

จีโนม RNA S และ M ของทอสโฟไวรัสสาเหตุโรคใบจุดวงแหวนเนื้อเยื่อตาย ของพริกและมะเขือเทศ

Genomic RNAs S and M of *Tomato Necrotic Ringspot Virus*, a Tospovirus Infecting Pepper and Tomato

จุฑารัตน์ ลิดจันทร^{1,2} รัชณี หงษ์ประยูร^{1,2,3} และพิศสุวรรณ เข้มสมมติ^{1,2,3}
Jutarat Lidjun,^{1,2} Ratchanee Hongprayoon^{1,2,3} and Pissawan Chiemsombat^{1,2,3}

บทคัดย่อ

โรคใบจุดวงแหวนเนื้อเยื่อตายเป็นโรคอุบัติใหม่ที่มีอัตราเกิดโรคสูงมากในแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศของเกษตรกร รวมทั้งมีรายงานการพบโรคในแปลงของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์บางแห่งในประเทศไทย เชื้อไวรัสมีหลายสายพันธุ์จึงจำเป็นต้องทราบข้อมูลจีโนมเพื่อจะนำไปสู่จัดการโรคที่มีประสิทธิภาพ การศึกษาค้นคว้านี้ได้ทำการแยก *Tomato necrotic ringspot virus* (TNRV) จำนวน 3 ไอโซเลทจากพริกและมะเขือเทศในจังหวัดนครปฐมและหนองคาย ผลการทดสอบพืชอาศัยเฉพาะแห่งพบว่าไอโซเลท T91 เท่านั้นที่ทำให้เกิดวงแผลสีเหลืองบนใบเลี้ยงของถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*) และทุกไอโซเลททำให้เกิดอาการต่างเฉี่ยวเข้มน้ำบนใบลำโพง (*Datura metel*) จีโนมส่วนที่เป็น RNA S ของไอโซเลท CT1, C94 และ T91 มีขนาด 3016, 3017 และ 3015 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ ส่วน RNA M มีขนาด 4716, 4736 และ 4723 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ RNA S ของทุกไอโซเลทมีความเหมือนกันในช่วง 95.1-99.2% ส่วน RNA M เหมือนกัน 94.3-97.2% นิวคลีโอไทด์ ส่วนที่ไม่ได้แปลรหัส (UTR) ด้าน 5' และ 3' และบริเวณระหว่างยีน (intergenic region, IGR) ของแต่ละไอโซเลทมีจำนวนและลำดับแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มสายของ RNA S และ RNA M ทั้ง 3 ไอโซเลทกับไอโซเลท TT1 ในประเทศไทยที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงที่ระดับ 95.1-98.8% และ 94.3-97.2% ตามลำดับ แต่เหมือนกับ RNA S และ M ของทอสโฟไวรัส group IV เพียง 58.9 % ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic analysis พบว่าเชื้อ TNRV ทุกไอโซเลทในประเทศไทยจับกลุ่มเดียวกัน และแยกออกจากทอสโฟไวรัสชนิดอื่น

คำสำคัญ : จีโนมชนิดอาร์เอ็นเอ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ไวรัสใบจุดวงแหวนเนื้อเยื่อตาย การวิเคราะห์ Phylogenetic tree

Abstract

The recent wide spread of tospovirus disease in vegetable crops in Thailand with high incidence rate in farmers' fields was caused by *Tomato necrotic ringspot virus*, TNRV. The virus has also been detected in seed production fields of some seed companies in Thailand. Knowledge of virus genetics will lead efficient disease management, therefore in the present study, three isolates of TNRV were newly isolated from pepper and tomato in Nakhon Pathom and Nong Khai provinces and their genomes were characterized. Isolate T91 induced yellow spot local lesion on leaves of *Vigna unguiculata*, while the other two isolates did not. All isolates caused systemic mosaic symptoms on leaves of *Datura metel*. Full length RNA S of isolates CT1, C94 and T91 contained 3016, 3017 and 3015 nucleotides, respectively, and full length RNA M contained 4716, 4736 and 4723 nucleotides, respectively. RNA S shared 95.1-99.2 % nucleotide identities among three isolates while RNA M shared 94.0-97.2% identity. The length and

¹ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

³ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

nucleotide sequence of 5' and 3' untranslated regions and the intergenic regions varied. Genomic RNA S and RNA M showed 95.1-98.8 % and 94.3-97.2 % identity to the previous reported TNRV isolate TT1 in Thailand, but only 58.9 % identity to tospovirus group IV. In phylogenetic tree analysis all TNRV isolates clustered together but separated from all previously reported tospovirus species.

Keywords: genomic RNA, nucleotide sequence, TNRV, phylogenetic tree analysis

คำนำ

ในประเทศไทย พบการระบาดของโรคที่เกิดจากทอสโฟไวรัสในพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น พริก มะเขือเทศ แตงกวา น้ำเต้า และเมล่อน ซึ่งเมื่อแยกเชื้อและศึกษาลำดับพันธุกรรมของยีนที่สังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (nucleocapsid protein, N) ของเชื้อสาเหตุโรค สามารถจำแนกทอสโฟไวรัสที่พบในประเทศไทยได้เป็น 4 ชนิด คือ *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), *Capsicum chlorosis virus* (CaCV), *Melon yellow spot virus* (MYSV), และ *Tomato necrotic ringspot virus* (TNRV) การถ่ายทอดเชื้อทอสโฟไวรัสทุกชนิดเกิดจากเพลี้ยไฟ (thrips) ที่เป็นแมลงพาหะและเชื้ออยู่ในตัวแมลงได้ตลอดอายุขัย การตรวจพบเชื้อ TNRV เริ่มขึ้นเมื่อปีพ.ศ. 2553 ต่อเนื่องมาถึงปัจจุบัน (Chiemsombat *et al.*, 2010; Seepiban *et al.*, 2010; Hassani-Mehraban *et al.*, 2011; Sunpapao, 2012) โรคนี้ทำความเสียหายแก่ผลผลิตพริกและมะเขือเทศเนื่องจากทำให้เกิดอาการแผลเนื่อเยื่อตายบนผล ใบ กิ่งก้าน และต้นแคระแกร็นไม่เจริญเติบโต อาการของโรคบนพริกแต่ละพันธุ์มีความรุนแรงแตกต่างกัน พันธุ์พริกที่เป็นพันธุ์การค้าอ่อนแอต่อโรคนี้จึงมีความจำเป็นต้องคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานโรค (คณิงนิจ และคณะ 2553; Hassani-Mehraban *et al.*, 2011) ทอสโฟไวรัสมีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวสามสาย ซึ่งมีความยาวไม่เท่ากัน เรียกชื่อสาย RNA ที่มีความยาวจากมากไปหาน้อยเป็น L, M, S โดยที่ RNA L ทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรมของโปรตีนเรพลิเคส (replicase) RNA M เป็นรหัสของโปรตีนสำหรับการเข้าอาศัยในตัวแมลงและไกลโคโปรตีน RNA S เป็นรหัสของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่ช่วยกวดการป้องกันตัวของพืช การวิจัยครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างพริกและมะเขือเทศ มาแยกเชื้อ TNRV รวมทั้งวิเคราะห์โครงสร้างจีโนมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA S และ M เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสำหรับนำมาใช้ทดสอบความต้านทานในพริกและมะเขือเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างพริกและมะเขือเทศที่เป็นโรคและการปลูกเชื้อ

เก็บใบพริกจากต้นที่แสดงอาการโรคในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตร- ศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และเก็บใบมะเขือเทศจากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดหนองคาย นำตัวอย่างใบพืชมาตรวจหาเชื้อ TNRV ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้แอนติบอดีต่อเชื้อ TNRV ของภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน (คณิงนิจ และคณะ, 2554) นำใบพริกและมะเขือเทศที่ตรวจพบเชื้อ TNRV มาใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อในต้นลำโพง (*Datura metel*) และพริก (*Capsicum annuum*) พันธุ์ CA758 และนำใบพริกบางส่วนมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อทำการทดลองขั้นต่อไป วิธีปลูกเชื้อใช้วิธีการ โดยบดใบพริกและมะเขือเทศที่เป็นโรคนำหนัก 1 กรัมตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโถงที่แช่เย็น เดิมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.5M phosphate buffer, pH 7.2) ที่แช่เย็นจัด ปริมาตร 10 มล.และเติม 0.2% โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ก่อนใช้ บดใบพืชกับบัฟเฟอร์จนละเอียดและแช่ภาชนะที่มีน้ำคั้นไว้ในน้ำแข็งเพื่อรักษาความเย็นตลอดระยะเวลาที่ปลูกเชื้อ ใช้ต้นลำโพงอายุประมาณ 3-6 สัปดาห์ มีใบจริงที่แผ่เต็มที่แล้ว 3-5 ใบ และต้นพริกที่อายุ 30 วัน มีใบจริง 4-6 ใบ ในการปลูกเชื้อ โรยผงคาร์บอนดำเพียงบางๆ บนใบ

พืชทุกใบแล้วใช้นิ้วชี้จุ่มน้ำคั้นทำให้ทั่วบนใบพืชทั้งหมดที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาทีจากนั้นล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดคราบผงคาร์บอนดำให้หมด เก็บต้นพืชในโรงเรือนที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส เพื่อสังเกตอาการภายใน 10-30 วัน

ศึกษาพืชอาศัยและลักษณะอาการบนใบพืชทดสอบ โดยปลูกเชื้อ TNRV ลงบนพืชทดสอบอีก 7 ชนิด ได้แก่ ถั่วพุ่ม *Vigna unguiculata* พันธุ์เจียใต้ อายุ 7 วัน มีใบเลี้ยงต้นละ 2 ใบ, หูปลาช่อน *Emilia sonchifolia* อายุ 20 วัน มีใบจริง 3-5 ใบ, คีนโปเดียม *Chenopodium quinoa* และ ยาสูบ *Nicotiana glutinosa* อายุ 20 วัน มีใบจริงต้นละ 3-5 ใบ, โทงเทง *Physalis minima* และกล็อกซิเนีย (*Gloxinia* sp.) อายุ 15 วัน มีใบจริงต้นละ 3-5 ใบ, แตงกวา *Cucumis sativus* และ เมล่อน *Cucumis melo* อายุ 7 วัน มีใบเลี้ยงต้นละ 2 ใบ ตรวจดูอาการบนใบเลี้ยงถั่วพุ่มหลังปลูกเชื้อแล้ว 7-10 วัน บนพืชอื่นตรวจดูอาการภายใน 30 วัน

2. การสกัดอาร์เอ็นเอ

บดใบลำโพงที่ติดเชื้อ TNRV น้ำหนัก 1 กรัม ในไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งแช่เย็น บดจนใบพืชละเอียดเป็นผง จากนั้นตักผงใบพืชใส่ในหลอดทดสอบขนาด 1 มล. ที่มีสารละลาย TRIzol (Invitrogen, USA) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ดูดส่วนใสในหลอดใหม่ เติมหคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนในหลอดใหม่ เติม 95% ethanol ปริมาตร 900 มล. แล้วนำหลอดส่วนผสมนี้ไปแช่เย็นในตู้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 15 นาที ดูด ethanol ออกจากหลอดให้หมดจนเหลือแต่ตะกอนใสของอาร์เอ็นเอ ตากตะกอนที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย DEPC treated water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3. การออกแบบไพรเมอร์และปฏิกิริยา RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนจีโนมสาย S และ M โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ TNRV ที่พบในประเทศไทยก่อนหน้านี้อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) สำหรับการออกแบบไพรเมอร์สาย S ใช้ข้อมูลของ Accession number FJ489600, FJ946835, FJ947153, FJ995637 และ FN677988 ส่วนสาย M ออกแบบโดยใช้ข้อมูลของ Accession number FJ947152 โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละสายดังกล่าวมาจัดเรียง (alignment) และเลือกบริเวณที่มีความอนุรักษ์ (conserved) และจำเพาะ (specific) กับ RNA S และ M มาใช้เป็นไพรเมอร์

วิธีสังเคราะห์ cDNA ทำโดยใช้เอนไซม์ M-MuLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) ซึ่งในหลอดปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลาย total RNA ที่สกัดได้ 5 ไมโครกรัม ผสมกับ random hexamer 100 นาโนกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วบ่มในน้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นเติม 5x first strand buffer 4 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร และ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 unit) เติม DEPC treated water ให้มีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มไว้ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครลิตร, 5X HF buffer 10 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 1 ไมโครลิตร, DMSO 1.5 ไมโครลิตร, primer 100 นาโนกรัม, Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Fermentas) 1 unit ใช้อุณหภูมิในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denaturation 95 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วทำปฏิกิริยารวม 35 รอบประกอบด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที, annealing 50 องศาเซลเซียส 40 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และหลังจากครบ 35 รอบ เพิ่มเวลา extension 72 องศาเซลเซียส อีก 7 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยใช้ 0.8 % agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer

4. การโคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

แยกชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ออกจากเจลโดยใช้ Favorgen gel extraction kit (Favorgen Biotech Corp, Taiwan) จากนั้นเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดพาหะ pJET (Life Technology, Thermo Fisher Scientific, USA) และทำการถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* DH5 α โดยวิธี heat shock (Sambrook *et al.*, 1989) คัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยวิธี PCR เลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา PCR และไพรเมอร์ของสาย M และ S สกัดพลาสมิดและส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (First BASE, Singapore) เมื่อได้ผลลำดับเบสมาแล้ว ทำการตรวจสอบชนิดของยีนด้วยโปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>) แล้วเชื่อมต่อดำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Seqman (DNASTar Lasergene software, DNASTAR Inc., USA) บริเวณที่ขึ้นส่วนยีนไม่เชื่อมต่อกัน ได้ออกแบบไพรเมอร์เพิ่มเติมเพื่อหาลำดับเบสจนได้ความยาวครบสมบูรณ์ทั้งจีโนมสาย M และ S

5. การจัดทำโครงสร้างจีโนมของ RNA M และ RNA S และศึกษา Phylogenetic tree

เมื่อได้ข้อมูลลำดับเบสมาครบทั้งสายแล้ว นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีนโดยใช้โปรแกรม ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) แปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนและคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แปลรหัสได้ด้วยโปรแกรม Editseq รวมทั้งศึกษาความคล้ายคลึงกันและ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Megalign (DNASTar Lasergene software, DNASTAR Inc., USA)

ผลการทดลองและวิจารณ์

อาการบนพืชทดสอบและพืชอาศัย

ตัวอย่างพริกที่ตรวจพบเชื้อ TNRV ด้วยเทคนิค ELISA และนำมาใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีอาการต่างกันสองแบบ คือแบบที่แสดงอาการใบด่างวงแหวนสีเหลือง และแบบที่แสดงอาการวงแผลเนื้อเยื่อตายบนใบ ซึ่งเป็นอาการที่พบในมะเขือเทศด้วย อาการทั่วไปที่คล้ายคลึงกันบนพริกได้แก่ใบด่าง ใบเหี่ยว บิดเบี้ยวเสียรูปทรง ใบร่วง ยอดเหี่ยว ผลการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค ELISA พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของใบพริกที่แสดงอาการโรคและพบเชื้ออยู่ในช่วง 1.2-1.8 ในมะเขือเทศค่าอยู่ในช่วง 1.1-1.5 ตรวจพบเชื้อจากตัวอย่างพริกจำนวน 16 ต้น มะเขือเทศจำนวน 10 ต้น คัดเลือกตัวอย่างพริกมา 2 ไอโซเลต คือ C94 และ CT1 ตัวอย่างมะเขือเทศ 1 ไอโซเลตคือ T91

ผลการปลูกเชื้อ TNRV ทั้ง 3 ไอโซเลตบนต้นลำโพงและพริกพบว่าพืชทดสอบแสดงอาการแตกต่างกันเล็กน้อย บนพริก ไอโซเลต C94 และ CT1 ทำให้เกิดอาการแผลไหม้บนใบ ใบบิดเบี้ยวเสียรูป และแผลวงแหวนเนื้อเยื่อตายบนใบตามลำดับ ส่วนไอโซเลต T91 ทำให้พริกเกิดอาการใบด่าง บนลำโพง ไอโซเลต C94 ทำให้เกิดอาการยอดเหี่ยว ใบด่างและลดรูป ไอโซเลต CT1 ทำให้เกิดอาการใบด่าง ส่วนไอโซเลต T91 ทำให้เกิดอาการใบด่างบนพริกและบนลำโพงแต่ใบไม่ลดรูป เมื่อนำใบลำโพงที่แสดงอาการมาตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้แอนติบอดีต่อเชื้อ TNRV พบว่าไอโซเลตที่นำมาศึกษาให้ค่า ELISA อยู่ในช่วง 1.0-1.9 และตัวอย่างควบคุม คือลำโพงที่ไม่ได้ปลูกเชื้อให้ค่า ELISA ไม่เกิน 0.3 พบว่ามีเฉพาะไอโซเลต T91 เท่านั้นที่ทำให้เกิดอาการจุดแผลขนาดประมาณ 2 มม. บนใบเลี้ยงของถั่วพุ่ม ส่วนไอโซเลต C94 และ CT1 ไม่ก่อให้เกิดอาการใดๆ บนใบถั่วพุ่ม พืชทดสอบที่ไม่แสดงอาการ ได้แก่ หูปลาช่อน คีนโปเตียม กล็อกซิเนีย แดงกวา และ เมล่อน (Table 1)

Table 1 Symptoms on tested host after mechanical inoculation by *Tomato necrotic ringspot virus* (TNRV).

Plant family	Plant Species	Symptoms on tested plant caused by TNRV isolate					
		CT1		C94		T91	
		Local	Systemic	Local	Systemic	Local	Systemic
Asteraceae	<i>Emilia sonchifolia</i>	-	-	-	-	-	-
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>Cucumis melo</i>	-	-	-	-	-	-
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>	-	-	-	-	-	-
Fabaceae	<i>Vigna unguiculata</i>	-	-	-	-	LL,CS	-
Gesneriaceae	<i>Gloxinia sp.</i>	-	-	-	-	-	-
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	-	Mo,LD	-	C, LD,NL	-	C,Mo
	<i>Capsicum annuum</i>	-	CS,C,LD	-	ST,NL,LD	-	Mo,C
	<i>Nicotiana glutinosa</i>	-	TN	-	TN	-	-
	<i>Physalis minima</i>	LD	LD,NL,RU	LD	ST,RU,NL,LD	LD	LD,NL,RU

C = chlorosis, CS = chlorotic spot, LD = leaf deformation, LL = local lesions, Mo = mottling, NL = necrotic lesions, ST = stunt, TN = top necrosis, RU = rugosity, (-) = no symptom

อาการบนพริกที่เกิดจากเชื้อ TNRV มีสองแบบใหญ่ๆ คืออาการที่ใบมีวงแผลสีเหลืองและอาจพบเป็นวงแหวนซ้อนกัน กับอาการวงแผลเนื้อเยื่อตายสีน้ำตาลบนใบ บนผลพริกพบอาการดังกล่าวได้ทั้งบนผลสีเขียวและผลสีแดง นอกจากนี้อาการที่พบบนใบ ต้น และผลมะเขือเทศ เป็นรอยแผลเนื้อเยื่อตายทั้งที่เป็นวงกลม วงแหวน หรือเป็นแผลไหม้รูปร่างไม่แน่นอน ตามที่มีรายงานมาก่อน (คณิงนิจ และคณะ, 2554) ความแตกต่างของอาการอาจมีสาเหตุจากสายพันธุ์เชื้อหรือสายพันธุ์พริกและมะเขือเทศ ดังนั้น จึงไม่ควรใช้พริกและมะเขือเทศเป็นพืชทดสอบในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ TNRV มีพืชทดสอบ 2 ชนิดที่ให้อาการแตกต่างกัน กล่าวคือไอโซเลท T91 จากมะเขือเทศทำให้เกิดแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion) บนใบแก้วพุ่มซึ่งคล้ายกับอาการที่พบจากไอโซเลท CR ที่แยกจากพริกในจังหวัดเชียงราย (คณิงนิจ และคณะ, 2554) รวมทั้งไอโซเลท TT1 (Sripiban *et al.*, 2011) และ T1 (Hassani-Mehraban *et al.*, 2011) จากมะเขือเทศ สำหรับไอโซเลทที่แยกจากพริกคือ C94 และ CT1 ไม่พบอาการแผลจุดเฉพาะแห่งบนใบเลี้ยงแก้วพุ่ม ดังนั้นอย่างน้อยการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ TNRV ด้วยอาการแผลจุดบนแก้วพุ่มอาจจะเพียงพอในขั้นต้นหากต้องการแยกกลุ่มของเชื้อ TNRV ที่พบในประเทศไทย นอกจากนี้อาการที่พบบนต้นลำโพงก็แยกความแตกต่างของเชื้อได้โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่มีอาการใบด่างรุนแรงมาก ร่วมกับอาการใบบิดเบี้ยวเสียรูปทรงกับกลุ่มที่แสดงอาการใบด่างเพียงเล็กน้อย (mottling) หรืออาจพบอาการแผลจุดจำนวนมากบนใบซึ่งเป็นอาการแบบแพร่กระจาย (systemic necrotic spot) มีรายงานของทอัสโฟไวรัสอีกชนิดหนึ่งคือเชื้อ *Iris yellow spot virus*, IYSV (Bag and Pappu, 2009) ซึ่งพบว่าเชื้อ IYSV สายพันธุ์ที่แตกต่างกันก่อให้เกิดอาการต่างกันบนลำโพงและยาสูบทั้งขนาดและจำนวนของแผลจุด รวมทั้งอาการแพร่กระจายสู่ใบส่วนบนได้ในอัตราช้า-เร็วที่แตกต่างกัน จึงใช้พืชทั้งสองชนิดจำแนกสายพันธุ์เชื้อไวรัส

ไพรเมอร์และผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา RT-PCR

ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบเพื่อสังเคราะห์สายจีโนมจาก cDNA ของไวรัสสาย RNA M และ S มีอย่างละ 2 คู่ (Table 2) พบว่าให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงตามความคาดหมายทุกคู่ (Figure 1) รวมทั้งได้ออกแบบไพรเมอร์อีก 2 สาย คือไพรเมอร์ TNRVM_786F และ TNRVM_3299F เพื่อใช้ในการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม RNA M บริเวณที่ข้อมูลลำดับเบสไม่เชื่อมต่อกันตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 786 และ 3,299 ซึ่งทำให้สามารถเพิ่มปริมาณจีโนมได้ครอบคลุมเต็มสาย

Table 2 Primers designed for RT-PCR synthesis of full length genomic RNA S and M of *Tomato necrotic spot virus* (TNRV) including two sequencing primers for RNA M.

	Primer name	Sequence (5' - 3')	Size of amplicon
(S1)	TNRVS_F	5' AGAGCAATCAGGGCAAAAGATATAA3'	1,849 bp
	TNRVS_1849R	5' CACATTTGGCGAGAGTTATACACT3'	
(S2)	TNRVS_1849F	5' AGTGTATAACTCTCGCCAAATGTG3'	1,174 bp
	TNRVS_3023R	5' AGAGCAATCGAGGCCAAAAAGAATA3'	
(M1)	TNRVM_F	5' AGAGCAATCGGTGCAACAATTAAT3'	2,374 bp
	TNRVM_2347R	5' TTATTATCAGTTAGACATGAGTATCGAT3'	
(M2)	TNRVM_2347F	5' ATCGATACTCATGTCTAACTGATAATAA3'	2,342 bp
	TNRVM_4716R	5' AGAGCAATCAGTGCATAACAAAAA3'	
(RNA M Sequencing)	TNRVM_786F	5' GTTCCCATAGCAGAGCCAAAG 3'	-
	TNRVM_3299F	5' ACTGGCAAGTCTCCAAACCG 3'	

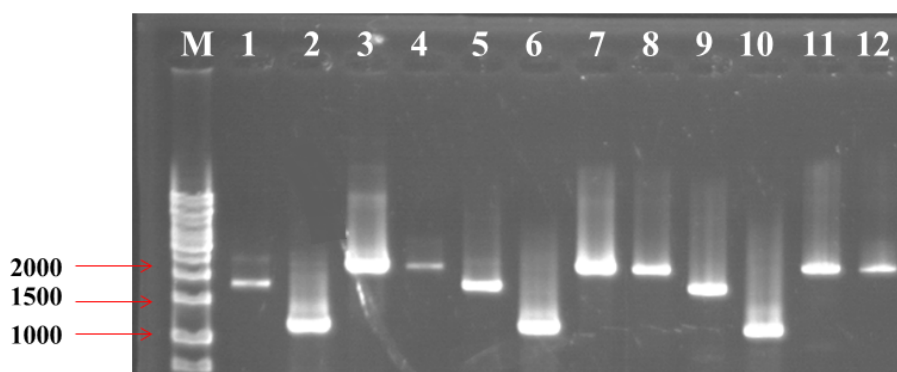


Figure 1 Gel electrophoresis of DNA fragments amplified by RT-PCR from RNA of diseased plant.

Lane 1-2= Isolate CT1-primers S1/S2, Lane 3-4= Isolate CT1-primers M1/M2,

Lane 5-6= Isolate C94-primers S1/S2, Lane 7-8= Isolate C94-primers M1/M2

Lane 9-10= Isolate T91-primers S1/S2, Lane 11-12= Isolate T91-primers M1/M2

Lane M = 1 kb DNA marker

โครงสร้างจีโนม RNA M

จีโนมส่วนของ RNA M มีการเรียงตัวของยีนเป็นแบบ ambisense RNA M ของไอโซเลท CT1 มีความยาว 4,716 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่แปลเป็นรหัส (untranslated region, UTR) ด้านปลาย 5' มีจำนวน 58 นิวคลีโอไทด์ ด้านปลาย 3' มีจำนวน 48 นิวคลีโอไทด์ ส่วนของยีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีนมี 2 ยีน ยีนที่มีรหัสของสายบวก (viral sense) คือยีนและโปรตีน NSm เริ่มต้นที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 59-991 ขนาด 933 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 310 เรสิดิวส์ โปรตีนมีขนาด 34.26 กิโลดาลตัน ยีน GP (หรือ GnGc) มีรหัสเป็นสายคู่สม (complementary sense) ตรงกับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 1,300-4,668 มีขนาด 3369 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 1,122 เรสิดิวส์ โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 127.67 กิโลดาลตัน ระหว่างยีน NSm และ GP มีส่วนที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน (Intergenic region, IGR)แทรกอยู่ มีความยาว 308 นิวคลีโอไทด์

RNA M ของไอโซเลท C94 มีความยาว 4,736 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่แปลเป็นรหัสด้าน 5' จำนวน 59 นิวคลีโอไทด์ และ ด้าน 3' 49 นิวคลีโอไทด์ ส่วนที่แปลรหัสเป็นยีน NSm เริ่มต้นที่ 60-992 นิวคลีโอไทด์ ขนาด 933 นิวคลีโอไทด์ แปลเป็นโปรตีนขนาด 310 เรสิดิวส์ ค้นด้วยส่วนที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน (Intergenic region) ยาว 326 นิวคลีโอไทด์ ต่อด้วยยีน GP ที่เป็นรหัสของสายคู่สมที่ตำแหน่ง 1,319-4,687 นิวคลีโอไทด์ ขนาด 3,369 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 1,122 เรสิดิวส์ โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 127.96 กิโลดาลตัน

RNA M ของไอโซเลท T91 มีความยาว 4,723 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่แปลเป็นรหัสด้าน 5' จำนวน 59 นิวคลีโอไทด์ และ ด้าน 3' 47 นิวคลีโอไทด์ ส่วนที่แปลรหัสเป็นยีน NSm ตำแหน่งที่ 60-992 ขนาด 933 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 310 เรสิดิวส์ ค้นด้วยส่วนที่ไม่แปลรหัสยาว 315 นิวคลีโอไทด์ ต่อด้วยยีน GP ที่เป็นรหัสของสายคู่สม ตรงกับ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,308-4,676 ขนาด 3,369 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 1,122 เรสิดิวส์ โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 127.87 กิโลดาลตัน

โครงสร้างจีโนมสาย S

จีโนมส่วนของ RNA S มีโครงสร้างเป็นแบบ ambisense RNA S ของไอโซเลท CT1 มีขนาด 3,016 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยส่วนที่ไม่แปลเป็นรหัสด้าน 5' จำนวน 65 นิวคลีโอไทด์ และ ด้าน 3' 66 นิวคลีโอไทด์ ส่วนที่แปลรหัสเป็นยีน NSs เริ่มต้นที่ 66-1,421 นิวคลีโอไทด์ ขนาด 1,356 นิวคลีโอไทด์ แปลเป็นกรดอะมิโน 451 เรสิดิวส์ โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 51.30 กิโลดาลตัน ค้นด้วยส่วนที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน (Intergenic region) ยาว 683 นิวคลีโอไทด์ ส่วนที่แปลรหัสเป็นยีน N นิวคลีโอไทด์ที่ 2,105-2,950 มีขนาด 846 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 281 เรสิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน

ไอโซเลท C94 มีความยาว 3,017 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่แปลเป็นรหัสทางปลายด้าน 5' จำนวน 68 นิวคลีโอไทด์ และ ด้าน 3' 66 นิวคลีโอไทด์ ส่วนที่แปลรหัสเป็นยีน NSs เริ่มจากนิวคลีโอไทด์ที่ 69-1,424 มีขนาด 1,356 นิวคลีโอไทด์ แปลเป็นกรดอะมิโน 451 เรสิดิวส์ โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 51.30 กิโลดาลตัน ค้นด้วยส่วนที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีนยาว 681 นิวคลีโอไทด์ และต่อด้วยส่วนที่แปลรหัสเป็นยีน N นิวคลีโอไทด์ที่ 2,106-2,951 ขนาด 846 นิวคลีโอไทด์ แปลเป็นกรดอะมิโน 281 เรสิดิวส์ โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 30.9 กิโลดาลตัน

ไอโซเลท T91 มีความยาว 3,015 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่แปลเป็นรหัสทางปลายด้าน 5' จำนวน 65 นิวคลีโอไทด์ และ ด้าน 3' จำนวน 67 นิวคลีโอไทด์ ส่วนที่แปลรหัสของยีน NSs อยู่ที่นิวคลีโอไทด์ 66-1,421 มีขนาด 1,356 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 451 เรสิดิวส์ โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 51.30 กิโลดาลตัน ค้นด้วยส่วนที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีนยาว 681 นิวคลีโอไทด์ และส่วนที่แปลรหัสเป็นยีน N ที่นิวคลีโอไทด์ 2,103-2,948 ขนาด 846 นิวคลีโอไทด์ แปลเป็นกรดอะมิโน 281 เรสิดิวส์ โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 30.9 กิโลดาลตัน (Table 3)

Table 3 Genome comparison of M RNA and S RNA of 3 isolates of *Tomato necrotic ringspot virus* in this study.

Genome	CT1	C94	T91
M RNA			
M RNA full length (nt)	4716	4736	4723
5'UTR (nt)	58 (1-58)	59 (1-59)	59 (1-59)
NSm gene ORF (nt)	933 (59-991)	933 (60-992)	933 (60-992)
NSm protein (aa)	310 (34.26 kDa)	310 (34.2 kDa)	310 (34.2 kDa)
IGR (nt)	308	326	315
GP gene ORF (nt)	3369 (1300-4668)	3369 (1319-4687)	3369 (1308-4676)
GP protein (aa)	1122 (127.67 kDa)	1122 (127.96 kDa)	1122(127.87 kDa)
3'UTR (nt)	48	49	47
S RNA			
S RNA full length (nt)	3016	3017	3015
5'UTR (nt)	65	68	65
NSs gene ORF (nt)	1356 (66-1421)	1356 (69-1424)	1356 (66-1421)
NSs protein (aa)	451 (51.3 kDa)	451(51.3 kDa)	451(51.3 kDa)
IGR (nt)	683	681	681
N gene ORF (nt)	846 (2105-2950)	846 (2106- 2951)	846 (2103-2948)
N protein (aa)	281 (30.9 kDa)	281 (30.9 kDa)	281 (30.9 kDa)
3'UTR (nt)	66	66	67

nt = nucleotides, aa = amino acids, kDa = kilodaltons, IGR = Intergenic region, UTR=untranslated region,

GP = glycoproteins precursor (GnGc), NSm=M RNA-non structural protein, N=nucleocapsid protein,

NSs=S RNA-nonstructural protein. Digits showed nucleotide positions and numbers of nucleotide in each region.

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์แบบ Phylogenetic tree

ผลการจัดเรียงและเปรียบเทียบ (alignment) จีโนม RNA M ของทั้งสามไวรัสเลท มีระดับความคล้ายคลึงกัน ดังนี้ คือ CT1 และ C94 มีความใกล้เคียงกัน 97.2% ส่วนไวรัสเลท T91 ที่แยกได้จากมะเขือเทศ มีความคล้ายคลึงกับไวรัสเลท CT1 และ C94 คือ 94.3 และ 94.6 ตามลำดับ เปรียบเทียบส่วนของนิวคลีโอไทด์ของสาย M กับทอสโพไวรัสชนิดอื่น พบว่า RNA M ของทั้งสามไวรัสเลทมีความใกล้เคียงกับ TNRV ไวรัสเลท TT1 ที่มีการรายงานไว้ 95.6-97.6% และเมื่อจัดทำ Phylogenetic tree เชื้อ TNRV ทั้ง 4 ไวรัสเลทจับกลุ่มเดียวกันและแยกออกจาก Tospovirus group IV เช่น WSMoV และ CaCV (Figure 2a)

เปรียบเทียบ RNA S ของทั้งสามไวรัสเลท พบว่า CT1 และ C94 มีความคล้ายคลึงกัน 99.2% ส่วนไวรัสเลท T91 คล้ายคลึงกับไวรัสเลท CT1 และ C94 ที่ระดับ 95.5 และ 95.1 % ตามลำดับ RNA S ของทั้งสามไวรัสเลทมีความใกล้เคียงกับ RNA S ของไวรัสเลท TT1 ที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ 95.1-98.8% เมื่อจัดทำ Phylogenetic tree

ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ จีโนม S พบว่า TNRV ทุกไอโซเลทจับกลุ่มแยกออกจาก Tospovirus group IV และ ทอสโฟไวรัสชนิดอื่นๆ ที่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลไว้ก่อนหน้านี้ (Figure 2b) ผลการจัดเรียง RNA S และ M ของ TNRV กับทอสโฟไวรัส group IV พบว่ามีความคล้ายคลึงกันเพียง 58.9 %

จีโนม RNA M ที่มีความยาวไม่เท่ากันนั้น เป็นผลมาจากความผันแปร (variation) และส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) มากกว่าส่วนที่เป็นยีน (coding region) ซึ่งปรากฏการณ์นี้พบมากในสายพันธุ์กรรมของไวรัส ชนิดอาร์เอ็นเอรวมทั้งทอสโฟไวรัส เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase ในการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ นั้นไม่มีระบบตรวจสอบแก้ไขข้อผิดพลาด จึงพบว่าการเกิดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผันแปรไปในอัตราสูง (Pappu *et al.*, 2000) กรณีของทอสโฟไวรัสที่มีรายงานพบความผันแปรอย่างหลากหลาย ได้แก่ *Tomato spotted wilt virus*; TSWV (Lian *et al.*, 2013) เกิดได้ทั้งในรูปแบบการเติมหรือตัดนิวคลีโอไทด์ (insertion/deletion) หรือการ สลับจีโนม (reassortment) หรือเกิดการตัดต่อนิวคลีโอไทด์บางส่วนของอาร์เอ็นเอต่างสาย (recombination) เชื้อ TNRV ที่ศึกษาในครั้งนี้ RNA S มียีนที่แปลรหัสให้โปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (N) ซึ่งจัดว่าเป็นบริเวณอนุรักษ์ มากที่สุด จึงพบว่า RNA S ของทุกไอโซเลทที่ศึกษาและไอโซเลท TT1 (Seepiban *et al.*, 2011) และ T1 (Hassani-Mehabaran *et al.*, 2011) ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้มีความคล้ายคลึงกันสูงกว่าสาย M ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า TNRV แยกกลุ่มจาก *Tosovirus* ชนิดอื่นที่พบมาก่อนหน้านี้ใน ประเทศไทยและที่อื่นๆ และไม่พบว่ามีสายพันธุ์ของเชื้อตามชนิดพืชที่พบโรคเช่นพริกหรือมะเขือเทศ ควรมีการเสนอให้ TNRV เป็นไวรัสชนิดใหม่ ทั้งนี้ Kunkalikar *et al.* (2011) ได้เสนอแนวทางตั้งกลุ่มของทอสโฟไวรัสชนิด *Watermelon bud necrosis virus*, WBNV ที่ค้นพบจากพริกในประเทศอินเดียให้แยกออกจากกลุ่มของเชื้อ CaCV และ IYSV โดยอาศัยการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA S และ M ร่วมกันทั้งสองสาย

ข้อมูลจีโนมของเชื้อ TNRV แต่ละไอโซเลทที่รายงานไว้นี้สามารถนำไปใช้ประกอบการเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ เพื่อทดสอบประเมินความรุนแรงของโรคและปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคได้อย่างเหมาะสม

สรุป

แยกเชื้อไวรัส TNRV สาเหตุโรคใบจุดวงแหวนเนื้อเยื่อตายจากพริกและมะเขือเทศรวม 3 ไอโซเลท พบว่า ทำให้เกิดอาการบนพืชทดสอบได้แตกต่างกัน สามารถใช้อาการจุดแผลเฉพาะแห่งที่เกิดขึ้นบนตัวพุ่มและอาการแบบ แพร่กระจายบนใบลำโพงในการจัดแบ่งสายพันธุ์ของเชื้อ TNRV ออกเป็นกลุ่มย่อยได้ในเบื้องต้น ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA M และ RNA S ของแต่ละไอโซเลทพบว่ามีความยาวไม่เท่ากัน และส่วนที่มีความแตกต่างกันมากที่สุดได้แก่บริเวณที่ไม่แปลรหัสระหว่างยีน จีโนมส่วนที่เป็น RNA S โดยเฉพาะบริเวณที่มีการแปลรหัสเป็น โปรตีน N มีลักษณะการอนุรักษ์สูง ในขณะที่ RNA M และบริเวณที่แปลรหัสเป็นโปรตีน GP มีความผันแปรมากกว่า การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Phylogenetic tree พบว่าเชื้อ TNRV ทุกไอโซเลทที่พบในประเทศไทยมีความใกล้ชิดกันและจับกลุ่มเดียวกัน โดยแยกออกจากทอสโฟไวรัสชนิดอื่นและควรจัดเป็นชนิดใหม่

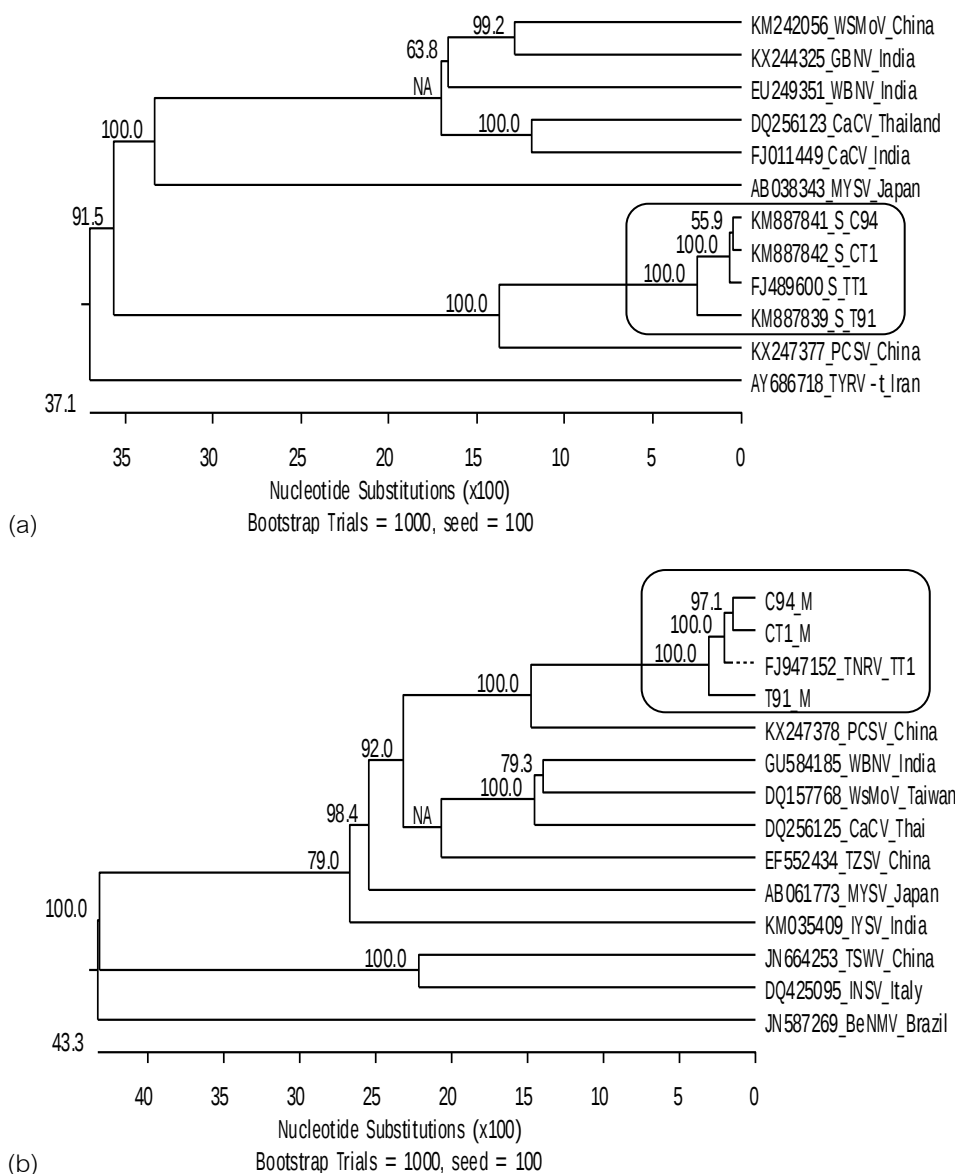


Figure 2 Neighbour joining phylogenetic tree reconstructed from nucleotide sequences of RNA M (a) and S (b) of *Tomato necrotic ringspot virus* isolates from Thailand (clear box) with other previously recorded tospovirus species. Percentage of bootstrapping for 1000 replications were shown.

Abbreviations: WSMoV; *Watermelon silver mottle virus*, CaCV; *Capsicum chlorosis virus*, GBNV; *Groundnut bud necrosis virus*, PCSV; *Pepper chlorotic spot virus*, TSWV; *Tomato spotted wilt virus*, INSV; *Impatiens necrotic spot virus*, IYSV; *Iris yellow spot virus*, MYSV; *Melon yellow spot virus*.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัย สถานที่ และเครื่องมือ จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และได้รับเงินทุนบัณฑิตศึกษาประจำปี 2555 จากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

เอกสารอ้างอิง

- คณินิจ ศรีวิสัย พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ และวัชรนี ฮังประยูร. 2554. โรคใบด่างจุดวงแหวนเนื้อเยื่อตายของพริกที่เกิดจากเชื้อ Tomato necrotic ringspot virus. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 42: 99-112.
- Bag, S., and Pappu, H.R. 2009. Symptomatology of Iris yellow spot virus in selected indicator hosts. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2009-0824-01-BR.
- Chiemsoombat, P., M. Sharman, K.S.C, P. Campbell, D. Persley and S. Attathom. 2010. A new tospovirus species infecting *Solanum esculentum* and *Capsicum annuum* in Thailand. Australasian Plant Disease Notes 5: 75-78.
- Hassani-Mehraban, A., S. Cheewachaiwit, C. Relevante, R. Kormelink and D. Peters. 2011. Tomato necrotic ring virus (TNRV), a recently described tospovirus species infecting tomato and pepper in Thailand. European Journal of Plant Pathology 130: 449-456.
- Huang, K.S., C.H.Tai, Y.H. Cheng, S.H.Lin, T.C. Chen, F.J. Jan. 2017. Complete nucleotide sequences of M and L RNAs from a new pepper-infecting tospovirus, Pepper chlorotic spot virus. Archives of Virology 162: 2109. doi:10.1007/s00705-017-3260-1.
- Kunkalikar, S.R., S. Poojari, B.M. Arun, P.A. Rajagopalan, T.C. Chen, S.D.Yeh and K.S. Ravi. 2011. Importance and genetic diversity of vegetable-infecting tospoviruses in India. Phytopathology 101: 367-376.
- Lian S., J-S. Lee, W.K. Cho, J. Yu and M-K. Kim. 2013. Phylogenetic and Recombination Analysis of Tomato Spotted Wilt Virus. PLoS ONE 8(5): e63380. doi:10.1371/journal.pone.0063380
- Pappu, S.S., A.I. Bhat, H.R. Pappu, C.M. Deom and A.K. Culbreath. 2000. Phylogenetic studies of tospoviruses (Family: Bunyaviridae) based on intergenic region sequences of small and medium genomic RNAs. Archives of Virology 145: 1035-1045.
- Sambrook F.E., F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A.
- Seepiban, C., O. Gajanandana, T. Attathom and S. Attathom. 2011. Tomato necrotic ringspot virus, a new tospovirus isolated in Thailand. Archives of Virology 156: 263-274.
- Silva, M.S., C.R. F. Martins, I.C. Bezerra, T. Nagata, A.C. De Avila and R.D.O. Resende. 2001. Sequence diversity of NSm movement protein of tospoviruses. Archives of Virology 146: 1267-1281.
- Sunpapao, A. 2012. The Occurrence and Disease Incidence of Tospovirus Infecting Pepper (*Capsicum annuum* L.) in Southern Thailand. The Philippine Agricultural Scientist 4: 411-415.