

การคัดเลือกแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท

Selection of KDML105 Calli Tolerance to Glyphosate

สุริยันตร์ ฉะอุ่ม¹ ศรีสม สุรวัฒนานนท์² กมลพรรณ นามวงศ์พรหม²
และ เฉลิมชัย วงศ์วัฒนะ³

Suriyan Cha-um, Srisom Surawattananon, Kramolpun Namwongprom
and Chalermchai Wongwattana

ABSTRACT

Calli of KDML105 were selected for glyphosate-tolerance on solidified 0.25% Phytigel®-solidified MS (Murashige and Skoog, 1962) selection medium (MS salts and vitamins, 1 mg l⁻¹ kinetin, and 10⁻⁴ M glyphosate) at 25±2 °C, 70±5 µmol m⁻²s⁻¹ photosynthetic photon flux density (PPFD), and 16 h d⁻¹ photoperiod. Calli fresh weight were decreased in selection medium more than in glyphosate-free medium. The selected calli at 4 and 8 weeks (S₄ and S₈) could be regenerated on the glyphosate-free medium. Plantlets were propagated by tissue culture technique and treated with 0, 10⁻⁵, 5×10⁻⁵ and 10⁻⁴ M glyphosate *in vitro*. The height of S₄ and S₈ plantlets was decreased with increasing glyphosate concentrations in culture media. The number of tillers and number of roots were increased in culture media supplemented with 10⁻⁵ M glyphosate. The S₈ plantlets could survived on the culture supplemented with 5×10⁻⁵ M glyphosate. Increasing the height of plantlets indicated high survival percentage under glyphosate-stressed condition. Tolerant plants were transferred to pots and treated with 0, 250, 500, 1000 and 2000 mg l⁻¹ glyphosate. The growth of plants was inhibited and phytotoxicity was observed when treated with high glyphosate concentrations. Increasing glyphosate concentrations resulted in lesser toxicity in S₈ plantlets than in S₄ plantlets.

Key words : glyphosate, *in vitro*, KDML105, calli

¹ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10400

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok 10400, Thailand.

² ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Botany, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

³ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10100

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10100, Thailand.

บทคัดย่อ

แคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ 105 ถูกนำมาคัดเลือกในอาหารแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติม kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์เพาะเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิ 25 ± 2 °C ความเข้มแสง 70 ± 5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สารกำจัดวัชพืชในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลทำให้น้ำหนักสดของแคลลัสลดลง แคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกนาน 4 และ 8 สัปดาห์ ถูกนำไปชักนำให้เกิดต้นในอาหารที่ไม่มีสารกำจัดวัชพืช สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ ต้นข้าวที่ได้นำไปเพิ่มจำนวนและทดสอบระดับความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยการเติมสารกำจัดวัชพืชความเข้มข้น 0 10^{-5} 5×10^{-5} และ 10^{-4} M ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ต้นข้าวมีความสูงลดลงตามความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชที่เพิ่มขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยง และในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืช 10^{-5} M ต้นข้าวมีจำนวนหน่อและจำนวนรากเพิ่มขึ้นและต้นข้าวที่ได้จากแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือก 8 สัปดาห์ สามารถรอดชีวิตได้ในอาหารที่เติมสารกำจัดวัชพืชความเข้มข้น 5×10^{-5} M ซึ่งการเจริญเติบโตด้านความสูงที่เพิ่มขึ้นจะเป็นตัวบ่งชี้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นพืชที่เพิ่มสูงขึ้น ต้นข้าวที่ได้จากการเพิ่มจำนวนถูกนำไปปลูกในกระถางสภาพขังน้ำและทำการฉีดพ่นด้วยสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 0 250 500 1000 และ 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร สารกำจัดวัชพืชความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ต้นข้าวไม่เจริญเติบโตและแสดงอาการเป็นพิษ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช ต้นข้าวที่ได้จากแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือก 8 สัปดาห์ แสดงอาการเป็นพิษน้อยกว่าแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือก 4 สัปดาห์

คำนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทในการปรับปรุงพันธุ์พืช ทำให้พืชเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงและสามารถใช้ในการคัดเลือกลักษณะกลายพันธุ์ที่

ทนทานต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช โดยการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชบนอาหารที่เติมสารกำจัดวัชพืชลงไป เมื่อกลุ่มเซลล์หรือเนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นต้น ต้นพืชเหล่านี้จะมีลักษณะที่ทนทานและสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้ (Chu, 1983; Wang et al., 1987) การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชโดยการคัดเลือกโดยตรง โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืช เซลล์ที่เจริญเติบโตจะถูกคัดเลือกไว้ แล้วนำไปชักนำให้เกิดต้นและทดสอบความทนทานต่อไป เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์ยาสูบทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทพบสายพันธุ์ทนทาน 17 สายพันธุ์ แม้ว่าจะทำการเพาะเลี้ยงต่อไปนานถึง 1 ปี พืชยังคงมีความทนทานต่อไกลโฟเสท (Dyer et al., 1988) หรือการคัดเลือกโดยวิธีช่วยชีวิต โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้วย้ายเซลล์ที่รอดชีวิตลงในอาหารที่ไม่มีสารกำจัดวัชพืชเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตต่อไป เช่น การคัดเลือกเซลล์ถั่วเหลืองทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่ความเข้มข้น 10^{-2} โมลาร์ เซลล์ทนทานได้สูงสุดและสามารถเจริญเติบโตได้ (Suwanketnikom et al., 1992) หรือการคัดเลือกโดยวิธีเป็นขั้นตอน การคัดเลือกโดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน เช่น การคัดเลือกเซลล์แคโรททนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท โดยใช้สารความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ แล้วทำการเปลี่ยนอาหารและเพิ่มความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงถึง 25 มิลลิโมลาร์ เซลล์มีความทนทานเพิ่มขึ้น 52 เท่าของเซลล์ปกติ (Shyr and Widholm, 1990)

ไกลโฟเสทเป็นสารกำจัดวัชพืชชนิดไม่เลือกทำลาย มีประสิทธิภาพในการกำจัดวัชพืชได้อย่างกว้างขวาง ไม่มีผลตกค้างในดินเนื่องจากสารนี้ถูกจับโดยอนุภาคดินและย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในดิน เป็นอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก ปลา แมลง และแบคทีเรียอย่างมาก จึงปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม (Franz, 1984) แต่ยังไม่มีการรายงานการใช้ในนาข้าว เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทสามารถทำลายต้นข้าวได้ด้วย

ดังนั้นการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการสร้างสายพันธุ์ข้าวทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทที่จะนำมาใช้ในนาข้าวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือกแคลลัสทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช

นำแคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกิ่งพืชบนอาหารเลี้ยงสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มี 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในสภาพมืด (Cha-um et al., 1997) หลังจากนั้น 2 สัปดาห์แคลลัสซึ่งมีน้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 78 มิลลิกรัม นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 10^{-4} โมลลาร์ (Cha-um et al., 1996) เปรียบเทียบกับแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารปกติ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 ± 5 เปอร์เซ็นต์ ได้รับแสงความเข้ม $70 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกน้ำหนักสดแคลลัสทุก ๆ 2 สัปดาห์

การชักนำแคลลัสทนทานให้เกิดขึ้น

แคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารที่เติมไกลโฟเสทในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 ถูกนำมาทำให้แห้งบนจานแก้วนาน 3 วัน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดขึ้นสูตร MS ที่มี kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Cha-um et al., 1997) วางแผนการทดลองเช่นเดียวกับการคัดเลือกแคลลัสทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดขึ้นและจำนวนต้นต่อแคลลัส

การทดสอบต้นข้าวทนทานในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ต้นข้าวที่ได้จากการชักนำให้เกิดขึ้นจากแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือกนาน 4 สัปดาห์ (S_4) และ 8 สัปดาห์ (S_8)

ถูกนำมาชักนำให้เกิดขึ้นจำนวนมาก ทำการตัดแบ่งต้นข้าวความสูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร แล้วนำไปทดสอบระดับความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชในอาหารสูตร MS ที่เติมสารกำจัดวัชพืชความเข้มข้น 0 , 10^{-5} , 5×10^{-5} และ 10^{-4} โมลลาร์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ ๆ ละ 2 ต้น เพาะเลี้ยงในสภาพเช่นเดียวกับการชักนำให้เกิดขึ้นจากแคลลัส หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตความสูงของต้น จำนวนหน่อ และจำนวนราก

การทดสอบต้นข้าวทนทานในกระถางสภาพธรรมชาติ

ต้นข้าว S_4 และ S_8 ถูกนำมาชักนำให้เกิดขึ้นจำนวนมาก ทำการตัดแบ่งต้นข้าวลงเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก ย้ายปลูกในกระถางที่มีดินปลูกอยู่ในสภาพน้ำขัง เมื่อต้นข้าวอายุครบ 1 เดือน ทดสอบระดับความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 0 250 500 1000 และ 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 9 ซ้ำ ๆ ละ 2 ต้น หลังการทดสอบนาน 4 สัปดาห์ บันทึกความสูงของต้น จำนวนหน่อ และระดับความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืช

ระดับความเป็นพิษ

- 1 = ต้นข้าวปกติไม่แสดงอาการได้รับพิษ
- 2 = ต้นข้าวเกิดอาการใบไหม้ 1/3 ของใบทั้งต้น
- 3 = ต้นข้าวเกิดอาการใบไหม้ 2/3 ของใบทั้งต้น
- 4 = ต้นข้าวเกิดอาการใบไหม้ทั้งต้น
- 5 = พิษสูงมากต้นข้าวตายทั้งต้นและใบ

ผล

การคัดเลือกแคลลัสทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช

แคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ถูกนำมาคัดเลือกความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงที่มีสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้น 10^{-4} โมลลาร์

พบว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแคลลัสและการเปลี่ยนถ่ายอาหารทุก ๆ 2 สัปดาห์ มีผลทำให้น้ำหนักสดของแคลลัสลดลง และในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชจะทำให้แคลลัสมีน้ำหนักสดลดลงตามระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหาร และลดลงมากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารปกติ (Figure 1)

การชักนำแคลลัสที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชให้เกิดขึ้น

แคลลัสข้าวที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารที่มีสารกำจัดวัชพืชไกลฟอสเฟตความเข้มข้น 10^{-4} โมลลาร์ นาน 4 และ 8 สัปดาห์ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดขึ้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์

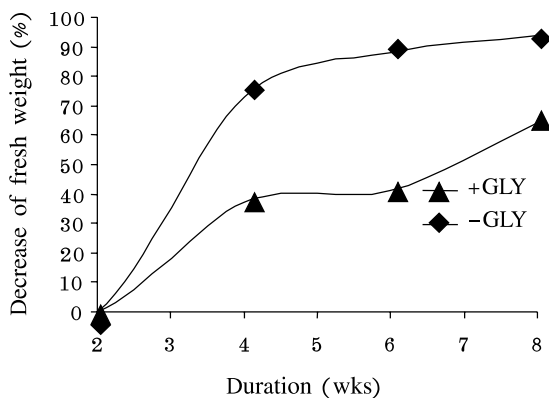


Figure 1 Comparisons of percent decrease in fresh weight of rice calli cultured on medium supplemented with glyphosate and control (without glyphosate).

และสามารถเกิดต้นได้ 1 และ 2 ต้นต่อแคลลัสตามลำดับ (Figure 2) แคลลัสทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลฟอสเฟตได้ (Figure 3) ความสามารถในการเกิดต้นของแคลลัสข้าวในสภาพที่ผ่านการคัดเลือกความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชต่ำกว่าแคลลัสที่เจริญในสภาพปกติ

การทดสอบต้นข้าวทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช ถูกนำไปเพิ่มจำนวนหน่อเพื่อนำไป

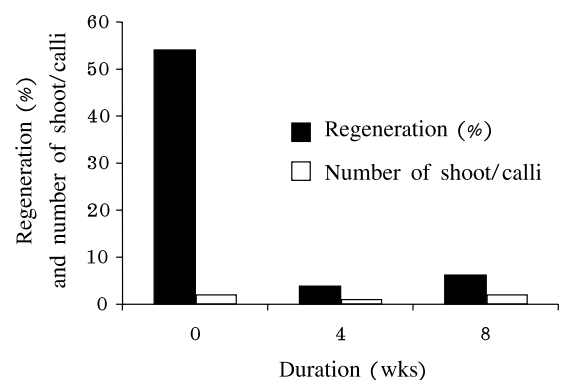


Figure 2 Regeneration of glyphosate-tolerant calli and control after cultured on MS medium supplemented with 1 mg l^{-1} kinetin at 1 month.

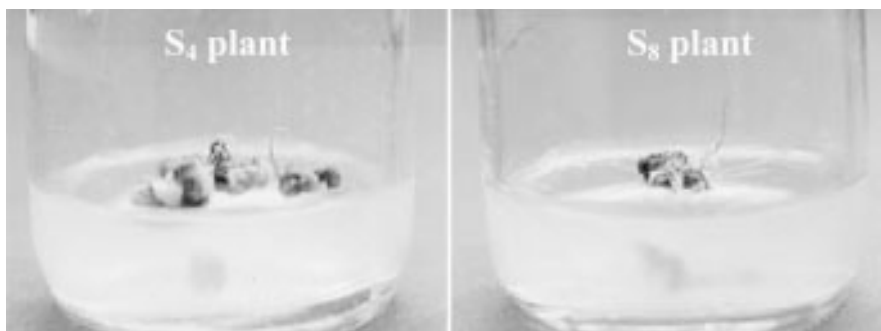


Figure 3 Plantlets regeneration of glyphosate-tolerant calli on MS medium supplemented with 1 mg l^{-1} kinetin after culture for 4 weeks.

ทดสอบระดับความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าสารกำจัดวัชพืชในระดับความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ มีผลทำให้จำนวนหน่อและจำนวนรากของต้นข้าวเพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ ทำให้ต้นข้าวตาย ส่วนที่ความเข้มข้น 5×10^{-5} โมลาร์ ต้นข้าวที่ได้จากแคลลัสทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตนาน 8 สัปดาห์ (S_8) สามารถอยู่รอดได้ แต่ไม่เกิดรากและหน่อ (Table 1) ความสูงของต้นข้าว S_4 และ S_8 ลดลงตามความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช และมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นข้าว (Figure 4) โดยต้นข้าวที่รอดชีวิตจะมีการเจริญเติบโตทางด้านความสูงของต้นเพิ่มขึ้น

กำจัดวัชพืชถูกนำไปเพิ่มจำนวนหน่อและชักนำให้เกิดรากแล้วย้ายลงปลูกในกระถางสภาพธรรมชาติเมื่อต้นข้าวอายุ 1 เดือน ทำการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าสารกำจัดวัชพืชความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้จำนวนหน่อและความสูงของต้นข้าว S_4 และ S_8 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้ฉีดพ่นด้วยสารกำจัดวัชพืช ซึ่งความสูงของต้นข้าวลดลงตามความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชที่เพิ่มขึ้น (Table 2) ความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชที่เพิ่มขึ้นทำให้ต้นพืชแสดงอาการได้รับพิษสูงขึ้น โดยต้นข้าว S_4 แสดงอาการได้รับพิษสูงกว่าต้นข้าว S_8 (Figure 5)

วิจารณ์

การทดสอบต้นข้าวที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกระถางสภาพธรรมชาติ
ต้นข้าวที่ได้จากการเลี้ยงแคลลัสทนทานต่อสาร

แคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เติมสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท

Table 1 Effect of glyphosate on number of tillers and number of roots of glyphosate-tolerant plants *in vitro*.

Glyphosate (M)	S ₄ plant		S ₈ plant	
	No. of tillers	No. of roots	No. of tillers	No. of roots
0	1.4b**	12b**	2.6b**	8b**
10^{-5}	5.0a	25a	4.1a	17a
5×10^{-5}	0.0c	0c	0.2c	0c
10^{-4}	0.0c	0c	0.0c	0c

¹ Values followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.01$ (DMRT's test)

Table 2 Effect of glyphosate on number of tillers and plant height of glyphosate-tolerant plants *in vivo*.

Glyphosate (mg l ⁻¹)	S ₄ plant		S ₈ plant	
	No. of tillers	Plant height (cm)	No. of tillers	Plant height (cm)
0	2ab**	53a**	3 ^{NS}	53a**
250	3a	53a	2	44ab
500	3a	40b	2	40b
1000	2ab	32c	2	31b
2000	1b	30c	2	32b

** Values followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.01$ (DMRT's test)

^{NS} Not significant according to F-test

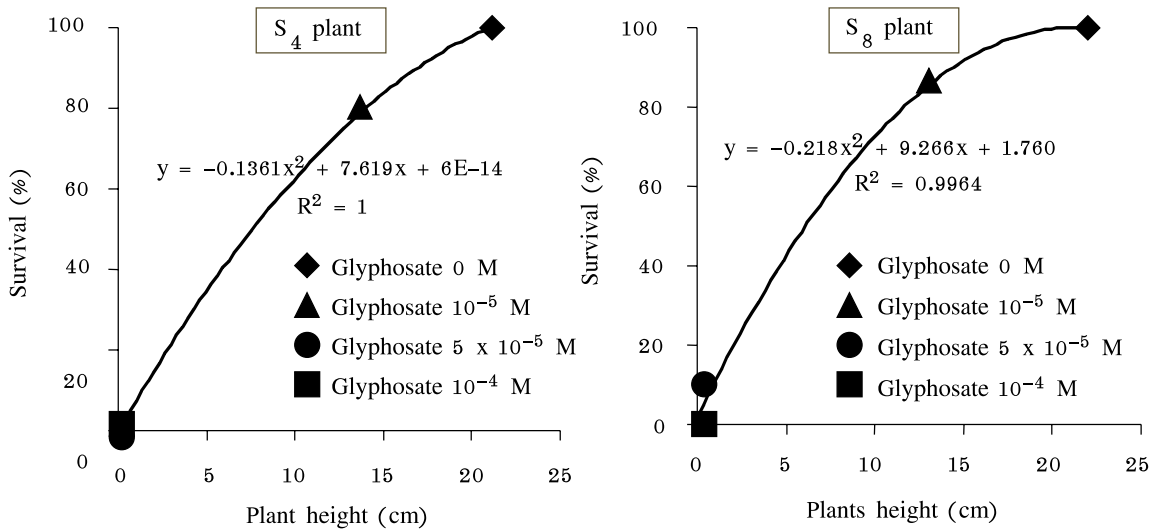


Figure 4 Correlation between plant height and survival percentage of glyphosate-tolerant plants after treated with glyphosate for 4 weeks *in vitro*.

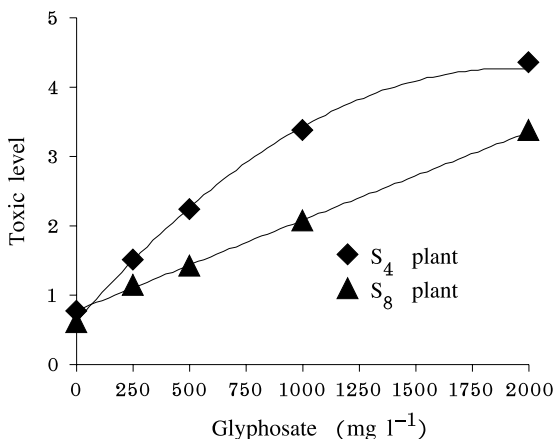


Figure 5 Effect of glyphosate on plants toxic level after treated with glyphosate for 4 weeks *in vivo*.

ความเข้มข้น 10^{-4} โมลลาร์ มีการเจริญเติบโตลดลง และทำการคัดเลือกเซลล์ที่รอดชีวิตมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 และ 8 สัปดาห์ นำเซลล์มาชักนำให้เกิดต้น ได้ต้นข้าวทนทาน S_4 จำนวน 1 ต้น และ S_8 จำนวน 2 ต้น การชักนำเซลล์ที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชให้เกิดขึ้นมีการทดลองในมะเขือเทศสามารถชักนำให้เกิดต้นได้แต่ได้ต้นผิดปกติ (Smith *et al.*, 1986) และเซลล์ของ *Cichorium intybus* L. สามารถ

ชักนำให้เกิดต้นได้ แต่ต้นพืชที่ได้อ่อนแอต่อไกลโฟเสท (Sellin *et al.*, 1992) และการคัดเลือกเซลล์ของยาสูบสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ และต้นพืชยังคงมีความทนทานต่อไกลโฟเสท (Singer and McDaniel, 1985) ความทนทานที่เกิดขึ้นมีได้หลายระดับดังนี้ ความทนทานสามารถแสดงออกได้ทั้งในระดับเซลล์และระดับต้นพืชซึ่งสามารถถ่ายทอดได้ (Dyer *et al.*, 1988) ความทนทานอยู่ในระดับเซลล์สามารถแสดงออกได้ในระดับเซลล์แต่ไม่แสดงออกในระดับต้นพืช เมื่อนำพืชนั้นไปชักนำให้เป็นแคลลัสหรือเพาะเลี้ยงเซลล์ก็ยังคงมีความทนทาน (Smith *et al.*, 1986) เมื่อนำไปผสมข้ามกับพืชปกติแล้วไม่สามารถถ่ายทอดความทนทานได้ (Sellin *et al.*, 1992) และความทนทานแสดงออกในระดับเซลล์แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ (Suwanwong *et al.*, 1991; Suwanketnikom *et al.*, 1992)

ต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช นำมาเพิ่มจำนวนต้นและทดสอบระดับความทนทานในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และในกระถางขังน้ำสภาพธรรมชาติ ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกเป็นระยะเวลานานมีความทนทานได้สูงกว่าต้นข้าวที่ได้จากเซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกเป็นระยะเวลาน้อยกว่าและต้นข้าวที่ได้จาก

แคลลัสปกติเป็นการเพิ่มระดับความทนทานของเซลล์พืชต่อสารกำจัดวัชพืช ซึ่งมีกลไกในการทนทาน/ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชโดยการลดการดูดซึมสารเข้าสู่พืชหรือการเคลื่อนย้ายสารกำจัดวัชพืช การลดความเป็นพิษของสาร และการที่เอนไซม์เป้าหมายไม่อ่อนแอต่อสารกำจัดวัชพืช (Mazur and Falco, 1989) ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นข้าวถูกยับยั้งการเจริญเติบโตและแสดงอาการเป็นพิษต่อสารกำจัดวัชพืชได้มากกว่าในกระถางในสภาพธรรมชาติ เนื่องจากในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสารกำจัดวัชพืชไกลฟอสเฟตสามารถดูดซึมและเคลื่อนย้ายไปทำลายต้นพืชได้ดี ส่วนในสภาพธรรมชาติจะมีเฉพาะส่วนที่มีสีเขียวเท่านั้นที่ดูดซึมสารกำจัดวัชพืชแล้วจึงเคลื่อนย้ายไปทำลายพืชทั้งต้น (Franz, 1984) สารกำจัดวัชพืชไกลฟอสเฟตเมื่อเข้าสู่พืชจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase) ต้นพืชไม่สามารถสังเคราะห์ aromatic amino acid 3 ชนิด คือ tryptophane phenylalanine และ tyrosine มีผลทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีน อัลคาลอยด์ วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้ ทำให้ต้นพืชตายในที่สุด (Wells and Appleby, 1992)

สรุป

การคัดเลือกแคลลัสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในอาหารที่เติมสารกำจัดวัชพืชไกลฟอสเฟต 10^{-4} โมลลาร์ แคลลัสมีการเจริญเติบโตลดลง หลังจากคัดเลือกแคลลัสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (S_4) และ 8 สัปดาห์ (S_8) สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดต้นข้าวที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชได้ ต้นข้าว S_4 และ S_8 ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตและตายในอาหารที่เติมไกลฟอสเฟตความเข้มข้นสูง และในอาหารที่เติมไกลฟอสเฟตความเข้มข้น 10^{-5} โมลลาร์ ต้นข้าวมีการแตกหน่อและรากจำนวนมากและต้นข้าว S_8 มีความทนทานต่อไกลฟอสเฟตได้สูงกว่าต้นข้าว S_4 ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งความสูงของต้นข้าวมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นข้าวในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ต้นข้าว S_4 และ S_8 เมื่อ

ทดสอบความทนทานต่อไกลฟอสเฟตในกระถางขังน้ำ สภาพธรรมชาติต้นข้าวสามารถเจริญเติบโตได้ และไม่แสดงความเป็นพิษหลังการฉีดพ่นด้วยไกลฟอสเฟตความเข้มข้นต่ำ แต่ที่ความเข้มข้นสูงต้นข้าวถูกยับยั้งการเจริญเติบโต และแสดงอาการเป็นพิษ โดยต้นข้าว S_8 มีความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลฟอสเฟตได้มากกว่าต้นข้าว S_4 ในกระถางขังน้ำสภาพธรรมชาติ

เอกสารอ้างอิง

- Cha-um, S., S. Surawattananon, K. Namwongprom, and C. Wongwattana. 1996. Effect of glyphosate on growth of Khao Dawk Mali 105 (*Oryza sativa* L.) callus and regenerated plants, pp. 219-218. In The 34th Kasetsart University Annual Conference. 30 January - 1 February 1996, Kasetsart University, Bangkok.
- Cha-um, S., S. Surawattananon, K. Namwongprom, and C. Wongwattana. 1997. *In vitro* culture of rice (*Oryza sativa* L. cv. Khao Dawk Mali 105), pp. 9-20. In The 35th Kasetsart University Annual Conference. 3-5 February 1997, Kasetsart University, Bangkok.
- Chu, I.Y.E. 1983. Use of tissue culture for breeding herbicide tolerant varieties, pp. 303-314. In Institute of Genetic, Academia Sinica and IRRI. Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Proceeding of a Workshop Cosponsors. Science Press, Beijing.
- Dyer, W.E., S.C. Weller, R.A. Bressan, and K.M. Herrmann. 1988. Glyphosate tolerance in tobacco (*Nicotina tabacum* L.). Plant Physiol. 88: 661-666.
- Franz, J.E. 1984. Discovery, development and chemistry of glyphosate, pp. 3-17. In E. Grossard and D. Atkinson (eds.). The Herbicide Glyphosate; Chemical of Glyphosate. Butterworth, London.
- Mazur, B.J. and S.C. Falco. 1989. The development of

- herbicide resistant crops. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 40: 441-470.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- Sellin, C., G. Forlani, J. Dubois, E. Nielsen, and J. Vasseur. 1992. Glyphosate tolerance in *Cichorium intybus* L. var. Magdebourg. *Plant Sci.* 85 : 223-231.
- Shyr Y.Y. and J.M. Widholm. 1990. Glyphosate resistance and gene amplification in selected *Daucus carota* suspension culture, pp. 142-152. In R.S. Sangwan and B.S. Sangwan-Norrel (eds.). *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Progress in Plant Cellular and Molecular Biology.* Kluwer Academic Publishers, Netherland.
- Singer, S.R. and C.N. McDaniel. 1985. Selection of glyphosate tolerance tobacco calli and the expression of this tolerance in regenerated plant. *Plant Physiol.* 78 : 411-416.
- Smith, C. M., D. Pratt, and G.A. Thompson. 1986. Increased 5-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphate synthase activity in a glyphosate-tolerant variant strain on tomato cells. *Plant Cell Rep.* 5 : 298-301.
- Suwanketnikom, R., T. Pronprom, S. Chanprem, and P. Srinives. 1992. Soybean plants and tissue culture selection for glyphosate tolerance. *Thai Agri. Res. J.* 10 : 52-57.
- Suwanwong, S., K. Usui, and K. Ishizuku. 1991. Regeneration of plant from bensulfuron methyl, glyphosate and glufosinate-tolerant callus of carrot. *Weed Res. Japan* 36 : 187-190.
- Wang, M.S., F.J. Zapata, and D.C. Castro. 1987. Plant regeneration through somatic embryogenesis for mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* L. Moench.). *Plant Cell Rep.* 6 : 294-296.
- Wells, B.H. and A.P. Appleby. 1992. Lactofen increasing glyphosate stimulated shikimate production in little mallow (*Malva parviflora*). *Weed Sci.* 40 : 171-173.

วันรับเรื่อง : 12 มี.ค. 42
วันรับตีพิมพ์ : 13 ต.ค. 42