การศึกษาอัตราการเกิดโรคใบด่างมันสำปะหลังในท่อนพันธุ์สะอาด
Study of Disease Incidence in Cassava Mosaic Disease Clean Seed

วันวิสา ศิริวรรณ์[1,*] นวลนภา เหมเนียม[1] จุฑาทิพย์ ถวิลอำพันธ์[1] สุกัญญา ฤกษ์วรรณ[1] กิ่งกาญจน์ เสาร์คำ[2,3] ศิริกาญจน์ หรรษาวัฒนกุล[4] ปภาวี พลีพรหม[4] และ เฉลิมพล ภูมิไชย์[4]

Wanwisa Siriwan[1,*], Nuannapa Hemniam[1], Jutathip Thawinampan[1], Sukanya Roekwan[1], Kingkan Saokham[2,3], Sirikan Hunsawattanakul[4], Paphawe Pleeprom[4] and Chalermpo Phumichai[4]

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[3] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
[4] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900
[2] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140
[3] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Office of the Higher Education Commission, Bangkok 10900
[4] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

รับเรื่อง:	28 ตุลาคม 2563	Received:	28 October 2020
ปรับแก้ไข:	16 ธันวาคม 2563	Revised:	16 December 2020
รับตีพิมพ์:	22 ธันวาคม 2563	Accepted:	22 December 2020

[*] Corresponding author: wanwisa.si@ku.th

ABSTRACT: The aim of this study was to compare rate of cassava mosaic disease (CMD) infection in Kasetsart 50, Huai Bong 60 and CMR-89 clean seed varieties and Kasetsart 50 variety from farmer saving seed. The trials were investigated in Ta Phraya, Sa Kaeo province where CMD was epidemic. The result showed, Kasetsart 50 farmer seed was high disease incidence than clean seed. So, disease incidence of farmer seed presented 49, 51 and 55% in 2, 3 and 4-month-old. Kasetsart 50, Hui Bong 60 and CMR-89 clean seed showed disease incidence as 0.85, 1.4 and 2.56% after 2, 3- and 4-month after planting. We also classified cause of disease infection in farmer seed and clean seed. Infected materials and whitefly infection symptoms were found in farmer seed. Most of the clean seed disease caused by whitefly infection, the symptoms appeared when cassava plants were 2 and 3 months old. Latent infection in clean seed samples were detected by polymerase chain reaction (PCR). PCR result showed latent infection in CMR-89, Hui Bong 60 and Kasetsart 50 varieties were 10, 3.5 and 3%. Thus, this result demonstrated that using clean seed materials replace in infected areas can reduce rate of disease infection.

Keywords: Cassava mosaic disease, clean seed, disease incidence, disease control

บทคัดย่อ

งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบอัตราการติดโรคใบด่างมันสำปะหลังในพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ห้วยบง 60 และ CMR-89 ที่ปลูกจากท่อนพันธุ์สะอาดกับท่อนพันธุ์ของเกษตรกร พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 โดยปลูกทดสอบที่อำเภอตาพระยา จังหวัดสระแก้ว ซึ่งเป็นเขตระบาดของโรค พบอัตราการเกิดโรคในแปลงที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์ของเกษตรกรสูงกว่าแปลงที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์สะอาด โดยอัตราการเกิดโรคของแปลงที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์ของเกษตรกรในเดือนที่ 2, 3 และ 4 คือ 49, 51 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ แปลงที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์สะอาดพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ห้วยบง 60 และ CMR-89 พบอัตราการเกิดโรคในเดือนที่ 2, 3 และ 4 เดือน เฉลี่ย 0.8, 1.3 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบสาเหตุการเกิดโรค พบว่า แปลงที่ปลูกโดยการใช้ท่อนพันธุ์ของเกษตรกร มีสาเหตุมาจากการใช้ท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคร่วมกับแมลงหวี่ขาวถ่ายทอดเชื้อไวรัส สำหรับแปลงท่อนพันธุ์สะอาดทั้ง 3 พันธุ์ พบเพียงลักษณะอาการที่มีสาเหตุมาจากแมลงหวี่ขาวนำเชื้อไวรัสในช่วงที่มันสำปะหลังมีอายุ 2–3 เดือนเท่านั้น นอกจากนี้ได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบของต้นที่ไม่แสดงอาการในมันสำปะหลังที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์สะอาดทั้ง 3 พันธุ์ และตรวจสอบเชื้อไวรัส SLCMV ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ผลการตรวจสอบพบว่า เปอร์เซ็นต์อาการแฝงของไวรัสในมันสำปะหลังพันธุ์ CMR-89 ห้วยบง 60 และ เกษตรศาสตร์ 50 คือ 10, 3.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้น งานทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า การใช้ท่อนพันธุ์สะอาดปลูกในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสามารถช่วยลดอัตราการเกิดโรคได้

คำสำคัญ: โรคใบด่างมันสำปะหลัง, ท่อนพันธุ์สะอาด, อัตราการเกิดโรค, การควบคุมโรค

บทนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ประเทศไทยผลิตมันสำปะหลังเป็นอันดับ 2 ของโลก รองจากประเทศไนจีเรีย มีส่วนแบ่งในตลาดโลกประมาณ 67 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 31 ล้านตันต่อปีโดยประมาณ ซึ่งสร้างรายได้ให้แก่ประเทศเป็นมูลค่า 79 ล้านบาท (Office of Agricultural Economics, 2019a) ในปี พ.ศ. 2563 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง 8.9 ล้านไร่ ครอบคลุมทั้งหมด 54 จังหวัด (Office of Agricultural Economics, 2019b) มันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกง่าย สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย สามารถปรับตัวกับสภาพแวดล้อมได้ง่าย ปลูกได้ในดินที่มีระดับความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ปัญหาในการผลิตโรคและแมลงน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น ในปัจจุบัน อุตสาหกรรมการผลิตมันสำปะหลังของประเทศกำลังเข้าสู่ระยะวิกฤตจากสภาวะการระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลัง ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิต 40–100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับช่วงอายุของมันสำปะหลังที่ติดเชื้อไวรัส (Office of Agricultural Economics, 2020)

โรคใบด่างมันสำปะหลัง (Cassava mosaic disease, CMD) รายงานพบการระบาดในประเทศไทยครั้งแรกในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 ในพื้นที่จังหวัดที่มีเขตติดต่อกับประเทศกัมพูชา ได้แก่ ศรีสะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี สระแก้ว นครราชสีมา และปราจีนบุรี รวมทั้งหมด 7 จังหวัด จำนวน 179 ต้น และกรมวิชาการเกษตรได้ดำเนินการทำลายพื้นที่การระบาดทั้งหมดด้วยวิธีการฝังกลบ (FAO, 2019) การตรวจพบโรคในช่วงเวลาดังกล่าวจัดว่าเป็นครั้งแรกในการรายงานการระบาดโรคใบด่างมันสำปะหลังและถูกจัดเป็นโรคอุบัติใหม่ (Emerging disease) ในประเทศไทย ข้อมูลพื้นที่การระบาดเมื่อเดือนตุลาคม พ.ศ. 2563 รายงานโดยกรมส่งเสริมการเกษตร พบพื้นที่ระบาดประมาณ 320,000 ไร่ ครอบคลุม 17

จังหวัด ซึ่งจังหวัดนครราชสีมาเป็นพื้นที่ระบาดสูงสุด 250,000 ไร่ คิดเป็น 78 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ระบาดทั้งหมด จังหวัดนครราชสีมามีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังทั้งหมด 1.6 ล้านไร่ และเป็นแหล่งในการผลิตท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทย (Office of Agricultural Economics, 2020)

โรคใบด่างมันสำปะหลัง หรือ Cassava mosaic disease (CMD) เกิดจากเชื้อไวรัส Cassava mosaic virus จัดอยู่ในสกุล *Begomovirus* วงศ์ *Geminiviridae* (Brown *et al.,* 2015) รายงานครั้งแรกในทวีปแอฟริกาโดยสายพันธุ์ African cassava mosaic virus (ACMV) (Warburg, 1894) ปัจจุบันโรคใบด่างมันสำปะหลังมีรายงานทั้งหมด 11 สายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) ก่อให้เกิดโรคในประเทศไทย (Siriwan *et al.,* 2020) และประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ราชอาณาจักรกัมพูชา และสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม) (Wang *et al.,* 2016) *Begomovirus* เป็นไวรัสที่มีอนุภาคเป็นทรงกลมคู่ (Geminate particle) มีขนาดเฉลี่ยโดยประมาณ 18x30 นาโนเมตร ลักษณะจีโนมเป็นแบบ bipartite จีโนม ประกอบด้วย DNA-A และ DNA-B แต่ละจีโนมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 2,700 เบส สารพันธุกรรมเป็นแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยววงปิด (Single stranded DNA, ssDNA) *Geminiviridae* เป็นไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สร้างความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น พืชตระกูลแตง มันสำปะหลัง มะเขือเทศ และฝ้าย เป็นต้น (Yadava *et al.,* 2010) นอกจากนี้ ยังมีรายงานพืชอาศัยของโรคใบด่างมันสำปะหลังที่ไวรัสสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ เช่น พืชในวงศ์ *Euphorbiacease* (สบู่ดำและละหุ่ง) และวงศ์ *Solanaceae* (ยาสูบ) เป็นต้น (Alabi *et al.,* 2008)

การแพร่ระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังสามารถถ่ายทอดผ่านทางแมลงหวี่ขาวยาสูบ (Whitefly; *Bemisia tabaci* (Gennadius) Hemiptera: *Aleyrodidae*) ซึ่งเป็นการถ่ายทอดไวรัสแบบ persistent และท่อนพันธุ์ที่เป็นโรค (Dubern, 1994; Tokunaga *et al.,* 2018) การแพร่กระจายของโรคสามารถเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว และเป็นบริเวณกว้าง จะเกิดขึ้นเมื่อมีการเคลื่อนย้ายท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคร่วมกับการแพร่กระจายของแมลงหวี่ขาว รายงานพบว่า ในแมลงหวี่ขาวเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแรงลมในอัตรา 100 กิโลเมตรต่อปี หรือ 0.2 เมตรต่อวินาที (Legg, 2010) แมลงหวี่ขาวเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีพืชอาศัยกว้าง เช่น กะเพรา โหระพา ผักชีฝรั่ง พืชตระกูลพริก มะเขือ มันฝรั่ง และพืชตระกูลแตง (Shah and Liu, 2013) เป็นต้น และถูกจัดว่าติดอันดับ 1 ใน 10 ของแมลงศัตรูพืชที่อันตรายที่สุด (Riordan, 2019) อาการของโรคใบด่างในสำปะหลังคือ ใบด่างเหลือง ใบเสียรูปทรง ลดรูป และยอดที่แตกใหม่จะมีลักษณะอาการด่าง ลำต้นแคระแกร็น เจริญเติบโตช้า ทำให้การสร้างหัวมันสำปะหลังลดลง (Legg *et al.,* 2006) ถ้าใช้ท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคปลูกอาการจะเริ่มแสดงในใบยอดที่แตกใหม่ ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับช่วงเวลาที่ต้นพืชได้รับเชื้อ และพันธุ์ของมันสำปะหลังที่เกษตรกรใช้ปลูก ถ้าเป็นพันธุ์อ่อนแออาการที่แสดงจะรุนแรง เช่น ใบหงิก บิดม้วน และด่างทั้งใบ เป็นต้น ลักษณะอาการของโรคที่แสดงสามารถใช้จำแนกชนิดของการติดเชื้อไวรัสได้ คือ การติดเชื้อไวรัสจากท่อนพันธุ์พบลักษณะอาการด่างทั้งต้น ตั้งแต่ใบยอดจนถึงใบแก่ด้านล่าง ในกรณีที่แมลงหวี่ขาวเป็นแมลงพาหะ อาการจะแสดงเฉพาะใบยอดเท่านั้น (Sseruwagi *et al.,* 2004) โดยช่วงเวลาการสังเกตควรเป็นช่วงที่มันสำปะหลังมีอายุ 1–4 เดือน เนื่องจากใบด้านล่างยังไม่ร่วงจากลำต้น

หลักการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลังสามารถทำได้โดย 1) การใช้มาตรการสุขอนามัยพืช (Phytosanitary) 2) การใช้พันธุ์ต้านทาน (Disease resistance varieties) 3) การเขตกรรม (Cultural practices) และ 4) การควบคุมประชากรแมลงพาหะ (Vector control) (Thresh and Cooter, 2005) การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรค ซึ่งพันธุ์ต้านทานที่ให้ผลผลิตสูงตรงตาม

ความต้องการของเกษตรกรไทยยังอยู่ในขั้นตอนการพัฒนา อย่างไรก็ตาม ปัจจุบัน กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร หน่วยงานของรัฐและเอกชนร่วมกันรณรงค์ส่งเสริมให้เกษตรกรใช้พันธุ์สะอาดเป็นต้นพันธุ์ และเมื่อสำรวจพบต้นมันสำปะหลังที่เป็นโรคให้ทำการถอน (Roguing) และนำออกทำลายนอกแปลงเพาะปลูก ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะช่วยชะลออัตราการเกิดโรคให้ช้าลง โรคใบด่างสำปะหลังรายงานพบครั้งแรกที่ประเทศแทนซาเนีย ในปี ค.ศ. 1894 ปัจจุบันการแพร่ระบาดได้ขยายวงกว้างไปยังประเทศต่าง ๆ ในทวีปแอฟริกา มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคพบว่า ประเทศที่ประสบความสำเร็จในการใช้ท่อนพันธุ์สะอาดปลูกทดแทนพื้นที่ที่มีการระบาดมาก่อน เช่น แทนซาเนีย (Storey, 1936; Childs, 1957) ยูกันดา (Jameson, 1964; Otim-Nape *et al.,* 1998; Otim-Nape *et al.,* 2000) เคนย่า และไอวอรี่โคสต์ (Fauquet *et al.,* 1988) เป็นต้น

ปัญหาสำคัญที่ส่งผลให้การระบาดของโรคในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลา 3 ปีที่ผ่านมา คือ การเคลื่อนย้ายท่อนพันธุ์ การขาดแคลนท่อนพันธุ์สะอาด และการระบาดของแมลงหวี่ขาวเกษตรกรมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เก็บท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคไว้ปลูกในฤดูกาลต่อไป รวมทั้งซื้อท่อนพันธุ์ที่ไม่ทราบแหล่งที่มา ซึ่งส่งผลให้โรคระบาดอย่างรวดเร็ว ไม่สามารถควบคุมได้ งานวิจัยนี้มีจุดเริ่มต้นจากปัญหาการระบาดของโรคที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จากการใช้ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่เป็นโรคปลูกในฤดูกาลเพาะปลูก 2562/2563 ที่ผ่านมา วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อเปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อไวรัส Sri Lankan cassava mosaic virus ในมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ห้วยบง 60 และ CMR-89 ที่ปลูกโดยใช้ท่อนพันธุ์สะอาดนำมาจากแหล่งที่เชื่อถือได้ เปรียบเทียบกับท่อนพันธุ์ของเกษตรกร พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่ได้จากฤดูเพาะปลูก 2562/2563 ในพื้นที่ระบาดของโรค อำเภอตาพระยา จังหวัดสระแก้ว ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดการการแพร่ระบาดของเชื้อ และควบคุมโรคได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมท่อนพันธุ์สะอาด

สำรวจแปลงมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU50), ห้วยบง 60 (HB60) และ CMR-89 ที่ใช้ผลิตเพื่อขยายท่อนพันธุ์ของสถาบันพัฒนามันสำปะหลัง อำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ไม่มีรายงานการระบาดของโรค ทำการสำรวจในช่วง 1 เดือนก่อนการเก็บเกี่ยว วิธีการสำรวจคือเดินสำรวจทุกต้น ระยะห่างระหว่างแถวให้อยู่ในรัศมีที่สามารถมองเห็น สังเกตอาการของโรค จากการสังเกตที่ใบยอด ถ้าต้นที่เป็นโรคจะมีลักษณะใบด่าง ในส่วนของต้นพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 นำมาจากแปลงของเกษตรกรที่พบต้นที่เป็นโรค ในพื้นที่อำเภอตาพระยา จังหวัดสระแก้ว

การเตรียมแปลงปลูก

เตรียมดินสำหรับปลูกมันสำปะหลังโดยไถดะ 1 ครั้ง และไถพรวน 1–2 ครั้ง ยกร่องปลูกมันสำปะหลัง ระยะห่างระหว่างสันร่อง 1 เมตร ระยะห่างระหว่างต้น 1 เมตร ปลูกโดยใช้ท่อนพันธุ์ที่มีความยาว 20–25 เซนติเมตร ก่อนปลูกแช่ท่อนพันธุ์ด้วยสาร 2% ไทอะมีโทแซม เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเพลี้ย เมื่อมันสำปะหลังอายุ 1 เดือน กำจัดวัชพืชโดยใช้แรงงานคน และใส่ปุ๋ยสูตร 15-7-18

การประเมินโรค

การประเมินอัตราการเกิดโรค เมื่อมันสำปะหลังมีอายุ 1 เดือน และทำการประเมินทุกเดือนจนกระทั่งมันสำปะหลังมีอายุครบ 4 เดือน การประเมินโรคทำโดยสำรวจมันสำปะหลังทุกต้น จดบันทึกจำนวนต้นที่เป็นโรค ลักษณะอาการ ระดับความรุนแรง สาเหตุ

ของการติดเชื้อไวรัส (ท่อนพันธุ์หรือแมลงหวี่ขาว) ซึ่งอัตราการเกิดโรคอ้างอิงจาก (Waller *et al.,* 2002)

$$\text{อัตราการเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนพืชที่เป็นโรค}}{\text{จำนวนพืชทั้งหมด}} \times 100$$

ระดับความรุนแรงของโรค (Disease severity) อ้างอิงจาก Terry (1976) ซึ่งแบ่งระดับความรุนแรงออกเป็น 5 ระดับ คือ ระดับ 1 ไม่แสดงอาการของโรค (Highly resistant) ระดับ 2 แสดงอาการด่างเล็กน้อยบนแผ่นใบ (Moderately resistant) ระดับ 3 แสดงอาการด่างเต็มบนแผ่นใบ และใบเริ่มม้วน ลดรูป (Tolerant) ระดับ 4 แสดงอาการด่างทั่วทั้งใบ ใบบิดม้วนงอ เริ่มลดรูป (Susceptible) และระดับ 5 แสดงอาการใบบิดม้วนงอ ใบลดรูปอย่างรุนแรง (Highly susceptible)

การสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจเชื้อไวรัส SLCMV

ตรวจสอบลักษณะการแฝงของเชื้อไวรัส (Latent infection) ที่แสดงอาการ asymptomatic ในมันสำปะหลังทั้ง 3 พันธุ์ ที่ปลูกจากท่อนพันธุ์สะอาด เมื่อมันสำปะหลังมีอายุ 4 เดือน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังพันธุ์ละ 30 ต้น บันทึกลักษณะอาการของแต่ละตัวอย่าง วิธีการเก็บตัวอย่างอ้างอิงจาก Siriwan *et al.* (2020) โดยการเดินทแยงมุมจากขอบแปลงเป็นรูป X เก็บตัวอย่างใบตำแหน่งที่ 3–4 นับลงมาจากยอด แต่ละตัวอย่างห่างกัน 3 ต้น ตัวอย่างใบที่สุ่มเก็บจะถูกนำใส่ถุงพลาสติกโดยบันทึก ชื่อพันธุ์ และตำแหน่งที่เก็บให้ถูกต้อง ตัวอย่างทั้งหมดนำมาตรวจสอบเชื้อไวรัสในขั้นตอนต่อไป

การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

สกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังที่ได้จากเก็บตัวอย่าง โดยดัดแปลงวิธีของ Doyle (1987) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SLCMV โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *AV1* ที่แปลรหัสได้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส (Coat protein, CP) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ คือ sense 5’GTT GAA GGT ACT TAT TCC C’3 และ antisense 5’TAT TAA TAC GGT TGT AAA’3 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1XPCR buffer (PCR Biosystems, UK) 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward และ reverse (10 pmol/µl) อย่างละ 1 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบ (10 ng/µl) 1 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ปฏิกิริยา PCR ถูกนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เครื่อง DNA Thermo Cycler (Bio Rad, USA) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอประกอบด้วย initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 40 วินาที ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (Gel electrophoresis) โดยใช้ 1.2% agarose ใน 0.5X TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ท่อนพันธุ์สะอาด จำนวน 3 พันธุ์ คือ เกษตรศาสตร์ 50 ห้วยบง 60 และ CMR-89 ได้คัดเลือกมาจากแปลงผลิตท่อนพันธุ์ของมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย โดยคัดเลือกจากต้นมันสำปะหลังที่ไม่แสดงอาการ และไม่มีประวัติการระบาดของโรคในพื้นที่ที่ผลิตท่อนพันธุ์ การทราบประวัติของแปลงมันสำปะหลังมีความสำคัญในการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกพื้นที่ผลิตท่อนพันธุ์สะอาด ในส่วนของท่อนพันธุ์เปรียบเทียบในการทดลอง

นี้คือ ท่อนพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่ได้จากในพื้นที่อำเภอตาพระยา จังหวัดสระแก้ว ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคค่อนข้างรุนแรงในฤดูกาลเพาะปลูก 2561/2562

ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังทั้งหมดถูกปลูกที่แปลงเกษตรกร อำเภอตาพระยา จังหวัดสระแก้ว โดยแต่ละพันธุ์ปลูกในเนื้อที่ 1 ไร่ รวมพื้นที่ปลูกทั้งหมดประมาณ 4 ไร่ ซึ่งการทดลองครั้งนี้ปลูกเป็นพื้นที่ขนาดใหญ่เพื่อคล้ายคลึงกับการปลูกในพื้นที่จริงของเกษตรกร การปลูกเชื้อไวรัสเป็นการปลูกเชื้อโดยธรรมชาติ โดยอาศัยแมลงหวี่ขาวเป็นแมลงพาหะในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส ในส่วนของท่อนพันธุ์เปรียบเทียบที่ได้จากเกษตรกรในพื้นที่ หลังจากที่ปลูกไปแล้ว 1 เดือน สังเกตอาการด่าง ใบบิดม้วน ในบริเวณส่วนของยอดที่ใบแตกใบใหม่ แสดงดัง Figure 1 ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ท่อนพันธุ์ดังกล่าวเป็นท่อนพันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส (Minato *et al.,* 2019) ในขณะที่ ต้นมันสำปะหลังที่ปลูกจากท่อนพันธุ์สะอาดไม่แสดงอาการผิดปกติหลังจาก 1 เดือนที่เพาะปลูก แต่อาการใบด่างแสดงเมื่อต้นมันสำปะหลังมีอายุ 2 เดือน ลักษณะอาการที่พบมีสาเหตุมาจากแมลงหวี่ขาวเป็นพาหะในการถ่ายทอดโรค โดยแสดงอาการใบด่างเฉพาะบริเวณใบยอด ลักษณะอาการบนใบมันสำปะหลังที่พบในแปลงปลูกที่ปลูกจากท่อนพันธุ์สะอาดและท่อนพันธุ์ของเกษตรกร อาการของโรคใบด่างมันสำปะหลังคล้ายคลึงกันคือ ใบด่างเหลือง และยอดที่แตกใหม่จะมีลักษณะอาการด่าง ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวพบได้ทั่วไปในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค

Figure 1 Cassava mosaic disease symptoms in cassava one month old

ผลของการประเมินโรคหลังจากมันสำปะหลังมีอายุ 2, 3 และ 4 เดือน พบอัตราการเกิดโรคของแปลงมันสำปะหลังที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์สะอาด พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และห้วยบง 60 พบอัตราการเกิดโรคในเดือนที่ 2, 3 และ 4 เฉลี่ย 0.85, 1.4 และ 2.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่แปลงมันสำปะหลังที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ของเกษตรกรพบอัตราการเกิดโรค 49, 51 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเกิดโรคของแปลงมันสำปะหลังที่ใช้ท่อนพันธุ์สะอาดพันธุ์ CMR-89 กับแปลงที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ของเกษตรกร พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของแปลงท่อนพันธุ์สะอาดในเดือนที่ 2, 3 และ 4 เพียง 2.6, 7.5 และ 16.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 The results of disease incidence and severity in difference cassava seed sources

Evaluation types	Type of planting materials	Month of evaluation		
		2nd	3rd	4th
Disease incidence (%)	Cleaned seed_KU50	0.9	1.7	3.1
	Cleaned seed_HB60	0.8	1.1	2.2
	Cleaned seed_CMR-89	2.6	7.5	16.0
	Farmer seed_KU50	49.0	51.0	55.0
Disease severity	Cleaned seed_KU50	2.8	3.2	3.2
	Cleaned seed_HB60	3.0	3.3	3.2
	Cleaned seed_CMR-89	3.4	3.3	3.4
	Farmer seed_KU50	2.9	3.4	3.3

ผลการตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลังเบื้องต้นด้วยเทคนิค PCR (Figure 2) ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า คล้ายกับเชื้อไวรัส Sri Lankan cassava mosaic virus ที่ค่า identity เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกันกับที่มีรายงานระบาดในประเทศไทย ราชอาณาจักรกัมพูชา และสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม (Wang *et al.,* 2016; Minato *et al.,* 2019; Siriwan *et al.,* 2020) ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส SLCMV ด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการโดยสุ่มเก็บจากแปลงท่อนพันธุ์สะอาดทั้ง 3 พันธุ์ พบว่า พันธุ์ CMR-89, ห้วยบง 60 และเกษตรศาสตร์ 50 พบเชื้อไวรัส 10, 3.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

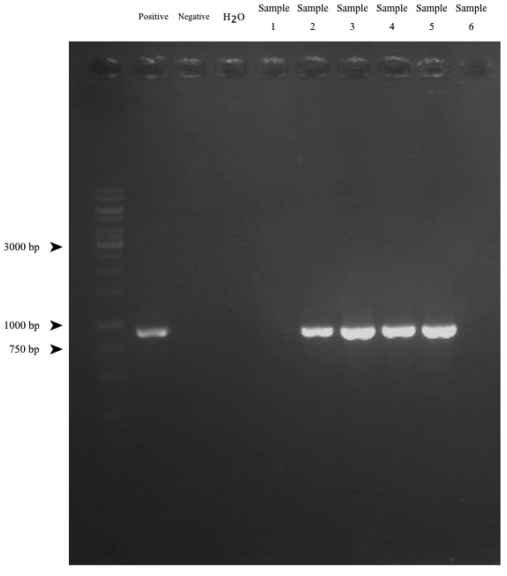

Figure 2 PCR diagnostic method for detecting the Sri Lankan cassava mosaic disease

จากรายงานของ Hemniam *et al.* (2019) ที่เปรียบเทียบความรุนแรงของโรคใบด่างมันสำปะหลังในพันธุ์การค้าของไทยด้วยวิธีการ grafting พบว่า มันสำปะหลังพันธุ์ CMR-89 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อไวรัส SLCMV ในขณะที่ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และห้วยบง 60 ค่อนข้างทนทานต่อเชื้อไวรัส จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ท่อนพันธุ์สะอาดที่อ่อนแอต่อโรคในการเพาะปลูกมีผลทำให้การเกิดโรคต่ำกว่าการใช้พันธุ์ทนทานที่ไม่ได้รับรองว่าเป็นท่อนพันธุ์สะอาด ดังนั้น การใช้ท่อนพันธุ์สะอาดมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการควบคุมการระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลัง

การใช้ท่อนพันธุ์ปลอดโรคเป็นหนึ่งในหลักการควบคุมโรคพืชมีสาเหตุจากเชื้อไวรัส (Attathom, 2009) ท่อนพันธุ์ปลอดโรคโดยทั่วไปต้องมีการตรวจสอบเชื้อไวรัสในระดับห้องปฏิบัติการ และท่อนพันธุ์ปลอดโรคที่ได้จะใช้สำหรับงานวิจัย สำหรับในส่วนของเกษตรกรการคัดเลือกท่อนพันธุ์ที่ไม่แสดงอาการจากแปลงปลูกที่ห่างจากแหล่งของโรคประมาณ 250 เมตร และไม่มีประวัติการพบโรคมาก่อนซึ่งท่อนพันธุ์ลักษณะดังกล่าวจัดเป็นท่อนพันธุ์สะอาด จะเห็นได้ว่าคัดเลือกท่อนพันธุ์สะอาดเกษตรกรสามารถปฏิบัติได้ตนเอง การคัดเลือกท่อนพันธุ์สะอาดเป็นการสังเกตจากลักษณะอาการซึ่งผู้ที่ทำการคัดเลือกต้องสามารถแยกลักษณะอาการของโรคได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม ท่อนพันธุ์ที่ผ่านการคัดไม่ได้การันตีว่าไม่มีเชื้อไวรัส ซึ่งเชื้อไวรัสอาจจะแฝงซึ่งส่งผลให้พืชไม่แสดงอาการ ดังนั้น ในช่วง 1–3 เดือนหลังจากการปลูกด้วยท่อนพันธุ์สะอาดเกษตรกรต้องมีการสำรวจแปลง เมื่อพบต้นที่เป็นโรคต้องถอนทำลาย ซึ่งจะมีผลให้การควบคุมการระบาดของโรคด้วยการใช้ท่อนพันธุ์สะอาดประสบความสำเร็จ (Thresh and Cooter, 2005)

สรุป

งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อไวรัส Sri Lankan cassava mosaic virus ในมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ห้วยบง 60 และ CMR-89 ที่ปลูกโดยใช้ท่อนพันธุ์สะอาดนำมาจากแหล่งที่เชื่อถือได้ เปรียบเทียบกับท่อนพันธุ์ของเกษตรกร พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่ได้จากฤดูเพาะปลูก 2562/2563 ในอำเภอตาพระยา จังหวัดสระแก้ว ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค ผลจากการประเมินโรคพบว่า อัตราการเกิดโรคของแปลงมันสำปะหลังที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์ของเกษตรกรในเดือนที่ 2, 3 และ 4 คือ 49, 51 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่แปลงมันสำปะหลังที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์สะอาด พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และห้วยบง 60 พบอัตราการเกิดโรคในเดือนที่ 2, 3 และ 4 เดือน เฉลี่ย 0.85, 1.4 และ 2.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเกิดโรคของแปลงมันสำปะหลังที่ใช้ท่อนพันธุ์สะอาด พันธุ์ CMR-89 กับแปลงที่ปลูกด้วยท่อนพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ของเกษตรกร พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของแปลงท่อนพันธุ์สะอาดในเดือนที่ 2, 3 และ 4 เพียง 2.6, 7.5 และ 16.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ผลของการสุ่มตรวจเชื้อไวรัส Sri Lankan cassava mosaic virus ในต้นที่ไม่แสดงอาการของโรคด้วยเทคนิค PCR พบว่า พันธุ์ CMR-89 ห้วยบง 60 และเกษตรศาสตร์ 50 พบเชื้อไวรัส 10, 3.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า วิธีการใช้ท่อนพันธุ์สะอาดเพาะปลูกในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค สามารถลดอัตราการเกิดโรคและควบคุมการระบาดโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อไวรัส Sri Lankan cassava mosaic virus ในเบื้องต้นได้ และสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดการโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยมูลนิธิพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

Alabi, O.J., F.O. Ogbe, R. Bandyopadhyay, P.L. Kumar, A.G. Dixon, J.D. Hughes and R.A. Naidu. 2008. Alternate hosts of African cassava mosaic virus and East African cassava mosaic Cameroon virus in Nigeria. Arch Virol. 153: 1743–1747.

Attathom, S. 2009. Virus Disease of Plant. Petrung Kanpim, Nonthaburi, Thailand. 206 pp. (In Thai)

Brown, J.K., F.M. Zerbini, J. Navas-Castillo, E. Moriones, R. Ramos-Sobrinho, J.C. Silva, E. Fiallo-Olivé, R.W. Briddon, C. Hernández-Zepeda, A. Idris, V.G. Malathi, D.P. Martin, R. Rivera-Bustamante, S. Ueda and A. Varsani. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. Arch Virol. 160: 1593–1619.

CIAT. 2018. GCP21 calls for regional approach to stem the outbreak of cassava mosaic disease in Southeast Asia. Available Source: https://blog.ciat.cgiar.org/press-release-gcp21-calls-for-regional-approach-to-stem-the-outbreak-of-cassava-mosaic-disease-in-southeast-asia/, October 12, 2020.

Childs, A.H.B. 1957. Trials with virus resistant cassavas in Tanga province, Tanganyika. E. Afr. Agr. J. 23: 135–137.

Doyle, J.J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 19: 11–15.

Dubern, J. 1994. Transmission of African cassava mosaic geminivirus by the whitefly *(Bemisia tabaci*). Trop. Sci. 34: 82–91.

Fauquet, C., D. Fargette and J.C. Thouvenel. 1988. Some aspects of the epidemiology of African cassava mosaic virus in Ivory Coast. Trop. Pest Manag. 34: 92–96.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019. The current status of SLCMV in Thailand. Available Source: https://www.ippc.int/en/countries/thailand/pestreports/2019/03/the-current-status-of-slcmv-in-thailand/, April 10, 2019.

Hemniam, N., K. Saokham, S. Roekwan, S. Hunsawattanakul, J. Thawinampan and W. Siriwan. 2019. Severity of cassava mosaic disease in resistance and commercial varieties by grafting. *In* Proc. the 14th National Plant Protection Conference. 12–14 November 2019. p. 163. (in Thai)

Jameson, J.D. 1964. Cassava Mosaic Disease in Uganda. East. Afr. Agr. For. J. 29: 208–213.

Legg, J.P. 2010. Epidemiology of a whitefly-transmitted cassava mosaic geminivirus pandemic in Africa, pp. 233–257. *In* P. Stansly and S. Naranjo, eds. Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest. Springer, Dordrecht.

Legg, J.P., B. Owor, P. Sseruwagi and J. Ndunguru. 2006. Cassava mosaic virus disease in east and central Africa: epidemiology and management of a regional pandemic. Virus Res. 67: 355–418.

Minato, N., S. Sok, S. Chen, E. Delaquis, I. Phirun, V.X. Le, D.D. Burra, J.C. Newby, K.A. Wyckhuys and S.D. Haan. 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. 14: e0212780.

Office of Agricultural Economics. 2019a. Cassava production capacity information. Available Source: http://impexp.oae.go.th/service/export.php?S_YEAR=2562&E_YEAR=2562&PRODUCT_GROUP=5263&wf_search=&WF_SEARCH=Y, October 12, 2020.

Office of Agricultural Economics. 2019b. Cassava cultivation area information. Available Source: http://www.oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/%E0%B8%9E%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B8%98%E0%B8%B8%E0%B9%8C%E0%B8%A1%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B8%AA%E0%B8%B3%E0%B8%9B%E0%B8%B0%E0%B8%AB%E0%B8%A5%E0%B8%B1%E0%B8%87%2061.pdf, October 12, 2020.

Office of Agricultural Economics. 2020. Situation analysis of cassava mosaic disease. Available Source: https://www.nabc.go.th/disaster/baidang, October 12, 2020.

Otim-Nape, G.W., A. Bua, J.M. Thresh, Y. Baguma, S. Ogwal, G. Ssemakula, G. Acola and B. Byabakama. 2000. The current pandemic of cassava mosaic virus disease in Uganda. *In* D.G. Jones, eds. The Epidemiology of Plant Diseases. Springer, Dordrecht.

Otim-Nape, G.W., J.M. Thresh and M. Shaw. 1998. The incidence and severity of cassava mosaic virus disease in Uganda: 1990-92. Trop. Sci. 38: 25–37.

Riordan, K.A. 2019. 10 insect pests that threaten the world's plants. Available Source: https://www.kew.org/read-and-watch/insect-pests-biggest-threat-plants, April 10, 2019.

Shah, M.M.R. and T.X. Liu. 2013. Feeding experience of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) affects their performance on different host plants. PLOS ONE. 8: e77368.

Siriwan, W., J. Jimenez, N. Hemniam, K. Saokham, D. Lopez-Alvarez, A.M. Leiva, A. Martinez, L. Mwanzia, L.A. Becerra Lopez-Lavalle and W.J. Cuellar. 2020. Surveillance and diagnostics of the emergent Sri Lankan cassava mosaic virus (Fam. Geminiviridae) in Southeast Asia. Virus Res. 285: 197959.

Sseruwagi, P., W.S. Sserubombwe, J.P. Legg, J. Ndunguru and J.M. Thresh. 2004. Methods of surveying the incidence and severity of cassava mosaic disease and whitefly vector populations on cassava in Africa: a review. Virus Res. 100: 129–142.

Storey, H.H. 1936. Virus diseases of East African plants. E. Afr. Agr. J. 1: 333–337.

Terry, E. 1976. Description and evaluation of cassava mosaic disease in Africa. *In* Proc. An Interdisciplinary Workshop. Ibadan, Nigeria. pp. 53–54.

Thresh, J.M. and R.J. Cooter. 2005. Strategies for controlling cassava mosaic virus disease in Africa. Plant Pathol. 54: 587–614.

Tokunaga, H., T. Baba, M. Ishitani, I.K. Kasumi, O.K. Le, K. Maejima, S. Namba, K. Natsuaki and N.V. Dong. 2018. Sustainable management of invasive cassava pests in Vietnam, Cambodia, and Thailand, pp. 131–157. *In* M. Kokubun and S. Asanuma, eds. Crop Production under Stressful Conditions. Springer, Singapore.

Waller, J.M., J.M. Lenné and S.J. Waller. 2002. Plant Pathologist's Pocketbook. CABI Pub., New York, USA. 528 pp.

Wang, H.L., X.Y. Cui, X.W. Wang, S.S. Liu, Z.H. Zhang and X.P. Zhou. 2016. First report of Sri Lankan cassava mosaic virus infecting cassava in Cambodia. Plant Dis. 100: 1029.

Yadava, P., G. Suyal and S.K. Mukherjee. 2010. Begomovirus DNA replication and pathogenicity. Curr. Sci. 98: 360–368.