รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. แผนงานวิจัย แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย วิจัยการค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่

กิจกรรม การศึกษาพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่และการทดสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม

กิจกรรมย่อย -

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) การโคลนยีนและการถ่ายยีนควบคุมการเกิดสีม่วง-น้ำเงินสู่กุหลาบ

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) Cloning and Tranformation of Violet-blue Color Regulation Gene in Rose**.**

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวกุหลาบ คงทอง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นายประสาน สืบสุข	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวจีราพร แก่นทรัพย์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวอำไพ สินพัฒนานนท์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การโคลนยีนและการถ่ายยีนควบคุมการเกิดสีม่วง-น้ำเงินสู่กุหลาบ

Cloning and Tranformation of Violet-blue Color Regulation Gene in Rose.

กุหลาบ คงทอง[1/] ประสาน สืบสุข[1/] จีราพร แก่นทรัพย์[1/] อำไพ สินพัฒนานนท์[1/]

บทคัดย่อ

การเกิดสีของดอกไม้ส่วนใหญ่ถูกควบคุมโดย ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ซึ่งจัดเป็นฟลาโวนอยชนิดหนึ่งที่ประกอบเป็นสีของดอกไม้หลากหลายตั้งแต่สีส้ม สีแดงจนถึงสีม่วง และสีน้ำเงิน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน *DFR* จากดอกอัญชันสีน้ำเงินและกุหลาบสีแดง โดยทำการสืบค้นข้อมูลออกแบบไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณยีน *DFR* จากดอกอัญชันและกุหลาบ พบว่ายีนที่โคลนได้มีขนาด 1,400 และ 1050 bp. ตามลำดับ ยีน *DFR* นี้สามารถนำมาใช้ในการสร้างชุดยีนร่วมกับยีน *F3'5'H* ที่โคลนได้จากดอกอัญชัน ได้เป็นชุดยีน *DFR - F3'5'H* สำหรับถ่ายฝากสู่กุหลาบเพื่อปรับแต่งสีดอกให้มีความหลากหลายมากขึ้นในโอกาสต่อไป

---

[1]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

รหัสการทดลอง 03-08-59-01-03-00-02-59

ABSTRACT

Flower color formation is mainly controlled by anthocyanin pigment synthesis gene, involved in flavonoid pathway leading to the production of the orange, red, blue or purple-colored anthocyanins. In this study, *DFR* was cloned from *Clitoria ternatea* and *Rosa hybrida*, generating 1400 bp *DFR* and 1050 bp *DFR*. The *DFR* cloned can be used to construct gene combination with the *F3'5'H* gene from *Clitoria ternatea*, generaeing *DFR - F3'5'H* gene cassets for modification of flower colors in economic rose.

คำนำ

ประเทศไทยได้ผลิตไม้ดอกเพื่อใช้ภายในประเทศ และส่งออก มูลค่าที่สูง ทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี และมีแนวโน้มจะขยายตัวเพิ่มขึ้น สืบเนื่องจากตลาดไม้ดอกเป็นตลาดที่มีผู้ค้าจำนวนมาก มีการแข่งขันสูง ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพเพื่อการผลิตไม้ดอกเพื่อส่งออกเป็นความจำเป็นที่ผู้ผลิตต้องเอาใจใส่ และตอบสนองความต้องการของลูกค้าในทุกรูปแบบ ปัจจุบันลูกค้าให้ความสำคัญกับสีสันของดอกไม้เป็นอันดับแรก ผู้ผลิตจึงต้องสร้างความแปลกใหม่ในตัวสินค้า เพื่อรักษาและเพิ่มส่วนแบ่งการตลาดให้ได้มากที่สุด ซึ่งวิธีสร้างความหลากหลายด้านสีดอกเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคได้ เป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิต และการส่งออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การพัฒนาอุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกต่างประเทศ ภาคธุรกิจให้ความสำคัญกับการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆเพื่อตอบสนองความต้องการของลูกค้าที่ต้องการความแปลกใหม่ของสีดอกอยู่ตลอดเวลา แนวทางการสร้างสายพันธุ์ใหม่ให้มีดอกสีสรรโดดเด่น แปลกใหม่ สวยงาม มีความหลากหลายของสีดอก และมีโทนสีที่ไม่เคยปรากฏในธรรมชาตินั้น สามารถกระทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นการนำการวิจัยทางชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ร่วมกับงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชสมัยใหม่ ที่สามารถนำยีนควบคุมการเกิดสีดอกจากไม้ดอกชนิดอื่นที่มีโทนสีตามต้องการ ส่งถ่ายเข้าไปสู่ไม้ดอกที่สำคัญหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่แล้ว เพื่อสร้างพันธุ์ใหม่ให้มีสีสรรโดดเด่น สวยงาม และเกิดความแปลกใหม่ของโทนสีที่ไม่เคยมีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพการส่งออกไม้ดอกในอนาคต

กุหลาบ (*Rosa hybrids*) เป็นดอกไม้ที่ได้รับความนิยมปลูกมากที่สุดชนิดหนึ่งของโลก ผู้คนนิยมปลูกเพื่อความสวยงาม ตกแต่งสวน, ประดับตกแต่งบ้าน, ประดับสถานที่, ปลูกเพื่อการพาณิชย์ อาทิ เพื่อนำไปสกัดน้ำหอม นำไปทำเป็นส่วนประกอบของสปา เป็นต้น กุหลาบเป็นไม้ตัดดอกที่มีการปลูกเป็นการค้ากันแพร่หลายทั่วโลกมานานแล้ว และเป็นไม้ตัดดอกที่มีการซื้อขายเป็นอันดับหนึ่งในตลาดประมูลอัลสเมีย ประเทศเนเธอร์แลนด์ ซึ่งเป็นตลาดประมูลไม้ดอก ที่ใหญ่ที่สุดของโลก เมื่อ พ.ศ. 2542 มีการซื้อขายถึง 1,672 ล้านดอก และมักจะมียอดขายสูงสุดในประเทศต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับไม้ดอกชนิดอื่น

ๆ ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกกุหลาบตัดดอกประมาณ 5,500 ไร่ กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ แหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ตาก นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี และกาญจนบุรี ตลาดของกุหลาบคุณภาพปานกลางถึงต่ำ (ตลาดล่าง) ในปัจจุบันถึงขั้นอิ่มตัว ส่วนตลาดของกุหลาบที่มีคุณภาพสูง (ตลาดบน) ผลผลิตในประเทศยังไม่เพียงพอ และขาดความต่อเนื่อง ทำให้ยังต้องนำเข้าดอกกุหลาบจากต่างประเทศ เช่น เนเธอร์แลนด์ และมาเลเซีย เป็นต้นประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตกุหลาบคุณภาพสูงอย่างต่อเนื่อง หากแต่จะต้องผลิตในพื้นที่ที่เหมาะสม

กุหลาบเป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพมากในอุตสาหกรรมไม้ดอก ปัจจุบันภาคธุรกิจให้ความสำคัญกับการผลิตกุหลาบ ซึ่งได้พัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆเพื่อตอบสนองความต้องการของลูกค้าที่ต้องการความแปลกใหม่ของสีดอกอยู่ตลอดเวลา แม้ว่ากุหลาบทั่วโลกมีหลายสายพันธุ์ มีสีดอกหลากหลายและนักปรับปรุงพันธุ์สามารถทำการผสมพันธุ์เพื่อสร้างพันธุ์ที่มีดอกสวยงามแตกต่างกันไปโดยอาศัยเทคนิคการผสมพันธุ์แบบดั้งเดิม แต่ไม่สามารถใช้เทคนิคดังกล่าวผสมพันธุ์ให้ได้กุหลาบที่มีสีดอกในโทนสีม่วงน้ำเงินได้ และในธรรมชาติสีดอกกุหลาบยังขาดโทนสีม่วงน้ำเงิน เนื่องจากดอกกุหลาบไม่มียีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ส่งผลให้ไม่สามารถสังเคราะห์ delphinidin-based anthocyanin ซึ่งมีโทนสีม่วงน้ำเงินได้ ด้วยเหตุนี้นักวิจัยจึงสนใจและประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์กุหลาบให้มีดอกสีน้ำเงินอย่างต่อเนื่อง

แนวทางการสร้างกุหลาบสายพันธุ์ใหม่ให้มีดอกสีสรรโดดเด่น แปลกใหม่ สวยงาม มีความหลากหลายของสีดอก และมีโทนสีที่ไม่เคยปรากฏในธรรมชาตินั้น สามารถกระทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งสามารถนำยีนควบคุมการเกิดสีดอกจากไม้ดอกชนิดอื่นที่มีโทนสีตามต้องการ ส่งถ่ายเข้าไปสู่กุหลาบ หรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่แล้ว เพื่อสร้างกุหลาบพันธุ์ใหม่ให้มีสีสรรโดดเด่นสวยงาม และเกิดความแปลกใหม่ของโทนสีที่ไม่เคยมีอยู่ในธรรมชาติแม้ว่าในต่างประเทศได้มีผู้รายงานผลความสำเร็จของการศึกษาการแสดงออกของยีนรวมทั้งการโคลนยีนที่ควบคุมสีดอกในวัฏจักรการสังเคราะห์ anthocyanin ในพืชหลายชนิดแล้ว แต่ยีนที่ค้นพบมักจะนำไปจดสิทธิบัตร ผู้ไม่ใช่เจ้าของสิทธิบัตรจึงไม่สามารถนำยีนเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ได้

สำหรับงานวิจัยนี้ได้เสนอการโคลนและการถ่ายยีนควบคุมสีดอกในวัฏจักรการสังเคราะห์ anthocyanin โดยทำการโคลนยีน dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จาก mRNA ของดอกอัญชันและกุหลาบ ซึ่งยีนนี้สามารถนำไปใช้นำมาใช้ในการสร้างชุดยีนร่วมกับยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase* (*F3'5'H*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างรงควัตถุที่ให้ดอกไม้มีสีม่วงหรือสีน้ำเงิน ที่โคลนได้จาก mRNA ของดอกอัญชันสีน้ำเงิน และได้ผ่านการทดสอบการแสดงออกในยาสูบซึ่งส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงสีดอก จากสีขาวอมชมพูเป็นชมพูม่วง (กุหลาบ และ ประสาน 2557) เพื่อสร้างชุดยีน *DFR - F3'5'H* สำหรับถ่ายฝากสู่กุหลาบเพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอกกุหลาบหรือเพื่อปรับปรุงพันธุ์กุหลาบให้มีดอกในโทนสีม่วงน้ำเงิน ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมไม้ดอกในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

สารเคมีสำหรับใช้ในงานเครื่องหมายโมเลกุล

1. อัญชันดอกสีน้ำเงิน
2. ดอกกุหลาบสีแดง
3. Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma)
4. DNase I Amplification Grade (Invitrogen life technology)
5. SuperScrip III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life technology)
6. QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
7. pGEM-T Easy Vector System (Promega)
8. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Appliedbiosystems)
9. สารปฏิชีวนะ เช่น ampicillin cefotaxime hygromycin
10. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
11. เชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ JM109
12. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
13. เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) เครื่อง spectrophotometer
14. ชุดถ่ายภาพเจลและประมวลผล Gel documentation (BIORAD)
15. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
16. เครื่องวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)
17. เครื่องมือ และสารเคมีอื่น ๆ สำหรับงานชีวโมเลกุล

วิธีการทดลอง

การโคลนยีน Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จากอัญชันและกุหลาบ

I. โคลนยีน Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน

1. ออกแบบ primer เพื่อใช้ในการโคลนยีนที่ควบคุมการเกิดสีดอก โดยสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ DFR โดยอาศัยหลักการเปรียบเทียบ alignment จากฐานข้อมูลใน GeneBank
2. สกัด mRNA จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน ที่ให้ดอกโทนสีที่พบใน anthocyanin pathway โดยใช้เนื้อเยื่อกลีบดอกที่เริ่มเปลี่ยนสี
3. สังเคราะห์สาย cDNA จาก mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR

4. เพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่เกี่ยวข้องกับยีน DFR ที่ควบคุมการเกิดสีดอกในข้อ 1
5. นำชิ้น cDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปเชื่อมต่อเข้ากับ plasmid พาหะ และถ่ายยีนเข้าแบคทีเรีย *E. coli*
6. คัดเลือก clone ที่มีชิ้น DNA เป้าหมาย
7. นำโคลนที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส เพื่อตรวจสอบกับยีนที่มีผู้รายงานมาก่อน

II. โคลนยีน Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จากดอกกุหลาบสีแดง

1. ออกแบบ primer เพื่อใช้ในการโคลนยีนที่ควบคุมการเกิดสีดอก โดยสืบค้นข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ DFR โดยอาศัยหลักการเปรียบเทียบ alignment จากฐานข้อมูลใน GeneBank
2. สกัด mRNA จากดอกกุหลาบสีแดง โดยใช้เนื้อเยื่อกลีบดอกที่เริ่มเปลี่ยนสี
3. สังเคราะห์สาย cDNA จาก mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR
4. เพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่เกี่ยวข้องกับยีน DFR ที่ควบคุมการเกิดสีดอกในข้อ 1
5. นำชิ้น cDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปเชื่อมต่อเข้ากับ plasmid พาหะ และถ่ายยีนเข้าแบคทีเรีย *E. coli*
6. คัดเลือก clone ที่มีชิ้น DNA เป้าหมาย
7. นำโคลนที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส เพื่อตรวจสอบกับยีนที่มีผู้รายงานมาก่อน

การโคลนยีน

1. การสืบค้นข้อมูลยีน และออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ *Dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* ของดอกอัญชันและดอกกุหลาบ ที่มีรายงานในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์หาตำแหน่งที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Vector NTI (ชนิดระบุระยะเวลาการใช้งาน) เพื่อโคลนยีน *DFR*

2. การโคลนชิ้นส่วนของยีน *DFR* จากดอกอัญชันและกุหลาบ

2.1 การสกัด Total RNA

นำตัวอย่างดอกอัญชันและและกุหลาบในระยะเริ่มเกิดสีน้ำเงินและสีแดงตามลำดับ มาตัดดอกเป็นชิ้นเล็ก ๆ น้ำหนัก 100 มิลลิกรัมด้วยมีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อ และนำมาสกัด Total RNA ตามวิธีการของ Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma) นำสารละลาย Total RNA ที่ได้ไปหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer และตรวจสอบดูแถบ RNA ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย GelStar แล้วนำไปใช้หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80 °C เพื่อนำไปใช้ต่อไป

2.2 การสังเคราะห์สาย cDNA และเพิ่มปริมาณยีน ***DFR*** การสังเคราะห์สาย cDNA จาก mRNA ของยีน ***DFR*** ด้วยเทคนิค RT-PCR นั้น จะต้องทำการกำจัดดีเอ็นเอที่อาจจะปะปนอยู่ใน Total RNA ก่อน โดยใช้ DNase I Amplification Grade (Invitrogen life technology)

ทำการสังเคราะห์สาย cDNA จาก Total RNA ของดอกอัญชันและกุหลาบโดยใช้ SuperScrip III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life technology) ที่มีการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา RNA/primer mixture ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยTotal RNA 1 ไมโครลิตร, Oligo (dT) 20 primer 1ไมโครลิตร, 10mM dNTP mix 1 ไมโครลิตร, DEPC-treated water 7 ไมโครลิตร รวมปริมาตร10 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 5 นาที และนำไปไว้ในน้ำแข็งทันทีอย่างน้อยเป็นเวลานาน 1 นาที ในระหว่างนั้นให้เตรียมส่วนผสม cDNA Synthesis mix ซึ่งส่วนผสมประกอบด้วย 10xRTbuffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 4 ไมโครลิตร, 0.1M DTT 2 ไมโครลิตร, RNaseOUT (40 U/ul) 1 ไมโครลิตร, SuperScrip III RT (200 U/ul) 1ไมโครลิตร

เติม cDNA Synthesis mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน RNA/primer mixture ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เวลานาน 50 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85 °C นาน 5 นาที จากนั้นในไปแช่ในน้ำแข็งทันที เติม RNase H ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที หลังจากนั้นสามารถนำปฏิกิริยา cDNA Synthesis ไปใช้ทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ- 20 °C เพื่อไปใช้ทำพีซีอาร์ต่อไป

การเพิ่มปริมาณยีน ***DFR*** ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร,5 uM Forward Primer (***DFR***) 2 ไมโครลิตร, 5 uM Reverse Primer (***DFR***) 2 ไมโครลิตร, cDNA Template 1ไมโครลิตร, 5 U/ul Platinum *Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร, DEPC-treated water11.8 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 20ไมโครลิตร

จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 2 นาที 1 รอบ

94 °C 1 นาที
55 °C 1 นาที
72 °C 2 นาที
} 35 รอบ

72 °C 10 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 2 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

2.3 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำชิ้นดีเอ็นเอของยีน *DFR* ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มาแยกด้วย 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย gel star (Cambrex) และตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Dark Reader transilluminators และตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วย 1% Agarose gel electrophoresis เก็บชิ้นดีเอ็นเอที่แยกได้ที่ –20 °C เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์พาหะต่อไป

2.4 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *DFR* เข้ากับเวคเตอร์ และถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์ ใช้ pGEM-T Easy Vector System (Promega) โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 2x Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase 2.5ไมโครลิตร, pGEM-T Easy Vector (50ng) 0.5ไมโครลิตร, PCR product 1.5 ไมโครลิตร T4 DNA ligase 0.5 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือนำปฏิกิริยาที่ได้ไปเก็บที่ 4 °C นานข้ามคืน นำสารละลายที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย โดยนำยีน ***DFR*** ที่เชื่อมต่อกับเวคเตอร์เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าเชื้อ *Escherichia coli* JM109 (Promega) มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. ดูดสารละลายในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อชิ้นยีน *DFR* เข้ากับเวคเตอร์ (ligation) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่อยู่ในน้ำแข็ง

2. นำ competent cell JM109 ออกจากตู้ -80 °C มาไว้ในน้ำแข็งทำให้ละลายช้าๆ แล้วผสมให้เข้ากันโดยดีดหลอดเบาๆ

3. ดูดสารละลาย competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในปฏิกิริยา ligation ดีดหลอดเบาๆ และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที

4. นำไป Heat-shock cell โดยแช่ใน water- bath ที่มีอุณหภูมิ 42 °C เวลา 50 วินาที และรีบนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลานาน 2 นาที

5. เติมสารละลาย soc medium (อุณหภูมิห้อง) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร

6. นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง 30 นาที

7. นำไป plate บนอาหารแข็ง LB ที่เติม 100 ug/ml ampicillin 0.5 mM IPTG และ 50 mg/ml X-Gal แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.5 การคัดเลือกโคลนเป้าหมาย

นำโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีขาวไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR โดยใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มโคโลนีที่มีสีขาว นำไปใส่ในหลอดที่มีปฏิกิริยาของพีซีอาร์ทีประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร, 5 uM Forward Primer (M13F) 2 ไมโครลิตร, 5 uM Reverse Primer (M13R) 2 ไมโครลิตร, 5 U/ul Platinum *Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร ,น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 12.8 ไมโครลิตร รวมปริมาตร20 ไมโครลิตร

จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 2 นาที 1 รอบ

94 °C 1 นาที
55 °C 1 นาที } 35 รอบ
72 °C 2 นาที

72 °C 10 นาที 1 รอบ

นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

2.6 การสกัดพลาสมิด

เลี้ยงเชื้อโคโลนีที่ได้ผ่านการตรวจสอบว่ามียีนเป้าหมายปรากฏอยู่ นำไปสกัด พลาสมิดด้วย QIAprep Spin Miniprep Kit ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้โดยใช้ 1% Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide นำสารละลายที่เหลือเก็บไว้ที่ –20 °C จนกว่าจะนำไปใช้หาลำดับเบส

2.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *DFR*

นำพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีน ***DFR*** เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการหาลำดับเบสโดยใช้สารเคมีชุด ABI PRISM® BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit โดยเตรียมส่วนผสมต่างๆ ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้ 2.5X Sequencing Buffer 3ไมโครลิตร,Terminator Ready Reaction Mix 2ไมโครลิตร,3.2 uM primer (T7 or SP6) 1ไมโครลิตร , Plasmid Template200นาโนกรัม เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ20ไมโครลิตร

นำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 2 นาที 1 รอบ

94 °C 10 วินาที
55 °C 5 วินาที } 35 รอบ

60 ℃ 4 นาที

60 ℃ 10 นาที 1 รอบ

นำสารละลายของปฏิกิริยาไปทำความสะอาดก่อนนำเข้าวิเคาะห์หาลำดับเบส นำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer นำลำดับเบสของยีน ***DFR*** ที่โคลนได้จากดอกอัญชันและกุหลาบไปเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI โดยใช้โปรแกรม Blast เพื่อตรวจสอบกับยีนที่มีผู้รายงานมาก่อน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด)

2559- 2560

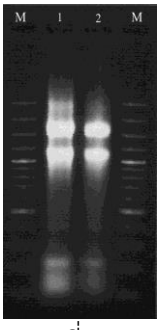
สถานที่ดำเนินการ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

โคลนยีน Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน

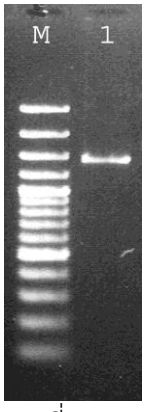
จากการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กี่ยวข้องกับยีน DFR จากฐานข้อมูลNCBI นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาส่วนที่เหมือนกันโดยใช้โปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ ทำให้ได้ไพรเมอร์ของยีน DFR คือ Primer:CT_DFR_F และ CT_DFR_R สำหรับนำมาใช้เพิ่มปริมาณยีนจาก cDNA ของดอกอัญชัน สามารถทำการสกัด mRNA จากดอกอัญชันสีน้ำเงินและสังเคราะห์สาย cDNA จาก mRNA ของดอกอัญชันด้วยเทคนิค RT-PCR และได้ชิ้นยีนจากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR มีขนาดประมาณ 1400 bp. ดังภาพที่1และ 2



ภาพที่1. แสดงแถบ RNA ที่สกัดได้จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน

M = 100 base plus markers

1,2 = RNA

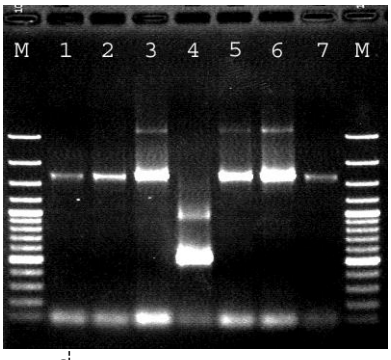


ภาพที่2. แสดงแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน DFR (CtDFR-attB1) ที่เพิ่มปริมาณได้จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน

M = 100 base plus , DNA markers

1 = ชิ้นส่วนของยีน DFR ที่เพิ่มปริมาณได้ ขนาด 1400 คู่เบส

ได้โคลนเป้าหมายที่มีชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อเข้ากับ เวกเตอร์ โดยการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ พร้อมทั้งถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรีย ภาพที่3.



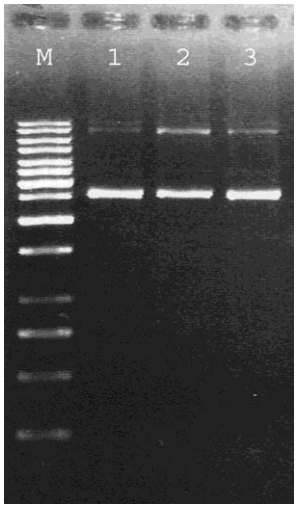
ภาพที่3. แสดงผลการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนยีน DFR (CtDFR-attB1) กับเวกเตอร์ pDORN221 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13

M = 100 base plus , DNA markers

1-3,5-7 = แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากโคโลนีที่มี pDORN221Vector ที่คาดว่ามียีน CtDFR-attB1 แทรกอยู่

4 = แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากโคโลนีที่ไม่มีการเชื่อมต่อของยีน

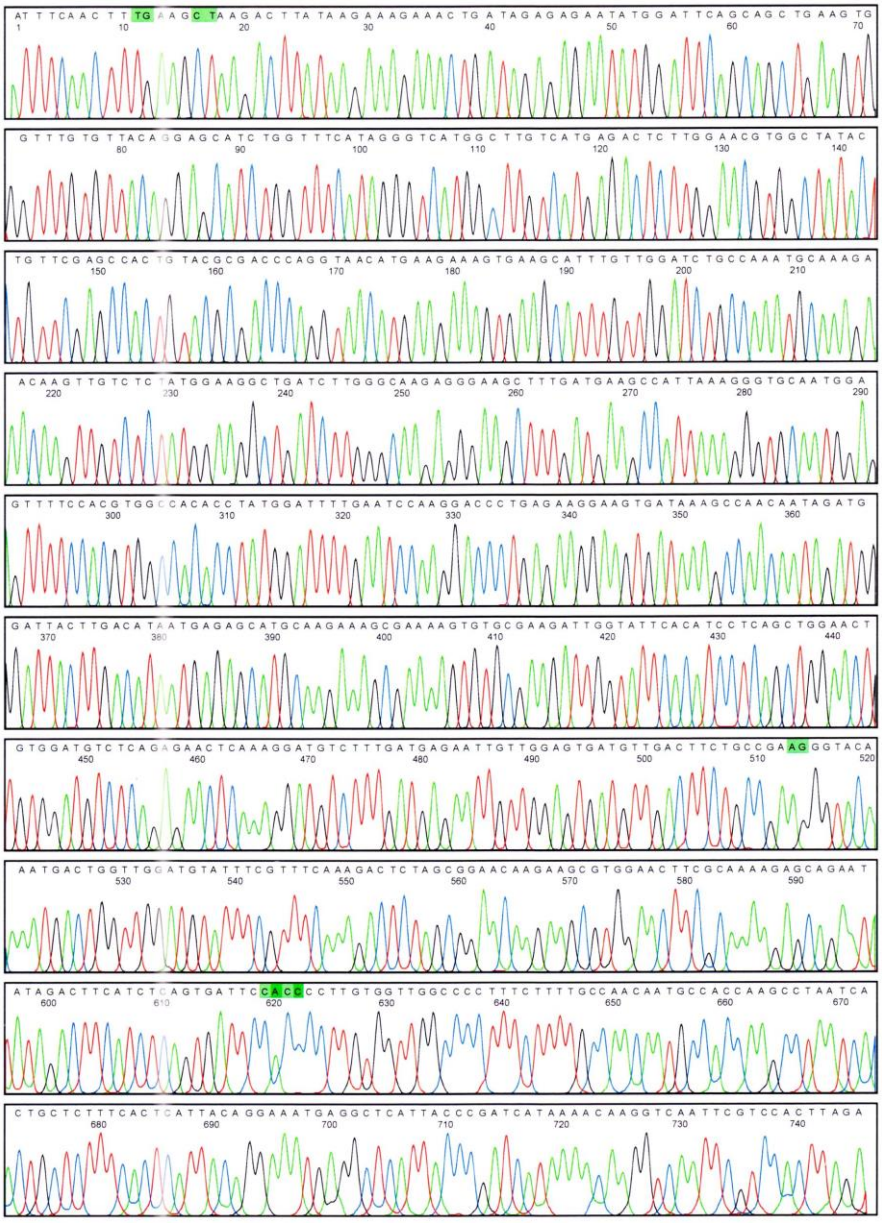
จากการสกัดพลาสมิดได้พลาสมิดจากโคลนเป้าหมาย เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส ทำให้ทราบลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกอัญชัน (ดังภาพที่4และ5 ตามลำดับ) จากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกอัญขันกับฐานข้อมูลที่มีการเผยแพร่ที่อยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blast-N พบว่าลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้มีลำดับเบสเหมือนกับยีน DFR ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI คิดเป็น100% กับ accession AB185901 ดังภาพที่ 6



ภาพที่4. แสดงพลาสมิด CtDFR-plasmid ที่สกัดได้จากโคลนเป้าหมาย

1-3 = CtDFR- plasmid

M = 1 kb , DNA markers



ภาพที่5. แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกอัญชัน โดยใช้ไพรเมอร์ M13F

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

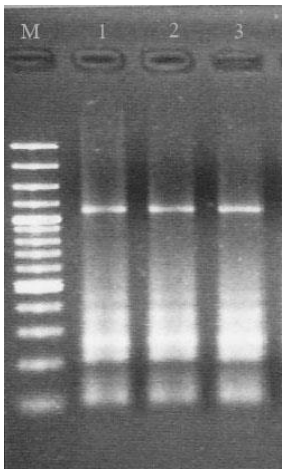
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Clitoria ternatea CtDFR mRNA for dihydroflavanol 4-reductase, complete cds, clone: pBSCtDFR20	1447	1447	100%	0.0	100%	gi|133874181|AB185901.1
Glycine max DFR2 mRNA for dihydroflavonol 4-reducatase 2, complete cds, allele: W4	879	879	93%	0.0	86%	gi|591984821|AB872212.1
PREDICTED: Glycine max dihydroflavonol-4-reductase (LOC732626), transcript variant X1, mRNA	875	875	95%	0.0	85%	gi|955377857|XM_003550340.3
Glycine max DFR2 mRNA for dihydroflavonol 4-reducatase 2, complete cds, allele: w4-Ip	874	874	93%	0.0	86%	gi|591984863|AB872215.1
Glycine max DFR2 mRNA for dihydroflavonol 4-reducatase 2, complete cds, allele: w4, strain: 222-A-3	874	874	93%	0.0	86%	gi|591984849|AB872214.1
Soybean clone JCVI-FLGm-19I19 unknown mRNA	872	872	95%	0.0	85%	gi|255637893|BT094981.1

ภาพที่6. แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน ctDFR ในฐานข้อมูล NCBI มีความเหมือนกัน 100%

กับ accession AB185901

โคลนยีน Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จากดอกกุหลาบสีแดง

จากการสืบค้นข้อมูลและออกแบบไพรเมอร์ในการโคลนยีน Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จาก cDNAของดอกกุหลาบสีแดง โดยการค้นหานิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องกับยีน DFR จากฐานข้อมูล NCBI และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาส่วนที่เหมือนกันโดยใช้โปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ของยีน DFR คือไพรเมอร์ RH_DFR_F และ RH_DFR_R สำหรับนำมาใช้เพิ่มปริมาณยีนจาก cDNA ของดอกกุหลาบ สามารถทำการสกัด mRNA จากดอกกุหลาบและสังเคราะห์สาย cDNA จาก mRNA ของดอกกุหลาบด้วยเทคนิค RT-PCR และได้ชิ้นยีนจากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR มีขนาดประมาณ 1050 bp. ดังภาพที่7

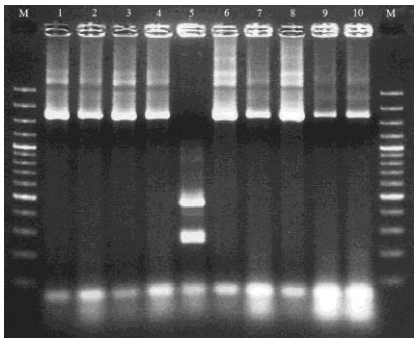


ภาพที่7. แสดงแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน DFR (RHDFR-attB1) ที่เพิ่มปริมาณได้จากดอกกุหลาบ

M = 100 base plus , DNA markers

1 = ชิ้นส่วนของยีน DFR ที่เพิ่มปริมาณได้ ขนาด 1050 คู่เบส

ได้โคลนเป้าหมายที่มีชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อเข้ากับ เวกเตอร์ โดยการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ พร้อมทั้งถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรีย ภาพที่ 8.



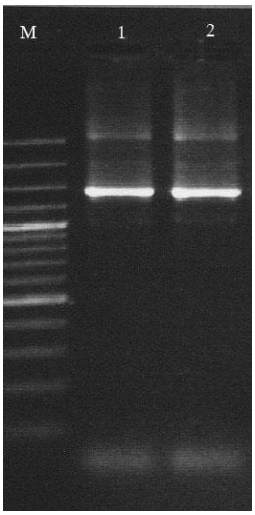
ภาพที่8. แสดงผลการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนยีน DFR (RHDFR-attB1) กับเวกเตอร์ pDORN221 ด้วย เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13

M = 100 base plus , DNA markers

1-4,6-10 = แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากโคโลนีที่มี pDORN221Vector ที่คาดว่ามียีน RHDFR-attB1 แทรกอยู่

5 = แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากโคโลนีที่ไม่มีการเชื่อมต่อของยีน

จากการสกัดพลาสมิดและนำมาตรวจสอบความถูกต้องของโคลน ได้พลาสมิดจากโคลนเป้าหมายที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง ดังภาพที่ 9



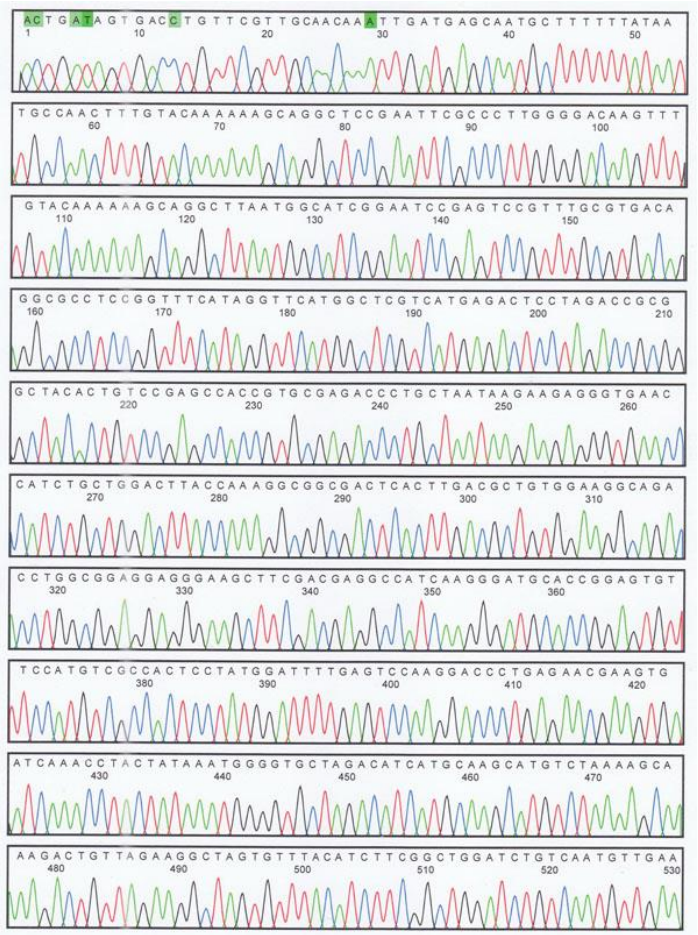
ภาพที่9 แสดงพลาสมิด RHDFR-plasmid ที่สกัดได้จากโคลนเป้าหมาย

1-2 = RHDFR- plasmid

M = 1 kb , DNA markers

เมื่อนำพลาสมิดจากโคลนเป้าหมายที่ผ่านการตรวจสอบไปวิเคราะห์ลำดับเบส ทำให้ทราบลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกกุหลาบ (ดังภาพที่10) และจากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกกุหลาบกับฐานข้อมูลที่มีการเผยแพร่ที่อยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blast-N พบว่า

ลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้มีลำดับเบสเหมือนกับยีน DFR ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI คิดเป็น 99% กับ accession KM203111 ดังภาพที่11



ภาพที่10. แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกกุหลาบโดยใช้ไพรเมอร์ M13F

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments | Download | GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Rosa hybrid cultivar RhDFR mRNA for dihydroflavonol 4-reductase, complete cds, cultivar: Noblesse	1940	1940	100%	0.0	100%	AB490072.1
Rosa multiflora cultivar Duohua dihydroflavonol 4-reductase mRNA, complete cds	1929	1929	100%	0.0	99%	KP137549.1
Rosa hybrida mRNA for dihydroflavonol 4-reductase, complete cds	1917	1917	100%	0.0	99%	D85102.1
Rosa hybrid cultivar dihydroflavonol 4-reductase mRNA, complete cds	1873	1873	100%	0.0	99%	AY780885.1
Rosa rugosa dihydroflavonol 4-reductase 1 mRNA, complete cds	1857	1857	100%	0.0	99%	KM203111.1
Rosa rugosa clone dq01 dihydroflavonol 4-reductase (dfr) mRNA, partial cds	1851	1851	99%	0.0	99%	KT809350.1
Rosa chinensis dihydroflavonol 4-reductase (DFR) mRNA, complete cds	1834	1834	100%	0.0	98%	KF734592.1
Fragaria vesca cultivar Alexandria dihydroflavonol 4-reductase (DFR) mRNA, complete cds	1397	1397	100%	0.0	91%	KC894050.1

ภาพที่ 11. แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน RH DFR ในฐานข้อมูล NCBI มีความเหมือนกัน 99% กับ accession KM203111

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin จัดเป็นฟลาโวนอยชนิดหนึ่งที่ประกอบเป็นสีของดอกไม้หลากหลายตั้งแต่สีส้ม สีแดงจนถึงสีม่วง และสีน้ำเงิน จากการโคลนยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* จากดอกอัญชันสีน้ำเงินและดอกกุหลาบสีแดง ได้ชิ้นยีนขนาด 1,400 และ1050 bp. ตามลำดับ ยีนที่ได้นี้สามารถนำมาสร้างเป็นชุดยีนร่วมกับยีน *F3’5’H* ที่โคลนได้จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน (กุหลาบ และ ประสาน,2557) สำหรับใช้ถ่ายฝากสู่กุหลาบ หรือไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อปรับแต่งสีดอกให้มีความหลากหลายมากขึ้นในโอกาสต่อไป

เนื่องจากการทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนบบประมาณ ในปี 2559-2560 ไม่ได้รับสนับสนุนงบวิจัยต่อในปี2561 จึงต้องยุติการทำงานวิจัยลง ได้ทำแค่ส่วนของโคลนยีน DFR จาก mRNA ของดอกอัญชันที่มีสีน้ำเงิน และโคลนยีน DFR จาก mRNA ของดอกกุหลาบที่มีสีแดง ไม่ได้ดำเนินการต่อตามแผนการดำเนินงานวิจัยในส่วนของ การสร้างชุดยีน ที่ประกอบด้วยยีน F3' 5'H ที่โคลนได้จากอัญชันสีน้ำเงิน (เป็นยีนที่โคลนได้และได้ผ่านการทดสอบการแสดงออกแล้วในยาสูบ โดยกุหลาบ และ ประสาน 2557) โดยชุดยีนประกอบด้วย ชุดยีน ที่มียีน DFR จากดอกกุหลาบที่ออกแบบให้มีการขัดขวางการทำงานของยีน DFR ในดอกกุหลาบพันธุ์ดั้งเดิมโดยใช้เทคนิค RNAi ควบคู่กับการเพิ่มการแสดงออกของยีน DFR จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน และยีน F3’5’H จากดอก ดอกอัญชันสีน้ำเงิน ในเวลาเดียวกัน รวมทั้งไม่ได้ดำเนินการต่อตามแผนการดำเนินงานวิจัยในส่วนของ การนำชุดยีนฝากถ่ายเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียมและนำไปใช้ถ่ายเข้าสู่กุหลาบ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *DFR (dihydroflavonol 4-reductase gene)* จากอัญชัน และ กุหลาบ ที่เป็นของกรมวิชาการเกษตรสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างชุดยีนนำไปปรับแต่งสีดอกไม้โดยวิธีการถ่ายยีน เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอก นอกจากนี้สามารถนำไปเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการได้

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ นักปรับปรุงพันธุ์ กรมวิชาการเกษตร สถาบันการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

กุหลาบ คงทอง และ ประสาน สืบสุข. 2557. การโคลนยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) จากอัญชันและพิทูเนีย. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัยประจำปี 2557 รอบ 6 เดือน. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ.

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2542. เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการควบคุมสีและลักษณะของดอก. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 13(1): 9-13.

Aida R., Iwahori S., Kano Murakami Y., Shinkai S., Sugiyama N. and Sakiyama R. 1998. Gene silencing in transgenic torenia and its applications for breeding. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 67(6): 1200-1202.

Aida. R, Kishimoto S, Tanaka Y and Shibata. M. 2000. Modification of flower color in torenia (*Torenia fourieri* Lind.) by genetic transformation. Plant. Science. Limerick.153(1): 33-42.

Bartley, G.E.and P.E. Scolnik. 1995. Plant carotenoids :pigments for photoprotection,visual attraction, and human health.Plant Cell 7:1027-1038.

Biolley, J.P, Jay.M, Forkmann, G. 1994. Pigmentation patterns of modern rose mutants throw light on the flavonoid pathway in Rosa x Hybrida. Phytochemisty 36: 1189-1196.

Brugliera F., Gina Barri-Reweell, Timothy A. Holton and John G. Mason. 1999. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*. The Plant Journal 19(4), 441-451.

Eric T. Johnson, Sunhyo Ryu, Hankuil Yi, Byongchul Shin, Hyeonsook Chong and Giltsu Choi. 2001. Alteration of single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. The Plant Journal 25(3): 325-333.

Holton, T.A. and Cornish. E.C. 1995. Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell 7: 1071-1083.