บทที่ 1

บทนำ

น้ำจากบริเวณเหมืองถ่านหินลิกไนต์ที่ อ. แม่เมาะ จ. ลำปาง ซึ่งเกิดจากการสะสมของน้ำฝนที่ตกลงมารวมกับน้ำใต้ดินที่เกิดจากการขุดถ่านหินลิกไนต์ พบว่ามีซัลเฟตปนเปื้อนอยู่สูงถึง 800-2,000 มิลลิกรัม/ลิตร ทั้งนี้เพราะถ่านหินลิกไนต์มีเหล็กซัลไฟด์ (FeS_2) หรือไพไรต์ปนเปื้อนอยู่ เพื่อที่จะกำจัดหรือลดปริมาณซัลเฟตในน้ำจากบริเวณเหมือง ให้สามารถปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยจึงสูบน้ำจากบริเวณเหมืองให้ไหลผ่านบริเวณที่ทำให้เป็นภาวะไร้ออกซิเจนโดยการปลูกพืชที่เจริญเติบโตเร็วอย่างหนาแน่นปกคลุมเพื่อป้องกันการแพร่ของออกซิเจนในอากาศเข้ามาทางผิวน้ำ และใส่สารอินทรีย์ปริมาณมากลงไปในบ่อเพื่อให้จุลินทรีย์ในน้ำซึ่งสามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานเจริญได้ดี ผลการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้จะทำให้ออกซิเจนซึ่งละลายอยู่ในน้ำหมดไป เมื่อน้ำจากบริเวณเหมืองไหลผ่านบริเวณไร้ออกซิเจนนี้ จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญจะใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเลคตรอน ทำให้ซัลเฟตเปลี่ยนไปเป็นซัลไฟด์ โดยวิธีนี้พบว่าสามารถลดซัลเฟตไปได้เพียง 30% เท่านั้น (ข้อมูลจากการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย) จึงยังไม่สามารถปล่อยน้ำที่ผ่านการบำบัดในร่องน้ำไร้ออกซิเจนออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ ดังนั้นการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยจึงกักเก็บน้ำเหล่านี้ไว้ในบ่อพักขนาดใหญ่เรียกว่า Biological pond แล้วนำมาผสมกับน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติใกล้เคียง เพื่อเจือจางซัลเฟตแล้วจึงปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ใน Biological pond นี้พบว่ามีผักบุ้ง(*Ipomoea aquatica*) เจริญอยู่ ผักบุ้งเป็นพืชที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว การเจริญมีการนำซัลเฟตในน้ำที่เจริญอยู่มาสังเคราะห์เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์หรือมีกระบวนการนำซัลเฟตในน้ำที่เจริญอยู่มาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซีสเตอีน (sulfate assimilation) แต่ในธรรมชาติประสิทธิภาพของกระบวนการนี้ถูกควบคุมไว้จึงไม่สูงมาก

อังคณา โพธิ์ไกร (2545) ได้รายงานว่าผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) ดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าว *Oryza sativa* สามารถดูดซับซัลเฟตได้มากกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม ทั้งเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส (serine acetyltransferase) และซิสเตอีนซินเตส (cysteine synthase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนโดยตรง แต่พบว่ากิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสนั้นต่ำมากเมื่อเทียบกับกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส (Reffet และคณะ, 1994) การเพิ่มกิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส น่าจะทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนจากซัลเฟตสูงขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้งให้สูงยิ่งขึ้นกว่าที่ อังคณา โพธิ์ไกร (2545) ได้เคย

รายงานไว้ โดยการถ่ายโอนยีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสจาก *Arabidopsis thaliana* เข้าสู่ผักบุ้งร่วมกับยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าว *Oryza sativa* โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium* ซึ่งเป็นวิธีการถ่ายโอนยีนที่ใช้ได้ผลดีกับพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledons) และเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด (Sahi และคณะ, 1994)

วัตถุประสงค์ ดัดแปลงพันธุ์ผักบุ้งจีน(*Ipomoea aquatica* Forsk.) ให้สามารถดูดซับซัลเฟตได้มากกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม และผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าว

ขอบเขตการศึกษา

1. สร้างพลาสมิด pBIH1-IG(SX) -*SAT*1 – *rcs*1ซึ่งมียีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส จาก *A. thaliana* (ยีน *SAT*1) และยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าว *Oryza sativa* (ยีน *rcs*1)
2. ถ่ายโอนยีน *SAT*1และยีน *rcs*1เข้าสู่ผักบุ้ง โดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิดจาก ข้อ1.
3. ตรวจหายีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ในต้นผักบุ้งที่คาดว่าเป็นผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์จาก ข้อ2.โดยวิธี PCR
4. หากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส และเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสในต้นผักบุ้งที่มียีน *rcs*1 และยีน *SAT*1
5. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตระหว่างผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์จาก ข้อ3. ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สร้างพลาสมิด pBIH1-IG(SX) - *SAT* 1 – *rcs*1 ซึ่งมียีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส จาก *A. thaliana* (ยีน *SAT*1) และยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าว *Oryza sativa* (ยีน *rcs*1)
   1.1 นำยีน *rcs*1 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBIH1-IG(SX) - *SAT* 1 ซึ่งมียีน *SAT*1 ด้วยเอนไซม์ T_4 ligase เรียกพลาสมิดที่ได้ว่า pBIH1-IG(SX) - *SAT* 1 – *rcs* 1
   1.2 ตรวจหายีน *SAT* 1 และ *rcs* 1 ในพลาสมิดที่ได้จาก ข้อ1.1 โดยวิธี PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ เพื่อการเพิ่มจำนวนยีน *SAT* 1 และยีน *rcs*1
2. ถ่ายโอนยีน *SAT*1และยีน *rcs*1เข้าสู่ผักบุ้ง โดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิดจาก ข้อ1.
   2.1 ถ่ายโอนพลาสมิดจาก ข้อ1. เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 โดยวิธี electroporation

2.2 ตัดใบเลี้ยงของผักบุ้งเป็นชิ้นเล็ก ๆ (cotyledon explant) จุ่มในสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) -*SAT*1 – *rcs*1 ซับให้แห้งในสภาวะปลอดเชื้อ วางบนอาหารแข็ง MS (Murastrige และ Skoog, 1961) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน

2.3 ล้างเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101ออกจาก cotyledon explant โดยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟเทคซีม(cefotaxime) แล้วเพาะเลี้ยง infected cotyledon explant บนอาหารแข็งMMS ที่เติม thidiazuron เพื่อกระตุ้นการสร้างต้น บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 1 เดือน

2.4 ย้าย cotyledon explant ซึ่งมีต้นอ่อนผักบุ้งเจริญขึ้นมา(ที่ได้จากข้อ 2.3) มาวางบนอาหารแข็ง MMS ที่เติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟเทคซีม และสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เพื่อคัดเลือกต้นที่คาดว่ามียีน *SAT* 1 และยีน *rcs*1 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 1 เดือน

2.5 นำต้นผักบุ้งที่คาดว่าจะมียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 (ที่ได้จากข้อ2.4) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS เพื่อให้งอกราก บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน จนได้ต้นอ่อนผักบุ้งที่สมบูรณ์

3. ตรวจหายีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ในต้นผักบุ้งที่คาดว่าเป็นผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์จาก ข้อ2. โดยวิธี PCR

3.1 นำต้นผักบุ้งที่คาดว่าจะมียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 มาสกัดดีเอ็นเอ

3.2 ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก ข้อ3.1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์เพื่อเพิ่มยีน *SAT* 1 และ ยีน *rcs*1

3.3 เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จาก ข้อ3.2 กับขนาดดีเอ็นเอที่ได้เมื่อใช้ยีน *SAT* 1 และยีน *rcs*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซิส

4. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตระหว่างผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์จาก ข้อ3. ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type)

4.1 ปลูกผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT* 1 และยีน *rcs*1ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิมซึ่งทราบน้ำหนักเริ่มต้นในอาหารเหลว MS ที่มีซัลเฟตความเข้มข้นสุดท้าย 1000 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในสภาวะปลอดเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 1 เดือน

4.2 ล้างต้นผักบุ้งที่ได้จาก ข้อ4.1 ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้งโดยวิธีปราศจากเชื้อ ชั่งน้ำหนักวัดปริมาตรอาหารเหลว MS ที่เหลือ และวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตที่เหลือใน

อาหารเหลวโดยวิธี HPLC เปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตระหว่างผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และ ยีน *rcs*1 (ผลจาก ข้อ4.2) ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 (อังคณา โพธิ์ไกร, 2545) และผักบุ้ง พันธุ์เดิม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ได้ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการดูดซับซัลเฟตสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม และผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสเพียงอย่างเดียว เพื่อใช้ดูดซับซัลเฟตในแหล่งน้ำที่มีซัลเฟตปนเปื้อน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย