

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

## โครงการวิจัยเรื่อง

ศึกษายีน 14-3-3 แต่ละไอโซฟอร์มในปาล์มน้ำมัน

Study of 14-3-3 isoform in oil palm

คณะผู้วิจัย

รศ.ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ

ดร. อลิษา หนักแก้ว

ศ.ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา

หน่วยงานต้นสังกัด สถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงบประมาณในการทำวิจัย ด้วยงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2556 ในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา ผู้อำนวยการสถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศที่กรุณาให้คำแนะนำแนวทางการทำวิจัย และ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงานการวิจัยมาโดยตลอด

วิไลวรรณ โชติเกียรติ

## บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ยีนที่มีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์น้ำมัน ซึ่งได้แก่ ยีน *Eg14-3-3* ที่คัดเลือกจากปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) และพบว่า 2 ไอโซฟอร์ม โดยมีลำดับเบสขนาด 777 และ 762 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสได้ 258 และ 253 กรดอะมิโนตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า MW มีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนพบว่ามือน้ำหนักโมเลกุลขนาด 29.2 และ 28.64 กิโลดาลตันตามลำดับ อีกทั้งมีสมบัติเป็นกรด ซึ่งมีค่า *pI* ของโปรตีนเป็น 4.81 และ 4.96 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์โปรตีนดังกล่าวทั้งสองด้วยโปรแกรม PHYLIP พบว่าผล phylogenetic โปรตีนดังกล่าวทั้งสองถูกจัดเป็นโปรตีน 14-3-3 ในกลุ่ม Non-epsilon หนึ่งในนั้นคือโปรตีน 14-3-3 ไอโซฟอร์มที่หนึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Non-epsilon ในกลุ่มไอโซฟอร์มโอเมกา ( $\omega$ ) จึงเรียกว่า โปรตีน *Eg14-3-3\omega* ในขณะที่โปรตีน 14-3-3 ไอโซฟอร์มที่สองจัดอยู่ในกลุ่มไอโซฟอร์มไซ ( $\psi$ ) จึงเรียกว่า โปรตีน *Eg14-3-3\psi* ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTP ในฐานข้อมูล NCBI

เมื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *Eg14-3-3 \omega* มีการแสดงออกสูงที่สุดเนื้อเยื่อชั้นกลางของผลสูงกว่ายีน *Eg14-3-3\psi* นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของ *Eg14-3-3* ทั้งสองไอโซฟอร์มในตัวอย่างของใบปาล์มน้ำมันทั้งสามสายพันธุ์คือ ดูรา พิลิเฟอราและ เทเนอรา พบว่ามีการแสดงออก ที่ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีน *Eg14-3-3\omega* นั้นมีการแสดงออกสูงในปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ให้ผลผลิตน้ำมันสูง (26.32-43.68 กิโลกรัมต่อต้นต่อปี) และมีระดับการแสดงออกของยีน *Eg14-3-3 \omega* ในระดับต่ำในปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่ำ (1.98-12.43 กิโลกรัมต่อต้นต่อปี) จากการวิจัยนี้พบว่าเมื่อเร่งระดับการแสดงออกของยีน *Eg14-3-3\omega* นั้นมีความเป็นไปได้อย่างยิ่งที่จะใช้เป็นวิธีการช่วยในการเพิ่มผลผลิตน้ำมัน และใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับคัดเลือกปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตน้ำมันสูงในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

## Abstract

Fatty acid synthesis related gene was characterized in this study. The *14-3-3* gene was isolated from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and was found two isoforms. Their sequences were an open reading frame of 777 and 762 which encode proteins of 258 and 253 amino acid residues, respectively. Thus, the proteins were predicted molecular weight of 29.2 and 28.64 kDa, respectively. In addition, pI of the acidic proteins were 4.81 and 4.96, respectively. Both the deduced protein sequences were analyzed by PHYLIP programme and the phylogenetic results indicated that they belong to the Plant Non-epsilon *14-3-3* group. One of these isoforms, Eg14-3-3 isoform1 was an omega subgroup, termed Eg14-3-3 $\omega$ . Whereas, the second isoform was a psi subgroup, termed Eg14-3-3 $\psi$ . These results were showed same direction with the BLASTP in NCBI.

Then, the Eg14-3-3  $\omega$  expression level in mesocarp tissues of oil palm was studied. Its expression was obviously higher than Eg14-3-3  $\psi$ . The study of the Eg14-3-3 gene expression level from three variant oil palm; Dura, Pisifera and Tenera, were shown not different of the relative expression level in those samples. Moreover, this research found that Eg14-3-3  $\omega$  expression level were shown high in high oil yield cultivar (26.32–43.68 Kg/palm/year) and low expression level of Eg14-3-3  $\omega$  in low oil yield plants (1.98–12.43 Kg/palm/year). Based on this research, enhance the expression of the Eg14-3-3  $\omega$  gene possibly to be one of the methods to increase the oil content and uses as a marker to assist selection of possible high oil yielding cultivars in oil palm breeding programs.

## สารบัญ

	หน้า
บทนำ	8
วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัย	9
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้องของ ขอบเขตของโครงการวิจัย	10 15
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	15
ผลการทดลองและวิจารณ์	21
สรุปผลการทดลอง	31
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	32

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. ลักษณะโดยทั่วไปของปาล์มน้ำมัน ( <i>Elaeis guineensis</i> Jacq)	11
2. แสดงโครงสร้าง 3 มิติ ในรูปแบบโดเมนของโปรตีน 14-3-3 จากพืช <i>Arabidopsis</i>	12
3. แผนผังภาพแสดงขั้นตอนการ RACE	18
4. แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของของโปรตีน Eg14-3-3 isoform I และ II จากปาล์มน้ำมันและตำแหน่งอนุรักษ์ของโปรตีน 14-3-3 โดยในกรอบสีดำ I และ II คือ ตำแหน่งอนุรักษ์ของ 14-3-3 ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ตำแหน่งด้วยเครื่องหมาย # หมายถึงตำแหน่งกรดอะมิโน S ของโปรตีน 14-3-3 และกรอบสีดำ III ซึ่งแสดงตำแหน่ง pseudosubstrate domain และตำแหน่ง $Ca^{2+}$ ตำแหน่งที่เส้นใต้สีดำ	23
5. Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโปรตีน 14-3-3 และแสดงผลว่ากรดอะมิโนของของโปรตีน Eg14-3-3 isoform I และ II คือ โปรตีน 14-3-3 isoform omega และ psi ตามลำดับ	24
6. การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน <i>Eg14-3-3 isoform <math>\omega</math></i> จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของปาล์มน้ำมันโดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR แล้ววิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Scion Image จากการทำให้ 1.5% agarose gel electrophoresis	26
7. การศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน <i>Eg14-3-3 isoform <math>\psi</math></i> จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของปาล์มน้ำมันโดยวิธี Semi-quantitative RT-PCR แล้ววิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Scion Image จากการทำให้ 1.5% agarose gel electrophoresis	26
8. แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน <i>Eg14-3-3 isoform <math>\omega</math></i> ในเนื้อเยื่อที่สะสมน้ำมันปาล์ม (mesocarp) หรือเนื้อเยื่อชั้นกลางของผลปาล์มน้ำมัน ช่วงอายุระหว่าง 1-4 เดือน โดยใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR แล้ววิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Scion Image จากการทำให้ 1.5% agarose gel electrophoresis	27
9. แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน <i>Eg14-3-3 isoform <math>\psi</math></i> ในเนื้อเยื่อที่สะสมน้ำมันปาล์ม (mesocarp) หรือเนื้อเยื่อชั้นกลางของผลปาล์มน้ำมัน ช่วงอายุระหว่าง 1-4 เดือน โดยใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR แล้ววิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Scion Image จากการทำให้ 1.5% agarose gel electrophoresis	28
10. แสดงปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อที่สะสมน้ำมันปาล์ม (mesocarp) ของผลปาล์มน้ำมัน ช่วงอายุระหว่าง 1-4 เดือน โดยใช้เทคนิค chloroform/methanol	28

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
11. แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน <i>Eg14-3-3 isoform <math>\omega</math></i> จากปาล์มน้ำมัน 3 สายพันธุ์โดยใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR แล้ววิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Scion Image	29
12. แสดงปริมาณการแสดงออกของยีน <i>Eg14-3-3 isoform <math>\psi</math></i> จากปาล์มน้ำมัน 3 สายพันธุ์โดยใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR แล้ววิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Scion Image	29
13. แสดงระดับปริมาณยีน <i>Eg14-3-3 isoform <math>\omega</math> (isoform I)</i> และ <i><math>\psi</math> (isoform II)</i> จากในตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตสูงและตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตต่ำโดยการคำนวณค่า $\log_2$ Ratio	30