

การแสดงออกของทรานส์ยีนในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทาน ไวรัสใบด่างจุดวงแหวน

Expression of Transgenes in Genetically Engineered – PRSV Resistant Papaya

คำนำ

มะละกอ (papaya) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่ใช้บริโภคภายในประเทศและส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ เนื่องจากมะละกอเป็นไม้ผลที่โตเร็ว และให้ผลตลอดปี ผลสามารถบริโภคได้ทั้งผลสุกและผลดิบ น้ำยางจากผลดิบสามารถผลิตเอนไซม์ปาเปนเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ปัจจุบันแหล่งปลูกมะละกอที่สำคัญอยู่ในภาคกลางและภาคตะวันออก โดยมีพื้นที่ปลูกประมาณ 200,000 ไร่ แต่การผลิตมะละกอในทางการค้าและอุตสาหกรรมกำลังประสบกับปัญหาที่สำคัญคือ โรคใบด่างจุดวงแหวนซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) เชื้อนี้จะเข้าทำลายได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต โดยมีระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน ต้นที่ได้รับเชื้อจะมีการเจริญเติบโตผิดปกติ แคระแกร็น ให้ผลผลิตน้อยและมีคุณภาพต่ำหรืออาจไม่ให้ผลผลิตเลย ส่งผลให้มูลค่าการส่งออกของมะละกอจาก 80 กว่าล้านบาทในปี 2526 ลดลงจนเหลือ 1 ล้านบาทบาทในปี 2540 (วิชัย, 2545)

PRSV สามารถถ่ายทอดโรคโดยมีเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะในลักษณะ non- persistent ซึ่งใช้ระยะเวลาสั้น ๆ เพียง 10-30 วินาที ในการถ่ายทอดโรค จึงทำให้การใช้สารเคมีกำจัดแมลงพาหะไม่ได้ผลในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค ส่วนวิธีการสร้างภูมิคุ้มกัน (cross protection) โรคใบด่างจุดวงแหวนให้กับมะละกอเป็นเพียงการชะลอการเกิดโรค หรือลดความเสียหาย ไม่ได้ทำให้มะละกอเกิดความต้านทานโรคอย่างถาวร (วิชัย, 2545)

ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น แนวทางหนึ่งที่มีความสนใจอย่างมาก คือ การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของไวรัสด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โดยการตัดต่อยีนของไวรัสเข้าไปในพืชเพื่อให้พืชมีความต้านทานต่อไวรัสชนิดนั้น ๆ หรือไวรัสสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ เรียกความต้านทานลักษณะนี้ว่า pathogen-derived resistance หากมีการใช้ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (CP) จะเรียกความต้านทานที่เกิดขึ้นว่า coat protein-mediated resistance (CP-MR) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการชะลอหรือยับยั้งการพัฒนาของโรคได้ (Beachy, 1993) สมมติฐานกลไกความต้านทานที่เกิดจากการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ coat protein-mediated resistance

และ RNA-mediated resistance ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกลไกของการเกิด gene silencing ในระดับอาร์เอ็นเอ ปัจจุบันความรู้ที่เกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานที่เกิดขึ้นในมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ความรู้เกี่ยวกับกลไกความต้านทานนี้มีความสำคัญมากในการนำไปพัฒนาวิธีการป้องกันโรคไวรัสของมะละกอและพืชอื่นๆ ให้มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้นในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. ตรวจสอบวิเคราะห์การแสดงออกของ transgenes ระดับอาร์เอ็นเอ ในมะละกอแขกนวลตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 ซึ่งต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนแตกต่างกัน
2. ตรวจสอบผลผลิตของ transgenes ระดับโปรตีน ในมะละกอแขกนวลตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3
3. เปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนอื่นๆ ระหว่างมะละกอแขกนวลตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3

การตรวจเอกสาร

มะละกอ

มะละกอ (*Carica papaya* Linn.) อยู่ในวงศ์ Caricaceae เป็นไม้ผลเขตร้อนและกึ่งร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบทวีปอเมริกากลาง บริเวณประเทศเม็กซิโกตอนใต้ และคอ스타ริกา มะละกอเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ประเภทไม้เนื้ออ่อนลำต้นเดี่ยว มีพุ่มรอบต้น และมีใบขนาดใหญ่ลักษณะเป็นแบบ palmately lobe เจริญเติบโตได้เร็วในเขตร้อน ให้ผลผลิตประมาณ 4-8 เดือนหลังปลูก มะละกอจะให้ผลผลิตสูงในปีแรกๆ และเมื่อต้นมีอายุมากขึ้นผลผลิตจะลดลง (วัฒนา, 2531) มะละกอสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งผลสุกและผลดิบ น้ำยางจากผลดิบมีเอนไซม์ปาเปน (papain) เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ ซึ่งเอนไซม์นี้ใช้มากในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การฟอกหนัง เครื่องสำอาง ยารักษาโรค อาหารกระป๋อง การทำเบียร์ เป็นต้น จากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของมะละกอสุก พบว่า ประกอบด้วยน้ำ 88 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาล 10-13 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.1 เปอร์เซ็นต์ และมะละกอสุกยังอุดมไปด้วยวิตามินเอ บี1 บี2 ซี และ เบต้าแคโรทีน (ประพันธ์, 2525) สำหรับประเทศไทยสามารถปลูกมะละกอได้ดีทั่วทุกภาค แหล่งปลูกมะละกอที่สำคัญคือจังหวัดราชบุรี นครปฐม ชุมพร นครราชสีมา และสระบุรี

ดอกและผลมะละกอ

มะละกอเป็นพืชที่มีดอก 3 ชนิดอยู่คนละต้น คือ

ต้นตัวผู้ จะมีเฉพาะดอกตัวผู้เป็นจำนวนมากอยู่บนก้านช่อยาวที่แตกแขนง ต้นตัวผู้จะไม่มีผล หรือให้ผลที่ไม่มีคุณภาพ

ต้นตัวเมีย จะมีแต่ดอกเพศเมียเท่านั้น ดอกจะเจริญจากส่วนก้านใบติดลำต้นเป็นดอกเดี่ยวหรือดอกช่อ รังไข่มีรูปร่างป้อมให้ผลค่อนข้างกลม ช่องว่างในผลมีมากจึงไม่ค่อยนิยมเช่นกัน

ต้นสมบูรณ์เพศ จะมีช่อดอกติดกันเป็นกลุ่ม ต้นสมบูรณ์เพศจะมีดอกสมบูรณ์เพศและดอกตัวผู้อยู่ในช่อเดียวกัน ดอกสมบูรณ์เพศจะมี 3 ชนิดตามตำแหน่งของเกสรตัวผู้ ดอกสมบูรณ์เพศชนิดธรรมดา (Elongata) ให้ผลมีรูปร่างทรงกระบอก เป็นที่นิยมของตลาดมากกว่าผลที่เกิดจากดอกสมบูรณ์เพศที่ดอกตัวผู้อยู่กับรังไข่ (Intermediate) ซึ่งทำให้ผลบิดเบี้ยวและดอกสมบูรณ์เพศที่ทำให้ผลเป็นพลู๊ก (Pentandria) ผลจากดอกสมบูรณ์เพศสองชนิดหลังนี้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด

พันธุ์มะละกอที่ปลูกเป็นการค้า

การปลูกมะละกอในท้องถิ่นใด ควรเลือกใช้พันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกแล้วว่าเหมาะสมกับท้องถิ่นนั้น เนื่องจากมะละกอเป็นพืชที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมมาก สำหรับประเทศไทยมีพันธุ์มะละกอพื้นเมืองและพันธุ์การค้าอยู่หลายพันธุ์ แต่พันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้ายังไม่ได้มาตรฐานที่ดีพอ เพราะพบว่ายังมีความผันแปรทางด้านขนาดของผลและรูปร่างลักษณะทั้งภายนอกและภายในอยู่เสมอ สำหรับพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าหรือพันธุ์ที่เป็นที่นิยมของตลาดในปัจจุบัน ได้แก่

มะละกอพันธุ์แขกดำ

เป็นพันธุ์ที่ได้รับความนิยมปลูกกันมากและเป็นที่ต้องการของตลาด ลักษณะเป็นมะละกอดำ เตี้ย ก้านใบสีเขียว สั้น ใบหนากว่ามะละกอพันธุ์อื่น ๆ ขนาดผลมีส่วนหัวและท้ายของผลเกือบเท่ากัน เปลือกหนา สีเขียวเข้ม ผิวขรุขระเล็กน้อย ผลสุกมีรสหวาน เมล็ดน้อย ช่องว่างภายในผลแคบ เนื้อแข็งสีแดง

มะละกอพันธุ์โกโก้

เป็นมะละกอพันธุ์ที่นำมาปลูกนานแล้ว ก้านใบเป็นสีม่วง ส่วนปลายผลเล็กเรียว ส่วนท้ายผลซึ่งใกล้หัวมีลักษณะเป็นทรงกระบอกใหญ่ ผิวผลสีเขียวค่อนข้างเรียบ ช่องว่างระหว่างผลกว้าง และเป็นเหลี่ยมชัดเจน สุกแล้วเนื้อสีแดง หรือส้ม เหมาะสำหรับบริโภคสุก

มะละกอพันธุ์สายน้ำผึ้ง

ลักษณะประจำพันธุ์เป็นมะละกอดำ เตี้ย ก้านใบสีเขียวอ่อนหรือเขียวปนขาว ก้านใบกว้างและยาวกว่าแขกดำแต่ใบบางกว่า จำนวนแฉกของใบมีน้อยกว่าแขกดำและโกโก้ ผลค่อนข้างโต ผลด้านหัวจะเล็กแล้วขยายโตขึ้นบริเวณใกล้ปลายผล มีร่องระหว่างพูเห็นเป็นเหลี่ยมชัดเจน เนื้อเมื่อสุกมีสีส้มปนเหลือง หรือสีส้ม เนื้อไม่แข็ง รสหวานจัด

มะละกอปากช่อง 1

เป็นพันธุ์ที่สถานีวิจัยปากช่อง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ได้ผสมพันธุ์ขึ้นมาจากการนำเอามะละกอสายพันธุ์ซันไรส์ โซโล จากประเทศไต้หวันมาทำการปลูกและผสมพันธุ์ตัวเอง 5ชั่วอายุ มีลักษณะเด่น คือ เป็นมะละกอที่ต้นค่อนข้างเตี้ยมาก ติดผลดก คือ ให้ผลผลิตประมาณ

30-40 กิโลกรัมต่อต้นต่อปี ผลลักษณะกลมขนาดเล็กมีน้ำหนักประมาณ 350 กรัมต่อผล ซึ่งเป็นการต้องการของตลาดต่างประเทศ เนื้อแข็งกรอบ สีส้ม มีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูง

มะละกอพันธุ์แขกดำท่าพระ

เป็นพันธุ์ที่หน่วยวิจัยและพัฒนาพืชสวนขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร ได้พัฒนาพันธุ์ขึ้น โดยนำมะละกอพันธุ์ Florida Tolerant มาผสมข้ามกับมะละกอพันธุ์แขกดำ และคัดเลือกทดสอบจำนวน 5 ชั่วอายุ มีลักษณะดี คือ มีความต้านทานโรคใบด่างจุดวงแหวน มะละกอ ดีกว่าพันธุ์แขกดำ 79 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลเร็ว ต้นเตี้ย เนื้อหนา ผลดิบกรอบ ผลสุกมีสีเหลืองอมส้ม (วิชัย และคณะ, 2545)

มะละกอพันธุ์แขกนวล

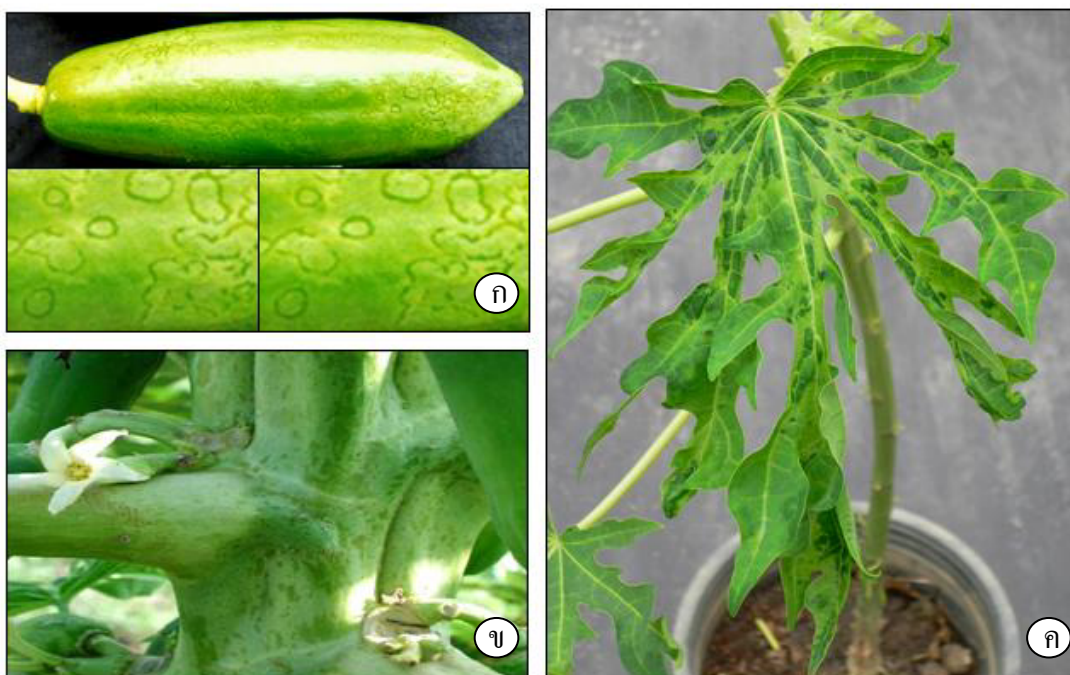
เป็นพันธุ์มะละกอที่เกิดการกลายพันธุ์มาจากพันธุ์แขกดำ และนิยมปลูกกันมากในแถบอำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี นิยมปลูกเพื่อส่งโรงงานแปรรูป ลักษณะต้นเตี้ย ใบมีสีเขียวเข้ม ผลมีขนาดปานกลางเช่นเดียวกับพันธุ์แขกดำ แต่สีเปลือกผลจะมีสีอ่อนกว่าพันธุ์แขกดำและสีของผลเห็นเป็นสีนวลอย่างชัดเจน ผลมีลักษณะกลมยาว น้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัมต่อผล เมื่อผลสุกเนื้อจะมีสีแดงส้มหรือสีเหลืองเข้ม รสหวาน เปอร์เซ็นต์น้ำตาลประมาณ 13.44 องศาบริกซ์ เมล็ดมีขนาดใหญ่สีดำ เหมาะสำหรับรับประทานผลสุก (สุวรรณา, 2539)

มะละกอพันธุ์ปลักไม้ลาย

เป็นมะละกอสายพันธุ์ใหม่ เริ่มปลูกครั้งแรกในปี พ.ศ. 2543 ที่หมู่บ้านปลักไม้ลาย ตำบลทุ่งขวาง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม มีลักษณะเด่น คือ ฐานลำต้นใหญ่คล้ายทรงเจดีย์ ใบสีเขียวเข้ม กลางใบมีใบขนาดเล็ก (กระโดงใบ) 1 ใบ ก้านใบสีเขียวอ่อน ตั้งชูไม่โน้มลงด้านล่าง ผลมีลักษณะทรงกระบอก เนื้อหนา 2.5-3.0 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 0.8-2.0 กิโลกรัม เมื่อผลสุกเนื้อจะมีสีแดงอมส้ม รสหวาน มีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลประมาณ 11-13 องศาบริกซ์ เป็นที่นิยมทั้งตลาดในประเทศและต่างประเทศ (กลุ่มเกษตรกร, 2547)

โรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

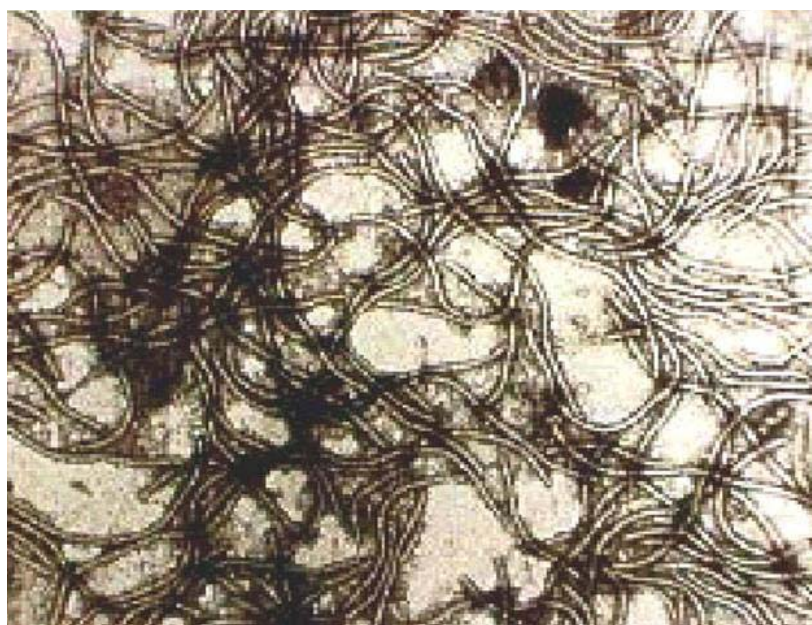
โรคที่พบระบาดในแปลงปลูกมะละกอที่สำคัญ คือ โรคใบด่างจุดวงแหวน ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) ที่สามารถเข้าทำลายมะละกอได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต ทำให้ผลผลิตลดลงเป็นจำนวนมาก โรคนี้มีรายงานครั้งแรกที่ จังหวัดขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2518 (ถวิล, 2518) ต่อมาระบาดมากขึ้นใน 10 จังหวัด ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือใน พ.ศ. 2525 โดยบางท้องถิ่นเสียหายถึงร้อยละ 100 (วิไล และคณะ, 2525) และมีการระบาดทั่วไปในเขตการปลูกมะละกอเพื่อเป็นการค้าในภาคกลาง เช่น จังหวัดราชบุรี ซึ่งมีรายงานว่าเกิดการระบาดอย่างรุนแรงและกว้างขวาง (สันทนา, 2531) อาการของโรคจะขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของพืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย ความแข็งแรงสมบูรณ์ของต้นพืช อุณหภูมิ สภาพแวดล้อม ตลอดจนสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส อาการพบได้ทั้งบนใบ ลำต้น ก้านใบ และผล อาการโดยทั่วไปคือใบด่างสีเขียวแก่สลับสีเหลือง เนื้อใบไม่เรียบเป็นคลื่น (puckering) หรือบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง (distortion) ในสภาพอากาศเย็นอาการของโรคจะรุนแรงขึ้น ใบด่างชัดเจน (mosaic) ถ้าได้รับเชื้อตั้งแต่ระยะต้นกล้า อาการของเนื้อใบจะใส (clearing) ใบอ่อนม้วนงอ มะละกอจะแสดงอาการของโรคหลังจากได้รับเชื้อ 1-2 สัปดาห์ โดยเริ่มจากอาการต่างชัดเจน ใบเล็กจนถึงบิดเบี้ยวเหลือแค่เส้นกลางใบ (filiform) บนผลมีอาการคล้ายกับบนต้นและก้านใบ คือ เป็นจุดสีเขียวเข้มและอาการจุดวงแหวน (ringspot) ถ้าเป็นรุนแรงผลจะมีลักษณะคล้ายสะเก็ด หรือหูดนูนขึ้นมา ผิวอาจขรุขระ เนื้อบริเวณที่เป็นจุดวงแหวนมักจะเป็นไตแข็ง และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อผลสุก มีรสขม ปริมาณน้ำตาลในผลลดลง ต้นที่เป็นโรคจะมีปล้องสั้นลง แคระแกรน และโดยทั่วไปแล้วจะไม่ให้ผลในดอกชุดต่อไป (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 อาการโรคใบด่างจุดวงแหวนที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) โดยแสดงลักษณะจุดวงแหวนสีเขียวน้ำนํ้าบนผล (ก) ลำต้น (ข) และอาการใบด่างสีเขียวก้ำสลับสีเหลืองเนื้อใบไม่เรียบเป็นคลื่น (puckering) บิดเบี้ยวผิดรูปร่าง (distortion) (ค)

เชื้อสาเหตุโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

เชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกามีชื่อเรียกว่า *Papaya ringspot virus* (PRSV) จัดอยู่ในกลุ่มโพทิวรัส (Potyvirus) มีอนุภาคเป็นแบบท่อนคดยาว ความยาวของอนุภาคอยู่ในช่วง 760–800 นาโนเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลางอนุภาคประมาณ 12 นาโนเมตร (ภาพที่ 2) สามารถตรวจพบอนุภาคไวรัสได้เป็นจำนวนมากในน้ำคั้นของพืชที่เป็นโรค มีการจำแนกเชื้อ PRSV ออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิด P (PRSV-P) เป็นเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายได้ทั้งมะละกอและพืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae) และชนิด W (PRSV-W) เป็นเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายได้เฉพาะพืชตระกูลแตงเท่านั้น (Purcifull *et al.*, 1984; Yeh *et al.*, 1992)



ภาพที่ 2 อนุภาคเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มโพทิวรัส (Potyvirus) (นุชนาถ และคณะ, 2546)

สมบัติทางกายภาพ

ในสภาพน้ำคั้น เชื้อ PRSV ไม่สามารถทำให้เกิดโรคแก่พืชทดสอบเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 ชั่วโมง หรือจุ่มน้ำคั้นลงในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 54-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที และเมื่อเจือจางน้ำคั้น 1:1,000 (Purcifull *et al.*, 1984)

องค์ประกอบทางเคมี

อนุภาคเชื้อ PRSV ประกอบด้วยเส้นกรดนิวคลีอิกชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) 5.5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอนุภาค และเป็นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค 94.5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักอนุภาค น้ำหนักโมเลกุลของกรดนิวคลีอิกเท่ากับ 3.5×10^6 ดาลตัน บริเวณปลายด้าน 5' ของสายอาร์เอ็นเอมีโปรตีน viral genome-linked protein (VPg) จับอยู่ด้วยพันธะโควาเลนต์ ส่วนปลายด้าน 3' จะเป็น poly(A) โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 1 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล 32×10^3 ดาลตัน จากการศึกษาโครงสร้างทางจุลภาคของเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค ตรวจพบโปรตีนอีก 2 ชนิด ที่ไม่ใช่ส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค คือ cylindrical (pinwheel) inclusion bodies (CI) และ amorphous inclusion bodies (AI) น้ำหนักโมเลกุล 69×10^3 - 70×10^3 และ 51×10^3 ดาลตัน ตามลำดับ นอกจากนี้ส่วนของ AI ยังสามารถแบ่งย่อยได้อีก 2 ชนิดคือ nuclear inclusion body a (NIA) และ nuclear inclusion body b (NIB) เชื้อไวรัสสามารถทวีจำนวนได้ภายในพืชโดยไม่ต้องอาศัยไวรัสชนิดอื่นๆ และตรวจพบอนุภาคไวรัสได้ทั้งในส่วนไซโตพลาสซึมและแวคิวโอลของเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อส่วนที่แสดงอาการ (Purcifull *et al.*, 1984)

การถ่ายทอดโรค

เชื้อ PRSV ในธรรมชาติจะถ่ายทอดโรคโดยอาศัยแมลงในวงศ์ Aphideae ได้แก่ เพลี้ยอ่อนชนิดต่างๆ เช่น เพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*) เพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Myzus persicae*) เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis cracivora*) ในลักษณะ non-persistent คือ ใช้เวลาในการดูดกินอาหารจากต้นที่เป็นโรคเพียง 10-30 วินาทีเท่านั้น ก็สามารถถ่ายทอดโรคได้ (Riechmann *et al.*, 1989) ขบวนการถ่ายทอดโรคโดยแมลงพาหะต้องการ helper component (HC-Pro) คือ โปรตีนจากยีน HC-Pro ซึ่งสร้างขึ้นในเซลล์พืชโดยอาศัยรหัสจากสายอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส เชื้อนี้สามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกล (mechanical transmission) และมีรายงานการถ่ายทอดโรคทางรากได้ 3-4 เปอร์เซ็นต์ (วิไล และคณะ, 2525)

พืชอาศัย

เชื้อ PRSV มีพืชอาศัยในวงศ์ Caricaceae และวงศ์ Cucurbitaceae ซึ่งประกอบด้วยแตงหลายชนิด รวมทั้งตำลึงซึ่งเป็นพืชที่พบได้ทั่วไป และเป็นแหล่งแพร่ขยายพันธุ์ที่ดีของเพลี้ยอ่อน (วิชัย และคณะ, 2533)

โครงสร้างยีนของไวรัสใบด่างจุดวงแหวน

เชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอจัดอยู่ในกลุ่มโพทิวไรรัส มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบเส้นบวก (single-stranded, positive sense RNA) มีความยาวประมาณ 10,326 นิวคลีโอไทด์ มี open reading frame (ORF) ขนาดยาว 1 ชุด ซึ่งมีลักษณะเป็น polycistronic คือ หลังจากแปลรหัส (translate) เป็นโปรตีนแล้วจะได้โพลีโปรตีน (polyprotein) ขนาดใหญ่หนึ่งสาย ซึ่งเมื่อผ่านขบวนการย่อย (polyprotein processing) โดยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) จะได้โปรตีนขนาดเล็กหลายชนิดเรียงลำดับจาก N-terminal (amino-terminal) ถึง C-terminal (carboxy-terminal) ของโปรตีน (หรือจากปลาย 5' ถึง 3' ของจีโนม) ได้แก่ viral genome-linked protein (VPg), first protein (P1), helper component protein (HC-Pro), third protein (P3), cylindrical inclusion protein (CI), small nuclear inclusion protein (NIa), large nuclear inclusion protein (NIb), และ coat protein (CP) (Riechmann *et al.*, 1992) (ภาพที่ 3) VPg และ CP เป็นโปรตีนที่ตรวจพบได้จากอนุภาคไวรัส โปรตีนชนิดอื่นคือ HC-Pro, CI, NIa และ NIb เป็นโปรตีนที่แยกได้จากพืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย ส่วน P1 และ P3 เป็นโปรตีนที่ยังไม่มีรายงานว่าพบในพืชที่เป็นโรค (Dougherty and Carrington, 1988) โพทิวไรรัสเริ่มแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 86-88 (AUG) และสิ้นสุดการแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 10,118-10,120 (UAG, UGA, UAA) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 3,344 ตัว (Yeh *et al.*, 1992)

P1 protein

เป็นโปรตีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงระหว่างไวรัสกับพืชอาศัย โพทิวไรรัสต่างชนิดกันจะมีน้ำหนักโมเลกุลและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันมาก และทางด้าน 3' ของ P1 protein เป็นส่วนอนุรักษ์ (His456, Asp465, Gly-Ser-Ser499-Gly, Phe519-Val-Val-Arg-Gly523) (Verchot *et al.*, 1992) ซึ่งพบได้ในโพทิวไรรัสทุกชนิด และยังทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ proteinase เนื่องจากพบว่าทางด้านปลาย 3' มีคุณสมบัติเป็น trypsin-like serine proteinase ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน P1 และ helper component (HC-Pro) (Verchot *et al.*,

1991) นอกจากนี้ยังอาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของไวรัสพืชในเซลล์พืชจากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่ง (cell-to-cell movement protein) และการแสดงอาการของโรค (symptoms expression)

Helper component protein (HC-Pro)

เป็นโปรตีนที่โพลีไวรัสสร้างขึ้น โดย HC-Pro ของ PRSV มีลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HC-Pro ในโพลีไวรัสชนิดต่างๆ ประมาณ 45.1-51.8 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-60 KDa HC-Pro ทำหน้าที่ได้หลายอย่าง เช่น

1. ส่วนอนุรักษ PTK และ FRNK ที่อยู่บริเวณส่วนกลางของโปรตีน HC-Pro และ KITC ที่อยู่บริเวณด้านปลาย N ของ HC-Pro ทำหน้าที่เกี่ยวกับการถ่ายทอดโรคไวรัสด้วยเพลี้ยอ่อน
2. บริเวณส่วนกลางของโปรตีน HC-Pro ใน *Tobacco etch potyvirus* (TEV) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอนุภาคไวรัสในพืชแบบ long-distance movement
3. ด้านปลาย C-terminus ของโปรตีน HC-Pro ใน *Bean common mosaic necrosis potyvirus* (BCMNV) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่แบบ cell-to-cell
4. ทำหน้าที่ เป็นเอนไซม์ proteinase สำหรับ autolytic cleavage ที่ตำแหน่ง HC-Pro กับ P3 เนื่องจากมีคุณสมบัติของ papain-like cystein proteinase (Carrington *et al.*, 1989)

P3 protein

เป็นโปรตีนที่อยู่ระหว่าง HC-Pro กับ 6K1 มีลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับโพลีไวรัสชนิดอื่น ๆ 25.7-33.0 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษพบว่า โปรตีน P3 มีความสัมพันธ์กับ cylindrical inclusion protein (CI) ในยาสูบที่ถูก *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) เข้าทำลาย โดยคาดว่าจะทำหน้าที่เป็น RNA helicases (Rodriguez-Cerezo and Shaw, 1991)

6 KDa protein (6K1)

เป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่อย่างแน่ชัด แต่จากการศึกษาพบว่าโปรตีนนี้อาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของเชื้อภายในเซลล์พืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย (Riechmann *et al.*, 1992)

Cylindrical inclusion protein (CI)

เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณของอาร์เอ็นเอ โดยโปรตีน CI มีกิจกรรมของ helicase ในการทำให้สายอาร์เอ็นเอเกิดการคลายเกลียว เพื่อให้เป็นสายต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอคู่สม โดยทั่วไปจะพบโปรตีน CI อยู่ทั่วไประหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ผนังเซลล์ (cell wall) และอยู่รอบ plasmodesmata นอกจากนี้ยังพบใน endoplasmic reticulum หรืออยู่เป็นเส้นสายเกาะกันอยู่ในไซโตพลาสซึมเรียกโครงสร้างลักษณะนี้ว่า pinwheel นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วโปรตีน CI ยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอนุภาคโพที่ไวรัสจากเซลล์หนึ่งไปยังเซลล์ข้างเคียง โดยผ่านทาง plasmodesmata (Shukla *et al.*, 1994)

6 KDa protein (6K2)

เป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่อย่างแน่ชัด แต่จากการศึกษาพบว่าโปรตีนชนิดนี้ อาจจะมีบทบาทเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณของไวรัส เนื่องจากพบโปรตีนชนิดนี้ใน RNA1 ของ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ซึ่งแปรหัดเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณ (Shukla *et al.*, 1994) และสันนิษฐานว่าโปรตีน 6K2 นี้จะมีบทบาทในการเคลื่อนย้าย NIa ภายในเซลล์ เนื่องจากพบว่า โปรตีนนี้ยับยั้งการเคลื่อนย้าย NIa ไปสู่นิวเคลียส (Restrepo-Hartwig and Carrington, 1992)

Small nuclear inclusion protein (NIa)

มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 49 KDa พบในเซลล์พืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย โปรตีน NIa ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ proteinase ในการตัดสายโพลีโปรตีน ทางด้านปลาย C-terminus เข้ามา 2 ใน 3 ส่วน (Dougherty and Carrington, 1988) NIa proteinase มีโครงสร้างที่สัมพันธ์กับ trypsin like serine proteinase (Bazan and Fletterick, 1988) จากการศึกษาทางอิมมูโน และการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ TVMV และ TEV ทำให้ทราบว่า ครึ่งหนึ่งทางด้านปลาย

N-terminus ของ NIa คือ ส่วนของ viral genome-linked protein (VPg) และทางด้านปลาย C-terminus จะเป็นส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ proteinase โดยส่วนของโปรตีน VPg จะทำหน้าที่เปรียบเสมือนเป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกสายใหม่ของไวรัส (Shahabuddin *et al.*, 1988)

Large nuclear inclusion protein (NIb)

มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 58 KDa โปรตีน NIb ของโพทิวไรรัสนี้ต่างชนิดกันจะมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกันมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนชนิดอื่นๆ ของโพทิวไรรัสนี้ โปรตีน NIb ของ *Potato virus Y* (PVY), *Plum pox virus* (PPV), TEV และ TYMV มีส่วนอนุรักษ์ที่เรียกว่า GDD (glycine-aspartic-aspartic) ซึ่งพบใน RNA-dependent RNA polymerase ของไวรัสในกลุ่ม comovirus และ picornavirus และพบในเอนไซม์เรพลิเคสของ *Cowpea mosaic virus* และ poliovirus โปรตีน NIb ของโพทิวไรรัสนี้คาดว่าจะเป็นเอนไซม์ RNA dependent RNA polymerase I หรือเรพลิเคส เนื่องจากมีการศึกษาลำดับกรดอะมิโนในส่วน of โปรตีน NIb ของเชื้อ PRSV สายพันธุ์ HA กับ HA 5-1 และ W พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับเบส 98.7-99.0 เปอร์เซ็นต์ และพบ conserved motif YCDAADGS, GNNSGQPSTVVDNT(S)LMV และ NGDDL-X34-K ซึ่งมีบทบาทใน RNA polymerase ของโพทิวไรรัสนี้ (Yeh *et al.*, 1992)

Coat protein (CP)

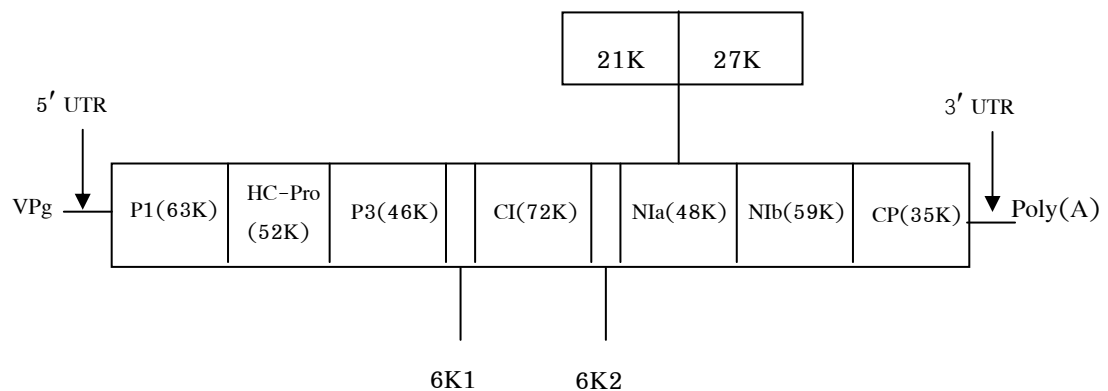
เป็นโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคไวรัสในกลุ่มโพทิวไรรัสนี้ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30-45 KDa (Dougherty and Carrington, 1988) ประกอบด้วยโปรตีนชนิดเดียว ซึ่งมีจำนวนประมาณ 2,000 หน่วยย่อย (subunit) ต่ออนุภาคไวรัส (Holling and Brunt, 1988) CP มีความสำคัญในการแยกชนิด และ strain ของไวรัสในกลุ่มนี้ จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PRSV มีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับโพทิวไรรัสนี้ชนิดอื่นๆ 53.2-56.6 เปอร์เซ็นต์ ทางด้านปลาย N-terminus มีส่วนอนุรักษ์ ที่เรียกว่า DAG ซึ่งส่วนนี้มีความสัมพันธ์กับเปลือกอ่อนในการถ่ายทอดโรค ในขณะที่ 2 ใน 3 ส่วนของโปรตีนทางด้าน C-terminus มีความคล้ายคลึงกันมาก (Shukla and Ward, 1988; Ward and Shukla, 1991)

5' Non-coding region

จีโนมของโพทิวไรรัสนั้นมีส่วน non-coding region และโพทิวไรรัสต่างชนิดกันจะมี non-coding region ขนาดใกล้เคียงกันมาก คือ ระหว่าง 144-205 นิวคลีโอไทด์ แต่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างชัดเจน ยกเว้นตำแหน่งที่เป็น conserved region (TCAACACAACA) ซึ่งเรียกว่า Poty box ที่ไม่แตกต่างกัน (Shukla *et al.*, 1991) โดย Poty box จะทำหน้าที่เกี่ยวกับ encapsidation และ translation (Lain *et al.*, 1989)

3' Non-coding region

ปลาย 3' ของโพทิวไรรัสนั้นต่าง ๆ มีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน ระหว่าง 147-499 นิวคลีโอไทด์ (Ward and Shukla, 1991) โพทิวไรรัสต่างชนิดกันจะมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' non-coding region ประมาณ 30-53 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเป็นโพทิวไรรัสนั้นเดียวกันแต่คนละสายพันธุ์ (strain) จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันมากถึง 83-98 เปอร์เซ็นต์ (Frenkel *et al.*, 1989) ส่วนของ 3' non-coding region ของโพทิวไรรัสแต่ละชนิดจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีส่วนซ้ำกัน (inverted repeats) ทำให้สามารถจับกันเป็น secondary structure ได้ (Turpen, 1989; Bryan *et al.*, 1992)



ภาพที่ 3 โครงสร้างยีนของเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV) แสดงส่วนที่ยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่างๆจากปลายด้าน 5' ไปสู่ปลายด้าน 3' (Yeh *et al.*, 1992)

- P1 = P1 protein
- HC-Pro = helper component
- P3 = P3 protein
- 6K1 = 6KDa protein
- CI = cylindrical inclusion protein
- 6K2 = 6KDa protein
- NIa = small nuclear inclusion protein
- NIB = large nuclear inclusion protein
- CP = coat protein
- 3' UTR = 3' non-coding region
- 5' UTR = 5' non-coding region
- VPg = viral genome-linked protein
- Poly(A) = Poly A tail

การควบคุมโรคใบต่างจุดวงแหวนในมะละกอ

เนื่องจากเชื้อไวรัส PRSV สามารถถ่ายทอดโรคโดยอาศัยเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะ เชื้อไวรัสมีความสัมพันธ์กับแมลงในลักษณะ non-persistent การถ่ายทอดโรคภายในเวลาสั้นๆ เป็นวินาที จึงทำให้การใช้สารเคมีกำจัดแมลงพาหะไม่ได้ผลในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค ทำให้ไม่มีวิธีใดๆ ในการป้องกันกำจัดอย่างได้ผลเพียงพอ และจากการที่เชื้อ PRSV มีพืชอาศัย 2 วงศ์ คือ Caricaceae และ Cucurbitaceae จึงได้มีการนำหลักการป้องกันแบบสร้างภูมิคุ้มกัน (cross protection) มาประยุกต์ใช้ ซึ่งวิธีการสร้างภูมิคุ้มกันนี้เป็นวิธีการที่มีการศึกษามานานแล้ว ตั้งแต่ ค.ศ. 1929 โดยนักโรคพืชชาวอเมริกันชื่อ McKinney พบว่า ถ้านำเชื้อไวรัสใบต่างยาสูบ *Tobacco mosaic virus* (TMV) สายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดโรครุนแรงไปปลูกเชื้อบนใบยาสูบ หลังจากนั้นประมาณ 1 สัปดาห์จึงปลูกเชื้อไวรัส TMV ที่ทำให้เกิดโรครุนแรง พบว่า สามารถป้องกันโรคจากไวรัสสายพันธุ์ที่รุนแรงได้ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่ได้นำมาใช้อย่างแพร่หลาย จนกระทั่งประมาณปี ค.ศ. 1964 ได้มีการนำวิธีการนี้มาใช้ควบคุมโรคใบต่างของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ TMV อย่างแพร่หลายในประเทศแถบยุโรป เช่น เนเธอร์แลนด์ และแถบเอเชีย วิธีนี้ถูกนำมาใช้ป้องกันและได้ผลดีกับโรคต้นโทรมของส้มที่เกิดจากเชื้อไวรัสทริสเตซ่า (*Citrus tristeza virus*; CTV) ในประเทศบราซิล ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1977 สำหรับในมะละกอได้มีการนำวิธีนี้มาใช้ควบคุมโรคใบต่างจุดวงแหวน ให้กับมะละกอซึ่งปลูกเป็นการค้าในประเทศไต้หวันในปี ค.ศ. 1986 และให้ผลในการควบคุมโรคในระดับที่น่าพอใจ แต่ก็ยังไม่มี การนำไปใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะว่าการสร้างภูมิคุ้มกันโรคนี้ไม่ทำให้มะละกอเกิดความต้านทานโรคอย่างถาวร เป็นแต่เพียงการชะลอการเกิดโรคหรือลดความเสียหายของโรคลง นอกจากนี้ยังต้องมีการจัดการและการดูแลเอาใจใส่แปลงปลูกที่ดีเป็นพิเศษจากเกษตรกร (วิชัย และคณะ, 2545)

ต่อมา Sanford and Johnson (1985) จึงได้นำเสนอแนวคิดในการป้องกันการเข้าทำลายของไวรัสที่มีประสิทธิภาพ และอยู่ได้ถาวรที่เรียกว่า pathogen derived resistance (PDR) คือ การนำยีนของเชื้อโรคหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ถ่ายเข้าไปในพืชอาศัย และชักนำยีนดังกล่าวให้แสดงออกก็จะสามารถต้านทานต่อเชื้อโรคได้ จนกระทั่ง Fitch *et al.* (1992) ได้นำแนวคิดเรื่อง PDR มาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคใบต่างจุดวงแหวนมะละกอในฮาวาย โดยนำยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของเชื้อไวรัสใบต่างจุดวงแหวนมะละกอสายพันธุ์ฮาวายมาใช้ในการสร้างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมให้เกิดความต้านทาน ป้องกันการเข้าทำลายของไวรัสใบต่างจุดวงแหวนมะละกอจากฮาวาย จากนั้น Yeh *et al.* (1997) ได้สร้างมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานโรคใบต่างจุดวงแหวนสำเร็จ โดยใช้วิธีการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบต่างจุดวงแหวนมะละกอสายพันธุ์ไต้หวัน เข้าไปในเนื้อเยื่อเอ็มบริโอของมะละกอ ทำให้มะละกอมียีน

โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และเมื่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคนี้มีการแสดงออก จะสามารถต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอสายพันธุ์ได้ทันที

กลไกความต้านทานที่เกิดขึ้นจากการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) เข้าสู่โครโมโซมพืช

ความต้านทานที่เกิดขึ้นจากยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส หรือ coat protein-mediated resistance (CP-MR) เป็นลักษณะความต้านทานที่เกิดขึ้นจากยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสในพืชดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการเข้าทำลายของไวรัส ทำให้ไวรัสลดอัตราการเพิ่มปริมาณ ส่งผลให้ลดความรุนแรงของโรคในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนดังกล่าว (Beachy, 1993) โดยมีสมมติฐานของความต้านทานที่เกิดขึ้นจากการถ่ายยีน CP เข้าสู่พืช 2 สมมติฐาน คือ

Coat protein-mediated resistance

กลไกความต้านทานที่เกิดจากโปรตีนของยีน CP มีอิทธิพลต่อวงจรชีวิตของไวรัสในลักษณะที่แตกต่างกันไป เช่น CP โปรตีน สามารถเข้ายับยั้งในขั้นตอนการแยกกันระหว่างกรดนิวคลีอิกและโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคในระยะแรกของการเข้าสู่เซลล์พืช (Powell-Abel *et al.*, 1986; Register and Beachy, 1988) ดังจะเห็นได้จากพืชที่มีการแสดงออกของยีน CP ในชั้น epidermal cells สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของไวรัสในระยะแรกได้ ในขณะที่การแสดงออกของยีน CP ที่ชั้น mesophyll cells ไม่มีผลต่อความต้านทานในการเข้าทำลายของไวรัส (Reimann-Phillipp and Beachy, 1993)

ยีน CP ที่ถ่ายให้กับพืชจะมีผลไปขัดขวางหรือชะลอการเกิดโรคในขั้นตอนการทวีจำนวนของไวรัส การรวมเป็นอนุภาคของไวรัสที่สมบูรณ์ (Clark *et al.*, 1995a; 1995b) หรือขั้นตอนการเคลื่อนที่ของไวรัสไปยังเซลล์ใกล้เคียง และการเคลื่อนที่ไปตามระบบท่อลำเลียง (Wisniewski *et al.*, 1990) โดย Beachy *et al.* (1990) ได้ทำการทดลองศึกษาผลกระทบของยีน CP ต่อการเคลื่อนที่ของไวรัสในระบบท่อลำเลียง โดยใช้ส่วนลำต้นของต้นยาสูบที่มียีน CP เสียบบยอระหว่าง root stock และ apical section ของต้นยาสูบปกติ ส่วนลำต้นของต้นยาสูบที่มียีน CP สามารถที่จะเชื่อมระบบท่อลำเลียงกับต้นยาสูบปกติได้ จากนั้นปลูกเชื้อ TMV ลงบนใบของ root stock ซึ่งพบว่า เฉพาะใบของ root stock เท่านั้นที่จะแสดงอาการของโรคแบบแพร่กระจายที่บริเวณเส้นกลางใบ ส่วนใบของต้นยาสูบที่มียีน CP และส่วนยอดของต้นยาสูบที่ปกติจะไม่พบอาการแบบแพร่กระจาย

Quemada *et al.* (1991) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน CP จาก *cucumber mosaic virus* (CMV) สายพันธุ์ C ในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม *N. tabacum* cv. Xanthi ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยอะโกรแบคทีเรีย สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน CP ด้วยเทคนิค Northern blot analysis และตรวจพบการแสดงออกของโปรตีน CP โดยเทคนิค Western blot analysis ทดสอบความต้านทานต่อโรคโดยการปลูกเชื้อ CMV สายพันธุ์ C ด้วยวิธีกลลงบนต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมนั้น และตรวจสอบระดับโปรตีน CP ที่มีอยู่ในต้นยาสูบโดยวิธี enzyme-linked immunoassay (ELISA) พบว่า ยาสูบที่มีการแสดงออกของโรคมักจะพบปริมาณไวรัสในระดับสูงเสมอ ในขณะที่ต้นยาสูบที่ไม่แสดงอาการของโรคจะตรวจพบปริมาณไวรัสในระดับต่างๆ กัน เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติที่ปลูกเชื้อไวรัสเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม ต้นยาสูบบางต้นซึ่งไม่แสดงอาการภายหลังการปลูกเชื้อ และตรวจพบปริมาณโปรตีนในระดับต่ำ อธิบายได้ว่าลักษณะการป้องกันโรคที่เกิดจากยีน CP มีผลในการยับยั้งการเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายของเชื้อไวรัสทำให้พืชต้านทานโรคได้

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส TMV บนต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CP เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยการปลูกเชื้อ TMV เฉพาะส่วนที่เป็นอาร์เอ็นเอของ TMV ลงบนใบ พบว่า เกิดอาการของโรคขึ้นได้ แสดงให้เห็นว่าความต้านทานที่เกิดขึ้นจากยีน CP มีผลต่อไวรัสในลักษณะที่เป็นอนุภาคเท่านั้น แต่ไม่มีผลต่อสภาพที่เป็นกรดนิวคลีอิก และกลไกการป้องกันโรคจากการใช้ยีน CP นี้ น่าจะมีมากกว่าหนึ่งกลไก (Baulcombe, 1996)

RNA- mediated resistance

กลไกความต้านทานที่เกิดจากยีน CP ในระดับอาร์เอ็นเอจะอยู่ในรูปของการเกิด gene silencing ซึ่งอาจมีผลในการยับยั้งการแสดงออกของ transgene และยีนอื่นๆ ในโครโมโซมพืช โดยทั่วไปพืชที่มีการสอดแทรกของยีนเข้าไปหลายตำแหน่งบนโครโมโซม จะถูกยับยั้งมิให้มีการแสดงออกบางตำแหน่ง หรือทุกตำแหน่งของ transgene แต่อาจจะพบว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการสอดแทรกของยีนเพียงตำแหน่งเดียวบนโครโมโซมก็ทำให้เกิดการไม่แสดงออกของยีน (Galun and Breiman, 1997)

gene silencing

การไม่แสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าสู่สิ่งมีชีวิต พบได้ในยูคาริโอตชนิดต่างๆ เช่น เชื้อรา, สัตว์ และ พืช โดยมีกลไกการย่อยทำลายอาร์เอ็นเอแบบ sequence-specific ซึ่งผลจากการย่อยทำลายอาร์เอ็นเอนี้ จะได้อาร์เอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ หรือที่เรียกว่า small

interfering RNA (siRNA) (Hamilton and Baulcombe, 1999) gene silencing อาจเกิดจาก กลไกที่สำคัญ 2 ชนิด ซึ่งไม่เกี่ยวเนื่องกัน คือ

Transcriptional gene silencing (TGS) เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับทรานส์ยีน (transgene) ที่ ถ่ายเข้าสู่พืชหรือสิ่งมีชีวิต ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์อาร์เอ็นเอได้ กลไกนี้จะปรากฏขึ้นเมื่อเกิด methylation ของยีนที่ถ่ายเข้าสู่พืช (Finnegan *et al.*, 1998) หรือเกิดจากการหดตัว (condensation) ของโครมาติน การไม่แสดงออกของยีนมักจะปรากฏเสมอในกรณีที่มีการ สอดแทรกของยีนเข้าไปหลายตำแหน่งบนโครโมโซมพืช หรือการเข้าคู่กันของยีนที่ถ่ายเข้าสู่พืชบน ตำแหน่งเดียวกันหรือต่างกัน นอกจากนี้ยีนที่มีลักษณะเป็น inverted repeats หรือเรียกว่า repeats-inducing gene silencing (RIGS) ก็มีผลต่อการไม่แสดงออกของยีนเช่นกัน (Vaucheret *et al.*, 1998)

Post-transcriptional gene silencing (PTGS) เกิดขึ้นเนื่องจากการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ของ transgenes ที่มากผิดปกติ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากโครงสร้างของ transgenes ในพืชดัดแปลง พันธุกรรมที่มีการใช้โปรโมเตอร์ CaMV 35S promoter ชนิด double enhancer (Elmayan and Vaucheret, 1996) หรือจำนวนชุด (copy) ของ transgene ที่สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมพืช (English *et al.*, 1996) จากนั้นเกิดการชักนำให้มีการสร้าง double-stranded RNA (dsRNA) โดยอาศัยเอนไซม์บางชนิด เช่น RNA dependent RNA polymerases (RdRp) dsRNA จะถูก ย่อยทำลายด้วย dsRNA endonuclease (RNase III) หรือเรียกว่า Dicer ซึ่ง Dicer ประกอบไป ด้วยเอนไซม์ helicase และ dsRNA binding domains จากการย่อยทำลาย dsRNA นี้จะได้ dsRNA ทั้งเส้น sense และ antisense RNA ที่มีขนาด 21-25 นิวคลีโอไทด์ หรือที่เรียกว่า small interfering RNA (siRNA) siRNA เหล่านี้ จะถูก Dicer นำไปเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ dsRNA อีกครั้ง (Matzke and Kooter, 2001)

PTGS มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าสู่พืช (transgene) และยีนในพืชที่ เข้าคู่กัน (homologous host gene) โดยทั่วไปจะเรียกลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ว่า co-suppression (Lomonossoff, 1995; Elmayan *et al.*, 1998; Vaucheret *et al.*, 1998) co-suppression จะ พบในพืชที่มีการสอดแทรกเข้าไปของ transgene มากกว่า 1 ตำแหน่ง Hobbs *et al.* (1993) ศึกษาการแสดงออกของยีน GUS ที่เกี่ยวข้องกับการสอดแทรกของ T-DNA เข้าไปอยู่บน โครโมโซมของยาสูบ พบว่า T-DNA ที่ใช้ส่งถ่ายยีน GUS มี 2 รูปแบบที่แตกต่างกัน คือ ชนิด high-expressing T-DNA (H-type) ซึ่งสามารถสอดแทรกเข้าไปอยู่บนโครโมโซมของยาสูบได้ 1 ตำแหน่ง และมีการแสดงออกของยีน GUS เกิดกิจกรรมของ β -glucuronidase ในระดับสูง อีก ชนิดหนึ่งคือ low-expressing T-DNA (L-type) ซึ่งจะสอดแทรกเข้าไปอยู่หลายตำแหน่งบน

โครโมโซมพืชทั้งบนโครโมโซมคู่เดียวกันและต่างโครโมโซม มีการแสดงออกของยีน GUS และเกิดกิจกรรมของ β -glucuronidase ในระดับต่ำ เมื่อทดสอบให้มีการผสมข้ามกันระหว่างยีนทั้ง 2 ชนิด พบว่า ประชากรรุ่นลูก จะมีการแสดงออกของยีน GUS และเกิดกิจกรรมของ β -glucuronidase ในระดับต่ำ แสดงให้เห็นว่าการเกิด co-suppression จะมีความสัมพันธ์กับจำนวนชุด (copy) ของยีนที่สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมพืช

Elmayan and Vaucheret (1996) รายงานการเกิด PTGS ของยีน GUS ที่มีโปรโมเตอร์ CaMV 35S promoter ชนิด double enhancer เมื่อถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบ พบว่า ยาสูบบางต้นที่มียีนสอดแทรกเข้าไป 1 ตำแหน่ง ทำให้เกิดการแสดงหรือไม่แสดงออกของยีนในระยะเวลาและระดับที่แตกต่างกันไป ต้นอ่อนของยาสูบที่มีการแสดงออกของยีน GUS ในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนสูง จะมีปริมาณอาร์เอ็นเอและกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 1 เดือน นอกจากนี้ยังพบลักษณะเช่นนี้ในต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนและมีลักษณะเป็น homozygous แต่มีระยะเวลาการแสดงออกที่แตกต่างกันไป ในขณะที่ต้นยาสูบที่มีลักษณะเป็น hemizygous ปริมาณอาร์เอ็นเอและกิจกรรมของ GUS จะลดลงหลังจากการถ่ายยีนระยะเวลา 1 ปี แสดงให้เห็นว่า ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งประกอบด้วย โปรโมเตอร์ที่มีลักษณะเป็น double enhancer ที่ช่วยส่งเสริมให้มีการแสดงออกของ transgene อาจมีผลชักนำให้ transgene นั้นเกิดการไม่แสดงออกของยีนได้ในภายหลัง ซึ่งเนื่องมาจากปริมาณอาร์เอ็นเอของ transgene ถูกสังเคราะห์ในปริมาณที่มากผิดปกติ จึงก่อให้เกิดการยับยั้งมิให้มีการแสดงออกของ transgene

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สายพันธุ์มะละกอ

มะละกอที่ใช้ในการทดลอง คือ มะละกอพันธุ์แขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 รุ่น R_0 ที่ได้รับการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) ของไวรัสใบด่าง จุตวงแหวนมะละกอสายพันธุ์เชียงใหม่จาก construct P2/CMCP (ภาพผนวกที่ 1) เข้าสู่ somatic embryo ที่พัฒนาจากคัพพะของเมล็ดมะละกออ่อนพันธุ์แขกนวลอายุประมาณ 120 วัน ด้วยวิธี microprojectile bombardment และจากการทดสอบความต้านทานไวรัส PRSV สายพันธุ์เชียงใหม่กับมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 รุ่น R_0 โดยวิธีการปลูกเชื้อภายใต้สภาพโรงเรือน พบว่า มะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 สามารถต้านทานไวรัส PRSV สายพันธุ์เชียงใหม่ได้ดี และเมื่อนำมาทดสอบความต้านทานไวรัส PRSV สายพันธุ์อื่นๆในประเทศไทย พบว่า มะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 ยังสามารถต้านทานไวรัส PRSV สายพันธุ์อื่นๆในประเทศไทย แต่ในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 1.2.3 ไม่สามารถต้านทานไวรัส PRSV สายพันธุ์อื่นๆในประเทศไทยได้ ด้วยความสามารถในการต้านทานไวรัส PRSV ที่ต่างกันของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 รุ่น R_0 จึงนำมาใช้เป็นพืชทดลอง โดยได้รับความอนุเคราะห์มะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรม จากกลุ่มงานวิจัยด้านพืช ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

2. การวิเคราะห์การแสดงออกของ PRSV-CP genes ในระดับอาร์เอ็นเอ

2.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอตัวติดตามสำหรับตรวจสอบยีน PRSV-CP (PRSV-CP probe)

สังเคราะห์ PRSV-CP probe ด้วยเทคนิค PCR ติดฉลากดีเอ็นเอของยีน PRSV-CP ด้วยสารไวรั้งสี Digoxigenin โดยใช้ชุดปฏิกิริยา PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) เตรียมปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SC113 (5'-AAG CTG TGG ATG CTG GTC TTA ATG 3') และ SC104 (5'-ATT GCG CAT ACC TAG GAG AGA GTG 3') ความเข้มข้น 20 pmol, 2mM Dig-dNTPs 2 ไมโครลิตร, 25mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 10x buffer 2.5 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำปฏิกิริยาไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และปฏิกิริยาสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน

10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer เก็บดีเอ็นเอตัวติดตามที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การแยกสกัด total RNA จากใบมะละกอ

นำใบอ่อนมะละกอแขกนวลตัดแปลงพันธุ์กรรม และมะละกอแขกนวลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยวิธี LiCl ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Verwoerd *et al.*, (1989) โดยบดใบอ่อนของมะละกอน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งให้เป็นผงละเอียด ตักใส่หลอดไมโครทิวปขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี TLES buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และ phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นาน 1 นาที หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเก็บน้ำใสที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสปริมาตร 350 ไมโครลิตร มาตกตะกอนกรดนิวคลีอิกโดยเติม 4 M LiCl เท่าปริมาตรน้ำใส (350 ไมโครลิตร) แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำ (RNase free water) 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 2.5M CH₃COONa (pH 6.0) 10 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับขึ้นมาเบาๆ เก็บส่วนผสมที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% ethanol ทำตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งในสุญญากาศ แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำ 20 ไมโครลิตร (RNase free water)

กำจัดดีเอ็นเอในสารละลายอาร์เอ็นเอโดยใช้เอ็นไซม์ RQ1 RNase-Free DNase (Promega) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 30 ไมโครกรัม ประกอบด้วยสารละลายอาร์เอ็นเอ 50 ไมโครกรัม RQ1 DNase buffer (10x) 3 ไมโครลิตร RQ1 RNase-Free DNase 2 unit ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ (RNase free water) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม RQ1 DNase stop solution 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) เท่าปริมาตร ผสมให้เข้ากันนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนเติม 2.5M CH₃COONa และ absolute ethanol บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 60 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ตากตะกอนให้แห้งในสุญญากาศ ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร (RNase free water) นำสารละลายอาร์เอ็นเอมาวัด

ค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer และตรวจคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 Northern blot hybridization

นำอาร์เอ็นเอของมะละกอแขกนวลตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49, KN 1.2.3 และมะละกอแขกนวลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จากข้อ 2.2 ปริมาตร 60 ไมโครกรัม มาแยกขนาดอาร์เอ็นเอด้วย 0.8% formaldehyde agarose gel electrophoresis โดยเตรียมเจล ปริมาตร 120 มิลลิลิตร ชั่ง agarose gel 0.96 กรัม น้ำกลั่น (DMPC) 76.2 มิลลิลิตร หลอมให้เข้ากันดี เติม 37% formaldehyde 21.5 มิลลิลิตร และ 5x formaldehyde running buffer [0.1M MOPS (pH 7.0), 40mM CH₃COONa, 5mM EDTA (pH 8.0)] ปริมาตร 23.6 มิลลิลิตร เตรียม RNA mixer โดยผสม total RNA 60 ไมโครกรัม กับ sample buffer [5x formaldehyde running buffer 4 ไมโครลิตร, 37% formaldehyde 7 ไมโครลิตร, deionized formamide 20 ไมโครลิตร, formaldehyde gel loading buffer (50% glycerol, 1mM EDTA (pH 8.0), 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol) 4 ไมโครลิตร] เก็บส่วนผสมที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที 5 นาที แยกขนาดอาร์เอ็นเอในเจลที่เตรียมไว้โดยใช้กระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ นานประมาณ 2 ชั่วโมง

แช่แผ่นเจลในสารละลาย 20x SSC (3M NaCl, 0.3M tri sodium citrate) เป็นเวลา 10 นาที โยกย้ายอาร์เอ็นเอจากเจลไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน (Roche) แบบ capillary blot transfer โดยใช้สารละลาย 20x SSC เป็นบัฟเฟอร์สำหรับการเคลื่อนย้ายอาร์เอ็นเอ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ครบเวลาแล้ว นำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาล้างด้วยสารละลาย 2x SSC เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งให้หมาดบนกระดาษกรอง 3 MM Whatman นำแผ่นไนลอนเมมเบรนไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อตรึงอาร์เอ็นเอไว้กับแผ่นไนลอนเมมเบรน จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาทำปฏิกิริยาฟริไฮบริไดเซชัน โดยแช่เมมเบรนในสารละลายไฮบริไดเซชัน high SDS concentration hybridization buffer (7% SDS, 50% formamide, 5x SSC, 2% blocking reagent, 50 mM sodium-phosphate (pH 7.0), 0.1% N-lauroylsarcosine) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเปลี่ยนเป็นสารละลายไฮบริไดเซชันที่เติมตัวติดตาม PRSV-CP probe (ติดตามโดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche) นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตรวจผลไฮบริไดเซชันด้วยเทคนิค chemiluminescence detection โดยใช้ CDP starTM (Roche) เป็นสับสเตรท และดำเนินการตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ total RNA ในแต่ละตัวอย่างที่อยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรน โดยการทำจุด PRSV-CP probe และ chemiluminescence substrate ออกตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต นำแผ่นไนลอนเมมเบรนดังกล่าวมาทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับ 18S rRNA probe (18S rRNA พบได้ในเซลล์พืชปกติ) ตรวจผลไฮบริดเซชันด้วยเทคนิค chemiluminescence detection

2.4 สังเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PRSV-CP genes

นำ total RNA ที่สกัดได้จากใบอ่อนของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 ตามวิธีการข้อ 2.2 มาสกัด mRNA ด้วยชุดสกัด oligotex mRNA spin column (QIAGEN®) จากนั้นนำ mRNA ไปเป็นต้นแบบในปฏิกิริยา reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อสังเคราะห์ cDNA ของ PRSV-CP genes โดยใช้ชุด one-step RT-PCR (QIAGEN®) เตรียมปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้สารละลาย mRNA 1 ไมโครลิตร, 5x RT-PCR buffer 4 ไมโครลิตร, 10mM dNTPs 0.8 ไมโครลิตร, 20 pmol SC113 primer (5'AAG CTG TGG ATG CTG GTC TTA ATG 3'), 20pmol SC104 primer (5'ATT GCG CAT ACC TAG GAG AGA GTG 3') อย่างละ 1 ไมโครลิตร, enzyme mix (one-step) 0.8 ไมโครลิตร และเติมน้ำ (RNase free water) ให้ครบปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และปฏิกิริยาสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา RT-PCR โดยนำผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer แล้วดูแถบ cDNA หลังจากการย้อมเจลด้วย ethidium bromide

นำ cDNA มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pDrive cloning vector (QIAGEN®) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตโดยใช้ cDNA 1 ไมโครลิตร, 10x ligation buffer 1 ไมโครลิตร, pDrive cloning vector 0.5 ไมโครลิตร, T4 ligase 0.5 ไมโครลิตร และเติมน้ำ (RNase free water) 7 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เก็บปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 16 ชั่วโมง จากนั้นโยกย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5- α competent cell ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook et al., 1989) โดยนำสารละลายพลาสมิดสายผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (*E. coli* DH5- α competent cell) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นจุ่มในน้ำอุ่นที่ 42 องศาเซลเซียส 1 นาที แล้วแช่

หลอดในน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที เติมหอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ดูดอาหารเหลว 2xYT ส่วนเกินทิ้ง ให้เหลือในหลอดไมโครทิวป์ประมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียในหลอดมา spread บนอาหารแข็ง 2xYT ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, IPTG 60 มิลลิกรัมต่อลิตร, X-Gal 80 มิลลิกรัมต่อลิตร บนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวมาสกัดพลาสมิดสายผสม ด้วยวิธี alkaline lysis (Sambrook *et al.*, 1989) โดยนำเซลล์แบคทีเรียมาเลี้ยงในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 2xYT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดอาหารเหลวออก เติม solution I (50mM glucose, 25mM tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม solution II (0.2N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 10 นาที เติม solution III (0.3M potassium acetate, 0.2M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที จากนั้นเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) เท่าปริมาตรของสารละลาย (450 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นานประมาณ 1 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใสส่วนบนเติม absolute ethanol และ 3M CH₃COONa (pH 5.2) ปริมาตร 2.5 และ 0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บตะกอนและล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ตากตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฝา เชื้อที่เติมเอนไซม์ RNaseA 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และแยกขนาดด้วย 0.8% agarose gel ใน 1x TAE buffer ตรวจสอบซ้ำโดยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน PRSV-CP (SC113 และ SC104) วิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel ใน 1x TAE buffer จากนั้นส่งไปวิเคราะห์หาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบด่างจตุรงควรรณมะละกอ โดยใช้โปรแกรม DNASTAR (LaserGene)

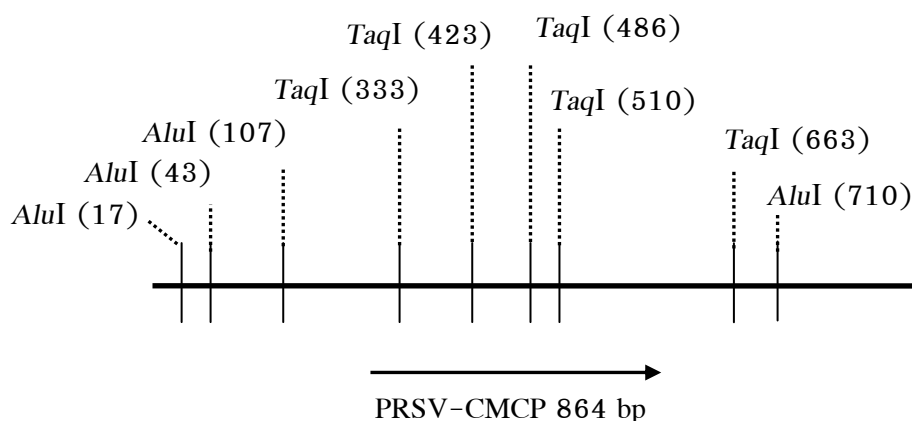
2.5 การตรวจวิเคราะห์ small RNA ในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรม

2.5.1 การแยกสกัด small RNA

สกัด small RNA จากโครโมโซมมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49, KN 1.2.3 และมะละกอแขกนวลปกติไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยดัดแปลงวิธีการสกัดจากวิธีการของ Hamilton *et al.*, (1999) นำใบอ่อนของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรม น้ำหนักประมาณ 1 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียดในโกร่ง ตักใส่หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี SDS based extraction buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และ phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นาน 1 นาที หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเก็บส่วนน้ำใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสปริมาตร 350 ไมโครลิตร มาตกตะกอนด้วย absolute ethanol 3 เท่าของปริมาตรน้ำใส (1,050 ไมโครลิตร) และเติม 3M CH_3COONa (pH 5.2) 0.1 เท่าของปริมาตรน้ำใส (35 ไมโครลิตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% ethanol ทำตะกอนให้แห้งในสุญญากาศ นำตะกอนอาร์เอ็นเอมาละลายด้วยน้ำ (RNase free water) 500 ไมโครลิตร เติม polyethylene glycol (MW 8000) และ NaCl ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5% และ 0.5M ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันแล้ววางบนน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใส 350 ไมโครลิตร เติม absolute ethanol 3 เท่าของปริมาตรน้ำใส (1,050 ไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% ethanol ทำตะกอนให้แห้งในสุญญากาศ ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย formamide วัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer และตรวจคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.5.2 การเตรียมดีเอ็นเอตัวติดตาม สำหรับตรวจสอบ small RNA ของยีน PRSV-CP

เตรียมตัวติดตามชนิดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการข้อ 2.1 จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *TaqI* โดยผลจากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะนี้จะได้ PRSV-CP probe ที่มีขนาดเล็กแตกต่างกันไป จำนวน 10 ชิ้น (ภาพที่ 4) โดยเตรียมปฏิกิริยาการย่อยผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ *AluI* ปริมาตร 3 ไมโครลิตร buffer C ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์ *TaqI* ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ buffer E ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ *AluI* แต่เป็นการเริ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ *TaqI* และเก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4 แผนภาพของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนสายพันธุ์เชียงใหม่ (PRSV-CMCP) แสดงตำแหน่งของ restriction enzymes *AluI* และ *TaqI*

2.5.3 Northern blot hybridization

นำสารละลายอาร์เอ็นเอจากข้อ 2.5.1 ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัม เติม 4x loading dye (2x TBE, 40% sucrose, 0.1% bromophenol blue) แล้วนำไปบ่มอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แช่น้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที จากนั้นนำไปแยกขนาดบน 15% polyacrylamide gel (19: 1) ที่มี 7.5M urea ใน 0.5x TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ นานประมาณ 1.30 ชั่วโมง จากนั้นย้ายอาร์เอ็นเอจากเจลไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน (Roche) ด้วยเครื่อง semi-dry transblot (Bio-Rad) ใช้กระแสไฟฟ้า 20 โวลต์ นาน 30 นาที แล้วนำแผ่นเมมเบรนวางบนกระดาษ 3 MM Whatman หลายๆ ชั้นที่ soaked ด้วย 20x SSC นาน 30 นาที และนำไปไว้ภายใต้แสง UV นาน 2 นาที เพื่อตรึง small RNA ไว้กับแผ่นเมมเบรน นำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาทำปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน โดยแช่แผ่นเมมเบรนในสารละลายไฮบริไดเซชัน standard hybridization buffer (5x SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 1% blocking reagent) ที่เติม 50% formamide (Hamilton *et al.*, 1999) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเปลี่ยนเป็นสารละลายไฮบริไดเซชันที่เติมตัวติดตาม PRSV-CP probe (ติดตามโดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche) นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตรวจผลไฮบริไดเซชันด้วยเทคนิค chemiluminescence detection โดยใช้ CDP *star*TM (Roche) เป็นสับสเตรท และดำเนินการตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต คือ นำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาล้างด้วย 2x SSC และ 0.2% SDS 2 ครั้งๆ ละ 20 นาที ตามด้วย washing buffer (1x maleic acid buffer, 0.3% tween 20) 1 ครั้ง นาน 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนใส่ถุงพลาสติก เติม blocking reagent solution แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที เติม anti-digoxigenin ที่เจือจางด้วย blocking reagent solution ในอัตราส่วน 1:1,000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 40 นาที ล้างด้วย washing buffer 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และ detection buffer (0.1M tris-HCl, 0.1M NaCl) 1 ครั้ง นาน 5 นาที เติม CDP-*star*TM (Roche) ซึ่งใช้เป็นสับสเตรท โดยเจือจางใน detection buffer อัตราส่วน 1:200 ลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วนำไปประกบฟิล์ม X-ray นานประมาณ 30-60 นาที

3. การวิเคราะห์การแสดงออกของ PRSV-CP genes ในระดับโปรตีน

3.1 ELISA

บดใบอ่อนของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 หลังการปลูกเชื้อ PRSV จำนวน 2 ครั้ง 0.1 กรัม ใน coating buffer (0.05M carbonate, pH 9.6) 1 มิลลิลิตร นำน้ำคั้นพืชปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของ microwell plate บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง เทน้ำคั้นออกแล้วล้าง plate ด้วย PBST หลุมละ 400 ไมโครลิตร นาน 3 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมต่อ PRSV เจือจาง 1:1,000 ใน 0.5% BSA ใน PBST (น้ำหนักโดยปริมาตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วยวิธีดังกล่าวมาแล้ว จากนั้นเติม alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins เจือจาง 1:1,000 ใน 0.5% BSA ใน PBST (น้ำหนักโดยปริมาตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วยวิธีดังกล่าวมาแล้ว เติม PNPP substrate solution (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 3M NaOH หลุมละ 50 ไมโครลิตร อ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A_{405}) ด้วยเครื่อง ELISA reader (ศรีเมฆ และคณะ, 2545)

3.2 Western blot

การแยกสกัด total protein จากใบมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49, KN 1.2.3 รุ่น R_0 ใบมะละกอปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และใบมะละกอปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ PRSV โดยใช้ protein extraction buffer (Macintosh *et al.*, 1992) ประกอบด้วย 50mM tris-HCl, 60 mM sodium sulphite (pH 8.5), 0.125M tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 0.02% bromophenol blue, 16% glycerol, 5% mercaptoethanol วิธีการสกัดทำโดยบดใบมะละกอประมาณ 0.4 กรัม ในบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นปั่นแยกเศษพืชออกด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกขนาดโปรตีนในน้ำคั้นโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989) ประกอบด้วย 5% stacking gel และ 12% separating gel ที่เติม 0.1% SDS ใช้กระแสไฟฟ้า 50 และ 100 โวลต์ นานประมาณ 2 ชั่วโมง

นำแผ่นเจลมาประกบกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน เพื่อโยกย้ายแถบโปรตีนจากเจลไปสู่แผ่นเมมเบรนด้วยเทคนิค electrotransfer blot (Sambrook *et al.*, 1989) จากนั้นตรวจสอบชนิดของโปรตีน CP ด้วยเทคนิค Western blotting โดยใช้แอนติซีรัมต่อ PRSV (ได้รับ

ความอ่อนแอกะทั่งจาก Dr. M. Bateson, Queensland University of Technology) นำแผ่นเมมเบรนผึ่งให้แห้งเพื่อกำจัด methanol ออก แล้วแช่ในสารละลาย TBST (10mM tris-HCl (pH 8.0), 0.15M NaCl, 0.05% tween 20) เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แช่ใน blocking solution (4% bovine serum albumin ใน TBST) เขย่านาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมแอนติซีรัมที่เจือจางใน TBST อัตรา 1:1,000 ส่วน ลงบนแผ่นเมมเบรน เขย่าเบาๆ นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาแล้ว ล้างเมมเบรนใน TBST 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที บ่มเมมเบรนในแอนติบอดีชนิดที่สอง คือ goat-anti rabbit-IgG alkaline phosphatase conjugated (GAR) ที่เจือจาง 1:10,000 ส่วน ใน TBST นาน 1 ชั่วโมง เขย่าเบาๆ ครบเวลาล้างเมมเบรนอีกครั้ง แล้วนำเมมเบรนมาเติมสารสับสเตรท NBT (nitroblue tetrazolium) และสารละลาย X-phosphate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) ผสมลงในน้ำกลั่น ประมาณ 5-10 นาที จะปรากฏสัญญาณสีม่วงน้ำเงินให้ตรวจสอบได้ หยุดปฏิกิริยาโดยแช่แผ่นเมมเบรนในน้ำกลั่น นาน 5 นาที

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนอื่น ๆ จาก papaya cDNA library

4.1 การเตรียมตัวติดตามชนิด cDNA (cDNA probe)

นำ total RNA ของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49, KN 1.2.3 และมะละกอแขกนวลปกติไม่ได้รับการถ่ายยีน ที่สกัดตามวิธีการข้อ 2.2 มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้เป็นตัวติดตามในการทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน สังเคราะห์ cDNA โดยใช้เอนไซม์ moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT; BIONEER) และเตรียมปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครกรัม ไพร์เมอร์ oligo dT ความเข้มข้น 100 pmol ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น (DMPC) นึ่งฆ่าเชื้อ นำปฏิกิริยาไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อ denature อาร์เอ็นเอและไพร์เมอร์ แช่น้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที จากนั้นเติม 5x M-MLV buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, 100mM DTT ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 10mM Dig-dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, RNase inhibitor 20 units และเติม M-MLV RTase 200 units แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เพื่อสังเคราะห์ cDNA จากนั้นเก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.2 *in vivo* excision

นำ total RNA ที่สกัดจากใบอ่อนของมะละกอแขกนวลปกติตามวิธีข้อ 2.2 มาเป็นต้นแบบในการสร้าง papaya cDNA library โดยบริษัท Euegentech Inc. ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

ใช้ Poly A tract mRNA isolation system (Promega) ในการทำ Poly (A⁺) purification สังเคราะห์ cDNA โดย cDNA Synthesis Kit (Stratagene) และใช้พาหะ Uni-ZAP[®] XR Vector (Stratagene) จากนั้นนำ cDNA library ที่ได้มาทำ *in vivo* excision เพื่อสกัด pBluescript[®] phagemid โดยเริ่มจาก

4.2.1 เลี้ยงเชื้อเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-blue MRF' และ SOLR ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติม 1M MgSO₄ และ 2M maltose แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำ XL1-blue MRF' และ SOLR มาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1000x g เพื่อตกตะกอนเซลล์ ดูดอาหารเหลว LB ที่ทั้งหมด ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย 10mM MgSO₄ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้ววัดความเข้มข้นของสารละลายตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง spectrophotometer และปรับความเข้มข้นให้ได้ค่าที่ OD₆₀₀ = 1 (8X10⁸ เซลล์/มิลลิลิตร) เก็บสารละลายตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2.2 นำ lambda phage ปริมาตร 10⁷ pfu มารวมกับ 10⁸ XL1-blue MRF' และ 10⁹ ExAssist helper phage ใส่ในหลอด conical ขนาด 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว LB ที่มี 1M MgSO₄ และ 2M maltose ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1000x g นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่เสียหาย นำส่วนใสด้านบนใส่หลอด conical ใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น stock phage particles ต่อไป

4.2.3 นำ stock phage particles ปริมาตร 1 ไมโครลิตร รวมกับสารละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรีย SOLR จากข้อ 4.2.1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียในหลอดปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread บนอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

4.2.4 คัดเลือกโคโลนีสีขาว จำนวน 1,320 โคโลนี มาเลี้ยงในหลอด ไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี alkaline lysis (Sambrook *et al.*, 1989) แล้วตรวจสอบขนาดของพลาสมิดสายผสมด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE

4.3 การตรวจสอบขนาดของ insert ใน pBluescript

สุ่มเลือกโคลนีสีขาวมาเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ insert โดยใช้ไพรเมอร์ T7 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3') และ T3 (5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3') ซึ่งมีความจำเพาะต่อ T7 และ T3 promoter ของ pBluescript ตามลำดับ จากนั้นนำปฏิกิริยา PCR ไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และปฏิกิริยาสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR มาวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer โดยใช้ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์ จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร มาตรวจสอบซ้ำอีกครั้งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Promega) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร buffer H ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 5 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปฏิกิริยารวมปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาแยกขนาดด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer

4.4 Dot blot hybridization

นำพลาสมิดสายผสมความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม หยดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วแช่แผ่นเมมเบรนใน 0.125x SSC และ 0.125N NaOH นาน 2 นาที ผึ่งแผ่นเมมเบรนให้หมาดบนกระดาษกรอง 3 MM Whatman แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอไว้กับแผ่นไนลอนเมมเบรน นำแผ่นไนลอนเมมเบรนไปทำปฏิกิริยาฟอสโฟรีไธเลชันกับ standard hybridization buffer (5x SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 1% blocking reagent) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นานประมาณ 60 นาที จากนั้นเติม cDNA probe ที่ติดฉลากด้วย Digoxigenin แล้วทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันต่อนานข้ามคืน จากนั้นนำ membrane มาล้างด้วย washing I buffer 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง washing II buffer 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ washing buffer 1 ครั้ง นาน 5 นาที แล้วนำ membrane ใส่ถุงพลาสติก เติม blocking reagent solution แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที เติม anti-digoxigenin ที่เจือจางด้วย blocking reagent solution ในอัตราส่วน 1:1000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 40 นาที ล้าง membrane ด้วย washing buffer 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และ detection buffer 1 ครั้ง นาน 5 นาที เติม CDP-starTM (Roche) ซึ่งใช้เป็น

สับสเตรท โดยเจือจางใน detection buffer อัตราส่วน 1:200 ลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วนำไป
ประกบฟิล์ม X-ray นานประมาณ 30-60 นาที

5. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยด้านพืช ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

6. ระยะเวลาในการทดลอง

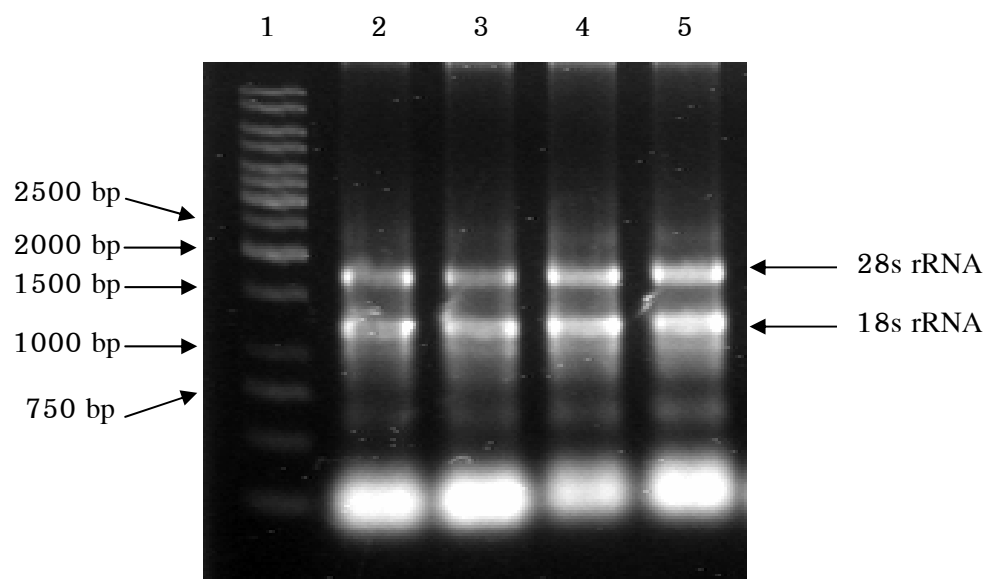
เดือนกันยายน 2546 – เดือนมกราคม 2549

ผลการทดลองและวิจารณ์

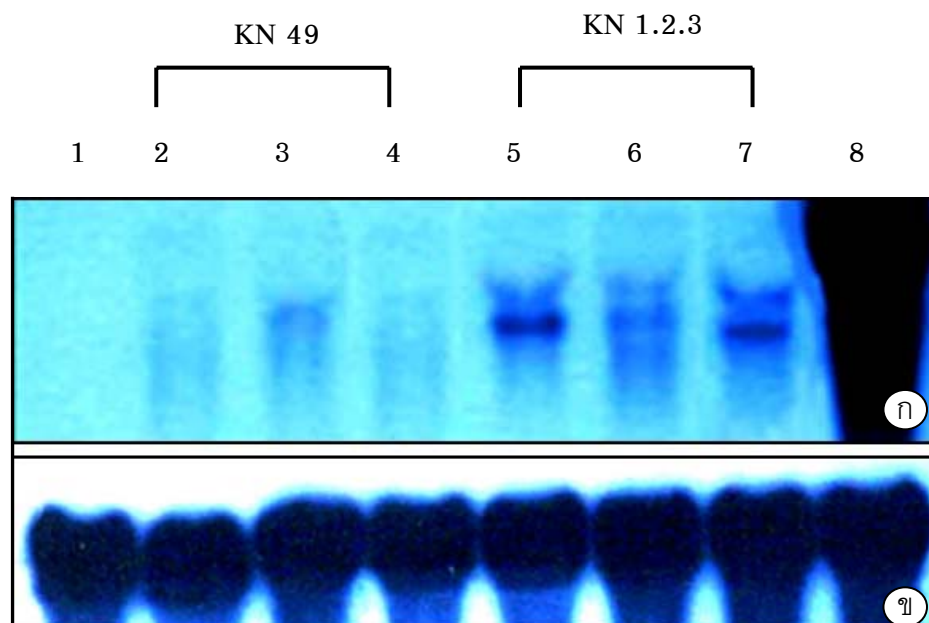
1. ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน PRSV-CP ระดับอาร์เอ็นเอ

จากการนำมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 6 ตัวอย่าง คือ สายพันธุ์ KN 49 จำนวน 3 ตัวอย่าง และสายพันธุ์ KN 1.2.3 จำนวน 3 ตัวอย่าง มาสกัด total RNA ด้วย TLES buffer วัดค่าความเข้มข้นของสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่าสามารถสกัด total RNA ได้ในปริมาณมาก และนำมาตรวจสอบคุณภาพด้วยการนำ total RNA มาแยกขนาดใน 0.8% agarose gel electrophoresis พบว่า total RNA ที่สกัดได้มีคุณภาพดีโดยพบแถบอาร์เอ็นเอทั้ง 18s rRNA และ 28s rRNA ปรากฏอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4)

เมื่อนำ total RNA มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน PRSV-CP ในระดับอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค northern blot hybridization พบว่า สามารถตรวจพบ mRNA หรือทรานสคริปของยีน CP ในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมทั้งสองสายพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์ KN 49 มีการแสดงออกของยีน CP น้อยกว่าสายพันธุ์ KN 1.2.3 และตรวจไม่พบสัญญาณใดๆ ในมะละกอแขกนวลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ขณะที่ตรวจพบแถบสัญญาณสีดำนี้นยาวในมะละกอแขกนวลปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ PRSV (ภาพที่ 6ก) เมื่อตรวจสอบปริมาณ total RNA ของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรม มะละกอแขกนวลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และมะละกอแขกนวลที่ได้รับการปลูกเชื้อ PRSV โดยการไฮบริไดซ์ด้วย 18S rRNA probe พบแถบอาร์เอ็นเอได้ชัดเจน และมีปริมาณใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ (ภาพที่ 6ข) แสดงให้เห็นว่า มะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 มีการแสดงออกของยีน CP ระดับอาร์เอ็นเอในปริมาณที่ต่างกัน



ภาพที่ 5 แถบ total RNA ของมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีน และมะละกอ
แขกนวลดัดแปลงพันธุกรรม แยกขนาดด้วย 0.8% agarose gel
electrophoresis ใน 1x TAE buffer
ช่องที่ 1 : total RNA มาตรฐาน 1 kb DNA ladder
(Fermentas)
ช่องที่ 2-3 : total RNA จากมะละกอปกติไม่ถ่ายยีน
ช่องที่ 4-5 : total RNA จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรม



ภาพที่ 6 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบด่างจตุรงแหวน ระดับอาร์เอ็นเอ ในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น R_0 ด้วยเทคนิค northern blot hybridization โดยทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับ PRSV-CP probe (ก) 18s rRNA probe (ข) ที่ติดฉลากด้วยสาร Digoxigenin ตรวจผลไฮบริไดเซชันด้วยเทคนิค chemiluminescence และใช้ CDP starTM เป็นสับสเตรท

ช่องที่ 1 : total RNA จากมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีน
ไม่ปลูกเชื้อ PRSV

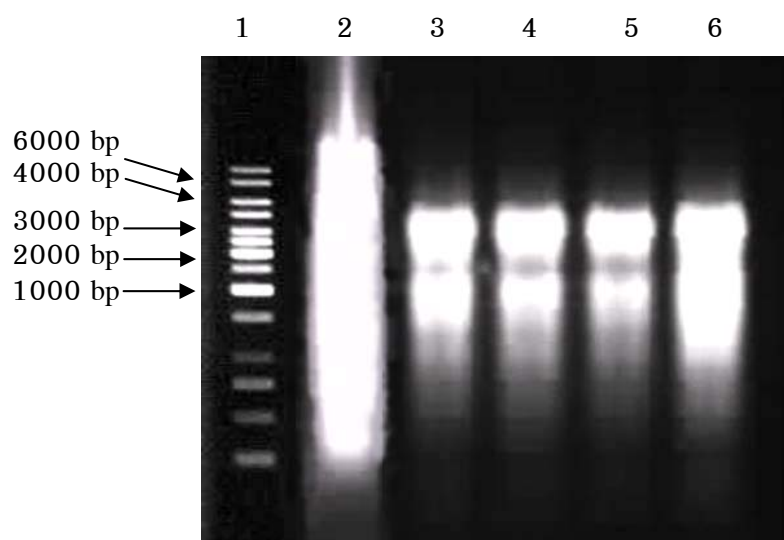
ช่องที่ 2-4 : total RNA มะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรม
สายพันธุ์ KN 49

ช่องที่ 5-7 : total RNA มะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรม
สายพันธุ์ KN 1.2.3

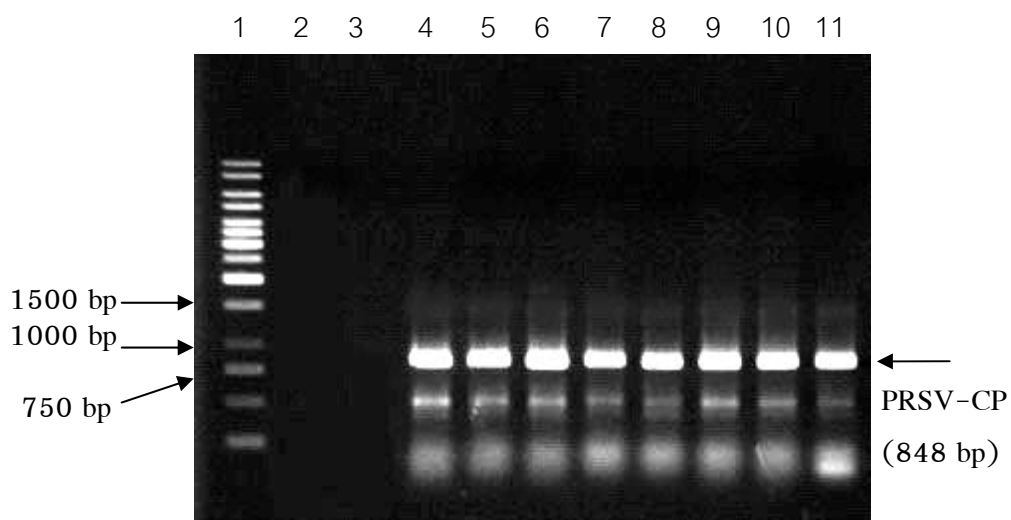
ช่องที่ 8 : total RNA จากมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีน
ปลูกเชื้อ PRSV

การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PRSV

นำ total RNA ของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 มาทำเจตดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ RQ1 RNase-Free DNase (Promega) และตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอเบื้องต้นด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer พบว่า แลบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3000 และ 1000 คู่เบส ในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 7) ก่อนที่จะนำมาสกัด mRNA เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SC113/SC104 ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน PRSV-CP แล้วนำ cDNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา RT-PCR มาแยกขนาดด้วย 0.8% agarose gel ใน 1x TAE buffer พบว่า สามารถสังเคราะห์ cDNA ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 ได้ และมีขนาดประมาณ 848 คู่เบส สอดคล้องกับขนาดของ PRSV-CPCM ซึ่งนำมาใช้สำหรับการถ่ายยีนให้กับมะละกอ เป็นที่น่าสังเกตว่า มีแลบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 และ 250 คู่เบส ในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมทั้งสองสายพันธุ์ แต่ไม่พบแลบดีเอ็นเอนี้ในมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีน ดีเอ็นเอที่ปรากฏนี้ซึ่งอาจจะเกิดจากการสังเคราะห์บางส่วน of PRSV-CP หรือจากสาเหตุอื่น การนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหล่านี้ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์น่าจะให้คำอธิบายชัดเจนได้ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 total RNA หลังการกำจัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ RQ1 RNase-Free DNase แยกขนาดด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer
 ช่องที่ 1-2 : total RNA จากมะละกอปกติไม่ถ่ายยีน
 ช่องที่ 3-4 : total RNA จากมะละกอแทรกนวลดัดแปลงพันธุกรรม



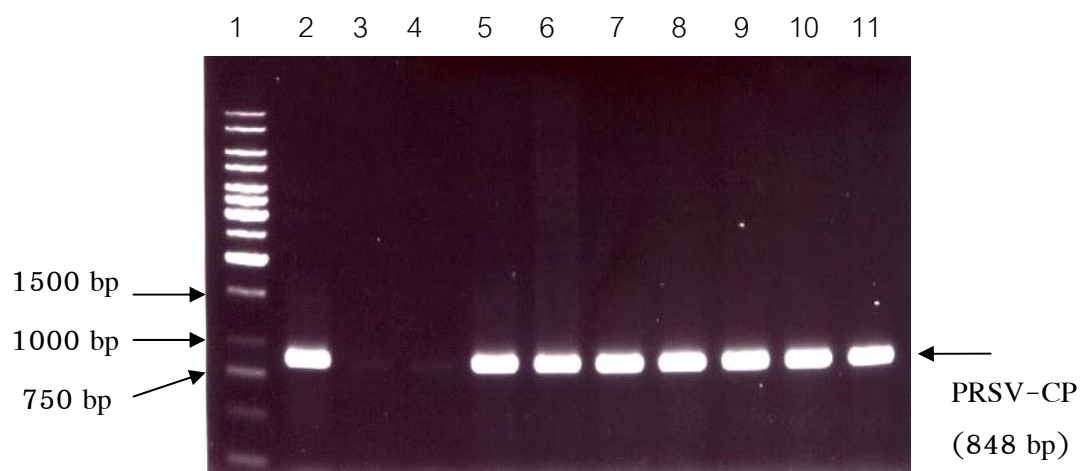
ภาพที่ 8 แล็บ cDNA ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบต่างจุดวงแหวนจากการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR ของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 รุ่น R₀

ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas)
 ช่องที่ 2 : น้ำ RNase free-water
 ช่องที่ 3 : cDNA จากมะละกอแขกนวลปกติไม่ได้รับการถ่ายยีน
 ช่องที่ 4 - 7 : cDNA จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49
 ช่องที่ 8-11 : cDNA จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 1.2.3

การวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene)

ผลการนำ cDNA ขนาด 848 คู่เบส ของยีน CP ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR เชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pDrive cloning vector ได้เป็นพลาสมิดสายผสมที่มีขนาดประมาณ 4.7 kb ย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณแล้วคัดเลือกบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน คัดเลือกโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบขึ้น insert ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SC113/SC104 แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาแยกขนาดด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer พบแถบดีเอ็นเอของยีน CP ที่มีขนาดประมาณ 848 คู่เบส (ภาพที่ 9) แสดงว่า สามารถ transform ยีน CP เข้าสู่พลาสมิดพาหะได้

จากนั้นนำโคลนที่มียีน CP ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNASTAR (LaserGene) พบว่า ยีน CP ของเชื้อ PRSV ที่ได้จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 มีขนาด 848 คู่เบส และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 283 เรซิดิวส์ (ภาพที่ 10) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนยีน CP ของเชื้อ PRSV จากทั้งสองสายพันธุ์ซึ่งมีลักษณะความต้านทานที่ต่างกันมาเปรียบเทียบกัน พบว่า มะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ PRSV มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน CP ต่างกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน CP ที่ได้จากสายพันธุ์ KN 1.2.3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ PRSV ระดับปานกลาง จำนวน 15 นิวคลีโอไทด์ และมีความเหมือนกันของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระดับ 99.1-99.6 เปอร์เซ็นต์ และเพื่อดูการจัดเรียงตัวใหม่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน CP ที่เข้าไปสอดแทรกอยู่ในโครโมโซมของมะละกอ จึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP จาก construct p2/CMCP (ภาพผนวกที่ 1) พบว่า ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 มีความเหมือนกันของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก construct p2/CMCP ที่ระดับ 99.2-99.8 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1, ภาพที่ 11) และมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนที่ระดับ 98.2-99.3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 9 แลปดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนจากพลาสมิดสายผสม โดยการสังเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และแยกขนาดด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer

ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas)
 ช่องที่ 2 : ดีเอ็นเอจาก construct p2/CMCP
 ช่องที่ 3 : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ
 ช่องที่ 4 : ดีเอ็นเอจากมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีน
 ช่องที่ 5-11 : ดีเอ็นเอจากโคลนที่ 1-7

```

- A V D A G L N D K L K D K E K Q K E E K -
1 AAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGATAAGCTCAAAGATAAAGAAAAACAGAAAGAAGAAA
- D K Q K G K E N N E A S D G N D V S T S -
61 AAGATAAACAAAAAGGTAAAGAAAATAATGAAGCTAGTGACGGAACGATGTGTCAACTA
- T K T G E R D R D V N A G T S G T F T V -
121 GCACAAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGCCGGAAGTGGTACTTTCACTG
- P R I K L F T D K M I L P G I K G K T V -
181 TTCCGAGAATAAAATTATTTACCGACAAGATGATTTTACCTGGAATTAAGGGAAAACTG
- L N L N H L L Q Y N P Q Q I D I S N T R -
241 TCCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAGTATAATCCGCAACAAATAGACATCTCAAACACTC
- A T Q S Q F E K W Y E G V R N D Y G L N -
301 GTGCCACTCAATCTCAATTCGAAAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTACGGTCTTA
- D N E M Q V M L N G L M V W C V E N G T -
361 ATGATAACGAAATGCAGGTGATGTTAAATGGTTTGATGGTTTGGTGCCTCGAAAATGGTA
- S P D I S G V W V M M D G E T Q V D Y P -
421 CATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTGATGATGGATGGGGAACTCAAGTCGATTATC
- I K P L I E H A T P S F R Q I M A H F S -
481 CCATCAAGCCTTTGATCGAACATGCAACTCCTTCGTTTCAGGCAAATCATGGCTCACTTCA
- N A A E A Y I A K R N A T E R Y M P R Y -
541 GTAACGCGGCAGAGGCATACATCGCAAAGAGGAATGCTACTGAGAGGTACATGCCGCGGT
- G I K R N L T D I S L A R Y A F D F Y E -
601 ATGGAATCAAGAGGAATTTGACTGACATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTGACTTCTATG
- V N S K T P D R A R E A H M Q M K A A A -
661 AGGTGAACTCAAAGACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAG
- L R N T S R R M F G T D G S V S N K E E -
721 CGCTGCGCAACACTAGTCGCAGAATGTTTGAACGGACGGCAGTGTCAGTAACAAGGAAG
- N T E G H T V E D V N R D M H S L L G M -
781 AAAACACGGAGGGACACACAGTGAAGATGTTAACAGAGACATGCACTCTCTCCTAGGTA
- R N
841 TGCGCAAT

```

ภาพที่ 10 การจัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค
เชื้อไวรัส PRSV (PRSV-CP)

```

49-1   ATTGCCATACCTAGGAGAGAGTGCATGTCTCTGTAAACATCTTCCACTGTGTGTCTCTC 60
123-2   ATTGCCATACCTAGGAGAGAGTGCATGTCTCTGTAAACATCTTCCACTGTGTGTCTCTC 60
49-3   AGTGCATACCTAGGAGAGAGTGCATGTCTCTGTAAACATCTTCCACTGTGTGTCTCTC 60
123-3   ATTGCCATACCTAGGAGAGAGTGCATGTCTCTGTAAACATCTTCCACTGTGTGTCTCTC 60
49-5   ATTGCCATACCTAGGAGAGAGTGCATGTCTCTGTAAACATCTTCCACTGTGTGTCTCTC 60
      * .....

49-1   CGTGTTCCTTCCTTGTACTGACACTGCCGTCCATTCCAAACATTCTGCGACTAGTGT 120
123-2   CGTGTTCCTTCCTTGTACTGACACTGCCGTCCATTCCAAACATTCTGCGACTAGTGT 120
49-3   CGTGTTCCTTCCTTGTACTGACACTGCCGTCCATTCCAAACATTCTGCGACTAGTGT 120
123-3   CGTGTTCCTTCCTTGTACTGACACTGCCGTCCATTCCAAACATTCTGCGACTAGTGT 120
49-5   CGTGTTCCTTCCTTGTACTGACACTGCCGTCCATTCCAAACATTCTGCGACTAGTGT 120
      * .....

49-1   GCGCAGCGCTGCGCGCTTCATCTGCATATGAGCTTCACGAGCGCTATCAGGTGTCTTTGA 180
123-2   GCGCAGCGCTGCGCGCTTCATCTGCATATGAGCTTCACGAGCGCTATCAGGTGTCTTTGA 180
49-3   GCGCAGCGCTGCGCGCTTCATCTGCATATGAGCTTCACGAGCGCTATCAGGTGTCTTTGA 180
123-3   GCGCAGCGCTGCGCGCTTCATCTGCATATGAGCTTCACGAGCGCTATCAGGTGTCTTTGA 180
49-5   GCGCAGCGCTGCGCGCTTCATCTGCATATGAGCTTCACGAGCGCTATCAGGTGTCTTTGA 180
      * .....

49-1   GTTCACCTCATAGAAGTCGAAAGCATATCTAGCGAGACTAATGTCAGTCAAATTCCTCTT 240
123-2   GTTCACCTCATAGAAGTCGAAAGCATATCTAGCGAGACTAATGTCAGTCAAATTCCTCTT 240
49-3   GTTCACCTCATAGAAGTCGAAAGCATATCTAGCGAGACTAATGTCAGTCAAATTCCTCTT 240
123-3   GTTCACCTCATAGAAGTCGAAAGCATATCTAGCGAGACTAATGTCAGTCAAATTCCTCTT 240
49-5   GTTCACCTCATAGAAGTCGAAAGCATATCTAGCGAGACTAATGTCAGTCAAATTCCTCTT 240
      * .....

49-1   GATTCCATACCGCGGCATGTACCTCTCAGTAGCATTCCTCTTTGCGATGTATGCCCTCTAC 300
123-2   GATTCCATACCGCGGCATGTACCTCTCAGTAGCATTCCTCTTTGCGATGTATGCCCTCTAC 300
49-3   GATTCCATACCGCGGCATGTACCTCTCAGTAGCATTCCTCTTTGCGATGTATGCCCTCTAC 300
123-3   GATTCCATACCGCGGCATGTACCTCTCAGTAGCATTCCTCTTTGCGATGTATGCCCTCTAC 300
49-5   GATTCCATACCGCGGCATGTACCTCTCAGTAGCATTCCTCTTTGCGATGTATGCCCTCTAC 300
      * .....

49-1   CCGTTACTGAAAGTGAGCCATGATTTGCCCTGAAACGAAAGGAGTTGCATGTTGGATCAAAGG 360
123-2   CCGTTACTGAAAGTGAGCCATGATTTGCCCTGAAACGAAAGGAGTTGCATGTTGGATCAAAGG 360
49-3   CCGTTACTGAAAGTGAGCCATGATTTGCCCTGAAACGAAAGGAGTTGCATGTTGGATCAAAGG 360
123-3   CCGTTACTGAAAGTGAGCCATGATTTGCCCTGAAACGAAAGGAGTTGCATGTTGGATCAAAGG 360
49-5   CCGTTACTGAAAGTGAGCCATGATTTGCCCTGAAACGAAAGGAGTTGCATGTTGGATCAAAGG 360
      * .....

49-1   CTTGATGCGATAATCGACTTGAGTTTCCCCATCCATCATCACCCAGACACCAGATATGTC 420
123-2   CTTGATGCGATAATCGACTTGAGTTTCCCCATCCATCATCACCCAGACACCAGATATGTC 420
49-3   CTTGATGCGATAATCGACTTGAGTTTCCCCATCCATCATCACCCAGACACCAGATATGTC 420
123-3   CTTGATGCGATAATCGACTTGAGTTTCCCCATCCATCATCACCCAGACACCAGATATGTC 420
49-5   CTTGATGCGATAATCGACTTGAGTTTCCCCATCCATCATCACCCAGACACCAGATATGTC 420
      * .....

49-1   TGGGATGTTCCATTTTCGACGCAACCAACCATCAAACCATTTAACATCACTTGCAATTC 480
123-2   TGGGATGTTCCATTTTCGACGCAACCAACCATCAAACCATTTAACATCACTTGCAATTC 480
49-3   TGGGATGTTCCATTTTCGACGCAACCAACCATCAAACCATTTAACATCACTTGCAATTC 480
123-3   TGGGATGTTCCATTTTCGACGCAACCAACCATCAAACCATTTAACATCACTTGCAATTC 480
49-5   TGGGATGTTCCATTTTCGACGCAACCAACCATCAAACCATTTAACATCACTTGCAATTC 480
      * .....

49-1   GTTATCATTAAGACCGTAATCATTCCTCACTCCCTCATACCACTTTTCGAAATTGAGATTG 540
123-2   GTTATCATTAAGACCGTAATCATTCCTCACTCCCTCATACCACTTTTCGAAATTGAGATTG 540
49-3   GTTATCATTAAGACCGTAATCATTCCTCACTCCCTCATACCACTTTTCGAAATTGAGATTG 540
123-3   GTTATCATTAAGACCGTAATCATTCCTCACTCCCTCATACCACTTTTCGAAATTGAGATTG 540
49-5   GTTATCATTAAGACCGTAATCATTCCTCACTCCCTCATACCACTTTTCGAAATTGAGATTG 540
      * .....

```

ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบการจัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค
 ไวรัส PRSV (PRSV-CP) ของมะละกอเชกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49
 (line 1,3 และ 5) และ KN 1.2.3 (line 2 และ 3) ด้วยโปรแกรม ClustalW
 version 1.83

```

49-1 AGTGGCACGAGTGTGAGATGTCTATTTGTCGGGATTATACTGAAGAAGATGATTTAA 600
123-2 AGTGGCACGAGTGTGAGATGTCTATTTGTCGGGATTATACTGAAGAAGATGATTTAA 600
49-3 AGTGGCACGAGTGTGAGATGTCTATTTGTCGGGATTATACTGAAGAAGATGATTTAA 600
123-3 AGTGGCACGAGTGTGAGATGTCTATTTGTCGGGATTATACTGAAGAAGATGATTTAA 600
49-5 AGTGGCACGAGTGTGAGATGTCTATTTGTCGGGATTATACTGAAGAAGATGATTTAA 600

49-1 ATTAAGGACAGTTTTCCCTTAATTCTAGGTAAAATCATCTTGTCGGTAAATAATTTTAT 660
123-2 ATTAAGGACAGTTTTCCCTTAATTCTAGGTAAAATCATCTTGTCGGTAAATAATTTTAT 660
49-3 ATTAAGGACAGTTTTCCCTTAATTCTAGGTAAAATCATCTTGTCGGTAAATAATTTTAT 660
123-3 ATTAAGGACAGTTTTCCCTTAATTCTAGGTAAAATCATCTTGTCGGTAAATAATTTTAT 660
49-5 ATTAAGGACAGTTTTCCCTTAATTCCAGGTAAAATCATCTTGTCGGTAAATAATTTTAT 660
*****

49-1 TCTCGGAACAGTGAAAGTACCACTAGTTCCGGCATTGACATCTCTATCTCTCTCCAGT 720
123-2 TCTCGGAACAGTGAAAGTACCACTAGTTCCGGCATTGACATCTCTATCTCTCTCCAGT 720
49-3 TCTCGGAACAGTGAAAGTACCACTAGTTCCGGCATTGACATCTCTATCTCTCTCCAGT 720
123-3 TCTCGGAACAGTGAAAGTACCACTAGTTCCGGCATTGACATCTCTATCTCTCTCCAGT 720
49-5 TCTCGGAACAGTGAAAGTACCACTAGTTCCGGCATTGACATCTCTATCTCTCTCCAGT 720
*****

49-1 TTTTGTGCTAGTTGACACATCGTTTCCGTCAGCTTCATTATTTCTTTACCTTTTGT 780
123-2 TTTTGTGCTAGTTGACACATCGTTTCCGTCAGCTTCATTATTTCTTTACCTTTTGT 780
49-3 TTTTGTGCTAGTTGACACATCGTTTCCGTCAGCTTCATTATTTCTTTACCTTTTGT 780
123-3 TTTTGTGCTAGTTGACACATCGTTTCCGTCAGCTTCATTATTTCTTTACCTTTTGT 780
49-5 TTTTGTGCTAGTTGACACATCGTTTCCGTCAGCTTCATTATTTCTTTACCTTTTGT 780
*****

49-1 TTTATCTTTTTCTTCTTTCTGTTTTCTTTATCTTTGAGCTTATCATTAAAGACCAGCATC 840
123-2 TTTATCTTTTTCTTCTTTCTGTTTTCTTTATCTTTGAGCTTATCATTAAAGACCAGCATC 840
49-3 TTTATCTTTTTCTTCTTTCTGTTTTCTTTATCTTTGAGCTTATCATTAAAGACCAGCATC 840
123-3 TTTATCTTTTTCTTCTTTCTGTTTTCTTTATCTTTGAGCTTATCATTAAAGACCAGCATC 840
49-5 TTTATCTTTTTCTTCTTTCTGTTTTCTTTATCTTTGAGCTTATCATTAAAGACCAGCATC 840
*****

49-1 CACAGCTT 848
123-2 CACAGGTT 848
49-3 CACAGCTT 848
123-3 CACAGCTT 848
49-5 CACAGCTT 848
*****

```

ภาพที่ 11 (ต่อ)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค เชื้อไวรัส PRSV จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 สายพันธุ์ KN 1.2.3 และ construct p2/CMCP โดยใช้โปรแกรม DNASTAR (LaserGene)

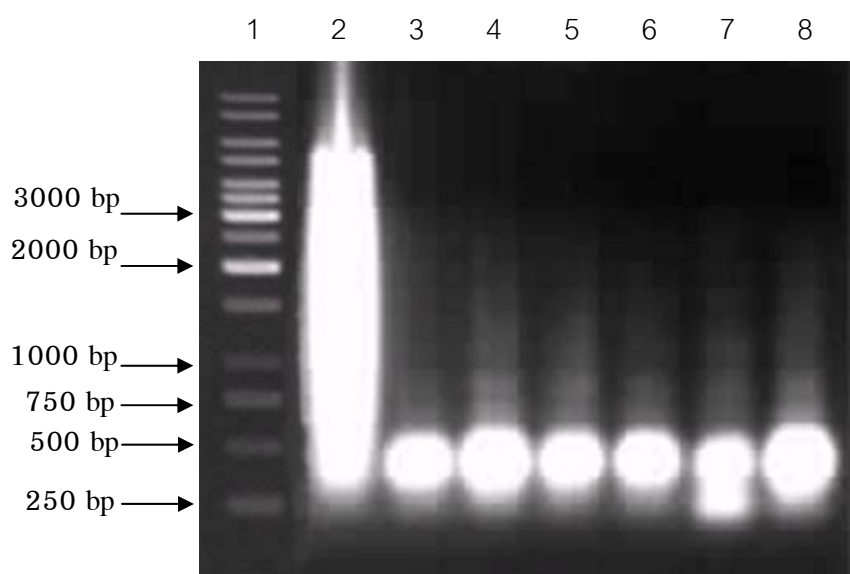
Percent Identity							
Divergence	PRSV line	49-1	49-2	49-3	1.2.3-1	1.2.3-2	PRSV-CMCP
	49-1		99.5	99.1	99.5	99.6	99.6
	49-2	0.4		99.1	99.5	99.6	99.6
	49-3	1.0	0.8		99.1	99.2	99.2
	1.2.3-1	0.5	0.4	0.9		99.6	99.6
	1.2.3-2	0.4	0.2	0.8	0.4		99.8
	PRSV-CMCP	0.4	0.2	0.8	0.4	0.2	

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโน ในส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 สายพันธุ์ KN 1.2.3 และ PRSV-CMCP โดยใช้โปรแกรม DNASTAR (LaserGene)

		Percent Identity					
Divergence	PRSV line	49-1	49-2	49-3	1.2.3-1	1.2.3-2	PRSV-CMCP
	49-1		98.9	98.2	98.6	98.9	98.9
	49-2	0.7		98.6	98.9	99.3	99.3
	49-3	1.8	1.1		98.2	98.6	98.6
	1.2.3-1	1.1	0.4	1.4		98.9	98.9
	1.2.3-2	1.1	0.7	1.4	0.7		99.3
	PRSV-CMCP	1.1	0.4	1.4	0.7	0.7	

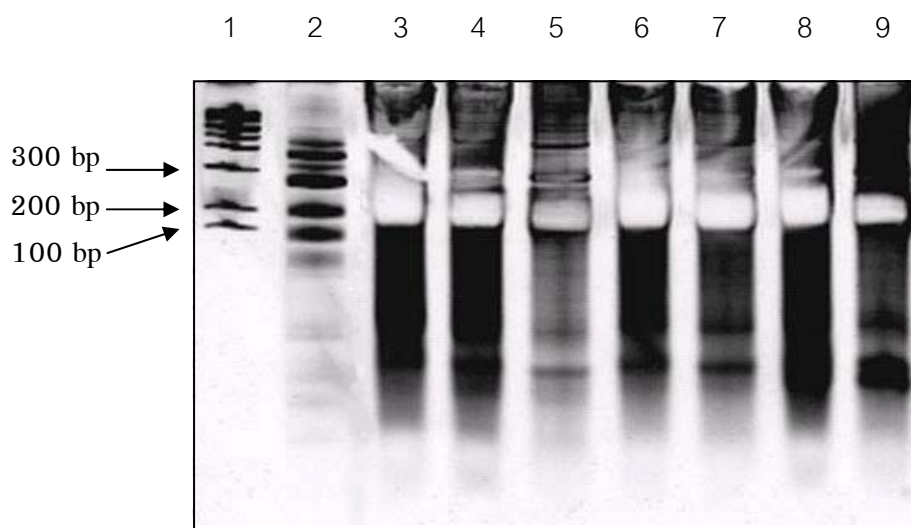
ผลการตรวจสอบ small RNA ด้วยเทคนิค northern blot hybridization

จากการตรวจสอบผลการแยก small RNA ด้วย SDS based extraction buffer โดยการนำ small RNA ที่แยกจากมะละกอพันธุ์แขกนวลดัดแปลงพันธุ์กรรม จำนวน 6 ตัวอย่าง คือ สายพันธุ์ KN 49 จำนวน 3 ตัวอย่าง สายพันธุ์ KN 1.2.3 จำนวน 3 ตัวอย่าง และมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีน มาแยกขนาดใน 0.8% agarose gel electrophoresis พบว่าสามารถแยก small RNA ได้ในปริมาณมาก (ภาพที่ 12) นำ small RNA ที่ได้มาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค dot blot hybridization พบว่า สามารถตรวจพบ small RNA ในส่วนยีน PRSV-CP ได้ในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุ์กรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 และตรวจไม่พบในมะละกอแขกนวลที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ไม่ได้แสดงผล) จากนั้นนำ small RNA มาตรวจสอบโดยเทคนิค northern blot hybridization ด้วยการแยกขนาด small RNA ใน 15% polyacrylamide gel (19:1) ที่มี 7.5M urea สามารถตรวจพบ small RNA ที่มีขนาดเล็กกว่า 100 นิวคลีโอไทด์ ได้ในปริมาณมากบนเจล ซึ่งคาดว่าน่าจะมี small RNA ในส่วนของยีน PRSV-CP ประกอบอยู่ด้วย (ภาพที่ 13) เมื่อย้ายอาร์เอ็นเอจากเจลไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน ด้วยเครื่อง semi-dry transblot พบว่า สามารถเคลื่อนย้ายอาร์เอ็นเอที่มีขนาดเล็กเหล่านี้ จากเจลไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนได้หมด เมื่อนำแผ่นเมมเบรนไปทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับ PRSV-CP probe ที่สังเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และย่อยด้วยเอนไซม์ *Alu I* และ *Taq I* (ภาพที่ 4) เพื่อให้ได้ probe ที่มีขนาดเล็กเหมาะสมแก่การจับกับ small RNA ยิ่งขึ้น จากการทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันและตรวจผลด้วยเทคนิค chemiluminescence โดยใช้ CDP starTM เป็นสับสเตรท สามารถตรวจพบแถบสัญญาณที่มีลักษณะเป็นปื้น ที่น่าจะเป็น small RNA ส่วนยีน CP ของเชื้อ PRSV ได้ในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุ์กรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานและต้านทานปานกลางต่อการเข้าทำลายของเชื้อ PRSV ตามลำดับ เช่นเดียวกับผลจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization แต่แถบสัญญาณที่ตรวจพบด้วยเทคนิค northern blot hybridization ยังไม่สามารถบอกได้แน่ชัด ซึ่งอาจเนื่องมาจากเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบ ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับตัวติดตามที่ติดฉลากด้วยสารไร้งสี Digoxigenin ซึ่งมีความไว (sensitivity) ไม่เพียงพอต่อการตรวจสอบ โดยทั่วไปในการตรวจสอบ small RNA จะใช้ตัวติดตามที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งมีความไวสูงกว่าการติดฉลากด้วย Digoxigenin



ภาพที่ 12 small RNA ที่แยกได้จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 วิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer

- ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas)
- ช่องที่ 2 : total RNA ของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรม
- ช่องที่ 3 : small RNA ของมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีน
- ช่องที่ 4-5 : small RNA ของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49
- ช่องที่ 6-7 : small RNA ของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 1.2.3
- ช่องที่ 8 : small RNA ของมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีนปลูกเชื้อ PRSV



ภาพที่ 13 การตรวจสอบขนาดของ small RNA ของมะละกอแขนวลดัดแปลง พันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 โดยแยกขนาดใน 7.5M urea 15% polyacrylamide gel in 0.5x TBE buffer

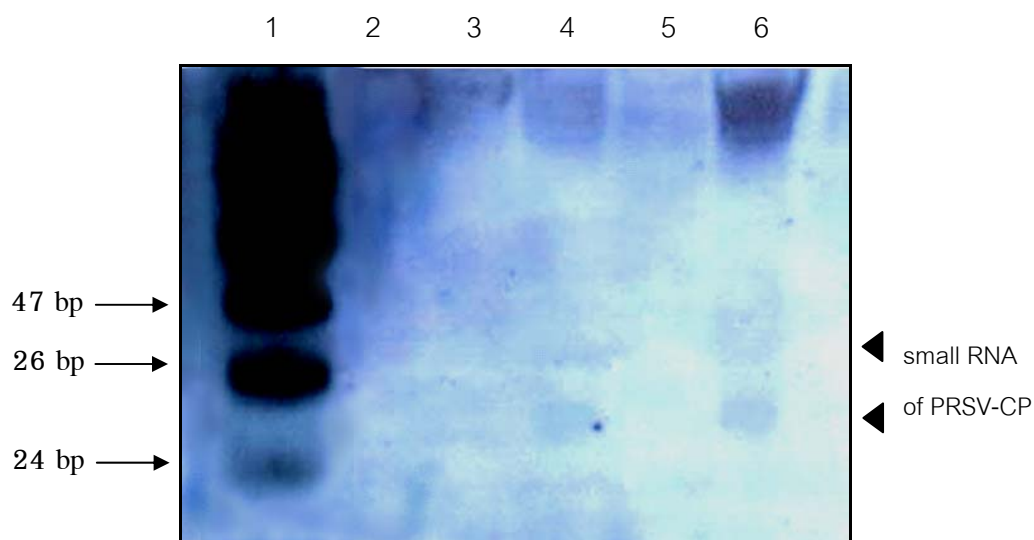
ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ช่องที่ 2 : PRSV-CP probe ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *TaqI*

ช่องที่ 3-5 : small RNA จากมะละกอแขนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49

ช่องที่ 6-8 : small RNA จากมะละกอแขนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 1.2.3

ช่องที่ 9 : small RNA จากมะละกอแขนวลปกติไม่ได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 14 แถบ small RNA ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบด่างจูดวงแหวน จากมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 รุ่น R_0 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค northern blot hybridization โดยทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับ PRSV-CP probe ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *AluI* และ *TaqI* และติดฉลากด้วยสาร digoxigenin ตรวจผล ไฮบริดเซชันด้วยเทคนิค chemiluminescence โดยใช้ CDP starTM เป็นสับสเตรท

- ช่องที่ 1 = PRSV-CP probe ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *AluI* และ *TaqI*
- ช่องที่ 2 = small RNA จากมะละกอแขกนวลปกติไม่ได้รับการถ่ายยีน
- ช่องที่ 3 - 4 = small RNA จากมะละกอแขกนวลตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49
- ช่องที่ 5 - 6 = small RNA จากมะละกอแขกนวลตัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 1.2.3

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP gene) เชื้อ PRSV ในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค ELISA และ Western blot

จากการตรวจวัดปริมาณ CP gene ของเชื้อไวรัส PRSV ในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ต้านทาน KN 49 และ ต้านทานปานกลาง KN 1.2.3 หลังจากการปลูกเชื้อด้วยเทคนิค ELISA พบว่า ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส PRSV โดยมีการค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (A_{405}) อยู่ในช่วง 0.065–0.070 ซึ่งไม่แตกต่างจากต้นปกติที่ไม่ได้ปลูกเชื้อซึ่งมีค่า A_{405} เท่ากับ 0.067

ผลการตรวจสอบโปรตีน CP ของเชื้อ PRSV ในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค western blot โดยใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อ PRSV ตรวจไม่พบแถบโปรตีน CP ของเชื้อ PRSV ที่มีขนาดประมาณ 32 กิโลดาลตัน ในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 ซึ่งไม่แตกต่างจากมะละกอปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ขณะที่พบแถบโปรตีนขนาดดังกล่าวในมะละกอปกติที่ได้รับการปลูกเชื้อ PRSV

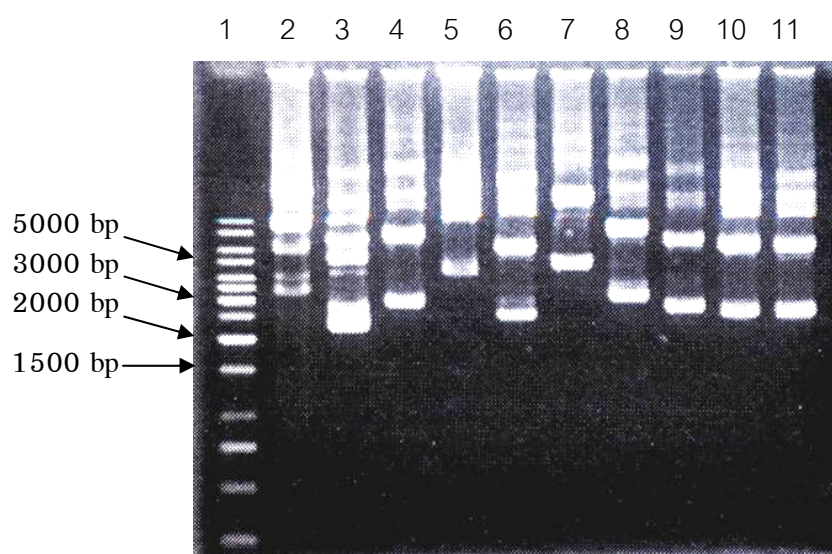
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 มีการแสดงออกของยีน CP ในระดับอาร์เอ็นเอ แต่ยังไม่สามารถตรวจการแสดงออกระดับโปรตีนได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อไวรัส ไม่สามารถผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสได้ หรือผลิตได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าระดับนาโนกรัม จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค ELISA และ western blot นอกจากนี้โปรตีนที่ผลิตได้อาจไม่เสถียร และวิธีการตรวจสอบผลผลิตของยีนในรูปโปรตีนยังมีความไว (sensitivity) ไม่สูงพอ Lines *et al.*, (2002)

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอื่นๆ ด้วยเทคนิค dot blot hybridization

จากการตรวจสอบเบื้องต้นของการแสดงออกของยีนอื่นๆ นอกจากยีน PRSV-CP ในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 จาก papaya cDNA library โดยการตรวจสอบขนาดของชิ้น insert ที่ได้จาก papaya cDNA library โดยการทำ *in vivo* excision แล้วแยกพลาสมิดสายผสมด้วยวิธี alkaline lysis แล้ววิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer พบว่า พลาสมิดสายผสมที่แยกได้มีหลายขนาด (ภาพที่ 15) จากนั้นนำพลาสมิดสายผสมมาตรวจสอบซ้ำอีกครั้งเพื่อดูขนาด insert โดยการใช้เทคนิค PCR และเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาแยกขนาดใน 0.8% agarose gel electrophoresis พบว่า ชิ้น insert มีหลายขนาด (ภาพที่ 16) แสดงให้เห็นว่า papaya cDNA library มียีนหลายยีนสอดแทรก

อยู่ ซึ่งคาดว่าจะมีความหลากหลายที่เพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอื่นๆ ด้วยเทคนิค dot blot hybridization ผลการการทำให้วิเคราะห์ด้วยเทคนิค dot blot hybridization โดยใช้ตัวติดตามชนิด cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA ของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุ์กรรมสายพันธุ์ KN 49, KN 1.2.3 และมะละกอแขกนวลปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ติดฉลากด้วยสาร Digoxigenin และใช้ CDP starTM เป็นสับสเตรท พบว่า cDNA ตัวติดตามมีปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันกับโคลนที่มีดีเอ็นเอสอดแทรก แต่ไม่มีปฏิกิริยากับเวกเตอร์ที่ไม่มีดีเอ็นเอสอดแทรก แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะระหว่างดีเอ็นเอสอดแทรก และ cDNA ตัวติดตาม (ไม่ได้แสดงผล) จากการทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันทั้งหมดจำนวน 1,320 โคลน กับ cDNA ตัวติดตามที่สังเคราะห์จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุ์กรรมสายพันธุ์ KN 49, KN 1.2.3 และมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีน มีการแสดงออกของยีนอื่นๆ นอกจากยีน PRSV-CP เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันมาก แต่ระดับการแสดงออกของแต่ละยีนมีความแตกต่างกันบ้าง คือ พบแถบสัญญาณเข้มในบางโคลนที่ใช้ cDNA probe ที่สังเคราะห์จากของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุ์กรรมสายพันธุ์ KN 49 แต่พบแถบสัญญาณที่จางกว่าจากการทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชันด้วย cDNA probe ที่สังเคราะห์จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุ์กรรมสายพันธุ์ KN 1.2.3 หรือมะละกอปกติไม่ถ่ายยีน (ภาพที่ 17)

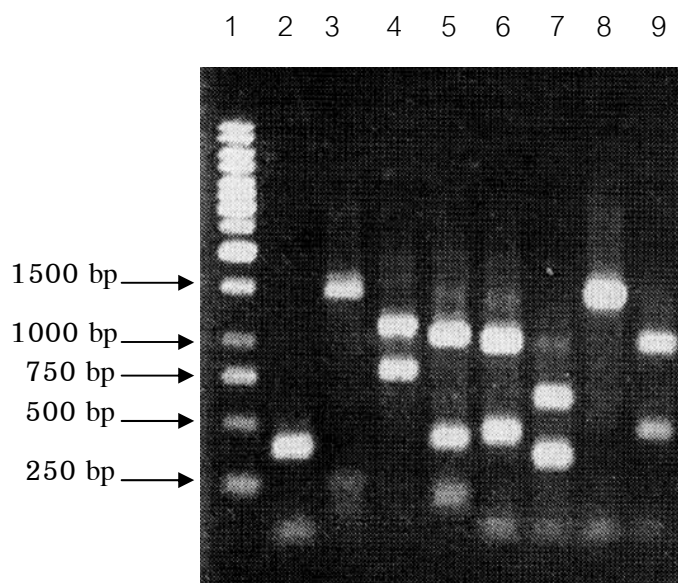
ระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่แตกต่างกันในระหว่างมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุ์กรรมทั้งสองสายพันธุ์ และมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีนนี้ อาจเนื่องมาจากยีน PRSV-CP สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของมะละกอที่ตำแหน่งต่างกัน เพราะมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุ์กรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี microprojectile bombardment ซึ่งจะถ่ายยีน CP ที่เข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมของมะละกอเป็นแบบสุ่ม ไม่สามารถกำหนดตำแหน่งที่ยีนจะเข้าไปสอดแทรกได้ การศึกษาในรายละเอียดของยีนและตำแหน่งที่ทรานส์ยีนเข้าไปสอดแทรก จะช่วยให้เกิดความเข้าใจด้านกลไกของความต้านทานต่อเชื้อไวรัสดียิ่งขึ้น ขณะเดียวกันสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงประกอบด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของมะละกอดัดแปลงพันธุ์กรรม หากมีการอนุญาตให้ใช้มะละกอดัดแปลงพันธุ์กรรมในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดสายผสมที่สกัดจากโคลนต่างๆ ของ papaya cDNA library โดยวิธี alkaline lysis และวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer

ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas)

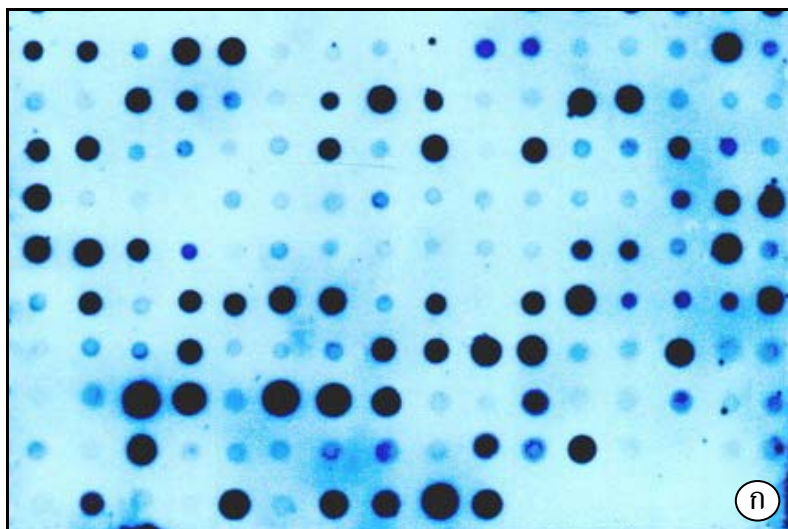
ช่องที่ 2-11 : ดีเอ็นเอจากพลาสมิดสายผสมที่สกัดจากโคลนที่ 1-10



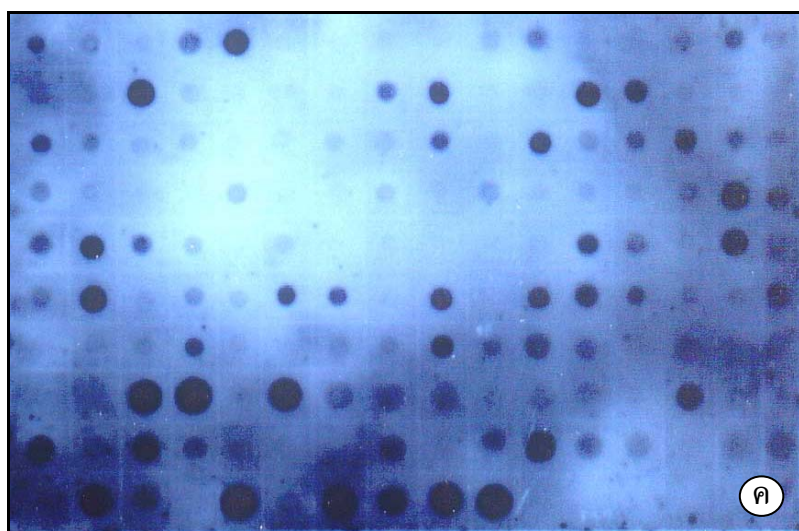
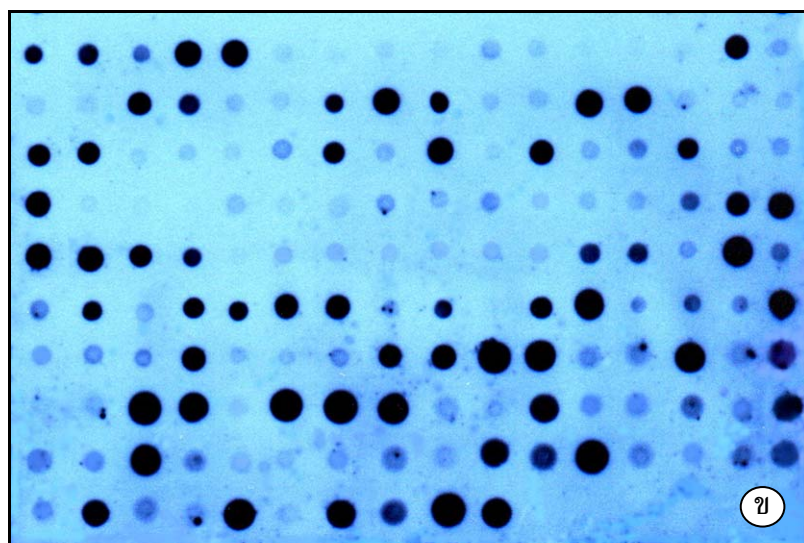
ภาพที่ 16 แอบริเอ็นเอที่ได้จากการย่อยผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer

ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas)

ช่องที่ 2-11 : ดีเอ็นเอจากผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ย่อยด้วย เอนไซม์ *EcoRI*



ภาพที่ 17 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนอื่นๆ ของมะละกอแขกนวล
ดัดแปลงพันธุกรรมเปรียบเทียบกับมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีน
ด้วยเทคนิค dot blot hybridization โดยทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับ
cDNA probe ที่สังเคราะห์จาก total RNA ของมะละกอแขกนวลปกติ
ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ก) total RNA ของมะละกอแขกนวลดัดแปลง
พันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 (ข) total RNA ของมะละกอแขกนวล
ดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 1.2.3 (ค) และตรวจผลไฮบริด
เซชันด้วยเทคนิค chemiluminescence และใช้ CDP *star*TM เป็น
สับสเตรท



ภาพที่ 17 (ต่อ)

สรุปผลการทดลอง

ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบต่างจตุวงแหวน (PRSV- CP) ในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3 มีการแสดงออกที่ระดับอาร์เอ็นเอ ซึ่งตรวจพบได้ด้วยเทคนิค northern blot hybridization และ RT-PCR โดยที่มะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49 ที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส PRSV มีการแสดงออกของยีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบต่างจตุวงแหวนมะละกอน้อยกว่าในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 1.2.3 ซึ่งต้านทานปานกลางต่อการเข้าทำลายของเชื้อ PRSV อย่างชัดเจน แต่ไม่พบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสองสายพันธุ์ด้วยเทคนิค ELISA และ western blot นอกจากนี้ยังตรวจพบอาร์เอ็นเอชิ้นเล็ก ๆ ที่มีขนาดประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ทั้งสายพันธุ์ KN 49 และ KN 1.2.3

ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบต่างจตุวงแหวน (PRSV- CP) ที่ได้จากมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ KN 49, KN 1.2.3 และ construct ที่ใช้ถ่ายยีน มีขนาด 848 คู่เบส แพลรหัสเป็นกรดอะมิโน 283 เรซิดิวส์ และไม่มีการจัดเรียงตัวใหม่ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อเข้าไปสอดแทรกอยู่ในโครโมโซมของมะละกอ โดยมีความเหมือนกันของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์สูงถึง 99.1-99.8 เปอร์เซ็นต์ มีระดับความเหมือนกันของข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่ระดับ 98.2-99.3 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์ผลของ transgenes หรือยีน (PRSV- CP) ในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ต้านทาน KN 49 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้านทานปานกลาง KN 1.2.3 พบว่า จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่างๆ ด้วยเทคนิค dot blot hybridization จำนวน 1,320 ยีน มะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมทั้งสองสายพันธุ์ มีการแสดงออกของยีนต่างๆ ไม่แตกต่างกับมะละกอแขกนวลปกติไม่ถ่ายยีน แต่มีบางยีนที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันบ้าง ซึ่งสามารถนำยีนเหล่านั้นมาศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในศึกษาและพัฒนามะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมให้ดียิ่งขึ้นต่อไปในอนาคต

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น สนับสนุนแนวความคิดว่าความต้านทานที่เกิดกับมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ต้านทาน KN 49 และสายพันธุ์ต้านทานปานกลาง KN 1.2.3 น่าจะเป็นความต้านทานที่เกี่ยวข้องกับ gene silencing ในระดับ post-transcription

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กลุ่มเกษตรกร. 2547. เอกสารเผยแพร่กลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกมะละกอพันธุ์ปลักไม้ลาย. ตำบล ปลักไม้ลาย, กำแพงแสน, นครปฐม. 4 น.
- ถวิล ศรีสมชัย. 2518. การศึกษาโรคใบด่างมะละกอ. รายงานประจำปี. สำนักงานเกษตรและ สหกรณ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ท่าพระ, ขอนแก่น. 5 น.
- ทวีเกียรติ ยิ้มสวัสดิ์. 2527. มะละกอ. กรุงเทพมหานคร. 46 น.
- นุชนาถ วารินทร์, ศรีเมฆ ชาวโพพาง, อัญญา บุญชด, กนกวรรณ รมยานนท์, ราตรี รอดอารีย์, วิชัย ไชสิทธิ์ตัน และ สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2546. มะละกอพันธุ์ใหม่ต้านทานไวรัสใบด่าง จุดวงแหวนมะละกอ การประชุมวิชาการครั้งที่ 41, 3-7 กุมภาพันธ์ 2546 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน หน้า 539-546. (ภาคโปสเตอร์)
- ประพันธ์ นันระไชย. 2525. แนวทางการปรับปรุงพันธุ์มะละกอ. รายงานการประชุมสัมมนา การเกษตรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มะละกอ ครั้งที่ 1. สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ, ท่าพระ, ขอนแก่น. 183 น.
- วัฒนา สวรรยาธิปติ. 2531. การปลูกมะละกอ. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. 42 น.
- วิชัย ไชสิทธิ์ตัน. 2545. มะละกอและโรคใบด่างจุดวงแหวน. โครงการการถ่ายทอดเทคโนโลยีเพื่อ การผลิตส่วนขยายพันธุ์พืชคุณภาพดี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. 68 น.
- วิชัย ไชสิทธิ์ตัน, นิพนธ์ ทวีชัย, อรรณพ ชวัลการพาณิชย์ และ อีระ สูตะบุตร. 2533. ตำลึง: พืชอาศัยตามธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ, น. 383-391. ในรายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิไล ปราสาทศรี, อาทิตย์ พุ่งเกียรติไพบูลย์ และ เกษม ชมพูนุชประภา. 2525. การศึกษา เบื้องต้นใบด่างมะละกอในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ, ขอนแก่น. 15 น.

สันทนา วรรณกะลัศ. 2531. ความคืบหน้าของการวิจัยเกี่ยวกับการป้องกันกำจัดไวรัสในมะละกอ.
วารสารเคหการเกษตร 134: 43-46.

สุวรรณ อินทร์คงแก้ว. 2539. การปลูกมะละกอ. 64 น.

Baulcombe, D.C. 1996. Mechanism of pathogen-derived resistance to virus in transgenic plant. *The Plant Cell*. 85: 149-158

Bazan, J.E. and R.J. Fletterick. 1988. Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 7872-7876.

Beachy, R.N. 1993. Virus resistance through expression of coat protein gene, pp. 89-104. In I. (et al.). *Biotechnology in Plant Disease Control*. A John Wiley and Sons, Inc., Publication.

Beachy, R.N., S. Loesch-Fries and N.E. Tumer. 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 451-474.

Bryan, G.T., R.C. Gardner and R.L.H. Forster. 1992. Nucleotide sequence of the coat protein gene a stem-loop structure in the 3' regions of potyviruses. *Arch. Virol.* 124: 133-146.

Carrington, J.C., S.M. Cary, T.D. Parks and W.G. Dougherty. 1989. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J.* 8: 365-370.

Clak, W.G., J.H. Fitchen, A. Nejdat, C.M. Deom and R.N. Beachy. 1995a. Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus (TMV)II. Challenge by a mutant altered virion surface does not overcome resistance conferred by TMV coat protein. *J. Gen. Virol.* 76: 2613-2617.

Clak, W.G., J.H. Fitchen and R.N. Beachy. 1995b. Studies of coat protein-mediated resistance to TMV. *Virology* 208: 485-491.

- Dougherty, W.G. and J.C. Carrington. 1988. Expression and function of potyviral gene products. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 123–143.
- Dehio, C. and J. Schell. 1994. Identification of plant genetic loci involved in a post-transcription mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 5538–5542.
- Elmayan, T. and H. Vaucheret. 1996. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J.* 9: 787–797.
- English, J.J., E. Mueller and D.C. Baulcombe. 1996. Suppression of virus accumulation in transgenic plant exhibiting silencing of nuclear gene. *Plant Cell* 8: 179–188.
- Finnegan, E.J., R.K. Genger, W.J. Peacock and E.S. Dennis. 1998. DNA methylation in plant. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 49: 223–247.
- Fitch, M.M., R.M. Manshardt, D. Gonsalves, J.S. Slightom and J.C. Sanford. 1992. Virus resistant papaya plant derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot. *Bio/Tech.* 10: 1466–1472.
- Frenkel, M., C.W. Ward and D.D. Shukla. 1989. The use of 3' noncoding nucleotide sequence in the taxonomy of potyviruses : application to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus-N. *J. Gen. Virol.* 70: 2775–2780.
- Galun, E. and A. Breiman. 1997. *Transgenic Plant*. ICP, London. 376 p.
- Hamilton, A.J. and D.C. Baulcombe. 1999. A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plant. *Science* 286: 950–952.
- Hobbs, S.L.A., T.D. Warkentin and C.M.O. Delong. 1993. Transgenic copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Molecular Biology* 21: 17–26.

- Lain, S., J.L. Reichmann and J.A. Garcia. 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research*. 13: 157–172.
- Langenberg, W.G. 1986. Virus protein associated with cylindrical inclusion of two viruses that infect wheat. *J. Gen. Virol.* 67: 1161–1168.
- Lindbo, J.A., L. Silva-Rosales, W.M. Proebsting and W.G. Dougherty. 1993. Induction of highly specific antiviral state in transgenic plant: Implication for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749–1759.
- Lomonosoff, G.P. 1995. Pathogen-derived resistance to plant virus. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33: 323–343.
- Matzke, A.J.M. and J.M. Kooter. 2001. RNA: Guiding gene silencing. *Science* 293: 1080–1083.
- Powell-Abel, P., R.S. Nelson and B. De, N. Hoftman, S.G. Rogers, R.T. Fraley and R.N. Beachy. 1986. Delay disease development in transgenic plant that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738–743.
- Purcifull, D.E., J. Edwardson, E. Hiebert and D. Gonsalves. 1984. Papaya ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 292.
- Quemada, H.D., D. Gonsalves and J.L. Slightom. 1991. Expression of coat protein gene from cucumber mosaic virus strain C in tobacco: Protection against infection by CMV strains transmitted mechanically or by aphids. *Phytopathology* 81: 794–802.
- Register, J.C. and R.N. Beachy. 1988. Resistance to CMV in transgenic plant results from interference with an early event in infection. *Virology* 166: 524–532.
- Restrepo-Hartwig, W.A. and J.C. Carrington. 1992. Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *J. Virol.* 66: 5662–5666

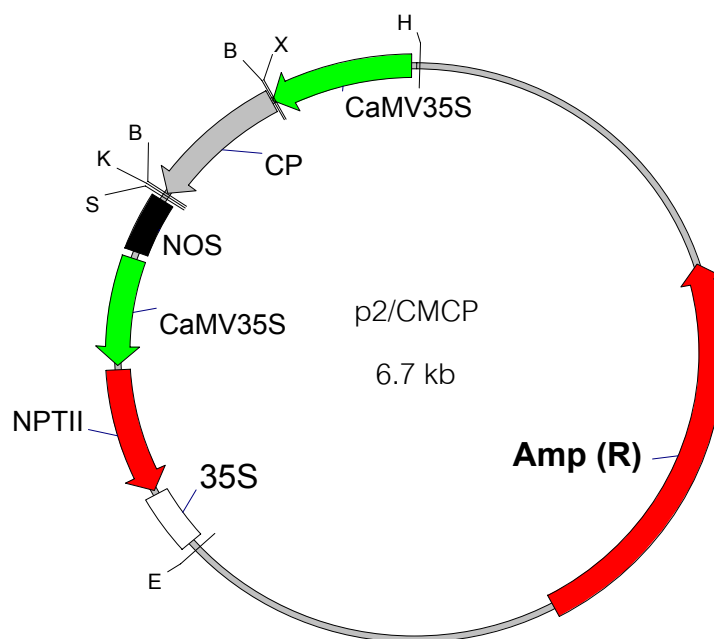
- Reimann-Phillipp, U. and R.N. Beachy. 1993. Coat protein-mediated resistance in transgenic tobacco expressing the tobacco mosaic virus coat protein from tissue specific promoter. *Mol. Plant-Microb Interact.* 6: 323-330.
- Riechmann, J.L., S. Lain and J.A. Garcia. 1989. The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of plum pox potyvirus. *J. Gen. Virol.* 70: 2785-2789.
- Riechmann, J.L., S. Lain and J.A. Garcia. 1992. Highlight and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73: 1-16.
- Robertson, D., S. Shore and D.M. Miller. 1997. Manipulation and expression of recombinant DNA: A laboratory Manual. Academic Press, New York. 204 p.
- Rodriguez-Cerezo. E. and J.G. Shaw. 1991. Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus infected cells. *Virology* 185: 572-579.
- Sanford, J.C. and S.A. Johnson. 1985. The concept of the parasite derived resistance: deriving resistance gene from the parasite's own genome. *J. Theor. Biol.* 113: 395-405.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 545 p.
- Shahabuddin, M., J.G. Shaw and R.E. Rhoads. 1988. Mapping of the tobacco vein mottling virus VPg cistron. *Virology* 163: 635-637.
- Shukla, D.D., M.J. Frenkel and C.W. Ward. 1991. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Can. J. Plant Pathol.* 13: 178-191.
- Shukla, D.D., P.M. Strike, S.L. Tracy, K.H. Gough and C.W. Ward. 1988. C-terminal of the coat protein of the potyviruses are surface located and the N terminus contains the major virus specific epitopes. *J. Gen. Virol.* 69: 1487-1508.

- Shukla, D.D. and C.W. Ward. 1988. Amino acid sequence of coat proteins as a basis of identification and classification of the potyvirus group. *J. Gen. Virol.* 69: 2703–2710.
- Shukla, D.D., C.W. Ward. and A.A. Brunt. 1994. *The potyviridae*. CAB international, Wallingford.
- Turpen, T. 1989. Molecular cloning of a potato virus Y genome: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. *J. Gen. Virol.* 70: 1951–1960.
- Vaucheret, H., C. Be'clin, T. Elmayan, F. Feuerbach, C. Godon, J.B. Morel, P. Mourrain, J.C. Palauqui and S. Vernhettea. 1998. Transgene-induced gene silencing in plant. *Plants J.* 16: 651–659.
- Verchot, J., E.V. Koonin and J.C. Carrington. 1991. The 35 KDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein function as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185: 527–535.
- Verwoerd, T.C, B.M.M. Dekker, and A. Hoekema. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17: 2362.
- Ward, C.W. and D.D. Shukla. 1991. Taxonomy of potyviruses; current problems and some solution. *Intervirology* 32: 269–296.
- Waterhouse, P.M., M.W. Graham, and M.B. Wang. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 13953–13964.
- Wisniewski, L.A., P.A. Powell, R.S. Nelson and R.N. Beachy. 1990. Local and systemic spread of tobacco mosaic virus in transgenic tobacco. *Plant cell.* 2: 559–567.

Yeh, S.D., H.J. Bau, Y.H. Cheng, Y.H. Yo and J.S. Yang. 1997. Greenhouse and field evaluations of coat protein transgenic papaya resistance to papaya ringspot virus. *Acta. Hort.* 461: 321–328.

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

ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 ภาพจำลองโครงสร้างของพลาสมิดสายผสม p2/CMCP ขนาด 6.7 กิโลเบส ที่ใช้สำหรับถ่ายยีน PRSV-CP ของเชื้อ PRSV สายพันธุ์ เชียงใหม่ในพลาสมิดพาหะ pUC 19 ให้กับมะละกอ