การเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังในประเทศไทย

Surveillance of *Cassava mosaic virus* outbreak in Thailand

ปัญญาวุฒิ อัมพุชินทร์[1,2] , อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์[1] และ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[1,2,3]
Panyavut Aumpuchin[1,2], Ampaiwan Paradornuwat[1]and Srimek Chowpongpang[1,2,3]

Abstract

Cassava mosaic disease (CMD) is caused by *Cassava mosaic virus*, in the genus *Begomovirus*. The disease caused *up to 80% yield loss* of the tuberous roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in African and Indian continents. The aim of this research was to determine the *Cassava mosaic virus* outbreak in Thailand. Universal primers CMV-Rep1 and CMV-Rep2 were designed on *Cassava mosaic virus* rep gene. Thirteen sequences of *Cassava mosaic virus rep* gene were fetched from GenBank and aligned. Polymerase chain reaction (PCR) using these primers could produce approximately 380 bp PCR amplicon. In addition, about 2,700 bp PCR amplicon were produced by back to back primer GEM-LF and GEM-LR for circular ssDNA of *Begomovirus* genome detection. The 218 samples of cassava leaf were collected from 16 provinces to determine *Cassava mosaic virus* using CMV-Rep1 and CMV-Rep2 by PCR. The all negative results showed that *Cassava mosaic virus* has not found in these surveyed areas and Thailand is quite safe from this outbreak.

Keywords: *Cassava mosaic virus*, *Cassava mosaic virus* detection, rep gene

---

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, KamphangSaen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand
[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษา และการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand.
[3] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok 10900, Thailand
รับเรื่อง : มิถุนายน 2559
รับตีพิมพ์ : กรกฎาคม 2559
* Corresponding author : agrsmc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

โรคใบด่างมันสำปะหลังมีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส *Cassava mosaic virus* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Begomvirus* โรคนี้ก่อความเสียหายมากถึง 80% ของผลผลิตมันสำปะหลังในแถบทวีปแอฟริกา และประเทศอินเดียวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อตรวจสอบการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังในประเทศไทย โดยสามารถออกแบบ universal primer CMV–Rep1 และ CMV–Rep2 ได้ถูกออกแบบมาจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rep* จำนวน 13 รายการที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rep* ด้วยปฏิกริยาพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์นี้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 380 คู่เบส นอกจากนั้นแล้วคู่ไพรเมอร์ชนิด back to back GEM–LF และ GEM–LR ยังสามารถผลิตผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 2,700 คู่เบสได้เพื่อการตรวจสอบไวรัสกลุ่ม *Begomovirus* ที่มีจีโนมเป็นแบบวงแหวนปิด จากผลการตรวจสอบตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 218 ตัวอย่างจาก 16 จังหวัดโดยใช้คู่ไพรเมอร์ CMV–Rep1 และ CMV–Rep2 ด้วยวิธีพีซีอาร์ในประเทศไทยยังไม่พบการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง

คำสำคัญ: ไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง การตรวจสอบไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง *rep* ยีน

คำนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชอาหารที่สำคัญลำดับที่ 6 รองจาก ข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด มันฝรั่ง และข้าวบาร์เลย์ และมีการเพาะปลูกกันมาอย่างยาวนาน พบว่ามีแหล่งกำเนิดในหลายประเทศคือ ทางทิศตะวันออกของประเทศบราซิล ทางทิศตะวันออกของประเทศโบลิเวีย ทิศตะวันออกของประเทศอาร์เจนตินา ทิศตะวันตกเฉียงเหนือของทวีปอเมริกาใต้ ประเทศกัวเตมาลา และประเทศเม็กซิโก ในประเทศไทยมีการเพาะปลูกมันสำปะหลังหลากหลายสายพันธุ์ โดยมีการปลูกมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มันสำปะหลังถูกใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรทที่สำคัญในหลายประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่ยากจนและกำลังพัฒนา เช่นในทวีปแอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ เนื่องจากมันสำปะหลังสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพพื้นที่ที่มีธาตุอาหารต่ำ ความแห้งแล้ง สภาพดินไม่เอื้ออำนวยต่อการปลูกพืชชนิดอื่น เช่น ความเป็นกรด–ด่างของดิน มันสำปะหลังนอกจากจะสามารถนำมาใช้ในการบริโภคได้โดยตรงแล้วยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์แป้ง ไบโอดีเซล หรือการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตาม มันสำปะหลังยังจัดเป็นพืชที่มีพิษหากนำไปบริโภคอย่างผิดวิธี เนื่องจากในส่วนของหัวมีการสะสมของสาร tannin และ hydrocyanic acid

ถึงแม้ว่ามันสำปะหลังจะสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามการเพาะปลูกมันสำปะหลังยังมีปัญหาที่ส่งผลให้จำนวนผลผลิต และคุณภาพลดน้อยลง ซึ่งเป็นผลจากการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคหลายชนิด เช่นโรคใบไหม้ (Cassava bacterial blight : CBB) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* โรคแอนแทรคโนสเกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum*

gloeosporioides f. sp. Manihotis โรค Cassava frogskin disease เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา อาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเพลี้ยไฟ และโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่สำคัญได้แก่ โรคใบด่างมันสำปะหลัง (CMD) เกิดจากเชื้อ *Cassava mosaic virus* ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่ม *Begomovirus*

โรคใบด่างมันสำปะหลังพบว่ามีการระบาดรุนแรงในทวีปแอฟริกา ประเทศอินเดีย และประเทศศรีลังกาและมีรายงานการค้นพบโรคนี้ครั้งแรกที่ประเทศแทนซาเนียในปี ค.ศ. 1894 และอาการของโรคใบด่างเป็นผลมาจากเชื้อไวรัส โดยมีแมลงหวี่ขาว (*Bemisiatabaci*) เป็นพาหะในปี 2015 มีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังสายพันธุ์ *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) และ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ในจังหวัดรัตนะคีรี ประเทศกัมพูชา ซึ่งนับเป็นประเทศแรกในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่พบการระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้และมีพื้นที่การระบาดใกล้กับชายแดนของประเทศไทย จากรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง จะเห็นได้ว่าพื้นที่การระบาดรุกคืบเข้าใกล้ประเทศไทยมากขึ้นทุกขณะ ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเฝ้าระวัง และตรวจสอบการเข้าระบาดในประเทศไทย

วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ จะช่วยให้การเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังมีประสิทธิภาพมากขึ้น วิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์จึงเป็นวิธีการอย่างหนึ่งซึ่งมักนิยมนำมาใช้ในการตรวจเฝ้าระวัง มีรายงานการทดลองการตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังโดยใช้วิธี m-PCR (multiplex polymerase chain reaction) โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้ได้ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกันในแต่ละชนิด โดยมีตั้งแต่การแยกกันของ 2 สายพันธุ์ เช่น *African cassava mosaic virus* (ACMV) และ *East African* cassava *mosaic Cameroon virus* (EACMCV) และหลายสายพันธุ์เช่น ACMV *East African* cassava *mosaic Malawi virus* (EACMMV) EACMCV และ *East African* cassava *mosaic Malawi Zanzibar*virus (EACMZV) เพื่อความรวดเร็วในการตรวจสอบคัดแยกสายพันธุ์ของไวรัสที่เข้าทำลายมันสำปะหลังที่ให้อาการของโรคใบด่างแต่ในการทำปฏิกริยาจะต้องใช้ไพรเมอร์หลายคู่เท่ากับจำนวนของสายพันธุ์ที่จะตรวจสอบซึ่งทำให้เกิดค่าใช้จ่ายที่เพิ่มมากขึ้นในการตรวจสอบ ซึ่งหากต้องการใช้ไพรเมอร์เพียงคู่เดียวในการตรวจสอบหลายๆ สายพันธุ์จะต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ให้เป็นแบบ degenerate primer โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทน์ของยีนส์ที่สนใจมาเปรียบเทียบเพื่อหาตำแหน่งอนุรักษ์ (conserve region) เช่น การตรวจสอบเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Begomovirus* สามารถใช้ยีนที่สร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสมาเปรียบเทียบ และออกแบบไพรเมอร์โดยเลือกจากบริเวณอนุรักษ์ให้มีบางลำดับเบสเป็นแบบสุ่ม เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการตรวจสอบพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากไวรัสดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังของประเทศไทย โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่เป็นตำแหน่งอนุรักษณ์ของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังได้ทุกสายพันธุ์ เพื่อใช้ตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์

อุปกรณ์และวิธีการ

การออกแบบไพรเมอร์และการทดสอบ

การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง โดยทำการสืบค้นข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่มีรายงานของเชื้อไวรัส *Cassava mosaic virus* ของยีน *rep* (replicating associated protein:

AC1) บน component A จาก GenBank ที่มีรายงานทั่วทวีปแอฟริกา ประเทศอินเดีย และประเทศศรีลังกา เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาตำแหน่งอนุรักษ์บนจีโนมสำหรับใช้ออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถตรวจสอบทุกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคใบด่างในมันสำปะหลัง และเปรียบเทียบส่วนอนุรักษ์บริเวณ stem loop เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแบบเต็มจีโนมทั้ง component ชนิด A และ B โดยใช้ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่สกัดจากประเทศอินเดียเป็นตัวทดสอบความเฉพาะเจาะจงของคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยวิธีพีซีอาร์

การเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังและการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำการเก็บตัวอย่างมันสัมปะหลังที่แสดงลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสจากพื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังและนำตัวอย่างใบที่เก็บได้มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Begomovirus* โดยใช้วิธีดัดแปลงจากการสกัด พลาสมิดแบบ alkaline lysis เนื่องจากสารพันธุกรรมของไวรัสในกลุ่มนี้เป็นดีเอ็นเอวงปิดสายเดี่ยว ซึ่งคล้ายกับลักษณะของพลาสมิด เพื่อลดการปนเปื้อนดีเอ็นเอจากมันสำปะหลัง และทดสอบความจำเพาะเจาะจงของคู่ไพรเมอร์ ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยทำปฏิกริยาในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตรมีส่วนประกอบคือ dH_20 ปริมาตร 39 ไมโครลิตร 10X buffer (TrisHCl pH 8.4 ความเข้มข้น 200 mM และ KCl ความเข้มข้น 500 mM) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 2.5 mM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward และ reverse ความเข้มข้น 10 uM อย่างละ 1 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี และนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ตามอุณหภูมิที่คำนวณได้จากคู่ไพรเมอร์โดยปฏิกริยาพีซีอาร์ที่ใช้ตรวจสอบยีน *rep* ประกอบด้วย 95 องศาเซลเซียส 5 นาที (pre denaturation) ตามด้วย 35 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 40 วินาที (denaturation) 58 องศาเซลเซียส 40 วินาที (annealing) 72 องศาเซลเซียส 40 วินาที (extension) และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที (final extension) จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย วิธี agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นเจล 1% ในสารละลาย TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 135 โวลต์ นาน 15 นาทีจากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมสีดีเอ็นเอด้วย Ultra power safe dye ผสมใน 10X DNA loading dye(20X) ตรวจดูแถบดีเอ็นเอในเจลภายใต้เครื่องส่องเจลชนิด LED ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

ผลและวิจารณ์

การออกแบบไพรเมอร์ และการทดสอบ

การออกแบบไพรเมอร์โดยการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rep* ทั้ง 13 หมายเลขรหัสที่มีการรายงานใน GenBank ดังแสดงไว้ใน Table 1 มาเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม clustal W เพื่อหาส่วนอนุรักษ์ในยีน *rep*(AC1) เนื่องจากยีน AC1 เป็นยีนที่ผลิต replication associated protein ซึ่งมีรูปร่างที่เฉพาะเจาะจงกับตำแหน่งอนุรักษ์บน stem loop (5' TAATATTAC 3') เพื่อใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการทวีจำนวนของจีโนมไวรัส ดังนั้นในยีน AC1 จึงมีลำดับนิวคลีโอไทน์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์มากกว่ายีนอื่นๆ จากการเปรียบเทียบบริเวณส่วนอนุรักษ์ของยีน AC1 ทั้ง 13 หมายเลขรหัสพบบริเวณอนุรักษ์ปรากฏอยู่ในบริเวณกรอบสี่เหลี่ยมใน Figure 1 ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน AC1 ตั้งชื่อเป็น CMV-Rep1 ถูกใช้เป็น forward primer (5' CCGCTGCG

CGGCCHTKGAGACC 3') และ CMV-Rep2 ถูกใช้เป็น reverse primer (5' GAAGRT BGCATTC TTTAAHGCCCA3') ตามลำดับซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งในคู่ไพรเมอร์นี้เป็น degenerate primer (H K R และ B) เนื่องจากในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ในตำแหน่งที่เลือกสำหรับการออกแบบไพรเมอร์มีความแตกต่างของบางลำดับนิวคลีโอไทน์ในแต่ละหมายเลขรหัส เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังสายพันธุ์อื่น ๆ

จากการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นแสดงอาการคล้ายใบด่างด้วยวิธี alkaline lysis ไม่พบแถบของจีโนมดีเอ็นเอปรากฏ เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดดีเอ็นเอแบบปกติ (total DNA extraction) (Figure 2) อย่างไรก็ตามเมื่อนำจีโนมดีเอ็นเอซึ่งสกัดได้ทั้ง 2 วิธีไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกริยาพีซีอาร์พบว่า ทั้งสองวิธีการสกัดตัวอย่างที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 380 คู่เบส (Figure 3) เนื่องจากจีโนมของไวรัสกลุ่มนี้เป็นดีเอ็นเอวงแหวนปิด สามารถใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ stem loop โดยทุก component ของไวรัสมี stem loop ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน คือ 5'TAATATTACGGATGGCCGC3' จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ component A ของไวรัสใบด่างมันสำปะหลังทั้ง 5 accessions (Figure 4)

Table 1 Thirteen accessions ofAC1 gene (*rep,* replication associated protein)

No	Accession No.	Country /strain/isolate
1	GQ204109-African cassava mosaic virus	Multan /Pakistan
2	AY211885-African cassava mosaic virus isolate CM/DO3	Cameroon/ Douala
3	AF112352_African cassava mosaic virus	Cameroon/ southwestern rainforest region
4	AF126800_African cassava mosaic virus	Uganda/ Mild DNA-A strain
5	FM877473_African cassava mosaic virus_	Burkina Faso/Kamboinse
6	NC_004655 East African cassava mosaic virus	Zanzibar
7	NC_011583 East African cassava mosaic virus	Kenya
8	NC_003803 South African cassava mosaic virus	South African
9	AY730035 Indian cassava mosaic virus isolate Mah-2	India/Mah
10	AJ575819 Indian cassava mosaic virus-[Ker2]	India/Ker
11	NC_003861 Sri Lankan cassava mosaic virus	Sri Lanka
12	AF259896 East African cassava mosaic Cameroon virus	Ivory Coast
13	EU685326 East African cassava mosaic Cameroon virus	Nigeria

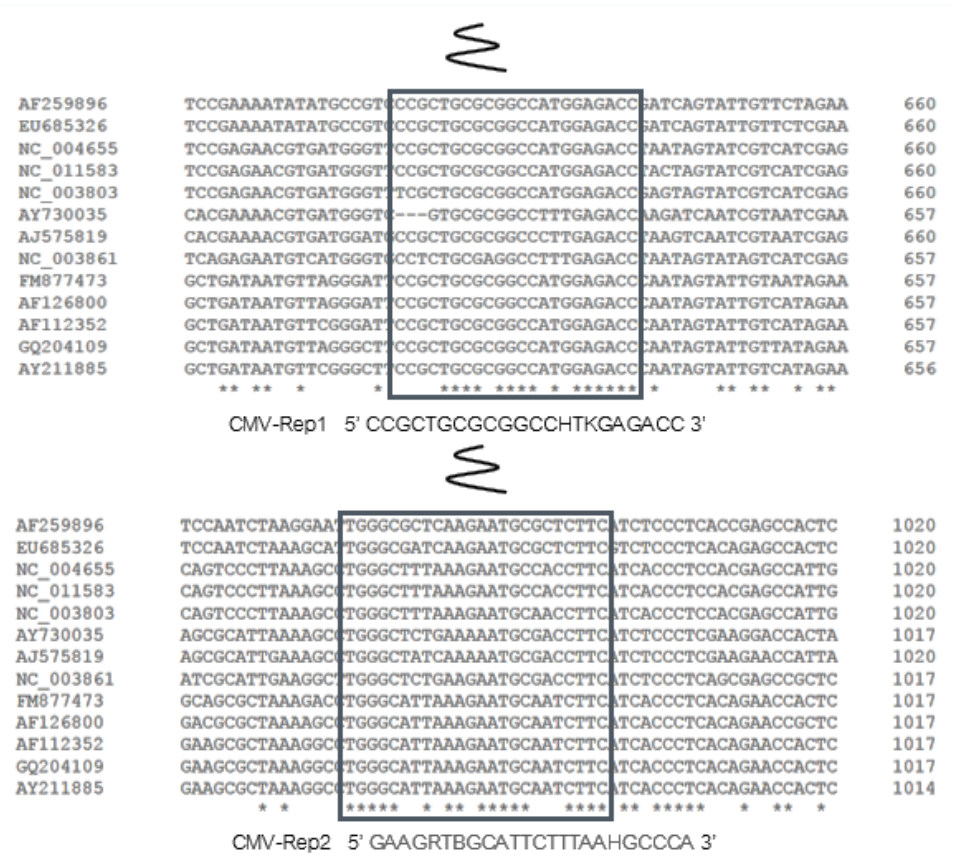

Figure 1 The multiple sequences alignment of AC1 gene. Conserved regions are shown in the box where the forward and reverse primers are designed

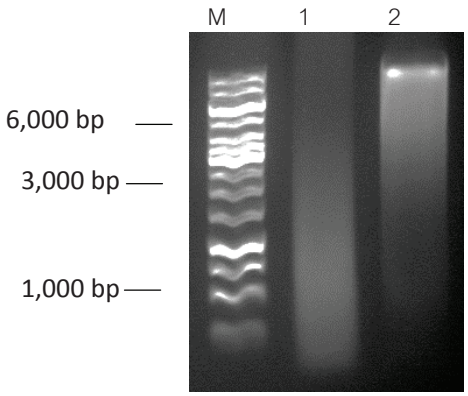

Figure 2 DNA extraction of SLCMV infected cassava leaves Lane M: 1 kb DNA Ladder, Lane 1: Alkaline lysis extraction and Lane 2: Total DNA extraction

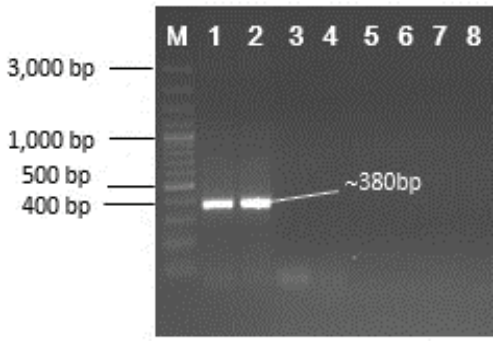

Figure 3 PCR amplification of *Cassava mosaic virus*-rep geneusing specific pair. Lane M:100 bp Plus DNA Ladder, Lane1*Cassava mosaic virus* infected cassava DNA sample (alkaline lysis extraction), Lane 2 *Cassava mosaic virus* infected cassava DNA sample (Total DNA extraction),Lane 3 - 8Cassava DNA sample

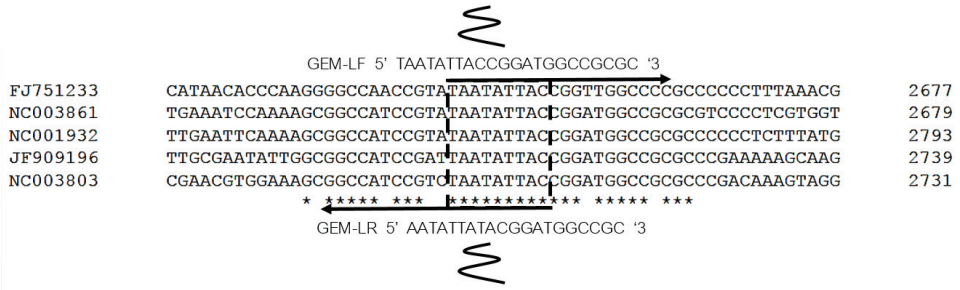

Figure 4 The multiple sequences alignment of stem loop conserved region of *Cassava mosaic virus* circular DNA.(FJ751233: ACMV, NC003861: SLCMV, NC001932: ICMV, JF909196: EACMV and NC003803: SACMV). Arrows indicate the position

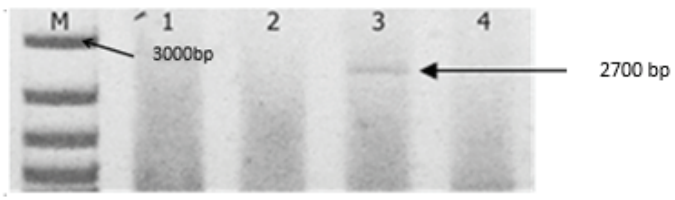

Figure 5 PCR amplification of stem loop region of *Cassava mosaic virus* genome using back to back primers. Lane M:100 bp Plus DNA Ladder, Lane1, 2 and 4 Cassava DNA sample, Lane 3 *Cassava mosaic virus* infected cassava DNA sample from India

จึงสามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบลำดับเบสของทั้งจีโนมของไวรัส ได้ไพรเมอร์ back to back ตั้งชื่อเป็น GEM-LF ถูกใช้เป็น forward primer (5' TAATATTACCGGAT GGCCGCGC3') และ GEM-LR ถูกใช้เป็น reverse primer (5'AATATTATACGGATGGC CGC3') ไพรเมอร์คู่นี้เมื่อนำไปทำปฏิกริยาพีซีอาร์โดยใช้จีโนมดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นแสดงอาการคล้ายใบด่างจะให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 2,700 คู่เบส (Figure 5) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับขนาดจีโนมของไวรัสที่ได้มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยการทดสอบไพรเมอร์ที่เป็น back to back จะมีการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาพีซีอาร์ในส่วนอุณหภูมิ annealing เป็น 55 ºC เวลา 40 วินาที และ extension ที่ 72 ºC นาน 2 นาที 30 วินาที

การตรวจสอบการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังในประเทศไทย

จากการเก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลัง 218 จาก 16 จังหวัด ได้แก่ ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ลพบุรี สระบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา นครราชสีมา บุรีรัมย์ ขอนแก่น มหาสารคาม กาฬสินธุ์ ชัยภูมิ หนองคาย นครพนม และมุกดาหาร ที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่มีอาการใบเหลืองด่าง ใบลดรูป ต้นที่แคระแกร็น ใบบิดโค้งงอ รวมถึงใบที่ไม่มีอาการของโรคดังที่มีรายงานการศึกษาลักษณะของเชื้อไวรัสใบด่างที่เข้าทำลายในมันสำปะหลัง (Fauqnet and Fargette, 1990) มาตรวจสอบหาเชื้อไวรัสในด่างมันสำปะหลังด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ CMV–Rep1 และ CMV–Rep2 โดยใช้ดีเอ็นเอมันสัมปะหลังที่เป็นโรคใบด่างจากประเทศอินเดียที่สกัดด้วยวิธี alkaline lysis พบว่า ใบมันสำปะหลังทั้งหมด 218 ตัวอย่างให้ผลเป็นลบคือไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 380 คู่เบสจากปฏิกริยาพีซีอาร์ดังแสดงใน Table 2 และ Figure 6 (แสดงเฉพาะผลปฏิกริยาพีซีอาร์ของตัวอย่างที่ 1-34) ซึ่งจนถึงปัจจุบันยังคงไม่มีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังในประเทศไทย อย่างไรก็ตาม ลักษณะอาการที่ผิดปกติของมันสำปะหลังอาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่นโรคแอนแทรคโนสที่แสดงอาการใบไหม้ บิด โค้งงอ ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *manihotis* หรืออาการที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่แสดงอาการยอดกระจุก ใบเหลือง ต้นแคระแกร็น ใบลดรูป ใบบิดเบี้ยว

Table 2 Cassava leaf samples from 16 provinces and PCR result

No.	Province	Total amount	PCR result (positive/total)
1	Lopburi	35	0/35
2	Saraburi	10	0/10
3	Cholburi	27	0/27
4	Rayong	4	0/4
5	Janthaburi	5	0/5
6	Chachoengsao	16	0/16
7	Prageenburi	4	0/4
8	Burirum	37	0/37
9	NakhonRatchasima	13	0/13
10	Mahasarakarm	2	0/2
11	Mook Da Han	19	0/19
12	Kalasin	5	0/5
13	KhonKaen	4	0/4
14	NakhonPhanom	12	0/12
15	Nongkai	19	0/19
16	Chaiyaphoom	6	0/6

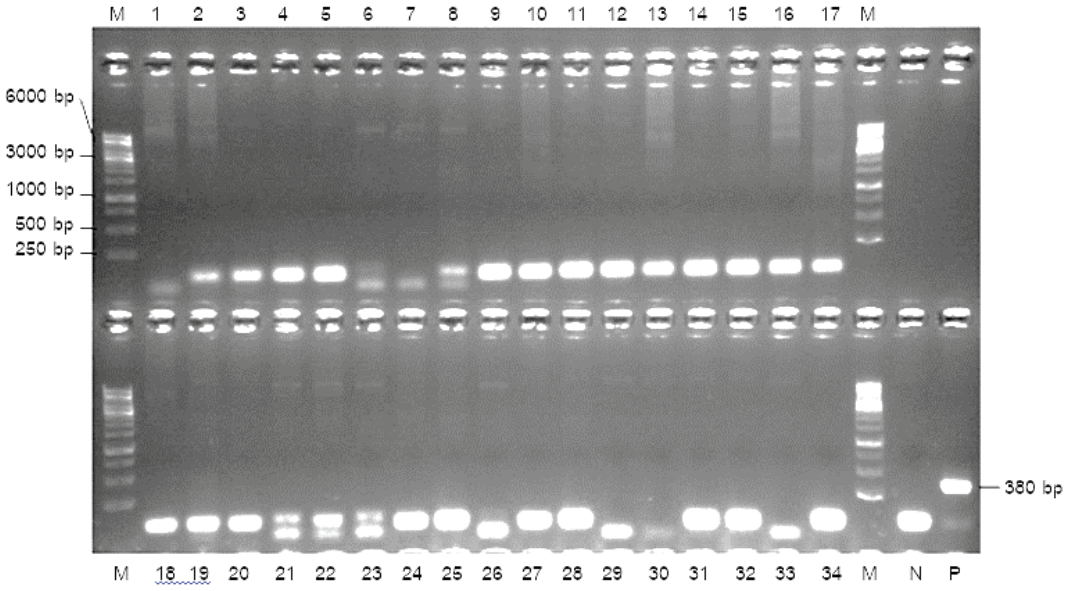

Figure 6 CMV detection from plant sample by specific primer (CMV-Rep1 and CMV-Rep2). Lane M:1 kb DNA Ladder, Lane1 – 34 *Cassava mosaic virus* infected cassava DNA sample, Lane N Negative, Lane P Positive

สรุป

ไพรเมอร์ CMV–Rep1 และ CMV–Rep2 ที่ออกแบบในการตรวจสอบไวรัสใบด่างมันสำปะหลังสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rep* ของเชื้อไวรัส *Cassava mosaic virus* ซึ่งออกแบบให้มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดเล็กเพื่อความรวดเร็วในการตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมาก โดยให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 380 คู่เบสจากการตรวจสอบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่าง และ back to back ไพรเมอร์ GEM–LF และ GEM–LR ที่จำเพาะกับส่วนอนุรักษ์ที่เป็น stem loop ซึ่งพบใน *Begomovirus* สามารถให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 2,700 คู่เบส และใช้ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อไวรัสแบบเต็มจีโนมได้

วิธีการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังด้วยวิธีการ alkaline lysis จากตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรค ช่วยลดการปนเปื้อนจากดีเอ็นเอมันสำปะหลัง และเอื้อต่อความจำเพาะต่อไวรัสมากขึ้น ถึงแม้จะไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอใน agarose gel เนื่องจากดีเอ็นเอของไวรัสมีปริมาณน้อยแต่สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกริยาพีซีอาร์ และให้ผลเป็นบวกเช่นเดียวกับการสกัดดีเอ็นเอแบบ total DNA extraction

จากการสุ่มเก็บตัวอย่าง 218 ตัวอย่าง ในพื้นที่เพาะปลูก 16 จังหวัด สกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ในทุกตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ CMV–Rep1 และ CMV–Rep2 ยังไม่พบการระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกของประเทศไทย

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

Alabi, O.J., P.L. Kumar and R.A. Naidu. 2008. Multiplex PCR for the detection of *African cassava mosaic virus* and *East african cassava mosaic cameroon virus* in cassava. J. Virol. Methods 154: 111–120.

Alexander, P.J., G. Rajanikanth, C.D. Bacon and C.D. Bailey. 2007. Recovery of plant DNA using a reciprocating saw and silica-based columns. Md. Ecol. Notes 7: 5–9.

Allem, A.C. 2002. The origins and taxonomy of cassava. Cassava: Biology, Production and Utilization. 1–16.

Alvarez, E., J.F. Mejía, G.A. Llano and J.B. Loke. 2007. Detection and characterization of a phytoplasma associated with frog skin disease in cassava. Bull. Insectology 60: 273.

Alvarez, E., J.F. Mejía, G.A. Llano, J.B. Loke, A. Calari, B. Duduk and A. Bertaccini. 2009. Characterization of a phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. Plant Dis. 93: 1139–1145.

Amusa, N.A. 2001. Screening of cassava and yam cultivars for resistance to anthracnose using toxic metabolites of *Colletotrichum* species. Mycopatho logia. 150: 137–142.

Bimboim, H. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513–1523.

Chaparro-Martinez, E.I. and G. Trujillo-Pinto. 2001. First report of frog skin disease in cassava (*Manihot esculenta*) in Venezuela. Plant Dis. 85: 1285–1285.

Colombo, C., G. Second, T.L. Valle and A. Charrier. 1998. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* crantz).: I) RAPD markers. Genet. Mol. 21: 105–113.

El-Sharkawy, M.A. 2004. Cassava biology and physiology. Plant Mol. Bio. 56: 481–501.

Fauquet, C. and D. Fargette. 1990. *African cassava mosaic virus*: Etiology, epidemiology and control. Plant Dis. 74: 404–411.

Flôres, D., I.C. Haas, M.C. Canale and I.P. Bedendo. 2013. Molecular identi-fication of a 16srIII-B phytoplasma associated with cassava witches' broom disease. European J. Plant Pathol. 137: 237–242.

Fokunang, C.N., T. Ikotun, A.G.O. Dixon and C.N. Akem. 1997. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* f. Sp. *Manihotis*, cause of cassava anthracnose disease, being seed-borne and seed-transmitted in cassava. Plant Dis. 81: 695–695.

Fregene, M.A., J. Vargas, J. Ikea, F. Angel, J. Tohme, R.A. Asiedu, M.O. Akoroda and W.M. Roca. 1994. Variability of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA in cassava (*Manihot esculenta* crantz) and its wild relatives. Theor. Appl. Genet. 89: 719–727.

Halsey, M.E., K.M. Olsen, N.J. Taylor and P. Chavarriaga-Aguirre. 2008. Repro-ductive biology of cassava (*Manihot esculenta* crantz) and isolation of experimental field trials Crop Sci. 48: 49–58.

Lapierre, H. and P.A. Signoret. 2004. Viruses and Virus Diseases of Poaceae (gramineae). Institut national de la recherche agronomique.Inra, Rue de l'Universite, Paris.

Lebot, V. 2009. Tropical Root and Tuber Crops: Cassava, Sweet Potato, Yams and Aroids. Cabi, United Kingdom. Cabi, Wallingford, United Kingdom.

Nassar, N.M.A. and R. Ortiz. 2007. Cassava improvement: Challenges and impacts. J. Agric. Sci. 145: 163–171.

Schoonhoven, A.V. 1974. Resistance to thrips damage in cassava. Journal of Economic Entomology. 67: 728–730.

Seng, S. 2009. The Effect of Cassava Foliage (*Manihot esculenta*) on Gastrointestinal Parasites of Small Ruminants in Cambodia. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.

Verdier, V., G. Mosquera and K. Assigbétsé. 1998. Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*, by polymerase chain reaction. Plant Dis. 82: 79–83.

Wang, H.L., X.Y. Cui, X.W. Wang, S.S. Liu, Z.H. Zhang and X. Zhou. 2015. First report of *Sri lankan cassava mosaic virus* infecting cassava in Cambodia. Plant Dis. 100(5): 1029.

Wyatt, S.D. and J.K. Brown. 1996. Detection of subgroup III*Geminivirus* isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology. 86: 1288–1293.