การกลายพันธุ์ของยีนอะซิโตแลคเตทซินเธทในเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์

Acetolactate Synthase Gene Mutation Conferring Imazapyr-Resistant Sugarcane Cell Line

นิศาชล เครื่องจันทร์ [1/] มัตติกา ทองรส [2/] ทศพล พรพรหม [2/]

Nisachol Khruangchan [1/] Mattika Thongros [2/] Tosapon Pornprom [2/]

ABSTRACT

Selection of sugarcane cell line resistant to imazapyr was conducted to investigate whether the biochemical and molecular basis of resistance was acetolactate synthase (ALS) gene mutation in resistant sugarcane cells. The experiment was conducted at the Laboratory of Plant Research Group, National Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom province. Selection of sugarcane cells resistant to imazapyr was carried out using callus and cell suspension induced from the tight young furled leaves of sugarcane clone K 97-32. The cell suspension was cultured in modified liquid MS medium supplemented with coconut water 10%/L, casein hydrolysate 0.5 g/l, myo-inositol 0.1 g/l and 2,4-D 3 mg/l. A sugarcane cell resistant to 1 µM imazapyr was obtained after 378 days of selection, using a stepwise selection with increasing concentrations of imazapyr from 0.1 to 1 µM. Surviving cells were sub-cultured at 14 days interval. This indicates that the resistant cells was 918-fold more resistant to imazapyr than the normal cells. To establish the biochemical mechanism of resistance to imazapyr, ALS activity was determined in the normal and resistant cells. Based on the I50 values, ALS activity of the resistant cells was 10.8-fold higher than that of the normal cells. In addition, to investigate the molecular of ALS gene at target site responsible for the herbicide activity, the partial of ALS gene region covering 455 bp of domain B and E from the normal and resistant cells

[1/] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร วิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[1/] Centre for Agricultural Biotechnology, Kamphaeng Saen Campus, Kasetsart University, Kamphaeng Sean district, Nakhon Pathom 73140

[2/] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[2/] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

was amplified and sequenced. The partial sequence of ALS gene of the normal and resistant cells was deposited in the GenBank database with accession number EU 243998 and EU 243999, respectively. The ALS gene sequence of the resistant cells showed the point mutant a form deletion of alanine (A) at 666 position, numbering based on *Arabidopsis thaliana* (GenBank accession number X 51514). This result suggested that the partial of ALS gene was occurred the point mutant a form deletion resulting in the alteration at target site, based on the ALS activity, leading to less sensitivity to imazapyr.

Key words: acetolactate synthase (ALS), imazapyr-resistant sugarcane cell line, less sensitivity, point mutation, sugarcane

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ได้ดำเนินการเพื่อพิจารณากลไกพื้นฐานทางชีวเคมี และชีวโมเลกุลว่ามีการกลายพันธุ์ของยีนอะซิโตแลคเตทซินเธท (ALS) เกิดขึ้นในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารหรือไม่ ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยด้านพืชศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ในการคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ได้ชักนำแคลลัสจากส่วนม้วนใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ K 97-32 จากนั้นชักนำให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอยโดยใช้สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่ประกอบด้วย น้ำมะพร้าว 10 %/ล. casein hydrolysate 0.5 ก./ล. myo-inositol 0.1 ก./ลิตร และ 2,4-D 3 มก./ลิตร โดยเริ่มต้นทำการคัดเลือกเซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ จากระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ตั้งแต่ 0.1 ถึง 1 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาในการคัดเลือกนาน 378 วัน เซลล์ที่รอดจากการคัดเลือกจะทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ในช่วงทุก ๆ 14 วัน ซึ่งมีดัชนีของความต้านทานสารเป็น 918 เท่าของเซลล์อ้อยปกติ การศึกษากลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสารอิมาซาเพอร์ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารและเซลล์อ้อยปกติ เมื่อพิจารณาจากค่า I_{50} แสดงว่าในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS มากกว่าเซลล์อ้อยปกติ 10.8 เท่า นอกจากนี้ได้ทำการพิจารณาในระดับชีวโมเลกุลของยีน ALS ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสารกำจัดวัชพืช โดยทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสในส่วนที่ครอบคลุมบริเวณ (domain) B และ E ของยีน ALS ขนาด 455 คู่เบส จากเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ซึ่งได้ทำการขึ้นทะเบียนใน GenBank รหัส EU 243998 และ EU 243999 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบลำดับเบสของยีน ALS ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร พบว่ามีการกลายพันธุ์เฉพาะจุดเกิดขึ้นที่เป็นแบบการหายไป (deletion) ของ

กรดอะมิโนอะลานีน (alanine) เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 666 เมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งลำดับกรดอะมิโนของ *Arabidopsis thaliana* (GenBank accession number x 51514) จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะมีการกลายพันธุ์เฉพาะจุดเกิดขึ้นภายในยีน ALS ที่เป็นแบบการหายไป ซึ่งอาจจะส่งผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่เป็นแบบการตอบสนองน้อย (less sensitivity) ต่อสารอิมาซาเพอร์

คำหลัก: เอนไซม์อะซิโตแลคเตทซินเธท (ALS) เซลล์ของสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ การตอบสนองน้อย การกลายพันธุ์เฉพาะจุด อ้อย

คำนำ

อิมาซาเพอร์ (imazapyr) จัดเป็นสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่ม imidazolinone ประเภทไม่เลือกทำลาย สามารถเคลื่อนย้ายได้ทั้งภายในท่อลำเลียงน้ำและท่อลำเลียงอาหารของพืช โดยที่สารจะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิโตแลคเตทซินเธท (acetolactate synthase, ALS) ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมาย (target site) ในการเข้าทำลายของสารกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้นภายในเซลล์พืช โดยมี pyruvate เป็นสารตั้งต้น และมีเอนไซม์ ALS เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นลูกโซ่ (branched chain amino acids) ซึ่งจะเกิดขึ้น 2 ปฏิกิริยา โดยที่ปฏิกิริยาแรกจะเกิดการรวมตัวของ 2 โมเลกุลของ pyruvate จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ 2-Acetolactate ซึ่งเป็นตัวกลางในการสังเคราะห์กรดอะมิโนvaline และleucine ส่วนอีกหนึ่งปฏิกิริยาจะเกิดการรวมตัวของ pyruvate และ ∝-kytobutyrate แล้วเปลี่ยนไปเป็น 2-Aceto-2-hydroxybutyrate ซึ่งจะเป็นตัวกลางนำไปสร้างกรดอะมิโน isoleucine ต่อไป ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้จำเป็นในการเจริญเติบโตของพืช (Singh and Shanner, 1995) หลังจากที่พืชได้รับสารอิมาซาเพอร์ มีผลทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และการเจริญเติบโตของพืชจะถูกยับยั้งภายใน 2-3 ชม. ต่อมาพืชจะแสดงอาการ chlorosis ในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญก่อน แล้วจะค่อย ๆ ขยายออกไปสู่บริเวณใบ จนเกิดอาการ necrosis ภายใน 2-3 สัปดาห์ หรืออาจจะมากกว่านั้น ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และจะตายไปในที่สุด (Cox, 1996; Shanner and Singh, 1997)

โดยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช (herbicide-resistant crops) ในพืชหลายชนิด เช่น ฝ้ายต้านทานสาร primisulfuron (Rajasekaran, 1996) sugarbeet ต้านทานสาร imazethapyr และ sulfonylurea (Wright *et al.*, 1998) ถั่วเหลืองต้านทานสาร oxyfluorfen (Pornprom *et al.*, 1994; Warabi *et al.*, 2001) และอ้อยต้านทานสาร glyphosate (Zambrazo *et al.*, 2003) เป็นต้น เมื่อพิจารณาจากกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช แสดงว่า มีความเกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมาย (target site-based) และไม่ใช่ตำแหน่งเป้าหมาย (non-target site-based) ในการเข้าทำลายของสาร

กำจัดวัชพืช (Corbett and Tardiff, 2006) ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำเทคนิคทางด้านดีเอ็นเอมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชกันมากขึ้น ส่วนใหญ่ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS จะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสารกำจัดวัชพืช (เอนไซม์ ALS) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีน ALS โดยที่ Devine และ Shukla (2000) ได้รายงานว่า การกลายพันธุ์ของยีน ALS เกิดขึ้นในบริเวณอนุรักษ์ (conserved domain) ของยีน ALS ที่มีอยู่ 5 ตำแหน่งคือ A, B, C, D และ E ซึ่งส่วนใหญ่พืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม imidazolinone นั้น มักจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณ B, C และ E (Figure 1) จากการรายงานของ Punyadee และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ได้มีการรายงานเกี่ยวกับการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน ALS ในเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อทำการคัดเลือกเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS และลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อ้อยปกติ (normal cells) และเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร (resistant cells) อิมาซาเพอร์ เพื่อที่จะนำไปใช้ในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสารกำจัดวัชพืช (เอนไซม์ ALS) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน ALS ในเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือกเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์

นำอ้อยสายพันธุ์ K 97-32 ที่ได้จากการคัดเลือกในสภาพแปลงทดลอง (Punyadee *et al.*, 2007) ซึ่งมีแนวโน้มว่า มีความทนทานต่อสารอิมาซาเพอร์ มาชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส โดยนำชิ้นส่วนใบม้วนยอดอ่อน (tight young furled leaves) มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งดัดแปลงจากสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) pH 5.7 หลังจากนั้น 6 สัปดาห์ ตัดชิ้นส่วนของแคลลัสนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับที่ชักนำให้เกิดแคลลัส แต่ไม่เติมผงวุ้นปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. นำไปวางบนเครื่องเขย่า ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 14 วัน เพื่อชักนำให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอย จากนั้นนำมาศึกษาการตอบสนองของเซลล์อ้อยต่อสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ ที่ 0 3 5 7 10 และ 14 วันหลังจากได้รับสาร โดยทำการวัดปริมาณเซลล์ด้วย packed cell volume (PCV) เพื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเซลล์ต่อไป จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ โดยวิธีเพิ่ม

ระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชเป็นลำดับ (stepwise selection) จากระดับความเข้มข้นเริ่มต้นที่ทำให้เซลล์อ้อยมีการเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเซลล์อ้อยมีอัตราเจริญเติบโตเท่ากับเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสารกำจัดวัชพืช จึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้นสูงมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งได้เซลล์ของสายพันธุ์อ้อยที่มีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ แล้วนำมาพิจารณาค่าระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชที่ทำให้เซลล์พืชมีการเจริญเติบโตลดลง 50 % (herbicide concentrations required to reduce the cells growth by 50% หรือเรียกว่า I_{50}) โดยทำการคำนวณจากวิธีการของ Seefeldt และคณะ (1995) ดังสมการต่อไปนี้

โดยที่ C = ขีดจำกัดล่าง (lower limit)

D = ขีดจำกัดบน (upper limit)

X = ระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช

b = ค่าความชันของกราฟที่ตำแหน่ง I_{50}

หลังจากนั้นนำไปพิจารณาค่าดัชนีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช (resistance index = I_{50} value of resistant cells/ I_{50} value of normal cells) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ตามแผนการทดลองแบบ 2x6 Factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ กรรมวิธีประกอบด้วยปัจจัยที่ 1 เป็นสายพันธุ์เซลล์อ้อยมี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เซลล์อ้อยปกติ และเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร และปัจจัยที่ 2 เป็นระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ ซึ่งมี 6 ระดับ ในกรณีของเซลล์อ้อยปกติ ได้แก่ 0 0.0001 0.001 0.01 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์ ส่วนในกรณีของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร ได้แก่ 0 0.1 1 10 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ วิเคราะห์ความแตกต่างกันทางสถิติ โดยใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Dancan's New Multiple Rang Test (DMRT) จากโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS)

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะซิโตแลคเตทซินเธส

การสกัดเอนไซม์: นำเซลล์อ้อยปกติ และเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารที่อายุ 7 วัน หลังจากการเปลี่ยนอาหาร (sub-culture) ตัวอย่างละ 2 ก. ไปกรองและบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาสกัดเอนไซม์ ALS โดยประยุกต์จากวิธีการของ Osuna และคณะ (2003) ด้วย extraction buffer [ประกอบด้วย potassium phosphate (K_2HPO_4) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 sodium pyruvate เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ thaiamine pyrophosphate (TPP) เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ flavin adenine dinucleotide (FAD) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ dithiothreitol (DTT) เข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ และ glycerol 10 % (1:9 V/V)] 3 มล./ตัวอย่างเซลล์ 1 ก. แล้วเติม polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) 0.5 ก. ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยผ้ากรอง 4 ชั้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 27,000 x g เป็นเวลา

15 นาที หลังจากนั้น ทำการตกตะกอนโปรตีนโดยดูดสารละลายใสส่วนบน มาเติมด้วยสารละลาย $(NH4)_2SO_4$ ที่อิ่มตัว 50 % ในปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรสารละลายใสส่วนบน จากนั้นแช่ในน้ำแข็งนาน 60 นาที เพื่อให้การตกตะกอนของ crude enzyme เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนทิ้ง นำตะกอนโปรตีนที่ได้ละลายด้วย extraction buffer ปริมาตร 0.3 มล. แล้วทำ desalting โดยใช้ Sephadex G-25 PD-10 คอลัมน์ ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย elution buffer pH 7.5 (ประกอบด้วย K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 $MgCl_2$ เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ sodium pyruvate เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์) จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ทันทีต่อไป

การวิเคราะห์เอนไซม์: โดยดูดสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 0.05 ม. ใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์เติม assay buffer ปริมาตร 0.1 มล. [ประกอบด้วย potassium phosphate (K_2HPO_4) เข้มข้น 0.08 โมลาร์ pH 7.5 sodium pyruvate เข้มข้น 0.15 โมลาร์ $MgCl_2$ เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ และ flavin adenine dinucleotide (FAD) เข้มข้น 160 ไมโครโมลาร์] เติมสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 0 0.01 0.1 1 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ แล้วเติม dibasic potassium phosphate (0.04 โมลาร์ pH 7.0) เพื่อปรับให้มีปริมาตรรวมทั้งหมด 0.25 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย H_2SO_4 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.25 มล. แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ. เป็นเวลา 15 นาที เพื่อช่วยให้เกิดการ decarboxylate ของ acetolactate เป็น acetoin จากนั้นเติม ∝-naphthol 0.25 มล. (5 ก./ล.ที่ทำละลายใน 2.5 โมลาร์ NaOH) และ creatine 0.25 มล. (5 ก./ล.) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ. นาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร (Westerfeld, 1945) ต่อมาได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ซึ่งได้ประยุกต์ตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้ bovine serum albumin ความเข้มข้น 1 มก./มล. เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ ALS และโปรตีนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วจึงนำมาคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ALS โดยมีหน่วยเป็นนาโนโมล acetoin/มก.โปรตีน/นาที (nmol acetoin mg-1 protein min-1) ซึ่งการรายงานผลกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ได้ทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเป็นเปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติตามแผนการทดลองแบบ 4x6 Factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ กรรมวิธีประกอบด้วยปัจจัยที่ 1 เป็นซึ่งสายพันธุ์เซลล์อ้อย มี 4 แบบคือ อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N = normal cells without the herbicide treatment) เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT = normal cells treated with the herbicide) เซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R = resistant

cells without the herbicide treatment) และเซลล์อ้อยต้านทานที่ได้รับสาร (RT = resistant cells treated with the herbicide) และปัจจัยที่ 2 เป็นความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์มี 6 ระดับ คือ 0 0.01 0.1 1 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ วิเคราะห์ความแตกต่างกันทางสถิติโดยใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT จากโปรแกรมสำเร็จรูป SAS

การโคลนยีนและการหาลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS

เมื่อเซลล์มีอายุได้ 7 วันหลังจากการเปลี่ยนอาหาร นำตัวอย่างของเซลล์อ้อยปกติ และเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร มาทำการสกัด total RNA ทำการประยุกต์ตามวิธีของ Verwoerd *et al.* (1989) โดยใช้ตัวอย่างเซลล์อ้อยจำนวนอย่างละ 0.2 ก. มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ตักใส่หลอด microcentrifuge tube ที่มี TLES บัฟเฟอร์ (100 mM Tris pH 8.0, 100 mM LiCl, 100 mM EDTA และ 1% SDS) 600 ไมโครลิตร และ phenol 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่ 4 °ซ. นาน 15 นาที นำสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิม นาน 15 นาที นำสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่เติม LiCl ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ. นานข้ามคืน จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิม นาน 15 นาที เก็บตะกอนไว้แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 30 นาที จากนั้นนำมาเติม 100 % เอธานอล ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายและ 2.6 โมลาร์ CH_3COONa pH 6.0 ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลาย พลิกหลอดไปมาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -80 °ซ. นานข้ามคืน จึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิมนาน 15 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 % เอธานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิมนาน 5 นาที เก็บตะกอนและทำให้แห้งโดย vacuum แล้วละลายตะกอนด้วย น้ำที่ปราศจาก RNase

นำ RNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณยีน ALS ด้วย degenerated primer ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของส่วน B และ E (Figure 1) ใน amino acid sequence ที่สืบค้นข้อมูล amino acid sequence ของยีน ALS จากพืชสกุลต่าง ๆ ประกอบด้วย *Arabidosis thaliana* L. Heynh. (accession no X 51514) ข้าวโพด (*Zea mays* L.) (accession no X 63553), ข้าว (*Oryza sativa* L.) (accession no AY 885674) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) (accession no AY 210408) จาก GenBank ที่มีขนาด 455 คู่เบส ใช้ไพรเมอร์ ALS2F: 5?CTGGTCTG GGGGCA ATGGGRTTTGG 3? และ ALS2R : 5?GTCCTTGAAAGCNCCACCACTCGG 3? เป็นแม่แบบ ทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยชุดสำเร็จรูป one step RT-PCR

(QIAGEN, Germany) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์สำเร็จรูป pGEMT®- easy vector (Promega, USA) และชักนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* โดยวิธี Heat shock transformation นำดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบการมียีน ALS โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I หลังจากนั้นจึงนำดีเอ็นเอพลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วว่ามียีน ALS มาทำการหาลำดับเบส โดยใช้บริการของ DNA Technology laboratory ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MegAlign (Lasergene; DNASTAR, USA) และ CLUSTAL-W (http:/ebi.ac.uk/clustalW/index.html) แล้วเปรียบเทียบการเรียงลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของยีน ALS ต่อไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

การคัดเลือกเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์

นำเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารเหลวให้ได้ปริมาณมากพอ จึงนำไปคัดเลือกเซลล์ให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ โดยพิจารณาการตอบสนองของเซลล์อ้อยปกติที่มีต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 0.0001 0.001 0.01 0.1 และ 1 ไมโครโมลาร์ แล้ววัดการเจริญเติบโตโดยการใช้ packed cell volume พบว่าเซลล์ของอ้อยมีการเจริญเติบโตลดลงตามระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ ที่สูงขึ้น (Figure 2a) โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ 0.1 ไมโครโมลาร์ ทำให้เซลล์อ้อยมีการเจริญเติบโตลดลง 50 % เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อ้อยปกติ ที่ไม่ได้รับสารอิมาซาเพอร์ เนื่องจากเซลล์อ้อยไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะที่มีสารอิมาซาเพอร์ได้ จึงทำให้มีการเจริญเติบโตลดลง ดังนั้นในการคัดเลือกเซลล์อ้อยให้ต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ จึงเริ่มต้นทำการคัดเลือกจากที่ระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ 0.1 ไมโครโมลาร์ และเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ให้สูงขึ้นเรื่อย ๆ ทีละน้อย เพื่อทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารค่อย ๆ มีการปรับตัวได้เหมือนเซลล์ปกติ จนกระทั่งได้เซลล์ที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาในการคัดเลือกนาน 378 วัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) หลังจากนั้นพิจารณาการตอบสนองของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารต่อสารอิมาซาเพอร์ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0 0.1 1 10 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ (Figure 2b) พบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารอิมาซาเพอร์ที่สูงมากขึ้นเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะมีการเจริญเติบโตลดลง โดยที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารลดลงไป 50 % เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อ้อยที่ต้านทานที่ไม่ได้รับสารอิมาซาเพอร์

เมื่อเปรียบเทียบระดับความแตกต่างของความต้านทานสารอิมาซาเพอร์ระหว่างเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารและเซลล์อ้อยปกติที่ 14 วัน

หลังได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0 0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 และ 1000 ไมโครโมลาร์ (Figure 3 and Table 1) พบว่า เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง 50 % ที่ความเข้มข้น 7.014 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่เซลล์อ้อยปกติจะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง 50 % ที่ความเข้มข้น 0.007 ไมโครโมลาร์ เมื่อพิจารณาดัชนีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช (resistance index) โดยเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 50 % ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารและเซลล์อ้อยปกติ พบว่าในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีระดับของความต้านทานสารอิมาซาเพอร์มากกว่า 918 เท่าของเซลล์อ้อยปกติ แสดงว่าเมื่อเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารได้รับสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ยังคงสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ ในขณะที่เซลล์อ้อยปกติมีการเจริญเติบโตลดลง เช่นเดียวกันกับการคัดเลือกฝ้ายที่ต้านทานต่อสารพริมซัลฟูรอน (primsulfuron) พบว่าในพันธุ์ที่ต้านทานสารมีระดับของความต้านทานสารพริมซัลฟูรอนมากกว่าในพันธุ์ที่อ่อนแอประมาณ 100-1,000 เท่า (Rajasekaran *et al.*, 1996) ซึ่งสอดคล้องกับ Zambrano และคณะ (2003) ได้คัดเลือกเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไกลโฟเสทในระดับความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์/ล. ซึ่งมีระดับของความต้านทานสารมากกว่าในพันธุ์ที่อ่อนแอ 12.5 เท่า การศึกษาในครั้งนี้ได้ตั้งสมมุติฐานเบื้องต้นของสาเหตุที่ทำให้เซลล์อ้อยเกิดความต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ว่ามีความเกี่ยวข้องหรือไม่ในการกลายพันธุ์ของยีนALS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ดังนั้นในการศึกษาขั้นตอนต่อไปจึงได้ทำการพิจารณากลไกทางชีวเคมี และชีวโมเลกุลพื้นฐานของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสารอิมาซาเพอร์

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะซิโทแลคเตทซินเธส

สารอิมาซาเพอร์จะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสาร (target site) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์พืช เมื่อพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ที่ 5 วันหลังจากได้รับสาร พบว่าในเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (N) มีกิจกรรมที่จำเพาะของเอนไซม์ ALS อยู่ในช่วง 15.45 - 20.25 nmol acetoin mg-1 protein min-1) แสดงว่าไม่แตกต่างไปจากเซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) ซึ่งมีกิจกรรมที่จำเพาะของเอนไซม์ ALS อยู่ในช่วง 14.80 - 21.05 nmol acetoin mg-1 protein min-1) ในขณะที่เซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร (NT) ในระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS เป็น 97.67 72.17 57.00 และ 25.33 %ของเซลล์อ้อยปกติที่ไม่ได้รับสาร (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 % ของเซลล์อ้อยต้านทานที่ไม่ได้รับสาร (R) ตามลำดับ (Figure 4 and Table 1) เมื่อพิจารณาจากดัชนีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช โดยประเมินจากระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ ALS ลดลงไป 50 % (I_{50}) แสดงว่าในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS มากกว่าเซลล์อ้อยปกติเป็น 10.8 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rajasekaran และคณะ (1996) ได้รายงานว่า เซลล์ของฝ้ายพันธุ์ SUR-6C ที่ต้านทานสารพริมซัลฟูรอน มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS ลดลง 50 % เมื่อได้รับสารพริมซัลฟูรอนในระดับความเข้มข้น 2.13 ไมโครโมลาร์ ต่อมา Milliman และคณะ (2003) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ALS ในหญ้า Eastern black-grass จำนวน 2 ไบโอไทป์ ใน Illinois resistant ไบโอไทป์ที่ต้านทานต่อสารในกลุ่ม imidazolinone พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS มากกว่าไบโอไทป์ที่อ่อนแอ 881 เท่า ส่วนใน Indiana resistant ไบโอไทป์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS มากกว่าไบโอไทป์ที่อ่อนแอ 118 เท่า จากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงว่า ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS มากกว่าเป็น 10.8 เท่าของเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร ซึ่งเป็นไปได้ว่ากลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสารอิมาซาเพอร์ จะเกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมาย (target site-based) ที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์พืช โดยที่ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารมีการปรับตัวเป็นแบบการตอบสนองน้อย (less sensitive) ต่อสารกำจัดวัชพืช ดังนั้นเมื่อได้รับสารอิมาซาเพอร์ จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารยังคงสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ ในขณะที่เซลล์อ้อยปกติไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ เนื่องจากสารอิมาซาเพอร์จะเข้าไปยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS ส่งผลทำให้เซลล์อ้อยปกติไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อไปได้ และจะตายไปในที่สุด ซึ่งในขั้นตอนต่อไปจะทำการศึกษาเกี่ยวกับกลไกพื้นฐานในระดับชีวโมเลกุลของสายพันธุ์เซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ โดยจะทำการพิจารณาจากลำดับเบสของยีน ALS ที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวนี้ เพื่อนำไปใช้ในการอธิบายกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นต่อไป

Table 1. I_{50} for imazapyr determined from the growth response and ALS activity of normal and resistant sugarcane cells.

Type of cells	Growth response	ALS activity
	I_{50} [1/] (μM)	
Resistant cells	7.014 ± 0.04	4.86 ± 0.17
Normal cells	0.007 ± 0.03	0.45 ± 0.17
Resistance index[2/]	**918**	**10.8**

1/ I_{50} ± standard error (SE) represents the average of three replications

2/ Resistance index = I_{50} value of resistant cells/ I_{50} value of normal cells

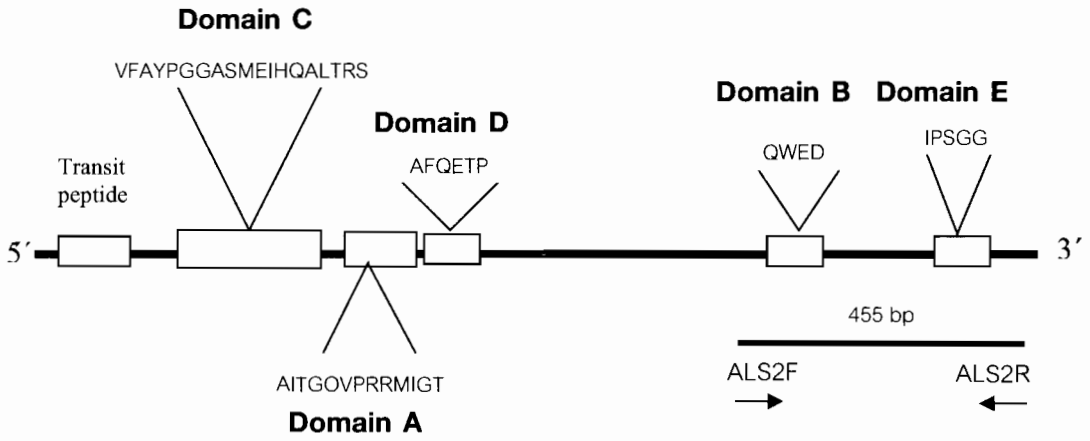

Figure 1. Diagram of the five domains involved in conferring resistance to various ALS inhibiting herbicides and degenerated primer was isolated ALS gene 455 bp fragment.

การโคลนยีนและการหาลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS

เอนไซม์ ALS เป็นตำแหน่งเป้าหมายในการเข้าทำลายของสารอิมาซาเพอร์ และยีน ALS เป็นตัวกำหนดการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวนี้ การศึกษากลไกในระดับชีวโมเลกุลของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช จึงได้ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ บางส่วนของยีน ALS จาก total RNA โดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่าได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบเหมือนกันทั้งในเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร จากลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS ที่มีขนาด 455 คู่เบส หลังจากนั้นเมื่อนำผลจากการหาลำดับเบสมาเปรียบ เทียบการเรียงลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของยีน ALS เซลล์อ้อยปกติ เซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร และยีน ALS ในพืชสกุลต่าง ๆ ประกอบด้วย *Arabidosis thaliana* L. Heynh. (X51514) ข้าวโพด (X 63553) ข้าว (AY 885674) และข้าวสาลี (AY 210408) จากฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้ MegAlign (Lasergene; DNASTAR, USA) และ CLUSTAL-W (http:/ebi.ac.uk/clustalW/ index.html) (Figure 5) พบว่ามีความแตกต่างกันของการเรียงลำดับเบสในเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารคือ เกิดการหายไปของกรดอะมิโนอะลานีน (alanine) ที่ตำแหน่ง 666 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *Arabidopsis thaliana* จึงนำลำดับเบสของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร ไปขึ้นทะเบียนในฐานข้อมูลของ GenBank รหัส EU 243998 และ EU 243999 ตามลำดับ

ตามรายงานการศึกษาเกี่ยวกับกลไกพื้นฐานในระดับชีวโมเลกุลของพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม ilmidazolinone แสดงว่าลักษณะของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชเกิดจากการกลายพันธุ์ในระดับยีน ALS ซึ่งจะเป็นแบบการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) ที่เป็นแบบการแทนที่ลำดับเบส (base substitution) โดยที่ Milliman และคณะ (2003) ได้ศึกษาความ

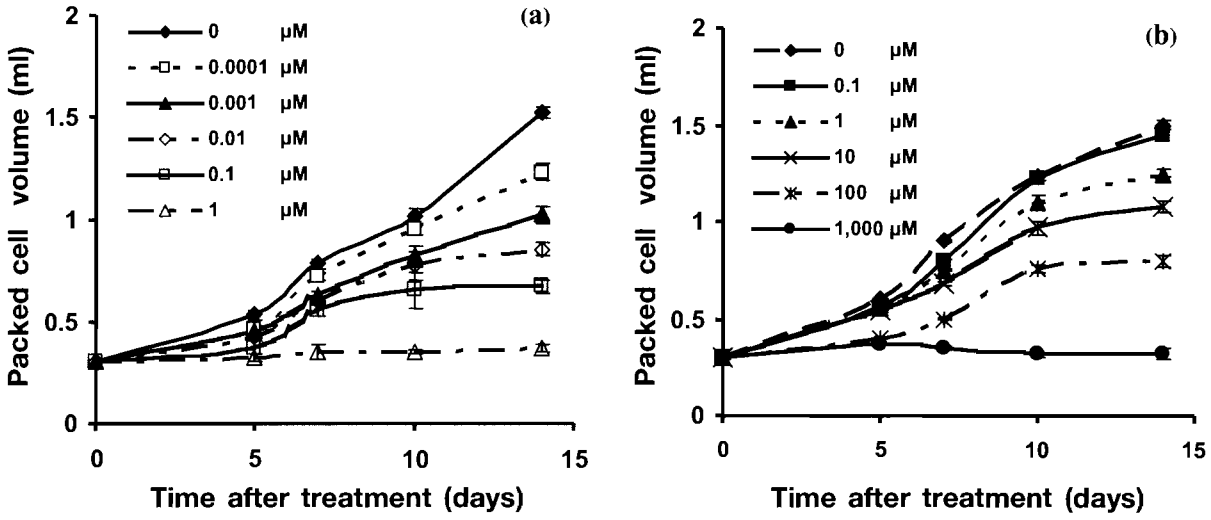

Figure 2. The effect of imazapyr on the growth response of normal (a) and resistant (b) sugarcane cell lines determined at 5, 7, 10 and 14 days after treatment at various concentration of herbicide; points are the average of three replicates ± standard errors.

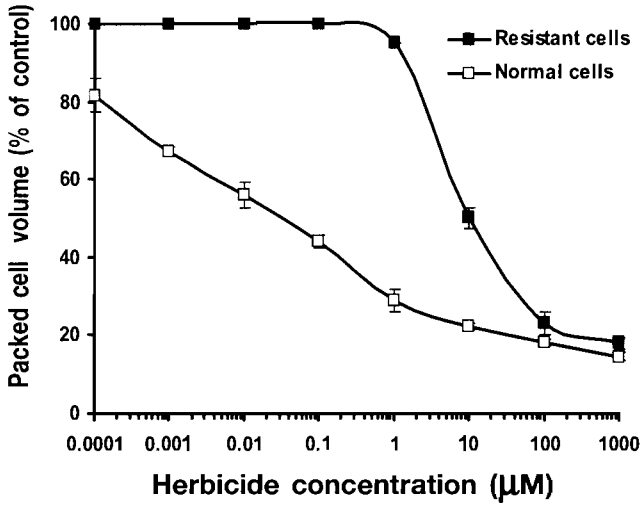

Figure 3. Growth response of normal and resistant sugarcane cells to imazapyr was determined 14 days after treatment; points are the average of three replicates ± standard errors.

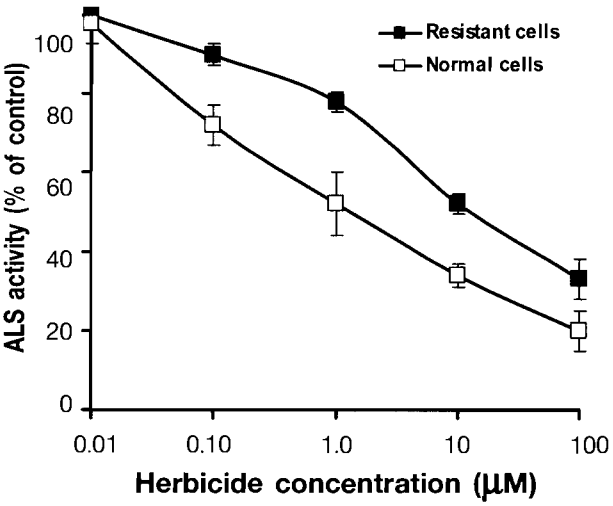

Figure 4. Inhibition of ALS activity in normal and resistant sugarcane cells by imazapyr; points are the average of three replicates ± standard errors.

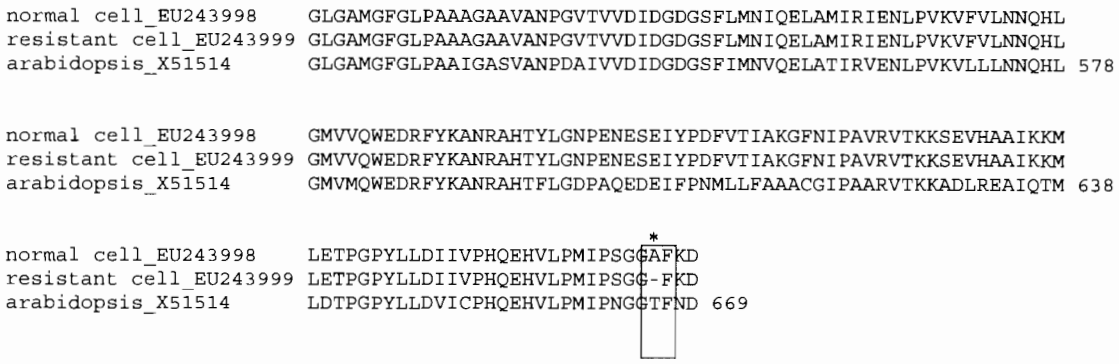

Figure 5. Alignment of deduced amino acid sequences from domain B and E of the acetolactate synthase gene in normal and resistant sugarcane cell line compared with other plant species. The asterisk (*) denotes the deletion of alanine (A) in resistant cells.

ต้านทานของสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มImidazolinone (ได้แก่ สาร imazethapyr และ imazamox) ในหญ้า Eastern black-grass จำนวน 2 ไบโอไทป์ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน พบว่าในพืชที่ต้านทานสารจะเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดเป็นแบบการแทนที่ลำดับเบส ทำให้การเกิดการแทนที่ของลำดับกรดอะมิโนจาก alanine จะกลายเป็น theronine ที่ตำแหน่ง 121 เช่นเดียวกับ sugarbeet ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม imidazolinone จะเกิดการแทนที่ลำดับเบสของกรดอะมิโนจาก threoinine กลายเป็น alanine ที่ตำแหน่ง 13 (Wright *et al.*, 1998) แสดงว่าการแทนที่ของลำดับกรดอะมิโน (amino acid substitution) ส่งผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดเกิดขึ้นในระดับยีน ALS ซึ่งผลการทดลองจะแตกต่างไปจากการศึกษาในครั้งนี้ คือ ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะมีการกลายพันธุ์เฉพาะจุดเกิดขึ้นภายในยีน ALS ที่เป็นแบบ deletion ซึ่งเป็นการเกิดการหายไปของลำดับนิวคลีโอไทป์ (nucleotide) ทำให้ลำดับกรดอะมิโน alanine ที่ตำแหน่ง 666 หายไปด้วย โดยที่กรดอะมิโน alanine มีคุณสมบัติทางเคมีเป็นพวกไม่มีขั้ว (nonpolar) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งเป็นไปได้ว่า การเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดของยีน ALS ที่เป็นแบบการหายไป ในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร อาจจะทำให้คุณสมบัติทางเคมีและโครงสร้างของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม จึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของตำแหน่งเป้าหมาย (ALS) ในการเข้าทำลายของสารกำจัดวัชพืช ซึ่งเป็นแบบตอบสนองน้อย (less sensitivity) ต่อสารกำจัดวัชพืช ส่งผลทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารนั้น มีความต้านทานต่อสารอิมาซาเพอร์ได้มากกว่าในเซลล์อ้อยปกติ ดังนั้นเมื่อเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารได้รับสารอิมาซาเพอร์ สารจะไม่สามารถเข้าไปทำลายเอนไซม์ ALS ได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับลำดับเบสของยีน ALS ในครั้งนี้สามารถอธิบายเกี่ยวกับกลไกพื้นฐานในระดับ

ชีวโมเลกุลของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชได้เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้นในระดับ mRNA และโปรตีน ว่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน ALS หรือไม่ ดังนั้นในการศึกษาขั้นตอนต่อไป ควรจะพิจารณาการแสดงออกของยีน ALS ในระดับ mRNA และ โปรตีน ในเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์

สรุปผลการทดลอง

1. การคัดเลือกเซลล์ของสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ซึ่งจะมีดัชนีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชเป็น 918 เท่าของเซลล์อ้อยปกติ ซึ่งจะเรียกว่า เซลล์ของสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (หรือเซลล์อ้อยที่ต้านทานสาร)

2. เมื่อพิจารณาจากค่า I_{50} จะเห็นได้ว่าในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS มากกว่าเป็น 10.8 เท่า ของเซลล์อ้อยปกติที่ได้รับสาร แสดงว่ากลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสารอิมาซาเพอร์ เกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมาย (target site-based) ที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในเซลล์ โดยที่เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะมีการปรับตัวเป็นแบบตอบสนองน้อยต่อสารอิมาซาเพอร์

3. กลไกในระดับชีวโมเลกุลของความต้านทานสาร โดยการพิจารณาจากลำดับเบสบางส่วนของยีน ALS ที่มีขนาด 455 คู่เบส แสดงว่าในเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารจะเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุด ที่เกิดจากการหายไปของกรดอะมิโน alanine ที่ตำแหน่ง 666 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *Arabidopsis thaliana* (X 51514) และนำลำดับเบสของเซลล์อ้อยปกติและเซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไปขึ้นทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank รหัส EU 243998 และ EU 243999 ตามลำดับ ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโนที่เกิดการหายไป อาจจะส่งผลต่อคุณสมบัติและโครงสร้างของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงจากเดิม จึงทำให้เซลล์อ้อยที่ต้านทานสารไม่ถูกยับยั้งโดยสารอิมาซาเพอร์

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และบริษัท BASF (Thai) Ltd. ที่ได้ให้สารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

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.

Corbett, C.L. and F.J. Tardif. 2006. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. *Pest Manag. Sci.* 62: 584-597.

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

Devine, D.M. and A. Shukla. 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protection.* 19: 881-889.

Milliman, L.D., D.E Riechers, L.M. Wax and F.W. Simmons. 2003. Characterization of two biotypes of imidazolinone-resistant eastern black nightshade (*Solanum pttycanthum*). *Weed Sci.* 51: 139-144.

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

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

Pornprom, T., H. Matsumoto, K. Usui and K. Ishizuka. 1994. Characterization of oxyfluorfen tolerance in selected soybean cell line. *Pestic. Biochem. Physiol. 50*: 107-114.

Punyadee, P., M. Thongros and T. Pornprom. 2007. Biochemical mechanism of resistance to imazapyr in sugarcane cell selections. *Thai J. of Agricultural Sci.* 40: 133-141.

Rajasekaran, K., J.W. Grula and D.M. Anderson. 1996. Selection and characterization of mutant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cell lines resistant to sulfonylurea and imidazolinone herbicides. *Weed Sci.* 119: 115-124.

Seefeldt, S.S., J.E. Jensen and E.P. Fuerst. 1995. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technol.* 9: 218-227.

Shaner, D.L. and B.K. Singh. 1997. Acetohydroxyacid synthase inhibitors. Pages 69-110. In : Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular biology. Roe, R.M., *et al.* (eds) IOS Press.

Singh, B.K. and D.L. Shaner. 1995. Biosynthesis of branched chain amino acid: from test tube to field. *The Plant Cell* 7: 935-944.

Verwoerd, T.C., B.N.M. Dekker and A. Hockema. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17: 2362.

Warabi, E., K. Usui., Y. Tanaka and H. Matsumoto. 2001. Resistance of a soybean cell line to oxyfluorfen by overproduction of mitochondrial protoporphyrinogen oxidase. *Pest Manag. Sci.* 57: 743-748.

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

Wright, T.R., N.F. Bascomb, S.F. Sturne and D. Penner. 1998. Biochemical mechanism and molecular basis for ALS – inhibiting herbicide resistance in sugarbeet (*Beta vulgaris*) somatic cell selections. *Weed Sci.* 46: 3-23.

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