

นิตยสาร เครื่องจักร 2552: พื้นฐานทางชีวโมเลกุลของสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 หลัค: รองศาสตราจารย์ทศพล พรพรม, Ph.D. 72 หน้า

การคัดเลือกเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ได้ดำเนินการเพื่อพิจารณากลไกพื้นฐานทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช ในการคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ได้ชักนำเซลล์จากส่วนมีวนใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ K97-32 จากนั้นชักนำให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอยโดยใช้สูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ casein hydrolysate 0.5 กรัมต่อลิตร myo-inositol 0.1 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเริ่มต้นทำการคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ จากระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ตั้งแต่ 0.1 ถึง 1 ไมโคร โมลาร์ ใช้เวลาในการคัดเลือกนาน 378 วัน เซลล์ที่รอดจากการคัดเลือกทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน ซึ่งมีดัชนีของความต้านทานสารเป็น 918 เท่าของเซลล์อ้อยปกติ นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงเซลล์อ้อยต้านทานในอาหารที่ปราศจากสารกำจัดวัชพืชนานอย่างน้อย 4 เดือน เซลล์อ้อยต้านทานยังคงความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ การศึกษากลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสารอิมาซาเพอร์ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยต้านทานและเซลล์อ้อยปกติ พบว่า เซลล์อ้อยต้านทานมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสารสูงกว่าเซลล์อ้อยปกติเป็น 2.65, 2.94, 3.36, 2.90 และ 2.62 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ ได้ทำการพิจารณาในระดับชีวโมเลกุลของยีน ALS ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสารกำจัดวัชพืช โดยทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสในส่วนที่ครอบคลุมบริเวณ B และ E ของยีน ALS ขนาด 455 คู่เบส จากเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ซึ่งได้ทำการขึ้นทะเบียนใน GenBank รหัส EU243998 และ EU243999 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบลำดับเบสของยีน ALS ในเซลล์อ้อยต้านทาน พบว่า มีการกลายพันธุ์เฉพาะจุดเกิดขึ้นที่เป็นแบบการหายไป ของกรดอะมิโนอะลานีน เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 666 เมื่อพิจารณาจากการสะสม mRNA ของยีน ALS ระดับ transcription ในเซลล์อ้อยต้านทานสาร ไม่พบความแตกต่างของการสะสม mRNA ของยีน ALS เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสารและเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร แสดงให้เห็นว่า การสะสม mRNA ของยีน ALS ไม่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ซึ่งการเกิดการกลายพันธุ์ภายในยีน ALS ในเซลล์อ้อยต้านทาน อาจส่งผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่เป็นแบบการตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช จึงทำให้เซลล์อ้อยต้านทานไม่ถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาเพอร์

Nisachol Khruangchan 2009: Molecular Basis of Imazapyr-Resistant Sugarcane Cell Line. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agriculture Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Tosapon Pornprom, Ph.D. 72 pages.

Selection of sugarcane cell line resistant to imazapyr was conducted to investigate the biochemical and molecular basis of herbicide resistance. Selection of sugarcane cells resistant to imazapyr was carried out using callus and cell suspension induced from the tight young furled leaves of sugarcane clone K97-32. The cell suspension was cultured in modified liquid MS medium supplemented with 10% coconut water, 0.5 g/L casein hydrolysate, 0.1 g/L myo-inositol and 3 mg/L 2,4-D. Sugarcane cells resistant to 1 μ M imazapyr were obtained after 378 days of stepwise selection with increasing concentrations of imazapyr from 0.1 to 1 μ M. Surviving cells were sub-cultured at 14 days interval. This indicates that the resistant cells were 918-fold more resistant to imazapyr than the normal cells. Moreover, the resistant cell line remained stable for at least 4 months when kept in herbicide-free medium. To establish the biochemical mechanism of resistance to imazapyr, ALS activity was determined in the normal and resistant cells. It was found that ALS activity of the resistant cells at 3, 5, 7, 10 and 14 days after treatment was 2.65, 2.94, 3.36, 2.90 and 2.62-fold higher than that of the normal cells. In addition, to investigate the molecular basis of ALS gene at the target site responsible for the herbicide activity, the partial sequences of ALS gene region covering 455 bp of domain B and E from the normal and resistant cells was amplified and sequenced. The partial sequence of ALS gene of the normal and resistant cells was deposited in the GenBank database with accession number EU243998 and EU243999, respectively. The ALS gene sequence of the resistant cells showed the point mutation of alanine (A) deletion at 666 position. The accumulation of ALS mRNA at transcription level in the resistant cell was not different from that in both non-treated and treated normal cells. The results indicated the amounts of ALS mRNA had no correlation with the levels of ALS activity. This suggested that the imazapyr resistance might be due to an alteration of the ALS activity making it less sensitive to the inhibitory effect of herbicide. Thus, the sugarcane cell was not inhibited by imazapyr.