รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยอนุกรมวิธานชีววิทยาและการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

2. โครงการวิจัย : วิจัยอนุกรมวิธานชีววิทยาและการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

กิจกรรม : ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ (วงจรชีวิต การเข้าทำลาย พืชอาหาร และการแพร่กระจาย)

กิจกรรมย่อย : ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของโรคพืช

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อ *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) ที่เข้าทำลายพริกในประเทศไทย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Biological and molecular characterization of *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) infecting pepper in Thailand

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: นายภูวนารถ มณีโชติ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	: นางเกสศสุดา สนศิริ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาววาสนา รุ่งสว่าง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาววิจิตรา โชคบุญ	สำนักวิจัยและพัฒนาการการเกษตรเขตที่ 6

5. บทคัดย่อ :

พริก (*Capsicum annuum*) เป็นพืชที่นิยมชนิดหนึ่งของประเทศไทย โรคเส้นใบเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ก่อความเสียหายต่อผลผลิตพริกในหลายประเทศ การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติด้านชีววิทยาในการตอบสนองของพริกต่อเชื้อไวรัส และด้านชีวโมเลกุลของเชื้อ PeVYV ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการใบม้วนขึ้น ข้อปล้องสั้น และเนื้อใบระหว่างเส้นใบเหลือง จากแปลงปลูกในกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา และศรีสะเกษ จำนวน 42 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ PeVYV จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น 3 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต BKK (กรุงเทพมหานคร) ไอโซเลต SBR (สุพรรณบุรี) และ ไอโซเลต KBR (กาญจนบุรี) ในงานวิจัยนี้ใช้ไอโซเลต BKK ศึกษาการตอบสนองของพริกต่อเชื้อไวรัส พบว่าพริกแสดงอาการใบม้วนขึ้นและเนื้อใบเหลืองชัดเจนหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ 20 วัน จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *CP* ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่ายีน *CP* มีขนาด 621 นิวคลิโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 206 เรซดิวส์ มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99% - 99.5% ตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์

กรมวิชาการเกษตร

Phylogenetic tree ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *CP* พบว่าเชื้อ PeVYV ที่แยกได้จากพริกของไทยจับกลุ่มใกล้ชิดกันและแยกออกจากเชื้อ PeVYV ที่พบในต่างประเทศ

Abstract :

Pepper (*Capsicum annum*) is an important crop in Thailand. Pepper yellows disease caused by *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) is one of the most important plant viruses infecting pepper crop worldwide. The aims of this research are 1) biological characterization of PeVYV based on host responses against virus infection and 2) molecular characterization of *CP gene*. The 42 samples showing upward leaf curling, internodal shortening and interveinal yellowing were collected from fields in Bangkok, Kanchanaburi, Suphan Buri, Ayutthaya and Srisaket Province. Seven samples were positive for PeVYV infected by RT-PCR. Symptoms on pepper induced by isolate BKK displayed upward leaf curling and interveinal yellowing at 20 days posted inoculation. By the complete of *CP gene* of three isolates namely, isolate BKK (Bangkok), SBR (Suphan Buri) and KBR (Kanchanaburi) were identified as *Pepper vein yellows virus*. The *CP gene* were 621 nucleotides which encoded 206 amino acid residues, shared 99.2% - 99.8% and 99% - 99.5% sequence identities, respectively. Neighbor joining phylogenetic tree of nucleotide and amino acid sequences clustered Thai isolates of PeVYV together and separate them from PeVYV isolates found in other countries.

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

พริกจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการปลูกอย่างกว้างขวางตามแหล่งต่างๆ ทั่วโลก ปัญหาโรคไวรัสก่อให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตพริกเป็นอย่างมาก ซึ่งพบว่ามีเชื้อไวรัสอย่างน้อย 68 ชนิดที่สามารถเข้าทำลายต้นพริก (Knierim *et al.*, 2013) สำหรับประเทศไทยเชื้อไวรัสที่ก่อความเสียหายให้กับพริกมากที่สุดได้แก่ *Cucumber mosaic virus*, *Chilli veinal mottle virus*, *Tobacco mosaic virus*, *Pepper yellow leaf curl virus*, *Capsicum chlorosis virus* (กรมวิชาการเกษตร, 2552) และ *Tomato necrosis virus* (Chiemsombat *et al.*, 2010; Hassani-mehraban *et al.*, 2011) และในปี 2556 Knierim *et al.* (2013) พบว่าพริกตามแหล่งปลูกพริกในจังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี แสดงอาการใบด่าง ใบเหลือง ใบด่างประ เส้นใบเหลือง ใบลดรูปและเสียรูปและลำต้นแคระแกรน เมื่อตรวจวิเคราะห์แล้วพบว่าเป็นเชื้อ *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) ถือว่าเป็นรายงานการพบเชื้อไวรัสชนิดนี้ครั้งแรกในประเทศไทย

เชื้อ PeVYV จัดอยู่ในแฟมิลี่ *Luteoviridae* จีนัส *Polerovirus* มีรายงานการพบในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น (Yohana *et al.*, 1995) อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน ไทย (Knierim *et al.*, 2013) สหรัฐอเมริกา (Villanueva *et al.*, 2013: Alabi *et al.*, 2015) ซูดาน (Alfaro-Fernández *et al.*, 2014) จีน (Tan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015) และออสเตรเลีย (Maina *et al.*, 2016) ต้นพริกที่ติดเชื้อ PeVYV ซึ่งอาการที่ปรากฏบนพริกจะมีความแตกต่างกันออกไป เช่น ลำต้นแคระแกรน ใบด่าง ใบเหลือง เส้นในใส เส้นใบเหลือง ใบหงิก ข้อปล้องสั้น และใบม้วนขึ้นคล้ายกับขาดธาตุแมกนีเซียม

เชื้อไวรัส PeVYV สามารถถ่ายทอดโรคโดยการเสียบกิ่ง และมีแมลงพวกเพลี้ยอ่อนฝ้าย (Aphis gossypii) เป็นพาหะในการถ่ายทอดโรค ความสัมพันธ์ในการถ่ายทอดโรคระหว่างเชื้อไวรัสกับเพลี้ยอ่อนเป็นแบบ circulative persistent manner (Murakami *et al.*, 2017; Murakami *et al.*, 2011; Yohana *et al.*, 1995)

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาคุณสมบัติด้านชีววิทยาในการตอบสนองของพริกต่อเชื้อไวรัส รวมทั้งด้านชีวโมเลกุลของเชื้อ PeVYV เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับเป็นองค์ความรู้เพื่อเผยแพร่สู่เกษตรกรและการจัดการโรคไวรัสในพริก

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคเส้นใบเหลือง
2. สารเคมี
   - ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์สารพันธุกรรมเชื้อไวรัส
   - ไนโตรเจนเหลว
   - ชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan)
   - One Step RT-PCR kit (Biotechrabbit, Germany)
   - 100 bp DNA Ladder with 6X Loading Dye (Biotechrabbit, Germany)
   - Agarose gel (SeaKem, USA)
   - RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)
   - 1X TAE Buffer
3. เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์
   - โกร่งบดตัวอย่างพืช
   - เครื่องปั่นตกตะกอน Mini Spin (Eppendorf, USA)
   - เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ Pipetman Kit (Gilson, France)
   - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
   - เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Thermo cycler

กรมวิชาการเกษตร

- เครื่องแยกสารพันธุกรรม Wide Mini-Sub Cell GT Basic System (Biorad, USA)
- เครื่อง ChemiDoc Gel Imaging System (BioRad, USA)
- เครื่องผสมสาร Vortex mixer (Fisher Scientific, USA)
- หลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร
- หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มล. และ 2 มล.

- วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรค

สำรวจและเก็บตัวอย่างพริกที่มีลักษณะอาการใบด่าง ใบเหลือง เส้นใบใส และเสียรูป จากแหล่งปลูกพริกจากที่ต่างๆ ได้แก่ จังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก สุพรรณบุรี เชียงใหม่ และเชียงราย โดยการสำรวจ ในพื้นที่ประมาณ 2 ไร่ ทำการสำรวจทุกแถวปลูก ในกรณีที่พื้นที่สำรวจมีพื้นที่มากกว่า 2 ไร่ขึ้นไป จะทำการสุ่มสำรวจโดยสำรวจแถวเว้นแถว พร้อมทั้งถ่ายภาพในแปลงปลูก ลักษณะอาการที่พบในพริกและบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืช

สกัดอาร์เอ็นเอรวมด้วยชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งใบพริกแต่ละตัวอย่างให้มีปริมาณ 100 มิลลิกรัม แล้วบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วย้ายมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมบัพเฟอร์ FARB ปริมาตร 500 มิลลิลิตรและเติม Mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. ย้ายส่วนของพืชมาใส่ Filter Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นดูดส่วนของเหลวใสใส่ใน Collection tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. เติม 70% Ethanol ปริมาตร 1 เท่าของทิ้งส่วนของเหลวใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันแล้วย้ายมาใส่ใน FARB Mini Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส
4. ล้างอาร์เอ็นเอครั้งที่ 1 ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลวใส จากนั้นล้างอาร์เอ็นเอครั้งที่ 2 ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที
5. นำ FARB Column มาวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บอาร์เอ็นเอรวมที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

3. ไพรเมอร์และการสังเคราะห์ยีน *CP* บางส่วน (3′ end of *CP* gene) และยีน *CP*

1. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *CP* บางส่วนของไวรัส โดยใช้ไพรเมอร์ที่รายงานโดย Sharman *et al*. (2015) ซึ่งจะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 370 คู่เบส

Forward primer Pol3870F : 5'- ATCACBTTCGGGCCGWSTYTWTCAGA -3'

Reverse primer AS3 : 5'- CACGCGTCIACCTATTTIGGRTTITG -3'

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *CP* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลิโอไทด์ของ PeVYV ของประเทศญี่ปุ่นในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB594828) ซึ่งจะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 621 คู่เบส

Forward primer PeVYV-CPF 5'- ATGAATACGGGAGGGGTTAG -3'

Reverse primer PeVYV-CPR 5'- ACATCATAGACCAGGGGGGGG -3'

ส่วนผสมของ One step RT-PCR ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Nuclease free water	5	ไมโครลิตร
2x One step Mix	10	ไมโครลิตร
10 pmole Pol3870F	0.5	ไมโครลิตร
10 pmole AS3	0.5	ไมโครลิตร
20x RT-RI Blend	1	ไมโครลิตร
RNA template	3	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

1) First strand synthesis	50 °C	20 นาที
Predenaturation	95 °C	2 นาที
2) Three step-cycling 35 cycles		
Denaturation	95 °C	20 วินาที
Annealing	55 °C	20 วินาที
Extension	72 °C	45 วินาที
3) Final extension	72 °C	5 นาที

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม Redsafe Nucleic Acid Straining Solution ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, USA)

กรมวิชาการเกษตร

4. การโคลนยีน

แยกดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบขนาดและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis เชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ พลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega, USA) โดยเติมดีเอ็นเอ 150 นาโนกรัม, T4 DNA ligase buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, pGEM-T easy vector 50 นาโนกรัม และ T4 DNA ligase 3 Units รวมปริมาตรสาร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ JM109 โดยใช้วิธี heat shock transformation คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีน *CP* ด้วยวิธี blue-white selection แล้วตรวจสอบโคลนของพลาสมิดสายผสมที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาวจำนวน 10 โคโลนีและสีฟ้า 1 โคโลนี มาผสมน้ำปริมาตร 8 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วตรวจสอบยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน CPของเชื้อ PeVYV

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนโปรตีน CP

วิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR มาจำแนกยีนด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/Blast) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ PeVYV ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีนโปรตีนด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ PeVYV ไอโซเลตต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al*., 2018)

6. การศึกษาการตอบสนองของพืชอาศัยต่อเชื้อไวรัส

ศึกษาการตอบสนองและลักษณะอาการของเชื้อไวรัสในพริกขี้หนูสวน โดยนำเพลี้ยอ่อนที่ปราศจากเชื้อ PeVYV มาทำให้อดอาหารในจานเลี้ยงเชื้อสะอาดประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเพลี้ยอ่อนที่อดอาหารมาปล่อยลงบนต้นมันพริกที่มีเชื้อ PeVYV เพื่อให้ดูดกินน้ำเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเพลี้ยอ่อนมาปล่อยลงบนต้นพริกปกติที่ปราศจากเชื้อ PeVYV จำนวน 10 ตัวต่อต้น นาน 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกำจัดเพลี้ยอ่อนโดยการพ่นสารเคมีกำจัดเพลี้ยอ่อน แล้วนำต้นพริกมาเก็บไว้ในกรงกันแมลง แล้วบันทึกผลโดยบันทึกระยะเวลาที่ต้นพืชทดสอบแสดงแสดงอาการของโรค บันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืช และบันทึกภาพอาการที่ปรากฏ จากนั้นนำพืชทดสอบมาตรวจหาเชื้อ PeVYV ในต้นพริกด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ตามวิธีการข้อ 3

เวลาที่ทำการทดลอง - ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

กรมวิชาการเกษตร

สถานที่ทำการทดลอง 1. แปลงปลูกพริกในจังหวัดกรุงเทพมหานคร สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ศรีสะเกษ และพระนครศรีอยุธยา
2. ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
3. โรงเรือนพืชทดลอง กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
4. โรงเรือนเลี้ยงแมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ตัวอย่างพริกเป็นโรคเส้นใบเหลือง

ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการอาการเนื้อใบเหลืองคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร เส้นใบเขียว และใบเสียรูปทรง จากแปลงปลูกพริกในจังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 30 ตัวอย่าง กาญจนบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง กรุงเทพมหานคร จำนวน 3 ตัวอย่าง และพระนครศรีอยุธยา จำนวน 4 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1) รวมทั้งสิ้น 42 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค One Step RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *CP* บางส่วน (3' end of CP gene) ของเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Polerovirus* ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสขนาด 370 คู่เบส (Sharman *et al.,* 2015) จากจังหวัดกาญจนบุรี 1 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง และกรุงเทพมหานคร 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 2) ส่วนตัวอย่างพริกจากจังหวัดศรีสะเกษและพระนครศรีอยุธยา ปรากฏว่าไม่พบตัวอย่างที่เป็นโรคเส้นใบเหลือง

ลักษณะอาการของพริกที่ตรวจพบเชื้อ PeVYV ครั้งนี้พบว่ามีอาการเหมือนกับที่รายงานในต่างประเทศ เช่น อินเดีย อินโดนีเซี ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน (Knierim *et al*., 2013) ถึงแม้ตัวอย่างพริกที่พบในจังหวัดพระนครศรีอยุธยาและศรีสะเกษจะมีอาการเหมือนกันแต่ไม่พบว่าเป็นโรคเส้นใบเหลือง เนื่องจากนี้ลักษณะอาการใบเหลืองพริกอาจเกิดจากการขาดธาตุอาหารหรือสามารถเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น เชื้อ CMV หรือเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Potyvirus* และ *Crinivirus* เป็นต้น (Tsai *et al*., 2008)

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *CP*

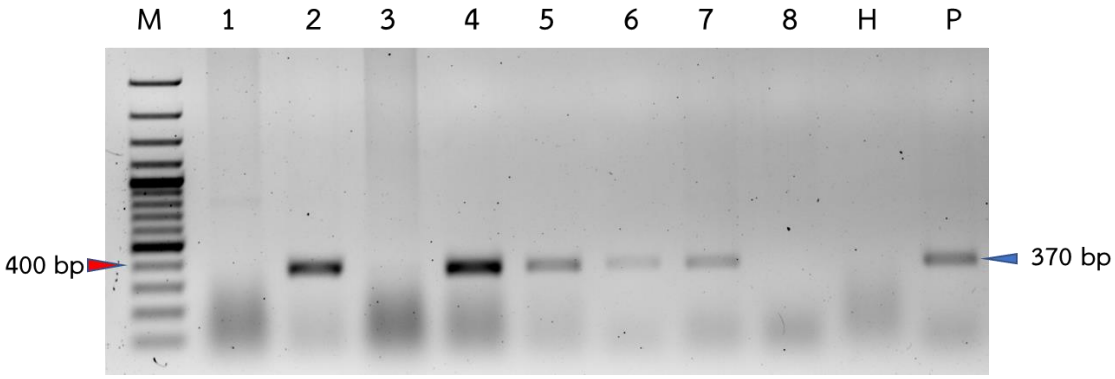
จากการทำวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *CP* (P3 ORF) ของเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร (BKK) ไอโซเลตกาญจนบุรี (KBR) และไอโซเลตสุพรรณบุรี (SBR) พบว่า ยีน *CP* ของทั้ง 3 ไอโซเลต มีขนาด 621 นิวคลิโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 206 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 22.94 - 22.97 กิโลดาลตัน

จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลิโอไทด์ (ภาพที่ 3) และกรดอะมิโนของโปรตีน CP (ภาพที่ 4) พบว่าเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลตของไทยมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99% - 99.5% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเชื้อ PeVYV ที่พบในต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น อิสราเอล จีน ออสเตรเลีย สเปน

กรมวิชาการเกษตร

มาเลเซีย และอินโดนีเซีย พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ระดับ 92.9% - 98.9% และกรดอะมิโนที่ระดับ 95.1% - 100% (ตารางผนวกที่ 1) และการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *CP* พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตของไทยจับกลุ่มใกล้ชิดกันและแยกออกจากเชื้อไอโซเลตอื่นที่พบในต่างประเทศ (ภาพที่ 5) และยังพบว่าทั้ง 3 ไอโซเลตของไทยยังจับกลุ่มอยู่ร่วมกับไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในเอเชีย (Asian population) เช่นกับเดียวรายงานของ Liu *et al*. (2015)

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของพริกที่แสดงอาการใบเหลือง ใบเสียรูปทรง ใบม้วนงอขึ้น พบในแปลงปลูกพริก ก : กาญจนบุรี, ข : สุพรรณบุรี, ค : กรุงเทพมหานคร, ง-จ : พระนครศรีอยุธยา และ ฉ : ศรีสะเกษ



ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอของยีน *CP* บางส่วน มีขนาด 370 คู่เบส (ลูกศรสีน้ำเงิน) ที่เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค One Step RT-PCR

M : 100 bp DNA ladder (Biotechrabbit, Germany)

1-3 : ตัวอย่างพริกในแปลงจังหวัดกาญจนบุรี

4 และ 8 : ตัวอย่างพริกในแปลงจังหวัดสุพรรณบุรี

5-7 : ตัวอย่างพริกที่พบในกรุงเทพมหานคร

H : พริกปกติ (Negative control)

P : ตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control)

กรมวิชาการเกษตร

```
KBR-CP      ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC    60
PKR-P3      ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC    60
SBR-CP      ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC    60
            ************************************************************

KBR-CP      CGTCGTAGACGCCCACGACAGGTTCGCCCTGTCGTTGTGGTCGCACCCCCTGGGCGCACA   120
BKK-CP      CGTCGTAGACGCCCACGACAGGTTCGCCCTGTCGTTGTGGTCGCACCCCCTGGGCGCACA   120
SBR-CP      CGTCGTAGACGCCCACGACAGGTTCGCCCTGTCGTTGTGGTCGCACCCCCTGGGCGCACA   120
            ************************************************************

KBR-CP      CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT   180
BKK-CP      CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT   180
SBR-CP      CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT   180
            ************************************************************

KBR-CP      GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT   240
BKK-CP      GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT   240
SBR-CP      GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT   240
            ************************************************************

KBR-CP      TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA   300
BKK-CP      TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGTGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA   300
SBR-CP      TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA   300
            *************************** ********************************

KBR-CP      GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA   360
BKK-CP      GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA   360
SBR-CP      GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA   360
            ************************************************************

KBR-CP      TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCCACTGCAAGCTTACT   420
BKK-CP      TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCCACTGCAAGCTTACT   420
SBR-CP      TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCCACTGCAAGCTTACT   420
            ************************************************************

KBR-CP      AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG   480
BKK-CP      AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG   480
SBR-CP      AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG   480
            ************************************************************

KBR-CP      GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC   540
BKK-CP      GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC   540
SBR-CP      GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC   540
            ************************************************************

KBR-CP      TACAGAGGCAACGGGACAAAGAACGTTGCTGCCGGTTTCTTTCAGATCCGGTTTACTGTG   600
BKK-CP      TACAAAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCCGCCGGTTTCTTTCAGATCCGGTTTACTGTG   600
SBR-CP      TACAAAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCCGCCGGTTTCTTTCAGATCCGGTTTACTGTG   600
            **** ************ *********** ******************************

KBR-CP      CAACTGCACAACCCCAAATGA   621
BKK-CP      CAaTTGCACAACCCCAAATGA   621
SBR-CP      CAATTGCACAACCCCAAATGA   621
            *** *****************
```

ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต

KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี

BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร

SBR: ไอโซเลตสระบุรี

(*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

```
KBR-CP      MNTGGVRRNNNGNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV    60
BKK-CP      MNTGGVRRNNNGNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV    60
SBR-CP      MNTGGVRRNNNGNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV    60
            ************************************************************

KBR-CP      GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPCLSESVALSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE   120
BKK-CP      GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPSLSESVALSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE   120
SBR-CP      GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPSLSESVALSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE   120
            ***************************** ******************************

KBR-CP      SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSEDQFRLL   180
BKK-CP      SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSEDQFRLL   180
SBR-CP      SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSEDQFRLL   180
            ************************************************************

KBR-CP      YKGNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK   206
BKK-CP      YRGNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK   206
SBR-CP      YKGNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK   206
            * ************************
```

ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับกรดอะมิโนของยีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต

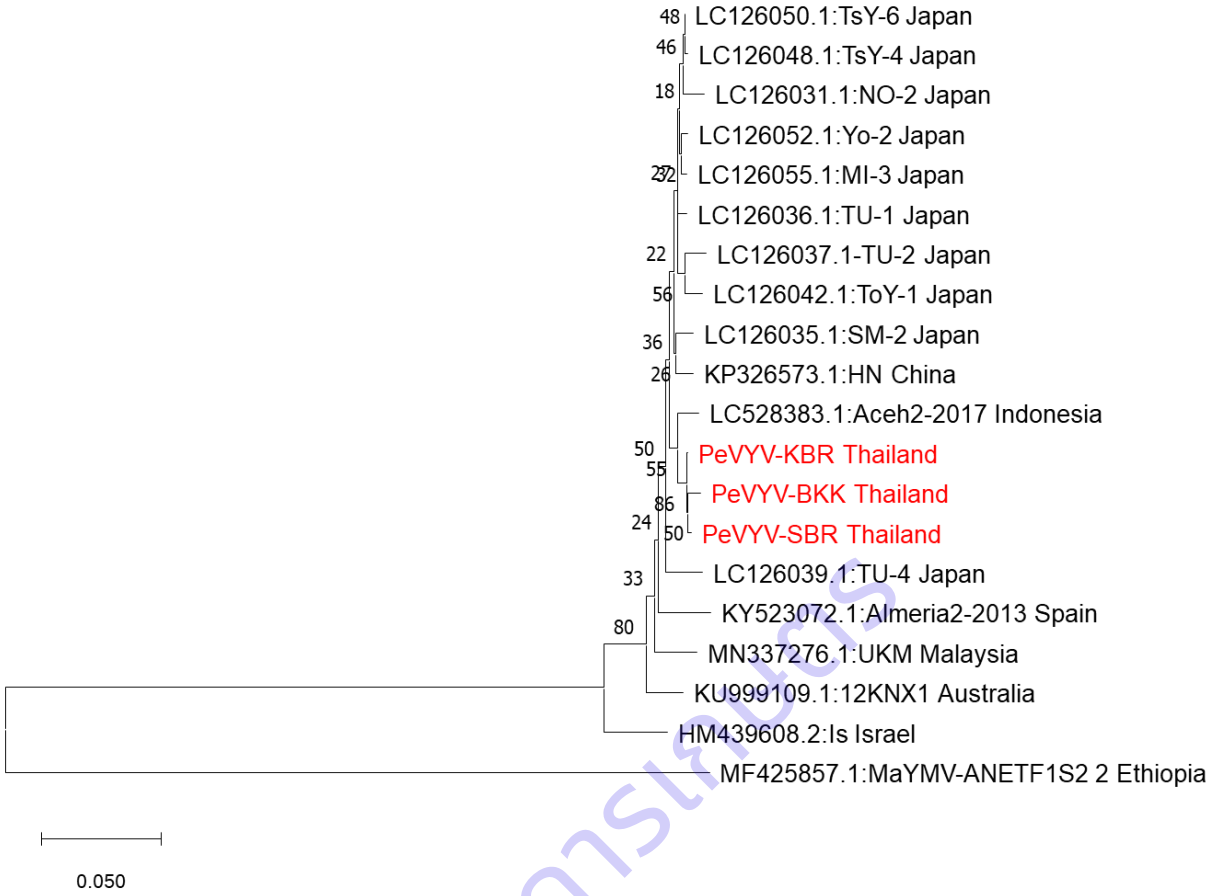
KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี

BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร

SBR: ไอโซเลตสระบุรี

(*) ระบุนิวคลิโอไทด์ที่เหมือนกัน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 5 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *CP* แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Pepper vein yellows virus* ที่แยกได้จากพริกในประเทศไทย (อักษรสีแดง) กับไอโซเลตอื่น ๆ ในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA X และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications และใช้ข้อมูลของเชื้อ *Maize yellow mosaic virus* (MaYMV) ไอโซเลต ANETF1S2_2 ของประเทศเอธิโอเปียเป็น outgroup

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3. การตอบสนองของพริกต่อเชื้อ PeVYV

การตอบสนองของพริกขี้หนูสวน (*Capsicum annuum*) ต่อเชื้อ PeVYV โดยนำเพลี้ยอ่อนที่ปลอดเชื้อไวรัสไปปล่อยบนต้นพริกที่เป็นโรคนาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมงแล้ว จึงนำมาปล่อยบนต้นพริกปกตินาน 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วสังเกตอาการบนพืชทดสอบ พบว่าต้นพริกเริ่มแสดงอาการเหลืองหลังจากที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 14 วัน และพัฒนาอาการของโรคจนเห็นอาการใบเหลืองชัดเจนหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 20 วัน (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 6 ต้นพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อโดยเพลี้ยอ่อนที่ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ต้นพริกแสดงอาการใบเหลืองในส่วนของเนื้อใบอย่างชัดเจนหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 20 วัน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

โรคเส้นใบเหลืองของพริกที่เกิดจากเชื้อ PeVYV พบว่าพริกที่เป็นโรคจะแสดงอาการใบม้วนขึ้นและเนื้อใบเหลืองคล้ายขาดธาตุอาหาร ในต่างประเทศมีรายงานว่าส่งผลให้ผลผลิตของพริกเสียหายและลดลงมาก จากการปลูกเชื้อไวรัสในพริกขี้หนูสวนพบว่าพริกขี้หนูสวนแสดงอาการใบม้วนขึ้นและเนื้อใบเหลืองชัดเจนหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ 20 วัน และยังพบว่าลำต้นแคระแกร็นอีกด้วย แต่เนื่องจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ยังพบมีรายงานพืชอาศัยอื่น ๆ น้อย และยังไม่มีการรายงานและการศึกษาเกี่ยวกับความเสียและการลดลงของผลผลิตของพริกที่เกิดจากเชื้อนี้ จึงเห็นว่าควรจะมีการศึกษาพืชอาศัยรองและผลกระทบต่อผลผลิตของพริกที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

1. นำข้อมูลของโรคที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปเผยแพร่แก่เกษตรกรในแง่ของคำแนะนำการป้องกันกำจัดโรคและแมลงพาหะ

2. สามารถถ่ายทอดเป็นองค์ความรู้เกี่ยวกับโรค เชื้อสาเหตุ และแมลงพาหะให้แก่ผู้ที่สนใจ เช่น นักวิจัย นิสิตนักศึกษา และบริษัทเอกชนผู้ผลิตพริก

กรมวิชาการเกษตร

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2552. คู่มือโรคผัก. บริษัท เอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด กรุงเทพฯ.153 หน้า.

Alabi, O.J., Al Rwahnih, M., Jifon, J.L., Gregg, L., Crosby, K.M., Mirkov, T.E., 2015. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting Pepper (*Capsicum* spp.) in the United States. *Plant Dis*. 99(11), 1656-1656.

Alfaro-Fernández, A., ElShafie, E.E., Ali, M.A., El Bashir, O.O.A., Córdoba-Sellés, M.C., Ambrosio, M.I.F.S., 2014. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting Hot pepper in Sudan. *Plant Dis*. 98(10), 1446-1446.

Chiemsombat, P., Sharman, M., Srivilai, K., Campbell, P., Persley, D., Attathom, S., 2010. A new *Tospovirus* species infecting *Solanum esculentum* and *Capsicum annuum* in Thailand. *Australasian Plant Dis. Notes* 5(1), 75-78.

Hassani-Mehraban, A., Cheewachaiwit, S., Relevante, C., Kormelink, R., Peters, D., 2011. *Tomato necrotic ring virus* (TNRV), a recently described tospovirus species infecting tomato and pepper in Thailand. *Eur. J. Plant Pathol*. 130(4), 449-456.

Knierim, D., Tsai, W.-S., Kenyon, L., 2013. Analysis of sequences from field samples reveals the presence of the recently described *Pepper vein yellows virus* (genus *Polerovirus*) in six additional countries. *Arch. Virol*. 158(6), 1337-1341.

Kumar, S., Stecher, G., Li. M, Knyaz, C, and Tamura, K., 2018. MEGA X:Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol*. 35(6), 1547-11549.

Liu, M., Liu, X., Li, X., Zhang, D., Dai, L. and Tang, Q. 2015. Complete genome sequence of a Chinese isolate of pepper vein yellows virus and evolutionary analysis based on the CP, MP and RdRp coding regions. *Arch. Virol*. 161(3):677-683.

Maina, S., Edwards, O.R., Jones, R.A.C., 2016. First complete genome sequence of *Pepper vein yellows virus* from Australia. *Genome Announcements* 4(3), e00450-00416.

Murakami, R., Kawano, S., 2017. A natural host and diversity of *Pepper vein yellows virus* in Japan. JARQ 51(1), 59-68.

Murakami, R., Nakashima, N., Hinomoto, N., Kawano, S., Toyosato, T., 2011. The genome sequence of *Pepper vein yellows virus* (family *Luteoviridae*, genus *Polerovirus*). *Arch. Virol*. 156(5), 921-923.

กรมวิชาการเกษตร

Sharman, M., Lapbanjob, S., Sebunruang, P. Belot, J.-L., Galbieri, R., Giband, M. and Suassuna, N. 2015. First report of *Cotton leafroll dwarf virus* in Thailand using a species-specific PCR validated with isolates from Brazil. *Australasian Plant Dis. Notes* 10:24.

Tan, W.P., Dong, Y.Z., Sun, X.H., Liang, Y.C., Liu, H.X., Zhu, X.P. 2015. The first identification of *Pepper vein yellows virus* in Shandong Province, China. *Plant Dis*. 99(9), 1288.

Tsai, W. S., Huang, Y. C., Zhang, D. Y., Reddy, K., Hidayat, S. H., Srithongchai, W. 2008. Molecular characterization of the CP gene and 30UTR of *Chilli veinal mottle virus* from South and Southeast Asia. *Plant Pathol*. 57:408–416.

Villanueva, F., Castillo, P., Font, M.I., Alfaro-Fernández, A., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2013. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting sweet pepper in Spain. *Plant Dis*. 97(9), 1261-1261.

Yonaha, T., Toyosato, T., Kawano, S., Osaki, T, 1995. Pepper vein yellows virus, a novel *Luteovirus* from bell pepper plants in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*. 61(3), 178-184.

Zhang, S.B., Zhao, Z.B., Zhang, D.Y., Liu, Y. 2015. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting red pepper in Mainland China. *Plant Dis.* 99(8), 1190-1190.

กรมวิชาการเกษตร

13. ภาคผนวก :

ตารางผนวกที่ 1 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *CP* ของเชื้อ *Pepper vein yellows virus* ทั้ง 3 ไอโซเลต กับไอโซเลตอื่น ๆ ในต่างประเทศ

		ลำดับกรดอะมิโน																			
	Isolate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	PeVYV-BKK_Thailand		99.5	99	99.5	99	100	99.5	99.5	99.5	99.5	98.1	98.1	99	98.1	97.1	97.6	96.1	97.6	95.1	52.9
2	PeVYV-SBR_Thailand	99.4		99.5	99	99.5	99.5	99	99	99	99	98.5	97.6	99.5	97.6	97.6	98.1	96.6	98.1	95.6	53.4
3	PeVYV-KBR_Thailand	99.2	99.8		98.5	99	99	98.5	98.5	98.5	98.5	98.1	97.1	99	97.1	97.1	97.6	96.1	97.6	95.1	52.9
4	LC126052.1:Yo-2_Japan	98.4	98.7	98.9		98.5	99.5	99	99	99	99	97.6	97.6	98.5	97.6	96.6	97.1	95.6	97.1	95.1	52.9
5	LC528383.1:Aceh2-2017_Indonesia	98.2	98.6	98.7	98.2		99	98.5	98.5	98.5	98.5	98.1	97.1	99	97.1	97.1	97.6	97.1	97.6	95.1	53.4
6	LC126055.1:MI-3_Japan	98.2	98.6	98.7	99.5	98.1		99.5	99.5	99.5	99.5	98.1	98.1	99	98.1	97.1	97.6	96.1	97.6	95.1	52.9
7	LC126050.1:TsY-6_Japan	98.2	98.6	98.7	99.5	98.1	99.4		100	99	99	97.6	98.5	98.5	97.6	97.6	97.1	95.6	97.1	94.7	52.4
8	LC126048.1:TsY-4_Japan	98.1	98.4	98.6	99.4	97.9	99.5	99.8		99	99	97.6	98.5	98.5	97.6	97.6	97.1	95.6	97.1	94.7	52.4
9	LC126036.1:TU-1_Japan	97.9	98.2	98.4	99.2	98.1	99.4	99.4	99.2		99.5	97.6	97.6	98.5	98.1	96.6	97.1	95.6	97.1	94.7	52.9
10	LC126042.1:ToY-1_Japan	97.7	98.1	98.2	98.7	97.9	98.6	98.9	98.7	98.6		97.6	97.6	98.5	98.1	96.6	97.1	95.6	97.1	94.7	52.9
11	LC126035.1:SM-2_Japan	97.4	98.1	98.2	98.7	97.6	98.6	98.9	98.7	98.6	98.1		96.1	99	97.1	96.1	97.6	96.1	96.6	94.2	53.4
12	LC126031.1:NO-2_Japan	97.3	97.6	97.7	98.6	97.1	98.7	99	98.9	98.7	97.9	97.9		97.1	96.1	96.1	95.6	94.2	95.6	93.2	51
13	KP326573.1:HN_China	97.3	97.9	98.1	98.6	98.1	98.7	98.7	98.6	99	97.9	98.6	98.1		97.1	97.1	98.5	97.1	97.6	95.1	53.4
14	LC126037.1-TU-2_Japan	97.1	97.4	97.6	98.4	97.1	98.6	98.6	98.4	98.6	98.4	98.1	97.9	98.1		95.1	95.6	94.2	95.6	93.2	52.4
15	LC126039.1:TU-4_Japan	96.6	97.3	97.4	97.6	97.7	97.7	97.7	97.6	97.7	96.9	96.9	97.1	97.7	96.8		96.6	96.1	96.6	94.7	52.9
16	KU999109.1:12KNX1_Australia	96.3	96.3	96.5	96.6	96.6	96.8	96.8	96.6	97.3	96.3	96.6	96.5	97.1	96.3	96.5		97.1	97.6	94.7	53.4
17	KY523072.1:Almeria2-2013_Spain	95.8	96.1	96.3	96.8	96.1	96.6	96.9	96.8	96.6	96.5	96.8	96.1	96.6	95.8	96	95.7		96.1	93.7	53.9
18	MN337276.1:UKM_Malaysia	95.3	96	96.1	96.6	95.8	96.8	96.6	96.5	96.8	95.8	96.1	96	96.5	96.1	96	95.5	95.3		96.1	52.7
19	HM439608.2:Is_Israel	92.9	92.9	93.1	93.1	93.4	92.8	92.8	92.6	92.4	92.3	92.3	91.9	92.1	91.6	92.6	91.9	92.4	91.9		52.9
20	MF425857.1:MYMV-ANETF1S2_2_Ethiopia	57.7	58.1	58.2	58.2	57.9	57.9	58.1	57.9	58.2	58.1	58.2	57.4	58.2	57.6	57.7	58.7	58.1	58.3	58.8	
		ลำดับนิวคลิโอไทด์																			

ศรีวิชาการเกษตร