บทคัดย่อ

210542

โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายที่การสกัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโธไซยานิน 3 ยีนจาก กล้วยไม้ไทยสกุลแวนด้า (Vanda) และสกุลเข็ม (Ascocentrum) ได้แก่ ยีน *dihydroflavonol 4-reductase* (*DFR*) ยีน *flavonoid 3'-hydroxylase* (*F3'H*) และยีน *flavonoid 3',5'-hydroxylase* (*F3'5'H*) การสกัดแยกชิ้นส่วนของยีนเหล่านี้ใช้วิธีพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ Degenerate primers ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนของยีน *DFR F3'H* และ *F3'5'H* ร่วมกับ genomic DNA ที่สกัดจากใบของกล้วยไม้สกุลแวนด้าและสกุลเข็ม ชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเป็น *DFR* candidate ขนาด 750 bp และ 850 bp ถูกสกัดแยกและโคลนจาก *Ascocentrum curvifolium* และ *A. miniatum* โคลนซึ่งเป็นตัวแทนของชิ้นดีเอ็นเอแต่ละขนาดได้รับการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Blastx จาก NCBI ปรากฏว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่มีความเหมือนกับโปรตีน DFR ใดในฐานข้อมูล GenBank ชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเป็น *F3'H* candidate ขนาด 1 kb ถูกสกัดแยกและโคลนจาก *A. curvifolium* และ *Vanda coerulea* โคลนซึ่งเป็นตัวแทนของชิ้นดีเอ็นเอแต่ละขนาดได้รับการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Blastx จาก NCBI ปรากฏว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่มีความเหมือนกับโปรตีน F3'H ใดในฐานข้อมูล GenBank ดังนั้นการสกัดแยกยีน *DFR* และ *F3'H* จากกล้วยไม้สกุลแวนด้าและสกุลเข็มจึงยังไม่ประสบความสำเร็จ ส่วนชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเป็น *F3'5'H* candidate ขนาด 1.1 kb ถูกสกัดแยกและโคลนจาก *V. coerulea A. curvifolium* และ *A. miniatum* โคลนซึ่งเป็นตัวแทนของชิ้นดีเอ็นเอแต่ละขนาดได้รับการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Blastx จาก NCBI ปรากฏว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับโปรตีน CYP76 และ F3'5'H (CYP75A) ซึ่งเป็นสมาชิกของ Cytochrome P450 superfamily ในฐานข้อมูล GenBank ปลาย cDNA ทั้งสองด้านของแต่ละยีนถูกโคลนด้วยวิธี 5'RACE และ 3'RACE เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดความยาวของยีนแต่ละยีน ยีนซึ่งสร้าง F3'5'H-like protein ที่สกัดได้จาก *V. coerulea A. curvifolium* และ *A. miniatum* ให้ชื่อว่า *VcX AcX* และ *AmX* ตามลำดับ Open reading frames (ORFs) ของยีน *VcX AcX* และ *AmX* สร้างเป็นกรดอะมิโนขนาด 497 467 และ 467 residues ตามลำดับ ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันอยู่ระหว่าง 78-89% และมี 3 บริเวณอนุรักษ์ของ Cytochrome P450 ปรากฏอยู่ได้แก่ Proline-rich region Heme-binding region และ Oxygen-binding region คู่เหมือน (Homologue) ของยีน *VcX AcX* และ *AmX* อีกยีนถูกสกัดแยกจาก *A. ampullaceum* ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสาม ORF ของยีนที่สกัดได้สร้างเป็นกรดอะมิโนขนาด 502 residues และให้ชื่อยีนนี้ว่า *AaX* การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *VcX* โดยวิธี RT-PCR ปรากฏว่ายีนนี้มีการแสดงออกที่ดอกแต่ไม่แสดงออกที่ใบ ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *VcX* ในดอก 5 ระยะของการเจริญพัฒนาพบว่าดอกระยะที่ 4 (ดอกแย้ม) มีการแสดงออกมากที่สุด ขณะที่การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AmX AcX* และ *AaX* ในดอกของต้นพ่อแม่ไม่สามารถสรุปได้เนื่องจากผล RT-PCR ที่ได้ไม่สอดคล้องกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ของยีนที่ได้มา

Isolation and characterization ofanthocyanin biosynthetic genes of orchids *Kumrop Ratanasut*

This research project aimed at isolating and characterizing three anthocyanin biosynthetic genes coding for dihydroflavonol 4-reductase (DFR), flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), and flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) from Thai-native orchids genera Vanda and Ascocentrum. Isolation of these gene fragments was performed by using PCR-based strategy. Degenerate primers were designed to the conserved amino acid regions of several published *DFR*, *F3'H*, and *F3'5'H* genes and used in PCR reactions with genomic DNA isolated from leaves of Vanda and Ascocentrum orchids. Four *DFR* candidate fragments were isolated and cloned from *Ascocentrum curvifolium* (750 and 850 bp) and *A. miniatum* (750 and 850 bp). Representative colonies of each insert length were sequenced. NCBI-Blastx analysis of these sequences revealed that their deduced amino acid sequences did not show homologies to protein sequences of any *DFR* genes in GenBank database. Two *F3'H* candidate fragments were isolated and cloned from *A. curvifolium* (1 kb) and *Vanda coerulea* (1 kb). Representative colonies of each insert length were sequenced. NCBI-Blastx analysis of these sequences revealed that their deduced amino acid sequences did not show homologies to protein sequences of any *F3'H* genes in GenBank database. Therefore the isolation of *DFR* and *F3'H* genes from Vanda and Ascocentrum orchids has not been accomplished yet. Three *F3'5'H* candidate fragments were isolated and cloned from *V. coerulea* (1.1 kb), *A. curvifolium* (1.1 kb), and *A. miniatum* (1.1 kb). Representative colonies of each insert length were sequenced. NCBI-Blastx analysis of these sequences revealed that their deduced amino acid sequences showed homologies to CYP76 and F3'5'H (CYP75A) proteins, members of Cytochrome P450 superfamily, in GenBank database. To obtain full length of these genes, cloning cDNA ends of each gene was carried out by 5'RACE and 3'RACE. F3'5'H-like protein genes isolated from *V. coerulea*, *A. curvifolium*, and *A. miniatum* were named as *VcX*, *AcX*, and *AmX*, respectively. Open reading frames of *VcX*, *AcX*, and *AmX* genes encoded amino acid 497, 467, and 467 residues, respectively. They were highly similar to each other (78-89% amino acid identity) and contained three highly conserved regions of Cytochrome P450 including Proline-rich region, Heme-binding region, and Oxygen-binding region. Based on the nucleotide sequences of *VcX*, *AcX*, and *AmX* genes, another homologue was isolated from *A. ampullaceum* by PCR and named as *AaX*. This gene encoded amino acid 502 residues. RT-PCR analysis of *VcX* in *V. coerulea* revealed that expression of *VcX* was observed in flowers but not in leaves. The transcripts of *VcX* in 5 different developmental stages of flowers were analyzed by RT-PCR. The result showed that the transcripts were most abundant in stage 4, opening flower. The endogenous expression of *AmX*, *AcX*, and *AaX* genes in their parental flowers was not able to make a conclusion because the RT-PCR results were not corresponded to the nucleotide sequences of these genes.