การดูดซับซัลเฟตของผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน serine acetyltransferase จาก *Arabidopsis thaliana* และยีน cysteine synthase จากข้าวจ้าว *Oryzae sativa* เพิ่มขึ้น

SULFATE UPTAKE INCREASE IN TRANSGENIC *Ipomaea aquatica* OVEREXPRESS *Arabidopsis thaliana* SERINE ACETYLTRANSFERASE AND *Oryzae sativa* CYSTEINE SYNTHASE GENES.

ศุภจิตรา ชัชวาลย์[1] จอมขวัญ มีรักษ์[2] ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์[3] อัญชริดา อัครจรัลญา[2]

[1]Department of Botany, [2]Department of Microbiology, [3]Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

บทคัดย่อ : ถ่ายโอนยีน serine acetyltransferase จาก *Arabidopsis thaliana* (ยีน *SAT* 1) และยีน cysteine synthase จากข้าวจ้าว *Oryzae sativa* (ยีน *rcs* 1) เข้าสู่ผักบุ้งโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ยืนยันการมีอยู่จริงของยีน *SAT* 1 และ ยีน *rcs* 1 ในผักบุ้งที่คาดว่าเป็นผักบุ้งแปลงพันธุ์โดยวิธี PCR ได้ผักบุ้งแปลงพันธุ์ 2 พันธุ์คือ พันธุ์ SR 3 และ SR 10 ตรวจหาการแสดงออกของยีนทั้งสองโดยวิธี nested RT-PCR แอคติวิตีของ serine acetyltransferase และ cysteins synthase ของผักบุ้งแปลงพันธุ์ (SR 3 และ SR 10) มีค่าเป็น 2.52, 2.08 และ 4.13, 3.44 เท่า สูงกว่าของผักบุ้งพันธุ์เดิมตามลำดับ ผักบุ้งแปลงพันธุ์ (SR 3 และ SR 10) มีปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีน 7.6 และ 6.5 เท่า สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม เมื่อปลูกผักบุ้งแปลงพันธุ์ทั้งสองและผักบุ้งพันธุ์เดิมในสภาวะที่มีซัลเฟต 1,000 มิลลิกรัมต่อ 1 ลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ผักบุ้งแปลงพันธุ์ (SR 3 และ SR 10) ดูดซัลเฟต 5.5 และ 4.0 เท่า สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม ผักบุ้งพันธุ์เดิมดูดซัลเฟต 3.84 มิลลิกรัมซัลเฟตต่อ 1 กรัมน้ำหนักเปียกของผักบุ้ง

Abstract : *Arabidopsis thaliana* serine acetyltransferase gene (*SAT* 1) and *Oryza sativa* cysteine synthase gene (*rcs* 1) were transformed into *Ipomoea aquatica* using *Agrobacterium tumefaciens*. Confirmation of the existence of *SAT* 1 and *rcs* 1 gene in the genome of putative transgenic lines was done by polymerase chain reaction. Two transgenic lines (SR 3 and SR 10) were obtained. Expression of genes transformed was detected by nested RT-PCR. Serine acetyltransferase and cysteine synthase activities of the transgenic lines (SR 3 and SR 10) were 2.52, 2.08 and 4.13, 3.44 times higher than those of wild type, respectively. The transgenic lines (SR 3 and SR 10) contain cysteine 7.6 and 6.5 times higher than wild type. Cultivation of the two transgenic lines in 1,000 mg sulfate/l condition, SR 3 and SR 10, absorped sulfate 5.5 and 4.0 times higher than those of the wild type. Wild type absorped 3.84 mg sulfate/g wet weight.

Introduction : The sulfate accumulation in waste water generated from lignite mine is one of the important environmental contamination. Plants naturally utilize sulfate through the mechanism known as sulfate assimilation. Plants uptake the sulfate from the environment using sulfate transporters, localized in root plasma membrane. With ATP sulfurylase activities, sulfate is converted to adenosine 5'-phosphosulfate (APS), and APS reductase reduce APS to sulfite. The final step in cysteine synthesis is the reaction that incorporates a sulfide moiety into the β-position of alanine. The carbon skeleton is derived from serine (ser) via O-acetyl- serine (OAS). Two enzymes, serine acetyltransferase and OAS (Thiol)-lyase (cysteine synthase) are involved in this step. Cysteine, then is the precursor of other sulfur containing compounds. The aim of this research is to increase sulfate uptake of *Ipomoea aquatica* by sulfate assimilation pathway manipulation for use as sulfate absorber in mine drainage water .

Methodology : Plasmid pBIH1-IG-*SAT* 1-*rcs* 1 harbouring *Arabidopsis thaliana* serine acetyltransferase gene (*SAT* 1) and *Oryzae sativa* cysteine synthase gene (*rcs* 1) were transformed into *Ipomoea aquatica* using *Agrobacterium tumefaciens* by the method described by Khamwan *et al* (2003). Putative transgenic lines were selected from hygromycin resistant ability. Confirmation for the existence of *SAT* 1 and *rcs* 1 was done by PCR. Genemic DNA was isolated from leaf tissue. Expression of *SAT* 1 and *rcs* 1 were detected by nested RT-PCR. Total RNA was isolated from the first young fully expanded leaf. After reverse transcription, 1 μl of the RT product was used for nested PCR. Amplification of Ubiquitin was used as an internal control for equal amount of total RNA. Serine acetyltransferase activity and cysteine synthase activity were analysed by the method described by Baecker and Wedding, 1980 ; and described by youssifan *et al*, 1993, respectively. Cysteine content was quantified by the method described by Noctor and Foyer, 1998. Sulfate uptake was quantified by HPLC.

Results, Discussion and Conclusion : Two transgenic lines of *Ipomoea aquatica* harbouring *Arabidopsis thaliana* serine acetyltransferase (*SAT* 1) and *Oryzae sativa* cysteine synthase (*rcs* 1) were obtained. Cysteine content of transgenic lines was higher than those of wild type. Sulfate absorption efficiency of the transgenic line was 5.5 times higher than those of wild type. The results suggest that the final step of cysteine biosynthesis is the key step of sulfate assimilation. The *Ipomoea aquatica* transgenic line increased in sulfate uptake has a potential for sulfate phytoremediation.

References :

(1) Baecker P.A. and Wedding R.T. (1980) *Anal Biochem*, **102**, 16-21.
(2) Khamwan, K. (2003) *Plant Biotechnology*, **20**, 335-338.
(3) Noctor, G. and Foyer, C.H. (1998) *Anal. Biochem.*, **264**, 98-110.
(4) Saito, K. (2000) *Curr Opin Plant Biol.* **3**, 188-195.
(5) Youssifian, S. (1993) *Plant J.*, **4**, 459-469.

Keywords : sulfate uptake, *Ipomoea aquatica*, serine acetyltransferase, cysteine synthase