วิทยานิพนธ์

กิจกรรมของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธสในเซลล์อ้อย
ที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานสารอิมาซาเพอร์

ACETOLACTATE SYNTHASE ACTIVITY IN SELECTED
IMAZAPYR-RESISTANT SUGARCANE CELLS

นายภาคภูมิ ปัญญาดี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

กิจกรรมของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธสในเซลล์อ้อยที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานสารอิมาซาเพอร์

Acetolactate Synthase Activity in Selected Imazapyr-Resistant Sugarcane Cells

โดย

นายภาคภูมิ ปัญญาดี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2551

ภาคภูมิ ปัญญาดี 2551: กิจกรรมของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธสในเซลล์อ้อยที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ทศพล พรพรหม, Ph.D. 71 หน้า

การคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งได้ชักนำแคลลัสจากส่วนม้วนใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ K95-282 จากนั้นชักนำให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอย โดยใช้สูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร myo-inositol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 5.7 การคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ เริ่มต้นทำการคัดเลือกเซลล์อ้อยพันธุ์ K 95-282 จากระดับความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 0.1 ถึง 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดเป็นเซลล์ที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ได้ ซึ่งจะเรียกว่า เป็นสายพันธุ์เซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาในการคัดเลือกนาน 420 วัน มีดัชนีของความต้านทานสารเป็น 116.7 เท่าของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์เดียวกัน การศึกษาลักษณะกลไกทางชีวเคมีของอ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ acetolactate synthase (ALS) ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารและเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์เดียวกัน เมื่อพิจารณาจากค่า I_{50} จะเห็นได้ว่าเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS มากกว่าในเซลล์ของอ้อยปกติพันธุ์เดียวกัน 6.5 เท่า หลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 ถึง 100 ไมโครโมลาร์ จากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์มีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็นแบบตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไม่ถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาเพอร์

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Parkpoom Punyadee 2008: Acetolactate Synthase Activity in Selected Imazapyr-Resistant Sugarcane Cells. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Tosapon Pornprom, Ph.D. 71 pages.

Selection of sugarcane (*Saccharum* spp.) cells resistant to imazapyr was carried out using callus and cell suspension induced from the tight young furled leaves of sugarcane clone K 95-282. The callus and cell suspension were cultured on modified MS medium supplemented with 3 mg/L 2,4-D, 500 mg/L casein hydrolysate, 100 mg/L myo-inositol, 10 % coconut water and pH 5.70. A sugarcane cell line from K 95-282 resistant to 1 μM imazapyr was obtained after 420 days of selection, using a stepwise selection with increasing concentrations of imazapyr from 0.1 to 1 μM. It was referred to as 1 μM imazapyr-resistant sugarcane cell line. The results indicated that the resistance index of the resistant cells line was 116.7-fold higher than that of the normal cells. To establish the biochemical mechanism of resistance to imazapyr, acetolactate synthase (ALS) activity was determined in normal and resistant cells. Based on I_{50} value, ALS activity of the resistant cells was 6.5-fold higher than that of the normal cells at various concentrations of imazapyr from 0.01 to 100 μM. These results suggested that the biochemical mechanism of imazapyr resistance in the sugarcane cell line appeared to be an alteration at the target site, based on the ALS activity, leading to less sensitivity to imazapyr.

_____ _____ __ / __ / __

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ทศพล พรพรหม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. เรวัต เลิศฤทัยโยธิน และ รองศาสตราจารย์ ดร. นวรัตน์ อุดมประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมซึ่งได้กรุณาให้คำปรึกษา และแนะนำในด้านการทดลองและเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร.วิชชุพร จันทร์ศรี ประธานในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และ ดร. ปาริชาติ เบิร์นส ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่กรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และขอขอบคุณ บริษัท บี เอ เอส เอฟ (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์สารอิมาซาเพอร์ ที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อาจารย์จำเนียร ชมภู และคุณมัตติกา ทองรส ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษาแนะนำต่าง ๆ ในการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมา ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนจนสำเร็จการศึกษา และทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ภาคภูมิ ปัญญาดี
มีนาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	17
อุปกรณ์	17
วิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	27
สรุป	49
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	50
ภาคผนวก	58

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (I_{50}) ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นต่างกัน	43
2	ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (I_{50}) ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์	48

ตารางผนวกที่

1	องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)	59
2	การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 เมื่อมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นต่างกัน	60
3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 เมื่อมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นต่างกัน	61
4	การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 ที่ระยะเวลาต่างกันหลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	62
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K95-282 ในระยะเวลาต่างกัน หลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	63
6	การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ระยะเวลาต่างกันหลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	64
7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ระยะเวลาต่างกัน หลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	65

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
8	ปริมาตรเซลล์เปรียบเทียบ (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) ของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน	66
9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเซลล์เปรียบเทียบ (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) ของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่างกัน	67
10	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K 95-282	68
11	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ในการวัดปริมาณโปรตีน ในเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K 95-282	68
12	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารที่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ ในระดับความเข้มข้นต่างกัน ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์	68
13	กิจกรรมของเอนไซม์ ALS เปรียบเทียบในเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารที่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ ในระดับความเข้มข้นต่างกัน ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์	69
14	การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ 7 วัน หลังจากทำการย้ายเซลล์ ในเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารที่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นต่างกัน	70

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของสารอิมาซาเพอร์ในรูปกรด (ก) และในรูปเกลือ (ข)	7
2	ตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาของสารอิมาซาเพอร์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธสภายในพืช	9
3	การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 ในช่วง 0 5 7 10 14 และ 21 วัน	30
4	การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 เมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน	32
5	ระยะเวลาในการคัดเลือกเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K 95-282 ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์	35
6	ระยะเวลาในการคัดเลือกเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K 95-282 ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	36
7	ลักษณะของเซลล์อ้อยปกติ (ก: normal cells) และเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (ข: 1 μM imazapyr-resistant sugarcane cell line)	37
8	การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยต้านทานสารสายพันธุ์ K 95-282 เมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน	39
9	การตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารของอ้อยสายพันธุ์ K 95-282 ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่างกัน	42
10	กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์ปกติและเซลล์ต้านทานสารของอ้อยสายพันธุ์ K 95-282 ที่ได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่างกัน ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์ โดยที่ในเซลล์ต้านทานสารที่ไม่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ALS 20.50 nmol acetoin mg^{-1} protein min^{-1} และในเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ALS 19.03 nmol acetoin mg^{-1} protein min^{-1} ตามลำดับ	47

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALS	=	Acetolactate synthase
$(NH_4)_2SO_4$	=	Ammonium sulfate
CRD	=	Completely randomized design
cv.	=	Cultivar
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
DTT	=	Dithiothreitol
EC	=	Enzyme commission
FAD	=	Flavin adenine dinucleotide
g	=	Gravity
I_{50}	=	Herbicide concentrations required to reduce growth by 50% or inhibit the ALS activity by 50%
L	=	Liter
$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
μM	=	Micromolar
mg	=	Milligram
min	=	Minute
PCV	=	Packed cell volume
PVPP	=	Polyvinyl polypyrolidone
K_2HPO_4	=	Dibasic potassium phosphate
NaOH	=	Sodium hydroxide
H_2SO_4	=	Sulfuric acid
TPP	=	Thiamine pyrophosphate
V	=	Volume
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxy acetic acid

กิจกรรมของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธสในเซลล์อ้อยที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานสารอิมาซาเพอร์

Acetolactate Synthase Activity in Selected Imazapyr-Resistant Sugarcane Cells

คำนำ

อ้อย (*Saccharum* spp.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลรูปแบบต่าง ๆ นอกจากนี้ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลยังก่อให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกหลายชนิด เช่น แอลกอฮอล์ ไม้อัด และกระดาษ เป็นต้น คิดเป็นมูลค่าปีละหลายหมื่นล้านบาท อีกทั้งยังมีความสำคัญต่อการสร้างงานให้คนในภาคเกษตรกรรมและภาคอุตสาหกรรมปีละเกือบล้านคนได้มีงานทำ ปัจจุบันเกษตรกรชาวไร่อ้อยยังต้องประสบปัญหาในการปลูกอ้อย ไม่ว่าจะเป็นการขาดแคลนพื้นที่ที่เหมาะสมในการปลูกอ้อย ความสมบูรณ์ของดินไม่ดีพอ พันธุ์อ้อยที่ใช้อยู่ไม่เหมาะสมกับพื้นที่ การจัดการแปลงปลูกยังไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังมีปัญหาของศัตรูพืชทางการเกษตร (เช่น โรคพืช แมลงศัตรูพืช และวัชพืช) เข้ามารบกวนโดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาวัชพืช ซึ่งนับว่าเป็นปัญหาที่จะส่งผลกระทบทำให้ผลผลิตอ้อยของเกษตรกรอยู่ในระดับต่ำ ดังนั้นจึงต้องหาแนวทางในการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น โดยการใช้พันธุ์พืชที่มีความต้านทานสารร่วมกับการเขตกรรมหรือการใช้สารกำจัดวัชพืชที่เหมาะสม สามารถช่วยกำจัดวัชพืชและเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น แต่ในกรณีที่มีการใช้สารแบบไม่เลือกทำลาย อาจจะเกิดความเป็นพิษและอันตรายต่อพืชปลูกได้ ดังนั้นแนวทางในการป้องกันหรือแก้ปัญหาวัชพืชปลูกที่ถูกทำลายจากการได้รับสารกำจัดวัชพืชนั้น สามารถทำได้โดยการใช้สารกำจัดวัชพืชประเภทเลือกทำลายหรือพัฒนาสายพันธุ์พืชปลูกที่มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ซึ่งจะทำให้สามารถใช้สารกำจัดวัชพืชได้อย่างปลอดภัย โดยที่ไม่เป็นพิษต่อพืชปลูก ในขณะที่วัชพืชจะถูกทำลายและตายไป

สารอิมาซาเพอร์ เป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทไม่เลือกทำลาย สามารถควบคุมวัชพืชพวกใบกว้างและวัชพืชวงศ์หญ้าชนิดต่างๆ ในพืชปลูกหลายชนิด เช่น ยางพาราปาล์มน้ำมัน และอ้อย (Cox, 1996) สารสามารถเคลื่อนย้ายได้ทั้งในไซเลมและโฟลเอม โดยจะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส (Acetolactate Synthase; ALS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งในขั้นตอนแรกของปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดอะมิโน leucine, valine และ isoleucine หลังจากที่พืชได้รับสารจะทำให้การเจริญเติบโตของพืชถูกยับยั้งไปภายใน 2-3 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตาม อาการได้รับพิษของพืชจะปรากฏออกมาภายใน 1-2 สัปดาห์ หรือมากกว่านั้น ซึ่งพืชที่ได้รับสารจะแสดงลักษณะอาการ chlorosis ในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ

ก่อน แล้วจะค่อย ๆ ขยายออกไปสู่บริเวณใบ จนเกิดอาการ necrosis และจะตายไปในที่สุด (Ahrens, 1994; Cox, 1996)

การสร้างสายพันธุ์พืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น สามารถคัดเลือกได้ทั้งในสภาพพืชทั้งต้นและในระดับเซลล์ (Dyer, 1996) ซึ่งการคัดเลือกในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นสามารถทำการคัดเลือกได้ในสภาพแปลงทดลองและเรือนทดลองโดยทำการคัดเลือกต้นที่ไม่ถูกทำลายหรือถูกทำลายบางส่วนภายหลังจากที่ได้รับสาร ส่วนการคัดเลือกในระดับเซลล์สามารถทำการคัดเลือกได้ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการคัดเลือกโดยสายพันธุ์พืชต้านทานมีลักษณะภายนอกเปลี่ยนแปลงไป (phenotype change) อาจเนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมในด้านความต้านทานต่อสารและสามารถที่จะถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวไปสู่รุ่นลูกรุ่นหลานต่อไปได้ (ทศพล, 2541) หรืออาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงส่วนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่สารพันธุกรรมและไม่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ (Chaleff, 1981) เช่นเดียวกับความทนทานของเซลล์อ้อยต่อสารไกลโฟเสทซึ่งมีอยู่เฉพาะในเซลล์เท่านั้น (epigenetic change) ไม่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ (Zambrano *et al*., 2003) ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ตลอดจนได้ทำการพิจารณากลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช (mechanisms of herbicide resistance) ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ ALS ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสารอิมาซาเพอร์ภายในพืช โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์กับเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นดัชนีในการอธิบายกลไกทางชีวเคมีของความต้านทานในพันธุ์หรือสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อยเพื่อให้มีลักษณะที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ทำการคัดเลือกสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับเซลล์แขวนลอยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อชักนำให้เกิดเป็นเซลล์อ้อยที่มีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์

2. ทำการศึกษากลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของความต้านทานสารในพันธุ์หรือสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์พืช เพื่อใช้เป็นดัชนีในการอธิบายลักษณะกลไกทางชีวเคมีของความต้านทานในพันธุ์หรือสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์

การตรวจเอกสาร

ความสำคัญของอ้อยในเชิงเศรษฐกิจ

อ้อย(*Saccharum* spp.) เป็นพืชตระกูลหญ้ายืนต้น(perennial grass)มีถิ่นกำเนิดทางตอนเหนือของประเทศอินเดีย และเกาะนิวกีนี อ้อยเป็นพืชที่มีพันธุกรรมที่ซับซ้อนเพราะเป็นแบบ heterozygous (Poehlman and Sleper, 1995) อ้อยที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน ได้แก่ *S. officinarum* และอ้อยลูกผสม ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างชนิด interspecific hybrid ของ *S. officinarum* กับอ้อยชนิดอื่นที่ปลูกเป็นการค้า โดยมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันตั้งแต่ 2n = 100-130

อ้อยเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ คือ การบริโภคน้ำตาลในประเทศปีละประมาณ 1.6-1.7 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 17,000-19,000 ล้านบาท การส่งออกน้ำตาลจำหน่ายในตลาดโลกปีละกว่า 3 ล้านตัน นำรายได้เข้าประเทศประมาณ 20,000-30,000 ล้านบาทต่อปี ทำให้ประเทศไทยมีสถานภาพเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลใหญ่เป็นอันดับ 3 ของโลก รองจากบราซิล สหภาพยุโรป แต่บางปีจะเป็นอันดับ 4 รองจากออสเตรเลีย มีสัดส่วนตลาดร้อยละ 9.5 ของโลก มีตลาดสำคัญคือ อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ เกษตรกรผู้ปลูกอ้อยจะมีรายได้จากการจำหน่ายอ้อยทั้งหมด ประมาณ 30,000 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 4 ของรายได้ภาคเกษตรทั้งหมด เป็นตลาดแรงงานใหญ่มีผู้เกี่ยวข้องทั้งด้านแรงงานตัดอ้อยและแรงงานในโรงงานน้ำตาล ในช่วงฤดูตัดอ้อยประมาณปลายเดือนพฤศจิกายน ถึงต้นเดือนเมษายน จะมีการจ้างแรงงานไม่ต่ำกว่า 600,000 คน ทั้งนี้ยังไม่รวมถึงแรงงานในการบรรทุกและขนส่งอ้อย และความสำคัญด้านพลังงาน รัฐบาลได้ตั้งคณะกรรมการเอธานอลแห่งชาติขึ้น เพื่อแก้ปัญหาวิกฤตเรื่องราคาน้ำมันเชื้อเพลิง โดยมีโครงการจัดตั้งโรงงานแอลกอฮอล์เพื่อใช้ผสมในน้ำมันเบนซินในอัตราส่วน 1:10 ซึ่งสามารถใช้ได้ดีเทียบเท่าน้ำมันเบนซิน 95 โดยโรงงานดังกล่าวจะใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ (กรมวิชาการเกษตร, 2550) นอกจากนี้อ้อยยังเป็นพืชที่ปลูกง่ายให้ผลผลิตและผลตอบแทนสูง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เช่น สภาพที่ขาดน้ำหรือมีน้ำมากเกินไป และยังเป็นพืชที่พิเศษกว่าพืชชนิดอื่น ๆ กล่าวคือ เมื่อปลูกครั้งหนึ่งแล้วสามารถเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง และมีตลาดรับซื้อที่แน่นอน

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยในปี พ.ศ. 2549 ประมาณ 6.03 ล้านไร่ มีผลผลิตรวมทั้งประเทศ 47.65 ล้านตัน และผลผลิตเฉลี่ย 7.89 ตันต่อไร่ แต่ยังอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตเฉลี่ยของต่างประเทศ เช่น ออสเตรเลีย 14.71 ตันต่อไร่ และสหรัฐอเมริกา 11.81 ตันต่อไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) เมื่อพิจารณาในแง่ของต้นทุนการผลิตต่อตันของประเทศไทย

มีต้นทุนการผลิตต่อตันที่สูงกว่าประเทศอื่น ๆ และมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เพราะปัญหาพื้นฐานทางการผลิต เช่น ขาดแหล่งน้ำชลประทาน ไม่มีการพัฒนาพื้นที่ปลูกอย่างเป็นระบบ ทำให้ดินขาดความอุดมสมบูรณ์ เครื่องจักรกลทางการเกษตรไม่มีประสิทธิภาพ แรงงานหายาก ค่าแรงแพง และมีปัญหาศัตรูพืชระบาดมาก เกษตรกรไม่สามารถป้องกันหรือกำจัดอย่างทันเหตุการณ์ได้ (เกลียวพันธ์, 2546)

การจัดการวัชพืชในการปลูกอ้อย

การปลูกอ้อยในปัจจุบัน สามารถแบ่งตามฤดูปลูกได้เป็น 2 ประเภท คือ การปลูกอ้อยต้นฝน แบ่งเป็น 2 เขต คือ การปลูกอ้อยต้นฝนในเขตชลประทาน ซึ่งเกือบทั้งหมดอยู่ในเขตภาคกลางและภาคตะวันออกเป็นพื้นที่ที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตอ้อยสูง การปลูกโดยใช้เครื่องปลูกทั้งแบบแถวเดี่ยวและแถวคู่ โดยจะปลูกแถวเดี่ยวระยะแถว 1.4-1.5 เมตร แถวคู่ระยะแถว 1.4-1.5 เมตร ระยะระหว่างคู่แถว 30-40 เซนติเมตร และการปลูกอ้อยต้นฝนในเขตอาศัยน้ำฝน ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความแปรปรวนในเรื่องผลผลิตสูง วิธีการปลูกใช้ระยะห่างระหว่างร่องในบางพื้นที่ 0.9-1.2 เมตร และอีกฤดูปลูกคือการปลูกอ้อยปลายฝน (ปลูกข้ามแล้ง) เป็นการปลูกอ้อยโดยอาศัยความชื้นในดินช่วงปลายฤดูฝนเพื่อให้อ้อยงอกและเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ ไปจนกว่าอ้อยจะได้รับน้ำฝนต้นฤดู เกษตรกรนิยมปลูกอ้อยแบบทั้งลำ โดยจะชักร่องให้ลึก ระยะแถว 1.0-1.3 เมตร และวางลำอ้อยในร่องแล้วใช้จอบสับลำอ้อยเป็น 2-3 ส่วน กลบดินหนาประมาณ 10-15 เซนติเมตร (กรมวิชาการเกษตร, 2550) แต่ในระบบการปลูกอ้อยเหล่านี้อาจจะมีปัญหาวัชพืชเข้ารบกวนอันเนื่องจากการเตรียมแปลงปลูกที่ไม่เหมาะสมทำให้วัชพืชที่มีศักยภาพในการแก่งแย่งปัจจัยในการเจริญเติบโต

วัชพืชนับว่าเป็นศัตรูพืชของอ้อยชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุทำให้ผลผลิตต่ำแต่ต้นทุนการผลิตสูง ถ้าทำการกำจัดวัชพืชไม่ทันกับการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วในช่วงวิกฤตของพืช เพราะวัชพืชจะแก่งแย่งแร่ธาตุอาหาร น้ำ และแสงสว่าง ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของอ้อย ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับชนิด ความหนาแน่น และช่วงเวลาการเบียดเบียนของวัชพืช พื้นที่ใดก็ตามถ้ามีปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตก็จะมีปัญหาวัชพืชมาก เพราะวัชพืชมีศักยภาพในการแข่งขันได้สูงกว่าอ้อย โดยเฉพาะในช่วง 3 เดือนแรกของอายุอ้อย โดยที่ผ่านมาได้มีรายงานเกี่ยวกับปัญหาวัชพืชในการผลิตอ้อย กล่าวคือ ในไร่ที่มีหญ้าแพรกขึ้นแข่งขันทำให้ผลผลิตของน้ำตาลลดลง 14 เปอร์เซ็นต์ (Richard, 1993) ส่วนในไร่อ้อยที่มีหญ้าโขย่งขึ้นแข่งขันกับอ้อยทำให้ผลผลิตลดลง 42–43 เปอร์เซ็นต์ (Richard, 1990) การควบคุมกำจัดวัชพืชในไร่อ้อยสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การกำจัดวัชพืชโดยวิธีกล ซึ่งเกลียวพันธุ์ และคณะ (2547) ศึกษาการสูญเสียผลผลิตอ้อยพันธุ์ K 88-200 โดยเปรียบเทียบ

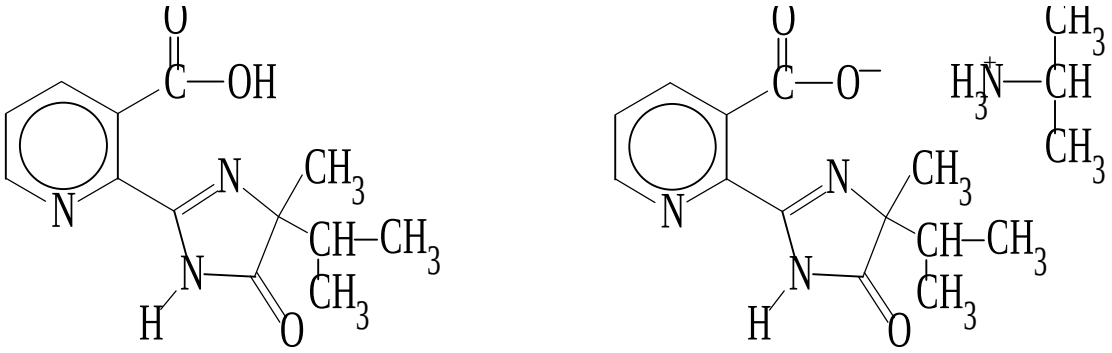
การใช้แรงงานทำรุ่นกับการไม่กำจัดวัชพืช พบว่า ผลผลิตอ้อยสูญเสีย 95.8 เปอร์เซ็นต์โดยที่ไม่มีการกำจัดวัชพืชตลอดฤดูปลูก และการใช้สารกำจัดวัชพืช ซึ่งปัจจุบันการใช้สารกำจัดวัชพืชเป็นวิธีการที่เกษตรกรนิยมนำมาใช้ในการจัดการวัชพืชมาก เนื่องจากเกษตรกรทำการปลูกอ้อยในพื้นที่ขนาดใหญ่ ปัญหาแรงงานขาดแคลน ค่าแรงสูง อีกทั้งมีสารกำจัดวัชพืชหลายชนิดที่ใช้ได้ผลดีในการควบคุมวัชพืชในไร่อ้อย (นริศร, 2530)

โดยทั่วไปการใช้สารกำจัดวัชพืชสำหรับการควบคุมวัชพืชในการปลูกอ้อย จะมีระยะเวลาในการใช้สารกำจัดวัชพืชอยู่ 3 ช่วง กล่าวคือ ใช้ก่อนปลูก (pre–planting) ใช้ก่อนที่พืชปลูกหรือวัชพืชงอก (pre–emergence) และใช้หลังพืชปลูกหรือวัชพืชงอก (post–emergence) ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการจัดการวัชพืชในไร่อ้อยโดยการใช้สารกำจัดวัชพืช โดยที่ Viator *et al.* (2002) ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ ในการควบคุมวัชพืชพวกสะอึก (red morning glory) ในไร่อ้อย พบว่าการใช้สาร atrazine, diuron, metribuzin และ terbacil ทำให้อ้อยแสดงอาการ chlorosis ที่บริเวณใบและใบส่วนที่สัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช ส่วนการใช้สาร sulfentrazone และ azafeniden ทำให้อ้อยแสดงอาการ red discoloration ที่แกนใบ (mid rib) และขยายออกไปจนถึงขอบใบ ส่งผลทำให้ความสูงของอ้อยลดลง นอกจากนี้ได้มีรายงานว่า ที่ 21 วันหลังจากที่มีการใช้สาร azafeniden ทำให้อ้อยแสดงอาการได้รับพิษจากการใช้สารมากถึง 23-31 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการใช้สาร azafeniden ในช่วงต้นฤดูฝนที่อัตรา 0.56 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ทำให้อ้อยเกิดความเสียหาย 30-33 เปอร์เซ็นต์ (Viator, 2002) นอกจากนี้ได้มีรายงานว่า การใช้สาร flumioxazin ในไร่อ้อยเป็นแบบหลังวัชพืชงอกที่อัตรา 0.28 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ สามารถควบคุมวัชพืชใบกว้างและวงศ์หญ้าได้ดี แต่มีผลทำให้ความสูงของอ้อยลดลง 15-28 เซนติเมตร (Dalley and Edward, 2005)

สารอิมาซาเพอร์ (imazapyr)

สารอิมาซาเพอร์ เป็นสารกำจัดวัชพืชจัดอยู่ในกลุ่ม Imidazolinones มีชื่อทางเคมี คือ 2-[4, 5-dihydro-4-methyl-4-(1-methylethyl)-5-oxo-1*H*-imidazol-2-yl]-3-pyridinecarboxylic acid (CA) หรือ 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl) nicotinic acid (IUPAC) มีสูตรโมเลกุลของสารเป็น $C_{13}H_{15}N_3O_3$ โดยทั่วไปมี 2 รูปคือ ในรูปกรด และรูปเกลือ isopropylamine (ภาพที่ 1) โดยสารมีลักษณะเป็นผงแป้งสีขาว และมีกลิ่นของ acetic acid (ทศพล, 2545; Ahrens, 1994) มีชื่อทางการค้า คือ Arsenal, Habitat, Chopper และ Stalker (Tu *et al.*, 2001) จัดเป็นสารกำจัดวัชพืชแบบไม่เลือกทำลายสามารถใช้ได้ทั้งแบบก่อนวัชพืชงอก (pre-emergence) และหลังวัชพืชงอก (post-emergence)

ใช้ควบคุมวัชพืชพวกวงศ์หญ้า วัชพืชใบกว้างทั้งปีเดียวและข้ามปีในพืชปลูกหลายชนิด เช่น ยางพารา อ้อย และปาล์มน้ำมัน เป็นต้น (Cox, 1996; Osuna *et al*., 2003)



(ก) imazapyr acid (ข) imazapyr isopropylamine

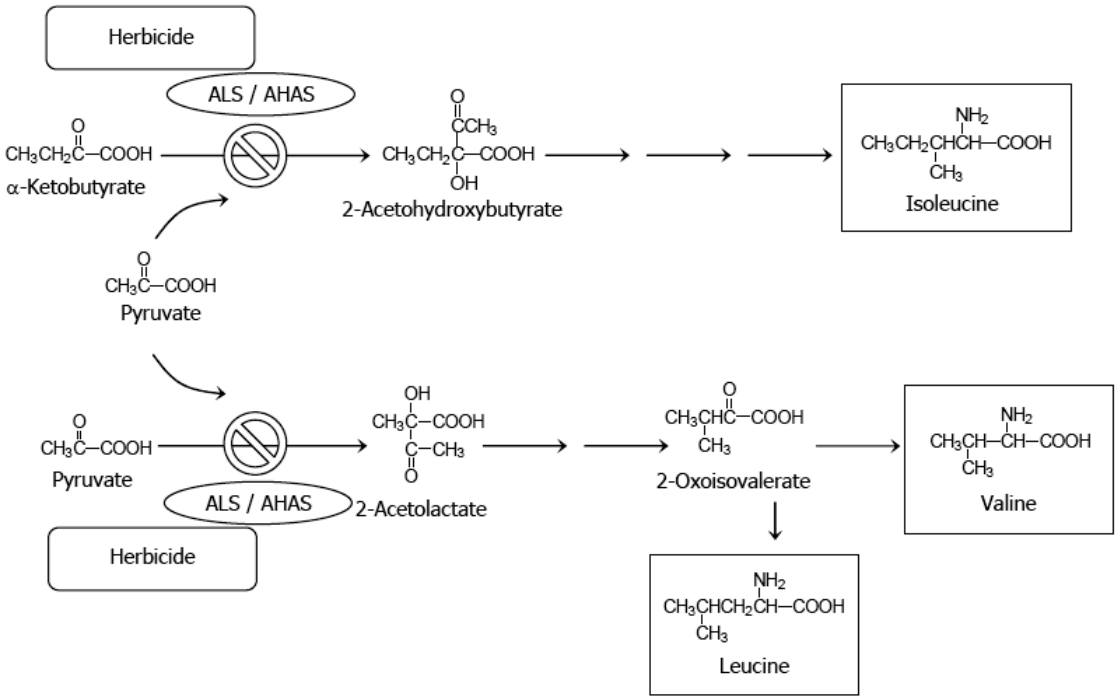
ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารอิมาซาเพอร์ในรูปกรด (ก) และในรูปเกลือ (ข)
ที่มา: Tu *et al*. (2001)

สารอิมาซาเพอร์สามารถดูดซึมเข้าสู่ในต้นพืชโดยผ่านได้ทั้งทางรากและทางใบ ซึ่งการดูดซึมผ่านทางรากพืชด้วยกระบวนการพา (passive process) ของสารละลายน้ำในดิน โดยจะขึ้นอยู่กับค่า pH ภายในดิน และความเป็น lipophilic ของสาร เนื่องจากสารอิมาซาเพอร์เป็นสารที่มีสภาพเป็นกรดอ่อน ๆ (weak acid) โดยที่สภาพแวดล้อมภายในดินจะมีผลต่อโครงสร้างของสาร เช่น เมื่อค่า pH ภายในดินต่ำกว่า 5 การดูดยึดของสารกับอนุภาคดินจะเพิ่มมากขึ้น และจำกัดการเคลื่อนย้ายของสารภายในดิน แต่ถ้าค่า pH ภายในดินมากกว่า 5 สารจะมีสภาพเป็นประจุลบมากขึ้น ทำให้การดูดยึดกับอนุภาคดินน้อยลงและละลายอยู่ในสารละลายของน้ำในดิน ทำให้รากพืชสามารถดูดซึมสารเข้าไปได้ (Tu *et al*., 2001) ส่วนในด้านความเป็น lipophilic ของสาร Little *et al*. (1994a,b) ได้ศึกษาปัจจัยทางฟิสิกส์ที่เกี่ยวข้องของการแทนที่ตำแหน่งที่ 5 ของ pyridine imidazolinones (5'-substitued pyridine imidazolinones) และการดูดซึมของรากข้าวโพดและทานตะวัน พบว่า ความเป็น lipophilic จะเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซึมของสาร กล่าวคือ ความเป็น lipophilic ที่เพิ่มมากขึ้นทำให้การดูดซึมของสารเพิ่มมากขึ้น และกระบวนการเคลื่อนย้ายจากรากสู่ยอดพืชโดยผ่านทางท่อน้ำ (xylem) ส่วนการดูดซึมผ่านทางใบ สารอิมาซาเพอร์ที่ติดฉลากด้วย ^{14}C สามารถดูดซึมได้ดีกว่าสารไกลโฟเสทที่ติดฉลากด้วย ^{14}C ในใบทานตะวันภายหลังจากการได้รับสาร 1 วัน (Diaz-Sanchez *et al*., 2002) โดยที่สารจะมีการเคลื่อนย้ายได้อย่างรวดเร็วผ่านท่ออาหาร (phloem) ไปสู่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ เช่น บริเวณปลายยอด และปลายราก สารสามารถปลดปล่อยออกทางรากพืชสู่ดินได้ โดยมีการศึกษาในข้าวโพดที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Imidazolinones พบว่า สารอิมาซาเพอร์

สามารถเคลื่อนย้ายจากใบสู่รากพืชและปลดปล่อยสู่ดินส่งผลทำให้หญ้าแม่มด witch weed (*Striga* spp.) ซึ่งเป็นวัชพืชปรสิต (parasitic weeds) ของข้าวโพดในทวีปแอฟริกาตาย และยังสามารถไปยับยั้งการงอกของเมล็ดวัชพืชดังกล่าวอีกด้วย (Kanampiu *et al*., 2002)

กลไกการทำลายของสารอิมาซาเพอร์ภายในพืช สารจะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส (Acetolactate synthase หรือ ALS; EC 4.1.3.18) ซึ่งอาจจะเรียกว่าเอนไซม์อะซิโทไฮดรอกซีแอซิดซินเธส (Acetohydroxy acid synthase หรือ AHAS; EC 2.2.1.6) (ภาพที่ 2) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นลูกโซ่ ได้แก่ valine, leucine และ isoleucine ในพืช เชื้อรา และแบคทีเรีย (Duggleby and Pang, 2000) โดยที่เอนไซม์ ALS ภายในเซลล์พืชสังเคราะห์ขึ้นโดยการลอกรหัสพันธุกรรมจากยีน (gene) ภายในนิวเคลียส และแปลรหัสพันธุกรรมของยีนดังกล่าวบริเวณไซโตพลาสซึม (cytoplasm) แล้วส่งผ่านในรูปของ transit peptide ไปยังคลอโรพลาสต์ (Corbett and Tardif, 2006; Tan *et al*., 2006; Kadaru *et al*., 2008) เพื่อทำหน้าที่ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นลูกโซ่ โดยที่การทำงานของเอนไซม์จะเกิดขึ้นสองปฏิกิริยาคู่ขนานกันไป กล่าวคือ ปฏิกิริยาแรกจะทำปฏิกิริยารวมโมเลกุลของไพรูเวต 2 โมเลกุล เป็น 2-acetolactate ในขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์กรดอะมิโน valine และ leucine ส่วนปฏิกิริยาที่สอง ทำปฏิกิริยารวมโมเลกุลของไพรูเวต 1 โมเลกุลกับ 2-oxobutyrate 1 โมเลกุล เป็น 2-aceto-2-hydroxybutyrate ในขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์กรดอะมิโน isoleucine โดยกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการ thiamine pyrophosphate (TPP) flavin adenine dinucleotide (FAD) และ Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} เป็นปัจจัยร่วมในการทำงาน และจะถูกควบคุมด้วยกระบวนการยับยั้งแบบย้อนกลับด้วยกรดอะมิโนที่สังเคราะห์ขึ้นภายในกระบวนการ (end-product amino acids) หรือเอนไซม์ถูกสารอื่น ๆ ยับยั้ง (Jung *et al*., 2004)

ภายหลังจากที่พืชได้รับสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS พืชจะแสดงอาการ chlorosis และ necrosis ในใบอ่อนของพืช และตายอย่างช้า ๆ โดยใช้เวลานานหลายสัปดาห์ขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดอะมิโนต่าง ๆ ที่สะสมภายในพืช สารจะสลายตัวอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง และจะค่อย ๆ ปลดปล่อยออกทางรากพืชสู่ดินโดยจุลินทรีย์ในดินจะเป็นผู้ย่อยสลายสาร มีค่า half-life ในดิน 25–14 วัน ในรูปสารละลายในน้ำจะเกิดการเสื่อมสลายด้วยแสง (photodegradation) ด้วยปฏิกิริยา photohydrolysis มีค่า half-life 2 วัน มีความเป็นพิษต่อ นก ปลา แมลง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำ (Tu *et al*., 2001)



ภาพที่ 2 ตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาของสารอิมาซาเพอร์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธสภายในพืช

ที่มา: Anonymous (2007)

การคัดเลือกพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช

ก. การคัดเลือกแบบปกติ

วิธีการคัดเลือกพืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชโดยวิธีการคัดเลือกในระดับที่เป็นพืชทั้งต้น เป็นการคัดเลือกในสภาพแปลงปลูก (field selection) หรือเรือนทดลอง โดยการคัดเลือกต้นพืชที่ไม่ถูกทำลาย หรือถูกทำลายบางส่วนหลังจากที่ได้รับสารกำจัดวัชพืช ซึ่งต้นพืชดังกล่าวจะเป็นต้นที่ต้านทานหรือทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น ๆ และการผสมพันธุ์พืชแบบเดิม (classical breeding) เป็นการนำพืชที่มีลักษณะต้านทาน หรือทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชมาผสมกับพันธุ์ปลูกที่ต้องการเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีความต้านทาน หรือทนทานต่อสารชนิดนั้น ๆ (ศรีสม, 2541) สำหรับการคัดเลือกพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช โดยอาศัยการคัดเลือกในสภาพแปลงทดลองและเรือนทดลองสามารถทำการคัดเลือกพืชได้ในระดับที่เป็นพืชทั้งต้น โดยการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชลงไปบนพืชที่ปลูกในช่วงระยะที่พืชนั้นมีการตอบสนองต่อสารสูงสุด มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายพืชของสารนั้น เป็นการศึกษาลักษณะและกระบวนการทางสรีรวิทยา โดยพืชที่ได้จากการคัดเลือกจะสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในแปลงปลูกได้ดี แต่การคัดเลือกในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นนี้มีข้อจำกัดหลายประการ กล่าวคือ ใช้ระยะเวลาในการคัดเลือกนาน ตลอดจนไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมที่มีผลเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชได้หรือการควบคุมได้ค่อนข้างลำบาก ไม่ว่าจะเป็น แร่ธาตุอาหาร ความชื้น อุณหภูมิ แสง และปัจจัยอื่น ๆ มักเกิดปัญหาเรื่องความเสียหายในเรื่องโรคและแมลงที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ ตลอดจนมีประสิทธิภาพในการควบคุมอัตราความเข้มข้นของสารที่ใช้ได้ไม่ทั่วถึงและสม่ำเสมอ

โดยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกพืชปลูกชนิดต่าง ๆ ที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชหลายชนิดในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นทั้งในสภาพเรือนทดลองและแปลงทดลองโดย Pornprom and Pyon (1997) ได้ทำการคัดเลือกพริกจำนาน 42 พันธุ์ที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ได้แก่ สารอิมาเซทธาเพอร์ และไพรมิซัลฟูรอน พบว่า พันธุ์ Red Top, Happy Dry, Golden Tower และ Hagyeorae จัดอยู่ในกลุ่มที่มีแนวโน้มว่ามีความทนทานต่อสารอิมาเซทธาเพอร์ ในอัตรา 0.20 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ส่วนพันธุ์ Korea, Cheongyang, Oriental Glory และ Hanam จัดอยู่ในกลุ่มที่อ่อนแอต่อสารอิมาเซทธาเพอร์ ในอัตรา 0.075 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ และพันธุ์ Red Horn, Jopoong, Kwangbok และ Wangcho จัดอยู่ในกลุ่มที่มีแนวโน้มว่ามีความทนทานต่อสารไพรมิซัลฟูรอนในอัตรา 0.16 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ส่วนพันธุ์ Korea, Dahhong, Chamjoah และ Poongchon จัดอยู่ในกลุ่มที่อ่อนแอต่อสารไพรมิซัลฟู

รอนในอัตรา 0.07 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ต่อมา Pornprom *et al.* (2000) ได้ทำการคัดเลือกถั่วเหลืองจำนวน 16 พันธุ์ ทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทในสภาพแปลงทดลอง พบว่า พันธุ์ สจ 4 สามารถทนทานต่อสารได้ที่อัตรา 0.5 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ และมีระดับความทนทานแตกต่างกันไป 2-3 เท่า ในพันธุ์ที่อ่อนแอ คือ พันธุ์ GC 87016 มีความอ่อนแอต่อสารเมื่อได้รับสารเพียง 0.20 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ต่อมา Pornprom *et al.* (2003) ได้รายงานเกี่ยวกับการคัดเลือกข้าวโพดทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทในสภาพแปลงทดลอง ตลอดจนทำการศึกษากลไกทางชีวเคมีของความทนทานสาร โดยพิจารณาจากการลดลงของปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นหลังจากที่พืชได้รับสาร พบว่า ข้าวโพดพันธุ์ Pacific 626 และ Pacific 983 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทมีการสะสมปริมาณแอมโมเนียน้อยกว่าในพันธุ์อ่อนแอถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา กัญญาวัฒน์ (2546) ได้ทำการคัดเลือกพันธุ์อ้อยจำนวน 15 พันธุ์ ที่ทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทในสภาพแปลงทดลอง โดยพิจารณาจากความเป็นพิษของสารที่มีต่อพืช พบว่า อ้อยพันธุ์ KPS 96-8-5, U-thong 3 และ KPS 96-16-07 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีแนวโน้มว่ามีความทนทานต่อสารที่อัตรา 1.0 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ นอกจากนี้ มัตติกา (2550) ได้ทำการคัดเลือกอ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ทนทานต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นในสภาพไร่ทดลอง พบว่า อ้อยพันธุ์ K 95-282, K 88-92, K 97-32, K 99-55, K 95-87 และ K 93-219 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีแนวโน้มว่ามีความทนทานต่อสารอิมาซาเพอร์ในอัตรา 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ส่วนพันธุ์ K 99-5, K 99-72, K 99-85, K 97-33 และ K 97-27 จัดอยู่ในกลุ่มที่อ่อนแอต่อสารในอัตรา 0.156 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์

ในการศึกษาพืชทนทานหรือต้านทานสารกำจัดวัชพืชโดยการใช้วิธีการคัดเลือกแบบปกติจะเห็นได้ว่า มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช เนื่องจากทำให้สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ โดยสังเกตได้จากการตอบสนองของพืชที่มีต่อสารกำจัดวัชพืช ซึ่งทำการประเมินได้จากลักษณะภายนอกที่ปรากฏออกมา แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดหลายประการ กล่าวคือต้องใช้พื้นที่ขนาดใหญ่ในการปลูกเพื่อการคัดเลือกและได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมสูง ซึ่งยากต่อการคัดเลือกพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรมตามจริง ใช้แรงงานจำนวนมากในการปฏิบัติงาน และระยะเวลาที่ใช้ในการคัดเลือกนาน ตลอดจนไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมที่มีผลเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชหรือการควบคุมได้ค่อนข้างลำบาก ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของแร่ธาตุอาหาร ความชื้น อุณหภูมิ แสง และปัจจัยอื่น ๆ มักเกิดปัญหาความเสียหายในด้านโรคและแมลงที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช ตลอดจนมีประสิทธิภาพในการควบคุมอัตราและความเข้มข้นของสารที่ใช้ได้ไม่ทั่วถึง ดังนั้นควรทำการคัดเลือกในระดับเซลล์ต่อไปด้วย เพื่อให้ผลการทดลองมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้นต่อไป

ข. การคัดเลือกโดยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืช

การปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืช เป็นต้น วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อสภาวะวิกฤตต่าง ๆ เช่น คัดเลือกพืชทนแล้ง พืชทนดินเค็ม และคัดเลือกพืชต้านทานโรคและแมลง นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช การนำเทคนิคทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้จะช่วยให้การคัดเลือกพืชให้มีลักษณะตามที่ต้องการได้ภายในระยะเวลาอันสั้น โดยการนำสารกำจัดวัชพืชมาผสมลงในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงชิ้นส่วนพืช จะทำให้เซลล์พืชที่อ่อนแอต่อสารไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้และตายในที่สุด จากนั้นนำเซลล์ของพันธุ์ต้านทานที่เหลือรอดมาเพาะเลี้ยงจนเจริญเติบโตต่อไป ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่าย สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้อย่างสม่ำเสมอ อีกทั้งยังเป็นการลดปัญหาในเรื่องผลกระทบจากโรคและแมลง เนื่องจากอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ สามารถควบคุมความแน่นอนของอัตราสารที่ใช้ในแต่ละพันธุ์ได้ และช่วยขจัดปัญหาในเรื่องการเคลื่อนย้ายของสาร ซึ่งอาจจะมีผลไปรบกวนการดูดซึมและเคลื่อนย้ายของสารไปยังตำแหน่งเป้าหมายที่สารจะเข้าไปยับยั้งในกระบวนการต่าง ๆ ภายในพืช

โดยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการนำเทคนิคทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ โดยที่ Pornprom *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาความต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทในเซลล์ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ4 พบว่า เซลล์ถั่วเหลืองพันธุ์ดังกล่าวสามารถต้านทานต่อสารที่ความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ และมีเซลล์เป็น diploid เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแอมโมเนียที่สะสมภายในเซลล์ที่อ่อนแอต่อสารกลูโฟซิเนท พบว่า มีปริมาณการสะสมของแอมโมเนียมากกว่าเป็น 15 เท่าของเซลล์ต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนท ต่อมา Bae *et al.* (2002) ได้ทำการคัดเลือกเซลล์แขวนลอยของข้าว (*Oryza sativa* L. cv. Ilpumbyeo) ให้ต้านทานต่อสาร cyhalofop-butyl ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถต้านทานได้ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อได้รับสารต่อเนื่องเป็นเวลานาน 6 เดือน ต่อมา กัญญาวัฒน์ (2546) ได้ทำการคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารกลูโฟซิเนท พบว่า เซลล์อ้อยพันธุ์ KPS 96-8-5 สามารถต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทได้ ในระดับความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ โดยมีระดับความของต้านทานสารเป็น 4,750 เท่าของเซลล์อ้อยปกติพันธุ์เดียวกัน ต่อมา Zambrano *et al.* (2003) ได้ทำการคัดเลือกอ้อยพันธุ์ V71-51 ต้านทานต่อสารไกลโฟเสทในสภาพเซลล์แขวนลอยได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร พบว่า เซลล์แขวนลอยของอ้อยสามารถต้านทานต่อสารได้มากถึง 170 เท่าของอ้อยพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร นอกจากนี้ มัตติกา(2550) ได้ทำการคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทาน

สารอิมาซาเพอร์ในระดับเซลล์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่า เซลล์ของอ้อยพันธุ์ K 97-32 สามารถชักนำให้เกิดเป็นเซลล์ที่ต้านทานต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ได้ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยมีระดับของความต้านทานสารเป็น 1,000 เท่าของเซลล์อ้อยปกติพันธุ์เดียวกัน

ในการศึกษาพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชโดยการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มาใช้ในการศึกษาวิจัยทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช จะเห็นได้ว่าสามารถนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชนิดของสารที่มีผลกระทบต่อพืชในด้านต่าง ๆ ทั้งในแง่ของสรีรวิทยา ชีวเคมี รวมทั้งพันธุกรรมและชีวโมเลกุล เพื่อการคัดเลือกสารกำจัดวัชพืชชนิดใหม่ การตรวจสอบประสิทธิภาพ กลไกการดูดซึม พิจารณากลไกภายในพืชที่ต้านทานต่อสาร การคัดเลือกพืชต้านทานต่อสาร และการพัฒนาพืชสายพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานต่อสารชนิดต่าง ๆ อีกทั้งยังช่วยประหยัด พื้นที่ เวลา และแรงงานที่นำมาใช้ในการคัดเลือก แต่การใช้เทคนิคทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้คัดเลือกพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น จะมีข้อจำกัดในการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ โดยที่พืชจะมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซมเกิด ขึ้นเรื่อย ๆ เกิดเป็น somaclonal variation ที่เกิดมาจากปัจจัยต่าง ๆ ทำให้ผลการคัดเลือกคลาดเคลื่อนและไม่สามารถนำไปใช้คัดเลือกได้กับพืชทุกชนิด (ทศพล, 2541) ดังนั้น เพื่อความแม่นยำในการคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชจึงควรมีการคัดเลือกในระดับแปลงทดลองควบคู่กันไป

กลไกทางชีวเคมีของความทนทาน/ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส

กลไกของความทนทาน/ต้านทานสารกำจัดวัชพืชขึ้นอยู่กับกระบวนการตอบสนองของแต่ละพืชต่อสารกำจัดวัชพืช ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืชในแง่ของความแตกต่างในด้านการดูดซึมของสาร (absorption หรือ uptake) การเคลื่อนย้ายของสาร (translocation) ไปยังตำแหน่งเป้า หมายที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา และกระบวนการสลายความเป็นพิษของสาร (detoxification) ภายในต้นพืชหรือกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยทั่วไปแล้วพืชที่มีการดูดซึมสารและมีการเคลื่อนย้ายของสารได้ในปริมาณที่น้อยจะทำให้พืชถูกทำลายได้น้อย กระบวนการทางชีวเคมีภายในพืช ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์เป้าหมาย และการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของพืช

การตอบสนองของพืชต่อสารกำจัดวัชพืช สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ลักษณะ กล่าวคือ ความทนทาน ความต้านทาน และความอ่อนแอต่อสาร ซึ่งในปี ค.ศ. 1998 ทางสมาคมวัชพืชแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (WWSA) ได้ให้คำจำกัดความของลักษณะดังกล่าว ดังนี้

ความทนทานสารกำจัดวัชพืชในพืชปลูก (herbicide tolerant crops) เป็นความสามารถของชนิดพืช (species) ในสภาพธรรมชาติที่มีชีวิตอยู่รอดและขยายพันธุ์ต่อไปได้ ภายหลังที่ได้รับสารกำจัดวัชพืช ซึ่งแสดงว่าพืชทนทานไม่ได้เกิดจากการคัดเลือกหรือวิธีการทางพันธุกรรม ที่ทำให้พืชเกิดความทนทาน แต่เกิดจากความทนทานที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ (Annonymous, 1998)

ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในพืชปลูก (herbicide resistant crops) เป็นความสามารถในการถ่ายทอดความมีชีวิตอยู่และขยายพันธุ์พืชได้อย่างปกติ ภายหลังจากที่ได้รับสารกำจัดวัชพืชในอัตราที่ทำให้พันธุ์ป่า (wild type) ตาย พืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชอาจจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือสร้างขึ้นโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) หรือการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenesis) โดยการใช้เทคนิคของวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Annonymous, 1998)

ความอ่อนแอ (susceptibility) เป็นลักษณะของพืชที่มีการตอบสนองต่อสารกำจัดวัชพืชอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจวัดได้จากการเจริญเติบโตหรือผลผลิต แม้ในอัตราต่ำกว่าปกติ (Holt and LeBaron, 1990)

กลไกทางชีวเคมีของความทนทาน/ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาในพืชปลูกหลายชนิด ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส โดยที่ Wright and Penner (1998) ได้ศึกษากลไกทางชีวเคมีของความต้านทานข้ามไปยังสารกำจัดวัชพืช 4 กลุ่ม ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส ประกอบด้วยสารในกลุ่ม Imidazolinones, Sulfonylureas, Triazlopyrimidine และ Pyrimidinyl thiobenzoates ของข้าวโพดที่ต้านทานสารในกลุ่ม Imidazolinones ได้แก่ พันธุ์ ICI 8692 IT, Pioneer 3751 IR และ Ciba 4393 IMR โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในพันธุ์ข้าวโพดที่ต้านทานต่อสารในกลุ่ม Imidazolinones เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม isogenic ที่อ่อนแอต่อสารในกลุ่ม Imidazolinones ได้แก่ พันธุ์ ICI 8692, Pioneer 3751 และ Ciba 4393 พบว่าพันธุ์ Pioneer 3751 IR และ Ciba 4393 IMR มีความต้านทานข้ามไปยังสารทั้ง 4 กลุ่มได้ และมีระดับความต้านทานสารเป็น 48–5,000 เท่า ส่วนพันธุ์ ICI 8692 IT มีความต้านทาน 4-8 เท่า ต่อสารในกลุ่ม Imidazolinones และ Pyrimidinyl thiobenzoates เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อ่อนแอแต่ไม่มีความต้านทานไปยังสารกลุ่ม Sulfonylureas และ Triazlopyrimidine sulfonamides ขณะเดียวกัน Wright *et al.* (1998) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในซูการ์บีทพันธุ์ Sir 13 93r30B และ Sur ซึ่งได้มาจากการคัดเลือกในระดับเซลล์ให้ต้านทานต่อสารกลุ่ม Imidazolinones พบว่า การทำงานที่จำเพาะของเอนไซม์ในพันธุ์ต้านทานดังกล่าวอยู่ในช่วง 73-93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ป่าของแต่ละพันธุ์ ซึ่ง

แสดงให้เห็นว่า การตอบสนองของเอนไซม์ที่มากกว่าปกติ (over expression) ไม่ใช่ปัจจัยที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อสารอิมาเซทธาเพอร์ ฟลูเมทซูแลม และคลอซัลฟูรอน ต่อมา Pomprom and Pyon (1999) ได้ศึกษาการตอบสนองของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธสในพันธุ์พริกทนทานต่อสารไพรมิซัลฟูรอน ได้แก่ พันธุ์ Red Horn และ Kwangbok เปรียบเทียบกับพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ พันธุ์ Chamjoah และ Poongchon พบว่า พันธุ์ทนทานทั้งสองพันธุ์มีอัตราส่วนความทนทานของเอนไซม์ ALS เป็น 10-15 เท่า และมีการตอบสนองของเอนไซม์ต่อสารไพรมิซัลฟูรอน เป็นแบบตอบสนองน้อย (less sensitive) ต่อสารกำจัดวัชพืช

ต่อมา Taregyan *et al.* (2001) ทำการคัดเลือกเซลล์ถั่วเหลืองพันธุ์ Dak, Izm, Ard และ Wil โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมสารอิมาเซทธาเพอร์ 2 มิลลิกรัมสารออกฤทธิ์ต่อลิตร ทำการคัดเลือกเซลล์ที่ต้านทานสารแล้วชักนำให้เกิดเป็นต้น จากนั้นทำการปลูกแล้วผสมตัวเอง จนได้เมล็ดรุ่นที่ 1 ทำการปลูกแล้วนำชิ้นส่วนใบอ่อนของต้นที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ชักนำให้เกิดแคลลัสและเซลล์แขวนลอยในอาหารสูตรเดียวกัน ชักนำให้เกิดเป็นต้นเพื่อให้ได้เมล็ดในรุ่นที่ 2 ทำการปลูกและชักนำให้เกิดแคลลัสอีกครั้ง แล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ALS พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ ต่อมา Gaston *et al.* (2002) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ภายในต้นพืช (*in vivo*) โดยทำการปลูกถั่วพี (*Pissum sativum* cv. Sugar Snap) ในสารละลายธาตุอาหารเมื่อถั่วพีมีอายุ 12 วัน ทำการเติมสารอิมาเซทธาเพอร์ในอัตรา 20 มิลลิกรัมสารออกฤทธิ์ต่อลิตร จากนั้นพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ 0 3 5 และ 7 วันหลังจากได้รับสาร พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้ง 45 เปอร์เซ็นต์ หลังจากได้รับสารเพียง 1 วัน และถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ 3 วัน ต่อมา Avila *et al.* (2005) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในข้าวแดง (*Oryza* spp.) จำนวน 3 อีโคไทป์ คือ LA 5, MS 5 และ TX เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ CL-121 ที่ทนทาน พันธุ์ CL-161 ที่ต้านทานต่อสารอิมาเซทธาเพอร์ ตามลำดับ และพันธุ์ Cypress พบว่า พันธุ์ CL-161 มีความต้านทาน 32 และ 420 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ CL-121 และค่าเฉลี่ยของค่า I_{50} ของพันธุ์ Cypress และข้าวแดงทั้งสามอีโคไทป์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า พันธุ์ CL-161 มีค่า I_{50} ที่สูงมาก แต่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในระดับปานกลาง แสดงให้เห็นว่า ความต้านทานต่อสารอิมาเซทธาเพอร์น่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ ALS มากกว่าที่จะเกิดจากการตอบสนองของเอนไซม์ที่เป็นแบบมากกว่าปกติ (over expression) ต่อมา Pornprom *et al.* (2005) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลการยับยั้งของสาร bensulfuron-methyl และกิจกรรมเอนไซม์ ALS ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าและเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลือง (*Glycine max* L. cv. Enrei) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้น และกิจกรรมเอนไซม์ ALS ถูกยับยั้งในระดับเซลล์มากกว่าในระดับที่เป็นพืชทั้งต้น นอกจากนี้

มัตติกา (2550) ได้ทำการพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ พบว่าเซลล์อ้อยพันธุ์ K 97-32 ที่ต้านทานสารมีปริมาณของเอนไซม์มากกว่าเซลล์ของอ้อยปกติพันธุ์เดียวกันถึง 11 เท่า ที่ 5 วันภายหลังจากทำการย้ายเซลล์ โดยมีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็นแบบตอบสนองน้อย (less sensitive) ต่อสารอิมาซาเพอร์

โดยทั่วไปการพิจารณากลไกของความต้านทานสารในกลุ่มสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส จะเกี่ยวข้องกับพื้นฐานของตำแหน่งเป้าหมาย (target site-based) และไม่ใช่ตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสารกำจัดวัชพืช (non-target site-based) (Corbett and Tardif, 2006) ซึ่งกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกี่ยวกับ target site-based นั้น จะเป็นการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสารกำจัดวัชพืช โดยที่อาจจะมีการสร้างตำแหน่งเป้าหมายที่มากกว่าปกติ (overproduction of the target site) หรือมีการตอบสนองของเอนไซม์เป้าหมายเป็นแบบตอบสนองน้อย (less sensitive) ต่อสารกำจัดวัชพืช ส่วน non-target site-based นั้นจะเกี่ยวข้องกับการดูดซึม (absorption หรือ uptake) การเคลื่อนย้าย (translocation) ของสารกำจัดวัชพืชไปยังตำแหน่งเป้าหมายที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา และกระบวนการสลายความเป็นพิษ (detoxification) ของสารกำจัดวัชพืช หรือกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในต้นพืช เพื่อที่จะทำให้สารกำจัดวัชพืชเข้าไปสู่บริเวณตำแหน่งเป้าหมายที่สารจะแสดงปฏิกิริยาในการทำลายภายในเซลล์พืชได้น้อยลง เป็นต้น การศึกษาในครั้งนี้ทำการพิจารณาเฉพาะในส่วนของ target site-based เท่านั้น โดยจะเกี่ยวข้องกับความต้านทานสารในกลุ่มสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ซึ่งใช้เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการอธิบายกลไกของความต้านทานสารที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์เป้าหมายที่สารเข้าไปยับยั้งในกระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในพืช สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาพันธุ์อ้อยให้มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์อ้อย

พันธุ์ K 95-282 ซึ่งเป็นพันธุ์อ้อยของศูนย์ส่งเสริมเกษตรและอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม

2. สารกำจัดวัชพืช

สารอิมาซาเพอร์ ในรูปของ technical grade มีความบริสุทธิ์ 98.8 เปอร์เซ็นต์

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์

3.1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ตารางผนวกที่ 1) วิตามิน ฮอร์โมน สารปรับความเป็น กรด–ด่าง ผงวุ้น และสารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ เป็นต้น

3.2. เครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ เครื่องชั่งสาร ตู้อบไมโครเวฟ เครื่องวัดค่าความเป็น กรด–ด่าง หม้อนึ่งความดันไอ ตู้ปลอดเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เครื่องเขย่า เครื่องควบคุมอุณหภูมิ ไมโครปิเปตต์ชนิดที่ปรับปริมาตรได้ มีดผ่าตัด ปากคีบ และตะเกียงแอลกอฮอล์ เป็นต้น

3.3. อุปกรณ์เครื่องแก้วและพลาสติก ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ขนาดปริมาตร 125 มิลลิลิตร ขวดวัดปริมาตร บีกเกอร์ หลอดวัดปริมาตรเซลล์ (Packed Cell Volume; PCV) จานแก้ว ลอดไซริงจ์ และปิเปตต์ เป็นต้น

3.4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ได้แก่ ชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เครื่องเขย่า และเครื่องควบคุมอุณหภูมิ เป็นต้น

4. อุปกรณ์และสารเคมีในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส

4.1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ได้แก่ เครื่องบ่มเพาะเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิ (incubator) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เครื่องปั่นเหวี่ยง คอลัมน์ (Sephadex™ G-25; PD-10) (บริษัท Amersham Bioscience) และไมโครปิเปตต์ เป็นต้น

4.2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS โดยปรับปรุงวิธีของ Osuna *et al.* (2003) (รายละเอียดดูในการทดลองที่ 2)

วิธีการ

1. ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น นำอ้อยสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มทนทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ได้จากการคัดเลือกในสภาพไร่ทดลอง คือ สายพันธุ์ K95-282 (มัตติกา, 2550) มาทำการคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

1.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสและเซลล์แขวนลอย

นำชิ้นส่วนบริเวณยอดใบม้วนอ่อนของอ้อย อายุ 3 เดือน (Srinivasan and Vasil, 1986; Chen *et al.*, 1988) มาลอกเอากาบใบชั้นนอกออก ฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 15 เปอร์เซ็นต์ เติมสารจับใบ tween 20 จำนวน 1-2 หยด นำไปวางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นลอกกาบใบอ่อนออกอีก 1-2 ชั้น จนเหลือเพียงใบอ่อนชั้นในสุด ตัดออกเป็นชิ้น ๆ ให้มีขนาดความยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แล้ววางบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Shoog, 1962) ประกอบด้วย 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร myo-inositol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และ phytagel 2 กรัมต่อลิตร (pH 5.7) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที (พจมาน และคณะ, 2543; Chen *et al.*, 1988; Aftab *et al.*, 1996) เพาะเลี้ยงในสภาพที่ไม่มีแสง อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 30 วัน ทุกครั้งที่เปลี่ยนอาหารตัดเอาเฉพาะกลุ่มของแคลลัสนำไปวางบนอาหารใหม่ จากนั้นนำแคลลัสมาประมาณ 0.50 กรัมน้ำหนักสด ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัส (ไม่เติมผงวุ้น) ในปริมาตร 45 มิลลิลิตรต่อขวดรูปชมพู่ขนาดปริมาตร 125 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน (กัญญาวัฒน์, 2546) เพื่อชักนำให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอย

1.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อย

วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A คือ ระยะเวลาที่ทำการวัดปริมาตรเซลล์ จำนวน 6 ระยะ คือ ที่ 0 5 7 10 14 และ 21 วัน

ปัจจัย B คือ ปริมาณเซลล์เริ่มต้นมี 3 ปริมาณ คือ 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร

ทำการย้ายเซลล์แขวนลอยที่ได้จากขั้นตอนที่ 1.1 ในปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์ MS สูตรดัดแปลง (สูตรเดียวกับที่ใช้ในการชักนำให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอย) ในอาหารเหลว 45 มิลลิลิตรต่อขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

การบันทึกผลการทดลอง มีดังนี้

การวัดปริมาณเซลล์ด้วยวิธี packed cell volume (PCV) (Pornprom *et al.*, 2000) ที่ระยะเวลา 0 5 7 10 14 และ 21 วันหลังจากย้ายเซลล์ลงในอาหารใหม่ นำข้อมูลไปวิเคราะห์ความแปรปรวน จากนั้นนำค่าเฉลี่ย 3 ค่ามาสร้างเป็นกราฟการเจริญเติบโต (sigmoid curve) เพื่อหาระยะเวลาที่เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงเข้าสู่ช่วง stationary และ decreasing stage แล้วจึงย้ายเซลล์ลงในอาหารเหลวใหม่ในรอบต่อไป

1.3 การตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A คือ ระยะเวลาที่ทำการวัดปริมาตรเซลล์ จำนวน 5 ระยะ คือ ที่ 0 5 7 10 และ 14 วัน

ปัจจัย B คือ ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ 6 ระดับ คือ 0 0.0001 0.001 0.01 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์

พิจารณาจากความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับสาร โดยใช้ PCV ในปริมาตรที่ได้จากการทดลองที่ 1.2 เติมสารอิมาซาเพอร์เพื่อให้มีระดับความเข้มข้นของสารเป็น 0.0001 0.001 0.01 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์ วางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

การบันทึกผลการทดลอง มีดังนี้

ทำการวัดปริมาณของเซลล์ ด้วยวิธี PCV เช่นเดียวกับการทดลองในขั้นตอนที่ 1.2 หลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0.0001 0.001 0.01 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์ ที่ 5 7 10 และ 14 วันหลังจากได้รับสาร ตามลำดับ จากนั้นนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติตามแผนการทดลองแบบ factorial in CRD เมื่อพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS) แล้วนำค่าเฉลี่ยมาสร้างเป็นกราฟการตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ต่อไป

1.4 การคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์

ใช้เซลล์เริ่มต้นที่ได้ตามผลการทดลองที่ 1.2 ต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร ด้วยวิธีเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารเป็นลำดับ (stepwise selection) จากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อย 50 เปอร์เซ็นต์ ตามผลการทดลองที่ 1.3 จนกระทั่งมีอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับสาร จากนั้นจึงย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่เพิ่มความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ในระดับที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ จนได้เซลล์ที่มีความต้านทานต่อสาร แล้วจึงนำเซลล์อ้อยที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนนี้ไปศึกษาลักษณะกลไกทางชีวเคมีของเซลล์อ้อยที่สามารถต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ในขั้นตอนต่อไป

การบันทึกผลการทดลอง มีดังนี้

ทำการวัดปริมาณของเซลล์เริ่มต้นก่อนที่จะย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารใหม่ โดยใช้ปริมาตรเซลล์เริ่มต้นตามผลการทดลองที่ 1.2 จากนั้นวัดปริมาตรเซลล์อีกครั้งเมื่อครบรอบ ที่ 14 วัน (1 รอบการเจริญเติบโต) โดยใช้ PCV จดบันทึกระยะเวลาที่ทำการชักนำให้เซลล์ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์

1.5 การตอบสนองของเซลล์อ้อยต้านทานสารที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A คือ ระยะเวลาที่ทำการวัดปริมาตรเซลล์ จำนวน 5 ระยะ คือ ที่ 0 5 7 10 และ 14 วัน

ปัจจัย B คือ ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ 6 ระดับ คือ 0 0.1 1 10 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์

ใช้ PCV ในปริมาตรที่ได้จากการทดลองที่ 1.2 เติมสารอิมาซาเพอร์ลงในอาหารใหม่ เพื่อให้มีระดับความเข้มข้นของสารเป็น 0 0.1 1.0 10 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ นำไปวางบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

การบันทึกผลการทดลอง มีดังนี้

1. วัดปริมาณของเซลล์ ด้วยวิธี PCV เช่นเดียวกับการทดลองในขั้นตอนที่ 1.2 หลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่างกัน ตั้งแต่ 0 0.1 1.0 10 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่ 5 7 10 14 และ 21 วันหลังจากได้รับสาร ตามลำดับ จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความแปรปรวน แล้วนำค่าเฉลี่ยมาสร้างเป็นกราฟการตอบสนองของเซลล์อ้อยต้านทานสารที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์

2. วัดดัชนีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ ทำการวัดดัชนีความต้านทานของเซลล์อ้อย ที่ 14 วัน โดยเปรียบเทียบเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารหลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ พิจารณาจากค่า resistance index (I_{50} value of resistant cells/ I_{50} value of normal cells) หลังจากนั้น

นำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติตามแผนการทดลองแบบ factorial in CRD เมื่อพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS แล้วนำค่าเฉลี่ยมาสร้างเป็นกราฟการตอบสนองของเซลล์อ้อยต้านทานสารที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ต่อไป

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส ในสายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ซึ่งประยุกต์จากวิธีการของ Osuna *et al.* (2003)

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A คือ รูปแบบของเซลล์อ้อย จำนวน 2 รูปแบบ ได้แก่ เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (normal cells treated with the herbicide; NT) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (resistant cells treated with the herbicide; RT)

ปัจจัย B คือ ระดับความเข้มข้นของสาร 6 ระดับ ได้แก่ ที่ระดับ 0 0.01 0.1 1 10 และ 100 ไมโครโมลาร์

โดยมีขั้นตอนในการศึกษา ดังนี้

2.1 วิธีการสกัดเอนไซม์ ALS

เมื่อเซลล์มีอายุได้ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์ (sub-culture) นำตัวอย่างของเซลล์อ้อย ดังกล่าวในข้างต้น กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นเซลล์มาทำให้แห้ง ตัวอย่างละ 2 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาสกัดด้วย extraction buffer ประกอบด้วย dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 sodium pyruvate เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ magnesium chloride ($MgCl_2$) เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ thiamine pyrophosphate (TPP) เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ flavin adenine dinucleotide (FAD) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ dithiothreitol (DTT) เข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ และ glycerol 10 เปอร์เซ็นต์ (1:9 V/V) 3 มิลลิลิตรต่อปริมาณเซลล์ 1 กรัม แล้วเติม polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) 0.5

กรัม ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยผ้ากรอง 4 ชั้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 27,000x*g* เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นดูดเอาสารละลายใสส่วนบน แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ 50 เปอร์เซ็นต์แช่ในน้ำแข็งนาน 60 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอนของ crude enzyme แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000x*g* เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนทิ้ง แล้วนำตะกอนที่ได้นั้นละลายด้วย extraction buffer ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร แล้วทำการ desalting โดยใช้ Sephadex G-25 คอลัมน์ ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย elution buffer pH 7.5 ประกอบด้วย K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 $MgCl_2$ เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ sodiumpyruvate เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ALS โดยทันทีต่อไป

2.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ALS

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ ALS โดยดูดเอาสารละลายที่ผ่านการ desalting โดยใช้ Sephadex G-25 คอลัมน์ จากขั้นตอนที่ 2.1 ในปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เติม assay buffer ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4) เข้มข้น 0.08 โมลาร์ pH 7.5 sodium pyruvate เข้มข้น 0.15 โมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ และ flavin adenine dinucleotide (FAD) เข้มข้น 160 ไมโครโมลาร์ เติมสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 0 0.01 0.1 1 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ แล้วเติม dibasic potassium phosphate (0.04 โมลาร์ pH 7.0) เพื่อปรับให้มีปริมาตรรวมทั้งหมด 0.25 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส นาน 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย H_2SO_4 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที เพื่อช่วยให้เกิดการ decarboxylate ของ acetolactate เป็น acetoin จากนั้นเติม α-naphthol 0.25 มิลลิลิตร (5 กรัมต่อลิตรที่ทำละลายใน 2.5 โมลาร์ NaOH) และ creatine 0.25 มิลลิลิตร (5 กรัมต่อลิตร) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x *g* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายใสไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร (Westerfeld, 1945)

2.3 การวัดปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้ bovine serum albumin ในปริมาตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดยนำ Coomassie Blue reagent (ประกอบด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 ปริมาตร 100 มิลลิกรัม ละลายใน ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมสาร phosphoric acid 85 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

กลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ แล้วเติมสารละลายโปรตีน 0.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

หลังจากที่ได้ผลการทดลองในการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของเอนไซม์และโปรตีน นำค่าทั้งสองมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ALS (specific activity of ALS) โดยมีหน่วยเป็น นาโนโมล acetoin ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที (nmol acetoin mg^{-1} protein min^{-1}) จากการแทนค่าในสมการเส้นตรง (linear regression) ดังสมการดังต่อไปนี้

$$Y = aX + b$$

เมื่อ Y = ตัวแปรตาม (dependent variable)
a = ค่าสัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปลง (regression coefficient)
X = ตัวแปรอิสระ (independent or fixed variable)
b = ค่าความลาดชันของเส้นตรง (slope)

หลังจากคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ALS แล้วมาคำนวณ ALS activity เปรียบเทียบกับชุดควบคุมเป็นเปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม หลังจากนั้น นำผลการทดลองมาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติตามแผนการทดลองแบบ factorial in CRD เมื่อพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

2. อาคารปฏิบัติการศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองในครั้งนี้เริ่มตั้งแต่ เดือนมีนาคม พ.ศ. 2548 ถึง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2551

ผลและวิจารณ์

1. ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสและเซลล์แขวนลอย

นำชิ้นส่วนบริเวณใบม้วนอ่อนของอ้อยสายพันธุ์ K95-282 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์ MS สูตรดัดแปลง พบว่า อ้อยสายพันธุ์ดังกล่าว มีการตอบสนองโดยการเกิดเป็นแคลลัสบริเวณผิวและรอยตัดหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตมากขึ้นจนกระทั่งอายุได้ 6 สัปดาห์ โดยมีลักษณะการเกิดแคลลัสแบบที่เกาะกันแน่น (compact callus) ลักษณะแห้ง สีเหลืองอ่อน ไม่เป็นเมือก เมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ พบว่า เริ่มมีจุดกำเนิดยอดสีเขียวบนชิ้นส่วนของแคลลัส โดยลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นนั้นส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้ 2,4-D ที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง

2,4-D เป็นสารที่มีผลควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซินที่ใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยทำหน้าที่กระตุ้นการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ และสามารถเร่งการแบ่งตัวของเซลล์ เนื่องจากสารจะไปส่งเสริมการสร้างโปรตีน ซึ่งความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีแนวโน้มที่สูงกว่าที่ใช้ในพืชใบเลี้ยงคู่ (กัญญา วัฒน์, 2546; จำเนียร, 2546) และเมื่อใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้นสูงสามารถกระตุ้นให้เกิดเซลล์อยู่ในสภาวะที่ไม่เสถียรรบกวนการทำงานของเส้นใย spindle fiber ที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ ทำให้เซลล์มีปริมาณเพิ่มเป็นจำนวนมาก แต่จะเป็นเซลล์ที่สูญเสียความสามารถในการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ (รังสฤษดิ์, 2541) นอกจากนี้ได้มีรายงานว่า 2,4-D มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของชุดโครโมโซมในระยะเมตาเฟส ซึ่งการเปลี่ยนโครงสร้างของโครโมโซมเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม (Ziauddin and Kasha, 1990) โดยที่ 2,4-D เป็นสารในกลุ่มออกซินสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะ ใช้ในการเพิ่มจำนวนและรักษาสภาพการเพาะเลี้ยงเป็นแคลลัสไว้ สารดังกล่าวนี้ใช้ได้ผลดีที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 10^{-5}-10^{-7} โมลาร์ ดังนั้นข้อควรระวัง คือ ในกรณีที่ใช้ในระดับความเข้มข้นสูงสารนี้สามารถใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทใบกว้างได้ เพราะฉะนั้น ควรระวังในการนำไปใช้ในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสโดยเพาะในพืชกลุ่มใบเลี้ยงคู่ นอกจากนี้ George (1993) ได้กล่าวว่า การตอบสนองของพืชต่อ 2,4-D มีผลทำให้ลักษณะของแคลลัสแตกต่างกันได้ ซึ่งผลดังกล่าวขึ้นอยู่กับพันธุ์และชนิดของพืชอีกด้วย

เมื่อทำการชักนำแคลลัสของอ้อย ได้ในปริมาณที่มากพอแล้ว นำมาชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยโดยการนำเซลล์เดี่ยว ๆ (single cell) หรือ กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (aggregate cell) มาเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง และนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่านาน 6 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสเกิดการแยกตัวและกระจายออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และหรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กได้โดยเซลล์มีสีเหลือง ปริมาณการเกิดปานกลาง ในการเกิดเซลล์แขวนลอยนั้นจะเกิดจากการแยกตัวและกระจายตัวออกจากกันของแคลลัสเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เมื่อได้รับแรงเหวี่ยงของเครื่องเขย่า ลักษณะของแคลลัสที่เหมาะสมสำหรับการนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอย ควรมีลักษณะเป็น friable callus ที่จะทำให้ได้เซลล์แขวนลอยที่เป็นเซลล์เดี่ยวได้ง่ายและมีการเติบโตอย่างรวดเร็ว (รังสฤษดิ์, 2541) ผลการทดลอง พบว่า เซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ K 95-282 มีลักษณะของการเกิดเซลล์แขวนลอยปริมาณน้อยเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์เนื่องจากแคลลัสมีลักษณะแบบที่เกาะกันแน่น (compact callus) ดังนั้นจึงต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับการชักนำเซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ KPS 96-8-5 ที่มีลักษณะของแคลลัสเป็นแบบผสมระหว่าง compact และ friable callus ทำให้เกิดเซลล์แขวนลอยได้ดี (กัญญาวัฒน์, 2546) ส่วนการชักนำเซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ K 97-32 ที่มีลักษณะแคลลัสเป็นแบบ friable callus จึงมีการเกิดเป็นเซลล์แขวนลอยได้ดีเช่นกัน (มัตติกา, 2550)

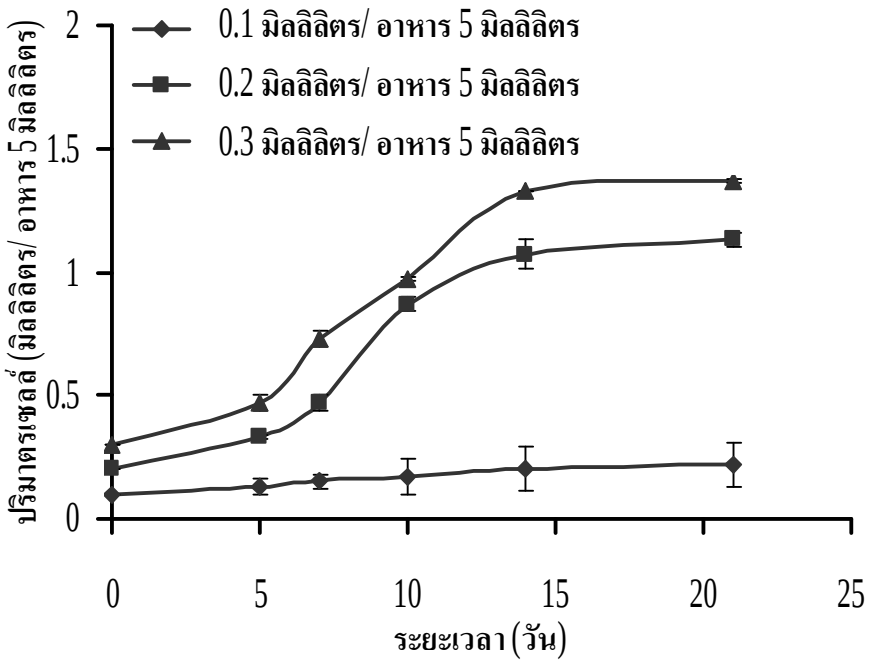
การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชสามารถให้ผลผลิตเป็นสารเคมีในปริมาณมาก โดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในระหว่างการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงเพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่สารที่ได้มักจะเป็นสารประเภท secondary metabolites เช่น polyphenol, alkaloids, steroids และเม็ดสีต่าง ๆ สารบางชนิดเมื่อสร้างขึ้นมาแล้วจะสะสมอยู่ในอาหารที่เพาะเลี้ยง และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเฉพาะสารจำพวก polyphenol ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำการย้ายเนื้อเยื่อหรือเซลล์ลงในอาหารใหม่ (sub-culture) ทันทีที่สังเกตเห็นเนื้อเยื่อมีสีคล้ำขึ้น (Kinnersley and Dou, 1980; จำนียร, 2546) ดังนั้นหลังจากได้เซลล์แขวนลอยในปริมาณที่มากพอแล้ว ในขั้นตอนต่อไปจึงทำการศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในช่วง 1 รอบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของอ้อยในอาหารเหลวสังเคราะห์ โดยพิจารณาระยะเวลาที่ควรทำการย้ายเซลล์ลงในอาหารเหลวที่เตรียมใหม่ในช่วงระยะเวลาใดในการทดลองต่อไป

1.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อย

หลังจากชักนำได้เซลล์แขวนลอยของอ้อยในปริมาณที่มากพอแล้ว นำไปทำการคัดเลือกเซลล์ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์โดยพิจารณาปริมาตรของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K 95-282 พบว่า การใช้ปริมาตรเซลล์เริ่มต้น 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร ที่ 21 วัน เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 0.21 1.13 และ 1.37 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร (ภาพที่ 3 และ ตารางผนวกที่ 2)

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 เมื่อมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นต่างกัน (ตารางผนวกที่ 3) พบว่า ระยะเวลาที่ทำการวัดปริมาตรเซลล์ในแต่ละวัน และปริมาตรเซลล์เริ่มต้นแต่ละปริมาตร มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และมีปฏิกิริยาสัมพันธ์กันระหว่างปัจจัยทั้งสอง กล่าวคือ การใช้ปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่ต่างกันจะทำให้เซลล์มีรูปแบบการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน

จากภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่า การใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร ของเซลล์อ้อย จะทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด และมีการเจริญเติบโตคงที่และมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นแบบคงที่หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Aftab *et al.* (1996) ที่ทำการศึกษาเซลล์แขวนลอยของอ้อย พบว่า การใช้เซลล์แขวนลอยของอ้อยเริ่มต้นปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่ออาหาร 25 มิลลิลิตร เซลล์แขวนลอยอ้อยสามารถเจริญเติบโตดีที่สุด เช่นเดียวกับ กัญญาวัฒน์ (2546) ศึกษาปริมาณของเซลล์เริ่มต้นของเซลล์และระยะเวลาที่เหมาะสมของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ KPS 96-8-5 พบว่าการใช้เซลล์แขวนลอยเริ่มต้นที่ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร ทำให้มีช่วงการเจริญเติบโตเป็นแบบ sigmoid curve และที่ระยะเวลา 14 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มีปริมาตรคงที่ จึงทำการย้ายเซลล์ลงในอาหารใหม่ที่ 14 วัน ซึ่งจะเรียกระยะเวลาดังกล่าวนี้เป็นช่วง 1 รอบในการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อย ส่วน มัตติกา (2550) ศึกษาปริมาตรเซลล์เริ่มต้นของอ้อยพันธุ์ K 97-32 ที่ใช้ในการคัดเลือกอ้อยพันธุ์ดังกล่าวนี้ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ พบว่า การใช้ปริมาตรเซลล์แขวนลอยในปริมาตรเริ่มต้นที่ 3 มิลลิลิตรต่อปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์ของอ้อยมีการเจริญเติบโตดีที่สุด เช่นกัน ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปของการคัดเลือกเซลล์ต้านทานสาร จึงใช้เซลล์เริ่มต้นในปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร แล้วทำการย้ายเซลล์แขวนลอยของอ้อยเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน ซึ่งเรียกว่า เป็น 1 รอบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยแล้ว จึงทำการคัดเลือกให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ต่อไป



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 ในช่วง 0 5 7 10 14 และ 21 วัน

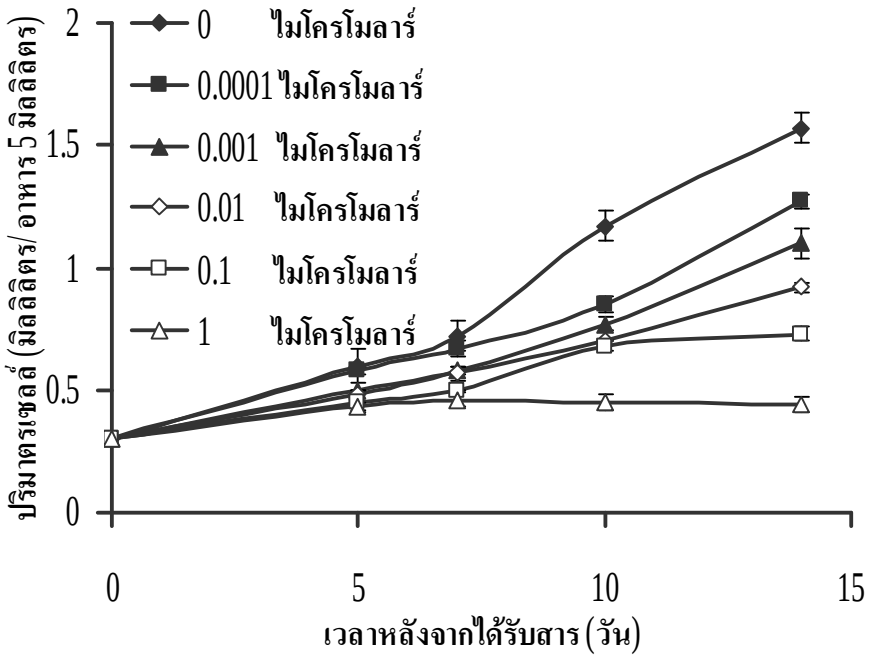
หมายเหตุ Vertical bars แสดงค่า $\pm$ SE ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

1.3 การตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์

การตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากที่ทราบปริมาตรของเซลล์เริ่มต้นและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K 95-282 แล้ว จึงทำการคัดเลือกเซลล์อ้อยพันธุ์ดังกล่าวให้มีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ จากภาพที่ 4 จะเห็นได้ว่า การตอบสนองต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0 0.0001 0.001 0.01 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยแตกต่างกัน พบว่า ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารจะมีปริมาตรเซลล์เป็น 1.50 1.27 1.10 0.92 0.73 และ 0.44 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นของสารที่ 0 0.0001 0.001 0.01 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 4)

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 ในระยะเวลาต่างกัน หลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางผนวกที่ 5) พบว่า ระยะเวลาที่ทำการวัดปริมาตรเซลล์ในแต่ละวัน และระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ในแต่ละระดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และมีปฏิกิริยาสัมพันธ์กันระหว่างปัจจัยทั้งสอง กล่าวคือ ในแต่ละความเข้มข้นของการใช้สารกำจัดวัชพืชมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยที่แตกต่างกัน

เซลล์อ้อยปกติ (ภาพที่ 10ก) จะมีปริมาตรเซลล์และการเจริญเติบโตลดลงตามระดับความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้น และที่ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ 0.1 ไมโครโมลาร์ มีผลทำให้เซลล์อ้อยมีการเจริญเติบโตลดลง 52.91 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสารที่ 14 วันหลังจากได้รับสาร เช่นเดียวกับ การตอบสนองของเซลล์อ้อยพันธุ์ KPS 96-8-5 ต่อสารกลูโฟซิเนท โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้น โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นของสารกลูโฟซิเนทที่ 10^{-5} โมลาร์ เซลล์แขวนลอยของอ้อยจะไม่มีการเจริญเติบโตเลย และที่ระดับความเข้มข้นของสารกลูโฟซิเนทที่ 10^{-8} โมลาร์ จะทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงเหลือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อ้อยปกติ ที่ระยะเวลา 14 วันหลังจากได้รับสาร (กัญญาวัฒน์, 2546) นอกจากนี้ มัตติกา (2550) ศึกษาการตอบสนองของเซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ K 97-32 ต่อสารอิมาซาเพอร์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ 0.01 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่งของเซลล์อ้อยปกติพันธุ์เดียวกัน ที่ระยะเวลา 14 วันหลังจากได้รับสาร



ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 เมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

หมายเหตุ Vertical bars แสดงค่า $\pm$ SE ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

ในการคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์จะเริ่มทำการคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่มีผลกระทบต่อเซลล์อ้อยปกติโดยทำให้เซลล์มีการเติบโตลดลงเหลือครึ่งหนึ่งของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์เดียวกัน ดังนั้นในการคัดเลือกเซลล์ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำโดยใช้เทคนิคการค่อย ๆ เพิ่มระดับความเข้มข้นของสารทีละน้อยลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์ จากระดับความเข้มข้นของสารที่ต่ำแล้วจึงค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของสารในระดับที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้เซลล์สามารถปรับตัวและอยู่รอดได้เหมือนเซลล์ปกติ (ทศพล, 2541)

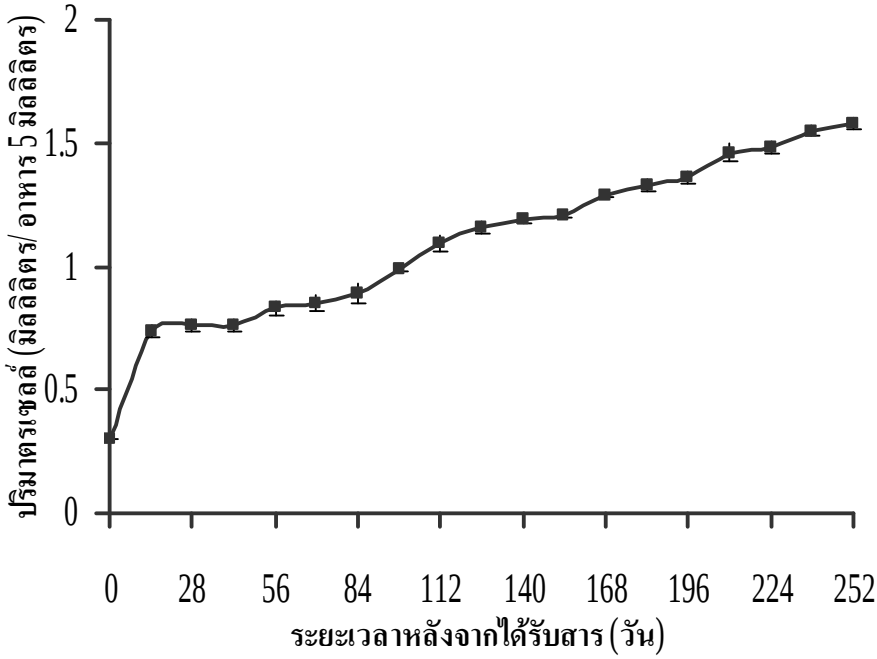
การตอบสนองของเซลล์พืชที่มีต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น จะมีความแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของพืช ซึ่งความแตกต่างของลักษณะที่ต้านทานต่อสารที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางด้านกลไกการทำลายของสารที่เกิดขึ้นภายในพืช ซึ่งเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างจะมีความซับซ้อนมาก เริ่มตั้งแต่การเข้าสู่เซลล์ ซึ่งก่อนที่สารกำจัดวัชพืชจะเข้าไปถึงเอนไซม์เป้าหมายนั้นได้สารจะเข้าสู่พืชโดยการผ่านเซลล์ผิวชั้นนอกของใบ และผ่านคิวติเคิลเพื่อเข้าสู่เซลล์พืช แล้วเคลื่อนย้ายผ่านทาง plasmodesmata เพื่อเข้าสู่ระบบท่อลำเลียงอาหารต่อไป (ทศพล, 2545) ส่วนการคัดเลือกเซลล์ต้านทานสารโดยใช้เซลล์แขวนลอยทำให้เซลล์ได้รับสารโดยตรง ไม่มีส่วนที่มากั้นทำให้เซลล์ได้รับสารน้อยกว่าความเป็นจริงที่ใช้ เช่น คิวติเคิลหรือแวกซ์ ทำให้เซลล์หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กสามารถสัมผัสกับสารได้อย่างทั่วถึงไม่ต้องผ่านกระบวนการเคลื่อนย้ายที่ซับซ้อนภายในพืช และเซลล์ปริมาณเพียงเล็กน้อยใช้เป็นตัวแทนเซลล์พืชจำนวนมาก ทำให้การสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืชมีความสม่ำเสมอมากกว่าการใช้ตัวอย่างพืชทดลองในแปลงปลูก (ศรีสม, 2541) และเป็นการเปิดโอกาสสร้างความผันแปรให้เกิดขึ้น สามารถให้ลักษณะใหม่ ๆ ที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้ (รังสฤษดิ์, 2541) นอกจากนี้การทดลองในห้องปฏิบัติการยังสามารถควบคุมสภาพแวดล้อม เพื่อกำหนดสภาพที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกและลดปัจจัยที่อาจมีผลต่อการดูดซึมและการเคลื่อนย้ายของสารได้ (ทศพล, 2541)

1.4 การคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์

การคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ต้องการคัดเลือกให้เซลล์อ้อยมีความต้านทานต่อสารที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ จึงเริ่มทำการคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารจากระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ที่ 0.1 ไมโครโมลาร์ก่อน ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์แขวนลอยอ้อยมีการเจริญเติบโตลดลงประมาณครึ่งหนึ่งของเซลล์อ้อยปกติ โดยใช้เวลาในการคัดเลือกจนกระทั่งเซลล์มีการเติบโตเช่นเดียวกับเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสารประมาณ

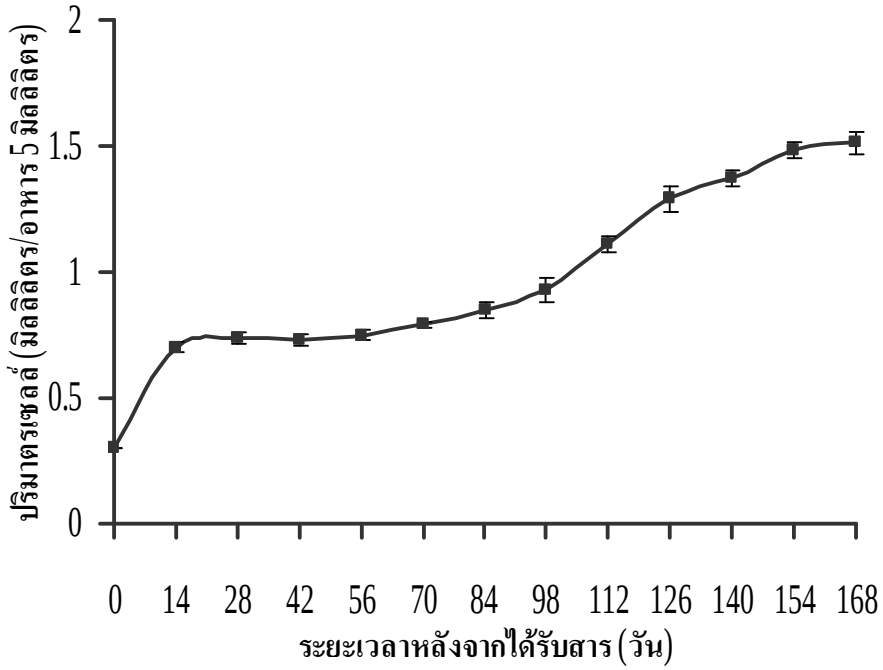
252 วัน (ภาพที่ 5) ซึ่งปริมาตรสุดท้ายของเซลล์อ้อยที่ทำการวัดได้ คือ 1.50 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร และทำการคัดเลือกเซลล์ต้านทานต่อสารที่ระดับความเข้มข้นที่ 1 ไมโครโมลาร์ จะต้องใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นอีก 168 วัน จึงจะได้ปริมาตรเซลล์ 1.48 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร (ภาพที่ 6) ซึ่งระยะเวลาในการชักนำเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K95-282 ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์เริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ จนถึงระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลานาน 420 วัน ซึ่งจะเรียกเซลล์อ้อยที่ทำการคัดเลือกได้นี้ว่า สายพันธุ์เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (1 μM imazapyr-resistant sugarcane cell line) หรือเรียกว่าเซลล์อ้อยต้านทานสาร (resistant cell) (ภาพที่ 7ข) เช่นเดียวกับ มัตติกา (2550) คัดเลือกเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K 97-32 ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ได้ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ระยะเวลาในการคัดเลือกนาน 378 วัน นอกจากนี้ Chompoo and Pornprom (2008) คัดเลือกเซลล์ข้าวโพดต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทได้ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ ใช้เวลาในการคัดเลือกนาน 308 วัน และเรียกเซลล์ที่คัดเลือกได้ว่า สายพันธุ์เซลล์ข้าวโพดที่ต้านทานสารกลูโฟซิเนทในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ (10^{-6} M glufosinate-resistant maize cell line) ซึ่งระยะเวลาในการคัดเลือกให้เซลล์ของพืชเกิดความต้านทานที่แตกต่างกันนั้น เป็นผลมาจากชนิดของพืชที่แตกต่างกัน การตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อความเข้มข้นของสาร ตลอดจนวิธีการหรือเทคนิคที่ใช้ในการชักนำและคัดเลือก (Dyer, 1996)

แต่อย่างไรก็ตาม การตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืชที่มีต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น จะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ พันธุ์พืช สารกำจัดวัชพืช และอัตราการใช้สารกำจัดวัชพืช เป็นต้น (ทศพล, 2545) ดังนั้น ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงทำการพิจารณาการตอบสนองของเซลล์อ้อยที่ผ่านการคัดเลือก (เซลล์อ้อยต้านทานสาร หรือ resistant cell) ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ เพื่อนำไปใช้เปรียบเทียบกับการตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติ (normal cell) ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ก่อนที่จะนำไปทำการประเมินหาค่าดัชนีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชต่อไป



ภาพที่ 5 ระยะเวลาในการคัดเลือกเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K 95-282 ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์

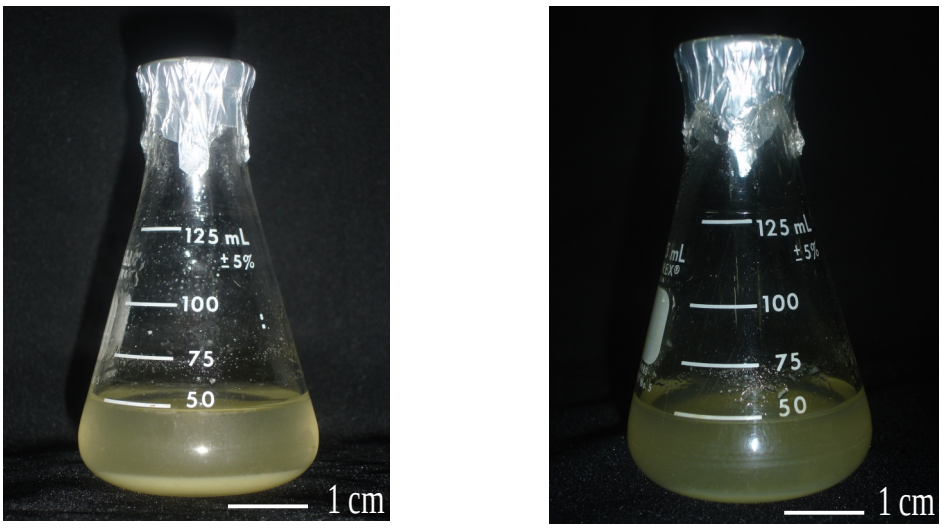
หมายเหตุ Vertical bars แสดงค่า $\pm$ SE ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า



ภาพที่ 6 ระยะเวลาในการคัดเลือกเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K 95-282 ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

หมายเหตุ Vertical bars แสดงค่า $\pm$ SE ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

(ก) (ข)



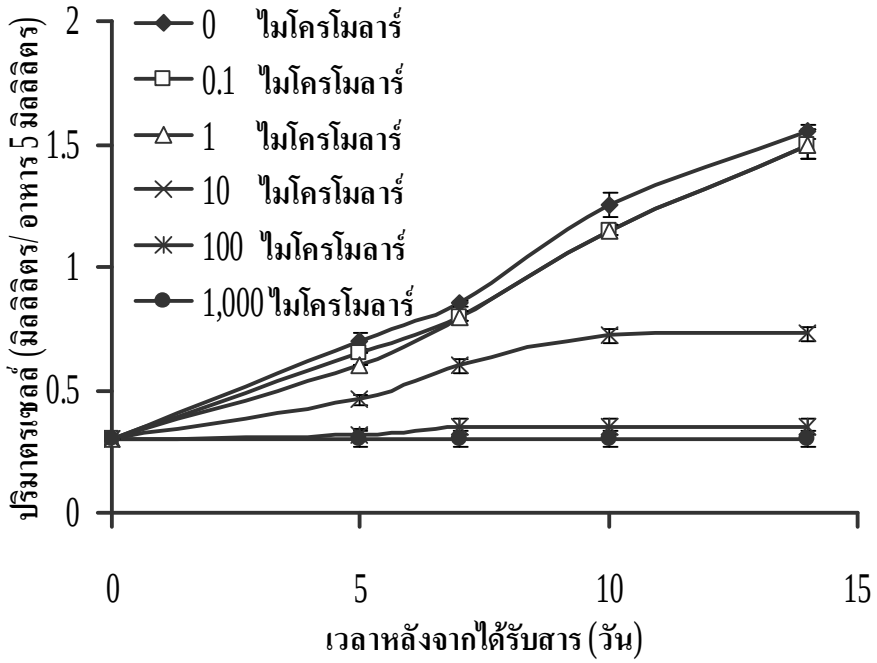
ภาพที่ 7 ลักษณะของเซลล์อ้อยปกติ (ก: normal cells) และเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (ข: 1 μM imazapyr-resistant sugarcane cell line)

1.5 การตอบสนองของเซลล์อ้อยต้านทานสารที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์

การตอบสนองของเซลล์อ้อยต้านทานสารที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นต่างกัน ตั้งแต่ 0 0.1 1 10 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ พบว่า ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารมีปริมาตรเซลล์เป็น 1.50 1.50 1.50 0.68 0.35 และ 0.30 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นของสารที่ 0 0.1 1.0 10 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 8 และตารางผนวกที่ 6)

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ในระยะเวลาต่างกัน หลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางผนวกที่ 7) พบว่า ระยะเวลาที่ทำการวัดปริมาตรเซลล์ในแต่ละวัน และระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์แต่ละระดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และมีปฏิกิริยาสัมพันธ์กันระหว่างปัจจัยทั้งสอง กล่าวคือ เซลล์อ้อยมีรูปแบบการเพิ่มปริมาตรเซลล์ที่แตกต่างกัน เมื่อได้รับความเข้มข้นของสารที่ต่างกัน

เซลล์ที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์มีการตอบสนองที่ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารที่เพิ่มมากขึ้น โดยมีปริมาตรเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อ้อยปกติพันธุ์เดียวกัน และในระดับความเข้มข้นเดียวกัน อาจเกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์มีการปรับตัวหรือมีการเปลี่ยนแปลงกลไกภายในของเซลล์ ทำให้การได้รับพิษจากสารอิมาซาเพอร์ลดน้อยลง โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ที่ 1 ไมโครโมลาร์ เซลล์ปกติไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ (ภาพที่ 4) แต่ในขณะที่เซลล์ต้านทานสารสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้และมีปริมาตรเซลล์ที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเข้มข้นของสารที่ 0 และ 0.1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ที่ 14 วันหลังจากได้รับสาร (ตารางผนวกที่ 6) เช่นเดียวกับ เซลล์ถั่วเหลือง (*Glycine max* L. cv. Enrei) ที่ต้านทานสาร oxyfluorfen สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ที่ระดับความเข้มข้นของสาร oxyfluorfen ที่ 10^{-7} โมลาร์ ในขณะที่เซลล์ปกติตายไปในที่สุด (Warabi *et al*., 2001) และเซลล์ข้าวโพด (*Zea mays* L.) ที่ได้จากการคัดเลือกให้ต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทที่ระดับความเข้มข้นที่ 10^{-6} โมลาร์ จะไม่ได้รับผลกระทบจากสารกลูโฟซิเนทที่ระดับความเข้มข้นที่ 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} และ 10^{-6} โมลาร์ (Chompoo and Pornprom, 2008)



ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยต้านทานสารสายพันธุ์ K 95-282 เมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

หมายเหตุ Vertical bars แสดงค่า $\pm$ SE ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

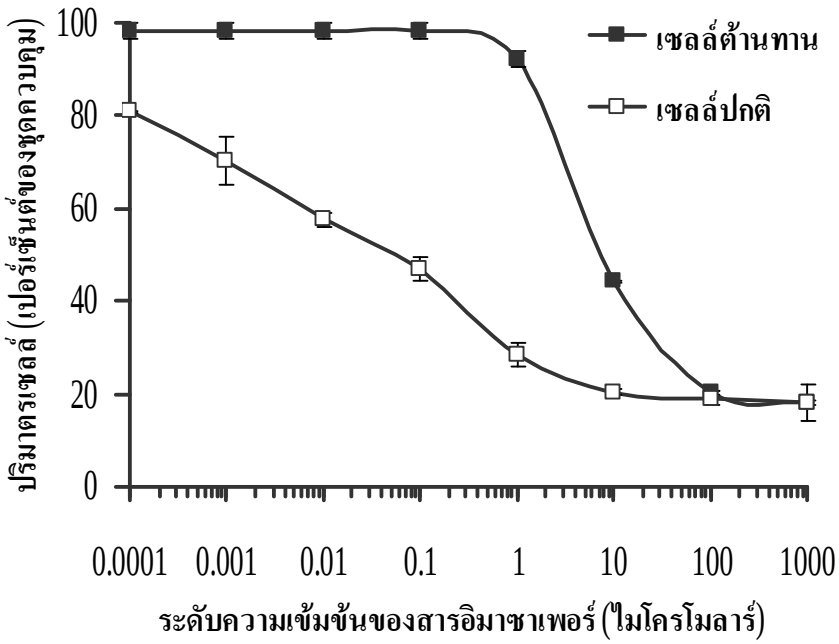
เมื่อทำการคัดเลือกจนได้เซลล์ที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้นจึงนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับความต้านทานสารในเซลล์อ้อยปกติ (normal cells) และเซลล์อ้อยต้านทานสาร (resistant cells) ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0 0.0001 0.001 0.01 0.1 1.0 10 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 9) พบว่า เซลล์อ้อยปกติจะมีการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 0.06 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 7 ไมโครโมลาร์ จากระดับความเข้มข้นดังกล่าว เมื่อนำมาพิจารณาค่าดัชนีของความต้านทานสาร (resistance index) โดยเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงไป 50 เปอร์เซ็นต์ ในเซลล์ต้านทานและเซลล์ปกติ (ตารางที่ 1) พบว่า ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีระดับความต้านทานมากกว่าในเซลล์อ้อยปกติ 116.7 เท่า แสดงให้เห็นว่า หลังจากที่เซลล์ได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เซลล์อ้อยต้านทานสารสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ ในขณะที่เซลล์อ้อยปกติไม่สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดอยู่ได้

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเซลล์เปรียบเทียบ (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) ของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่างกัน (ตารางผนวกที่ 9) พบว่า รูปแบบของเซลล์ทั้งสองรูปแบบ และระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์แต่ละระดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และมีปฏิกิริยาสัมพันธ์กันระหว่างปัจจัยทั้งสอง กล่าวคือ เซลล์อ้อยทั้งสองรูปแบบมีการลดลงของปริมาตรเซลล์เปรียบเทียบ (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) ที่แตกต่างกัน เมื่อได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากการคัดเลือกจนได้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และมีดัชนีของความต้านทานสารเป็น 116.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อ้อยปกติ เช่นเดียวกับ Rajasekaran *et al.* (1996) คัดเลือกเซลล์ของฝ้ายพันธุ์ SJ2 และ B1654 ให้ต้านทานต่อสารไพรมิซัลฟูรอนที่ระดับความเข้มข้น 2.13 ไมโครโมลาร์ พบว่า มีความต้านทาน 100-1,000 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ฝ้ายพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร ต่อมา Warabi *et al.* (2001) คัดเลือกเซลล์ถั่วเหลือง (*Glycine max* L. cv. Enrei) ให้ต้านทานต่อสาร oxyfluorfen พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารที่ 10^{-9} โมลาร์ เซลล์ปกติจะถูกยับยั้งในขณะที่เซลล์ต้านทานสารสามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับความเข้มข้นของสารที่ 10^{-7} โมลาร์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์ปกติไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ เมื่อพิจารณาระดับของความต้านทานสาร พบว่า ในเซลล์ที่ต้านทานสารมีระดับ

ของความต้านทานสารเป็น 1,000 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ต่อมา Bae *et al.* (2002) คัดเลือกเซลล์แขวนลอยของข้าว (*Oryza sativa* L. cv. Ilpumbyeo) ให้ต้านทานต่อสาร cyhalofop-butyl ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถต้านทานได้ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อได้รับสารดังกล่าวต่อเนื่องเป็นเวลานาน 6 เดือน ต่อมา กัญญาวัฒน์ (2546) ได้รายงานการคัดเลือกอ้อยต้านทานสารกลูโฟซิเนท พบว่า เซลล์อ้อยพันธุ์ KPS 96-8-5 สามารถต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทได้ ในระดับความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ โดยมีระดับความต้านทานเป็น 4,750 เท่าของเซลล์อ้อยปกติพันธุ์เดียวกัน ต่อมา Zambrano *et al.* (2003) ได้ทำการคัดเลือกอ้อยพันธุ์ V71-51 ต้านทานต่อสารไกลโฟเสทในสภาพเซลล์แขวนลอยได้ในระดับความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร พบว่า เซลล์แขวนลอยของอ้อยสามารถต้านทานต่อสารได้มากถึง 170 เท่า ของเซลล์อ้อยพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร ต่อมา มัตติกา (2550) ได้ทำการคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับเซลล์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่า เซลล์ของอ้อยพันธุ์ K 97-32 สามารถชักนำให้เกิดเป็นเซลล์ที่ต้านทานต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ได้ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยมีระดับความต้านทานเป็น 1,000 เท่าของเซลล์อ้อยปกติพันธุ์เดียวกัน นอกจากนี้ ในการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ถั่วเหลือง (*Glycin max* L. cv. Enrei) ต่อสารเบนซัลฟูรอนเมททิล พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารประมาณ 10^{-9} โมลต่อลิตร ทำให้เซลล์ถั่วเหลืองมีการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (Pornprom *et al.*, 2005) ซึ่งจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาของพืชที่มีต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น อาจจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิดของพืช พันธุ์พืช สารกำจัดวัชพืช และอัตราของสารกำจัดวัชพืช เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม ในเซลล์ของอ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ามีกลไกของความต้านทานต่อสารที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไป จึงได้ทำการพิจารณาลักษณะกลไกพื้นฐานของความต้านทานทางชีวเคมีในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ เพื่อนำไปใช้เป็นดัชนีในการอธิบายลักษณะกลไกทางชีวเคมีของความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ต่อไป



ภาพที่ 9 การตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์ต้านทานสารของอ้อยสายพันธุ์ K 95-282 ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่างกัน

หมายเหตุ Vertical bars แสดงค่า $\pm$ SE ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

ตารางที่ 1 ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (I_{50}) ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นต่างกัน

เซลล์	ค่า I_{50} (ไมโครโมลาร์)
เซลล์ปกติ	0.06 ± 0.03[1/]
เซลล์ต้านทานสาร	7.00 ± 0.04
ดัชนีความต้านทานสาร[2/]	116.7

[1/] ค่าความเข้มข้น ± SE ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

[2/] ค่าดัชนีของความต้านทานสาร พิจารณาจากค่า I_{50} ของเซลล์ต้านทานสารต่อค่า I_{50} ของเซลล์ปกติ

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส

สารอิมาซาเพอร์เป็นสารที่มีกลไกการทำงานเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน leucine, valine และ isoleucine ซึ่งเกิดขึ้นภายในคลอโรพลาสท์ในเซลล์พืช มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ DNA และการเจริญเติบโตของพืชผิดปกติ (Ahrens, 1994) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ ALS สามารถวัดเป็นปริมาณของ acetoin ได้ภายหลังจากการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาของ acid-catalysed decarboxylation ของ 2-acetolactate เป็น acetoin (Westerfeld, 1945) ในขั้นตอนแรกของกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนดังกล่าว ซึ่งจะบ่งบอกถึงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ได้ (Corbett and Tardif, 2006) ในการทดลองนี้ จึงทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในระดับเซลล์ หลังจากที่ทำการชักนำและคัดเลือกเซลล์อ้อยให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อย ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย เซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N = normal cells without herbicide treatment) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT = normal cells treated with the herbicide) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R = resistant cells without herbicide) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT = resistant cells treated with the herbicide) พบว่า ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N = 19.03 nmol acetoin mg^{-1} protein min^{-1}) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R = 20.50 nmol acetoin mg^{-1} protein min^{-1}) มีกิจกรรมที่จำเพาะของเอนไซม์ ALS ที่ไม่แตกต่างกัน (ตารางผนวกที่ 12) ในขณะที่เซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) ในระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 1 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็น 98 99 89 60 และ 38 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) ตามลำดับ (ภาพที่ 9และตารางผนวกที่ 13) เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (I_{50}) จะเห็นได้ว่าดัชนีของความต้านทานสาร (resistance index) เมื่อเปรียบเทียบในระหว่างเซลล์ต้านทานที่ได้รับสาร (RT; I_{50} = 28.6 μM) กับเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT; I_{50} = 4.4 μM) มีค่าเท่ากับ 6.5 เท่า (ตารางที่ 2) ที่ 7 วันหลังจากการย้ายเซลล์

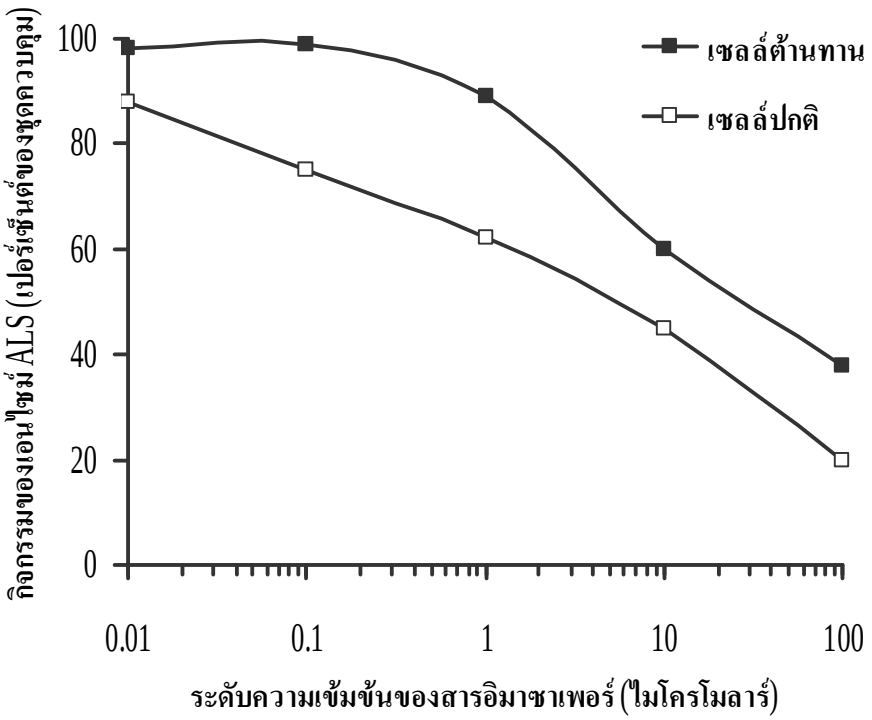
เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์ในเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารที่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ ในระดับความเข้มข้นต่างกัน (ตารางผนวกที่ 14) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์ทั้งสองรูปแบบ และในแต่ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และมีปฏิกิริยาสัมพันธ์กันระหว่างปัจจัยทั้งสอง กล่าวคือ เซลล์ทั้งสองรูปแบบมีอัตราการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่แตกต่างกัน เมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS โดยพิจารณาจาก target site-based ในการเข้าทำลายของสารอิมาซาเพอร์ในเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับสารในระดับความเข้มข้น 28.6 ไมโครโมลาร์ และมีดัชนีของความต้านทานสารเท่ากับ 6.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT; I_{50} = 4.4 μM) ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์ เช่นเดียวกับการทดลองของมัตติกา(2550) ได้รายงานว่าเซลล์อ้อยพันธุ์ K97-32 ที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ มีดัชนีของความต้านทานสารของเซลล์ต้านทานที่ได้รับสารกับเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสารมากถึง 11 เท่า ที่ 5 วันหลังจากได้รับสารที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ฝ่ายพันธุ์ SUR-6C ที่ต้านทานสารไพรมิซัลฟูรอนในระดับความเข้มข้น 2.13 ไมโครโมลาร์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับสาร 21.3 ไมโครโมลาร์ (Rajasekaran *et al*., 1996) ในขณะที่ Pornprom *et al*. (2005) ได้รายงานว่า เซลล์ถั่วเหลือง (*Glycine max* L. cv. Enrei) มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับสารเบนซัลฟูรอนเมทิลในระดับความเข้มข้นประมาณ 8 x 10^{-10} โมลต่อลิตร

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS ซึ่งคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายของเอนไซม์ดังกล่าวนี้ โดยมีการปรับตัวเป็นแบบตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช กล่าวคือ กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์ที่ต้านทานที่ไม่ได้รับสาร และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสารมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่มากกว่าในเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร ในขณะที่เซลล์ที่ต้านทานที่ไม่ได้รับสารและเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสารมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ไม่แตกต่างกัน (ตารางผนวกที่ 12 และ 13) โดยที่ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะมีการปรับตัวมากกว่าในเซลล์ปกติ ซึ่งเป็นแบบตอบสนองน้อย จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไม่ถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาเพอร์ เช่นเดียวกับผลการทดลอง Pornprom and Pyon (1999) ซึ่งได้รายงานว่า กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในพริกที่พันธุ์ทนทานต่อสารไพรมิซัลฟูรอนมากกว่าในพันธุ์อ่อนแอ 10-15 เท่า และมีการตอบสนองต่อสารเป็นแบบตอบสนองน้อยต่อสาร นอกจากนี้ Buker *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในพริกและมะเขือเทศเมื่อได้รับสารไพรมิซัลฟูรอนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า ในพริกมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS มากกว่าในมะเขือเทศมากถึง 10 เท่า และในขณะที่ Avila *et al*. (2005) ได้รายงานว่า ข้าวพันธุ์ CL-161 ที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ พบว่าพันธุ์ CL-161 มีความต้านทานสารเป็น 32 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ CL-121 ซึ่งทนทานต่อสารดังกล่าว ทั้งนี้เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์กรดอะมิโนดังกล่าวนี้ จะเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน valine, leucine และ isoleucine โดยที่สารจะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS

ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสารในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาในการเปลี่ยน α–ketobutyrate กับ pyruvate เป็น acetohydroxybutyrate หรือ pyruvate กับ pyruvate เป็น 2-acetolactate (Anonymous, 2007) ส่งผลทำให้พืชที่อ่อนแอต่อสารจะมีการตอบสนองต่อสาร กล่าวคือ การทำงานของเอนไซม์ ALS จะถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาเพอร์ จึงทำให้ไม่สามารถเกิดการสังเคราะห์กรดอะมิโนดังกล่าวได้ ในขณะที่พืชที่ต้านทานสารจะตอบสนองน้อยต่อสาร จึงทำให้พืชต้านทานสารสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ

จากผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ซึ่งเป็นการพิจารณาจากกลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกี่ยวข้องกับ target site-based จะเห็นได้ว่าในเซลล์ที่ต้านทานสารที่ได้รับสาร (RT) มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS สูงกว่าในเซลล์ปกติที่ได้รับสาร (NT) มากถึง 6.5 เท่า ซึ่งการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในสายพันธุ์เซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์นั้นจะเป็นแบบตอบสนองน้อยต่อสารกำจัดวัชพืช จึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาเพอร์ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการอธิบายกลไกของความต้านทานสารที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์เป้าหมายที่สารเข้าไปยับยั้งในกระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในพืช และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาพันธุ์อ้อยให้มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชต่อไป



ภาพที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์ปกติและเซลล์ต้านทานสารของอ้อยสายพันธุ์ K 95-282 ที่ได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่างกัน ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์ โดยที่ในเซลล์ต้านทานสารที่ไม่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ALS 20.50 nmol acetoin mg^{-1} protein min^{-1} และในเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ALS 19.03 nmol acetoin mg^{-1} protein min^{-1} ตามลำดับ

หมายเหตุ Vertical bars แสดงค่า $\pm$ SE ของค่าเฉลี่ย 3 ค่า

ตารางที่ 2 ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (I_{50}) ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์

เซลล์	ค่า I_{50} (ไมโครโมลาร์)[1/]
เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT)	4.4 $\pm$ 0.2
เซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT)	28.6 $\pm$ 1.1
ดัชนีความต้านทานสาร[2/]	6.5

[1/] ค่า I_{50} $\pm$ ค่า SE จากค่าเฉลี่ยจริง 3 ค่า

[2/] ค่าดัชนีของความต้านทานสาร พิจารณาจากค่า I_{50} ของเซลล์ต้านทานสารต่อค่า I_{50} ของเซลล์ปกติ

สรุป

ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธสในเซลล์อ้อยที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ สามารถสรุปผลการทดลอง ได้ดังนี้

1. การคัดเลือกสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับเซลล์ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งได้ชักนำแคลลัสจากส่วนม้วนใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ K95-282 สามารถชักนำให้เกิดเป็นเซลล์ที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ได้ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาในการคัดเลือกนาน 420 วัน และมีดัชนีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชเป็น 116.7 เท่าของเซลล์อ้อยปกติ

2. การศึกษากลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของความต้านทานสารในสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส (ALS) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์พืช พบว่า ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS มากกว่าในเซลล์อ้อยปกติถึง 6.5 เท่า จะเห็นได้ว่า เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์มีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็นแบบตอบสนองน้อยต่อสารอิมาซาเพอร์ จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไม่ถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาเพอร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. **การปลูกอ้อย**. ฐานความรู้พืชพลังงานทดแทน. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/power_oil/WebSugarcaneNew/Technology/weed.htm, 1 ธันวาคม 2550.

กัญญาวัฒน์ สิริเวชพันธุ. 2546. **การคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชกลูโฟซิเนท**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์. 2546. **วัชพืชในไร่อ้อยและการป้องกันกำจัด**. สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

_____ แฉล้ม มาศวรรณา, วิมลรัตน์ ศุกรินทร์ และ เสริมศิริ คงแสงดาว. **การสูญเสียผลผลิตอ้อยเนื่องจากวัชพืชร้ายแรงบางชนิด**. แหล่งที่มา: http://agriqua.doae.go.th/Plant%20%20Protection%20%20Conference/weed%20%20scie nce/C-01.pdf, 1 ธันวาคม 2550.

จำเนียร ชมภู. 2546. **การคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนท**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทศพล พรพรหม. 2541. การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้กับการศึกษาวิจัยทางด้านสารกำจัดวัชพืช. **วิทยาสารวัชพืช** 1: 209-214.

_____. 2545. **สารกำจัดวัชพืช: หลักการและกลไกการทำลาย**. มหาวิทยาเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นริศร ขจรผล. 2530. **ผลของสารเคมีของสารกำจัดวัชพืชบางชนิดที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ผลผลิตและคุณภาพของอ้อย 4 พันธุ์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พจมาน สุรนิลพงศ์, สุภาวรัตน์ ชาญยุทธ และ อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2543. การปรับปรุงพันธุ์อ้อยทนเค็ม. **วารสารเทคโนโลยีสุรนารี** 7: 217-223.

มัตติกา ทองรส. 2550. **กลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2549. **สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก** 2549. แหล่งที่มา: http://oae.go.th/statistic/yearbook49/, 25 มกราคม 2551.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศรีสม สุรวัฒนานนท์. 2541. การสร้างสายพันธุ์พืชต้านทาน/ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชโดยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ. **วิทยาสารวัชพืช** 2: 3-15.

Aftab, F., Y. Zafar, K.A. Malik and J. Iqbal. 1996. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplasts in sugarcane (*Saccharum* spp. *hybrid* cv. CoL-54). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 44: 71-78.

Ahrens, H.W. 1994. Herbicide Handbook. Weed Science Society of America, Illinios.

Anonymous. 1998. Technology note: herbicide resistance and herbicide tolerance defined. Weed Technol. 12(4): 789-792.

_____. 2007. Inhibition of amino acid synthesis. Available Source: http://www.agronomy.lsu.edu/weedscience/AGRO4070/lectures/Griffin.WeedCourse. Chapter18.2005.pdf, July 5, 2007.

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 Manag. Sci. 61: 171-178.

Bae, C., L. Young-Ill, L. Yong-Pyo, S. Yong-Won, L. Do-Jin, Y. Deuk-Chum and L. Hyo-Yeon. 2002. Selection of herbicide tolerant cell lines from γ-ray-irradiated cell cultures in rice (*Oryza sativa* L. cv. Ilpumbyeo). J. Plant Biotechnol. 4: 123-127.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 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 Sci. 52: 201-205.

Chaleff, R.S. 1981. Genetics of Higher Plants: Applications of Cell Culture. Cambridge Univ. Press, London, UK.

Chen, W.H., M.R. Davey, J.B. Power and E.C. Cocking. 1988. Control and maintenance of regeneration in sugarcane callus cultures. J. Exp. Bot. 39(199): 251-261.

Chompoo, J. and T. Pornprom. 2008. RT-PCR based detection of resistance conferred by an insensitive GS in glufosinate-resistant maize cell lines. Pestic. Biochem. Physiol. 90: 189-195.

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 Manag. Sci. 62: 584-597.

Cox, C. 1996. Herbicide fact sheet imazapyr. J. Pesticide Reform 16(3): 16-20.

Dalley, C.D. and P.R. Edward. 2005. Sugarcane *(Saccharum* spp.*)* response to the herbicide flumioxazin. J. American Society Sugarcane Technologists 25: 104.

Diaz-Sanchez, J., N. Lopez-Martinez, F. Lopez-Granados, R. De Prado and L. Garcia-Torres. Absorption, translocation, and fate of herbicides in *Orobanche cumana* sunflower system. Pestic. Biochem. Physiol. 74: 9-15.

Duggleby, R.G. and S.S. Pang. 2000. Acetohydroxyacid synthase. J. Biochem Mol. Biol. 33: 1-36.

Dyer, W.F. 1996. Techniques for producing herbicide-resistant crops, pp. 38-51. *In* S.O. Duke, ed. Herbicide-Resistance Crops. CRC press Inc., Boca Roton.

Gaston, S., A. Zabalza, E.M. González, C. Arrese-Igor, P.M. Aparicio-Tejo and M. Royucla. 2002. Imazethapyr an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis induces aerobic fermentation in pea plants. Physiol. Plant. 114: 524-532.

George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture Part 1 Vol. 2. 2nd ed., Exegetics Ltd., England.

Holt, J.S. and H.M. LeBaron. 1990. Significance and distribution of herbicide resistance. Weed Technol. 4: 141-149.

Jung, S.M., D.T. Le, S.S. Yoon, M.Y. Yoon, Y.T. Kim and J.D. Choi. 2004. Amino acid residues conferring herbicide resistance in tobacco acetohydroxy acid synthase. Biochemical Society 383: 53-61.

Kadaru, S., W. Zhang, A. Yadav and J.H. Oard. 2008. Development and application of allele-specific PCR assays for imazethapyr resistance in rice (*Oryza sativa*). Available Source: http://www.springerlink.com/content/j102h1m4682hpw53/fulltext.pdf, March 5, 2008.

Kanampiu, F.K., J.K. Ransom, D. Friesen and J. Gressel. 2002. Imazapyr and pyriobac movement in soil and from maize seed coats to control *Striga* in legume intercropping. Crop Protect. 21: 611-619.

Kennersley, A.M. and D.K. Dougall. 1980. Increase in anthocyanin yield from wild-carrot cell cultures by a selection system based on cell aggregate size. Planta 149: 200-204.

Little, D.L., D.L. Shaner, D.W. Ladner, B. Tecle and R.D. Ilnicki. 1994a. Root absorption and translocation of 5'-substituted analogs of the imidazolinone herbicide, imazapyr. Pest. Sci. 41: 161-169.

_____, _____, _____ and R.D. Ilnicki. 1994b. Modeling root absorption and and translocation of 5'-substituted analogs of the imidazolinone herbicide, imazapyr. Pest. Sci. 41: 171-185.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18: 100-127.

Osuna, M.D., A.J. Fisher and R. De Prado. 2003. Herbicides resistance in *Aster squamatus* conferred by a less sensitive from of acetolactate synthase. Pest Manag. Sci. 59: 1210-1216.

Poehlman, J.M. and D.A. Sleper. 1995. Breeding Field Crop. 4th ed., Iowa State Univ. Press, Iowa.

Pornprom, T. and J.Y. Pyon. 1997. Assessment of ALS-inhibiting herbicides tolerance in pepper cultivars. Kor. J. Weed Sci. 17(3): 325-333.

_____, _____. 1999. Primisulfuron-tolerant pepper: a biochemical basis of tolerance. Kasetsart. J. (Nat. Sci.). 17(3): 325-333.

_____ J. Chompoo and B. Grace. 2003. Glufosinate tolerance in hybrid corn varieties based on decreasing ammonia accumulation. Weed Biol. Manage. 3: 41-45.

_____ K. Usui and K. Ishizuka. 2005. Growth inhibition and acetolactate synthase activity of soybean seedlings and suspension-cultured cells treated with bensulfuron-methyl. Weed Biol. Manage. 5: 150-153.

_____ S. Surawattananon and P. Srinives. 2000. Ammonia accumulation as an index of glufosinate-tolerant soybean cell lines. Pestic. Biochem. Physiol. 68: 102-106.

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 herbicide. Plant Science 119(1): 115-124.

Richard, E.P. 1990. Timing effects on johnsongrass control with asulam in sugarcane. Weed Technol. 4(1): 81-86.

_____. 1993. Preemergence herbicide effects on bermudagrass interference in sugarcane hybrids. Weed Technol. 7(3): 578-584.

Srinivasan, C. and I.K. Vasil. 1986. Plant regeneration from protoplasts of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Plant Physiol. 126(1): 41-48.

Taregyan, M.R., A.M. Mortimer, P.D. Putwanin and H.A. Collin. 2001. Selection for resistance to the herbicide imazethapyr in somaclones of soybean. Weed Res. 41: 143-154.

Tan, S., R. Evans and B. Singh. 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. Amino acids 30: 195-204.

Tu, M., C. Hurd and J.M. Randall. 2001. Weed Control Methods Handbook. The Nature Conservancy. Available Source: http://tncweeds.ucdavis.edu/products/ handbook/17.Imazapyr.pdf, April 14, 2005.

Viator, B.J. 2002. Sugarcane (*Saccharum* spp.) response to azafeniden applied pre-emergence and post emergence. Weed Technol. 16: 444-451.

_____ J.L. Griffin and J.M. Ellis. 2002. Red morning glory (*Ipomoea cooinea*) control with sulfentrazone and azafeniden applied at layby in sugarcane (*Saccharum* spp.). Weed Technol. 16: 142-148.

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 Manag. Sci. 57: 743-748.

Westerfeld, W.W. 1945. A colorimetric determination of blood acetoin. J. Biol. Chem. 161: 495-502.

Wright, T.R. and D. Penner. 1998. Corn (*Zea mays*) acetolactate synthase sensitivity to four classes of ALS-inhibiting herbicides. Weed Sci. 46: 8-12.

Wright, T.R., N.F. Bascomb, S.F. Sturner and D. Penner. 1998. Biochemical mechanism and molecular basis for ALS-inhibiting herbicide resistance in sugarbeet (*Beta valgaris*) somatic cell selections. Weed Sci. 46: 13-23.

Zambrano, A.Y., J.R. Demey and V. Gonzalez. 2003. *In vitro* selection of a glyphosate-tolerant sugarcane cellular line. Plant Mol. Biol. Rep. 21: 365-373.

Ziauddin, A. and K.J. Kasha. 1990. Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*) II. Effect of auxins on chromosomal status of cultures and regeneration of plants. Euphytica 48: 279-286.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macroelements:	
NH_4NO_3	1650.00
$CaCl_2.2H_2O$	1900.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
KH_2PO_4	170.00
Microelements:	
NH_2-EDTA	37.30
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.4H_2O$	22.30
$ZnSO_4.H_2O$	8.60
KI	0.85
$NaMoO_4.2H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	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 การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 เมื่อมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นต่างกัน

ปริมาตรเซลล์ (มิลลิลิตร)	ระยะเวลา						เฉลี่ย
	0	5	7	10	14	24	
	มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร						
0.1	0.10 i	0.13 i	0.15 i	0.16 hi	0.20 ghi	0.21ghi	0.16 C[1/]
0.2	0.20 ghi	0.33 g	0.46 f	0.86 d	1.06 bc	1.13 b	0.67 B
0.3	0.30 gh	0.46 f	0.73 e	0.96 cd	1.33 a	1.37 a	0.86 A
เฉลี่ย	0.20 E[2/]	0.31 D	0.45 C	0.67 B	0.87 A	0.91 A	0.57
Duncan's Multiple Range Test (0.05) ระยะเวลา					141.09		
Duncan's Multiple Range Test (0.05) ปริมาตรเซลล์					434.14		
Duncan's Multiple Range Test (0.05) ระยะเวลา x ปริมาตรเซลล์					26.75		
C.V. (%) = 13.04 %							

[1/] อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาจากค่า LSR .05

[2/] อักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาจากค่า LSR .05

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 เมื่อมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นต่างกัน

Source of variation	df	SS	MS	F-Value
Day (D)	5	3.85	0.77	141.09**
Initial cell (C)	2	4.74	2.37	434.14**
D x C	10	1.46	0.15	26.75**
Error	36	0.19	0.005	

** มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 4 การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 ที่ระยะเวลาต่างกัน หลังจากได้รับสารสารอิมาซาเพอร์ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ระยะเวลา (วัน)					เฉลี่ย
	0	5	7	10	14	
	มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร					
0	0.30 l	0.60 i	0.72 gh	1.20 c	1.50 a	0.85 A[1/]
0.0001	0.30 l	0.58 i	0.67 h	0.85 f	1.27 b	0.73 B
0.001	0.30 l	0.50 j	0.58 i	0.77 g	1.10 d	0.65 C
0.01	0.30 l	0.48 j	0.53 i	0.72 h	0.92 e	0.59 D
0.1	0.30 l	0.45 jk	0.50 j	0.68 h	0.73 gh	0.53 E
1	0.30 l	0.42 k	0.43 jk	0.57 jk	0.44 jk	0.41 F
เฉลี่ย	0.30 E[2/]	0.50 D	0.58 C	0.76 B	0.99 A	0.52
Duncan's Multiple Range Test (0.05) ระยะเวลา					982.63	
Duncan's Multiple Range Test (0.05) ความเข้มข้น					283.98	
Duncan's Multiple Range Test (0.05) ระยะเวลา x ความเข้มข้น					56.14	
C.V. (%) = 5.65 %						

[1/] อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาจากค่า LSR .05

[2/] อักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาจากค่า LSR .05

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยปกติสายพันธุ์ K 95-282 ในระยะเวลาต่างกัน หลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

Source of variation	df	SS	MS	F-Value
Day (D)	4	4.99	1.24	982.63**
Concentration (C)	5	1.80	0.36	283.98**
D x C	20	1.42	0.07	56.14**
Error	60	0.07	0.001	

** มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 6 การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ระยะเวลาต่างกัน หลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ระยะเวลา (วัน)					เฉลี่ย
	0	5	7	10	14	
	มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร					
0	0.30 k	0.66 g	0.85 d	1.25 b	1.50 a	0.91 A[1/]
0.1	0.30 k	0.65 g	0.80 e	1.15 c	1.50 a	0.88 B
1	0.30 k	0.63 gh	0.80 e	1.15 c	1.50 a	0.87 B
10	0.30 k	0.46 i	0.59 h	0.72 f	0.68 f	0.56 C
100	0.30 k	0.32 jk	0.35 j	0.35 j	0.35 gh	0.33 D
1,000	0.30 k	0.30 k	0.30 k	0.35 j	0.30 k	0.31 E
เฉลี่ย	0.30 E[2/]	0.50 D	0.61 C	0.82 B	0.98 A	0.64
Duncan's Multiple Range Test (0.05) ระยะเวลา					2,104.86	
Duncan's Multiple Range Test (0.05) ความเข้มข้น					1,952.22	
Duncan's Multiple Range Test (0.05) ระยะเวลา x ความเข้มข้น					255.20	
C.V. (%) = 3.82 %						

[1/] อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาจากค่า LSR .05

[2/] อักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาจากค่า LSR .05

ตารางผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ระยะเวลาต่างกัน หลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

Source of variation	df	SS	MS	F-Value
Day (D)	4	5.13	1.28	2,104.86**
Concentration (C)	5	5.95	1.19	1,952.22**
D x C	20	3.11	0.15	255.20**
Error	60	0.03	0.0006	

** มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 8 ปริมาตรเซลล์เปรียบเทียบ (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) ของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	เซลล์อ้อยปกติ (normal cells)	เซลล์อ้อยต้านทาน (resistant cells)	เฉลี่ย
0	100.00 a	100.00 a	100.00 A[1/]
0.0001	81.72 c	98.36 a	90.04 B
0.001	70.97 d	98.36 a	84.67 C
0.01	58.28 e	98.36 a	78.32 D
0.1	47.10 f	98.36 a	72.73 E
1	28.39 g	92.17 b	60.28 F
10	20.43 h	44.19 f	32.31 G
100	19.14 h	20.08 h	19.60 H
1,000	18.06 h	18.07 h	18.06 H
เฉลี่ย	49.34 B[2/]	74.22 A	61.78
Duncan's Multiple Range Test (0.05) รูปแบบของเซลล์			1,555.42
Duncan's Multiple Range Test (0.05) ความเข้มข้น			1,080.23
Duncan's Multiple Range Test (0.05) รูปแบบของเซลล์ x ความเข้มข้น			151.04
C.V. (%) = 3.75 %			

[1/] อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาจากค่า LSR .05

[2/] อักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาจากค่า LSR .05

ตารางผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเซลล์เปรียบเทียบ (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) ของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ 14 วัน หลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่างกัน

Source of variation	df	SS	MS	F-Value
Type of Cell (T)	1	8,354.95	8,354.95	1,555.42**
Concentration (C)	8	46,419.92	5,802.49	1,080.23**
T x C	8	6,489.40	811.17	151.04**
Error	36	193.37	5.37	

** มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K 95-282

Concentration (Absorbance)							Trend line	R-square
0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30		
0.000	0.245	0.419	0.571	0.628	0.684	0.729	Y = 2.34X + 1171	0.907

ตารางผนวกที่ 11 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ในการวัดปริมาณโปรตีนในเซลล์อ้อยสายพันธุ์ K 95-282

Concentration (Absorbance)						Trend line	R-square
0	20.0	40.0	60.0	80.0	100.0		
0.000	0.334	0.571	0.745	0.918	1.005	Y = 0.0099X + 0.099	0.9618

ตารางผนวกที่ 12 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารที่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ ในระดับความเข้มข้นต่างกัน ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	เซลล์อ้อยปกติ (normal cells)	เซลล์อ้อยต้านทาน (resistant cells)
	nmol acetoin mg^{-1} protein min^{-1} [1/]	
0	19.03 ± 0.02	20.50 ± 0.15
0.01	16.76 ± 0.13	20.09 ± 0.05
0.1	14.18 ± 0.06	20.30 ± 0.06
1	11.80 ± 0.10	18.25 ± 0.08
10	7.99 ± 0.01	12.30 ± 0.65
100	3.83 ± 0.12	7.79 ± 0.13

[1/] ค่าเฉลี่ยจากค่าจริง 3 ค่า ± ค่า SE

ตารางผนวกที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ ALS เปรียบเทียบในเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารที่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ ในระดับความเข้มข้นต่างกัน ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	เซลล์อ้อยปกติ (normal cells)	เซลล์อ้อยต้านทาน (resistant cells)	เฉลี่ย
0	100.00 a	100.00 a	100.00 A[1/]
0.01	88.00 b	98.00 a	93.00 B
0.1	75.00 c	99.00 a	87.00 C
1	62.00 d	89.00 b	75.50 D
10	43.00 e	60.00 d	51.50 E
100	20.00 g	38.00 f	29.00 F
เฉลี่ย	64.67 B[2/]	80.67 A	72.67
Duncan's Multiple Range Test (0.05) รูปแบบของเซลล์			1,626.35
Duncan's Multiple Range Test (0.05) ความเข้มข้น			3,158.54
Duncan's Multiple Range Test (0.05) รูปแบบของเซลล์ x ความเข้มข้น			102.07
C.V. (%) = 1.63 %			

[1/] อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาจากค่า LSR .05

[2/] อักษรที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อพิจารณาจากค่า LSR .05

ตารางผนวกที่ 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ 7 วันหลังจากทำการย้ายเซลล์ ในเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารที่ได้รับสารอิมาซา เพอร์ ในระดับความเข้มข้นต่างกัน

Source of variation	df	SS	MS	F-Value
Type of Cell (T)	1	2,304.00	2,304.00	1,626.35**
Concentration (C)	5	22,373.00	4,474.60	3,158.54**
T x C	5	723.00	144.60	102.07**
Error	24	34.00	1.41	

** มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นายภาคภูมิ ปัญญาดี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 8 มกราคม 2525
สถานที่เกิด	อำเภอนาน้อย จังหวัดน่าน
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน พ.ศ. 2548