

การตรวจเชื้อเบโกโมไวรัสสาเหตุโรควิวเหลืองพริกในประเทศไทยโดยใช้  
broad-spectrum primers  
Detection of Begomoviruses Causing Pepper Yellow Leaf Curl Disease in  
Thailand Using Broad-Spectrum Primers

ศรีหรรษา มลิจารย์<sup>1/, 2/</sup> ปริณ ทวีโชตวรกุล<sup>1/, 2/</sup> และ รัชณี ฮงประยูร<sup>1/, 2/, 3/</sup>  
Srihansa Malichan<sup>1/, 2/</sup>, Parin Taweechothworakul<sup>1/, 2/</sup>, and Ratchanee Hongprayoon<sup>1/, 2/, 3/</sup>

Received 11 Jun 2019/Revised 04 Aug 2019/Accepted 21 Aug 2019

### ABSTRACT

Begomoviruses are causal agents of yellow leaf curl disease in peppers causing serious threat for pepper's quality and quantity. Their distribution was reported throughout the country. The viruses are highly variable in nature and have evolved and adapted rapidly due to several reported factors, and may lead to incorrect detection by the previously designed universal primers in polymerase chain reaction technique. A more specific and reliable detection method will provide an effective tool for disease surveillance, control and breeding for resistance. In this research, the new broad-spectrum Unibego-Pep primers were designed to amplify the target consensus sequence in the AV1 gene regions of 8 pepper-infecting begomoviruses, i.e., *Chili leaf curl virus* (ChiLCV), *Eggplant golden mosaic virus* (EGMV), *Pepper leaf curl virus* (PepLCV), *Pepper yellow leaf curl Thailand virus* (PepYLCTHV), *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus* (PepYLCIV), *Tobacco leaf curl virus* (TbLCTHV), *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCKaV) and *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV). The efficiency of the primers was investigated by testing 4 reference samples, all of which gave positive results giving an approximately 380 bp fragment. The testing was also performed with 41 pepper samples showing disease symptoms collected from 20 provinces and the target band could be amplified from the samples in all regions. Analysis of the amplified products by sequence alignment with the GenBank database showed five pepper-infecting begomoviruses were at 93-99% identity, i.e., EGMV (93.62-98.49%), PepLCV-[MY] (93.43-96.69%), PepYLCTHV (97.83-99.69%), PepYLCIV (98.25-99.40%) and TYLCKaV (97.38-99.12%). The positive samples were categorized based on a phylogenetic tree constructed and representatives from each group further characterized by full-length DNA-A rolling circle amplification and sequencing to confirm the 380 bp results. BLASTn analysis showed good correlation of 7 out of 8 samples examined. This newly designed primers has very strong potential to be an effective tool for the detection of pepper-infecting begomoviruses in Thailand.

**Key words:** begomovirus, pepper yellow leaf curl disease, detection, PCR

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

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

<sup>2/</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

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

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

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

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

## บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสในจีนัสเบโกโมไวรัส (Begomovirus) เป็นสาเหตุของโรคใบหงิกเหลืองในพริก ทำให้เกิดความเสียหายต่อปริมาณและคุณภาพผลผลิตพริก ซึ่งพบการแพร่ระบาดในทุกภูมิภาคของประเทศไทย เนื่องจากเชื้อไวรัสกลุ่มนี้มีวิวัฒนาการที่ส่งผลต่อความหลากหลายของเชื้อซึ่งเกิดจากหลายปัจจัย เป็นสาเหตุให้โรคมีความแปรปรวนและมีความหลากหลายมากขึ้น การตรวจหาเชื้อด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้คูไพรเมอร์ที่เคยใช้อาจไม่สามารถตรวจหาเชื้อเบโกโมไวรัสที่เกิดขึ้นใหม่ได้ งานวิจัยนี้ได้ออกแบบคูไพรเมอร์ Unibego-Pep ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะร่วม (consensus sequence) ในยีน AV1 และ AV2 ของเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพริก รวม 8 ชนิด ได้แก่ *Chili leaf curl virus* (ChiLCV), *Eggplant golden mosaic virus* (EGMV), *Pepper leaf curl virus* (PepLCV), *Pepper yellow leaf curl Thailand virus* (PepYLCTHV), *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus* (PepYLCIV), *Tobacco leaf curl virus* (TbLCTHV), *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCKaV) และ *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ โดยทดสอบกับตัวอย่างอ้างอิง 4 ชนิด ให้ผลบวกทั้งหมด และมีขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอประมาณ 380 คู่เบส เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างพริก 41 ตัวอย่าง ที่แสดงอาการโรคใบหงิกเหลืองจากพื้นที่ปลูกใน 20 จังหวัด พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนเป้าหมายในตัวอย่างพริกที่เก็บจากทุกภูมิภาคของประเทศ ด้วยวิธี PCR จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อเบโกโมไวรัส 5 ชนิด ที่ระดับความเหมือน 93-99% ได้แก่ EGMV (93.62-98.49%), PepLCV-[MY] (93.43-96.69%), PepYLCTHV (97.83-99.69%), PepYLCIV (98.25-99.40%), และ TYLCKaV

(97.38-99.12%) เมื่อเลือกตัวแทนจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree ไปสังเคราะห์ full-length DNA-A โดยใช้วิธี Rolling circle amplification (RCA) พบว่า ชนิดของเชื้อเบโกโมไวรัสจาก 7 ใน 8 ตัวอย่าง ที่นำมาศึกษามีความสอดคล้องกับข้อมูลผลผลิตดีเอ็นเอ 380 คู่เบส ที่ได้จากคูไพรเมอร์ Unibego-Pep ดังนั้น คูไพรเมอร์ในงานวิจัยนี้จึงมีศักยภาพในการใช้เพื่อคัดกรองเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพริกในประเทศไทยได้

**คำสำคัญ:** เบโกโมไวรัส, โรคใบหงิกเหลืองพริก, การตรวจหา, พีซีอาร์

## บทนำ

เบโกโมไวรัส จัดอยู่ในวงศ์ *Geminiviridae* ประกอบด้วยเชื้อไวรัสมากกว่า 200 ชนิด สามารถเข้าทำลายและสร้างความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น พริก มะเขือ มะเขือเทศ แตงกวา มันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลงอย่างมาก มีรายงานการแพร่ระบาดของไวรัสในจีนัสนี้ไปทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (Green and Kali, 1994; Sakata *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2010; Tahir and Mansoor, 2011; Kenyon *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2015; Bhatt *et al.*, 2016) โดยมีแมลงหมีขาว (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะ อนุภาคของเชื้อเบโกโมไวรัสมีลักษณะเป็นทรงกลม อยู่ติดกันเป็นคู่ (icosahedral twinned particles) ภายในบรรจุสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นวง (circular single-stranded DNA) เบโกโมไวรัสถูกแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะของจีโนม คือ monopartite genome ซึ่งมี circular DNA เพียงชนิดเดียว ได้แก่ DNA-A และ bipartite genome ซึ่งประกอบด้วย circular DNA-A และ DNA-B (Galvao *et al.*, 2003; Varma and Malathi, 2003; Prasanna and Rai, 2007; Zhou, 2013) ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อเบโกโมไวรัสสาเหตุโรคของพริกหลายชนิด ได้แก่ *Pepper*

*leaf curl virus* (PepLCV), *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus* (PepYLCIV), *Pepper yellow leaf curl Thailand virus* (PepYLCV), และ *Tobacco leaf curl Thailand virus* (TbLCTHV) (Samretwanich *et al.*, 2000; Seepiban *et al.*, 2017; Chiemsombat *et al.*, 2018) โดยพริกที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะแสดงอาการใบเหลือง ขอบใบม้วนขึ้น และพบความรุนแรงของโรคตั้งแต่ 10-95% ของพื้นที่ที่สำรวจ (Chiemsombat *et al.*, 2018)

การตรวจวิเคราะห์เชื้อเบโกโมไวรัสด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเบโกโมไวรัสแต่ละชนิดในการทำปฏิกิริยา เป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบและบ่งชี้ชนิดของเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพืชได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากมีสารพันธุกรรมเป็นชนิดดีเอ็นเอ (Rojas *et al.*, 1993; Leke *et al.*, 2015) และมีรายงานการออกแบบ degenerate primers เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อเบโกโมไวรัสแบบ broad spectrum หลายคู่ เช่น PAL/PAR1 degenerate primer set (Rojas *et al.*, 1993) และ AV494/AC1048 (Wyatt *et al.*, 1996) ที่ออกแบบให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อส่วนยีน AC1, common region, และยีน AV1 โดย PAL/PAR1 degenerate primer set สามารถตรวจสอบเชื้อในกลุ่มเบโกโมไวรัสใน Western hemisphere และเชื้อเบโกโมไวรัสบางชนิดจาก Eastern hemisphere ได้ และ AV494/AC1048 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเชื้อ *Jatropha mosaic virus*, *Serrano golden mosaic virus*, *Squash leaf curl virus* และ *Pepper mild tigre virus* ได้นอกจากนี้ ยังมี degenerate primers ที่ถูกออกแบบให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะในส่วนยีน AV1 ซึ่งเป็นส่วนอนุรักษ์ (conserved region) ของเชื้อไวรัสในกลุ่มนี้ เช่น Deng's 541/540 โดยสามารถตรวจสอบเชื้อเบโกโมไวรัสที่ได้จากทวีปแอฟริกา ยุโรป อเมริกา และประเทศอินเดียได้ (Deng *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตาม

จากข้อมูลที่มีการรายงานในประเทศต่าง ๆ พบว่ามีการเพิ่มจำนวนชนิดและความหลากหลายของเชื้อเบโกโมไวรัส (Sakata *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2010; Kenyon *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2015) ซึ่งอาจมีสาเหตุจากหลายปัจจัย เช่น กระบวนการรวมกันใหม่ (Recombination) การกลายพันธุ์ (mutation) การแทนที่ตำแหน่งเบส (substitution) ในดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส และ/หรือ การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) จึงทำให้เชื้อไวรัสมีวิวัฒนาการที่ส่งผลต่อความหลากหลายของเชื้อที่มากขึ้น (Harrison and Robinson, 1999; Kumar *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2017) และส่งผลให้ไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานมาก่อนอาจไม่สามารถตรวจจับเบโกโมไวรัสบางชนิดได้ โดยคู่ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ ได้แก่ PAL1v1978/PAR1c496 และ PAL1V1978/PAR1C715 (Rojas *et al.*, 1993) แม้ว่าพริกจะแสดงอาการใบหงิกเหลืองซึ่งเป็นอาการที่พบได้เสมอเนื่องจากเชื้อเบโกโมไวรัส การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบ broad-spectrum primers สำหรับตรวจหาเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพริก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวัง การศึกษาวิจัยและพัฒนาพืชต้านทานเชื้อเบโกโมไวรัสต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่างเชื้อเบโกโมไวรัสในพริก

เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อเบโกโมไวรัส เช่น ใบเหลือง (yellowing) ใบด่าง (mosaic) ใบม้วนงอขึ้น (leaf curling) เนื้อใบโป่งพอง ผิดรูป (blistering) และ เส้นใบยื่น (vein enation) จากแหล่งปลูกพริก 20 จังหวัด ได้แก่ นครปฐม (NPT) สุพรรณบุรี (SPI) ราชบุรี (RBI) กาญจนบุรี (KBI) เพชรบุรี (PBI) เชียงใหม่ (CMI) น่าน (NAN) ตาก (TAK) ชัยภูมิ (CPM) นครราชสีมา (NRT) ขอนแก่น (KKN) สกลนคร (SKN) บุรีรัมย์ (BRM) สุรินทร์ (SRN) ศรีสะเกษ (SSK) อุบลราชธานี (UBN) ระนอง (RNG)

สุราษฎร์ธานี (SNI) นครศรีธรรมราช (NST) และ พัทลุง (PLG) ระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2562 ชื่อของตัวอย่าง ประกอบด้วยอักษรย่อของจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง และลำดับที่เก็บ ในกรณีที่ตัวอย่างในจังหวัดเดียวกันถูกเก็บซ้ำในปีที่ต่างกัน ปี (พ.ศ.) จะถูกระบุหลังอักษรย่อของจังหวัด ตัวอย่างใบพริกที่เก็บได้ ถูกนำมาตรวจเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่สามารถเข้าทำลายพริกโดยใช้วิธี Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Indirect ELISA) และ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส 6 ชนิด คือ *Potato virus Y (PVY)*, *Tobacco mosaic virus (TMV)*, *Tospovirus group 4*, *Cucumber mosaic virus (CMV)*, *Pepper mild mottle virus (PMMoV)* และ *Chili veinal mottle virus (ChiVMV)*

ตัวอย่างควบคุมบวก (positive control) ที่ใช้ในการทดสอบไพรเมอร์ ได้แก่ ดีเอ็นเอของเชื้อ เบโกโมไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองพริกที่พบในประเทศไทย จำนวน 4 ชนิด คือ 1) *PepYLCTHV*: Acc.no MK946436 2) *EGMV* 3) *PepYLIV* และ 4) *TYLCKaV* (ตัวอย่างควบคุมลำดับที่ 2-4 ผ่านการตรวจสอบโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ เบโกโมไวรัสดังกล่าวข้างต้นแล้ว) และตัวอย่าง ควบคุมลบ (negative control) ได้แก่ พริกสาย พันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลอดเชื้อเบโกโมไวรัส (พริกชี้หูสวน พริกจินดา พริกมันบางช้าง พริกหนุ่มขาว และ พริกหนุ่มเขียว) (ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่าง ควบคุมลบ ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ ไวรัสพืช และแบคทีรีโอฟาจ ศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

#### การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบพริกมาสกัดดีเอ็นเอรวม ดัดแปลงจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) โดยบดใบพริก 100 มก. ในไนโตรเจนเหลว ให้ละเอียด เติม 2X CTAB buffer (2% CTAB + 2% PVP + 100 mM Tris-HCl pH 8.0 + 20 mM EDTA pH 8.0 + 1.4 M NaCl และ 2%

2-mercaptoethanol) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร อัตราส่วนใบพืช:บัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:6 (w/v) นำไปปั่น ที่อุณหภูมิ 65°C. นาน 30 นาที เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C. ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 2 รอบ จากนั้น เติม Isopropanol 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอน ดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol และ 70% ethanol ตามลำดับ ตากตะกอน ดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายตะกอน ใน Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 + 1 mM EDTA pH 8.0) 50 ไมโครลิตร เก็บที่ -20°C. จนกว่าจะใช้งาน

#### การออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจเชื้อเบโกโมไวรัส ที่เข้าทำลายพริก

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน DNA-A ของเชื้อเบโกโมไวรัส (full-length sequence) ที่มีรายงานว่าสามารถเข้าทำลายพริก จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Chili leaf curl virus (ChiLCV)*, *Eggplant golden mosaic virus (EGMV)*, *Pepper leaf curl virus (PepLCV)*, *Pepper yellow leaf curl Thailand virus (PepYLCTHV)*, *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus (PepYLCIV)*, *Tobacco leaf curl virus (TbLCTHV)*, *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus (TYLCKaV)*, และ *Tomato yellow leaf curl Thailand virus (TYLCTHV)* จากฐานข้อมูล GenBank มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วม (consensus sequence) ด้วยโปรแกรม Clustal Omega version 1.2.1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers et al., 2011), GENEDOC version 2.6.0.2 <http://genedoc.software.informer.com/2.6/>) (Nicholas and Nicholas, 1996) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *PepYLCTHV* (NC 028989) เป็น reference sequence ออกแบบไพรเมอร์ที่มี

ความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AV1 (coat protein gene) ด้วยโปรแกรม FastPCR (Kalendar, 2005) เพื่อให้ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเป้าหมายบนสายดีเอ็นเอต้นแบบ และสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตดีเอ็นเอได้เพิ่มขึ้น กำหนดให้ไพรเมอร์มีความยาว 22-28 คู่เบส มีนิวคลีโอไทด์ C/G อยู่ปลายด้าน 3' ค่า %CG > 50 และมีค่า Tm สูงกว่า 55°C. ตามรายงานของ Dieffenbach *et al.*, (1993)

### การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียไวรัสในตัวอย่างพริกโดยเทคนิค PCR

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช 1 ไมโครลิตร 2X Green PCR master mix (Biotech rabbit, Germany) 12.5 ไมโครลิตร, 10 µM specific primers ประกอบด้วย Unibego-PepF: 5' TGTGAAGGCCCATGTAAGGTCCAG 3' และ Unibego-PepR: 5' CTCCTTGCTTGCATATTGACCACC 3' อย่างละ 0.2 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 25 ไมโครลิตร ใช้กระบวนการ PCR ที่ประกอบด้วยขั้นตอน pre-denaturation 94°C. นาน 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาด้วยขั้นตอนต่อไปนี้ จำนวน 30 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturation 94°C. 30 วินาที, annealing 55°C. 30 วินาที และ extension 72°C. 30 วินาที ขั้นตอนสุดท้าย คือ final extension 72°C. 5 นาที หยุดปฏิกิริยาที่ 16°C. 10 นาที จากนั้น ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอโดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis ใน Tris-borate buffer (TBE) ที่ผสม 1xRedsafe™ DNA stain (Intron Biotechnology, USA) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) เปรียบเทียบขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอ กับ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas, USA) ขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอที่ต้องการ คือ ประมาณ 380 คู่เบส

### การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ Unibego-Pep

นำผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้ จำนวนทั้งสิ้น 41 ตัวอย่าง มาแยกขนาดโดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis ตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 380 คู่เบส ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มล. แยกดีเอ็นเอโดยใช้ FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (FAVORGEN®, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ส่งผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing method (Sanger and Coulson, 1975) กับบริษัท U2Bio (South Korea) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในขั้นต่อไป

### การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศศาสตร์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE__TYPE=BlastSearch)), 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 MEGA X version 10.0.5 (<http://www.megasoftware.net/>) (Kumar *et al.*, 2018) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987) จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 380 คู่เบส จำนวน 41 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของเชื้อแบคทีเรียไวรัสที่ได้จากการโคลนด้วยวิธี RCA จำนวน 8 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนมของเชื้อแบคทีเรียไวรัสที่มีรายงานใน GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ด้วยวิธีโปรแกรม Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE__TYPE=BlastSearch))

## การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Full-length DNA-A ของตัวอย่างที่เป็นตัวแทนเชื้อเบโกโมไวรัสที่ตรวจพบแต่ละชนิด

นำดีเอ็นเอรวมจากตัวอย่างหมายเลข CMI6133, BRM2, UBN6, RBI601, PLG3, SNI9, CPM9, และ NAN16 มาเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสด้วยวิธี Rolling circle amplification (RCA) โดยใช้ TempliPhi™ DNA amplification kit (GE Healthcare, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต นำ total genomic DNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียง 1 ชนิดต่อ 1 ปฏิกริยา คือ *Bam*HI (Fermentas, USA) แยกชิ้นจีโนมซึ่งมีขนาดประมาณ 2,700 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) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน และถ่ายฝากให้กับเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ด้วยวิธีการ Heat Shock (Sambrook and Russel, 1989) เลี้ยงเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายฝาก recombinant plasmid ในอาหาร *Luria-Bertani (LB) broth* ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน สกัดพลาสมิดโดยใช้ FravoPrep™ Plasmid Purification Mini kit และส่งดีเอ็นเอไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยวิธี Sanger sequencing method (Sanger and Coulson, 1975) ด้วยบริการ Primer walking service (Solgent, Korea) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE__TYPE=BlastSearch)) และเปรียบเทียบข้อมูลชนิดเชื้อเบโกโมไวรัสที่ระบุได้จาก full-length DNA-A กับข้อมูลชนิดเชื้อเบโกโมไวรัสที่ระบุได้จากผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยคู่ไพรเมอร์ Unibego-Pep

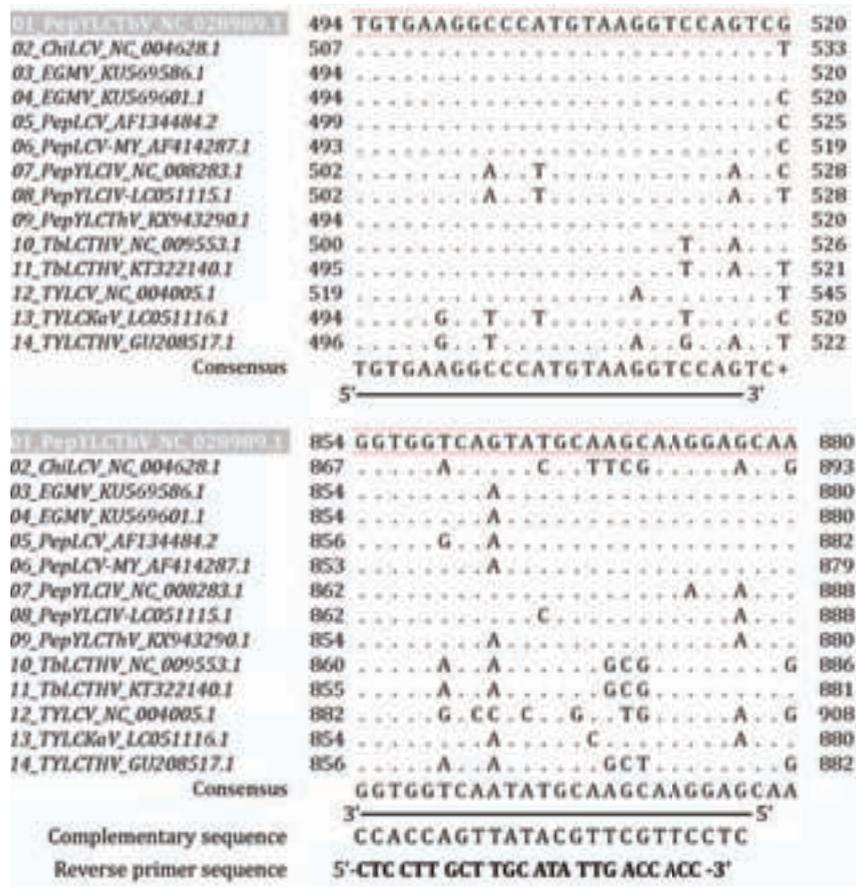
## ผลการทดลองและวิจารณ์

### ตัวอย่างเชื้อเบโกโมไวรัสในพริก

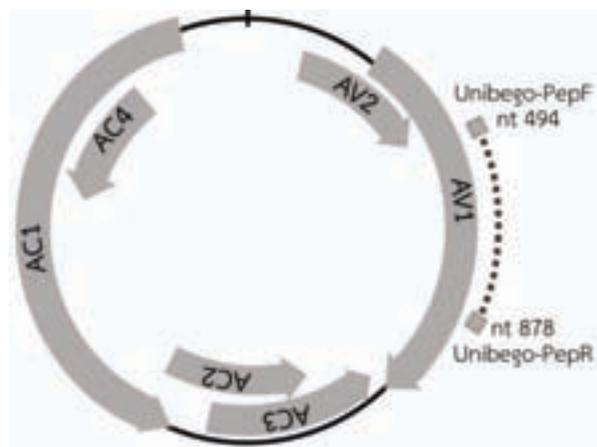
เก็บตัวอย่างพริกจาก 20 จังหวัดใน 4 ภูมิภาค จำนวนทั้งหมด 338 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงอาการหลากหลาย ได้แก่ ใบด่างเหลือง ขอบใบม้วน จุดเหลือง ใบด่างเขียว ใบลดรูป เส้นใบย่น และเนื้อใบโป่ง และมีความหลากหลายของสายพันธุ์พริกที่เก็บ ได้แก่ พริกชี้หูสวน พริกจินดา พริกหยวก พริกหนุ่มขาว พริกหนุ่มเขียว พริกมันบางช้าง พริกกะเหรี่ยง พริกดอกขาว พริกยอดสน พริกเดี่ยวไก่อ จากการตรวจสอบตัวอย่างโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสที่สามารถเข้าทำลายพริกได้ 6 ชนิด ไม่พบเชื้อไวรัส *Potato virus Y (PVY)*, *Tobacco mosaic virus (TMV)*, *Tospovirus group 4*, *Cucumber mosaic virus (CMV)*, *Pepper mild mottle virus (PMMoV)* และ *Chili veinal mottle virus (ChiVMV)* ในทุกตัวอย่าง

### การออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพริก

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมของ DNA-A ในส่วนของยีน AV1 ของไวรัสทั้ง 8 ชนิด พบลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 494 จำนวน 24 เบส และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 854 จำนวน 24 เบส (Figure 1, 2 and Table 1) เมื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Fast PCR พบว่า %CG ของ forward และ reverse primers เท่ากับ 54.2 และ 50 ตามลำดับ มีค่า melting temperature ( $T_m$ ) อยู่ที่ 60.7 $^{\circ}$ C และ 58.4 $^{\circ}$ C. ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นไม่สามารถจับกันเป็น dimer ได้ ตั้งชื่อไพรเมอร์แต่ละเส้นว่า Unibego-PepF (Universal primer for begomovirus infecting pepper-Forward) และ Unibego-PepR (Universal primer for begomovirus infecting pepper-Reverse) โดยไพรเมอร์คู่นี้จะสังเคราะห์ให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดประมาณ 380 คู่เบส



**Figure 1** Alignment of the nucleotide sequence regions of the partial AV1 gene on DNA-A from 8 pepper-infecting begomoviruses. Consensus sequences were used to design broad-spectrum primers for pepper-infecting begomoviruses. Nucleotide sequences of Unibego-PepF and Unibego-PepR primers are underlined



**Figure 2** Diagrammatic representation of the replicative forms for DNA-A and the region amplified (dashed line) by polymerase chain reaction with Unibego-Pep primers

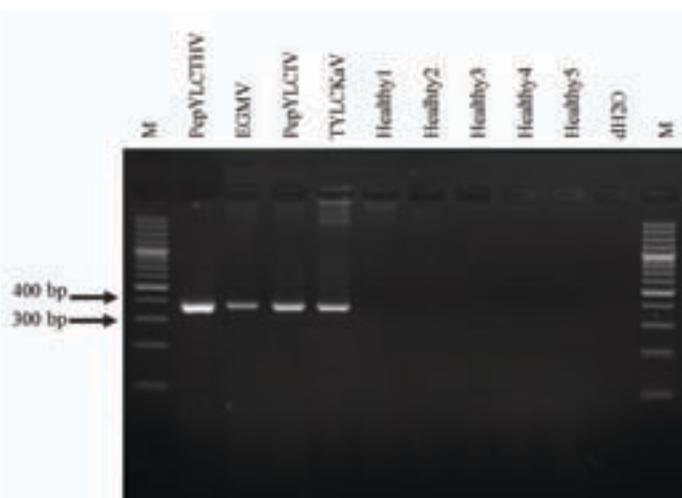
**Table 1** Nucleotide sequences and properties of broad spectrum primer set used in begomovirus screening in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Position	%CG	Tm (°C)
Unibego-PepF	TGT GAA GGC CCA TGT AAG GTC CAG	494-518	54.2	60.7
Unibego-PepR	CTC CTT GCT TGC ATA TTG ACC ACC	854-878	50	58.4

### การตรวจวิเคราะห์เชื้อเบโกโมไวรัสในตัวอย่างพริกโดยเทคนิค PCR

การทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างควบคุมบวก 4 ตัวอย่าง ได้แก่ PepYLCTHV, EGMV, PepYLIV, TYLCKaV และ ตัวอย่างควบคุมลบซึ่งเป็นพริกปลอดเชื้อ 5 ตัวอย่าง พบว่า คู่ไพรเมอร์ Unibego-Pep สามารถตรวจเชื้อเบโกโมไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองในพริกที่พบในประเทศไทยทั้ง 4 ชนิด ช่างต้น ได้โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างพริกปลอดเชื้อ (Figure 3) การตรวจวิเคราะห์ขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากคู่ไพรเมอร์ Unibego-Pep พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 380 คู่เบสในตัวอย่างพริก 307 ตัวอย่าง คิดเป็น 90.8% ของตัวอย่างทั้งหมด ทั้งนี้แถบของดีเอ็นเอมีความเข้มที่แตกต่างกันโดยตัวอย่างที่เก็บได้จากภาคเหนือ (CMI) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (SRN, UBN, SSK, CPM และ KKN) และภาคกลาง (SPI, RBI, KBI และ NPT) มีแถบดีเอ็นเอที่เข้มมาก ในขณะที่ผลผลิต

ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่เก็บในจังหวัดภาคใต้ (PLG, NST และ SNI) ให้แถบสีจาง นอกจากนี้ ยังพบแถบของดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบจากผลผลิตดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ในบางตัวอย่าง (SPI602 และ RBI604) ที่เก็บจาก จ.สุพรรณบุรี และราชบุรี (Figure 4) ทั้งนี้ความเข้มแถบดีเอ็นเอและจำนวนชั้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้น่าจะเกิดจากความสามารถที่แตกต่างกันของไพรเมอร์ในการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของ เบโกโมไวรัสต่างชนิดกัน เนื่องด้วยไพรเมอร์คู่นี้ไม่ได้ถูกออกแบบให้เป็น degenerate primers เพื่อให้มีนิวคลีโอไทด์ที่สามารถจับได้กับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันในเบโกโมไวรัสแต่ละชนิดได้ แต่ถูกออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PepYLCTHV เป็น reference sequence การส่งผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากตัวอย่างเหล่านี้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์จึงเป็นวิธีการที่จะสามารถระบุชนิดของไวรัสได้

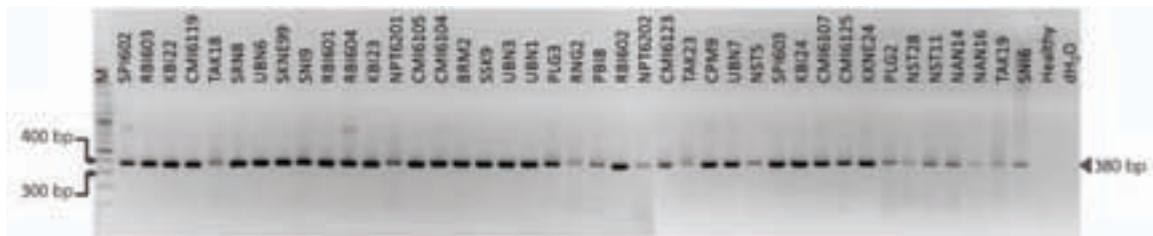


**Figure 3** Specificity testing of Unibego-Pep primer pair with six positive samples, i.e., PepYLCTHV, EGMV, PepYLCTV, TYLCKaV and 5 healthy pepper cultivars (Bird eye pepper, Chinda, Bang Chang, Prik Num khao, and Prik Num Keaw)

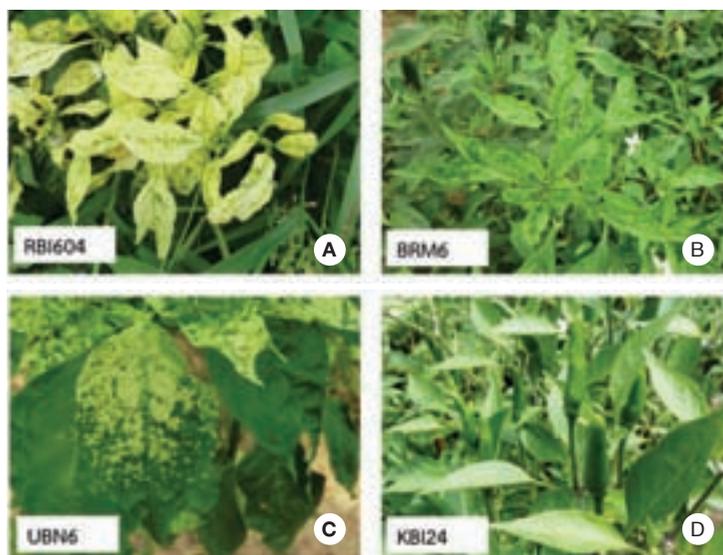
**การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ Unibego-Pep**

การตรวจสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ Unibego-Pep พบว่า มีตัวอย่าง จำนวน 307 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวก โดยเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 380 คู่เบส นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกมาจัดกลุ่มตัวอย่างตามลักษณะอาการ ได้ 4 กลุ่ม คือ 1) ใบเหลือง 2) ต่างเขียว 3) จุดประเหลือง และ 4) ไม่แสดงอาการของเชื้อเบโกโมไวรัส (Figure 5) คัดเลือกตัวอย่างจากแต่ละกลุ่มอาการกลุ่มละ 10-12 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 41 ตัวอย่าง เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอจากตัวอย่างพริก จำนวน 17 ตัวอย่าง มีความเหมือน (Identity) กับเชื้อไวรัสชนิด PepYLCTHV จำนวน 3 ไอโซเลท คือ TMK-KR5 (KT322145), Suphanburi11 (KX900490) และ SNS-CM5 (KT322142)

โดยมี %identity สูงสุดที่ระดับ 97.83-99.69% ผลผลิตดีเอ็นเอจากตัวอย่างพริกจำนวน 7 ตัวอย่าง มี %identity สูงสุดที่ระดับ 93.62-98.49 กับเชื้อ EGMV ไอโซเลท TH14E3-5 (KU569601) ผลผลิตดีเอ็นเอ จำนวน 6 ตัวอย่างมี %identity สูงสุดกับเชื้อ PepLCV ไอโซเลท Malaysia (AF414287) ที่ระดับ 93.43-96.69% ผลผลิตดีเอ็นเอจากจังหวัดน่าน จำนวน 2 ตัวอย่าง มี %identity สูงสุดกับเชื้อ TYLCKaV ไอโซเลท eggplant-Chiang Mai (KX900495) ที่ระดับความเหมือน 97.38-97.87% ในขณะที่ตัวอย่างจาก จ.เพชรบุรี 1 ตัวอย่าง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอเหมือนกับเชื้อ TYLCKaV ไอโซเลท TH12WE14 (KU509590) ที่ระดับ 99.12% นอกจากนี้ ยังพบว่า ตัวอย่างพริกที่เก็บจากภาคใต้ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มี %identity สูงสุดกับเชื้อ PepYLCIV ไอโซเลท BA-E2-1(LC05115) ที่ระดับ 98.25-99.40% (Table 2)



**Figure 4** Amplified PCR fragment of 41 chosen samples based on symptom grouping of positive samples using Unibego-Pep primers



**Figure 5** Three hundred and seven samples given positive results were divided based on their major notable symptoms into 4 groups, i.e., Yellowing (A) Green mosaic (B) Chlorotic spot (C) and Non begomovirus-like symptoms (D)

**Table 2** Nucleotide sequence analysis of the 380 bp DNA fragments from 41 pepper samples amplified by Unibego-Pep primers compared with the GenBank database

Begomoviruses with Acc. No. in GenBank	Samples with Acc. No	%Identity	
PepYLCTHV TMK-KR4 (Acc. No. KT322145) or EGMV TH12WE12 (Acc. No. KU569586.1)	KBI22	MN204580	99.09
	KBI23	MN204581	98.79
	RBI601	MN204583	98.79
	RBI602	MN204584	98.79
	RBI603	MN204585	98.79
	RBI604	MN204586	98.79
	SPI603	MN204587	98.79
	NPT6201	MN204582	97.88
PepYLCThV (SNS-CM5) (Acc. No. KT322142)	CMI6125	MN204576	99.69
	CMI6119	MN204574	99.40
	CMI6123	MN204575	99.40
	CMI6105	MN204572	99.10
	CMI6107	MN204573	99.07
	CMI6133	MN204577	98.80
PepYLCThV (Suphanburi-11) (Acc. No. KX900490)	BRM2	MN204571	99.38
	SPI602	MN204578	99.38
	UBN7	MN204579	97.83
EGMV (TH14E3-5) (Acc. No. KU569601)	KKNE24	MN204588	98.49
	SRN8	MN204590	94.22
	SSK9	MN204591	93.92
	UBN1	MN204592	93.92
	UBN3	MN204593	93.92
	NPT6202	MN204589	93.62
	UBN6	MN204594	93.62
PepLCV-[MY] (Acc. No. AF414287)	KBI24	MN204596	96.69
	CPM9	MN204595	96.08
	TAK18	MN204598	95.69
	TAK19	MN204599	95.68
	TAK23	MN204600	95.6
	SKNE99	MN204597	93.43
PepYLCIV-BA__E2-1 (Acc. No. LC051115)	PLG2	MN204604	99.4
	PLG3	MN204605	99.39
	NST28	MN204602	98.83
	SNI9	MN204608	98.83
	RNG2	MN204606	98.54
	SNI6	MN204607	98.54
	NST11	MN204601	98.51
	NST5	MN204603	98.25
TYLCKaV (eggplant-Chiang Mai) (Acc. No. KX900495)	NAN16	MN204610	97.87
	NAN14	MN204609	97.38
TYLCKaV (TH12WE14) (Acc. No. KU569590)	PBI8	MN204611	99.12

## การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศศาสตร์

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์จาก phylogenetic tree ของผลผลิตดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Neighbor-joining พบว่า ตัวอย่างที่มีค่า %identity สูงสุดกับเชื้อ PepYLCTHV และ EGMV ถูกจัดอยู่ในเคลด (clade) เดียวกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาเกณฑ์การจำแนกชนิด (species) และ สายพันธุ์ (strain) ของเชื้อเบโกโมไวรัสที่ระดับ 91% และ 94% ตามลำดับ (Brown *et al.*, 2015) ทำให้สามารถกล่าวได้ว่าเชื้อ PepYLCTHV และ EGMV เป็นชนิดเดียวกัน ในขณะที่ตัวอย่างที่มี %identity สูงสุดกับเชื้อ PepLCV ไอโซเลท Malaysia ถูกจัดอยู่ในเคลดเดียวกับตัวอย่างที่มี %identity สูงสุดกับเชื้อ EGMV ไอโซเลท TH14E3-5 เนื่องจากตัวอย่างในกลุ่มนี้มีความเหมือนกับเชื้อ EGMV ไอโซเลท TH14E3-5 เพียง 93.80-93.94% เท่านั้น ซึ่งเมื่อพิจารณาจากเกณฑ์การจำแนก strain ที่ระดับ 94% จึงกล่าวได้ว่า ตัวอย่างเหล่านี้มีเชื้อ EGMV คนละ strain กับที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank อย่างไรก็ตาม เชื้อ PepLCV- ไอโซเลท Malaysia ก็ยังมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับเชื้อ PepYLCTHV และ EGMV โดยเชื้อทั้งสามชนิดนี้ถูกจัดให้อยู่ในเคลดเดียวกัน สำหรับตัวอย่างที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอเหมือนกับเชื้อ PepYLCTHV และ TYLCKaV ทุกตัวอย่างถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยแยกออกจากกลุ่มของเชื้อ PepYLCTHV, EGMV, และ PepLCV อย่างชัดเจน (Figure 6)

## การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Full-length DNA-A ของตัวอย่างที่เป็นตัวแทนเชื้อเบโกโมไวรัสที่ตรวจพบแต่ละชนิด

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full-length DNA-A จากตัวอย่างที่ถูกเลือกเพื่อเป็นตัวแทนของเชื้อเบโกโมไวรัสทั้ง 5 ชนิด จำนวน 8 ตัวอย่างได้แก่ CMI6133, BRM2, UBN6, RBI601, PLG3, SNI9, CPM9, และ NAN16 พบว่า DNA-A ของทุกตัวอย่างมีขนาดประมาณ 2,700-2,800 คู่เบส เมื่อนำไปเปรียบ

เทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่า ผลการวิเคราะห์ชนิดไวรัสในตัวอย่างจากผลของ full-length DNA-A ตรงกับผลการวิเคราะห์จากผลผลิตดีเอ็นเอ 380 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ Unibego-Pep แม้จะพบว่ามีไอโซเลทของเชื้อที่แตกต่างกันก็ตาม ทั้งนี้ มีเพียง 1 ตัวอย่างที่ให้ผลไม่ตรงกัน คือ CPM9 ซึ่งมีผลการวิเคราะห์ DNA-A มีค่า %identity สูงสุดกับเชื้อ EGMV TH14E2 (KU569598) ที่ระดับ 92.64% แต่ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอ 384 คู่เบส มีความเหมือนกับเชื้อ PepLCV ไอโซเลท Malaysia สูงสุด คือ ที่ระดับ 96.08% (Table 3) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจาก phylogenetic tree และ pairwise identity พบว่า เชื้อ PepLCV ไอโซเลท Malaysia มีความใกล้เคียงทางวิวัฒนาการกับเชื้อ EGMV และ PepYLCTH ที่ 89-90% และถูกจัดอยู่ในเคลดเดียวกันกับเชื้อทั้งสองชนิดข้างต้น (Figure 7) จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า คู่ไพรเมอร์ Unibego-Pep สามารถใช้เพื่อตรวจคัดกรองเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพริกที่เก็บตัวอย่างได้จากประเทศไทยอย่างน้อย 5 ชนิด คือ EGMV, PepLCV-[MY], PepYLCIV, PepYLCTHV, TYLCKaV อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full-length DNA-A ในตัวอย่างมีความจำเป็นในการระบุชนิดเชื้อของเบโกโมไวรัสสาเหตุเชื้อโรคใบหงิกเหลืองของพริกในตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง

## สรุปผลการทดลอง

ไพรเมอร์ Unibego-Pep ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้ มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางช่วงของยีน AV1 สามารถใช้เป็น broad-spectrum primer สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพริกในประเทศไทยได้อย่างน้อย 5 ชนิด EGMV, PepLCV-[MY], PepYLCIV, PepYLCTHV, TYLCKaV ซึ่งสามารถสังเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอ ได้ขนาดประมาณ 380 คู่เบส

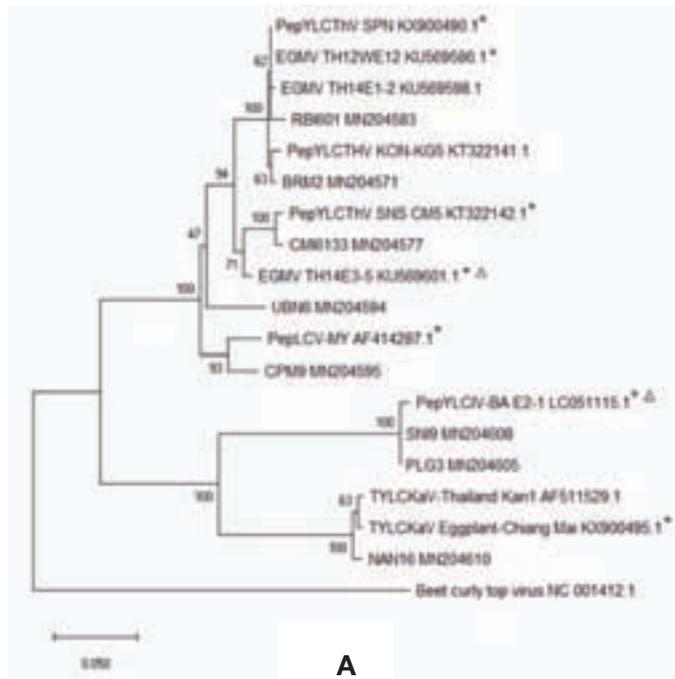
**Table 3** Full-length DNA-A nucleotide sequence analysis of 8 representative samples comparing with the result obtained from 380 bp length nucleotide sequence

No.	Sample	Nucleotide sequence analysis						Symptom*	Region of collection
		380 bp fragment			Full-length DNA-A				
		Species	GenBank Acc no.	%Identity	species	GenBank Acc No.	%Identity		
1	CMI6133	PepYLCTHV	KT322142.1	98.25	PepYLCTHV	KT322141.1	98.55	Y	North
2	BRM2	PepYLCThV	KX900490.1	98.55	PepYLCThV	KT322141.1	98.55	Y	Northeast
3	RBI601	EGMV	KU569586.1	98.55	EGMV	KU569598.1	99.12	Y	Central plain
4	UBN6	EGMV	KU569601.1	92.39	EGMV	KU569601.1	93.16	CS	Northeast
5	CPM9	PepLCV-[MY]	AF414287	96.08	EGMV	KU569598.1	92.64	GM	Northeast
6	SNI9	PepYLCIV	LC051115.1	98.83	PepYLCIV	LC051115.1	98.84	CS	South
7	PLG3	PepYLCIV	LC051115.1	99.39	PepYLCIV	LC051115.1	97.93	Y	South
8	NAN16	TYLCKaV	KX900495.1	97.57	TYLCKaV	AF511529.1	97.85	GM	North

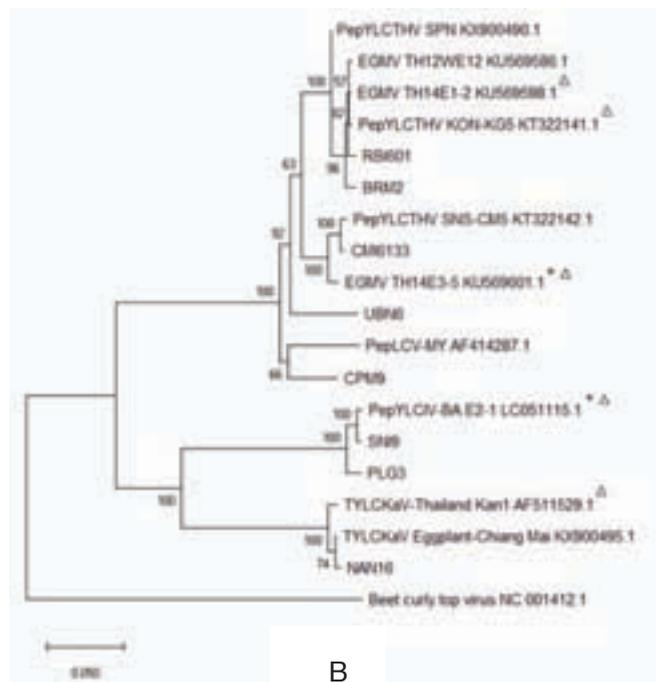
**Remark:** Y, Yellowing; GM, green mosaic; Cs, chlorotic spot; NS, non begomovirus-like symptom



**Figure 6** Phylogenetic analysis based on the alignment of 380 nucleotide PCR amplified sequences using Unibego-Pep primers showing genetic relationship of begomoviruses causing pepper yellow leaf curl disease from 41 chosen samples from 4 regions of Thailand. Neighbour-joining tree were reconstructed using MEGA X with 1000 replications bootstrapping. The star above begomovirus isolate indicates the previous recognized begomoviruses in GenBank which show the highest identity with samples. Begomovirus samples in this study are written with Acc. no. submitted in NCBI. Eight selected samples for full-length DNA-A sequence analysis are indicated with the rectangular blocks



A



B

**Figure 7** Phylogenetic tree analysis based on the alignments of 380 nucleotide PCR amplified sequences using Unibego-Pep primers (A) and full-length DNA-A (B) shows good correlation of all DNA-A sequences with the 380 bp BLASTn results. Neighbour-joining tree were reconstructed using MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) with 1,000 replications bootstrapping. The star and triangle above the begomovirus isolates indicate the begomovirus isolate from the GenBank showing the highest identity with the 380 bp fragment sequence and full-length DNA-A of selected samples, respectively

## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

## เอกสารอ้างอิง

- Bhatt, B.S., F.D. Chahwala, S. Rathod and A.K. Singh. 2016. Identification and molecular characterization of a new recombinant begomovirus and associated betasatellite DNA infecting *Capsicum annuum* in India. *Arch. Virol.* 161 (5): 1389-1394.
- Brown, J.K., F.M. Zerbini, J. Navas-Castillo, E. Moriones, R. Ramos-Sobrinho, J.C. Silva and A. Varsani. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160 (6): 1593-1619.
- Chiemsoombat, P., B. Srikamphung, and S. Yule. 2018. Begomoviruses associated to Pepper yellow leaf curl disease in Thailand. *J. Agri. Res.* 3 (7): 000183.
- Deng, D., McGrath, P. F., Robinson, D. J., & Harrison, B. D. (1994). Detection and differentiation of whitey-transmitted geminiviruses in plants and vector insects by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Ann. Appl. Biol.* 125(2), 327-336.
- Dieffenbach, C.W., T.M. Lowe and G.S. Dveksler. 1993. General concepts for PCR primer design. *PCR Meth. Appl.* 3: S30-S37.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Galvao, R. M., A.C. Mariano, D.F. Luz, P.F. Alfenas, E.C. Andrade, F.M. Zerbini, and E.P.B. Fontes. 2003. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *J. Gen. Virol.* 84: 715-726.
- Green, S. and G. Kali. 1994. Leaf curl and yellowing viruses of pepper and tomato: an overview: Asian Vegetable Research and Development Center. Technical Bulletin No.21, n.p.
- Harrison, B. and D. Robinson. 1999. Natural Genomic and Antigenic Variation in Whitey-Transmitted Geminiviruses (Begomoviruses). *Annu. Rev. Phytopatho.* 37: 369-398.
- Kalendar, R. 2005. Fast PCR: PCR primer design, DNA and protein tools repeat and own database searches program. Available at: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpccr.html>, Accessed: July 15, 2015.
- Kenyon, L., W.-S. Tsai, S.-L. Shih and Lee, L.-M. 2014. Emergence and diversity of begomoviruses infecting solanaceous crops in East and Southeast Asia. *Virus Res.* 186: 104-113.
- Kumar S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549
- Kumar, S., S. Kumar, M. Singh, A.K. Singh and M. Rai. 2006. Identification of host plant resistance to pepper leaf curl virus in chilli (*Capsicum* species). *Sci. Hortic.* 110 (4): 359-361.
- Leke, W.N., D.B. Mignouna, J.K. Brown and Kvarnheden, A. 2015. Begomovirus disease complex: emerging threat to vegetable production systems of West and Central Africa. *Agriculture & Food Security* 4(1): 1.
- Lima, A., J. Silva, F.N. Silva, G.P. Castillo-Urquiza, F F. Silva, Y.M. Seah, E.S.G. Mizubuti, S. Duffy and F.M. Zerbini.

2017. The diversification of begomovirus populations is predominantly driven by mutational dynamics. *Virus evol.* 3(1): vex005.
- Nicholas, K.B., and H.B.J. Nicholas. 1996. Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. n.p.
- Prasanna, H. C. and M. Rai. 2007. Detection and frequency of recombination in tomato-infecting begomoviruses of South and Southeast Asia. *Virology* 4: 111.
- Rojas, M. R., R. Gilbertson, D. Russell and D. Maxwell. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* 77(4):340-347.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The Neighbor-joining Method: A New method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425.
- Sakata, J.-j., Y. Shibuya, P. Sharma and M. Ikegami. 2008. Strains of a new bipartite begomovirus, pepper yellow leaf curl Indonesia virus, in leaf-curl-diseased tomato and yellow-vein-diseased ageratum in Indonesia. *Arch. Virol.* 153 (12): 2307-2313.
- Sambrook, J. and D.W. Russel. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup>ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 213 pp.
- Samretwanich, K., P. Chiemsombat, K. Kittipakorn and M. Ikegami. 2000. A new geminivirus associated with a yellow leaf curl disease of pepper in Thailand. *Plant Dis.* 84(9): 1047.
- 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.
- Seepiban, C., S. Charoenvilaisiri, N. Warin, A. Bhunchoth, N. Phironrit, B. Phuengrat, O. Chatchawankanphanich, S. Attathom and O. Gajanandana. 2017. Development and application of triple antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assays for begomovirus detection using monoclonal antibodies against Tomato yellow leaf curl Thailand virus. *Virology* 14 (1): 99.
- Shih, S.L., W.S. Tsai, L.M. Lee, J.T. Wang, S.K. Green and L. Kenyon. 2010. First Report of Tomato yellow leaf curl Thailand virus Associated with Pepper Leaf Curl Disease in Taiwan. *Plant Dis.* 94 (5): 637-637.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Rmmert, J. Soding, J.D. Thompson and D.G. Higgins. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7: 539.
- Tahir, M.N. and S. Mansoor. 2011. betaC1 of chili leaf curl betasatellite is a pathogenicity determinant. *Virology* 8: 509.
- Varma, A. and V.G. Malathi. 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Ann. Appl. Biol.* 142: 145-164.
- Wyatt, S. D., & Brown, J. K. (1996). Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86(12), 1288-1293.
- Zhou, X. 2013. Advances in understanding begomovirus satellites. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51: 357-381.