

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีน *CpRDR6* ที่เกี่ยวข้องกับ  
ความต้านทานโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ  
**Comparative Nucleotide Sequences and Expression Pattern of *CpRDR6*  
Gene Related to *Papaya Ringspot Virus* Resistance**

อรุณทัย ซาววา<sup>1/, 2/, 3/</sup> วันวิสา ศิริวรรณ<sup>4/</sup> ศรีเมฆ ชาวโพงพาง<sup>1/, 2/, 4/, 5/,\*</sup>

Aroonothai Sawwa<sup>1/, 2/, 3/</sup> Wanwisa Siriwan<sup>4/</sup> Srimek Chowpongpan<sup>1/, 2/, 4/, 5/,\*</sup>

---

**ABSTRACT**

Papaya (*Carica papaya* L.) is an economically important fruit crop in Thailand. Its production is facing with a serious problem of papaya ring spot disease outbreak caused by Papaya Ring Spot Virus or PRSV. Several previous reports revealed that *RDR6* gene were involved in RNA silencing and was related to plant viral defense mechanisms. The objectives of this experiment were to compare *CpRDR6* nucleotide sequences in three papaya varieties, Khak-Dam, Florida and Khon-Kean including the expression levels in Khak-Dam (susceptible) and Florida (resistance) when infected by PRSV. The comparison of nucleotide sequences showed the partial sequence was 1,125 bp, located in a part of *RDR6* protein superfamily in the first exon region. There were differences in one position at 292 where Cytosine (C) was presented in Florida, while in Khak-Dam variety it was Adinine (A) and Khon-Khan 80 both Cytosine (C) and Adinine (A) were found. The measuring results of *CpRDR6* gene expression levels revealed that the highest expression level were detected at 5 and 9 days after inoculation in Khak-Dam and Florida respectively. The development of symptoms appeared as chlorosis of leaf veins at 7 days in Khak-Dam and 9 days in Florida. The level of *CpRDR6* gene expression in susceptible variety was higher than that of the resistance variety.

**Key words:** Papaya, PRSV, RNA-dependent RNA polymerases 6, gene expression

---

<sup>1/</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140  
(Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand)

<sup>2/</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานับพันธุศาสตร์และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ  
การอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900 (Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE),  
Bangkok 10900, Thailand)

<sup>3/</sup> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ. ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110 (Biotechnology Research and Development  
Office, Department of Agriculture, Thanyaburi, Pathumthani, 12110, Thailand)

<sup>4/</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900  
(Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Khet Chatuchak, Bangkok, 10900, Thailand)

<sup>5/</sup> ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จ.ปทุมธานี 12120 (National Center for Genetic  
Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Pathum Thani, Thailand, 12120)

\*Corresponding author: aroonothai.s@doa.in.th

## บทคัดย่อ

มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มักประสบปัญหาการระบาดของโรคไวรัสใบต่างจุดวงแหวน ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญและมีผลกระทบต่อการผลิตมะละกอในประเทศไทยอย่างมาก มีสาเหตุมาจากไวรัสใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ (*Papaya ringspot virus*, PRSV) จากรายงาน พบว่า ยีน *RDR6* อยู่ในกระบวนการ RNA silencing และเกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อไวรัส การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* ในมะละกอ 3 พันธุ์ ได้แก่ แยกดำ ฟลอริดา และขอนแก่น 80 และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *CpRDR6* ในมะละกอ แยกดำ (พันธุ์อ่อนแอ) และฟลอริดา (พันธุ์ทนทาน) ที่ถูกเข้าทำลายด้วยไวรัสสาเหตุโรคใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ ผลจากการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,125 คู่เบส ในส่วนของโปรตีน super family ใน exon 1 พบว่า มีความแตกต่างกันของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 292 ซึ่งมีลำดับเบส C (cytosine) ในพันธุ์ฟลอริดา ในขณะที่พันธุ์แยกดำ พบลำดับเบส A (adenine) และพันธุ์ขอนแก่น 80 พบทั้ง C และ A ผลจากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *CpRDR6* ในมะละกอสายพันธุ์อ่อนแอและต้านทาน พบว่า มะละกอพันธุ์แยกดำซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ มีการแสดงออกของยีนสูงสุดในวันที่ 5 และในสายพันธุ์ฟลอริดาซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานมีการแสดงออกของยีนในวันที่ 9 หลังจากการปลูกเชื้อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ สำหรับการแสดงอาการของโรคในพันธุ์แยกดำและฟลอริดา เริ่มแสดงอาการเส้นใบซีดใน 7 และ 9 วัน หลังการปลูกเชื้อไวรัส นอกจากนี้ พบว่าการแสดงออกของยีน *CpRDR6* ในพันธุ์อ่อนแอจะสูงกว่าพันธุ์ต้านทาน

**คำสำคัญ:** มะละกอ, ไวรัสใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ, อาร์เอ็นเอดีเพนเดนท์ อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส 6, การแสดงออกของยีน

## บทนำ

มะละกอ (*Carica papaya* L.) อยู่ในวงศ์ *Caricaceae* เป็นแหล่งสารอาหารที่ดีและมีวิตามินหลากหลาย น้ำยางที่ได้จากผลดิบมีเอนไซม์ปาเปน (papain enzyme) ใช้กันมากในอุตสาหกรรม เช่น เครื่องสำอาง การฟอกหนัง ยารักษาโรค เป็นต้น (Lines et al., 2002) ปัญหาสำคัญของการปลูกมะละกอ คือ การระบาดของโรคใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ สามารถทำลายมะละกอได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต โรคนี้มีสาเหตุจากไวรัสใบต่างจุดวงแหวน (*Papaya ringspot virus*, PRSV) สำหรับประเทศไทย มีรายงานการพบโรคครั้งแรกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเมื่อปี ค.ศ. 1970 (Sakuanrungrasirikul, et al., 2005) ไวรัสใบต่างจุดวงแหวนจัดอยู่ในจีนัสโพทิวไวรัส (*Potyvirus*) สามารถถ่ายทอดได้ทั้งแบบวิถีกล และผ่านทางเพลี้ยอ่อนซึ่งเป็นพาหะนำโรค มีการถ่ายทอดแบบไม่คงอยู่ในตัวแมลง (non-persistent)

PRSV แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ P (PRSV-P) และ W (PRSV-W) สำหรับชนิด P สามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งมะละกอและพืชตระกูลแตง ส่วนชนิด W จะทำให้เกิดโรคเฉพาะในพืชตระกูลแตงเท่านั้น (Yeh and Gonsalves, 1994) PRSV เป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบเส้นบวก (single-stranded, positive sense RNA) ความยาวประมาณ 10,326 นิวคลีโอไทด์ มีจีโนมประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้ P1, Helper component proteinase (Hc-Pro), P3, Cylindrical inclusion protein (CI), Nuclear

inclusion protein a (Nia), Nuclear inclusion protein b (Nib) และ Coat protein (CP) สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนก้อนเดี่ยวขนาดใหญ่ที่ประกอบไปด้วยหลายโปรตีน (Polyprotein) (Gonsalves *et al.*, 2010) ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคโนโลยีการยับยั้งอาร์เอ็นเอ (RNA interference) หรือ RNA silencing มาใช้ในการสร้างมะละกอตัดแปลงพันธุกรรมโดยใส่ยีน CP ของไวรัสจุดดวงแหวนมะละกอ เพื่อให้มะละกอด้านทานต่อโรคไวรัสใบต่างจุดดวงแหวน

กระบวนการ RNA silencing คือ การควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างหนึ่ง สามารถเกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอตทุกชนิดรวมถึงเชื้อรา (Mlotshwa *et al.*, 2002) กลไกของ RNA silencing จะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อยีนเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และปกป้องสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตจากไวรัส (Meister and Tuschl, 2004) โดยมีโปรตีนหลักที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Argonaute (AGOs), RNA-dependent RNA polymerase (RDRs) และ Dicer-like (DCLs) (Musidlak *et al.*, 2017) ซึ่งโปรตีน RDRs เป็นตัวเริ่มต้นการสร้างความต้านทานให้กับพืชจากยีนแปลกปลอมภายนอกเซลล์โดยการสร้างสาย dsRNA แล้วโปรตีน DCLs จะทำหน้าที่ตัดย่อย dsRNA ให้เป็นสายสั้น ๆ ประมาณ 22-25 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า small interfering RNAs หรือ siRNAs จากนั้นโปรตีน AGO จะเข้ามาจับ siRNA รวมกันเพื่อสร้างเป็น RISC complex และทำการตัดย่อยภายในสายเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) เป้าหมายได้อย่างแม่นยำ (Qu *et al.*, 2008) หน้าที่สำคัญของยีน *RDR6* คือ การสังเคราะห์ dsRNA ในกระบวนการ RNA silencing เพื่อการต่อต้านการเข้าทำลายของไวรัส (Yang *et al.*, 2011) เมื่อพืชสามารถสร้าง dsRNA จากอาร์เอ็นเอของไวรัส

ระบบกลไก RNA silencing จะเริ่มทำงานและตัด dsRNA กลายเป็น siRNA ที่จำเพาะต่อไวรัส และสามารถเข้าทำลายอาร์เอ็นเอของไวรัสได้ (Devert *et al.*, 2015) หากมีการยับยั้งการแสดงออกของยีน *RDR6* จะทำให้พืชมีความอ่อนแอต่อไวรัส (Qu *et al.*, 2005) จากการศึกษาของ Schwach *et al.* (2005) พบว่า การยับยั้ง *RDR6* ในต้นยาสูบทำให้ยาสูบแสดงอาการอ่อนแออย่างรวดเร็วเมื่อถูกไวรัส *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) และ *Cucumber mosaic virus* (CMV) เข้าทำลาย อย่างไรก็ตามยีน *RDR6* เป็นสื่อกลางในการต้านทานไวรัส โดยต้องการถ่ายยีนไวรัสเข้าสู่ต้นพืช เช่น มะละกอตัดแปลงพันธุกรรมที่ใส่ยีน coat protein ของไวรัสจุดดวงแหวนมะละกอเข้าไปทำให้กลไก RNA silencing ทำงาน แต่เนื่องจากไวรัสมีกลไกการยับยั้งกระบวนการ RNA silencing จึงทำให้ไวรัสสามารถเพิ่มปริมาณและเข้าทำลายมะละกอได้ การทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Carica papaya* RNA-dependent RNA polymerase (*CpRDR6*) ในมะละกอพันธุ์ทนทานต่อไวรัสและอ่อนแอต่อไวรัส 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ฟลอริดา แหกดำ และขอนแก่น 80 เพื่อทราบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน และศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CpRDR6* ภายหลังการปลูกเชื้อไวรัสจุดดวงแหวนมะละกอ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและปรับปรุงพันธุ์มะละกอให้ต้านทานต่อโรคไวรัสใบต่างจุดดวงแหวนต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ***CpRDR6*** ในมะละกอพันธุ์ทนทานและพันธุ์อ่อนแอต่อไวรัสใบต่างจุดดวงแหวนมะละกอ)

## 1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช และการสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างพันธุ์มะละกอที่ใช้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ มะละกอพันธุ์แขกดำ (พันธุ์อ่อนแอต่อไวรัสใบต่างจุดวงแหวน) พันธุ์ฟลอริดา (พันธุ์ทนทานต่อไวรัสใบต่างจุดวงแหวน) และพันธุ์ขอนแก่น 80 (ลูกผสมระหว่างแขกดำกับฟลอริดา) จำนวน 3 ต้นต่อพันธุ์ นำส่วนของใบมะละกามาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีของอูโรโนทัย และคณะ (2552) แล้ววัดค่า optical density (OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น  $A_{260}/A_{280}$  ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป

## 1.2 การออกแบบไพรเมอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* หมายเลข accession KF668595.1 ความยาว 3,588 คู่เบส จากฐานข้อมูล NCBI มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลจีโนมมะละกอ *Carica papaya* cultivar SunUp chromosome LG3 contig 18548 หมายเลข accession ABIM01018523.1 ความยาว 4,893 คู่เบส ในการหาตำแหน่งของ Intron และ exon ด้วยโปรแกรม SCAN2 (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=scan2&group=programs&subgroup=scanh>) แล้วทำการออกแบบไพรเมอร์ในส่วน of exon และตรวจสอบคุณภาพของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)

## 1.3 การเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ และการทำชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *CpRDR6* จากดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยชุดน้ำยา GoTaq® DNA Polymerase (Pomega, USA)

โดยใช้ไพรเมอร์ RDR6F: 5'-GGT TGA AAC TTG TCC AAG AAT GGA T-3' และ RDR6R: 5'-TGT GTC AAA GTT TTG GTA TCT GCA-3' นำเข้าเครื่อง thermal cycler, Gene-Amp 9700 (Thermo Scientific, USA) ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 °ซ. 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 °ซ. 30 วินาที 55 °ซ. 30 วินาที และ 72 °ซ. 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 °ซ. 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen, USA) แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้านด้วยไพรเมอร์ RDR6F และ RDR6R

## 1.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับอะมิโนแอซิดของยีน *CpRDR6*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* มาถอดรหัสเป็นอะมิโนแอซิดด้วยโปรแกรม ExPASy translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>) แล้วทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโนแอซิดด้วยโปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

## 2. การศึกษาการแสดงออกของยีน *CpRDR6* ในมะละกอพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ทนทานต่อโรคไวรัสใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ

### 2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

เพาะเมล็ดมะละกอพันธุ์แขกดำ (พันธุ์อ่อนแอ) และพันธุ์ฟลอริดา (พันธุ์ทนทาน) ในกระถางขนาด 6 นิ้ว จนกระทั่งอายุต้น 2 เดือน คัดเลือกต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกัน นำมาตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสจุดวงแหวนมะละกอด้วยวิธี reverse transcriptase PCR โดยใช้ไพรเมอร์

Coat protein ของไวรัส ดังนี้ SC501: 5'- AAA GTG GTA TGA GGG AGT-3' และ SC104: 5'- ATT GCG CAT ACC TAG GAG AGA GTG -3' (Siriwan, 2013) ย้ายต้นมะละกอ ปราศจากเชื้อไวรัสไว้ในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต (versatile environmental test chamber) รุ่น MLR-350HR ยี่ห้อ SANYO ปรับความเข้มแสง ที่ 15,000 ลักซ์ ให้แสงสว่าง 8 ชม./วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. (Chumpookam *et al.*, 2012) ให้ต้นมะละกอปรับตัวกับสภาพแวดล้อมภายในตู้เป็นเวลา 3 วัน แล้วปลูกเชื้อไวรัสใบต่างจุดวงแหวน มะละกอชนิด P สายพันธุ์สมุทรสงคราม ด้วยวิธีกล โดยบดตัวอย่างใบมะละกอที่มีเชื้อไวรัส 1 ก. กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ (pH 7.0) และผงคาร์โบรันดัม (Carborundum) นำไปทาบในใบมะละกอ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ทำการทาบในใบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมล (pH 7.0) ผสมผงคาร์โบรันดัม ทำการควบคุมอัตราการให้น้ำ ที่ปริมาตร 300 มล./ต้น/วัน เก็บตัวอย่างใบมะละกอใบที่ 3 นับจากยอด ในเวลา 08.00 นาฬิกา ที่ 0, 3, 5, 7 และ 9 วัน หลังการปลูกเชื้อ นำตัวอย่างใบห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียมแล้วจุ่มในไนโตรเจนเหลวทันที จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ. จนกว่าจะนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ

## 2.2 การสกัดอาร์เอ็นเอรวมและการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่ผสม (Total RNA extraction and cDNA synthesis)

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบมะละกอ โดยใช้ RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA) นำไปวัดค่า OD โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น  $A_{260}$  และ  $A_{280}$  แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่ผสมด้วยชุด Revert Aid First Strand

cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, USA) ใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอ 5 นาโนกรัม ต่อปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร

## 2.3 การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน *CpRDR6* แบบหาปริมาณในสภาพจริง (quantitative real-time PCR) กับตัวอย่างต้นมะละกอพันธุ์แขกดำ (พันธุ์อ่อนแอ) และพันธุ์พลอริต้า (พันธุ์ทนทาน) พันธุ์ละ 3 ต้น ในการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน (3 biological replicates) และวิเคราะห์ qPCR ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (3 technical replicates) ด้วยไพรเมอร์ ดังนี้ rtRDR6F: 5'- TGG GAT GAA AAT CTT GTT CCA C -3' และ rtRDR6R: 5'- TCT GCC AAG AGT ATG CAG TTC T -3' โดยมียีนอ้างอิง *EPSPS* ด้วยไพรเมอร์ ดังนี้ EPSPSF: 5' TGA TGG TCT TAA GCA GCT TGG CGC A '3 และ EPSPSR: 5' TCG CTC CAT CAA CTT CAG TGT CAT TTC AAC'3 (Siriwan, 2013) นำดีเอ็นเอสายคู่ผสมที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยชุดน้ำยาชุด SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, USA) แล้วนำเข้าเครื่อง Light Cycler 480 (Roche, USA) โดยตั้งโปรแกรมเครื่องดังนี้ ขั้นตอน Initial denature ที่ 94 °ซ. นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอน Denature ที่ 94 °ซ. นาน 20 วินาที Amplification 60 °ซ. นาน 20 วินาที และ Extension 72 °ซ. นาน 20 วินาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน Melting Curve 95 °ซ. นาน 5 วินาที ตามด้วย 65 °ซ. นาน 1 นาที แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่า Relative quantification โดยใช้วิธีการคำนวณด้วยวิธี 2 (-delta delta CT) (Rao *et al.*, 2013).

## 2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

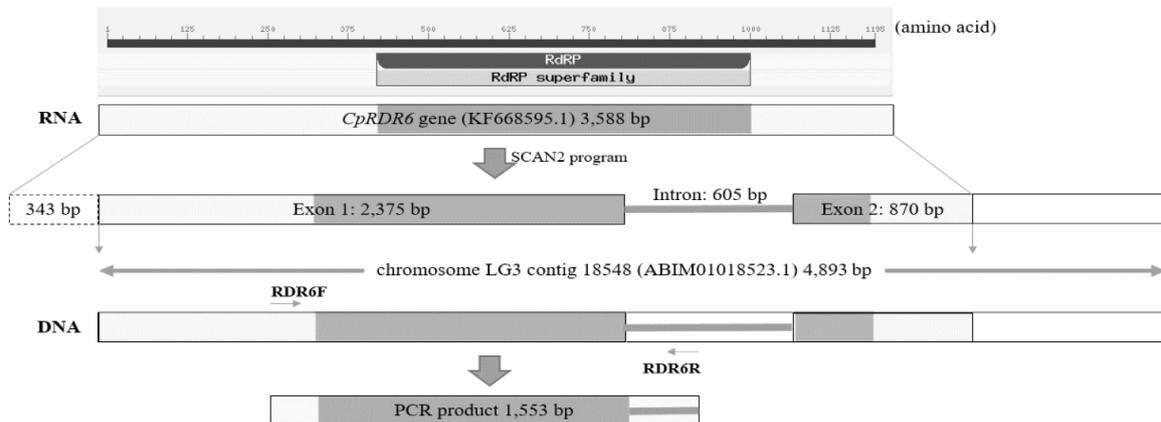
วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน One-way ANOVA และ Post Hoc Tests ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Tests (DMRT) ของซอฟต์แวร์ SPSS v.19

### ผลการทดลองและวิจารณ์

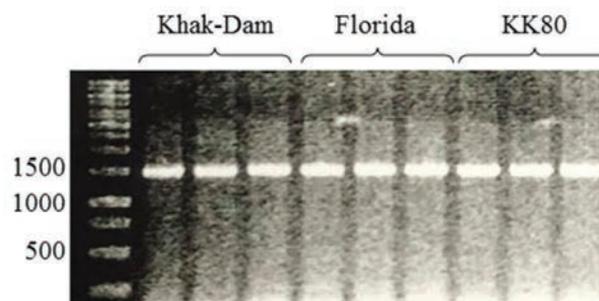
#### 1. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* ในมะละกอ

การออกแบบไพรเมอร์พบชิ้นส่วนจีโนมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* ในส่วนของ exon 2 ตำแหน่ง คือ ขนาด 2,375 คู่เบส

และ 870 คู่เบส แต่ไม่พบ 343 คู่เบส ที่เป็นส่วนด้านปลาย 5' ของยีน *CpRDR6* และพบส่วน intron เพียง 1 ตำแหน่งบนจีโนม มีขนาดความยาว 605 คู่เบส การทดลองนี้จึงได้ออกแบบไพรเมอร์จากส่วน Super family ใน exon 1 และตรวจสอบคุณภาพของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม OligoCalc ได้ขนาดความยาวที่เหมาะสมต่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ด้าน (5' และ 3') ในช่วงประมาณ 1,553 คู่เบส (Figure 1) จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอมะละกอทั้ง 3 พันธุ์ ได้แก่ แยกดำ พลอริต้า และขอนแก่น 80 (Figure 2)



**Figure 1** The schematic representation of primers designing



**Figure 2** The PCR products of 1,553 bp *CpRDR6* gene from 3 papayas (Florida, Khak-Dam and Khon-Kaen 80) on 1.5 % agarose gel

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *CpRDR6* ด้านปลาย 5' และ 3' ด้วยโปรแกรม RDR6F และ RDR6R เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาต่อกัน และตัดส่วนปลาย 5' และ 3' ที่ไม่ได้คุณภาพออก จะเหลือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์จำนวน 1,125 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ความยาว 375 เรซิดิวส์ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Cluster Omega พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันหลายตำแหน่ง แต่ตำแหน่งที่น่าสนใจ ได้แก่ ตำแหน่ง 292 ซึ่งเป็นลำดับเบส C (cytosine) ที่พบเฉพาะในมะละกอพันธุ์ฟลอริดา และลำดับเบส A (adenine) ที่พบในเฉพาะมะละกอแขกดำ (Figure 3) นอกจากนี้ พบว่า ในมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80 พบเป็นได้ทั้งลำดับเบส C และ A

ซึ่งมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80 เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ฟลอริดาที่มีความทนทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ และพันธุ์แขกดำที่อ่อนแอต่อไวรัสมากที่สุด (วิไล และคณะ, 2551) ทำให้มีโอกาสได้รับพันธุกรรมมาจากพันธุ์ฟลอริดาหรือแขกดำอย่างละครึ่ง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน พบตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ C และ A ส่งผลให้ลำดับของอะมิโนเปลี่ยนไปเป็น P (proline) ในมะละกอพันธุ์ฟลอริดา และเป็นลำดับ T (threonine) ในพันธุ์แขกดำ (Figure 4) อย่างไรก็ตามตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ C และ A ที่พบเฉพาะในพันธุ์ฟลอริดาหรือแขกดำ อาจนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์ลูกผสมระหว่างมะละกอพันธุ์ฟลอริดา และพันธุ์แขกดำต่อไปได้

```

Florida2      CGTTTGGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATTTCGGTCCATAATATCCAAATTGG      300
Florida3      CGTTTGGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATTTCGGTCCATAATATCCAAATTGG      300
Florida1      CGTTCGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATTTCCAAATTGG      300
KK80_2        CGTTTGGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATTTCCAAATTGG      300
KK80_3        CGTTCGCTTGGTTTTTTGCTGAAGACAAGAACATTTCGGTCCATAATTTCCAAATTGG      300
KhakDam3      CGTTTGGCTTGGTTTTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATTTCCAAATTGG      300
KhakDam1      CGTTCGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATATCCAAATTGG      300
KK80_1        CGTTCGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATATCCAAATTGG      300
KhakDam2      CGTTCGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATATCCAAATTGG      300
**** *

```

**Figure 3** The nucleotide alignment of *CpRDR6* using Clustal Omega. The polymorphic nucleotides are highlighted in red and yellow color

```

Florida2      SNQLRDRFAWFFAEDKNISVHNIINWWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV      120
Florida3      SNQLRDRFAWFFAEDKNISVHNIINWWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV      120
KhakDam1      SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNIINWWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV      120
KhakDam2      SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNIINWWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV      120
KK80_3        SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNIINWWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV      120
KK80_1        SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNIINWWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV      120
Florida1      SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNIINWWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV      120
KK80_2        SNQLRDRFAWFFAEDKNISVHNIINWWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV      120
KhakDam3      SNQLRDRFAWFFAEDKNISVHNIINWWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV      120
*****

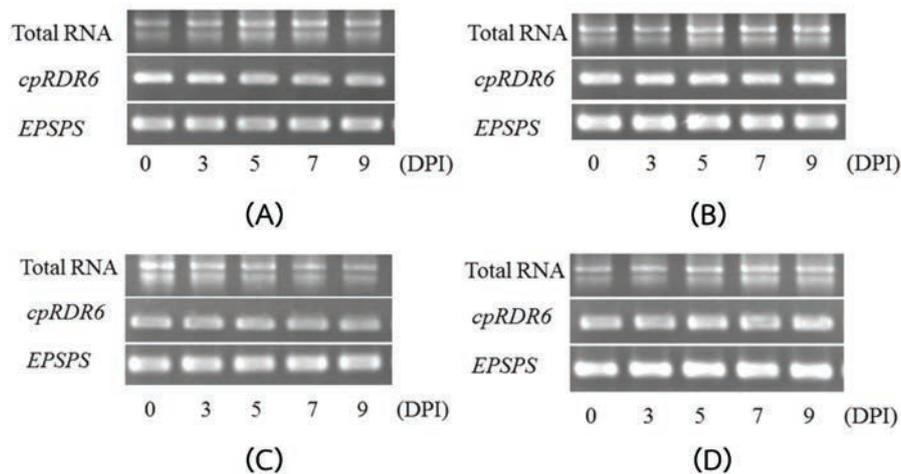
```

**Figure 4** The amino acid alignment of *CpRDR6* using Clustal Omega. The polymorphic amino acids are highlighted in red and yellow color

## 2. การศึกษาการแสดงออกของยีน *CpRDR6* ในมะละกอพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ทนทานต่อโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

การศึกษาการแสดงออกของยีน *CpRDR6* ในมะละกอพันธุ์แขกดำ (อ่อนแอต่อไวรัส) และ ฟลอริดา (ทนทานต่อไวรัส) ได้ออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีนขนาดความยาว 227 คู่เบส ที่อยู่คร่อมตำแหน่งของ Intron เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีน หากอาร์เอ็นเอรวม มีการปนเปื้อน

ของดีเอ็นเอจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ ขนาด 227 และ 832 คู่เบส จากการทดลองนี้ พบการเพิ่มปริมาณเพียงแถบดีเอ็นเอขนาด 227 คู่เบส แสดงว่าการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุด RNeasy Plant Mini Kit ไม่มีการปนเปื้อนดีเอ็นเอ เมื่อนำอาร์เอ็นเอและผลผลิตที่ได้จาก qPCR มาตรวจสอบบนเจลอะกาโรส พบแถบอาร์เอ็นเอ และแถบยีนที่ชัดเจนเพียง 1 แถบ (Figure 5)



**Figure 5** The total RNA and PCR products of *CpRDR6* and *EPSPS* genes after qPCR analysis of (A.) healthy Khak-Dam papaya, (B) PRSV infected Khak-Dam papaya, (C) healthy Florida papaya and (D) PRSV infected Florida papaya. The total RNA was extracted from leaves at indicated time points of Days Post-inoculation (DPI). 2 microliters of PCR products were loaded to 1.5% agarose gel

จากการวิเคราะห์ปริมาณยีน *CpRDR6* ด้วยวิธี quantitative real-time PCR (qPCR) พบว่า ค่า Relative Quantification (RQ) ในมะละกอที่มีการปลูกเชื้อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ มีความแตกต่างทางสถิติในแต่ละช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Table 1) มะละกอแขกดำมีค่า RQ สูงสุด 4.32 เท่า ในวันที่ 5 และมะละกอฟลอริดามีค่าสูงสุด 2.30 เท่า

ในวันที่ 9 ภายหลังจากปลูกเชื้อไวรัส (Figure 6) ซึ่งมะละกอแขกดำแสดงอาการของโรคให้เห็นบนใบในวันที่ 7 ขณะที่มะละกอฟลอริดาแสดงอาการในวันที่ 9 อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *CpRDR6* ที่สูงขึ้นอาจเกี่ยวเนื่องกับการที่มะละกอเกิดสภาวะเครียดจากการเข้าทำลายจากไวรัส เนื่องจากยีน *RDR6* มีหน้าที่ตั้งแต่ว่าการป้องกันไวรัสหรือ transgenes ไปจนถึง

การควบคุมยีนภายใน (putative gene) สำหรับการพัฒนาเซลล์ และการตอบสนองต่อความเครียดของพืช (Curaba and Chen, 2008) นอกจากนี้ การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *CpRDR6* ทำให้พืชสามารถผลิตโปรตีน *RDR6* เพิ่มขึ้นมากด้วย แต่การทำงานของโปรตีน *RDR6* อาจถูกนำไปใช้ในการควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญหรือเสื่อมสภาพของเซลล์จากสภาวะเครียดหรืออาจถูกยับยั้งโดยโปรตีนจากไวรัส เนื่องจาก

ไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวหลายชนิดมีโปรตีนยับยั้ง (suppressor) กระบวนการ RNA silencing ของพืช ซึ่งในไวรัสจุดวงแหวนมีรายงานว่าโปรตีน P1/HcPro เป็นโปรตีนแรก ที่ค้นพบว่า เป็นโปรตีนยับยั้งกระบวนการ RNA silencing (Mallory *et al.*, 2002) จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่พืชปกติ ที่ไม่ใช่พืชดัดแปลงพันธุกรรม ไม่สามารถปกป้องตัวเองจากไวรัสได้

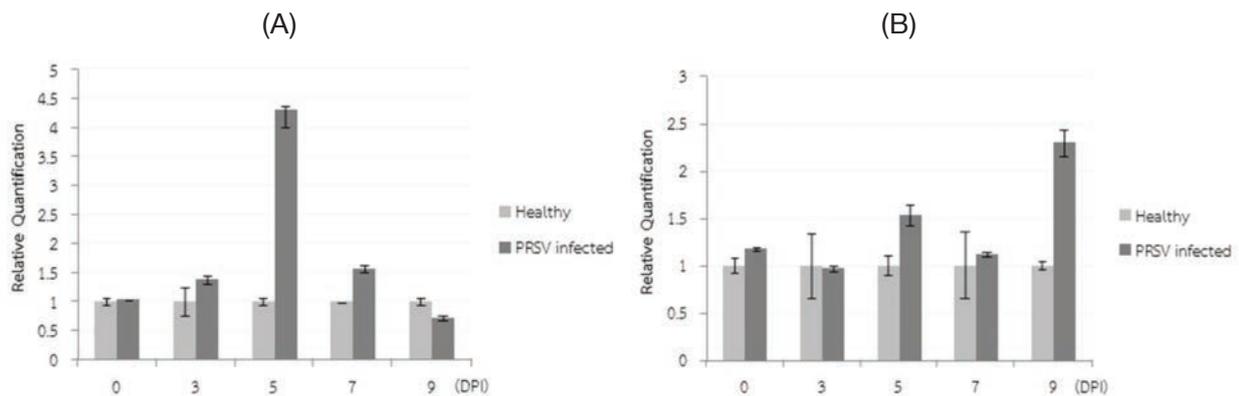
**Table 1** Gene expression level of *cpRDR6* gene during PRSV infection

DPI*	Relative Quantification (RQ)	
	Khak-Dam papaya	Florida papaya
0	1.05 b	1.18 b
3	1.40 c	0.97 a
5	4.32 d	1.53 c
7	1.57 c	1.11 b
9	0.72 a	2.30 d

Mean in the same column, follow by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT

N = 3

\*DPI: Day Post-inoculation



**Figure 6** Expression pattern of *CpRDR6* under PRSV infected at 0, 3, 5, 7 and 9 days Post-inoculation (DPI) in (A) Khak-Dam papaya and (B) Florida papaya. The total RNA was extracted from leaves at indicated time points. The expression patterns were analyzed using the qPCR method. *EPSPS* gene was used as an endogenous control. The level of transcripts in leaves treated with Mock was set to 1 and level of PRSV treated was given relative to this. Error bars represent standard deviation of mean value from triplicates for each biological sample

## สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้ได้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสใบต่างจุดวงแหวนของมะละกอแขกดำ ซึ่งเป็นมะละกอพันธุ์อ่อนแอต่อไวรัส มะละกอฟลอริดาซึ่งเป็นพันธุ์มะละกอที่ทนทานต่อไวรัส และมะละกอขอนแก่น 80 ที่เป็นลูกผสมระหว่างมะละกอแขกดำกับฟลอริดา พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างระหว่างมะละกอแขกดำกับมะละกอฟลอริดา และเมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนพบความแตกต่างของกรดอะมิโนเช่นกัน ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างอาจนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการศึกษาและพัฒนาสำหรับการคัดเลือกพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์มะละกอได้ต่อไปในอนาคต สำหรับการศึกษากการแสดงออกของยีน สรุปได้ว่าเมื่อมีการปลูกเชื้อไวรัสจุดวงแหวน มะละกอพันธุ์อ่อนแอมีการแสดงออกของยีน *CpRDR6* สูงกว่าในมะละกอพันธุ์ทนทาน ซึ่งระดับเอ็มอาร์เอ็นเอที่สูงขึ้นอยู่ในช่วงการแสดงอาการของโรคไวรัสใบต่างจุดวงแหวน

## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่อง real-time PCR และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์มะละกอสำหรับการทดลองนี้

## เอกสารอ้างอิง

- วิไล ปราสาทศรี, อุดม คาชา, เฉลิมชัย ปราสาทศรี, รัชณี ศิริยาน, สุวิทย์ ชัยเกียรติยศ และ Dennis Gonsalves. 2551. ขอนแก่น 80 มะละกอผลเล็กเพื่อกินสุกและส่งออก. ใน: เอกสาร ผลงานวิจัยใช้ได้จริงจากห้องสู่ห้าง ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 31-44.
- อรุณทัตย์ ซาววา, สุภาวดี ง้อเหรียญ, อัญชลี ศรีสุวรรณ, ประพิศ วงเทียม และ หทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118.
- Chumpookam, J., H.L. Lin and C.C. Shiesh. 2012. Effect of Smoke-water on Seed Germination and Seedling Growth of Papaya (*Carica papaya* cv. Tainung No. 2). *Hort Science* 47: 741-744.
- Curaba, J. and X. Chen. 2008. Biochemical activities of *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase 6. *J. Biol. Chem.* 283: 3059-3066.
- Devert, A., N. Fabre, M. Floris, B. Canard, C. Robaglia and P. Crete. 2015. Primer-dependent and primer-independent initiation of double stranded RNA synthesis by purified *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases RDR2 and rdr6. *PLoS one.* 10: e0120100.

- Gonsalves, D., S. Tripathi, J. B. Carr, and J. Y. Suzuki. 2010. *Papaya Ringspot virus*. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2010-1004-01. Available at: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/PapayaRingspotvirus.aspx>, Accessed: Feb 7, 2018.
- Lines, R., D. Persley, J. Dale, R. Drew and M. Bateson. 2002. Genetically engineered immunity to Papaya ringspot virus in Australian papaya cultivars. *Mol. Breeding* 10:119-129.
- Mallory, A.C., B.J. Reinhart, D. Bartel, V.B. Vance and L.H. Bowman. 2002. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *PNAS*. 99: 15228-15233.
- Meister, G. and T. Tuschl. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 431: 343-349.
- Mlotshwa, S., O. Voinnet, M.F. Mette, M. Matzke, H. Vaucheret, S.W. Ding, G. Pruss and V.B. Vance. 2002. RNA silencing and the mobile silencing signal. *The Plant Cell*. 14: s289-s301.
- Musidlak, O., R. Nawrot and A. Gozdzicka-Gozeak. 2017. Which plant proteins are involved in antiviral defense? Review on in vivo and in vitro activities of selected plant proteins against viruses. *Int J Mol Sci*. 18: 2300.
- Qu, F., X. Ye and T.J. Morris. 2008. *Arabidopsis* drb4, ago1, ago7, and rdr6 participate in a dcl4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by dcl1. *PNAS*. 105: 14732-14737.
- Qu, F., X. Ye, G. Hou, S. Sato, T.E. Clemente and T.J. Morris. 2005. Rdr6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *nicotiana benthamiana*. *JVI*. 79: 15209-15217.
- Rao X, Lai D, Huang X (2013) A new method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *J. Comput. Biol.*, 20(9): 703–711.
- Sakuanrungsirikul , S., N. Sarindu, V. Prasartsee, S. Chaikiatiyos, R. Siriyan, M. Sriwatanakul, P. Lekananon, C. Kitprasert, P. Boonsong, P. Kosiyachinda, G. Fermin, and D. Gonsalves. 2005. Update on the development of virus-resistant papaya: Virus-resistant transgenic papaya for people in rural communities of Thailand. *Food and Nutrition Bulletin*. 26: 307-311
- Schwach, F., F.E. Vaistij, L. Jones and D.C. Baulcombe. 2005. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus x and is required for

- the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol.* 138: 1842.
- Siriwan, W. 2013. *Proteomics of Papaya ringspot virus (PRSV) Infected Papaya Leaves*. Ph.D. Thesis. Kasetsart University. 96 p.
- Yang, H., M. Wang, Z. Gao, C. Zhu and X. Guo. 2011. Isolation of a novel RNA-dependent RNA polymerase 6 from *Nicotiana glutinosa*, NgRDR6, and analysis of its response to biotic and abiotic stresses. *Mol. Biol. Rep.* 38: 929-937.
- Yeh, S.-D. and D. Gonsalves. 1994. Practices and perspective of control of *papaya ringspot virus* by cross protection, p. 237-257. In K. F. Harris, eds. *Advances in disease vector research*. Springer New York, New York, NY.