การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม

Development on Screening Technique for GM Papaya

ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ [1/] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง [2/] วิจิตรา โชคบุญ [1/]

ณฐมน แก้วนุ้ย [1/] กตัญญุฑิตา ดำช่วย [1/] ชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล [1/]

พงศกร สรรค์วิทยากุล [1/] อรรคพล ภูมีศรี [1/] ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ [3/] ดนัย นาคประเสริฐ [1/]

Khanitha Wongwathanarat [1/] Srimek Choaphongphang [2/] Vijittra Chokboon [1/]

Nathamon Kaewnuy [1/] Katanyutita Damchuay [1/] Chananton Danaisilichaichon [1/]

Pongsakorn Sunvittayakul [1/] Arkkapon Phoomeesri [1/] Prasert Wongwathanarat [3/] Danai Narkprasert [1/]

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a screening technique in order to identify different genetically modified (GM) papaya events by polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. Experiments were conducted at the laboratory of GMO detection and analysis, the department of Agriculture from year 2012 to 2015. Nucleotide sequences of *cp* gene encoded the coat protein (AUS-PRSV-CP, Hawaii-PRSV-CP, Taiwan-PRSV-CP-YK, THAI-DOA-PRSV-CP and THAI-KU-PRSV-CP-CM2) of the papaya ring spot virus (PRSV) and glucuronidase gene (*uidA*) were fetched from a genebank and compared using Blast. Three pair of specific primers (CP_F-all/CP_R-all, CP_FTT/CP_R2, CP_FHA/CP_R2) was designed on the *cp* gene, while a pair of specific primer (GUS_F/GUS_R) was designed on *uidA*. All specific primer pairs were then used to screen GM papaya and identify its event by PCR. Felidity of the specific primers and the method were reconfirmed by Real-time PCR. Result showed that the specific primer pair (CP_F-all/CP_R-all) could screen all GM papaya events. The specific pair of primers (CP_FTT/CP_R2) could screen only Thai events (PRSV-KU and PRSV-DOA), while the specific primer pair (CP_FHA/CP_R2) could screen only one Hawaii event (PRSV HA-55-1) and the primers (GUS_F/GUS_R) could screen both Hawaii and Thai events (PRSV HA-55-1 and PRSV-DOA). Next, surveying and sampling papaya from farmer fields of registered good agriculture practice (GAP) and of non-registered GAP and farmer fields of growing papaya for export were done. Papaya samples were screened and identified with these four pairs of specific primers and the method previously described. It was found that PRSV-KU were the most abundant which took in an account of 40.7%, while PRSV-DOA, PRSV

---

[1] โครงการวิจัยเร่งด่วน การจัดการระบบควบคุมคุณภาพ เพื่อแก้ปัญหาเร่งด่วนกรณีประเทศกลุ่มสหภาพยุโรปตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรมจากไทย

[2] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน)

[3] ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

HA-55-1, the hybrid of PRSV-KU x PRSV HA-55-1 and unidentified events were 13.67, 1.17, 0.08 and 46.37%, respectively. Phylogenetic analysis of *cp* sequences of all GM papaya samples and those of all GM papaya events from the gene bank revealed that GM papaya events could be divided into 4 clades; PRSV-KU, PRSV-DOA, PRSV-YK and PRSV-Hawaii.

Key words : genetically modified papaya, screening, DNA, PCR

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองเพื่อจำแนกสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ การทดลองดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชจีเอ็มโอ กรมวิชาการเกษตร ระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง 2558 สืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cp* ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสโรคใบด่างจุดวงแหวน (PRSV) จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรม 5 สายพันธุ์ (AUS-PRSV-CP, Hawaii-PRSV-CP, Taiwan-PRSV-CP-YK, THAI-DOA-PRSV-CP และ THAI-KU-PRSV-CP-CM2) และยีนกลูโคโลนิเดส นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรมบลาสท์เพื่อออกแบบและสังเคราะห์คู่ไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 3 คู่ (CP_F-all/CP_R-all, CP_FTT/CP_R2 และ CP_FHA/CP_R2) จากยีน *cp* ของไวรัสฯ ขณะที่คู่ไพรเมอร์จำเพาะอีก 1 คู่ (GUS_F/GUS_R) ออกแบบจากยีนกลูโคโลนิเดส จากนั้นนำคู่ไพรเมอร์ทั้งหมดมาใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมด้วยวิธี PCR และตรวจยืนยันด้วยวิธี Real-time PCR ผลการตรวจพบว่าคู่ไพรเมอร์ (CP_F-all/CP_R-all) สามารถตรวจคัดแยกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมได้ทุกสายพันธุ์ สำหรับคู่ไพรเมอร์ (CP_FTT/CP_R2) สามารถตรวจคัดแยกมะละกอฯได้เฉพาะสายพันธุ์ไทย (PRSV-KU และ PRSV-DOA), ส่วนคู่ไพรเมอร์ (CP_FHA/CP_R2) ตรวจคัดแยกได้เพียงสายพันธุ์ฮาวาย (PRSV HA-55-1) สายพันธุ์เดียวและคู่ไพรเมอร์ (GUS_F/GUS_R) ตรวจคัดแยกได้ทั้งสายพันธุ์ฮาวายและไทย (PRSV HA-55-1 และ PRSV-DOA) ลำดับต่อมาสำรวจและเก็บตัวอย่างมะละกอจากแปลงเกษตรกรที่ขึ้นและไม่ขึ้นทะเบียน GAP และแปลงผู้ส่งออก นำตัวอย่างมะละกอฯมาตรวจจำแนกสายพันธุ์ด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 4 คู่และทำตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาเบื้องต้น พบว่าเป็นมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-KU มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 40.70, รองลงมา คือ สายพันธุ์ PRSV-DOA ร้อยละ 13.67 สายพันธุ์ PRSV HA-55-1 ร้อยละ 1.17, สายพันธุ์ผสมระหว่าง PRSV-KU x PRSV HA-55-1 ร้อยละ 0.08 และไม่สามารถระบุสายพันธุ์แหล่งที่มาได้คิดเป็นร้อยละ 46.37 จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมกับมะละกอฯสายพันธุ์อ้างอิงจากธนาคารยีนโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *cp* พบว่าตัวอย่างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมแบ่งออกได้เป็น 4 clades; PRSV-KU, PRSV-DOA, PRSV-YK และ PRSV-Hawaii

คำหลัก : มะละกอดัดแปรพันธุกรรม การตรวจคัดกรอง ดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

คำนำ

มะละกอจัดเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญในเขตร้อนและร้อนชื้น รวมถึงประเทศไทยด้วย (จริงแท้, 2552) แต่การปลูกมะละกอในบริเวณนี้และทั่วโลกมักพบกับความสูญเสียและเสียหายอันเนื่องมาจากการเข้าทำลายของโรคใบด่างจุดวงแหวนของมะละกอ (Papaya ringspot Virus; เรียกย่อๆ ว่า PRSV) ซึ่งมีสาเหตุมาจากไวรัสชื่อว่า Papaya ringspot virus (PRSV) ไวรัสชนิดนี้สามารถแพร่กระจายและถ่ายทอดโรคได้ภายในเวลาสั้นๆ โดยเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะในลักษณะ non-persistent (วิไลและคณะ, 2525) ดังนั้นการใช้สารเคมีกำจัดแมลงพาหะจึงไม่ได้ผลในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรค ถึงแม้จะมีรายงานว่ามีมะละกอบางสายพันธุ์ที่ค่อนข้างต้านทานต่อโรคนี้ได้แต่ก็ไม่สามารถผสมข้ามกับมะละกอพันธุ์ปลูกชนิด *Carica papaya* L. ได้ ดังนั้นการควบคุมโรคนี้โดยการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคจึงเป็นไปได้ยาก (Tennant *et al.*, 1994) การปลูกมะละกอโดยใช้มะละกอดัดแปรพันธุกรรมจึงกำลังได้รับความนิยมจากผู้ปลูกมากขึ้น

มะละกอดัดแปรพันธุกรรม หรือที่เรียกกันว่า "มะละกอจีเอ็มโอ" แสดงความต้านทานต่อโรคใบจุดวงแหวนได้ เนื่องจากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมได้รับการถ่ายยีนรหัสของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein gene; *cp*) ของเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน (Papaya Ring Spot Virus; PRSV) เข้าไปในจีโนมของมะละกอเพื่อให้ต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน (Benfey, 1990) ปัจจุบันประเทศต่าง ๆ จึงได้พัฒนามะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆขึ้นมาหลายพันธุ์ อย่างเช่น สายพันธุ์ 55-1 (Fitch *et al.*, 1992), Sun up (55-1 x 55-1) และ Rainbow (sun up x Kapoho) (Manshardt, 1998), GCP 16-0, GCP 17-0 และ GCP 17-1 (Cheng *et al.*, 1996) เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยก็ได้มีการพัฒนาสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมขึ้นมาด้วยเช่นกัน เช่น มะละกอดัดแปรพันธุกรรมพันธุ์แขกนวล 3 สายพันธุ์และพันธุ์แขกดำ 1 สายพันธุ์ (Mendoza *et al.*, 2008) เมื่อสังเกตจากรูปลักษณะภายนอกแล้ว มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านี้ ไม่มีความแตกต่างจากมะละกอพันธุ์ปกติ แต่ระหว่างสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมจะมีความแตกต่างกันของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PRSV ชิ้นดีเอ็นเอของโปรโมเตอร์และเทอร์มิเนเตอร์ซึ่งนำมาใช้ควบคุมการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PRSV และยีนคัดเลือก ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของพาหะนำยีน โดยเฉพาะยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PRSV แต่ละไอโซเลทจะมีความผันแปรของลำดับเบสของยีนแตกต่างกันไป การตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมจึงทำได้ยาก เมื่อมีการปลูกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมมากขึ้น การปะปนของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมเข้ามาในประเทศไทยจึงส่งผลกระทบต่อการส่งออกมะละกอของไทย และยังอาจส่งผลโดยทางอ้อมต่อความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์มะละกอปกติของไทย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองเพื่อเฝ้าระวังสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PRSV

ลำดับเบสของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PRSV (PRSV HA-55-1 accession no. FJ467933.1; PRSV-DOA accession no. AY010714.1; PRSV-KU accession no. DQ085856; PRSV-AUS accession no. U14736 และ PRSV-YK accession no. X97251.1) และยีนนกลูโคโลนิเดสซึ่งใช้เป็นองค์ประกอบของพาหะนำยีนในการสร้างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสืบค้นจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอในธนาคารยีน ส่วนจีโนมิคดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-DOA ซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงได้รับความอนุเคราะห์จากธนาคารเชื้อพันธุกรรม กรมวิชาการเกษตร

2. มะละกอดัดแปรพันธุกรรม

ตัวอย่างมะละกอซึ่งใช้ในการทดลองนี้เก็บจากด่านตรวจพืช แปลงปลูกมะละกอของเกษตรกรที่ขึ้นทะเบียน GAP และไม่ขึ้นทะเบียน GAP ตามแปลงปลูกมะละกอทั่วประเทศ และแปลงปลูกมะละกอของผู้ส่งออก ระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง พ.ศ. 2558

3. เปรียบเทียบลำดับเบสของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (*cp*) ของเชื้อไวรัส PRSV จากมะละกอ GMO สายพันธุ์ต่าง ๆ และออกแบบคู่ไพรเมอร์จำเพาะ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 5 หมายเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (5 Accession number) ได้แก่ AUS-PRSV-CP (มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์จากประเทศออสเตรเลีย) Hawaii-PRSV-CP (สายพันธุ์จากฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา) Taiwan_PRSV-CP-YK (จากประเทศไต้หวัน) THAI-DOA-PRSV-CP และ THAI-KU-PRSV-CP_CM2 (สายพันธุ์จากประเทศไทยซึ่งพัฒนาขึ้นมาโดยกรมวิชาการเกษตร และโดยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ร่วมกับศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพตามลำดับ) มาเปรียบเทียบและวิเคราะห์เฉพาะบริเวณของยีน (*cp*) ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PRSV และยีน *uid*A (เป็นยีนสร้างเอนไซม์ b-glucuronidase; GUS) ด้วยโปรแกรมบลาสท์ จากนั้นออกแบบและสังเคราะห์คู่ไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 4 คู่ เพื่อใช้จำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ (Table 1)

Table 1 Specific primers used for identification of different lines of genetically modified papaya

ชื่อคู่ไพรเมอร์จำเพาะ	ลำดับนิวคลิโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์จำเพาะ (5’⟶ 3’)	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอคาดหวัง (bp)	สายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมซึ่งถูกจำแนก
CP_F-all/CP_R-all	5’-GCTTTCGACTTCTATGAGGTGA-3’ 5’-ACATCTTCCACTGTGTGTCTCT-3’	107	PRSV-KU, PRSV-DOA และ PRSV HA-55-1
CP_FTT/CP_R2	5’-GAGAGAGATAGAGATGTCAATGCC-3’ 5’-CCATCCATCATCACCCAGAC-3’	325	PRSV-KU และ PRSV-DOA

ชื่อคู่ไพรเมอร์จำเพาะ	ลำดับนิวคลิโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์จำเพาะ (5'⟶ 3')	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอคาดหวัง (bp)	สายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมซึ่งถูกจำแนก
CP_FHA/CP_R2	5'-GAGAGAGATAGAGATGTCAATGTT-3' 5'-CCATCCATCATCACCCAGAC-3'	325	PRSV HA-55-1
(GUS_F/GUS_R	5'-CAGTCTGGATCGCGAAAACT-3' 5'-CTTTTTCTTGCCGTTTTCGT-3'	409	PRSV HA-55-1 และ PRSV-DOA

สำหรับคู่ไพรเมอร์ซึ่งใช้สำหรับการตรวจคัดกรองมะละกอดัดแปรพันธุกรรมออกจากมะละกอปกติใช้คู่ไพรเมอร์เพื่อตรวจหายีน CaMV 35S Promoter และ Nos terminator ด้วยวิธีเรียล-ไทม์ พีซีอาร์ ตามมาตราฐานการตรวจคัดกรองของ (ISO 21571: 2005)

4.การทดสอบการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *cp* และ *uidA* จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR

4.1 การทดสอบคู่ไพรเมอร์จำเพาะเพื่อจำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ

นำดีเอ็นเอต้นแบบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ของไทย PRSV-KU (สายพันธุ์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ร่วมกับศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ) และ PRSV-DOA (ของกรมวิชาการเกษตร) และสายพันธุ์ฮาวาย PRSV HA-55-1 (ของประเทศสหรัฐอเมริกา (สำหรับสายพันธุ์ PRSV-YK และ PRSV-Aus ไม่สามารถทดสอบได้เนื่องจากไม่มีตัวอย่างอ้างอิง) มาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 107, 325 และ 325 คู่เบส ของยีน *cp* ตามลำดับโดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ (Table 1) ด้วยวิธี PCR โดยมีส่วนผสมในปฏิกิริยาต่อ 1 หลอด ดังนี้; กรีน โก แท็ก เฟลซี บัฟเฟอร์ (ความเข้มเข้น 1. 5 เท่า) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ (ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์) ปริมาณ 1.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นทีพี (10 มิลลิโมลาร์) ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร คู่ไพรเมอร์โฟเวิร์ดและรีเวิร์ด (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร เอ็นไซม์แท็ก ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (5 ยูนิต/ไมโครลิตร) ปริมาณ 0.13ไมโครลิตร สารละลายดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 11.87 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรรวมครบ 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ เมื่อทำปฏิกิริยาเสร็จ ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา PCR โดยนำผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเจลอีเล็กโตรโฟรีซีส

4.2 การทดสอบความไวของการตรวจ (LOD) มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆโดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ

นำจีโนมิคดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ PRSV-KU, PRSV-DOA และ PRSV HA-55-1 มาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *cp* ด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อมะละกอดัดแปรพันธุกรรมแต่ละสายพันธุ์ (Table 1) ตามวิธีการในข้อ 4.1 โดยเจือจางความ

เข้มข้นของจีโนมิคดีเอ็นเอซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบให้ได้ความเข้มข้นที่ระดับ 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายของดีเอ็นเอต้นแบบ (final concentration) ที่ใช้ในการทดสอบนี้อยู่ที่ระดับ 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 นาโนกรัม ตามลำดับ ทำปฏิกิริยา PCR ในแต่ละความเข้มข้นจำนวน 10 ซ้ำ หลังจากนั้นผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

4.3 การยืนยันการตรวจจำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆด้วยวิธี Real-time PCR

นำจีโนมิคดีเอ็นเอของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-KU, PRSV-DOA และ PRSV HA-55-1 ในข้อ 4.1 มาตรวจยืนยันจำแนกสายพันธุ์อีกครั้งด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะและทำตามวิธีการตรวจของ (Anonymous, 2015) และ (Nakamura *et al.*, 2013)

5 การสำรวจและจำแนกสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมในประเทศไทย

การสำรวจและจำแนกสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมกระทำโดยสุ่มเก็บตัวอย่างมะละกอจากแปลงเกษตรกรที่ขึ้นทะเบียน GAP แปลงเกษตรกรไม่ขึ้นทะเบียน GAP และแปลงผู้ส่งออกตามแหล่งปลูกมะละกอทั่วประเทศและมะละกอส่งออกจากด่านท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2558 ตัวอย่างมะละกอมีทั้งใบสด ผลสด และเมล็ดพันธุ์ ต่อมานำตัวอย่างมะละกอมาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจคัดกรองเบื้องต้น โดยการตรวจหายีน 35S CaMV Promoter และ Nos Terminator ด้วยวิธี เรียล-ไทม์ พีซีอาร์ เพื่อคัดกรองมะละกอดัดแปรพันธุกรรม หลังจากนั้นนำมาตรวจจำแนกสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม ด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะ (Table 1) ตามวิธีการในข้อ 4.1 แล้วตัดแถบผลผลิตพีซีอาร์ซึ่งมีขนาดตามที่คาดหวังออกจากเจลและทำให้ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ เพื่อนำชิ้นดีเอ็นเอไปวิเคราะห์หาลำดับการเรียงตัวของเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ และนำลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือน (identity) กับลำดับเบสของยีน *cp*จากสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่างๆในฐานข้อมูลดีเอ็นเอ เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของยีน *cp* ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PRSV ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สุ่มเก็บมา

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความเหมือนและความต่างของลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *cp* และการออกแบบไพรเมอร์

เมื่อนำลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *cp* ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PRSV มาเปรียบเทียบกันเพื่อหาความเหมือนและความคล้ายกันเพื่อออกแบบไพรเมอร์จำเพาะไว้ใช้สำหรับการตรวจจำแนกสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรม พบว่า ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *cp* ของไวรัส PRSV ทั้ง 5 ไอโซเลทมีความเหมือนกันถึงร้อยละ 98 (Figure 1) จึงได้เลือกออกแบบไพรเมอร์เป็น 4 คู่ คู่แรกเพื่อใช้จำแนกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมได้ทุกสายพันธุ์ไม่ว่าจะได้มีการถ่ายยีน *cp* ของไวรัส PRSV ไอโซเลทใดก็ตาม บริเวณที่ออกแบบอยู่ระหว่างนิวคลิโอไทด์ที่ 719 ถึง 740 (เป็น forward

primer ชื่อ CP_F-all) และนิวคลิโอไทด์ที่ 863 ถึง 885 (เป็น reverse primer ชื่อ CP_R-all) (แสดงด้วยแถบสีขาว, Figure 1) เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่นี้สามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *cp* ได้ขนาดประมาณ 170 คู่เบส ไพรเมอร์คู่แรกได้ถูกออกแบบบริเวณดังกล่าวเพราะบริเวณนี้ลำดับนิวคลิโอไทด์ของทุกไอโซเลทจะมีความเหมือนกันสูงมาก ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ออกแบบอยู่ระหว่างนิวคลิโอไทด์ที่ 208 ถึง 231 (เป็น forward primer ชื่อ CP_FTT) และนิวคลิโอไทด์ที่ 515 ถึง 534 (เป็น reverse primer ชื่อ CP_R2) (แสดงด้วยแถบสีเหลือง, Figure 1) ไพรเมอร์คู่นี้สามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *cp* ได้ขนาดประมาณ 325 คู่เบส เฉพาะสายพันธุ์ไทย คือ PRSV-KU และ PRSV-DOA เนื่องจากลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์คู่นี้มีความเหมือนกันระหว่างสายพันธุ์ไทยมากที่สุดส่วนไพรเมอร์คู่ที่ 3 (forward primer ชื่อ CP_FHA และ reverse primer ชื่อ CP_R2) ถูกออกแบบบริเวณเดียวกันกับคู่ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ซึ่งจะสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *cp* ได้ขนาดประมาณ 325 คู่เบสเช่นเดียวกัน (Figure 1) แต่ไพรเมอร์คู่ที่ 3 นี้ใช้จำแนกได้เฉพาะสายพันธุ์จากฮาวาย (PRSV HA-55-1) เท่านั้น เนื่องจากเบส 2 ตัวทางด้านปลาย 3’ ของ forward primer (CP_FHA) แตกต่างจาก forward primer (CP_FTT) ของคู่ที่ 2 แต่ไพรเมอร์คู่ที่ 3 นี้ ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์จากออสเตรเลีย (AUS-PRSV-CP) ได้เนื่องจากสายพันธุ์จากฮาวายและสายพันธุ์จากออสเตรเลียมีองค์ประกอบของโครงสร้างของพลาสมิดที่ใช้ถ่ายยีน *cp* ต่างกัน แต่ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *cp* บริเวณนี้มีความเหมือนกัน

ส่วนไพรเมอร์คู่ที่ 4 (forward primer ชื่อ GUS_F และ reverse primer ชื่อ GUS_R) เป็นคู่ไพรเมอร์เดียวในงานวิจัยนี้ซึ่งไม่ได้ออกแบบจากยีน *cp* ของไวรัส PRSV แต่ออกแบบมาจาก glucuronidase gene (*uidA*) และใช้สำหรับจำแนกเฉพาะสายพันธุ์ PRSV HA-55-1 (จากฮาวาย) และ PRSV-DOA (สายพันธุ์ไทย กรมวิชาการเกษตร) เนื่องจากทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีองค์ประกอบของโครงสร้างของพลาสมิดที่ใช้ถ่ายยีน *cp* เหมือนกัน คือมี *uidA* เป็นองค์ประกอบเหมือนกันแต่ใช้ไวรัสPRSV ต่างไอโซเลทกัน ไพรเมอร์คู่ที่ 4 (forward primer ชื่อ GUS_F และ reverse primer ชื่อ CP_R2) ออกแบบอยู่ระหว่างนิวคลิโอไทด์ที่ 268 ถึง 287 และ 658 ถึง 677 ตามลำดับ ซึ่งสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *uidA* ได้ขนาดประมาณ 409 คู่เบส

2. การทดสอบการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *cp* และ *uidA* จากมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR

เมื่อนำคู่ไพรเมอร์จำเพาะซึ่งถูกออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นมา (Table 1) มาทดสอบเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *cp* และ *uidA* กับดีเอ็นเอต้นแบบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ PRSV HA-55-1, PRSV-DOA และ PRSV-KU ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง (สำหรับสายพันธุ์ PRSV-YK และ PRSV-Aus ไม่สามารถทดสอบได้เนื่องจากไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบของ 2 สายพันธุ์นี้) พบว่าคู่ไพรเมอร์จำเพาะทั้ง 4 คู่ (CP_F-all/CP_R-all, CP_FTT/CP_R2, CP_FHA/CP_R2 และ GUS_F/GUS_R) สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *cp* ขนาด 170, 325, 325 ตามลำดับ และยีน *uidA* ขนาด 409 คู่เบสได้ตามที่คาดหวัง (Figure 2)

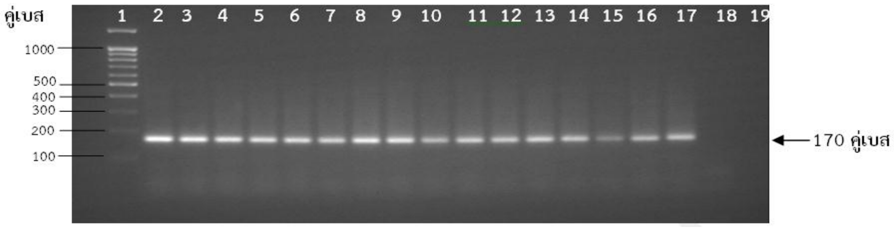
```
                             1                                                  50
         AUS-PRSV-CP     (1) --------------------------------------------------
      Hawaii-PRSV-CP     (1) ---------ATGGACAAATCTGAATCAACCAGTGCTGGTCGTAACCATCG
   Taiwan_PRSV-CP-YK     (1) TCGAGAAGCACTGACAATCATCAATTAACCCGCGGCAGTAATACACATGT
    THAI-DOA-PRSV-CP     (1) --------------------------------------------------
THAI-KU-PRSV-CP_CM2      (1) --------------------------------------------------
                             51                                                100
         AUS-PRSV-CP     (1) --------------------------------CTGGTTTGAACGAAAAGC
      Hawaii-PRSV-CP    (42) ACGTCGTCAGTCCAAGAATGAAGCTGTGGATGCTGGTTTGAATGAAAAAC
   Taiwan_PRSV-CP-YK    (51) GTTTCACCAGTCTAAAAATGAAGCTGTGGATACCGGTCTGAATGAGAAGC
    THAI-DOA-PRSV-CP     (1) ------ATGGTCCAAGAATGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGAGAAGT
THAI-KU-PRSV-CP_CM2      (1) ----------TCCAAAACTGAAGCTGTGGATGCTGGTCTTAATGATAAGC
                             101                                               150
         AUS-PRSV-CP    (19) TCAGAGAAAAAGAAAAACAGAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAACAAAAAGAG
      Hawaii-PRSV-CP    (92) TCAAAGAGAAGGAAAATCAGAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAACAAAAAGAG
   Taiwan_PRSV-CP-YK   (101) TCAAAGAAAAAGAAAAGCAGAAAGAAAAAGAAAAAGATAAACAACAAGAT
    THAI-DOA-PRSV-CP    (45) TCAAAGATAAAGAAAAACAGAAAGAA---GAAAAAGATAAACAAAAAGGT
THAI-KU-PRSV-CP_CM2     (41) TCAAAGATAAAGAAAAACAGAAAGAA---GAAAAAGATAAACAAAAAGGT
                             151                                               200
         AUS-PRSV-CP    (69) AAAGAAAAAGACGATGCTAGTGACGGAAATGATGTGTCAACTAGCACAAA
      Hawaii-PRSV-CP   (142) AAAGAAAAAGACGGTGCTAGTGACGGAAATGATGTGTCAACTAGCACAAA
   Taiwan_PRSV-CP-YK   (151) AAAGACAATGATGGAGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTAGCACAAA
    THAI-DOA-PRSV-CP    (92) AAAGAAAATAATGAAGCTAGTGACGGAAATGATGTGTCAACTAGCACAAA
THAI-KU-PRSV-CP_CM2     (88) AAAGAAAATAATGAAGCTAGTGACGGAAACGATGTGTCAACTAGCACAAA

                                                           CP_FTT/CP_FHA

                             201                                               250
         AUS-PRSV-CP   (119) AACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGAACTTTCA
      Hawaii-PRSV-CP   (192) AACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGTTGGGACCAGTGGAACTTTCA
   Taiwan_PRSV-CP-YK   (201) AACTGGAGAGAGAGATAGGGATGTCAATGCCGGAACTAGTGGAACCTTCA
    THAI-DOA-PRSV-CP   (142) AACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGCCGGAACTAGTGGTACTTTCA
THAI-KU-PRSV-CP_CM2    (138) AACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGCCGGAACTAGTGGTACTTTCA
                             251                                               300
         AUS-PRSV-CP   (169) CTGTTCCAAGAATCAAATCATTTACTGATAAGATGATTCTACCAAGAATT
      Hawaii-PRSV-CP   (242) CTGTTCCGAGAATTAAATCATTTACTGATAAGATGGTTCTACCGAGAATT
   Taiwan_PRSV-CP-YK   (251) CTGTTCCGAGGATAAAGTCATTTACTGATAAGATGATCTTACCAAGAATT
    THAI-DOA-PRSV-CP   (192) CTGTTCCGAGAATAAAATTATTTACCGACAAGATGATTTTACCAAGAATT
THAI-KU-PRSV-CP_CM2    (188) CTGTTCCGAGAATAAAATTATTTACCGACAAGATGATTTTACCTAGAATT
                             301                                               350
         AUS-PRSV-CP   (219) AAGGGAAAGCCTGTCCTTAATTTAAATCACCTTCTTCAGTATAATCCGCA
      Hawaii-PRSV-CP   (292) AAGGGGAAGACTGTCCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAGTACAATCCGCA
   Taiwan_PRSV-CP-YK   (301) AAGGGAAAAACTGTCCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAGTATAATCCGAA
    THAI-DOA-PRSV-CP   (242) AAGGGAAAAACTGTCCTTAGTTTAAATCATCTTCTTACGTATAATCCGCA
THAI-KU-PRSV-CP_CM2    (238) AAGGGAAAAACTGTCCTTAATTTAAATCATCTTCTTCAGTATAATCCGCA
                             351                                               400
         AUS-PRSV-CP   (269) ACAAATTGACATTTCTAACACTCGTGCCACTCAGTCACAATTTGAGAAGT
      Hawaii-PRSV-CP   (342) ACAAATTGACATTTCTAACACTCGTGCCACTCATTCACAATTTGAGAAGT
   Taiwan_PRSV-CP-YK   (351) ACAAGTTGACATCTCAAACACTCGCGCCACTCAATCTCAATTTGAGAAGT
    THAI-DOA-PRSV-CP   (292) ACAAATAGACATCTCAAACACTCGTGCCACTCAATCTCAATTCGAAAAGT
THAI-KU-PRSV-CP_CM2    (288) ACAAATAGACATCTCAAACACTCGTGCCACTCAATCTCAATTCGAAAAGT
                             401                                               450
         AUS-PRSV-CP   (319) GGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTAA CP_R2 ATGAAATGCAA
      Hawaii-PRSV-CP   (392) GGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTATGGCCTTAATGATAATGAAATGCAA
   Taiwan_PRSV-CP-YK   (401) GGTATGAGGGAGTGAGAAATGATTATGGCCTTAATGATAACGAAATGCAA
    THAI-DOA-PRSV-CP   (342) GGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTACGGTCTTAATGATAACGAAATGCAA
THAI-KU-PRSV-CP_CM2    (338) GGTATGAGGGAGTGAGGAATGATTACGGTCTTAATGATAACGAAATGCAA
                             451                                               500
         AUS-PRSV-CP   (369) GTGATGTTAAATGGCTTGATGGTTTGGTGT-ATCGAGAATGGTACATCTC
      Hawaii-PRSV-CP   (442) GTGATGCTAAATGGTTTGATGGTTTGGTGT-ATCGAGAATGGTACATCTC
   Taiwan_PRSV-CP-YK   (451) GTAATGTTAAATGGTTTGATGGTTTGGTGT-ATCGAAAATGGTACATCTC
    THAI-DOA-PRSV-CP   (392) GTGATGTTAAATGGTTTGATGGTTTGGTGCCATCGAAAATGGAACATCCC
THAI-KU-PRSV-CP_CM2    (388) GTGATGTTAAATGGTTTGATGGTTTGGTGC-ATCGAAAATGGAACATCCC
                             501                                               550
         AUS-PRSV-CP   (418) CAGATATATCTGGTGTCTGGGTTATGATGGATGGGGAAACCCAAGTTGAT
      Hawaii-PRSV-CP   (491) CAGACATATCTGGTGTCTGGGTTATGATGGATGGGGAAACCCAAGTTGAT
   Taiwan_PRSV-CP-YK   (500) CAGATATATCTGGTGTCTGGGTTATGATGGATGGGGAAACCCAAGTCGAT
    THAI-DOA-PRSV-CP   (442) CAGACATATCTGGTGTCTGGGTGATGATGGATGGGGAAACCCAAGTCGAT
THAI-KU-PRSV-CP_CM2    (437) CAGACATATCTGGTGTCTGGGTGATGATGGATGGGGAAACTCAAGTCGAT
                             551                                               600
         AUS-PRSV-CP   (468) TATCCAATCAAGCCTTTAATTGAGCATGCTACTCCGTCATTTAGGCAAAT
      Hawaii-PRSV-CP   (541) TATCCAATCAAGCCTTTGATTGAGCATGCTACTCCGTCATTTAGGCAAAT
```

```
   Taiwan_PRSV-CP-YK  (550) TATCCCATTAAACCTTTGATTGAACACGCAACTCCTTCATTTAGGCAAAT
    THAI-DOA-PRSV-CP  (492) TATCCCATCAAGCCTTTGATCGAACATGCAACTCCTTCGTTCAGGCAAAT
 THAI-KU-PRSV-CP_CM2  (487) TATCCCATCAAGCCTTTGATCGAACATGCAACTCCTTCGTTCAGGCAAAT
                            601                                              650
         AUS-PRSV-CP  (518) TATGGCTCACTTTAGTAACGCGGCAGAAGCATATATTGCAAAGAGAAATG
      Hawaii-PRSV-CP  (591) TATGGCTCACTTTAGTAACGCGGCAGAAGCATACATTGCGAAGAGAAATG
   Taiwan_PRSV-CP-YK  (600) CATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAGGCATACATCGCGAAGAGGAATG
    THAI-DOA-PRSV-CP  (542) CATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAGGCATACATCGCAAAGAGGAATG
 THAI-KU-PRSV-CP_CM2  (537) CATGGCTCACTTCAGTAACGCGGCAGAGGCATACATCGCAAAGAGGAATG
                            651                                              700
         AUS-PRSV-CP  (568) CTACTGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGAATCAAGAGAAATTTGACTGAC
      Hawaii-PRSV-CP  (641) CTACTGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGAATCAAGAGAAATTTGACTGAC
   Taiwan_PRSV-CP-YK  (650) CAACTGAGAAGTACATGCCGCGGTATGGAATCAAGAGAAATTTGACTGAC
    THAI-DOA-PRSV-CP  (592) CTACTGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGAATCAAGAGGAATCTGACTGAC
 THAI-KU-PRSV-CP_CM2  (587) CTACTGAGAGGTACATGCCGCGGTATGGAATCAAGAGGAATTTGACTGAC
                            701                                              750
         AUS-PRSV-CP  (618) ATTAGCCTAGCTAGATACGCTTTCGATTTCTATGAGGTGAATTCGAAAAC
      Hawaii-PRSV-CP  (691) ATTAGCCTCGCTAGATACGCTTTCGACTTCTATGAGGTGAATTCGAAAAC
                                                                     CP_F-all
   Taiwan_PRSV-CP-YK  (700) ATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTCGATTTCTATGAGGTGAATTCGAAAAC
    THAI-DOA-PRSV-CP  (642) ATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTCGACTTCTATGAGGTGAACTCAAAAAC
 THAI-KU-PRSV-CP_CM2  (637) ATTAGTCTCGCTAGATATGCTTTCGACTTCTATGAGGTGAACTCAAAGAC
                            751                                              800
         AUS-PRSV-CP  (668) ACCTGATAGGGCTCGCGAAGCTCACATGCAGATGAAAGCTGCAGCGCTGC
      Hawaii-PRSV-CP  (741) ACCTGATAGGGCTCGCGAAGCTCACATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGC
   Taiwan_PRSV-CP-YK  (750) ACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTAC
    THAI-DOA-PRSV-CP  (692) ACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGC
 THAI-KU-PRSV-CP_CM2  (687) ACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATGAAGGCTGCAGCGCTGC
                            801                                              850
         AUS-PRSV-CP  (718) GAAACACTAGTCGCAGAATGTTTGGTATGGACGGCAGTGTTAGTAACAAG
      Hawaii-PRSV-CP  (791) GAAACACCAGTCGCAAAATGTTTGGTATGGACGGCAGTGTTAGTAACAAG
   Taiwan_PRSV-CP-YK  (800) GCAATACTAATCGCAAAATGTTTGGAATGGACGGCAGTGTCAGTAACAAG
    THAI-DOA-PRSV-CP  (742) GCAACACTGATCGCAGAATGTTTGGAATGGACGGCAGTGTCAGTAACAAG
 THAI-KU-PRSV-CP_CM2  (737) GCAACACTAGTCGCAGAATGTTTGGAATGGACGGCAGTGTCAGTAACAAG
                                                                   CP_R-all
                            851                                              900
         AUS-PRSV-CP  (768) GAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTCAATAGAGACATGCA
      Hawaii-PRSV-CP  (841) GAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTCAATAGAGACATGCA
   Taiwan_PRSV-CP-YK  (850) GAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTCAACAGAGACATGCA
    THAI-DOA-PRSV-CP  (792) GAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTCAACAGAGACATGCA
 THAI-KU-PRSV-CP_CM2  (787) GAAGAAAACACGGAGAGACACACAGTGGAAGATGTTAACAGAGACATGCA
                            901                                              950
         AUS-PRSV-CP  (818) CTCTCTCCTGGGTATGCACAACTGA-------------------------
      Hawaii-PRSV-CP  (891) CTCTCTCCTGGGTATGCGCAACTAA-------------------------
   Taiwan_PRSV-CP-YK  (900) CTCTCTCCTGGGTATGCGCAATTGA-------------------------
    THAI-DOA-PRSV-CP  (842) CTCTCTCCTAGGTATGCGCAATTGAATACTCGCACTAGTGTGTTTGTCGA
 THAI-KU-PRSV-CP_CM2  (837) CTCTCTCCTAGGTATGCGCAATTGA-------------------------
                            951                   973
         AUS-PRSV-CP  (843) -----------------------
      Hawaii-PRSV-CP  (916) -----------------------
   Taiwan_PRSV-CP-YK  (925) -----------------------
    THAI-DOA-PRSV-CP  (892) GTCTGACTCGACCCTGTTTCACC
 THAI-KU-PRSV-CP_CM2  (862) -----------------------
```

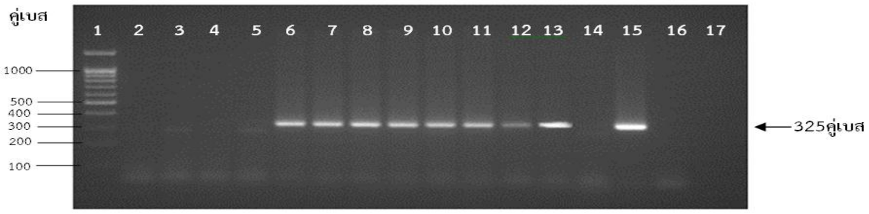
Figure 1 Comparison of nucleotide sequences of *cp* among different isolates of PRSV.

☐ indicates the position of the primers (CP_F-all/CP_R-all) designed.

☐ (yellow) indicates the position of the primers (CP_FTT/CP_R2 and CP_FHA/CP_R2) designed.

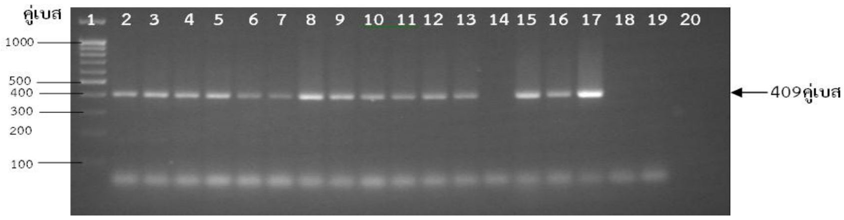


ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ CP_F-all/CP_R-all ในตัวอย่างมะละกอมีขนาดยีนคาดหวังประมาณ 170 คู่เบสแถวที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน ; 100+1,500 คู่เบสดีเอ็นเอแลดเดอร์, แถวที่ 2-14 ตัวอย่างมะละกอ, แถวที่ 15 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV HA-5-1, แถวที่ 16 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-DOA, แถวที่ 17 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-KU, แถวที่ 18 มะละกอปกติ, แถวที่ 19 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ



ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ CP-FTT/CP- R2 จากตัวอย่างมะละกอ มีขนาดยีนคาดหวังประมาณ 325 คู่เบสแถวที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน; 100+1,500 คู่เบสดีเอ็นเอแลดเดอร์, แถวที่ 1-12 ตัวอย่างมะละกอ, แถวที่ 13 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-DOA, แถวที่14มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV HA-55-1, แถวที่ 15 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-KU, แถวที่ 16 มะละกอปกติ, แถวที่ 17 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ CP-FHA/CP-R2 จากตัวอย่างมะละกอ มีขนาดยีนคาดหวังประมาณ 325 คู่เบสแถวที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน ; 100+1,500คู่เบสดีเอ็นเอแลดเดอร์, แถวที่ 2-16 ตัวอย่างมะละกอ, แถวที่ 17 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-KU, แถวที่ 18 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV HA-5-1, แถวที่ 19 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-DOA, แถวที่ 20 มะละกอปกติ, แถวที่ 21 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ



ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *uid*A ที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ GUS_F/GUS_R จากตัวอย่างมะละกอมีขนาดยีนคาดหวังประมาณ 409 คู่เบส แถวที่1ดีเอ็นเอมาตรฐาน; 100+1,500 คู่เบสดีเอ็นเอแลดเดอร์, แถวที่ 2-14ตัวอย่างมะละกอ, แถวที่ 15-16 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV HA-55-1, แถวที่ 17 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-DOA, แถวที่ 18 มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-KU, แถวที่ 19 มะละกอปกติ, แถวที่ 20 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

Figure 2 Eletrophoresis of *cp* and *uid*A amplified with the four specific primers

จากนั้นเมื่อนำคู่ไพรเมอร์จำเพาะทั้ง 4 คู่นี้ไปทดสอบความไวของคู่ไพรเมอร์ถึงความสามารถในการตรวจวิเคราะห์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ (PRSV HA-55-1, PRSV-DOA และ PRSV-KU) ต่อปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอต้นแบบ (LOD) พบว่าคู่ไพรเมอร์ CP_F-all/CP_R-all) สามารถตรวจสอบยีน *cp* ของไวรัส PRSV ในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ค่า LOD ต่ำสุดเมื่อเทียบกับคู่ไพรเมอร์จำเพาะทั้ง 4 คู่ (Table 2)

Table 2 Sensitivity of detection of 3 genetically modified papaya events by PCR on the lowest of detection (LOD)

คู่ไพรเมอร์	ค่า LOD การตรวจสอบมะละกอ GMOs แต่ละสายพันธุ์		
	PRSV-KU (นาโนกรัม)	PRSV-DOA (นาโนกรัม)	PRSV HA-55-1 (นาโนกรัม)
Papain_5F/Papain_3R	0.5	0.5	0.5
CP_F-all/CP_R-all	0.5	0.5	5
CP_FTT/CP_R2	5	5	-
CP_FHA/CP_R2	-	-	5
Gus_F/Gus_R	-	5	5

แม้ว่าคู่ไพรเมอร์ (Papain_5F/Papain_3R) มีค่า LOD ต่ำสุดก็ตาม แต่คู่ไพรเมอร์คู่นี้เป็นคู่ไพรเมอร์ซึ่งใช้ตรวจสอบยีน papain ซึ่งเป็นยีนของมะละกอ (endogenous gene) ไม่ใช่ยีนของไวรัสซึ่งเป็นยีนเป้าหมายที่ต้องการตรวจหา

เพื่อเป็นการยืนยันว่าคู่ไพรเมอร์จำเพาะทั้ง 4 คู่นี้มีความจำเพาะต่อมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 3 สายพันธุ์อย่างแท้จริง ดีเอ็นเอต้นแบบของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์อ้างอิงนี้จึงได้ถูกนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบกับชุดไพรเมอร์จำเพาะของ Anonymous, 2015 และ Nakamura *et al.*, 2013 และทำการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการของ Anonymous, 2015 และ Nakamura *et al.*, 2013 ด้วยวิธี Real-time PCR เพื่อตรวจจำแนกสายพันธุ์ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ผลการตรวจพบว่า ชุดไพรเมอร์จำเพาะของ Anonymous, 2015 และ Nakamura *et al.*, 2013 ตรวจจำแนกสายพันธุ์ได้ตรงกับชุดไพรเมอร์ของคณะผู้วิจัย ผลงานวิจัยของ Anonymous, 2015 และ Nakamura *et al.*, 2013 เป็นการยืนยันว่าชุดไพรเมอร์ซึ่งถูกออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นมาและทำการตรวจตามวิธีการของคณะผู้วิจัยสามารถตรวจจำแนกสายพันธุ์ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้ง 3 สายพันธุ์อ้างอิงได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ

3. การสำรวจและจำแนกสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมในประเทศไทย

คู่ไพรเมอร์จำเพาะทั้ง 4 คู่และวิธีการตรวจซึ่งคณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นมานี้ได้ถูกนำมาใช้ตรวจจำแนกสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมจากตัวอย่างมะละกอซึ่งถูกสุ่มเก็บตามแปลงปลูกมะละกอประเภทต่างๆและด่านกักกันพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2558 จำนวนทั้งสิ้น

11,135 ตัวอย่าง พบว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมมีการแพร่กระจายอยู่ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคกลาง แต่ยังไม่พบการแพร่กระจายในภาคใต้ ภาคที่พบการแพร่กระจายของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมมากที่สุดคือภาคกลาง (Table 3) และมีร้อยละของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมซึ่งแพร่กระจายอยู่ในแต่ละจังหวัด (Table 3)

Table 3 Dispersal of genetically modified papaya in different parts of Thailand during year 2012 to 2015

ลำดับที่	จังหวัด	จำนวนตัวอย่างที่สำรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม	% ตัวอย่างที่ตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม
ภาคเหนือ				
1	กำแพงเพชร	14	1	7.1
2	เชียงราย	109	5	4.6
3	เชียงใหม่	40	1	2.5
4	ตาก	101	5	5.0
5	นครสวรรค์	8	6	75.0
6	พิษณุโลก	10	3	30.0
7	ลำพูน	3	1	33.3
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ				
8	กาฬสินธุ์	1,760	24	1.4
9	นครราชสีมา	33	1	3.0
10	มุกดาหาร	2,361	157	6.6
11	ศรีสะเกษ	430	275	64.0
ภาคกลาง				
12	กรุงเทพฯ	7	1	14.3
13	กาญจนบุรี	695	76	10.9
14	ชัยนาท	137	41	29.9
15	นครปฐม	1,541	24	1.6
16	นนทบุรี	74	7	9.5
17	ปทุมธานี	686	39	5.7
18	ประจวบคีรีขันธ์	673	289	42.9
19	เพชรบุรี	276	128	46.4
20	ราชบุรี	387	55	14.2
21	ลพบุรี	452	29	6.4
22	สระบุรี	296	6	2.0

ลำดับที่	จังหวัด	จำนวนตัวอย่างที่สำรวจ	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม	% ตัวอย่างที่ตรวจพบมะละกอดัดแปรพันธุกรรม
23	สุพรรณบุรี	695	32	4.6
24	อ่างทอง	216	21	9.7
ภาคตะวันออก				
25	ฉะเชิงเทรา	131	34	26.0

เมื่อนำมะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ตรวจพบมาตรวจจำแนกสายพันธุ์โดยใช้คู่ไพรเมอร์และวิธีการตรวจตามที่กล่าวมาพบว่ามีมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-KU แพร่กระจายและปะปนอยู่มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 40.70 รองลงมา คือ สายพันธุ์ PRSV-DOA จำนวนร้อยละ 13.67 สายพันธุ์ PRSV HA-55-1 จำนวนร้อยละ 1.17 สายพันธุ์ผสมระหว่าง PRSV-KU x PRSV-55-1 จำนวนร้อยละ 0.08 และไม่สามารถระบุสายพันธุ์แหล่งที่มาได้จำนวนร้อยละ 46.37 เมื่อสุ่มตัวอย่างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมมาจำนวน 10 ตัวอย่างซึ่งมีรหัสดังนี้ KP1, KP7, KP6, 4391, 4980, 5833, 5925, 6018, 5426 และ 5538 และนำเอาลำดับเบสของยีน *cp* ของตัวอย่างเหล่านี้ไปเทียบกับลำดับเบสของยีน *cp* ของมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-DOA, PRSV-KU, PRSV-YK และ PRSV-Hawaii ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงและวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Poission correlation พบว่าตัวอย่างมะละกอดัดแปรพันธุกรรมมาจำนวน 10 ตัวอย่างนี้มีความสัมพันธ์กับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 4 สายพันธุ์ (Figure 3)

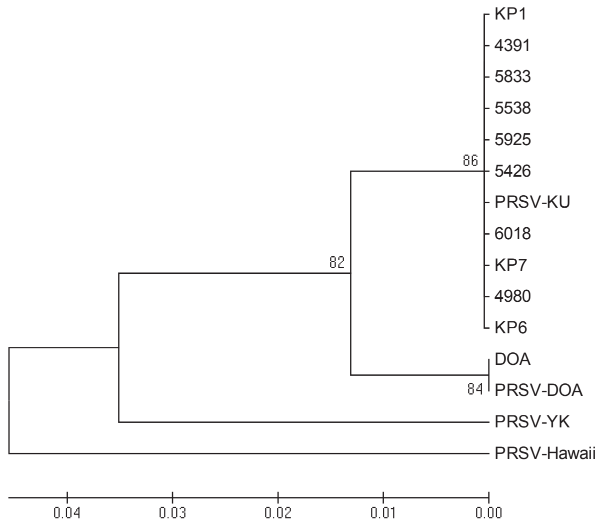


Figure 3 Phylogenetic analysis of 10 samples of genetically modified papaya with 4 reference events of PRSV by comparison of nucleotide sequences of *cp*. Distance calculation using Poission correction by Neibor-Joining with boot strap 1000

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แสดงให้เห็นว่ามะละกอดัดแปรพันธุกรรมซึ่งแพร่กระจายและปะปนอยู่ในแปลงปลูกมะละกอในประเทศไทยโดยส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-KU มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

สรุปผลการทดลอง

คู่ไพรเมอร์ (CP_F-all/CP_R-all) สามารถตรวจคัดแยกมะละกอดัดแปรพันธุกรรมได้ทุกสายพันธุ์ สำหรับคู่ไพรเมอร์ (CP_FTT/CP_R2) สามารถตรวจคัดแยกมะละกอฯ ได้เฉพาะสายพันธุ์ไทย (PRSV-KU และ PRSV-DOA) ส่วนคู่ไพรเมอร์ (CP_FHA/CP_R2) ตรวจคัดแยกได้เพียงสายพันธุ์ฮาวาย (PRSV HA-55-1) สายพันธุ์เดียวและคู่ไพรเมอร์ (GUS_F/GUS_R) ตรวจคัดแยกได้ทั้งสายพันธุ์ฮาวายและไทย (PRSV HA-55-1 และ PRSV-DOA)

มะละกอดัดแปรพันธุกรรมพบว่ามีแพร่การกระจายและปะปนอยู่ในแหล่งปลูกทุกภาคของประเทศไทย ยกเว้นภาคใต้ และภาคที่พบว่ามีมะละกอดัดแปรพันธุกรรมแพร่กระจายและปะปนอยู่มากที่สุด คือ ภาคกลาง

มะละกอดัดแปรพันธุกรรมสายพันธุ์ PRSV-KU พบว่ามีการแพร่กระจายและปะปนอยู่มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 40.70 ของสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมที่ถูกตรวจพบ

การนำไปใช้ประโยชน์

1. เพื่อใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อพันธุ์มะละกอ ไม่ให้ปนเปื้อนมะละกอดัดแปรพันธุกรรมทั้งในสภาพแปลงปลูก และเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์
2. วิธีการตรวจจำแนกสายพันธุ์มะละกอดัดแปรพันธุกรรมยังใช้เป็นข้อมูลเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช ในกรณีการเกิดข้อพิพาทกันทางกฎหมาย
3. ใช้ประโยชน์ในการกำกับดูแลสินค้าเกษตรตามพระราชบัญญัติกักพืช และสร้างมาตรการควบคุม และตรวจสอบการแพร่กระจายมะละกอดัดแปรพันธุกรรม ซึ่งกรมวิชาการเกษตรเป็นผู้กำกับดูแล
4. สามารถนำวิธีการจำแนกสายพันธุกรรม โดยวิธีวิเคราะห์ทางด้านโมเลกุลเครื่องหมาย มาใช้จำแนกสายพันธุ์พืช หรือค้นหายีนที่มีความสำคัญและมีประโยชน์ทางการเกษตร เพื่อเพิ่มมูลค่าของทรัพยากรแหล่งพันธุกรรมพืชและจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรซึ่งให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยด่านกักกันพืชสุวรรณภูมิและสำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขต 1-8 ซึ่งช่วยเก็บตัวอย่างส่วนหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

จริงแท้ ศิริพานิช. 2552. มะละกอไทย สถานภาพด้านสายพันธุ์ ระบบการผลิต และการตลาด. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย 136 น.

วิไล ปราสาทศรี, อาทิตย์ ฟุ้งเกียรติไพบูลย์ และ เกษม ชมพูนุชประภา. 2525. การศึกษาเบื้องต้นใบด่างมะละกอในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. สำนักงานเกษตรและสหกรณ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ขอนแก่น.

Benfey, P. N. and N. H. Chua. 1990. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: Combinatorial regulation of transcription in plants. Science. 254: 959-966.

Cheng, Y.H., J.S. Yang and S.D. Yeh. 1996. Efficient transformation of papaya by coat protein gene of *Papaya ringspot virus* mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with carborundum. Plant Cell Report. 16: 127-132.

Fitch, M.M., Manshardt, R.M., Gonsalves, D., Slightom, J.L. and Sanford, J.C. 1992. Virus resistant papaya derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology*, *10*, 1466-1472.

Manshardt, R.M. 1998. 'UH Rainbow' papaya.Germplasm, G1. Honolulu, HI: University of Hawaii College of Tropical Agriculture and Human Resources.

Mendoza, EM. and Botella, J.R. 2008. Recent advances in the development of transgenic papaya technology. Biotechnol.Annu. Rev. 14: 423-462.

Nakamura K, Kondo K, Kobayashi T, Noguchi A, Ohmori K, Takabatake R, Kitta K, Akiyama H, Teshima R and Nishimaki-Mogami T. 2014. Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand.Biol Pharm Bull. 37(1):1-5.

Tennant, P.F., Gonsalves, C., Ling, K.S., Fitch, M.M., Manshardt, R., Slightom, L.J. and Gonsalves, D. 1994. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. Phytopathology, 84 (11), 1359-1366.

Anonymous, 2015. Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques. Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW), Japan. On line http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food/index.html