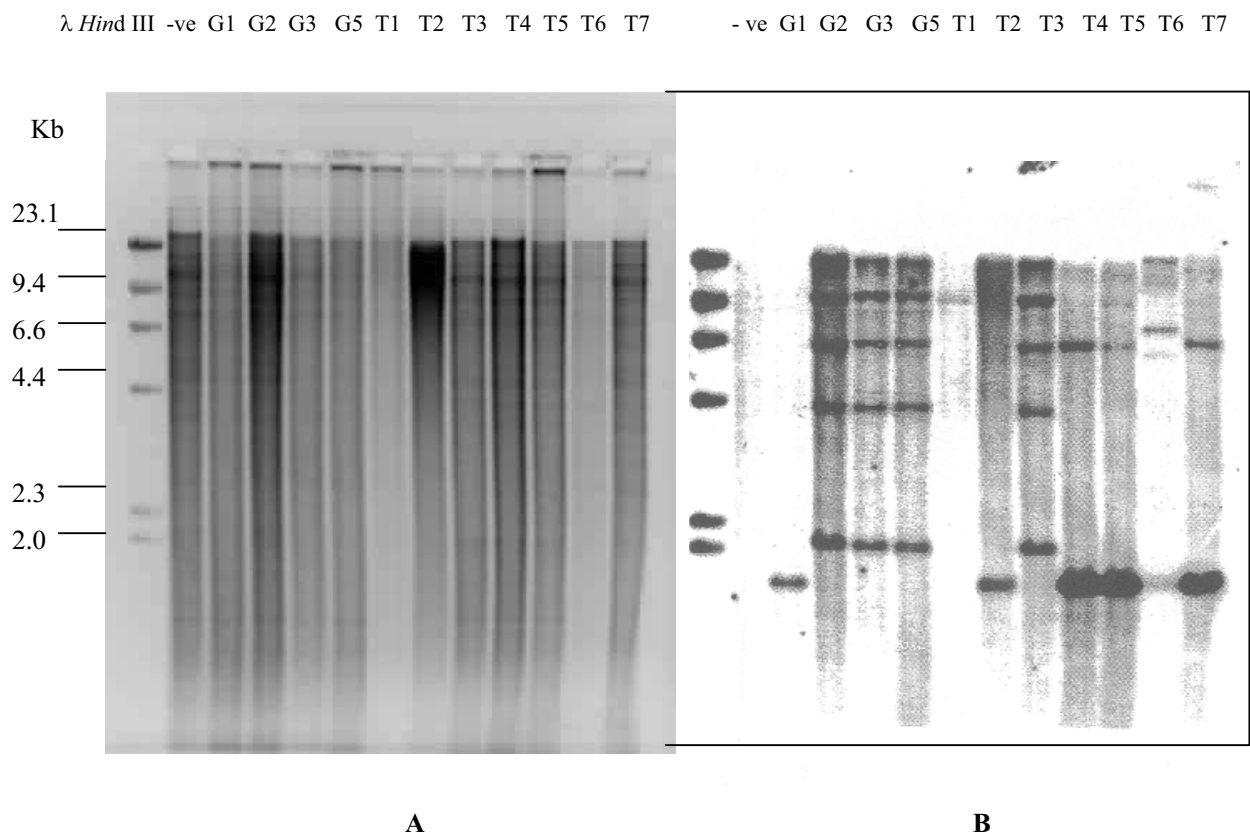
1.2 การตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Southern Blot analysis

ทำการสกัด DNA จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 11 สายพันธุ์ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I, *Hind* III ตัด DNA ออกเป็นชิ้นส่วนย่อยแล้วนำไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis ทำการย้าย DNA จาก agarose gel ไปยังแผ่น nylon membrane และใช้ DNA ติดตาม (DNA probe) ในการทำปฏิกิริยาคู่สม (hybridisation) กับ DNA จากมะละกอโดยเทคนิค Southern blot analysis

ผลการทดลอง

จากการใช้ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสเป็น DNA ติดตามในการทำปฏิกิริยาคู่สมกับ DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III (รูปที่ 1.2) พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้งหมดมียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสแทรกอยู่ ยกเว้นมะละกอดัดแปรพันธุกรรม T1 ซึ่งเห็นแถบ DNA ที่ทำปฏิกิริยากับ DNA ติดตามไม่ชัดเจน ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1 และ T2 มีแถบ DNA ที่จับกับ DNA ติดตาม 1 แถบมีขนาด 1.6 kb ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2, G3, G5 และ T3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อไวรัสที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรี มีรูปแบบของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่แทรกเข้าไปในจีโนมของมะละกอใกล้เคียงกันมาก โดยพบว่ามียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสหลาย copy numbers และมีลักษณะของ DNA rearrangement โดยพบว่าแถบ DNA ขนาด 2.1 kb, 4.0 kb และ 6.3 kb สามารถจับกับ DNA ติดตาม สำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรม T4, T5 และ T7 พบว่าแถบ DNA ขนาด 1.6 kb และ 6.3 kb สามารถจับกับ DNA ติดตาม ในขณะที่ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม T6 มีแถบ DNA ขนาด 1.6 kb และประมาณ 8 kb

การใช้ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสเป็น DNA ติดตามในการทำปฏิกิริยาคู่สมกับ DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I (รูปที่ 1.3) ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน



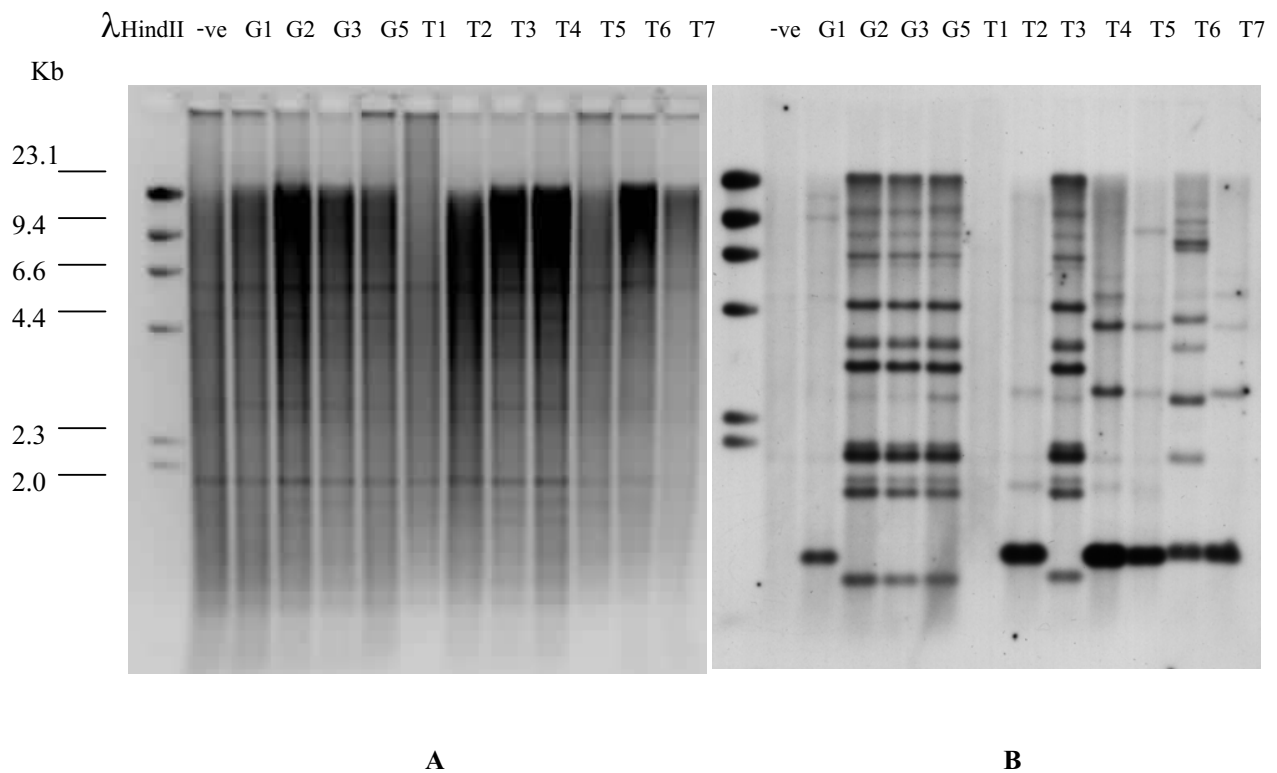
รูปที่ 1.2 แสดงผลการตัด DNA จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมและมะละกอไม่เป็นโรคไวรัส (-ve)

ด้วยเอนไซม์ *Hin* d III นำไปแยกขนาดบน 0.8 % agarose gel electrophoresis (A) และผลจาก Southern blot hybridization โดยใช้ DNA ของ coat protein gene ของ PRSV เป็น probe (B)

แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 negative control (DNA จากมะละกอที่ไม่เป็นโรคไวรัส)

แถวที่ 3-13 DNA จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5, T1, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 ตามลำดับ



รูปที่ 1.3 แสดงผลการตัด DNA จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมและมะละกอไม่เป็นโรคไวรัส (-ve) ด้วย *Nco* I แล้วแยกขนาดบน 0.8 % agarose gel electrophoresis (A) และผลจาก Southern blot hybridization โดยใช้ DNA ของ coat protein gene ของ PRSV เป็น probe (B)

แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 negative control (DNA จากมะละกอที่ไม่เป็นโรคไวรัส)

แถวที่ 3-13 DNA จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5, T1, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 ตามลำดับ

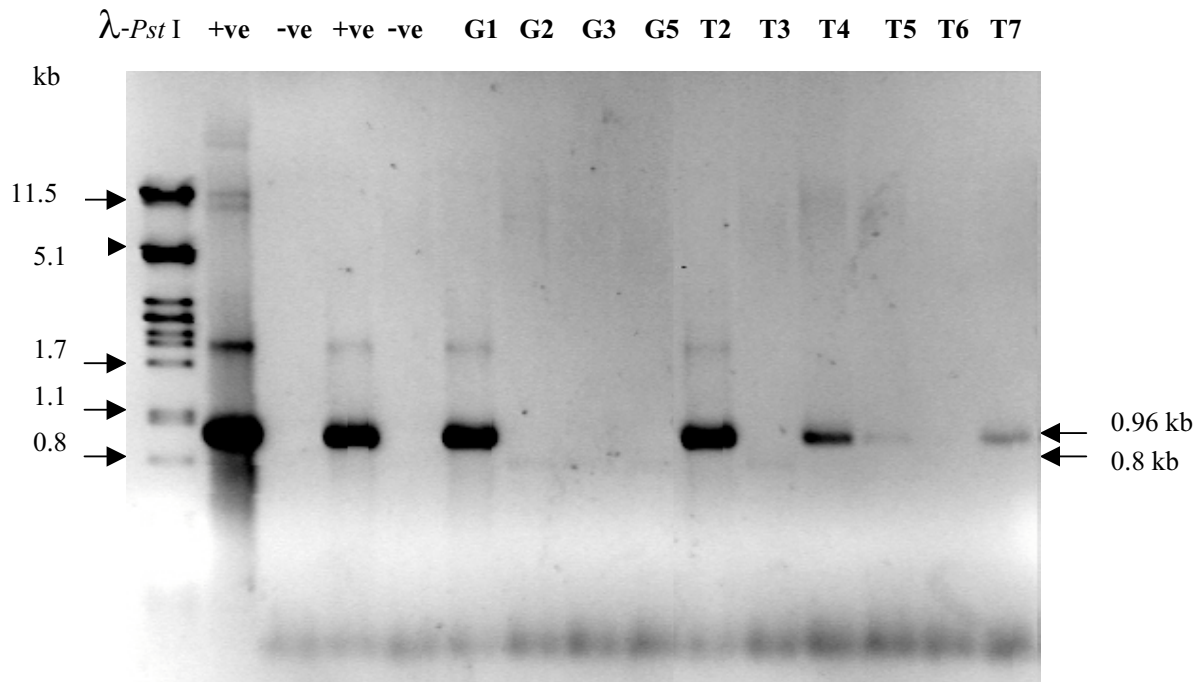
1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ในระดับของการสร้าง RNA (transcription) โดยวิธี RT-PCR

ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 ในระดับการสร้าง mRNA (mRNA transcription) โดยวิธี RT-PCR โดยการสกัด RNA จากใบมะละกอโดยใช้สาร Trizol ของบริษัท Gibco, Ltd. แล้วใช้เอนไซม์ DNaseI ทำการกำจัด DNA ที่อาจติดมาในขั้นตอนการสกัด RNA วัดปริมาณ RNA ที่ได้จากปฏิกิริยาโดยใช้ spectrophotometer โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD260 nm และตรวจสอบบน 1% agarose-formaldehyde gel (1% agarose, 2.2 M formaldehyde, 10% of 10x MOPS) นำสารพันธุกรรม RNA ในปริมาณ 2 µg มาเตรียม cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription reaction โดยใช้ oligo-dT และเอนไซม์ SuperscriptTM II (GIBCO BRL) และทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่อง Gene Amplification System 2400 (Perkin Elmer) นำ cDNA จำนวนเท่ากันจากแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR และใช้ primers ที่จำเพาะกับลำดับเบสด้านปลาย 5' และ 3' ของ coat protein gene (5'PRV/3'PRV) แล้วจึงนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

ผลการทดลอง

พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่สามารถต้านทานไวรัสได้ คือ สายพันธุ์ G1 และ T2 มีการสร้าง mRNA จำนวนมากเห็นเป็นแถบเข้ม ขณะที่สายพันธุ์ T4 และ T7 สามารถสร้าง mRNA ได้ปริมาณน้อยกว่า G1 และ T2, สายพันธุ์ T5 สร้าง mRNA น้อยมาก และสายพันธุ์ T6 ไม่สามารถตรวจพบการสร้าง mRNA สำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่สามารถต้านทานไวรัสได้ คือสายพันธุ์ G2, G3, G5, T3 มีการสร้าง mRNA ปริมาณน้อยมาก และ mRNA ที่สร้างขึ้นมีขนาดประมาณ 800 เบส ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับขนาดของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ที่พบในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ตรวจพบ โดยวิธี PCR มาก่อนหน้านี้ (รูปที่ 1.4)

ผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่ามีการยับยั้งการสร้าง mRNA จากยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ที่ใส่เข้าไปในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมบางสายพันธุ์ทั้งที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อไวรัส การยับยั้งการสร้าง mRNA นี้ อาจเกิดจากกระบวนการเกิด gene silencing หรืออาจเกิดจากความผิดปกติของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่ใส่เข้าไปในมะละกอทำให้ไม่สามารถสร้าง mRNA ได้



รูปที่ 1.4 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ในระดับของการสร้าง RNA (transcription) โดยวิธี RT-PCR

- แถวที่ 1 λ -Pst I digested marker
- แถวที่ 2 positive control ในการทำ PCR amplification (ใช้ pSA1092 เป็น template)
- แถวที่ 3 negative control ในการทำ PCR amplification (ไม่ใส่ template)
- แถวที่ 4 PCR amplification จาก cDNA ที่เตรียมจาก RNA ที่สกัดจากมะละกอธรรมดา ที่ติดเชื้อไวรัส
- แถวที่ 5 PCR amplification จาก cDNA ที่เตรียมจาก RNA ที่สกัดจากมะละกอธรรมดา ที่ไม่ติดเชื้อไวรัส
- แถวที่ 6-15 PCR amplification จาก cDNA ที่เตรียมจาก RNA ที่สกัดจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T2, T3, T4, T5, T6, และ T7 ตามลำดับ

1.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ในระดับของการสร้าง RNA (transcription) โดยวิธี northern blot analysis

ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 ในระดับการสร้าง RNA (transcription) โดยวิธี northern blot analysis โดยการสกัด RNA จากใบมะละกอโดยวิธี Hot phenol RNA extraction แล้วนำ RNA ที่ได้ไปแยกขนาดบน 1.0 % denaturing formaldehyde agarose gel ทำการย้าย RNA ไปบนแผ่น nitrocellulose membrane และนำไปทำปฏิกิริยากับตัวติดตาม CP gene probe คือ IF-PRV3' riboprobe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี P^{32} ซึ่งมีความจำเพาะกับปลายด้าน 3' ของ cp gene นำแผ่น nitrocellulose membrane ไปประกบบนแผ่นฟิล์ม X-ray หากมีการสร้าง mRNA จาก CP gene ที่อยู่ในมะละกอดัดแปร พันธุกรรม mRNA ที่สร้างขึ้นจะสามารถทำปฏิกิริยากับ CP gene probe เมื่อนำฟิล์มไปล้างจะเห็นแถบ mRNA บนแผ่นฟิล์ม

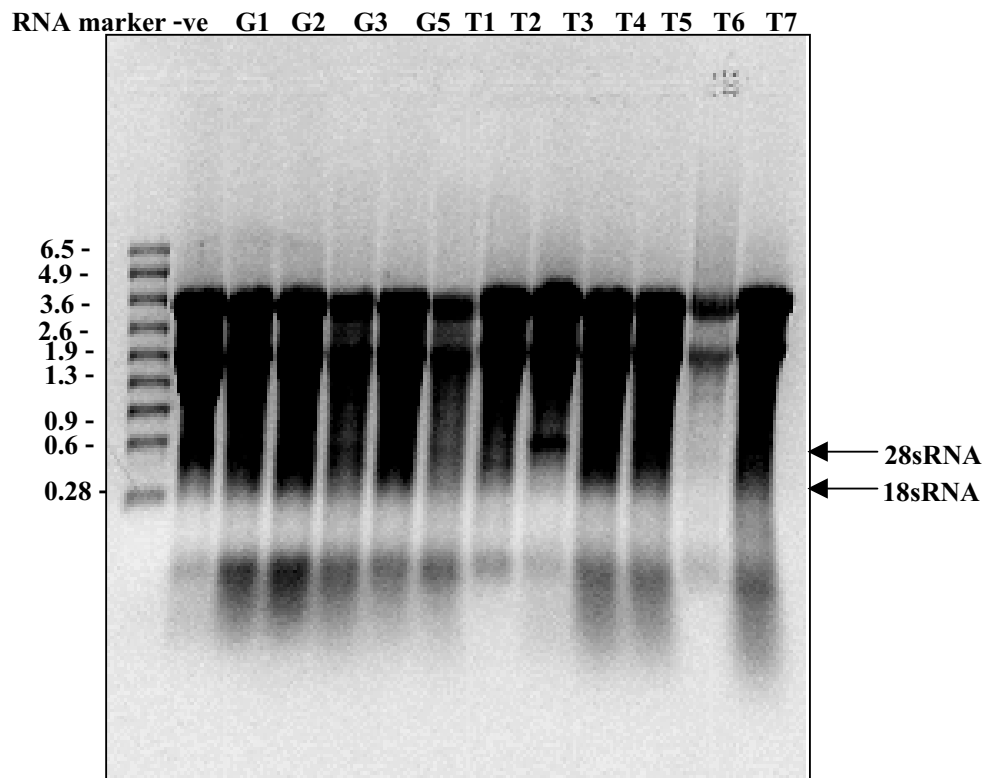
ผลการทดลอง

จากการสกัด RNA จากใบมะละกอโดยวิธี Hot phenol RNA extraction เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในระดับ การสร้าง RNA (transcription) ได้นำ RNA ที่ได้ไปแยกขนาดบน agarose formaldehyde gel electrophoresis (รูปที่ 1.5) แล้วย้าย RNA ไปบนแผ่น nitrocellulose membrane ทำปฏิกิริยา northern blot analysis โดยใช้ IF-PRV3' riboprobe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี P^{32} ซึ่งมีความจำเพาะกับปลายด้าน 3' ของ cp gene แล้วนำแผ่น nitrocellulose membrane ไปประกบบนแผ่นฟิล์ม X-ray พบว่าสามารถตรวจพบการสร้าง RNA ของ CP gene ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1 และ T2 เป็นแถบ RNA เข้ม มีขนาดประมาณ 1.5 kb ในขณะที่พบแถบ RNA จาง ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ T4 และ T7 แต่ไม่พบแถบ RNA ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2, G3, G5, T3, T5 และ T6 (รูปที่ 1.6)

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีน เปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในระดับของการสร้าง RNA (transcription) โดยวิธี RT-PCR นอกจากนั้นยังพบว่าการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ในระดับการสร้าง RNA โดยวิธี RT-PCR มีความไวสูงกว่าวิธี northern blot analysis

เมื่อทดลองล้าง CP gene probe ออกจากแผ่น nitrocellulose membrane แล้วใช้ GUSKF-GUSKR probe ซึ่งมีความจำเพาะกับ *gus* gene ในการทำปฏิกิริยา เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ *gus* gene ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม พบว่าสามารถตรวจพบการสร้าง RNA ของ *gus* gene ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, T2, T4, T5 และ T7 เป็นแถบ RNA มีขนาดประมาณ 1.9 kb โดยในมะละกอดัดแปรพันธุ

กรรมสายพันธุ์ T5 พบเป็นแถบจาง แต่ไม่พบแถบ RNA ในมะละกอดัดแปร พันธุ์กรรม สายพันธุ์ G2, G3, G5, T3 และ T6 (รูปที่ 1.7)

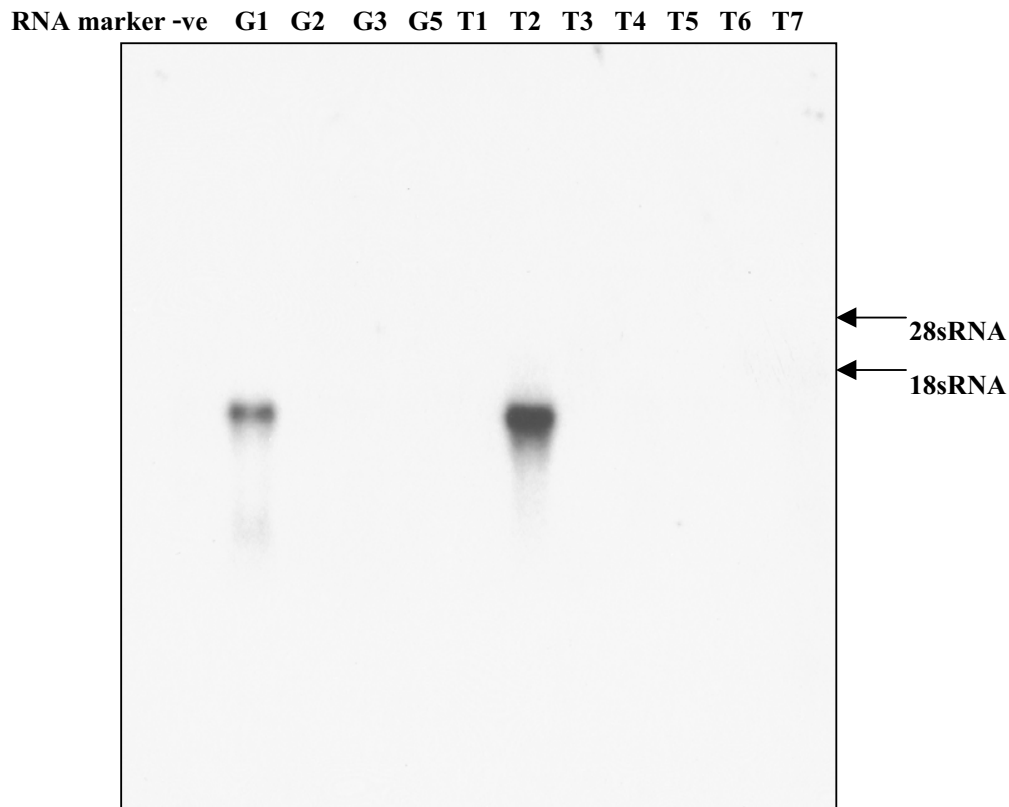


รูปที่ 1.5 แสดง RNA ที่สกัดจากของมะละกอธรรมดาที่ไม่ติดโรคไวรัสและมะละกอดัดแปรพันธุ์กรรม สายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6, และ T7 ตามลำดับ นำไปแยกขนาดบน 1.0 % denaturing formaldehyde-agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 RNA marker ขนาด 0.28-6.58 kb จำนวน 1 μ g

แถวที่ 2 RNA ของมะละกอธรรมดาที่ไม่ติดโรคไวรัส

แถวที่ 3–13 RNA ของมะละกอดัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6 และ T7



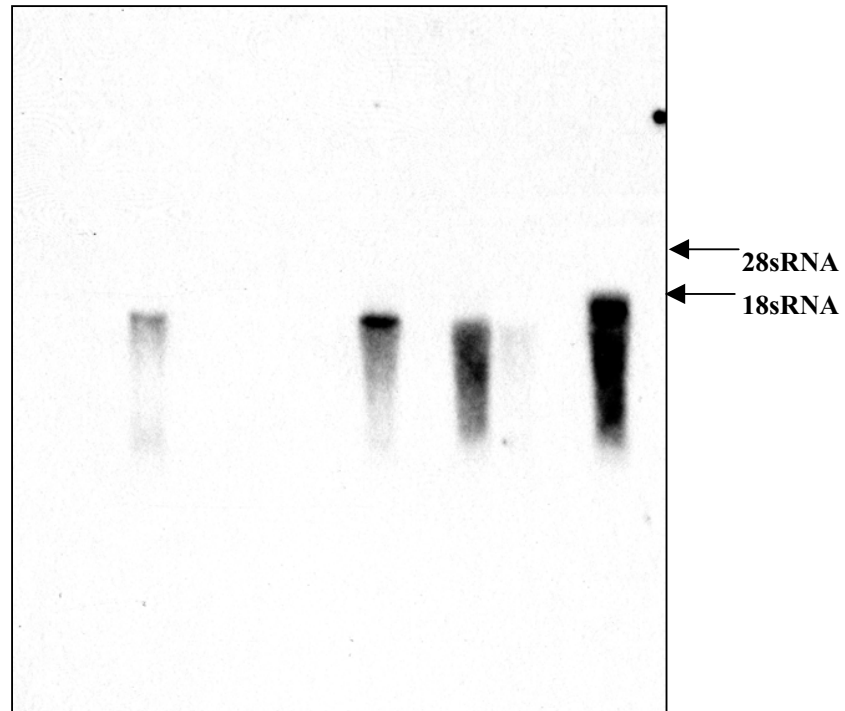
รูปที่ 1.6 แสดงผล northern blot hybridization ของ RNA ที่สกัดจากของมะละกอ ธรรมดาที่ไม่ติดโรคไวรัสและมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6, และ T7 ตามลำดับ ที่นำไปแยกขนาดบน 1.0 % denaturing formaldehyde-agarose gel electrophoresis แล้วทำปฏิกิริยาโดยใช้ IF-PRV3' riboprobe

แถวที่ 1 RNA marker ขนาด 0.28-6.58 kb จำนวน 1µg

แถวที่ 2 RNA ของมะละกอธรรมดา

แถวที่ 3-13 RNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6 และ T7

RNA marker -ve G1 G2 G3 G5 T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7



รูปที่ 1.7 แสดงผล northern blot hybridization ของ RNA ที่สกัดจากของมะละกอธรรมดา ที่ไม่ติดไวรัส และมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6, และ T7 ตามลำดับ ที่แยกตามขนาดบน 1.0 % denaturing formaldehyde-agarose gel electrophoresis แล้ว ทำปฏิกิริยาโดยใช้ GUSKF-GUSKR probe

แถวที่ 1 RNA marker ขนาด 0.28-6.58 kb จำนวน 1µg

แถวที่ 2 RNA ของมะละกอธรรมดา

แถวที่ 3-13 RNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6 และ T7

1.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยวิธี

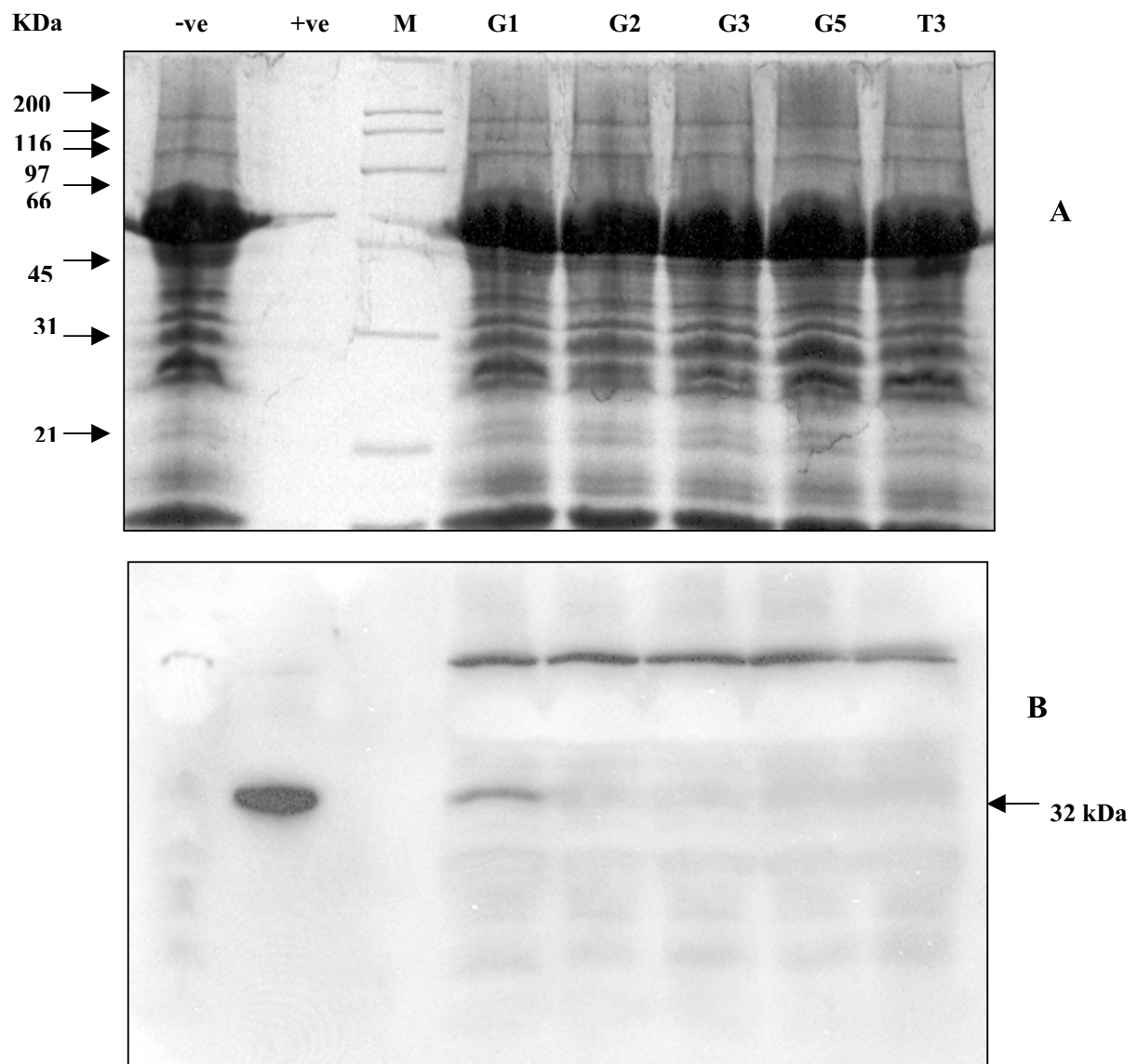
western blot analysis

ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ในระดับการสร้างโปรตีน (translation) โดยวิธี western blot analysis โดยสกัดโปรตีนจากใบมะละกอด้วย Trichloro Acetic Acid (TCA) (Wu and Wang, 1984) นำโปรตีนที่ได้มาแยกขนาดโดยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนจาก acrylamide gel ไปยังแผ่น nitrocellulose membrane นำไปทำปฏิกิริยากับ antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนเปลือกไวรัส (anti-CP polyclonal antibody) ที่มีความเจือจาง 1:2000 แล้วใช้ anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase ที่มีความเจือจาง 1:5000 ทำปฏิกิริยากับ antibody ตัวแรก แล้วใช้ western blotting detection reagent (ECL plus western blotting detection reagent, Amersham Pharmacia Biotech) ในการทำปฏิกิริยาตรวจสอบ นำแผ่น nitrocellulose membrane ไปประกบบนแผ่นฟิล์ม X-ray หากมีโปรตีนเปลือกไวรัสบนแผ่น nitrocellulose membrane เมื่อนำฟิล์มไปล้าง จะเห็นแถบโปรตีน บนแผ่นฟิล์ม

ผลการทดลอง

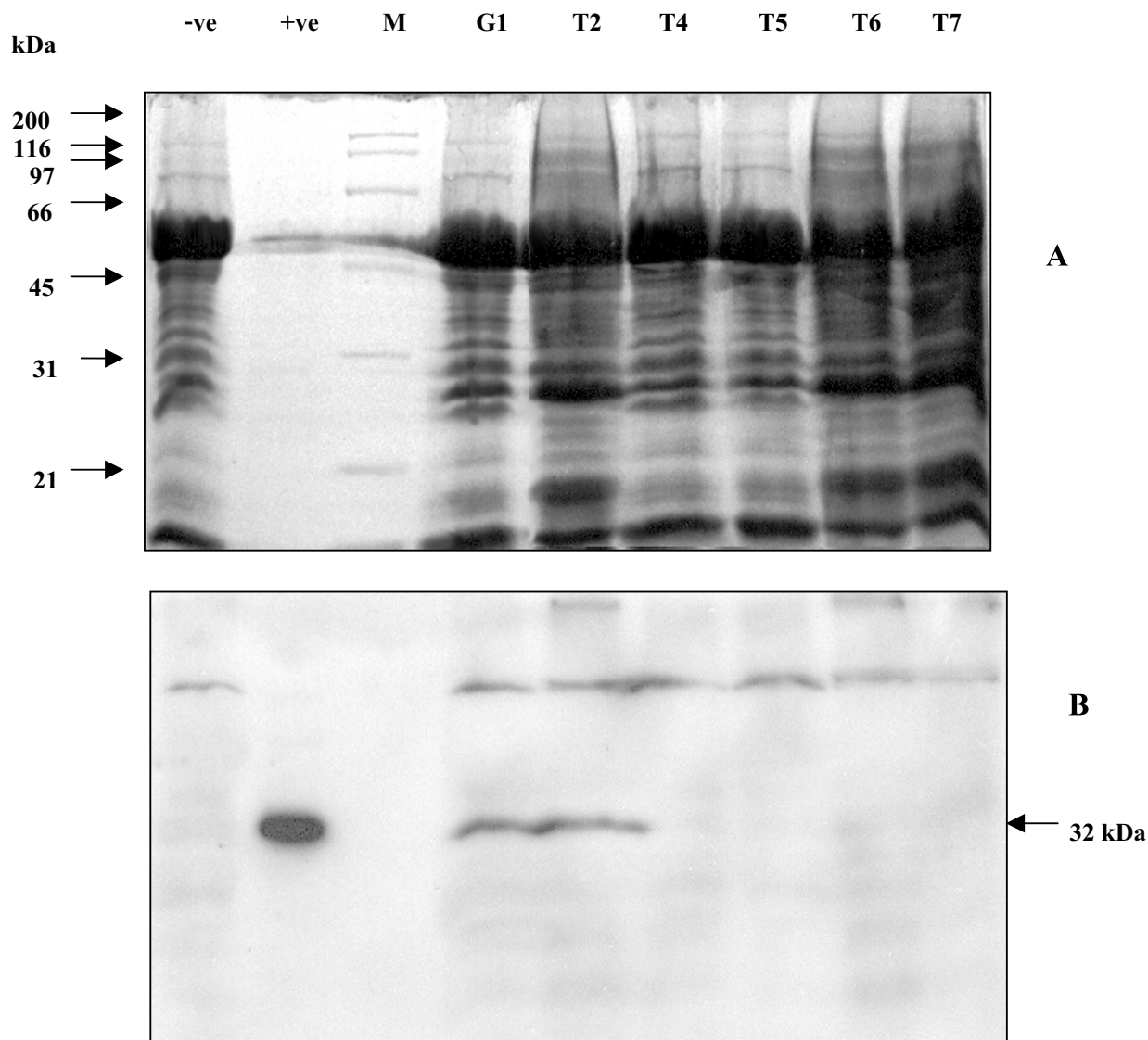
จากการนำโปรตีนที่สกัดได้จากใบมะละกามาทำการแยกขนาดโดย SDS-PAGE (รูปที่ 1.8A และ 1.9A) และย้ายโปรตีนไปแผ่น nitrocellulose membrane เพื่อทำปฏิกิริยา western blot analysis (รูปที่ 1.8B และ 1.9B) กับ anti-CP polyclonal antibody พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1 และ T2 ซึ่งไม่ต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนสามารถสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่มีขนาดประมาณ 32 kDa ได้ ในขณะที่ตรวจไม่พบโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมอื่นๆ

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเปลือกไวรัสและการสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสไม่เกี่ยวข้องกับ การเกิดความต้านทานไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม



รูปที่ 1.8 แสดงโปรตีนที่สกัดจากใบมะละกอธรรมดาที่ไม่เป็นโรคไวรัส, ใบมะละกอที่เป็นโรคไวรัส, ใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5 และ T3 ซึ่งนำมาแยกตามขนาดบน 13 % SDS polyacrylamide gel (A) และตรวจสอบด้วยวิธี western blot analysis (B)

- แถวที่ 1 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอธรรมดา จำนวน 35 μg
- แถวที่ 2 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอที่เป็นโรคไวรัส จำนวน 500 ng
- แถวที่ 3 โปรตีนที่ทราบขนาดและใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิง (Broad range protein marker)
- แถวที่ 4 -8 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5 และ T3 ตามลำดับ (ใช้โปรตีนจำนวน 35 μg จากแต่ละตัวอย่าง)



รูปที่ 1.9 แสดงโปรตีนที่สกัดจากใบมะละกอธรรมดาที่ไม่เป็นโรคไวรัส, ใบมะละกอที่เป็นโรคไวรัส, ใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5 และ T3 ซึ่งนำมาแยกขนาดบน 13 % SDS polyacrylamide gel (A) และตรวจสอบด้วยวิธี western blot analysis (B)

- แถวที่ 1 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอธรรมดา จำนวน 35 μg
- แถวที่ 2 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอที่เป็นโรคไวรัส จำนวน 500 ng
- แถวที่ 3 โปรตีนที่ทราบขนาดและใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิง (Broad range protein marker)
- แถวที่ 4-8 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, T2, T4, T5, T6 และ T7 ตามลำดับ (ใช้โปรตีนจำนวน 35 μg จากแต่ละตัวอย่าง)

1.6 การศึกษาการสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (coat protein gene: *cp* gene) ของไวรัสใบด่างจุด วงแหวนที่พบในแหล่งปลูกมะละกอต่างๆในประเทศไทย

การศึกษาไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่พบระบาดในแหล่งปลูกมะละกอต่างๆในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสกับความไวและความต้านทานต่อไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

การเก็บตัวอย่างไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่ระบาดในแหล่งปลูกมะละกอต่างๆในประเทศไทย ได้ขอข้อมูลพื้นที่ปลูกมะละกอในแต่ละจังหวัด จากกรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ แต่มีปัญหา คือ ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์ ไม่มีข้อมูลของพื้นที่ปลูกมะละกอในแต่ละจังหวัด ข้อมูลบางส่วนที่มีอยู่เป็นข้อมูลเก่า ซึ่งเมื่อไปทำการ เก็บตัวอย่างจริงพบว่าพื้นที่ปลูกมะละกอสั้นใหญ่ได้เปลี่ยนไปแล้ว เนื่องจากมะละกอที่ปลูกไว้เดิม เป็นโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวน เจ้าของพื้นที่จึงตัดต้นมะละกอทิ้งและเปลี่ยนไปปลูกพืชชนิดอื่น แทนมะละกอ นอกจากนั้นพื้นที่ปลูกมะละกอบางส่วนเป็นการที่เกษตรกรเช่าพื้นที่ เพาะปลูกในระยะเวลาสั้น เมื่อประสบปัญหาไวรัสระบาดหรือหมดระยะการเช่าเกษตรกรก็ย้ายที่ปลูกไปที่อื่น ดังนั้นเพื่อให้ได้ตัวอย่าง ไวรัสที่ครอบคลุมในภาคต่างๆ จึงใช้วิธีการเก็บตัวอย่างโดยสุ่มจากแผนที่เลือกบริเวณอำเภอที่อยู่ กระจายกันและมีระยะห่างกันอย่างน้อย 50 กิโลเมตร ประกอบกับใช้วิธีสอบถาม แหล่งปลูกมะละกอจากประชาชนและพ่อค้ามะละกอในพื้นที่จังหวัดนั้นๆ แล้วทำการเก็บตัวอย่างใบจาก ต้นมะละกอที่เป็นโรคจำนวน 2 ตัวอย่างต่อ 1 จุด โดยเก็บใส่ถุงพลาสติก แช่น้ำแข็ง เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการจึงทำการเก็บตัวอย่างลงกล่องและแช่แข็ง ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

การศึกษายีนเปลือกไวรัสจากตัวอย่างไวรัสใบด่างจุดวงแหวน นำตัวอย่างจากไวรัสที่เก็บ แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C มาปลูกเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนในต้นมะละกอโดยนำไปมะละกอจำนวน 0.5 g มาบดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.5 M แล้วนำมาทาบใบของต้นมะละกอที่มีขนาดสูงประมาณ 40-50 เซนติเมตร ซึ่งที่ใบมะละกอได้โรยผง celite ไว้ก่อนทาด้วยไวรัส ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วล้างใบมะละกอด้วยน้ำสะอาด หลังจากนั้นประมาณ 14-30 วัน ต้นมะละกอจะมีการติดเชื้อไวรัส นำใบมะละกอจำนวน 0.2 g มาทำการสกัดสารพันธุกรรม RNA โดยใช้สาร Trizol ของบริษัท Gibco, Ltd. ใช้ปฏิกิริยา reverse transcription สร้างสาย cDNA จากสารพันธุกรรม RNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1.10 แล้วใช้ primers ที่จำเพาะกับลำดับเบสด้านปลาย 5' และด้านปลาย 3' ของ *cp* gene (รูปที่ 1.11) ทำการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสโดยใช้วิธี PCR นำชิ้น DNA ที่ได้มา clone เข้าพลาสมิด pUC19 หรือ sk pBluscript ที่ตำแหน่ง *Bam* HI/*Hind* III ทำการคัดเลือก clones ที่ถูกต้อง แล้วนำไปศึกษาลำดับเบส

ผลการทดลอง

ได้ตัวอย่างไปจากต้นมะละกอที่ติดโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในภาคต่างๆดังนี้

ภาคกลาง ได้ตัวอย่างไวรัสจากจังหวัดกรุงเทพฯ นนทบุรี นครปฐม ปทุมธานี อโยธยา สุพรรณบุรี
อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท สระบุรี ลพบุรี

ภาคตะวันออก ได้ตัวอย่างไวรัสจากจังหวัดจันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี นครนายก ปราจีนบุรี และ
สระแก้ว (ไม่พบตัวอย่างที่จังหวัดตราด และระยอง ในขณะที่ออกเก็บตัวอย่าง)

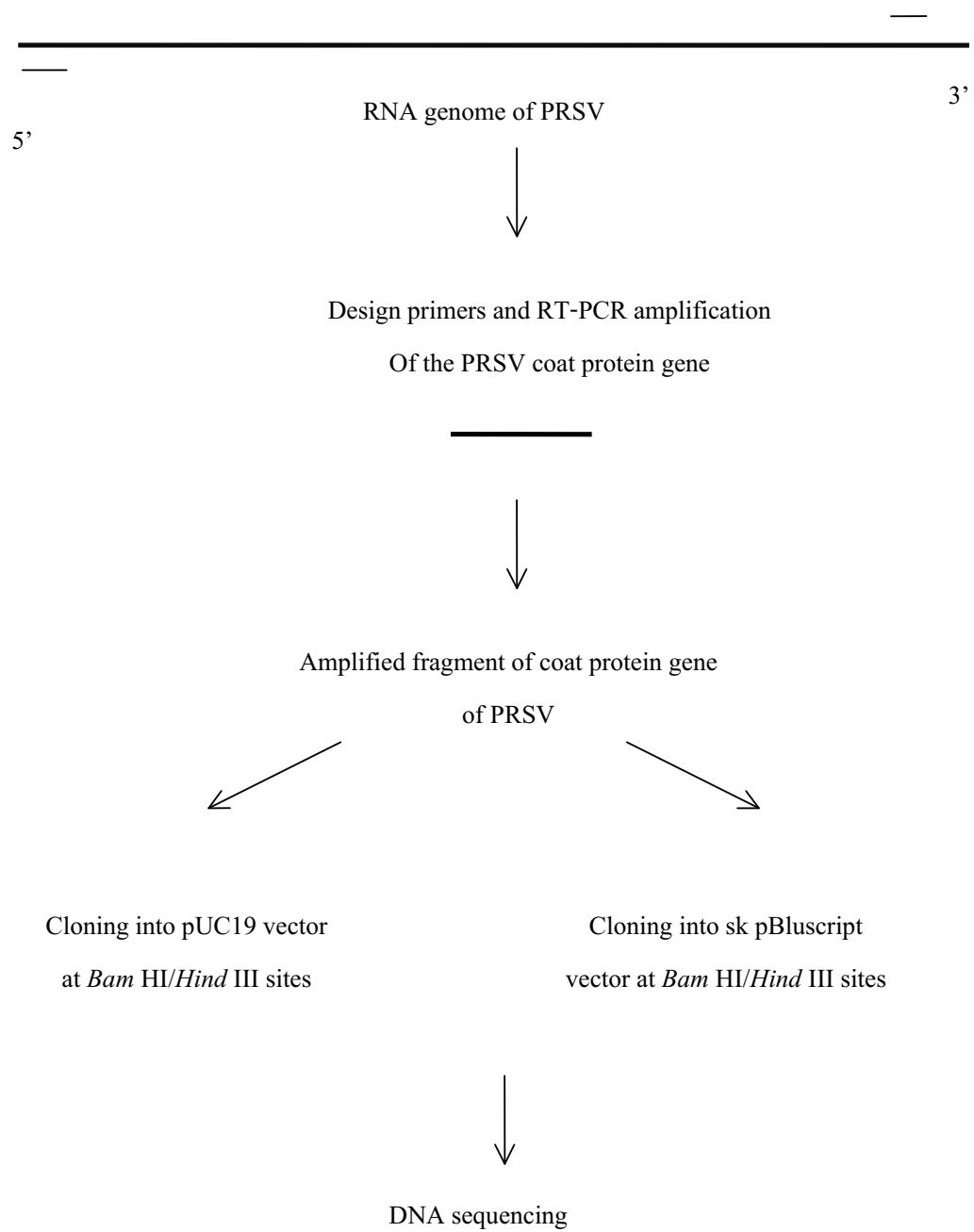
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้ตัวอย่างไวรัสจากจังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น นครราชสีมา บุรีรัมย์
มหาสารคาม ยโสธร ร้อยเอ็ด เลย ศรีสะเกษ สกลนคร สุรินทร์และหนองคาย

ภาคเหนือ ได้ตัวอย่างไวรัสจากจังหวัดเชียงใหม่ น่าน กำแพงเพชร ลำปาง เชียงราย พะเยา
อุตรดิตถ์ สุโขทัย พิจิตร และพิจิตร (ไม่พบตัวอย่างที่จังหวัดนครสวรรค์และตาก ในขณะที่ออกเก็บตัว
อย่าง)

ภาคใต้ ได้ตัวอย่างไวรัสจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี และสงขลา

จากการนำไวรัสที่เก็บตัวอย่างบางส่วนมาศึกษาโดยเพิ่มจำนวนไวรัสในต้นมะละกอ, สกัด RNA ของ
ไวรัสจากใบมะละกอ แล้วใช้ปฏิกิริยา RT-PCR ในการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีน เปลือกไวรัส ได้ชิ้น DNA
ขนาดประมาณ 1 กิโลเบส (รูปที่ 1.12 และ 1.13) นำชิ้น DNA ที่ได้มา clone เข้าพลาสมิด pUC19 หรือ sk
pBluscript ที่ตำแหน่ง *Bam* HI/*Hind* III ทำการคัดเลือก clones ที่ถูกต้อง โดยการสกัด DNA จาก clones แล้วนำ
มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI/ *Hind* III ซึ่ง DNA จาก clones ที่ถูกต้องจะถูกตัดเป็นชิ้น DNA 2 ชิ้น มี
ขนาด 2.6 กิโลเบส และ 1 กิโลเบส (รูปที่ 1.14) ตัวอย่างไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่เก็บจากภาคต่างๆและ clones
ที่ได้จากการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 1.1-1.5

นำ DNA จาก clones ที่ถูกต้องมาทำปฏิกิริยา sequencing และส่งวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสของ coat
protein gene ทำการเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับเบสของ Wisconsin Sequence Analysis Suit
(Accelrys, Ma, USA) ดังที่แสดงในรูปที่ 1.15 ผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส
ของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่พบระบาดในภาคต่างๆของ ประเทศไทยมีความคล้ายคลึงกันมากถึง 95%-97%



รูปที่ 1.10

แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาลำดับเบสของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส

FLCP-F

5' GATAAAAAGCTTGAGCGAGAGAGAGGAG 3'

FLCP-R

5' AAATGGATCCGGTGGCGCAGCC 3'

5'CP

5'-CATCATCATCATATCATTCCATGGCTGTGGATGCTGGTTTGAATG-3'

3'CP

5'-CTACTACTACTAGTCAAGCCATGGTTGCGCAGCCACNCTGTATTG-3'

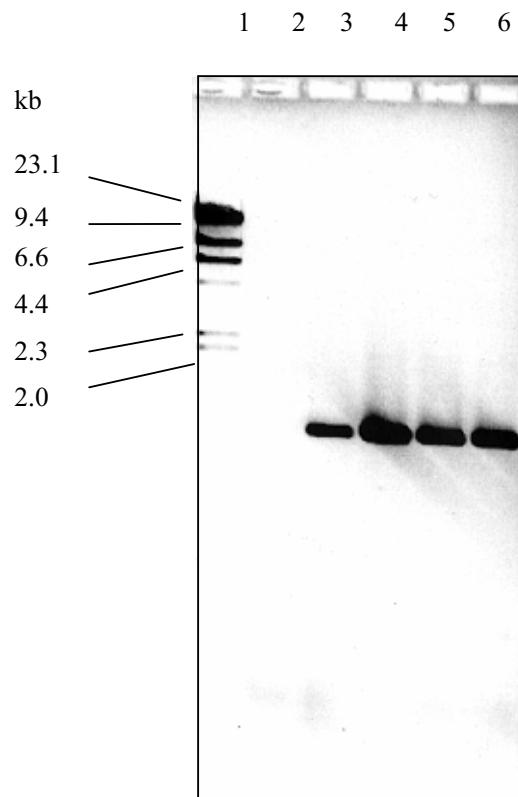
5'PRV

5' - ATC ATT CCA TGG CTG TGG ATG CTG GTT TGA ATG

3'PRV

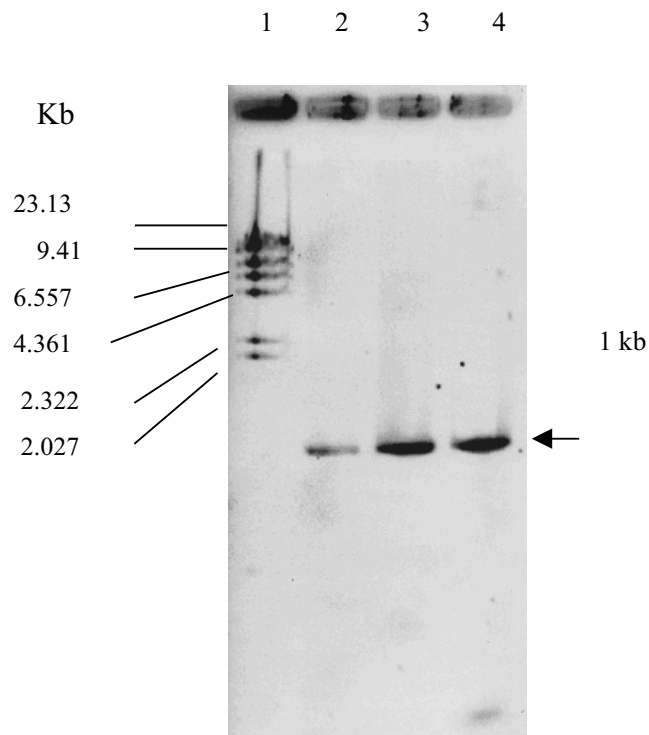
5' - GTC AAG CCA TGG TTG CGC AGC CAC NCT GTA TTC TAA TG -3'

รูปที่ 1.11 แสดงลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส



รูปที่ 1.12 แสดงผลการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดสุพรรณบุรี อ่างทอง สระบุรี นนทบุรี

- แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker
- แถวที่ 2 PCR amplification ของมะละกอไม่ติดโรค (-ve)
- แถวที่ 3 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดสุพรรณบุรี (S1)
- แถวที่ 4 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดอ่างทอง (S3)
- แถวที่ 5 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดสระบุรี (S13)
- แถวที่ 6 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดนนทบุรี (S20)



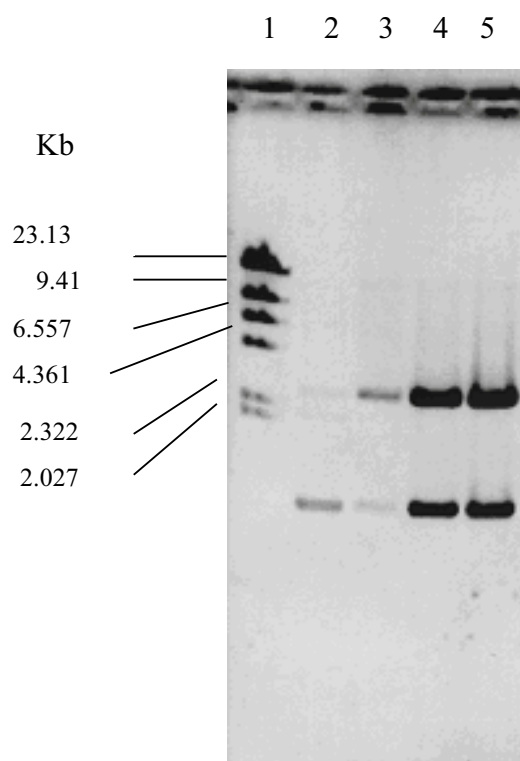
รูปที่ 1.13 แสดงผลการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัด ชลบุรี
 ปราจีนบุรี และสระแก้ว แล้วนำไปแยกขนาดบน 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 λ Hind III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดชลบุรี

แถวที่ 3 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดปราจีนบุรี

แถวที่ 4 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดสระแก้ว



รูปที่ 1.14 แสดงผลการตรวจสอบ DNA จาก clones ที่มียืนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส จากตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดชลบุรี ปราจีนบุรี และสระแก้ว โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI/ *Hind* III แล้วนำไปแยกขนาดบน 0.8% agarose gel electrophoresis

- แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker
- แถวที่ 2 DNA ของยืนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจังหวัดสระแก้วที่ได้จาก PCR
- แถวที่ 3 DNA ของ clone ที่มียืนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสที่เก็บจากจังหวัดชลบุรีตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI/ *Hind* III
- แถวที่ 4 DNA ของ clone ที่มียืนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เก็บจากจังหวัดสระแก้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI/ *Hind* III
- แถวที่ 5 DNA clone ที่มียืนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เก็บจากจังหวัดปราจีนบุรีตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI/ *Hind* III

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากภาคกลาง 10 จังหวัด ในระหว่างเดือนกรกฎาคม 2544 และ clones ที่ได้จากการทดลอง

จังหวัด	ตำบล	อำเภอ	primers	vectors	clones
กรุงเทพ		บางซื่อ	5'CP/3' PRV	pUC19	pSABK
		รามอินทรา			
นนทบุรี		บางใหญ่	FLCP F/R	pUC19	pSA1221
นครปฐม		ศาลายา	FLCP F/R	pUC19	pSA1185
ปทุมธานี		ลาดหลุมแก้ว	FLCP F/R	pUC19	pSA1192
อยุธยา		พรหมบุรี	FLCP F/R	pUC19	pSA1189
		บางบาล	FLCP F/R	pUC19	pSA1186
	บางกระสั้น	บางไทร	5'CP/3' CP	pUC19	pSA1170
สุพรรณบุรี			5'CP/3' PRV	pUC19	pSA1169
		บางปลาม้า	FLCP F/R	pUC19	pSA1220
อ่างทอง	ยี่โถ	วิเศษชัยชาญ	FLCP F/R	pUC19	pSA1230
		วัดสิงห์	FLCP F/R	pUC19	pSA1237
สิงห์บุรี		อินทร์บุรี	FLCP F/R	pUC19	pSA1188
	โรงช้าง	พรหมบุรี			
ชัยนาท	วังไก่อเลื้อย	หันคา	FLCP F/R	sk pBluscript	pSA1176
	ทุ่งวัดสิงห์	วัดสิงห์	FLCP F/R	pUC19	pSA1241
สระบุรี	ห้วยบง	เฉลิมพระเกียรติ	FLCP F/R	pUC19	pSA1191
		พระพุทธบาท			
		แก่งคอย			
ลพบุรี		ชัยบาดาล	FLCP F/R	pUC19	pSA1187
	ห้วยโป่ง	พัฒนานิคม	FLCP F/R	pUC19	pSA1180

ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากภาคตะวันออก 7 จังหวัด ในระหว่างเดือนธันวาคม 2544 และ clones ที่ได้จาก การทดลอง

จังหวัด	ตำบล	อำเภอ	primers	vectors	clones
จันทบุรี		ขลุง			
ชลบุรี		บ่อพลอย	5'CP/3' CP	sk pBluscript	pSA1024
ชลบุรี					PSA1025
ตราด		ไม่พบ			
นครนายก		องครักษ์			
ปราจีนบุรี		กบินทร์บุรี			pSA1235
	โคกวัด	ศรีมโหสถ			
ระยอง		ไม่พบ			
สระแก้ว		อรัญประเทศ	FLCP F/R	pUC19	pSA1244
	ทับพริก	อรัญประเทศ			pSA1222
	วังสมบูรณ์	วังสมบูรณ์			

ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 12 จังหวัดในช่วงเดือนกรกฎาคม 2545 และ clones ที่ได้จากการทดลอง

จังหวัด	ตำบล	อำเภอ	primers	vectors	clones
กาฬสินธุ์	บัวขาว	กุฉินารายณ์			
ขอนแก่น		บ้านท่าพระ	FLCP F/R	pUC19	pSA1228
นครราชสีมา	-	-	FLCP F/R	pUC19	pSA1179
	ทองหลาง	จักรราช			
	ทองหลาง	จักรราช			
บุรีรัมย์	กระสัง	เมือง			
มหาสารคาม		เมือง	5'CP/3' CP	sk pBluscript	pSA1245
ยโสธร	ลาดท้อ	เมือง			
ร้อยเอ็ด	โนนชัยศรี	โพนทอง			
เลย					
ศรีสะเกษ	คู	ราษีไศล	5'CP/3' CP	sk pBluscript	pSA1243
สกลนคร		เมือง	FLCP F/R	pUC19	pSA1242
สุรินทร์	ยาง	ศรีขรภูมิ	5'CP/3' CP	sk pBluscript	pSA1247
หนองคาย		เมือง			

ตารางที่ 1.4 แสดงตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากภาคเหนือ 12 จังหวัดในช่วงเดือนมกราคม 2546 และ clones ที่ได้จากการทดลอง

จังหวัด	อำเภอ	primers	vectors	clones
เชียงใหม่	เมือง	5'CP/3' PRV	pUC19	pSA1229
น่าน		5'CP/3' PRV	pUC19	pSA1168
นครสวรรค์	เมือง (ไม่พบ)			
กำแพงเพชร	เมือง			
	คลองลาน (ไม่พบ)			
ตาก	วังเจ้า (ไม่พบ)			
ลำปาง	เกาะคา (ไม่พบ)			
	เมือง	5'CP/3' PRV	pUC19	pSA1308
เชียงราย	เมือง			
พะเยา	เมือง			
อุตรดิตถ์	เมือง	FLCP F/R	pUC19	pSA1307
สุโขทัย	ศรีสำโรง			
พิษณุโลก	พรหมพิราม	FLCP F/R	pUC19	pSA1207
พิจิตร	เมือง			
	บึงนาราง			

ตารางที่ 1.5 แสดงตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากภาคใต้ 4 จังหวัดในช่วงเดือนมิถุนายน 2546 และ clones ที่ได้จากการทดลอง

จังหวัด	อำเภอ	primers	vectors	clones
ประจวบคีรีขันธ์	ปราณบุรี	5'PRV/3'PRV	sk pBluscript	pSA1236
ชุมพร	ทุ่งตะโก	5'PRV/3'PRV	sk pBluscript	pSA1225
ชุมพร	ท่าแซะ			
สุราษฎร์ธานี	พุนพิน	5'PRV/3'PRV	sk pBluscript	pSA1226
สงขลา ต.คลองแงะ	สะเดา	5'PRV/3'PRV	sk pBluscript	pSA1227

Comparison of Thai CP sequences

transformed-cp	~~~~~GCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAGAAACTCAAAGAGAAAGAGAAACAG
p74-chonburi	TCCAGAACTGAA-----c-t-----a-g-----t-----a-----
p75-chonburi	TCCAGAACTGAA-----c-t-----a-g-----t-----a-----
p837m-lab	TCCAAAAATGAA-----c-a-----
p837s-lab	TCCAAAAATGAA-----c-----a-----
p88-chieng-mai	TCCAAAACTGAA-----c-t-----t-g-----g-t-----a-----
p96-chieng-mai	TCCAAAACTGAA-----c-t-----t-g-----t-----a-----
ayutaya	TCCAGAACTGAA-----t-g-----t-----a-----
bangkok	TCCAAAACTGAA-----t-----a-g-----t-----a-----
chainat	TCCAGAAATGAA--c-----a-----g-----a-----
chumporn	TCCAAAAATGAA-----c-----g-----t-----a-----
khon-khen2	~~~~~GAA-----c-t-----g-----c-----a-----
khon-khen1	TCCAAAACTGAA-----c-----g-----t-----a-----
nan	~~~~~GAA-----t-g-----t-----a-----
ratchaburi	TCCAAAAATGAA-----c-t-----g-----a-----
sakhon-nakhon	~~~~~GAA-----c-c-----g-gt-----t-----a-----
nakompathom	TCCAAAACTGAA-----c-t-cc-t-g-----cc-----a--c--
supanburi	TCCAGAACTGAA-----a-g-----t-----a-----
transformed-cp	AGAGAAGAAAAAGATAAACAAAAAGGAAAAGACAATAATGGAGCTAGTGACGGAAACGAT
chonburi	-a-----t-----a-----a-----
chonburi	-a-----t-----a-----a-----
chieng-mai	-a-----t-----a-----a-----
chieng-mai	-a-----t-----a-----a-----
ayutaya	-a-----t-----a-----a-----
bangkok	-a-----t-----a-----a-----
chainat	-----t-----t-a-----
chumporn	-a-----t-----a--c-a-----
khon-khen2	-a-----t-----a-----a-----t--
khon-khen1	-a-----t-----a--c-a-----
nan	-a-----g-----t-----a-----a-----
ratchaburi	-a-----t-----a-----a-----
sakhon-nakhon	-a-----tt-----a--c-a-----
nakompathom	-a-----c-----t-----a-----a-----
supanburi	-a-----a-----t-----a-----a-----
transformed-cp	GTGTCAACTAGCACGAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTTAATGCTGGAAC TAGTGGA
chonburi	-----a-----c-----c-----t
chonburi	-----a-----c-----c-----t
chieng-mai	-----a-----c-----a-----t
chieng-mai	-----a-----c-----c-----t
ayutaya	-----a-----c-----c-----t
bangkok	-----g-a-----c-----c-----t
chainat	-----a-----a-----g
chumporn	-----a-----c-----c-----t
khon-khen2	-----a-----c-----c-----t
khon-khen1	-----a-----c-----c-----t
nan	-----a-g-----c-----c-----t
ratchaburi	-----a--t-----c-----
sakhon-nakhon	-----a-----c-----c-----t
nakompathom	-----t--a-----c-----c-----t
supanburi	-----a-----c-----c-----t

transformed-cp	ACTTTCACGTGTTCCGAGGATAAAATCATTACTGATAAGATGATTTTACCAAAAATTAAG
chonburi	-----a-----t-----c-----g-----
chonburi	-----a-----t-----c-----g-----
chieng-mai	-----a-----t-----c-c-----g-----
chieng-mai	-----a-----t-----c-----g-----
ayutaya	-----a-----t-----c-c-----g-----
bangkok	-----a-----t-----c-----g-----a
chainat	-----g-----a-----c-----
chumporn	-----a-----t-----c-c-----g-----a
khon-khen2	-----a-----t-----c-c-----g-----a
khon-khen1	-----a-----t-----c-c-----g-----a
nan	-----g-----a-----t-----c-c-----g-----
ratchaburi	-----a-----c-----g-----
sakhon-nakhon	-----a-----t-----c-c-----g-----a
nakompathom	g-----a-----t-----c-c-----g-----
supanburi	-----a-----g-t-----c-----g-c-----g-----

transformed-cp	GGAAAACTGTCCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAGTATAAATCCGCAACAAATTGACATC
chonburi	-----g-----a-----
chonburi	-----g-----a-----
chieng-mai	-----a-----t
chieng-mai	-----a-----
ayutaya	-----g-a-----
bangkok	-----a-----
chainat	-----a-----g-----t-c-----
chumporn	-----a-----
khon-khen2	-----a-----
khon-khen1	-----a-----
nan	-----a-----
ratchaburi	-----c-----a-----
sakhon-nakhon	-----a-----
nakompathom	-----a-----
supanburi	-----g-----a-----

transformed-cp	TCAAACACTCGTGCCACTCAATATCAATTTGAAAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGAT
chonburi	-----c-----c-----
chonburi	-----c-----c-----
chieng-mai	-----c-----c-----
chieng-mai	-----c-----c-----
ayutaya	-----c-----c-----
bangkok	-----c-----c-----
chainat	-----c-----
chumporn	-----c-----c-----c-g-----
khon-khen2	-----c-----c-----
khon-khen1	-----c-----c-----c-g-----
nan	-----c-----c-----
ratchaburi	-----c-----c-----
sakhon-nakhon	-----c-----g-----
nakompathom	-----c-----
supanburi	-----c-----

transformed-cp	TACGGTCTTAATGATAACGAAATGCAGTTGATGTTAAATGGTCTGATGGTTTGGTGTATC
chonburi	--t--g----c-----ag-----t-----c---
chonburi	--t--g----c-----ag-----t-----c---
chieng-mai	-----ag-----ct-----c--t
chieng-mai	-----ag-----t-----c---
ayutaya	-----ag-----t-----c---
bangkok	--t-----c-----ag-----t-----c---
chainat	-----t-----t-----
chumporn	-----t-----ag-a-----t-----c---
khon-khen2	-----g-g-----t-----c---
khon-khen1	-----t-----ag-a-----t-----c---
nan	-----ag-----t-----c---
ratchaburi	-----ag-----t-----c---
sakhon-nakhon	-----t-----ag-a-----t-----c---
nakompathom	-----ag-----c--ct-----c---
supanburi	--t-----ag-----t-----c---

transformed-cp	GAAAAATGGTACATCTCCGGACATATCTGGTGTCTGGGTAATGATGGATGGGGAAACTCAA
p74-chonburi	-----a-----c-a-----g-----t-c---
p75-chonburi	-----a-----c-a-----g-----t-c---
p837m-lab	-----
p837s-lab	-----
p88-chieng-mai	-----a-----c-a-----g-----
p96-chieng-mai	-----a-----c-a-----g-----
ayutaya	-----a-----c-a-----g-----
bangkok	-----a-----c-a-----g-----t-c---
chainat	-----g-----
chumporn	-----a-----c-a-----g-----c---
khon-khen2	-----a-----c-a--g--g-----g-----c---
khon-khen1	-----a-----c-a-----g-----c---
nan	-----a-----c-a-----g-----c---
ratchaburi	-----a-----c-a-----g-----c---
sakhon-nakhon	-----a-----c-a-----g-----c---
salaya	-----a-----c-a--t-----g-----
supanburi	-----a-----c-a-----g-----t-c---

transformed-cp	GTTGAATATCCCATCAAACCTTTGATTGAACATGCAACTCCTTCATTCAGACAAATCATG
chonburi	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
chonburi	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
chieng-mai	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
chieng-mai	--c--t-----t--g--c-----g-----g-----
ayutaya	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
bangkok	----t-----a--g-----c-----g-----g-----
chainat	-----g-----c-----c-----
chumporn	--c--t-----g-----c-----c-----g-----g-----
khon-khen2	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
khon-khen1	--c--t-----g-----c-----c-----g-----g-----
nan	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
ratchaburi	----t-----g-----
sakhon-nakhon	--c--t-----g-----c-----c-----g-----g-----
nakompathom	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
supanburi	--c--t-----g-----c-----g-----g-----t---

transformed-cp	GCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAGGCATACATCGCGAAGAGGAACGCAACCGAGAGGTAC
chonburi	-----t--t--t-----
chonburi	-----t--t--t-----
chieng-mai	-----a-----t--t--t-----
chieng-mai	-----a-----t--t--t-----
ayutaya	-----a-----t--c--t-----
bangkok	-----a-----a-----t--t--t-----
chainat	-----t-----t-----t-----
chumporn	-----t-----a-----t--t--t-----
khon-khen2	-----a-----t--g--t-----
khon-khen1	-----a-----t--t--t-----
nan	-----a-----t--t--t-----
ratchaburi	-----a-----t--t--t-----
sakhon-nakhon	-----a-----t--t-----a---
nakompathom	-----a-----t--t--t-----
supanburi	-----g-----a-----t--t--t-----

transformed-cp	ATGCCGCGGTATGGGATCAAGAGAAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATACGCTTTC
chonburi	-----a-----g-----t-----
chonburi	-----a-----g-----t-----
chieng-mai	-----a-----g-----t-----
chieng-mai	-----a-----g-----t-----
ayutaya	-----a-----t-----t-----
bangkok	-----a-----g-----t-----t-----
chainat	-----t-----t-----t-----
chumporn	-----a-----g--c-----t-----
khon-khen2	---a-----a-----g-----t-----
khon-khen1	-----a-----g--c-----t-----
nan	-----a-----g-----t-----
ratchaburi	-----a-----g-----t-----
sakhon-nakhon	-----a-----g--c-----a-----t-----
nakompathom	-----a-----g-----t-----t-----t
supanburi	-----a-----g-----t-----t-----

transformed-cp	GATTTCATGAGGTCAATTCAAAAACGCCTGATAGAGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATG
chonburi	--c-----g-gc-----a-----g-----
chonburi	--c-----g--c-----a-----g-----
chieng-mai	--c-----a--g--c-----g--a-----g-----c-----
chieng-mai	--c-----g--c-----g--a-----g-----
ayutaya	--c-----g--c-----a-----g-----
bangkok	--c-----g--c-----a-----g-----
chainat	-----t-----a-----t-----
chumporn	--c-----g--c-----a-----g-----
khon-khen2	--c-c-----g--c-----a-----g-----
khon-khen1	--c-----g--c-----a-----g-----
nan	-----g--c-----a-----g-----
ratchaburi	--c-----g--c-----a-----g-----
sakhon-nakhon	--c-----g--c-----a-----g-----
nakompathom	--c-----g--c-----a-----g-----
supanburi	--c-----g--c-----a-----g-----

```

transformed-cp AAAGCTGCAGCGCTGCGCAATGCTAGTCGCAGAATGTTTGAATGGACGGCAGTGTCACT
chonburi      --g-----ca--g-----t-----
chonburi      --g-----ca--g-----t-----
chieng-mai    --g-----t--ca-----t-----
chieng-mai    --g-----ca-----t-----
ayutaya       --g-----a-----ca-----
bangkok       --g-----a--ca--g-----
chainat       -----at-----
chumporn      --g-----ca--g-----
khon-khen2    --g-----a--g-----
khon-khen1    --g-----ca--g-----
nan           --g-----ca-----g-----
ratchaburi    --g-----ca--g-----
sakhon-nakhon --g-----ca--g-----
nakompathom   --g-----ca-----
supanburi     --g-----ca--g-----

transformed-cp AACAAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTCAACAGAGACATGCACTCT
chonburi      -----
chonburi      -----
chieng-mai    -----t-----
chieng-mai    -----g--t-----
ayutaya       -----g-----
bangkok       -----
chainat       -----
chumporn      -----
khon-khen2    -----t-----
khon-khen1    -----
nan           -----t-----
ratchaburi    -----
sakhon-nakhon -----
nakompathom   -----t-----
supanburi     -----

transformed-cp CTCCTGGGTATGCGCAATTG
chonburi      -----
chonburi      -----
chieng-mai    -----a-----
chieng-mai    -----a-----
ayutaya       -----a-----
bangkok       -----t-----
chainat       -----
chumporn      -----a-----
khon-khen2    -----a-----
khon-khen1    -----a-----
nan           -----a-----
ratchaburi    -----
sakhon-nakhon -----a-----
nakompathom   -----a-----
supanburi     -----

```

รูปที่ 1.15 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่นำเข้าสู่มะละกอ
ดัดแปรพันธุกรรมกับ clones ที่ได้ตัวอย่างจากจังหวัด ชลบุรี เชียงใหม่ อุดรฯ กรุงเทพฯ ชัยนาท
ชุมพร ขอนแก่น น่าน ราชบุรี สกลนคร นครปฐม และ สุพรรณบุรี

1.7 การศึกษายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อไวรัสจากจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

จากการศึกษายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่แทรกเข้าไปในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Southern Blot analysis แสดงให้เห็นว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่ต้านทานไวรัสสายพันธุ์ G1 น่าจะมียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสแทรกเข้าไปในจีโนมมะละกอ 1 ชุด เนื่องจากเมื่อใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ตัด DNA ของมะละกอสายพันธุ์ G1 แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับตัวติดตาม (probe) ที่เป็น *cp* gene พบว่ามีชิ้น DNA ที่มีชุดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ขนาด 1.6 kb แทรกอยู่ เพียง 1 ชิ้น ในขณะที่มะละกอดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไวรัสสายพันธุ์ G2 น่าจะมียีนสร้างโปรตีน เปลือกไวรัสแทรกเข้าไปในโครโมโซมมะละกอมากกว่า 1 ชุด โดยพบชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ที่มีชุดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสและสามารถทำปฏิกิริยากับ *cp* gene probe หลายชิ้น มีขนาด 2.1 kb, 4.0 kb , 6.3 kb, 9.4 kb และ 23.1 kb ดังนั้นจึงทำการศึกษายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อไวรัสจากจีโนมของมะละกอดัดแปร พันธุกรรม ตามขั้นตอนดังนี้

1.7.1 การเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากจีโนมมะละกอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

ในการแยกยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อไวรัส จากจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ได้ทำการสกัด DNA จำนวนมาก จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ที่ไม่ต้านทานไวรัสสายพันธุ์ G1 และสายพันธุ์ที่ต้านทานไวรัส G2 นำ DNA ที่สกัดได้ไปตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III แยกขนาด DNA ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 1.16) แล้วทำการแยกชิ้น DNA พืชขนาดต่างๆที่พบว่ามียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสแทรกอยู่ออกจาก agarose gel โดยวิธี gene clean

นำชิ้น DNA ขนาดต่างๆที่แยกได้ ไปทำการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะชุดต่างๆ (รูปที่ 1.17) ทำการ clone ชิ้น DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนและนำไปศึกษาลำดับเบส

ผลการทดลอง

การใช้ไพรเมอร์จำเพาะชุดต่างๆในการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ที่แทรกเข้าไปในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่ต้านทานไวรัส G1 และสายพันธุ์ ที่ต้านทานไวรัส G2 โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) พบว่าไพรเมอร์บางชุด สามารถเพิ่มจำนวนยีน สร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (ตารางที่ 1.6)

พบว่าไพรเมอร์จำเพาะ 5'PRSV-3'PRSV สามารถใช้เพิ่มจำนวนของ CP gene ขนาด 0.9 kb ได้จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 1.6 kb ของจีโนมมะละกอตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ G1 และสามารถเพิ่มจำนวน CP gene ขนาด 0.9 kb และ 0.7 kb ได้จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 2.1 kb, 4.0 kb, 6.3 kb ของจีโนมมะละกอตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ G2

ไพรเมอร์จำเพาะชุด 35SPRT/3' PRV และ ชุด 35SPRT/IR ไม่สามารถใช้ในการเพิ่มจำนวน CP gene จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ที่แยกจากจีโนมของมะละกอ สายพันธุ์ G1 และ G2 ได้ (รูปที่ 1.18)

ไพรเมอร์จำเพาะชุด 35SPRT/CP3S ไม่สามารถใช้ในการเพิ่มจำนวน PCR product ของ CP gene จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ที่แยกจากจีโนมของมะละกอสายพันธุ์ G1 และ G2 (รูปที่ 1.19) ในขณะที่ไพรเมอร์จำเพาะชุด 5'PRV/35S polyA สามารถใช้เพิ่มจำนวน PCR product ของ CP gene ขนาดประมาณ 1.2 kb จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 1.6 kb ที่แยกจากมะละกอสายพันธุ์ G1 และสามารถเพิ่ม จำนวน PCR product ของ CP gene ขนาดประมาณ 1 kb จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 2.1 kb ที่แยกจากมะละกอสายพันธุ์ G2 (รูปที่ 1.20)

ไพรเมอร์จำเพาะชุด 35SPRT/ 35SPolyA สามารถใช้เพิ่มจำนวน PCR product ของ CP gene ขนาดประมาณ 1.6 kb จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 1.6 kb ที่แยกจากมะละกอสายพันธุ์ G1 แต่ไม่สามารถเพิ่ม จำนวน PCR product ของ CP gene จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 2.1, 4.0 และ 6.3 kb ที่แยกจากมะละกอสายพันธุ์ G2 (รูปที่ 1.21)

ผลจากการทดลองเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากจีโนมมะละกอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แสดงให้เห็นว่ามีการเกิด DNA rearrangement ในมะละกอตัดแปร พันธุ์กรรมด้านทานไวรัสสายพันธุ์ G2



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การป้องกันมะละกอจากโรคใบด่างจุดวงแหวนโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม”

“Protection of papaya against detrimental effect of papaya ringspot virus
by genetic engineering”

โดย นางสาวสุณี เกิดบัณฑิต และคณะ
สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

16 พฤษภาคม 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การป้องกันมะละกอจากโรคใบด่างจุดวงแหวนโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม”

“Protection of papaya against detrimental effect of papaya ringspot virus

by genetic engineering”

คณะผู้วิจัย

1. นางสาวสุณี เกิดบัณฑิต
2. Dr. Miloslav Juricek
3. นางสาวพงโสภี อุตศาสตร์
4. นางนวลวรรณ พึ่งถนอม

สังกัด: สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive Summary

Papaya (*Carica papaya* L.) is one of the important fruit crop in Thailand. However, a destructive disease caused by papaya ringspot virus (PRSV) is a major limiting factor for commercial production of papaya. The papaya production drastically decreased from 5,807 tons in 1989 to 34 tons in 1998 as a result of PRSV infection. The major cultivars of papaya grown in Thailand, Khak Dum and Khak Nuan are very susceptible for this virus. The infected area increased each year and it is now endemic throughout Thailand.

Papaya ringspot virus (PRSV) is a positive single stranded RNA virus in potyvirus group. The virions are flexuous, filamentous particles of 780x12 nm. The infected papaya plants show a range of symptoms: yellowing and vein-clearing of younger leaves, yellow mottling of the leaves, one or more lobes of infected leaves may become severely distorted and narrow, ringed spot on the fruit and dark green streaks may develop on the petioles and stems. Infected papaya plants show reduction in both quality and quantity of fruit production. Several techniques have been previously applied to control the disease in Thailand including mild strain cross protection and conventional breeding programs. However these techniques were not successful.

The pathogen derived resistance technique (PDR) has been used successively to produce transgenic plants resistant to viruses (Balcombe, 1996, Beachy, 1997). This technique was used to produce transgenic papaya resistant to PRSV (Fitch *et al*, 1990; Fitch *et al*, 1992, Cabrera-Ponce *et al*, 1995; Yang *et al*, 1996, Cheng *et al*, 1996). Transgenic plants of papaya cultivar "Sunset" containing the coat protein gene (*cp* gene) of mild strain HA 5-1 of PRSV isolate Hawaii showed resistance to the severe strain of PRSV isolated from Hawaii (HA) but not to PRSV isolated from Thailand and other countries (Tennant *et al*, 1994). For the research concerns with papaya ringspot virus at the Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, we compared the sequences of the coat protein gene and the 3' non-translated region of papaya ringspot virus isolates from Thailand and other countries (Kertbundit *et al*, 1998). We found very high degree of similarity among PRSV Thai isolates (95-99%) and 91% similarity with PRSV Hawaiian isolate. The high variability in the N terminus may play an important role in overcoming CP mediated resistance against PRSV generated by Hawaiian strain HA5-1.

In our previous work, we successfully used the coat protein gene of one PRSV Thai isolate Ratchaburi to generate transgenic papaya. Four of eleven transgenic papaya lines bearing the *cp* gene obtained from our experiments are resistant to PRSV. In this work these transgenic papayas had been analyzed in detail to gain the more information of resistance conferred by the *cp* transgene. The virus resistance is inherited to the next generation of transgenic papaya. The analysis of the coat protein insertion and expression in these PRSV resistant papayas revealed that the *cp* gene was integrated into the plant genome as rearrangement multiple copies in one loci. The rearrangement *cp* transgene triggers the gene silencing process in transgenic papayas and diminishes the transcription and expression of the *cp* transgene and generates the PRSV resistance. However this resistance in these transgenic papayas is very high specific. The transgenic papayas are resistance to some of PRSV isolates but not all. The sequence comparison of the *cp* gene

and the *Hc-Pro* of some PRSV isolates demonstrated that the PRSV isolates that can break down the resistance have sequence similarity of 95-97% in *cp* gene and 93-95% of the *Hc-Pro*. The *cp* genes of PRSV Khon Khan and Chumporn isolates were used to develop more transgenic papaya resistance to PRSV. The results from this study provide us more information of the use of genetic engineering to generate transgenic papaya resistance to PRSV which will be very useful to improve and maintain high the resistance ability of transgenic papaya in the future.

Abstract

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.

บทคัดย่อ

ไวรัสโรคใบด่างจุดวงแหวนเป็นสาเหตุของโรคร้ายแรงในมะละกอ การควบคุมโรคด้วยวิธีดั้งเดิมไม่ประสบความสำเร็จ มีเพียงวิธีการสร้างมะละกอโดยวิธีทางพันธุกรรมวิศวกรรม เท่านั้นที่สามารถสร้างมะละกอด้านทานต่อไวรัสนี้ได้ 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 ในการวิจัยนี้จึงทำการศึกษาวิธีการป้องกันมะละกอจากโรคใบด่างจุดวงแหวนโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม เพื่อให้สามารถเข้าใจกลไกการต้านทานไวรัสและนำไปใช้พัฒนาวิธีการป้องกันไวรัสให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

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

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

บทนำ

ความสำคัญของมะละกอและโรคใบด่างจุดวงแหวน

มะละกอเป็นพืชที่มีความสำคัญทางด้านการเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเป็นไม้ผลที่สามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคในประเทศ ผลสามารถใช้รับประทานได้ทั้งผลดิบและผลสุก แหล่งเพาะปลูกใหญ่เพื่อการค้าและอุตสาหกรรม ได้แก่ ราชบุรี นครปฐม ชุมพร สุราษฎร์ธานี กระบี่ จันทบุรีและสระแก้ว จากข้อมูลของกองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร ปี 2541 รายงานว่าในประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกมะละกอทั้งสิ้น 170,753 ไร่ ผลผลิตรวม 367,861 ตัน โดยมะละกอพันธุ์แขกดำมีผลผลิตมากที่สุด (61.20%) แขกนวล (22.83%) และพันธุ์อื่นๆ (15.97%) ผลผลิตมะละกอส่วนใหญ่นอกจากใช้บริโภคภายในประเทศแล้ว ยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญของ อุตสาหกรรมแปรรูป เพื่อนำไปผลิตเป็นมะละกอบรรจุกระป๋อง มะละกอบแห้ง และใช้เป็นส่วน ประกอบที่สำคัญของฟรุทสลัด ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกฟรุทสลัดที่สำคัญรายหนึ่ง ของโลก ข้อมูลของกรมเศรษฐกิจการพาณิชย์ในปี 2540 รายงานมูลค่าการส่งออกมะละกอ และผลิตภัณฑ์รวมประมาณ 30.4 ล้านบาท (ไม่รวมส่วนของมะละกอ ที่อยู่ในฟรุทสลัด) ถ้าคิดส่วนของมะละกอที่ใช้ผสมอยู่ในฟรุทสลัด ซึ่งมีส่วนผสมอยู่ประมาณ 20% จากมูลค่าส่งออกฟรุทสลัดทั้งสิ้น 979.4 ล้านบาท จะคิดเป็นส่วนของมะละกามีมูลค่า 195.88 ล้านบาท รวมทั้งสิ้นจะมีมูลค่าการส่งออกมะละกอทั้งหมดประมาณ 226.3 ล้านบาท

ถึงแม้ว่ามะละกอจะเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญดังกล่าว แต่ในปัจจุบันพบว่ามีโรคระบาดที่สำคัญ คือ โรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวน ซึ่งเกิดจากไวรัส papaya ringspot virus (PRSV) โรคนี้พบระบาดรุนแรงในทุกภาคของประเทศไทยที่มีการปลูกมะละกอ โรคระบาดนี้ได้ทำลายผลผลิตมะละกอในประเทศ ทำให้ปริมาณลดลงและมีคุณภาพต่ำไม่สามารถส่งผลผลิตออกจำหน่ายในตลาดต่างประเทศได้ ปริมาณการส่งออกมะละกอของประเทศไทยลดลงอย่างชัดเจน ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 เป็นต้นมา (ตารางที่ 1)

Year	Exports (Mt)	Exports (Val 1000\$)
1985	5,807	2720
1986	3,766	870
1987	4,179	971
1988	4,132	1,002
1989	1,235	334
1990	247	86
1991	89	37
1992	75	58
1993	94	61
1994	355	89
1995	8	10
1996	5	8
1997	34	31
1998	34	31

ตารางที่ 1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกมะละกอของประเทศไทย ปี 1985-1998
(ข้อมูลจาก FAOSTAT)

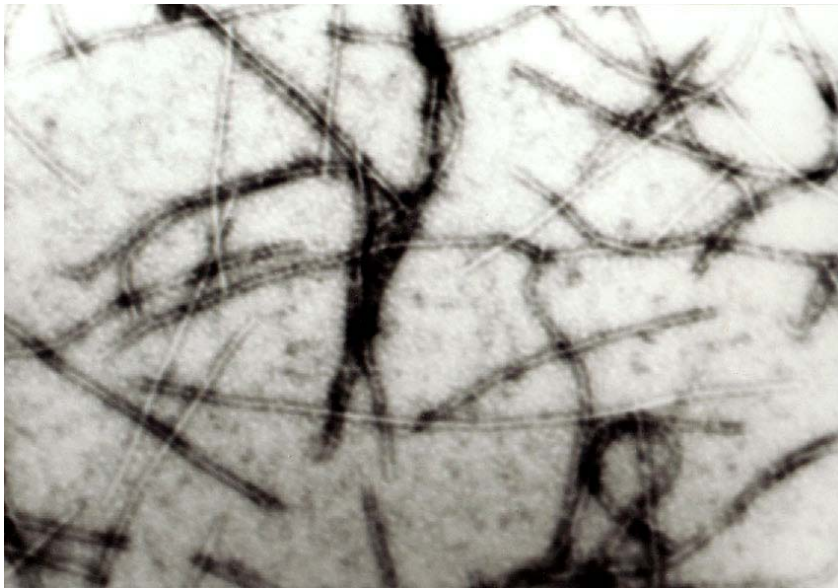
โรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอ

เกิดจากไวรัส papaya ringspot virus (PRSV) สามารถแพร่ระบาดโดยมีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ ไวรัสนี้สามารถเข้าทำลายมะละกอได้ทุกระยะ ตั้งแต่ในระยะที่เป็นต้นอ่อนจนถึงระยะที่มะละกอเติบโตเต็มที่ อาการเริ่มแรกของโรคจะเห็นชัดที่ใบมีลักษณะของใบด่าง หักงอผิดรูปร่าง มีขีดซ้ำๆตามลำต้น ถ้ามะละกอเป็นโรคในระยะที่เป็นต้นอ่อน จะมีอาการรุนแรงมาก ต้นจะแคระแกรน ไม่ติดผลเลย ถ้ามะละกอเป็นโรคในระยะต้นโต มะละกอสามารถให้ผลได้ แต่จะทำให้ปริมาณผลผลิตและคุณภาพของมะละกอลดลงเป็นอย่างมาก เนื่องจากที่ผลมะละกอจะมีรอยซ้ำเป็นวงแหวนไปทั่วทั้งผล เนื้อในจะแข็งกระด้าง เมื่อมะละกอสุกบริเวณรอยซ้ำดังกล่าวจะมีเนื้อเป็นไต แข็ง มีรสขม ขายไม่ได้ราคา

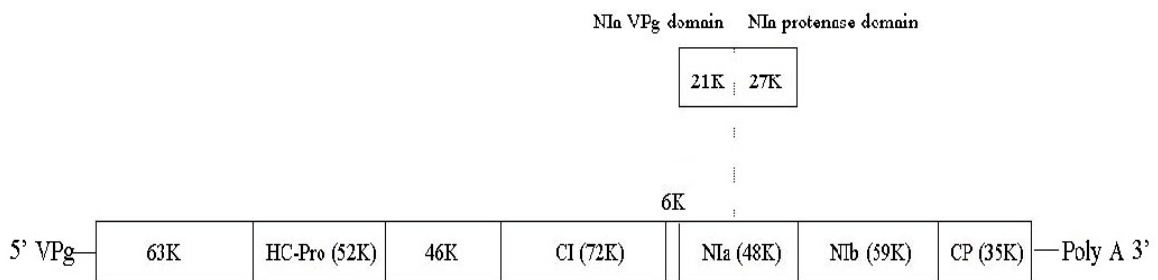


รูปที่ 1 และ 2 ลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับใบและผลของมะละกอที่เป็นโรคใบด่างจุดวงแหวน

ไวรัสใบด่างจูดวงแหวนในมะละกอ หรือ PRSV จัดอยู่ในกลุ่มของ potyvirus ซึ่งเป็นไวรัสกลุ่มใหญ่ที่สุดที่ก่อโรคในพืช ลักษณะของไวรัสนี้เป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) มีขนาดประมาณ 780x12 nm. และมีลักษณะบิดคด เป็นเกลียว (flexuous) มีความยาวของจีโนมประมาณ 10 kb การแปลรหัสโปรตีนของไวรัสจะแปลเป็นโปรตีนเดี่ยวเส้นยาว (polyprotein) ซึ่งจะถูกย่อยออกเป็นโปรตีนย่อยอีกหลายชนิด รวมทั้ง helper component protein, replicase และ coat protein (โปรตีนเปลือกไวรัส) ด้วย



รูปที่ 3. รูปร่างของไวรัส PRSV เมื่อดูด้วยกล้อง transmission electron microscope (40,000x)



รูปที่ 4. จีโนมของไวรัส PRSV ประกอบด้วย VPg-5' leader-63K (NT)-52K (HC-Pro)-46K-72K (CI)-6K-48K (Nla)-59K (Nlb)-35K (coat protein)-3' non coding region-poly(A) tract

การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการสร้างมะละกอข้ามสายพันธุ์ (transgenic papaya) ต้านทานโรคไวรัส

มีรายงานการวิจัยพบว่าการใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ตัดต่อยีนของไวรัสใส่เข้าไปในพืช ทำให้สามารถสร้างพืชตัดแปรพันธุกรรม(transgenic plant) ที่ต้านทานไวรัสได้ ยีนของไวรัส ที่ใช้ตัดต่อใส่เข้าไปในพืชมีหลายยีน เช่น ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (coat protein : CP), ยีนสร้าง cytoplasmic inclusion protein (CI) และยีนถ่ายแบบ (replicase gene) เทคนิคในการตัดต่อยีนไวรัสใส่เข้าไปในพืช เพื่อสร้างพืชต้านทานไวรัสนี้ เรียกว่า pathogen derived resistance (PDR) กลไกในการต้านทานไวรัสโดยวิธีนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในระดับของการสร้างโปรตีน (protein mediated) และในระดับของการสร้างอาร์เอ็นเอ (RNA mediated or gene silencing) โดยในระดับของการสร้างโปรตีนจะมีการสร้างโปรตีนจากยีนไวรัสที่ใส่เข้าไปในเซลล์ซึ่งโปรตีนนี้จะรบกวนขบวนการแบ่งตัวของไวรัสเมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์ ทำให้ไวรัสไม่สามารถแบ่งตัวแล้วทำให้เกิดโรคได้ การสร้างความต้านทานไวรัสในระดับของการสร้างอาร์เอ็นเอเกิดขึ้นจากการสร้างอาร์เอ็นเอจากยีนของ ไวรัสที่ใส่เข้าไปในเซลล์พืช อาร์เอ็นเอที่สร้างขึ้นจะมาจับกับยีนของไวรัสที่เข้าสู่เซลล์แล้วเกิดการเหนี่ยวนำ ให้มีการทำลายยีนที่จับกับอาร์เอ็นเอดังกล่าว กลไกการต้านทานโดยวิธี RNA mediated นี้ จะมีความจำเพาะสูงกับลำดับเบสของไวรัส (for reviews see Balcombe, 1996, Beachy, 1997)

มีการนำวิธี PMD มาใช้ในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานโรคไวรัสใบด่าง จูดวงแหวน (Fitch, *et al*, 1992, 1993) โดยทำการตัดต่อยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากจีโนมของ ไวรัสใบด่างจูดวงแหวนสายพันธุ์ฮาวายใส่เข้าไปในพลาสมิดพาหะ (vector) แล้วนำพลาสมิดที่มียีน ของไวรัสใส่เข้าไปในมะละกอสายพันธุ์ฮาวาย พบว่ามะละกอข้ามสายพันธุ์ที่ได้จากการทดลองสามารถ ต้านทานไวรัสใบด่างจูดวงแหวนสายพันธุ์ฮาวายได้ กลไกการต้านทานต่อไวรัสใบด่างจูดวงแหวน ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แต่ความต้านทานที่เกิดขึ้นนี้มีความจำเพาะสูงกับสายพันธุ์ของไวรัส กล่าวคือ มะละกอที่ได้สามารถต้านทานเฉพาะกับไวรัสชนิดที่ใช้นามาสกัดยีนใส่เข้าไปในมะละกอเท่านั้น ไม่ สามารถต้านทาน

ต่อไวรัสใบด่างจูดวงแหวนที่พบระบาดในที่อื่นๆ ได้ ดังนั้นมะละกอที่ได้รับยีน สร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจูดวงแหวนสายพันธุ์ฮาวาย จึงไม่สามารถต้านทานต่อไวรัสใบด่าง จูดวงแหวนที่พบระบาดในประเทศไทยได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมามะละกอด้านทานไวรัสที่ได้จาก ฮาวายมาใช้ปลูกในประเทศไทยเพื่อช่วยแก้ปัญหาโรคไวรัสใบด่างจูดวงแหวนในประเทศไทยได้

สำหรับการวิจัยในส่วนของมหาวิทยาลัยมหิดล ได้เริ่มดำเนินการศึกษาเกี่ยวกับไวรัส ใบด่างจูดวงแหวนเพื่อให้ได้ข้อมูลรายละเอียดที่ถูกต้องตั้งแต่ในระดับพื้นฐานไปจนถึงการนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันมะละกอจากโรคไวรัส โดยในขั้นต้นได้เริ่มทำการศึกษา ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ของไวรัสใบด่างจูดวงแหวนที่พบระบาดในแหล่งเพาะปลูกภาคต่างๆ ในประเทศ ได้แก่ ราชบุรี ขอนแก่น ชุมพร เชียงใหม่ ชลบุรี พบว่ายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจูดวงแหวน ที่พบระบาดในประเทศไทยมีความคล้ายคลึงของลำดับเบส (sequence identity) สูงประมาณ 95%-99% และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจูดวงแหวนที่มี รายงานจากประเทศอื่นๆ พบว่ามีความแตกต่างจากที่พบในสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลียและเวียดนาม ในระดับต่างกันจนถึงประมาณ 13% (Kertbundit *et al*, 1998) โดยพบว่าลำดับเบสทางปลายด้าน 5' มีความแตกต่างกันมากกว่าปลายด้าน 3' และยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสที่พบระบาด ในประเทศไทยมีกรดอะมิโนไลซีนที่ขาดหายไป 1 ตัว ทางปลายด้าน 5' สันนิษฐานว่าความแตกต่าง ของลำดับเบสทางปลายด้าน 5' นี้ อาจจะเกี่ยวข้องกับความจำเพาะของการใช้ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ในการต้านทานต่อไวรัส ข้อมูลที่ได้จากศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการเลือกใช้ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไวรัสมีความสำคัญมาก ความแตกต่างของ ลำดับเบสของยีนเปลือกไวรัสเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้การใช้นี้ในการป้องกันโรคไม่ได้ผล ดังนั้น มะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่สามารถต้านทานไวรัสที่ระบาดในแหล่งปลูกหนึ่งก็อาจจะไม่ต้านทานกับ ไวรัสที่พบระบาดในแหล่งอื่นที่มีความแตกต่างกัน และหากเกิดการกลายพันธุ์ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจูดวงแหวนซึ่งเป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอเส้นเดี่ยว (single stranded RNA) ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสสูงกว่าไวรัสชนิดดีเอ็นเอ (DNA virus) ก็อาจทำให้มะละกอดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไวรัสที่สร้างขึ้นไม่สามารถต้านทานกับไวรัสที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ ดังนั้นในการ สร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไวรัส นอกจากจะต้องคำนึงถึงการใช้นี้สร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากไวรัสที่พบระบาดในท้องถิ่นนั้นๆ แล้ว ยังจำเป็นต้องศึกษาถึงกลไกของการใช้ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจูดวงแหวนในการสร้างความต้านทานต่อไวรัส และศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับเบสในยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสควบคู่ไปกับการตรวจสอบความต้านทานไวรัส ในมะละกอข้ามสายพันธุ์ที่สร้างขึ้นด้วย เพื่อให้ได้ความต้านทานต่อไวรัสที่ยั่งยืน และเพื่อให้สามารถนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการป้องกันไวรัสให้ได้ผลในระยะยาว

การดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยในวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ คือ

1. การศึกษากลไกการต้านทานไวรัสโดยใช้ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส

1.1 การตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

1.2 การตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Southern Blot analysis

1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในระดับของการสร้าง อาร์เอ็นเอ (transcription) โดยวิธี RT-PCR

1.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในระดับของการสร้าง อาร์เอ็นเอ (transcription) โดยวิธี northern blot analysis

1.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยวิธี western blot analysis

1.6 การศึกษายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (coat protein gene: *cp* gene) ของไวรัสใบด่างจูดงแหวนที่พบในแหล่งปลูกมะละกอต่างๆในประเทศไทย

1.7 การศึกษายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อไวรัสจากจีโนมของ มะละกอดัดแปรพันธุกรรม

1.8 การศึกษาลำดับเบสของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่แทรกเข้าไปในจีโนมของมะละกอ ดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2

1.9 การพัฒนาพลาสมิดที่มียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่ใช้สร้างความต้านทานในมะละกอนำยีนที่สร้างขึ้นเข้าสู่มะละกอ

1.10 การศึกษาและเปรียบเทียบยีนสร้างโปรตีน Helper component (Hc-Pro) ในไวรัสใบด่าง จูดงแหวนที่ระบาดในแหล่งปลูกมะละกอ

1.11 การตรวจสอบหา samll interference RNA ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานและ ไม่ต้านทานต่อไวรัส

2. การตรวจสอบประสิทธิภาพของมะละกอในการป้องกันโรคระบาดไวรัสใบด่างจุดวงแหวน

- 2.1 การทดสอบความต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม
- 2.2 การทดสอบความต้านทานของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน สายพันธุ์ต่างๆที่เก็บจากแหล่งปลูกมะละกอในประเทศไทย
- 2.3 การทดสอบความต้านทานไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมรุ่นลูกและหลาน (R1, R2 และ R3)
- 2.4 การศึกษาการถ่ายทอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสไปยังมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่นลูกและหลาน (R1, R2 และ R3) โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)
- 2.5 การตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่นลูกและหลาน (R1, R2 และ R3) โดยใช้วิธี Southern Blot analysis
- 2.6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปร พันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R1 โดยวิธี western blot analysis
- 2.7 การตรวจสอบการสร้างโปรตีนจากยีนเปลือกไวรัสของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 โดยวิธี RT-PCR

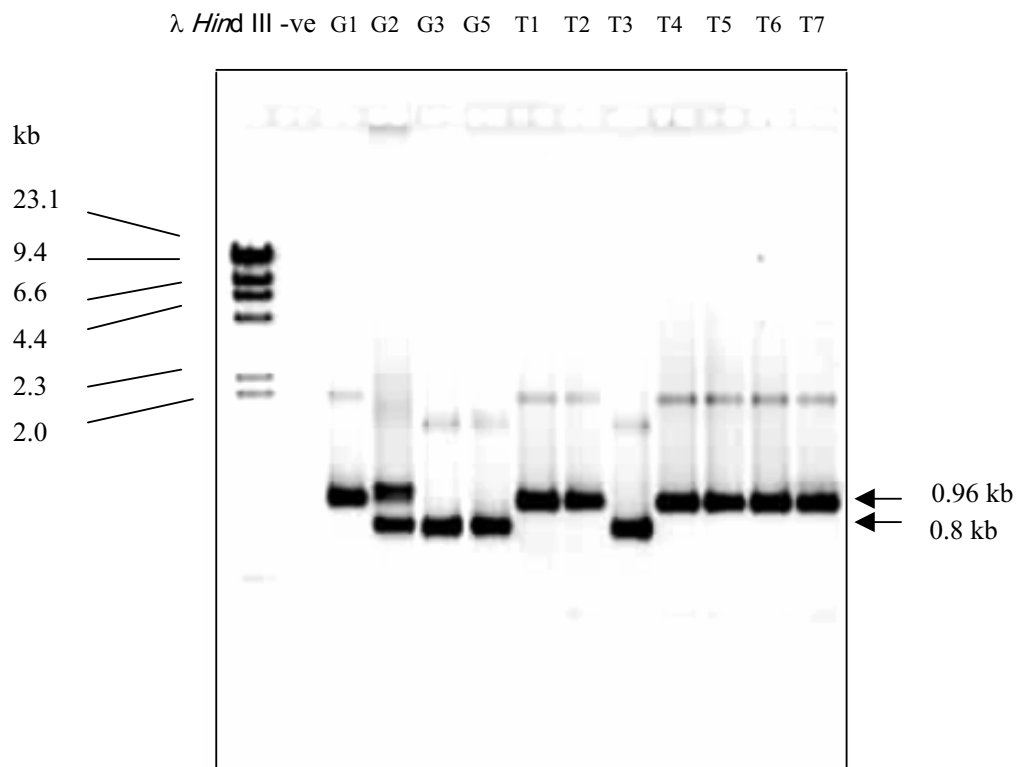
1. การศึกษากลไกการต้านทานไวรัสโดยยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส

1.1 การตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยใช้ เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ทำการสกัด DNA จากใบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 โดยวิธี CTAB method (Rogers. and Bendich., 1994) แล้วใช้ primers ที่จำเพาะกับลำดับเบส ด้านปลาย 5' และด้านปลาย 3' ของ coat protein gene (5' PRV และ 3' PRV) ทำการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสโดยใช้วิธี PCR โดยในปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 50 μ l มีส่วนประกอบ คือ DNA template จำนวน 100 ng, forward and reverse primers จำนวน 50 pmol, dNTPs mix จำนวน 200 μ M, 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM $MgSO_4$, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Triton x-100 และ 100 μ g/ml nuclease-free BSA), *Pfu* DNA polymerase จำนวน 0.5 μ l (1.5 units) และน้ำปลอด DNase นำ DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยใช้เครื่อง gene amplification system 2400 thermal cycle (Perkin-Elmer) โดยทำปฏิกิริยา 35 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที, 50°C นาน 30 วินาที และ 72°C นาน 2 min นำ DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

ผลการทดลอง

พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้งหมดมียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสแทรกอยู่ เนื่องจาก สามารถใช้ primers ที่จำเพาะ 5' PRV และ 3' PRV ทำการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีน เปลือกไวรัสได้โดยใช้วิธี PCR ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เพิ่มจำนวนได้ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, T1, T2, T4, T5, T6 และ T7 มีขนาด 0.96 kb ในขณะที่ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เพิ่มจำนวนได้ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G3, G5 และ T3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อไวรัสที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรี มีขนาด 0.8 kb และยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เพิ่มจำนวนได้ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ ที่ต้านทานต่อไวรัสที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรีเช่นกัน มี 2 ชั้น ขนาด 0.96 kb และ 0.8 kb (รูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 แสดงผลการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยวิธี PCR นำไปแยกขนาดบน 0.8 % agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 negative control ในการทำ PCR amplification (ไม่มีใส่ template)

แถวที่ 3-13 PCR amplification จาก DNA ที่สกัดจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5, T1, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 ตามลำดับ

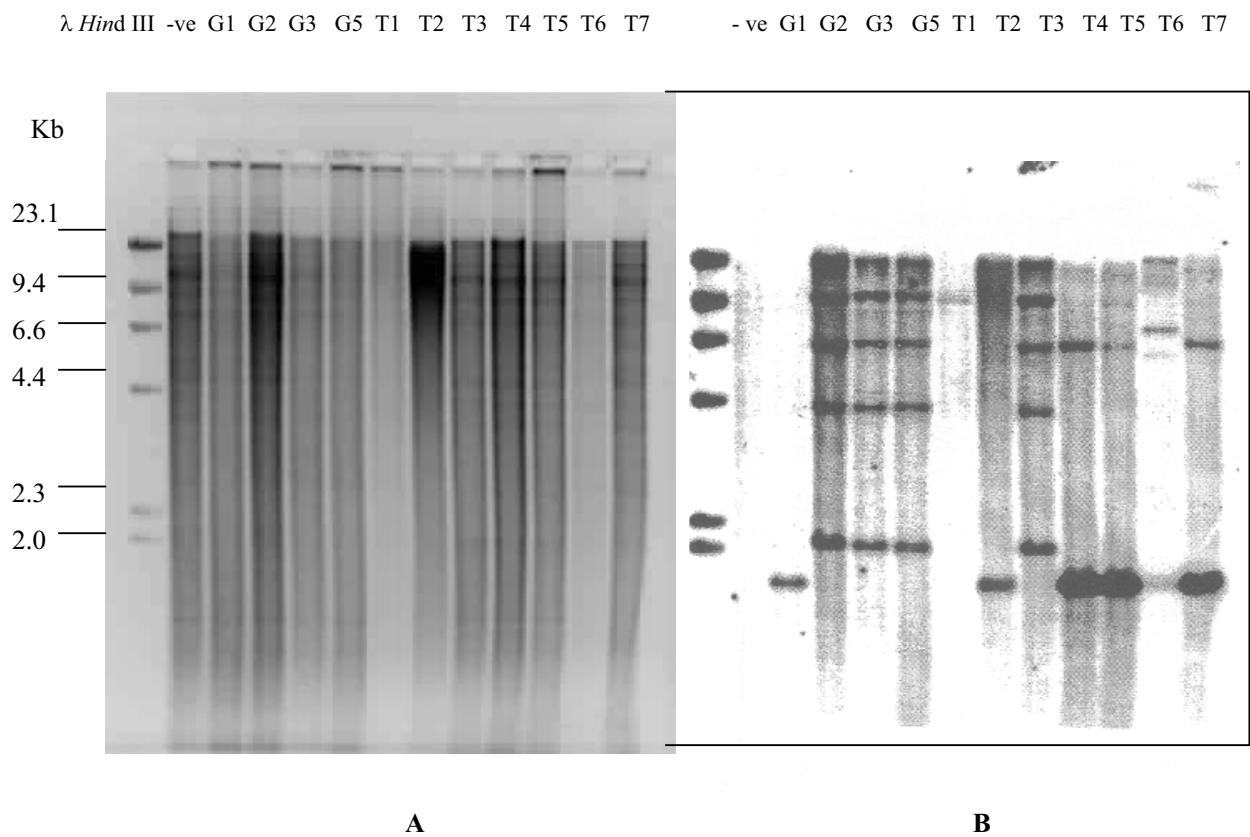
1.2 การตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Southern Blot analysis

ทำการสกัด DNA จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 11 สายพันธุ์ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I, *Hind* III ตัด DNA ออกเป็นชิ้นส่วนย่อยแล้วนำไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis ทำการย้าย DNA จาก agarose gel ไปยังแผ่น nylon membrane และใช้ DNA ติดตาม (DNA probe) ในการทำปฏิกิริยาคู่สม (hybridisation) กับ DNA จากมะละกอโดยเทคนิค Southern blot analysis

ผลการทดลอง

จากการใช้ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสเป็น DNA ติดตามในการทำปฏิกิริยาคู่สมกับ DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III (รูปที่ 1.2) พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้งหมดมียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสแทรกอยู่ ยกเว้นมะละกอดัดแปรพันธุกรรม T1 ซึ่งเห็นแถบ DNA ที่ทำปฏิกิริยากับ DNA ติดตามไม่ชัดเจน ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1 และ T2 มีแถบ DNA ที่จับกับ DNA ติดตาม 1 แถบมีขนาด 1.6 kb ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2, G3, G5 และ T3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อไวรัสที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรี มีรูปแบบของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่แทรกเข้าไปในจีโนมของมะละกอใกล้เคียงกันมาก โดยพบว่ามียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสหลาย copy numbers และมีลักษณะของ DNA rearrangement โดยพบว่าแถบ DNA ขนาด 2.1 kb, 4.0 kb และ 6.3 kb สามารถจับกับ DNA ติดตาม สำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรม T4, T5 และ T7 พบว่าแถบ DNA ขนาด 1.6 kb และ 6.3 kb สามารถจับกับ DNA ติดตาม ในขณะที่ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม T6 มีแถบ DNA ขนาด 1.6 kb และประมาณ 8 kb

การใช้ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสเป็น DNA ติดตามในการทำปฏิกิริยาคู่สมกับ DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I (รูปที่ 1.3) ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน



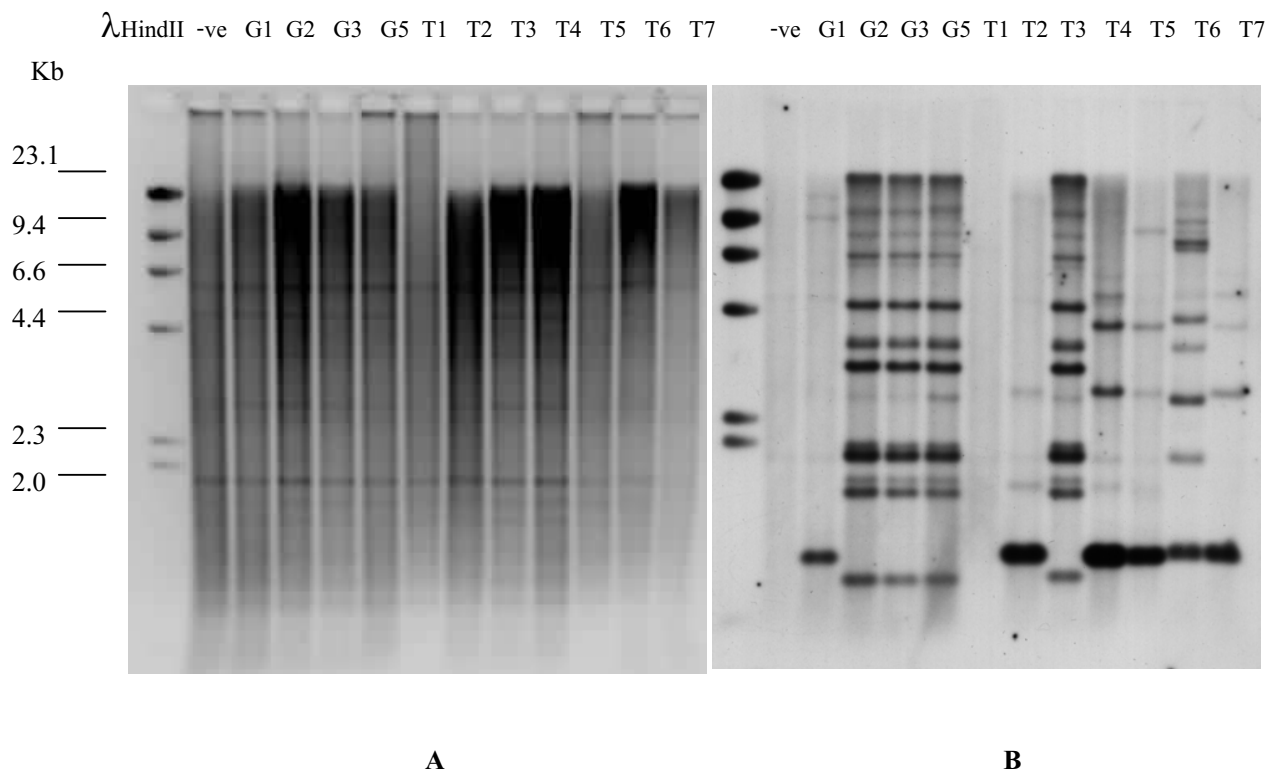
รูปที่ 1.2 แสดงผลการตัด DNA จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมและมะละกอไม่เป็นโรคไวรัส (-ve)

ด้วยเอนไซม์ *Hin* d III นำไปแยกขนาดบน 0.8 % agarose gel electrophoresis (A) และผลจาก Southern blot hybridization โดยใช้ DNA ของ coat protein gene ของ PRSV เป็น probe (B)

แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 negative control (DNA จากมะละกอที่ไม่เป็นโรคไวรัส)

แถวที่ 3-13 DNA จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5, T1, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 ตามลำดับ



รูปที่ 1.3 แสดงผลการตัด DNA จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมและมะละกอไม่เป็นโรคไวรัส (-ve) ด้วย *Nco* I แล้วแยกขนาดบน 0.8 % agarose gel electrophoresis (A) และผลจาก Southern blot hybridization โดยใช้ DNA ของ coat protein gene ของ PRSV เป็น probe (B)

แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 negative control (DNA จากมะละกอที่ไม่เป็นโรคไวรัส)

แถวที่ 3-13 DNA จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5, T1, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 ตามลำดับ

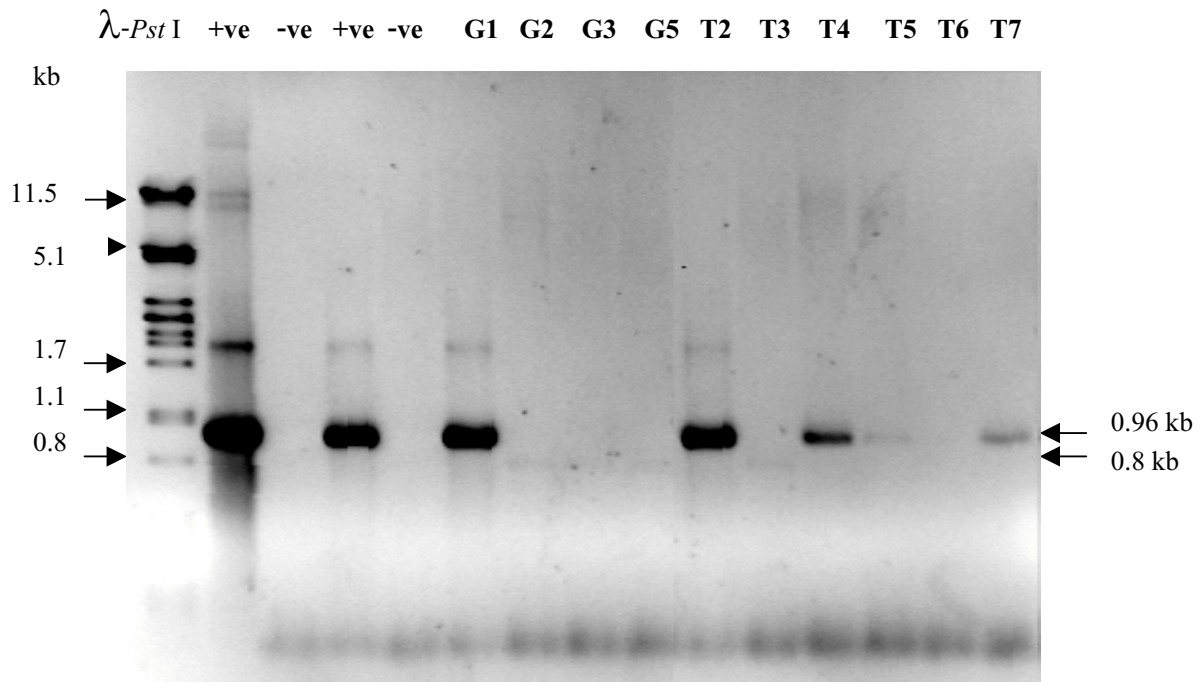
1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ในระดับของการสร้าง RNA (transcription) โดยวิธี RT-PCR

ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 ในระดับการสร้าง mRNA (mRNA transcription) โดยวิธี RT-PCR โดยการสกัด RNA จากใบมะละกอโดยใช้สาร Trizol ของบริษัท Gibco, Ltd. แล้วใช้เอนไซม์ DNaseI ทำการกำจัด DNA ที่อาจติดมาในขั้นตอนการสกัด RNA วัดปริมาณ RNA ที่ได้จากปฏิกิริยาโดยใช้ spectrophotometer โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD260 nm และตรวจสอบบน 1% agarose-formaldehyde gel (1% agarose, 2.2 M formaldehyde, 10% of 10x MOPS) นำสารพันธุกรรม RNA ในปริมาณ 2 µg มาเตรียม cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription reaction โดยใช้ oligo-dT และเอนไซม์ SuperscriptTM II (GIBCO BRL) และทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่อง Gene Amplification System 2400 (Perkin Elmer) นำ cDNA จำนวนเท่ากันจากแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR และใช้ primers ที่จำเพาะกับลำดับเบสด้านปลาย 5' และ 3' ของ coat protein gene (5'PRV/3'PRV) แล้วจึงนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

ผลการทดลอง

พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่สามารถต้านทานไวรัสได้ คือ สายพันธุ์ G1 และ T2 มีการสร้าง mRNA จำนวนมากเห็นเป็นแถบเข้ม ขณะที่สายพันธุ์ T4 และ T7 สามารถสร้าง mRNA ได้ปริมาณน้อยกว่า G1 และ T2, สายพันธุ์ T5 สร้าง mRNA น้อยมาก และสายพันธุ์ T6 ไม่สามารถตรวจพบการสร้าง mRNA สำหรับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่สามารถต้านทานไวรัสได้ คือสายพันธุ์ G2, G3, G5, T3 มีการสร้าง mRNA ปริมาณน้อยมาก และ mRNA ที่สร้างขึ้นมีขนาดประมาณ 800 เบส ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับขนาดของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ที่พบในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ตรวจพบ โดยวิธี PCR มาก่อนหน้านี้ (รูปที่ 1.4)

ผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่ามีการยับยั้งการสร้าง mRNA จากยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ที่ใส่เข้าไปในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมบางสายพันธุ์ทั้งที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อไวรัส การยับยั้งการสร้าง mRNA นี้ อาจเกิดจากกระบวนการเกิด gene silencing หรืออาจเกิดจากความผิดปกติของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่ใส่เข้าไปในมะละกอทำให้ไม่สามารถสร้าง mRNA ได้



รูปที่ 1.4 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ในระดับของการสร้าง RNA (transcription) โดยวิธี RT-PCR

- แถวที่ 1 λ -Pst I digested marker
- แถวที่ 2 positive control ในการทำ PCR amplification (ใช้ pSA1092 เป็น template)
- แถวที่ 3 negative control ในการทำ PCR amplification (ไม่ใช่ template)
- แถวที่ 4 PCR amplification จาก cDNA ที่เตรียมจาก RNA ที่สกัดจากมะละกอธรรมดา ที่ติดเชื้อไวรัส
- แถวที่ 5 PCR amplification จาก cDNA ที่เตรียมจาก RNA ที่สกัดจากมะละกอธรรมดา ที่ไม่ติดเชื้อไวรัส
- แถวที่ 6-15 PCR amplification จาก cDNA ที่เตรียมจาก RNA ที่สกัดจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T2, T3, T4, T5, T6, และ T7 ตามลำดับ

1.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ในระดับของการสร้าง RNA (transcription) โดยวิธี northern blot analysis

ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T4, T3, T5, T6 และ T7 ในระดับการสร้าง RNA (transcription) โดยวิธี northern blot analysis โดยการสกัด RNA จากใบมะละกอโดยวิธี Hot phenol RNA extraction แล้วนำ RNA ที่ได้ไปแยกขนาดบน 1.0 % denaturing formaldehyde agarose gel ทำการย้าย RNA ไปบนแผ่น nitrocellulose membrane และนำไปทำปฏิกิริยากับตัวติดตาม CP gene probe คือ IF-PRV3' riboprobe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี P^{32} ซึ่งมีความจำเพาะกับปลายด้าน 3' ของ cp gene นำแผ่น nitrocellulose membrane ไปประกบบนแผ่นฟิล์ม X-ray หากมีการสร้าง mRNA จาก CP gene ที่อยู่ในมะละกอดัดแปร พันธุกรรม mRNA ที่สร้างขึ้นจะสามารถทำปฏิกิริยากับ CP gene probe เมื่อนำฟิล์มไปล้างจะเห็นแถบ mRNA บนแผ่นฟิล์ม

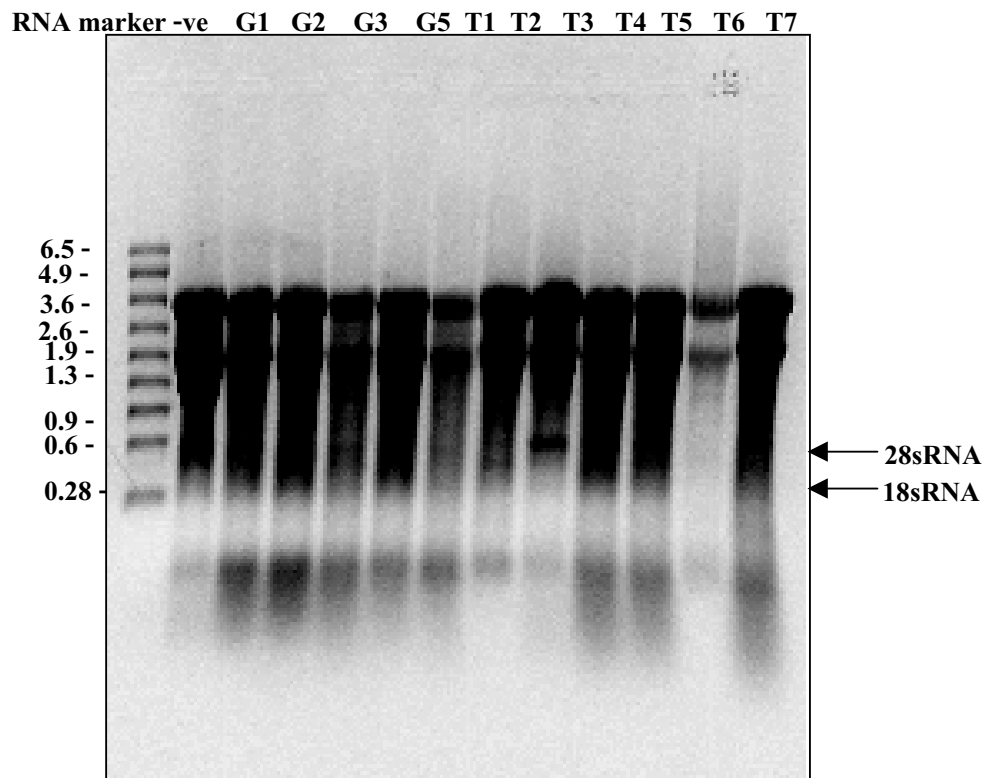
ผลการทดลอง

จากการสกัด RNA จากใบมะละกอโดยวิธี Hot phenol RNA extraction เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในระดับ การสร้าง RNA (transcription) ได้นำ RNA ที่ได้ไปแยกขนาดบน agarose formaldehyde gel electrophoresis (รูปที่ 1.5) แล้วย้าย RNA ไปบนแผ่น nitrocellulose membrane ทำปฏิกิริยา northern blot analysis โดยใช้ IF-PRV3' riboprobe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี P^{32} ซึ่งมีความจำเพาะกับปลายด้าน 3' ของ cp gene แล้วนำแผ่น nitrocellulose membrane ไปประกบบนแผ่นฟิล์ม X-ray พบว่าสามารถตรวจพบการสร้าง RNA ของ CP gene ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1 และ T2 เป็นแถบ RNA เข้ม มีขนาดประมาณ 1.5 kb ในขณะที่พบแถบ RNA จาง ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ T4 และ T7 แต่ไม่พบแถบ RNA ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2, G3, G5, T3, T5 และ T6 (รูปที่ 1.6)

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีน เปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมในระดับของการสร้าง RNA (transcription) โดยวิธี RT-PCR นอกจากนั้นยังพบว่าการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ในระดับการสร้าง RNA โดยวิธี RT-PCR มีความไวสูงกว่าวิธี northern blot analysis

เมื่อทดลองล้าง CP gene probe ออกจากแผ่น nitrocellulose membrane แล้วใช้ GUSKF-GUSKR probe ซึ่งมีความจำเพาะกับ *gus* gene ในการทำปฏิกิริยา เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ *gus* gene ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม พบว่าสามารถตรวจพบการสร้าง RNA ของ *gus* gene ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, T2, T4, T5 และ T7 เป็นแถบ RNA มีขนาดประมาณ 1.9 kb โดยในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

กรรมสายพันธุ์ T5 พบเป็นแถบจาง แต่ไม่พบแถบ RNA ในมะละกอดัดแปร พันธุ์กรรม สายพันธุ์ G2, G3, G5, T3 และ T6 (รูปที่ 1.7)

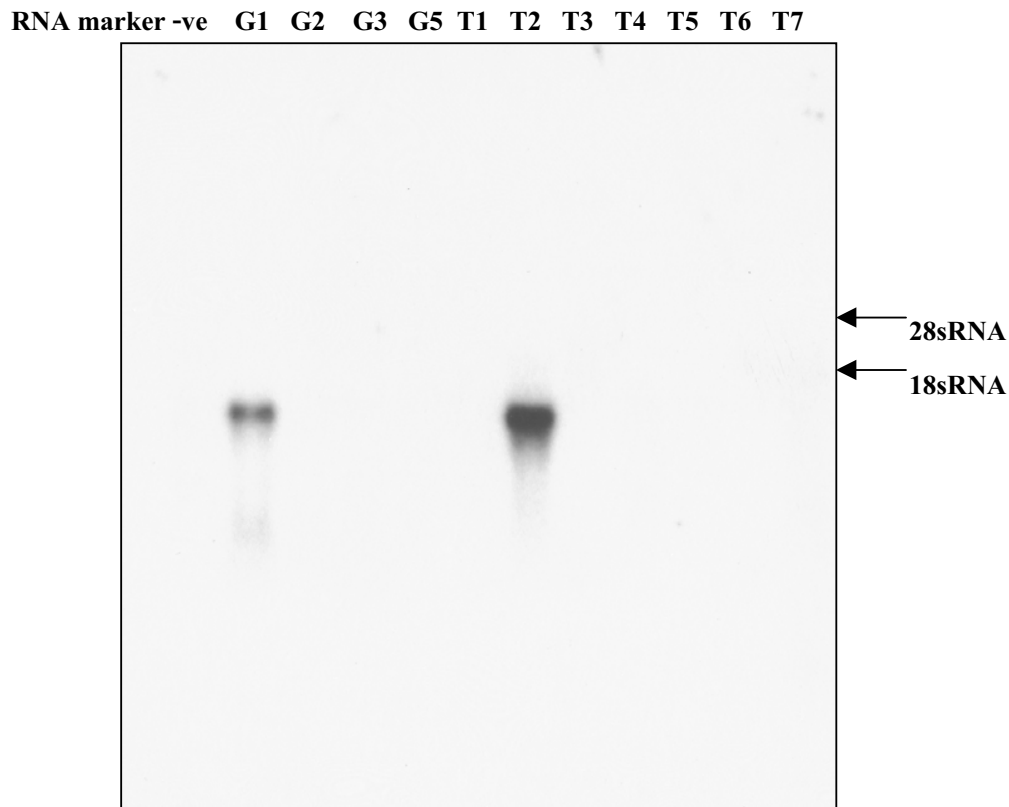


รูปที่ 1.5 แสดง RNA ที่สกัดจากของมะละกอธรรมดาที่ไม่ติดโรคไวรัสและมะละกอดัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6, และ T7 ตามลำดับ นำไปแยกขนาดบน 1.0 % denaturing formaldehyde-agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 RNA marker ขนาด 0.28-6.58 kb จำนวน 1 μ g

แถวที่ 2 RNA ของมะละกอธรรมดาที่ไม่ติดโรคไวรัส

แถวที่ 3–13 RNA ของมะละกอดัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6 และ T7



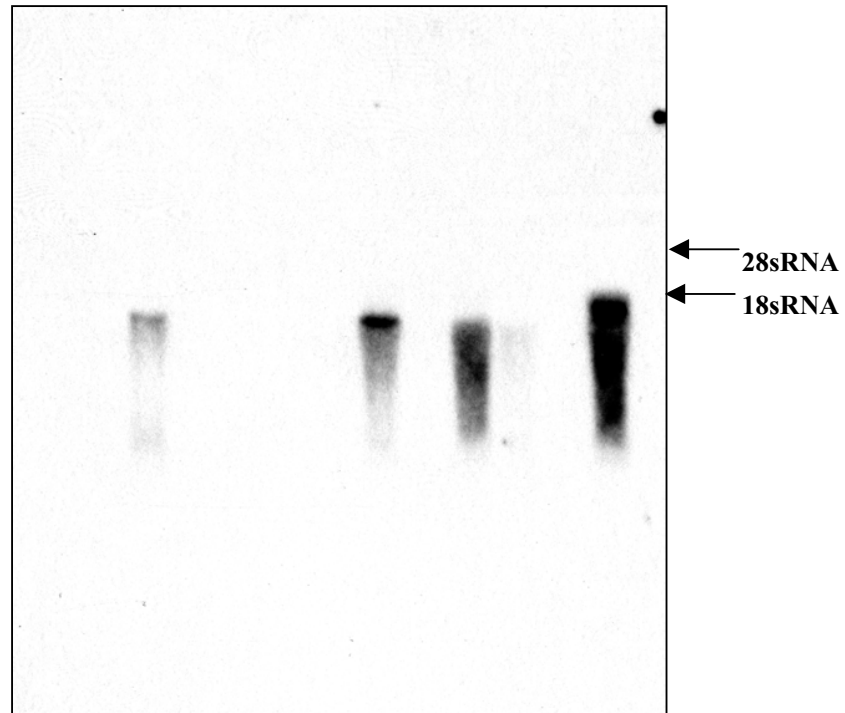
รูปที่ 1.6 แสดงผล northern blot hybridization ของ RNA ที่สกัดจากของมะละกอ ธรรมดาที่ไม่ติดโรคไวรัสและมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6, และ T7 ตามลำดับ ที่นำไปแยกขนาดบน 1.0 % denaturing formaldehyde-agarose gel electrophoresis แล้วทำปฏิกิริยาโดยใช้ IF-PRV3' riboprobe

แถวที่ 1 RNA marker ขนาด 0.28-6.58 kb จำนวน 1 μ g

แถวที่ 2 RNA ของมะละกอธรรมดา

แถวที่ 3-13 RNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6 และ T7

RNA marker -ve G1 G2 G3 G5 T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7



รูปที่ 1.7 แสดงผล northern blot hybridization ของ RNA ที่สกัดจากของมะละกอธรรมดา ที่ไม่ติดไวรัส และมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6, และ T7 ตามลำดับ ที่แยกตามขนาดบน 1.0 % denaturing formaldehyde-agarose gel electrophoresis แล้ว ทำปฏิกิริยาโดยใช้ GUSKF-GUSKR probe

แถวที่ 1 RNA marker ขนาด 0.28-6.58 kb จำนวน 1µg

แถวที่ 2 RNA ของมะละกอธรรมดา

แถวที่ 3-13 RNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4, T5, T6 และ T7

1.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยวิธี

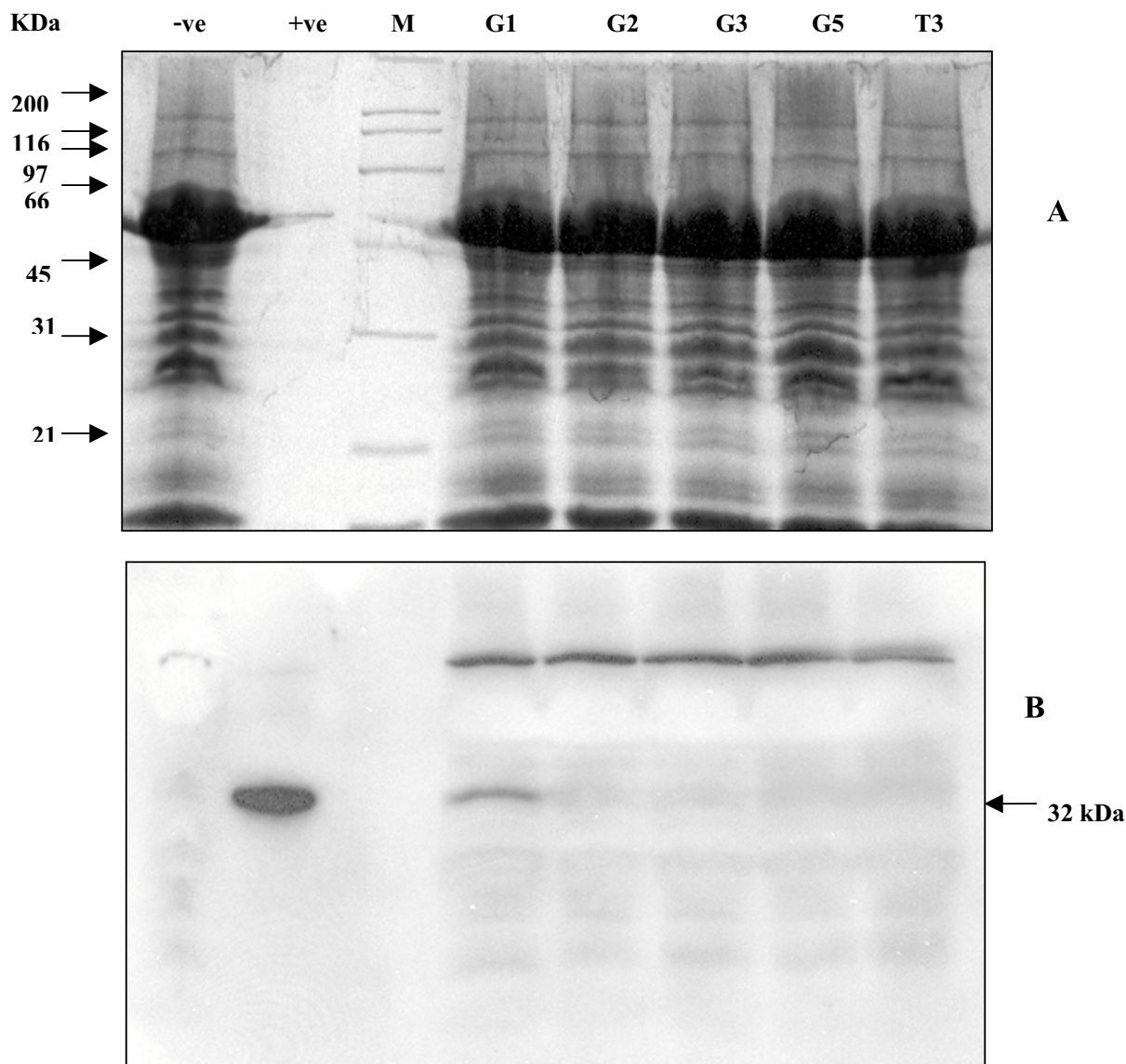
western blot analysis

ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ในระดับการสร้างโปรตีน (translation) โดยวิธี western blot analysis โดยสกัดโปรตีนจากใบมะละกอด้วย Trichloro Acetic Acid (TCA) (Wu and Wang, 1984) นำโปรตีนที่ได้มาแยกขนาดโดยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนจาก acrylamide gel ไปยังแผ่น nitrocellulose membrane นำไปทำปฏิกิริยากับ antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนเปลือกไวรัส (anti-CP polyclonal antibody) ที่มีความเจือจาง 1:2000 แล้วใช้ anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase ที่มีความเจือจาง 1:5000 ทำปฏิกิริยากับ antibody ตัวแรก แล้วใช้ western blotting detection reagent (ECL plus western blotting detection reagent, Amersham Pharmacia Biotech) ในการทำปฏิกิริยาตรวจสอบ นำแผ่น nitrocellulose membrane ไปประกบบนแผ่นฟิล์ม X-ray หากมีโปรตีนเปลือกไวรัสบนแผ่น nitrocellulose membrane เมื่อนำฟิล์มไปล้าง จะเห็นแถบโปรตีน บนแผ่นฟิล์ม

ผลการทดลอง

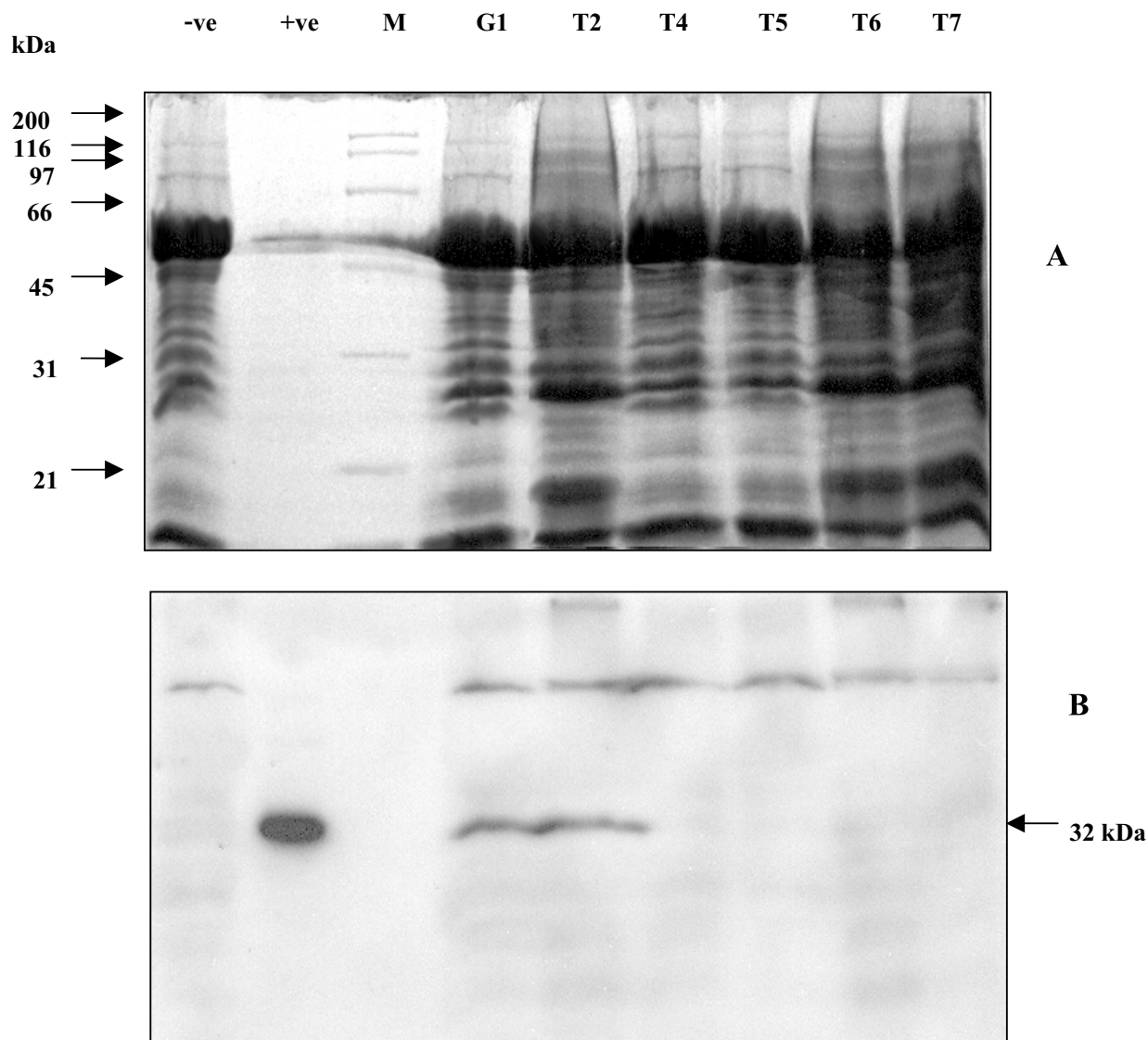
จากการนำโปรตีนที่สกัดได้จากใบมะละกามาทำการแยกขนาดโดย SDS-PAGE (รูปที่ 1.8A และ 1.9A) และย้ายโปรตีนไปแผ่น nitrocellulose membrane เพื่อทำปฏิกิริยา western blot analysis (รูปที่ 1.8B และ 1.9B) กับ anti-CP polyclonal antibody พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1 และ T2 ซึ่งไม่ต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนสามารถสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่มีขนาดประมาณ 32 kDa ได้ ในขณะที่ตรวจไม่พบโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมอื่นๆ

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเปลือกไวรัสและการสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสไม่เกี่ยวข้องกับ การเกิดความต้านทานไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม



รูปที่ 1.8 แสดงโปรตีนที่สกัดจากใบมะละกอธรรมดาที่ไม่เป็นโรคไวรัส, ใบมะละกอที่เป็นโรคไวรัส, ใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5 และ T3 ซึ่งนำมาแยกตามขนาดบน 13 % SDS polyacrylamide gel (A) และตรวจสอบด้วยวิธี western blot analysis (B)

- แถวที่ 1 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอธรรมดา จำนวน 35 μ g
- แถวที่ 2 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอที่เป็นโรคไวรัส จำนวน 500 ng
- แถวที่ 3 โปรตีนที่ทราบขนาดและใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิง (Broad range protein marker)
- แถวที่ 4 -8 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5 และ T3 ตามลำดับ (ใช้โปรตีนจำนวน 35 μ g จากแต่ละตัวอย่าง)



รูปที่ 1.9 แสดงโปรตีนที่สกัดจากใบมะละกอธรรมดาที่ไม่เป็นโรคไวรัส, ใบมะละกอที่เป็นโรคไวรัส, ใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, G2, G3, G5 และ T3 ซึ่งนำมาแยกขนาดบน 13 % SDS polyacrylamide gel (A) และตรวจสอบด้วยวิธี western blot analysis (B)

- แถวที่ 1 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอธรรมดา จำนวน 35 μ g
- แถวที่ 2 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอที่เป็นโรคไวรัส จำนวน 500 ng
- แถวที่ 3 โปรตีนที่ทราบขนาดและใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิง (Broad range protein marker)
- แถวที่ 4-8 โปรตีนที่แยกจากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G1, T2, T4, T5, T6 และ T7 ตามลำดับ (ใช้โปรตีนจำนวน 35 μ g จากแต่ละตัวอย่าง)

1.6 การศึกษาการสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (coat protein gene: *cp* gene) ของไวรัสใบด่างจุด วงแหวนที่พบในแหล่งปลูกมะละกอต่างๆในประเทศไทย

การศึกษาไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่พบระบาดในแหล่งปลูกมะละกอต่างๆในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสกับความไวและความต้านทานต่อไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

การเก็บตัวอย่างไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่ระบาดในแหล่งปลูกมะละกอต่างๆในประเทศไทย ได้ขอข้อมูลพื้นที่ปลูกมะละกอในแต่ละจังหวัด จากกรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ แต่มีปัญหา คือ ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์ ไม่มีข้อมูลของพื้นที่ปลูกมะละกอในแต่ละจังหวัด ข้อมูลบางส่วนที่มีอยู่เป็นข้อมูลเก่า ซึ่งเมื่อไปทำการ เก็บตัวอย่างจริงพบว่าพื้นที่ปลูกมะละกอสั้นใหญ่ได้เปลี่ยนไปแล้ว เนื่องจากมะละกอที่ปลูกไว้เดิม เป็นโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวน เจ้าของพื้นที่จึงตัดต้นมะละกอทิ้งและเปลี่ยนไปปลูกพืชชนิดอื่น แทนมะละกอ นอกจากนั้นพื้นที่ปลูกมะละกอบางส่วนเป็นการที่เกษตรกรเช่าพื้นที่ เพาะปลูกในระยะเวลาสั้น เมื่อประสบปัญหาไวรัสระบาดหรือหมดระยะการเช่าเกษตรกรก็ย้ายที่ปลูกไปที่อื่น ดังนั้นเพื่อให้ได้ตัวอย่าง ไวรัสที่ครอบคลุมในภาคต่างๆ จึงใช้วิธีการเก็บตัวอย่างโดยสุ่มจากแผนที่เลือกบริเวณอำเภอที่อยู่ กระจายกันและมีระยะห่างกันอย่างน้อย 50 กิโลเมตร ประกอบกับใช้วิธีสอบถาม แหล่งปลูกมะละกอจากประชาชนและพ่อค้ามะละกอในพื้นที่จังหวัดนั้นๆ แล้วทำการเก็บตัวอย่างใบจาก ต้นมะละกอที่เป็นโรคจำนวน 2 ตัวอย่างต่อ 1 จุด โดยเก็บใส่ถุงพลาสติก แช่น้ำแข็ง เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการจึงทำการเก็บตัวอย่างลงกล่องและแช่แข็ง ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

การศึกษายีนเปลือกไวรัสจากตัวอย่างไวรัสใบด่างจุดวงแหวน นำตัวอย่างจากไวรัสที่เก็บ แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C มาปลูกเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนในต้นมะละกอโดยนำไปมะละกอจำนวน 0.5 g มาบดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.5 M แล้วนำมาทาบใบของต้นมะละกอที่มีขนาดสูงประมาณ 40-50 เซนติเมตร ซึ่งที่ใบมะละกอได้โรยผง celite ไว้ก่อนทาด้วยไวรัส ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วล้างใบมะละกอด้วยน้ำสะอาด หลังจากนั้นประมาณ 14-30 วัน ต้นมะละกอจะมีการติดเชื้อไวรัส นำใบมะละกอจำนวน 0.2 g มาทำการสกัดสารพันธุกรรม RNA โดยใช้สาร Trizol ของบริษัท Gibco, Ltd. ใช้ปฏิกิริยา reverse transcription สร้างสาย cDNA จากสารพันธุกรรม RNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1.10 แล้วใช้ primers ที่จำเพาะกับลำดับเบสด้านปลาย 5' และด้านปลาย 3' ของ *cp* gene (รูปที่ 1.11) ทำการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสโดยใช้วิธี PCR นำชิ้น DNA ที่ได้มา clone เข้าพลาสมิด pUC19 หรือ sk pBluscript ที่ตำแหน่ง *Bam* HI/*Hind* III ทำการคัดเลือก clones ที่ถูกต้อง แล้วนำไปศึกษาลำดับเบส

ผลการทดลอง

ได้ตัวอย่างไปจากต้นมะละกอที่ติดโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในภาคต่างๆดังนี้

ภาคกลาง ได้ตัวอย่างไวรัสจากจังหวัดกรุงเทพฯ นนทบุรี นครปฐม ปทุมธานี อโยธยา สุพรรณบุรี
อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท สระบุรี ลพบุรี

ภาคตะวันออก ได้ตัวอย่างไวรัสจากจังหวัดจันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี นครนายก ปราจีนบุรี และ
สระแก้ว (ไม่พบตัวอย่างที่จังหวัดตราด และระยอง ในขณะที่ออกเก็บตัวอย่าง)

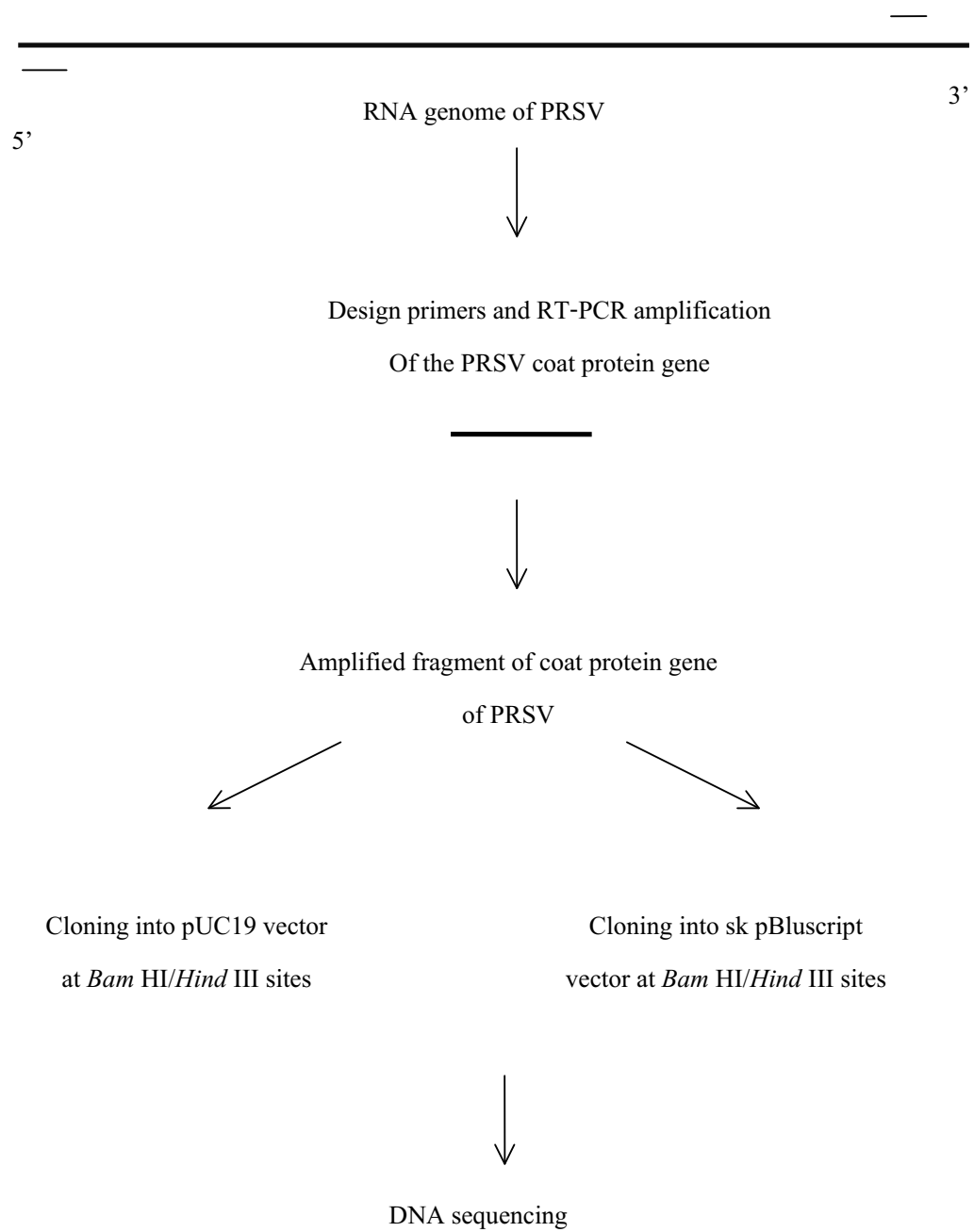
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้ตัวอย่างไวรัสจากจังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น นครราชสีมา บุรีรัมย์
มหาสารคาม ยโสธร ร้อยเอ็ด เลย ศรีสะเกษ สกลนคร สุรินทร์และหนองคาย

ภาคเหนือ ได้ตัวอย่างไวรัสจากจังหวัดเชียงใหม่ น่าน กำแพงเพชร ลำปาง เชียงราย พะเยา
อุตรดิตถ์ สุโขทัย พิจิตร และพิจิตร (ไม่พบตัวอย่างที่จังหวัดนครสวรรค์และตาก ในขณะที่ออกเก็บตัว
อย่าง)

ภาคใต้ ได้ตัวอย่างไวรัสจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี และสงขลา

จากการนำไวรัสที่เก็บตัวอย่างบางส่วนมาศึกษาโดยเพิ่มจำนวนไวรัสในต้นมะละกอ, สกัด RNA ของ
ไวรัสจากใบมะละกอ แล้วใช้ปฏิกิริยา RT-PCR ในการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีน เปลือกไวรัส ได้ชิ้น DNA
ขนาดประมาณ 1 กิโลเบส (รูปที่ 1.12 และ 1.13) นำชิ้น DNA ที่ได้มา clone เข้าพลาสมิด pUC19 หรือ sk
pBluscript ที่ตำแหน่ง *Bam* HI/*Hind* III ทำการคัดเลือก clones ที่ถูกต้อง โดยการสกัด DNA จาก clones แล้วนำ
มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI/ *Hind* III ซึ่ง DNA จาก clones ที่ถูกต้องจะถูกตัดเป็นชิ้น DNA 2 ชิ้น มี
ขนาด 2.6 กิโลเบส และ 1 กิโลเบส (รูปที่ 1.14) ตัวอย่างไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่เก็บจากภาคต่างๆและ clones
ที่ได้จากการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 1.1-1.5

นำ DNA จาก clones ที่ถูกต้องมาทำปฏิกิริยา sequencing และส่งวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสของ coat
protein gene ทำการเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับเบสของ Wisconsin Sequence Analysis Suit
(Accelrys, Ma, USA) ดังที่แสดงในรูปที่ 1.15 ผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส
ของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่พบระบาดในภาคต่างๆของ ประเทศไทยมีความคล้ายคลึงกันมากถึง 95%-97%



รูปที่ 1.10

แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาลำดับเบสของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส

FLCP-F

5' GATAAAAAGCTTGAGCGAGAGAGAGGAG 3'

FLCP-R

5' AAATGGATCCGGTGGCGCAGCC 3'

5'CP

5'-CATCATCATCATATCATTCCATGGCTGTGGATGCTGGTTTGAATG-3'

3'CP

5'-CTACTACTACTAGTCAAGCCATGGTTGCGCAGCCACNCTGTATTG-3'

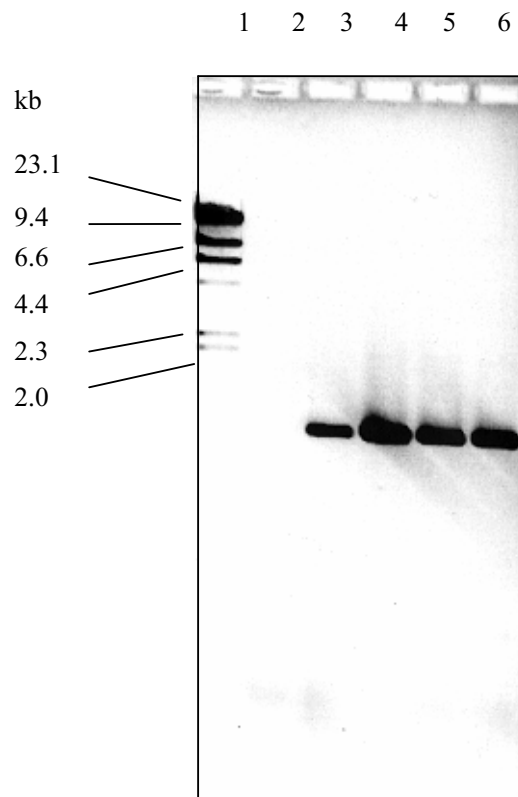
5'PRV

5' - ATC ATT CCA TGG CTG TGG ATG CTG GTT TGA ATG

3'PRV

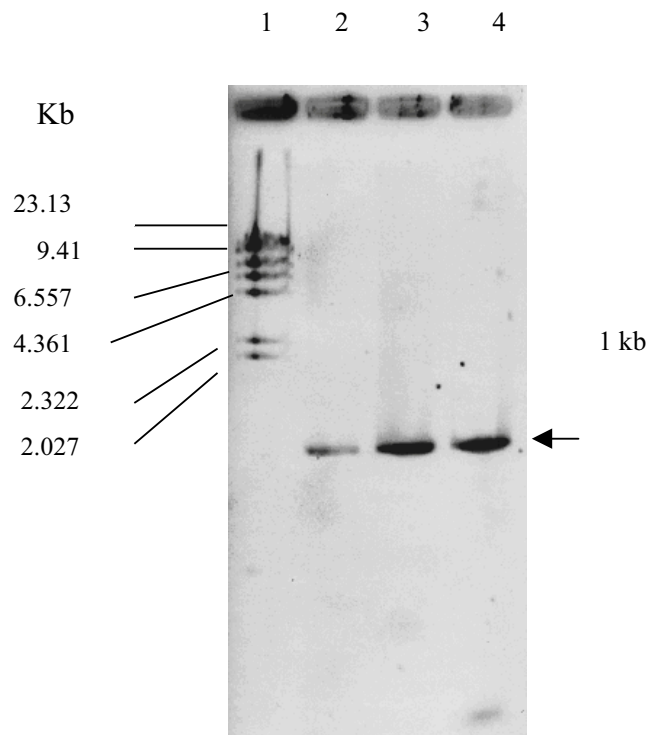
5' - GTC AAG CCA TGG TTG CGC AGC CAC NCT GTA TTC TAA TG -3'

รูปที่ 1.11 แสดงลำดับเบสของ primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส



รูปที่ 1.12 แสดงผลการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดสุพรรณบุรี อ่างทอง สระบุรี นนทบุรี

- แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker
- แถวที่ 2 PCR amplification ของมะละกอไม่ติดโรค (-ve)
- แถวที่ 3 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดสุพรรณบุรี (S1)
- แถวที่ 4 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดอ่างทอง (S3)
- แถวที่ 5 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดสระบุรี (S13)
- แถวที่ 6 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดนนทบุรี (S20)



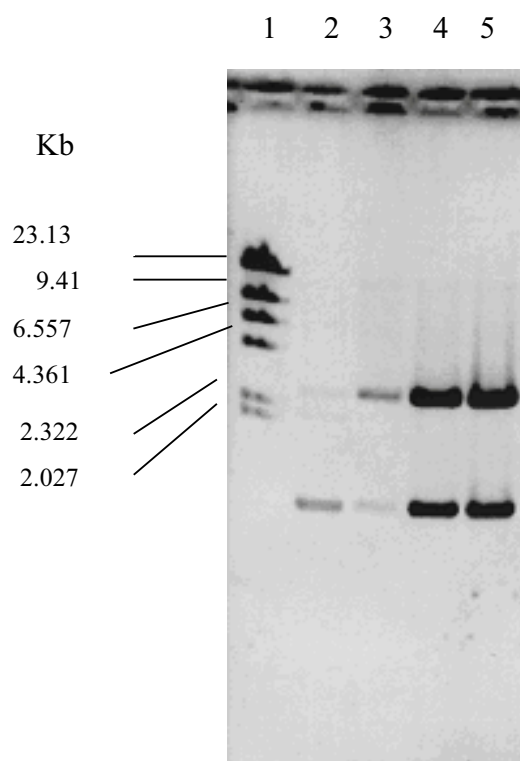
รูปที่ 1.13 แสดงผลการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัด ชลบุรี
 ปราจีนบุรี และสระแก้ว แล้วนำไปแยกขนาดบน 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดชลบุรี

แถวที่ 3 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดปราจีนบุรี

แถวที่ 4 PCR amplification ของตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดสระแก้ว



รูปที่ 1.14 แสดงผลการตรวจสอบ DNA จาก clones ที่มียืนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส จากตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากจังหวัดชลบุรี ปราจีนบุรี และสระแก้ว โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI/ *Hind* III แล้วนำไปแยกขนาดบน 0.8% agarose gel electrophoresis

- แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker
- แถวที่ 2 DNA ของยืนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจังหวัดสระแก้วที่ได้จาก PCR
- แถวที่ 3 DNA ของ clone ที่มียืนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสที่เก็บจากจังหวัดชลบุรีตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI/ *Hind* III
- แถวที่ 4 DNA ของ clone ที่มียืนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เก็บจากจังหวัดสระแก้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI/ *Hind* III
- แถวที่ 5 DNA clone ที่มียืนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เก็บจากจังหวัดปราจีนบุรีตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI/ *Hind* III

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากภาคกลาง 10 จังหวัด ในระหว่างเดือนกรกฎาคม 2544 และ clones ที่ได้จากการทดลอง

จังหวัด	ตำบล	อำเภอ	primers	vectors	clones
กรุงเทพ		บางซื่อ	5'CP/3' PRV	pUC19	pSABK
		รามอินทรา			
นนทบุรี		บางใหญ่	FLCP F/R	pUC19	pSA1221
นครปฐม		ศาลายา	FLCP F/R	pUC19	pSA1185
ปทุมธานี		ลาดหลุมแก้ว	FLCP F/R	pUC19	pSA1192
อยุธยา		พรหมบุรี	FLCP F/R	pUC19	pSA1189
		บางบาล	FLCP F/R	pUC19	pSA1186
	บางกระสั้น	บางไทร	5'CP/3' CP	pUC19	pSA1170
สุพรรณบุรี			5'CP/3' PRV	pUC19	pSA1169
		บางปลาม้า	FLCP F/R	pUC19	pSA1220
อ่างทอง	ยี่โถ	วิเศษชัยชาญ	FLCP F/R	pUC19	pSA1230
		วัดสิงห์	FLCP F/R	pUC19	pSA1237
สิงห์บุรี		อินทร์บุรี	FLCP F/R	pUC19	pSA1188
	โรงช้าง	พรหมบุรี			
ชัยนาท	วังไก่อเลื้อย	หันคา	FLCP F/R	sk pBluscript	pSA1176
	ทุ่งวัดสิงห์	วัดสิงห์	FLCP F/R	pUC19	pSA1241
สระบุรี	ห้วยบง	เฉลิมพระเกียรติ	FLCP F/R	pUC19	pSA1191
		พระพุทธบาท			
		แก่งคอย			
ลพบุรี		ชัยบาดาล	FLCP F/R	pUC19	pSA1187
	ห้วยโป่ง	พัฒนานิคม	FLCP F/R	pUC19	pSA1180

ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากภาคตะวันออก 7 จังหวัด ในระหว่างเดือนธันวาคม 2544 และ clones ที่ได้จาก การทดลอง

จังหวัด	ตำบล	อำเภอ	primers	vectors	clones
จันทบุรี		ขลุง			
ชลบุรี		บ่อพลอย	5'CP/3' CP	sk pBluscript	pSA1024
ชลบุรี					PSA1025
ตราด		ไม่พบ			
นครนายก		องครักษ์			
ปราจีนบุรี		กบินทร์บุรี			pSA1235
	โคกวัด	ศรีมโหสถ			
ระยอง		ไม่พบ			
สระแก้ว		อรัญประเทศ	FLCP F/R	pUC19	pSA1244
	ทับพริก	อรัญประเทศ			pSA1222
	วังสมบูรณ์	วังสมบูรณ์			

ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 12 จังหวัดในช่วงเดือนกรกฎาคม 2545 และ clones ที่ได้จากการทดลอง

จังหวัด	ตำบล	อำเภอ	primers	vectors	clones
กาฬสินธุ์	บัวขาว	กุฉินารายณ์			
ขอนแก่น		บ้านท่าพระ	FLCP F/R	pUC19	pSA1228
นครราชสีมา	-	-	FLCP F/R	pUC19	pSA1179
	ทองหลาง	จักรราช			
	ทองหลาง	จักรราช			
บุรีรัมย์	กระสัง	เมือง			
มหาสารคาม		เมือง	5'CP/3' CP	sk pBluscript	pSA1245
ยโสธร	ลาดท้อ	เมือง			
ร้อยเอ็ด	โนนชัยศรี	โพนทอง			
เลย					
ศรีสะเกษ	คู	ราษีไศล	5'CP/3' CP	sk pBluscript	pSA1243
สกลนคร		เมือง	FLCP F/R	pUC19	pSA1242
สุรินทร์	ยาง	ศรีขรภูมิ	5'CP/3' CP	sk pBluscript	pSA1247
หนองคาย		เมือง			

ตารางที่ 1.4 แสดงตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากภาคเหนือ 12 จังหวัดในช่วงเดือนมกราคม 2546 และ clones ที่ได้จากการทดลอง

จังหวัด	อำเภอ	primers	vectors	clones
เชียงใหม่	เมือง	5'CP/3' PRV	pUC19	pSA1229
น่าน		5'CP/3' PRV	pUC19	pSA1168
นครสวรรค์	เมือง (ไม่พบ)			
กำแพงเพชร	เมือง			
	คลองลาน (ไม่พบ)			
ตาก	วังเจ้า (ไม่พบ)			
ลำปาง	เกาะคา (ไม่พบ)			
	เมือง	5'CP/3' PRV	pUC19	pSA1308
เชียงราย	เมือง			
พะเยา	เมือง			
อุตรดิตถ์	เมือง	FLCP F/R	pUC19	pSA1307
สุโขทัย	ศรีสำโรง			
พิษณุโลก	พรหมพิราม	FLCP F/R	pUC19	pSA1207
พิจิตร	เมือง			
	บึงนาราง			

ตารางที่ 1.5 แสดงตัวอย่างไวรัสที่เก็บจากภาคใต้ 4 จังหวัดในช่วงเดือนมิถุนายน 2546 และ clones ที่ได้จากการทดลอง

จังหวัด	อำเภอ	primers	vectors	clones
ประจวบคีรีขันธ์	ปราณบุรี	5'PRV/3'PRV	sk pBluscript	pSA1236
ชุมพร	ทุ่งตะโก	5'PRV/3'PRV	sk pBluscript	pSA1225
ชุมพร	ท่าแซะ			
สุราษฎร์ธานี	พุนพิน	5'PRV/3'PRV	sk pBluscript	pSA1226
สงขลา ต.คลองแงะ	สะเดา	5'PRV/3'PRV	sk pBluscript	pSA1227

Comparison of Thai CP sequences

transformed-cp	~~~~~GCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAGAAACTCAAAGAGAAAGAGAAACAG
p74-chonburi	TCCAGAACTGAA-----c-t-----a-g-----t-----a-----
p75-chonburi	TCCAGAACTGAA-----c-t-----a-g-----t-----a-----
p837m-lab	TCCAAAAATGAA-----c-a-----
p837s-lab	TCCAAAAATGAA-----c-----a-----
p88-chieng-mai	TCCAAAACTGAA-----c-t-----t-g-----g-t-----a-----
p96-chieng-mai	TCCAAAACTGAA-----c-t-----t-g-----t-----a-----
ayutaya	TCCAGAACTGAA-----t-g-----t-----a-----
bangkok	TCCAAAACTGAA-----t-----a-g-----t-----a-----
chainat	TCCAGAAATGAA--c-----a-----g-----a-----
chumporn	TCCAAAAATGAA-----c-----g-----t-----a-----
khon-khen2	~~~~~GAA-----c-t-----g-----c-----a-----
khon-khen1	TCCAAAACTGAA-----c-----g-----t-----a-----
nan	~~~~~GAA-----t-g-----t-----a-----
ratchaburi	TCCAAAAATGAA-----c-t-----g-----a-----
sakhon-nakhon	~~~~~GAA-----c-c-----g-gt-----t-----a-----
nakompathom	TCCAAAACTGAA-----c-t-cc-t-g-----cc-----a--c--
supanburi	TCCAGAACTGAA-----a-g-----t-----a-----
transformed-cp	AGAGAAGAAAAAGATAAACAAAAAGGAAAAGACAATAATGGAGCTAGTGACGGAAACGAT
chonburi	-a-----t-----a-----a-----
chonburi	-a-----t-----a-----a-----
chieng-mai	-a-----t-----a-----a-----
chieng-mai	-a-----t-----a-----a-----
ayutaya	-a-----t-----a-----a-----
bangkok	-a-----t-----a-----a-----
chainat	-----t-----t-a-----
chumporn	-a-----t-----a--c-a-----
khon-khen2	-a-----t-----a-----a-----t--
khon-khen1	-a-----t-----a--c-a-----
nan	-a-----g-----t-----a-----a-----
ratchaburi	-a-----t-----a-----a-----
sakhon-nakhon	-a-----tt-----a--c-a-----
nakompathom	-a-----c-----t-----a-----a-----
supanburi	-a-----a-----t-----a-----a-----
transformed-cp	GTGTCAACTAGCACGAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTTAATGCTGGAAC TAGTGGA
chonburi	-----a-----c-----c-----t
chonburi	-----a-----c-----c-----t
chieng-mai	-----a-----c-----a-----t
chieng-mai	-----a-----c-----c-----t
ayutaya	-----a-----c-----c-----t
bangkok	-----g-a-----c-----c-----t
chainat	-----a-----a-----g
chumporn	-----a-----c-----c-----t
khon-khen2	-----a-----c-----c-----t
khon-khen1	-----a-----c-----c-----t
nan	-----a-g-----c-----c-----t
ratchaburi	-----a--t-----c-----
sakhon-nakhon	-----a-----c-----c-----t
nakompathom	-----t--a-----c-----c-----t
supanburi	-----a-----c-----c-----t

transformed-cp	ACTTTCACGTGTTCCGAGGATAAAATCATTACTGATAAGATGATTTTACCAAAAATTAAG
chonburi	-----a-----t-----c-----g-----
chonburi	-----a-----t-----c-----g-----
chieng-mai	-----a-----t-----c-c-----g-----
chieng-mai	-----a-----t-----c-----g-----
ayutaya	-----a-----t-----c-c-----g-----
bangkok	-----a-----t-----c-----g-----a
chainat	-----g-----a-----c-----
chumporn	-----a-----t-----c-c-----g-----a
khon-khen2	-----a-----t-----c-c-----g-----a
khon-khen1	-----a-----t-----c-c-----g-----a
nan	-----g-----a-----t-----c-c-----g-----
ratchaburi	-----a-----c-----g-----
sakhon-nakhon	-----a-----t-----c-c-----g-----a
nakompathom	g-----a-----t-----c-c-----g-----
supanburi	-----a-----g-t-----c-----g-c-----g-----

transformed-cp	GGAAAACTGTCCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAGTATAATCCGCAACAAATTGACATC
chonburi	-----g-----a-----
chonburi	-----g-----a-----
chieng-mai	-----a-----t
chieng-mai	-----a-----
ayutaya	-----g-a-----
bangkok	-----a-----
chainat	-----a-----g-----t-c-----
chumporn	-----a-----
khon-khen2	-----a-----
khon-khen1	-----a-----
nan	-----a-----
ratchaburi	-----c-----a-----
sakhon-nakhon	-----a-----
nakompathom	-----a-----
supanburi	-----g-----a-----

transformed-cp	TCAAACACTCGTGCCACTCAATATCAATTTGAAAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGAT
chonburi	-----c-----c-----
chonburi	-----c-----c-----
chieng-mai	-----c-----c-----
chieng-mai	-----c-----c-----
ayutaya	-----c-----c-----
bangkok	-----c-----c-----
chainat	-----c-----
chumporn	-----c-----c-----c-g-----
khon-khen2	-----c-----c-----
khon-khen1	-----c-----c-----c-g-----
nan	-----c-----c-----
ratchaburi	-----c-----c-----
sakhon-nakhon	-----c-----g-----
nakompathom	-----c-----
supanburi	-----c-----

transformed-cp	TACGGTCTTAATGATAACGAAATGCAGTTGATGTTAAATGGTCTGATGGTTTGGTGTATC
chonburi	--t--g----c-----ag-----t-----c---
chonburi	--t--g----c-----ag-----t-----c---
chieng-mai	-----ag-----ct-----c--t
chieng-mai	-----ag-----t-----c---
ayutaya	-----ag-----t-----c---
bangkok	--t-----c-----ag-----t-----c---
chainat	-----t-----t-----
chumporn	-----t-----ag-a-----t-----c---
khon-khen2	-----g-g-----t-----c---
khon-khen1	-----t-----ag-a-----t-----c---
nan	-----ag-----t-----c---
ratchaburi	-----ag-----t-----c---
sakhon-nakhon	-----t-----ag-a-----t-----c---
nakompathom	-----ag-----c--ct-----c---
supanburi	--t-----ag-----t-----c---

transformed-cp	GAAAAATGGTACATCTCCGGACATATCTGGTGTCTGGGTAATGATGGATGGGGAAACTCAA
p74-chonburi	-----a-----c-a-----g-----t-c---
p75-chonburi	-----a-----c-a-----g-----t-c---
p837m-lab	-----
p837s-lab	-----
p88-chieng-mai	-----a-----c-a-----g-----
p96-chieng-mai	-----a-----c-a-----g-----
ayutaya	-----a-----c-a-----g-----
bangkok	-----a-----c-a-----g-----t-c---
chainat	-----g-----
chumporn	-----a-----c-a-----g-----c---
khon-khen2	-----a-----c-a--g--g-----g-----c---
khon-khen1	-----a-----c-a-----g-----c---
nan	-----a-----c-a-----g-----c---
ratchaburi	-----a-----c-a-----g-----c---
sakhon-nakhon	-----a-----c-a-----g-----c---
salaya	-----a-----c-a--t-----g-----
supanburi	-----a-----c-a-----g-----t-c---

transformed-cp	GTTGAATATCCCATCAAACCTTTGATTGAACATGCAACTCCTTCATTTCAGACAAATCATG
chonburi	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
chonburi	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
chieng-mai	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
chieng-mai	--c--t-----t--g--c-----g-----g-----
ayutaya	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
bangkok	----t-----a--g-----c-----g-----g-----
chainat	-----g-----c-----c-----
chumporn	--c--t-----g-----c-----c-----g-----g-----
khon-khen2	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
khon-khen1	--c--t-----g-----c-----c-----g-----g-----
nan	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
ratchaburi	----t-----g-----
sakhon-nakhon	--c--t-----g-----c-----c-----g-----g-----
nakompathom	--c--t-----g-----c-----g-----g-----
supanburi	--c--t-----g-----c-----g-----g-----t---

transformed-cp	GCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAGGCATACATCGCGAAGAGGAACGCAACCGAGAGGTAC
chonburi	-----t--t--t-----
chonburi	-----t--t--t-----
chieng-mai	-----a-----t--t--t-----
chieng-mai	-----a-----t--t--t-----
ayutaya	-----a-----t--c--t-----
bangkok	-----a-----a-----t--t--t-----
chainat	-----t-----t-----t-----
chumporn	-----t-----a-----t--t--t-----
khon-khen2	-----a-----t--g--t-----
khon-khen1	-----a-----t--t--t-----
nan	-----a-----t--t--t-----
ratchaburi	-----a-----t--t--t-----
sakhon-nakhon	-----a-----t--t-----a---
nakompathom	-----a-----t--t--t-----
supanburi	-----g-----a-----t--t--t-----

transformed-cp	ATGCCGCGGTATGGGATCAAGAGAAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATACGCTTTC
chonburi	-----a-----g-----t-----
chonburi	-----a-----g-----t-----
chieng-mai	-----a-----g-----t-----
chieng-mai	-----a-----g-----t-----
ayutaya	-----a-----t-----t-----
bangkok	-----a-----g-----t-----t-----
chainat	-----t-----t-----t-----
chumporn	-----a-----g--c-----t-----
khon-khen2	---a-----a-----g-----t-----
khon-khen1	-----a-----g--c-----t-----
nan	-----a-----g-----t-----
ratchaburi	-----a-----g-----t-----
sakhon-nakhon	-----a-----g--c-----a-----t-----
nakompathom	-----a-----g-----t-----t-----t
supanburi	-----a-----g-----t-----t-----

transformed-cp	GATTTCATGAGGTCAATTCAAAAACGCCTGATAGAGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATG
chonburi	--c-----g-gc-----a-----g-----
chonburi	--c-----g--c-----a-----g-----
chieng-mai	--c-----a--g--c-----g--a-----g-----c-----
chieng-mai	--c-----g--c-----g--a-----g-----
ayutaya	--c-----g--c-----a-----g-----
bangkok	--c-----g--c-----a-----g-----
chainat	-----t-----a-----t-----
chumporn	--c-----g--c-----a-----g-----
khon-khen2	--c-c-----g--c-----a-----g-----
khon-khen1	--c-----g--c-----a-----g-----
nan	-----g--c-----a-----g-----
ratchaburi	--c-----g--c-----a-----g-----
sakhon-nakhon	--c-----g--c-----a-----g-----
nakompathom	--c-----g--c-----a-----g-----
supanburi	--c-----g--c-----a-----g-----

```

transformed-cp AAAGCTGCAGCGCTGCGCAATGCTAGTCGCAGAATGTTTGAATGGACGGCAGTGTCACT
chonburi      --g-----ca--g-----t-----
chonburi      --g-----ca--g-----t-----
chieng-mai    --g-----t--ca-----t-----
chieng-mai    --g-----ca-----t-----
ayutaya       --g-----a-----ca-----
bangkok       --g-----a--ca--g-----
chainat       -----at-----
chumporn      --g-----ca--g-----
khon-khen2    --g-----a--g-----
khon-khen1    --g-----ca--g-----
nan           --g-----ca-----g-----
ratchaburi    --g-----ca--g-----
sakhon-nakhon --g-----ca--g-----
nakompathom   --g-----ca-----
supanburi     --g-----ca--g-----

transformed-cp AACAAAGGAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTCAACAGAGACATGCACTCT
chonburi      -----
chonburi      -----
chieng-mai    -----t-----
chieng-mai    -----g--t-----
ayutaya       -----g-----
bangkok       -----
chainat       -----
chumporn      -----
khon-khen2    -----t-----
khon-khen1    -----
nan           -----t-----
ratchaburi    -----
sakhon-nakhon -----
nakompathom   -----t-----
supanburi     -----

transformed-cp CTCCTGGGTATGCGCAATTG
chonburi      -----
chonburi      -----
chieng-mai    -----a-----
chieng-mai    -----a-----
ayutaya       -----a-----
bangkok       -----t-----
chainat       -----
chumporn      -----a-----
khon-khen2    -----a-----
khon-khen1    -----a-----
nan           -----a-----
ratchaburi    -----
sakhon-nakhon -----a-----
nakompathom   -----a-----
supanburi     -----

```

รูปที่ 1.15 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่นำเข้าสู่มะละกอ
 คัดแปรพันธุกรรมกับ clones ที่ได้ตัวอย่างจากจังหวัด ชลบุรี เชียงใหม่ อุดรฯ กรุงเทพฯ ชัยนาท
 ขอนแก่น น่าน ราชบุรี สกลนคร นครปฐม และ สุพรรณบุรี

1.7 การศึกษายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อไวรัสจากจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

จากการศึกษายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่แทรกเข้าไปในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี Southern Blot analysis แสดงให้เห็นว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่ต้านทานไวรัสสายพันธุ์ G1 น่าจะมียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสแทรกเข้าไปในจีโนมมะละกอ 1 ชุด เนื่องจากเมื่อใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ตัด DNA ของมะละกอสายพันธุ์ G1 แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับตัวติดตาม (probe) ที่เป็น *cp* gene พบว่ามีชิ้น DNA ที่มีชุดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ขนาด 1.6 kb แทรกอยู่ เพียง 1 ชิ้น ในขณะที่มะละกอดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไวรัสสายพันธุ์ G2 น่าจะมียีนสร้างโปรตีน เปลือกไวรัสแทรกเข้าไปในโครโมโซมมะละกอมากกว่า 1 ชุด โดยพบชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ที่มีชุดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสและสามารถทำปฏิกิริยากับ *cp* gene probe หลายชิ้น มีขนาด 2.1 kb, 4.0 kb , 6.3 kb, 9.4 kb และ 23.1 kb ดังนั้นจึงทำการศึกษายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อไวรัสจากจีโนมของมะละกอดัดแปร พันธุกรรม ตามขั้นตอนดังนี้

1.7.1 การเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากจีโนมมะละกอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

ในการแยกยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อไวรัส จากจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ได้ทำการสกัด DNA จำนวนมาก จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ที่ไม่ต้านทานไวรัสสายพันธุ์ G1 และสายพันธุ์ที่ต้านทานไวรัส G2 นำ DNA ที่สกัดได้ไปตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III แยกขนาด DNA ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 1.16) แล้วทำการแยกชิ้น DNA พืชขนาดต่างๆที่พบว่ามียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสแทรกอยู่ออกจาก agarose gel โดยวิธี gene clean

นำชิ้น DNA ขนาดต่างๆที่แยกได้ ไปทำการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะชุดต่างๆ (รูปที่ 1.17) ทำการ clone ชิ้น DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนและนำไปศึกษาลำดับเบส

ผลการทดลอง

การใช้ไพรเมอร์จำเพาะชุดต่างๆในการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ที่แทรกเข้าไปในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่ต้านทานไวรัส G1 และสายพันธุ์ ที่ต้านทานไวรัส G2 โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) พบว่าไพรเมอร์บางชุด สามารถเพิ่มจำนวนยีน สร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (ตารางที่ 1.6)

พบว่าไพรเมอร์จำเพาะ 5'PRSV-3'PRSV สามารถใช้เพิ่มจำนวนของ CP gene ขนาด 0.9 kb ได้จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 1.6 kb ของจีโนมมะละกอตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ G1 และสามารถเพิ่มจำนวน CP gene ขนาด 0.9 kb และ 0.7 kb ได้จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 2.1 kb, 4.0 kb, 6.3 kb ของจีโนมมะละกอตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ G2

ไพรเมอร์จำเพาะชุด 35SPRT/3' PRV และ ชุด 35SPRT/IR ไม่สามารถใช้ในการเพิ่มจำนวน CP gene จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ที่แยกจากจีโนมของมะละกอ สายพันธุ์ G1 และ G2 ได้ (รูปที่ 1.18)

ไพรเมอร์จำเพาะชุด 35SPRT/CP3S ไม่สามารถใช้ในการเพิ่มจำนวน PCR product ของ CP gene จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ที่แยกจากจีโนมของมะละกอสายพันธุ์ G1 และ G2 (รูปที่ 1.19) ในขณะที่ไพรเมอร์จำเพาะชุด 5'PRV/35S polyA สามารถใช้เพิ่มจำนวน PCR product ของ CP gene ขนาดประมาณ 1.2 kb จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 1.6 kb ที่แยกจากมะละกอสายพันธุ์ G1 และสามารถเพิ่ม จำนวน PCR product ของ CP gene ขนาดประมาณ 1 kb จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 2.1 kb ที่แยกจากมะละกอสายพันธุ์ G2 (รูปที่ 1.20)

ไพรเมอร์จำเพาะชุด 35SPRT/ 35SPolyA สามารถใช้เพิ่มจำนวน PCR product ของ CP gene ขนาดประมาณ 1.6 kb จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 1.6 kb ที่แยกจากมะละกอสายพันธุ์ G1 แต่ไม่สามารถเพิ่ม จำนวน PCR product ของ CP gene จากชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ขนาด 2.1, 4.0 และ 6.3 kb ที่แยกจากมะละกอสายพันธุ์ G2 (รูปที่ 1.21)

ผลจากการทดลองเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากจีโนมมะละกอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แสดงให้เห็นว่ามีการเกิด DNA rearrangement ในมะละกอตัดแปร พันธุ์กรรมด้านทานไวรัสสายพันธุ์ G2

1.11.4. การตรวจสอบการสร้าง siRNA ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 รุ่น R2

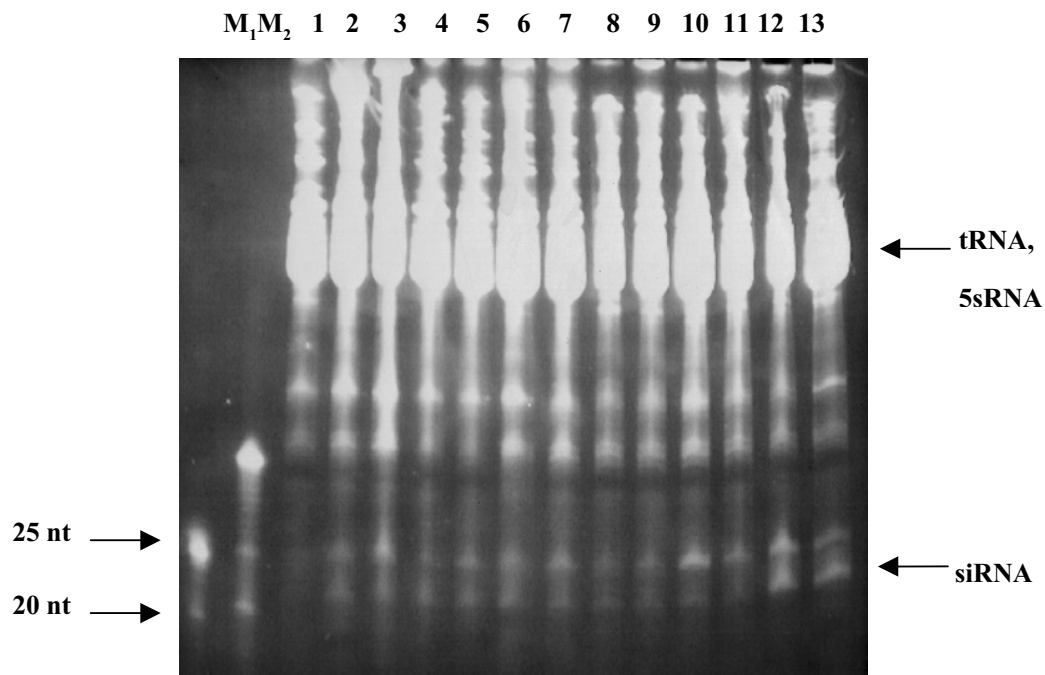
ทำการตรวจสอบการสร้าง siRNA ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 รุ่น R2 โดยการสกัด RNA ขนาดเล็กจากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 รุ่น R2 หมายเลข 18 และหมายเลข 50 ในวันที่ 0, 90, 120 และ 150 หลังจากการปลูกไวรัสบนต้นมะละกอดังกล่าว มะละกอดัดแปรพันธุกรรม ทั้งสองต้นนี้ได้รับการตรวจสอบโดยวิธี PCR และ Southern blot hybridization แล้วว่าได้รับการถ่ายทอด ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 รุ่น R0 และ R1

นำ RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 รุ่น R2 หมายเลข 18 และหมายเลข 50 จำนวน 50 µg มาแยกขนาดบน 15 % denaturing polyacrylamide, 7 M urea ใช้ 0.5×TBE buffer (รูปที่ 1.53) ย้าย RNA ดังกล่าวไปบน Hybond N⁺ membrane แล้วทำปฏิกิริยา hybridization กับตัวติดตามที่เป็น riboprobe สร้างจากชิ้น PRV5'-CP3S ซึ่งจำเพาะกับปลายด้าน 5' ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ในทิศ sense strand เมื่อล้างเอาตัวติดตามนี้ออก ใช้แผ่น membrane เดิมนี้ทำปฏิกิริยากับตัวติดตามที่เป็น riboprobe ที่สร้างจากยีนสร้างโปรตีน *HC-Pro* ในทิศ antisense strand

ผลการทดลอง

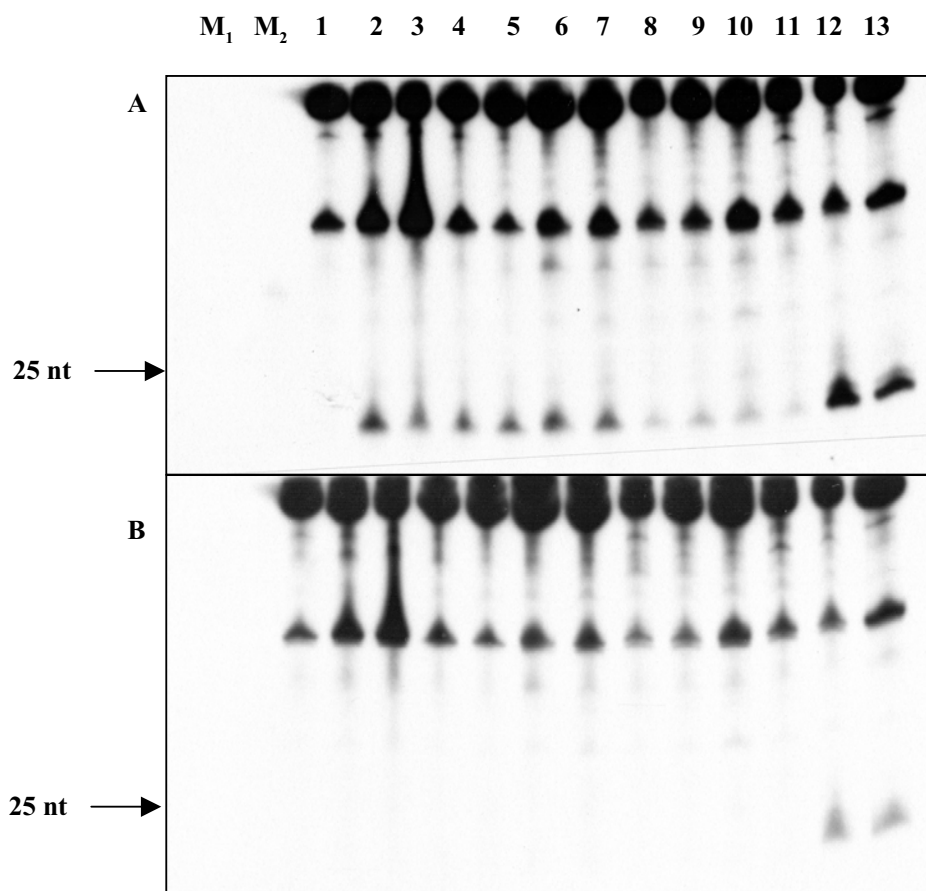
เมื่อใช้ตัวติดตามที่เป็น riboprobe สร้างจากชิ้น PRV5'-CP3S ซึ่งจำเพาะกับปลายด้าน 5' ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ในทิศ sense strand ทำปฏิกิริยา พบว่าก่อนการปลูกเชื้อไวรัส (วันที่ 0) สามารถตรวจพบ siRNA ขนาดประมาณ 23 bp จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้านทานไวรัสรุ่น R0 คือ G2, G3, G5 และ T3 และจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้านทานไวรัส G2 รุ่น R2 หมายเลข 50 (รูปที่ 1.54 A) การตรวจสอบ siRNA หลังการปลูกเชื้อไวรัสเป็นเวลา 90, 120 และ 150 วัน ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้านทานไวรัส G2 รุ่น R2 หมายเลข 50 พบว่าปริมาณ siRNA ลดลง แต่ไม่พบการติดเชื้อ สำหรับการตรวจสอบ siRNA ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้านทานไวรัส G2 รุ่น R2 หมายเลข 18 พบว่าหลังการปลูกเชื้อไวรัสเป็นเวลา 90 วัน มีปริมาณ siRNA น้อยกว่าหมายเลข 50 หลังการปลูกเชื้อไวรัสเป็นเวลา 120 วัน มีปริมาณ siRNA ลดน้อยลงมาก หลังการปลูกเชื้อไวรัส 150 วัน ตรวจพบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้านทานไวรัส G2 รุ่น R2 หมายเลข 18 มีการติดเชื้อไวรัส และตรวจพบ RNA ขนาดเล็กจำนวนมากเช่นเดียวกับที่ตรวจพบ ในมะละกอธรรมดาที่ติดเชื้อไวรัส

เมื่อใช้แผ่น membrane เดิมที่ล้างตัวติดตามออก มาทำปฏิกิริยากับตัวติดตามที่เป็น riboprobe ที่สร้างจากยีนสร้างโปรตีน *HC-Pro* ในทิศ antisense strand (รูปที่ 1.54 B) ตรวจพบแถบปฏิกิริยาใน RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้านทานไวรัส G2 รุ่น R2 หมายเลข 18 หลังจากปลูกเชื้อไวรัส 150 วัน



รูปที่ 1.53 แสดงผลการนำ RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากใบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม แล้วนำ RNA จำนวน 50 µg ไปแยกขนาดบน 15 % denaturing polyacrylamide gel, 7 M urea โดยใช้ 0.5×TBE buffer และย้อมด้วย ethidium bromide

- แถว M1 DNA oligomers ขนาด 26 และ 19 bp ซึ่งเป็น DNA primer ของ HCB2-R specific to sense *HC-Pro* gene และ DNA primer ของ GUSKR specific to sense *uidA* gene
- แถว M2 DNA oligomers ขนาด 25 และ 20 bp ซึ่งเป็น DNA primer ของ PANUR specific to sense 166 bp missing part of *CP* transgene และ DNA primer ของ CP3S specific to sense 5' part of *CP* transgene
- แถวที่ 1–5 RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากใบของมะละกอธรรมดาและใบของมะละกอดัดแปร พันธุกรรม G2, G3, G5 และ T3 รุ่น R0 ตามลำดับ
- แถวที่ 6–9 RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากใบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 รุ่น R2 หมายเลข 50 หลังปลูกเชื้อไวรัสเป็นเวลา 0, 90, 120 และ 150 วัน
- แถวที่ 10–12 RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากใบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 รุ่น R2 หมายเลข 18 หลังปลูกเชื้อไวรัสเป็นเวลา 90, 120 และ 150 วัน
- แถวที่ 13 RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากใบของมะละกอธรรมดาที่ติดไวรัส



รูปที่ 1.54 แสดงผลการใช้ตัวติดตามที่เป็น RNA transcript สร้างจากชิ้น PRV5'-CP3S ซึ่งจำเพาะกับปลายด้าน 5' ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส ในทิศ sense strand ทำปฏิกิริยากับ Hybond N⁺ membrane ที่มี RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากมะละกอดัดแปร พันธุกรรม รุ่น R0 และ รุ่น R2 โดยวิธี Northern Blot Analysis (A) และเมื่อใช้แผ่น membrane เดิมที่ล้างตัวติดตามออก แล้วใช้ตัวติดตามที่เป็น riboprobe ที่สร้างจากยีนสร้าง โปรตีน *HC-Pro* ในทิศ antisense strand (B) ทำปฏิกิริยา

แถว M1	DNA oligomers ขนาด 26 และ 19 bp
แถว M2	DNA oligomers ขนาด 25 และ 20 bp
แถวที่ 1 –5	RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากใบของมะละกอรธรรมดาและใบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2, G3, G5 และ T3 รุ่น R0 ตามลำดับ
แถวที่ 6 –9	RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากใบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 รุ่น R2 หมายเลข 50 หลังปลูกเชื้อไวรัสเป็นเวลา 0, 90, 120 และ 150 วัน
แถวที่ 10–12	RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากใบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 รุ่น R2 หมายเลข 18 หลังปลูกเชื้อไวรัสเป็นเวลา 90, 120 และ 150 วัน
แถวที่ 13	RNA ขนาดเล็กที่สกัดจากใบของมะละกอรธรรมดาที่ติดไวรัส

2. การตรวจสอบประสิทธิภาพของมะละกอในการต้านทานโรคระบาดไวรัสใบด่างจุดวงแหวน

2.1 การทดสอบความต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม

ทำการทดสอบความต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยการเพิ่มจำนวนมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G1, G2, G3, G5, T1, T2, T3, T4 และ T5 โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขยายจากขูดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาปลูกในกระถาง และทำการทดสอบกับไวรัส ใบด่างจุดวงแหวนที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรี

ผลการทดลอง

จากการทดสอบความต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม พบว่า มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2, G3, G5 และ T3 ต้านทานกับไวรัสที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรี ขณะที่มะละกอดัดแปรพันธุกรรมอื่นๆไม่ต้านทาน (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 แสดงผลการทดสอบความต้านทานของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม กับไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่ระบาดที่จังหวัดราชบุรี

มะละกอ	จำนวนต้น	ติดโรค	ความต้านทานต่อไวรัส (ต้นไม่ติดโรค/ต้นที่ทดสอบ)
G1	20	20	0% (0/20)
G2	25	0	100% (25/25)
G3	20	0	100% (20/20)
G5	20	0	100% (20/20)
T1	20	20	0% (0/20)
T2	20	20	0% (0/20)
T3	20	0	100% (20/20)
T4	20	20	0% (0/20)
T5	20	20	0% (0/20)
T6	20	20	0% (0/20)
T7	20	20	0% (0/20)

2.2 การทดสอบความต้านทานของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน สายพันธุ์ต่างๆ ที่เก็บจากแหล่งปลูกมะละกอในประเทศไทย

ปลูกมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2, G3, G5 และ T3 และทดสอบการติดโรค โดยใช้ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนสายพันธุ์ต่างๆ ที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรี อยุธยา สุพรรณบุรี น่าน ขอนแก่น นครราชสีมา ขอนแก่น สงขลา สระแก้ว กาญจนบุรี และสุราษฎร์ธานี โดยใช้ในมะละกอในการทดลองอย่างน้อย 2 ต้น ต่อ 1 ไวรัส ติดตามดูอาการโรคทุกสัปดาห์ เป็นเวลานาน 3 เดือน

ผลการทดลอง

พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 ต้านทานต่อไวรัสที่ระบาดที่จังหวัดนครราชสีมา แต่สามารถติดโรคจากไวรัสที่ระบาดที่จังหวัดอยุธยา สุพรรณบุรีและน่าน ขณะที่สายพันธุ์ G3 ต้านทานต่อไวรัสที่ระบาดที่จังหวัดอยุธยา สุพรรณบุรี น่าน ขอนแก่นและสงขลา, สายพันธุ์ G5 ต้านทานต่อไวรัสที่ระบาดที่จังหวัดสุพรรณบุรี นครราชสีมา สระแก้วและกาญจนบุรี แต่สามารถ ติดโรคจากไวรัสที่ระบาดที่จังหวัดน่าน, สายพันธุ์ T3 ต้านทานต่อไวรัสที่พบระบาดที่จังหวัด สุพรรณบุรี นครราชสีมาและ สุราษฎร์ธานี แต่สามารถเกิดติดโรคได้เมื่อทดสอบกับไวรัส ที่พบระบาดที่จังหวัดอยุธยา ขอนแก่น สระแก้วและ กาญจนบุรี โดยเกิดอาการของโรคจากไวรัส ที่ระบาดที่จังหวัดอยุธยาช้ากว่ามะละกอที่ไม่ได้รับยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (delay) ประมาณ 1 เดือน (ตารางที่ 2.2 และ 2.3)

ตารางที่ 2.2 แสดงจำนวนมะละกอดัดแปรพันธุกรรมรุ่น R0 ที่ติดโรคเมื่อใช้ไวรัสใบด่างจุดวงแหวน ที่เก็บจากแหล่งปลูกมะละกothiจังหวัดราชบุรี สุพรรณบุรี อโยธยา น่าน ขอนแก่น และ นครราชสีมา

มะละกอ	ราชบุรี	สุพรรณบุรี	อโยธยา	น่าน	ขอนแก่น	นครราชสีมา
G2	0/2	1/2	2/2	1/2(delay 1 month)	-	0/2
G3	0/2	0/3	0/5	0/3	-	-
G5	0/2	0/2	-	1/2	-	0/2
T3	0/2	0/2	2/2 (delay 1 month)	-	3/3	0/2

ตารางที่ 2.3 แสดงจำนวนมะละกอดัดแปรพันธุกรรมรุ่น R0 ที่ติดโรคเมื่อใช้ไวรัสใบด่างจุดวงแหวน ที่เก็บจากแหล่งปลูกมะละกothiจังหวัดราชบุรี ขอนแก่น สงขลา สระแก้ว กาญจนบุรี สุราษฎร์ธานี

มะละกอ	ราชบุรี	ขอนแก่น	สงขลา	สระแก้ว	กาญจนบุรี	สุราษฎร์ธานี
G3	0/2	1/3	0/2	-	-	-
G5	0/2			0/2	0/2	-
T3	0/2	2/2		1/2	1/2	0/2

2.3 การทดสอบความต้านทานไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R1, R2 และ R3

ทำการทดสอบความต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R1, R2 และ R3 ดังนี้

1. ปลุกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสาย รุ่น R1 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R0 คือ G2, G3, G5 และ T3 ซึ่งเป็นมะละกอดันตัวเมียกับมะละกอแขกดำเพื่อให้ได้มะละกอที่มีคุณสมบัติดีและเป็นที่ต้องการของเกษตรกร แต่เนื่องจากสายพันธุ์มะละกอแขกดำในปัจจุบันไม่น่าจะมีความแตกต่างกันบ้าง ดังนั้นจึงแบ่งมะละกอแขกดำที่ได้จากแหล่งปลูกต่างๆ ได้แก่ จังหวัดราชบุรี (แขกดำ), จังหวัดเพชรบุรี (แขกดำ-เพชรบุรี), บริษัท Dole จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (แขกดำ-Dol), สวนคุณปรง ป้อมเกิด อ.นครชัยศรี จังหวัดนครปฐม (แขกดำ-ปรง) และทำการทดสอบกับไวรัสที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรี

2. ปลุกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของสายพันธุ์ G2 รุ่น R1 คือ มะละกอ G2-1-4 และ G2-1-4-2 ซึ่งเป็นต้นกระเทย ได้มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R2 นำมาทำการทดสอบกับไวรัสที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรี

3. ปลุกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ที่ได้จากการผสมตัวเอง และผสมข้ามของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 รุ่น R2 และทำการทดสอบกับไวรัส ที่พบระบาดที่จังหวัดราชบุรี

ผลการทดลอง

จากการทดสอบความต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม พบว่า

1. การทดสอบความต้านทานไวรัสของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R1 ซึ่งได้จากการผสมข้ามระหว่างเกสรตัวเมียของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 กับเกสรตัวผู้ของมะละกอแขกดำที่ไม่ได้ผ่านการดัดแปรพันธุกรรม (มะละกอแขกดำ, แขกดำ-เพชรบุรี, แขกดำ-Dol และแขกดำ-ปรง) ในระยะแรกพบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R1 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างมะละกอ G2 กับมะละกอแขกดำ มีความต้านทานกับไวรัสที่พบระบาด ที่จังหวัดราชบุรีในระดับ 50%-75% (ตารางที่ 2.4) แต่การทดสอบในระยะต่อมาพบว่ามะละกอรุ่น R1 ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 มีความต้านทานที่ระดับ 65%-75% (ตารางที่ 2.5) ขณะที่มะละกอสายพันธุ์ G3 รุ่น R1 มีความต้านทานที่ระดับ 7.14%, มะละกอสายพันธุ์ G5 รุ่น R1 มีความต้านทานที่ระดับ 4.35%-11.54% ตามลำดับ และมะละกอสายพันธุ์ T3 รุ่น R1 มีความต้านทานที่ระดับ 20%-37.93% (ตารางที่ 2.6, 2.7 และ 2.8)

2. การทดสอบความต้านทานไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R2 ซึ่งได้จากการผสมตัวเองของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2 รุ่น R1 คือ มะละกอ G2-1-3 (self), G2-1-4 (self) และ G2-1-4-2 (self) ซึ่งเป็นต้นกระเทย พบว่ามีความต้านทานต่อไวรัสในระดับ 57.5-76.47%, 18-46% และในระดับ 22-97% ตามลำดับ (ตารางที่ 2.9 และ 2.10) ส่วนมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างต้น ระหว่าง รุ่น R1 คือ G2-1-5 x G2-1-4-2 พบว่ามีความต้านทานต่อไวรัสในระดับ 31.8% และมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างต้น ระหว่าง รุ่น R0 และ R1 ได้แก่ G2, G3, G5 และ T3 ผสมกับ G2-1-4 และ G2-1-4-2 มีความแตกต่างกันตั้งแต่ 7-97% (ตารางที่ 10)

3. การทดสอบความต้านทานไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ที่ได้จากการผสมตัวเองของมะละกอรุ่น R2 ที่เป็นลูกของมะละกอ G2-1-4 (No.4 self และ No.18 self) ในการปลูกและทดสอบพบว่ามีความต้านทาน 46.81%-87.50% มะละกอรุ่น R3 ที่เกิดจากการผสมข้ามต้นของมะละกอรุ่น R2 ที่ได้จากมะละกอ G2-1-4 คือ No.5 No.15 No.18 No.34 No.46 No.47 มีความต้านทานแตกต่างกันในระดับ 50-90% (ตารางที่ 2.11)

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีการถ่ายทอดความต้านทานไวรัสของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆ ไปยังมะละกอรุ่น R1, R2 และ R3 โดยมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 แสดงการถ่ายทอดความต้านทานต่อไวรัสตามหลักพันธุกรรม คือ รุ่น R1, R2 และ R3 มีความต้านทานไวรัสในระดับประมาณ 50%, 75% และ 90% ตามลำดับ แต่ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G3, G5 และ T3 รุ่น R1 มีความต้านทานที่ระดับ 7.14%, 4.35%-11.54% และ 20%-37.93% ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าที่ควรจะเป็นคือประมาณ 50% ทั้งนี้อาจขึ้นกับจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งมีจำนวนไม่มาก คือ ประมาณ 15-30 ต้น ทำให้ค่าที่ได้จากการทดลองน้อยกว่าที่คาดไว้ จึงวางแผนว่ามีการใช้จำนวนต้นในการทดลองเพิ่มมากขึ้นกว่าที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน เพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติม

ตารางที่ 2.4 แสดงผลการทดสอบความต้านทานของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R1 กับไวรัสใบด่างจุดวงแหวน ที่ระบาดที่จังหวัดราชบุรีในระยะแรก

มะละกอ	จำนวนต้น	ชื่อรหัส	ติดโรค	ความต้านทานต่อไวรัส (ต้นไม่ติดโรค/ต้นที่ทดสอบ)
G2 x แยกดำ	60		30	30/60 (50%)
G2 x แยกดำ	8		4	4/8 (50%)

ตารางที่ 2.5 แสดงผลการทดสอบความต้านทานของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R1 กับไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่ระบาดที่จังหวัดราชบุรีในระยะต่อมา

มะละกอ	จำนวนต้น	ชื่อรหัส	ติดโรค	ความต้านทานต่อไวรัส (ต้นไม่ติดโรค/ต้นที่ทดสอบ)
G2 x แยกดำ	22	C1-C32	3	19/22 (75%)
G2 x แยกดำ-ปราง	43	W1-W43	15	28/43 (65.12%)

ตารางที่ 2.6 แสดงผลการทดสอบความต้านทานของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G3 รุ่น R1 กับไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่ระบาดที่จังหวัดราชบุรี

มะละกอ	จำนวนต้น	ชื่อรหัส	ติดโรค	ความต้านทานต่อไวรัส (ต้นไม่ติดโรค/ต้นที่ทดสอบ)
G3 x แยกดำ-ปราง	29	AA1-AA29	26	2/28 (7.14%)

ตารางที่ 2.7 แสดงผลการทดสอบความต้านทานของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G5 รุ่น R1 กับไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่ระบาดที่จังหวัดราชบุรี

มะละกอ	จำนวนต้น	ชื่อรหัส	ติดโรค	ความต้านทานต่อไวรัส (ต้นไม่ติดโรค/ต้นที่ทดสอบ)
G5 xแบกดำ-ปรง	26	Z1-Z26	23	3/26 (11.54%)
G5 xแบกดำ-ปรง	23	Z27-Z49	22	1/23 (4.35%)

ตารางที่ 2.8 แสดงผลการทดสอบความต้านทานของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ T3 รุ่น R1 กับไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่ระบาดที่จังหวัดราชบุรี

มะละกอ	จำนวนต้น	ชื่อรหัส	ติดโรค	ความต้านทานต่อไวรัส (ต้นไม่ติดโรค/ต้นที่ทดสอบ)
T3 xแบกดำ-ปรง	15	Y1-Y19	12	3/15 (20%)
T3 xแบกดำ-ปรง	29	Y20-Y50	18	11/29 (37.93%)

ตารางที่ 2.9 การทดสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R2 กับไวรัสใบด่างจุดวงแหวน ที่
 ระบาดที่จังหวัดราชบุรี

มะละกอ	จำนวนต้น	ชื่อรหัส	ติดโรค	ความต้านทานต่อไวรัส (ต้นไม่ ติดโรค/ต้นที่ทดสอบ)
G2-1-3 self	40	B1-B40	27	23/40 (57.5%)
G2-1-3 self	17	B41-58	4	13/17 (76.47%)
G2-1-4 self	39		32	7/39 (18%)
G2-1-4 self	100		54	46/100 (46%)
G3 x G2-1-4	30		24	6/30 (20%)
G3 x G2-1-4	40		6	34/40 (85%)
G5 x G2-1-4	25		20	5/25 (20%)
G5 x G2-1-4	13		6	7/13 (53.8%)
T3 x G2-1-4	28		26	2/28 (7.14%)
T3 x G2-1-4	30		23	7/30 (23.33%)
G2-1-4-2 self	60		46	14/60 (22.33%)
G2-1-4-2 self	100		54	46/100 (46%)
G2-1-4-2 self	6		4	2/6 (33%)
G2-1-4-2 self	7		3	4/7 (57.14%)
G2-1-4-2 self	58		39	19/58 (32.76%)
G2-1-4-2 self	42	A1-A42	5	37/42 (88%)
G3 x G2-1-4-2	6		3	3/6 (50%)
G3 x G2-1-4-2	42		21	21/42 (50%)

ตารางที่ 2.9 (ต่อ) การทดสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R2 กับไวรัสใบด่างจุดวงแหวน ที่ระบาดที่จังหวัดราชบุรี

มะละกอ	จำนวนต้น	ชื่อรหัส	ติดโรค	ความต้านทานต่อไวรัส (ต้นไม่ติดโรค/ต้นที่ทดสอบ)
G5 x G2-1-4-2	7		3	4/7 (50%)
G5 x G2-1-4-2	19	F1-F19	9	10/19 (52.63%)
T3 x G2-1-4-2	57		28	29/57 (51%)
T3 x G2-1-4-2	12		3	9/12 (75%)
G2-1-5 x G2-1-4-2	66		45	21/66 (31.8%)

ตารางที่ 2.10 การทดสอบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R2 คือ G2-1-4 กับไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่ระบาดที่จังหวัดราชบุรี

มะละกอ	จำนวนต้น	ชื่อรหัส	ตาย	ติดโรค	เปอร์เซ็นต์ที่ต้านทาน
G2-1-4 (ลูกที่ 3)	4	H1-H4	0	1	3/4 (75%)
G2-1-4 (ลูกที่ 4)	37	I1-I37	0	1	36/37 (97.30%)
G2-1-4 (ลูกที่ 5)	44	M51-M99	5	23	21/44 (47.73%)
G2-1-4 (ลูกที่ 6)	22	R1-R43	21	13	9/22 (40. 91%)

ตารางที่ 2.11 การทดสอบมะละกอตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ G3 รุ่น R3 กับไวรัสใบด่างจุดวงแหวน
ที่ระดับที่จังหวัดราชบุรี

	จำนวนต้น	ชื่อรหัส	ตาย	ติดโรค	เปอร์เซ็นต์ที่ต้านทาน
No.4 self	47	U1-U47	0	25	22/47 (46.81%)
No.4 self	8	U48-U55	0	1	7/8 (87.50%)
No.18 self	50	V1-V50	0	11	39/50 (78.00%)
No.18 self	6	18.1-18.6	0	3	3/6 (50%)
No.5 x No.15	58	X1-X58	0	19	39/58 (67.24%)
No.34 x No.18	79	D1-D79	9	35	35/70 (50%)
No.46 x No.47	32	E1-E32	12	2	18/20 (90%)

2.4 การศึกษาการถ่ายถอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสไปยังมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R1, R2 และ R3 โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ในการศึกษาการถ่ายถอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสไปยังมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R1, R2 และ R3 ทำโดยการสกัด DNA จากใบของมะละกอ แล้วใช้ primers ที่จำเพาะกับลำดับเบส ด้านปลาย 5' และด้านปลาย 3' ของ coat protein gene (5' PRV และ 3' PRV) ทำการเพิ่มจำนวนยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสโดยใช้วิธี PCR แล้วจึงนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

มะละกอที่ทำการศึกษาได้แก่

1. มะละกอสายพันธุ์ G2 รุ่น R1 จำนวน 13 ต้น โดยแบ่งเป็นมะละกอที่สามารถต้านทานไวรัส 9 ต้น และไม่ต้านทานไวรัส 4 ต้น
2. มะละกอสายพันธุ์ G2 รุ่น R2 จำนวน 34 ต้น ที่เกิดจากการผสมตัวเองของมะละกอ รุ่น R1 คือ G2-1-4
3. มะละกอสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 จำนวน 52 ต้น ที่เกิดจากการผสมตัวเองของมะละกอ รุ่น R2

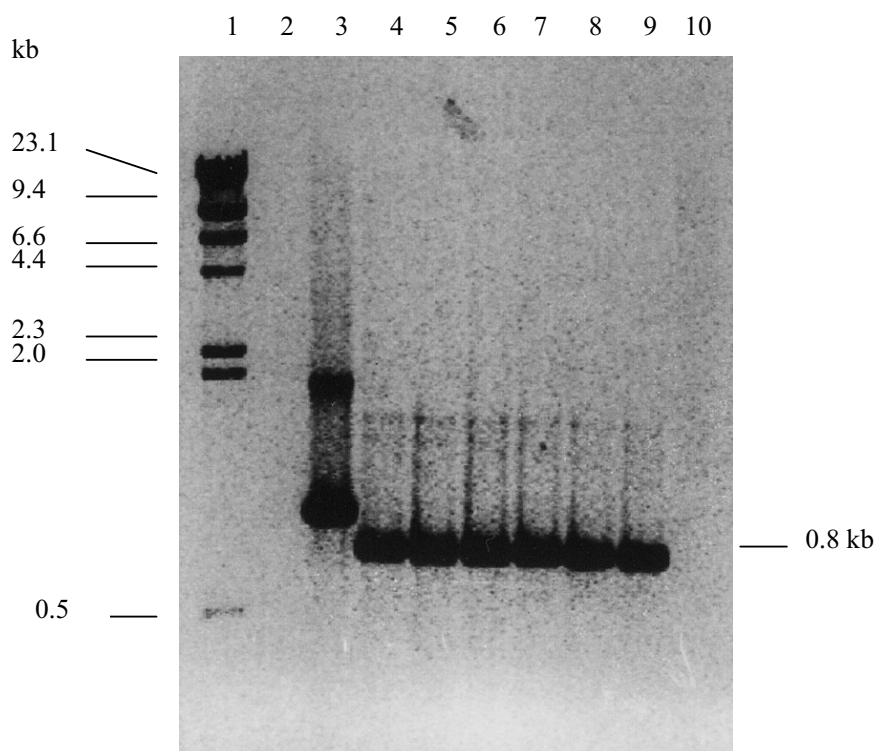
ผลการทดลอง

จากการทดลอง (รูปที่ 2.1 และ 2.2) พบว่ามะละกอสายพันธุ์ G2 รุ่น R1 ที่ต้านทานไวรัส 9 ต้น คือ G2-1-5-2, G2-1-5-8, G2-1-6-1, G2-1-4-2, G2-1-3-1, G2-1-3-4, G2-1-2, G2-1-4, G2-1-5 ได้รับการถ่ายถอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 โดยพบว่ามียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสขนาด 0.8 กิโลเบสอยู่ในจีโนม ในขณะที่มะละกอที่ไม่สามารถต้านทานต่อไวรัส 4 ต้น คือ G2-1-2-7, G2-1-1, G2-1-3 และ G2-1-6 ไม่มียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส

มะละกอสายพันธุ์ G2 รุ่น R2 จำนวน 32 ต้น จาก 34 ต้น ได้รับการถ่ายถอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม R1 และ R0 โดยพบว่ามียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสขนาด 0.8 กิโลเบสอยู่ในจีโนมของมะละกอ (รูปที่ 2.3, 2.4, 2.5 และ 2.6)

มะละกอสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 จำนวน 49 ต้น จาก 52 ต้น ได้รับการถ่ายถอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมรุ่น R0 R1 และ R2 โดยพบว่ามียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสขนาด 0.8 กิโลเบสอยู่ในจีโนมของมะละกอ ยกเว้นต้น No. 18-1 No. 18-3, No. 18-6 (รูปที่ 2.7-2.13)

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R1, R2 และ R3 ที่สามารถต้านทานไวรัส ได้รับการถ่ายถอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R0 ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)



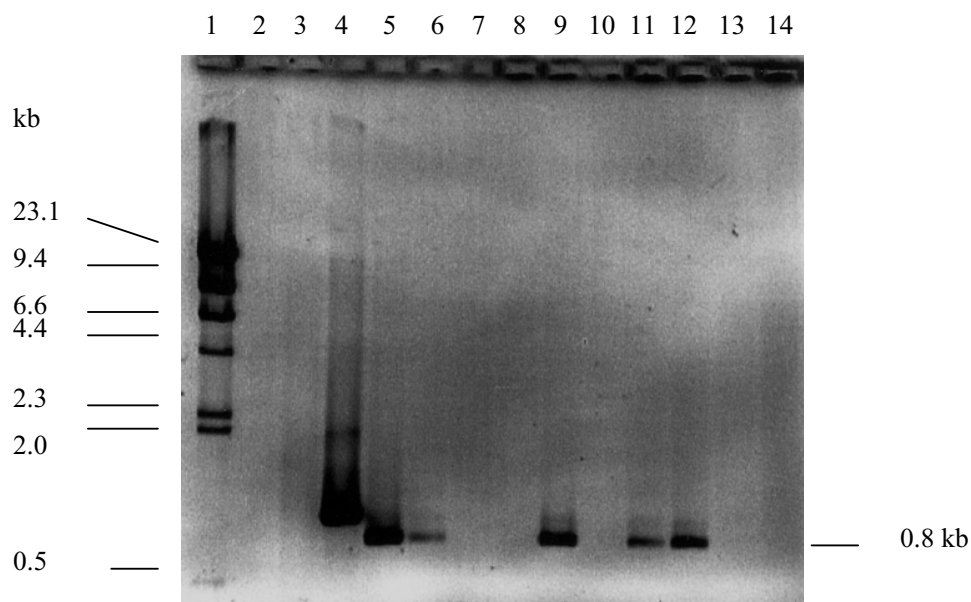
รูปที่ 2.1 แสดงผล PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R1 โดยวิธี PCR โดยใช้ primers 5'PRV และ 3'PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 negative control ในการทำ PCR amplification (ไม่มีใส่ template)

แถวที่ 3 positive control ในการทำ PCR amplification (ใช้ pSA1006 เป็น template)

แถวที่ 4-10 PCR amplification จาก DNA ที่สกัดจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมรุ่น R1 ได้แก่ G2-1-5-2, G2-1-5-8, G2-1-6-1, G2-1-4-2, G2-1-3-1, G2-1-3-4 และ G2-1-2-7 ตามลำดับ



รูปที่ 2.2 แสดงผล PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R1

โดยวิธี PCR โดยใช้ primers 5'PRV และ 3'PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 λ Hind III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 negative control (ไม่ใส่ template)

แถวที่ 3 negative control (ใช้ใบมะละกอธรรมดาที่ไม่เป็นโรคไวรัส)

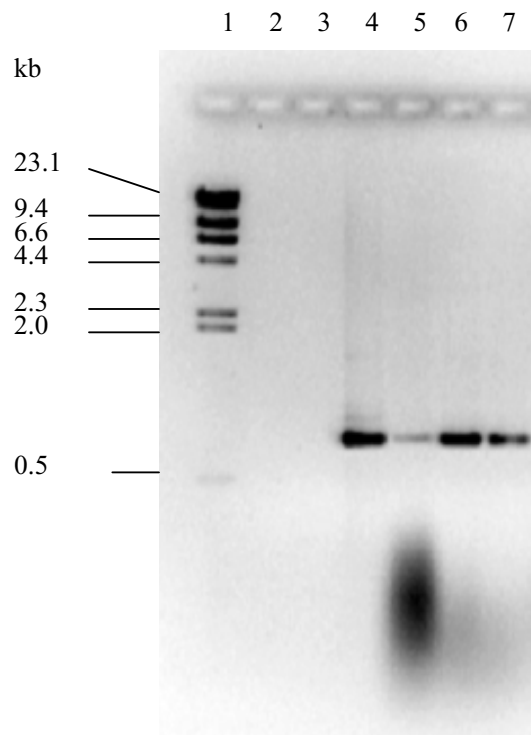
แถวที่ 4 positive control (ใช้ pSA1006 เป็น template)

แถวที่ 5 PCR amplification จาก DNA ที่สกัดจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2

แถวที่ 6-13 PCR amplification จาก DNA ที่สกัดจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R1 ได้แก่ G2-1-3-4, G2-1-2-7, G2-1-1, G2-1-2, G2-1-3, G2-1-4, G2-1-5, G2-1-6

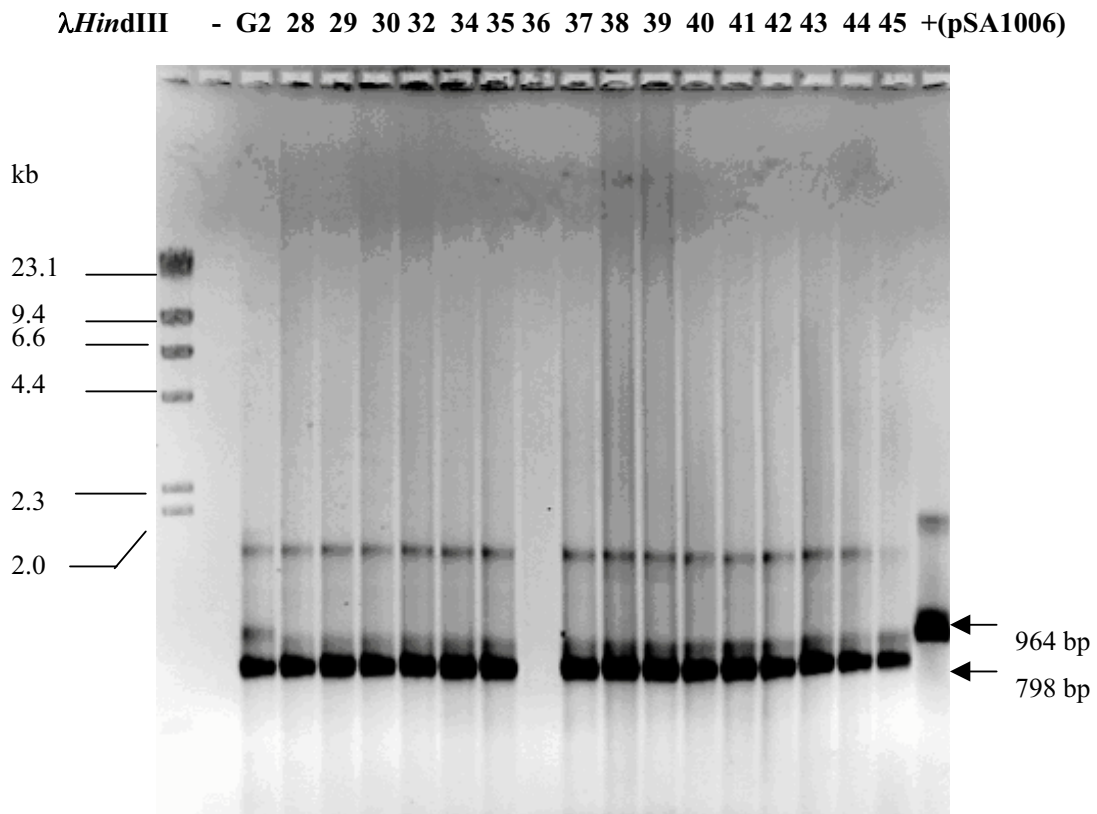
ตามลำดับ

แถวที่ 14 negative control (ใช้ใบมะละกอธรรมดาที่ไม่เป็นโรคไวรัส)



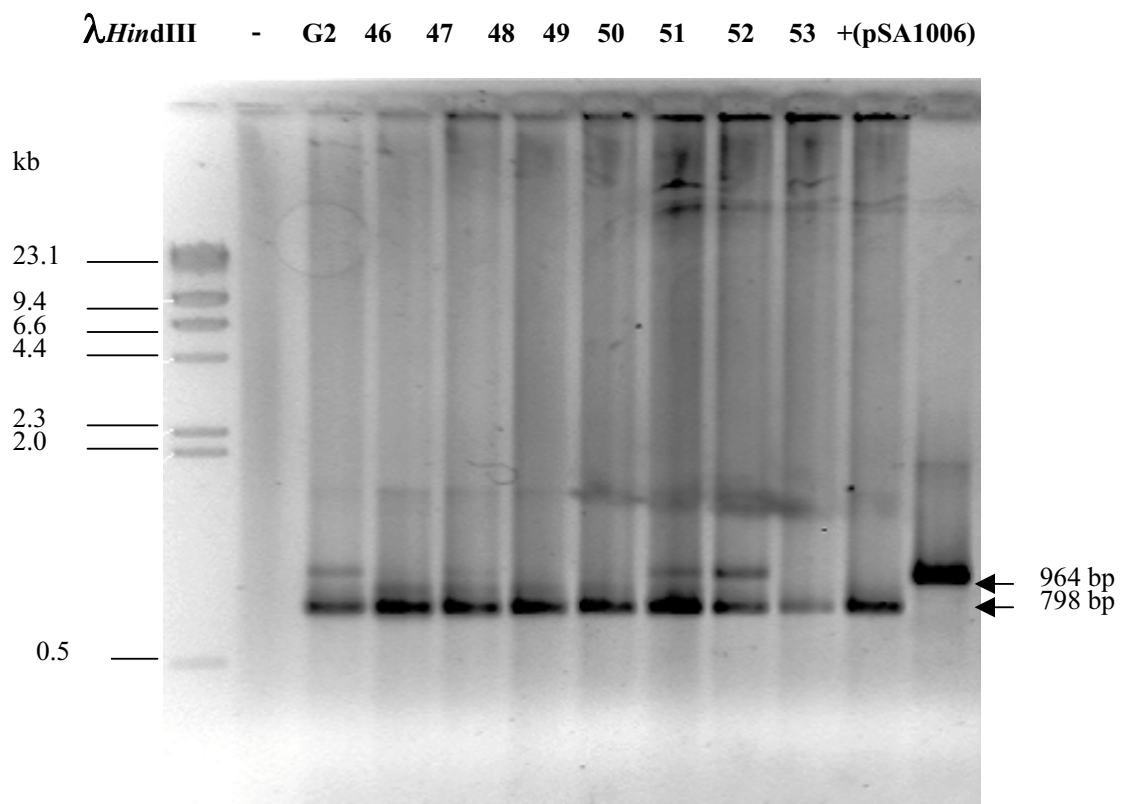
รูปที่ 2.3 แสดงผล PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R2 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของมะละกอ รุ่น R1 (G2-1-4 x G2-1-4 ลูกที่ 4) โดยใช้ primers 5'PRV และ 3'PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไป แยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1	λ Hind III ที่ใช้เป็น DNA marker
แถวที่ 2	Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template)
แถวที่ 3	Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template)
แถวที่ 4	Positive control (ใช้ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2)
แถวที่ 5-7	PCR amplification ของ DNA จากใบของมะละกอ ดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R2 หมายเลข No. I2, No. I5, No. I7



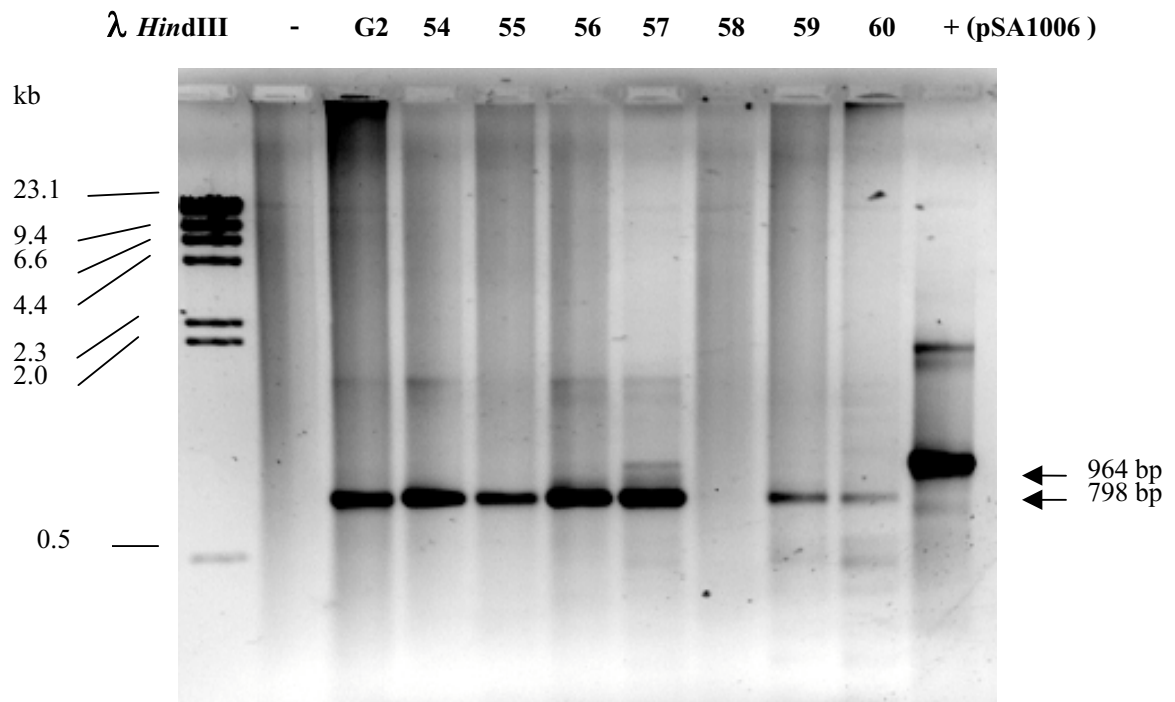
รูปที่ 2.4 แสดงผล PCR amplification ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R2 โดยใช้ primers 5' PRV และ 3' PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

- | | |
|-------------|--|
| แถวที่ 1 | <i>λ Hind III</i> ที่ใช้เป็น DNA marker |
| แถวที่ 2 | Negative control (ใช้ DNA จากใบมะละกอรธรรมดาที่ไม่เป็นโรคไวรัส) |
| แถวที่ 3 | Positive control (ใช้ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2) |
| แถวที่ 4-19 | PCR amplification ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R2 หมายเลข 28, 29, 30, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 และ 45 |
| แถวที่ 20 | Positive control (ใช้ DNA จากพลาสมิด pSA1006) |



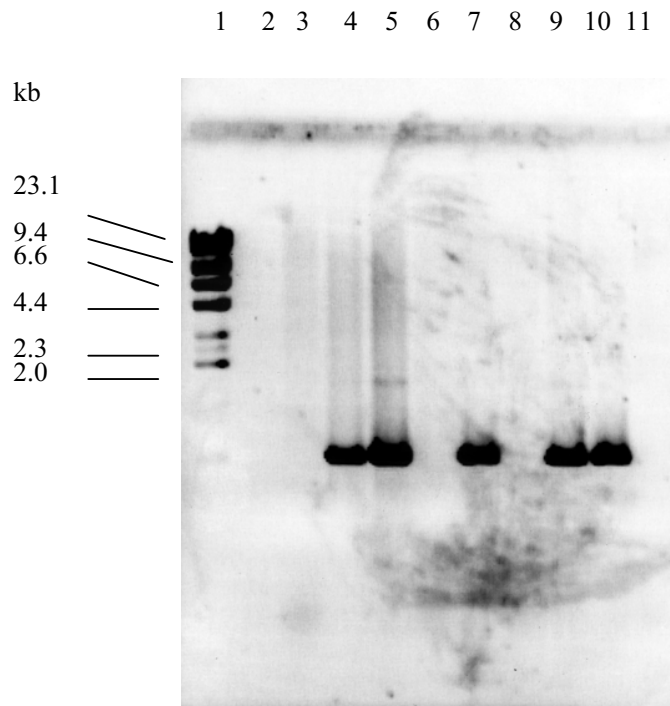
รูปที่ 2.5 แสดงผล PCR amplification ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R2 โดยใช้ primers 5' PRV และ 3' PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

- แถวที่ 1 λ Hind III ที่ใช้เป็น DNA marker
- แถวที่ 2 Negative control (ใช้ DNA จากใบมะละกอธรรมดาที่ไม่เป็นโรคไวรัส)
- แถวที่ 3 Positive control (ใช้ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2)
- แถวที่ 4-11 PCR amplification ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R2 หมายเลข 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 และ 53
- แถวที่ 12 Positive control (ใช้ DNA จากพลาสมิด pSA1006)



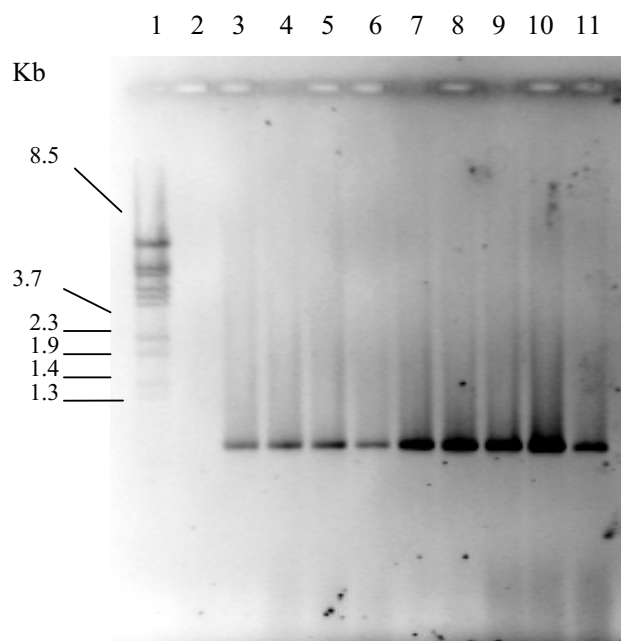
รูปที่ 2.6 แสดงผล PCR amplification ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R2 โดยใช้ primers 5' PRV และ 3' PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

- แถวที่ 1 λ Hind III ที่ใช้เป็น DNA marker
- แถวที่ 2 Negative control (ใช้ DNA จากใบมะละกอธรรมดาที่ไม่เป็นโรคไวรัส)
- แถวที่ 3 Positive control (ใช้ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2)
- แถวที่ 4-11 PCR amplification ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R2 หมายเลข 54, 55, 56, 57, 58, 59 และ 60
- แถวที่ 12 Positive control (ใช้ DNA จากพลาสมิด pSA1006)



รูปที่ 2.7 แสดงผล PCR amplification ของ DNA จากจากใบมะละกอมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R3 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของมะละกอ รุ่น R2 (มะละกอ No. 18) โดยใช้ primers 5' PRV และ 3' PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1	λ Hind III ที่ใช้เป็น DNA marker
แถวที่ 2	Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template)
แถวที่ 3	Negative control (ใช้ DNA จากใบมะละกอธรรมดาที่ไม่เป็นโรคไวรัส)
แถวที่ 4-5	Positive control (ใช้ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2)
แถวที่ 6-11	PCR amplification ของ DNA จากจากใบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R3 หมายเลข No. 18-1, No. 18-2, No. 18-3, No. 18-4, No. 18-5, No. 18-6



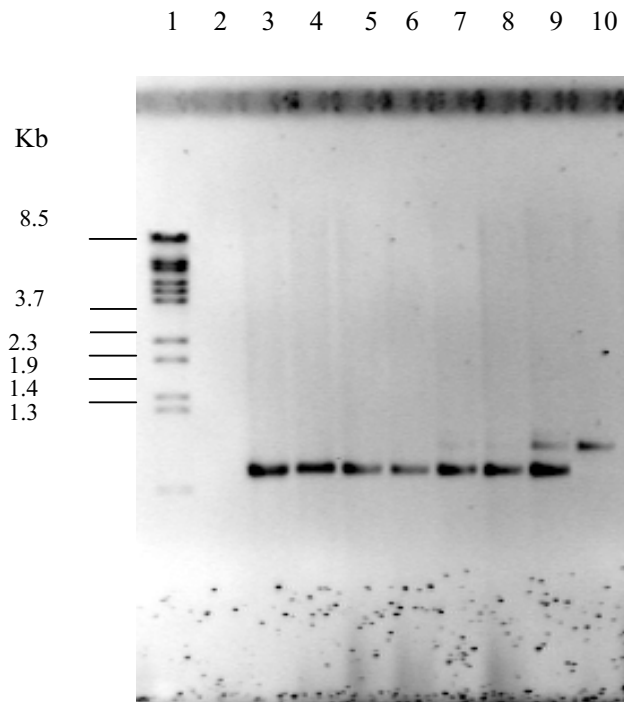
รูปที่ 2.8 แสดงผล PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของมะละกอ รุ่น R2 คือ G2-1-4-No. 4 (self) โดยใช้ primers 5'PRV และ 3'PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 λ Bst EII ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template)

แถวที่ 3 Positive control (ใช้ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2)

แถวที่ 4-11 PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 หมายเลข No. U1, No. U3, No. U4, No. U6, No. U12, No. U18, No. U20, No. U42



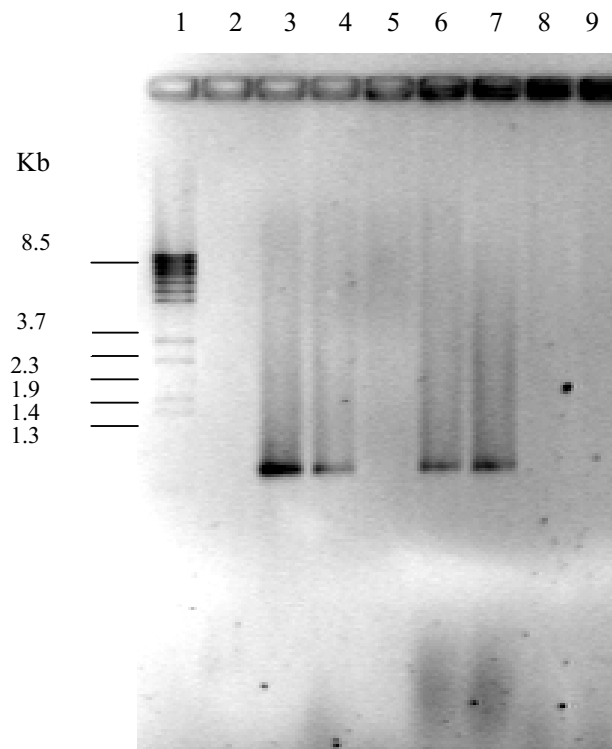
รูปที่ 2.9 แสดงผล PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของมะละกอ รุ่น R2 (มะละกอ G2-1-4 No.4 self) โดยใช้ primers 5'PRV และ 3'PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 λ Bst EII ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template)

แถวที่ 3 Positive control (ใช้ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2)

แถวที่ 4-10 PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R2 หมายเลข No. U2, No. U5, No. U8, No. U9, No. U11, No. U17, No. U38



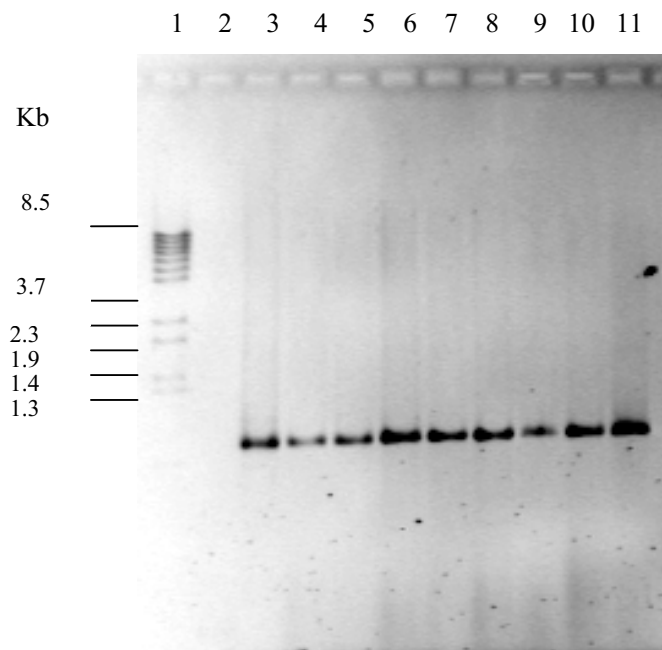
รูปที่ 2.10 แสดงผล PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของมะละกอ รุ่น R2 (มะละกอ G2-1-4 No.18 self) โดยใช้ primers 5'PRV และ 3'PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 λ Bst EII ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template)

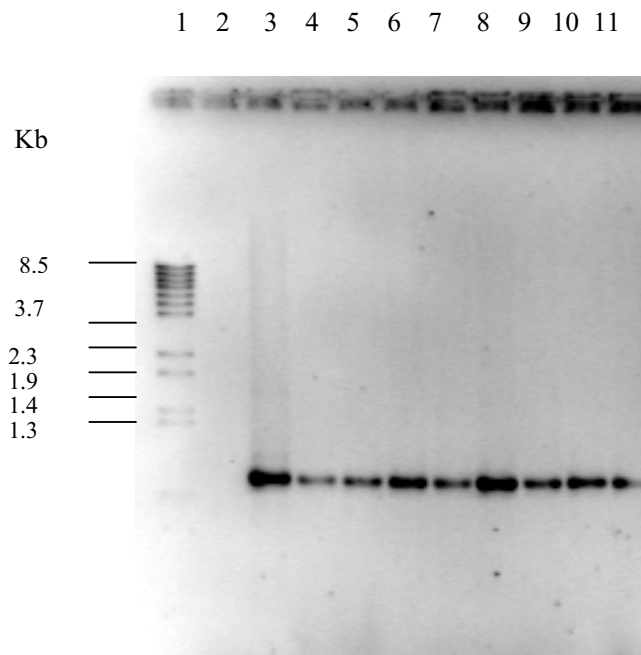
แถวที่ 3 Positive control (ใช้ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2)

แถวที่ 4-9 PCR amplification ของ DNA จากใบของต้นมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 หมายเลข No. V1, No. V2, No. V5, No. V10, No. V20, No. V35



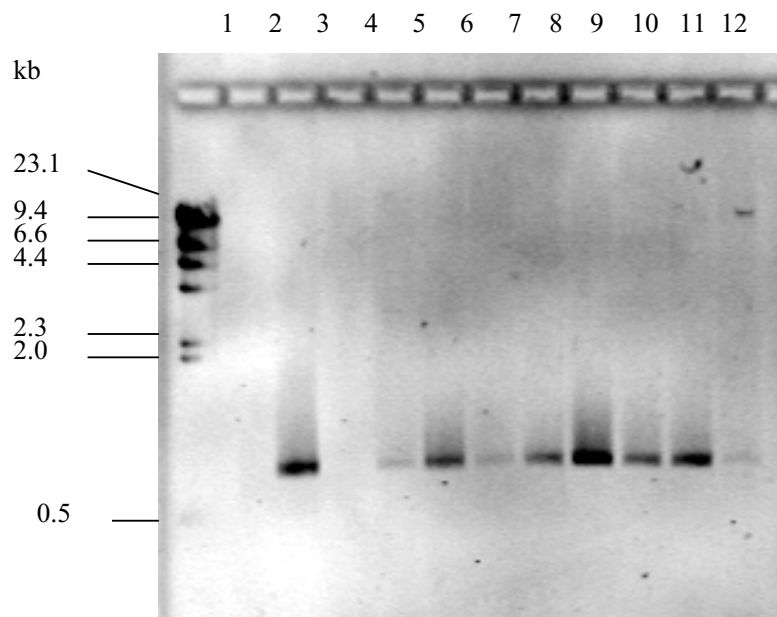
รูปที่ 2.11 แสดงผล PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของมะละกอ รุ่น R2 (G2-1-4-No. 5 x No 15) โดยใช้ primers 5'PRV และ 3'PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1	λ <i>Bst</i> EII ที่ใช้เป็น DNA marker
แถวที่ 2	Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template)
แถวที่ 3	Positive control (ใช้ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2)
แถวที่ 4-11	PCR amplification ของ DNA จากใบของต้นมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R3 หมายเลข No. X1, No. X2, No. X3, No. X4, No. X27, No. X33, No. X35, No. X37



รูปที่ 2.12 แสดงผล PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของมะละกอ รุ่น R2 (G2-1-4-No. 5 x No 15) โดยใช้ primers 5'PRV และ 3'PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1	λ <i>Bst</i> EII ที่ใช้เป็น DNA marker
แถวที่ 2	Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template)
แถวที่ 3	Positive control (ใช้ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2)
แถวที่ 4-11	PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R3 หมายเลข No. X5, No. X6, No. X7, No. X14, No. X21, No. X22, No. X26, No. X32



รูปที่ 2.13 แสดงผล PCR amplification ของ DNA จากใบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของมะละกอ รุ่น R2 (G2-1-4-No. 46 x No 47) โดยใช้ primers 5'PRV และ 3'PRV แล้วนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 λ Bst EII ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template)

แถวที่ 3 Positive control (ใช้ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2)

แถวที่ 4-12 PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 หมายเลข No. E6, No. E7, No. E8, No. E11 No. E13, No. E14, No. E18, No. E25, No. E27

2.5 การตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R1, R2 และ R3 โดยใช้วิธี Southern Blot analysis

ทำการสกัด DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R1, R2 และ R3 ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I หรือ *Hind* III แล้วนำ DNA ไปแยกตามขนาดด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis แล้วย้าย DNA ไปบนแผ่น nitrocellulose membrane ทำการตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอโดยใช้ DNA ของ coat protein gene ของ PRSV เป็น probe นำแผ่น nitrocellulose membrane ไปประกบบนแผ่นฟิล์ม X-ray หากมียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสบนแผ่น nitrocellulose membrane เมื่อนำฟิล์มไปล้างจะเห็นแถบ ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่จับกับ DNA probe บนแผ่นฟิล์ม

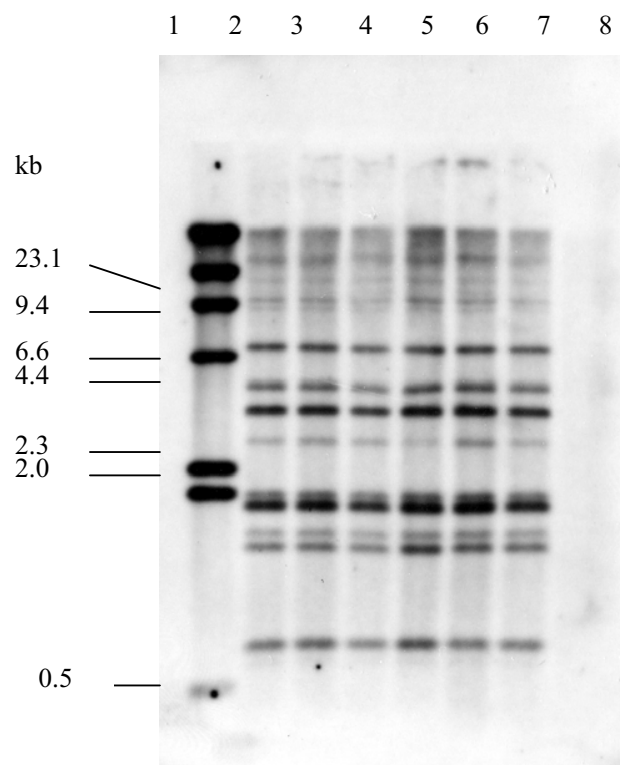
ผลการทดลอง

จากการใช้วิธี Southern Blot analysis ตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนม ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I จำนวน 13 ต้น พบว่า มะละกอดัดแปรพันธุกรรม R1 ที่ต้านทานไวรัส จำนวน 9 ต้น คือ G2-1-5-2, G2-1-5-8, G2-1-6-1, G2-1-4-2, G2-1-3-1, G2-1-3-4, G2-1-2, G2-1-4 และ G2-1-5 ได้รับการถ่ายทอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส จากมะละกอดัดแปร พันธุกรรม G2 รุ่น R0 โดยมีรูปแบบของการเรียงตัว ของ DNA ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส เหมือนกับต้นแม่ ในขณะที่มะละกอที่ไม่ได้รับการถ่ายทอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส 3 ต้น คือ G2-1-2-7, G2-1-1, G2-1-3 และ G2-1-6 ไม่แสดงแถบ DNA ให้เห็นในฟิล์ม (รูปที่ 2.14 และ 2.15)

จากการตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R2 (G2-1-4 self) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I จำนวน 26 ต้น (รูปที่ 2.16 และ 2.17) พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมรุ่น R2 จำนวน 23 ต้น จาก 26 ต้น ที่ทำการตรวจสอบ ได้รับการถ่ายทอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมรุ่น R1 และ R0 โดยมีรูปแบบของการเรียงตัว ของ DNA ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสเหมือนกับต้นมะละกอ รุ่น R1 และ R0 ในขณะที่มะละกอที่ไม่ได้รับการถ่ายทอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (No. 8, 33, 36) ไม่แสดงแถบ DNA ให้เห็นในฟิล์ม

จากการตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ต้น No.18-2, No.18-7, No.18-8, No.D12, No.E18, No.D58 (ตารางที่ 2.12) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III โดยใช้วิธี Southern Blot analysis พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมรุ่น R3 ทั้ง 6 ต้นที่ทำการตรวจสอบ ได้รับการถ่ายทอดยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากมะละกอดัดแปร พันธุกรรมรุ่น R0 R1

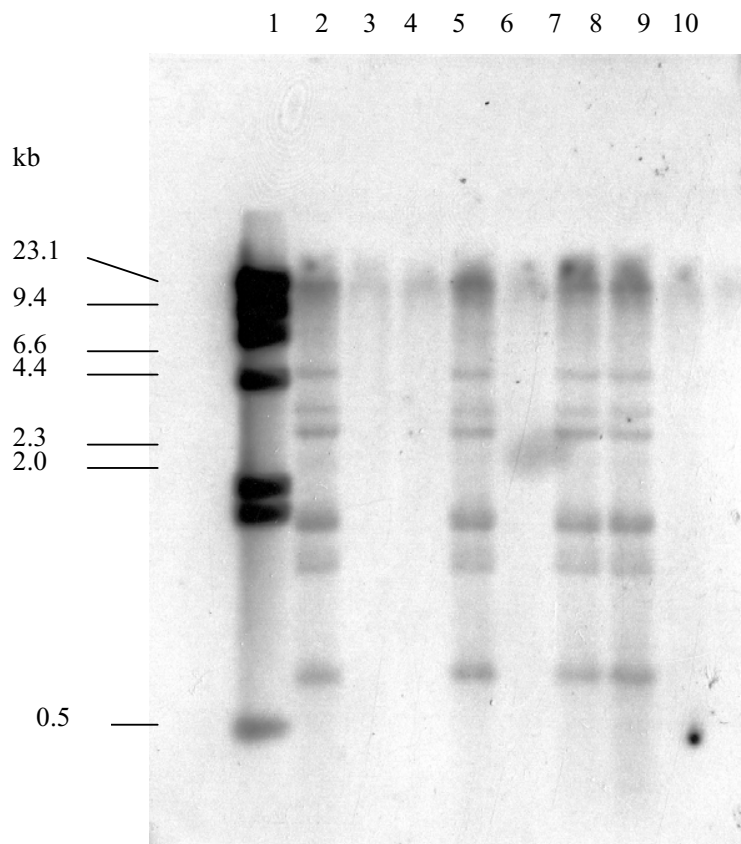
และ R2 โดยมีรูปแบบของการเรียงตัวของ DNA ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส เหมือนกับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R0 R1 และ R2 ในขณะที่มะละกอ ธรรมดาไม่แสดงแถบ DNA ให้เห็นในฟิล์ม และมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1 แสดงให้เห็นยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมเพียง 1 ชุด มีขนาด 1.6 kb



รูปที่ 2.14 แสดงผลตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I โดยใช้วิธี Southern Blot analysis

แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 –8 DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2-1-5-2, G2-1-5-8, G2-1-6-1, G2-1-4-2, G2-1-3-1, G2-1-3-4 และ G2-1-2-7 ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I ตามลำดับ

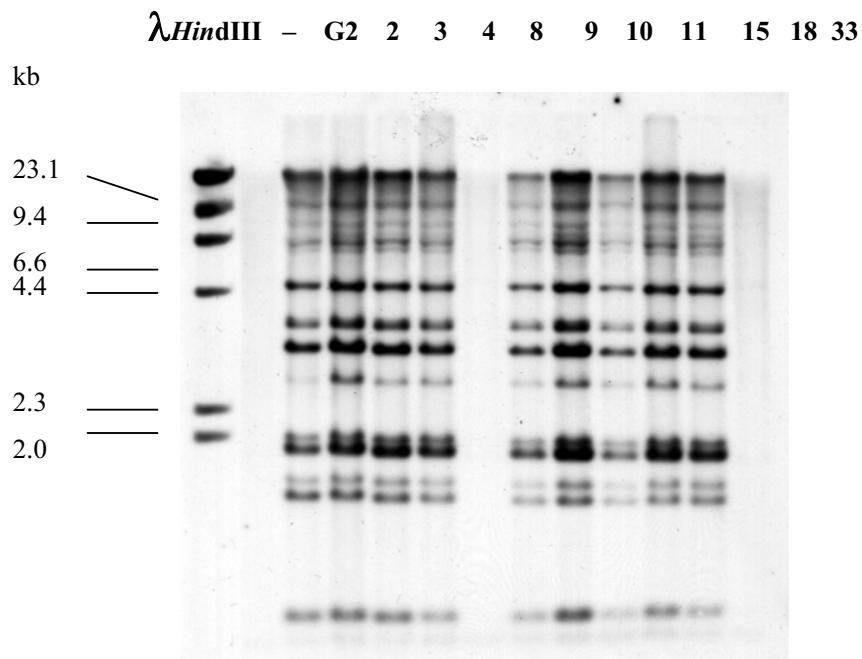


รูปที่ 2.15 แสดงผลตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I โดยใช้วิธี Southern Blot analysis

แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 –9 DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม G2, G2-1-3-4, G2-1-2-7, G2-1-1, G2-1-2, G2-1-3, G2-1-4, G2-1-5, G2-1-6 ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I ตามลำดับ

แถวที่ 10 DNA ของมะละกอรธรรมดาที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I



รูปที่ 2.16

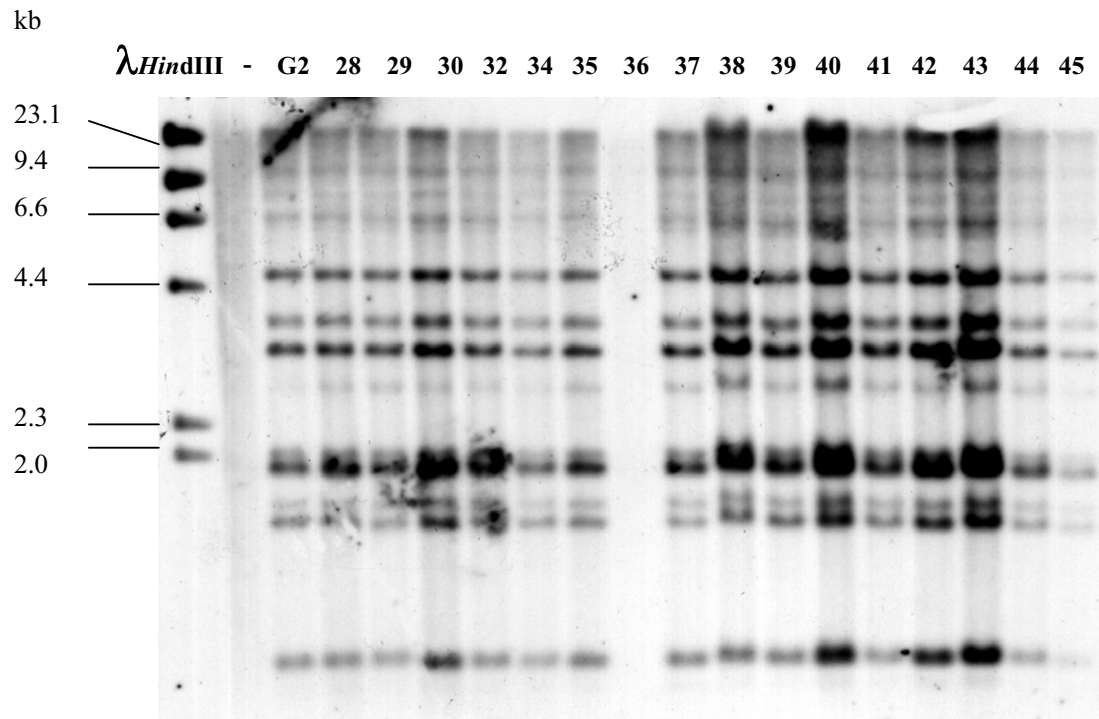
แสดงผลการตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปร พันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I โดยใช้วิธี Southern Blot analysis

แถวที่ 1 λ Hind III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 DNA ของมะละกอที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I

แถวที่ 3 DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุ์กรรม G2 ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I

แถวที่ 4–13 DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุ์กรรมรุ่น R2 หมายเลข 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 15, 18 และ 33 ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I ตามลำดับ

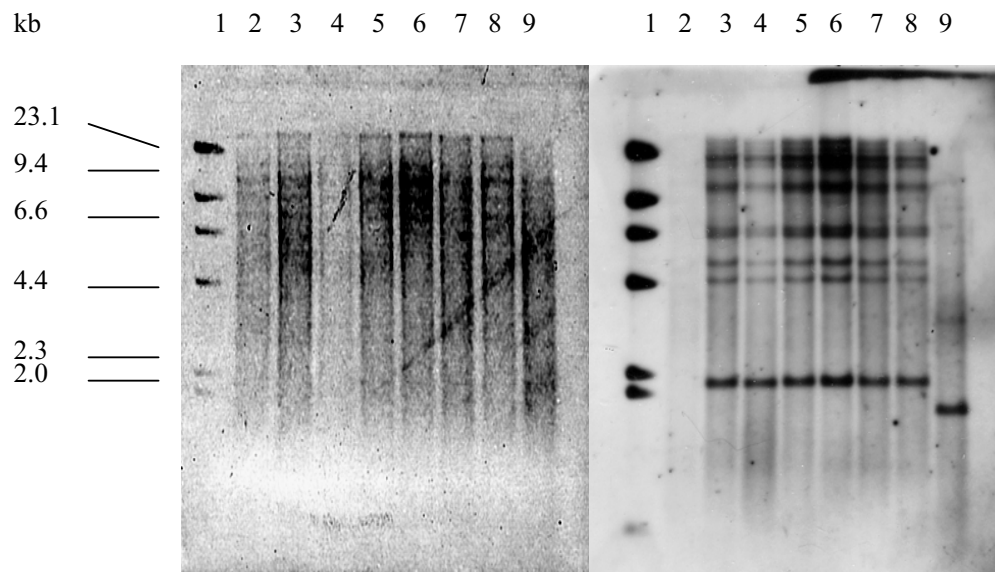


รูปที่ 2.17 แสดงผลการตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปร พันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I โดยใช้วิธี Southern Blot analysis

- แถวที่ 1 λ Hind III ที่ใช้เป็น DNA marker
- แถวที่ 2 DNA ของมะละกอธรรมดาที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I
- แถวที่ 3 DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุ์กรรม G2 ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I
- แถวที่ 4-13 DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุ์กรรมรุ่น R2 หมายเลข 28, 29, 30, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 และ 45 ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I ตามลำดับ

ตารางที่ 2.12 แสดงมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ที่ใช้ตรวจสอบ

มะละกอรุ่น R2 ที่เป็นผู้ผสม	มะละกอรุ่น R3 ที่ตรวจสอบ
G2-1-4-No. 18 self	No. 18-2
G2-1-4-No. 18 self	No. 18-7
G2-1-4-No. 18 self	No. 18-8
G2-1-4-No. 34x No 18	D12
G2-1-4-No. 34x No 18	D58
G2-1-4-No. 46x No 47	E18



รูปที่ 2.18 แสดงผลการตรวจสอบยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III โดยใช้วิธี Southern Blot analysis

แถวที่ 1 λ *Hind* III ที่ใช้เป็น DNA marker

แถวที่ 2 DNA ของมะละกอธรรมดาคัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III

แถวที่ 3-8 DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 คือ No.18-2, No.18-7, No.18-8, No.D12, No.E18, No.D58 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III

แถวที่ 9 DNA ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III

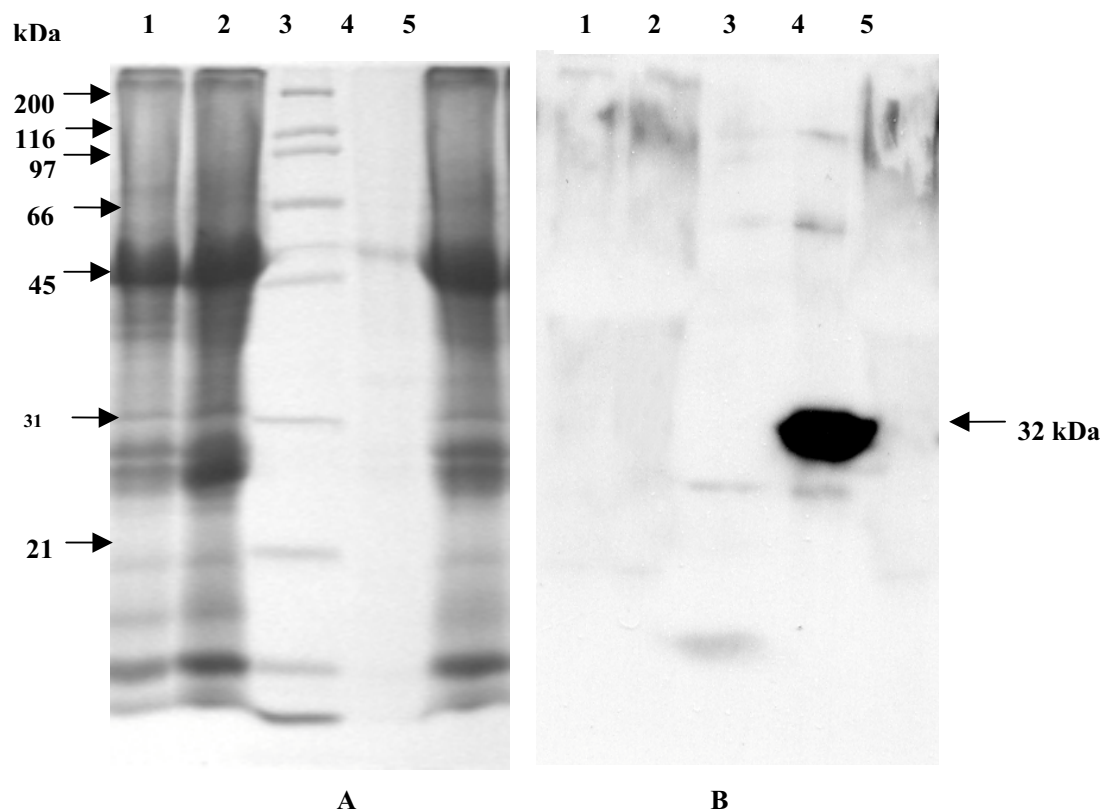
2.6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R1 โดยวิธี western blot analysis

ทำการสกัดโปรตีนจากใบมะละกอโดยใช้ Trichloro Acetic Acid (TCA) นำโปรตีนที่ได้มาแยกขนาดโดยวิธี SDS-PAGE แล้วทำการย้ายโปรตีนจาก acrylamide gel ไปยังแผ่น nitrocellulose membrane นำไปทำปฏิกิริยากับ antibody ที่จำเพาะกับโปรตีนเปลือกไวรัส (anti-CP polyclonal antibody) ที่มีความเจือจาง 1:2000 แล้วใช้ anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase ที่มีความเจือจาง 1:5000 ทำปฏิกิริยากับ antibody ตัวแรก แล้วใช้ western blotting detection reagent (ECL plus western blotting detection reagent, Amersham Pharmacia Biotech) ในการทำปฏิกิริยาตรวจสอบ สุดท้ายนำแผ่น nitrocellulose membrane ไปประกบบนแผ่นฟิล์ม X-ray หากมีโปรตีนเปลือกไวรัสบนแผ่น nitrocellulose membrane เมื่อนำฟิล์มไปล้างจะเห็นแถบ โปรตีนบนแผ่นฟิล์ม

ผลการทดลอง

จากตรวจสอบการแสดงออกของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R1 จำนวน 2 lines คือ G2-1-4 และ G2-1-5 ในระดับการสร้างโปรตีน (translation) โดยวิธี western blot analysis โดยนำโปรตีนที่สกัดได้จากใบมะละกามาทำการแยกขนาดโดย SDS-PAGE (รูปที่ 2.19 A) และย้ายโปรตีนไปแผ่น nitrocellulose membrane เพื่อทำปฏิกิริยา western blot analysis (รูปที่ 2.19 B) กับ anti-CP polyclonal antibody พบว่าไม่สามารถตรวจพบโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R1

การทดลองนี้ยืนยันว่ามะละกอสายพันธุ์ G2 รุ่น R1 ไม่สามารถสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส เช่นเดียวกับในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R0



รูปที่ 2.19 แสดงโปรตีนที่แยกได้จากใบมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น R1 ของมะละกอดัดแปร พันธุกรรมสายพันธุ์ G2 คือ จากต้น G2-1-4 และต้น G2-1-5 นำมาแยกตามขนาดโดย 13 % SDS polyacrylamide gel (A) แล้วทำการตรวจหาโปรตีนเปลือกไวรัสโดยวิธี western blot analysis (B)

- แถวที่ 1 โปรตีนที่แยกได้จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม จากต้น G2-1-4 จำนวน 35 μ g
- แถวที่ 2 โปรตีนที่แยกได้จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม จากต้น G2-1-5จำนวน 35 μ g
- แถวที่ 3 โปรตีนที่ทราบขนาดและใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิง (Broad range protein marker)
- แถวที่ 4 โปรตีนที่แยกได้จากใบมะละกอที่เป็นโรคไวรัส จำนวน 500 ng (positive control)
- แถวที่ 5 โปรตีนที่แยกได้จากใบของมะละกอธรรมดาที่ไม่เป็นโรค จำนวน 35 μ g (negative control)

2.7 การตรวจสอบการสร้างโปรตีนจากยีนเปลือกไวรัสของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 โดยวิธี RT-PCR

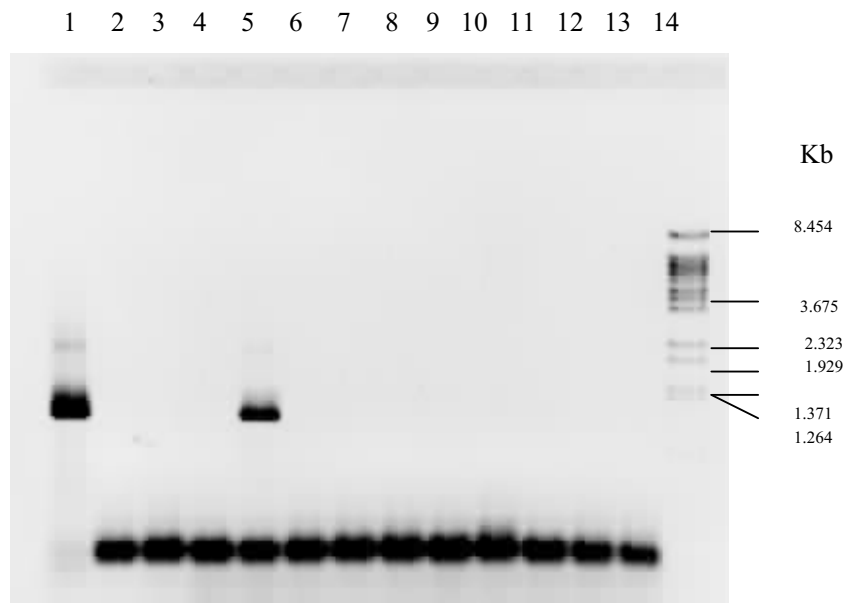
ทำการสกัด RNA จากใบมะละกอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 โดยวิธี RT-PCR โดยการสกัด RNA จากใบมะละกอโดยใช้สาร Trizol ของบริษัท Gibco, Ltd. แล้วใช้เอนไซม์ DNaseI ทำการกำจัด DNA ที่อาจติดมาในขั้นตอนการสกัด RNA วัดปริมาณ RNA ที่ได้จากปฏิกิริยาโดยใช้ spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD260 nm และตรวจสอบ 1% agarose-formaldehyde gel (1% agarose, 2.2 M formaldehyde, 10% of 10x MOPS) นำสารพันธุกรรม RNA ในปริมาณ 2 µg มาเตรียม cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription reaction โดยใช้ oligo-dT และเอนไซม์ Superscript™ II (GIBCO BRL) และเครื่อง Gene Amplification System 2400 (Perkin Elmer) และนำ cDNA จำนวนเท่ากันจากแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้วิธี PCR และใช้ primers ที่จำเพาะกับลำดับเบสด้านปลาย 5' และ 3' ของ coat protein gene (5'PRV/3'PRV) แล้วจึงนำ DNA ที่ได้ไปแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

ในทดลองใช้วิธี Southern blot hybridization เพื่อตรวจสอบการสร้าง mRNA ปริมาณน้อยๆ ทำโดยการนำ DNA ที่ได้จากการทำ RT-PCR มาแยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis แต่ใช้ปริมาณของ Positive control คือ DNA จากพลาสมิด pSA1006 และ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR amplification ของ DNA จากใบของต้นมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1 น้อยกว่า 200 เท่า และ 100 เท่า จากปริมาณที่ใช้ในการตรวจสอบใน 0.8% agarose gel electrophoresis ตามลำดับ

ผลการทดลอง

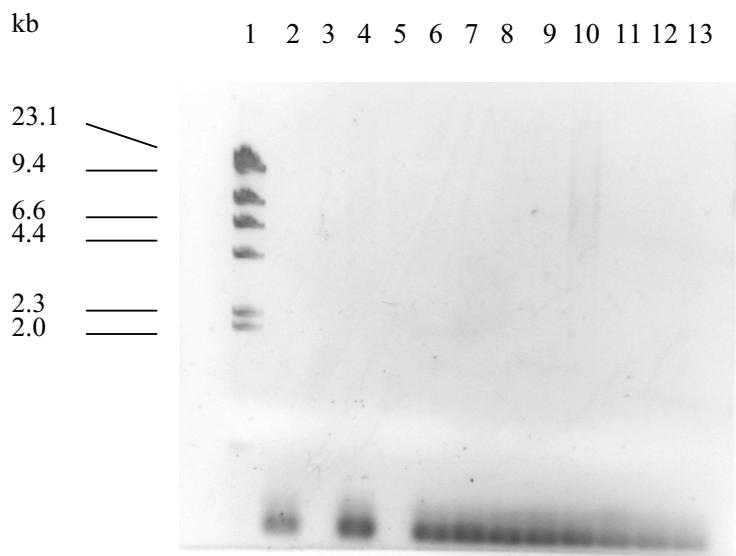
พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1 รุ่น R0 ซึ่งไม่ต้านทานต่อไวรัส สามารถสร้าง mRNA มีขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ที่สามารถตรวจพบได้โดยการนำ DNA ที่ได้จากวิธี RT-PCR ไปแยกขนาดบน 0.8% agarose gel electrophoresis ในขณะที่มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ที่สามารถต้านทานไวรัสได้ มีการสร้าง mRNA ปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถตรวจได้จาก 0.8% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 2.20) แต่สามารถตรวจพบได้โดยวิธี Southern blot hybridization โดยพบว่า mRNA ที่สร้างในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม รุ่น R3 ของสายพันธุ์ G2 มีขนาดประมาณ 800 เบส (รูปที่ 2.22)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากลไกการต้านทานต่อไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมเกิดจากกระบวนการหยุดยั้งการทำงานของยีน (gene silencing) ทำให้มีการทำลาย mRNA ที่สร้างจากโปรตีนเปลือกไวรัส กระบวนการดังกล่าวนี้สามารถถ่ายทอดไปยังมะละกอรุ่น R3 ได้ ดังนั้นจึงตรวจพบ mRNA ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไวรัสในปริมาณที่น้อยและไม่สามารถตรวจพบโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดังกล่าวจากวิธี western blot analysis



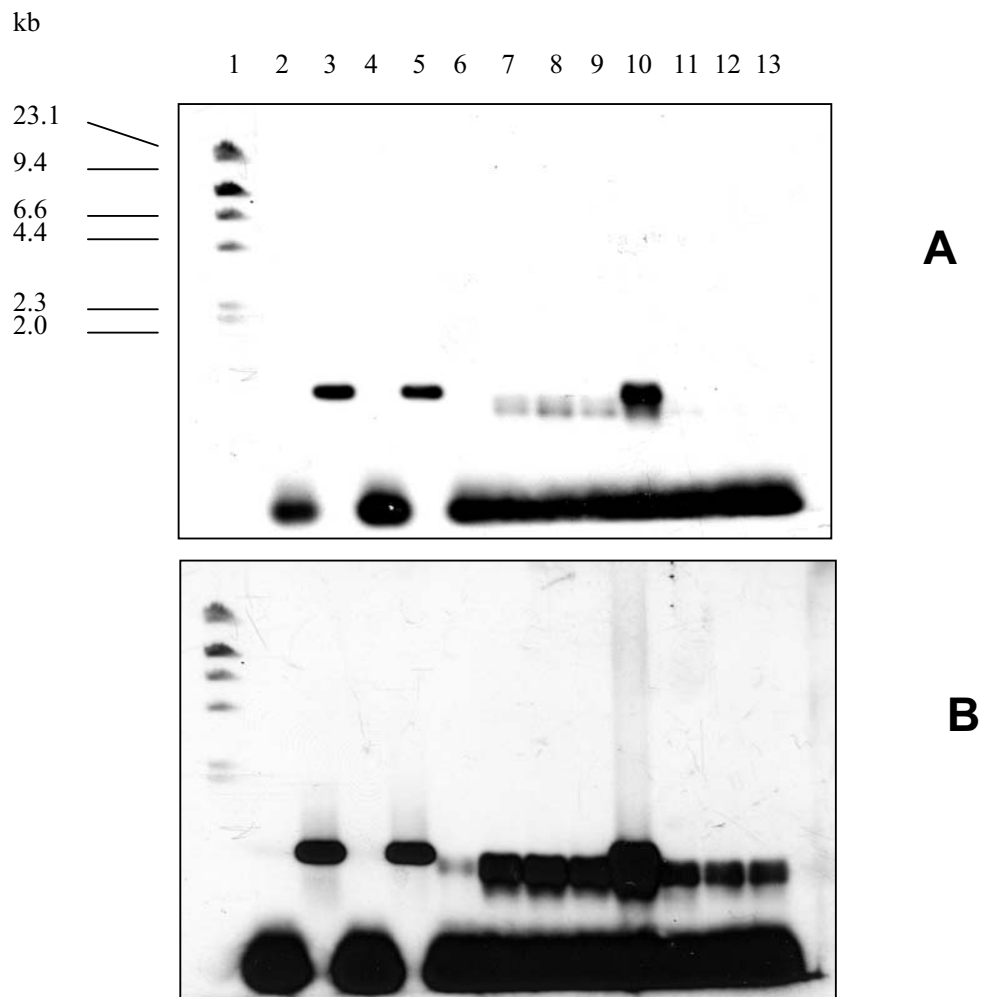
รูปที่ 2.20 แสดงผล RT-PCR amplification ของ RNA ที่สกัดจากใบมะละกอธรรมดา (N) และมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R3 โดยใช้ primers (5'PRV/3'PRV) แล้วนำ DNA ที่ได้ไป แยกขนาดโดย 0.8% agarose gel electrophoresis

- แถวที่ 1 Positive control (ใช้ DNA จากพลาสมิด pSA1006)
- แถวที่ 2 Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template)
- แถวที่ 3 Negative control (ใช้ DNA จากมะละกอที่ไม่ติดโรคเป็น template)
- แถวที่ 4 Negative control (ใช้ DNA จากมะละกอที่ไม่ติดโรคเป็น template)
- แถวที่ 5 RT-PCR amplification ของ RNA ที่สกัดจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G1 รุ่น R0
- แถวที่ 6-13 RT-PCR amplification ของ RNA ที่สกัดจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R3 No.D12, No.D58, No.E11, No.E14, E No.18, No.18-2, No.18-7, No.18-8
- แถวที่ 14 λ Bst EII ที่ใช้เป็น DNA marker



รูปที่ 2.21 การเตรียม DNA ที่ได้จาก RT-PCR amplification ของมะละกอธรรมดา และมะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยใช้ primers (5'PRV/3'PRV) เพื่อทำ Southern blot hybridization โดยใช้ Positive control (ใช้ DNA จากพลาสมิด pSA1006) ที่เจือจางลง 200 เท่า และใส่ DNA ที่ได้จาก RT-PCR amplification ของ DNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1 ที่เจือจางลง 100 เท่าของที่ใช้ใน 0.8% agarose gel electrophoresis รูปที่ 2.20

- | | |
|-------------|---|
| แถวที่ 1 | λ Hind III ที่ใช้เป็น DNA marker |
| แถวที่ 2 | Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template) |
| แถวที่ 3 | Positive control (ใช้ DNA จากพลาสมิด pSA1006) |
| แถวที่ 4 | Negative control (ใช้ DNA จากมะละกอที่ไม่ติดเชื้อเป็น template) |
| แถวที่ 5 | RT-PCR amplification ของ RNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G1 รุ่น R0 |
| แถวที่ 6-13 | RT-PCR amplification ของ RNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 ของต้น G2-1-4 No.D12, No.D58, No.E11, No.E14, No.E18, No.18-2, No.18-7, No.18-8 |



รูปที่ 2.22 แสดงผล Southern blot hybridization ของแผ่นเจลที่ใช้ตรวจ RT-PCR amplification ของ DNA จากใบของต้นมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ G2 รุ่น R3 โดยใช้ IF-3' amplified fragment ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส เป็น probe ภาพ A ใช้เวลาในการ exposed x-ray film นาน 4 วินาที ภาพ B ใช้เวลาในการ exposed x-ray film นาน 4 นาที

- แถวที่ 1 λ Hind III ที่ใช้เป็น DNA marker
- แถวที่ 2 Negative control (ไม่ได้ใส่ DNA เป็น template)
- แถวที่ 3 Positive control (ใช้ DNA จากพลาสมิด pSA1006)
- แถวที่ 4 Negative control (ใช้ DNA จากมะละกอที่ไม่ติดโรคเป็น template)
- แถวที่ 5 RT-PCR amplification ของ RNA จากใบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G1
- แถวที่ 6-13 RT-PCR amplification ของ RNA จากใบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม สายพันธุ์ G2 รุ่น R3 No.D12, No. D58, No.E11, No.E14, No.E18, No. 8-2, No.18-7, No.18-8

สรุปผลและวิจารณ์

การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการป้องกันมะละกอจากโรคใบด่างจุดวงแหวน โดยการตัดต่อยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสจากจีโนมของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนใส่เข้าไปในพลาสมิดพาหะ (vector) แล้วนำพลาสมิดที่มียีนของไวรัสใส่เข้าไปในมะละกอ ทำให้ได้มะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่สามารถต้านทานไวรัสใบด่างจุดวงแหวนได้ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก มะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ได้จากเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมนี้สามารถต้านทานไวรัสและถ่ายทอดความต้านทานไวรัสไปยังมะละกอรุ่นลูกและหลานได้ อย่างไรก็ตามความต้านทานไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมนี้มีความจำเพาะสูงกับสายพันธุ์ของไวรัส กล่าวคือ มะละกอที่ได้สามารถต้านทานเฉพาะกับไวรัสชนิดที่ใช้นามาสกัดยีนใส่เข้าไปในมะละกอเท่านั้น ไม่สามารถต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่พบระบาดในที่อื่นๆได้ จากการทดลองในโครงการวิจัยนี้พบว่าแม้ว่าไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่พบระบาดในแหล่งปลูกภาคต่างๆ ในประเทศไทยจะมียีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่มีความคล้ายคลึงของลำดับเบสสูงถึง 95-97% แต่มะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนสายพันธุ์ราชบุรี สามารถต้านทานต่อไวรัสที่ระบาดที่จังหวัดราชบุรีและที่บางจังหวัดได้ แต่ไม่สามารถต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่พบระบาดในประเทศไทยทุกจังหวัด เนื่องจากไวรัสที่ระบาดในแต่ละแห่งมีสารพันธุกรรมที่คล้ายคลึงและแตกต่างกัน มะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนสามารถต้านทานต่อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสใกล้เคียงกันมากเท่านั้น

ที่ผ่านมา มีรายงานการวิจัยพบว่า การใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมศาสตร์ตัดต่อยีนของไวรัสนำใส่เข้าไปในพืช ทำให้สามารถสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรม (transgenic plant) ที่ต้านทานไวรัสได้ ยีนของไวรัสที่ใช้ตัดต่อใส่เข้าไปในพืชนั้นมีหลายยีน เช่น ยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (coat protein : CP), ยีนสร้าง cytoplasmic inclusion protein (CI) และยีนถ่ายแบบ (replicase gene) เทคนิคในการตัดต่อยีนไวรัสใส่เข้าไปในพืชเพื่อสร้างพืชต้านทานไวรัสนี้ เรียกว่า pathogen derived resistance (PDR) กลไกในการต้านทานไวรัสโดยวิธีนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในระดับของการสร้างโปรตีน (protein mediated) และในระดับของการสร้างอาร์เอ็นเอ (RNA mediated or gene silencing) โดยในระดับของการสร้างโปรตีนจะมีการสร้างโปรตีนจากยีนไวรัสที่ใส่เข้าไปในเซลล์ซึ่งโปรตีนนี้จะ รบกวนขบวนการแบ่งตัวของไวรัสเมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์ ทำให้ไวรัสไม่สามารถแบ่งตัวแล้วทำให้เกิดโรค การสร้างความต้านทานไวรัสในระดับของการสร้างอาร์เอ็นเอเกิดขึ้นจากการสร้างอาร์เอ็นเอจากยีน ของไวรัสที่ใส่เข้าไปในเซลล์พืช อาร์เอ็นเอ

ที่สร้างขึ้นจะมาจับกับยีนของไวรัสที่เข้าสู่เซลล์แล้ว เกิดการเหนี่ยวนำให้มีการทำลายยีนที่จับกับอาร์เอ็นเอดังกล่าว กลไกการต้านทานโดยวิธี RNA mediated นี้จะมีความจำเพาะสูงกับลำดับเบสของไวรัส (for reviews see Balcombe, 1996, Beachy, 1997)

การศึกษากลไกการต้านทานไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส โดยการตรวจสอบยีนเปลือกไวรัสในจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR), Southern Blot analysis, การตรวจสอบการแสดงออกของยีนเปลือกไวรัส ในระดับของการสร้างอาร์เอ็นเอ (transcription) โดยวิธี northern blot hybridization, RT-PCR และการตรวจสอบการสร้างโปรตีนเปลือกไวรัส (translation) โดยวิธี western blot analysis แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า กลไกการต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม เกิดจากกระบวนการหยุดยั้งการทำงานของยีน (gene silencing) โดยยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมมีหลายชุด (copies) และมีการเรียงตัวใหม่ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่ใส่เข้าไปในมะละกอ (rearrangement) ซึ่งเห็นได้ชัดในการศึกษายีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมโดยวิธี Southern Blot analysis นอกจากนั้นการแยกและศึกษาลำดับเบสของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสที่เหนี่ยวนำให้เกิดความต้านทานต่อไวรัสจากจีโนมของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม พบว่าเกิด DNA rearrangement ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรม โดยมีการเกิด rearrangement ของยีนสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสทางด้านปลาย 5' และเกิดการ deletion ที่ส่วนของ CaMV35S promoter และมีชิ้นส่วนของ vector backbone และ genomic DNA sequences ของพืชสอดแทรกเข้ามา ซึ่งการเกิด rearrangement ของยีนดังกล่าวน่าจะทำให้เกิดการสร้าง aberrant RNA ขึ้นในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมเช่นเดียวกับที่มีรายงานพบในพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดอื่น (for review ;Lecellier and Vionnet, 2004) ซึ่งทำให้เกิดการสร้าง small interference RNAs (siRNAs) ที่มีขนาดเล็ก ประมาณ 21-25 เบส ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิด RNA-induced silencing complex (RISC) เกิดการทำลาย RNA ที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับ siRNAs ดังกล่าว ซึ่งจากการวิจัยในโครงการนี้พบว่ามีการสร้าง siRNAs ขนาดประมาณ 21-25 เบส และพบว่ามีการทำลาย RNA ที่สร้างขึ้น เนื่องจากการตรวจหา RNA ด้วยวิธี RT-PCR และ northern blot hybridization ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานไวรัส พบ RNA ปริมาณน้อยมาก และไม่สามารถตรวจพบการสร้างโปรตีนเปลือกไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานไวรัส โดยวิธี western blot analysis ในขณะที่มะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่ต้านทานไวรัส สายพันธุ์ G1 และ T2 มีการสร้างโปรตีนดังกล่าว

กลไกการต้านทานต่อไวรัสที่เกิดจากกระบวนการหยุดยั้งการทำงานของยีนดังกล่าว ทำให้มะละกอดัดแปรพันธุกรรมต้านทานไวรัสมีข้อจำกัด เนื่องจากไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกามีความแตกต่างของสารพันธุกรรม นอกจากนั้นไวรัสชนิดนี้มีสารพันธุกรรมเป็น RNA เส้นเดี่ยว ซึ่งสามารถปรับเปลี่ยนลำดับเบสได้เร็วกว่าสารพันธุกรรมชนิด DNA ดังนั้นการนำมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานไวรัสไปใช้ในแปลงปลูกธรรมชาติจึงสามารถเกิดการเอาชนะความต้านทานได้ โดยไวรัสที่มีสารพันธุกรรมแตกต่างออกไป กระบวนการหนึ่งที่สามารถเอาชนะกลไกการหยุดยั้งการทำงานของยีนได้ คือ กระบวนการที่เกิดจากยีนสร้างโปรตีน Helper component (Hc-Pro) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบยีนสร้างโปรตีน Helper component (*Hc-Pro*) ของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนที่ระบาดในแหล่งปลูกมะละกอบางแห่ง พบว่ายีนดังกล่าวมีความคล้ายคลึงของลำดับเบสในระดับ 93-95% อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบจากลำดับเบสไม่สามารถบ่งได้ถึงลำดับเบสที่อาจเกี่ยวข้องกับการเอาชนะความต้านทานต่อไวรัสในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานต่อไวรัส

ดังนั้นการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการป้องกันไวรัสใบด่างจุดวงแหวนจึงนับว่าเป็นวิธีที่ได้ผลแต่ยังมีข้อจำกัด ซึ่งการศึกษาในระดับลึกของสารพันธุกรรมไวรัสกับการสร้างความต้านทานในพืชดัดแปรพันธุกรรมจะเป็นหนทางที่จะใช้ในการปรับปรุงการกระตุ้นให้เกิดการหยุดยั้งการทำงานของยีนในพืชให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นกว่าวิธีการที่ใช้ในปัจจุบัน นอกจากนั้นยังอาจเป็นแนวทางในการนำไวรัสมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการต้านทานไวรัสในพืช ที่เรียกว่า virus inducing gene silencing (VIGS) ซึ่งจะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีการสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรมที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

วิชัย โฉมรัตน์ (2541) เอกสารประกอบการบรรยายการประชุม เรื่อง "เทคโนโลยีเพื่อผลิตมะละกอในประเทศไทย" ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 19 ตุลาคม 2541 อาคารมหานครยิบซ์ ม ถนนศรีอยุธยา กรุงเทพฯ

Balcombe, D. C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8, 1833-1844 Balcombe, (1996).

Bateson, M. and J. Dale. The nucleotide sequence of the coat protein and 3' untranslated region of papaya ringspot virus type W (Aust). *Arch Virol* 123:101-109 (1992).

Beachy, R. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 215-220 (1997).

Fitch, M.M., Mansardt, R.M., Gonsalves, D., Slightom, J.L. and Sanford, J.C. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Tech*. 10: 1466-1472 (1992).

Fitch, M.M., Manshardt, R., Gonsalves, D. and Slightom, J.L. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Reports* 12:245-249 (1993).

Hamilton, A. and Baucombe, D.C. A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science*, 286: 950-952 (1999)

Kertbundit, S., Attasart, P., Panyim, S. and Juricek, M. Sequence comparison of coat protein and 3' non-translated region of papaya ringspot virus isolates from Thailand. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 6(2): 191-197 (1998).

Kositratana, W., N. Thaveechai, S. Attathom, R. Hongprayoon and Chatchawankanphanich. Control of papaya ringspot disease by cross protection, Kasetsart J. (Natural Science) 25: 33-39 (1991).

Nelson, R., Powell, A.P. and Beachy, R.N. Lesions and virus accumulation in incubated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus. Virology 158: 126-132 (1987).

Lecellier, C. H. and Vionnet, O. RNA silencing ; n mercy for viruses? Immunol. Rev. 198: 285-303 (2004)

Nelson, R.S., McCormick, S.M., Dellanay, X., Dube, P., Layton, J., Anderson, E.J., Kaniewska, M., Proksch, R.K., Horsch, R.B., Rogers, S.G., Fraley, R.T. and Beachy, R.N. Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. Bio/Technology 6:403-409 (1988).

Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, B., Hoffman, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T. and Beachy, R.N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232:738-743 (1986).

Purcifull, D.C., J. Edwardson, E. Hiebert and D. Gonsalves. Papaya ringspot virus (revised) No. 292 in : Mycol. Inst/Assoc. Appl. Biol., Kew, Surry, England (1984).

Roger SO and Bendick AJ. Extraction of total cellular DNA from plant, algae and fungi. In: Gelvin SB and Schilperoot RA, editors. Plant molecular biology manual. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; D1: 1-8 1 (1994)

Wang H. L. and Yeh, S.D. Nucleotides sequence comparison of the 3'-terminal regions of severe, mild, and non-papaya infecting strains of papaya ringspot virus. Arch Virol 127: 345-354 (1992).

Wang H. L., Yeh, S.D., Chiu, R.J. and Gonsalves, D. Effectiveness of cross-protection by wild mutants of papaya ringspot virus for control of ringspot disease of papaya in Taiwan. *Plant Dis* 71: 491-497 (1987).

Wu, F.S. and Wang, M.-Y. Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues. *Anal Biochem* 1984; 139: 100-103 (1984)

Yeh, S.D., Jan, F.J., Chiang, C.H., Doong, T.J., Chen, M.C., Chung, P.H. and Bau, H.J. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. *J. Gen. Virol.* 73: 2531–2541 (1992).

Yeh, S.D. and Gonsalves, D. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross-protection. *Phytopathology* 74: 1086-1091 (1984a).

Yeh, S.D. and Gonsalves, D. Purification and immunological analyses of cylindrical inclusion protein induced by papaya ringspot virus and watermelon mosaic virus 1. *Phytopathology* 74: 1273-1278 (1984b).