

จีโนมของเชื้อไวรัสเหี่ยวเฉาข้าวในประเทศไทยและการวิเคราะห์
ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
**Complete Genome of Rice Grassy Stunt Tenuivirus in Thailand
and Genetic Relationship Analysis**

คณินิจ ศรีวิลัย^{1,2} ภัสสร วรณพินิจ³ Scott Adkins⁴ สุจินต์ ภัทรภูวดล^{1*}
Kanuenngij Srivilai^{1,2} Passorn Wonnapijit³ Scott Adkins⁴ Sujin Patarapuwadol^{1*}

Received 24 Jan 2022/Revision 19 Mar 2022/Accepted 23 Mar 2022

ABSTRACT

Rice grassy stunt virus (RGSV) belongs to the genus *Tenuivirus*. The virus caused stunted and prolific tillering of rice plants, which significantly reduce the yield of the rice crop in many countries. Rice grassy stunt disease was first described in Thailand in 1966 however, a complete genome sequence of RGSV has not been available. This study examined an isolate of RGSV from an infected rice plant collected from Prachin Buri province (isolate PRI). Total RNA was extracted from diseased rice leaves and then used for cDNA library construction. Its genome sequence was read using RNA-Seq technology, and de novo assembly was applied to reconstruct the genome. The qualified 9,680,170 short reads were de novo assembled to reconstruct the complete genome sequence. Results showed that the genome of RGSV isolate PRI consisted of 25,118 nucleotides (nt) of six RNA segments. The length of RNAs were 9,760 nt (RNA1), 4,059 nt (RNA2), 3,125 nt (RNA3), 2,892 nt (RNA4), 2,692 nt (RNA5), and 2,590 nt (RNA6). The genome of isolate PRI was compared with that of RGSV isolate IRRI from the Philippines by multiple alignments. Result showed that the RGSV isolate PRI shared 96.6% identity with RGSV isolate IRRI. The Maximum likelihood phylogenetic analysis from the concatenated genome indicated that isolate PRI closely related to isolate FZ0403 from China. The phylogenetic tree reconstructed by using RNA1, RNA4, and RNA5 sequences revealed that isolate PRI closely related to isolate FZ0403.

Keywords : viral genome, rice grassy stunt disease, RNA sequencing, phylogenetic analysis

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

² ศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร อ.เมือง จ.สกลนคร 47000

² Sakon Nakhon Rice Research Center, Mueang, Sakon Nakhon 47000

³ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

³ Department of genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

⁴ United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, U. S. Horticultural Research Laboratory, 2001 South Rock Road. Fort Pierce, FL 34945, United States

* Corresponding author: agrsujp@ku.ac.th

บทคัดย่อ

Rice grassy stunt tenuivirus (RGSV) สาเหตุโรคเหี่ยวเตี้ยของข้าว เป็นไวรัสจัดอยู่ในสกุล *Tenuivirus* ทำให้ข้าวแสดงอาการต้นเตี้ยแตกกอมาก ส่งผลเสียหายต่อผลผลิตข้าวในหลายประเทศ โรคนี้พบครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อ พ.ศ. 2509 แต่ยังไม่มีการศึกษาจีโนมที่ครบสมบูรณ์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครบสมบูรณ์ของจีโนมเชื้อ RGSV ที่เข้าทำลายต้นข้าวใน จ.ปราจีนบุรี (ไอโซเลท PRI) โดยสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบข้าว ด้วยเทคโนโลยี RNA-Seq และประกอบจีโนมไวรัส ด้วยวิธี de novo assembly ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ คัดกรองดีเอ็นเอสายสั้นที่มีคุณภาพได้ 9,680,170 สาย เชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนจีโนมของไวรัสจนครบแต่ละสาย ด้วยวิธีที่ไม่ใช้จีโนมอ้างอิง ผลการศึกษาพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครบสมบูรณ์ของจีโนมเชื้อ RGSV ไอโซเลท PRI มีความยาว 25,118 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย RNA 6 สาย มีขนาด 9,760 (RNA1) 4,059 (RNA2) 3,125 (RNA3) 2,892 (RNA4) 2,692 (RNA5) และ 2,590 (RNA6) นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ RGSV-IRRI จากสาธารณรัฐฟิลิปปินส์ พบว่า มีความคล้ายคลึงกัน 96.6% การวิเคราะห์แผนภูมิวงวิวัฒนาการแบบ maximum likelihood โดยใช้จีโนมรวมทุกสาย พบว่า ไอโซเลท PRI มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากที่สุดกับไอโซเลท FZ0403 จากประเทศจีน ผลการวิเคราะห์แบบแยกสายอาร์เอ็นเอ พบว่า RNA1 RNA4 และ RNA5 มีความใกล้ชิดกับไอโซเลท FZ0403 เช่นเดียวกัน

คำสำคัญ: จีโนมเชื้อไวรัส, โรคเหี่ยวเตี้ยข้าว, การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอ, การวิเคราะห์วงวิวัฒนาการ

บทนำ

โรคเหี่ยวเตี้ยข้าว มีสาเหตุมาจากเชื้อ rice grassy stunt tenuivirus (RGSV) จัดอยู่ในสกุล *Tenuivirus* พบในประเทศไทย เมื่อ พ.ศ. 2509 (Wathanakul and Weerapat, 1969) โรคนี้จัดแบ่งเป็น 2 สายพันธุ์ตามความรุนแรงของอาการ ดังนี้ RGSV-1 ทำให้ข้าวแสดงอาการต้นเตี้ยแตกกอมากเป็นพุ่มแจ้ ใบข้าวตั้งตรง ใบแคบ มีสีเขียว (Hibino *et al.*, 1985a) RGSV-2 ทำให้ต้นข้าวมีใบสีเหลือง อมเขียวจนถึงส้ม ใบแก่มีจุดประคล้ายสนิมกระจายทั่วไป (Ling, 1972; Shikata *et al.*, 1980; Hibino *et al.*, 1985a) ซึ่งเป็นอาการที่มีความรุนแรง พบในสาธารณรัฐฟิลิปปินส์ (Cabauatan *et al.*, 1985; Hibino *et al.*, 1985a) ไต้หวัน (Chen and Chiu, 1982) และประเทศไทย (Chettanachit *et al.*, 1985) จึงจัดแบ่งกลุ่มเชื้อที่ทำให้ต้นข้าวเกิดอาการแตกพุ่มแจ้ มีใบสีเขียวเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม (RGSV1) และแบบที่มีอาการใบสีเหลืองอมส้มเป็นสายพันธุ์รุนแรง (RGSV2) ทั้งนี้เมื่อปลูกเชื้อสายพันธุ์ RGSV2 ลงบนข้าว *Oryza nivara* ที่มียืนต้านทานต่อ RGSV1 (Cabauatan *et al.*, 1985) พบว่า ข้าว *O. nivara* เกิดโรคในอัตราสูงถึง 80% (Cabauatan *et al.*, 1985) ทั้ง RGSV1 และ RGSV2 มีลักษณะทางสัณฐานเหมือนกัน มีแมลงพาหะชนิดเดียวกัน และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางซีรุ่มวิทยา (Hibino *et al.*, 1985a)

อนุภาคไวรัส RGSV มีลักษณะทางสัณฐานเป็นสายยาวคล้ายเส้นด้าย (thread-like filament) มีความกว้าง 6-8 นาโนเมตร ยาว 200-2,400 นาโนเมตร (Hibino *et al.*, 1985b) ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว 6 สาย (RNA1-6) ส่วนปลายสายทั้งสองข้างของอาร์เอ็นเอมาจับกันเป็นวง (circular filament) และบางครั้งสายบิดเป็นเกลียว (spiral form) อาร์เอ็นเอแต่ละสายถูกห่อหุ้มไว้ด้วยโมเลกุลของโปรตีน

ห่อหุ้ม (nucleocapsid protein) ตามความยาวของสายอาร์เอ็นเอ และมีกอนโปรตีน RNA dependent-RNA polymerase ติดอยู่บนสาย RNA1 เพื่อใช้ในการจำลองตัวเมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์พืช (Toriyama, 1987) อนุภาคไวรัสไม่มีเยื่อหุ้ม (Toriyama *et al.*, 1998) รหัสพันธุกรรมบน RNA1-6 เป็นแบบสายลบ (negative sense) และมีการเรียงตัวของยีนแบบสองทิศทาง (ambisense) ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน (untranslated region, UTR) ทางด้านปลายสายด้าน 5 และ 3 และบริเวณที่เชื่อมต่ออยู่ระหว่างยีนที่เรียกว่า intergenic region (IGR) และส่วนที่แปลรหัสเป็นโปรตีน (open reading frame, ORF) ได้แก่ ORF1 แปลรหัสจากสายบวก (viral strand) และ ORF2 แปลรหัสจากสายลบ (viral complementary strand) รวมทั้งหมด 12 ORFs มีการศึกษาและทราบหน้าที่เพียง 5 ORFs ได้แก่ ORF2 ของ RNA1 แปลรหัสตามสายลบเป็น RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Toriyama *et al.*, 1994; 1998) ORF1 ของ RNA2 และ ORF1 ของ RNA5 เกี่ยวข้องกับการยับยั้งไม่ให้ยีนพืชทำงาน (viral silencing suppressor, VSR) (Nguyen *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015) ORF2 ของ RNA5 เป็น nucleocapsid protein (NCP) (Toriyama *et al.*, 1997) และ ORF2 ของ RNA6 เป็นโปรตีนที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของอนุภาคภายในพืช (movement protein, MP) (Hiraguri *et al.*, 2011) ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลายสายด้าน 5 UTR และ 3 UTR มีเบสคู่สมกัน จำนวน 16 คู่เบส เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายด้ามกระบะ (panhandle-like structure) ไวรัสในสกุล *Tenuivirus* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อนุรักษ์ จำนวน 10 คู่เบส ทั้งปลายด้าน 5 (ACACAAAGUC) และ 3 (UGUGUUUCAG) (Takahashi *et al.*, 1990; Falk and Tsai, 1998)

Toriyama *et al.* (1997) ศึกษาข้อมูลจีโนมเชื้อ RGSV ไอโซเลท IRRI จากสาธารณรัฐฟิลิปปินส์ โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากอนุภาคไวรัสที่บริสุทธิ์ นำมาสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สม (cDNA) จากต้นแบบอาร์เอ็นเอแต่ละชิ้น จนครบ 6 ชิ้น จากนั้นโคลนดีเอ็นเอ แล้วนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และเรียงลำดับประกอบกันจนครบสมบูรณ์ทั้งจีโนม (NC_002323-002328) (Toriyama *et al.*, 1997; 1998) Miranda *et al.* (2000) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ RGSV จากสาธารณรัฐฟิลิปปินส์ ได้แก่ ไอโซเลท South Cotabato จากภาคใต้ และ Laguna จากภาคเหนือ เมื่อเปรียบเทียบแต่ละสายของ RNA1-6 พบว่า RNA1 4 และ 5 มีความเหมือนกันมาก (nearly identical) ส่วน RNA2 3 และ 6 มีความแตกต่างกัน รวมทั้งพบข้อมูลที่ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่มีการเรียงสลับสายอาร์เอ็นเอ (reassortment) ระหว่างสองไอโซเลทนี้ สำหรับเชื้อ RGSV สายพันธุ์รุนแรงที่พบในประเทศไทย (Chettanachit *et al.*, 1985) มีการบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA1-6 ของไอโซเลท PT010 (KF438753-438758) ที่แยกจาก จ.ปทุมธานี และ SP002 (KF438711-438716) จาก จ. สุพรรณบุรี ไว้ในฐานข้อมูล GenBank แต่ข้อมูลจีโนมของทั้งสองไอโซเลทยังไม่ครบสมบูรณ์

มีการนำเทคนิค RNA sequencing (RNA-Seq) มาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาจีโนมของเชื้อไวรัสในข้าว โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบข้าวที่เป็นโรค และคัดเลือกเฉพาะอาร์เอ็นเอส่งข้าว (mRNA) มาเป็นต้นแบบสำหรับสังเคราะห์ไลบรารีดีเอ็นเอ (cDNA library) แล้วนำดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Illumina, San Diego, CA, USA) เช่น การวิเคราะห์จีโนมเชื้อ rice stripe tenuivirus (RSV) ในแมลง และข้าว (Zhao *et al.*, 2018) ซึ่งเป็นเชื้อในสกุลเดียวกับ RGSV Chao *et al.* (2021) วิเคราะห์ใบข้าวที่ได้รับการถ่ายทอดไวรัสด้วยเพลี้ยกระโดด

สีน้ำตาล สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอไวรัสที่มีอยู่ในต้นข้าวที่เป็นโรคได้ จีโนมไวรัสที่ครบสมบูรณ์ถึง 13 ชนิด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ครบสมบูรณ์ของจีโนมเชื้อ RGSV สายพันธุ์รุนแรง ที่ได้จาก จ. ปราจีนบุรี โดยใช้เทคโนโลยี RNA-Seq และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และวิวัฒนาการของเชื้อ RGSV กับเชื้อจากแหล่งอื่นในต่างประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมไวรัสโรคข้าวเขียวเตี้ยและการตรวจสอบสายพันธุ์ไวรัส RGSV

ต้นข้าวที่เป็นโรคข้าวเขียวเตี้ย ซึ่งได้รับเชื้อ RGSV ไอโซเลท PRI (RGSV-PRI) ได้รับความอนุเคราะห์จากกองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว เป็นตัวอย่างต้นข้าวเป็นโรคที่เก็บมาจาก จ. ปราจีนบุรี เมื่อ พ.ศ. 2560 นำมาถ่ายทอดโรคบนข้าวพันธุ์ไทซุงเนทีฟ 1 (TN1) โดยใช้แมลงพาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* Stal.) ตามวิธีของ Ling *et al.* (1970) เมื่อต้นข้าวแสดงอาการ หลังได้รับเชื้อ 35 วัน นำมาตรวจยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อ RGSV ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ RGSV-P1/P2 (Toriyama *et al.*, 1997) ที่จำเพาะต่อยีน pc5 (nucleocapsid protein) และตรวจหาเชื้อ rice ragged stunt tenuivirus (RRSV) โดยใช้ไพรเมอร์ S8U1374/S8E3 (สุชาติ, 2547) ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจล 1.5% ในบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 5 นาที บันทึกภาพเจลด้วยเครื่องถ่ายภาพ (Gens Flash, Syngene bioimaging) ส่งผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท MacroGen (เกาหลีใต้) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn

จากนั้น ทดสอบสายพันธุ์เชื้อ RGSV ตามวิธีการของ Cabauatan *et al.* (1985)

2. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยี RNA sequencing (RNA-Seq)

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบข้าวที่เป็นโรคข้าวเขียวเตี้ยปริมาณ 1 กรัม ด้วยชุดสกัด TRIzol reagent (Invitrogen, USA) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอรวม ด้วยเครื่อง Nanodrop8000 (Thermo Fisher Scientific, USA) และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตโฟรีซิส นำอาร์เอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี RNA-seq โดยนำไปผ่านกระบวนการ ribo-depleted RNA ซึ่งจะลดปริมาณ ribosomal RNA ของข้าวออกจากอาร์เอ็นเอรวมก่อนนำไปเตรียมไลบรารีดีเอ็นเอ (cDNA library) แล้วทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) แบบ paired-end sequencing ให้ได้ข้อมูลอย่างน้อย 15 กิกะเบส เพื่อให้ครอบคลุมจีโนมไวรัส (Vishuo Biomedical Thailand, Ltd.)

3. การคัดกรองข้อมูลดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี และการประกอบดีเอ็นเอสายยาว

อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอและความถูกต้องของเบสแต่ละตำแหน่ง ด้วยโปรแกรม FastQC 0.11.5 (Schmieder and Edwards, 2011) คัดกรองดีเอ็นเอที่มีคุณภาพต่ำออก และตัดดีเอ็นเอส่วนที่เป็น adapter ด้วยโปรแกรม Trimmomatic 0.39 (Bolger *et al.*, 2014) จากนั้น นำดีเอ็นเอสายสั้นคุณภาพดี (clean read) ทั้งหมดมาคัดกรองสายดีเอ็นเอที่เป็นรหัสพันธุกรรมของข้าวออก ด้วยโปรแกรม Burrows-Wheeler Aligner, BWA (Li and Durbin, 2009) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมข้าว (*Oryza sativa*) ที่รายงานในฐาน

ข้อมูล NCBI (RefSeq assembly accession: GCF_001433935.1) ซึ่งเป็นสิ่งอ้างอิงเปรียบเทียบ (map align) นำดีเอ็นเอสายสั้นที่ได้ภายหลังการคัดกรอง (unmapped read) มาประกอบกันเป็นดีเอ็นเอสายยาว (scaffold) ด้วยวิธีที่ไม่ใช้จีโนมอ้างอิง (de novo assembly) โดยใช้โปรแกรม SPAdes 3.12.0 (Bankevich *et al.*, 2012)

4. การเปรียบเทียบโปรตีนของเชื้อ RGSV-PRI กับไวรัสชนิดอื่นในสกุล *Tenuivirus*

วิเคราะห์ดีเอ็นเอสายยาวเพื่อระบุชนิดของไวรัส ด้วยการค้นหาและเปรียบเทียบกับจีโนมไวรัสในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn และจัดทำจีโนมเชื้อไวรัสที่สมบูรณ์จนครบทั้ง 6 สาย จากนั้น นำมาวิเคราะห์หาค่าตำแหน่งเริ่มต้นและสิ้นสุดของการแปลรหัสเป็นโปรตีน (gene annotation) ด้วยโปรแกรม Open Reading Frame Finder (ORF finder) วิเคราะห์ชนิดไวรัสตามเกณฑ์แบ่งแยกสปีชีส์ของ ICTV (King *et al.*, 2012) โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ virion membrane–glycoprotein-like proteins (93.9 KDa) และ nucleocapsid proteins (35.6 KDa) กับไวรัสชนิดต่าง ๆ ในสกุล *Tenuivirus* ได้แก่ rice stripe tenuivirus (RStV), maize stripe tenuivirus (MStV), rice hoja blanca tenuivirus (RHBV), Iranian wheat stripe tenuivirus (IWSV) และ RGSV-IRRI ด้วยโปรแกรม ClustalW (Thompson *et al.*, 1994)

5. การหาความผันแปรบนจีโนมของเชื้อ RGSV -PRI

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครบสมบูรณ์ของจีโนมเชื้อ RGSV-PRI และจีโนมของไอโซเลท IRRI (NC_002323–002328) จากสาธารณรัฐฟิลิปปินส์ มาเปรียบเทียบกันแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW แล้ววิเคราะห์หาค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (variable site) บน RNA1-6 ทั้งส่วนที่ไม่แปลรหัส และส่วนที่เป็น

รหัสของยีน รวม 5 บริเวณ ดังนี้ 5'UTR, 3'UTR, IGR, ORF1 และ ORF2

6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวงศาคานวิวัฒนาการ

6.1 การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (concatenated genomic RNA)

เรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA 1-6 ของ RGSV-PRI ให้ต่อกันเป็นสายยาว (concatenate genome) สายเดียวและเรียงจีโนมจาก RNA1-6 เช่นเดียวกันนี้กับ RGSV อีก 4 ไอโซเลทที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI ได้แก่ ไอโซเลท IRRI (NC_002323–002328), South Cotabato (AB032180 AB023777 AB029894 AB023778–023780), ไอโซเลท Shaxian (AF509470 AB511072 AF397468 AF290946 AF290947 AF287949) และ ไอโซเลท FZ0403 (MF947494–94799) จัดทำไฟล์ Fasta เพื่อทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW สร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) โดยกำหนดค่า bootstrap 1,000 ครั้ง

6.2 การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอาร์เอ็นเอแต่ละสาย

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บน RNA 1-6 แบบแยกสาย ระหว่างเชื้อ RGSV-PRI กับ ไอโซเลทอื่นตามที่ระบุในข้อ 6.1 โดยใช้โปรแกรม ClustalW และสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA X โดยกำหนดค่า bootstrap 1,000 ครั้ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. แหล่งของเชื้อไวรัสโรคเขียวเตี้ย

ต้นข้าวพันธุ์ TN1 หลังจากได้รับการถ่ายทอดไวรัส RGSV-PRI 35 วัน แสดงอาการต้นเตี้ย กอที่แตกใหม่มีขนาดเล็ก ใบแคบสั้นและ

เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Figure 1A) การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของอาร์เอ็นเอจากใบข้าวที่เป็นโรคให้ผลเป็นบวก เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน pc5 ของเชื้อ RGSV ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส และให้ผลเป็นลบเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ RRSV (Figure 1B) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน pc5 (856 นิวคลีโอไทด์) จากเชื้อ RGSV-PRI มีความคล้ายคลึงกับยีน pc5 ของไอโซเลท PT010 (KF438757) และ SP002 (KF438715) จากประเทศไทย ผลการปลูกเชื้อ RGSV- PRI ให้กับข้าว *O. nivara* โดยใช้แมลง

พาหะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบอัตราเกิดโรค 80% (Figure 1C) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า RGSV- PRI เป็นสายพันธุ์รุนแรงคล้ายกับ RGSV2 ที่พบในสาธารณรัฐฟิลิปปินส์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chettanachit *et al.* (1985) ที่พบเชื้อ RGSV ในประเทศไทย แต่ยังไม่มียีนข้อมูลเพียงพอที่จะระบุว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกับ RGSV2 ที่พบในสาธารณรัฐฟิลิปปินส์ (Cabauatan *et al.*, 1985) จึงนำใบข้าวที่แสดงอาการมาใช้เป็นแหล่งของไวรัสในการสกัดอาร์เอ็นเอรวม และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งจีโนม



Figure 1 Rice grassy stunt tenuivirus (RGSV) infecting TN1 plants and virus detection. (A) Symptoms on infected rice plant 35 days-post inoculation with RGSV isolate PRI (right), and healthy plants (left). (B) Gel electrophoresis of PCR products obtained from diseased TN1 rice plants showing an expected gene fragment by using RGSV specific primers RGSV-P1/P2 (lane 5–8), but no product when using RRSV specific primers (lane 10–14). (C) Rice plants, *Oryza nivara* showed disease symptoms after RGSV transmission by brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal. (right) and healthy plants (left)

2. ปริมาณดีเอ็นเอสายสั้นที่ใช้จัดทำจีโนม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มีทั้งหมด 16,631 กิกะเบส (GB) ซึ่งมาจากดีเอ็นเอสายสั้น (short read) ที่มีความยาว 150 เบส จำนวนทั้งสิ้น 55,435,576 reads ดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพที่ระดับ Q30 มีค่า GC content เท่ากับ 35.08 % ดีเอ็นเอสายสั้นหลังการคัดกรองดีเอ็นเอของข้าวออกแล้ว (unmapped read) มีจำนวน 9,680,170 reads ผลการประกอบดีเอ็นเอสายยาวแบบไม่ใช้สิ่งอ้างอิงแล้วเปรียบเทียบกับ scaffold กับฐานข้อมูลเพื่อระบุชนิดไวรัสด้วยโปรแกรม Blastn พบอาร์เอ็นเอ 6 สาย ที่เหมือนกับ RNA1-6 ของเชื้อ RGSV-IRRI (NC_002323-002328)

ครอบคลุมจีโนมได้ถึง 100% โดยมีจำนวนซ้ำของข้อมูล ดังนี้ RNA1 มีจำนวน 32,077 ซ้ำ RNA2 มีจำนวน 30,519 ซ้ำ RNA3 มีจำนวน 90,186 ซ้ำ RNA4 มีจำนวน 84,406 ซ้ำ RNA5 มีจำนวน 91,116 ซ้ำ และ RNA6 มีจำนวน 55,761 ซ้ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Visser *et al.* (2016) ที่สรุปว่า จำนวนสายดีเอ็นเออย่างน้อย 500,000 reads ที่นำมาประกอบจีโนม ทำให้ครอบคลุมจีโนมได้มากกว่า 98% และ Zhao *et al.* (2018) รายงานว่า จำนวนซ้ำของการอ่านเบสตำแหน่งเดิม ระหว่าง 2,192–7,627 ครั้ง มีประสิทธิภาพเพียงพอในการประกอบจีโนมเชื้อ RSV ซึ่งเป็นสกุลเดียวกับ RGSV

3. ขนาดของจีโนมเชื้อ RGSV ไอโซเลท PRI

จีโนมเชื้อไวรัส RGSV-PRI ที่ประกอบขึ้นด้วยอาร์เอ็นเอจำนวน 6 สาย (RNA1-6) มีความยาวไม่เท่ากัน เมื่อรวมทั้งจีโนมมีความยาว 25,118 นิวคลีโอไทด์ (Figure 2) นำไปจัดบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ดังนี้ RNA1 (MW339662), RNA2 (MW339663), RNA3 (MW339664), RNA4 (MW339665), RNA5 (MW339666) และ RNA6 (MW339667) RNA 6 สาย มีการเรียงตัวของสองยีนแบบสองทิศทาง โครงสร้างจีโนมเรียงตามลำดับจากปลาย 5 ถึงปลาย 3 เริ่มจากบริเวณ 5'UTR ที่ไม่แปลรหัส ORF1 (sense) IGR (ส่วนที่ไม่แปลรหัส อยู่ระหว่างยีน) ORF2 (antisense) และ 3'UTR รายละเอียดดังแสดง ใน Table 1

ผลการเปรียบเทียบขนาดจีโนมของไอโซเลท PRI กับไอโซเลท IRRI ที่ใช้อ้างอิง (Toriyama *et al.*, 1997; 1998) มีความใกล้เคียงกัน โดยพบว่า

RNA1 ของทั้งสองไอโซเลทมีความยาวเต็มสายเท่ากัน ส่วน RNA2, RNA3 และ RNA6 ของไอโซเลท PRI มีความยาวมากกว่าไอโซเลท IRRI แต่ RNA4 และ RNA5 มีขนาดสั้นกว่า นอกจากนี้จีโนมของ PRI มีบริเวณ IGR ของ RNA3 ยาวมากที่สุด ขณะที่ IGR ของ RNA1 นั้นสั้นที่สุดในภาพรวมไอโซเลท PRI สั้นกว่าไอโซเลท IRRI อยู่ 24 นิวคลีโอไทด์ (Figure 2 และ Table1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท PRI บริเวณที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีนมีความผันแปรมากกว่าบริเวณที่แปลรหัสเป็นโปรตีน เช่นเดียวกับที่พบในจีโนมเชื้อ RGSV ที่ได้จากภาคใต้และภาคเหนือของสาธารณรัฐฟิลิปปินส์ (Miranda *et al.*, 2000) นอกจากนี้ RNA3 ของเชื้อ RGSV ไอโซเลท PRI มีความผันแปรสูงคล้ายกับ RGSV ที่พบหลายไอโซเลทในประเทศเวียดนาม (Ta *et al.*, 2013)

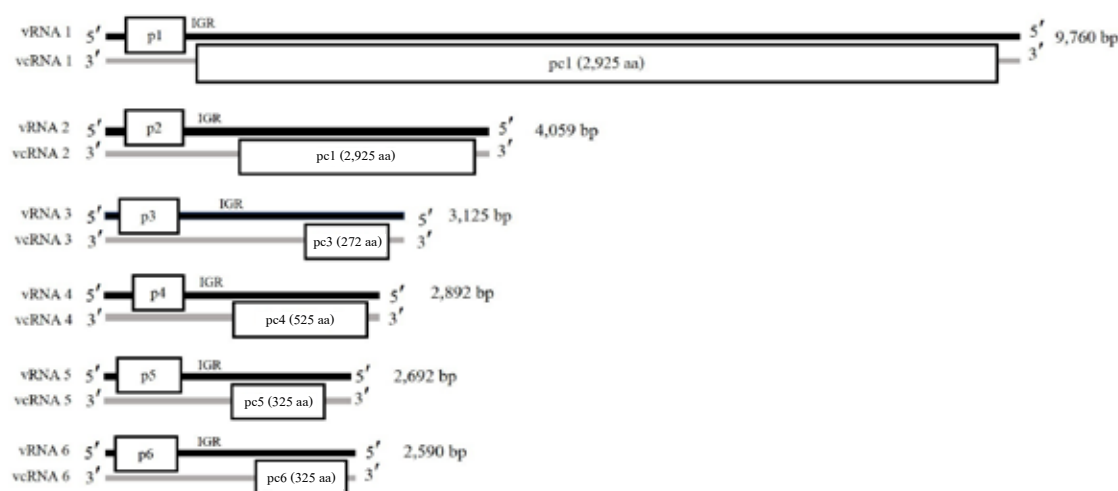


Figure 2 Genome organization characteristics of RGSV-PRI consisted of six RNAs (RNA1-6) and their nucleotide length (bp). Boxes indicated the gene and protein positions on each RNA (dense lines). The number of amino acid residues, p1-p6 are displayed on viral strands (vRNA), and pc1- pc6 on the viral complementary strands (vcRNA)

4. การเปรียบเทียบโปรตีนของเชื้อ RGSV-PRI กับไวรัสชนิดอื่นในสกุล *Tenuivirus*

ใช้โปรตีน virion membrane-glycoprotein

like proteins (VMP) บน RNA 2 และ nucleocapsid protein (NCP) บน RNA 5 ในการเปรียบเทียบเชื้อ RGSV-PRI กับไวรัสอื่นอีก 4 ชนิดใน

Table 1 The result of nucleotide and amino acid sequence comparison between RGSV isolates PRI and IIRI

RNA		Regions in RNA genome							Total
		5' UTR	ORF1		IGR	ORF2		3' UTR	
			nt	aa		nt	aa		
1	Number of total ^a	165/165	501/501	166/66	108/108	8778/8778	2,925 2,925	208/208	9,720/9,760
	Number of differences ^b	7	18	7/166	6	181	15	4	216
	% of differences ^e	4.24	3.59	4.21	5.55	2.06	0.51	1.92	2.21
2	Number of total ^a	210/209	603/603	200/200	570/568	2,469/2,469	822/822	207/207	4,059/4,056
	Number of differences ^b	12	16	4	76	65	12	6	175
	% of differences ^e	5.71	2065	2	13.33	2.63	1.45	2.89	4.31
3	Number of total ^a	159/159	588/588	195/195	1,384/1,382	819/819	272/272	175/175	3,125/3,123
	Number of differences ^b	2	21	7	100	38	28	10	171
	% of differences ^e	1.26	3.57	3.58	7.22	4.63	10.29	5.71	5.47
4	Number of total ^a	227/227	498/498	165/165	508/510	1,578/1,578	525/525	81/102	2,892/2,915
	Number of differences ^b	8	8	1	32	62	21	28	133
	% of differences ^e	3.52	1.60	0.6	6.29	3.92	4	34.56	4.59
5	Number of total ^a	103/103	576/576	191/191	867/867	978/978	325/325	168/169	2,692/2,704
	Number of differences ^b	1	16	6	50	22	1	1	90
	% of differences ^e	0.97	2.77	3.14	5.76	2.25	0.3	0.59	3.34
6	Number of total ^a	74/74	540/540	179/179	919/913	978/978	325/325	79/79	2,590/2,584
	Number of differences ^b	0	9	0	65	18	1	0	92
	% of differences ^e	none	1.66	none	7.07	1.84	0.3	none	3.54

UTR, untranslated region; ORF1 on the genome strand; IGR, intergenic region; ORF2 on the complementary strand.

^a PRI isolate/IIRI isolate

^b Each nucleotide substitution, deletion, and insertion between the two isolates was counted as 1

^c The number of different nucleotide (nt) or amino acid (aa) was divided by the number of total of the PRI isolate in each region.

สกุล *Tenuivirus* ได้แก่ RSV MStV RHBV และ IWSV ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้แยกชนิดไวรัสที่ต่างกันในกลุ่ม *Tenuivirus* ต้องมีความเหมือนของโปรตีนสองส่วนนี้ต่ำกว่า 85% (King *et al.*, 2012) พบว่าโปรตีน VMP มีความเหมือนกันเพียง 23.4–25% และโปรตีน NCP 22.9–26.5% แต่เหมือนกับโปรตีนของเชื้อ RGSV-IIRI 98.5 และ 99.7% ตามลำดับ (Figure 3) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์รวมทั้งจีโนม พบว่า มีความคล้ายคลึงกัน 96.6% จึงจัดให้ RGSV-PRI เป็น variant ของ RGSV-IIRI

5. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และหาความผันแปรของเชื้อ RGSV

เชื้อ RGSV ไอโซเลท PRI กับ IIRI มีความแตกต่างของจีโนม RNA1-6 ในอัตรา 2.21, 4.31, 5.47, 4.59, 3.34 และ 3.54% ตามลำดับ (Table 1) บริเวณ IGR ที่ไม่แปลรหัสมีความผันแปรมากกว่าบริเวณที่แปลรหัส (ORF) โดยที่ IGR บน RNA2 มีความผันแปรของนิวคลีโอไทด์สูงสุด (13.33%) ORF2 บน RNA3 มีความผันแปรของนิวคลีโอไทด์สูงสุด 4.63 % และกรดอะมิโน 10.29% บริเวณ 5'UTR และ 3'UTR บน RNA6 ไม่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และพบว่า บริเวณ 3'UTR ของ RNA4 มีขนาดสั้นกว่าของไอโซเลท IIRI อยู่ 21 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเกิดจากการหายไปของเบส AAAAAAG จำนวนสามซ้ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Miranda *et al.* (2000)

virion membrane-glycoprotein like proteins (% identity)

	RGSV-PRI	RGSV-IRRI	RSV	MStV	RHBV	IWSV
nucleocapsid protein (% identity)						
RGSV-PRI		98.5	23.6	23.4	23.5	25
RGSV-IRRI	99.7		23.6	23.2	23.3	25.2
RSV	22.9	22.5		53.5	45.1	44.4
MStV	26.5	26	65.2		44.1	44.1
RHBV	24.7	25.1	48.4	48.9		69.1
IWSV	23.5	23.5	47.4	44.3	71.1	

Figure 3 The matrix presenting amino acid identity between virion membrane–glycoprotein–like proteins (upper diagonal black boxes) and nucleocapsid protein (lower diagonal black boxes) encoded by RGSV-PRI, RGSV-IRRI and the other tenuivirus species, RSV, MStV, RHBV and IWSV

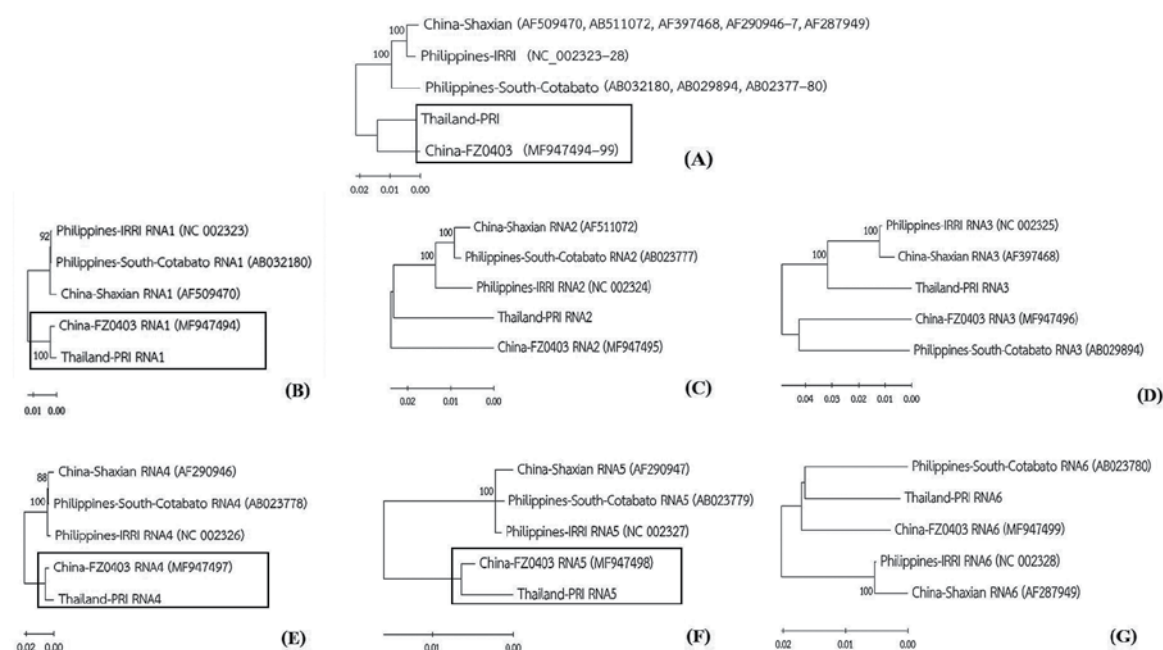


Figure 4 The Maximum Likelihood phylogenetic analysis presenting the evolutionary relationship among five RGSV isolates; PRI, IRRI, FZ0403, South Cotabato, and Shaxian built by MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) based on nucleotide sequence alignment of six RNA segments. (A) Concatenated genome, (B) RNA1, (C) RNA2 (D) RNA3, (E) RNA4, (F) RNA5, (G) RNA6. The 1000 bootstrap replication was applied to calculate the statistical support for each clade

6. การศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อ RGSV-PRI

แผนภูมิวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (Figure 4A) ชี้ให้เห็นว่า ไอโซเลท PRI กับ FZ0403 มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด และพบความสัมพันธ์เช่นเดียวกันนี้เมื่อวิเคราะห์แบบแยกสาย RNA1 RNA4 และ RNA5 (Figure 4B, 4E และ 4F) ในขณะที่ phylogenetic tree ที่สร้างจาก RNA2 RNA3 และ RNA6 แสดงความสัมพันธ์ที่แตกต่างออกไป กล่าวคือ RNA 2 ของไอโซเลท PRI อยู่ในคลัด (clade) เดียวกับไอโซเลท Shaxian South Cotabato และ IRRI (Figure 4C) RNA3 ของไอโซเลท PRI อยู่ในคลัดเดียวกับไอโซเลท Shaxian และ IRRI (Figure 4D) แต่แยกออกจาก South Cotabato ส่วน RNA6 ของไอโซเลท PRI มีความใกล้เคียงกับไอโซเลท South Cotabato (Figure 4G) ปัจจัยของการเกิดความผันแปรของนิวคลีโอไทด์อาจมาจากการย้ายถิ่นของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศในคาบสมุทรอินโดจีน (Hereward *et al.*, 2020) ซึ่งในกรณีของไอโซเลท PRI จากการวิเคราะห์วงศ์วานวิวัฒนาการ พบว่า จับกลุ่มใกล้เคียงกับไอโซเลท FZ0403 อาจเนื่องมาจากแมลงพาหะ ทั้งนี้ Hereward *et al.* (2020) ได้รายงานการศึกษาจีโนมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในทวีปเอเชียพบว่า คาบสมุทรอินโดจีนเป็นแหล่งสำคัญของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่อพยพไปเซตอปุ่นของสาธารณรัฐประชาชนจีน

สรุปผลการทดลอง

เชื้อไวรัส RGSV ไอโซเลท PRI ที่แยกจากต้นข้าวเป็นโรคจาก จ. ปราจีนบุรี ก่อให้เกิดลักษณะอาการของโรคเหี่ยวเฉาต้นข้าว และจัดเป็นสายพันธุ์รุนแรง (RGSV2) เมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยี RNA-Seq พบว่าจีโนมที่ครบสมบูรณ์มีขนาด 25,118 นิวคลีโอไทด์

ประกอบด้วย RNA 6 สาย แต่ละสายมีบริเวณที่แปลรหัส 2 ยีน ที่เรียงตัวแบบสองทิศทาง เชื้อ RGSV-PRI มีความผันแปรของนิวคลีโอไทด์บน RNA1 RNA4 และ RNA5 น้อยกว่า RNA2 RNA3 และ RNA6 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อ RGSV-PRI ด้วยข้อมูลทั้งจีโนม พบว่า มีความใกล้เคียงมากที่สุดกับไอโซเลท FZ0403 จากสาธารณรัฐประชาชนจีน เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบแยกสายโดยใช้ RNA2 และ RNA3 พบว่า ใกล้เคียงกับไอโซเลท IRRI จากสาธารณรัฐฟิลิปปินส์ แต่ RNA6 ใกล้เคียงกับไอโซเลท South Cotabato จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเป็นไปได้ของการสลับยีน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุน จากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) โครงการทุนปริญญาเอกเฉลิมพระเกียรติทรงครองราชย์ 70 ปี ประจำปี พ.ศ. 2560 เลขที่ รท 24/2561 และโครงการโมบายแอปพลิเคชันเพื่อการวินิจฉัยโรคข้าวโดยใช้การวิเคราะห์ภาพถ่ายและปัญญาประดิษฐ์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สนับสนุนสถานที่ และเครื่องมือปฏิบัติงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สุชาติ ปัญญาวัด. 2547. ความหลากหลายของรหัสพันธุกรรมในจีโนมเส้นที่ 5 และเส้นที่ 8 ของไวรัสโรคใบหงิกข้าวในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 66 หน้า.

- Bankevich A., S. Nurk, D. Antipov, A.A Gurevich, M. Dvorkin, A.S Kulikov, V.M Lesin, S.I Nikolenko, S Pham, A.D. Prjibelski, A.V. Pyshkin, A.V. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M.A. Alekseyev and P.A. Pevzner. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Comput Biol.* 19(5): 455-477.
- Bolger, A.M., M. Lohse and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 30(15): 2114-2120.
- Cabauatan, P.Q., H. Hibino, D.B. Lapis, T. Omura and T. Tsuchizaki. 1985. *Rice Grassy Stunt Virus 2: A New Strain of Rice Grassy Stunt in the Philippines*. IRRI Research Paper Series No. 106. 8 p.
- Chao, S.; H. Wang, Q. Yan, L. Chen, G. Chen, Y. Wu, B. Meng, L. Jin, X. Zhu and G. Feng. 2021. Metatranscriptomic sequencing suggests the presence of novel RNA viruses in rice transmitted by brown planthopper. *Viruses.* 13(12): 2464.
- Chen, C.C. and R.J. Chiu. 1982. Three symptomatologic types of rice virus diseases related to grassy stunt in Taiwan. *Plant Dis.* 66: 15-18.
- Chettanachit D., M. Putta, W. Balaveang, J. Hongkajorn and S. Disthaporn. 1985. New rice grassy stunt virus (GSV) strain in Thailand. *Int. Rice Res. Notes.* 10(2): 10-11.
- Falk, B.W. and J.H. Tsai. 1998. Biology and molecular biology of viruses in the genus *Tenuivirus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36(1): 139-163.
- Hereward, J.P., X. Cai, A.M.A. Matias, G.H. Walter, C. Xu and Y. Wang. 2020. Migration dynamics of an important rice pest: The brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) across Asia-Insights from population genomics. *Evol. Appl.* 13(9): 2449-2459.
- Hibino, H., P.Q. Cabauatan, T. Omura and T. Tsuchizaki. 1985a. Rice grassy stunt virus strain causing tungrolike symptoms in the Philippines. *Plant Dis.* 69(6): 538-541.
- Hibino, H., T. Usugi, T. Omura, T. Tsuchizaki, K., Shohara and M. Iwasaki. 1985b. Rice grassy stunt virus: a planthopper-borne circular filament. *Phytopathology.* 75: 894-899.
- Hiraguri, A., O. Netsu, T. Shimizu, T. Uehara Ichiki, T. Omura, N. Sasaki, H. Nyunoya and T. Sasaya. 2011. The nonstructural protein pC6 of rice grassy stunt virus trans complements the cell-to-cell spread of a movement-defective tomato mosaic virus *Arch.Virol.* 156(5): 911-916.
- King, A.M. Q., M.J. Adams, E.B. Carstens and E.J. Lefkowitz. 2012. Virus Taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1327 p.
- 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(6): 1547-1549.
- Ling, K.C., V.M. Aguiro and S.H. Lee. 1970. A mass screening method for testing resistance to grassy stunt disease of rice. *Plant Dis. Rep.* 54(7): 565-569.
- Ling, K.C. 1972. *Rice Virus Diseases*. Los Banos, Philippines: IRRI. 142 p.
- Li, H. and R. Durbin. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 25(14): 1754-1760.
- Miranda, J.G., O. Azzam and Y. Shirako. 2000. Comparison of nucleotide sequences between northern and southern Philippine isolates of rice grassy stunt virus indicates

- occurrence of natural genetic reassortment. *Viol.* 266(1): 26-32.
- Nguyen, T.D., S. Lacombe, M. Bangratz, H.A. Ta, D.N. Vinh, P. Gantet and C. Brugidou. 2015. P2 of Rice grassy stunt virus (RGSV) and p6 and p9 of Rice ragged stunt virus (RRSV) isolates from Vietnam exert suppressor activity on the RNA silencing pathway. *Virus Genes*. 51(2): 267-275.
- Schmieder, R. and R. Edwards. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 27(6): 863-864.
- Shikata, E., T. Senboku and T. Ishimizu. 1980. The causal agent of rice grassy stunt disease. *Proc Jpn Acad, Ser B*. 56(2): 89-94.
- Ta, H.A., D.P. Nguyen, S. Causse, T.D. Nguyen, V.V. Ngo and E. Hbrard. 2013. Molecular diversity of Rice grassy stunt tenuivirus in Vietnam. *Virus Genes*. 46(2): 383-386.
- Takahashi, M., S. Toriyama, Y. Kikuchi, T. Hayakawa and A. Ishihama. 1990. Complementarity between the 5' and 3' terminal sequences of rice stripe virus RNAs. *J. Gen. Virol.* 71(12): 2817-2821.
- Thompson, J. D., D.G., Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22(22): 4673-4680.
- Toriyama, S. 1987. Ribonucleic acid polymerase activity in filamentous nucleoproteins of rice grassy stunt virus. *J. Gen. Virol.* 68: 925-929.
- Toriyama, S., M. Takahashi, Y. Sano, T. Shimizu and A. Ishihama. 1994. Nucleotide sequence of RNA1, the largest genomic segment of rice stripe virus, the prototype of the tenuiviruses. *J. Gen. Virol.* 75(12): 3569-3579.
- Toriyama, S., T. Kimishima and M. Takahashi 1997. The proteins encoded by rice grassy stunt virus RNA5 and RNA6 are only distantly related to the corresponding proteins of other members of the genus *Tenuivirus*. *J. Gen. Virol.* 78: 2355-2363.
- Toriyama, S., T. Kimishima, M. Takahashi, T. Shimizu, N. Minaka and K. Akutsu. 1998. The complete nucleotide sequence of the rice grassy stunt virus genome and genomic comparisons with viruses of the genus *Tenuivirus*. *J. Gen. Virol.* 79(8): 2051-2058.
- Visser, M., R. Bester, J.T. Burger and H.J. Maree. 2016. Next-generation sequencing for virus detection: covering all the bases. *Virol. J.* 13(1): 1-6.
- Wathanakul, L. and P. Weerapat. 1969. Virus diseases of rice in Thailand. pp. 78-85. In: The Virus Diseases of the Rice Plant. Proceedings of a symposium at the International Rice Research Institute, April, 1967. Baltimore, Maryland, USA: John Hopkins Press.
- Zhang, C., X.J. Liu, K.C. Wu, L.P. Zheng, Z.M. Ding, F. Li, P. Zou, L. Yang, J. Wu and Z.J. Wu. 2015. Rice grassy stunt virus nonstructural protein p5 serves as a viral suppressor of RNA silencing and interacts with nonstructural protein p3. *Arch. Virol.* 160 (11): 2769-2779.
- Zhao, W., Z. Xu, X. Zhang, M. Yang, L. Kang, R. Liu and F. Cui. 2018. Genomic variations in the 3-termini of Rice stripe virus in the rotation between vector insect and host plant. *New Phytol.* 219(3): 1085-1096.