

การโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PPO* และ *CYP* ในแคลลัสของต้นสร้อยไก่

นงลักษณ์ บุญโชติ*, ฐาปนกรณ์ แสงอรุณ และ ปรียกมล กลั่นฤทธิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

*อีเมลของผู้ประพันธ์บรรณกิจ: nongke@kku.ac.th

บทคัดย่อ

สารบีตาเลน (betalains) เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชหลายชนิด มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านจุลชีพ และต้านมะเร็ง โดยพบได้ในพืชกลุ่มวงศ์บานไม่รู้โรย (Amaranthaceae) รวมถึงต้นสร้อยไก่ (*Celosia argentea* var. *plumosa*) ซึ่งเป็นพืชไม้ดอกที่มีศักยภาพในการผลิตบีตาเลนในกลุ่มบีตาแซนทีน (สีเหลือง - ส้ม) และบีตาไซยานิน (สีแดง - ม่วง) วิธีการสังเคราะห์สารบีตาเลนในพืชเกี่ยวข้องกับยีนสำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะ polyphenol oxidase (*PPO*) และ cytochrome P450 76AD1 (*CYP76AD1*; *CYP*) ซึ่งมีบทบาทในช่วงต้นของกระบวนการผลิตสารนี้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PPO* และ *CYP* ในต้นสร้อยไก่ โดยออกแบบ degenerate primers จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชในวงศ์เดียวกันหรือใกล้เคียง โดยยีน *PPO* ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากผักโขม (*Amaranthus tricolor*) และบิตูรุต (*Beta vulgaris*) ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *CYP* ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากต้นบิตูรุต (*B. vulgaris*) ในการออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นสกัด RNA จากแคลลัสสีแดงของสร้อยไก่ และใช้เทคนิค RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีนเป้าหมาย ผลิตภัณฑ์ PCR ถูกตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM®-T Easy และส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 เพื่อทำการโคลนและวิเคราะห์ลำดับเบื้องต้น ผลการศึกษาพบว่า *PPO* cDNA ที่โคลนได้มีความยาว 471 นิวคลีโอไทด์ และมีความเหมือนกับยีน *PPO* ของ *Amaranthus tricolor* ร้อยละ 74.82 ส่วน *CYP* cDNA ที่ได้มีความยาว 270 นิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนกับยีนของ *Celosia cristata* ร้อยละ 98.90 และยังมีความคล้ายกับ *Amaranthus cruentus*, *A. tricolor* และ *Chenopodium quinoa* ร้อยละ 87.41, 86.67 และ 84.44 ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารบีตาเลนในพืชต่อไป

คำสำคัญ: ต้นสร้อยไก่, บีตาเลน, ลำดับนิวคลีโอไทด์, polyphenol oxidase (*PPO*), cytochrome P450 76AD1 (*CYP*)

Cloning and Partial Nucleotide Sequence Analysis of *PPO* and *CYP* Genes in *Celosia argentea* Callus

Nongluck Boonchot*, Thapagorn Sang A Roon and Preekamol Klanrit

Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University,
Mueang District, Khon Kaen 40002, Thailand

*Corresponding author's e-mail: nongke@kku.ac.th

Abstract

Betalains are phenolic compounds found in various plant species, possessing significant biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and anticancer properties. These compounds are typically present in plants of the Amaranthaceae family, including *Celosia argentea* var. *plumosa*, an ornamental species with the ability to produce betalains in both the betaxanthin group (yellow to orange) and the betacyanin group (red to purple). The biosynthetic pathway of betalains in plants involves several key genes, especially polyphenol oxidase (*PPO*) and cytochrome P450 76AD1 (*CYP76AD1*; *CYP*), which function in the early stages of the pathway. This study aimed to clone and analyze partial nucleotide sequences of the *PPO* and *CYP* genes in *C. argentea* var. *plumosa*. Degenerate primers were designed based on nucleotide sequences from related species within or closely related to the Amaranthaceae family. For *PPO*, the primers were designed using sequences from *Amaranthus tricolor* and *Beta vulgaris*, while for *CYP*, sequences from *B. vulgaris* were used. Total RNA was extracted from red callus of *C. argentea*, and RT-PCR was performed to amplify cDNA of the target genes. PCR products were confirmed by agarose gel electrophoresis, ligated into the pGEM®-T Easy vector, and transformed into *Escherichia coli* strain JM109 for cloning and preliminary sequencing analysis. The cloned *PPO* cDNA fragment was 471 nucleotides in length and showed 74.82% similarity to the *PPO* gene of *A. tricolor*. The *CYP* cDNA fragment was 270 nucleotides long and shared 98.90% similarity with *Celosia cristata*, as well as 87.41%, 86.67%, and 84.44% similarity to *Amaranthus cruentus*, *A. tricolor*, and *Chenopodium quinoa*, respectively. These findings provide foundational information for the design of gene-specific primers to study gene expression related to betalain biosynthesis in plants.

Keywords: *Celosia argentea*, betalains, nucleotide sequence, polyphenol oxidase (*PPO*), cytochrome P450 76AD1 (*CYP*)

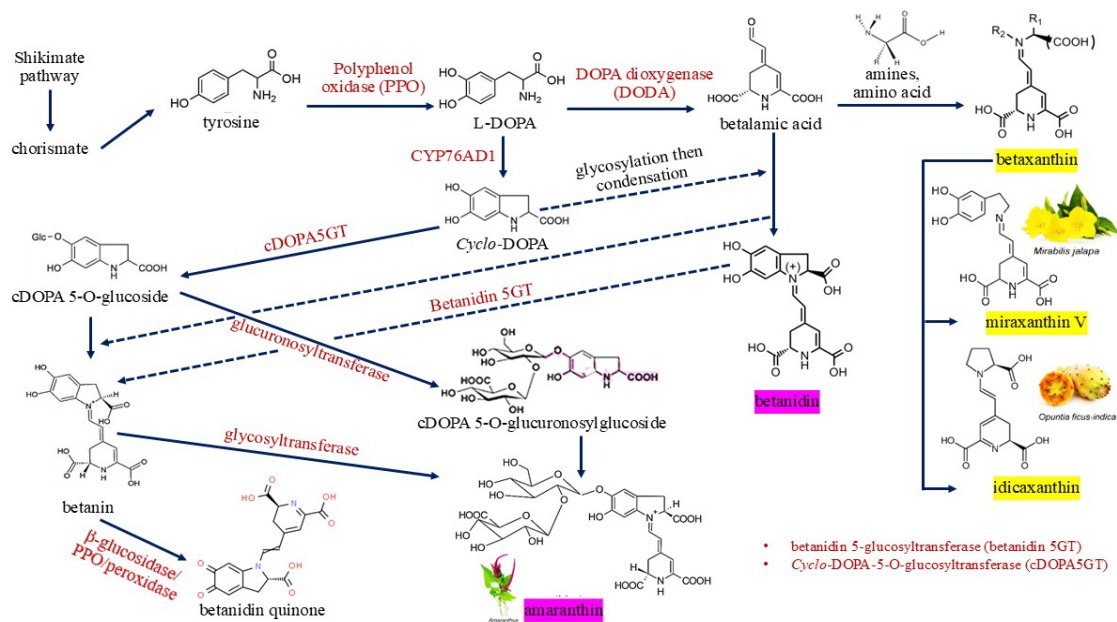
บทนำ

ต้นสร้อยไก่ (*Celosia argentea* var. *plumosa*) จัดอยู่ในวงศ์บานไม่รู้โรย (Amaranthaceae) เป็นต้นไม้ที่มีแหล่งกำเนิดในทวีปเอเชีย อเมริกา และแอฟริกา เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก มีความสูงประมาณ 2 - 3 เมตร แตกกิ่งก้านจำนวนมาก ใบเดี่ยวและหน้าใบมีสีเขียว ส่วนด้านหลังมีเส้นกลางใบที่เด่นชัด โดยปกติต้นสร้อยไก่ออกดอกในช่วงฤดูหนาว ดอกมีหลากหลายสี เช่น เหลือง ส้ม ชมพู และแดง เป็นต้น ขึ้นกับพันธุ์ นิยมใช้ต้นสร้อยไก่เป็นไม้ประดับสถานที่และจัดสวนเพื่อความสวยงาม นอกจากนี้ในบางประเทศ เช่น ประเทศจีนหรือประเทศในทวีปแอฟริกา มีการนำต้นอ่อนและดอกของต้นสร้อยไก่อมาประกอบอาหารได้เช่นเดียวกันกับผักทั่วไป (Palada & Crossman, 1999)

สารที่พบในดอกสร้อยไก่อคือสารกลุ่มบีตาเลน ซึ่งเป็นสารสีที่ไม่มีเลกุลประกอบด้วยธาตุไนโตรเจน (N) (nitrogen-containing compounds) ละลายในน้ำได้ โดยแบ่งออกเป็นสองกลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่มที่ 1 บีตาแซนทิน (betaxanthin) เกิดจากปฏิกิริยาการควบแน่นระหว่างกรดบีตาลามิก ([4-(2-oxoethylidene)-1,2,3,4-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylic acid]; betalamic acid) และกรดอะมิโน โดยสารกลุ่มนี้มีสีเหลืองถึงส้ม ซึ่งมีการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 475 - 480 นาโนเมตร สำหรับสารในกลุ่มของบีตาแซนทินจะมีกรดอะมิโน เช่น โพรลีน (proline) กลูตามีน (glutamine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) กรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) ฮิสติดีน (histidine) ไทโรซีน (tyrosine) อะลานีน (alanine) เป็นต้น (Slimen et al., 2017) มาเชื่อมกับโมเลกุลทำให้เกิดเป็นสารตัวใหม่ที่หลากหลาย ได้แก่ โดปาแซนทิน (dopaxanthin) อินดิคาแซนทิน (indicaxanthin) พอร์ทูลากาแซนทิน (portulacaxanthin I) และวูลกาแซนทิน (vulgaxanthin I) เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่ 2 บีตาไซยานิน (betacyanin) เกิดจากปฏิกิริยาการควบแน่นระหว่างกรดบีตาลามิก และ -3-(-L-3,4-dihydroxy-phenylalanine) (-DOPA) (Herbach et al., 2006) มีสีแดงถึงม่วง ซึ่งมีการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 535 - 540 นาโนเมตร (Lystvan et al., 2018)

การสังเคราะห์สารบีตาเลนนั้นเกิดขึ้นภายในเซลล์ และจะถูกเก็บสะสมอยู่ที่แวคิวโอล (vacuole) ภายในเซลล์พืช กระบวนการสังเคราะห์สารบีตาเลนเริ่มต้นจากวิถีชิคิเมต (shikimate pathway) ซึ่งเป็นวิถีที่สังเคราะห์กรดคอร์สมิก (chorismic acid) เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนจำเป็นในต้นพืช ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ทริปโตเฟน (tryptophan) และไทโรซีน (tyrosine) โดยสารบีตาเลนนั้นมีสารตั้งต้นคือ ไทโรซีน หลังจากนั้นไทโรซีนจะถูกเปลี่ยนเป็นไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีน (dihydroxyphenylalanine; L-DOPA) ด้วยเอนไซม์ โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase; PPO) จากนั้นเอนไซม์โดปาไดออกซิจีเนส (L-DOPA 4,5 dioxygenase; DODA) เปลี่ยน L-DOPA เป็น betalamic acid โดยที่กรดอะมิโนที่อยู่ภายในเซลล์พืชจะเข้ามาเชื่อมกับกรดบีตาลามิกทำให้เกิดเป็นสารกลุ่มบีตาแซนทิน เช่น ไมราแซนทิน (miraxanthin) และอินดิคาแซนทิน (indicaxanthin) เป็นต้น สำหรับสารกลุ่มบีตาไซยานินนั้นเริ่มจากการที่เอนไซม์ cytochrome P450 76AD1 (CYP76AD1) เปลี่ยน L-DOPA เป็นไฮโดรโดปา (-DOPA) จากนั้นทำปฏิกิริยากับกรดบีตาลามิกมีการเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation) ตามด้วยปฏิกิริยาควบแน่น (condensation) โดยเอนไซม์ betanidin 5-glucosyltransferase (Be 5-GT) เกิดเป็นบีตานิน (betanin) นอกจากนี้ไฮโดรโดปายังสามารถเปลี่ยนเป็นไฮโดรโดปา-5-O-กลูโคไซด์ (-DOPA 5-O-glucoside) ด้วยเอนไซม์ไฮโดรโดปา-5-O-กลูโคซิลทรานส์เฟอเรส (-DOPA-5-O-glucosyltransferase; cDOPA5GT) ที่สามารถ

ทำปฏิกิริยากับกรดปีตาลามิก ทำให้เกิดเป็นสารปีตานิน และสารกลุ่มปีตาไซยานินชนิดอื่น ๆ เช่น กอมพรีนิน (gomphrenin) และอะมาแรนทิน (amaranthin) เป็นต้น โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 วิธีการสังเคราะห์สารกลุ่มปีตาเลน (ฐาปกรณ์ แสงอรุณ, 2565)

สารปีตาเลนเป็นเม็ดสีในโตรเจนที่พบเฉพาะในกลุ่มพืชบางชนิด โดยเฉพาะในวงศ์ *Amaranthaceae*, *Cactaceae* และ *Caryophyllaceae* ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อย คือ ปีตาแซนทิน (สีเหลือง-ส้ม) และ ปีตาไซยานิน (สีแดง-ม่วง) โดยกระบวนการสังเคราะห์สารปีตาเลนเริ่มต้นจากกรดอะมิโน ไทโรซีน (tyrosine) ที่ถูกเปลี่ยนผ่านหลายขั้นตอนของเอนไซม์เฉพาะ โดยเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) มีบทบาทในวิธีการสังเคราะห์สารปีตาเลน โดยทำหน้าที่ออกซิไดส์ tyrosine เป็น L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) ผ่านกระบวนการไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) การเกิดของ L-DOPA เป็นจุดเริ่มต้นสำคัญที่นำไปสู่การสร้าง betalamic acid ซึ่งเป็นโครงสร้างแกนกลางของสารปีตาเลนทุกชนิด ส่วนเอนไซม์ cytochrome P450 76AD1 (CYP76AD1; CYP) มีบทบาทในวิธีการสังเคราะห์สารปีตาเลน โดยเอนไซม์ CYP76AD1 ออกซิไดส์ L-DOPA เป็น cyclo-DOPA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นเฉพาะที่สำคัญในการสร้างกลุ่มปีตาไซยานิน การสร้าง cyclo-DOPA ทำให้เกิดการรวมตัวกับ betalamic acid และผ่านกระบวนการ glycosylation และ condensation ต่อไป จึงสามารถสร้าง betacyanins ได้ เช่น betanin โดยที่ PPO และ CYP ทำงานในช่วงต้นของวิธีการสังเคราะห์ปีตาเลน โดย PPO เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเปลี่ยนไทโรซีนเป็น L-DOPA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ร่วมกันทั้งในกลุ่ม betaxanthins และ betacyanins ส่วน CYP มีบทบาทเฉพาะในแขนงของ betacyanin เท่านั้น โดยเปลี่ยน L-DOPA ให้เป็น cyclo-DOPA เพื่อให้สามารถจับกับ betalamic acid ได้

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าบีตาเลนเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ มีคุณสมบัติเด่นในการช่วยต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ด้านจุลชีพ และต้านมะเร็ง (Smeriglio et al., 2019; Madadi et al., 2020) นอกจากนี้ ยังพบว่าสารสกัดบีตาเลนจากบีทรูทสามารถยับยั้งการลำเลียงน้ำตาลกลูโคสในลำไส้ได้ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวอาจเป็นประโยชน์สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Madadi et al., 2020) ในปัจจุบัน สารที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ที่พบในตลาดส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์ ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และเนื่องจากผู้บริโภคให้ความสนใจกับสุขภาพและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้น จึงมีการใช้ประโยชน์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืชเพิ่มมากขึ้น และด้วยคุณสมบัติหลายประการที่กล่าวข้างต้น ประกอบกับเป็นสารที่มีโหนดที่แตกต่างกัน จึงเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายชนิด ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาสารสกัดบีตาเลนจากพืชหลายชนิดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น ด้านอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมยา รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีการผลิตออกมาจำหน่ายตามท้องตลาด อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและสีย้อม เพื่อตอบสนองต่อกลุ่มคนที่ต้องการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติและต้องการหลีกเลี่ยงการใช้สังเคราะห์ทางเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ (Delgado-Vargas et al., 2000)

แม้ว่าจะพบรายงานการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์รวมถึงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์สารกลุ่มบีตาเลนในพืชที่มีการสะสมสารบีตาเลน เช่น *Amaranthus tricolor*, *Suaeda salsa*, *Hylocereus polyrhizus*, *Hylocereus costaricensis* และ *Beta vulgaris* (Zhao et al., 2011; Hatlestad et al., 2012; Qingzhu et al., 2016; Zheng et al., 2016; Xi et al., 2019) อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนดังกล่าวจากแคลลัสของต้นสร้อยไก่ที่มีการสะสมสารกลุ่มบีตาเลนภายในเซลล์ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน polyphenol oxidase (PPO) และ CYP76AD1 (CYP) จากแคลลัสสีแดงที่มีการสะสมสารบีตาเลนจากต้นสร้อยไก่ โดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล และหวังว่าข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากหากต้องการนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการทำวิจัยเพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบเต็มยีน (full-length gene) หรือใช้ข้อมูลที่ได้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในวิถีสังเคราะห์สารบีตาเลนในพืชวงศ์บานไม่รู้โรยหรือพืชชนิดอื่น ๆ ที่มีการสังเคราะห์และสะสมสารบีตาเลน

สำหรับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PPO และ CYP ที่โคลนได้จากแคลลัสสีแดงของต้นสร้อยไคนั้น จะใช้เทคนิคการสกัดอาร์เอ็นเอจากแคลลัสสีแดงของต้นสร้อยไก่ นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็นแม่แบบ (template) ในการสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription (RT) จากนั้นเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน PPO และ CYP ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ degenerate primers ที่ได้ออกแบบไว้ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผู้วิจัยได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบางส่วนของยีน PPO และ CYP จากแคลลัสต้นสร้อยไก่ รวมถึงโดเมนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากการศึกษาครั้งนี้ คาดว่าจะสามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน PPO และ CYP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สำหรับการคัดเลือกพืชที่ผลิตสารบีตาเลนในเบื้องต้น โดยวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว นอกจากนี้ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนจากพืชในวงศ์ใกล้เคียงกัน โดยใช้ฐานข้อมูล National Center for

Biotechnology Information (NCBI) พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนดังกล่าว และยังสามารถใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการศึกษาการแสดงออกของยีนในวิธีการสังเคราะห์สารปีตาเลนต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน polyphenol oxidase (*PPO*) และ CYP76AD1 (*CYP*) จากแคลลัสสีแดงของต้นสร้อยไก่ ซึ่งคาดว่าเป็นยีนที่ควบคุมการการสังเคราะห์สารปีตาเลน โดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

ระเบียบวิธีวิจัย

พืชตัวอย่าง

ในงานวิจัยนี้ใช้แคลลัสสีแดงที่ได้จากการชักนำแคลลัสจากต้นสร้อยไก่พันธุ์ดอกสีแดง ซึ่งมีการผลิตสารกลุ่มปีตาเลน ที่ได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Sang A Roon et al., 2024) โดยเฉพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) (PhytotechLab, USA) ที่เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) (Sigma, USA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 6-benzylaminopurine (BAP) (Sigma, USA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงแคลลัสในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยขอนแก่น รวมถึงต้นสร้อยไก่ที่โตเต็มวัยที่มีดอกสีแดงที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และได้นำไปประนุสายพันธุ์ที่พิพิธภัณฑ์พืช สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยได้หมายเลขตัวอย่างคือ KCU No 25556

การเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ผลิตสารปีตาเลน

ย้ายแคลลัสสีแดงที่มีอายุ 14 วันลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D (Sigma, USA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP (Sigma, USA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุก ๆ 2 สัปดาห์เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส โดยเลือกเฉพาะแคลลัสที่มีสีแดง มีลักษณะเกาะตัวแบบหลวม ๆ และมีการเจริญอย่างรวดเร็วทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (Lux) โดยให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

การสืบค้นข้อมูลและการออกแบบไพรเมอร์

สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *PPO* และ *CYP* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการผลิตสารกลุ่มปีตาเลน เริ่มจากการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองจากฐานข้อมูลออนไลน์ของ NCBI เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ เมื่อได้ข้อมูลยีนดังกล่าวจากพืชชนิดอื่นที่ปรากฏในฐานข้อมูล NCBI เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (DNA sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega จากเว็บไซต์

<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo> เพื่อหาตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน โดยออกแบบไพรเมอร์ (Degenerate Primers) สำหรับยีน *PPO* ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากผักโขม (*Amaranthus tricolor*; XM_057675084.1) และบีทรูท (*B. vulgaris*; KU644146.1) ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *CYP* ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากต้นบีทรูท (*B. vulgaris*; HQ656024.1, KM592962.1) ในการออกแบบไพรเมอร์

การสกัดอาร์เอ็นเอจากแคลลัสที่ผลิตสารบีตาเลน

สกัดอาร์เอ็นเอจากแคลลัสสีแดงจากต้นสร้อยไก่ที่มีอายุ 14 วัน โดยใช้สาร TRIzol® Reagent (Invitrogen, USA) จากนั้นใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุด High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA) โดยเตรียม 2x Reverse Transcription Master Mix ที่ประกอบด้วย 10x RT Buffer 2 ไมโครลิตร 25 x dNTP Mix (100 mM) 0.8 ไมโครลิตร 10x RT Random Primers 2 ไมโครลิตร MultiScribe™ Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (Nuclease-free water) ให้ครบ 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมอาร์เอ็นเอ 300 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีแล้ว บ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที และบ่มต่อที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที ด้วยเครื่อง PCR: C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) จากนั้น วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของ cDNA ที่ได้ ด้วยเครื่อง BioDrop Duo (Biochrom, UK) ปรับความเข้มข้นของ cDNA ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการทำ PCR ขั้นตอนต่อไป

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

เพิ่มปริมาณยีน *PPO* และ *CYP* ในหลอดทดลอง โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีน *PPO* และ *CYP* โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร (ExpressGO™ PreMix, Bioptic, Taiwan) ประกอบด้วย cDNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม, 1X ExpressGO™ PreMix 0.2 ไมโครโมล ของ forward primer และ reverse primer และปรับปริมาตรให้ครบ 25 ไมโครลิตรด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease-free water) ผสมให้เข้ากันในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในเครื่องพีซีอาร์ (PCR): C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) โดยปรับอุณหภูมิอัตโนมัติดังนี้ ขั้นที่ 1 (Initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 (PCR amplification) จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนย่อย ได้แก่ (1) อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (2) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ (3) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที และขั้นที่ 3 (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส ที่ความเข้มข้น 1% (w/v) ในสารละลายทีเอบัฟเฟอร์ (Tris-acetate-EDTA buffer; TAE) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5X โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นระยะเวลา 30 นาที และบันทึกภาพเจลอะกาโรสด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์เจล (Gel Documentation, BIO-RAD, USA)

การทำผลิตภัณฑ์ฟิชอาร์ให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ฟิชอาร์ที่ได้หลังจากการทำปฏิกิริยาไปแยกขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลที่มีความเข้มข้น 1% (w/v) ในสารละลาย TAE buffer ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5X และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องผ่านภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV light) และใช้ใบมีดใหม่ที่ปลอดเชื้อตัดชิ้นเจลในตำแหน่งที่มีผลิตภัณฑ์ฟิชอาร์เป้าหมายอยู่ เก็บชิ้นเจลในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปแยกสกัดผลิตภัณฑ์ฟิชอาร์ออกจากเจล โดยใช้ชุดแยกสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF-1 AmbiClean Kit (Vivantis Technology, Malaysia) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ฟิชอาร์ที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์นั้นยังคงมีขนาดที่ถูกต้องตามที่คาดไว้ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ การส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและการคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการ

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA ligation)

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย (PCR products) เข้ากับ pGEM® T-easy vector (Promega, USA) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์การเชื่อมต่อ (ligation products) ซึ่งในหลอดปฏิกิริยาประกอบด้วย pGEM® T-easy vector ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, PCR products ปริมาตร 3 ไมโครลิตร, 2X Rapid Ligation Buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ของ T4 DNA Ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตรผสมสารให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ แล้วนำส่วนผสมดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

การส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการ (Transformation)

การส่งถ่าย ligation products ที่ได้จากข้อ 7.1 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ JM109 โดยองค์ประกอบของหลอดปฏิกิริยาประกอบด้วยเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่พร้อมรับดีเอ็นเอจากภายนอก (competent cells) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ ligation products ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ ด้วยปิเปต ตั้งทิ้งไว้บนอ่างน้ำแข็ง 30 นาที ตามด้วยนำไปแช่ใน heat block ที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 - 50 วินาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำแข็ง 2 นาที ตามด้วยการเติม Luria-Bertani (LB) broth ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเกลี่ยเซลล์ (spread) บนจานอาหาร LB ที่มีการเติม X-gal (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), IPTG และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อครบ 16 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ต้องการ โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) ที่เปลี่ยนแปลงของเซลล์เจ้าบ้านภายหลังได้รับชิ้นดีเอ็นเอเข้าไป ซึ่งในการทดลองนี้ใช้วิธีการคัดเลือกโคโลนีด้วยเทคนิค blue/white colony screening โดยเลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) สีขาวที่สามารถเจริญบนจานอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติม IPTG, X-gal และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน จากนั้นนำมาขีดลาก (streak) บนจานอาหารเพาะเลี้ยงที่มี LB เพื่อใช้สำหรับการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

ต่อไป ซึ่งก่อนนำเซลล์ไปใช้ในการสกัดพลาสมิดนั้น ผู้วิจัยได้นำเซลล์จากโคโลนีสีขาวมาทำโคโลนีพีซีอาร์ (colony PCR) เพื่อเป็นการยืนยันผลอีกครั้งว่าโคโลนีสีขาวที่คัดเลือกมานั้นได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มียีนของ *PPO* และยีน *CYP*

การเพาะเลี้ยงโคลนที่คัดเลือกได้เพื่อเพิ่มจำนวนและแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำโคโลนีเดี่ยวของเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่คัดเลือกได้จากข้อ 7.2 ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นสกัดพลาสมิดลูกผสมตามวิธีการที่ระบุในชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป GF-1 Plasmid DNA Extraction Kit (Vivantis Technology, Malaysia) ตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดลูกผสมที่แยกสกัดได้ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PPO* และ *CYP*

ผู้วิจัยได้ส่งพลาสมิดลูกผสมไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้วิธี Dideoxy-mediated chain termination (Sanger et al., 1977) (Macrogen Korea) จากนั้น วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 11 software (Tamura et al., 2021) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลออนไลน์ NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม BioEdit (Alzohairy, 2011) และวิเคราะห์ตำแหน่งโดเมนของโปรตีน (protein domain) ในฐานข้อมูล Conserved Domain (CD Search, NCBI)

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง

การเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ผลิตสารปีตาเลน

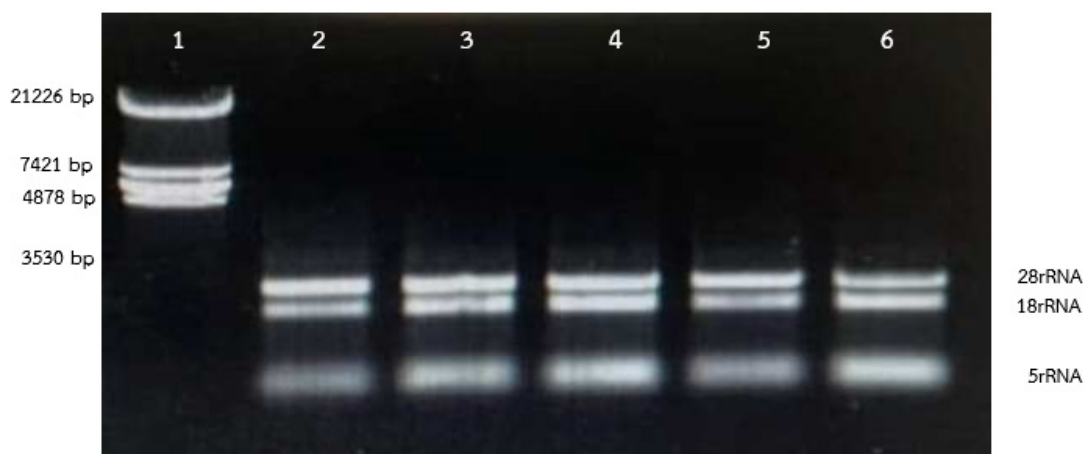
เมื่อนำแคลลัสต้นสร้อยไก่มาวางบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงและในที่มืด 8 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และมีลักษณะเป็นแคลลัสที่เซลล์จับกันแบบหลวม ๆ (Friable callus) เซลล์มีลักษณะชุ่มน้ำ อ่อนนุ่ม เซลล์มีสีแดงอย่างสม่ำเสมอ (ภาพที่ 2) บ่งบอกว่ามีการผลิตและสะสมสารปีตาเลน ซึ่งเป็นคุณสมบัติของแคลลัสตามที่ต้องการ



ภาพที่ 2 ลักษณะแคลลัสหลังจากการเพาะเลี้ยง 14 วัน ในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การสกัดอาร์เอ็นเอจากแคลลัสต้นสร้อยไก่ที่ผลิตสารปีตาเลน

ผลการสกัดอาร์เอ็นเอจากแคลลัสด้วย TRIzol® Reagent ภายหลังการตรวจสอบขนาดของอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ TAE ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์เจล (Gel Documentation, BIO-RAD, USA) พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ เนื่องจากพบแถบที่คมชัดของ ribosomal อาร์เอ็นเอ (rRNA) จำนวน 3 แถบ คือ 28S rRNA, 18S rRNA และอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก (5.8S และ 5S) rRNA (ภาพที่ 3) และมีปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป นอกจากนี้ ไม่พบแถบของดีเอ็นเอทั้งหมด (genomic DNA) ที่อาจปนเปื้อนมากับตัวอย่าง และไม่พบรอยสเมียร์ (smear) ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงการเสียสภาพของอาร์เอ็นเอ ทั้งนี้



ภาพที่ 3 อาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากแคลลัสสีแดงจากต้นสร้อยไก่ (Lane 1 ; Lambda DNA/ *Eco*RI Marker, Lanes 2 ถึง 6; อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากแคลลัสสีแดงต้นสร้อยไก่ ตัวอย่างที่ 1 - 5)

การสืบค้นข้อมูลและการออกแบบไพรเมอร์

ผู้วิจัยออกแบบไพรเมอร์ (Degenerate primers) สำหรับยีน *PPO* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากผักโขม (*Amaranthus tricolor*; XM_057675084.1) และบิตูรุต (*B. vulgaris*; KU644146.1) ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *CYP* ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากต้นบิตูรุต (*B. vulgaris*; HQ656024.1, KM592962.1) การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *CYP* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก *B. vulgaris* ทั้งสองรหัส HQ656024.1 และ KM592962.1 แม้ว่าจะเป็นยีนที่แตกต่างจากพืชชนิดอื่น ๆ สามารถทำได้ เนื่องจากบิตูรุต (*Beta vulgaris*) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันกับต้นสร้อยไก่ (*Celosia argentea*) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYP* ที่อาจมีความใกล้เคียงกัน โดยการเลือกยีนจากพืชชนิดใกล้เคียงกันสามารถให้ผลที่แม่นยำ ในกระบวนการออกแบบไพรเมอร์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากพืชต่างชนิดกันอาจมีการเปลี่ยนแปลงในลำดับที่สำคัญสำหรับการจับกับไพรเมอร์ได้ ข้อมูลที่มีในฐานข้อมูลอาจจำกัด โดยการเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากพืชชนิดเดียวกัน เช่น *B. vulgaris* จะช่วยให้การออกแบบไพรเมอร์มีความแม่นยำ และความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (polymerase chain reaction; PCR) มากขึ้น เพราะข้อมูลเหล่านี้มีการศึกษาและถูกบันทึกไว้อย่างครบถ้วน ในกรณีที่ยีน *CYP* ไม่พบข้อมูลในพืชอื่นๆ ที่ศึกษาใกล้เคียงกันมาก่อน การใช้ยีนจากพืชเดียวกันที่มีข้อมูลพื้นฐานเป็นประโยชน์ในขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์ เนื่องจากการใช้ข้อมูลจากพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันจะช่วยให้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะและประสิทธิภาพในการทำ PCR ที่ดี ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันในวงศ์หรือสกุลเดียวกันอาจให้ผลการทดลองที่แม่นยำและสอดคล้องกันมากกว่าการใช้ยีนจากพืชที่มีการพัฒนาในเส้นทางพันธุกรรมต่างชนิดในการออกแบบไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในขั้นตอนการทำ PCR

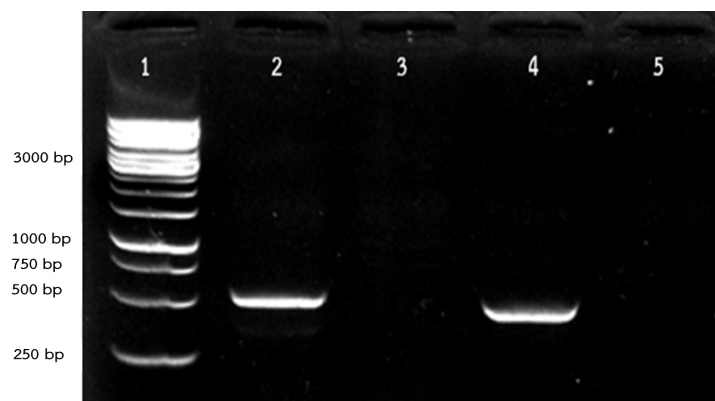
ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *PPO* และ *CYP*

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ไพรเมอร์ (5' → 3')	ขนาดของ PCR product (bp)	ตำแหน่ง Degenerate
1	PPO-F	GAA T/CTG GGA TCA T/CCC A/TGA TGG	~ 525	T/C, T/C, A/T
2	PPO-R	ACA GGA/T TT/GA GCG/A TTT TCA TCA		A/T, T/G, G/A
3	CYP-F	GGA AGT GTA ACA ACT ATT GTT G	~ 440	
4	CYP-R	CAG CAT AAT TAG GT/CT/C TG/TC CAA T		T/C, T/C, G/T

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส

จากการทำพีซีอาร์ โดยนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์แคลลัสต้นสร้อยไก่ สังเคราะห์ cDNA และนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณยีน *PPO* และ *CYP* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์เจล พบว่าแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่คาดว่าเป็นชิ้นส่วนของยีน *PPO* มีขนาดประมาณ 500 bp และ ยีน *CYP* มีขนาดประมาณ 400 bp (ภาพที่ 4) ซึ่งมีความคมชัด นอกจากนี้ไม่พบแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ไม่ต้องการ (non-specific PCR

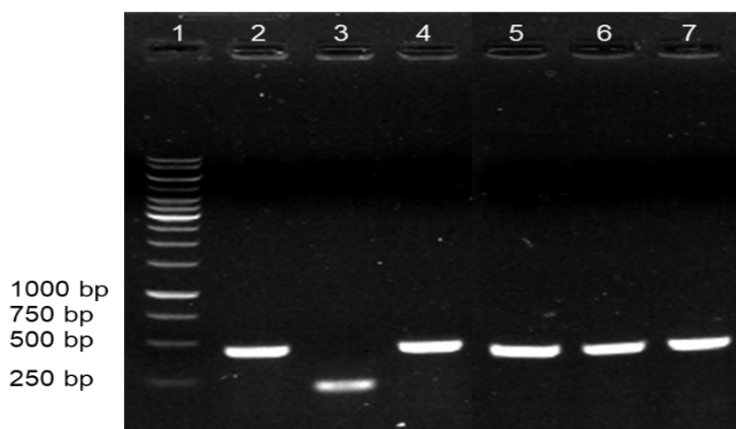
products) ซึ่งบ่งบอกว่าสถานะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มีความเหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *PPO* และ *CYP* จากแคลลัสต้นสร้อยไก่อ



ภาพที่ 4 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Lane 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Lanes 2 และ 4: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณขึ้นยีน *PPO* และ *CYP* โดยใช้ไพรเมอร์ PPO-F, PPO-R และ CYP-F, CYP-R ตามลำดับ และ Lanes 3 และ 5: ไม่มีตัวอย่าง)

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ การส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและการคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการ

หลังจากการเพิ่มปริมาณยีน *PPO* และ *CYP* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดตรงตามที่คาดไว้ จึงสกัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ออกจากเจล โดยใช้ชุดแยกสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF-1 AmbiClean Kit (Vivantis Technology, Malaysia) จากนั้นเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับ pGEM® T-easy vector และส่งถ่ายผลิตภัณฑ์การเชื่อมต่อ (ligation products) ที่ได้ เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ JM109 และคัดเลือกโคโลนีที่ต้องการโดยใช้เทคนิค blue/white colony selection โดยจะเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวซึ่งเป็นโคโลนีที่ได้รับการส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าไปภายในเซลล์ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคโคโลนีพีซีอาร์ (colony PCR) เพื่อใช้ในการตรวจสอบและยืนยันผลการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มียีนของ *PPO* และยีน *CYP* จากผลการทดลองพบว่า โคโลนีสีขาวที่ผ่านการคัดเลือกล้วนมีแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *PPO* ที่มีขนาดประมาณ 500 และ 250 bp และยีน *CYP* ที่มีขนาดประมาณ 400 bp ซึ่งเป็นไปตามที่คาดไว้ (ภาพที่ 5) จากนั้นนำเซลล์จากโคโลนีที่คัดเลือกได้ไปเพาะเลี้ยงและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป GF-1 Plasmid DNA Extraction Kit (Vivantis Technology, Malaysia) และส่งพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 5 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส หลังจากการตรวจสอบโคลนที่ได้รับยีน *PPO* และ *CYP* จากแคลลัสต้นสร้อยไก่ (Lane 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Lanes 2-4: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากโคลนสีขาวที่ได้รับยีน *PPO*; Lanes 5-7: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากโคลนสีขาวที่ได้รับยีน *CYP*)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PPO* และ *CYP*

เนื่องจากยังไม่มีรายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PPO* และ *CYP* จากแคลลัสของต้นสร้อยไก่ในฐานข้อมูล NCBI มาก่อน ดังนั้นการโคลนยีนและการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PPO* และ *CYP* จากแคลลัสของต้นสร้อยไก่ในครั้งนี้จึงใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชวงศ์บานไม่รู้โรย (*Amaranthaceae*) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้เป็นแนวทางในการดำเนินการทดลอง เช่น การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน รวมถึงวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น

เมื่อศึกษาและเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทดลองนี้และยีนอื่น ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MEGA11 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PPO* มีความยาวเท่ากับ 471 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความเหมือน (percent identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผักโขมสวน (*Amaranthus tricolor* ; XM_057675084.1) ร้อยละ 74.82 จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 156 กรดอะมิโน (ภาพที่ 6) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Conserved Domain Search Service (CD Search) ตรงกับลำดับกรดอะมิโนที่เป็นโดเมนของเอนไซม์ polyphenol oxidases (PPO) ในฐานข้อมูล NCBI โดยมีหมายเลข accession number คือ cl13563 และ cl02830 โดยเอนไซม์ *PPO* นั้นจัดเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์สารกลุ่มปีตาเลนปีตาเลนในพืชรวมถึงต้นสร้อยไก่ โดยมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโนไทโรซีนไปเป็น L-DOPA จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีน *PPO* ที่โคลนได้บางส่วนจากแคลลัสต้นสร้อยไก่นั้น เป็นยีนที่จะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ชื่อ PPO ซึ่งมีบทบาทและหน้าที่ในการสังเคราะห์สารกลุ่มปีตาเลนปีตาเลนในแคลลัสต้นสร้อยไก่

1 ATA GAT TTG GCT TAC AAC AGA AGC TTT GTA GAG GCC GAT TAT ACA 45
 1 I D L A Y N R S F V E A D Y T 15

 46 GAC AAG CAA CAG ATC CAG GAA AAC TTA CTA CTC CTG CGC AAG CAA 90
 16 D K Q Q I Q E N L L L L R K Q 30

 91 ATG TTG TAT GTA ACT AAA CCC AAT CTC TTT TTT GGT GCG GAA TAT 135
 31 M L Y V T K P N L F F G A E Y 45

 136 GTA GGT GGA GAT GCC GGT CAG TTT CAA GCT TCT AGC GCG GGT TCC 180
 46 V G G D A G Q F Q A S S A G S 60

 181 CTT GAG AGA TCT CCT CAC AAT AAT GTT CAC ATT TGG ACT GGA CAA 225
 61 L E R S P H N N V H I W T G Q 75

 226 AAG ATC GAT GGT GGT AAA GAC ATG GGT GCT TTT TGG TCT TCT GCT 270
 76 K I D G G K D M G A F W S S A 90

 271 CGG GAC TCT ATC TTC TAT TGT CAT CAC GCC AAC GTT GAT CGA ATG 315
 91 R D S I F Y C H H A N V D R M 105

 316 TGG GAC ATC TGG ATT AAC AAC CTT CCA GGG TCT GGA AGA GTC GAC 360
 106 W D I W I N N L P G S G R V D 120

 361 CTC AAC GTA CCA GAC TAC CTC AAT GCG TAC TTC ATT TTC TAT GAT 405
 121 L N V P D Y L N A Y F I F Y D 135

 406 GAA AAC GCT AAA CCT GTA ATC ACT AGT GAA TTC GCG GCC GCC TGC 450
 136 E N A K P V I T S E F A A A C 150

 451 AGG TCG ACC ATA TGG GAG AG- 471
 151 R S T I W E XXX 156

ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PPO* ของต้นสร้อยไก่ และลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ตัวหนาสีแดง แสดงถึงตำแหน่งบริเวณอนุรักษ์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA11 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CYP* มีความยาว 270 นิวคลีโอไทด์ เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ไปเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของต้นหงอนไก่ (*Celosia cristata* ; KC857455.1) ต้นผักโขมแดง (*Amaranthus cruentus* ; HQ656025.1)

ต้นผักโขมสวน (*Amaranthus tricolor* ; MT740230.1) และควินัว (*Chenopodium quinoa* ; XM_021913610.1) ร้อยละ 98.90 87.41, 86.67 และ 84.44 ตามลำดับ จากนั้นใช้โปรแกรม BioEdit ในการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 90 กรดอะมิโน (ภาพที่ 7) และพบว่าลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งโดเมนของเอนไซม์กลุ่ม cytochrome P450 ในฐานข้อมูล NCBI โดยมีหมายเลข accession number คือ cl41757 โดยเอนไซม์ดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์สารปีตาเลนปีตาเลนในต้นพืชที่มีการสะสมสารกลุ่มปีตาเลนปีตาเลน ซึ่งมีหน้าที่ในการเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น cyclo-DOPA

```

1   TGG CGA AAT TTC CGA AAA ATC ACC GCC GTT CAC TTA CTC TCC CCA   45
1   W R N F R K I T A V H L L S P   15

46   CTA AGA CTA GAT GCT TGC CAA TCC CTT AGG CAT GCC AAA GTG CAA   90
16   L R L D A C Q S L R H A K V Q   30

91   CAA CTT TTT CAA TAC GTA CAA GAA TGT GCT CAA AAA GGT CAA GCT   135
31   Q L F Q Y V Q E C A Q K G Q A   45

136  GTT GAC ATT GGC AAA GCT GCA TTT ACC ACT TCC CTT AAT TTG TTA   180
46   V D I G K A A F T T S L N L L   60

181  TCA AAA CTA TTC TTT TCA AAA GAA TTA GCG AGC CAT AAA TCC CAT   225
61   S K L F F S K E L A S H K S H   75

226  GAA TCA CAA GAA TTT AAG CAA TTA ATT TGG AAT ATA ATG GAA GAT   270
76   E S Q E F K Q L I W N I M E D   90

```

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน CYP ของต้นสร้อยไก่และลำดับกรดอะมิโน ตำแหน่งที่ตัวหนาสีแดงแสดงถึงตำแหน่งบริเวณอนุรักษ์

สรุปผลการวิจัย

การโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน PPO และ CYP จากแคลลัสของต้นสร้อยไก่

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อนำพลาสมิดที่สกัดได้จากเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มียีน PPO บางส่วนมีความเหมือนกับผักโขมสวน ร้อยละ 74.82 สำหรับ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มียีน CYP บางส่วนนั้น พบว่ามีความเหมือนกับต้นหงอนไก่ร้อยละ 98.90 รวมถึงผักโขมแดง ผักโขมสวน และควินัว ร้อยละ 87.50, 86.76 และ 84.44 ตามลำดับ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BioEdit และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปเทียบ

กับฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม CD Search พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากยีน *PPO* และ *CYP* มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งโดเมนของเอนไซม์ polyphenol oxidases (PPO) และกลุ่มของเอนไซม์ cytochrome P450

ยีน *PPO* และ *CYP* ที่โคลนได้จะมีต้นกำเนิดมาจากพืชชนิดเดียวกัน คือ แคลลัสสีแดงของต้นสร้อยไก่ (*Celosia argentea* var. *plumosa*) แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่า ยีน *PPO* มีความคล้ายคลึงสูงสุดกับยีนจากผักโขมสวน (*Amaranthus tricolor*) ขณะที่ ยีน *CYP* กลับมีความคล้ายคลึงสูงสุดกับยีนจากต้นหงอนไก่ (*Celosia cristata*) และยังมีความคล้ายคลึงกับพืชในสกุลอื่น ๆ ในวงศ์ *Amaranthaceae* เช่น *Amaranthus cruentus* และ *Chenopodium quinoa* อีกด้วย ความแตกต่างในการจับคู่ความคล้ายคลึงนี้สามารถอธิบายได้จากปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความแตกต่างของอัตราการวิวัฒนาการของแต่ละยีน (Gene Evolution Rate) ยีนแต่ละยีนมีความเร็วในการกลายพันธุ์ไม่เท่ากัน บางยีนมีการอนุรักษ์สูง (highly conserved) ขณะที่บางยีนมีการเปลี่ยนแปลงมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ยีน *PPO* เป็นยีนที่พบได้กว้างในพืชหลายชนิดและมีฟังก์ชันที่กว้างเกี่ยวข้องกับกระบวนการออกซิเดชัน จึงอาจมีความแปรผันมากกว่า *CYP* ที่มีบทบาทจำเพาะในเส้นทางการสังเคราะห์บีตาเลน ส่วนลักษณะของยีนในระดับสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic divergence) พืชในวงศ์ *Amaranthaceae* แม้จะมีสายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน แต่ก็มีหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับของแต่ละยีน จึงอาจทำให้บางยีนของต้นสร้อยไก่อมีความคล้ายกับผักโขมสวน ขณะที่อีกยีนหนึ่งมีความคล้ายกับต้นหงอนไก่อมากกว่า ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Sunnadeniya et al. (2016) ที่ศึกษาในเส้นทางบีตาเลนในบีทรูท (*Beta vulgaris*) พบว่ายีน *CYP* มีรูปแบบเฉพาะในบางสายพันธุ์มากกว่ายีน *PPO* ซึ่งพบในวงกว้างของพืชที่ไม่จำเป็นต้องผลิตบีตาเลนเสมอไป สำหรับระดับการอนุรักษ์ของโดเมนในโปรตีน (Protein Domain Conservation) ถึงแม้ลำดับนิวคลีโอไทด์อาจแปรผัน แต่โดเมนที่มีหน้าที่ในโปรตีน (functional domain) ยังคงอนุรักษ์ไว้ ดังที่ยืนยันจากผลการวิเคราะห์ด้วย CD Search ว่าทั้ง *PPO* และ *CYP* ที่ได้จากต้นสร้อยไก่อ้วนมีโดเมนตรงกับกลุ่มของ polyphenol oxidase และ cytochrome P450 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการรักษาหน้าที่ไว้แม้มีความหลากหลายในลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนของขนาดตัวอย่างของลำดับ (Partial gene fragment) ในงานวิจัยนี้ใช้การโคลนยีนบางส่วน (partial cDNA) ซึ่งอาจครอบคลุมเฉพาะบริเวณที่มีความแปรผันสูงหรือต่ำไม่เท่ากันในแต่ละยีน จึงทำให้ผลการเปรียบเทียบแตกต่างกันขนาดและตำแหน่งของลำดับที่ใช้วิเคราะห์มีผลต่อระดับความคล้ายคลึงอย่างมาก

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่ายีน *PPO* และ *CYP* ที่โคลนได้จากแคลลัสสีแดงของต้นสร้อยไก่อ้วนนั้น เป็นยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์สารกลุ่มบีตาเลนในแคลลัสต้นสร้อยไก่ โดยยีนดังกล่าวจะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์สารกลุ่มบีตาเลน ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ได้กำหนดไว้ ซึ่งทางคณะผู้วิจัยคาดหวังว่าข้อมูลและองค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการศึกษากการแสดงออกของยีน รวมถึงการโคลนยีน *Be 5-GT* และยีน *DODA* จากพืชที่มีการสังเคราะห์สารกลุ่มบีตาเลน นอกจากนี้ ข้อมูลดังกล่าวยังสามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาการแสดงออกของยีน และการโคลนยีนที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีนซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์สารกลุ่มบีตาเลนในพืชสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีการสังเคราะห์และสะสมสารบีตาเลนอีกด้วย

ข้อเสนอแนะการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ซึ่งมุ่งเน้นการโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PPO* และ *CYP* จากแคลลัสของต้นสร้อยไก่ ควรขยายขอบเขตการวิจัยโดยดำเนินการเปรียบเทียบผลในแคลลัสที่มีสีแตกต่างกัน ของต้นสร้อยไก่เพิ่มเติม และการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PPO* และ *CYP* ที่ได้ดำเนินการในครั้งนี้ สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบเต็มยีนในอนาคตได้ นอกจากนี้งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นการศึกษาในระดับโมเลกุลเพื่อให้เกิดความเข้าใจกลไกการสังเคราะห์สารปีตาเลน ดังนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารปีตาเลน ทั้งนี้เพื่อนำองค์ความรู้ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตสารปีตาเลนในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนให้ใช้สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีทางด้านยีนสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น จนนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

เอกสารอ้างอิง

- ฐาปกรณ์ แสงอรุณ. (2565). การผลิตสารสีกลุ่มปีตาเลนจากเซลล์แขวนลอยของต้นสร้อยไก่ (*Celosia argentea*). โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Alzohairy, A. M. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(1), 60-61.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289.
- Hatlestad, G. J., Sunnadeniya, R. M., Akhavan, N. A., Gonzalez, A., Goldman, I. L., McGrath, J. M., & Lloyd, A. M. (2012). The beet R locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. *Nature Genetics*, 44(7), 816-820.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation-structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, 71(4), R41-R50.
- Lystvan, K., Kumorkiewicz, A., Szneler, E., Wybraniec, S. (2018). Study on betalains in *Celosia cristata* linn. callus culture and identification of new malonylated amaranthins. *Agricultural and Food Chemistry*, 66(15), 3870-3879.
- Madadi, E., Mazloun-Ravasan, S., Yu, J. S., Ha, J. W., Hamishehkar, H., & Kim, K. H. (2020). Therapeutic application of betalains: A review. *Plants*, 9(9), 1219.

- Palada, M. C., & Crossman, S. M. A. (1999). *Evaluation of tropical leaf vegetables in the Virgin Islands*. ASHS Press.
- Qingzhu, H., Chengjie, C., Zhe, C., Pengkun, C., Yuewen, M., Jingyu, W., Jian, Z., Guibing, H., Jietang, Z., & Yonghua, Q. (2016). Transcriptomic analysis reveals key genes related to betalain biosynthesis in pulp coloration of *Hylocereus polyrhizus*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1179.
- Sang A Roon, T., Klanrit, P., Klanrit, P., Thanonkeo, P., Apiraksakorn, J., Thanonkeo, S., & Klanrit, P. (2024). Establishment of betalain-producing cell line and optimization of pigment production in cell suspension cultures of *Celosia argentea* var. *plumosa*. *Plants*, 13(22), 3225.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-5467.
- Slimen, I. B., Najar, T., & Abderrabba, M. (2017). Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4) 675-689.
- Smeriglio, A., Bonasera, S., Germanò, M. P., D'Angelo, V., Barreca, D., Denaro, M., Monforte, M. T., Galati, E. M., & Trombetta, D. (2019). *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. fruit as source of betalains with antioxidant, cytoprotective, and anti-angiogenic properties. *Phytotherapy Research*, 33(5), 1526-1537.
- Sunnadeniya, R., Bean, A., Brown, M., Akhavan, N., Hatlestad, G., Gonzalez, A., Symonds, V. V., & Lloyd, A. (2016). Tyrosine hydroxylation in betalain pigment biosynthesis is performed by cytochrome P450 enzymes in beets (*Beta vulgaris*). *PLoS ONE*, 11(2), e0149417.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Xi, X., Zong, Y., Li, S., Cao, D., Sun, X., & Liu, B. (2019). Transcriptome analysis clarified genes involved in betalain biosynthesis in the fruit of red pitayas (*Hylocereus costaricensis*). *Molecules*, 24(3), 445.
- Zhao, S. Z., Sun, H. Z., Gao, Y., Sui, N., & Wang, B. S. (2011). Growth regulator-induced betacyanin accumulation and dopa-4,5-dioxygenase (DODA) gene expression in euhalophyte *suaeda salsa* calli. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 47(3), 391-398.
- Zheng, X., Liu, S., Cheng, C., Guo, R., Chen, Y., Xie, L., Mao, Y., Lin, Y., Zhang, Z., & Lai, Z. (2016). Cloning and expression analysis of betalain biosynthesis genes in *Amaranthus tricolor*. *Biotechnology Letters*, 38(4), 723-729.