# การตรวจเชื้อไวรัส *African cassava mosaic virus* (ACMV) ศัตรูพืชกักกัน ในมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและอณูชีววิทยา

# Detection of *African cassava mosaic virus* (ACMV) in Cassava Using Serological and Molecular Biology Technique

**กาญจนา วาระวิชะนี[1/] แสนชัย คำหล้า[1/] ปรียพรรณ พงศาพิชญ์[2/]**

**[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

**[2/]กลุ่มกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

---

## รายงานความก้าวหน้า

เชื้อไวรัส ACMV เป็นสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลังอยู่ใน Family *Geminiviridae* Genus *Begomovirus* พบทำลายมันสำปะหลังที่ปลูกในแถบแอฟริกา อเมริกาใต้ อเมริกากลาง และแถบกลุ่มประเทศเอเชียแปซิฟิก มีแมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci*) การจำแนกความแตกต่างของชนิดไวรัส ACMV อ้างอิงตามข้อกำหนดของ ICTV จำแนกได้ 10 ชนิด และจากการสำรวจตัวอย่างและเก็บใบมันสำปะหลัง ปี 2560 ที่ในแปลงปลูกเกษตรกร จ.นครราชสีมา อำเภอสี่คิ้ว และอำเภอด่านขุนทด ได้ตัวอย่างรวมจำนวน 40 ตัวอย่าง ตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา สรุป ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส ACMV สาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง ดังนั้น ในปี 2561 จำเป็นต้องสำรวจตัวอย่างในพื้นที่ปลูกและสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัสใน Family Geminiviridae ภายใต้ Genus Begomovirus เพิ่มเติม ใช้เป็นข้อมูลประกอบการวิจัยเพื่อนำไปสู่การพัฒนาเพื่อให้ได้วิธีการตรวจสอบต่อไป

**คำหลัก** : มันสำปะหลัง, *Geminiviridae*, *Begomovirus*, *African cassava mosaic virus* (ACMV), Double Antibody-sandwich Enzyme-linked Immunosorbent (DAS-ELISA), ICTV

---

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-01-00-03-60

## คำนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยชนิดหนึ่ง สำหรับในปัจจุบันแผนยุทธศาสตร์ของประเทศได้กำหนดให้มันสำปะหลังเป็นพืชทดแทนพลังงานสำหรับการผลิตเอทานอล เพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในส่วนของพันธุ์มันสำปะหลังที่เกษตรนิยมปลูกมีไม่กี่พันธุ์ 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) เมื่อเข้าทำลายแล้วจะส่งผลกระทบต่อผลผลิตมันสำปะหลังอย่างมาก จากข้อมูลการระบาดในประเทศอินเดียพบว่าเชื้อไวรัส ACMV ทำให้ผลผลิตมันสำปะหลังในภาพรวมของประเทศลดลงถึง 20-90 % ซึ่งความรุนแรงของอาการโรคขึ้นกับความต้านทานของมันสำปะหลังแต่ละสายพันธุ์ แมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะสำคัญในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส (Seif, 1982; Legg and Fauquet, 2004) สำหรับในประเทศไทยขณะนี้ยังไม่มีรายงานโรคในมันสำปะหลังที่เกิดจากเข้าทำลายของเชื้อไวรัสชนิดนี้ ดังนั้น จึงต้องเร่งและพยายามพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทั้งทางเซรุ่มวิทยาและอณูชีววิทยาที่มีความถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำเข้ามาช่วยตรวจสอบว่าพบเชื้อไวรัส ACMV ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญชนิดหนึ่งในมันสำปะหลังที่ปลูกในประเทศไทยหรือไม่ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับผลผลิตพืชของเกษตรกรในอนาคต และเป็นการกำจัดแหล่งสะสมโรคออกจากแปลงปลูกรวมทั้งป้องกันการแพร่ระบาดโรคไปยังแปลงปลูกอื่นๆ หากพบการระบาดของโรคเกิดขึ้น

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคและตัวอย่างพืชปกติ
2. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- โกร่งบดตัวอย่าง
- หลอด microcentrifuge tube ขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
- ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียล
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker)
- เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ

- ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood)
- เครื่อง Thermal cycler
- เครื่อง Gel electrophoresis
- เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

1. 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)
- ชุดสกัด agarose gel: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany)
- ชุดสกัด Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany)
- DNA Purification System (Promega, USA)
- ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ Wizard PlusSV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)
- เอ็นไซม์ PLATINUM Taq polymeras High quality (Invitrogen,USA)
- β-mercaptoethanol (Sigma, USA)
- ชุดไพรเมอร์
- GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas), GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)
- พลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega,USA), pBAD/His A, B, and C vector (Invitrogen,USA)
- T4 DNA Ligase (Promega,USA)
- competent cell *(E. coli* สายพันธุ์ DH 5α ) (Invitrogen,USA)

**วิธีการ**

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัส ACMV สาเหตุโรคใบด่างเหลืองในพืชมันสำปะหลัง และข้อมูลเชื้อไวรัสใน Family Geminiviridae จาก GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) และจากเอกสารที่เคยได้รายงานไว้ นำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มภายใต้ Genus Begomovirus และนำมาเข้า Clustal Omega programs (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) และเลือกหาส่วนยีนเป้าหมายที่ต้องการเพื่อนำมาใช้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจด้วยเทคนิค PCR และเทคนิค ELISA ต่อไป

2. สำรวจและเก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูกของประเทศไทยจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา และขอนแก่น และทำการบันทึกข้อมูลสำคัญระหว่างการสำรวจได้แก่ เช่น สถานที่ปลูก อายุพืช

ลักษณะอาการที่พบ ศัตรูพืชที่พบในระหว่างการสำรวจ จำนวนตัวอย่างที่สำรวจได้ ถ่ายภาพลักษณะแปลงปลูกและลักษณะอาการที่พบระหว่างการสำรวจ วันที่เก็บตัวอย่าง เป็นต้น

3. ทำการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสสาเหตุด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาแบบ DAS-ELISA ตามขั้นตอนของบริษัท Agdia (ดำเนินการปี 2560-2561) โดยการเตรียม capture antibody ที่ความเข้มข้น 1 : 200 เติมลงใน ELISA Plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ล้างด้วย 1X PBST แล้วทำการบดตัวอย่างใบพืชด้วย general extract buffer ในอัตราส่วน 1:10 ปริมาตรเติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร เติม enzyme conjugate ที่ความเข้มข้น 1 : 200 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่ละลาย PNP solution ที่ความเข้มข้น 1X (ในอัตราส่วน 1 เม็ดต่อ 5 มิลลิลิตร ) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที และตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยอ่านอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm (O.D. 405 nm) ด้วยเครื่อง ELISA reader (รุ่น GO Multiskan, Thermo Scientific) เพื่อนำผลการทดสอบที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดการตรวจวินิจฉัยต่อไป

4. สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany) (ดำเนินการปี 2560-2561) ชั่งตัวอย่างพืช ประมาณ 0.1 กรัม บดให้เป็นผงละเอียด และเติม AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโคลิตรที่เติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโคลิตร นำใส่หลอด microcentrifuge tube ไปแช่ที่ 65 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำมาเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโคลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทั้งหมดใส่ลงใน QIAshredder Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนน้ำใส มาเติม absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่า แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 650 ไมโคลิตร ใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้าง column ด้วย RW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโคลิตร แล้วชะล้าง DNA ออกจาก column โดยเติม AE buffer ปริมาตร 50 ไมโคลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ทำการเก็บดีเอ็นเอที่สกัดไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียล เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ในขั้นต่อไป

5. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์และสรุปผลการทดลองเพื่อเขียนรายงาน

**- เวลาและสถานที่**

ระยะเวลา ตุลาคม 2559-กันยายน 2561

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

## ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเชื้อไวรัส ACMV สาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลังเพื่อใช้ประกอบการวิจัย ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่อยู่ใน Family Geminiviridae Genus Begomovirus พบทำลายมันสำปะหลังที่ปลูกในแถบแอฟริกา อเมริกาใต้ อเมริกากลาง และแถบกลุ่มประเทศเอเชียแปซิฟิก มีแมลงหวี่ขาวยาสูบ (Bemisia tabaci) เป็นพาหะแบบ persistent circulative ใช้เวลาเพียง 10 นาทีเท่านั้น ก็มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการก่อให้เกิดโรคได้ ฯลฯ

2. จากการสืบค้นข้อมูลจาก Genbank ภายใต้ Genus Begomovirus โดยอ้างอิงตามข้อกำหนด International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Geminiviridae Study-Group Taxonomic Proposals, 2002) สามารถจำแนกความแตกต่างของชนิดไวรัส ACMV รวมทั้งหมดจำนวน 10 ชนิด ดังนี้ 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 mosaicvirus(ICMV), South African cassava mosaic virus(SACMV), Sri Lankan cassava mosaic virus(SLCMV) และ East African cassava mosaic virus-Uganda(EACMV-UG)

3. ผลจากการสำรวจตัวอย่างและเก็บใบมันสำปะหลัง ในแปลงปลูกเกษตรกร จ.นครราชสีมา อำเภอสี่คิ้ว และอำเภอด่านขุนทด ได้ตัวอย่างจำนวน 40 ตัวอย่าง โดยลักษณะอาการที่พบ ได้แก่ ใบพืชแสดงอาการอาการผิดรูป (ภาพที่ 1) ใบเหลือง (ภาพที่ 2) และพบเพลี้ยแป้งบนยอดของใบพืช และได้แสดงรายละเอียดข้อมูลพืชที่ได้สำรวจตามตารางที่ 1

4. กำลังดำเนินการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างที่สำรวจได้จำนวน 40 ตัวอย่าง เทคนิคทางเซรุ่มวิทยาแบบ DAS-ELISA ตามขั้นตอนของบริษัท Agdia นำผลการทดสอบในเบื้องต้นไปประกอบงานวิจัยเพื่อให้ได้วิธีการตรวจสอบต่อไป

5. การตรวจวินิจฉัยตัวอย่างปี 2560 ที่สำรวจได้จำนวน 40 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาแบบ DAS-ELISA ตามขั้นตอนของบริษัท Agdia สรุป ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส ACMV สาเหตุโรคใบด่างเหลืองมัน

**ภาพที่ 1** แสดงลักษณะอาการผิดรูปของใบมันสำปะหลัง

**ภาพที่ 2** แสดงลักษณะอาการเหลืองของใบมันสำปะหลัง

**ตารางที่ 1** แสดงรายละเอียดของตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่ได้สำรวจจากแหล่งปลูกจังหวัดนครราชสีมา

| ภาค | จังหวัด | อำเภอ | ลักษณะอาการที่สำรวจพบในมันสำปะหลัง | อายุพืช (เดือน) | พิกัดพื้นที่แปลงปลูก |
|---|---|---|---|---|---|
| **ตะวันออกเฉียงเหนือ** | นครราชสีมา | สีคิ้ว | - ใบผิดรูป<br>- ยอดผิดรูปพบเพลี้ยแป้ง | 5 | 1) ตำแหน่งที่ละติจูด 14 องศา 54.940 ลิปดาเหนือ ลองจิจูด 101 องศา 40.900 ลิปดาตะวันออก<br>(2) ตำแหน่งที่ละติจูด 14 องศา 55.997 ลิปดาเหนือ ลองจิจูด 101 องศา 41.253 ลิปดาตะวันออก |
| | | ด่านขุนทด | - ใบด่างเหลือง | 3-5,7-8 | 1) ตำแหน่งที่ละติจูด 16 องศา 05.833 ลิปดาเหนือ ลองจิจูด 101 องศา 42.567 ลิปดาตะวันออก<br>(2) ตำแหน่งที่ละติจูด 16 องศา 09.491 ลิปดาเหนือ ลองจิจูด 101 องศา 43.789 ลิปดาตะวันออก |

## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ได้ข้อมูลเบื้องต้นสำหรับประกอบการวิจัย ดังนี้ เชื้อไวรัส ACMV เป็นสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลังอยู่ใน Family Geminiviridae Genus Begomovirus พบทำลายมันสำปะหลังที่ปลูกในแถบแอฟริกา อเมริกาใต้ อเมริกากลาง และแถบกลุ่มประเทศเอเชียแปซิฟิก มีแมลงหวี่ขาวยาสูบ *(Bemisia tabaci)* เป็นพาหะแบบ persistent circulative ใช้เวลาเพียง 10 นาทีเท่านั้น ก็มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการก่อให้เกิดโรคได้ ความแตกต่างของชนิดไวรัสอ้างอิงตามข้อกำหนดของ ICTV ได้ข้อมูลชนิดเชื้อไวรัส ACMV รวมทั้งหมดจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ ACMV, EACMCV, EACMKVEACMMV, EACMV, EACMZV, ICMV, SACMV, SLCMV และ EACMV-UG ดังนั้น ในปี 2561 จำเป็นต้องสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัสใน Family Geminiviridae ภายใต้ Genus Begomovirus จาก GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) เพิ่มเติมเพื่อนำมาประกอบการวิจัยเพื่อให้ได้วิธีการตรวจสอบต่อไป

จากการสำรวจตัวอย่างและเก็บใบมันสำปะหลัง ปี 2560 ที่ในแปลงปลูกเกษตรกร จ.นครราชสีมา อำเภอสี่คิ้ว และอำเภอด่านขุนทด ได้ตัวอย่างจำนวน 40 ตัวอย่าง โดยลักษณะอาการที่พบได้แก่ ใบพืชแสดงอาการอาการผิดรูป (ภาพที่ 1) ใบเหลือง (ภาพที่ 2) และพบเพลี้ยแป้งบนยอดของใบพืช และได้แสดงรายละเอียดข้อมูลพืชที่ได้สำรวจตามตารางที่ 1 เมื่อตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาแบบ DAS-ELISA ตามขั้นตอนของบริษัท Agdia สรุป ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส ACMV สาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง ดังนั้น ในปี 2561 จำเป็นต้องออกสำรวจตัวอย่างเพิ่มเติมเพื่อเป็นข้อมูลประกอบการวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

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.

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.

Fondong, V.N., Pita, J.S., Rey, M.E.d.K.A., Beachy, R.N., Fauquet, C.M., (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.

Geminiviridae Study-Group Taxonomic Proposals 2002. 2002. ICTV–Plant Virus Subcommittee Study Group on Geminiviruses Online. Available: (http://ictvonline.org/proposals/2002.P108-109.Geminiviridae.pdf, 6 June, 2016)

Legg, J.P., Thresh, J.M., (2000). Cassava mosaic virus disease in East Africa: a dynamic disease in a changing environment. *Virus Res.* 71(1-2): 135-149.

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

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