การศึกษาความต้านทานสารหลายกลุ่มและลักษณะทางชีวโมเลกุลของหญ้าดอกขาว (*Leptochloa chinensis* L. Nees) ที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ

Investigation of Multiple-Resistance and Molecular Characterization of Fenoxaprop-Resistance in Chinese Sprangletop (*Leptochloa chinensis* L. Nees)

ศุภธิดา ศิริสวัสดิ์[1/] ภาณุวัฒน์ มหาทำนุโชค [1/] ทศพล พรพรหม[1/]

Supatida Sirisawat[1/] Pharnuwat Mahatamnuchoke[1/] Tosapon Pornprom[1/]

ABSTRACT

According to paddy field observations in 2002, fenoxaprop-ethyl resistance in have been found Chinese sprangletop (*Leptochloa chinensis*) at the Saphan-Sung district of Bangkok during 2540-2545. Whole-plant response in greenhouse tests, the resistance index of resistant-Chinese sprangletop was 10-25 fold higher than that of the susceptible one. The farmers were suggestel to change the herbicides used to control the Chinese sprangletop with a different mode of action from fenoxaprop-ethyl. In 2004, a second investigation by interviewing the farmers sites was carried at the same, out to ascertain the current situation of resistant-Chinese sprangletop. It was found that the farmers were satisfied with the action of changing the type of herbicide, because the resistant-Chinese sprangletop had apparently decreased. In addition, the resistant-Chinese sprangletop did not exhibit the multiple resistant to oxadiazon, propanil and quinclorac. To investigate the molecular basis of fenoxaprop-resistance in Chinese sprangletop, acetyl-CoA carboxylase (ACCase) gene encoding 657 bp of carboxyl transferase (CT) domain of Chinese sprangletop was isolated. The ACCase sequence of the resistant (R)- and the susceptible (S)-Chinese sprangletop were deposited in the genbank database with accession numbers AY803783 and AY662693, respectively. Based on the sequence data, four point mutations of nucleotides were detected in the R-Chinese sprangletop that lead to the substitutions of four amino acids (Phe^{1718} changed to Ser, Glu^{1739} changed to Asp, Gly^{1746}

[1/] ภาควิชาพืชไร่ คระเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[1/] Depertment of Agrinomy Facuity of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,Kamphaeng Saen campus, Kamphaeng Saen district, Nakhon Pathom privimce 73140

changed to Ala, and Ala[1815] changed to Thr). It is possible that the point mutations may contribute to the molecular modification of the target site (ACCase gene) and caused the resistance to fenoxaprop-ethyl in the R-Chinese sprangletop. In addition, the accumulation of ACCase mRNA was detected in the same levels in both of the R- and the S-Chinese sprangletop. The results suggested that the molecular basis of resistance to fenoxaprop-ethyl in Chinese sprangletop may have occurred after the transcription of ACCase gene. Although, the expression slightly deceased in both of the R- and the S-biotypes, when treated with the recommended amount of fenoxaprop-ethyl (at 6.75 g a.i./ rai).

Key words: base pair substitution, Chinese sprangletop, fenoxaprop, multiple resistance, acetyl-CoA carboxylase (ACCase) gene, point mutation

บทคัดย่อ

ทำการสำรวจพื้นที่ของเกษตรกรที่ทำนาข้าวแบบนาหว่านน้ำตม ในเขตสะพานสูง กรุงเทพฯ ปี พ.ศ. 2545 พบว่าเกิดปัญหาของวัชพืชหญ้าดอกขาว (Chinese sprangletop, *Leptochloa chinensis*) ที่ต้านทานต่อสารฟีนอกซาพรอพ และจากการประเมินความต้านทานสารในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นในสภาพเรือนทดลอง พบว่าในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารมีค่าดัชนีของความต้านทานสารกำจัดวัชพืชสูงกว่าไบโอไทป์อ่อนแอถึง 10-25 เท่า เกษตรกรจึงได้รับคำแนะนำให้เปลี่ยนแปลงการใช้สารกำจัดวัชพืชควบคุมวัชพืชหญ้าดอกขาวที่มีกลไกการทำลายแตกต่างไปจากสารฟีนอกซาพรอพ ต่อมาได้ทำการสำรวจในพื้นที่เดิมอีกครั้งหนึ่งในปี พ.ศ. 2547 เพื่อสอบถามให้รู้แน่ชัดเกี่ยวกับสถานการณ์ของหญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ พบว่าเกษตรกรพึงพอใจกับวิธีการแนะนำดังกล่าว ทำให้ประชากรของหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารมีจำนวนลดลงไป นอกจากนี้ไม่พบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชหลายกลุ่มของหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ ไปยังสารออกซาไดแอสซอน โพรพานิลและควินคลอแรกซ์ ส่วนในการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลของหญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ ได้ทำการโคลนยีนและหาลำดับเบส ในส่วน carboxyl transferase (CT domain) ของยีนอะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลส (ACCase) ขนาด 657 คู่เบส จากหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารและไบโอไทป์ที่อ่อนแอต่อสารฟีนอกซาพรอพ โดยได้ขึ้นทะเบียนใน genbank และมีรหัส AY803783 และ AY662693 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบส พบว่ามีการเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดของนิวคลีโอไทด์ 4 ตำแหน่งในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร ส่งผลให้แปลรหัสเป็น

กรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 4 ตำแหน่ง (Phe[1718] เปลี่ยนเป็น Ser, Glu[1739] เปลี่ยนเป็น Asp, Gly[1746] เปลี่ยนเป็น Ala และ Ala[1815] เปลี่ยนเป็น Thr) เมื่อพิจารณาจากปริมาณการสะสมของ ACCase mRNA พบว่าในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารมีการสะสมปริมาณของ ACCase mRNA ที่ใกล้เคียงกับในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่อ่อนแอ แสดงว่ากลไกพื้นฐานทางชีวโมเลกุลของหญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ อาจเกิดขึ้นภายหลังจากกระบวนการ transcription ของยีน ACCase แม้ว่าเมื่อได้รับสารฟีนอกซาพรอพที่อัตราแนะนำ (6.75 ก.ของสารออกฤทธิ์ต่อไร่) ส่งผลทำให้ปริมาณการสะสมของ ACCase mRNA ของทั้งสองไบโอไทป์ลดลงไปเล็กน้อย

คำหลัก: การแทนที่ลำดับเบส หญ้าดอกขาว สารฟีนอกซาพรอพ ความต้านทานสารหลายกลุ่ม ยีนอะซิทิลโคเอคาร์ บอกซิเลส (ACCase) การกลายพันธุ์เฉพาะจุด

คำนำ

ในปัจจุบันนี้มีข้อมูลจากการสำรวจวัชพืชต้านทานสารของ International Survey of Herbicide Resistant Weeds ว่ามีวัชพืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม imidazolinones, sulfonylureas, aryloxyphenoxypropinoates, triazines, dinitroanilines, ureas, amindes, bipyridiliums และ synthetic auxins จำนวนมากถึง 319 ไบโอไทป์และ 185 ชนิด ซึ่งแบ่งเป็นวัชพืชพวกใบกว้าง 111 ชนิดและวงศ์หญ้า 74 ชนิด ในสภาพพื้นที่ทางการเกษตรมากกว่า 290,000 แห่งทั่วโลก (Heap, 2008) สำหรับในประเทศไทย พบว่าวัชพืชหญ้าดอกขาวหรือหญ้าไม้กวาด (Chinese sprangletop, *Leptochloa chinensis* L. Nees) ซึ่งเป็นวัชพืชอายุปีเดียวและเป็นปัญหาในนาข้าวโดยเฉพาะการทำนาแบบนาหว่านน้ำตม (direct-seeded rice) มีการพัฒนากลายเป็นวัชพืชต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ ซึ่งมีปัญหาเกิดขึ้นในหลายพื้นที่ เช่น จ.สุพรรณบุรี จ.นครปฐม และ จ.ฉะเชิงเทรา รวมทั้งในพื้นที่เขตสะพานสูง กรุงเทพฯ (Maneechote *et al*., 2005; Pornprom *et al*., 2006)

สารกำจัดวัชพืชฟีนอกซาพรอพ เป็นสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่ม aryloxyphenoxy propinoates (AOPP) ซึ่งกลไกการทำลายของสาร จะเกี่ยวข้องกับในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลส (acetyl-CoA carboxylase หรือ ACCase (ACCase-inhibiting herbicides) เป็นสารประเภทเลือกทำลาย ใช้แบบหลังวัชพืชงอก สำหรับควบคุมวัชพืชวงศ์หญ้าปีเดียว เช่น หญ้าดอกขาวและหญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* L. Beauv.) และหญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* L. P. Beauv.) เป็นต้น ในพืชปลูกข้าว ถั่วเหลือง ฝ้าย ทานตะวันและผักชนิดต่าง ๆ สารสามารถดูดซึมเข้าสู่พืชโดยผ่านเข้าทางใบและเคลื่อนย้ายได้ทั้งแบบ acropetal และ basipetal สารจะไปยับยั้งการทำงานของ

เอนไซม์ ACCase ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างไขมันในคลอโรพลาสต์ ส่งผลทำให้การเจริญเติบโตของยอด ปล้อง และปลายรากชะงัก หลังจากที่พืชได้รับสารภายใน 1-3 สัปดาห์ พืชจะแสดงอาการใบเหลืองซีด ต่อมาจะแสดงอาการแห้งไหม้และตายในที่สุด

ในช่วง 4-5 ปี ที่ผ่านมา สารกำจัดวัชพืชที่นิยมนำมาใช้ควบคุมวัชพืชในนาข้าวในประเทศไทย ได้แก่ สารฟีนอกซาพรอพ สารออกซาไดแอสซอน (เป็นสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่ม oxadiazoles ซึ่งกลไกการทำลายของสาร จะเกี่ยวข้องกับในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Protox (protox-inhibiting herbicides) สารโพรพานิล (เป็นสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่ม amides ซึ่งกลไกการทำลายของสาร จะเกี่ยวข้องกับในการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง) และสารควินคลอแรกซ์ (เป็นสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่ม quinolinecarboxylic acids ซึ่งกลไกการทำลายของสาร จะมีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืช) เป็นต้น โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมนำสารฟีนอกซาพรอพมาใช้สำหรับการควบคุมวัชพืชหญ้าดอกขาวในการทำนาข้าวแบบนาหว่านน้ำตมกันมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในการใช้สารกำจัดวัชพืชดังกล่าวนี้ซ้ำ ๆ ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน อาจจะส่งผลทำให้เกิดปัญหาวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชขึ้นมาได้ และสามารถถ่ายทอดลักษณะที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไปสู่เมล็ดหรือส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ต่อไปได้ (Andrews *et al.*, 1998) ซึ่งนับว่าเป็นปัญหาสำคัญทำให้เกิดการแพร่ระบาดของวัชพืชที่มีความต้านทานสารกำจัดวัชพืชต่อไปได้ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จึงได้ทำการสำรวจปัญหาที่แท้จริงของการเกิดวัชพืชหญ้าดอกขาวต้านทานสารฟีนอกซาพรอพในสภาพการทำนาข้าวแบบนาหว่านน้ำตม ในพื้นที่เขตสะพานสูง กรุงเทพฯ รวมทั้งทำการศึกษาความต้านทานสารกำจัดวัชพืชหลายกลุ่มในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ ซึ่งอาจจะเกิดความต้านทานข้ามไปยังสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มอื่น ๆ ที่มีการใช้ในนาข้าว เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการวัชพืชหญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพในพื้นที่ ๆ มีปัญหาก่อนที่จะมีการแพร่ระบาดมากยิ่งขึ้นต่อไป นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะพื้นฐานทางชีวโมเลกุลของยีน ACCase ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ACCase ในหญ้าดอกขาว โดยพิจารณาการเกิดการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ในส่วน coding region ของยีน ACCase และการแสดงออกของยีน ACCase ในระดับ messenger RNA (mRNA) โดยการเปรียบเทียบระหว่างหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารและไบโอไทป์ที่อ่อนแอต่อสารฟีนอกซาพรอพ

อุปกรณ์และวิธีการ

การสำรวจวัชพืชต้านทานสาร

ดำเนินการสำรวจปัญหาของวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชในสภาพแปลงของเกษตรกร (field observation) ในปี พ.ศ. 2545 โดยทำการสัมภาษณ์ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการใช้สารกำจัดวัชพืชในนาข้าวแบบนาหว่านน้ำตม

จำนวน 11 แหล่ง ในพื้นที่ต.สะพานสูง เขตสะพานสูง กรุงเทพฯ ย้อนหลัง 5 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 ถึง พ.ศ. 2545 ทั้งนี้เนื่องจากได้รับการรายงานจากเกษตรกรว่า มีปัญหาวัชพืชหญ้าดอกขาวต้านทานสารฟีนอกซาพรอพเกิดขึ้นและแพร่ระบาดอย่างรุนแรงมาก จึงได้เข้าไปทำการสำรวจปัญหาที่เกิดขึ้นอย่างแท้จริงจากเกษตรกร โดยการใช้แบบสำรวจวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชจากสมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย (Pornprom *et al*., 2006) ต่อมาในปี พ.ศ. 2547 ทำการสำรวจอีกครั้งหนึ่งเพื่อสอบถามให้รู้แน่ชัดเกี่ยวกับสถานการณ์ของหญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ โดยใช้แบบสำรวจของ www. weedscience.com (Heap, 2004) บันทึกข้อมูลพื้นฐานของเกษตรกร ชนิดของพืชปลูก ประวัติการใช้สารกำจัดวัชพืช ชนิดของวัชพืช และวัชพืชที่เป็นปัญหาที่พบในนาข้าวแบบนาหว่านน้ำตม และข้อมูลเพิ่มเติมอื่น ๆ

ความต้านทานสารหลายกลุ่มไปยังสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มอื่น ๆ

การทดสอบความต้านทานสารหลายกลุ่มในสภาพเรือนทดลอง โดยพิจารณาว่าหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพอาจจะเกิดความต้านทานข้ามขึ้นได้ด้วยหรือไม่ ไปยังสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มอื่น ๆ ที่มีการนำมาใช้ควบคุมวัชพืชในนาข้าว ได้แก่ ออกซาไดแอสซอน โพรพานิลและควินคลอแรกซ์ เมื่อวัชพืชหญ้าดอกขาวมีอายุได้ 21 วันหลังจากงอก ทำการพ่นสารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ ในอัตราที่กำหนด ประกอบด้วยการใช้สารฟีนอกซาพรอพในอัตรา 0 3.37 6.75 13.50 27.00 และ 54.00 ก.สารออกฤทธิ์/ไร่ สารออกซาไดแอสซอนในอัตรา 0, 0.48 0.96 1.92 3.84 และ 7.68 ก. สารออกฤทธิ์/ไร่ สารโพรพานิลในอัตรา 0 1 2 4 8 และ 16 ก. สารออกฤทธิ์/ไร่ และสารควินคลอแรกซ์ในอัตรา 0 0.21 0.43 0.85 1.70 และ 3.40 ก. สารออกฤทธิ์/ไร่ ตามลำดับ บันทึกผลการทดลอง ที่ 14 วันหลังจากได้รับสาร ทำการประเมินด้วยสายตาจากระดับความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชที่มีต่อวัชพืชหญ้าดอกขาว โดยการให้เป็นระดับคะแนนตั้งแต่ 0-100 โดยที่ 0 = ต้นวัชพืชมีอาการปกติ 10-30 = ต้นวัชพืชเป็นพิษเล็กน้อย 40-60 = ต้นวัชพืชเป็นพิษปานกลาง 70-90 = ต้นวัชพืชเป็นพิษรุนแรง และ 100 = ต้นวัชพืชตาย นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณเป็นค่า I_{50} (Herbicide concentrations causing 50% inhibition) ต่อมาทำการวัดความสูง และน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้นเหนือดิน (อบที่อุณหภูมิ 50 °ซ. เป็นเวลา 72 ชม.) ของหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่อ่อนแอและไบโอไทป์ที่ต้านทานสารเฉลี่ยจำนวนอย่างละ 10 ต้น/กระถาง เปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารกำจัดวัชพืช นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณเป็นค่า GR_{50} (Herbicide concentrations causing 50% reduction of growth) ต่อไป

การโคลนยีนและการหาลำดับเบสบางส่วนของยีน ACCase

การสกัด RNA และโคลนยีน ACCase:

การสกัด RNA รวมจากใบของหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารและอ่อนแอต่อสารฟีนอกซาพรอพ โดยใช้ Rneasy®Plant Mini Kit (บริษัท QIAGEN ประเทศเยอรมัน) จากนั้นทำการโคลนยีนในส่วน carboxyl transferase (CT domain) ของยีน ACCase ขนาด 657 คู่เบส ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน ACCase ได้แก่ไพเมอร์ ACC1822-F (5'-GGG CTC AAY GAC ATT GGY ATG-3') และไพเมอร์ ACC2478-R (5'-RGG RCC ACC MAR CTG CAT-3') ซึ่งออกแบบมาจากข้อมูลลำดับเบสของยีน chloroplastic ACCase ของข้าวสาลี (accession no. AF029895) ข้าวโพด (accession no. U19183) และข้าวโอ๊ต (accession no. AF072737) จากฐานข้อมูลของ National Centre for Biotechnology Information (NCBI) เมื่อได้ cDNA ของยีน ACCase บางส่วน จึงนำไปทำการโคลนโดยใช้เวคเตอร์ pGEM®-Teasy (บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา) จากนั้นนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL-1 blue โดยวิธี heat shock ตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม โดยสกัดแยก DNA ออกจากเซลล์แบคทีเรีย โดยวิธี plasmid minipreparation ต่อมาโคโลนีสีขาวจะถูกคัดเลือกนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ QIAprep Purification of Plasmid DNA Miniprep kit (บริษัท QIAGEN) จากนั้นนำ DNA ที่ได้จากการสกัดพลาสมิดไปวิเคราะห์หาการเรียงลำดับเบสของยีน ACCase โดยเครื่อง DNA sequencer ABI Model 377 Version 3.4.1 ตามวิธีการของห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม แล้วนำข้อมูลลำดับเบสของ DNA ที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างของการเรียงลำดับเบสของยีน ACCase ในหญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารและอ่อนแอต่อสารฟีนอกซาพรอพ รวมทั้งพืชชนิดอื่น ๆ ที่ต้านทานสารและอ่อนแอต่อสารในกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACCase ได้แก่ rigid ryegrass ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ตป่า ข้าวโอ๊ต ข้าวโพด และ annual ryegrass โดยใช้ซอฟแวร์ clustalW จากเวบไซด์ http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/ นอกจากนี้ข้อมูลการเรียงลำดับเบสของยีน ACCase ในวัชพืชหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารและอ่อนแอต่อสาร ได้รับการจดทะเบียนในคลังข้อมูลของ genBank ต่อไป

การทำ northern hybridizations: หลังจากวัชพืชมีอายุได้ 21 วันหลังจากงอก ทำการพ่นสารฟีนอกซาพรอพในอัตราแนะนำที่ 6.75 ก.สารออกฤทธิ์/ไร่ ต่อมาที่ 10 วันหลังจากได้รับสาร จึงทำการเก็บตัวอย่างใบของหญ้าดอกขาวที่ได้รับสารฟีนอกซาพรอพทั้งจากไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร (RT) และอ่อนแอ (ST) โดยใช้ใบของหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร (R) และอ่อนแอ (S) ที่ไม่ได้รับการฉีดพ่นสารเป็นชุดควบคุม ทำการสกัด RNA รวม จากตัวอย่างพืชดังกล่าวในข้างต้น โดยบดตัวอย่างให้ละเอียด

แล้วเติม 4 มล. ของ extraction buffer (2%CTAB, 1M NaCl, 0.5%SDS, 10mM Tris HCl pH8 and 5% EDTA, 2% mercaptoethanol) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม chloroform: isoamyl alcohol 1 มล. แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 4 °ซ. โดยใช้ความเร็วรอบที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที นำเฉพาะส่วนของเหลวมาเติม 10M LiCl ปริมาณ 0.25 เท่าของปริมาณตัวอย่าง และเก็บที่ –80 °ซ. เป็นเวลา 12 ชม. จากนั้นทำการตกตะกอน RNA โดยแหว่งที่ 4 °ซ. โดยใช้ความเร็วรอบที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วละลายตะกอนด้วย DEPC-treated H_2O ที่ผสม 25 L 3M CH_3COONa pH 5.2 ปริมาณ 25 L และเอทานอล 500 L จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ –80 °ซ. เป็นเวลา 12 ชม. จากนั้นปั่นแหว่งที่ 4 °ซ. โดยใช้ความเร็วรอบที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งส่วนของเหลว แล้วเติม 70% ETOH ปริมาณ 500 L จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 4 °ซ. โดยใช้ความเร็วรอบที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสแล้วละลายตะกอนโดยใช้ DEPC-treated H_2O ปริมาณ 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำ RNA รวมปริมาณ 50 ก./ตัวอย่าง มาแยกใน 1% agarose-formaldehyde gel นำแผ่นเจลที่มี RNA รวมย้ายสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน จากนั้นนำโพรบของยีน ACCase ที่ติดฉลากด้วย DIG (บริษัท Roche ประเทศเยอรมัน) มาจับบนแผ่นเมมเบรน จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาประกบกับฟิล์มในห้องมืดเพื่อตรวจสอบผลต่อไป

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสำรวจวัชพืชต้านทานสาร

การสัมภาษณ์ข้อมูลการใช้สารกำจัดวัชพืชในนาข้าวของเกษตรกรย้อนหลังเป็นเวลา 5 ปี ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2540-2545 เกษตรกรใช้สารกำจัดวัชพืชที่มีชื่อการค้า (trade name) แตกต่างกัน เช่น WHIP 7.5% EW, FURE 7.5% EW และ RICESTAR 6.9% EC เป็นต้น แต่เป็นสารฟีนอกซาพรอพเหมือนกัน ซึ่งเกษตรกรนิยมนำสาร WHIP 7.5% EW มาใช้ในการควบคุมวัชพืชหญ้าดอกขาว ในนาข้าวมากที่สุด ตลอดในช่วงระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมา ปกติเกษตรกรทำนาข้าว 2 ครั้ง/ปี ซึ่งการทำนาข้าวในแต่ละครั้งมีการพ่นสารกำจัดวัชพืชสองครั้ง (Table 1) โดยที่เกษตรกรใช้สารกำจัดวัชพืชตามอัตราที่แนะนำคือ สาร 90 ซีซี /น้ำ 80 ล./ 1 ไร่ พ่นหลังจากข้าวมีอายุได้ 15 วันหลังจากปลูก และพ่นสารอีกครั้งในบริเวณที่พบวัชพืชหลังจากข้าวมีอายุ 30 วัน หลังจากที่ได้มีการใช้สารฟีนอกซาพรอพซ้ำ ๆ ติดต่อกันอย่างต่อเนื่อง เกษตรกรสังเกตได้ว่า เริ่มมีปัญหาวัชพืชต้านทานสารฟีนอกซาพรอพเกิดขึ้นในประชากรวัชพืชของหญ้าดอกขาวคือ การใช้สารกำจัดวัชพืชในอัตราที่แนะนำ ไม่สามารถควบคุมวัชพืชหญ้าดอกขาวต้านทานสารฟีนอกซาพรอพได้ ซึ่งก่อนหน้านี้สามารถควบคุมวัชพืชหญ้าดอกขาวได้

ต่อมาได้ทำการสัมภาษณ์ข้อมูลการใช้สารกำจัดวัชพืชในนาข้าวของเกษตรกรอีกครั้งในปี พ.ศ. 2547 พบว่า เกษตรกรส่วนใหญ่ได้มี

การนำสารกำจัดวัชพืชมาใช้ในการกำจัดวัชพืชในนาข้าวเพียงอย่างเดียวมากว่า 10 ปี โดยที่ในแต่ละครั้งที่ปลูกข้าวจะพ่นสารกำจัดวัชพืชสองครั้ง ในปัจจุบันได้มีการเปลี่ยนจากการใช้สารฟีนอกซาพรอพ เป็นสารโพรพานิล และสารคลอมาโซน โดยพ่นสารหลังจากข้าวมีอายุได้ 7-14 วันหลังจากปลูก ซึ่งเกษตรกรได้ปฏิบัติตามคำแนะนำในการควบคุมหญ้าดอกขาวต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ ทำให้ประชากรของหญ้าดอกขาวลดน้อยลง โดยใช้วิธีการเปลี่ยนสารกำจัดวัชพืชที่มีกลไกการทำลายที่แตกต่างไป คือ เปลี่ยนสารฟีนอกซาพรอพที่มีกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน (lipid synthesis inhibitors) ไปเป็นสารคลอมาโซน ที่เป็นสารยับยั้งการสร้างพวกรงควัตถุคาโรทีนอยด์ (carotenoid synthesis inhibitors) และสารโพรพานิลที่มีกลไกการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis inhibitors) ซึ่งเกษตรกรได้รายงานว่า วัชพืชหญ้าดอกขาวต้านทานสารฟีนอกซาพรอพที่เป็นปัญหามีจำนวนประชากรลดลงไปบ้าง นอกจากนี้เกษตรกรยังมีการใช้น้ำร่วมด้วยในการจัดการวัชพืช โดยหลังการเก็บเกี่ยวข้าวเกษตรกรจะเผาตอซังข้าวและขังน้ำไว้ในแปลง เมื่อต้องการหว่านข้าวจึงปล่อยน้ำออกจากแปลง ซึ่งในการใช้วิธีการดังกล่าวนี้ร่วมกัน มีประสิทธิภาพช่วยในการควบคุมวัชพืชชนิดต่าง ๆ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ

ความต้านทานสารหลายกลุ่มไปยังสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มอื่น ๆ

ในการประเมินระดับความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชที่มีต่อหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร ที่ 14 วันหลังจากได้รับสาร พบว่า การใช้สารออกซาไดแอสซอน โพรพานิลและควินคลอแรกซ์ที่อัตราแนะนำที่ 0.96, 2.0 และ 0.43 ก.สารออกฤทธิ์/ไร่ ตามลำดับ หญ้าดอก

Table 1. History of herbicide application application to the paddy field in Saphan-Sung district of Bangkok during 1997-2002

Year of Application	Herbicide*	No. of Season
1997	WHIP 7.5% EW (fenoxaprop-P-ethyl)	2
	FURE 7.5% EW (fenoxaprop-P-ethyl)	
	RICESTAR 6.9% EC (fenoxaprop-P-ethyl)	
1998	WHIP 7.5% EW (fenoxaprop-P-ethyl)	2
1999	WHIP 7.5% EW (fenoxaprop-P-ethyl)	2
2000	WHIP 7.5% EW (fenoxaprop-P-ethyl)	2
2001	WHIP 7.5% EW (fenoxaprop-P-ethyl)	2
2002	WHIP 7.5% EW (fenoxaprop-P-ethyl)	2

* Two applications of herbicide

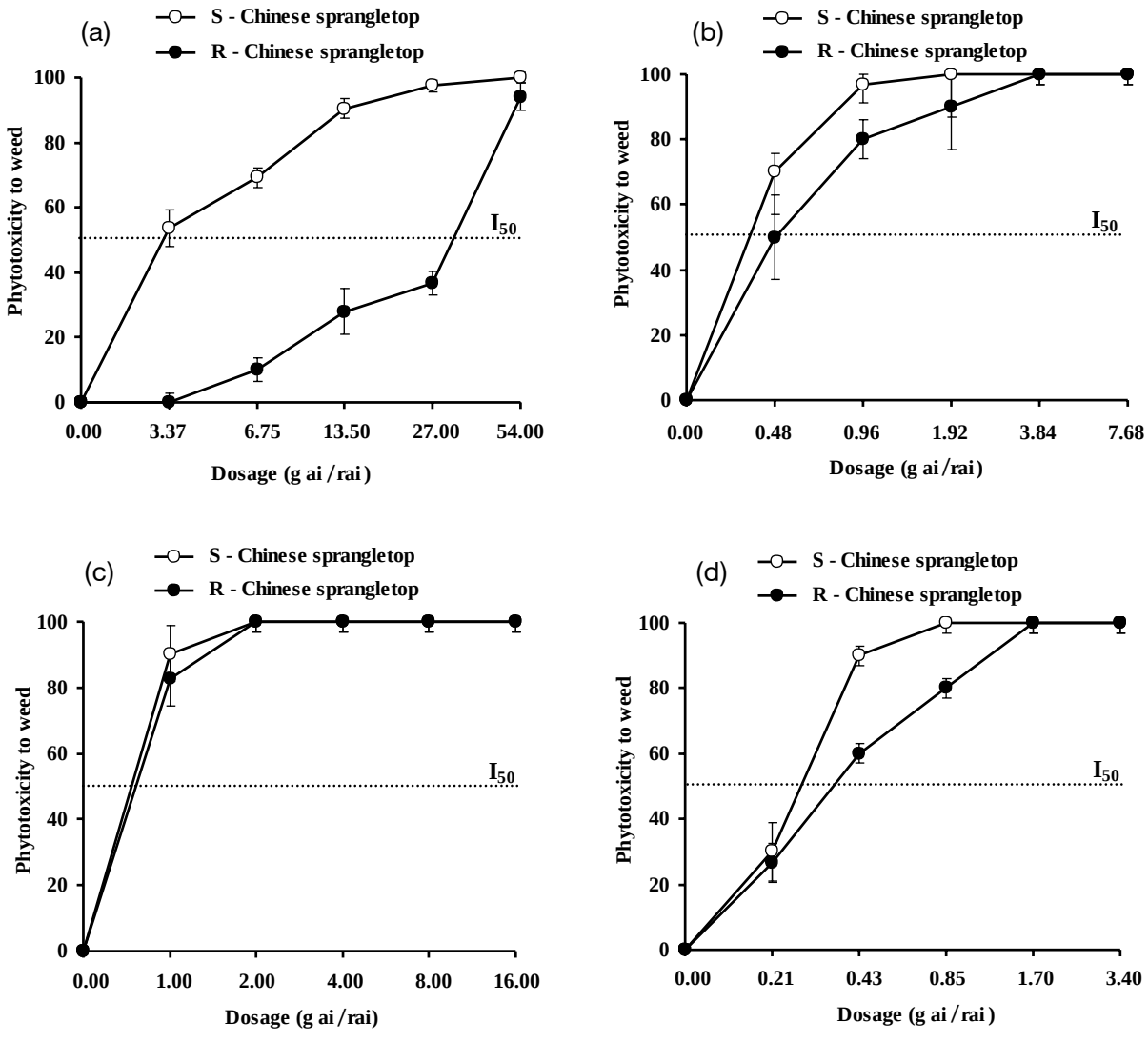

Figure 1. Effect of fenoxaprop-P-ethyl (a), oxadiazon (b), propanil (c) and quinclorac (d) on phytotoxicity of susceptible-Chinese sprangletop (○) and resistant-Chinese sprangletop (●) at 14 days after application; the vertical bars indicate the errors from an average of four values

ขาวไบโอไทป์ที่อ่อนแอมีระดับความเป็นพิษอยู่ในช่วง 90-100 % ส่วนไบโอไทป์ที่ต้านทานสารมีระดับความเป็นพิษในช่วง 60-80 % เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราแนะนำของการใช้สารฟีนอกซาพรอพ (6.75 ก.สารออกฤทธิ์/ไร่) พบว่าหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่อ่อนแอและไบโอไทป์ที่ต้านทานสารมีระดับความเป็นพิษ 80 และ 10 % ตามลำดับ (Figure 1) เมื่อพิจารณาที่ระดับค่า I_{50} ของความเป็นพิษจากสารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร พบว่า ค่า I_{50} ของสารฟีนอกซาพรอพนั้น มีระดับความเป็นพิษของสารในอัตราที่สูงกว่าการใช้ในอัตราแนะนำ ในขณะที่ระดับค่า I_{50} ของสารควินคลอแรกซ์ ออกซาไดแอสซอนและ

โพรพานิล มีระดับความเป็นพิษของสารในอัตราที่ต่ำกว่าการใช้ในอัตราแนะนำ นอกจากนี้ระดับความเป็นพิษของสารที่มีต่อหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อได้รับสารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวนี้ในอัตราความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชที่สูงมากขึ้น

เมื่อพิจารณาทางด้านความสูงที่ 14 วันหลังจากได้รับสาร พบว่าการใช้สารออกซาไดแอสซอน โพรพานิลและควินคลอแรกซ์ ที่อัตราแนะนำ ทำให้หญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่อ่อนแอสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 0-5 % ในขณะที่ไบโอไทป์ที่ต้านทานสารสามารถเจริญเติบโตได้มากกว่า 15-30 % ส่วนการใช้สารฟีนอกซาพรอพที่อัตราแนะนำ พบว่าหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่อ่อนแอและไบโอไทป์ที่ต้านทานสารสามารถเจริญเติบโตได้มากกว่า 30 และ 100 % ตามลำดับ (Figure 2) เมื่อพิจารณาที่ระดับค่า GR_{50} ของการใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อความสูงในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร พบว่าค่า GR_{50} ของสารฟีนอกซาพรอพ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสูงในอัตราที่มากกว่าการใช้ในอัตราแนะนำ ในขณะที่สารออกซาไดแอสซอน ควินคลอแรกซ์ และโพรพานิลนั้นมีค่า GR_{50} ของสารในระดับที่ต่ำกว่าการใช้ในอัตราแนะนำ นอกจากนี้ความสูงของหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารจะลดลงไป เมื่อได้รับสารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวนี้ในอัตราความเข้มข้นที่สูงมากขึ้น

เมื่อพิจารณาทางด้านน้ำหนักแห้งที่ 14 วันหลังจากได้รับสาร พบว่าการใช้สารฟีนอกซาพรอพ ออกซาไดแอสซอน โพรพานิลและควินคลอแรกซ์ ที่อัตราแนะนำ ส่งผลทำให้หญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่อ่อนแอและไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งลดลงมากอยู่ในช่วง 5-62.06 % ในขณะที่เมื่อได้รับสารฟีนอกซาพรอพ หญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งมากถึง 85 % (Figure 3) เมื่อพิจารณาที่ระดับค่า GR_{50} ของการใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อน้ำหนักแห้งในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร พบว่าค่า GR_{50} ของสารฟีนอกซาพรอพและควินคลอแรกซ์นั้น มีผลต่อน้ำหนักแห้งในอัตราที่สูงกว่าการใช้ในอัตราแนะนำ ในขณะที่สารออกซาไดแอสซอนและโพรพานิลมีค่า GR_{50} ในระดับที่เป็นอัตราแนะนำ

การศึกษาความต้านทานสารหลายกลุ่มไปยังสารกำจัดวัชพืชชนิดอื่น ๆ ที่มีการใช้ในนาข้าวที่มีต่อหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร โดยพิจารณาจากการตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาของหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้าน ทานสารที่มีต่อสารกำจัดวัชพืชชนิดต่าง ๆ เมื่อพิจารณาที่ระดับค่า I_{50} และ GR_{50} จากที่อัตราแนะนำของการใช้สารกำจัดวัชพืช พบว่าหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารได้รับความเป็นพิษจากการใช้สารโพรพานิลมากที่สุด ส่งผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของความสูงและน้ำหนักแห้งมากที่สุด รองลงมาได้แก่การใช้สารออกซาไดแอสซอนและควินคลอแรกซ์ ในขณะที่หญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารได้รับความเป็นพิษจากสารการใช้สารฟีนอกซาพรอพน้อยที่สุด จึง

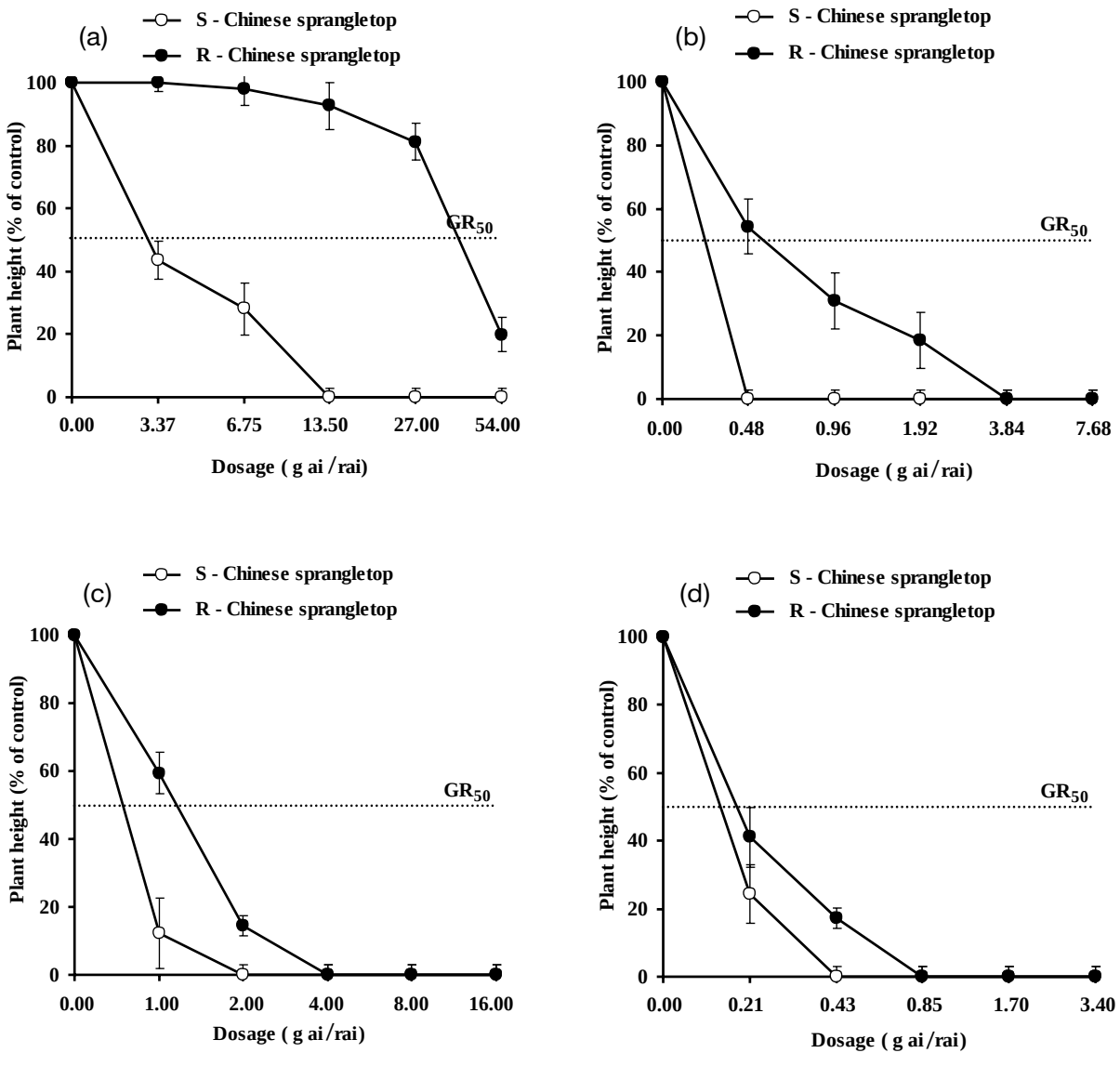

Figure 2. Effect of fenoxaprop-P-ethyl (a), oxadiazon (b), propanil (c) and quinclorac (d) on plant height of susceptible-Chinese sprangletop (○), and resistant-Chinese sprangletop (●) at 14 days after application; the vertical bars indicate the standard errors from an average of four values

ส่งผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของความสูงและน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด แสดงว่าการใช้สารกำจัดวัชพืชแต่ละชนิดดังกล่าวในอัตราแนะนำ (หรือการใช้สารในอัตราที่มากกว่า) ทำให้ไม่สามารถเกิดความต้าน ทานสารหลายกลุ่มไปยังสารออกซาไดแอสซอน โพรพานิลและควินคลอแรกซ์ ที่มีการนำมาใช้สำหรับควบคุมวัชพืชในนาข้าว ดังนั้นแนวทางการเปลี่ยนชนิดของสารกำจัดวัชพืชที่มีกลไกการทำลาย (site/ mechanism of action) ที่แตกต่างกัน และการหลีกเลี่ยงไม่ใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดเดิมซ้ำติดต่อกันในพื้นที่เดียวกันเป็นเวลานาน เป็นวิธีการป้องกันปัญหา

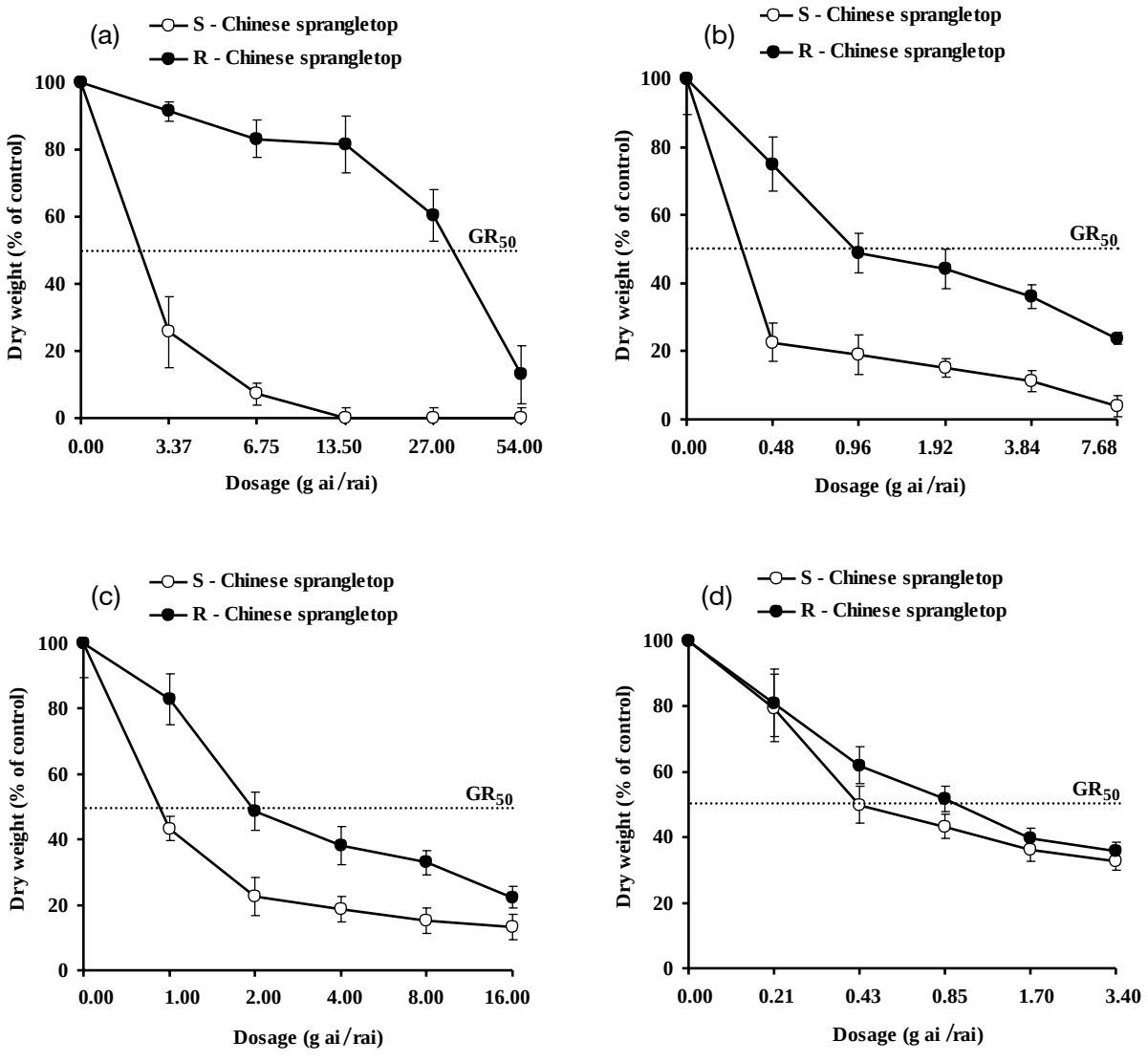

Figure 3. Effect of fenoxaprop-P-ethyl (a), oxadiazon (b), propanil (c) and quinclorac (d) on dry weight of susceptible-Chinese sprangletop (○), and resistant-Chinese sprangletop (●) at 14 days after application; the vertical bars indicate the standard errors from an average of four values

ในการเกิดการพัฒนาความต้านทานสารกำจัดวัชพืช นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่น ๆ ที่สามารถนำมาใช้ร่วมกับการเปลี่ยนชนิดสารกำจัดวัชพืช เช่น การปลูกพืชหมุนเวียน (เนื่องจากวัชพืชที่ขึ้นในแปลงจะเปลี่ยนไปตามชนิดของพืชปลูก) หรือการเขตกรรมที่มีการลดการใช้สารกำจัดวัชพืช โดยใช้แรงงานคนหรือเครื่องจักรในการกำจัดวัชพืช (Valverde *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาต่อไปควรมีการพิจารณาเกี่ยวกับความต้านทานข้าม (cross-resistance) ด้วย โดยพิจารณาว่าหญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพอาจจะมีความต้านทานข้ามเกิด

ขึ้นไปยังสารกำจัดวัชพืชชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่ม ACCase-inhibiting herbicides เดียวกันได้ด้วยหรือไม่ โดยเฉพาะสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่ม aryloxyphenoxypropionate (AOPP) และ cyclohexanedione (CHD) ซึ่งมีสารกำจัดวัชพืชหลายชนิดที่ได้มีการนำมาใช้ควบคุมวัชพืชในการทำนาข้าวแบบนาหว่านน้ำตม เพื่อเป็นการป้องกันและหาแนว ทางในการจัดการวัชพืชที่ต้านทานสารในเขตพื้นที่ ๆ มีปัญหา ซึ่งเกิดขึ้นในหลายพื้นที่ เช่น จ.สุพรรณบุรี นครปฐมและฉะเชิงเทรา เป็นต้น ซึ่งอาจจะเกิดความต้านทานข้ามไปยังสารกำจัดวัชพืชชนิดอื่น ๆ ที่มีการใช้ในนาข้าว ก่อนที่หญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพจะมีการแพร่ระบาดมากยิ่งขึ้นต่อไป

การโคลนยีนและการหาลำดับเบสบางส่วนของยีน ACCase

กลไกของความต้านทานสารที่เกิดขึ้นในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพนี้ อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตำแหน่งที่สารเข้าไปทำปฏิกิริยาภายในพืช (target site-based) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สารฟีนอกซาพรอพเข้าไปทำปฏิกิริยาภายในพืชคือเอนไซม์ ACCase การสังเคราะห์เอนไซม์ถูกควบคุมโดยกลไกทางชีวโมเลกุลมาตั้งแต่ในระดับของยีน ACCase ดังนั้นจึงได้ทำการการโคลนยีนและการหาลำดับเบสบางส่วนของยีน ACCase เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจกลไกของความต้านทานสารในระดับโมเลกุลของวัชพืชหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพต่อไป

ยีน ACCase ประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ คือ biotin-carboxylase, biotin-carbkyl carrier และ carboxyl transferase การศึกษาในครั้งนี้ได้พิจารณาการเกิดการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ในส่วน coding region ในส่วนของ carboxyl transferase (CT domain) ซึ่งเป็นส่วนที่ตอบสนองต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม ACCase-inhibiting herbicides มากที่สุด (Nikolskaya *et al.*, 1999) โดยทำการโคลนและหาลำดับเบสบางส่วนของยีน ACCase ขนาด 657 คู่เบส ของหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารและไบโอไทป์ที่อ่อนแอ ได้ขึ้นทะเบียนใน GenBank ได้รับหมายเลข AY803783 และ AY662693 ตามลำดับ (Figure 4) เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน ACCase ระหว่างหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารและไบโอไทป์ที่อ่อนแอ พบว่ามีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์จำนวน 28 ตำแหน่ง ซึ่งมี 4 ตำแหน่ง ส่งผลทำให้กรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างไปจากเดิมจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Phe^{1718} เป็น Ser, Glu^{1739} เป็น Asp, Gly^{1746} เป็น Ala และ Ala^{1815} เป็น Thr (Table 2) ซึ่งเป็นการเกิดแบบการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) กล่าวคือเกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของของเบสหนึ่งตำแหน่ง ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่แตกต่างออกไปจากเดิม ซึ่งได้สอดคล้องกับการรายงานในวัชพืช green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) ที่ต้านทานสารในกลุ่มที่ยั้งยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยที่ตำแหน่ง 1780 ในส่วน CT domain ของยีน ACCase มีการ

```
S-rigid ryegrass          SGARIGIADEVKSIFRVKWIDDSNPERGFDYVYLSEEDYGRISSSVIAHKTQLDSGEIRW
S-wheat                   SGARIGIADEVKSCFRVGWSDDGSPERGFQYIYLTEEDHARISASVIAHKMQLDNGEIRW
S-wild oat                SGARIGIADEVKSCFRVEWVDPANPERGFKYIYLNEEDYGRISSSVIAHKTQLDSGEIRW
S-oat                     SGARIGIADEVKSCFRVEWVDPANPERGFKYIYLNEEDYGRISSSVIAHKTQLDSGEIRW
S-maize                   SGARIGIADEVKSCFRVGWSDERSPERGFQYIYLTEEDYARISSSVIAHKLQLDNGEIRW
S-annual ryegrass         SGARIGIADEVKSIFRVKWIDDSNPERGFDYVYLSEEDYGRISSSVIAHKTQLDSGEIRW
S-Chinese sprangletop     SGARIGIADEVKSCFRVGWSDEDSPERGFQYIYLTEEDYSRIGSSVIAHKLQLDSGEVIW
R-Chinese sprangletop     SGARIGIADEVKSCSRVGWSDESSPERGFQYIYLTDEDYSRIASSVIAHKLQLDSGEVRW
R-rigid ryegrass          SGARIGIADEVKSIFRVKWIDDSNPERGFDYVYLSEEDYGRISSSVIAHKTQLDSGEIRW
R-maize                   SGARIGIADEVKSCFRVGWSDEGSPERGFQYIYLTEEDYARISSSVIAHKLELDSGEIRW
R-green foxtail           SGARIGIADEVKSCFRVGWSDEGSPERGFQYIYLTDEDYARISLSVIAHKLQLDNGEIRW
R-wild oat                SGARIGIADEVKSCFRVEWVDPANPERGFKYIYLNEEDYGRISSSVIAHKTQLDSGEIRW
R-annual ryegrass         SGARIGIADEVKSIFRVKWIDDSNPERGFDYVYLSEEDYGRISSSVIAHKTELDSGEIRW
R-C.cryptica              SGARIGLVDDLKPKFQIKFIDEASPSKGFEYLYLDDATYKSLPEGSVNVRKVPEG----W
                          ******:.*::*.  :: : *  .*.:**.*:** :  :  :  . :  :   :.    *

1780
S-rigid ryegrass          VIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
S-wheat                   VIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
S-wild oat                VIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVSGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
S-oat                     VIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVSGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
S-maize                   IIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
S-annual ryegrass         VIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
S-Chinese sprangletop     IIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
R-Chinese sprangletop     IIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLTRLGIRCIQ
R-rigid ryegrass          VIDSVVGKEDGLGVENLHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
R-maize                   IIDSVVGKEDGLGVENLHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
R-green foxtail           IIDSVVGKEDGLGVENLHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
R-wild oat                VIDSVVGKEDGLGVENLHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVSGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
R-annual ryegrass         VIDSVVGKEDGLGVENLHGSAAIASAYSRAYEETFTLTFVTGRTVGIGAYLARLGIRCIQ
R-C.cryptica              AITDIIGTNEGIGVENLQGSGKIAGETSRAYDEIFTLSYVTGRSVGIGAYLVRLGQRIIQ
                           * .::*.::*:****::**. **.  ****:* ***::*:**:*******.*** * **
```

Figure 4. Alignment of the deduced amino acid sequences for partial acetyl-CoA carboxylase (ACCase) gene of resistant (R) and susceptible (S) biotypes of Chinese sprangletop and several R- and S-plants resistant to ACCase inhibiting herbicides as compared to the changed amino acids (marked with *) in resistant Chinese sprangletop.

Table 2. Summary of nucleotide and amino acid substitutions in susceptible biotypes of Chinese sprangletop resulting to resistant biotypes of Chinese sprangletop.

Nucleotide position*		Nucleotide substitution			Amino acid substitution		
(1)	5153	TTC	→	TCC	Phe[1718]	→	Ser
(2)	5217	GAA	→	GAC	Glu[1739]	→	Asp
(3)	5237	GGC	→	GCC	Gly[1746]	→	Ala
(4)	5443	GCT	→	ACT	Ala[1815]	→	Thr

* The numbers refer to partial GS coding sequence of *Setaria* sp. for ACCase (genbank Accession No. AF294805)

เปลี่ยนแปลงของเบสจาก C เป็น T ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก isoleucine ในวัชพืชที่อ่อนแอต่อสาร เปลี่ยนไปเป็น leucine ในวัชพืชที่ต้านทานต่อสาร (Dlye *et al.*, 2002a) ต่อมา Brown และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาความต้านทานสารกลุ่ม cyclohexanedione

และกลุ่ม aryloxyphenoxypropionate ในวัชพืชพวกวงศ์หญ้า 3 ชนิด คือ หญ้า *Setaria viridis* หญ้าไรน์ (*Lolium rigidis)* และข้าวโอ๊ตป่า (*Avena fatua*) พบว่ากลไกของความต้านทานสารในกลุ่ม ACCase-inhibiting herbicides มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดของยีน ACCase ส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก isoleucine กลายเป็น leucine เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนในตำแหน่งเดียวกันในพืชที่อ่อนแอต่อสาร พบว่าเกิดการการกลายพันธุ์เฉพาะจุดที่ตำแหน่งแรกของการแปลรหัส จากเดิม ATA (isoleucine) กลายเป็น CTA หรือ TTA ซึ่งทั้ง 2 codon จะแปลรหัสเป็น leucine เช่นเดียวกับในการทดลองของ Moss และคณะ (2003) ได้ทำการเปรียบเทียบกลไกพื้นฐานทางด้านชีวโมเลกุลของเอนไซม์ ACCase ใน black-grass พันธุ์ Nott A1 ที่ต้านทานสาร sethoxydim และพันธุ์ Oxford S1 ที่อ่อนแอต่อสาร พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน isoleucine ที่มีอยู่ในพันธุ์อ่อนแอกลายเป็น leucine ในพันธุ์ที่ต้านทานสารที่ตำแหน่งเดียวกัน โดยที่การเปลี่ยนแปลงบริเวณตำแหน่งดังกล่าวยังพบในข้าวโอ๊ตป่า (Christoffer and Messersmith, 1999), Italian ryegrass (*Lolium rigidum*) (Zagnitko *et al*., 2001) และ black grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) (Moss *et al*., 2003) ซึ่งในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก isoleucine เป็น leucine แต่อย่างใด นอกจากนี้ Dlye และคณะ (2002a) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของ กรดอะมิโนจาก isoleucine เป็น leucine นั้น ทำให้กิจกรรมของเอนโซม์ ACCase เปลี่ยนแปลง ไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เนื่องจากกรดอะมิโน isoleucine และ leucine มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกันมาก ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก isoleucine เป็น leucine อาจจะไม่เกี่ยวข้องกับความต้านทานสารฟีนอกซาพรอพในหญ้าดอกขาวโดยตรง

การแทนที่ของลำดับเบส (base-pair substitution) ที่เกิดขึ้นภายในยีน ACCase ของหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารทั้ง 4 ตำแหน่ง (Table 2) ในสาย DNA ส่งผลทำให้กรดอะมิโนในโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อการเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุด ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกลไกทางชีวโมเลกุลของตำแหน่งเป้าหมาย (ACCase gene) ที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร ซึ่งนำไปสู่สาเหตุของการเกิดความต้านทานสารฟีนอกซาพรอพได้ นอกจากนี้การเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุดในวัชพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช ยังสามารถพัฒนาไปสู่การตรวจหาวัชพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชในสภาพแปลงปลูกพืช โดยวิธี SNPs (single nucleotide polymorphisms) โดยการออกแบบ allele-specific PCR primers ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุด แล้วนำไปตรวจสอบในประชากรวัชพืช ซึ่งในวัชพืชที่

ต้านทานสารกำจัดวัชพืชจะแสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากวัชพืชที่อ่อนแอต่อสาร การใช้วิธีนี้สามารถช่วยตรวจหาความต้านทานของวัชพืชในสภาพแปลงปลูกพืชได้อย่างรวดเร็ว ต่อมาได้มีการพัฒนานำมาใช้ในการตรวจสอบประชากรของวัชพืช black-grass ที่ต้านทานสารในกลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน (D lye *et al*., 2002b) อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคดังกล่าวนี้สามารถนำไปพัฒนาใช้ในการตรวจหาวัชพืชต้านทานสารฟีนอกซาพรอพในสภาพแปลงปลูกพืชได้ต่อไป โดยพิจารณาในบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ทั้ง 4 ตำแหน่งดังกล่าวในข้างต้น เพื่อช่วยในการตรวจสอบหาประชากรของวัชพืชหญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารในกลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน ก่อนที่จะมีการแพร่ระบาดมากยิ่งขึ้นต่อไป

การศึกษาปริมาณการสะสมของ ACCase mRNA ในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารและไบโอไทป์ที่อ่อนแอต่อสารฟีนอกซาพรอพ โดยสกัด RNA รวมจากหญ้าดอกขาวที่ไม่ได้รับสารฟีนอกซาพรอพ (เป็นชุดควบคุม) และหญ้าดอกขาวที่ได้รับสารฟีนอกซาพรอพที่อัตราแนะนำ (6.75 ก.สารออกฤทธิ์/ไร่) แล้วนำมาทำ northern hybridizations พบว่าในสภาวะที่ไม่มีการใช้สารฟีนอกซาพรอพนั้น หญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่อ่อนแอ มีปริมาณการสะสมของ ACCase mRNA เป็นปริมาณสูงมากเท่า ๆ กับหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร แต่เมื่อได้รับสารฟีนอกซาพรอพที่อัตราแนะนำดังกล่าวในข้างต้น หญ้าดอกขาวทั้งไบโอไทป์ที่ต้านทานสารและไบโอไทป์ที่อ่อนแอ มีปริมาณการสะสมของ ACCase mRNA ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ปริมาณไม่แตกต่างกันในระหว่างหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารกับไบโอไทป์ที่อ่อนแอ (Figure 5) แสดงว่าการใช้สารฟีนอกซาพรอพมีผลต่อปริมาณการสะสมของ mRNA ในหญ้าดอกขาว อย่างไรก็ตามจากการศึกษากลไกทางชีวเคมีของหญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพนั้น พบว่าในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACCase สูงกว่าในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่อ่อนแอเป็น 10 เท่า (Pornprom *et al*., 2006) ซึ่งเป็นไปได้ว่า การควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมันของสารฟีนอกซาพรอพในวัชพืชหญ้าดอกขาวอาจเกิดขึ้นในช่วงหลังจากกระบวนการ transcription หรือ translation ของยีน ACCase ในช่วงของการสังเคราะห์เอนไซม์ โดยที่กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ACCase ที่มีต่อสารฟีนอกซาพรอพมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่แสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACCase ที่เป็นแบบตอบสนองน้อย (less sensitivity) ต่อสารกำจัดวัชพืช จึงทำให้หญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร สามารถสังเคราะห์กรดไขมัน (หรือไม่ถูกยับยั้งโดยสารฟีนอกซาพรอพ) ได้มากกว่าในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่อ่อนแอ ซึ่งนำไปสู่สาเหตุของการเกิดความต้านทานสารฟีนอกซาพรอพได้ ดังนั้นเมื่อมีการใช้สารฟีนอกซาพรอพ สารจะไม่สามารถเข้าไปยับยั้งหรือทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ ACCase ได้หมด ถึงแม้ว่าจะได้รับสารกำจัดวัชพืชในระดับ

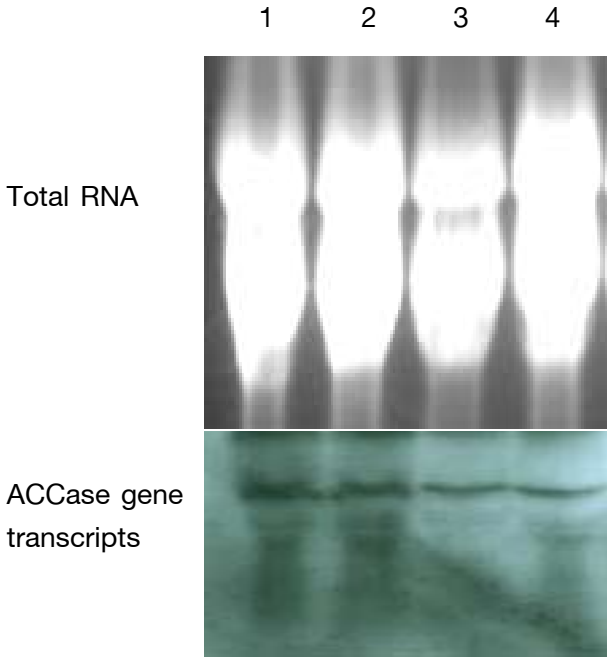

Figure 5. Northern hybridizations of ACCase mRNA in resistant (R) and susceptible (S) biotypes of Chinese sprangletop.

Lane 1 = S-Chinese sprangletop control

Lane 2 = R-Chinese sprangletop control

Lane 3 = S-Chinese sprangletop treated with fenoxaprop-P-ethyl 6.75 g a.i./ rai

Lane 4 = R-Chinese sprangletop treated with fenoxaprop-P-ethyl 6.75 g a.i./ rai

ความเข้มข้นที่สูง ยังคงพบว่ามีการแสดงออกของเอนไซม์ ACCase ในวัชพืชไบโอไทป์ที่ต้านทานสารอยู่ อย่างไรก็ตามมีการรายงานเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานสาร quizalofop-p และ sethoxydim ในวัชพืชหญ้าจอห์นสันพบว่าเป็นแบบการแสดงออกมากกว่าปกติของเอนไซม์ (Bradley *et al*., 2001) ต่อมามีรายงานว่า การเกิดความต้านทานสารกลุ่ม ALS ในประชากรของวัชพืช wild radish นั้น เกิดขึ้นในช่วงหลังจากกระบวนการ transcription หรือ translation ของยีน ALS โดยที่การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ของไบโอไทป์ที่ต้านทานสารไม่ต่างกับไบโอไทป์ที่อ่อนแอ (Yu *et al*., 2003) ซึ่งกลไกของความต้านทานสารดังกล่าวนี้ มีความสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบในหญ้าดอกขาวที่ต้านทานต่อสารฟีนอกซาพรอพ แม้ว่าสารกลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ALS จะเป็นสารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่มที่ต่างกันกับสารฟีนอกซาพรอพก็ตาม

ในการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการวัชพืชในนาข้าวแบบนาหว่านน้ำตม ซึ่งหลักการจัดการวัชพืชในแต่ละฤดูกาลเพาะปลูกนั้น ควรมีการหมุนเวียนและเปลี่ยนการใช้สารกำจัดวัชพืชให้มีกลไกในการทำลายพืชที่หลากหลายแตกต่างกันไป เพื่อเป็นการช่วยลดปัญหาของการเกิดวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช อีกทั้งยังเป็นการช่วยควบคุมและกำจัดวัชพืชได้อย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งในการพิจารณาลักษณะพื้นฐานทางด้านสรีรวิทยา ชีวเคมีและชีวโมเลกุลของหญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ ช่วยในการอธิบายเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานสารกำจัดวัชพืช (mechanisms of herbicide resistance) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีความซับซ้อนมาก

ภายในพืช ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อเกษตรกรที่มีปัญหาวัชพืชหญ้าดอกขาวต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ ในการทำนาข้าวแบบนาหว่านน้ำตม นอกจากนี้การพัฒนาเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลดังกล่าวนี้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการขยายพื้นที่ตรวจสอบวัชพืชที่ต้าน ทานสารกำจัดวัชพืชได้รวดเร็วยิ่งขึ้น โดยเฉพาะในพื้นที่ ๆ คาดว่าอาจจะมีวัชพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชเกิดขึ้นมาได้ และอยู่ในระยะที่วัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชมีการแพร่ระบาดไม่มากนัก เพื่อที่จะได้หาแนวทางในการป้องกันไม่ให้วัชพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชดังกล่าวนี้มีการแพร่ระบาดและกระจายพันธุ์ได้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การสำรวจพื้นที่ของเกษตรกรที่ทำนาข้าวแบบนาหว่านน้ำตม ในเขตสะพานสูง กรุงเทพฯ เพื่อทำการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับวัชพืชหญ้าดอกขาวต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ เมื่อพิจารณาความต้านทานสารหลายกลุ่มไปยังสารกำจัดวัชพืชชนิดอื่น ๆ ที่มีการใช้ในนาข้าว ไม่พบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชหลายกลุ่มของหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพไปยังสารออกซาไดแอสซอน โพรพานิล และควินคลอแรกซ์ เมื่อพิจารณาทางด้านชีวโมเลกุลของหญ้าดอกขาวที่ต้านทานสารฟีนอกซาพรอพ โดยทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสในส่วน carboxyl transferase (CT domain) ของยีน ACCase ขนาด 657 คู่เบส ได้ขึ้นทะเบียนใน genbank และมีรหัส AY803783 (ไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร) และ AY662693 (ไบโอไทป์ที่อ่อนแอ) ตามลำดับ พบว่ามีการเกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) ของนิวคลีโอไทด์จำนวน 4 ตำแหน่งในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร ส่งผลให้แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 4 ตำแหน่ง ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก Phe^{1718} เป็น Ser, Glu^{1739} เป็น Asp, Gly^{1746} เป็น Ala และ Ala^{1815} เป็น Thr ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางชีวโมเลกุลของตำแหน่งเป้าหมาย (ACCase gene) ที่สารกำจัดวัชพืชแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งในหญ้าดอกขาวไบโอไทป์ที่ต้านทานสาร ซึ่งนำไปสู่สาเหตุของการเกิดความต้านทานสารฟีนอกซาพรอพได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตลอดจนขอขอบคุณบริษัท ไบเออร์ไทย จำกัด (ไบเออร์ ครอปซายน์) ที่ให้การสนับสนุนสารกำจัดวัชพืชฟีนอกซาพรอพ และช่วยอำนวยความสะดวกในการสำรวจวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช

เอกสารอ้างอิง

Andrews, T.S., J.N. Morrison and G.A. Penner. 1998. Monitoring the spread of ACCase inhibitors

resistance among wild oat (*Avena fatua*) patches using AFLP analysis. *Weed Sci.* 46: 196-199.

Bradley, K.W., J. Wu, K.K. Hatzios and E.S. Jr. Hagood, 2001. The mechanism of resistance to aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione herbicides in Johnson grass biotype. *Weed Sci.* 49: 477-484.

Brown, A.C., S.R. Moss, Z.A. Wilson and L.M. Field. 2002. An isoleucine to leucine substitution in the ACCase of black-grass (*Alopecurus myosuroides*) is associate with resistance to the herbicide sethoxydim. *Pestic. Biochem. Physiol.* 72: 160-168.

Christoffers, M.J. and C.G. Messersmith. 1999. Molecular analysis of acetyl-CoA carboxylase genes from herbicide-resistant and -susceptible wild oats. Page 54. *In: Proceedings of the North Central Weed Science Society.* NCWSS Publications, Illinois, USA.

Dlye, C., T. Wang and H. Darmecy. 2002a. An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaris viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to cyclohexanedione herbicide sethoxydim. *Planta.* 214: 421-427.

Dlye, C., A. Matjicek and J. Gasquez. 2002b. SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) genotypes resistant to acetyl CoA-carboxylase inhibiting herbicides. *Theor. Appl. Genet.* 104:1114-1120.

Heap, I.M. 2004. *International Survey of Herbicide-Resistant Weeds*. Committee *and Weed Science Society of America*, http://www.weedscience.com 15/6/2004.

Heap, I.M. 2008. *International Survey of Herbicide Resistance Weeds*, http:// www.weedscience.com. 30/5/2008.

Maneechote, C., S. Samanwong, X.Q. Zhang and S.B. Powles. 2005. Resistance to ACCase-inhibiting herbicides in sprangletop (*Leptochloa chinensis*). *Weed Sci.* 53: 290-295.

Moss, S.R., K.M. Cocker, A.C. Brown, H. Linda and L.M. Field. 2003. Characterization of target-site resistance to ACCase-inhibiting herbicide in the weed (black-grass) *Alopecurus myosuroides*. *Pest Manage. Sci.* 59:190-201.

Nikolskaya, T., O. Zagnitko, G. Tevzadze, R. Haselkorn and P. Gornicki. 1999. Herbicide sensitivity determinant of wheat plastid acetyl-coA carboxylase is located in a 400-amino acid fragment of the carboxyltransferase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 14647-14651.

Pornprom, T., P. Mahatamnuchoke and K. Usui. 2006. Altered acetyl-CoA carboxylase confers resistance to fenoxaprop in Chinese sprangletop (*Leptochloa chinensis* L. Nees). *Pest Manage. Sci.* 62: 1109-1115.

Valverde, E.B., C.R. Riches and J.C. Caseley. 2000. *Prevention and Management of Herbicide Resistant Weeds in Rice: Experiences from Central America with Echinochloa colona.* CATIC, Turrialba, Costa Rica. 123 p.

Yu, Q., X.Q. Zhang, A. Hashem, M.J. Walsh and S.B. Powles. 2003. ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Sci.* 51: 831-838.

Zagnitko, O., J. Jelenska, G. Tevzadze, R. Haselkorn and P. Gornicki. 2001. An isoleucine/ leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxy propionate and cyclohexanedione inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 6617-6622.