

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการเพิ่มผลผลิตอ้อย
2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยการบริหารจัดการศัตรูอ้อย
กิจกรรมที่ 3 : การจัดการ โรคใบขาวแบบผสมผสาน
กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : 3.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในอ้อยที่ติดเชื้อโรคใบขาว
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : **Effect of phytoplasma on some biochemical markers in**

phytoplasma infected sugarcane

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางสาวศุภิรัตน์ สงวนรังศิริกุล¹
ผู้ร่วมงาน นางทักษิณา คันสยะวิชัย¹ นางสาวสุนิ ศรีสิงห์²

5. บทคัดย่อ (ภาษาไทย และภาษาอังกฤษ)

การศึกษาเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในต้นอ้อยที่ติดเชื้อโรคใบขาวทำการศึกษาโดยตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับความเครียดจากพืชในกลุ่ม Oxidative stress ปริมาณ โปรตีน และองค์ประกอบและผลผลิตจากการสังเคราะห์แสง ร่วมกับการตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาและการแสดงออกของยีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับความเครียดและการแสดงอาการของโรคในพืช ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์อื่นบางพันธุ์ ผลการตรวจปริมาณเชื้อร่วมกับวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในใบ พบว่าสารที่มีค่าแปรผันตามระดับอาการใบขาวและปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในใบ ประกอบด้วย 3 กลุ่มหลัก คือ (1) สารที่ปริมาณมากขึ้นเมื่อเชื้อมากขึ้นและอาการใบขาวมากขึ้น ได้แก่ Malondialdehyde (MDA) (2) สารที่ปริมาณน้อยลงเมื่อเชื้อมีมากขึ้นและอาการใบขาวมากขึ้น ได้แก่ โปรตีนรวม น้ำตาลรวม และคลอโรฟิลล์ (3) สารที่ปริมาณน้อยลงเมื่อมีอาการใบขาว แต่มีปริมาณมากเมื่อยังไม่มีอาการ หรือมีอาการบางส่วน และมีเชื้อมาก ได้แก่ กิจกรรมเอนไซม์ Ascorbate peroxidase (APX), Hydrogen peroxide (H₂O₂) และสารประกอบฟีนอลิก ส่วนปริมาณชนิดอื่นได้แก่ แป้งรวม โพรตีน สามารถพบได้ทั้งในกลุ่มที่มีปริมาณ

เชื้อสูง กลุ่มที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำ หรือกลุ่มที่มีขบวนการสังเคราะห์แสงผิดปกติ ส่วนกิจกรรมเอ็นไซม์ GUAICOL PEROXIDASE (GPX) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากภาวะดังกล่าว ผลการตรวจการแสดงออกของยีนบางชนิด พบว่ายีนที่มีการแสดงออกมากขึ้นในต้นที่มีอาการใบขาว ได้แก่ ยีน *Sucrose synthase (SuSy)*, *Alcohol dehydrogenase I (AdhI)* และ *Callose synthase (CaSy)*

The investigation on biochemical changes in white leaf disease infected sugarcane were emphasized on oxidative stress response basis, total protein content, photosynthesis components, phytoplasma concentration and expression of some genes responsive for stress and symptom expression in plant. The sugarcane variety Khon Kaen 3 (KK3) and some other varieties were used in the study. It was found that the biochemical parameters that were changed in accordance to white leaf symptom severity and phytoplasma concentrations in leaf tissues can be divided into three groupings. (1) The parameter that increased with the increasing of phytoplasma content and white leaf symptom severity was Malondialdehyde (MDA) content. (2) The parameters that reduced with the increasing of phytoplasma content and white leaf symptom severity were included total protein, total sugar and chlorophyll. (3) The parameters that reduced when phytoplasma content increased and higher white leaf symptom severity, were included Ascorbate peroxidase (APX) activity, Hydrogen peroxide (H_2O_2) and phenolic compound contents. The other parameters, i.e., total starch and proline accumulations could be detected in plant samples harvested high phytoplasma content, in drought stress, or inappropriate photosynthesis conditioned. No changing of GUAICOL PEROXIDASE (GPX) activity was not detected in the white leaf disease infected sugarcane. Investigation of some selected gene expressions revealed that *Sucrose synthase (SuSy)*, *Alcohol dehydrogenase I (AdhI)* and *Callose synthase (CaSy)* were up-regulated in the infected sugarcane with white leaf symptom.

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

² ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี

6. คำนำ

อ้อยเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ปัญหาการเป็นโรคของอ้อยได้สร้างความเสียหายอย่างมากต่อผู้ผลิต โรคที่สำคัญมากและส่งผลกระทบต่อการปลูกอ้อยในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ โรคใบขาวของอ้อย ปัจจุบันมีการระบาดเกือบทุกพื้นที่ โดยปัญหาใหญ่มาจากการใช้ท่อนพันธุ์ที่ติดโรค โรคนี้เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งมีเปลือกจกั้นเป็นแมลงพาหะนำโรค อ้อยที่เป็นโรคจะมีคลอโรฟิลล์ลดลง ใบอ้อยที่เป็นโรคจึงมีสีขาวหรือสีเขียวอ่อน หรือ

ชาวสลับเขียวอ่อน มีการแตกออกเป็นพุ่มฝอยคล้ายกอหญ้า ไม่เจริญเติบโตและตายไป โรคนี้เกิดได้ทุกระยะ การเจริญโดยอาการของโรคจะปรากฏให้เห็นชัดในระยะต้นกล้า ต้นอ้อยที่ได้รับเชื้อเมื่อยังมีความแข็งแรงสมบูรณ์จะไม่ปรากฏอาการให้เห็น แต่จะเป็นอาการแฝง และอาจปรากฏหน่อขนาดเล็ก ๆ บริเวณโคนกอ ก่อนจะแห้งตายไป การเกิดโรคจะรุนแรงมากในอ้อยตอจนไม่สามารถไว้ต่อได้ เป็นผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น

การแพร่กระจายของโรคนี้ นอกจากเกิดจากพาหะแล้ว ส่วนใหญ่มักติดมากับท่อนพันธุ์ ดังนั้น การตรวจต้นแม่พันธุ์ก่อนทำการขยายพันธุ์เป็นสิ่งจำเป็นมาก เพราะต้นแม่พันธุ์อาจจะไม่แสดงอาการ ดังกล่าวไว้ข้างต้น การตรวจโรคใบขาวของอ้อยที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ เทคนิค nested PCR (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2542) และ ELISA (นงลักษณ์ ศรีนทุ, 2536) การตรวจสอบด้วย PCR นั้นให้ผลที่ค่อนข้างแม่นยำ และมีความไวสูงในกรณีที่มีเชื้อจำนวนน้อยมาก แต่ต้องมีขั้นตอนมากใช้เครื่องมือราคาแพง และใช้เวลานาน เนื่องจากต้องทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง ส่วนวิธี ELISA นั้นมีความไวต่ำกว่า อาจมีความผิดพลาด และต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ในการตรวจสอบตัวอย่างปริมาณมากด้วยวิธีดังกล่าวจึงเป็นข้อจำกัด ทั้งในส่วนของงบประมาณในการตรวจและเวลา นอกจากนี้ แม้การตรวจด้วย nested PCR จะให้ผลที่แม่นยำ แต่ในทางปฏิบัติ พบว่าให้ผลผิดพลาดได้ ผลการทดลองของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นพบว่าการตรวจตัวอย่างที่แสดงอาการใบขาวชัดเจนแล้ว สามารถตรวจพบเชื้อได้เพียง 89% จากตัวอย่างใบขาวทั้งสิ้นจำนวน 60 ตัวอย่าง นอกจากนี้ ตัวอย่างอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งผ่านการตรวจเชื้อด้วยวิธีการนี้และพบว่าไม่มีเชื้อ เมื่อนำไปขยายพันธุ์ต่อด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และนำไปปลูกในโรงเรือนที่มีการป้องกันแมลง ยังสามารถพบต้นที่เป็นโรคเป็นโรคใบขาวได้อีกประมาณ 1-2% ยิ่งไปกว่านั้นจากผลการทดลองตรวจอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งอยู่ในกอเดียวกัน แต่มีส่วนที่แสดงอาการใบขาว และส่วนที่ใบยังเป็นสีเขียวอยู่ ด้วยวิธี nested PCR พบว่าส่วนใบขาวสามารถตรวจพบเชื้อได้ ในขณะที่ส่วนที่แสดงใบสีเขียวนั้น ตรวจไม่พบเชื้อ แสดงว่าวิธีการให้ผลที่ไม่แม่นยำเท่าที่ควร และอาจจะไม่ใช้วิธีการที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อ เนื่องจากวิธี nested PCR เป็นการตรวจหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ หากไม่มีเชื้ออยู่เลยในตำแหน่งนั้น ก็ไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ ดังนั้นหากมีการทดสอบหาวิธีการอื่น เช่น การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของพืชเมื่อมีการติดเชื้อ ซึ่งอาจมีการแสดงคุณสมบัติไปจากเดิม อาจจะเป็นวิธีการที่มีความไวมากกว่าการตรวจหาชิ้นส่วนของเชื้อด้วยวิธี nested PCR รวมทั้งยังเป็นวิธีการที่ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงมาก ไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำมาใช้ตรวจสอบการติดโรคเบื้องต้นในท่อนพันธุ์ หรือตัวอย่างในแปลงที่มีปริมาณมากได้ จะช่วยให้กำจัดต้นแม่พันธุ์ที่มีเชื้อได้ก่อนที่จะมีการขยาย และลดการระบาดของโรค จากรายงานพบว่าพืชที่มีการติดเชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระภายใน ซึ่งอาจส่งผลให้การทำงานของเอ็นไซม์บางชนิดเปลี่ยนแปลงไป เป็นปฏิกิริยาต่อต้านของพืชนั้นๆ หรือเชื้ออาจจะปล่อยสารเคมี โปรตีน หรือ เอ็นไซม์บางชนิดออกมาทำลายพืช เช่น white rot fungus (*Pleurotus ostreatus*) จะปล่อยเอ็นไซม์ Laccase 4 ชนิด ออกมาทำลาย

ลิกนิน หรืออ้อยที่อ่อนแอต่อโรคราสนิม (rust) จะมีรูปแบบของเอนไซม์ peroxidase เปลี่ยนแปลงเมื่อเริ่มเป็นโรค (Ramos Real, M., et al., 1989) และในแอปเปิลที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ ribulose 1,5-biphosphate carboxylase และ nitrate reductase ลดลง แต่มีปริมาณของ น้ำตาล แป้ง กรดอะมิโน และแซคคาไรด์ เพิ่มขึ้น (Bermatini, M., et al., 2002)

ในภาวะพืชเกิดการติดเชื้อหรือได้รับความเครียดจากสภาวะแวดล้อม จะเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นภายในต้น oxidative stress เป็นขบวนการหนึ่งที่เกิดขึ้นเมื่อพืชมีความเครียดจากสาเหตุดังกล่าว และเป็นสาเหตุให้กระบวนการต่าง ๆ ของพืชผิดปกติไป โดยพืชจะผลิต reactive oxygen species (ROS) จำนวนมากเพื่อต่อต้านความเครียดดังกล่าว ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ ไฮดรอกซิล (OH-) ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ โมเลกุล โครงสร้าง รวมทั้งขบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ภายในพืช (Hernández and Almansa, 2002) ROS ที่เพิ่มสูงขึ้นในเซลล์ สามารถทำลายพวกโมเลกุล ต่าง ๆ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน DNA และ เกิดกระบวนการ lipid peroxidation มีผลทำให้เมมเบรนเสียหาย และเกิดการรั่วไหลของไอออน (Asada, 1999; Johnson *et al.*, 2003) พืชมีกลไกในการป้องกันอันตรายจากพวก reactive oxygen species โดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant; AOS) ซึ่งมีทั้งกลุ่มเอนไซม์และไม่เอนไซม์ ลดความเป็นพิษจาก ROS ต่าง ๆ ได้ AOS ที่ไม่เอนไซม์ ได้แก่ ascorbate, glutathione, phenolic compound และ tocopherols, พวกที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (PRX), glutathione reductase (GR) (Vaidyanathan *et al.*, 2003 และ Yordanova, 2004) ภายใต้สภาวะปกติของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจน พืชมีการผลิต ROS และมีการสร้างสาร antioxidant เพื่อลดความเป็นพิษ แต่ในสภาวะเครียด พืชจะสร้างเหล่านี้เพิ่มขึ้นเกินกว่าระดับปกติ ทำให้เกิดสภาวะ oxidative Stress ที่มี antioxidant ไม่เพียงพอในการกำจัด ดังนั้นปริมาณสารดังกล่าวรวมทั้งกิจกรรมเอนไซม์สามารถใช้ตรวจว่าพืชได้รับความเครียดหรือไม่ อย่างไร และอาจใช้เป็นวิธีการคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการได้ เช่น Gueta-Dahan *et al.* (1997) พบว่าเอนไซม์ APX สามารถใช้คัดเลือกส้มทนเค็มได้ เนื่องจากเซลล์ของส้มทนเค็มมีการสร้างเอนไซม์ ascorbate peroxidase สูงกว่าเซลล์ส้มไม่ทนเค็มมาก Karanlik *et al.* (2000) พบว่าข้าวสาลีพันธุ์ต้านทานต่อดินเค็ม มีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD, APX และ glutathione reductase (GR) เพิ่มขึ้นเช่นกัน

ในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาหาเอนไซม์ โปรตีน หรือสารชีวเคมีบางชนิด ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในอ้อยที่เป็นโรคใบขาว เพื่อพัฒนาเป็นเทคนิคในการตรวจโรคอย่างง่าย มีความแม่นยำ มีวิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับการคัดเลือก หรือใช้ตรวจสอบตัวอย่างปริมาณมากโดยไม่ต้องใช้งบประมาณสูง สามารถปฏิบัติการทดลองได้ง่ายในห้องปฏิบัติการทั่วไป รวมทั้ง

เพื่อเป็นข้อมูลการในการศึกษาความเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาของอ้อยที่ติดเชื้อใบขาว สำหรับเป็นแนวทางการพัฒนาวิธีการคัดเลือกต้นอ้อยทนโรคใบขาวต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

ตัวอย่างพืช : ใบอ้อยตำแหน่ง 2-5 และ ใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ บันทึกอาการ ประวัติการเป็นโรคใบขาว และตัวแปรอื่น ได้แก่ การให้น้ำ อายุต้น ตำแหน่งใบขาว ฤดูกาลและสภาวะอากาศ

การตรวจหาปริมาณเชื้อ *Phytoplasma* ในใบอ้อย ด้วยเทคนิค nested PCR :

1. การสกัดดีเอ็นเอจากพืชเป็นโรคสกัดดีเอ็นเอจากใบอ้อยโดยตัดแปลงวิธีของ Li and Midmore (1999) เริ่มด้วยบดตัวอย่างใบ 0.2 กรัมใน extraction buffer 800 ul ในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที พลิกหลอดไปมาทุก 10 นาที นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเติม Chloroform : Isoamyl (24 : 1) 500 ul ผสมให้เข้ากัน นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเติม Isopropanol 500 ul พลิกไปมาเบาๆ จนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอ นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วยการเติม 95% ethanol 500 ul คัดให้ตะกอนลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที เติม 95% ethanol 500 ul อีกครั้งหนึ่ง ตากตะกอนให้แห้ง เติมน้ำกลั่นมาเชื้อแล้ว 180 ul รอให้ตะกอนละลาย เติม 5M NaCl 20 ul และ 95% ethanol 200 ul พลิกไปมาจนกระทั่งเห็นสายตะกอนดีเอ็นเอ นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม 70% ethanol 500 ul คัดตะกอนให้ลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที ทำซ้ำ ตากตะกอนจนแห้ง เติม TE buffer ที่มี RNase A 40 ul

2. การตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในใบอ้อยด้วยเทคนิค Nested-PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested-PCR ขั้นตอนแรกใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากบริเวณ 16S-23S rDNA (MLO-X, MLO-Y, P1, P2) ตามรายงานของ พรทิพย์ และคณะ (2542) และใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณตามรายงานของ สุจิรัตน์ และคณะ (2554) มีรายละเอียด ดังนี้ ขั้นที่ 1 ในหลอดทดลองปริมาตร 15 ul ประกอบด้วย 1x buffer, 1.5 mM Mg₂Cl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 uM Primer MLO-X, 0.5 uM Primer MLO-Y, 0.1 U Taq polymerase and DNA template 3 ul นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเจือจางสัดส่วน 1: 100 สำหรับใช้ในขั้นตอนที่ 2 ในหลอดทดลองปฏิกิริยาสุทธิ 15 ul ประกอบด้วย 1x buffer, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 uM Primer P1, 0.5 uM Primer P2, 0.1 U Taq polymerase and DNA template (1st-PCR product) 3 ul และโปรแกรมที่ใช้ในการ

ทดลองนี้ประกอบด้วย 95°C นาน 1 นาที, 55°C นาน 30 วินาที (ขั้นตอนที่ 2 ใช้ 60°C) และ 72°C นาน 1 นาที จำนวนรอบ 24 รอบ (ขั้นตอนที่ 2 ใช้จำนวนรอบ 25 รอบ) นำผลผลิตที่ได้จากทั้ง 2 ขั้นตอน มาผสมกับ loading dye ที่มี SYBER GREEN จำนวน 1.5 μ l ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใช้ 0.5X TBE เป็น buffer ในเวลาประมาณ 40 นาที แล้วนำมาผ่าน agarose gel ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีบางชนิดในอ้อยที่เป็นโรคใบขาว

ตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีบางชนิดด้วยวิธี Colorimetric method ดังนี้

1. Ascorbate Peroxidase Assay (APX) (Allen, 1995)

ชั่งตัวอย่างใบอ้อย 0.1 กรัม บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดสารร่วมกับไนโตรเจนเหลว (ทำ 3 ซ้ำ) เติม extraction buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างแล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำสารละลายส่วนใสที่ได้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ในสารทำปฏิกิริยา ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM hydrogen peroxide และ 0.5 mM ascorbate โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ก่อนเติม hydrogen peroxide เป็นสารสุดท้าย วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ 290 nm บันทึกค่าดูดกลืนแสงที่เวลา 0 และ 1 นาที โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ APX คำนวณจาก μ mol ascorbate ต่อ mg protein ต่อ นาที หรือเท่ากับ Unit ต่อ mg protein

2. Guaiacal Peroxidase Activity (GPX) (Pandolfini, et. al., 1992)

ชั่งตัวอย่างใบอ้อย 0.1 กรัม บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดสารร่วมกับไนโตรเจนเหลว (ทำ 3 ซ้ำ) เติม extraction buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างแล้วเขย่าให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสที่ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ในสารทำปฏิกิริยา ที่มี 60 mM Potassiumphosphate buffer (pH 6.1), 28 mM guaiacal และ 5 mM hydrogen peroxide โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร โดยเติม hydrogen peroxide เป็นสารสุดท้าย วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ 470 nm บันทึกค่าดูดกลืนแสงที่เวลา 0 และ 1 นาที

3. Chlorophylls (Cross, et. al., 2006)

ชั่งตัวอย่างใบอ้อย 0.1 กรัม บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดสารร่วมกับไนโตรเจนเหลว (ทำ 3 ซ้ำ) เติม เอทานอล 80% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างแล้วเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสที่ได้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ 645 nm และ 663 nm แล้วบันทึกค่าดูดกลืนแสง

4. Phenolic compound (Singleton, et. al., 1999)

ชั่งตัวอย่างใบอ้อย 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดสารร่วมกับไนโตรเจนเหลว (ทำ 3 ซ้ำ) เติม เอทานอล 80% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างแล้วเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย 2.5% NaCO₃ ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้ครบ 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำสารละลายส่วนใสที่ได้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ 532 nm แล้วบันทึกค่าดูดกลืนแสง

5. Protein (Bradford, 1976)

ชั่งตัวอย่างใบอ้อย 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดสารร่วมกับไนโตรเจนเหลว (ทำ 3 ซ้ำ) เติมสารละลาย 0.25 NaCl ใน 0.05 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ทำสองรอบ) นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาในข้อที่ 4 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย Bradford reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ 595 nm แล้วบันทึกค่าดูดกลืนแสง

6. Malondialdehyde (MDA) Assay (Heat and Packer, 1968)

ชั่งตัวอย่างใบอ้อย 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดสารร่วมกับไนโตรเจนเหลว (ทำ 3 ซ้ำ) เติม 0.1% (w/v) trichloroacetic acid 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างแล้วเขย่าให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทำปฏิกิริยาในอัตราส่วน 1:4 (v/v) กับ 0.5% 2-thiobarbituric acid ใน 20% Trichloroacetic acid ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็งแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสที่ได้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ 532 nm และ 600 nm แล้วบันทึกค่าดูดกลืนแสง

7. Proline (Troll and Lindsey, 1955)

ชั่งตัวอย่างไบอ้อย 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดสารร่วมกับไนโตรเจนเหลว เติมเอทานอล 80% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างแล้วเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงใน reaction mix ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย ninhydrin 1% (w/v) ในสารละลาย acetic acid 60% (v/v) กับ เอทานอล 20% (v/v) เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสที่ได้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ 520 nm แล้วบันทึกค่าดูดกลืนแสง

8. แป้งและน้ำตาล (Clegg, 1956)

ชั่งตัวอย่างไบอ้อย 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดสารร่วมกับไนโตรเจนเหลว เติมเอทานอล 80% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างแล้วเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกเป็นส่วนใสและตะกอน นำส่วนใสไปวิเคราะห์น้ำตาล โดยเติมสารละลายส่วนใสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 52% perchloric acid ปริมาตร 0.65 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที เจือจางสารละลายตัวอย่างโดยเติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร เติมสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย 1% anthrone ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสที่ได้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ 630 nm แล้วบันทึกค่าดูดกลืนแสง นำตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแป้งโดยย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยการเติมสารละลาย 52% perchloric acid ปริมาตร 0.65 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เจือจางสารละลายตัวอย่างโดยเติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่น 0.98 มิลลิลิตร เติมสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย 1% anthrone ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใสที่ได้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ 630 nm แล้วบันทึกค่าดูดกลืนแสง

เวลาและสถานที่ : ระยะเวลา 2554-2558 สถานที่ดำเนินการ : ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในต้นอ้อยที่ติดเชื้อโรคใบขาวทำการศึกษาโดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับความเครียดจากพืชในกลุ่ม oxidative stress ได้แก่ กิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ได้แก่ Ascorbate peroxidase (APX) และ Guaiacol peroxidase (GPX) เพื่อศึกษาถึงการสลายสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นออกซิเจนและน้ำ และระดับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดจากการกำจัดอนุมูลอิสระ (O_2^-) ที่พืชสร้างขึ้นจากการที่พืชได้รับความเครียดจากสภาพแวดล้อมทั้งมีชีวิต (biotic stress) และไม่มีชีวิต (abiotic stress) วัดปริมาณสาร Malondialdehyde (MDA) เพื่อวิเคราะห์การทำลายของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการ lipid peroxidation วัดปริมาณ โปรตีนรวมเพื่อตรวจสอบการทำงานของระบบต่างๆ ภายในเซลล์ ในช่วงเครียด ศึกษาปริมาณแป้ง น้ำตาล และคลอโรฟิลล์ เพื่อตรวจสอบขบวนการสังเคราะห์แสง ศึกษาปริมาณสาร โปรตีนเพื่อตรวจระดับ osmotic stress ในกลุ่ม abiotic stress ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกซึ่งพืชจะสร้างขึ้นเมื่อถูกโรคและแมลงเข้าทำลาย ศึกษาปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และศึกษาการแสดงออกของยีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับความเครียดและการแสดงอาการของโรคในพืช ทำการศึกษาในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์อื่นบางพันธุ์ ในอ้อยอายุ 4-9 เดือน ใช้ตัวอย่างจากแปลงทดลองในศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ส่วนในกลุ่มอายุ 1-2 เดือนใช้การเพาะกล้าอ้อยในกระบะทรายและให้น้ำ

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในอ้อยที่ติดโรคใบขาวที่เกิดจาก Oxidative stress พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ APX มีการเปลี่ยนแปลงที่ค่อนข้างสัมพันธ์กับการแสดงอาการของโรคใบขาวเด่นชัดกว่า GPX โดยในกลุ่มที่มีอาการใบขาว มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ APX สูงกว่ากลุ่มใบเขียว ในตัวอย่างใบขาวที่มีอาการรุนแรงแล้ว จะมีค่านี้ต่ำ ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า APX ในกลุ่มตัวอย่างอายุ 1 เดือน ที่ไม่มีอาการใบขาว พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.57-1.63 unit การตรวจวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในกลุ่มตัวอย่างเหล่านี้ พบว่ามีปริมาณ 30-41 mg/l ในขณะที่ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างใบขาวอายุ 1 เดือน จำนวนอีก 21 ตัวอย่าง พบมีค่าอยู่ระหว่าง 24.67-66.00 mg/l สูงกว่าช่วงค่าปกติในกลุ่มต้นที่ไม่มีอาการที่อายุเดียวกันซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 15.33-37.66 mg/l แสดงถึงสถานะเครียดที่พืชไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้

ค่า APX ที่สูงขึ้นนี้พบในตัวอย่างทั้งช่วงอายุ 1 เดือน 4-5 เดือน และ 9 เดือน รวมทั้งกลุ่มตัวอย่างเส้นกลางใบเหลืองซึ่งเป็นอาการหนึ่งที่มีพบในกอที่แสดงอาการใบขาวด้วย ในใบที่มีอาการรุนแรงแล้ว จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์นี้ต่ำ สาเหตุจากต้นเข้าสู่ภาวะการตาย ในใบเขียวที่อยู่ในกอขาว ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์นี้สูงเช่นกัน แสดงถึงภาวะเครียดของอ้อยในกอที่มีอาการใบขาวที่มีการสร้างและสลายไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระ และในสภาวะนี้อาจแสดงอาการใบขาวได้หากถูกกระตุ้นด้วยสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม

ในอ้อยที่มีภาวะเครียดจากสภาพแล้ง พบว่ามีค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ APX สูงขึ้นได้เช่นกัน การทดสอบอ้อยที่ไม่มีอาการใบขาวในสภาวะแล้งจัด ในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต (39°C ; 20,000 LUX; 60% RH; 72Hrs) พบว่าใบแสดงอาการม้วนเป็นแฉ่ และมีค่า APX สูงขึ้นกว่าต้นควบคุมที่ไม่ผ่านสภาวะแล้ง โดยมีค่าในช่วง 2.23-2.47 unit และพบว่าปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในกลุ่มตัวอย่างเหล่านี้ค่อนข้างสูง (25.66-31.00 mg/l) เมื่อเทียบกับช่วงค่าปกติ (15.33-51.33 mg/l) ดังนั้นในสภาพนี้ หากพืชมีภาวะติดเชื้อใบขาวร่วมด้วย อาจทำให้เกิดการแสดงอาการใบขาวได้ในระยะต่อมา

อย่างไรก็ตามพบว่า การเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ APX นี้ขึ้นอยู่กับลักษณะประจำพันธุ์ได้ด้วยเช่นกัน จากการทดสอบอ้อย 3 พันธุ์อายุประมาณ 1-2 เดือน ที่ไม่มีอาการใบขาว มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับต่ำกว่า 100 copies / μl (ในดีเอ็นเอพืช 25 ng) มีลักษณะการทนแล้งในระดับต่างกัน ได้แก่ พันธุ์ขอนแก่น 3 และ K88-92 ซึ่งมีรายงานว่าทนแล้ง และพันธุ์ KPK 98-40 ซึ่งไวต่อสภาพแล้ง เมื่อนำมาทดสอบสภาวะแล้งในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต (39°C ; 20,000 LUX; 55% RH; 14:10 Light/dark) เวลานาน 4 วัน และตรวจวัดผลหลังการทดสอบทันที พบว่าค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ APX ของพันธุ์ขอนแก่น 3 มีระดับสูงกว่าค่าปกติ 2.05 เท่า ส่วนพันธุ์ K88-92 และ KPK98-40 มีค่า APX สูงกว่าค่าปกติ 1.29 และ 1.91 เท่าตามลำดับ เช่นเดียวกับค่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่มีค่าสูงขึ้น 2.06, 1.78 และ 1.61 เท่าจากค่าปกติตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์ APX นี้สามารถถูกสร้างขึ้นได้ทั้งจากภาวะเครียดจากการติดเชื้อไฟโตพลาสมา และจากสภาพแล้ง

สำหรับกิจกรรมเอ็นไซม์ Guaiacol peroxidase (GPX) ของต้นใบขาวมีค่าระหว่าง 101.11-228.38 unit ซึ่งอยู่ในกลุ่มค่าสูงของกลุ่มต้นที่ไม่แสดงอาการ โดยค่าปกติอยู่ในช่วง 53.11-212.44 unit จึงทำให้ความแตกต่างของ GPX ชนิดระหว่างกลุ่มที่มีและไม่มีอาการใบขาวไม่ชัดเจนเท่ากับ APX แต่จากการทดสอบในอ้อย 3 พันธุ์ที่มีเชื้อต่ำ และมีลักษณะการทนแล้งในระดับต่างกัน ดังกล่าวข้างต้น พบว่าการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอ็นไซม์ GPX จากสภาพแล้งขึ้นกับพันธุ์ด้วย โดยพบว่า พันธุ์ขอนแก่น 3 มีค่า GPX สูงกว่าค่าปกติถึง 2.05 เท่า ส่วนพันธุ์ K88-92 และ KPK 98-40 มีค่าที่ 1.17 และ 1.08 เท่าของค่าปกติตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอ็นไซม์ GPX อาจเป็นเอ็นไซม์ที่ไม่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไฟโตพลาสมา แต่อาจจะแสดงถึงความแตกต่างในการตอบสนองต่อสภาวะแล้งของแต่ละพันธุ์

ส่วนสาร Malondialdehyde (MDA) ของต้นใบขาวอายุ 1 เดือนพบว่ามีค่าระหว่าง 0.015-0.053 mg/g FW ซึ่งอยู่ภายในช่วงของกลุ่มที่ไม่แสดงอาการที่ค่าปกติอยู่ในช่วง 0.019-0.041 mg/g FW ทั้งนี้พบว่าค่า MDA ที่สูงส่วนใหญ่พบในกลุ่มที่มีอาการใบขาวแล้ว เช่นเดียวกันกับการอ้อยที่อยู่ในสภาวะแล้ง โดยผลการทดสอบอ้อย 3 พันธุ์ที่มีเชื้อดำในสภาพแล้ง ดังกล่าวข้างต้น พบว่ามีค่า MDA สูงขึ้นกว่าค่าปกติ 4.00, 2.46 และ 2.85 เท่าในพันธุ์ขอนแก่น 3 พันธุ์ KPK 98-40 และ K88-92 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า MDA บ่งชี้ถึงสภาวะที่เซลล์บางส่วนถูกทำลายไปทั้งจากการติดเชื้อ และสภาพแล้ง

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในอ้อยที่ติดโรคใบขาว พบว่าต้นที่แสดงอาการใบขาว (อายุ 1 เดือน) มีปริมาณ โปรตีนค่อนข้างสูงแต่ไม่แตกต่างจากช่วงของกลุ่มต้นที่มีอาการขาวเขียว โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 4.30 -7.22 mg/g FW ส่วนค่าปกติของกลุ่มต้นที่ไม่มีอาการอยู่ในช่วง 2.65-6.18 mg/g FW ทั้งนี้กลุ่มต้นที่มีอาการใบขาวอย่างรุนแรงและเริ่มเข้าสู่ภาวะตายแล้วจะมีปริมาณ โปรตีนต่ำกว่าช่วงปกติ เช่นเดียวกันกับการทดสอบในอ้อยที่มีเชื้อดำในสภาวะแล้งดังกล่าวข้างต้น ที่มีปริมาณโปรตีนรวมลดลง 1.27, 1.27 และ 3.11 เท่าในพันธุ์ขอนแก่น 3 พันธุ์ KPK 98-40 และ K88-92 ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในต้นใบขาวอายุ 1 เดือน พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.31-3.39 mg/g FW ส่วนในต้นที่ไม่แสดงอาการใบขาวมีค่าระหว่าง 1.31-2.98 mg/g FW จะเห็นว่าในกลุ่มต้นใบขาวนั้นมีปริมาณสารนี้ครอบคลุมช่วงค่าปกติ และพบว่าในกลุ่มต้นที่มีอาการใบขาวรุนแรงจะสารชนิดนี้ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับกลุ่มต้นที่ไม่แสดงอาการใบขาวแต่มีการติดเชื้อในระดับสูง ซึ่งได้แก่ กลุ่มต้นที่มีอาการเส้นกลางใบเหลือง และกลุ่มใบเขียว ใบขาวเขียว ที่อยู่ในกอใบขาว แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างสารเพื่อต่อต้านการทำลายจากโรค ในกลุ่มต้นอ้อยที่มีเชื้อดำ แต่อยู่ในสภาวะแล้ง สามารถตรวจพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงได้เช่นกัน โดยพบค่าสูงขึ้น 1.6, 2.14 และ 2.5 เท่าจากค่าปกติในพันธุ์ขอนแก่น 3 พันธุ์ KPK 98-40 และ K88-92 ตามลำดับ

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโพรลีนในอ้อยที่ติดโรคใบขาว ในกลุ่มตัวอย่างอายุ 1 เดือน ที่มีอาการใบขาว พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.91-3.74 $\mu\text{mol/g}$ FW ซึ่งอยู่ในช่วงค่าสูงเมื่อเทียบกับค่าปกติของกลุ่มตัวอย่างอายุเดียวกันที่ไม่มีอาการใบขาวซึ่งมีค่านี้อยู่ในช่วง 0.55-2.42 $\mu\text{mol/g}$ FW และพบว่าค่าโพรลีนนี้จะมีค่าสูงในกลุ่มที่มีอาการใบขาว และกลุ่มเส้นกลางใบเหลือง ในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีอาการใบขาวที่ทดสอบภาวะแล้งจัดในตู้ควบคุมสภาวะแวดล้อม พบว่ามีค่าโพรลีนสูงอย่างเด่นชัดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่านี้อยู่ในช่วง 5.34-6.17 $\mu\text{mol/g}$ FW แสดงให้เห็นถึงบทบาทที่ชัดเจนของโพรลีนในการรักษาภาวะออสโมติกในเซลล์พืช จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าอ้อยที่ฟื้นจากการผ่านสภาวะแล้งในตู้ควบคุม บางต้นจะแสดงอาการใบขาวทันทีเมื่อมีการสร้างใบใหม่

ผลการทดสอบอ้อย 3 พันธุ์ที่มีปริมาณเชื้อต่ำในสภาพแล้งดังกล่าวข้างต้น พบว่าตรวจพบปริมาณโพสเฟอรัสสูงกว่าค่าปกติอย่างเด่นชัดเช่นเดียวกัน โดยพบมีค่าสูงถึง 5.9, 5.3 และ 5.4 เท่าในพันธุ์ขอนแก่น 3 พันธุ์ KPK 98-40 และ K88-92 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพืชแสดงภาวะเครียดคอสโมติกได้จากทั้งสภาวะแล้งและการติดเชื้อไฟโตพลาสมา ดังนั้นสภาวะแล้งจึงอาจมีผลต่อการแสดงอาการโรคใบขาวได้ หากต้นมีเชื้อในปริมาณสูงประกอบด้วย และจากการทดสอบเพิ่มเติมพบว่า ในใบที่แสดงอาการขาวเพียงบางส่วนนั้นสามารถกลับเขียวคืนได้เอง เมื่อได้รับน้ำและไม่อยู่ในสภาวะเครียด

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่สัมพันธ์กับการสังเคราะห์แสงในอ้อยที่ติดโรคใบขาว การเปลี่ยนแปลงที่พบได้อย่างเด่นชัด คือ ปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยในอ้อยใบขาวอายุ 1 เดือนมีปริมาณคลอโรฟิลล์ในช่วง 0.11-0.22 mg/g FW ส่วนค่าปกติของกลุ่มต้นที่ไม่มีอาการมีค่าอยู่ในช่วง 0.47-1.09 mg/g FW ในกลุ่มตัวอย่างใบเขียวที่อยู่ในกอขาว รวมทั้งกลุ่มที่มีอาการเส้นกลางใบเหลือง พบว่ามีปริมาณคลอโรฟิลล์ต่ำกว่ากลุ่มกอที่ไม่มีอาการใบขาว

ในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวจะมีปริมาณแป้งและน้ำตาลแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่มีอาการ โดยในกลุ่มที่มีอาการใบขาวจะมีการสะสมแป้งในปริมาณที่สูง แต่มีปริมาณน้ำตาลรวมในปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มไม่มีอาการ โดยค่าปกติของแป้งในต้นอายุ 1 เดือนอยู่ในช่วง 2.56-10.98 mg/g FW ส่วนในใบขาวรุนแรงที่อายุเดียวกัน จะมีค่านี้ต่ำอยู่ในช่วงคล้ายต้นปกติ (1.96-4.72 mg/g FW) ในขณะที่ต้นใบเขียว ขาวเขียว และขาวที่อยู่ในกอขาว จะมีค่าแป้งอยู่ในช่วงค่อนข้างสูงกว่าช่วงปกติ (3.70-34.36 mg/g FW) ส่วนในอ้อยที่อยู่ในสภาวะแล้ง ในขณะที่ใบยังม้วนเป็นลักษณะคล้ายเส้นนั้น พบว่าการสะสมแป้งสูงกว่าช่วงค่าปกติได้เช่นกัน โดยมีค่าในช่วง 11.17-15.65 mg/g FW ผลการทดสอบอ้อย 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ขอนแก่น 3 พันธุ์ KPK 98-40 และ K88-92 ที่มีปริมาณเชื้อต่ำในสภาพแล้งดังกล่าวข้างต้น สามารถตรวจพบปริมาณแป้งในใบสูงกว่าค่าปกติ 2.14, 1.63 และ 2.04 เท่าตามลำดับ

แต่ทั้งนี้ในกลุ่มที่เป็นใบขาวจะมีค่าน้ำตาลรวมต่ำลง โดยในต้นใบขาวอายุ 1 เดือนมีค่าอยู่ในช่วง 1.14-2.37 mg/g FW ในขณะที่ช่วงค่าปกติของกลุ่มอายุเดียวกันอยู่ระหว่าง 1.34-4.19 mg/g FW เช่นเดียวกับตัวอย่างอ้อยอายุ 3 เดือนในแปลง ในทางตรงกันข้าม ในต้นที่ไม่มีอาการใบขาวที่อยู่ในสภาพแล้งกลับพบว่าปริมาณน้ำตาลรวมค่อนข้างสูง โดยอยู่ระหว่าง 2.59-3.76 mg/g FW ซึ่งเป็นสัดส่วนที่แตกต่างจากต้นที่เป็นใบขาว และผลการทดสอบอ้อย 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ขอนแก่น 3 พันธุ์ KPK 98-40 และ K88-92 ที่มีปริมาณเชื้อต่ำในสภาพแล้งดังกล่าวข้างต้น พบปริมาณน้ำตาลสะสมในใบสูงกว่าค่าปกติเช่นกัน โดยพบมีค่าสูงขึ้นไป 2.24, 2.23 และ 1.17 เท่าตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความผิดปกติของการสะสมน้ำตาลในอ้อยที่ติดเชื้อใบขาว กับอ้อยที่มีเชื้อต่ำ และอยู่ในสภาวะแล้ง

ผลการศึกษการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในอ้อยที่ติดโรคใบขาว ร่วมกับการตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในใบ

การทดสอบในกลุ่มตัวอย่างอ้อยต่ออายุประมาณ 2 เดือนในแปลงทดลองที่ประกอบด้วยตัวอย่างใบขาวและใบเขียวที่ได้จากกอเดียวกัน ตัวอย่างใบเขียวจากกอที่ไม่มีอาการใบขาว และต้นที่ขยายจากอ้อยสะอาดและไม่มีอาการใบขาว จากการตรวจระดับปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวพบว่า ตัวอย่างจากสองกลุ่มแรกมีเชื้อในปริมาณสูงมาก ส่วนกลุ่มหลังตรวจพบเชื้อในปริมาณต่ำ จากผลการทดลองวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีร่วมกับการตรวจปริมาณเชื้อในใบ พบว่ามีบางชนิดเท่านั้นที่มีค่าแปรผันตามอาการและปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในใบ โดยประกอบด้วย 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ (1) กลุ่มที่แสดงถึงการสลายของเซลล์ที่เกิดจากการทำลายของเชื้อหรือการเสื่อมสภาพของเซลล์ จะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อเชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และอาการใบขาวมากขึ้น ได้แก่ MDA (ภาพที่ 1ก) (2) กลุ่มที่แสดงถึงระบบการทำงานของเซลล์ถูกขัดขวาง เมตาบอลิซึมผิดปกติ สร้างสารต่างๆ ได้ลดลง ทำให้ระบบต่างๆ ทำงานได้น้อย ได้แก่ โปรตีนรวม ที่มีปริมาณน้อยลงเมื่อเชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นและอาการใบขาวมากขึ้น (ภาพที่ 1ข) (3) กลุ่มที่แสดงถึงการต่อต้านของพืชต่อการเข้าทำลายของเชื้อ จะมีปริมาณน้อยเมื่ออ้อยแสดงอาการใบขาวแล้ว แต่จะมีปริมาณมากเมื่อยังไม่แสดงอาการหรือมีอาการบางส่วน แต่มีเชื้อในปริมาณมาก ได้แก่ กิจกรรมเอ็นไซม์ APX ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (ภาพที่ 2 ก-ค) ส่วนกลุ่มชนิดอื่นที่เหลือจะประกอบด้วย กลุ่มที่แสดงถึงเมตาบอลิซึมที่ผิดปกติ ที่เกิดจากผลของสภาพแวดล้อมอื่น ได้แก่ ปริมาณแป้ง น้ำตาล และ โพรลีน ซึ่งโพรลีนนี้ แม้พบว่ามีปริมาณสูงในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นใบเขียวทั้งในกลุ่มที่มีเชื้อมากและเชื่อน้อยคล้ายกับกลุ่มที่ 3 แต่พบปริมาณสูงเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะขาดน้ำ เช่น แล้ง แสดงให้เห็นว่าโพรลีนอาจเป็นตัวบ่งชี้ถึงตัวแปรร่วมที่เสริมภาวะเครียดที่ทำให้พืชอ่อนแอมากขึ้น (ภาพ 1ค)

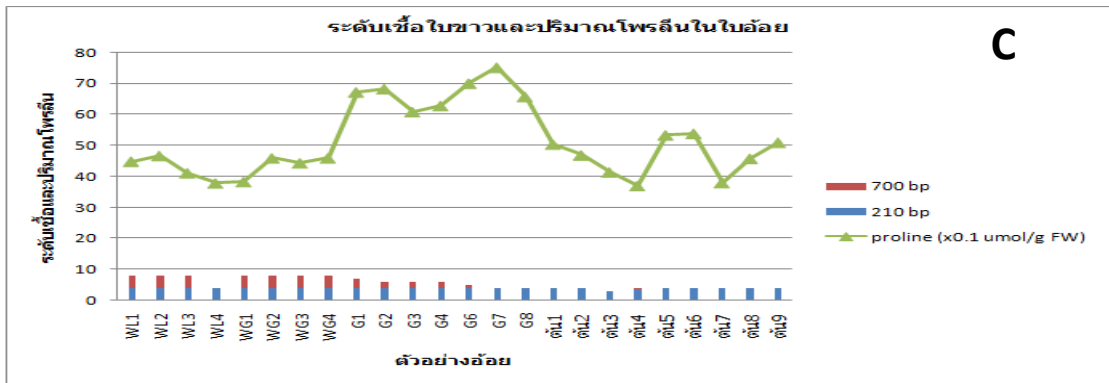
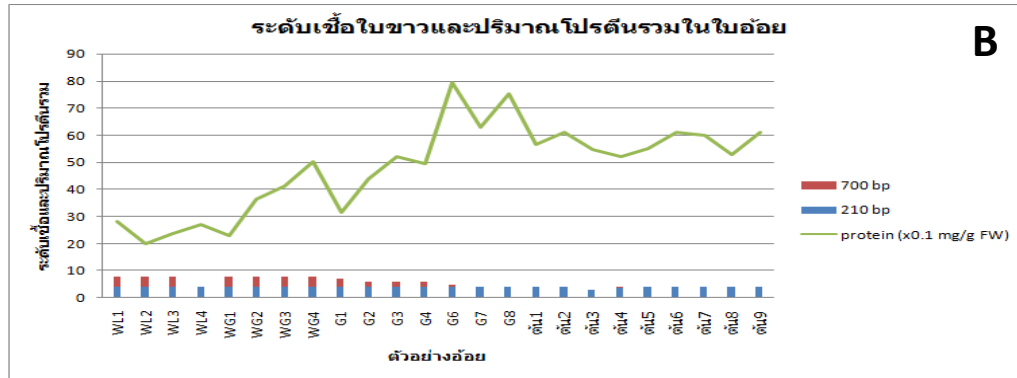
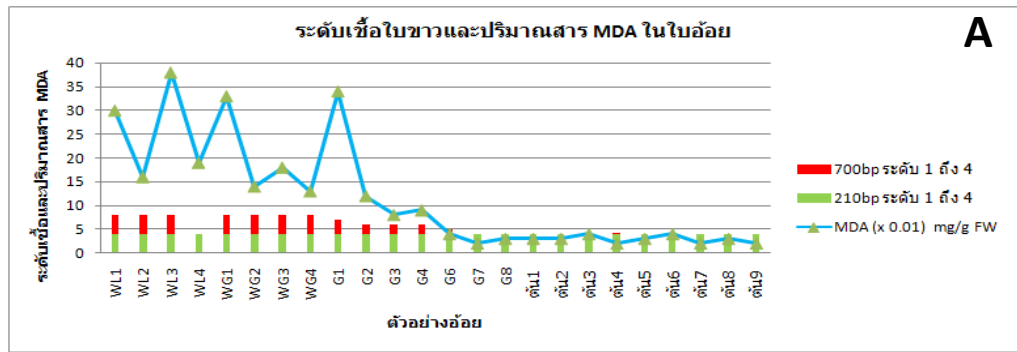


Figure 1. Sugarcane white leaf phytoplasma dosages estimated by PCR and biochemical changes in leaves of 24 samples of the 2 months old ratoon canes. WL : leaf sample with full white symptom from white leaf hill. WG : leaf sample with partial white symptom from white leaf hill. G: symptomatic leaf sample from non symptom hill. 1 -9 : non symptomatic leaf samples from clean seedcane planted originated by tissue culture propagation. 700 bp: high dosage phytoplasma concentration (1+ to 4+). 210 bp: low phytoplasma concentration (1+ to 4+). A. Sugarcane white leaf phytoplasma dosages and MDA concentration. B: Sugarcane white leaf phytoplasma dosages and total protein. C. Sugarcane white leaf phytoplasma dosages and proline.

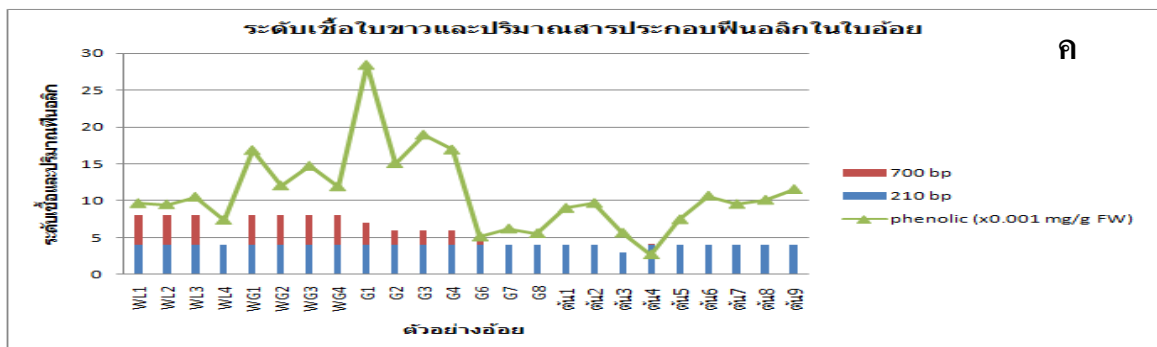
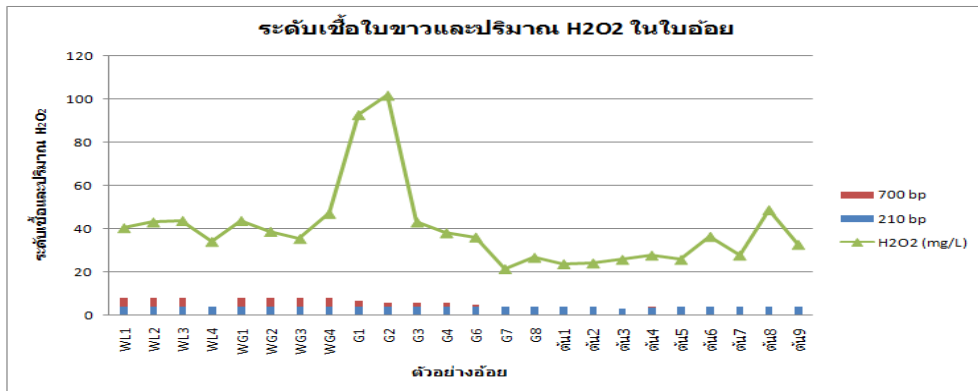
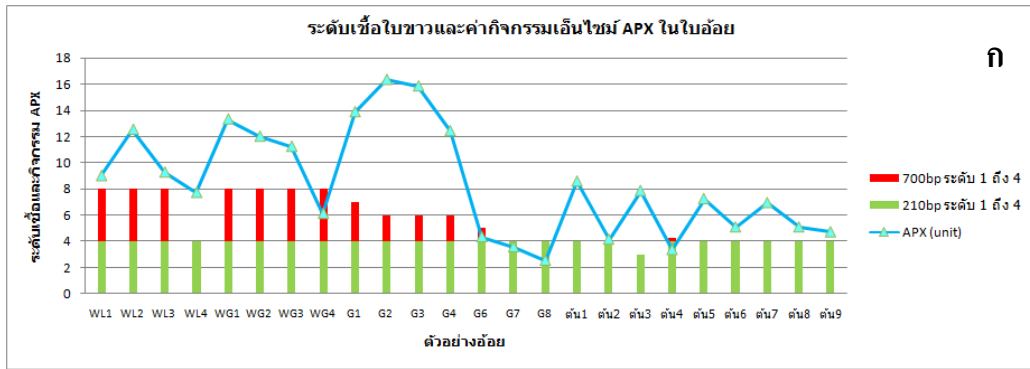


Figure 2. Sugarcane white leaf phytoplasma dosages estimated by PCR and biochemical changes in leaves of 24 samples of the 2 months old ratoon canes. WL : leaf sample with full white symptom from white leaf hill. WG : leaf sample with partial white symptom from white leaf hill. G: symptomatic leaf sample from non symptom hill. 1 -9 : non symptomatic leaf samples from clean seedcane planted originated by tissue culture propagation. 700 bp: high dosage phytoplasma concentration (1+ to 4+). 210 bp: low phytoplasma concentration (1+ to 4+). A. Sugarcane white leaf phytoplasma dosages and APX activities. B: Sugarcane white leaf phytoplasma dosages and hydrogen peroxide. C. Sugarcane white leaf phytoplasma dosage and phenolic compounds.

สำหรับกิจกรรมเอ็นไซม์ GPX ยังคงพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ทดสอบ เช่นเดียวกับผลที่เคยทำการทดสอบแล้ว ซึ่งแสดงว่าอาจจะไม่มีบทบาทในการตอบสนองต่อการติดเชื้อโรคใบขาวในอ้อย (ภาพที่ 3)

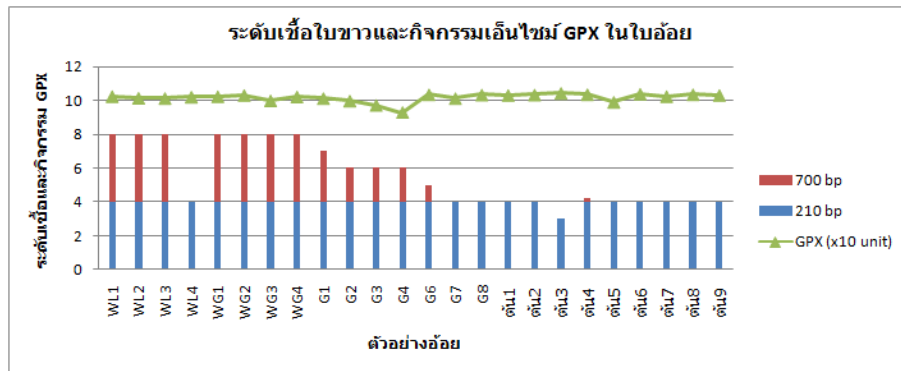


Figure 3. Sugarcane white leaf phytoplasma dosages estimated by PCR and GPX activities in leaves of 24 samples of the 2 months old ratoon canes. WL : leaf sample with full white symptom from white leaf hill. WG : leaf sample with partial white symptom from white leaf hill. G: symptomatic leaf sample from non symptom hill. 1-9: non symptomatic leaf samples from clean seedcane planted originated by tissue culture propagation. 700 bp: high dosage phytoplasma concentration (1+ to 4+). 210 bp: low phytoplasma concentration (1+ to 4+).

ผลการศึกษารายการแสดงออกของยีนในอ้อยที่ติดเชื้อโรคใบขาว มีการศึกษาในอ้อยอายุ 1 เดือนที่เพาะใน กระบะทราย และใช้อ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นตัวควบคุม การตรวจเชื้อด้วยตำแหน่ง 700 bp ที่ใช้ ระบุการติดเชื้อปริมาณมากนั้น พบว่าต้นใบขาวมีปริมาณเชื้อมากที่สุด ส่วนใบขาวเขียว และใบเขียวมี ปริมาณเชื้อลดลงตามลำดับ ส่วนต้นควบคุมสามารถตรวจพบเชื้อได้เฉพาะตำแหน่ง 210 bp เท่านั้นแสดงถึง มีปริมาณเชื่อน้อย

การศึกษารายการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารด้านการถูกทำลายโดยเชื้อ ได้แก่ *Lipoxygenases (LOXs)* ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ *Sucrose synthase (SuSy)* และ *Invertase (Inv)* ยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) ได้แก่ *Alcohol dehydrogenase I (AdhI)* ยีนที่ เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิในการจำกัดการเคลื่อนที่ของเชื้อไฟโตพลาสมา ได้แก่ *Callose synthase (CaSy)* ใช้การแสดงผลการออกของยีน *Triosephosphate isomerase (TPI)* เป็นยีนควบคุม ผลการทดลองพบว่ายีนดังกล่าว บางชนิดมีการแสดงออกมากขึ้นในต้นที่มีอาการใบขาว ภายใต้การแสดงผลการออกของยีนควบคุมที่เท่ากัน ได้แก่ *AdhI, SuSy* และ *CaSy*

การแสดงออกของยีน *Inv* พบว่าจะมีการแสดงออกขึ้นอยู่กับการสุกแก่ และการสะสมน้ำตาลของ อ้อย จึงไม่ดำเนินการทดสอบต่อ ส่วนยีน *Lox* สามารถตรวจพบการแสดงออกได้โดยมีขนาดประมาณ 700 bp

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอ้อยที่เป็น โรคใบขาวมีความผิดปกติของขบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและพืชอยู่ในภาวะขาดออกซิเจน จากการตรวจพบการแสดงออกของยีน *AdhI* และ *SuSy* ที่พบอย่างชัดเจนในตัวอย่างใบขาวและใบเขียวที่มีเชื้อในปริมาณสูง การตรวจพบการแสดงออกของ *AdhI* ในกลุ่มต้น healthy ใต้นั้นอาจเกิดจากภาวะภาวะขาดออกซิเจนชั่วคราวที่สามารถเกิดขึ้นได้ในขบวนการสังเคราะห์แสงของพืชโดยทั่วไป อย่างไรก็ตามในกรณีของต้นที่มีเชื้อในปริมาณสูง แต่ยังไม่แสดงอาการใบขาวนั้น พบว่า *SuSy* และ *AdhI* มีการแสดงออกน้อยมาก แสดงให้เห็นถึงภาวะ oxidation inactivation ในกลุ่มใบเขียว ทำให้พืชยังไม่เข้าสู่ภาวะขาดออกซิเจน

การตรวจพบการแสดงออกของยีน *CaSy* ในกลุ่มตัวอย่างใบขาวและใบเขียวที่มีปริมาณเชื้อมากแสดงถึงปฏิกิริยาต่อต้านของอ้อยในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยการสร้างแคลโลสเพื่อล้อมกรอบเชื้อไว้สำหรับการทำลายในขั้นต่อไป อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออกของยีนชนิดนี้ยังคงต้องศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างที่มากขึ้น การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของฮอร์โมนไซโตไคนิน ได้แก่ *Cytokinin oxidase (Cko)* สามารถตรวจพบได้ โดยมีขนาดประมาณ 600 bp ส่วนยีนที่สร้างสาร flavonoid ซึ่งพืชใช้ในการกำจัดเชื้อโรคที่เข้าทำลาย ได้แก่ *Flavanone -3-hydroxylase (F3h)* นั้น ไม่สามารถตรวจสอบได้ในอ้อย

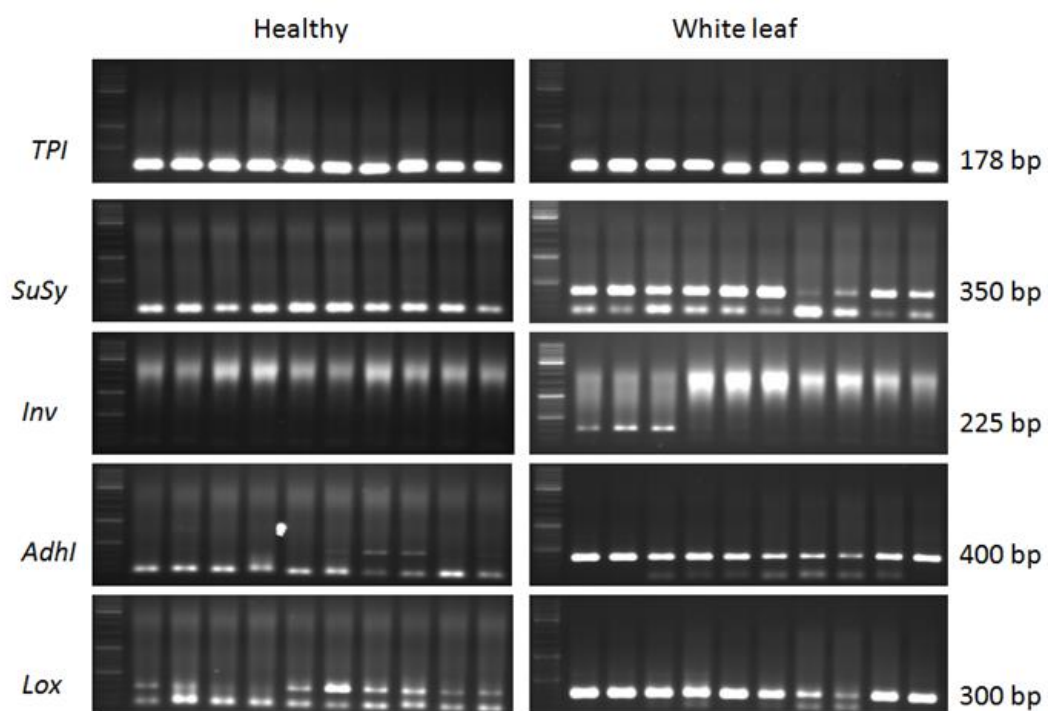


Figure 4. Expression of genes *Sucrose synthase (SuSy)*, *Invertase (Inv)*, *Alcohol dehydrogenase I (AdhI)* and *Lipid peroxidase (Lox)* in healthy and white leaf sugarcane samples.

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

อ้อยที่ติดเชื้อโรคใบขาวพบว่าเกิดความเครียดออกซิเดชันขึ้น ทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่อ้อยจะต้องกำจัดเพื่อลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้น หากพืชยังคงสามารถควบคุมขบวนการนี้ได้ จะทำให้พืชยังคงต่อต้านกับการทำลายของเชื้อได้ นอกจากนี้ในอ้อยที่มีการติดเชื้อแต่ยังไม่แสดงอาการรุนแรงมีการสร้างประกอบกลุ่มฟีนอลิกขึ้นเพื่อต่อต้านเชื้อ และพบว่าเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างชัดเจน โดยพบว่าการสะสมแป้งในใบแต่มีปริมาณน้ำตาลลดลง ทั้งนี้การสะสมแป้งในใบสามารถพบได้ในอ้อยที่อยู่ในสภาพแล้งได้เช่นกัน แต่มีปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้น ซึ่งในสภาพแล้งนี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้อ้อยแสดงอาการใบขาวได้หากมีเชื้ออยู่ในปริมาณที่สูง และพืชอยู่ในภาวะเครียด ทั้งนี้พบว่าอ้อยที่ผ่านแล้งแล้วเมื่อฟื้นตัวจะแสดงอาการใบขาว แต่อาจกลับคืนเขียวได้อีกหากอาการไม่รุนแรงหรือระบบยังไม่ถูกทำลายมาก พบว่ายีน *Adh1* มีบทบาทในการแสดงอาการใบขาวของอ้อย และปริมาณ MDA ในใบแปรผันตามความรุนแรงของการเข้าทำลายของเชื้อใบขาว

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ให้ระบุผลงานที่สิ้นสุด ได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างไร พัฒนาต่อหรือถ่ายทอด หรือเผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย (ระบุเป็นข้อๆ)

10.1 เป็นข้อมูลประกอบในผลงานวิจัยดีเด่นของกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2558

10.2 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการบรรยายในการฝึกอบรมนักวิชาการ สวพ. 3 เรื่องการจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาด วันที่ 11 มีนาคม 2558

10.3 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการบรรยายในการฝึกอบรมนักวิชาการและเกษตรกร หลักสูตร การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อยโรงงาน จำนวน 2 รุ่น ระหว่างวันที่ 9-11 มิถุนายน 2558 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และ วันที่ 23-25 มิถุนายน 2558 ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี

10.4 ถ่ายทอดข้อมูลบางส่วนในรายการ ก้าวไกลกับกรมวิชาการเกษตร เรื่อง โรคใบขาวของอ้อย ออกอากาศทางโทรทัศน์ ปิงปองประมาณ 2558

10.5 ถ่ายทอดข้อมูลบางส่วน เรื่อง โรคใบขาวของอ้อย ออกอากาศทางวิทยุ ปิงปองประมาณ 2558

10.6 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการแสดงโปสเตอร์ความรู้เรื่องโรคใบขาวในอ้อย ในงานเปิดบ้านกรม
วิชาการเกษตร ปีงบประมาณ 2558

10.7 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการแสดงโปสเตอร์ความรู้เรื่องโรคใบขาวในอ้อย ให้แก่เกษตรกรจากแหล่ง
ต่างๆ ที่มาดูงานที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ปีงบประมาณ 2558

11. คำขอขอบคุณ : ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานกลุ่มวิจัยโรคใบขาว จากสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร
ดร. ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ ผชช. กอบเกียรติ ไพบูลย์เจริญ อาจารย์รังสี เจริญสถาพร ที่ให้ข้อมูล และ
คำปรึกษา ขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่าน ที่ร่วมกันดำเนินงานอย่างจริงจัง ทำให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี
และสำเร็จตามเป้าหมายเป็นอย่างดี

12. เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ ศรีนทุ. 2536. การวินิจฉัยความแตกต่างระหว่างเชื้อมาโคพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยและ
หญ้าแพรกด้วยวิธี ELISA และ SDS – PAGE. ว.วิชาการเกษตร 11,3 (ก.ย.-ธ.ค.36) 162-168.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. โครงการจัดการโรคใบขาวของอ้อย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา. ขอนแก่น. 219 หน้า

ศุภรัตน์ สงวนรังศิริกุล ชีรวุฒิ วงศ์วัฒน์ ปิยะดา ชีระกุลพิสุทธิ์ ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุณี ศรีสิงห์ นิลกุล
ทวีกุล นฤทัย วรสถิตย์ รังสี เจริญสถาพร. 2554. วิธีประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรค
ใบขาวในอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์. ในเอกสารประกอบการประชุมเสวนาวิชาการอ้อย เรื่อง “วิกฤติ
และโอกาสอ้อยไทยในเวทีโลก” ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและ
พัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร วันที่ 30-31 สิงหาคม. หน้า 74-80.

Allen, R. 1995. Overexpression of chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase in plants. *Method. Mol. Biol.* 44:309–323.

Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of
excess photons. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50: 601–39.

Bermatini, M., K. Muthuchelian, M.S. Grando and N. Nedunchezian. 2002. Effect of phytoplasma
infection on growth and photosynthesis in leaves of field grown apple (*Malus pumila* Mill. Cv.
Golden delicious). *Photosynthetica* 40 (1) : 157-160.

- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Clegg, K. M. 1956. The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in cereals. *J. Sci. Food Agric.* 7:40.
- Cross JM, von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M (2006) Variation of Enzyme Activities and Metabolite Levels in 24 Arabidopsis Accessions Growing in Carbon-Limited Conditions. *Plant Physiology* 142: 1574-1588.
- Gueta-Dahan, Y., Z. Yaniv, B. A. Zilinskas and G. Ben-Hayyim. 1997. Salt and Oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. *Planta.* 203: 460-469.
- Heat, R. L., and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 25:189-198.
- Hernández, J.A. and M.S. Almansa. 2002. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relation of pea leaves. *Physiol Plantarum.* 155: 251-352.
- Johnson, S.M., S.J. Doherty and R.R.D. Croy. 2003. Biphasic superoxide generation in potato tubers. A self amplifying response to stress. *Plant Physiol.* 13:1440–1449.
- Karanlik, S., F. Ozkutlu, L. Ozturk, G. Bozbay, L. Cakmak and H. Ekiz. 2000. Investigation of the response of the difference bred ans durum wheat cultivars to NaCl salt. *Orta Anadolu da hububat tarmmn sorunlar ve cozum yollar Sempozyumu, Konya, Turkey, 8-11 Haziran 1999.* 365-374.
- Li M, Midmore DJ (1999). Estimating the genetic relationships of Chinese water chestnut (*E. dulcis* (Burm.f.) Hensch) cultivated in Australia, using RAPDs. *J. Hort. Biotech.* 74(2): 224-231.
- Pandolfini, T., Gabrielli, R., and Comparini, C. 1992. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Environ.* 15:719-725.
- Ramos Leal, M., A. Ruiz, I. Sandoval, R. H. Maribona. 1989. Biochemical Evaluation of Fungal Disease Resistance in Sugarcane. *Plant Breeding* 102 (1), 45–50.

Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.

Troll W, Lindsey J. (1955) A photometric method for the determination of proline. *Journal of Biological Chemistry* **215**: 655-660.

Vaidyanathan, H., P. sivakumar, R. Chakrabarty and G. Thomas. 2003. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) differential response in the salt tolerant and sensitive varieties. *Plant Sci.* 165: 1411-1418.

Yordanova, R.Y. 2004. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Env. Exp. Bot.* 51: 93-101.