

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : แผนงานวิจัยมาตรการสุขอนามัยพืช
2. โครงการวิจัย : ชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vector) ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) ที่เป็นพาหะของเชื้อ *Polerovirus* สาเหตุโรคเส้นใบเหลืองในพริก
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Species of Aphid (Hemiptera: Aphididae) insect vectors of the *Polerovirus* causing agent of pepper vein yellowing disease
4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	เกศสุดา สนศิริ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ภูวนารถ มณีโชติ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	จารุวัตร ด้กกุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ยุวรินทร์ บุญทพ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

พริก (*Capsicum* sp.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ โรคเส้นใบเหลืองที่เกิดจาก *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ก่อความเสียหายต่อผลผลิตพริกในหลายประเทศ ที่มีเพลี้ยอ่อน (Aphid) (Hemiptera: Aphididae) เป็นแมลงพาหะถ่ายทอด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อทราบชนิดเพลี้ยอ่อนพาหะและชนิดของโรคพืช ความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดโรคระหว่างชนิดของเพลี้ยอ่อนกับโรคพืชและพืชอาศัย โดยทำการศึกษาระหว่างเดือน ต.ค.60 – ก.ย. 63 ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนศัตรูพริก ลักษณะของใบพริกที่แสดงอาการโรคเส้นใบเหลืองและโรคใบเหลือง ในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดละ 5 แปลง รวม 192 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่ได้มาจำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยา และจากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบเพลี้ยอ่อน 2 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover และเพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* (Sulzer) ผลการศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อและการถ่ายทอดเชื้อ PeVYV ของเพลี้ยอ่อน พบว่าที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการรับเชื้อ PeVYV ได้ดีที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาในการถ่ายทอดเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป สามารถ

ถ่ายถอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพริกจะแสดงอาการเส้นใบมีสีเหลือง บางครั้งขอบใบม้วนเข้าหากัน หลังจากได้รับการถ่ายถอดเชื้อ 14-30 วัน

คำสำคัญ เพลี้ยอ่อน พริก การถ่ายทอดโรค Aphididae Transmission Pulerovirus

Abstract

Chilli (*Capsicum* sp.) is an economic crop in Thailand. It is widely planted throughout all regions. Pepper yellows disease caused by *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) is one of the most important plant viruses infecting pepper crop worldwide. The Aphid (Hemiptera: Aphididae) is vector for virus transmission. The objective of this study is to investigate the relationship of the virus, aphids and host plants. A sampling of aphids on chilli plantations showing symptoms of pepper yellows disease was carried out from October 2017 to September 2019 in Kanchanaburi, Suphanburi, Ayutthaya, Tak and Nakhon Ratchasima provinces. 192 aphid samples were collected from the diseased fields and identified based on morphology and amplification of partial mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and nucleotide sequenced revealed two species including *Aphis gossypii* Glover and *Myzus persicae* (Sulzer). Transmission of PeVYV by *A. gossypii* from diseased chilli plant to healthy seedlings was successful. PeVYV virions were detected in aphids reached to 60% at 12 hr and 24 hr of acquisition access period (AAP). The PeVYV transmission efficiency of aphids was obtained 100% transmission efficiency at 24 hr of Inoculation access period (IAP) or much longer. The inoculated chilli developed the typical symptoms including interveinal yellowing and leaf upward within 14 - 30 days after inoculation.

Keywords Aphididae Chilli Hemiptera Transmission Pulerovirus

6. คำนำ

พริก (*Capsicum* sp.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ เนื่องจากเป็นพืชอาหารที่คนนิยมบริโภคและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ สามารถสร้างอาชีพและรายได้จำนวนมากให้แก่เกษตรกร แต่ในการผลิตพืชดังกล่าวมักประสบปัญหาและอุปสรรคเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูเข้าทำลาย ทำให้ผลผลิตและคุณภาพลดลง ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด เพิ่มต้นทุนในการผลิต เพลี้ยอ่อน (Aphid) (Hemiptera: Aphididae) เป็นแมลงศัตรูสำคัญของทั้งพืชไร่และพืชผักหลายชนิด เช่น พริก พืชตระกูลแตง มันฝรั่ง และยาสูบ เป็นต้น ซึ่งสามารถทำลายใบพืชโดยทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชบริเวณใต้ใบ หรือส่วนอ่อนๆ เช่น ยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอก หลังการเข้าทำลายจะทำให้ใบหงิกงอ ร่วง

หล่น ต้นแคระแกรน และขับถ่ายของเสียที่มีส่วนผสมของน้ำตาลที่เหลื่อใช้ เรียกว่า มูลน้ำหวาน (honeydew) ซึ่งเป็นอาหารของมดและราดำ ราดำจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วปกคลุมใบ ใบจึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้อย่างเต็มที่ นอกจากนี้จะดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชแล้วเพลี้ยอ่อนยังเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช เพลี้ยอ่อนที่พบในเขตร้อนและเขตอบอุ่นมีมากกว่า 200 ชนิด ที่เป็นพาหะนำเชื้อไวรัส (Brunt *et al.*, 1996; Nault 1997; พัชรินทร์ 2555) เพลี้ยอ่อนจัดเป็นแมลงพาหะที่สำคัญเนื่องจากมีลักษณะเด่นคือ มีปากแบบแทงดูด (piercing sucking) สามารถถ่ายทอดอนุภาคไวรัสไปยังเซลล์พืช โดยที่ไม่ทำให้เซลล์พืชเสียหายมากนัก นอกจากนี้ เพลี้ยอ่อนยังมีลักษณะเด่นที่ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายทอดโรคไวรัสดีกว่าแมลงอื่นๆ คือ เป็นแมลงที่สืบพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ ทำให้ประชากรเพลี้ยอ่อนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดการระบาดของเชื้อไวรัสเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาอันสั้น (พัชรินทร์, 2555)

เชื้อไวรัสในกลุ่ม *Potterovirus* จะทำให้ใบพืชมีอาการม้วนขึ้นเข้าหากันของขอบด้านข้าง สีซีดจาง โดยเฉพาะใบล่าง และกิ่งก้านใบมีการตั้งชูขึ้น ส่วนของต้นแคระแกรน และอาจมีแผลเนื้อเยื่อตายแห้งตาย (necrosis) ในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารในส่วนของลำต้นและก้านใบ (Ryazantsev and Zavriev, 2009) การถ่ายทอดและการแพร่ระบาดของไวรัสชนิดนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์ได้ ดังนั้นเมื่อนำหัวพันธุ์ที่เป็นโรคไปปลูกจะมีส่วนอย่างมากที่ทำให้ผลผลิตลดลง ซึ่งเชื้อนี้ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีสัมผัส แต่สามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงพาหะจำพวกเพลี้ยอ่อน แบบ nonpersistent manner (Mayo *et al.* 2000; Dods *et al.*, 1983; Milne *et al.*, 1969; Nameth *et al.*, 1985) ซึ่งโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสนี้ไม่มีทางแก้ไขนอกจากการป้องกัน และวิธีการป้องกันกำจัดที่ได้ผลและมีประสิทธิภาพก็คือการป้องกันกำจัดแมลงพาหะที่จะนำเชื้อไวรัสมาปล่อยสู่พืช

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบชนิดของเพลี้ยอ่อนที่ระบาดในพื้นที่ปลูกพริกของประเทศไทย และสามารถใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาชนิดของเพลี้ยอ่อนที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสมาสู่พริก เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาหาแนวทางการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ รวมถึงการเฝ้าระวัง การพยากรณ์การระบาด ตลอดจนการวางแผนในการจัดการกรณีที่มีการตรวจพบการระบาดของเชื้อไวรัสในพริกและแตงกวาต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- 1) ตัวอย่างเพลี้ยอ่อน ที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพริกในจังหวัด
- 2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดตอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่าง ถังรักษาความเย็น และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
- 3) อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดเพลี้ยอ่อน ได้แก่ potassium hydroxide 10 %, Alcohol 70-95 %, acetic acid gacial, clove oil และ canada balsam แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์ ตู้อบสไลด์ถาวร

- 4) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope และกล้องถ่ายภาพ
- 5) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยอ่อน Aphididae ของ Blackman and Eastop (2000)

- วิธีการ

การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนศัตรูพริก

เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากแปลงปลูกพริกที่แสดงอาการของเส้นใบเหลืองจากไวรัสในจังหวัด กาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และนครราชสีมา จำนวน 25 แปลง โดยทำการเก็บตัวอย่างแบบ สุ่มสำรวจทั่วแปลง ตาม ISPM No.6 (FAO, 2006) (ภาพที่ 1) แบ่งตัวอย่างเป็นสามส่วน ส่วนที่หนึ่งนำไปศึกษา ชนิดและ DNA barcode ส่วนที่สองนำไปตรวจหาเชื้อ *Poterovirus* ส่วนที่สามนำไปศึกษาการถ่ายทอดโรค ระหว่างเพลี้ยอ่อนกับเชื้อ *Poterovirus* และพืชอาศัยอื่น บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยอ่อน ส่วนของพืชที่พบ ตัวอย่าง ลักษณะการทำลาย ลักษณะอาการของพืชที่เป็นโรค ปริมาณการพบ ปัจจัยแวดล้อม พืชปลูกข้างเคียง สภาพแวดล้อมทั้งในและนอกแปลง วัน /เดือน /ปี สถานที่ พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง รวมทั้ง บันทึกโดยการถ่ายภาพ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก

นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยที่ได้จากการสำรวจมาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Blackman and Eastop (2000) นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดกับเอกสารแนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อน ลักษณะสำคัญของเพลี้ยอ่อนที่ใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่ ส่วนหัว; ร่องหนวดและร่องบริเวณหน้าผาก ความสั้น ยาวของหนวด จำนวนปล้องและความยาวส่วนปลายของปล้องสุดท้าย ความยาวของปาก ส่วนอก; ความยาวของ ปลายขาคู่หลังและหนามบนน่องขา ส่วนท้อง; จะมีตุ่มขนาดเล็กปรากฏบริเวณปล้องท้องปล้องที่ 1 และ 7 โดยเฉพาะปล้องที่ 7 ตำแหน่งของตุ่มขนาดเล็กที่ปรากฏอยู่ด้านบนหรือด้านล่างรูหายใจใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกระดับสกุล แต่ในเพลี้ยอ่อนบางชนิดไม่ปรากฏตุ่มดังกล่าว วาดรูปแสดงลักษณะต่างๆที่สำคัญ บันทึก รายละเอียดต่างๆของเพลี้ยอ่อนที่สำรวจพบ เช่น ลักษณะ รูปร่าง ขนาด สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนในแต่ละ ระยะ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์เพลี้ยอ่อนแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์ และ จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาเก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

การศึกษาลำดับพันธุกรรม (DNA Barcode) ของเพลี้ยอ่อน

นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% มาสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) โดยใช้ชุดสกัด Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit ของบริษัท Favorgen Biotech Corp. ทำการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน mtCOI ของเพลี้ยอ่อน (LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' และ HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGCCAAAAAATCA-3' (Hebert *et al.*, 2003) และเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เป้าหมาย โดยใช้ส่วนผสมของ MyTag HS Red DNA Polymerase (Bioline, Australia) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 25 ไมโครลิตร นำส่วนผสมของ MyTag HS Red DNA Polymerase ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม (PCR machine) ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยหยอด PCR product ลงใน 2% agarose gel ใน 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 45 นาที ทำให้ PCR product มีความบริสุทธิ์ด้วย Isolate II PCR and Gel kit; Cat No. BIO-52060 ทำการวิเคราะห์หาลำดับ นิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) เพื่อตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ เป้าหมาย โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่บริสุทธิ์ของเพลี้ยอ่อนไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประเทศเกาหลีใต้ นำข้อมูลของดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสเพลี้ยอ่อนที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรหัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยอ่อนที่อยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ รวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้อง

การศึกษาวงจรชีวิตเพลี้ยอ่อนในพริก

นำตัวเต็มวัยเพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงปลูกพริก มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อน จำนวน 200 ตัว มาเพาะเลี้ยงรวมกันในกล่องพลาสติกขนาด 14 x 23 x 7 เซนติเมตร ให้ใบพริกเป็นอาหารโดยใช้สำลีชุบน้ำพันรอบก้านใบเพื่อรักษาความสด เมื่อตัวเต็มวัยออกลูกทำการแยกตัวอ่อนโดยใช้ฟุ้งกันเบอร์ศูนย์แช่เพลี้ยอ่อนแต่ละตัวไปเพาะเลี้ยงใน petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 2 เซนติเมตร รองด้วยกระดาษกรองที่มีความชื้น petri dish ละ 1 ตัว และใส่ใบพริกเพื่อเป็นอาหาร ทำการเปลี่ยนใบพริกทุก 2 วัน สังเกตการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิต บันทึกข้อมูลจำนวนเพลี้ยอ่อนที่รอดชีวิตทุกวันจนกระทั่งเพลี้ยอ่อนเป็นตัวเต็มวัย สังเกตพฤติกรรมและระยะเวลาลอกคราบในแต่ละวัย ทำการบันทึกข้อมูลระยะตัวอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย รวมถึงพฤติกรรมในแต่ละระยะ (ภาพที่ 2)

ศึกษาชนิดเชื้อ Polerovirus ในพริกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพริกที่เป็นโรคใบเหลือง ตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณยีน CP บางส่วนของเชื้อ Polerovirus จากอาร์เอ็นเอรวมที่เตรียมได้ ด้วยปฏิกิริยา One step RT-PCR โดยไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ยีน CP บางส่วน โดยใช้ไพรเมอร์ Pol3870F (5'-YTVGGTTTYAAAGTCGAGG-3') (Sharman *et al.*, 2015) และ AS3 (5'CACGCGTCIACC TATTTIGGRTTITG-3') (Abraham *et al.*, 2008) และสังเคราะห์ยีน CP ด้วยไพรเมอร์ PeVYV-CPF 5'-ATGAAT ACGGGAGGGGTTAG -3' และ PeVYV-CPR 5'- ACATCATAGACCAGGGGGGGG -3' เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาจะได้ ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 และ 621 คู่เบส ตามลำดับ ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Nuclease-free water	11	ไมโครลิตร
5x buffer	4	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
10 pmole Pol3870F	0.5	ไมโครลิตร
10 pmole AS3	0.5	ไมโครลิตร
enzyme mix	1	ไมโครลิตร
RNA template	2	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยา ในการสังเคราะห์ดังนี้

1) First strand synthesis	50 °C	30 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	30 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 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, USA)

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* สายพันธุ์ JM109 โดยใช้วิธี heat shock transformation คัดเลือกโคลนของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีน CP ด้วยวิธี blue-white selection แล้วตรวจสอบโคลนของพลาสมิดสายผสมที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคลนสีขาวจำนวน 10 โคลนและสีฟ้า 1 โคลน มาผสมน้ำปริมาตร 8 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วตรวจสอบยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน CP ของเชื้อ PeVYV

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA จากปฏิกิริยา RT-PCR มาทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Potterivirus* ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีน CP ด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของเชื้อไวรัสกลุ่ม *Potterivirus* ชนิดต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar et al., 2018)

การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนวันที่รับเชื้อ จำนวนตัว และจำนวนวันที่ถ่ายถอดเชื้อของเพลี้ยอ่อนกับเชื้อไวรัส PeVYV ในพริก

ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพลี้ยอ่อนที่บริสุทธิ์ เตรียมต้นกล้าพริกปลอดโรค และต้นพริกที่เป็นโรคเพื่อเป็นแหล่งของไวรัส หลังจากนั้นจะนำเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากพริกที่เป็นโรคเส้นใบเหลืองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3) และทำการย้ายเพลี้ยอ่อนให้ดูดกินต้นกล้าพริกปกติ เมื่อต้นพริกแสดงอาการเส้นใบเหลือง นำส่วนของใบไปตรวจสอบหาเชื้อ และใช้ต้นพริกที่มีเชื้อเป็นแหล่งของไวรัสในการทดสอบการถ่ายถอดโรคด้วยปฏิกิริยา One step RT-PCR

การศึกษาอัตราและระยะเวลาในการรับเชื้อ นำเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัย มาปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพริกที่เป็นโรคเส้นใบเหลือง ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว) เมื่อครบกำหนดเวลานำเพลี้ยอ่อนมาตรวจสอบหาเชื้อ PeVYV ด้วยปฏิกิริยา One step RT-PCR

การศึกษาอัตราและระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อ นำเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพริก ที่มีเชื้อ PeVYV เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยเพลี้ยอ่อนจำนวน 20 ตัว ในต้นพริกปลอดโรค ที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 10 ซ้ำ) เมื่อครบกำหนดเวลา กำจัดเพลี้ยอ่อนโดยการพ่นสารเคมีกำจัดแมลง นำต้นพริกมาเก็บไว้ในกรงป้องกันแมลงและสังเกตระยะเวลาที่ต้นพริกแสดงอาการของโรค บันทึกลักษณะอาการโรคที่ปรากฏ ตรวจสอบเชื้อ PeVYV ในใบพริกด้วยด้วยปฏิกิริยา One step RT-PCR

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

สถานที่ - แหล่งปลูกพริกในจังหวัด สุพรรณบุรี กาญจนบุรี

พระนครศรีอยุธยา ตาก และนครราชสีมา

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา และ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัย

พัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาของเพลี้ยอ่อน

ผลการจำแนกชนิดเพลี้ยอ่อนที่ได้จากการเก็บรวบรวมบนต้นพริก ในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดละ 5 แปลง รวม 192 ตัวอย่าง โดยนำเพลี้ยอ่อนมาจัดทำสไลด์ถาวรเพื่อจัดจำแนกชนิด จากการวินิจฉัยชนิดพบว่า 190 ตัวอย่างเป็นเพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover คิดเป็น 98.96 เปอร์เซ็นต์ และ 2 ตัวอย่าง เป็นเพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* (Sulzer) คิดเป็น 1.04 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะสัณฐานวิทยาของเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลักษณะของลำตัวรูปไข่ ยาวเรียวไปทางส่วนหัว ขนาดลำตัวยาว 1.30-1.58 มิลลิเมตร ลำตัวมีสีเหลือง สีเหลืองอมเขียว ไปจนสีเขียวเข้ม สีของลำตัวเปลี่ยนแปลงตามพืชอาหาร ส่วนหัว (head) มีขนาดเล็ก หน้าผาก (vertex) โค้ง ร่องหนวด (antennal tubercle) ไม่พัฒนา ตา (eyes) มีสีน้ำตาลดำ หนวด (antenna) มีจำนวน 6 ปล้อง มีความยาวน้อยกว่าลำตัว หนวดปล้องแรก (scape) สีเหลืองอมน้ำตาล หนวดปล้องที่ 2 (pedicel) สีจางลง หนวดปล้องที่ 3, 4, 5 และ 6 มีสีเหลืองแกมขาว หนวดปล้องที่ 6 ส่วนของ processus terminalis ยาวกว่าส่วนฐานน้อยกว่า 3.5 เท่า มีปากแบบเจาะดูด (piercing-sucking type) อยู่ด้านใต้ส่วนหัวมี 5 ปล้อง ขา (leg) มีสีขาอมเหลือง ตอนปลายของต้นขา (femur) ที่ต่อกับหน้าแข้ง (tibia) สีเข้มขึ้น ปลายหน้าแข้งที่ต่อกับเท้า (tarsus) และเท้ามีสีน้ำตาลเข้มหรือดำ เท้าปล้องแรกและเล็บ (claw) สีดำ ท่อเรียวยาวที่ตั้งอยู่ปลายท้องด้านบนบริเวณปล้องที่ 5 และ

6 (siphunculi) มีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ยาวกว่า ส่วนหาง (cauda) ซึ่งมีสีอ่อน มีขน 4-7 เส้น มีทั้งแบบมีปีกและไม่มีปีก เป็นเพลี้ยอ่อนที่มีพืชอาหารกว้างมาก พบเป็นศัตรูของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก ประเทศไทยพบระบาดทั่วไปในแหล่งปลูกพืชทั่วประเทศ (ภาพที่ 4) สำหรับเพลี้ยอ่อนยาสูบ *M. persicae* เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลำตัวยาว 1.68 – 1.84 มิลลิเมตร ตัวอ่อนที่ออกมาใหม่ๆ มีขนาดเล็กมากสีชมพูอ่อนปนเหลือง เมื่อโตขึ้นสีเหลืองอ่อน สีเหลืองอมเขียว หัวและหนวดมีสีเหลืองอ่อน หนวดมี 6 ปล้อง ความยาวเท่ากับลำตัว ปากยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไซฟิงคูไลยาว ส่วนหางยาวรูปร่างคล้ายนิ้ว ไซฟิงคูไลและส่วนหาง สีจางใส มีพืชอาหารได้แก่ พริก ยาสูบ มะเขือเทศ ผักกาด กะหล่ำดอก คื่นช่าย ข้าว งา ถั่วต่างๆ และมันฝรั่ง เป็นต้น และมีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก (ภาพที่ 5)

การศึกษาชีววิทยาและวงจรชีวิตในห้องปฏิบัติการได้คัดเลือกเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* มาทำการศึกษาในครั้งนี้เนื่องจากพบมากถึง 98.96 เปอร์เซ็นต์ และพบทุกจังหวัดที่ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า เพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* สามารถขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ตัวเต็มวัยสามารถออกลูกได้โดยไม่ต้องผสมพันธุ์ โดยมีการลอกคราบ 4 ครั้ง ตัวอ่อน (nymph) มี 4 ระยะ ตัวอ่อนออกมาใหม่ๆ มีขนาดเล็กมากสีเหลืองจางจนเกือบขาว เมื่อโตขึ้นมีสีเขียวอมเหลืองจนถึงสีเขียวเข้ม ส่วนหัวมีสีดำ และบริเวณส่วนท้องมีจุดสีเขียวเข้มกระจายอยู่ ระยะตัวอ่อน 6 - 7 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุขัย 10 - 15 วัน ตัวแม่ 1 ตัว สามารถออกลูกได้ 39 - 78 ตัว วงจรชีวิตจากไข่จนถึงตัวเต็มวัยตาย 12-30 วัน ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก (ภาพที่ 6)

การศึกษาลำดับพันธุกรรม (DNA Barcode) ของเพลี้ยอ่อน

จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซีตไอน์เอทีขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI เปรียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยอ่อนที่อยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมฐานข้อมูลทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกเพื่อยืนยันความถูกต้อง ผลการวิจัยชนิด พบว่า 190 ตัวอย่าง คิดเป็น 98.96 เปอร์เซ็นต์ เป็นเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* ซึ่งพบทุกจังหวัดที่ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่าง (ตารางที่ 1) และจำนวน 2 ตัวอย่าง เป็นเพลี้ยอ่อนยาสูบ *M. persicae* คิดเป็น 1.04 เปอร์เซ็นต์ พบเฉพาะที่จังหวัดกาญจนบุรี (ตารางที่ 2)

การตรวจสอบเชื้อ PeVYV ในพริกที่เป็นโรคใบเส้นเหลือง

1. ตัวอย่างพริกเป็นโรคใบเส้นเหลือง

ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการอาการเนื่อใบเหลืองคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร เส้นใบเขียว และใบเสียรูปทรง จากแปลงปลูกพริกในจังหวัด กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ตาก นครราชสีมา และพระนครศรีอยุธยา จังหวัดละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค One Step RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน CP บางส่วน (3' end of CP gene) ของเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Potyvirus* ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสขนาด 370 คู่เบส (Sharman *et al.*, 2015) จากจังหวัดกาญจนบุรี 1 ตัวอย่าง และสุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง

(ภาพที่ 7) ส่วนตัวอย่างพริกจากจังหวัดตาก นครราชสีมา และพระนครศรีอยุธยา ปรากฏว่าไม่พบตัวอย่างที่เป็นโรคเส้นใบเหลือง

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

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน CP

จากการทำวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน CP (P3 ORF) ของเชื้อ PeVYV ทั้ง 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตกาญจนบุรี (KBR) และไอโซเลตสุพรรณบุรี (SBR) พบว่า ยีน CP ของทั้ง 3 ไอโซเลต มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 206 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 22.94 - 22.97 กิโลดาลตัน จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 8) และกรดอะมิโนของโปรตีน CP (ภาพที่ 9) พบว่าเชื้อ PeVYV ทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99% - 99.5% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเชื้อ PeVYV ที่พบในต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น อิสราเอล จีน ออสเตรเลีย สเปน มาเลเซีย และอินโดนีเซีย พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระดับ 92.9% - 98.9% และกรดอะมิโนที่ระดับ 95.1% - 100% และการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยจับกลุ่มใกล้ชิดกันและแยกออกจากเชื้อไอโซเลตอื่นที่พบในต่างประเทศ (ภาพที่ 10) และยังคงพบว่าทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยยังจับกลุ่มอยู่ร่วมกับไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในเอเชีย (Asian population) เช่นกับเดียวรายงานของ Liu *et al.* (2015)

การศึกษาอัตราและระยะเวลาการรับเชื้อ และการถ่ายทอดเชื้อ PeVYV ของเพลี้ยอ่อน

ผลการศึกษาระยะเวลาต่อการรับเชื้อ พบว่าที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการรับเชื้อ PeVYV เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ (6 ตัว) 60 เปอร์เซ็นต์ (18 ตัว) 60 เปอร์เซ็นต์ (18 ตัว) 46.67 เปอร์เซ็นต์ (14 ตัว) และ 56.67 เปอร์เซ็นต์ (17 ตัว) ตามลำดับ และการใช้เทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจพบเชื้อในตัวเพลี้ยอ่อน 1 ตัวได้

ผลการศึกษาระยะเวลาต่อการถ่ายทอดเชื้อ พบว่าที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อ PeVYV เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ 50 เปอร์เซ็นต์ 100 เปอร์เซ็นต์ 100 เปอร์เซ็นต์ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และต้นพริกจะแสดงอาการเกิดโรค หลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส 14 - 30 วัน โดยมีลักษณะอาการใบเส้นเหลืองทั่วทั้งใบ บางครั้งขอบด้านข้างของใบม้วนเข้าหากัน โดยเริ่มแสดงอาการจากใบล่างขึ้นไปยอด ส่งผลให้ต้นแคระแกรน (ภาพที่ 11)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เพลี้ยอ่อนในพื้นที่ปลูกพริกจังหวัดจันทบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และจังหวัด นครราชสีมา จังหวัดละ 5 แปลง รวม 192 ตัวอย่าง จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัย และการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาดประมาณ 650 นิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกเพลี้ยอ่อนได้ 2 ชนิด คือ เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover และเพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* (Sulzer) เพลี้ยอ่อนฝ้าย มีระยะตัวอ่อน (nymph) 4 ระยะ ระยะตัวอ่อน 6 - 7 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุขัย 10 - 15 วัน ตัวแม่ 1 ตัว สามารถ ออกลูกได้ 39 -78 ตัว วงจรชีวิตจากไข่จนถึงตัวเต็มวัยตาย 12-30 วัน ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก

การตรวจสอบเชื้อ PeVYV ในพริกที่เป็นโรคเส้นใบเหลืองไอโซเลตจันทบุรี (KBR) และไอโซเลต สุพรรณบุรี (SBR) ยีน CP ของทั้ง 2 ไอโซเลต มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 206 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 22.94 - 22.97 กิโลดาลตัน และเมื่อทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของโปรตีน CP เชื้อ PeVYV ทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99% - 99.5% ตามลำดับ การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP พบว่าเชื้อ ทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยจับกลุ่มใกล้ชิดกัน อยู่ร่วมกับไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในเอเชีย (Asian population) แต่แยก ออกจากเชื้อไอโซเลตอื่นที่พบในต่างประเทศ

ผลการศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อและการถ่ายทอดเชื้อ PeVYV ของเพลี้ยอ่อน พบว่าที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการรับเชื้อ PeVYV ได้ดีที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาในการถ่ายทอด เชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพริกจะแสดง อาการเส้นใบมีสีเหลือง บางครั้งขอบใบม้วนเข้าหากัน หลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อ 14-30 วัน

เพลี้ยอ่อน *A. gossypii* เป็นแมลงที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดโรค และเป็นแมลงที่มีการสืบพันธุ์แบบ ไม่ใช้เพศ (parthenogenesis) ทำให้ประชากรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งหากมีเพลี้ยอ่อนชนิดนี้เข้าทำลายพริกอาจ ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นควรมีการติดตามและเฝ้าระวังเพลี้ยอ่อนในแปลงปลูกพริก สำรวจพืช อาศัยอื่นของเพลี้ยอ่อน และเชื้อ PeVYV ซึ่งอาจจะเป็นแหล่งอาศัยของแมลงและโรค ปลูกพืชหมุนเวียนหรือสลับที่ ไม่ใช้พืชอาศัยของเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* และ เชื้อ PeVYV เพื่อลดการระบาด และควรมีการศึกษาชนิดและ ประสิทธิภาพของตัวห้ำที่จำเพาะต่อเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* เพื่อกำจัดการถ่ายทอดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ข้อมูลชนิด (species) ของแมลงพาหะและชนิดของโรคพืช เพื่อทราบเป้าหมายชนิดของแมลงที่ ต้องควบคุม และทราบความหลากหลายของเชื้อไวรัส

2. ทราบชนิดของพืชอาศัยที่เป็นพืชปลูกและวัชพืช ที่สะสมเชื้อและถ่ายทอดเชื้อต่อไปได้ เพื่อแนะนำแนวทางลดปริมาณเชื้อไม่ให้สะสมบริเวณแปลง
3. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างแมลงพาหะกับโรค เช่น ระยะเวลาเจริญของแมลงที่มีเชื้อโรคที่สะสมอยู่ ระยะของแมลงที่สามารถถ่ายทอดโรคได้ ทำให้ทราบแนวทางการควบคุมแมลง
4. ได้คำแนะนำเพื่อลดปริมาณเชื้อและแมลงในบริเวณแปลงเพื่อลดอัตราการเป็นโรค

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ ผชช. พรพิมล อธิปัญญาคม ผชช. พิเชฐ เชาว์ฉนวนวงศ์ ผอ. ณีภูริมา โฆษิตเจริญกุล ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษาจนงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลง ด้วยดี และขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการทดลอง

12. เอกสารอ้างอิง

- พัชรินทร์ ครุฑเมือง. 2555. เพลี้ยอ่อนแมลงพาหะนำโรคพืช. ภาควิชากีฏวิทยา และโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่. วารสารแก่นเกษตร 40: 197-202.
- Abraham, A., Varrelmann, M. and Vetten, H.J. 2008. Molecular evidence for the occurrence of two new luteoviruses in cool season food legumes in Northeast Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 7(4): 414-420.
- Blackman, R. L. and V. F. Eastop. 2000. *Aphida on the World's crops an Identification and Information Guide.* John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England.
- Brunt, A. A., K. Chrabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson, and E. J. Zurcher. 1996. Plant viruses online: description and lists from the VIDE database. Version: 20 August 1996. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/videl/>. Accessed 21 Mar. 2011.
- Dodds, J. A., J.G. Lee, S.T. Nameth, and F.F. Laemmlen. 1983. Aphid- and whitefly-transmitted viruses in Imperial County, California. *Phytopathology* 74:221-225.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S.L. Ball and J.R. Eward. 2003. Biological identifications through DNA bar-codes. *Proc. Roy. Soc. B*, 270: 313-321.
- 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 *Poterovirus*) in six additional countries. *Arch. Virol.* 158(6), 1337-1341.

- 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.
- Mayo, M., E. Ryabov, G. Fraser and M. Taliansky. 2000. Mechanical transmission of Potato leaf roll virus. *J. Gen. Virol.* 81: 2791-2795.
- Milne, K. S., R.G. Grogan, and K.A. Kimble. 1969. Identification of viruses infecting cucurbits in California. *Phytopathology* 59:819-828.
- Nameth, S. T., J.A. Dodds, A.O. Paulus, and A.N. Kishaba. 1985. Zucchini yellow mosaic virus associated with severe diseases of melon and watermelon in southern California desert valleys. *Plant Dis.* 69:785-788.
- Nault, L.R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses-a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 521-541
- Ryazantsev, D.Yu. and S.K., Zavriev. 2009. An efficient diagnostic method for the identification of potato viral pathogens. *Mol. Biol.* 43: 558 – 567.
- Sharman, M., Lapbanjob, S., Seunruang, 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.
- 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.

13. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยอ่อน *Aphis gossypii* Glover ที่พบในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี ตาก พระนครศรีอยุธยา และ นครราชสีมา

>กาญจนบุรี KAN_65

```
CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTAATATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC
```

>กาญจนบุรี KAN_64

```
CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTAATATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC
```

>กาญจนบุรี KAN_18

```
CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTAATATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC
```

>กาญจนบุรี KAN_33

```
CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTAATATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC
```

>กาญจนบุรี KAN_34

```
CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTAATATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC
```

ตารางที่ 1 (ต่อ)

>สุพรรณบุรี SUP_91

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTTCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACCTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC

>สุพรรณบุรี SUP_92

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAAATCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAAATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTTCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAACTTAACCTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC

>สุพรรณบุรี SUP_93

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTTCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACCTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC

>สุพรรณบุรี SUP_106

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTTCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACCTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC

>สุพรรณบุรี SUP_100

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTTCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACCTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC

ตารางที่ 1 (ต่อ)

>อยุธยา AYU_74

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCC

>อยุธยา AYU_75

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCC

>อยุธยา AYU_80

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCC

>อยุธยา AYU_82

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCC

>อยุธยา AYU_83

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCC

ตารางที่ 1 (ต่อ)

>ตากล TAK_10

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTAATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCC

>ตากล TAK_001

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTAATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCC

>ตากล TAK_004

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTAATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCC

>ตากล TAK_010

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTAATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCC

>ตากล TAK_009

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTCATCTGTAATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGGATCC

ตารางที่ 1 (ต่อ)

>นครราชสีมา RSM_137.1

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAAATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAAATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAACTTAATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTATCTGTACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC

>นครราชสีมา RSM_133.1

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAACTTAATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTATCTGTACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC

>นครราชสีมา RSM_020

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAACTTAATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTATCTGTACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC

>นครราชสีมา RSM_018

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAACTTAATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTATCTGTACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC

>นครราชสีมา

CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACT
ATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTG
ATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATA
TTGCTCATAATAATATTTAGTAACTTAATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATTTATCTGTACTATC
TTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGATCAATTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTA
TTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซีเอ็นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยอ่อนยาสูบ
Myzus persicae (Sulzer) ที่พบในจังหวัดกาญจนบุรี

>กาญจนบุรี 150/KAN

```
TTAGAATCTTAATTCGTCTTGAATTAAGACAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTTATTGTTACAATTCACGCTTTTATTATAA  
TTTTTTTTATAACAATACCAATTGTTATTGGTGGATTGGAAATTGGTTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCTGATATATCTTTCCCACGATTAAT  
AACATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGTAGTTTTTAATTAATAATGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTACCCACC  
CTTATCAAATAATATTGCACATAATAATATTTTCAGTTGATTTAACTATTTTTTCATTACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTTAGGAGCAATTAATT  
TTATTTGTACAATCTTAAATATAATACCAAACAATATAAAATTAACCAAATCCCTTTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATTTTATTAATTT  
TATCTTTACCTGTTCTAGCAGGTGCTATTACAATATTATTAAGTATCGTAATTTAAATA
```

กรมวิชาการเกษตร



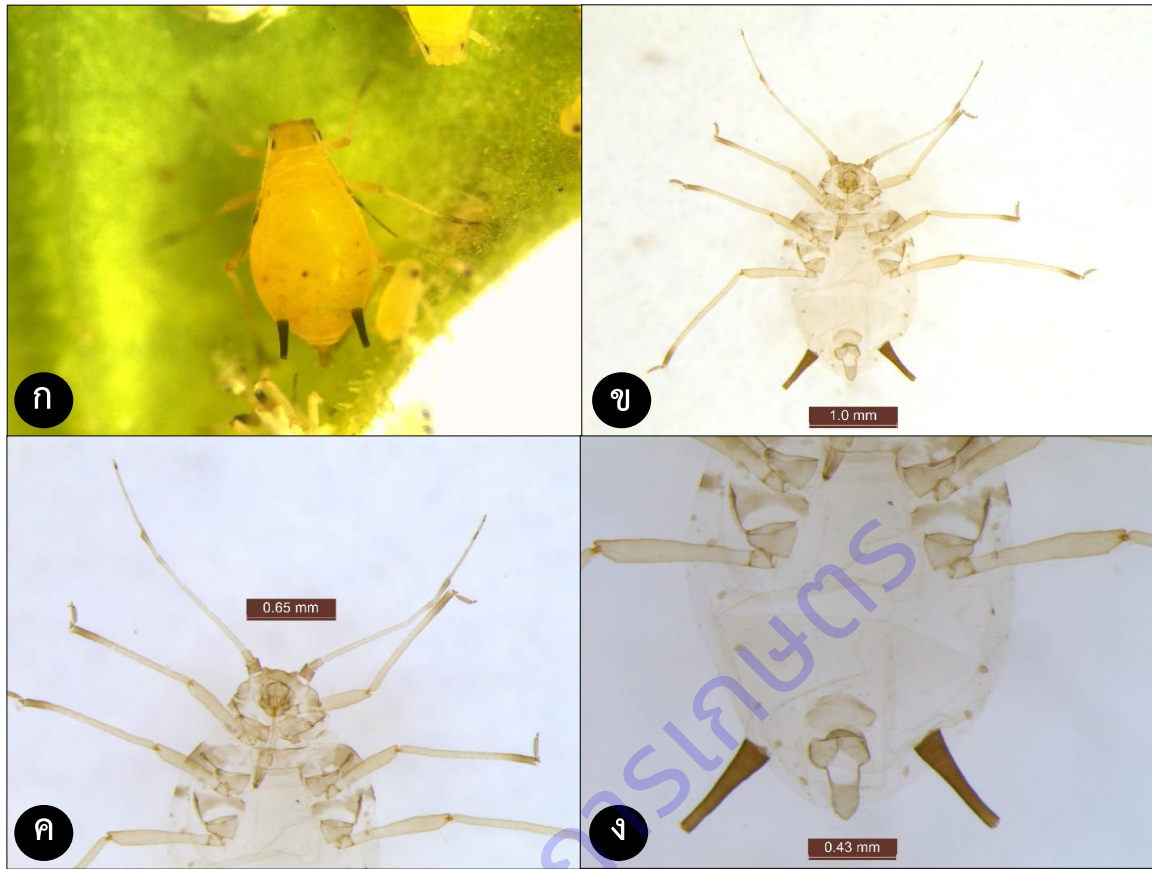
ภาพที่ 1 สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนและใบพริกที่แสดงอาการโรคเส้นใบเหลือง



ภาพที่ 2 ทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) และศึกษาชีววิทยาและวงจรชีวิตเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* Glover ในห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 3 ทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Polerovirus* โดยเพลี้ยอ่อน



ภาพที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii*

- ก.) ตัวเต็มวัย (adult)
- ข.) ตัวเต็มวัยเมื่อนำไปทำสไลด์ถาวร
- ค.) ส่วนหัว (head)
- ง.) ส่วนหาง (cauda) และไซฟิงคูล (siphunculi)



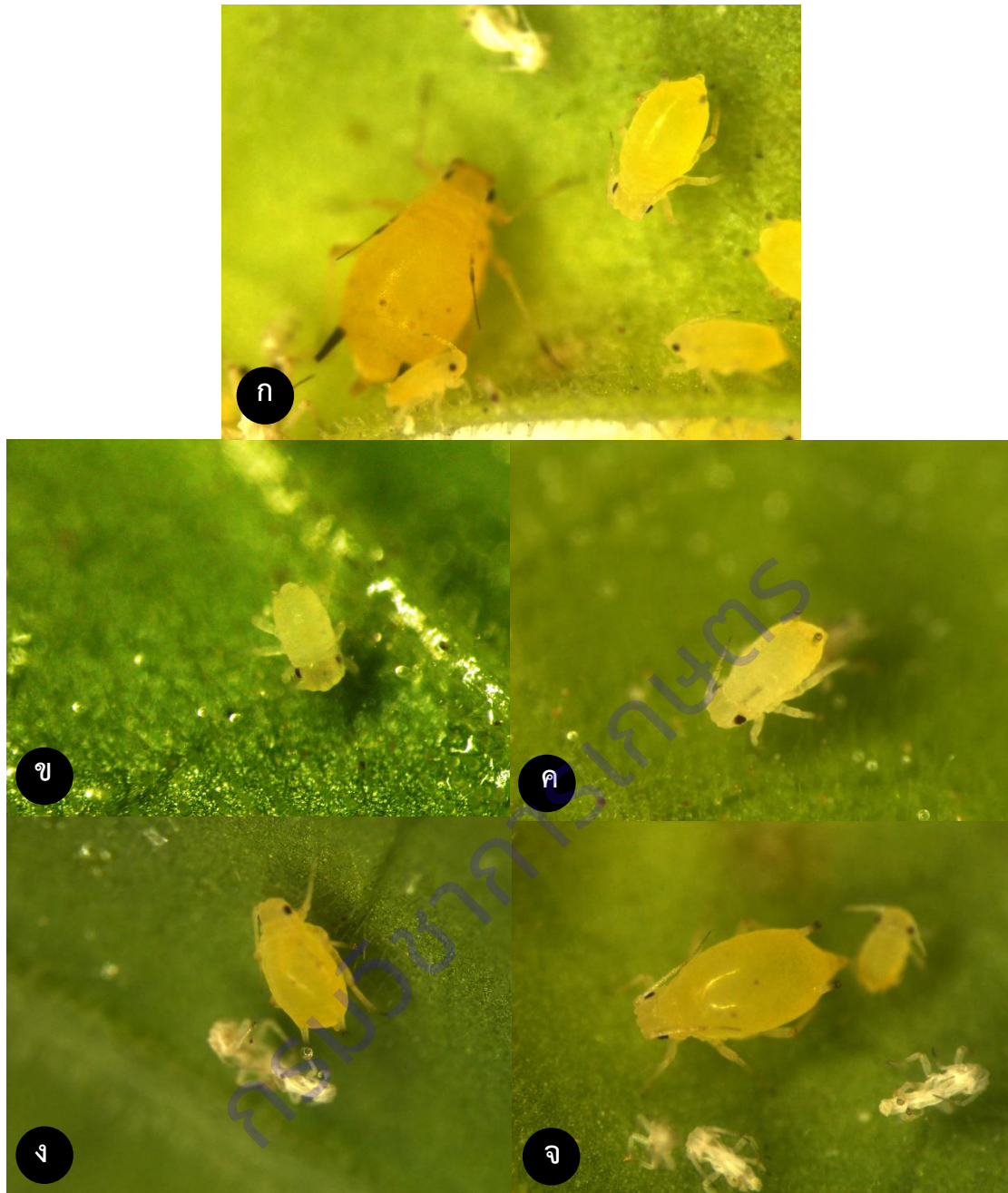
ภาพที่ 5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเพลี้ยอ่อนยาสูบ *M. persicae*

ก.) ตัวเต็มวัย (adult)

ข.) ตัวเต็มวัยเมื่อนำไปทำสไลด์ถาวร

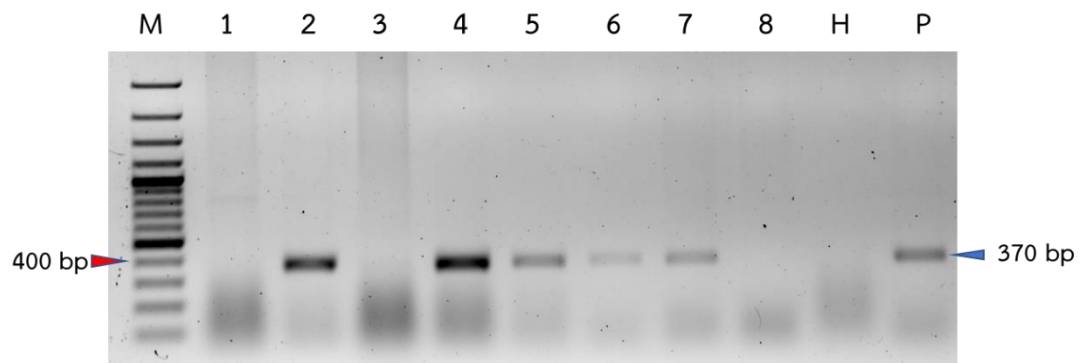
ค.) ส่วนหัว (head)

ง.) ส่วนหาง (cauda) และไซฟิงคูลิ (siphunculi)



ภาพที่ 6 วงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii*

- ก. ตัวเต็มวัย
- ข. ตัวอ่อนวัย 1
- ค. ตัวอ่อนวัย 2
- ง. ตัวอ่อนวัย 3
- จ. ตัวอ่อนวัย 4



ภาพที่ 7 แลปดีเอ็นเอของยีน *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	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC	60
PKR-P3	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC	60
SBR-CP	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC	60

KBR-CP	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTCGCACCCCTGGGCGCACA	120
BKK-CP	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTCGCACCCCTGGGCGCACA	120
SBR-CP	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTCGCACCCCTGGGCGCACA	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	TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA	300
SBR-CP	TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA	300

KBR-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAAGTAA	360
BKK-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAAGTAA	360
SBR-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAAGTAA	360

KBR-CP	TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCACTGCAAGCTTACT	420
BKK-CP	TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCACTGCAAGCTTACT	420
SBR-CP	TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCACTGCAAGCTTACT	420

KBR-CP	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCGTCACCAAAGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480
BKK-CP	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCGTCACCAAAGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480
SBR-CP	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCGTCACCAAAGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480

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

KBR-CP	TACAGAGGCAACGGGACAAAGAACGTTGCTGCCGTTTCTTTTTCAGATCCGGTTTACTGTG	600
BKK-CP	TACAAAGGCAACGGGACAAAGAACGTTGCTGCCGTTTCTTTTTCAGATCCGGTTTACTGTG	600
SBR-CP	TACAAAGGCAACGGGACAAAGAACGTTGCTGCCGTTTCTTTTTCAGATCCGGTTTACTGTG	600
	**** *****	
KBR-CP	CAACTGCACAACCCCAAATGA	621
BKK-CP	CAaTTGCACAACCCCAAATGA	621
SBR-CP	CAATTGCACAACCCCAAATGA	621
	*** *****	

ภาพที่ 8 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของยีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต

KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี

BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร

SBR: ไอโซเลตสระบุรี

(*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

KBR-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNNRRRNGGRNRRSRNRV	60
BKK-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNNRRRNGGRNRRSRNRV	60
SBR-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNNRRRNGGRNRRSRNRV	60

KBR-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPCLSESVLSSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE	120
BKK-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPCLSESVLSSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE	120
SBR-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPCLSESVLSSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE	120

KBR-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSEDQFRL	180
BKK-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSEDQFRL	180
SBR-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSEDQFRL	180

KBR-CP	YKNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNP	206
BKK-CP	YKNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNP	206
SBR-CP	YKNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNP	206
	* *****	

ภาพที่ 9 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับ

กรดอะมิโนของยีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต

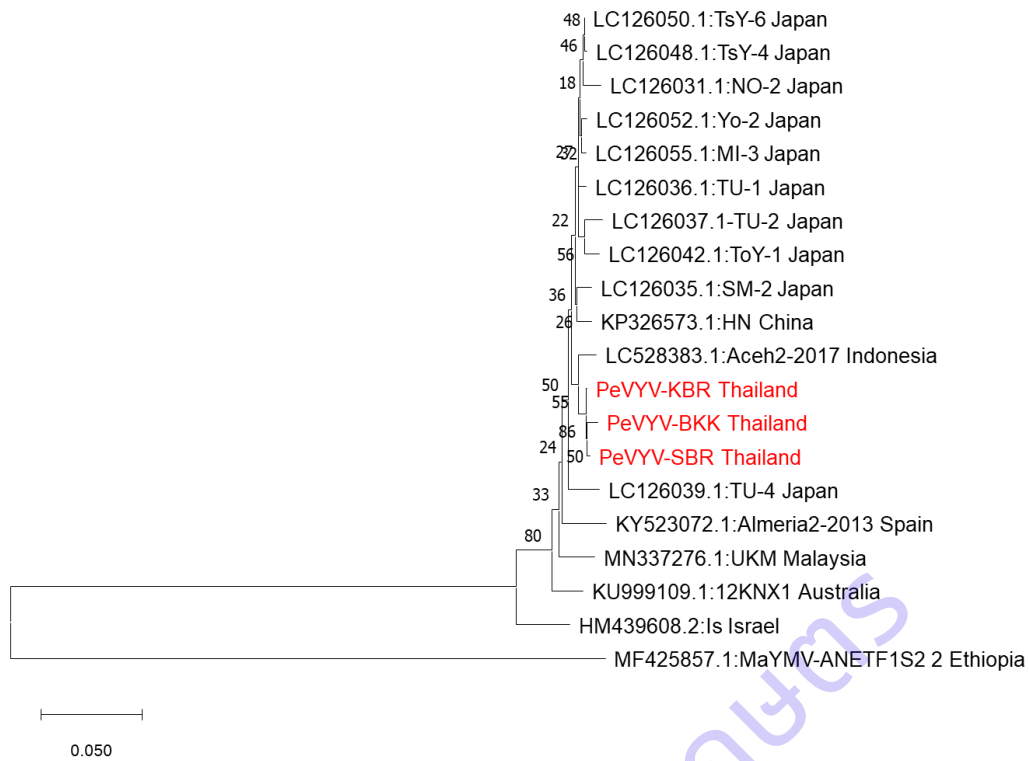
KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี

BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร

SBR: ไอโซเลตสระบุรี

(*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 10 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 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



ภาพที่ 11 อาการเกิดโรคของต้นพริกหลังจากการถ่ายทอดเชื้อไวรัส PeVWV โดยเพลี้ยอ่อนฝ้าย
A. gossypii