

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การโคลนและการศึกษาการแสดงออกของยีน *EgLEC1* สำหรับ
คัดเลือกปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี
Cloning and Expression analysis of *EgLEC1* for high oil
yield selection in *Elaeis guineensis* Jacq.

คณะผู้วิจัย

ดร. อลิษา หนักแก้ว
รศ.ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ
ศ.ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา
กนกอร เพชรเสน

หน่วยงานต้นสังกัดสถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงบประมาณในการทำวิจัยด้วยงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558-2559 ในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา ผู้อำนวยการสถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ และ รองศาสตราจารย์ ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือในทุกด้าน ทั้งให้คำแนะนำ ในการทำวิจัยจนลุล่วงสำเร็จเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ โมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ได้อนุเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัยสุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงานการวิจัยมาโดยตลอด

อลิษา หนักแก้ว

บทคัดย่อ

EgLeafy cotyledon1 (EgLEC1) เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์น้ำมันของพืช การศึกษาครั้งนี้พบว่ายีน *EgLEC1* จากเนื้อเยื่อชั้นกลาง (mesocarp) ของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) มีขนาด 663 คู่เบส แพลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ขนาด 218 กรดอะมิโน การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *EgLEC1* พบมีค่าความเหมือน (Identity) กับโปรตีน LEC1 ของสับดูดำมากที่สุด 89% การวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีน *EgLEC1* พบโครงสร้างทุติยภูมิแบบ helices จำนวน 10 ตำแหน่งและ beta strand จำนวน 11 ตำแหน่ง ทำให้โปรตีนมีแนวโน้มพบเกิดเป็นโครงสร้างตติยภูมิ โดยมีการพบบริเวณอนุรักษ HAP3 ซึ่งเป็นส่วนจำเพาะที่มีการจับกับตำแหน่ง CAAT box ของโปรโมเตอร์ และเมื่อศึกษาการจับกันของโปรตีน *EgLEC1* กับโปรโมเตอร์ต่างๆพบว่าโปรตีนมีปฏิสัมพันธ์มากอย่างจำเพาะกับโปรโมเตอร์ *EgaccD* ของปาล์มน้ำมันที่สุด และจากการศึกษาการแสดงออกของยีน *EgLEC1* ในเนื้อเยื่อต่างๆของปาล์มน้ำมัน พบการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อชั้นกลางของปาล์มน้ำมันที่มีการสะสมน้ำมันมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกสูงในส่วนเนื้อเยื่อใบปาล์มน้ำมันของต้นที่ให้ผลผลิตสูงของการศึกษาการแสดงออกของยีน *EgLEC1* ในใบปาล์มน้ำมันของต้นผลผลิตสูงและผลผลิตต่ำ และเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของ *EgLEC1* ในเนื้อเยื่อส่วนใบของต้นอ่อนปาล์มน้ำมันใต้ต้น พบว่ามีการแสดงออกของยีนที่หลากหลายแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง โดยคาดว่าจะมีการแสดงออกสูงในตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันของต้นอ่อนที่จะพัฒนาไปเป็นต้นที่มีการสะสมน้ำมันมาก ซึ่งจากผลการทดลองสรุปได้ว่าการแสดงออกของยีน *EgLEC1* มีความสัมพันธ์กับปริมาณการสะสมน้ำมันในปาล์มน้ำมัน จึงน่าสนใจที่จะนำยีน *EgLEC1* ไปพัฒนาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกปาล์มน้ำมันพันธุ์ได้ต่อไปในอนาคต

Abstract

EgLeafy cotyledon1 (*EgLEC1*) is transcription factor that involved in the oil synthesis in plants. In this study, *EgLEC1* gene was isolated from mesocarp of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), contained 663 bp encoded 218 amino acid. The amino acid sequence analysis of *EgLEC1* showed 89% similarity compared with LEC1 protein *Jatropha curcas*. The secondary structure of *EgLEC1* was predicted and showed 10 sites of helices and 11 sites of beta strand. Additionally, *EgLEC1* encodes a HAP3 subunit of the CAAT-binding factor. The binding of *EgLEC1* protein and *EgaccD* promoter was strongly interaction. *EgLEC1* gene was highly expressed in mesocarp tissue and high yield leaves. Moreover, the unknown young leaves from different trees were analyzed for their level of expression of *EgLEC1* considerable variations were observed. These result indicated that the *EgLEC1* expression may be related to the ability of the palm tree to accumulate oil. Therefore, *EgLEC1* might be used as a molecular marker during the breeding program for producing high yielding oil palms.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	03
Abstract	04
บทนำ	07
วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัย	09
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ(Information) ที่เกี่ยวข้อง	10
ขอบเขตของโครงการวิจัย	15
วิธีการดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	16
ผลการทดลองและวิจารณ์การทดลอง	26
สรุปผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	36

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
1. แสดงการผสมพันธุ์ปาล์มน้ำมันเพื่อให้ได้ปาล์มพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา (tenera) จากพ่อแม่พันธุ์แท้พันธุ์ดुरา (dura) และ พิสิเฟอรา (pisifera) และผลจากการที่พันธุ์ปาล์มน้ำมันแต่ละทำการผสมกันในแต่ละพันธุ์	11
2. โครงสร้างของทรานสคริปชันแพกเตอร์	13
3. แผนผังภาพสรุปขั้นตอนการเตรียม cDNA เส้นสมบูร์ณ (RACE)	19
4. การทำ DPI-ELISA	25
5. แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของของโปรตีน <i>EgLEC1</i> จากปาล์มน้ำมัน และตำแหน่งอนุรักษ์ของโปรตีน <i>EgLEC1</i> โดยในกรอบสีดำ	26
6. โครงสร้างความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจาก <i>EgLEC1</i> จากปาล์มน้ำมัน (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.)เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น	27
7. แสดงการทำนายโครงสร้างสามมิติของโปรตีน <i>EgLEC1</i>	28
8. แสดงระดับการแสดงออกของยีน <i>EgLEC1</i> ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของปาล์มน้ำมัน วิเคราะห์ด้วยวิธี Semi-quantitative RT-PCR	29
9. แสดงระดับการแสดงออกของยีน <i>EgLEC1</i> ในตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันต้นที่ให้ผลผลิตน้ำมันสูง (High1- High3) และต่ำ (Low1- Low3) วิเคราะห์ด้วยวิธี Semi-quantitative RT-PCR	30
10. แสดงผลการตรวจสอบการผลิตโปรตีนลูกผสม <i>EgLEC1</i> ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3)	31
11. ภูมิตัณ ELISA ที่มีการเคลือบโปรโมเตอร์ที่ติด biotin บ่มกับโปรตีนลูกผสม <i>EgLEC1</i> แสดงผลการจับกันระหว่างโปรโมเตอร์กับโปรตีนลูกผสม <i>EgLEC1</i> ในภูมิตัณ ELISA	33
12. แสดงการทำปฏิสัมพันธ์กันระหว่างโปรโมเตอร์ต่างๆกับโปรตีนลูกผสม <i>EgLEC1</i>	33