การศึกษาทางชีวโมเลกุลของยีน chalcone synthase ในกล้วยไม้ *Dendrobium* Kaosanan และ *Dendrobium* Red Bull

Molecular Characterization of Chalcone Synthase Gene Isolated from *Dendrobium* Kaosanan and *Dendrobium* Red Bull

วิภารัตน์ พิทักษ์ด่านธรรม[1,2] ธีระ สูตะบุตร[3] พิสสวรรณ เจียมสมบัติ[3] และ เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์[4]

Wiparat Rattana[1,2], Thira Sutabutra[3], Pissawan Chiemsombat[3] and Chetsadaporn Pitaksutheepong[4]

Abstract

Chalcone synthase gene, which encodes for a key enzyme in anthocyanin biosynthetic pathway, was isolated from *Dendrobium* Kaosanan and *Dendrobium* Red Bull by reverse transcription polymerase chain reaction. A full-length cDNA clone was obtained from these two *Dendrobium* cultivars. The cDNA clones contained 1,188 nucleotides and encoded 395 amino acids. They shared 100% identity at nucleotide and amino acid levels. Multiple alignment of amino acid sequences showed that chalcone synthase of *Dendrobium* Kaosanan and *Dendrobium* Red Bull exhibited high homology to those of *Dendrobium* 'Uniwai Prince' and *Dendrobium* Sonia 'Earsakul' (99% identity). Transcription analysis of chalcone synthase gene was examined in *Dendrobium* Kaosanan and *Dendrobium* Red Bull at five developmental stages by real time reverse transcription polymerase chain reaction. In *Dendrobium* Kaosanan, expression of chalcone synthase gene was largely detected in flower buds while that of *D.* Red Bull was peaked when flowers were nearly bloomed.

Keywords : chalcone synthase, anthocyanin, *Dendrobium,* orchid

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[2] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

[3] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[3] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kampangsean Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[4] ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี 12120

[4] National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Pathumthani 12120, Thailand

รับเรื่อง : พฤษภาคม 2554

Corresponding author : chetsadaporn@biotec.or.th

บทคัดย่อ

การแยกยีน และศึกษาทางชีวโมเลกุลของยีน chalcone synthase ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีแอนโทไซยานิน ในดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ขาวสนาน และพันธุ์กระทิงแดง โดยวิธีการ reverse transcription polymerase chain reaction สามารถแยกยีนได้ ความยาว 1188 คู่เบส ซึ่งสามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 395 กรดอะมิโน จากกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน เหมือนกัน 100 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ของ chalcone synthase จากกล้วยไม้พันธุ์ขาวสนาน และพันธุ์กระทิงแดง กับ chalcone synthase จากกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ พบว่า chalcone synthase มีความอนุรักษ์สูง ในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* โดยมีความเหมือนกับ chalcone synthase จาก *Dendrobium.* 'Uniwai Prince' และ *Dendrobium.* Sonia 'Earsakul' 99 เปอร์เซนต์ จากการศึกษาการแสดงออกของยีน chalcone synthase ในดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ขาวสนาน และพันธุ์กระทิงแดง ที่การพัฒนาของดอกระยะต่าง ๆ 5 ระยะ โดยวิธีการ real time reverse transcription polymerase chain reaction พบว่า กล้วยไม้พันธุ์ขาวสนาน มีการแสดงออกของยีน chalcone synthase สูงสุดในระยะดอกตูม ในขณะที่กล้วยไม้พันธุ์กระทิงแดงมีการแสดงออกของยีน chalcone synthase สูงสุดในระยะดอกใกล้บาน

คำนำ

chalcone synthase (CHS) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่ง ในกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) รวมถึงเม็ดสีแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งให้สีกลุ่ม สีแดง ม่วงแดง ส้ม และน้ำเงิน (Tanaka *et al.*, 2005) ในส่วนต่างๆ ของพืช โดยเอมไซม์ CHS จะทำหน้าที่สังเคราะห์ 4, 2', 4', 6' tetrahydroxychalcone ซึ่งเป็นสารตั้งต้นตัวแรกในกระบวนการสร้างเม็ดสีแอนโทไซยานิน จาก *p*-coumaroyl CoA และ malonyl CoA สามโมเลกุล (Ferrer *et al.*, 1999) มีรายงานการศึกษายีน *CHS* ในไม้ดอกหลายชนิด เช่น พิทูเนีย (*Petunia*) โทรีเนีย (*Torenia*) และเจนเชี่ยน (*Gentian*) (Fukusaki *et al.*, 2004; Hanumappa *et al.*, 2007; Nakatsuka *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมีการแยกยีน *CHS* และศึกษาการแสดงออกของ ยีน *CHS* ในกล้วยไม้หลายสกุล เช่น *Bromheadia* (Liew *et al.*, 1998) ฟาแลนนอปซีส (*Phalaenopsis*) (Han *et al.*, 2006) และหวาย (*Dendrobium*) (Mudalige-Jayawickrama *et al.*, 2005) โดยมีเป้าหมายเพื่อความเข้าใจในกระบวนการสร้างสีในดอกไม้ ตลอดจนการพัฒนาสีดอกให้มีความหลากหลาย

กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม เป็นไม้ตัดดอกที่มีความสำคัญ และทำรายได้สูงของประเทศไทยจากการส่งออกไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และกลุ่มประเทศในยุโรป ปัจจุบันกล้วยไม้พันธุ์หวายลูกผสม ยังขาดความหลากหลายในเรื่องของสีดอก แม้ว่าในกลุ่มกล้วยไม้ที่มีอยู่ในธรรมชาติจะมีความหลากหลายของสี แต่เนื่องจากข้อจำกัดเรื่อง การผสมข้ามสายพันธุ์ และลักษณะทางการค้าของกล้วยไม้ลูกผสม เช่น ลักษณะดอกที่บานทนนาน ออกดอกได้ทั้งปี หรือลักษณะดอกที่สวยงาม ขนาดใหญ่ มักสูญหายไปในระหว่างการผสมกับพันธุ์ธรรมชาติ ดังนั้น การศึกษาทางชีวโมเลกุลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสี เพื่อความเข้าใจในกระบวนการสร้างสีในดอกกล้วยไม้ จึงเป็นทางหนึ่งในการพัฒนาความหลากหลายของสีในดอกกล้วยไม้ได้ ในการศึกษานี้ได้นำกล้วยไม้หวายลูกผสม พันธุ์ขาวสนาน (*Dendrobium* Kaosanan) ดอกมีสีขาว และพันธุ์กระทิงแดง (*D*endrobium Red Bull) ดอกมีสีม่วงแดง มาทำการแยกยีน *CHS* และศึกษาข้อมูลทางชีวโมเลกุลของยีนดังกล่าว

อุปกรณ์ และวิธีการ

พืชที่ใช้ในการศึกษา และการสกัด RNA

นำดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน และกล้วยไม้หวายกระทิงแดง ซึ่งปลูกเลี้ยงที่โรงเรือนภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาใช้ในการสกัด RNA ด้วยวิธี CTAB method (Sambrook *et al.*, 1989) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ CHS cDNA ส่วนการศึกษาการแสดงออกของยีน ทำการแบ่งดอกที่ระยะการพัฒนาต่างๆ ออกเป็น 5 ระยะ (ภาพที่ 1) แยกสกัด RNA แต่ละระยะการพัฒนาของดอก เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน

การสร้าง chalcone synthase cDNA

สร้าง chalcone synthase จาก RNA โดยใช้ MMLV reverse transcriptase (Fermentas, Canada) โดยมี oligodTM13R (5'CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG TTT TTT TTT TTT TTT TT 3') เป็นไพรเมอร์ จากนั้นทำการสังเคราะห์ CHS cDNA ด้วยเทคนิค พีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 5'endF (5' GAA TAG GGA GGG AGT TAA TTA ATG GC 3') และ ไพรเมอร์ 5'endR (5'GGC GTT GTT CTC GGC GAG GTC TTT GGC3') ในการสังเคราะห์ ปลาย 5' และไพรเมอร์ 3'endF (5'TAT CCG GAY TAC TAC TTC AGR ATT ACC A 3') และ ไพรเมอร์ M13R (5'CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG 3') ในการสังเคราะห์ปลาย 3' ทำการต่อชิ้นส่วน cDNA ที่เพิ่มปริมาณได้ เข้าไปใน pDrive พลาสมิด (QIAGEN, Germany) แล้วถ่ายพลาสมิดลูกผสม เข้าไปในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีนในพลาสมิด วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลยีน โดยใช้โปรแกรม BLAST SEARCH (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ chalcone synthase

สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) เพื่อจัดกลุ่มเอนไซม์ CHS ของดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน และ ดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดง กับเอนไซม์ CHS ของพืชชนิดอื่นๆ เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนโดยใช้โปรแกรม clustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor joining จากโปรแกรม MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007)

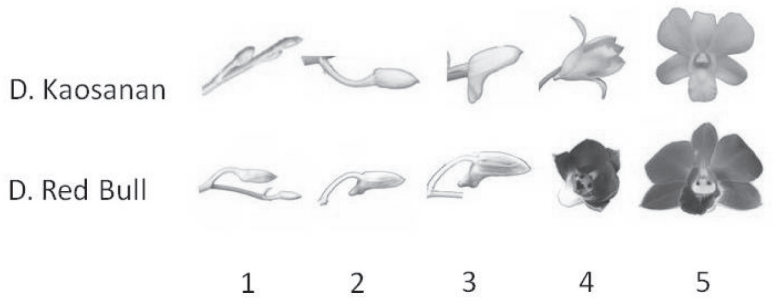
การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *CHS* ในดอกที่ระยะการพัฒนาต่าง ๆ

ศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS* ในดอกที่ระยะการพัฒนาต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค real time RT-PCR และใช้การแสดงออก ของยีน 18S rRNA เป็นยีนอ้างอิง คำนวณปริมาณของการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *CHS* โดยใช้วิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) ในแต่ละปฏิกิริยา real time RT-PCR ประกอบด้วย RNA direct MASTER ที่มี SYBR I dye (Toyobo, Japan) 7.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (สังเคราะห์ CHS cDNA ใช้ไพรเมอร์ CHS101F (5'AAT CGA ATC ATG CTT TAC CAA CAA GGC TGC3') และ ไพรเมอร์ CHS101R (5'TGA ACA AAC GAC GAG AAC TCG 3') ส่วนการสังเคราะห์ 18S cDNA ใช้ไพรเมอร์ 18SF (5'GCT ACT CGG ATA ACC GTA GT 3') และไพรเมอร์ 18SR (5'ACC AGA CTT GCC CTC CAA TG 3') ชนิดละ 0.5 ไมโครโมล และ RNA 150 นาโนกรัม ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเริ่มจาก denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที reverse transcription ที่ 61 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อสังเคราะห์ cDNA สายเดี่ยว จากนั้นพีซีอาร์จะเริ่มสังเคราะห์ CHS cDNA และ 18S cDNA โดยเริ่มจาก denaturation DNA ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที, 58 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 45 รอบ จากนั้นเครื่องจะทำการแยกสาย DNA ที่สังเคราะห์ได้ด้วยอุณหภูมิสูง เพื่อทำการคำนวณหาปริมาณ RNA เริ่มต้น

ผลและวิจารณ์

การสังเคราะห์ chalcone synthase cDNA

cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน และดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดง ทั้งสองสายพันธุ์ มีขนาด 1188 เบส ซึ่งสามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 395 กรดอะมิโน โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ และ



ภาพที่ 1 ดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน (*D*. Kaosanan) และหวายกระทิงแดง (*D*. Red Bull) ที่การพัฒนาของดอกระยะต่าง ๆ

กรดอะมิโน เหมือนกัน 100 เปอร์เซนต์ (ภาพที่ 2) เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีน โดยการเปรียบเทียบกับ conserved domains ที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีส่วนของ malonyl coA binding site ซึ่งเป็นลักษณะทางชีวโมเลกุลที่สำคัญของ CHS เอนไซม์ (Jez *et al.*, 2000) เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CHS จากกล้วยไม้หวายขาวสนาน และกล้วยไม้หวายกระทิงแดง กับ CHS ของกล้วยไม้อื่น ๆ พบว่า ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกันกับ *D*endrobium 'Uniwai Prince' และ *D*endrobium Sonia 'Earsakul' ถึง 99 เปอร์เซนต์ (Mudalige-Jayawickrama *et al.*, 2005; Pitakdantham *et al.*, 2010) รองลงมาคือ CHS จาก *D*endrobium *nobile* และ *Bromheadia finlaysoniana* (98 เปอร์เซนต์ และ 94 เปอร์เซนต์ตามลำดับ) ส่วนในกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Phalaenopsis* และ *Oncidium* ที่มีรายงานการแยกยีน *CHS* พบว่า CHS ของดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน และดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดง มีความเหมือนกับ CHS ของกล้วยไม้กลุ่ม ดังกล่าวเพียง 60 เปอร์เซนต์ จึงอาจกล่าวได้ว่ายีน *CHS* มีการอนุรักษ์สูงภายในกลุ่มกล้วยไม้สกุล *Dendrobium*

การจัดกลุ่ม chalcone synthase ยีน

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) เพื่อจัดกลุ่มเอนไซม์ CHS จากดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน และดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดง กับเอนไซม์ CHS จากกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ CHS ที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* และ *Bromheadia* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ CHS ที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* และ *Oncidium* โดยพบว่าเอนไซม์ CHS จากดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน และดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดง ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 เช่นเดียวกับกล้วยไม้สกุลหวายอื่น ๆ ได้แก่ *Dendrobium* 'Uniwai Prince', *Dendrobium* Sonia 'Earsakul' และ *Dendrobium nobile* และเอนไซม์ CHS จากดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน และดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดง ถูกจัดแยกออกจากกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* และ *Oncidium* (ภาพที่ 3)

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน CHS ในดอกที่การบานระยะต่าง ๆ

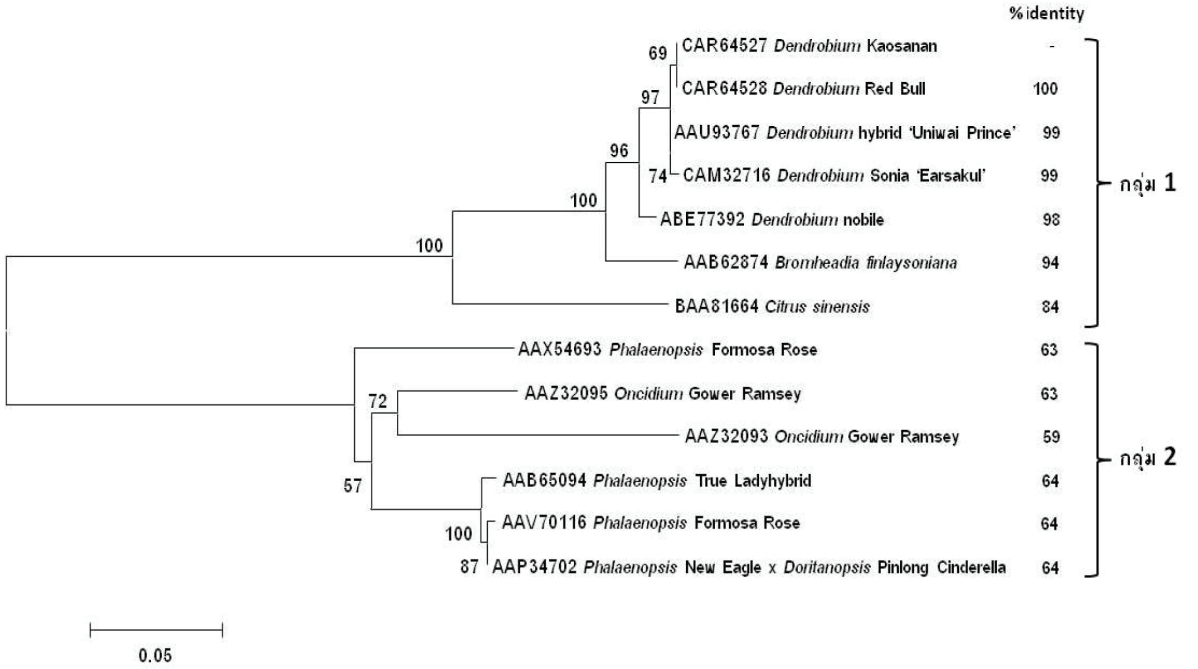
จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *CHS* ด้วยวิธี real time RT-PCR ในดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน และดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดง ที่การพัฒนาของดอกห้าระยะ (ภาพที่ 1) พบการแสดงออกของยีนในทุกระยะการพัฒนาของดอก โดยการแสดงออกของยีน *CHS* ในดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน จะเพิ่มขึ้นอย่างมากในระยะดอกตูม จนถึงระยะดอกตูมขนาดใหญ่ (ระยะที่ 1 – 3) และการแสดงออกของยีน *CHS* จะลดลงเมื่อดอกเริ่มบาน

(ระยะที่ 4) และกลับเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อดอกบานเต็มที่ (ระยะที่ 5) ส่วนแสดงออกของยีน *CHS* ในดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดง จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆตามระยะการพัฒนาของดอก (ระยะที่ 1 – 4) และลดลงในระยะดอกบานเต็มที่ (ระยะที่ 5) (ภาพที่ 4) ซึ่งการแสดงออกของยีน *CHS* ในดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดงมีรูปแบบเหมือนกับ ในกล้วยไม้ออนซิเดียม (Chiou and Yeh, 2008) และในดอกเจนเชี่ยน (Nakatsuka *et al.*, 2005) ส่วนรูปแบบการแสดงออกของยีน *CHS* ในดอกกล้วยไม้หวายขาวสนานไม่พบว่าเหมือนกับในพืชใด

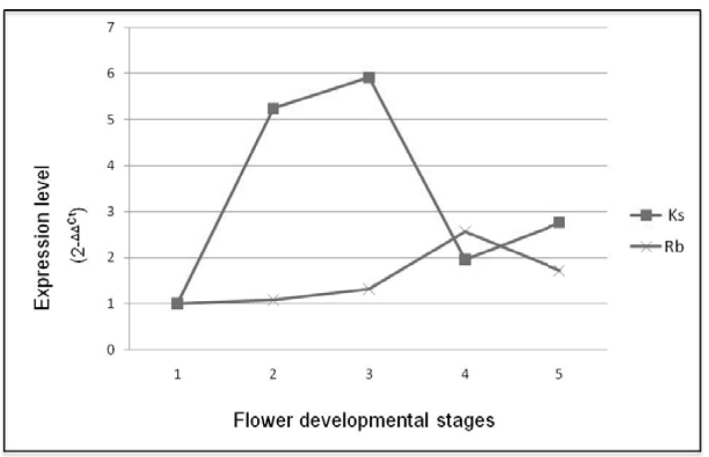
จากรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีน *CHS* ที่พบในดอกผักบุ้งญี่ปุ่น (*Ipomoea nil*) ซึ่งโดยธรรมชาติดอกมีสีม่วง เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ ทำให้ดอกเปลี่ยนเป็นสีขาว และพบว่าเกิดจากความผิดปกติของยีน *CHS* (Hoshino *et al.*, 2009) ในขณะที่จากการศึกษาครั้งนี้ กล้วยไม้หวายพันธุ์ขาวสนาน ซึ่งมีดอกสีขาว พบว่าไม่ได้เกิดจากความผิดปกติของยีน *CHS*

```
    M  A  P  P  A  M  E  E  I  R  R  A  Q  R  A  E  G  P  A  T  V  L  A  I  G  T
1   ATGGCGCCGCCGGCAATGGAAGAGATCAGGAGAGCTCAGAGGGCGGAGGGGCCGGCGACGGTGCTCGCTATCGGAACC

    S  T  P  P  N  A  L  Y  Q  A  D  Y  P  D  Y  Y  F  R  I  T  K  C  E  H  L  T
79  TCGACGCCACCGAACGCGTTGTATCAGGCGGACTATCCGGATTACTACTTCAGGATTACCAAGTGCGAGCATCTCACT

    E  L  K  E  K  F  K  R  M  C  E  K  S  M  I  K  K  R  Y  M  Y  L  T  E  E  I
157 GAGCTCAAGGAGAAGTTCAAACGAATGTGTGAAAAATCGATGATCAAAAAGCGCTACATGTACTTAACAGAAGAAATT

    L  K  E  N  P  N  I  C  A  F  M  A  P  S  L  D  A  R  Q  D  I  V  V  T  E  V
235 CTGAAGGAAAATCCAAACATATGCGCATTCATGGCGCCATCTCTAGATGCTAGACAAGACATAGTGGTAACCGAGGTT

    P  K  L  A  K  E  A  S  A  R  A  I  K  E  W  G  Q  P  K  S  R  I  T  H  L  I
313 CCAAAACTCGCCAAAGAGGCCTCCGCCCGCGCCATAAAGGAATGGGGACAGCCCAAATCTCGCATAACTCATCTAATC

    F  C  T  T  S  G  V  D  M  P  G  A  D  Y  Q  L  T  R  L  L  G  L  R  P  S  V
391 TTCTGCACCACCAGCGGCGTAGACATGCCCGGTGCCGACTACCAACTCACTCGTCTCCTCGGCCTCCGCCCATCCGTC

    N  R  I  M  L  Y  Q  Q  G  C  F  A  G  G  T  V  L  R  L  A  K  D  L  A  E  N
469 AATCGAATCATGCTTTACCAACAAGGCTGCTTCGCCGGCGGCACCGTCCTTCGCCTTGCCAAAGACCTCGCCGAGAAC

    N  A  G  A  R  V  L  V  V  C  S  E  I  T  A  V  T  F  R  G  P  S  E  S  H  L
547 AACGCCGGTGCGCGAGTTCTCGTCGTTTGTTCAGAAATCACAGCAGTTACGTTCCGCGGGCCGTCCGAATCCCATCTC

    D  S  L  V  G  Q  A  L  F  G  D  G  A  A  A  V  I  V  G  S  D  P  D  L  T  T
625 GATTCTCTTGTCGGGCAGGCGCTGTTTGGCGATGGGGCTGCAGCTGTCATAGTTGGATCTGACCCTGACTTGACTACT

    E  R  P  L  F  Q  L  V  S  A  S  Q  T  I  L  P  E  S  E  G  A  I  D  G  H  L
703 GAGCGACCGCTTTTCCAACTCGTCTCGGCTTCCCAGACCATCCTTCCGGAGTCCGAGGGCGCCATAGATGGCCATCTA

    R  E  M  G  L  T  F  H  L  L  K  D  V  P  G  L  I  S  K  N  I  Q  K  S  L  V
781 CGCGAGATGGGACTAACCTTCCACCTACTCAAAGACGTCCCAGGCTTGATCTCTAAAAACATTCAAAAGAGTCTCGTA

    E  A  F  K  P  L  G  I  H  D  W  N  S  I  F  W  I  A  H  P  G  G  P  A  I  L
859 GAGGCATTCAAGCCACTTGGTATTCACGACTGGAATTCGATCTTCTGGATTGCGCATCCGGGCGGTCCGGCAATACTC

    D  Q  V  E  V  K  L  G  L  K  A  E  K  L  A  A  S  R  N  V  L  A  E  Y  G  N
937 GACCAAGTGGAAGTTAAGCTTGGACTTAAAGCTGAGAAGCTCGCGGCCAGTAGAAACGTGCTTGCGGAGTATGGGAAT

    M  S  S  A  C  V  L  F  I  L  D  E  M  R  R  R  S  A  E  A  G  Q  A  T  T  G
1015 ATGTCCAGCGCTTGTGTGCTTTTCATACTTGATGAAATGAGGCGGAGGTCGGCGGAGGCTGGGCAAGCTACCACCGGA

    E  G  L  E  W  G  A  L  F  G  F  G  P  G  L  T  V  E  T  V  V  L  R  S  V  P
1093 GAGGGGTTGGAGTGGGGAGCATTGTTCGGATTCGGTCCGGGGCTTACAGTTGAAACCGTTGTGCTACGCAGCGTTCCG

    I  A  G  A  V  .
1171 ATTGCTGGTGCGGTGTGA
```

ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของยีน *CHS* ที่แยกได้จากดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน และดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดง กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 57 ถึง 310 เป็นตำแหน่งของ malonyl coA binding site



ภาพที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของเอนไซม์ CHS จากกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ สร้างขึ้นจากโปรแกรม clustalW และ MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) ตัวเลขด้านขวามือ แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ CHS ที่แยกได้จากกล้วยไม้แต่ละชนิด เทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ CHS ที่แยกได้จากกล้วยไม้หวายขาวสนาน ส่วนตัวเลขที่อยู่บริเวณกิ่งของแผนภูมิ แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ จากการทำ bootstap 1000 ครั้ง บาร์ที่อยู่ทางด้านซ้ายมือ แสดงเปอร์เซ็นต์ระยะทางการเกิดวิวัฒนาการ



ภาพที่ 4 การแสดงออกของยีน CHS ในดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน (Ks) และดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดง (Rb) ที่การพัฒนาของดอกระยะต่าง ๆ ระยะที่ 1 ดอกตูมขนาดเล็ก ระยะที่ 2 ดอกตูมขนาดกลาง ระยะที่ 3 ดอกตูมขนาดใหญ่ ระยะที่ 4 ดอกเริ่มบาน ระยะที่ 5 ดอกบานเต็มที่

สรุป

ยีน *CHS* ที่สังเคราะห์ได้จากดอกกล้วยไม้หวายขาวสนาน และดอกกล้วยไม้หวายกระทิงแดง มีความเหมือนกันทุกประการ และเมื่อสร้างแผนภูมิเพื่อจัดกลุ่มพบว่ายีน *CHS* มีความอนุรักษ์สูงในกลุ่มของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีน *CHS* ในทุกระยะการพัฒนาของดอก ทั้งในดอกสีแดง และดอกสีขาว ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ CHS เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการผลิตสารฟลาโวนอยด์หลายชนิด ดังนั้นการที่จะพัฒนาสีในดอก โดยการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *CHS* จึงอาจมีผลกระทบต่อการผลิตสารฟลาโวนอยด์ชนิดอื่น ๆ ได้ การพัฒนาสีดอกจึงควรมุ่งเน้นไปที่เอนไซม์อื่น ๆ ที่มีความจำเพาะต่อการผลิตสารแอนโทไซยานิน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (AG-BIO/PERDO-CHE) กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

Chiou, C.Y., and K.W. Yeh. 2008. Differential expression of MYB gene (OgMYB1) determines color patterning in floral tissue of *Oncidium* Gower Ramsey. Plant Molecular Biology 66:379-388.

Ferrer, J.-L., J.M. Jez, M.E. Bowman, R.A. Dixon, and J.P. Noel1. 1999. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. Nature Structural Biology 6:775-784.

Fukusaki, E.-i., K. Kawasaki, S.i. Kajiyama, C.-I. An, K. Suzuki, Y. Tanaka, and A. Kobayashi. 2004. Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase genes with RNA interference. Journal of Biotechnology 111:229-240.

Han, Y.Y., F. Ming, J.W. Wang, J.G. Wen, M.M. Ye, and D.L. Shen. 2006. Cloning and characterization of a novel chalcone synthase gene from *Phalaenopsis hybrida* orchid flowers. Russian Journal of Plant Physiology 53:223-230.

Hanumappa, M., G. Choi, and S. Ryu. 2007. Modulation of flower colour by rationally designed dominant-negative chalcone synthase. Journal of Experimental Botany 58:2471-2478.

Hoshino, A., K.-I. Park, and S. Iida. 2009. Identification of r mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory (*Ipomoea nil*). Journal of Plant Research 122:215-222.

Jez, J.M., M.B. Austin, J.L. Ferrer, M.E. Bowman, J. Schroder, and J.P. Noel. 2000. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. Chemistry and Biology 7:919-930.

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 Physiology and Biochemistry 36:647-656.

Livak, J.K., and D.T. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods 25:402-408.

Mudalige-Jayawickrama, R.G., M.M. Champagne, A.D. Hieber, and A.R. Kuehnle. 2005. Cloning and characterization of two anthocyanin biosynthetic genes from *Dendrobium* orchid. Journal of the American Society for Horticultural Science 130:611-618.

Nakatsuka, T., M. Nishihara, K. Mishiba, and S. Yamamura. 2005. Temporal expression of flavonoid biosynthesis-related genes regulates flower pigmentation in *gentian* plants. Plant Science 168:1309-1318.

Nakatsuka, T., K.I. Mishiba, Y. Abe, A. Kubota, Y. Kakizaki, S. Yamamura, and M. Nishihara. 2008. Flower color modification of *gentian* plants by RNAi-mediated gene silencing. Plant Biotechnology 25:61-68.

Pitakdantham, W., T. Sutabutra, P. Chiemsombat, and C. Pitaksutheepong. 2010. Isolation and characterization of chalcone synthase gene isolated from *Dendrobium* Sonia earsakul. Pakistan Journal of Biological Sciences 13:1000-1005. .

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.

Suzuki, K.I., H.M. Xue, Y. Tanaka, Y. Fukui, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Murakami, Y. Katsumoto, S. Tsuda, and T. Kusumi. 2000. Flower color modifications of *Torenia hybrida* by cosuppression of anthocyanin biosynthesis genes. Molecular Breeding 6:239-246.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.

Tanaka, Y., Y. Katsumoto, F. Brugliera, and J. Mason. 2005. Genetic engineering in floriculture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80:1-24.