รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

   กิจกรรม : -

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การตรวจเชื้อไวรัส *African cassava mosaic virus* (ACMV) ศัตรูพืชกักกันในมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและอณูชีววิทยา

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Detection of African cassava mosaic virus (ACMV) in Cassava using Serological and Molecular Biology Technique

   คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง :	กาญจนา วาระวิชะนี	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน :	แสนชัย คำหล้า	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
:	ปรียพรรณ พงศาพิชณ์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

4. **บทคัดย่อ**

เชื้อไวรัส ACMV สาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลังเป็นศัตรูพืชตามแนบท้ายประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ จัดอยู่ใน Family *Geminiviridae* Genus *Begomovirus* ถ่ายทอดเชื้อทางท่อนพันธุ์และแพร่ระบาดด้วยแมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci*) ยังไม่มีรายงานเชื้อไวรัสชนิดนี้เข้าทำลายมันสำปะหลังในประเทศไทย งานวิจัยครั้งนี้ทำการออกแบบไพร์เมอร์จำนวน 2 ชุด สำหรับการตรวจวินิจฉัยกลุ่มเชื้อไวรัส Cassava Mosaic Viruses (CMVs) โดยเฉพาะเชื้อไวรัส ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG) และ SLCMV ด้วยเทคนิค PCR ที่มีความแม่นยำสูง จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสกัดกั้น (interception) และตรวจเฝ้าระวัง (monitoring) เชื้อไวรัสกลุ่ม CMVs ได้อย่างครอบคลุม

คำสำคัญ : มันสำปะหลัง โรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง ออกแบบไพร์เมอร์ แมลงหวี่ขาวยาสูบ

ABSTRACT

African cassava mosaic virus (ACMV) is a plant pest according to the list of plant pests attached to the Notification of Ministry of Agriculture and Cooperatives Re : Specification of plant pests as prohibited articles, under the Plant Quarantine Act B.E. 2507 (No. 6) B.E. 2550. ACMV was classified into family *Geminiviridae* genus *Begomovirus* transmitted through plant propagation materials and insect vector: whitefly (*Bemisia tabaci*). There is no evidence of the incidence of ACMV in Thailand. This research provided two primer sets able to diagnose Cassava Mosaic Viruses (CMVs) particularly to ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG) and SLCMV with PCR technique in highly precise then thoroughly covered interception and monitoring of CMVs in cassava.

Key words : cassava, tapioca, *Geminiviridae*, *Begomovirus*, *African cassava mosaic virus*, ACMV, Cassava Mosaic Viruses, CMVs, Phylogenetic tree, *Bemisia tabaci*

5. คำนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยชนิดหนึ่ง ในแผนยุทธศาสตร์ของประเทศกำหนดให้เป็นพืชทดแทนพลังงานสำหรับการผลิตเอทานอลเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในส่วนของพันธุ์มันสำปะหลังที่เกษตรกรนิยมปลูกมีไม่กี่พันธุ์ หากเกิดปัญหาการระบาดของโรคและแมลงขึ้นจึงมีโอกาสเสี่ยงต่อความเสียหายของผลผลิตสูงมาก จากรายงานพบเชื้อไวรัสไม่น้อยกว่า 20 ชนิด ที่สามารถเข้าทำลายมันสำปะหลังที่ปลูกในแถบแอฟริกา อเมริกาใต้ อเมริกากลาง และกลุ่มประเทศเอเชียแปซิฟิก จากรายงานพบว่าเชื้อไวรัส *African cassava mosaic virus* (ACMV) เป็นเชื้อสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการปลูกมันสำปะหลังมากที่สุด (Fondong et al., 2000; Calvert and Thresh, 2002; Legg and Fauquet, 2004; Legg et al., 2006; Duraisamy et al., 2012) เมื่อเข้าทำลายแล้วจะส่งผลกระทบต่อผลผลิตมันสำปะหลังอย่างมาก จากข้อมูลการระบาดในประเทศอินเดียพบว่าเชื้อไวรัส ACMV ทำให้ผลผลิตมันสำปะหลังในภาพรวมของประเทศลดลงถึง 20-90 % ความรุนแรงของอาการโรคขึ้นกับความต้านทานของมันสำปะหลังแต่ละสายพันธุ์ และพาหะสำคัญในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส คือ แมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci*) (Seif, 1982; Legg and Fauquet, 2004) สำหรับในประเทศไทยขณะนี้ยังไม่มีรายงานเชื้อไวรัสชนิดนี้ (กาญจนาและคณะ, 2556; ปัญญาวุฒิและคณะ, 2559)

ดังนั้น การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทั้งทางเซรุ่มวิทยาและอณูชีววิทยาที่มีความถูกต้อง รวดเร็ว และแม่นยำเพื่อช่วยตรวจสอบสถานภาพการปรากฏหรือไม่ปรากฏเชื้อไวรัส ACMV ซึ่ง

เป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญชนิดหนึ่งในมันสำปะหลังที่ปลูกในประเทศไทย เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับผลผลิตพืชของเกษตรกรในอนาคต รวมทั้งเป็นการกำจัดแหล่งสะสมโรคออกจากแปลงปลูกป้องกันการแพร่ระบาดโรคไปยังแปลงปลูกอื่น ๆ หากพบการอุบัติของโรคเกิดขึ้น

6. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคและตัวอย่างพืชปกติ
2. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- โกร่งบดตัวอย่าง
- หลอด microcentrifuge tube ขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker)
- เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) แบบควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่อง Thermal cycler
- เครื่อง Gel electrophoresis
- เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

3. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- Alkaline phosphatase label สารประกอบการทดสอบ ELISA และสารควบคุมปฏิกิริยาของชุดทดสอบเชื้อไวรัส ACMV (Agdia) (LPC73600 - ACMV , Positive control)
- ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany)
- เอ็นไซม์ platinum Taqmix (Invitrogen)
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
- Agarose gel (SeaKem)
- ชุดสกัดเจลและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPreP GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN)
- ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ Wizard PlusSV Minipreps DNA Purification System
- เอ็นไซม์ PLATINUM Taq polymerase High quality (Invitrogen, USA)
- ชุดไพร์เมอร์
- GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)
- ชุดพลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega, USA),
- T4 DNA Ligase (Promega, USA)
- competent cell (E. coli สายพันธุ์ Top 10) (Invitrogen, USA)

- สารปฏิชีวนะ

- วิธีการ

1.สืบค้นข้อมูล

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัส ACMV สาเหตุโรคใบด่างเหลืองในพืชมันสำปะหลัง และข้อมูลเชื้อไวรัสใน Family Geminiviridae จาก GenBank และจากเอกสารที่เคยรายงานไว้ นำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มภายใต้ Genus *Begomovirus* และนำมาเข้า Clustal Omega programs (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) และเลือกหาส่วนยีนเป้าหมายที่ต้องการเพื่อนำมาใช้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

2.ออกแบบไพร์เมอร์

ทำการเลือกออกแบบไพร์เมอร์แบบ specific primer และแบบ universal primer โดยอาศัยข้อมูลที่เคยมีรายงานและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสในวงศ์ *Geminiviridae* ภายใต้กลุ่ม *Begomovirus* ที่มีอยู่ใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) หลังจากนั้นใช้โปรแกรมโอเพ่นซอสที่ให้บริการทางอินเตอร์เน็ตสำหรับออกแบบไพร์เมอร์ เช่น โปรแกรม Primer3 (http://simgene.com/Primer3) และคำนวณค่า Annealing Temperature (Tm °C) ที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม Oligonucleotide Properties Calculator (http://www.basis.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html) เป็นต้น

3. สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany) ทำการชั่งตัวอย่างพืชประมาณ 0.1 กรัม บดให้เป็นผงละเอียด และเติม AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรที่เติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำใส่หลอด microcentrifuge tube บ่มที่ 65 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำมาเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทั้งหมดใส่ลงใน QIAshredder Mini Spin Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนน้ำใสเติม absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่า แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ล้าง column ด้วย RW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วชะล้าง DNA ออกจาก column โดยเติม AE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ในขั้นต่อไป

4. สังเคราะห์ยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ได้แก่ 10x buffer 2.5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (25 mM) 2 ไมโครลิตร, dNTP (10 mM) 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ reverse และ forward (10 pmol/ μl) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (0.1 unit/μl) 0.25 ไมโครลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 16.25 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาที่เตรียมไว้มาเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) ด้วยโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 1 นาที	
ขั้นที่ 3:	52-56°C	นาน 2 นาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 3 นาที (ขั้นที่ 2 - 4)	29 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	15°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

จากนั้นนำ DNA PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1% gel agarose ที่ผสมสาร red safe dye ที่เตรียมในสารละลาย 1x TAE buffer มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที และนำแผ่น 1% agarose gel มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง ChemiDoc™ Touch Imaging System (170-8370) โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp DNA Ladder และทำการบันทึกภาพเพื่อสรุปผลที่เกิดขึ้น

5. ทำการบันทึกข้อมูล และจัดทำรายงาน

- เวลาและสถานที่ : ระยะเวลา 2 ปี **เริ่ม** ตุลาคม 2559 **สิ้นสุด** กันยายน 2561

สถานที่ : กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และแปลงมันสำปะหลังของเกษตรกร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1.ผลการสืบค้นข้อมูล

เชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง(Cassava Mosaic Viruses, CMVs) อยู่ใน Family *Geminiviridae* Genus *Begomovirus* จากรายงานพบประมาณ 10 ชนิด ได้แก่ *African cassava mosaic virus*(ACMV), *East African cassava mosaic Cameroon virus*(EACMCV), *East African cassava mosaic Kenya virus*(EACMKV) , *East African cassava mosaic Malawi virus*(EACMMV), *East African cassava mosaic virus*(EACMV), *East African cassava*

mosaic Zanzibar virus(EACMZV), *Indian cassava mosaic virus*(ICMV), *South African cassava mosaic virus*(SACMV), *Sri Lankan cassava mosaic virus*(SLCMV) และ *East African cassava mosaic virus-Uganda*(EACMV-UG) พบทำลายมันสำปะหลังในแถบแอฟริกา อเมริกาใต้ อเมริกากลาง และแถบกลุ่มประเทศเอเชียแปซิฟิก (Thottappilly *et al*., 2003) ติดมาได้กับท่อนพันธุ์และมีแมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะแบบ persistent circulative ใช้เวลาถ่ายทอดเชื้อไวรัสประมาณ 10 นาที ก็มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการก่อให้เกิดโรคได้ (Fauquet and Fargette., 1990) สำหรับเชื้อไวรัส ACMV เป็นศัตรูพืชสำคัญชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในแนบท้ายประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ ที่เป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญกับมันสำปะหลังที่ปลูกในประเทศไทย แต่ขณะนี้ยังไม่มีรายงานเชื้อไวรัส ACMV ในประเทศไทย

2.ผลการออกแบบไพร์เมอร์

ออกแบบไพร์เมอร์ให้มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง (CMVs) โดยเฉพาะเชื้อไวรัส ACMV ดำเนินการโดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกัน (Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวแทนจากฐานข้อมูล GenBank นำมาวิเคราะห์ด้วย Clustal Omega programs และสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ MEGA 7.026 programs (maximum-likelihood method, 500 bootstrap replicates) พบว่า ตัวแทนเชื้อไวรัส CMVs ทั้ง 10 ชนิดมีความคล้ายกัน (Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 90% ทั้งนี้ ตามเงื่อนไขของ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ฉบับที่ 9 สำหรับการจำแนกเชื้อไวรัสในจีนัส *Begamovirus* ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบครบสมบูรณ์ (Whole genome) ถ้ามีความคล้ายกัน (Identity) น้อยกว่า 90% จัดเป็นเชื้อไวรัสคนละชนิด (Fauquet *et al*., 2003 ; Alabi *et al*., 2011) (ตารางที่ 1) (ภาพที่ 1) จากนั้นออกแบบไพร์เมอร์จากข้อมูลข้างต้น ได้ไพร์เมอร์จำนวน 2 ชุด สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส ACMV และเชื้อไวรัส CMVs ภายใต้ Genus *Begamovirus* Family *Geminiviridae* ด้วยเทคนิค PCR มีความถูกต้อง และแม่นยำ ดังนี้

ชุดที่ 1 ประกอบด้วยไพร์เมอร์ทั้งหมดจำนวน 3 คู่ ได้แก่ <u>ไพร์เมอร์คู่ที่ 1.1</u> สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส ACMV ได้อย่างแม่นยำ สำหรับ positive control ได้สั่งจ้างบริษัทการค้าทำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัส ACMV ส่วน *AV2* gene (pre coat protein gene) รวมกับ *AV1* gene (coat protein gene) จำนวน 937 bp (ภาพที่ 2) <u>ไพร์เมอร์คู่ที่ 1.2</u> สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง (CMVs) ได้ทั้ง 10 ชนิด จึงทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสกัดกั้น (interception) และตรวจเฝ้าระวัง (monitoring) เชื้อไวรัสกลุ่มนี้ได้ครอบคลุม และ<u>ไพร์เมอร์คู่ที่ 1.3</u> เลือกออกแบบให้มีลำเบสคล้ายกับเชื้อ

ไวรัส ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG) ซึ่งทั้ง 3 ชนิด เป็นศัตรูพืชสำคัญที่อยู่ในบัญชีพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 6) รวมทั้งไพร์เมอร์ชุดนี้ออกแบบให้มีลำดับเบสคล้ายกับ SLCMV ด้วย เนื่องจากปัจจุบันมีข้อมูลการแพร่ระบาดของเชื้อดังกล่าวในประเทศกัมพูชา และเวียนนาม (Wang H. L *et al*., 2016; Uke A *et al*., 2018 ; Minato *et al*., 2019)

ชุดที่ 2 ประกอบด้วยไพร์เมอร์ทั้งหมดจำนวน 4 คู่ ได้แก่ <u>ไพร์เมอร์คู่ที่ 2.1-2.4</u> ที่คาดหวังว่าจะสามารถใช้สำหรับตรวจแยกเพื่อระบุชนิดเชื้อไวรัสที่เป็นศัตรูพืชสำคัญที่อยู่ในบัญชีพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 6) ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG) รวมทั้ง SLCMV ด้วย (ตารางที่ 2)

นอกจากนี้ ได้นำคู่ไพร์เมอร์ GEM-U-CP-F1/ GEM-U-CP-R1 ซึ่งเป็น universal primer นำมาร่วมใช้สำหรับงานทดลองครั้งนี้ด้วย ซึ่งเป็นคู่ไพร์เมอร์ที่ได้ทดสอบแล้วว่าสามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสในส่วน partial *AV1* gene ใน Family *Geminiviridae* Genus *Begomovirus* ได้ด้วยเทคนิค PCR แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส (กาญจนาและคณะ, 2555) และคู่ไพร์เมอร์ที่เคยมีรายงานมาใช้เปรียบเทียบ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เชื้อไวรัส ACMV เป็นสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลังอยู่ใน Family *Geminiviridae* Genus *Begomovirus* พบทำลายมันสำปะหลังที่ปลูกในแถบแอฟริกา มีแมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะช่วยแพร่ระบาด และที่สำคัญเชื้อไวรัส ACMV เป็นศัตรูพืชตามแนบท้ายประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ ที่เป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญกับมันสำปะหลัง แต่ขณะนี้ยังไม่มีรายงานว่าพบเชื้อไวรัสชนิดนี้เข้าทำลายมันสำปะหลังในประเทศไทย (กาญจนาและคณะ, 2556; ปัญญาวุฒิและคณะ, 2559) ตามข้อกำหนดของระบบ ICTV ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ครบทั้งจีโนมของเชื้อไวรัสภายใต้ genus *Begomovirus* ถ้ามีความคล้ายกัน (Identity) กันน้อยกว่า 90% จัดแยกเป็นเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง (Cassava Mosaic Viruses, CMVs) คนละชนิด รวมจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ ACMV, EACMCV, EACMKVEACMMV, EACMV, EACMZV, ICMV, SACMV, SLCMV และ EACMV-UG นำข้อมูลนิวคลีโอไทด์มาออกแบบไพร์เมอร์ สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส ACMV เชื้อไวรัส CMVs รวมจำนวน 2 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 ประกอบด้วยไพร์เมอร์ทั้งหมดจำนวน 3 คู่ ได้แก่ <u>ไพร์เมอร์คู่ที่ 1.1</u> และ <u>ไพร์เมอร์คู่ที่ 1.2</u> สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส ACMV และ CMVs ได้อย่างแม่นยำ และ<u>ไพร์เมอร์คู่ที่ 1.3</u> สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG) และ SLCMV ชุดที่ 2 ประกอบด้วยไพร์เมอร์ทั้งหมดจำนวน 4 คู่ ได้แก่ <u>ไพร์เมอร์คู่ที่ 2.1-2.4</u> ที่คาดหวังว่าจะสามารถใช้สำหรับตรวจแยกเพื่อระบุชนิดเชื้อไวรัสที่เป็นศัตรูพืชสำคัญที่อยู่ในบัญชีพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 6) ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG)

รวมทั้ง SLCMV ด้วย ทั้งนี้ไพร์เมอร์ทั้ง 2 ชุด จะถูกนำมาใช้ประโยชน์ต่อยอดในการทดลองเรื่อง "การศึกษาสถานภาพของเชื้อไวรัส *African cassava mosaic virus* (ACMV) ในประเทศไทย" ในระหว่างปี 2562-2564 ต่อไป นอกจากนี้ คู่ไพร์เมอร์ GEM-U-CP-F1/ GEM-U-CP-R1 ซึ่งเป็น universal primer สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสในส่วน partial *AV1* gene ใน Family *Geminiviridae* Genus *Begomovirus* ได้ด้วยเทคนิค PCR แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส และคู่ไพร์เมอร์ที่เคยมีรายงานนำมาใช้เปรียบ

เนื่องจากในช่วงเดือนตุลาคม 2561 พบโรคใบด่างมันสำปะหลังระบาดใน 7 จังหวัดชายแดนไทยกัมพูชา ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา มี 2 อำเภอ คือ เสิงสาง และครบุรี จังหวัดบุรีรัมย์ มี 1 อำเภอ บ้านกรวด จังหวัดสุรินทร์ มี 3 อำเภอ คือ บัวเชด กาบเชิง และสังขะ จังหวัดศรีสะเกษ มี 3 อำเภอ คือ กันทรลักษณ์ ภูสิงห์ และขุนหาญ จังหวัดอุบลราชธานี มี 2 อำเภอ คือ น้ำยืนและน้ำขุ่น จังหวัดสระแก้ว มี 1 อำเภอ คือ ตาพระยา และจังหวัดปราจีนบุรี 1 อำเภอ คือ ศรีมหาโพธิ ซึ่งกรมวิชาการเกษตรได้ทำลายด้วยการเผาหรือฝังกลบเรียบร้อยแล้ว ดังนั้น การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการออกแบบชุดไพรเมอร์ครั้งนี้สามารถช่วยการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง (CMVs) อยู่ใน Family *Geminiviridae* Genus *Begomovirus* ได้อย่างแม่นยำขึ้น เพื่อทราบข้อมูลการการแพร่ระบาดได้ทันก่อนสถานการณ์ระบาดเชื้อไวรัสในกลุ่มนี้ CMVs จะเกิดขึ้นในประเทศไทย ทั้ง เกษตรกรต้องหมั่นตรวจแปลง ถ้าพบต้องแจ้งเกษตรอำเภอที่อยู่ในเขตนั้น หรือ ทำลายด้วยการเผาหรือฝังกลบ และส่งตรวจวินิจฉัยห้องปฏิบัติการเพื่อให้ทราบสาเหตุ

10. **การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :**
    - ได้วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส ACMV ในมันสำปะหลังที่มีประสิทธิภาพ
    - เป็นประโยชน์กับงานวิจัยขั้นประยุกต์สำหรับใช้ต่อยอดเพื่อหาวิธีการจัดการหรือกำจัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานเชื้อไวรัส ACMV
    - เป็นประโยชน์เกษตรกรผู้ปลูกมันสำประหลังทราบข้อมูลด้านการระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส ACMV ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นว่าหากพบการปรากกฏของเชื้อดังกล่าวจะสามารถป้องกันกำจัดและระวังการระบาดโรคไปยังพื้นที่อื่น ๆ ได้อย่างถูกวิธี
11. **คำขอบคุณ (ถ้ามี)** : -

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา วาระวิชะนี รังสี เจริญสถาพร และแสนชัย คำหล้า. 2556. การศึกษาเพื่อยืนยันว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัส African cassava mosaic virus (ACMV) ในมันสำปะหลัง. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.). (ออนไลน์). แหล่งข้อมูล : https://oer.learn.in.th/search_detail/result/25820 (6 มิถุนายน 2561).

ปญญาวุฒิ อัมพุชินทร อำไพวรรณ ภราดรนุวัฒน และศรีเมฆ ชาวโพงพาง. 2559. การเฝาระวังการระบาดของเชื้อไวรัสใบดางมันสำปะหลังในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 47 (3) : 417 – 428.

Alabi, O. J., Kumar, P. L., and R. A. Naidu. 2011. Cassava mosaic disease: A curse to food security in Sub-Saharan Africa. APSnet Features. doi:10.1094 /APSnetFeature-2011-0701.(Online)Available: https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/cassava.aspx(July28, 2019).

Calvert, L.A. and J.M. Thresh. 2002. The Viruses and Virus Diseases of Cassava, chapter 12. In CAB Internacional 2002. Cassava : Biology, Production and Utilization (eds. K. J. Hillocks, J.M. Thresh and A.C. Bellotti) pp. 237-260. Kent ME4 4TB, UK.

Duraisamy R., Natesan S., Muthurajan R., Gandhi K., Lakshmanan P., Karuppusamy N. and M. Chokkappan. 2012. Molecular Studies on the Transmission of Indian Cassava Mosaic Virus (ICMV) and Sri Lankan Cassava Mosaic Virus (SLCMV) in Cassava by Bemisia tabaci and Cloning of ICMV and SLCMV Replicase Gene from Cassava. Mol Biotechnol. Vol.53(2) : 150-158.

Fauquet C. and D. Fargette. 1990. African Cassava Mosaic Virus: Etiology, Epidemiology, and Control. Laboratoire de Phytovirologie, ORSTOM, Abidjan, Ivory Coast. Plant Disease. 74: 404-411.

Fauquet C.M., Bisaro D.M., Briddon R.W., Brown J.K., Harrison B.D., Rybicki E.P, Stenger D.C., and Stanley. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus specises. Arch Virol. 148: 405-421.

Fondong, V.N., Pita, J.S., Rey, M.E.d.K.A., Beachy, R.N. and C.M. Fauquet. 2000. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. J. Gen. Virol. 81(Pt1), 287-297.

Legg, J.P. and C.M. Fauquet. 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. Plant Mol. Biol. 56(4), 585–599.

Legg J. P., Owor B., P. Sseruwagi and J. Ndunguru. ¶2006. Cassava mosaic virus disease in East Africa and center Africa : epidemiology and management of regional pandemic. ADVANCES IN VIRUS RESEARCH. Vol. 67. 355-481.

Minato, N., Sok, S., Chen, S., Delaquis E., rik, Phirun Iv., Le V. X., Burra D. D., Newby J. C., Wickhuys K. A. G. And S. D. HannID. 2019. Surveillance for Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) in Cambodia and Vietnam one year after its initial detection in a single plantation in 2015. PLOS ONE. (Online) Available : https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212780 (July 28, 2019).

Seif, A.A. 1982. Effect of cassava mosaic virus on yield of cassava. Plant disease Reporter 66 (8): 661-662.

Thottappilly, G., Thresh, J. M., Calvert, L. A., and S. Winte.r 2003. Cassava. Pages 107-165 In: Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries. G. Loebenstein and G. Thottappilly, eds. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands.

Wang, H. L., Cui, X. Y., Wang, X. W., Liu, S. S., Zhang, Z. H., and X. P. Zhou. 2016. First Report of Sri Lankan cassava mosaic virus Infecting Cassava in Cambodia. Plant Disease. 100(5), 1029. (Online) Available : http://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1228-PDN (July 28, 2019).

Uke A., HoaT X. T., M. V.Quan, N. V.Liem, Thang D., Liem B. T., Noi H.,Ugaki M., and K. T. Natsuaki. 2018. First Report of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus Infecting Cassava in Vietnam. Plant Disease. 102(12), 1029–1029. (Online) Available : https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0805-PDN (July 28, 2019).

ภาคผนวก

Table 1 Cassava mosaic virus sequences retrieved from Genbank

Species	Accession No. of DNA-A
African cassava mosaic virus(ACMV)	HE814062, HE814065, KT869130, AF126802, AF126800, Z83252, J0205, N053431, FJ807631, HE979768, AF112352, AJ427910, EU685322, AF366902, FJ751235, GQ204109, FJ751234, AF259894, KR476372, HG530111, X17095
East African cassava mosaic Cameroon virus(EACMCV)	EU685319, NC_004625, EU685323, EU685326, JN165089, AF259896, JF909117
East African cassava mosaic Kenya virus(EACMKV)	NC_011583, AJ717578, AJ717576, AJ717580, AJ717581
East African cassava mosaic Malawi virus(EACMMV)	KP890354, AJ006459, AJ006460, KT869122, KP890349
East African cassava mosaic virus(EACMV)	FN435280, JX910240, NC_004674, HG530116
East African cassava mosaic Zanzibar virus(EACMZV)	AF422174, AJ717560, AJ717562, AJ717567, AJ717566, AJ717561, AJ717583, AJ717565
Indian cassava mosaic virus(ICMV)	KU308385, AJ314739, NC_001932, AJ575819 AY730035, Z24758
South African cassava mosaic virus(SACMV)	NC_003803, AJ422132, AF155806
Sri Lankan cassava mosaic virus(SLCMV)	NC_003861, KF898349, AJ579307, KR611577, KU550961
East African cassava mosaic virus-Uganda(EACMV-UG)	AJ717518, KT780440, HE979773, HE979775, Z83257, AJ717532, AJ717530, AJ717519, HE979770, AJ717522, AF126804, AF126806

Source: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

Table 2 Primers used for detection ACMV and CMVs by Polymerase chain reaction technique.

Primer set	Forward primer name	Reverse primer name	Tm °C	Virus detected	Product Size (bp)	reference
ไพร์เมอร์ชุดที่ 1						
คู่ที่ 1.1	51./AV2- ACMV-F1	51./AV1-ACMV-R1	60	ACMV-A	~ 710	กาญจนาและแสนชัย 2561
คู่ที่ 1.2	53./AV1-CMVs-F2.2	53./AV1-CMVs-F2.1	58-60	CMVs-A	~ 500	กาญจนาและแสนชัย 2561
คู่ที่ 1.3	52.AV1-CMV4-F1	52./AC1-CMV4-R1.1	60	4 kinds-A	~ 1300	กาญจนาและแสนชัย 2561
ไพร์เมอร์ชุดที่ 2						
คู่ที่ 2.1	62./BV1-ACMV-SF1	62./BV1-ACMV-SR1	60	Specific ACMV-B	~ 750	กาญจนาและแสนชัย 2561
คู่ที่ 2.2	61./AC1-ICMV-SF1	61./AC1-ICMV-SR1	60-61	Specific ICMV-A	~ 500	กาญจนาและแสนชัย 2561
คู่ที่ 2.3	63.1/BC1-EACMV-SF1	63.1/BC1-EACM-SR1	60-61	Specific EACMV-B	~ 900	กาญจนาและแสนชัย 2561
คู่ที่ 2.4	60./AC1-SLCMV-SF1	60./AC1-SLCMV-SR1	60	Specific SLCMV-A	~ 450	กาญจนาและแสนชัย 2561
universal primer for detecting Virus within Genus *Begomovirus*, Family *Geminiviridae*						
Virion sense primer name		Complementary primer name	Tm °C	Virus detected	Product Size (bp)	reference
GEM-U-CP-F1.1		GEM-U-CP-R1.2	56	Begomo virus	~ 500	กาญจนาและคณะ 2556

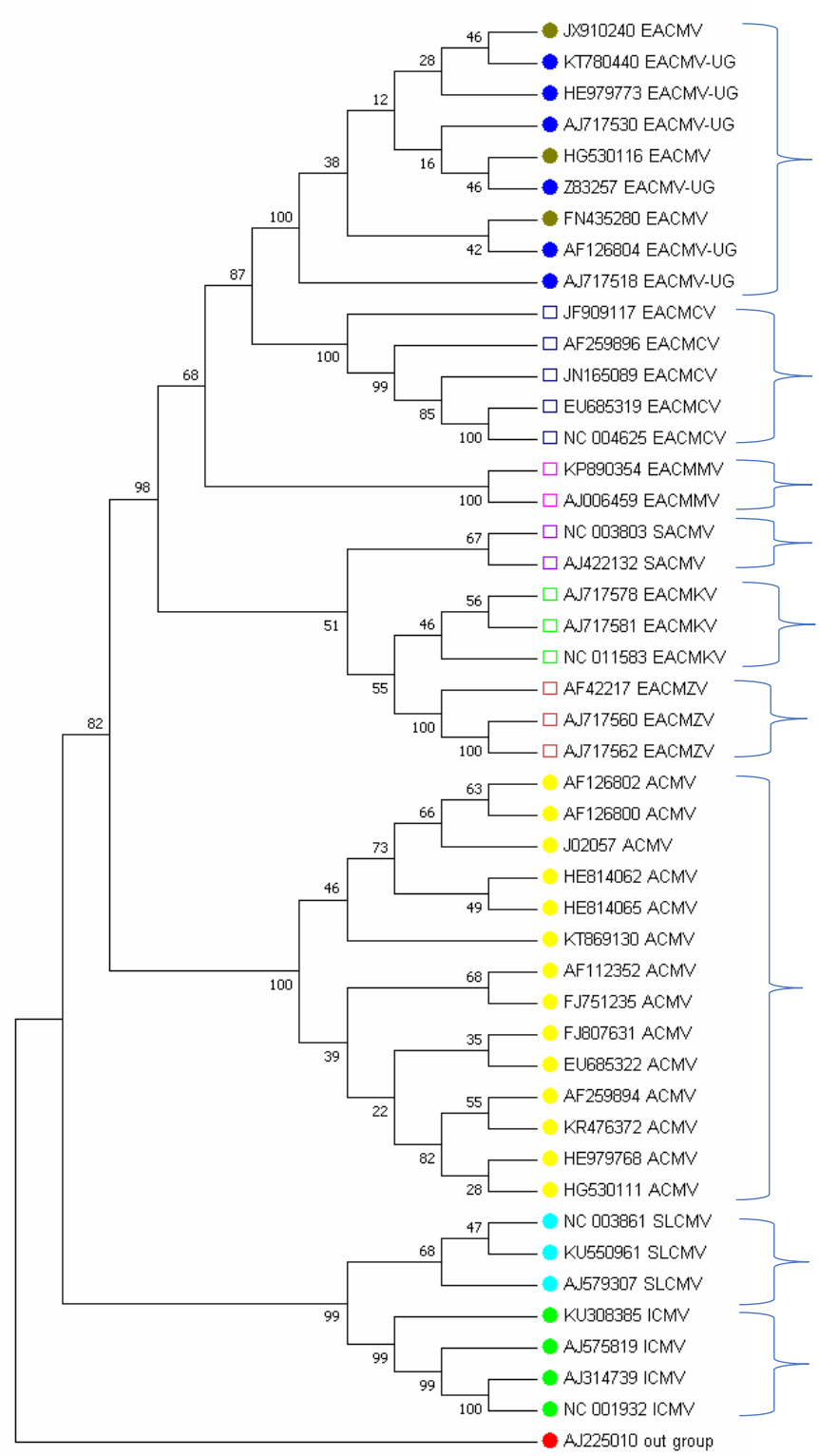

Figure 1 Phylogenetic trees of nucleotide sequences of DNA-A region from 10 CMVs species (table 1) using maximum-likelihood method, 500 bootstrap replicates, MEGA version 7.0.26

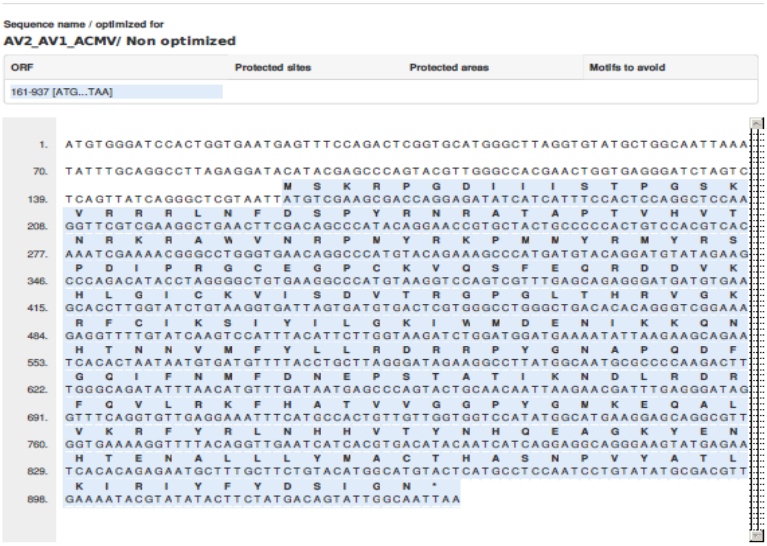

Figure 2 Sequence alignment corresponding to DNA-A region of AV2 gene (pre coat protein) and AV1 gene (coat protein gene) synthesized as positive control for ACMV detection