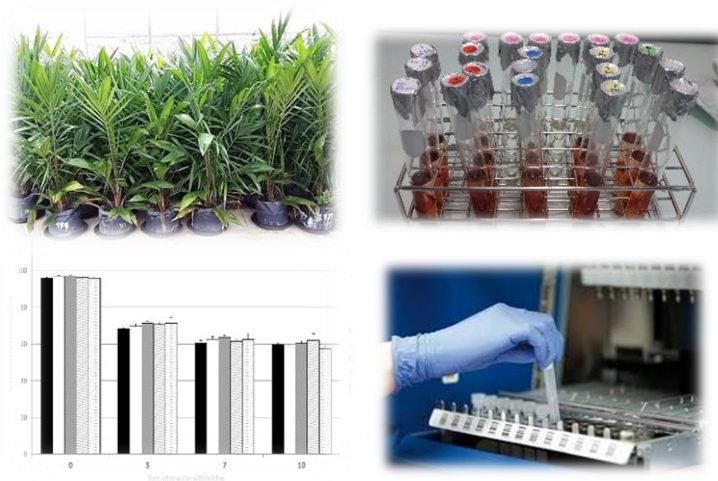


## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมโพรลีนในปาล์มน้ำมันในสภาวะขาดน้ำ

The study of proline accumulation-related gene in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

in water deficit condition



คณะนักวิจัย

ดร. เสาวภา ต้วงปาน

ศาสตราจารย์ ดร. ชีระ เอกสมทราเมษจู้

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2560 - 2561 รหัสโครงการ NAT600219S

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมโพรลีนในปาล์มน้ำมันในสภาวะขาดน้ำ

The study of proline accumulation-related gene in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

in water deficit condition

คณะนักวิจัย

ดร. เสาวภา ต้วงปาน

ศาสตราจารย์ ดร. วีระ เอกสมทราเมษฐ์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2560-2561 รหัสโครงการ NAT600219S

ชื่อโครงการ การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมโพรลีนในปาล์มน้ำมัน  
ในสภาวะขาดน้ำ

The study of proline accumulation-related gene in oil palm  
(*Elaeis guineensis* Jacq.)

ผู้วิจัย

หน่วยงาน

ดร. เสาวภา ต้วงปาน

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ศาสตราจารย์ ดร. ชีระ เอกสมทราเมษฐ์

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมโพรตีนในปาล์มน้ำมันในสภาวะขาดน้ำ ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2560 และได้รับความร่วมมืออย่างดีจากภาควิชาพืชศาสตร์ และสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย นางสาวพรทิพย์ แสงศิลป์ ตลอดจนผู้มีส่วนร่วมทุกท่าน ที่ทำให้ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## บทคัดย่อ

สภาวะแห้งแล้งส่งผลกระทบต่อพืชปลูกเกือบทุกชนิด โดยเฉพาะปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นพืชที่ต้องการน้ำในปริมาณสูง การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันทนแล้งจึงมีความจำเป็น เพื่อช่วยลดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลก ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันจำเป็นที่จะต้องมีการคัดเลือกพันธุ์หรือสายพันธุ์ที่มีลักษณะทนแล้ง ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำลักษณะการตอบสนองทางสรีรวิทยา และชีวเคมีของพืชที่ส่งเสริมความสามารถในการทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตอบสนองของปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 ในการสะสมโปรตีน และการแสดงออกของยีน pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) ต่อสภาวะขาดน้ำ โดยทดสอบใน 5 คู่ผสม ได้แก่ PSU-171, PSU-177, PSU-183, PSU-222 และ PSU-223 วางแผนการทดลองแบบ complete randomized design มี 4 ทรีทเมนต์ ได้แก่ ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ผ่านการรดน้ำ และต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการรดการให้น้ำ 5, 7 และ 10 วัน จากการวิเคราะห์ปริมาณการสะสมโปรตีนในต้นกล้าปาล์มน้ำมันคู่ผสมต่างๆ พบว่า ทุกคู่ผสมมีการสะสมปริมาณโปรตีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการรดน้ำ โดยเมื่อผ่านการรดน้ำเป็นเวลา 5 วัน ปาล์มน้ำมันทั้ง 5 คู่ผสม มีปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ ความแตกต่างของระดับโปรตีนจะพบได้เมื่อผ่านการรดน้ำเป็นเวลา 10 วัน โดยคู่ผสม PSU-177 มีปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ 473.86  $\mu\text{mole/g}$  FW และคู่ผสม PSU-183 มีปริมาณโปรตีนต่ำสุด คือ 198.82  $\mu\text{mole/g}$  FW การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* พบว่า คู่ผสม PSU-223, PSU-171 และ PSU-177 มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน *P5CS* ไม่มากนักหลังจากมีการรดน้ำไปแล้ว 5 วัน และการแสดงออกของยีน *P5CS* ในปาล์มน้ำมันทั้งสามคู่ผสม มีค่าลดลงเมื่อมีการรดน้ำ 7 และ 10 วันตามลำดับ ในขณะที่คู่ผสม PSU-222 มีการแสดงออกของยีน *P5CS* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อได้รับการรดน้ำ โดยมีระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* สูงสุดที่ 5 วันหลังการรดน้ำ หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีแนวโน้มลดลง ส่วนคู่ผสม PSU-183 มีรูปแบบการแสดงออกของยีน *P5CS* ที่แตกต่างออกไป นั่นคือ การแสดงออกของยีน *P5CS* จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อมีการรดน้ำ และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 10 วันหลังการรดน้ำ การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *P5CS* กับการสะสมโปรตีน เนื่องจากคู่ผสม PSU-177 ซึ่งสะสมปริมาณโปรตีนได้สูงสุดเมื่อมีสภาวะแล้งไม่ได้มีการแสดงออกของยีน *P5CS* สูงสุด เมื่อเทียบกับคู่ผสมอื่นๆ ในขณะที่คู่ผสม PSU-183 ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *P5CS* สูง กลับมีปริมาณโปรตีนที่ตอบสนองต่อสภาวะแล้งต่ำสุด อาจเป็นไปได้ว่ากระบวนการสะสมโปรตีนในปาล์มน้ำมันมีเอนไซม์อื่น เช่น P5C reductase (*P5CR*) เป็นตัวแปรที่สำคัญในการกำหนดความสามารถในการสะสมโปรตีน ดังนั้น การสะสมโปรตีนของต้นกล้าปาล์มที่ช่วยส่งเสริมความสามารถในการทนแล้งจึงควรวัดจากปริมาณโปรตีนโดยตรง และในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า PSU-177 แนวโน้มทนทานต่อสภาวะแล้ง จึงควรเป็นลูกผสมที่ถูกคัดเลือกในการปลูกทดสอบต่อไป

**คำสำคัญ:** โปรตีน, pyrroline-5-carboxylate synthetase, ปาล์มน้ำมัน, สภาวะขาดน้ำ

## Abstract

Drought affects almost all crops especially oil palm which has high water requirement. Oil palm breeding is, therefore, needed to reduce loss stemming from climate change. In oil palm breeding program, it is necessary to screen for drought tolerant genotypes. Apart from conventional method which relies chiefly on yield, physiological and biochemical responses has been used as indicative characteristics for drought tolerance. This study aimed to investigate the responses of oil palm Sub-PSU 1 in term of proline accumulation and expression of pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) upon drought stress. Five progenies including PSU-171, PSU-177, PSU-183, PSU-222 and PSU-223 were tested. The experiment was arranged in complete randomized design with 4 treatments. Seedlings were exposed to 0, 5, 7 and 10 days waterwithholding. Analysis of proline accumulation revealed that enhanced proline content was observed in all progenies following water deficit conditions. However, genotypic variation among progenies was not found until 10 days of waterwithholding. PSU-177 exhibited the highest level of proline content of 473.86  $\mu\text{mole/g}$  FW and PSU-183 contained the lowest amount of proline of 198.82  $\mu\text{mole/g}$  FW. Additionally, the analysis of P5CS expression level showed that P5CS expression was slightly enhanced in PSU-223, PSU-171 and PSU-177 after 5 days of waterwithholding and started to decline afterward. Whereas, P5CS expression level was sharply increased in PSU-222 and was gradually reduced after 5 days of water deficit. However, PSU-183 showed different pattern of gene expression. P5CS expression in PSU-183 was gradually increased along the drought treatment period. Therefore, the highest level was observed after 10 days of waterwithholding. In this study, no correlation between P5CS expression level and proline accumulation was observed. It might be because other enzymes such as P5C reductase (P5CR) play a key role in proline accumulation in this species. Therefore, proline accumulation potential in oil palm should be investigated directly from proline content rather than gene expression. Also, PSU-177 showed the high potential of drought tolerance and should be selected for further field trial.

**Keywords:** Proline, pyrroline-5-carboxylate synthetase, oil palm, water deficit

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
การตรวจเอกสาร	3
วิธีการดำเนินการวิจัย	10
ผลการทดลองและวิจารณ์	15
สรุป	30
เอกสารอ้างอิง	31

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 Primers ที่ใช้สำหรับการโคลนยีน P5CS	15
ตารางที่ 2 แสดงปริมาณโพรตีนที่มีการสะสมในต้นกล้าปาล์มน้ำมันเมื่อมีการรดน้ำ 0, 5, และ 10 วัน ตามลำดับ โดย A, B, C, D และ E แทนต้นกล้าปาล์ม น้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 คู่ผสมเบอร์ PSU- 171, PSU-177, PSU-183, PSU-222 และ PSU-223 ตามลำดับ (ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	27
ตารางที่ 3 ชนิดของไพรเมอร์สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน P5CS	29



## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ผลปาล์มน้ำมันดูรา เทเนอรา และพิลีเฟอรา	3
รูปที่ 2 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 9 เดือนที่ผ่านการให้น้ำ 3 ระดับ คือ (A) ให้น้ำ ทุกวัน (B) ให้น้ำ ทุก 4 วัน และ (C) ให้น้ำทุก 8 วัน เป็นเวลา 6 เดือน	5
รูปที่ 1 กลไกการสังเคราะห์และสลายโพรลีนภายในเซลล์	7
รูปที่ 4 แสดงการสะสมโพรลีนในปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 คู่ผสม PSU-106 และ PSU-220 ที่มีการรดน้ำเป็นเวลา 10 วัน และให้น้ำกลับเป็นเวลา 5 วัน	9
รูปที่ 5 แผนที่ความร้อน (Heat map) และการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Hierarchical clustering) สำหรับลักษณะทางการเจริญเติบโตและสรีรวิทยาของต้นกล้าปาล์มน้ำมันแต่ละคู่ผสมที่ได้รับน้ำทุกวัน (WW) กับ ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้รับน้ำทุกวันกับได้รับน้ำทุก 8 วัน (SS) โดยลักษณะที่วิเคราะห์ ได้แก่ จำนวนใบ (NL) พื้นที่ใบ (LA) น้ำหนักแห้ง (DW) น้ำหนักสด (FW) อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักรากต่อน้ำหนักต้น (RS) ความสูงต้น (PH) ค่าความเขียวใบ (SPAD) ปริมาณโพรลีน (Proline) และค่า $F_v/F_m$	9
รูปที่ 6 ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก cDNA ส่วนใบของปาล์มน้ำมัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ของไพรเมอร์ P52_F และ P52_R คือ 54 °C และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)	16
รูปที่ 7 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนของยีน <i>P5CS</i> ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ RBC TA cloning จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M)	17
รูปที่ 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>P5CS</i> บริเวณส่วนกลางยีนมีขนาด 746 นิวคลีโอไทด์	18
รูปที่ 9 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Forward : RACE_P_F4 กับ universal primer B25 และ B26 โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA Ladder (M)	19
รูปที่ 10 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Forward : EG-04 กับ universal primer โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA Ladder (M)	19
รูปที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทป์และกรดอะมิโนของยีน <i>P5CS</i> ของปาล์มน้ำมัน	20
รูปที่ 12 เมล็ดปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 ที่ผ่านการทำลายระยะพักตัวและการทำงานออกเป็นเวลา 45 วัน	21

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 13 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 อายุ 10 สัปดาห์ที่ปลูกในสภาพเพาะและผ่านการคัดเลือกลักษณะที่ผิดปกติ	22
รูปที่ 14 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแปลงภาควิชาพืชศาสตร์	22
รูปที่ 15 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ทำการย้ายเข้าภายในเรือนกระจก	23
รูปที่ 16 ปริมาณความชื้นของดินในกระถางต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 คู่ผสม PSU- 171, PSU-177, PSU-183, PSU-222 และ PSU-223 ที่ใช้ในการทดลองเมื่อผ่านการรดน้ำ 0, 5, และ 10 วัน ตามลำดับ	24
รูปที่ 17 ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการทดลองเมื่อผ่านการรดน้ำ 0, 5, 7 และ 10 วัน ตามลำดับ	25
รูปที่ 18 การวัดปริมาณโพรลินในใบต้นกล้าปาล์มน้ำมันหลังจากเติม toluene	26
รูปที่ 19 ระดับการแสดงออกของยีน P5CS ของปาล์มน้ำมันในการทดลองเมื่อผ่านการรดน้ำ 0, 5, 7 และ 10 วัน ตามลำดับ	30

## บทนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยแหล่งเพาะปลูกหลักของประเทศอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดกระบี่ ตรัง สุราษฎร์ธานี ชุมพร และสตูล ปัจจุบันได้มีการขยายพื้นที่เพาะปลูกไปยังภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ต้องการน้ำและความชื้นค่อนข้างสูง ต้องการน้ำฝนเฉลี่ยมากกว่า 2000 มิลลิเมตรต่อปี พื้นที่เพาะปลูกควรมีการกระจายตัวของฝนสม่ำเสมอ และไม่มีสภาพแห้งแล้งนานเกินสามเดือน (กรมวิชาการเกษตร, 2547) การได้รับน้ำไม่เพียงพอจะส่งผลให้ปาล์มน้ำมันเจริญเติบโตช้า มีพื้นที่ใบน้อย และการสังเคราะห์แสงผิดปกติ ทำให้ผลผลิตทะลายปาล์มและน้ำมันลดลง (Corley *et al.*, 1973; Suresh *et al.*, 2010) ในปัจจุบันสภาวะโลกร้อนทำให้เกิดปัญหาความแห้งแล้งในพื้นที่ที่เคยมีความเหมาะสมสำหรับการเพาะปลูกปาล์มน้ำมัน และปัญหานี้มีแนวโน้มจะทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น (Dai *et al.*, 2004) ประกอบกับมีการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันไปยังพื้นที่ที่มีความเหมาะสมน้อยลง โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนไม่เพียงพอ (ธีระพงศ์และคณะ, 2547) ดังนั้นการพัฒนาปาล์มน้ำมันให้มีลักษณะทนแล้งจะสามารถช่วยลดผลกระทบจากสภาวะที่เกิดขึ้นนี้ได้ แต่การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) ใช้ระยะเวลาเวลานาน โดยเฉพาะขั้นตอนการปลูกทดสอบคุณสมบัติเพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการจะใช้เวลา พื้นที่ และต้นทุนสูง ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิคและความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกเพื่อเพิ่มความแม่นยำ และลดระยะเวลาในการพัฒนาพันธุ์ปาล์มที่มีลักษณะตามต้องการ

โดยทั่วไปพืชมีกลไกและลักษณะหลายลักษณะที่ส่งเสริมให้ทนต่อสภาพแห้งแล้ง การสะสมโพรลีนเป็นกลไกหนึ่งที่ช่วยรักษาระดับน้ำในเซลล์ ทำให้พืชสามารถอยู่รอดในสภาวะขาดน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่า โพรลีนช่วยป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์และรักษาไม่ให้โปรตีนเสื่อมสภาพในระหว่างที่พืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ (Ain-Lhont *et al.*, 2000) โดยมีรายงานว่าในปาล์มน้ำมันจะมีการสะสมโพรลีนเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด เช่น สภาวะเครียดน้ำ หรือเกลือ (Cha-um *et al.*, 2010) แต่กลไกการสะสมโพรลีนในพืชชนิดนี้ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัด การศึกษาในครั้งนี้จะทำการศึกษาการแสดงออกของยีน pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) ที่เกี่ยวข้องกับ การสะสมโพรลีนในปาล์มน้ำมัน ยีนที่มีการแสดงออกสัมพันธ์กับการสะสมโพรลีนจะสามารถใช้เป็นยีนเป้าหมายเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ปาล์มน้ำมันทนแล้งต่อไป

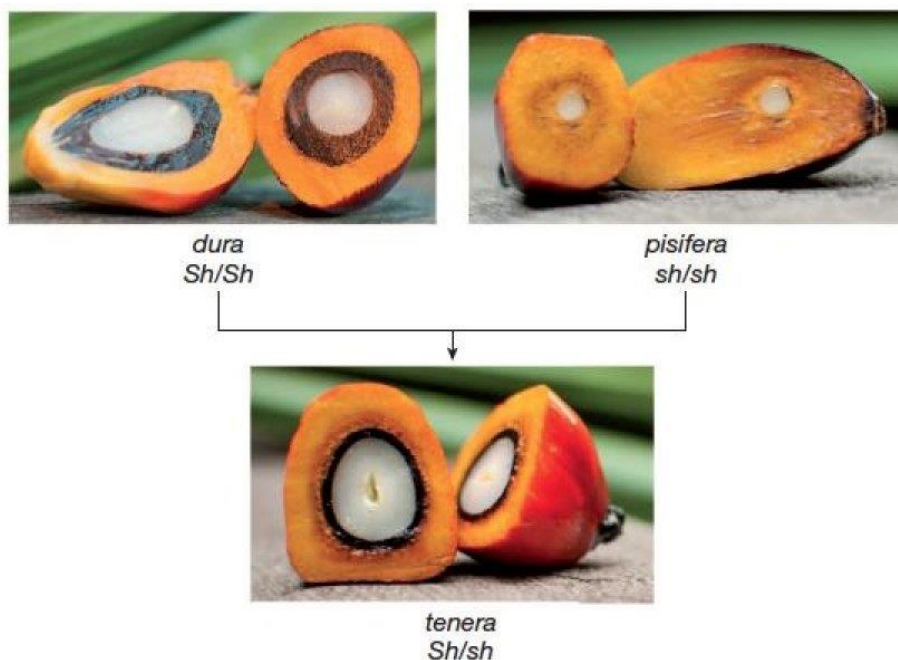
## วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการสะสมโพรลีนของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาวะขาดน้ำ
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมโพรลีนกับการแสดงออกของยีน pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) ในปาล์มน้ำมันในสภาวะขาดน้ำ
3. นำข้อมูลการแสดงออกของยีน *P5CS* ในต้นกล้าปาล์มน้ำมันมาคัดเลือกลูกผสมเทเนอร่าพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 ที่มีแนวโน้มทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ

## การตรวจเอกสาร

### ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ผสมข้าม (cross-pollinated) และเป็นพืชอายุยาว (perennial crop) อยู่ในวงศ์ Palmae หรือ Arecaceae เช่นเดียวกับ มะพร้าว อินทผลัม และ ตาลโตนด และอยู่ในสกุล *Elaeis* มีโครโมโซม  $2n=2x=32$  พันธุ์ที่มีการปลูกเพื่อการค้า คือ *Elaeis guineensis* Jacq. หรือ African oil palm มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกาตอนกลางและตะวันตก พันธุ์หรือสายพันธุ์ของปาล์มชนิดนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ ดุรา (dura) เทเนอร์รา (tenera) และพิสิเฟอรา (pisifera) โดยปาล์มน้ำมันเทเนอร์ราเป็นลูกผสมระหว่างแม่ดุรา กับ พ่อพิสิเฟอรา (DXP) ทั้งสามชนิดมีความต่างของความหนาของกะลา การปรากฏของเส้นใยสีน้ำตาล และความหนาของเนื้อปาล์มชั้นนอก (รูปที่ 1) ทั้งนี้ปาล์มน้ำมันเทเนอร์ราเป็นปาล์มน้ำมันที่นิยมปลูกในทางการค้ามากที่สุด เนื่องจากผลเทเนอร์รามีลักษณะกะลาบาง เนื้อปาล์มต่อผลมาก ให้ผลผลิตปาล์มสด (fresh fruit bunch; FFB) สูง และมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มดิบ (crude palm oil) ที่หีบสกัดในโรงงานได้สูงสุด มีความสามารถปรับตัวได้ดี ให้ผลผลิตสม่ำเสมอในสภาพภูมิอากาศและสภาพแวดล้อมที่มีช่วงฤดูแล้งนาน (Corley, 1973) เป็นที่ต้องการของเกษตรกร



รูปที่ 1 ผลปาล์มน้ำมันดุรา เทเนอร์รา และพิสิเฟอรา (ที่มา: ดัดแปลงจาก Singh et al., 2013)

## ผลของการขาดน้ำในปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณเขตร้อนชื้น สภาพภูมิอากาศที่มีฝนตกชุก และสม่ำเสมอตลอดปี มีความชื้นสูงและแสงแดดจัด โดยปาล์มน้ำมันควรได้รับแสงไม่น้อยกว่า 5 ชั่วโมงต่อวัน ซึ่งลักษณะดังกล่าวตรงกับพื้นที่ส่วนใหญ่ของภาคใต้ ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะปลูกปาล์ม น้ำมันเนื่องจากการกระจายของน้ำฝนสม่ำเสมอ ประมาณ 1,800 ถึง 2,000 มิลลิเมตรต่อปี และจะต้องไม่มีสภาพแห้งแล้งเกิน 3 เดือน หากเกิดการแห้งแล้งเกิน 3 เดือน จะพบว่า มีการส่งผลกระทบต่อ การให้ผลผลิตปาล์มลดลง ดังนั้นในบริเวณที่เกิดปัญหาสภาวะแห้งแล้ง การติดตั้งระบบชลประทานจะ ทำให้ผลผลิตปาล์มสดเพิ่มขึ้น 15-30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการให้น้ำแบบหยดสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และผลผลิตปาล์มน้ำมัน การให้น้ำที่มีประสิทธิภาพ 85-95 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยเพิ่มคุณภาพและ ปริมาณผลผลิตได้ 15-25 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาปริมาณความต้องการน้ำของปาล์มน้ำมันอายุ 4-11 ปี พบว่า หากมีการให้น้ำ เท่ากับค่าการระเหยน้ำจากต้น สามารถเพิ่มผลผลิตสดได้ 41 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปาล์มที่ ไม่ให้น้ำ ส่วนต้นปาล์มที่มีอายุ 3-9 ปี ต้นปาล์มที่ให้น้ำจะให้ผลผลิต 3.75 ตันต่อไร่ต่อปี ขณะที่ต้น ปาล์มที่ไม่ได้ให้น้ำจะให้ผลผลิตเพียง 3 ตันต่อไร่ต่อปี ดังนั้นปาล์มน้ำมันในเขตที่ได้รับน้ำฝนน้อยกว่า 1,800 มิลลิเมตรต่อปี ควรมีการให้น้ำเพิ่ม และมีการจัดการให้มีความชื้นในสวนปาล์มเพิ่มมากขึ้น (เอกชัย, 2548)

ในสภาวะที่ต้นกล้าขาดน้ำเกิดขึ้นเนื่องจากพืชมีอัตราการคายน้ำมากกว่าการดูดซึมน้ำไป ใช้ จะทำให้มีค่าศักย์ของน้ำในใบ อัตราการสังเคราะห์แสง ค่าความเครียดใบ และการเจริญเติบโตต่ำ กว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ขาดน้ำ (รูปที่ 2) และพบว่าพันธุ์ปาล์มมีการตอบสนองต่อการขาดน้ำที่ แตกต่างกัน (วิภาวี และคณะ, 2556; ศาตนันท์ และคณะ 2560; Cha-um, *et al.*, 2013; Duangpan, *et al.*, 2018; Harun, 1997) สำหรับในปาล์มน้ำมันที่ปลูกลงแปลงปลูกแล้ว พบว่า น้ำ เป็นปัจจัยสำคัญที่จำกัดการเจริญเติบโตและผลผลิตเช่นกัน การขาดน้ำจะส่งผลให้ปาล์มมีต้นเตี้ยลง โดยเฉพาะในปาล์มน้ำมันที่ยังมีอายุน้อย และหากขาดน้ำเป็นเวลานานจะส่งผลให้เกิดใบไหม้ซ้ำ ใบเหลือง และหากขาดน้ำอย่างรุนแรงอาจทำให้ปาล์มตายได้ Haniff (2006) พบว่า อัตราการ สังเคราะห์แสงลดลงพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของค่าความแตกต่างของความดันไอ (vapor pressure deficit หรือ VPD) นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของใบในพื้นที่แล้งลดลง 4-12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับพื้นที่ ที่ได้รับน้ำอย่างเพียงพอ โดยพื้นที่ที่ได้รับน้ำอย่างเต็มที่จะมีการสะสมอาหารเพื่อใช้ในการสร้างจำนวน และน้ำหนักทะลายที่เพิ่มขึ้น (Noor and Harun, 2004) ชีระพงศ์ และคณะ (2547) รายงานว่า ใน สภาพที่ขาดน้ำ 1 เดือน ไม่ทำให้สัดส่วนเพศลดลง แต่มีผลทำให้น้ำหนักทะลายลดลง 5 เปอร์เซ็นต์ และหากมีการขาดน้ำมากกว่า 2 เดือน จะทำให้น้ำหนักทะลายลดลงถึง 15-20 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วน เพศจะลดลงเมื่อมีการขาดน้ำต่อเนื่องกันอย่างน้อย 2 เดือน โดยมีผลกระทบมากในปาล์มที่มีอายุน้อย พบว่าการขาดน้ำในปาล์มอายุ 4 ปี ทำให้สัดส่วนเพศลดลงถึง 57 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปาล์มอายุ 5

และ 7 ปี จะมีสัดส่วนเพศลดลง 36 และ 30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้สภาวะการขาดน้ำ ในช่วงแล้งจะมีผลต่อการเจริญและพัฒนาของผลปาล์ม กล่าวคือ ในสภาพช่วงแล้ง (มีน้ำฝนต่ำกว่า 100 มิลลิเมตร/เดือน) ติดต่อกัน 2-4 เดือน ทำให้การพัฒนาของผลปาล์มลดลง 7-15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพที่ไม่ขาดน้ำในช่วงเวลาดังกล่าวโดยปาล์มที่มีอายุน้อยจะมีอัตราการลดลงของผลผลิตมากกว่าปาล์มอายุมาก



รูปที่ 2 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 9 เดือนที่ผ่านการให้น้ำ 3 ระดับ คือ (A) ให้น้ำทุกวัน (B) ให้น้ำทุก 4 วัน และ (C) ให้น้ำทุก 8 วัน เป็นเวลา 6 เดือน

ที่มา: ศาตวรรษ และคณะ (2560)

นอกจากนี้ พบว่าในสภาพที่ไม่มีฝนตกต่อเนื่อง 2-3 เดือน ในช่วงแตกใบ ทำให้ทางใบหัก ต้องมีการตัดใบทิ้ง ส่งผลลดพื้นที่ใบและการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหาร หากสภาวะขาดน้ำเกิดขึ้น ในช่วงการกำหนดเพศจะทำให้มีสัดส่วนเพศผู้มาก ส่งผลให้ผลผลิตทะลายปาล์มน้ำมันลดลง สำหรับการผสมเกสร หากมีภาวะแล้งจะส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการผสมเกสรลดลง (ธีระพงศ์ และ คณะ, 2547) เช่นเดียวกับ Corley และ Gray (1976) รายงานว่า สภาพแวดล้อมมีอิทธิพลอย่างสูงต่อ อัตราส่วนเพศ จากการเปรียบเทียบพบว่าปาล์มน้ำมันที่ปลูกในประเทศมาเลเซียมีอัตราส่วนเพศผู้สูงกว่าปาล์มน้ำมันที่ปลูกในประเทศไนจีเรียมาก มีผลให้การพัฒนาเป็นผลปาล์มน้อย ปริมาณผลผลิตที่ได้จึงลดลง เนื่องจากจำนวนผลต่อทะลายต่ำและมีน้ำหนักทะลายลดลง 10-15 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้ปริมาณการผลิตทะลายปาล์มน้ำมันโดยรวมลดลงเหลือเพียง 2 ตัน/ไร่/ปี ในขณะที่ปาล์มซึ่งปลูกในบริเวณที่สภาพแวดล้อมเหมาะสม ได้รับน้ำตลอดปีจะสามารถผลิตทะลายได้สูงถึงประมาณ 3-3.5 ตัน/ไร่/ปี

## โพรลีนกับสภาวะขาดน้ำ

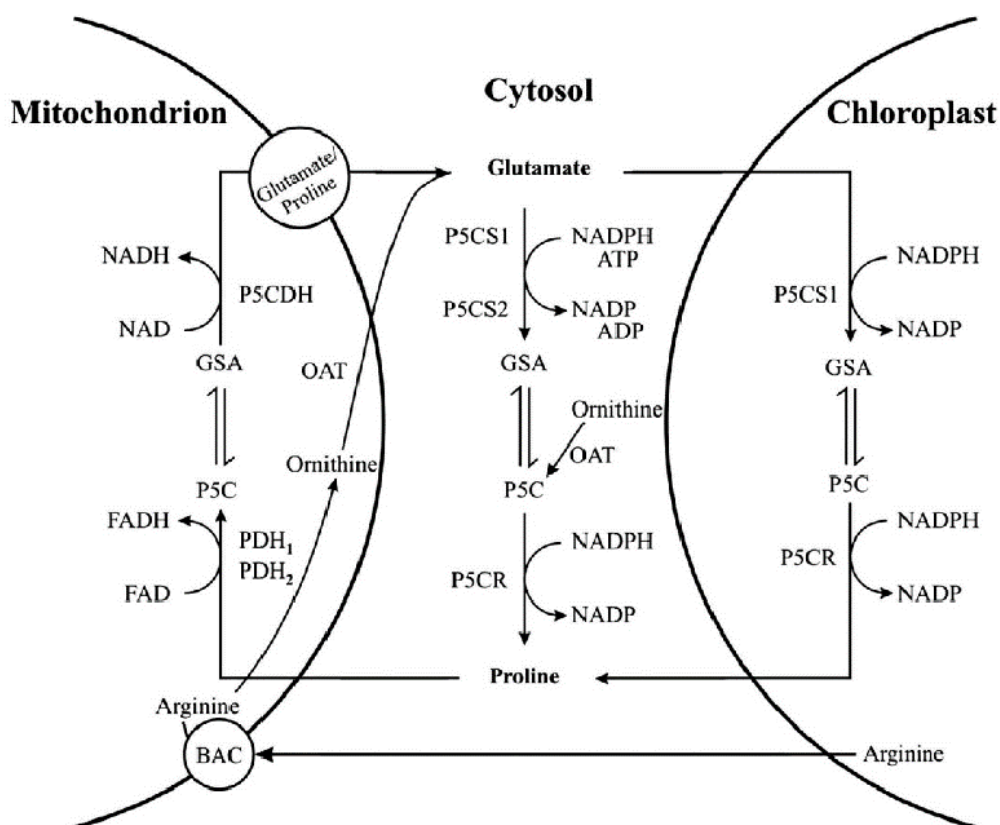
การสะสมโพรลีนในพืชเป็นกลไกหนึ่งซึ่งช่วยรักษาระดับน้ำรวมถึงเร่งต้นออสโมติกภายในเซลล์ ทำให้พืชสามารถอยู่รอดในสภาวะขาดน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่า โพรลีนช่วยป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์และรักษาไม่ให้โปรตีนเสื่อมสภาพในระหว่างที่พืชอยู่ในสภาวะแห้งแล้ง (Ain-Lhont *et al.*, 2000) มีรายงานพบการสะสมโพรลีนในพืชที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน ข้าว อ้อย และมันฝรั่ง เป็นต้น (Cha-um *et al.*, 2010; Cha-um *et al.*, 2013; Duangpan, *et al.*, 2018; Guimaraes *et al.*, 2008; Knipp and Honermeier, 2006) ในปาล์ม น้ำมันพบว่าการสะสมโพรลีนเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด เช่น สภาวะเครียดน้ำ หรือเกลือ (Cha-um *et al.*, 2010; Duangpan, *et al.*, 2018) แต่กลไกการสะสมโพรลีนในพืชชนิดนี้ยังไม่มียางานที่แน่ชัด

โพรลีนถูกสร้างขึ้นมาจาก glutamate โดยทั่วไปพืชจะมีการสะสมโพรลีนอยู่แล้วแต่มีอยู่ในระดับต่ำ (Gzik, 1996) เมื่อได้รับสภาวะขาดน้ำ กระบวนการสังเคราะห์โพรลีนจะถูกกระตุ้นในขณะที่กระบวนการสลายโพรลีนจะถูกยับยั้งทำให้เกิดการสะสมโพรลีนขึ้น (Yoshida *et al.*, 1995) ในกระบวนการสร้างโพรลีน จะเริ่มจาก glutamate ถูกรีดิวซ์ไปเป็น glutamate-semialdehyde (GSA) โดยเอนไซม์ pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) หลังจากนั้น GSA จะเปลี่ยนไปเป็น pyrroline-5-carboxylate (P5C) และถูกเปลี่ยนไปเป็นโพรลีน ด้วยเอนไซม์ P5C reductase (P5CR) (Szabados and Savoure, 2010) โดยขั้นตอนการเปลี่ยน glutamate ไปเป็น GSA ด้วยเอนไซม์ P5CR จะเป็นขั้นตอนที่กำหนดความเร็วในกลไกการสร้างโพรลีน (rate limiting step) และการที่ GSA ถูกเปลี่ยนไปเป็นโพรลีนนั้น จะเป็นปฏิกิริยาที่ไม่สามารถผันกลับได้ (รูปที่ 3) กระบวนการย่อยสลายโพรลีนจึงถูกยับยั้งภายใต้สภาวะเครียดต่าง ๆ (Yoshida *et al.*, 1995) ที่เกี่ยวข้องกับเร่งต้นออสโมติก จึงทำให้เกิดการสะสมของโพรลีนขึ้นภายในเซลล์ ที่ไซโทซอล และคลอโรพลาสต์

เมื่อพืชกลับเข้าสู่สภาวะปกติโพรลีนจะลดระดับลงจากกระบวนการเกิดออกซิเดชันโดยการเปลี่ยนไปเป็นกลูตามัท โพรลีนที่สะสมไว้จะถูกเคลื่อนย้ายไปยังไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นอแกเนลที่สามารถเปลี่ยนโพรลีนให้กลับไปเป็นกลูตามัทด้วยเอนไซม์ proline dehydrogenase (PDH) และ  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (P5CDH) โดย PDH จะเปลี่ยนโพรลีนกลับไปเป็น P5C และ P5CDH จะเปลี่ยน P5C ให้กลับไปเป็นกลูตามัทอีกครั้ง บทบาทของไมโทคอนเดรียนอกจากในสภาวะปกติที่เป็นอแกเนลที่สังเคราะห์พลังงานแล้ว ภายใต้สภาวะเครียดอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงเร่งต้นออสโมติกภายในเซลล์นั้น ยังมีบทบาทในการควบคุมปริมาณของโพรลีนด้วยการทำหน้าที่เป็นตัวย่อยสลายหรือลดระดับของโพรลีนลง รวมถึงยังเป็นแหล่งสะสมของคาร์บอนและไนโตรเจนที่ใช้ในกระบวนการรักษาระดับสภาวะเครียดได้เช่นกัน



ยีน *P5CS* ได้ถูกโคลนในพืชต่างๆ เช่น *Arabidopsis*, ข้าวไรย์ (ryegrass), ข้าว, อ้อย เป็นต้น การศึกษาใน *Arabidopsis* พบว่าปริมาณ mRNA ของยีน *P5CS* มีความสัมพันธ์กับปริมาณโพรลีนที่สะสมในต้นพืช และการแสดงออกของยีน *P5CS* จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ สภาวะเค็ม หรือได้รับ abscisic acid (ABA) แต่ระดับการแสดงออกของยีน *P5CR* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์โพรลีนเช่นกัน กลับไม่ถูกกระตุ้นด้วยสภาวะต่างๆ ดังกล่าว (Yoshiba, *et al.*, 1995) จากรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ในข้าว พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการสะสมโพรลีน (Yooyongwech *et al.*, 2012) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวกับการแสดงออกของยีน *P5CR* นอกจากนี้ยังพบว่าในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม (*Oryza sativa* cultivar DGWG) มีการแสดงออกของยีน *P5CS* และสะสมโพรลีนได้มากกว่าข้าวสายพันธุ์ที่ไม่ทนเค็ม (*Oryza sativa* cultivar IR28) (Igarashi *et al.*, 1997) และยังมีรายงานว่า การแสดงออกของยีน *P5CS* ในข้าวไรย์และข้าวฟ่าง สามารถถูกชักนำได้ด้วยไซโตคอกโลโรด ABA โพลีเอทิลีนไกลคอล และความเย็น (Cao *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2011) การศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกที่จะศึกษาการแสดงออกของยีนที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์โพรลีนเพียงหนึ่งชนิด คือ *P5CS* ซึ่งมีแนวโน้มที่จะมีความสัมพันธ์กับการสะสมโพรลีนมากกว่ายีน *P5CR*



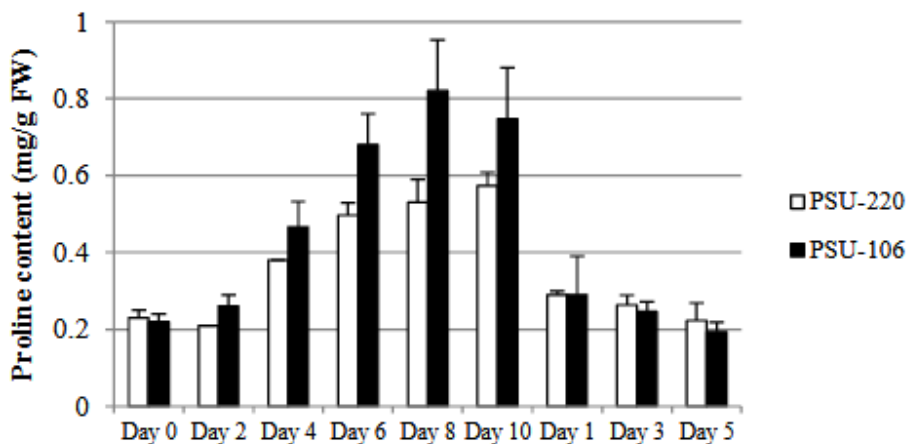
รูปที่ 2 กลไกการสังเคราะห์และสลายโพรลีนภายในเซลล์  
ที่มา: Kaur and Asthir (2015)

## การสะสมโพสลินกับการคัดเลือกพันธุ์ทนแล้ง

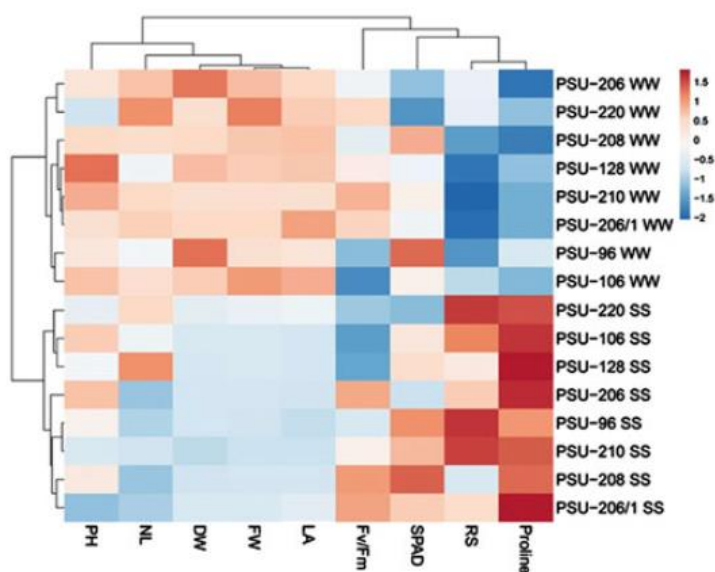
ความสามารถในการสะสมโพสลิน และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมโพสลินเมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำได้ถูกนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ทนแล้ง ในพืช เช่น ข้าว ข้าวสาลี งาม ยาสูบ และมะพร้าว เป็นต้น (Dossa, *et al.*, 2017; Gomes, *et al.*, 2010; Mwadzingeni, *et al.*, 2016; Rensburg, *et al.*, 1993; Vajrabhaya, *et al.*, 2001) โดยทั่วไปพันธุ์ทนแล้ง (tolerant genotype) จะมีความสามารถในการสะสมโพสลินมากกว่าพันธุ์อ่อนแอ (sensitive genotype) Mwadzingeni *et al.* (2016) รายงานว่า การศึกษาในข้าวสาลีจำนวน 98 สายพันธุ์ พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณผลผลิตกับการสะสมโพสลินในระหว่างการเกิดความแห้งแล้ง และสามารถคัดเลือกพันธุ์ทนแล้งได้จำนวน 12 สายพันธุ์ นอกจากนี้ Dossa, *et al.* (2017) ได้รายงานผลการศึกษาในงาจำนวน 10 พันธุ์ พบว่า เมื่อได้รับน้ำไม่เพียงพอ งามทั้ง 10 พันธุ์จะมีการตอบสนองทางด้านการเจริญเติบโต คุณภาพผลผลิต ลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมีที่เปลี่ยนแปลงไป การศึกษาความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่างๆ พบว่า ความสามารถในการสะสมโพสลินมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางบวกกับปริมาตรของราก และความสูง ซึ่งลักษณะดังกล่าวช่วยส่งเสริมให้พืชมีความทนแล้งมากขึ้น ดังนั้นในการคัดเลือกพันธุ์งาทนแล้งสามารถใช้ความสามารถในการสะสมโพสลิน ซึ่งวิเคราะห์ได้ง่ายและรวดเร็วกว่าการตรวจสอบรากเป็นตัวบ่งชี้ความทนแล้งได้

ในปาล์มน้ำมัน Cha-um, *et al.* (2013) ได้ทำการศึกษาการตอบสนองของต้นกล้าปาล์มน้ำมันต่อสภาวะขาดน้ำ พบว่า ความแห้งแล้งกระตุ้นให้ปาล์มน้ำมันมีปริมาณโพสลินในใบมากขึ้น และปริมาณโพสลินจะลดต่ำลงเมื่อต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้รับน้ำกลับ หรือเมื่อสภาวะเครียดแล้งหายไป Duangpan *et al.* (2017) ได้ทำการศึกษาการสะสมโพสลินในปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 สองกลุ่ม คือ PSU-106 และ PSU-220 ที่มีความสามารถในการทนแล้งต่างกัน นั่นคือ PSU-106 สามารถเจริญเติบโตในสภาวะขาดน้ำได้ดีกว่า PSU-220 พบว่า ในสภาวะแห้งแล้ง PSU-106 ถูกกระตุ้นให้มีการสะสมโพสลินได้เร็วกว่า และในปริมาณมากกว่า PSU-220 โดยมีปริมาณโพสลินสูงสุดที่ 8 วันหลังการงดน้ำ และเมื่อมีการให้น้ำกลับ ปริมาณโพสลินในใบลดลงจนกลับสู่สภาวะปกติภายใน 5 วัน (รูปที่ 4)

นอกจากนี้ Duangpan *et al.* (2018) ยังศึกษาการตอบสนองทางการเจริญเติบโตและสรีรวิทยาของต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 จำนวน 8 กลุ่ม ในสภาวะที่ได้รับน้ำเพียงพอ และสภาวะขาดน้ำ พบมีการตอบสนองที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม โดยการสะสมโพสลินเป็นตัวบ่งชี้หนึ่งที่สามารถแยกความสามารถในการทนแล้งของปาล์มน้ำมันได้



รูปที่ 4 แสดงการสะสมโพรลีนในปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรพย์ ม.อ. 1 คู่ผสม PSU-106 และ PSU-220 ที่มีการรดน้ำเป็นเวลา 10 วัน และให้น้ำกลับเป็นเวลา 5 วัน  
ที่มา: ดัดแปลงจาก Duangpan *et al.* (2017)



รูปที่ 5 แผนที่ความร้อน (Heat map) และการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Hierarchical clustering) สำหรับลักษณะทางการเจริญเติบโตและสรีรวิทยาของต้นกล้าปาล์มน้ำมันแต่ละคู่ผสมที่ได้รับน้ำทุกวัน (WW) กับ ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้รับน้ำทุกวันกับได้รับน้ำทุก 8 วัน (SS) โดยลักษณะที่วิเคราะห์ได้แก่ จำนวนใบ (NL) พื้นที่ใบ (LA) น้ำหนักแห้ง (DW) น้ำหนักสด (FW) อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักรากต่อน้ำหนักต้น (RS) ความสูงต้น (PH) ค่าความเขียวใบ (SPAD) ปริมาณโพรลีน (Proline) และค่า  $F_v/F_m$

ที่มา: ดัดแปลงจาก Duangpan *et al.* (2018)

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### วัสดุ / อุปกรณ์การวิจัย

#### 1. ตัวอย่างพืช

ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 จำนวน 5 คู่ผสม ได้แก่ คู่ผสม PSU- 171, PSU-177, PSU-183, PSU-222 และ PSU-223

#### 2. สารเคมี

##### 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทป์

- 100 bp DNA Ladder
- Absolute ethanol
- Agarose
- Ampicillin
- Chloroform
- Deoxyribonuclease I (DNase I)
- Diethyl pyrocabonate
- Ethidium bromide
- Glycerol
- Isoamyl alcohol
- Isopropyl alcohol
- Phenol
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- Sodium chloride
- Sodium acetate
- Tryptone
- Tris-base
- Yeast extract
- Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA)
- Taq DNA Polymerase with ThermoPol™ Buffer (BioLabs)
- Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set (BioLabs)
- E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega bio-tek, USA)
- E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit (Omega bio-tek, USA)
- Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)

## 2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

- Glacial acetic acid
- Hypophosphoric acid
- Ninhydrin
- Sulfosalicylic acid
- Toluene
- L-proline (Sigma Co.Ltd, MW 115.13)

## 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

- SYBR Green Master Mix (BioRad, USA)

## 3. แบคทีเรีย

*Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5  $\alpha$

## 4. พลาสมิดดีเอ็นเอ

ชุด T&A cloning vector (RBC Bioscience)

## 5. อุปกรณ์สำหรับการทำวิจัย

- Autoclave
- BioDrop DUO UV/VIS Spectrophotometer
- Centrifuge
- Gel electrophoresis
- Gel documentation
- Hotplate
- Micropipette
- PCR Machine
- pH meter
- Real-Time PCR Machine (ABI 7300)
- Vortex mixer
- Water bath

## 6. เครื่องมือ

-Theta probe soil moisture meter

### สถานที่ทำการทดลอง

1.1 เรือนกระจก คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

1.2 แปลงภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

### วิธีการทดลอง

#### 1. การเตรียมพืช

เตรียมเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเทเนอร่าพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 ด้วยการผสมพันธุ์ระหว่างต้นแม่ดูราและต้นพ่อฟิลิเฟอร่า ที่แตกต่างกันจำนวน 5 คู่ หลังจากนั้นนำเมล็ดมาเพาะเป็นเมล็ดตอก ย้ายลงปลูกในถุงดำขนาด 6x9 นิ้ว เมื่อดันกล้าปาล์มอายุ 3 เดือน ย้ายต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะแข็งแรงและมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันมาปลูกในถุงปลูกพลาสติกสีดำขนาดใหญ่ (ขนาด 16x18 นิ้ว) นำต้นกล้าปาล์มน้ำมันไปวางทดลองที่แปลงภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รดน้ำทุกวันเป็นเวลา 1 เดือน เริ่มการทดลองโดยแบ่งต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละคู่ผสมออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ต้น โดยกลุ่มที่ 1 รดน้ำทุกวัน กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 รดน้ำเป็นเวลา 5 วัน, 7 วันและ 10 วัน ตามลำดับ

#### 2. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน P5CS

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3 เดือน บดในโกร่งที่เติมไนโตรเจนเหลว ย้ายเนื้อเยื่อที่บดละเอียดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม TRIzol reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนใสไม่ติดตะกอนมาเติมคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร เขย่า 2-3 นาที เพื่อสกัดแยกโปรตีนปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบ/นาที (15 นาที, 4 องศาเซลเซียส) เก็บสารละลายชั้นบน (upper phase) มาเติมไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol) ปริมาตรเท่ากันเพื่อตกตะกอน RNA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน RNA ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 70% ระบายแห้งแอลกอฮอล์ ละลายด้วยน้ำ RNase-free นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ oligo (dT) ตามขั้นตอนของชุด

สำเร็จรูป Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA) ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* ด้วยเทคนิค 5' และ 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

### 3. การหาค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ

ค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ (Relative water content: RWC) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำในพืช (นิคาซล และคณะ 2555) ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทางใบที่ 3 จากต้นกล้าจำนวน 3 ต้นในแต่ละกลุ่มการทดลอง ทั้งหมด 20 กลุ่มการทดลอง ตัดเป็นชิ้นที่มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตร นำมาชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักที่ช่วงที่เซลล์เต่ง (แช่น้ำกลั่น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วางไว้ในที่มืด) น้ำหนักแห้ง (อบชิ้นส่วนใบพืชที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณโดยสูตร

$$\text{"RWC (\%)} = \text{"(FW-DW) / (TW-DW)" } \times 100\text{"}$$

โดย FW (Fresh Weight) คือ น้ำหนักสดของพืช

TW (Turgid Weight) คือ น้ำหนักพืชที่เต่งตัวเต็มที่

DW (Dry Weight) คือ น้ำหนักแห้งของพืช

### 4. การวัดปริมาณโพรลีน

วัดปริมาณโพรลีนโดยดัดแปลงวิธีของ Bates *et al.* (1973) ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบจากต้นกล้าจำนวน 3 ต้นในแต่ละกลุ่มการทดลอง ทั้งหมด 20 กลุ่มการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างใบย่อยจากทางใบที่ 3 ปริมาณ 0.5 กรัม บดใบกล้าปาล์มในไนโตรเจนเหลว แล้วนำผงตัวอย่างใบใส่ในหลอดเอฟเฟนดอร์ฟ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมกรด sulfosalicylic acid ความเข้มข้น 3% (w/v) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เติม glacial acetic acid 1 มิลลิลิตร และ ninhydrin reagent 1 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ตัวอย่างใน ice bath แล้วเติม toluene 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เมื่ออุณหภูมิของตัวอย่างเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิห้อง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วย UV-visible spectrophotometer เปรียบเทียบความเข้มข้นของโพรลีนในตัวอย่างกับโพรลีนที่ทราบความเข้มข้น

### 5. การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS*

วัดการแสดงออกของยีน *P5CS* ในต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา พันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 ทั้ง 5 คู่ผสมที่ได้ทำการทดลองงดการให้น้ำที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ งดให้น้ำ 5 วัน 7 วัน และ 10 วัน

โดยมีกลุ่มการทดลองที่รดน้ำทุกวันเป็นชุดควบคุม เก็บตัวอย่างใบเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* จากต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งหมด 20 กลุ่มการทดลอง (ทั้งหมด 5 คู่ผสม คู่ผสมละ 4 ระดับการรดน้ำ) เก็บตัวอย่างทางใบที่ 3 จำนวน 3 ต้น (3 ซ้ำ) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างปริมาณ 100 มิลลิกรัม บดในโกรงที่เติมไนโตรเจนเหลว แล้วสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีที่กล่าวข้างต้น นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ oligo (dT) ตามขั้นตอนของชุดสำเร็จรูป Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)

นำ cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์การแสดงออกด้วยวิธี quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป SYBR Green Master Mix (BioRad, USA) ปริมาตร 25  $\mu$ l และใช้ cDNA ตัวอย่างละ 500 ng โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับยีน *P5CS* โดยไพรเมอร์จะถูกออกแบบด้วยโปรแกรม Primer3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนยีนในขั้นตอนข้างต้น และทำการหาอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ (relative expression ratio) กับการแสดงออกของยีน  $\alpha$ -tubulin ซึ่งมีรายงานว่าเป็นยีนมาตรฐาน (reference gene) ที่ดีและเหมาะสมในการศึกษาการแสดงออกของยีนในปาล์มน้ำมัน (Yeap *et al.*, 2014) ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับยีน  $\alpha$ -tubulin คือ forward primer: 5' GCCTTCGAGCCATCTTCTATGAT 3' และ reverse primer: 5' AGGCAGCAAGCCATGTACTTAC 3' วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนด้วย Pfaffl method (Pfaffl, 2001) นำอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *P5CS* ของแต่ละกลุ่มการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



## ผลการทดลองและวิจารณ์

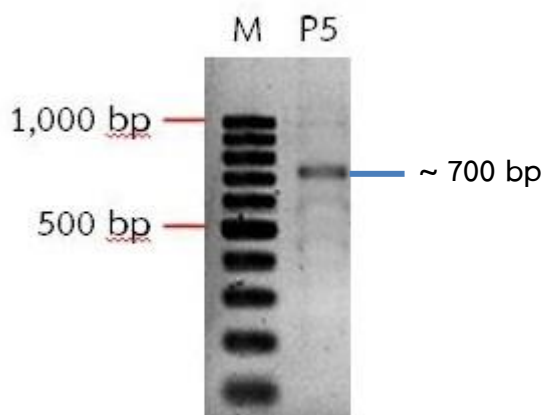
### 1. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* ในปาล์มน้ำมัน

เมื่อสกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนใบของปาล์มน้ำมันโดยดัดแปลงวิธีการจาก Venkatachalam และคณะ (1999) และนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา Reverse transcription โดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase ตามวิธีการของ Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit แล้วนั้น ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* ในพืชอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> และทำการวิเคราะห์ multiple alignment ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 เพื่อใช้ในการออกแบบ degenerated primers ซึ่งได้ออกแบบ degenerated primers ที่ใช้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Primers ที่ใช้สำหรับการโคลนยีน *P5CS*

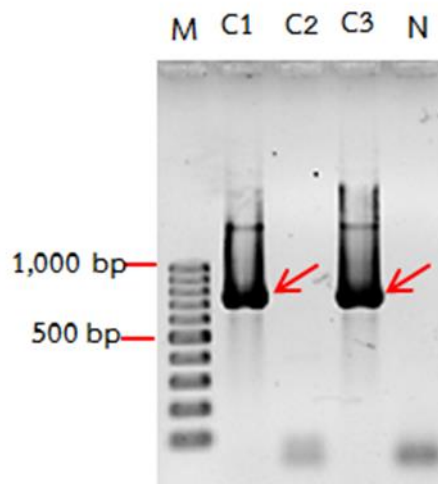
Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Tm	%GC	Product length
<b>Degenerated primers</b>					
P52_F	GAGCTMAAAGCYGATCTTCT	20	52.2	45	700
P52_R	AGWAGCCCATTCCTACTT	18	53.5	50	700
P53_F	GTGGGAATGGGCTWCTCT	18	54.2	55.6	500
P53_R	CATGGAAGTGRCAYACT	18	52.8	50	500
<b>Specific primers</b>					
EG-04	ATGGATCCCACTCGAGCTTTC				
RACE_P_F4	GTCACGACTTGATGCCTT	18	52.5	50	1260
<b>Universal primers for 3' RACE</b>					
B26	GACTCTAGACGACATCGATTTTTT TTTTTTTTTTTT	18	50.1	50	-
B25	GACTCTAGACGACATCGA				
<b>Universal primers for 5' RACE</b>					
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGG GGGGGGGGGG	20	60.1	65	-
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC				

จากการเพิ่มปริมาณยีน *P5CS* บริเวณส่วนกลางของยีน ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์หา อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า degenerated primers P52\_F และ P52\_R สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และมีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้อง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing คืออุณหภูมิ 54 °C พบว่าได้ขนาดแถบดีเอ็นเอ ประมาณ 700 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 6)



**รูปที่ 6** ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก cDNA ส่วนใบของปาล์มน้ำมัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน annealing ของไพรเมอร์ P52\_F และ P52\_R คือ 54 °C และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ GeneRuler (Thermo Scientific) 100 bp DNA Ladder (M)

หลังจากนั้นทำการสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ตามวิธีการของ E.Z.N.A® Gel Extraction Kit นำดีเอ็นเอที่ได้ เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ RBC TA cloning ทำการถ่าย โอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และทำ การคัดเลือกโคโลนีสีขาวขุ่น เพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน *P5CS* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ RBC TA cloning (pTA- *P5CS*) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์พบขนาดของชิ้นส่วนยีน ประมาณ 700 bp (รูปที่ 7) เลือกโคโลนีที่ต้องการนำส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์มาสกัดแยก ชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายผสม pTA- *P5CS* ออกจากแบคทีเรีย *E. coli* สาย พันธุ์ DH5α โดยใช้ E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I ตรวจสอบปริมาณ และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสายผสม pTA-*P5CS* ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง และนำดีเอ็นเอสายผสม pTA-*P5CS* ที่สกัดได้มา ตรวจสอบขนาดของ แถบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน นำส่งวิเคราะห์ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Integrated DNA Technologies (IDT), Inc. โดยใช้ Universal primer คือ T7 promoter โดยวิธี Sanger sequencing



รูปที่ 7 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *P5CS* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ RBC TA cloning จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler (Thermo Scientific) 100 bp DNA Ladder (M)

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *P5CS* ที่โคลนได้มีขนาด 746 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 8) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* จากปาล์มน้ำมันที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *P5CS* พืชอื่นในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม nucleotide blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่ายีน *P5CS* ที่ได้จากปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* ในปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) 99 เปอร์เซ็นต์ ลิลลี่ (*Lilium regale*) 84 เปอร์เซ็นต์ พลับพลึงแดง (*Lycoris radiata*) 83 เปอร์เซ็นต์ ต้นปลายसान (*Eurya emarginata*) 79 เปอร์เซ็นต์ และแคนตาลูป (*Cucumis melo*) 77 เปอร์เซ็นต์

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100
P52E1_T7pr : GAGCTAAAAGCCGATCTTCTTGTGTTTGGCTTACGTGATGTTGGAGGGTCTATATAGTGTCTCCTCCTGGTGAACCTCATTC AAGGATAATACATACCTTACTTAA : 100
GAGCTAAAAGCCGATCTTCTTGTGTTTGGCTTACGTGATGTTGGAGGGTCTATATAGTGTCTCCTCCTGGTGAACCTCATTC AAGGATAATACATACCTTACTTAA

*      120     *      140     *      160     *      180     *      200
P52E1_T7pr : AAGAAAAGGCATCAGGGCGAGATTACTTTTGGGGACAAGTCTAGGGTGGGAAGAGGTGGTATGACTGCTAAAAGTGAAGTCTGCAGTTTATGCTGCGTCTGC : 200
AAGAAAAGGCATCAGGGCGAGATTACTTTTGGGGACAAGTCTAGGGTGGGAAGAGGTGGTATGACTGCTAAAAGTGAAGTCTGCAGTTTATGCTGCGTCTGC

*      220     *      240     *      260     *      280     *      300
P52E1_T7pr : AGGCACCCCTGTTGTAATCATTAGTGGTTTCGCTACTGATAGCATTTATAAAAAGTACTTCAAGGGGAGAGAATTGGTACTCTGTTTCATCAGGATGCACAT : 300
AGGCACCCCTGTTGTAATCATTAGTGGTTTCGCTACTGATAGCATTTATAAAAAGTACTTCAAGGGGAGAGAATTGGTACTCTGTTTCATCAGGATGCACAT

*      320     *      340     *      360     *      380     *      400
P52E1_T7pr : TTATGGGCATTGCCAAAGAAGTTGGTGTCTATGAGATGGCAGTTTCAGCAAGGGAATGCTCCAGGCGCACTTCAGAGTGTGTTCATCAGAAGACCCGAGGA : 400
TTATGGGCATTGCCAAAGAAGTTGGTGTCTATGAGATGGCAGTTTCAGCAAGGGAATGCTCCAGGCGCACTTCAGAGTGTGTTCATCAGAAGACCCGAGGA

*      420     *      440     *      460     *      480     *      500
P52E1_T7pr : AGATTTTGTGGACATTTGCTGATGCTCTAGAGGCAAAATGAAAAATCAATCAGAAATTGAAAAATGAAGCTGATGTTGCTGCTGCACAGCAGGCTGGATATGA : 500
AGATTTTGTGGACATTTGCTGATGCTCTAGAGGCAAAATGAAAAATCAATCAGAAATTGAAAAATGAAGCTGATGTTGCTGCTGCACAGCAGGCTGGATATGA

*      520     *      540     *      560     *      580     *      600
P52E1_T7pr : GAACTCATTGATTTCTAGGTTGACCTTGAAGCCTGGAAGATATCAAGTCTCGCAAAGTCCATTCGTATACCTTCAGACATGGAAGACCCCAATAGGCCAT : 600
GAACTCATTGATTTCTAGGTTGACCTTGAAGCCTGGAAGATATCAAGTCTCGCAAAGTCCATTCGTATACCTTCAGACATGGAAGACCCCAATAGGCCAT

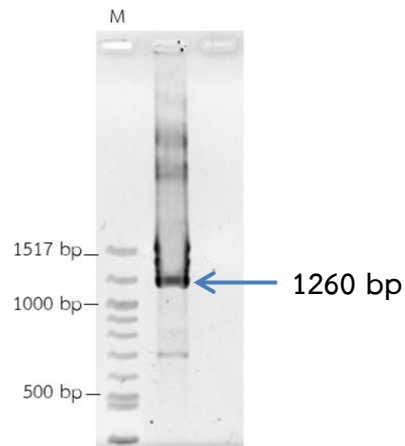
*      620     *      640     *      660     *      680     *      700
P52E1_T7pr : GTCTTGAAGAGGACAGAGCTTGACATGGACTTGTCTTAGAAAAAGACATCATGCCCCCTGGGTGTTCTCCTGATTTGTTTGTGAGTACAGACTTGTATGCCT : 700
GTCTTGAAGAGGACAGAGCTTGACATGGACTTGTCTTAGAAAAAGACATCATGCCCCCTGGGTGTTCTCCTGATTTGTTTGTGAGTACAGACTTGTATGCCT

*      720     *      740
P52E1_T7pr : TAGTTCAGATTGCATCTTTAGCAATTAGAAGTGGGAATGGGCTACT : 746
TAGTTCAGATTGCATCTTTAGCAATTAGAAGTGGGAATGGGCTACT

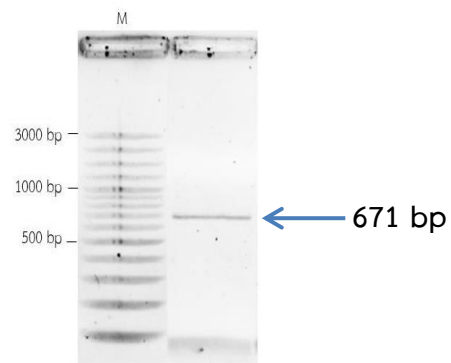
```

### รูปที่ 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* บริเวณส่วนกลางยีนมีขนาด 746 นิวคลีโอไทด์

เมื่อได้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *P5CS* บางส่วนแล้ว จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อโคลน ยีนเส้นสมบูรณ์โดยใช้เทคนิค 5'-3' RACE (ตารางที่ 1) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ 3' race ได้ ผลิตปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก specific primer RACE\_P\_F4 (forward) กับ universal primer B25 และ B26 (reverse) ซึ่งมีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1260 bp (รูปที่ 9) สำหรับ 5' ได้ผลิตปฏิกิริยาพีซีอาร์จาก specific primer EG-04 (forward) กับ RACE 2 (reverse) ซึ่งมีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 671 bp (รูปที่ 10) และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับส่วนกลางยีนได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* ในปาล์มน้ำมันขนาด 2,085 bp ค้นหาตำแหน่ง Open Reading Frame Finder (ORF) จากเว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> และ <http://reverse-complement.com/translate-protein/ROOT/> พบตำแหน่ง ORF บริเวณ frame+1 แปลงเป็นโปรตีนได้โปรตีนจำนวน 694 อะมิโนแอซิด ดังรูปที่ 11



**รูปที่ 9** ลักษณะแถบดีเอ็นเอของพาล์มน้ำมันที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Forward : RACE\_P\_F4 กับ universal primer B25 และ B26 โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA Ladder (M) (Thermo Scientific)



**รูปที่ 10** ลักษณะแถบดีเอ็นเอของพาล์มน้ำมันที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Forward : EG-04 กับ universal primer โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA Ladder (Thermo Scientific) (M)

>Frame 1.

```

1 M D P T R A F V K D V K R V I I K V G T A V V T R T D G R L
  atggatccccactcagactctttcgtaaaaggacgtcaagcgcgttataatcaagggtgggtactgctggtgtcactagaactgatgggagactg

91 A L G R L G A L C E Q V K E L N S R G F E V I L V T S G A V
  gctctgggaagacttggagctctttgtgaacaggttaaagaactaaattctcagaggcttgaagttattttggtcacttcaggtgcagtg

181 G V G R Q R L R Y R R L L N S S F A D L Q K P Q L E L D G K
  ggtgttggccggcaaaggcttagatacaggagactgcttaacagcagctttgctgatctccaaaaaccacaattagaactgggatggaaag

271 A C A A A G Q S G L M A L Y D A L F S Q L D V A S S Q L L V
  gcttgtgcccgtgctggtcagagtgccctaatggctctatatgatgccttatttagtcagctagatgtggcatcgtctcagctctctgtgc

361 T D S E F K H P D F R M Q L I Q T V N S L I A L R V I P V F
  actgatagtgagtttaagcatccagatttcaggatgcagcttattcaaaactgtgaattcattgatagctcttagagttattcctgttttc

451 N E N D A I S T R K A P Y E D S S G I F W D N D S L A A L L
  aatgaaaatgatgccatcagcactaggaaagctccatgatgaggattcttcgggtatcttttgggataatgacagtttagcagctctattg

541 A L E L K A D L L V L L S D V E G L Y S A P P G E P H S R I
  gcttggagttaaaagctgatctctgtgtttgcttagtgatgtggagggtctatatagtgctcctcctggtgaacctcattcaaggata

631 I H T Y I K E R H Q G E I T F G D K S R V G R G G M T A K V
  atacatacttacataaaaagaaagcagcagggcagagattacttttggggacaagcttaggggtgggaagaggtggtatgactgctaaaagt

721 K S A V Y A A S A G T P V V I I S G F A T D S I I K V L Q G
  aagtctcagtttatgctgcgtctgcaggcaacctggtgtaatcattagtggttttgctactgatagcattataaaagtacttcaaggg

811 E R I G T L F H Q D A H L W A L P K E V G A H E M A V S A R
  gagagaattggtactctgtttcattcaggtgacattttatgggcattgcccagaagttggtgctcatgagatggcagtttcagcaagg

901 E C S R R L Q S V S S E D R R K I L L D I A D A L E A N E K
  gaatgctccaggcagacttcagagtggtcatcagaagaccgcaggaagattttgtggacattgctgatgctctagaggcaaatgaaaa

991 S I R I E N E A D V A A A Q Q A G Y E N S L I S R L T L K P
  tcaatcagaattgaaaatgaagctgatgttctgctgcacagcaggtggatgatgagaactcattgatttctaggttgacctggaagcct

1081 G K I S S L A K S I R I L A D M E D P I G H V L K R T E L A
  ggaaagatatcaagtctcgaagtcattcgtatacttgacagacatggaagaccaataggccatgctctgaaagaggacagagcttgca

1171 D G L V L E K T S C P L G V L L I V F E S R L D A L V Q I A
  gatggacttgccttagaaaagacatcatgccccctgggtgttctcctgattgtttttgagtcacgacttgatgccttagttcagattgca

1261 S L A I R S G N G L L L K G G K E A M R S N A I L H K V I T
  tctttagcaattaggagtggaatggtcttctctcgtgaaaggtggaaggaagcagatgagatcctaatgcaatcttgcataaggttattact

1351 G A I P D T V G E K L I G L V T S R D E I P E L L K L D D V
  ggagctattccagatactgtaggtgagaagcttattgggcttggatcatcaagagatgagattcctgaattgctaaaacttgatgatgct

1441 I D L V I P R G S N K L V T Q I K E S T K I P V L G H A D G
  attgatcttgcattccaagaggttagcaataaactgttactcaaactcaaggaatctactaagattcctgttctaggtcatgctgatggc

1531 I C H V Y I D K S A D M D M A K R I V L D A K I D Y P A A C
  atctgtcatgtttatattgacaaaactcagctgacatggatattggcaagcagcttattggtatgcaaaaaatagactatcctgcagcctgt

1621 N A M E T L L I H K D L L K T K G L N D L I V Q L R G Q G V
  aatgctatggaaactccttatacataaggtatcttttgaagaccaaaagggctaaaatgatctaatagtacaacttagaggtcaagggggt

1711 T I Y G G P R A S I E L D I P R A H S F H H D N S M A C T I
  actattttatggtggacctagagcaagcattgaattagacattccacgggcacattcatttcatcatgataactcagatggcttgcactatt

1801 E I V D D V H A A I D H I H R H G S A H T D C V V A K D L D
  gaaattggtgatgatgtacatgctgcaattgaccatatacatcgtcatggaagtgcacatactgattgtgtggttgccaaggtatctcagat

1891 V A E I F F R Q V D S A A V F H N A S T R F C D G A R F G L
  gtggcagagatttttttctcgaagttgacagtgctgctgtttttcacaaatgcaagcacaogcttttgtgatggggctcgttttggactt

1981 G A E V G I S T S R I H A R G P V G V E G L L T T R W S N T
  ggtgacagaggttggtataagtacgagtaggatacatgctcagaggtcctgttgggtggtgaaggactgctaaccacacgatggagcaataca

2071 S L S S A
  agtttatcatccgct

```

รูปที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน P5CS ของปาล์มน้ำมัน

## 2. ผลของสภาวะขาดน้ำต่อต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1

### 2.1 การเตรียมต้นกล้า

หลังจากผสมปาล์มน้ำมันดูรา และพิสิเฟอรา ให้ได้คู่ผสมที่ต้องการแล้ว ทำการเพาะต้นกล้าปาล์มจากเมล็ดงอก (รูปที่ 12) และย้ายต้นกล้าปาล์มพันธุ์ลูกผสมเทเนอราพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างต้นแม่ดูรา และต้นพ่อพิสิเฟอรา ที่แตกต่างกันจำนวน 5 คู่ ได้แก่ PSU- 171, PSU-177, PSU-183, PSU-222 และ PSU-223 มาลงปลูกในถาดเพาะ และดูแลให้อยู่ภายใต้โรงเรือนที่มีวัสดุพรางแสง 60% เป็นเวลา 10 สัปดาห์ (รูปที่ 13) หลังจากนั้นย้ายลงปลูกในถุงดำขนาด 6x9 นิ้ว เมื่อต้นกล้าปาล์มอายุ 3 เดือน ย้ายต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะแข็งแรง และมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันมาปลูกในถุงปลูกพลาสติกสีดำขนาดใหญ่ (ขนาด 16x18 นิ้ว) นำต้นกล้าปาล์มน้ำมันไปวางทดลองที่แปลงภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (รูปที่ 14) เมื่อต้นกล้าปาล์มน้ำมันมีอายุ 6 เดือน ย้ายต้นกล้า ที่มีลักษณะที่แข็งแรง ไม่เป็นโรค และมีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน มาวางในเรือนกระจก (รูปที่ 15) เพื่อให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมภายในเรือนกระจกเป็นเวลา 1 เดือน ก่อนทำการทดลองงดน้ำต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยแบ่งต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละ คู่ผสมออกเป็น 4 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 10 ต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ทรีตเมนต์ เก็บตัวอย่างโดยเก็บ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น โดยให้ ทรีตเมนต์ที่ 1 รดน้ำทุกวัน ทรีตเมนต์ที่ 2, 3 และ 4 งดน้ำเป็นเวลา 5 วัน, 7 วัน และ 10 วันตามลำดับ



รูปที่ 12 เมล็ดปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 ที่ผ่านการทำลายระยะพักตัว และการทำงอกเป็นเวลา 45 วัน





รูปที่ 13 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรพย์ ม.อ. 1 อายุ 10 สัปดาห์ที่ปลูกในถาดเพาะ และผ่านการคัดเลือกลักษณะที่ผิดปกติ



รูปที่ 14 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแปลงภาควิชาพืชศาสตร์

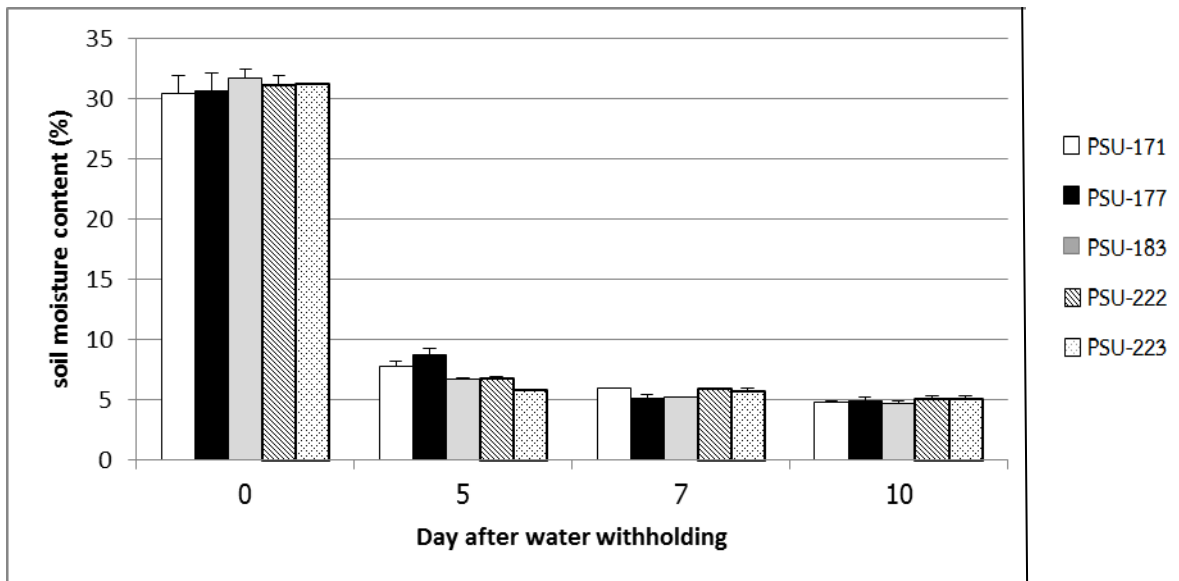




รูปที่ 15 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ทำการย้ายเข้าภายในเรือนกระจก

## 2.2 ปริมาณความชื้นดินระหว่างการทดลอง

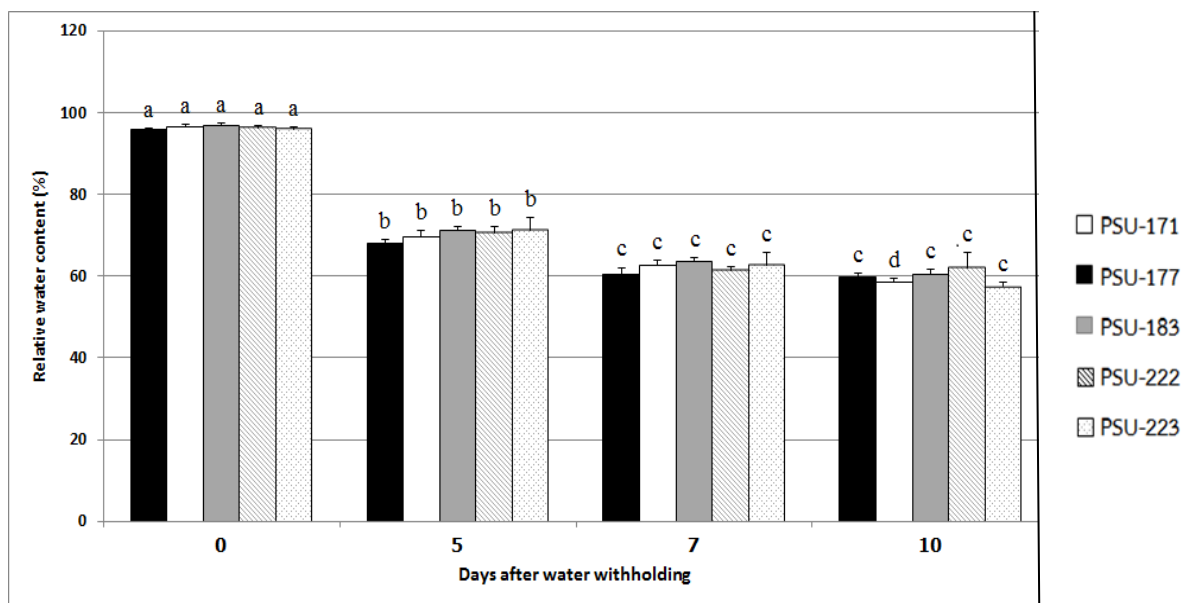
ทำการวัดปริมาณความชื้นของดินในกระถาง โดยสุ่มวัดทริตเมนต์ละ 3 กระถาง ด้วยเครื่องมือ Theta probe soil moisture meter ในวันที่ 0, 5, 7 และ 10 วันหลังเริ่มการรดน้ำ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 16 ก่อนการทดลองเริ่มรดน้ำพบว่า ดินมีความชื้นประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการรดน้ำเป็นเวลา 5 วัน พบว่า ปริมาณความชื้นในดินลดลงเหลือประมาณ 5-7 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ของความชื้นเริ่มต้น และเมื่อรดน้ำเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ปริมาณความชื้นลดลงเหลือ 5 เปอร์เซ็นต์ และคงที่เมื่อผ่านการรดน้ำเป็นเวลา 10 วัน ซึ่งปริมาณน้ำดังกล่าวส่งผลให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันอยู่ในสภาวะขาดน้ำ โดยสภาวะขาดน้ำนั้นเกิดขึ้นตั้งแต่มีการรดน้ำผ่านไป 5 วัน



รูปที่ 16 ปริมาณความชื้นของดินในกระถางต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 คู่ผสม PSU- 171, PSU-177, PSU-183, PSU-222 และ PSU-223 ที่ใช้ในการทดลองเมื่อผ่านการงดน้ำ 0, 5, 7 และ 10 วัน ตามลำดับ

### 2.3 วัดปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ของใบต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

การวัดปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ในใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน สามารถบ่งชี้ระดับในการขาดน้ำของต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ จากการเก็บข้อมูลได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ของต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 คู่ผสมเบอร์ PSU- 171, PSU-177, PSU-183, PSU-222 และ PSU-223 ที่ใช้ในการทดลองเมื่อผ่านการงดน้ำ 0, 5, 7 และ 10 วัน ตามลำดับ ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันระหว่างการงดน้ำที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในคู่ผสมเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญที่  $P \leq 0.05$  ด้วยวิธี DMRT

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ของใบต้นกล้าปาล์มน้ำมันก่อนงดน้ำมีค่าอยู่ในช่วง 96-97 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อผ่านการงดน้ำเป็นเวลา 5 วัน พบว่า ความชื้นสัมพัทธ์ของใบต้นกล้าปาล์มน้ำมันลดลงเหลือ 68-71 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นค่าประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ ของความชื้นสัมพัทธ์ในใบก่อนการงดน้ำ และลดลงอีกเล็กน้อยเมื่อมีการงดน้ำ 7 และ 10 วัน โดยพบว่า คู่ผสม PSU-177 มีค่าความชื้นสัมพัทธ์ในใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละช่วงของการงดน้ำ ในขณะที่คู่ผสมอื่น ๆ เมื่องดน้ำเป็นเวลา 7 และ 10 วันไม่มีความแตกต่างทางสถิติของค่าปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ในใบ ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างคู่ผสมเมื่อมีการงดน้ำที่ระยะต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าคู่ผสมปาล์มน้ำมันทั้ง 5 คู่ มีความสามารถในการทนแล้งใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ เมื่องดการให้น้ำเป็นเวลา 10 วันจะเห็นว่าคู่ผสม PSU-222 สามารถรักษาระดับความชื้นในใบได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับคู่ผสมอื่นๆ อาจแสดงให้เห็นแนวโน้มของลักษณะทนแล้งในคู่ผสมนี้ได้

## 2.4 การสะสมปริมาณโพรลีนของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

จากการวัดปริมาณโพรลีนจากตัวอย่างต้นกล้าปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 18) พบว่า ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 18 การวัดปริมาณโพรลีนในใบต้นกล้าปาล์มน้ำมันหลังจากเติม toluene

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณโพรลีนที่มีการสะสมและปริมาณโพรลีนที่เพิ่มขึ้นเปรียบเทียบกับปริมาณก่อนงดน้ำในต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 คู่ผสมเบอร์ PSU-171, PSU-177, PSU-183, PSU-222 และ PSU-223 เมื่อมีการงดน้ำ 0, 5, 7 และ 10 วัน ตามลำดับ (ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

Progenies	Days after water withholding							
	0		5		7		10	
	Proline accumulation ( $\mu\text{mole/g FW}$ )	Proline Increased (folds)	Proline accumulation ( $\mu\text{mole/g FW}$ )	Proline Increased (folds)	Proline accumulation ( $\mu\text{mole/g FW}$ )	Proline Increased (folds)	Proline accumulation ( $\mu\text{mole/g FW}$ )	Proline Increased (folds)
PSU-171	39.44 $\pm$ 2.73a	0	33.38 $\pm$ 15.73	0.84	75.40 $\pm$ 6.44	1.91	302.74 $\pm$ 39.27ab	7.67ab
PSU-177	37.92 $\pm$ 2.23a	0	27.51 $\pm$ 5.21	0.72	69.15 $\pm$ 5.50	1.82	473.86 $\pm$ 111.89a	12.50a
PSU-183	32.05 $\pm$ 0.50ab	0	38.49 $\pm$ 13.60	1.20	51.93 $\pm$ 13.12	1.62	198.82 $\pm$ 16.72b	6.20b
PSU-222	27.70 $\pm$ 1.48b	0	43.60 $\pm$ 13.17	1.57	54.96 $\pm$ 2.30	1.98	305.20 $\pm$ 52.75ab	11.00ab
PSU-223	31.48 $\pm$ 5.55ab	0	36.60 $\pm$ 3.12	1.16	69.72 $\pm$ 18.36	2.21	273.40 $\pm$ 31.86ab	8.70ab

หมายเหตุ : ตัวเลขค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.0

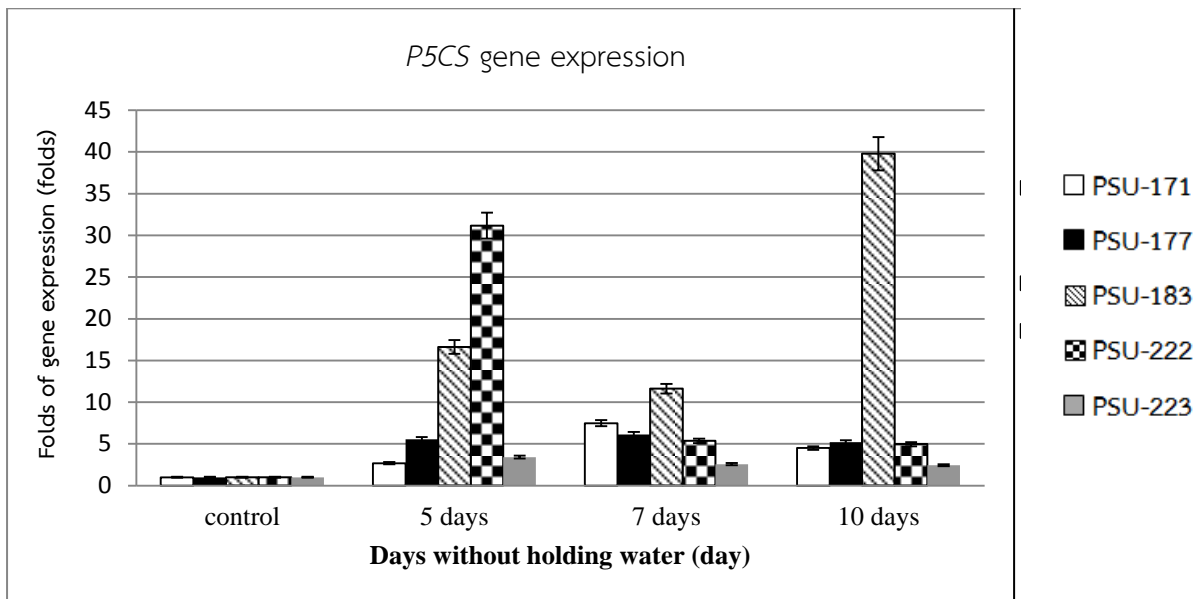
จากการวัดปริมาณโพรลีนในใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันคู่ผสม PSU- 171, PSU-177, PSU-183, PSU-222 และ PSU-223 ที่ผ่านการรดน้ำ 0, 5, 7 และ 10 วัน พบว่า ในระยะแรกที่งดการให้น้ำ ปาล์มน้ำมันทั้ง 5 คู่ผสม มีปริมาณโพรลีนอยู่ในระดับต่ำ แต่เมื่องดการให้น้ำ 7 วัน พบว่า ปาล์มน้ำมันทั้ง 5 คู่ผสม มีปริมาณโพรลีนที่เพิ่มขึ้นชัดเจน ปริมาณโพรลีนไม่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ แต่เมื่อพิจารณาปริมาณโพรลีนที่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนเท่าเปรียบเทียบกับปริมาณโพรลีนก่อนการรดน้ำ พบว่า PSU-183 มีปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นในอัตราที่ต่ำสุด และ PSU-223 มีปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นในอัตราที่สูงสุด ความแตกต่างของระดับโพรลีนจะพบได้เมื่อผ่านการรดน้ำเป็นเวลา 10 วัน โดยคู่ผสม PSU-177 มีปริมาณโพรลีนสูงสุดที่ 473.86  $\mu\text{mole/g}$  FW คิดเป็น 12 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโพรลีนก่อนการรดน้ำ และคู่ผสม PSU-183 มีปริมาณโพรลีนต่ำสุด คือ 198.82  $\mu\text{mole/g}$  FW คิดเป็น 6.2 เท่าเปรียบเทียบกับปริมาณโพรลีนก่อนการรดน้ำ การเพิ่มขึ้นของปริมาณโพรลีนเพื่อตอบสนองต่อสภาวะแล้งพบมีรายงานในพืชอื่นๆ เช่น การศึกษาในยางพาราพันธุ์ PB5/51, RRIT408 และ RRIM623 พบว่า การงดการให้น้ำกระตุ้นให้มีการสะสมปริมาณโพรลีนในใบเพิ่มมากขึ้น โดยเมื่อมีการรดการให้น้ำเป็นเวลา 7 วัน พันธุ์ PB5/51 มีปริมาณโพรลีนเพิ่มสูงกว่าพันธุ์ RRIT408 และ RRIM623 (อรรวรรณ และคณะ, 2562) ความสามารถในการสะสมโพรลีนยังสอดคล้องกับการทนแล้งในยางพาราอีกด้วย

## 2.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS*

ออกแบบไพรเมอร์ forward primers และ reverse primers สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *P5CS* ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *P5CS* ที่สามารถโคลนได้สำเร็จ เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer3 จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/> และจากการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบ พบว่า สามารถใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 3 วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

ตารางที่ 3 ชนิดของไพรเมอร์สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS*

Primers name	Sequence (5'-3')	Length	Tm	%GC	Product length (bp)
<i>Reference genes for Elaeis guineensis</i>					
$\alpha$ -tubulin_F	GCCTTCGAGCCATCTTCTATGAT	23	56.7	47.8	-
$\alpha$ -tubulin_R	AGGCAGCAAGCCATGTACTTAC	22	57.5	50	
<i>Real time PCR primers for P5CS gene</i>					
qRT_F1	AGCCGATCTTCTTGTTTTGCT	21	58.49	42.86	111
qRT_R1	TCGCCCTGATGCCTTTCTTT	20	59.96	50	



**รูปที่ 19** ระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* ของปาล์มน้ำมันในการทดลองเมื่อผ่านการงดน้ำ 0, 5, 7 และ 10 วัน ตามลำดับ ในต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์ ม.อ. 1 คู่ผสมเบอร์ PSU- 171, PSU-177, PSU-183, PSU-222 และ PSU-223

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *P5CS* โดยรวมนั้นกล่าวได้ว่าภายหลังจากมีการงดน้ำ การแสดงออกของยีน *P5CS* ในทุกคู่ผสมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแตกต่างกันออกไป โดยคู่ผสม PSU-223, PSU-171 และ PSU-177 มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน *P5CS* ไม่มากนัก หลังจากมีการงดน้ำไปแล้ว 5 วัน และการแสดงออกของยีน *P5CS* ในปาล์มน้ำมันคู่ผสมทั้งสาม มีแนวโน้มลดลงเมื่อมีการงดน้ำ 7 และ 10 วันตามลำดับ ในขณะที่คู่ผสม PSU-222 มีการแสดงออกของยีน *P5CS* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อได้รับการงดน้ำ โดยมีระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* สูงสุดที่ 5 วันหลังการงดน้ำ หลังจากนั้นการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีแนวโน้มลดลง ส่วนคู่ผสม PSU-183 มีรูปแบบการแสดงออกของยีน *P5CS* ที่แตกต่างออกไป นั่นคือ การแสดงออกของยีน *P5CS* จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อมีการงดน้ำ และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 10 วันหลังการงดน้ำ หากพิจารณาการแสดงออกของยีน *P5CS* และปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการงดน้ำ พบว่า คู่ผสม PSU-223 มีการแสดงออกของยีนไม่สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน แต่คู่ผสม PSU-171, PSU-177, PSU-183 และ PSU-222 มีการแสดงออกของยีนที่สอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้น ความสัมพันธ์ดังกล่าวไม่พบเมื่อผ่านการงดน้ำ 7 และ 10 วัน ผลการทดลองนี้มีความคล้ายคลึงกันกับผลการทดลองของ อรวรรณ และคณะ (2562) ในการงดการให้น้ำในยางพาราพันธุ์ PB5/51 จะมีการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* อย่างรวดเร็ว โดยพบการแสดงออกของยีน *P5CS* สูงสุดที่ 3 วันหลังการงดน้ำ และการแสดงออกของยีนจะลดลงเมื่อเข้าสู่การรดน้ำที่ระยะเวลา 9 และ 11



วัน แต่ในพันธุ์ RRIM623 และ RRIT408 จะมีการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของยีน *P5CS* ที่ช้ากว่า โดยในพันธุ์ RRIM623 และพันธุ์ RRIT408 จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 7 และวันที่ 9 หลังการรดน้ำ ตามลำดับ สอดคล้องกับการตรวจวัดการแสดงออกของยีน *P5CS* ในลิลลี่ พบระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อถูกชักนำให้เกิดภาวะเครียดโดยเกลือ ความแห้งแล้ง และกรดแอบซิซิก (Wang *et al.*, 2017)

## สรุป

ทั้งนี้การศึกษาในครั้งนี้พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *P5CS* กับเพิ่มขึ้นของโพรลีนเมื่อพิจารณาในวันที่ 5 หลังการรดน้ำ แต่เมื่อพิจารณาการรดน้ำ 7 วันและ 10 วัน ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว เนื่องจากคู่ผสม PSU-177 ซึ่งสะสมปริมาณโพรลีนได้สูงสุดเมื่อมีสภาวะแล้ง ไม่ได้มีการแสดงออกของยีน *P5CS* สูงสุด เมื่อเทียบกับคู่ผสมอื่นๆ ในขณะที่คู่ผสม PSU-183 ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *P5CS* สูง กลับมีปริมาณโพรลีนที่ตอบสนองต่อสภาวะแล้งต่ำสุด อาจเป็นไปได้ว่ากระบวนการสะสมโพรลีนในปาล์มน้ำมันมีเอนไซม์อื่น เช่น P5C reductase (*P5CR*) เป็นตัวแปรที่สำคัญในการกำหนดความสามารถในการสะสมโพรลีน ดังนั้น การสะสมโพรลีนของต้นกล้าปาล์มที่ช่วยส่งเสริมความสามารถในการทนแล้งจึงควรวัดจากปริมาณโพรลีนโดยตรง และในการศึกษาครั้งนี้พบว่า PSU-177 แนวโน้มทนทานต่อสภาวะแล้ง จึงควรเป็นลูกผสมที่ถูกคัดเลือกในการปลูกทดสอบต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการปาล์มน้ำมัน. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 188 หน้า.
- ธีระพงศ์ จันทรมาน ประกิจ ทองคำ ชัยรัตน์ นิสนนธ์ และธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2547. ควรให้น้ำกับปาล์มน้ำมันน้ำมันหรือไม่. จดหมายข่าวปาล์มน้ำมัน 5: 2-4.
- นิสาชล แจ้พรมมา ประสิทธิ์ ใจคิด พัทธิน สงศรี ประสาร สวัสดิ์ชิตัง ศักดา ดาดวง และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2555. การประเมินการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ และระดับมาลอนไดแอลดีไฮด์ของใบอ้อย 10 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะขาดน้ำ. วารสารแก่นเกษตร 40: 74-82.
- วิภาวี บุญยะ ตุลานนท์ ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และ สายัณห์ สดุดี. 2556. การตอบสนองของพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) ต่อการให้น้ำในระยะต้นกล้า. วารสารแก่นเกษตร 41: 111-120.
- ศาดนันทน์ สุจิตโต ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และเสาวภา ต่วงปาน. 2560. การเจริญเติบโตและปริมาณโพรงของต้นกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราในสภาวะขาดน้ำ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1: 14-18.
- อรรวรรณ แก้วรักษา เสาวภา ต่วงปาน กรกช นาคคนอง และ จรัสศรี นวลศรี. 2562. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีน *P5CS* ที่เกี่ยวข้องกับการสะสมโพรงในสภาวะขาดน้ำของต้นกล้าอย่างพารา. วารสารพืช ศาสตร์สงขลานครินทร์ 2: 22-31.
- เอกชัย พฤกษ์อำไพ. 2548. คู่มือปาล์มน้ำมัน, เพ็ท-แพล้น พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 304 น.
- Ain-Lhont, F., Zunzunegui, F. A., Diaz Barradas, M.C., Tirado, R., Clavijio A. and Novo, F.C. 2000. Comparison of proline accumulation into Mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant Soil* 230: 175-183.
- Bates, L.S., R.P. Waldren and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205-207.
- Cao, L., Han, L., Zhang, H., Xin, H., Imtiaz, M., Yi, M., Sun, Z., Ju, G., Qian, Y. and Liu, J. 2015. Isolation and characterization of pyrroline-5-carboxylate synthetase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 62.
- Cha-um, S., Yooyongwech S. and Supaibulwatana, K. 2010. Water deficit stress in the reproductive stage of four indica rice (*Oryza sativa* L.) Genotypes. *Journal of Botany* 42: 3387-3398.

- Cha-um, S., Yamada, N. Takabe, T. and Kirdmanee, C. 2013. Physiological features and growth characters of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in response to reduced water-deficit and rewatering. *Australian Journal of Crop Science* 7: 432-439.
- Corley, R. H. V. 1973. Effects of plant density on growth and yield of oil Palm. *Experimental Agriculture*. 9: 169-180.
- Corley, R. H. V. and Gray, B. S. 1976. Yield and yield components. *Oil Palm Research* 77-86.
- Dai, A. Trenberth, K. E. and Qian, T. 2004. A global data set of Palmer Drought Severity Index for 1870-2002: Relationship with soil moisture and effects of surface warming. *Journal of Hydrometeor* 5: 1117-1130.
- Dossa, K., Yehouessi, L. W., Likeng-Li-Ngue, B. C., Diouf, D., Liao, B., Zhang, X., Cissé, N. and Bell, J. M. 2017. Comprehensive screening of some west and central African sesame genotypes for drought resistance probing by agromorphological, physiological, biochemical and seed quality Traits. *Agronomy*. 7: 84.
- Duangpan, S., Sujitto, S. and Eksomtramage, T. 2017. Genotypic variation in proline accumulation during sequential drought and rewatering in response to drought preconditioning. *International Journal of Agricultural Technology* 13: 927-940.
- Duangpan, S., Buapet, P., Satanan, S. and Eksomtramage, T. 2018. Early assessment of drought tolerance in oil palm DxP progenies using growth and physiological characters in seedling stage. *Plant Genetic Resources – Characterization Plant Genetice Resources, Characterization and Utilization* 16: 544-554.
- Gomes, F. P., Oliva, M. A., Mielke, M., and Aquino, L. A. 2010. Osmotic adjustment, proline accumulation and cell membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. *Scientia Horticulturae* 126: 379-384.
- Guimarães, E. R., Mutton, M. A., Mutton, M. J. R., Ferro, M. I. T., Cristina, G. and Alberto, S. J. 2008. Free proline accumulation in sugarcane under water restriction and spittlebug infestation. *Scientia Agricola* 65: 628-633.

- Gzik, A. 1996. Accumulation of proline and pattern of amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 36: 29-38.
- Haniff, M. H. 2006. Gas exchange of excised oil palm (*Elaeis guineensis*) fronds. *Asian Journal of Plant Sciences* 5:9-13.
- Harun, M. H. 1997. Proline accumulation in the leaves of water stressed oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedling. *Elaeis* 9: 93-99.
- Igarashi, Y., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K. and Shinozaki, K. 1997. Characterization of the gene for delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Molecular Biology* 33: 857-865.
- Kaur, G. and B. Asthir. 2015. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum* 59: 609-619.
- Knipp G. and Honermeier B. 2006. Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans. *Journal of Plant Physiology* 163: 392-397.
- Mwadzingeni, L., Shimelis, H., Tesfay, S. and Tsilo, T. J. 2016. Screening of Bread Wheat Genotypes for Drought Tolerance Using Phenotypic and Proline Analyses. *Frontiers in Plant Science* 7: 1276.
- Noor, M. R. M. and Harun, M. H. 2004. Oil Palm Root Study Using the Mini-Rhizotron Technique. *Oil Palm Bulletin* 48: 17-23.
- Pfaffl, M.W. and Hageleit, M. 2001. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letter* 23: 275-282.
- Rensburg, L. V., Krüger, G. H. J. and Krüger, H. 1993. Proline accumulation as drought-tolerance selection criterion: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum* L.. *Journal of Plant Physiology* 141: 188-194.
- Singh, R., Low, E. T., Ooi, L. C., Ong-Abdullah, M., Ting, N. C., Nagappan, J., Nookiah, R., Amiruddin, M. D., Rosli, R., Manaf, M. A., Chan, K. L., Halim, M. A., Azizi, N., Lakey, N., Smith, S. W., Budiman, M. A., Hogan, M., Bacher, B., Van Brunt, A., Wang, C., Ordway, J. M., Sambanthamurthi, R. and Martienssen, R. A.

2013. The oil palm SHELL gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. *Nature* 500: 340–344. doi:10.1038/nature12356.
- Su, M. X. F., Li, X.Y., Ma, X. J., Zhao Peng, A. G. and Cheng L.Q. 2011. Cloning two *P5CS* genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. *Plant Science* 181: 652- 659.
- Suresh, K., Nagamani, C., Ramachandrudu, K. and Mathur, R. K. 2010. Gas-exchange characteristics, leaf water potential and chlorophyll a fluorescence in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings under water stress and recovery. *Photosynthetica* 48: 430-436.
- Szabados, L. and Savouré, A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89-97.
- Vajrabhaya, M., Kumpun, W. and Chadchawan, S. 2001. The Solute Accumulation: The mechanism for drought tolerance in RD23 rice (*Oryza sativa* L) Lines. *Science Asia* 27: 93-97.
- Venkatachalam, P., Thanseem, I. and Thulaseedharan, A. 1999. A rapid and efficient method for isolation of RNA from bark tissue of *Hevea brasiliensis*. *Current Science India* 77: 635-637.
- Wang, L., Z. Guo., Y. Zhang., Y. Wang., G. Yang., L. Yang., R. Wang and Z. Xie. 2017. Characterization of *LhSorP5CS*, a gene catalyzing proline synthesis in Oriental hybrid lily Sorbonne: molecular modelling and expression analysis. *Botanical Studies* 58: 1-8.
- Yeap, W., Loo, J. M., Wong, Y. C. and Kulaveerasingam, H. 2014. Evaluation of suitable reference genes for qRT-PCR gene expression normalization in reproductive, vegetative tissues and during fruit development in oil palm. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 116: 55-66.
- Yooyongwech, S., Cha-um, S. and Supaibulwatana, K. 2012. Proline related genes expression and physiological changes in *indica* rice response to water deficit stress. *Plant Omics* 5: 597-603.
- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y. and Shinozaki, K. 1995. Correlation between the induction of a gene for delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant Journal* 7: 751–760.