บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

วิชาพันธุศาสตร์ได้มีการศึกษาและพัฒนามาเป็นเวลานาน ปัจจุบันเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมก็ได้พัฒนาและนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง คุณสมบัติที่โดดเด่น และเป็นที่ต้องการของสิ่งมีชีวิตหนึ่งสามารถคัดเลือกและถ่ายทอดสู่สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกันก็ได้โดยการคัดเลือกยีนที่สนใจหรือต้องการออกมาได้ หลังจากนั้นเพิ่มจำนวนโดยวิธีการที่เรียกว่าโคลนนิ่ง แล้วจึงใส่กลับเข้าไปในสิ่งมีชีวิตที่ต้องการ โดยที่ยีนนั้นจะทำหน้าที่ได้ตามปกติ นอกเหนือจากนี้แล้ว ยีนที่แยกออกมาได้อาจถูกดัดแปลง โดยทำให้มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง แล้วจึงใส่กลับเข้าไปในสิ่งมีชีวิตที่ต้องการ

เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ประสบความสำเร็จอย่างมาก ในหลายด้าน เช่น การผลิตฮอร์โมนอินซูลินในแบคทีเรีย ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว สามารถผลิตเป็นอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อโรคและแมลง เช่นการผลิตมะละกอที่ทนต่อโรคไวรัสวงแหวน หรือผลิตต้นฝ้ายที่ทนทานแมลง ปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณสารที่ต้องการสารใดสารหนึ่ง ดังนี้เป็นต้น ในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุ์จำเป็นที่จะต้องอาศัยวิธีการทางด้านพันธุวิศวกรรม ซึ่งเทคนิคดังกล่าว เป็นเทคนิคที่สามารถสร้างสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุ์ที่มีคุณสมบัติได้ตามที่ต้องการ และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตร เช่น ปรับปรุงพันธุ์ และคัดเลือกพันธุ์ ทนทานต่อโรคและแมลง เป็นต้น ในการปรับปรุงพันธุ์พืชวิธีการดั้งเดิมนั้นจะต้องใช้เวลานาน และแรงงานมาก อีกทั้งยังต้องใช้พื้นที่ในการทดลองจำนวนมาก การปรับปรุงพันธุ์โดยการใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมีข้อได้เปรียบต่อวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิมคือสามารถส่งถ่ายยีนที่ต้องการให้กับพืชแต่ละชนิดได้โดยตรงในระดับพันธุกรรม โดยไม่ต้องกังวลถึงข้อจำกัดของสภาพที่เข้ากันไม่ได้ (incompatibility) จากการผสมข้ามชนิด (species) ต่างสกุล (genus) หรือต่างวงศ์ (family) นอกจากนั้นยังเลือกใส่เฉพาะยีนที่ต้องการโดยตรง ซึ่งถือว่าเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการยกระดับผลผลิต และคุณภาพของผลผลิตให้สูงขึ้น (นเรศ, 2543) แต่การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยอาศัยพันธุวิศวกรรมนั้นต้องอาศัยการส่งถ่ายยีนเพื่อสร้างพืชดัดแปลงพันธุ์ (transgenic plant) ซึ่งมีหลายวิธีทั้งการถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer) ตัวอย่างเช่น การใช้กระแสไฟฟ้าแรงสูง (electroporation) เพื่อชักนำให้ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืช (Chaudhury et al., 1995) การใช้สารเคมีโพลีเอทีลีนไกลคอล (polyethylene glycol

หรือ PEG) (Weissinger, 1992) การใช้เข็มฉีด (microinjection) (อารีย์, 2541) การใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle gun bombardment หรือ microprojectile bombardment) (Gordon-Kamm et al., 1990) การใช้เทคนิค Ion beam ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Yu et al.,1993) รวมถึงสามารถนำเทคนิคไอออนบีมพลังงานต่ำมาใช้ในการส่งถ่ายพลาสมิด ดี เอ็น เอ เข้าสู่แบคทีเรีย (Anuntalabhochai et al., 2001) และการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยอาศัยแบคทีเรียเป็นพาหะ ได้แก่ *Agrobacterium* (agrobacterium – mediated gene transfer) (Weising & Kahl, 1996) เป็นต้น

ปทุมมาเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae พบได้ทั่วไปเกือบทุกภาคของไทยโดยเฉพาะบริเวณที่ร้อนและมีความชื้นสูง เช่น ภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ ชาวบ้านนิยมนำมาบริโภคและใช้เป็นสมุนไพร นอกจากนั้นแล้วปทุมมายังเป็นไม้ดอกที่มีรูปทรงสีสันที่สวยงาม จึงมีผู้นิยมนำไปปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับเป็นจำนวนมากทั้งในและต่างประเทศ มีรายงานถึงการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศของหัวพันธุ์ และดอกปทุมมาว่ามีมูลค่าหลายร้อยล้านบาท และปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี โดยประเทศที่นำเข้าได้แก่ เนเธอแลนด์ ญี่ปุ่น ไต้หวัน และอิสราเอล เป็นต้น ซึ่งมีความต้องการแตกต่างกันโดยญี่ปุ่นชอบโทนสีหวาน คลาสสิก ตลาดยุโรปชอบสีเข้ม เช่น สีบานเย็น แต่อเมริกาชอบทั้งสองแบบ อย่างไรก็ตามปัญหาของการส่งออกของหัวพันธุ์คือโรคที่เกิดจาก *Pseudomonas solanacerum* และอายุของดอกปทุมมา (vase life) ที่ไม่ ยืนยาวมากนัก ในอนาคตหากสามารถสร้างปทุมมาเป็นพืชดัดแปลงพันธุกรรมให้สามารถต้านทานต่อโรค หรือยืดอายุดอกปทุมมา โดยเฉพาะทำให้ปทุมมามีสีดอกแตกต่างไปจากธรรมชาติเดิมที่ มีอยู่ ก็จะเป็นวิธีหรือทางเลือกหนึ่งที่จะเพิ่มมูลค่าสินค้าและสามารถขยายตลาดปทุมมาให้ครอบคลุมความต้องการที่หลากหลายของกลุ่มลูกค้าได้มากขึ้น ส่งผลให้สามารถเพิ่มปริมาณการผลิต ส่งออกและรายได้เข้าสู่ประเทศได้มากตามไปด้วย

จากการศึกษาของ Jaakola et al. (2002) รายงานว่าแอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีในดอกไม้ การที่ดอกไม้มีสีที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดหรือกลุ่มของรงควัตถุแอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบ ชนิดของน้ำตาลที่เกาะกับแอนโทไซยานิดินเพื่อสร้างเป็นแอนโทไซยานิน และถ้ามีการส่งถ่ายยีนที่ไปยับยั้งหรือเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารในกลุ่มของรงควัตถุแอนโทไซยานิน อาจทำให้มีผลต่อการแสดงออกของสีดอกไม้ที่เปลี่ยนแปลงไป (Holton & Cornish, 1995) ดังนั้นหากสามารถแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในปทุมมา และนำยีนดังกล่าวส่งถ่ายเข้าไปในพืชโดยใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรม อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีดอกของปทุมมาได้จากรายงานของ Rosati et al. (2000) ศึกษาการส่งถ่าย

ยีนใน *Forsythia intermedia* ซึ่งมีดอกสีเหลือง พบว่าเมื่อส่งถ่าย Sense *DFR* gene จาก *Antirrhinum* สามารถทำให้ดอก *Forsythia intermedia* มีสีน้ำตาลเหลืองได้ และ Holton (1996) ได้ทำการส่งถ่าย *Sense DFR* gene จากพิทูเนียเข้าไปใน *Dianthus caryophyllus* พบว่า ทำให้ดอกสีขาวของ *Dianthus caryophyllus* เปลี่ยนเป็นดอกสีม่วงได้ Suzuki et al. (2000) ได้ศึกษาการส่งถ่าย Sense *DFR* gene และพบว่าทำให้ดอก *Torenia hybrida* ซึ่งมีสีน้ำเงินเปลี่ยนเป็นดอกสีขาวและมีลวดลายสีน้ำเงินปะปน นอกจากนี้การส่งถ่าย Antisense *DFR* gene (Aida et al., 2000) ทำให้ *Torenia hybrida* มีดอกสีน้ำเงินอ่อน

ในปัจจุบันได้มีรายงานถึงการถ่ายทอดยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* ประสบความสำเร็จในพืชเช่นข้าว (Rashid et al., 1996) กล้วยไม้ (belarmino et al.,2000) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะพัฒนาเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน คือ ยีน Dihydroflavonol 4 - reductase (*DFR*) จากดอกปทุมมา จากนั้นศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชปทุมมา โดยใช้ *A. tumefaciens* และนำผลการศึกษามาใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกยีนสังเคราะห์เอนไซม์ Dihydroflavonol 4 - reductase (*DFR*) จากดอกปทุมมา
2. ศึกษาวิธีส่งถ่ายยีนในพืชปทุมมาโดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens*
3. เพื่อส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน คือ ยีน Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) ด้วยวิธี Antisense Technology ในพืชปทุมมา