

การสำรวจเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ในพริก มะเขือเทศ
และพืชตระกูลแตง ที่พบในประเทศไทย
Survey of *Capsicum Chlorosis Virus* (CaCV) in Pepper, Tomato
and Cucurbits in Thailand

มณธิรา กิจพลิต^{1,2} นุชนาถ วารินทร์³ ชาญณรงค์ ศรีภิบาล³ อัญจนา บุญชต³ อรประไพ คชนันท์³
และ อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์^{3,*}

Montira Kitpalit^{1,2}, Nuchnard Warin³, Channarong Seepiban³, Anjana Bhunchoth³,
Oraprapai Gajanandana³ and Orawan Chatchawankanphanich^{3,*}

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ กรุงเทพฯ 10900

³ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี 12120

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

³ National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani 12120, Thailand

รับเรื่อง: กรกฎาคม 2560 Received: July 2017

รับตีพิมพ์: เมษายน 2561 Accepted: April 2018

* Corresponding author: orawan@biotec.or.th

ABSTRACT: Field survey and sample collection were conducted in the production area of peppers, tomatoes and cucurbits showing orthospovirus-like symptoms from 11 provinces in Thailand. A total of 154 plant samples were collected and were initially screened by Plate Trapped Antigen-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (PTA-ELISA) using polyclonal antibody-MYSV6 specific to orthospovirus. Forty seven samples from peppers, tomatoes and cucurbits were positively to orthospovirus. CaCV was then detected in 47 samples by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using specific primers for non-structural protein (NSs) gene of CaCV. The results showed that 17 samples from peppers, tomatoes and cucurbits were infected with CaCV. Comparison of amino acid sequences of NSs protein of CaCV with other CaCV submitted in GenBank indicated that CaCV infecting pepper, tomato and cucurbits was grouped into 2 clusters - CaCV-AIT and CaCV-NRA. CaCV-AIT infecting peppers, tomato and cucurbits shared 94–97% amino acid sequence identity. CaCV-NRA infecting pepper and tomato shared 92–99% amino acid sequence identity. The amino acid sequence identities between two clusters were 82–91%.

Keywords: Tospoviruses, CaCV-AIT, CaCV-NRA, non-structural protein, NSs protein

บทคัดย่อ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง ที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อทอสปอไวรัส จำนวน 154 ตัวอย่าง จากแปลงปลูก 11 จังหวัด ตรวจสอบตัวอย่างพืชกับโพลีโคโนลแอนติบอดี-MYSV6 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อทอสปอไวรัส ด้วยเทคนิค Plate Trapped Antigen-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (PTA-ELISA) พบปฏิกิริยาเป็นบวกกับตัวอย่างพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง รวม 47 ตัวอย่าง จากนั้นตรวจเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน non-structural protein (NSs) ของเชื้อ CaCV ตรวจพบเชื้อ CaCV ในพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง จำนวน 17 ตัวอย่าง จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ NSs protein ของเชื้อ CaCV เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานใน GenBank พบว่า เชื้อ CaCV ที่เข้าทำลายพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม CaCV-AIT และ CaCV-NRA โดยกลุ่ม CaCV-AIT ที่พบในพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 94–97% และกลุ่ม CaCV-NRA ที่พบในพริกและมะเขือเทศ มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 92–99% ซึ่งเชื้อ CaCV ทั้งสองกลุ่มนี้มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันประมาณ 82–91%

คำสำคัญ: ทอสปอไวรัส, CaCV-AIT, CaCV-NRA, non-structural protein, NSs protein

บทนำ

เชื้อออร์ทอทอสปอไวรัส (Orthotospovirus) จัดอยู่ในวงศ์ *Bunyaviridae* เป็นไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สร้างความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจหลายชนิด และ

แพร่ระบาดไปทั่วโลก เช่น พริก มะเขือเทศ ถั่วลิสง พืชตระกูลแตง และไม้ดอกไม้ประดับ เป็นต้น (Pappu *et al.*, 2009) เชื้อออร์ทอทอสปอไวรัสสามารถแพร่ระบาดโดยเพลี้ยไฟ (*Thripidae*) เป็นแมลงพาหะ ถ่ายทอดเชื้อแบบ persistent และ propagative manner อนุภาคของเชื้อออร์ทอทอสปอไวรัสเป็นแบบ quasi-spherical มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 80–120 nm ห่อหุ้มด้วยไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) 2 ชนิด คือ Gn และ Gc ภายในบรรจุสารพันธุกรรมของเชื้อออร์ทอทอสปอไวรัสซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) จำนวน 3 สาย ได้แก่ L, M และ S RNA segment แพลรหัสพันธุกรรมจาก L RNA สาย viral complementary strand (vc strand) ขนาดประมาณ 8.9 kb ได้ L protein หรือ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ซึ่งทำหน้าที่ในการเพิ่มปริมาณ RNA genome ภายในเซลล์พืช ส่วน M และ S RNAs เป็น ambisense RNA ที่มีการแปลรหัสพันธุกรรมทั้งแบบสายบวกและสายลบ โดย M RNA มีขนาดประมาณ 4.8 kb แพลรหัสจากสาย vc strand เป็นโปรตีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไกลโคโปรตีน 2 ชนิด คือ Gn และ Gc ส่วนสาย viral strand (v strand) แพลรหัสได้เป็น non-structural protein (NSm protein) ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็น movement protein สำหรับ S RNA มีขนาดประมาณ 3.4 kb แพลรหัสจากสาย vc strand เป็นโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (N protein หรือ nucleocapsid protein) และสาย v strand แพลรหัสได้เป็น non-structural protein (NSs protein) ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งกระบวนการ gene silencing ในพืช (Knierim *et al.*, 2006)

เชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) จัดอยู่ในสกุลออร์ทอทอสปอไวรัส (Orthotospovirus) วงศ์ *Bunyaviridae* เป็นไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สร้างความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น พริก มะเขือเทศ ถั่วลิสง พืชตระกูลแตง และไม้ดอกไม้ประดับ และพบแพร่ระบาดไปทั่วโลก (Whitfield

et al., 2005) การแพร่ระบาดของเชื้อ CaCV มีรายงานตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999 โดยพบเข้าทำลายพริก และมะเขือเทศเป็นครั้งแรกในประเทศออสเตรเลีย (McMichael et al., 2002) ต่อมาพบเชื้อ CaCV เข้าทำลายมะเขือเทศในประเทศไทย (Premachandra et al., 2005; Warin et al., 2005; Knierim et al., 2006) ถั่วลิสงในประเทศจีน (Chen et al., 2007b) พริกและมะเขือเทศในประเทศอินเดีย (Kunkaliker et al., 2007; Krishnareddy et al., 2008; Kunkaliker et al., 2010) มะเขือเทศและไม้ดอกไม้ประดับในประเทศไต้หวัน เช่น calla lily, *Phalaenopsis orchids*, amaryllis และ blood lily (Chen et al., 2007a; Zheng et al., 2008; Chen et al., 2009; Huang et al., 2010)

สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้ออโทรทอสโฟไวรัสเข้าทำลายมะเขือเทศในแปลงปลูกจังหวัดเชียงใหม่เป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1981 ต่อมาพบการแพร่ระบาดของเชื้อ *Peanut bud necrosis virus* (PBNV) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคยอดไหม้ของถั่วลิสงในแปลงปลูกจังหวัดสกลนคร และมีการแพร่ระบาดมากขึ้นในจังหวัดทางภาคเหนือ เช่น ลำปาง น่าน และอุดรดิตถ์ นอกจากนี้ ยังพบเชื้ออโทรทอสโฟไวรัสเข้าทำลายพริก ยาสูบ พืชตระกูลแตง และพืชอื่น ๆ อีกหลายชนิด (Wongkaew, 1993) ในปี ค.ศ. 2002 มีรายงานการพบเชื้ออโทรทอสโฟไวรัสในซีโรกรุป IV ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากเชื้อ PBNV ที่พบในมะเขือเทศ และตรวจไม่พบเชื้อ *Tomato spotted wilt virus* (Pongsapich and Chiemsombat, 2002) และในระหว่างปี ค.ศ. 2002–2004 มีรายงานการพบมะเขือเทศในแปลงปลูกที่จังหวัดปทุมธานี และกาฬสินธุ์ มีลักษณะอาการคล้ายการเข้าทำลายของเชื้ออโทรทอสโฟไวรัสเมื่อนำตัวอย่างพืชมาตรวจด้วยเทคนิคทางซีรั่มวิทยา (serological method) และวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของ N protein พบว่า เชื้อสาเหตุที่เข้าทำลายมะเขือเทศดังกล่าวเป็นเชื้ออโทรทอสโฟไวรัสชนิด CaCV (Premachandra et al., 2005; Warin et al., 2005; Knierim et al., 2006) นอกจากนี้

มีรายงานการพบเชื้ออโทรทอสโฟไวรัสชนิดอื่น ๆ เข้าทำลายพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย ได้แก่ Melon yellow spot virus (MYSV) (Bhunchoth et al., 2005) และ *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) (Chiemsombat et al., 2006) ซึ่งพบเข้าทำลายพืชตระกูลแตง และ Tomato necrotic ringspot virus (TNRV) ที่เข้าทำลายพริก และมะเขือเทศ (Hassani-Mehraban et al., 2011; Seepiban et al., 2011)

Chiemsombat et al. (2008) ได้จัดจำแนกชนิดของเชื้ออโทรทอสโฟไวรัสที่พบในประเทศไทย โดยศึกษาจากความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของยีน N พบว่า เชื้อ CaCV ที่เข้าทำลายพริก มะเขือเทศ และถั่วลิสง สามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม CaCV-tomato necrosis ประกอบด้วย CaCV-AIT (DQ256123), CaCV-TD8 (AY647437) และ CaCV-KS16 (formerly Thailand tomato tospovirus, ThTT) (AF134400) มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 97–99% และกลุ่ม CaCV-pepper/peanut ประกอบด้วย CaCV-Pkk (DQ022745), CaCV-Pkk2UD (AM087456) และ CaCV-Tok (AY626762) มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 97–98% ซึ่งเชื้อ CaCV ทั้งสองกลุ่มนี้มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันประมาณ 90–92% และสามารถแยกเชื้อ CaCV ทั้งสองกลุ่มนี้โดยการปลูกเชื้อ (inoculation) บนใบถั่วลิสง (*Vigna unguiculata*) โดยเชื้อในกลุ่ม CaCV-tomato necrosis ทำให้เกิดอาการจุดขีดเหลือง (chlorotic spot) ส่วนกลุ่ม CaCV-pepper/peanut ทำให้เกิดอาการวงแหวนขีดเหลืองหรือแผลไหม้ (chlorotic or necrotic concentric ring) บนใบถั่วลิสง (Chiemsombat et al., 2008)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจเชื้อ CaCV ที่พบในมะเขือเทศ พริก และพืชตระกูลแตงในประเทศไทย ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนานิเวศวิทยาการตรวจเชื้อ CaCV ให้มีประสิทธิภาพ การแพร่ระบาดของเชื้อ CaCV

การจัดการ ควบคุมโรค และการปรับปรุงพันธุ์พืช ให้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ CaCV

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงลักษณะอาการต่าง ๆ ที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้ออโทรทอสโฟไวรัส

เก็บตัวอย่างใบพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา แตงโม เมล่อน และฟักทอง ที่แสดงลักษณะอาการใหม่ (necrosis) ใบซีดเหลือง (chlorosis) ต่างวงแหวน (ringspot) ต่างประ (mottling) แผลจุดตาย (local lesion) บนส่วนต่าง ๆ ของพืช ซึ่งอาจเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้ออโทรทอสโฟไวรัสจากแปลงปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ (CM) ขอนแก่น (KK) ชัยภูมิ (CP) มหาสารคาม (MK) อุบลราชธานี (UT) กาญจนบุรี (KB) นครปฐม (NP) สระบุรี (SB) เพชรบุรี (PB) ราชบุรี (RB) และสุพรรณบุรี (SP) ระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2558

ชื่อของตัวอย่างพืชที่เก็บในพื้นที่ต่าง ๆ ประกอบด้วย อักษรย่อของตัวอย่างพืช อักษรย่อของจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง และลำดับของตัวอย่างที่เก็บ เช่น ตัวอย่างพริก (Pepper, Pe) จากจังหวัดขอนแก่น (Khon Kaen, KK) ตัวอย่างที่ 6 ให้สัญลักษณ์เป็น PeKK6 เป็นต้น

2. การตรวจสอบเชื้ออโทรทอสโฟไวรัส ด้วยเทคนิค PTA-ELISA

ตรวจสอบเชื้ออโทรทอสโฟไวรัสจากตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค Plate Trapped Antigen-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (PTA-ELISA) โดยใช้แอนติบอดี PAb-MYSV6 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้ออโทรทอสโฟไวรัสที่พบในประเทศไทย ได้แก่ CaCV, MYSV, TNRV และ WSMoV (Gajanandra *et al.*, 2006) โดยบดใบพืชใน coating buffer (0.05 M sodium carbonate, pH 9.6) ที่เติม 0.2% sodium

diethyldithiocarbamic acid, sodium salt ในสัดส่วนใบพืช 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 2.5 มิลลิลิตร นำน้ำคั้นใบพืช มาตรวจสอบด้วย PAb-MYSV6 และทำปฏิกิริยากับ alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Sigma Aldrich, USA) ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาด้วยสารละลาย *p*-nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน substrate buffer (0.1 M Diethanolamine, pH 9.5, 1.0 M MgCl₂) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30–60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader Multiskan (Labsystem, Finland) ที่ความยาวคลื่นแสง 405 nm

3. การตรวจสอบเชื้อ Capsicum chlorosis virus จากตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) และการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ CaCV

แยกสกัด total RNA จากตัวอย่างพืชที่ตรวจพบเชื้ออโทรทอสโฟไวรัสด้วยชุดสกัด RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการในคู่มือของบริษัท และนำ RNA ที่สกัดได้ไปตรวจหาเชื้อ CaCV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ One-step RT-PCR kit (QIAGEN, Germany) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน NSs ของเชื้อ CaCV ได้แก่ CaTPNS17, CaToNS1081 และ CaPnNS1233 (Table 1 และ Figure 1) โดยทำปฏิกิริยา reverse transcription ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 1 รอบ initial PCR activation step ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเริ่มเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR โดย denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 50 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 58°C เป็นเวลา 50 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 80 วินาที จำนวน 35 รอบ ใช้ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบ RT-PCR product ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ใน 1x TAE buffer (0.04 M

Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0)

นำ RT-PCR product ที่ได้มาเชื่อมต่อเข้ากับ pDrive cloning vector (QIAGEN, Germany) ด้วย เอนไซม์ T4-ligase โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และเคลื่อนย้ายพลาสมิด เข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* strain DH5 α ด้วยวิธี heat shock transformation คัดเลือกโคโลนีสีขาว (white colony) ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก 2X-YT ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร มาตรวจสอบยืนยัน NSs ด้วยเทคนิค PCR แล้วนำโคโลนีที่ให้ผลเป็นบวกมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ ในอาหารเหลวสูตร 2X-YT ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C นาน

ข้ามคืน นำเชื้อที่เพิ่มปริมาณได้มาปั่นตกตะกอนเซลล์ ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis (Sambrook *et al.*, 1989) ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs จาก recombinant plasmid ที่ตรวจพบยืนยัน NSs โดยส่งไปที่บริษัท SolGent Co., Ltd. ประเทศเกาหลีใต้

ตรวจวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ NSs protein ของเชื้อ CaCV และเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ NSs protein ของเชื้อ CaCV ที่มีรายงานใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Table 2) ด้วยโปรแกรม DNASTAR Software (Lasergene, Wisconsin, USA) เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อ CaCV

Table 1 NSs-Specific primers of CaCV-AIT and CaCV-NRA

Primers	Nucleotide sequence	Product size	CaCV isolate
CaTPNS17	5' GTG CTG CTT CAG AAT TYG TGA A 3'	1,064 bp	CaCV-AIT
CaToNS1081	5' TAG GGA TCT TGG GAG GAC CTC CA 3'		
CaTPNS17	5' GTG CTG CTT CAG AAT TYG TGA A 3'	1,216 bp	CaCV-NRA
CaPnNS1233	5' GAG TAC CGG ACA AAT TCA TTG C 3'		

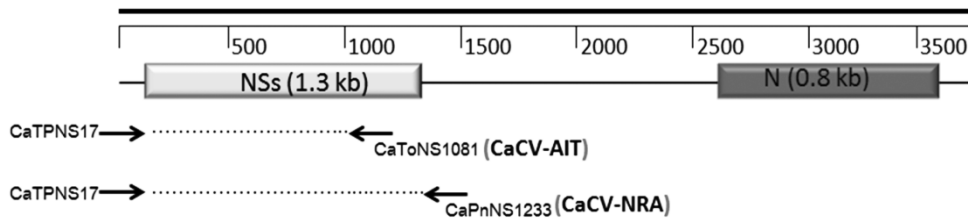


Figure 1 Diagram of the position of NSs-specific primers of CaCV. CaTPNS17 and CaToNS1081 primers were used for detection of CaCV-AIT isolate. CaTPNS17 and CaPnNS1233 primers were used for detection of CaCV-NRA isolate

Table 2 GenBank accession numbers of tospovirus sequences with name, host and origin of isolates used for sequence comparison

CaCV isolate	Host	Country	GenBank Accession number
CaCV-AIT	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thailand	DQ256123
CaCV-Ch-Pan	<i>Capsicum annuum</i>	India	FJ011449
CaCV-CP	<i>Arachis hypogaea</i>	China	DQ355974
CaCV-KK	<i>Arachis hypogaea</i>	Thailand	FJ947157
CaCV-NRA	<i>Arachis hypogaea</i>	Thailand	FJ947156
CaCV-Ph	<i>Phalaenopsis sp.</i>	Taiwan	KC953852
CaCV-PKK2D	<i>Arachis hypogaea</i>	Thailand	EF488164
CaCV-TPT	<i>Scirtothrips dorsalis</i>	Thailand	EF990562
CaCV-Qld-3432	<i>Capsicum annuum</i>	Australia	KM589495

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างพืช การตรวจสอบเชื้ออโทรทอสสโไวรัสในตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค PTA-ELISA

เก็บตัวอย่างใบมะเขือเทศที่มีอาการแผลไหม้ขอบใบไหม้ (necrosis) ใบซีดเหลือง (chlorosis) และต้นแคระแกร็น (stunting) (Figure 2A-C) ใบพริกที่มีอาการใบซีดเหลืองและจุดต่างวงแหวน (ringspot) (Figure 2D-E) และพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา แตงโม เมล่อน และฟักทอง ที่แสดงอาการแผลจุดตายบนใบ (local lesion) และใบซีดเหลือง (Figure 2F-G) จำนวน 57, 36, 31, 10, 9 และ 11 ตัวอย่างตามลำดับ รวมทั้งหมด 154 ตัวอย่างจากแปลงปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ ขอนแก่น ชัยภูมิ มหาสารคาม อุบลราชธานี กาญจนบุรี นครปฐม เพชรบุรี ราชบุรี สระบุรี และสุพรรณบุรี เมื่อตรวจหาเชื้ออโทรทอสสโไวรัสในตัวอย่างพืชทั้งหมด ด้วยเทคนิค PTA-ELISA โดยใช้แอนติบอดี PAb-MYSV6 พบปฏิกิริยาเป็นผลบวกกับตัวอย่างมะเขือเทศ พริก แตงกวา แตงโม เมล่อน และฟักทอง จำนวน 6, 22, 9, 4, 3, และ 3 ตัวอย่างตามลำดับ รวม 47 ตัวอย่าง (Table 3)

ลักษณะอาการที่พบบนใบตัวอย่างพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง ที่เก็บมาจากแปลงปลูกของเกษตรกร คล้ายกับข้อมูลที่เคยมีรายงานมาก่อน (Chiemsombat *et al.*, 2006, 2008; Knierim *et al.*, 2006) แอนติบอดี PAb-MYSV6 ที่นำมาใช้ในการตรวจหาเชื้ออโทรทอสสโไวรัส ตามรายงานของ Gajanandana *et al.* (2006) พบว่า แอนติบอดีดังกล่าวสามารถตรวจสอบเชื้ออโทรทอสสโไวรัสที่พบในประเทศไทยได้อย่างครอบคลุม โดยสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อเชื้ออโทรทอสสโไวรัสชนิด CaCV, MYSV และ WSMoV ในปี ค.ศ. 2010 มีรายงานการพบมะเขือเทศแสดงอาการคล้ายเชื้ออโทรทอสสโไวรัสเข้าทำลาย เมื่อตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค PTA-ELISA โดยใช้แอนติบอดี PAb-MYSV6 พบปฏิกิริยาเป็นบวก แต่กลับให้ผลเป็นลบเมื่อตรวจสอบด้วย RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน N ของเชื้อ CaCV, MYSV และ WSMoV จากการจัดจำแนกเชื้อดังกล่าวจึงทราบว่าเป็นชนิด TNRV ซึ่งเป็นเชื้ออโทรทอสสโไวรัสชนิดใหม่ที่พบในประเทศไทย (Seepiban *et al.*, 2011) ซึ่งแสดงว่าแอนติบอดี PAb-MYSV6 มีประสิทธิภาพสำหรับ

ตรวจวินิจฉัย และตรวจสอบเชื้อออร์ทอทอสโฟไวรัส ทั้ง 4 ชนิดที่พบในประเทศไทย สำหรับตัวอย่างพืชที่แสดงลักษณะอาการซึ่งคล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อออร์ทอทอสโฟไวรัสเข้าทำลาย แต่ไม่ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นบวม อาจเป็นเพราะลักษณะอาการดังกล่าวเกิดจากสาเหตุอื่น เช่น โรคจุดใบไหม้ (Early blight disease) มีเชื้อสาเหตุจากเชื้อรา (*Alternaria* spp.) โรคใบจุดวงเป้า (Target leaf spot disease) มีเชื้อสาเหตุจากเชื้อรา (*Corynespora* spp.) โรคใบจุดสีเทา (Gray leaf spot disease) มีเชื้อสาเหตุจากเชื้อรา (*Stemphylium* spp.) โรคใบด่างที่เกิดเชื้อ *Tomato mosaic virus* หรือ *Cucumber mosaicvirus* และโรคใบหงิกที่เกิดจากเชื้อ *Chilli leaf curl virus* หรือ *Cucurbit leaf curl virus* เป็นต้น

2. การตรวจสอบเชื้อ CaCV ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากนั้นนำตัวอย่างทั้ง 47 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อออร์ทอทอสโฟไวรัสโดยเทคนิค PTA-ELISA มาตรวจหาเชื้อ CaCV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คูไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน NSs ของเชื้อ CaCV ได้แก่ คูไพรเมอร์ CaTPNS17/CaToNS1081 ตรวจพบเชื้อในกลุ่ม CaCV-AIT ซึ่งให้ DNA ขนาด 1,064 bp จำนวน 13 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างแตงกวา (CuPB10), เมล่อน (MeMK4, MeMK6, MeMK7), พริก (PeKK3,

PeKK10), พักทอง (PuNP3), มะเขือเทศ (ToNP1, ToSB2, ToKK1), แตงโม (WmMK4, WmMK5, WmMK9) และคูไพรเมอร์ CaTPNS17/CaPnNS1233 ตรวจพบเชื้อในกลุ่ม CaCV-NRA ซึ่งให้ แถบ DNA ขนาด 1,216 bp จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างพริก (PeKK1, PeKK6) และมะเขือเทศ (ToSB12, ToSB20) (Table 3, Figure 3) สำหรับตัวอย่างพืชที่ตรวจไม่พบ แถบ DNA ขนาด 1,064 bp และ 1,216 bp น่าจะเป็น เพราะมีเชื้อออร์ทอทอสโฟไวรัสชนิดอื่นเข้าทำลาย

ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คูไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน NSs ของเชื้อ CaCV ที่พัฒนาขึ้นมาสามารถนำมาใช้ตรวจสอบ และจำแนกเชื้อ CaCV ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม CaCV-AIT และ CaCV-NRA ในครั้งเดียวกัน ซึ่งสามารถแก้ปัญหาข้อจำกัดในการตรวจสอบ และวินิจฉัยเชื้อออร์ทอทอสโฟไวรัสชนิดต่าง ๆ ในมะเขือเทศ พริก พืชตระกูลแตง และถั่วลิสงที่พบในประเทศไทยที่มีรายงานมาก่อนโดย Chiamsombat *et al.* (2008) ที่ใช้คูไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับส่วน N-terminal และ C-terminal ของยีน N ด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งตรวจพบแถบ DNA ขนาดประมาณ 800 bp ในตัวอย่างพืชที่นำมาตรวจสอบ แต่ไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อออร์ทอทอสโฟไวรัสได้ ต้องมีการศึกษา วิเคราะห์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของยีน N จึงจะทราบชนิดของออร์ทอทอสโฟไวรัส

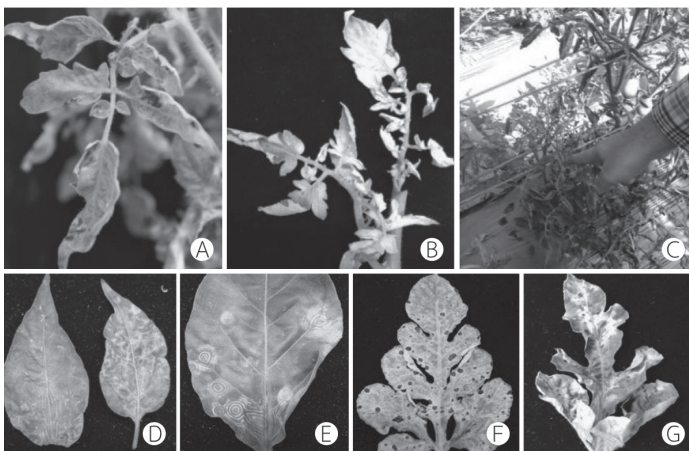


Figure 2 Typical symptoms of disease caused by orthotospovirus: tomato showing necrosis (a), chlorosis (b) and stunting (c), pepper showing chlorosis (D) and ringspot (E), watermelon showing local lesion (F) and chlorosis (G)

Table 3 Detection of CaCV in cucurbits, pepper and tomato samples from field survey during June 2014–April 2015 by PTA-ELISA and RT-PCR

Locations	Provinces	Plant samples	No. of total samples	No. of positive samples by PTA-ELISA	No. of positive samples of NSs gene by RT-PCR	
					CaCV-AIT	CaCV-NRA
North	Chiang Mai (CM)	Tomato (To)	10	-	-	-
		Pepper (Pe)	3	-	-	-
Northeast	Chaiyaphum (CP)	Pepper	1	-	-	-
	Khon Kaen (KK)	Cucumber (Cu)	3	-	-	-
		Pepper	11	5	2	2
		Tomato	6	4	1	-
	Maha Sarakham (MK)	Melon (Me)	9	3	3	-
		Watermelon (Wm)	10	4	3	-
	Ubon Ratchathani (UT)	Pepper	1	-	-	-
Central	Kanchanaburi (KB)	Pepper	7	-	-	-
		Pumpkin (Pu)	1	-	-	-
	Nakhon Pathom (NP)	Tomato	11	11	1	-
		Pumpkin	10	3	1	-
	Phetchaburi (PB)	Cucumber	12	9	1	-
		Tomato	10	2	-	-
	Ratchaburi (RB)	Pepper	13	1	-	-
	Saraburi (SB)	Tomato	20	5	1	2
Suphan Buri (SP)	Cucumber	16	-	-	-	
Total			154	47	13	4

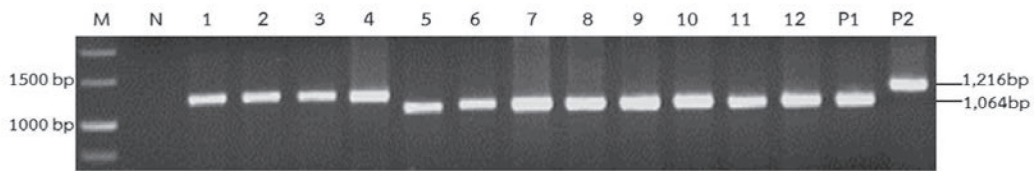


Figure 3 Detection of CaCV infecting plant samples by RT-PCR using specific primer for NSs gene of CaCV-AIT (1,064 bp) and CaCV-NRA (1,216 bp). M: 1 kb DNA ladder (Fermentas, Lithuania), N: dH₂O as negative control, P1: CaCV-AIT as positive control, P2: CaCV-NRA as positive control
 Lane 1-2: Pepper (PeKK1, PeKK6)
 Lane 3-4: Tomato (ToSB12, ToSB20)
 Lane 5: Cucumber (CuPB10)
 Lane 6: Melon (MeMK4)
 Lane 7: Pepper (PeKK10)
 Lane 8: Pumpkin (PuNP3)
 Lane 9-11: Tomato (ToKK1, ToNP1, ToSB2)
 Lane 12: Watermelon (WmMK4)

3. การศึกษาความหลากหลายของเชื้อ CaCV จาก การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ NSs protein

จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ NSs protein ของเชื้อ CaCV ที่ตรวจพบในพริก มะเขือเทศ แตงกวา แตงโม เมลอน และฟักทอง เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ NSs protein ของเชื้อ CaCV ที่มีรายงานใน GenBank และการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ CaCV จากลำดับกรดอะมิโนของ NSs protein ที่ตรวจพบในพริก มะเขือเทศ แตงกวา แตงโม เมลอน และฟักทอง เปรียบเทียบกับข้อมูลดังกล่าวของเชื้อ CaCV ที่มีรายงานใน GenBank พบว่า CaCV ที่พบในประเทศไทย สามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม CaCV-NRA และ CaCV-AIT ตัวอย่างพืชที่

ตรวจพบ CaCV-NRA ได้แก่ ตัวอย่างพริกจากจังหวัดขอนแก่น (PeKK1, PeKK6) และตัวอย่างมะเขือเทศจากจังหวัดสระบุรี (ToSB12, ToSB20)) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ CaCV-NRA (FJ947156), CaCV-KK (FJ947157) CaCV-PKK2UD (EF488164) ที่เข้าทำลายถั่วลิสง และ CaCV-TPT (EF990562) จากเพลี้ยไฟชนิด *Scirtothrips dorsalis* ที่พบในประเทศไทย CaCV-Ch-Pan (FJ011449) และ CaCV-TN-CBE (KY308185) ที่เข้าทำลายพริกในประเทศอินเดีย CaCV-Ph (KC953852) ที่เข้าทำลายกล้วยไม้ตระกูล *Phalaenopsis* sp. ในประเทศไต้หวัน CaCV-Qld 3432 (KM589495) ที่เข้าทำลายพริกในประเทศออสเตรเลีย CaCV-R2M (KX757228) ที่เข้าทำลาย

Rudbeckia sp. ในประเทศอิหร่าน และ CaCV-Hainan (KX078567) ที่เข้าทำลายกล้วยไม้เอื้องแมลงปอ (*Arachnis labrosa*) ในประเทศจีน โดยมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันประมาณ 92–98% (Table 4 และ Figure 4) ส่วนตัวอย่างพริกจากจังหวัดขอนแก่น (PeKK3 และ PeKK10) มะเขือเทศจากจังหวัดนครปฐมขอนแก่น สระบุรี (ToNP1, ToKK1 และ ToSB2) และพืชตระกูลแตงจากจังหวัดเพชรบุรี นครปฐม และมหาสารคาม (CuPB10, PuNP3, MeMK4, MeMK6, MeMK7, WmMK4, WmMK5 และ WmMK9) ตรวจพบ CaCV ที่จัดอยู่ในกลุ่ม CaCV-AIT ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ CaCV-AIT (DQ256123) ที่เข้าทำลายมะเขือเทศในประเทศไทย โดยมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันประมาณ 94–97% ตามลำดับโดยเชื้อ CaCV ทั้ง 2 กลุ่มนี้มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันประมาณ 85–91% (Table 4 และ Figure 4) ผลการจัดกลุ่มของทอสปไวรัสชนิด CaCV จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบชนิดของอโทรทอสปไวรัสด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ CaCV-AIT และ CaCV-NRA (Figure 3)

สำหรับการจัดจำแนกเชื้อ CaCV ตามคำอธิบายโครงสร้างบริเวณ intergenic region (IGR) ของจีโนม S RNA โดย Huang *et al.* (2017) พบว่าเมื่อศึกษา และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ IGR ของเชื้อ CaCV แต่ละไอโซเลท (Table 2) ซึ่งเป็นส่วนที่มีความหลากหลายมากสุดนั้น เชื้อ CaCV-Hainan ประเทศจีน CaCV-Ph ประเทศไต้หวัน CaCV-NRA ประเทศไทย และ CaCV-Ch-Pan ประเทศอินเดีย มีลักษณะโครงสร้างที่เหมือนกับเชื้อ CaCV-Qld-3432

ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ในบางส่วน อาจจะมีการแปรผันบ้าง เช่น การขาดหายไปหรือเพิ่มเข้ามา แต่ขณะเดียวกันพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน IGR-S RNA ของ CaCV-AIT ที่พบในประเทศไทย มีความแตกต่างจาก CaCV-Qld-3432 และไอโซเลทอื่น ๆ ดังนั้นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการจัดกลุ่มของเชื้อ CaCV นี้จึงสามารถจัดจำแนกเชื้อ CaCV ได้เป็น 2 กลุ่ม โดย CaCV ส่วนใหญ่จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ CaCV-Qld-3432 ซึ่งคาดว่าต้นกำเนิดของเชื่อน่าจะมาจากแหล่งเดียวกัน ในขณะที่อีกกลุ่มจะเป็น CaCV-AIT

จากการสำรวจและตรวจสอบเชื้ออโทรทอสปไวรัสชนิด CaCV ที่พบในประเทศไทยด้วยวิธี RT-PCR และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน NSs ของเชื้ออโทรทอสปไวรัสชนิด CaCV กับข้อมูลยีนที่มีรายงานใน GenBank พบว่า CaCV ที่พบในประเทศไทยสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม CaCV-AIT และ CaCV-NRA โดยพบเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง แต่ไม่พบในภาคเหนือ เชื้อ CaCV ทั้ง 2 กลุ่มนี้สามารถเข้าทำลายพืชในตระกูล *Solanaceae* ได้แก่ พริก และมะเขือเทศ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่เคยมีรายงานมาก่อน (Chiemsombat *et al.*, 2006; Chiemsombat *et al.*, 2008; Knierim *et al.*, 2006) การศึกษาครั้งนี้นอกจากจะตรวจพบเชื้อ CaCV ทั้ง 2 กลุ่มในพริก และมะเขือเทศแล้ว ยังตรวจพบเชื้อ CaCV ในกลุ่ม CaCV-AIT ในพืชตระกูลแตงซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการพบเชื่อดังกล่าวในพืชตระกูลแตงมาก่อน โดยพบทั้งในภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนรายละเอียดของเชื้อ CaCV ที่พบในพืชตระกูลแตงจะต้องมีการศึกษาให้ละเอียดต่อไป

Table 4 Amino acid sequence identities (%) of NSs protein of CaCV in tomato, pepper and cucurbits compared with those of CaCV submitted in GenBank

CaCV sample	CaCV isolates submitted in GenBank												
	AIT (DQ256123)	Ch-Pan (FJ011449)	CP (DQ355974)	Hainan (KX078567)	KK (FJ947157)	NRA (FJ947157)	Ph (KC953852)	PKK-2UD (EF488164)	QId-3432 (KM589495)	R2M (KX757228)	TN-CBE (KY308185)	TPT (EF990562)	
CuPB10	98.0	86.2	89.8	89.0	87.9	88.4	87.6	86.4	89.3	88.4	86.7	85.3	
MeMK4	94.1	87.6	89.8	89.8	89.3	89.3	89.0	87.9	90.4	89.0	87.0	86.7	
MeMK6	94.1	87.6	89.8	89.8	89.3	89.3	89.0	87.9	90.4	89.0	87.0	86.7	
MeMK7	94.1	87.6	89.8	89.8	89.3	89.3	89.0	87.9	90.4	89.0	87.0	86.7	
PeKK1	85.2	92.8	86.9	91.4	94.6	94.6	94.1	92.6	92.3	90.4	90.6	91.1	
PeKK3	97.5	85.6	89.3	88.4	87.3	87.3	87.0	85.9	88.7	87.6	86.4	84.7	
PeKK6	87.2	95.6	88.6	94.3	97.3	97.3	96.8	95.3	94.6	92.3	92.6	93.8	
PeKK10	93.8	87.3	89.5	89.5	89.0	89.0	88.7	87.6	90.1	88.7	86.7	86.4	
PuNP3	97.2	85.6	89.0	88.4	87.3	87.3	87.0	85.9	88.7	87.6	86.2	84.7	
ToKK1	93.8	87.4	89.1	89.4	88.9	88.9	88.6	87.4	90.4	88.9	86.9	86.2	
ToNP1	97.2	85.8	89.2	88.1	87.5	87.5	87.3	86.1	89.0	87.5	86.4	85.0	
ToSB2	93.8	87.3	88.9	89.5	89.0	89.0	88.7	87.6	90.1	88.7	86.7	86.4	
ToSB12	87.2	95.6	88.4	93.8	97.3	98.0	96.8	95.3	95.1	92.8	93.2	93.8	
ToSB20	87.4	95.6	89.8	93.8	97.3	98.0	96.8	95.3	95.1	92.3	92.6	93.8	
WmMK4	94.1	87.6	89.0	89.8	89.3	89.3	89.0	87.9	90.4	89.0	87.0	86.7	
WmMK5	97.2	85.6	89.0	88.7	87.3	87.9	87.0	85.9	88.7	88.1	86.7	84.7	
WmMK9	94.1	87.6	89.8	89.8	89.3	89.3	89.0	87.9	90.4	89.0	87.0	86.7	

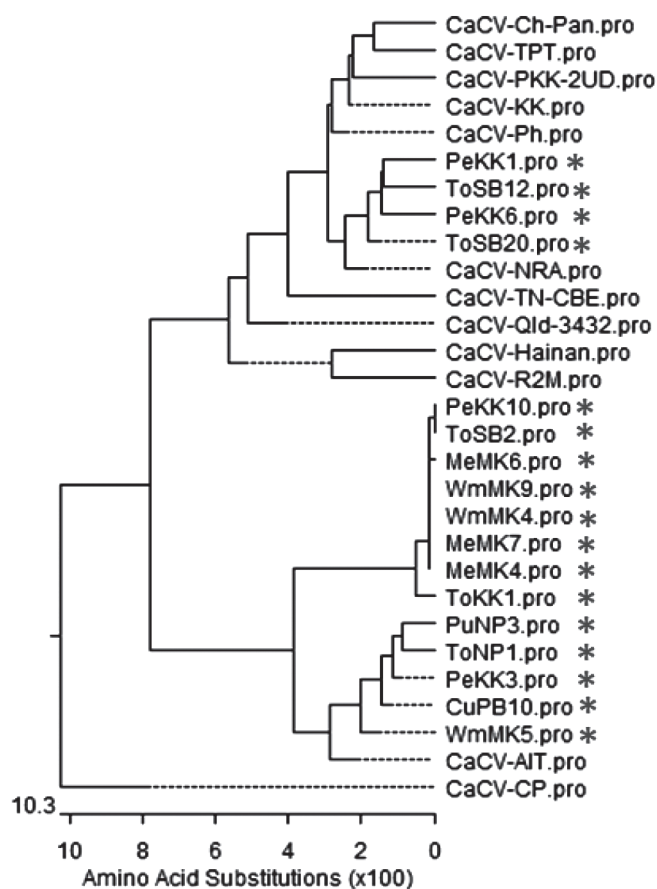


Figure 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequence alignments of the NSs protein. The tree was generated using Clustal W method (DNASTAR Software, USA). The CaCV sequences in this study were labelled with a red star (*)

สรุป

จากการตรวจสอบเชื้อ CaCV ที่เข้าทำลายพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง จากแปลงปลูกในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน NSs ของเชื้อ CaCV ศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ NSs protein และเปรียบเทียบข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ NSs protein ของ

เชื้อ CaCV ที่ศึกษาได้กับข้อมูลยีนที่มีรายงานใน GenBank สามารถจัดจำแนกเชื้อ CaCV ได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม CaCV-AIT และ CaCV-NRA ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการจัดจำแนกเชื้อ CaCV ที่พบในประเทศไทย (Thai-CaCV isolate) โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของยีน N ของเชื้อ CaCV ที่มีรายงานโดย Chiemsoombat *et al.* (2008) ซึ่งเชื้อ CaCV ทั้ง 2 กลุ่มนี้สามารถเข้าทำลายพริกและมะเขือเทศได้ นอกจากนี้ยังพบว่า

เชื้อ CaCV ในกลุ่ม CaCV-AIT ยังสามารถเข้าทำลายพืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา แตงโม เมล่อน และฟักทอง ได้อีกด้วย ซึ่งเป็นข้อมูลใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนทั้งในประเทศ และต่างประเทศ ข้อมูลที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับนักโรคพืช และนักปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อใช้ในการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ CaCV การพัฒนาพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อโรค และการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อออร์โททอสโฟไวรัสชนิดต่าง ๆ ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและศูนย์ความเป็นเลิศทางเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- Bhunchoth, A., N. Warin, P. Chiemsombat, C. Seepiban, S. Wongyam, R. Hongprayoon and O. Gajanandana. 2005. Molecular characterization of Melon yellow spot virus infecting cucurbits in Thailand. BioThailand 2005, Bangkok, Thailand.
- Chen, C.C., C.H. Huang, T.C. Chen, S.D. Yeh, Y.H. Cheng, H.T. Hsu and C.A. Chang. 2007a. First report of *Capsicum chlorosis virus* causing yellow stripes on calla lilies in Taiwan. Plant Dis. 91: 1201.
- Chen, K., Z. Xu, L. Yan and G. Wang. 2007b. Characterization of a new strain of *Capsicum chlorosis virus* from peanut (*Arachis hypogaea* L.) in China. J. Phytopathol. 155: 178–181.
- Chen, C.C., C.H. Huang, Y.H. Cheng, T.C. Chen, S.D. Yeh and C.A. Chang. 2009. First report of *Capsicum chlorosis virus* infecting amaryllis and blood lily in Taiwan. Plant Dis. 93: 1346.
- Chiemsombat, P., O. Gajanandana, N. Warin, R. Hongprayoon, A. Bhunchoth and P. Pongsapich. 2008. Biological and molecular characterization of tospoviruses in Thailand. Arch. Virol. 153: 571–577.
- Chiemsombat, P., O. Gajanandana, R. Hongprayoon, A. Bhunchoth, W. Seetou, N. Warin, C. Seepiban and P. Petchsoongnern. 2006. Diversity of tospoviruses in Thailand and their potential thrips vectors. pp. 42–48. In Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart University, Bangkok, Thailand (In Thai)
- Gajanandana, O., C. Seepiban, S. Pansa-ard, A. Bhunchot, N. Warin, O. Himananto, P. Pongsapich, P. Chiemsombat and R. Hongprayoon. 2006. Production of antibodies for detection of tospoviruses in Thailand. pp. 556–563. In Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart University, Bangkok, Thailand (In Thai)

- Hassani-Mehraban, A., S. Cheewachaiwit, C. Relevante, R. Kormelink and D. Peters. 2011. Tomato necrotic ringspot virus (TNRV), a recently described tospovirus species infecting tomato and pepper in Thailand. *Eur. J. Plant. Pathol.* 130: 449–456.
- Huang, C.H., Y.X. Zheng, Y.H. Cheng, W.S. Lee and F.J. Jan. 2010. First report of Capsicum chlorosis virus infecting tomato in Taiwan. *Plant Dis.* 94: 1263.
- Huang, Y., H. Hong, X.H. Zhao, J. Li and X.R. Tao. 2017. Complete genome sequence of a Capsicum chlorosis virus in China and the structural variation and evolutionary origin of its S RNA intergenic region. *Arch. Virol.* 162: 3229–3232.
- Knierim, D., R. Blawid and E. Maiss. 2006. The complete nucleotide sequence of a capsicum chlorosis virus isolate from *Lycopersicon esculentum* in Thailand. *Arch. Virol.* 151: 1761–1782.
- Krishnareddy, M., R.U. Rani, K.A. Kumar, K.M. Reddy and H. Pappu. 2008. Capsicum chlorosis virus (Genus Tospovirus) infecting chili pepper (*Capsicum annum*) in India. *Plant Dis.* 92: 1469–1470.
- Kunkaliker, S., S. Poojari, P. Rajagopalan, U.B. Zehr, R.A. Naidu and R.S. Kankanallu. 2007. First report of Capsicum chlorosis virus in tomato in India. *Plant Health Prog.* doi: 10.1094/PHP-2007-1204-01-BR.
- Kunkaliker, S., S. Poojari, P. Rajagopalan, U.B. Zehr and R.S. Kankanallu. 2010. Biological and molecular characterization of Capsicum chlorosis virus infecting chili and tomato in India. *Arch. Virol.* 155: 1047–1057.
- McMichael, L.A., D.M. Persley and J.E. Thomas. 2002. A new tospovirus serogroup IV species infecting capsicum and tomato in Queensland, Australia. *Australas. Plant Pathol.* 31: 231–239.
- Pappu, H.R., R.A.C. Jones and R.K. Jain. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Res.* 141: 219–236.
- Pongsapich, P. and P. Chiemsombat. 2002. Characterization of tospovirus infecting tomatoes in Thailand revealed the presence of serogroup IV-tospovirus but not serogroup I-tomato spotted wilt virus. pp. 92. *In* The First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease. Chaing Mai, Thailand.
- Premachandra, W.T.S.D., C. Borgemeister, E. Maiss, D. Knierim and H.M. Poehling. 2005. *Ceratothripoides claratris*, a new vector of a Capsicum chlorosis virus isolate infecting tomato in Thailand. *Phytopathology* 95: 659–663.

- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- Seepiban, C., O. Gajanandana, T. Attathom and S. Attathom. 2011. Tomato ring spot virus, a new tospovirus isolated in Thailand. *Arch. Virol.* 156: 263–274.
- Warin, N., A. Bhunchoth, P. Chiemsombat, P. Petchsoongnern, C. Seepiban and O. Gajanandana. 2005. The occurrence of Capsicum chlorosis virus in peanut in Thailand. *BioThailand 2005*, Bangkok, Thailand.
- Whitfield, A.E., D.E. Ullman and T.L. German. 2005. Tospovirus-thrips interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 459–489.
- Wongkaew, P. 1993. Peanut Virus Diseases in Thailand. Oil Group Division of Agronomy Department of Agricultural Extension Ministry of Agriculture, Bangkok, Thailand. pp. 44 (in Thai)
- Zheng, Y.X., C.C. Chen, C.J. Yang, S.D. Yeh and F.J. Jan. 2008. Identification and characterization of a tospovirus causing chlorotic ringspots on *Phalaenopsis* orchids. *Eur. J. Plant Pathol.* 120: 199–209.