

การโคลนยีน *chalcone reductase* (CHR) จากถั่วเหลือง
Molecular Cloning of *Chalcone Reductase* (CHR) Gene
from *Glycine max* (L.) Merr.

คำนำ

ในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกนอกจากจะมุ่งเน้นในการปรับปรุงเรื่องของกลิ่น รูปทรง ขนาดของดอก และอายุการใช้งานของดอกไม้ สีของดอกไม้จะเป็นจุดเด่นและเป็นส่วนสำคัญต่อการตัดสินใจซื้อของผู้ใช้ดอกไม้อย่างมาก นักปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกจึงให้ความสำคัญต่อสีของดอกไม้เช่นกัน แต่ไม้ดอกบางพันธุ์ยังขาดความหลากหลายของสีดอก อาทิเช่น กล้วยไม้จัดเป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะในปัจจุบันนี้ประเทศไทยได้รับการยอมรับจากต่างประเทศว่าเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญของโลก กล้วยไม้จัดเป็นสินค้าไม้ดอกไม้ประดับซึ่งเป็นที่นิยมสูงในตลาดโลก และเป็นสินค้า product champion ที่สำคัญของไทย มีความสวยงามโดดเด่น มีเสถียรภาพ มีมูลค่าสูง และจัดเป็นสินค้าที่อยู่ในเศรษฐกิจสร้างสรรค์ (Creative Economy) โดยอุตสาหกรรมกล้วยไม้ของไทยสามารถสร้างรายได้นำเงินเข้าสู่ประเทศได้เป็นจำนวนมาก ในปี 2552 ประเทศไทยส่งออกดอกกล้วยไม้และต้นกล้วยไม้คิดเป็นมูลค่า 2,738.82 ล้านบาท (คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ, 2553) ดอกกล้วยไม้เป็นที่นิยมใช้ทั้งในตลาดภายในประเทศและต่างประเทศมาเป็นเวลานาน กล้วยไม้ที่นิยมปลูกเพื่อตัดดอกมากที่สุด คือ กล้วยไม้หวาย พันธุ์ที่ได้รับการส่งเสริมได้แก่ *Dendrobium Pompadour*, *Dendrobium Walter Oumae*, *Dendrobium JaquelynThomas*, *Dendrobium Ekapol 'Panda'*, *Dendrobium Caesar*, *Dendrobium Waipahu*, *Dendrobium Sonia*, *Dendrobium Kasam Gold*, *Dendrobium Mary Muk*, *Dendrobium Mary Muk*, *Dendrobium Mary Trowse* ประเทศผู้นำเข้าดอกกล้วยไม้ที่สำคัญของไทยคือ ญี่ปุ่น ส่วนใหญ่ของกล้วยไม้ที่ปลูกตัดดอกเป็นกล้วยไม้สกุลหวาย และส่งออกประมาณครึ่งหนึ่งของผลผลิตทั้งหมด กล้วยไม้สกุลหวายที่ปลูกตัดดอกเพื่อการค้ามีสีจำกัดอยู่เพียงไม่กี่สี ส่วนมากจะเป็นดอกสีขาว (*Dendrobium Jaquelyn Thomas 4N*) ดอกสีม่วงปนขาว (*Dendrobium Venus*) ดอกสีม่วง (*Dendrobium Pompadour*, *Dendrobium Sabin*) (จิตรภาพรณ, 2542) เนื่องจากในปัจจุบันพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายสีเหลืองมีอยู่น้อยพันธุ์ และส่วนใหญ่มีรูปร่างลักษณะและสมบัติอื่นๆ ด้อยกว่าพันธุ์สีม่วง และพันธุ์ดอกสีขาว ดอกกล้วยไม้สกุลหวายสีเหลืองมักให้ดอกขนาดเล็ก มีสีเขียว และสีน้ำตาลปน ไม่มีลักษณะที่เหมาะสมที่จะนำมาปลูกเลี้ยงเพื่อตัดดอกทั้งในด้านรูปร่างลักษณะดอก และช่อดอก (ครรรชิต, 2541) อีกทั้งไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดยังไม่มีพันธุ์

ทำให้ดอกสีเหลือง เช่น geranium, cyclamen และ saintpaulia (Ono *et al.*, 2006) หรือถ้ามีพันธุ์ที่ให้ดอกสีเหลือง เช่น ดอกพิทูเนีย และ pelargonium แต่ก็พบว่ามีสีอื่นปนมาด้วย (Doroles *et al.*, 2000)

การปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกจะต้องดำเนินต่อไปเรื่อยๆ และควรมีหลายๆ พันธุ์ที่มีความหลากหลาย เพื่อตอบสนองต่อผู้บริโภค ที่มีความต้องการแตกต่างกันทั้งในเรื่องของรสนิยมนและค่านิยม ในการเริ่มต้นจากการโคลนยีน *chalcone reductase* และนำยีนที่โคลนได้ถ่ายเข้าไปในต้นพืช ทำให้เกิดการเปลี่ยนวิถีของการเกิดปฏิกิริยาเคมีภายในต้นพืช เพื่อใช้ปรับปรุงพันธุ์สีดอกไม้ด้วยยีนดังกล่าวคาดว่าจะน่าจะเป็นดอกในโทนสีเหลือง ซึ่งช่วยในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ และพืชต้นใหม่ยังคงลักษณะที่ดีไว้ได้ต่อไปในอนาคตการศึกษาวิจัยการปลูกเลี้ยง เช่นเดียวกับการทดลองของ Doroles *et al.*, (2000) ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ดอกพิทูเนียพันธุ์ใหม่ที่มีดอกสีเหลืองด้วยการถ่ายยีน *chalcone reductase (chr)* จาก alfalfa เข้าสู่พิทูเนียดอกสีขาวพันธุ์ Mitchell ทำให้ดอกพิทูเนียจากเดิมสีขาวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน

การตรวจเอกสาร

1. กลุ่มสารที่ทำให้เกิดสีในดอกไม้

สีของดอกไม้เกิดจากกลุ่มเม็ดสี 3 กลุ่มใหญ่ คือ เฟลโวนอยด์ (flavonoid) คลอโรฟิลล์ (chlorophylls) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เหมือนกับที่พบในดอกไม้อื่นๆ สารในกลุ่มเฟลโวนอยด์พบในพืชชั้นสูงทุกชนิดเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญต่อพืช เช่น การเกิดของสีดอกไม้ การงอกของละอองเกสร การควบคุมการขนส่งฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน และเป็นสาร chemoattraction ของ rhizobia และชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *nod* และยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช เฟลโวนอยด์จึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการการเติบโตและพัฒนาของพืช บทบาทของเฟลโวนอยด์ในการทำให้เกิดสีของดอกไม้ซึ่งเป็นกลุ่มเม็ดสีที่ละลายในน้ำ อยู่ในส่วนของแวกคิวโอ เป็นสารกลุ่มใหญ่และกลุ่มหลักที่ให้สีแก่พืชมีเมล็ดที่ค่อนข้างกว้าง ตั้งแต่สีเหลืองอ่อน ๆ จนถึงสีแดง สีม่วง สีนํ้าเงิน (Folkmann, 1991) เช่น anthocyanins ให้สีม่วง สีนํ้าเงิน สีส้ม และสีแดง flavonols chalcone aurones ให้สีเหลือง flavonones และ flavanonols ไม่ให้สี ซึ่งจะเห็นเป็นสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน คลอโรฟิลล์เป็นกลุ่มเม็ดสีที่ละลายได้ในอะซีโตน และ เมธานอล อยู่ในคลอโรพลาสต์ เป็นเม็ดสีกลุ่มเดียวที่ให้สีเขียว คลอโรฟิลล์ที่พบในพืชชั้นสูง คือ คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี โดยเฉพาะในระยะดอกตูมจะเห็นสีเขียวชัดเจน เมื่อดอกเริ่มบานสีเขียวจะจางลงเนื่องจากการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ และปรากฏสีขาวหรือสีเหลืองชัดเจนขึ้น ส่วนแคโรทีนอยด์เป็นกลุ่มเม็ดสีที่ละลายได้ในไขมันอยู่ในคลอโรพลาสต์ของเนื้อเยื่อที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ เช่น ใบ และเนื้อเยื่อสีเขียวและอยู่ใน chloroplast ของเนื้อเยื่อที่ไม่มีสีเขียวซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์แสง เช่น ดอกไม้ ผลไม้ และเนื้อเยื่ออื่นๆ ที่มีสีเหลืองและสีส้ม แคโรทีนอยด์ให้สีเหลือง สีส้ม และส้มแดง หน้าที่ที่สำคัญของแคโรทีนอยด์ ได้แก่ ช่วยในกระบวนการสังเคราะห์แสง ป้องกันพลังงานแสงที่จะทำลายคลอโรฟิลล์ (Bartley and Scolnik, 1995)

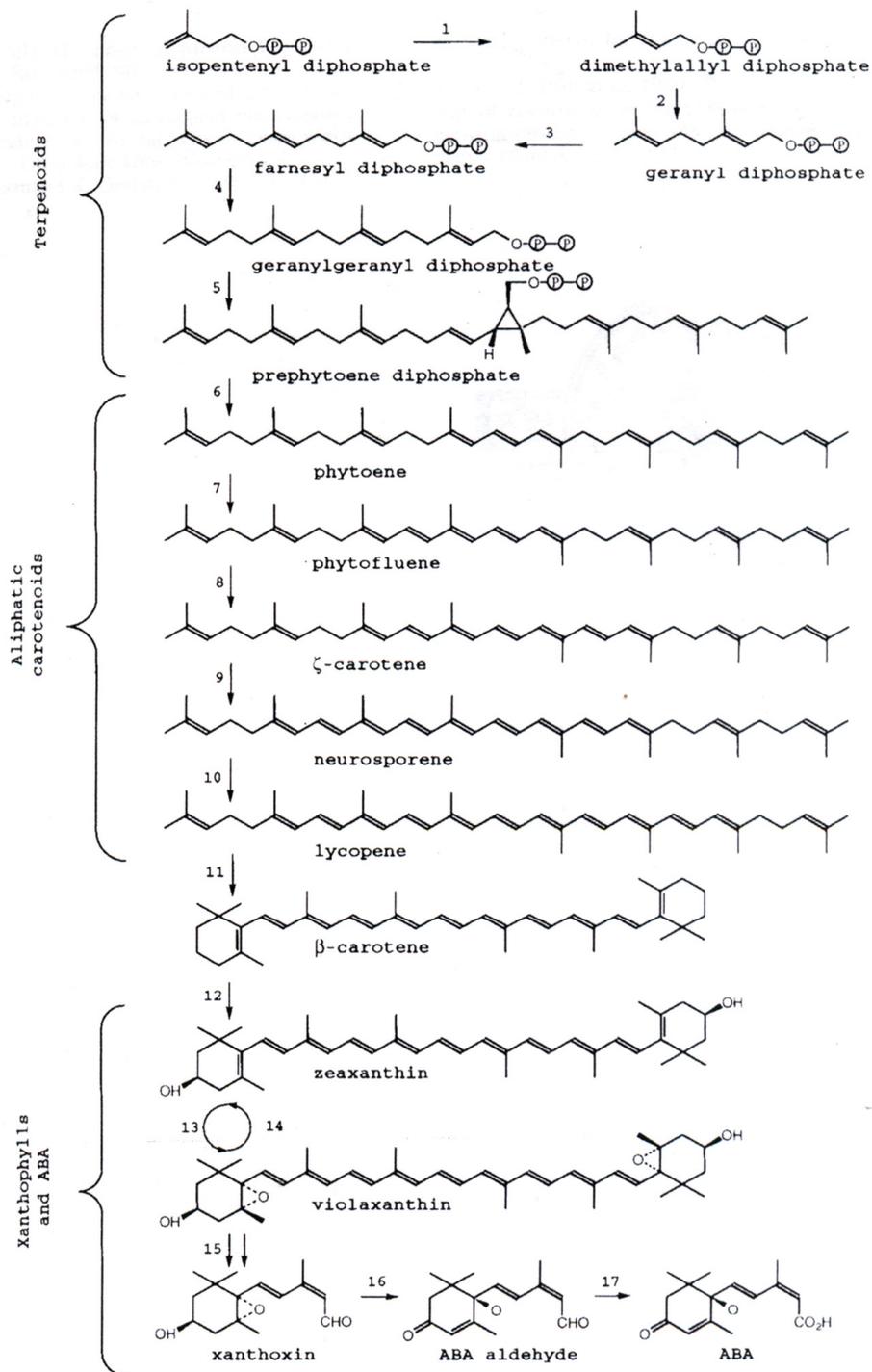
2. กลุ่มสารที่ทำให้เกิดสีเหลืองในดอกไม้

กลุ่มแคโรทีนอยด์ เป็นกลุ่มรงควัตถุที่ให้สีดอกไม้ในโทนสีเหลือง สีส้ม และสีแดง ส่วนใหญ่ของดอกไม้สีเหลืองเกิดจากรงควัตถุพวกแคโรทีนอยด์ ปัจจุบันมีการศึกษากระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์กันอย่างกว้างขวาง ได้มีการแยกและโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จากพืชหลายชนิด เช่น ยาสูบ ข้าว ข้าวโพด พริกไทย ถั่วเหลือง มะเขือเทศ เป็นต้น ในพืชชั้นสูงแคโรทีนอยด์ถูกสร้างผ่านกระบวนการสังเคราะห์ isoprenoids (ภาพที่ 1) โดยสะสมอยู่ในคลอโรพลาสต์ทำหน้าที่ช่วยในกระบวนการสังเคราะห์แสง ป้องกันพลังงานแสงที่จะทำลาย

คลอโรฟิลล์ และสะสมในคลอโรพลาสต์ในปริมาณสูงทำให้ปรากฏเป็นสีเหลือง สีส้ม หรือสีแดง ในส่วนของผล ดอก ใบที่เสื่อมสภาพ และรากของพืชบางชนิด สีเหลืองทั่วไปของดอกไม้เกิดจากการสะสมสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ แต่การรวมกันของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ และ anthocyanin ทำให้เกิดสีเหลืองในโทนสีที่แตกต่างออกไป (Bartley and Scolnik, 1995) ยีนที่ใช้ในการกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ถูกถอดรหัสมาจากนิวเคลียส และแปลรหัสเป็นโปรตีน และถูกส่งเข้าเข้ามาในพลาสติด แคโรทีนอยด์ตัวแรกที่สังเคราะห์ขึ้นตัวแรกที่สังเคราะห์ขึ้นคือ phytoene โดยการทำงานของเอนไซม์ phytoene synthase ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงสารประกอบ geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) 2 โมเลกุล เป็นสาร prephytoene pyrophosphate จึงเปลี่ยนเป็น phytoene เป็นสารที่ไม่มีสี ต่อมา phytoene จะถูกเปลี่ยนเป็น ζ -carotene เป็นสารสีเหลือง โดยการทำงานของเอนไซม์ phytoene desaturase สาร ζ -carotene สามารถเปลี่ยนเป็นแคโรทีนอยด์ตัวอื่น เช่น lycopene เป็นสารที่มีสีแดง β -carotene เป็นสารที่มีสีส้ม และ xanthophyll ซึ่งมีสีเหลือง (Cunningham and Gantt, 1998)

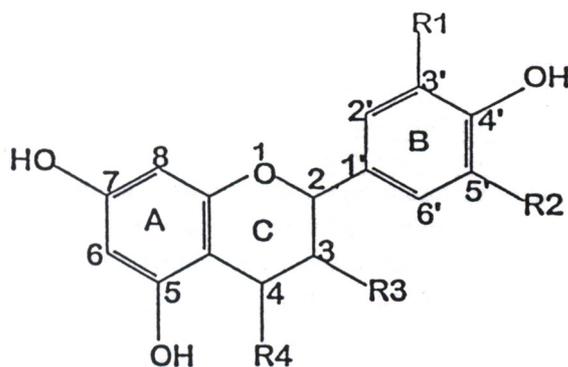
ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *phytoene synthase* ในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยตรวจระดับ mRNA ของผล melon ในส่วนของราก ใบ และ ผล พบว่าที่ส่วนผล melon ในระยะที่ผลมีสีเขียวมีการแสดงออกของยีน *phytoene synthase* ในระดับต่ำ แต่มีการแสดงออกสูงสุดเมื่อผลเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีส้ม และลดต่ำลงเมื่อผลสุกเต็มที่ ส่วนที่ใบและรากมีการแสดงออกน้อยมาก (Karvouni *et al.*, 1995) เม็ดสีเหลืองเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ซึ่งมักพบอยู่รวมกัน 6 ชนิด คือ neoxanthin violaxanthin antherxanthin lutein zetaxanthin และ β -carotenoid แคโรทีนอยด์เป็นเม็ดสีที่พบในพลาสติกให้โทนสีเหลือง สีส้ม พบในดอกทานตะวัน ผลมะเขือเทศ (Bartley and Scolnik, 1995) นอกจากดอกสีเหลืองเกิดจากเม็ดสีในกลุ่มแคโรทีนอยด์แล้ว ดอกไม้สีเหลืองเกิดจากการสะสมสาร flavonoids ชนิด chalcones aurones และ flavonol บางชนิด โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids ประกอบด้วยอะโรมาติกคาร์บอน 2 วง (A และ B) และ heterocyclic ring 1 วง (C) (ภาพที่ 2)

การสังเคราะห์สารในกลุ่ม flavonoids (ภาพที่ 3) เริ่มจากสารตั้งต้น malonyl-CoA และ p-coumaroyl-CoA โดยการทำงานของเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) เร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการรวมตัวเป็นสารประกอบ chalcone เป็นสารที่ทำให้เกิดสีเหลือง (Holton and Cornish, 1995) มีอยู่ 2 ชนิด คือ 6'-hydroxychalcones มีหมู่ hydroxy ตำแหน่งที่ 6' ของวง A เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารในกลุ่ม flavonoids เช่น anthocyanin และ flavonols เป็นต้น และอีกชนิดหนึ่งคือ 6'-deoxychalcones ไม่มีหมู่ hydroxy ตำแหน่งที่ 6' ของ วง A เป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์สาร 5-deoxyflavonoids (Tanaka *et al.*, 1998) พบในพืชไม่กี่ชนิดเท่านั้น เช่น พืชในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) (Dixon and Pavia, 1995) สาร chalcone ชนิด 6'-hydroxychalcones จะถูกสังเคราะห์ขึ้นเมื่อมี



ภาพที่ 1 การกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

ที่มา: Cunningham and Gantt (1998)



ภาพที่ 2 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์แสดงลักษณะวง A, B และ C การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวง B และ C ทำให้เกิดฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ

ที่มา: Madhuri and Reddy (1999)

เอนไซม์ chalcone synthase (CHS) เพียงชนิดเดียว ส่วน 6'-deoxychalcones จะถูกสร้างขึ้นเมื่อมีเอนไซม์ CHR และร่วมทำงานกับเอนไซม์ CHS ซึ่ง chalcone ทั้ง 2 ชนิดเปลี่ยนไปเป็น 5'-hydroxyflavonoids และ 5'-deoxyflavonoids ตามลำดับโดยการทำงานของเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) (Deroles *et al.*, 2000) ดังนั้นในดอกไม้บางพันธุ์และบางชนิดการสะสมของ chalcones จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อเกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ CHI (ภาพที่ 4) (Heller and Forkmann, 1988) แต่อย่างไรก็ตามในการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ CHI ด้วยเทคนิค antisense RNA ในพืชเนี่ย ยังไม่ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พืชเนี่ยให้มีดอกสีเหลือง เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเกิด isomerisation ของ 6'-hydroxychalcone และ 6'-deoxychalcones โดยการทำงานของเอนไซม์ CHI พบว่า 6'-deoxychalcones มีอัตราการเกิด isomerisation ต่ำกว่า 6'-hydroxychalcone (Miles and Main, 1989) ในดอกไม้สีเหลือง เช่น Cosmos Dahlia Coreopsis และ Bidens มีการสะสม chalcones ชนิด 6'-deoxychalcone เป็นจำนวนมาก (Bohm, 1993) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงพืชให้ผลิต 6'-deoxychalcone จะทำให้ลดการเกิด isomerisation ไปเป็นสารอื่น ทำให้เกิดการสะสม chalcones มากขึ้น น่าจะทำให้เกิดเป็นดอกไม้สีเหลืองขึ้น

3. ยีน *chalcone reductase*

ยีน *CHR* เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์สาร isoflavonoids (ภาพที่ 1) พบใน alfalfa และพืชวงศ์ถั่วบางชนิด การสร้างสาร isoflavonoids ขึ้นอยู่กับระยะในการพัฒนาของต้นพืช และมีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อพืช หรือเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด เช่น การได้รับแสง ultraviolet การขาดธาตุอาหารไนโตรเจน รวมทั้งการอยู่เข้าทำลายของเชื้อ (Dixon and Paiva, 1995) ตัวอย่างพืชที่ได้มี

การศึกษาการโคลนยีน *CHR* มาแล้ว เช่น alfalfa พันธุ์ Nagyszensai (Salluad *et al*, 1995) *Sesbania rostrata* (Gorrmacttig *et al.*, 1999) และ *Pueraria montana* (GenBank : AF462632)

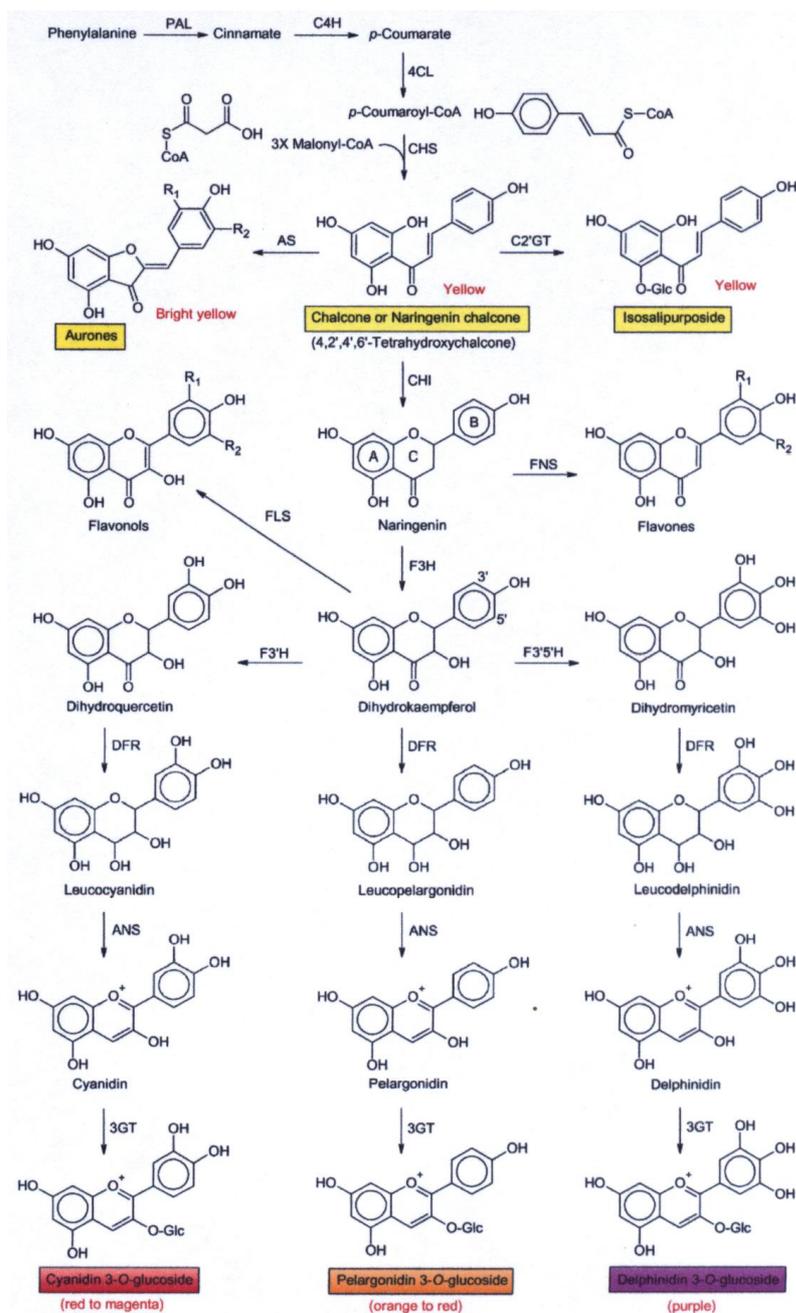
4. ความก้าวหน้าและความเป็นไปได้ของ **metabolic engineering** ในพืชเพื่อผลิตไม้ดอกสีเหลือง

metabolic engineering คือ การเปลี่ยนวิถีของการเกิดปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ โดยเปลี่ยนปฏิกิริยาทางเคมีที่มีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง 1 ปฏิกิริยา หรือ มากกว่า 1 ปฏิกิริยา เพื่อผลิตสารประกอบชนิดใหม่ หรือผลิตสารประกอบเดิมให้มากขึ้น หรือทำให้เกิดการสลายตัวของสารประกอบที่เดิมผลิตได้ในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (DellaPenna, 2001) ตัวอย่างความก้าวหน้าและความเป็นไปได้ของ metabolic engineering ในวิถีของการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เพื่อผลิตไม้ดอกสีเหลือง

Van Blokland *et al.* (1993) ทดลองถ่ายยีนที่ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ CHI แบบ antisense ในพิทูเนีย และ lisianthus โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้เกิดการสะสม chalcone เป็นกลุ่มสารที่ให้สีเหลือง แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พิทูเนีย และ lisianthus ให้มีดอกสีเหลือง ภายหลังได้ค้นพบยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ chalcone 2'-glucosyltransferase (C2'GT) สามารถเปลี่ยน chalcone ไปเป็นสารตัวอื่น ทำให้ไม่เกิดการสะสม chalcone จึงเป็นสาเหตุให้ไม้ดอกทั้ง 2 ชนิดไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีดอกมาเป็นสีเหลือง (Yu *et al.*, 2006)

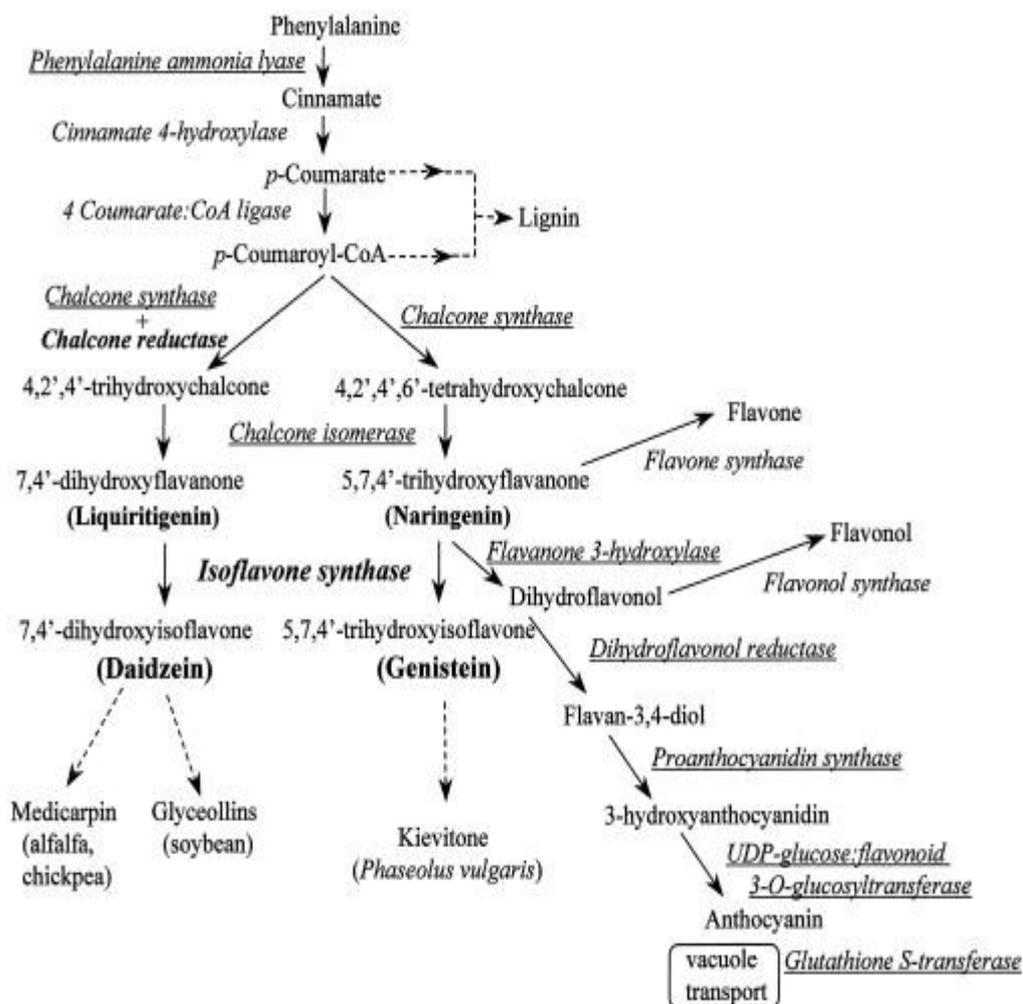
Doroles *et al.*, (2000) ได้ทดลองถ่ายยีน *chalcone reductase (chr)* จาก alfalfa เข้าสู่พิทูเนีย ดอกสีขาวพันธุ์ Mitchell ทำให้เกิดการสะสมสาร chalcones ชนิด 6'-deoxychalcones ที่บริเวณกลีบดอกจำนวนมาก พบว่าดอกพิทูเนียจากเดิมสีขาวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนวิถีของปฏิกิริยาของการสังเคราะห์ chalcones ชนิด 6'-hydroxychalcones เป็น chalcones ชนิด 6'-deoxychalcones ส่งผลให้เอนไซม์ CHI ชนิด type I ที่ถูกสังเคราะห์จากยีนภายในพิทูเนียเองไม่สามารถใช้ 6'-deoxychalcones เป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาได้ จึงทำให้เกิดการสะสม 6'-deoxychalcones เช่นเดียวกับการทดลองของ Akashi *et al.* (1997) ได้ถ่ายยีน *chr* จากต้น licorice เข้าสู่พิทูเนีย

Ono *et al.* (2006) ได้ถ่ายยีน *aureusidin synthase (AS)* จากต้นลิ้นมังกร แบบ sense ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนสาร chalcone ไปเป็นฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม aurones เป็นกลุ่มสารที่ให้สีเหลืองกับพืช เข้าสู่ต้น torenia (*Torenia hybrida*) พันธุ์ Summer Wave Blue เป็นพันธุ์ที่ให้ดอกสีน้ำเงินที่เกิดจาก anthocyanins ชนิด malvidin พบว่า ต้น torenia ที่ได้รับการถ่ายไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก และไม่มีการสะสมสาร aurones ในการทดลองต่อมาจึงทดลองถ่ายยีน *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)* แบบ sense เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ให้เกิดปฏิกิริยา glucosylation ให้กับ chalcone ที่ตำแหน่ง 4' ของวง B ถูกเปลี่ยนไปเป็น



ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม anthocyanin และฟลาโวนอยด์ในบางกลุ่ม โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ ANS, anthocyanin; AS, aureusidin synthase; C2'GT, chalcone 2'-O-glucosyltransferase; C4H, cinnamate-4-hydroxylase; CHI, chalcone isomerase; CHR, chalcone reductase; DFR, dihydroflavonol-4-reductase; F3H, flavanone-3-hydroxylase; F3'H, flavonoid-3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid-3'5'-hydroxylase; PAL, phenylalanine ammonia lyase; 3GT, UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase 4CL, 4-coumarate CoA ligase

ที่มา: To and Wang (2006)



ภาพที่ 4 การสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ชนิด 5-hydroxyflavonoids และ 5-deoxyflavonoids
ที่มา: Yu *et. al*, (2000)

ฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม aurones ในลำดับต่อมาโดยเอนไซม์ AS พบว่า ต้น torenia ที่ได้รับการถ่ายโอนไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก แต่มีการสะสม tetrahydroxychalcone 4'-O glucoside เป็นกลุ่มสารที่ให้สีเหลืองอ่อนในกลีบดอก แต่สีของดอก torenia ยังคงมีสีน้ำเงินเช่นเดิม เมื่อทดลองถ่ายยีน AS ร่วมกับยีน 4'CGT แบบ sense เข้าสู่ต้น torenia พบว่า ทำให้เกิดสีเหลืองที่เกสรตัวผู้ และบางส่วนของกลีบดอก ต่อมาจึงทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยถ่ายยีน AS และยีน 4'CGT แบบ sense ร่วมกับการยับยั้งการทำงานของยีน dfr (dihydroflavonol 4-reductase) เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารสีในกลุ่ม anthocyanins ภายในต้น torenia ด้วยเทคนิค RNA interfere ทำให้ได้ดอก torenia สีเหลือง เนื่องจากปริมาณ anthocyanins ลดลง และเกิดการสะสมฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม aurones จำนวนมาก จึงทำให้ได้ลักษณะดอกที่มีสีเหลือง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ถ้วยเหล็อง

ต้นถ้วยเหล็องพันธุ์สุโขทัย

2. ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน CHR

ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์บริเวณกลางยีนตั้งแต่ปลาย 5' จนถึงปลาย 3' (ตำแหน่งที่ 81-781) คือ

CHR1 (sense) 5'-ATC TGC CCC TGA CTT CAC ATG-3'

CHR2 (antisense) 5'-ATG TCA CAC CTT GTT CGT ACA ACC -3'

ไพรเมอร์ oligo T₍₁₅₎

3. เครื่องมือที่ใช้ในการโคลนยีน

Pipetman model P20, P200, P1000

Spectrafuge 16 M Microcentrifuge

Mini centrifuge

GelCam Camera (

UV Transilluminator

Cooling Bath Model AB-1600 Super Stat Mini

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยานบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

โปรแกรม Blast จาก website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายดีเอ็นเอ หรือ โปรตีนที่สนใจกับฐานข้อมูล

โปรแกรม 6 Frame Translation Tool จาก website <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html> สำหรับเปลี่ยนสายดีเอ็นเอเป็นโปรตีน

โปรแกรม Clustal W จาก website <http://ebi.ac.uk> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มโปรตีนที่กำลังศึกษา

วิธีการ

1. การออกแบบไพรเมอร์

การเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างในการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของโปรตีน chalone reductase พืชที่รายงานใน GenBank จาก website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> และโปรแกรม CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment จาก website <http://ebi.ac.uk> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มโปรตีน chalone reductase

2. การแยกอาร์เอ็นเอรวมจากของถั่วเหลือง

นำต้นกล้าถั่วเหลืองอายุ 2 สัปดาห์ที่ได้รับแสง UV เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ transilluminator เป็นแหล่งกำเนิดแสง หลังจากต้นกล้าได้รับแสง UV เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จึงนำมาแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วย Perfect RNA TM, Eukaryotic, Mini Kit (บริษัท Eppendorf สหรัฐอเมริกา) เริ่มต้นจากคัตถั่วเหลือง 0.2 กรัม ในไนโตรเจนเหลวใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เดิม 350 ไมโครลิตรของ lysis buffer ที่นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ผุสสารละลายส่วนบน ผสมกับ 70% เอทานอล 350 ไมโครลิตร และ 200 ไมโครลิตร ของสารละลาย binding matrix ผสมให้เข้ากัน ผุสสารละลายใส่ใน spin column ที่ตั้งอยู่บนหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ หมุนเหวี่ยงนาน 30 วินาที ล้างตะกอนด้วย wash solution I นำไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาที ล้างอีกครั้งด้วย 95 % เอทานอล : wash solution II (อัตราส่วน 4 : 1 โดยปริมาตร) หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้คอลัมน์แห้ง เติมน้ำ (เกรดสำหรับงานวิจัยด้านชีวโมเลกุล) จำนวน 50 ไมโครลิตร ใน spin column ที่ตั้งอยู่บนหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โมง จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที

นำอาร์เอ็นเอรวมมาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้จากต้นถั่วเหลือง

3. สังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

3.1 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) สายแรกโดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcriptase system (บริษัท Promega สหรัฐอเมริกา)

การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) สายแรก นำอาร์เอ็นเอรวมจากต้นถั่วเหลืองที่แยกได้โดย Perfect RNA TM, Eukaryotic, Mini จำนวน 1 ไมโครกรัม เติมน้ำ cDNA synthesis

primer (oligo dT₁₅) 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาณเป็น 5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 นาที แชนในน้ำแข็ง นาที เติมส่วนผสมของบัฟเฟอร์สำหรับการสังเคราะห์ cDNA สายแรก นิวคลีโอไทด์ ribonuclease inhibitor และ ImProm-II™ Reverse Transcriptase โดยมี ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับอาร์เอ็นเอต้นแบบ และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA สายแรก และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ reverse transcriptase โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

3.2 การเพิ่มปริมาณยีน *chalcone reductase* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ cDNA เจือจางในน้ำด้วยอัตราส่วน 1 : 10 แบ่ง 1 ไมโครลิตร ใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่ม ปริมาณยีน *CHR* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ 2 ชนิด คือ

CHR1 (sense) 5'-ATC TGC CCC TGA CTT CAC ATG-3'

CHR2 (antisense) 5'-ATG TCA CAC CTT GTT CGT ACA ACC -3'

เติมส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์ นิวคลีโอไทด์ และ *AmpliTaq* DNA polymerase โดยให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle (บริษัท Perkin-Elmer สหรัฐอเมริกา) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1	ที่ 94 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
โปรแกรมที่ 2	ที่ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
	50 องศาเซลเซียส	1 นาที	
	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	

นำผล PCR มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% อะกาโรสเจล เปรียบเทียบขนาดของ ดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker

4 การตรวจสอบผล PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยการใช้ gel electrophoresis เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker ด้วย 1% อะกาโรสเจลใน 1X TAE ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมสีด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที สึกษาและสังเกตแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator ถ่ายรูปด้วย

5 การทำให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ และหาลำดับเบส (direct sequencing from PCR product)

นำผลิตภัณฑ์ PCR มาแยกด้วยนิวคลีโอไทด์ขนาดเล็ก เกลือ และโปรตีนออกเพื่อทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick PCR purification kit เติม 5 เท่าโดยปริมาตร ของบัฟเฟอร์ PB ต่อ 1 เท่า โดยปริมาตรของปริมาตร PCR ผสมให้เข้ากัน บรรจุลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบ ต่อนาที นาน 1 นาที ล้างด้วย 750 ไมโครลิตร ของบัฟเฟอร์ PE นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งนาน 1 นาที หมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้คอลัมน์แห้ง จึงเติม TE 50 ไมโครลิตร และนำไปศึกษาการหาลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน

6 การวิเคราะห์และประเมินผล

นำข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *chalcone reductase* ของพืชต่างชนิดกันที่มีรายงานในต่างประเทศ

ผลและวิจารณ์

1. การออกแบบไพรเมอร์

ศึกษาการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของพืชที่รายงานใน GenBank จาก website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ในพืช 5 ชนิด ดังนี้ *Glycine max* (accession: X55730), *Glycyrrhiza glabra* (accession: D86559), *Medicago sativa* (accession: X82366) *Pueraria montana* (accession: AF462632) และ *Hydrangea macrophylla* (accession: AY382665) และนำมาเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างในการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของพืชทั้ง 5 ชนิด ด้วยโปรแกรม CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment จาก website <http://ebi.ac.uk> (ภาพที่ 5)

นำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *chalcone reductase* ประกอบด้วย

ไพรเมอร์ CHR1 (sense) มีการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโน SAPDFTC เป็นตำแหน่งที่ 28-34 เมื่อเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *Glycine max* (accession: X55730) และมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-ATC TGC CCC TGA CTT CAC ATG-3' เป็นตำแหน่งที่ 91-111 เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Glycine max* (accession: X55730)

ไพรเมอร์ CHR2 (antisense) มีการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโน LYEQGVT เป็นตำแหน่งที่ 253-259 เมื่อเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *Glycine max* (accession: X55730) และมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-ATG TCA CAC CTT GTT CGT ACA ACC -3' เป็นตำแหน่งที่ 768-791 เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Glycine max* (accession: X55730)

```

X55730soybean      MAAAIEIPTIVFPNSSAQQRMPVVGMSAPDFTCKKDT-KEAIEAVKQGYRHFDTAAAY 59
AF462632Pueraria  -MAAIEIPTIVFPNSFAQHRVPVVMGMSAPDFTCKKDT-KEAIEAVKQGYRHFDTAAAY 58
X82366Medicago   -MGSVEIPTKVLNTSSQLKMPVVGMSAPDFTCKKDT-KDAIEAIKQGYRHFDTAAAY 58
AY382665Hydrangea --MAFTIPEVPLS--SGGRKMPVLGLGTAADPPVDPEVTRKAVTEALKGYRHFDTAALY 56
D86559Glycyrrhiza --MAFTIPEVPLS--SGGRKMPVLGLGTAADPPVDPEVTRKAVTEALKGYRHFDTAALY 56
                   :. **   :.   .   :*: :*:.* . . :*  .*:  **:* ***** *

X55730soybean      GSEQALGEALKEAHLGLVS-RQDLFVTSKLWVTENHHPHLVLPALRKSCLKLQLEYLDLY 118
AF462632Pueraria  GSEQALGEALKEAVDLGLVS-RQDLFVTSKLWVTDNHHPHLVVSALRKSCLKLQLEYLDLY 117
X82366Medicago   GSEQALGEALKEAIELGLVT-RDELVFTSKLWVTENHHPHLVIPALQKSLKTLQLDYLDLY 117
AY382665Hydrangea NSEQPLGDAIAEALGEGLIKSRDELFI TSKLWCSDAHRENVEPALQKTLKNLKEYIDMY 116
D86559Glycyrrhiza NSEQPLGDAIAEALGEGLIKSRDELFI TSKLWCSDAHRENVEPALQKTLKNLKEYIDMY 116
                   .***.**: :* :* . :*:*:***** : : * . * .**:*:*:*:*:*:*

X55730soybean      LIHWPLSSQPQKFSFPIEVEDLLPFQVKGWESMEECQKLGTLKAIGVSNFSVKKLQNL 178
AF462632Pueraria  LIHWPLSSQPQKFSFPIEVEDLLPFQVKGWESMEECQKLGTLKAIGVSNFSVKKLQNL 177
X82366Medicago   LIHWPLSSQPQKFTFPIDVADLLPFQVKGWESMEESLKLGLTKAIGVSNFSVKKLENLL 177
AY382665Hydrangea LIHWPVSSKPGNYEYPIKEDFLQMDYKSVWEAMEECQKLGTLKAIGVSNFSCKKLSVDL 176
D86559Glycyrrhiza LIHWPVSSKPGNYEYPIKEDFLQMDYKSVWEAMEECQKLGTLKAIGVSNFSCKKLSVDL 176
                   *****:*:*: :*.  *:* :* *.*:*:*.*. ***** ***** *:*:*

X55730soybean      SVATIRPVVDQVEMNLAWQQKKLREFCKENGIIVTAFSPL-RKGASRGPNEVMENDVLKE 237
AF462632Pueraria  SVATIRPVVNQVEMNLAWQQKKLREFCKENGIIVTAFSPL-RKGASRGPNEVMENDVLKE 236
X82366Medicago   SVATVLPVAVNQVEMNLAWQQKKLREFCNAHGIVLTAFSPL-RKGASRGPNEVMENDMLKE 236
AY382665Hydrangea ANAKVPPAVNQVEVNPCWQQKQLTEFCKSNLILVVAYAALGAVGTFYGTNRVMGSEVLNE 236
D86559Glycyrrhiza ANAKVPPAVNQVEVNPCWQQKQLTEFCKSNLILVVAYAALGAVGTFYGTNRVMGSEVLNE 236
                   : *.: *.*:***:* .*****:* ***: :*:::.*:::* * : *.*.** :*::*

X55730soybean      IAEAHGKSIAQVSLRWLYEQGVTFVPKSYDKERMNQNLFHFDWALTEQDHHKISQISQSR 297
AF462632Pueraria  IADAHGKSIAQVSLRWLYEQGVTFVPKSYDKERMNQNLFHFDWALTEQDHHKISQISQSR 296
X82366Medicago   IADAHGKSVAQISLRWLYEQGVTFVPKSYDKERMNQNLRIFDWSLTKEDEKIDQIKQNR 296
AY382665Hydrangea IARIRGNTVAQVCLRWAYEQGIGVLVKSFNKERMEQNLQIFNWTLSDESSEKISEIPQGR 296
D86559Glycyrrhiza IARIRGNTVAQVCLRWAYEQGIGVLVKSFNKERMEQNLQIFNWTLSDESSEKISEIPQGR 296
                   **  :*:::***.*** *****: .: **::****:***:*:*:*::: .**:* *.*

X55730soybean      LISGPTKPQLA-----DLWDDQI 315
AF462632Pueraria  LISGPTKPQLS-----DLWDDDEI 314
X82366Medicago   LIPGPTKPGLN-----DLYDD-- 312
AY382665Hydrangea ACLGTDYTSVHGPFKTI EELWDGEF 321
D86559Glycyrrhiza ACLGTDYTSVHGPFKTI EELWDGEF 321
                   *.   . :   :*:*.*

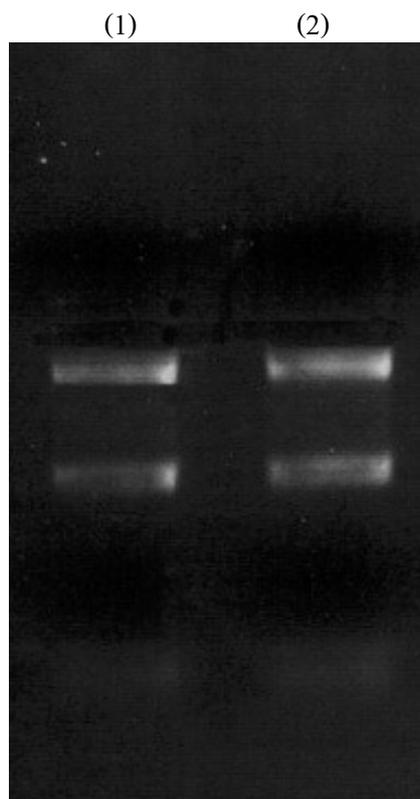
```

ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ multiple alignment โปรตีนของยีน *chalcone reductase* ในพืช 5 ชนิด

2. การแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วย Perfect RNA™, Eukaryotic, Mini Kit

นำต้นกล้าถั่วเหลืองอายุ 2 สัปดาห์ที่ได้รับแสง UV เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ transilluminator เป็นแหล่งกำเนิดแสง หลังจากต้นกล้าได้รับแสง UV เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จึงนำมาแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วย Perfect RNA™, Eukaryotic, Mini Kit ด้วยบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย guanidium thiocyanate และ 2 β -mercaptoethanol นำไปตรวจบน agarose gel สามารถแยกอาร์เอ็นเอรวมจากต้นถั่วเหลือง (ภาพที่ 6) ในการแยกอาร์เอ็นเอรวมจากพืช และนำอาร์เอ็นเอรวมมาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้จากต้นถั่วเหลือง ตรวจพบแถบของ ribosomal RNA (rRNA) 2 ขนาดคือ แถบของ 18s rRNA จาก ribosomal subunit ขนาดเล็ก (light subunit) และ แถบของ 28s rRNA จาก ribosomal subunit ขนาดใหญ่ (heavy subunit) ส่วนอาร์เอ็นเอชนิด mRNA จะเป็นแถบต่างๆ ที่มีหลายขนาดใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 6) เป็นอาร์เอ็นเอเป้าหมายที่นำมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน *chalcone reductase* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ต่อไป ในสิ่งมีชีวิตที่จัดเป็น eukaryote รวมทั้งพืชด้วย ribosome สิ่งเป็นโครงสร้างสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน โดยทั่วไป eukaryote มีไรโบโซมขนาด 80s ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ 60s ribosomal subunit และ 40s ribosomal subunit โดยที่ 60s ribosomal subunit ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอขนาด 28s rRNA, 5.8s rRNA, 5s rRNA และโปรตีนประมาณ 45 ชนิด ส่วน 40s ribosomal subunit ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอขนาด 18s rRNA และโปรตีนประมาณ 21 ชนิด (ประคิษฐ์, 2543)

สิ่งสำคัญในการแยกอาร์เอ็นเอ คือการป้องกันการสลายตัวของอาร์เอ็นเอในระหว่างการสกัด วิธีการแยกอาร์เอ็นเอในพืชเริ่มต้นจาก การทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์พืชที่ประกอบด้วย cellulose pectin และ xyloglucans (Carpita and Gibeau, 1993) การใช้วิธีกลเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ โดยการบดชิ้นส่วนพืชในไนโตรเจนเหลว ในสภาพอุณหภูมิต่ำ ribonuclease ไม่สามารถทำงานได้ ร่วมกับการเติมบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ nuclease รักษาสภาพของอาร์เอ็นเอ ทำลายโครงสร้างของโปรตีน เซลล์เมมเบรน เพื่อให้เซลล์แตกออก และปลดปล่อยอาร์เอ็นเอออกสู่ภายนอกเซลล์ การทำลายเซลล์เมมเบรนมีผลต่อปริมาณอาร์เอ็นเอที่แยกได้ (Wilkins and Smart, 1996) สาร guanidium thiocyanate มีผลทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ และยับยั้งกิจกรรมของ ribonuclease (Jones et. al, 1994) ส่วน 2 β -mercaptoethanol เป็น reducing agent ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของ ribonuclease และป้องกันการ oxidized สารในกลุ่มฟีนอลิก กำจัดอนุมูลอิสระที่เข้าไปจับสารฟีนอลิก และจับเข้ากับกรดนิวคลีอิก เนื่องจากการจับกันระหว่างฟีนอลิกกับกรดนิวคลีอิกในสภาพ oxidized ทำให้คุณสมบัติทางเคมีของกรดนิวคลีอิกเปลี่ยนไป (Wilkins and Smart, 1996)



ภาพที่ 6 การแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วย Perfect RNA TM, Eukaryotic, Mini Kit

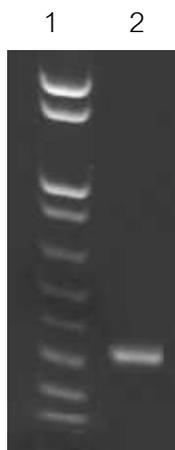
- (1) ต้นกล้าถั่วเหลืองต้นควบคุม
- (2) ต้นกล้าถั่วเหลืองที่ได้รับแสง UV

ก่อนการแยกอาร์เอ็นเอรวมจากต้นถั่วเหลืองได้นำพืชตัวอย่างไปปรับแสง UV เพื่อชักนำการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* เป็นการเพิ่มโอกาสในการประสบความสำเร็จในการแยกยีน *chalcone reductase* มากกว่าการแยกยีนจากต้นถั่วเหลืองปกติ ยีน *chalcone reductase* เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์สาร isoflavonoids พบใน alfalfa และพืชวงศ์ถั่วบางชนิด การสร้างสาร isoflavonoids ขึ้นอยู่กับระยะในการพัฒนาของต้นพืช และมีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อพืช หรือเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด เช่น การได้รับแสง ultraviolet การขาดธาตุอาหารไนโตรเจน รวมทั้งการอยู่เข้าทำลายของเชื้อ (Dixon and Paiva, 1995) ในการทดลองของ Sallaud *et al.*, (1995) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* ใน alfalfa ในอวัยวะต่างๆ และการพัฒนาในระยะของการเติบโตที่แตกต่าง ด้วยการตรวจสอบเทคนิค Northern Blot Hybridization และใช้ยีน *chalcone reductase* จาก alfalfa เป็นตัวตรวจสอบ และยังศึกษาการแสดงของยีน *chalcone reductase* เมื่อได้รับแสง UV การทำให้เกิดบาดแผล และการเข้าทำลายของเชื้อโรค ผลปรากฏว่า พบการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* ที่ราก และ hypocotyls แต่ไม่พบในใบเลี้ยงของต้นกล้าที่มีอายุ 5 วัน นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนในส่วนของลำต้น ก้านใบ และราก แต่ไม่พบในดอกตั้งแต่

ระยะดอกตูมจนกระทั่งดอกบานเต็มที่ในต้น alfalfa อายุ 8 สัปดาห์ การแสดงออกของยีน *chalcone reductase* ในต้นกล้าที่มีอายุ 5 วัน และต้นที่เติบโตเต็มที่แล้วพบที่บริเวณรากมากที่สุด เมื่อนำต้นกล้าไปรับแสง UV เป็นเวลา 45 นาที ภายหลังจากได้รับแสง UV ไปแล้ว 6 ชั่วโมง พบการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* ในส่วนต่างๆพืชได้แก่ ราก hypocotyls ใบเลี้ยง เพิ่มขึ้นมากกว่าพืชปกติ ส่วนของรากยังเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* มากที่สุดแต่ไม่พบการแสดงออกในใบแท้ เมื่อนำใบจากต้น alfalfa ที่มีอายุ 6 สัปดาห์ มาชักให้เกิดบาดแผลโดยการขัดด้วยกระดาษทราย พบการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* เพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 3-9 ชั่วโมงภายหลังจากการทำให้เกิดบาดแผล เมื่อชักนำการเข้าทำลายเชื้อโรค *Xanthomonas campestris* pv. *alfalfa* ที่บริเวณใบ พบการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาดังแต่ 6 ชั่วโมงภายหลังจากการเข้าทำลายของเชื้อ *X. campestris* pv. *alfalfa*

3. การเพิ่มปริมาณยีน *chalcone reductase* ในถั่วเหลืองด้วยเทคนิค PCR

การแยกอาร์เอ็นเอรวมจากต้นถั่วเหลือง โดยวิธี Perfect RNA TM, Eukaryotic, Mini และนำอาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยไพรเมอร์ oligo dT(15) ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase นำ cDNA เป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอสายที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะกับยีน *chalcone reductase* 2 ชนิด จากการวิเคราะห์ด้วย multiple alignment ในโปรตีน *chalcone reductase* ของพืช 5 ชนิด ที่รายงานใน GenBank เพื่อหาคำแหน่งอนุรักษ์ คือ SAPDFTC และ LYEQGVV ถูกใช้เป็นตำแหน่งไพรเมอร์ คือ sense primer CHR 5'-ATC TGC CCC TGA CTT CAC ATG-3' เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 91-111 และ antisense primer CHR 5'-ATG TCA CAC CTT GTT CGT ACA ACC -3' เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 768-791 ของยีน *chalcone reductase* ในถั่วเหลือง (*Glycine max*, accession: X55730) ด้วยเอนไซม์ *AmpliTaq* DNA polymerase พบว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอของถั่วเหลืองโดยวิธี RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ CHR1/CHR2 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนมีขนาดประมาณ 0.7 กิโลเบส (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ขนาดชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ของยีน CHR จากอาร์เอ็นเอของถั่วเหลือง โดยวิธี RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ CHR1/CHR2

(1) DNA ladder marker

(2) ผลผลิต PCR ด้วย ไพรเมอร์ CHR1 (sense) และ CHR2 (antisense)

5. การศึกษาการเรียงลำดับเบสของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ CHR

ผลิตภัณฑ์จาก PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์และนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส ผลปรากฏว่าสามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *chalcone reductase* จากถั่วเหลือง (ภาพที่ 8) การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของจำนวน 701 คู่เบส แปลเป็นรหัสกรดอะมิโน 233 เรซิดิว ในเฟรม +2 และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยการ alignment ด้วยโปรแกรม Blast จาก website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/> เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างโปรตีนที่สนใจกับฐานข้อมูลของ GenBank กับพืชดังต่อไปนี้ *Pueraria montana* var. *lobata* (accession: AF462632) *Medicago sativa* (accession: X82366) *Hydrangea macrophylla* (accession: AY382665) *Glycyrrhiza glabra* accession: D86559 ในการเปรียบเทียบโปรตีน *chalcone reductase* จากถั่วเหลืองมีส่วนอนุรักษ์ 6 ส่วน (ภาพที่ 9) ดังนี้

ส่วนที่ 1 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 23-31 การเรียงกรดอะมิโน GYRHFDTAA

ส่วนที่ 2 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 34-39 การเรียงกรดอะมิโน SEQALG

ส่วนที่ 3 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 56-63 การเรียงกรดอะมิโน LFVTSKLW

ส่วนที่ 4 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 84-102 การเรียงกรดอะมิโน LEYLDLYLIHWPLSSQPG

ส่วนที่ 5 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 130-143 การเรียงกรดอะมิโน KLGLTKAIGVSNFS

ส่วนที่ 6 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 160-164 การเรียงกรดอะมิโน VNQVE

ตำแหน่งอนุรักษ์ของโปรตีน chalcone reductase มีจำนวน 6 กลุ่ม มีตำแหน่งอนุรักษ์ที่ยาว
ต่อเนื่องกันยาวมากที่สุดถึง 18 เรซิดิว

DNA: ATCTGCCCTGACTTCACATGTAAGAAAAGACACAAAAGAGGCAATCATTGA
+3: L P L T S H V R K T Q K R Q S L R
+2: S A P D F T C K K D T K E A I I E
+1: I C P * L H M * E R H K R G N H *

DNA: GGCCATGAAACAGGGTTATAGGCACTTTGACACTGCTGCTGCATATGGCTC
+3: P * N R V I G T L T L L L H M A R
+2: A M K Q G Y R H F D T A A A Y G S
+1: G H E T G L * A L * H C C C I W L

DNA: GGAGCAGGCTCTTGGAGAAGCTTTGAAGGAGGCACTTGACCTTGGCCTTGT
+3: S R L L E K L * R R H L T L A L S
+2: E Q A L G E A L K E A L D L G L V
+1: G A G S W R S F E G G T * P W P C

DNA: CACCCGTGATGACCTTCTCGTCACTTCCAAGCTTTGGGTCCTGACAATCA
+3: P V M T S S S L P S F G S L T I I
+2: T R D D L F V T S K L W V T D N H
+1: H P * * P L R H F Q A L G H * Q S

DNA: TCCTCATCTTGTGTTCTCGTCTCCGAAATCTCTCAAACTCTTCAACT
+3: L I L L F L L S A N L S K L F N *
+2: P H L V V P A L R K S L K T L Q L
+1: S S S C C S C S P Q I S Q N S S T

DNA: AGAGTACTTGGACTTGTATCTCATCCACTGGCCCTCAGTTCTCAGCCCGG
+3: S T W T C I S S T G P S V L S P E
+2: E Y L D L Y L I H W P L S S Q P G
+1: R V L G L V S H P L A P Q F S A R

DNA: AAAGTTTTATTCCCAATGAGGTGGAGGATCTTGCATTGATGIGAA
+3: S F H S Q L R W R I S C H S M * R
+2: K F S F P I E V E D L L P F D V K
+1: K V F I P N * G G G S L A I R C E

DNA: GGGTGTGTGGGAAGCCATGGAAGAGAGCCAGAAACTTGGCCTCACAAAAGC
+3: V C G K P W K R A R N L A S Q K P
+2: G V W E A M E E S Q K L G L T K A
+1: G C V G S H G R E P E T W P H K S

DNA: CATTGGAGTCAGCAACTTCTCTGTCAAGAAGCTTCAAAATCTGCTCTCTGT
+3: L E S A T S L S R S F K I C S L L
+2: I G V S N F S V K K L Q N L L S V
+1: H W S Q Q L L C Q E A S K S A L C

DNA: TGCCACCATCCGTCCTGCGGTCAATCAAGTGGAGATGAACCTTGCATGGCA
+3: P P S V L R S I K W R * T L H G N
+2: A T I R P A V N Q V E M N L A W Q
+1: C H H P S C G Q S S G D E P C M A

DNA: ACAGAAGAAGCTAAGAGAGTTCTGCAAAGCAAATGGGATAATCCTAACTGC
+3: R R S * E S S A K Q M G * S * L H
+2: Q K K L R E F C K A N G I I L T A
+1: T E E A K R V L Q S K W D N P N C

DNA: ATTCTCTCTGAGGAAAGGTGCAAGCAGGGACCAAATGAAGTTATGGA
+3: S L L * G K V Q A G D Q M K L W R
+2: F S P L R K G A S R G P N E V M E
+1: I L S S E E R C K Q G T K * S Y G

DNA: GAATGATGTGCTGAAAGAGATTGCAGATGCTCATGAAAATCCATAGCACA
+3: M M C * K R L Q M L M E N P * H R
+2: N D V L K E I A D A H G K S I A Q
+1: E * C A E R D C R C S W K I H S T

DNA: GGTTTCTCTGAGATGGTTGTACGAACAAGGTGTGACAT
+3: F L * D G C T N K V * H
+2: V S L R W L Y E Q G V T
+1: G F S E M V V R T R C D

>/tmp/outseq.input.18720 [Unknown form], frame+2, 233 bases.
SAPDFTCKKDTKEAIEAMKQGYRHFDTAAAYGSEQALGEALKEALDLGL
VTRDDLFTSKLWVTDNHPHLVVPALRKSLLTLQLEYLDLYLIHWPLSSQ
PGKFSFP I E V E D L L P F D V K G V W E A M E E S Q K L G L T K A I G V S N F S V K L Q N L
LSVATIRPAVNQVEMNLAWQQKLR E F C K A N G I I L T A F S P L R K G A S R G P N
EVMENDVLKEIADAHGKSI AQVSLRWLYEQGVT

ภาพที่ 8 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHR* จำนวน 701 คู่เบสที่แยกได้จากไบอัวเหลียง
แปลเป็นรหัสกรดอะมิโน 233 เรซิดิว (แถว+2 และขีดเส้นใต้)

สรุป

ผลการแยกอาร์เอ็นเอจากต้นถั่วเหลือง ตามวิธี Perfect RNA TM, Eukaryotic, Mini ได้ผลดี ทั้งด้านปริมาณ และคุณภาพของอาร์เอ็นเอ ในการโคลนยีนจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอด้วย การเพิ่มปริมาณยีน *chalcone reductase* จากถั่วเหลืองเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์สาร isoflavonoids พบใน alfalfa และพืชวงศ์ถั่วบางชนิด การสร้างสาร isoflavonoids ขึ้นอยู่กับระยะในการพัฒนาของต้นพืช และมีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อพืช พบว่ายีน *chalcone reductase* ที่ถูกสังเคราะห์มีขนาด 701 คู่เบส เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RT-PCR

เอกสารอ้างอิง

- กองเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2540. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับ. เอกสารเผยแพร่
ฝ่ายวิเคราะห์ข้อมูลการส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ. 2554. ยุทธศาสตร์การแข่งขันกล้วยไม้ไทยในตลาดโลก พ.ศ.
2554-2559.
- ครรชิต ชรรมศิริ. 2541. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์.
มหาวิทยาลัยมหิดล.
- จิตราพรรณ พิสิท. 2542. การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมชาย สุขนชสิทธิ์, เสรี วิริยะวัฒนะ, โอฟาร พิทักษ์ และ ชัยณรงค์ ชูจันทร์. 2534. คู่มือการผลิต
กล้วยไม้เพื่อการส่งออก. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- Akashi, T., N. Saito, H. Hirota and S. Ayabe. 1997. Anthocyanin-producing dandelion callus as a
chalcone synthase source in recombinant polyketide reductase assay. *Phytochemistry* 46 :
283-287.
- Bartley, G.E. and P.A. Scolnik. 1995. Plant carotenoid: Pigments for photoprotection, visual
attraction, and human health. *The Plant Cell* 7 : 1027-1038.
- Bohm, B.A. 1993. The minor flavonoids and flower colour. *In* J.B. Harborne (ed.). pp. 387-440.
The Flavonoids : Advanced in Research Science. Chap&Hall, London.
- Carpita, N.C. and D.M. Gibeaut. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering
plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during
growth. *Plant J.* 3 : 1-30.
- Cunningham, E.X. and P.A. and E. Gantt. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in
plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 : 557-583.
- DellaPenna, D. 2001. Plant metabolic engineering. *Plant Physiol.* 125 : 160-163.
- Dixon, R. A. and N.L. Paiva. 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7 :
1085-1097.
- Doroles, S.C., K.M. Davies, G.B. Spiller and S.J. Bloor. 2000. Modification of chalcone
biosynthesis in *Petunia hybrida*. *Acta Hort.* 508 : 29-37.
- Forkmann, G. 1991. Flavonoids as flower pigments : The formation of natural spectrum and its
extension by genetic engineering. *Plant Breed.* 16 : 1-26.

- Goormachtig, S., S. Livens, S. Herman, M. Van Montagu and M. Holsters. 1999. Chalcone reductase – homologous transcripts accumulate during development of stem – borne nodules on the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Planta* 209 (1) : 45-52.
- Heller, W. and G. Forkmann. 1988. Biosynthesis of flavonoids. In J.B. Harborne (ed.) , *The Flavonoids : Advanced in Research Science*. Chap&Hall, London pp. 399-425.
- Jones, P., J. Qiu and D. Rickwood. 1994. *RNA Isolation and Analysis*. Bios Scientific, England. 445 p.
- Karvouni, S., I. John, J.E. Taylor, C.F. Watson, A. J. Turner and D. Grierson. 1995. Isolation and characterisation of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant Mol. Biol.* 27(6) : 1153-1163.
- Madhuri, G. and A.R. Reddy. 1999. Plant biotechnology of flavonoids. *Plant Biotech.* 16 (3) : 179-199.
- Miles, C.O., and L. Main. 1989. Kinetics and mechanism of the cyclisation of 2,6 – dihydroxychalcone and derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trns. II* 1623-1632.
- Ono, E., M. Fukuchi-Mizutani, N. Nakamura, Y. Fukai, K. Yonekura-Sakkibara, M. Yamaguchi, T. Nakayama, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2006. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *PNAS* 103 (29) : 11075-11080.
- Sallaud, C., J. El-Turk, L. Bigarre, H. Sevin, R. Welle and R. Esnault. 1995. Nucleotide sequence of three *chalcone reductase* gene from alfalfa. *Plant Physiol.* 108 : 869-870.
- Tanaka, Y., S. Tsuda and T. Kusumi. 1998. Metabolic engineering to modified flower color. *Plant Cell Physiol.* 39 (11) : 1119-1126.
- To, K.Y. and C.K. Wang. 2006. Molecular breeding of flower color. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* 1 : 300-310.
- Van Blokland, R., P. de Lange, J.N.M. Mol and J.M. Kooter. 1993. Modulation of gene expression in plants by antisense genes. *In* S.T. Crooke and B. Lebleu (eds.). pp.125-148. *Antisense Research and Applications*. CRC Press, London
- Wilkins, T.A. and L.B. Smart. 1996. Isolation of RNA from plant tissue, pp. 21-41. *In* P.A. Krieg (ed.). *A Laboratory Guide to RNA : Isolation, Analysis, and Synthesis*. Wiley-Liss, New York.
- Yu, O., M. Matsuno and S. Subramanian. 2006. Flavonoid compounds in flowers: Genetics and Biochemistry. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* 1 : 285-292.

Yu, O., W. Jung, J. Shi, R.A. Croes, G.M. Fader, B. McGonigle and J.T. Odell. 2000. Production of the isoflavones genstein and Daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol.* 124 : 781-793.