Agricultural Sci. J. 44 : 3 (Suppl.) : 113-116 (2013) ว. วิทย. กษ. 44 : 3 (พิเศษ) : 113-116 (2556)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน lycopene ε-cylase และ β-carotene hydroxylase ในมะละกอสายพันธุ์การค้า

DNA Polymorphism of Lycopene ε-cylase and β-carotene Hydroxylase Commercial Cultivars of Papaya (*Carica papaya* L.) Fruits

พิมพิไล แสงมณี[1] ธนพล ไชยแสน[3] สิริกุล วะสี[4] และ ปาริชาติ เบิร์นส[1,2]

Pimpilai Saengmanee[1], Tanapon Chaisan[2], Sirikul Wasee[4] and Parichart Burns[1,2]

Abstract

Papaya (*Carica papaya* L.) is an important cash crop for local consumption and export. Nowadays, consumers and food manufacturers require several horticultural features particularly flesh colour; red and yellow. However, the lack of standard in commercialized papaya cultivar results in variation in colour. Papaya colour is found associated with carotenoid biosynthetic pathway. In this study, fifteen papaya cultivar including cultivar in breeding program, commercial and local cultivar were used and their flesh colour were determined. Fifty-nine gene specific primers were designed for each of carotenoid synthetic gene and used to amplifiy DNA fragment with approximate size of 400-600 base pairs and DNA fragment migration pattern was determined by denaturing acrylamide gel electrophoresis. The results showed that fifty-six gene specific primers were able to amplified carotenoid synthetic genes. DNA polymorphism via migration pattern was found in several carotenoid synthetic genes including lycopene ε-cylase and β-carotene hydroxylase. The measurement and analysis based on L*, a* and b* indicated that papaya flesh colour can be divided into 3 groups; red, orange and yellow. Information will lead to the development of the molecular markers associated will the color of flesh papaya in the future.

Keywords: Carotenoid synthesis pathway, Lycopene ε-cylase, β-carotene hydroxylase.

บทคัดย่อ

มะละกอเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญต่อการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก ในปัจจุบันมีการใช้มะละกอเพื่อการแปรรูปและอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวางโดยสีเนื้อเป็นลักษณะที่สำคัญของมะละกอซึ่งนอกจากจะมีผลต่อการเลือกซื้อของผู้บริโภคยังใช้เป็นข้อมูลที่บ่งบอกถึงปริมาณสี จากงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้พบว่าสารคาโรทีนอยด์เป็นสารหลักที่ทำให้เกิดสีในมะละกอ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจสอบลักษณะของสีเนื้อมะละกอ15สายพันธุ์โดยการวัดค่า L*, a* และb* และวิเคราะห์ทางสถิติ รวมไปถึงตรวจสอบความหลากหลายของยีนในกระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้นั้นมีขนาดประมาณ 400 ถึง 600 คู่เบสและตรวจสอบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเป้าหมายในสนามไฟฟ้าพบความหลากหลายของลำดับเบสที่เกี่ยวข้องกับยีน lycopene ε-cylase และ β-carotene hydroxylase ส่วนการวิเคราะห์สีในเนื้อมะละกอสามารถจัดกลุ่มสีได้ 3 กลุ่ม คือ สีแดง สีส้ม และสีเหลือง สำหรับข้อมูลที่ได้นี้นำไปใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล สำหรับปรับปรุงพันธุ์มะละกอในอนาคต

คำสำคัญ: กระบวนการสร้างสารแคโรทีนอยด์, ไลโคปีนเอปไซลอนไซเครส, เบต้าคาโรทีไฮดรอกซิเลส

[1] ห้องปฏิบัติงานวิจัยทางด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[1] BIOTEC Central Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University Kamphangsaen Nakhorn Pathom 73140

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[2] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University KamphangSaen Campus Nakon Pathom 73140 Thailand

[3] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[3] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, 50 Ngam Wong Wan Rd, Lat Yao Chatuchak Bangkok 10900

[4] ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[4] Tropical vegetable research center, Research and Development Institute at KamphangSaen, Kasetsart University KamphangSaen Campus Nakon Pathom 73140 Thailand

คำนำ

คาโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นกลุ่มสารประเภท isoprenoid ที่ทำหน้าที่สำคัญในพืช อาทิ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกระบวนการสังเคราะห์แสง เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ (antioxidants) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญและทำให้เกิดสีในผล เช่น มะเขือเทศ ส้ม และ มะละกอ ในการสังเคราะห์สารคาโรทีนอยด์เอนไซม์ lycopene ε-cyclase ควบคุมการเปลี่ยนสารไลโคปีน (lycopene) ให้เป็น α-carotene และเอนไซม์ β-carotene hydroxylase เปลี่ยน α-carotene ให้เป็นลูทีน (lutein) นอกจากนั้นเอนไซม์ β-carotene hydroxylase ยังทำหน้าที่เปลี่ยน β-carotene ให้เป็น zeaxanthin (Tanaka and Ohmiya, 2008) มีรายงานว่าระดับแสดงออกของยีน lycopene ε-cyclase และ β-carotene hydroxylase ทำให้เกิดการสะสมของสาร β-carotene และทำให้เนื้อของมันฝรั่ง มะเขือเทศ และพริกหวาน มีสีส้มเพิ่มมากขึ้น (Ronen *et al*., 1999; Diretto *et al*., 2006; Ma *et al*., 2011; Borovsky *et al*., 2013) นอกจากนั้นยังพบว่าความหลากหลายของยีนทั้งสองมีความสัมพันธุ์กับปริมาณ provitamin A ในข้าวโพด (Babu *et al*., 2013) การศึกษาองค์ประกอบของเนื้อมะละกอพบว่ามีปริมาณสารคาโรทีนอยด์มากถึง 5,924 µg/100g FW (Schwiggert *et al*., 2011) อย่างไรก็ดียังไม่มีการศึกษาถึงผลของยีน lycopene ε-cyclase และ β-carotene hydroxylase ต่อสีเนื้อผลของมะละกอ การวิจัยในครั้งนี้ต้องการศึกษายีน lycopene ε-cylase และ β-carotene hydroxylase เพื่อหาความหลากหลายในมะละกอสายพันธุ์การค้า และพันธุ์ที่พบในประเทศไทย โดยวิธีตรวจสอบการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า และการตรวจสอบลำดับเบส และตรวจสอบสีเนื้อของมะละกอโดยการใช้ colorimeter และหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีนทั้งสอง และสีเนื้อผลของมะละกอ ผลการศึกษาจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อใช้ในคัดเลือกมะละกอในการปรับปรุงพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ออกแบบตรวจสอบไพรเมอร์และเพิ่มจำนวนยีน

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะจากลำดับเบสของยีน lycopene ε-cylase และ β-carotene hydroxylase ในฐานข้อมูลของ Genbank และฐานข้อมูลจีโนมมิกดีเอ็นเอของมะละกอ โดยให้ดีเอ็นเอเป้าหมายมีขนาดประมาณ 400-600 คู่เบส เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนมะละกอจำนวน 15 สายพันธุ์ ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้รอบในการทำปฏิกิริยาคือ 95 C° เป็นเวลา 3 นาที 1 รอบ 95 C° เป็นเวลา 1 นาที 1 รอบ 44-45 C° เป็นเวลา 1 นาที และ 72 C° 1 นาที สำหรับ 35 รอบ และสุดท้าย 72 C° 10 นาที ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเป้าหมายบน 5% denaturing polyacrylamide gel (ขนาด 38x50 cm) ที่ 3,000 V 300 mA 80 W เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate

2. การวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน

บันทึกรูปแบบการเคลื่อนแถบดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Excel วิเคราะห์ผล และสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม Darwin 5.0.158 (Perrier et al, 2003) ตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย นำไปใช้เป็น template ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเพื่อส่งหาลำดับเบสโดย automate sequencing วิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม CLUSTALW

3. การวัดสีเนื้อของมะละกอและจัดกลุ่มสีของมะละกอโดยใช้วิธีทางสถิติ

เก็บผลมะละกอทั้ง 15 สายพันธุ์ในระยะสุกที่มีการพัฒนาของเมล็ดและสีเนื้ออย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำมาวัดสีเนื้อผลด้วย colorimeter โดยเครื่อง Minolta รุ่น CR400 (Tokyo, Japan) ซึ่งข้อมูลที่ได้จะแสดงเป็นค่า L*, a* และ b* จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติโดยการใช้โปรแกรม ANOVA และ R statistics

ผล

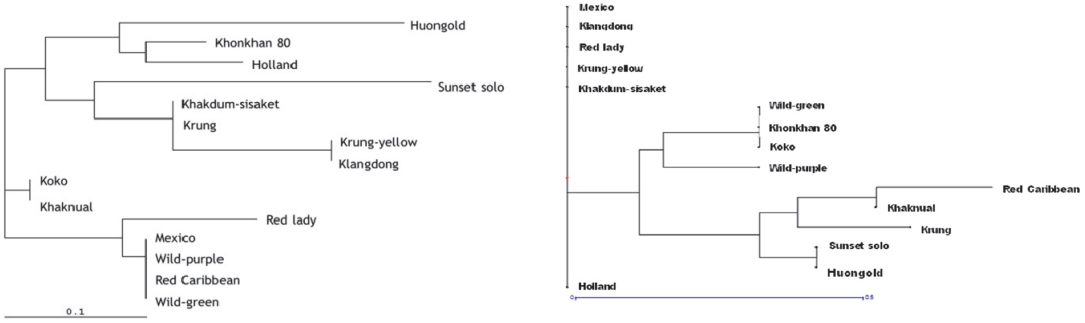
1. ความหลากหลายของยีน lycopene ε-cylase และ β-carotene hydroxylase

การตรวจสอบฐานข้อมูลมะละกอพบว่า ยีน lycopene ε-cylase และ β-carotene hydroxylase มีขนาด 6,915 และ 1,570 คู่เบส ตามลำดับ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 12 และ 3 คู่ ตามลำดับ จัดกลุ่มโดยใช้รูปแบบการเคลื่อนที่ของ ยีน lycopene ε-cylase พบว่า สามารถแบ่งสายพันธุ์มะละกอออกเป็น 4 กลุ่มย่อย กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เรดเลดี้ เม็กซิโก พันธุ์ป่าก้านเขียว พันธุ์ป่าก้านม่วง และ เรดคาริเบียน กลุ่มที่ 2 ได้แก่ โกโก้ และแขกนวล กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ฮวนโกล ขอนแก่น 80 และปลักไม้ลาย กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ซันเซ็ตโซโล แขกดำศรีสะเกษ ครั่ง ครั่งเหลือง และกลางดง (Figure 1a) รูปแบบการเคลื่อนที่ของ ยีน β-carotene hydroxylase สามารถแบ่งสายพันธุ์มะละกอออกเป็น 4 กลุ่มย่อย กลุ่มที่ 1 ได้แก่

เม็กซิโก กลางดง เรดเลดี้ ครั่งเหลือง และ แขกดำศรีสะเกษ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ขอนแก่น 80 โกโก้ พันธุ์ป่าก้านเขียว และ พันธุ์ป่าก้านม่วง กลุ่มที่ 3 ได้แก่ เรดคาริเบียน แขกนวล ครั่ง ซันเซ็ตโซโล และฮวนโกล กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ปลักไม้ลาย (Figure 1b)

2. การวัดสีเนื้อของมะละกอและจัดกลุ่มสีของมะละกอโดยใช้วิธีทางสถิติ

หลังจากที่ทำการวัดสีผิวและเนื้อของมะละกอทั้ง 15 สายพันธุ์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติโดยการใช้โปรแกรม ANOVA และ R statistics พบว่าสามารถจัดกลุ่มสีเนื้อของมะละกอได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเนื้อสีแดง (เม็กซิโก และแขกดำศรีสะเกษ) กลุ่มเนื้อสีเหลือง (ฮวนโกล และครั่งเหลือง) และกลุ่มเนื้อสีส้ม (Table 1) เมื่อนำข้อมูลสีเนื้อของมะละกอแต่ละสายพันธุ์มาเปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มโดยใช้ความหลากหลายของยีน lycopene ε-cylase และ β-carotene hydroxylase พบว่าการจัดกลุ่มโดยอาศัยความหลากหลายของยีน β-carotene hydroxylase สามารถแยกสายพันธุ์มะละกอเนื้อสีส้มและเหลืองส่วนใหญ่ออกมาจากมะละกอเนื้อสีแดงทั้งสองสายพันธุ์ และ การจัดกลุ่มโดยใช้ ยีน lycopene ε-cylase สามารถแยกสายพันธุ์มะละกอเนื้อส้มและเหลือง ได้ 2 กลุ่ม นอกจากนั้นยังพบว่าสายพันธุ์ฮวนโกล และครั่งเหลืองมีความแตกต่างกันภายในยีนทั้งสองยีน แม้ว่าจะมีสีเนื้อไม่แตกต่างกัน



(a) (b)

Figure 1 Phylogenetic tree of lycopene ε-cylase and β-carotene hydroxylase

Table 1 L*, a* and b* values of papaya flesh

Cultivars	L*	a*	b*	Chroma	Hue
		Red Group			
Mexico	51.38 cde	37.83 a	35.82 cd	52.11 cd	43.41 fg
Khakdum-Sisaket	45.44 e	37.00 a	31.66 cde	48.93 cde	39.90 g
		Yellow Group			
Krung-yellow	59.75 ab	18.10 f	57.93 a	60.80 a	72.50 a
Huongold	65.30 a	23.53 e	54.72 a	59.52 ab	66.82 ab
		Orange Group			
Holland	48.95 cde	28.17 cde	45.59 b	53.63 bc	58.32 bcd
Wild-green	50.27 cde	30.33 bcd	38.13 bc	49.23 cde	50.92 def
Wild-purple	51.37 cde	27.30 de	38.40 bc	47.40 cdef	54.36 cde
Sunset solo	50.43 cde	34.57 ab	32.43 cde	47.60 cdef	43.06 fg
Khaknual	56.00 bc	33.20 abc	34.67 cde	46.98 defg	47.73 efg
Khonkhan 80	53.61 bcd	31.00 bcd	31.03 cde	43.90 efgh	45.04 efg
Klangdong	52.72 cd	23.60 e	34.45 cde	42.16 fgh	54.68 cde
Red lady	47.69 de	31.70 bcd	26.87 e	41.86 fgh	43.39 fg
Red Caribbean	54.93 bcd	29.60 bcd	29.24 de	41.64 fgh	44.61 efg
Krung	47.87 de	27.10 de	29.64 de	40.44 gh	46.53efg
Koko	54.90 bcd	17.93 f	35.38 cd	39.72 h	63.05 abc

Papaya flesh color (L*, a*, b* parameters) was analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test (DMRT). Data within the same column followed by different letters are significantly different at P = 0.05

วิจารณ์ผลการทดลอง

การจัดกลุ่มสายพันธุ์มะละกอโดยใช้ความหลากหลายของยีน lycopene ε-cylase และ β-carotene hydroxylase พบว่ามีความสอดคล้องกับสีเนื้อผลที่วัดและวิเคราะห์ได้โดยสามารถแยกกลุ่มมะละกอที่มีสีส้มและสีเหลืองออกจากกลุ่มมะละกอที่ทำการศึกษาได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในมะละกอสายพันธุ์ฮวนโกลด์และสายพันธุ์ครั่งเหลืองจะมีค่าคุณลักษณะที่บอกถึงสีเหลือง (b*) ที่ใกล้เคียงกันแต่ทั้ง 2 สายพันธุ์จะถูกจัดกลุ่มคนละกลุ่มเมื่อแบ่งโดยความหลากหลายของยีน ซึ่งแสดงว่ามีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อสีเนื้อ อย่างไรก็ดีจำเป็นต้องเพิ่มชุดไพรเมอร์ที่ใช้ หรือเพิ่มการศึกษายีนอื่นๆในกระบวนการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์เพื่อแยกกลุ่มมะละกอสายพันธุ์เนื้อแดง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยและขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวที่สนับสนุน สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Babu, R., N.A. Rojas, S. Gao, J. Yan and K. Pixley. 2013. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in LcyE and CrtRB1 on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. Theor Appl Genet 126: 389-399.

Borovsky, Y., Y. Tadmor, E. Bar, A. Meir, E. Lewinsohn and I. Paran. 2013. Induced mutation in β-carotene hydroxylase results in accumulation of β-carotene and conversion of red to orange colour in pepper fruit. Theor Appl Genet 126: 557-565.

Diretto, G., R. Tavazza, R. Welsch, D. Pizzichini, F. Mourgues, V. Papacchioli, P. Beyer and G. Giuliano. 2006. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. BMC Plant Biol 6:13 doi: 10.1186/1471-2229-6-13.

Ronen, G., M. Cohen, D. Zamir and J. Hirschberg. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cylcase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. The Plant J 17: 341-351.

Perrier, X., A. Flori and F. Bonnot. 2003. Data analysis methods. p 43-76. *In* P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier and J.C. Glaszmann. (eds.). Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier.

Schweiggert, R.M., C.B. Steingass, P. Esquivel and R. Carle. 2012. Chemical and morphological characterization of Casta Rican papaya (*Carica papaya* L.) hybrids and lines with particular focus on their genuine carotenoid profiles. Agri. Food Chem. J. 60: 2577-2585.

Tanaka Y and A. Ohmiya. 2008. Seeing is believing engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. Current Opinion in Biotech 19: 190-197.