ผลของสาร Purine nucleoside ต่อการควบคุมโรคใบด่างในท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง
Effect of purine nucleoside for controlling cassava mosaic disease in cassava cuttings

อติพร นิยมธรรม, วันวิสา ศิริวรรณ์ , ศรีหรรษา มลิจารย์, อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช
Atiporn Niyomthama , Wanwisa Siriwana, Srihunsa Malichan , Udomsak Lertsuchatavanich
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
Corresponding author: agrusl@ku.ac.th

บทคัดย่อ
โรคใบด่างมันสำปะหลัง (Cassava mosaic disease) สาเหตุจากเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) เป็นโรคที่สำคัญที่ทำให้ผลผลิตมันสำปะหลังในประเทศไทยลดลงอย่างมาก นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการขาดแคลนพันธุ์มันสำปะหลังสะอาดในการเพาะปลูกอีกด้วย งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสาร purine nucleoside (PN) ในการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลังในท่อนพันธุ์ ด้วยการแช่ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่เป็นโรคไวรัสใบด่าง 2 พันธุ์ ได้แก่ ระยอง 9 และ เกษตรศาสตร์ 50 ในสาร PN 500 ppm นาน 15 30 45 และ 60 นาที ก่อนปลูก ผลการทดลองพบว่าต้นกล้าที่แช่ในสาร PN 500 ppm นาน 60 นาที มีโรคใบด่างต่ำที่สุด ในพันธุ์ระยอง 9 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 45.67% มีดัชนีการเกิดโรค 32.67% พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 50.50% ดัชนีการเกิดโรค 31.67 % นอกจากนี้ผลการตรวจปริมาณเชื้อในต้นกล้ามันสำปะหลังพบว่าเมื่อระยะเวลาแช่นานขึ้นจะมีปริมาณเชื้อลดลง ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าสาร purine nucleoside สามารถลดความรุนแรงโรคใบด่างมันสำปะหลังในท่อนพันธุ์ได้
คำสำคัญ: โรคใบด่างมันสำปะหลัง, พิวรีน นิวคลีโอไซด์, การควบคุมโรค

Abstract
Cassava mosaic disease (CMD), caused by *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV), is a major disease that has led to a substantial reduction in cassava yield in Thailand. In addition, it has resulted in a shortage of clean cassava planting materials for cultivation. This experiment aimed to evaluate the effect of purine nucleoside (PN) on the control of cassava mosaic disease in cassava stem cuttings. Infected stem cuttings of two cassava cultivars, Rayong 9 and Kasetsart 50, were soaked in a PN solution at a concentration of 500 ppm for 15, 30, 45, and 60 minutes. The results showed that seedlings soaked in 500 ppm PN for 60 minutes exhibited the most effective disease control. In cultivar Rayong 9, disease incidence was 45.45% and disease severity index 32.67%. In cultivar Kasetsart 50, disease incidence was 50.50%, and the disease severity index was 31.67%. Furthermore, analysis of viral concentrations in cassava seedlings indicated that longer soaking durations resulted in lower viral concentrations. These experiments demonstrate that PN can reduce the severity of cassava mosaic disease in infected stem cuttings.
Keywords: Cassava mosaic disease, purine nucleoside, disease control

คำนำ
ในการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลังสามารถทำได้ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้พันธุ์ต้านทาน การใช้พืชปลอดโรค การเขตกรรม และการควบคุมแมลงพาหะโรค (Thresh and Cooter, 2005) เป็นต้น ซึ่งการใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรค แต่การปรับปรุงพันธุ์ต้านทานเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลานาน ซึ่งการควบคุมโรคโดยสารเคมีเป็นอีกวิธีที่นิยมปฏิบัติของเกษตรกร เพราะเป็นวิธีที่ง่ายสะดวกและรวดเร็ว เห็นผลได้เร็ว (นิพนธ์, 2553) สารในกลุ่ม purine nucleoside (PN) ที่มีฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อไวรัสชนิดสารพันธุกรรมแบบ DNA โดยขัดขวางการสร้างและสังเคราะห์ DNA polymerase ของเชื้อไวรัส ทำให้ไวรัสไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ (Zenchenko et.al., 2022) และมีการทดสอบเบื้องต้นในการนำสาร PN มาควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลังที่ติดมากับท่อนพันธุ์ได้ (ชมพูนุท, 2564; จิดาภา, 2564) งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ PN ในการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลังที่ติดมากับท่อนพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ
1.การเตรียมท่อนพันธุ์และการแช่สาร purine nucleoside

เก็บตัวอย่างท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 และ เกษตรศาสตร์ 50 ที่แสดงอาการโรคใบด่างมันสำปะหลังชัดเจน ได้แก่มีอาการใบด่างเหลือง และบิดงอเสียรูปทรง นำท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคใบด่างมา 3 ต้น ยาวประมาณ 1.5 เมตร ตัดท่อนพันธุ์ให้มีความยาว 7-8 เซนติเมตร ให้ได้ทั้งหมด 60 ท่อน โดยคละส่วนต่างๆ ของต้น แบ่งออกเป็น 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ดังนี้
กรรมวิธีที่ 1 แช่ด้วย purine nucleoside 500 ppm นาน 15 นาที
กรรมวิธีที่ 2 แช่ด้วย purine nucleoside 500 ppm นาน 30 นาที
กรรมวิธีที่ 3 แช่ด้วย purine nucleoside 500 ppm นาน 45 นาที
กรรมวิธีที่ 4 แช่ด้วย purine nucleoside 500 ppm นาน 60 นาที
กรรมวิธีที่ 5 ชุดควบคุม

เมื่อแช่ท่อนพันธุ์ครบตามกรรมวิธีต่างๆนำท่อนพันธุ์มาเพาะในถาดเพาะชำขนาด 280x540 มม. โดยใช้ดินผ่านการฆ่าเชื้อเป็นวัสดุปลูก บันทึกผลผลการทดลอง ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความงอกมันสำปะหลัง เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของมันสำปะหลัง ประเมินความรุนแรงของโรคใบด่าง โดยดัดแปลงเกณฑ์การประเมินโรค (Disease severity) จาก Ariyo et al. (2015) และ Fauquet and Fargette (1990) ซึ่งแบ่งระดับความรุนแรงเป็น 5 ระดับ ดังนี้

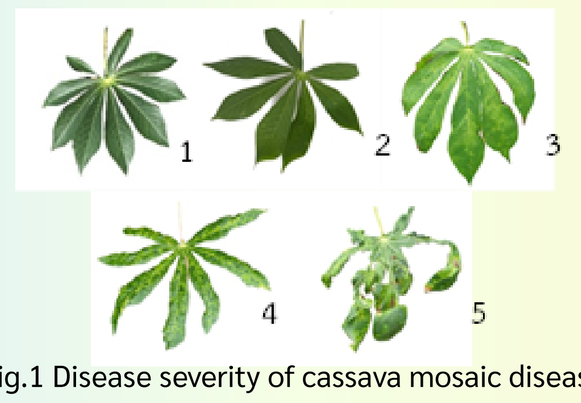

Fig.1 Disease severity of cassava mosaic disease

2.การตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัส SLCMV ด้วยเทคนิค RT-PCR

เก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังในกรรมวิธีต่างๆ ที่อายุ 60 วัน แบ่งเก็บใบมันสำปะหลัง กรรมวิธีละ 12 ซ้ำ สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบมันสำปะหลังด้วยวิธี CTAB method (Doyle and Doyle, 1987) ตรวจเชื้อไวรัส SLCMV ด้วยเทคนิค qPCR โดยใช้ 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne, Estinia) ด้วยไพรเมอร์ SLCMV_CP_F(5’ TTA GAG GTT TTG CGT TAA GTC CG 3’), SLCMV_CP_R (5’TGT ACA GCA TCA ATG CAT TCT CG 3’) ซึ่งจำเพาะต่อส่วน coat protein และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน cytochrome coxidase I (COXI) เป็น reference gene ในเครื่อง Real-Time PCR (CFX96 Connect Real-Time PCR System, Bio-Red, U.S.) คำนวณการแสดงออกของยีนจากสมการ 2-ΔΔCT (Livak and Schmittgen, 2001)

ผลการทดลอง

Treatment	%Germination		ค่าเฉลี่ย
	R9	KU50	
Tr1 purine nucleoside 500 ppm 15min	75.00 b	75.00 b	75
Tr2 purine nucleoside 500 ppm 30min	100.00 a	100.00 a	100
Tr3 purine nucleoside 500 ppm 45min	100.00 a	91.67 a	95.83
Tr4 purine nucleoside 500 ppm 60min	100.00 a	100.00 a	100
Tr5 control	100.00 a	100.00 a	100
ค่าเฉลี่ย	95	93.3	
LSD (0.05) พันธุ์ x treatment	10.34		
CV (%) พันธุ์	4.84		
CV (%) treatment	28.26		
CV (%) พันธุ์ x treatment	4.84		

Table 1 Germination of cassava Rayong 9 and Kasetsart 50 varieties at 30 days

Treatment	%Germination		ค่าเฉลี่ย
	R9	KU50	
Tr1 purine nucleoside 500 ppm 15min	75.00 ab	83.00 ab	79.00
Tr2 purine nucleoside 500 ppm 30min	90.83 ab	58.33 ab	74.58
Tr3 purine nucleoside 500 ppm 45min	54.33 ab	63.67 ab	59.00
Tr4 purine nucleoside 500 ppm 60min	45.67 b	50.50 b	48.03
Tr5 control	100.00 a	100.00 a	100
ค่าเฉลี่ย	73.17	71.10	
LSD (0.05) พันธุ์ x treatment	48.27		
CV (%) พันธุ์	7.84		
CV (%) treatment	67.50		
CV (%) พันธุ์ x treatment	29.52		

Table 2 Disease incidence (%) of cassava Rayong 9 and Kasetsart 50 varieties at 30 days

Treatment	%Germination		ค่าเฉลี่ย
	R9	KU50	
Tr1 purine nucleoside 500 ppm 15min	57.33 ab	40.00 b	48.67
Tr2 purine nucleoside 500 ppm 30min	63.50 ab	53.33 ab	58.42
Tr3 purine nucleoside 500 ppm 45min	38.17 b	45.67 ab	42.92
Tr4 purine nucleoside 500 ppm 60min	32.67 b	31.67 b	32.17
Tr5 control	91.00 a	53.33 ab	72.17
ค่าเฉลี่ย	56.53	44.80	
LSD (0.05) พันธุ์ x treatment	47.91		
CV (%) พันธุ์	63.42		
CV (%) treatment	74.31		
CV (%) พันธุ์ x treatment	41.72		

Table 3 Disease index (%) of cassava Rayong 9 and Kasetsart 50 varieties at 30 days

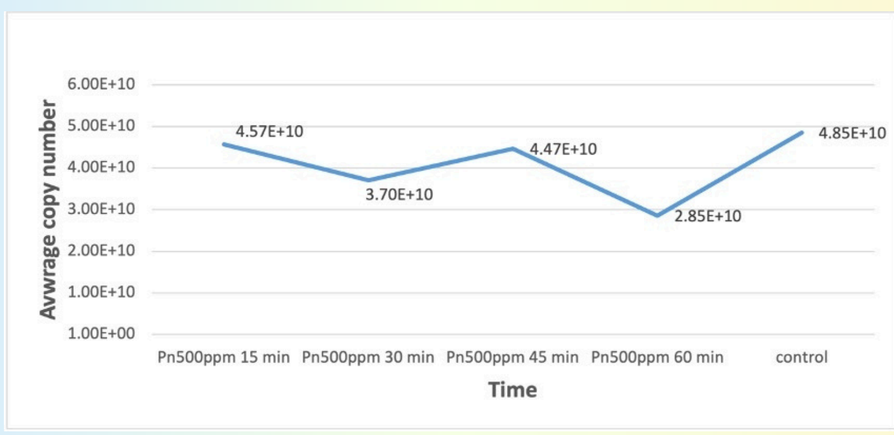

Fig.2 Average copy number of SLCMV in cassava Rayong 9 variety

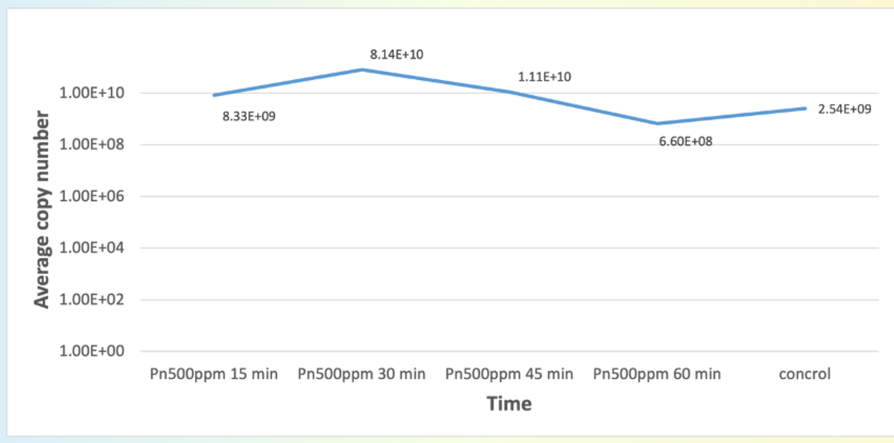

Fig.3 Average copy number of SLCMV in cassava KU50 variety

สรุป
จากการศึกษาประสิทธิภาพของสาร PN ในการควบคุมโรคใบด่างในท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 และเกษตรศาสตร์ 50 พบว่ากรรมวิธีที่แช่ในสาร PN 500 ppm นาน 60 นาที มีประสิทธิภาพดีที่สุดมีดัชนีการเกิดโรคใบด่างมันสำปะหลัง 32.67 % และ 31.67 % ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัส SLCMV ด้วยเทคนิค RT-PCR พันธุ์ระยอง 9 มีปริมาณเชื้อไวรัส 2.85x1010 copies น้อยกว่าชุดควบคุม 2.0x1010 copies ส่วนพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 มีปริมาณเชื้อไวรัส 6.60x108 copies น้อยกว่าชุดควบคุม 1.10x109 copies จากผลการทดลองข้างต้น จึงสรุปได้ว่าการแช่ท่อนพันธุ์ในสาร PN ก่อนปลูก สามารถช่วยลดความรุนแรงของโรคใบด่างและปริมาณเชื้อไวรัสในต้นมันสำปะหลังได้ แต่ไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสในท่อนพันธุ์มันสำปะหลังได้

เอกสารอ้างอิง
Ariyo, O.A., A.G.O. Dixon, G.I. Atiri, E.W. Gachomo and S.O. Kotchoni. 2015. Disease resistance characterisation of improved cassava genotypes to cassava mosaic disease at different ecozones. *Arch. Phytopathology Plant Protect*. 48: 504-518.
Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11–15.
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/, December 10, 2024.
Fauquet, C. and D. Fargette. 1990. African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology and control. Plant Dis. 74: 404–411.
Havey, M.J. 1996. CMV resistance in three sources of cucumber. Cucurbit Genet coop. 19: 2-33.
Legg, J. P., Owor, B., Sseruwagi, P. and J. Ndunguru. 2006. Cassava mosaic virus disease in east and central Africa: Epidemiology and management of a regional pandemic. Advances in Virus Research, 67: 255-418.
Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402–408.
Thresh, J.M. and Cooter, R.J. 2005. Strategies for Controlling Cassava Mosaic Disease in Africa. Plant Pathology, 54: 587-614.
Zenchenkoa, M. S. Drenicheva, I. A. Il’ichevaa, and S. N. Mikhailova. 2021. Antiviral and Antimicrobial Nucleoside Derivatives: Structural Features and Mechanisms of Action. Molecular Biology. Vol.55, No.6, 786–812.
จิดาภา เทือกท้าวสาร. 2565. การควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลังด้วยการแช่น้ำร้อนและสารเคมีในแปลงปลูก. ปัญหาพิเศษ. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
ชมพูนุช แก้วนวม. 2565. การศึกษาการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลังด้วยการแช่น้ำร้อนและสารเคมี. ปัญหาพิเศษ. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.