

ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนในกระบวนการสร้าง สารคาโรทีนอยด์ในมะละกอสายพันธุ์เนื้อสีแดง ส้ม และเหลือง

Differential gene expression of carotenoid biosynthetic genes in red-, orange- and yellow-fleshed papaya

พิมพิไล แสงมณี^{1,2*}, ธนพล ไชยแสน³, จรินทร์ สิริพานิชย์⁴ และ ปาริชาติ เบิร์นส์^{1,2}

Pimpilai Saengmanee^{1,2*}, Tanapon Chaisan³, Jingtair Siriphanich⁴ and Parichart Burns^{1,2}

บทคัดย่อ: มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและสังคม เนื่องจากสามารถนำไปรับประทานสด ประกอบอาหาร และแปรรูป ซึ่งสีเนื้อเป็นลักษณะสำคัญที่ส่งผลต่อความชอบและการตัดสินใจของผู้บริโภคโดยเฉพาะการบริโภคผลสด สีเนื้อมะละกอแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ สีแดง สีส้ม และสีเหลือง ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสีในมะละกอทั้งสามกลุ่มโดยใช้ชุดยีนมะละกอเนื้อสีแดง (พันธุ์โซโล) เนื้อสีส้ม (พันธุ์แขกนวล) และเนื้อสีเหลือง (พันธุ์ครึ่งเหลือง) เก็บตัวอย่างมะละกอที่ระยะผลดิบผลเต็มและ ผลสุกในส่วนเปลือก (exocarp) เนื้อผล (mesocarp) และส่วน endocarp มาสกัด total RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Mini kit (QIAGEN, USA) นำมาตรวจการแสดงออกของยีนที่สำคัญในกระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์จำนวน 4 ยีนโดยใช้ปฏิกิริยา reverse transcriptase polymerase chain reaction ด้วย One step reverse transcriptase polymerase chain reaction (QIAGEN, USA) ผลการศึกษาพบความแตกต่างของการแสดงออกในยีนที่สำคัญในกระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์ในมะละกอที่มีสีเนื้อแตกต่างกัน

คำสำคัญ: มะละกอ, กระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์, การแสดงออกของยีน

ABSTRACT: Papaya (*Carica papaya* L.) is an important fruit crop economically and socially. Although commonly consumed fresh or as a part of cuisine, papaya can also be manufactured into products such as medicine. Color plays a vital role in consumer preference for fresh consumption. Papaya can be divided into 3 groups based on flesh colour; red, orange and yellow. In this study, 3 varieties of papaya Solo (red-fleshed), KhakNual (orange-fleshed) and Yellow-Krung (yellow-fleshed) were harvested at mature green, colour break and ripen stage in exocarp, mesocarp and endocarp. The samples were extracted for total RNA using RNeasy Mini kit (QIAGEN, USA). The gene expression of 4 carotenoid synthetic genes was determined using one step reverse transcriptase polymerase chain reaction (QIAGEN, USA). The results indicated differential expression of gene in carotenoid synthetic pathway in papaya with different flesh colour.

Keywords: Papaya (*Carica papaya* L.), Carotenoid biosynthetic genes, Gene expression

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University KamphangSaen Campus Nakhon Pathom 73140 Thailand

² ห้องปฏิบัติการวิจัยทางด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

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

³ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

⁴ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

* Corresponding author: pimpilai0593@gmail.com

บทนำ

มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ในปี 2555 พบว่ามะละกามีพื้นที่การปลูกทั้งหมด 81,250 ไร่ และมีผลผลิตรวม 215,000 ตัน (FAOSTAT, 2014) โดยผลผลิตส่วนใหญ่ใช้บริโภคภายในประเทศ การเลือกซื้อมะละกอของผู้บริโภคจะขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปทรงของผล ความหวาน ตลอดจนความแน่นเนื้อนอกจากปัจจัยดังกล่าวแล้ว ลักษณะของสียังเป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้บอกถึงคุณภาพและช่วยในการตัดสินใจในการเลือกซื้อของผู้บริโภคและผู้ผลิตในระบบอุตสาหกรรม (Pereira et al., 2009; Nisha et al., 2011) สำหรับมะละกอสารหลักที่ทำให้เกิดสีของเนื้อผลได้แก่สารคาโรทีนอยด์ โดยสารคาโรทีนอยด์ที่พบในมะละกามีคุณค่าทางอาหาร และความเหมาะสมต่อการบริโภคทั้งดิบและสุก โดยมี bioavailability ที่ระยะผลสุกมากกว่าผักและผลไม้อื่นๆหลายชนิด อาทิ มะเขือเทศ และ แครอท (Lemmens et al., 2014) Schweiggert et al. (2012) ศึกษาปริมาณสารคาโรทีนอยด์ในมะละกอเนื้อเหลือง 2 สายพันธุ์ และมะละกอเนื้อส้ม-แดง 5 สายพันธุ์ พบปริมาณสารไลโคปีนทั้งหมด (Total lycopene) ปริมาณสูง 2175-4307 µg/100 g of FW และมีปริมาณเบต้าแคโรทีน 200-554 µg/100 g of FW ในมะละกอกกลุ่มเนื้อส้ม-แดง ในขณะที่มะละกอเนื้อเหลืองมีปริมาณไลโคปีนทั้งหมดต่ำ (9-12 µg/100 g of FW) และมีปริมาณเบต้าแคโรทีน 270-508 µg/100 g of FW

สารคาโรทีนอยด์ถูกสร้างในกระบวนการซึ่งมีสารเริ่มต้นเป็น Geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น Phytoene โดยเอนไซม์ Phytoene synthase หลังจากนั้น Phytoene ก็จะถูกเปลี่ยนเป็นคาโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ โดยการทำงานของเอนไซม์ ดังแสดงในภาพที่ 1 Takyi (2001) รายงานว่า สาร β -carotene ทำให้เกิดลักษณะเนื้อสีส้มส่วนสาร α -carotene ทำให้เกิดลักษณะเนื้อสีเหลือง ขณะที่ลักษณะเนื้อสีแดงจะเกี่ยวข้องกับปริมาณ lycopene

(Devitt et al., 2010; Blas et al., 2010) รายงานความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน lycopene β -cyclase และการเกิดเนื้อสีเหลืองหรือส้ม-แดงนอกจากนั้นไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนกับสีเนื้อผลในมะละกอเนื้อสีแดง สีส้ม และสีเหลือง ดังที่พบในการศึกษาในผลไม้ชนิดอื่น อาทิ มะเขือเทศ และพริก (Fraser et al., 2002; Borovsky et al., 2013) การศึกษาดังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน 4 ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์ในมะละกอเนื้อสีแดง เนื้อสีส้มและเนื้อสีเหลืองทั้ง 3 ระยะการพัฒนา (ผลดิบ ผลเต็ม และ ผลสุก) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอธิบายถึงความสัมพันธ์ของยีนกับการเกิดสีในมะละกอ

วิธีการทดลอง

ศึกษาการแสดงออกของยีน 4 ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์คือ lycopene β -cyclase, zeaxanthin epoxidase, violaxanthin de-epoxidase และ 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase โดยใช้การแสดงออกของยีน Actin เป็นยีนเปรียบเทียบด้วยโปรแกรมที่จำเพาะ (Table 1) ในกลุ่มมะละกอเนื้อสีแดง (พันธุ์โชโล) เนื้อสีส้ม (พันธุ์แขกนวล) และเนื้อสีเหลือง (พันธุ์ครึ่งเหลือง) โดยเก็บตัวอย่างมะละกอที่ระยะผลดิบ ผลเต็ม และผลสุกซึ่งทำการปลูกและดูแลโดยฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม นำมาสกัด total RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Mini kit (QIAGEN, USA) ตรวจสอบความเข้มข้นของ total RNA และนำมาตรวจการแสดงออกของยีนที่สำคัญในกระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์จำนวน 4 ยีนโดยใช้ปฏิกิริยา reverse transcription polymerase chain reaction ด้วย One step reverse transcriptase polymerase chain reaction (QIAGEN, USA) โดยใช้รอบในการทำปฏิกิริยา คือ Reverse transcription 50 °C เป็นเวลา 30 นาที 1 รอบ Initial PCR activation

step 95 °C เป็นเวลา 15 นาที 1 รอบ Denaturation 94 °C เป็นเวลา 1 นาที Annealing 52°C 1 นาที สำหรับ 35 รอบ และ Extension 72°C 10 นาที และ

ตรวจสอบการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้า 1% TAE agarose gel ที่ 100 V นาน 30 นาที ย้อมดีเอ็นเอ โดยสารละลายเอทริเดียมโบรไมด์

Table 1 Primer sequences used for one-step RT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)
9-Cis-epoxycarotenoid dioxygenase	5'- AGCTACACTTTGCAGCCGTTTC-3'	5'- GGATTCATCCCGATCTGTATG-3'	543
Lycopene β -cyclase	5'-ATTCGTCACAGAATCTCAG-3'	5'-AACCAAATCCACTTGCATC-3'	539
Violaxanthin de-epoxidase	5'-ATGGCATTGACGACATGTTTC-3'	5'-TACCTGCATTCCTTTAATAAGC-3'	535
Zeaxanthin epoxidase	5'-ATGACAATGTTGTTTCTACAGC-3'	5'-CTTCCCTCGTTACTGTAAAG-3'	518
Actin	5'-AAGCTGTTCTTCCCTATATGCTGGTGG-3'	5'-CCTCTCCTTGATGTCCCTGACAAATT-3'	233

ผลการศึกษา

การแสดงออกของยีน 4 ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์คือ lycopene

β -cyclase, zeaxanthin epoxidase, violaxanthin de-epoxidase และ 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (Figure 1) โดยใช้การแสดงออกของยีน Actin เป็นยีนเปรียบเทียบได้ผลการศึกษาดังนี้

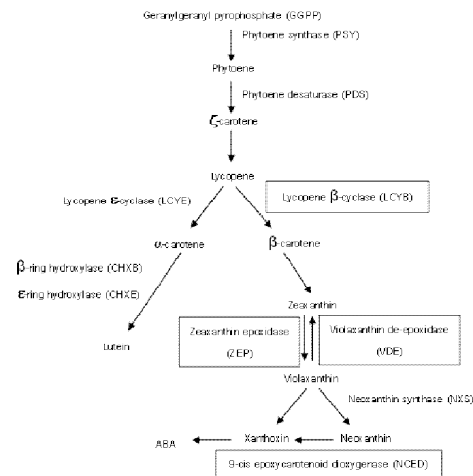


Figure 1 Carotenoid biosynthetic pathway. Genes used in this study are lycopene β -cyclase, zeaxanthin epoxidase, violaxanthin de-epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase as indicated in the boxes. This picture is modified from Aluru et al., 2008

มะละกอเนื้อสีแดง ระยะเวลาผลดิบและระยะเวลาผลสุกมีการแสดงออกของยีนที่สอดคล้องกัน คือ มีการแสดงออกน้อยสุดในส่วนของเปลือก เพิ่มขึ้นในส่วน

ของเนื้อผล และมากที่สุดอยู่ในส่วนของ endocarp ขณะที่ในระยะผลแก่มีการแสดงออกของยีนมากสุดในส่วน

ของ endocarp ในมะละกอเนื้อสีส้ม ระยะผล

ดิบ มีการแสดงออกของยีนมากสุดในส่วน

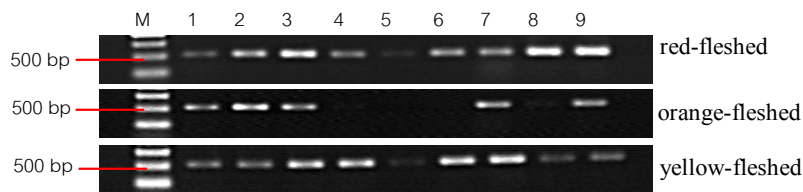


Figure 2 Gene expression of β -cyclase in exocarp (1, 4, 7), mesocarp (2, 5, 8) and endocarp (3, 6, 9) were harvested at mature green (1-3), colour break (4-6) and ripen stage (7-9).

ยีน Zeaxanthin epoxidase

พบการแสดงออกในทุกส่วนและทุกระยะในมะละกอเนื้อสีแดง ส้ม และเหลือง โดยพบการ

แสดงออกในระดับสูงที่ผลสุกส่วนเนื้อผล และ endocarp ของมะละกอเนื้อแดง (Figure 3)

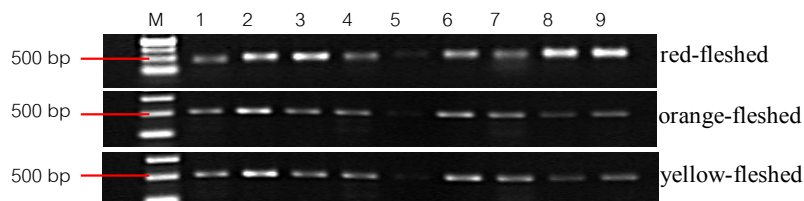


Figure 3 Gene expression of zeaxanthin epoxidase in exocarp (1, 4, 7), mesocarp (2, 5, 8) and endocarp (3, 6, 9) were harvested at mature green (1-3), colour break (4-6) and ripen stage (7-9).

ยีน Violaxanthin de-epoxidase

ในมะละกอเนื้อสีแดงระยะผลดิบและผลสุกมีการแสดงออกน้อยที่สุดในส่วนของเปลือก เพิ่มขึ้นในส่วน

แสดงออกมากที่สุดในส่วนเนื้อผล ขณะที่มะละกอเนื้อสีเหลือง พบมีดีเอ็นเอ 2 แถบ เฉพาะระยะผลดิบ ทั้งสามส่วน (exocarp, mesocarp และ endocarp) แต่พอระยะผลเต็มและผลสุก พบมีดีเอ็นเอเพียง 1 แถบและการแสดงออกมากที่สุดในส่วนของเนื้อผล (Figure 4)

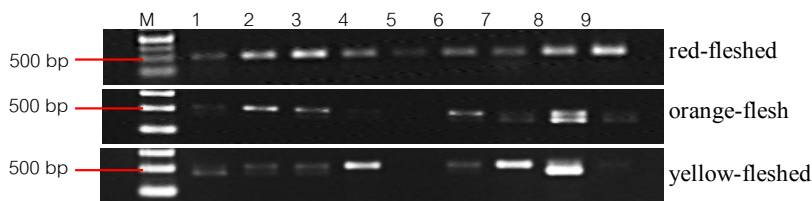


Figure 4 Gene expression of violaxanthin de-epoxidase in exocarp (1, 4, 7), mesocarp (2, 5, 8) and endocarp (3, 6, 9) were harvested at mature green (1-3), colour break (4-6) and ripen stage (7-9).

ยีน 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase

ระยะผลดิบและผลสุกในมะละกอเนื้อสีแดงมีการแสดงออกที่คล้ายคลึงกัน คือ มีการแสดงออกในส่วนของเปลือกน้อยที่สุด เพิ่มขึ้นในส่วนของเนื้อผลและมากที่สุดอยู่ที่ส่วน endocarp ส่วนในระยะผลแต้ม พบ

ว่า มีการแสดงออกมากสุดในส่วนของเปลือก และน้อยสุดอยู่ในส่วนของ endocarp ขณะที่ในมะละกอเนื้อสีส้ม และสีเหลือง พบว่า มีการแสดงออกมากสุดในระยะของผลแต้มและผลสุกในส่วนของเปลือก (Figure 5)

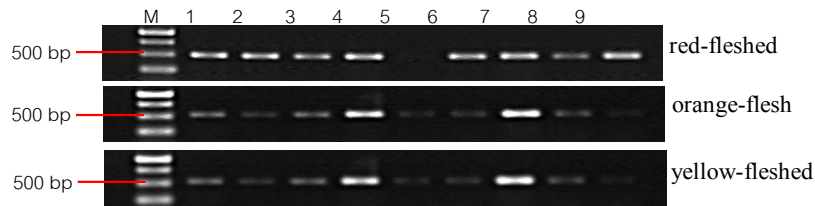


Figure 5 Gene expression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in exocarp (1, 4, 7), mesocarp (2, 5, 8) and endocarp (3, 6, 9) were harvested at mature green (1-3), colour break (4-6) and ripen stage (7-9).

สรุปและวิจารณ์

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์ได้แก่ lycopene β -cyclase, zeaxanthin epoxidase, violaxanthin de-epoxidase และ 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase ในผลดิบ ผลแต้ม และผลสุก ในเนื้อเยื่อทั้งสามชั้นของผลมะละกอ (exocarp, mesocarp และ endocarp) 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ไซโล (เนื้อสีแดง) พันธุ์แขกนวล (เนื้อสีส้ม) และ พันธุ์ครึ่งเหลือง (เนื้อสีเหลือง) ในสายพันธุ์มะละกอที่มีสีเนื้อผลแดง ส้ม และเหลืองมีรูปแบบที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยส่วนใหญ่แล้ว มะละกอเนื้อสีแดงจะมีการแสดงออกของยีนในระดับที่สูงที่สุด โดยการแสดงออกของยีนที่ศึกษามากขึ้นตามลำดับในระหว่างการสุก (ระยะผลแต้มเป็นผลสุก) ของมะละกอเนื้อสีแดงสอดคล้องกับรายงานในผล loquat (Fu et al., 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าในมะละกอเนื้อสีส้มมีรูปแบบการแสดงออกของยีน violaxanthin de-epoxidase ที่จำเพาะโดยมีดีเอ็นเอเกิดขึ้น 2 แถบ ในระยะผลสุกและมากที่สุดในส่วนเนื้อผล นอกจากนี้พบการแสดงออกของยีน 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase ลดลงตามลำดับในระหว่างการสุก คล้ายคลึงกันในมะละกอเนื้อสีส้มและสีเหลือง ซึ่ง

สอดคล้องกับการศึกษาในส้ม (Zhang et al., 2012) โดยพบการแสดงออกมากที่สุดในเปลือก ชี้ว่ายีนดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของสีเปลือกในมะละกอ เอนไซม์ NCED เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสารคาโรทีนอยด์ชนิด 9-cis neoxanthin ให้เข้าสู่กระบวนการสร้างสาร ABA ความแตกต่างในระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่มีมาก่อนใน ส้ม พืช และองุ่น ที่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน NCED1 กับการสะสมสารคาโรทีนอยด์ และการสุกของผล (Zhang et al., 2009; Rodrigo et al., 2006) ส่วนยีน zeaxanthin epoxidase มีการแสดงออกของยีนที่ไม่แตกต่างกันทั้ง 3 ส่วน ในมะละกอทั้งสีส้มและสีเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับแสดงออกของยีนในกระบวนการสร้างสารคาโรทีนอยด์ในพริกระหว่างการสุกซึ่งมีการเปลี่ยนสีจากเขียว เป็น ส้ม และแดงตามลำดับ (Martinez-Lopez et al., 2014)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยและขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ

แห่งชาติและศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวที่สนับสนุน สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Aluru, M. Y. Xu, R. Guo, Z. Wang, Z. Li, W. White, W. Wang and S. Rodermeil. 2008. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. J Exp Bot. 59:3551-3562.
- Blas, A.L., R. Ming, Z. Liu, O.J. Veatch, R.E. Paull, P.H. Moore and Q. Yu. 2010. Cloning of the Papaya Chromoplast-Specific Lycopene b-Cyclase, CpCYC-b, Controlling Fruit Flesh Color Reveals Conserved Microsynteny and a Recombination Hot Spot. Plant Physiol. 152:2013-2022.
- 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.
- Devitt, A.L., K. Fanning, R.G. Dietzgen and T.A. Holton. 2010. Isolation and functional characterization of a lycopene b-cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). J.EXP. Bot 61:33-39
- Fraser, P.D., S. Romer, C.A. Shipton, P.B. Mills, J.W. Kiano, N. Misawa, R.G. Drake, W. Schuch and P.M. Bramley. 2002. Evaluation of transgenic tomato plant expressing an additional phytoene synthetase in a fruit-specific manner. PNAS 99:1092-1097.
- Lemmens, L., I.C. Sandy, V. Buggenhout, P. Palmero, A.V. Loey and M. Hendrickx. 2014. Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro) structural characteristics and the presence of lipids: A review. Trends in Food Science & Technology. 1-11.
- Nisha, P., R.S. Singhal, and A.B.Pandit. 2011. Kinetic modeling of colour degradation in tomato puree (*Lycopersicon esculentum* L.). Food and Bioprocess Technology. 4:781-787.
- Pereira, A.C., M.S Reis, and P.M.Saraiva. 2009. Quality control of food products using image analysis and multivariate statistical tools. Industrial and Engineering Chemistry Research. 48(2):988-998.
- Schweiggert, R.M., C.B. Steingass, P. Esquivel and R. Carle. 2012. Chemical and Morphological Characterization of Costa Rican Papaya (*Carica papaya* L.) Hybrids and Lines with Particular Focus on Their Genuine Carotenoid Profiles. J. Agric. Food Chem. 60:2577-2585.
- Takyi, E.E.K. 2001. In Vegetables, Fruits and Herbs in Health Promotion, pp.19-31. In: R.R. Watson (Eds.). CRC Press LCC; Danvers M.A., USA.
- FAOSTAT. มปป. ชื่อเรื่อง. Available: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>. Accessed June 24, 2014.