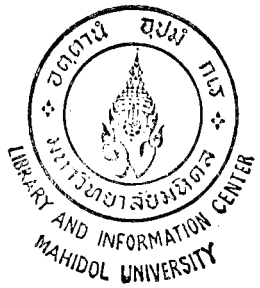
21 JUL 2000



CONSTRUCTION OF FULL-LENGTH PAPAYA RINGSPOT VIRUS TYPE P THAI STRAIN CASSETTES FOR *IN VIVO* TRANSCRIPTS AND PRODUCTION IN PAPAYA PLANT

GULSIRI CHAROENSILP

ดุลสิริ เจริญศิลป์
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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
2000

ISBN 974-664-396-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
G973c
2000
c.2
44992 c.2

Copyright by Mahidol University

4036146 MBMG/M : MAJOR: MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING; M. Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
KEY WORDS : PAPAYA RINGSPOT VIRUS / FULL-LENGTH cDNA / *IN VIVO* TRANSCRIPT / CaMV 35S PROMOTER

GULSIRI CHAROENSILP : CONSTRUCTION OF THE CASSETTES OF FULL-LENGTH PAPAYA RINGSPOT VIRUS TYPE P THAI STRAIN FOR *IN VIVO* TRANSCRIPTS AND PRODUCTION IN PAPAYA PLANT. THESIS ADVISORS: MILOSLAV JURICEK, Ph.D., SUNEE KERTBUNDIT, Ph.D.,167 p. ISBN 974-664-396-7

Papaya ringspot virus (PRSV) is a major limiting factor in Thailand's papaya production. The 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. When the molecular biology of PRSV is clearly understood, effective methods for controlling PRSV can be developed. This thesis focuses on development of an effective method that can generate infectious RNA transcripts *in vivo* from Thai isolate of PRSV, type P.

Three plasmid cassettes for *in vivo* and *in vitro* transcription of papaya ringspot virus type P were constructed. The *in vivo* expression cassettes were composed of CaMV 35S promoter or partially duplicated CaMV 35S promoter, the 5′ end combined with 3′ end of PRSV at *Sac*I site, the 127 bp of artificial poly (A) tail and the NOS terminator. The vectors were named pSA1078 (single 35S promoter) and pSA1079 (partially duplicated 35S promoter). The *in vitro* PRSV transcription cassette contains T7 promoter, the full length of papaya ringspot cDNA, the 127 bp of artificial poly(A) tail and the NOS terminator (pSA1110).

The three overlapping fragments of a 10.3-kb full-length of Thai isolate of the PRSV genomic cDNA were obtained by RT-PCR technique. All three fragments were combined by sequential cloning to obtain the full-length cDNA clone of PRSV under the T7 promoter (pSA1100 plasmid). A 9.5 kb *Sac*I fragment from pSA1100 was further cloned into both *in vivo* expression cassettes to obtain the full-length cDNA clones of PRSV under single CaMV 35S promoter (pSA1101) and partially duplicated 35S promoter (pSA1102).

The two full-length cDNA plasmids, pSA1101 and pSA1102 were used to infect papaya plants by mechanical inoculation. Plasmid pSA1110 was used as a negative control while live virus particles were used as positive control. Only 30 % of the positive control plants showed severe symptoms at three weeks post-inoculation while no symptom was so far seen in remaining plants.

These findings suggest that further research in the development of infectious RNA transcripts *in vivo* from Thai isolate of PRSV, type P is required.

Copyright by Mahidol University

4036146 MBMG/M : สาขาวิชา: อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์; วท.ม.
(อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

กุลศิริ เจริญศิลป์: การสร้าง cassettes ของจีโนมไวรัสใบด่างจุดวงแหวน type P สายพันธุ์ไทยสำหรับ *in vivo* transcripts และทดสอบการก่อโรคในพืช (CONSTRUCTION OF THE CASSETTES OF FULL-LENGTH PAPAYA RINGSPOT VIRUS TYPE P THAI STRAIN FOR *IN VIVO* TRANSCRIPTS AND PRODUCTION IN PAPAYA PLANT) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : Miloslav Juricek, Ph.D., สุณี เกิดบัณฑิต, Ph.D., บูรชัย สนธยานนท์, Ph.D. 167 หน้า ISBN 974-664-396-7

ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนก่อโรคที่เป็นปัญหาสำคัญต่อการผลิตมะละกอในประเทศไทย การสร้าง RNA transcripts จาก full-length cDNA clones โดยใช้วิธี *in vitro* หรือ *in vivo* transcription นับเป็นกุญแจที่สำคัญสำหรับใช้ศึกษาไวรัสนี้ในระดับโมเลกุล เพื่อนำความรู้ไปใช้ในการควบคุมการระบาดของไวรัส ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาและพัฒนาวิธีการสร้าง infectious RNA transcripts *in vivo* ของไวรัส PRSV type P ที่ระบาดในประเทศไทย

ได้สร้างพลาสมิดที่มี plant expression cassettes ขึ้น 3 ชนิด เพื่อใช้สำหรับ *in vivo* และ *in vitro* transcription ของ ไวรัส PRSV type P พลาสมิดสองชนิดแรกที่ใช้สำหรับ *in vivo* transcription ประกอบด้วยส่วนโปรโมเตอร์ของ CaMV 35S (แบบ single และแบบ partially duplicated), ปลายด้าน 5' และ 3' ของจีโนมของไวรัส PRSV เชื่อมต่อกันที่จุดตัดเอนไซม์ *Sac*I, ส่วนปลาย poly(A) tail ที่มีขนาด 127 เบส และส่วนควบคุม Nos terminator พลาสมิดนี้ชื่อ pSA1078 (มีส่วนโปรโมเตอร์ของ CaMV 35S แบบ single) และ pSA1079 (มีส่วนโปรโมเตอร์ของ CaMV 35S แบบ partially duplicated) พลาสมิดที่ใช้สำหรับ *in vitro* expression นั้น ประกอบด้วย T7 promoter, จีโนมของไวรัส, ส่วนปลาย poly(A) tail ที่มีขนาด 127 เบส และส่วนควบคุม Nos terminator (ให้ชื่อว่าพลาสมิด pSA1110)

ได้สร้าง genomic cDNA ของไวรัส PRSV มีความยาว 10.3 กิโลเบส โดยนำชิ้นดีเอ็นเอย่อย 3 ชิ้นที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR มาเชื่อมต่อกันเป็นชิ้นเดียวในพลาสมิด pSA1100 โดยวางอยู่ต่อกับ T7 promoter ได้ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 9.5 กิโลเบสจากพลาสมิด pSA1100 ด้วยเอนไซม์ SacI แล้วตัดต่อเข้ากับพลาสมิดสำหรับ *in vivo* transcription ทำให้ได้ full length cDNA clones ของไวรัส PRSV ภายใต้การควบคุมโปรโมเตอร์ CaMV35S แบบ single (ให้ชื่อว่าพลาสมิด pSA1101) และแบบpartially duplicated (ให้ชื่อว่าพลาสมิด pSA1102)

นำพลาสมิด pSA1101 และ pSA1102 มาทดสอบการก่อโรคในต้นมะละกอเปรียบเทียบกับ pSA1110 และไวรัส PRSV พบว่ามีเพียง 30% ของมะละกอที่ได้รับเชื้อ PRSV เท่านั้นที่แสดงอาการโรคขณะที่มะละกออื่นๆที่ทำการทดสอบไม่แสดงอาการ

Copyright by Mahidol University