ANALYSIS OF PAPAYA LINES TRANSFORMED WITH *Papaya ringspot virus* GENES

SUCHADA SAENGWIMAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004

ISBN 974-04-5023-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การตรวจวิเคราะห์มะละกอที่ได้รับการถ่ายฝากยีนจากเชื้อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ
(ANALYSIS OF PAPAYA LINES TRANSFORMED WITH *Papaya ringspot virus* GENES)

สุชาดา แสงวิมาน 4436435 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

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

บทคัดย่อ

ไวรัสโรคใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอเป็นโรคที่สำคัญซึ่งสร้างความเสียหายเป็นอย่างมากต่อการปลูกมะละกอทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก การควบคุมการระบาดของโรคด้วยวิธีดั้งเดิมยังไม่ประสบผลสำเร็จ วิธีที่ได้ผลมากที่สุดคือการถ่ายยีนของไวรัสเข้าสู่พืช เพื่อเหนี่ยวนำให้พืชต้านทานไวรัสได้ ในการวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์มะละกอที่ได้รับการถ่ายยีน โปรตีนเปลือกหุ้ม (*cp*) ยีน หรือ ยีน ของ ไวรัสโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

ผลจาก PCR พบว่ามะละกอ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 16001, 15001-15004 ซึ่งได้รับการถ่ายยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และ สายพันธุ์ 39001 และ 39001 ซึ่งได้รับการถ่ายฝากยีน *NIb* ประสบความสำเร็จในการถ่ายฝากยีนไวรัส ในขณะที่มะละกอ 130 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถตรวจสอบการมีอยู่ของยีนไวรัส ถูกตรวจสอบผลซ้ำด้วย PCR โดยใช้ primer ต่างชุดและตรวจสอบโดย Southern blot ปรากฏว่าผลยังคงเป็นลบ จึงสรุปว่ามะละกอเหล่านี้ไม่มียีนของไวรัส จากผลของ Southern blot ในมะละกอสายพันธุ์ 15001-15004, 39001 และ 39002 พบว่าในมะละกอทุกสายพันธุ์มียีนของไวรัสอยู่เป็นจำนวนหลายสำเนาและมีการจัดเรียงตัวใหม่เกิดขึ้น จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-PCR ในมะละกอสายพันธุ์ 15001-15004 ตรวจสอบพบการแสดงออกของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มในประมาณน้อยของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มสมบูรณ์ขนาด 0.96 กิโลเบส และของยีนทางด้าน 3’ ขนาด 0.6 กิโลเบส ขณะเดียวกันพบการแสดงออกของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มปริมาณมากทางด้าน 5’ การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NIb* พบการแสดงออกของยีนขนาด 1.6 กิโลเบส ในการตรวจสอบยีน *uidA* พบว่ามียีน *uidA* หลายสำเนาและพบการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนในดีเอ็นเอของพืช มีการแสดงออกของยีน *uidA* ในระดับ mRNA ในมะละกอทุกสายพันธุ์ การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน GUS ด้วยวิธี Fluorometric และ Histochemical staining พบว่ามะละกอทุกสายพันธุ์มีการแสดงออกของโปรตีน แตกต่างกัน การตรวจสอบความต้านทานต่อไวรัสในมะละกอดัดแปรสายพันธุ์ทั้งหมดพบว่า มะละกอมีการแสดงออกของความต้านทานในหลายระดับ ตั้งแต่ไม่ต้านทานโรค ทำให้เกิดโรคช้าลง หรือต้านทานโรค ซึ่งน่าจะมีผลมาจากอายุของมะละกอและสิ่งแวดล้อม

114 หน้า ISBN 974-04-5023-7

ANALYSIS OF PAPAYA LINES TRANSFORMED WITH *Papaya ringspot virus* GENES

SUCHADA SAENGWIMAN 4436435 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

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

ABSTRACT

Papaya ringspot virus (PRSV) is a serious disease of papaya (*Carica papaya*) in Thailand and throughout the world. Conventional methods have failed to control PRSV infection. An alternative method is the transformation of plants with the viral gene which could confer virus resistance. In this study, 137 lines of papayas transformed with *cp*, *NIb* or HC-Pro genes of PRSV were analyzed.

The integrated viral transgenes were amplified from five *cp*-transformed papayas (16001, 15001-15004) and two *NIb* transformed papayas (39001 and 39002) using primers specific to the viral genes. Negative amplification results of 130 remaining papaya lines were confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) using different primers and Southern blot analysis. The results were negative as well. It suggested that these papayas did not contain any viral genes. Southern blot hybridization of transgenic papaya lines 15001-15004, 39001 and 39002 revealed multiple and rearranged bands of viral transgenes. Truncated *cp* bands were also detected from transgenic papaya lines 15003 and 15004. RT-PCR analysis of viral transgene transcription in transgenic papaya lines 15001-15004 revealed weak amplified bands of 0.96 kb of full-length *cp* and 0.6 kb of 3'end *cp* whereas the strong 0.3 kb fragment was amplified from the 5'end of *cp*. In the *NIb*-transgenic papaya lines 39001 and 39002, the RT PCR result showed 1.6 kb *NIb* transcription product. The existence and the expression of *uidA* reporter gene in transgenic papayas were also analyzed. Southern blot hybridization displayed multiple copies of *uidA* gene. The 1.8 kb *uidA* transcription product was amplified from all transgenic papayas by RT-PCR. Histochemical staining and fluorometric analysis of the *uidA* protein revealed that GUS expression from all transgenic papaya lines were varied. The PRSV resistance of all transgenic papayas was evaluated by mechanical inoculation. The results showed that various degrees of resistance from susceptible, to delayed, to resistant phenotypes, were observed in all transgenic lines thus, making this method potentially effective. However, the resistant phenotypes may have been influenced by the plant development stage or environmental factors and further research is needed to investigate this.

KEY WORDS: PAPAYA RINGSPOT VIRUS / TRANSGENE / TRANSFORMATION / VIRUS RESISTANCE /

114 pp. ISBN 974-04-5023-7