



รายงานโครงการวิจัย

ชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vectors) ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญ
กับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย

Study of insect vectors that causes plant diseases in
economic plants in Thailand

สุนัดดา ชาวลิต

Sunadda Chaovalit

ปี พ.ศ. 2563



รายงานโครงการวิจัย

ชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vectors) ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญ
กับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย

Study of insect vectors that causes plant diseases in
economic plants in Thailand

สุนัดดา ชาวลิต

Sunadda Chaovalit

ปี พ.ศ. 2563

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
ผู้วิจัย	1
บทนำ	2
บทคัดย่อ	4
1. การทดลองที่ 1 ชีวชนิด (biotype) ของแมลงหวี่ขาวยาสูบ <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) ที่เป็นพาหะของโรคใบหงิกเหลืองในพริก (Pepper yellow Leaf curl virus) ในภาคตะวันตกของประเทศไทย	6
2. การทดลองที่ 2 ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) ที่เป็นพาหะของเชื้อ Polerovirus สาเหตุโรคเส้นใบเหลือง ในพริก	26
3. การทดลองที่ 3 ชนิดของเพลี้ยแป้ง (Hemiptera: Pseudococcidae) ที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt) ในเขตภาคตะวันออกและภาคตะวันตกของประเทศไทย	51
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	77
บรรณานุกรม	80

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พิสสุวรรณ เจียมสมบัติ ผชช. พรพิมล อธิปัญญาคม ผชช.พิเชฐ เชาววัฒนวงศ์ ผอ. ณิชฎิมา โฆษิตเจริญกุล ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษา งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี และขอบคุณบุคคลากรของกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บและเตรียมตัวอย่างทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ

ผู้วิจัย

นาง	พิสสุวรรณ เจียมสมบัติ	ที่ปรึกษาโครงการ
นางสาว	พรพิมล อธิปัญญาคม	ที่ปรึกษาโครงการ
นาย	พิเชฐ เชาววัฒนวงศ์	ที่ปรึกษาโครงการ
นาง	ณิชฎิมา โฆษิตเจริญกุล	ที่ปรึกษาโครงการ
นางสาว	สุนัดดา เชาวลิต	หัวหน้าโครงการ
นาย	จารุวัฒน์ แต้มกุล	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาว	ยุวรินทร์ บุญทบ	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาว	ชมัยพร บัวมาศ	ผู้ร่วมวิจัย
นาง	เกศสุดา สนศิริ	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาว	จอมสุรางค์ ดวงธิสาร	ผู้ร่วมวิจัย
นาย	ภูวนารถ มณีโชติ	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาว	กาญจนา วาระวิชะนี	ผู้ร่วมวิจัย
นาย	แสนชัย คำหล้า	ผู้ร่วมวิจัย

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

ปัจจุบันมีโรคพืชหลายชนิดที่มีแมลงเป็นพาหะ ระบาดรุนแรงในพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ สร้างความเสียหายต่อผลผลิตการเกษตรเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งไม่สามารถทำลายเชื้อที่อยู่ในพืชได้โดยตรง โดยเฉพาะการใช้สารเคมี การป้องกันกำจัดจึงจำเป็นต้องทำแบบบูรณาการ เช่น การปรับสภาพแวดล้อมให้ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อโรค การปรับวิธีเขตกรรมเพื่อปรับสภาพนิเวศในแปลงไม่ให้อื้อต่อการเกิดโรคและแมลงพาหะ การใช้ท่อนพันธุ์ที่ปลอดเชื้อ การใช้พันธุ์ต้านทาน ซึ่งการป้องกันกำจัดแมลงพาหะซึ่งถือเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสที่สำคัญยิ่ง แมลงพาหะแต่ละชนิดมีความเฉพาะเจาะจงกับโรคที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคอุบัติใหม่ที่เกิดขึ้นกับพืชสำคัญทางเศรษฐกิจที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน และมีแนวโน้มจะมีความรุนแรงของการเกิดโรคมากยิ่งขึ้น การถ่ายทอดโรคโดยอาศัยแมลงพาหะ (insect vectors) จัดว่าเป็นการถ่ายทอดเชื้อระหว่างต้นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด เพราะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว การควบคุมทำได้ยาก โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูด เช่น แมลงหวี่ขาว เพลี้ยอ่อน เพลี้ยแป้ง เพลี้ยไก่แจ้ เพลี้ยจักจั่น และ เพลี้ยไฟ เป็นต้นพริก แดงกวา สับปะรด และพืชตระกูลส้ม เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ เนื่องจากเป็นพืชอาหารที่คนนิยมบริโภคและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ สามารถสร้างรายได้จำนวนมากให้แก่เกษตรกร แต่ปัจจุบันในการผลิตพืชดังกล่าวประสบปัญหาการระบาดของโรคพืชที่มีแมลงเป็นพาหะ ทำให้ผลผลิตและคุณภาพลดลง ไม่เป็นที่ต้องการของตลาดความเสียหายที่เกิดจากโรคอาจทำให้ผลผลิตของพืชลดลง หรือหากรุนแรงมากอาจทำให้ผลผลิตลดลง 80-100 เปอร์เซ็นต์ได้ ปัญหาดังกล่าวนี้หากไม่รีบดำเนินการแก้ไขโดยด่วน ประเทศไทยสูญเสียรายได้คิดเป็นมูลค่าปีละหลายพันล้านบาท

โรคพืชที่สำคัญได้แก่ โรคใบหงิกเหลืองของพริกที่เกิดจากไวรัส *Pepper yellow leaf curl virus* (PeYLCV) ในสกุลบีโกโมไวรัส (*Begomovirus*) มีแมลงหวี่ขาวยาสูบเป็นแมลงพาหะ โรคดังกล่าวพบแพร่ระบาดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ในประเทศอินเดีย และศรีลังกา สำหรับประเทศไทยพบการระบาดมานานแล้วและมีแนวโน้มการระบาดรุนแรงมากขึ้น พริกที่เป็นโรคแสดงอาการใบด่างหงิกเหลือง ต้นแคระแกร็น และผลผลิตลดลงถึง 80 % นอกจากนี้ยังมีโรคเส้นใบหงิกเหลืองในพริกและแตงกวาซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Polerovirus* โดยมีเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะ พืชที่เป็นโรคแสดงอาการม้วนขึ้นเข้าหากันของขอบด้านข้างของใบ สีซีดจาง โดยเฉพาะใบล่าง และกิ่งก้านใบมีการตั้งชูขึ้น ต้นแคระแกร็น และอาจมีแผลเนื้อเยื่อตายแห้งตาย (necrosis) ในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารในส่วนของลำต้นและก้านใบ และผลผลิตลดลงถึง 80-100 % โรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt) ที่มีเพลี้ยแป้งเป็นพาหะนำโรค ครั้งแรกในปี 2532

ซึ่งสร้างความเสียหายแก่ผลผลิตสับปะรดเป็นอย่างมาก โดยสาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อไวรัสสกุล Closterovirus ที่ซึ่งจะแสดงอาการเหี่ยว ใบจะแห้งคล้ายขาดน้ำ รากส่วนใหญ่เน่าแห้งตายตั้งแต่วัยสับปะรดอายุ 6 เดือน หากเกิดระบาดในระยะติดผลจะทำให้ผลเล็กและกระแกรีนคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน หากมีการระบาดรุนแรงจะไม่ได้ผลผลิตเลย แมลงพาหะนำเชื้อโรคเหี่ยวสับปะรด เป็นเพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพูและเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาหรือเพลี้ยแป้งน้อยหน้า สำหรับโรครินนิง (Citrus greening disease) เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มทั่วโลกโดยเฉพาะในแถบเอเชีย สร้างความเสียหายให้กับประเทศที่ปลูกส้มอย่างมากมายรวมทั้งประเทศไทยด้วย โรคนี้เกิดจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในท่ออาหารของพืช โดยมีเพลี้ยไก่แจ้เป็นแมลงพาหะ ต้นส้มที่ได้รับเชื้อจะแสดงอาการใบเล็ก เหลือง ชี้ตั้ง คล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร ผลผลิตลดลงไม่มีคุณภาพ มักจะร่วงก่อนอายุการเก็บเกี่ยว ต้นส้มจะแสดงอาการทรุดโทรมอยู่หลายปีและตายในที่สุด จะเห็นได้ว่าปัญหาโรคพืชที่สำคัญ ที่กล่าวมาข้างต้นล้วนมีแมลงเป็นพาหะนำโรคทั้งสิ้น

ดังนั้นกรมวิชาการเกษตรในฐานะเป็นองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) จึงมีหน้าที่เตรียมข้อมูลเพื่อดำเนินการเฝ้าระวังและวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และเป็นมาตรการสนับสนุนการส่งออกสินค้าเกษตร จึงได้จัดทำโครงการ ชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vectors) ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย เพื่อทราบความสัมพันธ์และประสิทธิภาพการถ่ายทอดโรคระหว่างโรคพืช แมลงพาหะ และพืชอาศัยซึ่งเป็นแหล่งสะสมของโรคและแมลงพาหะ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ต่อการเฝ้าระวังการระบาดของแมลงพาหะและโรคพืช และการป้องกันกำจัดแบบบูรณาการ ช่วยให้อัตราการแพร่ระบาดของโรคและแมลงในแปลงปลูกลดลงและผลผลิตที่ได้มีคุณภาพตามความต้องการของตลาด ส่งผลให้การผลิตสินค้าเกษตรได้มาตรฐานสุขอนามัย เอกชนผู้ประกอบการและเกษตรกรสามารถผลิตพืชที่คุณภาพได้มาตรฐานสุขอนามัยพืช สามารถพึ่งพาตนเองได้ รายได้ครัวเรือนมากขึ้น คุณภาพชีวิตดีขึ้น เศรษฐกิจในภาพรวมซบเซมและของประเทศดีขึ้น เป็นลำดับ

วัตถุประสงค์

ทราบความสัมพันธ์และประสิทธิภาพการถ่ายทอดโรคระหว่างแมลงพาหะ โรคพืช และพืชอาศัย เพื่อเฝ้าระวังการระบาดของแมลงพาหะและโรคพืช และเป็นมาตรการสนับสนุนการส่งออกสินค้าเกษตร

วิธีการวิจัย

โครงการวิจัยชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vectors) ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย ภายใต้แผนบูรณาการการวิจัยและพัฒนามาตรการสุขอนามัยพืชและการ

เผ่าระวังศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 3: การสร้างความเข้มแข็งทางเศรษฐกิจและแข่งขันได้อย่างยั่งยืนเป้าหมายที่ 3. แผนการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อตอบโจทย์การสร้างองค์ความรู้พื้นฐานของประเทศและขีดความสามารถทางเทคโนโลยี ซึ่งโครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย 4 การทดลอง ซึ่งมีรายละเอียดของขอบเขตโครงการวิจัยดังต่อไปนี้

- 1) เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงพาหะ โรคพืช และพืชอาศัยอื่น ในแปลงพืชที่แสดงอาการเป็นโรค โดยพืชเศรษฐกิจที่เป็นเป้าหมาย ได้แก่ พริก แตงกวา สับปะรด และพืชตระกูลส้ม
- 2) ตรวจสอบวิเคราะห์ชนิดแมลงพาหะโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคชีวโมเลกุล
- 3) ตรวจสอบวิเคราะห์ชนิดโรคพืชด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล
- 4) ศึกษาความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดโรคระหว่างแมลงพาหะ โรคพืชและพืชอาศัยอื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ
- 5) ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายทอดโรคโดยแมลงพาหะไปยังพืชอาศัย
- 6) จัดทำคำแนะนำการเผ่าระวังและการจัดการแมลงพาหะนำโรค (Insect vectors) ได้แก่ แมลงหวี่ขาวในพริก เพลี้ยอ่อนในพริกและแตงกวา เพลี้ยแป้งในสับปะรด และเพลี้ยไก่แจ้ส้มในพืชตระกูลส้ม

Abstract

Chilli and pineapple are economic crop in Thailand. The planting areas are around the country. Production of chilli and pineapple has decreased in quantity and quality due to the outbreak of yellow leaf curl disease caused by pepper yellow leaf curl virus (PepYLCV), *Bemisia tabaci* is a vector for virus transmission. Pepper vein yellows virus (PeVYV), the Aphid is vector for virus transmission. Pineapple Mealybug Wilt (PMWaV), the Mealybug is 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, insect vector and host plants. A sampling of *B. tabaci* in Tak, Kanchanaburi, Ratchaburi and Phetchaburi provinces and sampling of aphid in Kanchanaburi, Suphanburi, Ayutthaya, Tak and Nakhon Ratchasima provinces on chilli plantations showing symptoms of yellow leaf curl disease, and sampling of Pineapple Mealybug Wilt-Associated found in Pineapple at Eastern and Southern was carried out from October 2017 to September 2020 The insect samples were collected from the diseased fields and identified based on morphology. Whitefly, Aphid and Mealybug were inspected by amplification of partial mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and nucleotide sequenced.

The morphology of the pupal stage of *B. tabaci* revealed smooth leaf forms. The obtained DNA product was 850 base pairs. Three biotypes from chilli were Asial, Asiall_6 and Asiall_7 in a proportion of 66.67%, 28.20% and 5.13.% respectively. 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. Two species of aphid 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. Two species of mealybug were identified by using molecular technic; *Dysmicococcus brevipes* (Cockerell) and *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley. However, species of mealybug might not be specific to Pineapple Mealybug Wilt because of two species of mealybug and , mealybugs were found to be associated with both symptomatic and asymptomatic pineapple plants. It was found that all stages of mealybug can be a carrier of viral disease.

บทคัดย่อ

พริกและสับปะรดเป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลาย สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตพริกและสับปะรดลดลง เนื่องมาจากการระบาดของโรคใบหงิกเหลือง ที่เกิดจาก pepper yellow leaf curl virus (PepYLCV) ที่มีแมลงหวี่ขาว ยาสือบเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดโรค โรคเส้นใบเหลืองที่เกิดจาก pepper vein yellows virus

(PeVYV) ที่มีเพลี้ยอ่อน (Aphid) (Hemiptera: Aphididae) เป็นแมลงพาหะ และโรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt; PMWaV) ที่มีเพลี้ยแป้ง (Hemiptera: Pseudococcus) ที่เป็นพาหะ การลดการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากแมลงพาหะ เป็นแนวทางหนึ่งในการจัดการโรค ซึ่งจำเป็นต้องทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุ แมลงพาหะ และพืชอาศัย การศึกษาวิจัยนี้ทำโดยเก็บตัวอย่างแมลงหิวข้าวยาสูบ ในจังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี และเพลี้ยอ่อน ในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และจังหวัดนครราชสีมา บนต้นพริกที่แสดงอาการเป็นโรค และพืชอื่นในแปลงพริก และเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งในแปลงสับปะรดที่ปรากฏอาการของโรค ในพื้นที่ภาคตะวันออกและภาคตะวันตก ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2563 จำแนกชนิดแมลงพาหะ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครมออกซิเดส (mtCOI)

พบว่าแมลงหิวข้าวยาสูบในพริกมีลักษณะสัณฐานวิทยาของดักแด้เป็น แบบ smooth leaf form จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาด 850 นิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกแมลงหิวข้าวยาสูบจากพริก ได้ 3 ไบโอไทป์ ได้แก่ Asial Asiall_6 และ Asiall_7 ในสัดส่วน 66.67 28.20 และ 5.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการทดลองถ่ายทอดโรคใบหงิกเหลืองพริกจากต้นพริกที่ติดเชื้อ PepYLCV ไปยังต้นกล้าพริกด้วยแมลงหิวข้าวยาสูบไบโอไทป์ Asial จำนวน 30 ตัวพบว่าระยะเวลาที่ให้แมลงรับเชื้อนาน 72 ชั่วโมงสามารถตรวจพบเชื้อในตัวแมลงแต่ละตัวได้ 63.34 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการรับเชื้อที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจพบเชื้อในตัวแมลงได้ 36.67 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาถ่ายทอดเชื้อ PepYLCV นาน 72 ชั่วโมงมีประสิทธิภาพถ่ายทอดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 1

ชีวชนิด (biotype) ของแมลงหิวข้าวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) ที่เป็นพาหะของโรคใบหงิกเหลืองในพริก (Pepper yellow leaf curl virus) ในภาคตะวันตกของประเทศไทย

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

สุนัดดา เชาวลิต¹ ภูวนารถ มณีโชติ² เกศสุตา สนศิริ¹

๒๕๖๕ กลุ่มวิจัยวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

๒๕๖๕ กลุ่มวิจัยวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

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.

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

บทคัดย่อ

พริกเป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายรวมทั้งในภาคตะวันตก สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตพริกลดลง เนื่องมาจากการระบาดของโรคใบหงิกเหลือง ที่เกิดจาก pepper yellow leaf curl virus (PepYLCV) ที่มีแมลงหิวข้าวยาสูบเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดโรค การลดการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากแมลงพาหะ เป็นแนวทางหนึ่งในการจัดการโรค ซึ่งจำเป็นต้องทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัส แมลงหิวข้าว และพืชอาศัย การศึกษาวิจัยนี้ทำโดยเก็บตัวอย่างแมลงหิวข้าวยาสูบบนต้นพริกที่แสดงอาการเป็นโรคใบหงิกเหลือง และพืชอื่นในแปลงพริก ในจังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2562 จำนวนรวม 60 ตัวอย่าง จำแนกชนิดแมลงหิวข้าวโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกไปโอไทป์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครมออกซิเดส (mtCOI) พบว่าแมลงหิวข้าวยาสูบมีลักษณะสัณฐานวิทยาของดักแด้เป็น แบบ smooth leaf form จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาด 850 นิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกแมลงหิวข้าวยาสูบจากพริกและพืชอาศัยอื่นได้ 4 ไปโอไทป์ ได้แก่ Asial Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 โดยแต่ละไปโอไทป์มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระดับ 99.48 – 100 86.1 – 100 85.2 – 100 และ 86.8 – 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แมลงหิวข้าวยาสูบที่เก็บจากพริกมี 3 ไปโอไทป์ ได้แก่ Asial Asiall_6 และ Asiall_7 ในสัดส่วน 66.67 28.20 และ 5.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ทางไฟโลเจเนติกส์พบว่าแมลงหิวข้าวยาสูบจับกลุ่มเป็นคลัสเตอร์ตามไปโอไทป์ โดยไปโอไทป์ Asial ในพริกและมะเขือทุกตัวอย่างอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกัน และแยกเป็นเคลด (clade) ตามชนิดพืช ส่วนไปโอไทป์ Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 ในพริก มะเขือ แตงโมป่า แยกคลัสเตอร์ตามไปโอไทป์และแยกเคลดตามชนิดพืชเช่นกัน ผลการทดลองถ่ายทอดโรคใบหงิกเหลืองพริกจากต้นพริกที่ติดเชื้อ PepYLCV ไปยังต้นกล้าพริกด้วยแมลงหิวข้าวยาสูบไปโอไทป์ 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

คำหลัก : พริก มะเขือ แผลงหวีขาว ยีนไซโตโครมออกซิเดส เบโกโมไวรัส การถ่ายทอดโรค

รหัสการทดลอง 03-47-61-01-00-00-01-61

คำนำ

พริกเป็นพืชผักสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการผลิตเพื่อใช้ในประเทศและเพื่อการส่งออกในรูปของพริกสดและพริกเพื่อการแปรรูป ในแต่ละปีประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออกพริกจำนวนมาก การผลิตพริกประสบปัญหาทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ ผลผลิตลดลงเนื่องจากการเข้าทำลายของโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคใบหงิกเหลืองที่เกิดจากไวรัสในสกุล *Begomovirus* ทำให้ความเสียหายให้พริกได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงเก็บเกี่ยวมากกว่า 97 % (Trisno *et al.*, 2009) โรคนี้มีแมลงหวีขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) เป็นพาหะ (Prakash and Singh, 2006) ในประเทศไทยพบโรคนี้ระบาดในแหล่งปลูกพริกทางภาคตะวันตกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อพืชได้รับเชื้อจะแสดงอาการอ่อนแอ ใบเหลือง หรือใบเหลืองร่วมกับใบด่าง ใบม้วน หงิก ลำต้นแคระแกร็น ผลพริกมีขนาดเล็กและบิดเบี้ยวเสียรูปทรง และผลผลิตลดลง การแพร่ระบาดและความรุนแรงของโรค ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ทั้งด้านประชากรของแมลงพาหะ ชนิดพืช และสภาพแวดล้อม เช่น ชนิดของแมลงหวีขาวที่เป็นแมลงพาหะ ชนิดและสายพันธุ์ของพืชอาศัย ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแมลงหวีขาวและชนิดของเชื้อ *Begomovirus* (Kenyon *et al.*, 2014)

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแมลงหวีขาว จึงทำให้การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว อีกทั้งแมลงหวีขาวยาสูบ *B. tabaci* ซึ่งจัดเป็นศัตรูพืชสำคัญที่มีการระบาดทำความเสียหายไปทั่วโลก มีความซับซ้อน การจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานยังมีความคลุมเครือ (cryptic species) ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงหวีขาวยาสูบ ส่งผลต่อการปรับตัวให้เข้ากับพืชอาหาร การดัดคุณสมบัติธรรมชาติ การต้านทานสารฆ่าแมลง รวมถึงประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส ดังนั้นสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ในฐานะหน่วยงานที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกำกับดูแลงานด้านอารักขาพืช จึงจำเป็นต้องศึกษาให้ทราบถึงชนิดของแมลงพาหะและพืชอาศัย ตลอดจนความสัมพันธ์และความจำเพาะระหว่างแมลงกับเชื้อสาเหตุ เพื่อหาแนวทางการจัดการโรคโดยลดการแพร่ระบาดของโรคจากแมลงพาหะ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างแมลงหีวขาวยาสูบ เช่น หลอดดูดตัวอย่างแมลง (aspirator) ขวดเก็บตัวอย่าง ปากคีบ พู่กัน ถังกระดาษสีน้ำตาล และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรแมลงหีวขาว เช่น เข็มปลายแหลม เข็มปลายงอ ปากคีบปลายแหลม เพลท โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 %, แอลกอฮอล์ 70 – 95 % กรดแกลเซียลอะซิติก แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แอซิกฟูซซินสแตน โคลฟอย 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) และอุปกรณ์ถ่ายภาพ (camera lucida)
5. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดแมลงหีวขาว ได้แก่ Russel (1958) Martin (1987) และ Mound and Halsey (1978)

วิธีการการเก็บตัวอย่างแมลงหีวขาวยาสูบ

เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหีวขาวยาสูบทั้งตัวเต็มวัยและดักแด้ จากแปลงพริกที่แสดงอาการของโรคใบหงิกเหลืองจากไวรัสในแหล่งปลูกพริกทางภาคตะวันตกของประเทศไทย 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)

การตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงหีวขาวยาสูบ

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

การสกัดดีเอ็นเอจากแมลงหีวขาวยาสูบ และเพิ่มปริมาณยีน mtCOI

สกัดดีเอ็นเอจากแมลงหริ่งขาวยาสูบที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% ตามวิธีการของ Walsh *et al.* (1991) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณยีน mtCOI ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ปริมาตร 23 ไมโครลิตร ประกอบด้วย nuclease free water 5.5 ไมโครลิตร master mix 12.5 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ 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

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

การเก็บตัวอย่างใบพริกและตรวจสอบชนิดเชื้อไวรัส

เก็บตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการของโรคใบหงิกเหลือง ในแปลงเดียวกับที่เก็บแมลงหริ่งขาว (fig.1B) เพื่อจำแนกชนิดเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุโรค ใช้ใบพริก 1 มิลลิกรัม สกัดดีเอ็นเอรวมด้วยชุดสกัด FavorPrep Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwan) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Begomovirus* ด้วยไพรมเมอร์ 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) ตรวจสอบ

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม 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. ดูคดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบต่าง ๆ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ Sample buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 95 °C นาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำมาวางบนน้ำแข็งทันที นาน 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 โดยให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอจีโนมของไวรัส ≥ 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 ด้วย

โปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) เพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดเชื้อไวรัสที่นำมาทดลอง

การเลี้ยงแมลงหีขาวยาสูบเพื่อใช้ทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

นำแมลงหีขาวยาสูบไปโอโทป์ Asial ที่ได้จากแปลงพริกมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในกรงขนาด 1 x 1 ตารางเมตร จนได้โคลีนิบริสุทธ์ จากนั้นเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนต้นมะเขือเปราะ ในโรงเรือนขนาด 3 x 2 ตารางเมตร คลุมด้วยตาข่ายความถี่ 40 ช่องต่อตารางเซนติเมตร

การศึกษาอัตราและระยะเวลาการได้รับเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัสของแมลงหีขาวยาสูบ

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

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

การศึกษาอัตราและระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อ นำแมลงหีขาวยาสูบไปโอโทป์ Asial ที่เพิ่งออกจากดักแด้ ให้ดูดอาหารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพริกที่มีเชื้อ PepYLCV เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยแมลงหีขาวยาสูบจำนวน 30 ตัว ในต้นพริกปกติ (พริกระยะ 3-4 ใบจริง) ที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 10 ซ้ำ) เมื่อครบเวลา กำจัดแมลงหีขาวยาสูบโดยการพ่นสารเคมีกำจัดแมลง นำต้นพริกมาเก็บไว้ในกรงป้องกันแมลงและสังเกตระยะเวลาที่ต้นพริกแสดงอาการของโรค บันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏ ตรวจหาเชื้อ PepYLCV ในใบพริก ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์

เวลาและสถานที่

เวลา : เดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

สถานที่ : แหล่งปลูกพริกทางภาคตะวันตกของประเทศไทย ได้แก่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี และห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงหีขาวยาสูบ

ผลการจำแนกแมลงหีขาวที่เก็บมาศึกษา โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดักแด้ พบว่าเป็นแมลงหีขาวยาสูบ *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) ช่องเปิดขนาดเล็กบนลำตัว (dorsal disc pores) มีขนาดเล็ก กระจายอยู่ที่ขอบด้านนอกของลำตัว 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)

การจำแนกไบโอไทป์ของแมลงหริ้วขาวยาสูบ โดยใช้ยีน mtCOI

ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 752 นิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI จำแนกไบโอไทป์แมลงหริ้วขาวยาสูบจำนวน 60 ตัวอย่างที่เก็บได้จากแปลงพริกที่เป็นโรคใบหงิกเหลือง พืชอาศัย และวัชพืชในแปลงพริก พบว่ามี 4 ไบโอไทป์ 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 ไบโอไทป์ โดยพบ Asial มากที่สุด (66.67%) ในจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี รองลงมาเป็น Asiall_6 (28.20%) และ Asiall_7 (5.13.%) พบในจังหวัดกาญจนบุรี สำหรับในพืชอาศัยอื่น พบไบโอไทป์ Asial ในมะเขือ พักทอง และแตงโมป่า พบในจังหวัดกาญจนบุรี และตาก ไบโอไทป์ Asiall_1 พบในมะเขือในจังหวัดตาก เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม clustalW ใน MEGA7 พบว่าแมลงหริ้วขาวยาสูบจากพริกที่เป็นไบโอไทป์ 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 – 100เปอร์เซ็นต์

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 เป็นไบโอไทป์ 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 เคลด เคลดที่ 1 เป็นไบโอไทป์ Asial ในแตงโมป่า 1 ตัวอย่างจากจังหวัดตาก เคลดที่ 2 พบในมะเขือ 4 ตัวอย่าง จากกรุงเทพมหานคร และตาก และพบในพักทอง 1 ตัวอย่าง จากกาญจนบุรี กิ่งที่ 2 มี 3 ไบโอไทป์อยู่ด้วยกัน ได้แก่ Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นไบโอไทป์ Asiall_7 จำนวน 2 ตัวอย่าง พบในพริกจากจังหวัด

กาญจนบุรี คลัสเตอร์ที่ 2 แบ่งเป็น 2 เคลด เคลดที่ 1 เป็นไปโอโทป์ Asiall_1 ในมะเขือ 2 ตัวอย่าง เคลดที่ 2 เป็นไปโอโทป์ Asiall_6 ในพริกทั้ง 11 ตัวอย่าง (fig. 4)

จากนั้นสร้างแผนภูมิแบบ maximum likelihood phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ โดยนำข้อมูลยีน mtCOI ขนาด 606 นิวคลีโอไทด์ของแมลงหิวข้าวยาสูบ 60 ตัวอย่าง บนพืชอาศัยชนิดต่างๆ ที่ศึกษาครั้งนี้ และที่เคยมีรายงานพบในประเทศไทยอีก 76 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นข้อมูลที่รายงานอยู่ใน GenBank หาความเชื่อมโยงระหว่างไปโอโทป์และพืชอาหาร 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 จากจังหวัด นครราชสีมา นครพนม อุบลราชธานี ศรีสะเกษ เชียงราย และ สุพรรณบุรี กลุ่มที่ 3 จำนวน 2 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย ส่วน Asial ในมะเขือ จับกลุ่มแยกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 12 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรีและตาก กลุ่มที่ 2 จำนวน 4 ตัวอย่าง จากจังหวัดตาก และกรุงเทพมหานคร และ Asia I ในมะเขือเทศ 18 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงราย ลำปาง บึงกาฬ หนองคาย นครราชสีมา สระบุรี ราชบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี นอกจากนี้มี Asia I ในซีกาเลย 1 ตัวอย่างจากสุพรรณบุรี ในมันเทศ 1 ตัวอย่างจากสุพรรณบุรี ในบวบเหลี่ยม 1 ตัวอย่างจากสงขลา ในแตงกวา 1 ตัวอย่างจากนครปฐม และในถั่ว 1 ตัวอย่างจากสุพรรณบุรี (fig. 5A) สำหรับชุดที่ 2 เป็นไปโอโทป์ 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 (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 จัดอยู่ในเดียวกัน

กับไอโซเลตอื่นที่พบในประเทศไทย (fig. 7) ดังนั้นเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นเชื้อไวรัสชนิด PeYLCV ไอโซเลต KBR

การศึกษาอัตราและระยะเวลาการรับเชื้อ และการถ่ายทอดเชื้อ PepYLCV ของแมลงหวีขาว ยาสูปไบโอไทป์ 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 และการใช้เทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจพบเชื้อในตัวแมลงหวีขาวยาสูป 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) และ ต้นพริกจะแสดงอาการเกิดโรค ภายในเวลา 14 – 30 วันหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส โดยมี ลักษณะอาการใบเหลืองร่วมกับใบด่างที่ยอด โดยจะเริ่มแสดงอาการต่างที่โคนใบและขยายเต็มใบ จากใบยอดถึงใบล่าง หรือบางครั้งมีอาการหงิกเหลืองร่วมกับอาการด่างเหลือง และลำต้นแคระแกร็น (fig. 12)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

แมลงหวีขาวยาสูปในพื้นที่ปลูกพริก จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี จำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของดักแด้ได้ 1 แบบ คือ แบบ smooth leaf form ในขณะที่การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาดประมาณ 850 นิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกแมลงหวีขาวยาสูปจากพริกและพืชอาศัยอื่นได้ 4 ไบโอไทป์ ได้แก่ Asial Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 โดยในพริก พบ 3 ไบโอไทป์ โดย Asial Asiall_6 และ Asiall_7 ในสัดส่วน 66.67 เปอร์เซ็นต์ 28.20 เปอร์เซ็นต์ และ 5.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไบโอไทป์ 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 พบว่าแมลงหวีขาวยาสูปในภาคตะวันตกของประเทศไทย จำนวน 60 ตัวอย่าง แยกได้ 2 กิ่ง โดยกิ่งที่ 1 เป็นไบโอไทป์ Asial ทั้งหมด ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 พบในพริก 26 ตัวอย่าง ในมะเขือ 12 ตัวอย่าง และในฟักทอง 1 ตัวอย่าง คลัสเตอร์ที่ 2 แยกออกเป็น 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็นไบโอไทป์ Asial ในแตงโมปา 1 ตัวอย่าง แคลดที่ 2 พบในมะเขือ 4 ตัวอย่าง และพบในฟักทอง 1 ตัวอย่าง กิ่งที่ 2 มี 3 ไบโอไทป์ด้วยกัน ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นไบโอไทป์ 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 ในซีกาเลย มันทเทศ 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 โดยจะเริ่มแสดงอาการด่างที่โคนใบและขยายเต็มใบ 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

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ ผชช. พรพิมล อธิปัญญาคม ผชช.พิเชฐ เชาววัฒนวงศ์ ผอ. ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษา

งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี และขอบคุณทีมงานกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้านตลอดการทดลอง

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.

กรมวิชาการเกษตร

Species name	Biotype	Host	Location	Coordinates	Code
Asia_Phetchaburi357_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°2'53",E99°55'33"	357
Asia_Phetchaburi357.2_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°2'53",E99°55'33"	357.2
Asia_Phetchaburi358.1_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°1'19",E99°53'57"	358.1
Asia_Phetchaburi358.2_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°1'19",E99°53'57"	358.2
Asia_Phetchaburi359_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°1'0",E99°53'32"	359
Asia_Phetchabun360_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N12°42'18",E99°54'25"	360
Asia_Phetchaburi360.1_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N12°42'18",E99°54'25"	360.1
Asia_Phetchaburi361.1_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N12°47'28",E99°54'20"	361.1
Asia_Ratchaburi363.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°43'44",E99°50'39"	363.1
Asia_Ratchaburi363.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°43'44",E99°50'39"	363.2
Asia_Ratchaburi363.3_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°43'44",E99°50'39"	363.3
Asia_Ratchaburi365_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	365
Asia_Ratchaburi365.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	365.2
Asia_Ratchaburi365.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	365.1
Asia_Ratchaburi366_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	366
Asia_Ratchaburi366.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	366.1
Asia_Ratchaburi366.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	366.2
Asia_Ratchaburi369_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'39",E99°55'25"	369
Asia_Ratchaburi369.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'39",E99°55'25"	369.1
Asia_Ratchaburi369.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'39",E99°55'25"	369.2
Asia_Ratchaburi370_Chili	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°50'4",E99°54'30"	370
Asia_Ratchaburi370.1_Chili	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°50'4",E99°54'30"	370.1
Asia_Kanchanaburi372.1_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	372.1
Asia_Kanchanaburi372.2_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	372.2
Asia_Kanchanaburi374.2_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°49'75",E99°34'42"	374.2
Asia_Kanchanaburi375_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°49'75",E99°34'42"	375
Asia_Bangkok378.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°50.865",E100°34.415"	378.1
Asia_Bangkok378.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°50.865",E100°34.415"	378.2
Asia_Tak386_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'12",E98°34'20"	386
Asia_Tak386.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'12",E98°34'20"	386.2
Asia_Tak387_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'8",E98°34'20"	387
Asia_Tak387.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'8",E98°34'20"	387.1
Asia_Tak387.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'8",E98°34'20"	387.2
Asia_Tak389.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°25'48",E98°41'54"	389.1
Asia_Tak389.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°25'48",E98°41'54"	389.2
Asia_Kanchanaburi551_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	551
Asia_Kanchanaburi551.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	551.1
Asia_Kanchanaburi551.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	551.2
Asia_Kanchanaburi552_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	552
Asia_Kanchanaburi552.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	552.1
Asia_Kanchanaburi553_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	553
Asia_Kanchanaburi553.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	553.1
Asia_Kanchanaburi379_Pumpkin	Asial	Pumpkin	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	379
Asia_Kanchanaburi379.1_Pumpkin	Asial	Pumpkin	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	379.1
Asia_Tak 393.2_Wildwatermelon	Asial	Wildwatermelon	Tak	N16°29'06",E98°48'56"	393.2
Asia11_1_Tak393_Eggplant	Asial1_1	Eggplant	Tak	N16°29'06",E98°48'56"	393
Asia11_1_Tak393.1_Eggplant	Asial1_1	Eggplant	Tak	N16°29'06",E98°48'56"	393.1
Asia11_6_Kanchanaburi354.2_Chilli	Asial1_6	Chilli	Kanchanaburi	N11°22'55",E99°31'1"	354.2
Asia11_6_Phetchaburi359.2_Chilli	Asial1_6	Chilli	Phetchaburi	N13°1'0",E99°53'32"	359.2
Asia11_6_Phetchaburi361_Chilli	Asial1_6	Chilli	Phetchaburi	N12°47'28",E99°54'20"	361
Asia11_6_Kanchanaburi371.1_Chilli	Asial1_6	Chilli	Kanchanaburi	N13°58'20",E99°42'33"	371.1
Asia11_6_Kanchanaburi373.2_Chilli	Asial1_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°6'27",E99°19'42"	373.2
Asia11_6_Kanchanaburi374.1_Chilli	Asial1_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°6'53",E99°18'50"	374.1
Asia11_6_Kanchanaburi375.1_Chilli	Asial1_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°7'25",E99°10'30"	375.1
Asia11_6_Kanchanaburi375.2_Chilli	Asial1_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°7'25",E99°10'30"	375.2
Asia11_6_Kanchanaburi376_Chilli	Asial1_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°12'54",E99°11'30"	376
Asia11_6_Kanchanaburi376.1_Chilli	Asial1_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°12'54",E99°11'30"	376.1
Asia11_6_Kanchanaburi376.2_Chilli	Asial1_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°12'54",E99°11'30"	376.2
Asia11_7_Kanchanaburi_373_Chilli	Asial1_7	Chilli	Kanchanaburi	N14°6'27",E99°19'42"	373
Asia11_7_Kanchanaburi373.1_Chilli	Asial1_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	

กรมวิชาการเกษตร



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.

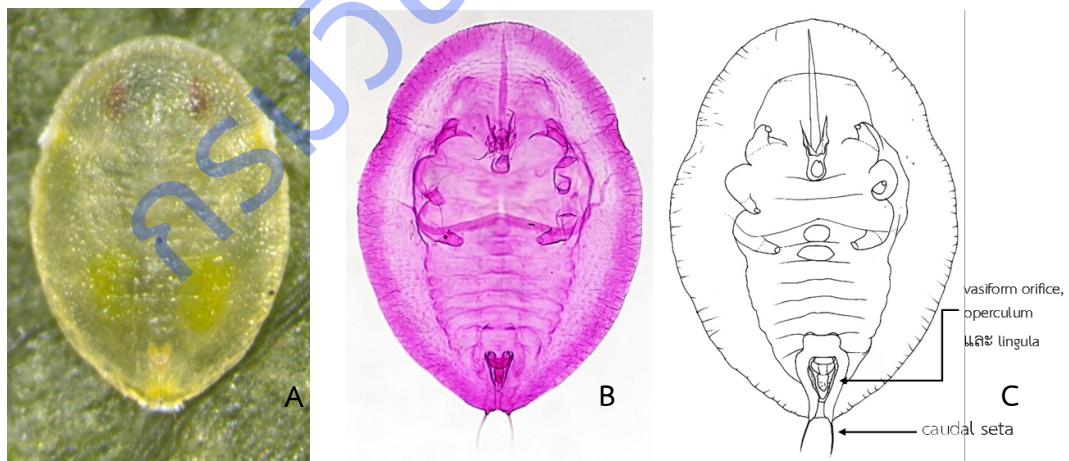


Figure 3 Smooth leaf form puparium of *B. tabaci* on chili symptomatic yellow leaf curl disease A. puparium on host plants B. puparium on slide C. drawing puparium.

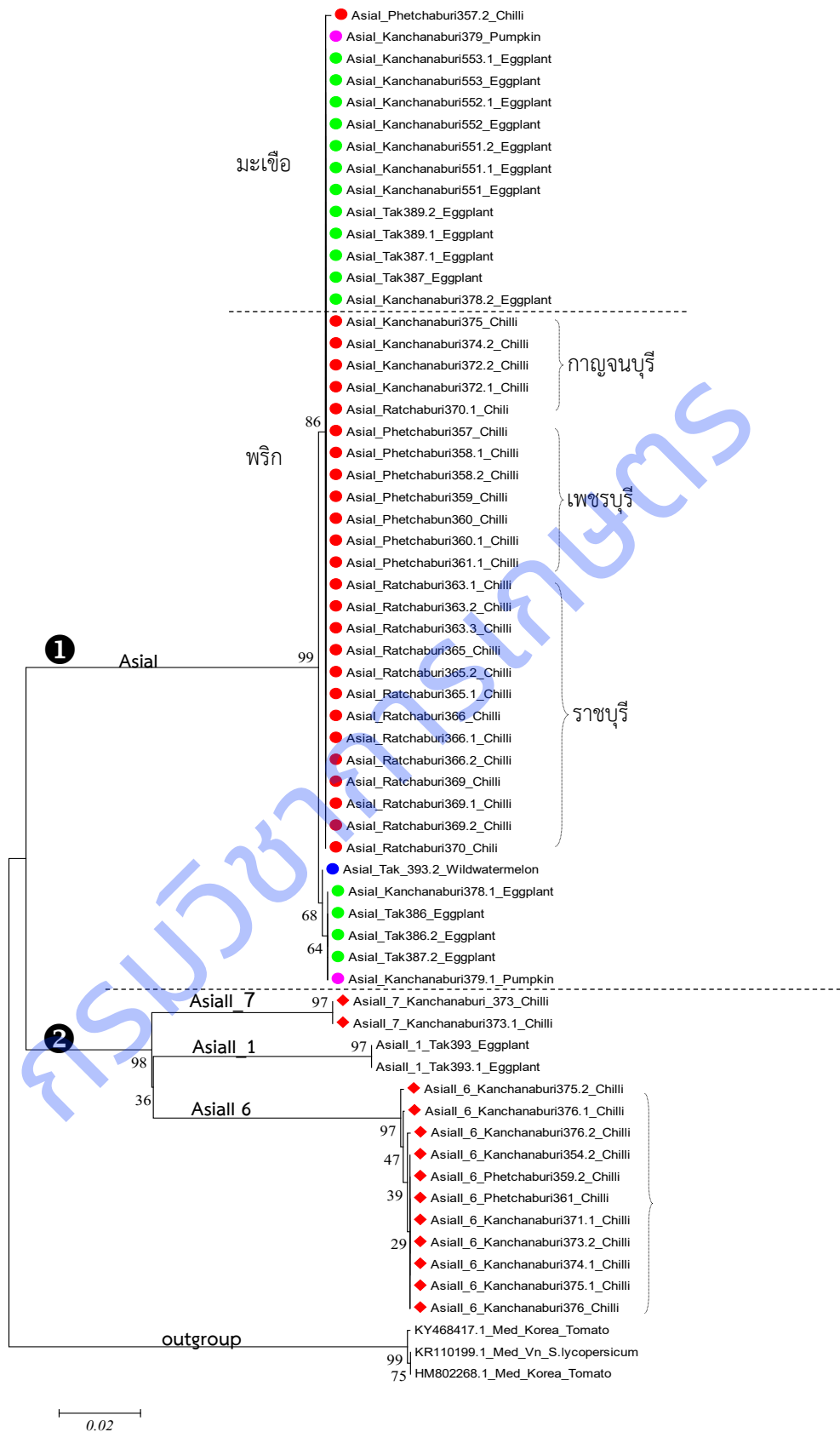


Figure 4 Phylogenetic tree based on the maximum likelihood of mtCOI sequences of *B. tabaci* on chilli plot symptomatic yellow leaf curl disease and other host plants in Tak, Kanchanaburi, Ratchaburi, and Phetchaburi



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

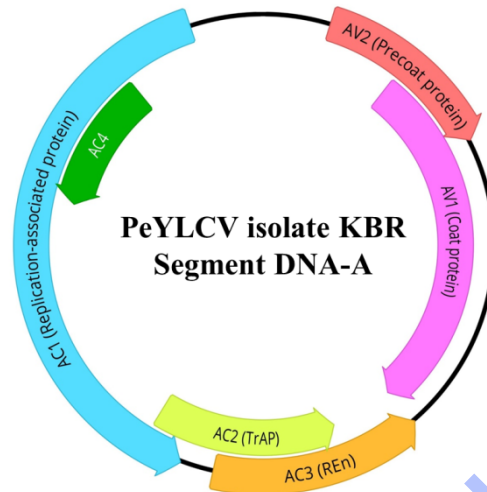


Figure 6 Genome composition of segment DNA-A of PeYLCV isolate KBR. Segment DNA-A contained 6 Open Reading Frames (ORFs) and encoded for 6 proteins: ORF AV1 encodes for coat protein, ORF AV2 encodes for precoat protein, ORF AC1 encodes for replication-associated protein, ORF AC2 encodes for transcriptional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

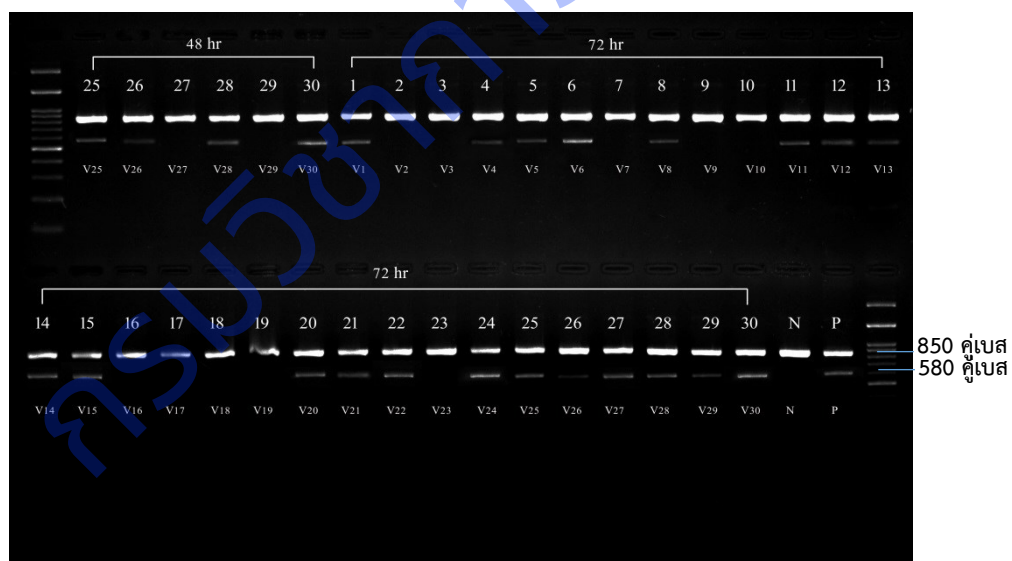


Figure 8 Electrophoresis of PCR products, Acquisition access period PepYLCV by *B. tabaci* biotype Asial at 72 hr, 100 bp DNA marker (1-30 : moco *B. tabaci*, V1-V30 : PepYLCV, N : Negative, P : Possitive (*B. tabaci* feed on Chilli ingfected by PepYLCV)).

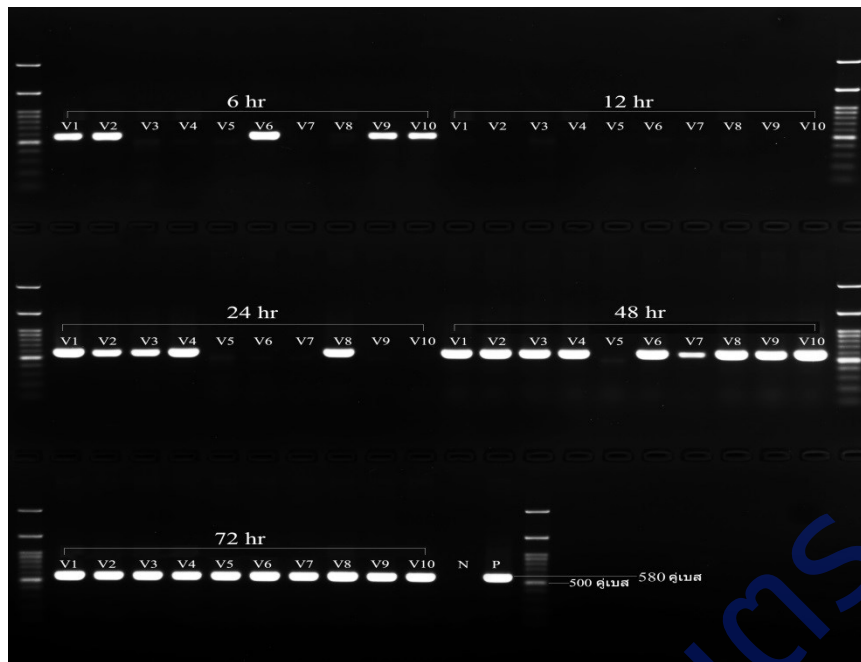


Figure 9 Electrophoresis of PCR products, Inoculation access period PepYLCV by *B. tabaci* biotype Asial at 6, 12, 24, 48 and 72 hr (V1-V10 : PepYLCV, N : Negative, P : Positive (PepYLCV)).

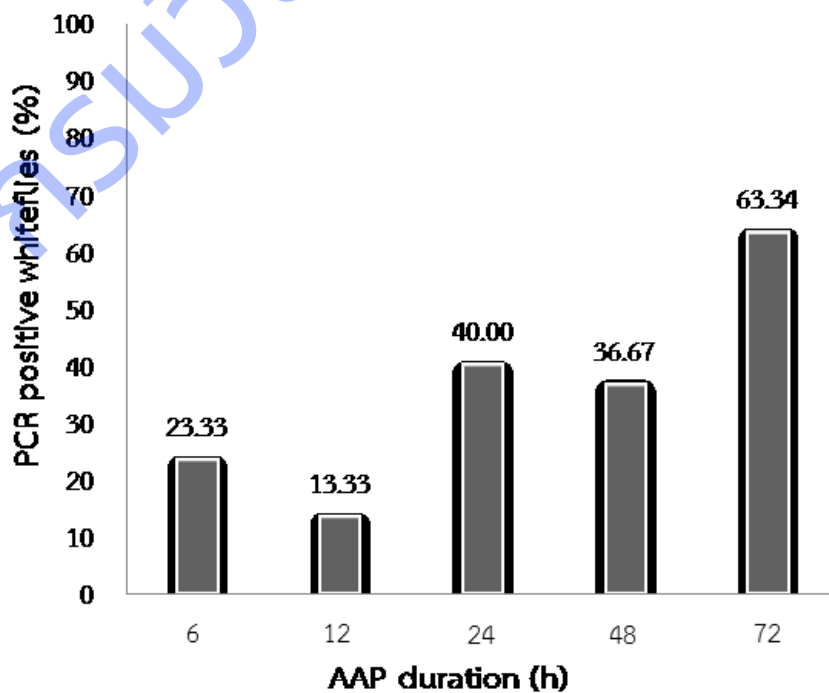


Figure 10 The effects of acquisition access period (AAP) on the proportion of PCR positive adults of *B. tabaci* Asial. Newly emerged whiteflies were allowed to feed on PepYLCV-infected chilli plants for 6, 12, 24, 48 and 72h, respectively, and 30 whiteflies from each group were collected for PCR tests.

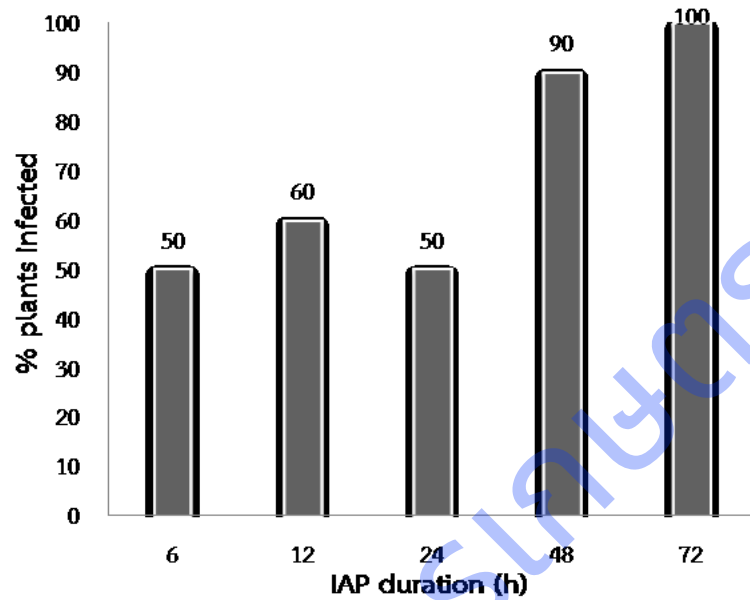


Figure 11 The effects of inoculation access period (IAP) of the vector *B. tabaci* Asial on the proportion of CCYV-infected cucumber plants. After feeding PepYLCV-infected chilli plants with 3 days, 30 whiteflies were placed on non-infected chilli leaves (3–4 leaf stage) with clip cages for 6, 12, 24,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

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2

ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) ที่เป็นพาหะของเชื้อ *Polyerovirus*
สาเหตุโรคเส้นใบเหลืองในพริก

**Species of Aphid (Hemiptera: Aphididae) insect vectors of the
Polerovirus causing agent of pepper vein yellowing disease and
cucumber yellowing disease**

เกศสุดา สนศิริ¹ ภูวนารถ มณีโชติ² จารุวัฒน์ แท้กุล¹ ยุวรินทร์ บุญทาบ¹

¹กลุ่มวิจัยวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

²กลุ่มวิจัยวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

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.

Keyword : Chilli, Aphid, Transmission, Pepper vein yellows virus

บทคัดย่อ

พริก (*Capsicum* sp.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ โรคเส้นใบเหลืองที่เกิดจาก *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ก่อความเสียหายต่อผลผลิตพริกในหลายประเทศ ที่มีเพลี้ยอ่อน (Aphid) (Hemiptera: Aphididae) เป็นแมลงพาหะถ่ายทอด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อทราบชนิดเพลี้ยอ่อนพาหะและชนิดของโรคพืชความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดโรคระหว่างชนิดของเพลี้ยอ่อนกับโรคพืชและพืชอาศัย 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 สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพริกจะแสดงอาการเส้นใบมีสีเหลือง บางครั้งขอบใบม้วนเข้าหากัน หลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อ 14-30 วัน

คำหลัก : เพลี้ยอ่อน โรคเส้นใบเหลือง พอร์โรไวรัส การถ่ายทอดโรค

รหัสการทดลอง 03-47-61-01-00-00-02-61

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 ร่วงหล่น ต้นแคระแกรน และขับถ่ายของเสียที่มีส่วนผสมของน้ำตาลที่เหลือใช้ เรียกว่า มูลน้ำหวาน (honeydew) ซึ่งเป็นอาหารของมดและราดำ ราดำจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วปกคลุมใบ ใบจึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้อย่างเต็มที่ นอกจากนี้จะดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชแล้วเพลี้ยอ่อนยังเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช เพลี้ยอ่อนที่พบในเขตร้อนและเขตอบอุ่นมีมากกว่า 200 ชนิด ที่เป็นพาหะนำเชื้อไวรัส (Brunt *et al.*, 1996; Nault 1997; พัทธินทร์ 2555) เพลี้ยอ่อนจัดเป็นแมลงพาหะที่สำคัญเนื่องจากมีลักษณะเด่นคือ มีปากแบบแทงดูด (piercing sucking) สามารถถ่ายทอดอนุภาคไวรัสไปยังเซลล์พืช โดยที่ไม่ทำให้เซลล์พืชเสียหายมากนัก นอกจากนี้เพลี้ยอ่อนยังมีลักษณะเด่นที่ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายทอดโรคไวรัสดีกว่าแมลงอื่นๆ คือ เป็นแมลงที่สืบพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ ทำให้ประชากรเพลี้ยอ่อนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดการระบาดของเชื้อไวรัสเป็นไปอย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาอันสั้น (พัชรีนทร์, 2555)

เชื้อไวรัสในกลุ่ม *Polerovirus* จะทำให้ใบพืชมีอาการม้วนขึ้นเข้าหากันของขอบด้านข้าง สีซีดจาง โดยเฉพาะใบล่าง และกิ่งก้านใบมีการตั้งชูขึ้น ส่วนของต้นแคระแกร็น และอาจมีแผลเนื้อเยื่อตายแห้งตาย (necrosis) ในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารในส่วนของลำต้นและก้านใบ (Ryazantsev and Zavriev, 2009) การถ่ายทอดและการแพร่ระบาดของไวรัสชนิดนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์ได้ ดังนั้นเมื่อนำหัวพันธุ์ที่เป็นโรคไปปลูกจะมีส่วนอย่างมากที่ทำให้ผลผลิตลดลง ซึ่งเชื่อนี้ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีสัมผัส 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

วิธีดำเนินการ

การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนศัตรูพริก

เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากแปลงปลูกพริกที่แสดงอาการของเส้นใบเหลืองจากไวรัสในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และนครราชสีมา จำนวน 25 แปลง โดยทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มสำรวจทั่วแปลง ตาม ISPM No.6 (FAO, 2006) (ภาพที่ 1) แบ่งตัวอย่างเป็นส่วนสามส่วน ส่วนที่หนึ่งนำไปศึกษาชนิดและ DNA barcode ส่วนที่สองนำไปตรวจหาเชื้อ *Potterovirus* ส่วนที่สามนำไปศึกษาการถ่ายทอดโรคระหว่างเพลี้ยอ่อนกับเชื้อ *Potterovirus* และพืชอาศัยอื่น บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยอ่อน ส่วนของพืชที่พบตัวอย่าง ลักษณะการทำลาย ลักษณะอาการของพืชที่เป็นโรค ปริมาณการพบ ปัจจัยแวดล้อม พืชปลูกข้างเคียง สภาพแวดล้อมทั้งในและนอกแปลง วัน/เดือน/ปี สถานที่ พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง รวมทั้งบันทึกโดยการถ่ายภาพ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก

นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยที่ได้จากการสำรวจมาทำสไลด์ถาวร โดยตัดแปลงจากวิธีการของ Blackman and Eastop (2000) นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดกับเอกสารแนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อน ลักษณะสำคัญของเพลี้ยอ่อนที่ใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่ ส่วนหัว; ร่องหนวดและร่องบริเวณหน้าผาก ความสั้นยาวของหนวด จำนวนปล้องและความยาวส่วนปลายของปล้องสุดท้าย ความยาวของปาก ส่วนอก; ความยาวของปลายขาคู่หลังและหนามบนน่องขา ส่วนท้อง; จะมีตุ่มขนาดเล็กปรากฏบริเวณปล้องท้องปล้องที่ 1 และ 7 โดยเฉพาะปล้องที่ 7 ตำแหน่งของตุ่มขนาดเล็กที่ปรากฏอยู่ด้านบนหรือด้านล่างรูหายใจใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกระดับสกุล แต่ในเพลี้ยอ่อนบางชนิดไม่ปรากฏตุ่มดังกล่าว วาดรูปแสดงลักษณะต่างๆที่สำคัญ บันทึกรายละเอียดต่างๆของเพลี้ยอ่อนที่สำรวจพบ เช่น ลักษณะ รูปร่าง ขนาด สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนในแต่ละระยะ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์เพลี้ยอ่อนแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ซื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์ และจัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาเก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ 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'-GGTCAACAAATCATAAAGATA TTGG-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 ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) เพื่อตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่บริสุทธิ์ของเพลี้ยอ่อนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประเทศเกาหลีใต้ 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 บันทึกข้อมูลจำนวนเพลี้ยอ่อนที่รอดชีวิตทุกๆวันจนกระทั่งเพลี้ยอ่อนเป็นตัวเต็มวัย สังเกตพฤติกรรมและระยะเวลาลอกคราบในแต่ละวัย ทำการบันทึกข้อมูลระยะตัวอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย รวมถึงพฤติกรรมในแต่ละระยะ (ภาพที่ 2)

ศึกษาชนิดเชื้อ Polerovirus ในพริกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ทำการสกัด DNA จากต้นพริกที่ได้รับการถ่ายเชื้อ *Polerovirus* ด้วยปฏิกิริยา One step RT-PCR สังเคราะห์ยีน CP บางส่วนของเชื้อ *Polerovirus* จากอาร์เอ็นเอรวมที่เตรียมได้ โดยไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ยีน CP บางส่วนของเชื้อไวรัสในจีโนม *Polerovirus* ประกอบด้วยไพรเมอร์ Pol3870F (5'-YTVGGTTTYAAAGTCGAGG-3') (Sharman *et al.*, 2015) และไพรเมอร์ AS3 (5'CACGCGTCIACC TATTTIGGRTTITG-3') (Abraham *et al.*, 2008) โดยได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 360 คู่เบส และใช้ส่วนผสมของ one step RT-PCR (QIAGEN) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย

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) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

1) First strand synthesis	50 °C	30 นาที
Pre-denaturation	94 °C	15 นาที
2) Three step-cycling 35 cycles		
Denaturation	94 °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 Solution ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation

การโคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

แยก DNA ออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นตรวจสอบขนาดและปริมาณ DNA ที่ได้

ด้วย 1% agarose gel electrophoresis แล้วเชื่อมต่อ DNA เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega) โดยเติม DNA 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 16 °C นานข้ามคืน นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ JM109 โดยใช้วิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของเชื้อ *Poleovirus* ด้วยวิธี blue-white selection แล้วตรวจสอบโคลนของพลาสมิดสายผสมที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาวจำนวน 10 โคโลนีและสีฟ้า 1 โคโลนี มาผสมน้ำปริมาตร 2 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน CP บางส่วนของเชื้อ *Poleovirus*

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA จากปฏิกิริยา PCR มาทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Poleovirus* ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีน CP ด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของเชื้อไวรัสกลุ่ม *Poleovirus* ชนิดต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 6 (Tamura et al., 2013)

การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนวันที่รับเชื้อ จำนวนตัว และจำนวนวันที่ถ่ายทอดเชื้อของเพลี้ยอ่อนกับเชื้อไวรัส PeVYV ในพริก

ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพลี้ยอ่อนที่บริสุทธิ์ เตรียมต้นกล้าพริกปลอดโรค และต้นพริกที่เป็นโรคเพื่อเป็นแหล่งของไวรัส หลังจากนั้นจะนำเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากพริกที่เป็นโรคเส้นใบเหลืองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3) และทำการย้ายเพลี้ยอ่อนให้ดูดกินต้นกล้าพริกปกติ เมื่อต้นพริกแสดงอาการเส้นใบเหลือง นำส่วนของใบไปตรวจสอบหาเชื้อ และใช้ต้นพริกที่มีเชื้อเป็นแหล่งของไวรัสในการทดสอบการถ่ายทอดโรค

การศึกษาอัตราและระยะเวลาในการรับเชื้อ นำเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัย มาปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพริกที่เป็นโรคเส้นใบเหลือง ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว) เมื่อครบกำหนดเวลานำเพลี้ยอ่อนมาตรวจสอบหาเชื้อ PeVYV ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์

การศึกษาอัตราและระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อ นำเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพริกที่มีเชื้อ 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 ในใบพริกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

สถานที่ - แหล่งปลูกพริกในจังหวัด สุพรรณบุรี กาญจนบุรี

พระนครศรีอยุธยา ตาก และนครราชสีมา

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา และ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

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 ร่องหวด

(antennal tubercle) ไม่พัฒนา ตา (eyes) มีสีน้ำตาลดำ หนวด (antena) 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 ปากยาวถึงโคนขาคุกกลาง ไซฟิงคูลอยาว ส่วนหางยาวรูปร่างคล้ายนิ้ว ไซฟิงคูลและส่วนหาง สีจางใส มีพืชอาหารได้แก่ พริก ยาสูบ มะเขือเทศ ผักกาด กะหล่ำดอก กระบี่ 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 ตัวอ่อนออกมาใหม่ๆมีขนาดเล็กมากสีเหลืองจางจนเกือบขาว เมื่อโตขึ้นมีสีเขียวอมเหลืองจนถึงสีเขียวเข้ม ส่วนหัวมีสีดำ และบริเวณส่วนท้องมีจุดสีเขียวเข้มกระจายอยู่ ระยะตัวอ่อน 6 - 7 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุขัย 10 - 15 วัน ตัวแม่ 1 ตัว สามารถออกลูกได้ 39 - 78 ตัว วงจรชีวิตจากไข่จนถึงตัวเต็มวัยตาย 12-30 วัน ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก

การศึกษาลำดับพันธุกรรม (DNA Barcode) ของเพลี้ยอ่อน

จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซีเอ็นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI เปรียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยอ่อนที่อยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมฐานข้อมูลทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกเพื่อยืนยันความถูกต้อง ผลการวินิจฉัยชนิด 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. ตัวอย่างพริกเป็นโรคเส้นใบเหลือง

ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการอาการเนื้อใบเหลืองคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร เส้นใบเขียวและใบเสีกรูปทรง จากแปลงปลูกพริกในจังหวัด กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ตาก นครราชสีมา และพระนครศรีอยุธยา จังหวัดละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 25 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 และสุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง (ภาพที่ 6) 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) พบว่ายีน CP ของทั้ง 3 ไอโซเลต มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 206 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 22.94 - 22.97 กิโลดาลตัน จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 7) และกรดอะมิโนของโปรตีน CP (ภาพที่ 8) 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 9) และยังคงพบว่าทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยยังจับกลุ่มอยู่ร่วมกับไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในเอเชีย (Asian population) เช่นเดียวกับเดียวรายงานของ 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 โดยเริ่มแสดงอาการจากใบล่างขึ้นไปโดยยอด ส่งผลให้ต้นแคระแกรน (ภาพที่ 10)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

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

การตรวจสอบเชื้อ PeVYV ในพริกที่เป็นโรคเส้นใบเหลืองไอโซเลตกาญจนบุรี (KBR) และไอโซเลตสุพรรณบุรี (SBR) ยีน CP ของทั้ง 2 ไอโซเลต มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 206 เรซิดิวส์ ค่าความน้ำหนักโมเลกุลได้ 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 พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยจับกลุ่มใกล้เคียงกัน อยู่ร่วมกับไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในเอเชีย (Asian population) แต่แยกออกจากเชื้อไอโซเลตอื่นที่พบในต่างประเทศ

ผลการศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อและการถ่ายทอดเชื้อ PeVYV ของเพลี้ยอ่อน พบว่าที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการรับเชื้อ PeVYV ได้ดีที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาในการถ่ายทอดเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป สามารถ

ถ่ายทอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพริกจะแสดงอาการเส้นใบมีสีเหลือง บางครั้งขอบใบม้วนเข้าหากัน หลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อ 14-30 วัน

เพลี้ยอ่อน *A. gossypii* เป็นแมลงที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดโรค และเป็นแมลงที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (parthenogenesis) ทำให้ประชากรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งหากมีเพลี้ยอ่อนชนิดนี้เข้าทำลายพริกอาจก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นควรมีการติดตามและเฝ้าระวังเพลี้ยอ่อนในแปลงปลูกพริก สำรวจพืชอาศัยอื่นของเพลี้ยอ่อน และเชื้อ PeVYV ซึ่งอาจจะเป็นแหล่งอาศัยของแมลงและโรค ปลูกพืชหมุนเวียนหรือสลับที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* และเชื้อ PeVYV เพื่อลดการระบาด และควรมีการศึกษาชนิดและประสิทธิภาพของตัวห้ำที่จำเพาะต่อเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* เพื่อการจัดการถ่ายทอดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ ผชช. พรพิมล อธิปัญญาคม ผชช. พิเชฐ เชาว์วัฒนวงศ์ ผอ. ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษางานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี และขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการทดลอง

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยอ่อน

Aphis gossypii Glover ที่พบในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี ตาก พระนครศรีอยุธยา และ นครราชสีมา

<p>>กาญจนบุรี</p> <p>CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCT TTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATA GGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTATAATAAT AATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTG CTCATAATAATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCA ATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGA TCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACA GATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC</p>
<p>>สุพรรณบุรี</p> <p>CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCT TTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATA GGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTATAATAAT AATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTG CTCATAATAATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCA ATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGA TCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACA GATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC</p>
<p>>ตาก</p> <p>CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCT TTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATA GGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTATAATAAT AATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTG CTCATAATAATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCA ATTAATTTTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGA TCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACA GATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC</p>
<p>>พระนครศรีอยุธยา</p> <p>CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCT TTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATA GGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTATAATAAT AATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTG</p>

```
CTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCA
ATTAATTTTCATCTGTAATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGA
TCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACA
GATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCC
```

ตารางที่ 1 (ต่อ)

>นครราชสีมา

```
CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCT
TTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCCTATAATAATA
GGATGTCCAGATATATCTTTTCCACGACTAAATAATATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAAAT
AATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCACCTTTATCAAATAATATTG
CTCATAATAATATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCA
ATTAATTTTCATCTGTAATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATCAAATTCCTCTATTTCCATGA
TCAATTTTAATTACAGCTATATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACA
GATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTTGATCC
```

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยอ่อน ยาสูบ

Myzus persicae (Sulzer) ที่พบในจังหวัดกาญจนบุรี

>กาญจนบุรี

```
TTAGAATCTTAATTCGTCCTGAATTAAGACAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTTATTG
TTACAATTCACGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACAATACCAATTGTTATTGGTGGATTTGGAAATTGGTTAA
TTCCTATAATAATAGGATGTCCTGATATATCTTTCCACGATTAATAACATTAGATTCTGATTATTACCACCC
TCATTAATAATAATAATTTGTAGTTTTTTAATTAATAATGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTACCCACCTT
ATCAAATAATATTGCACATAATAATTTTCAGTTGATTTAACTATTTTTTCATTACATTTAGCAGGAATTTTCATC
AATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTTGTACAATCTTAAATATAATACCAAACAATATAAAAATTAACCAAATCCC
TTTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATTTTATTAATTTTATCTTTACCTGTCTAGCAGGTGCTATTAC
AATATTATTAATGATCGTAATTTAAATA
```




ภาพที่ 1 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนและใบพริกที่แสดงอาการโรคเส้นใบเหลือง



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

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3 ทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Polerovirus* โดยเพลี้ยอ่อน



ภาพที่ 4 เพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงพริก

ก.) ตัวเต็มวัยเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* Glover

ข.) *A. gossypii* เมื่อนำไปทำสไลด์ถาวร

ค.) ตัวเต็มวัยเพลี้ยอ่อนยาสูบ *M. persicae*

ง.) *M. persicae* เมื่อนำไปทำสไลด์ถาวร



ภาพที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii*

- ก.) ตัวเต็มวัย ข.) ตัวเต็มวัยเมื่อนำไปทำสไลด์ถาวร ค.) ส่วนหัว
ง.) ส่วนหาง และไซฟิงคูไล



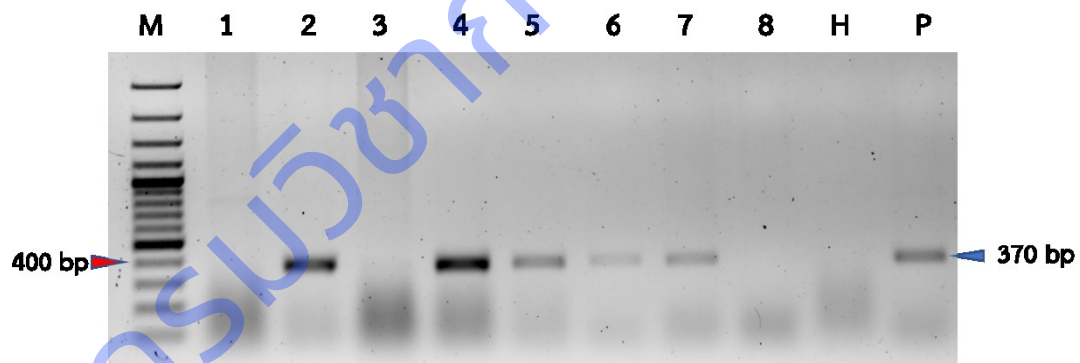
ภาพที่ 5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเพลี้ยอ่อนยาสูบ *M. persicae*

- ก.) ตัวเต็มวัย ข.) ตัวเต็มวัยเมื่อนำไปทำสไลด์ถาวร ค.) ส่วนหัว
ง.) ส่วนหาง และไซฟิงคูไล



ภาพที่ 6 วงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii*

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



ภาพที่ 6 แลบดีเอ็นเอของยีน 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)

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

KBR-CP	CGTCGTAGACGCCCACGACAGGTTGCGCCGTGTCGTTGTGGTCGCACCCCTGGGCGCACA	120
BKK-CP	CGTCGTAGACGCCCACGACAGGTTGCGCCGTGTCGTTGTGGTCGCACCCCTGGGCGCACA	120
SBR-CP	CGTCGTAGACGCCCACGACAGGTTGCGCCGTGTCGTTGTGGTCGCACCCCTGGGCGCACA	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	TCCTCAGGATCTGTACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA	300
BKK-CP	TCCTCAGGATCTGTACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA	300
SBR-CP	TCCTCAGGATCTGTACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA	300

KBR-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGTTTCGTCAGTGAA	360
BKK-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGTTTCGTCAGTGAA	360
SBR-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGTTTCGTCAGTGAA	360

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

KBR-CP	AGTCTCCAATCCACCTTGC GCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480
BKK-CP	AGTCTCCAATCCACCTTGC GCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480
SBR-CP	AGTCTCCAATCCACCTTGC GCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480

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

KBR-CP	TACAGAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCTGCCGGTTTCTTTCAGATCCGGTTTACTGTG	600
BKK-CP	TACAAAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCTGCCGGTTTCTTTCAGATCCGGTTTACTGTG	600
SBR-CP	TACAAAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCTGCCGGTTTCTTTCAGATCCGGTTTACTGTG	600
	**** *****	
KBR-CP	CAACTGCACAACCCCAAATGA	621
BKK-CP	CAaTTGCACAACCCCAAATGA	621
SBR-CP	CAATTGCACAACCCCAAATGA	621
	*** *****	

ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับ
 นิวคลีโอไทด์ของยีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต
 KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี

BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร

SBR: ไอโซเลตสระบุรี

(*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

KBR-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV	60
BKK-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV	60
SBR-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV	60

KBR-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPCLSESVALSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE	120
BKK-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPCLSESVALSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE	120
SBR-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPCLSESVALSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE	120

KBR-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSQDFRLL	180
BKK-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSQDFRLL	180
SBR-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSQDFRLL	180

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

ภาพที่ 8 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับ

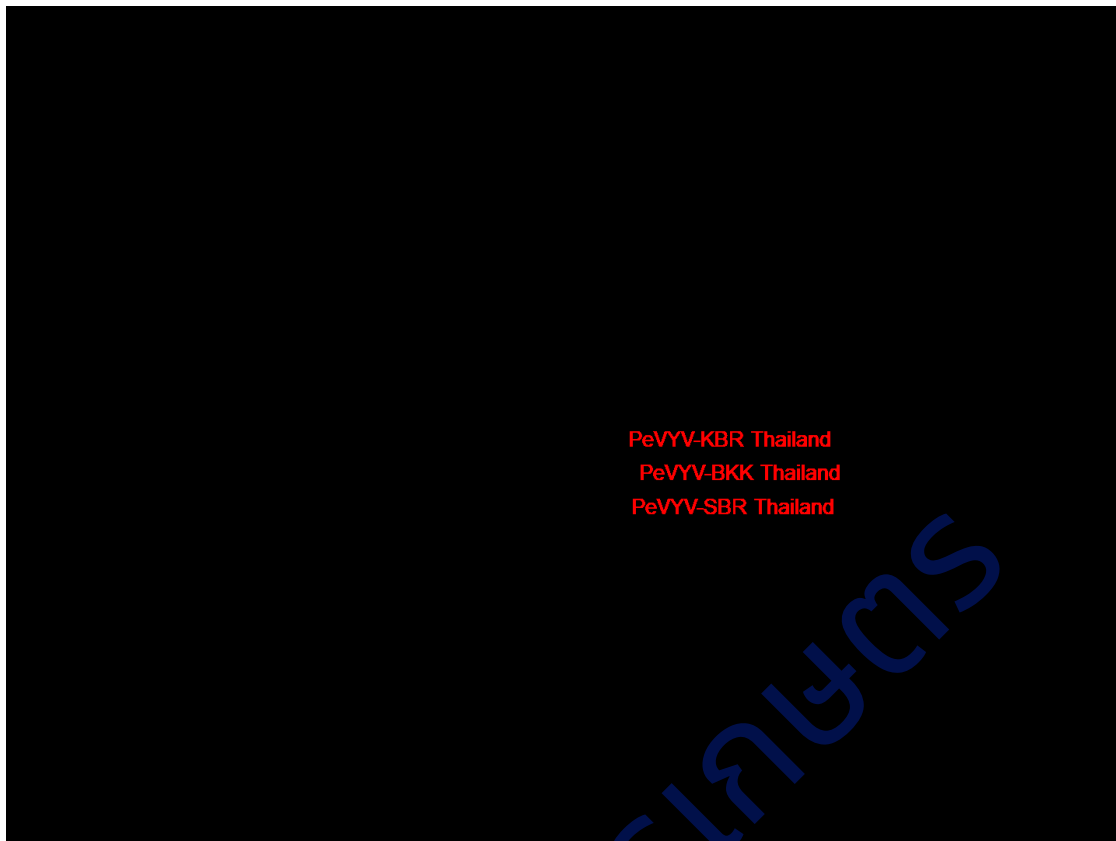
กรดอะมิโนของยีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต

KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี

BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร

SBR: ไอโซเลตสระบุรี

(*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน



ภาพที่ 9 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 10 อาการเกิดโรคของต้นพริกหลังจากการถ่ายทอดเชื้อไวรัส PeVYV โดยเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii*

การทดลองที่ 3

ชนิดของเพลี้ยแป้ง (Hemiptera: Pseudococcidae) ที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยว
สับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt) ในเขตภาคตะวันออกและภาคตะวันตกของ
ประเทศไทย

Species of Pineapple Mealybug Wilt-Associated found in Pineapple at
Eastern and Southern Thailand (Hemiptera: Pseudococcidae)

ชัยพร บัวมาศ¹ กาญจนา วาระวิชนี² ยุวรินทร์ บุญทพ³

¹กลุ่มวิจัยวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

²กลุ่มวิจัยวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดของเพลี้ยแป้ง (Hemiptera: Pseudococcus) ที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยว
สับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt; PMWaV) ในเขตภาคตะวันออกและภาคตะวันตกของ
ประเทศไทย ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2562 เพื่อทราบชนิดของเพลี้ย
แป้งและชนิดของโรคไวรัสในสับปะรด รวมทั้งความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดโรคระหว่างเพลี้ยแป้งที่
เป็นพาหะนำโรคในสับปะรด โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งในแปลงสับปะรดที่ปรากฏอาการ
ของโรค ในพื้นที่ภาคตะวันออกและภาคตะวันตก ทั้งหมด 41 แปลง 122 ตัวอย่าง ทำการสุ่ม
ตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากต้นที่แสดงอาการโรคเหี่ยวอย่างชัดเจน ตรวจจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้งและ
ตรวจสอบเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ PMWaV 2 ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยว พบเชื้อไวรัสจำนวน 117
ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อไวรัส จำนวน 5 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่เหลื้อมาทำการจำแนกด้วยเทคนิคทาง
โมเลกุลและสัณฐานวิทยา พบเพลี้ยแป้งจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 1. เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู
Dysmicoccus brevipes (Cockerell) 2. เพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทา *Dysmicoccus neobrevipes*

Beardsley นอกจากนี้นำตัวอย่างต้นสับปะรดที่พบเพลี้ยแป้งตรวจหาเชื้อไวรัส จำนวน 8 ตัวอย่าง พบเชื้อไวรัสทั้ง 8 ตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการตรวจเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเพลี้ยแป้ง ซึ่งชนิดเพลี้ยแป้งอาจไม่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัสเนื่องจากตรวจพบเชื้อไวรัสในเพลี้ยแป้ง 2 ชนิด คือ เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพูและเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาแต่ในเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาพบเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าเพลี้ยแป้งมีความสัมพันธ์กับต้นสับปะรดที่พบเชื้อไวรัสทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ และพบว่าเพลี้ยแป้งทุกระยะสามารถเป็นพาหะของโรคไวรัสได้แม้จะเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 มีขนาดตัวเล็กและสามารถใช้ตัวอย่างเพลี้ยแป้งเพียง 1 ตัวในการตรวจเชื้อไวรัสได้ และเมื่อทำการศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู พบว่า เพลี้ยแป้งมีอายุ 65 - 110 วัน สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ สามารถวางไข่ได้ประมาณ 250 -700 ฟอง ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุประมาณ 35 - 90 วัน เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำการศึกษาวิจัยด้านชีวโมเลกุลเข้ามาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดและตรวจสอบเชื้อไวรัส รวมทั้งข้อมูลชีววิทยาของเพลี้ยแป้งเบื้องต้น ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ศึกษาต่อยอดในกระบวนการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในเพลี้ยแป้งและความสัมพันธ์ในการถ่ายทอดเชื้อของเพลี้ยแป้งแต่ละชนิดต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: เชื้อไวรัส PMWaV 1 PMWaV 2 โรคเหี่ยวสับปะรด เพลี้ยแป้ง

Abstract

Species of Pineapple Mealybug Wilt-Associated found in Pineapple at Eastern and Southern Thailand (Hemiptera: Pseudococcidae) was conducted from October 2017 to September 2019. Survey and specimen collecting were carried out from pine apple orchards in order to detected PMWaV 1 and PMWaV 2 from mealybug and pine apple. Forty-one plot, one hundred twenty two sample were tested and 117 sample were detected PMWaV 1 and PMWaV 2 and 5 species were not presented of Pineapple Mealybug Wilt. Two species of mealybug were identified by using molecular technic; *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) and *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley. However, only one of *D. neobrevipes* that presented of Pineapple Mealybug Wilt. In addition, eight specimens of pine apple were tested and also detected PMWaV 1 and PMWaV 2. However, species of mealybug might not be specific to Pineapple Mealybug Wilt because of two species of mealybug and ,

mealybugs were found to be associated with both symptomatic and asymptomatic pineapple plants. It was found that all stages of mealybug can be a carrier of viral disease even though it is crawler and just only one sample of mealybug can be used for virus testing. And when studying the life cycle of pink pineapple mealybug, it was found that the life cycle of pink mealybug was 65 - 110 days. It can lay about 250 - 700 eggs. The adult female is about 35 - 90 days. This study is the study of molecules applied in the classification and detection of virus. Including preliminary biological data of mealybugs so this data can be further studied in the process of transmission of the virus in mealybugs and their relationships in the future transmission of each type of mealybug.

Key words: PMWaV 1, PMWaV, Pineapple Mealybug Wilt, Mealybug

คำนำ

เพลี้ยแป้ง (mealybug) จัดอยู่ในวงศ์ Pseudococcidae ทั่วโลกมีรายงานแล้วมากกว่า 266 สกุล 7,800 ชนิด ซึ่งเพลี้ยแป้งจัดเป็นแมลงปากดูด (sucking insect) ที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชได้หลายชนิด ทั้งพืชสวน และพืชไร่ โดยดูดน้ำเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ ของพืช ทำให้บริเวณที่ถูกทำลายมีลักษณะผิดปกติ เช่น ใบเหลือง หงิกงอ ลำต้นคดงอ และเป็นพาหะ (vector) นำโรคสู่พืชอาศัยที่เข้าทำลายอีกด้วย Hull (2009) รายงานว่ามีเพลี้ยแป้ง จำนวน 19 ชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำโรคที่ก่อให้เกิดโรคจากเชื้อไวรัส เช่น banana streak, grapevine leafroll และ pineapple mealybug-wilt เป็นต้น สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการพบโรคเหี่ยวสับประรด (Pineapple Mealybug Wilt) ครั้งแรกในปี 2532 ซึ่งสร้างความเสียหายแก่ผลผลิตสับประรดเป็นอย่างมาก โดยสาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อกลุ่ม closterovirus จำนวน 2 ชนิด คือ pineapple mealybug wilt-associated virus-1 (PMWaV1) ซึ่งต้นที่มีเชื้อชนิดนี้จะไม่แสดงอาการ ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตผิดปกติ และผลผลิตลดลงไปมากในปีถัดไป ในขณะที่ pineapple mealybug wilt-associated virus-2 (PMWaV2) จะแสดงอาการเหี่ยวอย่างชัดเจน (Sether, 2001) โดยปลายใบจะเริ่มแห้ง พื้นใบสีม่วงแดงลามจากปลายเข้าสู่เนื้อใบ หลังจากนั้นใบจะแห้งคล้ายขาดน้ำ ขอบใบค่อยๆ ม้วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ใบสดหรืออ่อนตัวอย่างชัดเจน สุดท้ายใบจะแห้งทั้งกอ รากส่วนใหญ่เน่าแห้งตายแสดงอาการตั้งแต่สับประรดอายุ 6 เดือน ถึงเก็บเกี่ยวและระบาดมากในช่วงบังคับให้ออกดอก เมื่อ

เกิดระบาดในระยะติดผลจะทำให้ผลเล็กแคระแกร็นคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน หากมีการระบาดรุนแรง จะไม่ได้ผลผลิตเลย นอกจากนี้ เกลียวพันธ์และคณะ (2550) รายงานว่า แมลงพาหะนำเชื้อโรคได้แก่ เพลี้ยแป้ง 2 ชนิด คือ เพลี้ยแป้งสับประรดสีชมพู *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ เพลี้ยแป้งสับประรดสีเทา หรือ เพลี้ยแป้งน้อยหน้า *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley และมีมดคันไฟ *Solenopsis* sp. และมดง่าม *Pheidole* sp. เป็นตัวแพร่กระจายเพลี้ยแป้งไปยังต้นพืช อื่นๆ ภายในแปลง ซึ่งมดและเพลี้ยแป้งจะอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย ในปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีป้องกันกำจัดโรคได้ โดยมีเพียงคำแนะนำให้ใช้หน่อพันธุ์ปลอดโรคซึ่งการผลิตหน่อพันธุ์ปลอดโรคยังไม่เพียงพอต่อความต้องการและเป็นเพียงการแก้ปัญหาเฉพาะหน้า นอกจากนี้ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาที่สามารถยืนยันได้ว่าเพลี้ยแป้งทั้ง 2 ชนิดมีความจำเพาะกับชนิดไวรัส PMWaV1 หรือ PMWaV2 ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการนำไปสู่การศึกษากลไกในการถ่ายทอดเชื้อ และการหาแนวทางในการป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะนำโรคที่เหมาะสม โดยเฉพาะการป้องกันกำจัดทางชีวภาพ เช่น การใช้ตัวห้ำ (predator) และ ตัวเบียน (parasitoid) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษานิตของเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยวสับประรดในครั้งนี้ เพื่อทราบลักษณะทางพันธุกรรมและสัณฐานวิทยาของเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะนำโรค และความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของไวรัส รวมทั้งชนิดมดที่สัมพันธ์กับเพลี้ยแป้งและเป็นพาหะในการแพร่กระจายของเพลี้ยแป้งและโรค ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่พบในแป้งสับประรดที่เป็นโรคไวรัส
2. เชื้อไวรัสที่แยกได้จากตัวอย่างเพลี้ยแป้ง
3. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ ฟู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ถุงกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง และถังรักษาความเย็น
4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ (alcohol) 50-100% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10%, กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) กรดกลacial acetic acid) ไชลีน (xylene) กรดคาร์บอริก (carbolic acid) แอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) เอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) โคล์ฟออย (clove oil) และ แคนาดาบัลซัม (Canada balsam) เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

5. สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอเช่น โกร่งบดตัวอย่าง ตู้แช่แข็ง -20C อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood) เครื่อง Thermal cycler เครื่อง Gel electrophoresis เครื่อง Gel Documentation UV-trans illuminator ชุดสกัดสารดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit), GeneRuler 1 0 0 bp DNA Ladder (Fermentas), Agarose gel (SeaKem) และ TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), MyTag HS Red DNA Polymerase และหลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร

6. สารเคมีและ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

7. ชุดทำความสะอาดดีเอ็นเอ (PCR clean up kit: Isolate PCR and Gel kit)

8. GeneRuler 1 0 0 bp plus DNA Ladder (Fermentas), GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas)

9. ชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แบบ One step RT-PCR

10. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermocycler), เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูง (Ultracentrifuge), กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy: TEM)

วิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่าง

1.1) เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแหล่งปลูกสับปะรด ในภาคตะวันออกและภาคตะวันตกโดยเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแปลงที่แสดงอาการของโรคเหี่ยว เก็บตัวอย่างใส่ในถุงกระดาษแล้วใส่ในถุงพลาสติก ในแต่ละจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างจะเก็บให้ได้ตัวอย่างมากที่สุด บันทึกสถานที่พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุด จะเก็บให้ได้ตัวอย่างมากที่สุด เพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ จัดทำสไลด์ถาวรในการจำแนกชนิด ศึกษาด้านโมเลกุลของทั้งเพลี้ยแป้งและไวรัสต่อไป

1.2) นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียดก่อนทำการดองตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 95% และ เก็บตัวอย่างที่ได้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 3 ส่วน โดยส่วนที่ 1 นำไปศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมส่วนไคตินที่เหลือนำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อเก็บเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen) ส่วนที่ 2 นำไปตรวจหาเชื้อไวรัสโดยการตัดแยกเพลี้ยแป้งตามระยะการเจริญเติบโต และส่วนที่ 3 นำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาข้อมูลชีววิทยา

1.3) การบันทึกข้อมูล

-บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ บันทึกรายละเอียดสภาพแวดล้อมของแปลงที่เก็บตัวอย่าง รวมทั้งข้อมูลอื่นๆ เช่น

ขนาดของแปลง อายุของสับปะรด ระยะห่างในการปลูก ปริมาณน้ำฝนและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ เป็นต้น

- บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยแป้ง เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะและสีของตัวอย่าง ก่อนทำการดองตัวอย่างพร้อมทั้งถ่ายภาพประกอบ

- บันทึกรายละเอียดวงจรชีวิตของเพลี้ยแป้งชนิด ตั้งแต่ระยะไข่จนเป็นตัวเต็มวัย รวมทั้งลักษณะการสืบพันธุ์ของเพลี้ยแป้ง

2. การศึกษาการจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะนำโรคเหี่ยวสับปะรดด้านลำดับพันธุกรรมและสัณฐานวิทยา

2.1) วิธีการศึกษาลำดับพันธุกรรม

1) นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ต้องในแอลกอฮอล์ 95% ที่ไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป ดังวิธีการต่อไปนี้

1.1) นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งมาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml โดยไคตินเพลี้ยแป้งที่เหลือนำไปทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้ในการศึกษาสัณฐานวิทยาและเก็บไว้เป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen)

1.2) สลายผนังเซลล์ (Lysis): โดยการเติม Lysis Buffer GL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Protinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วยพาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม ATL Buffer ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และเขย่าให้สม่ำเสมอ

1.3) จับสารพันธุกรรม (Bind DNA): เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาณ 210 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอเขย่าอย่างรวดเร็วประมาณ 15 วินาที

เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AL ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอ ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน tube และตกตะกอน ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน)

1.4) ล้างตะกอน (Wash silica membrane): โดยการเติม Wash Buffer AW1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer AW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 20,000x g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้น ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน

1.5) ตกตะกอนสารพันธุกรรมให้แห้ง (Dry silica membrane):

ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 20,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอด tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก 1.5 ไมโครลิตร

1.6) ละลายสารพันธุกรรม (Elute DNA): โดยการเติม Elution Buffer AE

ปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2) ทำการเพิ่มปริมาณยีน mtCOI ด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction

(PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ C1J2195 และ TL2N3014 ในการเพิ่มปริมาณ DNA

Primer Name	Sequence	Base
C1J2195	TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT	24
TL2N3014	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	25

สังเคราะห์ยีน mtCOI ของเปลี้ยแบ่งจากดีเอ็นเอที่เตรียมได้ โดยใช้ส่วนผสมของ MyTaq HS Red DNA Polymerase (Bioline, Cat No. BIO-21114) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย

Nuclease free water 10.5 ไมโครลิตร

5x MyTaq Red Reaction Buffer 4 ไมโครลิตร

10 pmole CP-F 1 ไมโครลิตร

10 pmole CP-R 1 ไมโครลิตร

MyTaq HS DNA Polymerase 0.5 ไมโครลิตร

DNA template 3 ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

1) Predenaturation 94 °C 5 นาที

2) Three step-cycling 35 cycles

Denaturation 94 °C 30 วินาที

Annealing 50 °C 30 วินาที

Extension 72 °C 45 วินาที

3) Final extension 72 °C 10 นาที

3) ตรวจสอบ PCR product โดยการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่ต้องการ โดยการให้ประจุของสารที่มีประจุแยกออกจากกัน ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยหยด PCR product ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 % (1% agarose gel) และให้ PCR product เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 45 นาที

4) ทำการ ถอดรหัสข้อมูลดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) เพื่อตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) แล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย

5) นำข้อมูลของดีเอ็นเอที่ผ่านการถอดรหัส (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสเพื่อแบ่งในวงศ์ Pseudococcidae ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรหัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999).

6) นำข้อมูล Barcode ที่ได้มาตรวจสอบชนิด กับ Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) ในการศึกษาจะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช นอกจากนี้ยังสามารถนำ ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ ที่ได้มาศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมต่อได้อีก

7) การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยแบ่งในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

2.2) วิธีการศึกษาด้านสัณฐานวิทยา

1) นำไคตินที่เหลือจากการศึกษาพันธุกรรมและดองในแอลกอฮอล์ 70% ที่ไปทำสไลด์ถาวรโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Williams and Watson (1988) นำตัวอย่างสไลด์ที่ทำเสร็จเรียบร้อยแล้วไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิต่ำ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอย่างน้อย 3 เดือน ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง

2) ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยแบ่งบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยอาศัยหลักการทางด้านอนุกรมวิธานและวาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเพลี้ยแบ่งแต่ละชนิด และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยแบ่ง โดยในแนวทางวินิจฉัยจะมีทั้งข้อมูลสัณฐานวิทยาที่ใช้จำแนกเพลี้ยแบ่งในวงศ์ย่อยนี้จนถึงระดับชนิด

3) จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยแบ่งในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล และจัดทำบาร์โค้ด (bar code) ของตัวอย่างเพลี้ยแบ่งแต่ละสไลด์เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

4) การบันทึกข้อมูล

-ชนิดของเพลี้ยแบ่งและรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยแบ่งเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่ และ ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

3. วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV 1-2 ในต้นสับปะรดและในเพลี้ยแบ่ง

วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV 1-2

1) สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากเพลี้ยแบ่งด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Thermo Scientific

2) สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากสับปะรดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป ด้วย GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit ยี่ห้อ Thermo Scientific โดยชั่งตัวอย่างใบพืชที่ต้องการทดสอบให้ได้น้ำหนัก 0.1 กรัม แล้วใส่ลงในโถรงบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย Plant RNA Lysis Solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วย้ายใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวบ์ใหม่ แล้วเติม 96% ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการผสมเบาๆ ให้เข้ากันด้วยปิเปต แล้วดูดสารละลายปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่ purification column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ให้ตะกอนอาร์เอ็นเอเกาะที่แผ่นเมมเบรนของ purification column และล้างด้วย Wash buffer1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และล้างด้วย Wash buffer2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย nuclease-free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3) ตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV 1-2 จากแมลงและพืชด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยนำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะกับไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 (Sether and Hu, 2002)

ส่วนประกอบปฏิกิริยา One step RT-PCR (Invitrogen)

-น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH ₂ O)	4.5	ไมโครลิตร
-2x buffer	12.5	ไมโครลิตร
-ไพรเมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-ไพรเมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-SuperscriptIII RT/platinum Taqmix (Invitrogen, 0.1 unit/ μ l)	1	ไมโครลิตร
-อาร์เอ็นเอต้นแบบ	5	ไมโครลิตร
รวม	25.0	ไมโครลิตร

นำส่วนประกอบของปฏิกิริยา RT-PCR ผสมกันแล้วทำการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยการตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

First strand cDNA synthesis

ขั้นที่ 1: 60°C นาน 30 นาที 1 รอบ

Pre-denaturation

ขั้นที่ 2: 94°C นาน 1 นาที 1 รอบ

PCR amplification จำนวน 30 รอบ

ขั้นที่ 3: (denature) 94°C นาน 15 วินาที

ขั้นที่ 4: (anneal) 60°C นาน 30 วินาที

ขั้นที่ 5: (extend) 68°C นาน 1 นาที

Final extension (optional)

ขั้นที่ 6: 68°C นาน 5 นาที 1 รอบ

ขั้นที่ 7: 15°C นาน 20 นาที 1 รอบ

4) ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอเป้าหมาย(ชิ้นยีนเป้าหมาย)ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ด้วย 1% agarose gel ในสารละลาย 1X TAE buffer โดยหยด PCR product ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ 1% agarose gel มาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide นาน 10 นาที และแช่น้ำเปล่า 15 นาที และนำแผ่น 1% agarose gel มาตรวจขนาดยีนเป้าหมายด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลการทดลอง

5) การโคลนดีเอ็นเอเป้าหมาย(ชิ้นยีนเป้าหมาย)เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega, USA.) โดยนำ PCR product ของดีเอ็นเอเป้าหมายมาทำให้บริสุทธิ์โดยแยกขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis ด้วย 0.8% agarose gel ในสารละลาย 1X TAE buffer

ทำการตัดเจลเฉพาะแถบดีเอ็นเอเป้าหมายตามขนาดที่ต้องการใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักของเจลไม่เกิน 300 มิลลิกรัม และสกัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายออกจากเจลด้วยชุดสำเร็จรูป QIAquickGel Extraction Kit (Qiagen, Germany) และทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และถ่ายพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH 5 α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวของแบคทีเรียที่คาดว่ามีการนำพลาสมิดลูกผสมอยู่ เพื่อนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) ด้วยโปรแกรม Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

6) การบันทึกข้อมูล

- ชนิดของเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวในสับปะรด
- ชนิดของเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวในเปลี้ยแปง

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาชนิดของเปลี้ยแปง (Hemiptera: Pseudococcus) ที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt; PMWaV) ในเขตภาคตะวันออกและภาคตะวันตกของประเทศไทย ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2562 โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างเปลี้ยแปงในแปลงสับปะรดที่ปรากฏอาการของโรค ในพื้นที่ภาคตะวันออกและภาคตะวันตกได้แก่จังหวัด ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ทั้งหมด 41 แปลง จำนวน 122 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ได้ตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ รายละเอียดดังนี้

1. การตรวจสอบหาเชื้อไวรัส PMWaV 1-2 ในเปลี้ยแปงและต้นสับปะรด

โดยตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อไวรัส PMWaV-1 ด้วยคู่ไพรเมอร์ Pa222-F1 และ Pa223-R1 และ PMWaV-2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ Pa224-F2&Pa225-R2 พบเชื้อไวรัสจำนวน 117 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อไวรัส จำนวน 5 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1 นอกจากนี้ นำตัวอย่างต้นสับปะรดที่พบเปลี้ยแปงตรวจหาเชื้อไวรัส จำนวน 8 ตัวอย่าง พบเชื้อไวรัสทั้ง 8 ตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการตรวจเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเปลี้ยแปง ซึ่งชนิดเปลี้ยแปงอาจไม่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัสเนื่องจากตรวจพบเชื้อไวรัสในเปลี้ยแปง 2 ชนิด คือ เปลี้ยแปงสับปะรดสีชมพูและเปลี้ยแปงสับปะรดสีเทาแต่ในเปลี้ยแปงสับปะรดสีเทาพบเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจไวรัส PMWaV 1 และ PMWaV 2 จากตัวอย่างเพลี้ยแป้ง (+ หมายถึง พบ - หมายถึงไม่พบ)

ตัวอย่างที่	PMWaV-1	PMWaV-2	ตัวอย่างที่	PMWaV-1	PMWaV-2
1	+	+	23	+	+
2	+	+	24	+	+
3	+	+	25	+	+
4	+	+	26	+	+
5	+	+	27	+	+
6	+	+	28	+	+
7	+	+	29	+	+
8	+	+	30	+	+
9	+	+	31	+	+
10	+	+	32	+	+
11	+	+	33	+	+
12	+	+	34	+	+
13	+	+	35	+	+
14	+	+	36	-	+
15	+	+	37	-	+
16	+	+	38	+	-
17	+	+	39	+	-
18	+	+	40	+	-
19	+	+	41	+	+
20	+	+	42	+	-
21	+	+	43	+	+
22	+	+	44	+	+

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	PMWaV-1	PMWaV-2	ตัวอย่างที่	PMWaV-1	PMWaV-2
45	+	-	84	+	+

46	+	+	85	+	+
47	+	+	86	+	+
48	+	+	87	+	+
49	+	-	88	+	+
50	-	-	89	+	+
51	-	-	90	+	+
52	+	-	91	+	+
53	+	-	92	+	+
54	+	-	93	+	+
55	+	-	94	+	+
56	-	-	95	+	+
57	+	-	96	+	+
58	+	-	97	+	+
59	+	+	98	+	+
60	-	-	99	+	+
61	+	+	100	+	+
62	+	+	101	+	+
63	+	-	102	+	+
64	+	-	103	+	+
65	-	-	104	+	+
66	+	-	105	+	+
67	+	+	106	+	+
68	+	+	107	+	+
69	+	-	108	+	+
70	+	-	109	+	+
71	+	-	110	+	+
72	+	-	111	+	+
73	+	-	112	+	+
74	+	-	113	+	+
75	+	+	114	+	+
76	+	+	115	+	+
77	+	+	116	+	+
78	+	+	117	+	+
79	+	+	118	+	+
80	+	+	119	+	+
81	+	+	120	+	+
82	+	+	121	+	+

83	+	+	122	+	+
----	---	---	-----	---	---

2. จำแนกชนิดเชื้อเพลิงแข็งที่เป็นพาหะนำโรคเหี่ยวสับประรดด้านลำดับพันธุกรรมและสัณฐานวิทยา

2.1 จำแนกชนิดเชื้อเพลิงแข็งด้วยลำดับพันธุกรรม

การตรวจสอบชนิดของเชื้อเพลิงแข็ง โดยนำตัวอย่างเชื้อเพลิงแข็งที่ตรวจสอบพบเชื้อไวรัสทั้ง PMWaV 1-2 จำนวน 117 ตัวอย่างมาทำการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางโมเลกุลและสัณฐานวิทยาประกอบ พบเชื้อเพลิงแข็งจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 1. เชื้อเพลิงสับประรดสีชมพู *Dysmicococcus brevipes* (Cockerell) 2. เชื้อเพลิงสับประรดสีเทา *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley พร้อมจัดทำ DNA barcode ของเชื้อเพลิงแข็งจำนวน 41 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) โดยพบเชื้อเพลิงสับประรดสีเทาเพียง 1 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อเพลิงแข็งมีความสัมพันธ์กับต้นสับประรดที่ตรวจพบเชื้อไวรัสทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ และพบว่าเชื้อเพลิงแข็งทุกระยะสามารถเป็นพาหะของโรคไวรัสได้แม้จะเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 มีขนาดตัวเล็กและสามารถใช้ตัวอย่างเชื้อเพลิงแข็งเพียง 1 ตัวในการตรวจหาเชื้อไวรัส นอกจากนี้เชื้อเพลิงแข็งทั้ง 2 ชนิดข้างต้นยังพบเชื้อเพลิงแข็งอีก 3 ชนิดจากการรวบรวมตัวอย่างจากแปลงที่ทำการสำรวจ ได้แก่ 1. เชื้อเพลิงลาย *Ferrisia virgata* Cockerell 2. เชื้อเพลิงจุดดำ *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 3. เชื้อเพลิงแจ๊คเบียร์ *Pseudococcus jackbeardsleyi* Gimpel and Miller ซึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้พบในปริมาณที่น้อย

ตารางที่ 2 DNA Barcode ของเชื้อเพลิงแข็งในสับประรดที่เป็นพาหะนำโรคไวรัส

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	DNA barcode
1	<i>D. brevipes</i>	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTTCG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTAAACAATATTATTATTATATAATAAATTAATCTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATCAAGAGATTTAATATTTTCTCGATTAATAATTTTAGATTTTGACT TTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATATATTATTAAGAAATAATTTGATACTGGATG AACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTACATTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACA TTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAA TAATAATTTTTTTAAGTAATTTAACTTTATATTTGATCTATTATTACTACTATTTTACTT ATTATTTCTATTCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATA AATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATT
2	<i>D. brevipes</i>	CAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTGAATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTT TTAATAACAATATTATTATTATATAAATAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT CTATACCAATTAATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATT TAATATTTCTCGATTAATAAATTTAGATTTTGACTTTTAAATGCTTCATTAATGTTTATATTAT TAAATATATTATTAAGAGATAATTTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAA ATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTC AATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAAATTTTTTTAATAATTTAATTTA TATATTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAAGAGCT ATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTAATATAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAAT

		CCTATTCTTTATCAACATTTATTT
3	<i>D. brevipes</i>	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTTCGAATTGAATTAATAAAATTTAAATAATAATTT TAATAACAATATTATTTATTATATAATAAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAAC TATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTT AATATTTCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATT AAATATATTATTAAGAGATAAATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAAA ATTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTC AATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTA TATATTTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAAGAGCT ATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAAT CCTATTCTTTATCAACATTTATTT
4	<i>D. brevipes</i>	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTTCGAATTGAATTAATAAAATTTAAATAATAATTT TAATAACAATATTATTTATTATATAATAAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAAC TATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTT AATATTTCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATT AAATATATTATTAAGAGATAAATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAAA ATTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTC AATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTA TATATTTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAAGAGCT ATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAAT CCTATTCTTTATCAACATTTATTT
5	<i>D. brevipes</i>	ATTAATAAATGATTATATTCAACTAATCATAAAAAATATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTT TGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTTCGAATTGAATTAATAAAATTTAAATAAT AATTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGA GATTAATATTTCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATA TTATTAATATATTATTAAGAGATAAATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTAATTAAT CAAAATTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAA CTTTATATATTTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAA GAGCTATTACTATAAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATG GAAATCCTATTT
6	<i>D. brevipes</i>	ATTAATAAATGATTATATTCAACTAATCATAAAAAATATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTT TGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTTCGAATTGAATTAATAAAATTTAAATAAT AATTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGA GATTAATATTTCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATA TTATTAATATATTATTAAGAGATAAATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTAATTAAT CAAAATTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAA CTTTATATATTTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAA GAGCTATTACTATAAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATG GAAATCCTATTTCTTTATCAACATTTATTT
7	<i>D. brevipes</i>	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTTCG AATTGAATTAATAAAATTTAAATAATAATTTTAAATAATAATATTATTATTATATAATAAATTACTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTAATATTTCTCGATTAAATAATTTTAGATTTTGACT

		TTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATG AACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAATTTTTTCACITTAATTTTTATTATTTTTCTTTACA TTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAA TAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTGATCTGTTATTACTACTATTTTTACTT ATTATTTCTATTCTATTTTTATCAAGAGCTATTACTATAAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATA AATTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
8	<i>D. brevipes</i>	AATAAATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTTAATAACAATATTATTTATTATATAAATAACTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCTCGATTAATAAATTTAGGTTTGGACT TTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATG AACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAATTTTTTCACITTAATTTTTATTATTTTTCTTTACA TTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAA TAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTGATCTATTATTACTACTATTTTTACTT ATTATTTCTATTCTATTTTTATCAAGAGCTATTACTATAAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATA AATTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
9	<i>D. brevipes</i>	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTTAATAACAATATTATTTATTATATAAATAACTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCTCGATTAATAAATTTAGATTTGGACT TTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATG AACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAATTTTTTCACITTAATTTTTATTATTTTTCTTTACA TTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAA TAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTGATCTATTT
10	<i>D. brevipes</i>	GGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAAATAATTT AATAACAATATTATTTATTATATAAATAACTATTTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACT ATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTA ATATTTCTCGATTAATAAATTTTAGATTTGGACTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTA AATATATTATTAAGAGATAAATTGATACAGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAA TTTTTCACITTAATTTTTATTATTTTTCTTTACATTTAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCA ATTAATTTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAAATAAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTAT ATATTTGATCTATGATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCTATTTATCAAGAGCTA TTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAATTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATC CTATTCTTTATCAACATTTGATT
11	<i>D. brevipes</i>	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTTAATAAATAATATTATTTATTATATAAATAACTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCTCGATTAATAAATTTAGATTTGGACT TTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATG AACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAATTTTTTCACITTAATTTTTATTATTTTTCTTTACA TTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAA TAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTGATCTGTTATTACTACTATTTTTACTT ATTATTTCTATTCTATTTTTATCAAGAGCTATTACTATAAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATA AATTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
12	<i>D. brevipes</i>	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTTAATAACAATATTATTTATTATATAAATAACTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCTCGATTAATAAATTTAGGTTTGGACT

		TTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATG AACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAAAATTTTTTCACITTAATTTTTATTATTTTTCTTTACA TTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAA TAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTGATCTATTATTACTACTATTTTTACTT ATTATTTCTATTCTATTTTTATCAAGAGCTATTACTATAAATTTTTAGATAAAAAATTTCAATATA AATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
13	<i>D. brevipes</i>	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTG AATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTA TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATCAAGAGATTAATATTTCTCGATTAATAATTTTTAGATTTTGACT TTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATG AACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAAAATTTTTTCACITTAATTTTTATTATTTTTCTTTACA TTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAA TAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTGATCTATTATTACTACTATTTTTACTT ATTATTTCTATTCTATTTTTATCAAGAGCTATTACTATAAATTTTTAGATAAAAAATTTCAATATA AATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
14	<i>D. brevipes</i>	ATTAATAATGATTATATTCAACTAATCATAAAAAATATTAGAATAATATATTAAATATTTGGATTT TGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAAT AATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT ATAACTATACCAATTTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGA GATTTAATATTTCTCGATTAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATA TTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATTGATACCTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAAT CAAAAATTTTTTCACITTAATTTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAAATTTTTTTTTAAATAATTTAA CTTTATATATTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAA GAGCTATTACTATAATTTTTAGATAAAAAATTTCAATATAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATG GAAATCCT
15	<i>D. brevipes</i>	TTATCTATAAGTTTTATTATTTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTAATAACAATATT ATTTATTATATAATAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT ATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCTCGA TTAAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATAATATTATTA AGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAAATTTTTTCACITTT AAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTAT TGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTGATCT ATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTATCAAGAGCTATTACTATAAAT ATTTTAGATAAAAAATTTCAATATAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTAT CAACATTTATTT
16	<i>D. brevipes</i>	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTTCGAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTT TAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT TATACCAATTTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTT AATATTTCTCGATTAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATT AAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAA ATTTTTTCACITTAATTTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTT AATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTA TATATTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAAGAGCT ATTACTATAAATTTTTAGATAAAAAATTTCAATATAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAAT CCTATTCTTTATCAACATTTATTT

17	<i>D. brevipes</i>	ATTAGGTTTATCAATAAGTTTTATTATTTCGAATTGAATTAATAAATTTAATAATAATTTTAAATAA TAATATTATTATTATATAATAAATAACTATTTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAACTATACC AATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATT TCCTCGATTAATAAATTTAGATTTTGACTTTTAAACCTTCCTTAATTTTATATTATTAATAT ATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTCTAATTAATCAAAAATTTTT TACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTA TTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAAATAATTTTTTTTATTAAATGATTTAACTTTATATATT TGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTTCTATTCTATTTTATCAAGAGCTATTACT ATAATTATTTAGATAAAAAATTTAATAATAAATTTCTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATT CTTTATCAACATTTATT
18	<i>D. brevipes</i>	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTTCGAATTGAATTAATAAATTTAATAATAATTT TAATAACAATATTATTATTATATAATAAATAACTATTTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAAC TATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTT AATATTTCTCGATTAATAAATTTAGATTTTGACTTTTAAACCTTCATTAATGTTTATATTATT AAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAA ATTTTTACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTC AATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTA TATATTTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTTCTATTCTATTTTATCAAGAGCT ATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAATTTTTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAAT CCTATTCTTTATCAACATTTATT
19	<i>D. brevipes</i>	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTTCG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTAAACAATATTATTATTATATAATAAATAACTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCTCGATTAATAAATTTAGATTTTGACT TTAATAACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATG AACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAAATTTTTACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACA TTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATA TAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTGATCTATTATTACTACTATTTTACTT ATTATTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATA AATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATT
20	<i>D. brevipes</i>	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTTCG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTAAACAATATTATTATTATATAATAAATAACTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCTCGATTAATAAATTTAGATTTTGACT TTAATAACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATG AACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAAATTTTTACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACA TTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATA TAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTGATCTATTATTACTACTATTTTACTT ATTATTCTATTCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATA AATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATT
21	<i>D. brevipes</i>	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTTCG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTAAACAATATTATTATTATATAATAAATAACTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCTCGATTAATAAATTTAGATTTTGACT TTAATAACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATATATTATTAAGAAATAATATTGATACTGGATG AACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAAATTTTTACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACA TTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATA TAATAATTTTTTTTTAAGTAATTTAACTTTATATATTGATCTATTATTACTACTATTTTACTT

		ATTATTTCTATTCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAAATTTCAATATA AATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
22	<i>D. brevipes</i>	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTGAAATGAATTAATAAATTTAAATAATAATTT TAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTTCATGCATTTATTATAATTTTTTTTATAAC TATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTT AATATTTCTCGATTAATAATTTTAGATTTTGACTTTTAAACCTTCATTAATGTTTATATTATT AAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAA ATTTTTCACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTC AATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTA TATATTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAAGAGCT ATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAAT CCTATTCTTTATCAACATTTATTT
23	<i>D. brevipes</i>	AAAAATCAAATAAATGTTGATATAGAATAGGATTTCCATTTCTAAAGGATTAAAAAATTTAT ATTGAAATTTTTATCTAAAATAATTATAGTAATAGCTCTTGATAAAAATAGGAATAGAAAATAATA GTAAAATAGTAGTAATAATAATAGATCAAAATATATAAGTTAAATTTTAAAAAAAATTTATTAT TATTAATAATAAAAATAGAAACAATAAAATTAATTGAACTAAAATTTGATGATAAACCATTTAAA TGTAAGAAAAAATAAAAATTTAAAGTAAAAAATTTTGATTAATTAAGGAGGATATAATGT TCATCCCGTATTAATATTATCTCTTAATAATATATTTAATAATAAACATTAATGAAGGTATTAA AAGTCAAAATCTAAAATTTAATCGAGGAAATTTAAATCTCTTGATATTAATATTAAAGGTA ATAATCAATTACTTAATCTTCAATAATAATTTGGTATAGTTATAAAAAATTAATAAATGCATGA ATAGTAATTATTATATAATAAATAATTTGTTATTAAAATTTATTATTATTATTAAATCAATTC GAATAATAAACTTATAGATAAACCTAATAAACCTGATCAAAATCCAATATTAAATATATTATT CTGATATTTTTATGT
24	<i>D. brevipes</i>	AAAAATATCAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGT TTTATTATTGAAATGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTAATAACAATATTATTATTATATA ATAATTACTATTTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTA AGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTAATATTTCTCGATTAATAATTTT AGATTTTGACTTTTAAACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATT GATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATT TTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTATTGTTTCTATTTTT ATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTGATCTATTATTACTA CTATTTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTAGATAAAA ATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT GATTTTTTGG
25	<i>D. brevipes</i>	AAAAATATCAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGT TTTATTATTGAAATGAATTAATAAATTTAAATAATAATTTAATAACAATATTATTATTATATA ATAATTACTATTTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTA AGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTAATATTTCTCGATTAATAATTTT AGATTTTGACTTTTAAACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATT GATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACTTTAAATTTTATTATT TTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTATTGTTTCTATTTTT ATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATATTGATCTATTATTACTA CTATTTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTAGATAAAA ATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT GATTTTTTGG
26	<i>D. brevipes</i>	TTTTTTTTATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAA TATCAAGAGATTAATAATTTCTCGATTAATAAATTTTAGATTTTGACTTTTAAACCTTCATTA TGTTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATTAATAACGGGATGAACATTATATCCTCCTT

		<p>TAATTAATCAAATTTTTCTACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTGTCAT CAATTTTTAGTTCAATTAATTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAAATTTTTTTTTAA TAATTTAACTTTATATATTTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATT TTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAATTTTTTAATCCTTTA GGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTTGATTTTTGGTCCACCTGAAGTTTATATT TTAATTTACCAGGATTTGGAGCTATATCTCAAATTATAAATCAAGAAAGTGGAAATTAGAAT TTTTAGTAAATTAATAAATTTTTGCTATAATTTCTATTGGAATTTAGGATTTATTGTATGAGC TCATCATATTTACTATTGGATTAGATATTGATACTCAATTATTTTTATAATAGCTACAATAAT CATTGCTATTTCAACAAGAATTTAAATTTTTAG</p>
27	<i>D. brevipes</i>	<p>AATAATATATTTAATATTTGGATTTGATCAGGATTATTAGGTTTATCAATAAGTTTTATTATTG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTAAATAAATATTATTATTATATAAATAACTAT TCATGCTTTTATTATAATTTTTTTATAACTATAACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCTCGATTAATAATTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCCTTAATTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATG AACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAATTTTTTACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACA TTTAAATGGTTTATCATCAATTTTAGTTCAATTAATTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATA TAATAATTTTTTTAATAATTTAACITTTATATTTGATCTATTATTACTACTATTTTACTT ATTATTTCTATTCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAAATTATTAGATAAAAAATTTAATA AATTTCTTTAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT</p>
28	<i>D. brevipes</i>	<p>AATAATATATTTAATATTTGGATTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTAAATAAATATTATTATTATATAAATAACTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATAACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCTCGATTAATAATTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATG AACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAATTTTTTACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACA TTTAAATGGTTTATCATCAATTTTAGTTCAATTAATTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATA TAATAATTTTTTTAATAAATTTAACITTTATATTTGATCTGTTATTATTACTACTATTTTACTT ATTATTTCTATTCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAAATTATTAGATAAAAAATTTCAATA AATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT</p>
29	<i>D. brevipes</i>	<p>AATAATATATTTAATATTTGGATTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTAAATAAATATTATTATTATATAAATAACTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATAACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCTCGATTAATAATTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATG AACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAATTTTTTACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACA TTTAAATGGTTTATCATCAATTTTAGTTCAATTAATTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATA TAATAATTTTTTTAATAAATTTAACITTTATATTTGATCTGTTATTATTACTACTATTTTACTT ATTATTTCTATTCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAAATTATTAGATAAAAAATTTCAATA AATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT</p>
30	<i>D. brevipes</i>	<p>ATTAATAAATGATTATATTTCAACTAATCATAAAAAATTAGAATAATATTTAATATTTGGATTT TGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTGGAATTAATAAATTTAAATAAT AATTTAATAACAATATTATTATTATATAAATAACTATTGATGATTTATTATAATTTTTTT ATAACTATAACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATCAAGA GATTTAATATTTCTCGATTAATAATTTAGATTTGACTTTAATACCTTCATTAATGTTTATA TTATTAATAATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTAATTAAT CAAATTTTTTACTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTT AGTTCAATTAATTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAAATAAATTTTTTTAAATAATTTAA CTTTATATATTTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAA</p>

		GAGCTATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATG GAAATCCTATTT
31	<i>D. brevipes</i>	ATTA AAAAATGATTATATTCAACTAATCATAAAAAATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTT TGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTGCAATTGAATTAATAAATTTAAATAAT AATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGA GATTTAATATTTCCCTCGATTAATAAATTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATA TTATTAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAAT CAAAAATTTTTACCTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAA CTTTATATATTTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAA GAGCTATTACTATAAATTTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATG GAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
32	<i>D. brevipes</i>	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTGCAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTT TAATAACAATATTATTTATTATATAATAAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAAC TATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTT AATATTTCCCTCGATTAATAAATTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATT AAATATATTATTAAGAGATAAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAA ATTTTTACCTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTC AATTAATTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTA TATATTTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAAGAGCT ATTACTATAAATTTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAT CCTATTCTTTATCAACATTTATTT
33	<i>D. brevipes</i>	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTGCAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTT TAATAACAATATTATTTATTATATAATAAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAAC TATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTT AATATTTCCCTCGATTAATAAATTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATT AAATATATTATTAAGAGATAAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAA ATTTTTACCTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTC AATTAATTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTA TATATTTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAAGAGCT ATTACTATAAATTTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAT CCTATTCTTTATCAACATTTATTT
34	<i>D. brevipes</i>	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTGCAATTGAATTAATAAATTTAAATAATAATTT TAATAACAATATTATTTATTATATAATAAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAAC TATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTT AATATTTCCCTCGATTAATAAATTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATT AAATATATTATTAAGAGATAAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAA ATTTTTACCTTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTC AATTAATTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACTTTA TATATTTGATCTATTATTACTACTATTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAAGAGCT ATTACTATAAATTTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAT CCTATTCTTTATCAACATTTATTT
35	<i>D. brevipes</i>	ATTA AAAAATGATTATATTCAACTAATCATAAAAAATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTT TGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTGCAATTGAATTAATAAATTTAAATAAT AATTTTAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTT ATAACTATACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGA GATTTAATATTTCCCTCGATTAATAAATTTAGATTTTGACTTTTAATACCTTCATTAATGTTTATA

		TTATTAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTAATTAAT CAAAATTTTTTCACITTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACITTTAAATGGTTTATCATCAATTTTT AGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTAAATAATTTAA CTTTATATATTTGATCTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCCTATTTTATCAA GAGCTATTACTATAATTTTATAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATG GAAATCCT
36	<i>D. brevipes</i>	TTATCTATAAGTTTTATTATTGCAATTGAATTAATAAAATTTAAATAATAATTTTAAATAACAATATT ATTTATTATATAATAATTAATTAATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATACCAATATT ATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCCTCGA TTAAATAATTTTAGATTTGACTTTTAAATACCTTCATTAAATGTTTATATTATTAATAATATTATTA AGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAATTTTTTCACITTT AAATTTTATTATTTTTCTTTACITTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTAT TGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTAAATAATTTAACTTTATATTTGATCT ATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATT ATTTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTAT CAACATTTATTT
37	<i>D. brevipes</i>	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTGCAATTGAATTAATAAAATTTAAATAATAATTT TAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTAATTAATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAAC TATACCAATATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTT AATATTTCCCTCGATTAATAATTTTAGATTTGACTTTTAAATACCTTCATTAATGTTTATATTATT AAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAA ATTTTTTCACITTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACITTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTC AATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTAAATAATTTAACTTTA TATATTTGATCTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTCTATTCCCTATTTTATCAAGAGCT ATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAAT CCTATTCTTTATCAACATTTATTT
38	<i>D. brevipes</i>	AGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTGCAATTGAATTAATAAAATTTAAATAATAATTT TAATAACAATATTATTTATTATATAATAATTAATTAATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAAC TATACCAATATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTT AATATTTCCCTCGATTAATAATTTTAGATTTGACTTTTAAATACCTTCATTAATGTTTATATTATT AAATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAA ATTTTTTCACITTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACITTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTC AATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTAAATAATTTAACTTTA TATATTTGATCTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTCTATTCCCTATTTTATCAAGAGCT ATTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAAT CCTATTCTTTATCAACATTTATTT
39	<i>D. brevipes</i>	GGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTGCAATTGAATTAATAAAATTTAAATAATAATTTT AATAACAATATTATTTATTATATAATAATTAATTAATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACT ATACCAATATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTA ATATTTCCCTCGATTAATAATTTTAGATTTGACTTTTAAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTA AATATATTATTAAGAGATAATATTGATACGGGATGAACATTATATCCTCCTTTAATTAATCAAAA TTTTTTTCACITTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACITTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTC ATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATTAATAATAATAATTTTTTTAAATAATTTAACTTTAT ATATTTGATCTATTATTACTACTATTTTACTTATTATTTCTATTCCCTATTTTATCAAGAGCTA TTACTATAATTATTTAGATAAAAAATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATC CTATTCTTTATCAACATTTATTT

40	<i>D. brevipes</i>	AATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGTTTTATTATTCG AATTGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTAAATAAATATTATTATTATATAAATAACTACTAT TCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATAACCAATTATTATTGGAAGATTAAGTAATTGATT ATTACCTTTAATATTAATATCAAGAGATTTAATATTTCCCTCGATTAATAAATTTTAGATTTTGACT TTTAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATATATTATTAAGAGATAATATTGACTGGATG AACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAAATTTTTCACCTTAAATTTTATTATTTTTCTTTACA TTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTTATTATAATAA TAATAATTTTTTTTTAAATAATTTAACCTTATATATTGATCTGTTATTACTACTATTTACTT ATTATTTCTATTCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAAAATTTCAATATA AATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT
41	<i>D. neobrevipes</i>	AAAAATATTAGAATAATATATTTAATATTTGGATTTTGATCAGGTTTATTAGGTTTATCTATAAGT TTTATTATTGGAATTAATAAATTTAAATAAATTTTAAACAATATTATTATTATATA ATAATTACTATTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAACTATAACCAATTATTATTGGAAGATTA AGTAATTGATTATTACCTTTAATATTAATCAAGAGATTTAATATTTCCCTCGATTAATAAATTTT AGATTTTGACTTTTAAATACCTTCATTAATGTTTATATTATTAATATATTATTAAGAGATAATATT GATACTGGATGAACATTATATCCTCCTTAATTAATCAAAATTTTTCACCTTAAATTTTATTATT TTTTCTTTACATTTAAATGGTTTATCATCAATTTTTAGTTCAATTAATTTTATTGTTTCTATTTTT ATTATTAATAATAAATTTTTTTTTAAATAATTTAACCTTATATATTGATCTATTATTACTA CTATTTTACTTATTATTCTATTCTATTTTATCAAGAGCTATTACTATAATTATTTTAGATAAAA ATTTCAATATAAAATTTTTTAAATCCTTTAGGAAATGGAAATCCTATTCTTTATCAACATTTATTT GATTTTTTGGAC

กรมวิชาการศึกษา

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะนำโรคเหี่ยวสับประรด

Genus Dysmicoccus Ferris, 1950

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างคล้ายรูปไข่ ค่อนข้างกลม หนวคมี 8 ปล้อง ช่องเปิดคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว มี 2 คู่ ขายาวเรียว ใกล้เคียงของเล็บมีลักษณะคล้ายเส้นขน 2 เส้น เรียกว่า digitules บริเวณปลายเส้นมีลักษณะเป็นปม (knob) ผิวหน้าเล็บหยักคล้ายฟัน กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มี 6-17 คู่ ไม่มีคู่ที่ 2 ที่อยู่บนส่วนหัว แต่ละอันประกอบด้วยรูเปิดรูปสามเหลี่ยม ขนปลายแหลมคล้ายรูปกรวยขนาดใหญ่จำนวน 5-6 เส้น และมีขนเส้นเล็กบาง โดยทั่วไปมีวงของแผ่นแข็ง ไม่มีท่อที่รอบปากท่อเป็นขอบแข็ง ขนด้านล่างของลำตัวมีลักษณะเป็นเส้นเรียวยาวคล้ายเส้น แต่อาจมีขนปลายแหลมคล้ายรูปกรวยปะปน ลอนปลายปล้องท้องแต่ละอันอาจมีหรือไม่มีแผ่นแข็ง (sclerotized area) ปรากฏอยู่ และไม่มีแถบแคบ

Dysmicoccus brevipes (Cockerell, 1893)

ชื่อสามัญ เพลี้ยแป้งสับประรดสีชมพู (pink pineapple mealybug)

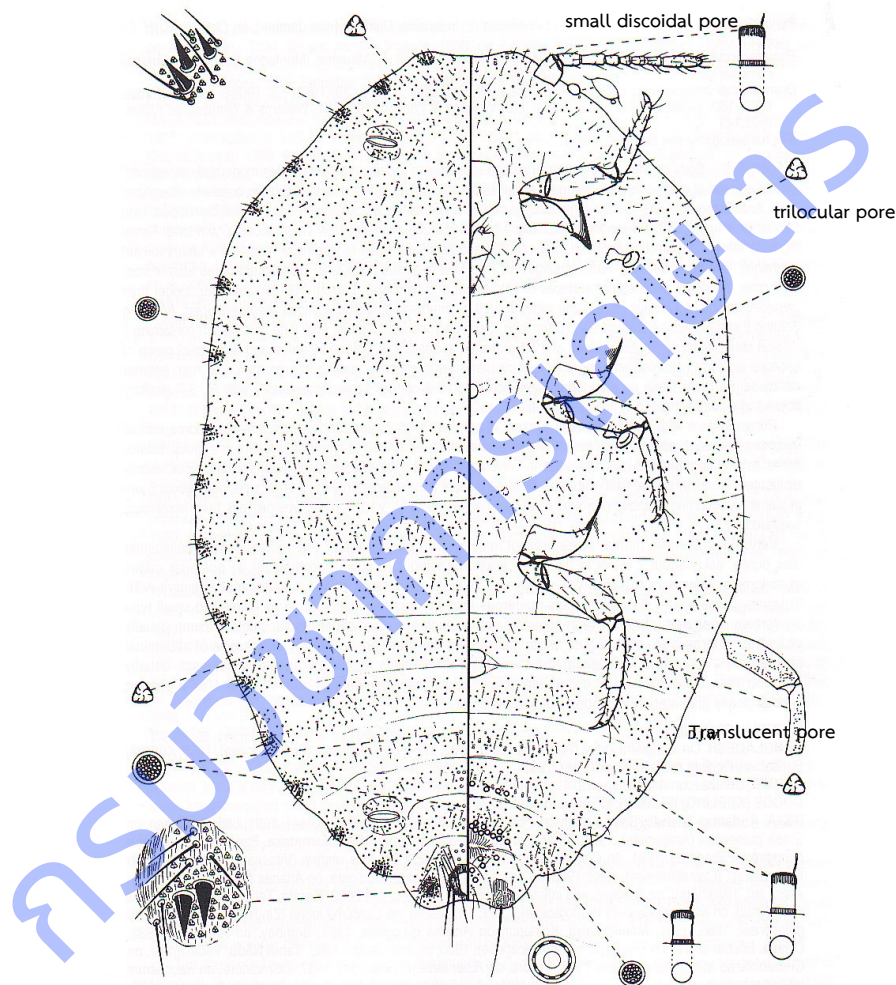
รูปร่างลักษณะ

ลักษณะในธรรมชาติ ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปร่างค่อนข้างกลม ผนังลำตัวสีชมพู ปกคลุมด้วยไขแป้งสีขาว ด้านข้างรอบลำตัวมีเส้นแป้งสั้นๆ เส้นแป้งด้านท้ายของลำตัวยาวกว่าด้านข้างเล็กน้อย ไม่มีการสร้างถุงไข่หุ้ม โดยวางไข่ได้ส่วนท้อง มักพบบริเวณกาบใบ ส่วนเหง้า ราก หรือฐานของผลสับประรด

ลักษณะบนแผ่นสไลด์แก้ว (ภาพที่ 1) ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปร่างค่อนข้างกลม ลำตัวยาว 2.3-3.0 มิลลิเมตร กว้าง 2.5-2.7 มิลลิเมตร หนวคมี 8 ปล้อง ขายาวเรียว มีรูโปร่งแสงที่ต้นขาและน่องขาของขาคู่หลัง กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มี 17 คู่ คู่สุดท้ายตั้งอยู่บนแผ่นแข็งรูปสี่เหลี่ยม แต่ละอันประกอบด้วยรูเปิดรูปสามเหลี่ยมและขนปลายแหลมคล้ายรูปกรวย ลอนปลายส่วนท้อง มีขนขนาดใหญ่ 2 เส้น และมีขนเส้นเล็กๆบางๆ 6 เส้น ช่องเปิดคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว มี 2 คู่

ผนังลำตัวด้านบน (dorsum) มีขนสั้นปลายแหลม รวมทั้งขนที่อยู่บนลอนปลายส่วนท้อง มีรูเปิดรูปสามเหลี่ยมเป็นจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป รูกลมมีขนาดต่างๆ กันกระจายอยู่บนผนังลำตัว แต่ละรูมีขอบหนาและผิวหน้ามีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ (granular) วงแหวนปลายส่วนท้องประกอบด้วยขน 6 เส้น

ผนังลำตัวด้านล่าง (venter) มีขนสั้นๆ ยกเว้นที่ส่วนหัวและปล้องท้องปล้องท้ายๆ ซึ่งมีขนาดยาวกว่า รูเปิดรูปวงกลม เรียงเป็นแถวที่ขอบด้านล่างของปล้องท้องปล้องที่ 7 รูเปิดรูปสามเหลี่ยมและรูปกลม กระจายอยู่ทั่วไป มีรูปกลมเล็ก จำนวน 2-3 รูอยู่บริเวณด้านหลังของขอบรอบตา ท่อชนิดที่ปากท่อเป็นแผ่นแข็ง มี 2 ขนาด ขนาดเล็กจะมีความยาวของท่อเท่ากับรูเปิดรูปวงกลม และปากท่อกว้างเท่ากับรูเปิดรูปสามเหลี่ยม โดยเรียงกันเป็นแถวจำนวน 1 แถวหรือ 2 แถวตามขวางโดยผ่านกลางปล้องท้องปล้องที่ 5-7



ภาพที่ 1 ตัวเต็มวัยเพศเมีย *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell, 1893) ปรับปรุงจาก Williams (2004)

Dysmicoccus neobrevipes Beardsley, 1959

ชื่อสามัญ เพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทา/เพลี้ยแป้งน้อยหน้า (grey pineapple mealybug)

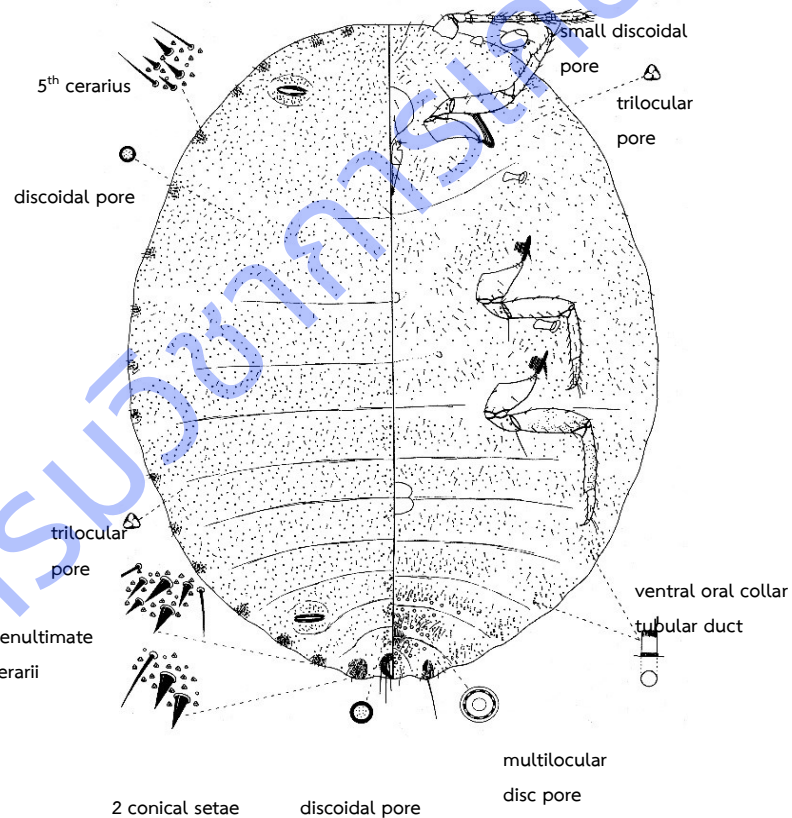
รูปร่างลักษณะ

ลักษณะในธรรมชาติ ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปร่างค่อนข้างกลม ผนังลำตัวสีเทาหรือสีน้ำตาลเข้ม ปกคลุมด้วยไขแป้งสีขาว ด้านข้างรอบลำตัวมีเส้นแป้งสั้นๆ เส้นแป้งด้านท้ายของลำตัวยาวกว่าด้านข้างเล็กน้อย เล็กน้อย ไม่มีการสร้างถุงไขหุ้ม โดยวางไข่ได้ส่วนท้อง มักพบบริเวณผลหรือใบของสับปะรด

ลักษณะบนแผ่นสไลด์แก้ว (ภาพที่ 2) ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปร่างค่อนข้างกลม ลำตัวยาว 3.3-3.4 มิลลิเมตร กว้าง 2.7-3.1 มิลลิเมตร หนวคมี 8 ปล้อง ขายาวเรียว มีรูโปร่งแสงที่ต้นขาและน่องขาของขาคู่หลัง กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มี 17 คู่ คู่สุดท้ายตั้งอยู่บนแผ่นแข็งรูปทรงรี แต่ละอันประกอบด้วยรูเปิดรูปสามเหลี่ยมและขนปลายแหลมคล้ายรูปกรวย ลอนปลายส่วนท้อง มีขนขนาดใหญ่ 2 เส้น และมีขนเส้นเล็กๆบางๆ 4-6 เส้น ช่องเปิดคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว มี 2 คู่ ผนังลำตัวด้านบน (dorsum) มีขนสั้นปลายแหลม รวมทั้งขนที่อยู่บนลอนปลายส่วนท้อง มีรูเปิดรูปสามเหลี่ยมเป็นจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป รูกลมมีขนาดต่างๆ กันกระจายอยู่บนผนังลำตัว แต่ละรูมีขอบหนาและผิวหน้ามีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ (granular) วงแหวนปลายส่วนท้องประกอบด้วยขน 6 เส้น

ผนังลำตัวด้านล่าง (venter) มีขนสั้นๆ ยกเว้นที่ส่วนหัวและปล้องท้องปล้องท้ายๆ ซึ่งมีขนาดยาวกว่า รูเปิดรูปวงกลม เรียงเป็นแถวที่ขอบด้านล่างของปล้องท้องปล้องที่ 7 รูเปิดรูปสามเหลี่ยมและรูกลม กระจายอยู่ทั่วไป มีรูกลมเล็ก จำนวน 2-3 รูอยู่บริเวณด้านหลังของขอบรอบตา ท่อชนิดที่ปากท่อเป็นแผ่นแข็ง มี 2 ขนาด ขนาดเล็กจะมีความยาวของท่อเท่ากับรูเปิดรูปวงกลม และปากท่อกว้าง

เท่ากับรูเปิดรูปสามเหลี่ยม โดยเรียงกันเป็นแถวจำนวน 1 แถวหรือ 2 แถวตามขวางโดยผ่านกลาง ปล้องท้องปล้องที่ 5-7



ภาพที่ 2 ตัวเต็มวัยเพศเมีย *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley, 1959 ปรับปรุงจาก Williams (2004)

3. วงจรชีวิต

การศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู โดยนำตัวอย่างเพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู มาเลี้ยงด้วยฟักทองในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ปิดกล่องให้มีความมืด พบว่า เพลี้ยแป้งมีอายุ 65 - 110 วัน สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ สามารถวางไข่ได้ประมาณ 250 - 700 ฟอง ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุประมาณ 35 - 90 วัน การเลี้ยงเพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพูจำเป็นต้องสร้างสภาพแวดล้อมให้มืดซิด ให้มีแสงน้อยที่สุด เนื่องจากในสภาพธรรมชาติเพลี้ยแป้งชนิดนี้จะอยู่บริเวณกาบใบของสับปะรด และอยู่บริเวณเหง้าและราก ซึ่งมักไม่ได้สัมผัสแสงสว่าง เพลี้ยแป้งจึงจะเจริญเติบโตได้ดี หากไม่มีการสร้างสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเพลี้ยแป้งจะไม่เจริญเติบโตและไม่สามารถเลี้ยงในฟักทองได้



ภาพที่ 3 ก.-ค. แปลงสับปะรดที่ปรากฏอาการของโรคเหี่ยว ค.-ฉ. เพลี้ยแป้งที่สำรวจพบในแปลงสับปะรด

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาชนิดของเพลี้ยแป้ง (Hemiptera: Pseudococcus) ที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt; PMWaV) ในเขตภาคตะวันออกและภาคตะวันตกของประเทศไทย เพื่อทราบชนิดของเพลี้ยแป้งและชนิดของโรคไวรัสในสับปะรด รวมทั้งความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดโรคระหว่างเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะนำโรคในสับปะรด โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งในแปลงสับปะรดที่ปรากฏอาการของโรค ในพื้นที่ภาคตะวันออกและภาคตะวันตก ทั้งหมด 41 แปลง 122 ตัวอย่าง ทำการสุ่มตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากต้นที่แสดงอาการโรคเหี่ยวอย่างชัดเจน ตรวจสอบชนิดของเพลี้ยแป้งและตรวจสอบเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ PMWaV 2 ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยว พบเชื้อไวรัสจำนวน 117 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อไวรัส จำนวน 5 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ตรวจพบเชื้อไวรัสมาตรวจสอบชนิดของเพลี้ยแป้งด้วยเทคนิคทางโมเลกุลและสัณฐานวิทยา พบเพลี้ยแป้งจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 1. เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) 2.

เพลี้ยแป้งสับประรดสีเทา *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley นอกจากนี้ยังพบเพลี้ยแป้งอีก 3 ชนิด แต่พบในปริมาณที่น้อยและพบเพียง 3 แปลงจากทั้งหมดที่ทำการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ 1. เพลี้ยแป้งลาย *Ferrisia virgata* Cockerell 2. เพลี้ยแป้งจุดดำ *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 3. เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียด *Pseudococcus jackbeardsleyi* Gimpel and Miller แต่ไม่พบเชื้อไวรัส นอกจากนี้นำตัวอย่างต้นสับประรดที่พบเพลี้ยแป้งตรวจหาเชื้อไวรัส จำนวน 8 ตัวอย่าง พบเชื้อไวรัสทั้ง 8 ตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการตรวจเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเพลี้ยแป้ง ซึ่งชนิดเพลี้ยแป้งอาจไม่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัสเนื่องจากตรวจพบเชื้อไวรัสในเพลี้ยแป้ง 2 ชนิด คือ เพลี้ยแป้งสับประรดสีชมพูและเพลี้ยแป้งสับประรดสีเทาแต่ในเพลี้ยแป้งสับประรดสีเทาพบเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าเพลี้ยแป้งมีความสัมพันธ์กับต้นสับประรดที่พบเชื้อไวรัสทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ และพบว่าเพลี้ยแป้งทุกระยะสามารถเป็นพาหะของโรคไวรัสได้แม้จะเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 มีขนาดตัวเล็กและสามารถใช้ตัวอย่างเพลี้ยแป้งเพียง 1 ตัวในการตรวจเชื้อไวรัสได้ และเมื่อทำการศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยแป้งสับประรดสีชมพู พบว่า เพลี้ยแป้งมีอายุ 65 - 110 วัน สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศสามารถวางไข่ได้ประมาณ 250 - 700 ฟอง ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุประมาณ 35 - 90 วัน เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำการศึกษาวิจัยด้านชีวโมเลกุลเข้ามาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดและตรวจสอบเชื้อไวรัส รวมทั้งข้อมูลชีววิทยาของเพลี้ยแป้งเบื้องต้น ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ศึกษาต่อยอดในกระบวนการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในเพลี้ยแป้งและความสัมพันธ์ในการถ่ายทอดเชื้อของเพลี้ยแป้งแต่ละชนิดต่อไปในอนาคต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ นำไปใช้เป็นองค์ความรู้ที่ถูกต้องของข้อมูลศัตรูพืชที่มีความสามารถในการเป็นแมลงพาหะนำโรค และโรคพืชที่เกิดจากแมลงเหล่านั้น รวมทั้งนักวิจัยด้านชีววิทยา ด้านเกษตร เช่น กัญญาวิทยา โรคพืช รวมทั้งหน่วยงานราชการ หน่วยงานที่ต้องการข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เช่น กลุ่มวิจัยกักกันพืช สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงพาณิชย์ ตลอดจนเอกชนที่ทำการค้าสินค้าเกษตรกับต่างประเทศ มหาวิทยาลัยต่างๆ โรงเรียน บริษัทเอกชนผู้ส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร รวมทั้งเกษตรกรและบุคคลทั่วไป ทั้งในและต่างประเทศ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ และลูกจ้างกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บและเตรียมตัวอย่างทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

แมลงหีขาวยาสูบในพื้นที่ปลูกพริก จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี จำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของดักแด้ได้ 1 แบบ คือ แบบ smooth leaf form ในขณะที่การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาดประมาณ 850 นิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกแมลงหีขาวยาสูบจากพริกและพืชอาศัยอื่นได้ 4 ไบโอดีปได้แก่ Asial Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 โดยในพริก พบ 3 ไบโอดีป โดย Asial Asiall_6 และ Asiall_7 ในสัดส่วน 66.67 เปอร์เซ็นต์ 28.20 เปอร์เซ็นต์ และ 5.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไบโอดีป 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 พบว่าแมลงหีขาวยาสูบในภาคตะวันตกของประเทศไทย จำนวน 60 ตัวอย่าง แยกได้ 2 กิ่ง โดยกิ่งที่ 1 เป็นไบโอดีป Asial ทั้งหมด ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 พบในพริก 26 ตัวอย่าง ในมะเขือ 12 ตัวอย่าง และในฟักทอง 1 ตัวอย่าง คลัสเตอร์ที่ 2 แยกออกเป็น 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็นไบโอดีป Asial ในแตงโมป่า 1 ตัวอย่าง แคลดที่ 2 พบในมะเขือ 4 ตัวอย่าง และพบในฟักทอง 1 ตัวอย่าง กิ่งที่ 2 มี 3 ไบโอดีปด้วยกัน ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นไบโอดีป Asiall_7 ในพริก 2 ตัวอย่าง คลัสเตอร์ที่ 2 แบ่งเป็น 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็นไบโอดีป Asiall_1 ในมะเขือ 2 ตัวอย่าง แคลดที่ 2 เป็นไบโอดีป Asiall_6 ในพริกทั้ง 11 ตัวอย่าง นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์หาความเชื่อมโยงระหว่างไบโอดีปของแมลงหีขาวยาสูบบนพริกและพืชอาศัยชนิดต่างๆ ที่พบในไทย โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ 60 ตัวอย่าง ร่วมกับข้อมูลจาก GenBank รวมทั้ง 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 ในซีกาตาย มันเทศ บวบเหลี่ยม แตงกวา และถั่ว (fig. 5A) สำหรับชุดที่ 2 เป็นไบโอดีป Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 จำนวน 54 ตัวอย่าง พบว่าแยกได้ 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็น Asiall_7 ในพริก 2 ตัวอย่าง แคลดที่ 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 จาก phylogenetic tree ข้างต้น เมื่อหาความเชื่อมโยงกับพริกและพืชอาศัยอื่นในประเทศไทย มีแนวโน้มว่า ในพริกไบโอดีปที่โดดเด่นคือ Asial สอดคล้องกับ Monika and Stephan (2016) รองลงมาคือไบโอดีป Asiall_1 นอกจากนี้ยังพบในมะเขือเทศ มะเขือ และพืชผักอีกหลายชนิด สำหรับไบโอดีป Asiall_1 เป็นกลุ่มประชากรที่โดดเด่นในมันสำปะหลัง การศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อ และถ่ายทอดเชื้อ PepYLCV ของแมลงหีขาวยาสูบไบโอดีป Asial พบว่าที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการรับเชื้อ PepYLCV ได้ดีที่สุดคือ 63.34 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ 72 ชั่วโมง สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีลักษณะอาการ

ใบเหลืองร่วมกับใบด่างที่เยียด โดยจะเริ่มแสดงอาการต่างที่โคนใบและขยายเต็มใบ จากใบยอดถึงใบล่าง หรือบางครั้งมีอาการหงิกเหลืองร่วมกับอาการต่างเหลือง และลำต้นแคระแกร็น ภายในเวลา 14 - 30 วันหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส ดังนั้น การลดระบาดของโรคใบหงิกเหลืองในพริกจากเชื้อ PepYLCV ที่มีแมลงหริ้วขาวยาสูบเป็นแมลงพาหะ จึงควรศึกษาเพิ่มเติม 1) การลดการแพร่ระบาดของโรค โดยลดประชากรแมลงหริ้วขาวยาสูบใบโอโทป์ Asial บนพริก และมะเขือ โดยไม่ควรปลูกพริกพร้อมกับมะเขือ แต่ควรปลูกพร้อมกับพืชอาศัยอื่นที่ที่ Asial ชอบแต่ไม่ใช่พืชอาศัยของไวรัส เช่น พืชวงศ์แตง หรือปลูกพืชอาศัยของ Asial ที่ไม่พบไวรัสไว้ขอบแปลง 2) ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพการถ่ายทอดโรคของแมลงหริ้วขาวยาสูบใบโอโทป์ Asial_1, Asial_6 และ Asial_7 เพิ่มเติม 3) ศึกษาชนิดและประสิทธิภาพตัวทำที่จำเพาะกับ Asial ในพริกและมะเขือ เพื่อกำจัดใบโอโทป์ที่ถ่ายทอดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เพลี้ยอ่อนในพื้นที่ปลูกพริกจังหวัดจันทบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดละ 5 แปลง รวม 192 ตัวอย่าง จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัย และการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาดประมาณ 650 นิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกเพลี้ยอ่อนได้ 2 ชนิด คือ เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover และเพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* (Sulzer) เพลี้ยอ่อนฝ้ายมีระยะตัวอ่อน (nymph) 4 ระยะ ระยะตัวอ่อน 6 - 7 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุขัย 10 - 15 วัน ตัวแม่ 1 ตัว สามารถออกลูกได้ 39 - 78 ตัว วงจรชีวิตจากไข่จนถึงตัวเต็มวัยตาย 12-30 วัน ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก การตรวจสอบเชื้อ PeVYV ในพริกที่เป็นโรคเส้นใบเหลืองไอโซเลตกาญจนบุรี (KBR) และไอโซเลตสุพรรณบุรี (SBR) ยีน CP ของทั้ง 2 ไอโซเลต มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ แปรรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 206 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 22.94 - 22.97 กิโลดาลตัน และเมื่อทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของโปรตีน CP เชื้อ PeVYV ทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99% - 99.5% ตามลำดับ การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยจับกลุ่มใกล้ชิดกัน อยู่ร่วมกับไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในเอเชีย (Asian population) แต่แยกออกจากเชื้อไอโซเลตอื่นที่พบในต่างประเทศ ผลการศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อและการถ่ายทอดเชื้อ PeVYV ของเพลี้ยอ่อน พบว่าที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการรับเชื้อ PeVYV ได้ดีที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาในการถ่ายทอดเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพริกจะแสดงอาการเส้นใบมีสีเหลือง บางครั้งขอบใบม้วนเข้าหากัน หลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อ 14-30 วันเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* เป็นแมลงที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดโรค และ

เป็นแมลงที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (parthenogenesis) ทำให้ประชากรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งหากมีเพลี้ยอ่อนชนิดนี้เข้าทำลายพริกอาจก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นควรมีการติดตามและเฝ้าระวังเพลี้ยอ่อนในแปลงปลูกพริก สํารวจพืชอาศัยอื่นของเพลี้ยอ่อน และเชื้อ PeVYV ซึ่งอาจจะเป็นแหล่งอาศัยของแมลงและโรค ปลูกพืชหมุนเวียนหรือสลับที่ไม้ใช้พืชอาศัยของเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* และ เชื้อ PeVYV เพื่อลดการระบาด และควรมีการศึกษาชนิดและประสิทธิภาพของตัวห้ำที่จำเพาะต่อเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* เพื่อกำจัดการถ่ายทอดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เพลี้ยแป้ง (Hemiptera: Pseudococcus) ที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple Mealybug Wilt; PMWaV) ในเขตภาคตะวันออกเฉียงและภาคตะวันตกของประเทศไทย เพื่อทราบชนิดของเพลี้ยแป้งและชนิดของโรคไวรัสในสับปะรด รวมทั้งความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดโรคระหว่างเพลี้ยแป้งที่เป็นพาหะนำโรคในสับปะรด โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งในแปลงสับปะรดที่ปรากฏอาการของโรค ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงและภาคตะวันตก ทั้งหมด 41 แปลง 122 ตัวอย่าง ทำการสุ่มตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากต้นที่แสดงอาการโรคเหี่ยวอย่างชัดเจน ตรวจจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้ง และตรวจสอบเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ PMWaV 2 ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยว พบเชื้อไวรัสจำนวน 117 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อไวรัส จำนวน 5 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ตรวจพบเชื้อไวรัสมาตรวจสอบชนิดของเพลี้ยแป้งด้วยเทคนิคทางโมเลกุลและสัณฐานวิทยา พบเพลี้ยแป้งจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 1. เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) 2. เพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทา *Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley นอกจากนี้ยังพบเพลี้ยแป้งอีก 3 ชนิด แต่พบในปริมาณที่น้อยและพบเพียง 3 แปลงจากทั้งหมดที่ทำการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ 1. เพลี้ยแป้งลาย *Ferrisia virgata* Cockerell 2. เพลี้ยแป้งจุดดำ *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 3. เพลี้ยแป้งแจ๊คเบียร์ส *Pseudococcus jackbeardsleyi* Gimpel and Miller แต่ไม่พบเชื้อไวรัส นอกจากนี้นำตัวอย่างต้นสับปะรดที่พบเพลี้ยแป้งตรวจหาเชื้อไวรัส จำนวน 8 ตัวอย่าง พบเชื้อไวรัสทั้ง 8 ตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการตรวจเชื้อไวรัสจากตัวอย่างเพลี้ยแป้ง ซึ่งชนิดเพลี้ยแป้งอาจไม่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัสเนื่องจากตรวจพบเชื้อไวรัสในเพลี้ยแป้ง 2 ชนิด คือ เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพูและเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาแต่ในเพลี้ยแป้งสับปะรดสีเทาพบเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าเพลี้ยแป้งมีความสัมพันธ์กับต้นสับปะรดที่พบเชื้อไวรัสทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ และพบว่าเพลี้ยแป้งทุกระยะสามารถเป็นพาหะของโรคไวรัสได้แม้จะเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 มีขนาดตัวเล็กและสามารถใช้ตัวอย่างเพลี้ยแป้งเพียง 1 ตัวในการตรวจเชื้อไวรัสได้ และเมื่อทำการศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู พบว่า เพลี้ยแป้งมีอายุ 65 - 110 วัน สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ

สามารถวางไข่ได้ประมาณ 250 -700 ฟอง ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุประมาณ 35 – 90 วัน เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำการศึกษาวิจัยด้านชีวโมเลกุลเข้ามาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดและตรวจสอบเชื้อไวรัส รวมทั้งข้อมูลชีววิทยาของเพลี้ยแป้งเบื้องต้น ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ศึกษาต่อยอดในกระบวนการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในเพลี้ยแป้งและความสัมพันธ์ในการถ่ายทอดเชื้อของเพลี้ยแป้งแต่ละชนิดต่อไปในอนาคต

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ นำไปใช้เป็นองค์ความรู้ที่ถูกต้องของข้อมูลศัตรูพืชที่มีความสามารถในการเป็นแมลงพาหะนำโรค และโรคพืชที่เกิดจากแมลงเหล่านั้น รวมทั้งนักวิจัยด้านชีววิทยา ด้านเกษตร เช่น กัญญา โรคมณี รวมทั้งหน่วยงานราชการ หน่วยงานที่ต้องการข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เช่น กลุ่มวิจัยกักกันพืช สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงพาณิชย์ ตลอดจนเอกชนที่ทำการค้าสินค้าเกษตรกับต่างประเทศ มหาวิทยาลัยต่างๆ โรงเรียน บริษัทเอกชนผู้ส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร รวมทั้งเกษตรกรและบุคคลทั่วไป ทั้งในและต่างประเทศ

บรรณานุกรม

- เกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์ มาลี ชวนพงษ์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย สมพร เจริญรุ่งเรือง จารินี จันทร์คำ และกิตติศักดิ์ กิตติยะอังกูร. 2550. โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูสับปะรดเพื่อแก้ปัญหาโรคเหี่ยว. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ 38 น..
- พัชรินทร์ ครุฑเมือง. 2555. เพลี้ยอ่อนแมลงพาหะนำโรคพืช. ภาควิชากีฏวิทยา และโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่. วารสารแก่นเกษตร 40: 197-202.
- วันเพ็ญ ศรีทองชัย ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ และกาญจนา วาระวิชนี. 2555. ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของไวรัส *pineapple mealybug wilt-associated virus* กับชนิดของเพลี้ยแป้งในการก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในสับปะรด. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หน้า 199-208.
- 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.

- 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.
- 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/vide/>. 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. Ewaard. 2003. Biological identifications through DNA bar-codes. *Proc. Roy. Soc. B*, 270: 313-321.
- Hull, R. 2009. *Comparative plant virology*. Elsevier Academic Press, London. 376 pp.
- 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.
- 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., 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.
- Larson, L.D. 1910. Diseases of pineapple. Hawaii Sugar Planters Association Pathology & Physiology Series, Experiment Station Bulletin: 10-12.
- 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.
- Martin, J. H. 1987. An Identification Guide to Common Whitefly Pest Species of the World (Homoptera: Aleyrodidae). *Tropical Pest Management*. 33(4): 298-322.
- 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.

- 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.
- 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
- 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.
- Ryazantsev, D.Yu. and S.K., Zavriev. 2009. An efficient diagnostic method for the identification of potato viral pathogens. *Mol. Biol.* 43: 558 – 567.
- Sether, D.M. 2001. Differentiation, Distribution and Elimination of Two different Pineapple mealybug wilt-associated virus Found in pineapple. *Plant Disease* 85(8): 856-864.
- Sharman, M., Lapbanjob, S., Seburuang, 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.
- Shatters, R.G. Jr, 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 annum*) in West Sumatera, Indonesia. *Microbiology Indonesia.* 3: 61-66.
- 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.
- Williams, D.J. 2004. Mealybugs of southern Asia. United Selangor Press Sdn. Bhd., Kuala Lumpur. 896 pp.
- Williams, D.J. and G.W. Watson. 1988. The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region Part I, the armored scale (Diaspididae). CAB International Institute of Entomology, Wallingford. 290 pp.

กรมวิชาการเกษตร