

**INVESTIGATION OF COAT PROTEIN AND RNAi  
TRANSFORMATION STRATEGIES FOR PROTECTION OF  
CANTALOUPE (*Cucumis melo* L. cv. Sun Lady) FROM  
INFECTION BY PRSV TYPE W**

**PONGRIT KRUBPHACHAYA**

**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  
2007**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การหาวิธีในการถ่ายยีนโปรตีนเปลือกหุ้มและRNAi เพื่อป้องกันแคนตาลูปจากการติดเชื้อไวรัสโรค  
ใบต่างจุดวงแหวนในมะละกอสชนิด W (INVESTIGATION OF COAT PROTEIN  
AND RNAi TRANSFORMATION STRATEGIES FOR PROTECTION OF  
CANTALOUPE (*Cucumis melo* L. cv. Sun Lady) FROM INFECTION BY  
PRSV TYPE W)

พงษ์ฤทธิ ครบปรัชญา 4437589 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สุณี เกิดบัณฑิต, Ph.D., วราภรณ์ อัครปฐมวงศ์, Ph.D., สกล  
พันธุ์เยี่ยม, Ph.D., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.,

บทคัดย่อ

ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มและยีน *HC-Pro* ของไวรัสโรคใบต่างจุดวงแหวนในมะละกอสชนิด W ถูกนำมาใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่แตงเคลตาลูปสายพันธุ์ Sun Lady เพื่อสร้างพืชตัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานต่อไวรัสโรคใบต่างจุดวงแหวนในมะละกอสชนิด W โดยการสร้างพลาสมิดที่มียีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสเป็นแบบเต็มยีน (pSA1175) แบบกลับทิสซ้ำ (inverted-repeat) (pSA1304) และยีน *HC-Pro* แบบกลับทิสซ้ำ (pSA1325) ภายใต้การควบคุมการทำงานของ 35S *CaMV* promoter นำพลาสมิดเหล่านี้เข้าสู่ใบเลี้ยงของแคนตาลูปสายพันธุ์ Sun Lady โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* จากการทดลองพบว่าการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pSA1325 ไม่ได้พืชตัดแปรพันธุกรรม แต่จากการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pSA1304 ได้พืชตัดแปรพันธุกรรม 4 สายพันธุ์ และการถ่ายยีนด้วย พลาสมิด pSA1175 ได้พืชตัดแปรพันธุกรรม 1 สายพันธุ์ ได้ทำการพิสูจน์ว่ามียีนโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสโรคใบต่างจุดวงแหวนในมะละกอสชนิด W อยู่ในสารพันธุกรรมของพืชตัดแปรพันธุกรรมที่ได้เหล่านี้โดยวิธีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS และวิธี Southern blot hybridization จากการปลูกเชื้อไวรัสโรคใบต่างจุดวงแหวนในมะละกอสชนิด W บนพืชตัดแปรพันธุกรรมเหล่านี้ในเขตทดลองพบว่า พืชตัดแปรพันธุกรรมทั้ง 4 สายพันธุ์ที่มี พลาสมิด pSA1304 อยู่ต้านทานต่อเชื้อไวรัส ในขณะที่พืชตัดแปรพันธุกรรม 1 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pSA1175 อยู่พบว่าไวต่อเชื้อ การพบ small RNA ที่มีลำดับเบสตรงกับส่วนของยีนสร้างโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสในพืชตัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสโรคใบต่างจุดวงแหวนในมะละกอสชนิด W แสดงให้เห็นว่ากระบวนการ post-transcriptional gene silencing เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานต่อไวรัส

INVESTIGATION OF COAT PROTEIN AND RNAi TRANSFORMATION STRATEGIES FOR PROTECTION OF CANTALOUPE (*Cucumis melo* L. cv. Sun Lady) FROM INFECTION BY PRSV TYPE W

PONGRIT KRUBPHACHAYA 4437589 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: SUNEE KERTBUNDIT, Ph.D., VARAPORN AKKARAPATUMWONG, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D.

ABSTRACT

The coat protein and the *HC-Pro* genes of PRSV type W were used to transform into cantaloupe cultivar Sun Lady in order to confer their resistance to PRSV type W. Binary vectors containing the full length coat protein coding region under control of the 35S *CaMV* promoter (pSA1175), the inverted-repeat of a coat protein coding region (pSA1304) and the inverted-repeat of a *HC-Pro* coding region (pSA1325), were constructed and used for *Agrobacterium*-mediated transformation. No transgenic plant was obtained from transformation using pSA1325. Four independent transgenic lines were obtained using pSA1304 and one using pSA1175. Integration of the PRSV-W *cp* gene into the genome of these transgenic lines was verified by PCR amplification, GUS assays and Southern blot hybridization. *In vitro* inoculation of these lines with PRSV-W revealed that the line containing pSA1175 remained sensitive while the four lines containing pSA1304 were resistant. The presence of small RNA species corresponding to regions of the viral *cp* gene in transgenic lines resistant to PRSV-W supports the involvement of post-transcriptional gene silencing in the establishment of resistance.

KEY WORDS: PRSV type W / COAT PROTEIN GENE/ HC-Pro GENE/ INVERTED-REPEAT / *In vitro* INOCULATION/VIRUS RESISTANCE/ siRNA/POST-TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING

171 P.