

การเปรียบเทียบจีโนมและอาร์เอ็นเอรีคอมบิเนชันของทอสโปไวรัสชนิด *Tomato necrotic ringspot virus* สาเหตุโรคใบจุดวงแหวนเนื้อเยื่อตายของพริก
Genome Comparison and RNA Recombination Detection of *Tomato Necrotic Ringspot Virus*, a Pepper Infecting Tospovirus

จุฑารัตน์ ลิดจันทร,^{1,2} รัชณี ฮงประยูร^{1, 2, 3} และ พิศสุวรรณ เขียมสมบัติ^{1, 2, 3}
Jutarat Lidjun,^{1, 2} Ratchanee Hongprayoon^{1, 2, 3} and Pissawan Chiemsombat^{1, 2, 3}

บทคัดย่อ

โรคใบจุดวงแหวนเนื้อเยื่อตายของพริกที่เกิดจากเชื้อ *Tomato necrotic ringspot virus* (TNRV) นับว่าเป็นโรคสำคัญ โดยทำให้พืชเกิดอาการใบจุดเป็นแผลวงกลมหรือวงแหวน และมีเนื้อเยื่อตายสีน้ำตาลอยู่รอบๆ วงแผล อาการเช่นนี้พบบนผลพริกและมะเขือเทศ ทำให้สูญเสียผลผลิตที่สามารถนำส่งตลาดได้ การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ TNRV อย่างถูกต้อง มีความจำเป็นต่อการคัดเลือกเชื้อที่จะนำไปใช้ทดสอบประเมินความต้านทานโรคของพืช ในการทดลองนี้ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA S และ M ของเชื้อ TNRV 4 ไอโซเลทที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ร่วมกับทอสโปไวรัสชนิดอื่น เพื่อตรวจหาลักษณะของจีโนมที่ผันแปรไปแตกต่างกัน ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มสายทั้งสองสายด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน 94.7-98.2% และคล้ายคลึงกับทอสโปไวรัสชนิดอื่น 58.2-76.9 % ดังนั้นควรพิจารณาแยกเป็นชนิดใหม่ ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (N) เป็นส่วนที่อนุรักษ์มากที่สุด ส่วนโปรตีน NSs มีความผันแปรมากที่สุด ผลการตรวจหาความผันแปรของนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ 3 โปรแกรมร่วมกัน ไม่พบการสลับจีโนมของ RNA S หรือ M กับทอสโปไวรัสชนิดอื่น แต่เมื่อใช้โปรแกรม RDP4 พบการเกิดรีคอมบิเนชันบน RNA M ของไอโซเลท TT1 ในบริเวณที่ไม่แปลรหัส (IGR) ตำแหน่งที่ 1146-1759 โดยมี ไอโซเลท T91 และ C94 เป็น major และ minor parent ตามลำดับ ซึ่งจัดเป็นความผันแปรของเชื้อ TNRV ที่เกิดขึ้นในสภาพแปลงปลูกธรรมชาติ

คำสำคัญ: ทอสโปไวรัส ลำดับนิวคลีโอไทด์ การเรียงลำดับโปรตีน การสลับจีโนม การตัดต่อเปลี่ยนยีน

Abstract

Pepper production in Thailand has been drastically affected by virus disease caused by *Tomato necrotic ringspot virus* (TNRV). The typical symptom of necrotic or yellow ringspot appeared on pepper and tomato fruits that caused unmarketable produces. The virus has been characterized based on genomic sequencing and various strains were identified. In this study, four of TNRV isolates (TT1, T91, C94 and CT1) from tomato and chili pepper were analyzed for the occurrence of genetic variations using three different analysis programs. Full length sequences of RNA M and RNA S indicated 94.7-98.2% identity among TNRV isolates but shared only 58.2-76.7% similarity to other tospoviruses. Therefore TNRV should be considered as a new species. Amino acid contents of protein N were the most conserved coding region while those of NSs protein were the most variable. There was no evidence of genome reassortment for all tested TNRV isolates. The phylogenetic network appeared among TNRV isolates.

¹ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

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

Analysis by using Recombination Detection Program (RDP4) revealed no possible recombination events for RNA S while the recombination event was found on RNA M of TNRV-TT1 between nucleotides positions 1146-1759 of the intergenic region suggesting that TNRV-C91 and C94 were major and minor parents, respectively. This result suggested that RNA recombination was the potential origin of genetic variation among the studied TNRV isolates in the natural fields.

Keywords : Tospovirus, nucleotide sequence, protein alignment, reassortment, recombination

คำนำ

โรคใบจุดวงแหวนเนื้อเยื่อตายที่เกิดจาก *Tomato necrotic ringspot virus* (TNRV) พบแพร่ระบาดรุนแรงในแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศในหลายแหล่งปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย โรคนี้ทำให้ผลพริกและมะเขือเทศมีรอยแผลเป็นวงสีเหลืองหรือสีน้ำตาลที่ผิวนอก จึงไม่ได้คุณภาพตามที่จะส่งขาย ตรวจพบเชื้อครั้งแรกจากพริกและมะเขือเทศในปี พ.ศ. 2553 ที่จังหวัดนครปฐม เชียงราย และเชียงใหม่ (Chiemsombat *et al.*, 2010, Hassani-Mahabaran *et al.*, 2011, Seepiban *et al.*, 2011) โดยยังไม่มียางานว่าพบเชื้อ TNRV ในประเทศอื่น เชื้อ TNRV จัดอยู่ในจีนัสทอสโฟไวรัส (*Tospovirus*) มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว 3 สายได้แก่ RNA L, M และ S อาร์เอ็นเอแต่ละสายถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก N (nucleocapsid) และทั้ง 3 สายบรรจุรวมกันอยู่ในอนุภาครูปทรงกลมที่มีเยื่อหุ้ม (envelop membrane) และมีไกลโคโปรตีน (glycoprotein, GP หรือ GnGc) เป็นระยงที่ยื่นออกมาจากผิวนอกของเยื่อหุ้ม Seepiban *et al.* (2015) ศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าเพลี้ยไฟ *Thrips palmi* และ *Ceratothripoides claratrix* ถ่ายทอดเชื้อ TNRV ไปสู่พริกและมะเขือเทศ การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของทอสโฟไวรัสใช้ข้อมูลยีน N ซึ่งเป็นรหัสพันธุกรรมที่อยู่บนสายจีโนม RNA S ต่อมาพบว่าในสภาพธรรมชาติทอสโฟไวรัสเกิดการสลับจีโนม (genome reassortment) ทำให้มีการพบสายจีโนม L, M หรือ S ต่างสายพันธุกรรมได้ในทอสโฟไวรัสชนิดเดียว หรือ ต่างชนิดกัน (Qiu and Moyer, 1999; Webster *et al.*, 2011) ซึ่งในกรณีของ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) สาเหตุโรคของพริกและมะเขือเทศ พบว่าเชื้อ TSWV มีจีโนมสาย N ผันแปรไปจากเดิมแล้วสามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชที่คัดเลือกมาแล้วว่าต้านทานต่อเชื้อ TSWV สายพันธุ์เดิมได้ นอกจากนี้ทอสโฟไวรัสยังสามารถแลกเปลี่ยนยีนบางส่วนบนอาร์เอ็นเอแต่ละสาย (RNA recombination) ในระหว่างการเกิด RNA replication ได้อีกด้วย ทำให้พันธุกรรมของเชื้อทอสโฟไวรัสชนิดต่างๆ เกิดความหลากหลายเพิ่มขึ้น ดังนั้นหากทอสโฟไวรัสสลับจีโนมกันหรือเกิดรีคอมบิเนชัน ทำให้มีการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์บางส่วนบนสายอาร์เอ็นเอ ก็จะทำให้การระบุชนิดจากยีน N เพียงอย่างเดียวเกิดความคลาดเคลื่อน การวิจัยนี้จึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA S และ M ของเชื้อ TNRV 4 ไอโซเลทและของทอสโฟไวรัสชนิดใกล้เคียงที่พบในประเทศไทยและที่อื่นมาเปรียบเทียบกันแล้วตรวจสอบโอกาสการเกิดความผันแปรบนจีโนมสองสายนี้ซึ่งจำเป็นต่อการจำแนกเชื้อ TNRV ที่จะนำไปใช้ประเมินคัดเลือกพันธุ์พืชที่ต้านทานโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ RNA S และ M ของเชื้อ TNRV

ใช้ข้อมูลจีโนมสาย S และ M เต็มสายของเชื้อ TNRV จากพริกและมะเขือเทศที่พบในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553- 2557 (ค.ศ. 2009- 2014) จำนวน 4 ไอโซเลท (Seepiban *et al.*, 2011; จุฑารัตน์และคณะ, 2560) ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทุกไอโซเลทมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของส่วนที่แปลรหัส

(coding region) และส่วนที่ไม่แปลรหัส ได้แก่ 5'-3' untranslated region (UTR) และ intergenic region (IGR) กับ ทอสมโไวรัสชนิดอื่นที่เลือกมาจาก GenBank

2. โปรแกรมและขั้นตอนการวิเคราะห์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA S และ M ของเชื้อทอสมโไวรัสแต่ละชนิดมาเรียงต่อกัน (RNA S+RNA M) แล้วนำไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Megalign (DNASTAR package, USA) จัดทำ phylogenetic tree ใช้ค่า Bootstrap 1000 replications โดยใช้โปรแกรม MAGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) สำหรับการวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับ โปรตีนของไวรัส 4 ชนิด ได้แก่ N (nucleocapsid) NSs (S non-structural protein) NSm (M non-structural protein) และ GP (glycoprotein) ใช้โปรแกรม editseq (DNASTAR package, USA) มาเปลี่ยนลำดับเบสส่วนแปลรหัส เป็นลำดับกรดอะมิโน วิเคราะห์เปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม ClustalW (Thompson *et al.*, 2002) และ ESPrnt (<http://esprnt.ibcp.fr>) (Robert and Gouet, 2014) นำมาทำ phylogenetic network ด้วยโปรแกรม Splitstree 4.11 (Huson, 1998)

ตรวจหาความเป็นไปได้ของการเกิด recombination ด้วยโปรแกรม Recombination Detection Program V4.16 (RDP4) (Martin *et al.*, 2015) โดยแยกวิเคราะห์ RNA S และ M ของเชื้อ TNRV ร่วมกับทอสมโไวรัสชนิดอื่น ทั้งที่พบในประเทศไทย และประเทศอื่น จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยวิธีวิเคราะห์ 9 วิธี ได้แก่ RDP, GENECOV, Chimaera, Maxchi, BOOTSCAN, SISCAN, Phylpro, LARD และ 3S โดยใช้ default parameters

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเปรียบเทียบจีโนม S และ M RNA ของเชื้อ TNRV กับทอสมโไวรัสชนิดอื่น

ใช้โปรแกรม ClustalW เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA S ระหว่างเชื้อ TNRV ไอโซเลตต่างกัน พบว่า RNA S มีค่า % identity 94.4-98.8% ซึ่งผันแปรน้อยกว่า RNA M ที่มีค่า identity ในช่วง 93.3-96.5% เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA S ที่นำมาเรียงต่อกับ RNA M (S+M) ของ TNRV ทุกไอโซเลต พบว่าค่า % similarity อยู่ในช่วง 94.7-97.2% แสดงว่าทั้ง RNA S และ RNA M เป็นจีโนมของไวรัส TNRV ชนิดเดียวกันทุกไอโซเลต ตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ว่าทอสมโไวรัสชนิดเดียวกันมีค่า similarity 90% ขึ้นไป และเมื่อเปรียบเทียบ TNRV ทุกไอโซเลตกับทอสมโไวรัสในกลุ่ม IV เช่น WsMoV, CaCV และ MYSV ซึ่งเป็นชนิดที่พบในประเทศไทย มีค่า % identity สูงสุด 62.9, 63.4 และ 58.9 % ตามลำดับ ในขณะที่ค่า identity สูงสุดของ TNR-RNA S รวมกับ RNA M กับทอสมโไวรัสชนิดใหม่ *Pepper chlorotic spot virus* (PCSV) ที่พบในประเทศจีน เท่ากับ 76.9 % ดังนั้นเชื้อ TNRV จึงใกล้เคียงกับเชื้อ PCSV มากที่สุด (Table 1) โรคใบจุดวงแหวนเนื้อเยื่อตายที่เกิดจากเชื้อ TNRV ที่พบในพริกและมะเขือเทศนี้มีการแพร่ระบาดในหลายพื้นที่การผลิตทุกภูมิภาคของไทย แต่ยังไม่มียางานว่าพบในประเทศอื่น จนกระทั่ง Cheng *et al.* (2014) รายงานว่าพบเชื้อ PCSV ระบาดในพริกหวานในประเทศไต้หวัน และ Zheng *et al.* (2017) รายงานว่าพบเชื้อ PCSV เข้าทำลายพริกและมะเขือเทศในมณฑลยูนนาน ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน พร้อมทั้งระบุว่า PCSV มีความใกล้ชิดกับเชื้อ TNRV ของไทย แต่มีพีชอคาย์ที่แตกต่างไปจาก TNRV ได้แก่วงศ์ *Brassicaceae* และ *Cucurbitaceae* จากข้อมูลจีโนมที่ศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสองชนิดนี้ใกล้ชิดกันมาก แต่เนื่องจากมีค่า % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่ถึงเกณฑ์ 90% ที่กำหนดโดย ICTV สำหรับทอสมโไวรัสชนิดเดียวกัน (King *et al.*, 2012) จาก phylogenetic tree พบว่าเชื้อ TNRV และ PCSV จับเป็นคลัสเตอร์ย่อยแยกกัน แต่อยู่ในคลัสเตอร์ซึ่งแยกจาก CaCV, WSMoV และ MYSV (จุฑารัตน์และคณะ, 2560)

Table 1 Similarity percentages of nucleotide sequences of RNA S and RNA M of *Tomato necrotic ring spot virus* (TNRV, bold letters) and other recorded tospovirus species infecting pepper and tomato. Upper right showed similarity, lower left showed distance.

Virus Species	TNRV CT1	TNRV C94	TNRV T91	TNRV TT1	CaCV Thailand	PCSV China	WSMoV Taiwan	MYSV Japan
TNRV-CT1		98.0	94.7	97.9	63.1	76.7	62.5	58.4
TNRV-C94	0.02		98.0	98.2	63.1	76.7	62.5	58.4
TNRV-T91	0.05	0.05		95.3	63.3	76.9	62.9	58.9
TNRV-TT1	0.02	0.05	0.05		63.4	76.8	62.7	58.8
CaCV-Thailand	0.50	0.49	0.49	0.49		62.5	75.0	61.1
PCSV-China	0.26	0.26	0.26	0.26	0.50		61.9	58.9
WsMoV-China	0.50	0.49	0.49	0.49	0.50	0.50		61.5
MYSV-Japan	0.59	0.58	0.58	0.57	0.50	0.50	0.50	

Virus name abbreviation and GenBank accession number: CaCV, *Capsicum chlorosis virus* (DQ256123, DQ256125), PCSV, *Pepper chlorotic spot virus* (KX247377, KX247378), WSMoV, *Watermelon silver mottle virus* (U78734, DQ157768), MYSV, *Melon yellow spot virus* (AB038343, AB061773).

เมื่อนำข้อมูลยีนและโปรตีนบนสาย RNA S และ M ของ TNRV และทอสโปไวรัสอีก 3 ชนิดได้แก่ CaCV, WSMoV และ MYSV ที่มีรายงานพบในประเทศไทย และเชื้อ PCSV ซึ่งจีโนมมีค่า % identity สูงสุดกับเชื้อ TNRV มาเปรียบเทียบกับกัน รวมทั้งจัดทำ sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเพื่อศึกษาส่วนที่พบความผันแปร โดยใช้ TNRV ไอโซเลท C94 เป็นตัวแทนของเชื้อ TNRV ผลการวิเคราะห์พบว่า เชื้อ TNRV และเชื้อ PCSV มีโปรตีน N ที่ให้ค่า % identity ของลำดับกรดอะมิโนสูงสุด 88.9 % รองลงมาคือโปรตีน NSm, GP (หรือ GnGc) และ NSs 86.4, 82.4 และ 81.4% ตามลำดับ ดังนั้นโปรตีน N จึงเป็นบริเวณอนุรักษ์สูงสุดและโปรตีน NSs มีความผันแปรมากที่สุด (Table 2) ในการเปรียบเทียบกับทอสโปไวรัสชนิดอื่นที่ต่าง species โปรตีน GP มีค่า identity สูงที่สุดรองลงมาคือโปรตีน N, NSm ส่วนโปรตีน NSs ผันแปรมากที่สุด สำหรับทอสโปไวรัสที่พบในประเทศไทยด้วยกัน เชื้อ CaCV มีความใกล้ชิดกับเชื้อ TNRV มากกว่า WSMoV หรือ MYSV โดยมีค่า % identity ของโปรตีน NSm สูงสุดที่ 70.5% แต่โปรตีน N มีค่า % identity เพียง 56.0% เท่านั้น จึงยังไม่ควรจัดให้เชื้อ TNRV อยู่ในซีโรกรุปเดียวกับกลุ่ม WSMoV Seepiban *et al.* (2015) พบว่าหากใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ WSMoV หรือ CaCV จะไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ TNRV แต่ต้องใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีของ Tospovirus group IV ที่ผลิตขึ้น (PAbA3) จึงจะให้ผลตรวจเป็นบวก Zheng *et al.* (2017) ทดลองตรวจเชื้อ PCSV จากใบพืช ด้วยวิธี immunoblotting และใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ WSMoV ซึ่งให้สัญญาณการตรวจวินิจฉัยเป็นบวก แต่จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อ TNRV กับ WSMoV และเชื้ออื่น พบว่ามีเพียงเชื้อ PCSV เท่านั้นที่ให้ค่า 88.9% identity และอาจจะเกิดปฏิกิริยาข้ามต่อแอนติบอดีของเชื้อสองชนิดนี้ได้ ผลการเปรียบเทียบโปรตีน N พบว่าเชื้อ WSMoV มีกรดอะมิโนหลายตำแหน่งที่แตกต่างไปจากเชื้อ TNRV และ PCSV ดังนั้นจึงควรมีการผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อตรวจแยกเชื้อ TNRV จากเชื้อทอสโปไวรัสชนิดอื่นในประเทศไทย แต่หากใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีตรวจวินิจฉัยโรคจะทำให้การระบุชนิดเชื้อคลาดเคลื่อน อีกทาง เลือกรหัสหนึ่งนั้นควรพัฒนาใช้โมโนโคลนอล

แอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ที่มีความจำเพาะมากขึ้นในการนำมาตรวจจำแนกชนิดเชื้อทดแทนการใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน N นอกจากนี้ Chen *et al.* (2006) พบว่ามี common epitope ร่วมบนโปรตีน NSs ที่สามารถนำมาใช้สร้างแอนติบอดีตรวจหาทอสมโฟไวรัสในกลุ่ม WSMoV, CaCV, และ PBNV

Table 2 Percentage identity of genomic RNA S and RNA M and protein coding sequences of TNRV-C94 with PCSV, CaCV, WSMoV and MYSV.

Region	Identity with PCSV	Identity with CaCV	Identity with WSMoV	Identity with MYSV
S RNA(nt)	69.2	42.1	43.3	40.5
N gene(nt)	82.1	51.3	50.6	48.3
N Protein(aa)	88.9	56.0	54.5	49.8
NSs gene(nt)	75.8	49.4	47.1	44.1
NSs Protein(aa)	81.4	49.6	48.5	42.5
M RNA (nt)	72.1	55.8	54.7	51.0
NSm gene(nt)	75.2	63.1	59.0	56.3
NSm Protein (aa)	86.4	70.5	63.5	61.0
GP gene (nt)	73.7	57.6	57.4	53.2
GP Protein (aa)	82.4	64.2	63.6	58.9

Virus name and GenBank accession number were listed in Table1. TNRV-C94, *Tomato necrotic ringspot virus* isolate C94.

การตรวจหา reassortment ของจีโนม RNA S และ M ของเชื้อ TNRV

ไม่พบค่า % similarity ที่สูงกว่า 90 % กับทอสมโฟไวรัสชนิดอื่นซึ่งไม่แสดงถึงการสลับจีโนมของ TNRV กับเชื้อ CaCV, WSMoV หรือ MYSV ที่พบในประเทศไทย Webster *et al.* (2011) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ N gene และ RNA S ของไวรัสสาเหตุโรคในมะเขือเทศ ระบุว่าเชื้อ GRSV (*Groundnut ringspot virus*) จากค่า nucleotide identity 98.3% แต่กลับพบว่า RNA M เหมือนกับเชื้อ TCSV (*Tomato chlorotic spot virus*) 97.6% ในขณะที่เหมือนกับเชื้อ GRSV เพียง 91.1% โดยคาดว่าเกิดการเกิด reassortment ของ RNA M เกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติ เนื่องจากมีเพลี้ยไฟพาหะดูดกินพืชอาศัยสลับกันไปมาในช่วงชีวิตของแมลง Seepiban *et al.* (2011) พบว่าในตัวเพลี้ยไฟ *Thrips palmi* ที่เก็บจากแปลงปลูกพืชตรวจพบทอสมโฟไวรัสทั้งสี่ชนิด แต่ในตัวเพลี้ยไฟ *Scirtothrips dorsalis* ซึ่งเป็นศัตรูพริกกลับตรวจไม่พบ TNRV ความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างเพลี้ยไฟ ชนิดของทอสมโฟไวรัส และพืชอาศัยของแมลง จึงเป็นปัจจัยสำคัญของการเกิด reassortment ของจีโนมไวรัสในธรรมชาติ

การศึกษาความแปรผันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N

โปรตีน N ของทอสปอไวรัสมีขนาด 29-30 กิโลดาลตัน มีหน้าที่ห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของทอสปอไวรัส จึงนิยมใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน N สำหรับตรวจสอบเชื้อแต่ละชนิดด้วยวิธี ELISA หรือใช้ร่วมกับวิธี RT-PCR ที่เพิ่มปริมาณยีน N แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อจัดทำ nucleotide & amino acid alignments ของยีนและโปรตีน N ของทอสปอไวรัสทั้ง 4 ชนิดข้างต้นโดยใช้ไอโซเลท TT1 เป็นตัวแทนเชื้อ TNRV พบว่าส่วนปลาย 5' ของยีน N จำนวน 7- 17 นิวคลีโอไทด์เหมือนกัน และเชื้อ TNRV กับ PCSV เหมือนกันมากที่สุดด้วยความยาวถึง 86 นิวคลีโอไทด์ (ต่างกัน 4 ตำแหน่ง คือ 21C/T, 39C/A, 62A/C, และ 84T/G) ส่วนด้านปลาย 3' ของยีน N ประมาณ 60 นิวคลีโอไทด์สุดท้ายของยีนของเชื้อ CaCV และ WSMoV แตกต่างกันและต่างจากเชื้อ TNRV และ PCSV ซึ่งมี 40 นิวคลีโอไทด์สุดท้ายต่างกันเพียง 6 ตำแหน่ง (Figure 1) โดยบริเวณดังกล่าวนี้มักจะใช้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน N เมื่อต้องการวินิจฉัยชนิดของทอสปอไวรัส เมื่อจัดทำ amino acid alignment ผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนจำนวน 281 เรสิดิวส์ของโปรตีน N ของเชื้อ TNRV ทั้ง 4 ไอโซเลทของไทยกับเชื้อ WSMoV และ PCSV ที่พบในประเทศจีนซึ่งคล้ายคลึงกันสูงสุดเท่ากับ 88.9% พบว่ามีความแตกต่างกันมากในบริเวณ C-terminal ของโปรตีน N ช่วงลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 167- 168, 172- 173, 186, 220- 225 และ 245- 279 (Figure 2)

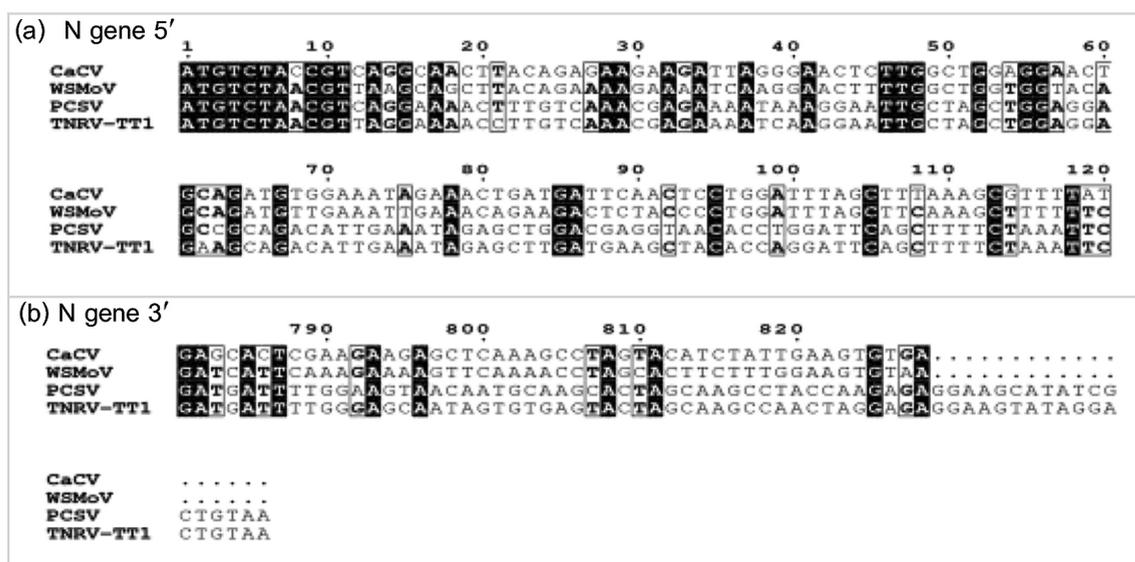


Figure 1 Alignment of N gene nucleotide sequences of tospovirus species which infected pepper and tomato. (a) 5' end of N gene sequence (b) 3' end of N gene sequence. CaCV, *Capsicum chlorosis virus* (DQ256123), PCSV, *Pepper chlorotic spot virus* (KX247377), WSMoV, *Watermelon silver mottle virus* (U78734).

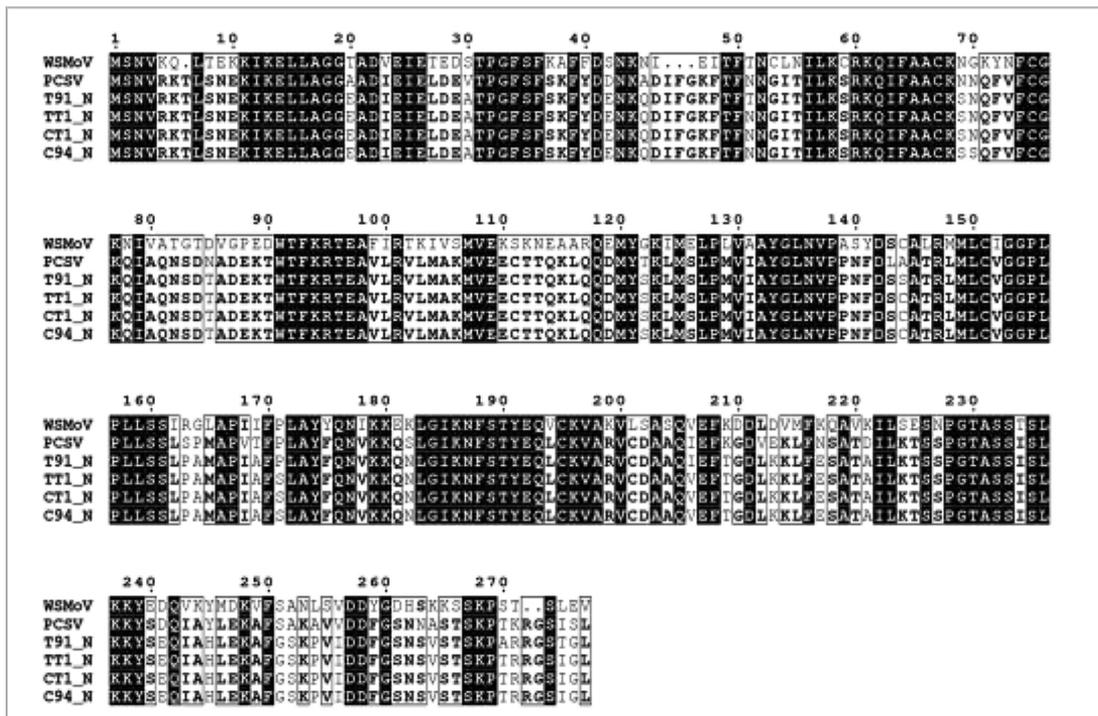


Figure 2 Alignment of N protein sequences of TNRV (T91, TT1, CT1, C94) in Thailand and WSMoV and PCSV in China by ClustalW. Alignment result was presented by ESPrpt3.0. (<http://esprpt.ibcp.fr>). Dense column indicated conserved residues for all entries, clear column with bold letters were those conserved excepting one entry. Regular letter indicated variable residues. N, Nucleocapsid; TNRV, *Tomato necrotic ringspot virus*; PCSV, *Pepper chlorotic spot virus*, WSMoV, *Watermelon silver mottle virus*.

การวิเคราะห์ Phylogenetic network และ RNA Recombination

นำข้อมูลจากโปรแกรม ClustalW มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Splittree เพื่อตรวจหาโอกาสของทอส์โพไวรัสที่อาจเกิดรีคอมบิเนชัน ทำให้มีการแลกเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์บนสายอาร์เอ็นเอ โดยเลือกสตริคเจอร์วิธี Neighbour-net joining network ได้ผลดังนี้ บนจีโนม RNA S พบโครงข่ายความสัมพันธ์ 2 กลุ่มคือ กลุ่ม TNRV ทั้ง 4 ไอโซเลทที่ศึกษา กลุ่ม CaCV WSMoV, PBNV GBNV และ MYSV (Figure 3a) ผลการวิเคราะห์ Phi test พบโอกาสการเกิด RNA recombination ที่มีนัยสำคัญ (statistically significant) สำหรับจีโนม RNA M พบโครงข่ายความสัมพันธ์ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม TNRV, PCSV, CaCV และ Tospovirus groupIV (Figure 3b) และจากค่า Phi test พบโอกาสการเกิด RNA recombination อย่างมีนัยสำคัญ จึงนำไปศึกษารีคอมบิเนชันด้วยโปรแกรม RDP4 (Martin *et al.*, 2015) โดยใช้เกณฑ์ที่กำหนดไว้คือ event ที่เป็นไปได้ต้องพบได้ 3 ใน 5 วิธี (methods) หรือ 5 ใน 7 หรือ 7 ใน 9 วิธี และค่า P ไม่น้อยกว่า 1.0×10^{-6} จึงจะผ่านเกณฑ์ค่า cutoff (Martin *et al.*, 2005) ผลการวิเคราะห์ 9 วิธี พบว่า RNA S ไม่มี recombination event ที่ผ่านเกณฑ์ แต่บน RNA M พบการเกิดรีคอมบิเนชัน event ที่ 4 ของ ไอโซเลท TT1 ให้ผลบวก 7 ใน 9 วิธี (Table 3) อยู่ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1146 -1759 ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน (intergenic region, IGR) โดยมีไอโซเลท T91 เป็น major parent ซึ่งมีบริเวณเกิดรีคอมบิเนชันบนจีโนมในสัดส่วนสูงสุด และ C94 เป็น minor parent ในสัดส่วนรองลงมา (Figure 4)

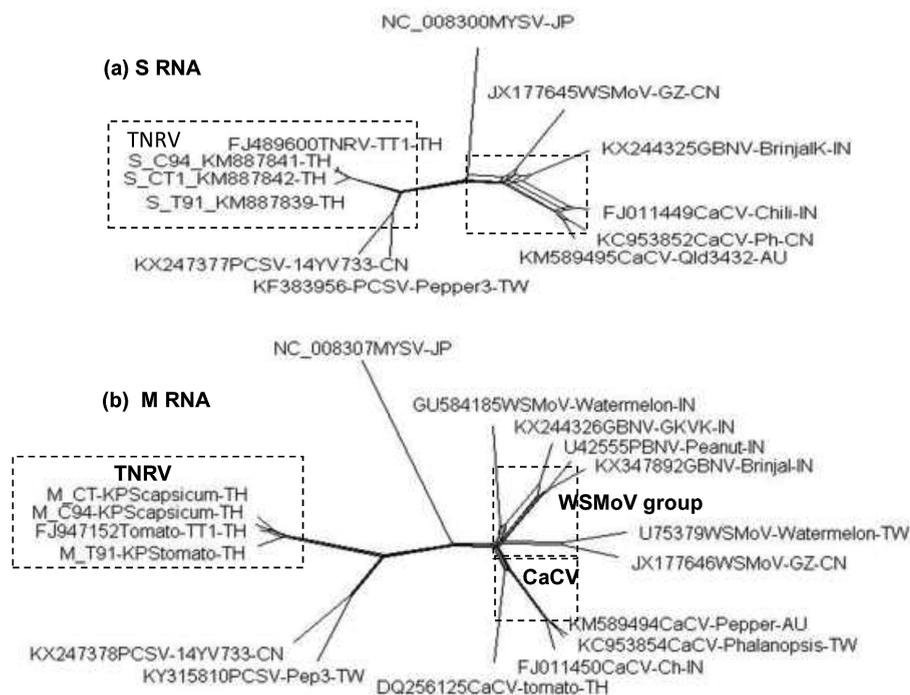


Figure 3 Phylogenetic network of full-length TNRV RNA segments S and M generated by Splitstree. Dash boxes indicated phylogenetic network relationships among virus species. TNRV, *Tomato necrotic ringspot virus*; CaCV, *Capsicum chlorosis virus*; PCSV, *Pepper chlorotic spot virus*; WSMoV, *Watermelon silver mottle virus*; MYSV, *Melon yellow spot virus*; GBNV, *Groundnut bud necrosis virus*

Table 3 Recombination events detected in RNA of TNRV isolates as analyzed by RDP4.

Event no.	Recombinant isolate	Recombinant Breakpoint to Ending	Major parent	Minor parent	Detection methods									
					R	G	B	M	C	S	P	L	3S	
M RNA														
4	TT1	1891-1937	T91	C94	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
5	T91	922-1088	CT1	MYSV	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
8	C94	1044-1666	T91	WSMoV	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S RNA														
2	TT1	1921-2111	WSMoV	CaCV	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
3	C94	1876-1939	CaCV	GBNV	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+

Detection methods: R=RDP, G= GENECOV, B= Bootscan, M= MaxChi, C= Chimaera, S= SiScan, P= PhylPro, L=LARD, 3S= 3Seq. TNRV= *Tomato necrotic ringspot virus*, MYSV= *Melon yellow spot virus*, WSMoV= *Watermelon silver mottle virus*, CaCV= *Capsicum chlorosis virus*, GBNV= *Groundnut bud necrosis virus*. Event 4 of M RNA (shading) was a possible recombination event detected (shading).

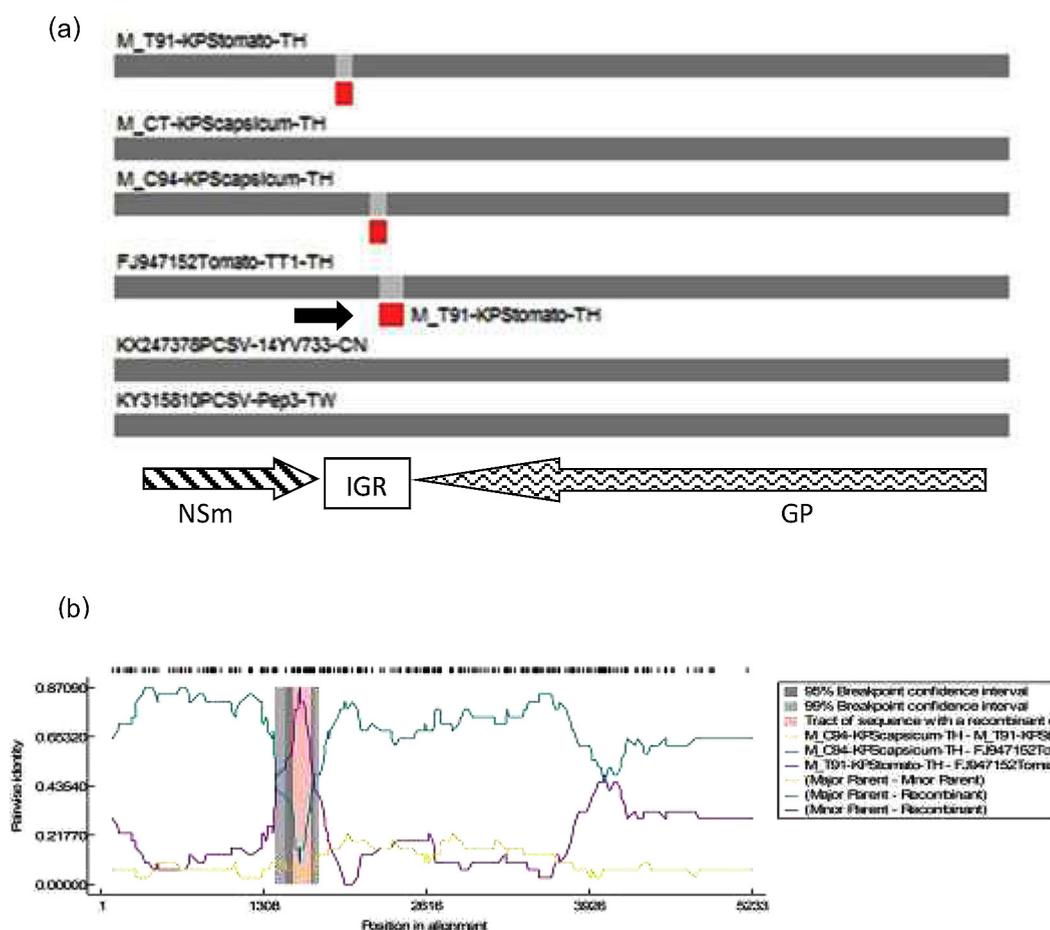


Figure 4 Analysis of possible recombination in full-length segments of TNRV- RNA M, and RNA Sof 4 TNRV isolates from Thailand (TH) by RDP method. (a) Genome map indicated possible recombination event detected in the intergenic region (IGR) of isolates TT1 (Black arrow). PCSV =Pepper chlorotic spot virus, China (CN) and Taiwan (TW) isolates. (b) Graphic showed the prediction breakpoint at positions 1546 to 1697 (nucleotides 1146-1759 of the alignment) as detected in isolate TT1.

การตรวจหารีคอมบิเนชันของจีโนมไวรัส นิยมใช้โปรแกรม phylogenetic network ซึ่งแสดงโครงข่ายของรีคอมบิเนชันในเบื้องต้นและให้ข้อมูลที่แตกต่างไปจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree ทั่วไป เมื่อคัดเลือกโครงข่ายสำคัญได้แล้ว จึงเพิ่มการตรวจสอบความเป็นไปได้ตามหลักสถิติด้วยโปรแกรม RDP ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการพบหรือไม่พบโอกาสของรีคอมบิเนชัน ได้แก่จำนวนข้อมูลของจีโนม ขนาดของจีโนม และจำนวนไอโซเลทที่นำมาวิเคราะห์ (Lian *et al.*, 2013; Chavan *et al.*, 2016) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีโครงข่ายความสัมพันธ์ของเชื้อที่อาจเกิดรีคอมบิเนชันได้บน RNA S และ M แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วย RDP ให้ผลลบบกับ RNA S เนื่องจากไม่ผ่านเกณฑ์ที่ยอมรับความเป็นไปได้ของ recombination event ทั้งจำนวนวิธีวิเคราะห์ที่ใช้และค่าความเป็นไปได้ทางสถิติ

การพบรีคอมบิเนชันของ RNA M บนบริเวณที่ไม่แปลรหัสของเชื้อ TNRV ต่างไอโซเลทอาจจะเนื่องมาจาก มีนิวคลีโอไทด์ A-U ต่อเนื่องจำนวนมากที่มีการเรียงลำดับคล้ายคลึงกัน จึงควรศึกษาเพิ่มเติมจากจำนวนไอโซเลทของ เชื้อแต่ละชนิดที่มากขึ้น เก็บจากหลายแหล่งปลูก และจากพืชอาศัยหลายวงศ์มากขึ้น สิ่งที่สำคัญคือควรระมัดระวัง ไม่ตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยการใช้แอนติบอดีเพียงวิธีเดียว หรือตรวจ N gene ด้วยวิธี RT-PCR เพียงอย่างเดียว เนื่องจาก อาจจะมีข้อมูลไม่เพียงพอที่จะระบุชนิดเชื้อทอสโปไวรัส หรือเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่จะนำไปใช้ประเมินความ ต้านทานของพืช ควรทำการศึกษาลำดับทั้งสามสาย หรืออย่างน้อย S และ M ควบคู่กัน เนื่องจากยีนและโปรตีน NSs, NSm และ GP มีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อโรค การแพร่ระบาด การพักอาศัยและเพิ่มปริมาณเชื้อในเพลี้ยไฟพาหะ ตลอดจน ความต้านทานของพืชอาศัย ซึ่งเป็นกลไกที่ควบคุมโดยรหัสพันธุกรรมบนจีโนมทั้งสองสายดังกล่าว

สรุป

เชื้อ TNRV ทุกไอโซเลทที่ศึกษามีจีโนมที่คล้ายคลึงกันมากกว่า 90% และแตกต่างจากเชื้อ PCSV ที่พบ ในประเทศจีนจึงควรจัด TNRV เป็นทอสโปไวรัสชนิดใหม่แยกออกมา โปรตีน N ของเชื้อ TNRV และทอสโปไวรัสที่พบ ในประเทศไทยมีความอนุรักษ์สูงจึงควรระมัดระวังไม่ตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยการใช้เพียงแอนติบอดีต่อโปรตีน N หรือ ตรวจ N gene ด้วยวิธี RT-PCR เพียงอย่างเดียวเท่านั้น การศึกษาเชื้อ TNRV ในครั้งนี้ ตรวจไม่พบการสลับจีโนม (reassortment) แต่พบการเกิดติดต่อสลับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ไม่แปลรหัสที่อยู่ระหว่างยีน (intergenic region) ของ RNA M ซึ่งจัดว่าเป็นความผันแปรของเชื้อในแปลงปลูกตามสภาพธรรมชาติ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัย สถานที่ และเครื่องมือ จากศูนย์ความเป็นเลิศด้าน เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการ การอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และได้รับเงินทุนบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2555 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัย แห่งชาติ (วช.)

เอกสารอ้างอิง

- จตุรรัตน์ ลิดจันทร์ รัตน์ ฮงประยูร และพิศสุวรรณ เจียมสมมติ. 2560. จีโนม RNA S และ M ของทอสโปไวรัสสาเหตุโรคใบจุดวงแหวน เนื้อเยื่อตายของพริกและมะเขือเทศ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า (กำลังตีพิมพ์).
- Chavan, R. R. and M.N. Pearson. 2016. Molecular characterisation of a novel recombinant *Ribgrass mosaic virus* strain FSHS. *Virology journal* 13(1), 29.
- Chen, T.C. C.W. Huang, Y.W. Kuo, F.L. C.H. Yuan, H.T. Hsu, and S.D. Yeh. 2006. Identification of common epitopes on a conserved region of NSs proteins among tospoviruses of Watermelon silver mottle virus Serogroup. *Phytopathology* 96: 1296-1304. doi: 10.1094/PHYTO-96-1296.
- Cheng Y.H., Y.X. Zheng, C.H. Tai, J.H. Yen, Y.K. Chen, and F.J. Jan. 2014. Identification, characterisation and detection of a new tospovirus on sweet pepper. *Annals Applied Biology* 164:107-115.
- Chiemsombat, P., M. Sharman, K. Sriwilai, P. Campbell, D. Persley and S. Attathom. 2010. A new tospovirus species infecting *Solanum esculentum* and *Capsicum annum* 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.
- Huson D. 1998. Splitstree: Analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* 14: 68-73.

- King, A.M.Q., M.J. Adams, E.B. Carsten, and E.J. Lefkowitz. 2012. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. USA.
- Lian S., J-S. Lee, W.K. Cho, J. Yu, M-K. Kim, H.S. Choi and K.H. Kim. 2013. Phylogenetic and recombination analysis of *Tomato Spotted Wilt Virus*. PLoS ONE 8(5): e63380. doi:10.1371/journal.pone.0063380.
- Martin D., C. Williamson, and D. Posada. 2005. RDP4:Recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21: 260-262.
- Martin, D. P., B. Murrell, M. Golden, A. Khoosal, and B. Muhire. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, 1(1).vev003.
- Qiu, W.P. and J.W. Moyer. 1999. Tomato spotted wilt tospovirus adapts to the TSWV N gene-derived resistance by genome reassortment. *Phytopathology* 89: 575–582.
- Robert, X. and P. Gouet. 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research* 42(W1), W320-W324. doi: 10.1093/nar/gku316.
- Seepiban, C., O. Gajanandana, O., T. Attathom, T, and S. Attathom. 2011. *Tomato necrotic ringspot virus*, a new tospovirus isolated in Thailand. *Archives of Virology* 156: 263–274.
- Seepiban, C., S. Charoenvilaisiri, M. Kumposiri, A. Bhunchoth, O. Chatchawankanphanich, and O. Gajanandana. 2015. Development of a protocol for the identification of tospoviruses and thrips species in individual thrips. *Journal of Virological Methods* 222: 206-213.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biological Evolution* 28: 2731–2739.
- Thompson, J., T. Gibson and D. Higgins. 2002. Multiple sequence alignment using CLustalW and ClustalX. *Current Protocol of Bioinformatics*: 2.3, 1-2.3.22.
- Webster, C. G., S.R. Reitz, K.L. Perry, and S. Adkins. 2011. A natural M RNA reassortant arising from two species of plant-and insect-infecting bunyaviruses and comparison of its sequence and biological properties to parental species. *Virology* 413: 216-225.
- Zheng, K., T.C. Chen, S.D. Yeh, M.S. Rahman, K. Wu, T. Li, Z. Zhang and J. Dong. 2017. Characterization of a new isolate of *Pepper chlorotic spot virus* from Yunnan province, China. *Archives of Virology* 162: 1-6.