



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง พื้นฐานทางชีวโมเลกุลของสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาซาเพอร์

Molecular Basis of Imazapyr-Resistant Sugarcane Cell Line

นามผู้วิจัย นางสาวนิศาชล เครื่องจันทร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ทศพล พรพรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์อรรณพ ชัชวาลการพาณิชย์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์นวิรัตน์ อุดมประเสริฐ, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

พื้นฐานทางชีวโมเลกุลของสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช
อิมซาซาเพอร์

Molecular Basis of Imazapyr-Resistant Sugarcane Cell Line

โดย

นางสาวนิสาชล เครื่องจันทร์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2552

นิตยสาร เครื่องจักร 2552: พื้นฐานทางชีวโมเลกุลของสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกำจัด
วัชพืชอิมาซาเพอร์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: รองศาสตราจารย์ศพล พรพรหม, Ph.D. 72 หน้า

การคัดเลือกเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ได้ดำเนินการเพื่อพิจารณากลไกพื้นฐานทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช ในการคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ได้ชักนำแคลัสจากส่วนม้วนใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ 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 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาในการคัดเลือกนาน 378 วัน เซลล์ที่รอดจากการคัดเลือกทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน ซึ่งมีดัชนีของความต้านทานสารเป็น 918 เท่าของเซลล์อ้อยปกติ นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงเซลล์อ้อยต้านทานในอาหารที่ปราศจากสารกำจัดวัชพืชขนาดอย่างน้อย 4 เดือน เซลล์อ้อยต้านทานสารยังคงความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ 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 นอกจากนี้ได้ทำการพิจารณาในระดับชีวโมเลกุลของยีน ALS ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสารกำจัดวัชพืช โดยทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสในส่วนที่ครอบคลุมบริเวณ B และ E ของยีน ALS ขนาด 455 คู่เบส จากเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ซึ่งได้ทำการขึ้นทะเบียนใน GenBank รหัส EU243998 และ EU243999 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบลำดับเบสของยีน ALS ในเซลล์อ้อยต้านทาน พบว่า มีการกลายพันธุ์เฉพาะจุดเกิดขึ้นที่เป็นแบบการหายไปของกรดอะมิโนอะลานีน 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 furred 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.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ทศพล พรพรม ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความกรุณาช่วยเหลือ คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ และรองศาสตราจารย์ ดร. นวรัตน์ อุดมประเสริฐ คณะกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความกรุณาช่วยเหลือ และคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ ด้วยดีเสมอมา ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงษ์ คำรงกิตติกุล ที่เป็นประธานในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และดร. ปาริชาติ เบิร์นส ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ ตลอดจนอบรมสั่งสอนจนสำเร็จ การศึกษาขอขอบคุณภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน ที่กรุณาให้ใช้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการทำวิทยานิพนธ์ และหน่วยวิจัยด้านพืช หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่กรุณาเอื้อเพื่อให้ใช้ห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์เครื่องมือในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ จากภาควิชาพืชไร่นา และหน่วยวิจัยด้านพืช ทุกคนที่ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์มาตลอด

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ รวมทั้งสมาชิกทุก ๆ คนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาตลอดมา

นิสาชล เครื่องจันทร์
กุมภาพันธ์ 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	15
อุปกรณ์	15
วิธีการ	18
ผลการทดลองและวิจารณ์	30
สรุปผลการทดลอง	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	60
ภาคผนวก	66

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	บริเวณอนุรักษ์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในยีน ALS ซึ่งมีความสัมพันธ์กับระดับความต้านทานต่อสารในกลุ่ม Sulfonylurea (SU), Imidazolinone (IM) และ Triazolopyrimidine (TP)	14
2	ระดับความเข้มข้นของสารอิมิซาซาเพอร์ที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (I_{50}) ที่ 14 วันหลังได้รับอิมิซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน	37
3	ผลของสารอิมิซาซาเพอร์ต่อการตอบสนองของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยต้านทานสารและเซลล์อ้อยปกติ ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสารอิมิซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	46
ตารางผนวกที่		
1	องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS	67
2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยต้านทานสารสายพันธุ์ K97-32 หลังได้รับสารอิมิซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน	68
3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K97-32 หลังได้รับสารอิมิซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน	68
4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมิซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน	69
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติ (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมิซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน	69

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
6 การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หลังจากเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารอิมซาเพอร์ เป็นเวลานาน 1-4 เดือน	70

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของสารอิมซาซาเพอร์ในรูปแบบกรด (ก) และในรูปแบบเกลือ (ข)	6
2	ตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาของสารอิมซาซาเพอร์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ภายในพีช	8
3	บริเวณ 5 ตำแหน่งภายในยีน ALS ที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS	14
4	Degenerated primer สำหรับสังเคราะห์บางส่วนของยีน ALS โดยครอบคลุมบริเวณตำแหน่ง B และ E ที่มีขนาด 455 คู่เบส	22
5	การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K97-32 เมื่อได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน	33
6	ระยะเวลาในการคัดเลือกเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K97-32 ให้ต้านทานต่อสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	34
7	การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารสายพันธุ์ K97-32 เมื่อได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน	35
8	การตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารสายพันธุ์ K97-32 ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน	36
9	การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หลังจากเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารอิมซาซาเพอร์ เป็นเวลา 1-4 เดือน	39
10	กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 3 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	43
11	กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 5 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 7 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	44
13	กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 10 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	44
14	กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	45
15	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ALS ของเซลล์อ้อยด้านทานสาร (R) และเซลล์อ้อยปกติ (N) โดยที่ M = 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, Lithuania), N = เซลล์อ้อยปกติ และ R = เซลล์อ้อยที่ด้านทานสาร	48
16	แถบ DNA ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ EcoRI ของพลาสมิดที่มียีน ALS ของเซลล์อ้อยปกติ (ก) และเซลล์อ้อยที่ด้านทานสาร (ข) ที่โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEMT [®] -easy	49
17	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ALS ในเซลล์อ้อยด้านทานสาร เซลล์อ้อยปกติ และพืชสกุลต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Clustal W	52
18	การสะสมของ RNA จากการแสดงออกของยีน ALS ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่รับสาร (NT) เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่รับสาร (R) และเซลล์อ้อยด้านทานที่รับสาร (RT)	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 การลงทะเบียนลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS ในฐานข้อมูล GenBank ของเซลล์ อ้อยด้านทานสาร	71
2 การลงทะเบียนลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS ในฐานข้อมูล GenBank ของเซลล์ อ้อยปกติ	72

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALS	=	Acetolactate synthase
(NH ₄) ₂ SO ₄	=	Ammonium sulphate
Anti-DIG	=	Anti-digoxigenin-alkaline phosphatase
bp	=	Base pair
X-gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-galactopyranoside
CRD	=	Complete randomized design
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
CDP-Star	=	Disodium 4-chloro-3-(methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1. ^{3.7}]decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate
DTT	=	Dithiothreitol
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
EDTA	=	Ethylene diamine tetraacetic acid
FAD	=	Flavin adenine dinucleotide
<i>g</i>	=	Gravity
I ₅₀	=	Herbicide concentration required to reduce growth by 50%
IPTG	=	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
MgCl ₂	=	Magnesium chloride
mg	=	Milligram
mM	=	Millimolar
M	=	Molar
PCV	=	Packed cell volume
PCI	=	Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol
PCR	=	Polymerase chain reaction
PVPP	=	Polyvinyl polypyrrolidone
K ₂ HPO ₄	=	Potassium phosphate
RT-PCR	=	Reverse transcription-polymerase chain reaction
RNA	=	Ribonucleic acid
SSC	=	Saline-sodium citrate

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
NaOH	=	Sodium hydroxide
H ₂ SO ₄	=	Sulfuric acid
TPP	=	Thiamine pyrophosphate
TAE	=	Tris acetate buffer

พื้นฐานทางชีวโมเลกุลของสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์

Molecular Basis of Imazapyr-Resistant Sugarcane Cell Line

คำนำ

อ้อยเป็นพืชที่มีจีโนมสลับซับซ้อนและมีจำนวนชุดของโครโมโซมพื้นฐานมากกว่า 2 เท่าของสภาพ haploid หรือเรียกว่าเป็นพืชพวก polyploid อ้อยส่วนใหญ่ที่ปลูกในปัจจุบันเป็นลูกผสมระหว่าง *Saccharum officinarum* L. และอ้อยชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ใน species เดียวกัน (Poehlmen and Sleper, 1995) ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมมากกว่าพืชชนิดอื่น ๆ ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่ทำให้การปรับปรุงพันธุ์อ้อยยังไม่ค่อยก้าวหน้าเท่าที่ควร (Arruda and Silva, 2007) อันเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตของอ้อยค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีก ได้แก่ การเขตกรรม การชลประทาน และการจัดการดินยังไม่เหมาะสม รวมทั้งปัญหาศัตรูพืช ได้แก่ โรคพืช แมลงศัตรูพืช และวัชพืช เป็นต้น โดยเฉพาะปัญหาทางด้านวัชพืช ซึ่งทำให้ผลผลิตตกต่ำ เกษตรกรจึงนิยมใช้สารกำจัดวัชพืชในการป้องกันและกำจัดวัชพืช แต่ถ้าใช้สารกำจัดวัชพืชประเภทไม่เลือกทำลายบางครั้งจะทำให้เกิดความเสียหายต่อพืชปลูกได้ ดังนั้นการป้องกันไม่ให้พืชปลูกได้รับพิษจากสารกำจัดวัชพืชประเภทนี้ สามารถทำได้โดยการใช้สารกำจัดวัชพืชประเภทเลือกทำลายหรือพันธุ์พืชที่มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชซึ่งทำให้สามารถใช้สารกำจัดวัชพืชได้อย่างปลอดภัยต่อพืชปลูก

อิมาซาเพอร์ (imazapyr) เป็นสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่ม imidazolinone ที่ยับยั้งการสร้างกรดอะมิโน (amino acid synthesis inhibitors) หรือเรียกว่า กลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์อะซิโตแลคเตทซินเทส (ALS-inhibiting herbicides) อิมาซาเพอร์เป็นสารประเภทไม่เลือกทำลาย สามารถเคลื่อนย้ายได้ทั้งภายในท่อลำเลียงน้ำและท่อลำเลียงอาหารของพืช สารจะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืช การเข้าทำลายของสารกำจัดวัชพืชเกิดขึ้นภายในคลอโรพลาสต์ของเซลล์พืช โดยที่เอนไซม์ ALS ภายในพืชมีการสังเคราะห์ขึ้นได้จากการลอกรหัสพันธุกรรมของยีนในนิวเคลียส และแปลรหัสยีนดังกล่าวบริเวณไซโตพลาสซึมแล้วจึงถูกส่งไปยังคลอโรพลาสต์ เพื่อทำหน้าที่ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนต่อไป โดยมี pyruvate เป็นสารตั้งต้น และมีเอนไซม์ ALS เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นลูกโซ่ซึ่งจะเกิดขึ้น 2 ปฏิกิริยา โดยที่ปฏิกิริยาแรกจะเกิดการรวมตัวของ 2 โมเลกุลของ pyruvate กลายเป็น 2-acetolactate ซึ่งเป็นตัวกลางในการสังเคราะห์

กรดอะมิโน valine และ leucine ส่วนอีกหนึ่งปฏิกิริยาจะเกิดการรวมตัวของ pyruvate และ α -ketoisobutyrate แล้วเปลี่ยนไปเป็น 2-aceto-2-hydroxybutyrate ซึ่งเป็นตัวกลางนำไปสร้างกรดอะมิโน isoleucine ต่อไป โดยกรดอะมิโนเหล่านี้จำเป็นในการเจริญเติบโตของพืช (Singh and Shaner, 1995) การพิจารณากลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืช (target site-based) และไม่ใช่ตำแหน่งเป้าหมาย (non-target site-based) ซึ่งกลไกความต้านทานที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมาย พบว่ามี 2 รูปแบบ คือ การตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช (Devine and Shukla, 2000; Shimizu *et al.*, 2002; Corbett and Tradiff, 2006) และมีการสร้างเอนไซม์ที่มากกว่าปกติ (Corbett and Tradiff, 2006) ส่วนใหญ่กลไกของความต้านทานสารจะเป็นแบบการตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช ส่วนในกรณีที่เป็นแบบไม่ใช่ตำแหน่งเป้าหมายนั้น จะเกี่ยวข้องกับการดูดซึม การเคลื่อนย้าย และกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์พืช เพื่อที่จะทำให้สารกำจัดวัชพืชเข้าสู่ตำแหน่งเป้าหมายให้น้อยลงหรือช้าลง เป็นต้น (Corbett and Tradiff, 2006)

ในการสร้างสายพันธุ์พืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในระดับพืชทั้งต้น สามารถทำการคัดเลือกได้ในสภาพแปลงทดลอง โดยคัดเลือกต้นที่ไม่ถูกทำลายหรือถูกทำลายน้อยเมื่อได้รับสารกำจัดวัชพืช จากการรายงานของ Punyadee *et al.* (2007) ได้ทำการคัดเลือกพันธุ์อ้อยทันทานต่อสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ โดยที่ในพันธุ์อ้อยที่ทนทานสารจะแสดงอาการได้รับพิษจากการให้สารกำจัดวัชพชน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อ้อยที่อ่อนแอ สำหรับพืชที่ทนทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS นั้น ส่วนใหญ่จะพบการเกิดการกลายพันธุ์เป็นแบบ single amino acid ในตำแหน่งเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยายับยั้งภายในพืช (Wright *et al.*, 1998; White *et al.*, 2003; Corbett and Tradiff, 2006) จะเกิดที่บริเวณอนุรักษ์ที่อยู่ภายในยีน ALS มี 5 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ A, B, C, D และ E โดยที่ Devine and Shukla (2000) ได้รายงานไว้ว่า ส่วนใหญ่ความต้านทานสารในกลุ่ม Imidazolinone นั้น มีระดับความต้านทานที่สูงเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณตำแหน่ง B, C และ E อย่างไรก็ตาม กลไกของความต้านทานที่เกิดขึ้นในสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ยังไม่ชัดเจน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จึงได้ทำการพิจารณาเฉพาะส่วนที่เป็นตำแหน่งเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืชเท่านั้น โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะซิโตแลคเตตซินเนส รวมทั้งพิจารณาการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกับสายพันธุ์เซลล์อ้อยอ่อนแอต่อสารอิมาซาเพอร์ เพื่อนำไปใช้เป็นดัชนีในการอธิบายเกี่ยวกับกลไกทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลของความต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับเซลล์ ตลอดจน

นำไปใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ทำการคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับเซลล์แขวนลอยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
2. ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเทส โดยการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกับเซลล์อ้อยปกติ เพื่อใช้เป็นดัชนีในการอธิบายกลไกทางชีวเคมีของความต้านทานในสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์
3. ทำการศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS และการแสดงออกของยีน ALS โดยวิธีการ semi-quantitative RT-PCR โดยการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกับเซลล์อ้อยปกติ เพื่อใช้เป็นดัชนีในการอธิบายกลไกทางชีวโมเลกุลของความต้านทานในสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์

การตรวจเอกสาร

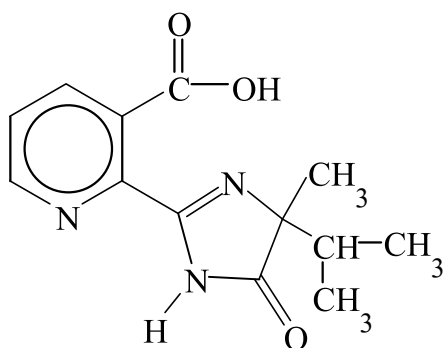
1. อ้อย

อ้อย (*Saccharum spp.*) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในตระกูลหญ้า (Family Poaceae) และเป็นพืชที่มีพันธุกรรมสลับซับซ้อน อ้อยที่ปลูกเป็นพันธุ์การค้าในปัจจุบันส่วนใหญ่จะเป็นอ้อยลูกผสมระหว่าง *S. officinarum* โดยมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันออกไป ตั้งแต่ $2n = 100-140$ (Poehlmen and Sleper, 1995) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของอ้อยประกอบด้วย ลำต้น ใบ และระบบราก ซึ่งลำต้นอ้อยมีอยู่ 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนใต้ดิน และส่วนเหนือดิน ส่วนที่อยู่เหนือดินจะมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ บริเวณลำต้นเหนือดินจะมีข้อ (node) และปล้อง (internode) เมื่อใบหลุดจะปรากฏรอยกาบใบให้เห็น ความยาวระหว่างปล้องจากรอยกาบใบหนึ่งถึงรอยถัดไป เรียกรวมว่า ข้อปล้อง (joint) โดยจะมีปมราก (root primordia) ตรงบริเวณใต้กาบใบ และที่ข้อจะมีตา ซึ่งสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้ ลำต้นอ้อยสามารถเจริญเติบโตได้สูงประมาณ 2-6 เมตร ส่วนของใบจะมีอยู่ 2 ส่วน คือ กาบใบ (leave sheath) กับแผ่นใบ (leave blade) ทั้งสองส่วนจะเชื่อมติดกัน โดยทั่วไปใบจะเกิดสลับกันที่ข้อและหุ้มตาเอาไว้ รอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบด้านในจะมีลิ้นใบ (ligule) เป็นแผ่นบางยื่นออกมาจากกาบใบ ส่วนที่อยู่ใต้ดินจะเป็นตอหรือเหง้า ระบบรากของอ้อยเป็นแบบระบบรากฝอย แผ่กระจายออกไปรอบต้น เพื่อหาน้ำ ธาตุอาหารและช่วยพยุงลำต้น รากจะเจริญเติบโตมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสภาพของดิน (Miller and Gilbert, 1993) ช่อดอกเป็นแบบพานิเคิล หรือที่เรียกว่า แอโรว์หรือทาสเซล (arrow or tassel) มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในช่อดอกเดียวกัน เนื่องจากอ้อยเป็นพืชไผ่แสง จึงออกดอกเมื่อเวลากลางวันสั้นกว่ากลางคืน ช่อดอกจะเป็นแบบ arrow เมล็ดของอ้อยเป็นชนิดคาริโอออปซิส (caryopsis)

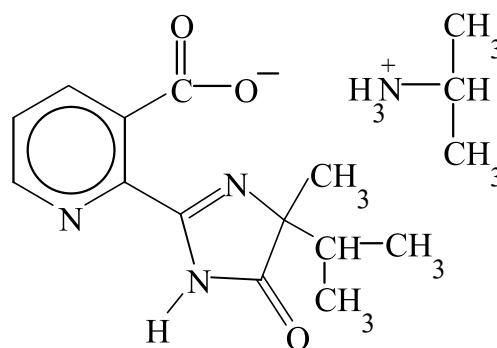
การปลูกอ้อยเพื่อการค้าส่วนใหญ่จะใช้ส่วนของลำต้นในการขยายพันธุ์ ซึ่งเรียกว่า ท่อนพันธุ์ (seed cane, cutting) โดยในแต่ละท่อนพันธุ์จะมีตาประมาณ 2-3 ตา ในการปลูกอ้อยครั้งหนึ่งสามารถไว้ตอได้หลายครั้ง ซึ่งอาจไว้ตอถึง 10 ครั้ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการเขตกรรมและการจัดการศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งศัตรูพืช เช่น โรค แมลง และวัชพืช เป็นต้น ซึ่งนับว่าเป็นปัญหาหลักที่สำคัญที่จะไปลดผลผลิตอ้อย ดังนั้นจึงควรวางแผนการปลูกให้ดี เพื่อเพิ่มผลผลิตและเพิ่มความหวาน โดยทั่วไปอ้อยมีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 10-12 เดือน แต่อ้อยบางพันธุ์จะให้ความหวานสูงที่อายุ 12 เดือน ควรเก็บเกี่ยวอ้อยที่สุกแก่เต็มที่ แต่ถ้าอ้อยออกดอกจะทำให้ความหวานของอ้อยลดลง ซึ่งจะทำให้คุณภาพของอ้อยในการผลิตน้ำตาลลดลงไปด้วย

2. สารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ (imazapyr)

อิมาซาเพอร์จัดเป็นสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่ม imidazolinone ประเภทไม่เลือกทำลาย ใช้ควบคุมวัชพืชตามพื้นที่รกร้าง วัชพืชข้างถนน สวนยางพารา และไร่อ้อย เป็นต้น ภายใต้ชื่อการค้า Arsenal, Chopper และ Assault ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1984 มีชื่อทางการค้าว่า Arsenal หลังจากนั้น ในปี ค.ศ. 1993 ได้พัฒนาสูตรใหม่มีชื่อทางการค้าว่า Chopper (Cox, 1996) โดยทั่วไปสารอิมาซาเพอร์ มักจะพบได้ 2 รูปแบบ คือ ในรูปกรด และรูปเกลือ (ภาพที่ 1) ส่วนใหญ่จะมีการผลิต และจำหน่ายในรูปเกลือ ซึ่งมีชื่อทางเคมี คือ 2-[4, 5-dihydro-4-methyl-4-(1-methylethyl)-5-oxo-1H-imidazol-2-yl]-3-pyridinecarboxylic acid (CA) หรือ 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl) nicotinic acid (IUPAC) มีสูตรโมเลกุลของสารเป็น $C_{13}H_{15}N_3O_3$ ลักษณะของสารจะเป็นผงสีขาว มีกลิ่นกรดเล็กน้อย (ทศพล, 2545)



(ก) Imazapyr acid



(ข) Imazapyr isopropylamine salt

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารอิมาซาเพอร์ในรูปกรด (ก) และในรูปเกลือ (ข)

ที่มา: Ahrens (1994)

อิมิซาเพอร์ เป็นสารกำจัดวัชพืชอยู่ในกลุ่มที่ยับยั้งการสร้างกรดอะมิโน (amino acid synthesis inhibitor) หรือเรียกว่า กลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS (ALS-inhibiting herbicides) เป็นสารประเภทไม่เลือกทำลาย มีการแนะนำให้ใช้ทั้งแบบก่อนงอก (pre-emergence) และหลังงอก (post-emergence) เมื่อฉีดพ่นสารแล้วพืชจะดูดซึมได้ทั้งทางใบและราก สารสามารถเคลื่อนย้ายได้อย่างรวดเร็วผ่านทาง xylem และ phloem ไปยังบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญของพืช เมื่อสารเข้าไปภายในเซลล์จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิโตแลคเตทซินเทส (acetolactate synthase, ALS) หรืออาจจะเรียกว่า เอนไซม์อะซิโตไฮดรอกซีซินเทส (acetohydroxy synthase, AHAS) ซึ่งจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสร้างกรดอะมิโนที่เป็นลูกโซ่ ได้แก่ valine, leucine และ isoleucine โดยปฏิกิริยาแรกจะเกิดการรวมตัวของ 2 โมเลกุลของไพรูเวท จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ 2-Acetolactate ซึ่งเป็นตัวกลางในการสังเคราะห์กรดอะมิโน valine และ leucine ส่วนอีกหนึ่งปฏิกิริยาจะเกิดการรวมตัวของไพรูเวท และแอลฟาคีโตบิวทีเรต (α -keto-butyrate) แล้วเปลี่ยนไปเป็น 2-Aceto-2-hydroxybutyrate ซึ่งจะเป็นตัวกลางนำไปสร้างกรดอะมิโน isoleucine ต่อไป (ภาพที่ 2) ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้จำเป็นในการเจริญเติบโตของพืช (Singh and Shanner, 1995) เมื่อพืชได้รับสารจะส่งผลให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และการแบ่งเซลล์ลดลงภายใน 2-3 ชั่วโมงหลังได้รับสาร ต่อมาพืชจะแสดงอาการได้รับพิษภายใน 1-2 สัปดาห์ โดยรากจะกุด ต้นเปลี่ยนเป็นสีม่วงและ จะค่อย ๆ ตายไปอย่างช้า ๆ ภายใน 1 เดือนหลังได้รับสาร แต่อย่างไรก็ตามจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และชนิดของพืช (Shanner and Singh, 1997)

สารอิมิซาเพอร์จะสลายตัวภายใน 24 ชั่วโมง โดยปริมาณสารจะลดลงอย่างรวดเร็ว และค่อย ๆ ถูกปลดปล่อยออกทางรากลงสู่ดิน โดยจุลินทรีย์ภายในดินจะเป็นตัวช่วยในการย่อยสลายของสาร มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปลา นก ต่ำ มีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในดิน มีความเป็นพิษทางอากาศน้อยเนื่องจากสารมีการระเหยได้น้อย จึงทำให้มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มสารสัมผัสหรือสารทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Contact-membrane disrupters)

3. กลไกทางชีวเคมีของพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS

เอนไซม์ ALS เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน valine leucine และ isoleucine ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เป็นตำแหน่งเป้าหมายของสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS ที่แสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งหรือเข้าทำลายพืช โดยทั่วไปกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS นั้น จะมีความเกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืช (target site-based) และไม่ใช้ตำแหน่งเป้าหมาย (non-target site-based) ซึ่งกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้นโดยไม่ใช้ตำแหน่งเป้าหมายนั้น อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการลดปริมาณสารกำจัดวัชพืชหรือลดอัตราการเคลื่อนย้ายของสารกำจัดวัชพืชไม่ให้ไปเกาะจับที่ตำแหน่งเป้าหมาย ส่วนกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมายนั้น อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งเป้าหมายของสารกำจัดวัชพืช ทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืช มีการตอบสนองน้อยหรืออาจเกิดการสร้างเอนไซม์ที่มีมากกว่าปกติ ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาความต้านทานสารกำจัดวัชพืชกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS ส่วนใหญ่ได้มีรายงานว่า กลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืช ทำให้สารกำจัดวัชพืชไม่สามารถเข้าจับกับตำแหน่งเป้าหมายได้ พืชจึงเกิดความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช (Corbette and Tardiff, 2006)

การศึกษากลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS ที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมายนั้น ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาในพืชปลูกหลายชนิด ซึ่งจากการศึกษาข้าวสาลีที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Imidazolinone โดยทำการคัดเลือกด้วยวิธี seed mutagenesis พบว่า ประชากรในรุ่นที่ 2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS สูงกว่าในพันธุ์ปกติ (Newhouse *et al.*, 1992) ต่อมา Wright *et al.* (1998) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ใน sugarbeet 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ Sir-13, พันธุ์ Sur และพันธุ์ 93R30B ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS พบว่า ทั้ง 3 สายพันธุ์เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS โดยที่ พันธุ์ Sir-13 มีระดับความต้านทานต่อสาร imazethapyr มากถึง 40 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อ่อนแอ ส่วนพันธุ์ Sur มีระดับความต้านทานต่อสาร chlosulfuron 1,000 เท่า และ flumetsulam 50 เท่า และพันธุ์ 93R30B มีความต้านทานต่อสารทั้ง 3 ชนิด โดยมีระดับความต้านทานต่อสาร imazethapyr, chlosulfuron และ flumetsulam มากกว่า 1,000, 4,300 และ 200 เท่า ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับ White *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาในทานตะวันที่ต้านทานต่อสาร imazethapyr และ chlorimuron เมื่อพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์ ALS พบว่า ในสายพันธุ์ที่ต้านทานมีระดับ

ความต้านทานต่อสารดังกล่าวนี้ เป็น 39 และ 9 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่อ่อนแอ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาในวัชพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช ได้แก่ wild radish (Yu *et al.*, 2003), eastern black nightshade (Milliman *et al.*, 2003), smooth pigweed (Trucco *et al.*, 2005), red rice (Avila *et al.*, 2005) และ wild mustard (Christoffer *et al.*, 2006) เป็นต้น ซึ่งให้ผลการทดลองที่คล้ายกัน กล่าวคือ ในสายพันธุ์ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชมีระดับของความต้านทานสารสูงกว่าในสายพันธุ์ที่อ่อนแอ แสดงว่า ความต้านทานต่อสารในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS เกิดจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมาย ที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืช

กลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งเป้าหมายนั้น อาจเกิดจากการสร้างเอนไซม์ที่มีมากกว่าปกติ หรืออาจเกิดจากการของสารกำจัดวัชพืช ทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายมีการตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช กล่าวคือ พืชที่ต้านทานสารจะลดการตอบสนองของเอนไซม์ ALS ต่อสารกำจัดวัชพืช จึงไม่ถูกยับยั้งโดยสารกำจัดวัชพืช (Tan *et al.*, 2005) การศึกษาในครั้งนี้ จะมุ่งเน้นไปที่การเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS เพื่อที่ใช้เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการอธิบายเกี่ยวกับกลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสารอิมาซาเพอร์ต่อไป

4. ชีวโมเลกุลพื้นฐานของพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS

การศึกษากลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS ที่ผ่านมามีการศึกษาในระดับสรีรวิทยาและชีวเคมี ซึ่งเป็นการพิจารณาเกี่ยวกับการตอบสนองของพืชที่มีต่อสารกำจัดวัชพืช รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เมื่อได้รับสาร ในปัจจุบันนี้ ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในระดับชีวโมเลกุล โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีน ALS ในระดับ DNA และ RNA ซึ่งยีน ALS เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ ALS และสังเคราะห์ขึ้นโดยการลอกรหัสพันธุกรรมจากยีนในนิวเคลียส และแปลรหัสยีนดังกล่าวบริเวณไซโตพลาสซึมแล้วจะถูกส่งไปยังคลอโรพลาสต์ เพื่อทำหน้าที่ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนต่อไป มักจะพบยีน ALS นี้ ในแบคทีเรีย รา สาหร่าย ยีสต์ และพืช แต่จะไม่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในพืชได้มีการศึกษาครั้งแรกใน *Arabidopsis thaliana* และยาสูบ หลังจากนั้นจึงได้มีการศึกษาในพืชชนิดอื่น ๆ ต่อมา (Shimizu *et al.*, 2002)

สารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 5 กลุ่ม คือ Sulfonyleurea (SU), Imidazolinone (IM), Triazolopyrimidine (TP), Pyrimidineylthio-oxybenzoate (POB) และ Sulfonyleamino-carbonyl-triazolinone (SCT) ในปัจจุบันนี้การศึกษาเกี่ยวกับความต้านทานของพืชที่มีต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS ได้มีการนำเทคนิคทางด้าน DNA มาใช้กันมากขึ้น ซึ่งมีรายงานว่า ส่วนใหญ่พืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS มีการเกิดการกลายพันธุ์เป็นแบบ single amino acid ที่บริเวณตำแหน่งเป้าหมาย (Corbett และ Tradiff, 2006; Tan *et al.*, 2005; White *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 1998) การเกิดการกลายพันธุ์ตรงตำแหน่งเป้าหมายนั้น จะเกิดที่บริเวณอนุรักษ์ (conserve domain) ที่อยู่ในยีน ALS มี 5 บริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ บริเวณ A, B, C, D และ E เมื่อเกิดความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS (ภาพที่ 3 และตารางที่ 1) อย่างไรก็ตาม การเกิดการกลายพันธุ์ในแต่ละตำแหน่งของยีน ALS นั้น จะขึ้นอยู่กับชนิดของ พืช พันธุ์พืช และชนิดของสารกำจัดวัชพืชในแต่ละกลุ่ม โดยที่ Devine และ Shukla (2000) ได้รายงานว่ สารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม sulfonyleurea และ triazolopyrimidine มีระดับความต้านทานที่สูงเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน ALS ที่บริเวณตำแหน่ง A แต่มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยที่บริเวณตำแหน่ง B, C และ E ส่วนสารในกลุ่ม Imidazolinone มีการเปลี่ยนแปลงของยีน ALS เล็กน้อยที่บริเวณตำแหน่ง A แต่จะมีระดับความต้านทานที่สูง เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณตำแหน่ง B, C และ E

ส่วนใหญ่ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้น มักจะเกิดจากการกลายพันธุ์ในระดับยีน โดยมีการเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่เป็นแบบการแทนที่ลำดับเบส (base-pair substitution) ทำให้กรดอะมิโนในโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงไป (Tan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007; Pornprom *et al.*, 2009) หรือเป็นแบบการหายไปของนิวคลีโอไทป์ในลำดับเบส (deletion) ทำให้กรดอะมิโนหายไปด้วย (Kim *et al.*, 2004) ซึ่งส่งผลให้เกิดความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในพืช จากการศึกษาของ Wright *et al.* (1998) ได้ทำการคัดเลือก sugarbeet 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ Sir-13 มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Imidazolinone เมื่อพิจารณาจากลำดับเบสของยีน ALS พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก threonine เป็น alanine ที่ตำแหน่ง 113 ส่วนพันธุ์ Sur ที่มีความต้านทานต่อสาร chlosulfuron และ flumetsulam เมื่อพิจารณาลำดับเบสของยีน ALS พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนทำให้ลำดับกรดอะมิโนเปลี่ยนจาก surine กลายเป็น proline ที่ตำแหน่ง 188 และพันธุ์ 93R30B มีความต้านทานต่อสาร imazethapyr, chlosulfuron และ flumetsulam จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 2 ตำแหน่งจาก threonine กลายเป็น alanine ที่ตำแหน่ง 113 และ surine กลายเป็น proline ที่ตำแหน่ง 188 นอกจากนี้ ได้มีรายงานใน

ทานตะวันที่ต้านทานสาร imazethapyr และ chlorimuron-ethyl พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 205 จาก alanine เป็น valine (White *et al.*, 2003) เช่นเดียวกับการรายงานของ Yu *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาใน wild radish จำนวน 8 สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสาร chlosulfuron, metosulam และ metsulfuron พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน proline ที่ตำแหน่ง 197 (เมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งลำดับกรดอะมิโนของ *Arabidopsis*) ในบริเวณ A ของยีน ALS เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน ALS ในระดับ mRNA โดยวิธี northern blot เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่ต้านทานกับสายพันธุ์อ่อนแอ พบว่า ระดับของการสะสม mRNA ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับรายงานของ Trucco *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน ALS บริเวณตำแหน่ง A และ B ใน smooth pigweed สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสาร imazethapyr พบว่า สายพันธุ์ที่ต้านทานจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก alanine เป็น threonine ที่ตำแหน่ง 122 บริเวณตำแหน่ง A ส่วนบริเวณตำแหน่ง B ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ต่อมา Chistoffers *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาใน wild mustard ที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS โดยพิจารณาลำดับเบสของยีน ALS เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่ต้านทานกับสายพันธุ์อ่อนแอ พบว่า ในสายพันธุ์ที่ต้านทานจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก triptophan เป็น leucine ที่ตำแหน่ง 574 (เมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งลำดับกรดอะมิโนของ *Arabidopsis*) นอกจากนี้ จากผลการรายงานของพืชและวัชพืชอีกหลายชนิด เช่น red rice (Rajguru *et al.*, 2005), common ragweed (Zheng *et al.*, 2005) และ grass weed (Marshall and Moss, 2008) เป็นต้น แสดงให้เห็นว่า การเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนจะส่งผลให้เกิดความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS ซึ่งการศึกษานี้จะพิจารณาลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS เพื่อใช้เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการอธิบายกลไกพื้นฐานในระดับชีวโมเลกุลของความต้านทานในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาฮาเพอร์ต่อไป

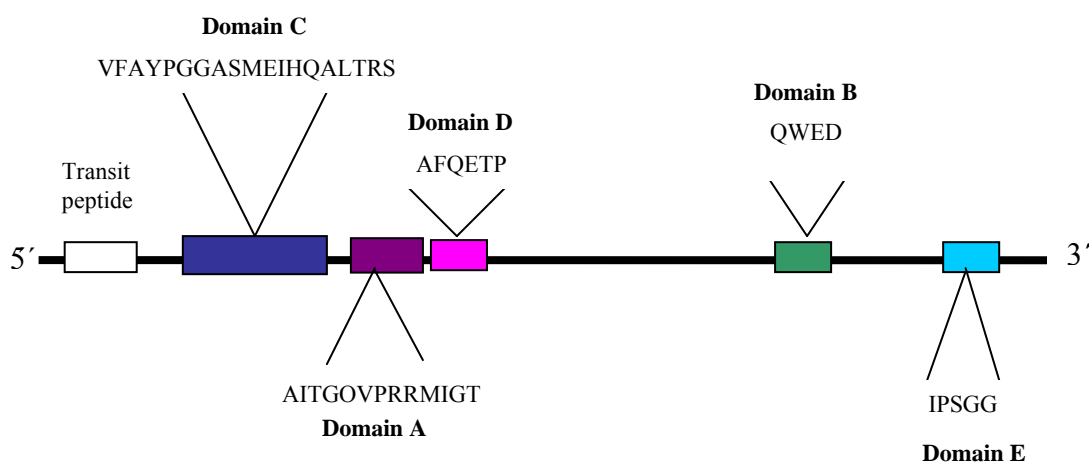
การศึกษากลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในระดับชีวเคมีและชีวโมเลกุลในพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช นับว่าเป็นสิ่งที่สำคัญมากในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช เนื่องจากการตอบสนองของพืชที่มีต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในพืชอย่างต่อเนื่องและมีความซับซ้อนมาก ดังนั้น การพิจารณาเกี่ยวกับกลไกทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลของพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช สามารถช่วยในการอธิบายเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น (Corbett และ Tardiff, 2006) ซึ่งการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในขั้นตอนของการดำเนินงานทางด้านการผลิตและการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อให้มีความต้านทานสารกำจัดวัชพืชได้ต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลเกี่ยวกับการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน

ALS ที่ทำให้พืชเกิดความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS ซึ่งแนวทางในการพัฒนาพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช จะช่วยให้เกษตรกรลดการใช้สารกำจัดวัชพืชภายในไร่นาและเป็นวิธีการหลีกเลี่ยงความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นจากการใช้สารกำจัดวัชพืชได้ต่อไป

ตารางที่ 1 บริเวณอนุรักษ์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในยีน ALS ซึ่งมีความสัมพันธ์กับระดับความต้านทานต่อสารในกลุ่ม Sulfonylurea (SU), Imidazolinone (IM) และ Triazolopyrimidine (TP)

บริเวณอนุรักษ์	ระดับความต้านทานสารกำจัดวัชพืช		
	SU	IM	TP
C (VFAYPGGASMEIHQALTRS)	ต่ำมาก	สูง	ต่ำมาก
A (AITGOVPRRMIGT)	สูง	-	ค่อนข้างต่ำ
D (AFQETP)	สูง	-	-
B (QWED)	สูง	สูง	สูง
E (IPSGG)	ต่ำ	สูง	-

ที่มา: Devine and Shukla (2000)



ภาพที่ 3 บริเวณ 5 ตำแหน่งภายในยีน ALS ที่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเกิดความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS

ที่มา: Devine and Shukla (2000)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์อ้อย

อ้อยพันธุ์ K97-32 เป็นพันธุ์อ้อยลูกผสมของศูนย์ส่งเสริมเกษตรและอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม

2. สารกำจัดวัชพืช

สารอิมาซาเพอร์ ในรูป technical grade ความบริสุทธิ์ 98.8 เปอร์เซ็นต์

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารและอุปกรณ์ที่ใช้ในตู้ปลอดเชื้อ เช่น เครื่องชั่ง ตู้อบลมร้อน ไมโครเวฟ เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เครื่องปั่นเหวี่ยง เตาอบความร้อน ขวดรูปชมพู่ ขวดวัดปริมาตร บีกเกอร์ จานแก้ว หลอดไซริงจ์ ปากกิบ ตะเกียง และไมโครปิเปตต์ เป็นต้น

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และฮอร์โมนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ตารางภาคผนวกที่ 1)

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เช่น เครื่องควบคุมอุณหภูมิและแสง ชั้นสำหรับวางขวดเนื้อเยื่อ ตู้ปลอดเชื้อ และเครื่องเขย่า เป็นต้น

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะซีโตนแลคเตทซินเนส

4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ได้แก่

- เครื่องปั่นเหวี่ยง เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Beckman couter DU^R 530)
- เครื่องบ่มอุณหภูมิ (water bath)
- คอลัมน์ (SephadexTM G-25; PD-10) (Amersham Bioscience)
- ไมโครปิเปตต์ P10, P20, P200 และ P1000 (Gilson)

4.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ โดยวิธีของ Osuna *et al.* (2003)

5. อุปกรณ์และสารเคมีในการศึกษาด้านชีวโมเลกุล

5.1 อุปกรณ์ทั่วไป ได้แก่

- เครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Jouan MR23i)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (eppendorf)
- ไมโครปิเปตต์ P10, P20, P200 และ P1000 (Gilson)
- Gel electrophoresis (GelMate 2000 Toyobo)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Amersham Biosciences, Ultras1100pro)
- เครื่อง PCR (ThermoHybaid PXE0.2)
- เครื่อง PCR (Biometra Thermocycler)
- Gel documentary (SYNGENE)
- ตู้ hybridization (Hot air oven hybaid)
- ตู้บ่มอุณหภูมิ waterbath (Mettmert WB-45) incubator (Mettmert)
- เครื่อง seal ถุงพลาสติก (FJ SFM-200)
- Gel electrophoresis (Gelmate TOYOBO) gel electrophoresis (Mupid-Exu)

5.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัด RNA และ โคลนยีน ALS ได้แก่

- ไนโตรเจนเหลว
- TLES buffer (0.1 M LiCl, 0.1 M Tris pH 8.0, 0.01 M EDTA, 1% SDS)
- Phenol chloroform: isoamyl alcohol (24 : 1 v/v)
- PCI (phenol : chloroform : isoamyl alcohol; 25 : 24 : 1 v/v)
- 100% ethanol, 70 % ethanol, น้ำปราศจาก RNase
- ชุดสำเร็จรูปในการทำปฏิกิริยา RT-PCR (QIAGEN, Germany)
- ชุดสำเร็จรูปที่ใช้ในการโคลนยีน โดยใช้เวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy vector (Promega, USA)
- Solution I (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8.0)
- Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้)
- Solution III (3 M potassium acetate, 5 M glacial acetic acid)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT, X-gal, IPTG, ยาปฏิชีวนะ ampicilin
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Biolab, England)
- ชุดสำเร็จรูปสำหรับสกัด DNA จากอะกาโรสเจล (Vivantis, Malaysia)
- TAE

5.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ southern blot hybridization ได้แก่

- ชุดสำเร็จรูปในการทำ probe (Roche, Germany)
- 20X SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate pH 7.0, 1% SDS)
- 2X SSC
- Blocking reagent hybridization solution (Roche, Germany)
- CDP-star (Roche, Germany)
- Anti-DIG (Roche, Germany)
- Detection buffer (0.1 M Tris pH 9.5, 0.1 M NaCl)

วิธีการ

1. การคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์

1.1 การคัดเลือกเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์

นำอ้อยพันธุ์ K97-32 ที่ได้จากการคัดเลือกในสภาพแปลงทดลอง (Punyadee *et al.*, 2007) ซึ่งมีแนวโน้มว่า มีความทนทานต่อสารอิมาซาเพอร์ มาชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส โดยนำชิ้นส่วนใบม้วนยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) pH 5.7 ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร myo-inositol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ามะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และ agar powder 7 กรัมต่อลิตร หนึ่งภาชนะที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที หลังจากนั้น 6 สัปดาห์ ตัดชิ้นส่วนของแคลลัสนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับที่ชักนำให้เกิดแคลลัสแต่ไม่เติมผงวุ้น ปริมาตร 50 มิลลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน เพื่อชักนำให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอย ต่อจากนั้นนำมาศึกษาการตอบสนองของเซลล์อ้อยต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 ไมโครโมลาร์ ที่ 0, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังจากได้รับสาร โดยทำการวัดปริมาตรเซลล์ด้วย packed cell volume (PCV) เพื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเซลล์ต่อไป จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ พิจารณาจากระดับความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชเป็นลำดับ (stepwise selection) จากระดับความเข้มข้นเริ่มต้นที่ทำให้เซลล์อ้อยมีการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเซลล์อ้อยมีอัตราเจริญเติบโตเท่ากับเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสารกำจัดวัชพืช จึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นสูงมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้สายพันธุ์เซลล์อ้อยที่มีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ ที่มีลักษณะเหมือนเซลล์อ้อยปกติ จึงนำมาศึกษาการตอบสนองของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่ 0, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังจากได้รับสาร โดยทำการวัดปริมาตรเซลล์ด้วย packed cell volume (PCV) จากนั้น นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วนำค่าเฉลี่ยมาสร้างกราฟการตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารต่อสารอิมาซาเพอร์

พิจารณาค่าระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชที่ทำให้เซลล์พืชมีการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (I_{50}) โดยวัดปริมาณเซลล์ของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร หลังได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่ 14 วันหลังได้รับสาร ทำการคำนวณค่า I_{50} จากวิธีการของ Seefeldt *et al.* (1995) ดังสมการต่อไปนี้

$$y = C + \frac{D - C}{1 + (x/I_0)^b}$$

โดยที่

C = ชีดจำกัดล่าง (lower limit)

D = ชีดจำกัดบน (upper limit)

X = ระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช

b = ค่าความชันของกราฟที่ตำแหน่ง I_{50}

หลังจากนั้น นำไปพิจารณาค่าดัชนีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช (resistance index = I_{50} value of resistant cells/ I_{50} value of normal cells) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติตามแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ เมื่อพบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ ใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

1.2 การทดสอบความคงตัวของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชของเซลล์อ้อย

ในการทดสอบความคงตัวของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช ประยุกต์ใช้ตามวิธีของ Chompoo และ Pornprom (2008) โดยนำเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์และเซลล์อ้อยปกติ มาทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน โดยปราศจากการเติมสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 เดือน บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 1 เดือน โดยเมื่อครบ 1 เดือน สุ่มเลือกเซลล์อ้อยปกติ เซลล์อ้อยต้านทานที่ปราศจากสารอิมาซาเพอร์ มาเลี้ยงในอาหารที่เติมและไม่เติมสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ นำเซลล์อ้อยปกติ เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร มาทำการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธี PCV ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความ

เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ แล้วนำเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร หลังทำการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มาเลี้ยงต่อในอาหารที่ปราศจากสาร จนกระทั่งเก็บข้อมูลครบ 4 เดือน แล้วทำการการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N = normal cells) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT = normal cells treated with the herbicide) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R = resistant cells without the herbicide) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT = resistant cells treated with the herbicide)

2. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะซีโตแลคเตทซินเนส

2.1 การสกัดเอนไซม์ ALS

เซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่อายุ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสาร ตัวอย่างละ 2 กรัม ไปกรองและบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาสกัดเอนไซม์ ALS โดยประยุกต์จากวิธีการของ Osuna *et al.* (2003) ด้วย extraction buffer [ประกอบด้วย 0.1 M K_2HPO_4 pH 7.5, 1 mM sodium pyruvate, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM TPP, 10 μ M FAD, 12 mM DTT และ 10% glycerol (1:9 โดยปริมาตร)] 3 มิลลิลิตรต่อตัวอย่างเซลล์ 1 กรัม แล้วเติม PVPP 0.5 กรัม ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยผ้ากรอง 4 ชั้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้น ทำการตกตะกอนโปรตีนโดยดูดสารละลายใส่ส่วนบน มาเติมด้วยสารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ที่อิ่มตัว 50 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรสารละลายใส่ส่วนบน จากนั้นแช่ในน้ำแข็งนาน 60 นาที เพื่อให้การตกตะกอนของ crude enzyme เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใส่ส่วนบนทิ้ง นำตะกอนโปรตีนที่ได้ละลายด้วย extraction buffer ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร แล้วทำ desalting โดยใช้ Sephadex G-25 PD-10 คอลัมน์ ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย elution buffer pH 7.5 [ประกอบด้วย 0.1 M K_2HPO_4 pH 7.5, 0.5 mM $MgCl_2$ และ 20 mM sodium pyruvate] จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในทันที

2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ALS

ดูดสารละลายใส่ส่วนบนปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เติม assay buffer ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร [ประกอบด้วย 0.08 M K_2HPO_4 pH 7.5, 0.15 M sodium pyruvate, 1.5 mM $MgCl_2$ และ 160 μ M FAD] เติมสารอิมซาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ แล้วเติม 0.04 โมลาร์ dibasic potassium phosphate (pH 7.0) เพื่อปรับให้มีปริมาตรรวมทั้งหมด 0.25 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยตู้บ่มอุณหภูมิ (water bath) นาน 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 3 โมลาร์ H_2SO_4 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อช่วยให้เกิดการ decarboxylate ของ acetolactate เป็น acetoin จากนั้นเติม α -naphthol ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร (5 กรัมต่อลิตรใน 2.5 โมลาร์ NaOH) และ creatine ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร (5 กรัมต่อลิตร) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที หลังจากนั้น นำสารละลายใส่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Beckman couter DU^R530) (Westerfeld, 1945)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ใช้วิธีประยุกต์ตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้ bovine serum albumin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ ALS และโปรตีนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วจึงนำมาคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALS โดยมีหน่วยเป็น ไมโครโมล acetoin ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที (μ mol acetoin/ mg protein /min) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ตามแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยที่สายพันธุ์เซลล์อ้อย มี 4 แบบ คือ เซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) เมื่อพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ จึงใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

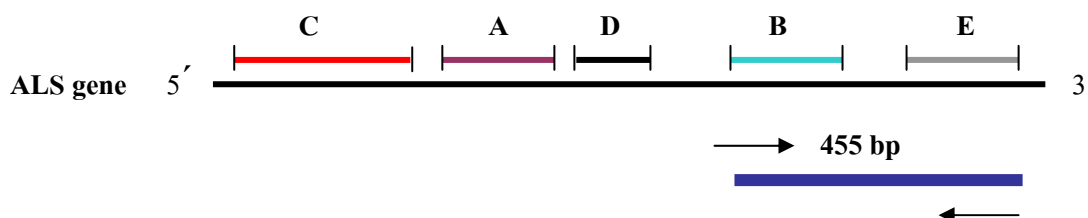
3. การโคลนยีนและการหาลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS

3.1 ออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน ALS จะเป็น degenerated primer ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของส่วน B และ E ซึ่งจะอยู่ทางด้านปลาย 3' ของยีน โดยจะทำการสืบค้นข้อมูล amino acid sequence ของยีน ALS จากพืชสกุลต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย *Arabidosis thaliana* (X51514) ข้าวโพด (*Zea mays*, X63553) ข้าว (*Oryza sativa*, AY885674) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L., AY210408) จากฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ที่มีขนาด 455 คู่เบส (ภาพที่ 4)

ไพรเมอร์ ALS2F (forward): 5' CTGGTCTGGGGCAATGGGRTTTGG 3'

ไพรเมอร์ ALS2R (reverse): 5' GTCCTTGAAAGCNCCACCACTCGG 3'



ภาพที่ 4 Degenerated ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์บางส่วนของยีน ALS โดยครอบคลุมบริเวณตำแหน่ง B และ E ที่มีขนาด 455 คู่เบส

3.2 สกัด RNA จากเซลล์อ้อยที่ด้านทานสารและเซลล์อ้อยปกติ

เมื่อเซลล์มีอายุได้ 7 วันหลังจากการเปลี่ยนอาหาร MS สูตรดัดแปลง นำตัวอย่างของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ด้านทานสาร มาสกัด total RNA ทำการประยุกต์ตามวิธีของ Verwoerd *et al.* (1989) โดยใช้ตัวอย่างเซลล์อ้อยอย่างละ 1 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ตักใส่หลอด microcentrifuge tube ที่มี TLES บัฟเฟอร์ (100 mM Tris pH 8.0, 100 mM LiCl, 100 mM EDTA และ 1% SDS) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และ phenol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้

เข้ากันโดยใช้ vortex หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1; โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่า ของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิม นาน 15 นาที นำสารละลายส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่ เติม 4 โมลาร์ LiCl ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิม นาน 15 นาที เก็บตะกอนไว้แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำมาเติม 100% ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายและ 2.6 โมลาร์ CH_3COONa pH 6.0 ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลาย พลิกหลอดไปมาแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิม นาน 15 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิม นาน 5 นาที เก็บตะกอนและทำให้แห้งโดย vacuum แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase

ตรวจสอบลักษณะของ RNA ที่ได้ ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลใน 1X TAE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลท์ นาน 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทริเดียมโบรไมด์ และถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene) เก็บ RNA ที่ตรวจคุณภาพแล้วไว้ในตู้แช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3.3 การเพิ่มปริมาณยีน ALS โดยวิธี RT-PCR

นำ RNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณยีน ALS ด้วย degenerated primer ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของส่วน B และ E ที่มีขนาด 455 คู่เบส โดยใช้ไพรเมอร์ ALS2F และ ALS2R ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล เป็นแม่แบบ ทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยชุดสำเร็จรูป one step RT-PCR (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตระบุ โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)
การสังเคราะห์สาย cDNA	50	30
การแยกสาย DNA เป็นแม่แบบเริ่มต้น	95	15
การแยกสาย DNA แม่แบบ	95	1
เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ	60	1
สังเคราะห์ DNA ต่อจาก DNA แม่แบบ	72	1
การสังเคราะห์ DNA รอบสุดท้าย	72	10

ทำการตรวจวิเคราะห์ชิ้น DNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลใน 1X TAE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทิลเบรียมโบรไมด์ และถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene) ทำการแยกชิ้นส่วนของ DNA ของยีน ALS ที่มีขนาด 455 คู่เบส โดยทำการตัดเจลที่ตำแหน่งที่ต้องการภายใต้แสง UV นำเจลที่ตัดได้มาสกัด DNA ให้บริสุทธิ์โดยชุดสำเร็จรูป gel-recovery kit (Vivantis, Malaysia) ตามที่วิธีการที่ผู้ผลิตระบุไว้ เก็บ DNA ที่ได้จากการสกัดจากเจลไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.4. การชักนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำ DNA ของยีน ALS ที่สกัดได้จากเจลมาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะเพื่อเข้าไปเพิ่มปริมาณยีนภายในเซลล์ของแบคทีเรีย โดยทำการเชื่อมต่อ DNA ที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์สำเร็จรูป pGEM[®]-T Easy vector (Promega, USA) ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 2X Rapid ligation buffer 2 ไมโครลิตร pGEM[®]-T Easy vector (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร PCR product 8.5 ไมโครลิตร และ เอนไซม์ T₄ DNA ligase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำให้ได้ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง

การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียด้วยวิธี heat shock transformation โดยทำการผสม ligation mixture ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ปริมาตร 120 ไมโครลิตร วางบนน้ำแข็งนาน 20 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว SOC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่านาน 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และนำไปเลี้ยงบน

อาหารแข็ง 2XYT ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร X-gal (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ IPTG (20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง

3.5 การแยกสกัดพลาสมิด

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีเดี่ยวสีขาว ซึ่งคาดว่าจะมี DNA สายผสม นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 2XYT ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12-16 ชั่วโมง เพื่อเก็บเป็น master plate จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicilin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

ทำการสกัด DNA สายผสมจากเซลล์แบคทีเรีย โดยปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารทิ้งแล้วเติม Solution I (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex แช่น้ำแข็งทันที 5 นาที แล้วเติม Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา แช่น้ำแข็งทันที 5 นาที จากนั้นเติม Solution III (3M potassium acetate, 5M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาให้สารผสมเข้ากัน แช่น้ำแข็งทันที 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเท่าเดิม นาน 5 นาที จึงดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ (ประมาณ 400-500 ไมโครลิตร) แล้วเติม PCI ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่เก็บได้ ผสมให้เข้าด้วย vortex ปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม ดูดส่วนในด้านบนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอน DNA ด้วย 100% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเท่าเดิม นาน 1 นาที ทำตะกอนให้แห้งโดยใช้เครื่อง desiccators นาน 5 นาที และละลายตะกอนด้วย TE บัฟเฟอร์ที่มี RNaseA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่ได้โดยการตัด DNA ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (Biolab, England) ในปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA 5 ไมโครลิตร 10X buffer สำหรับเอนไซม์ *EcoRI* ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ *EcoRI* (20 ยูนิต ต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำให้ได้ 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นตรวจสอบผลการ

ตัดของเอนไซม์ ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ และตรวจดูชิ้นยีนด้วยเครื่อง gel documentation (Syngene)

3.6 การวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน ALS

ตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนของยีน ALS ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้บริการของ DNA technology laboratory ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจวิเคราะห์โดยโปรแกรม Edit sequence เพื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน ALS ในเซลล์อ้อยปกติ เซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร ด้วยโปรแกรม MegAlign (Laser gene DNASTar, USA) และพืชอื่น ๆ จากฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) ต่อไป

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ALS โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR

4.1 การสร้าง probe สำหรับยีน ALS และ Actin

นำดีเอ็นเอจากผสมที่ได้จากการสกัดพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่ามียีน ALS มาเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูปของ DIG PCR probe labeling (Roche ประเทศเยอรมนี) ใช้ไพรเมอร์ ALS2F และ ALS2R ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงสำหรับบางส่วนของยีน ALS ตามวิธีการที่ระบุโดยผู้ผลิต ส่วนการสร้าง probe ของยีน Actin เพื่อเป็น Internal control คล้ายกับการสร้าง probe ในยีน ALS โดยใช้ไพรเมอร์ Actin-O-F 5' AAGCTGTTCTTCCCTATATGCTAGTGG 3' และไพรเมอร์ Actin-O-R 5' CTTCTCCTTGATGTCCCTGACAATTT 3' ซึ่งเป็นไพรเมอร์สำหรับยีน Actin ของกล้วยไม้ มีขนาด 250 คู่เบส (Rungruchkanon *et al.*, 2007)

4.2 Semi-quantitative RT-PCR

4.2.1 นำ RNA สกัดได้จากเซลล์อ้อยปกติ (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสารอิมซาซาเพอร์ 1 ไมโครโมลาร์ (NT) เซลล์อ้อยต้านทานสารที่ได้รับสารอิมซาซาเพอร์ 1 ไมโครโมลาร์ (RT) และ เซลล์อ้อยต้านทานสารที่ไม่ได้รับสาร (R) ที่อายุ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังจากได้รับสาร หลังจากนั้น กำจัด DNA ออกจากสารละลาย RNA ด้วยเอนไซม์ *DNase I* (Fermentas, Lithuania) ใน ปฏิกริยาประกอบด้วย RNA ปริมาณ 2 ไมโครกรัม เอนไซม์ *DNase I* (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10X reaction buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติมน้ำจนครบ 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาเติม 0.25 มิลลิโมลาร์ EDTA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกริยา บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ทดสอบความเข้มข้นของ RNA เริ่มต้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยา RT-PCR โดยใช้การแสดงออกของยีน Actin ในปฏิกริยา RT-PCR เป็นตัวควบคุม โดยใช้ปฏิกริยา ดังนี้

ปฏิกริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)
การสังเคราะห์สาย cDNA	50	30
การแยกสาย DNA เป็นแม่แบบเริ่มต้น	95	15
การแยกสาย DNA แม่แบบ	95	1
เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ	55	1
สังเคราะห์ DNA ต่อจาก DNA แม่แบบ	72	1
การสังเคราะห์ DNA รอบสุดท้าย	72	10

ตรวจสอบผลของการทำปฏิกริยา PCR ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลท์ นาน 30 นาที ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ และตรวจดูชิ้นยีนด้วยเครื่อง gel documentation (Syngene)

4.2.2 ทดสอบการแสดงออกของยีน ALS โดยปฏิกริยา RT-PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ความเข้มข้นของ RNA ที่ทดสอบด้วยการแสดงออกของยีน actin ว่าเท่ากันแล้วที่ ความเข้มข้น 300 นาโนกรัม โดยใช้การแสดงออกของยีน actin เป็นตัวควบคุม ใช้ไพรเมอร์ ALS2F

และไพรเมอร์ ALS2R ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เพื่อเป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณชิ้น ALS และเตรียมปฏิกิริยาตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำ โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)
การสังเคราะห์สาย cDNA	50	30
การแยกสาย DNA เป็นแม่แบบเริ่มต้น	95	15
การแยกสาย DNA แม่แบบ	95	1
เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ	55	1
สังเคราะห์ DNA ต่อจาก DNA แม่แบบ	72	1
การสังเคราะห์ DNA รอบสุดท้าย	72	10

ตรวจสอบผลของการทำปฏิกิริยา PCR ด้วย 0.8 เบอ์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลท์ นาน 30 นาที ย้อมเจลด้วยเอทซิดียมโบรไมด์ และตรวจดูชิ้นขึ้นด้วยเครื่อง gel documentation (Syngene)

4.2.3 การตรวจสอบผลของ RT-PCR ด้วยเทคนิค southern blot ปรับสภาพเจลด้วย 0.25 M HCl นาน 10 นาที และ 0.4 N NaOH นาน 5 นาที ย้าย DNA ที่อยู่บนเจลไปยัง positively charged nylon membrane (Roche, Germany) ด้วยเทคนิค capillary force ในสารละลาย 0.4 N NaOH เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แช่ nylon membrane ใน 2X SSC นาน 10 นาที ตรึง DNA บนแผ่น membrane ด้วยการอบแผ่น membrane ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ตรวจสอบผลชิ้น ALS และชิ้น Actin ด้วย probe ที่ได้เตรียมไว้แล้ว โดยทำการ hybridize membrane ด้วย hybridization solution ที่มี probe นาน 12-14 ชั่วโมง ทำการล้าง membrane ด้วย washing I buffer (2X SSC + 0.1% SDS) 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย washing II buffer (0.5X SSC + 0.1% SDS) 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ล้างด้วย washing buffer (1X maleic acid + 0.3% tween 20) นาน 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย blocking 40 นาที ตามด้วย blocking ที่มี Anti-DIG (1 : 20,000) นาน 30 นาที ล้างด้วย washing buffer 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ต่อจากนั้นตรวจสอบผลด้วย CDP Star (Roche, Germany) และตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาของ CDP Star บน X-ray ฟิล์ม (Kodak, USA)

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
2. ห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยด้านพืช หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาในการทำการทดลอง

เริ่มตั้งแต่เดือนธันวาคม 2548 ถึงเดือนตุลาคม 2551

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์

1.1 การคัดเลือกเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์

นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการนำแคลล์สมาเลี้ยงในอาหารเหลวให้ได้ปริมาณมากพอ จึงนำไปคัดเลือกเซลล์ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ โดยพิจารณาการตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์ แล้ววัดการเจริญเติบโตโดยการใช้ packed cell volume เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติในระยะเวลาต่างกัน หลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน (ตารางผนวกที่ 2) พบว่า ระยะทำเวลาที่ทำการวัดปริมาณเซลล์ในแต่ละวัน และระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์แต่ละระดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ของอ้อยมีการเจริญเติบโตลดลงตามระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ที่สูงขึ้น (ภาพที่ 5) โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ 0.1 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์อ้อยมีการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ เนื่องจากเซลล์อ้อยไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะที่มีสารอิมาซาเพอร์ได้ จึงทำให้มีการเจริญเติบโตลดลง ดังนั้นในการคัดเลือกเซลล์อ้อยให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ จึงเริ่มต้นทำการคัดเลือกจากที่ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ 0.1 ไมโครโมลาร์ และเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ให้สูงขึ้นเรื่อย ๆ ทีละน้อย เพื่อทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์น้อย ๆ มีการปรับตัวได้เหมือนเซลล์ปกติ จนกระทั่งได้เซลล์ที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาในการคัดเลือกนาน 378 วัน (ภาพที่ 6) ซึ่งเรียกเซลล์อ้อยที่ได้ทำการคัดเลือกนี้ว่า เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หรือเรียกว่า เซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร

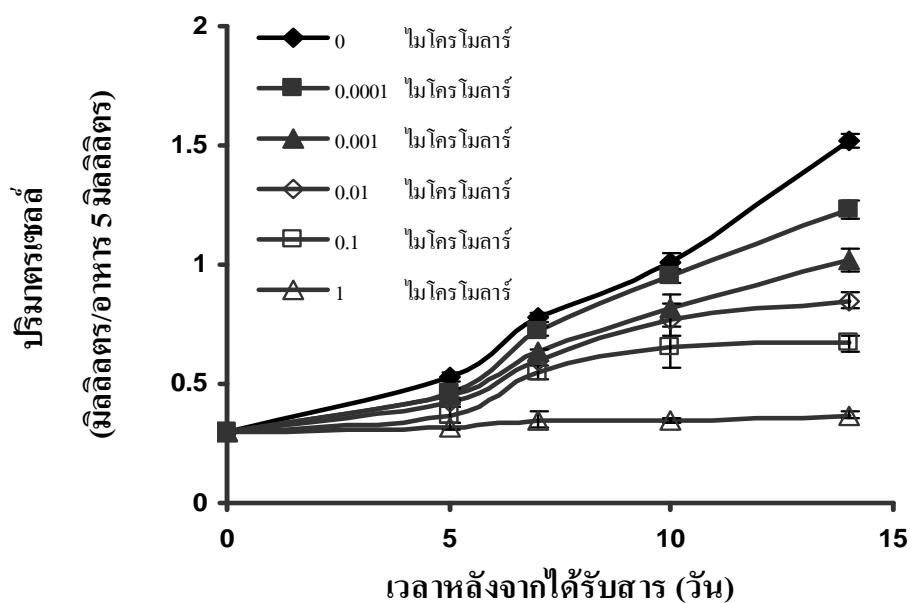
หลังจากนั้นพิจารณาการตอบสนองของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.1, 1, 10, 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 7) เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระยะเวลาต่างกัน หลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน (ตารางผนวกที่ 3) พบว่า ระยะทำเวลาที่ทำการวัดปริมาณเซลล์ในแต่ละวัน และระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์แต่ละระดับ มีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารอิมิซาลิพอร์ที่สูงมากขึ้น เซลล์อ้อยที่ด้านทานสารจะมีการเจริญเติบโตลดลง โดยในระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ จะทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยที่ด้านทานสารลดลงไป 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อ้อยที่ด้านทานที่ไม่ได้รับสารอิมิซาลิพอร์

เมื่อเปรียบเทียบระดับความแตกต่างของความต้านทานสารอิมิซาลิพอร์ระหว่างเซลล์อ้อยที่ด้านทานสารกับเซลล์อ้อยปกติ ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมิซาลิพอร์ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 8 และตารางที่ 1) พบว่า เซลล์อ้อยที่ด้านทานสารมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 7.014 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่เซลล์อ้อยปกติจะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 0.007 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาดัชนีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช (resistance index) โดยเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ในเซลล์อ้อยที่ด้านทานสารและเซลล์อ้อยปกติ พบว่า ในเซลล์อ้อยที่ด้านทานสารมีระดับของความต้านทานสารอิมิซาลิพอร์มากกว่า 918 เท่าของเซลล์อ้อยปกติ แสดงให้เห็นว่า เมื่อเซลล์อ้อยที่ด้านทานสารได้รับสารอิมิซาลิพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ จะยังคงสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ ในขณะที่เซลล์อ้อยปกติจะมีการเจริญเติบโตลดลง

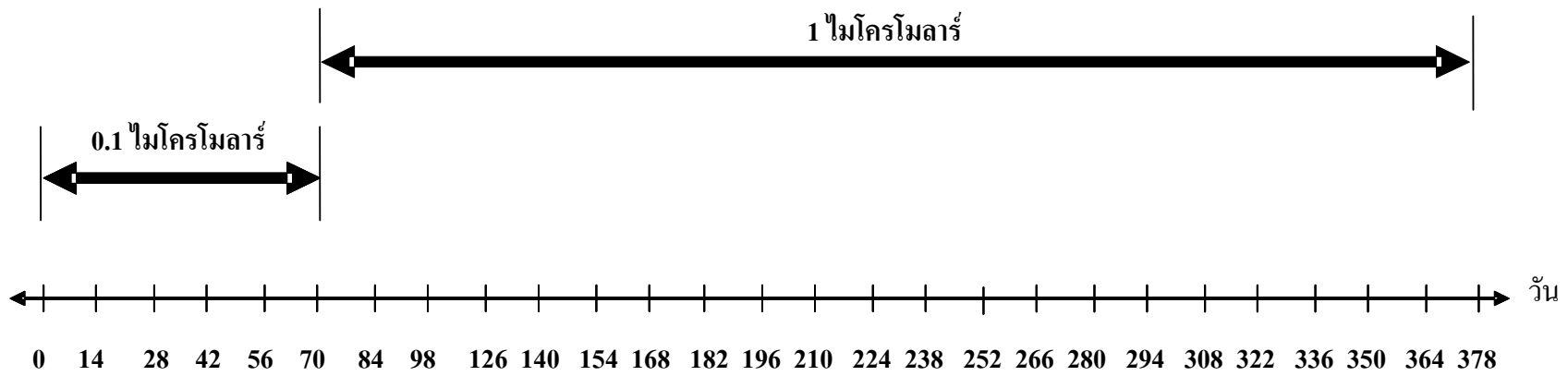
จากการศึกษาในครั้งนี้ ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาในพืชปลูกและสารกำจัดวัชพืชหลายชนิด โดยที่ Rajasekaran *et al.* (1996) ได้ทำการคัดเลือกสายที่ด้านทานต่อสารพริมาซัลฟูรอน (primisulfuron) พบว่า พันธุ์สายที่ด้านทานสาร มีระดับของความต้านทานสารพริมาซัลฟูรอนสูงกว่าในพันธุ์สายที่อ่อนแอประมาณ 100-1,000 เท่า เช่นเดียวกับ Warabi *et al.* (2001) ได้ทำการคัดเลือกเซลล์ถั่วเหลืองให้ด้านทานต่อสาร oxyfluorfen ที่ความเข้มข้น 10^{-7} ไมโครโมลาร์ โดยวิธี stepwise selection ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นนี้ เซลล์ถั่วเหลืองปกติสายพันธุ์เดียวกันไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ เมื่อพิจารณาระดับความต้านทานของสาร พบว่า เซลล์ที่ด้านทานมีระดับความต้านทานสารเป็น 1,000 เท่า มากกว่าเซลล์ปกติสายพันธุ์เดียวกัน ต่อมา Zambrano *et al.* (2003) ได้คัดเลือกเซลล์อ้อยที่ด้านทานสารไกลโฟเสทในระดับความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร ซึ่งมีระดับของความต้านทานสารมากกว่าในพันธุ์ที่อ่อนแอ 12.5 เท่า เช่นเดียวกับ Panyadee *et al.* (2007) ได้คัดเลือกเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K95-282 ให้ด้านทานต่อสารอิมิซาลิพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาในการคัดเลือกว่า 420 วัน ซึ่งมีดัชนีความต้านทานสารเป็น 116.67 เท่าของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์เดียวกัน นอกจากนี้ Chompoo and Pornprom (2008) ได้ทำการคัดเลือก

เซลล์ข้าวโพดให้ต้านทานต่อสารกลูโคซิเนตในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ และมีดัชนีความต้านทานสารเป็น 120 เท่าของเซลล์ข้าวโพดปกติสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งจะเรียกว่าเซลล์ที่ได้คัดเลือกว่า เซลล์ข้าวโพดที่ต้านทานสารกลูโคซิเนตในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ เช่นเดียวกับ Pornprom *et al.* (2009) ได้ทำการคัดเลือกเซลล์ถั่วเหลืองให้ต้านทานสารกลูโคซิเนตในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ และมีดัชนีความต้านทานสารเป็น 50 เท่าของเซลล์ถั่วเหลืองปกติสายพันธุ์เดียวกัน แสดงให้เห็นว่า การคัดเลือกพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชโดยใช้วิธี stepwise selection นั้นเป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกพืชให้ต้านทานสารกำจัดวัชพืชเป็นอย่างดี การศึกษาในครั้งนี้ได้ตั้งสมมุติฐานเบื้องต้นของสาเหตุที่ทำให้เซลล์อ้อยเกิดความต้านทานสารอิมิซาเพอร์ ว่ามีความเกี่ยวข้องหรือไม่ในการกลายพันธุ์ของยีน ALS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสารอิมิซาเพอร์ โดยพิจารณาจากความคงตัวของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช และพิจารณากลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในระดับชีวเคมีและในระดับชีวโมเลกุลต่อไป

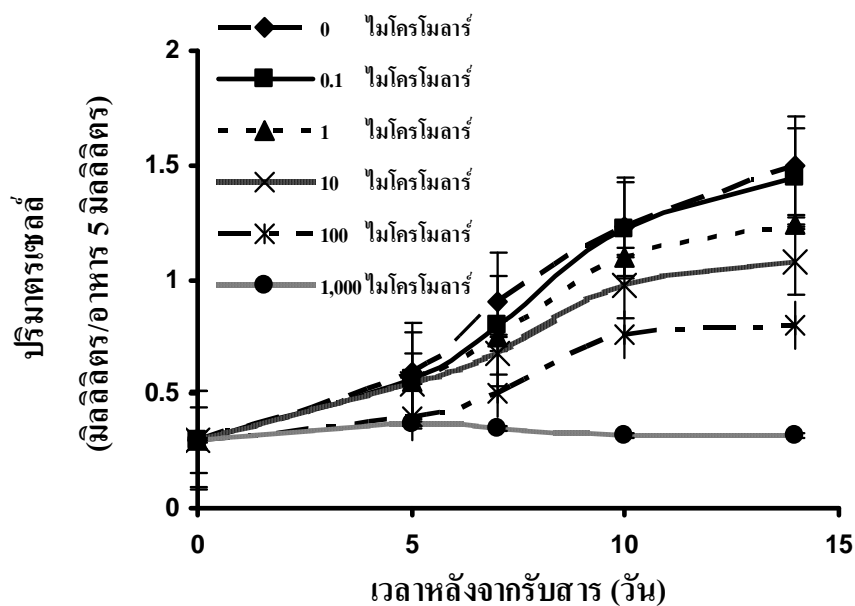


ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ K97-32 เมื่อได้รับสารอิมซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

หมายเหตุ Vertical bar แสดงค่า \pm standard error ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

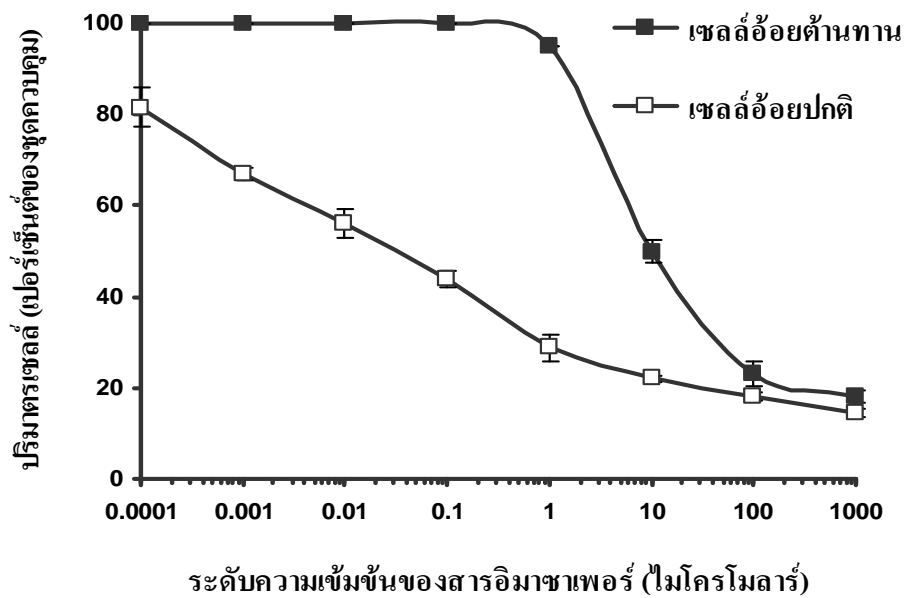


ภาพที่ 6 ระยะเวลาในการคัดเลือกเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K97-32 ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์



ภาพที่ 7 การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารสายพันธุ์ K97-32 เมื่อได้รับสารอิมซาซาเพอร์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

หมายเหตุ Vertical bar แสดงค่า \pm standard error ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า



ภาพที่ 8 การตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารสายพันธุ์ K97-32 ที่ 14 วัน หลังได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

หมายเหตุ Vertical bar แสดงค่า \pm standard error ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

ตารางที่ 2 ระดับความเข้มข้นของสารอิมซาเพอร์ที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อย ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (I_{50}) ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

เซลล์อ้อย	ค่า I_{50} (ไมโครโมลาร์) ^{1/}
เซลล์อ้อยปกติ	0.007 ± 0.003
เซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร	7.014 ± 0.004
ดัชนีความต้านทานสาร ^{2/}	918

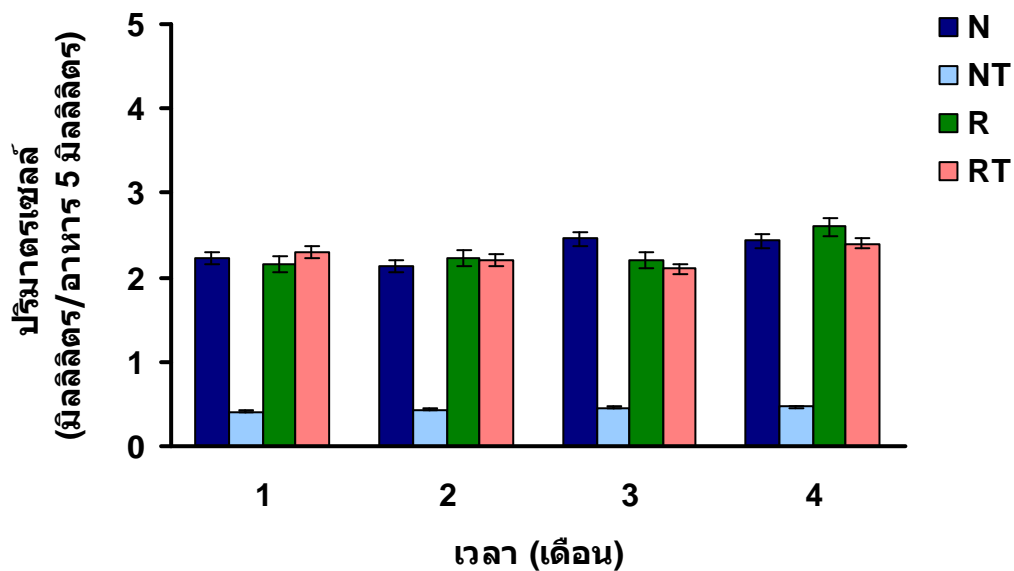
^{1/} ค่าความเข้มข้น \pm standard error ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

^{2/} ดัชนีความต้านทานสาร = I_{50} ของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร / I_{50} ของเซลล์อ้อยปกติ

1.2 การทดสอบความคงตัวของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชของเซลล์อ้อย

ทำการเลี้ยงเซลล์อ้อยที่ต้านทานในอาหารเหลวที่ปราศจากสารอิมานาเพอร์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ นำเซลล์อ้อยที่ต้านทานที่เลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารอิมานาเพอร์ทุก 1 เดือน มาทำการวัดปริมาณของเซลล์ที่ 14 วันหลังจากได้รับสาร เป็นเวลาอย่างน้อย 4 เดือน (ตารางผนวกที่ 4) จากผลการทดลองพบว่า เซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) ปริมาณเซลล์ที่วัดได้ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า มีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เป็นปกติ ส่วนเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) มีการเจริญเติบโตที่ลดลง ปริมาณของเซลล์ที่วัดได้น้อยกว่าเซลล์ทั้ง 3 แบบดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสารกับเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสารเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 4 เดือน พบว่า ปริมาณเซลล์ของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมากกว่าเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (ภาพที่ 9)

เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารอิมานาเพอร์เป็นเวลาอย่างน้อย 4 เดือน ส่งผลทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารยังคงมีความต้านทานต่อสารอิมานาเพอร์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Choompoo and Pormprom (2008) ได้รายงานไว้ว่า เซลล์ข้าวโพดต้านทานสารกลูโฟซิเนทที่ความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารกลูโฟซิเนทเป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือน ยังคงมีความต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนท เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ข้าวโพดปกติ ดังนั้น ความต้านทานที่เกิดขึ้นในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมานาเพอร์ จึงเป็นความต้านทานที่เป็นแบบถาวรและมีความคงตัวของความต้านทานเกิดขึ้นภายในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร แสดงให้เห็นว่า ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้นนั้น ไม่ได้เป็นความแปรปรวนที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นในการศึกษาขั้นตอนต่อไป ควรจะทำการพิจารณาเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานสารอิมานาเพอร์ ในระดับชีวเคมีโดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS และในระดับชีวโมเลกุลโดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีน ALS โดยการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกับเซลล์อ้อยปกติ



ภาพที่ 9 การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หลังจากเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารอิมซาเพอร์ เป็นเวลานาน 1-4 เดือน

หมายเหตุ Vertical bar แสดงค่า \pm standard error ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

2. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะซิโตนแลคเตทซินเนส

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายที่สารอิมิซาซาเพอร์แสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืช สามารถวัดเป็นปริมาณของ acetoin ได้ภายหลังจากการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาของ acid-catalysed decarboxylation ของ 2-acetolactate เป็น acetoin (Westerfeld, 1945) ในขั้นตอนแรกของกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนดังกล่าว ซึ่งจะบ่งบอกถึงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ได้ (Corbett and Tardif, 2006)

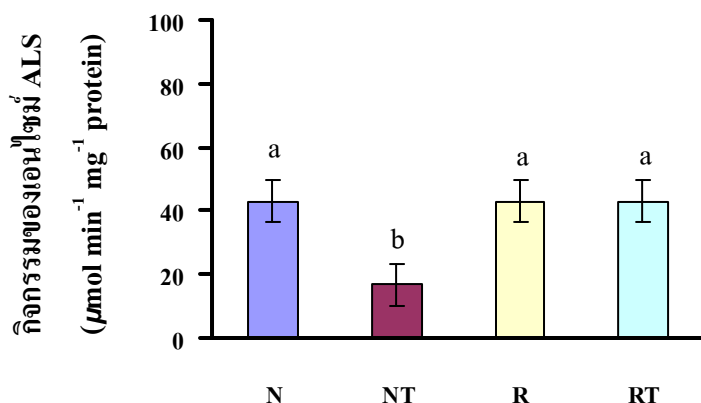
เมื่อพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์ย่อย ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน หลังจากได้รับสารอิมิซาซาเพอร์ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ซึ่งประกอบด้วย เซลล์ย่อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์ย่อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์ย่อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์ย่อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT) พบว่า เซลล์ย่อยปกติที่ไม่ได้รับสาร เซลล์ย่อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร และเซลล์ย่อยด้านทานที่ได้รับสาร มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ 3 วันหลังได้รับสาร เป็น 42.90, 42.95 และ 42.64 ไมโครโมล acetoin ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที่ ซึ่งมากกว่าเซลล์ย่อยปกติที่ได้รับสาร ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เพียง 16.67 ไมโครโมล acetoin ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที่ (ภาพที่ 10) เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ 5 วันหลังจากได้รับสาร พบว่า ในเซลล์ย่อยปกติที่ไม่ได้รับสาร เซลล์ย่อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร และเซลล์ย่อยด้านทานที่ได้รับสาร มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็น 45.43, 45.59 และ 45.47 ไมโครโมล acetoin ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที่ ซึ่งสูงกว่าเซลล์ย่อยปกติที่ได้รับสาร ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เพียง 16.67 ไมโครโมล acetoin ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที่ (ภาพที่ 11) เมื่อพิจารณา ที่ 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสาร พบว่า เซลล์ย่อยปกติที่ไม่ได้รับสาร มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็น 50.57, 44.78 และ 40.27 ไมโครโมล acetoin ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที่ ตามลำดับ เซลล์ย่อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็น 50.65, 44.76 และ 40.25 ไมโครโมล acetoin ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที่ ตามลำดับ และเซลล์ย่อยด้านทานที่ได้รับสาร มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็น 50.62, 44.73 และ 40.22 ไมโครโมล acetoin ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที่ ตามลำดับ โดยที่เซลล์ย่อยทั้ง 3 แบบดังกล่าวนี้ มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS สูงกว่าเซลล์ย่อยปกติที่ได้รับสาร ที่ 7, 10 และ 14 วันหลังจากได้รับสาร ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เท่ากับ 15.05, 15.39 และ 15.35 ไมโครโมล acetoin ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที่ ตามลำดับ (ภาพที่ 12, 13 และ 14) แสดงว่า ที่ 3-14 วันหลังจากได้รับสาร เซลล์ย่อยปกติที่ไม่ได้รับสาร เซลล์ย่อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร และเซลล์ย่อยด้านทานที่ได้รับสาร มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS สูงกว่าเซลล์ย่อยปกติที่ได้รับสารที่ระดับความเข้มข้นที่ 1

ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ของเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสาร อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาความต้านทานสารกำจัดวัชพืชจากกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ระหว่างเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสารและเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (ตารางที่ 2) พบว่า เซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร มีกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสาร มากถึง 2.65, 2.49, 3.36, 2.90 และ 2.62 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร ตามลำดับ

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS แสดงให้เห็นว่า เซลล์อ้อยที่ด้านทานสารมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ALS สูงกว่าเซลล์อ้อยปกติเมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rajasekaran *et al.* (1996) ได้รายงาน bahwa เซลล์ของฝ้ายพันธุ์ SUR-6C ที่ด้านทานสารพริมาซัลฟูรอน ซึ่งมีดัชนีความต้านทานสารประมาณ 100-1,000 เท่า และมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับสารพริมาซัลฟูรอนในระดับความเข้มข้น 2.13 ไมโครโมลาร์ ต่อมา Wright *et al.* (1998) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ใน sugarbeet 3 สายพันธุ์ที่ด้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS พบว่า ทั้ง 3 สายพันธุ์เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS โดยที่พันธุ์ Sir-13 มีระดับความต้านทานต่อสารอิมาเซททาเพอร์ มากถึง 40 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อ่อนแอ ส่วนพันธุ์ Sur ที่มีระดับความต้านทานต่อสารคลอซัลฟูรอน 1,000 เท่า และฟลูเมทซูแรม 50 เท่า และพันธุ์ 93R30B มีความต้านทานต่อสารทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว โดยที่มีระดับความต้านทานต่อสารอิมาเซททาเพอร์ คลอซัลฟูรอน และฟลูเมทซูแรม มากกว่า 1,000, 4,300 และ 200 เท่า ตามลำดับ เช่นเดียวกับ White *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาต้านทานต่อสารอิมาเซททาเพอร์ และคลอริมูรอน เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ซึ่ให้เห็นว่า ในสายพันธุ์ที่ด้านทานมีระดับความต้านทานต่อสารเป็น 39 และ 9 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่อ่อนแอ เช่นเดียวกับรายงานของ Yu *et al.* (2003) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ใน wild radish จำนวน 8 สายพันธุ์ที่ด้านทานต่อสารในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS พบว่า พันธุ์ที่ด้านทานสารมีความต้านทานต่อสารคลอซัลฟูรอน ไตรอะโซโลไพริมิดีน และเมทซัลฟูรอน มากถึง 20-160, 10-46 และ 3-8 เท่า ตามลำดับ ต่อมา Milliman *et al.* (2003) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในหญ้า eastern black-grass จำนวน 2 ไบโอไทป์ ใน Illinois resistant ไบโอไทป์ที่ด้านทานต่อสารในกลุ่มอิมิดาโซลิโนน พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS สูงกว่าไบโอไทป์ที่อ่อนแอ 881 เท่า ส่วนใน Indiana resistant ไบโอไทป์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS สูงกว่าไบโอไทป์ที่อ่อนแอ 118 เท่า นอกจากนี้ Buker *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในพริกและมะเขือ

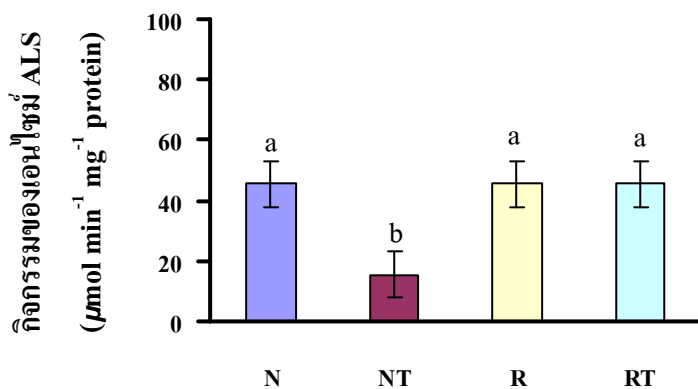
เทศ เมื่อได้รับสารไพรมิซัลฟูรอนที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบว่า ในพริกมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS สูงกว่าในมะเขือเทศมากถึง 10 เท่า ในขณะที่ Avila et al. (2005) ได้รายงานว่ามีค่าพังก์ CL-161 มีความต้านทานสารอิมาซาซาเพอร์เป็น 32 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับพังก์ CL-121 ซึ่งทนทานต่อสารดังกล่าว ต่อมา Marshall and Moss (2008) ได้ทำการศึกษาความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ในหญ้า *Alopecurus myosuroides* จำนวน 8 สายพังก์ เมื่อพิจารณากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS เมื่อได้รับสาร sulfometuron พบว่า พังก์ PeIRES มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS มากถึง 16.3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพังก์ Roth ซึ่งเป็นสายพังก์ที่อ่อนแอ

การศึกษากลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช ได้มีรายงานว่ามีผลเกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืช และไม่ใช้ตำแหน่งเป้าหมาย (Corbett and Tardif, 2006) ซึ่งการทดลองในครั้งนี้ ได้ทำการพิจารณาเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมายเท่านั้น กล่าวคือ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS พบว่า เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS เป็น 2.65, 2.49, 3.36, 2.90 และ 2.62 เท่า ของเซลล์อ้อยปกติ ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสารอิมาซาซาเพอร์ ตามลำดับ แสดงว่า กลไกทางชีวเคมีของความต้านทานที่เกิดขึ้น มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาการยับยั้งภายในพืช โดยที่ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีการปรับตัวเป็นแบบการตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช เมื่อพืชได้รับสารอิมาซาซาเพอร์ จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารยังคงสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ เนื่องจากตำแหน่งเป้าหมายมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น สารกำจัดวัชพืชจึงไม่สามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ALS ได้ จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไม่ถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาซาเพอร์ ในขณะที่เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสารไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ เนื่องจากสารอิมาซาซาเพอร์จะเข้าไปยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS ส่งผลทำให้เซลล์อ้อยปกติไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นได้ ทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต และต่อมาพืชจะตายไปในที่สุด ซึ่งในขั้นตอนต่อไปควรจะทำการศึกษาเกี่ยวกับกลไกพื้นฐานในระดับชีวโมเลกุลของเซลล์อ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาซาเพอร์ โดยพิจารณาจากลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS ที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวนี้ เปรียบเทียบระหว่างเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกับเซลล์อ้อยปกติ เพื่อนำไปใช้เป็นดัชนีในการอธิบายกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในระดับชีวโมเลกุลได้ชัดเจนยิ่งขึ้นอีกต่อไป



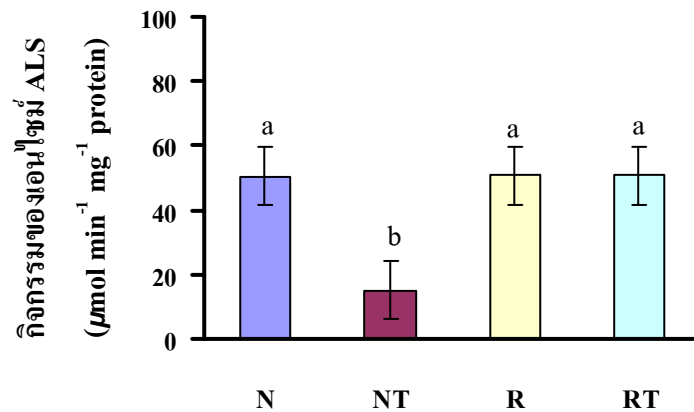
ภาพที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 3 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละชนิดของเซลล์อ้อยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ และ vertical bar แสดงค่า \pm standard error ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า



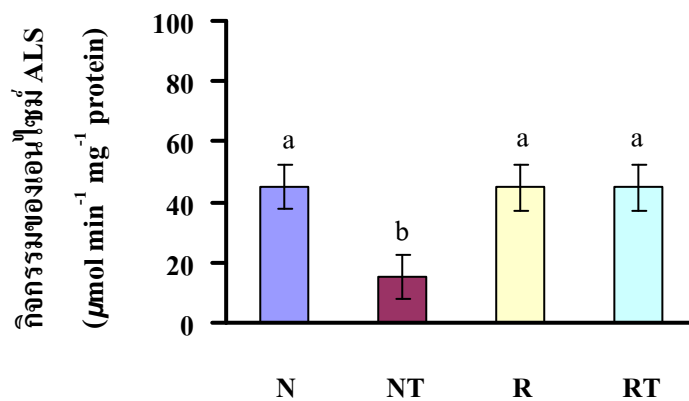
ภาพที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 5 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละชนิดของเซลล์อ้อยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ และ vertical bar แสดงค่า \pm standard error ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า



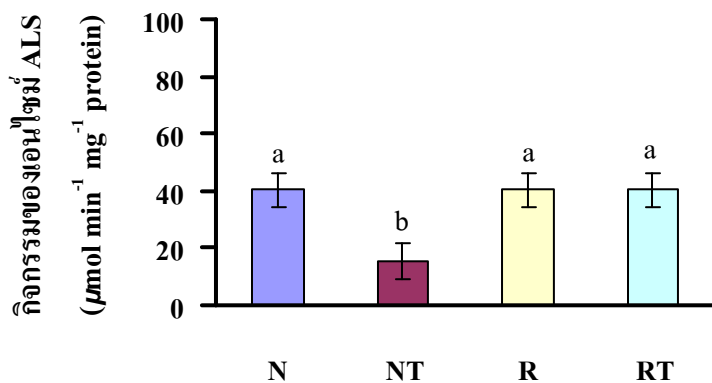
ภาพที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 7 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโคร โมลาร์

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละชนิดของเซลล์อ้อยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ และ vertical bar แสดงค่า \pm standard error ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า



ภาพที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 10 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโคร โมลาร์

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละชนิดของเซลล์อ้อยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ และ vertical bar แสดงค่า \pm standard error ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า



ภาพที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละชนิดของเซลล์อ้อยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ และ vertical bar แสดงค่า \pm standard error ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

ตารางที่ 3 ผลของสารอิมาซาเพอร์ต่อการตอบสนองของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยที่ด้านทานสาร และเซลล์อ้อยปกติ ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

เซลล์	กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)				
	3 DAT ^{1/}	5 DAT	7 DAT	10 DAT	14 DAT
เซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้สาร (N)	42.90 a	45.43 a	50.57 a	44.78 a	40.27 a
เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT)	16.67 b	15.45 b	15.05 b	15.39 b	15.35 b
เซลล์อ้อยที่ด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R)	42.95 a	45.59 a	50.65 a	44.76 a	40.25 a
เซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT)	42.64 a	45.47 a	50.62 a	44.73 a	40.22 a
สัดส่วนระหว่าง RT/NT ^{2/}	2.65	2.94	3.36	2.90	2.62

^{1/} DAT = days after treatment

^{2/} สัดส่วนระหว่าง RT/NT = $\frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยที่ด้านทานสาร (RT)}}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติ (NT)}}$

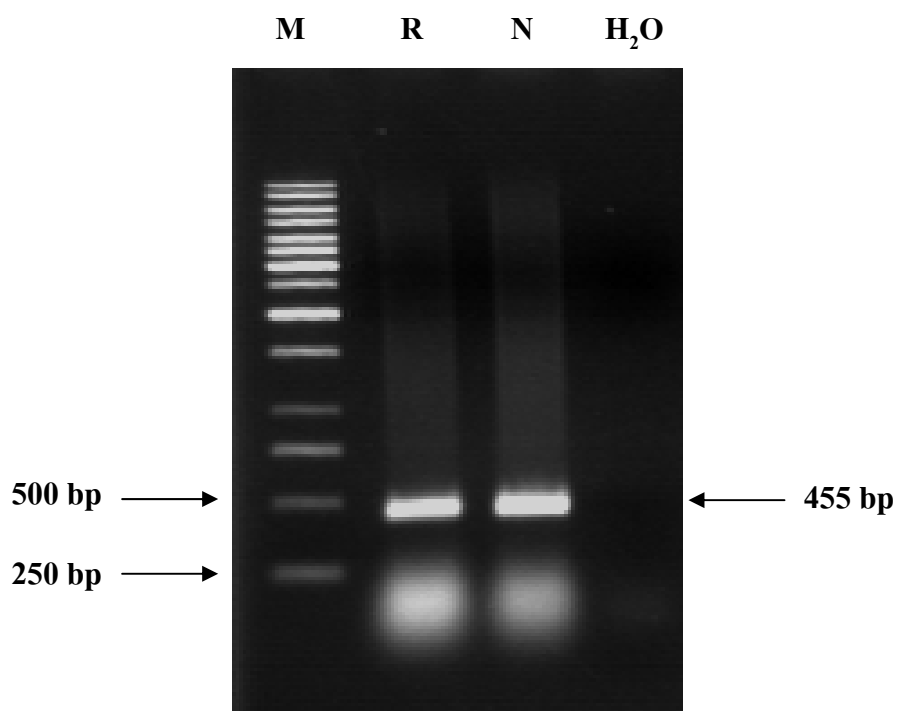
หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

3. การโคลนยีนและการหาลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS

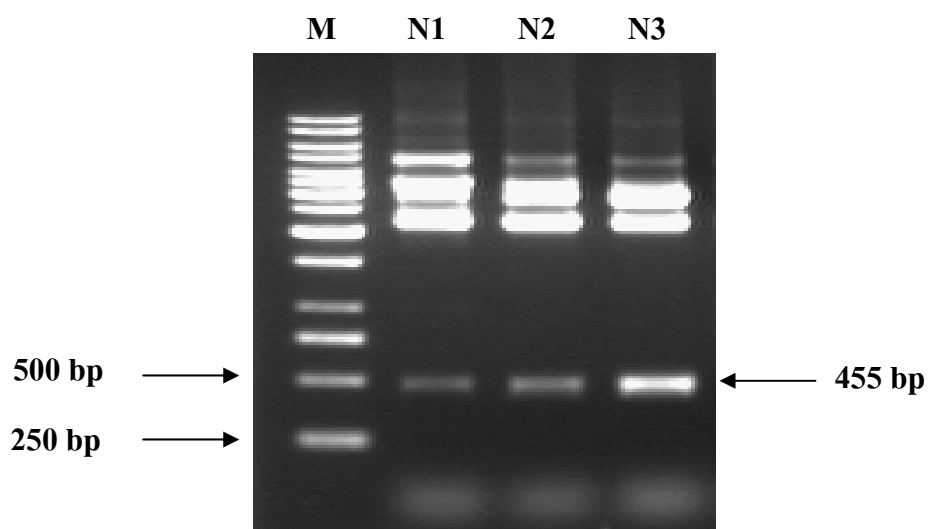
3.1 การโคลนยีนบางส่วนของยีน ALS

เอนไซม์ ALS เป็นตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสารอิมิซาซาเพอร์ เมื่อพืชได้รับสารส่งผลทำให้กระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน leucine, valine และ isoleucine ถูกยับยั้ง ซึ่งการสังเคราะห์เอนไซม์ ALS เกิดขึ้นได้โดยการลอกรหัสสารพันธุกรรมจากยีนในนิวเคลียส หลังจากนั้นจะแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่ไซโทพลาสซึม แล้วถูกส่งไปทำงานที่คลอโรพลาสต์ (chloroplast) ซึ่งอยู่ในเซลล์พืช เพื่อทำหน้าที่ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนต่อไป (Shimizu *et al.*, 2002; Corbett and Tardif, 2006) การศึกษากลไกในระดับชีวโมเลกุลของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช จะพิจารณาบริเวณอนุรักษ์ของยีน ALS ซึ่งมีด้วยกัน 5 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้ ทำการพิจารณาเฉพาะบริเวณ B และ E ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดเมื่อพืชเกิดความต้านทานต่อสารในกลุ่ม Imidazolinone หลังจากนั้น ทำการโคลนยีนและวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน ALS เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ย่อยที่ต้านทานสารกับเซลล์ย่อยปกติ ว่ามีการเรียงตัวของลำดับเบสแตกต่างกันหรือไม่ ดังนั้นจึงได้ทำการสังเคราะห์ cDNA บางส่วนของยีน ALS จาก total RNA โดยใช้เทคนิค RT-PCR (one step RT-PCR) เพื่อตรวจหาลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ALS

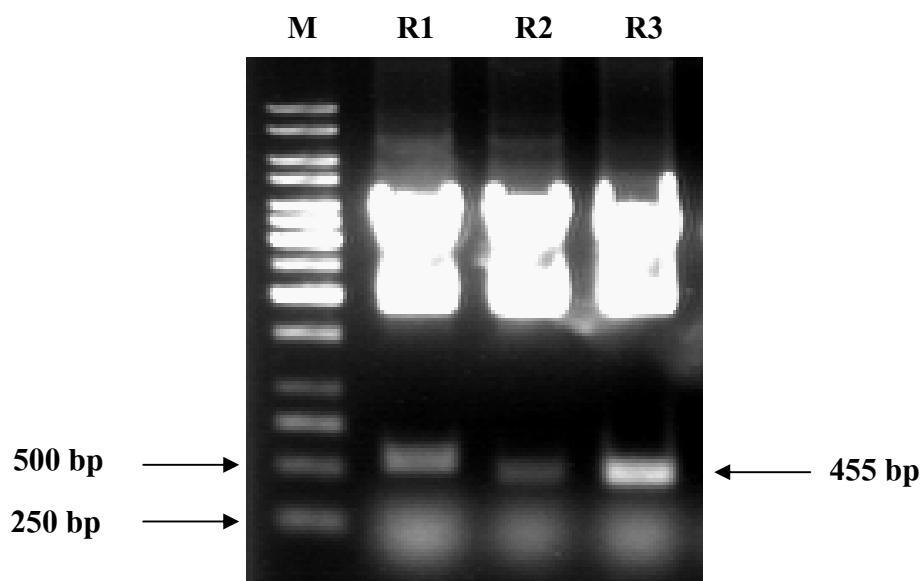
เมื่อทำการสังเคราะห์บางส่วนของยีน ALS ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบเหมือนกันทั้งในเซลล์ย่อยปกติและเซลล์ย่อยที่ต้านทานสาร จากบางส่วนของยีน ALS ที่มีขนาด 455 คู่เบส (ภาพที่ 15) หลังจากนั้นได้นำ PCR product ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี RT-PCR มาทำการโคลนยีน โดยเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM[®]-T easy (Promega, USA) แล้วจึงได้ชักนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณยีน ALS ด้วยวิธี heat shock transformation สุ่มเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง 2XYT ที่เติม ampicillin, IPTG และ X-gal นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน แต่เติมเฉพาะ ampicillin เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าเป็นเวลานานข้ามคืน แล้วจึงทำการแยกสกัดพลาสมิดลูกผสมออกมา จากนั้นตรวจสอบพลาสมิดลูกผสม โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ซึ่งจะได้อินดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ALS ที่มีขนาด 455 คู่เบส และอินดีเอ็นเอของเวกเตอร์ที่มีขนาด 3,017 คู่เบส จะพบว่าทุกโคลนที่นำมาทำการตรวจเช็ค ทั้งในเซลล์ย่อยปกติและเซลล์ย่อยที่ต้านทานสาร พบชิ้น DNA ขนาด 455 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดบางส่วนของยีน ALS (ภาพที่ 16 และ 16ข) แล้วจึงได้เลือกโคลนที่ได้รับการตรวจสอบแล้วว่ามียีน ALS เพื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส



ภาพที่ 15 ผลผลิตที่ได้จาก RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน ALS ของเซลล์อ้อย ต้านทานสาร (R) และเซลล์อ้อยปกติ (N) โดยที่ M = 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, Lithuania), N = เซลล์อ้อยปกติ และ R = เซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร



(ก)



(ข)

ภาพที่ 16 แล็บ DNA ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ EcoRI ของพลาสมิดที่มียีน ALS ของเซลล์ อ้อยปกติ (ก) และเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร (ข) ที่โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEMT[®]-easy

3.2 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน ALS

เมื่อนำผลจากการหาลำดับเบสมาเปรียบเทียบการเรียงลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของยีน ALS ของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร และยีน ALS ในพืชสกุลต่าง ๆ จากฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม MegAlign (Lasergene; DNASTAR, USA) พบว่าการเรียงลำดับกรดอะมิโนของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารและเซลล์อ้อยปกติ มีความเหมือนกันของยีน 97.3 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันของยีนเพียง 0.7 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ผลจากความแตกต่างของการเรียงลำดับกรดอะมิโนในเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร กล่าวคือ เกิดการหายไปของกรดอะมิโนอะลานีนที่ตำแหน่ง 666 (Ala₆₆₆) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *A. thaliana* (ภาพที่ 17) จึงนำลำดับของเบสและลำดับกรดอะมิโนของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร ไปจับทะเบียนในฐานข้อมูลของ GenBank รหัส EU243998 และ EU243999 ตามลำดับ (ภาพผนวกที่ 1 และ 2)

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับกลไกพื้นฐานในระดับชีวโมเลกุลของพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Imidazolinone ซึ่งเห็นได้ว่า ลักษณะของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชจะเกิดจากการกลายพันธุ์ในระดับยีน ALS ซึ่งจะเป็นแบบการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) ที่เป็นแบบการแทนที่ลำดับเบส (base-pair substitution) ในสาย DNA แล้วทำให้กรดอะมิโนในโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป โดยที่ Milliman *et al.* (2003) ได้ศึกษาความต้านทานของสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Imidazolinone (ได้แก่ สาร imazethapyr และ imazamox) ในหญ้า eastern black-grass จำนวน 2 ใบ โอโทปป์ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน พบว่า ในพืชที่ต้านทานสารจะเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่เป็นแบบการแทนที่ลำดับเบส ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนจาก alanine กลายเป็น threonine ที่ตำแหน่ง 121 เช่นเดียวกับรายงานของ Diebold *et al.* (2003) ได้ศึกษาใน powell amaranth ซึ่งเป็นวัชพืชที่ต้านทานสาร atrazine และ imazethapyr ในการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน psbA ที่เป็นตำแหน่งเป้าหมายของสาร atrazine เท่านั้น พบว่า มีการแทนที่กรดอะมิโนจาก glycine กลายเป็น serine ที่ตำแหน่ง 264 ในโปรตีน D1 ส่วนการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน ALS ที่เป็นตำแหน่งเป้าหมายของสาร imazethapyr นั้น พบว่า มีการแทนที่ลำดับกรดอะมิโนเช่นเดียวกัน โดยที่มีการแทนที่ลำดับเบสของกรดอะมิโน serine กลายเป็น threonine ที่ตำแหน่ง 652 เช่นเดียวกับการศึกษาใน sugarbeet ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Imidazolinone ก็เกิดการแทนที่ลำดับเบสทำให้กรดอะมิโน threonine กลายเป็น alanine ที่ตำแหน่ง 13 (Wright *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่ามี การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน ALS ที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS ในพืชหลายชนิด เช่น ทานตะวัน (White *et al.*, 2003), red rice

(Rajguru *et al.*, 2005), common ragweed (Zheng *et al.*, 2005) และ grass weed (*Alopecurus myosuroides*) (Marshall and Moss, 2008) เป็นต้น ซึ่งกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณ 5 ตำแหน่งภายในยีน ALS ที่มีพบการเกิดการกลายพันธุ์บ่อย เมื่อพืชเกิดความต้านทานสารคือ Alanine₁₂₂, Proline₁₉₇, Alanine₂₀₅, Tryptophan₅₇₄ และ Serine₆₅₃ (Tan *et al.*, 2006; Christoffers *et al.*, 2006; Corbett and Tardif, 2006; Tan *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตาม การเกิดการกลายพันธุ์ในแต่ละตำแหน่งของยีน จะขึ้นอยู่กับชนิดของ พืช พันธุ์พืช และชนิดของสารกำจัดวัชพืชในแต่ละกลุ่ม เช่นเดียวกับในรายงานของ Pornprom *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน Glutamine synthetase (GS) ในเซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารกลูโฟซิเนท โดยพิจารณาลำดับเบสบางส่วนของยีน (GS) พบว่า เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่เป็นแบบการแทนที่ของลำดับเบสทำให้กรดอะมิโนในโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก histidine (His) กลายเป็น tyrosine (Tyr) ที่ตำแหน่ง 249 จึงส่งผลทำให้เซลล์ถั่วเหลืองเกิดความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช โดยจะไปลดการตอบสนองของเอนไซม์ที่เป็นแบบตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช

การศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า ในเซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารจะมีการกลายพันธุ์เฉพาะจุดเกิดขึ้นภายในยีน ALS ที่เป็นแบบ deletion ซึ่งเป็นการเกิดการหายไปของลำดับนิวคลีโอไทป์ (nucleotide) ทำให้ลำดับกรดอะมิโน alanine ที่ตำแหน่ง 666 (Ala₆₆₆) หายไปด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *A. thaliana* ซึ่งเป็นไปได้ว่า การเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดของยีน ALS ในเซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารที่เป็นแบบการหายไป จึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของตำแหน่งเป้าหมาย (ALS) อาจส่งผลทำให้พืชสามารถต้านทานสาร อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับลำดับเบสของยีน ALS ในครั้งนี้ สามารถอธิบายเกี่ยวกับกลไกพื้นฐานในระดับชีวโมเลกุลของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชได้เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้นในระดับ mRNA ว่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน ALS หรือไม่ ซึ่งในการศึกษาขั้นตอนต่อไป ควรจะพิจารณาการแสดงออกของยีน ALS ในระดับ mRNA ในเซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารอิมามาซาเพอร์ เพื่อใช้เป็นดัชนีในการอธิบายกลไกทางชีวโมเลกุลของความต้านทานในสายพันธุ์เซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารอิมามาซาเพอร์ ในระดับชีวโมเลกุลได้ชัดเจนยิ่งขึ้นอีกต่อไป

```

Wheat      GLGAMGFGLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMILNNQHL
Rice       GLGAMGFGLPAAAGASVANPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQHL
Corn       GLGAMGFGLPAAAGASVANPGVTVVDIDGDGSFLMNVQELAMIRIENLPVKVFLNNQHL
Arabidopsis GLGAMGFGLPAAIGASVANPDIVVDIDGDGSFIMNVQELATIRVENLPVKVLLLNQHL
Normal cell GLGAMGFGLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELAMIRIENLPVKVFLNNQHL
Resistant cell GLGAMGFGLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELAMIRIENLPVKVFLNNQHL 578
***** **:****. . *****:**:* **:******:*****

Wheat      GMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPENENESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVTAAIKKM
Rice       GMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPECESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIKKM
Corn       GMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPENENESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKNEVRAAIKKM
Arabidopsis GMVVQWEDRFYKANRAHTFLGDPAQEDEFIPNMLLFAAACGIPAARVTKKADLREAIQTM
Normal cell GMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPENENESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVHAAIKKM
Resistant cell GMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPENENESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVHAAIKKM 638
**:******:**:* *.***:*:::* . .:**.***:* : *:*.*

Wheat      LETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPNGGAFKD
Rice       LETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKD
Corn       LETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKD
Arabidopsis LDTPGPYLLDVICPHQEHVLPMPNGGTFND
Normal cell LETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKD
Resistant cell LETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGG-FKD 669
**:******:* *******.***:*

```

ภาพที่ 17 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ โปรตีน ALS ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร เซลล์
อ้อยปกติ และพืชสกุลต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Clustal W (เมื่อ
เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *Arabidopsis thaliana*)

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน ALS โดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR และ Southern blot hybridization

การศึกษาการแสดงออกของยีน ALS ในระดับ transcription (mRNA) ระหว่างเซลล์อ้อยที่ด้านทานสารและเซลล์อ้อยปกติ ซึ่งประกอบด้วย เซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT) ทำการเก็บตัวอย่างมาศึกษา ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน หลังได้รับสารอิมซาเพอร์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยมีตัวอย่างควบคุมคือ RNA ของยีน actin ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกตลอดระยะเวลาเจริญเติบโตของพืช จึงใช้เป็น internal standard เพื่อใช้สำหรับ Semi-quantitative RT-PCR ซึ่งความเข้มข้นของ RNA เริ่มต้นที่ทำให้การแสดงออกของยีน actin เท่ากันคือ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นของ RNA ดังกล่าว ในการทำ RT-PCR เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ของ PCR นำมาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส หลังจากนั้น จึงนำ RT-PCR 1 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ผลอีกครั้งด้วยวิธี southern blot hybridization

การแสดงออกของยีน ALS ของเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสาร พบว่า มีการสะสม mRNA ของยีน ALS มากกว่า เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT) เพียงเล็กน้อย ส่วนการสะสม mRNA ของยีน ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT) มีการสะสม mRNA ไม่แตกต่างกัน ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสาร (ภาพที่ 18) เมื่อพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์ ALS (ในการทดลองที่ 2) และการวิเคราะห์หาลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS (ในการทดลองที่ 3) พบว่า เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสารอิมซาเพอร์มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ต่ำกว่าเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร ถึงแม้ว่าเซลล์ที่อ้อยด้านทานสาร มีการเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่เป็นแบบการหายไปของกรดอะมิโน alanine ที่ตำแหน่ง 666 (Ala₆₆₆) แต่การสะสม mRNA ของยีน ALS ในระดับ transcription ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่า สารอิมซาเพอร์ไม่มีผลต่อการสะสม mRNA ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Yu *et al.* (2003) ได้ศึกษาใน wild radish สายพันธุ์ด้านทานจำนวน 8 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ที่ด้านทานสารทั้ง 8 สายพันธุ์ มีความต้านทานต่อสาร chlorsulfuron มากที่สุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS 20-160 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ่อนแอ นอกจากนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน พบว่า มีการเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน proline ที่บริเวณตำแหน่ง A ภายใน

ยีน ALS เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีน ALS ในระดับ mRNA โดยวิธี northern blot analysis เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ต้านทานกับสายพันธุ์อ่อนแอ พบว่า ระดับของการสะสม mRNA ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า ความต้านทานสารที่เกิดขึ้นใน wild radish ไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการแสดงออกของยีน ALS ในระดับ mRNA กับกิจกรรมของเอนไซม์ ALS อย่างไรก็ตาม ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ALS จะไม่เกี่ยวข้องในระดับ transcription แต่อาจจะมีส่วนช่วยในการทำให้เกิดความต้านทานต่อสาร chlorsulfuron ภายในพืชก็ได้

กลไกพื้นฐานในระดับชีวโมเลกุลของความต้านทานสารอิมาซาเพอร์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร จะไม่เกี่ยวข้องกับการสะสม mRNA ของยีน ALS ในระดับ transcription ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร เกิดการหายไปของกรดอะมิโน alanine ที่มีคุณสมบัติทางเคมีเป็นพวกไม่มีขั้ว (nonpolar) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จึงทำให้คุณสมบัติทางเคมีและโครงสร้างของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับการกระบวนการ post-transcription และ post-translation จึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของตำแหน่งเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาการยับยั้งภายในพืช ในการเข้าทำลายของสารกำจัดวัชพืช เนื่องจากสารในกลุ่ม Imidazolinone จะเข้าทำลายพืชโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS เมื่อตำแหน่งของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร ไม่ถูกยับยั้งโดยสารกำจัดวัชพืช ส่งผลทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารนั้น มีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ได้มากกว่าในเซลล์อ้อยปกติ ซึ่งเป็นแบบตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช ดังนั้นเมื่อเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร ได้รับสารอิมาซาเพอร์ สารกำจัดวัชพืชจะไม่สามารถเข้าไปยับยั้งเอนไซม์ ALS ได้ทั้งหมด จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ ส่วนเซลล์อ้อยปกติเมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ สารกำจัดวัชพืชสามารถเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ได้ ทำให้เซลล์อ้อยปกติถูกทำลายไป จึงไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้

กลไกความต้านทานสารในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS นั้น มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาการยับยั้งภายในพืช และไม่ใช่ตำแหน่งเป้าหมาย ในปัจจุบันการศึกษาความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มดังกล่าวนี้ ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาการยับยั้งภายในพืช โดยเกิดจากการที่ตำแหน่งเป้าหมายของสารกำจัดวัชพืชมีการเปลี่ยนแปลงไป ทำให้สารไม่สามารถเข้าจับกับบริเวณเกาะจับภายในตำแหน่งเป้าหมายได้หรือเข้าจับได้น้อยพืชจึงเกิดความต้านทานต่อสาร (Corbett and Tardif; 2006; Tan *et al.*, 2005; Tranel and Wright, 2002; Devine and Shukla, 2000) สำหรับพืชต้านทานสาร

กำจัดวัชพืชในกลุ่ม Imidazolinone ส่วนใหญ่จะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งเป้าหมายในระดับชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีน ALS โดยมีักพบการเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Ala₁₂₂, Ala₂₀₅, Trp₅₇₄ และ Ser₆₅₂ (Tan *et al.*, 2005; Corbett and Tardif, 2006; Tan *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007) ซึ่งเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งดังกล่าวนี้ที่คาดว่า จะเป็นบริเวณเกาะจับของสาร (herbicide binding site) จึงทำให้เกิดความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้ (Tan *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007)

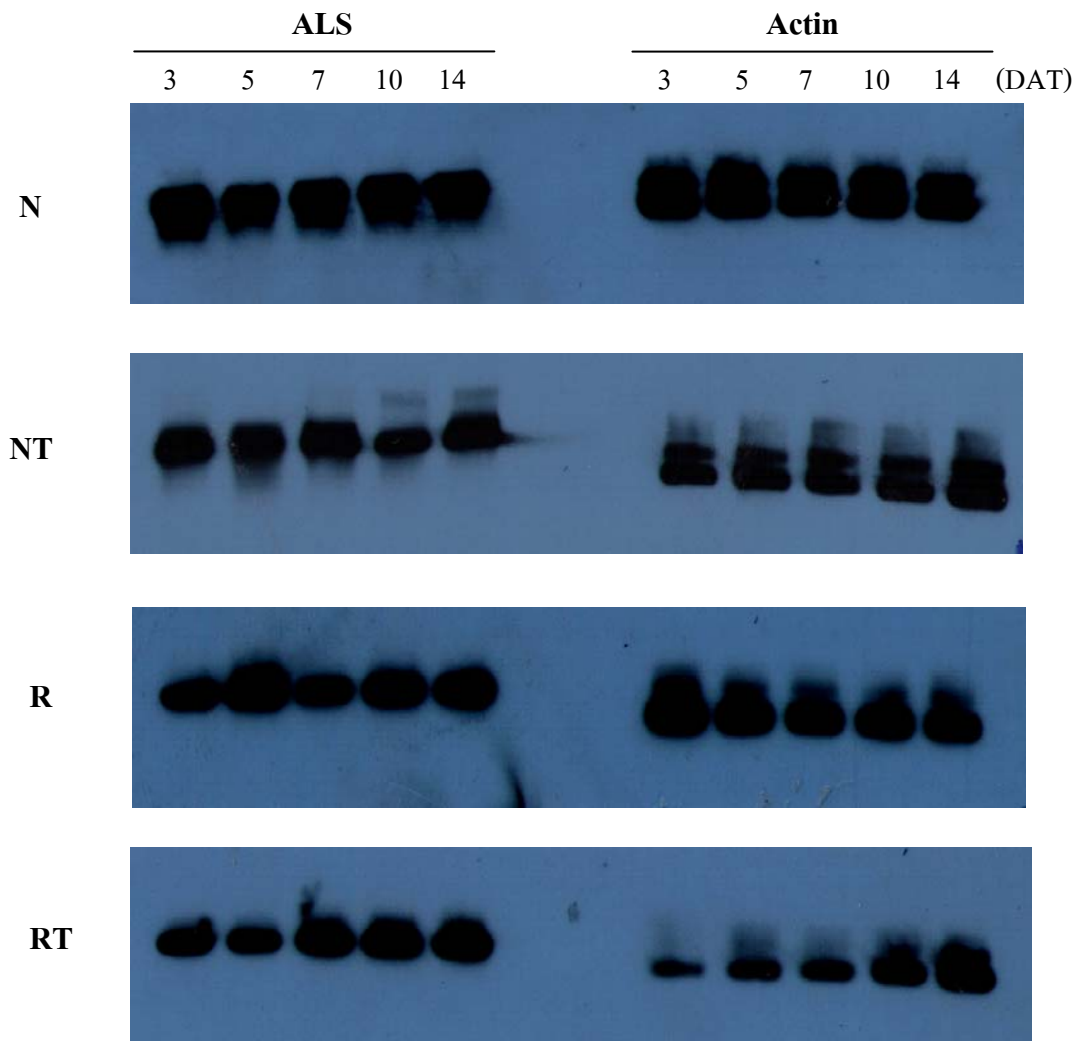
จากการศึกษาในครั้งนี้ ในสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์มีความคงตัวของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช แม้ว่าจะเลี้ยงเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารในอาหารที่ปราศจากสารอิมาซาเพอร์ เป็นเวลานานอย่างน้อย 4 เดือน เมื่อได้รับสารกำจัดวัชพืชเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารก็ยังคงมีความคงตัวของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชไว้ได้ แสดงให้เห็นว่า ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้นนั้น ไม่ได้เกิดจากความแปรปรวนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อพิจารณาจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายที่สารอิมาซาเพอร์แสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืช พบว่า ในสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS สูงกว่าในเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์เดียวกัน แสดงว่า ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งเป้าหมายที่สารอิมาซาเพอร์แสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืช โดยที่ในสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานมีการปรับตัวเป็นแบบการตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีน ALS พบว่า ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในยีน ALS ที่บริเวณ B และ E ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์แบบการหายไปของยีน ทำให้กรดอะมิโนหายไป นอกจากนี้ การแสดงออกของยีนดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารกับเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์เดียวกัน แสดงว่า กลไกความต้านทานที่เกิดขึ้นเป็นแบบตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช อย่างไรก็ตาม การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนนั้นเป็นการศึกษาที่บริเวณสั้น ๆ กล่าวคือ บริเวณ B และ E ที่นำมาใช้ศึกษาในครั้งนี้ มีความยาวของยีนเพียง 455 คู่เบส ถึงแม้จะมีรายงานว่าบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด เมื่อเกิดความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Imidazolinone ซึ่งบริเวณอื่นก็อาจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นได้ เนื่องจากว่ายีน ALS นั้นเป็นยีนที่ขนาดประมาณ 2,000 เบส และมีบริเวณอนุรักษ์ถึง 5 บริเวณ นอกจากนี้ยังพบว่า กลไกของความต้านทานในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ transcription เพราะการแสดงออกของยีน ALS ไม่พบความแตกต่างกันในทั้งเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารและเซลล์อ้อยปกติ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดว่า ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้นนั้นเกิดที่ไหนในขั้นตอนของการทำงานภายในเซลล์ จากผลของการศึกษาใน

ครั้งนี้ คาดว่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน alanine ที่ตำแหน่ง 666 (Ala₆₆₆) แล้วทำให้โครงสร้างของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้ตำแหน่งบริเวณในการเกาะจับของสารกำจัดวัชพืชในเอนไซม์ ALS เกิดการเปลี่ยนแปลงไป สารอิมาซาเพอร์จึงไม่สามารถที่จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ได้ ในขั้นตอนต่อไปจึงควรศึกษาในระดับ post-translation และโครงสร้างของเอนไซม์ ALS ที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ เพื่อให้ทราบถึงกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชได้ชัดเจนยิ่งขึ้นอีก

การคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ โดยใช้วิธี stepwise selection เป็นวิธีการที่สามารถคัดเลือกพืชให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้เป็นอย่างดี ซึ่งการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการศึกษาวิจัยทางการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชนั้นสามารถนำมาศึกษาถึงผลกระทบของสารต่อพืชในด้านต่าง ๆ ได้ ไม่ว่าจะเป็นในด้านสรีรวิทยา ชีวเคมี และชีวโมเลกุล รวมทั้งยังช่วยประหยัดพื้นที่ เวลา และแรงงานที่นำมาใช้ในการคัดเลือก นอกจากนี้ การทดลองในห้องปฏิบัติการยังสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการคัดเลือก และลดปัจจัยที่อาจมีผลต่อการคัดเลือก การเคลื่อนย้ายของสารได้ดีกว่าในสภาพแปลงทดลอง อย่างไรก็ตาม การนำเทคนิคทางด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พืชให้ต้านทานสารกำจัดวัชพืชนั้น จะมีข้อจำกัดในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ โดยที่พืชจะมีความแปรปรวนของจำนวนชุดโครโมโซมเกิดขึ้น ทำให้ผลการคัดเลือกคลาดเคลื่อน และไม่สามารถนำไปใช้ได้กับทุกพืช (ทศพล, 2541) เมื่อพิจารณาจากการศึกษากลไกความต้านทานในระดับชีวเคมีของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ พบว่า การทำงานของเอนไซม์ ALS เป็นแบบตอบสนองน้อยต่อสารอิมาซาเพอร์ โดยเมื่อเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารได้รับสารอิมาซาเพอร์ เอนไซม์ ALS จะยังคงมีกิจกรรมและสามารถทำงานต่อไปได้ ทำให้เซลล์อ้อยสามารถสร้างกรดอะมิโนที่จำเป็นในการเจริญเติบโตต่อไปได้ จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารยังมีชีวิตรอดอยู่ได้เมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ เมื่อพิจารณาจากพื้นฐานในระดับชีวโมเลกุล พบว่า มีการเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน alanine ที่ตำแหน่ง 666 (Ala₆₆₆) โดยเกิดการหายไปที่บริเวณ B และ E ภายในยีน ALS ซึ่งเป็นบริเวณที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด เมื่อพืชเกิดความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Imidazolinone จึงคาดว่าน่าจะทำให้พืชเกิดความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ได้ อย่างไรก็ตามยังมีบริเวณอื่น ๆ ที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาถึงลำดับเบส เนื่องจากว่า ภายในยีน ALS มีด้วยกัน 5 บริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อพืชเกิดความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสารกำจัดวัชพืชที่แตกต่างกันซึ่ง เป็นไปได้ว่าอาจมีบริเวณอื่น ๆ ภายในยีน ALS ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเช่นเดียวกับบริเวณ B และ E

นอกจากนี้ควรทำการศึกษากลไกของความต้านทานสารในระดับชีวเคมีและชีวโมเลกุลในระดับที่เป็นพืชทั้งต้น เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในขั้นตอนการผลิตและปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีต้านทานสารกำจัดวัชพืช

เนื่องจากการตอบสนองของพืชที่มีต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องภายในพืช และมีความซับซ้อนมาก ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นดัชนีในการอธิบายเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลเกี่ยวกับการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน ALS ที่ทำให้พืชเกิดความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS การสร้างพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชส่วนใหญ่จะเลือกสารกำจัดวัชพืชที่เป็นพิษสิ่งแวดล้อมน้อย ไม่เคลื่อนย้ายในดินหรือมีผลตกค้างในดินไม่นาน ซึ่งสารอิมาซาเพอร์เป็นสารกำจัดวัชพืชที่สามารถใช้ในปริมาณที่น้อย และไม่เป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถกำจัดวัชพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น การพัฒนาพันธุ์พืชต้านทานหรือทนทานสารกำจัดวัชพืช นับว่าเป็นทางเลือกหนึ่งที่ทำให้เกษตรกรเลือกใช้สารกำจัดวัชพืชได้อย่างปลอดภัย และลดการใช้สารกำจัดวัชพืชในสภาพไร่นาได้ โดยที่พืชปลูกไม่ได้รับอันตราย แต่ในขณะที่วัชพืชจะได้รับอันตรายจากการใช้สารกำจัดวัชพืช



ภาพที่ 18 การสะสมของ RNA จากการแสดงออกของยีน ALS ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังได้รับสารอิมาซาเพอร์ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่รับสาร (NT) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่รับสาร (R) และเซลล์อ้อยต้านทานที่รับสาร (RT)

สรุปผลการทดลอง

1. จากการคัดเลือกเซลล์ของสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมามาซาเพอร์ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ได้เซลล์อ้อยที่มีดัชนีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชเป็น 918 เท่าของเซลล์อ้อยปกติ ซึ่งจะเรียกว่า สายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมามาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (หรือ เซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร)

2. เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS สูงถึง 2.62-3.39 เท่า ของเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร แสดงว่า กลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสารอิมามาซาเพอร์ มีความเกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมาย (target site-based) ที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในเซลล์ โดยที่เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีการปรับตัวเป็นแบบตอบสนองน้อย (less sensitivity) ต่อสารอิมามาซาเพอร์

3. การพิจารณาจากลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS ที่มีขนาด 455 คู่เบส พบว่า ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุด ที่เกิดจากการหายไปของกรดอะมิโน alanine และนำลำดับเบสของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไปขึ้นทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank รหัส EU243998 และ EU243999 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการแสดงออกของยีน ALS ในระดับ transcription พบว่า เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไม่มีความแตกต่างในการสะสมของ mRNA ของยีน ALS เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร ดังนั้นการแสดงออกของยีน ALS จึงไม่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ ALS แสดงว่า ความต้านทานที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดในขั้นตอนของกระบวนการ post-transcription และ post-translation ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ทศพล พรพรม. 2541. การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้กับการศึกษาวิจัยทางด้านสารกำจัดวัชพืช. *วิทยาสารวัชพืช* 1: 209-214.
- _____. 2545. **สารกำจัดวัชพืช: หลักการและกลไกการทำลาย**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Ahrens, H.W. 1994. **Herbicide handbook**. 7th ed. Weed Science Society America, Illinois, USA. 352 p.
- Arruda, P. and T.R. Silva. 2007. Transcriptome analysis of the sugarcane genome for crop improvement, pp. 438-494. In R.K. Varshney and R. Tuberosa (eds). **Genomics-Assisted Crop Improvement Vol. 2: Genomics Applications in Crops** Springer, Netherlands.
- Avila, L.A., D.J. Lee, S.A. Senseman, G.N. McCauley, J.M. Chandler and J.T. Cothren. 2005. Assessment of acetolactate synthase (ALS) tolerance to imazethapyr in red rice ecotypes (*Oryza* spp.) and imidazolinone tolerant/resistant rice (*Oryza sativa*) varieties. **Pest Management. Science** 61: 171-178.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analysis Biochemistry** 72: 248-254.
- Buker, R.S., B. Rathinasabapathi, G. MacDonald and S.M. Olson. 2004. Physiological basis for differential tolerance of tomato and pepper to rimsulfuron and halosulfuron: site of action study. **Weed Science** 52: 201-205.
- Chompoo, J. and T. Pornprom. 2008. RT-PCR based detection of resistance conferred by an insensitive GS in glufosinate-resistant maize cell line. **Pesticid Biochemistry and Physiology** 90: 189-195.

- Christoffers, M.J., V.K. Nandula, K.A. Howatt and T.R. Wehking. 2006. Target – site resistance to acetolactate synthase inhibitors in wild mustard (*Sinapis arvensis*). **Weed Science** 54: 191-197.
- Corbett, C.L. and F.J. Tardif. 2006. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. **Pest Management Science** 62: 584-597.
- Cox, C. 1996. Herbicide fact sheet imazapyr. **Journal of Pesticide Reform** 16(3): 16-20.
- Devine, D.M. and A. Shukla. 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. **Crop Protection** 19: 881-889.
- Diebold, R.S., K. E. McNaughton, E. A. Lee and F.J. Tardif. 2003. Multiple resistance to imzethapyr and atrazine in Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). **Weed Science** 51: 312-318.
- Kim, J., D. G. Beak, Y. T. Kim, J. D. Choi and M. Y. Yoon. 2004. Effect of deletion at the C-terminus of tobacco acetohydroxyacid synthase on the enzyme activity and cofactor binding. **Biochemical Journal** 384: 59-68.
- Marshall, R. and S.R. Moss. 2008. Characterisation and molecular basis of ALS inhibitor resistance in the grass weed *Alopecurus myosuroides*. **Weed Research** 48: 439-447.
- Mille, J.D. and R. A. Gilbert. 1993. **Sugarcane Botany: A Brief View**. Available source: <http://edis.ifas.ufl.edu/SC034>. May 17, 2006.
- Milliman, L.D., D.E. Riechers, L.M. Wax and F.W. Simmons. 2003. Characterization of two biotypes of imidazolinone-resistant eastern black nightshade (*Solanum ptycanthum*). **Weed Science** 51: 139-144.

- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum** 15: 473–497.
- Newhouse, K.E., W.A. Smith, M.A. Starrett, T.J. Schaefer and B.K. Signh. 1992. Tolerance to imidazolinone herbicide in wheat. **Plant Physiology** 100: 882-886.
- Osuna, M.D., A.J. Fisher and R.D. Prado. 2003. Herbicides resistance in *Aster squamatus* conferred by a less sensitive form of acetolactate synthase. **Pest Management Science** 59: 1210-1216.
- Poehlmen, J.M. and D.A. Sleper. 1995. **Breeding Field Crop**. 4th ed., Iowa State Univ. Press, Iowa.
- Pornprom, T., N. Prodmatee and O. Chatchawankanphanich. 2009. Glutamine synthetase mutation conferring target-site-based resistance to glufosinate in soybean cell selection. **Pest Management Science** 69: 216-222.
- Punyadee, P., M. Thongros and T. Pornprom. 2007. Biochemical mechanism o resistance to imazapyr in sugarcane cell selections. **Thai Journal of Agricultural Science** 40 (3-4): 133-141.
- Rajasekaran, K., J.W. Grula and D.M. Anderson. 1996. Selection and characterization of mutant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cell lines resistant to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. **Weed Science** 119: 115-124.
- Rajguru, S. N., N. R. Burgos, V. K. Shivrain and J. McD. Stewart. 2005. Mutation in the red rice ALS gene associated with resistance to imazethapyr. **Weed Science** 53: 567-577.

- Rungruchkanont, K. S. Ketsa, O. Chatchawankarnphanich and W. G. van Doorn. 2007. Endogenous auxin regulates the sensitivity of *Dendrobium* (cv. Miss Teen) flower pedicel abscission to ethylene. **Functional Plant Biology** 34: 885-894.
- Seefeldt, S.S., J.E. Jensen and E.P. Fuerst. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology** 9: 218-227.
- Shaner, D.L. and B.K. Singh. 1997. **Acetohydroxyacid synthase inhibitors**. Pages 69-110. In Roe, R.M., et al. (eds) *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular biology*. IOS press.
- Shimizu, T., I.Nagayama, K.Nagayama, T.Miyazawa and Y.Nezy. 2002. Acetolactate synthase inhibitors, pp.1-31.. **Herbicides classes in development**. In Boger, P.,K.Wakabayashi and K.Hiarai, eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin.
- Singh, B.K. and D.L. Shaner. 1995. Biosynthesis of branched chain amino acid: from test tube to field. **The Plant Cell** 7: 935-944.
- Tan, S., R.R. Evans, M.L. Dahmer, B.K. Singh and D. L. Shaner. 2005. Imidazolinone – tolerance crops: history, current status and future. **Pest Management Science** 61: 246-257.
- _____, _____ and B. Singh. 2006. Herbicide inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. **Amino Acids** 30: 195-204.
- Tranel, P.J. and T.R. Wright. 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned?. **Weed Science** 50: 700-712.
- Trucco, F., A. G. Hager and P. J. Tranel. 2006. Acetolactate synthase mutation conferring imidazolinone-specific herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. **Journal of Plant Physiology** 163: 475-479.

- Verwoerd, T.C., B.N.M. Dekker and A. Hockema. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. **Nucleic Acids Research** 17: 2362.
- Warabi, E., K. Usui., Y. Tanaka and H. Matsumoto. 2001. Resistance of a soybean cell line to oxyfluorfen by overproduction of mitochondrial protoporphyrinogen oxidase. **Pest Management Science** 57: 743-748.
- Westerfeld, W.W. 1945. A colorimetric determination of blood acetoin. **Journal Biology and Chemistry** 161(2): 495-502.
- White, D.A., M.D.K. Owen, R.G. hartzler and J. Cardina. 2002. Common sunflower resistance to acetolactate synthase – inhibiting herbicides. **Weed Science** 50: 432-437.
- _____, M.A. Graham and M.D.K. Owen. 2003. Isolation of acetolactate synthase homologs in common sunflower. **Weed Science** 51: 845-853.
- Wright, T.R., N.F. Bascomb, S.F. Sturme and D. Penner. 1998. Biochemical mechanism and molecular basis for ALS – inhibiting herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections. **Weed Science** 46: 3-23.
- Yu, Q., X.Q. Zhang, A. Hasem, M.J. Walsh and S.B. Powles. 2003. ALS gene praline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrom*) populations. **Weed Science** 51: 831-838.
- Zambrano, A.Y., J.R. Demey and V. Gonzalez. 2003. *In vitro* selection of a glyphosate-tolerant sugarcane cellular line. **Plant Molecular Biology Reporter** 21: 365-373.
- Zheng, D., W. L. Patzoldt and P. J. Tranel. 2005. Association of the W574L ALS substitution with resistance to cloransulam and imazamox in common rag weed (*Ambrosia artemisiifolia*). **Weed Science** 53: 424-430.

Zhou, Q., W. Liu, Y. Zhang and K. K. Liu. 2007. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 89: 89-96.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macroelements:	
NH_4NO_3	1650.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1900.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
KH_2PO_4	170.00
Microelements:	
$\text{NH}_2\text{-EDTA}$	37.30
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	8.60
KI	0.85
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Organic compounds:	
Myo-inositol	100.00
Glycine	2.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.10

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์ย้อยที่ด้านทวนสาร
สายพันธุ์ K97-32 ในระยะเวลาแตกต่างกัน หลังได้รับสารอิมานาเพอร์ที่ระดับ
ความเข้มข้นต่างกัน

Source of variation	SS	df	MS	F-value
Concentrations	3.52	5	0.70	252.65**
Days after treatment	6.97	4	1.74	624.91**
Concentrations x Days after treatment	2.02	20	0.10	36.35**
Error	0.16	60	0.002	

** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์ย้อยปกติสายพันธุ์
K97-32 ในระยะเวลาแตกต่างกัน หลังได้รับสารอิมานาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น
ต่างกัน

Source of variation	SS	df	MS	F-value
Concentrations	2.222	5	0.44	346.71**
Days after treatment	4.74	4	1.18	925.90**
Concentrations x Days after treatment	1.5	20	0.07	60.15**
Error	0.08	60	0.001	

** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์ย้อยที่ด้านทวนสาร (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

Source of variation	SS	df	MS	F-value
Between Groups	29847.84	8	3730.98	15385.48
Within Groups	4.365	18	0.2425	
Total	29852.205	26		

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์ย้อยปกติ (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมซาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

Source of variation	SS	df	MS	F-value
Between Groups	22015.29	8	2751.91	3104.74
Within Groups	15.95	18	0.88	
Total	22031.24	26		

ตารางผนวกที่ 6 การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) เซลล์อ้อยด้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) และเซลล์อ้อยด้านทานที่ได้รับสาร (RT) ที่ 14 วันหลังได้รับสารอิมซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หลังจากเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารอิมซาเพอร์ เป็นเวลานาน 1-4 เดือน

ชนิดของเซลล์	ระยะเวลาที่ปราศจากสารอิมซาเพอร์ (เดือน)			
	1	2	3	4
	————— ปริมาตรเซลล์ (มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร) ^{1/} —————			
N	2.23 ± 0.20	2.13 ± 0.15	2.46 ± 0.05	2.43 ± 0.11
NT	0.41 ± 0.05	0.43 ± 0.03	0.46 ± 0.05	0.47 ± 0.05
R	2.16 ± 0.11	2.23 ± 0.20	2.20 ± 0.10	2.60 ± 0.28
RT	2.30 ± 0.17	2.20 ± 0.17	2.10 ± 0.17	2.40 ± 0.58

^{1/} ปริมาตรเซลล์ ± standard error ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

LOCUS EU243999 452 bp mRNA linear PLN 20-NOV-2007
 DEFINITION *Saccharum officinarum* cultivar K97-32 resistant line chloroplast acetolactate synthase (ALS) mRNA, partial cds; nuclear gene for chloroplast product
 ACCESSION EU243999
 VERSION EU243999.1 GI:160346987
 KEYWORDS .
 SOURCE *Saccharum officinarum*
 ORGANISM *Saccharum officinarum*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; PACCAD clade; Panicoideae; Andropogoneae; *Saccharum*; *Saccharum officinarum* complex.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 452)
 AUTHORS Khruangchan,N., Chatchawankanphanich,O. and Pornprom,T.
 TITLE Molecular basis of imazapyr resistant sugarcane cell lines
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 452)
 AUTHORS Khruangchan,N., Chatchawankanphanich,O. and Pornprom,T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-OCT-2007) Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Malaiman, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..452
 /organism="Saccharum officinarum"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="K97-32 resistant line"
 /db_xref="taxon:4547"
 /PCR_primers="fwd_seq: ctggtctggggcaatgggrtttgg, rev_seq: gtcttgaaagcncaccactogg"
 gene <1..>452
 /gene="ALS"
 CDS <1..>452
 /gene="ALS"
 /codon_start=3
 /product="chloroplast acetolactate synthase"
 /protein_id="ABX26126.1"
 /db_xref="GI:160346988"
 /translation="GLGAMGFGLPAAAGAAVANPGVTVVDIDGDGSFLMNIQELAMIR
 IENLPVKVFVLLNQLGLGMVQWEDRFYKANRAHTYLGPNENESEIYPDFVTIAKGFNI
 PAVRVTKKSEVHAAIKKMLETPGPYLLDII VPHQEHVLP MIPSGGFKD"
 ORIGIN
 1 ctggtctggg ggcaatggga tttggttgc ctgctgctgc tggogctgct gtggccaacc
 61 cagggtgcac tgttgtgac atogacggag atggtagctt cctcatgaac attcaggagc
 121 tagctatgat ccgaattgag aacctocag tgaaggctct tgtgctaaac aaocagcaoc
 181 tggggatggt ggtgcagtgg gaggacaggt tctataaggc caacagagog cacacatac
 241 tgggaaacc agagaatgaa agtgagatat atccagattt ogtgacaatt gccaaaggg
 301 tcaacattoc agcagtogt gtgacaaaga agagogaagt ocatgcagca atcaagaaga
 361 tgcttgagac tocagggcog taaccttgg atataatgt ccogcaocag gagcatgtgt
 421 tgccatgat ccogagtgt gggtttaagg ac//

ภาพผนวกที่ 1 การลงทะเบียนลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS ในฐานข้อมูล GenBank ของเซลล์
 อ้อยด้านทาน

LOCUS EU243998 455 bp mRNA linear PLN 20-NOV-2007
 DEFINITION *Saccharum officinarum* cultivar K97-32 chloroplast acetolactate synthase (ALS) mRNA, partial cds; nuclear gene for chloroplast product.
 ACCESSION EU243998
 VERSION EU243998.1 GI:160346985
 KEYWORDS .
 SOURCE *Saccharum officinarum*
 ORGANISM *Saccharum officinarum*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; PACCAD; Panicoideae; Andropogoneae; *Saccharum*; *Saccharum officinarum* complex.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 455)
 AUTHORS Khruangchan,N., Chatchawankanphanich,O. and Pornprom,T.
 TITLE Molecular basis of imazapyr resistant sugarcane cell lines
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 455)
 AUTHORS Khruangchan,N., Chatchawankanphanich,O. and Pornprom,T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-OCT-2007) Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Malaiman, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..455
 /organism="Saccharum officinarum"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="K97-32"
 /db_xref="taxon:4547"
 /PCR_primers="fwd_seq: ctggtctgggggcaatgggrtttgg, rev_seq: gtocttgaagcncaccactogg"
 gene <1..>455
 /gene="ALS"
 CDS <1..>455
 /gene="ALS"
 /codon_start=3
 /product="chloroplast acetolactate synthase"
 /protein_id="ABX26125.1"
 /db_xref="GI:160346986"
 /translation="GLGAMGFGLPAAAGAAVANPQVTVVDIDGDGSFLMNIQELAMIR IENLPVKVAFALNNQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPENESEIYPDFVTIAKGFNI PAVRVTKKSEVHAAIKKMLETPGPYLLDII VPHQEHLVLPMI PSGGAFKD"
 ORIGIN
 1 ctggtctggg ggcaatggga tttggttgc cggctgctgc tggogctgct gtggccaacc
 61 cagggtgcac tgttgttgac atcgaoggag atggtagctt octcatgaac attcaggagc
 121 tagctatgat ccgaattgag aacctocag tgaaggtctt tggctaaac aaccagcacc
 181 tggggatggt ggtgcagtgg gaggacaggt tctataagge caacagagca cacacatact
 241 tgggaaacc agagaatgaa agtgagatat atccagattt ogtgacaatt gccaaagggt
 301 tcaacattoc agcagtoogt gtgacaaaga agagogaagt ocatgcagca atcaagaaga
 361 tgcttgagac tocagggcog taoccttgg atataatgt ccogcaocag gagcatgtgt
 421 tgccatgat cccgagtggg ggagctttca aggac

ภาพผนวกที่ 2 การลงทะเบียนลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS ในฐานข้อมูล GenBank ของเซลล์
 อ้อยปกติ