

**GENOME CHARACTERIZATION AND CONSTRUCTION OF
PAPAYA RINGSPOT VIRUS TYPE W (PRSV-W)
INFECTIOUS TRANSCRIPT**

PONGSOPEE ATTASART

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003**

ISBN 974-04-2887-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาเกี่ยวกับจีโนมและการสร้าง infectious transcript ของไวรัสโรคใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอสายพันธุ์ W (GENOME CHARACTERIZATION AND CONSTRUCTION OF PAPAYA RINGSPOT VIRUS TYPE W (PRSV-W) INFECTIOUS TRANSCRIPT).

พงโสภี อัดศาสตร์ 4038377 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : MILOSLAV JURICEK, Ph.D., สุณี เกิดบัณฑิต, Ph.D.

บทคัดย่อ

ไวรัสโรคใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอเป็นสาเหตุของโรคที่สำคัญในมะละกอในหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย ไวรัสนี้แบ่งเป็นสายพันธุ์ P และ W ซึ่งมีความใกล้เคียงกัน สามารถแยกความแตกต่างจากการก่อโรคในพืชต่างชนิดกัน การสร้าง RNA transcripts จาก full-length cDNA clones โดยวิธี *in vitro* หรือ *in vivo* transcription นับเป็นกุญแจสำคัญสำหรับใช้ศึกษาไวรัสในระดับโมเลกุล จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้เพื่อสร้าง infectious clones ของไวรัส PRSV สายพันธุ์ W และศึกษาจีโนมของไวรัสนี้

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งเส้น (10,323 เบส) ของจีโนมไวรัส PRSV-W พบว่านิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนกันกับไวรัส PRSV ที่พบในแหล่งอื่นๆในระดับ 83-95% และมีกรดอะมิโนเหมือนกันในระดับ 91-97% แต่ไม่พบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ P และ W ที่สามารถบ่งชี้ถึงการก่อโรคในพืชต่างชนิดกัน

งานวิจัยนี้ได้สร้างพลาสมิดหลายชนิด ทั้งพลาสมิดที่ประกอบด้วย cDNA ทั้งเส้นของ PRSV-W และพลาสมิดที่มี cDNA ถูกผสมระหว่าง PRSV-W และ P โดยพลาสมิด T7-fl-W ที่ได้จากการประกอบกันของ cDNA 3 ชิ้นของ PRSV-W และควบคุมโดยโปรโมเตอร์ T7 นั้นไม่เสถียรใน *E. coli* ขณะที่พลาสมิด pSA1155, pSA1164 และ pSA1273 ประกอบด้วย cDNA สายเต็มของ PRSV-W ควบคุมโดยโปรโมเตอร์ CaMV 35S แบบ partially duplicated และ NOS terminator โดย pSA1155 ได้จากการประกอบกันของ cDNA 3 ส่วน pSA1164 ได้จากการแทนที่ลิเอ็นเอขนาด 9 กิโลเบสใน pSA1155 ที่ตำแหน่ง *KpnI* ถึง *SacII* ด้วยลิเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนจาก PRSV-W โดยวิธี RT-PCR pSA1273 คือ pSA1164 ที่มีการเปลี่ยนเบสที่ตำแหน่ง 9,985 ซึ่งทำให้ตำแหน่งในการตัดของเอ็นไซม์ *PstI* หายไป เพื่อใช้แยกโคลนออกจากไวรัสในธรรมชาติ พลาสมิดที่มี cDNA ถูกผสมระหว่าง PRSV -W และ P มี 2 ชนิดคือ pSA1135 ซึ่งควบคุมโดยโปรโมเตอร์ T7 และ pSA1151 ควบคุมโดยโปรโมเตอร์ CaMV 35S แบบ partially duplicated

เมื่อนำพลาสมิด pSA1164 และ pSA1273 เข้าพืชโดยวิธี particle gun bombardment พบว่า pSA1164 สามารถก่อโรคใน zucchini ได้สูงถึง 90.0% และในฟักทองได้ 73.3% ขณะที่ pSA1273 ก่อโรคใน zucchini ได้ 50.0% การเกิดโรคใช้เวลานานกว่าไวรัสในธรรมชาติ 1-2 สัปดาห์ ในขณะที่พลาสมิด pSA1151 และ pSA1155 และ capped-*in vitro* transcript ของพลาสมิด pSA1135 ไม่ก่อให้เกิดโรคในพืชทดสอบเมื่อใช้วิธี mechanical inoculation

พลาสมิดที่มี cDNA สายเต็มของ PRSV-W ที่สามารถก่อโรคในพืชที่สร้างขึ้นในการศึกษาดังนี้ จะเอื้ออำนวยให้สามารถศึกษาหาส่วนของยีนของไวรัส PRSV-W และ P ที่เกี่ยวข้องกับความจำเพาะในการก่อโรคในพืชต่างชนิดกัน โดยใช้วิธีการสร้างไวรัสลูกผสมต่อไป

245 หน้า ISBN 974-04-2887-8

GENOME CHARACTERIZATION AND CONSTRUCTION OF PAPAYA RINGSPOT VIRUS TYPE W (PRSV-W) INFECTIOUS TRANSCRIPT

PONGSOPEE ATTASART 4038377 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: MILOSLAV JURICEK, Ph.D., SUNEE KERTBUNDIT, Ph.D.

ABSTRACT

Papaya ringspot virus (PRSV) causes a serious disease of papaya in many countries including Thailand. Its two closely related strains, P and W, can only be distinguished by host specificity. Synthesis of biologically functional RNA transcripts from the full-length cDNA clones via *in vitro* or *in vivo* transcription plays a key role in the further research of PRSV at the molecular level. The aims of this thesis were to generate infectious clones of PRSV-W as well as to characterize the PRSV-W genome.

Complete nucleotide sequence of the full-length PRSV-W cDNA (10,323 bp) was determined. Overall similarity with other isolates of PRSV of 83-95% at nucleotide level and 91-97% at amino acid level were observed. There was no consistent sequence difference between PRSV-P and PRSV-W isolates that would obviously account for their host range difference.

Several plasmids containing the full-length of a Thai isolate of PRSV-W cDNA and chimeric cDNA of PRSV-W and PRSV-P was constructed. The plasmid T7-fl-W, containing the full-length of three overlapping PRSV-W cDNA under the control of T7 promoter was not stable in the *E.coli* host system. Plasmids, pSA1155, pSA1164 and pSA1273, containing the full-length PRSV-W cDNA under the control of partially duplicated CaMV 35S promoter and NOS terminator were constructed. The pSA1155 was obtained by assembling three overlapping cDNA fragments while the pSA1164 was obtained by replacement of the 9 kb *KpnI-SacII* fragment of pSA1155 with the corresponding RT-PCR amplified fragment of PRSV-W. The pSA1273, where the *PstI* recognition site at position 9,985 of pSA1164 was removed, was also constructed in order to distinguish cloned cDNA from the native virus. Chimeric cDNA clones were also constructed downstream from the T7 promoter (pSA1135) and from the partially duplicated 35S promoter (pSA1151).

High infectivity of pSA1164 on zucchini (90.0%) and on pumpkin (73.3%) plants while 50.0% infectivity of pSA1273 on zucchini were obtained by particle gun bombardment. A one to two week delay of symptom development was observed when compared with the native viral infection, whereas no symptoms were observed using mechanical inoculation of tested plants with capped *in vitro* transcript of pSA1135 or with DNA of pSA1151 and pSA1155.

The infectious cDNA copy of the PRSV-W genome produced in this study would provide the possibility to map the viral sequences involved in the host specificity of type P and W by construction of chimeric viruses in future experiments.

KEY WORDS : PAPAYA RINGSPOT VIRUS TYPE W / COMPLETE SEQUENCE / INFECTIOUS CLONE

245 p. ISBN 974-04-2887-8