

## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : แผนงานวิจัยมาตรการสุขอนามัยพืช
2. โครงการวิจัย : ชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vector) ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : ชีวชนิด (biotype) ของแมลงหริ่งขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) ที่เป็นพาหะของโรคใบหงิกเหลืองในพริก (Pepper yellow leaf curl virus) ในภาคตะวันตกของประเทศไทย  
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Biotypes of Tobacco Whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in the western part of Thailand and transmission of pepper yellow leaf curl virus in chilli
4. คณะผู้ดำเนินงาน  
หัวหน้าการทดลอง : สุนัดตา เชาวลิต สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช  
ผู้ร่วมงาน : ภูวนารถ มณีโชติ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช  
: เกศสุดา สนศิริ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
5. บทคัดย่อ

พริกเป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายรวมทั้งในภาคตะวันตก สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตพริกลดลง เนื่องมาจากการระบาดของโรคใบหงิกเหลือง ที่เกิดจาก pepper yellow leaf curl virus (PepYLCV) ที่มีแมลงหริ่งขาวยาสูบเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดโรค การลดการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากแมลงพาหะ เป็นแนวทางหนึ่งในการจัดการโรค ซึ่งจำเป็นต้องทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัส แมลงหริ่งขาว และพืชอาศัย การศึกษาวิจัยนี้ทำโดยเก็บตัวอย่างแมลงหริ่งขาวยาสูบบนต้นพริกที่แสดงอาการเป็นโรคใบหงิกเหลือง และพืชอื่นในแปลงพริก ในจังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2562 จำนวนรวม 60 ตัวอย่าง จำแนกชนิดแมลงหริ่งขาวโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

และจำแนกไปโอโทป์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครมออกซิเดส (mtCOI) พบว่าแมลงหีขาวยาสูบมีลักษณะสัณฐานวิทยาของดักแด้เป็น แบบ smooth leaf form จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาด 850 นิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกแมลงหีขาวยาสูบจากพริกและพืชอาศัยอื่นได้ 4 ไปโอโทป์ ได้แก่ Asial Asiall\_1 Asiall\_6 และ Asiall\_7 โดยแต่ละไปโอโทป์มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระดับ 99.48 – 100 86.1 – 100 85.2 – 100 และ 86.8 – 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แมลงหีขาวยาสูบที่เก็บจากพริกมี 3 ไปโอโทป์ ได้แก่ Asial Asiall\_6 และ Asiall\_7 ในสัดส่วน 66.67 28.20 และ 5.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ทางไฟโลเจเนติกส์พบว่าแมลงหีขาวยาสูบจับกลุ่มเป็นคลัสเตอร์ตามไปโอโทป์ โดยไปโอโทป์ Asial ในพริกและมะเขือทุกตัวอย่างอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกัน และแยกเป็นคลอด (clade) ตามชนิดพืช ส่วนไปโอโทป์ Asiall\_1 Asiall\_6 และ Asiall\_7 ในพริก มะเขือ แตงโมป่า แยกคลัสเตอร์ตามไปโอโทป์และแยกคลอดตามชนิดพืชเช่นกัน ผลการทดลองถ่ายทอดโรคใบหงิกเหลืองพริกจากต้นพริกที่ติดเชื้อ PepYLCV ไปยังต้นกล้าพริกด้วยแมลงหีขาวยาสูบไปโอโทป์ Asial จำนวน 30 ตัวพบว่าระยะเวลาที่ให้แมลงรับเชื้อนาน 72 ชั่วโมงสามารถตรวจพบเชื้อในตัวแมลงแต่ละตัวได้ 63.34 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการรับเชื้อที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจพบเชื้อในตัวแมลงได้ 36.67 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาถ่ายทอดเชื้อ PepYLCV นาน 72 ชั่วโมงมีประสิทธิภาพถ่ายทอดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 48 และ 24 ชั่วโมงถ่ายทอดโรคได้ 90 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ต้นกล้าพริกแสดงอาการใบหงิกเหลืองและต้นแคระแกร็นภายในเวลา 14 – 30 วันหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

### Abstract

Chilli is an economic crop in Thailand. The planting areas are around the country, including western areas. Production of chilli has decreased in quantity and quality due to the outbreak of yellow leaf curl disease caused by pepper yellow leaf curl virus (PepYLCV). The whitefly, *Bemisia tabaci* is a vector for virus transmission. One approach for disease management is to reduce the spread of the virus by the insect vector. This research aimed to investigate the relationship of the virus, whiteflies and host plants. A sampling of *B. tabaci* on chilli plantations showing symptoms of yellow leaf curl disease was carried out from October 2017 to September 2019 in Tak, Kanchanaburi, Ratchaburi and Phetchaburi provinces. Sixty whitefly samples were collected from the diseased fields and identified based on pupal morphology. Biotypes of *B. tabaci* were

inspected by amplification of partial mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and nucleotide sequenced. The morphology of the pupal stage revealed smooth leaf forms. The obtained DNA product was 850 base pairs. Nucleotide sequences revealed four biotypes including Asial, Asiall\_1, Asiall\_6 and Asiall\_7 from chilli and other host plants. Three biotypes from chilli were Asial, Asiall\_6 and Asiall\_7 in a proportion of 66.67%, 28.20% and 5.13.% respectively. The identity percentage of nucleotide sequences of the mtCOI gene of biotype Asial ranged from 99.48 – 100%, while that of Asiall\_1 was 86.1 – 100%, Asiall\_6 was 85.2 – 100%, and Asiall\_7 was 86.8 – 100%. Phylogenetic analysis showed tree of branches separating different biotype of *B. tabaci* biotypes Asiall\_1 Asiall\_6 and Asiall\_7. Transmission of PepYLCV by *B. tabaci* biotype Asial from diseased chilli plant to healthy seedlings was successful. The detectable populations in chilli, for which clades found coherent with plant host species. The branching in relative with biotype and clades with host species were also found for rate of PepYLCV from single whitefly was 63.34% after 72 hr AAP, while it was 36.67% by 48 hr AAP. The inoculation access period of PepYLCV by whitefly for 72 hr AAP provided 100% transmission rate, while 48 and 24 hr AAP revealed 90 and 50% transmission rate, respectively. The chilli seedlings exhibited typical yellow leaf curl and dwarf symptoms within 14 – 30 days after insect transmission.

**คำสำคัญ :** พริก มะเขือ แตงกวา ยีนไซโตโครมออกซิเดส เบโกโมไวรัส การถ่ายทอดโรค

**Keywords:** Chilli, Eggplant, Whitefly, Cytochrome oxidase gene, *Begomovirus*, Transmission.

**รหัสการทดลอง** 03-47-61-01-00-00-01-61

## 6. คำนำ

พริกเป็นพืชผักสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการผลิตเพื่อใช้ในประเทศและเพื่อการส่งออกในรูปของพริกสดและพริกเพื่อการแปรรูป ในแต่ละปีประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออกพริกจำนวนมาก การผลิตพริกประสบปัญหาทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ ผลผลิตลดลงเนื่องจากการเข้าทำลายของโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคใบหงิกเหลืองที่เกิดจากไวรัสในสกุล *Begomovirus* ทำให้พริกได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงเก็บเกี่ยวมากกว่า 97 % (Trisno *et al.*, 2009) โรคนี้มีแมลงห้ำขาวยาสู้ *Bemisia tabaci* (Gennadius) เป็นพาหะ (Prakash and Singh, 2006) ใน

ประเทศไทยพบโรคนี้ระบาดในแหล่งปลูกพริกทางภาคตะวันตกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อพืชได้รับเชื้อจะแสดงอาการอ่อนแอ ใบเหลือง หรือใบเหลืองร่วมกับใบด่าง ใบม้วน หัก ลำต้นแคระแกร็น ผลพริกมีขนาดเล็กและบิดเบี้ยวเสียรูปทรง และผลผลิตลดลง การแพร่ระบาดและความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ทั้งด้านประชากรของแมลงพาหะ ชนิดพืช และสภาพแวดล้อม เช่น ชนิดของแมลงหริ้วขาวที่เป็นแมลงพาหะ ชนิดและสายพันธุ์ของพืชอาศัย ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแมลงหริ้วขาวและชนิดของเชื้อ *Begomovirus* (Kenyon *et al.*, 2014)

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแมลงหริ้วขาว จึงทำให้การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว อีกทั้งแมลงหริ้วขาวยาสูบ *B. tabaci* ซึ่งจัดเป็นศัตรูพืชสำคัญที่มีการระบาดทำความเสียหายไปทั่วโลก มีความซับซ้อน การจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานยังมีความคลุมเครือ (cryptic species) ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงหริ้วขาวยาสูบ ส่งผลต่อการปรับตัวให้เข้ากับพืชอาหาร การดัดแปลงพันธุกรรมชาติ การต้านทานสารฆ่าแมลง รวมถึงประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส ดังนั้นสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ในฐานะหน่วยงานที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกำกับดูแลงานด้านอารักขาพืช จึงจำเป็นต้องศึกษาให้ทราบถึงชนิดของแมลงพาหะและพืชอาศัย ตลอดจนความสัมพันธ์และความจำเพาะระหว่างแมลงกับเชื้อสาเหตุ เพื่อหาแนวทางการจัดการโรคโดยลดการแพร่ระบาดของโรคจากแมลงพาหะ

## 7. เนินการ

### - อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างแมลงหริ้วขาวยาสูบ เช่น หลอดดูดตัวอย่างแมลง (aspirator) ขวดเก็บตัวอย่าง ปากคีบ พู่กัน ถังกระดาษสีน้ำตาล และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรแมลงหริ้วขาว เช่น เข็มปลายแหลม เข็มปลายงอ ปากคีบปลายแหลม เพลท โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 %, แอลกอฮอล์ 70 – 95 % กรดกลูเซียมอะซิติก แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แอซิกฟูซซินสเตน โคลฟออย คานาดาบาลซัม แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ ตู้อบสไลด์ และกล่องใส่สไลด์
3. สารเคมีในการศึกษาสารพันธุกรรม เช่น Chelex, TBE nuclease free water, PCR master mix, DNA template, agarose gel, RedSafe loading dye, DNA Marker ladder
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope (Olympus รุ่น SZ 51) compound microscope (Olympus รุ่น CX 41) กล้องถ่ายภาพ (Leica รุ่น M165C) และอุปกรณ์วาดภาพ (camera lucida)

5. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดแมลงหริ่งขาว ได้แก่ Russel (1958) Martin (1987) และ Mound and Halsey (1978)

### - วิธีการ

#### การเก็บตัวอย่างแมลงหริ่งขาวยาสูบ

เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหริ่งขาวยาสูบทั้งตัวเต็มวัยและดักแด้ จากแปลงพริกที่แสดงอาการของโรคใบไหม้จากไวรัสในแหล่งปลูกพริกทางภาคตะวันตกของประเทศไทย ได้แก่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี จำนวน 25 แปลง ระหว่าง เดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2562 โดยเก็บตัวอย่างแบบสุ่มสำรวจทั่วแปลง ตาม ISPM No.6 (FAO., 2006) แบ่งตัวอย่างแมลงเป็นสองส่วน ส่วนแรกเป็นระยะดักแด้เก็บในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำสไลด์ถาวร และส่วนที่สองเป็นตัวเต็มวัยเก็บในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แช่ในตู้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอ (fig.1A)

#### การตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงหริ่งขาวยาสูบ

ตรวจดูรูปร่างลักษณะภายนอกใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และเลือกแมลงระยะดักแด้เพื่อทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ Martin (1987) ตรวจดูลักษณะสำคัญใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และจำแนกชนิดตามแนวทางการวินิจฉัยของ Russel (1958), Martin (1987) และ Mound and Halsey. (1978) ตัวอย่างที่ศึกษา (voucher specimens) จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

#### การสกัดดีเอ็นเอจากแมลงหริ่งขาวยาสูบ และเพิ่มปริมาณยีน mtCOI

สกัดดีเอ็นเอจากแมลงหริ่งขาวยาสูบที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% ตามวิธีการของ Walsh *et al.* (1991) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณยีน mtCOI ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 23 ไมโครลิตร ประกอบด้วย nuclease free water 5.5 ไมโครลิตร master mix 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Bem-Bt-F (TGR TTT TTT GGT CAT CCR GAA GT) และ Bem-Bt-R (TTT ACT GCA CTT TCT GCC) (Shatters *et al.*, 2009) อย่างละ 1 ไมโครลิตร DNA template 3 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันได้ดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จำนวน 1 รอบ เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสงยูวี (ultraviolet) ด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Image System (Biorad) จากนั้นส่งผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้)

#### *การจำแนกไปโอไทป์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI และวิเคราะห์ Phylogenetic tree*

ตรวจสอบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากแมลงหิวขาอายุสุบ ด้วยโปรแกรม DNASTar (DNASTar package, USA) และตรวจสอบชนิดยีนและไปโอไทป์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยใช้โปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ของแมลงหิวขาอายุสุบที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW และสร้าง Phylogenetic tree ตามวิธี maximum likelihood ด้วยโปรแกรม MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกส์

#### *การเก็บตัวอย่างใบพริกและตรวจสอบชนิดเชื้อไวรัส*

เก็บตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการของโรคใบหงิกเหลือง ในแปลงเดียวกับที่เก็บแมลงหิวขา (fig.1B) เพื่อจำแนกชนิดเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุโรค ใช้ใบพริก 1 มิลลิกรัม สกัดดีเอ็นเอรวมด้วยชุดสกัด FavorPrep Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwan) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Begomovirus* ด้วยไพรเมอร์ AVcore 5' GCCHATRTAYAGRAAGCCMAGRAT 3' และ ACcore 5' GGRTTDGARGCATGHGTACANGCC 3' ตามวิธีการของ Brown *et al.* (2001) เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis และส่งผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้) ตรวจสอบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASTar และระบุชนิดของเชื้อไวรัสด้วยการใช้โปรแกรม Blast ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>)

#### *การเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อ SLCMV ด้วยเทคนิค Rolling circle amplification (RCA)*

เพิ่มปริมาณจีโนมเชื้อไวรัสในตัวอย่างมันสำปะหลังโดยเลือกตัวอย่างไวรัสจังหวัดละ 1 ตัวอย่าง ด้วยชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จรูป TempliPhi 100 Amplification Kit (GE Healthcare, Germany) ตามวิธีการที่แนะนำของของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้

1. ดูดดีเอ็นเอของมันเป็นสำปะหลังที่เป็นโรคใบต่าง ๆ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ Sample buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 95 °C นาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำมาวางบนน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที
2. เติม Reaction buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเติม Enzyme mix ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 4-18 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 10 นาที ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณจีโนมไวรัสบน 1% agarose gel แล้วย้อมด้วย GelRed แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Imaging System (Biorad, USA)

#### *การหาลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัสด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS)*

แยกจีโนมเชื้อไวรัสออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป FavorPrep GEL/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต แล้วตรวจสอบขนาดและปริมาณ DNA ที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ทำการวัดปริมาณจีโนมเชื้อไวรัสด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร (O.D.) ด้วยเครื่อง Multiskan GO ELISA reader (Finland) ค่าสัดส่วนของ O.D.260/O.D.280 ที่มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 1.8 - 2.2 แสดงว่าดีเอ็นเอของจีโนมไวรัสที่ได้มีความบริสุทธิ์มาก โดยให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอจีโนมของไวรัส  $\geq 2$  ng/ul ปริมาตร  $> 10$  ไมโครลิตร จากนั้นนำจีโนมไวรัสที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัสด้วยการทำ Whole Genome Sequencing ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq instrument, 150PE (Illumina, San Diego, CA, USA)

#### *การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัส*

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไวรัสจาก Illumina HiSeq Sequence, 150PE ด้วยซอฟต์แวร์ Geneious Prime 2021.0.3 โดยการนำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ขนาดประมาณ 150 นิวคลีโอไทด์ มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสต้นแบบที่มีรายงานใน GenBank เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไวรัสที่สมบูรณ์แล้ว จะนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ PeYLCV กับเชื้อไวรัสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) เพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดเชื้อไวรัสที่นำมาทดลอง

#### *การเลี้ยงแมลงหิวข้าวยาสูบเพื่อใช้ทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัส*



นำแมลงหริ่งขาวยาสูบใบโอท็อป Asial ที่ได้จากแปลงพริกมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในกรงขนาด 1 x 1 ตารางเมตร จนได้โคลอนบริสุทธิ์ จากนั้นเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนต้นมะเขือเปราะ ในโรงเรือนขนาด 3 x 2 ตารางเมตร คลุมด้วยตาข่ายความถี่ 40 ช่องต่อตารางเซนติเมตร

*การศึกษาอัตราและระยะเวลาการได้รับเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัสของแมลงหริ่งขาวยาสูบ*

เตรียมต้นพริกที่เป็นโรคเพื่อเป็นแหล่งของไวรัส โดยคัดเลือกแมลงหริ่งขาวยาสูบใบโอท็อป Asial ที่เพิ่งออกจากดักแด้ ให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากพริกที่เป็นโรคใบหงิกเหลืองและตรวจพบเชื้อ PepYLCV เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง (fig.2 A-D) แล้วย้ายแมลงให้ดูดกินต้นกล้าพริกปกติ เมื่อต้นพริกแสดงอาการใบหงิกเหลือง นำไปตรวจสอบเชื้อ PepYLCV และใช้ต้นพริกที่มีเชื้อเป็นแหล่งของไวรัสในการทดสอบการถ่ายทอดโรค

การศึกษาอัตราและระยะเวลาในการรับเชื้อ นำแมลงหริ่งขาวยาสูบใบโอท็อป Asial ที่เพิ่งออกจากดักแด้ ให้ดูดอาหารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพริกที่มีเชื้อ PepYLCV ที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว) เมื่อครบกำหนดเวลานำแมลงหริ่งขาวยาสูบมาตรวจหาเชื้อ PepYLCV ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์

การศึกษาอัตราและระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อ นำแมลงหริ่งขาวยาสูบใบโอท็อป Asial ที่เพิ่งออกจากดักแด้ ให้ดูดอาหารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพริกที่มีเชื้อ PepYLCV เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยแมลงหริ่งขาวยาสูบจำนวน 30 ตัว ในต้นพริกปกติ (พริก ระยะ 3-4 ใบจริง) ที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 10 ซ้ำ) เมื่อครบเวลา กำจัดแมลงหริ่งขาวยาสูบโดยการพ่นสารเคมีกำจัดแมลง นำต้นพริกมาเก็บไว้ในกรงป้องกันแมลงและสังเกตระยะเวลาที่ต้นพริกแสดงอาการของโรค บันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏ ตรวจหาเชื้อ PepYLCV ในใบพริก ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์

#### - เวลาและสถานที่

เวลา : เดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

สถานที่ : แหล่งปลูกพริกทางภาคตะวันตกของประเทศไทย ได้แก่จังหวัดตาก กาญจนบุรี

ราชบุรี และเพชรบุรี และห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

*ลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงหริ่งขาวยาสูบ*

ผลการจำแนกแมลงหริ่งขาวที่เก็บมาศึกษา โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดักแด้ พบว่าเป็นแมลงหริ่งขาวยาสูบ *B. tabaci* แบบ smooth leaf form โดยดักแด้มีขนาดกว้าง 0.35 มิลลิเมตร ยาว 0.48 มิลลิเมตร (n=20) รอยหยักบริเวณขอบของช่องเปิดของปล้องอก (thoracic tracheal comb) มีขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจน ท่อช่องเปิดของปล้องอก (thoracic tracheal flod) ช่องเปิดขนาด



เล็กบนลำตัว (dorsal disc pores) มีขนาดเล็ก กระจายอยู่ที่ขอบด้านบนนอกของลำตัว vasiform orifice เป็นรูปสามเหลี่ยม ขอบด้านในมีรอยหยักเล็กน้อย lingular เป็นท่อยาวส่วนปลายขยายใหญ่ มีเส้นขนสั้น 2 เส้น operculum ปกคลุมลงมาถึง 1 ใน 2 ส่วนของ lingular รอยหยักบริเวณท้ายลำตัว (caudal tracheal fold) เห็นได้ชัดเจน (fig.3 A-C)

#### *การจำแนกไบโอโทป์ของแมลงหริ่งขาวยาสูบ โดยใช้ยีน mtCOI*

ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 752 นิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI จำแนกไบโอโทป์แมลงหริ่งขาวยาสูบจำนวน 60 ตัวอย่างที่เก็บได้จากแปลงพริกที่เป็นโรคใบหงิกเหลือง พืชอาศัย และวัชพืชในแปลงพริก พบว่ามี 4 ไบโอโทป์ ได้แก่ Asial จำนวน 45 ตัวอย่าง Asiall\_1 จำนวน 2 ตัวอย่าง Asiall\_6 จำนวน 11 ตัวอย่าง และ Asiall\_7 จำนวน 2 ตัวอย่าง (Table 1) ในพริกพบ 3 ไบโอโทป์ โดยพบ Asial มากที่สุด (66.67%) ในจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี รองลงมาเป็น Asiall\_6 (28.20%) และ Asiall\_7 (5.13.%) พบในจังหวัดกาญจนบุรี สำหรับในพืชอาศัยอื่น พบไบโอโทป์ Asial ในมะเขือ พักทอง และแตงโมป่า พบในจังหวัดกาญจนบุรี และตาก ไบโอโทป์ Asiall\_1 พบในมะเขือ ในจังหวัดตาก เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม clustalW ใน MEGA7 พบว่าแมลงหริ่งขาวยาสูบจากพริกที่เป็นไบโอโทป์ Asial มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันที่ระดับ 99.48 – 100 เปอร์เซ็นต์ Asiall\_1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันที่ระดับ 86.1 – 100 เปอร์เซ็นต์ Asiall\_6 อยู่ที่ระดับ 85.2 – 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Asiall\_7 อยู่ที่ระดับ 86.8 – 100 เปอร์เซ็นต์

#### *การวิเคราะห์ไฟโลเจเนติกส์ (Phylogenetic analysis)*

สร้างแผนภูมิแบบ maximum likelihood phylogenetic tree โดยใช้ค่าความแตกต่าง (distance) ของข้อมูลยีน mtCOI ขนาด 762 นิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ multiple alignment คำนวณค่าความเชื่อมั่นจากการวิเคราะห์ bootstrap จำนวน 1000 replications พบว่าแยกได้ 2 กิ่ง (branch) โดยกิ่งที่ 1 เป็นไบโอโทป์ Asial ทั้งหมด ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ (cluster) คลัสเตอร์ที่ 1 พบในพริก 26 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรี และราชบุรี ในมะเขือ 12 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรี ตาก และกรุงเทพมหานคร และในพักทอง 1 ตัวอย่าง จากกาญจนบุรี คลัสเตอร์ที่ 2 แยกออกเป็น 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็นไบโอโทป์ Asial ในแตงโมป่า 1 ตัวอย่างจากจังหวัดตาก แคลดที่ 2 พบในมะเขือ 4 ตัวอย่าง จากกรุงเทพมหานคร และตาก และพบในพักทอง 1 ตัวอย่าง จากกาญจนบุรี กิ่งที่ 2 มี 3 ไบโอโทป์อยู่ด้วยกัน ได้แก่ Asiall\_1 Asiall\_6 และ Asiall\_7 ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นไบโอโทป์ Asiall\_7 จำนวน 2 ตัวอย่าง พบในพริกจากจังหวัดกาญจนบุรี คลัสเตอร์ที่ 2 แบ่งเป็น 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็นไบโอโทป์ Asiall\_1 ในมะเขือ 2 ตัวอย่าง แคลดที่ 2 เป็นไบโอโทป์ Asiall\_6 ในพริกทั้ง 11 ตัวอย่าง (fig. 4)

จากนั้นสร้างแผนภูมิแบบ maximum likelihood phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ โดยนำข้อมูลยีน mtCOI ขนาด 606 นิวคลีโอไทด์ของแมลงหิวข้าวยาสูบ 60 ตัวอย่างบนพืชอาศัยชนิดต่างๆ ที่ศึกษาครั้งนี้ และที่เคยมีรายงานพบในประเทศไทยอีก 76 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นข้อมูลที่รายงานอยู่ใน GenBank หาความเชื่อมโยงระหว่างไบโอไทป์และพืชอาหาร เป็น Asia I ทั้งหมดจำนวน 82 ตัวอย่าง แบ่งเป็น Asia I ในพริก มีการจับกลุ่มแยกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 26 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี กลุ่มที่ 2 จำนวน 9 ตัวอย่าง จากจังหวัดนครราชสีมา นครพนม อุบลราชธานี ศรีสะเกษ เชียงราย และ สุพรรณบุรี กลุ่มที่ 3 จำนวน 2 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย ส่วน Asia I ในมะเขือ จับกลุ่มแยกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 12 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรีและตาก กลุ่มที่ 2 จำนวน 4 ตัวอย่าง จากจังหวัดตาก และ กรุงเทพมหานคร และ Asia I ในมะเขือเทศ 18 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงราย ลำปาง บึงกาฬ หนองคาย นครราชสีมา สระบุรี ราชบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี นอกจากนี้มี Asia I ในขี้กากลาง 1 ตัวอย่างจากสุพรรณบุรี ในมันเทศ 1 ตัวอย่างจากสุพรรณบุรี ในบวบเหลี่ยม 1 ตัวอย่างจากสงขลา ในแตงกวา 1 ตัวอย่างจากนครปฐม และในถั่ว 1 ตัวอย่างจากสุพรรณบุรี (fig. 5A) สำหรับชุดที่ 2 เป็นไบโอไทป์ Asiall\_1 Asiall\_6 และ Asiall\_7 จำนวน 54 ตัวอย่าง พบว่าแยกได้ 2 เคลด เคลดที่ 1 เป็น Asiall\_7 ในพริก 2 ตัวอย่าง เคลดที่ 2 ประกอบด้วย Asiall\_6 และ Asiall\_1 โดย Asiall\_6 จำนวน 13 ตัวอย่าง พบในพริก 7 ตัวอย่าง และในมันสำปะหลัง 6 ตัวอย่าง สำหรับ Asiall\_1 จำนวน 39 ตัวอย่าง ในมันสำปะหลังทั้งหมด (fig. 5B)

#### การตรวจสอบเชื้อ PepYLCV ในพริกที่เป็นโรคใบหงิกเหลือง

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต KBR segment DNA-A จากวิเคราะห์ Whole Genome Sequencing ด้วย Illumina HiSeq Sequence, 150PE พบว่า ไอโซเลต KBR segment DNA-A มีขนาด 2737 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 6 Open Reading Frames (ORFs) แปลเป็นโปรตีนได้ 6 ชนิด ได้แก่ 1. AV1 Protein (Coat protein) 2. AV2 Protein (Precoat protein) 3. AC1 Protein (Replication-associated protein) 4. AC2 Protein (TrAP) 5. AC3 Protein (REn) และ 6. AC4 Protein (fig. 6)

จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต KBR segment DNA-A พบว่ามีความคล้ายคลึงกับไอโซเลตอื่นๆ ที่พบในประเทศไทยที่ระดับ 92.7%-99.2% โดยคล้ายคลึงกับไอโซเลต KON-KG5 ที่ระดับ 99.2% (Table 2) และการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต KBR segment DNA-A พบว่าไอโซเลต KBR จัดอยู่ในเดียวกับไอโซเลตอื่นๆ ที่พบในประเทศไทย (fig. 7) ดังนั้นเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นเชื้อไวรัสชนิด PeYLCV ไอโซเลต KBR

### การศึกษาอัตราและระยะเวลาการรับเชื้อ และการถ่ายทอดเชื้อ PepYLCV ของแมลงหิวข้าวยาสูบ ใบโอไทป์ *Asial*

ผลการศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อ พบว่าที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการรับเชื้อ PepYLCV เท่ากับ 23.33 เปอร์เซ็นต์ (7 ตัว) 13.33 เปอร์เซ็นต์ (4 ตัว) 40.00 เปอร์เซ็นต์ (12 ตัว) 36.67 เปอร์เซ็นต์ (11 ตัว) และ 63.34 เปอร์เซ็นต์ (19 ตัว) ตามลำดับ และการใช้เทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจพบเชื้อในตัวแมลงหิวข้าวยาสูบ 1 ตัวได้ (fig. 8, 10)

ผลการศึกษาระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อ พบว่าที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อ PepYLCV เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (5 ต้น) 60 เปอร์เซ็นต์ (6 ต้น) 50 เปอร์เซ็นต์ (5 ต้น) 90 เปอร์เซ็นต์ (9 ต้น) และ 100 เปอร์เซ็นต์ (10 ต้น) ตามลำดับ (fig. 9, 11) และต้นพริกจะแสดงอาการเกิดโรค ภายในเวลา 14 – 30 วันหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส โดยมีลักษณะอาการใบเหลืองร่วมกับใบด่างที่ยอด โดยจะเริ่มแสดงอาการต่างที่โคนใบและขยายเต็มใบจากใบยอดถึงใบล่าง หรือบางครั้งมีอาการหงิกเหลืองร่วมกับอาการต่างเหลือง และลำต้นแคระแกร็น (fig. 12)

### 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

แมลงหิวข้าวยาสูบในพื้นที่ปลูกพริก จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี จำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของดักแด้ได้ 1 แบบ คือ แบบ smooth leaf form ในขณะที่การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาดประมาณ 850 นิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกแมลงหิวข้าวยาสูบจากพริกและพืชอาศัยอื่นได้ 4 ใบโอไทป์ ได้แก่ *Asial* *Asiall\_1* *Asiall\_6* และ *Asiall\_7* โดยในพริก พบ 3 ใบโอไทป์ โดย *Asial* *Asiall\_6* และ *Asiall\_7* ในสัดส่วน 66.67 เปอร์เซ็นต์ 28.20 เปอร์เซ็นต์ และ 5.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใบโอไทป์ *Asial* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันที่ระดับ 99.48 – 100 เปอร์เซ็นต์ *Asiall\_1* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันที่ระดับ 86.1 – 100 เปอร์เซ็นต์ *Asiall\_6* อยู่ที่ระดับ 85.2 – 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Asiall\_7* อยู่ที่ระดับ 86.8 – 100 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิเคราะห์ทางไฟโลเจเนติกส์ พบว่าแมลงหิวข้าวยาสูบในภาคตะวันตกของประเทศไทย จำนวน 60 ตัวอย่าง แยกได้ 2 กิ่ง โดยกิ่งที่ 1 เป็นใบโอไทป์ *Asial* ทั้งหมด ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 พบในพริก 26 ตัวอย่าง ในมะเขือ 12 ตัวอย่าง และในฟักทอง 1 ตัวอย่าง คลัสเตอร์ที่ 2 แยกออกเป็น 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็นใบโอไทป์ *Asial* ในแตงโมป่า 1 ตัวอย่าง แคลดที่ 2 พบในมะเขือ 4 ตัวอย่าง และพบในฟักทอง 1 ตัวอย่าง กิ่งที่ 2 มี 3 ใบโอไทป์ด้วยกัน ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นใบโอไทป์ *Asiall\_7* ในพริก 2 ตัวอย่าง คลัสเตอร์ที่ 2 แบ่งเป็น 2 แคลด

เคลดที่ 1 เป็นไปโอโทป Asiall\_1 ในมะเขือ 2 ตัวอย่าง เคลดที่ 2 เป็นไปโอโทป Asiall\_6 ในพริกทั้ง 11 ตัวอย่าง

นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์หาความเชื่อมโยงระหว่างไปโอโทปของแมลงหวี่ขาวยาสูบบนพริก และพืชอาศัยชนิดต่างๆ ที่พบในไทย โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ 60 ตัวอย่าง ร่วมกับข้อมูลจาก GenBank รวมทั้งหมด 76 ตัวอย่าง เป็น Asia I ทั้งหมดจำนวน 82 ตัวอย่าง แบ่งเป็น Asia I ในพริก จำนวน 37 ตัวอย่าง มีการจับกลุ่มแยกเป็น 3 กลุ่ม ส่วน Asial ในมะเขือ จำนวน 16 ตัวอย่าง จับกลุ่มแยกเป็น 2 กลุ่ม และ Asia I ในมะเขือเทศ 18 ตัวอย่าง นอกจากนี้มี Asia I ในขี้กากลาง มันเทศ บวบเหลี่ยม แตงกวา และถั่ว (fig. 5A) สำหรับชุดที่ 2 เป็นไปโอโทป Asiall\_1 Asiall\_6 และ Asiall\_7 จำนวน 54 ตัวอย่าง พบว่าแยกได้ 2 เคลด เคลดที่ 1 เป็น Asiall\_7 ในพริก 2 ตัวอย่าง เคลดที่ 2 ประกอบด้วย Asiall\_6 และ Asiall\_1 โดย Asiall\_6 จำนวน 13 ตัวอย่าง พบในพริก 7 ตัวอย่าง และในมันสำปะหลัง 6 ตัวอย่าง สำหรับ Asiall\_1 จำนวน 39 ตัวอย่างในมันสำปะหลังทั้งหมด

จาก phylogenetic tree ข้างต้น เมื่อหาความเชื่อมโยงกับพริกและพืชอาศัยอื่นในประเทศไทย มีแนวโน้มว่า ในพริกไปโอโทปที่โดดเด่นคือ Asial สอดคล้องกับ Monika and Stephan (2016) รองลงมาคือไปโอโทป Asiall\_1 นอกจากนี้ยังพบในมะเขือเทศ มะเขือ และพืชผักอีกหลายชนิด สำหรับไปโอโทป Asiall\_1 เป็นกลุ่มประชากรที่โดดเด่นในมันสำปะหลัง

การศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อ และถ่ายทอดเชื้อ PepYLCV ของแมลงหวี่ขาวยาสูบไปโอโทป Asial พบว่าที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการรับเชื้อ PepYLCV ได้ดีที่สุดคือ 63.34 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ 72 ชั่วโมง สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีลักษณะอาการใบเหลืองร่วมกับใบด่างที่ยอด โดยจะเริ่มแสดงอาการต่างที่โคนใบและขยายเต็มใบ จากใบยอดถึงใบล่าง หรือบางครั้งมีอาการหงิกเหลืองร่วมกับอาการด่างเหลือง และลำต้นแคระแกร็น ภายในเวลา 14 – 30 วันหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

ดังนั้น การลดระดับของโรคใบหงิกเหลืองในพริกจากเชื้อ PepYLCV ที่มีแมลงหวี่ขาวยาสูบเป็นแมลงพาหะ จึงควรศึกษาเพิ่มเติม 1) การลดการแพร่ระบาดของโรค โดยลดประชากรแมลงหวี่ขาวยาสูบไปโอโทป Asial บนพริก และมะเขือ โดยไม่ควรปลูกพริกพร้อมกับมะเขือ แต่ควรปลูกร่วมกับพืชอาศัยอื่นที่ Asial ชอบแต่ไม่ใช่พืชอาศัยของไวรัส เช่น พืชวงศ์แตง หรือปลูกพืชอาศัยของ Asial ที่ไม่พบไวรัสไว้ขอบแปลง 2) ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพการถ่ายทอดโรคของแมลงหวี่ขาวยาสูบไปโอโทป Asiall\_1, Asiall\_6 และ Asiall\_7 เพิ่มเติม 3) ศึกษาชนิดและประสิทธิภาพตัวห้ำที่จำเพาะกับ Asial ในพริกและมะเขือ เพื่อกำจัดไปโอโทปที่ถ่ายทอดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังการระบาดของโรคพืชและแมลงพาหะศัตรูพืช และถ่ายทอดองค์ความรู้ให้กับเจ้าหน้าที่ของกรมวิชาการเกษตร ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเฝ้าระวังการระบาดของ

ศัตรูพืช ตลอดจนหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้องกับการป้องกัน กำจัด ศัตรูพืชที่สำคัญทางการเกษตร และเป็นข้อมูลสนับสนุนการผลิตสินค้านำเข้าและส่งออกให้ได้มาตรฐานสุขอนามัยพืช ส่งผลต่อเกษตรกร และชุมชนมีรายได้เพิ่มขึ้น สามารถพึ่งพาตนเองได้ จากสินค้านำเข้าและส่งออกได้มาตรฐานสุขอนามัยพืช

## 11. คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พิสสุวรรณ เจียมสมบัติ ผชช. พรพิมล อธิปัญญาคม ผชช.พิเชษฐ เชาววัฒน์วงศ์ ผอ. ณีภูติมา โฆษิตเจริญกุล ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษา งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี และขอบคุณทีมงานกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้านตลอดการทดลอง

## 12. เอกสารอ้างอิง

- Brown, J.K., A.M. Idris, I Torres-Jerez, G.K. Banks and S.D. Wyatt. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Arch. Virol.* 146: 1581-1598.
- Kenyon, F. L., S. Kumar, W. S. Tsia and J. A. Hughes. 2014. Virus disease of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. *Advances in virus research.* 90: 297-354.
- Martin, J. H. 1987. An Identification Guide to Common Whitefly Pest Species of the World (Homoptera: Aleyrodidae). *Tropical Pest Management.* 33(4): 298-322.
- Monika, G. and Stephan, W. 2016. Diversity of *Bemisia tabaci* in Thailand and Vietnam and indications of species replacement. *Journal of Asia-Pacific Entomology.* 19(2): Pages 537-543.
- Mound L.A., & S.H. Halsey,. 1978. Whitefly of the world: a systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data. *British Museum (Natural History)/ Wiley, London/Chichester.*
- Kumar, S., S. Glen, L. Michael, K. Christina and T. Koichiro. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547-1549.
- Prakash, S. and S. J. Singh. 2006. Insect transmitted virus of pepper: *Vegetation Science.* 33: 109-116.
- Russel, L.M. 1958. Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). *Bull Brooklyn Entomol Soc.* 52:122-123.

Shatters, R.G. J.r, C.A. Powell, L.M. Boykin, H.L. Sheng and C.L. McKenzie. 2009.

Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype-specific mitochondrial cytochrome c oxidase I polymerase chain reaction primers. J. Econ. Entomol. 102: 750–758.

Shoorcheh, H.R., B. Kazemi, S. Manzari, J.K. Brown and A. Sarafrazi. 2008. Genetic variation and mtCOI phylogeny for *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) indicate that the 'B' biotype predominates in Iran. J. Pest Sci. 81: 199-206.

Trisno, J., S. H. Hidayat, T. Habazar, I. Manti and I. Jamsari. 2009. Detection and sequence diversity of begomovirus associated with yellow leaf curl disease of pepper (*Capsicum annuum*) in West Sumatera, Indonesia. Microbiology Indonesia. 3: 61-66.

กรมวิชาการเกษตร

**Table 1** Whitefly samples on chilli plantations showing symptoms of yellow leaf curl disease and other host plants in Tak, Kanchanaburi, Ratchaburi and Phetchaburi provinces.

Species name	Biotype	Host	Location	Coordinates	Code
Asial_Phetchaburi357_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°2'53",E99°55'33"	357
Asial_Phetchaburi357.2_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°2'53",E99°55'33"	357.2
Asial_Phetchaburi358.1_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°1'19",E99°53'57"	358.1
Asial_Phetchaburi358.2_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°1'19",E99°53'57"	358.2
Asial_Phetchaburi359_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°1'0",E99°53'32"	359
Asial_Phetchabun360_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N12°42'18",E99°54'25"	360
Asial_Phetchaburi360.1_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N12°42'18",E99°54'25"	360.1
Asial_Phetchaburi361.1_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N12°47'28",E99°54'20"	361.1
Asial_Ratchaburi363.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°43'44",E99°50'39"	363.1
Asial_Ratchaburi363.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°43'44",E99°50'39"	363.2
Asial_Ratchaburi363.3_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°43'44",E99°50'39"	363.3
Asial_Ratchaburi365_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	365
Asial_Ratchaburi365.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	365.2
Asial_Ratchaburi365.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	365.1
Asial_Ratchaburi366_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	366
Asial_Ratchaburi366.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	366.1
Asial_Ratchaburi366.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	366.2
Asial_Ratchaburi369_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'39",E99°55'25"	369
Asial_Ratchaburi369.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'39",E99°55'25"	369.1
Asial_Ratchaburi369.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'39",E99°55'25"	369.2
Asial_Ratchaburi370_Chili	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°50'4",E99°54'30"	370
Asial_Ratchaburi370.1_Chili	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°50'4",E99°54'30"	370.1
Asial_Kanchanaburi372.1_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	372.1
Asial_Kanchanaburi372.2_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	372.2
Asial_Kanchanaburi374.2_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°49'75",E99°34'42"	374.2
Asial_Kanchanaburi375_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°49'75",E99°34'42"	375
Asial_Bangkok378.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°50.865",E100°34.415"	378.1
Asial_Bangkok378.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°50.865",E100°34.415"	378.2
Asial_Tak386_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'12",E98°34'20"	386
Asial_Tak386.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'12",E98°34'20"	386.2
Asial_Tak387_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'8",E98°34'20"	387
Asial_Tak387.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'8",E98°34'20"	387.1
Asial_Tak387.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'8",E98°34'20"	387.2
Asial_Tak389.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°25'48",E98°41'54"	389.1
Asial_Tak389.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°25'48",E98°41'54"	389.2
Asial_Kanchanaburi551_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	551
Asial_Kanchanaburi551.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	551.1
Asial_Kanchanaburi551.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	551.2
Asial_Kanchanaburi552_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	552
Asial_Kanchanaburi552.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	552.1
Asial_Kanchanaburi553_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	553
Asial_Kanchanaburi553.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	553.1
Asial_Kanchanaburi379_Pumpkin	Asial	Pumpkin	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	379
Asial_Kanchanaburi379.1_Pumpkin	Asial	Pumpkin	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	379.1
Asial_Tak 393.2_Wildwatermelon	Asial	Wildwatermelon	Tak	N16°29'06",E98°48'56"	393.2
Asiall_1_Tak393_Eggplant	Asiall_1	Eggplant	Tak	N16°29'06",E98°48'56"	393
Asiall_1_Tak393.1_Eggplant	Asiall_1	Eggplant	Tak	N16°29'06",E98°48'56"	393.1
Asiall_6_Kanchanaburi354.2_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N11°22'55",E99°31'11"	354.2
Asiall_6_Phetchaburi359.2_Chilli	Asiall_6	Chilli	Phetchaburi	N13°1'0",E99°53'32"	359.2
Asiall_6_Phetchaburi361_Chilli	Asiall_6	Chilli	Phetchaburi	N12°47'28",E99°54'20"	361
Asiall_6_Kanchanaburi371.1_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N13°58'20",E99°42'33"	371.1
Asiall_6_Kanchanaburi373.2_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°6'27",E99°19'42"	373.2
Asiall_6_Kanchanaburi374.1_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°6'53",E99°18'50"	374.1
Asiall_6_Kanchanaburi375.1_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°7'25",E99°10'30"	375.1
Asiall_6_Kanchanaburi375.2_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°7'25",E99°10'30"	375.2
Asiall_6_Kanchanaburi376_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°12'54",E99°11'30"	376
Asiall_6_Kanchanaburi376.1_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°12'54",E99°11'30"	376.1
Asiall_6_Kanchanaburi376.2_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°12'54",E99°11'30"	376.2
Asiall_7_Kanchanaburi_373_Chilli	Asiall_7	Chilli	Kanchanaburi	N14°6'27",E99°19'42"	373
Asiall_7_Kanchanaburi373.1_Chilli	Asiall_7	Chilli	Kanchanaburi	N14°6'27",E99°19'42"	373.1



**Table 2** Nucleotide sequence identity values of segment A of PeYLCV isolate KBR and other PeYLCV isolates.

Isolate	1	2	3	4	5	6	7
1 PeYLCV-KBR							
2 KT322141.1:KON-KG5	99.2						
3 KX943290.1:WF-SPN-Pep2015	98.8	99.1					
4 KT322145.1:TMK-KR5	98.8	99.1	98.7				
5 KT322143.1:SPN-PG1	98.7	99	99.5	98.6			
6 MK946436.1:BRM103	97.1	97.2	96.8	96.8	96.7		
7 KT322142.1:SNS-CM5	92.7	93	93.1	92.7	92.9	91.3	



**Figure 1** A. Whitefly samples were collected on chilli plantations showing symptoms of yellow leaf curl disease and other host plants in Tak, Kanchanaburi, Ratchaburi and Phetchaburi Bangkok  
 B. chilli plantations showing symptoms of yellow leaf curl disease.

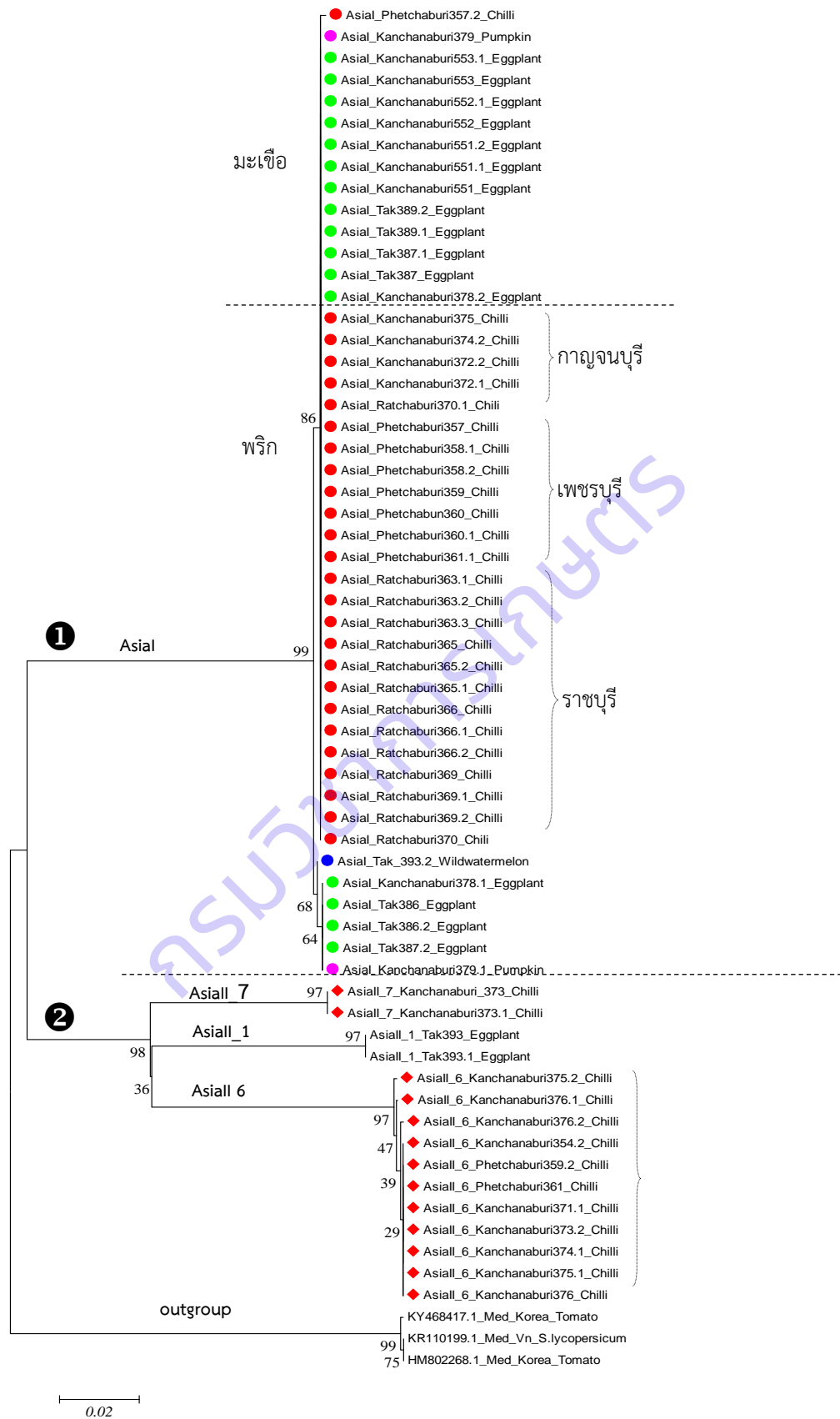




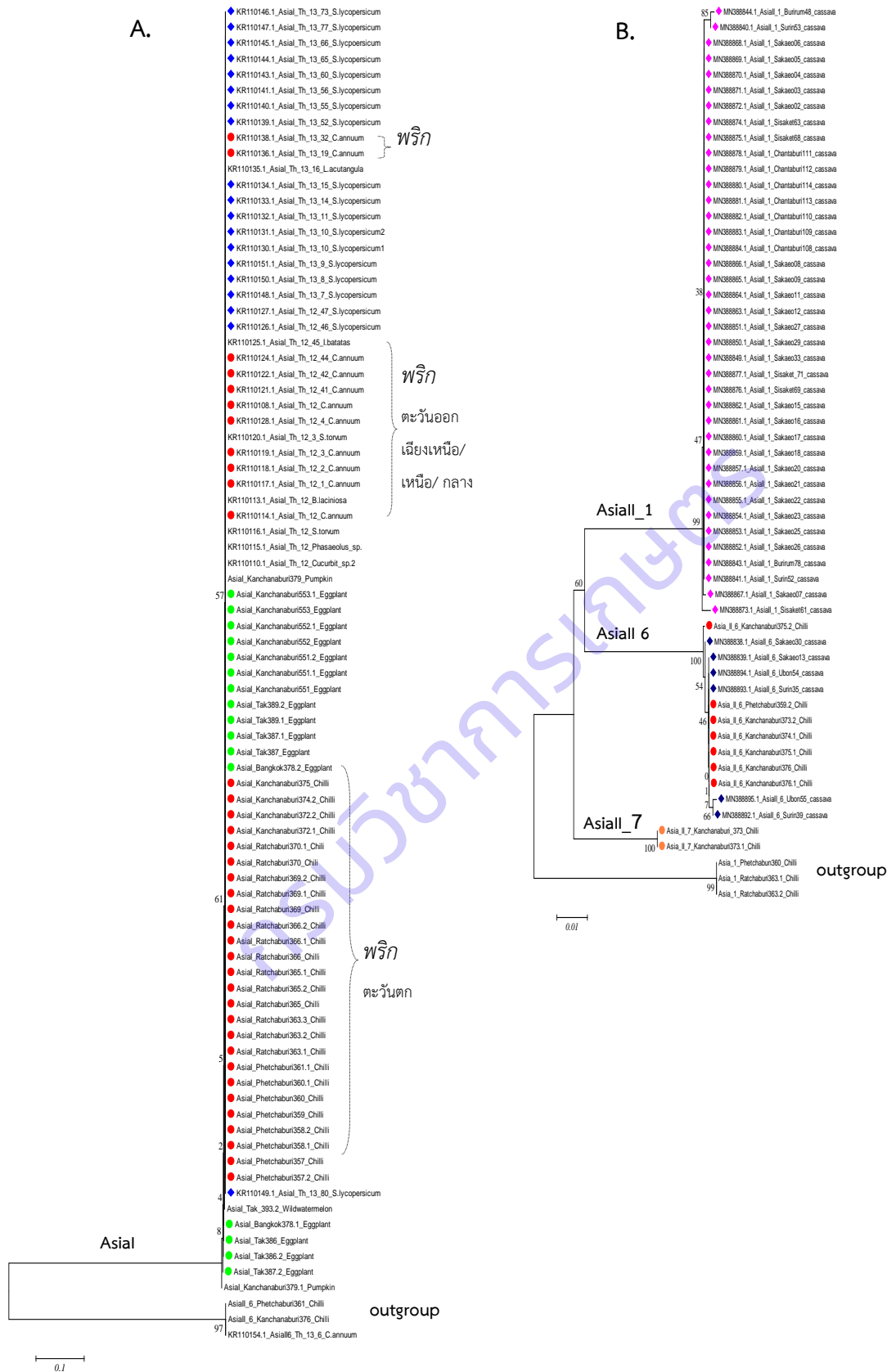
Figure 2 A.-D. Transmission PepYLCV by *B. tabaci* biotype Asial.



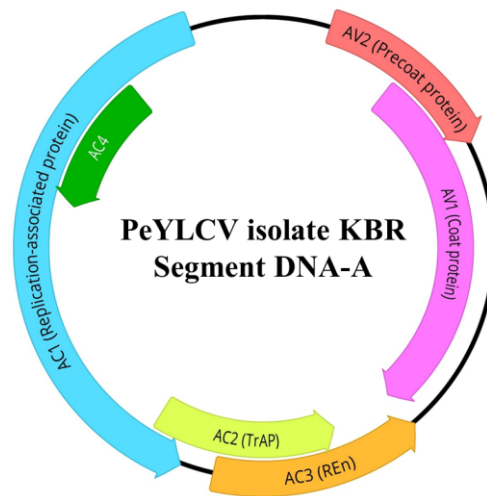
Figure 3 Smooth leaf form puparium of *B. tabaci* on chili symptomatic yellow leaf curl disease A. puparium on host plants B. puparium on slide C. drawing puparium.



**Figure 4** Phylogenetic tree based on the maximum likelihood of mtCOI sequences of *B. tabaci* on chilli plot symptomatic yellow leaf curl disease and other host plants in Tak, Kanchanaburi, Ratchaburi, and Phetchaburi



**Figure 5** Phylogenetic tree based on the maximum likelihood of mtCOI sequences of *B. tabaci* on chilli plot symptomatic yellow leaf curl disease and other host plants in Thailand. A biotype Asial, B. biotype Asiall\_1 Asiall\_6 and Asiall\_7

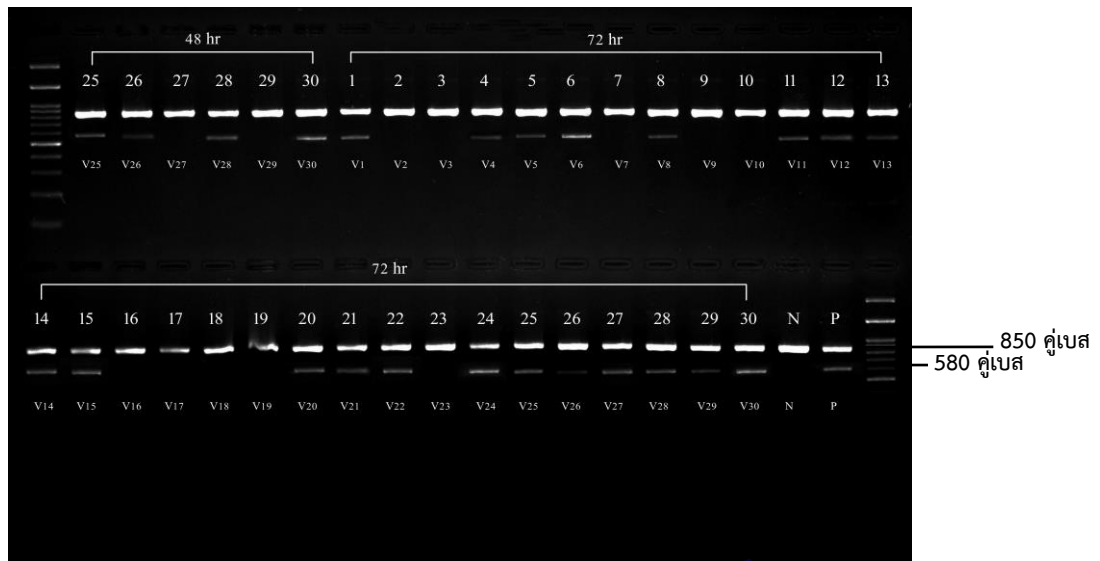


**Figure 6** Genome composition of segment DNA-A of PeYLCV isolate KBR. Segment DNA-A contained 6 Open Reading Frames (ORFs) and encoded for 6 proteins: ORF AV1 encodes for coat protein, ORF AV2 encodes for precoat protein, ORF AC1 encodes for replication-associated protein, ORF AC2 encodes for transcriptional activator protein (TrAP), ORF AC3 encodes for replication enhancer protein (REn) and ORF AC4 encodes for AC4 protein.

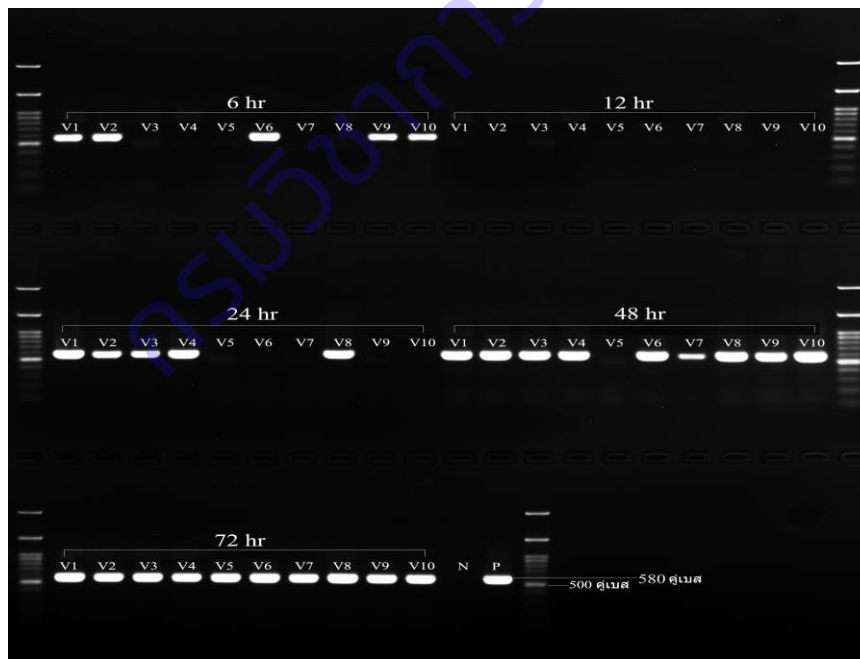


**Figure 7** A Neighbour-Joining phylogenetic tree of complete genome segment DNA-A.

The data set was subjected to 1000 bootstrap replicates. The bootstrap values are shown above the branches (>80%). PeYLCV isolate KBR is indicated in red.

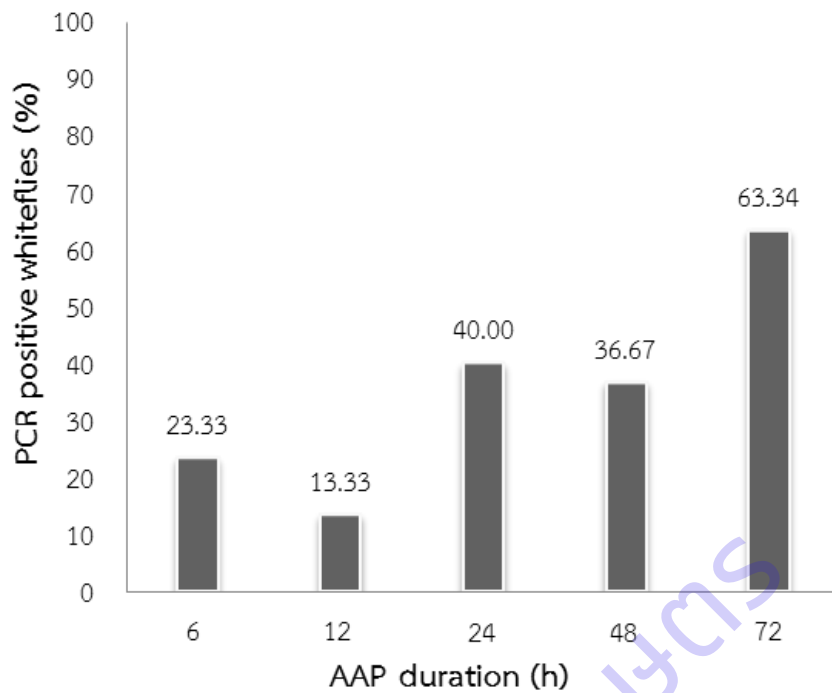


**Figure 8** Electrophoresis of PCR products, Acquisition access period PepYLCV by *B. tabaci* biotype Asial at 72 hr, 100 bp DNA marker (1-30 : moco *B. tabaci*, V1-V30 : PepYLCV, N : Negative, P : Possitive (*B. tabaci* feed on Chilli infected by PepYLCV)).

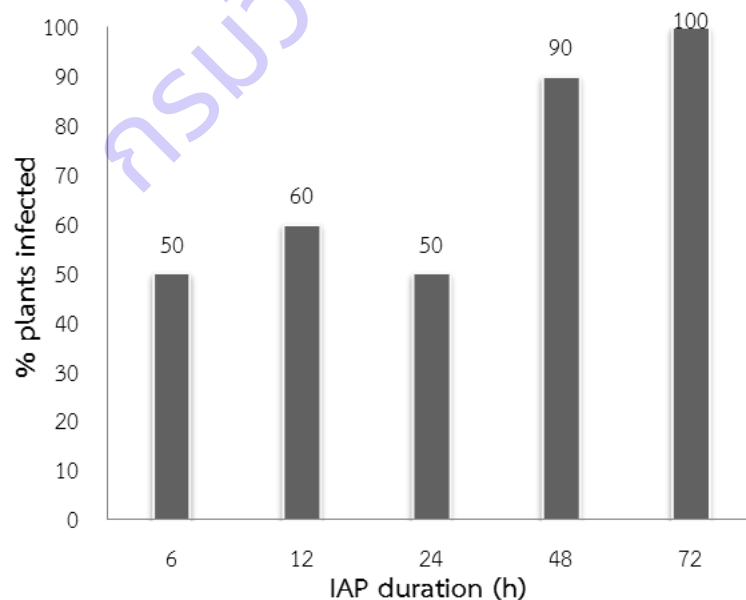


**Figure 9** Electrophoresis of PCR products, Inoculation access period PepYLCV by *B. tabaci* biotype Asial at 6, 12, 24, 48 and 72 hr (V1-V10 : PepYLCV, N : Negative, P : Possitive (PepYLCV)).





**Figure 10** The effects of acquisition access period (AAP) on the proportion of PCR positive adults of *B. tabaci* Asial. Newly emerged whiteflies were allowed to feed on PepYLCV-infected chilli plants for 6, 12, 24, 48 and 72h, respectively, and 30 whiteflies from each group were collected for PCR tests.



**Figure 11** The effects of inoculation access period (IAP) of the vector *B. tabaci* Asial on the proportion of CCYV-infected cucumber plants. After feeding PepYLCV-infected chilli plants with 3 days, 30 whiteflies were placed on non-infected chilli leaves (3–4 leaf stage) with clip cages for 6, 12, 24, 48 and 72h, respectively. Ten plants were used for each treatment and detected with PCR after 30 days.



Figure 12 Chilli infected by PepYLCV transmission by *B. tabaci* biotype Asial.