วิทยานิพนธ์

การคัดเลือกและกลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์

SELECTION AND BIOCHEMICAL MECHANISM OF IMAZAPYR-RESISTANCE IN SUGARCANE CLONES

นางสาวมัตติกา ทองรส

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

พืชไร่นา	พืชไร่นา
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การคัดเลือกและกลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์

Selection and Biochemical Mechanism of Imazapyr-Resistance in Sugarcane Clones

นามผู้วิจัย นางสาวมัตติกา ทองรส

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....
(รองศาสตราจารย์ทศพล พรพรหม, Ph.D.)

กรรมการ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, D.Agr.)

กรรมการ .....
(อาจารย์รงรอง หอมหวล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....
(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 23 **เดือน** ..... **พ.ศ.** 2550

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดเลือกและกลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์

Selection and Biochemical Mechanism of Imazapyr-Resistance in Sugarcane Clones

โดย

นางสาวมัตติกา ทองรส

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2550

มัตติกา ทองรส 2550: การคัดเลือกและกลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชไร่นา ภาควิชาพืชไร่นา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ทศพล พรพรหม, Ph.D. 68 หน้า

การคัดเลือกพันธุ์อ้อยทนทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นในสภาพไร่ทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Split-plot in RCBD มีปัจจัยหลัก คือ อัตราสาร จำนวน 4 อัตรา (0, 0.156, 0.312 และ 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์) ปัจจัยรอง คือ พันธุ์อ้อย จำนวน 27 พันธุ์ ประเมินการตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาของพืชที่มีต่อสารกำจัดวัชพืช โดยพิจารณาจากข้อมูลความเป็นพิษที่ 1, 3 และ 6 เดือนหลังจากฉีดพ่นสาร ส่วนความสูง และจำนวนลำต่อไร่ พิจารณาที่ 6 เดือนหลังฉีดพ่นสาร พบว่า อ้อยพันธุ์ K95-282, K88-92, K97-32, K99-55, K95-87 และ K93-219 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีแนวโน้มว่ามีความทนทานต่อสารอิมาซาเพอร์ในอัตรา 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ส่วนพันธุ์ K99-5, K99-72, K99-85, K97-33 และ K97-27 จัดอยู่ในกลุ่มที่อ่อนแอต่อสารในอัตรา 0.156 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ สำหรับการคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับเซลล์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งได้ชักนำแคลลัสจากส่วนม้วนใบอ่อน จากนั้นชักนำให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอย โดยใช้สูตรอาหาร MS ดัดแปลง ในการคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ เริ่มต้นทำการคัดเลือกเซลล์อ้อยพันธุ์ K97-32 จากระดับความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 0.1 – 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดเป็นเซลล์ที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ได้ ซึ่งจะเรียกว่า เป็นสายพันธุ์เซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาในการคัดเลือกนาน 378 วัน มีดัชนีของความต้านทานสารเป็น 1,000 เท่าของเซลล์อ้อยปกติพันธุ์เดียวกัน หลังจากนั้นได้ทำการศึกษาลักษณะกลไกทางชีวเคมีของสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ acetolactate synthase (ALS) พบว่า เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะมีปริมาณของเอนไซม์ ALS มากกว่าเซลล์ของอ้อยปกติ 11 เท่า ที่ 5 วันหลังจากได้รับสาร จากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สารอิมาซาเพอร์แสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในพืช โดยมีการปรับตัวเป็นแบบไม่ตอบสนอง (less sensitivity) ต่อสาร จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไม่ถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาเพอร์

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Mattika Thongros 2007: Selection and Biochemical Mechanism of Imazapyr-Resistance in Sugarcane Clones. Master of Science (Agriculture), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Associate Professor Tosapon Pornprom, Ph.D. 68 pages.

Field tolerance to imazapyr of sugarcane clones was evaluated by whole plant selection. Split-plot in RCBD was applied with four dosages of imazapyr application (0, 0.156, 0.312 and 0.625 kg ai/ha) as main plot and 27 different sugarcane clones as sub plot. The effect of imazapyr on the physiological response of sugarcane clones was evaluated. The degree of tolerance was evaluated at 1, 3 and 6 months after application by inspecting crop injury. Furthermore, plant height and stalk per rai was evaluated at 6 months after application. It was shown that K95-282, K88-92, K97-32, K99-55, K95-87 and K93-219 clones were relatively tolerant to imazapyr at 0.625 kg ai/ha, whereas K99-5, K99-72, K99-85, K97-33 and K97-27 clones were susceptible to imazapyr at 0.156 kg ai/ha. Selection of sugarcane cell line resistant to imazapyr was developed by tissue culture, beginning from young tight fuled leaves-induced calluss formation and cell suspension. The callus and cell suspension were culture in modified MS liquid medium. A sugarcane cell line from K97-32 resistant to 1 μM imazapyr was obtained after 378 days of selection, using a stepwise selection with increasing concentration of imazapyr from 0.1- 1 μM. It was referred to as 1 μM imazapyr-resistant sugarcane cell line. This indicated that the resistance index was 1,000-fold more resistant to imazapyr than that of the normal cells. The biochemical mechanism of resistance to imazapyr were investigated in the normal and resistant cells. Assay of acetolactate synthase (ALS) activity of the resistance cells was 11-fold higher than the normal cells at 5 days after treatment 1 μM imazapyr. The result indicated that the mechanism of imzapyr resistance in the sugarcane cell lines appears to be an altered at the target site as the ALS activity, leading to less sensitivity to imazapyr.

Mattika Thongros — Student's signature

T. Pornprom — Thesis Advisor's signature

8 / May / 07

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ทศพล พรพรหม ประธานกรรมการที่ปรึกษาในความกรุณาช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เรวัต เลิศฤทัยโยธิน กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ดร. รงรอง หอมหวล กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คนึงนิตย์ เหรียญ-วรการ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่ ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์และสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจารย์จำเนียร ชมภู ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษาแนะนำต่าง ๆ ในการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด และขอขอบคุณ คุณรณยุทธ์ สัตยานิคม ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย เขต 1 จังหวัดกาญจนบุรี สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย ที่ได้ให้ความรู้และช่วยเหลือการคัดเลือกพันธุ์อ้อยในสภาพไร่ทดลอง

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านพี่ ๆ และน้อง ๆ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาเภสัชพฤกษศาตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับ คุณพ่อ คุณแม่ ขอบคุณน้อง ๆ เพื่อน ๆ และทุกท่านในครอบครัวที่ได้ให้ความรัก กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

มัตติกา ทองรส

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
อุปกรณ์	14
วิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	25
สรุป	52
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	53
ภาคผนวก	59

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1	การให้คะแนนความเป็นพิษของสารที่พืชแสดงออกหลังจากได้รับสาร	17
2	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารอิมาซาเพอร์ที่มีต่ออ้อย 27 พันธุ์ โดยวิธีประเมินด้วยสายตา ที่ 1 เดือนหลังจากได้รับสาร	27
3	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารอิมาซาเพอร์ที่มีต่ออ้อย 27 พันธุ์ โดยวิธีประเมินด้วยสายตา ที่ 3 เดือนหลังจากได้รับสาร	28
4	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารอิมาซาเพอร์ที่มีต่ออ้อย 27 พันธุ์ โดยวิธีประเมินด้วยสายตา ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร	29
5	เปอร์เซ็นต์ความสูงเปรียบเทียบของอ้อย 27 พันธุ์ ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร	32
6	เปอร์เซ็นต์จำนวนลำต่อไร่เปรียบเทียบของอ้อย 27 พันธุ์ ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร	33
7	การเกิดแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ K95-282, K88-92, , K97-32, K99-55, K95-87 และ K93-219 หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์	36
8	ค่า I_{50} ของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารพันธุ์ K97-32 ที่ 14 วัน หลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	48
9	ค่า I_{50} ของเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสารและเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร พันธุ์ K97-32 ที่ 5 วัน หลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	51

ตารางผนวกที่

1	พันธุ์อ้อยคู่ผสม จำนวน 27 พันธุ์ ที่นำมาใช้ในการคัดเลือกในสภาพไร่ทดลอง	60
2	วิเคราะห์ความแปรปรวนจากการประเมินความเป็นพิษของพันธุ์อ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ ที่ 1 เดือนหลังจากได้รับสาร	61
3	วิเคราะห์ความแปรปรวนจากการประเมินความเป็นพิษของพันธุ์อ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่ออิมาซาเพอร์ ที่ 3 เดือนหลังจากได้รับสาร	61

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
4	วิเคราะห์ความแปรปรวนจากการประเมินความเป็นพิษของพันธุ์อ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่ออิมาซาเพอร์ ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร	62
5	วิเคราะห์ความแปรปรวนจากความสูงเปรียบเทียบของพันธุ์อ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่อสารอิมาซเพอร์ ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร	62
6	วิเคราะห์ความแปรปรวนจากจำนวนลำต่อไร่ที่เปรียบเทียบของพันธุ์อ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร	63
7	ระดับการตอบสนองของอ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร	64
8	องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)	65
9	การเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K95-282 เมื่อมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่ต่าง ๆ กัน	66
10	การเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K97-32เ มื่อมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่ต่าง ๆ กัน	66
11	การเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K99-55 เมื่อมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่ต่าง ๆ กัน	67
12	การเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K97-32 เมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	67
13	ปริมาตรเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	68
14	ปริมาตรเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสารและเซลล์อ้อยต้านทานไม่ได้รับสารทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ 5 วันหลังจากได้รับสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	68

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของสารอิมาซาเพอร์ในรูปกรด (ก) และในรูปเกลือ (ข)	5
2	ตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาของสารอิมาซาเพอร์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetolactate synthase (ALS) ภายในพืช	6
3	ลักษณะของอ้อยพันธุ์ทนทานพันธุ์ K95-282 (ก) และ พันธุ์อ่อนแอพันธุ์ K97-27 (ข) ที่ 3 เดือนหลังจากได้รับสารในอัตรา 0, 0.156, 0.312 และ 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์	34
4	การเติบโตของเซลล์อ้อยพันธุ์ K95-282 ในช่วง 0, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน	38
5	การเติบโตของเซลล์อ้อยพันธุ์ K97-32 ในช่วง 0, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน	39
6	การเติบโตของเซลล์อ้อยพันธุ์ K99-55 ในช่วง 0, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน	40
7	การเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K97-32 เมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้น 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 และ 1 มโครโมลาร์	42
8	ระยะเวลาในการคัดเลือกเซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ K97-32 ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์	44
9	ระยะเวลาในการคัดเลือกเซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ K97-32 ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์	45
10	ลักษณะของเซลล์อ้อยปกติ (ก: normal cells) และเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ (ข: 0.1 μM imazapyr-resistant sugarcane cell line)	46
11	การตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารพันธุ์ K97-32 ที่ 14 วัน หลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	48
12	การตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสารพันธุ์ K97-32 ที่ 5 วัน หลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	51

การคัดเลือกและกลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์

Selection and Biochemical Mechanism of Imazapyr-Resistance in Sugarcane Clones

คำนำ

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาล สารเคลือบผิว ผงชักฟอก และสารประกอบทางเคมีหลายชนิด ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกอ้อย 6.67 ล้านไร่ และมีผลผลิตเฉลี่ยทั้งประเทศ 7.45 ตันต่อไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) และผลผลิตอ้อยในแต่ละปีไม่แน่นอน โดยเฉลี่ย 7-10 ตันต่อไร่ ซึ่งถือว่ามีปริมาณต่ำ ในปัจจุบันนี้ เกษตรกรชาวไร่อ้อยยังต้องประสบปัญหาในการปลูกอ้อย ไม่ว่าจะเป็นการขาดแคลนพื้นที่ที่เหมาะสมในการปลูกอ้อย ความอุดมสมบูรณ์ของดินไม่ดีพอ พันธุ์อ้อยที่ใช้อยู่ไม่เหมาะสมกับพื้นที่ การจัดการแปลงปลูก และการจัดการศัตรูพืชทางการเกษตรยังไม่เหมาะสม ส่งผลให้ผลผลิตอ้อยของเกษตรกรอยู่ในระดับต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาเรื่องวัชพืช ซึ่งนับว่าเป็นอีกปัญหาหนึ่ง โดยจะขึ้นแข่งขันการใช้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเจริญเติบโตจากพืชปลูก เช่น แร่ธาตุอาหาร น้ำ และแสง เป็นต้น ตลอดจนวัชพืชยังเป็นที่อยู่อาศัยของเชื้อสาเหตุโรคพืช และศัตรูแมลงชนิดต่าง ๆ ดังนั้นจึงต้องทำการกำจัดวัชพืช ซึ่งมีอยู่หลายวิธี ได้แก่ การถอน การไถพรวน และการใช้แรงงานคน เป็นต้น การใช้สารกำจัดวัชพืชนับว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เกษตรกรเลือกใช้ อย่างไรก็ตามควรเลือกใช้สารกำจัดวัชพืชที่มีคุณสมบัติควบคุมวัชพืชได้กว้างขวาง มีความเป็นพิษต่ำต่อผู้ใช้และพืชปลูก เมื่อสารลงสู่ดินสามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว หรือการเลือกใช้พันธุ์พืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ซึ่งสามารถทำได้โดยการคัดเลือกพันธุ์ทนทานสารกำจัดวัชพืชในระดับพืชทั้งต้น ซึ่งได้มีรายงานการคัดเลือกพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองและข้าวโพดให้ทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทในระดับพืชทั้งต้น (Pornprom *et al*., 2000; Pornprom *et al*., 2003) การคัดเลือกเซลล์อ้อยให้ต้านทานต่อสารไกลโฟเสทโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Zambrano *et al*., 2003) และการพัฒนาพันธุ์พืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชโดยวิธีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมด้านพืช โดยการถ่ายยีน *ahas* เพื่อให้ฝ้ายต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ (Aragão *et al*., 2005) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันนี้ในต่างประเทศได้มีการนำพันธุ์พืชชนิดต่าง ๆ ที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชหลายชนิดไปพัฒนาผลิตเป็นพันธุ์การค้า ได้แก่ ข้าวโพดพันธุ์ 3245IR ที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ (Kanampiu *et al*., 2001)

หรือข้าวโพดพันธุ์ Pioneer 3395IR ที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ (Armel *et al*., 2001) และถั่วเหลือง (Roundup Ready soybean) ที่ต้านทานสารไกลโฟเสท (Annonymouse, 2007) เป็นต้น

สารอิมาซาเพอร์ เป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทไม่เลือกทำลาย ในพืชปลูกสามารถควบคุมวัชพืชใบกว้างทั้งปีเดียวและหลายปี รวมทั้งควบคุมวัชพืชวงศ์หญ้า (ทศพล, 2545; รังสิต, 2547) สารอิมาซาเพอร์เคลื่อนย้ายได้ทั้งในไซเลมและโฟเอม จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetolactate synthase (ALS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาแรกของการสังเคราะห์กรดอะมิโน leucine, valine และ isoleucine เมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งทำให้การสร้างดีเอ็นเอลดลง ทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง โดยพืชที่ได้รับสารจะแสดงลักษณะอาการ chlorosis หลังจากนั้นพืชจะแสดงอาการ necrosis และตายในที่สุด (Ahrens, 1994; Devine *et al*., 1993; Tu *et al*., 2001)

การได้รับพิษของพืชจากสารกำจัดวัชพืช ถูกควบคุมด้วยปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ชนิดของพืช พันธุ์พืช ระยะการเจริญเติบโต สภาพแวดล้อม และชนิดของสารกำจัดวัชพืช เป็นต้น ซึ่งมักพบอยู่เสมอว่าพืชปลูกบางชนิดสามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ในขณะที่พืชบางชนิดไม่สามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช แม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกันแต่มีพันธุกรรมต่างกัน ก็จะมีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไม่เท่ากัน จากข้อสังเกตนี้ จึงเป็นแนวทางในการคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ ตลอดจนพิจารณากลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสาร (biochemical mechanism of resistance) เพื่อนำไปใช้ในการจัดการวัชพืชในการปลูกอ้อยได้อย่างเหมาะสมต่อไป โดยที่สามารถใช้สารกำจัดวัชพืชกับอ้อยได้อย่างปลอดภัย ในขณะที่วัชพืชจะได้รับความเป็นพิษจากการใช้สารกำจัดวัชพืชดังกล่าวนี้

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกพันธุ์อ้อยที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นในสภาพไร่ทดลอง

2. คัดเลือกพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับเซลล์แขวนลอย โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3. ศึกษาลักษณะกลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS ภายในพืช เพื่อใช้เป็นดัชนีในการอธิบายเกี่ยวกับกลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยที่มีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์

การตรวจเอกสาร

1. การจัดการวัชพืชในการผลิตอ้อย

1.1 ระบบการผลิตอ้อยในประเทศไทย

การปลูกอ้อยในปัจจุบัน สามารถแบ่งตามฤดูปลูกได้เป็น 2 ประเภท คือ การปลูกอ้อยต้นฝน แบ่งเป็น 2 เขต คือ การปลูกอ้อยต้นฝนในเขตชลประทาน ซึ่งเกือบทั้งหมดอยู่ในเขตภาคกลาง และภาคตะวันออก เป็นพื้นที่ที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตอ้อยสูง 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) เป็นการปลูกอ้อยโดยอาศัยความชื้นในดินช่วงปลายฤดูฝน เพื่อให้อ้อยงอกและเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ ไปจนกว่าอ้อยจะได้รับน้ำฝนต้นฤดู เกษตรกรนิยมปลูกอ้อยแบบทั้งลำ โดยจะชักร่องให้ลึก ระยะแถว 1.0-1.3 เมตร และวางลำอ้อยในร่องแล้วใช้จอบสับลำอ้อยเป็น 2-3 ส่วน กลบดินหนาประมาณ 10-15 เซนติเมตร (กรมวิชาการเกษตร, 2549)

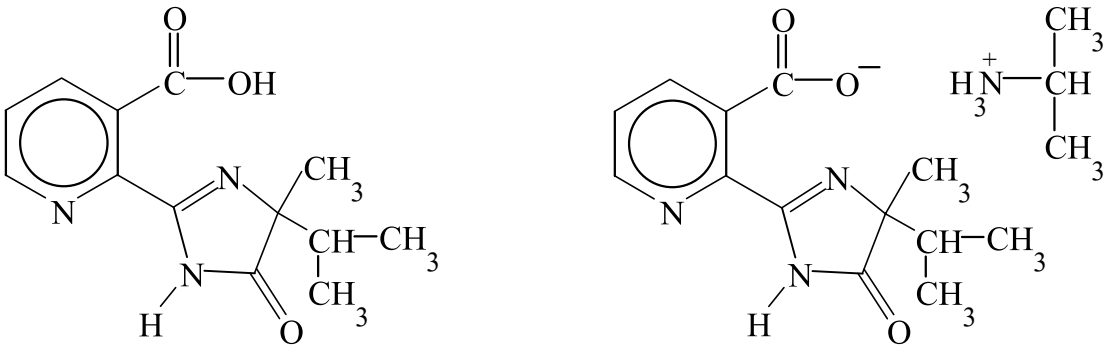
1.2 ปัญหาวัชพืชในการผลิตอ้อย

วัชพืชเป็นศัตรูพืชทางการเกษตรที่สำคัญที่ทำความเสียหายในการผลิตอ้อย โดยวัชพืชจะแก่งแย่งธาตุอาหารในดิน ความชื้น และแสงแดดที่อ้อยควรจะได้รับ ทำให้อ้อยมีการแตกกอและความยาวของลำอ้อยลดลง อีกทั้งยังเป็นที่อยู่อาศัยของศัตรูชนิดต่าง ๆ ซึ่งวิธีการควบคุมกำจัดวัชพืชในไร่อ้อยสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การกำจัดวัชพืชโดยวิธีกล โดยเกลียวพันธุ์ และคณะ (2547) ได้ทำการศึกษาการสูญเสียผลผลิตอ้อยพันธุ์ K88-200 โดยเปรียบเทียบการใช้แรงงานคายกับไม่กำจัดวัชพืช พบว่า ผลผลิตอ้อยสูญเสีย 95.8 เปอร์เซ็นต์ หากไม่มีการกำจัดวัชพืชตลอดฤดูปลูก นอกจากนี้ได้มีการนำสารกำจัดวัชพืชมาใช้ในการควบคุมวัชพืช ซึ่งเป็นวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้ในปัจจุบัน ซึ่งได้มีรายงานว่า มีการนำสาร azafeniden ใช้หลังวัชพืชงอกในอัตรา 8 ออนซ์ต่อเอเคอร์ ในการควบคุมวัชพืชวงค์หญ้าและพวกใบกว้างในไร่อ้อย พบว่า วัชพืชแสดงอาการได้รับพิษ 12-50 เปอร์เซ็นต์ (Viator *et al.*, 2001) และ มีการนำสาร flumioxazin อัตรา 0.28 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อ

เฮกตาร์ มาใช้ในการควบคุมวัชพืชวัชพืชใบกว้างและวงศ์หญ้าในร่อ้อยหลังวัชพืชงอก พบว่าสามารถควบคุมวัชพืชได้ดีแต่มีผลทำให้ความสูงของอ้อยลดลง 15-28 เซนติเมตร (Dalley and Edward, 2005)

2. สารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ (imazapyr)

อิมาซาเพอร์ เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม imidazolinones ได้มีการนำเข้ามาใช้ในประเทศไทยในปี 1985 มีชื่อทางเคมี คือ 2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidasolin-2-yl)nicotinic acid (IUPAC) และมีชื่อการค้าต่าง ๆ เช่น Arsenal, Railroad, Herbicide และ Chopper เป็นต้น สารอิมาซาเพอร์ที่นิยมมี 2 รูป ได้แก่ imazapyr acid มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{13}H_{15}N_3O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 261.28 และ imazapyr isopropylamine มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{16}H_{24}N_4O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 320.39 (ภาพที่ 1) (ทศพล, 2545; Ahrens, 1994)

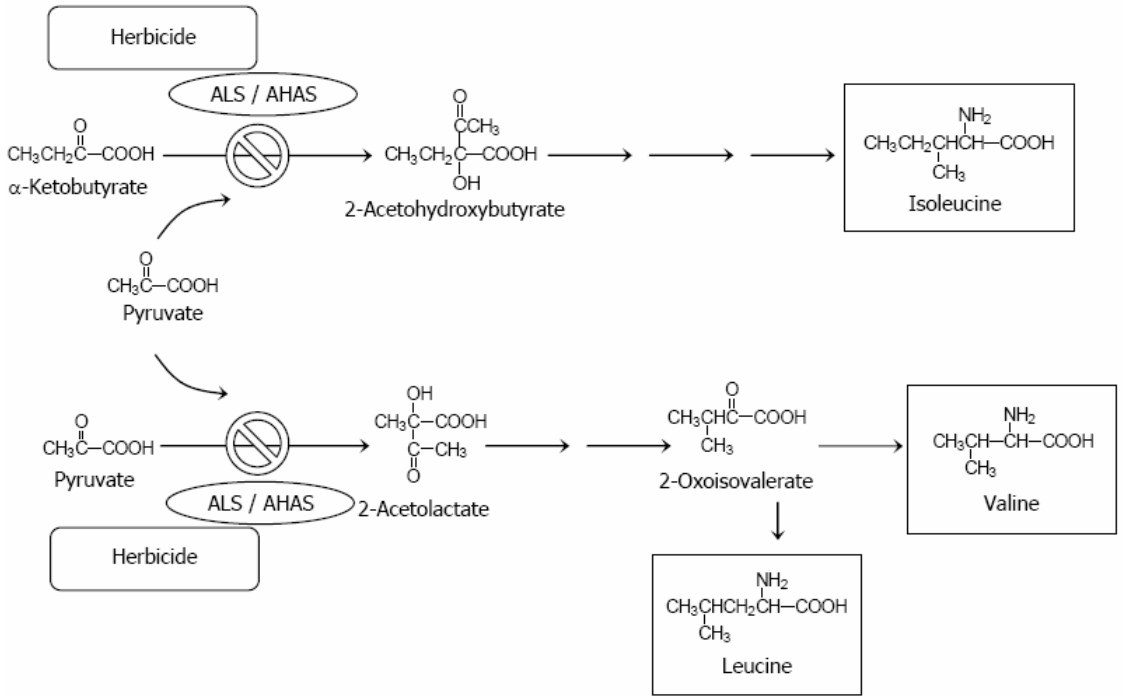


(ก) imazapyr acid (ข) imazapyr isopropylamine

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารอิมาซาเพอร์ในรูปกรด (ก) และในรูปเกลือ (ข)
ที่มา: Ahrens (1994)

อิมาซาเพอร์ ใช้ควบคุมวัชพืชทั้งก่อนงอกและหลังงอก โดยอัตราที่ใช้ 0.56-1.7 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ขึ้นอยู่กับชนิดพืช สามารถควบคุมวัชพืชวงศ์หญ้า ใบกว้างทั้งปีเดียวและหลายปีในพืชบางชนิด เช่น อ้อย ยางพารา ปาล์ม หรือใช้ควบคุมวัชพืชในพื้นที่ไม่ทำการเกษตร เป็นต้น

กลไกการเข้าทำลายของสารอิมาซาเพอร์ เป็นสารประเภทไม่เลือกทำลายเข้าสู่พืชทั้งทางรากและใบ สามารถเคลื่อนย้ายภายในพืชได้ทั้งในไซเลมและโฟเอม ไปสะสมที่เนื้อเยื่อเจริญ เมื่อพืชได้รับสารแล้วสารดังกล่าวจะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetolactate synthase (ALS) หรืออาจเรียกว่า acetohydroxy acid synthase (AHAS) ซึ่งเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโนที่เป็นลูกโซ่ (branch-chain amino acid) ได้แก่ leucine, valine และ isoleucine ซึ่งเกิดขึ้นภายในคลอโรพลาสท์ที่อยู่ในต้นพืช (ภาพที่ 2) ทำให้พืชไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีน และ DNA ได้ การเจริญเติบโตของเซลล์ก็จะหยุดชะงัก พืชจะหยุดการเจริญเติบโตหลังจากได้รับสารเพียง 1-2 ชั่วโมง จากนั้นจะแสดงอาการความเสียหายหลังจากได้รับสาร 1-2 สัปดาห์ โดยในระยะแรกเนื้อเยื่อเจริญของพืชจะแสดงอาการใบสีซีดจาง หลังจากนั้นจะแสดงอาการเหี่ยวแห้งและตายในที่สุด (ทศพล, 2545; รังสิต, 2547; Ahrens,1994; Tu *et al*., 2001)



ภาพที่ 2 ตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาของสารอิมาซาเพอร์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetolactate synthase (ALS) ภายในพืช

ที่มา: Anonymous (2005)

3. การคัดเลือกพันธุ์พืชทนทานหรือต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช

วัชพืชนับว่าเป็นปัญหาหนึ่งในการเพาะปลูก เนื่องจากวัชพืชจะไปแก่งแย่งปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชปลูก เช่น แสง ความชื้น และธาตุอาหาร เป็นต้น ทำให้ผลิตลดลง สารกำจัดวัชพืชจึงเป็นทางเลือกที่เกษตรกรเลือกมาใช้ในการควบคุมกำจัดวัชพืช แต่การใช้สารกำจัดวัชพืชอาจมีผลทำให้พืชปลูกได้รับความเสียหายจากสาร ในการศึกษาของ Viator *et al.* (2002) ใช้สารซัลเฟนทราโซน และอะซาฟีนิดีน ทำให้อ้อยแสดงอาการ red discoloration ที่แกนใบ และขยายออกไปจนถึงขอบใบ มีผลทำให้ความสูงของอ้อยลดลง การตอบสนองของพืชเมื่อได้รับสารกำจัดวัชพืชโดยพืชจะแสดงอาการ ทนทานซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือแสดงอาการต้านทานซึ่งสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือสร้างขึ้นโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (Anonymous, 1998) หรือแสดงความอ่อนแอต่อสารกำจัดวัชพืชแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากปัจจัยทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาที่แตกต่างระหว่างพืชต่างชนิดกัน หรือระหว่างไบโอไทป์ของพืชชนิดเดียวกัน ซึ่งเมื่อพืชได้รับสารจะมีการสะสมสารภายในต้นพืชและเข้าสู่ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา ทำให้พืชเกิดความเสียหายและตายในที่สุด จากข้อสังเกตดังกล่าว Dyer (1996) ได้กล่าวถึงวิธีการพัฒนาสารพันธุ์พืชทนทานหรือต้านทานต่อสารซึ่งสามารถทำการศึกษาได้ทั้งที่เป็นพืชทั้งต้น ในระดับเซลล์ และในระดับชีวโมเลกุล ดังนี้

3.1 การคัดเลือกพืชในสภาพแปลงทดลอง (field selection)

การคัดเลือกพืชในสภาพแปลง ทำโดยการคัดเลือกต้นที่ไม่ถูกทำลายหรือถูกทำลายบางส่วนหลังจากได้รับสารกำจัดวัชพืช ซึ่งต้นดังกล่าวจะเป็นต้นที่ต้านทานหรือทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชชนิดนั้น ๆ และการผสมพันธุ์พืช เป็นการนำพืชที่มีลักษณะต้านทานหรือทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชที่ต้องการ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีความต้านทานหรือทนทานต่อสารชนิดนั้น ๆ (ศรีสม, 2541) ในการคัดเลือกพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในสภาพแปลงทดลองหรือเรือนทดลอง โดยทำการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชในอัตราต่าง ๆ ลงไปบนพืชปลูกแล้วพืชสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ซึ่งได้มีรายงานการคัดเลือกพืชทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชในสภาพภาพแปลงทดลอง ดังต่อไปนี้

Simpson *et al.* (1995) ศึกษาการตอบสนองของถั่วเหลืองที่มีต่อสาร CPCA ความเข้มข้น 15, 153, 306, 766 และ 1532 กรัมต่อเฮกตาร์ เลี้ยงในสภาพเรือนทดลอง และทำการวัดปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ 3 ชั่วโมงหลังจากได้รับสาร พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1532 กรัมต่อเฮกตาร์ มีปริมาณของเอนไซม์มากที่สุด คือ 23.7 ไมโครกรัมต่อชั่วโมงต่อกรัมของเนื้อเยื่อ

Pornprom and Pyon (1999) ได้ทดสอบความทนทานต่อสารไพรมิซัลฟูรอนของพริกจำนวน 4 พันธุ์ ในสภาพเรือนทดลอง โดยพิจารณาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืชที่มีต่อสารและน้ำหนักแห้ง พบว่า พันธุ์ Red Horn และ Kwangbok มีความทนทานต่อสารอิมิซัลฟูรอนมากกว่าพันธุ์ Chamjoah และ Poongchon ประมาณ 3 เท่า และมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS มากกว่า 10-15 เท่า

Lee and Owen (2000) ทำการวัดปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ใน *Xanthium strumarium* พันธุ์ต้านทานต่อสารที่ยับยั้งเอนไซม์ ALS ได้แก่ พันธุ์ Co-25 และ Ohio-1 ส่วนพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ CAM-10 โดยฉีดพ่นสารอิมาเซธาเพอร์ และอิมาซาควิน ที่อัตราต่าง ๆ ในสภาพเรือนทดลอง เมื่อพิจารณาอัตราสารที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (I_{50}) ของพันธุ์ที่ต้านทานต่อพันธุ์อ่อนแอ พบว่า พันธุ์ดังกล่าวมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เท่ากับ 9 และ 12 เท่า เมื่อได้รับสารอิมาเซธาเพอร์ ในขณะที่เมื่อได้รับสารอิมาซาควินมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็น 6 และ 9 เท่า ตามลำดับ

Pornprom *et al.* (2000b) ทำการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลือง 16 พันธุ์ ทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทในสภาพแปลงทดลอง พบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 แสดงความทนทานต่อสารในอัตรา 0.50 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ และมีระดับของความทนทานแตกต่างกัน 2-3 เท่า ของพันธุ์ที่อ่อนแอ คือ พันธุ์ GC 87016 ซึ่งมีความอ่อนแอต่อสารเมื่อได้รับสารเพียง 0.20 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์

Jame *et al.* (2001) ศึกษาการตอบสนองของข้าวโพดที่ต้านทานสารอิมเซธาเพอร์เมื่อได้รับสารอิมาเซทธาเพอร์ร่วมกับอิมาซาเพอร์ โดยใช้ก่อนและหลังวัชพืชงอก พบว่า สามารถควบคุมวัชพืชได้ทั้งใบแคบและใบกว้างได้ดี และสารไม่มีผลต่อผลผลิตของข้าวโพด

Taregyan *et al.* (2001) ทำการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลือง 20 พันธุ์ ทนทานต่อสารอิมาเซธาเพอร์ โดยที่เติมสารอิมาเซธาเพอร์ 1.7 หรือ 2.5 มิลลิกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ใน

สารละลาย เมื่อพิจารณาความต้านทานจากความยาวรากและน้ำหนักแห้งของยอดที่ 10 วันหลังจากได้รับสาร พบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ Dak, Izm, Ard และ Wil มีความทนทานมากที่สุด

Gaston *et al*. (2002) ศึกษาการปลูกถั่วพี (*Pissum sativum* cv. Sugar Snap) ร่วมกับสารอิมาซาเพอร์อัตรา 20 มิลลิกรัมสารออกฤทธิ์ต่อลิตรในสภาพสารละลาย เมื่ออายุ 12 วันหลังปลูก พิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ 0, 3, 5 และ 7 วันหลังจากได้รับสาร พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้ง 45 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งสมบูรณ์ หลังจากได้รับสารเพียง 1 และ 3 วัน ตามลำดับ

Pornprom *et al*. (2003) ได้ทำการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม 15 พันธุ์ ทนทานต่อสารกลูโฟซิเนท พบว่า ข้าวโพดพันธุ์ Pacific 626 และ Pacific 938 ทนทานต่อสารที่อัตรา 1 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ในขณะที่พันธุ์ CP989 อ่อนแอต่อสารเมื่อได้รับสาร 0.25 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์

จากรายงานผลการวิจัยดังกล่าวในข้างต้น แสดงให้เห็นได้ว่าในพืชชนิดต่าง ๆ จะแสดงอาการตอบสนองต่อสารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากปัจจัยภายในพืชเอง เพราะเมื่อสารเข้าไปสะสมภายในพืชแล้วสารจะเข้าสู่ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาทำให้แสดงอาการได้รับพิษ และทำให้พืชตายได้ แต่ในพืชที่ต้านทานต่อสารจะมีกลไกต่าง ๆ เพื่อให้อยู่รอดได้ เช่น การเปลี่ยนรูปสาร หรือผลิตปริมาณเอนไซม์ในปริมาณที่มาก เป็นต้น

3.2 การคัดเลือกพืชในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (*in vitro* selection)

เป็นการคัดเลือกพืชที่ทนทานหรือต้านทานต่อสารกำจัดสารกำจัดวัชพืช โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถทำการคัดเลือกพืชได้ในระดับเซลล์พืช (stepwise selection) โดยอาศัยหลักการเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้เซลล์มีการปรับตัวได้ในที่สุด จึงคัดเลือกเซลล์ที่สามารถรอดชีวิต เซลล์ของพืชที่อ่อนแอต่อสารสามารถกลายพันธุ์ได้ เนื่องจากเซลล์ที่เกิดใหม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม จึงทำให้มีความแตกต่างในด้านความทนทานต่อสารซึ่งสามารถที่จะถ่ายทอดลักษณะไปสู่รุ่นลูกหลานได้ (ทศพล, 2541) จากวิธีการคัดเลือกดังกล่าวได้มีผู้ทำการศึกษาในพืชต่าง ๆ ดังนี้

Pornprom *et al*. (2000a) คัดเลือกถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ทนทานต่อสารกลูโฟซิเนท ในสภาพเซลล์แขวนลอย โดยเพิ่มความเข้มข้นของสารกลูโฟซิเนท จนได้เซลล์แขวนลอยที่ต้านทานที่ความเข้มข้น 10^{-7} โมลาร์ เมื่อพิจารณาปริมาณแอมโมเนียที่สะสมภายในเซลล์ พบว่า เซลล์ที่อ่อนต่อสารมีปริมาณแอมโมเนียสะสมภายในเซลล์มากกว่าเซลล์ที่ต้านทาน 15 เท่า

Taregyan *et al.* (2001) คัดเลือกเซลล์ถั่วเหลืองพันธุ์ Dak, Izm, Ard และ Wil โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมสารอิมาเซธาเพอร์ 2 มิลลิกรัมสารออกฤทธิ์ต่อลิตร คัดเลือกเซลล์ที่ต้านทานชักนำให้เกิดต้นปลูกแล้วทำการผสมตัวเอง จากนั้นนำเมล็ดรุ่นที่1 มาชักนำให้เกิดแคลลัสและเซลล์แขวนลอยในอาหารสูตรเดียวกัน ชักนำให้เกิดต้นเพื่อให้ได้เมล็ดในรุ่นที่ 2 นำมาชักนำให้เกิดแคลลัสอีกครั้ง แล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ALS พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับพ่อแม่

Zambrano *et al*. (2003) ได้ทำการคัดเลือกอ้อยพันธุ์ V71-51 ทนทานต่อสารไกลโฟเสทในสภาพเซลล์แขวนลอย ที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร พบว่า แขวนลอยของอ้อยสามารถต้านทานต่อสาร 170 เท่า ของอ้อยพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร

Pornprom *et al.* (2005) ศึกษาผลความต้านทานต่อสาร bensulfuron-methyl (BSM) ของเซลล์แขวนลอยถั่วเหลือง (*Glycine max* L. cv. Enrei) ที่เติมสาร BSM ความเข้มข้น 10^{-10} ถึง 10^{-6} โมลาร์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-9} โมลาร์ ทำให้เซลล์ถั่วเหลืองเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับสาร เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS พบว่า ปริมาณเอนไซม์ลดลงตามระดับความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้น

3.3 การศึกษาพืชต้านทานสารในระดับชีวโมเลกุล (Studies of herbicide resistant crop at molecular level)

การศึกษาเกี่ยวกับพืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้มีการนำเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุลต่าง ๆ มาช่วยในการพัฒนาพืชปลูกให้ต้านทานต่อสาร การถ่ายยีนก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่นำมาศึกษา การถ่ายยีนในพืชทำสำเร็จได้ในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด ฝ้าย และยาสูบ เป็นต้น เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งใช้รองรับการถ่ายยีนมีความก้าวหน้ามาก โดยสามารถเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบ ราก ลำต้น ดอก คัพภะ จนถึงกลุ่มเซลล์และโปรโตพลาสต์ จนเกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ สำหรับการสร้างพืชแปลงพันธุ์ เทคนิคการถ่ายยีนในพืช

มี 2 แบบ วิธีแรกคือการถ่ายยีนโดยตรง ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี การถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) และการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (microprojectile) เป็นต้น ส่วนวิธีที่สอง คือ การถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* เป็นพาหะการสร้างพืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant) ทำได้โดยการนำยีนทนทานหรือต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชจากพืชที่มียีนต้านทานสารนั้น ๆ ถ่ายทอดให้กับพืชปลูกที่ต้องการ ยีนที่ควบคุมลักษณะการแสดงออกของความต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ได้แก่ยีน ALS หรือ AHAS พบที่บริเวณ domain A และ domain B ในพืชที่มียีน A19 (Trp_{563} เป็น Ser) และ IPSGG (Ser_{670} เป็น Asp) จะต้านทานสารอิมาซาเพอร์(Rajasekaran *et al*., 1996; Devine and Shukla, 2000) นอกจากนี้ได้มีรายงานเกี่ยวกับการถ่ายยีนต้านทานในพืชอีกหลายชนิดและสารชนิดต่าง ๆ ดังนี้

Enriquez-Obregon *et al*. (1998) สร้างสายพันธุ์อ้อยต้านทานต่อสาร phosphinotricine โดยถ่ายทอดยีนต้านทานที่ได้จาก *Agrobacterium tumefaciens*-mediate ในส่วนปลายยอด จากนั้นชักนำให้เกิดต้น แล้วนำไปทดสอบความทนทานในสภาพเรือนทดลอง พบว่า อ้อยมีความทนทานต่อสาร phosphinotricine 10-35 เปอร์เซ็นต์

Falco *et al*. (2000) ทำการถ่ายยีนต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนท ซึ่งยีนประกอบด้วย 2 plasmids คือ gene coding neomycin phosphotransferase (*neo*) และ phosphinotricin acetyltransferase (*bar*) โดยใช้วิธี particle bombarment ลงใน embryonic calli ของ Brazilian sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) เลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตรคัดเลือกที่เติม Kanamycin จากนั้นชักนำให้เกิดต้น แล้วฉีดพ่นสารแอมโมเนียมกลูโฟซิเนท พบว่า อ้อยสามารถเจริญเติบโตได้ปกติและอ้อยไม่ได้รับความเสียหาย

Zeldin *et al.* (2002) ทำการทดสอบความทนทานของ cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) ต่อสารกลูโฟซิเนท ระหว่างต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *bar* กับต้นปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ในสภาพเรือนทดลอง พบว่า cranberry ที่ได้รับการถ่ายยีนมีความทนทานต่อสารที่อัตรา 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ cranberry ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนแสดงอาการได้รับพิษและตายในที่สุดเมื่อได้รับสารในอัตรา 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

Leibbrandt and Snyman (2003) ทดสอบความต้านทานสารกลูโฟซิเนท ของอ้อยพันธุ์ Nco310 ที่ได้รับการถ่ายทอด *pat* gene ในสภาพแปลงทดลอง พบว่า เมื่ออ้อยได้รับสารกลูโฟซิเนทอัตรา 5 ลิตรต่อเฮกตาร์ อ้อยที่ได้รับการถ่ายทอดยีนไม่แสดงอาการได้รับพิษ ส่วนอ้อยที่ไม่ได้รับการถ่ายทอดยีนแสดงอาการได้รับพิษและตายในที่สุด

Aragão *et al.* (2005) ทำการถ่ายยีน *ahas* เข้าสู่ embryonic axes ของฝ้ายพันธุ์ 7MH, Antares, CD-401 และ ITA94 เมื่อย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรคัดเลือก แล้วทำการทดสอบผลของการถ่ายยีน โดยใช้เทคนิค PCR ออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับยีน *ahas* พบว่า สามารถถ่ายทอดยีนดังกล่าวได้ 0.49, 0.62, 0.71 และ 0.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้

การคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชโดยการคัดเลือกในสภาพไร่ทดลองและเรือนทดลอง โดยการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชลงไปในพืชปลูกในอัตราต่าง ๆ ซึ่งวิธีนี้เป็นการศึกษาถึงกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช แต่มีข้อจำกัด คือ ควบคุมสภาพแวดล้อมได้ยาก ทั้งในแง่ของเรื่องความชื้น อุณหภูมิ แสงแดด ธาตุอาหาร การถูกรบกวนจากโรคและแมลง ตลอดจนความเข้มข้นของอัตราสารที่พืชได้รับไม่เท่ากัน การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับผลของสารกำจัดวัชพืชต่อพืชในด้านต่าง ๆ เช่น สรีรวิทยา ชีวเคมี และชีวโมเลกุล ในการศึกษาหาอัตราสารที่เหมาะสม การดูดซึมของสาร การคัดเลือกพืชต้านทาน กลไกภายในพืชที่ต้านทานต่อสาร เป็นต้น ซึ่งวิธีนี้สามารถควบคุมสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น แสง และควบคุมอัตราสารได้แม่นยำ นอกจากนี้ยังปราศจากโรคและแมลงเนื่องจากอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ส่วนการสร้างพืชแปลงพันธุ์ (transgenic plant) พบว่า เมื่อพืชได้รับยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชจะทำให้ไม่ได้รับความเสียหายจากสารที่ฉีดพ่น จึงสามารถใช้สารกำจัดวัชพืชได้อย่างปลอดภัยโดยที่พืชปลูกจะไม่ได้รับความเสียหาย

ในปัจจุบันนี้มีพืชปลูกหลายชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด อ้อย ฝ้าย ข้าว และซูการ์บีท เป็นต้น ที่ต้านทานหรือได้รับการถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ สารกลูโฟซิเนท อิมาเซธาเพอร์ และไกลโฟเสท เป็นต้น (Falco *et al*., 2000) จะเห็นได้ว่า แนวโน้มการการใช้พืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเกษตรกรมีการเพาะปลูกในพื้นที่ขนาดใหญ่และมีการใช้เครื่องจักรกลการเกษตรและสารกำจัดวัชพืชเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการคัดเลือกพืชต้านทานหรือสร้างพืชแปลงพันธุ์นั้นจะมีประสิทธิภาพดีกว่าการผลิตสารกำจัดวัชพืชชนิดเลือกทำลาย เพราะการผลิตสารกำจัดวัชพืชชนิดใดชนิดหนึ่งขึ้นมาใหม่ เสียค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานาน

การเลือกใช้พืชต้านทานสารหรือพืชแปลงพันธุ์ จึงเป็นทางเลือกที่ดีกว่าการป้องกันความเสียหายของพืชจากการใช้สาร ตลอดจนการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะของกลไกทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และชีวโมเลกุล ภายในของพืชที่มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในการพัฒนาสายพันธุพืชต้านทานต่อสารใหม่ ๆ นอกจากนี้เกษตรกรสามารถเลือกใช้สารกำจัดวัชพืชหรือพืชปลูกที่ทนทานหรือต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช เพื่อลดความเสียหายของพืชปลูกจากการใช้สารกำจัดวัชพืชในการควบคุมและกำจัดวัชพืช และปลอดภัยต่อผู้ใช้สารกำจัดวัชพืชต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์อ้อย

อ้อยพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 27 พันธุ์ ได้แก่ K84-32, K88-92, K92-80, K92-213, K93-219, K93-347, K95-84, K95-87, K95-156, K95-161, K95-234, K95-282, K95-283, K97-27, K97-29, K97-32, K97-33, K99-5, K95-45, K99-49, K99-55, K99-56, K99-59, K99-61, K99-72, K99-82 และ K99-85

2. สารกำจัดวัชพืช

สารอิมาซาเพอร์ ในรูป commercial formulation ชื่อการค้า อาร์เซนัล (Arsenal) สารออกฤทธิ์ 2-(4-isopropyl-4-methy-5-oxo-2-imidazolin-2-yl) nicotinic acid 12.3 เปอร์เซ็นต์ และในรูป technical grade ความบริสุทธิ์ 98.8 เปอร์เซ็นต์

3. เครื่อมือในการทำแปลงปลูกอ้อย

เครื่องมือที่ใช้ทำแปลงปลูกอ้อย ได้แก่ รถแทร็กเตอร์ ไม้วัดความสูง และถุงกระดาษ เป็นต้น อุปกรณ์ในการพ่นสาร ได้แก่ ถังฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชแบบสะพายหลัง (knapsack sprayer) ขนาดความจุ 15 ลิตร และหัวฉีดแบบรูปพัดริมสอบ (flat fan) เป็นต้น

4. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารและอุปกรณ์ที่ใช้ในตู้ปลอดเชื้อ เช่น เครื่องชั่ง ตู้อบไมโครเวฟ เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องปั่นเหวี่ยง เตาอบความร้อน ขวดรูปชมพู่ ขวดวัดปริมาตร บีกเกอร์ จานแก้ว หลอดไซริงจ์ และไมโครปิเปตต์ เป็นต้น

4.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และฮอร์โมนที่ใช้ตามวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละขั้นตอน (รายละเอียดดูในการวิธีการทดลองที่ 2)

4.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เช่น เครื่องควบคุมอุณหภูมิและแสง ชั้นสำหรับวางขวดเนื้อเยื่อ และเครื่องเขย่า เป็นต้น

5. อุปกรณ์และสารเคมีในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS

5.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS เช่น เครื่องปั่นเหวี่ยง เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (รุ่น Beckman couter DU^R 530) เครื่องบ่มอุณหภูมิ (water bath) คอลัมน์ ($Sephadex^{TM}$ G-25; PD-10) (บริษัท Amersham Bioscience) และไมโครปิเปตต์ เป็นต้น

5.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ โดยวิธีของ Sengnil *et al*., 1992; Usui *et al.*, 1992 (รายละเอียดดูในวิธีการทดลองที่ 3.1)

วิธีการ

ในการศึกษาการคัดเลือกและกลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ ได้แบ่งวิธีการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกพันธุ์อ้อยทนทานสารอิมาซาเพอร์ในสภาพไร่ทดลอง

การคัดเลือกในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นในสภาพไร่ทดลอง วางแผนการทดลองแบบ split plot in RCB ทำการทดลอง 3 ซ้ำ กำหนดให้ ปัจจัยหลัก (main plot) คือ อัตราของสารอิมาซาเพอร์ จำนวน 4 อัตรา ได้แก่ 0, 0.156, 0.312 และ 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ส่วนปัจจัยรอง (sub plot) คือ พันธุ์อ้อย จำนวน 27 พันธุ์ (รายละเอียดดูในส่วนของอุปกรณ์) ทำการทดลองและคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ไร่ทดลองของศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายภาคกลาง (แปลงดอนเจดีย์) ต. ดอนเจดีย์ อ. พนมทวน จ. กาญจนบุรี แปลงทดลองทั้งหมด 324 แปลงย่อย ขนาดของแปลงย่อย 1.4 x 2 เมตร ทำ 3 ซ้ำ ทำการปลูกอ้อยโดยใช้พันธุ์อ้อย 2 ลำวางขนานกันในแปลง จากนั้นตัดให้เป็นท่อน ๆ ให้มีตา 3 ตา เมื่ออ้อยมีอายุ 45 วัน หรือมีใบจริง 4-6 ใบ แล้วจึงฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชทั้ง 4 อัตรา

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

1. ความเป็นพิษของสารอิมาซาเพอร์ที่มีต่ออ้อยด้วยสายตา (crop visual injury) หลังจากฉีดพ่นสารที่ 1, 3, 6 เดือน โดยให้คะแนนเป็นเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษที่พืชแสดงอาการ (ตารางที่ 1)

2. วัดความสูงต้นมีหน่วยเป็นเซนติเมตร โดยทำการวัดความสูงจากส่วนของลำต้นที่ระดับพื้น จนถึงจุด Top visible dewlap (TVP) สุ่มวัดความสูงซ้ำละ 1 กอ ๆ ละ 1 ลำที่สูงที่สุดภายในกออ้อย ที่ 6 เดือนหลังจากฉีดพ่นสาร

ตารางที่ 1 การให้คะแนนความเป็นพิษของสารที่พืชแสดงออกหลังจากได้รับสาร

ระดับความเป็นพิษ (เปอร์เซ็นต์)	ลักษณะที่พืชปลูกแสดงออก
0	พืชปกติ
10	เป็นพิษเล็กน้อย ใบมีจุดสีเหลือง
20	เป็นพิษเล็กน้อย แผ่นใบเริ่มมีสีเหลือง
30	เป็นพิษเพิ่มขึ้น แผ่นใบเหลือง มีจุดไหม้
40	เป็นพิษปานกลาง พืชชะงักการเจริญเติบโต
50	เป็นพิษปานกลาง ทำลายพืช 50 เปอร์เซ็นต์
60	เป็นพิษค่อนข้างรุนแรง พืชแคระแกร็น
70	เป็นพิษรุนแรง ใบเริ่มแห้ง ไหม้
80	เป็นพิษรุนแรงมาก ใบไหม้แห้งเกือบทั้งแผ่นใบ
90	พืชแห้งไหม้เกือบทั้งต้น
100	พืชตายอย่างสมบูรณ์

ที่มา : ดัดแปลงจาก Harrison *et al*. (1989)

3. บันทึกข้อมูลจำนวนลำต่อไร่ ที่ 6 เดือนหลังฉีดพ่นสาร โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างอ้อยจากทุกแปลง ตัดเฉพาะบริเวณส่วนเหนือดิน (above-ground part) แล้วนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติต่อไป

การทดลองที่ 2 การคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำพันธุ์อ้อยที่มีแนวโน้มว่ามีความทนทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ได้จากการทดลองที่ 1 จำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ K95-282, K88-92, K97-32, K99-55, K95-87 และ K93-219 มาใช้ในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสและเซลล์แขวนลอย จากนั้นคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับเซลล์แขวนลอย ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

2.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสและเซลล์แขวนลอย

การชักนำให้เกิดแคลลัส โดยนำชิ้นส่วนบริเวณม้วนใบอ่อน (young tightly furled leaves) ของอ้อย อายุ 3 เดือน (Srinivasan and Vasil, 1986; Chen *et al*. 1988) มาลอกเอากาบใบชั้นนอกออก แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 15 เปอร์เซ็นต์ เติมสารจับใบ tween 20 จำนวน 1-2 หยด เขย่าบน shaker นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นลอกกาบใบอ่อนออกอีก 1-2 ชั้น จนเหลือเพียงใบอ่อนชั้นในสุด ตัดเป็นชิ้นขนาดความยาว 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาวางบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร myo-inositol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และ agar powder 7 กรัมต่อลิตร (pH 5.7) นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที (พจมาน และคณะ, 2543; Chen *et al*.,1988; Aftab *et al*., 1996) เพาะเลี้ยงในสภาพที่ไม่มีแสง 3 สัปดาห์ อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ ทุกครั้งที่ทำการเปลี่ยนอาหารจะตัดเฉพาะกลุ่มของแคลลัสนำไปวางบนอาหารใหม่ หลังจากนั้นนำแคลลัสมา 0.50 กรัม น้ำหนักสด ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร เดียวกับที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัส (ไม่เติม agar powder) ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส ทำการย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน เพื่อชักนำให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอยต่อไป

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

1. สังเกตสีและลักษณะแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของอ้อยแต่ละพันธุ์
2. การเติบโตของแคลลัสและเซลล์แขวนลอย หลังจากเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์โดยใช้วิธีการให้คะแนน ดัดแปลงมาจาก Dhaka and Kothri (2002) ดังนี้

-	หมายถึง	ไม่มีการเกิดแคลลัส
+	หมายถึง	มีปริมาณของแคลลัสน้อย
++	หมายถึง	มีปริมาณของแคลลัสปานกลาง
+++	หมายถึง	มีปริมาณของแคลลัสมาก

2.2 ทดสอบการตอบสนองของเซลล์อ้อยที่มีต่อปริมาตรเซลล์เริ่มต้นในปริมาตรต่าง ๆ กัน

นำส่วนของเซลล์แขวนลอยที่เกิดจากการชักนำในขั้นตอนที่ 2.1 ทดสอบปริมาตรเซลล์อ้อยเริ่มต้นและวันที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของอ้อย โดยใช้หลอดวัดปริมาตร (packed cell volume tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร วัดให้ได้ปริมาตรเซลล์เริ่มต้น 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหารเก่าให้ได้ปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ 45 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

วัดปริมาตรเซลล์โดยวิธี packed ell volume (PCV) (Pornprom *et al.*, 2000a) ที่ระยะเวลา 5, 7, 10, 14 และ 21 วันหลังจากย้ายเซลล์ลงเลี้ยงในอาหารเหลวใหม่ นำข้อมูลที่ได้จากค่าเฉลี่ย 3 ค่า มาสร้างกราฟแสดงการเจริญเติบโต (sigmoid curve) เพื่อหาระยะเวลาที่เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงเข้าสู่ช่วง stationary และ decreasing stage จึงทำการย้ายเซลล์ลงเลี้ยงในอาหารเหลวใหม่ในรอบ (cycle) ต่อไป

2.3 ทดสอบการตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

หลังจากที่ได้เซลล์เริ่มต้นและช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการย้ายเซลล์แล้ว จึงทดสอบการตอบสนองของเซลล์อ้อยที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, และ 1 ไมโครโมลาร์ โดยใช้เซลล์เริ่มต้นปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลล์เซียส

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

1. วัดปริมาตรเซลล์ โดยวิธี PCV เช่นเดียวกับการทดลองในการทดลองที่ 2.2 ทำการวัดปริมาตรเซลล์ที่ 14 วัน หลังจากย้ายเซลล์ลงเลี้ยงในอาหารที่เติมสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับ

2.4 การคัดเลือกเซลล์แขวนลอยของอ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์

ทำการคัดเลือกเซลล์อ้อยให้ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ด้วยวิธี Stepwise selection เริ่มจากการคัดเลือกเซลล์ที่มีชีวิตรอดอยู่ได้ในระดับความเข้มข้นของสาร 0.1 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์อ้อยปกติมีการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้ายเซลล์ดังกล่าว (ซึ่งเรียกว่า เซลล์ที่มีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์) นำไปลงเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ จนได้เซลล์อ้อยที่มีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ตามที่ต้องการ หลังจากนั้นพิจารณาการตอบสนองของเซลล์อ้อยที่ต้านทาน (resistant cell) และเซลล์ปกติ (normal cell) ที่ 14 วันหลังจากได้รับสาร ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

1. วัดปริมาตรของเซลล์เริ่มต้นก่อนที่จะย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่โดยใช้ปริมาตรของเซลล์เริ่มต้น 3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีและลักษณะของเซลล์ ทำการบันทึกระยะเวลาที่ทำการชักนำให้เซลล์ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 10, 100 และ 1000 ไมโครโมลาร์

2. วัดดัชนีความต้านทานของเซลล์อ้อย ที่ 14 วันหลังจากได้รับสาร ในระดับความเข้มข้นของสาร 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 1 ไมโครโมลาร์ โดยพิจารณาจาก สมการ ดังนี้

$$\text{Resistance index} = I_{50} \text{ value of resistance cell} / I_{50} \text{ value of normal cell}$$

เมื่อ Resistance index = ดัชนีความต้านทานสาร

I_{50} value of resistance cell = ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์ต้านทานเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

I_{50} value of normal cell = ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์ปกติเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 การศึกษากลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์

ในการศึกษากลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของความต้านทานสาร พิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ต้านทานสารและเซลล์ที่อ่อนแอต่อสาร ซึ่งประยุกต์จากวิธีของ Sengnil *et al*. (1992) และ Usui *et al*. (1992) ขั้นตอนในการศึกษามีดังนี้

3.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ซึ่งมีขั้นตอนในการทดลอง ดังนี้

3.1.1 วิธีการสกัดเอนไซม์

เมื่อเซลล์มีอายุได้ 5 วัน นำตัวอย่างของเซลล์ของอ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยทำการแบ่งตัวอย่างเซลล์ดังกล่าวออกเป็น 4 แบบ คือ เซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N = normal cells without herbicide treatment) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT = normal cells treated with the herbicide) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R = resistant cells without herbicide treatment) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT = resistant cells treated with the herbicide) นำไปกรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นเซลล์มาทำให้แห้ง ตัวอย่างละ 2 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาสกัดด้วย Homogenization buffer 5 มิลลิลิตร (ซึ่งประกอบด้วย potassium phosphate (K_2HPO_4) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 Magnesium chloride ($MgCl_2$) เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ thaiamine pyrophosphate (TPP) เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ flavin adenine dinucleotide (FAD) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และ pyruvic acid เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ glycerol 10 เปอร์เซ็นต์) เติม polyvinylpolypyrrolidone 0.5 กรัม ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยผ้ากรอง 4 ชั้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 27,000 x g เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นดูดเอาสารละลายใสส่วนบน แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ 50 เปอร์เซ็นต์แช่ในน้ำแข็งนาน 60 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนทิ้ง แล้วนำตะกอนที่ได้นั้นละลายด้วย resuspension buffer 5 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 $MaCl_2$ เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ pyruvic acid เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์) จากนั้นทำ desalting โดยใช้ Sephadex G-25

3.1.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ALS

โดยดูดเอาสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เติม reaction buffer ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย potassium phosphate (K_2HPO_4) เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 $MgCl_2$ เข้มข้น 0.625 มิลลิโมลาร์ thaiamine pyrophosphate เข้มข้น 0.625 มิลลิโมลาร์ flavin adenine dinucleotide (FAD) เข้มข้น 1.25 ไมโครโมลาร์ และ pyruvic acid 25 มิลลิโมลาร์) เติมสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย H_2SO_4 ความเข้มข้น 6 N ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (Westerfield, 1945) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม α-naphthol 0.25 มิลลิลิตร (2.5 กรัมต่อลิตรที่ทำละลายใน 2.5 N NaOH) และ creatine 0.25 มิลลิลิตร (5 กรัมต่อลิตร) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g นาน 5 นาที หลังจากนั้นใช้สารละลายใส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

3.1.3 การวัดปริมาณโปรตีนมาตรฐาน

วัดปริมาณโปรตีนมาตรฐาน ตามวิธีของ Bradford (1976) โดยนำ 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 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ แล้วเติมสารละลายโปรตีน Bovine serum albumin ในปริมาตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

หลังจากที่ได้ผลการทดลองในการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของเอนไซม์และโปรตีน นำค่าทั้งสองมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวนค่า ALS activity โดยมีหน่วยเป็นนาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน (nmol (mg protein)$^{-1}$) 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)

สถานที่ทำการทดลอง

1. ไร่ทดลองของศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายภาคกลาง (แปลงดอนเจดีย์) ตำบลดอนเจดีย์ อำเภอพนมทวน จังหวัดกาญจนบุรี

2. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2546 และสิ้นสุดการทดลองในเดือนเดือนธันวาคม 2549

ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกพันธุ์อ้อยทนทานสารอิมาซาเพอร์ในสภาพไร่ทดลอง

ในการคัดเลือกพันธุ์อ้อยทนทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับที่เป็นต้นพืชในสภาพไร่ทดลอง ได้พิจารณาลักษณะการตอบสนองทางสรีรวิทยาของอ้อยที่มีต่อสาร โดยการประเมินลักษณะของความทนทานต่อสารจากข้อมูลพื้นฐานต่าง ๆ ประกอบด้วย เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของพืชที่มีต่อสาร ความสูง และจำนวนลำต่อไร่ ซึ่งผลการทดลองที่ระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับสาร มีดังนี้

เมื่อพิจารณาจากอาการที่อ้อยได้รับพิษหลังจากฉีดพ่นสารอิมาซาเพอร์ที่ 1 เดือนหลังจากได้รับสาร (ตารางที่ 2) พบว่า การใช้สารในอัตรา 0.156 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ สารมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษอยู่ในช่วง 36.67-50.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้สารที่อัตรา 0.312 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 40-50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อมีการใช้สารในอัตรา 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษอยู่ในช่วง 50-60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของพืชที่มีต่อสารที่ 3 เดือนหลังจากได้รับสาร (ตารางที่ 3) พบว่า การใช้สารอัตรา 0.156 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ อ้อยได้รับพิษจากสารอยู่ในช่วง 46.67-63.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้สารที่อัตรา 0.312 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษมากขึ้นอยู่ในช่วง 56.67-73.33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้สารอัตรา 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษอยู่ในช่วง 66.67-90 เปอร์เซ็นต์ และพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของพืชที่มีต่อสารหลังจากฉีดพ่นสารอิมาซาเพอร์ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร (ตารางที่ 4) พบว่า การใช้สารในอัตรา 0.156 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ สารมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษอยู่ในช่วง 20-43.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้สารที่อัตรา 0.312 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษมากขึ้นอยู่ในช่วง 33.33-70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อมีการใช้สารในอัตรา 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษอยู่ในช่วง 46.67-90 เปอร์เซ็นต์

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนจากการประเมินความเป็นพิษของสารอิมาซาเพอร์ด้วยสายตาที่ 1, 3 และ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร (ตารางผนวกที่ 2-4) พบว่า อ้อยแต่ละพันธุ์และการใช้สารแต่ละอัตราจะมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ และทั้งสองปัจจัยไม่มีปฏิกิริยาสัมพันธ์กัน

จากผลข้างต้นระดับความรุนแรงของอาการที่อ้อยได้รับพิษจากสาร จะมีระดับความรุนแรงที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ และแต่ละอัตราของสารที่ได้รับ ซึ่งพันธุ์อ้อยที่จัดว่ามีแนวโน้มว่ามีความทนทานต่อสาร จะมีการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบต่อไปได้ จะเห็นได้จากเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของพืชที่มีต่อสารเฉลี่ยจากทุกความเข้มข้นในอ้อยพันธุ์ K95-282, K88-92, K97-32, K99-55, K95-87 และ K93-219 ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร มีอัตราลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 3 เดือนหลังจากได้รับสาร ในขณะที่อ้อยพันธุ์ K99-5, K99-72, K99-85, K97-33 และ K97-27 แสดงอาการได้รับพิษเพิ่มขึ้น ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้และตายหลังจากได้รับสาร (ตารางที่ 3 และ 4) ในการทดลองของ Bailey and Wilcut (2003) พบว่า การใช้สารไดคลอซูแลมที่อัตรา 18, 27 และ 36 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ที่ 10-11 สัปดาห์หลังปลูกข้าวโพดพันธุ์ Pioneer 3242 ที่ต้านทานสารกลุ่มอิมิดาโซลิโนน แสดงอาการได้รับพิษจากสารน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พันธุ์ Pioneer 3223 ที่อ่อนแอต่อสารแสดงอาการได้รับพิษ 73-94 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารอิมาซาเพอร์ที่มีต่ออ้อย 27 พันธุ์ โดยวิธีประเมินด้วยสายตา ที่ 1 เดือนหลังจากได้รับสาร

พันธุ์	ความเป็นพิษ (เปอร์เซ็นต์)[1/] อัตราสารอิมาซาเพอร์ (กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์)				ค่าเฉลี่ย
	0	0.156	0.312	0.625	
K84-200	0	47 ab	50 ab	57 ab	38.33 AB
K88-92	0	40 cd	47 bc	50 b	34.14 C-F
K92-80	0	40 cd	43 bc	50 b	33.33 DEF
K92-213	0	50 a	50 ab	60 a	40.00 A
K93-219	0	40 cd	50 ab	53 ab	35.83 B-E
K93-347	0	40 cd	40 d	50 b	32.50 EF
K95-84	0	43 bc	50 ab	53 ab	36.67 BCD
K95-87	0	43 bc	50 ab	57 a	37.50 ABC
K95-156	0	40 cd	47 bc	50 b	34.17 C-F
K95-161	0	40 cd	43 cd	50 b	33.33 DEF
K95-234	0	40 cd	40 d	50 b	32.50 EF
K95-282	0	37 d	43 cd	53 ab	33.33 DEF
K95-283	0	40 cd	50 ab	57 ab	36.67 BCD
K97-27	0	40 cd	50 ab	57 ab	36.67 BCD
K97-29	0	40 cd	47 bc	53 ab	35.00 B-E
K97-32	0	37 d	40 d	50 b	31.67 F
K97-33	0	40 cd	50 ab	57 ab	36.67 BCD
K99-5	0	40 cd	47 bc	53 ab	35.00 B-E
K99-45	0	40 cd	50 ab	50 b	35.00 B-E
K99-49	0	43 bc	50 ab	57 ab	37.50 ABC
K99-55	0	43 bc	53 a	57 ab	38.33 AB
K99-56	0	40 cd	50 ab	57 ab	36.67 BCD
K99-59	0	43 bc	47 bc	53 ab	35.83 B-E
K99-61	0	40 cd	43 cd	53 ab	34.17 C-F
K99-72	0	40 cd	47 bc	57 ab	35.83 B-E
K99-82	0	40 cd	50 ab	53 ab	35.83 B-E
K99-85	0	40 cd	50 ab	53 ab	35.83 B-E
ค่าเฉลี่ย	0 D	40.99 C	47.28 B	53.70 A	
C.V. (%) อัตราสาร			8.33		
C.V. (%) พันธุ์อ้อย			9.59		

[1/] เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษ (visual rating): 0 = no injury และ 100 = complete death

Duncan's Multiple Range Test (0.01) อัตราสาร 4102.92

Duncan's Multiple Range Test (0.01) พันธุ์อ้อย 4.16

Duncan's Multiple Range Test (0.01) อัตราสาร x พันธุ์อ้อย NS

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารอิมาซาเพอร์ที่มีต่ออ้อย 27 พันธุ์ โดยวิธีประเมินด้วยสายตา ที่ 3 เดือนหลังจากได้รับสาร

พันธุ์	ความเป็นพิษ (เปอร์เซ็นต์)[1/] อัตราสารอิมาซาเพอร์ (กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์)				ค่าเฉลี่ย
	0	0.156	0.312	0.625	
K84-200	0	57 abc	67 abc	67 e	47.50 BCD
K88-92	0	50 cd	57 d	67 e	43.33 E
K92-80	0	57 abc	67 abc	73 cde	49.17 BCD
K92-213	0	57 abc	67 abc	77 b-e	50.00 A-D
K93-219	0	60 ab	70 ab	73 cde	50.83 A-D
K93-347	0	57 abc	63 bcd	73 cde	48.33 BCD
K95-84	0	60 ab	67 abc	73 cde	50.00 A-D
K95-87	0	60 ab	67 abc	80 a-d	51.67 ABC
K95-156	0	47 d	67 abc	77 b-e	45.84 DE
K95-161	0	57 abc	70 ab	77 b-e	50.83 A-D
K95-234	0	53 bcd	63 bcd	73 cde	47.50 B-E
K95-282	0	53 bcd	63 bcd	70 de	49.17 A-D
K95-283	0	57 abc	67 abc	83 abc	51.67 ABC
K97-27	0	60 ab	73 a	83 abc	54.17 A
K97-29	0	53 bcd	67 abc	77 b-e	49.17 A-D
K97-32	0	53 bcd	63 bcd	77b-e	48.33 BCD
K97-33	0	57 abc	70 ab	90 a	54.17 A
K99-5	0	60 ab	70 ab	87 ab	54.17 A
K99-45	0	57 abc	70 ab	70 de	49.17 A-D
K99-49	0	60 ab	70 ab	80 a-d	52.50 ABC
K99-55	0	53 bcd	67 abc	73 cde	48.33 BCD
K99-56	0	57 abc	70 ab	73 cde	50.00 A-D
K99-59	0	57 abc	67 abc	77 b-e	50.00 A-D
K99-61	0	53 bcd	63 bcd	73 cde	47.50 CDE
K99-72	0	53 bcd	70 ab	83 abc	51.67 ABC
K99-82	0	63 a	67 abc	80 a-d	52.50 AB
K99-85	0	57 abc	67 abc	83 abc	52.50 ABC
ค่าเฉลี่ย	0 D	56.42C	66.67B	76.67A	
C.V. (%) อัตราสาร			18.31		
C.V. (%) พันธุ์อ้อย			10.58		

[1/] เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษ (visual rating): 0 = no injury และ 100 = complete death

Duncan's Multiple Range Test (0.01) อัตราสาร 3401.68

Duncan's Multiple Range Test (0.01) พันธุ์อ้อย 3.02

Duncan's Multiple Range Test (0.01) อัตราสาร x พันธุ์อ้อย NS

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของสารอิมาซาเพอร์ที่มีต่ออ้อย 27 พันธุ์ โดยวิธีประเมินด้วยสายตา ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร

พันธุ์	ความเป็นพิษ (เปอร์เซ็นต์)[1/] อัตราสารอิมาซาเพอร์ (กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์)				ค่าเฉลี่ย
	0	0.156	0.312	0.625	
K84-200	0	37 ab	50 a-e	57 bc	24.59 I
K88-92	0	27 bc	40 cde	47 c	28.34 HI
K92-80	0	33 abc	57 a-e	57 bc	36.67 D-G
K92-213	0	37 ab	47 a-e	73 ab	39.17 B-G
K93-219	0	37 ab	60 a-d	67 abc	40.84 A-G
K93-347	0	30 abc	47 a-e	67 abc	35.84 D-I
K95-84	0	30 abc	47 a-e	63 bc	35.00 E-I
K95-87	0	33 abc	33 e	77 ab	32.49 GHI
K95-156	0	37 ab	60 a-d	77 ab	43.34 A-G
K95-161	0	40 ab	63 abc	77 ab	38.33 A-E
K95-234	0	33 abc	53 a-e	67 abc	38.33 C-H
K95-282	0	20 c	37 de	47 c	37.50 A-E
K95-283	0	37 ab	53 a-e	77 ab	41.67 A-E
K97-27	0	43 a	70 a	90 a	50.83 A
K97-29	0	33 abc	43 b-e	63 bc	34.99 E-I
K97-32	0	33 abc	63 abc	77 ab	43.33 A-G
K97-33	0	33 abc	70 a	90 a	48.33 ABC
K99-5	0	33 abc	53 a-e	90 a	36.67 A-F
K99-45	0	30 abc	53 a-e	60 bc	35.83 D-I
K99-49	0	33 abc	50 a-e	77 ab	40.00 B-G
K99-55	0	33 abc	47 a-e	53 bc	33.33 F-I
K99-56	0	27 bc	43 b-e	60 bc	32.50 GHI
K99-59	0	37 ab	57 a-e	77 ab	42.50 A-G
K99-61	0	37 ab	60 a-d	70 abc	41.67 A-G
K99-72	0	33 abc	63 abc	90 a	46.67 A-D
K99-82	0	37 ab	57 a-e	73 ab	41.67 A-G
K99-85	0	40 ab	57 a-e	90 a	49.17 AB
ค่าเฉลี่ย	0 D	33.83 C	53.33 B	70.25 A	
C.V. (%) อัตราสาร			68.45		
C.V. (%) พันธุ์อ้อย			27.97		

[1/] เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษ (visual rating): 0 = no injury และ 100 = complete death

Duncan's Multiple Range Test (0.01) อัตราสาร 608.31

Duncan's Multiple Range Test (0.01) พันธุ์อ้อย 3.62

Duncan's Multiple Range Test (0.01) อัตราสาร x พันธุ์อ้อย NS

เมื่อพิจารณาทางด้านความสูงเฉลี่ยของอ้อยแต่ละพันธุ์ พบว่า ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร อ้อยจะมีความสูงแตกต่างกัน กล่าวคือ อ้อยที่ได้รับสารในอัตรา 0.156, 0.312 และ 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ จะมีเปอรเซ็นต์ความสูงเฉลี่ยน้อยกว่าอ้อยพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร และความสูงจะลดลงตามอัตราสารที่สูงขึ้น จากตารางที่ 5 แสดงความสูงของอ้อยเปรียบเทียบที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร พบว่า ความสูงของอ้อยทุกพันธุ์หลังจากได้รับสารที่อัตรา 0.156, 0.312 และ 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ มีความสูงประมาณ 73-99, 38-73 และ 0-70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่สารอัตรา 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ อ้อยพันธุ์ K95-282, K88-92, K97-32, K99-55, K93-219 และ K95-87 สูง 59, 55, 47, 53, 47 และ 54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอ้อยพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร ในขณะที่อ้อยพันธุ์ K99-5, K99-85, K97-33 และ K97-27 ไม่สามารถวัดความสูงได้ เช่นเดียวกับการลดลงของความสูงของยูคาลิปตัสหลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่อัตรา 0.254 ไมโครลิตรต่อลิตร นาน 1 เดือน ทำให้ยูคาลิปตัสพันธุ์ GE463 มีความสูงลดลง 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับยูคาลิปตัสพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร (Silva *et al*. 2004) และ Bailey and Wilcut (2003) ได้ทำการทดลองโดยใช้สารอะทราซีนร่วมกับสารเมทโทลาคลอและไดคลอซูแลมที่อัตรา 18, 27 และ 36 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ที่ 10-11 สัปดาห์หลังปลูก พบว่า ข้าวโพดพันธุ์ Pioneer 3223 ที่อ่อนแอต่อสารในกลุ่มอิมิดาโซลิโนน แสดงอาการลำต้นแคระแกร็น 60-87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกันข้าวโพดพันธุ์ Pioneer 3242 ที่ต้านทานสารในกลุ่มอิมิดาโซลิโนน

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ของความสูงอ้อยเปรียบเทียบที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร (ตารางผนวกที่ 5) พบว่า อ้อยแต่ละพันธุ์ และการใช้สารอิมาซาเพอร์ในแต่ละอัตรา จะมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีปฏิกิริยาสัมพันธ์กันระหว่างปัจจัยทั้งสอง

เมื่อพิจารณาจำนวนลำต่อไร่เฉลี่ยของอ้อยแต่ละพันธุ์ อ้อยจะมีจำนวนลำต่อไร่แตกต่างกันอย่างชัดเจน กล่าวคือ อ้อยที่ได้รับสารในอัตรา 0.156, 0.312 และ 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ จะมีจำนวนลำต่อไร่น้อยกว่าอ้อยพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร (ตารางที่ 6) ซึ่งจะเห็นได้ว่าอ้อยมีจำนวนลำต่อไร่ลดลงตามอัตราสารอิมาซาเพอร์ที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่ออ้อยได้รับสารในอัตราต่าง ๆ ทำให้อ้อยพันธุ์ K95-282, K88-92, K97-32, K99-55, K93-219 และ K95-87 มีจำนวนลำต่อไร่เปรียบเทียบเฉลี่ย 80.33, 75.49, 73.16, 74.60, 62.06 และ 70.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอ้อยพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร ในขณะที่อ้อยพันธุ์ K99-5, K99-72, K99-85, K97-33 และ K97-27 มีจำนวนลำต่อไร่เปรียบเทียบเฉลี่ย 60.12, 56.33, 61.83, 56.49 และ 48.15

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอ้อยพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสารโดยที่ Bailey and Wilcut (2003) ได้ทำการศึกษาการตอบสนองรของพันธุ์ข้าวโพดพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสารไดคลอซูแลม พบว่า พันธุ์ Pioneer 3242 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนทานจะมีผลผลิตลดลง 15 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พันธุ์ Pioneer 3223 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสาร จะมีผลผลิตลดลง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้สารอะทราซีนร่วมกับสารเมทโทลาคลอและสารไดคลอซูแลม อัตรา 36 กรัมต่อเฮกตาร์ เมื่อเทียบกับข้าวโพดพันธุ์เดียวกันที่ฉีดพ่นสารอะทราซีนร่วมกับสารเมทโทลาคลออย่างเดียว

จากการคัดเลือกพันธุ์อ้อยทนทานต่อสารอิมาซาเพอร์ในสภาพไร่ทดลอง จะเห็นได้ว่าสามารถจัดกลุ่มระดับความทนทานของพันธุ์อ้อยได้ โดยพิจารณาจากค่า I_{50} ของเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษของพืชที่มีต่อสาร ที่ 1, 3 และ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร ความสูงเปรียบเทียบ และจำนวนลำต่อไร่เปรียบเทียบ ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร โดยกลุ่มของพันธุ์อ้อยที่มีแนวโน้มว่าทนทานต่อสารมากที่สุดได้แก่ K95-282, K88-92, K97-32, K99-55, K95-87 และ K93-219 ส่วนอ้อยพันธุ์ K99-45, K84-200, K99-56, K92-80, K95-283, K95-161, K93-347, K99-59, K99-61, K95-156, K95-84, K95-234, K99-82, K92-213, K97-29 และ K99-49 จัดเป็นกลุ่มของพันธุ์อ้อยที่มีแนวโน้มมีความทนทานต่อสารระดับปานกลาง และกลุ่มของพันธุ์อ้อยที่มีแนวโน้มว่าอ่อนแอต่อสาร ได้แก่ พันธุ์ K99-5, K99-72, K99-85, K97-33 และ K97-27 ตามลำดับ (ภาพที่ 3 และตารางผนวกที่ 7)

นอกจากนี้ลักษณะของกลไกต่าง ๆ ภายในพืช เช่น กลไกทางชีวเคมี รวมทั้งลักษณะทางพันธุกรรม ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของพืชที่ทำให้เกิดควาทนทานต่อสารได้ ซึ่งพืชอาจมีกลไกในการทำลายสารพิษ หรือลดความรุนแรง หรือลดความรุนแรงของสารพิษที่ได้รับหลายกลไก เช่น การเปลี่ยนแปลงเป้าหมาย (target-site modification) การสร้างเป้าหมายเพิ่มมากขึ้น (target-site overproduction) การไม่ตอบสนองต่อสาร (less sensitive) และการย่อยสลายสารกำจัดวัชพืช (metabolic inactivation of herbicide) ดังนั้น การศึกษาในขั้นต่อไปจึงได้นำอ้อยที่มีแนวโน้มว่ามีความทนทานต่อสารที่ได้จากการคัดเลือกในสภาพไร่ทดลอง คือ พันธุ์ K95-282, K88-92, K97-32, K99-55, K95-87 และ K93-219 ไปชักนำและคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในสภาพเซลล์แขวนลอยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อ้อยต้านทานและเซลล์อ้อยปกติ เพื่อเป็นดัชนีในการอธิบายกลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยที่มีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ต่อไป

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ความสูงเปรียบเทียบของอ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร

พันธุ์	ความสูง (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม)[1/]				เฉลี่ย
	อัตราสารอิมาซาเพอร์ (กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์)				
	0	0.156	0.312	0625	
K84-200	100	79 ab	60 ab	50 ab	72.14 B-E
K88-92	100	76 b	73 a	55 ab	76.13 AB
K92-80	100	73 b	66 ab	57 ab	74.06 B-E
K92-213	100	76 b	60 ab	34 ab	66.29 DEF
K93-219	100	77 b	68 a	47 ab	72.95 EF
K93-347	100	85 ab	53 ab	45 ab	70.77 ABC
K95-84	100	82 ab	63 ab	28 b	68.28 B-E
K95-87	100	85 ab	59 ab	54 ab	74.49 B-E
K95-156	100	86 ab	67 a	43 ab	74.23 C-F
K95-161	100	84 ab	55 ab	35 ab	68.76 C-F
K95-234	100	84 ab	52 ab	30 b	66.52 C-F
K95-282	100	99 a	68 a	59 ab	81.51 AB
K95-283	100	85 ab	59 ab	70 a	78.41 C-F
K97-27	100	80 ab	48 ab	ND[2/]	57.14 F
K97-29	100	88 ab	72 a	43 ab	75.74 CDE
K97-32	100	82 ab	53 ab	53 ab	72.10 B-E
K97-33	100	87 ab	38 b	ND	56.30 EF
K99-5	100	82 ab	58 ab	ND	39.29 C-F
K99-45	100	94 ab	56 ab	56 ab	62.73 A-D
K99-49	100	88 ab	53 ab	39 ab	54.08 EF
K99-55	100	83 ab	72 a	47 ab	64.67 ABC
K99-56	100	90 ab	64 ab	64 ab	69.67 ABC
K99-59	100	83 ab	48 ab	28 b	69.47 A
K99-61	100	76 ab	65 ab	37 ab	46.85 CDE
K99-72	100	78 ab	64 ab	ND	41.73 EF
K99-82	100	81 ab	56 ab	29 b	50.47 B-E
K99-85	100	78 ab	64 ab	ND	41.42 EF
ค่าเฉลี่ย	100 A	83.21 B	59.61 C	37.15 D	
C.V. (%) อัตราสาร			68.45		
C.V. (%) พันธุ์อ้อย			27.76		

[1/]ความสูง = (ความสูงที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร x100)/ ความสูงอ้อยพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร)

[2/]Abbrevation: ND = Not determined

Duncan's Multiple Range Test (0.01) อัตราสาร 237.94

Duncan's Multiple Range Test (0.01) พันธุ์อ้อย 1.57

Duncan's Multiple Range Test (0.01) อัตราสาร x พันธุ์อ้อย NS

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์จำนวนลำต่อไร่เปรียบเทียบของอ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร

พันธุ์	จำนวนลำต่อไร่ (เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม)[1/]				เฉลี่ย
	อัตราสารอิมาซาเพอร์ (กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์)				
	0	0.156	0.312	0.625	
K84-200	100	72 ab	46 abc	49 a	66.59 A-G
K88-92	100	60 ab	89 ab	53 a	75.49 AB
K92-80	100	81 ab	63 a-e	42 a	71.42 A-G
K92-213	100	64 ab	58 a-e	9 a	57.72 A-I
K93-219	100	63 ab	69 a-e	16 a	62.06 A-G
K93-347	100	98 ab	80 abc	28 a	76.64 A
K95-84	100	81 ab	83 abc	10 a	68.45 ABC
K95-87	100	82 ab	72 a-e	30 a	70.95 A-F
K95-156	100	91 ab	79 abc	12 a	70.41 E-I
K95-161	100	83 ab	69 a-e	29 a	70.29 B-I
K95-234	100	88 ab	50 a-e	10 a	62.18 A-I
K95-282	100	101 ab	74 abc	48 a	80.83 A-D
K95-283	100	78 ab	52 a-e	35 a	66.38A-H
K97-27	100	67 ab	25 d	ND[2/]	48.15 I
K97-29	100	65 b	64 a-e	24 a	63.26 A-I
K97-32	100	92 ab	66 a-e	34 a	73.16 C-I
K97-33	100	94 ab	32 cd	ND	56.49 GHI
K99-5	100	92 ab	48 bcd	ND	60.12 A-G
K99-45	100	101 ab	53 bcd	37 a	72.94 A-G
K99-49	100	70 b	46 bcd	4 a	54.82 GHI
K99-55	100	74 ab	73 bcd	52 a	74.60 A-E
K99-56	100	113 a	98 a	42 a	88.09 A-F
K99-59	100	92 ab	52 bcd	16 a	65.02 A-F
K99-61	100	92 ab	81 abc	12 a	71.39 HI
K99-72	100	73 ab	52 a-d	ND	56.33 F-I
K99-82	100	92 ab	66 a-d	10 a	66.92 A-I
K99-85	100	76 ab	72 a-d	ND	61.83 D-I
ค่าเฉลี่ย	100 A	82.79 B	63.44 C	22.29 D	
C.V. (%) อัตราสาร			68.45		
C.V. (%) พันธุ์อ้อย			27.97		

[1/]จำนวนลำต่อไร่ = (จำนวนลำที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร x 100)/จำนวนลำของอ้อยพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร)

[2/]Abbrevation: ND = Not determined

Duncan's Multiple Range Test (0.01) อัตราสาร 146.32

Duncan's Multiple Range Test (0.01) พันธุ์อ้อย 1.64

Duncan's Multiple Range Test (0.01) อัตราสาร x พันธุ์อ้อย NS

(ก)

0 0.156 0.312 0.625

(ข)

0 0.156 0.312 0.625

ภาพที่ 3 ลักษณะของอ้อยพันธุ์ทนทานพันธุ์ K95-282 (ก) และพันธุ์อ่อนแอ K97-27 (ข) ที่ 3 เดือน หลังจากได้รับสารในอัตรา 0, 0.156, 0.312 และ 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์

การทดลองที่ 2 การคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส

เมื่อได้พันธุ์อ้อยที่มีแนวโน้มว่ามีความทนทานต่อสารอิมาซาเพอร์จากการคัดเลือกในสภาพไร่ทดลองแล้ว นำพันธุ์อ้อยเหล่านั้นมาชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสและเซลล์แขวนลอย แล้วจึงทำการชักนำและคัดเลือกเซลล์ให้มีความต้านทานสารอิมาซาเพอร์ต่อไป ซึ่งผลการทดลองมีดังนี้

เมื่อนำชิ้นส่วนบริเวณใบม้วนอ่อนของอ้อยจำนวน 6 พันธุ์ คือ K95-282, K88-92, K97-32, K99-55, K95-87 และ K93-219 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์ MS สูตรดัดแปลง พบว่าอ้อยทั้ง 6 พันธุ์ ดังกล่าวในข้างต้น สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ โดยที่ชิ้นส่วนบริเวณใบม้วนอ่อนจะมีการพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสบริเวณผิวและรอยตัดหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ เนื้อเยื่อจะมีการเจริญเติบโตมากขึ้นจนกระทั่งอายุได้ 6 สัปดาห์ โดยที่พันธุ์อ้อยแต่ละพันธุ์ มีลักษณะการเกิดแคลลัสที่แตกต่างกัน ดังนี้ พันธุ์ K95-28, K97-32 และ K99-55 เป็นพันธุ์ที่มีปริมาณการเกิดแคลลัสมากที่สุด เมื่อเทียบกับทั้ง 3 พันธุ์ที่เหลือ แต่มีความแตกต่างกันในด้านลักษณะของแคลลัส (ตารางที่ 7) กล่าวคือ พันธุ์ K95-282 มีลักษณะของเซลล์ที่เกาะกันแน่น (compact callus) มีสีเหลืองอ่อน มีลักษณะแห้ง ไม่เป็นเมือก เมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ พบว่า เริ่มมีจุดกำเนิดยอดสีเขียวบนชิ้นส่วน พันธุ์ K88-92 มีลักษณะของแคลลัสที่เกาะกันแน่น (compact callus) สีน้ำตาลและพบลักษณะเป็นเมือกเหลว มีปริมาณการเกิดแคลลัสน้อย แคลลัสพันธุ์ K97-32 มีลักษณะของเซลล์ที่เกาะกันแบบหลวม ๆ (friable callus) สีเหลืองอ่อน มีลักษณะแห้ง ไม่มีเมือกเหลว พันธุ์ K99-55 มีลักษณะของแคลลัสที่เกาะกันแน่น (compact callus) ผสมกับเซลล์ที่เกาะกันแบบหลวม ๆ (friable callus) ด้านล่างของก้อนแคลลัสมีลักษณะฉ่ำน้ำ ส่วนด้านบนแคลลัสเกาะกันแน่นสีเหลืองอ่อน พันธุ์ K95-87 มีลักษณะของเซลล์ที่เกาะกันแบบหลวม ๆ (friable callus) สีน้ำตาล พบลักษณะเป็นเมือกเหลว มีปริมาณการเกิดแคลลัสน้อย และพันธุ์ K93-219 มีลักษณะของเซลล์ที่เกาะกันแน่น (compact callus) ผสมกับเซลล์ที่เกาะกันแบบหลวม ๆ (friable callus) สีเหลืองอ่อนและสีน้ำตาล มีประมาณการเกิดแคลลัสปานกลาง ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นนั้นส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้ 2,4-D ที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง George (1993) กล่าวว่า การตอบสนองของพืชต่อ 2,4-D มีผลทำให้ลักษณะของแคลลัสแตกต่างกันได้ ซึ่งผลดังกล่าวขึ้นอยู่กับลักษณะประจำพันธุ์และชนิดของพืช

ตารางที่ 7 การเกิดแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ K95-282, K88-92, K 97-32, K99-55, K95-87 และ K93-219 หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์

พันธุ์	ชิ้นส่วน	แคลลัส			เซลล์แขวนลอย
		ปริมาณ[1/]	ลักษณะ[2/]	สี[2/]	
K95-282	ใบม้วน	+++	C	Y	++
K88-92	ใบม้วน	+	C	B	_
K97-32	ใบม้วน	+++	F	Y	++
K99-55	ใบม้วน	+++	M	Y	++
K95-87	ใบม้วน	+	F	B	+
K93-219	ใบม้วน	++	M	YB	+

[1/] การให้คะแนนแคลลัส

_	หมายถึง	ไม่เกิดแคลลัส/ เซลล์แขวนลอย
+	หมายถึง	มีปริมาณของแคลลัส/ เซลล์แขวนลอยน้อย
++	หมายถึง	มีปริมาณของแคลลัส/ เซลล์แขวนลอยปานกลาง
+++	หมายถึง	มีปริมาณของแคลลัส/ เซลล์แขวนลอยมาก

[2/] ลักษณะของแคลลัส

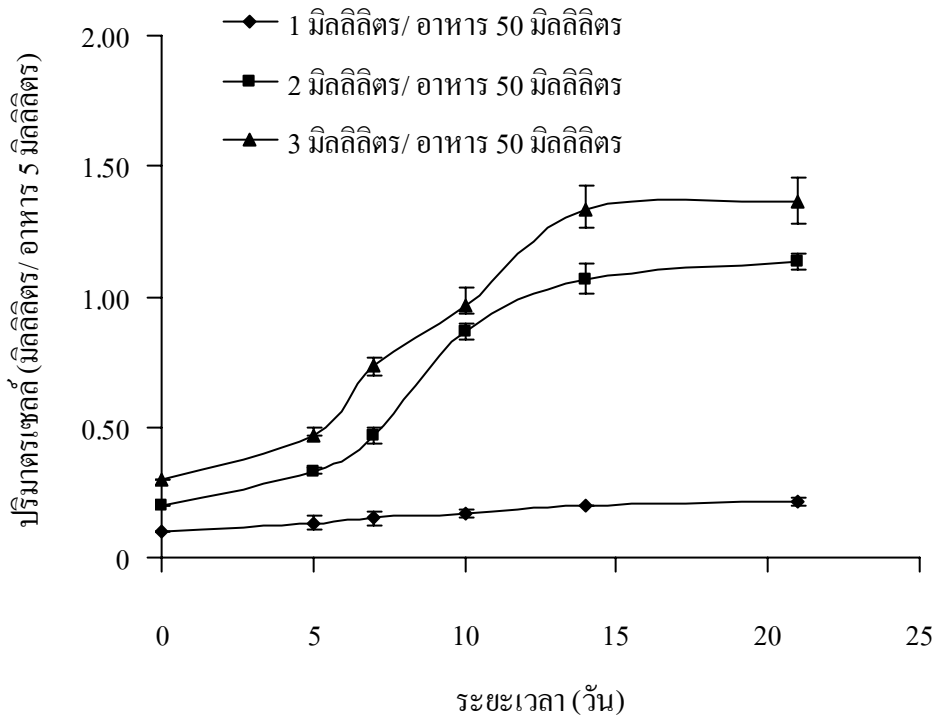
C	หมายถึง	แคลลัสที่เกาะกันแน่น (compact callus)
F	หมายถึง	แคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ (friable callus)
M	หมายถึง	แคลลัสที่มีลักษณะของ C และ F ผสมกัน
Y	หมายถึง	แคลลัสที่มีสีเหลืองอ่อน
B	หมายถึง	แคลลัสที่มีสีน้ำตาล
YB	หมายถึง	แคลลัสที่มีสีน้ำตาลและสีเหลืองรวมกัน

2.2 การชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอย

เมื่อทำการชักนำแคลลัสของอ้อยทั้ง 6 พันธุ์ ได้ในปริมาณที่มากตามต้องการแล้ว นำมาชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง และนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่านาน 6 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสทั้ง 6 พันธุ์จะเกิดการแยกตัวและกระจายออกจากกันได้แตกต่างกัน โดยที่แคลลัสของอ้อยพันธุ์ K95-282, K97-32 และ K99-55 จะเกิดการแยกตัวเป็นเซลล์เดี่ยวและ/หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กได้ง่าย เซลล์มีสีเหลือง มีปริมาณการเกิดแคลลัสปานกลาง และมีการเกิดเป็นก้อนของแคลลัสด้วย ส่วนเซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ K93-219 และ K95-87 มีปริมาณการเกิดเซลล์เดี่ยวและ/หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กปริมาณน้อยและมีการเกิดเป็นก้อนของแคลลัส ส่วนอ้อยพันธุ์ K88-92 ไม่เกิดเป็นเซลล์เดี่ยวและ/หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก อาจเนื่องจากก้อนแคลลัสที่นำมาชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยมีลักษณะเป็นเมือกและมีสีน้ำตาลจึงไม่มีการเกิดเซลล์ใหม่ (ตารางที่ 7)

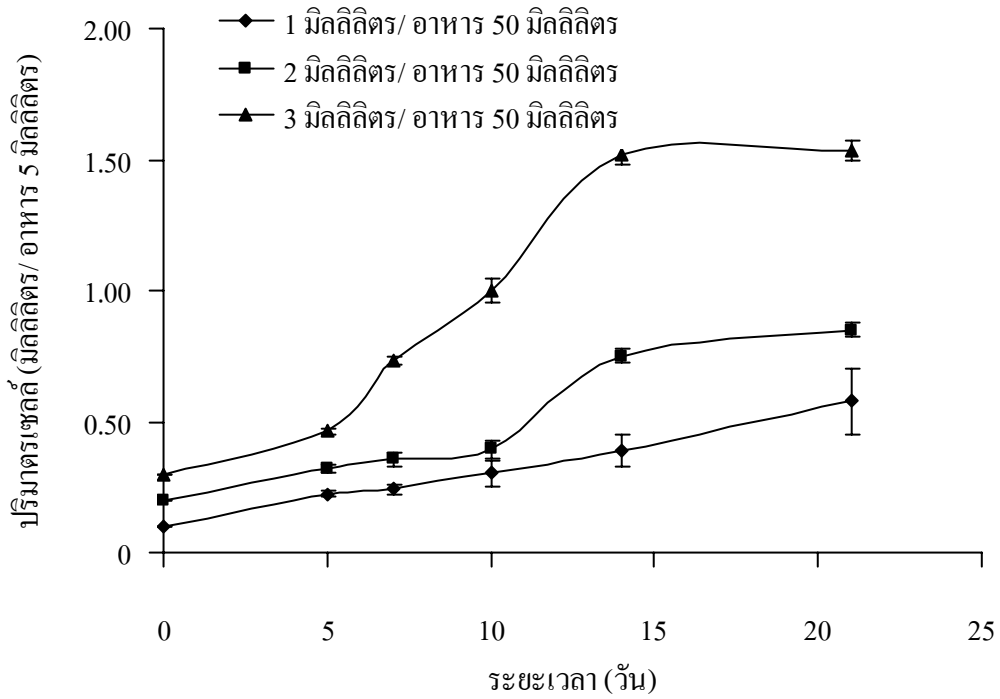
ในการเกิดเซลล์แขวนลอยจะเกิดจากการแยกตัวและกระจายตัวออกจากกันของแคลลัสเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เมื่อได้รับแรงเหวี่ยงของเครื่องเขย่า ลักษณะของแคลลัสที่เหมาะสมสำหรับการนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์แขวนลอย ควรมีลักษณะเป็น friable callus ที่จะทำให้ได้เซลล์แขวนลอยที่เป็นเซลล์เดี่ยวได้ง่ายและมีการเติบโตอย่างรวดเร็ว (Evans *et al*., 2003) ผลการทดลองในตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่า เซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ K95-282, K97-32 และ K99-55 มีลักษณะของเกิดเซลล์แขวนลอยปริมาณน้อยเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ แต่มากกว่าพันธุ์ K88-92, K95-87 และ K93-219 ดังนั้นจึงต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงได้ศึกษาการเพิ่มปริมาตรของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมในพันธุ์ K95-282, K97-32 และ K99-55

หลังจากชักนำได้เซลล์แขวนลอยของอ้อยในปริมาณที่มากพอ แล้วนำไปทำการคัดเลือกเซลล์ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ โดยพิจารณาปริมาตรของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K95-282, K97-32 และ K99-55 พบว่า การใช้ปริมาตรเซลล์เริ่มต้น 1, 2 และ 3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร ที่ 21 วัน เซลล์มีการเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 0.22, 1.13 และ 1.37 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลลิลิตร ในเซลล์อ้อยพันธุ์ K95-282 ในขณะที่พันธุ์ K97-32 มีปริมาตรเซลล์ 0.58, 0.85 และ 1.53 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลลิลิตร และพันธุ์ K99-55 มีปริมาตรเซลล์ 0.27, 0.68 และ 1.45 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-6)



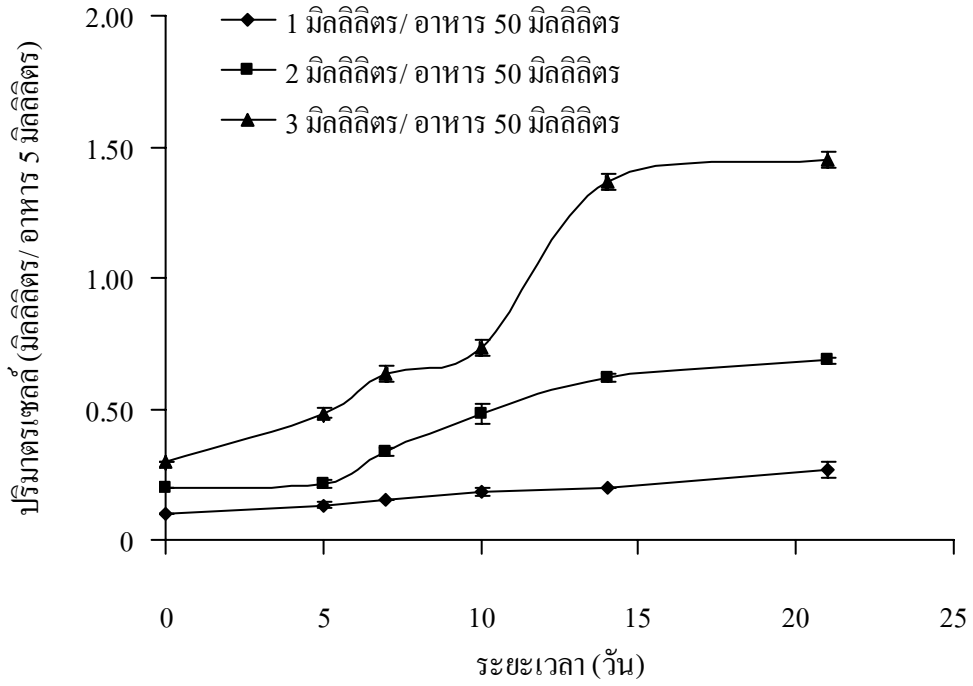
ภาพที่ 4 การเติบโตของเซลล์อ้อยพันธุ์ K95-282 ในช่วง 0, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน

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



ภาพที่ 5 การเติบโตของเซลล์อ้อยพันธุ์ K97-32 ในช่วง 0, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน

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



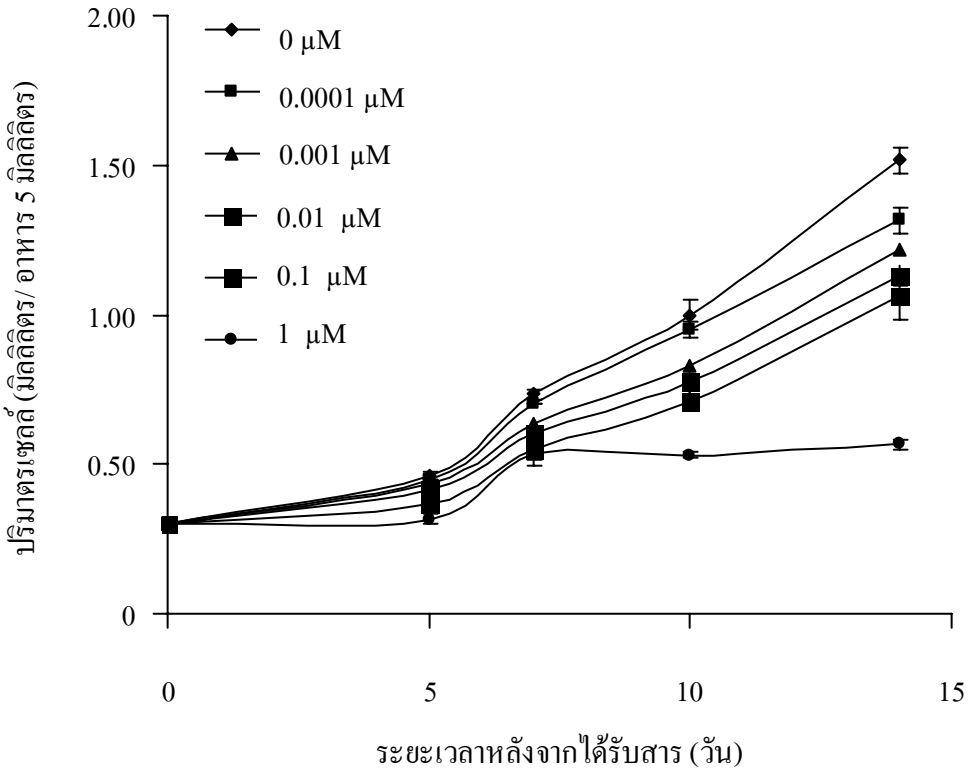
ภาพที่ 6 การเติบโตของเซลล์อ้อยพันธุ์ K99-55 ในช่วง 0, 5, 7, 10, 14 และ 21 วัน

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

จากภาพที่ 4-6 จะเห็นได้ว่า การใช้เซลล์เริ่มต้นในปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร ของเซลล์อ้อยทุกพันธุ์ จะทำให้มีการเติบโตของเซลล์ได้ดีที่สุด และเซลล์อ้อยมีการเจริญคงที่และมีแนวโน้มลดลงหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Aftab *et al.* (1996) ที่ทำการศึกษาเซลล์แขวนลอยของอ้อย พบว่า การใช้เซลล์แขวนลอยของอ้อยเริ่มต้นปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่ออาหาร 25 มิลลิลิตร เซลล์แขวนลอยอ้อยสามารถเจริญเติบโตดีที่สุด ดังนั้น ในขั้นตอนต่อไปของการคัดเลือกเซลล์ต้านทานสาร จึงใช้เซลล์เริ่มต้นในปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการย้ายเซลล์แขวนลอยของอ้อยไปเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน ซึ่งเรียกว่า เป็น 1 รอบการเติบโตของเซลล์แขวนลอย แต่เนื่องจากการเติบโตของเซลล์อ้อยพันธุ์ K95-282 และ K99-55 มีการเติบโตไม่คงที่ปริมาตรเซลล์ลดลงและเซลล์มีลักษณะเป็นเมือกเมื่อเพาะเลี้ยงไปในระยะเวลานาน ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงตัดอ้อยพันธุ์ดังกล่าวออก แล้วทำการคัดเลือกอ้อยพันธุ์ K97-32 ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ ต่อไป

2.3 ทดสอบการตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

เมื่อทราบปริมาตรของเซลล์เริ่มต้นและวันที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K97-32 แล้ว จึงทำการคัดเลือกเซลล์อ้อยพันธุ์ดังกล่าวให้มีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์มากขึ้นต่อไป จากภาพที่ 6 จะเห็นได้ว่า การตอบสนองต่อสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จะมีผลต่อการเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยแตกต่างกัน พบว่า ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารจะมีปริมาตรเซลล์เป็น 1.50, 1.32, 1.13, 1.07 และ 0.57 มิลลิลิตรต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นของสารที่ 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ กล่าวคือ เซลล์ของอ้อยจะมีปริมาตรเซลล์และมีการเติบโตลดลงตามระดับความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้น (ภาพที่ 7) และที่ความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ 0.1 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์อ้อยมีการเติบโตลดลง 70 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสารที่ 14 วันหลังจากได้รับสาร ดังนั้นในการคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารเริ่มทำการคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่มีผลกระทบต่อเซลล์อ้อยปกติและสามารถเติบโตได้ ในการคัดเลือกเซลล์ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำได้โดยการค่อยๆ เพิ่มระดับความเข้มข้นของสารทีละน้อย ในอาหารที่เลี้ยงเซลล์ จากระดับความเข้มข้นของสารที่ต่ำ แล้วจึงค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นในระดับที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ ให้เซลล์สามารถปรับตัวได้เหมือนเซลล์ปกติ (ทศพล, 2541)

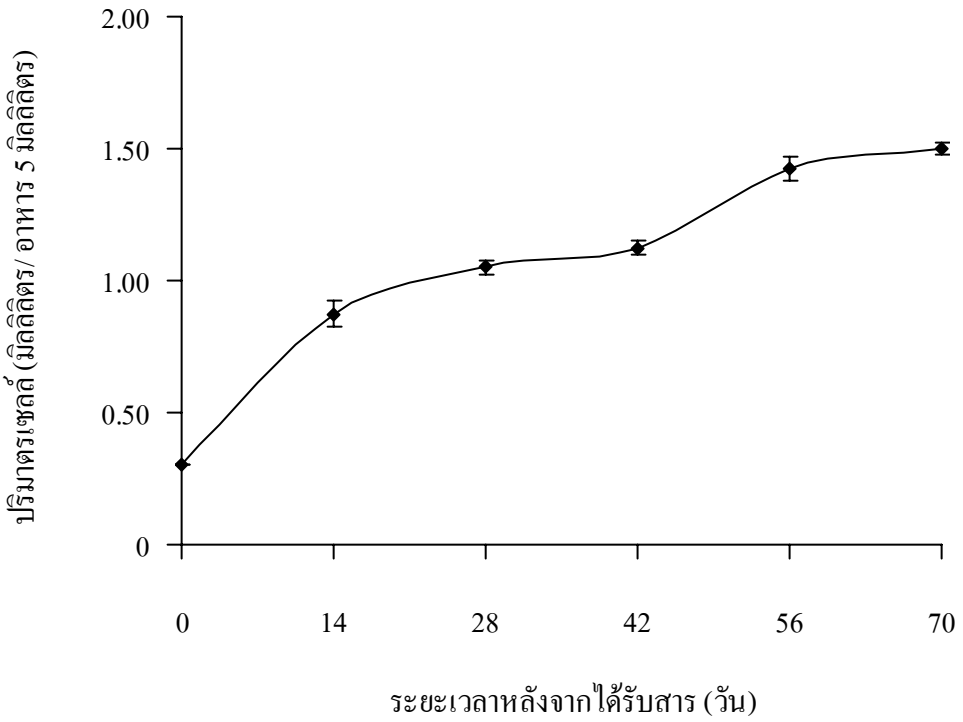


ภาพที่ 7 การเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K97-32 เมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้น 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์

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

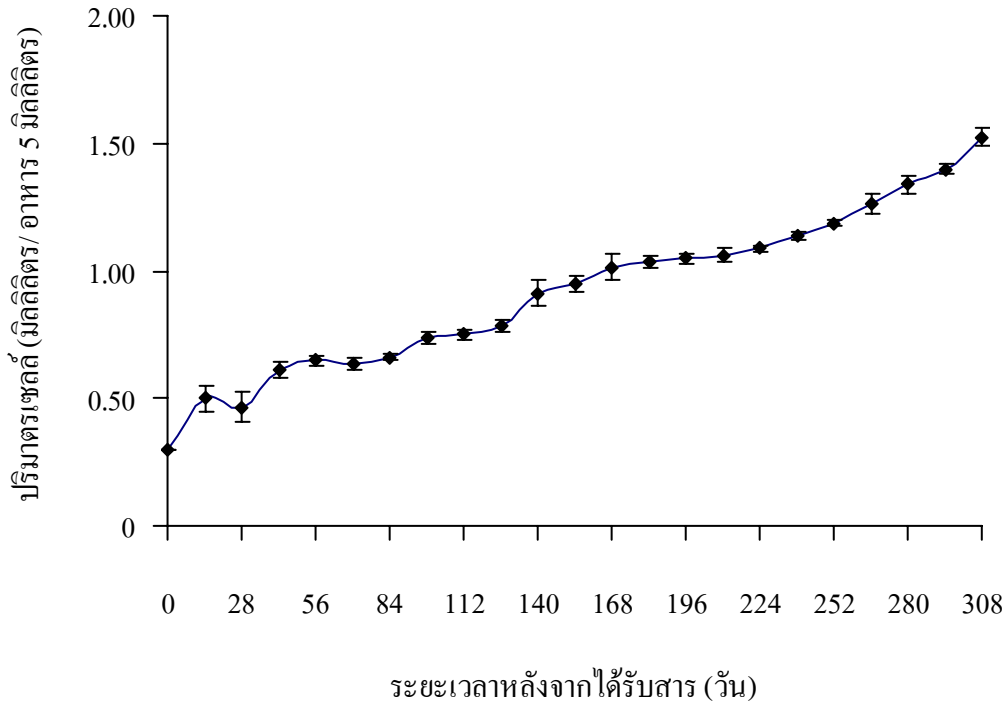
2.4 การคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์

ในการคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ต้องการคัดเลือกให้เซลล์อ้อยมีความต้านทานต่อสารใน 1 ไมโครโมลาร์ จึงเริ่มต้นทำการคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์จากระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ที่ 0.1 ไมโครโมลาร์ โดยวัดปริมาตรเซลล์และสังเกตลักษณะการเติบโตเหมือนกับเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร ซึ่งใช้เวลาในการคัดเลือก 70 วัน (ภาพที่ 8) ในขณะที่การคัดเลือกเซลล์ให้ต้านทานสารที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 9) เพิ่มมากขึ้นเป็น 308 วัน ดังนั้นช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์ของอ้อยให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ เริ่มต้นจากที่ความเข้มข้นของสาร 0.1 ไมโครโมลาร์ จนกระทั่งถึงความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการคือ 1 ไมโครโมลาร์ จะใช้เวลารวมทั้งหมด 378 วัน ซึ่งลักษณะของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะมีลักษณะเหมือนกับเซลล์อ้อยปกติ (normal cells) ที่ไม่ได้รับสาร และเมื่อสังเกตสีและลักษณะภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ microscope ของเซลล์อ้อยปกติ และเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ พบว่า เซลล์ทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันในทุกลักษณะ (ภาพที่ 10) การศึกษาในครั้งนี้จะเรียก เซลล์ที่คัดเลือกได้นี้ว่า เซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (1 μM mazapyr-resistant cell line) หรือเรียกว่าเซลล์ต้านทานสาร (resistant cells)



ภาพที่ 8 ระยะเวลาในการคัดเลือกเซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ K97-32 ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์

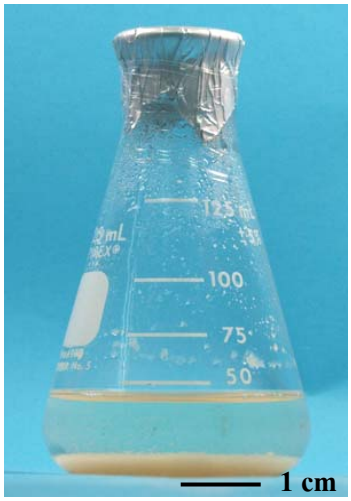
หมายเหตุ Vertical bars แสดงค่า $\pm$ SE ของค่าเฉลี่ย 4 ค่า

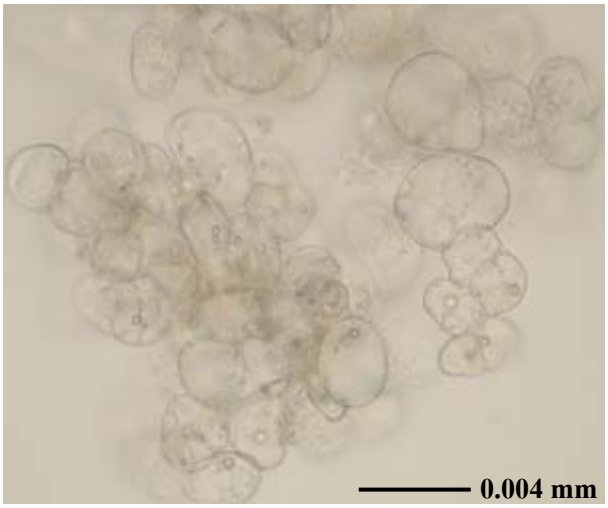


ภาพที่ 9 ระยะเวลาในการคัดเลือกเซลล์แขวนลอยของอ้อยพันธุ์ K97-32 ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

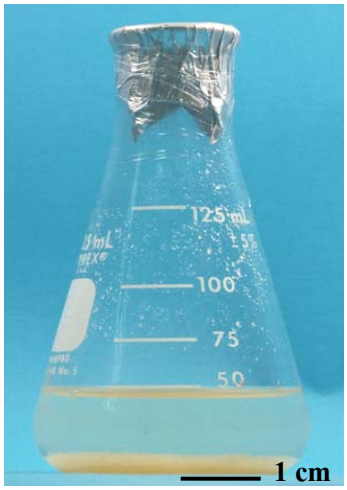
หมายเหตุ Vertical bars แสดงค่า $\pm$ SE ของค่าเฉลี่ย 4 ค่า

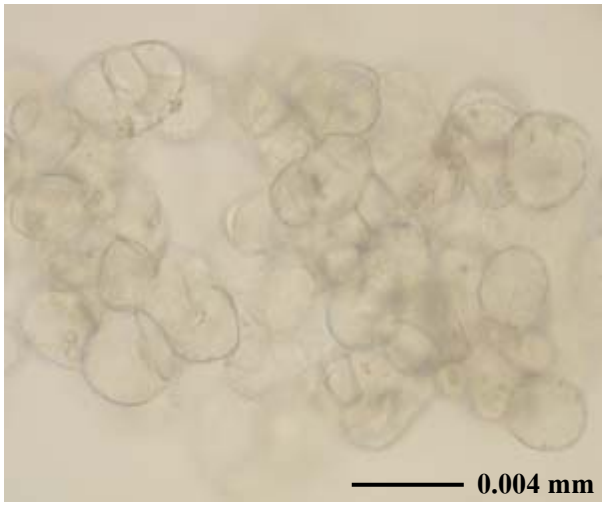
(ก)





(ข)

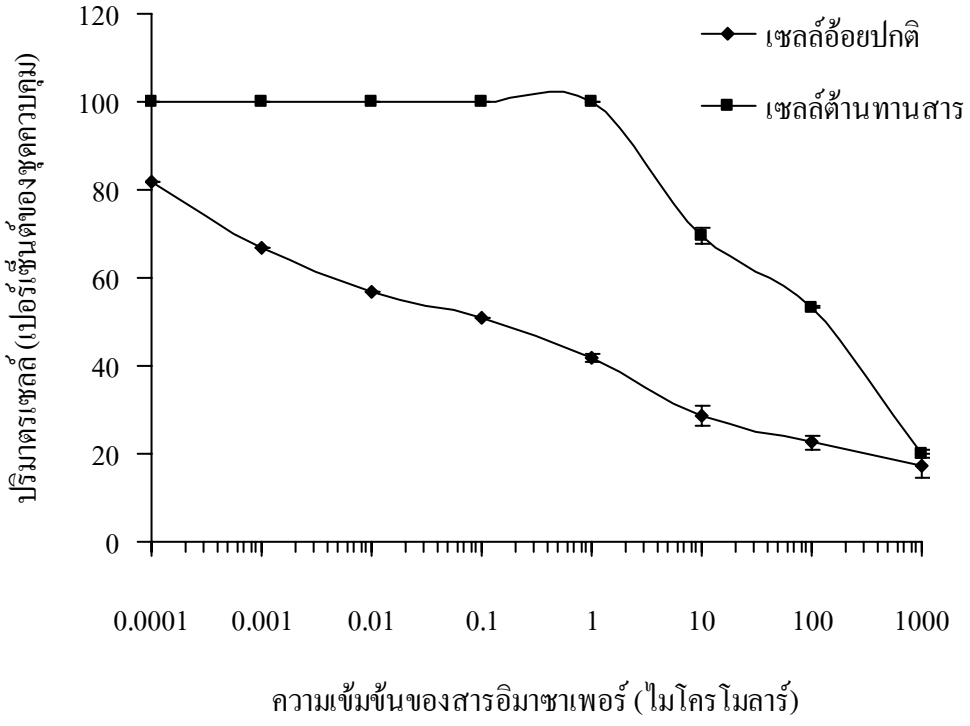




ภาพที่ 10 ลักษณะของเซลล์อ้อยปกติ (ก: normal cells) และเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (ข: 1 µM imazapyr-resistant sugarcane cell line)

เมื่อทำการคัดเลือกจนได้เซลล์ที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ หลังจากนั้นจึงนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับความต้านทานต่อสาร ระหว่างเซลล์อ้อยปกติ (normal cells) เซลล์อ้อยต้านทานสาร (resistant cells) ที่ได้รับสารในระดับความเข้มข้น 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน (ภาพที่ 11) พบว่า เซลล์อ้อยปกติจะมีการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 0.15 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 150 ไมโครโมลาร์ จากระดับความเข้มข้นดังกล่าว เมื่อนำมาพิจารณาค่าดัชนีความต้านทาน (resistance index) โดยเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นอิมาซาเพอร์ที่ทำให้การเติบโตของเซลล์ลดลงไป 50 เปอร์เซ็นต์ ในเซลล์ต้านทานและเซลล์ปกติ (ตารางที่ 8) พบว่าในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร มีระดับความต้านทานมากกว่าในเซลล์อ้อยปกติ 1,000 เท่า นั่นแสดงว่าหลังจากที่เซลล์ได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ ในขณะที่เซลล์อ้อยปกติสามารถเจริญเติบโตลดลง เช่นเดียวกับการคัดเลือกเซลล์ของฝ้ายพันธุ์ SJ2 และ B1654 ให้ต้านทานต่อสารไพรมิซัลฟูรอน 2.13 ไมโครโมลาร์ พบว่า มีความต้านทาน 100-1000 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ฝ้ายพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับสาร (Rajasekaran *et al*., 1996) และในการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ถั่วเหลืองต่อสารเบนซัลฟูรอนเมททิล พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 10^{-9} โมลาร์ ทำให้เซลล์ถั่วเหลืองมีการเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (Pornprom *et al*., 2005)

เซลล์ของอ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ ดังกล่าวมีกลไกของความต้านทานต่อสารที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ ALS ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนพวก valine, leucine และ isoleucine ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ALS สามารถวัดเป็นปริมาณของ acetoin ซึ่งจะบ่งบอกถึงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS และพบว่า เซลล์ที่ต้านทานต่อสารจะมีปริมาณ acetoin มากกว่าเซลล์ที่อ่อนแอต่อสารเนื่องจากเอนไซม์ ALS นั้นถูกยับยั้ง (Corbett *et al.*, 2006) ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปเป็นการศึกษาลักษณะกลไกของความต้านทานทางชีวเคมีของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ เพื่อที่จะนำไปใช้เป็นดัชนีในการอธิบายลักษณะกลไกของความต้านทานทางชีวเคมีต่อไป



ภาพที่ 11 การตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสาร พันธุ์ K97-32 ที่ 14 วัน หลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

หมายเหตุ Vertical bars แสดงค่า $\pm$ SE ของค่าเฉลี่ย 4 ค่า

ตารางที่ 8 ค่า I_{50} ของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์ต้านทานสาร พันธุ์ K97-32 ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

เซลล์	ค่า I_{50} (ไมโครโมลาร์)[1/]
เซลล์ปกติ	0.15 ± 5.00
เซลล์ต้านทานสาร	150 ± 0.01
ดัชนีความต้านทาน[2/]	1,000

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

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

การทดลองที่ 3 การศึกษากลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์

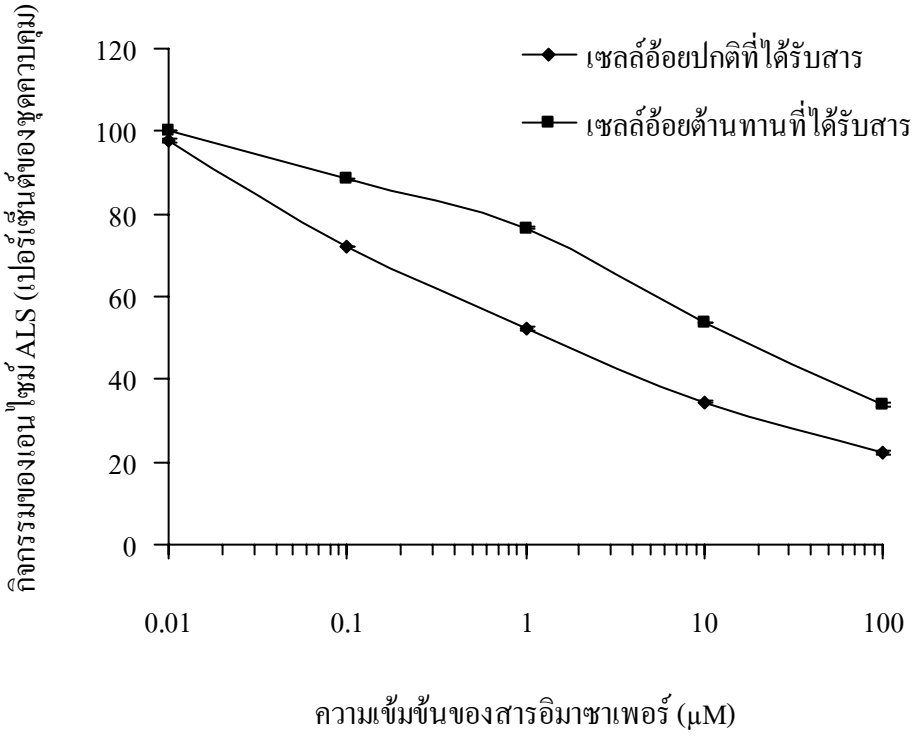
3.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS

สารอิมาซาเพอร์เป็นสารที่มีกลไกการทำงานเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน leucine, valine และ isoleucine ซึ่งเกิดขึ้นภายในคลอโรพลาสท์ในพืช มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ DNA และการเจริญเติบโตของพืชผิดปกติ (Ahrens, 1994) ในการทดลองครั้งนี้ จึงทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในระดับเซลล์ หลังจากที่ทำการชักนำและคัดเลือกเซลล์อ้อยให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ 5 วัน หลังจากได้รับสารอิมาซาเพอร์ ในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (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) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ไม่แตกต่างกัน (ไม่แสดงข้อมูล) ในขณะที่เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) ในระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็น 97.67, 72.17, 57.00 และ 25.33 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) ในขณะที่เซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT) ในระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็น 100, 88.50, 76.83, 54.33 และ 33.33 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) ตามลำดับ (ภาพที่ 11) จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบดัชนีความต้านทานของเซลล์ต้านทานที่ได้รับสารกับเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร มีค่าเท่ากับ 11 เท่า ที่ 5 วัน หลังจากได้รับสาร (ตารางที่ 9) เช่นเดียวกับการทดลองของ Rajasekaran *et al*. (1996) ได้รายงานว่า เซลล์ฝ้ายพันธุ์ SUR-6C ที่ต้านทานสารพริมซัลฟูรอนในระดับความเข้มข้น 2.13 ไมโครโมลาร์ มีกิจกรรมของเอนไซมม์ ALS ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับสาร 21.3 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่ Pornprom *et al*. (2005) ได้รายงานว่า เซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อสารเบนซัลฟูรอนเมทิลในระดับความเข้มข้น 10^{-9} โมลาร์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับสารความเข้มข้นประมาณ 8×10^{-10} โมลาร์

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS ซึ่งคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับ target-site based โดยมีการปรับตัวเป็นแบบไม่ตอบสนองต่อสาร โดยที่ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะมีการปรับตัวมากกว่าใน

เซลล์ปกติ ซึ่งเป็นแบบไม่ตอบสนอง (less sensitive) จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไม่ถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาเพอร์ เช่นเดียวกับผลการทดลอง Pornprom and Pyon (1999) ซึ่งได้รายงานว่า กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในพริกที่ทนทานต่อสารไพรมิซัลฟูรอนมากกว่าในพันธุ์อ่อนแอ 10-15 เท่า และมีการตอบสนองต่อสารเป็นแบบไม่ตอบสนองต่อสาร นอกจากนี้ Buker *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในพริกและมะเขือเทศเมื่อได้รับสารริมซัลฟูรอนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า พริกมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS มากกว่ามะเขือเทศ 10 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์พวกกรดอะมิโนดังกล่าวนี้ จะเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์พวกกรดอะมิโน valine, leucine และ isoleucine โดยที่สารจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ซึ่งเป็น target-site based ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน α–ketobutyrate ไปเป็น acetohydroxybutyrate หรือ pyruvate ไปเป็น 2-acetolactate ได้ (Anonymous, 2005) ส่งผลทำให้พืชที่อ่อนแอต่อสารในบริเวณ target-site based จะมีการตอบสนองต่อสาร กล่าวคือ การทำงานของเอ็นไซม์ ALS จะถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาเพอร์จึงทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนดังกล่าวได้ ในขณะที่พืชที่ต้านทานสารในบริเวณ target-site based จะไม่ตอบสนองต่อสาร (less sensitive) จึงทำให้พืชต้านทานสารสามารถเจริญเติบโตได้เป็นไปตามปกติ

จากการศึกษาการคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ทั้งในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นและโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนศึกษากลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการใช้สารกำจัดวัชพืชได้อย่างปลอดภัย โดยที่พืชปลูกไม่ได้รับพิษจากการใช้สารกำจักวัชพืชในขณะที่วัชพืชจะถูกทำลายไป ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการวัชพืชในการปลูกอ้อยได้อย่างเหมาะสมต่อไป นอกจากนี้ในการศึกษาลักษณะกลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสารสามารถใช้เป็นดัชนีในการอธิบายเกี่ยวกับกลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยที่ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ นอกจากนี้เซลล์ที่ต้านทานสารที่ได้จากการคัดเลือกดังกล่าวนี้ สามารถนำไปศึกษาเกี่ยวกับลักษณะพื้นฐานทางชีวโมเลกุลในพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชต่อไป



ภาพที่ 11 การตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสารและเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร พันธุ์ K97-32 ที่ 5 วัน หลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 9 ค่า I_{50} ของเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสารและเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร พันธุ์ K97-32 ที่ 5 วัน หลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

เซลล์	ค่า I_{50} (ไมโครโมลาร์)[1/]
เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT)	1.40 ± 0.5
เซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT)	15.20 ± 0.4
ดัชนีความต้านทาน[2/]	11

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

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

สรุป

ในการคัดเลือกพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ สามารถสรุปผลการทดลอง ดังนี้

1. การคัดเลือกในระดับพืชทั้งต้นในสภาพไร่ทดลอง พิจารณาจากการตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาของพันธุ์อ้อยที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ พบว่า พันธุ์ที่มีแนวโน้มว่ามีความทนทานต่อสารที่อัตรา 0.625 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ คือ K95-282, K88-92, K97-32, K99-55, K95-87 และ K93-219 ส่วนอ้อยพันธุ์ K99-45, K84-200, K99-56, K92-80, K95-283, K95-161, K93-347, K99-59, K99-61, K95-156, K95-84, K95-234, K99-82, K92-213, K97-29 และ K99-49 จัดเป็นกลุ่มของพันธุ์อ้อยที่มีแนวโน้มว่ามีความทนทานต่อสารในระดับปานกลาง และกลุ่มของพันธุ์อ้อยที่มีแนวโน้มว่ามีความอ่อนแอต่อสารอัตรา 0.156 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ได้แก่ พันธุ์ K99-5, K99-72, K99-85, K97-33 และ K97-27 ตามลำดับ

2. การคัดเลือกในระดับเซลล์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า อ้อย K97-32 สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสและเซลล์แขวนลอยได้ดีที่สุด ใช้เวลา 378 วัน ในการชักนำเซลล์ให้มีความต้านทานต่อสารที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ มีความต้านทานเป็น 1,000 เท่าของเซลล์อ้อยปกติพันธุ์เดียวกัน ซึ่งเรียกว่า เซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์

3. การศึกษากลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสาร พบว่า ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานที่ได้รับสารจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS มากกว่าในเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสารมากกว่าถึง 11 เท่า ที่ 5 วันหลังจากได้รับสาร ซึ่งคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับ taget-site based โดยมีการปรับตัวเป็นแบบไม่ตอบสนองต่อสาร จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไม่ถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาเพอร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. **การปลูกอ้อย.** ฐานความรู้พืชพลังงานทดแทน. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/power_oil/WebSugarcaneNew/Technology/weed.htm, 10 ธันวาคม 2549.

เกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์, แฉล้ม มาศวรรณา, วิมลรัตน์ ศุกรินทร์ และเสริมศิริ คงแสงดาว. **การสูญเสียผลผลิตอ้อยเนื่องจากวัชพืชร้ายแรงบางชนิด.** แหล่งที่มา: http://agriqua.doae.go.th/Plant%20%20Protection%20%20Conference/weed%20%20science/C-01.pdf **,** 10 ธันวาคม 2549.

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

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

_____. 2545. **สารกำจัดวัชพืช: หลักการและกลไกการทำลาย.** ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รังสิต สุวรรณเขตนิคม. 2547. **สารป้องกันกำจัดวัชพืช: พื้นฐานและวิธีการใช้.** ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2549. **สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2539-2548.** แหล่งที่มา: http://oae.go.th/statistic/yearbook48/, 1 กรกฎาคม 2549.

Aftab, F., Y. Zafar, K.A. Malik and J. Iqbal. 1996. Plant regeneration from embryogenic cell suspension and protoplast in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid cv. Co-54). **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 44: 71-78.

Ahrens, H.W. 1994. **Herbicide handbook.** 7th ed. Weed Science Society America, Illinios.

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

_____. 2005. **Inhibition amino acid synthesis.** Available Source: http://www.agronomy.lsu.edu/weedscience/AGRO4070/lectures/Griffin.WeedCourse.Chapter18.2005.pdf, August 10, 2005.

_____. 2007. **Roundup.** Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Roundup, March 3, 2007.

Aragão, F.J.L., G.R. Vianna, S.B.R.C. Carvalheira and E.L. Rech. 2005. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. **Plant Science** 168(5): 1227-1233

Armel, G.R., H.P. Wilson, R.J. Richardson and T.E. Hines. 2003. Use of mixtures of mesotrione, imazethapyr, and imazethapyr plus imazapyr in imidazolinone-resistant corn (*Zea mays*). **Weed Technol.** 17(4): 674-679.

Bailey, W.A. and J.W. Wilcut. 2003. Tolerance of imidazolinone-resistant corn (*Zea mays*) to diclosulam. **Weed Technol**. 17: 60-64.

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.

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

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.

Dalley, C.D. and P.R. Edward. 2005. Sugarcane *(Saccharum spp.)* Response to the Herbicide Flumioxazin. **Journal American Society Sugar Cane Technologists** 25: 104.

Devine, M.D. and S. Amit. 2000. Altered target site as a mechanism of herbicide resistance. **Crop Protection** 19: 881-889.

_____, S.O. Duke and C. Fedtke. 1993. **Physiology of Herbicide Action**. PTR Printice-Hall Inc., New Tersey.

Dhaka, N. and S.L. Kothari. 2002. Phenyl acetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Helianthus annus* L. **Plant Cell Rep**. 21(1): 29-34.

Dyer, W.E. 1996. Techniques for producing herbicide-resistant crop, pp. 38-51. *In* S.O. Duke, ed. **Herbicide-Resistant Crop**. CRC pressInc., USA.

Enriquez-Obrigon, A.G., R.I. Vazquez-Padron, D.L. Prieto-Samsonov, G.A. De la Riva and G. Selman-Housein. 1998. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plant by *Agrobacterium*–mediated transfer. **Planta** 206(1): 20-27.

Evans,D.E., J.O.D. Coleman and A. Kearns. 2003. **Plant Cell Culture.** 1st ed. Bios Scientiti Publishers, New York.

Falco, M.C., A. T. Neto and E.C. Ulian. 2000. Genetic transformation and hybridization: Transformation and expresstion of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Rep**. 19(12): 1188-1994.

Gapton, 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.

Harrison, H.F. Jr. and R.L. Irvine. 1989. Assessment of bentazon tolerance in papper (*Capsicum sp*.). **Weed Technol**. 3: 307-312.

James, T.K., A. Rahman and J.S. Gray. 2001. Control of weed in imidazolinone tolerant maize with imazethapyr plus imazapyr. **N.Z. Plant Prot**. 54: 162-167.

Kanampiu, F.K., J.K. Ransom and J. Gressel. 2001. Imazapyr seed dressings for *Striga* control on acetolactate synthase target-site resistant maize. **Crop Protection** 20: 885-895.

Lee, J.M. and M.D.K. Owen. 2000. Comparison of acetolactate synthase enzyme inhibition among resistant and susceptible *Xanthium strumarium* biotypes. **Weed Sci.** 48: 286-290.

Leibbrandt, N. B. and S. J. Snyman. 2003. Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcance line in South Africa. **Crop Sci**. 43: 671-677.

Murashige,T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant**. 15: 473–497.

Pornprom, T., J. Chompoo and B. Grace. 2003. Glufosinate tolerance in hybrid corn varieties based on decreasing ammonia accumulation. **Weed Biol. and Manage**. 3: 52-56.

_____ and J.Y. Pyon. 1999. Primisulfuron-Tolerant Papper: A biochemical basis of tolerance. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. 33: 178-184.

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

_____, S. Surawattananon and P. Srinives. 2000b. Differential tolerance of soybean genotype to glufosinate. **SABRAO Journal of Breeding & Genetics** 32(2): 73-80.

_____ , 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. and Manage**. 5: 150-153.

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.

Sengnil, K., K. Usui and K. Ishizuka. 1992. Recovery from growth inhibition and acetolactate synthase activity in rice suspension cultured cells treated with bensulfuron-methyl. **Weed Res. Japan.** 37: 28-34.

Silva, C.M.M., L.R. Ferreira, F.A. Ferreira and G.V. Miranda. 2004. Tolerance of eucalypt (*Eucaiyptus* spp.) seedling to imazapyr in nutritive solution**. Planta Daninha, Vicosa-MG**. 22(4): 597-606.

Simpson, D.M., E.W. Stoller and L.M. Wax. 1995. An in vivo acetolactate synthase assay. **Weed Technol.** 9: 17-22.

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 imazetapyr in somaclones of soybean. **Weed Research** 41: 143-154.

Tu, M., C. Hurd and J.M. Randall. 2001. **The herbicide**. Weed Control Methods Hand book: Tool and Techiques for Use in Natural Areas. Available Source: http://tncweeds.ucdavis.edu/products/handbook/17.Imazapyr.pdf, September 15, 2003.

Viator, B.J., J.L. Griffin, J.M. Ellis and C.A. Jone. 2001. New herbicide chemistries for weed control in sugarcane, pp. 190-191. *In* **Southern weed science society 54ed.** Available Source: http://www.swss.ws/Proceedings/2001/2001_Section_XII.pdf, March 20, 2007

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

Westerfeld, W.W. 1945. A colorimetric determination of blood acetoin. **J. Biol. Chem**. 161(2): 495-502.

Zambrano, A.Y., J.R. Demey and V. Gonzalez. 2003. *In Vitro* Selection of a glyphosate-tolerant sugarcane cellular line. **Plant Molecular Biology Reporter** 21: 365-373.

Zeldin, E.L., T.P. Jury, R.A. Serres and B.H. McCown. 2002. Tolerance to the herbicide glufosinate in transgenic cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and enhancement of tolerance in progeny. **Amer. Soc. Hort. Sci**. 127(4): 502-507.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 พันธุ์อ้อยคู่ผสม จำนวน 27 พันธุ์ ที่นำมาใช้ในการคัดเลือกในสภาพไร่ทดลอง

พันธุ์อ้อย	คู่ผสม
K84-200	RoC1 x CP63-558
K88-92	อู่ทอง 1 x PL310
K92-80	K84-200 x K76-4
K92-213	K84-200 x K83-74
K93-219	อู่ทอง 1 x อีเหี่ยว
K93-347	อู่ทอง 1 x K84-200
K95-84	K90-79 x K84-200
K95-87	K90-79 x K84-200
K95-156	PL310 x อู่ทอง 1
K95-161	K84-20 x อีเหี่ยว
K95-234	K83-74 x Roc1
K95-282	Q79 x ผสมเปิด
K95-283	Q79 x ผสมเปิด
K97-27	อู่ทอง 1 x K84-200
K97-29	อู่ทอง 1 x K84-200
K97-32	อู่ทอง 1 x K84-200
K97-33	K83-74 x อีเหี่ยว
K99-5	Co270 x ชัยนาท 1
K99-45	K84-200 x K96-341
K99-49	K84-200 x K96-341
K99-55	K84-200 x K96-341
K99-56	K84-200 x K96-341
K99-59	K84-200 x K96-341
K99-61	K84-200 x K96-34
K99-72	K84-200 x อีเหี่ยว
K99-82	K84-200 x อีเหี่ยว
K99-85	K84-200 x อีเหี่ยว

ตารางผนวกที่ 2 วิเคราะห์ความแปรปรวนจากการประเมินความเป็นพิษของพันธุ์อ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ ที่ 1 เดือนหลังจากได้รับสาร

Source	DF	SS	MS	F Value
Block	2	4.32	2.16	0.19
Dosage	3	142196.32	47398.77	4102.92**
Block x Dosage	6	52.47	8.74	
Clone	26	1254.32	48.24	4.16**
Dosage x Clone	78	1091.36	13.99	1.21ns
Block x Dosage x Clone	208	2409.88	11.58	
Total	323	147420.99		

C.V. main plot = 8.33% และ C.V. sub plot = 9.59

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 3 วิเคราะห์ความแปรปรวนจากการประเมินความเป็นพิษของพันธุ์อ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ ที่ 3 เดือนหลังจากได้รับสาร

Source	DF	SS	MS	F Value
Block	2	496.30	246.15	8.90
Dosage	3	28468.89	94894.96	3401.68**
Block x Dosage	6	501.23	83.54	
Clone	26	2188.89	84.19	3.02**
Dosage x Clone	78	2423.46	31.07	1.11ns
Block x Dosage x Clone	208	5802.47	27.90	
Total	323	296097.22		

C.V. main plot = 18.31% และ C.V. sub plot = 10.58%

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 4 วิเคราะห์ความแปรปรวนจากการประเมินความเป็นพิษของพันธุ์อ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร

Source	DF	SS	MS	F Value
Block	2	9918.52	4959.26	40.90
Dosage	3	221055.25	73685.08	608.31**
Block x Dosage	6	4353.08	725.51	
Clone	26	11388.89	438.03	3.62**
Dosage x Clone	78	11053.09	141.71	1.17^{ns}
Block x Dosage x Clone	208	25195.06	121.13	
Total	323	282963.89		

C.V. main plot = 68.45% และ C.V. sub plot = 27.97%

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 5 วิเคราะห์ความแปรปรวนจากความสูงที่เปรียบเทียบของพันธุ์อ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร

Source	DF	SS	MS	F Value
Block	2	1405.29	702.61	5.25
Dosage	3	95020.69	31673.56	237.94**
Block x Dosage	6	7742.01	1290.34	
Clone	26	5421.44	208.57	1.57^{**}
Dosage x Clone	73	7235.61	99.12	0.74^{ns}
Block x Dosage x Clone	208	34257.44		
Total	288	151092.44		

C.V. main plot = 68.45% และ C.V. sub plot = 27.97%

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 6 วิเคราะห์ความแปรปรวนจากจำนวนลำต่อไร่ที่เปรียบเทียบของพันธุ์อ้อย จำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ ที่ 6 เดือนหลังจากได้รับสาร

Source	DF	SS	MS	F Value
Block	2	57470.34	2573.67	7.75
Dosage	3	162770.56	54256.85	146.32**
Block x Dosage	6	9845.77	1640.96	
Clone	26	15812.40	608.17	1.64**
Dosage x Clone	72	28513.35	396.02	1.07ns
Block x Dosage x Clone	174	64521.61	370.81	
Total	283	295254.64		

C.V. main plot = 68.45 % และ C.V. sub plot = 27.97 %

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 7 ระดับการตอบสนองของอ้อยจำนวน 27 พันธุ์ ที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์

ระดับการตอบสนองต่อสารอิมาซาเพอร์[1/]	พันธุ์
ระดับทนทาน (Tolerant):	K95-282
	K88-92
	K97-32
	K99-55
	K95-87
	K93-219
ระดับทนทานปานกลาง (Moderate):	K99-45
	K84-200
	K99-56
	K92-80
	K95-283
	K95-161
	K93-347
	K99-59
	K99-61
	K95-156
	K95-84
	K95-234
	K99-82
	K92-213
	K97-29
	K99-49
ระดับอ่อนแอ (Susceptible):	K99-5
	K99-72
	K99-85
	K97-33
	K97-27

[1/]พิจารณาจากข้อมูลความเป็นพิษ ความสูงเปรียบเทียบ และจำนวนลำต่อไร่ เปรียบเทียบ ที่ 1, 3 และ 6 เดือนหลังจากฉีดพ่นสาร

ตารางผนวกที่ 8 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 9 การเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K95-282 เมื่อมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่ต่าง ๆ กัน

ปริมาตรเซลล์เริ่มต้น (มิลลิลิตร)	ระยะเวลา (วัน)				
	5	7	10	14	21
	มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร[1/]				
1	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.22 ± 0.01
2	0.33 ± 0.01	0.47 ± 0.03	0.87 ± 0.03	1.07 ± 0.06	1.1 3 ± 0.03
3	0.47 ± 0.03	0.73 ± 0.03	0.97 ± 0.07	1.50 ± 0.09	1.50 ± 0.09

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ได้จริง 3 ค่า ± ค่า SE

ตารางผนวกที่ 10 การเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K97-32 เมื่อมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่ต่าง ๆ กัน

ปริมาตรเซลล์เริ่มต้น (มิลลิลิตร)	ระยะเวลา (วัน)				
	5	7	10	14	21
	มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร[1/]				
1	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.30 ± 0.05	0.39 ± 0.06	0.58 ± 0.12
2	0.32 ± 0.01	0.36 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.75 ± 0.03	0.85 ± 0.05
3	0.46 ± 0.01	0.73 ± 0.01	1.00 ± 0.04	1.52 ± 0.04	1.53 ± 0.04

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ได้จริง 3 ค่า ± ค่า SE

ตารางผนวกที่ 11 การเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K99-55 เมื่อมีปริมาตรเซลล์เริ่มต้นที่ต่าง ๆ กัน

ปริมาตรเซลล์เริ่มต้น (มิลลิลิตร)	ระยะเวลา (วัน)				
	5	7	10	14	21
	มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร[1/]				
1	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.27 ± 0.03
2	0.22 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.48 ± 0.08	0.62 ± 0.03	0.68 ± 0.03
3	0.48 ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.73 ± 0.03	1.37 ± 0.03	1.45 ± 0.03

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ได้จริง 3 ค่า ± ค่า SE

ตารางผนวกที่ 12 การเติบโตของเซลล์แขวนลอยอ้อยพันธุ์ K97-32 เมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ระยะเวลา (วัน)			
	5	7	10	14
	มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร[1/]			
0	0.46 ± 0.01	0.73 ± 0.01	1.00 ± 0.04	1.52 ± 0.04
0.0001	0.45 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.95 ± 0.03	1.32 ± 0.04
0.001	0.43 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.83 ± 0.05	1.22 ± 0.04
0.01	0.42 ± 0.02	0.06 ± 0.00	0.87 ± 0.12	1.13 ± 0.06
0.1	0.37 ± 0.03	0.55 ± 0.03	0.71 ± 0.09	1.07 ± 0.03
1	0.32 ± 0.02	0.53 ± 0.04	0.53 ± 0.01	0.57 ± 0.02

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ได้จริง 3 ค่า ± ค่า SE

ตารางผนวกที่ 13 ปริมาตรเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยต้านทานสารที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ที่ 14 วันหลังจากได้รับสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	เซลล์อ้อยปกติ (normal cells)	เซลล์อ้อยต้านทาน (resistant cells)
	มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร[1/]	
0	1.52 ± 0.04	1.50 ± 0.03
0.0001	1.23 ± 0.06	1.50 ± 0.03
0.001	1.02 ± 0.04	1.50 ± 0.03
0.01	0.87 ± 0.09	1.50 ± 0.03
0.1	0.77 ± 0.02	1.50 ± 0.03
1	0.62 ± 0.04	1.50 ± 0.03
10	0.40 ± 0.03	1.07 ± 0.03
100	0.32 ± 0.02	0.77 ± 0.04
1000	0.22 ± 0.02	0.28 ± 0.02

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ได้จริง 3 ค่า ± ค่า SE

ตารางผนวกที่ 14 ปริมาตรเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสารและเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสารทานสารอิมาซาเพอร์ ที่ 5 วันหลังจากได้รับสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (normal cells treated with the herbicide)	เซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (resistant cells treated with the herbicide)
	เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม[1/]	
0.01	97.67 ± 0.44	100.00 ± 0.00
0.1	72.17 ± 0.17	88.50 ± 0.29
1	52.33 ± 0.33	76.67 ± 0.17
10	34.50 ± 0.29	53.67 ± 0.17
100	22.33 ± 0.33	34.00 ± 0.17

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ได้จริง 3 ค่า ± ค่า SE