

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยรหัส ก-ษ(ด) 15.51

การพัฒนาสีผิวของผลมังคุดระหว่างการเจริญเติบโต

และหลังการเก็บเกี่ยว

**Colour Development of Mangosteen Fruit during
Growth and Development and after Harvest**

สายชล เกตุษา

ยศพล ผลาผล

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2551

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาการพัฒนาสีผิวของผลมังคุดระหว่างการเจริญเติบโตและหลังการเก็บเกี่ยวได้รับ
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี 2551 ผู้วิจัย
ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนสำหรับ
การวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อไทย	1
บทคัดย่ออังกฤษ	3
บทนำ	4
วัตถุประสงค์	5
การตรวจเอกสาร	5
วิธีวิจัย	15
ผลการทดลอง	41
วิจารณ์ผลการทดลอง	95
สรุปผลการทดลอง	100
เอกสารอ้างอิง	101

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2551

โครงการวิจัยรหัส ก-ษ(ด) 15.51

การพัฒนาสีผิวของผลมังคุดระหว่างการเจริญเติบโตและหลังการเก็บเกี่ยว

**Colour Development of Mangosteen Fruit during Growth and
Development and after Harvest**

สายชล เกตุษา และยศพล ผลาผล ⁽¹⁾

Saichol Ketsa and Yossapol Palapol

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบ ปริมาณของแอนโทไซยานิน และกลไกในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินผลมังคุดระหว่างการเจริญเติบโตและหลังการเก็บเกี่ยวของผล พบว่าผลมังคุดหลังการเก็บเกี่ยวเปลี่ยนผิวสีเขียวเป็นสีม่วงดำระหว่างการสุกอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 25 °ซ (85-90% RH). ผลมังคุดที่เก็บเกี่ยววัยต่างๆตั้งแต่ระยะที่ 1 – 5 สามารถพัฒนาสีผิวและสุกจนถึงวัยระยะที่ 6 สีผิวม่วงดำและมีองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพการรับประทานไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับผลมังคุดที่เก็บเกี่ยวในวัยสีม่วงดำ (วัยระยะที่ 6) ผลมังคุดเก็บเกี่ยวระยะที่ 4-6 พบว่าหลังการเก็บเกี่ยวสีผิวมีค่า hue และความแน่นเนื้อของเปลือกของผลลดลง ขณะที่ ค่า total soluble solids เพิ่มขึ้นและ ปริมาณกรด titratable acidity, TA) ลดลง ปริมาณแอนโทไซยานินในเปลือกผลมังคุดเพิ่มขึ้นตลอดเวลาระหว่างการเจริญเติบโตของผลจนกระทั่งผลแก่และปริมาณแอนโทไซยานินในเปลือกผลด้านนอกมีมากกว่าหลายเท่าในเปลือกผลด้านใน แอนโทไซยานินในเปลือกผลด้านนอกประกอบด้วยแอนโทไซยานิน 5 ชนิด คือ cyanidin-sophoroside, cyanidin-glucoside, cyanidin-glucoside-pentoside, cyanidin-glucoside-X, cyanidin-X₂ และ cyanidin-X สาร cyanidin-3-sophoroside และ

⁽¹⁾ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

cyanidin-3-glucoside เป็นสารแอนโทไซยานินหลักที่ทำให้เกิดสีม่วงในสีผิวเปลือกผลมังคุด การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเปลือกผลมังคุดถูกควบคุมโดยกลุ่มยีน MYB-super family ที่ระดับ transcription factor โดยทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสเต็มเส้นของยีนในกลุ่ม MYB-super family ทั้ง 3 ตัว คือ *GmMYB1*, *GmMYB7* และ *GmMYB10* และได้โคลนและตรวจสอบลำดับเบส (amino sequencing) ของยีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินคือ *GmPAL*, *GmCHS*, *GmCHI*, *GmF3H*, *GmF3'H* และ *GmF3''H* การแสดงออกของยีน *GmMYB10* และ *GmUFGT* มีความสัมพันธ์โดยตรงอย่างมากกับการเริ่มต้นการพัฒนาสีผิวและการเกิดสีม่วงแดงของผลมังคุด การแสดงออกของยีน *GmMYB10* และ *GmUFGT* ขึ้นอยู่กับการสร้างเอทิลีนของผลมังคุด อุณหภูมิต่ำ (15 °C) และสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน (1-MCP) ชะลอการพัฒนาสีม่วงแดงของผลมังคุด และลดการแสดงออกของยีน *GmMYB10* ดังนั้นการสังเคราะห์สารสีม่วงแดงของเปลือกผลมังคุดระหว่างการสุกน่าจะถูกควบคุมโดยยีน *GmMYB10*

คำสำคัญ: ผลมังคุด อุณหภูมิ เอทิลีน สีผิว สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน เอ็นไซม์ แอนโทไซยานิน

ABSTRACT

The colour of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit changes from green to purple black after harvest as the fruit ripening advances. The relationships between anthocyanin composition and content during colour development and fruit maturity and postharvest quality were determined. Fruit at different stages of maturity (light greenish-yellow with 5% scattered pink spots to purple black) were harvested and kept at 25°C (85-90% RH). Fruit from each maturity stage all developed to the final purple black stage. During the postharvest period, hue values and pericarp firmness decreased significantly, while soluble solids content increased concomitant with a decrease in titratable acidity (stage 4-6). Anthocyanin content in the outer pericarp was higher than in the inner pericarp and increased to a maximum at the final stage. Sensory evaluation and fruit quality (hue values, soluble solids and titratable acidity) of fruit harvested at the different stages did not differ once the fruit had finally developed to the purple black stage. Anthocyanins in the outer pericarp mainly consisted of five compounds, identified by HPLC/MS as cyanidin-sophorose, cyanidin-glucoside, cyanidin-glucoside-pentoside, cyanidin-glucoside-X, cyanidin-X₂ and cyanidin-X, where X denotes an unidentified residue of *m/z* 190, a mass which did not correspond to any common sugar residue. Cyanidin-3-sophorose and cyanidin-3-glucoside were the major compounds that increased with fruit colour development. In all plant species previously studied, the anthocyanin pathway is co-ordinatively regulated by transcription factors of the MYB-super family. Three full-length mangosteen MYB transcription factors (GmMYB1, GmMYB7 and GmMYB10) and all the anthocyanin biosynthesis genes (GmPal to GmUFGT) were characterized. Sequence analysis at the protein level of the R2R3-MYB transcription factor family showed GmMYB10 had a high degree of similarity with production of anthocyanin pigment1 (PAP1) in *Arabidopsis* and as well as sequences from other plant species related to the elevation of anthocyanin pigmentation. In transient transactivation assays, *GmMYB10*, co-expressed with *AtbHLH2*, strongly activated the *GmDFR* and *AtDFR* promoters. Transcript levels of *GmMYB10* and *GmUFGT* were highly abundant with onset of pigmentation and subsequently during red colouration. The expression patterns of *GmMYB10* and *GmUFGT* correlated with ethylene production that increased linearly until stage 5 (dark purple) and decreased thereafter. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) and low temperature storage (15°C) clearly delayed red colouration with resulting down-regulation of *GmMYB10*. These results suggest that the effect of ethylene on anthocyanin biosynthesis may be via the regulation of *GmMYB10* expression.

Key words: mangosteen fruit, temperature, ethylene, surface colour, 1-methylcyclopropene, enzyme, anthocyanin

บทนำ

มังคุด (*Garcinia mangostana*) เป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นราชินีของผลไม้ “Queen of Tropical Fruits” เนื่องจากผลมังคุดมีสีที่สวยงาม รูปร่างที่ดีและรสชาติที่อร่อย มังคุดนับว่าเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ซึ่งมีการปลูกมากทางภาคตะวันออกและภาคใต้ของไทย ในปี 2551 ประเทศไทยส่งออกมังคุดประมาณ 44,271 ตัน คิดเป็นมูลค่า 744 บาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) แต่พบว่าการส่งออกมังคุดไปยังตลาดต่างประเทศของไทยยังมีข้อจำกัดเนื่องจากปัญหาต่างๆ เช่น ปัญหาผลผลิตที่ต่ำ คุณภาพไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ดี และคุณภาพไม่ตรงกับความต้องการของตลาด ปัญหาภายในผลมีอาการผิดปกติ (internal disorder) เช่น อาการเนื้อแก้วยางไหล อาการก้นผลจิบ และปัญหาเปลือกแข็ง

ในการเก็บเกี่ยวผลมังคุดนั้นจะใช้สีของเปลือกที่เปลี่ยนไปเป็นดัชนีในการเก็บเกี่ยว เปลือกผลที่มีสีม่วง-ม่วงเข้มจนดำ เป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับรับประทานและส่งขาย นอกจากนี้สีของเปลือกยังใช้เป็นดัชนีเพื่อบ่งบอกว่าผลมังคุดมีความแก่หรือไม่อีกด้วย (Paull and Ketsa, 2004) ผลมังคุดที่มีสีเหลืองอ่อนอมเขียว มีจุดสีชมพูกระจายบางส่วนสามารถพัฒนาเป็นระยะที่มีสีม่วงเข้มได้แต่การเก็บเกี่ยวผลมังคุดในระยะนี้ผลจะยังไม่แก่เต็มที่ดังนี้เมื่อสีผลพัฒนาจนถึงระยะสีม่วงเข้มอาจทำให้มีรสชาติที่ผิดปกติได้

โดยปกติแล้วเกษตรกรจะทำการเก็บเกี่ยวมังคุดในช่วงที่ผลยังมีจุดสีแดง-ชมพูกระจายทั่วไปทั้งผลแต่ระยะที่ผลมังคุดเหมาะสมต่อการบริโภคคือ ระยะที่เปลือกมีสีม่วงเข้มหรือม่วงดำ (dark to reddish- purple) เปลือกไม่มียาง, เปลือกและเนื้อแยกออกจากกันได้ง่าย (Tongdee and Suwanagul, 1989) ในทางตรงข้าม สมโภชน์ (2535) รายงานว่า ผลมังคุดที่มีสีเหลือง-สีม่วงแดงเป็นระยะที่มีคุณภาพการรับประทานดีที่สุด Tongdee and Suwanagul (1989) รายงานว่ามังคุดที่อยู่ในระยะ 2-4 ซึ่งเป็นระยะที่ผลมีสีเหลืองอ่อนอมชมพู มีจุดประสีชมพูกระจายทั้งผลเปลือก-ผลมีสีม่วงอมแดง หรือน้ำตาลอมแดง เป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเกี่ยวเพื่อส่งไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ แต่อย่างไรก็ตามผลมังคุดในระยะนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีค่อนข้างดำอย่างรวดเร็ว ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้นเพื่อเป็นการตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค

การพัฒนาสีของเปลือกมังคุดนั้นเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารสี คือ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เปลือกของผลมังคุดที่มีสีแดงม่วงนั้น สารสีที่พบส่วนใหญ่คือ สารแอนโทไซยา

นิน (Du and Francis, 1977) ปริมาณของแอนโทไซยานินที่สะสมในเปลือกมังคุดนั้นมีอิทธิพลมาจากหลาย ๆ ปัจจัยด้วยกัน เช่น แสง อุณหภูมิ และเอทิลีน (Saure, 1990) นอกจากนี้ Ratanamano *et al.* (2005) รายงานว่า ผลของแสงและอุณหภูมิมีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินในเปลือกมังคุด ซึ่งแสงไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) และปริมาณแอนโทไซยานินในทุกะยะการเปลี่ยนสีของเปลือกมังคุด ในขณะที่พบว่าอุณหภูมิกลับมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ปัจจุบันการศึกษาระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินมีการศึกษาและรายงานเป็นจำนวนมากเช่น อุ่น แอปเปิล พืทุเนีย และ *Arabidopsis* (Borevitz *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002; Koes *et al.*, 2005; Espley *et al.*, 2007) แต่ยังไม่มีการศึกษาในไม้ผลเมืองร้อนโดยเฉพาะมังคุด

เอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชที่ควบคุมหลายกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสุกของผลไม้ (Abeles *et al.*, 1992) ในอุ่นและแอปเปิ้ลพบว่าเอทิลีนชักนำให้เกิดการพัฒนาสีและเร่งกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Boss *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2000; El-Kereamy *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2004)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยควบคุมการพัฒนาสี คุณภาพและการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเก็บเกี่ยวใน ระยะต่าง ๆ ของมังคุด
2. ศึกษาปัจจัยที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสีผิวของผลมังคุด
3. ศึกษาการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในส่วนเปลือกของผลมังคุด
4. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในผลมังคุด

การตรวจเอกสาร

มังคุด (*Garcinia mangostana*) เป็นผลไม้เขตร้อนชนิดหนึ่งที่เป็นที่รู้จักกันดีในนาม “Queen of Fruits” (Popenoe, 1974) เนื่องจากผลมังคุดมีรสชาติที่อร่อย สีของผลที่สวยงาม เนื้อของผลมีสีขาว นุ่มและมีรสชาติหวานอมเปรี้ยว มีกลิ่นหอม (Martin, 1980) นอกจากนี้ จะใช้มังคุดในการบริโภคผลสดแล้ว เนื้อของผลเมื่อแห้งจะประกอบด้วย แทนนิน และแซนโทฟิลล์ ใช้เป็นยาพื้นบ้านสำหรับการป้องกันการติดเชื้อและแก้ท้องเสีย (Yapwattanaphum *et al.*, 2002) มังคุดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากแนวโน้มการผลิตและการส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปีแต่พบปัญหาเรื่องพันธุ์และเรื่องการส่งออกเนื่องจากมังคุดเป็นผลไม้ที่เจริญเติบโตช้าและมักจะพบปัญหาเรื่อง อาการผิดปกติภายในผล

ระยะที่ผลม้งคุดเหมาะสมสำหรับการบริโภค คือระยะที่เปลือกเปลี่ยนสีเป็นสีม่วงแดง-ม่วงดำ ที่เปลือกไม่มียางและส่วนของเปลือกและเนื้อต้องแยกออกจากกันได้ง่าย ผลม้งคุดมีรูปร่างดังนี้ คือ ผลกลม (globe-shaped) ผลเป็นแบบ berry มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-7 เซนติเมตร มีกลีบเลี้ยง เปลือกหนา 6-10 มิลลิเมตร และเปลี่ยนเป็นสีม่วงเมื่อสุก เปลือกมีรสขม มียางสีเหลือง เนื้อผลมีสีขาวสามารถรับประทานได้ โดยทั่วไป 1 ผลจะประกอบด้วยเนื้อ 4-8 กลีบ ซึ่ง 1 หรือ 2 กลีบจะมีขนาดใหญ่ เมล็ดเป็นแบบ apomictic seeds คือเมล็ดเจริญมาจาก nucellus เนื้อผล (aril) เจริญมาจาก integument ไม่มีเมล็ดจริง การพัฒนาของผลจะเกิดในช่วง 100-120 วัน ภายหลังระยะการผสมเกสร (anthesis) แต่สำหรับม้งคุดที่ปลูกในที่ค่อนข้างเย็น หรือปลูกในพื้นที่สูงจะใช้เวลาประมาณ 180 วัน (Nakasone and Paull, 1998; Paull and Ketsa, 2004)

สีของเปลือกม้งคุดจะใช้เป็นดัชนีในการชี้ว่าผลม้งคุดแก่หรือไม่ ผลม้งคุดที่แก่จะใช้เส้นสีแดงที่เกิดขึ้นบริเวณเปลือกนอกของผล เส้นสีแดงที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่าระยะสายเลือด (bloodlines) ซึ่งเส้นนี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อผลสุกมากขึ้น หรืออาจใช้ดัชนีอื่น ๆ บอกความแก่ของผลม้งคุดได้ คือ การใช้การแยกตัวของเปลือกและเนื้อที่จะแยกตัวได้ง่ายขึ้นเมื่อผลสุกมากขึ้น นอกจากนี้ผลม้งคุดเมื่ออยู่ในระยะที่เหมาะสมกับการเก็บเกี่ยว เมื่อเก็บเกี่ยวจะหลุดออกจากขั้วได้ง่าย และภายหลังจากเก็บเกี่ยวผลม้งคุดมาแล้วจะมีกระบวนการ metabolism ของผลจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง (Kanchanapom and Kanchanapom, 1998)

ปัจจุบัน ดัชนีการเก็บเกี่ยวที่ใช้เป็นสากลยังไม่มี หลายประเทศ เช่น มาเลเซีย ไทย และออสเตรเลียจะใช้ดัชนีการเก็บเกี่ยวที่กำหนดเองในแต่ละประเทศ ประเทศไทยใช้การเปลี่ยนแปลงสีเป็นดัชนี (Tongdee and Suwanagul, 1989) ดังนี้

ระยะ0 ผลสีเขียวทองอ่อนทั้งผลหรือมีสีขาวอมเหลืองแต้มด้วยสีเขียวอ่อนหรือจุดสีแดง เปลือกและเนื้อยังไม่แยกจากกัน

ระยะ1 ผลมีสีเขียวอมเหลือง มีจุดสีชมพูกระจายอยู่ตามส่วนหนึ่งของผลเปลือกและเนื้อยังไม่แยกจากกัน

ระยะ2 ผลมีสีเขียวอ่อนอมเหลืองหรือมีสีเหลืองอ่อนอมชมพูกระจายไปทั่วผล เปลือกมียางปานกลาง เปลือกและเนื้อแยกออกจากกันยาก

ระยะ3 ผลมีสีชมพูสม่ำเสมอ จุดประสีชมพูเริ่มขยายมารวมกัน ไม่แบ่งแยกกันอย่าชัดเจนดัง
ในระยะที่2 เปลือกมียางน้อย เปลือกและเนื้อแยกออกจากกันได้

ระยะ4 ผลมีสีแดงหรือน้ำตาลอมแดงบางครั้งมีแต้มสีม่วง เปลือกมียางน้อยหรือไม่พบเลย เปลือก
และเนื้อแยกออกจากกันได้

ระยะ5 ผลมีสีแดงอมม่วง เปลือกไม่มียาง เปลือกและเนื้อแยกออกจากกันได้ง่าย

ระยะ6 ผลมีสีม่วงเข้ม-ม่วงดำอาจมีหรือไม่มีสีแดงปนอยู่เลย เปลือกไม่มียาง เปลือกและเนื้อแยก
ออกจากกันได้ง่ายมาก

แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)

สีแดง-ม่วง-น้ำเงิน ที่พบในพืชส่วนใหญ่ ในพืชคือสีของสารแอนโทไซยานิน แอนโทไซยานินเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) แอนโทไซยานินมีรากศัพท์จากภาษากรีก คือ anthos หมายถึงดอกไม้ และ Kyanos หมายถึงสีน้ำเงิน แอนโทไซยานินเป็นสารที่ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม ประกอบด้วยวงแหวนของ phenol 2 วง เรียกววงแหวน A และ B เชื่อมต่อกันเกิดเป็นวงแหวน C (Figure 1A) โครงสร้างหลักของแอนโทไซยานินมักถูกเรียกว่าแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) หรือ aglycone เนื่องจากส่วนดังกล่าวไม่มีส่วนของน้ำตาลมาเชื่อมกับ aromatic ring อื่น ๆ

แอนโทไซยานินที่พบในธรรมชาติจะประกอบด้วย $C_6-C_3-C_6$ ที่มีน้ำตาลและ acyl groups ส่วนมากแอนโทไซยานินที่พบจะมี 17 กลุ่ม ซึ่งจะแตกต่างกันตามจำนวนและตำแหน่งของหมู่ hydroxyl และ/หรือหมู่ methyl ether แอนโทไซยานิดินที่พบส่วนใหญ่ในธรรมชาติ คือ pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin, malvidin และ petunudin (Figure 1B และ 1C) ซึ่ง aglycones เหล่านี้มีความแตกต่างกันในส่วนของจำนวนหมู่ hydroxyl และ methoxyl ในวงแหวน B ring ของ flavylium cation (Davies, 2004; Delago-Vargas and Paredes-lopez, 2002)

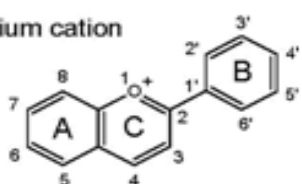
สภาพการคงตัวของแอนโทไซยานินจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่ม glycoside และแอนโทไซยานินที่พบมากในผลไม้จะพบลักษณะของ β -glucosidic linkage แอนโทไซยานิดินแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปตามจำนวนและชนิดของน้ำตาล ในน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว glycosylation ที่เกิดขึ้นจะพบบริเวณวงแหวน B ที่ตำแหน่งคาร์บอน 3 จุด โดยน้ำตาลที่พบมากได้แก่ น้ำตาล glucose arabinose หรือ galactose ในแอนโทไซยานินที่มีลักษณะเป็น diglycosides จะพบทั้งน้ำตาล

โมเลกุลคู่ที่สามารถจะจับกับวงแหวนได้ทั้ง 3 ตำแหน่ง เช่น 3-glucoside หรือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 โมเลกุล สามารถเชื่อมกับหมู่ hydroxyls ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน เช่น 3,5 diglucosides แต่ triglycoside จะพบได้น้อยในผลไม้

แอนโทไซยานินสามารถ acylated ได้ทั้ง organic และสารฟีนอลิก (Macheix *et al.*, 1990) แอนโทไซยานิน เป็นสารสีที่ละลายในน้ำและพบในส่วนของแวคิวโอลในเซลล์ของพืช ซึ่งพบในส่วนของผล ดอก ใบ และ storage organs แอนโทไซยานินที่พบในพืชหลัก ๆ ได้แก่ glycosides ของแอนโทไซยานิดิน 6 ชนิด รูปทั่วไปของแอนโทไซยานิดินคือ cyanidin ส่วนประกอบของฟลาโวนอยด์ในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปตามพืชแต่ละชนิด ในผลไม้หลายชนิดความเข้มข้นของแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์กับความเข้มของสีผลและค่า hue (Rein, 2005)

Du and Francis (1997) รายงานว่า แอนโทไซยานินส่วนใหญ่ในเปลือกมังคุดที่สามารถวิเคราะห์ได้คือ cyaniding-3-sophoroside ในขณะที่สารสีที่พบส่วนน้อยคือ cyaniding-3-glucoside ปริมาณของแอนโทไซยานินทั้งหมดในเปลือกในระยะที่ 6 มีปริมาณ 84-105 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด (สุจิตรา, 2541) และมีปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นสูงสุด (Ratanamarno *et al.*, 2005)

(A) Flavylium cation



(B)

Name	Hydroxyl group in	Colour
Apigeninidin	5, 7, 4'	Orange
Aurantidin	3, 5, 6, 7, 4'	Orange
<u>Cyanidin</u>	3, 5, 7, 3', 4'	Magenta and crimson
<u>Delphinidin</u>	3, 5, 7, 3', 4', 5'	Purple, mauve and blue
8-Hydroxycyanidin	3, 5, 6, 7, 3', 4'	Red
Luteolinidin	5, 7, 3', 4'	Orange
<u>Pelargonidin</u>	3, 5, 7, 4'	Orange, salmon
Triacetidin	5, 7, 3', 4', 5'	Red

(C)

Name	Hydroxyl group in	Colour
Capensinidin	5, 3', 5'	Bluish red
Europenidin	5, 3'	Bluish red
Hirsutidin	7, 3', 5'	Bluish red
<u>Malvidin</u>	3, 5'	Purple
5-Methylcyanidin	5	Orange-red
<u>Peonidin</u>	3'	Magenta
<u>Petunidin</u>	3'	Purple
Pulchellidin	5	Bluish red
Risnidin	7	Red

Figure 1 Basic structure of anthocyanin pigments in which R_x could be H (A), OH (B) or OCH_3 (C) depending on the pigment considered. The most commonly accepted nomenclature numbering carbons is indicated inside the structure. The most important naturally-occurring anthocyanidins are underlined.

การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

กระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและฟลาโวนอยด์อื่น ๆ (Figure 2) เริ่มต้นจากการรวมตัวกันของ malonyl CoA 3 โมเลกุลและ 4-coumaroyl CoA โดยที่วงแหวน A ได้จาก malonyl CoA ส่วนวงแหวน B ได้จาก coumaroyl CoA Malonyl CoA เกิดจากการ carboxylation โมเลกุลของ acetyl CoA จากกระบวนการหายใจ และเป็นกระบวนการเดียวกับการเริ่มต้นของการสังเคราะห์กรดไขมันต่าง ๆ ส่วน coumaroyl CoA ได้จากกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอล (phenol) ซึ่งเริ่มต้นจากกรดอะมิโน phenylalanine ผ่านการดึงเอากลุ่มอะมิโนออกด้วยเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ตามด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ของการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอล ดังแสดงในภาพที่ 2 ดังนั้น PAL จึงยังไม่ใช่เอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและฟลาโวนอยด์อื่น ๆ โดยตรง แต่ก็พบว่าปัจจัยภายนอกหลายอย่างที่กระตุ้นหรือควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินก็ไปกระตุ้นเอนไซม์ PAL ด้วย

เอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินมีจำนวนมากดังภาพที่ 2 โดยเอนไซม์แรกได้แก่ chalcone synthase (CHS) ซึ่งกระตุ้นปฏิกิริยาการรวมตัวกันของ malonyl CoA และ 4-coumaroyl CoA ได้เป็น 2', 4', 6', 4 tetrahydroxychalcone หรือ chalcone ในขั้นตอนต่อมา ได้แก่ การเปลี่ยนรูป (isomerization) ของ chalcone ไปเป็น flavanone (naringenin) โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) naringenin นี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบฟลาโวนซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์สำคัญกลุ่มหนึ่งโดยเอนไซม์ flavone synthase (FNS) หรือถูกเปลี่ยนไปเป็น dihydrokaempferol ด้วยเอนไซม์ flavanone-3-hydroxylase (F3H) dihydrokaempferol อาจถูกเปลี่ยนไปเป็นฟลาโวนอลด้วย flavonol synthase (FLS) ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์สำคัญอีกกลุ่มหนึ่ง หรือถูก hydroxylate โดยเอนไซม์ flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) ไปเป็น dihydroquercetin หรือ โดยเอนไซม์ flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) ไปเป็น dihydromyricetin จากนั้น dihydrokaempferol dihydroquercetin และ dihydromyricetin ถูกเปลี่ยนเป็น leucoanthocyanidins โดยใช้ NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ในการเกิดปฏิกิริยา หลังจากนั้นเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็น anthocyanidins โดย anthocyanidin synthase หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า 'leucoanthocyanidin dioxygenase' และสุดท้ายเกิดเปลี่ยนเป็นสารสีที่เรียกว่า แอนโทไซยานินชนิดต่าง ๆ โดย UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UGT, 3GT) (Delgado-Vargas and Paredes-lopez, 2002; Davies, 2004) ตัวอย่างแอนโทไซยานิน ฟลาโวนอล และฟลาโวนหลักที่พบมากในพืช ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

Table 1 Major flavanoid in plant (ที่มา Harborne, 1988)

Anthocyanin	Flavonol	Flavone	Flavanone
Pelargonidin (ให้สีแดงส้ม scarlet)	Kaempferol	Apigenin	Naringenin
Cyanidin (ให้สีแดง crimson)	Quercetin	luteolin	eriodictyol
Delphinidin (ให้สีม่วง)	myricetin		

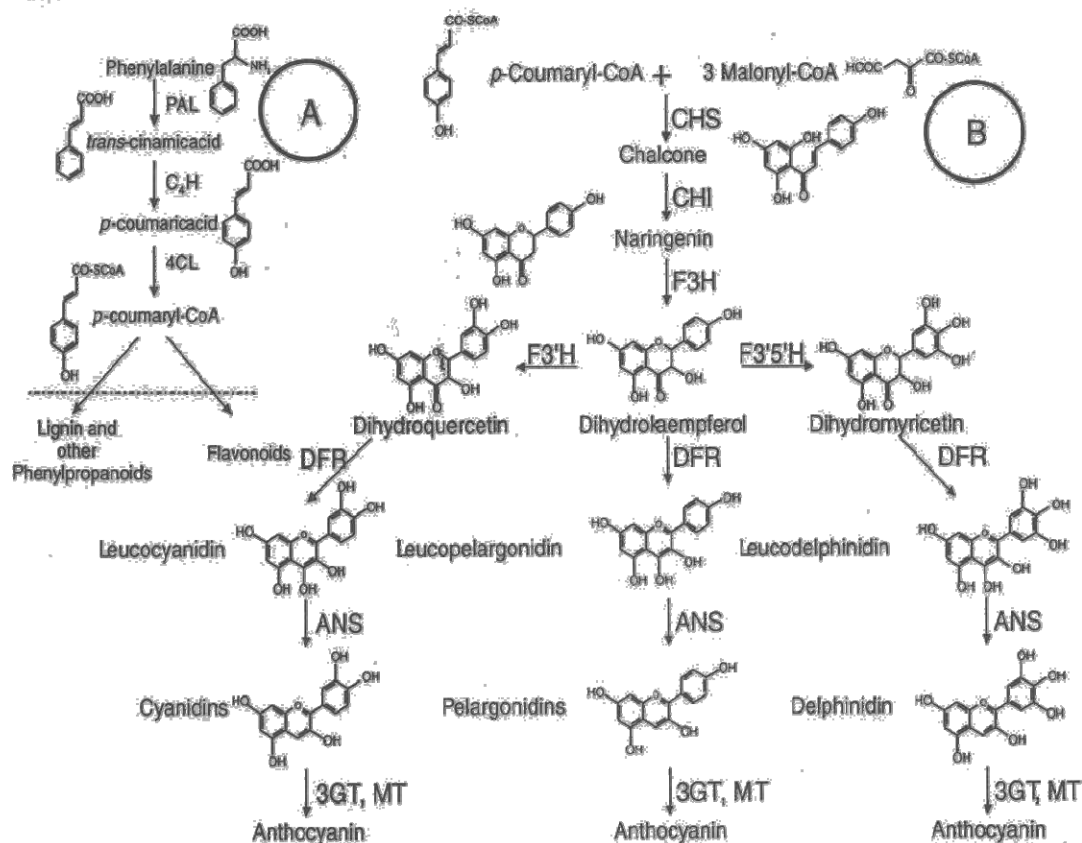


Figure 2 Anthocyanin biosynthesis pathway. (A) General phenylpropanoid metabolism.

Enzymes involved: PAL, phenylalanine ammonia lyase; C₄H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumaroyl:CoA ligase. (B) Specific steps of anthocyanin biosynthesis. Enzymes involved: CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F₃H, F₃'H, F₃'5'H, flavanol hydroxylase; DFR, dihydroflavonol-4-reductase; ANS, anthocyanidin synthase; 3GT, UFGT, UDP glucose-flavonoid 3-*O*-glucosyl transferase (Delgado-Vargas and Paredes-lopez, 2002).

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของผลไม้

มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเปลี่ยนสีของผลไม้ดังนี้

1. แสง แสงมีผลที่สำคัญมากในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน นักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาผลของแสงที่มีต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในผลไม้ เช่น แอปเปิ้ล (Saure, 1990; Ju *et al.*, 1995 and 1998) และองุ่น (Spayd *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2004) ในแอปเปิ้ลพบว่า การสร้างแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับแสง การห่อผลมีผลต่อการลดลงของการสะสมแอนโทไซยานิน และสีแดงของผล แต่การห่อผลจะไม่มีผลต่ออายุการเก็บเกี่ยวของแอปเปิ้ล เมื่อเปิดถุงผลแอปเปิ้ลที่ห่อผลพบว่าแอปเปิ้ลจะเริ่มมีการสะสมแอนโทไซยานินทันทีและจะมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 ภายหลังที่เปิดถุงออก กิจกรรมของเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) และปริมาณ flavonoid จะมีค่าสูงขึ้น และคงที่เมื่อผลเข้าสู่ระยะ fruitlet จนถึงระยะที่ผลแก่ นั้นแสดงให้เห็นว่า CHS ไม่มีผลต่อการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในผลแอปเปิ้ลเมื่อเปิดถุงออก (Saure, 1990; Ju *et al.*, 1995; Ju, 1998) แสงยังมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Gross, 1987) ในขณะที่ Ratanamano *et al.* (2005) รายงานว่าแสงแดดไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) และปริมาณแอนโทไซยานินในมังคุดทุกระยะ Jeong *et al.* (2004) พบว่าการพรางแสงในผลองุ่น ทำให้มีการสะสมของแอนโทไซยานินลดต่ำลง และยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

2. อุณหภูมิ การสังเคราะห์แอนโทไซยานินจะเกิดขึ้นได้ดีในผลไม้ที่ปลูกในอุณหภูมิค่อนข้างเย็น อุณหภูมิที่สูงในฤดูใบไม้ร่วงยับยั้งการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เมื่ออุณหภูมิต่ำลงจะเป็นตัวเร่งการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ในผลไม้ที่ยังไม่สุกมีความจำเป็นอย่างมากที่ต้องได้รับอุณหภูมิต่ำ (12°C ในเวลากลางวัน และ 2°C ในเวลากลางคืน) แต่ในขณะเดียวกันอุณหภูมิที่สูง (12°C ในเวลากลางวันและกลางคืน) กลับมีผลในผลไม้ที่แก่แล้ว (Gross, 1987) อุณหภูมิที่สูงขึ้นจากการได้รับแสงแดดปริมาณแสงแดด จะมีผลกับปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของผลองุ่น (Spayd, 2002)

3. สารควบคุมการเจริญเติบโต เอทิลีนเป็นฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสุก อีกทั้งยังทำให้มีการสะสมปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้สารดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเมื่อผลไม่มีการสุก(แก่) เพิ่มขึ้น นักวิจัยหลายท่านได้รายงานไว้ว่า เอทิลีนมีผลชักนำให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Gomez-Cordoves *et al.*, 1996; El-Kereamy *et al.*, 2003) ในผลแอปเปิ้ลกิจกรรมของเอนไซม์ CHS และ UDPGal : flavonoid-3-O-glycosyltransferase (UGaIT) มีความสัมพันธ์กับกร

สังเคราะห์แอนโทไซยานินที่เพิ่มขึ้นเมื่อผลแอปเปิ้ลทั้งพันธุ์ Delicious และพันธุ์ Ralls มีความแก่มากขึ้น การให้เอทิลฟอนจะไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ UFGaIT และไปทำให้มีการเพิ่มการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเพิ่มด้วย (Ju *et al.*, 1995)

ในองุ่น เอทิลีนก็มีส่วนช่วยชักนำให้มีการสะสมและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเช่นกัน (El-Kereamy *et al.*, 2003) สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีนคือ 1-Methylcyclopropene (1-MCP) มีผลยับยั้งการสุกของผลไม้ประเภท climacteric หลายชนิด 1-MCP ทำให้เกิดการชะลอการสร้างแอนโทไซยานินและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PAL ในผลสตอเบอรี่ (Jiang *et al.*, 2001) และแอปเปิ้ล (MacLean *et al.*, 2006)

นอกจากนี้ฮอร์โมนชนิดอื่นก็มีผลต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินด้วยเช่นเดียวกัน Awad and Jager (2002) รายงานว่าได้ให้สาร (S)-trans-2-amino-4-(2-aminoethoxy-3-butenic acid hydrochloride (ABG-3168), gibberellins (GA_{4+7} and GA_3), Alar, cycoel (CCC มีผลคือยับยั้งการทำงานของ gibberellins) ให้กับผลแอปเปิ้ล พบว่า ABG และ GA_3 มีผลยับยั้งการสะสมของแอนโทไซยานินและไม่มีผลกับ flavonoid และ chlorogenic acid ABG นั้นมีผลคือทำให้ชะลอการสะสมของแอนโทไซยานิน แต่สารดังกล่าวไม่มีอิทธิพลต่อการสร้างแอนโทไซยานินหรือ total flavonoids และ chlorogenic acid ของผลแอปเปิ้ล

4. สภาพการเก็บรักษา สภาพการเก็บรักษาที่แตกต่างกันมีผลต่อการสะสมแอนโทไซยานินในผลไม้หลายชนิด Holcroft *et al.* (1998) รายงานว่า การรับอนไดออกไซด์มีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินในผลทับทิม โดยพบว่าผลทับทิมที่เก็บไว้ 10°C ผลจะมีสีแดงมากกว่าเมื่อเทียบกับ Control และสภาพการเก็บรักษาที่ที่คาร์บอนไดออกไซด์สูงๆ เมื่อเก็บรักษาผลมังคุดในระยะที่ 1 ที่อุณหภูมิต่ำ 15°C จะมีการเปลี่ยนสีผลเป็นระยะที่ 6 ซ้ำกว่าการเก็บผลมังคุดไว้ที่อุณหภูมิสูง 35°C และการเก็บมังคุดไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30°C) (Ratanamarmo *et al.*, 2005)

วัตถุประสงค์

- 1 ศึกษาปัจจัยควบคุมการพัฒนาสี คุณภาพและการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเก็บเกี่ยวในระยะต่าง ๆ ของมังคุด
- 2 ศึกษาปัจจัยที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสีผิวของผลมังคุด
- 3 ศึกษาการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในส่วนเปลือกของผลมังคุด
- 4 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในขบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในผลมังคุด

วิธีวิจัย

มังคุดที่ใช้ในงานทดลองเป็นมังคุดจากสวนเกษตรกรจากจังหวัดจันทบุรี ซึ่งทำการเก็บเกี่ยวอย่างระมัดระวัง โดยที่ภายหลังการเก็บเกี่ยวจะทำการบรรจุผลลงในตะกร้าพลาสติกจำนวน 10 กิโลกรัมต่อตะกร้า เพื่อมิให้ผลบรรจุแน่นเกินไปจนเกิดการกดทับ และทำการขนส่งมายังงานวิจัยพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง จะทำการคัดเลือกผลที่สม่ำเสมอทั้งสีและรูปร่าง (ผลที่ใช้ควรมีขนาดประมาณ 75 – 90 กรัม) ทำการแบ่งเป็น 7 ระยะ โดยการใช้การพัฒนาศีของเปลือกเป็นดัชนีดังนี้

ระยะที่ 0 ผลสีเขียวตองอ่อนทั้งผลหรือมีสีเขียวอมเหลือง

ระยะที่ 1 ผลมีสีเขียวอมเหลือง มีจุดสีชมพูกระจายอยู่บางส่วน 5-50% ของเปลือก

ระยะที่ 2 ผลมีสีเขียวอมเหลือง มีจุดสีชมพูกระจายอยู่ทั้งผล

ระยะที่ 3 ผลมีสีชมพูสม่ำเสมอ จุดประสีชมพูเริ่มขยายมารวมกัน ไม่แบ่งแยกกันอย่างชัดเจนดังในระยะที่ 2

ระยะที่ 4 ผลมีสีแดงหรือน้ำตาลอมแดง

ระยะที่ 5 ผลมีสีม่วงเข้ม

ระยะที่ 6 ผลมีสีม่วงดำหรือดำ

การทดลองที่ 1 ศึกษาการพัฒนาศีและคุณภาพของมังคุดเมื่อเก็บเกี่ยวในระยะที่มีความแตกต่างกัน

การทดลองนี้จะแบ่งมังคุดออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 (A) ใช้มังคุดที่อยู่ระยะที่ 1 นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 °C (ความชื้นสัมพัทธ์ 85-90%) บันทึกการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านสรีรวิทยา (physiological change) และทางชีวเคมี (biochemical change) เมื่อมังคุดเปลี่ยนสีไปในระยะที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 (ใช้จำนวนมังคุด 15 ผล/ระยะที่เปลี่ยนไป)

กลุ่มที่ 2 (B) การทดลองนี้จะใช้มังคุดรวมทั้งหมด 90 ผล โดยใช้ผลมังคุดที่เก็บเกี่ยวจากต้นที่มีระยะแตกต่างกันคือ ระยะที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้าน

สรีรวิทยาและด้านชีวเคมีเช่นเดียวกับมังคุดในกลุ่ม 1 เมื่อผลมังคุดเปลี่ยนสีเป็นระยะที่ 6 โดยระหว่างรอให้ผลมังคุดระยะต่างๆ เปลี่ยนสีทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C (85-90% RH)

1.1 การเปลี่ยนแปลงสีของเปลือก

การให้คะแนนสีของเปลือกที่เปลี่ยนแปลงให้คะแนนเป็น 1-6 คะแนน ตามวิธีของ Tongdee and Suwanagul (1989) คือ

คะแนน 1	=	มีจุดสีชมพูอ่อนกระจายกระจายอยู่ในบางส่วน 5-50% ของพื้นที่
คะแนน 2	=	มีจุดสีชมพูอ่อนกระจาย กระจายทั่วผล
คะแนน 3	=	เปลือกสีชมพู
คะแนน 4	=	เปลือกสีแดง
คะแนน 5	=	เปลือกสีม่วงเข้ม
คะแนน 6	=	เปลือกสีม่วงดำหรือดำ

ทำการวัดสีเปลือกทั้ง 2 ด้านของผลมังคุดโดยใช้เครื่องวัดสี (Minolta CR300) รายงานผลเป็นค่า L, a, b และ hue

ค่า L หมายถึง ความสว่าง โดย L = 0 หมายถึงสีดำ และ L = 100 หมายถึง สีขาว

a เป็นบวก หมายถึงสีแดง เป็นลบหมายถึงสีเขียว

b เป็นบวก หมายถึงสีเหลือง เป็นลบหมายถึงสีน้ำเงิน

ทำการคำนวณค่า Hue (h°) โดยใช้สูตร

$$h^\circ = \arctan(b/a) \text{ เมื่อ } 0^\circ \text{ หมายถึงสีม่วงแดง}$$

90° หมายถึงสีเหลือง

180° หมายถึงสีน้ำเงินเขียว

และ 270° หมายถึงสีน้ำเงิน

1.2 ความแน่นเนื้อของเปลือก

ความแน่นเนื้อของเปลือกวัดด้วย fruit firmness tester (Effigi) ใช้แท่งกด (plunger) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 เซนติเมตร และ 0.5 เซนติเมตร และกดลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร ที่

เปลือกทั้ง 2 ด้าน คำนวณค่าที่ได้เป็นนิวตัน โดยแปลงค่าแรงกดจากกิโลกรัมเป็นนิวตัน (Newton, N)

ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็นนิวตัน = ค่าที่วัดได้ (กิโลกรัม) $\times$ 9.807

1.3 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Soluble solids content; SSC) ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity; TA) และอัตราส่วน SS/TA

นำน้ำคั้นมาจากเนื้อมังคุดมาหาปริมาณ SSC ด้วย hand refractometer (Atago, Japan) ปริมาณ TA นำน้ำคั้นมาไทเทรตด้วย NaOH 0.1 N โดยใช้ phenolphthalein 1% เป็น indicator นำค่าปริมาตรของด่างที่ใช้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดซิตริก

1.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

นำผลมังคุดในการทดลองที่ 1.2 (B) มาตัดขั้วผลและกลีบเลี้ยงออกจากนั้นจัดให้มีการทดสอบคุณภาพของเนื้อผลมังคุดจำนวน 10 คน ผู้ชิมทำการให้คะแนน 1-5 คือ คะแนน 5 เท่ากับคุณภาพดีเยี่ยมและคะแนนเท่ากับ 1 คือคุณภาพไม่ดี

1.5 ศีรษะกายวิภาคของเปลือกผล (ผิวผล)

ทำการสุ่มเลือกผลมังคุดระยะ 1-6 ทำการแยกเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค hand section และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.6 อัตราการผลิตเอทิลีน

นำผลมังคุดระยะที่ 1 ใส่ในภาชนะพลาสติกขนาด 0.8 ลิตร นำไปไว้ในที่อุณหภูมิ 25°C (85-90%RH) ทำการปิดภาชนะนาน 30 นาที โดยก่อนการปิดภาชนะทำการไล่อากาศภายในภาชนะด้วยก๊าซออกซิเจน ดูดแก๊สภายในภาชนะด้วยเข็มฉีดยาและฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography (Shimadzu GC 8A, Kyoto, Japan) แยกแก๊สด้วย alumina 177-149 μm ที่ต่อเชื่อมด้วย flame ionization detector ภายในอุณหภูมิ column เท่ากับ 80°C และอุณหภูมิ detector เท่ากับ 150°C

1.7 วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน

ภายหลังศึกษาคุณภาพของผล นำเปลือกมังคุดมาแยกเป็นเปลือกด้านนอก (outer pericarp) และเปลือกด้านใน (inner pericarp) โดยหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว เก็บในถุง PE และเก็บตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำออกมาวิเคราะห์

ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin content) ของเปลือกทั้งด้านนอกและใน วิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธีการของ (Piccaglia *et al.*, 2002) โดยใช้ตัวอย่างจากเปลือกด้านนอก 1 กรัมหรือ จากเปลือกด้านในจำนวน 2 กรัม เติมน้ำละลาย methanol:HCl 99:1 v/v ปริมาณ 20 ml นำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จากนั้นนำไปวางบนเครื่อง shaken ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 6 ชั่วโมง แยกเอาส่วนใสออก นำส่วนกากที่เหลือไปสกัดอีก 4 ครั้ง เช่นเดียวกับวิธีข้างต้นภายในเวลา 24 ชั่วโมง นำส่วนใสของการสกัดทั้ง 4 ครั้งมารวมกันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml โดยใช้ methanol:HCl นำส่วนใสที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $8,000\times g$ นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 530 นาโนเมตร นำค่าที่ได้คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินโดยคิดเป็น มิลลิกรัม cyanidin

ปริมาณวัดได้คำนวณได้โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Total anthocyanin (mg/100g)} = \frac{A \times MW \times DF \times 100}{\epsilon L \times Mt}$$

A = Absorbance

ϵ = Gyd-3 glu molar absorbance (34,300)

MW = anthocyanin molecular weight (287)

DF = dilution factor

Wt = sample weight (mg)

L = cell path length (usually 1 cm)

ทำการวิเคราะห์ชนิดของแอนโทไซยานินโดยใช้เครื่อง HPLC และ LCMS ตามวิธีของ Stevenson *et al.* (2006) ซึ่งจะใช้ส่วนใสของแอนโทไซยานินที่สกัดได้ข้างต้นมาทำการกรองผ่าน Gyrodisc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $0.45\ \mu\text{m}$ ใช้ส่วนใสที่กรองได้จำนวน 20 μL วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC (Shimadzu, LC-10AVP Series) แยกผ่าน Synergi[®] ขนาด particle เท่ากับ $4\ \mu\text{m}$ Polar-RP, 8 nm pore size (Phenomenex, Auckland, NZ) โดยใช้ (A) acetonitrile ที่มี 0.1% formic

acid และ (B) acetonitrile/water/formic acid (5:92:3) เป็น mobile phase ปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 ml/min ที่อุณหภูมิ 45°C ตัวทำละลาย

ในนาที่ที่ 0 จะปรับให้มีความเข้มข้นของ A = 0% B = 100%

จากนั้นนาที่ที่ 20 จะปรับให้มีความเข้มข้นของ A = 20%

จากนั้นนาที่ที่ 26 จะปรับให้มีความเข้มข้นของ A = 30%

จากนั้นนาที่ที่ 28.5 จะปรับให้มีความเข้มข้นของ A = 50%

จากนั้นนาที่ที่ 32-35 จะปรับให้มีความเข้มข้นของ A = 95%

จากนั้นให้ปรับความเข้มข้นของ A กลับไปเป็น 0% อีกครั้งในนาที่ที่ 36-40 หาพื้นที่ได้กราฟกับ retention time โดยเปรียบเทียบกับ standard ที่ 520 nm

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของเอทิลีนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการพัฒนาศีของผลมังคุด

ทำการสุ่มผลมังคุดที่อยู่ระยะที่ 1 มาทำการทดลองโดยแยกออกเป็น 4 กรรมวิธี 3 ซ้ำๆ ละ 7 ผล ดังนี้

กลุ่มที่ 1 รมด้วยอากาศ (control)

กลุ่มที่ 2 รมด้วยเอทิลีนความเข้มข้น 200 ppm นาน 24 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 3 รมด้วยสาร 1-MCP (1-methylcyclopropene) ความเข้มข้น $1 \mu\text{g L}^{-1}$

กลุ่มที่ 4 รมด้วยเอทิลีนความเข้มข้น 200 ppm + สาร 1-MCP ความเข้มข้น $1 \mu\text{g L}^{-1}$

ในการรมสารแต่ละชนิดในหีองที่มีอุณหภูมิ 25°C จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (85-90%RH) ภายหลังการรมด้วยสารดังกล่าวข้างต้น ทำการบันทึกผลทั้งทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมี เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาและการพัฒนาการเปลี่ยนแปลงสีของมังคุด

สุ่มผลมังคุดในระยะที่ 1 และแยกออกเป็น 4 กรรมวิธี 3 ซ้ำๆ ละ 7 ผล ดังนี้

กลุ่มที่ 1 นำผลมังคุดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (85-90%RH)

กลุ่มที่ 2 นำผลมังคุดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C (85-90%RH) นาน 7 วันและย้ายไปเก็บรักษาต่อที่อุณหภูมิ 25°C (85-90%RH)

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทั้งทางสรีรวิทยาและทางเคมี เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 4 ศึกษาการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของผลมังคุดระหว่างการพัฒนาสีผล

4.1 สกัด RNA จากเนื้อเยื่อพืช ตามวิธีของ Lopez-Gomez and Gomez-Lim (1992) ดังนี้

4.1.1 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อเปลือกชั้นนอกที่แช่แข็งมาบดละเอียดในไนโตรเจนเหลวด้วยเครื่องบด Mixer Mill MM 301 (Retsch, Germany) ซึ่งตัวอย่างปริมาณ 2 กรัม ใส่ในสารละลายที่ประกอบด้วย Tris ความเข้มข้น 150 mM, EDTA ความเข้มข้น 50 mM, SDS ความเข้มข้น 2% ที่มีค่าความเป็นกรด 8.0 และเติม β -mercaptoethanol ความเข้มข้น 2% ร่วมกับ polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ปริมาณ 0.5 กรัม เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex และนำไปผสมอีกครั้งด้วย homogenizer จนสารละลายมีสีขาวนวล

4.1.2 เติมสารละลาย potassium acetate ความเข้มข้น 5 M ปริมาตร 1.5 mL และ absolute ethanol ปริมาตร 4 mL ผสมจนสารละลายมีสีขาวนวลด้วย vortex ทันที และเติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 x g ที่ 4°C นาน 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ลงในหลอดใหม่ และเติมสารละลาย phenol: chloroform: isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย เขย่าด้วย vortex จนสารเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 x g ที่ 4°C นาน 20 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใส่ลงในหลอดใหม่ เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย เขย่าด้วย vortex จนสารเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 x g ที่ 4°C นาน 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนลงในหลอดใหม่และตกตะกอน RNA ด้วย LiCl ความเข้มข้น 8 M ปริมาตร 1 ใน 3 ของปริมาตรส่วนใสที่เก็บได้ ปิดฝาให้สนิทและพลิกหลอดคว่ำไปมา 1-2 ครั้ง นำหลอดไปบ่มในอุณหภูมิ 4°C ประมาณ 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำหลอดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้งด้วยความระวังเพื่อเก็บตะกอน RNA เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.1.3 นำตะกอนจากข้อ 5.1.2 มาล้างด้วยสารละลายด้วย LiCl ความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 5 mL นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้งด้วยความระวัง หลังจากนั้นล้างตะกอน นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นาน 20 นาที ละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase free water) ปริมาตร 350 μ L คูณสารละลาย RNA ใส่ในหลอด 1.5 μ L เติมสารละลาย potassium acetate ความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 35 mL และ absolute alcohol ปริมาตร 962.5 mL พลิกหลอดไปมา 2-3 ครั้ง นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -70 °C นาน 60 นาที แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 30 นาที เก็บส่วนของตะกอนที่ได้ เติมสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70 % ปริมาตร 500 mL หมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิมนาน 5 นาที เก็บตะกอน RNA ทำให้แห้งโดย vacuum แล้วละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase free water) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบลักษณะของ RNA ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ที่ 0.8 % อะกาโรสใน 0.5X TBE buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที เก็บ RNA ที่ตรวจสอบคุณภาพแล้วไว้ในตู้แช่แข็งที่ -70 °C จนกว่าจะใช้งาน

4.2 การออกแบบ degenerate primer ของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

สืบค้นข้อมูล amino acid sequence ของยีนต่างๆ ในพืชสกุลต่างๆ จากฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) นำข้อมูลมา alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/index.html>) วิเคราะห์หาส่วน amino acid sequencesที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) 2 ช่วงเพื่อออกแบบ primer ขนาดความยาว 18-30 เบส

4.3 การเพิ่มปริมาณของยีน โดยวิธี RT-PCR ด้วย degenerate primer

ทำการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกด้วยชุดสำเร็จรูป Omniscript Reverse Transcriptase (QIAGEN, Germany) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร โดยใช้ total RNA ที่สกัดได้จากข้อ 5.1 ปริมาตร 2 μ g เป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ Oligo dT₁₈ ความเข้มข้น 1 μ M, 1X buffer RT, dNTP ความเข้มข้น 0.5 mM, เอนไซม์ Omicript RT 4 ยูนิต ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C

นาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยใช้ความร้อน 93°C นาน 5 นาทีและวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นทำการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณยีนโดยใช้ cDNA เส้นแรกที่ได้สังเคราะห์ได้เป็นแม่แบบสำหรับ ทำ PCR (ยกเว้น *GmCHI* และ *GmUGT*) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 μ L ใช้ cDNA 1 μ L, ไพรเมอร์ที่ ออกแบบไว้ในข้อ 5.2 ตารางที่ 2 ความเข้มข้น 2 μ M, dNTP ความเข้มข้น 0.2 μ M, MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 μ M, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.625 ยูนิต (QIAGEN, Germany) โดยมี ปฏิกิริยาดังตารางที่ 3

Table 2 Degenerate primers for fragment amplification of and anthocyanin biosynthesis genes

Gene name	Sequence	Annealing temperature (°C)	Expected size (bp)
<i>GmPAL</i> (FJ197127)	F- GYDATYTTYGCWGARGTBATG R- AGATTNGAHGGYAABCCRTTGTG	48	467
<i>GmCHS</i> (FJ197128)	F-CAGCCCAARTCCAARATCAC R-ATCCAGAARAKBGARTTCCA	55	548
<i>GmCHI</i> (FJ197129)	F-AAGTTCACRGSSATMGGMGTRTAC TTGG and 3' race	55	700
<i>GmF3H</i> (FJ197131)	F-G TCCVAAGGTKGCTAYAAAYG R-CYTTGCTCATCTTCYTCYTGTAC	50	912
<i>GmF3'H</i> (FJ197132)	F-TAYAAYTAYCARGAYYTBGT R- CTDGATGWBGTRTCWGTGCC	48	570
<i>GmDFR</i> (FJ197130)	F-YTCWTGGCT SGTCATGAGRC R-SCAGWDATGAGGCTYGGHG	55	572
<i>GmLDOX</i> (FJ197133)	F-ARAARGAGAAGTATGCHAAAYGASC R-CCAYGARATYCTMACCTTYTCC	54	578
<i>GmUGT</i> (FJ197134)	F-CAGGARGAYATHGAGYTSTTCATG ARKGC and 3' race	59	1430

Table 3 PCR conditions for fragment amplification of anthocyanin biosynthesis genes

Temperature (°C)	Time	No. of cycles
94	3 min	1
94	30 s	35
55	30 s	
72	1 min	
72	10 min	1

ทำการตรวจวิเคราะห์ชิ้น DNA ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย 0.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทidiumโบรไมด์ ตรวจดูแถบ DNA ภายใต้ UV transilluminator และถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene Bio Imaging System) ทำการแยกชิ้น DNA ของยีนโดยตัดเจลตำแหน่งที่มีผลิตภัณฑ์ตามต้องการภายใต้แสงยูวี นำเจลที่ตัดไว้สกัด DNA ให้บริสุทธิ์โดยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

4.4 การเพิ่มปริมาณของยีนบริเวณปลาย 5' และ 3' โดยเทคนิค 5' and 3' RACE

จากปัญหาการเพิ่มปริมาณของยีน *GmCHI* และ *GmUFGT* โดยวิธี RT-PCR ด้วย degenerate primer จึงใช้เทคนิค 3' RACE เพื่อโคลนยีนบางส่วน โดยนำ RNA มาทำการสังเคราะห์ cDNA ที่มีการต่อ adaptor ตามวิธีของ GeneRacer (Invitrogen, USA) (Appendix Figure 1) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ของ GeneRacer ร่วมกับ degenerate primer (Table 2) ทำการเตรียมปฏิกิริยาดังตารางที่ 4 และทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 5

GeneRacer 5' primer 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'

GeneRacer 5' Nested primer 5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'

GeneRacer 5' primer 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'

GeneRacer 5' Nested primer 5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'

Table 4 PCR reactions for primary condition of 5' and 3' RACE

Reagent	Volume (μL)	Volume (μL)
GeneRacer 5' or 3' primer	3	3
Degenerate primer	10	
Specific primer		1
cDNA (GeneRacer)	1	1
10x PCR Buffer	5	5
10 mM dNTPs	1	1
50 mM MgCl ₂	1.5	1.5
Platinum Taq	0.5	0.5
Water	28	37

Table 5 PCR conditions for primary condition of 5' and 3' RACE

Temperature (°C)	Time	No. of cycles
94	3 min	1
94	30 s	5
72	1.5 min	
94	30 s	5
70	1.5 min	
94	30 s	32
57, 61	30 s	
72	1.5 min	
72	10 min	1

ภายหลังทราบบางส่วนของยีน ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงดังตารางที่ 6 หลังจากนั้นเตรียมและทำปฏิกิริยาดังหัวข้อ 4.4

Table 6 Specific primers for 5' and 3' RACE and real-time PCR

Gene name	Sequence	Expected size (bp)
<i>GmPAL</i> (FJ197127)	F- ATGGCTCGGCCCACCTATTGA R- CTGGAAGTTGCCACCGTGTAAATG	130
<i>GmCHS</i> (FJ197128)	F- GGCCTTCTGATACCCACTTGGACT R- GGATGGTTTGGGCCGCAGATA	141
<i>GmCHI</i> (FJ197129)	F- GAAGAGGAGGAAGAGGCGTTGGA R- GGCAGTGGGTGAAGTTACTGGGAA	108
<i>GmF3H</i> (FJ197131)	F- TTGTTGAGGCTTGTGAGGAATGG R- CGGACATATCGAATCGGAGCTTT	141
<i>GmF3'H</i> (FJ197132)	F-GCACATTTCGAGAGGCAGAGTTGG R-TGAATACCCTCCTCCCCACCATT	140
<i>GmDFR</i> (FJ197130)	F- GCGTCTGCTGGTGCATTGGA R- GCTCTCTCCGCCTTTGTCTTGG	140
<i>GmLDOX</i> (FJ197133)	F- ACCAGCGAGTACGCAAGGCAA R- TGGAGGGCCAGTTCTTCAATGC	128
<i>GmUFGT</i> (FJ197134)	F-GCGAGTTTGTGATTTGCCTGAAGG R-ACCGCATCCGCTTTAGGTAACG	105

4.5 การโคลนยีน

นำ DNA ของยีนต่างๆ ที่สกัดได้จากเจลหรือจากปฏิกิริยามาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะเพื่อเข้าไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรีย

4.5.1 ทำการเชื่อมต่อ DNA ที่ได้จากการทำ PCR จากยีนต่างๆ เข้าสู่เวกเตอร์

ถ้าเรารู้ปล pGEM[®]-T Easy vector (Promega, USA) ในปฏิกิริยา 10 μ L ประกอบด้วย 10X ligation buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, pGEM[®]-T easy vector ปริมาตร 2 μ L, DNA ที่ได้จากการทำ PCR ปริมาตร 7 μ L, เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 ยูนิต ต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 μ L ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4°C นาน 16 ชั่วโมง

4. 5.2 ทำการผสม ligation mixture ปริมาตร 10 μ L กับเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α ปริมาตร 100 μ L วางบนน้ำแข็งนาน 30 นาที ชักนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยวิธี heat shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 1 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที เติมด้วยอาหารเหลว SOC แล้วนำไปปั่นเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียและนำไปเลี้ยงบนอาหาร LB แข็งที่ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 100 μ g L⁻¹ และเติม X-gal (20 mg μ L⁻¹) ปริมาตร 40 μ L บนผิวอาหารแข็ง เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะมี DNA สายผสม นำมาแยกเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และนำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเก็บแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวไว้เป็น master plate นำโคโลนีที่มีสีขาวจาก master plate เพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 100 100 μ g L ปริมาตร 1 mL เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียโดยชุดสำเร็จรูป QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

4. 5.3 นำ DNA สายผสมที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียมาตรวจสอบว่ามี DNA ของยีนหรือไม่ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Fermentas, USA) ในปฏิกิริยา 20 μ L ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10Xbuffer (Fermentas, USA) ปริมาตร 2 μ L ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบผลการตัดของเอนไซม์ด้วย 0.8 % อะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที

4. 5.4 ทำการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนของยีนต่างๆ ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้บริการของ DNA Technology ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MegAlign (Lasergene; DNASTar, USA) เปรียบเทียบ amino acid ของยีนนั้นๆ ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

4.6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน quantitative RT-PCR

นำ RNA ที่สกัดจากเปลือกชั้นนอกจำนวน 2 μ g ในการทดลองต่างๆ ที่ผ่านการกำจัด DNA ด้วยเอนไซม์ DNase I (Fermentas, USA) แล้ว เจือจางด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase

free water) ปริมาตร 50 เท่า ทำการสังเคราะห์ cDNA ตามวิธีของ SuperscriptIII kit (Invitrogen, USA) ทำการทดสอบคุณภาพของไพรเมอร์ด้วย plasmid DNA ของยีนแต่ละยีน ตรวจสอบผลด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ภายหลังการทดสอบไพรเมอร์และพบว่าเกิด pcr product เพียงหนึ่งแถบจึง สามารถทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR ได้ โดย ตรวจสอบและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Light Cycler 480 system (384-well plates) และใช้ชุด ทดสอบ Light Cycler® 480 SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics, Germany) ปริมาตร 10 μL ในปฏิกิริยาประกอบด้วย cDNA (50x) 3 μL , ไพรเมอร์แต่ละชนิดปริมาตร 1 μL (2.5 μM) และ Master mix สำเร็จรูป 5 μL ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 วินาที, 60°C นาน 5 วินาที และ 72°C นาน 10 วินาที จำนวนทั้งหมด 40 รอบ ทำการวิเคราะห์ melting peak และ dissociation curve เพื่อตรวจการเกิดการจับตัวกันระหว่าง ไพรเมอร์ ทำการคำนวณโดยเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน elongation factor 1 alpha (*GmELF*, EU274578) ความคุมประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาให้ได้เท่ากับ 1.893-1.999 และทำการ วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนทั้งหมดเปรียบเทียบกับระยะการพัฒนาระยะที่ 1 หรือวันที่ 0 ภายหลังการทดลอง ตามสูตร

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{Ref}})^{C_P \text{ sample}}}{(E_{\text{target}})^{C_P \text{ sample}}} \div \frac{(E_{\text{Ref}})^{C_P \text{ calibrator}}}{(E_{\text{target}})^{C_P \text{ calibrator}}}$$

โดย E_{ref} และ E_{target} หมายถึง ประสิทธิภาพของไพรเมอร์สำหรับยีนอ้างอิง (ELF) และยีน เป้าหมาย (anthocyanin biosynthesis gene) นอกจากนี้ $C_{P_{\text{ref}}}$ และ $C_{P_{\text{target}}}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของ C_P สำหรับยีนอ้างอิง (ELF) และยีนเป้าหมาย (anthocyanin biosynthesis gene)

มังคุดที่ใช้ในงานทดลองเป็นมังคุดจากสวนเกษตรกรจากจังหวัดจันทบุรี ซึ่งทำการเก็บ เกี่ยวอย่างระมัดระวัง โดยที่ภายหลังการเก็บเกี่ยวจะทำการบรรจุผลลงในตะกร้าพลาสติกจำนวน 10 กิโลกรัมต่อตะกร้า เพื่อมิให้ผลบรรจุแน่นเกินไปจนเกิดการกดทับ และทำการขนส่งมายัง งานวิจัยพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง จะทำการคัดเลือกผล ที่สม่ำเสมอทั้งสีและรูปร่าง (ผลที่ใช้ควรมีขนาดประมาณ 75 – 90 กรัม) ทำการแบ่งเป็น 7 ระยะ โดยใช้การพัฒนาสีของเปลือกเป็นดัชนีดังนี้

ระยะที่ 0 ผลสีเขียวตองอ่อนทั้งผลหรือมีสีเขียวอมเหลือง

ระยะที่ 1 ผลมีสีเขียวอมเหลือง มีจุดสีชมพูกระจายอยู่บางส่วน 5-50% ของเปลือก

ระยะที่ 2 ผลมีสีเขียวอมเหลือง มีจุดสีชมพูกระจายอยู่ทั่วทั้งผล

ระยะที่ 3 ผลมีสีชมพูสม่ำเสมอ จุดประสีชมพูเริ่มขยายมารวมกัน ไม่แบ่งแยกกันอย่างชัดเจนดังในระยะที่ 2

ระยะที่ 4 ผลมีสีแดงหรือน้ำตาลอมแดง

ระยะที่ 5 ผลมีสีม่วงเข้ม

ระยะที่ 6 ผลมีสีม่วงดำหรือดำ

การทดลองที่ 1 ศึกษาการพัฒนสีและคุณภาพของมังคุดเมื่อเก็บเกี่ยวในระยะที่มีความแตกต่างกัน

การทดลองนี้จะแบ่งมังคุดออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 (A) ใช้มังคุดที่อยู่ระยะที่ 1 นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 °C (ความชื้นสัมพัทธ์ 85-90%) บันทึกการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านสรีรวิทยา (physiological change) และทางชีวเคมี (biochemical change) เมื่อมังคุดเปลี่ยนสีไปในระยะที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 (ใช้จำนวนมังคุด 15 ผล/ระยะที่เปลี่ยนไป)

กลุ่มที่ 2 (B) การทดลองนี้จะใช้มังคุดรวมทั้งหมด 90 ผล โดยใช้ผลมังคุดที่เก็บเกี่ยวจากต้นที่มีระยะแตกต่างกันคือ ระยะที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านสรีรวิทยาและด้านชีวเคมีเช่นเดียวกับมังคุดในกลุ่ม 1 เมื่อผลมังคุดเปลี่ยนสีเป็นระยะที่ 6 โดยระหว่างรอให้ผลมังคุดระยะต่างๆ เปลี่ยนสีทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C (85-90% RH)

1.1 การเปลี่ยนแปลงสีของเปลือก

การให้คะแนนสีของเปลือกที่เปลี่ยนแปลงให้คะแนนเป็น 1-6 คะแนน ตามวิธีของ Tongdee and Suwanagul (1989) คือ

คะแนน 1	=	มีจุดสีชมพูอ่อนกระจายกระจายอยู่ในบางส่วน 5-50%
คะแนน 2	=	มีจุดสีชมพูอ่อนกระจาย กระจายทั่วผล
คะแนน 3	=	เปลือกสีชมพู
คะแนน 4	=	เปลือกสีแดง
คะแนน 5	=	เปลือกสีม่วงเข้ม

คะแนน 6 = เปลือกสีม่วงดำหรือดำ

ทำการวัดสีเปลือกทั้ง 2 ด้านของผลมังคุดโดยใช้เครื่องวัดสี (Minolta CR300) รายงานผลเป็นค่า L, a, b และ hue

ค่า L หมายถึง ความสว่าง โดย L = 0 หมายถึงสีดำ และ L = 100 หมายถึง สีขาว

a เป็นบวก หมายถึงสีแดง เป็นลบหมายถึงสีเขียว

b เป็นบวก หมายถึงสีเหลือง เป็นลบหมายถึงสีน้ำเงิน

ทำการคำนวณค่า Hue (h°) โดยใช้สูตร

$h^\circ = \arctan(b/a)$ เมื่อ 0° หมายถึงสีม่วงแดง

90° หมายถึงสีเหลือง

180° หมายถึงสีน้ำเงินเขียว

และ 270° หมายถึงสีน้ำเงิน

1.2 ความแน่นเนื้อของเปลือก

ความแน่นเนื้อของเปลือกวัดด้วย fruit firmness tester (Effigi) ใช้แท่งกด (plunger) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 เซนติเมตร และ 0.5 เซนติเมตร และกดลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร ที่เปลือกทั้ง 2 ด้าน คำนวณค่าที่ได้เป็นนิวตัน โดยแปลงค่าแรงกดจากกิโลกรัมเป็นนิวตัน (Newton, N)

ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็นนิวตัน = ค่าที่วัดได้ (กิโลกรัม) $\times$ 9.807

1.3 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Soluble solids content; SSC) ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity; TA) และอัตราส่วน SS/TA

นำน้ำคั้นมาจากเนื้อมังคุดมาหาปริมาณ SSC ด้วย hand refractometer (Atago, Japan) ปริมาณ TA นำน้ำคั้นมาไทเทรตด้วย NaOH 0.1 N โดยใช้ phenolphthalein 1% เป็น indicator นำค่าปริมาตรของด่างที่ใช้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดซิตริก

1.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

นำผลมั่งคุดในการทดลองที่ 1.2 (B) มาตัดข้าวผลและกลีบเลี้ยงออกจากรั้วจัดให้มีการทดสอบคุณภาพของเนื้อผลมั่งคุดจำนวน 10 คน ผู้ชิมทำการให้คะแนน 1-5 คือ คะแนน 5 เท่ากับคุณภาพดีเยี่ยมและคะแนนเท่ากับ 1 คือคุณภาพไม่ดี

1.5 ศึกษากายวิภาคของเปลือกผล (ผิวผล)

ทำการสุ่มเลือกผลมั่งคุดระยะ 1-6 ทำการแยกเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค hand section และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.6 อัตราการผลิตเอทิลีน

นำผลมั่งคุดระยะที่ 1 ใส่ในภาชนะพลาสติกขนาด 0.8 ลิตร นำไปไว้ในที่อุณหภูมิ 25°C (85-90%RH) ทำการปิดภาชนะนาน 30 นาที โดยก่อนการปิดภาชนะทำการไล่อากาศภายในภาชนะด้วยก๊าซออกซิเจน คูดแก๊สภายในภาชนะด้วยเข็มฉีดยาและฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography (Shimadzu GC 8A, Kyoto, Japan) แยกแก๊สด้วย alumina 177-149 μm ที่ต่อเชื่อมด้วย flame ionization detector ภายใต้อุณหภูมิ column เท่ากับ 80°C และอุณหภูมิ detector เท่ากับ 150°C

1.7 วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน

ภายหลังศึกษาคุณภาพของผล นำเปลือกมั่งคุดมาแยกเป็นเปลือกด้านนอก (outer pericarp) และเปลือกด้านใน (inner pericarp) โดยหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว เก็บในถุง PE และเก็บตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70 °C จนกว่าจะนำออกมาวิเคราะห์

ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin content) ของเปลือกทั้งด้านนอกและใน วิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธีการของ (Piccaglia *et al.*, 2002) โดยใช้ตัวอย่างจากเปลือกด้านนอก 1 กรัมหรือ จากเปลือกด้านในจำนวน 2 กรัม เติมน้ำละลาย methanol:HCl 99:1 v/v ปริมาณ 20 ml นำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จากนั้นนำไปวางบนเครื่อง shaken ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 6 ชั่วโมง แยกเอาส่วนใสออก นำส่วนกากที่เหลือไปสกัดอีก 4 ครั้ง เช่นเดียวกับวิธีข้างต้นภายในเวลา 24 ชั่วโมง นำส่วนใสของการสกัดทั้ง 4 ครั้งมารวมกันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml โดยใช้

methanol:HCl นำส่วนใสที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 530 นาโนเมตร นำค่าที่ได้คำนวณปริมาณแอนโทไซยานิน โดยคิดเป็น มิลลิกรัม cyanidin

ปริมาณวัดได้คำนวณได้โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Total anthocyanin (mg/100g)} = \frac{A \times MW \times DF \times 100}{\epsilon L \times Mt}$$

A = Absorbance

ϵ = Gyd-3 glu molar absorbance (34,300)

MW = anthocyanin molecular weight (287)

DF = dilution factor

Wt = sample weight (mg)

L = cell path length (usually 1 cm)

ทำการวิเคราะห์ชนิดของแอนโทไซยานินโดยใช้เครื่อง HPLC และ LCMS ตามวิธีของ Stevenson *et al.* (2006) ซึ่งจะใช้ส่วนของแอนโทไซยานินที่สกัดได้ข้างต้นมาทำการกรองผ่าน Gyrodisc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 μm ใช้ส่วนใสที่กรองได้จำนวน 20 μL วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC (Shimadzu, LC-10AVP Series) แยกผ่าน Synergi® ขนาด particle เท่ากับ 4 μm Polar-RP, 8 nm pore size (Phenomenex, Auckland, NZ) โดยใช้ (A) acetonitrile ที่มี 0.1% formic acid และ (B) acetonitrile/water/formic acid (5:92:3) เป็น mobile phase ปรับให้มีอัตราการไหล เท่ากับ 1.5 ml/min ที่อุณหภูมิ 45°C ตัวทำละลาย

ในนาที่ที่ 0 จะปรับให้มีความเข้มข้นของ A = 0% B = 100%

จากนั้นนาที่ที่ 20 จะปรับให้มีความเข้มข้นของ A = 20%

จากนั้นนาที่ที่ 26 จะปรับให้มีความเข้มข้นของ A = 30%

จากนั้นนาที่ที่ 28.5 จะปรับให้มีความเข้มข้นของ A = 50%

จากนั้นนาที่ที่ 32-35 จะปรับให้มีความเข้มข้นของ A = 95%

จากนั้นให้ปรับความเข้มข้นของ A กลับไปเป็น 0% อีกครั้งในนาที่ที่ 36-40 หาพื้นที่ใต้กราฟกับ retention time โดยเปรียบเทียบกับ standard ที่ 520 nm

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของเอทิลีนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการพัฒนาลูกของผลมังคุด

ทำการสุ่มผลมังคุดที่อยู่ระยะที่ 1 มาทำการทดลองโดยแยกออกเป็น 4 กรรมวิธี 3 ซ้ำๆ ละ 7 ผล ดังนี้

กลุ่มที่ 1 รมด้วยอากาศ (control)

กลุ่มที่ 2 รมด้วยเอทิลีนความเข้มข้น 200 ppm นาน 24 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 3 รมด้วยสาร 1-MCP (1-methylcyclopropene) ความเข้มข้น $1 \mu\text{g L}^{-1}$

กลุ่มที่ 4 รมด้วยเอทิลีนความเข้มข้น 200 ppm + สาร 1-MCP ความเข้มข้น $1 \mu\text{g L}^{-1}$

ในการรมสารแต่ละชนิดในห้องที่มีอุณหภูมิ 25°C จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (85-90%RH) ภายหลังการรมด้วยสารดังกล่าวข้างต้น ทำการบันทึกผลทั้งทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมี เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาและการพัฒนาการเปลี่ยนแปลงสีของมังคุด

สุ่มผลมังคุดในระยะที่ 1 และแยกออกเป็น 4 กรรมวิธี 3 ซ้ำๆ ละ 7 ผล ดังนี้

กลุ่มที่ 1 นำผลมังคุดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (85-90%RH)

กลุ่มที่ 2 นำผลมังคุดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C (85-90%RH) นาน 7 วันและย้ายไปเก็บรักษาต่อที่อุณหภูมิ 25°C (85-90%RH)

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทั้งทางสรีรวิทยาและทางเคมี เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 4 ศึกษาการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของผลมังคุดระหว่างการพัฒนาลูก

4.7 สกัด RNA จากเนื้อเยื่อพืช ตามวิธีของ Lopez-Gomez and Gomez-Lim (1992) ดังนี้

4.1.1 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อเปลือกชั้นนอกที่แช่แข็งมาบดละเอียดในไนโตรเจนเหลว ด้วยเครื่องบด Mixer Mill MM 301 (Retsch, Germany) ชั่งตัวอย่างปริมาณ 2 กรัม ใส่ในสารละลาย

ที่ประกอบด้วย Tris ความเข้มข้น 150 mM, EDTA ความเข้มข้น 50 mM, SDS ความเข้มข้น 2% ที่มีค่าความเป็นกรด 8.0 และเติม β -mercaptoethanol ความเข้มข้น 2% ร่วมกับ polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ปริมาณ 0.5 กรัม เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex และนำไปผสมอีกครั้งด้วย homogenizer จนสารละลายมีสีขาวนวล

4.1.2 เติมสารละลาย potassium acetate ความเข้มข้น 5 M ปริมาตร 1.5 mL และ absolute ethanol ปริมาตร 4 mL ผสมจนสารละลายมีสีขาวนวลด้วย vortex ทันที และเติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 x g ที่ 4°C นาน 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ลงในหลอดใหม่ และเติมสารละลาย phenol: chloroform: isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย เขย่าด้วย vortex จนสารเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 x g ที่ 4°C นาน 20 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใส่ลงในหลอดใหม่ เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย เขย่าด้วย vortex จนสารเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 x g ที่ 4°C นาน 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนลงในหลอดใหม่และตกตะกอน RNA ด้วย LiCl ความเข้มข้น 8 M ปริมาตร 1 ใน 3 ของปริมาตรส่วนใสที่เก็บได้ ปิดฝาให้สนิทและพลิกหลอดคว่ำไปมา 1-2 ครั้ง นำหลอดไปบ่มในอุณหภูมิ 4°C ประมาณ 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำหลอดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้งด้วยความระวังเพื่อเก็บตะกอน RNA เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.1.3 นำตะกอนจากข้อ 5.1.2 มาล้างด้วยสารละลายด้วย LiCl ความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 5 mL นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้งด้วยความระวัง หลังจากนั้นล้างตะกอน นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นาน 20 นาที ละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase free water) ปริมาตร 350 μ L ดูดสารละลาย RNA ใส่ในหลอด 1.5 μ L เติมสารละลาย potassium acetate ความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 35 mL และ absolute alcohol ปริมาตร 962.5 mL พลิกหลอดไปมา 2-3 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70 °C นาน 60 นาที แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 30 นาที เก็บส่วนของตะกอนที่ได้ เติมสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70 % ปริมาตร 500 mL หมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิมนาน 5 นาที เก็บตะกอน RNA ทำให้แห้งโดย vacuum แล้วละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase free water) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง

spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบลักษณะของ RNA ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ที่ 0.8 % อะกาโรสใน 0.5X TBE buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที เก็บ RNA ที่ตรวจสอบคุณภาพแล้วไว้ในตู้แช่แข็งที่ -70°C จนกว่าจะใช้งาน

4.8 การออกแบบ degenerate primer ของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

สืบค้นข้อมูล amino acid sequence ของยีนต่างๆ ในพืชสกุลต่างๆ จากฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) นำข้อมูลมา alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/index.html>) วิเคราะห์หาส่วน amino acid sequences ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) 2 ช่วงเพื่อออกแบบ primer ขนาดความยาว 18-30 เบส

4.9 การเพิ่มปริมาณของยีน โดยวิธี RT-PCR ด้วย degenerate primer

ทำการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรกด้วยชุดสำเร็จรูป Omniscript Reverse Transcriptase (QIAGEN, Germany) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร โดยใช้ total RNA ที่สกัดได้จากข้อ 5.1 ปริมาตร 2 μg เป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ Oligo dT₁₈ ความเข้มข้น 1 μM , 1X buffer RT, dNTP ความเข้มข้น 0.5 mM, เอนไซม์ Omicript RT 4 ยูนิต ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยใช้ความร้อน 93°C นาน 5 นาทีและวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นทำการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณยีนโดยใช้ cDNA เส้นแรกที่ได้เป็นแม่แบบสำหรับทำ PCR (ยกเว้น *GmCHI* และ *GmUFGT*) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 μL ใช้ cDNA 1 μL , ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ในข้อ 5.2 ดังตารางที่ 2 ความเข้มข้น 2 μM , dNTP ความเข้มข้น 0.2 μM , MgCl_2 ความเข้มข้น 2.5 μM , เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.625 ยูนิต (QIAGEN, Germany) โดยมีปฏิกิริยาดังตารางที่ 3

Table 2 Degenerate primers for fragment amplification of and anthocyanin biosynthesis genes

Gene name	Sequence	Annealing temperature (°C)	Expected size (bp)
<i>GmPAL</i> (FJ197127)	F- GYDATYTTYGCWGARGTBATG R- AGATTNGAHGGYAABCCRTTGTG	48	467
<i>GmCHS</i> (FJ197128)	F-CAGCCCAARTCCAARATCAC R-ATCCAGAARAKBGARTTCCA	55	548
<i>GmCHI</i> (FJ197129)	F-AAGTTCACRGSSATMGGMGTRTAC TTGG and 3' race	55	700
<i>GmF3H</i> (FJ197131)	F-G TCCVAAGGTGKCYTAYAAYG R-CYTTGCTCATCTTCYTCYGTAC	50	912
<i>GmF3'H</i> (FJ197132)	F-TAYAAYTAYCARGAYYTBGT R- CTDGATGWBGTRTCWGTGCC	48	570
<i>GmDFR</i> (FJ197130)	F-YTCWTGGCT SGTCATGAGRC R-SCAGWDATGAGGCTYGGHG	55	572
<i>GmLDOX</i> (FJ197133)	F-ARAARGAGAAGTATGCHAAAYGASC R-CCAYGARATYCTMACCTTYTCC	54	578
<i>GmUFGT</i> (FJ197134)	F-CAGGARGAYATHGAGYTSTTCATG ARKGC and 3' race	59	1430

Table 3 PCR conditions for fragment amplification of anthocyanin biosynthesis genes

Temperature (°C)	Time	No. of cycles
94	3 min	1
94	30 s	
55	30 s	35
72	1 min	
72	10 min	1

ทำการตรวจวิเคราะห์ชิ้น DNA ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย 0.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทิดีเอ็มโบรไมด์ ตรวจดูแถบ DNA ภายใต UV transilluminator และถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene Bio Imaging System) ทำการแยกชิ้น DNA ของยีนโดยตัดเจลตำแหน่งที่มีผลิตภัณฑ์ตามต้องการภายใต้แสงยูวี นำเจลที่ตัดไว้สกัด DNA ให้บริสุทธิ์โดยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

4.10 การเพิ่มปริมาณของยีนบริเวณปลาย 5' และ 3' โดยเทคนิค 5' and 3' RACE

จากปัญหาการเพิ่มปริมาณของยีน *GmCHI* และ *GmUFGT* โดยวิธี RT-PCR ด้วย degenerate primer จึงใช้เทคนิค 3' RACE เพื่อโคลนยีนบางส่วน โดยนำ RNA มาทำการสังเคราะห์ cDNA ที่มีการต่อ adaptor ตามวิธีของ GeneRacer (Invitrogen, USA) (Appendix Figure 1) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ของ GeneRacer ร่วมกับ degenerate primer (Table 2) ทำการเตรียมปฏิกิริยาดังตารางที่ 4 และทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 5

GeneRacer 5' primer 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'

GeneRacer 5' Nested primer 5'GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'

GeneRacer 5' primer 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'

GeneRacer 5' Nested primer 5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'

Table 4 PCR reactions for primary condition of 5' and 3' RACE

Reagent	Volume (μL)	Volume (μL)
GeneRacer 5' or 3' primer	3	3
Degenerate primer	10	
Specific primer		1
cDNA (GeneRacer)	1	1
10x PCR Buffer	5	5
10 mM dNTPs	1	1
50 mM MgCl ₂	1.5	1.5
Platinum Taq	0.5	0.5
Water	28	37

Table 5 PCR conditions for primary condition of 5' and 3' RACE

Temperature (°C)	Time	No. of cycles
94	3 min	1
94	30 s	5
72	1.5 min	
94	30 s	5
70	1.5 min	
94	30 s	32
57, 61	30 s	
72	1.5 min	
72	10 min	1

ภายหลังทราบบางส่วนของยีน ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงดังตารางที่ 6 หลังจากนั้นเตรียมและทำปฏิกิริยาดังหัวข้อ 4.4

Table 6 Specific primers for 5' and 3' RACE and real-time PCR

Gene name	Sequence	Expected size (bp)
<i>GmPAL</i> (FJ197127)	F- ATGGCTCGGCCCACCTATTGA R- CTGGAAGTTGCCACCGTGTAAATG	130
<i>GmCHS</i> (FJ197128)	F- GGCCTTCTGATACCCACTTGGACT R- GGATGGTTTGGGCCGCAGATA	141
<i>GmCHI</i> (FJ197129)	F- GAAGAGGAGGAAGAGGCGTTGGA R- GGCAGTGGGTGAAGTTACTGGGAA	108
<i>GmF3H</i> (FJ197131)	F- TTGTTGAGGCTTGTGAGGAATGG R- CGGACATATCGAATCGGAGCTTT	141
<i>GmF3'H</i> (FJ197132)	F-GCACATTTCGAGAGGCAGAGTTGG R-TGAATACCCTCCTCCCCACCATT	140
<i>GmDFR</i> (FJ197130)	F- GCGTCTGCTGGTGCATTGGA R- GCTCTCTCCGCCTTTGTCTTGG	140
<i>GmLDOX</i> (FJ197133)	F- ACCAGCGAGTACGCAAGGCAA R- TGGAGGGCCAGTTCTTCAATGC	128
<i>GmUFGT</i> (FJ197134)	F-GCGAGTTTGTGATTTGCCTGAAGG R-ACCGCATCCGCTTTAGGTAACG	105

4.11 การโคลนยีน

นำ DNA ของยีนต่างๆ ที่สกัดได้จากเจลหรือจากปฏิกิริยามาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะเพื่อเข้าไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรีย

4.5.1 ทำการเชื่อมต่อ DNA ที่ได้จากการทำ PCR จากยีนต่างๆ เข้าสู่เวกเตอร์

ถ้าเรารู้ปล pGEM[®]-T Easy vector (Promega, USA) ในปฏิกิริยา 10 μ L ประกอบด้วย 10X ligation buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, pGEM[®]-T easy vector ปริมาตร 2 μ L, DNA ที่ได้จากการทำ PCR ปริมาตร 7 μ L, เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 ยูนิต ต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 μ L ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4°C นาน 16 ชั่วโมง

4. 5.2 ทำการผสม ligation mixture ปริมาตร 10 μ L กับเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α ปริมาตร 100 μ L วางบนน้ำแข็งนาน 30 นาที ชักนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยวิธี heat shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 1 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที เติมด้วยอาหารเหลว SOC แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียและนำไปเลี้ยงบนอาหาร LB แข็งที่ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 100 μ g L⁻¹ และเติม X-gal (20 mg μ L⁻¹) ปริมาตร 40 μ L บนผิวอาหารแข็ง เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะมี DNA สายผสม นำมาแยกเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และนำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเก็บแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวไว้เป็น master plate นำโคโลนีที่มีสีขาวจาก master plate เพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 100 100 μ g L ปริมาตร 1 mL เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียโดยชุดสำเร็จรูป QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

4. 5.3 นำ DNA สายผสมที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียมาตรวจสอบว่ามี DNA ของยีนหรือไม่ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Fermentas, USA) ในปฏิกิริยา 20 μ L ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10Xbuffer (Fermentas, USA) ปริมาตร 2 μ L ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบผลการตัดของเอนไซม์ด้วย 0.8 % อะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที

4. 5.4 ทำการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนของยีนต่างๆ ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้บริการของ DNA Technology ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MegAlign (Lasergene; DNASTar, USA) เปรียบเทียบ amino acid ของยีนนั้นๆ ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

4.12 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน quantitative RT-PCR

นำ RNA ที่สกัดจากเปลือกชั้นนอกจำนวน 2 μ g ในการทดลองต่างๆ ที่ผ่านการกำจัด DNA ด้วยเอนไซม์ DNase I (Fermentas, USA) แล้ว เจือจางด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase

free water) ปริมาตร 50 เท่า ทำการสังเคราะห์ cDNA ตามวิธีของ SuperscriptIII kit (Invitrogen, USA) ทำการทดสอบคุณภาพของไพรเมอร์ด้วย plasmid DNA ของยีนแต่ละยีน ตรวจสอบผลด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ภายหลังการทดสอบไพรเมอร์และพบว่าเกิด pcr product เพียงหนึ่งแถบจึง สามารถทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR ได้ โดย ตรวจสอบและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Light Cycler 480 system (384-well plates) และใช้ชุด ทดสอบ Light Cycler® 480 SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics, Germany) ปริมาตร 10 μL ในปฏิกิริยาประกอบด้วย cDNA (50x) 3 μL , ไพรเมอร์แต่ละชนิดปริมาตร 1 μL (2.5 μM) และ Master mix สำเร็จรูป 5 μL ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 วินาที, 60°C นาน 5 วินาที และ 72°C นาน 10 วินาที จำนวนทั้งหมด 40 รอบ ทำการวิเคราะห์ melting peak และ dissociation curve เพื่อตรวจการเกิดการจับตัวกันระหว่าง ไพรเมอร์ ทำการคำนวณโดยเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน elongation factor 1 alpha (*GmELF*, EU274578) คำนวณประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาให้ได้เท่ากับ 1.893-1.999 และทำการ วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนทั้งหมดเปรียบเทียบกับระยะการพัฒนาระยะที่ 1 หรือวันที่ 0 ภายหลังการทดลอง ตามสูตร

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{Ref}})^{C_{\text{P sample}}}}{(E_{\text{target}})^{C_{\text{P sample}}}} \div \frac{(E_{\text{Ref}})^{C_{\text{P calibrator}}}}{(E_{\text{target}})^{C_{\text{P calibrator}}}}$$

โดย E_{ref} และ E_{target} หมายถึง ประสิทธิภาพของไพรเมอร์สำหรับยีนอ้างอิง (ELF) และยีน เป้าหมาย (anthocyanin biosynthesis gene) นอกจากนี้ $C_{\text{P ref}}$ และ $C_{\text{P target}}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของ C_{p} สำหรับยีนอ้างอิง (ELF) และยีนเป้าหมาย (anthocyanin biosynthesis gene)

ผลการทดลอง

1. การศึกษาการพัฒนาลีและคุณภาพของผลมังคุดที่เก็บเกี่ยวในระยะต่างๆ

1.1 การพัฒนาลีและคุณภาพ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายหลังเก็บเกี่ยวของผลมังคุดระยะที่ 1 (group A) ที่อุณหภูมิ 25°C พบว่า สีของผลมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว โดยค่า L^* และ b^* ลดลงอย่างรวดเร็ว ค่า a^* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงการพัฒนาลีระยะที่ 0-4 หลังจากนั้นลดลงต่อเนื่องจนถึงระยะที่ 6 (Figure 3b, Appendix Table 1) ค่า hue ลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.001$) และมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาลีของสีผลมังคุดอย่างชัดเจน (Figure 3d, Appendix Table 1) โดยมีการพัฒนาลีผลจากระยะที่ 1 (ระยะสายเลือด) เป็นระยะที่ 6 (สีม่วงดำ) อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 9 วัน และการพัฒนาลีผลในช่วงระยะสุดท้าย (ระยะที่ 5 -6) ช้ากว่าการเปลี่ยนแปลงในระยะอื่นๆ (Table 7, A columns) ความแข็งของเปลือกลดลงอย่างรวดเร็วจากระยะ 0 ถึงระยะที่ 6 ในขณะที่ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้และสัดส่วนของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่อปริมาณกรดที่ไทเทรตได้เพิ่มขึ้นจากระยะ 0 ถึงระยะที่ 6 และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ลดลงในระยะที่ 3 ถึงระยะที่ 6 (Table 7, A columns)

การเก็บผลมังคุดในระยะต่างๆ และนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (group B) พบว่าผลมังคุดระยะต่างๆสามารถพัฒนาเป็นสีม่วงดำหรือระยะสุดท้าย (ระยะที่ 6) ได้อย่างสมบูรณ์และไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นผลที่เก็บเกี่ยวจากระยะใด สีผล (ค่า L^* , b^* และ hue) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Figure 4, Appendix Table 2) การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสและคุณภาพของผล ได้แก่ สีผล (hue) ความแข็งของเปลือก ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำและปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ ($P > 0.05$) (Table 7, B columns)

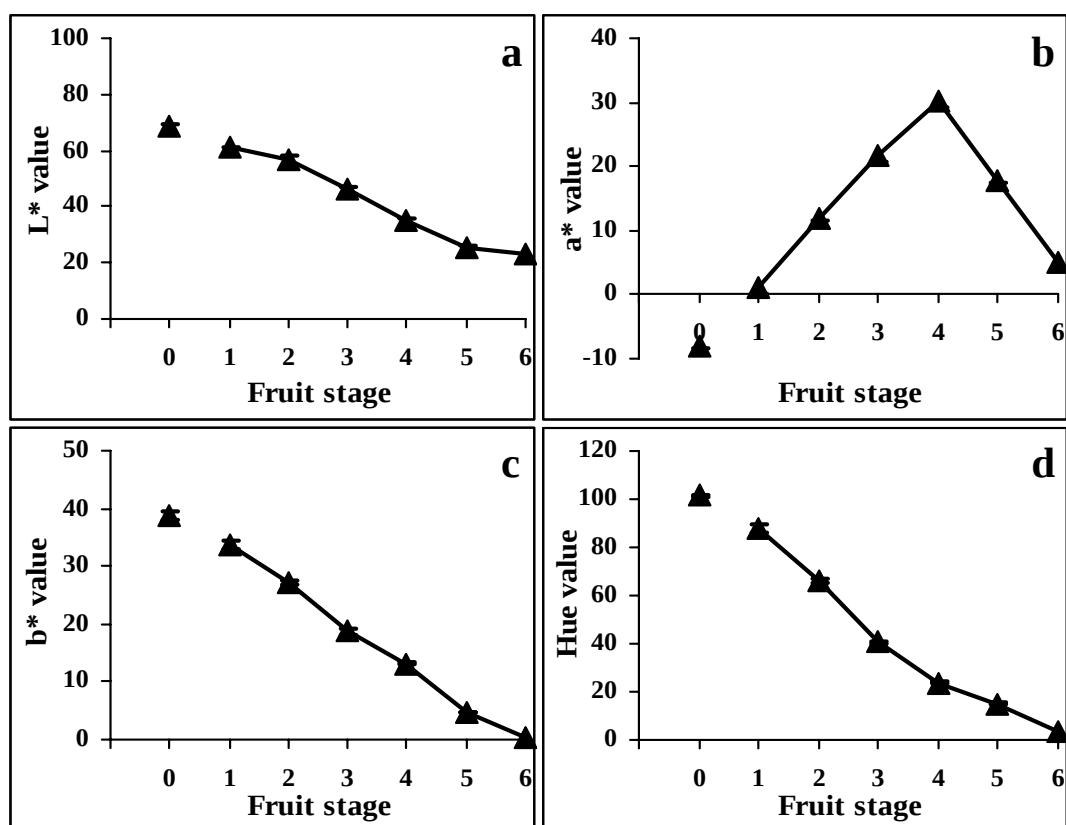


Figure 3 Colour development (L*, a*, b* and hue value) of mangosteen fruit harvested at stage 1 compared to stage 0. Data are means $\pm$ SE of three replications.

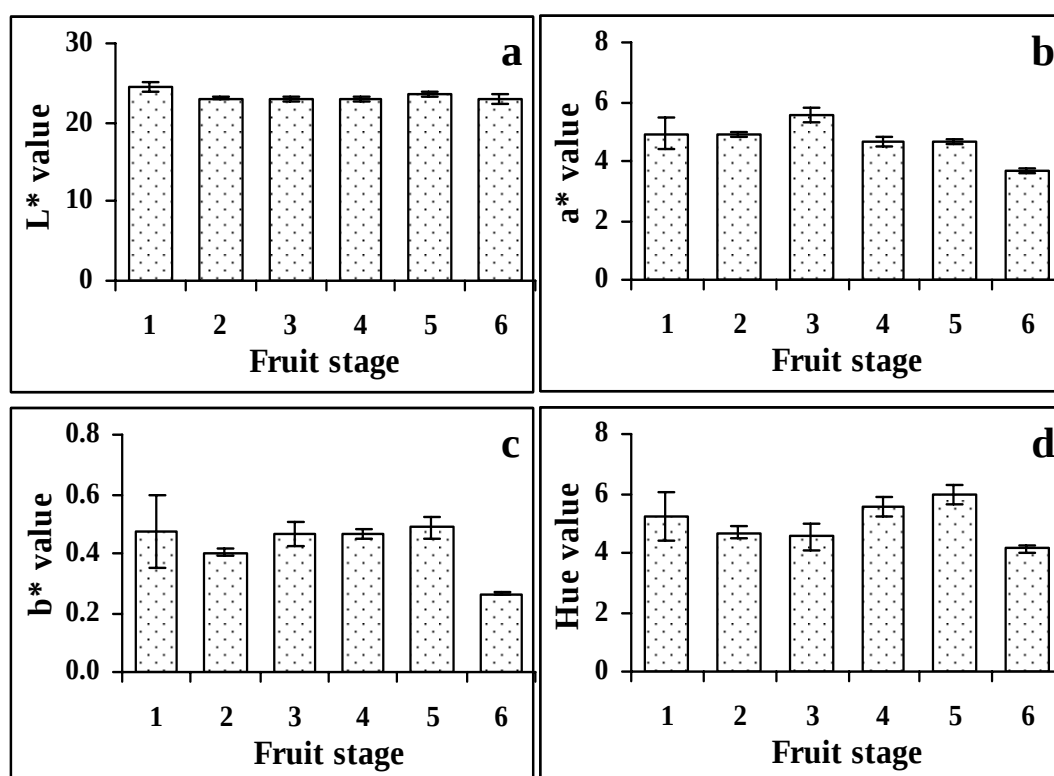


Figure 4 Fruit colour (L*, a*, b* and hue value) of mangosteen fruit at stage 6 developed from 6 different maturity stages. Data are means $\pm$ SE of three replications.

Table 7 Time, quality and sensory evaluation of mangosteen fruit harvested at different stage.

Fruit stage	Time (d)	Firmness (N) ¹		% SSC ¹		% TA ¹		SSC/TA ¹		Sensory ¹	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0 	-	898.3a	-	13.33c	-	0.68d	-	19.6bc	-	-	-
1 	0	779.3b	44.8	15.2b	17.2	0.77bc	0.81	19.8bc	21.2b	4.2	4.2
2 	1	201.3c	43.6	15.3b	17.3	0.78abc	0.81	19.6bc	21.3b	3.7	3.7
3 	2	136.0d	46.0	16.3a	17.5	0.84a	0.80	19.3c	21.9ab	3.8	3.8
4 	3	98.4e	42.9	16.6a	17.9	0.80ab	0.78	20.8bc	23.0ab	4.0	4.0
5 	5	66.5f	45.0	17.1a	17.5	0.79abc	0.75	21.7ab	23.5a	3.7	3.7
6 	9	46.5g	47.9	17.2a	17.4	0.73dc	0.74	23.7a	23.7a	4.1	4.1
<i>F-test</i>		***	ns	***	ns	**	ns	**	*		ns

Fruit were either harvested at stage 1 (A) and allowed to ripen at 25°C, or harvested at the 6 different maturity stages and measurements made when the fruit of each maturity had reached stage 6(B). The firmness in A column were log (ln) transformed data and untransformed values were presented. ¹Means within any column followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$).

ns = non-significantly different, * = significantly different at $P \leq 0.05$, ** = significantly different at $P \leq 0.01$, *** = significantly different at $P \leq 0.001$

1.2 การสังเคราะห์เอทิลีน

จากการเก็บเกี่ยวผลมังคุดระยะที่ 1 (ระยะสายเลือด) และทำการวัดอัตราการผลิตเอทิลีนในช่วงการพัฒนาสีผลพบว่า อัตราการผลิตเอทิลีนของผลมังคุดมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นต่อเนื่องและสูงสุดที่ระยะที่ 5 (สีม่วงแดง) ภายในระยะเวลา 5 วันหลังเก็บเกี่ยว หลังจากนั้นอัตราการผลิตเอทิลีนลดลงเล็กน้อย (Figure 5) โดยพบว่าการลดลงของการผลิตเอทิลีนของผลมังคุดมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในระหว่างการพัฒนาสีผลจากระยะที่ 5-6 ($P \leq 0.001$) (Appendix Table 3).

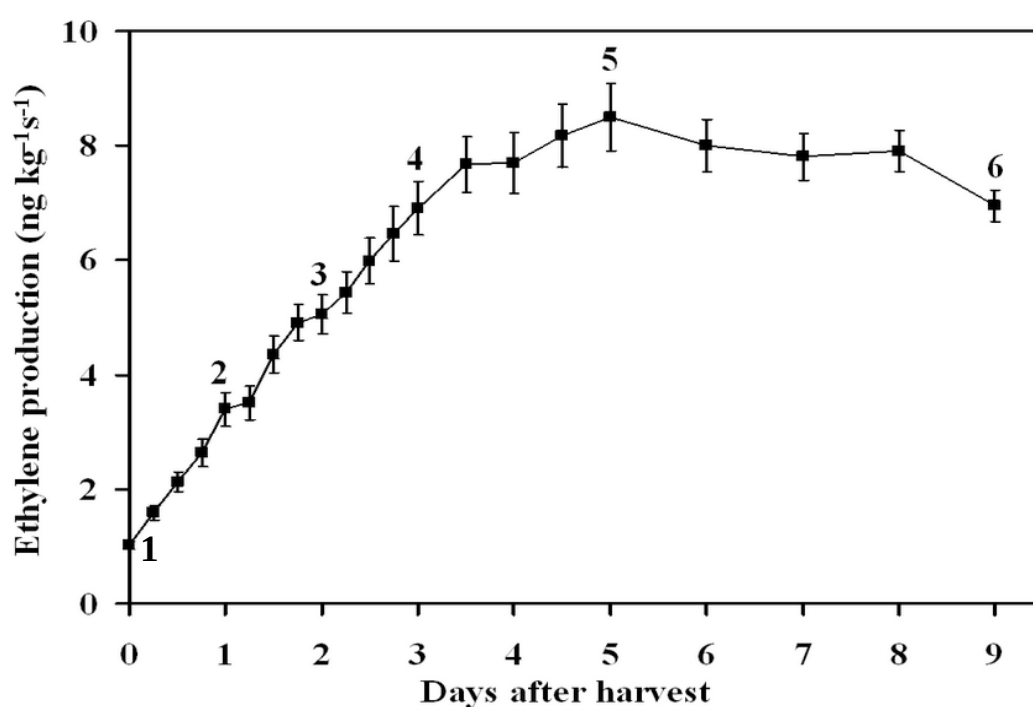


Figure 5 Ethylene production of mangosteen fruit harvested at stage 1 during storage at 25°C. The numbers of 1 to 6 in the graph represent maturity stages of mangosteen fruit at stages 1 to 6. Data are means of 10 fruit $\pm$ SE.

1.3 ปริมาณแอนโทไซยานิน

ในระหว่างการพัฒนาสีผลระยะที่ 1-6 (group A) ปริมาณแอนโทไซยานินในเปลือกชั้นนอกและชั้นในเพิ่มขึ้นมากกว่า 70 และ 18 เท่าตามลำดับ สอดคล้องกับค่า hue ที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในเปลือกชั้นนอกเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและสูงกว่าเปลือกชั้นในอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.001$) ตลอดระยะเวลาการพัฒนาสีผล อย่างไรก็ตามปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในเปลือกชั้นในเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกันกับปริมาณแอนโทไซยานินในเปลือกชั้นนอก (Figure 6) สีผล (hue value) และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการพัฒนาสีผลมั่งคุด

การเก็บเกี่ยวผลมั่งคุดระยะต่างๆ และเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ 25°C (group B) พบว่าผลมั่งคุดแต่ละระยะสามารถพัฒนาสีผลอย่างสมบูรณ์เข้าสู่ระยะสีม่วงดำ (ระยะที่ 6) ได้ทุกระยะ (Figure 4) ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในเปลือกชั้นนอกและชั้นในของมั่งคุดระยะที่ 6 ที่เก็บเกี่ยวในระยะต่างๆ มีความแตกต่างทางสถิติ $P \leq 0.001$ และ $P \leq 0.05$ ตามลำดับ (Figure 11, Appendix Table 4) อย่างไรก็ตามเมื่อผลมั่งคุดทุกระยะพัฒนาสีผลถึงระยะที่ 6 (สีม่วงดำ) ก็ไม่สามารถจำแนกได้ว่าผลมั่งคุดนั้นเก็บเกี่ยวจากระยะใด (Table 7, B columns)

จากการวิเคราะห์ชนิดของแอนโทไซยานินในเปลือกชั้นนอกโดย HPLC/MS พบแอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบหลัก 5 ชนิด ได้แก่ cyanidin-sophoroside ($M+ 611$, major fragment, $m/z 287$), cyanidin-glucoside ($M+ 449$, $m/z 287$), cyanidin-glucoside-pentoside ($M+ 581$, $m/z 287$), cyanidin-glucoside-X ($M+ 639$, $m/z 287$), cyanidin- X_2 ($M+ 667$, $m/z 287$) และ cyanidin-X ($M+ 477$, $m/z 287$) (Table 15, Figure 12, Appendix Figure 6) โดย X หมายถึงสารที่มีค่า m/z เท่ากับ 190 ซึ่งไม่ตรงนำตาลชนิดใดๆ ที่มีการค้นพบในปัจจุบัน ผลการวิเคราะห์แอนโทไซยานินด้วย HPLC และ LC-MS โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน พบแอนโทไซยานิน 2 ชนิด คือ cyanidin-3-sophoroside และ cyanidin-3-glucoside และพบว่าปริมาณสารทั้ง 2 ชนิด เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในระหว่างการพัฒนาสีผล (Table 8) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์พบสารอื่นๆ ได้แก่ cyanidin-glucoside-pentoside ซึ่งพบในปริมาณน้อยโดยการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารมีลักษณะเช่นเดียวกับแอนโทไซยานินหลัก แอนโทไซยานินชนิดอื่นๆ ในเปลือกมั่งคุดพบในปริมาณต่ำและลดลงในระหว่างการพัฒนาสี (Table 8) ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในเปลือกชั้นในพบแอนโทไซยานินชนิดต่างๆ และมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างการเปลี่ยนสีผลเช่นเดียวกับเปลือกชั้นนอก แต่มีปริมาณน้อยกว่าเปลือกชั้นนอก (Table 9).

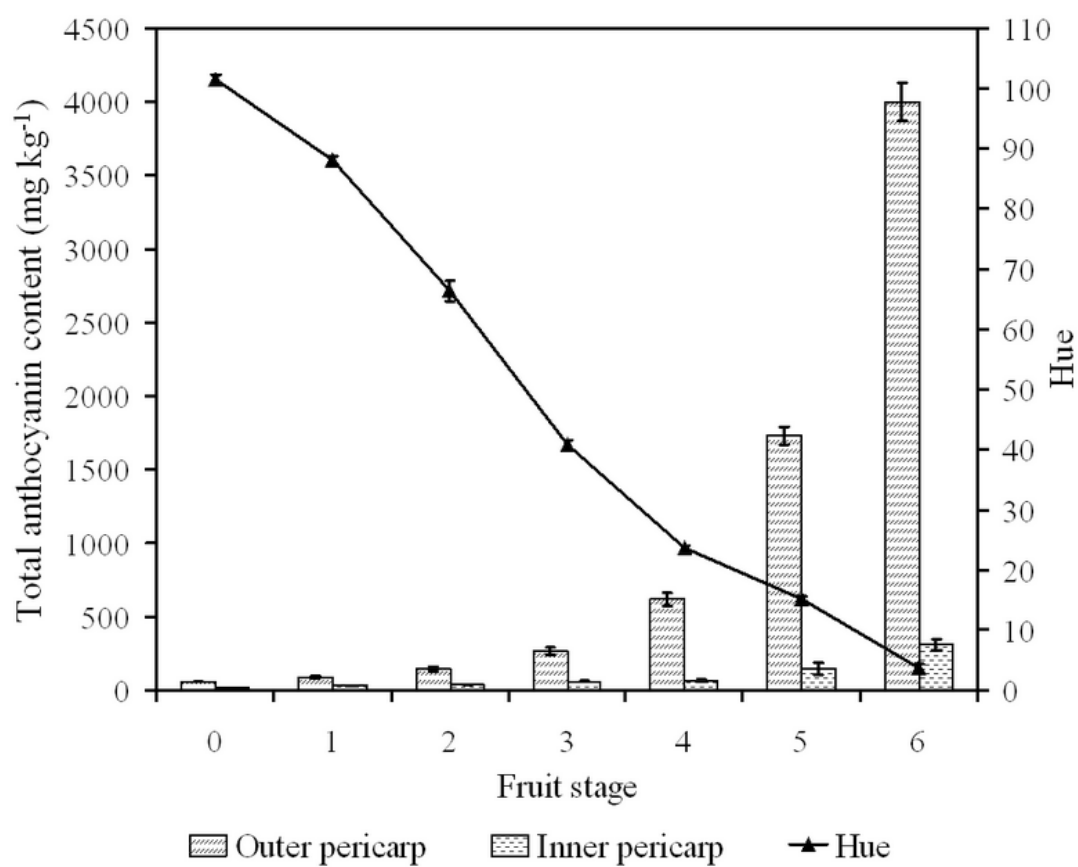


Figure 6 Total anthocyanin content and hue value of mangosteen fruit harvested at stage 1 compared to stage 0. Data are means $\pm$ SE of three replications.

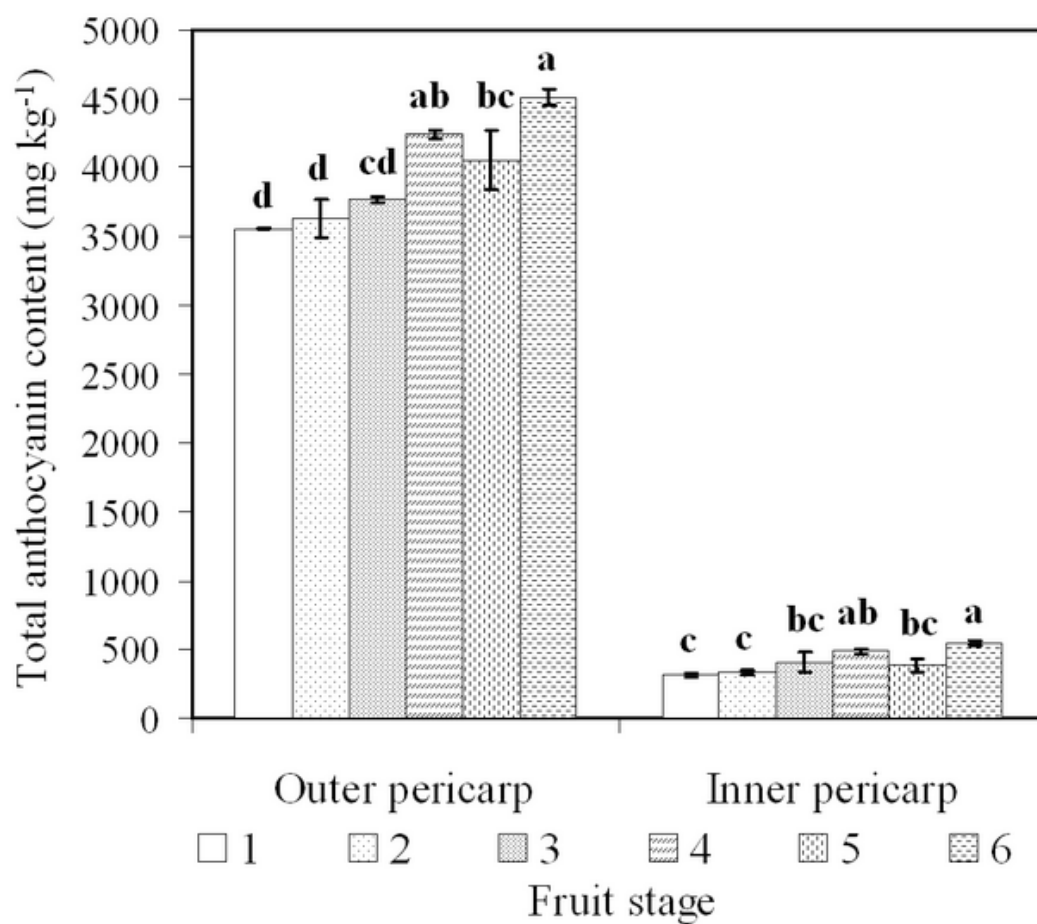


Figure 7 Total anthocyanin content of mangosteen at stage 6 developed from 6 different maturity stages. Data are means $\pm$ SE of three replications.

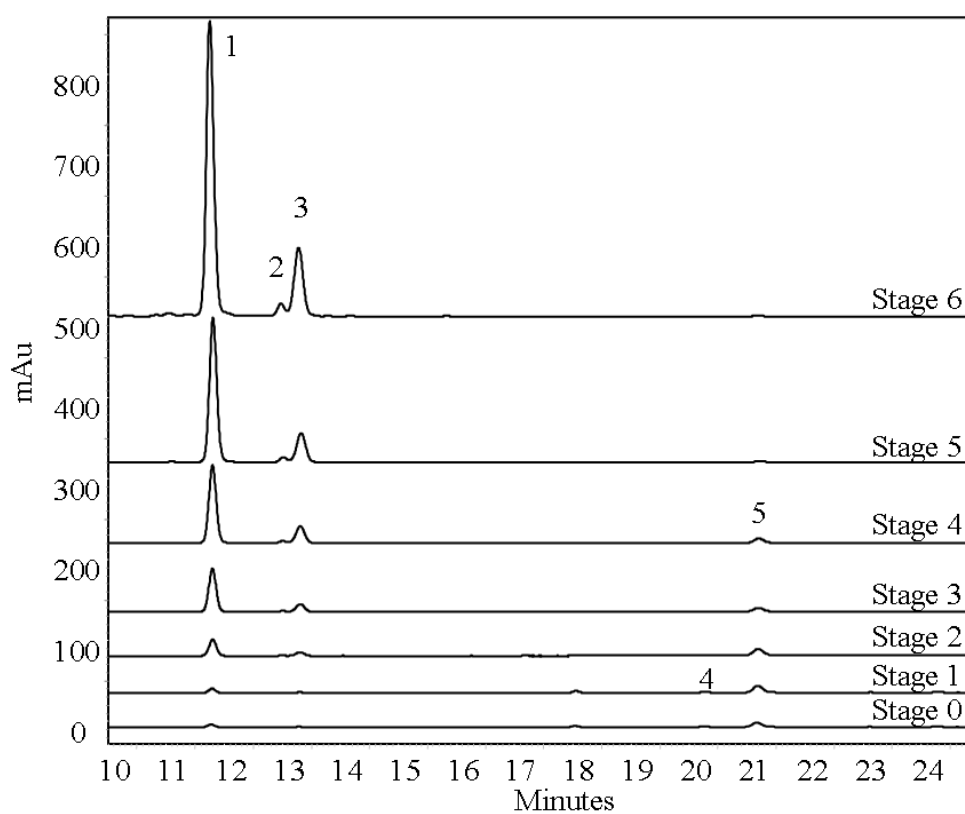


Figure 8 Anthocyanin profiles in outer pericarp of mangosteen fruit during colour development after harvest and compared to stage 0. Peak identity was as follow: 1) cyanidin-sophoroside, 2) cyanidin-glucoside-pentoside, 3) cyanidin-glucoside and cyanidin-glucoside-X (overlapping peak), 4) cyanidin-X₂, and 5) cyanidin-X. X denotes a residue of m/z 190 which is unified atomic mass units.

Table 8 Anthocyanin contents (mg kg⁻¹) in outer pericarp of mangosteen during colour development after harvest (stage 1 to 6).

Fruit stage	Unknown ¹ 1	Unknown ¹ 2	Unknown ¹ 3	Cy-sop ¹	Cy-glu-pent ¹	Cy-glu + Cy-glu-X ¹	Unknown ¹ 4	Unknown ¹ 5	Cy ¹	Cy-(190) ₂ ¹	Cy-(190) ₂ ²	Total ²
0	0c	0c	0c	0e	0d	0e	0b	2b	21a	18a	94a	135e
1	0c	0c	0c	52de	0d	11e	0b	0b	11ab	11b	83a	167e
2	0c	0c	0c	143de	0d	36de	0b	0b	3b	10b	87a	278de
3	0c	0c	0c	359d	9d	81d	0b	0b	0b	2c	58b	509d
4	0c	6c	3c	823c	27c	191c	0b	0b	0b	6bc	56b	1111c
5	10b	20b	14b	1403b	62b	290b	0b	0b	0b	0c	26c	1824b
6	15a	44a	30a	3126a	125a	842a	9a	16a	0b	0c	27c	4235a
<i>F</i> -test	***	***	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***

Total values represent the sum of the individual compounds. Cy-sop: cyanidin-3-sophoroside, Cy-glu-pent: cyanidin-glucoside-pentoside, Cy-glu: cyanidin-3-glucoside, Cy-gluc-X: cyaniding-glucosideX Cy-X: cyanidin-X (X denotes a residue of *m/z* 190 which has not been identified. The ¹-values were x+1 transformed data and untransformed values were presented. ^{1,2}Means within any column followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$) using DMRT. ns = non-significantly different, * = significantly different at $P \leq 0.05$, *** = significantly different at $P \leq 0.001$

Table 9 Anthocyanin contents (mg kg⁻¹) in inner pericarp of mangosteen during colour development after harvest (stage 1 to 6).

Fruit stage	Unknown ¹ 1	Unknown ¹ 2	Unknown ¹ 3	Cy-sop ¹	Cy-glu-pent ¹	Cy-glu + Cy-glu-X ¹	Unknown ¹ 4	Unknown ¹ 5	Cy ¹	Cy-(190) ₂ ²	Cy-(190) ₂ ²	Total ²
0	0	0	0	0.0e	0b	0.0b	0	0.0b	7.0b	9.7	50.8	67.5e
1	0	0	0	24.2de	0b	5.7b	0	9.8a	6.0b	11.5	52.0	109.2de
2	0	0	0	41.7cde	0b	11.3b	0	3.3b	15.0a	10.3	49.6	131.3cde
3	0	0	0	68.2cd	0b	13.8b	0	1.0b	15.8a	10.0	52.5	161.3cd
4	0	6	0	89.2c	0b	17.8b	0	0.0b	7.2b	10.7	56.7	181.5c
5	0	1.2	0	223.3b	1.8b	66.0a	0	0.0b	0.0c	5.5	44.2	350.7b
6	0	1.2	0	345.2a	7.0a	72.2a	0	0.0b	1.2bc	6.2	41.2	474.0a
<i>F</i> -test	-	ns	-	***	***	***	-	*	***	ns	ns	***

Total values represent the sum of the individual compounds. Cy-sop: cyanidin-3-sophoroside, Cy-glu-pent: cyanidin-glucoside-pentoside, Cy-glu: cyanidin-3-glucoside, Cy-glu-X: cyanidin-glucoside-X, Cy-X: cyanidin-X (X denotes a residue of *m/z* 190 which has not been identified. The ¹-values were x+1 transformed data and untransformed values were presented. ^{1, 2}Means within any column followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$) using DMRT. ns = non-significantly different, * = significantly different at $P \leq 0.05$, *** = significantly different at $P \leq 0.001$

1.4 กายวิภาคของผิวเปลือกมังคุด

การศึกษากายวิภาคของผิวเปลือก (เปลือกชั้นนอก) โดยเทคนิค hand section พบว่า สารสีแดงที่รั่วไหลจากบริเวณรอยตัดของเนื้อเยื่อในระยะสีม่วงดำ (ระยะที่ 6) มีความเข้มของสีแดงสูงกว่าระยะอื่นๆ และความเข้มของสารสีแดงในเซลล์ของผิวผลมังคุดระยะที่ 6 (สีม่วงดำ) มีความเข้มสีสูงกว่าระยะอื่นๆ เช่นเดียวกัน (Figure 9)

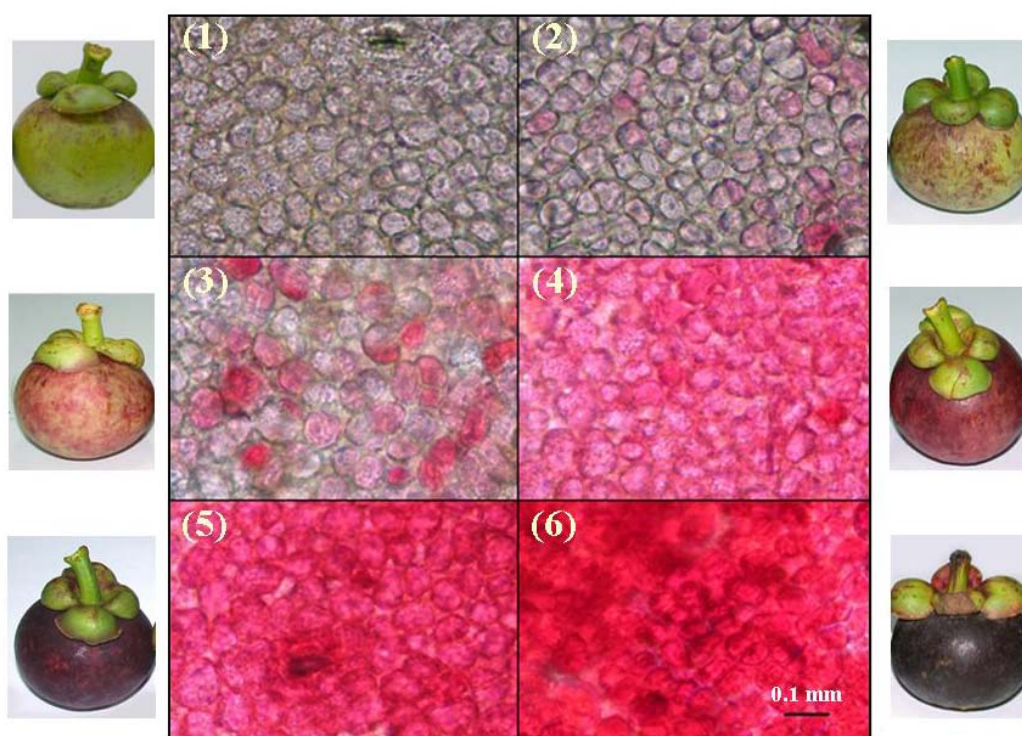


Figure 9 Light microscopy of outer pericarp (skin) of mangosteen fruit. The bar in the outer pericarp section shows 0.1 mm. Numbers refer the maturity stage of the fruit.

2. ผลของเอทิลีนต่อการพัฒนาสีผลมังคุด

ภายหลังการเก็บเกี่ยวผลมังคุดระยะที่ 1 และรมผลมังคุดด้วยเอทิลีน ด้วยยับยั้งการทำงานเอทิลีน (1 methycyclopropene; 1-MCP) วิธีต่างๆ ดังนี้ 1) รมด้วยอากาศ (ชุดควบคุม), 2) รมเอทิลีน ความเข้มข้น $200 \mu\text{L L}^{-1}$ นาน 24 ชั่วโมง (ethylene treatment) 3) รม 1 methycyclopropene ความเข้มข้น $1 \mu\text{g L}^{-1}$ นาน 12 ชั่วโมง (1-MCP treatment) และ 4) รมเอทิลีนความเข้มข้น $200 \mu\text{L L}^{-1}$ นาน 24 ชั่วโมง และรมต่อเนื่องด้วย 1-MCP นาน 12 ชั่วโมง (E+M) ภายหลังการรมสารต่างๆ พบว่า ผลมังคุดที่รมเอทิลีนและชุดควบคุมมีการพัฒนาสีผลในระหว่างการรมสารเร็วกว่าการรม 1-MCP (Figure 10) โดยพบว่าค่า hue ลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่การรมผลมังคุดด้วย 1-MCP มีการพัฒนาสีเพียงเล็กน้อยระหว่างการรม การรมเอทิลีนและอากาศ (ชุดควบคุม) ชักนำให้ผลมังคุดเปลี่ยนเป็นสีม่วงดำ (ระยะที่ 6) ภายในระยะเวลา 7 และ 9 วันตามลำดับ (Figure 15a) การรมสาร 1-MCP และเอทิลีนร่วมกับ 1-MCP สามารถยับยั้งการพัฒนาสีผลมังคุด (hue value and colour index) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 14 and 15, Appendix Table 5 and 6) การรมผลมังคุดด้วยสาร 1-MCP สามารถชะลอการพัฒนาสีได้ดีเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (Figure 11)

ในระหว่างการรมสารต่างๆ ความแข็งของเปลือกผลมังคุดลดลงอย่างรวดเร็ว การรมเอทิลีนและอากาศ (ชุดควบคุม) ชักนำให้ความแข็งของเปลือกผลมังคุดลดลงเร็วกว่าการรมผลมังคุดด้วยสาร 1-MCP และเอทิลีนร่วมกับ 1-MCP การรมสาร 1-MCP สามารถชะลอการอ่อนนุ่มของเปลือกผลมังคุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 12, Appendix Table 7)

ภายหลังการรมสารต่างๆ การผลิตเอทิลีนของผลมังคุดที่ผ่านการรมเอทิลีนและอากาศ (ชุดควบคุม) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและสูงที่สุดในวันที่ 5 ภายหลังการเก็บเกี่ยว หลังจากนั้นปริมาณเอทิลีนลดลงซึ่งลักษณะดังกล่าวมีความเหมือนกับการผลิตเอทิลีนของผลไม้จำพวก climacteric อย่างไรก็ตามการผลิตเอทิลีนของผลมังคุดที่ได้รับสาร 1-MCP และเอทิลีนร่วมกับ 1-MCP พบว่าการเพิ่มขึ้นถึงจุดสูงสุดช้ากว่าการรมเอทิลีนและอากาศ (ชุดควบคุม) (Figure 13a) ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของเปลือกมังคุดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการผลิตเอทิลีน (Figure 13a) ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของเปลือกผลมังคุดที่ผ่านการรมด้วยเอทิลีนเพิ่มขึ้นสูงกว่าการรมสารอื่นๆ (Figure 13b, Appendix Table 8) การรมผลมังคุดด้วยสาร 1-MCP ชะลอการเพิ่มสูงขึ้นของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดได้และสอดคล้องกับการผลิตเอทิลีนและการพัฒนาสีผล (Figure 13, Appendix Table 8)

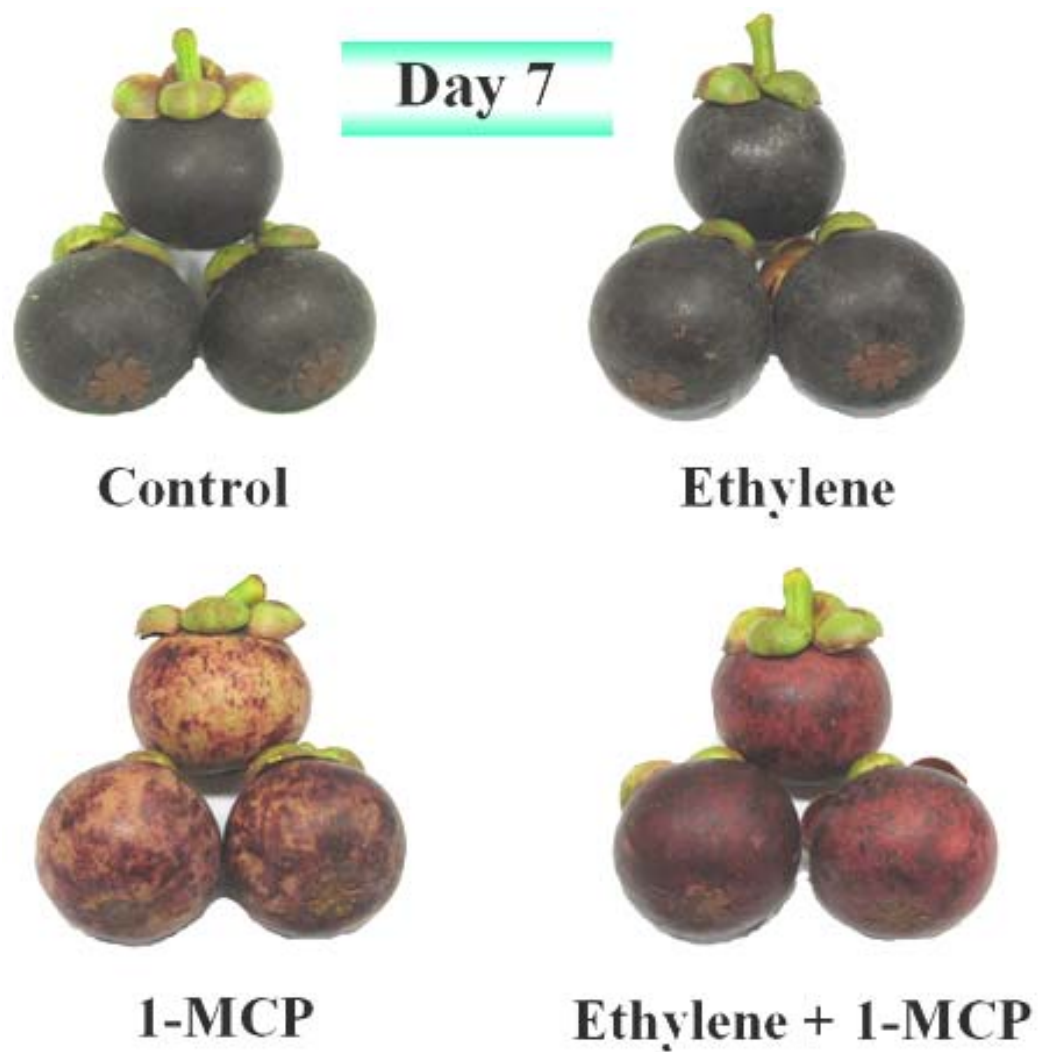


Figure 10 Mangosteen fruit at day 7 treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h + $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

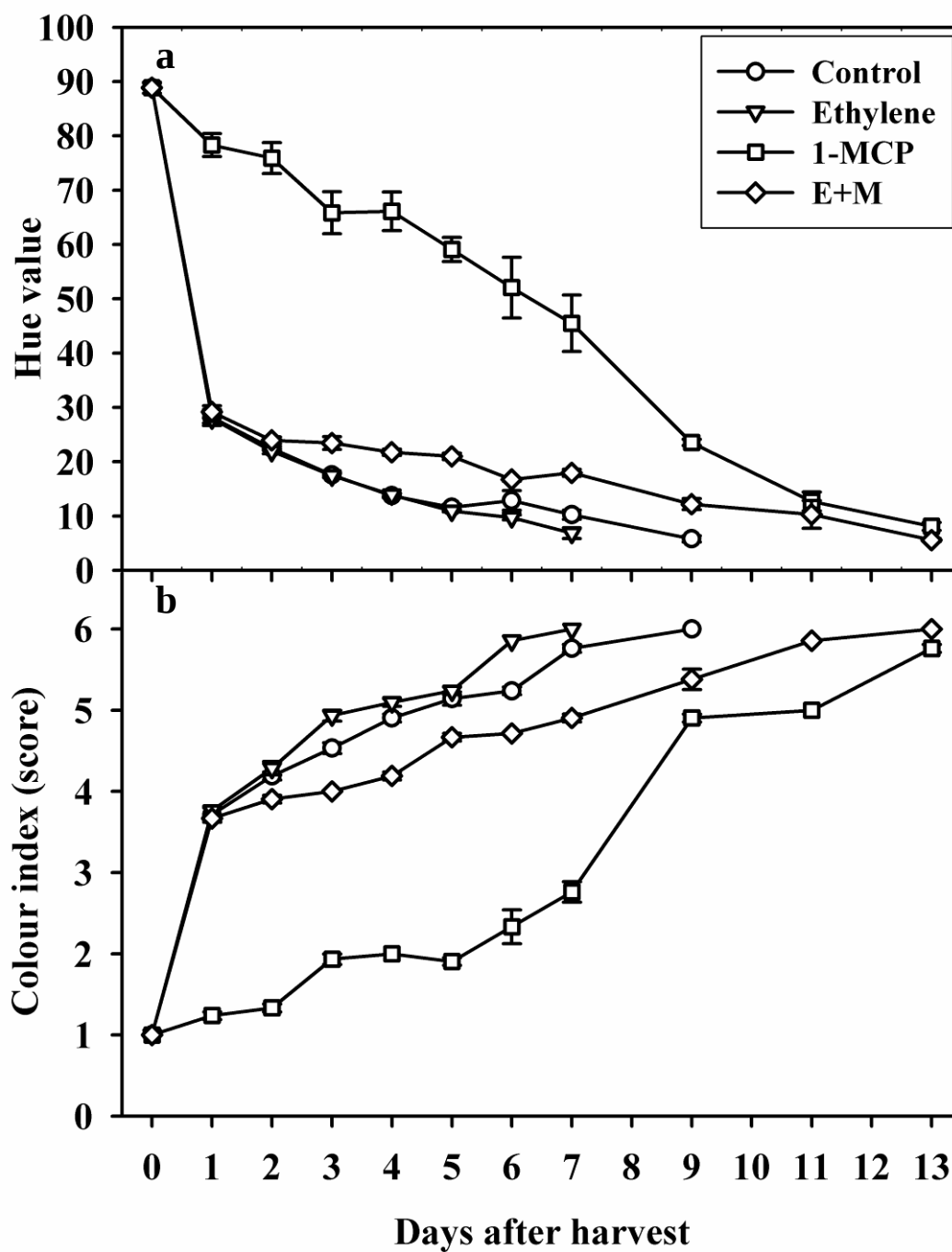


Figure 11 Change in fruit colour (hue value) and colour index (score) of fruit treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h + $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M). Data are means $\pm$ SE of three replications.

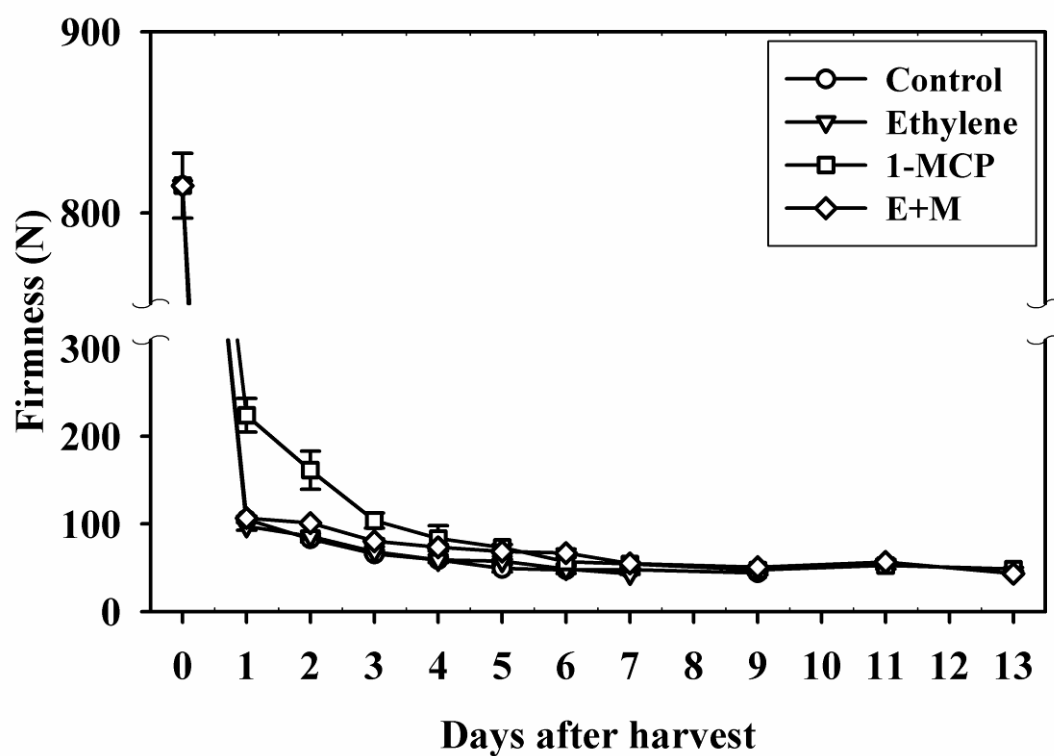


Figure 12 Change in pericarp firmness treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h + $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M). Data are means $\pm$ SE of three replications.

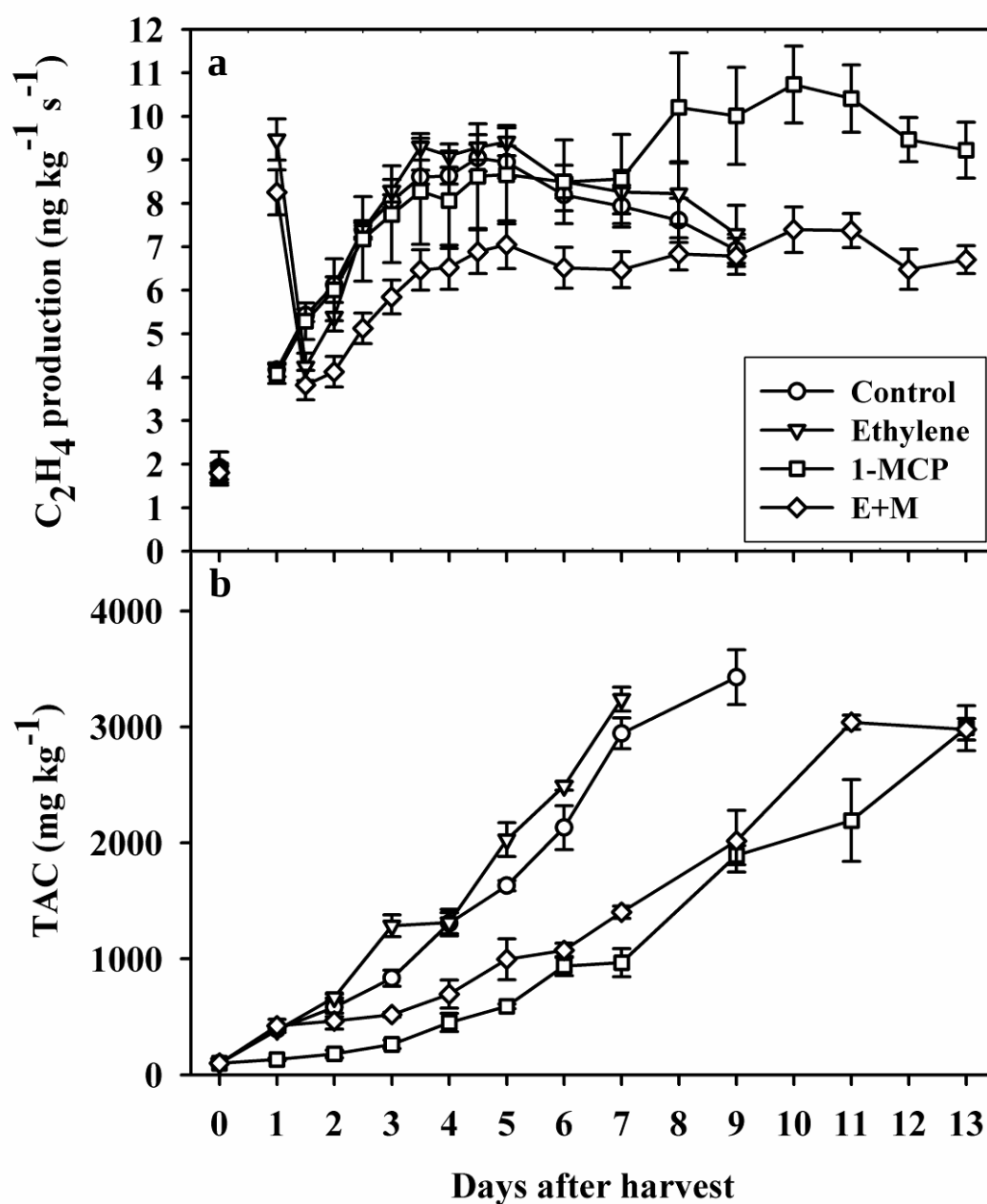


Figure 13 Change in ethylene production of fruit and total anthocyanin content of mangosteen pericarp (TAC) treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h + $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M). Data are means $\pm$ SE of five replications for ethylene production and three replications for total anthocyanin content.

3. ผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อการพัฒนาสีผลมังคุด

ภายหลังการเก็บเกี่ยวผลมังคุดระยะที่ 1 (ระยะสายเลือด) ทำการเก็บรักษาผลมังคุดที่อุณหภูมิ 25°C (ชุดควบคุม) เปรียบเทียบกับการเก็บรักษาผลมังคุดที่อุณหภูมิต่ำ 15°C นาน 7 วัน และย้ายไปเก็บรักษาต่อที่อุณหภูมิ 25°C พบว่า ผลมังคุดที่เก็บรักษาอุณหภูมิ 25°C สามารถพัฒนาสีผลเร็วกว่าผลมังคุดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ 15°C (Figure 14, Appendix Table 9 and 10) โดยสามารถเปลี่ยนสีเป็นสีม่วงดำ (ระยะที่ 6) ภายในระยะเวลา 9 วัน ค่า hue (สีผล) ลดลงอย่างรวดเร็ว และมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการพัฒนาสีผล (Figure 19) การเก็บรักษาผลมังคุดที่อุณหภูมิต่ำสามารถชะลอการพัฒนาสีผลได้ แต่เมื่อทำการย้ายไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C พบว่า ผลมังคุดสามารถพัฒนาสีผลเป็นสีม่วงดำอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 13 วัน (Figure 15)

ความแข็งของเปลือกผลมังคุดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C ลดลงอย่างรวดเร็วและเร็วกว่าผลมังคุดที่เก็บรักษา 15°C (Figure 16, Appendix Table 11)

จากการเก็บรักษาผลมังคุดที่อุณหภูมิ 25°C (ชุดควบคุม) พบว่า การผลิตเอทิลีนเพิ่มสูงขึ้นตลอดระยะเวลา 5 วัน หลังจากนั้นการผลิตเอทิลีนลดลงเช่นเดียวกับรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของเอทิลีนในผลไม้ชนิด climacteric การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของเปลือกผลมังคุดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า ปริมาณเพิ่มสูงขึ้นต่อเนื่องตลอดการเก็บรักษาทั้งสองอุณหภูมิและสอดคล้องกับการผลิตเอทิลีน (Figure 17a) อย่างไรก็ตามปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของเปลือกผลมังคุดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C เพิ่มขึ้นสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 17b, Appendix Table 12) การย้ายผลมังคุดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C ไปไว้ที่อุณหภูมิ 25°C พบว่าอัตราการผลิตเอทิลีนและปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (Figure 21) การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ 15°C สามารถชะลอการเพิ่มขึ้นของอัตราการผลิตเอทิลีนและปริมาณแอนโทไซยานินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 17, Appendix Table 12)

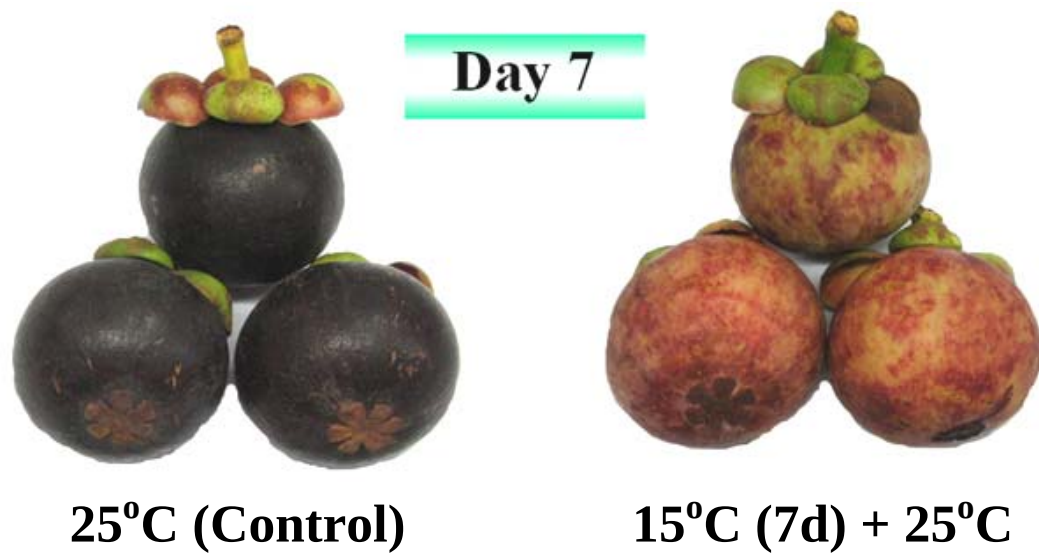


Figure 14 Mangosteen fruit at day 7 stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

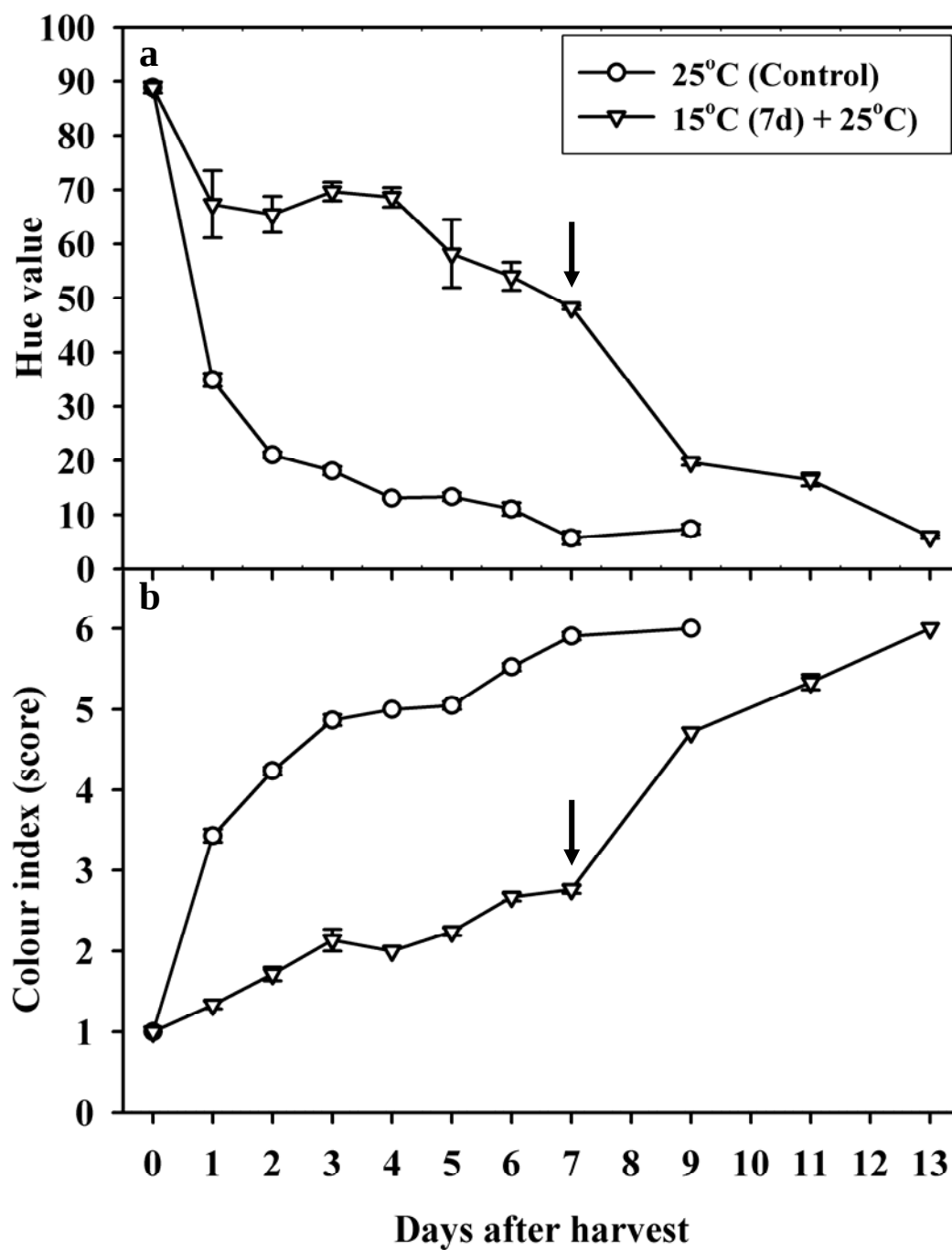


Figure 15 Change in fruit colour (hue value) and colour index (score) of fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C (arrows). Data are means $\pm$ SE of three replications.

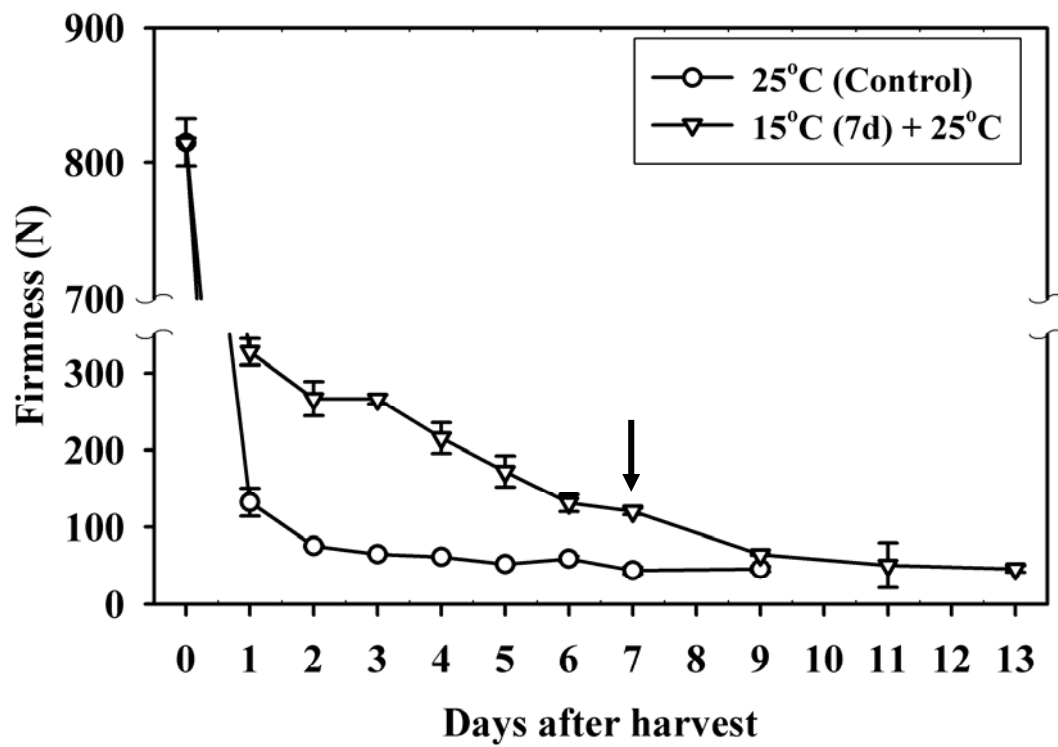


Figure 16 Change in pericarp firmness of fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C (arrow). Data are means $\pm$ SE of three replications.

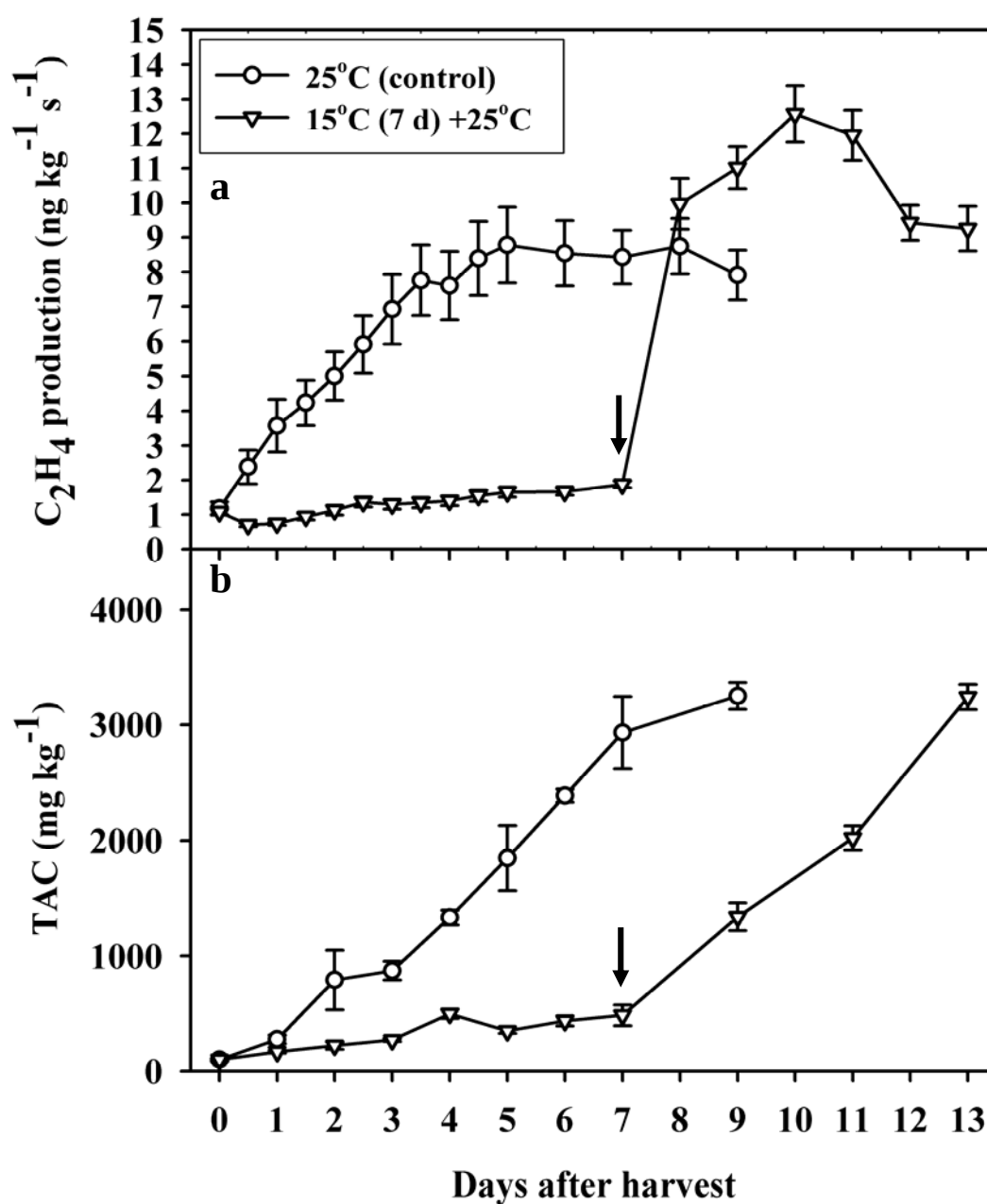


Figure 17 Change in ethylene production of fruit and total anthocyanin content of mangosteen pericarp (TAC) stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C (arrows). Data are means $\pm$ SE of three replications

4. การจำแนกยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินระหว่างการพัฒนาสีผลของผลมังคุด

4.1 การโคลนยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินระหว่างการพัฒนาสีผลของผลมังคุด

จากการโคลนยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยใช้ degenerate primer ทั้ง 2 เส้นหรือใช้เทคนิค 3' RACE และทำการโคลนยีนบริเวณปลาย 5' และ 3' โดยใช้เทคนิค RACE-PCR สามารถโคลนยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้ทั้งหมดและได้จดทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้หมายเลข FJ197127 ถึง FJ197134

1) Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

จากการโคลนยีน phenylalanine ammonia lyase (PAL) พบว่า ยีนมีขนาด 2,449 คู่เบสและสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเท่ากับ 718 เรซิดิว (Figure 18) ข้อมูลของยีน PAL ได้จดทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ชื่อ *GmPAL* รหัส FJ197127 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PAL ของมังคุดกับข้อมูลใน GenBank พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ *GmPAL* มีความเหมือนกับ PAL2 ของ เชอร์รี่ (*Prunus avium*) ราสเบอร์รี่ (*Rubus idaeus*) องุ่น (*Vitis vinifera*) แครอท (*Daucus carota*) แอปเปิ้ล (*Pyrus communis*) และ *Arabidopsis thaliana* เท่ากับ 82-84% ตามลำดับ นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *GmPAL* พบตำแหน่งอนุรักษ์ของยีน ที่มีอยู่ในยีน PAL ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น active site consensus sequence: G-[STG]-[LIVM]-[STG]-[AC]-S-G-[DH]-L-x-P-L-[SA]-x(2)-[SAV] (Figure 19 บริเวณขีดเส้นใต้) (Mahesh *et al.*, 2006)

2) Chalcone synthase (CHS)

จากการโคลนยีน chalcone synthase (CHS) พบว่า ยีนมีขนาด 1,373 คู่เบสและสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเท่ากับ 394 เรซิดิว (Figure 20) ข้อมูลของยีน CHS ได้จดทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ชื่อ *GmCHS* รหัส FJ197128 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CHS ของมังคุดกับข้อมูลใน GenBank พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ *GmCHS* มีความเหมือนกับ องุ่น (*Vitis vinifera*) พิทูเนีย (*Petunia hybrida*) สตรอเบอร์รี่ (*Fragaria ananassa*) และแอปเปิ้ล (*Malus domestica*) เท่ากับ 87-89% ตามลำดับ นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน

โนของ *GmCHS* พบตำแหน่งอนุรักษ์ของยีนทั้งหมดที่มีอยู่ในยีน CHS ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น active site consensus sequence GY[FY][GA]GGTX(2)R (Figure 21 บริเวณขีดเส้นใต้) (Liew *et al.*, 1998)

3) Chalcone isomerase (CHI)

จากการโคลนยีน chalcone isomerase (CHI) พบว่ายีนมีขนาด 826 คู่เบสและสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเท่ากับ 209 เรซิดิว (Figure 22) ข้อมูลของยีน CHI ได้จดทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ชื่อ *GmCHI* รหัส FJ197129 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CHI ของมั่งคุดกับข้อมูลใน GenBank พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ *GmCHI* มีความเหมือนกับพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) แพร่ (*Pyrus communis*) *Arabidopsis thaliana* และ black cotton wood (*Populus trichocarpa*) เท่ากับ 31-82% ตามลำดับ นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *GmCHI* พบตำแหน่งอนุรักษ์ของยีนทั้งหมดที่มีอยู่ในยีน CHI ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น active site consensus sequence GY[FY][GA]GGTX(2)R (Figure 23 บริเวณเครื่องหมาย) (Ralston *et al.*, 2005)

4) Flavonone 3-hydroxylase (F3H)

จากการโคลนยีน flavonone 3-hydroxylase (F3H) พบว่ายีนมีขนาด 1,318 คู่เบสและสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเท่ากับ 209 เรซิดิว (Figure 24) ข้อมูลของยีน CHI ได้จดทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ชื่อ *GmF3H* รหัส FJ197131 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน F3H ของมั่งคุดกับข้อมูลใน GenBank พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ *GmF3H* มีความเหมือนกับ *Arabidopsis thaliana* กีวี (*Actinidia chinensis*) ราสเบอร์รี่ (*Rubus idaeus*) ส้ม (*Citrus sinensis*) สตอเบอรี่ (*Fragaria ananassa*) และ องุ่น (*Vitis vinifera*) เท่ากับ 81-85% ตามลำดับ นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *GmCHI* พบตำแหน่งอนุรักษ์ของยีนทั้งหมดที่มีอยู่ในยีน CHI ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ (Figure 25 บริเวณขีดเส้นใต้) (Britsch *et al.*, 1993)

5) Flavonone 3'-hydroxylase (F3'H)

จากการโคลนยีน flavonone 3'-hydroxylase (F3'H) พบว่ายีนมีขนาด 1,711 คู่เบสและสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเท่ากับ 507 เรซิดิว (Figure 26) ข้อมูลของยีน CHI ได้จดทะเบียน

ทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ชื่อ *GmF3'H* รหัส FJ197132 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน F3H ของมันฝรั่งกับข้อมูลใน GenBank พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ *GmF3H* มีความเหมือนกับ *Arabidopsis thaliana* ลิ้นมังกร (*Antirrhinum majus*) เจอรานิยม (*Pelargonium hortorum*) พิทูเนีย (*Petunia hybrida*) และ องุ่น (*Vitis vinifera*) เท่ากับ 66-75% ตามลำดับ นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *GmF3'H* พบตำแหน่งอนุรักษ์ของยีนที่สำคัญในยีน F3'H ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น heme-binding domain ตำแหน่ง proline-rich region (PPxP) และตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นออกซิเจนและการส่งถ่ายโปรตอนไปยัง active site (A/G)Gx(D/E)T(T/S) (Figure 27 บริเวณขีดเส้นใต้) (Britsch *et al.*, 1993)

6) Dihydroflavonol 4-reductase (DFR)

จากการโคลนยีน dihydroflavonol 4-reductase (DFR) พบว่ายีนมีขนาด 1,229 คู่เบสและสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเท่ากับ 334 เรซิดิว (Figure 28) ข้อมูลของยีน DFR ได้จดทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ชื่อ *GmDFR* รหัส FJ197130 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน DFR ของมันฝรั่งกับข้อมูลใน GenBank พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ *GmDFR* มีความเหมือนกับพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) *Arabidopsis thaliana* สตรอเบอร์รี่ (*Fragaria ananassa*) แอปเปิ้ล (*Pyrus communis*) องุ่น (*Vitis vinifera*) และ แอปเปิ้ล (*Malus domestica*) เท่ากับ 69-76% ตามลำดับ นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *GmDFR* พบตำแหน่งอนุรักษ์ของยีนทั้งหมดที่มีอยู่ในยีน DFR ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น NADP-binding region ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ co-factor binding site มีลักษณะเหมือนกับยีน DFR ที่รายงานในมันฝรั่ง (Lacombe *et al.*, 1997) และตำแหน่ง substrate specificity domain (Figure 29 บริเวณขีดเส้นใต้) (Johnson *et al.*, 2001)

7) Leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX)

จากการโคลนยีน leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) พบว่ายีนมีขนาด 1,285 คู่เบสและสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเท่ากับ 354 เรซิดิว (Figure 30) ข้อมูลของยีน LDOX ได้จดทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ชื่อ *GmLDOX* รหัส FJ197133 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน LDOX ของมันฝรั่งกับข้อมูลใน GenBank พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ *GmLDOX* มีความเหมือนกับ *Arabidopsis thaliana* แอปเปิ้ล (*Malus domestica*) ส้ม (*Citrus sinensis*) สตรอเบอร์รี่ (*Fragaria ananassa*) ท้อ (*Prunus persica*) และ องุ่น (*Vitis vinifera*) เท่ากับ 77-83% ตามลำดับ นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *GmLDOX* พบตำแหน่งอนุรักษ์ของยีนที่มีอยู่ในยีน LDOX ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น ตำแหน่ง 2-oxoglutarate ซึ่งมี

กรดอะมิโน arginine เป็นองค์ประกอบสำคัญ และมีกรดอะมิโน histidine และ aspartic acid ช่วยการประสานของ ferrous-iron (Figure 31 บริเวณเครื่องหมาย) (Saito *et al.*, 1999)

6) UDP-glucose:flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (UGFT)

จากการโคลนยีน UDP-glucose:flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (UGFT) พบว่ายีนมีขนาด 1,680 คู่เบสและสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเท่ากับ 457 เรซิดิว (Figure 32) ข้อมูลของยีน UGFT ได้จดทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ชื่อ *GmUGFT* รหัส FJ197134 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน UGFT ของมั่งคุดกับข้อมูลใน GenBank พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ *GmUGFT* มีความเหมือนกับพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) แอปเปิล (*Malus domestica*) ส้ม (*Citrus sinensis*) *Arabidopsis thaliana* สตอเบอรี่ (*Fragaria ananassa*) และ องุ่น (*Vitis vinifera*) เท่ากับ 48-59% ตามลำดับ นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *GmUGFT* พบตำแหน่งอนุรักษ์ของยีนที่มีอยู่ในยีน UGFT ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น ตำแหน่งสำคัญ 2 จุดที่ปลาย C-terminal ของ UDP-glucose-dependent glucosyltransferases (Figure 33 บริเวณขีดเส้นใต้) (Yamazaki *et al.*, 2002)

```

1  TCTACCACTCACCCCTTTAAGCTTTCCTTTAAGCTTTTTCTCCACACCTTCTCTCATCAG  60
61  AAGCCTCTTAGCTCACCAATAGTATTCTTTGTGAAGGAAATGGAAACAACAATCACACAG  120
      M E T T I T Q
121  AACGGCCACCACATGAATGGCTTGTGCATGAACGGCTCGGCTCACGTGAATAGTGACCCA  180
      N G H H M N G L C M N G S A H V N S D P
181  TTGAAGTGGGGATACTTAGCTGAGTCGTTGAAGGGGAGCCATTTGGAGGAAGTGAAGAGG  240
      L N W G Y L A E S L K G S H L E E V K R
241  ATGGTGGAGGAGTACAGGAAGCCTCTAGTGAAGTTGGGTGGGAGACTTTGACCATAGCT  300
      M V E E Y R K P L V K L G G E T L T I A
301  CAAGTGGCAGCTGTGGCTGGCGGCTTCGAAGCTGGGGTCAAAGTGGAGCTGGCTGAGTCG  360
      Q V A A V A G G F E A G V K V E L A E S
361  GCTAGAGCCGGCGTTAAGGCTAGTAGCGATTGGGTCATGGATAGTATGAACAATGGAACC  420
      A R A G V K A S S D W V M D S M N N G T
421  GATAGTTACGGGTTACTACTGGTTTTGGTGCTACTTCTCATAGGAGAACCAACAGGGC  480
      D S Y G V T T G F G A T S H R R T K Q G
481  GCTGCCCTTCAAAAAGAGCTCATCAGATTCTTGAACGCTGGTATTTTCGGCAACGGGACA  540
      A A L Q K E L I R F L N A G I F G N G T
541  GAGACAAGCCACACGCTGCCTCATTCTGCAACCAGAGCAGCCATGCTAGTGAGGATAAAC  600
      E T S H T L P H S A T R A A M L V R I N
601  ACACTACTCCAAGGCTACTCCGGCATTAGATTTGAGATCTTGGAAGCCCTCACCAAGTTT  660
      T L L Q G Y S G I R F E I L E A L T K F
661  CTAACACTACAACATTACTCCTTGCTGCCTCTTCGCGGCACCATTACAGCTTCCGGTGAT  720
      L N Y N I T P C L P L R G T I T A S G D
721  TTAGTCCCTCTTTCTACATTGCTGGTTTATTGACAGGCAGGTCTAATGCTAAAGCTGTT  780
      L V P L S Y I A G L L T G R S N A K A V
781  GGTCCCAATGGCCAAACCTTGAATGCCGAGGAAGCGTTTTTCGCTGGCTGGAGTTGGATAT  840
      G P N G Q T L N A E E A F S L A G V G Y
841  CAATTTTTTGAGTTGCAGCCTAAGGAAGGGCTTGCTCTTGTGAATGGAACCGCGGTGGGG  900
      Q F F E L Q P K E G L A L V N G T A V G
901  TCTGGCTTGGCTTCTATGGTCCTTTTCGAGGCCAACATTCTTGGTGTGTTTAGCAGAACTC  960
      S G L A S M V L F E A N I L G V L A E L
961  TTGTCTGCAATTTTTGCAGAAGTTATGAATGGTAAAGCAGAGTTCACTGACCACTTGACT  1020
      L S A I F A E V M N G K A E F T D H L T
1021  CACAAATTGAAGCACCATCCAGGCCAGATTGAGGCTGCAGCTATAATGGAGCACATTCTT  1080
      H K L K H H P G Q I E A A A I M E H I L
1081  GATGGAAGCTCTTATATGAAAGAAGCCAAGAGATTGCATGAGATGGATCCCTTGAGAAG  1140
      D G S S Y M K E A K R L H E M D P L Q K
1141  CCTAAACAAGATCGATACGCTCTCAGGACTTCACCTCAATGGCTCGGCCACCTATTGAA  1200
      P K Q D R Y A L R T S P Q W L G P P I E
1201  GTCATCCGTTTCGCTACAAAAATGATTGAAAGGGAGATTAACCTCTGTGAATGACAATCCT  1260
      V I R F A T K M I E R E I N S V N D N P

```

Figure 18 Nucleotide sequence of the gene encoding PAL from mangosteen with its deduced amino acid sequence. The underlined letters indicate the translation start site (ATG)

1261	TTGATTGATGTTTCCAGGAATAAGGCATTACACGGTGGCAACTTCCAGGGGAACCCCAATT	1320
	L I D V S R N K A L H G G N F Q G T P I	
1321	GGAATGTCAATGGACAATGCAAGATTGGCTATTGCTGCTATTGAAAACTCATGTTTGCT	1380
	G M S M D N A R L A I A A I G K L M F A	
1381	CAATTCAGTGAGCTTGTTAATGACTACTACAATAATGGGTGCCATCAAATCTCACAGCC	1440
	Q F S E L V N D Y Y N N G L P S N L T A	
1441	AGCAGGAATCCCAGTCTAGACTATGGCTTCAAGGGAGCTGAAATTGCAATGGCTTCTTAT	1500
	S R N P S L D Y G F K G A E I A M A S Y	
1501	TGTTCCGAGCTGCAGTACCTTGCAAGCCCCGTCACTACCCACGTGCAAAGCGCAGAGCAG	1560
	C S E L Q Y L A S P V T T H V Q S A E Q	
1561	CATAACCAAGATGTGAACTCTTTGGGACTCATCTCTTCAAGAAAGACCCAAGAAGCTATA	1620
	H N Q D V N S L G L I S S R K T Q E A I	
1621	GACATTCTGAAGCTCATGTCCTCAACTTTCTTGGTGGCAATCTGCCAGGCTGTTGACTTG	1680
	D I L K L M S S T F L V A I C Q A V D L	
1681	AGGCATTTGGAGGAGAACCTGAAGAGCACTGTCAAGAACACAGTGAGTCAAGTTGCCAAG	1740
	R H L E E N L K S T V K N T V S Q V A K	
1741	AGGGTCTTAACCACAGGAGCCAAATGGAGAGCTTCATCCATCCAGGTTTTGCGAAAAGGAC	1800
	R V L T T G A N G E L H P S R F C E K D	
1801	TTGCTCAAAGTGGTTGATCGCGAGTATGTTTTCGCCTACGCTGATGATCCTTGCAGCGCA	1860
	L L K V V D R E Y V F A Y A D D P C S A	
1861	ACGTATCCACTGATGCAAAGCTGAGGCAAGTTCTGGTGGATCACGCGCTGGCTAATGGT	1920
	T Y P L M Q K L R Q V L V D H A L A N G	
1921	GAAGGTGAGAGGAATCCAAACACATCAGTCTTCCAAAAGATTGCAGCATTTGAGGAGGAA	1980
	E G E R N P N T S V F Q K I A A F E E E	
1981	TTGAAGGACCTTTTGCCAAAGGAAATTGAGGGTGTGAGACTTGCTTATGAGAGTGGAAC	2040
	L K D L L P K E I E G V R L A Y E S G N	
2041	ACAGCAATTCCTAACAGGATTAAGGAGTGCAGATCTTACCCTCTTTATAAGTTTGTTAGG	2100
	T A I P N R I K E C R S Y P L Y K F V R	
2101	GAGGTAGCAGGCACTTCGTTGCTTACAGGGGAAAAGGTCACTTCTCCAGGGGAGGAGCTT	2160
	E V A G T S L L T G E K V T S P G E E L	
2161	GACAAGGTTTTTACTGCAATTTGCCAAGGCAAAATCATTGATCCCATCCTGGATTGCCTT	2220
	D K V F T A I C Q G K I I D P I L D C L	
2221	GAGGAATGGGATGGAACCCCACTTCTATCTGTTAGAGAATCAACAACCTTTTTCTTTC	2280
	E E W D G T P L P I C	
2281	CTTCTTTTTTTTTTCTGTTTTGTTCAGTGCTTCAATTAGTATGGTTTCTTTTGTTTAT	2340
2341	ACCCAACGAAATGTACGGACGTCCCTTGTTTCTTTTATTATTTGTCAACTTGTTCAATGA	2400
2401	AGGAAATAATAACTTCCAAATCAACAATTA	2449

Figure 18 (Continued).

Arabidopsis	(1)	MEINGAHKSNGGGVDAMLGGDIKTKNMVINAEE-----DPLNWGAAAEQMKGSHLDEVKRMVAEYR
Carrot	(1)	-----MAYTNGHHENGNGVDLQMKKE-----DPLSWGVAABALTGSHLDEVKRMVAEYR
Grape	(1)	-----MDATNCHGSKNKVESFQVYS-----DPLNWGMAAEQLKGSHLDEVKRMVAEYR
Pear	(1)	-----MEAEITITQNGKNGHHQNGAVESPLCIKK-----DPLNWGLAADSLKGSHLDEVKRMVAEYR
Raspberry	(1)	----MESITQNGHHHQNGIQNGSLDDGLCIKTESIKTGYSVS-----DPLNWGMAAEQMTGSHLDEVKRMVAEYR
Sweet cherry	(1)	-----MATNSIKQNGHKNGSVLPELCIKK-----DPLNWGVAAEQLKGSHLDEVKRMVAEYR
Mangosteen	(1)	-----METTITQNGHHMNGLCMNGSAHVN---SDPLNWGYLAESLKGSHLDEVKRMVAEYR
Arabidopsis	(62)	KPVVVLGGELTLTISQVAAISTIGNS-VKVELSETARAGVNASSDWMESMNGKTDSYGVTTGFGATSHRR
Carrot	(50)	KPVVVLGGELTLTISQVAAISARDDSGVKVELSEARAGVKASSDWMESMNGKTDSYGVTTGFGATSHRR
Grape	(47)	KPVVVLGGELTLTISQVAAIAGREGD-VGVLESETARAGVNASSDWMESMNGKTDSYGVTTGFGATSHRR
Pear	(57)	KPVVVLGGELTLTISQVAAIATHDTG-VKVELSEARAGVKASSDWMDSMNGKTDSYGVTTGFGATSHRR
Raspberry	(67)	KPVVVLGGELTLTISQVAAIANHDSG-VKVELSEARAGVKASSDWMDSMNGKTDSYGVTTGFGATSHRR
Sweet cherry	(54)	KPVVVLGGELTLTISQVAAIATHDSG-VKVELSEARAGVKASSDWMDSMNGKTDSYGVTTGFGATSHRR
Mangosteen	(54)	KPVVVLGGELTLTISQVAAVAGGFVAGVKVELSEARAGVKASSDWMDSMNGKTDSYGVTTGFGATSHRR
Arabidopsis	(131)	TKNGVALQKELIRFLNAGIFGSTKET-SHTLPHSATRAAMLVRINTLLQGESGIRFEILEAITSPLMNNI
Carrot	(120)	TKQGAALQKELIRFLNAGIFGSGEAGNNTLPHSATRAAMLVRINTLLQGESGIRFEILEAITSPLMNNI
Grape	(116)	TKQGAALQKELIRFLNAGIFGNGTES-CHTLPHSATRAAMLVRINTLLQGESGIRFEILEAITSPLMNNI
Pear	(126)	TNKGAAALQKELIRFLNAGVFGSATES-GHTLPHQATRAAMLVRINTLLQGESGIRFEILEAITSPLMNNI
Raspberry	(136)	TKQGAALQKELIRFLNAGVLRNGTES-AHTLPHSATRAAMLVRINTLLQGESGIRFEILEAITSPLMNNI
Sweet cherry	(123)	TKQGAALQKELIRFLNAGVFGSTKES-GHTLPHQATRAAMLVRINTLLQGESGIRFEILEAITSPLMNNI
Mangosteen	(124)	TKQGAALQKELIRFLNAGIFGNGTES-SHTLPHSATRAAMLVRINTLLQGESGIRFEILEAITSPLMNNI
Arabidopsis	(200)	TPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKATGPNGEAATAEAFKTAG-SSGFFDLQPKGLALVN
Carrot	(190)	TPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGVTLSPTEAFKTAGVEGFFELQPKGLALVN
Grape	(185)	TPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPGSEVYNAAEAFKTAG-SSGFFDLQPKGLALVN
Pear	(195)	TPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNQQLNAEAFVGVNCSGFFELQPKGLALVN
Raspberry	(205)	TPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPKGETLNAAEAFQVGVNCSGFFELQPKGLALVN
Sweet cherry	(192)	TPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPDGQQLNAEAFVGVNCSGFFELQPKGLALVN
Mangosteen	(193)	TPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNQQLNAEAFSTAGVGYQFFELQPKGLALVN
Arabidopsis	(270)	GTAVSGGLASVLFETNVLAVLAEILLSAIFAEVMSGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSY
Carrot	(260)	GTAVSGGLASVLFETNVLAVLAEVMSAIFAEVMOGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSY
Grape	(255)	GTAVSGGLASVLFETNVLAVLSEVLSAIFAEVMOGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSY
Pear	(265)	GTAVSGGLASTVLFETNVLAVLAEILLSAIFAEVMEGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSY
Raspberry	(275)	GTAVSGGLASTVLFETNVLAVLSEVLSAIFAEVMOGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSY
Sweet cherry	(262)	GTAVSGGLASTVLFETNVLAVLSEVLSAIFAEVMOGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSY
Mangosteen	(263)	GTAVSGGLASVLFETNVLAVLAEILLSAIFAEVMMGKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSY
Arabidopsis	(340)	MKLAQKLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRYSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNF
Carrot	(330)	VKAAQKLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRYSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNF
Grape	(325)	VKEAKKLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNF
Pear	(335)	VKAAKKLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRYSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNF
Raspberry	(345)	VKAAEKLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRYSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNF
Sweet cherry	(332)	VKAAKKLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRYSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNF
Mangosteen	(333)	MKEAKRLHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRFATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNF

Figure 19 Protein sequence alignment of mangosteen PAL with other PAL proteins.

The active site consensus sequence is underlined. Identical residues are shown in black, conserved residues in dark grey and similar residues in light grey. The accession numbers of these proteins in the GenBank database are as follows; *Arabidopsis*, AAP59438; carrot, BAG31930; grape, ABM67591; pear, ABB70117; sweet cherry, AAF40224; mangosteen, ACM62741.

Arabidopsis	(410)	QGTPIGVSMNDNRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFFYNNGLPSNLTASRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQ
Carrot	(400)	QGTPIGVSMNDNRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQ
Grape	(395)	QGTPIGVSMNDNRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFFYNNGLPSNLSGSRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQ
Pear	(405)	QGTPIGVSMNDNRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQ
Raspberry	(415)	QGTPIGVSMNDNRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFFYNNGLPSNLSGGRDPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQ
Sweet cherry	(402)	QGTPIGVSMNDNRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFFYNNGLPSNLSGGRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQ
Mangosteen	(403)	QGTPIGVSMNDNRLAIAAIGKLMFAQFSELVNDFFYNNGLPSNLTASRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQ
Arabidopsis	(480)	YLANPVTSHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTSSEAVDILKLMSSTTLVALCQAVDLRHLEENLRQTVKNTV
Carrot	(470)	FLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTSSEAVEILKLMSSTTLVLGCGAIDLRLHLEENLKSTVKKTV
Grape	(465)	FLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVIDILKLMSSTTLVALCQAILDLRLHLEENLKSTVKKTV
Pear	(475)	FLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVIDILKLMSSTTLVALCQSVDLRLHLEENLRNTVKNVT
Raspberry	(485)	FLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVIDILKLMSSTTLVALCQAILDLRLHLEENLKSTVKNVT
Sweet cherry	(472)	FLANPVTNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVIDILKLMSSTTLVALCQAILDLRLHLEENLRNTVKNVT
Mangosteen	(473)	YLAPEVTTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTCQAIDILKLMSSTTLVALCQAVDLRLHLEENLKSTVKNVT
Arabidopsis	(550)	SOVAKRVLTGTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVYFAYIDDPSCSATYPLMQKLRQVLVDHALINGEHESEKN
Carrot	(540)	SOVAKRVLTGTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVYFAYIDDPSCSATYPLMQKLRQVLVEHALNNGDKERN
Grape	(535)	SHVAKRLLTGTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVYFAYIDDPSCSATYPLMQKLRQVLVEHALNNGENEKN
Pear	(545)	SOVAKRLLTGTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVYFAYIDDPSCSATYPLMQKLRQVLVEHALTNGEHESEKN
Raspberry	(555)	SQLAKRVLTGTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVYFAYIDDPSCSATYPLMQRLQVLVEHALTNGEHESEKN
Sweet cherry	(542)	SOVAKRLLTGTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVYFAYIDDPSCSATYPLMQKLRQVLVEHALTNGEHESEKN
Mangosteen	(543)	SOVAKRVLTGTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVYFAYIDDPSCSATYPLMQKLRQVLVDHALANGEGERN
Arabidopsis	(620)	AVTSIFHKIGAFEEELKAVLPKEVEAARAAYDNQTSAPNRIKECRSYPLYKFVREELGTLLLTGGEKVT
Carrot	(610)	LSTSIQKIAAFDELKAILPKEVESARAAYVESGMPAIPNRIKECRSYPLYKFVREELGTLLLTGGEKVT
Grape	(605)	GSTSIQKIGAFEEELKAVLPKEVESARDGVESGMPAIPNRIKECRSYPLYKFVREELGTLLLTGGEKVT
Pear	(615)	ASTSIQKIGAFEEELKAVLPKEVESARAAYVESGMAIPNRIKECRSYPLYKFVREELGTLLLTGGEKVT
Raspberry	(625)	ASTSIQKITAFAEEELKAVLPKEVESARAAYVESGMAIPNRIKECRSYPLYKFVREELGTLLLTGGEKVT
Sweet cherry	(612)	ASTSIQKIVAFEEELKAVLPKEVESARAALDSGSAGVPNRIKECRSYPLYKFVREELGTLLLTGGEKVT
Mangosteen	(613)	PNTSIQKIAAFDELKAILPKEVEGVRDAYESGMAIPNRIKECRSYPLYKFVREELGTLLLTGGEKVT
Arabidopsis	(690)	PGEEDFKVFTATCEGKIIDPMMECLENGWNGAPLPIC
Carrot	(680)	PGEEDFKVFTATCKGEIIDPLECLEQSWNGAPLPIC
Grape	(675)	PGEEDFKVFTATCEGKIIDPLEDCLSAWNGAPLPIC
Pear	(685)	PGEEDCDRVFCAICQGGKIIDPILGCLGEGWNGAPLPIC
Raspberry	(695)	PGEEDCDKVFTATCQGGKIIDPILDCLEGGWNGAPLPIC
Sweet cherry	(682)	PGEEDCDKVFTATCEGKIIDPILDCLEGGWNGAPLPIC
Mangosteen	(683)	PGEEDDKVFTATCQGGKIIDPILDCLEENDDGTPLPIC

Figure 19 (Continued).

```

1  GACTCTTAAGTGTAGACATCAAAAAAGAAACAATCGAAATGGCAACCAACGGTTGAGGAGG  60
    M A P T V E E
61  TTAGGAATGCACAGAGAGCACAAAGGGCCAGCCACGGTGCTAGCCATTGGCACTGCTACTC  120
    V R N A Q R A Q G P A T V L A I G T A T
121 CATCGAACTGTGTGCTCCAGGCTGAGTATCCTGACTACTATTTCCGTATCACTAATAGCG  180
    P S N C V L Q A E Y P D Y Y F R I T N S
181 AACACAAGACCAGCTCAAGGAGAAATTCAGGCGCATGTGCGAAAAATCAATGATCAAGA  240
    E H K T E L K E K F R R M C E K S M I K
241 AGCGTTACATGCACCTAACCGAGGAAATCCTCAAGGAAAAATCCAAAGATGTGTGACTATT  300
    K R Y M H L T E E I L K E N P K M C D Y
301 GGTCAACCATCCCTAGACGCCCGCCAGACATAGTGGTAGTGAAATTCCAAAGCTCGGGA  360
    W S P S L D A R Q D I V V V E I P K L G
361 AAGAAGCCGCGAGTCAAAGCCATCAAAGAGTGGGGTCAACCCAAGTCCAAGATCACCCACC  420
    K E A A V K A I K E W G Q P K S K I T H
421 TCGTTTTTTGCACCACTTCAGGCGTTGACATGCCCGGAGCTGACTACCAGCTCACTAAGC  480
    L V F C T T S G V D M P G A D Y Q L T K
481 TTCTCGGTCTCCGCCCCACGTCAAACGTTTGATGATGTATCAACAGGGTTGCTTTGCGG  540
    L L G L R P H V K R L M M Y Q Q G C F A
541 GTGGCACCGTTCTCCGCCTAGCAAAAGACTTGGCGGAGAACAACAAAGGTGCTCGTGTGC  600
    G G T V L R L A K D L A E N N K G A R V
601 TTGTGATTTGCTCCGAAATTACTGCTGTACCTTCCGTGGGCCTTCTGATACCCACTTGG  660
    L V I C S E I T A V T F R G P S D T H L
661 ACTCTCTAGTGGGCCAGGCCCTTTTCGGTGATGGGGCCGCTGCTATTATTGTTGGGTCCG  720
    D S L V G Q A L F G D G A A A I I V G S
721 ACCCTGATCCAGCTATTGAGCGCCCATTTATCCAAATTGTATCTGCGGCCCAAACCATCC  780
    D P D P A I E R P L F Q I V S A A Q T I
781 TTCCTGACTCGGATGGGGCCATTGATGGACACTTGCCTGAAGTGGGCCTCACTTTCCATT  840
    L P D S D G A I D G H L R E V G L T F H
841 TGTAAAGGACGTTCTCGGCTTATCTCCAAGAATATTGAGAAAAGCCTTGTTGAGGCTT  900
    L L K D V P G L I S K N I E K S L V E A
901 TTACACCTATTGGTATTAGTGATTTGGAAGTCTCTTTTCTGGATTGCTCACCCCTGGTGGC  960
    F T P I G I S D W N S L F W I A H P G G
961 CTGCTATCTTGACCAAGTTGAGGTTAAGTTGGGCCTTAAAGAAGAGAAGTTGAGAGCTA  1020
    P A I L D Q V E V K L G L K E E K L R A
1021 CTAGGCATGTGTTAAGTGAGTTTGGGAATATGTCCAGTGCATGTGTGCTGTTTATTTTGG  1080
    T R H V L S E F G N M S S A C V L F I L
1081 ATGAGATGAGGAAAAAGCCTTGGAAGAAGGAAAGCCCACTACTGGAGAAGGCCTTGACT  1140
    D E M R K K A L E E G K P T T G E G L D
1141 GGGGAGTCCTCTTTGGATTTGGGCCTGGTCTAACCGTTGAGACTGTTGTTTTGCACAGTG  1200
    W G V L F G F G P G L T V E T V V L H S
1201 TCCCAACGGAAACGAGAGCATAGGCCCACTAAATAAATTCTAATAGTGGTCGTATGTGG  1260
    V P T E T R A
1261 AAATTGGAATGTGGGATAAAACCTCGTATCGATTTACAGTTACTTTGCTGCATTGAAAT  1320
1321 TTGTAATAAAACGTGATTTCTTATATGGTATTCCTTTTCTTCTTTAAAAAAA  1373

```

Figure 20 Nucleotide sequence of the gene encoding CHS from mangosteen with its deduced amino acid sequence. The underlined letters indicate the translation start site (ATG).

Arabidopsis	(1)	MVMAGASSLDETRQAQRADGPGAGILIAIGTANPENNHHVDAQAEYDPDYFRITNSEHMTDLKEKFRMCDKSMI
Apple	(1)	-----MVTVEEVKKAQRAEGPATVMAIGTATPSNVCVDQATYPDYFRITNSEHVELKEKFRMCDKSMI
Grape	(1)	-----MVSVEEIRKKAQRAEGPATVLAIGTATPANCVQADYDPDYFRITNSEHMTDLKEKFRMCDKSMI
Petunia_ChsA	(1)	-----MVTVEEVKKAQRAEGPATVMAIGTATPSNVCVDQSTYPDYFRITNSEHMTDLKEKFRMCDKSMI
Petunia_ChsD	(1)	-----MVTVEEVKKAQRAEGPATVLAIGTATPSNVCVDQSTYPDYFRITNSEHMTDLKEKFRMCDKSMI
Petunia_ChsJ	(1)	-----MVTVEEVKKAQRAEGPATVMAIGTATPSNVCVDQSTYPDYFRITNSEHMTDLKEKFRMCDKSMI
Strawberry	(1)	-----MVTVEEVKKAQRAEGPATVLAIGTATPSNVCVDQSTYPDYFRITNSEHMTDLKEKFRMCDKSMI
Mangosteen	(1)	----MAPTVVEEVKKAQRAEGPATVLAIGTATPSNVCVDQAEYDPDYFRITNSEHMTDLKEKFRMCDKSMI
Arabidopsis	(71)	RKRHMHLETEFLKENPHEMCAVMAPSLDTRQDIVVVEVPKLGKEAAVKAIKEWQPKSKITHLVFCTTSGV
Apple	(66)	KKRMMYLTTEEILKENPSVCEYMAPSIDARQDMVVVEVPKLGKEAAVKAIKEWQPKSKITHLVFCTTSGV
Grape	(66)	NKRMMHLETEFLKENPNVCAVMAPSLDARQDMVVVEVPKLGKEAAVKAIKEWQPKSKITHLVFCTTSGV
Petunia_ChsA	(66)	KKRMMHLETEFLKENPSMCEYMAPSLDARQDIVVVEVPKLGKEAAVKAIKEWQPKSKITHLVFCTTSGV
Petunia_ChsD	(66)	KKRMMHLETEFLKENPNICEYMAPSLDARTNIYAVEVPKLGKEAAVKAIKEWQPKSKITHLVFCTTSGV
Petunia_ChsJ	(66)	KKRMMHLETEFLKENPNICEYMAPSLDARQDIVVVEVPKLGKEAAVKAIKEWQPKSKITHLVFCTTSGV
Strawberry	(66)	KKRMMYLTTEEILKENPSMCEYMAPSLDARQDMVVVEVPKLGKEAAVKAIKEWQPKSKITHLVFCTTSGV
Mangosteen	(67)	KKRMMHLETEFLKENPKMCDVMAPSLDARQDIVVVEVPKLGKEAAVKAIKEWQPKSKITHLVFCTTSGV
Arabidopsis	(141)	DMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTH
Apple	(136)	DMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTH
Grape	(136)	DMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTH
Petunia_ChsA	(136)	DMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTH
Petunia_ChsD	(136)	SMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTH
Petunia_ChsJ	(136)	DMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTH
Strawberry	(136)	DMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTH
Mangosteen	(137)	DMPGADYQLTKLLGLRPHVKRLMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNRGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTH
Arabidopsis	(211)	LDSLVGQALFGDGAAAIIVGSDPDTSVGEKPIEFEMVSAAQTILPDS DGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGI
Apple	(206)	LDSLVGQALFGDGAAAIIVGADPVEEV-ERPLFEIVSAAQTILPDS DGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGI
Grape	(206)	LDSLVGQALFGDGAAAIIVGADPDTKI-ERPLFEIVSAAQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGI
Petunia_ChsA	(206)	LDSLVGQALFGDGAAAIIVGSDPDTFV-ERPLFEIVSAAQTILPDSHGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGI
Petunia_ChsD	(206)	FDSLVGQALFGDGAAAIIVGSDPDTFV-ERPLFEIVSAAQTILPDSKNSICGLREIIGLTFHLLKDVPGI
Petunia_ChsJ	(206)	LDSLVGQALFGDGAAAIIVGSDPDTFV-ERPLFEIVSAAQTILPDSHGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGI
Strawberry	(206)	LDSLVGQALFGDGAAAIIVGSDPDTFV-ERPLFEIVSAAQTILPDS DGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGI
Mangosteen	(207)	LDSLVGQALFGDGAAAIIVGSDPDTFV-ERPLFEIVSAAQTILPDS DGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGI
Arabidopsis	(281)	ISKNIYKSLDEAFKPLGISDWNISLFWIAHPGGPAILDOVEKLGKLEKLRATHRVLSSEYGNMSSACVLF
Apple	(275)	ISKNIEKSLMEAFKPLGISDWNISLFWIAHPGGPAILDOVEKLGKLEKLRATHRVLSSEYGNMSSACVLF
Grape	(275)	ISKNIEKSLVEAFKPLGISDWNISLFWIAHPGGPAILDOVEKLGKLEKLRATHRVLSSEYGNMSSACVLF
Petunia_ChsA	(275)	ISKNIEKSLMEAFKPLGISDWNISLFWIAHPGGPAILDOVEKLGKLEKLRATHRVLSSEYGNMSSACVLF
Petunia_ChsD	(275)	ISKNIEKSLVEAFKPLGISDWNISLFWIAHPGGPAILDOVEKLGKLEKLRATHRVLSSEYGNMSSACVLF
Petunia_ChsJ	(275)	ISKNIQKSLVEAFKPLGISDWNISLFWIAHPGGPAILDOVEKLGKLEKLRATHRVLSSEYGNMSSACVLF
Strawberry	(275)	ISKNIEKSLMEAFKPLGISDWNISLFWIAHPGGPAILDOVEKLGKLEKLRATHRVLSSEYGNMSSACVLF
Mangosteen	(276)	ISKNIEKSLVEAFKPLGISDWNISLFWIAHPGGPAILDOVEKLGKLEKLRATHRVLSSEYGNMSSACVLF

Figure 21 Protein sequence alignment of mangosteen CHS with other CHS proteins.

The active site consensus sequence is underlined. Identical residues are shown in black, conserved residues in dark grey and similar residues in light grey. The accession numbers of these proteins in the GenBank database are as follows; *Arabidopsis*, NP_196897; apple, BAB92996; grape, BAB84112; petunia (chsA), CAA32731; petunia (chsD), CAA32733; petunia, (chsJ), CAA32737; strawberry, AAX99413; mangosteen, ACM62742.

```

Arabidopsis (281) ISKNIVKSLDEAFKPLGISDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIKLGLKEEKKRATRHLSEYGNMSSACVLF
Apple (275) ISKNIEKSLNEAFKPLGISDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEAKLALKEKLEATRQVLSYGNMSSACVLF
Grape (275) ISKNIEKSLVEAFKPLGISDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIKLGLKEEKLRAIRHVLSEYGNMSSACVLF
Petunia_ChA (275) ISKNIEKSLDEAFKPLGISDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIKLGLKEKLEKATRNVLSDYGNMSSACVLF
Petunia_ChD (275) ISKNIEKSLVEAFKPLGISDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIKLGLKEKLEKATRNVLSEYGNMSSACVLF
Petunia_ChJ (275) ISKNIEKSLVEAFKPLGISDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIKLGLKEKLEKATRNVLSEYGNMSSACVLF
Strawberry (275) ISKNIEKSLNEAFKPLGISDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEAKLALKEKLEATRHLSEYGNMSSACVLF
Mangosteen (276) ISKNIEKSLVEAFKPLGISDWNSLFWIAHPGGPAILDQVEIKLGLKEEKLRAIRHVLSEYGNMSSACVLF

Arabidopsis (351) ILDEMRKSAKDGVAATTGEGLEWGVLEFGPGGLTVETVVLHSLVPL-----
Apple (345) ILDEVRRKSAEKGLKTTGEGLEWGVLEFGPGGLTVETVVLHSLVGLTA-----
Grape (345) ILDEMRKKSIEEGKGTGEGLEWGVLEFGPGGLTVETVVLHSLATQSTH-----
Petunia_ChA (345) ILDEMRKSAKDEGLTTGEGLEWGVLEFGPGGLTVETVVLHSLVAT-----
Petunia_ChD (345) VLDEMRKSSAQKGFDTTGEGLKQGVLEFGPGGLTFETVVLHSLVSTQGSFGIRDWDYNFGIEFKIIPYIL
Petunia_ChJ (345) ILDEMRKSSKDEGLTTGEGLEWGVLEFGPGGLTVETVVLHSLVST-----
Strawberry (345) ILDEVRRKSAANGHKTTGEGLEWGVLEFGPGGLTVETVVLHSLVSA-----
Mangosteen (346) ILDEMRKKALEEGKPTTGEGLDWGVLEFGPGGLTVETVVLHSLVPTETRA-----

Arabidopsis (396) -----
Apple (392) -----
Grape (394) -----
Petunia_ChA (390) -----
Petunia_ChD (415) VLGIS
Petunia_ChJ (390) -----
Strawberry (390) -----
Mangosteen (395) -----

```

Figure 21 (Continued).

```

1  ATATTTTATCCTTTGGTTATCTCCAGCAACGTGCAGGGAACATGGCTACTGAAGTGGTG  60
    M A T E V V
61  ATGGTGGATGAAGTGTCAATCCACCCAGATTACTACCACCAAGCCTTTATCTCTCCTT  120
    M V D E V S F P P Q I T T T K P L S L L
121  GGCCATGGAATGACGGACATCGAGATACACTTTCTCCAGATTAAGCTCACAGCAATAGGA  180
    G H G M T D I E I H F L Q I K L T A I G
181  GTGTACTTGGAGCCCGAAGTGCTGAGCCATTTGCAGAAATGGAAGGGCAAACCCGGAAT  240
    V Y L E P E V L S H L Q K W K G K P G N
241  GAACCTTGCTGAGAATGACGAATCTTTGATGCTCTCATTGCAGCTCCTGTTGAGAAGTTC  300
    E L A E N D E F F D A L I A A P V E K F
301  CTGAGGGTTGTGATTATAAAGGAGATAAAAGGTTCAATATGGGGTGCAGCTAGAGAGC  360
    L R V V I I K E I K G S Q Y G V Q L E S
361  TCCGTGAGGGATAGACTCGCAGAAGAGGATAAGTACGAGGAAGAGGGAAGAGGCGTTG  420
    S V R D R L A E E D K Y E E E E E A L
421  GAGAAAATTGTCGAGTTCTTCAATCCAAGTACTTAAAGAAACACTCTGTATCATCCTTC  480
    E K I V E F F Q S K Y L K K H S V I T F
481  CATTTCCAGTAACCTTCAACCCACTGCCGAGATTGTGGTTTCCACAGAAGGGAAGAGGAT  540
    H F P V T S P T A E I V V S T E G K E D
541  AGCAAGATTTTGGTGGAGAATGCAAATGTGGTGGAGATGATCAAGAGGTGGTATTTAGGT  600
    S K I L V E N A N V V E M I K R W Y L G
601  GGAACCAGGGGGTGTCCCTTCAACCATTTCTTGCCTGGCTAATGCACTCTCTGCTGAG  660
    G T R G V S P S T I S C L A N A L S A E
661  TTGGCCAAATGAACGCTATCAGGGTGTTCTTGGGTTGTTTGCTGCTGATTTATGTACGAT  720
    L A K
721  GATGGCAGTTTGATTTTAGTCATTATTAGAGACTTGGTTTTGTTGCTTGGGTTCTCTCTT  780
781  GCTACTATGGATATGAATTACTCTTGAGTGTTTTTAAAAAAAAAAAA  826

```

Figure 22 Nucleotide sequence of the gene encoding CHI from mangosteen with its deduced amino acid sequence. The underlined letters indicate the translation start site (ATG).

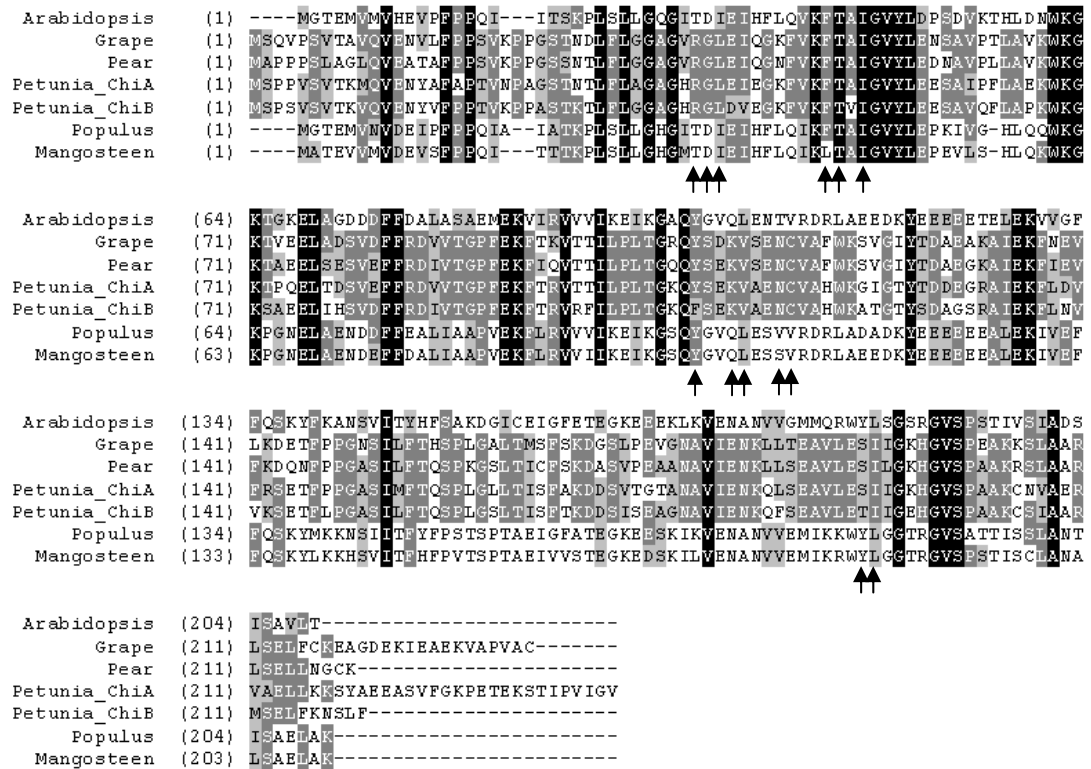


Figure 23 Protein sequence alignment of mangosteen CHI with other CHI proteins.

The active site consensus sequences are indicated by arrows. Identical residues are shown in black, conserved residues in dark grey and similar residues in light grey. The accession numbers of these proteins in the GenBank database are as follows; *Arabidopsis*, NP_568154; grape, CAA53577; pear, ABQ08639; petunia (chiA), AAF60296; petunia (chiB), CAA32730; Populus, XP_002325926; mangosteen, ACM62743.

```

1  CCATAAGAGAGATAACCAAACCTATATGGCTCCTACCCCAACAACACTTACCGCTCTTGAA 60
      M A P T P T T L T A L E
61  GGAGAGACAATCCTTCGAGCCAGCTTTGTAAGGGATGAAGATGAACGTCCCAAAGTGCCA 120
      G E T I L R A S F V R D E D E R P K V A
121 TATAACCAATTTAGCAATGACGTTCTGTGATTTCACTTGAAGGGATTGATGAAGGTGGC 180
      Y N Q F S N D V P V I S L E G I D E G G
181 CAAAAAAGGGCTGAGATTTGTAAGAAAATTGTTGAGGCTTGTGAGGAATGGGGGATTTTC 240
      Q K R A E I C K K I V E A C E E W G I F
241 CAAGTGGTTGACCATGGTGTGATACTAAGCTTGTCTGAAATGACACGTTTGGCTAGG 300
      Q V V D H G V D T K L V S E M T R L A R
301 GCATTCTTTGCCTTGCCACCAGAGGAAAAGCTCCGATTGATATGTCCGGTGGTAAAAAG 360
      A F F A L P P E E K L R F D M S G G K K
361 GGTGGTTTCATTGTCTCCAGTCATTTGCAGGGAGAGGCAGTGCAAGATTGGCGTGAGATA 420
      G G F I V S S H L Q G E A V Q D W R E I
421 GTGACATATTTCTCATACCAACGAGGACCCGTGACTACTCAAGGTGGCCCGATAAACCC 480
      V T Y F S Y P T R T R D Y S R W P D K P
481 GATGGCTGGGTGGACGTCACCAAGGACTATGGTGACCAGCTCATGGGCCTGGCCTGCAAA 540
      D G W V D V T K D Y G D Q L M G L A C K
541 CTCCTGGAGGTCCTATCTGAGGCCATGGGATTGGAAGGAGGCCCTTGACTAAGGCCTGT 600
      L L E V L S E A M G L E K E A L T K A C
601 GTGGACATGGACCAGAAGATTGTGGTCAATTATTATCCCAAGTGTCACAACCAGACCTC 660
      V D M D Q K I V V N Y Y P K C P Q P D L
661 ACTCTTGGGCTGAAGAGGCACACTGACCCAGGCACTATTACTCTATTGCTTCAGGACCAA 720
      T L G L K R H T D P G T I T L L L Q D Q
721 GTTGGTGGGCTTCAGGCCACTAGAGATAATGGAGAGACTTGGATTACTGTTTCAGCCCATT 780
      V G G L Q A T R D N G E T W I T V Q P I
781 GAAGGTGCTTTTGTGTCAATCTTGGTGATCATGGCCATTTCTTAGCAATGGAAGGTTT 840
      E G A F V V N L G D H G H F L S N G R F
841 AGAAATGCTGACCATCAAGCAGTGGTCAACTCAAATTGTAGCCGATTGTCCATAGCAACA 900
      R N A D H Q A V V N S N C S R L S I A T
901 TTCCAGAACCCAGCCCCAGATGCAATTGTTTATCCACTAAAGATAAGGGAAGGAGAGAAA 960
      F Q N P A P D A I V Y P L K I R E G E K
961 TCAATTCTTGAGGAGCCAATCACATTCTCTGAGATGTACAGGAGGAAAATGGCCAAGGAC 1020
      S I L E E P I T F S E M Y R R K M A K D
1021 TTGGAATTAGCCAGGCTTAAGAAGCTTGCTAAGGAGCAGCAATTGACGGACGTTGAGAAA 1080
      L E L A R L K K L A K E Q Q L T D V E K
1081 GCTAAGTTGGAGGCCAAGCCCATCGAAAAGATCCTTGCTTAAATGCTATAAACTACAAC 1140
      A K L E A K P I E K I L A
1141 ATTTTATAGTGATCTACTTGGATCCTATATTTGCACGCTTCACTGTAATTTTTCATGTT 1200
1201 ATTGTAATGCTTTTCGGTAAGGAAATGCGTTTCCGTGTGCTTGTGCTGGGAAAAATGAGA 1260
1261 TATGGGAACCGTTTTTCTAAATAAAAGAATTTTATTCGTTACCTTAAAAAAAAAAAAA 1310

```

Figure 24 Nucleotide sequence of the gene encoding F3H from mangosteen with its deduced amino acid sequence. The underlined letters indicate the translation start site (ATG).

Arabidopsis	(1)	--MA <u>GGTL</u> TELAGEKLSKFWRDERPKVAYNVSDEIPVISLAGIDDVCKRKEICRQIVHACENMG
Apple	(1)	MAPPATTLTSLAHEKTLQOKFVRDERPKVAYNEFSNEIPISLAGIDEVEGRRAEICKKIVEACEDWG
Black raspberry	(1)	MAPTPPTLTALAGEKTLQSFVRDERPKVAYNQFSNEIPISLSGIDEVEGRRAEICKKIVEACEDWG
Citrus	(1)	--MAPSTLTALAGEKTLNPSFVRQDERPKVAYNEFSNEIPVISLAGIDDVCKRKEICKKIVEACEDWG
Grape	(1)	--MAPTTLTALAGEKTLQSFVRDERPKVAYNDFSNIPVISLAGEIDEVGGRRDEICKKIVEACEDWG
Kiwifruit	(1)	--MAPTTLTALAGEKTLQSFVRDERPKVAYNVSSEIPVISLAGIDEVDGRRSEICKKIVEACEDWG
Petunia	(1)	--MAPSTLTALAGEKTLQTSFVRDERPKVAYNQFSNEIPISLAGEIDDETCKRAEICKKIVEACEDWG
Strawberry	(1)	MAPTPPTLTALAGEKTLQSFVRDERPKVAYNQFSNDIPISLSGIEVEGRRAEICKKIVEACEDWG
Mangosteen	(1)	MAPTPPTLTALAGEKTLQSFVRDERPKVAYNQFSNDVVISLAGEIDEGGKRAEICKKIVEACEDWG
Arabidopsis	(69)	IPQVVDHGVDNLELVADMTRLANDFFALPPEEKLFDMSGGKGGFIVSSHLQGEAVQDWREIVTYFSYEV
Apple	(71)	IPQIVDHGVDNELISEMTGLAKEFFDLPEEKLFDMSGGKGGFIVSSHLQGEAVQDWREIVTYFLYPI
Black raspberry	(71)	VPQIVDHGVDKLLISEMTTRLANDFFALPPEEKLFDMSGGKGGFIVSSHLQGEAVQDWREIVTYFSYEV
Citrus	(69)	IPQVVDHGVDKLLISDMTRLATEFFALPPEEKLFDMSGGKGGFIVSSHLQGEAVQDWREIVTYFSYEV
Grape	(69)	IPQVVDHGVDNLEISEMTRLAREFFALPPEEKLFDMSGGKGGFIVSSHLQGEAVQDWREIVTYFSYEV
Kiwifruit	(70)	IPQVVDHGVDKLLVSEMTRLANDFFALPPEEKLFDMSGGKGGFIVSSHLQGEAVQDWREIVTYFSYEV
Petunia	(69)	VPQVVDHGVDNELISQMTFAKEFFALPPEEKLFDMSGGKGGFIVSSHLQGEAVQDWREIVTYFSYEV
Strawberry	(71)	VPQIVDHGIDPELLISEMTRLAREFFALPPEEKLFDMSGGKGGFIVSSHLQGEAVQDWREIVTYFSYEV
Mangosteen	(71)	IPQVVDHGVDNLELVSEMTRLAREFFALPPEEKLFDMSGGKGGFIVSSHLQGEAVQDWREIVTYFSYEV
Arabidopsis	(139)	RMRDYSRWPDKPEGWVKTEBYSERLMSLACKLLEVLSEAMGLEKEALTRACVDMQKVVVNYPKCPQP
Apple	(141)	RHRDYSRWPDKPEAWREYTKKYSDELMSGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTRACVDMQKVVVNYPKCPQP
Black raspberry	(141)	RHRDYSRWPDKPEGWRAVTCQYSDELMSGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTRACVDMQKVVVNYPKCPQP
Citrus	(139)	QSRDYSRWPDKPEGWMEVTKKYSDELMSGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTRACVDMQKVVVNYPKCPQP
Grape	(139)	RHRDYSRWPDKPEGWRSVTQBYSEKLMGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTRACVDMQKVVVNYPKCPQP
Kiwifruit	(140)	RHRDYSRWPDKPEGWRAVTCQYSDELMSGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTRACVDMQKVVVNYPKCPQP
Petunia	(139)	RHRDYSRWPDKPEGWIAVTCQYSDELMSGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTRACVDMQKVVVNYPKCPQP
Strawberry	(141)	RHRDYSRWPDKPEGWMDVTCQYSDELMSGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTRACVDMQKVVVNYPKCPQP
Mangosteen	(141)	RHRDYSRWPDKPEGWMDVTCQYSDELMSGLACKLLEVLSEAMGLEKEALTRACVDMQKVVVNYPKCPQP
Arabidopsis	(209)	DLTLGLKRHTDPGTITLLQDQVGGGLQATRDGGKTWITVQFVEGAFVVLNLDHGHLSNGRFPKNADHQAV
Apple	(211)	DLTLGLKRHTDPGTITLLQDQVGGGLQATRDGGKTWITVQFVEGAFVVLNLDHGHLSNGRFPKNADHQAV
Black raspberry	(211)	DLTLGLKRHTDPGTITLLQDQVGGGLQATRDGGKTWITVQFVEGAFVVLNLDHGHLSNGRFPKNADHQAV
Citrus	(209)	DLTLGLKRHTDPGTITLLQDQVGGGLQATRDGGKTWITVQFVEGAFVVLNLDHGHLSNGRFPKNADHQAV
Grape	(209)	DLTLGLKRHTDPGTITLLQDQVGGGLQATRDGGKTWITVQFVEGAFVVLNLDHGHLSNGRFPKNADHQAV
Kiwifruit	(210)	DLTLGLKRHTDPGTITLLQDQVGGGLQATRDGGKTWITVQFVEGAFVVLNLDHGHLSNGRFPKNADHQAV
Petunia	(209)	DLTLGLKRHTDPGTITLLQDQVGGGLQATRDGGKTWITVQFVEGAFVVLNLDHGHLSNGRFPKNADHQAV
Strawberry	(211)	DLTLGLKRHTDPGTITLLQDQVGGGLQATRDGGKTWITVQFVEGAFVVLNLDHGHLSNGRFPKNADHQAV
Mangosteen	(211)	DLTLGLKRHTDPGTITLLQDQVGGGLQATRDGGKTWITVQFVEGAFVVLNLDHGHLSNGRFPKNADHQAV
Arabidopsis	(279)	VNSNSRLSIAATFQNPAPDAIVYPLKIREGEKPLEEPITFAEMYRKMKGRDLELARKKLAKNEERDHKE
Apple	(281)	VNSNSRLSIAATFQNPAPDAIVYPLSVREGEKPLEEPITFAEMYRKMKDLELARKKLAKNEEQQLQDL
Black raspberry	(281)	VNSNSRLSIAATFQNPAPDAIVYPLKIREGEKPLEEPITFAEMYRKMKDLELARKKLAKNEEQQLQDL
Citrus	(279)	VNSNSRLSIAATFQNPAPDAIVYPLKIREGEKPLEEPITFAEMYRKMKDLELARKKLAKNEEQQLQDL
Grape	(279)	VNSNSRLSIAATFQNPAPDAIVYPLKIREGEKPLEEPITFAEMYRKMKDLELARKKLAKNEEQQLQDL
Kiwifruit	(280)	VNSNSRLSIAATFQNPAPDAIVYPLKIREGEKPLEEPITFAEMYRKMKDLELARKKLAKNEEQQLQDL
Petunia	(279)	VNSNSRLSIAATFQNPAPDAIVYPLKIREGEKPLEEPITFAEMYRKMKDLELARKKLAKNEEQQLQDL
Strawberry	(281)	VNSNSRLSIAATFQNPAPDAIVYPLKIREGEKPLEEPITFAEMYRKMKDLELARKKLAKNEEQQLQDL
Mangosteen	(281)	VNSNSRLSIAATFQNPAPDAIVYPLKIREGEKPLEEPITFAEMYRKMKDLELARKKLAKNEEQQLQDL
Arabidopsis	(349)	-----VAKPVDCIFA
Apple	(351)	EK---AKYETKEADDIFA
Black raspberry	(351)	--EK-AKLEVKQVDDIFA
Citrus	(349)	K----AKLDAKPIEEDIFA
Grape	(349)	EKA-KLE--SKEDQIDA
Kiwifruit	(350)	ELEK-AKLGAGVVEIFA
Petunia	(349)	VAAEKAKLESKPIEEDIFA
Strawberry	(351)	K----TKLEAKPVDDIFA
Mangosteen	(351)	EK---AKLEAKPIEKIDA

Figure 25 Protein sequence alignment of mangosteen F3H with other F3H proteins.

Five motifs conserved in flavanone 3-hydroxylases are underlined.

Identical residues are shown in black, conserved residues in dark grey and similar residues in light grey. The accession numbers of these proteins in the GenBank database are as follows; Arabidopsis, AAC49176; apple, BAB92997; black raspberry, ABY84868; citrus, BAA36553; grape, ABM67589; kiwifruit, ACL54955; petunia, AAC49929; strawberry, AAU04792; mangosteen, ACM62745.

```

1  ATCCTGTGCTTCTCCTTCAAAAGTCTCTATCCTGTACTTCTCCTTCAATATAAAATCAAA  60
61  AATAGGAAGTTTACTAAACAAAAGGAGGAAACACAATGTCTCCTTTTATTCTCTACTCCA  120
      M S P F I L Y S
121 TTCTAATAGCAATACTCGTCTACGTTCTCATAAAGTTGGGTTCTCTCAGTAGTGGTCGTC  180
      I L I A I L V Y V L I K L G S L S S G R
181 GCCTACCACCAGGCCAAGACCTTACCTCTTGTGGGGAACCTACCGCACTTGGGCTCAA  240
      R L P P G P R P L P L V G N L P H L G S
241 TGCCTCACCACTCCATTGCTCATTAGTCAAGAAATATGGGCCTCTAATGTACCTCAGGC  300
      M P H Q S I A S L V K K Y G P L M Y L R
301 TAGGCTATGTGGACGTTGTAGTGGCGGCTCTGCGTCGGTCGCGGCCCAAATTTTTAAAA  360
      L G Y V D V V V A A S A S V A A Q I F K
361 ACCATGACGCCAATTTTTCCAGCCGCCCCCCCAATTCCGGTGCCAAATACGTAGCGTACA  420
      N H D A N F S S R P P N S G A K Y V A Y
421 ATTACCATGACCTTGTTTTTGCACCGTACGGGCCAAGGTGGCGCATGCTTAGGAAGATCA  480
      N Y H D L V F A P Y G P R W R M L R K I
481 GTTCCGTCACCTCTTCTCCAACAAGGCATTGGATGACTTTAGGCACATTCGAGAGGCAG  540
      S S V H L F S N K A L D D F R H I R E A
541 AGTTGGCAGTGCTGACACAAACACTAGCAAGTGCGGGCAAGCACCTGTAAACTTGGGGC  600
      E L A V L T Q T L A S A G K A P V N L G
601 AACTACTAAATGTGTGCACCACCAACGCCCTAGGCCGGGTAAATGGTGGGGAGGAGGGTAT  660
      Q L L N V C T T N A L G R V M V G R R V
661 TCAACGACGGCGTTGATCCAAAGGCAAGTGATTTCAGGACATGACATTGGAGCTAATGC  720
      F N D G V D P K A S D F K D M T L E L M
721 AATTGGCGGGTGTGTTTAAACATTGGTGATTTTGTCTGCATTGGAGTGGCTGGACTTAC  780
      Q L A G V F N I G D F V P A L E W L D L
781 AAGGAGTGGCATCTAAAATGAAAAGGCTACACAAGAGGTTTGATGATTTTTTGACTACCA  840
      Q G V A S K M K R L H K R F D D F L T T
841 TCGTGGAAGAGCACAGGAACGGGGGTCAAGAAAAGCATGTGGACTTGTGAGCACGTTGA  900
      I V E E H R N G G Q E K H V D L L S T L
901 TTTGTTAAAAGATAATGCTGATGGTGACGGTGAAAGCTCACAGACACCGAAATTAAG  960
      I S L K D N A D G D G G K L T D T E I K
961 CATTGCTTTTGAATTTTTTTTACTGCTGGGACCGACACATCATCAAGCACAGTGGGAATGGG  1020
      A L L L N F F T A G T D T S S S T V E W
1021 CTATTGCAGAATTCTTAGGCATCCAAAATCTTGACCCAGGTCCAAAGAGAGCTGGATT  1080
      A I A E L L R H P K I L T Q V Q R E L D
1081 CTGTTGTGGGCCGAGATCGTCTCGTTAGCGACTTGACCTACCCCAACTCACTTACCTTA  1140
      S V V G R D R L V S D L D L P Q L T Y L
1141 GTGCTGTTATTAAAGAGACATTTTCGGCTCCACCCATCGACGCCCTATCACTGCCTCGAA  1200
      S A V I K E T F R L H P S T P L S L P R

```

Figure 26 Nucleotide sequence of the gene encoding F3'H from mangosteen with its deduced amino acid sequence. The underlined letters indicate the translation start site (ATG).

```

1201  TGGCGGCTGAGAGTTGCGAAATCGACGGCTATCATATTCCGAAAGGTGCAACCCCTTTTGG  1260
      M A A E S C E I D G Y H I P K G A T L L

1261  TTAATGTATGGGCCATAGCACGTGACCCAGATGTGTGGGCCGAGCCTTTGGTGTTCATGC  1320
      V N V W A I A R D P D V W A E P L V F M

1321  CCGAAAGGTTTCTACCTGGTGGAGAAAAGGCCAAAGTTGATGTGAGGGGCAATGACTTTG  1380
      P E R F L P G G E K A K V D V R G N D F

1381  AGCTTATTCCATTCGGTGGTGGTAGGAGAATTTGTGCCGGTTTGAGTTACGGATTGCGTG  1440
      E L I P F G G G R R I C A G L S Y G L R

1441  TAGTTTATTTAATGGCTGCCACGTTACTCCATGCATTTGATTGGGAACTGGCCAATGGAT  1500
      V V Y L M A A T L L H A F D W E L A N G

1501  TGATTCCTGAAAAGTTAAACATGGATGAAGCCTATGGATTGACCCTTCAGCGAGCTGCTC  1560
      L I P E K L N M D E A Y G L T L Q R A A

1561  CCTTAATGGTGCACCCTAAGCCAAGGTTAAGCCCTCAGGCTTACAAAGCAAAAAATTGAA  1620
      P L M V H P K P R L S P Q A Y K A K N

1621  GAAATACATGTGATAAGCATTGTCTTTATTTAAGCTTATGAATTACGTTAATTAATAAAT  1680

1681  GTCTTTTATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  1711

```

Figure 26 (Continued).

Arabidopsis	(1)	-----MATLFLTILLATVLFLLRIISHRNRSNNRLPPGPNPMPILGNLPHMGTRPHRTL
Antirrhinum	(1)	MQHQYYSLLITMDDISITSLVPCTEIDGFLDLYSFLNR---KVKPLPPGPKMPIVGNLPHLGPFPQSM
Grape	(1)	-----MNPDLALIFCTALFCVLLYHFLTR---RSVRLPPGPKMPIVGNLPHLGEVPHHSI
Pelargonium	(1)	-----MYNMSLYLLLGSSALAFAAVLVDFSPSKSR-----RRLPPGPKMPIVGNLPHMGSMFPHNL
Petunia	(1)	-----MEILSLILYIVIFSEFLQFIDRSFRRK---YPLPLPPGPKMPILGNLPHLGPFPQST
Mangosteen	(1)	-----MSPFLLYSILIAILVYVLLIKGLSLSS---GRRLPPGPRPPLDVLGNLPHLGSMPHQSII
Proline-rich region		
Arabidopsis	(58)	<u>SAMVTIYGFILHLRLGFDVVVAASKSVAEQFLKTHDANFASRPPNSGAKHMAVNYODLVFAPYGRWRRL</u>
Antirrhinum	(68)	<u>AALARVHGPIHLKMGFVHVVAASASVAEKFLKTHDANFSSRPPNSGAKHMAVNYODLVFAPYGRWRRL</u>
Grape	(53)	<u>AALAKTYGPIHLRLMGFDVVVAASASVAAQFLKTHDANFSSRPPNSGAKHMAVNYODLVFAPYGRWRRL</u>
Pelargonium	(58)	<u>AAMARTYGFILVHLRLGFDVVVAASASMASQFLKTHDANFSSRPPNAGAKHMAVNYODLVFAPYGRWRRL</u>
Petunia	(58)	<u>AAMARTYGFILVHLRLGFDVVVAASASVAAQFLKTHDANFSSRPPNSGAKHMAVNYODLVFAPYGRWRRL</u>
Mangosteen	(55)	<u>ASLVKKYGFILVHLRLGFDVVVAASASVAAQIFKTHDANFSSRPPNSGAKHMAVNYODLVFAPYGRWRRL</u>
Proline-rich region		
Arabidopsis	(128)	<u>LRKISVHLFSKALDDFRHVRQEVGTLTRELVRVGTKPVNLGQLVNMVNVNAGREMHGRRFGADA-</u>
Antirrhinum	(138)	<u>LRKICALHLFSKALDDFTHVRODEVGILTRELVDAGETPLKLGQMMNLCATNALRVMLGRRVYGHADS</u>
Grape	(123)	<u>LRKICSVHLFSKALDDFRHVRQEVAVLTPALARAGQTPVNLGQLNVCTTNALGRVMIGRRVFGDCSG</u>
Pelargonium	(128)	<u>PRKITSIHLFSKALDDYRHVRQEVGLASNLARAVSTIVNLGQLNLCATNALGRVAVTKKVFKDQTD</u>
Petunia	(128)	<u>LRKICSVHLFSKALDDFRHVRQDEVKTLTALASAGQKPVNLGQLNVCTTNALGRVMIGRRVFGDCSG</u>
Mangosteen	(125)	<u>LRKISVHLFSKALDDFRHVRQEAELAVLTQTLSAGKAPVNLGQLNVCTTNALGRVMIGRRVFGDCV-</u>
Proline-rich region		
Arabidopsis	(197)	--DHKADFFRSMVTEMMALAGVFNIGDFVPSLDLMDLQGVAKMKKLHRRFDFLSSILKEHEMNGQD--
Antirrhinum	(208)	---KAEFFKAMVVELMVLAVGFNIGDFVPELPELKLQGVIAKMKKLHRRFDFLSKILBDHKINSSDET
Grape	(193)	GEDPKADEFKEMVVELMVLAVGFNIGDFVPALBMLDLQGVAAKMKKLHRRFDFLGAIVPEHKTSSGAGS
Pelargonium	(198)	DVDPKADEFKSMVVELMVLAVGFNIGDFIPBLDCLDLQGVASKMKKLHRRFDFLSAILQEHNLNSAAS-
Petunia	(198)	DVDEQAEFKSMVVELMVLAVGFNIGDFIPBLNMLDLQGVAAKMKKLHRRFDFLTDILEEHGKIFG--
Mangosteen	(194)	--DPKASDFKDMTEEMQLAGVFNIGDFVPALBMLDLQGVASKMKKLHRRFDFLTTIVEEHRNGSQE--
Proline-rich region		
Arabidopsis	(263)	<u>QKHTDMLSTLISLKGTDLDGCGSLTDTEIKALLNMFPTAGTDTTSASTVDMAIAELIRHPDLMVKAQBEL</u>
Antirrhinum	(274)	<u>KGHSDDLMLISLKDA-DDAEGGRLTDVEIKALLNMFPTAGTDTTSSTVEWCAIAELVRHPEILACVQREL</u>
Grape	(263)	<u>ERHVDLLSTLISVRDN-ADCEGGRLTDVEIKALLNMFPTAGTDTTSSTVEWCAIAELIRHPBMMAQAQREL</u>
Pelargonium	(267)	<u>-ATPSMLTTLISLKDSEDEGGRLTDTEIKALLNMFPTAGTDTTSSTVEWCAIAELTROPEILIRAOEIL</u>
Petunia	(266)	<u>-EMKDLLSTLISLKNDDADNDGGRLTDTEIKALLNMFPTAGTDTTSSTVEWCAIAELIRHPKILACQAQREL</u>
Mangosteen	(260)	<u>-KHVDLLSTLISLKN-ADCEGGRLTDTEIKALLNMFPTAGTDTTSSTVEWCAIAELIRHPKILTVQREL</u>
Oxygen-binding pocket		
Arabidopsis	(333)	<u>DIWVGGRDRLVNESDIALQPLQLQAVIKENFRLHPSTPLSLPRLASCEINGYIPKCSSTLLNVMAIARD</u>
Antirrhinum	(343)	<u>DSVVGKNRVVKADLAGLPPLQAVVKNFRHLHPSLPLSLPRLASCEINGYIPKCSSTLLNVMAIARD</u>
Grape	(332)	<u>DAVVGSRRLVTDLDLPQLTVOAIIKETFRHLHPSLPLSLPRLMAESCEINGYIPKNATLLNVMAIARD</u>
Pelargonium	(336)	<u>DSVVGGRDRLVTELDLKLPLQLQAVKETFRHLHPSLPLSLPRLATQCEINGYIPKCATLLNVMAIARD</u>
Petunia	(335)	<u>DKVVGGRDRLVGELDLAQLTYLEAVKETFRHLHPSLPLSLPRLASCEINGYIPKCSSTLLNVMAIARD</u>
Mangosteen	(328)	<u>DSVVGGRDRLVSDLDLPQLTQLSAVIKETFRHLHPSLPLSLPRLMAESCEINGYIPKCATLLNVMAIARD</u>
Oxygen-binding pocket		
Arabidopsis	(403)	<u>PNQWSDPLAFKPRERFLGGSEKSGVDVNGSDFELIPFGAGRRICAGLSLGRITICQLTATLVQGFDMELAG</u>
Antirrhinum	(413)	<u>PNVWDEPLEFRPRERFLGGSEKPNVDVNGDPELIPFGAGRRICAGMSLGRIMVQLLTATLTHAEDFDLAD</u>
Grape	(402)	<u>PEVWDEPLEFRPRERFLGGSEKPNADVNGDPEVIFPGAGRRICAGMSLGRIMVHLLTATLVHAFNWDPEE</u>
Pelargonium	(406)	<u>PDVWADPLEFRPRERFLGGSEKPNVDVNGDPELIPFGAGRRICAGMSLGRIMVQLLTATLTHAFNWDPEQ</u>
Petunia	(405)	<u>PNWADPLEFRPRERFLGGSEKPNVDVNGDPEVIFPGAGRRICAGNLSLRIMVQLLTATLTHAFNWDPEQ</u>
Mangosteen	(398)	<u>PDVWAEPLVFMPEFRFLGGSEKAKVDVNGDPELIPFGAGRRICAGLSYSLRVVYLMATLTHAEDFELAN</u>
Heme-binding region		
Arabidopsis	(473)	<u>GVTPKELNMEESYGLTLQRAVPLVHHPKRLAPNVYGLGSG</u>
Antirrhinum	(483)	<u>GQLPESLNMEESYGLTLQRADPLVHHPKRLAPHVYQT---</u>
Grape	(472)	<u>GVVAEKLNMDEYGLTLQRAAPLVHHPKRLSPQVFGK---</u>
Pelargonium	(476)	<u>GQIFQELNMDEYGLTLQRASPLHVRPFRPLPSHLY----</u>
Petunia	(475)	<u>GQLPEMLNMEESYGLTLQRADPLVHHPKRLPEACAVIG---</u>
Mangosteen	(468)	<u>GLIPEKLNMDEYGLTLQRAAPLVHHPKRLSPQAVKAKN-</u>

Figure 27 Protein sequence alignment of mangosteen F3'H with other F3'H proteins. The proline-rich region, oxygen-binding pocket and heme-binding region are underlined. Identical residues are shown in black, conserved residues in dark grey and similar residues in light grey. The accession numbers of these proteins in the GenBank database are as follows; *Arabidopsis*, AAG16746; *antirrhinum*, ABB53383; *grape*, CAI54278; *pelargonium* AAG49315; *petunia* AAD56282; *mangosteen*, ACM62746.

```

1  GCTCTCTGCCTAGCTGTATTTCTTGTTGACCATATTTTGTACCCAATTATTCATCTTTA 60
61  AAAATTCATGGGTTCCCAAAATGAAATTGTATGTGTACCGGGGCATCAGGGTTCATCGG 120
      M G S Q N E I V C V T G A S G F I G
121  GTCATGGCTCGTCATGAGACTTCTTGAAAGGGGTATACGGTTAGAGCCACTGTCCGTGA 180
      S W L V M R L L E R G Y T V R A T V R D
181  TCCTGATAACGCAAAGAAGGTGCAACATTTGTTGGAGTTACCTAAAGCCAAGACGCACTT 240
      P D N A K K V Q H L L E L P K A K T H L
241  GACACTGTGGAAGCTGAACTTGAATTGAAGGAAGCTTTGATGAAGCGATTCAAGGGTG 300
      T L W K A E L G I E G S F D E A I Q G C
301  CTCGGTGTGTTCCATGTTGCCACCCCTATGGACTTTGAGTCCAAGGACCCGGAGAATGA 360
      S G V F H V A T P M D F E S K D P E N E
361  AGTGATAAAGCCAACATTGATGGGATGATTGACATATTGAAATCATGTGCCAAAGCCAA 420
      V I K P T I D G M I D I L K S C A K A K
421  GGTGCGTAGGATAGTGTTCACTGCGTCTGCTGGTGCATTGGACGTGGAAGAGCATCGGAG 480
      V R R I V F T A S A G A L D V E E H R R
481  GCCTGTCTATGATGAGAATTGTTGGAGTGACTTGAATTTATCAACTCCGTCAAATGAC 540
      P V Y D E N C W S D L E F I N S V K M T
541  AGGATGGATGTATTTCTGCTCCAAGACAAAGGCGGAGAGAGCAGCATGGAAGTTTGCAA 600
      G W M Y F V S K T K A E R A A W K F A K
601  AGAGAACAACCTTGATTTTCATTAGTATAATCCCATCTCTTGTTGTTGGTCTTTTCATCAT 660
      E N N L D F I S I I P S L V V G P F I M
661  GCAATCAATGCCACCTAGCCTTATCAGTGCCCTCGCTCTAATTACTGGAATGAAGGTCA 720
      Q S M P P S L I S A L A L I T G N E G H
721  CTACACAATTCTGAAGCAAGGCCACTACGTGCACTTGGATGACCTAGTCGAGTCACATAT 780
      Y T I L K Q G H Y V H L D D L V E S H I
781  TTACCTGTACGAGAATCCAAAGGCAGAGGGAAGGTACATTTGCTCTAATTACGACGTCAA 840
      Y L Y E N P K A E G R Y I C S N Y D V N
841  CATTTTTGAACCTTGCCAATATGCTCAACAAGAAGTATCCAGAGTACAACATCCCCACCAC 900
      I F E L A N M L N K K Y P E Y N I P T T
901  GTTCAAGGGGATTGAGGAGAAGTTGCCAAGTGTGATTTTCTCTTCCAAGAAATTGTTGGA 960
      F K G I E E N L P S V I F S S K K L L D
961  CCATGGATTTGAATTCAAGTACACCCTGGATGACATGTTTCAGGGAGCCGTTGAAACCTG 1020
      H G F E F K Y T L D D M F Q G A V E T C
1021  TCGGAAAAAGGGATTGATTCCACTTTCTCATTTTAATAATGATGCAAAATAAATGGATGG 1080
      R K K G L I P L S H F N N D A K
1081  AGTACAAAACATCGCAAGCATAAATATTTGTTTCGATGTTTTATCCTTGGAGGATGTGAC 1140
1141  CAGTGAGACAGTCAGTAATAAGTAACATTGTTTATGCCAGATTTTATAAAATAAAATGT 1200
1201  CCACGGTACTTCCTTGGATGAAAAAAAAA 1229

```

Figure 28 Nucleotide sequence of the gene encoding DFR from mangosteen with its deduced amino acid sequence. The underlined letters indicate the translation start site (ATG).

Arabidopsis	(1)	-----NYSQKETVCVTGASGFIGSWLVMRLLEHGYTVRATVRDPGNKKVQHLLDLPKAKTQLTTL
Apple	(1)	-----MGSSESVCVTGASGFIGSWLVMRLLEHGYTVRATVRDPTNKKVKHLLDLPKAEHTLTL
Citrus	(1)	-----MGSIAETVCVTGASGFIGSWLIMRLLEHGYTVRATVRDPTNKKVKHLLDLPKAEHTLTL
Grape	(1)	-----MGSQSEVCVTGASGFIGSWLVMRLLEHGYTVRATVRDPTNKKVKHLLDLPKAEHTLTL
Pear	(1)	-----MGSSESVCVTGASGFIGSWLVMRLLEHGYTVRATVRDPTNKKVKHLLDLPKAEHTLTL
Petunia	(1)	MASEAVHAPSPPVAVPTVCVTGAAGFISWLVMLRLEHGYTVRATVRDPTNKKVKHLLDLPKADTNLTL
Strawberry	(1)	-----MGLGAEHGSVCVTGASGFVGSWLVMLRLEHGYTVRATVRDPTNKKVKHLLDLPQAATRLTL
Mangosteen	(1)	-----MGSQNEIVCVTGASGFISWLVMLRLEHGYTVRATVRDPTNKKVQHLLDLPKAKHTLTL
NADPH-binding region		
Arabidopsis	(61)	WKADLSEEGSDDAINGCDGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTVNGMIGIMKACVRAKTVRRFVFTSSAG
Apple	(61)	WKADLADEGSDEAIOGCSGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTINGGLDILKACQKAKTVKLVFTSSAG
Citrus	(61)	WKADLAEENFDEAIGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTINGMYSIMRACKNAKTVRRIVFTSSAG
Grape	(61)	WKADLADEGSDEAIGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTIEGMDIGMKSCAAAKTVRRIVFTSSAG
Pear	(61)	WKADLADEGSDEAIOGCSGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTINGGLDILKACQKAKTVKLVFTSSAG
Petunia	(71)	WKADLTVEGSDEAIOGCSGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTVIRGMDIIESCAKANTVRRIVFTSSAG
Strawberry	(63)	WKADLDVGSDEAIGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTINGMLDIMKACLRAKTVRRIVFTSSAG
Mangosteen	(61)	WKAEELGEGSDEAIOGCSGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTIDGMDILKSCAKAKVRRIVFTASAG
Substrate specificity domain		
Arabidopsis	(131)	TVNVEEHQKNVYDENWSDLEFIMSKKMTGWMYFVSKSLAEKAANDFAEBKGLDFTSIIIPTLVVGPFITTT
Apple	(131)	TVNVEEHQKPYDENWSDVDFCRSVKMTGWMYFVSKTLAEQAANKYAKENNIDFTIIPITLVVGPFITMP
Citrus	(131)	TLDVVEEHKPYVDTSMSDLDFFVRSVKMTGWMYFVSKTLAEQAANKFAENNIDFTSIIPSLVVGPFITTS
Grape	(131)	TVNIQEHQLPYVDESCEWSDMEFCRAKKMTAWMYFVSKTLAEQAANKYAKENNIDFTIIPITLVVGPFITMS
Pear	(131)	TVNVEEHQKPYDENWSDVDFCRSVKMTGWMYFVSKTLAEQAANKYAKENNIDFTIIPITLVVGPFITMP
Petunia	(141)	TLDVQEQQLPYDQTSMSDLDFFIYAKMTGWMYFASKILAEKAAMEBAKKNIDFTSIIPITLVVGPFITFP
Strawberry	(133)	AVAAIEEHKPYVSENNWSDVDFCRKVKMTGWMYFVSKTLAEQAANKFAENNIDFTIIPITLVVGPFITAB
Mangosteen	(130)	ALDVVEEHKPYVDENCWSDLEFFINSVKMTGWMYFVSKTKABRAANKFAENNIDFTSIIPSLVVGPFITDQ
Substrate specificity domain		
Arabidopsis	(201)	SMPPSLITLSPITRNEAHYSIIKQGGVHLDLDCNAHIDLYEQAAAKGRYICSSHDATILTISIFLRLPK
Apple	(201)	SMPPSLITGLSPILRNESHYGIKQGGVHLDLDCLSHIMLYEHFPAKAGRYICSSHDATIELVYKMLREK
Citrus	(201)	SMPPSLITLSPITRNEAHYPIIKQGGVHLDLDCSAHIDLYEHFPAKAGRYICSSHDATIELAKFLREK
Grape	(201)	SMPPSLITLSPITGNEAHYSIIKQGGVHLDLDCNAHIDLYEFPAKAGRYICSSHDATITDLAKMLREK
Pear	(201)	SMPPSLITGLSPILRNESHYGIKQGGVHLDLDCLSHIMLYKHPKAGRYICSSHDATIELVYKMLREK
Petunia	(211)	TFPPSLITLSPITGNEAHYCIKQGGVHLDLDCSAHIDLYEHFPAKAGRYICSSHDATITVDVAKMVRK
Strawberry	(203)	SMPPSLISGLSPITGNEAHYGIKQGGVHLDLDCSHIDLYEHFPAKAGRYICSSHDATITDIAKMLREK
Mangosteen	(200)	SMPPSLISALALITGMEGHYTIKQGGVHLDLDCVESHIDLYEFPAKAGRYICSSNYIVNIFELANMLNKK
Substrate specificity domain		
Arabidopsis	(271)	YPEYNVPTTFEGVDENLKSIEFSSKKLIDMGFMFKYSLEDMFIESIEICRQKGLFLPVLSYQSISEIKVP
Apple	(271)	YPEYNPTTKFGIDNLEPVHFSSKKLREIGFEFKYSLEDMFVGAVDACRAKGLIPIPPAEKTEAAEES
Citrus	(271)	YPEFNVPTEFEDVDENMKNNMLFSSKKLIDLGFEFKYSLEDMFTGAVDTCRAKGLLP--LLCENHVSEVSI-
Grape	(271)	YPEYNPTTFEGVDENLKSIEFSSKKLIDLGFEFKYSLEDMFTGAVDTCRAKGLLRPSHEKPVDGKT---
Pear	(271)	YPEYNPTTKFGIDNLEPVHFSSKKLREIGFEFKYSLEDMFVGAVDACRAKGLIPIPAEKTEAAEESNL
Petunia	(281)	MPYYVPTTFKGIDKDLPVVHFSSKKLIDMGFCFKYLTEDMYKGAIDTCRQKGLLPSTRSAEDNGHNE
Strawberry	(273)	YPKYVPTTKFGIENLTIHFSSKKLIDMGFEFKYSLEDMFTGAVDACREKGLLPPOEEETEKRRAG-
Mangosteen	(270)	YPEYNPTTFKGIEENLPSVIFSSKKLIDHGFEPFKYLTEDDMFQGAVEICRKKGLIPISHFNNDAK----
Substrate specificity domain		
Arabidopsis	(341)	TKNEIIEVKTGDLTDGMKPCNKTETGVTGERTDAPMLAQQMCA
Apple	(341)	NLVDVKVG-----
Citrus	(339)	-----
Grape	(338)	-----
Pear	(341)	VDVKVG-----
Petunia	(351)	AIAISQNYASGKENAPVANHTEMLSNVEV-----
Strawberry	(342)	-----
Mangosteen	(335)	-----

Figure 29 Protein sequence alignment of mangosteen DFR with other DFR proteins.

The putative NADP-binding domain and substrate specificity domain are underlined. Identical residues are shown in black, conserved residues in dark grey and similar residues in light grey. The accession numbers of these proteins in the GenBank database are as follows; *Arabidopsis*, AAA32783; apple, AAD26204; citrus, AAS00611; grape, CAA53578; pear, AAO39819; petunia, CAA56160; strawberry, AAC25960; mangosteen, ACM62744.

```

1  AAAAGAAGGCCAAGATGGTGACCTCAGTGGCTCCAAGAGTAGAGACATTAGCAAGCAGCG 60
      M V T S V A P R V E T L A S S
61  GGATCCAATGCATCCCAAAGAGTACATCCGCCACAAGAGGAGCTAACCAACTTAGGAA 120
      G I Q C I P K E Y I R P Q E E L T N L G
121 ACATCTTTGAGCAAGAGAAGAAAGAAAGGCCCCAGGTGCCAACCATTTGATTTAGAAGGCA 180
      N I F E Q E K K E G P Q V P T I D L E G
181 TAGTTTCTGAAGACAAGGAAGTGAGGGACAAATGTTGGGATGAACTAATGAAGGCTGCCA 240
      I V S E D K E V R D K C W D E L M K A A
241 AGGAATGGGGGGTAATGCACTTGGTTAACCATGGAATTTCCAATGAACTCACTGAGAAGG 300
      K E W G V M H L V N H G I S N E L T E K
301 TGAAGATTGCTGGAGAGGCTTTCTTTCACTTCCCATAGAGGAGAAGGAGAAGTATGCTA 360
      V K I A G E A F F Q L P I E E K E K Y A
361 ATGATCAAGGGTCTGGGATGATCCAAGGGTATGGAAGCAAGTTGGCTAATAATGCTAGTG 420
      N D Q G S G M I Q G Y G S K L A N N A S
421 GCGGGCTTGAGTGGGAGGATTACTTCTTTCACTTGGTGTTCCTGAGGAGAAGAGGGACT 480
      G R L E W E D Y F F H L V F P E E K R D
481 TGTCCATTTGGCCTAAGACACCTAGTGA CTATATTGAGGTAACCGAGTACGCAAGGC 540
      L S I W P K T P S D Y I E V T S E Y A R
541 AACTGAGAGCTCTTGCAACAAAGGTCCTATCAGCACTATCACTGTGCTTGGGATTAGAAG 600
      Q L R A L A T K V L S A L S L C L G L E
601 AAGGAAGACTAGAGAAAGAAGTTGGAGGCATTGAAGAAGTGGCCCTCCAAATGAAGATCA 660
      E G R L E K E V G G I E E L A L Q M K I
661 ACTACTACCCCAAGTGTCTCAACCCGAGCTAGCCCTTGGTGTGGAGGCTCACACCGACG 720
      N Y Y P K C P Q P E L A L G V E A H T D
721 TGAGTGCACTAACCTTCATCCTCCACAACATGGTCCCTGGCCTCCAACCTTTCTACGAGG 780
      V S A L T F I L H N M V P G L Q L F Y E
781 GCGAATGGGTACAGCCAAATGTGTCCCTAACTCAATTATCATGCACATTGGTGACACAT 840
      G E W V T A K C V P N S I I M H I G D T
841 TGGAGATTTTGAAGCAATGGGAAGCTTAAGAGTATTCTTCATAGGGGAGTTGTTAATAAGG 900
      L E I L S N G K L K S I L H R G V V N K
901 AGAAAGTGAGGATTTCTTGGGCTGTTTTTTGTGAGCCTCCTAAAGATAAGATCATTCTTA 960
      E K V R I S W A V F C E P P K D K I I L
961 AGCCTTTGCCTGAGCTTGTGAGTGAGACTGAGCCACCTATGTTTCCGCCTCGCACGTTTT 1020
      K P L P E L V S E T E P P M F P P R T F
1021 CACAGCATATTACAGCACAAGCTCTTCAGGAAGAACCAAGATGATGTTGGTCCCAACTGAT 1080
      S Q H I Q H K L F R K N Q D D V G P N
1081 TACTTGATGTTATTGTGTTTAAATAAAATGTGTGGTCTTATTATTGTTAACTGCATTAA 1140
1141 TAAGTTCGTGACGTTCAACGTACTTTTATTAGTTAAGTAGTTTTATTCATGTGTGACA 1200
1201 TTAATGGGTTTCATTAAAAGAATATATCCAAACTACTATGTAAGATGTAATGAAATGAGT 1260
1261 TTTACATGCTTTCCTTCAAAAAAAA 1285

```

Figure 30 Nucleotide sequence of the gene encoding LDOX from mangosteen with its deduced amino acid sequence. The underlined letters indicate the translation start site (ATG).

Arabidopsis	(1)	---MVAVERVESLAKSGIISIPKEYIRPKKEELESMDVFLKEKKEDGPQVPTIDLKMIESDDEKIRENC
Apple	(1)	MVSSDSVNSRVETLASSGISTIPKEYIRPKDELVNIGDIFQENNEGPQVPTIDLKEIESDNEKVRAC
Citrus	(1)	--MVTPTARRVESLARSIGIQAIPKEYIRPKKEELMGIGNIFEEEDDEGPQVPTIDLKEIDSEDRVEREK
Grape	(1)	--MVTSVAPRVESLSSSGIOSIPKEYIRPKDELTSIGNVFEEKKDEGPQVPTIDLKIDSEDEVVRERC
Peach	(1)	MVSSDSVNSRVETLSSSGIATIPKEYIRPKBELINISDIFQEKSTDGPQVPTIDLKEIDSENEVRERC
Strawberry	(1)	MVTAAISGSRVESLASSGISTIPKEYIRPKBELVNIGDIFEDERSTEGPQVPTIDLKEIDSDDIKVRKC
Mangosteen	(1)	--MVTSVAPRVETLASSGIOCIPKEYIRPKBELTNLGNIFEEKK-EGPQVPTIDLEGIVSEDKVDRKC
Arabidopsis	(67)	IEELKKAASLDWGMHLINHGIPADLMFVKKAGEEFFSLSVEEKKEYANDQATGKIOGYGSKLANNASGQ
Apple	(71)	REELKKAATVDWGMHLVNHGISDELMDVVRKAGKAFFDLPIEQEKKYANDQASGKIOGYGSKLANNASGQ
Citrus	(69)	REELKKAAMDWGMHLVNHGISDDLTERVVRKAGQAFFDQPVVEEKKYANDQASGKIOGYGSKLANNASGQ
Grape	(69)	REELKKAAMDWGMHLVNHGISDDLINRVVRAGETFFNLPMEEKKYANDQASGKIOGYGSKLANNASGQ
Peach	(71)	REELKKAAMDWGMHLVNHGISDELMDVVRKAGKAFFDLPIEQEKKYANDQASGKIOGYGSKLANNASGQ
Strawberry	(71)	REDLKBAAMDWGMHLINHGISDELMEVVRKAGKAFFDLPIEQEKKYANDQASGKIOGYGSKLANNASGQ
Mangosteen	(68)	WDELKKAAMWGMHLVNHGISDELTERVVRKAGKAFFDLPIEQEKKYANDQASGKIOGYGSKLANNASGR
Arabidopsis	(137)	LEWEDYFFHLATPEEKRDLSIWPKTPSDYIEATSEYAKCLRLATKVFKALESVGLGLEPDRLEKEVGGLE
Apple	(141)	LEWEDYFFHCVYPEEKRDLSIWPQTPADYIEATAEYAKQLRELATKVLKVLSLGLGLEDEGRLEKEVGGLE
Citrus	(139)	LEWEDYFFHLIYPEEKRDMSIWPKTPSDYTEATSEYARQLRSLATKILAVLSLGLGLEEGRLEKEVGGLE
Grape	(139)	LEWEDYFFHLIYPEEKRDMSIWPKTPSDYVPTCEYSVKLRLSLATKILSVLSLGLGLEEGRLEKEVGGLE
Peach	(141)	LEWEDYFFHLIYPEEKRDLSIWPQTPADYIEATAEYAKELRALATKVLRLVLSLGLGLEEGRLEKEVGGLE
Strawberry	(141)	LEWEDYFFHCVYPEEKRDLSIWPQTPSDYIVATSEYAKELRGLATKILSILSLGLGLEEGRLEKEVGGLE
Mangosteen	(138)	LEWEDYFFHLVPEPEEKRDLSIWPKTPSDYIEVTSEYARQLRALATKVLKALSILGLGLEEGRLEKEVGGLE
Arabidopsis	(207)	ELLLOQKINYYPKCQPPELALDVEAHTDVSALTFILHNMVPGQLFYEGKWVTAKCVPDSIVMHIGDTLE
Apple	(211)	ELLLOQKINYYPKCQPPELALGVEAHTDVSALTFILHNMVPGQLFYEGKWVTAKCVPNSIVMHIGDTLE
Citrus	(209)	ELLLOQKINYYPKCQPPELALGVEAHTDVSALTFILHNMVPGQLFYKDKWVTAKCVPNSIIMHIGDTLE
Grape	(209)	ELLLOQKINYYPKCQPPELALGVEAHTDVSALTFILHNMVPGQLFYEGKWVTAKCVPNSIIMHIGDTLE
Peach	(211)	ELLLOQKINYYPLCQPPELALGVEAHTDVSALTFILHNMVPGQLFYEGKWVTAKCVPNSIIMHIGDTLE
Strawberry	(211)	ELLLOQKINYYPKCQPPELALGVEAHTDVSALTFILHNMVPGQLFYEGKWVTAKCVPNSIVMHIGDTLE
Mangosteen	(208)	ELLLOQKINYYPKCQPPELALGVEAHTDVSALTFILHNMVPGQLFYEGWVTAKCVPNSIIMHIGDTLE
Arabidopsis	(277)	ILSNGKYKSILHRGLVNKEKVRISWAVFCEPPPKDKIILKPLPETVSEEPAPFPPTFAQHIEHKLFRKS
Apple	(281)	ILSNGKYKSILHRGLVNKEKVRISWAVFCEPPPKDKIILKPLPETVSEEPAPFPPTFAQHIEHKLFRKS
Citrus	(279)	ILSNGEYKSILHRGLVNKEKVRISWAVFCEPPPKDKIILKPLPETVSEEPAPFPPTFAQHIEHKLFRRT
Grape	(279)	ILSNGKYKSILHRGLVNKEKVRISWAVFCEPPPKDKIILKPLPETVSETPPFPPTFAQHIEHKLFRKT
Peach	(281)	ILSNGKYKSILHRGLVNKEKVRISWAVFCEPPPKDKIILKPLPETVSETPPFPPTFAQHIEHKLFRKS
Strawberry	(281)	ILSNGKYKSILHRGLVNKEKVRISWAVFCEPPPKDKIILKPLPETVSEEPAPFPPTFAQHIEHKLFRQS
Mangosteen	(278)	ILSNGKDKSILHRGLVNKEKVRISWAVFCEPPPKDKIILKPLPETVSETPPFPPTFAQHIEHKLFRKN
Arabidopsis	(347)	QEELVSEKND-----
Apple	(351)	QEALLPK-----
Citrus	(349)	QDALLSDEE-----
Grape	(349)	QEALLSK-----
Peach	(351)	QEALLNK-----
Strawberry	(351)	QEALVSTKESAAALKSTTESALKSTKEAALISTN
Mangosteen	(348)	QDDVGPN-----

Figure 31 Protein sequence alignment of mangosteen LDOX with other LDOX proteins. Arrows indicate conserved His and Asp residues as required for ferrous-iron coordination, and Arg residue of putative binding site of 2-oxoglutarate. Identical residues are shown in black, conserved residues in dark grey and similar residues in light grey. The accession numbers of these proteins in the GenBank database are as follows; *Arabidopsis*, CAD91994; apple, BAB92998; citrus, AAT02642; grape, BAC07545; peach, ABX89943; strawberry, AAU12368 ; mangosteen, ACM62747.

```

1  ACTCTAATCACACACTCACTTCCAAGCTTCTGCTCTTTTCACAAAGCCAATGACCAAACC 60
    M T K P
61  CACCACCGATGATCATCCCCACGTGGCAGTGCTAGCCTTCCCATTGGAACACATGCAGC 120
    T T D D H P H V A V L A F P F G T H A A
121 CCCACTCCTCTCCATAACACACCACTTAGCCGCACTTTCCCCCTCCACTCACTTCTCCTT 180
    P L L S I T H H L A A L S P S T H F S F
181 CTTTGGCACCCCATCTTCCAACCTCTTCATCCTCTCGTCCAACACCAACTTGCCACCCAA 240
    F G T P S S N S F I L S S N T N L P P N
241 CGTCAAGCCCTACGACGTCTGGGATGGCACCCCTGATGGTTATGCCTATACAGGTGACGT 300
    V K P Y D V W D G T P D G Y A Y T G D V
301 ACAAGAGGAAATGGGGTTGTTTATAAGTGGGCTCATGAAAGCTTTAGGAAGGGGGTGGA 360
    Q E E M G L F I S A A H E S F R K G V D
361 TAGGGCTGTGGAGGAGAGTGGAAGAAGGGTTAGTTGTTTGATGAGTGATGCGTTTTTTTG 420
    R A V E E S G R R V S C L M S D A F F W
421 GTTTGGGAAGGAGATGGCTGAGGAGATTGGTGGTGGTGTATGTGGGTACCCTTTTGGAC 480
    F G K E M A E E I G G G V M W V P F W T
481 TGCTGGCCCTCATGCGCTTTCTAGTCATCTTTATACTGATTTTATCAGGGAGAGTTTTGC 540
    A G P H A L S S H L Y T D F I R E S F A
541 TGGAGATGTGACGCAGCGTGAAGATGAGCTACTAAGCTCAATCCCAGGAATGTCTAGAGT 600
    G D V T Q R E D E L L S S I P G M S R V
601 GCGAGTTTGTGATTTGCCTGAAGGAGTGGTCTTTGGAAGATTGGATTCACTCTTCTCTCA 660
    R V C D L P E G V V F G R L D S L F S Q
661 AATGCTACACAAAATGGGACAAGCGTTACCTAAAGCGGATGCGGTCTTCATAAACTCATT 720
    M L H K M G Q A L P K A D A V F I N S F
721 TGAAGAACTGGACCCGACGTTTACAAACGACCTCAAGTCCAAGCTCAAATGCTGTCTCAA 780
    E E L D P T F T N D L K S K L K C C L N
781 CATTGGACCATTCAACTTGATCTCGCCACCGGCACAAGTACCAGATACATATGGCTGCAT 840
    I G P F N L I S P P A Q V P D T Y G C I
841 ACCCTGGCTTGACAAGCAACAATTAGCCTCCGTGGCTTATGTAAGTTTTGGATCGGCAAC 900
    P W L D K Q Q L A S V A Y V S F G S A T
901 GATACCACTGCCTCATGAGCTCGTGGCACTGGCCGAGGCCTTGGAGGATAGGAAGGTTCC 960
    I P L P H E L V A L A E A L E D R K V P
961 TTTCATATGGTCACTAAAGGACAACGCAAAAGTACATTTGCCAGATGGGTTCTTGAGAGAC 1020
    F I W S L K D N A K V H L P D G F L E T
1021 GACAAAGTTTCAAGGGATTGTGATACCTTGGGCTCCCCAAGCAAAGGTTCTAGGACATAA 1080
    T K F Q G I V I P W A P Q A K V L G H K
1081 AGCAGTTGGGGTGTATTATACCCACTGTGGGTGGAACCTCACTTTTAGAACTATAGTTGG 1140
    A V G V F I T H C G W N S L L E T I V G
1141 AGGGGTGCCCCGTGATCTGTAGGCCTTTTATGGTGATCAAAGACTTAATGCGAGAATGAT 1200
    G V P V I C R P F Y G D Q R L N A R M I

```

Figure 32 Nucleotide sequence of the gene encoding UFGT from mangosteen with its deduced amino acid sequence. The underlined letters indicate the translation start site (ATG).

```

1201  AGGGGACGTTTGGAAAATTGGTGTTATTGTTAACGGTGGAGTTCTTGCAAAGGAGGCAAT 1260
      G D V W K I G V I V N G G V L A K E A M

1261  GATTGATTGCTTTGATAAGATACTGTTGCAAGAGGATGGGAAACAGATGAGGGGAAGAAT 1320
      I D C F D K I L L Q E D G K Q M R G R I

1321  AAAATCCCTAAAAGATCTTGCACTTGCGGCTACTGCTTACAAAGGAAGCTCTAGCGACAA 1380
      K S L K D L A L A A T A Y K G S S S D N

1381  TATGAGAGAATTGTCTCGGCTAGTATCGAGCCCCTGCAAGTAATAACTGCTGAGAGCCGA 1440
      M R E L S R L V S S P C K

1441  ATCCTTCGTTTTTCTGTGGTGCATGTAGGTTTATCATGTCAAATGATCAGAACATTTTAC 1500

1501  TTCAAATAACAACAAAGACACGGTGCAAATAACGTAGGCTTTCAAAGTAGCACATGAA 1560

1561  CCCAAGCTTGCTCTTTAAAATAATGGCCATTGAGTTTTGAATGAACATTAGGCCATATTC 1620

1621  ACCTATTTCAACTTCCATCTAATTTAATTATTCAACCGTTTTTTCTTTAGATCAAAAAAA 1680

```

Figure 32 (Continued).

Arabidopsis	(1)	-----MTKSPDPTRDSHVAVLAPFFCTHAAPLLTVTRRLASASP-SLVFSFFMTQSNSS
Apple	(1)	MAAPLPiEIEPSSSTNGQPHLADAYNRHVAVVAFPPFTHASALLETVRRLATADP-NLLFSFFSTSKSNSS
Citrus	(1)	-----MAQTQSQPRPHDAVLNFFPSTHASVSPSIKRLAVSSP-TAMFTFFSTPQSNKA
Grape	(1)	-----MSQTTTNPHVAVLAPFFCTHAAPLLAVVRRLLAAAP-HAVFSFFSTQSNAS
Petunia	(1)	-----MTTSQLHLIALAPFFGSHAAPLLTLVQKLSPLPSPDILIFSFFNTSQSNMS
Strawberry	(1)	-----MAPVSNQVGGHVAVLAPFFCTHAAPLLNLVCLRLAAAP-SLIFSFFNTQSNSS
Mangosteen	(1)	-----MTKPTTDDHPHVAVLAPFFCTHAAPLLSITHHLAALSP-SLIFSFFGTPSSNMF
Arabidopsis	(55)	LFSSGDEADRLANIRVYDIADGVPEGYVFSGRPOEATLEFLQAAPENFFREIAKAEDEVGTEVVKCLMTDA
Apple	(70)	LFSSNNSIDNMERNIRVYDVADGVPEGYVFGKPOEDIELFMNAAPENIRSLDASVADIGKQISCLITDA
Citrus	(54)	LFSTGQQRHLESNVFPYDVSQGVPEGHVFSGRQEDIELFMNAADANFKAVEAAVAETGRLPLCLVTD
Grape	(52)	IFHDSMHT-MQCNIKSVDISQGVPEGYVFGKPOEDIELFTRAAPESFQGMVMVAETGRLPVSCLVADA
Petunia	(51)	IFSEGSKP---DNIKVYNVMDGVTEETNGNKPVGLEAKLFIQATSTNPEKVMKEAEBETGVKFSCLFSDA
Strawberry	(54)	ILAGNTSVLRYSNVSVCEVADGVPEGYVFGKPOEDIELFMKAEDNFRCLASVAESGSEVSCLVTD
Mangosteen	(54)	ILSSNTNL--FPNVFPYDVMGDTEDGYAYTSDVQEBMGLFISAHESFRKGVDRABESGRVSCLMSSA
Arabidopsis	(125)	FFWFAADMATEIN--ASWIAFWTAGANSLSAHLYTDLIRETIGVKEVGERMEETIG----VISGMEKIRV
Apple	(140)	FFWFGVHLADELG--VFWVTFWISGLKLSVHVHTDLIRDITIGTQGITRENDLIVDKNVNTQGLSNVRI
Citrus	(124)	FFWFAADMARDWN--VFWIFCSGAPGNLSAHLYTDLIRDKIGTQS-QMQDQQLIH----FIPGMKIRV
Grape	(121)	FFWFAADMMAEMG--VAMPFFWTAGPNLSLTHVYIDEIREKIGVSGIQGREDELLN----FIPGMSKVRV
Petunia	(118)	FFWFSYKLAEKIN--VFWIAFWTAASGLSVHLYTDFIRSN-----DETSLN----IPGFSTLKI
Strawberry	(124)	FFWFGVHMADDMGG-VFWVFWTAGPNSLSAHVHTDLIRST--TSGGCHDEKTTIT----VLAGMSKVRV
Mangosteen	(122)	FFWFGKEMAEIIGGVMWVFWTAGPHALSSHLYTDFIRES-FAGDVITQREDELLS----SIPGMSRVRV
Arabidopsis	(189)	KDTEPGVVFGNLDVSFVKMLHOMGLALPRATAVFINSEFEDLDPTLTNNLRSRF-KRYLNIGPLGLSSSTL
Apple	(208)	KDLAEGVIFGNLDSVISGMILOMGRLLPRATAVFMNGFELELPIPNLKSIV-NKLLNVGPSNVASLPL
Citrus	(188)	ADLPEGVVSGDLDSVFSVMWHOMGRQLPKAAAVFINSEFELDPETLNLKTKFNNKFLSVGPFKLLASD
Grape	(185)	RDLQEGIVFGNLDLSRMLHRMGQVLPKATAVINSEFELDDSLTNDLKSIL-KTLLNIGPFNLITEP-
Petunia	(173)	SDMPPEVMAEHLDPMPMSMLYNNMALNLHKAADVVLNFEFELDPTINKDLKVKL-QKVLNIGPLVLTQPTSP
Strawberry	(187)	QDLPEGIIFGNLESLSRMLHOMGQMPLELATAVINSEFELDPVITNDLKSIF-KRELNVGPLDLLEPPA
Mangosteen	(187)	CDLPEGVVFGRLDSLFSQMLHKMSQALPKADAVFINSEFELDPTFTNDLKSIL-KCCLNIGPFNLISEP-
Arabidopsis	(258)	-----QQLVQDPHGCLAMMEKRSS--GSWAYISFGVTMTPEGETAATAEG----LESSKVPFFW
Apple	(277)	-----PLPPSDACLSDLDKQAP--SSVYVTSFGTVASAEKEQMAIAEA----LEATGAPFFW
Citrus	(258)	QQ-----PSSATDLDKYGCLAWLDKQKKKPSWAYVGFVATSENEIAAIAEDQPGPSLEASKVPFFW
Grape	(253)	-----PVVPNTTGCLQMLKERKP--TSVYVTSFGTVTTTPPAELVAAEA----LEASRVFFW
Petunia	(242)	KK-----VLDACDERGCIIMDEKQK--ESVYVTSFGTVTTLPPELIVAAEA----LEAKRFFW
Strawberry	(256)	SAATTPQTAAEAAGDGLSDLDLQK--ASVYVTSFGSVTRSEPELMAIAEA----LEASRVFFW
Mangosteen	(255)	-----AQVPNTYGCIPMLDKQQL--ASWAYVTSFGSATILPELIVAAEA----LEDRKVPFFW
Arabidopsis	(312)	SLKEKSLVQLKGFLEDR--TREQGIIVFWAPQVELLKHEATGVFVTHCGWNSVLESVSGGVPMICRPFFG
Apple	(330)	SLKDSCKTPDLNEFTTKTLNMGVFWAPQPHVLAHDSVGAFFVTHCGWNSIMETIAGRVPMICRPFFA
Citrus	(324)	SLRHRSQANLENGFLER--TRSDGIIVFWMATQVNVLAHEAVGVFVTHCGWNSILESIAAGVPMICRPFFG
Grape	(306)	SLRDKARVHLEEGFLEK--TRGYGMVFWAPQAEVLAHEAVGAFFVTHCGWNSLWESVAGGVPMICRPFFG
Petunia	(298)	SLKDNIGIKMLETGFLER--TGQFGKIVSWAPQLEILNHSVAVGVFVTHCGWNSILEGISCGVPMICRPFFG
Strawberry	(319)	SLRDNLNKRNQLDEFLSK--GKLNMGVFWAPQPVLAHGSVGAFFVTHCGWNSVLESVAGGVPMICRPFFG
Mangosteen	(308)	SLKDNKAVHLEDGFLER--TKFQGIIVFWAPQAKVLGHKAVGVFVTHCGWNSLLETIVGGVPMICRPFFG

Figure 33 Protein sequence alignment of mangosteen UFGT with other UFGT proteins. The underline indicates the common motif found in glycosyltransferases. Identical residues are shown in black, conserved residues in dark grey and similar residues in light grey. The accession numbers of these proteins in the GenBank database are as follows; *Arabidopsis*, NP_197207; apple, AAD26203; citrus, AAS00612; grape, BAB41021; petunia BAA89008; strawberry, AAU09442; mangosteen, ACM62748.

```

Arabidopsis (380) DQRLNGRAVEVVMETGMTLING-VFTKDGFEKCLDKVLVDDGKKMKCAKKLKELAYEAVSSKGRSSEN
Apple (400) DQRLNARMVBEVFEIGVTVEDG-VFTREGLVKSLEVVLSPESGRNFRDNIRKVKQLAVEAVGPQGSSTRN
Citrus (392) DQRLNGRMMEQIMGVGIAVDGGGICTKEGLLSLLDLILCQEKGIKIREKVTKLKQLCQNAIGPGGSSMON
Grape (374) DQRLNSRMVEDALEIGVRIEGG-VFTESGLMSCFDQILSQEKGKKLRENLRARETADRAVGPKGSSSTEN
Petunia (366) DQRLNSRMVBSVWQIGLQIEGG-SFTKIGTISALDTFFSEKGGVLRBNVKGLEKRALAEVKPDGSSSKN
Strawberry (387) DQRLNARMVEDVWKIGLRLEGG-VFTKNGMLKSLDMLLSQDKGTMMKNKINTLKQFAKQAVEPKGSSARN
Mangosteen (376) DQRLNARMIGDVWKIGVIWNGG-VLAKEAMIDCFDKILLQEDGKQMRGRIKSLKDLALAATAVKGSSSDN

Arabidopsis (449) FRGLLDLVVNII---
Apple (469) EKSLDDIVSGSNYQV
Citrus (462) LDALVDMISRSY---
Grape (443) FKTLVDLVSKPKDV-
Petunia (435) EKDLVELVKCHKLT-
Strawberry (456) ESLLLEMTTTN----
Mangosteen (445) MRRLSRLVSPCK--

```

Figure 33 (Continued).

4.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินระหว่างการพัฒนาสีผลมั่งคุด

4.2.1 การเปลี่ยนสีที่รวดเร็วของผลมั่งคุดเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

จากการเปลี่ยนแปลงสีผลอย่างรวดเร็วเมื่อผลอยู่บนต้นและภายหลังการเก็บเกี่ยวโดยแบ่งการพัฒนาสีผลเป็น 7 ระยะ ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่า ยีนทั้งหมดมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ระยะ 0 (ระยะสีเขียวอ่อน) ในระหว่างการพัฒนาสีผลบนต้นและสูงสุดในระยะสีม่วงเข้ม (ระยะที่ 5) ซึ่งเป็นช่วงท้ายของการพัฒนาสีผล (Figure 34a-e, g-h) หลังจากนั้นลดลงในระยะสุดท้าย (Figure 34) เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนต่างๆ ในระหว่างการพัฒนาสีผลกับระยะสีเขียวอ่อน (ระยะ 0) พบว่าระดับการแสดงออกของยีนทั้งหมดในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นสูง โดยยีน PAL มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นน้อยสุด 12 เท่า การแสดงออกของยีนภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลมั่งคุดระยะเดียวกันพบว่า การแสดงออกของยีนทั้งหมดในระยะที่ 3-6 สูงกว่าผลมั่งคุดที่มีการพัฒนาสีผลบนต้น (Figure 34, Appendix Table 13 and 14) และพบว่า การแสดงออกของ *GmUFGT* มีระดับสูงสุดของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเท่ากับ 571 และ 763 เท่า ในผลมั่งคุดระยะที่ 5 (สีม่วงเข้ม) ที่มีการพัฒนาสีผลบนต้นและภายหลังการเก็บเกี่ยวผลตามลำดับ (Figure 34) จากระดับการเปลี่ยนแปลงของยีนต่างๆ สอดคล้องกับอัตราการผลิตเอทิลีนในระหว่างการพัฒนาสีผล (Figure 5 and 6 การศึกษาที่ 1)

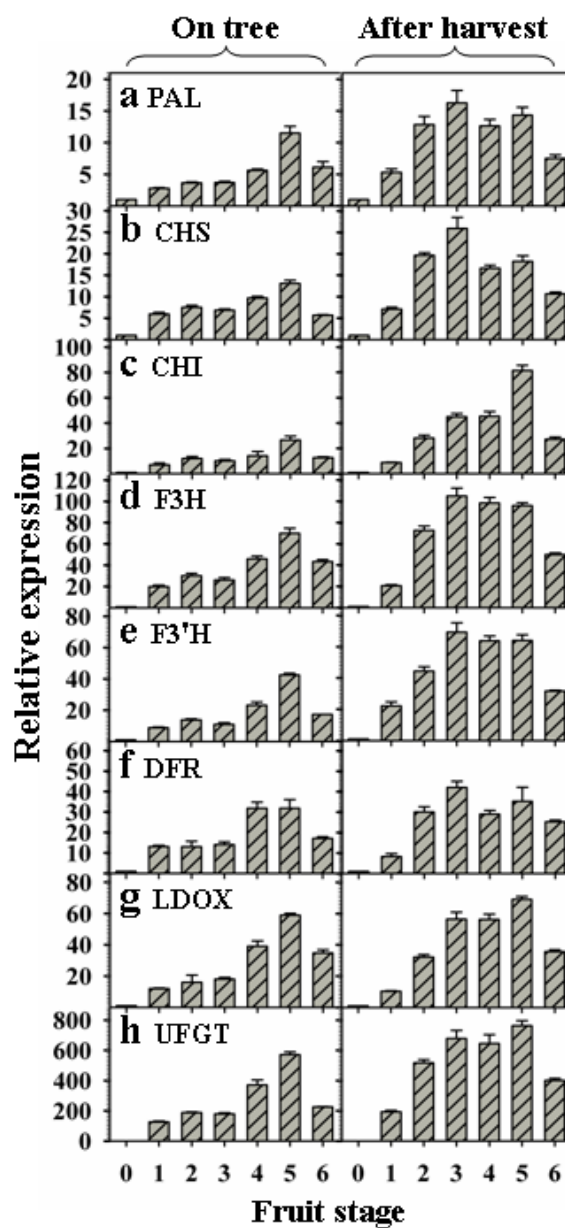


Figure 34 Expression profiling of mangosteen anthocyanin biosynthetic genes during colour development. Real-time PCR was used to analyze *GmPAL* (a), *GmCHS* (b), *GmCHI* (c), *GmF3H*(d), *GmF3'H* (e) , *GmDFR* (f), *GmLDOX* (g) and *GmUFGT* (h) expression patterns. Each column height indicates relative mRNA abundance of mature green fruit (stage 0) which was set to 1. All real time-PCR reactions were normalized using the Cp value corresponding to a mangosteen ELF gene. Data are mean $\pm$ SE of three replicate reactions.

4.4.2 เอทิลีนควบคุมการพัฒนาสีผลมั่งคุดและสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนใน

กระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

จากการศึกษาผลของเอทิลีนต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของผลมั่งคุด โดยการให้เอทิลีนและตัวยับยั้งการทำงานของเอทิลีน 1-MCP พบว่า ลักษณะการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของผลมั่งคุดชุดควบคุม (รวมด้วยอากาศ) เอทิลีน และรวมเอทิลีนร่วมกับ 1-MCP (E+M) เหมือนกันโดยมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นภายใน 1 วัน หลังการเก็บเกี่ยว ในขณะที่การแสดงออกของยีนของผลมั่งคุดที่รม 1-MCP มีระดับคงที่ต่อเนื่องถึง 3 วัน (Figure 35) การแสดงออกของยีนทั้งหมดยกเว้น *GmDFR* มีการแสดงออกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 หลังการเก็บเกี่ยวและลดลงต่อเนื่อง (Figure 35) ในทางตรงข้ามการรม 1-MCP สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้งหมดที่เพิ่มสูงขึ้นในช่วงวันที่ 1-3 ได้อย่างชัดเจน (Figure 35, Appendix Table 15-22) การรม 1-MCP สามารถลดระดับการแสดงออกของยีนทั้งหมดอย่างชั่วคราวได้โดยเฉพาะการรม 1-MCP หลังรมเอทิลีนในวันที่ 2 (Figure 35) การรม 1-MCP สามารถยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างเอทิลีนและการแสดงออกของยีนได้ชัดเจนโดยสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินทั้งหมด (Figure 35, Appendix Table 15-22)

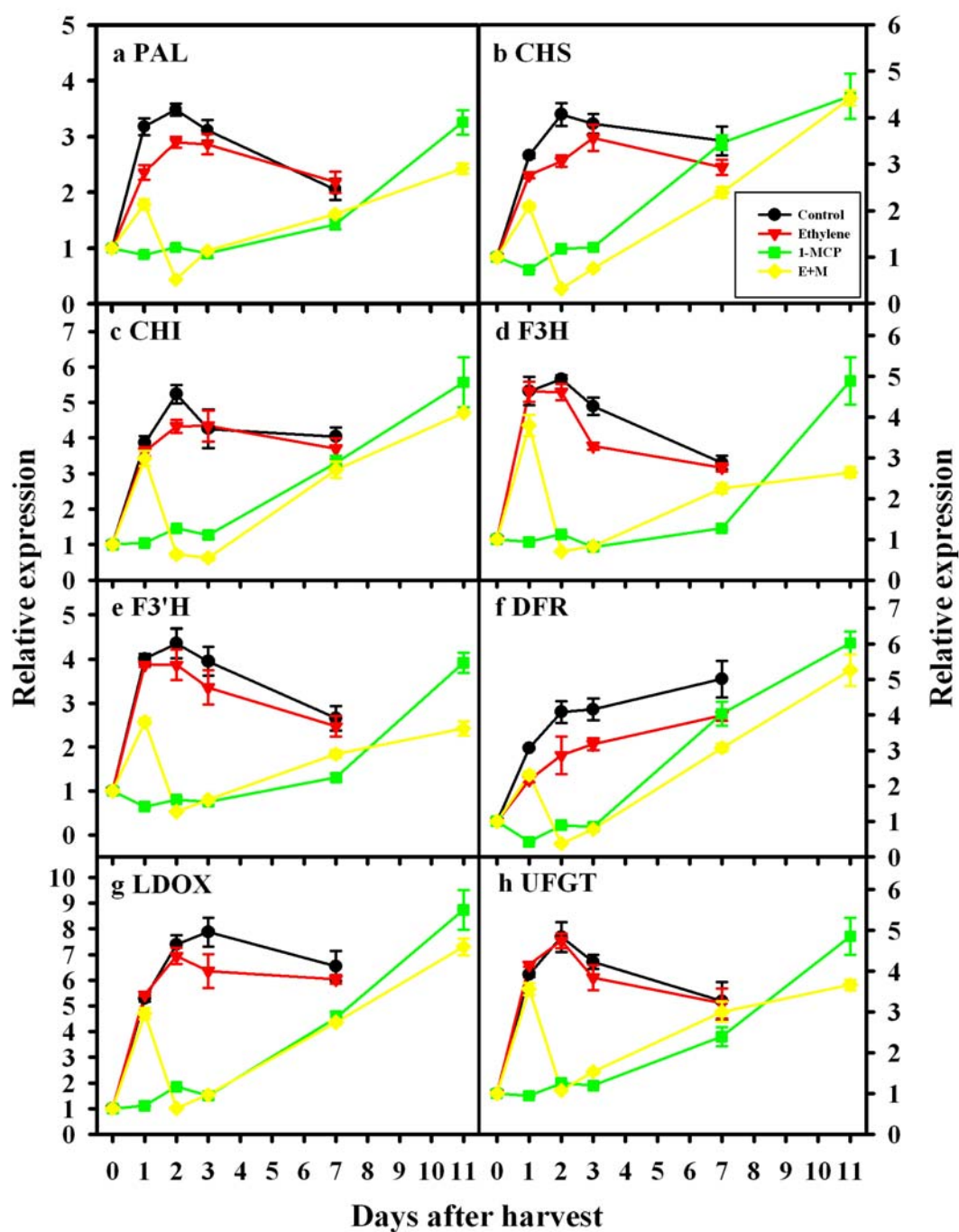


Figure 35 Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in mangosteen fruit. Fruit were treated with air (control), $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene), $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h + $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M). The sample of air (control) at harvest time (day 0) was set at 1. Data are mean $\pm$ SE from three replications.

4.4.3 การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำควบคุมการพัฒนาสีผลมังคุดซึ่งสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของผลมังคุดโดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C นาน 7 วันและย้ายไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C เปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (ชุดควบคุม) พบว่า ลักษณะการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของผลมังคุดที่เก็บรักษาอุณหภูมิ 25°C (ชุดควบคุม) มีการแสดงออกสูงขึ้นภายใน 1 วันหลังการเก็บรักษา ในขณะที่การแสดงออกของยีนทั้งหมดมีระดับคงที่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C (Figure 36) การแสดงออกของยีนทุกยีนยกเว้น *GmDFR* มีระดับเพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันที่ 2 หลังจากนั้นลดต่ำลง (Figure 36) การย้ายผลมังคุดจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C ไปยัง 25°C พบว่าระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้นอย่างแตกต่างทางสถิติและการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C ชะลอการแสดงออกของยีนทุกยีนอย่างชัดเจน (Figure 36, Appendix Table 23-30)

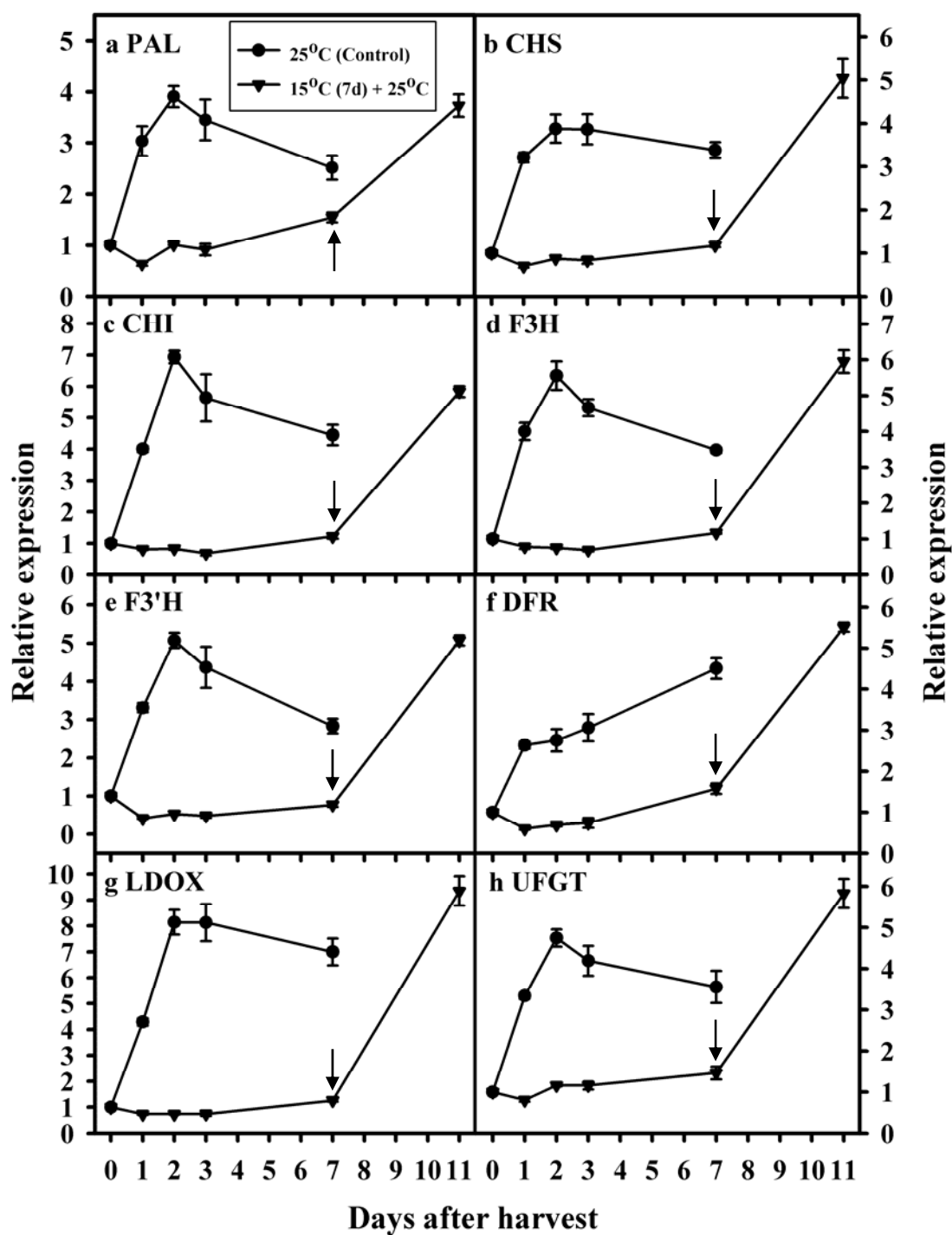


Figure 36 Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in mangosteen fruit. Fruit were stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C (arrows). The sample of 25°C at harvest time (day 0) was set at 1. Data are means $\pm$ SE of three replications.

วิจารณ์

1. การพัฒนาสีผลและคุณภาพของผลมังคุดระหว่างการสุกและภายหลังการเก็บเกี่ยว

มังคุดเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่พิเศษที่มีการพัฒนาสีผลเมื่อผลอยู่บนต้นและภายหลังการเก็บเกี่ยวเช่นเดียวกับการพัฒนาสีม่วงแดงหรือดำของผล saskatoon (Rogiers and Knowles, 1999) อะโวคาโดพันธุ์ Hass (Cox *et al.*, 2004) และผล bayberry (Zhang *et al.*, 2005) โดยผลมังคุดส่วนใหญ่ของการศึกษาเริ่มพัฒนาสีผลเมื่ออยู่บนต้นและมีการพัฒนาสีผลอย่างรวดเร็วภายหลังการเก็บเกี่ยว ณ อุณหภูมิ 25°C การพัฒนาสีผลจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยผลมังคุดระยะที่ 1 หรือระยะสายเลือด (จุดประสีแดงมากกว่า 5% กระจายทั่วผล) สามารถพัฒนาสีผลเป็นสีม่วงเข้ม (ระยะที่ 5) ภายในระยะเวลา 5 วัน (Table 7) สีผลโดยเฉพาะค่า hue ลดลงอย่างรวดเร็วจาก 88.1 ถึง 3.7 ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการพัฒนาสีผลมังคุด จึงชี้ให้เห็นว่าค่า hue สามารถใช้เป็นดัชนีความอ่อน-แก่ ของผลและระยะการพัฒนามังคุดได้ (Figure 3) เช่นเดียวกับการทดลองของ Zhang *et al.* (2005) ที่ใช้สีผลเป็นดัชนีชี้วัดและแบ่งแยกระยะการพัฒนามังคุดของผล bayberry และสอดคล้องกับรายงานของ Mercado-Silva *et al.* (1998) ที่ใช้สีผลเป็นดัชนีชี้วัดความอ่อนแก่ของผลฝรั่ง ซึ่งสีผลเป็นดัชนีที่ดีที่สุด การพัฒนาสีผลมีความสัมพันธ์ที่ดีกับอัตราการผลิตเอทิลีน (Figure 5) และยังพบในผลไม้หลายชนิดเช่น ผลองุ่น (El-Kereamy *et al.*, 2003) และผล saskatoon (Rogiers *et al.*, 1998) ซึ่งผลไม้เหล่านี้รวมทั้งมังคุดและอะโวคาโด น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษากลไกการทำงานของเอทิลีนต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินต่อไป การผลิตเอทิลีนในผลมังคุดพบว่าการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับรายงานก่อนหน้านี้ (Kanchanapoom and Kachanapoom, 1998; Paull and Ketsa, 2004; Noichinda *et al.*, 2007) ในระหว่างการพัฒนาสีผล นอกจากการลดลงของค่า และความแข็งของเปลือกพบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เพิ่มสูงขึ้นซึ่งเป็นลักษณะหลักของการสุกในผลไม้ (Noichinda, 1992; Wills *et al.*, 2007)

คุณภาพผลผลิตโดยทั่วไปขึ้นอยู่กับระยะความบริบูรณ์ของผลผลิตที่ทำการเก็บเกี่ยว มังคุดเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่ระยะความบริบูรณ์มีผลต่อคุณภาพโดยพบว่า ผลมังคุดระยะที่ 1-5 สามารถพัฒนาเปลี่ยนสีจนเข้าสู่ระยะที่ 6 (ระยะสีม่วงดำ) ได้ เมื่อพิจารณาคุณภาพของผลผลิตเช่น ความแข็งของเปลือก ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ รวมถึงการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (Table 7, B columns) ในประเทศมาเลเซียได้มีการแนะนำให้เกษตรกรเก็บเกี่ยวผลมังคุดเพื่อการส่งออกโดยแนะนำให้เกษตรกรเก็บผลมังคุดตั้งแต่ระยะผลสีเหลืองที่มีจุดประสีแดงซึ่งตรงกับระยะสายเลือดหรือระยะที่ 1 ของประเทศไทย (Osman and Milan, 2006) จาก

ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการพัฒนาการสุกของผลมังคุดเริ่มตั้งแต่การเก็บเกี่ยว ทำให้เห็นว่าการปฏิบัติของเกษตรกรไทยที่เก็บเกี่ยวผลมังคุดเพื่อการส่งออกในระยะที่ 1 หรือระยะสายเลือนั้นไม่มีผลต่อคุณภาพของผลมังคุดและยังส่งเสริมอายุการวางจำหน่ายให้ยาวนานกว่าผลมังคุดในระยะท้ายของการพัฒนา

การวิเคราะห์แอนโทไซยานินในเปลือกผลมังคุดที่มีสารสีแดงเป็นจำนวนมากพบว่า สารสีหลักได้แก่ cyanidin-3-sophoroside และ cyanidin-3-glucoside โดยเป็นการยืนยันผลการทดลองของ Du and Francis (1977) ซึ่งจำแนกสารสีด้วยเทคนิค thin layer chromatography การวิเคราะห์แอนโทไซยานินด้วยเทคนิค LC-MS พบสารสี cyanidin-3-glycosides 3 ชนิด ได้แก่ cyanidin-3-glucoside cyanidin-3-pentoside และ cyanidin ที่ประกอบด้วยสารชนิดหนึ่งที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ การค้นพบ pentoside และสารที่ไม่สามารถจำแนกได้ที่มี m/z เท่ากับ 190 เป็นการค้นพบและรายงานครั้งแรกในมังคุด การจำแนกชนิดของสารที่มี m/z เท่ากับ 190 ในอนาคตอาจต้องใช้เทคนิคอื่นๆ ในการจำแนกเช่น เทคนิค NMR นอกจากนี้ยังพบสารสี cyanidin ชนิดอื่นๆ ที่มีปริมาณต่ำ การพัฒนาสีผลมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด cyanidin-3-sophoroside และ cyanidin-3-glucosides (Table 8 and 9, Figure 6 and 8) การเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของสารสีอาจเกิดขึ้นจากสารฟีนอลิกที่พร้อมจะเปลี่ยนเป็นสารสี cyanidin ชนิดต่างๆ และการไม่มีสารสีชนิดอื่นๆ เช่น สีฟ้าหรือสีน้ำเงินส่งผลต่อสีต้นของผลผลิต การศึกษาทางชีวภาคโดยใช้เทคนิค hand section ทำให้เห็นว่าปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระหว่างการพัฒนาสีผลมังคุด (Figure 9) Cox และคณะ (2004) พบว่าในระหว่างการพัฒนาสีผลของอะโวคาโดพันธุ์ Hass มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการเพิ่มขึ้นของแอนโทไซยานินชนิด cyanidin-3-glucoside

2. การจำแนกยีนในขบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินระหว่างการพัฒนาสีผลมังคุด

การสังเคราะห์แอนโทไซยานินเป็นขบวนการที่ซับซ้อนมีการศึกษาในพืชหลายชนิดเช่น องุ่น แอปเปิล พืชเนื้อ และ Arabidopsis (Borevitz *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2002; Koes *et al.*, 2005; Espley *et al.*, 2007) การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีการโคลนยีนทั้งหมดในขบวนการนี้ของไม้ผลเมืองร้อนโดยยีนทั้งหมดมีความเหมือนกับยีนในขบวนการสังเคราะห์ในพืชอื่นๆ ในขั้นตอนของ hydroxylation ซึ่งมีความสำคัญในการสังเคราะห์สารสีชนิดต่างๆ เช่น สีแดง สีฟ้าหรือสีม่วง ผลการทดลองพบเพียงยีนเดียวคือ flavanone 3'-hydroxylase (F3'H) ซึ่งมีบทบาทในการเติม

หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3' ของวงแหวน B นำไปสู่การสังเคราะห์แอนโทไซยานินชนิด cyanidin glycoside (Winkel-Shirley, 2001) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้พยายามใช้เทคนิคต่างๆ เช่น nested หรือ RACE PCR ในการโคลนยีน flavonoid 3', 5'-hydroxylase (F3'5'H) แต่ก็ไม่สามารถโคลนยีนนี้ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์แอนโทไซยานินคือ พบ cyanidin glycoside ชนิดเดียวเท่านั้นซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของ flavanone 3'-hydroxylase (F3'H) ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า ขบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของมังคุดน่าจะไม่มีกิจกรรมของยีน flavonoid 3', 5'-hydroxylase เช่นเดียวกับ *Arabidopsis* แอปเปิลและกุหลาบ (Forkmann, 1991) ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์สารสีที่มีสีน้ำเงินหรือสีฟ้าได้

3. การเปลี่ยนสีที่รวดเร็วของผลมังคุดเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในขบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

มังคุดเป็นผลไม้ที่มีการพัฒนาสีแดง โดยมีการสะสมแอนโทไซยานินอย่างเด่นชัดเมื่อผลอยู่บนต้นหรือภายหลังการเก็บเกี่ยว ผลการแสดงออกของยีนทั้งหมดพบว่า ยีนทั้งหมดมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนจากระยะที่ 0-1 หรือจากสีเขียวตองอ่อนเป็นระยะสายเลือดเมื่อผลอยู่บนต้นและภายหลังการเก็บเกี่ยวและพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน UFGT เพิ่มขึ้นสูงสุด (Figure 34) ซึ่งสอดคล้องกับการพัฒนาสีผล ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีน UFGT น่าจะเป็นยีนหลักในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเช่นเดียวกับองุ่น (Boss *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2001) การแสดงออกของยีนที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อผลมีการสะสมแอนโทไซยานินสูงและลดลงในช่วงท้ายของการพัฒนาสีสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Almieda *et al.* (2007) พบว่าการแสดงออกของยีนต่างในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเพิ่มสูงขึ้นตั้งระยะผลมีสีขาวถึงระยะเปลี่ยนสีและลดลงในระยะผลมีสีแดง

4. เอทิลีนควบคุมการพัฒนาสีผลมังคุดและสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

จากการพัฒนาสีผลที่รวดเร็วของผลมังคุดทั้งบนต้นและภายหลังการเก็บเกี่ยวจึงทำการศึกษาผลของเอทิลีนและตัวยับยั้งการทำงานของเอทิลีน(1-MCP) พบว่าการรมสาร 1-MCP สามารถชะลอการพัฒนาของสีได้โดยเฉพาะการลดลงของค่า hue ชะลอการอ่อนนุ่มของเปลือกผล อัตราการผลิตเอทิลีนและปริมาณแอนโทไซยานิน (Figure 10-13) การใช้ 1-MCP สามารถชะลอ

การเปลี่ยนสีผลและการสะสมแอนโทไซยานินในผลไม้ชนิดอื่นเช่น องุ่น (Chervin *et al.*, 2004) และสตรอเบอรี่ (Jiang *et al.*, 2001) โดย Jiang *et al.* (2001) รายงานว่า 1-MCP ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดแรกในขบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน อย่างไรก็ตามการรวมผลมั่งคุดด้วยเอทิลีนไม่สามารถเร่งการพัฒนาสีผลและอัตราการผลิตเอทิลีนได้ (Figure 11 and 13a) เช่นเดียวกับผลการให้เอทิลีนต่อการสุกของผลมั่งคุด (พัชระ, 2551) และสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่อยู่ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Figure 35) ซึ่งอาจเป็นผลจากระยะการให้สาร (Noichinda, unpublished data)

การรม 1-MCP หรือการรม 1-MCP หลังรมเอทิลีนสามารถลดระดับการแสดงออกของยีนทั้งหมดได้เช่นเดียวกับการชะลอ ethylene peak เอทิลีนน่าจะควบคุมการทำงานของยีนต่างๆ ได้จากการศึกษาในองุ่นพบว่าเอทิลีนสามารถกระตุ้นการสะสมแอนโทไซยานินได้โดยเพิ่มการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (El-Kereamy *et al.*, 2003) Tira-Umphon และคณะ (2007) รายงานว่าเอทิลีนสามารถชักนำการสะสมแอนโทไซยานินในผลและเซลล์แขวนลอยโดยขึ้นกับการแสดงออกของยีน UFGT และพบจุดรับสัญญาณในการตอบสนองต่อเอทิลีน (E4, AWTTC AAA) บนโปรโมเตอร์ของยีน UFGT ด้วย ผลการตอบสนองต่อเอทิลีนในผลมั่งคุดอาจเป็นไปได้ว่าบนโปรโมเตอร์ของยีน UFGT มีจุดรับสัญญาณจากเอทิลีนอยู่ Solano และคณะ (1998) รายงานว่า EIN3/EILs สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อเอทิลีนผ่านตัวรับสัญญาณของเอทิลีน (primary ethylene response element; PERE)

5. การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำควบคุมการพัฒนาสีผลมั่งคุดซึ่งสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ 15°C สามารถชะลอการพัฒนาสีผลมั่งคุดได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C (Figure 14) สอดคล้องกับการทดลอง Ratanamarno และคณะ (2004) พบว่าการเก็บรักษาผลมั่งคุดระยะที่ 1 ณ อุณหภูมิต่ำ 15°C ทำให้การพัฒนาสีผลเป็นระยะที่ 6 ช้ากว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง 30-35°C เช่นเดียวกับการทดลองเก็บรักษาผลสตรอเบอรี่ที่อุณหภูมิต่ำสามารถช่วยรักษาคุณภาพผลและชะลอการเพิ่มขึ้นของแอนโทไซยานินได้ (Shin *et al.*, 2008) การย้ายผลมั่งคุดจากอุณหภูมิต่ำ 15°C ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C พบว่าการพัฒนาสีผล การสะสมแอนโทไซยานินเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว รวมถึงการอ่อนนุ่มของเปลือกซึ่งสอดคล้องกับอัตราการผลิตเอทิลีน (Figure 15-17) การศึกษาของ Kim และคณะ (2003) พบว่าการ

แสดงออกของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของแอปเปิลเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณแอนโทไซยานินที่เพิ่มสูงขึ้น การเก็บรักษาผลที่อุณหภูมิต่ำ 15°C พบว่าการแสดงออกของยีนต่างๆ เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเช่นเดียวกับอัตราการผลิตเอทิลีน การย้ายจากอุณหภูมิ 15°C ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C พบว่าปริมาณแอนโทไซยานินและการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับอัตราการผลิตเอทิลีนที่เพิ่มสูงขึ้น (Figure 17 และ 36) ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเอทิลีนมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการควบคุมการพัฒนาสีระหว่างที่เก็บรักษา El-Kereamy และคณะ (2003) พบว่าเอทิลีนส่งผลต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ ในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน อย่างไรก็ตามผลของอุณหภูมิต่ำต่อการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาคุณภาพของผลมังคุด ผลของเอทิลีนและการเก็บรักษาผลมังคุดที่อุณหภูมิต่ำ และการจำแนกชั้นในขบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินสามารถสรุปผลดังนี้

1. ผลมังคุดระยะที่ 1 (ระยะสายเลือดมีจุดประสีแดง 5-50%) สามารถพัฒนาสีผลสู่ระยะสุดท้ายระยะที่ 6 (สีม่วงดำ) ได้ และเป็นระยะเก็บเกี่ยวที่มีความบริบูรณ์น้อยสุดโดยคุณภาพผลอยู่ในระดับดี
2. ปริมาณแอนโทไซยานินในเปลือกชั้นนอกสูงกว่าเปลือกชั้นใน
3. แอนโทไซยานินหลักที่พบในเปลือกผลมังคุดคือ cyanidin-3-sophoroside และ cyanidin-3-glucoside โดยเพิ่มขึ้นสูงระหว่างการพัฒนาสีผล
4. ขบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในผลมังคุดขึ้นกับเอทิลีน
5. สารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน 1-Methycyclopropene และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ 15 °C สามารถชะลอการพัฒนาสีผลและการสะสมแอนโทไซยานินโดยยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆ ในขบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน
6. *GmUFGT* คือยีนหลักในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

เอกสารอ้างอิง

- พัชร ปิริยะวินิตร. 2551. การควบคุมการสุกของผลมังคุดหลังการเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมโภชน์ น้อยจินดา. 2535. ผลของสภาพบรรยากาศตัดแปลงที่มีต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลมังคุด (*Garcinia mangostana* L.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุจิตรา รตนะมโน 2541. ผลของแสงและอุณหภูมิต่อปริมาณรงควัตถุและเอนไซม์ฟีนอลานีน แอมโมเนียไลเอส ในเปลือกผลมังคุด. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Abeles, F.B., P.W. Morgan and M.E. Saltveit. 1992. **Ethylene in Plant Biology**, 2nd eds. Academic Press, NY.
- Aharoni, A., C.H.R.D. Vos, M. Wein, Z. Sun, R. Greco, A. Kroon, J.N.M. Mol and A.P. O'Connell. 2001. The strawberry *FaMYB1* transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. **Plant J.** 28:319-332.
- Ali, M.B., N. Singh, A.M. Shohael, E.J. Hahn, K.Y. Paek. 2006. Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. **Plant Sci.** 171: 147-154.
- Allan, A.C., R.P. Hellens and W.A. Laing. 2008. MYB transcription factors that colour our fruit. **Trends Plant Sci.** 13:99-102.
- Almeida, J.R.M., E. D'Amico, A. Preuss, F. Carbone, C.H.R. de Vos, B. Deiml, F. Mourgues, G. Perrotta, T.C. Fischer, A.G. Bovy, S. Martens and C. Rosati. 2007. Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis

during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). **Arch. Biochem. Biophys.** 465:61-71.

Atchley, W.R., W. Terhalle and A. Dress. 1999. Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain. **J. Mol. Evol.** 48:501-516.

Auta, J., Y. Chen, W. Ruzicka and D. Grayson. 2007. Nucleic acid quantitation using the competitive polymerase chain reaction. pp. 341-361. *In* **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology**. Kluwer Academic Publishers, New York.

Avila, J., C. Nieto, L. Canas, M.J. Benito and J. Paz-Ares. 1993. *Petunia hybrida* genes related to the maize regulatory C1 gene and to animal myb proto-oncogenes. **Plant J.** 3:553-562.

Awad, M.A. and A. de Jager. 2002. Relationships between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin. **Sci. Hortic.** 92: 265–276.

Bailey, B.A., H. Bae, M.D. Strem, G.A. de Mayolo, M.J. Guiltinan, J.A. Verica, S.N. Maximova and J.H. Bowers. 2005. Developmental expression of stress response genes in *Theobroma cacao* leaves and their response to Nep1 treatment and a compatible infection by *Phytophthora megakarya*. **Plant Physiol. Biochem.** 43:611-622.

Ban, Y., C. Honda, Y. Hatsuyama, M. Igarashi, H. Bessho and T. Moriguchi. 2007. Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. **Plant Cell Physiol.** 48:958-970.

Bogs, J., F.W. Jaffe, A.M. Takos, A.R. Walker and S.P. Robinson. 2007. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. **Plant Physiol.** 143:1347-1361.

- Borevitz, J.O., Y. Xia, J. Blount, R.A. Dixon and C. Lamb. 2000. Activation tagging Identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. **Plant Cell** 12:2383-2394.
- Boss, P.K., C. Davies and S. Robinson. 1996. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. **Plant Physiol.** 111: 1059-1066.
- _____ and C. Davies. 2001. Molecular biology of sugar and anthocyanin accumulation in grape berries, pp. 1-34. *In* Roubelakis-Angelakis, K.A., ed. **Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine**. Kluwer Academic Press, The Netherlands.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Bradley, J.M., K.M. Davies, S.C. Deroles, S.J. Bloor and D.H. Lewis. 1998. The maize LC regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of Petunia. **Plant J.** 13: 381–392.
- Britsch, L., B. Ruhnau-Brich and G. Forkmann. 1992. Molecular cloning, sequence analysis, and *in vitro* expression of flavanone 3 beta-hydroxylase from *Petunia hybrida*. **J. Biol. Chem.** 267: 5380– 5387.
- _____, J. Dedio, H. Saedler and G. Forkmann. 1993. Molecular characterization of flavanone 3 beta-hydroxylases consensus sequence, comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues. **Eur. J. Biochem.** 217, 745–754.
- Bronstein, I., J. Fortin, P.E. Stanley, G.S.A.B. Stewart and L.J. Kricka. 1994. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. **Anal. Biochem.** 219:169-181.

- Broun, P. 2005. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. **Curr. Opin. Plant Biol.** 8:272-279.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J. Mol. Endocrinol.** 25: 169-193.
- Carey, C.C., J.T. Strahle, D.A. Selinger and V.L. Chandler. 2004. Mutations in the pale aleurone color1 regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar TRANSPARENT TESTA GLABRA1 gene in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell** 16:450-464.
- Castellarin, S. and G. Di Gaspero. 2007. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. **BMC Plant Biol.** 7:46.
- Chervin, C., A. El-Kereamy, J.P. Roustan, A. Latch, J. Lamon and M. Bouzayen. 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. **Plant Sci.** 167:1301-1305.
- Chopra, S., Hoshino, A., Boddu, J. and Iida, S. (2006) Flavonoid pigments as tools in molecular genetics, pp. 147–173. In Glotewold, E., ed. **The Science of Flavonoids**. Springer Press, New York.
- Cox, K.A., T.K. McGhie, A. White and A.B. Woolf. 2004. Skin colour and pigment changes during ripening of 'Hass' avocado fruit. **Postharvest Biol. Technol.** 31:287-294.

- Dale, J. W. and M. von Schantz. 2003. **From Genes to Genomes Concepts and Applications of DNA Technology**. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex.
- Davies, K. 2004. **Plant Pigments and Their Manipulation**. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
- de Vetten, N., F. Quattrocchio, J. Mol and R. Koes. 1997. The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals. **Genes Dev.** 11:1422-1434.
- de Wet, J.R., K.V. Wood, D.R. Helinski and M. DeLuca. 1985. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. **PNAS** 82:7870-7873.
- Deikman, J., R. Xu, M.L. Kneissl, J.A. Ciardi, K.-N. Kim and D. Pelah. 1998. Separation of cis elements responsive to ethylene, fruit development, and ripening in the 5'-flanking region of the ripening-related E8 gene. **Plant Mol. Biol.** 37:1001-1011.
- Delgado-Vargas, F. and O. Paredes-Lopez. 2002. **Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses**. CRC Press, USA.
- Du, C.T. and F.J. Francis. 1977. Anthocyanin of mangosteen (*Garcinia mangostana* L). **J. Food Sci.** 42: 1667-1668.
- El-Kereamy A., C. Chervin, J.P. Roustan, V. Cheynier, J.M. Souquet, M. Moutounet, J. Raynal, C. Ford, A. Latche, J.C. Pech and M. Bouzayen. 2003. Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. **Physiol. Plant.** 119(2): 175-182.

- Espley, R.V., R.P. Hellens, J. Putterill, D.E. Stevenson, S. Kuty-Amma and A.C. Allan. 2007. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. **Plant J.** 49: 414-427.
- Forkmann, G. 1991. Flavonoids as Flower Pigments: The formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. **Plant Breeding.** 106: 1-26.
- _____ and W. Heller. 1999. Biosynthesis of flavonoids. pp. 713–748. *In* Sankawa, U., ed. **Comprehensive Natural Products Chemistry.** Amsterdam, Elsevier.
- Freeman, W. M., S. J. Walker and K. E. Vrana. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **BioTechniques** 26: 112-125.
- Gachon, C., A. Mingam and B. Charrier. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **J. Exp. Bot.** 55(402): 1445-1454.
- Giambernardi, T.A. and R.J. Klebe. 2000. Relative reverse transcription-polymerase chain reaction. pp. 51-58. *In* **Developmental Biology Protocols.** Humana Press, NJ
- Goff, S.A., K.C. Cone and V.L. Chandler. 1992. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: Evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. **Genes Dev.** 6: 864-875.
- _____, T.M. Klein, B.A. Roth, M.E. Fromm, K.C. Cone, J.P. Radicella and V.L. Chandler. 1990. Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of *B* regulatory genes into maize tissues. **EMBO J.** 9: 2517-2522.
- Gollop, R., S. Even, V. Colova-Tsolova and A. Perl. 2002. Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. **J. Exp. Bot.** 53(373): 1397-1409.

- Gomez-Cordoves, M.C., F. Varela, C. Larrigaudiere and M. Vendrell. 1996. Effect of ethephon and seniphos treatments on the anthocyanin composition of starking apples. **J. Agric. Food Chem.** 44: 3449-3452.
- Goodrich, J., R. Carpenter and E.S. Coen. 1992. A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species. **Cell.** 68:955-964.
- Goto-Yamamoto, N., G.H. Wan, K. Masaki and S. Kobayashi. 2002. Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). **Plant Sci.** 162: 867-872.
- Griesser, M., T. Hoffmann, M.L. Bellido, C. Rosati, B. Fink, R. Kurtzer, A. Aharoni, J. Munoz-Blanco and W. Schwab. 2008. Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit. **Plant Physiol.** 146: 1528-1539.
- Gross, J. 1987. **Pigments in Fruits.** Academic Press, London.
- Grotewold, E., M.B. Sainz, L. Tagliani, J.M. Hernandez, B. Bowen and V.L. Chandler. 2000. Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. **PNAS** 97: 13579-13584.
- Heim, M.A., M. Jakoby, M. Werber, C. Martin, B. Weisshaar and P.C. Bailey. 2003. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. **Mol. Biol. Evol.** 20: 735-747.
- Heller, W. and G. Forkmann. 1994. Biosynthesis of flavonoids, pp. 499-535. In Harborne, J.B., ed. **The Flavonoids- Advances in Research since 1986.** Chapman and Hall, London.

- Hernandez, J.M., G.F. Heine, N.G. Irani, A. Feller, M.G. Kim, T. Matulnik, V.L. Chandler and E. Grotewold. 2004. Different mechanisms participate in the R-dependent activity of the R2R3 MYB transcription factor C1. **J. Biol. Chem.** 279: 48205-48213.
- Holcroft, D.M., M.I. Gil and A.A. Kader. 1998. Effect of carbon dioxide on anthocyanins, phenylalanine ammonia lyase and glucosyltransferase in the arils of stored pomegranates. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 123(1): 136-140.
- Holton, T.A. and E.C. Cornish. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **Plant Cell** 7: 1071-1083.
- Honda, C., K. Nobuhiro, W. Masato, K. Satoru, K. Shozo, S. Junichi, Z. Zilian, T. Tomomi and M. Takaya, 2002. Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. **Plant Physiol. Biochem.** 40: 955-962.
- Hrazdina, G. and G.J. Wagner. 1985. Metabolic pathways as enzyme complexes: evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. **Arch. Biochem. Biophys.** 237: 88-100.
- _____ and R.A. Jensen. 1992. Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.** 43: 241-267.
- Jaakola, L., K. Maatta, A.M. Pirttila, R. Torrenen, S. Karenlampi, and A. Hohtola 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. **Plant Physiol.** 130: 729-739.
- Jackson, D., F. Culianez-Macia, A.G. Prescott, K. Roberts and C. Martin. 1991. Expression patterns of myb genes from *Antirrhinum* flowers. **Plant Cell** 3: 115-125.

- _____, K. Roberts, and C. Martin. 1992. Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Antirrhinum majus*. **Plant J.** 2: 425-434.
- Jeong, S.T., N. Goto-Yamamoto, K. Hashizume and M. Esaka. 2006. Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). **Plant Sci.** 170(1): 61-69.
- _____, _____, S. Kobayashi and M. Esaka. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. **Plant Sci.** 167: 247-252.
- Jiang, Y., D.C. Joyce and L.A. Terry. 2001. 1-Methycyclopropene treatment affects strawberry fruit decay. **Postharvest Biol. Technol.** 23: 227-232.
- Johnson, E.T., S. Ryu, H. Yi, B. Shin, H. Cheong and G. Choi. 2001. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. **Plant J.** 25: 325-333.
- Ju Z.G., Y. Yuan, C. Liu and S. Xin. 1995. Relationships among phenylalanine ammonia-lyase activity, simple phenol concentrations and anthocyanin accumulation in apple. **Sci. Hortic.** 61: 215-266.
- Ju, Z. 1998. Fruit bagging, a useful method for studying anthocyanin synthesis and gene expression in apples. **Sci. Hortic.** 77: 155-164.
- Kanchanapoom, K. and M. Kanchanapoom. 1998. Mangosteen, pp. 191-216. In Shaw P.E., Jr., H.T. Chan and S. Nagi, eds. **Tropical and Subtropical Fruits**. AgScience Inc., USA.

- Kim, S., L. Jae-Rin, H. Sung-Tae, Y. Yung-Keun, A. Gynheung and K. Seong-Ryong. 2003. Molecular cloning and analysis of anthocyanin biosynthesis genes preferentially expressed in apple skin. **Plant Sci.** 165: 403-413.
- Klempnauer, K.H., T.J. Gonda and J. Michael Bishop. 1982. Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: The architecture of a transduced oncogene. **Cell** 31: 453-463.
- Kobayashi, S., M. Ishimaru, C.K. Ding, H. Yakushiji, and N. Goto. 2001. Comparison of UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. **Plant Sci.** 160: 543-550.
- _____, _____, K. Hiraoka and C. Honda. 2002. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. **Planta** 215: 924-933.
- _____, N. Goto-Yamamoto and H. Hirochika. 2004. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. **Science** 304: 982.
- Koes, R., W. Verweij and F. Quattrocchio. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. **Trends Plant Sci.** 10: 236-242.
- Kondo, S., K. Hiraoka, S. Kobayashi, C. Honda and N. Terahara. 2002. Changes in the expression of anthocyanin biosynthetic genes during apple development. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 127: 971-976.
- Konig, P., R. Giraldo, L. Chapman and D. Rhodes. 1996. The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA. **Cell** 85: 125-136.

- Kosiyachinda, S. and Tansiriyakul, S. 1988. Respiration rate and ethylene production of fresh fruits, vegetables and cut flowers. **J. Food.** 18: 1-10 (In Thai).
- Kreuzaler, F., Ragg, H., Fauz, E., Kuhn, D.N. and K. Hahlbrock. 1983. UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. **PNAS** 80: 2591-2593.
- Kristiansen, K.N. and W. Rohde. 1991. Structure of the *Hordeum vulgare* gene encoding dihydroflavonol-4-reductase and molecular analysis of ANT18 mutants blocked in flavonoid synthesis. **Mol. Gen. Genet.** 230: 49-59.
- Krumlauf, R. 1994. Analysis of gene expression by Northern blot. **Mol. Biotechnol.** 2: 227-242.
- Kumar, A. and B.E. Ellis. 2001. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry: structure, expression, and evolution. **Plant Physiol.** 127: 230-239.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform.** 5: 150-163.
- Lacombe, E., S. Hawkins, J.V. Doorsselaere, J. Piquemal, D. Goffner, O. Poeydomenge, A.M. Boudet and J. Grima-Pettenati. 1997. Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. **Plant J.** 11: 429-441.
- Liew, C.F., C.J. Goh, C.S. Loh and S.H. Lim. 1998. Cloning and characterization of full-length cDNA clones encoding chalcone synthase from the orchid *Bromheadia finlaysoniana*. **Plant Physiol. Biochem.** 36:647-656.
- Lipsick, J.S. 1996. One billion years of myb. **Oncogene** 13: 223-235.

- Lister, C.E., J.E. Lancaster and J.R.L. Walker. 1996. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars. **J. Sci. Food Agric.** 71: 313-330.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods.** 25: 402-408.
- Lopez-Gomez, R. and M.A. Gomez-Lim. 1992. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. **HortScience** 27: 440-442.
- Lorenz, W.W., R.O. McCann, M. Longiaru and M.J. Cormier. 1991. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. **PNAS** 88: 4438-4442.
- Macheix, J.J., A. Fleuriet and J. Billot. 1990. **Fruit Phenolics.** CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- MacLean, D.D., D.P. Murr, J.R. DeEll and C.R. Horvath. 2006. Postharvest variation in apple (*Malus domestica* Borkh.) flavonoids following harvest, storage, and 1-MCP treatment. **J. Agr. Food Chem.** 4(3): 870-8.
- Mahesh, V., J. Rakotomalala, L. Le Gal, H. Vigne, A. de Kochko, S. Hamon, M. Noirot and C. Campa. 2006. Isolation and genetic mapping of a *Coffea canephora* phenylalanine ammonia-lyase gene (CcPAL1) and its involvement in the accumulation of caffeoyl quinic acids. **Plant Cell Rep.** 25: 986-992.
- Mandaokar, A. and J. Browse. 2009. MYB108 acts together with MYB24 to regulate jasmonate-mediated stamen maturation in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 149: 851-862.

- Marques, S.M. and J.C.G. Esteves da Silva. 2009. Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. **IUBMB Life**. 61: 6-17.
- Martin, C. and J. Paz-Ares. 1997. MYB transcription factors in plants. **Trends Genet.** 13: 67-73.
- _____, A. Prescott, S. Mackay, J. Bartlett and E. Vrijlandt. 1991. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. **Plant J.** 1: 37-49.
- Martin, F.W. 1980. Durian and mangosteen, pp. 407-414. *In* S. Nagy and P.E. Shawx, eds. **Tropical and Subtropical Fruits : Composition, Properties and Uses**. The AVI Publishing, Westport, CN.
- Matthews, J.C., K. Hori and M.J. Cormier. 1977. Purification and properties of Renilla reniformis luciferase. **Biochemistry** 16: 85-91.
- Matus, J. T., F. Aquea and P. Arce-Johnson. 2008. Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across Vitis and *Arabidopsis* genomes. **BMC Plant Biol.** 8: 83.
- Mengiste, T., X. Chen, J. Salmeron and R. Dietrich. 2003. The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 15: 2551-2565.
- Mercado-Silva, E., P. Benito-Bautista and M.A. Garcia-Velasco. 1998. Fruit development, harvest index and ripening changes of guavas produced in central Mexico. **Postharvest Biol. Technol.** 13: 143-150.
- Mol, J., E. Grotewold and R. Koes. 1998. How genes paint flowers and seeds. **Trends Plant Sci.** 3: 212-217.

- Montgomery, J., V. Pollard, J. Deikman and R.L. Fischer. 1993. Positive and negative regulatory regions control the spatial distribution of polygalacturonase transcription in tomato fruit pericarp. **Plant Cell** 5: 1049-1062.
- Mori, S., H. Kobayashi, Y. Hoshi, M. Kondo and M. Nakano. 2004. Heterologous expression of the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene of *Vinca major* alters flower color in transgenic *Petunia hybrida*. **Plant Cell Rep.** 22: 415-421.
- Moyano, E., I. Portero-Robles, N. Medina-Esco-bar, V. Valpuesta, J. Muñoz-Blanco and J.L. Caballero. 1998. A fruit specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. **Plant Physiol.** 117: 711-716.
- Muir, S.R., G.J. Collins, S. Robinson, S. Hughes, S. Bovy, C.H. De Vos, A.J. van Tunen and M.E. Verhoeven. 2001. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. **Nature Biotechnol.** 19: 470-474.
- Murre, C., P.S. McCaw and D. Baltimore. 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. **Cell** 56: 777-783.
- Nakajima, Y., T. Kimura, K. Sugata, T. Enomoto, A. Asakawa, H. Kubota, M. Ikeda and Y. Ohmiya. 2005. Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. **BioTechniques** 38: 891-894.
- Nakasone, H.Y. and R.E. Paull. 1998. **Tropical Fruits**. CAB International, Wallingford.

- Naylor, L.H. 1999. Reporter gene technology: the future looks bright. **Biochem. Pharmacol.** 58: 749-757.
- Nesi, N., C. Jond, I. Debeaujon, M. Caboche and L. Lepiniec. 2001. The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. **Plant Cell** 13: 2099-2114.
- Noichinda, S., K. Bodhipadma, S. Singkhornart and S. Ketsa. 2007. Changes in pectic substances and cell wall hydrolase enzymes of mangosteen (*Garcinia mangostana*) fruit during storage. **NZ J. Crop Hort. Sci.** 35: 229-233.
- Office of Agriculture Economics. 2009. **Export statistics: Mangosteen.** Available source: <http://www.oae.go.th/export/13statistic01Mug.xls> , February 10, 2009.
- Ogata, K., H. Hojo, S. Aimoto, T. Nakai, H. Nakamura, A. Sarai, S. Ishii and Y. Nishimura. 1992. Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. **PNAS** 89: 6428-6432.
- Osman, M.B. and A.R. Milan. 2006. **Mangosteen: *Garcinia mangostana* L.** Southampton Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK.
- Pabo, C.O. and R.T. Sauer. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. **Annu. Rev. Biochem.** 61: 1053-1095.
- Palapol, Y., S. Ketsa, D. Stevenson, J.M. Cooney, A.C. Allan and I.B. Ferguson. 2009. Colour development and quality of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit during ripening and after harvest. **Postharvest Biol. Technol.** 51: 349-353.
- Paull, R.E. and S. Ketsa. 2004. Mangosteen. In Gross, K.C., C.Y. Wang and M.E. Salveit, eds. **The Commercial Storage of Fruits Vegetables and florist and Nursery Stocks.**

- USDA Agric. Handb. No. 66 (revised). Available source
<http://usna.usda.gov/hb66/092mangosteen.pdf>, May 10, 2006.
- Pelletier, M.K., I.E. Burbulis and B. Winkel-Shirley. 1999. Disruption of specific flavonoid genes enhances the accumulation of flavonoid enzymes and end-products in *Arabidopsis* seedlings. **Plant Mol. Biol.** 40: 45-54.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucl. Acids Res.** 29: e45.
- Piccaglia, R., M. Marotti and G. Baldoni. 2002. Factors influencing anthocyanin content in red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L. f. *rubra* (L.) Thell.). **J. Sci. Food Agric.** 82: 1504-1509.
- Popenoe, W. 1974. **Manual of Tropical and Subtropical Fruits.** Hafner Press, New York.
- Quaadvlieg, N., J. Dockx, G. Keultjes, P. Kock, J. Wilmering, P. Weisbeek and S. Smeekens. 1996. Identification of a light-regulated MYB gene from an *Arabidopsis* transcription factor gene collection. **Plant Mol. Biol.** 32: 987-993.
- Ralston, L., S. Subramanian, M. Matsuno and O. Yu. 2005. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases. **Plant Physiol.** 137: 1375-1388.
- Ramsay, N.A. and B.J. Glover. 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. **Trends Plant Sci.** 10: 63-70.
- Ratanamarno, S. 1999. **Effects of light and temperature on pigment contents and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in mangosteen pericarp.** Ph.D. Thesis, Chiangmai University (in Thai).

- _____, U. Chamnong and S. Kobkiat. 2005. Effects of bagging and storage temperature on anthocyanin content and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit pericarp during maturing. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 27(4): 711-717.
- Rein, M. J. 2005. **Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins.**
Available source: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/rein>. March 15, 2006.
- Rogiers, S.Y. and N.R. Knowles. 1999. A comparison of preharvest and postharvest ethylene production and respiration rates of saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) fruit during development. **Can. J. Bot.** 77: 323-332.
- _____, G.N.M. Kumar and N.R. Knowles. 1998. Regulation of ethylene production and ripening by saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) fruit. **Can. J. Bot.** 76: 1743-1754.
- Saito, K., M. Kobayashi, Z. Gong, Y. Tanaka and M. Yamazaki. 1999. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: Molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*. **Plant J.** 17: 181-189.
- Sambrook, J. and D.W. Russel 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3rd eds.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Saure, M.C. 1990. External control of anthocyanin formation in apple. **Sci. Hortic.** 42: 181-218.
- Schwinn, K., J. Venail, Y. Shang, S. Mackay, V. Alm, E. Butelli, R. Oyama, P. Bailey, K. Davies and C. Martin. 2006. A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. **Plant Cell** 18: 831-851.

- Shin, Y., J.A. Ryu, R.H. Liu, J.F. Nock and C.B. Watkins. 2008. Harvest maturity, storage temperature and relative humidity affect fruit quality, antioxidant contents and activity, and inhibition of cell proliferation of strawberry fruit. **Postharvest Biol. Technol.** 49: 201-209.
- Sherf B.A., S.L. Navarro, R.R. Hannah and K.V. Wood. 1996 Dual-luciferase reporter assay: an advanced co-reporter technology integrating firefly and *Renilla* luciferase assay. **Promega Notes** 57: 2.
- Smith, T.F., C. Gaitatzes, K. Saxena and E.J. Neer. 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. **Trends Biochem. Sci.** 24: 181-185.
- Solano, R., A. Stepanova, Q. Chao and J.R. Ecker. 1998. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. **Genes Dev.** 12: 3703-3714.
- Solano, R., C. Nieto, J. Avila, L. Canas, I. Diaz and J. Paz-Ares. 1995. Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. **EMBO J.** 14: 1773-1784.
- Sparvoli, F., C. Martin, A. Scienza, G. Gavazzi and C. Tonelli. 1994. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). **Plant Mol. Biol.** 24: 743-755.
- Spayd, S.E., J.M. Tarara, D.L. Mee, and J.C. Ferguson. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. **Amer. J. Enol. Vitic.** 53: 171-182.

- Stevenson, D.E., R. Wibisono, D.J. Jensen, R.A. Stanley and J.M. Cooney. 2006. Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435[®]). **Enzyme Microb. Technol.** 39: 1236-1241.
- Stracke, R., M. Werber and B. Weisshaar. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Curr. Opin. Plant Biol.** 4: 447-456.
- Streit, S., C.W. Michalski, M. Erkan, J. Kleeff and H. Friess. 2009. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. **Nat. Protocols** 4: 37-43.
- Takos, A.M., F.W. Jaffe, S.R. Jacob, J. Bogs, S.P. Robinson and A.R. Walker. 2006. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. **Plant Physiol.** 142: 1216-1232.
- Tamagnone, L., A. Merida, A. Parr, S. Mackay, F.A. Culianez-Macia, K. Roberts and C. Martin. 1998. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. **Plant Cell** 10: 135-154.
- Tanaka, Y., S. Tsuda and T. Kusumi. 1998. Metabolic engineering to modify flower color. **Plant Cell Physiol.** 39: 1119-1126.
- Tira-Umphon, A., J. P. Roustan and C. Chervin. 2007. The stimulation by ethylene of the UDP glucose-flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UGFT) in grape tissues is independent from the MybA transcription factors. **Vitis** 46: 210-211.
- Tohge, T., Y. Nishiyama, M.Y. Hirai, M. Yano, J.I. Nakajima, M. Awazuhara, E. Inoue, H. Takahashi, D.B. Goodenowe, M. Kitayama, M. Noji, M. Yamazaki and K. Saito. 2005.

- Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. **Plant J.** 42: 218-235.
- Toledo-Ortiz, G., E. Huq and P.H. Quail. 2003. The *Arabidopsis* Basic/Helix-Loop-Helix transcription factor family. **Plant Cell** 15: 1749-1770.
- Tongdee, S.C. and A. Suwanagul. 1989. Postharvest mechanical damage in mangosteen. **ASEAN Food J.** 4(4): 151-155.
- Tsuda, T., M. Yamaguchi, C. Honda and T. Moriguchi. 2004. Expression of anthocyanin biosynthesis genes in the skin of peach and nectarine fruit. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 129: 857-862.
- Ubi, B.E., C. Honda, H. Bessho, S. Kondo, M. Wada, S. Kobayashi, T. Moriguchi. 2006. Expression analysis of anthocyanin biosynthesis genes in apple skin: Effect of UV-B and temperature. **Plant Sci.** 170: 571-578.
- VanGuilder, H.D., K.E. Vrana and W.M. Freeman. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **BioTechniques** 44: 619-626.
- Walker, A.R., E. Lee, J. Bogs, D.A.J. McDavid, M.R. Thomas and S.P. Robinson. 2007. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. **Plant J.** 49: 772-785.
- _____, P.A. Davison, A.C. Bolognesi-Winfield, C.M. James, N. Srinivasan, T.L. Blundell, J.J. Esch, M.D. Marks and J.C. Gray. 1999. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. **Plant Cell** 11: 1337-1349.

- Wang, H., O. Arakawa and Y. Motomura. 2000. Influence of maturity and bagging on the relationship between anthocyanin accumulation and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in 'Jonathan' apples. **Postharvest Biol. Technol.** 19: 123-128.
- Weston, K. 1998. Myb proteins in life, death and differentiation. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 8: 76-81.
- Wills, R., B. McGlasson, D. Graham and D. Joyce. 2007. **Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit, Vegetables and Ornamentals** (5th ed.). UNSW Press. Sydney.
- Wilson, T. and J.W. Hastings. 1998. BIOLUMINESCENCE. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.** 14: 197-230.
- Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiol.** 126: 485-493.
- Wood, K.V., J.R. de Wet, N. Dewji and M. DeLuca. 1984. Synthesis of active firefly luciferase by *in vitro* translation of RNA obtained from adult lanterns. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 124: 592-596.
- Yamazaki, M., E. Yamagishi, Z. Gong, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, Y. Tanaka, T. Kusumi, M. Yamaguchi and K. Saito. 2002. Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunia hybrida*: molecular cloning, biochemical properties and developmentally regulated expression. **Plant Mol. Biol.** 48: 401-411.
- Yapwattanaphum, C., Subhadrabanhu, S. Sugiura, A., Yonemori, K. and Utsunomiya, N. 2002. Utilisation of some *Garcinia* species in Thailand. **Acta Hort.** 575(2): 563-570.

- Zhang, W., K. Chen, B. Zhang, C. Sun, C. Cai, C. Zhou, W. Xu, W. Zhang and I.B. Ferguson. 2005. Postharvest responses of Chinese bayberry fruit. **Postharvest Biol. Technol.** 37: 241-251.
- Zimmermann, I.M., M.A. Heim, B. Weisshaar and J.F. Uhrig. 2004. Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. **Plant J.** 40: 22-34.
- Zipper, H., H. Brunner, J. Bernhagen and F. Vitzthum. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucl. Acids Res.** 32: e103.
- Zuker, A., T. Tzfira, H. Ben-Meir, M. Ovadis, E. Shklarman, H. Itzhaki, G. Forkmann, S. Martens, I. Neta-Sharir, D. Weiss and A. Vainstein. 2002. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. **Mol. Breeding** 9: 33-41.

APPENDIX

Appendix Table 1 Colour development (L*, a*, b* and hue value) of mangosteen fruit harvested at stage 1 compared to stage 0.

Stage	L* value ¹	a* value ^{1,2}	b* value ¹	hue value ¹
0	68.8a	-7.9f	38.8a	101.5a
1	61.1b	1.0e	33.8b	88.1b
2	56.8c	11.8c	27.1c	66.4c
3	46.3d	21.7b	18.7d	40.8d
4	35.0e	30.1a	13.2e	23.7e
5	25.6f	17.8b	4.8f	15.1f
6	23.0f	4.9d	0.3g	3.7g
<i>F</i> -test	***	***	***	***

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

² The ¹ values were $x+100$ transformed data and untransformed values were presented

***= significantly different at $P \leq 0.01$

Appendix Table 2 Fruit colour (L*, a*, b* and hue value) of mangosteen at stage 6 developed from 6 different maturity stages.

Stage	L* value ¹	a* value ¹	b* value ¹	hue value ¹
1	24.5	4.9ab	0.47	5.23
2	23.6	4.9ab	0.40	4.69
3	22.9	5.6a	0.47	4.54
4	23.1	4.6b	0.46	5.57
5	23.6	4.7b	0.49	5.94
6	23.0	3.7c	0.26	4.13
<i>F</i> -test	ns	**	ns	ns

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

** = significantly different at $P \leq 0.01$

Appendix Table 3 Ethylene production ($\text{mg kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$) of mangosteen fruit at stage 6 developed from 6 different maturity stages.

Days after harvest (days)	Ethylene production ($\text{mg kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ¹
0	1.02l
0.25	1.59kl
0.5	2.13kl
0.75	2.63jk
1.0	3.39ij
1.25	3.51ij
1.5	4.36hi
1.75	4.91gh
2.0	5.05gh
2.25	5.44fgh
2.5	5.99efg
2.75	6.46def
3.0	6.91cde
3.5	7.68abc
4.0	7.70abc
4.5	8.17ab
5.0	8.49a
6	8.00abc
7	7.81abc
8	7.90abc
9	7.17bcd
<i>F</i> -test	***

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 4 Total anthocyanin content (mg kg^{-1}) of mangosteen at stage 6 developed from 6 different maturity stages.

Stage	Outer pericarp ¹	Inner pericarp ¹
1	3550.3d	312.5c
2	3629.4d	331.9c
3	3765.2cd	407.4bc
4	4239.9ab	488.8ab
5	4050.2bc	385.8bc
6	4509.9a	544.8a
<i>F</i> -test	***	**

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 5 Fruit colour (hue value) of mangosteen fruit treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h +1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest										
	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13
Air (control)	88.9	28.1b	22.5b	17.6b	13.8c	11.6c	12.9b	10.2bc	5.8c		
ethylene	88.9	28.0b	21.9b	17.5b	13.9c	10.9c	9.7b	6.8c			
1-MCP	88.9	78.3a	75.9a	65.8a	66.1a	59.1a	52.1a	45.5a	23.5a	12.7	8.1
E+M	88.9	29.2b	23.9b	23.4b	21.7d	21.0b	16.7b	17.9b	12.2b	10.3	5.6
<i>F</i> -test	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	na	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 6 Colour index (score) of mangosteen fruit treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h +1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest										
	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13
Air (control)	1.0	3.7a	4.2a	4.5b	4.9b	5.1a	5.2a	5.8b	6.0a		
ethylene	1.0	3.8a	4.3a	4.9a	5.1a	5.2a	5.9a	6.0a			
1-MCP	1.0	1.2b	1.3c	1.9d	2.0c	1.9c	2.3d	2.8d	4.9b	5.0	5.8
E+M	1.0	3.7a	3.9b	4.0c	4.2c	4.7b	4.7c	4.9c	5.4b	5.9	6.0
<i>F</i> -test	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	na	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 7 Pericarp firmness (N) of mangosteen fruit treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h +1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest										
	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13
Air (control)	815.0	105.3b	82.7b	65.8b	58.9a	49.1b	47.4b	47.9b	44.0a		
ethylene	815.0	97.2b	85.8b	68.4b	58.9a	57.4b	48.4b	42.9b			
1-MCP	815.0	224.0a	161.3a	103.9a	83.4a	73.1a	56.1ab	54.3a	47.4a	52.7	48.4
E+M	815.0	106.7b	101.0b	80.3b	73.4a	68.6a	66.7a	54.8a	50.7a	56.5	43.4
<i>F</i> -test	ns	***	**	**	ns	**	*	**	ns	na	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 8 Total anthocyanin content (mg kg^{-1}) of mangosteen fruit treated with the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) $200 \mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h + $1 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest ¹										
	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13
Air (control)	98.8	391.2a	582.3ab	832.6b	1307.0a	1630.5b	2131.2b	2944.8a	3428.8a		
ethylene	98.8	384.9a	667.0a	1284.4a	1312.4a	2028.7a	2491.1a	3239.8a			
1-MCP	98.8	131.5b	180.0c	262.0d	451.3b	590.5d	937.1c	967.7c	1893.3b	2192.0	2990.3
E+M	98.8	422.3a	463.0b	518.5c	695.1b	997.2c	1073.6c	1402.1b	2015.3b	3039.7	2979.4
<i>F</i> -test	ns	***	**	***	***	***	***	***	**	na	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 9 Fruit colour (hue value) of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

Treatment	Days after harvest ¹										
	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13
Air (control)	88.9	34.9	21.1	18.1	13.1	13.3	11.1	5.7	7.4		
15°C (7 d) + 25°C	88.9	67.3	65.5	69.7	68.6	58.2	54.0	48.3	19.7	16.5	5.9
<i>t</i> -test	ns	**	***	***	***	*	***	***	***		

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 10 Colour index (score) of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

Treatment	Days after harvest ¹										
	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13
Air (control)	1.0	3.4	4.2	4.9	5.0	5.0	5.5	5.9	6.0		
15°C (7 d) + 25°C	1.0	1.3	1.7	2.1	2.0	2.2	2.7	2.8	4.7	5.3	6.0
<i>t</i> -test	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***	

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

ns = non-significantly different

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 11 Pericarp firmness (N) of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

Treatment	Days after harvest ¹										
	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13
Air (control)	815.0	132.2	75.3	65.0	61.2	52.2	59.1	43.8	45.7		
15°C (7 d) + 25°C	815.0	327.9	266.9	266.1	215.6	172.3	131.0	120.3	64.4	50.5	45.7
<i>t</i> -test	ns	**	*	***	*	*	**	***	**		

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 12 Total anthocyanin content (mg kg⁻¹) of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

Treatment	Days after harvest ¹										
	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13
Air (control)	98.8	275.2	790.7	871.9	1334.0	1849.3	2386.6	2931.7	3250.7		
15°C (7 d) + 25°C	98.8	167.2	222.6	270.5	497.7	347.1	435.2	484.0	1340.5	2023.2	3240.6
<i>F</i> -test	ns	ns	ns	**	***	*	***	**	***		

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 13 The relative expression of mangosteen anthocyanin biosynthesis genes during colour development harvested from tree.

Stage	Genes ¹							
	PAL	CHS	CHI	F3H	F3'H	DFR	LDOX	UFGT
0	1.00d	1.00e	1.00d	1.00e	1.00f	1.00c	1.00d	1.00e
1	2.78c	5.95d	7.11c	19.87d	8.87e	13.04b	11.97c	125.77d
2	3.63c	7.51c	12.15bc	30.20c	13.82d	12.95bb	16.02c	187.15c
3	3.70c	6.86	10.26bc	26.07cd	10.97de	14.03b	18.13c	178.68c
4	5.62b	9.69b	14.16b	45.98b	23.25b	31.83a	39.08b	370.74b
5	11.51a	13.10a	26.65a	70.03a	42.58a	31.76a	58.95a	571.45a
6	6.11b	5.70d	12.74bc	43.37b	17.28c	17.03b	34.79b	225.21c
<i>F</i> -test	***	***	***	***	***	***	***	***

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 14 The relative expression of mangosteen anthocyanin biosynthesis genes during colour development after harvest.

Stage	Genes ¹							
	PAL	CHS	CHI	F3H	F3'H	DFR	LDOX	UFGT
0	1.00c	1.00e	1.00e	1.00e	1.00d	1.00c	1.00e	1.00f
1	5.30b	7.10d	8.80d	20.66d	22.10c	8.28c	10.34d	193.36e
2	12.83a	19.68b	28.15c	72.62b	44.39b	30.07b	32.15c	517.39c
3	16.26a	25.91a	44.91b	105.06a	69.34a	42.06a	56.49b	678.77ab
4	12.65a	16.65b	45.41b	98.36a	63.79a	29.02b	56.24b	645.10b
5	14.35a	18.24b	81.49a	95.92a	64.05a	35.33ab	69.10a	763.36a
6	7.51b	10.67c	27.16c	49.80c	31.65c	25.26b	35.68c	400.87d
<i>F</i> -test	***	***	***	***	***	***	***	***

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 15 The relative expression of *PAL* of mangosteen fruit treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h +1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
Air (control)	1.00	3.18a	3.49a	3.12a	2.06ab	
ethylene	1.00	2.36b	2.90b	2.87a	2.18a	
1-MCP	1.00	0.88d	1.01c	0.91b	1.43c	3.26
E+M	1.00	1.79c	0.44d	0.96b	1.61bc	2.43
<i>F</i> -test	ns	***	***	***	*	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 16 The relative expression of *CHS* of mangosteen fruit treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h +1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
Air (control)	1.00	3.18a	4.07a	3.87a	3.50a	
ethylene	1.00	2.76b	3.06b	3.56a	2.93ab	
1-MCP	1.00	0.73d	1.18c	1.21b	3.46a	4.46
E+M	1.00	2.09c	0.32d	0.76b	2.39b	4.42
<i>F</i> -test	ns	***	***	***	*	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 17 The relative expression of *CHI* of mangosteen fruit treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h +1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
Air (control)	1.00	3.86a	5.24a	4.26a	4.04a	
ethylene	1.00	3.61a	4.33b	4.34a	3.70ab	
1-MCP	1.00	1.04b	1.45c	1.27b	3.30ab	5.57
E+M	1.00	3.42a	0.72d	0.62b	3.10b	4.71
<i>F</i> -test	ns	***	***	***	ns	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 18 The relative expression of *F3H* of mangosteen fruit treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h +1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
Air (control)	1.00	4.63a	4.94a	4.27a	2.88a	
ethylene	1.00	4.62a	4.62a	3.29b	2.76a	
1-MCP	1.00	0.94b	1.12b	0.81c	1.27c	4.89
E+M	1.00	3.79a	0.70c	0.84c	2.25b	2.64
<i>F</i> -test	ns	***	***	***	***	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 19 The relative expression of *F3'H* of mangosteen fruit treated with ethylene the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h +1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
Air (control)	1.00	4.01a	4.36a	3.95a	2.66a	
ethylene	1.00	3.87a	3.87a	3.36a	2.47ab	
1-MCP	1.00	0.65c	0.81b	0.75b	1.31c	3.92
E+M	1.00	2.58b	0.53b	0.80b	1.84bc	2.42
<i>F</i> -test	ns	***	***	***	**	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 20 The relative expression of *DFR* of mangosteen fruit treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h + 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
Air (control)	1.00	3.06a	4.09a	4.16a	5.01a	
ethylene	1.00	2.17b	2.87b	3.18b	3.99ab	
1-MCP	1.00	0.43c	0.89c	0.85c	4.04ab	6.03
E+M	1.00	2.31b	0.37c	0.78c	3.08b	5.26
<i>F</i> -test	ns	***	***	***	*	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 21 The relative expression of *LDOX* of mangosteen fruit treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h +1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
Air (control)	1.00	5.30a	7.38a	7.87a	6.55a	
ethylene	1.00	5.44a	6.94a	6.35b	6.04a	
1-MCP	1.00	1.11c	1.86b	1.50c	4.52b	8.74
E+M	1.00	4.70b	1.01c	1.54c	4.36b	7.30
<i>F</i> -test	ns	***	***	***	**	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 22 The relative expression of *UFGT* of mangosteen fruit treated with ethylene and the ethylene inhibitor 1-MCP following 4 treatments; 1) air (control), 2) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h (ethylene treatment), 3) 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (1-MCP treatment) and 4) 200 $\mu\text{L L}^{-1}$ ethylene for 24 h +1 $\mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP for 12 h (E+M).

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
Air (control)	1.00	3.92a	4.84a	4.22a	3.26	
ethylene	1.00	4.12a	4.74a	3.84a	3.20	
1-MCP	1.00	0.95c	1.25b	1.19b	2.39	4.85
E+M	1.00	3.56b	1.07b	1.54b	3.00	3.66
<i>F</i> -test	ns	***	***	***	ns	na

¹ Mean values followed by different letters in the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ using DMRT

ns = non-significantly different

***= significantly different at $P \leq 0.001$

na = no analysis

Appendix Table 23 The relative expression of *PAL* of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
25°C (control)	1.00	3.04	3.90	3.45	2.51	
15°C (7 d) + 25°C	1.00	0.63	1.01	0.91	1.54	3.73
<i>t</i> -test	ns	*	**	**	*	

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

** = significantly different at $P \leq 0.01$

Appendix Table 24 The relative expression of *CHS* of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
25°C (control)	1.00	3.21	3.88	3.86	3.38	
15°C (7 d) + 25°C	1.00	0.70	0.87	0.83	1.18	5.04
<i>t</i> -test	ns	***	*	**	***	

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 25 The relative expression of *CHI* of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
25°C (control)	1.00	4.00	6.93	5.63	4.45	
15°C (7 d) + 25°C	1.00	0.82	0.84	0.68	1.23	5.84
<i>t</i> -test	ns	***	***	*	***	

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 26 The relative expression of *F3H* of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
25°C (control)	1.00	4.00	5.56	4.66	3.48	
15°C (7 d) + 25°C	1.00	0.78	0.76	0.69	1.17	5.95
<i>t</i> -test	ns	***	**	***	***	

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

ns = non-significantly different

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 27 The relative expression of *F3'H* of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
25°C (control)	1.00	3.31	5.07	4.37	2.83	
15°C (7 d) + 25°C	1.00	0.42	0.53	0.48	0.77	5.07
<i>t</i> -test	ns	**	**	*	***	

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 28 The relative expression of *DFR* of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
25°C (control)	1.00	2.63	2.76	3.06	4.51	
15°C (7 d) + 25°C	1.00	0.60	0.69	0.74	1.58	5.51
<i>t</i> -test	ns	***	*	**	***	

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

ns = non-significantly different

* = significantly different at $P \leq 0.05$

** = significantly different at $P \leq 0.01$ ***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 29 The relative expression of *LDOX* of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
25°C (control)	1.00	4.29	8.14	8.13	7.00	
15°C (7 d) + 25°C	1.00	0.74	0.73	0.74	1.26	9.35
<i>t</i> -test	ns	***	**	**	**	

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

ns = non-significantly different

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

Appendix Table 30 The relative expression of *UFGT* of mangosteen fruit stored at 25°C (control) and 15°C for 7 days then transferred to 25°C.

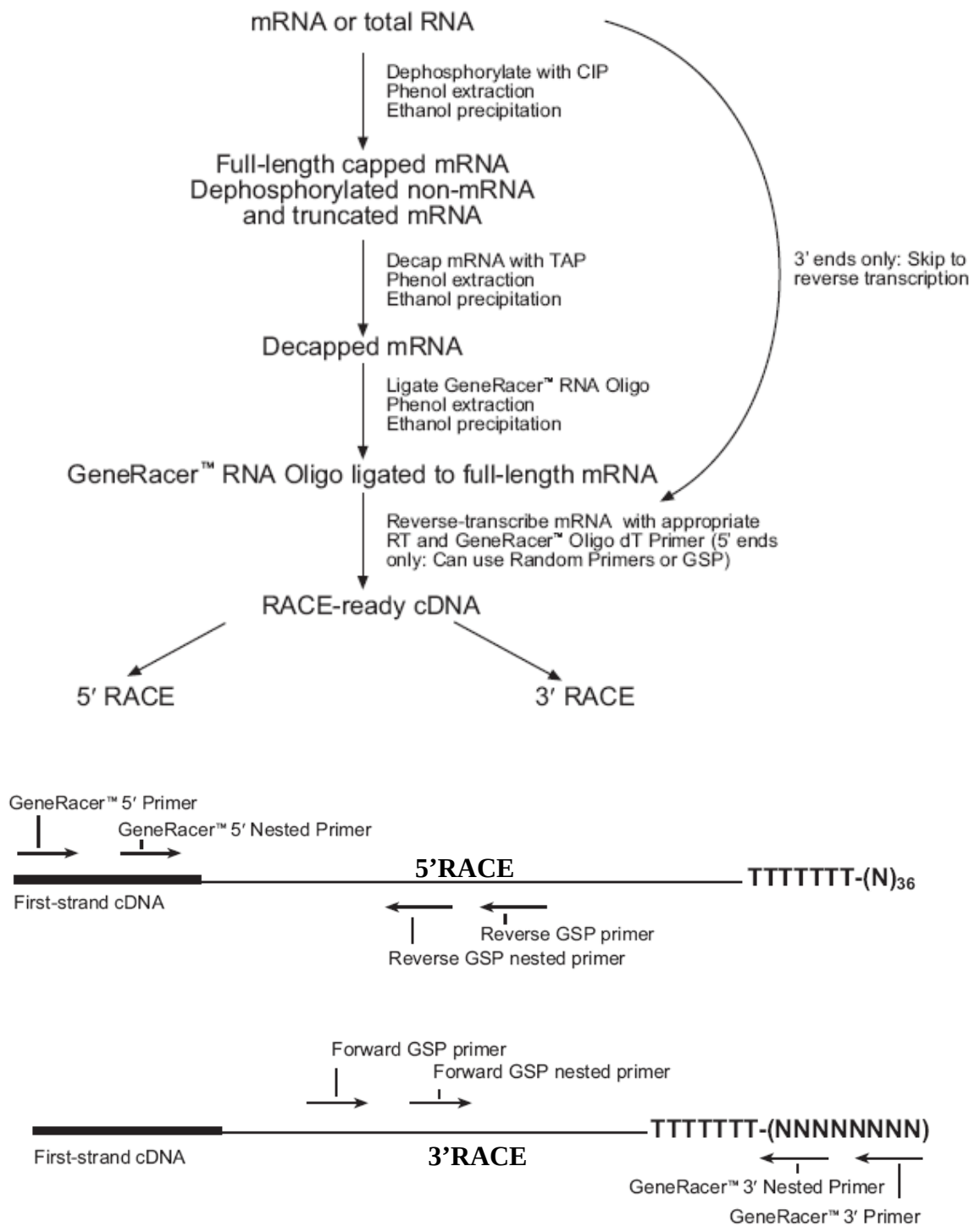
Treatment	Days after harvest ¹					
	0	1	2	3	7	11
25°C (control)	1.00	3.33	4.74	4.19	3.55	
15°C (7 d) + 25°C	1.00	0.80	1.16	1.16	1.46	5.83
<i>t</i> -test	ns	***	**	**	**	

¹ Asterisks indicate a significant difference between mean values according to Student *t*-test

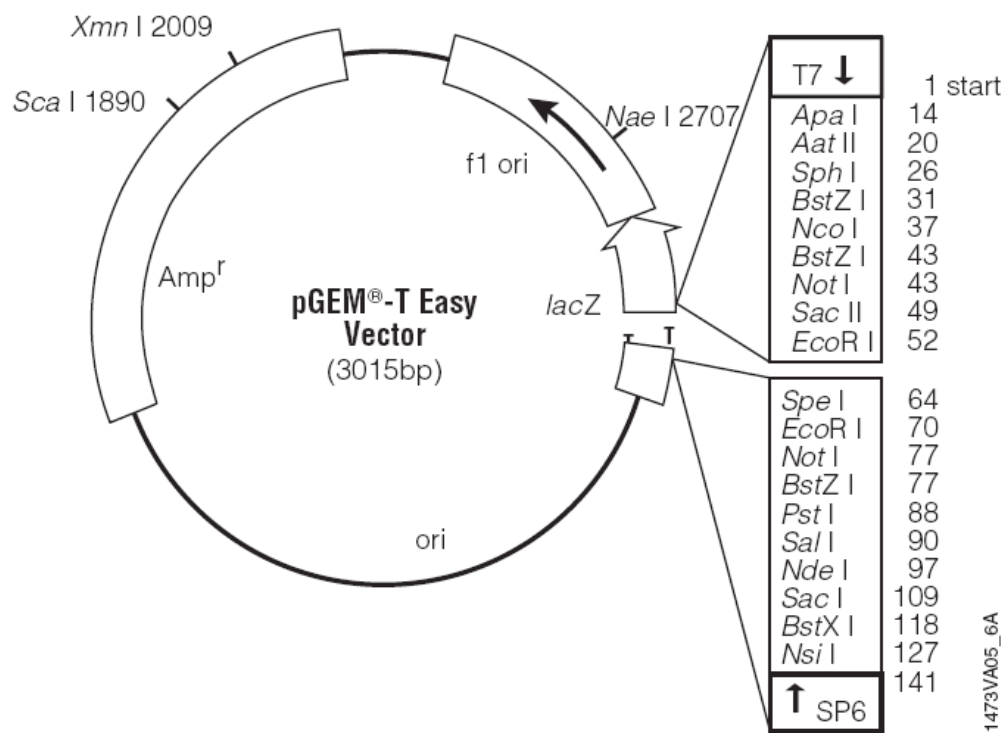
ns = non-significantly different

** = significantly different at $P \leq 0.01$

***= significantly different at $P \leq 0.001$

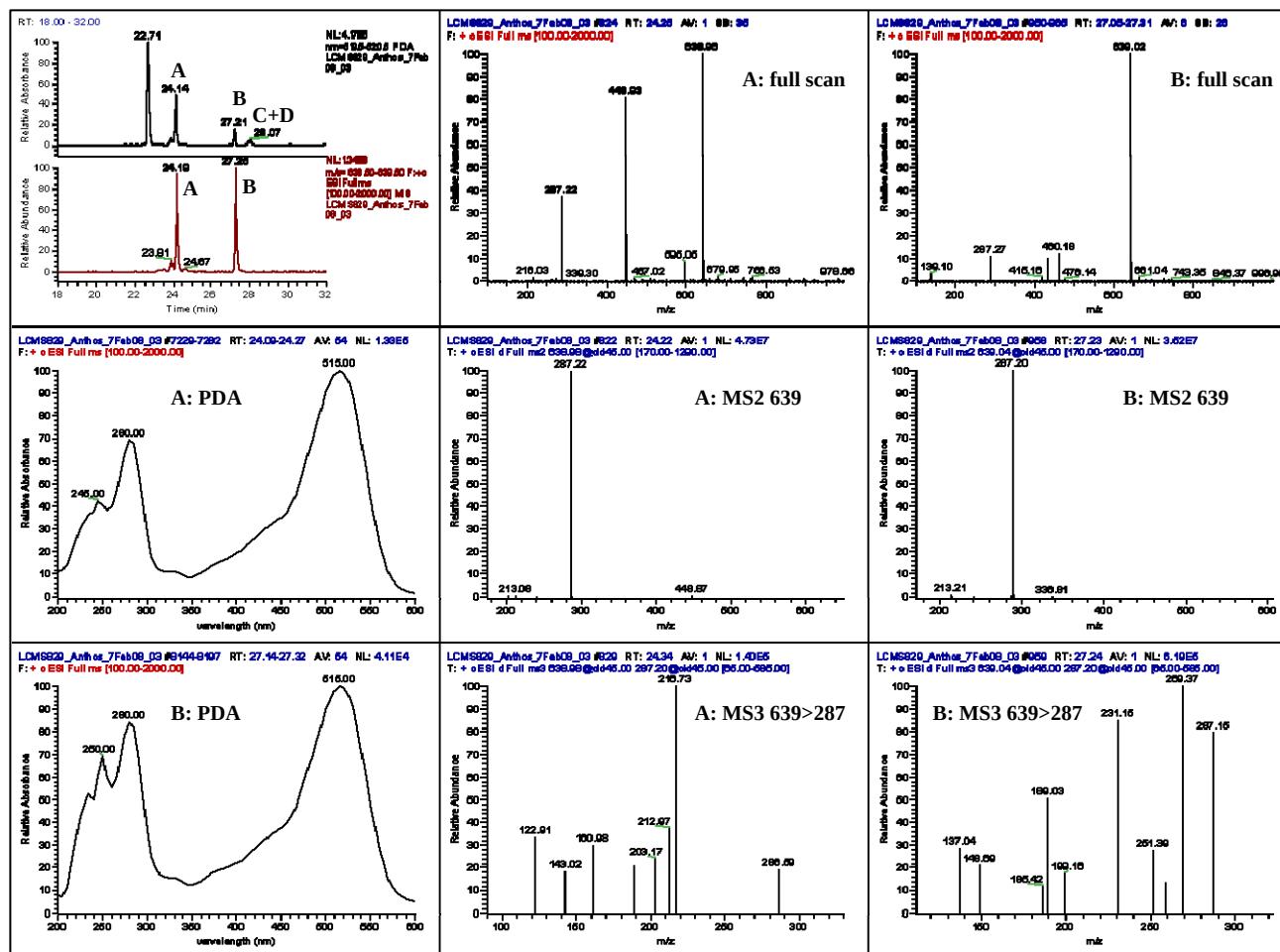


Appendix Figure 1 GeneRacer protocol (Invitrogen, USA).



Appendix Figure 2 pGEM-T Easy vector (Promega, USA).

Appendix Figure 3 LC-MS of anthocyanin in outer pericarp at stage 6 of mangosteen fruit.



Appendix Figure 3 (Continue)

