

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของดีเอ็นเอ-เอ และดีเอ็นเอ-บี ของเชื้อ *Tomato leaf curl New Delhi virus*–[Thailand:Kanchanaburi:Cucumber:2012] (ToLCNDV–[TH:KR:Cu:12]) สาเหตุอาการใบหงิกของแตงกวา ในจังหวัดกาญจนบุรี

Complete DNA–A and DNA–B Nucleotide Sequences of *Tomato leaf curl New Delhi virus*–[Thailand: Kanchanaburi:Cucumber:2012] (ToLCNDV–[TH:KR:Cu:12]) Associated with Curling Leaf of Cucumber in Kanchanaburi Province

สรชัย จันทะจร<sup>1,2</sup> และ รัชณี ฮงประยูร<sup>1,2,3,\*</sup>  
Sanchai Chantajorn<sup>1,2</sup> and Ratchanee Hongprayoon<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>2</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ กรุงเทพฯ

<sup>3</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>1</sup> Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>2</sup> Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG–BIO/PERDO–CHE), Bangkok, Thailand

<sup>3</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง: กรกฎาคม 2559 Received: July 2016

รับตีพิมพ์: กันยายน 2559 Accepted: September 2016

\* Corresponding author: agrat@ku.ac.th

**ABSTRACT:** Analysis of genome structure of begomovirus infecting cucumber showing curling leaf without yellow symptom from Kanchanaburi province was studied in this research. The causal pathogen has not been identified previously. Total DNA extraction was carried out and the begomovirus genome was amplified by rolling circle amplification (RCA), then cut with restriction enzymes; *Bam*HI for DNA–A and *Kpn*I for DNA–B. DNA sequencing demonstrated that DNA–A contained 2,738 bp in length which consisted of 8 open reading frames (ORFs) including AV1, AV2, AV3, AC1, AC2, AC3, AC4 and AC5 while DNA–B contained 2,690 bp which consisted of 2 ORFs including BC1 and BV1. Comparison of the DNA–A and DNA–B sequences in this study to those belonged to begomoviruses from GenBank database reveals a close genetic relationship to the begomovirus causing tomato leaf curl in India at 98 and 94%, respectively and a close relationship to ToLCNDV–[TH:Cuc:06] DNA–A (accession no. AB330079) and DNA–B (accession no. AB330080) isolated from cucumber in the previous report at 97.26% and 92.34%. The begomovirus in this study was designated *Tomato leaf curl New Delhi virus* –

Thailand:Kanchanaburi:Cucumber:2012] (ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12]). Analysis of the genetic relationship among begomoviruses reported from 1999–2012 reveals that there are two species infecting cucurbits including ToLCNDV and *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV). These viruses do not infect other plants in *Solanaceae* and *Leguminosae* except ToLCNDV that was reported to infect *Sauropus androgynous*.

**Keywords:** begomovirus, leaf curl, cucumber, rolling circle amplification, genome

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(2): 231–244

ว. วิทย. กษ. (2560) 48(2): 231–244

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาโครงสร้างจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายแตงกวาที่แสดงลักษณะอาการใบหงิกโดยไม่แสดงอาการต่างเหลือจาก อ.เมือง จ.กาญจนบุรี ซึ่งยังไม่มีการรายงานถึงเชื้อสาเหตุของอาการดังกล่าวที่พบในประเทศไทย นำมาสกัดดีเอ็นเอรวมและเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสด้วยเทคนิค Rolling circle amplification (RCA) จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI สำหรับ DNA-A และ KpnI สำหรับ DNA-B จากการหาลำดับเบสพบว่า DNA-A มีขนาด 2,738 คู่เบส ประกอบด้วย 8 Open reading frame (ORFs) คือ AV1, AV2, AV3, AC1, AC2, AC3, AC4 และ AC5 ส่วน DNA-B มีขนาด 2,690 คู่เบส ประกอบด้วย 2 ORFs คือ BC1 และ BV1 เมื่อนำข้อมูลจีโนมไปเปรียบเทียบกับเบโกโมไวรัสในฐานข้อมูล Genbank พบว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันอย่างมากกับเชื้อเบโกโมไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกของมะเขือเทศที่พบในประเทศอินเดีย คือ *Tomato leaf curl New Delhi virus* isolate ToLCNDV-OM DNA-A (accession no. GU180095.1) และ DNA-B (accession no. GU180096.1) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันถึง 98 และ 94 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีความสัมพันธ์กับจีโนมของเชื้อ ToLCNDV-[TH:Cuc:06] จากใบแตงกวาที่มีรายงานก่อนหน้านี้ ในส่วน DNA-A (accession no.

AB330079) และ DNA-B (accession no. AB330080) เท่ากับ 97.26% และ 92.34% ตามลำดับ สำหรับเชื้อเบโกโมไวรัสที่พบในรายงานนี้ได้ตั้งชื่อว่า *Tomato leaf curl New Delhi virus*-[Thailand:Kanchanaburi:Cucumber:2012] (ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12]) เมื่อนำข้อมูลของเชื้อเบโกโมไวรัสที่มีรายงานในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ.2542–2555 ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตงมี 2 ชนิด คือ ToLCNDV และ *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV) โดยไม่พบรายงานว่าเข้าทำลายพืชวงศ์อื่น เช่น พืชในวงศ์พริกและมะเขือ และวงศ์ถั่ว ยกเว้นผักหวานบ้านซึ่งมีรายงานการตรวจพบเชื้อ ToLCNDV ก่อนหน้านี้

**คำสำคัญ:** เบโกโมไวรัส, ใบหงิก, แตงกวา, การเพิ่มปริมาณจีโนม, จีโนม

## บทนำ

แตงกวาเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยมีการผลิตเพื่อการบริโภคภายในประเทศและผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก ปัจจุบันมีรายงานการพบโรคของแตงกวาหลายชนิด ได้แก่ *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus* type W (PRSV-W), *Zucchini yellow mosaic*

virus (ZYMV), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV) และ *Melon yellow spot virus* (MYSV) (Kositsakulchai *et al.*, 2013) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 มีรายงานการพบเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่และสามารถถ่ายทอดโรคด้วยแมลงห้ำหิว (*Bemisia tabaci*) (Brown, 1994) ซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่มีคุณภาพและมีปริมาณลดลงอย่างมาก (Kittipakorn and Srithongchai, 2002) เบโกโมไวรัสมีลักษณะของอนุภาคเป็นแบบทรงกลมคู่ (icosahedral twinned particles) เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 18–22 นาโนเมตร (Böttcher *et al.*, 2004) จีโนมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวลักษณะเป็นวง (circular single-stranded DNA) เบโกโมไวรัสมีจีโนม 2 แบบ คือ monopartite มีส่วนของ DNA-A เพียงอย่างเดียว และ bipartite ประกอบด้วยส่วนของ DNA-A และ DNA-B โดย Chiemsombat *et al.* (1996) รายงานการพบเบโกโมไวรัสในพืชวงศ์แตง เช่น ฟักทอง บวบเหลี่ยม แตงกวา น้ำเต้า ด้วยการใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) และเทคนิคดอทบลอต ไฮบริดไอเซชัน (Dot blot hybridization) โดยใช้ DNA probe ที่ผลิตจากดีเอ็นเอของเบโกโมไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองของมะเขือเทศ Tantiwanich *et al.* (1999) รายงานการตรวจพบเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายบวบเหลี่ยม (*Angled luffa leaf curl virus*, AILCV) ซึ่งจะแสดงอาการใบยอดหงิกย่นและเป็นจุดสีเหลือง ใบมีขนาดเล็กกว่าปกติ การศึกษาจีโนมของไวรัส AILCV พบว่าประกอบด้วย DNA-A มีขนาด 2,746 นิวคลีโอไทด์ และมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับเชื้อ *Tomato leaf curl virus – Indian* (TLCV–In) 93.3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อเจมินีไวรัสที่เข้าทำลายฟักเขียว คือ *Squash leaf curl China virus*–[Thailand:Wax Gourd:2008] (SLCCNV–[TH:Wax:08]) ทำให้แสดงอาการใบหงิกย่นและต่างเหลือง (Sawangjit, 2009) การศึกษาจีโนม

ของไวรัส SLCCNV–[TH:Wax:08] พบ DNA–A มีขนาด 2,739 นิวคลีโอไทด์ ในปี พ.ศ. 2551 Ito *et al.* (2008) รายงานการตรวจพบเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายแตงกวาใน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม คือ *Tomato leaf curl New Delhi virus* – [Thailand:Cucurbit:2006] (ToLCNDV–[TH:Cuc:06]) จีโนมประกอบด้วย DNA–A มีขนาด 2,739 นิวคลีโอไทด์ และ DNA–B มีขนาด 2,694 นิวคลีโอไทด์ พบเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายน้ำเต้า คือ ToLCNDV–[Thailand: Bottle gourd:2006] ซึ่งจีโนมประกอบด้วย DNA–A มีขนาด 2,739 นิวคลีโอไทด์ และพบเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายฟักทอง คือ SLCCNV–CN [TH:06] ซึ่งจีโนมประกอบด้วย DNA–A มีขนาด 2,736 นิวคลีโอไทด์ โดยพืชทั้งสามชนิดแสดงอาการใบเหลือง จากรายงานการสำรวจพืชวงศ์แตงของ Kositsakulchai *et al.* (2013) พบว่าแปลงปลูกแตงกวาที่มีการระบาดของแมลงห้ำหิว ใบแตงกวาจะแสดงลักษณะอาการที่หลากหลาย เช่น ใบม้วนงอขึ้นด้านบน (upward-rolling leaf) ใบหงิก (curling leaf) ใบจุดเหลือง (yellow spot leaf) และใบเหลือง (yellow leaf) จากการศึกษาของ Ito *et al.* (2008) ได้สุ่มตัวอย่างแตงกวาที่แสดงอาการใบเหลือง (yellow leaf) เพียง 1 อาการ เพื่อศึกษาจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสสาเหตุโรคใบเหลืองในแตงกวา อย่างไรก็ตาม อาการใบหงิกโดยไม่แสดงอาการเหลืองหรือต่างเหลืองร่วมด้วยยังไม่มีผู้ศึกษาถึงเชื้อสาเหตุและเป็นตัวอย่งที่ควรนำมาศึกษาเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลาย และใช้อธิบายความหลากหลายของอาการที่สัมพันธ์กับชนิดของเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายแตงกวาของไทย ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคต่อไปในอนาคต งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของเชื้อเบโกโมไวรัสจากตัวอย่างใบแตงกวาที่เก็บมาจาก อ.เมือง จ.กาญจนบุรี ซึ่งแสดงอาการใบหงิกแต่ไม่แสดงอาการต่างเหลือง โดยนำข้อมูลจีโนมมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และเปรียบเทียบความเหมือนกัน

ของลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสที่พบในพื้นที่ช่วงสีแดงและพืชชนิดอื่นที่มีรายงานในประเทศไทย

## อุปกรณ์ และวิธีการ

### การเก็บตัวอย่างเชื้อเบโกโมไวรัสจากแตงกวา

สุ่มเก็บตัวอย่างแตงกวาอายุประมาณ 55 วัน ที่มีลักษณะอาการของเชื้อเบโกโมไวรัสเข้าทำลายจำนวน 4 ตัวอย่าง จากลักษณะอาการที่แตกต่างกัน คือ ใบม้วนงอขึ้นด้านบน (A) ใบหงิก (B) ใบจุดเหลือง (C) และใบเหลือง (D) โดยเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกแตงกวาเชิงพาณิชย์ในเขตพื้นที่ ต.วังเย็น อ.เมือง จ.กาญจนบุรี ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 นำตัวอย่างแตงกวาทั้ง 4 อาการ มาตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสชนิดอื่นด้วยวิธี Indirect plate trapped antigen ELISA (indirect PTA-ELISA) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Clark and Adam (1977) เพื่อตรวจสอบว่ามีไวรัสชนิดอื่นเข้าทำลายร่วมกับเชื้อเบโกโมไวรัสหรือไม่ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสที่มีรายงานว่าเข้าทำลายพืชตระกูลแตง 6 ชนิด คือ anti-CMV anti-PRSV anti-ZYMV anti-MYSV anti-WSMoV และ anti-CGMMV polyclonal antibody

นำตัวอย่างแตงกวามาสกัดดีเอ็นเอรวมจากใบพืชตามวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) และนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ specific primers: Begomo-CP-F : 5' ATGTCGAAGCGACCAGC 3' และ Begomo-CP-R : 5' CGATGCGTGAGTACAGG 3' ที่จำเพาะต่อ partial CP gene ของเชื้อเบโกโมไวรัสซึ่งออกแบบโปรแกรมจากฐานข้อมูลใน GenBank database โดยใช้โปรแกรม FastPCR (Kalendar, 2005) ใช้กระบวนการ PCR ประกอบด้วยขั้น pre-denaturation 94 °C 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturation 94 °C 45 วินาที annealing 55 °C 45 วินาที และ

extension 72 °C 45 วินาที ขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension 72 °C 7 นาที หยุดปฏิกิริยาที่ 16 °C 10 นาที จากนั้นตรวจสอบ PCR product โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ใน Tris borate buffer (TBE) และนำไปย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) เปรียบเทียบขนาดของ PCR product กับ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas, USA) ขนาดของ PCR product ที่ต้องการ คือ 714 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของ partial CP gene

### การโคลนจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัส

นำดีเอ็นเอรวมจากตัวอย่างแตงกวาที่เป็นโรครมาเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสด้วยวิธี rolling circle amplification โดยใช้ TempliPhi™ DNA amplification kit (GE Healthcare, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต นำ Total genomic begomovirus DNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียง 1 ชนิดต่อ 1 ปฏิกิริยา คือ *Bam*HI และ *Kpn*I (Fermentas, USA) แยกชิ้นจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสซึ่งมีขนาดประมาณ 2700 คู่เบส ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis นำไปย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (LONZA, USA) สกัดชิ้นจีโนมออกจากเจลด้วย FravoPrep™ GEL/PCR Purification Mini kit (Favorgen, Taiwan) นำไปเชื่อมต่อกับ pQE-80L vector (QIAGEN, USA) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันกับที่ตัดชิ้นจีโนมของเบโกโมไวรัสและถ่ายฝากให้กับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธีการ Heat Shock (Sambrook and Russel, 1989) นำไปส่งวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Sanger sequencing method (Sanger and Coulson, 1975) กับบริษัท Macrogen (South Korea) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ Open reading frame (ORF) ด้วยโปรแกรม BVTech Plasmid (<http://www.biovisualtech.com/>) และนำข้อมูลจีโนมในส่วน of DNA-A มาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในขั้นต่อไป

## การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศศาสตร์

นำข้อมูลจีโนมที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Clustal Omega version 1.2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), GENEDOC version 2.6.0.2 (<http://genedoc.software.informer.com/2.6/>) และโปรแกรม MEGA5 version 5.1 (<http://www.megasoftware.net/>) เปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนมของเชื้อแบกโคโมไวรัสที่มีรายงานใน GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987) ของเชื้อแบกโคโมไวรัสในพืชชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทยที่มีรายงานการพบเชื้อแบกโคโมไวรัสเข้าทำลาย (Table 1)

## ผลการทดลอง และวิจารณ์

### การเก็บตัวอย่างเชื้อแบกโคโมไวรัสจากแตงกวา

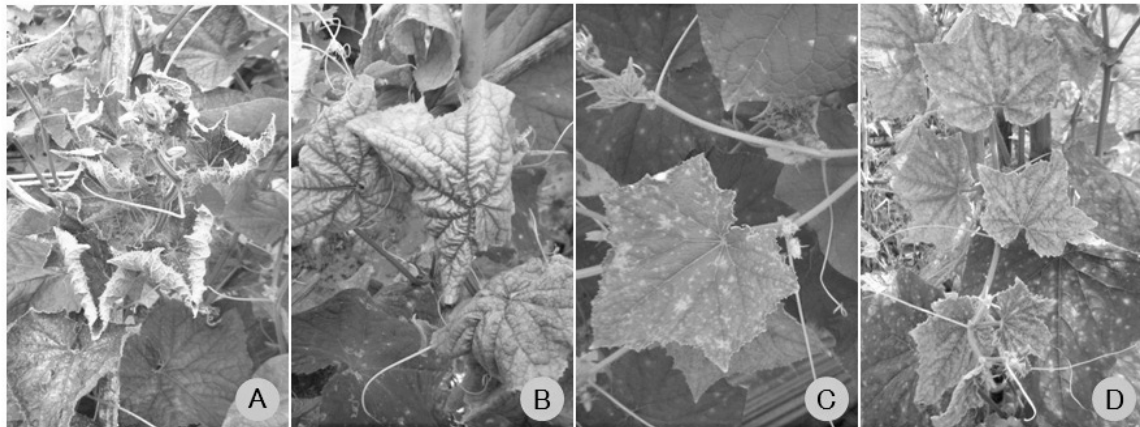
ใบแตงกวาจากแปลงปลูกที่มีแมลงหวี่ชวาระบาดใน ต.วังเย็น อ.เมือง จ.กาญจนบุรี มีลักษณะอาการ 4 ลักษณะ คือ ใบม้วนงอขึ้นด้านบน ใบหงิก ใบจุดเหลือง และใบเหลือง (Figure 1) โดยสุ่มเก็บ 1 ตัวอย่างต่อ 1 อาการ รวมจำนวน 4 ตัวอย่าง และตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส 7 ชนิด พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างใบแตงกวาทั้ง 4 อาการที่นำมาตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี PTA indirect ELISA แต่เมื่อนำใบแตงกวาทั้ง 4 อาการมาตรวจวินิจฉัยเชื้อแบกโคโมไวรัสด้วยวิธี PCR พบว่าตัวอย่าง B C และ D ตรวจพบเชื้อแบกโคโมไวรัสโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 714 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของ partial CP gene ในงานวิจัยนี้เลือกตัวอย่าง B เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสของจีโนมของเชื้อสาเหตุโรค เนื่องจากมีลักษณะอาการใบหงิก (curling leaf) เพียงอย่างเดียวและเป็นอาการที่แตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Ito *et al.* (2008) ซึ่งได้ทำการเลือก

ตัวอย่างแตงกวาที่มีอาการใบเหลือง (yellow leaf) มาศึกษา และจากการสำรวจของ (Kositsakulchai *et al.*, 2013) จะพบอาการใบหงิก (curling leaf) และใบเหลือง (yellow leaf) ประมาณ 40–50 เปอร์เซ็นต์ ของแปลงปลูกแตงกวา

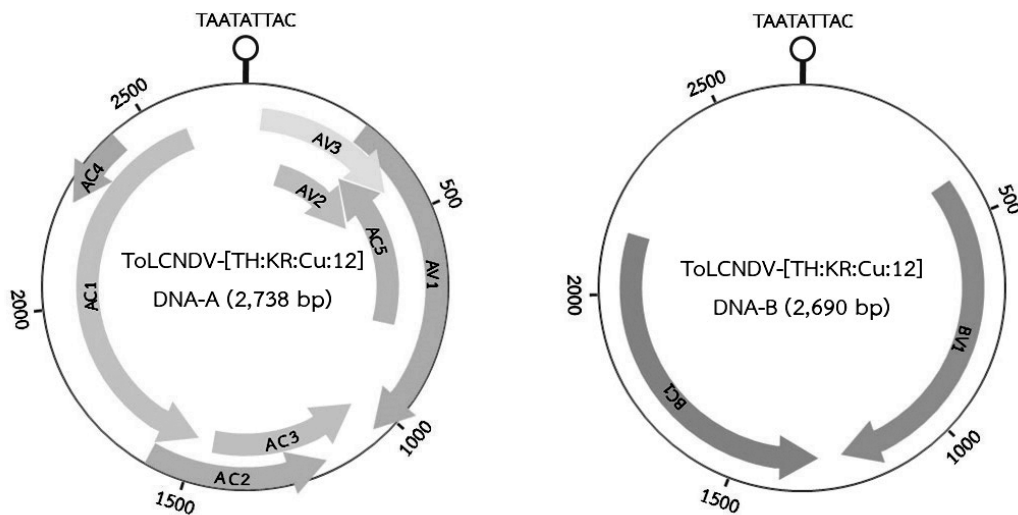
### การโคลนจีโนมของเชื้อแบกโคโมไวรัส

เชื้อแบกโคโมไวรัสในตัวอย่าง B มีจีโนมเป็นแบบ bipartite ประกอบด้วย DNA-A และ DNA-B จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA-A พบว่า *Bam*HI สามารถตัด DNA-A ได้ 2 ตำแหน่ง (ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 108 และ 125) โดยอยู่ห่างกัน 11 เบส จึงทำการยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 114–124 ด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบมาจากข้อมูล DNA-A คือ DNA-A-FOR: 5' CGGCGTCCCTCAACTTCCTC 3' และ DNA-B-REV: 5' GAGTCGTCGGCGTACCTTCG 3' นำ PCR product ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 114–124 พบว่า DNA-A มีขนาด 2,738 คู่เบส มี 8 ORFs คือ AV1 (coat protein), AV2 (pre-coat protein), AV3 (AV3 protein), AC1 (replication-associated protein), AC2 (transcriptional activator protein), AC3 (replication enhancer), AC4 (AC4 protein) และ AC5 (AC5 protein)

DNA-B มีขนาด 2,690 คู่เบส ซึ่งถูกตัดด้วย *Kpn*I เพียง 1 ตำแหน่ง (ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1957) มี 2 ORFs คือ BC1 (movement protein) และ BV1 (nuclear shuttle protein) (Figure 2) (Table 2 และ Table 3)



**Figure 1** Symptoms on the infected cucumbers collected from Wang Yen Sub-district, Muang District Kanchanaburi Province showing upward-rolling leaf (A) curling leaf (B) yellow spot leaf (C) and yellow leaf (D)



**Figure 2** The genome structure of *Tomato leaf curl New Delhi virus*-[Thailand:Kanchanaburi:Cucumber: 2012] consisted of DNA-A (left) and DNA-B (right). The DNA-A and DNA-B showed conserved sequences of stem structure and loop structure of nonanucleotides (TAATATTAC) in the intergenic regions. Three ORFs (AV1, AV2, AV3) in virion-sense and five ORFs (AC1, AC2, AC3, AC4, AC5) in complementary-sense of DNA-A and one ORF (BV1) in virion-sense and one ORF (BC1) in complementary-sense of DNA-B were reported in this study

**Table 1** The begomovirus genomes were found in Thailand and recorded in GenBank database from 1999 to 2016 (Brown *et al.*, 2015)  
The KU992383 and KU99238 accession numbers were the genomes in this study (ND: no data)

Begomovirus Name	Virus Acronym	Host	Size of DNA-A (bp)	Accession No.	Size of DNA-B (bp)	Accession No.	Year
Tomato leaf curl New Delhi virus - [Thailand:Kanchanaburi:Cucumber:2012]	ToLCNDV- [TH:KR:Cur:12]	Cucumber	2,738	KU992383	2,690	KU992384	2012
Ageratum yellow vein virus - Kamphaengsaen [Thailand: Kamphaengsaen:AFSP3d:2010]	AYVV-Ka[TH:Ka:AFSP3d:10]	Star Gooseberry	2,750	JN809816	ND	ND	2010
Sauropus leaf curl virus - [Thailand:Kamphaengsaen:AFSP5e:2010]	SauLCuV- [TH:Kam:AFSP5e:10]	Star Gooseberry	2,747	JN809820	ND	ND	2010
Tomato leaf curl New Delhi virus - [Thailand: Kamphaengsaen:AFSP2c:Sauropus androgynus:2010]	ToLCNDV- [TH:Kam:AFSP2c:Sa:10]	Star Gooseberry	2,739	JN809814	ND	ND	2010
Bhendi yellow vein mosaic virus - [Thailand:Kanchanaburi:Ok2:2009]	BYMV- [TH:Kan:Ok2:09]	Okra	2,740	JX678966	ND	ND	2009
Squash leaf curl China virus - Thailand [Thailand:Nakhon Pathom:Wax Gourd:2007]	SLCCNV-TH[TH:NK:WG:07]	Wax Gourd	2,739	EU543562	ND	ND	2007
Squash leaf curl China virus - China [Thailand:06]	SLCCNV-CN[TH:06]	Pumpkin	2,736	AB330078	ND	ND	2006
Tomato leaf curl New Delhi virus - [Thailand: Bottle gourd:2006]	ToLCNDV- [TH:BG:06]	Bottle Gourd	2,739	AB368447	ND	ND	2006
Tomato leaf curl New Delhi virus - [Thailand: Cucurbit:2006]	ToLCNDV- [TH:Cuc:06]	Cucumber	2,739	AB330079	2,694	AB330080	2006
Tobacco leaf curl Thailand virus - [Thailand: Tomato:2005]	ToLCTHV- [TH:Te:05]	Tomato	2,752	DQ871221	ND	ND	2005
Tomato yellow leaf curl Thailand virus - B [Thailand:2005]	TYLCTHV-B[TH:05]	Tomato	2,747	DQ871222	2,744	DQ871220	2005
Tomato yellow leaf curl Thailand virus - B [Thailand: Chiang Mai]	TYLCTHV-B[TH:ChMai]	Tomato	2,747	AY514630	2,750	AY514633	2005
Tomato yellow leaf curl Thailand virus - B [Thailand: Nong Khai]	TYLCTHV-B[TH:Nok]	Tomato	2,744	AY514631	2,749	AY514634	2005
Tomato yellow leaf curl Thailand virus - B [Thailand: Sakon Nakhon]	TYLCTHV-B[TH:SaNa]	Tomato	2,747	AY514632	2,749	AY514635	2005
Tomato leaf curl New Delhi virus - [Thailand: Luffa]	ToLCNDV- [TH:Luf]	Angled Luffa	2,746	AF102276	ND	ND	2003
Mungbean yellow mosaic virus - [Thailand: Mungbean 1]	MYMV- [TH:Mg1]	Mungbean	2,726	AB017341	ND	ND	2003
Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus - [Thailand: Kanchanaburi 1:2001]	TYLCKaV- [TH:Kan1:01]	Tomato	2,752	AF511529	2,752	AF511528	2001
Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus - [Thailand: Kanchanaburi 2:Eggplant :2001]	TYLCKaV- [TH:Kan2:Egg01]	Eggplant	2,752	AF511530	2,752	AF511527	2001
Pepper leaf curl virus - Thailand [Thailand]	PeplCV- TH[TH]	Pepper	2,744	AF134484	ND	ND	1999

**Table 2** Analysis of the open reading frames (ORFs) of *Tomato leaf curl New Delhi virus* – [Thailand:Kanchanaburi:Cucumber:2012] (DNA-A) genome

ORF	Frame	Protein Name	Nucleotide position	Number of amino acids	Protein molecular weight (Dalton)
AV1	+1	coat protein	280–1050	256	29612.1
AV2	+3	pre-coat protein	120–458	112	12992.7
AV3	+2	AV3 protein	41–427	128	14791.8
AC1	-2	replication-associated protein	1499–2584	361	40955.3
AC2	-3	transcriptional activator protein	1177–1596	139	15644.3
AC3	-1	replication enhancer	1047–1457	136	16057.7
AC4	-3	AC4 protein	2251–2427	58	6537.3
AC5	-3	AC5 protein	310–795	161	17817.2

**Table 3** Analysis of the open reading frames (ORFs) of *Tomato leaf curl New Delhi virus* – [Thailand:Kanchanaburi:Cucumber:2012] (DNA-B) genome

ORF	Frame	Protein Name	Nucleotide position	Number of amino acids	Protein molecular weight (Dalton)
BV1	+3	movement protein	402–1247	281	32256.8
BC1	-2	nuclear shuttle protein	1304–2149	281	31273.5



พบว่า ทั้ง DNA-A และ DNA-B มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ stem structure เหมือนกันและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ชื่อว่า nonanucleotides (TAATATTAC) ซึ่งเป็นส่วนที่อนุรักษ์ไว้ (conserved) ของไวรัสในกลุ่มเบโกโมไวรัสเนื่องจากเป็นจุดเริ่มต้นในการจำลองตัวเองของไวรัสกลุ่มนี้ Laufs *et al.* (1995) เมื่อนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของ DNA-A ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากกับ *Tomato leaf curl New Delhi virus* isolate ToLCNDV-OM DNA-A (accession no. GU180095.1) ที่ระดับ 98% ในขณะที่ DNA-B มีความใกล้เคียงกันที่ระดับ 94% กับ *Tomato leaf curl New Delhi virus* isolate ToLCNDV-OM DNA-B (accession no. GU180096.1) เมื่อนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของ DNA-A และ DNA-B ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลเชื้อเบโกโมไวรัสที่เก็บตัวอย่างแดงความมาจาก อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม accession no. AB330079 (DNA-A) และ AB330080 (DNA-B) ในรายงานของ Ito *et al.* (2008) พบว่ามีความใกล้เคียงกันที่ระดับ 97.26% และ 92.34% ตามลำดับ (Table 4 และ Table 5) จึงตั้งชื่อเชื้อเบโกโมไวรัสจากแดงความตัวอย่าง B ว่า *Tomato leaf curl New Delhi virus*-[Thailand:Kanchanaburi:Cucumber:2012] ชื่อย่อคือ (ToLCNDV-TH:KR:Cu:12) และได้รายงานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank database โดย DNA-A มี accession no. KU992383 และ DNA-B มี accession no. KU992384

#### การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศศาสตร์

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Tomato leaf curl New Delhi virus*-[TH:KR:Cu:12] ในส่วนของจีโนม DNA-A เปรียบ

เทียบกับข้อมูลเชื้อเบโกโมไวรัสที่มีรายงานในประเทศไทย (Figure 3) พบว่าเชื้อ ToLCNDV-[TH:KR:Cu:12] อยู่ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกับเชื้อ ToLCNDV-[TH:Cuc:06], ToLCNDV-[TH:BG:06], SLCCNV-CN [TH:06] Ito *et al.* (2008), ToLCNDV-[TH:Luf] Tantiwanich *et al.* (1999) และ SLCCNV-TH [TH:NK:WG:07] (Sawangjit, 2009) ซึ่งเป็นเชื้อเบโกโมไวรัสที่มีพีชวงศ์แดงเป็นพีชอาศัยคือ แดงความ น้ำเต้า ผักทอง บวบเหลี่ยม และผักเขียวตามลำดับ โดยมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากกว่า 80% ในขณะที่ ToLCNDV-[TH:Kam:AFSP2c:Sa:10] เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันแต่มีพีชอาศัยเป็นผักหวานบ้าน (Shih *et al.*, 2013) ส่วนเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพีชวงศ์มะเขือ คือ ToLCTHV-[TH:To:05], TYLCTHV-B [TH:05] (Knierim and Maiss, 2007), TYLCTHV-B [TH:SaNa], TYLCTHV-B [TH:Nok], TYLCTHV-B [TH:ChMai] (Sawangjita *et al.*, 2005), TYLCKaV-[TH:Kan1:01] และ TYLCKaV-[TH:Kan2:Egg:01] (Tsai and Green, 2003) ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันประมาณ 70% กับเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพีชวงศ์แดง

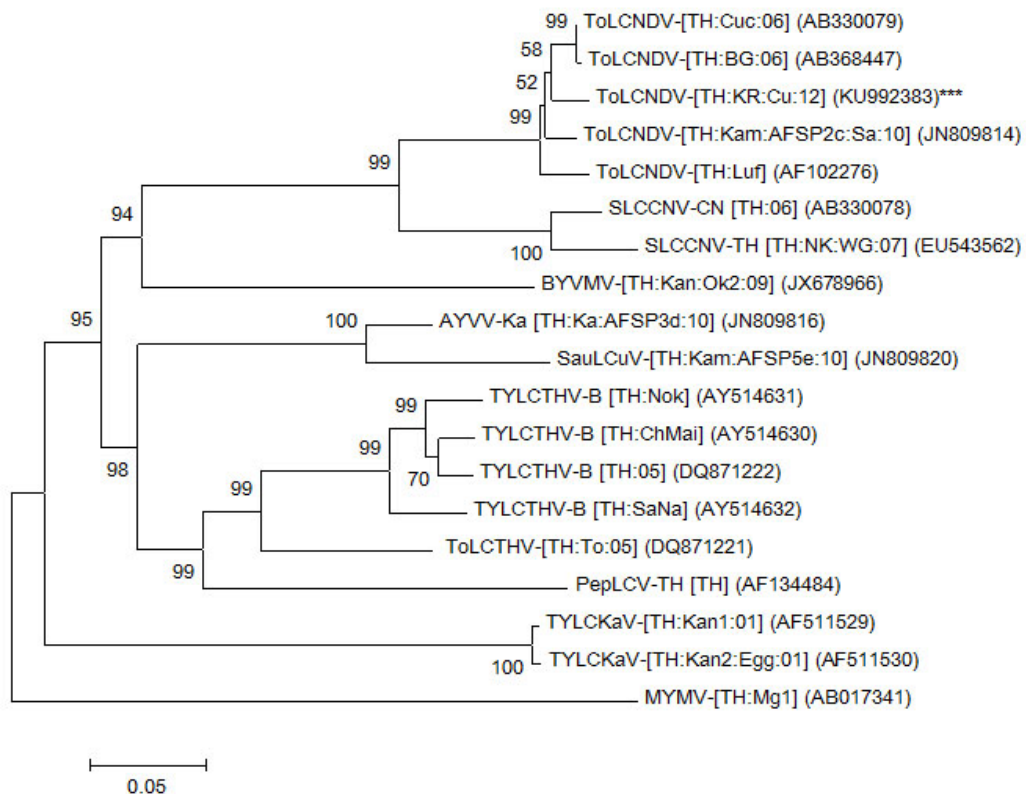
ปัจจุบันมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง DNA-A, DNA-B และ beta-sattelite DNA ของเชื้อ ToLCNDV ต่ออาการของโรคที่แสดงออกในต้นมะเขือยาว Pratap *et al.* (2011) พบว่า beta-sattelite DNA ทำให้พีชมีอาการต่างเหลืองมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่มี beta-sattelite DNA ดังนั้นการทดลองในขั้นต่อไปจึงควรศึกษาความสัมพันธ์ของ DNA-A, DNA-B และ beta-sattelite DNA ของเชื้อ ToLCNDV ที่แสดงอาการในพีชตระกูลแดงเพื่อทำความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการเข้าทำลายและลักษณะอาการของพีชที่ถูกเชื้อ ToLCNDV เข้าทำลายต่อไป

**Table 4** Percentage of genetic similarity of DNA-A nucleotide sequences from the begomoviruses found in Thailand. KU992383 accession number (underlined) is the genome from this study

AB017341	AF102276	<u>KU992383</u>	JN809814	AB330079	AB368447	AB330078	EU543562	AF511529	AF511530	JX678966	AF134484	JN809816	JN809820	DO871221	AY514632	AY514631	DO871222	AY514630
AB017341	63.05	63.10	63.15	63.19	63.15	63.05	62.46	63.46	63.31	62.54	63.04	64.42	62.27	65.48	64.57	64.38	64.61	64.68
AF102276	63.05	95.29	95.76	96.64	96.46	83.99	82.84	65.73	65.62	70.63	68.33	71.83	68.22	71.72	70.71	70.57	70.71	70.42
<u>KU992383</u>	63.10	95.29	96.24	97.26	97.08	84.76	83.38	65.38	65.27	70.92	68.47	71.83	68.58	71.54	70.78	70.53	70.45	70.45
JN809814	63.15	95.76	96.24	97.59	97.41	84.73	83.61	65.94	65.83	71.30	68.33	72.21	68.63	71.81	71.09	70.76	70.83	70.72
AB330079	63.19	96.64	97.26	97.59	99.74	85.02	83.76	65.72	65.58	71.04	68.14	72.06	68.74	71.88	71.01	70.72	70.94	70.54
AB368447	63.15	96.46	97.08	97.41	99.74	84.84	83.57	65.61	65.47	70.90	68.03	71.88	68.59	71.81	70.87	70.65	70.79	70.39
AB330078	63.05	83.99	84.76	84.73	85.02	84.84	94.40	65.29	65.40	70.73	68.34	70.93	67.54	71.05	70.81	70.67	70.37	70.15
EU543562	62.46	82.84	83.38	83.76	83.57	94.40	94.40	64.63	64.74	69.03	67.45	69.79	66.32	70.13	69.96	69.71	69.67	69.41
AF511529	63.46	65.73	65.38	65.94	65.72	65.61	65.29	64.63	99.35	68.73	67.23	71.60	68.08	68.80	68.41	68.45	68.45	68.56
AF511530	63.31	65.62	65.27	65.83	65.58	65.47	64.74	99.35	68.62	68.62	67.16	71.60	68.04	68.72	68.37	68.34	68.37	68.52
JX678966	62.54	70.63	70.92	71.04	70.90	70.73	69.03	68.73	68.62	68.45	68.45	74.72	71.47	72.87	71.62	71.07	71.03	71.43
AF134484	63.04	68.33	68.47	68.33	68.14	68.03	67.45	67.23	67.16	68.45	74.37	74.37	71.58	74.80	76.79	77.06	77.34	77.27
JN809816	64.42	71.83	71.83	72.21	72.06	71.88	69.79	71.60	71.60	74.72	74.37	74.37	89.82	79.94	75.86	75.30	76.04	75.86
JN809820	62.27	68.22	68.58	68.74	68.59	67.54	66.32	68.08	68.04	71.47	71.58	89.82	77.77	73.56	73.56	73.19	73.71	73.71
DO871221	65.48	71.72	71.54	71.81	71.88	71.81	70.13	68.80	68.72	72.87	74.80	79.94	77.77	86.37	86.37	84.20	84.25	84.07
AY514632	64.57	70.71	70.78	71.09	71.01	70.87	69.96	68.41	68.37	71.62	76.79	75.86	73.56	86.37	91.25	91.25	93.12	94.72
AY514631	64.38	70.57	70.53	70.76	70.72	70.65	69.71	68.45	68.34	71.07	77.06	75.30	73.19	84.20	91.25	95.59	95.59	94.83
DO871222	64.61	70.71	70.45	70.83	70.94	70.79	69.67	68.45	68.37	71.03	77.34	76.04	73.71	84.25	93.12	95.59	95.59	96.69
AY514630	64.68	70.42	70.45	70.72	70.54	70.39	69.41	68.56	68.52	71.43	77.27	75.86	73.71	84.07	94.72	94.83	96.69	96.69

**Table 5** Percentage of genetic similarity of DNA-B nucleotide sequences from the begomoviruses found in Thailand. KU992384 accession number (underlined) is the genome from this study

	AB33008	<u>KU99238</u>	AF51152	AF51152	DQ87122	AY51463	AY51463	AY51463
AB330080		92.34	48.57	48.57	50.40	50.02	50.27	50.25
<u>KU99238</u>	92.34		47.99	47.99	49.49	49.28	49.45	49.51
AF511528	48.57	47.99		100	74.60	74.60	74.30	74.04
AF511527	48.57	47.99	100		74.60	74.60	74.30	74.04
DQ87122	50.40	49.49	74.60	74.60		93.91	94.42	94.35
AY514634	50.02	49.28	74.60	74.60	93.91		97.05	96.87
AY514633	50.27	49.45	74.30	74.30	94.42	97.05		99.42
AY514635	50.25	49.51	74.04	74.04	94.35	96.87	99.42	



**Figure 3** The phylogenetic tree showing the genetic relationship of *Tomato leaf curl New Delhi virus* -[Thailand: Kanchanaburi:Cucumber:2012] of DNA-A (\*\*\*) compared with the other begomoviruses reported in Thailand

## สรุป

การศึกษาโครงสร้างจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายแตงกวาโดยแสดงลักษณะอาการใบหงิกและไม่แสดงอาการต่างเหลือง โดยเก็บตัวอย่างจาก อ.เมือง จ.กาญจนบุรี พบว่ามีจีโนมเป็นแบบ bipartite ประกอบด้วย DNA-A มีขนาด 2,738 คู่เบส ประกอบด้วย 8 Open reading frames (ORFs) คือ AV1, AV2, AV3, AC1, AC2, AC3, AC4 และ AC5 ส่วน DNA-B มีขนาด 2,690 คู่เบส ประกอบด้วย 2 ORFs คือ BC1 และ BV1 และพบว่าเชื้อเบโกโมไวรัสที่ศึกษาในงานวิจัยนี้มี DNA-A และ DNA-B ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกับเชื้อ *Tomato leaf curl New Delhi virus* isolate ToLCNDV-OM สาเหตุโรคใบหงิกมะเขือเทศที่พบในประเทศอินเดียที่ระดับ 98% และ 94% ตามลำดับ และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ ToLCNDV-[TH:Cuc:06] ที่ระดับ 97.26% และ 92.34% ตามลำดับ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้จากใบแตงกวาแสดงอาการใบเหลืองที่พบใน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม (Ito *et al.*, 2008) จึงตั้งชื่อเชื้อเบโกโมไวรัสชนิดนี้ว่า *Tomato leaf curl New Delhi virus* - [Thailand:Kanchanaburi:Cucumber:2012]

ชื่อย่อคือ (ToLCNDV – [TH:KR:Cu:12]) จากข้อมูลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อเบโกโมไวรัสที่มีรายงานในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542–2555 พบว่าเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตงมี 2 ชนิด คือ ToLCNDV และ SLCCNV โดยไม่พบรายงานว่าเข้าทำลายพืชวงศ์อื่น เช่น พืชในวงศ์พริกและมะเขือ และ วงศ์ถั่ว ยกเว้นผักหวานบ้าน ซึ่งมีรายงานการตรวจพบเชื้อ ToLCNDV ก่อนหน้านี้ (Shih *et al.*, 2013)

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย และขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน ในการอนุเคราะห์สถานที่ปลูกพืชทดลอง

## เอกสารอ้างอิง

- Böttcher, B., S. Unsel, H. Ceulemans, R.B. Russell and H. Jeske. 2004. Geminate structures of *African cassava mosaic virus*. *J. Virol.* 78: 6758–6765.
- Brown, J.K. 1994. Current status of *Bemisia tabaci* as a pest and virus vector in world agro-ecosystems. *FAO. Plant Prot. Bull.* 42: 3–32.
- Brown, J.K., F.M. Zerbini, J. Navas-Castillo, E. Moriones, R. Ramos-Sobrinho, J.C.F. Silva, E. Fiallo-Olive, R.W. Bridson, C. Hernandez-Zepeda, A. Idris, V.G. Malathi, D.P. Martin, R. Rivera-Bustamante, S. Ueda and A. Varsani. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160: 1593–1619.
- Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J. Gen. Virol.* 34: 475–483.

- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4): 19–21.
- Ito, T., P. Sharma, K. Kittipakorn and M. Ikegami. 2008. Complete nucleotide sequence of a new isolate of tomato leaf curl New Delhi virus infecting cucumber, bottle gourd and muskmelon in Thailand. *Arch. Virol.* 153: 611–613.
- Kalendar, R. 2005. FastPCR: PCR primer design, DNA and protein tools repeat and own database searches program. Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland. Available Source: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.html> July 15, 2015.
- Kittipakorn, K. and W. Srithongchai. 2002. The importance of viral disease of vegetable and oil crop. The Agricultural Cooperative Federation of Thailand, Limited Press, Bangkok, Thailand. (in Thai)
- Kositsakulchai, E., K. Reanwarakorn, S. Klinkong, R. Hongprayoon, W. Intanoo, A. Engkaninan and B. Wanking. 2013. Development of geographic information system of emerging and re-emerging diseases in cucurbits. 292 pp. *In* Final report on the Development of detection and control systems for emerging and re-emerging diseases in cucurbits. National Research Council of Thailand, Thailand. (in Thai)
- Knierim, D. and E. Maiss. 2007. Application of Phi29 DNA polymerase in identification and full-length clone inoculation of tomato yellow leaf curl Thailand virus and tobacco leaf curl Thailand virus. *Arch. Virol.* 152(5): 941–954.
- Laufs, J., W. Traut, F. Heyraud, V. Matzeit, S.G. Rogers, J. Schell and B. Gronenborn. 1995. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 3879–3883.
- Pratap, D., A.R. Kashikar and S.K. Mukherjee. 2011. Molecular characterization and infectivity of a *Tomato leaf curl New Delhi virus* variant associated with newly emerging yellow mosaic disease of eggplant in India. *Viol. J.* 3: 305–318.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The Neighbor-joining Method: A New method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406–425.
- Sambrook, J. and D.W. Russel. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup>ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 213 pp.
- Sanger, F. and A.R. Coulson. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94(3): 441–448.
- Sawangjit, S. 2009. The complete nucleotide sequence of *Squash leaf curl China virus*–[Wax gourd] and its phylogenetic relationship to other geminiviruses. *Sci. Asia.* 35: 131–136.
- Sawangjit, S., O. Chatchawankanphanichb, P. Chiemsombata, T. Attathomc, J. Daled and S. Attathoma. 2005. Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Thailand. *Virus Res.* 109: 1–8.

- Tantiwanich, Y., P. Chiemsombat, S. Attathom and O. Chatchawankarnpanich. 1999. New geminivirus associated with leaf curl disease of angled luffa. p. 217–226. *In* Proceedings of 37<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference: Plant, Agricultural Extension and Communication, Thailand. (in Thai)
- Tsai, W.S. and S.K. Green. 2003. Molecular characterization of a new begomovirus associated with tomato yellow leaf curl and eggplant yellow mosaic diseases in Thailand. *Plant Dis.* 87(4): 446.