

ความสัมพันธ์ของความรุนแรงของโรคใบไหม้มันสำปะหลังและปริมาณไซยาไนด์ ในใบมันสำปะหลังพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย

Relation of severity of cassava bacterial blight disease and cyanide content in leaf of cassava cultivars in Thailand

อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช^{1*} รัชดา เสงี่ยมโค่น¹ ภัศรี คงศีล² และกฤตยา เพชรผึ้ง³

Udomsak Lertsuchatavanich^{1*}, Ratchada Sengprakhon¹, Pasajee Kongseen² and Krittaya Petchpoung³

Abstract

Our relations between HCN content in the leaf of cassava and bacterial blight disease severity, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) was investigated. The results indicated that in the older leaves at the lower part of stem, the leaves had more disease severity and lower amount of HCN, while opposite results were observed in the younger leaves of the plant. In laboratory test, it was demonstrated that HCN released from cassava leaf was able to affect the growth of Xam in the medium. When Xam was incubated with different amount of macerated cassava leaves from 0.1 to 1.0 g, the inhibition of growth of Xam was increased from 99.24% to 99.89% compared to the control. The correlation of HCN content in leaf tissue of commercial cultivars and bacterial blight disease severity was also evaluated. The results showed that cultivars with the highest to lowest bacterial blight disease severity were Kasetsart 50, Rayong 72, Rayong 5, Huay Bong 60, Huay Bong 80 and Rayong 11, respectively, whereas, the cultivars with the highest to lowest HCN contents were Rayong 72, Kasetsart 50, Rayong 5, Huay Bong 60, Huay Bong 80 and Rayong 11, respectively. In summarization, this study indicated the negative correlation between HCN content in cassava leaves and severity of bacterial blight disease caused by Xam.

Keywords: cassava, bacterial blight disease, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, cyanogenic glycoside, hydrogen cyanide

¹ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Bangkok 10900, Thailand.

²ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900

²Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Bangkok 10900, Thailand.

³ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

³Scientific Equipment and Research Division, Kasetsart University Research and Development Institute

Kasetsart University, Bangkok, Bangkok 10900, Thailand.

รับเรื่อง : เมษายน 2557

* Corresponding author: agrusl@ku.ac.th

บทคัดย่อ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย โดยปกติแล้วมันสำปะหลังเป็นพืชที่มีปัญหาของศัตรูพืชน้อย เนื่องจากมีกลไกการป้องกันตัวจากศัตรูพืชโดยการผลิตสารไฮโดรเจนไซยาไนด์เมื่อเนื้อเยื่อถูกศัตรูพืชเข้าทำลาย การศึกษาความสัมพันธ์ของไฮโดรเจนไซยาไนด์ในมันสำปะหลังกับโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) ในการทดลองนี้ พบว่าโรคใบไหม้จะมีอาการรุนแรงกับใบตำแหน่งล่างของต้นซึ่งเป็นใบแก่และมีปริมาณไฮโดรเจนไซยาไนด์ต่ำ เมื่อเทียบกับใบส่วนยอดที่มีอาการรุนแรงน้อยกว่าเนื่องจากมีปริมาณไฮโดรเจนไซยาไนด์สูงกว่า โดยไฮโดรเจนไซยาไนด์ที่ปลดปล่อยจากใบจะมีผลกระทบต่ออาการเจริญของเชื้อ Xam การทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อที่มีใบมันสำปะหลังบดตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.0 กรัม พบว่าเชื้อ Xam มีการเจริญลดลงตั้งแต่ 99.24 ถึง 99.89% นอกจากนี้ยังทำการทดลองหาความสัมพันธ์ของไฮโดรเจนไซยาไนด์ในใบมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆกับโรคใบไหม้ พบว่าพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคใบไหม้จากมากไปหาน้อยที่สุดได้แก่ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ระยะ 72 ระยะ 5 ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 และระยะ 11 ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ที่มีปริมาณไฮโดรเจนไซยาไนด์ในใบจากมากไปหาน้อยที่สุด ได้แก่ พันธุ์ระยะ 72 เกษตรศาสตร์ 50 ระยะ 5 ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 และระยะ 11 ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารไฮโดรเจนไซยาไนด์ในมันสำปะหลังมีความสัมพันธ์กับกับความรุนแรงของโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ Xam

คำนำ

โรคใบไหม้ของมันสำปะหลัง (cassava bacterial blight) มีสาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) (Vauterin *et al.*, 1995) เป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อมันสำปะหลังในทวีปอเมริกาใต้ และแอฟริกา (Lazano, 1986) ส่วนในประเทศไทยพบการระบาดของโรคนี้ในช่วงฤดูฝน อาการของโรคจะเกิดจุดดำน้ำ อยู่ระหว่างเส้นใบ จุดมีรูปร่างเป็นเหลี่ยม เมื่ออาการพัฒนามากขึ้นจะทำให้ใบไหม้ และมีหยดเชื้อสีขาวขุ่นเกาะอยู่ใต้ใบ ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย (bacterial ooze) อาการของโรคส่วนมากเกิดกับใบที่อยู่ส่วนล่างของทรงพุ่มใกล้กับระดับดินก่อน เมื่อเชื้อลามเข้าสู่ก้านใบทำให้ใบเหี่ยว หลุดร่วง และทำให้ต้นแห้งตายได้ เมื่อผ่าดูระบบท่อน้ำท่ออาหารของลำต้นจะมีสีคล้ำ เนื่องจากเนื้อเยื่อถูกทำลาย ในต้นที่มีอาการรุนแรงจะพบอาการยางไหลบนส่วนก้านใบหรือลำต้นที่ยังอ่อนได้ด้วย (Lazano, 1986; Lertsuchatavanich, 2003)

มีการศึกษาความต้านทานของมันสำปะหลัง ต่อโรคใบไหม้ว่ามีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ เช่น ความสัมพันธ์ของพันธุ์ (cultivar) มันสำปะหลัง และสายพันธุ์ของเชื้อ Xam (Restrepo *et al.*, 2000)

ความสามารถในการสลายตัวของมันสำปะหลัง ปริมาณเชื้อ Xam ที่เข้าทำลาย และความสามารถของเชื้อ Xam ในการเข้าครอบครองระบบท่อน้ำเลี้ยง (Boher and Daniel, 1985) การผลิตสาร lignin suberin และ callose ในระบบท่อน้ำเลี้ยงของมันสำปะหลัง (Kpemoua *et al.*, 1996) แต่มีรายงานว่าความต้านทานโรคไม่เกี่ยวข้องกับปริมาณของสารฟีนอลในใบมันสำปะหลัง (Teles *et al.*, 1993)

นอกจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้ต่างๆ ข้างต้นแล้ว ปกติมันสำปะหลังจะมีกลไกการป้องกันการเข้าทำลายจากศัตรูพืช เนื่องจากในเนื้อเยื่อของมันสำปะหลัง จะมีสารไซยาโนเจนิกไกลโคไซด์ (cyanogenic glycoside, CG) เมื่อถูกศัตรูพืชเข้าทำลาย สารนี้จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ linamarase แล้วปลดปล่อยสารไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide, HCN) ออกมา ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อศัตรูพืชต่างๆ ปริมาณของ CG ในมันสำปะหลังจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น พันธุ์ สภาพแวดล้อม การปฏิบัติดูแลและอายุของพืช เป็นต้น โดยสาร CG จะถูกสร้างขึ้นที่ใบและเคลื่อนย้ายมายังราก (Siritunga and Sayre, 2004)

มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของสาร HCN กับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในพืชที่สร้างสาร CG และพืชที่ไม่สร้างสาร CG พบว่าเชื้อ *Pseudomonas* มีความอ่อนแอต่อ HCN มากกว่าเชื้อ *Xanthomonas* และเชื้อ Xam มีความทนทานต่อ HCN ได้สูงกว่าเมื่อเทียบเชื้อ *Xanthomonas* อื่นๆ จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในพืชที่สร้างสาร CG ไม่มีความแตกต่างในความทนทานต่อ HCN อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสาเหตุโรคในพืชที่ไม่สร้างสาร CG (Rust *et al.*, 1980) นอกจากนี้ยังมีรายงานความสัมพันธ์ของปริมาณสาร CG ในมันสำปะหลังกับความต้านทานต่อศัตรูพืชต่างๆ เช่น ตี๊ดแตน (*Zonocerus variegates*) (Bernays *et al.*, 1977) และด้วง *Cyrtomenus bergi* (burrowing bug) (Bellotti and Arias, 1993) จะเข้าทำลายมันสำปะหลังพันธุ์ที่มีสาร CG ต่ำมากกว่า หรือในกรณีของโรคใบด่างมันสำปะหลัง (cassava mosaic disease, CMD) พบว่ามันสำปะหลังที่มีอาการโรค CMD รุนแรงจะมีการสะสม CG สูงมากกว่าต้นที่มีอาการของโรค CMD ปานกลาง และต้นที่ไม่มีอาการโรค (Tumwesigye *et al.*, 2006) เป็นต้น

ในประเทศไทยซึ่งมีมันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและปลูกกันอย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่มียางานถึงข้อมูลความสัมพันธ์ของโรคกับปริมาณ HCN ในมันสำปะหลังมาก่อน จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการทำการศึกษให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว ที่อาจเป็นอีกปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในมันสำปะหลัง และนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ ในการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคต่อไปในอนาคต โดยในการทดลองนี้ได้เลือกศึกษากับโรคใบไหม้ของมันสำปะหลัง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การทดสอบความรุนแรงของโรคใบไหม้มันใบตำแหน่งต่าง ๆ ของต้นมันสำปะหลัง

นำเชื้อ *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) สายพันธุ์ Xam5601 ที่แยกได้จากมันสำปะหลังเป็นโรคใบไหม้อ.ด่านขุนทด จ.นครราชสีมา เลี้ยงบนอาหาร yeast

extract dextrose calcium carbonate agar (YDC) (Schaad *et al.*, 2001) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นสารละลายในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ โดยปรับค่าความขุ่นของสารละลายเชื้อให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml โดยการวัดค่าการดูดซับแสงด้วยเครื่อง spectro photometer ที่ความยาวช่วงแสง 600 นาโนเมตร ให้มีค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 นำเชื้อที่ได้ไปทำการปลูกเชื้อด้วยวิธี leaf clipping method (Thaveechai *et al.*, 1993) บนใบมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5 และ ระยอง 72 อายุ 1 เดือน ที่ตำแหน่งต่างๆ ของต้น ได้แก่ ส่วนยอด กลาง และล่างของต้นอย่างละ 5 ซ้ำต่อต้น เป็นจำนวน 2 ต้น บันทึกระดับความรุนแรงของโรคโดยจัดแปลงวิธีการประเมินมาจาก Leksomboon (1988) และเก็บส่วนของใบย่อยในใบเดียวกันที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไปวัดปริมาณ HCN ด้วย picrate paper (Bradbury *et al.*, 1999)

2. การทดสอบผลของไซยาไนด์ในใบมันสำปะหลังต่อการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

ทำการทดสอบผลของ HCN ในใบมันสำปะหลังต่อการเจริญของเชื้อ Xam โดยจัดแปลงวิธีการมาจาก Lertsuchatavanich *et al.* (2011) นำเชื้อ Xam5601 มาเลี้ยงบนอาหาร YDC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นสารละลายในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ โดยปรับค่าความขุ่นของสารละลายเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.2 O.D. ที่ 600nm จะมีเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml ทำสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ 10 ไมโครลิตร หยดบนอาหาร nutrient agar (Schaad *et al.*, 2001) และปล่อยให้แห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำใบมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 จากส่วนกลางของต้นมาบดให้ละเอียด ชั่งใบที่บดน้ำหนัก 0.1 0.3 0.5 และ 1.0 กรัม ใส่บนผาจานเลี้ยงเชื้อแล้วปิดจานเลี้ยงเชื้อ โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อให้ด้านที่มีอาหารอยู่ด้านบนใช้ผ้าเทปโพลีไวนิล คลอไรด์พันให้สนิทจำนวน 3 ซ้ำ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลการเจริญของเชื้อโดยใช้ cork borer เบอร์ 6 เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตร เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่มีโคโลนีของเชื้อเจริญ ใส่ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลา 5

นาที่ ให้เชื้อละลายในน้ำ แล้วนำสารละลายเชื้อไปวัดค่าการดูดซับแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงแสง 600 นาโนเมตร และบันทึกผล

3. ความสัมพันธ์ของปริมาณไฮยาไนต์ในใบมันสำปะหลังพันธุ์การค้าต่าง ๆ ต่อความรุนแรงของโรคใบไหม้

นำเชื้อ Xam มาเลี้ยงบนอาหาร YDC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นสารละลายในน้ำกลั่นหนึ่งขวด โดยปรับค่าความขุ่นของสารละลายเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 0.2 OD ที่ 600nm จะมีเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml นำเชื้อไปปลูกบนใบส่วนกลางของต้นมันสำปะหลังพันธุ์การค้า 6 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ระยะของ 5 ระยะของ 11 ระยะของ 72 ห้วยบง 60 และ ห้วยบง 80 ด้วยวิธี leaf clipping method และใช้ cork borer เบอร์ 5 ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เก็บส่วนของใบย่อยในใบเดียวกันที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไปวัดปริมาณ HCN ด้วย picrate paper และบันทึกความรุนแรงของโรคใบไหม้โดยวัดความยาวของอาการใบไหม้ที่เกิดขึ้น

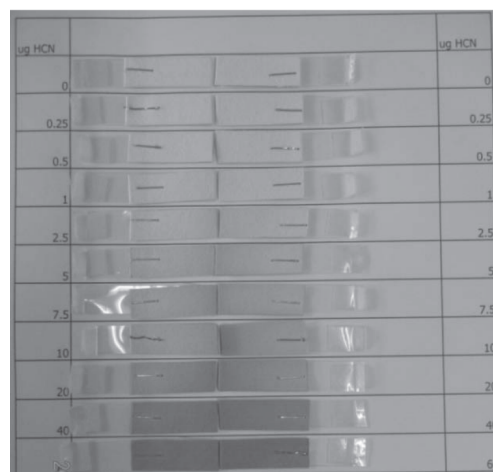
4. การวัดปริมาณไฮโดรเจนไฮยาไนต์ในใบมันสำปะหลัง

การวัดปริมาณไฮโดรเจนไฮยาไนต์ (hydrogen cyanide, HCN) อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาเคมีระหว่าง

HCN กับ picric acid (2, 4, 6-trinitrophenol) ได้เป็นสารประกอบสีน้ำตาลของสาร 2,6-dinitro-5-hydroxy-4-hydroxylamino-1, 3-dicyanobenzene หรือ isopurpuric acid ($C_8H_3O_6N_5$) (Williams and Edwards, 1980)

ทำการเตรียม picrate paper สำหรับวัดปริมาณไฮโดรเจนไฮยาไนต์ในใบมันสำปะหลังโดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Bradbury *et. al* (1999) โดยนำกระดาษกรอง Whatman® no. 3 แช่ในสารละลาย picrate (0.5 % picric acid ที่ละลายในสารละลาย 2.5 % sodium carbonate) แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง ตัด picrate paper ให้มีขนาด 3×1 เซนติเมตร แล้วนำไปติดกับแผ่นพลาสติกขนาด 5×1 เซนติเมตร

นำ picrate paper ที่ติดบนพลาสติกไปติดกับฝาหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ด้วยกระดาษกาว ใช้ cork borer เบอร์ 5 เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะใบมันสำปะหลังใส่ลงในหลอดทดลอง ตูดสารละลาย 1.0 M phosphate buffer pH 8 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร แล้ววัดใบมันสำปะหลังให้ละเอียดประมาณ 10 วินาที นำฝาหลอดที่มี picrate paper ติดอยู่มาปิดให้สนิท แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 °C) 24 ชั่วโมง นำ picrate paper มาเทียบกับสีมาตรฐาน picrate paper ที่แบ่งเป็น 11 ช่วงสีตามความเข้มข้นของ HCN ที่ 0 0.25 0.50 1.00 2.50 5.00 7.50 10 20 40 และ 60 ไมโครกรัมตามลำดับ(ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การตรวจปริมาณสารไฮโดรเจนไฮยาไนต์ด้วย picrate paper ที่แบ่งเป็น 11 ช่วงสีตามระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไฮยาไนต์ ด้านบนความเข้มข้นน้อย (สีเหลือง) ด้านล่างความเข้มข้นมาก (สีส้ม)

ผลและวิจารณ์

1. การทดสอบความรุนแรงของโรคใบไหม้บนใบ

ตำแหน่งต่าง ๆ ของต้นมันสำปะหลัง

ผลจากการทดลอง พบว่า ความรุนแรงของโรคใบไหม้ในมันสำปะหลังทั้ง 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ระยอง 5 และ ระยอง 72 จะมากที่สุดที่ใบตำแหน่งล่างของต้น โดยมีระดับความรุนแรงเท่ากับ 3.0 และ 1.8 ตามลำดับ และมีความรุนแรงลดลงในใบที่ส่วนกลาง และส่วนบนของต้น ซึ่งพันธุ์ระยอง 5 มีค่าเท่ากับ 2.2 และ 2.8 ส่วนพันธุ์ระยอง 72 มีค่าเท่ากับ 1.8 และ 1.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 1, ภาพที่ 2) และเมื่อนำใบที่ตำแหน่งต่างๆ มาวิเคราะห์พบว่าใบ

ตำแหน่งบนจะมีปริมาณ HCN สูงกว่าส่วนใบล่าง โดยพันธุ์ระยอง 5 ใบตำแหน่งบนมีค่าเท่ากับ 315.79 มก./กก.และเท่ากับ 276.31 มก./กก. ส่วนพันธุ์ระยอง 72 มีค่าเท่ากับ 631.50 มก./กก. และ 484.21 มก./กก. ในใบส่วนบนและล่างตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของความรุนแรงโรคใบไหม้ กับตำแหน่งของใบมันสำปะหลังภายในต้น ว่ามีความรุนแรงมากที่สุดในใบมันสำปะหลังตำแหน่งล่าง และรุนแรงน้อยที่สุดในใบส่วนบน เพราะใบที่ตำแหน่งล่างจะมีปริมาณ HCN ที่ต่ำกว่าส่วนบน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่ามันสำปะหลังที่มีอายุน้อยจะมีการสะสมของ HCN สูงกว่าในมันสำปะหลังที่มีอายุมากกว่า (Tumwesigye *et. al.*, 2006)

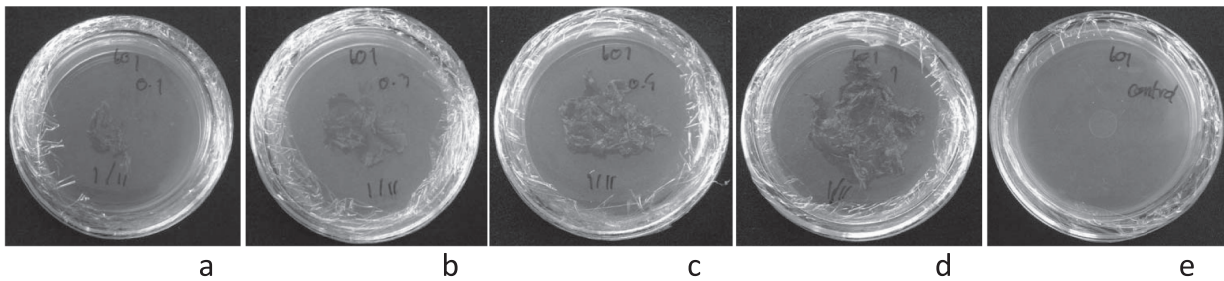
ตารางที่ 1 ความรุนแรงของโรคใบไหม้ที่ตำแหน่งใบต่างๆ ในมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5 และ 72 ที่ 14 วันหลังการปลูกเชื้อ

พันธุ์	ตำแหน่ง ของใบ	ต้นที่ 1					ต้นที่ 2					ความ รุนแรง เฉลี่ย	ปริมาณ HCN (มก./ กก.)
		ระดับความรุนแรงของโรคไหม้ใบ ย่อยที่					ระดับความรุนแรงของโรคไหม้ใบ ย่อยที่						
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
ระยอง5	ใบบน	2*	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2.2±0.4	315.79
	ใบกลาง	3	3	3	2	3	3	3	3	3	2	2.8±0.4	302.63
	ใบล่าง	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3.0±0.0	276.31
ระยอง 72	ใบบน	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1.4±0.5	631.50
	ใบกลาง	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1.8±0.4	568.42
	ใบล่าง	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1.8±0.4	484.21

*ระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้ 1 = แผลไหม้ยาว 0-1 ซม. 2 = แผลไหม้ยาว 1-3 ซม. 3 = แผลไหม้ยาวมากกว่า 3 ซม. 4 = ใบร่วง



ภาพที่ 2 อาการโรคใบไหม้ที่ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* โดยวิธีตัดใบที่นำมาจากตำแหน่งต่างๆ คือ ส่วนบน (a) กลาง (b) และ ล่าง (c) ของต้นมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 5



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* ที่ป้อนด้วยไขมันสำปะหลังสด 0.1(a) 0.3(b) 0.5(c) และ 1.0(d) กรัม เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (e) บนอาหาร nutrient agar ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

2. ผลของไฮโดรเจนไซยาไนด์ในไขมันสำปะหลังต่อการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam)

จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่าในไขมันสำปะหลังที่มี HCN แตกต่างกันทำให้มีความรุนแรงของโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ Xam แตกต่างกัน จึงทดสอบผลของ HCN ในใบต่อการเจริญของเชื้อ Xam โดยนำใบสดส่วนกลางของต้นมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 มาบด แล้วใส่ในจานเลี้ยงที่มีเชื้อ Xam อยู่ พบว่าในกรรมวิธีที่ใส่ไขมันสำปะหลังสดบด 0.1 0.3 0.5 และ 1.0 กรัม มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Xam ทำให้เชื้อลดปริมาณลงอย่างชัดเจนซึ่งอ่านได้จากค่าการดูดซับแสงที่ลดลงจาก 0.916 ในชุดควบคุม เหลือเพียง 0.007 0.006 0.003 และ 0.001 ตามลำดับ หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ Xam เท่ากับ 99.24 99.34 99.67 และ 99.89% ตามลำดับ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 3)

ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้โดย Fry and Evans (1977) พบว่าเชื้อ Xam มีความทนทานต่อ HCN สูงสุดในเชื้อ *Xanthomonas* แต่เชื้อไม่สามารถปรับตัวให้ทนทานต่อ HCN ได้อย่างชัดเจนเหมือนเชื้อราสาเหตุโรคในพืชไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด เช่น เชื้อรา *Gloeocercospora sorghi* สามารถสร้างเอนไซม์ formamide hydro-lyase ซึ่งสามารถเปลี่ยน HCN เป็นฟอรั่มามิด (formamide) ได้ (Fry and Millar, 1972)

3. ความสัมพันธ์ของปริมาณไฮโดรเจนไซยาไนด์ในไขมันสำปะหลังพันธุ์การค้าต่างๆ กับความรุนแรงของโรคใบไหม้

จากการทดลอง พบว่ามันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และระยอง 72 มีระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้ต่ำที่สุด เท่ากับ 1.84 และ 2.05 แตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาได้แก่ พันธุ์ ระยอง 5 ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 และ ระยอง 11 ซึ่งมีระดับความรุนแรงเท่ากับ 2.33 2.40 2.52 และ 3.10 ตามลำดับ ในขณะที่ผลการวัดปริมาณ HCN ในไขมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ พบว่า พันธุ์ระยอง 72 มีปริมาณ HCN สูงสุดเท่ากับ 1,234.70 มก./กก. แตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาได้แก่ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ระยอง 5 ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 และ ระยอง 11 ซึ่งมีปริมาณ HCN เท่ากับ 873.01 693.88 496.24 396.82 และ 348.21 มก./กก. ตามลำดับ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 4)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อ Xam และปริมาณ HCN ในมันสำปะหลัง พบว่าพันธุ์ที่มีปริมาณ HCN ในใบสูงจะมีความรุนแรงของโรคใบไหม้ต่ำ ได้แก่ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และ ระยอง 72 ส่วนพันธุ์ที่มีปริมาณ HCN ในใบต่ำจะมีความรุนแรงของโรคใบไหม้สูง ได้แก่ พันธุ์ระยอง 11 ซึ่งความสัมพันธ์นี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับความต้านทานต่อแมลงศัตรูมันสำปะหลัง โดย Bellotti and Arias (1993) พบว่ามันสำปะหลังที่มี CG สูงจะพบการเข้าทำลายของ

ตั๊กแตน (*Zonocerus variegates*) และด้วง *Cyrtomenus bergi* (burrowing bug) น้อยกว่าในมันสำปะหลังที่มี CG ต่ำ

ในทางกลับกัน มีรายงานความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับข้อมูลข้างต้น พบว่ามันสำปะหลังที่มีอาการโรค cassava mosaic disease (CMD) รุนแรงจะมีการสะสมของ CG ปริมาณสูงกว่ามันสำปะหลังที่มีอาการโรค CMD ปานกลาง หรือไม่มีอาการ (Tumwesigye *et al.*, 2006) และยังมีในกรณีของโรคใบไหม้ของยางพาราที่เกิดจากเชื้อรา *Microcyclus ulei* พบว่าพันธุ์ที่มีปริมาณ CG

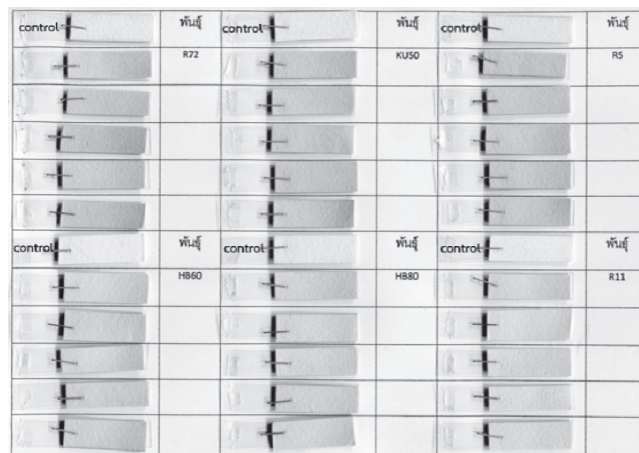
สูงจะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อรามากกว่าพันธุ์ที่มี CG ต่ำ (Lieberei *et al.*, 1989)

picrate paper เป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณ cyanogen 3 รูปแบบ ได้แก่ HCN/CN⁻ acetone cyanohydrins และ limanarin ที่ทำงานและมีประสิทธิภาพ โดยมีการพัฒนามาใช้วัดปริมาณ HCN ในแป้งมันสำปะหลัง (Bradbury *et al.*, 1999) จากผลการตรวจวัด HCN ในใบมันสำปะหลังพันธุ์การค้าต่างๆ พบว่ามีปริมาณ HCN ตั้งแต่ 348.21 ถึง 1,234.70 (มก./กก.)

ตารางที่ 2 ผลของไฮโดรเจนไซยาไนด์จากใบมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 ต่อการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) หลังจากปมเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

กรรมวิธี	ชุด ที่	ค่าการดูดซับแสงของสารละลายเชื้อ Xam	ค่าเฉลี่ย	การยับยั้ง(%)
ใบมันสำปะหลัง 0.0 ก.	1	0.912		
	2	0.934	0.916±0.017	0.00
	3	0.901		
ใบมันสำปะหลัง 0.1 ก.	1	0.007		
	2	0.007	0.007±0.000 (a)	99.24 (c)
	3	0.007		
ใบมันสำปะหลัง 0.3 ก.	1	0.005		
	2	0.008	0.006±0.002 (a)	99.34 (c)
	3	0.006		
ใบมันสำปะหลัง 0.5 ก.	1	0.003		
	2	0.004	0.003±0.001 (b)	99.67 (b)
	3	0.003		
ใบมันสำปะหลัง 1.0 ก.	1	0.002		
	2	0.001	0.001±0.001 (c)	99.89 (a)
	3	0.001		

อักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยวิธี LSD



ภาพที่ 4 ผลการวัดระดับไฮโดรเจนไซยาไนด์ในใบมันสำปะหลังพันธุ์การค้าต่างๆ ด้วย picrate paper

ตารางที่ 3 ปริมาณไฮโดรเจนไซยาไนด์ในใบมันสำปะหลังพันธุ์การค้าต่างๆ กับระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้

พันธุ์	ปริมาณไฮโดรเจนไซยาไนด์(มก./กก.)	ระดับความรุนแรงโรคใบไหม้*
ระยอง 72	1,234.70 a	2.05 c
เกษตรศาสตร์ 50	873.01 b	1.84 c
ระยอง 5	693.88 c	2.33 b
ห้วยบง 60	496.24 d	2.40 b
ห้วยบง 80	396.82 e	2.52 b
ระยอง 11	348.21 e	3.10 a

ระดับความรุนแรงต่อการเกิดโรคไหม้ที่ 14 วัน หลังการปลูกเชื้อ 1 = แผลไหม้ยาว 0-1 ซม. 2 = แผลไหม้ยาว 1-3 ซม. 3 = แผลไหม้ยาวมากกว่า 3 ซม. และ 4 = ใบร่วง

อักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยวิธี LSD

สรุป

โรคใบไหม้ของมันสำปะหลังมีสาเหตุมาจากการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam) แต่ถึงแม้ว่าเชื้อ Xam จะสามารถก่อให้เกิดโรคกับมันสำปะหลังได้ อาการของโรคจะมีระดับความรุนแรงแตกต่างกันตามปัจจัยต่างๆ ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องคือปริมาณ HCN ในใบมันสำปะหลัง จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า HCN ในใบมันสำปะหลังมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ Xam ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ นอกจากนี้การทดสอบในโรงเรือนพบว่าโรคใบไหม้จะมีอาการรุนแรงที่ใบแก่ซึ่งอยู่ส่วนล่างของต้น เนื่องจากมีปริมาณ HCN ในใบต่ำกว่าส่วนบน ซึ่งสอดคล้องกับการ

เกิดโรคใบไหม้ในธรรมชาติที่จะเกิดกับใบส่วนล่างของต้นก่อน เนื่องจากเมื่อมันสำปะหลังมีอายุมากขึ้นจะมีทรงพุ่มใหญ่ขึ้นทำให้ใบส่วนล่างไม่ได้รับแสงและมีความชื้นสูง ทำให้เหมาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อ Xam มันสำปะหลังพันธุ์ที่มี HCN สะสมที่ใบสูงจะมีระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้ต่ำหรือมีความต้านทานต่อโรคสูง โดยพันธุ์การค้าที่มีความต้านทานต่อโรคใบไหม้มากที่สุด ได้แก่ เกษตรศาสตร์ 50 และ ระยอง 72 พันธุ์ที่มีความต้านทานรองลงมา ได้แก่ ระยอง 5 ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 และ ระยอง 11 ตามลำดับ จากการตรวจวัดปริมาณของ HCN ในใบมันสำปะหลัง พบว่าพันธุ์ที่มีปริมาณของ HCN มากที่สุด ได้แก่ ระยอง 72 พันธุ์ที่มีปริมาณ HCN รองลงมา ได้แก่ เกษตรศาสตร์ 50 ระยอง 5 ห้วยบง 60 ห้วยบง

80 และระยะ 11 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า HCN ในใบมันสำปะหลังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคใบไหม้ของมันสำปะหลัง ซึ่งจะเป็นประโยชน์นำมาใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่สนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Bellotti, A.C. and B. Arias. 1993. The possible role of HCN in the biology and feeding behavior of the cassava burrowing bug (*Cyrtomenus bergi* Froeschner: Cyanide: Hemiptera). In Proceedings of the First International Scientific Meeting on Cassava Biotechnology Network, Cartagena de Indias, Colombia 25-28 August 1992, CIAT, Cali Columbia.
- Bernays, E.A., R.F. Chapman, E.M. Leather, A.R. McCaffery, and W.W.D. Modder. 1977. The relationship of *Zonocerus variegates* (L) (Acridoidea: Pyrgomorphidae) and cassava (*Manihot esculenta*). Bulletin of Entomological Research 67: 391-404.
- Boher, B. and J.F. Daniel. 1985. Recherche des sites d' expression de la tolerance vis-à-vis de *Xanthomonas campestris* pathovar manihotis (Arthaud-berthet) Starr chez certains cultivar de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) Agronomie. 5:677-683.
- Bradbury, M.G., S.V. Egan and J.H. Bradbury. 1999. Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. J. Sci. Food Agric. 79:593-601.
- Fry, W.E. and P.H. Evans. 1977. Association of formamide hydrolyase with fungal pathogenicity to cyanogenic plants. Phytopathology. 67:1001-1006.
- Fry, W.E. and R.L. Millar. 1972. Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti*. Arch. Biochem. Biophys. 151:468-474.
- Kpemoua, K., B. Boher, M. Nicole, P. Calatayud and J.P. Geiger. 1996. Cytochemistry of defense response in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Canadian Journal of Microbiology. 42: 1131-1143
- Lazano, J.C. 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. Plant Disease. 70: 1089-1093.
- Lieberei, R., Biehl, B., Giesemann, A., and Junqueira, N.T.V. 1989. Cyanogenesis inhibits active defense reactions in plants. Plant Physiol. 90: 33-36.
- Leksomboon, C. 1988. Detection and disease rating of bacterial blight of cassava caused by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. M.S. thesis, Kasetsart University. Bangkok. (in Thai)
- Lertsuchatavanich, U., C. Butkit and N. Thaveechai. 2011. Effect of Biofumigants from Brassica Degradation on Controlling of Tomato Wilt Bacterium, *Ralstonia solanacearum*. Agri cultural Sci. J. 42(3): 391-402. (in Thai)

- Lertsuchatavanich U. 2012. Diseases and Insects Pest of Cassava. Department of Plant Pathology. Faculty of Agriculture. Kasetsart University. 63 p. (in Thai)
- Rust, L.A., W.E. Fry, and Beer, S.V. 1980. Hydrogen cyanide sensitivity in bacterial pathogens of cyanogenic and non-cyanogenic plants. *Phytopathology* 70:1005-1008.
- Restrepo S., M.C. Duqueand and V. Verdier. 2000. Characterization of pathotypes among isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Columbia. *Plant Pathology*. 49: 680-687.
- Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN 373pp.
- Siritunga, D. and R.T. Sayr. 2004. Engineering cyanogens synthesis and turnover in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Molecular Biology*. 56: 661-669.
- Teles, F.F.F., W. Brune, G. Maia, V.E.L. Borges, T.T. Albuquerque, C. Fukuda and R.S. Romeiro. 1993. Tuber HCN and leaf phenols of 16 Brazilian cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars as related to their resistance to bacterial blight. *Rev. Ceres*, 40: 383-389.
- Thaveechai, N., C. Leksomboon, W. Kositratana, A. Paradornuwat and C. Rodjanaridpiched. 1993. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* under natural field condition. *Agricultural Sci. J.* 27: 25-32. (in Thai)
- Tumwesigye, S.K., Y. Baguma, W. Kyamuhangire and G. Mpango. 2006. Association between accumulation of total cyanogens and progression of cassava mosaic disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Uganda Journal of Agricultural Sciences*. 12(1):13-21
- Vauterin, L., B. Hoste, S. Kersters and J. Swing. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systemic Bacteriology*. 45: 472-489.
- Williams, H.J. and T.G. Edwards. 1980. Estimation of cyanide with alkaline picrate. *J. Sci. Food Agri*. 31:15-22.