

## รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. แผนงานวิจัย การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
2. โครงการวิจัยที่ 1. การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่
  - กิจกรรมที่ 1 การตรวจสอบยีน และศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร
3. ชื่อการทดลองที่ (ภาษาไทย) การตรวจสอบการกลายของยีนที่กระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ
 

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) The Mutation Assay of Genes Involved Resistant to Papaya Ringspot Disease

#### 4. คณะผู้ดำเนินงาน

นางสาวอรุณทัย ซาวา<sup>1</sup>

นางสาวภรณ์ สว่างศรี<sup>1</sup>

นายอำนาจ อรรถลั้งรอง<sup>2</sup>

นายศรีเมฆ ชาวโพงพวง<sup>3</sup>

#### 5. บทคัดย่อ

มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีพื้นที่เพาะปลูกลดลงเรื่อยๆ สาเหตุมาจากการระบาดของโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ ปัจจุบันมีรายงานว่ายีนในกลุ่มปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรม และกลุ่มกระบวนการ RNA silencing ได้แก่ยีน *eIF4E* และ *RDR6* เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อไวรัส การทดลองนี้จึงได้ศึกษาการกลายของยีน โดยการโคลนยีน *CpeIF4E* และ *CpRDR6* จากมะละกอ พบว่า ยีน *CpeIF4E* มีขนาด 711 คู่เบส จาก Start codon ถึง Stop codon สามารถถอดรหัสเป็นอะมิโนเอซิดได้ 236 อะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบมีความเหมือนกับ *Carica papaya eIF4E*, *Vasconcellea monoica eIF4E* และ *Manihot esculenta eIF4E* ที่ identity 99, 93 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับลำดับอะมิโนเอซิดมีความเหมือนกับ *Carica papaya*, *Vasconcellea goudotiana* และ *Manihot esculenta* ที่ identity 99, 92 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของยีน *CpRDR6* มีขนาด 3588 คู่เบส มีความเหมือนกับ *Carica papaya RDR6*, *Morus notabilis RDR6* และ *Nicotiana glutinosa RDR6* มีค่า identity 100, 75 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถอดรหัสอะมิโนเอซิด 1194 อะมิโน เหมือนกับ *Carica papaya*, *Manihot esculenta* และ *Herrania umbratica* ที่เปอร์เซ็นต์ identity 100, 71 และ 70 ตามลำดับ การตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* และ *CpeIF4E* พบว่ามะละกอตัวอย่าง HF39 ต้น 1 มีลำดับอะมิโนเอซิดที่แตกต่างจากทุกตัวอย่างถึง 36 อะมิโน และพบความแตกต่างของอะมิโนเอซิดที่สัมพันธ์กับตัวอย่างที่ทนทานต่อไวรัส คือ ลำดับอะมิโน P (proline) พบในตัวอย่าง KK80-Florida 67, ขอนแก่น 80 ต้นที่ 2, Florida ต้นตัวผู้ และ Florida ต้นตัวเมีย ซึ่งเป็นตัวอย่างต้นที่ทนทานแต่ไม่พบในตัวอย่างต้นที่อ่อนแอเลย ส่วนยีน

*CpeIF4E* พบความแตกต่างของตัวอย่าง KDTP-Florida 47 เพียง 1 ตำแหน่ง คือ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น A (Adenine) ซึ่งตัวอย่างอื่นทุกตัวอย่างเป็น G (Guanine) ส่งผลให้ลำดับอะมิโนเอซิดเปลี่ยนไปเป็น K (Lycine) จากอะมิโน E (Glutamic acid) อย่างไรก็ตามความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนเอซิดที่พบอาจเกี่ยวข้องกับความต้านทานของมะละกอ ซึ่งน่าสนใจและจำเป็นต้องศึกษาต่อไปในอนาคต

Papaya (*Carica papaya* L.) is an economically important fruit tree. The production areas have been trending to be decreased, caused by the papaya ringspot disease. Recently, the genes involving initiation translation factor (eIF4E) and RNA silencing mechanism (RDR6) have been reported that related to against virus infection. This study aims to assay mutation of *CpeIF4E* and *CpRDR6* genes from papaya. The *CpeIF4E* gene cloning was obtained 711 base pairs of nucleotide length from start to stop codon which translate to 236 amino acids. The nucleotides blast searching was showed 99%, 93% and 85% sequence identity with *Carica papaya eIF4E*, *Vasconcellea monoica eIF4E* and *Manihot esculenta eIF4E*. The deduced amino acid was showed similarity to *Carica papaya*, *Vasconcellea goudotiana* and *Manihot esculenta* with 99%, 92% and 80% identity respectively. The *CpRDR6* sequence result was obtained 3588 base pairs which could translate to 1194 amino acids. The nucleotide was showed similar with *Carica papaya RDR6*, *Morus notabilis RDR6* and *Nicotiana glutinosa RDR6*, 100%, 75% and 71% identity. Moreover, its amino acid was present similarity with *Carica papaya*, *Manihot esculenta* and *Herrania umbratical* with 100%, 71% and 70% identity respectively. The results of *CpRDR6* gene mutation assay shown 36 differences amino acids in HF39 No.1 when compared with all samples. And, the P (proline) has related to papaya resistance samples (KK80-Florida 67, Khonkhen 80 No.2, Male Florida and Female Florida), but has not been found in the samples that represent to susceptible papaya tree. In part of *CpeIF4E* gene has shown 1 position of nucleotide polymorphism in KDTP-Florida 47, is A (Adenine) which the other samples are G (Guanine). The polymorphism of nucleotide has changed the codon usage of amino acid from the E (Glutamic acid) to K (Lycine). Consequently, the found polymorphism of nucleotides and amino acids might be related to virus resistance papaya which needs to be further more study.

---

<sup>1/</sup> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

<sup>2/</sup> สถาบันวิจัยพืชสวน

<sup>3/</sup> มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## 6. คำนำ

มะละกอ (*Carica papaya* L.) อยู่ในวงศ์ *Caricaceae* เป็นไม้ผลเขตร้อน และเขตกึ่งร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบทวีปอเมริกากลาง บริเวณประเทศเม็กซิโกตอนใต้ และประเทศคอซตาริกา พืชในวงศ์ *Caricaceae* มีทั้งหมด 4 สกุล (Genera) ได้แก่ สกุล *Carica* มีทั้งหมด 22 ชนิด (species) สกุล *Jacaratia* มีทั้งหมด 6 ชนิด สกุล *Jarilla* มีทั้งหมด 1 ชนิด และสกุล *Cylicomorpha* มีทั้งหมด 2 ชนิด (Devi, 1952) โดยสกุล *Carica*, *Jacaratia* และ *Jarilla* มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางแถบอเมริกา ส่วนสกุล *Cylicomorpha* มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางแถบเส้นศูนย์สูตรของแอฟริกา สกุลที่เข้ารับประทานมีเพียงสกุลเดียวเท่านั้น คือ *Carica* เช่น *Carica papaya* ใช้รับประทานได้ทั้งผลดิบและผลสุก นอกจากนี้ *C. chinensis*, *C. goudotiana* และ *C. monoica* ใช้ส่วนใบรับประทาน (Storey, 1976) มะละกอเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ประเภทไม้เนื้ออ่อนลำต้นเดี่ยว และมีใบขนาดใหญ่ลักษณะเป็นแบบ palmately lobe เจริญเติบโตได้เร็วในเขตร้อน ให้ผลผลิตประมาณ 4-8 เดือนหลังปลูก (วิวัฒนา, 2531) มะละกอสามารถนำมารับประทานได้ทั้งผลดิบ และผลสุก เป็นแหล่งสารอาหารที่ดีและมีวิตามินหลากหลาย น้ำยางที่ได้จากผลดิบยังมีเอนไซม์ปาเปน (papain) ที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรม เช่น เครื่องสำอาง การฟอกหนัง ยารักษาโรค เป็นต้น (Lines *et al.*, 2002) สำหรับประเทศไทยสามารถปลูกมะละกอได้ดีทั่วทุกภาค โดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญ คือ จังหวัดราชบุรี นครปฐม ชุมพร นครราชสีมา และสระบุรี (สิริกุล, 2542) ปัจจุบันพื้นที่ปลูกมะละกอลดน้อยลงอย่างมาก เนื่องจากมีการระบาดของโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ ทำให้เกษตรกรไม่สามารถปลูกมะละกอได้ ทำให้ผลผลิตมะละกอลดลงอย่างต่อเนื่องทุกปี จากข้อมูลการปลูกมะละกอในปี 2546 มีพื้นที่ปลูก 150,000 ไร่ แต่ปี 2551 พื้นที่ปลูกลดลงเหลือแค่ 45,836 ไร่ต่อปี (จริงแท้ และคณะ, 2552)

ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยมีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน (PRSV) มาเป็นเวลานาน การแพร่ระบาดดังกล่าวมีผลกระทบต่อปริมาณ และคุณภาพของมะละกอ โดยเฉพาะในแหล่งปลูกมะละกอที่สำคัญของโลก เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งมีการปลูกมากที่สุดในสหรัฐอเมริกา ได้เกิดการระบาดของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนอย่างรุนแรงในปี พ.ศ. 2535 จนต้องทำลายผลผลิตมะละกอไปกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ชาวไร่ต้องหามาตรการควบคุมโรค ซึ่งได้พยายามวิจัยเพื่อหาวิธีป้องกันกำจัดไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมาอย่างต่อเนื่อง (Sanford and Johnston, 1985) มะละกอที่เป็นโรคใบด่างจุดวงแหวนจะมีอาการใบสีเหลืองโปร่งใสใน

ระยะแรก ต่อมาจะมีอาการเขียวต่าง เมื่อโรคระบาดรุนแรงขึ้น พื้นที่ผิวใบจะแคบลง จนในที่สุดจะเหลืองแต่เส้นกลางใบที่มีลักษณะคล้ายด้าย ที่ก้านดอก ก้านใบและลำต้นส่วนบนจะปรากฏรอยช้ำเป็นขีด ๆ หรือวงกลมเล็ก ๆ ผิวของผลจะมีรอยจุดเป็นรูปวงแหวนอยู่ทั่ว ถ้าเชื้อไวรัสเข้าทำลายมะละกอในระยะต้นอ่อน ก็จะทำให้ต้นแคระแกรน หรือไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ แต่ถ้าเป็นต้นที่โตแล้วก็พอจะให้ผลผลิตบ้าง แต่ทรงผลจะบิดเบี้ยว มีขนาดเล็ก ผิวผลปรากฏเป็นจุดวงแหวนเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่ว เนื้อภายในผลแข็งกระด้าง เนื้อสุกจะเป็นไตแข็ง รสขม ไม่สามารถรับประทานได้ (Gonsalves *et.al.*, 2008)

ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนอยู่ในกลุ่มโพทิวรัส (potyvirus) ถ่ายทอดได้ทั้งแบบวิธีกถ และแมลงเป็นพาหะนำโรค ได้แก่ แมลงในกลุ่มเพลี้ยอ่อน เป็นการถ่ายทอดแบบไม่คงอยู่ในตัวแมลง (non-persistent) แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนชนิด P (PRSV-P) และชนิด W (PRSV-W) สำหรับชนิด P สามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งมะละกอ และพืชตระกูลแตง ส่วนชนิด W จะทำให้เกิดโรคเฉพาะในพืชตระกูลแตงเท่านั้น และไวรัสสามารถเข้าทำลายมะละกอได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต (Purcifull *et.al.*, 1984) จีโนมโพทิวรัสเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบเส้นบวก (single-stranded, positive sense RNA) ความยาวประมาณ 10,326 นิวคลีโอไทด์ มี open reading frame (ORF) ขนาดยาว 1 ชุด ซึ่งมีลักษณะเป็น polycistronic คือหลังจากแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้วจะได้โพลีโปรตีน (polyprotein) ขนาดใหญ่หนึ่งสายซึ่งเมื่อผ่านขบวนการย่อย (polyprotein processing) โดยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ของไวรัส จะได้โปรตีนขนาดเล็กหลายชนิดเรียงลำดับจาก N-terminal (amino-terminal) ถึง C-terminal (carboxy-terminal) ของโปรตีน (หรือจากปลาย 5' ถึง 3' ของจีโนม) ได้แก่ viral genome linked protein (VPg), first protein (P1), helper component protein (HC-Pro), third protein (P3), cylindrical inclusion protein (CI), small nuclear inclusion protein (NIa), large nuclear inclusion protein (NIb) และ coat protein (CP) ดังภาพที่ 1 (Riechmann *et al.*, 1992) VPg และ CP เป็นโปรตีนที่ตรวจพบได้จากอนุภาคไวรัส โปรตีนชนิดอื่นคือ HC-Pro, CI, NIa และ NIb เป็นโปรตีนที่แยกได้จากพืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย ส่วน P1 และ P3 เป็นโปรตีนที่ยังไม่มีรายงานว่าพบในพืชที่เป็นโรค (Dougherty and Carrington, 1988) โพทิวรัสเริ่มแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 86–88 (AUG) และสิ้นสุดการแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 10,118–10,120 (UAG, UGA, UAA) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 3,344 ตัว (Yeh *et.al.*, 1988)

การแปลรหัส (Translation) คือ ขั้นตอนแรกในการสร้างโปรตีน และเป็นส่วนหนึ่งของการแสดงออกของยีน (gene expression) เป็นการสร้างโปรตีนโดยอ่านรหัสจาก mRNA ที่ได้จากการถอดรหัส (transcription) เกิดในบริเวณไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ซึ่งมีไรโบโซม (Ribosome) อยู่ โดยไรโบโซมนั้นประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดใหญ่และหน่วยย่อยขนาดเล็ก โดยทั้ง 2 หน่วยย่อยจะมาประกบกันเมื่อมีการแปลรหัสจาก mRNA โดยจะทำการสร้างสายโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) จากการที่อ่านรหัสพันธุกรรมที่เป็นลำดับเบสบนสายของ mRNA ซึ่งรหัสพันธุกรรมนี้จะเป็นตัวกำหนดลำดับของกรดอะมิโน (amino acid) ในโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นมาจากการแปลรหัส มีอยู่ 4 ขั้นตอนคือ การเริ่มต้น (Initiation), การต่อสาย (Elongation), การย้ายตำแหน่ง (Translocation) และการสิ้นสุด (Termination) โดยขั้นตอนการเริ่มต้น จะเริ่มจากหน่วยเล็กของไรโบโซมจับกับปลาย 5' ของ mRNA โดยมี Initiation Factors (IF) เป็นตัวช่วย การสิ้นสุดของการสร้างสายโพลีเปป

ไทด์เกิดขึ้นเมื่อด้าน A ของไรโบโซมเป็นรหัสพันธุกรรมหยุด (UAA, UAG, UGA) ซึ่งจะไม่มีการเข้ามา แต่มี Releasing Factor จะเข้ามาทำให้ปล่อยสายโพลีเปปไทด์ออกไป ปลาย 5' ของ mRNA ไปเป็นปลาย N ของโพลีเปปไทด์ และขั้นตอนการแปลรหัสจะเริ่มสายโพลีเปปไทด์จากปลาย N ไปยังปลาย C

การเริ่มแปลรหัสพันธุกรรมของเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) มีกลไกที่ขึ้นอยู่กับเกิดการเกิดปฏิสัมพันธ์โปรตีนทางด้าน 5'-7<sup>m</sup>GpppN-cap และ 3'-poly(A) กับโปรตีนในกลุ่มปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรม (translation initiation factors) โดย จะปฏิสัมพันธ์โปรตีนและจดจำกับ eukaryotic initiation factor 4F หรือ iso4E (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002) การปฏิสัมพันธ์ด้าน 5' เรียกว่ากลไก cap-independent mechanism ซึ่งไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอในกลุ่ม Potyviridae, Luteoviridae, Tombusviridae และ *Tobamovirus* ไม่มีกลไกอันนี้ จึงต้องใช้ปลาย 5' ของจีโนมเป็นตัวทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนของปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรมของพืชในการจำลองตัวเอง (replication) (Kneller *et al.*, 2006) การแปลรหัสโปรตีนของพืชจะเริ่มที่ Translation initiation factor 4E (eIF4E) จับกับโครงสร้าง 7-methylguanosine cap ของเอ็มอาร์เอ็นเอ (McKendrick *et al.*, 1999) สำหรับไวรัสจุดวงแหวนมะละกอที่อยู่ในกลุ่มโพทิวไวรัส มีโปรตีนทางด้าน 5' เรียกว่า virus-encoded protein (VPg) ที่ทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน eIF4E ได้ (Grzela *et al.*, 2006)

กระบวนการ RNA silencing คือ กระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างหนึ่ง ซึ่งมีการยับยั้งการแสดงออกของยีนหลังการถอดรหัสพันธุกรรม (Post-Transcriptional Gene Silencing : PTGS) ไม่ให้เกิดการแปลรหัส (Translation) ไปเป็นโปรตีนต่อไปได้ สามารถเกิดขึ้นได้ในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตทุกชนิดรวมถึงเชื้อราด้วย ซึ่งกระบวนการเกิด RNA silencing เป็นการทำงานของ Dicer ที่จดจำตำแหน่งของ siRNA, hpRNA หรือ dsRNA เป็นต้น สามารถส่งถ่ายสัญญาณแบบ cell- to-cell และทางท่ออาหารได้ด้วย (Mlotshwa *et.al.*, 2002)

การทำงานของกระบวนการ RNA silencing เริ่มจาก DCLs มี dsRNA-specific endonuclease ที่สามารถจดจำและจับ dsRNA ที่มีความคล้ายคลึง (homologue) กับ mRNA เป้าหมาย จะตัดสาย dsRNA ออกเป็นสายสั้นๆ ที่เรียกว่า small interference RNA (siRNA) ที่มีความยาวประมาณ 21-25 คู่ จากนั้นAGO2 จะเข้ามาจับ siRNA ดังกล่าวเกิดเป็น ribonucleoprotein complex (RNP) และเหนี่ยวนำให้โปรตีนชนิดอื่นเข้ามารวมกันเพื่อสร้างเป็น RISC complex จะทำการแยก siRNA สายคู่ออกเป็นสายเดี่ยว โดยสายเดี่ยวที่เป็น antisense ของ siRNA จะมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย จึงเป็นตัวกำหนดความจำเพาะ และการจดจำให้ RISC complex เข้าจับ และทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้อย่างแม่นยำ ซึ่ง RISC ที่มี siRNA สายเดี่ยวรวมอยู่ด้วย (RISC complex) เข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอ เป้าหมายโดยอาศัยลำดับเบสคู่สมระหว่าง siRNA และเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย จากนั้นเอ็มอาร์เอ็นเอจะถูกย่อยโดย slicer ใน RISC complex เป็นผลให้ไม่มีเอ็มอาร์เอ็นเอผ่านเข้าสู่กระบวนการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนจากยีนนั้นเกิดขึ้น การทำงานของ RNAi จึงเป็น post-transcriptional regulation of gene expression หรือ post-transcriptional gene silencing กระบวนการเกิด RNA silencing ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นการสังเคราะห์ short interference RNA (siRNA) และ ขั้นการทำลาย mRNA เป้าหมาย (Qu *et.al.*, 2008)

Xie และคณะ (2001) รายงานการสร้างต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม โดยยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNA silencing ในส่วนของยีน *NtRDR1* เมื่อนำทดสอบปลูกถ่ายเชื้อ ไวรัสใบด่าง

ยาสูบ (tobacco mosaic virus : TMV) พบว่า ต้นที่ตัดแปลงพันธุกรรมให้ยับยั้งการแสดงออกของยีน *NtRDR1* จะแสดงอาการอ่อนแอต่อโรคมามากกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นต้นปกติ

Mallory และคณะ (2001) ได้ศึกษาการส่งถ่ายสัญญาณ RNA silencing ในต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 1.) ต้นยาสูบยับยั้งการแสดงออกของยีน *GUS* (6b5) 2.) ต้นยาสูบที่มีการแสดงออกของ *GUS* (T19) และ 3.) ต้นยาสูบที่มีการแสดงออกของยีน *GUS* และยีน *Hcpro* (T19HC-Pro) เมื่อต้นนำ 6b5 มาทำเป็นต้นต่อ แล้วเสียบยอดด้วยต้น T19 และต้น T19HC-Pro พบว่า ยอด T19 จะไม่มีการแสดงออกของยีน *GUS* เนื่องจากต้นต่อมีการส่งสัญญาณ silencing ขึ้นไปหายอดได้ จึงทำให้ยอดที่มีการแสดงออกของยีน *GUS* ถูกยับยั้ง แต่ยอด T19HC-Pro มีการแสดงออกของยีน *GUS* แสดงว่ายีน *HcPro* สามารถยับยั้งการทำงานของกระบวนการ RNA silencing ได้ จึงทำให้ยีน *GUS* ถึงแสดงออกในต้น T19HC-Pro

การกลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ปัจจุบันได้มีรายงานแล้ว ได้แก่ ยีนในกลุ่มปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรม (translation initiation factors) จะเกิดปฏิสัมพันธ์โปรตีน (protein interaction) กับโปรตีนของไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ทำให้มะละกอเกิดโรค แต่เมื่อมีการกลายของยีน *eIF4E* พบมะละกอสามารถต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอได้ สำหรับยีนในกลุ่มกระบวนการ RNA silencing เป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างภูมิคุ้มกันของพืชให้ต้านทานต่อไวรัสได้ ดังนั้น หากพบว่า มะละกอมีการกลายของยีนในสองกลุ่มยีนนี้ อาจส่งผลให้โปรตีนจากไวรัสไม่สามารถเกิดการปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนมะละกอได้ และอาจส่งผลให้ต้นมะละกอมีความต้านทานต่อโรคไวรัสใบต่างจุดวงแหวนมะละกอ การทดลองนี้จึงได้ศึกษาการกลายของยีนในมะละกอ เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกต้นมะละกอทนทานต่อโรคไวรัสใบต่างจุดวงแหวนต่อไป

## 7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

### อุปกรณ์

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุล ได้แก่ ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), เจลอะกาโรส (Agarose gel), TBE Buffer, Taq DNA Polymerase, DNA Ladder และ Edthidium Bromide ฯลฯ
2. วัสดุวิทยาศาสตร์และวัสดุห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Thermal Paper, ถุงมือ, Mask, โกร่ง, หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร, หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร, หลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร, ไปเปตทิปขนาดต่างๆ, ขวดดูแรน ฯลฯ
3. เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
6. ชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)
7. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

## วิธีดำเนินการ

### 1. การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

#### 1.1 การค้นหายีนและการออกแบบไพรเมอร์

ทำการค้นหายีนในกลุ่มปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรม (translation initiation factors) ได้แก่ ยีน *eIF4E* และยีนในกลุ่มกระบวนการ RNA silencing ได้แก่ *RDR6* จากฐานข้อมูล นำนิวคลีโอไทด์ของยีน *eIF4E* หมายเลข accession FJ644949.1 และ ยีน *RDR6* หมายเลข accession KF668595.1 มาออกแบบและตรวจสอบด้วยโปรแกรม OligoClac (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) แล้วทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์

#### 1.2 การสกัดดีเอ็นเอรวมจากใบมะละกอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบมะละกอพันธุ์แขกดำศรีสะเกษ โดยใช้ RNeasy Plant Mini Kit ของบริษัท Qiagen นำใบปริมาณ 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ RLT ปริมาตร 450 ไมโครลิตร และ  $\beta$ -mercaptoethanol ผสมอยู่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าสารละลายโดยการ vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นดูดสารละลายลงใน QIAshredder spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองด้วย QIAshredder spin column (ปริมาตรประมาณ 450 ไมโครลิตร) มาเติมลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม absolute ethanol 0.5 เท่าของส่วนใส ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีดูดขึ้นและลง แล้วดูดสารละลายดังกล่าวลงใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้งไป ล้าง column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ RW<sub>1</sub> ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้ง ล้าง column อีกสองครั้งโดยการเติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้ง ปั่นเหวี่ยง column ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่เหลือค้างอยู่บน column ให้หมดไป ย้ายเฉพาะในส่วนของ column ไปวางลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชะอาร์เอ็นเอออกจาก column ด้วยการเติม RNase free water ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ที่มี RiboLock™ RNase Inhibitor ของบริษัท Fermentas ผสมอยู่ความเข้มข้น 0.04 ยูนิตต่อไมโครลิตร

#### 1.3 การสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวม

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสมด้วยชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit ยี่ห้อ Thermo โดยนำอาร์เอ็นเอรวมความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร 5 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ oligo(dT)<sub>18</sub> 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DEPC 6.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำมาเติมบัฟเฟอร์ 5X reaction 4.5 ไมโครลิตร RiboLock™ RNase inhibitor 1 ไมโครลิตร 10mM dNTP mix 2 ไมโครลิตร และ RevertAid M-MuLV 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

#### 1.4 การเพิ่มปริมาณยีน *CpRDR6* และ *CpelF4E* ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

นำ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ มาเพิ่มปริมาณยีน *CpRDR6* และ *CpelF4E* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ดังนี้

ไพรเมอร์สำหรับยีน *CpRDR6*

RDR6F: 5'-ATG GGG TCT GAA GGT AAT ATG AAG A-3'

RDR6R: 5'-TCA TAT TCT ATC AGC AAG ATA CCT T-3'

ไพรเมอร์สำหรับยีน *CpelF4E*

eIF4EF: 5'-ATG GTA GTA GAA GGA ACC CCC AAA C-3'

eIF4ER: 5'-TCA TAC CGG AGA GCG ATT CTT AGC A-3'

เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

cDNA template	1	ไมโครลิตร
5x Buffer	5	ไมโครลิตร
dNTPs (2mM)	2	ไมโครลิตร
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Forward (10 μM)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Reverse (10 μM)	1	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase, Pomega	0.1	ไมโครลิตร
Distilled water	12.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ดูตสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

#### 1.5 การโคลนยีนเข้าสู่พีซีอาร์เวคเตอร์

นำชิ้นยีนที่ได้จากพีซีอาร์มาทำปฏิกิริยา ligation ด้วยวิธีโคลนปลายทู่ (blunt-End Cloning) โดยใช้ชุด CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) ประกอบด้วย 2X reaction buffer 10 ไมโครลิตร ผลผลิตพีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร DNA blunting enzyme 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย Water nuclease-free ให้ได้ 18 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่น 3-5 วินาที บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้ว



วางบนน้ำแข็ง จากนั้นเติม pJET 1.2/blunt cloning vector (50 ng/ul) 1 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (5U/ul) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่น 3-5 วินาที บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที (สามารถบ่มได้นานถึง 30 นาที) นำปฏิกิริยา ligation ที่ได้ไปฝากถ่ายเข้าเก็บเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

#### 1.6 การสกัดพลาสมิด

นำโคลนของเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายยีนมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดโดยดัดแปลงวิธีการของ Sambrook และ Russell (2001) ดูดเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารทิ้งไป เติม TE buffer (10 mM Tris-HCl; (pH 8.0), 1 mM EDTA) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์ด้วยการ vortex เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที จากนั้นเติม lysis buffer (0.2 mM NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นและลงเบาๆ เติม precipitation buffer (5 M potassium acetate, 96 เปอร์เซ็นต์ acetic acid) ปริมาตร 225 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นและลงเบาๆ เชน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเติม isopropanol ปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรส่วนใส (500 ไมโครลิตร) พลิกหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นและลง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนของพลาสมิดด้วยน้ำที่เติม RNase A ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบส

## 2. การตรวจสอบการกลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

### 2.1 ตัวอย่างมะละกอนำมาตรวจสอบการกลายของยีน

แบ่งตัวอย่างมะละกอออกเป็น 3 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 มะละกอพันธุ์อ่อนแอต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

กลุ่มที่ 2 มะละกอพันธุ์ทนทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอที่มีการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

กลุ่มที่ 3 มะละกอที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาที่ผ่านการคัดเลือกจากสถาบันวิจัยพืช

สวน กรมวิชาการเกษตร

### 2.2 การสกัดอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอจากใบมะละกอ

การตรวจสอบการกลายของยีน *CpeIF4E* จะทำการเพิ่มปริมาณจากอาร์เอ็นเอตามวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอในข้อที่ 1.2 สำหรับยีน *CpRDR6* ทำการเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจากอรุโณทัย และคณะ (2552) ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-

HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2% (W/V) CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)] เติมน้ำ 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งใบมะละกอ 3 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแห้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำ Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติมน้ำ Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมน้ำ 3M NaOAc 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำ RNaseA(10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

### 2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *CpEIF4E* จาก cDNA ที่สังเคราะห์ได้ และยีน *CpRDR6* จากดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ดังนี้

ไพรเมอร์สำหรับยีน *CpEIF4E*

eIF4EF: 5'-ATG GTA GTA GAA GGA ACC CCC AAA C-3'

eIF4ER: 5'-TCA TAC CGG AGA GCG ATT CTT AGC A-3'

ไพรเมอร์สำหรับยีน *CpRDR6* ในส่วนของ active site

atRDR6F: 5'-ACA AAA GCA TAT CGT CTG CCA CCG G -3'

atRDR6R: 5'-ATT GGA AGT ATC ATC ATT ATA GAC-3'

เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

cDNA template	1	ไมโครลิตร
5x Buffer	5	ไมโครลิตร
dNTPs (2mM)	2	ไมโครลิตร
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ Forward (10 $\mu$ M)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Reverse (10 $\mu$ M)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase, Pomega	0.1	ไมโครลิตร
Distilled water	12.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ดูสูตรละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

#### 2.4 การทำชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit ยี่ห้อ Invitrogen ดังนี้ นำพีซีอาร์ 100 ไมโครลิตร มาเติม PureLink® Binding Buffer (B2) จำนวน 1 เท่า คือ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดของเหลวใส่ลงใน PureLink® Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วปั่นคอลัมน์ให้แห้งอีกรอบนาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นชะผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนแอซิดของยีน *CpRDR6* และ *CpeIF4E*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* และ *CpeIF4E* มาถอดรหัสเป็นอะมิโนแอซิดด้วยโปรแกรม ExpAsy translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>) แล้วทำ alignment ด้วยโปรแกรม Cluster Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) และเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโนแอซิด

#### ระยะเวลาการทดลอง (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2558      สิ้นสุด กันยายน 2560 รวม 2 ปี

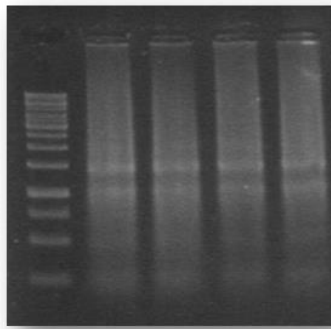
#### สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

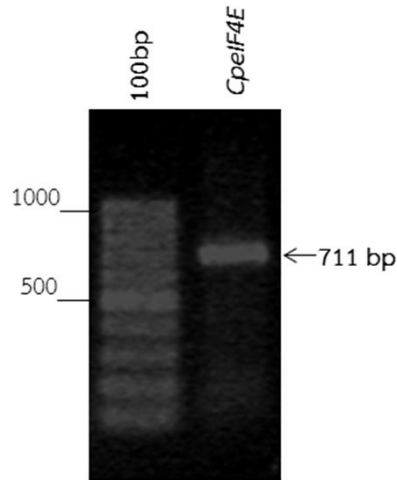
การออกแบบไพรเมอร์จากนิวคลีโอไทด์ของยีน *eIF4E* หมายเลข accession FJ644949.1 และยีน *RDR6* หมายเลข accession KF668595.1 เฉพาะส่วน coding sequence ทั้งทางด้านหัวและท้ายยีน เมื่อตรวจสอบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม OligoCalc ไม่พบการการม้วนพับ (hairpin) และการจับกันเองของไพรเมอร์ (Complementarity) ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีต่อการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบมะละกอด้วยชุด RNeasy Plant Mini Kit ของบริษัท Qiagen พบว่า ที่ปริมาณใบ 0.5 กรัม เหมาะสมที่สุดทำให้ได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดีและปริมาณมาก (ภาพที่ 1) ปริมาณใบเริ่มต้นหากมากกว่า 0.5 กรัม มีผลต่อการสกัดทำให้ได้ปริมาณอาร์เอ็นเอน้อยหรือไม่ได้เลย เนื่องจากปริมาณใบที่มากขึ้นส่งผลให้ปริมาณน้ำยาตามคำแนะนำของชุดสกัดไม่เพียงพอต่อการกำจัดสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ ส่งผลให้เอ็นไซม์หลายชนิดยังคงทำงานได้ ทำให้ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอลดลง แต่ปริมาณใบที่น้อยกว่า 0.5 กรัม ไม่มีผลต่อการสกัดและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ



ภาพที่ 1 อาร์เอ็นเอรวมจากใบมะละกอที่สกัดด้วยชุด RNeasy Plant Mini Kit บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

การโคลนยีนจากไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ พบว่ายีน *CpeIF4E* ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *eIF4EF* กับ *eIF4ER* เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder จะมีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 2) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มีส่วนของ coding sequence ทั้งหมดขนาด 711 คู่เบส จาก start codon ถึง stop codon (ภาพที่ 3) สามารถถอดรหัสเป็นอะมิโนแอซิดได้ 236 อะมิโน (ภาพที่ 4) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpeIF4E* กับฐานข้อมูล NCBI พบมีความเหมือนกับ *Carica papaya eIF4E*, *Vasconcellea monoica eIF4E* และ *Manihot esculenta eIF4E* ที่ identity 99, 93 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับลำดับอะมิโนแอซิดมีความเหมือนกับ *Carica papaya*, *Vasconcellea goudotiana* และ *Manihot esculenta* ที่ identity 99, 92 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของยีน *CpRDR6* ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *RDR6F* กับ *RDR6R* เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส มีขนาดประมาณ 3500 คู่เบส (ภาพที่ 5) เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ยีนขนาด 3588 คู่เบส (ภาพที่ 6) มีความเหมือนกับ *Carica papaya RDR6*, *Morus notabilis RDR6* และ *Nicotiana glutinosa RDR6* มีค่า identity 100, 75 และ 71 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ อะมิโนเอซิดเหมือนกับ *Carica papaya*, *Manihot esculenta* และ *Herrania umbratica* ที่เปอร์เซ็นต์ identity 100 71 และ 70 ตามลำดับ จากข้อมูลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทำให้ทราบว่า ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนเอซิดของยีน *CpRDR6* และ *CpelF4E* จากมะละกอ มีความเหมือนกับมันสำปะหลังมากที่สุด



ภาพที่ 2 ชิ้นส่วนยีน *CpelF4E* ของมะละกอขนาดความยาว 711 คู่เบส ที่ได้จากอาร์เอ็นเอ บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

```

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAATCCCAATACCGCGAACCC
TAATTCTAGACCTCGTGGCGACGAGGAAGACGAGGGGCCGGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGA
GATCATCAGCCGTTTTGCTCCAGCCGCATCCTCTCGAGCATCCATGGACATTCTGGTTTTGATAACTTCTCTGCCAAA
TCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTGTATACGTTCCGAACTGTTGAGGAGTTCTGGAGCCTTTA
CAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTTGGAGCAGACTTTTTATTGCTTCAAACATAAAAATTGAACCAAAAT
GGGAGGACCCTGTTTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGAATTTCCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTG
TATACGTTGCTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTCTGAATGTCAGAGG
CAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGGACCAAAAATGCTGCAAACGAGGCTGCTCAGATGAGCATTGGGAAGCAGTGGGA
AGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTACAGAGGATGCAAAGAAGCTTGAGAGAGCTGCTAAG
AATCGCTCTCCGGTATGA

```

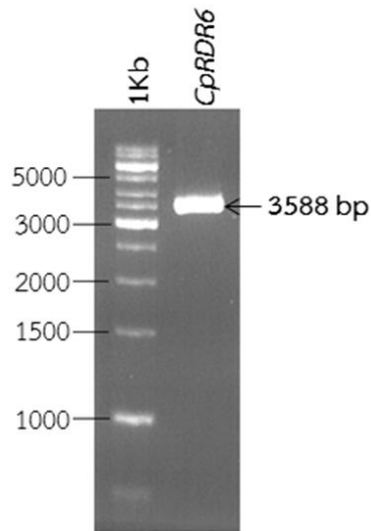
ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *eIF4E* ในส่วนของ coding sequence ทั้งหมด ความยาว 711 คู่เบส

```

MVVEGTPKLSSTSV AEDKPNPNTANPNSRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQPHPLEHPWTFWFDNFS AK
SKQATWGSSMRSVYTFRTVVEEFWSLYNNIHHPSKLA VGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTMNFQRGKSDTCWL
YLLAMIGEQFDHGDEICGVVVNVRGRQEKIALWTKNA ANEAAQMSIGKQWKEFLDYNDTMGFI FHEDAKKLERAAK
NRSPV

```

ภาพที่ 4 ลำดับอะมิโนเอซิดของยีน *CpelF4E* ขนาดความยาว 236 อะมิโน



ภาพที่ 5 ชิ้นส่วนยีน *CpRDR6* ของมะละกอนขนาดความยาว 3588 คู่เบส ที่ได้จากอาร์เอ็นเอ บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

ATGGGGTCTGAAGGTAATATGAAGAATACTGTGGTTACTCAAGTTAGTTTTGGTGGTTTTGGTCGGAATGTTACGGCCAAAGAACT  
AACGGAGTTTTTGGGAAGAAGAAGTTGGACTTGTATGGAGACGTAGATTGAAGACTTCTTGCACCCCTCCAGACTCCTTCCCAGATT  
TTCGGATAACTGATATGGCAGGTGTCTGGAGGTCGGATAACTACAAGAAGGTGGAGCCACATGCATTTGTTCAATTTGGCTTGCCT  
AAATCGGCAACTAGAGCCATGGAGGCTTCCGGTCGTGGTGGATTATTTTTTAAAAATCAACTATTGAAGGCCAGTCTGGGTCCTGA  
GAGTTCATTTACATGAATCAGAGGAGGAGGACCATGATCCCCTTCAAGTTAGTTGATGTGGGTCTTGAGATTGGAACCTTGGTTA  
GTCCAGGTGAGTTTATGTTGGTGGAGAGGACCTTCTCTGGGATTGAATTTCTAGTGGATCCTTTTGACAGGACATGCAAGTTT  
TGTTTCTCAAGAGATATGGCTTTCTCTTTCAGAGGCAGTGTAGAGCATGCAGTGATAAAATGTAATTTTAAAGATGGAGTTCTTGGT  
GAGAGAAATTAAGATTCTAATACTACAAAGATTCATCAGGTTTTGTAATTATGTTGCAGCTGGCTTACCACCCTGGCTTTGGT  
ATAGAAGTGTGGTGTATGATGTATATGAAACAGTTGCTTTTGATGTTTTGGATGATGATGATCCTTGGATAAGAACCCTGATTTT  
ACTCTAGTGGAGCTTTCGGTCGATGTAATTCCTACAGGTTTTCTATTTCTCCCGCTATGAGGGAAAAATGAAAAATATCTGGGA  
ATATCTTCAGAATCAGAGGGTGCCTGTTCCACAGCCTTAAGTGGCCACCAGGTGTCAGGGATGAACCTTGATTTTGGGATTTCCCATGT  
CAGACATATTCTCTTCTATCCATTACAGAAAAGGTATTGAATTTGAGATACTTTTTTTAGTGAATGCGGTAATGCACAAAGGCATC  
TTTAAACCAGTATAGGATGACTGGAAGTTTCTTTGATCTACTAAGAAGCCAACCCAAGGAGGTAATTTGGCTGCCTGAAGCACAT  
CTGGTCTCTAAATGCCAGTGTGTTGACGCCTACAAGAGGTTGAAACTTGTCCAAGAAATGGATTTTGAAGAATCCAAGTACTTC  
AGAGACCCAAGCAGATGATCGATATGTTGAGATCAGACGGCTGGTGAATTTACTCCACAAAAGCATATCGTCTGCCACCGGAAGTT  
GAACCTTCCAATAGGGTCTTAGAAGATATAATGATGTGTCTGATAGATTTTAAAGGGTCACTTTTATGGATGAAGGTATGCAGAC  
GATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGGCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGT  
TCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGCGAAAAATATTCTTTTCTAGCCTTTTCAATCCAACCAATTG  
AGGGACCGTTCTGCTTGGTCTTTGCTGAAGACAAGAACACATCCGTCATAATATCACAATGGAAGGGGGAAGTTCCTGACCG  
AAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCAATT  
TTGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTCACATGATCTTACAATGGAAGTTGTG  
GAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCC  
ATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCAGTGCAGGCCCCAGCATGAACAAATTCACGCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTT  
GGACAAGATTTTCAGCCTGGTTTTCTTGAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAATTGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGAC  
ATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTCACAAGATGGTAGAGGCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGA  
ACAAGGGAATAGTGGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAA  
GAGCAGCACAGCTTTGGGGCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTTGTTCCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGCTGCTTGGATGAACTG  
GCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCGGTCCATCACTACAAAATGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTTTC  
TGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGTAGCGAAGAATCCTTGTCTTCATCCAGGGGATATAAGAATTC  
TCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATTGCCTTGTTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAATGAA

GCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTCCACCCAGCAAAGAAGCTGGACTCC  
 TATGGATTATGAACCTGCAGATACCAAACTTTGACACACCCTGTCAGCCATCAGGACATAATAGGATTTTTTGCCTAAGAACATGG  
 TACATGAAAACCTGGGAGCAATTTGCAATGCCATGTGGTTCATGCTGACAGGAGTGAGTATGGAGCTTTGGACGAGAATGCATA  
 CTCTTGGCAGAATGGCAGCTATAGCTGTGATTTTCCCAAGACTGGGAACTTGTGACAATGCCTTCTCATTTAAAACCAAAAAT  
 CTACCAGATTTTTATGGGAAAAGAGGATTATCGATCATATAAAATCAAATAAAATTTCTGGGAAGGTTGTATCGACGCATAAAAAGATG  
 TCTATAATGATGATACTTCCAATGCAGATTTTGTACCAGGAGATATCCCTTATGATACTGATTTGGATAAAACCCGGATCTGCCGGT  
 TTTCTTCTTGATGCCTGGGCCAGAAAGTGTATACGATTGGCAGCTTACCAGTCTTCTTGGGCAGTATAAAGTGAAAAGGGAAGA  
 AGAGATTGTAACAGGCCATGTTTGGTCTATGCCATAGATACACCAGTAGGAAGGAAGGGGAGCTGAAGGAGAGGCTGAAACATTTCTT  
 ACAGTGTCTTGAAGAAAGAATTCGGACAGATTTTTGAGAACATGCACCCAGAATTTGAGCAACTCACTGAGGATGAGAAGAATATT  
 CTGTATGAACAGAAGGCATCAGCTTGGTACCAGTTTGTACCACCCCAAGTGGGTGGATAAAATCTCGGGAATTGCAAGAGCCTGT  
 TTGTGCTGAAAATCCCTTAATGTTGAGTTTTGCATGGATTGCGGTTGATTACCTTGTGCAATCAAGATCAAATCTCGTCAAATGG  
 GAGATATTGATTCTACCAAGCCAGTCAACTCTCTAGCAAGGTATCTTCTGATAGAATATGA

### ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* ในส่วนของ coding sequence ความยาว 3588 คู่เบส

MGSEGNMKNVTVVTVQVSFGGFGRNVTAKELTEFLEEEVGLVWRRRLKTSCTPPDSFPDFRITDMAGVWVSDNYKKVPE  
 HAFVHFALPKSATRAMEASGRGGLFFKNQLLKASLGPESSEFHMNQRRRTMIPFKLVVDVGLIEGTLVSPGFEIVGWGRG  
 PSSGIEFLVDPFDRTCKFCFSRDMAFSFRGSVEHAVIKCNFKMEFLVREITEISNYKDSGGFVIMLQLASPPWLWYR  
 TAGDDVYETVAFDVLDDDDPWIRTTDFTPSGAFGRCSYRVSISPRYEGKLNKIWEYLQNRVVRVHSLKWPPSVRDE  
 LDFGIPMSDIFSSIHYRKGIEFEILFLVNAVMMHKGIFNQYRMTGSFFDLLRSQPKEVNLAAALKHIWSSKCPVFDAYK  
 RLKLVQEWILKNPKVLQRPKQIMIDIVEIRRLVITPTKAYRLPPEVELSNRVLRRYNDVSDRFLRVTFMDEGMQITINL  
 NVLNYYVASIVKDLTSNSAPQKTTVFKRVKILTNGFNLCGRKYSFLAFSSNQLRDRSAWFFAEDKNTSVHNI TNGR  
 GKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEVNFELEKEIKRNGYVFSDDGIGTISHDLTMEVVEKLLKDMNPPSAF  
 QIRYAGCKGVVACWPSKGDGIRLSLRPSMNKFTSNHAILEICSWTRFQPGFLNRQIVTLLSALIVPDEVFVWMMESM  
 LDELAVLEQQQCFIQVSGPSLQNCFSKHGSRFSEIQRNLEVVKGFFVIAKNPCLHPGDIRILEAVDAPDLHHLCDCL  
 VFPQKGRPHNTNEASGSDLGDLYFVTWDENLVPPSKRSWTPMDYEPADTKTLTHPVSHQDIIGFFAKNMVHENLGA  
 ICNAHVHADRSEYGALDENCILLAEALAAI AVDFPKTKGLVTMPSHLKPKIYPDFMGKEDYRSYKSNKILGRLYRRI  
 KDVYNDTSDNADFVTGDI PYDITDLKPGSAGFLLDAWAQKCLYDQWQLTSLLGQYKVKREEEIVTGHVWSPRYTSRK  
 EGELKERLKHYSVLKKEFRQIFENMHPEFEQLTEDEKNILYEQKASAWYQVCYHPKWVDKSRELQEPVCAENPLML  
 SFAWIAVDYLARIKIKSRQMGDIDSTKPVNSLARYLADRI

### ภาพที่ 7 ลำดับอะมิโนเอซิดของยีน *CpRDR6* ขนาดความยาว 1194 อะมิโน

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* และ *Cpelf4E* ที่โคลนได้จากอาร์เอ็นเอกับ  
 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอจากมะละกอ พบว่า ยีน *CpRDR6* มีส่วนของ coding sequence บนโครโมโซม  
 ยาว 1773 คู่เบส (ภาพที่ 8) และเป็นส่วน active site ของโปรตีน ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จากดีเอ็นเอ การ  
 ทดลองนี้จึงได้ทำการตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* ตรงส่วนของ active site โดยการเพิ่มปริมาณจากดี  
 เอ็นเอด้วยไพรเมอร์ atRDR6F และ atRDR6R แต่ยีน *Cpelf4E* มีส่วน coding sequence เพียงแค่ 200 คู่เบส  
 และขนาดยีนในส่วนของ coding sequence ทั้งหมดยาวเพียง 711 คู่เบส จึงเพิ่มปริมาณจากอาร์เอ็นเอในการ  
 ตรวจสอบการกลายของยีน

ACAAAAGCATATCGTCTGCCACCGGAAGTTGAACTTTCCAATAGGGTTCTTAGAAGATATAATGATGTGTCTGATAG  
 ATTTTTAAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCCTCCA  
 TAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAAT  
 GGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAATATTCTTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTT  
 CTTTGTCTGAAGACAAGAACACATCCGTCCATAATATCACAATGGAAGGGGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCA  
 AGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTCCATCACTAGAGGTCAATTTT  
 GAGCTTAAAGAAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTCACATGATCTTACAATGGA  
 AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGG  
 TTGTGGCTTGTGGCCATCAAAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAAATTCACGTCTAAC  
 CATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTTCAGCCTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTT

AGCGCTAATTGTTCCAGATGAAGTGTGTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTTCAAATTACACAAGATGGTAGAGG  
 ACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGCGGCCATAATGTTGAGTGCA  
 GGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCCCTCCG  
 GGAGAAGGCAAGGATTTTTGTTCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAG  
 GCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCGGTCCATCACTACAAAATTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTTCTGAGATC  
 CAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGATAGCGAAGAATCCTTGTCTTCATCCAGGGGATATAAGAAAT  
 TCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTGTTTTCCCCAGAAAAGTGATAGGCCCC  
 ACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGTGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTTCACCC  
 AGCAAAAGAAGCTGGACTCCTATGGATTATGAACCTGCAGATACCAAACTTTGACACACCCTGTCAGCCATCAGGA  
 CATAATAGGATTTTTTGGCAAGAACATGGTACATGAAAACCTTGGGAGCAATTTGCAATGCCCATGTGGTTCATGCTG  
 ACAGGAGTGAGTATGGAGCTTTGGACGAGAAGTGCATACTCTTGGCAGAATTGGCAGCTATAGCTGTGATTTTCCC  
 AAGACTGGGAAAACCTTGTGACAATGCCTTCTCATTTAAAACCAAAAATCTACCCAGATTTTATGGGAAAAGAGGATTA  
 TCGATCATATAAATCAAATAAAAATTCTGGGAAGGTTGTATCGACGCATAAAAAGATGTCTATAATGATGATACTTCCA  
 AT

ภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* ในส่วนของ active site ความยาว 1773 คู่เบส

## 2. การตรวจสอบการกลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

การตรวจสอบการกลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอได้ทำการ  
 ตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* จากดีเอ็นเอ และ *Cpelf4E* จากอาร์เอ็นเอ ที่สกัดจากใบมะละกอ โดย  
 แบ่งตัวอย่างมะละกอเป็น 3 กลุ่ม จากตัวอย่างมะละกอทั้งหมด 24 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 1 เป็นตัวแทนมะละกอพันธุ์  
 อ่อนแอต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ มข.(ธ3) แยกคำศรีสะเกษ (R1T1) และแยก  
 คำศรีสะเกษ (R3T1) กลุ่มที่ 2 มะละกอพันธุ์ทนทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอที่มีการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ  
 จำนวน 14 ได้แก่ Florida ต้นตัวผู้, Florida ต้นตัวเมีย ขอนแก่น 80 ต้นที่ 1, ขอนแก่น 80 ต้นที่ 2, KK80-  
 Florida 67, KK80-Florida 19, KDTP-Florida 4, KDTP-Florida 12, KDTP-Florida 76, KDTP-Florida 41,  
 KDTP-Florida 47, KDTP-Florida 27, KDTP-Florida 34 และ KDTP-Florida 74 กลุ่มที่ 3 มะละกอที่ก่อให้เกิด  
 การกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาที่ผ่านการคัดเลือกจากสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร 4 ตัวอย่าง ได้แก่  
 M13-12 ต้น 1, M13-12 ต้น 2, M13-15 และ M13-6 21 นอกจากนี้สถาบันวิจัยพืชสวนศรีสะเกษได้ทำการ  
 ทดสอบต้นมะละกอที่ทนทานต่อโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอในแปลงปลูก พบมีต้นมะละกอที่ทนทานต่อโรคไม่  
 แสดงอาการของโรคทั้งที่ต้นบริเวณรอบด้านเป็นโรคหมด จึงได้นำมาตรวจสอบการกลายของยีนด้วย จำนวน 3 ต้น  
 ได้แก่ HF33 1/1, HF39 ต้น 1 และ HF39 ต้น 2 (ตารางที่ 1)

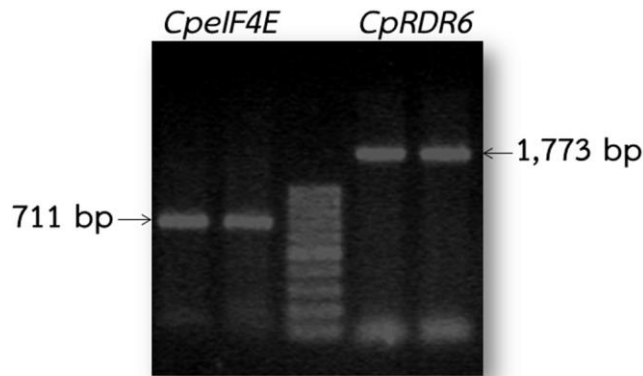
ตารางที่ 1 ตัวอย่างมะละกอที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* และ *Cpelf4E*

หมายเลข	ตัวอย่างมะละกอ	สถานที่ปลูก	กลุ่มตัวอย่างมะละกอ
01	พันธุ์ มข.(ธ3)	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	อ่อนแอ
02	Florida ต้นตัวผู้	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
03	Florida ต้นตัวเมีย	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
04	ขอนแก่น 80 ต้นที่ 1	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
05	ขอนแก่น 80 ต้นที่ 2	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
06	แยกคำศรีสะเกษ (R1T1)	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	อ่อนแอ



07	แขกดำศรีสะเกษ (R3T1)	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	อ่อนแอ
08	KK80-Florida 67	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
09	KK80-Florida 19	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
10	KDTP-Florida 4	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
11	KDTP-Florida 12	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
12	KDTP-Florida 76	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
13	KDTP-Florida 41	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
14	KDTP-Florida 47	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
15	KDTP-Florida 27	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
16	KDTP-Florida 34	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
17	KDTP-Florida 74	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
18	M13-12 ต้น 1	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	ทนทาน (จากการฉายรังสี)
19	M13-12 ต้น 2	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	ทนทาน (จากการฉายรังสี)
20	M13-15	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	ทนทาน (จากการฉายรังสี)
21	M13-6 21	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	ทนทาน (จากการฉายรังสี)
22	HF33 1/1	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	อยู่ในระหว่างการเก็บ ข้อมูล
23	HF39 ต้น 1	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	อยู่ในระหว่างการเก็บ ข้อมูล
24	HF39 ต้น 2	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	อยู่ในระหว่างการเก็บ ข้อมูล

การตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* จากดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ atRDR6F กับ atRDR6R และ ยีน *CpelF4E* ด้วยไพรเมอร์ eIF4EF กับ eIF4ER จะได้ชิ้นส่วนยีนขนาด 1773 คู่เบส และ 711 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 9) การเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ทั้งสองไพรเมอร์พบว่ายังมีการปนเปื้อนการจับกันของไพรเมอร์ (primer dimer) การส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้ผลผลิตพีซีอาร์โดยตรง ไม่ได้ทำการโคลนเข้าสู่พีซีอาร์เวกเตอร์ก่อน จึงจำเป็นต้องทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ก่อนนำส่งวิเคราะห์ลำดับเบส หากไม่บริสุทธิ์จะมีผลต่อการวิเคราะห์ อาจทำให้ได้สายนิวคลีโอไทด์สั้นลงหรือไม่ได้เลย



ภาพที่ 9 ชิ้นส่วนยีน *CpRDR6* จากตีเอ็นเอ และ *CpeIF4E* จากอาร์เอ็นเอ ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ บน เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์การกลายของยีน *CpRDR6* และ *CpeIF4E* จะนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้าน (ด้าน Forward และ Reverse) มารวมเข้าด้วยกัน (assembly) ตัดส่วนที่คาดว่าวิเคราะห์ไม่สมบูรณ์ทางด้านปลายทั้งสองด้าน นำลำดับนิวคลีโอไทด์แปลรหัสเป็นลำดับอะมิโนเอซิดด้วยโปรแกรม ExPASy translate tool แล้ววิเคราะห์ผลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนเอซิดด้วยโปรแกรม Clustal Omega พบว่า ยีน *CpRDR6* ในตัวอย่าง HF39 ต้น 1 มีลำดับอะมิโนเอซิดที่แตกต่างจากทุกตัวอย่างถึง 36 อะมิโน (ภาพที่ 11) ซึ่งน่าสนใจในการนำไปพัฒนาและศึกษาความทนทานต่อโรคไวรัสจุดวงแหวนต่อไป เนื่องจากต้นดังกล่าวไม่ถูกทำลายด้วยไวรัสจุดวงแหวน ในขณะที่ต้นรอบข้างทุกต้นถูกทำลายด้วยไวรัสรอบด้าน การวิเคราะห์ลำดับอะมิโนเอซิดของยีน *CpRDR6* ยังพบความแตกต่างของอะมิโนเอซิดที่สัมพันธ์กับตัวอย่างที่ทนทานต่อไวรัส คือ ลำดับอะมิโน P (proline) ในตัวอย่าง KK80-Florida 67, ขอนแก่น 80 ต้นที่ 2, Florida ต้นตัวผู้ และ Florida ต้นตัวเมีย (ภาพที่ 12) ซึ่งเป็นตัวอย่างต้นที่ทนทานแต่ไม่พบในตัวอย่างต้นที่อ่อนแอเลย สำหรับตัวอย่างอื่นพบเป็นลำดับอะมิโน T (Threonine) ความแตกต่างในจุดนี้อาจเกี่ยวข้องกับความต้านทานของมะละกอ ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไปในอนาคต สำหรับยีน *CpeIF4E* พบความแตกต่างของตัวอย่าง KDTP-Florida 47 เพียง 1 ตำแหน่ง คือ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น A (Adenine) ซึ่งตัวอย่างอื่นทุกตัวอย่างเป็น G (Guanine) (ภาพที่ 13) ส่งผลให้ลำดับอะมิโนเอซิดเปลี่ยนไปเป็น K (Lycine) จากอะมิโน E (Glutamic acid) (ภาพที่ 14) การเปลี่ยนแปลงอะมิโนดังกล่าวอยู่ทางด้าน N-terminal ของโปรตีน อาจไม่มีผลต่อความต้านทานต่อไวรัส เนื่องจากมีรายงานของ Nieto และคณะ (2006) รายงานไว้ว่า eIF4E เป็นปัจจัยที่ทำให้พืชอ่อนแอและไม่ต้านทานต่อไวรัส ปัจจุบันมีรายงานว่าพืชตระกูลแตงเกิดความต้านทานต่อไวรัส เมื่อ eIF4E มีการกลายของยีนส่งผลให้ลำดับอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป เมื่อถูกเชื้อไวรัส *Melon necrotic spot virus* (MNSV) ที่อยู่ในกลุ่มโพที่ไวรัสเข้าทำลาย พืชเกิดความต้านทานต่อไวรัส เมื่ออะมิโนเอซิดตำแหน่งที่ 228 ซึ่งอยู่ทางด้าน C-terminal เปลี่ยนไป จากผลการทดลองดังกล่าว Nieto ได้ทำการทดลองต่อไป พบว่า Translation initiation factor 4E และ 4G สามารถกระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อไวรัสได้หลายชนิดในธรรมชาติ จากการเกิดการกลายของยีนที่เปลี่ยนอะมิโนเอซิดเพียงจุดเดียว โดยทดสอบกับไวรัสดังต่อไปนี้ *Melon necrotic spot virus* (MNSV) strains MA5, MNSV strains 264, *Cucumber vein*

*yellowing virus* (CVYV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus strain W* (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV) และ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) ด้วยเทคนิค EcoTILLING พบว่า หากอะมิโนตำแหน่ง 228 เปลี่ยนไปเป็น His จะเกิดความต้านทานต่อ CVYV, PRSV, WMV และ ZYMV สำหรับ CMV และ MNSV- M05 อะมิโนตำแหน่ง 228 เปลี่ยนไปเป็น Leu จึงเกิดความต้านทาน (Nieto et al., 2007) อย่างไรก็ตามการยีน *CpelF4E* ในต้นที่ทนทานหรือต้นที่อ่อนแอไม่มีความแตกต่างกันทางด้าน C-terminal นั้นหมายความว่าไวรัสสามารถจำลองตัวเองได้อย่างปกติเมื่อเข้าสู่มะละกอ ซึ่งการยับยั้งการสร้างโปรตีน eIF4E ในมะละกอจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการสร้างมะละกอต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอได้

HF39_1	PPGERQCF LFLLESC LMG LIGMNAVLE TRASCF TOGLOSITYKIA FSKHGSRFSEIQRN
FloridaW	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDSK_R1T2	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KK80_1	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPFlo41	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPFlo47	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPFlo27	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPFlo74	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
M13_12_1	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
HF33_1_1	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
HF39_2	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KK80Flo19	LREKARIFVP-SGRGLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KKU_T3	LREKARIFVP-SGRWLKGCLE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPFlo04	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPFlo76	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPFlo734	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
M13_12_2	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KK80Flo67	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
FloridaM	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KK80_2	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDSK_T3R1	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPFlo12	LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
	: : * :       * * *       **** :.. *       :.* : : .** :*****

ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบอะมิโนเอซิดของยีน *CpRDR6* ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ที่มีความแตกต่างของลำดับอะมิโนเอซิดเฉพาะตัวอย่าง HF39 ต้น 1 (ในแถบสีแดง)

KK80Flo67	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDSK_R1T2	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KK80_2	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
FloridaW	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
FloridaM	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
HF39_2	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
HF33_1_1	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
M13_12_2	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
M13_12_1	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPFlo74	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPFlo734	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPFlo27	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPFlo47	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPFlo41	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPFlo76	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPFlo12	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPFlo04	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KK80Flo19	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDSK_T3R1	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KK80_1	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KKU_T3	SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNI TNWVGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV

M13\_6

SNQLRDRSAWFFAEDKNISVHNITNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV  
\*\*\*\*\*

ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบอะมิโนเอซิดของยีน *CpRDR6* ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ที่มีความแตกต่างกันของลำดับอะมิโนเอซิด (ในแถบสีแดง)

```

eIF14      ATGGTAGTAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF01      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF02      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF03      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF07      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF11      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF12      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF15      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF16      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF17      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF05      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF08      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF09      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF18      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF24      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF06      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF10      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF23      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF19      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF13      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF04      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF20      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF21      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF22      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
*****

```

ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ยีน *CpelF4E* ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ที่มีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ในแถบสีแดง)

```

eIF23      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF22      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF21      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF20      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF19      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF13      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF10      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF06      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF01      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF02      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF03      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF04      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF05      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF07      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF08      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF09      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF11      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF12      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF14      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF15      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF16      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF17      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF18      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF24      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
*** *****

```

**ภาพที่ 14** การเปรียบเทียบอะมิโนเอซิดของยีน *Cpelf4E* ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ที่มีความแตกต่างกันของลำดับอะมิโนเอซิด (ในแถบสีแดง)

## 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากนิวคลีโอไทด์ของยีน *eIF4E* หมายเลข accession FJ644949.1 และยีน *RDR6* หมายเลข accession KF668595.1 พบว่ายีน *Cpelf4E* มีขนาด 711 คู่เบส จาก start codon ถึง stop codon สามารถแปลรหัสเป็นอะมิโนเอซิดได้ 236 อะมิโน การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบมีความเหมือนกับ *Carica papaya eIF4E*, *Vasconcellea monoica eIF4E* และ *Manihot esculenta eIF4E* ที่ identity 99, 93 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับลำดับอะมิโนเอซิดมีความเหมือนกับ *Carica papaya*, *Vasconcellea goudotiana* และ *Manihot esculenta* ที่ identity 99, 92 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของยีน *CpRDR6* มีขนาด 3588 คู่เบส มีความเหมือนกับ *Carica papaya RDR6*, *Morus notabilis RDR6* และ *Nicotiana glutinosa RDR6* มีค่า identity 100, 75 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อะมิโนเอซิดเหมือนกับ *Carica papaya*, *Manihot esculenta* และ *Herrania umbratica* ที่เปอร์เซ็นต์ identity 100, 71 และ 70 ตามลำดับ

การตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* จากดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ atRDR6F กับ atRDR6R และยีน *Cpelf4E* จากอาร์เอ็นเอด้วยไพรเมอร์ eIF4EF กับ eIF4ER จะได้ชิ้นส่วนยีนขนาด 1773 คู่เบส และ 711 คู่เบส ตามลำดับ การวิเคราะห์ผลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนเอซิด พบว่ายีน *CpRDR6* ในตัวอย่าง HF39 ต้น 1 มีลำดับอะมิโนเอซิดที่แตกต่างจากทุกตัวอย่างถึง 36 อะมิโน และพบความแตกต่างของอะมิโนเอซิดที่สัมพันธ์กับตัวอย่างที่ทนทานต่อไวรัส คือ ลำดับอะมิโน P (proline) พบในตัวอย่าง KK80-Florida 67, ขอนแก่น 80 ต้นที่ 2, Florida ต้นตัวผู้ และ Florida ต้นตัวเมีย ซึ่งเป็นตัวอย่างต้นที่ทนทานแต่ไม่พบในตัวอย่างต้นที่อ่อนแอเลย สำหรับยีน *Cpelf4E* พบความแตกต่างของตัวอย่าง KDTP-Florida 47 เพียง 1 ตำแหน่ง คือ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น A (Adenine) ซึ่งตัวอย่างอื่นทุกตัวอย่างเป็น G (Guanine) ส่งผลให้ลำดับอะมิโนเอซิดเปลี่ยนไปเป็น K (Lycine) จากอะมิโน E (Glutamic acid) แต่การเปลี่ยนแปลงอะมิโนดังกล่าวอยู่ทางด้าน N-terminal ของโปรตีน อาจไม่มีผลต่อความต้านทานต่อไวรัส สำหรับตัวอย่างอื่นพบเป็นลำดับอะมิโน T (Threonine) อย่างไรก็ตามความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนเอซิดที่พบอาจเกี่ยวข้องกับความต้านทานของมะละกอ ซึ่งน่าสนใจและจำเป็นต้องศึกษาต่อไปในอนาคต

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นักวิชาการ อาจารย์ นักศึกษา และนักวิจัยมะละกอ สามารถนำข้อมูลยีน *CpRDR6* และ *Cpelf4E* ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ข้อมูลลำดับอะมิโนเอซิด และเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างของมะละกอที่อยู่ใน

กลุ่มอ่อนแอและต้านทาน ไปศึกษาและพัฒนาต่อ เพื่อค้นหาความสัมพันธ์ต่อความต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนในมะละกอต่อไป

## 11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยพืชสวนศรีสะเกษ และศูนย์วิจัยพัฒนาการเกษตรขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อเมล็ดมะละกอและตัวอย่างใบมะละกอสำหรับการศึกษาทดลองในครั้งนี้

## 12. เอกสารอ้างอิง

จริงแท้ ศิริพานิช, จันทรจรัส เร็วเดชะ, จันทรวิภา ธนะโสภณ, อำไพวรรณ ภราดรน์วัฒน์, นันทวัน บุญยประภัศร และ เปรม ฌ สงขลา. 2552. มะละกอไทย สถานภาพด้านสายพันธุ์ ระบบการผลิต และการตลาด. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). 136 น.

วัฒนา สวรรยาธิปัติ. 2531. การปลูกมะละกอ. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. 42 น.

สิริกุล วะสี. 2542. มะละกอ. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 45 น.

Carrington, J.C., S.M. Cary, T.D. Parks and W.G. Dougherty. 1989. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. EMBO Journal. 8: 365-370.

Devi, s. 1952. Studies in the order Parietales. III. Vascular anatomy of the flower of *Carica papaya* L. with special reference to the structure of the gynoecium. Indian Acad. Sci. Proc, 36. 59-69.

Dougherty, W.G. and J.C. Carrington. 1988. Expression and function of potyviral gene products. Annual Review of Phytopathology. 26: 123-143.

Gonsalves, D., J.Y. Suzuki, S. Tripathi and S.A. Ferreira. 2008. Papaya Ringspot Virus. Encyclopedia of Virology (Third Edition). Pages 1-8

Grzela R., L. Strokowska, J.P. Andrieu, B. Dublet, W. Zagorski and J. Chroboczek. 2006. Potyvirus terminal protein Vpg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. Science Direct, Biochimie 88. 887-896.

- Kawaguchi R. and J. Bailey-Serres. 2002. Regulation of Translational initiation in plants. *Plant Biology* 5. 460-465.
- Kneller E.L.P., A.M. Rakotondrafara and W.A. Miller. 2006. Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Science Direct, Virus Research* 119. 63-75.
- Lines R, Persley D, Dale J, Drew R, Bateson M (2002) Genetically engineered immunity to Papaya ringspot virus in Australian papaya cultivars. *Mol. Breeding* 10:119-129.
- Mallory, A C.,L. Ely,T. H. Smith, R. Marathe, R. Anandalakshmi, M. Fagard, H. Vaucheret, Gail Pruss, L. Bowman and V. B. Vance. 2001. HC-Pro Suppression of Transgene Silencing Eliminates the Small RNAs but Not Transgene Methylation or the Mobile Signal. *The Plant Cell*, Vol. 13, 571–583.
- McKendrick L., V.M. Pain and S.J. Morley. 1999. Translation initiation factor 4E. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31. 31-35.
- Mlotshwa, S., Voinnet O., Mette M. F., Matzke M., Vaucheret H., Ding S.W., Pruss G. and B. Vicki Vance. 2002. RNA Silencing and the Mobile Silencing Signal. *The Plant Cell*. S289–S301.
- Nieto C., F. Piron, M. Dalmais, C.F. Marco, E. Moriones, M.L. Gomez-Guillamon, V. Truniger, P. Gomez, J. Garcia-Mas M.A. Aranda and A. Bendahmane. 2007. EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biology* 7:34. 1-9.
- Nieto C., M. Morales, G. Orjeda, C. Clepet. A. Monfort, B. Sturbois, P. Puigdomenech, M. Pitrat, M. Caboche, C. Dogimont, J. Garcia-Mas, A. Aranda and A. Bendahmane. 2006. An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *The Plant Journal* 48. 452-462.
- Purcifull, D.E., Edwardson J.R., Hiebert E. and D. Gonsalves (1984) *Papaya ringspot virus*. In: Coronel RE (Ed) CMI/AAB Description of Plant Viruses, no. 292. (Vol 2), Wageningen University, the Netherlands. 8 pp.
- Qu F., Ye X., 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*, vol. 105, no. 38. 14732–14737.
- Riechmann, J.L., S. Lain and J.A. Garcia. 1992. Highlight and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*. 73: 1-16.

- Sanford, JC and Johnston SA. 1985. The concept of parasite – derived resistance : Deriving resistance genes from the parasite’s own genome. J Theo Biol 113 : 395 – 405.
- Storey, W.B. 1976. The botany and sex relationships in papaya. I. Papaya production in Hawaiian Islands. Hawaii Agric. Exp. Sta. Bull. 85 : 5-22.
- Xie Z., Fan B., Chen C. and Z. Chen. 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. PNAS, vol. 98, no. 1. pp 16516–6521.
- Yeh, S. D., Gonsalves, D., Wang, H. L., Namba, R., and Chui, R. J. 1988. Control of papaya ringspot virus by cross protection. Plant Disease. 72: 375-380.

## 11. ภาคผนวก

### ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน active site ของยีน CpRDR6

>RDR01

```
AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT
CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTCGCCCCCAAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAATTTGTGTGG
GCGAAAAATATCTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCGTGCTTGGTTCCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATC
ACAAATTTGGATGGGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGCTTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC
CATCAGTAGAGGTCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGA
AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTGTTGGCCATCA
AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCAGTGGAGCCAGCATGAACAATTCACGCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTACAGC
CTGGTTTCCTGAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTCAAAT
ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGCCATAATGTTGAGTGCAGGT
TTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTC
CTTCTGGAAGGTGGTTGAAGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATTG
CTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGATAGCGAAGAATCCTGTCTTCATCCA
GGGATATAAGAATTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTCCTCCCAAGGATGATAGGCCCCACACAA
```



ATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTTCACCCAGCAAAGAAGCTGGACTCCTATGGA  
TAGACTCCGTCCTCCCTC

>RDR02

AGATATAATGATGTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT  
CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGG  
GCGAAAATATTTCTTTAGCCTTTTCAATCCAACCAATGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAGAACATATCCGTCCATAATTTT  
CCAAATTTGGATGGGGAAGTTCACGTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC  
CATCAGTAGAGGTCATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACATGATCTTACAATGGA  
AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCA  
AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCTGAGGCCCAGCATGAACAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTGTTCTTGGACAAGATTTTTCAGC  
CTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAT  
ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAAACAAGGGAATAGTGGCCATAATGTTGATGTCAGGT  
TTTAATCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTC  
CTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAAGTGGCAGTACTAGAACAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATTG  
CTTTTCGAACCATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGATAGCGAAGAATCCTTGTCTTCATCCC  
GGGGATATAAGAAATCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAA  
ATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTTCACCCAGCAAAGAAGCTGGACTCCTATGGA  
TAGAGCTCCGTCCTCCTC

>RDR03

AGATATAATGATGTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT  
CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGG  
GCGAAAATATTTCTTTAGCCTTTTCAATCCAACCAATGAGGGACCGTTTGTCTGGTTCTTTGCTGAAGACAGAACATTTCCGTCCATAATATC  
CCAAATTTGGATGGGGAAGTTCACGTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC  
CATCAGTAGAGGTCATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACATGATCTTACAATGGA  
AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCA  
AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCTGAGGCCCAGCATGAACAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTGTTCTTGGACAAGATTTTTCAGC  
CTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAT  
ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAAACAAGGGAATAGTGGCCATAATGTTGATGTCAGGT  
TTTAATCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTC  
CTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAAGTGGCAGTACTAGAACAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCCCTACAAAATTG  
CTTTTCGAACCATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGATAGCGAAGAATCCTTGTCTTCTCCT  
CCAGGGATATAAGAAATCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAA  
CAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTTCACCCAGCAAAGAAGCTGGACTCCTAT  
GATAGAGCTCGTTCCGCCAC

>RDR04

GGGGGGGACTTTCATAGGGTCTTAGAAGATATAATGATGTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTT  
TGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTAT  
TCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAAAATATTTCTTTTCTAGCCTTTTCAATCCAACCAATGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGTCTGAA  
GACAAGAACATATCCGTCCATAATACAAAATTTGGATGGGGAAGTTCACGTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTT  
CATCTACCTATGCTACAATAGAAGTCCATCAGTAGAGGTCATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGG  
TACTATTTTACATGATCTTACAATGGAAGTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGC  
AAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCTGAGGCCCAGCATGAACAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTTGG  
AGATTTGTCTTGGAGAAAGATTTCAGCTGTTTCTGTAACAGACAGATGTTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGG  
CATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAAACAAGGGAAT  
AGTGGCCGATAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCC  
TCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAAGTGGCAGTACTAGAACAGGCCAGTGTTCATCCA  
GGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTG  
ATAGCGAAGAATCCTTGTCTTCAATCCAGGGATATAAGAAATCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTTTCC  
CCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTTCACCC  
CAGCAAAGAAGCTGGACTCCTATGATATATCTCATCCCCTATCCC

>RDR05

AGATATAATGATGTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT  
CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGG  
GCGAAAATATTTCTTTAGCCTTTTCAATCCAACCAATGAGGGACCGTTTGTCTGGTTCTTTGCTGAAGACAGAACATATCCGTCCATAATTTT  
CCAAATTTGGATGGGGAAGTTCACGTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC  
CATCAGTAGAGGTCATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACATGATCTTACAATGGA  
AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCA  
AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCTGAGGCCCAGCATGAACAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTGTTCTTGGACAAGATTTTTCAGC  
CTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAT  
ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAAACAAGGGAATAGTGGCCATAATGTTGATGTCAGGT  
TTTAATCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTC  
CTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAAGTGGCAGTACTAGAACAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATTG  
CTTTTCGAACCATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGATAGCGAAGAATCCTTGTCTTCATCCA  
GGGGATATAAGAAATCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAA  
ATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTTCACCCAGCAAAGAAGCTGGACTCCTATGGA  
TT

>RDR06

AGGGATATTCATAGGGTCTTAGAAGATATAATGATGTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGA  
ATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCT  
GACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAAAATATTTCTTTTCTAGCCTTTTCAATCCAACCAATGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGTCTGAGAC  
AAGAACATATCCGTCCATAATACAAAATTTGGATGGGGAAGTTCACGTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCTCAT

CTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCAATTTTGGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTAC
TATTTACATGATCTTACAATGGAAAGTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACCGTGGCTGCAAA
GGGGTTGGACTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCAGTGGCCAGCATGAACAAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGA
TTTGTCTTGGACAAGATTTACGCTGGTTTCCCTGAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACAT
GATGGAGTCTATGATTTTTCAAATTCACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGGAGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGT
GCGGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCCTCC
GGGAGAAGGCAAGGATTTTTGTTCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGTTCATCCAGGT
CTCCAGTCCATCACTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGATA
GCGAAAATATCTTGTCTTCACTCAGGGGATCAAACCAATTTGAGGACCGTGTGATGCCCCGATCTACATCATTTGTGTGATGCTTTCCCTTCCCTC
AGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGGATGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTCCACCCAG
CAAAGAAGCTGGACTCTATGATAGATCCGCAATCCCCATTG

>RDR07

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTACCTTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT
CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGG
GCGAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCACTCAACCAATTTGAGGGACCGTCTGCTTGGTTTCTTGGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATTT
ACAATTTGGATGGGAAGTTCACCTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC
CATCCTAGAGGTCAATTTTGAAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTCACATGATCTTACAATGGA
AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGTGTGGCTTGTGGCCATCA
AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAATTTACGCTTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTTCAGC
CTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAT
ACACAAGATGGTTGAGTGCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGCAGGCAATATGTTGAGTGCAGGT
TTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTC
CTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATTTG
CTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTATAGCGAAGAATCCTTTG

>RDR08

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTACCTTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT
CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGG
GCGAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCACTCAACCAATTTGAGGGACCGTCTGCTTGGTTTCTTGGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATTT
CCAAATTTGGATGGGAAGTTCACCTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC
CATCCTAGAGGTCAATTTTGAAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTCACATGATCTTACAATGGA
AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGTGTGGCTTGTGGCCATCA
AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAATTTACGCTTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTTCAGC
CTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAT
ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGCAGGCAATATGTTGAGTGCAGGT
TTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTC
CTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATTTG
CTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAAGAAATCTAGAATTTGGTAAAAGGATTTGTGGTATAGCGAAGAATCCTTTGCTTTCATCCA
GGGGATATAAGAAATTTCTGAAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTCCTCCCAAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAA
ATGAAGCTTCTGGGAGGCACCTTGTATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTTCACCCAGCAAAAAGGCTGGACTCCTATGAT
AGAGCTCATCCTTTATCAACG

>RDR09

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTACCTTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT
CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGG
GCGAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCACTCAACCAATTTGAGGGACCGTCTGCTTGGTTTCTTGGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATATC
ACAATTTGGATGGGAAGTTCACCTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC
CATCCTAGAGGTCAATTTTGAAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTCACATGATCTTACAATGGA
AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGTGTGGCTTGTGGCCATCA
AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAATTTACGCTTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTTCAGC
CTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAT
ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGCAGGCAATATGTTGAGTGCAGGT
TTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTC
CTTCTGGAAGGGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATTTG
CTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTATAGCGAAGAATCCTTTGCTTTCATCCA
GGGGATATAAGAAATTTCTGAAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTCCTCCCAAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAA
ATGAAGCTTCTGGGAGGCACCTTGTATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTTCACCCAGCAAAAAGGCTGGACTCCTATGAT
AGAGCTCGTCTCCCGC

>RDR10

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTACCTTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT
CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGG
GCGAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCACTCAACCAATTTGAGGGACCGTCTGCTTGGTTTCTTGGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATATC
ACAATTTGGATGGGAAGTTCACCTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC
CATCCTAGAGGTCAATTTTGAAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTCACATGATCTTACAATGGA
AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGTGTGGCTTGTGGCCATCA
AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAATTTACGCTTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTTCAGC
CTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAT
ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGCAGGCAATATGTTGAGTGCAGGT
TTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTC
CTTCTGGAAGGGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATTTG
CTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTATAGCGAAGAATCCTTTGCTTTCATCCA
GGGGATATAAGAAATTTCTGAAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTCCTCCCAAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAA
ATGAAGCTTCTGGGAGGCACCTTGTATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTTCACCCAGCAAAAAGGCTGGACTCCTATGGA
TAGAGCTGCATCACTCGC

&gt;RDR11

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT  
 CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAATTTGTGTGG  
 GCGAAAATATTTCTTTAGCCTTTTCAACCAATTTGAGGGACCGTTTCTGCTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATTTT  
 ACAAAATGGATGGGAAGTTCAGTACCAGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGCCAGTGTCTTTTCACTACCTATGCTACAATAGAAGTTC  
 CATCACTAGAGGTCATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGA  
 AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTTGTTGGCCATCA  
 AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCTGAGGCCAGCATGAACAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTACAGC  
 CTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAT  
 ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGCAGGATAATGTTGAGTGCAGGT  
 TTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTC  
 CTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCCTCAGTCCATCACTACAAAATTTG  
 CTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTTGGTATAGCGAAGAATCCTTGTCTTCATCCA  
 GGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAA  
 ATGAAGCTT

&gt;RDR12

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT  
 CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAATTTGTGTGG  
 GCGAAAATATTTCTTTAGCCTTTTCAACCAATTTGAGGGACCGTTTCTGCTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATATC  
 ACAAAATGGATGGGAAGTTCAGTACCAGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGCCAGTGTCTTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC  
 CATCACTAGAGGTCATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGA  
 AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTTGTTGGCCATCA  
 AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCTGAGGCCAGCATGAACAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTACAGC  
 CTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAT  
 ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGCAGGATAATGTTGAGTGCAGGT  
 TTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTC  
 CTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCCTCAGTCCATCACTACAAAATTTG  
 CTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTTGGTATAGCGAAGAATCCTTGTCTTCATCCA  
 GGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAA  
 ATGAAGCTTCTGGGAGCC

&gt;RDR13

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT  
 CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAATTTGTGTGG  
 GCGAAAATATTTCTTTAGCCTTTTCAACCAATTTGAGGGACCGTTTCTGCTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATATC  
 ACAAAATGGATGGGAAGTTCAGTACCAGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGCCAGTGTCTTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC  
 CATCACTAGAGGTCATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGA  
 AGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTTGTTGGCCATCA  
 AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCTGAGGCCAGCATGAACAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTACAGC  
 CTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAT  
 ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGCAGGATAATGTTGAGTGCAGGT  
 TTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTC  
 CTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCCTCAGTCCATCACTACAAAATTTG  
 CTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTTGGTATAGCGAAGAATCCTTGTCTTCATCCA  
 GGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAA  
 ATGAAGCTTCTGGGAGCC

&gt;RDR14

ATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTTC  
 AAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAATATTTCTTTCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTTGAGGGACCGTTCTGC  
 TTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATATCACAATTTGGATGGGGAAGTTCAGTACCAGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGG  
 ATGGGCCAGTGCCTTTTCTAGCTTACTGATACATAGAAATTTCCATCAAGTACTAGAGTCAATTTTGGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCT  
 TCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGAT  
 TAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTTGATGGAATCAGACTGCTACTGAGGCCAGCATGAACAATTTACAGTCT  
 AACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTACAGCTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAG  
 ATGAAGTGTGTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTTACACAAGATGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATG  
 TTCTGAACAAGGGAATAGTGCAGGATAATGTTGAGTGCAGGTTTAACTCCTTCAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCA  
 GCACAGCTTTGGGGCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTGGATGAACCTGGCAGTACTAGAACAAG  
 GCCAGTGTTCATCCAGGTCCTCAGTCCATCACTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGT  
 AAAAGGATTTGTGGTATAGCGAAGAATCCTTGTCTTCACTCCAGGGGATAAAGAATTTCTGAAAGCTGTTGATGGCCTGATGCCCCGATCTACATCATTTGTGT  
 GATTGCCTTGTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGTGGGATCTT

&gt;RDR15

TGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGAAG  
 GACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAATTTGTGTGGGCGAAAATATTT  
 CTTTTCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATATCACAATTTGAT  
 GGGGAAGTTCAGTACCAGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGCCAGTGTCTTCTACTACCTATGCTACAATAGAAGTTCCATCACTAGAG  
 GTCAAATTTGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAATAGAAGTTGTTGGAGA  
 AACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTTGTTGGCCATCAAAGGTGATGG  
 AATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTACAGCTGTTTCTCTG  
 AACAGGCAGATGTTACCTTACTTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTTACACAAGATGG  
 TTGAGGACCCAGATGTTGATGAGGTTCTCCTTGCCATGATGTTCTGAAACAAGGGAATAGTGCAGGATAAAGATTTCTGAAAGCTGTTGATGGCCTGATG  
 AACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGG  
 TGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCCTCAGTCCATCACTACAAAATTTGCTTTTTCGAAAC

ATGGTTCTAGGTTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCATCCAGGGGATATAAG  
AATTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCT  
GGGAGCGACCTTGATGGGGATC

>RDR16

AGATATAATGATGTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCT  
CCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTCGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGG  
GCGAAAAATATTCTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCGTCTGGTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATC  
ACAAATTTGGATGGGGAAGTTCACGTACCGGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC  
CATCACTAGAGGTCAATTTGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTCACATGATCTTACAATGGA  
AGTTGTGGAGAACTCAAATGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTGTTGGCCATCA  
AAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAATAATCAGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTGTTCTTGGACAAGATTTACGC  
CTGGTTTTCTGAAACAGGACAGATTGTTACCTTACTTTACGGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTGGGACATGATGGGCTATGATTTTCAAAT  
ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAAACAAGGGAATAGTGGGCCATAATGTTGAGTGCAGGT  
TTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTTGTTC  
CTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATG  
CTTTTGAAGCTGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATG  
GGGATATAAGAAATCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAA  
ATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATG

>RDR17

GTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGAAGG  
ACCTAACATCAAATTCGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAAATATTC  
TTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCGTCTGGTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCACAATTTGGATG  
GGGAAGTTCACGTACCGGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCACTAGAGG  
TCAAATTTGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTCACATGATCTTACAATGGAAAGTTTGGAGAA  
ACTCAAATTTGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGA  
ATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAATAATCAGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTGTTCTTGGACAAGATTTACAGCTGGTTTCTCTGA  
ACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTACGGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTACACAAGATGGT  
TGAGGACCCAGATGTTGATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAAACAAGGGAATAGTGGGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCCTCTA  
ACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTTGTTCTTCTGGAAGGT  
GGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATGCTTTTTCGAAACA  
TGTTCTAGGTTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCACTCCAGGGGATATAAGA  
ATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTG  
GGAGCGACCTTGATG

>RDR18

TTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAA  
ATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAAATATTCCTTTCTAGCCTT  
TTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCGTCTGGTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCACAATTTGGATGGGGAAGTTCAC  
GACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCAATTTGAGC  
TTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTCACATGATCTTACAATGGAAAGTGTGGAGAAACTCAAATTTGA  
CATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCA  
CTGAGGCCAGCATGAACAATAATCAGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTGTTCTTGGACAAGATTTACAGCTGGTTTCTGAAACAGGCGAGATTG  
TTACCTTACTTTACGGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTACACAATAATGTTGAGGACCCAGA  
TGTTCATTTGAGGTTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAAACAAGGGAATAGTGGGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCCTCTCACTACATG  
CTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTTGTTCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCT  
GCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTT  
TCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCACTCCAGGGGATATAAGAAATCTCGAAGCT  
GTTGATGCCCTGATGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTG  
ATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGA

>RDR19

GTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGAAGG  
ACCTAACATCAAATTCGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAAATATTC  
TTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCGTCTGGTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCACAATTTGGATG  
GGGAAGTTCACGTACCGGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCACTAGAGG  
TCAAATTTGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTCACATGATCTTACAATGGAAAGTTTGGAGAA  
ACTCAAATTTGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGA  
ATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAATAATCAGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTGTTCTTGGACAAGATTTACAGCTGGTTTCTCTGA  
ACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTACGGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTACACAATAATGGT  
TGAGGACCCAGATGTTGATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAAACAAGGGAATAGTGGGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCCTCTA  
ACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTTGTTCTTCTGGAAGGT  
GGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATGCTTTTTCGAAACA  
TGTTCTAGGTTTTCTGAAATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCACTCCAGGGGATATAAGA  
ATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTG  
GGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTCTC

>RDR20

GTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGAAG  
GACCTAACATCAAATTCGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAAATATTC  
CTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCGTCTGGTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCACAATTTGGATG  
GGGGAAGTTCACGTACCGGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCACTAGAG  
GTCAAATTTGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTCACATGATCTTACAATGGAAAGTTTGGAGAA  
AACTCAAATTTGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGG

AATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTACAGCTGGTTTCCTG AACAGGCAGATTAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTA

>RDR21

GTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCCTCCATAGTGAAGG ACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAAATATTC TTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATATAATACAAAATGGATG GGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCCTACTAGAGG TCAATTTTGGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTGATGGTATGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAA ACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAAAGGTGATGGA ATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTACAGCTGGTTTCCTGA ACAGGCAGATTTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTTACACAAAATGGT TGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTA ACAGAACCTCATCTG

>RDR22

AGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCCTCCATAGTGAAGGACCTAACAT CAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAAATATTCCTTTTCTAGC CTTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATATAATACAAAATGGATGGGGAAGTTC ACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCCTACTAGAGGTCATTTTGG AGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTGATGGTATGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTT GGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAAAGGTGATGGAATTCAGACTG TCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTACAGCTGGTTTCCTGAACAGGCAGA TTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTTACACAAGATGGTTGAGGACCC AGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCT CATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTCTTCTGGAAGGTGTTGATGG GCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGTTCATCCAGGCTCCAGTCCATCACTACAAAATGCTTTTCAAACATGGTTCTAG GTTTTCTGAGATCCAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTTGGTGTATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCATCCAGGGGATATAAGAAATTCGAA GCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACC TTGATGGGG

>RDR23

GTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCCTCCATAGTGAAGG ACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAAATATTC TTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATATAATACAAAATGGATG GGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGGGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCCTACTAGAGG TCAATTTTGGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCGGATGGTATGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAA ACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAAAGGTGATGGA ATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTACAGCTGGTTTCCTGA ACAGGCAGATTTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTTACACAAGATGGT TGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTA ACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTCTTCTGGAAA GTGGTTTGTGGGCTTGTCTGGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGGTTTTCATCCAGGCTCCAGTCCATCACTTACAAAATTTGC TTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTTGGTGTATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCATCCA GGGGATATAAGAAATCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAA ATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTT

>RDR24

TTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAA ATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAAATATTCCTTTTCTAGCCTT TTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATATAATACAAAATGGATGGGGAAGTTCCTACT GACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCCTACTAGAGTCAATTTTGGAGC TTAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTGATGGTATGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGA CATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAAAGGTGATGGAATTCAGACTGTCA CTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTACAGCTGGTTTCCTGAACAGGCAGATTG TTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTTACACAAGATGGTTGAGGACCCAGA TGTGCTTACTTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCAT CTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTCTTCTGGAAGGTGTTGATGGGCT GCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGTTCATCCAGGCTCCAGTCCATCACTACAAAATGCTTTTCAAACATGGTTCTAGGTT TCTGAGATCCAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTTGGTGTATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCATCCAGGGGATATAAGAAATTCGAAAGCT GTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTG A

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpeIF4E*

>eIF01

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAACCCCAATCCCAATACCGCGAACCCCTAATTTCTAGACCTCGTGGCG ACGAGGAAGACGAGGGGCGGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGAGATCATACGCCGTTTGTCTCCAGCCGCATCCTCTCGAGCA TCCATGGACATTTCTGGTTTGATAAATCTCTGCCAAATCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTTGATACGTTCCGAATGTTGAG GAGTTCCTGGAGCCTTTACAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTGGAGCAGACTTTTATTGCTTCAAACATAAAATTTGAACCAAAATGGG AGGACCCGTGTTTGTGCTAATGGAGGAAATGGACTATGAATTTCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTGTATACGTTGCTGGCAATGATTGG AGAACAGTTTGTATGATGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTCGTGAATGTCAAGGCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGGACCAAAAATGCTGCAAAC









AGAACAGTTTGATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTCGTGAATGTCAGAGGCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGGACCAAAAATGCTGCAAAC  
GAGGCTGCTCAGATGAGCATTGGGAAGCAGTGGGAAGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTACGAGGATGCAAAGAAGCTTG  
AGAGAGCTGCTAAGAATCGCTCTCCGGTATGAAA