

การค้นหายีนในกลไกการออกดอกของมะพร้าว
(*Cocos nucifera* L.) ด้วยเทคนิค Differentially Display RT-PCR
Identification of Genes in Controlling Flowering Transition of
Coconut (*Cocos nucifera* L.)
Using Differentially Display RT-PCR

ศิริวรรณ ไทยสกุล

สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

ปรียา มณีประเสริฐ

หน่วยวิจัยเทคโนโลยีพันธุศาสตร์และการประยุกต์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ถนนมาลัยแมน อำเภอกำแพงแสน นครปฐม 73140

จรีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา*

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ถนนมาลัยแมน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Siriwan Thaisakun

Interdisciplinary Graduate Program in Genetic Engineering, Graduate School,
Kasetsart University, Bangkhen Campus, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

Pariya Maneeprasert

Research Unit of Genetic Technology and Applications, Faculty of Liberal Arts and Science,
Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Malaiman Road, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Chareerat Mongkolsiriwatana*

Division of Genetics, Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science,
Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Malaiman Road, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Received: May 14, 2019; Accepted: May 19, 2019

บทคัดย่อ

การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการออกดอกของมะพร้าวทำโดยเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (SAM) ของมะพร้าวต้นเตี้ย ระหว่างระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (เฟื่องงอก, 4, 6, 12 และ 24 เดือน) และระยะออกดอก (36 เดือน) ด้วยเทคนิค DDRT-PCR (differentially display RT-PCR) ผลการทดลองพบยีนกำหนดรหัสโปรตีน adenylate kinase, DNA (cytosine-

5)-methyltransferase1b และ 14-3-3 protein 6, ทรานสโพซอนชนิด retrotransposonRLC_Rider_Eg133H20-1, ALP1 like transposon และ uncharacterized proteins, (LOC105038377 and LOC105032930) มีการแสดงออกสูงในระยะออกดอก (up-regulated gene) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ายีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับกลไกชักนำการออกดอก เมื่อได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในระหว่างการเจริญเติบโตและพัฒนาของมะพร้าวต้นเตี้ย (ออกดอกเร็ว) และมะพร้าวต้นสูง (ออกดอกช้า) ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR พบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ (ยกเว้น *ALP1 like*) มีการแสดงออกตั้งแต่ระยะเฟื่องออก แล้วเพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะออกดอกในมะพร้าวทั้ง 2 กลุ่ม แต่ที่น่าสนใจ คือ ยีน *ALP1 like* มีรูปแบบการแสดงออกแบบไดนามิก คือ มีการแสดงออกในระยะต้นอ่อนแล้วหายไป แล้วจึงมีการแสดงออกสูงขึ้นอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ระยะที่สมบูรณ์ และระยะออกดอก อีกทั้งยังแสดงความแตกต่างระหว่างมะพร้าวต้นเตี้ย และ ต้นสูง โดยมีการแสดงออกล่าช้าในมะพร้าวต้นสูง จากผลการทดลองร่วมกับการวิเคราะห์หน้าที่ของยีน *ALP1 like* จึงเชื่อว่า *ALP1 like* มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมให้มะพร้าวต้นเตี้ยมีระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบสั้นลง จึงทำให้ออกดอกเร็วกว่ามะพร้าวต้นสูง

คำสำคัญ : มะพร้าว; การออกดอก; การเจริญเติบโตทางลำต้นและใบที่ยาวนาน; DDRT-PCR (differentially display RT-PCR)

Abstract

To identify novel genes involved in controlling flowering transition of coconut, DDRT-PCR (differentially display RT PCR) was used to compare expression of genes in somatic apical meristem (SAM) of dwarf coconut during vegetative growth phase, Vg (germination, 4, 6, 12 and 24 months of age) and reproductive phase, Rp (36 months of age). The result revealed that genes encoding adenylate kinase, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1b, 14-3-3 protein 6, retrotransposon RLC_Rider_Eg133H20-1, ALP1 like transposon and uncharacterized proteins (LOC105038377 and LOC105032930) were identified as up-regulated genes in reproductive phase. The expression of these candidate genes were monitored during growth and development in both dwarf (early flowering type) and tall (late flowering type) coconuts using quantitative real time PCR. The expression of those six genes, except *ALP1 like*, showed gradually increase during vegetative growth phase (germination, 4, 6, 12 and 24 months) and reached the highest in reproductive phase in both coconut types (36 months in dwarf and 60 months in tall types). Interestingly, *ALP1 like* showed dynamic expression, up-regulated during seedling and then disappeared during juvenile and up-regulated again during adult and reproductive phase. The different expression pattern between dwarf and tall coconuts was also found in which tall coconut showed delay expression. Taken its function and this result together, we proposed that shorten vegetative growth phase and early flowering of dwarf coconut was probably controlled by *ALP1 like*.

Keywords: coconut; flowering transition; prolong vegetative growth phase; DDRT PCR (differentially display RT-PCR)

1. คำนำ

การออกดอก (flowering transition) เป็นลักษณะที่สำคัญในพืชเศรษฐกิจที่ต้องการผลผลิตเป็นดอกหรือผล เป็นกลไกที่สลับซับซ้อน ควบคุมด้วยยีนจำนวนมากที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ หรือระยะ vegetative growth phase เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตเพื่อการสืบพันธุ์ คือ ออกดอกหรือระยะ reproductive growth phase (Simpson *et al.*, 1999) ซึ่งการที่พืชจะพัฒนาเข้าสู่ระยะออกดอกได้จะต้องเจริญเติบโตและพัฒนาจนมีความพร้อม เรียกระยะนี้ว่า reproductive competence หรือ adult phase แล้วจึงสามารถชักนำให้มีการสร้างจุดกำเนิดดอกได้ โดยพืชแต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธุ์ใช้เวลาในการพัฒนาเข้าสู่ระยะที่พร้อมจะออกดอกแตกต่างกันไป จึงทำให้เกิดความผันแปรของอายุออกดอกในไม้ยืนต้น (perennial plant) โดยมีความผันแปรมากตั้งแต่เดือน ปี หรือหลายสิบปีจึงจะเข้าสู่ระยะออกดอก ความผันแปรของอายุออกดอกของพืชประเภทนี้เนื่องมาจากพันธุกรรมที่ควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาในระยะเวลาการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบนั่นเอง (Hackett, 1985; Bergonzi and Albani, 2011)

หลังจากงอกออกจากเมล็ด พืชจะเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นส่วนประกอบต่าง ๆ ที่มาจากการแบ่งเซลล์ไมโทซิสที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (somatic apical meristem, SAM) การเจริญเติบโตในระยะแรกจะกำหนดให้กลุ่มเซลล์เหล่านี้พัฒนาเป็นส่วนประกอบของลำต้นและใบ จนกระทั่งพืชมีการเจริญเติบโต มีความสมบูรณ์พันธุ์ และพร้อมที่จะเปลี่ยนแปลงเข้าสู่การออกดอก กลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อเจริญบริเวณนี้จึงจะสามารถตอบสนองต่อสัญญาณการออกดอก (floral induction) และถูกชักนำให้มีการพัฒนาไปเป็นส่วนประกอบต่าง ๆ ของดอก (Hackett, 1985; Lawson and Poethig, 1995;

Simpson *et al.*, 1999; Araki, 2001) การเจริญเติบโตและพัฒนาตั้งแต่งอกออกจากเมล็ดจนกระทั่งเข้าสู่ระยะที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญมีความพร้อมที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นดอก เรียกระยะนี้ว่า juvenile phase และเรียกระยะที่มีความพร้อมสำหรับการชักนำการออกดอกว่าระยะ reproductive competence หรือ adult phase อายุการออกดอกของไม้ยืนต้นนั้นจึงขึ้นกับช่วงเวลาของระยะ juvenile phase (Martin-Trillo and Martinez-Zapater, 2002)

กลไกควบคุม juvenile phase ระดับโมเลกุลนั้น มีการศึกษาเฉพาะในอะราบิโดปซิส ซึ่งเป็นพืชต้นแบบ โดยรายงานว่าควบคุมด้วยยีน *SERRATE*, *SUPPRESSOR OF GENE SILENCING3* และ *SUPPRESSOR OF GENE SILENCING2/SILENCING DEFECTIVE1/ RNA DEPENDENT POLYMERASE6* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ (Clarke *et al.*, 1999; Peragine *et al.*, 2004) นอกจากนี้มียีน *ARGONAUTE1*, *ZIPPY*, *SQUINT* และ *HASTY* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอในการลดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย โดยการตัดหรือยับยั้งกระบวนการแปลรหัสของเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (Bohmert *et al.*, 1998; Telfer and Poethig, 1998; Berardini *et al.*, 2001; Hunter *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009) และเมื่อชักนำยีนเหล่านี้ให้เกิดการกลายในอะราบิโดปซิส พบว่าเป็นการเร่งให้เข้าสู่ระยะ adult phase โดยระยะ juvenile phase สั้นลงและออกดอกเร็วขึ้น จึงจัดยีนเหล่านี้ให้อยู่ในกลุ่มยับยั้งการออกดอก (floral repressor) โดยควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาทางลำต้นและใบ ซึ่งกลไกการควบคุมระยะ juvenile phase ที่ยาวนานยังไม่เคยมีรายงานในไม้ยืนต้น

มะพร้าว (*Cocos nucifera* L.) เป็นไม้ยืนต้นเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งต้องการดอก

และผลเป็นผลผลิต โดยมะพร้าวมีระยะเวลาเจริญเติบโตทางลำต้นและใบที่ค่อนข้างยาวนาน ใช้ระยะเวลาประมาณ 5-6 ปี จึงออกดอกและให้ผลผลิต จึงเป็นข้อจำกัดในการผลิตมะพร้าวหรือการปรับปรุงพันธุ์มะพร้าว อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยมีมะพร้าวต้นเดี่ยวที่มีระยะเวลาเจริญเติบโตทางลำต้นและใบประมาณ 3 ปี ก็สามารถออกดอกและให้ผลผลิต ดังนั้นหากสามารถปรับปรุงพันธุ์ให้มะพร้าวออกดอกเร็ว ร่นอายุการออกดอกของมะพร้าวต้นสูงได้ จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาการผลิตมะพร้าว ทั้งด้านเกษตรกรรมและการพัฒนาพันธุ์ ซึ่งนักวิจัยจำเป็นต้องทราบถึงกลไกและยีนที่ควบคุมการออกดอกของมะพร้าว โดยเฉพาะกลุ่มยีนที่เกิดการกลายแล้วทำให้มะพร้าวต้นเดี่ยวออกดอกเร็ว งานวิจัยนี้ต้องการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องในกลไกการเปลี่ยนแปลงจากระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบเข้าสู่ระยะออกดอกด้วยเทคนิค DDRT-PCR (differentially display RT-PCR) ในเบื้องต้น แล้วค้นหายีนที่เกี่ยวข้องที่ทำให้มะพร้าวต้นเดี่ยวออกดอกเร็ว โดยตั้งสมมติฐานว่าการแสดงออกของยีนเป้าหมายในส่วนเนื้อเจริญปลายยอดของมะพร้าวทั้ง 2 กลุ่ม ต้องมีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันในระหว่างการเจริญเติบโตและพัฒนา ซึ่งผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้นอกจากนำไปสู่การอธิบายกลไกการออกดอกของมะพร้าว ซึ่งเป็นไม้ยืนต้นแล้ว ยังทราบยีนที่คาดว่าทำให้มะพร้าวต้นเดี่ยวออกดอกเร็ว มีระยะเวลาเจริญเติบโตทางลำต้นและใบที่สั้นกว่ามะพร้าวต้นสูง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาเทคโนโลยีการร่นอายุการออกดอกของมะพร้าวต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของมะพร้าวและสกัดอาร์เอ็นเอรวมโดยเก็บตัวอย่างยอดของมะพร้าวต้นเดี่ยว

(มะพร้าวน้ำหอมสามพราน) และมะพร้าวต้นสูง (มะพร้าวแกงทับสะแก) ในระยะเวลาเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (vegetative growth) ได้แก่ ระยะเฟื่องงอก, 4, 6, 12 และ 24 เดือน และระยะออกดอก (reproductive growth) ได้แก่ 36 เดือน ในมะพร้าวต้นเดี่ยว และ 60 เดือน ในมะพร้าวต้นสูง นำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Trizol® (Invitrogen, USA) ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณอาร์เอ็นเอรวม ที่สกัดได้โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) และ 280 นาโนเมตร (OD_{280}) แล้วหาค่า OD_{260}/OD_{280} และวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำอาร์เอ็นเอรวมของมะพร้าวต้นเดี่ยวระยะเฟื่องงอก, 4, 6, 12 และ 24 เดือน แต่ละระยะในปริมาณที่เท่ากันมารวมกัน ใช้เป็นตัวแทนของอาร์เอ็นเอรวมระยะเวลาเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (Vg-RNA) ส่วนอาร์เอ็นเอรวมที่ระยะ 36 เดือน ใช้เป็นตัวแทนอาร์เอ็นเอรวมระยะออกดอก (Rp-RNA)

2.2 การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องในกลไกควบคุมการออกดอกของมะพร้าวด้วยเทคนิค DDRT-PCR (differentially display RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอรวมที่เป็นตัวแทนของระยะเวลาเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (Vg-RNA) และระยะออกดอก (Rp-RNA) มาค้นหายีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างเนื้อเยื่อทั้ง 2 ระยะ ด้วยเทคนิค DDRT-PCR ที่ดัดแปลงจาก Colonna-Romano และคณะ (1998) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของยีนที่แตกต่าง (differentially expressed gene, DEG) ด้วยเจลพลอริอะคริลลาไมด์ความเข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ สกัดแยกแถบดีเอ็นเอที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างออกจากเจล นำมาเพิ่มปริมาณอีกครั้งด้วยไพรเมอร์คู่เดิม โคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEM®-T Easy vector (Promega, USA) และถ่ายฝากพลาสมิดลูกผสมเข้า

สู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาสกัดแยกพลาสมิดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Presto™ mini Plasmid kit (Geneaid, Korea) แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท MacroGen Sequencing Service (Korea) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับความเหมือนกันกับยีนในฐานข้อมูลสากลด้วยโปรแกรม BlastN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และวิเคราะห์หน้าที่ของยีนจากฐานข้อมูล KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

ใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดแยกได้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยนำ cDNA สายแรกที่ได้ไปทำ quantitative real-time PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Biorad, USA) Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG kit (Invitrogen, USA) โดยใช้เครื่อง CFX96™ System (Biorad, USA) จากนั้นวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนแบบ relative (ΔC_T) โดยใช้ระดับการแสดงออกของยีน *Actin1* ในการปรับค่า (normalization)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การค้นหายีนในกลไกควบคุมการออกดอกของมะพร้าวด้วยเทคนิค DDRT-PCR

การค้นหายีนที่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกัน ระหว่างเนื้อเยื่อเจริญของยอดมะพร้าวต้นเตี้ยระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบกับระยะออกดอก โดยใช้เทคนิค DDRT-PCR จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของยีนต่างกัน

(DEG) จำนวน 93 แถบ โดยเป็นแถบที่มีการแสดงออกลดลงในระยะออกดอก (down-regulation) จำนวน 42 แถบ และเป็นแถบที่มีการแสดงออกสูงขึ้นในระยะการออกดอก (up-regulation) จำนวน 51 แถบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงจากระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบเพื่อเข้าสู่ระยะออกดอก (flowering transition) ในมะพร้าวถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมาก โดยกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้ มีทั้งถูกยับยั้งให้มีการแสดงออกลดลงและถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเพื่อชักนำการออกดอก คือ กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงบริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดจากการสร้างใบมาเป็นการสร้างจุดกำเนิดดอก (flowering transition) เช่นเดียวกับที่พบในข้าวและอะราบิดอปซิส (Boss *et al.*, 2004; Mongkol siriwatana, 2008) รวมทั้งไมยต้นบางชนิด เช่น เลมอล (Li *et al.*, 2017) แอปเปิ้ล (Hattasch *et al.*, 2008)

การสุ่มเลือกแถบ DEG มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูล GenBank พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ DEG จำนวน 7 แถบ ที่มีการแสดงออกสูงในระยะออกดอก โดยพบว่ามีความเหมือนกันกับยีนกำหนดรหัสเอนไซม์ adenylate kinase และ DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1b ยีนกำหนดรหัสโปรตีน 14-3-3 protein 6 ยีน กำหนดรหัสยีนเคลื่อนที่ retrotransposon RLC_Rider_Eg133 H20-1 และ ALP1 like transposon นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของยีนที่เหมือนกับยีนกำหนดรหัสโปรตีนที่ยังไม่เคยมีรายงาน ได้แก่ uncharacterized LOC105038377 และ uncharacterized LOC105032930 ของปาล์มน้ำมัน ดังตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการออกดอกของมะพร้าวนั้นจะถูกควบคุมด้วยกลไกการทำงานร่วมกันของยีนเหล่านี้

ตารางที่ 1 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการค้นหายีนด้วยเทคนิค DDRT-PCR

Primer name	Tm (°C)	Sequence (5'→3')
DD-GT	61.0	CACTATAGGGAAGCTTTTTTTTTTGT
AP1	64.0	ACACTATAGCTCGAGAGGTGACCGT
AP4	63.0	ACACTATAGCTCGAGTTTTGGCTCC
AP5	63.0	ACACTATAGCTCGAGGGAACCAATC
AP6	61.0	ACACTATAGCTCGAGAACTCCGTC
AP7	60.0	ACACTATAGCTCGAGTCGATACAGG
AP8	61.0	ACACTATAGCTCGAGTGGTAAAGGG
AP12	63.0	ACACTATAGCTCGAGTTTTTCGCAG
AP14	61.0	ACACTATAGCTCGAGGATCAAGTCC
AP15	59.0	ACACTATAGCTCGAGGATCCAGTAC

ตารางที่ 2 รายละเอียดของ DEG ที่มีความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูล GenBank

Name	Description	Identity	Accession	Plant species
Rp4.1	<i>Adenylate kinase</i>	81 %	XM_019853357.1	<i>Elaeis guineensis</i>
Rp4.2	<i>Retrotransposon RLC_RLC_Rider_Eg133H20-1</i>	75 %	KF142648.1	<i>Elaeis guineensis</i>
Rp4.3	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1b</i>	92 %	XM_019845784.1	<i>Elaeis guineensis</i>
Rp4.5	<i>ALP1 like transposon</i>	89 %	XM_010939795.2	<i>Elaeis guineensis</i>
Rp5.2	<i>uncharacterized LOC105038377</i>	97 %	XM_019849038.1	<i>Elaeis guineensis</i>
Rp6.3.1	<i>14-3-3 protein 6</i>	95 %	XM_010941390.2	<i>Elaeis guineensis</i>
Rp12.1.5	<i>uncharacterized LOC105032930</i>	95 %	XM_010907526.2	<i>Elaeis guineensis</i>

เพื่อตรวจสอบความน่าเชื่อถือของผลการค้นหายีนที่ทำหน้าที่ในกลไกการออกดอกของมะพร้าวที่ได้จากเทคนิค DDRT-PCR ในครั้งนี้ จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากชิ้นส่วน DEG เหล่านี้มาออกแบบไพรมเมอร์ใหม่ โดยให้มีความจำเพาะต่อชิ้นส่วนของยีนแต่ละยีน ดังตารางที่ 3 จากนั้นนำไพรมเมอร์ที่ออกแบบได้มาทำปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป้าหมายในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (Vg) และระยะออกดอก (Rp) พบว่ามี

รูปแบบการแสดงออกที่สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากเทคนิค DDRT-PCR (ไม่แสดงผล) จึงเป็นการยืนยันผลความน่าเชื่อถือของ DEG ที่ได้

3.2 การวิเคราะห์หน้าที่ของ DEG ในกระบวนการทางชีววิทยา

เมื่อนำ DEG ที่ได้มาวิเคราะห์หาคำศัพท์หน้าที่ในกระบวนการทางชีววิทยา โดยใช้ฐานข้อมูล KEGG ร่วมกับข้อมูลจากวารสารวิทยาศาสตร์ระดับสากล พบว่า

(1) เอนไซม์ adenylate kinase (AK, EC

2.7.4.3) เป็นเอนไซม์ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของพลังงาน ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตหรือดึงหมู่ฟอสเฟต เพื่อควบคุมสมดุลระหว่าง AMP, ADP และ ATP โดยในพืชนั้นมีหลายไอโซฟอร์ม (isoform) โดยมี 2 ไอโซฟอร์มทำงานในคลอโรพลาสต์ และเป็นไอโซฟอร์มที่สัมพันธ์กับการชักนำการออกดอกของ *Chenopodium rubrum* ซึ่งเป็นพืชวันยาว และยาสูบซึ่งเป็นพืชวันสั้น ถึงแม้ว่ากลไกการออกดอกของพืชทั้ง 2 ชนิด นี้จะตอบสนองต่อช่วงแสงที่แตกต่างกัน แต่ในช่วงชักนำการออกดอกกลับพบว่าการแสดงออกของยีนกำหนดรหัสเอนไซม์นี้สูงขึ้นในพืชทั้ง 2 ชนิด เพื่อรักษาสสมดุลของพลังงานในช่วงชักนำการออกดอก (Schlattner and Wagner, 2001) ซึ่งจากการทดลองนี้พบการแสดงออกของยีนกำหนดรหัสเอนไซม์ adenylate kinase ในมะพร้าวระยะออกดอกเช่นเดียวกัน ซึ่งให้ เห็นว่าในช่วงชักนำการออกดอกของมะพร้าวนั้นเกี่ยวข้องกับกลไกเมทาบอลิซึมของพลังงาน

(2) เอนไซม์ DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1b เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในแฟมิลี C5-MTase family โดยทำหน้าที่เติมหมู่เมทิล (methyl) ให้กับเบสไซโทซีนบนสายดีเอ็นเอ (Pavlopoulou and Kossida, 2007) ซึ่งเป็นกลไกทาง epigenetics ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในกระบวนการพัฒนาในพืช รวมทั้งกลไกควบคุมการออกดอกในการเปลี่ยนแปลงจากระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบเข้าสู่ระยะออกดอก กลุ่มโปรตีน C5-MTase families ในพืชแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย (Met1, Met2, Met3 และ Met4) โดย Kankel และคณะ (2003) พบว่าเมื่อชักนำให้ยีน *Met1* ในอะราบิดอปซิสเกิดการกลาย (*met1* mutant) ทำให้อะราบิดอปซิสออกดอกช้า มีการเจริญเติบโตในระยะต้นอ่อน (juvenile) เข้าสู่ระยะสมบูรณ์ (adult) ที่ยาวนาน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า

Met1 ในไวต์โทบีทำหน้าที่ส่งเสริมการออกดอกจากผลการทดลองในครั้งนี้ พบยีนกำหนดรหัสเอนไซม์ DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1b ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม 1 (*Met1*) มีการแสดงออกสูงขึ้นในระยะออกดอก ซึ่งสอดคล้องกับกลไกในอะราบิดอปซิส ซึ่งให้ เห็นว่าการออกดอกในมะพร้าวถูกควบคุมด้วยกลไกทาง epigenetics เช่นเดียวกัน

(3) โปรตีน 14-3-3 protein 6 เป็นกลุ่มโปรตีนแฟมิลี ที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนสื่อสัญญาณ (signaling protein) ในการสื่อสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมส่งต่อมายังโปรตีนภายในเซลล์ หรือการสื่อสัญญาณภายในต้นพืช ไม่ว่าจะเป็นการสื่อสัญญาณของฮอร์โมนพืช การเจริญเติบโต หรือการแบ่งเซลล์ เป็นต้น โดย Taoka และคณะ (2011) พบว่าโปรตีน 14-3-3 นี้ เป็น intracellular receptor จับกับโปรตีน Hd3A ในบริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด สื่อสัญญาณกระตุ้นการออกดอกในข้าว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ ที่พบการแสดงออกของยีนกำหนดรหัสโปรตีน 14-3-3 protein 6 และ Hd3A (ไม่แสดงผล) ในเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดในระยะออกดอก

(4) รีโทรทรานส์โพซอนชนิด RLC_Rider_Eg133H20-1 เป็นกลุ่มยีนที่สามารถเคลื่อนย้ายได้โดยอาศัยอาร์เอ็นเอเป็นตัวกลางแล้วสอดแทรกไปยังตำแหน่งเป้าหมายภายในจีโนม ซึ่งสามารถพบได้ในยูแคริโอททั่วไป โดยพบมากที่สุด ในพืช ถึงแม้ว่ายังไม่มียารายงานถึงบทบาทของยีนเคลื่อนที่ในกลไกการควบคุมการออกดอกพืช แต่ Tamaki และคณะ (2015) พบว่าในช่วงชักนำของการออกดอกโดยสารประกอบฟอริเจน (Hd3A-14-3-3-osFD complex) ในข้าว พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของกลุ่มยีนเคลื่อนที่ ทรานส์โพซอน และรีโทรทรานส์โพซอนภายในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดจำนวนมาก ทั้งที่มีการแสดงออกสูงขึ้นและลดลงในระยะออกดอก จึงชี้ให้เห็นว่ายีนเคลื่อนที่มี

บทบาทสำคัญในกลไกควบคุมการออกดอก ซึ่งสนับสนุนผลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ ที่พบรีโทรทรานส์โพซอนชนิด RLC_Rider_Eg133 H20-1 มีการแสดงออกสูงขึ้นในระยะออกดอกเช่นเดียวกัน จึงน่าสนใจในการขยายผลการศึกษาต่อไป

(5) ยีน *ALP1 like transposon* เป็นยีนเคลื่อนที่ (transposon) ที่พบในพืช โดย Liang และคณะ (2015) พบว่าโปรตีน ALP1 ทำงานร่วมกับ PcG complex ยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของยีนเป้าหมายโดยการเติมหมู่เมทิลให้กับโปรตีนฮิสโตน โดยในอะราบิดอปซิส *ALP1* มีส่วนร่วมยับยั้งการแสดงออกของยีน *EMF1* และ *EMF2* *EMBRYOIC FLOWERING 1*, *EMBRYOIC FLOWERING 2* ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ ให้มีการแสดงออกลดลง เพื่อเข้าสู่ระยะออกดอก (Kim *et al.*, 2010) ซึ่งผลการทดลองพบการแสดง ออกของ *ALP1 like* ในระยะออกดอก จึงชี้ให้เห็นว่ากลไกการออกดอกในมะพร้าวถูก

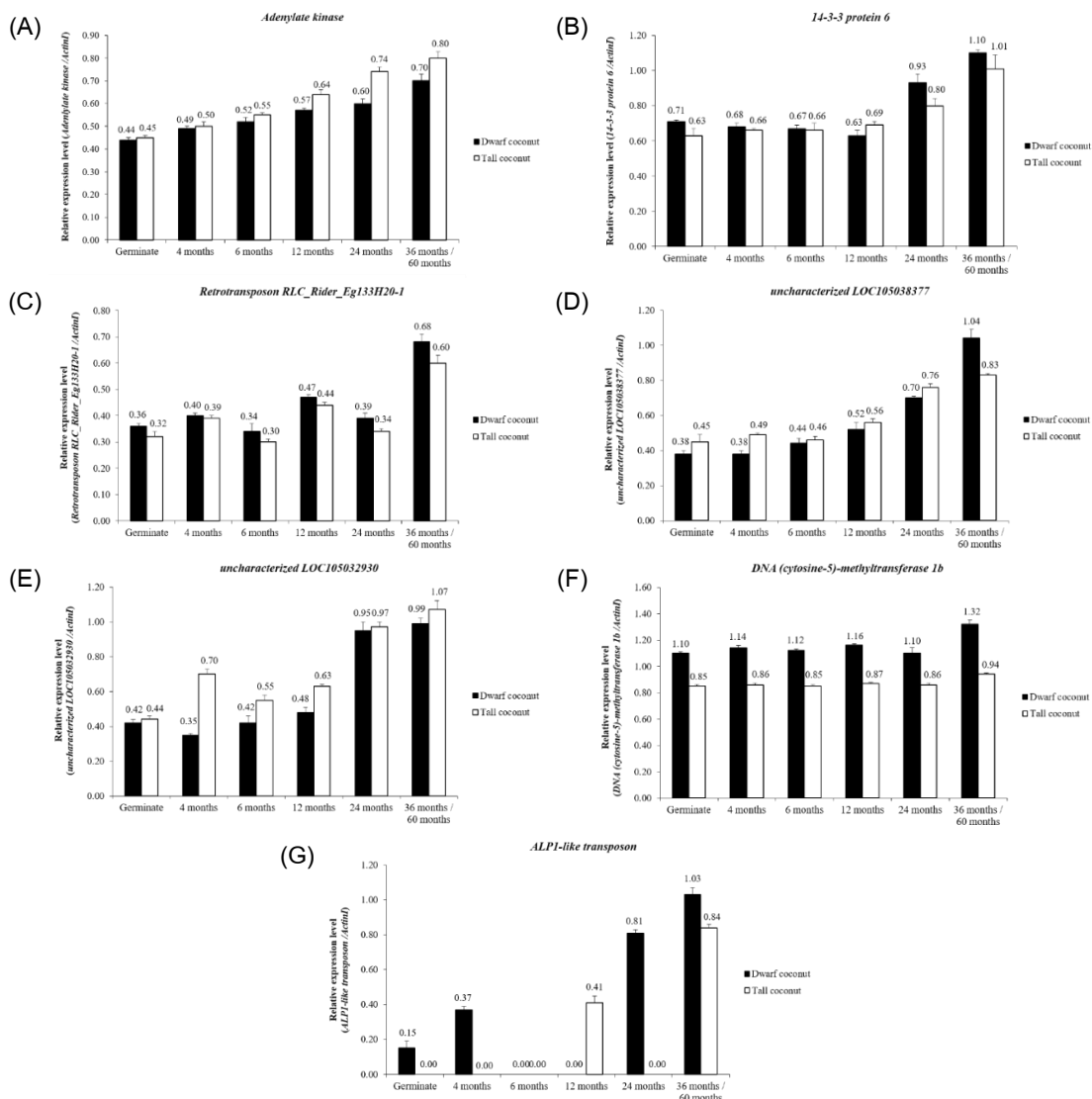
ควบคุมโดยกลไกทาง epigenetics ผ่านการเติมหมู่เมทิลให้กับฮิสโตนเพื่อลดการแสดงออกของยีน *EMF1* และ *EMF2* homolog ในมะพร้าว

3.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของ DEG ระหว่างการเจริญเติบโตและพัฒนาของมะพร้าว ต้นเตี้ยและต้นสูงด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

เพื่อวิเคราะห์บทบาทของ DEG ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของมะพร้าว จึงติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของ DEG ในระหว่างการเจริญเติบโตและพัฒนาตั้งแต่เฟื่องงอกจนถึงระยะออกดอกทั้งในมะพร้าวต้นสูงและต้นเตี้ย (ระยะเฟื่องงอก, 4, 6, 12, 24 และ 36 เดือนในมะพร้าวต้นเตี้ย และ 60 เดือน ในมะพร้าวต้นสูง ซึ่งเป็นระยะออกดอก) พร้อมทั้งค้นหายีนที่คาดว่าจะทำให้มะพร้าวต้นเตี้ยออกดอกเร็ว โดยเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างมะพร้าวทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนกำหนด

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ตรวจสอบการแสดงออกของ DEG ด้วยเทคนิค RT-PCR

Primer name	Sequence (5'→3')	T _m (°C)	T _a (°C)
Rp4.1_F	TCT-CAA-AGT-AGG-TGG-CAA-TC	57.3	52
Rp4.1_R	GAT-CGG-TAA-TGC-TCT-CTC-C	59.3	
Rp4.2_F	TCA-GAG-CTA-GGT-GGT-ATC-AG	60.3	55
Rp4.2_R	TCA-CTC-TTG-CTT-TCC-ATA-AG	60.3	
Rp4.3_F	GTA-ATG-CTG-TCC-CTC-CTC-C	57.3	52
Rp4.3_R	TAG-CCT-GAC-TTC-CAC-CCA-TC	57.3	
Rp4.5_F	TGG-CTC-CAT-GCT-AGA-GAC-AAC	59.3	52
Rp4.5_R	GGC-GGA-CCT-ACA-ACC-AAT-TC	57.3	
RP5.2_F	TAG-TTG-GTA-TGG-GGG-CTT-C	56.7	51
RP5.2_R	TTT-CCC-TGT-TCT-GAG-GTG-C	56.7	
Rp6.3.1_F	CCG-ACA-GGG-CTT-GCA-CTC	60.7	56
Rp6.3.1_R	TAT-CAT-CTG-CCC-CAT-CAT-CC	58.4	
Rp12.1.5_F	CGT-TTC-CTG-TCA-AGG-TAG-CC	60.5	55
Rp12.1.5_R	CAG-CTT-CGG-CCT-TCA-CTG-C	61.7	



รูปที่ 1 ระดับการแสดงออกของยีน *adenylate kinase* (A), *14-3-3 protein 6* (B), *RLC_Rider_Eg133H20-1* (C), *uncharacterized LOC105038377* (D), *uncharacterized LOC105032930* (E), *(cytosine-5)-methyltransferase 1b* (F) และ *ALP1 like transposon* (G) ระหว่างการเจริญเติบโตและพัฒนาในมะพร้าวต้นเตี้ยและต้นสูง

กำหนดรหัสเอนไซม์ *adenylate kinase* แสดงออกตั้งแต่ระยะเฟื่องอกและค่อย ๆ เพิ่มปริมาณจนมีปริมาณสูงสุดที่ระยะออกดอกในมะพร้าวทั้ง 2 กลุ่ม (รูปที่ 1A) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนนี้เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและพัฒนาของมะพร้าวทั้ง 2 กลุ่ม

การแสดงออกของยีนกำหนดรหัสโปรตีน

14-3-3 protein และยีนกำหนดรหัสโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (*uncharacterized LOC105038377* และ *uncharacterized LOC105032930*) นั้น มีการแสดงออกที่ใกล้เคียงกันในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ ตั้งแต่ระยะเฟื่องอกจนอายุ 12 เดือน แล้วเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่ออายุ

24 เดือน และระยะออกดอก (36 เดือน ในมะพร้าวต้นเตี้ย และ 60 เดือน ในมะพร้าวต้นสูง) เหมือนกัน ในมะพร้าวทั้ง 2 กลุ่ม (รูปที่ 1B, 1D และ 1E) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการชักนำการแสดงออกของยีนนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับในกลไกการเข้าสู่ระยะออกดอก อย่างไรก็ตาม น่าจะไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับในกลไกการออกดอกเร็วของมะพร้าวต้นเตี้ย

ยีนกำหนดรหัส retrotransposon_RLC_Rider_Eg133H20-1 มีการแสดงออกในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบที่ใกล้เคียงกัน แล้วถูกชักนำให้มีการแสดงออกที่สูงขึ้นในระยะออกดอกทั้งในมะพร้าวต้นเตี้ยและต้นสูง (รูปที่ 1C) จึงแสดงให้เห็นว่ายีนนี้มีบทบาทสำคัญในระยะออกดอกของมะพร้าวเช่นเดียวกับพืชต้นแบบอะราบิดอปซิส และข้าว (Tamakia *et al.*, 2015) ส่วนการแสดงออกของยีนกำหนดรหัสเอนไซม์ DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1b ถึงแม้ว่าจะรูปแบบการแสดงออกที่เหมือนกันระหว่างมะพร้าวต้นเตี้ยและต้นสูง (รูปที่ 1F) ก็ตาม แต่การแสดงออกของยีนนี้ในมะพร้าวต้นเตี้ยมีแนวโน้มสูงกว่ามะพร้าวต้นสูง ซึ่งอาจทำให้มะพร้าวต้นเตี้ยมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและเข้าสู่ระยะออกดอกที่เร็วกว่า แต่ที่น่าสนใจคือ รูปแบบการแสดงออกของยีน *ALP1 like* (รูปที่ 1G) ที่พบการแสดงออกแบบไดนามิกคือ ในมะพร้าวต้นเตี้ยพบการแสดงออกตั้งแต่เฟื่องอกและ 4 เดือน จากนั้นการแสดงออกหายไปไม่สามารถตรวจพบในมะพร้าวอายุ 6 และ 12 เดือน และกลับมาพบการแสดงออกอีกครั้งเมื่อมะพร้าวอายุ 24 เดือน ซึ่งเข้าสู่ระยะสมบูรณ์ (adult phase) แล้วมีการแสดงออกที่สูงขึ้นอย่างชัดเจนในระยะออกดอกคือ 36 เดือน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *ALP1 like* มีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโตของมะพร้าวทั้งในระยะต้นอ่อนและการเข้าสู่ระยะออกดอก ส่วนในมะพร้าวต้นสูงนั้นพบการแสดงออกที่อายุ 12 เดือน ซึ่งยังเป็นระยะต้นอ่อนและกลับมา

พบการแสดงออกอีกครั้งในระยะออกดอกที่อายุ 60 เดือน จากข้อมูลนี้อธิบายได้ว่า *ALP1 like* ในมะพร้าวต้นเตี้ยถูกชักนำให้มีการแสดงออกที่เร็วกว่าต้นสูง จึงส่งผลให้มะพร้าวต้นเตี้ยมีการเจริญเติบโตรวดเร็วมีระยะ juvenile phase สั้นเข้าสู่ระยะสมบูรณ์ (adult phase) ได้เร็วกว่ามะพร้าวต้นสูง จึงสรุปว่ายีน *ALP1 like* น่าจะมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการแสดงออกของกลุ่มยีนควบคุมการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ โดยที่สำคัญคือ ยีน *EMF1* และ *EMF2* (Kim *et al.*, 2010) จึงส่งผลให้มะพร้าวต้นเตี้ยมีระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบที่สั้นลง และออกดอกเร็วกว่ามะพร้าวต้นสูง

4. สรุปผลการทดลอง

กลไกควบคุมการออกดอกของมะพร้าว ซึ่งเป็นไม่ยีนต้นที่มีระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบยาวนานนั้น ควบคุมด้วยยีนจำนวนมากอย่างน้อย 93 ยีน การทดลองครั้งนี้สามารถบ่งชี้ยีนที่เกี่ยวข้องจำนวน 7 ยีน กำหนดรหัสเอนไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึมของพลังงาน (*adenylate kinase*) ยีนกำหนดรหัสเอนไซม์ในกลไก epigenetics [DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1b และ *ALP1 like* transposon] ยีนกำหนดรหัสโปรตีนในวิถีการสื่อสารสัญญาณ (*14-3-3 protein 6*) รีโทรทรานส์โพซอน (RLC_Rider_Eg133H20-1) และยีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (uncharacterized LOC105038377 และ uncharacterized LOC105032930) โดยยีนเหล่านี้มีรูปแบบการแสดงออกที่คล้ายคลึงกันระหว่างมะพร้าวต้นสูงและต้นเตี้ย ยกเว้นยีน *ALP1 like* ซึ่งเป็นยีนเคลื่อนที่ มีรูปแบบการแสดงออกแบบไดนามิกโดยมะพร้าวต้นเตี้ยมีการแสดงออกที่เร็วกว่ามะพร้าวต้นสูง จึงเชื่อว่าการแสดงออกของยีนนี้น่าจะมีบทบาทต่อการออกดอกเร็วของมะพร้าวต้นเตี้ย ผ่านกลไก epigenetics โดยไปยับยั้งการแสดงออกของยีน *EMF1* และ *EMF2* ที่ควบคุมการ

เจริญเติบโตทางลำต้นและใบ ดังนั้นควรขยายผลการศึกษาเชิงลึกต่อไป

5. รายการอ้างอิง

- Araki, T., 2001, Transition from vegetative to reproductive phase, *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 63-68.
- Berardini, T.Z., Bollman, K., Sun, H. and Poethig, R.S., 2001, Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40, *Science* 291: 2405-2407.
- Bergonzi, S. and Albani, M. C. , 2011, Reproductive competence from an annual and perennial Perspective, *J. Exp. Bot.* 62: 4415-4422.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. and Benning, C., 1998, AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development, *EMBO. J.* 17: 170-180.
- Boss, P.K., Bastow, R.M., Mylne, J.S. and Dean, C., 2004, Multiple pathways in the decision to flower: Enabling, promoting, and resetting, *Plant Cell* 16: 18-31.
- Clarke, J.H., Tack, D., Findlay, K., van Montagu, M. and Van Lijsebettens, M., 1999, The *SERRATE* locus controls the formation of the early juvenile leaves and phase length in *Arabidopsis*, *Plant J.* 20: 493-501.
- Colonna-Romano, S., Leone, A. and Maresca, B., 1998, Differential-Display Reverse Transcription-PCR (DDRT-PCR), Springer Berlin Heidelberg.
- Hattasch, C., Flachowsky, H., Kapturska, D. and Hanke, M.V., 2008, Isolation of flowering genes and seasonal changes in their transcript levels related to flower induction and initiation in apple (*Malus domestica*), *Tree Physiol.* 28: 1459-1466.
- Hackett, W.P., 1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plant, *Hort. Rev.* 7: 109-155.
- Hunter, C., Sun, H. and Poethig, R.S., 2003, The *Arabidopsis* heterochronic gene *ZIPPY* is an ARGONAUTE family member, *Curr. Biol.* 13: 1734-1739.
- Kankel, M.W., Ramsey D.E., Stokes T.L., Flowers S.K., Haag J.R., Jeddelloh J.A., Riddle, N.C., Verbsky M. L. and Richards E.J. 2003. *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics.* 163: 1109-22.
- Kim, S.Y., Zhu, T. and ReneeSung, Z.R., 2010, Epigenetic regulation of gene programs by EMF1 and EMF2 in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 152: 516-528.
- Lawson, E.J. and Poethig, R.S., 1995, Shoot development in plant: time for a change, *Trends Genet.* 11: 263-268.
- Li, J.X., Hou, X.J., Zhu, J., Zhou, J.J., Huang, H.B., Yue, J.Q., Gao, J.Y., Du, Y.X., Hu, C.X., Hu, C.G. and Zhang J.Z., 2017, Identification of genes associated with lemon floral transition and flower development during floral inductive water deficits: A hypothetical model, *Front. Plant. Sci.* 8: 1-17.
- Liang, S. C. , Hartwig, B. , Perera, P. , Mora-García, S. , Leau, E. , Thornton, H. , Alves,

- F.L., Rapsilber, J., Yang, S., James, G.V., Schneeberger, K., Finnegan, E. J., Turck, F. and Goodrich, J., 2015, Kicking against the PRCs: A domesticated transposase antagonises silencing mediated by polycomb group proteins and Is an accessory component of polycomb repressive complex 2, *PLoS Genet.* 11: 1-26.
- Martin-Trillo, M. and Martinez-Zapater, J.M., 2002, Growing up fast: manipulating the generation time of trees, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 151-155.
- Mongkolsiriwatana, C., 2008, Expression Analysis of Photoperiod Responsive Genes in Rice (*Oryza sativa* L.) KDML 105, Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H. and Poethig, R.S., 2005, Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102: 3691-3696.
- Pavlopoulou, A. and Kossida, S., 2007, Plant cytosine- 5 DNA methyltransferases: Structure, function, and molecular evolution, *Genomics* 90: 530-541.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L. and Poethig, R.S., 2004, SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of *trans*-acting siRNAs in *Arabidopsis*, *Genes Dev.* 18: 2368-2379.
- Schlattner, U. and Wagner, E., 2001, The adenylate kinase family in plants: Isoenzyme activity is related to flower induction, *Endocyt. Cell Res.* 14: 67-73.
- Simpson, G.G., Gendall, A.R. and Dean, C., 1999, When switch to flowering, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15: 519-550.
- Smith, M.R., Willmann, M.R., Wu, G., Berardini, T.Z., Moller, B., Weijers, D. and Poethig, R.S., 2009, Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in *Arabidopsis*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 106: 5424-5429.
- Tamania, S., Tsujib, H., Matsumoto, A., Fujitab, A., Shimatanib, Z., Teradac R., akamotoa, T., Kurata, T. and Shimamoto, K., 2015, FT-like proteins induce transposon silencing in the shoot apex during floral induction in rice, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 112: E901-E910.
- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, C., Purwestri, Y. A., Tamaki, S., Ogaki, Y., Shimada, C., Nakagawa, A., Kojima, C. and Shimamoto, K., 2011, 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen, *Nature* 476: 332-335.
- Telfer, A. and Poethig, R.S., 1998, *HASTY*: a gene that regulates the timing of shoot maturation in *Arabidopsis thaliana*, *Development* 125: 1889-1898.
- Yang, L., Huang, W., Wang, H., Cai, R., Xu, Y. and Huang, H., 2006, Characterizations of a hypomorphic argonaute1 mutant reveal novel *AGO1* functions in *Arabidopsis* lateral organ development, *Plant Mol. Biol.* 61: 63-78.