การโคลนและศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน MIPS (myo-inositol phosphate synthase) ในปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่า

Cloning and expression pattern study of MIPS, myo-inositol phosphate synthase gene in Tenera oil palm

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์[1,2], อนุรักษ์ อรัญญนาค[3] และ สนธิชัย จันทร์เปรม[1,2,3*]

Jirasak Wichasawasdi[1,2], Anuruck Arunyanark[3] and Sontichai Chanprame[1,2,3*]

บทคัดย่อ: สภาวะขาดน้ำเป็นปัญหาสำคัญในการปลูกปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) ยีน *myo-inositol phosphate synthase* (*MIPS*) มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาพการขาดน้ำในพืชหลายชนิดรวมถึงปาล์มน้ำมันด้วย วัตถุประสงค์การศึกษานี้เพื่อจำแนก full-length ของยีน *MIPS* (ให้ชื่อว่า *EgMIPS*) จากปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่า รวมทั้งศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนเมื่อปาล์มน้ำมันได้รับสภาพเครียดจากการขาดน้ำ พบว่า ยีน *MIPS* ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,533 คู่เบส เมื่อเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนได้โพลีเปปไทด์ขนาด 510 กรดอะมิโน เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน พบว่า มีค่าความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนจากยีน *MIPS* ในพืชอื่น ได้แก่ อินทผลัม (95%) สับปะรด (92%) ยาสูบ (91%) ข้าวโพด (90%) และอ้อย (89%) และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับยีน *MIPS*3 ในพืชอื่น เช่น อินทผลัม (*Phoenix dactylifera*) มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม 0.05 สับปะรด (*Ananas comosus*) และหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม 0.08 เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *EgMIPS* ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยวิเคราะห์จาก cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะเลียนแบบการขาดน้ำ โดยให้พืชได้รับ PEG (6000) 30% นาน 14 วัน พบว่า เมื่อได้รับสภาวะขาดน้ำ ระดับการแสดงออกของยีนในใบมีค่าลดต่ำลงทันทีเมื่อเทียบกับต้นปกติ โดยต้นที่ไม่ได้รับสภาวะขาดน้ำมีระดับการแสดงออกของยีนมากที่สุดในทุกช่วงเวลา ข้อมูลที่ได้สามารถถูกนำไปประยุกต์ใช้หาแนวทางควบคุมยีนนี้ในปาล์มน้ำมันให้มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดต่ำลงตามที่ต้องการภายใต้สภาวะขาดน้ำ หรืออาจใช้เป็นยีนเครื่องหมายค้นหาปาล์มน้ำมันพันธุ์ทนแล้งต่อไป

คำสำคัญ: ยีนตอบสนองต่อการขาดน้ำ, *MIPS*, ปริมาณ PCR, ปาล์มน้ำมัน

ABSTRACT: Water deficit stress is an important problem in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) production. *Myo-inositol phosphate synthase* (*MIPS*) gene has an important role in water deficit stress response in many plant species including oil palm. The objectives of this study were to clone the full-length of *EgMIPS* gene and to study of expression pattern of *EgMIPS* gene in

Received May 3, 2018
Accepted August 7, 2018

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand
[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology:(AG-BIO/PERDO-CHE),Bangkok 10900, Thailand
[3] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand
* Corresponding author: agrstc@ku.ac.th

Tenera oil palm subjected to water deficit stress treatments. It was found that the full length of *EgMIPS* was 1,533 bp and encoded a polypeptide of 510 amino acid residues. Sequence analysis revealed that the *EgMIPS* was high similarity to *MIPS* gene in many plant species such as *Phoenix dactylifera* (95%), *Ananas comosus* (92%), *Nicotiana tabacum* (91%), *Zea may* (90%) and *Saccharum officinarum* (89%). The phylogenetic tree analysis found that *EgMIPS* gene is closely-genetic relationship with *MIPS3* of other plants such as *Phoenix dactylifera* (genetic distance = 0.05) *Ananas comosus* and *Asparagus officinalis* (genetic distance = 0.08). Relative gene expression analysis of *EgMIPS* by using real-time PCR was done with cDNA synthesized from total RNA extracted from young leaves of oil palm under water deficit stress treatment (30% PEG 6000 solution) for 14 days. The result showed that *EgMIPS* gene expression pattern in leaves was down regulated under water deficit condition when compared with the control while the plants without water deficit stress showed highest expression level at all-time points. This data can be applied for controlling the up or down regulation of the gene in oil palm or use for developing a marker gene associated with water deficit tolerant trait in oil palm cultivar in the future.

Keywords: water deficit stress responsive gene, *MIPS*, quantitative real-time PCR, oil palm

บทนำ

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชน้ำมันที่สำคัญของโลก เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีอายุหลายปี อยู่ในวงศ์ Arecaceae มีถิ่นกำเนิดที่แอฟริกาตะวันตก และปลูกได้ในเขตร้อน (tropical areas) ของทวีปแอฟริกา เอเชีย และละตินอเมริกา (Beule et al., 2011; Sun et al., 2011) น้ำมันปาล์มใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น น้ำมันประกอบอาหาร ไบโอดีเซล เป็นต้น (Lam et al., 2009) อย่างไรก็ตาม การปลูกปาล์มน้ำมันในเขตร้อนมักประสบปัญหาสภาวะขาดน้ำ (water deficit stress) ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ที่จำกัดการเจริญเติบโตของพืชและการให้ผลผลิต การขาดน้ำทำให้อัตราการเติบโตของปาล์มน้ำมันลดลง (Sun et al., 2011) เนื่องจากการลดลงของการชักนำปากใบ ศักย์ของน้ำในใบ (วิภาวี และคณะ, 2556) ลดการสังเคราะห์แสงและการตรึงคาร์บอน (วิภาวี และคณะ, 2556; Lu et al., 2012) โดยการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและการเติบโตต่างๆ ที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากปัจจัยสภาพแวดล้อม (environmental stress) เป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน (Parmentier-Line et al., 2002) ทั้งนี้พืชทั่วไปมียีนที่ควบคุมและเกี่ยวข้องกับการขาดน้ำอยู่หลายกลุ่ม เช่น ยีนกลุ่ม osmoprotectants ยีนเกี่ยวกับการขจัดสารพิษ (detoxification) (Bray et al., 2000) การส่งสัญญาณ (signaling) (Ali et al., 2011) และระบบขนส่งสารต่างๆ (transport system) (Blumwald, 2000) นอกจากนี้ มีรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับการขาดน้ำในปาล์มน้ำมัน เช่น *EgLEA4* (Hualkasin et al., 2013; Thongin et al., 2013) *upe1* (Rival and Jaligot, 2010)

L-*myo* inositol 1-phosphate synthase (MIPS, E.C.5.5.1.4) ทำหน้าที่ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ในปฏิกิริยาขั้นต้นของการสังเคราะห์อิโนซิทอล (inositol) (Cui et al., 2013; Kaur et al., 2013) ซึ่งสารประกอบอิโนซิทอลและอนุพันธ์ (derivative) เป็นสารจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืช ช่วยให้พืชทนต่อสภาวะเครียดจากปัจจัยกายภาพ (abiotic stress) จำเป็นต่อการควบคุมการเจริญเติบโต มีความสำคัญต่อการปกป้องแรงดันออสโมติกและการเจริญเติบโตของเมล็ด (Abid et al., 2009; Cui et al., 2013; Kaur et al., 2013) มีรายงานพบการแสดงออกของยีน *MIPS* ในพืชหลายชนิดเมื่อพืชได้รับสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม (environmental stress) เช่น ถั่วเหลือง (Abid et al., 2009) ข้าวโพด ข้าว (Kaur et al., 2008) ถั่ว chick pea (Kaur et al., 2013) และยาสูบ (Kaur et al., 2008) โดยทั่วไปสามารถพบเอนไซม์ MIPS ที่ cytosol และคลอโรพลาสต์ของพืช แต่ใน Arabidopsis นอกจากพบเอนไซม์ MIPS ที่ cytosol แล้ว ยังพบในเอนโดสเปิร์มภายในเมล็ดด้วย นอกจากนี้ ในพืชหลายชนิดพบว่า ยีน *MIPS1* *MIPS2* และ *MIPS3* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ *myo-inositol 3-phosphate synthase* ที่ช่วยเปลี่ยน D-glucose 6-phosphate ไปเป็น *myo-*

inositol 3-phosphate ในขบวนการสังเคราะห์ *myo*-inositol (Abid et al., 2009; Sato et al., 2011) สำหรับการทดสอบการตอบสนองของพืชในสภาวะจำลองการขาดน้ำ Cha-um et al. (2010) รายงานไว้ว่า มีการใช้สารละลาย PEG ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดสภาวะขาดน้ำในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันมีรายงานวิจัยไม่มากนักเกี่ยวกับการที่พืชใช้ยีน *MIPS* ตอบสนองต่อการขาดน้ำ รวมทั้งการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในปาล์มน้ำมันด้วย

ดังนั้น การวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full length) ของยีน *MIPS* ในปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่า และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนดังกล่าวโดยใช้เทคนิค real-time PCR เมื่อกล้าปาล์มน้ำมันได้รับสภาวะขาดน้ำจำลอง ซึ่งจะช่วยสร้างความเข้าใจ และเพิ่มโอกาสประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้ต้านทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ในอนาคต

วิธีการศึกษา

นำกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าสายพันธุ์เทพา อายุ 12 เดือน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งได้รับอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว โดยใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุปลูก จำนวน 29 ต้น ภายใต้สภาพโรงเรือน แช่กระถางในสารละลาย 1/10 Hoagland (pH 5.6-6.5) เป็นเวลา 1 เดือน เปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก 2 วัน โดยให้ระดับของสารละลายสูงจากก้นกระถางประมาณ 1 นิ้ว เพื่อปรับสภาพต้นกล้า จากนั้นแบ่งต้นกล้าออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 21 ต้น ให้ได้รับสารละลาย polyethylene glycol (PEG 6000) 30 % (-1,400 kPa) โดยละลายสาร PEG 30 ก. ต่อสารละลาย 1/10 Hoagland ที่ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. เพื่อจำลองสภาวะขาดน้ำ และกลุ่มที่ 2 ไม่ใส่ PEG (ชุดควบคุม; -500 KPa) จำนวน 8 ต้น ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้ได้นำมาเปรียบเทียบข้อมูลกัน โดยเก็บตัวอย่างใบอ่อน ที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน หลังการได้รับหรือไม่ได้รับสาร PEG เพื่อใช้สกัด total RNA

การสกัด total RNA และสังเคราะห์ first-strand cDNA

สกัด total RNA จากตัวอย่างใบอ่อน ตามวิธีการของ Laksana and Chanprame (2015) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ total RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer 8000 (Eppendrof) ที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร และ 1.2 % agarose gel electrophoresis จากนั้นกำจัด DNAด้วยเอนไซม์ DnaseI (Promega, USA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และสังเคราะห์ first strand cDNA จาก mRNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription (ThermoScientific, USA) ร่วมกับไพรเมอร์ Oligo dt (20-mer) เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบในการโคลนยีน *MIPS*

การโคลนยีน *MIPS* จากปาล์มน้ำมัน

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ full length ของยีน *MIPS* ในปาล์มน้ำมันโดยเลือกใช้ยีน putative African oil palm *MIPS* ในฐานข้อมูล GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov) เป็นต้นแบบ ซึ่งได้ไพรเมอร์ ดังนี้ Full*EgMIPS*, F 5'-ATGTTTATAGAGAAGTTTAAGG-3' และ Full*EgMIPS*, R 5'-TCACTTGTACTCGAGGATC-3' จากนั้น สังเคราะห์ full length ของยีน *MIPS* โดยใช้ first strand cDNA ของปาล์มน้ำมันเป็นต้นแบบด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับเอนไซม์ Platinum® Hifidelity *Tag* DNA polymerase (Invitrogen, USA.) และไพรเมอร์ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Biometra T1 Thermal cycler, Germany) กำหนดปฏิกิริยา ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตที่ได้โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1.0xTBE กระแสไฟฟ้า 100 V นาน 40 นาที สกัดชิ้น DNA ที่ได้จาก agarose gel โดยใช้ QIA quick gel Extraction Kit (QIAGEN) จากนั้นโคลนชิ้นส่วน DNA บริสุทธิ์ที่สกัดได้เข้าสู่ pGEM-T easy® vector (Promega, USA)

และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E.coli*) สายพันธุ์ DH5α โดยเทคนิค heat shock เพื่อเพิ่มปริมาณ แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท Solgent company เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และชีวสารสนเทศ (bioinformatics)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ full length ของยีน *MIPS* ที่ได้จากปาล์มน้ำมันเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Mega6 (http://www.megasoftware.net/) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ProteinBlast ในฐานข้อมูล GenBank (www.blast.ncbi.nih.gov) และ clustalW2 (www.ebi.ac.uk) สร้าง phylogenetic trees ด้วยโปรแกรม Mega6 โดยวิธี neighbor-joining (bootstrap value 1,000 replicate) และวิเคราะห์hydrophobic plot ด้วยโปรแกรม TM pred (www.ch.embnet.org/software/TMPRED-form.html)

การแสดงออกของยีน *MIPS* ในปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดน้ำจำลองด้วยเทคนิค real-time PCR

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการสังเคราะห์สาย DNA สำหรับยีน *MIPS* และ *Actin* ในปาล์มน้ำมันด้วยโปรแกรม primer3 (http://simgene.com/primer3) **(Table 1)** โดยให้สาย DNA ที่สังเคราะห์ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 159 คู่เบส และ 150 คู่เบส ตามลำดับ ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *MIPS* ในใบปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดน้ำจำลองเป็นเวลา 14 วัน ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้ยีน *Actin* เป็น reference gene ใช้ cDNA ปริมาณ 300 ng เป็นต้นแบบ ร่วมกับ SensiFast SYBR No-Rox kit (Biolines, USA) และไพรเมอร์ที่แสดงใน **Table 1** ทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA Mastercycler® ep realplex4 (Eppendrof, USA) โดยใช้ปฏิกิริยา ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที จำนวน 45 รอบ โดยระดับการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ 0 วัน (control) แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ (technical replication) เก็บข้อมูลตัวอย่างใบอ่อนที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน หลังการได้รับสารละลาย PEG 6000 ความเข้มข้น 30% เพื่อจำลองสภาวะขาดน้ำ (ตามวิธีการของ Cha-um et al., 2010)

การวิเคราะห์สถิติ นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Sirichai Statistics version 7.0 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance, ANOVA) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ 95 %

Table 1 Primer for amplification of partial *EgMIPS* and *Actin* used for real-time PCR

Remark	Primer	Sequence
Amplified partial *EgMIPS* for qPCR	*MIPS*_rt1_F	5'-GGATGAGTACACCTCGGAGA-3'
	*MIPS*_rt1_R	5'-TTTCCCTCTTCCTCAGCTTT-3'
Amplified partial *Actin* for qPCR	*Actin*_rt_F	5'-AGGGAACATGGTTGATCCTC-3'
	*Actin*_rt_R	5'-TTGGTGCAGAGAGATTCAGG-3'

ผลการศึกษา

การโคลนยีน *MIPS* จากปาล์มน้ำมัน การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และชีวสารสนเทศ

การโคลนยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ first strand cDNA เป็นแม่แบบร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *MIPS* ของปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่า สามารถโคลน full length ของยีนซึ่งมีจำนวน 1,533 คู่เบส (Figure 1) และให้ชื่อว่า *EgMIPS* จากนั้นเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า ได้สายโพลีเปปไทด์ ขนาด 510 กรดอะมิโน (Figure 2) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนมาหาค่าความเหมือนด้วยโปรแกรม Protein Blast บนฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีค่าความเหมือนกับยีน *MIPS* ที่รายงานในพืชชนิดอื่น ได้แก่ อินทผลัม (XP008803742.1, 95 %) หน่อไม้ฝรั่ง (XP 020257396.1, 92 %) สับปะรด (XP 020081282.1, 92 %) กล้วย (XP009386949.1, 91 %) ยาสูบ (XP001311846.1, 91 %) มะละกอ (XP021905472.1, 91 %) องุ่น (XP010652823.1, 91 %) สปู่ดำ (NP001292951.1, 91 %) ข้าวโพด (NP001105552.1, 90 %) ข้าวสายพันธุ์ญี่ปุ่น (XP015632437.1, 90 %) อ้อย (AL050703.1, 89 %) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TMpred เพื่อวิเคราะห์ส่วนของ membrane spanning region วิเคราะห์ hydrophobic plot พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากยีน *EgMIPS* มีส่วนประกอบของ trans-membrane domain จำนวน 4 domain โดยเชื่อมต่อกันด้วย loop A-E (Figure 3)

ATGTTTATAGAGAAGTTTAAGGTGGAGAGCCCCAACGTGAAGTATGGGGAGCACAAGATCGAATCGATGTACCACTAT-
CAGACCACGGAGCTCGTCCACGAGACCCGTGATGGGTCCTACCAGTGGATCGTTAAGCCGAAGACCGTCCGATAC-
GACTTCAGGACCGATACCCGTGTTCCCAAGCTCGGGGTGATGCTGGTGGGGTGGGGAGGGAACAACGGGTCCACACTCA-
CAGCTGGAGTCATTGCTAACAGAGAGGGGATTTCATGGCGACCAAGGATAAAGTGCAGCGGGCTAACTATTATGGGTCGCT-
GACGCAGGCTTCCACAATCAGGGTCGGATCTTTTAATGGGGAGGAGATCCATGCTCCGTTTAAGAGCTTGCTTCCAATGGTTA-
ACCCAGATGATATCATCTTTGGAGGGTGGGACATAAGTAACATGAAGCTGGCTGATGCCATGGCGAGGGCCAAGGTTCTGG-
ACATAGACCTCCAGAAGCAGCTCAGGCCCTACATGGATTCCATGGTCCCTCTCCCCGGAATCTATGACCCTGATTTCATAGCT-
GCTAACCAGGGGTCACGTGCTAATAATGTGATCAAGGGGACGAAAAAGGAGCAGGTCCAACAAATCATCAAGGACATAAGG-
GTGTTTAAGGAGAAGAACAAGGTGGACAAGGTGGTGGTGCTATGGACAGCAAATACTGAAAGGTACAGCGACGTGATTGTC-
GGGCTCAATGACACTATGGAGAACCTCTTGGCTTCGTTGGACAAGAATGAGACCGAGATATCTCCATCGACTTTGTATG-
CACTTGCTTGTGTCCTAGAGAACGTTCCATTCATCAACGGAAGCCCGCAGAACACCTTTGTGCCGGGACTGATTGATCTGGC-
TATTAAGAGGAACAGTCTCATTGGTGGAGATGACTTCAAGAGTGGGCAGACAAAGATGAAGTCTGTCTTGGTGGATTTTCTTGT-
GGGAGCTGGAATCAAGCCAACTTCTATAGTCAGCTACAACCATCTCGGGAACAATGATGGCATGAATCTCTCTGCTCCA-
CAAACTTTCCGGTCGAAGGAGATCTCAAAGAGCAATGTTGTTGATGACCTGGTCTCTAGCAATAGCATAGTCTATGAGCCCG-
GGGAGCATCCAGACCATGTTATTGTCATCAAGTATGTGCCCTATGTTGGGGACAGCAAGAGGGCTATGGATGAATACACAT-
CAGAGATATTTATGGGTGGGAGGAACACAATTGTTCTTCACAACACATGTGAGGACTCTCTTCTGGCGGCACCCATCATTTTG-
GATTTGGTTTTGCTGGCTGAGCTCAGCACCAGGATTCAGCTCAAAGCTGAGGGGGAGGAAAAGTTCCACTCCTTCCATCCAGT-
GGCCACCATCTTGAGTTATCTCACCAAAGCTCCCCTTGTTCCTCCAGGCACTCCTGTTGTGAATGCCCTTGCAAAGCAGAGAG-
CCATGCTGGAGAACATCCTGCGGGCTTGCATTGGACTGGCTCCTGAGAACAACATGATCCTCGAGTACAAGTGA

Figure 1 The full-length of EgMIPS of tenera oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)

MFIEKFKVESPNVKYGEHKIESMYHYQTTELVHETRDGSYQWIVKPKTVRYDFRTDTRVPKLGVMLVGWGGNNGSTLTAGVIAN-
REGISWATKDKVQRANYYGSLTQASTIRVGSFNGEEIHAPFKSLLPMVNPDDIIFGGWDISNMKLADAMARAKVLDIDLQKQL-
RPYMDSMVPLPGIYDPDFIAANQGSRANNVIKGTKKEQVQQIIKDIRVFKEKNKVDKVVVLWTANTERYSDVIVGLNDTMENL-
LASLDKNETEISPSTLYALACVLENVPFINGSPQNTFVPGLIDLAIKRNSLIGGDDFKSGQTKMKSVLVDFLVGAGIKPTSIVSYNHL-
GNNDGMNLSAPQTFRSKEISKSNVVDDLVSSNSIVYEPGEHPDHVIVIKYVPYVGDSKRAMDEYTSEIFMGGRNTIVLHNTCEDSL-
LAAPIILDLVLLAELSTRIQLKAEGEEKFHSFHPVATILSYLTKAPLVPPGTPVVNALAKQRAMLENILRACIGLAPENNMILEYK

Figure 2 The deduced 510 amino acid residues of EgMIPS of tenera oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *EgMIPS* มาวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับยีน *MIPS* ของพืชชนิดต่างๆ ที่รายงานหมายเลขจำเพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) ในฐานข้อมูล GenBank เช่น อินทผลัม(*pdMIPS3*: XP008803742.1) สับปะรด(*AcMIPS*: OAY71391.1) กล้วยพันธุ์ malaccensis (*MaMIPS*:XP009386949.1) หน่อไม้ฝรั่ง (*AoMIPS*: XP020257396.1) ข้าวโอ๊ต (*AsMIPS*:BAB40956.2*)* ข้าวโพด (*ZmMIPS*: ONM01000.1) อ้อย (*SoMIPS*:ALO50703.1) ฝ้าย (*GhMIPS3*:XP016742292.1) มันสำปะหลัง (*MeMIPS*: XP021633433.1) อะราบิดอฟซิส (*AtMIPS*: NP196579.1) จากนั้นสร้างเป็น phylogenetic tree พบว่า โปรตีน EgMIPS จัดอยู่ในกลุ่ม Inositol phosphate synthase 3 ซึ่งยีน *MIPS* ของปาล์มน้ำมันมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับยีน *MIPS3* ในพืชบางชนิดโดยเมื่อพิจารณาจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เทียบกับยีน *EgMIPS*ซึ่งหากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมนี้มีค่าต่ำแสดงว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับยีน *EgMIPS* มากขึ้น เช่น อินทผลัม (0.05) สับปะรด และหน่อไม้ฝรั่ง (0.08) กล้วยพันธุ์ malaccensis ยางพารา และมันสำปะหลัง (0.10) ข้าวโอ๊ต อ้อย ฝ้าย ฝ้ายแดง ทุเรียน (0.11) สำหรับอะราบิดอฟซิส (0.14) และข้าวโพด(0.19) **(Figure 4)**

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *EgMIPS* ในปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค real-time PCR

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *EgMIPS* โดยเทคนิค real-time PCR ในใบอ่อนของปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะจำลองการขาดน้ำ เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *EgMIPS* มีค่าสูงสุดในชุดควบคุมหรือต้นไม่ได้รับสารละลาย PEG ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กับกลุ่มต้นที่ได้รับสารละลาย PEG ซึ่งใช้สร้างสภาวะ

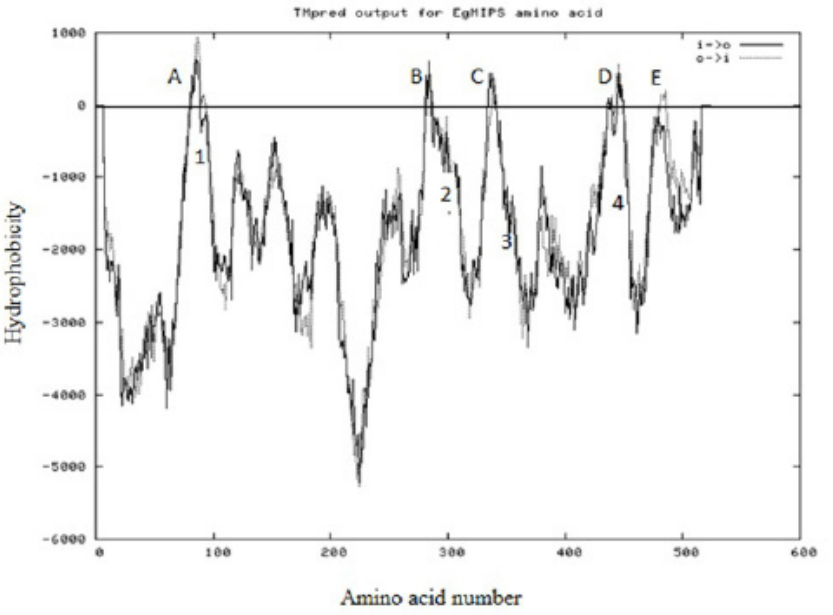


Figure 3 The hydrophobicity plot of EgMIPS amino acid sequence of tenera oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) analyzed by TM pred program. The X-axis represents the amino acid 1-510 residues. The areas above the x-axis indicate the hydrophobic amino acid residues. The protein composes of 4 hydrophobic domains.

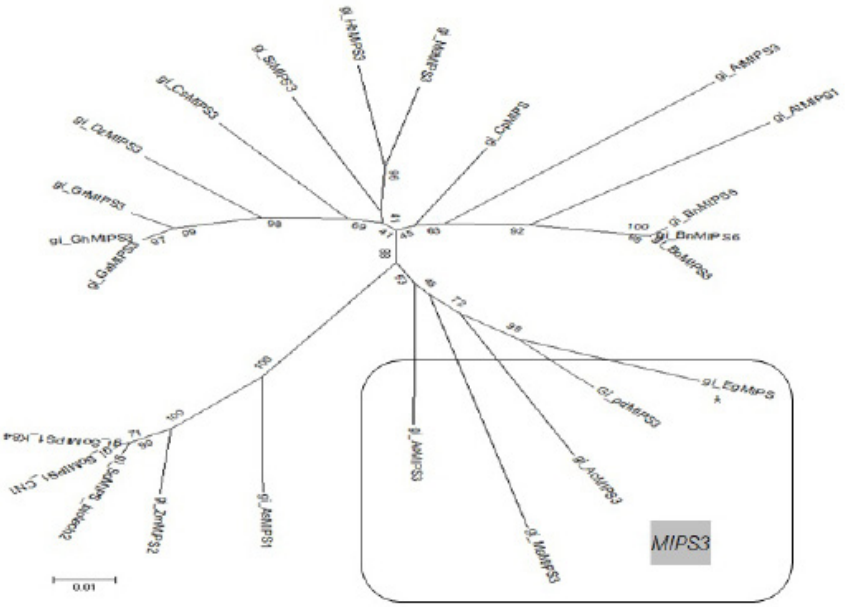


Figure 4 Phylogenetic tree among different species of plants that was constructed based on deduced amino acid sequences by neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replication using MEGA6 program.

จำลองการขาดน้ำ โดยระดับการแสดงออกของยีนมีค่าลดลงทันทีหลังได้รับสภาวะขาดน้ำ ซึ่งการแสดงออกของยีน *EgMIPS* ที่เวลา 1 วัน ถึง 14 วัน หลังได้รับสภาวะขาดน้ำ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้งนี้ ระดับการแสดงออกของยีน มีรูปแบบ down regulation กล่าวได้ว่าเมื่อปาล์มน้ำมันได้รับสภาวะขาดน้ำ ทำให้การแสดงออกของยีน *EgMIPS* ลดต่ำลงทันที เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสภาวะขาดน้ำ **(Figure 5)**

วิจารณ์

สภาวะขาดน้ำเป็นปัญหาที่สำคัญในปาล์มน้ำมัน เนื่องจากเมื่อขาดน้ำทำให้จำกัดการเติบโต ลดการสังเคราะห์แสง ลดการตรึงคาร์บอน (Sun et al., 2011; Lu et al., 2012) ยีนที่เกี่ยวกับการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในพืชได้แก่ ยีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์สารป้องกันแรงดันออสโมติก ยีนส่งสัญญาณ และยีนระบบขนส่งเคลื่อนย้ายสารต่างๆ (Blumwald, 2000; Bray et al., 2000; Ali et al., 2011) จัดเป็นกลไกตอบสนองต่อความแล้งทั้งนี้ลักษณะทนแล้งในพืชเป็นลักษณะเชิงปริมาณที่เกี่ยวกับขบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ซึ่งควบคุมโดยยีนหลายยีน (Yu et al., 2013) จึงควรมีการศึกษายีนเหล่านี้เพื่อให้เข้าใจกลไกตอบสนองต่อความแล้ง ยีน *MIPS* จัดเป็นยีนหนึ่งที่มีการแสดงออกเพื่อตอบสนองต่อการขาดน้ำและช่วยให้พืชดำรงชีวิตในสภาวะดังกล่าวได้โดยช่วยควบคุมแรงดันออสโมติก และรักษาสมดุลน้ำภายในเซลล์ (Abid et al., 2009; Cui et al., 2013; Kaur et al., 2013) สารที่มีบทบาทเกี่ยวกับการควบคุมแรงดันออสโมติก ได้แก่ น้ำตาล sugar polyol (Harfouche et al., 2014) ซึ่งอยู่ในรูปของน้ำตาลอิโนซิทอล (inositol) ในการสังเคราะห์น้ำตาลนี้ถูกควบคุมโดยยีน *MIPS* ซึ่งอยู่ในกลุ่มยีน *Inositol phosphate synthase* (*Ips*)

จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถจำแนกยีน *MIPS* จากปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าและให้ชื่อว่า *EgMIPS* โดยเป็นยีนที่มีขนาด 1,533 คู่เบส เมื่อแปลรหัสให้เป็นโปรตีนได้เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 510 กรดอะมิโน จากผลการวิเคราะห์ hydrophobic plot ด้วยโปรแกรม TM pred พบว่า

แก่นเกษตร 47 (1) : 51-62 (2562). /doi: 10.14456/kaj.2019.4

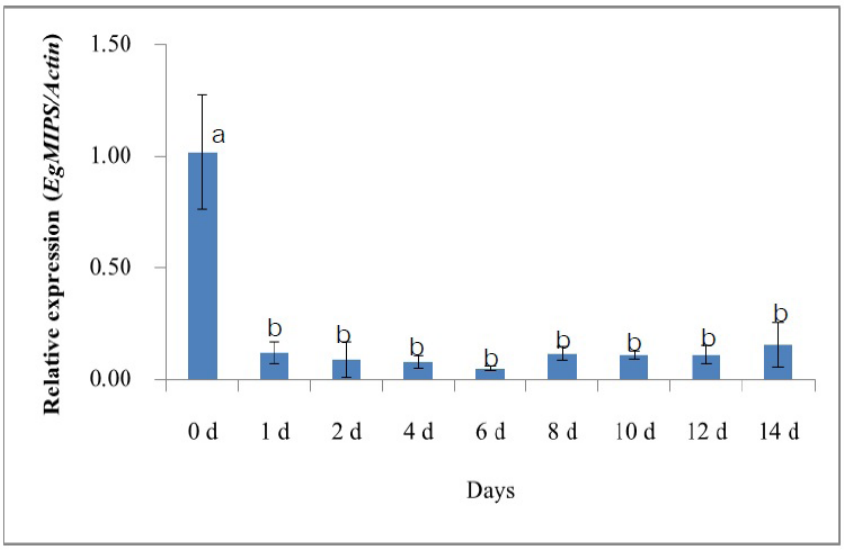


Figure 5 Relative expression of EgMIPS gene in leaves of tenera oil palm (Elaeis guineensis jacq.) under water deficit stress that receiving 30% PEG6000 for 14 days (mean ± SD). Different letters on the boxes indicate significant difference at P<0.05 according to DMRT.

โปรตีน MIPS มีส่วนประกอบของ trans-membrane domain จำนวน 4 โดเมน โดยเชื่อมต่อกันด้วย loop A-E ทั้งนี้ หน้าที่ MIPS นอกจากมีหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ inositol และเป็นโคแฟกเตอร์ (co factor) ทำงานร่วมกับ NAD^+ แล้วยังมีบทบาทหน้าที่ สำคัญคือ ส่งเสริมการเป็นโคแฟกเตอร์ของตัวรับ auxin (*TIR1*) โดยโปรตีน MIPS ควบคุมและส่งเสริมการกระจายตัวของ auxin และการเคลื่อนย้ายของสารออกซิน (Chen and Xiong, 2010) มีรายงานว่า โปรตีน MIPS มีโครงสร้างส่วนประกอบเป็นกลุ่มเมมเบรนรวมอยู่ด้วย (membrane association of *MIPS*) โดย *MIPS* ที่มีองค์ประกอบเป็นเมมเบรนเพื่อทำหน้าที่เป็น co-filter ซึ่งโครงสร้างดังกล่าว ช่วยส่งเสริมให้ MIPS ทำงานร่วมกับ endoplasmic reticulum (ER) ได้ดีขึ้น (Chen and Xiong, 2010) อย่างไรก็ตาม โปรตีนที่เกิดจากยีน *EgMIPS* ที่กล่าวมาข้างต้นนี้ มีความแตกต่างจากโปรตีนในกลุ่ม Major intrinsic protein หรือ MIP super family (MIPs) โดยโปรตีนกลุ่ม MIPs อยู่ในรูปช่องทาง (protein channel) ส่งเสริมการลำเลียงสาร และช่วยลำเลียงส่ง substrate ต่างๆ ข้ามระหว่างเซลล์เมมเบรน (Shivaraj et al., 2017) สำหรับโปรตีนในกลุ่มแฟมิลีของ MIPs ได้แก่ โปรตีน aquaporins (AQPs) ซึ่ง AQPs เป็นโปรตีนเมมเบรนที่มีขนาดเล็ก 21-34 kDa ทำหน้าที่ส่งเสริมการเคลื่อนย้ายสารตัวถูกละลายโมเลกุลเล็กระหว่างเซลล์เมมเบรน เช่น สารยูเรีย แอมโมเนีย กลีเซอรอล กรดบอริก CO_2 และ H_2O_2 เป็นต้น (Shivaraj et al., 2017) ทั้งนี้ AQPs มี 6 trans-membrane และมีเกลียว helix ที่มีลักษณะ 5 loops ช่วยลำเลียงน้ำและลำเลียงสารโมเลกุลเล็กผ่านชั้นเมมเบรน lipid bilayer สำหรับแฟมิลียีนในกลุ่มย่อยของ AQPs ได้แก่ *NIP SIP XIP TIP* และ *PIP* super family (Shivaraj et al., 2017) รวมทั้ง ยีน *NIP6;1* และ *NIP5;1* ที่มีบทบาทเป็นช่องทางส่งเสริมการเคลื่อนย้ายโบรอนในปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้ ลักษณะที่พบเฉพาะในโปรตีน AQPs คือ มีส่วนของ NPA (Asn-Pro-Ala) boxes (อัญชนา และคณะ, 2560) โดย NPA motif มีหน้าที่ส่งเสริมการสร้างรูพรุนสำหรับการเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกของน้ำ (Ishibashi, 2006) อย่างไรก็ตาม โครงสร้างยีน *EgMIPS* ในปาล์มน้ำมัน ไม่พบ NPA boxes สะท้อนว่า *EgMIPS* ไม่เป็นโปรตีน AQPs จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสร้างเป็น phylogenetic tree โดยเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *EgMIPS* และ *MIPS* ที่รายงานในพืชหลายชนิด แสดงให้เห็นว่า ยีน *EgMIPS*

มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน *pdMIPS3* ในอินทผาลัม *AcMIPS3* ในสับปะรด *MaMIPS3* ในกล้วยพันธุ์ malaccensis และ *AoMIPS*3 ในหน่อไม้ฝรั่ง (Figure 4) โดย ยีน *MIPS และ IPS* ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและควบคุมการสังเคราะห์น้ำตาล inositol กับอนุพันธ์ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืช ช่วยให้ทนต่อสภาวะเครียดจากปัจจัยกายภาพ ควบคุมการเจริญเติบโต และควบคุมแรงดันออสโมติกในสภาวะเครียด (Kaur et al., 2013; Cui et al., 2013) ช่วยปกป้องโครงสร้างของโปรตีนและเมมเบรน (Harfouche et al., 2014) เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inositol phosphate (Chappell et al., 2006)

ในการศึกษานี้ พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *MIPS* ในปาล์มน้ำมันที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำนาน 14 วัน ลดต่ำลงเมื่อเทียบกับต้นปกติ โดยลดลงทันทีหลังจากได้รับสภาวะแล้งจำลอง 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cui et al. (2013) ที่พบว่าสามารถชักนำให้ยีน *MIPS* ใน *Actinidia* แสดงออกได้ตั้งแต่ภายในเวลา 24 ชั่วโมงนับจากได้รับสภาวะแล้ง การลดลงของระดับการแสดงออกของยีนนี้สอดคล้องกับงานวิจัย Jiang et al. (2012) ที่พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *MIPS* ในข้าวโพดลดลงเมื่อข้าวโพดได้รับสภาวะขาดน้ำและยังพบด้วยว่าการแสดงออกของยีนนี้อาจมีค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงขึ้นกับระยะการเติบโตและส่วนของพืช เช่นเดียวกับ Chun et al. (2003) ที่รายงานว่าการแสดงออกของยีน *MIPS* ในงา (sesame) ลดลงเมื่อได้รับสภาวะเครียดจากความเค็ม แต่ยีนนี้มีการแสดงออกมากในเมล็ดที่กำลังเติบโตและใบ ส่วนลำต้นและรากแสดงออกน้อย การแสดงออกของยีนแบบลดลง (down regulate) เมื่อได้รับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำอาจเนื่องจากพืชนี้มีกลไกของ *gluose-6-phosphate dehydrogenase* (*G6PD*) และฟอสโฟโปรตีน (phospho protein) เพื่อควบคุมการสังเคราะห์ inositol และขบวนการสร้าง ATP โดยเมื่อพืชสร้าง ATP ได้มากขึ้นจะทำให้มีพลังงานภายในเซลล์มากขึ้น ส่งผลให้พืชทนต่อสภาวะเครียดได้มากขึ้นด้วย รวมทั้งอาจมีโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ เช่น protein kinase และ transcription factor ทำหน้าที่ควบคุมให้ *G6PD* มี activity เพิ่มมากขึ้น (Ling Ho, 2014;Santo et al., 2012) ส่งผลให้ยีน *MIPS* มีระดับการแสดงออกลดลง ซึ่งเมื่อกิจกรรมของ *G6PD* เพิ่มขึ้นจะช่วยลดปริมาณ ROS (reactive oxygenase species) เมื่อค่า ROS ลดลง ช่วยให้พืชมีความทนทานต่อความเครียด (Santo et al., 2012)

สรุป

การจำแนกยีน *EgMIPS* ในปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าที่ได้รับสภาวะขาดน้ำจำลอง พบว่ายีนนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,533 คู่เบส เมื่อแปลงเป็นโปรตีนจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 510 กรดอะมิโน เมื่อตรวจสอบความเหมือนของยีนที่แยกได้นี้กับข้อมูลยีนในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายกับยีน *MIPS* ในอินทผาลัม สับปะรด หน่อไม้ฝรั่ง และกล้วยบางสายพันธุ์ และเมื่อนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีนโดยใช้ข้อมูลชีวสารสนเทศร่วมกับการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนเมื่อปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดน้ำซึ่งจำลองโดยใช้สารละลาย 1/10 Hoagland ที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้น 30% เป็นเวลา 14 วัน พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *EgMIPS* ในใบมีค่าลดต่ำลงทันทีเมื่อเทียบกับต้นปกติ กล่าวได้ว่า เมื่อปาล์มน้ำมันได้รับสภาวะขาดน้ำทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *EgMIPS* มีรูปแบบ down regulation

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

วิภาวี บุญยะตุลานนท์, ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ และสายัณห์ สดุดี. 2556. การตอบสนองของพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) ต่อการให้น้ำในระยะต้นกล้า. แก่นเกษตร 41(2): 111-120.

อัญชนา รอดรังนก, กนกวรรณ เที่ยงธรรม, และสนธิชัย จันทร์เปรม. 2560. การจำแนก และรูปแบบการแสดงออกของยีน *NIP6;1* (Boric acid channel for preferential transport of boron) ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า. ว.วิทย. กษ. 48(2): 174-185.

Abid, G., S. Silue, Y. Muhovski, J.M. Jacquemin, A. Toussaint, and J.P. Baudoin. 2009. Role of *myo-inositol phosphate synthase* and sucrose synthase genes in plant seed development. Gene. 439(1-2): 1-10.

Ali, Q., M. Ehahi, B. Hussain, N.H. Khan, F. Ali, and F. Elahi. 2011. Genetic improvement of maize (*Zea mays* L.) against drought stress: An overview. Agri. Sci. Res. J. 1: 228-237.

Beule, T., C. Camps, S. Debiesse, C. Tranchant, S. Dussert, X. Sabau, E. Jaligot, S.S.R.S. Alwee, and J.W. Tregear. 2011. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with the mantled homeotic flowering abnormality in oil palm. Tree Genet. Genomes. 7(1): 169-182.

Blumwald, E. 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. Curr. Opin. Cell Biol.12(4): 431-434.

Bray, E.A., J. Bailey-Serres, and E. Weretilnyk. 2000. Responses to abiotic stresses.P. 1158-1249. In: W. Gruissem, B. Buchannan, and R. Jones (eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville.

Chappell, A.S., A.M. Scaboo, X. Wu, H. Nguyen, V.R. Pantalone, and K.D. Bilyeu. 2006. Characterization of the *MIPS* gene family in *Glycine max*. Plant Breed. 125(5): 493-500.

Cha-um, S., T. Takabe, and C. Kirdmanee. 2010. Osmotic potential, photosynthetic abilities and growth characters of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings in responses to polyethylene glycol-induced water deficit. Afr. J. Biotechnol. 9(39): 6509-6516.

Chen, H. and L. Xiong, 2010. *Myo*-Inositol-1-phosphate synthase is required for polar auxin transport and organ development. J. Biol. Chem. 285(31): 24238-24247.

Chun, J.A., U.H. Jin, J.W. Lee, Y.B. Yi, N.I. Hyung, M.H. Kang, J.H. Pyee, M.C. Suh, C.W. Kang, H.Y. Seo, S.W. Lee, and C.H. Chung. 2003. Isolation and characterization of a *myo-inositol 1-phosphate synthase* cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. Planta. 216(5): 874-880.

Cui, M., D. Liang, S. Wu, F. Ma, and Y. Lei. 2013. Isolation and developmental expression analysis of *L-myo-inositol-1-phosphate synthase* in four *Actinidia* species. Plant Physiol. Biochem. 73: 351-358.

Harfouche, A., R. Meilan, and A. Altman. 2014. Molecular and physiological responses to abiotic stress in forest trees and their relevance to tree improvement. Tree Physiol. 34(11): 1181-1198.

Hualkasin,W., W. Thongin, K. Petsean, A. Phongdara, and A. Nakkaew. 2013. Molecular cloning and characterization of the late embryogenesis abundant group 4 (*EgLEA4*) gene from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Songklanakarin J. Sci. Technol. 35(3): 275-285.

Ishibashi, K. 2006. Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. Biochim.Biophys. Acta.1758: 989-993.

Jiang, T., J. Fountain, G. Davis, R. Kemerait, B. Scully, R.D. Lee, and B. Guo. 2012. Root morphology and gene expression analysis in response to drought stress in maize. Plant Mol. Biol. Rep. 30(2): 360-369.

Kaur, H., P. Verma, B.P. Petla, V. Rao, S.C. Saxena, and M. Majee. 2013. Ectopic expression of the ABA-inducible dehydration-responsive chickpea L-*myo*-inositol 1-phosphate synthase 2 (*CaMIPS2*) in Arabidopsis enhances tolerance to salinity and dehydration stress. Planta.237 (1): 321-335.

Kaur, H., R.K. Shukla, G. Yadav, D. Chattopadhyay, and M. Majee. 2008. Two divergent genes encoding L-*myo*-inositol 1–phosphate synthase 1 (*CaMIPS1*) and 2 (*CaMIPS2*) are differentially expressed in chickpea. 2008. Plant Cell Environ. 31(11): 1701-1716.

Laksana, C. and S. Chanprame. 2015. A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaf of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). ISSAAS. 21(1): 96-106.

Lam, M. K., K.T. Tan, K.T. Lee, and A.R. Mohamed. 2009. Malaysian palm oil: Surviving the food versus fuel dispute for a sustainable future. Renew. Sustain. Energy reviews. 13(6-7): 1456-1464.

Ling Ho, H. 2014. Plant protein kinase and protein-protein interaction. J. Biodivers Biopros. Dev. 2(1): 15.

Lu, Y., J. Xu, Z. Yuan, Z. Hao, C. Xie, X. Li, T. Shah, H. Lan, S. Zhang, T. Rong, and Y. Xu. 2012. Comparative LD mapping using single SNPs and haplotypes identifies QTL for plant height and biomass as secondary traits of drought tolerance in maize. Mol. Breed. 30(1): 407- 418.

Parmentier-Line C.M., G.R. Panta, and L.J. Rowland. 2002. Changes in dehydrin expression associated with cold, ABA and PEG treatments in blueberry cell cultures. Plant Sci. 162(2): 273-282.

Rival, A. and E. Jaligot. 2010. Oil palm biotechnologies are definitely out of infancy. O.C.L.17(6): 368-374.

Santo, S.D., H. Stampfl, J. Krasensky, S. Kempa, Y. Gibon, E. Petutschnig, W. Rozhon, A. Heuck, T. Clausen, and C. Jonak. 2012. Stress-induced *GSK3* regulates the redox stress response by phosphorylating glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. Plant Cell. 24(8): 3380- 3392.

Sato,Y., K. Yazawa, S. Yoshida, M. Tamaoki, N. Nakajima, H. Iwai, T. Ishii, and S. Satoh. 2011. Expression and functions of *myo-Inositol monophosphatase* family genes in seed development of Arabidopsis. J. Plant Res. 124(3): 385-394.

Shivaraj, S.M., R.K. Deshmukh, R. Rai,R. Belanger, P.K. Agrawal, and P.K Dash. 2017. Genome-wide identification, characterization, and expression profile of Aquaporin gene family in Flax. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406838. Accessed Jan.10, 2018.

Sun, C.X., H.X. Cao, H.B. Shao, W.T. Lei, and Y. Xiao. 2011. Growth and physiological responses to water and nutrient stress in oil palm. Afr. J. Biotechnol. 10(51): 10465-10471.

Thongin, W., A. Nakkaew, W. Wanna, and A. Phongdara. 2013. Sequence analysis of drought-tolerance (*EgLEA4*) gene from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). Thai J. Genet. 1(S.1): 266-269.

Yu, X., G. Bai, S. Liu, N. Luo, Y. Wang, D.S. Richmond, P.M. Pijut, S.A. Jackson, J. Yu, and Y. Jiang. 2013. Association of

candidate genes with drought tolerance traits in diverse perennial ryegrass accessions. J. Exp. Bot. 64(6): 1537-1551.