



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีน GS และ ALS
ในพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.ทศพล พรพรหม
คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี (29 กรกฎาคม 2548 ถึง 28 กรกฎาคม 2551)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีน GS และ ALS
ในพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช

ผู้วิจัยโดย รองศาสตราจารย์ ดร.ทศพล พรพรม
คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ร่วมกับ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) กระทรวงศึกษาธิการ และ สถาบันวิจัยและพัฒนา แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Kenji Usui, Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba ประเทศญี่ปุ่น ที่กรุณาได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก ในด้านการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการวิเคราะห์ทางชีวเคมี ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนขอขอบคุณบริษัท ไบเออร์ไทย จำกัด (Bayer CropScience) ที่ให้การสนับสนุนสารกำจัดวัชพืชกลูโฟซิเนต และบริษัท BASF (Thai) จำกัด ที่ได้ให้การสนับสนุนสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ สำหรับนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

Abstract

Project Code : RMU4880046
Project Title : Alteration and Expression of the GS and ALS Gene in
Herbicide-Resistant Crops
Investigator : Associate Prof. Dr. Tosapon Pornprom
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture,
Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus,
Nakhon Pathom 73140
E-mail Address : agrtpp@ku.ac.th
Project Period : 3 years (July 29, 2005 – July 28, 2008)

This study reports investigated the alteration and expression of the acetolactate synthase (ALS) and glutamine synthetase (GS) gene in herbicide-resistant crops such as maize, mungbean, soybean, and sugarcane. Field tolerance to glufosinate and imazapyr evaluation of plant varieties were conducted in split-plots in RCBD to compare the response of genotypic differences (sub-plots) from four dosages of herbicide application (main-plots). The degree of tolerance was evaluated by inspection of crop injury, plant height, fresh weight, and dry weight. Tissue culture selection was conducted using cell suspension of culture prepared from callus of tolerant plant varieties. The cell suspension was cultured on MS-modified medium and selected using a stepwise selection with increasing concentration of herbicide from 10^{-9} to 10^{-6} M. The activity of ALS and GS enzyme of the resistant cells was higher than the normal cells. The biochemical mechanism of herbicide resistance in the plant cell appears to be an alteration at the target-site, based on the ALS and GS activity, leading to less sensitivity to the herbicides. The molecular basis of resistance showed that the ALS and GS sequence comparison was attempted, and showed nucleotides substitution leading to amino acids alteration in the resistant cell from the normal cell and ALS and GS sequence of plants from NCBI (GenBank). The ALS and GS gene sequence derived from herbicide-resistant plant cells were further submitted to the GenBank. From the results, the successful selection of herbicide resistant plant cells was an encouraging result as it may serve as useful materials in crops improvement for herbicide resistance. Our efforts to regenerate plants from the cells remain to be continuously performed.

Keywords : acetolactate synthase (ALS), ALS gene, glufosinate, glutamine synthetase (GS), GS gene, herbicide-resistant crops, imazapyr, maize, mungbean, soybean, sugarcane

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU4880046
ชื่อโครงการ : การเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีน GS และ ALS
ในพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช

ื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร.ทศพล พรพรหม
คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

E-mail Address : agrtpp@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (29 กรกฎาคม 2548 ถึง 28 กรกฎาคม 2551)

การศึกษาในครั้งนี้ ได้รายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีน acetolactate synthase (ALS) และ glutamine synthetase (GS) ในพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และถั่วลิสง โดยทำการคัดเลือกพันธุ์พืชทนทานสารกลูโฟซิเนทและอิมาซาเพอร์ ในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นในสภาพแปลงทดลอง วางแผนการทดลองแบบ split-plot in RCBD ปัจจัยหลัก คือ อัตราของการใช้สารกำจัดวัชพืช 4 อัตรา และปัจจัยรอง คือ พันธุ์พืชชนิดต่าง ๆ ประเมินลักษณะของความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช โดยพิจารณาจากข้อมูลความเป็นพิษ ความสูงต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ส่วนการคัดเลือกในระดับเซลล์ของพืชชนิดต่าง ๆ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งได้ชักนำแคลลัสและคัดเลือกให้เกิดเป็นเซลล์ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช ในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง ด้วยวิธีเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชเป็นลำดับตั้งแต่ 10^{-9} - 10^{-6} โมลาร์ ในการศึกษากลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชภายในเซลล์พืช ซึ่งพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS และ GS พบว่า ในเซลล์ที่ต้านทานสารมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS และ GS มากกว่าเซลล์ปกติ แสดงให้เห็นได้ว่า เซลล์พืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชจะมีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ALS และ GS ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งภายในเซลล์พืช โดยมีการปรับตัวเป็นแบบตอบสนองน้อย (less sensitivity) ต่อสารกำจัดวัชพืช เมื่อพิจารณาจากกลไกทางชีวโมเลกุลของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช โดยการตรวจสอบลำดับเบสของยีน ALS และ GS ในเซลล์พืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช พบว่า มีการเรียงลำดับของเบสเปลี่ยนแปลงไป เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์พืชปกติ ยีน ALS และ GS ของพืชชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งลำดับของนิวคลีโอไทด์นี้ได้ขึ้นทะเบียนใน GenBank ต่อไป สำหรับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการทำวิจัยอย่างต่อเนื่องนั้น จะเป็นการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานสารกำจัดวัชพืชต่อไป

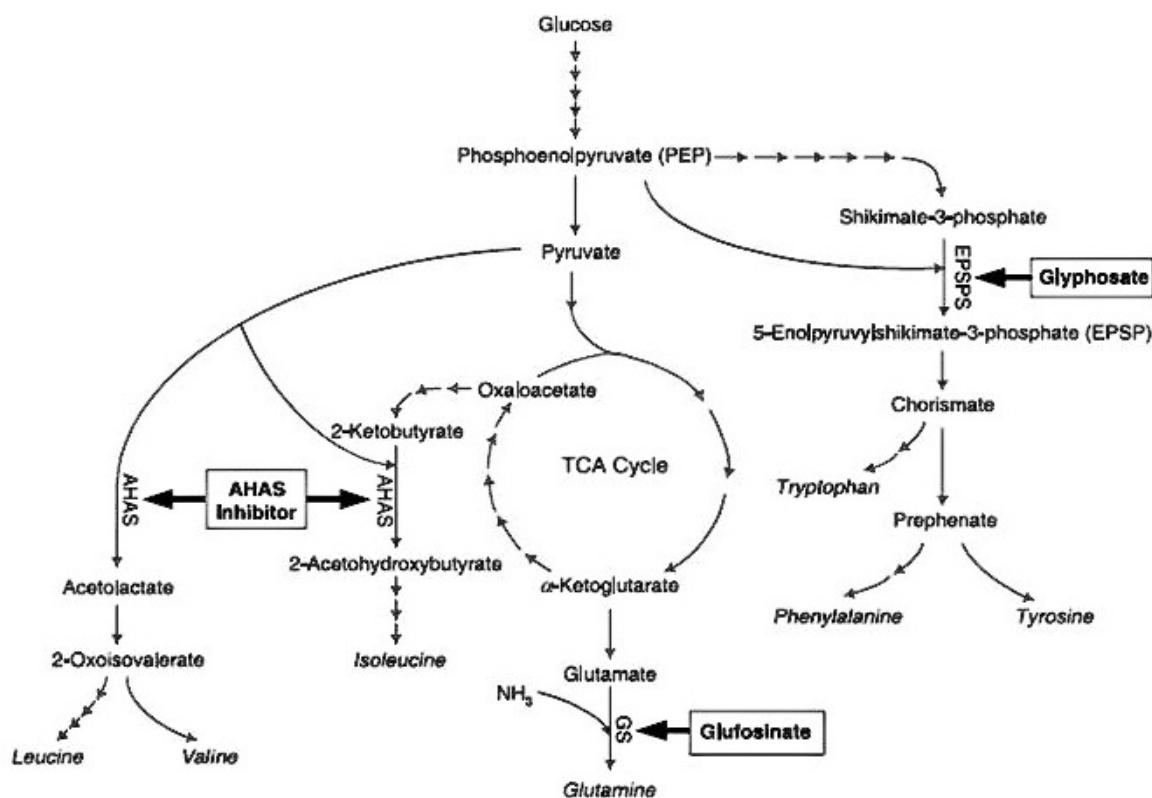
คำหลัก : อะซิโตนแลคเตทซินเทส (ALS) ยีน ALS กลูโฟซิเนท กลูตามีนซินเทส (GS) ยีน GS ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในพืชปลูก อิมาซาเพอร์ ข้าวโพด ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง

บทนำ

ในการได้รับพิษของพืชจากการใช้สารกำจัดวัชพืชนั้น จะถูกควบคุมด้วยปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ชนิดของพืช พันธุ์พืช ระยะการเจริญเติบโต สภาพแวดล้อม รวมทั้งชนิดของสารกำจัดวัชพืช ซึ่งมักจะพบอยู่เสมอว่า พืชปลูกบางชนิดสามารถทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้ ในขณะที่พืชปลูกบางชนิด (หรือแม้แต่เป็นพืชชนิดเดียวกัน) จะมีความอ่อนแอต่อสารกำจัดวัชพืช จากข้อสังเกตในข้างต้นนี้ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช (Herbicide-resistant crops) ซึ่งการพัฒนาพืชพันธุ์หรือสายพันธุ์ใหม่ที่มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น จะสามารถช่วยประหยัดเวลาและช่วยลดค่าใช้จ่าย ในการที่จะแก้ปัญหาการขึ้นรบกวนหรือการแข่งขันของวัชพืชกับพืชปลูกได้ดีกว่าในการที่จะผลิตสารชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมา

การพัฒนาสายพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น สามารถทำการคัดเลือกได้ทั้งในระดับพืชทั้งต้น (whole plant selection) และในระดับเซลล์ (cell culture selection) ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีโอกาสประสบความสำเร็จสูงและก่อให้เกิดประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์พืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช ซึ่งการคัดเลือกในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นนั้น สามารถทำการคัดเลือกได้ทั้งในสภาพแปลงทดลองและเรือนทดลอง โดยทำการคัดเลือกต้นพืชที่ไม่ถูกทำลายหรือถูกทำลายบางส่วนภายหลังจากที่ได้รับสารกำจัดวัชพืช ส่วนการคัดเลือกในระดับเซลล์พืชโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น สายพันธุ์พืชที่ต้านทานสารจะมีลักษณะภายนอกเปลี่ยนแปลงไป (phenotype change) อาจเนื่องจากการเกิดการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมในด้านความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ซึ่งสามารถที่จะถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวไปสู่รุ่นลูกหลานต่อไปได้ หรืออาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงส่วนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่สารพันธุกรรมและไม่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้

ความเข้าใจในลักษณะของกลไกพื้นฐานทางด้านสรีรวิทยา ชีวเคมี และชีวโมเลกุล ในพืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช นับว่าเป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็นมากสำหรับการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช เพื่อเพิ่มศักยภาพของพืชในการให้ผลผลิตที่สูงขึ้น แต่เนื่องจากการตอบสนองของกลไกพื้นฐานทางด้านสรีรวิทยา ชีวเคมี และชีวโมเลกุลในพืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีความซับซ้อนมากภายในพืช ซึ่งการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ เป็นการพิจารณาเกี่ยวกับกลไกพื้นฐานในระดับชีวเคมีและชีวโมเลกุลของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการสร้างกรดอะมิโน (เช่น สาร bensulfuron-methyl, glufosinate และ imazapyr เป็นต้น) (ภาพที่ 1) ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และ อ้อย เป็นต้น ซึ่งมีบทบาทสำคัญที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนของการดำเนินงานทางด้านการผลิตและการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อให้มีลักษณะของความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้ต่อไป



ภาพที่ 1 ตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยาของสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการสร้างกรดอะมิโน
(Tan et al., 2006)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. คัดเลือกพันธุ์พืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด อ้อย และ ถั่วเขียว เป็นต้น ที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการสร้างกรดอะมิโน เช่น สาร bensulfuron-methyl, glufosinate และ imazapyr เป็นต้น ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีการนำไปใช้ในการควบคุมวัชพืชในพืชปลูก โดยที่มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์น้อยมาก ไม่มีฤทธิ์ตกค้างในดิน ตลอดจนเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรมของพืช ซึ่งจะช่วยให้สามารถใช้สารกำจัดวัชพืชดังกล่าวนี้ในการควบคุมวัชพืชได้อย่างปลอดภัย

2. ศึกษากลไกพื้นฐานในระดับชีวโมเลกุลของพืชที่ต้านทานสารกลูโฟซิเนตและอิมามาซาเพอร์ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของยีน acetolactate synthase (ALS) (หรือเรียกว่า acetohydroxyacid synthase, AHAS) และ glutamine synthetase (GS) รวมทั้งทำการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนดังกล่าวนี้ เพื่อที่จะนำไปใช้ในการอธิบายกลไกพื้นฐานของความ

ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในระดับชีวเคมีและชีวโมเลกุลที่เกิดขึ้นภายในพืช นำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตและการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชต่อไป

3. เพื่อผลิตบัณฑิตในระดับปริญญาตรีและโท ให้มีความรู้ความสามารถทางด้านการจัดการวัชพืชและวิธีการพัฒนาในการใช้สารกำจัดวัชพืช เพื่อทำงานวิจัยที่มีคุณภาพสูง สามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในระดับชาติและนานาชาติได้

วิธีการทดลอง

1. ทำการทดสอบและคัดเลือกหาพันธุ์และสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ถั่วเหลือง (เอกสารแนบหมายเลข 1 และ 4) อ้อย (เอกสารแนบหมายเลข 2) ข้าวโพด (เอกสารแนบหมายเลข 3) และถั่วเขียว (เอกสารแนบหมายเลข 5) ที่ต้านทานต่อสารในกลุ่มที่ยับยั้งการสร้างกรดอะมิโน เช่น สาร bensulfuron-methyl, glufosinate และ imazapyr เป็นต้น โดยใช้วิธีการคัดเลือกทั้งแบบมาตรฐาน (conventional selection) และใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พิจารณาจากการตอบสนองของพืชที่มีต่อสารกำจัดวัชพืช ทั้งในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นและในระดับที่เป็นเซลล์ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างต้นพืช (เซลล์) ที่ปกติกับต้นพืช (เซลล์) ที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน ALS และ GS ในระดับชีวโมเลกุล ในพืชที่มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช glufosinate และ imazapyr ทั้งในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นและในระดับที่เป็นเซลล์ โดยนำ DNA ของยีนดังกล่าว ไปทำการโคลน โดยใช้เวกเตอร์ pGEM[®]-Teasy จากนั้น นำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* โดยวิธี electroporation ตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม โดยสกัดแยก DNA ออกจากเซลล์แบคทีเรีย เมื่อพบโคโลนีสีขาว สกัดพลาสมิดบริสุทธิ์ด้วยวิธี QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep จากนั้นนำ DNA ที่ได้จากการสกัดพลาสมิดไปวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสของยีนดังกล่าวต่อไป โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างต้นพืช (เซลล์) ที่ปกติกับต้นพืช (เซลล์) ที่ต้านทานสาร glufosinate และ imazapyr

3. การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน GS และ ALS ในระดับชีวโมเลกุล ในพืชที่มีความต้านทานสาร glufosinate และ imazapyr ทั้งในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นและในระดับที่เป็นเซลล์ โดยนำ mRNA ของยีนดังกล่าวนี้ ไปทำการตรวจสอบการผลิต RNA โดยใช้วิธี Northern hybridization แล้วทำการเปรียบเทียบระหว่างต้นพืช (เซลล์) ที่ปกติกับต้นพืช (เซลล์) ที่ต้านทานสาร glufosinate และ imazapyr

ผลและวิจารณ์

ในการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีน ALS และ GS ในพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และอ้อย ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการสร้างกรดอะมิโน เช่น สาร bensulfuron-methyl, glufosinate และ imazapyr เป็นต้น ซึ่งผลของทดลองได้แสดงในเอกสารแนบหมายเลข 1-5 และหมายเลข 6-10 ดังต่อไปนี้

1. Growth inhibition and acetolactate synthase activity of soybean seedlings and suspension-cultured cells treated with bensulfuron-methyl.
(เอกสารแนบหมายเลข 1)
2. Biochemical mechanism of resistance to imazapyr in sugarcane cell selections.
(เอกสารแนบหมายเลข 2)
3. RT-PCR based detection of resistance conferred by an insensitive GS in glufosinate-resistant maize cell lines.
(เอกสารแนบหมายเลข 3)
4. Glutamine synthetase mutation conferring target site-based resistance to glufosinate in soybean cell selections.
(เอกสารแนบหมายเลข 4)
5. The role of altered glutamine synthetase in conferring resistance to glufosinate in mungbean cell selections.
(เอกสารแนบหมายเลข 5)

กลไกพื้นฐานของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด อ้อย และถั่วเขียว (เอกสารแนบหมายเลข 1-5 และเอกสารแนบหมายเลข 6-10) นั้น จะมีสาเหตุหนึ่งที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการทางชีวเคมี (biochemical responses) ตรงบริเวณตำแหน่งที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งหรือทำลายภายในพืช (target site) จากการพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ALS และ GS พบว่า ที่ 3-14 วันหลังจากได้รับสาร ในเซลล์ที่ต้านทานสารจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ ALS และ GS มากกว่าในเซลล์ปกติ (พืชที่อ่อนแอ) กล่าวคือ จะมีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS และ GS เกิดขึ้นที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ

พืช และสารกำจัดวัชพืช ซึ่งในเซลล์ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชจะมีการปรับตัวของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALS และ GS เป็นแบบไม่ตอบสนอง (less sensitivity) ต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มที่ยับยั้งการสร้างกรดอะมิโน (amino acid synthesis inhibitors) กล่าวคือ เมื่อมีการใช้สารกำจัดวัชพืช ในพืชที่ต้านทานสารจะไม่ถูกยับยั้งโดยสารกำจัดวัชพืช จึงทำให้สามารถมีชีวิตรอดต่อไปได้ และมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าพืชที่อ่อนแอ ในขณะที่พืชที่อ่อนแอจะถูกยับยั้งโดยสารกำจัดวัชพืชและต่อมาจะตายไปในที่สุด

เมื่อพิจารณาจากกลไกทางชีวโมเลกุลของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช ในเซลล์พืชที่ต้านทานสารและเซลล์ปกติ (หรืออ่อนแอต่อสาร) โดยการตรวจสอบลำดับเบสของยีน ALS และ GS พบว่า ในเซลล์พืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช มีการเรียงลำดับของเบสเปลี่ยนแปลงและแตกต่างไปจากเซลล์ปกติ เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน จะมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (amino acid substitution) เกิดขึ้นในหลายตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์พืชปกติ ยีน ALS และ GS ของพืชชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งลำดับของนิวคลีโอไทด์นี้ ได้ขึ้นทะเบียนใน GenBank ต่อไป จะเห็นได้ว่า ลักษณะความต้านทานของเซลล์พืชที่ต้านทานสารดังกล่าวนี้ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของเบส (base-pair substitution) ภายในยีน GS และ ALS ส่งผลทำให้กรดอะมิโนแตกต่างไปจากในเซลล์ที่ไม่ต้านทานสาร ซึ่งอาจจะส่งผลทำให้โครงสร้างโปรตีนของยีน GS และ ALS มีการเปลี่ยนแปลงไป จึงควรที่จะมีการศึกษาในระดับโปรตีนต่อไป

จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถช่วยอธิบายให้เข้าใจกลไกพื้นฐานในระดับชีวโมเลกุลของเซลล์พืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช กล่าวคือ ลักษณะของความต้านทานดังกล่าวนี้ เกิดจากการกลายพันธุ์ในระดับยีน (gene mutation) เป็นแบบ point mutation การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีนจากอัลลีลหนึ่งไปเป็นอีกอัลลีลหนึ่ง ซึ่งเป็นผลมาจากเกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอที่เกิดจากการแทนที่เบส (base-pair substitution) สอดคล้องกับการทดลองของ Brown et al. (2002) ที่ศึกษาความต้านทานสารกลุ่ม cyclohexanedione และกลุ่ม aryloxyphenoxy-propionates ในวัชพืชวงศ์หญ้า 3 ชนิด คือ *Setaria viridis*, *Lolium rigidus* และ *Avena fatua* พบว่า กลไกของความต้านทานสารจะเกี่ยวข้องกับการเกิด mutation ของยีน ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก isoleucine กลายเป็น leucine เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนในตำแหน่งเดียวกัน ในพืชที่อ่อนแอต่อสาร พบว่า เกิดการ mutation ที่ตำแหน่งแรกของการแปลรหัส จากเดิม ATA (isoleucine) กลายเป็น CTA หรือ TTA ซึ่งทั้ง 2 codon จะแปลรหัสเป็น leucine เช่นเดียวกันในการทดลองของ Moss et al. (2003) ได้ทำการเปรียบเทียบพื้นฐานทางด้านชีวโมเลกุลของเอนไซม์ ACCase ใน black-grass พันธุ์ Nott A1 ที่ต้านทานสาร sethoxydim และพันธุ์ Oxford S1 ที่อ่อนแอต่อสาร พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน isoleucine ที่มีอยู่ในพันธุ์อ่อนแอกลายเป็น leucine ในพันธุ์ที่ต้านทานสารที่ตำแหน่งเดียวกัน

เมื่อทำการศึกษาปริมาณการสะสมของ mRNA (กรณีศึกษาในยีน GS) พบว่า ในสภาวะที่ไม่มีการใช้สารกำจัดวัชพืชนั้น ในเซลล์ปกติ (พืชที่อ่อนแอ) จะมีปริมาณการสะสมของ mRNA เป็นปริมาณสูงมาก ซึ่งจะใกล้เคียงกับในเซลล์พืชที่ต้านทานสาร แต่เมื่อได้รับสารกำจัดวัชพืชกลุ่มโฟซิเนท พบว่า ในเซลล์พืชที่ต้านทานสารและเซลล์ปกติ (พืชที่อ่อนแอ) มีปริมาณการสะสมของ mRNA ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่จะไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า การใช้สารกำจัดวัชพืชมีผลต่อปริมาณการสะสมของ mRNA จากการพิจารณากลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสารนั้น ในเซลล์ที่ต้านทานสารจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ GS มากกว่าในเซลล์ปกติ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า กลไกในการควบคุมการสังเคราะห์กรดอะมิโนของสารกำจัดวัชพืชในเซลล์พืช อาจจะเกิดขึ้นในช่วง translation หรือ posttranslation ของยีน GS กล่าวคือ ในช่วงของการสังเคราะห์เอนไซม์ GS โดยที่ความจำเพาะเจาะจงและว่องไวต่อสารกำจัดวัชพืช จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่แสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS ที่เป็นแบบการตอบสนองน้อย (less sensitivity) ต่อสารกำจัดวัชพืช จึงทำให้พืชที่ต้านทานสารไม่ถูกยับยั้งโดยสารกำจัดวัชพืช (หรือสามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช) ได้มากกว่าในเซลล์ปกติ (พืชที่อ่อนแอ) ซึ่งนำไปสู่สาเหตุของการเกิดความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้ ดังนั้น สารกำจัดวัชพืชจึงไม่สามารถเข้าไปทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ GS ได้หมด แต่อย่างไรก็ตาม ในพืชที่ต้านทานสารต่อสารกำจัดวัชพืช ยังคงพบว่าการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวนี้ ถึงแม้ว่าพืชจะได้รับสารกำจัดวัชพืชกลุ่มโฟซิเนท

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถใช้เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการอธิบายกลไกพื้นฐานทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลของพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชได้ ซึ่งสายพันธุ์เซลล์พืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่ได้จากการคัดเลือกในครั้งนี้ กำลังอยู่ในขั้นตอนของการชักนำเพื่อให้เกิดเป็นต้นใหม่ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ขั้นตอนของการดำเนินงานในการผลิตและการปรับปรุงพันธุ์พืช ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช โดยเฉพาะในกลุ่มที่ยับยั้งการสร้างกรดอะมิโน (amino acid synthesis inhibitors) เพื่อให้มีลักษณะของความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชต่อไป นอกจากนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและแนวทางในการพัฒนาพันธุ์พืชให้ต้านทานสารกำจัดวัชพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไปได้ ซึ่งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการป้องกันหรือลดความเสียหายของพืชปลูกจากการใช้สารกำจัดวัชพืช ทำให้เกษตรกรสามารถเลือกใช้สารกำจัดวัชพืชได้อย่างปลอดภัย สามารถช่วยในการควบคุมและกำจัดวัชพืชอย่างมีประสิทธิภาพได้มากยิ่งขึ้น โดยที่สามารถนำความรู้ทางด้านชีวเคมีและชีวโมเลกุล มาใช้ในการอธิบายเกี่ยวกับกลไกพื้นฐานของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช ตลอดจนยังเป็นการพัฒนาเทคนิคและวิธีการในการตรวจสอบข้อมูลในระดับชีวโมเลกุลของพืชปลูก เพื่อช่วยตรวจสอบข้อมูลทางพันธุกรรมของพืชปลูก (และ/หรือวัชพืช) ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในระดับชีวโมเลกุลได้เช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Brown, A.C., S.R. Moss, Z.A. Wilson and L.M. Field. 2002. An isoleucine to leucine substitution in the ACCase of *Alopecurus myosuroides* (black-grass) is associate with resistance to the herbicide sethoxydim. *Pestic. Biochem. Physiol.* 72: 160-168.
2. Chaleff, R.S. and M.F. Parsons. 1987. Direct selection in vitro for herbicide-resistant mutants of *Nicotiana tabacum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 5104-5107.
3. Chompoo, J. and T. Pornprom. 2008. RT-PCR based detection of resistance conferred by an insensitive GS in glufosinate-resistant maize cell lines. *Pestic. Biochem. Physiol.* 90: 189-195.
4. Devine, M., S.O. Duke and C. Fedtke. 1993. Physiology of herbicide action. PTR Prentice-Hall Inc., New Jersey. 439 p.
5. Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell Res.* 50: 151.
6. Hughes, K. 1983. Selection for herbicide resistance, pp. 442-460. *In*: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada. (eds.). *Hand Book of Plant Cell Culture*. Vol. 1, Macmillan Publishing Co. A Div. Macmillan Inc., New York.
7. Moss, S.R., K.M. Cocker, A.C. Brown, L. Hall and L.M. Field. 2003. Characterisation of target-site resistance to ACCase-inhibiting herbicides in the weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *Pest Manag. Sci.* 59: 190-201.
8. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
9. Pornprom, T., H. Matsumoto, K. Usui and K. Ishizuka. 1994. Characterization of oxyfluorfen tolerance in selected soybean using cell line. *Pestic. Biochem. Physiol.* 50: 107-112.
10. Pornprom, T., S. Surawattananon and P. Srinives. 2000a. Differential tolerance of soybean cultivars to glufosinate. *SABRAO J. of Breeding and Genetics.* 32(2): 73-80.
11. Pornprom, T., S. Surawattananon and P. Srinives. 2000b. Ammonia accumulation as an index of glufosinate-tolerant soybean cell lines. *Pestic. Biochem. Physiol.* 68: 102-106.
12. Pornprom, T., J. Chompoo and B. Grace. 2003. Glufosinate tolerance in hybrid corn varieties base on decreasing ammonia accumulation. *Weed Biology and Management.* 3(1): 52-56.
13. Pornprom, T., K. Usui and K. Ishizuka. 2005. Growth inhibition and acetolactate

synthase activity of soybean seedlings and suspension-cultured cell treated with bensulfuron-methyl. *Weed Biology and Management*. 5(3): 150-153.

14. Susan, R.S. and M.N. Carl. 1985. Selection of glyphosate-tolerant tobacco calli and the expression of this tolerance in regenerated plant. *Plant Physiol*. 78: 411-416.
15. Tan, S., R. Evans and B. Singh. 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino acids*. 30: 195-204.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ ได้เสนอรายงานความก้าวหน้าของผลงานวิจัย ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 4-5 เรื่อง มีดังนี้

1.1 Tosapon Pornprom, Kenji Usui and Kozo Ishizuka. 2005. Growth inhibition and acetolactate synthase activity of soybean seedlings and suspension-cultured cells treated with bensulfuron-methyl. *Weed Biology and Management*. 5(3): 150-153. (published เอกสารแนบหมายเลข 1)

1.2 Parkpoom Punyadee, Mattika Thongros and Tosapon Pornprom. 2007. Biochemical mechanism of resistance to imazapyr in sugarcane cell selections. *Thai J. Agricultural Science*. 40(3-4): 133-141. (published เอกสารแนบหมายเลข 2)

1.3 Jamnian Chompoo and Tosapon Pornprom. 2008. RT-PCR based detection of resistance conferred by an insensitive GS in glufosinate-resistant maize cell lines. *Pesticide Biochem. and Physiol*. 90: 189-195. (published เอกสารแนบหมายเลข 3)

1.4 Tosapon Pornprom, Nathinee Prodmatee and Orawan Chatchawankanphanich. 2008. Glutamine synthetase mutation conferring target site-based resistance to glufosinate in soybean cell selections. *Pest Management Science*. (accepted เอกสารแนบหมายเลข 4)

1.5 Tosapon Pornprom, Athitaya Pengnual, Nawarat Udomprasert and Orawan Chatchawankanphanich. 2008. The role of altered glutamine synthetase in conferring resistance to glufosinate in mungbean cell selections. *Thai Journal of Agricultural Science*. (submitted เมื่อวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2551 ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนของการ revising the manuscript เอกสารแนบหมายเลข 5)

นอกจากนี้ กำลังอยู่ในช่วงของการทำการวิจัยทางด้านการเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีน ALS ในพันธุ์อ้อยที่ต้านทานสาร imazapyr อย่างต่อเนื่อง ซึ่งคาดว่าจะได้ผลงานวิจัยอีกจำนวน 1 เรื่อง คือ "Acetolactate synthase mutation conferring target site-based resistance to imazapyr in sugarcane cell selections" เพื่อที่จะได้เสนอรายงานความก้าวหน้าของงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติและ/หรือนานาชาติต่อไป

1. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์

เป็นข้อมูลทางวิชาการที่จะช่วยให้ภาครัฐและเอกชนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในการผลิตและการใช้สารกำจัดวัชพืช โดยเฉพาะบริษัทที่ประกอบธุรกิจทางด้านสารเคมีทางการเกษตร ได้แก่ บริษัท ไบเออร์ไทย จำกัด (Bayer CropScience) และบริษัท BASF (Thai) จำกัด รวมทั้งบริษัทที่ประกอบธุรกิจทางด้านปรับปรุงพันธุ์พืช และเมล็ดพันธุ์ ได้รับทราบข้อมูลในการใช้สารกำจัดวัชพืชได้อย่างถูกต้องและปลอดภัย เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในส่วนของการพัฒนาพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชต่อไป

- เชิงนโยบาย

เป็นข้อมูลทางวิชาการที่จะช่วยให้ภาครัฐและบริษัทเอกชนต่าง ๆ ที่มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/ เกิดมาตรการใหม่/ เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน ที่เกี่ยวข้องในการพัฒนาพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช (herbicide-resistant crops) รวมทั้งกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช (mechanism of herbicide resistance) เช่น หน่วยงานที่เกี่ยวข้องจากทางมหาวิทยาลัย กรมวิชาการเกษตร และบริษัทที่ประกอบธุรกิจด้านสารเคมีทางการเกษตร ได้แก่ บริษัท ไบเออร์ไทย จำกัด (Bayer CropScience) และบริษัท BASF (Thai) จำกัด ได้รับทราบข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช และการใช้สารกำจัดวัชพืชได้อย่างถูกต้องและมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้

- เชิงสาธารณะ

เป็นข้อมูลทางวิชาการที่จะช่วยให้ภาครัฐ เช่น หน่วยงานหน่วยงานที่เกี่ยวข้องจากทางมหาวิทยาลัย กรมวิชาการเกษตร บริษัทเอกชนต่าง ๆ ได้แก่ บริษัท ไบเออร์ไทย จำกัด (Bayer CropScience) และบริษัท BASF (Thai) จำกัด และองค์กรต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในการพัฒนาพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช (herbicide-resistant crops) รวมทั้งกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช (Mechanism of herbicide resistance) โดยเฉพาะองค์กร NGO ที่มีเครือข่ายความร่วมมือ/ สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง ได้รับทราบข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช และการใช้สารกำจัดวัชพืชได้อย่างถูกต้องและปลอดภัย

- เชิงวิชาการ

ได้มีการพัฒนาการเรียนการสอน รวมทั้งสร้างนักวิจัยใหม่ ผลิตบัณฑิตในระดับปริญญาตรีและโท ให้มีความรู้ความสามารถทางด้านการจัดการวัชพืชและวิธีการพัฒนาในการใช้สารกำจัดวัชพืช เพื่อทำงานวิจัยที่มีคุณภาพสูง สามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในระดับชาติและนานาชาติได้ ซึ่งมีนักศึกษาปริญญาโทในโครงการ จบการศึกษาจำนวน 5-6 คน ดังนี้

1. น.ส.จำเนียร ชมภู ทำวิทยานิพนธ์เรื่อง การคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนท ปัจจุบันทำงานเป็นพนักงานในตำแหน่งอาจารย์ สังกัดภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

2. น.ส.อาทิตย์ยา เป็งนวล ทำวิทยานิพนธ์เรื่อง การศึกษาทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลของสายพันธุ์เซลล์ถั่วเขียวต้านทานสารกลูโฟซิเนท ปัจจุบันกำลังศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก ที่ประเทศ Australia

3. น.ส.ณัฐินี โปรดเมธี ทำวิทยานิพนธ์เรื่อง การศึกษาทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลของสายพันธุ์เซลล์ถั่วเหลืองต้านทานสารกลูโฟซิเนท ปัจจุบันทำงานเป็นนักวิจัย สังกัดสถานีวิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา

4. น.ส.มัตติกา ทองรส ทำวิทยานิพนธ์เรื่อง การคัดเลือกและกลไกทางชีวเคมีของพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ ปัจจุบันทำงานเป็นนักวิจัย ในโครงการวิจัยสังกัดภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

5. นายภาคภูมิ ปัญญาดี ทำวิทยานิพนธ์เรื่อง กิจกรรมของเอนไซม์อะซิโตนแลคเตทซินเรสในเซลล์อ้อยที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานสารอิมาซาเพอร์ ปัจจุบันทำงานเป็นนักวิจัย บริษัท ไบเออร์ไทย จำกัด (Bayer CropScience) ประเทศไทย

6. น.ส.นิศาชล เครื่องจันทร์ ทำวิทยานิพนธ์เรื่อง กลไกทางชีวโมเลกุลของพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ ปัจจุบันกำลังศึกษาในระดับปริญญาโท ที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ซึ่งคาดว่าจะสำเร็จการศึกษาในช่วงเดือนมีนาคม 2552

2. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

1. ภาคภูมิ ปัญญาดี นิศาชล เครื่องจันทร์ มัตติกา ทองรส และ ทศพล พรพรหม 2550 การคัดเลือกและกลไกทางชีวเคมีของสายพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 38(5): 433-442 (เอกสารแนบหมายเลข 6)

2. นิศาชล เครื่องจันทร์ มัตติกา ทองรส และ ทศพล พรพรหม การเกิดการกลายพันธุ์ของยีนอะซิโตนแลคเตทซินเรสในสายพันธุ์เซลล์อ้อยต้านทานสารอิมาซาเพอร์ 2551 วารสารวิชา

การเกษตร (submitted เมื่อวันที่ 12 พฤษภาคม 2551 ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนของการ revising the manuscript เอกสารแนบหมายเลข 7)

3. ญัฐินี โปรตเมธี และ ทศพล พรพรหม การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสในสายพันธุ์เซลล์ถั่วเหลืองต้านทานสารกลูโฟซิเนท ในการประชุมทางวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ในวันที่ 2-4 พฤศจิกายน 2548 ณ โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว จ. เชียงใหม่ (เอกสารแนบหมายเลข 8)

4. อาทิตยา เป็งนวล และ ทศพล พรพรหม การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสและการสะสมแอมโมเนียในสายพันธุ์เซลล์ถั่วเขียวต้านทานสารกลูโฟซิเนท ในการประชุมทางวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ในวันที่ 2-4 พฤศจิกายน 2548 ณ โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว จ. เชียงใหม่ (เอกสารแนบหมายเลข 9)

5. ภาคภูมิ ปัญญาดี มัตติกา ทองรส รัตนยุทธ์ สัตยานิคม และ ทศพล พรพรหม การคัดเลือกและกลไกทางชีวเคมีของพันธุ์ถั่วต้านทานสารกำจัดวัชพืชอิมาซาเพอร์ ในการประชุมทางวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ในวันที่ 20-22 พฤศจิกายน 2550 ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูน จ.พิษณุโลก (เอกสารแนบหมายเลข 10)