

การจำแนก และรูปแบบการแสดงออกของยีน *EgBADH2* (*Betaine aldehyde dehydrogenase*) ในปาล์มน้ำมันพันธุ์เทนอรา

Identification and Expression Pattern of *EgBADH2*, *Betaine aldehyde dehydrogenase* in Tenera Oil Palm

จิระศักดิ์ วิชาสวัสดิ์^{1,2} อรุณรักษ์ อรุณยานาร์ก³ และสนธิชัย จันทน์เปรม^{1,2,3*}
Jirasak Wichasawasdi^{1,2}, Anuruck Arunyanark³ and Sontichai Chanprame^{1,2,3*}

บทคัดย่อ

ยีน *BADH* (*betaine aldehyde dehydrogenase*) มีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในวิถีการสังเคราะห์ glycine betaine (GB) ซึ่ง GB เป็นสารในกลุ่ม osmoprotectant ที่พบในพืชชั้นสูง ถูกผลิตขึ้นและสะสมในเซลล์ภายใต้สภาวะเครียดจากการขาดน้ำ วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อจำแนก full-length ของยีน *EgBADH2* จากปาล์มน้ำมันพันธุ์เทนอรา และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนนี้ภายใต้สภาวะที่ปาล์มขาดน้ำ จากผลการศึกษา พบว่า ยีน *EgBADH2* ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ ขนาด 1,512 คู่เบส และเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 503 กรดอะมิโน เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่า *EgBADH2* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน *BADH2* ในพืชหลายชนิด เช่น มะพร้าว อินทผลัม กล้วยพันธุ์ *malaccensis* และสับปะรด สำหรับรูปแบบการแสดงออกของยีน *EgBADH2* เมื่อปาล์มน้ำมันได้รับสภาวะขาดน้ำจำลองนาน 14 วัน พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *EgBADH2* ในช่วงเวลา 0, 1 และ 2 วัน หลังจากขาดน้ำ ยีนมีการแสดงออกเป็น 1 ± 0.04 , 0.87 ± 0.07 และ 0.74 ± 0.53 ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการแสดงออกของยีนในวันที่ 4 ถึง 14 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สรุปว่า รูปแบบการแสดงออกของยีน *EgBADH2* เป็นแบบลดลง เมื่อต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้รับสภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 14 วัน

คำสำคัญ: ยีนตอบสนองต่อการขาดน้ำ โพลีเอทิลีนไกลคอล เรียลไทม์ พีซีอาร์ ปาล์มน้ำมัน

Abstract

The *Betaine aldehyde dehydrogenase* (*BADH*) is a gene controlling the synthesis of an enzyme in the glycine betaine (GB) biosynthesis pathway. GB is an osmoprotectant that is found in higher plants that synthesize and accumulate it in cells in response to drought stress. The objectives of this study were to clone the full-length of the *EgBADH2* gene of the Tenera oil palm and to study the expression pattern of this gene in the oil palm under conditions of water deficit. The results indicated that the full length of the *EgBADH2* gene was 1,512 bp and it encoded a protein of 503 amino acid residues. From the phylogenetic tree analysis performed, it was found that the *EgBADH2* gene is closely related to the *BADH2* gene, which is present in a range of plants including *Cocos nucifera*, *Phoenix dactylifera*, *Musa acuminata* 'malaccensis' and *Ananas comosus*. The gene expression pattern analysis of 14 days water deficit stressed oil palm plants indicated that the expression levels of the gene after 0, 1 and 2 days of stress were 1 ± 0.04 , 0.87 ± 0.07 and 0.74 ± 0.53 , respectively, results which were not significantly different. However, significant differences of gene expression levels at the 95% confidence interval were observed for plants subject to between 4 and 14 days of water deficit stress. Therefore, the expression of the *EgBADH2* gene was reduced when the oil palm seedlings were subject to water deficit stress for about 14 days.

Keywords: water deficit stress responsive gene, PEG, real-time PCR, oil palm

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900

³ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

*Corresponding author, Email: agtstc@ku.ac.th

คำนำ

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชน้ำมันที่สำคัญของโลก มีถิ่นกำเนิดที่แอฟริกาตะวันตก และปลูกได้ในเขตร้อนของทวีปแอฟริกา เอเชีย และลาตินอเมริกา (Beule et al., 2011; Sun et al., 2011) น้ำมันปาล์มใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง เช่น น้ำมันประกอบอาหาร ไบโอดีเซล เป็นต้น (Lam et al., 2009) น้ำเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช หากพืชได้รับน้ำในปริมาณที่จำกัดจะทำให้เกิดสภาวะเครียด (abiotic stress) และส่งผลกระทบต่อผลผลิต (Rodriguez et al., 2006) สภาวะขาดน้ำ (water deficit) จะจำกัดการเจริญเติบโต และทำให้ผลผลิตลดลง เนื่องจากการสังเคราะห์แสงและตรึงคาร์บอนลดลง (Sun et al., 2011; Lu et al., 2012) โดยการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และการเจริญเติบโตเพื่อตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Parmentier-Line et al., 2002) พืชมีเยื่อที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำหลายกลุ่มยีน (Yu et al., 2013) เช่น ยีนกลุ่ม osmoprotectants ยีนขจัดสารพิษ (detoxification) (Bray et al., 2000) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (Ali et al., 2011) ระบบขนส่งสารต่าง ๆ (Blumwald, 2000) ในปาล์มน้ำมันมีรายงานยีนที่แสดงออกในสภาวะขาดน้ำ เช่น *EgLEA4* (Hualkasin et al., 2013) *upe1* (Rival and Jaligot, 2010) เมื่อพืชขาดน้ำ โปรตีนเหล่านี้จะทำหน้าที่ปกป้องโครงสร้างภายในเซลล์โดยปรับสมดุลออสโมติก สร้างสารออสโมไลต์ และยับยั้งเอนไซม์ protease ปกป้องโปรตีนเมมเบรน รวมทั้งสะสมสารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่เรียกว่า compatible solutes (Sithtisarn et al., 2009) ยีนหนึ่งที่มีบทบาทในสภาวะขาดน้ำของพืชคือยีน *betaine aldehyde dehydrogenase (BADH)* ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ glycine betaine (GB) ซึ่ง GB จัดเป็น osmoprotectant ชนิดหนึ่ง (Amudha and Balasubramani, 2011) จะถูกผลิตขึ้นในสภาวะเครียดจากแรงดันออสโมติก (Liu et al., 2010) โดยในพืชหลายชนิดมีการสะสม GB เมื่อพืชได้รับสภาวะขาดน้ำและในพืชทนเค็ม (Sithtisarn et al., 2009; Wang et al., 2016) การสังเคราะห์ GB เริ่มจากขบวนการออกซิเดชันของสารประกอบ choline เป็น betaine aldehyde (BA) โดยเอนไซม์ choline monooxygenase (CMO) แล้ว BA จะถูกเปลี่ยนไปเป็น GB โดยเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) ทั้งนี้ เมื่อมีการสะสม GB มากขึ้น ทำให้ระดับโปรตีนและ mRNA ของยีน *BADH* มีเพิ่มขึ้นด้วย มีรายงานการใช้ GB เป็นตัวบ่งชี้ว่าพืชทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเค็ม โดยถ้าพืชมีระดับ GB สูงขึ้น บ่งชี้ได้ว่าพืชมีความทนเค็มมากกว่า ทั้งนี้ ปริมาณ GB ที่สะสมขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือและจำนวนครั้งที่ได้รับเกลือด้วย (Sithtisarn et al., 2009) ยีน *BADH* อาจอยู่ในรูปยีนที่ประกอบด้วยกลุ่มยีนขนาดเล็กหลายยีน (small multi-gene family) เช่น ข้าวบาร์เลย์ มียีน *BADH* 2 หรือ 3 ยีน เป็นต้น (Wang et al., 2016)

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนก full-length ของยีน *EgBADH2* และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนนี้ในปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอราภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยใช้เทคนิค real-time PCR การศึกษานี้จะทำให้เข้าใจถึงขบวนการปรับตัว และตอบสนองของปาล์มน้ำมันต่อสภาวะขาดน้ำ ซึ่งมีความสำคัญต่อการจัดการระบบผลิตปาล์มน้ำมันในพื้นที่น้ำน้อย และอาจใช้ค้นหาสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันทนแล้งในอนาคต

วิธีการศึกษา

การสกัด total RNA และสังเคราะห์ first strand cDNA

นำกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา อายุประมาณ 12 เดือน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว โดยใช้เวอร์มิคูไลต์เป็นวัสดุปลูก จำนวน 29 ต้น ภายใต้สภาพโรงเรือน แสงกระถางในสารละลาย 1/10 Hoagland (pH 5.6-6.5) (Jiang et al., 2012) เป็นเวลา 1 เดือน เปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก 2 วัน โดยให้ระดับของสารละลายสูงจากก้นกระถางประมาณ 1 นิ้ว เพื่อปรับสภาพต้นกล้า จากนั้นแบ่งต้นกล้าออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 21 ต้น ให้ได้รับสาร polyethylene glycol น้ำหนักโมเลกุล 6000 (PEG 6000) 30% (-1,400 kPa) เพื่อจำลองสภาวะขาดน้ำ และกลุ่มที่ 2 ไม่ใส่สาร PEG (ชุดควบคุม; -500 KPa) จำนวน 8 ต้น เก็บตัวอย่างใบอ่อน ที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน หลังการได้รับหรือไม่ได้รับสาร PEG เพื่อใช้สกัด total RNA โดยสกัด total RNA จากตัวอย่างใบอ่อน ตามวิธีการของ Laksana and Chanpramee (2015) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ total RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer 8000 (Eppendorf, Germany) ที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร และ 1.2% agarose gel electrophoresis จากนั้นกำจัด DNA ด้วยเอนไซม์ DNase I (Promega, USA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription (ThermoScientific, USA) ร่วมกับไพรเมอร์ Oligo dt (20-mer) เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบในการโคลนยีน *BADH*

การโคลนยีน *BADH* จากปาล์มน้ำมัน

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ full length ของยีน *EgBADH2* ในปาล์มน้ำมันโดยเลือกใช้ยีน putative African oil palm *BADH* ในฐานข้อมูล GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov) เป็นต้นแบบสังเคราะห์ full length ของยีน *BADH* โดยใช้ first strand cDNA ของปาล์มน้ำมันเป็นต้นแบบด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับเอนไซม์ Platinum[®] Hifidelity Tag DNA polymerase (Invitrogen, USA) และไพรเมอร์ Full*EgBADH*, F 5'- ATGTCGGTCGCGATCCC-3' และ Full*EgBADH*, R 5'-CTACAGCTTGGAGGGAGG-3' โดยใช้เครื่อง PCR (Biometra T1 Thermal cycler, Germany) กำหนดปฏิกิริยา ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 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 ความต่างศักย์ 100 V นาน 40 นาที สกัดชิ้น DNA ที่ได้จาก agarose gel โดยใช้ QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, Germany) จากนั้นโคลนชิ้นส่วน DNA บริสุทธิ์ที่สกัดได้เข้าสู่ pGEM[®]-T easy vector (Promega, USA) และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E.coli*) สายพันธุ์ DH5 α โดยเทคนิค heat shock เพื่อเพิ่มปริมาณ แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท SolGent (SolGent Co., Ltd., South Korea) เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (National Center for Biotechnology Information, www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/)

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และชีวสารสนเทศ (bioinformatics)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full length ของยีน *EgBADH2* ที่ได้จากปาล์มน้ำมันเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Mega6 (<http://www.megasoftware.net/>) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ProteinBlast ในฐานข้อมูล GenBank และ ClustalW2 (www.ebi.ac.uk) จากนั้นสร้าง phylogenetic trees ด้วยโปรแกรม Mega6 โดยวิธี neighbor-joining (bootstrap value 1,000 replicates) และวิเคราะห์ hydrophobic plot ด้วยโปรแกรม TM pred (www.ch.embnet.org/software/TMPRED-form.html)

การแสดงออกของยีน *EgBADH2* ในปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดน้ำจำลองด้วยเทคนิค real-time PCR

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการสังเคราะห์สาย DNA สำหรับยีน *BADH* และ *Actin* ในปาล์มน้ำมันด้วยโปรแกรม primer3 (<http://simgene.com/primer3>) ดังนี้ *BADH2_Eg_rt1_F* 5'-TGTGGACATTGAGAAAGCTG-3' และ *BADH2_Eg_rt1_R* 5'-CCTTCTTCAAGTGGATTGGA-3' และ *Actin* ที่ใช้สำหรับเป็นยีนอ้างอิง (reference gene) ดังนี้ *Actin_rt_F* 5'-AGGGAACATGGTTGATC CTC-3' และ *Actin rt_R* 5'-TTGGTGCAGAGAGATTCAGG-3' สาย DNA ที่สังเคราะห์ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 174 และ 150 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *BADH* ในปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดน้ำจำลองเป็นเวลา 14 วัน ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้ยีน *Actin* เป็น reference gene ใช้ cDNA ปริมาณ 300 นาโนกรัม เป็นต้นแบบร่วมกับ SensiFast SYBR No-Rox kit (Biolines, USA) และไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้แล้วมาทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA Mastercycler[®] ep realplex4 (Eppendorf, USA) โดยใช้ปฏิกิริยา ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที จำนวน 45 รอบ โดยระดับการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ 0 วัน (control)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การโคลนยีน *BADH* จากปาล์มน้ำมัน วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และชีวสารสนเทศ

การโคลนยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีน *BADH* และใช้ first strand cDNA เป็นแม่แบบ สามารถโคลน full length ของยีนได้ และให้ชื่อว่า *EgBADH2* เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มีขนาด 1,512 คู่เบส (Figure 1) โดยมีปลาย 5' และ 3' เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ start และ stop codon ตามลำดับ จากนั้นเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนได้สายโพลีเปปไทด์ขนาด 503 กรดอะมิโน (Figure 2) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TMpred เพื่อวิเคราะห์ส่วนของ membrane spanning region วิเคราะห์ hydrophobic plot พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากยีน *EgBADH2* มีส่วนประกอบของ transmembrane domain จำนวน 4 โดเมน โดยเชื่อมต่อกันด้วย loop A-C พบ NPA boxes (high conserved asparagine-proline-alanine) ที่เกี่ยวกับการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ จำนวน 1 ตำแหน่ง ซึ่งมีตำแหน่ง NPA อยู่ในช่วง 100 กรดอะมิโนแรกของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Figure 3) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโน

ของยีน *EgBADH* มาวิเคราะห์ multiple sequences alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัส พันธุกรรมจากยีน *EgBADH2* มีความเหมือน (similarity) กับยีน *BADH2* ที่รายงานในพืชชนิดอื่น ๆ ได้แก่ มะพร้าว (*Cocos nucifera*) (*CnBADH*; BAV82469.1, 95%) อินทผลัม (*Phoenix dactylifera*) (*pdBADH*; XP008798034.1, 95%) กล้วย (*Musa acuminata 'malaccensis'*) (*McBADH*; XP009417704.1, 84%) สับปะรด (*Ananas comosus*) (*AcBADH*; OAY76151.1, 83%) ข้าวโพด (*Zea mays*) (*ZmBADH*; NP001105781.2, 80%) อะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*) (*AtBADH*; NP565094.1, 80%) และยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) (*NtBADH*; NP001312083.1, 70%) (Figure 4)

```

1  ATGTCGGTCGCGATCCCTCGCCGCCTGCTCTTCATCGACGGCGAATGGAGAGAACCCGTC
61  CGCCACAAGCGAATCCCCATCATCAATCCTGCCACCGAGGAGCCCATCGGGGAGATACCC
121 GCTGCGACGGCGGAGGACGTGGAGCTGGCGGTGGCCGCCGCCGAGGGCTCTTACCAGG
181 AACCGGGGCAAGGACTGGGCCCGCACCTCCGGTGCTGCTCGTGCCAAATATCTCCGTGCG
241 ATCGCCGCCAAGATAACCGAGAGGAAATCTGAGCTGGCTAAGCTAGAGACACTAGACTGC
301 GGGAAGCCTCTGGATGAAGCAGCGTGGGACATGGATGATGTTGCTGGGTGTTTTGAGTAT
361 TATGCAGATCTTGACAGAGGCCTTGATGGAAAACAAAGAGCCCCTGTATCTCTTCCTATG
421 CAAACATTTAAATCTTATGTTCTTAAAGAGCCTATTGGAGTTGTTGGCTTGATCACTCCA
481 TGGAATATCCTCTATTAATGGGTGTTTGAAGGTTGCTCCTGCCTTGCTGCTGGTTGT
541 ACAGCTATACTAAAGCCATCTGAGCTGGCTTCTGTAAATGTTTAGAGCTTGCTGACATA
601 TGCAAGGAAGTTGGACTCCCTCCTGGTGTCTTAAACATAGTGACTGGGTTTGGTCTGAA
661 GCTGGCGCTCCTTTAGTATCCCATCCTCATGTGGATAAGATTGCATTTACTGGAAGTACA
721 GAAACTGGTAGAAGGATAATGACTGCTGCTGCTCAAACAATCAAGCCTGTTTCATTGGAA
781 CTTGGTGGTAAAAGTCCCATATTGTATTTGAAGATGTGGACATTGAGAAAGCTGTTGAA
841 TGGTCTCTTTTGGGTGCTTTTGGACAAATGGTCAAATATGCAGTGCAACTTCCCGTCTT
901 CTTGTACATGAAAGCATCTCAAAGAATTCATGGAGAGACTTGTGCTTGGGCCAAAAAC
961 ATCAAAATCTCCAATCCACTTGAAGAANGTTGCAGGCTTGACCTGTTGTGAGTGAAGGG
1021 CAGTATGAGAAGATCAAAAAGTTCATTTCAACTGCAAAGAGTGAAGGTGCTACCTTTTTG
1081 TGTGGAGGTGGACGCCCCCAGCATCTAGAAAAGGGTCTTTATTGAACCAACAATCATT
1141 ACTGATGTGGACACATCCATGCAAAATTTGGAGAGATGAGGTTTTCGGGCCTGTTCTTTGT
1201 ATTAAACATTGAGCACCAGGAAGAAGCTGTTGAACTGCAAATGATACTCAATTTGGC
1261 TTAGCAGGTGCTGTTATTTCAAAGGATCCAGAGCGCTGCAACCGTATATCTGAGGAAATT
1321 CAAGCTGGAATTGTATGGGTAAACTGCTCACAGCCCTGCTTCTGTCAAGCTCCTTGGGGA
1381 GGAAACAAGCGCAGTGTTTGGTCTGAACTGGGGAATGGGGGCTCGATACTACTTG
1441 AGTGTGAAGCAAGTGACTGAATACATCTCAGATGAACCTTGGGCATGGTATCCACCTCCC
1501 TCCAAGCTGTAG

```

Figure 1 The full length of *EgBADH2* of Tenera oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.).

```

MSVAIPRRLLFIDGEWREPVRHKRIPIINPATEEPIGEIPAATAEDVELAVAAARRALTRNRGKDWARTEGAARA
KYLRAIAAKITERKSELAKLETLDGKPLDEAAWDMDDVAGCFEYYADLAEALDGKQRAPVSLPMQTFKSYVLKEPIGV
GLITPWNYPLLMGVWKVAPALAAGCTAILKPSELASVTCLELADICKEVGLPPGVLNIVTGFGPEAGAPLVSHPHVDKIAF
TGSTETGRRIMTAAQTIKPVSLLEGGKSPIIVFEDVDIEKAVEWSLFGCFWTNGQICSATSRLLVHESISKEFMERLVAWA
KNIKISNPLEEXCRLGPVWSEGQYEKIKKFISTAKSEGATFLCGGGRPQHLEKGFIEPTIITDVTSMQIWRDEVFGPVLCI
KTFSTEEEAVELANDTQFLAGAVISKDPERCNRISSEIQAGIVWVNCSPCFQCQAPWGGNKRSGFGRELGEWGLDNY
LSVKQVTEYISDEPWAWYPPPSKL

```

Figure 2 The deduced amino acid sequence of *EgBADH2* of Tenera oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) The protein composes of NPA boxes have been shown at underline; (1) NPA (asparagine-proline-alanine), (2) APL (alanine-proline-leucine and (3) NPL (asparagine-proline-leucine) amino acids.

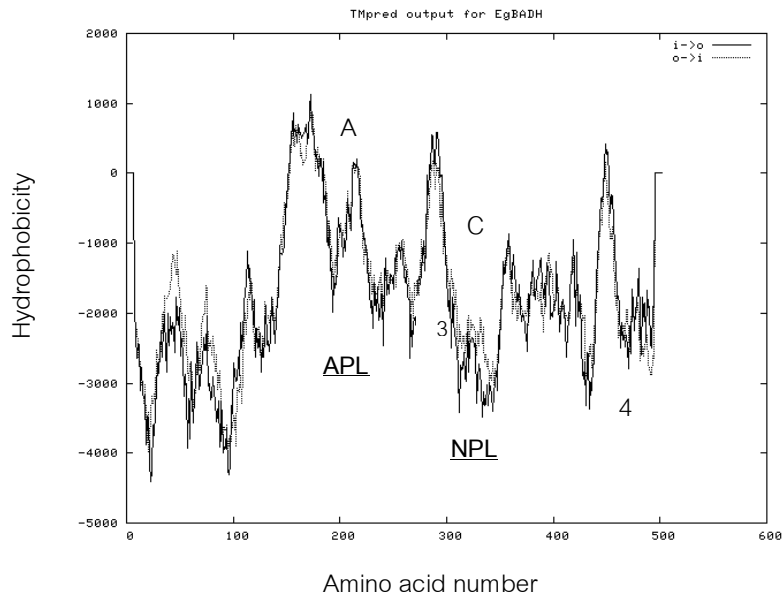


Figure 3 The hydrophobicity plot of *EgBADH2* amino acid sequence of Tenera oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) analyzed by TM pred program. The X-axis represents the amino acid 1-503 residues. The area above the x-axis indicate the hydropobic amino acid residues. The protein composes of 4 hydropobic domains and NPA boxes; NPA (Asn-Pro-Ala), APL (Ala-Pro-Leu) and NPL (Asn-Pro-Leu) amino acids.

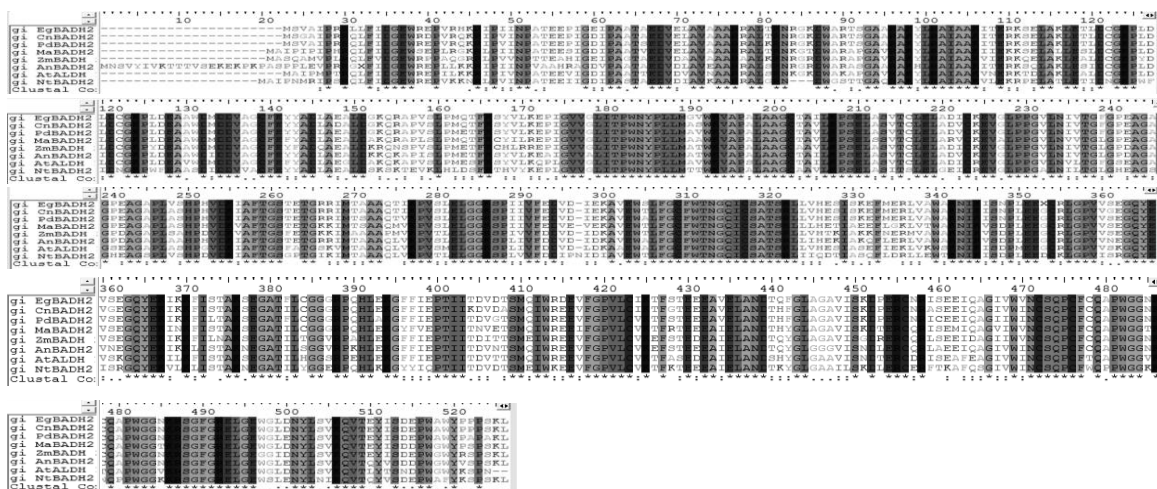


Figure 4 Multiple amino acid sequence alignment analysis of *EgBADH2* protein using ClustalW2 compared with *BADH* proteins reported in certain plant species such as *Cocos nucifera* (BAV82469.1) *Phoenix dactylifera* (XP008803742.1), *Musa acuminata* 'malaccensis' (XP009417704.1), *Ananas comosus* (OAY71391.1), *Arabidopsis* (NP196579.1).

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *EgBADH2* มาวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับยีน *BADH2* ที่รายงานในพืชชนิดต่าง ๆ จากนั้นสร้างเป็น phylogenetic tree พบว่า โปรตีน *EgBADH* จัดอยู่ในกลุ่ม *Betaine aldehyde dehydrogenase* ซึ่งยีน *EgBADH2* มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้เคียงกับยีน *BADH2* ในพืชหลายชนิด โดย *BADH2* ของปาล์มน้ำมัน (*EgBADH2*) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงมากกับ *BADH2* ในอินทผลัม (*PdBADH2*; XP008798034.1) และมะพร้าว (*CnBADH2*; BAV82469.1) นอกจากนี้ยังใกล้เคียงกับพืชอื่น ๆ เช่น หน่อไม้ฝรั่ง (*AoBADH2*) กล้วยพันธุ์ *malaccensis* (*MaBADH2*) ข้าวโพด (*ZmBADH*) และสับปะรด (*AnBADH2*) เป็นต้น (Figure 5)

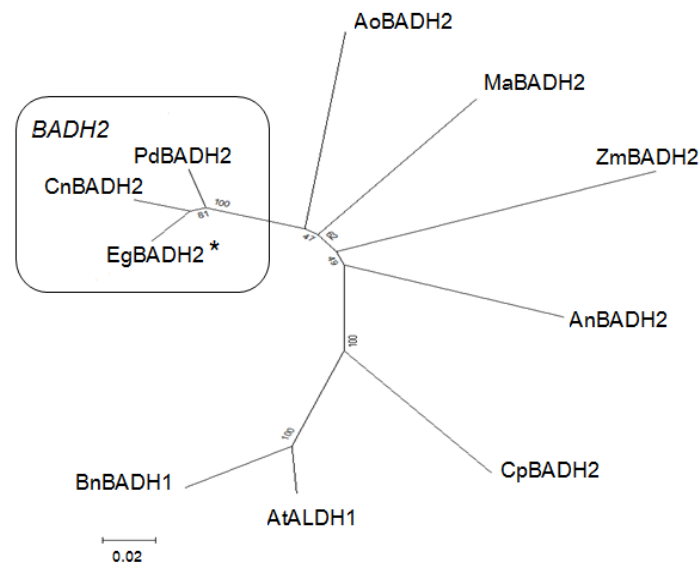


Figure 5 Phylogenetic tree among different species of plant that was constructed based on deduced amino acid and sequences of *EgBADH2* by neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replications using MEGA6 program.

การแสดงออกของยีน *EgBADH2* ในปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดน้ำจำลองด้วยเทคนิค real-time PCR

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *EgBADH2* โดยเทคนิค real-time PCR ในใบอ่อนของปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดน้ำเป็นเวลา 14 วัน พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *EgBADH2* ในช่วงเวลาที่ยังไม่ได้รับสภาวะขาดน้ำ (ที่ 0 วัน) มีการแสดงออกของยีนมากที่สุด เท่ากับ 1 ± 0.04 แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับเมื่อได้รับสภาวะขาดน้ำ นาน 1 และ 2 วัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.87 ± 0.07 และ 0.74 ± 0.53 ตามลำดับ (Figure 6) สำหรับช่วงเวลาที่ยีนมีการแสดงออกน้อยที่สุด คือ ช่วงเวลาที่ 6 วัน หลังจากได้รับสภาวะขาดน้ำ มีค่าเท่ากับ 0.02 ± 0.01 แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับในช่วงเวลา 8 ถึง 14 วัน หลังจากได้รับสภาวะขาดน้ำจำลอง (Figure 6) โดยรูปแบบการแสดงออกของยีน *EgBADH2* มีการแสดงออกแบบลดลง (down regulation) เมื่อได้รับสภาวะขาดน้ำยาวนานขึ้น

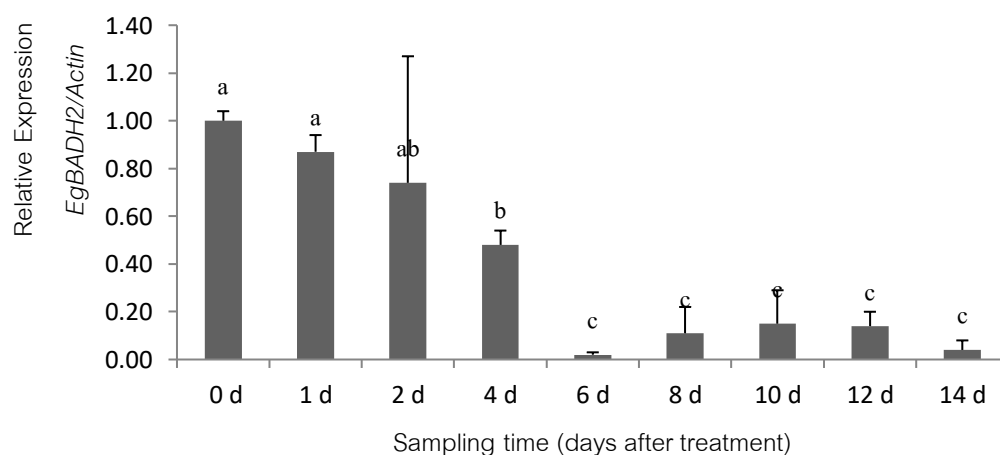


Figure 6 Relative expression of *EgBADH2* gene in leaves of Tenera oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) under water deficit stress which receiving 30% of PEG for 14 days. Different letters on the boxes indicate significant differences at $P < 0.05$ according to DMRT.

ยีนที่มีบทบาทในสภาวะที่พืชขาดน้ำ ได้แก่ ยีน *BADH* โดยยีน *BADH* มีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์สาร glycine betaine (GB) โดย GB จัดเป็นสาร osmoprotectant ซึ่งจะถูกผลิตและสะสมเมื่อพืชได้รับสภาวะเครียดจากแรงดันออสโมติก GB ทำหน้าที่ช่วยปกป้องเซลล์เมมเบรน ช่วยลดความเสียหายของเซลล์จากความเครียดเนื่องจากสูญเสียน้ำ และเป็นส่วนประกอบของลิพิดในเมมเบรนทำให้ใบมีความต้านทานต่อความเครียด (Liu et al., 2010; Zhang et al., 2012; Li et al., 2016) มีรายงานชนิดพืชที่ยีน *BADH* มีการตอบสนองต่อสภาวะแล้ง ได้แก่ ข้าวสาลี (*BADH1*) ข้าวบาร์เลย์ (*BADH1* และ *BADH2*) ข้าวฟ่าง (*BADH1* และ *BADH2*) แพร่ (total *BADH*) (Fitzgerald et al., 2009) ข้าวโพด (Zhang et al., 2012) และพบ *BADH* ในกลุ่มพืชทนเค็ม (halotolerant plants) (Wang et al., 2016) ข้าวหอมมะลิ 105 (Hasthanasombut et al., 2011)

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถจำแนกยีน *BADH2* จากปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอร่าและให้ชื่อว่า *EgBADH2* โดยเป็นยีนที่มีขนาด 1,512 คู่เบส เมื่อแปลรหัสให้เป็นโปรตีนได้เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 503 กรดอะมิโน จากผลการวิเคราะห์ hydrophobic plot ด้วยโปรแกรม TM pred พบว่า โปรตีน *EgBADH2* มีส่วนประกอบของ transmembrane domain จำนวน 4 โดเมน โดยเชื่อมต่อกันด้วย loop A-C และพบมี NPA (Asn-Pro-Ala) boxes ซึ่งคล้ายกับในยีนกลุ่มสังเคราะห์โปรตีนชนิด AQP (aquaporins) ในปาล์มน้ำมัน เช่น ยีน *NIP6;1* และ *NIP5;1* (อัญชนา รอดวังนง และคณะ, 2560) เป็นตัวชี้ว่ายีน *EgBADH2* ในปาล์มน้ำมันมีการสร้างโปรตีนชนิด AQP คล้ายคลึงกับในยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนกลุ่ม major intrinsic protein (MIPs) ซึ่ง NPA boxes นั้นประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนสายสั้น ๆ ที่มีกรดอะมิโนบางตัวซ้ำกัน (high conserved of two NPA boxes) ได้แก่ NPA (Asn-Pro-Ala) NPL (Asn-Pro-Leu) และ APL (Ala-Pro-Leu) โดย Ishibashi (2006) รายงานว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่ซ้ำกัน (repeat) ในตำแหน่ง First NPA boxes ของโปรตีนกลุ่ม aquaporins กล่าวคือ NPA พบในกลุ่มโปรตีน AQP ส่วนกรดอะมิโน NPL พบในกลุ่มโปรตีน SIP2.1 สำหรับกรดอะมิโน APL เป็นส่วนประกอบของโปรตีน Urch2 ทั้งนี้กลุ่มโปรตีน AQP โปรตีน SIP2.1 และกลุ่มโปรตีน Urch2 เป็นโปรตีน subcellular-aquaporins มีหน้าที่เกี่ยวกับโปรตีนช่องทางลำเลียงน้ำ (water channel protein) การลำเลียงน้ำ (water transport) และรูพรุนช่องทางเข้าออกของน้ำ (formation water permeating pore) ในการทดลองนี้ พบว่า มีกรดอะมิโน ได้แก่ NPA NPL และ APL คล้ายกับกรดอะมิโนที่พบอยู่ในโปรตีนกลุ่ม AQP SIP2.1 และ Urch2 ตามลำดับ ซึ่งพบได้ในกลุ่มพืชทนแล้ง (Ishibashi, 2006) นอกจากนี้ ในยีน *EgBADH2* พบ transmembrane domain จำนวน 4 โดเมน คาดว่าโครงสร้าง transmembrane domain ที่มีลักษณะเกลียว helix และมีหลาย loops อาจช่วยในการลำเลียงน้ำและลำเลียงสารโมเลกุลเล็กผ่านชั้นเมมเบรน lipid bilayer (Shivaraj et al., 2017) ส่วน NPA motif มีหน้าที่ส่งเสริมการสร้างรูพรุนสำหรับการเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกของน้ำ (water-permeating pore) (Ishibashi, 2006)

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสร้างเป็น phylogenetic tree โดยเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *EgBADH2* กับ *BADH2* ที่รายงานในพืชหลายชนิด ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า ยีน *EgBADH2* จัดอยู่ในกลุ่มยีน *BADH2* โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน *pdBADH2* ในอินทผลัม ยีน *CnBADH2* ในมะพร้าว ยีน *AoBADH2* ในหน่อไม้ฝรั่ง ยีน *MaBADH2* ในกล้วยพันธุ์ *malaccensis* ยีน *ZmBADH* ในข้าวโพด และยีน *AnBADH2* ในสับปะรด ซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่ายีนในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ GB ที่เป็นสาร osmoprotectant ซึ่งถูกผลิตภายใต้สภาวะเครียด (Liu et al., 2010; Sithtisarn et al., 2009) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่ายีนที่จำแนกได้จากปาล์มน้ำมันเป็น *EgBADH2* มีรายงานก่อนหน้านี้ว่า พืชหลายชนิดในสภาวะขาดน้ำจะมีกิจกรรมและการแสดงออกของยีน *BADH* เพิ่มขึ้น เช่น ข้าวโพด (Zhang et al., 2012) อ้อย (บุศริน อิมอินทร์ และคณะ, 2555) และ sugarbeet (Li et al., 2016) แต่ในการศึกษานี้พบว่า ยีน *EgBADH2* ในใบของปาล์มน้ำมันที่อยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำจำลอง นาน 14 วัน มีการแสดงออกของยีนในระดับลดต่ำลงเมื่อเทียบกับต้นปกติ สอดคล้องกับ Nakamura et al. (1997) ที่รายงานว่าการได้รับความเค็มมีการแสดงออกของยีน *BADH* ต่ำ Wang et al. (2016) รายงานไว้ว่า สะดรา (Suaeda sp.) มีการแสดงออกของยีน *ScBADH* ในใบต่ำลง เมื่อได้รับ PEG 10% นาน 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับต้นที่ได้รับน้ำปกติ ส่วนรากและลำต้นมีการแสดงออกของยีนลดต่ำลง หลังได้รับ PEG 10% นาน 48 ชั่วโมง

ปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *BADH* ในปาล์มน้ำมัน มีดังนี้ (1) การขาดน้ำทำให้โปรตีนเสียสภาพเนื่องจากขาดน้ำในการรักษาอุณหภูมิภายในเซลล์ ทำให้เซลล์มีอุณหภูมิสูง อาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนได้ สอดคล้องกับ Incharoensakdi and Kum-arb (1998) ที่รายงานว่าการขาดน้ำอุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส กิจกรรมของ *BADH* ลดต่ำลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ยิ่งเพิ่มอุณหภูมิมากขึ้นจะส่งผลให้กิจกรรมของ *BADH* ลดต่ำลงมากขึ้น Hasthanasombut et al. (2011) รายงานว่า ในข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ที่ได้รับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (heat stress) มีการแสดงออกของยีน *OsBADH1*

ลดลง (2) ความเข้มข้นเกลือภายในเซลล์หลังได้รับสภาวะขาดน้ำ เมื่อน้ำภายในเซลล์ลดลงทำให้เกิดและธาตุอาหารที่สะสมอยู่เข้มข้นมากขึ้นอาจยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ BADH โดย Oishi and Ebina (2005) รายงานว่า เมื่อถ่ายยีน *BADH* จากผักปวยเล้ง และหญ้า *zoysia* เข้าสู่จุลินทรีย์ *E. coli* เพื่อทดสอบผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ BADH พบว่า ความเข้มข้นของ NaCl ยิ่งสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ BADH ยิ่งลดลง (3) โคแฟกเตอร์กับเอนไซม์อื่น ๆ ที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย คลอโรพลาสต์ และไซโตซอล อาจได้รับความเสียหายภายใต้สภาวะขาดน้ำ จึงมีผลทำให้การแสดงออกของยีน *BADH* ลดลง ทั้งนี้ Fitzgerald et al. (2009) กล่าวว่า โคแฟกเตอร์ต่าง ๆ เช่น NAD^+ $NADP^+$ มีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ BADH ซึ่ง BADH มีแอกติวิตีสูงในการใช้ NAD^+ เพื่อสังเคราะห์ GB (4) พืชอาจมีการสูญเสียฟังก์ชัน (loss of functional) ของยีน *BADH* ในบางอัลลีล (allele) เช่น ที่พบในข้าว (Fitzgerald et al., 2009) (5) กล้าปาล์มน้ำมันที่ปลูกเลี้ยงในระบบไฮโดรโปนิกส์โดยรากแช่ในสารละลาย PEG เป็นเวลานานทำให้ภายในเซลล์อาจได้รับออกซิเจนต่ำแล้วสังเคราะห์และสะสม acetaldehyde ซึ่งอาจมีผลไปยับยั้งการแสดงออกของยีน *BADH* โดย Mitsuya et al. (2009) รายงานว่า ในต้นกล้าข้าวสายพันธุ์ญี่ปุ่นที่ได้รับสภาพน้ำท่วมขังนาน 24 ชั่วโมง พบว่า การแสดงออกของยีน *BADH* ลดต่ำลง เนื่องจากเมื่อพืชจมน้ำกลไกในการหายใจมีการเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น acetaldehyde และเอทานอล โดยมียีน *OsBADH1* ทำหน้าที่เปลี่ยน acetaldehyde ไปเป็น acetate และเข้าสู่วงจร glyoxylate นอกจากนี้ acetaldehyde ในพืชจะไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ BADH เนื่องจาก acetaldehyde เป็น analog ของ BA (betaine aldehyde) (Incharoensakdi and Kum-arb, 1998) จึงอาจทำให้ BADH ทำปฏิกิริยากับ BA ได้ไม่สมบูรณ์เท่าที่ควร ในปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบข้อมูลเกี่ยวกับสารตั้งต้นที่จำเพาะ (substrate specificity) และกิจกรรมของ BADH ในพืชที่ชัดเจนมากนัก (Fitzgerald et al., 2009)

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาเพื่อจำแนกยีน *BADH* ในปาล์มน้ำมันพันธุ์เทนอราที่ได้รับสภาวะขาดน้ำ พบว่า ยีนนี้มีขนาด 1,512 คู่เบส และแปลงเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 503 กรดอะมิโน โดยให้ชื่อว่า *EgBADH2* และเมื่อนำมาสร้าง phylogenetic tree พบว่า *EgBADH2* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดและอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับยีน *BADH2* ในมะพร้าว อินทผลัม กล้วยพันธุ์ *malaccensis* หน่อไม้ฝรั่ง สับปะรด และข้าวโพด จึงมีความเป็นไปได้ว่ายีนนี้ในปาล์มน้ำมันเป็นยีนชนิด *EgBADH2* สำหรับการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนนี้ในปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดน้ำโดยใช้สารละลาย PEG6000 ความเข้มข้น 30% จำลองสภาวะขาดน้ำ พบว่า เมื่อปาล์มน้ำมันอยู่ในสภาวะขาดน้ำมีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *EgBADH2* ลดลง และเมื่อปาล์มน้ำมันอยู่ในสภาวะขาดน้ำนานขึ้นระดับการแสดงออกของยีน *EgBADH2* ก็ยิ่งต่ำลง และต่ำที่สุดในวันที่ 6 หลังได้รับสภาวะขาดน้ำ โดยรูปแบบการแสดงออกของยีน *EgBADH2* ในปาล์มน้ำมันมีการแสดงออกแบบลดลง (down regulation) เมื่อได้รับสภาวะขาดน้ำยาวนานขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้ สะท้อนให้เห็นว่า *EgBADH2* มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในปาล์มน้ำมัน ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อทราบถึงระดับการแสดงออกของยีนนี้ในปาล์มสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้รับสภาวะขาดน้ำ เพื่อหาความเชื่อมโยงของลักษณะทนทานหรืออ่อนแอต่อสภาวะขาดน้ำกับระดับการแสดงออกของยีน ซึ่งอาจสามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด gene targeted marker เพื่อใช้ในการคัดเลือกปาล์มน้ำมันทนแล้งได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร และภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- บุศรินทร์ อิมอินทร์, นงลักษณ์ เทียนเสรี และสนธิชัย จันทน์เปรม. 2555. การบ่งชี้ยีนที่ควบคุมการสร้าง betaine aldehyde dehydrogenase ที่เกี่ยวข้องตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ. ใน *การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9*. น. 2166-2173.
- อัญชนา รอดรุ่งนง, กนกวรรณ เทียงธรรม และสนธิชัย จันทน์เปรม. 2560. การจำแนก และรูปแบบการแสดงออกของยีน *NIP6;1* (Boric Acid channel for preferential transport of boron) ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า. *ว.วิทย์.เกษตร*. 48 (2): 174-185.
- Ali, Q., Ehahi, M., Hussain, B., Khan, N. H., Ali, F., and Elahi, F. 2011. Genetic improvement of maize (*Zea mays* L.) against drought stress: An overview. *Agri. Sci. Res. J.* 10: 228- 237.
- Amudha, J., and Balasubramani, G. 2011. Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 6 (2): 31-58.
- Beule, T., Camps, C., Debiesse, S., Tranchant, C., Dussert, S., Sabau, X., Jaligot, E., Alwee, S. S. R. S., and Tregear, J. W. 2011. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with the mantled homeotic flowering abnormality in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Tree Genetics & Genomes* 7: 169-182.
- Blumwald, E. 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 431- 434.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., and Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. pp. 1158- 249. In: W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones, eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Fitzgerald, T. L., Waters, D. L. E., and Henry, R. J. 2009. Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant Biol.* 11: 119-130.
- Hashtanasombut, S., Paisarnwipatpong, N., Triwitayakorn, K., Kirdmanee, C., and Supaibulwatana, K. 2011. Expression of *OsBADH1* gene in Indica rice (*Oryza sativa* L.) in correlation with salt, plasmolysis, temperature and light stresses. *POJ.* 4 (7): 400-407.
- Huakasin, W., Thongin, W., Petsean, K., Phongdara, A., and Nakkaew, A. 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.
- Incharoensakdi, A., and Kum-arb, U. 1998. Betaine aldehyde dehydrogenase from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*: purification, properties, and regulation by salinity. 1998. *J. Sci. Soc.* 24: 231-240.
- Ishibashi, K. 2006. Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochim Biophys Acta.* 1758: 989-993.
- Jiang, T., Fountain, J., Davis, G., Kemerait, R., Scully, B., Lee, R. D., and Guo, B. 2012. Root morphology and gene expression analysis in response to drought stress in maize (*Zea mays*). *Plant Mol. Biol. Rep.* 30: 360-369.
- Laksana, C., and Chanprame, S. 2015. A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaf of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *ISSAAS J.* 21 (1): 96-106.
- Lam, M. K., Tan, K. T., Lee, K. T., and Mohamed, A. R. 2009. Malaysian palm oil: surviving the food versus fuel dispute for a sustainable future. *Renew Sust. Energy Rev.* 13: 1456-1464.
- Li, G., Wu, H., Sun, Y., and Zhang, S. 2016. Betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) expression and betaine production in sugarbeet cultivars with different tolerances to drought stress. *Sugar Tech.* 18 (4): 420-423.
- Liu, J., Zeng, H., Li, X., Xu, L., Wang, Y., Tang, W., and Han, L. 2010. Isolation and characterization of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in *Ophiopogon japonicus*. *Open Biotechnol J.* 4: 18-25.
- Lu, Y., Xu, J., Yuan, Z., Hao, Z., Xie, C., Li, X., Shah, T., Lan, H., Zhang, S., Rong, T., and Xu, Y. 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. Breeding.* 30 (1): 407-418.
- Mitsuya, S., Yokota, Y., Fujiwara, T., Mori, N., and Takabe, T. 2009. *OsBADH1* is possibly involved in acetaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes. *FEBS Letters* 583: 3625-3629.
- Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K., and Takabe, T. 1997. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine non-accumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J.* 11 (5): 1115-1120.
- Oishi, H., and Ebina, M. 2005. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *J. Plant Physiol.* 162: 1077-1086.
- Parmentier-Line, C. M., Panta, G. R., and Rowland, L. J. 2002. Changes in dehydrin expression associated with cold, ABA and PEG treatments in blueberry cell cultures. *Plant Sci.* 162: 273-282.
- Rival, A., and Jaligot, E. 2010. Oil palm biotechnologies are definitely out of infancy. *O.C.L.* 17 (6): 368-374.
- Rodriguez, M., Canales, E., Borroto, C. J., Carmona, E., Lopez, J., Pujol, M., and Borrás-Hidalgo, O. 2006. Identification of genes induced upon water-deficit stress in a drought-tolerant rice cultivar. *J. Plant Physiol.* 163 (5): 577-584.
- Shivaraj, S. M., Deshmukh, R. K., Rai, R., Belanger, R., Agrawal, P. K., and Dash, P. K. 2017. Genome-wide identification, characterization, and expression profile of aquaporin gene family in Flax (*Linum usitatissimum*). *Sci. Rep.* 17 p.

- Sithtisarn, S., Harinasut, P., Pornbunlualap, S., and Cha-um, S. 2009. Accumulation of glycinebetaine and *betaine aldehyde dehydrogenase* activity in *Eucalyptus camaldulensis* clone T5 under *in vitro* salt stress. *Kasetsart J. (Nat Sci.)* 43 (5): 146-152.
- Sun, C. X., Cao, H. X., Shao, H. B., Lei, W. T., and Xiao, Y. 2011. Growth and physiological responses to water and nutrient stress in oil palm. *Afr. J. Biotech.* 10 (51): 10465-10471.
- Wang, F. W., Wang, M. L., Guo, C., Wang, N., Li, X. W., Chen, H., Dong, Y. Y., Chen, X. F., Wang, Z. M., and Li, H.Y. 2016. Cloning and characterization of a novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda corniculata*. *Genet. Mol. Res.* 15 (2): 14.
- Yu, X., Bai, G., Liu, S., Luo, N., Wang, Y., Richmond, D. S., Pijut, P. M., Jackson, S. A., Yu, J., and Jiang, Y. 2013. Association of candidate genes with drought tolerance traits in diverse perennial ryegrass accessions. *J. Exp. Bot.* 64 (6): 1537-1551.
- Zhang, L., Gao, M., Hu, J., Zhang, X., Wang, K., and Ashraf, M. 2012. Modulation role of abscisic acid (ABA) on growth, water relations and glycine betaine metabolism in two maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 3189-3202.

วันรับบทความ (Received date) : 4 ก.ค. 61

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 4 ต.ค. 61

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 7 พ.ย. 61