

กระบวนการเกิด Programmed cell death ในเซลล์ใบอ้อยที่เป็นโรคใบขาว

Programmed cell death in the process of cells sugarcane white leaves disease

กาญจนา กิระศักดิ์^{1*}, ทักษิณา ศันสยะวิชัย¹ และ วีระพล พลรักดี¹

Kanjana Kirasak^{1*}, Taksina Sansayawichai¹ and Weerapon Polrakdee¹

บทคัดย่อ: โรคใบขาวอ้อย เป็นโรคที่ทำความเสียหายมากกับอ้อยซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจของไทย เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา มีเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ มีหลายลักษณะอาการที่แสดงให้เห็นได้ เช่น สีใบอ้อยเป็นสีขาว สีขาวสลับเขียว และสีเหลืองซีด เป็นต้น ซึ่งลักษณะอาการที่เกิดขึ้นต่างๆ ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตอ้อยแตกต่างกันตามความรุนแรงของอาการที่เกิดขึ้น โดยอาการรุนแรงที่สุดมีผลต่อการตายของต้นอ้อยและไม่ได้ผลผลิต ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมา และไม่มียาที่ต้านทานต่อโรคได้ งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อทำความเข้าใจถึงกลไกที่เป็นผลกระทบของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เข้าทำลายภายในต้นอ้อยต่อการแสดงออกของลักษณะอาการใบขาว ในการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการฟื้นฟูต้นอ้อยที่เป็นโรคไม่รุนแรงให้สามารถดำรงชีวิตจนกระทั่งให้ผลผลิตได้ โดยศึกษาถึงกระบวนการเกิด Programmed cell death (PCD) ระหว่างการพัฒนาอาการและโรคใบขาวของอ้อย เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์อ้อยที่ถูกเชื้อเข้าทำลายกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะอาการภายนอก ใช้การศึกษาทางกายวิภาคผ่านภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ และเซลล์วิทยาผ่านทางภาพถ่ายจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งใช้เนื้อเยื่อจากใบอ้อยที่มีสีขาว ขาวปนเขียว เหลือง และเขียว พบว่าเซลล์ท่อลำเลียง ชั้นมีซิฟิลล์และพาเรงโคมา ในเนื้อเยื่ออ้อยใบขาวมีการตายของเซลล์มากที่สุด โครงสร้างภายในเซลล์พบว่า แวคิวโอลขยายขนาดใหญ่ เกิดการรวมตัวของโครมาตินภายในนิวเคลียส เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกหัก และไม่โตคอนเดรียเสื่อมสภาพ นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงของออร์แกเนลล์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ คลอโรพลาสต์ขยายขนาดใหญ่กว่าปกติ มีการสะสมเม็ดแป้งจำนวนมากภายใน และเกิดการเสื่อมสภาพของกรานา

คำสำคัญ: Hypersensitive Response, Programmed Cell Death, Ultrastructure, โรคใบขาว

ABSTRACT: White leaf disease of sugarcane, which is more damage to economic crops in Thailand. It is infected by phytoplasma pathogenic and transmitted plant by leafhoppers vector. There are several symptoms that indicate the white colour, white-green and yellow leaf etc. The symptoms are affecting to sugarcane growth and yield vary according to the intensity of the symptoms. The most severe were effect on the death and no yield. There is no way the get rid phytoplasma and no disease-resistant varieties. This research leads to understand the mechanism of the effect of phytoplasma to damage sugarcane in the expression of the white leaf disease symptoms. Application for renewal of the sugarcane is the serious disease that can survive until the yield. Processes of programmed cell death in sugarcane different white leaf disease infected symptoms were studied. Anatomical changes among white leaf, white-green, yellow and green leaf sugarcane were explored through cell cross section using light microscopy. Cellular ultrastructure was examined by using transmission electron microscopy (TEM). The study showed that had vascular bundle cell, mesophyll and parenchyma layers of white leaf were collapsed. Under TEM studied, white-green, yellow and green leaf showed enlarged vacuole, condensed chromatin and broken nuclear envelope and in green leaf disorganized mitochondria was found. Finally, enlarged chloroplasts, declined grana and starch granules, accumulation and collapsed phloem have been found associated with symptom development of the disease.

Keywords: Hypersensitive Response, Programmed Cell Death, Ultrastructure, White leaf disease

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร

Khon Kaen Field Crops Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture

* Corresponding author: kanjana.kiki@gmail.com

บทนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทย และเป็นแหล่งรายได้ของเกษตรกรจำนวน 223,213 ครัวเรือน ปัญหาในการผลิตอ้อยอย่างหนึ่งก็คือผลผลิตที่ชาวไร่อ้อยส่วนใหญ่ผลิตได้ยังต่ำหรือผลิตไม่ได้ตามต้องการ เนื่องจากอ้อยเป็นโรคใบขาว มีรายงานว่ามีโรคใบขาวระบาดทำความเสียหายในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คิดเป็นมูลค่า 255 ล้านบาท และปี 2543/44 เกิดโรคใบขาวระบาด ทำความเสียหายเป็นพื้นที่ประมาณ 170,000 ไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2551) โรคใบขาวเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา (Wongkaew et al., 1997) โดยมีเพลี้ยจักจั่น 2 ชนิดคือ *Matsumuratettix hiroglyhicus* และ *Yamatotettix flavovittatus* (Hanboonsong et al., 2006) เป็นแมลงพาหะนำโรค อาการที่พบโดยทั่วไป เช่น สีใบอ้อยเป็นสีชาว สีขาวสลับเขียว สีเหลืองซีด และกอดตะไคร้ เป็นต้น ลักษณะอาการดังกล่าวเป็นอาการที่อ้อยแสดงการตอบสนองต่อสภาวะที่พืชถูกโรคเข้าทำลาย เป็นกลไกการตอบสนองที่สำคัญ และเป็นกระบวนการที่มีการควบคุมภายในและนำไปสู่การตายของเซลล์เฉพาะอย่างในเวลาหรือสถานการณ์จำเพาะ ที่เรียกว่า Programmed Cell Death (PCD) (จริงแท้, 2549) การเกิด PCD มี 2 รูปแบบหลักคือ รูปแบบการเจริญเติบโตและการพัฒนาของสิ่งมีชีวิตโดยธรรมชาติ และรูปแบบการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมทั้งจากสิ่งมีชีวิต (biotic) และไม่มีชีวิต (abiotic) (Johnes, 2001) โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ สามารถตรวจสอบได้หลายทาง เช่น ฐานฐานวิทยา กายวิภาควิทยา สรีรวิทยา เซลล์วิทยา และชีวเคมี เป็นต้น สำหรับกระบวนการเกิด PCD ในพืชที่เกิดจากการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่มาจากสิ่งมีชีวิต ก็คือการถูกโรคพืชเข้าทำลาย ซึ่งบริเวณที่โรคพืชเข้าทำลายพืชนั้นเป็นบริเวณที่พืชมีกลไกการตอบสนองอย่างรวดเร็วต่อโรคพืชขึ้นนั้น เรียกว่า Hypersensitive response (HR) โดยทั่วไปเมื่อพืชได้รับเชื้อโรคเข้าไป พืชก็เปลี่ยนแปลงกลไกการทำงานต่างๆ ภายในต้น เช่น มีการเปลี่ยนแปลงของคลอโรพลาสต์ มีการสังเคราะห์

เอนไซม์หลายชนิด และมีการปลดปล่อยน้ำออกจากเซลล์อย่างรวดเร็ว เป็นต้น จนกระทั่งส่งผลกระทบต่อแสดงอาการผิดปกติของลักษณะภายนอกพืชให้เห็น (Park, 2005) ซึ่งการที่อ้อยถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย และแสดงอาการใบขาวลักษณะต่างๆ ให้เห็นนั้น เป็นลักษณะการแสดงออกของอ้อยอย่างหนึ่งที่ตอบสนองต่อการถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย จึงเป็นประเด็นสำคัญที่ต้องการพิสูจน์ว่า มีกลไกการเปลี่ยนแปลงของเซลล์รวมถึงระดับออร์แกเนลของอ้อยที่เกิดโรคขึ้นนั้น มีความเชื่อมโยงกันอย่างไรกับอาการที่แสดงออกภายนอกให้เห็น และมีเหตุผลใดที่ทำให้อ้อยบางกลุ่มที่เป็นโรคใบขาวสามารถกลับคืนสู่การเจริญเติบโตที่เป็นปกติได้ หรือบางกลุ่มเมื่อเกิดโรคแล้วก็ตายไปไม่ให้เกิดผลผลิต การวิจัยในครั้งนี้ จึงนำมาซึ่งข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาพันธุ์ต้นอ้อยที่เป็นโรคให้สามารถดำรงชีวิตจนกระทั่งให้ผลผลิตได้ และเป็นข้อมูลใช้ประกอบในการหาวิธีการป้องกัน หรือกำจัดโรคต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างใบอ้อยทุกลักษณะ ได้จากต้นอ้อยที่มีอายุ 6 เดือน ในแปลงทดลองปลูกอ้อยของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น (ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น) ปีงบประมาณ 2552-2553 ที่ใช้สำหรับการศึกษาข้อมูลการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของอ้อยที่ปลูกมาจากท่อนพันธุ์อ้อยที่เป็นโรคใบขาว และไม่เป็นโรค ซึ่งได้รับการปฏิบัติดูแลปกติ การทดลองนี้เก็บใบที่มีความสมบูรณ์ นับใบที่ 3 จากยอด ทั้งหมด 4 ซ้ำ ในช่วงเวลา 10.00-11.30 น. ใส่ตัวอย่างใบลงในถุงพลาสติกแช่ไว้บนน้ำแข็งก่อนนำมาที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยพืชไร่ และนำมาศึกษา 2 การทดลอง คือ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเซลล์เบื้องต้นของอ้อยที่เป็นโรคใบขาว

นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่แสดงลักษณะอาการต่างๆ 4 ลักษณะ คือใบสีขาว ใบสีชาวปนเขียว ใบสีเหลืองปนเขียว และใบสีเขียว (control) ที่เก็บมา ใช้ทำภาค

ตัดขวางดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กประมาณ 1x1 ซม. จากนั้นแช่เนื้อเยื่อลงในสารละลายฆ่าและคงสภาพเซลล์ คือ formalin-acetoalcohol (FAA) ที่ประกอบด้วย เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 90 % กรดกลาเซียลอะซีติก (Glacial acetic acid) 5 % และฟอร์มาลิน (Formalin) 5 % เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์ จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการแช่ใน FAA เป็นเวลา 24 ชั่วโมงขึ้นไป นำไปแช่ในสารต่างๆ ตามขั้นตอนดังนี้คือ แช่ในสาร 2-methylpropan-2-butanol (TBA) ที่ความเข้มข้น 50 70 85 95 100 % และ absolute TBA 2 ครั้ง ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนสารแต่ละความเข้มข้นทุกขั้นตอนต้องใช้เวลาแช่ทิ้งไว้ห่างกันนาน 12 ชั่วโมง เมื่อครบตามลำดับแล้ว จึงเปลี่ยนจากสาร TBA เป็น paraplast ทิ้งไว้ 2 วัน แล้วจึงเปลี่ยน paraplast ทุก 12 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปเทลงแม่พิมพ์ที่แข็งไว้ข้างคั้น ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องมือโครโตม ผึ่งสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสาร toluidine blue (Sekai, 1973) ความเข้มข้น 1 % เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำเป็นสไลด์ถาวรด้วยน้ำการสไลด์ที่ย้อมแล้วล้างในน้ำกลั่นนาน 10 นาที วางผึ่งลมข้างคั้นแล้วนำมาแช่ไว้ใน xylene 2 ครั้ง ห่างกันนานครั้งละ 5 นาที ผึ่งลมสักครู่ แล้วจึงหยดสาร permount ปิดด้วย cover slip ผึ่งลมไว้ 2-3 วัน ตามวิธีการของ Brooks et al. (1950) ส่งดูเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Light microscopy, Olympus BH-2, Japan) บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของอ้อยที่เป็นโรคใบขาว

ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อใบอ้อยที่แสดงลักษณะอาการต่างๆ 5 ลักษณะ คือ ใบสีเขียว ใบสีขาวย่นเขียว ใบสีเหลือง ใบสีเขียวที่ติดเชื้อโรคใบขาวไม่แสดงอาการที่ใบแต่แสดงอาการใบขาวที่หน่อ ใบสีเขียวที่ติดเชื้อโรคใบขาวไม่แสดงอาการ และ ใบสีใบสีเขียวปลอดโรค (control) เพื่อนำไปทำภาคตัดขวางในระดับจุลภาคตามวิธีการของ ณรงค์ (2529) โดยทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อแบ่งเป็นชิ้นเล็ก ขนาด 0.2x1.5 ตร.มม. ทำการแช่ชิ้น

เนื้อเยื่อทั้งหมดในสารละลายกอลลูตารอลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น 5 % ที่ผสมรวมกับบัพเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 25 mM พีเอช 6.8 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นชิ้นเนื้อเยื่อจะถูกย้ายลงในสารละลายกอลลูตารอลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น 3 % ที่ผสมรวมกับบัพเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 25 mM พีเอช 6.8 วางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเนื้อเยื่อด้วยบัพเฟอร์ ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นแช่เนื้อเยื่อลงในสารออสเมียมเตตราออกไซด์เข้มข้น 1 % (บริษัท Electron Microscope Sciences ฟลอริดาอิงตัน รัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ละลายด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ข้ามคืน จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนทำการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่าง (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ โดยการล้างชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน เริ่มตั้งแต่แอลกอฮอล์เข้มข้น 70 ถึง 100 % และแทนที่แอลกอฮอล์ด้วยสารฟิสิกส์ออกไซด์ นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ปราศจากน้ำแล้วมาฝังในเรซิน Spurr's resin (บริษัท Electron Microscope Sciences ประเทศสหรัฐอเมริกา) นำตัวอย่างทั้งหมดในเรซินไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำบล็อกตัวอย่างมาตัดให้มีความหนา 0.5 μm . ด้วยเครื่องมือโครโตม แล้วทำการตรวจเช็คบริเวณที่มีท่อน้ำท่ออาหารและเซลล์รอบบริเวณดังกล่าว หลังจากนั้นทำการตัดตัวอย่างซ้ำเฉพาะบริเวณที่เลือกไว้ โดยทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้มีความหนา 80-90 nm. ด้วยเครื่องมือโครโตม (หัวตัดทำด้วยเพชร) ชิ้นเนื้อเยื่อที่ถูกตัดถูกวางบนตาข่ายทองแดงขนาดเล็ก (copper grid) วางผึ่งลมไว้จนกระทั่งแห้ง แล้วจึงนำไปย้อมด้วยสารละลายโลหะหนัก 2 ชนิด คือ ยูรานิลอะซิเตรต ความเข้มข้น 2 % (ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน) และ เลดอะซิเตรต เข้มข้น 2 % (บริษัท Electron Microscope Sciences ประเทศสหรัฐอเมริกา) หลังจากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ย้อมแล้วไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, JEOL TEM-1230, Tokyo, Japan) บันทึกผลการทดลองด้วยภาพถ่าย

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทำภาคตัดขวางของเนื้อเยื่อใบอ้อยที่มีสีเขียว แสดงให้เห็นเซลล์ท่อลำเลียง และเซลล์บริเวณรอบท่อลำเลียงเกิดการเสื่อมสภาพจนไม่สามารถแยกแยะระหว่างท่อน้ำและท่ออาหารออกจากกันได้ (Figure 1 ลูกศรเล็กสีน้ำเงิน) บริเวณชั้นเซลล์มีไซโทพลาสซึมและพลาเอนโดมาที่อยู่บริเวณรอบท่อลำเลียงเกิดการยุบตัวเสียสภาพ ความสมบูรณ์ของเซลล์ ทำให้มองเห็นช่องว่างขนาดใหญ่ภายในเซลล์ (Figure 1 ลูกศรขนาดใหญ่สีแดง) สำหรับเซลล์ของใบอ้อยสีเขียวปนเขียว สีเหลือง และใบสีเขียว ชั้นเซลล์และท่อลำเลียงมีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้นตามระดับการเปลี่ยนแปลงของสีใบ (Figure 1) ซึ่งใบที่มีสีเขียวมีความสมบูรณ์ของเซลล์มากที่สุด โดยการเปลี่ยนแปลงของเซลล์นั้น เกิดขึ้นได้เนื่องจากพืช

ได้รับภาวะเครียดจากการถูกโรคเข้าทำลาย พืชจึงเริ่มแสดงการเสื่อมสภาพตั้งแต่เซลล์ ที่เป็นกระบวนการ PCD จนกระทั่งนำไปสู่การตายที่ระดับอวัยวะให้เห็นได้ด้วยตาเปล่า เนื่องจากเซลล์มีไซโทพลาสซึมเสมือนแหล่งความจำของเยื่อหุ้มเซลล์และกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์พืชตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งเข้าสู่วัยชราภาพ (Lee and Chen, 2002) ในพืชหลายชนิดพบว่าในช่วงที่พืชเข้าสู่สภาวะการชราภาพ เซลล์พืชเกิดการเสื่อมสภาพขึ้น เนื่องมาจากเซลล์ลูไลส และเฮมิเซลล์ลูไลสที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์มีปริมาณลดลง เกิดการสูญเสียโครงสร้างเส้นใยเชื่อมต่อกันภายในเซลล์ จึงมีผลให้เกิดเป็นช่องว่างภายในเซลล์ (Thomas et al., 2003; Gunawardena et al., 2007) การเสื่อมสภาพของชั้นเซลล์และท่อลำเลียงจึงเป็นสิ่งที่ชี้บ่งได้ว่าพืชกำลังเข้าสู่สภาวะการชราภาพและตายแม้ว่าพืชจะแสดงให้เห็นในสภาพภายนอกหรือยังไม่แสดงให้เห็น

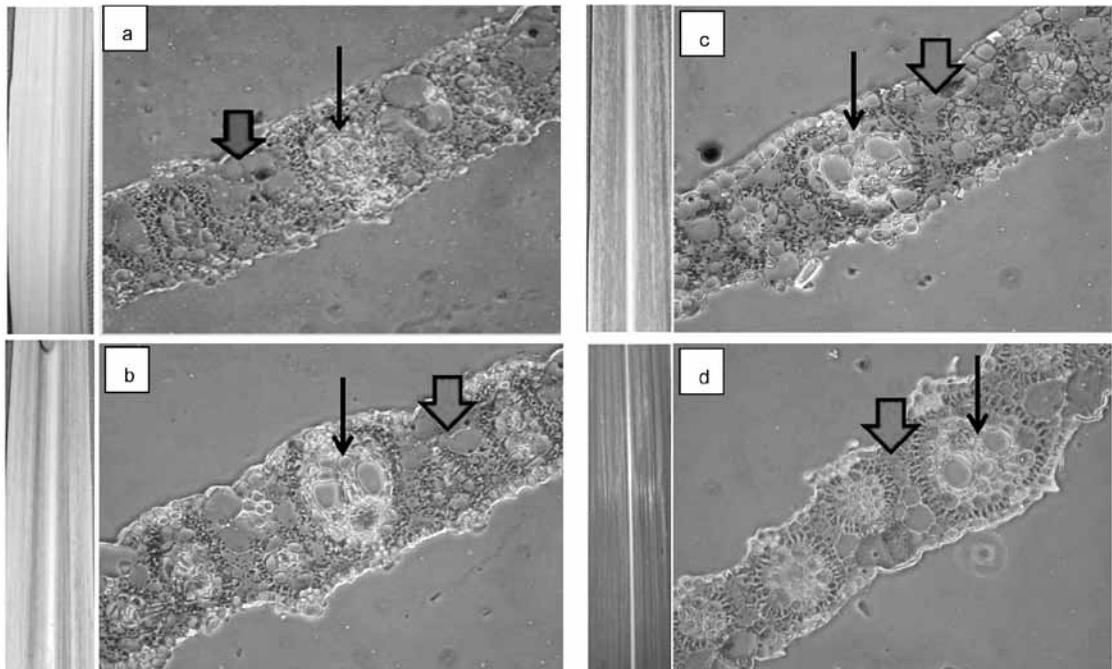


Figure 1 Cross section of sugarcane leaves, using under light microscopy as 40x. Collapsed vascular bundle and mesophyll layer occurred at various stages of symptoms (a, white leaf ; b, white-green leaf ; c, yellow leaf) and normal vascular bundle and cell layer in healthy cell (d, green leaf) (thin and big arrow indicated as vascular bundle and mesophyll cell)

Figure 2 - 7 เป็นภาพที่แสดงการเปลี่ยนแปลงของออร์แกเนลล์ต่างๆ ภายในเซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่ออ่อนที่มีสีเขียวหลายลักษณะ ซึ่งในการแสดงอาการใบขาวของอ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นผลกระทบมาจากการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดจากสิ่งมีชีวิต (biotic) หรือสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic) เป็นการชราภาพเนื่องจากสภาวะการเสื่อมสภาพของเซลล์อย่างหนึ่ง โดยอาการใบขาวแสดงได้หลายรูปแบบของสีใบ เนื่องจากเป็นความไม่เสถียรภาพของเซลล์ที่แสดงอาการ และไม่สามารถทำนายรูปแบบอาการใบที่เกิดขึ้นได้ (Kirk and Tilney-Bassett, 1978; Yu et al., 2007) ภายในเซลล์ของใบอ้อยสีขาวออร์แกเนลล์เสื่อมสลายไปหมด (Fig.2 A) และพบว่ามีการสะสมเชื้อไฟโตพลาสมาปริมาณมาก (Fig. 2 B-C, Fig. 3 A, Fig. 5 A และ Fig. 6 A) บางเซลล์มีแวคิวโอลขยายขนาดใหญ่ขึ้นให้ออร์แกเนลล์อื่นๆ ไปอยู่รอบผนังเซลล์ มีปริมาณออร์แกเนลล์ชนิดอื่นน้อย ผนังนิวเคลียสแตก และโครมาตินภายในนิวเคลียสรวมตัวกันเป็น

กลุ่มก้อน (Fig. 3 B; C, Fig. 4 B และ Fig. 7 A; B) การชราภาพมีการเปลี่ยนแปลงของแวคิวโอลเกิดขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจากแวคิวโอลเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของการเสื่อมสภาพ ที่มีผลต่อเนื่องกับการเปลี่ยนแปลงของออร์แกเนลล์อื่นๆ ตามมา โดยแวคิวโอลขยายขนาดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มแวคิวโอล ที่เสื่อมสภาพลงทีละน้อย และเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเวลาต่อมาจนกระทั่งเสื่อมอย่างสมบูรณ์ (Van Doorn and Woltering, 2008) ในขณะที่โครมาตินภายในนิวเคลียสเกิดการรวมตัวอย่างหนาแน่น เป็นกลุ่มก้อน เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกหัก และเยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพแยกตัวออกจากผนังเซลล์ ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาในสัตว์ พบว่าเมื่อสัตว์เป็นโรค เนื้อเยื่อมีการชักนำให้เกิดภาวะ Hypersensitive Response (HR) ต่อเนื่องด้วยการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์โดยเฉพาะการเกิดลักษณะที่เรียกว่า blebbing ที่เยื่อหุ้มนิวเคลียสและเยื่อหุ้มเซลล์ (Wang et al., 1996; Ryerson and Heath, 1996)

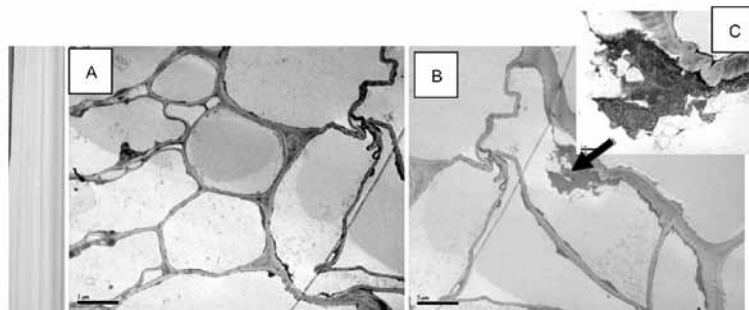


Figure 2 Ultrastructural changes in mesophyll cells in white sugarcane leaves under transmission electron microscopy. Without organelles in cells (A), pathogen was inside the cell (C -high magnification of B). Bar size, A and B= 5µm, C=1 µm.

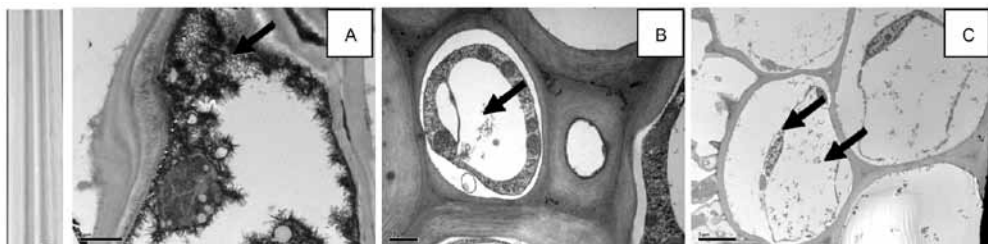


Figure 3 Ultrastructural changes in mesophyll cells in white-green sugarcane leaves under transmission electron microscopy. Pathogen was inside the cell (A), big vacuole (B), nucleus deteriorated and big vacuole. Bar size, A=1 µm, B= 0.5 µm and C=5 µm.

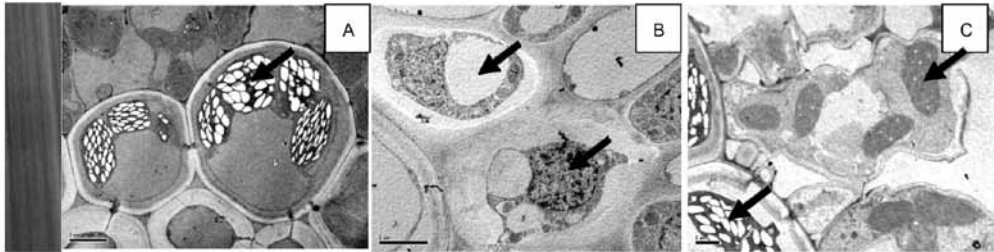


Figure 4 Ultrastructural changes in mesophyll cells in yellow sugarcane leaves under transmission electron microscopy. Accumulation of starch granules in chloroplast structure (A), nucleus deteriorated and big vacuole (B), starch granules and chloroplast (C). Bar size, A=5 μ m, B= 2 μ m and C=2 μ m.

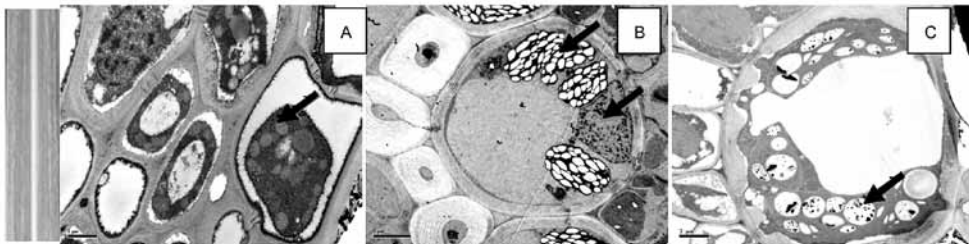


Figure 5 Ultrastructural changes in mesophyll cells in green sugarcane leaves (white tiller) under transmission electron microscopy. Pathogen was inside cells (A), accumulation of starch granules in chloroplast structure and nucleus deteriorated and big vacuole (B), starch granules broken in chloroplast structure (C). Bar size, A=1 μ m, B= 5 μ m and C=2 μ m.

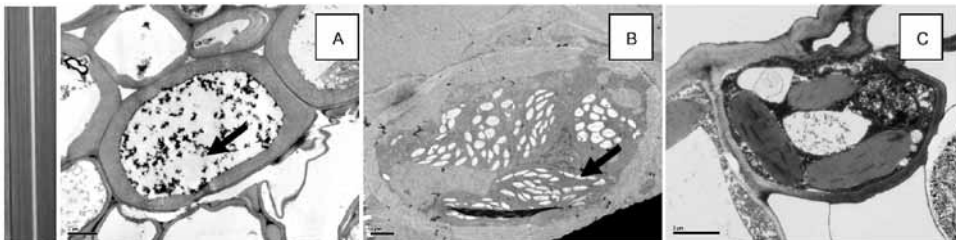


Figure 6 Ultrastructural changes in mesophyll cells in green sugarcane leaves (pathogen infected) under transmission electron microscopy. Pathogen was inside cells (A), accumulation of starch granules in chloroplast structure (B), some organelle in cell (C). Bar size, A- C=2 μ m.

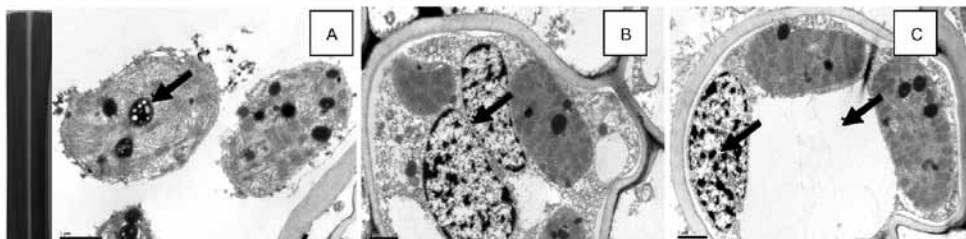


Figure 7 Ultrastructural changes in mesophyll cells in green sugarcane leaves (no pathogen) under transmission electron microscopy. Mitochondria deteriorated (A), nuclear envelope fragmentation (B), big vacuole and nucleus deteriorated (C). Bar size, A- C=1 μ m.

นอกจากนี้ภายในเซลล์ยังปรากฏให้เห็นคลอโรพลาสต์ขยายขนาดใหญ่ ชั้นของกรานาเสื่อมสภาพ (Fig. 6 C) การขยายขนาดหรือเกิดการบวมขึ้นของคลอโรพลาสต์เป็นอาการที่เกิดอาการแรกของการเปลี่ยนแปลง ที่เกิดควบคู่ไปกับการเสื่อมสภาพของกรานาและไทลาคอยด์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ มีความเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายไอออนที่เป็นประจุบวกและกรดอินทรีย์ หรือช่องว่างภายในระหว่างไทลาคอยด์กับสโตรมาที่ยังไม่แยกออกจากกัน เมื่อสโตรมาเกิดการขยายตัวมากขึ้นกว่าปกติเนื่องจากแรงกระตุ้นที่ได้รับผลมาจากค่าออกซิโมติกที่มีค่าเพิ่มขึ้นสูงในกิจกรรมการสังเคราะห์แสง ที่บริเวณของเหลวภายในสโตรมา สโตรมาจึงบวมขึ้น และส่งผลกระทบต่อให้คลอโรพลาสต์บวมตามไปด้วย (Taylor and Craig, 1971; Taylor and Rowley, 1971) และหลายเซลล์พบว่าภายในมีเม็ดแป้งสะสมไว้ในคลอโรพลาสต์ปริมาณมาก บางเซลล์เม็ดแป้งแตกหัก (Fig. 5 C) แทนที่ไทลาคอยด์ (Fig. 4 A; C, Fig. 5 B และ Fig. 6 B) และมีไมโทคอนเดรียเสื่อมสภาพขยายขนาดเพิ่มขึ้นภายในมองเห็นช่องว่างเป็นรูปสามเหลี่ยม (Fig. 7 A) โดยในพืชหลายชนิดพบว่าเมื่อถูกโรคเข้าทำลายออร์แกเนลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจนคือคลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย มีการสะสมเม็ดแป้งอยู่ในคลอโรพลาสต์มากกว่าปกติแทนที่ส่วนของไทลาคอยด์ทั้งเม็ดแป้งปกติและเม็ดแป้งแตกหัก ดังเช่น ข้าวสาลีที่ถูกเชื้อ *Puccinia striiformis* (Mac Donald and Strobel, 1970) และแตงกวาที่ถูกโรค TMV เข้าทำลาย (Cohen and Loebenstein, 1974) สำหรับอ้อยที่ถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลายนั้น ผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และออร์แกเนลล์ภายในเซลล์อ้อยที่เกิดขึ้นนั้น กล่าวได้ว่าเป็นผลกระทบที่เกิดเนื่องมาจากเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าไปสะสมอยู่ในเซลล์ท่อลำเลียงของอ้อย และทำลายเซลล์ท่อลำเลียงให้เสื่อมสภาพจนถึงขั้นเซลล์ตาย ส่งผลให้อ้อยไม่สามารถลำเลียงแร่ธาตุอาหารจากข้างล่างไปสู่ส่วนใบ ทำให้ใบขาดแคลนสารอาหารในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์สำหรับการสังเคราะห์แสง ใบจึงเปลี่ยนเป็นสีชาารูปแบบต่างๆ

ตามปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สูญเสียไป ในขณะเดียวกันในใบซึ่งมีอาหารสะสมไว้แล้ว ไม่สามารถส่งน้ำตาลไปยังส่วนการเจริญเติบโตต่างๆ ของพืชได้ จึงเปลี่ยนน้ำตาลมาสะสมไว้ในรูปเม็ดแป้งภายใน คลอโรพลาสต์ ส่งผลต่อเนื่องให้คลอโรพลาสต์มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงลดลง ซึ่งอาการที่เกิดขึ้นนี้คล้ายคลึงกับส้มที่ถูกโรค Huanglongbing (HLB) เข้าทำลาย มีเชื้อสาเหตุมาจากแบคทีเรียที่เข้าไปทำลายเซลล์ท่ออาหาร ทำให้ท่ออาหารยุบตัวและเสื่อมสภาพไม่สามารถขนส่งแร่ธาตุอาหารได้ตามปกติ ส่งผลกระทบให้คลอโรพลาสต์ซึ่งเป็นแหล่งสังเคราะห์แสงเกิดความเครียดจากการขาดธาตุอาหาร มีผลต่อการลดความสามารถของกระบวนการสะสมพลังงานในการสร้างน้ำตาลจากกระบวนการสังเคราะห์แสงลง และไม่สามารถส่งคาร์บอนที่ถูกตรึงไว้ออกไปใช้ประโยชน์ได้ เซลล์บริเวณอื่นจึงเกิดการขาดแคลนคาร์โบไฮเดรตขณะเดียวกันท่ออาหารที่เสื่อมสภาพไม่สามารถเคลื่อนย้ายน้ำตาลที่สำรองไว้ไปยังบริเวณอื่นของพืชเพื่อการเจริญเติบโตได้ จึงส่งผลที่นำไปสู่สภาวะการสะสมแป้งเพิ่มมากขึ้น 300-1600 เปอร์เซ็นต์ คลอโรพลาสต์และโครงสร้างกรานาชั้นในจึงเสื่อมสภาพลงและใบเข้าสู่สภาวะขาดคลอโรฟิลล์ โดยใบแสดงอาการสีซีดขาว (Russin et al., 1996; Chen et al. 2009; Achor et al., 2010) นอกจากนี้การแสดงอาการใบสีซีดจาง มีความสัมพันธ์กับการสูญเสียแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นในโครงสร้างของไทลาคอยด์ และโครงสร้างของกรานาถูกทำลายเนื่องจากขาดธาตุเหล็ก สังกะสี และแมกนีเซียม ซึ่งเสมือนเป็นสิ่งที่ส่งเสริมการสะสมแป้งปริมาณมากในใบ (Teixeira et al., 2008)

สรุป

อ้อยที่เป็นโรคใบขาว มีเซลล์ท่อลำเลียงตายและยุบตัวท่อน้ำและท่ออาหารไม่แยกออกจากกัน ส่วนชั้นเซลล์มีไซโทพลาซึมและพาราเอนโดไมซึมรอบบริเวณท่อลำเลียงตายและยุบตัวเห็นเป็นช่องว่างขนาดใหญ่ภายในเซลล์ สำหรับอ้อยที่แสดงอาการใบขาวในระดับไม่รุนแรง

ถึงไม่แสดงอาการใบขาว สภาพการเปลี่ยนแปลงของ
ชั้นเซลล์และภายในเซลล์มีความรุนแรงลดลงระดับ
ความรุนแรงตามสภาพการแสดงอาการของอ้อย
มีออร์แกนเปลี่ยนแปลงสภาพชัดเจน คือ คลอโรพลาสต์
และการสะสมเม็ดแป้งปริมาณมากอยู่ภายใน แวคิวโอด
มีขนาดใหญ่ขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนักวิชาการเกษตรของศูนย์วิจัยพืชไร่
ทุกท่านที่ให้คำปรึกษาความรู้เพิ่มเติมและช่วยเหลือ
ในส่วนของการประมาณที่ไม่พอเพียงในระหว่างทำวิจัย
และนางสาวสุพัฒนา คณานิตย์ ได้ช่วยเหลือในการทำ
วิจัย

เอกสารอ้างอิง

กนกพร เมฆาฉานนท์ ฌ์ฐกฤต พิทักษ์วิภาวรรณ กิติวัชระเจริญ ดุจ
ลดดา พิมพ์รัตน์ และสุวีรัตน์ ทองคำ. 2551. ความสูญเสีย
ของผลผลิตอ้อยเนื่องจากโรคใบขาว. [http://it.doa.go.th/
refs/show.php?record=894](http://it.doa.go.th/refs/show.php?record=894) ค้นเมื่อ 16 กรกฎาคม 2555.
จริงแท้ ศิริพานิช. 2549. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวการวางยของ
พืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
ณรงค์ จึงสมานญาติ. 2529. หลักการและเทคโนโลยีการเลี้ยงจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน ภาควิชาสัตวศาสตร์.
คณะสัตวแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
นครปฐม.
Achor, D. S., E. Etxeberría, N. Wang, S. Y. Folimonova,
K. R. Chung, and L. G. Albrigo. 2010. Sequence of
anatomical symptom observations in citrus affected
with Huanglongbing disease. *Plant Pathol. J.* 1-9.
Brooks, R. M., M. V. Bradley, and T. I. Anderson. 1950.
Plant Microtechnique Manual. Division of Pomology,
Davis. University of California.
Chen, J. C., X. PuDeng, X. Liu, S. H. Li, and E. Civerolo.
2009. A phytoplasma related (yellow
shoot disease) symptom in Guangdong, P.R. China.
Physiol. 99: 236-242.
Cohen, J. and G. Loebenstein. 1974. An electronmicroscope
study of starch lesion in cucumber cotyledons infected
with tobacco mosaic virus. *Phytopathol.* 65: 32-39.

Gunawardena, A. H. L. A. N., J. S. Greenwood, and N. G.
Dengler. 2007. Cell wall degradation and modification
during programmed cell death lace plant , *Apono-
geton Madagascariensis* (Aponogetonaceae). *Amer.
J. Bot.* 94(7): 1116-1128.
Hanbonsoong, Y., W. Ritthison, C. Choosai, and P.
Sirithorn. 2006. Transmission of sugarcane white
leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new
leafhopper vector. *J. Econ. Entomol.* 99(5):1531-
1537.
Johnes, A. M. 2001. Programmed cell death in development
and defense. *Plant Physiol.* 125: 94-97.
Kirk , J. T. O., and R. A. E. Tilney-Bassett. 1978. The
Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and
Inheritance. Elsevier/North-Holland Biomedical
Press, Amsterdam.
Lee, R. H., and G. Chen Shu-chen. 2002. Programmed cell
death during rice leaf senescence is nonapoptotic.
New Phytol. 155: 25-32.
Macdonald, M. P., and A. G. Stroble. 1970. Adenosine
diphosphate-glucose pyrophosphorylase control of
starch accumulation in rust-infected wheat leaves.
Plant Physiol. 46: 126-135.
Park, M. J. 2005. The hypersensitive response. A cell
death during disease resistance. *Plant Pathol. J.*
21(2): 99-101.
Russin, W. A., R. F. Vanderveer, P. J. Sharkey, and S. P.
Briggs. 1996. Modification of specific class of
plasmodesmata and loss of sucrose export ability in
the *sucrose export defective1* maize mutant. *Plant
Cell.* 8: 645-658.
Ryerson, D. E., and M. C. Heath. 1996. Cleavage of
nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during
cell death induced by fungal infection or by abiotic
treatments. *Plant Cell.* 8(3):393-402.
Taylor, A. O., and A. S. Craig. 1971. Plants under Climatic
Stress : II. Low temperature, high light effects on
chloroplast ultrastructure. *Plant Physiol.* 47: 719-725.
Taylor, A. O., and J. A. Rowley. 1971. Plants under
Climatic Stress I. Low Temperature, High Light
Effects on Photosynthesis. *Plant Physiol.* 47(5):
713-718.
Teixeira, D. C., N. A. Wulff, E. C. Martins, E. W. Kitajima,
and R. Bassanezi *et al.* 2008. A phytoplasma
closely related to the Pigeon Pea Whiches-Broom
phytoplasma (16 Sr.IX) is associated with citrus
huanglongbing symptoms in the state of Sao Paulo,
Brazil. *Physiol.* 98: 977-984.

- Thomas, H., H. J. Qugham, C. Wagstaff, and A. D. Stead. 2003. Defining senescence and death. *J. Exp. Bot.* 54: 1127-1132
- Van Doorn, W. G., and E. J. Woltering 2008. Physiology and molecular biology of petal senescence. *J. Exp. Bot.* 59: 453-480.
- Wang, H., J. Li, R. M. Bostock, and D. G. Gilchrist. 1996. Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell.* 8(3):375-391.
- Wongkaew, P., Y. Hanboonsong, P. Sirithorn, C. Choosai, S. Boonkrong, T. Tinnangwattana, R. Kitchareonpanya, and S. Damak. 1997. Differentiation of phytoplasmas associated with sugarcane and gramineous weed white leaf disease and sugarcane grassy shoot disease by RFLP and sequencing . *Theoret. and Appl. Gen.* 95(4): 660-663.
- Yu, F., A. Fu, M. Aluru, S. Park, Y. Xu, H. Liu, X. Liu, A. Foudree, M. Nambogga, and S. Rodermeil. 2007. Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. *Plant Cell Environ.* 30: 350-365.