2 9 JUN 2001

TRANSFORMATION AND CHARACTERIZATION OF TOBACCO AND MUSKMELON WITH PAPAYA RINGSPOT VIRUS NIb GENE

PONGRIT KRUBPHACHAYA

ได้รับมอบวิทยานิพนธ์
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS and GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2001

ISBN 974-665-527-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
P769t
2001
C.2

Copyright by Mahidol University

4137909 MBMG/M : MAJOR: MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING; M.Sc (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
KEY WORDS : PAPAYA RINGSPOT VIRUS / NUCLEAR INCLUSION b GENE (*NIb*), TRANSLATABLE, NON- TRANSLATABLE / BINARY VECTOR / TOBACCO / CUCUMIS MELO / AGROBACTERIUM TUMEFACIENS / TRANSFORMATION / RESISTANT PLANT

PONGRIT KRUBPHACHAYA: TRANSFORMATION AND CHARACTERIZATION OF TOBACCO AND MUSKMELON WITH PAPAYA RINGSPOT VIRUS *NIb* GENE. THESIS ADVISORS: SUNEE KERTBUNDIT, Ph.D., MILA JURICEK, Ph.D. 132 p. ISBN 974-665-527-2.

Papaya ringspot virus (PRSV) causes a serious disease in papaya (*Carica papaya)* and some cucurbit plant species, resulting in a large reduction in the yield of commercial crops. It can only be marginally controlled by conventional methods. The alternative way is by transforming plants with the viral gene which would generate a transgenic plant which would be resistant to the virus, based on the concept of pathogen-derived resistance. In this thesis, a binary vector containing the PRSV translatable *NIb* gene was constructed and transformed into tobacco and muskmelon. A parallel experiment was done with a vector containing a non-translatable *NIb* gene, which was previously constructed. This experimental design can reveal both the putative NIb-mediated protection as well as if it occurs on the protein or RNA level.

The PRSV type P *NIb* gene was amplified with specific primers by the PCR technique and cloned into pSA1032 with translatable under the CaMV 35S promoter. The *NIb*-expression cassette was isolated and cloned into the T-DNA region of the pSA1001 plasmid. The resulting *NIb*-binary vector was mobilized into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 by conjugation. Tobacco and muskmelon plants were transformed with A. *tumefaciens* strain EHA101, containing both translatable and non-translatable *NIb* gene. Eleven tobacco lines transformed with non-translatable *NIb* gene were obtained and 6 tobacco lines transformed with translatable *NIb* gene were selected and the presence of *NIb* gene insertion was verified. All of the 17 independently transformed lines showed susceptibility to infection with potato virus Y. Three muskmelon lines transformed with non-translatable *NIb* gene were obtained and two of the three lines contain intact *NIb* gene insertion. Both two independently transformed lines showed susceptibility to infection with PRSV type W. Transgenic tobacco plants containing the *NIb* gene of PRSV type P could not confer the resistance to potato virus Y. The resistance to PRSV type W was not observed in the two screen lines of muskmelon as well.

Copyright by Mahidol University

4137909 MBMG/M : สาขาวิชา: อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์: วท.ม.
(อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

พงษ์ฤทธิ์ ครบปรัชญา: การถ่ายยีนและการศึกษาคุณลักษณะของยีน *NIb* ของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอในต้นยาสูบและแตงไทย (TRANSFORMATION AND CHARACTERIZATION OF TOBACCO AND MUSKMELON WITH PAPAYA RINGSPOT VIRUS *NIb* GENE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุณี เกิดบัณฑิต, Ph.D., Mila Juricek, Ph.D. 132 หน้า. ISBN 974-665-527-2.

ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอ (Papaya ringspot virus) เป็นสาเหตุของโรคระบาดที่พบในมะละกอและพืชกลุ่มแตง ทำให้ผลผลิตของพืชลดลงเป็นอย่างมาก การใช้วิธีดั้งเดิมควบคุมโรคได้เพียงบางส่วน การใช้เทคนิคการถ่ายยีนของไวรัสเข้าสู่พืชสามารถสร้างพืชดัดแปลงทางพันธุกรรมซึ่งต้านทานต่อไวรัส (pathogen-derived resistance) งานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้ยีน *NIb* ของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอชนิด P ในการป้องกันโรคไวรัสในต้นยาสูบและแตงไทย โดยทำการสร้างพลาสมิดพาหะที่มียีน *NIb* ที่อ่านเป็นโปรตีนนี้ได้ (translatable) และนำเข้าสู่ต้นยาสูบและแตงไทย และทำการทดลองคู่ขนานโดยใช้พลาสมิดพาหะที่มียีน *NIb* ที่ไม่สามารถอ่านเป็นโปรตีนนี้ได้ (non-translatable) ซึ่งถูกสร้างขึ้นก่อนหน้านี้เป็นการเปรียบเทียบ

ยีน *NIb* ของเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอชนิด P ถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะ และโคลนชิ้นยีนเข้าเวคเตอร์ pSA1032 เพื่อให้มีรหัสแปลโปรตีนที่อ่านได้ภายใต้การควบคุมของ CaMV 35S โปรโมเตอร์ ได้ทำการแยกยีนพร้อมชุดควบคุมการแสดงออกของยีน *NIb* และโคลนลงในบริเวณ T-DNA ของ พลาสมิด pSA1001 ย้ายพลาสมิดที่ได้เข้าสู่เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 โดยวิธี conjugation เพื่อใช้นำพลาสมิดเข้าสู่ต้นยาสูบและแตงไทย จากการทดลองถ่ายยีนในต้นยาสูบ ได้ต้นยาสูบแปลงพันธุ์จำนวน 17 สายพันธุ์ โดย 11 สายพันธุ์มียีน *NIb* ที่อ่านระหัสโปรตีนไม่ได้และ 6 สายพันธุ์มียีน *NIb* ที่อ่านโปรตีนได้ การทดสอบปลูกเชื้อ Potato virus Y ในต้นยาสูบแปลงพันธุ์ทั้ง 17 สายพันธุ์ พบว่าต้นยาสูบทั้งหมดแสดงอาการติดเชื้อไวรัส ส่วนการทดลองถ่ายยีนในแตงไทยได้ต้นแตงไทยแปลงพันธุ์จำนวน 3 สายพันธุ์โดย 2 สายพันธุ์มียีน *NIb* ที่อ่านเป็นโปรตีนไม่ได้ แต่อีก 1 สายพันธุ์ตรวจไม่พบยีน *NIb* ดังกล่าว การทดสอบปลูกเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอชนิด W ในต้นแตงไทย 1 สายพันธุ์ที่มียีน *NIb* ที่อ่านรหัสโปรตีนไม่ได้และ 1 สายพันธุ์ที่ตรวจไม่พบยีนดังกล่าว พบว่าต้นแตงไทยแปลงพันธุ์ทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงอาการติดเชื้อไวรัส

Copyright by Mahidol University