การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีนในวิถีสื่อสัญญาณฮอร์โมน Brassinosteroid เพื่อควบคุมการออกดอกของมะพร้าว (*Cocos nucifera* L.)

Differentially Expression Display of Brassinosteroid Signaling Genes to Control Flowering Transition of Coconut (*Cocos nucifera* L.)

ปริยา มณีประเสริฐ และสุรินทร์ ปิยะโชคณากุล

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

ศลยา สุขสอาด และจรีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา[a]*

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ตำบลกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Pariya Maneeprasert and Surin Peyachoknagul

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

Solaya Suksa-ard and Chareerat Mongkolsiriwatana*

Division of Genetics, Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Kamphaengsaen, Nakorn-pathom 73140

บทคัดย่อ

เพื่อให้ทราบถึงกลไกควบคุมการออกดอกในระดับโมเลกุลของมะพร้าว (*Cocos nucifera* L.) ซึ่งมีระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบที่ยาวนาน จึงค้นหายีนที่ควบคุมการเปลี่ยนจากระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบเข้าสู่ระยะออกดอกด้วยเทคนิค DDRT-PCR (differential display RT-PCR) โดยเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (SAM) ของมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ยระหว่างระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (เพิ่งงอก 4, 6, 12 และ 24 เดือน) กับระยะออกดอก (36 เดือน) พบยีนกำหนดรหัสเอนไซม์ในวิถีการสื่อสัญญาณของฮอร์โมน brassinosteroid ที่แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างเนื้อเยื่อทั้ง 2 ระยะ ได้แก่ ยีน

[a]หน่วยวิจัยเทคโนโลยีพันธุศาสตร์และการประยุกต์ใช้ คณะศิลปะศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ตำบลกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** faascrp@ku.ac.th

SERK1-like (*somatic embryogenesis receptor kinase 1-like*) มีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ ขณะที่ยีน *FEI 1* (LRR-receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1) *BZR1* (*BZR1 homolog 3-like*) มีการแสดงออกสูงในระยะออกดอก และยังพบการแสดงออกของยีน *inactive LRR-RLK* (*leucine rich repeat receptor like kinase*) ที่อยู่ในวิถี CLAVATA มีการแสดงออกสูงในระยะออกดอก ชี้ให้เห็นว่าการออกดอกในมะพร้าวควบคุมด้วยฮอร์โมน brassinosteroid ที่ทำงานร่วมกับวิถี CLAVATA เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในระหว่างการเจริญเติบโตและพัฒนา (ตั้งแต่งอกจนถึงระยะออกดอก) ของมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ยและสายพันธุ์ต้นสูง พบว่ายีน *SERK-1 like* มีการแสดงออกสูงสุดที่ระยะเพิ่งงอก และมีแนวโน้มลดลง ซึ่งตรงกันข้ามกับยีน *FEI 1, inactive LRR-RLK* และ *BZR1 homolog 3-like* ซึ่งมีการแสดงออกต่ำสุดในระยะเพิ่งงอก แล้วมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะการเจริญเติบโตและพัฒนา โดยพบการแสดงออกสูงสุดที่ระยะออกดอก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการทำงานร่วมกันของยีนในวิถีสื่อสัญญาณฮอร์โมน brassinosteroid นั้นมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงระยะการเจริญเติบโตและพัฒนาของมะพร้าว และเป็นที่น่าสังเกตว่าการแสดงออกของยีน *inactive LRR-RLK* ในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ยถูกชักนำให้มีการแสดงออกที่เร็วและสูงกว่ามะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูง จึงเป็นไปได้ว่าการควบคุมการแสดงออกของยีนนี้น่าจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้มะพร้าวต้นเตี้ยมีระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบที่สั้นกว่ามะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูง

คำสำคัญ : การออกดอก; มะพร้าว; เจริญเติบโตทางลำต้นและใบที่ยาวนาน; ฮอร์โมนบราสสิโนสเตอรอยด์

Abstract

To elucidate molecular mechanism to control flowering transition of coconut (*Cocos nucifera* L.), which has a prolong vegetative growth phase, DDRT-PCR (differential display RT-PCR) was used to identify genes involved in a regulation change from vegetative growth phase to reproductive phase. Comparative expression of genes in somatic apical meristem (SAM) during vegetative growth phase (germination, 4, 6, 12 and 24 months of age) and reproductive phase (36 months of age) of dwarf coconut was performed. Genes encoding enzymes in brassinosteroid signaling showed differentially display expression. *SERK1-like* (*somatic embryogenesis receptor kinase 1 like*), was up-regulated in vegetative phase, whereas *FEI 1* (LRR-receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1) and *BZR1* (*BZR1 homolog 3-like*) was up-regulated in reproductive phase. In addition, *inactive LRR-RLK* (*leucine rich repeat receptor like kinase*), which functions to control CLAVATA pathway was up-regulated in reproductive phase. This indicated that flowering transition of coconut was controlled by brassinosteroid hormone in coordination with CLAVATA pathway. Monitoring of their expression throughout growth and development was further performed both in dwarf and tall coconuts using quantitative real-time PCR. The result revealed that *SERK1-like* showed the highest expression at germination stage and its expression decreased during growth and development in both types of coconut. In contrast, *FEI 1, inactive LRR-RLK* and *BZR1 homolog 3-like* showed the

lowest expression at germination stage and gradually increased in corresponding to growth and development. The highest expression was found at reproductive phase. These indicated that coordination of brassinosteroid signaling genes played a role to regulate phase changes of coconut. Obviously, expression of *inactive LRR-RLK* in dwarf type was induced earlier and higher than in tall coconut, indicating that shorten vegetative growth phase of dwarf coconut was probably controlled by *inactive LRR-RLK* expression.

Keywords: flowering transition; coconut; prolong vegetative growth phase; brassinosteroid hormone

1. บทนำ

มะพร้าว (*Cocos nucifera* L.) จัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากผลของมะพร้าวทั้งผลอ่อนและผลแก่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิด ทั้งในส่วนเนื้อมะพร้าว น้ำมะพร้าว และน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (virgin oil) ที่มีสมบัติออกฤทธิ์ในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น การรักษาโรคติดเชื้อไวรัส HIV ไวรัสตับอักเสบ ไวรัสซาร์ (SAR) โรคหัวใจและหลอดเลือด มะเร็ง เบาหวาน โรคสมองเสื่อม กระดูกพรุน กลุ่มอาการหมดประจำเดือน ฯลฯ (Coconut Research Center; http://www.coconutresearchcenter.com) จึงทำให้ผลิตภัณฑ์มะพร้าวเป็นที่ต้องการของตลาดโลก มะพร้าวเป็นพืชท้องถิ่นของประเทศไทย มีฐานพันธุกรรมที่หลากหลาย สามารถนำมาพัฒนาพันธุ์ให้มีลักษณะเฉพาะสำหรับการผลิตมะพร้าวเชิงสมุนไพร เพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตของมะพร้าวให้แก่เกษตรกรไทย อย่างไรก็ตาม การผลิตมะพร้าวมีข้อจำกัดทั้งในด้านระยะเวลาการปลูกจนกระทั่งเก็บเกี่ยวผลผลิต และการปรับปรุงพันธุ์แบบผสม เนื่องจากเป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตช้ามีระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (vegetative growth phase) ที่ยาวนานใช้เวลา 5-6 ปี สำหรับมะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูง หรือ 3 ปี สำหรับสายพันธุ์ต้นเตี้ย จึงจะสามารถออกดอกและให้ผลผลิต ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานานกว่าจะเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร ดังนั้นแนวทางในการแก้ไขปัญหา คือ การพัฒนาเทคโนโลยีร่นอายุการออกดอกของมะพร้าว หรือกำหนดอายุการออกดอกของมะพร้าวได้ จะช่วยให้เกษตรกรสวนมะพร้าวมีรายได้เร็วขึ้น หรือกำหนดการออกดอกตามความต้องการของตลาด ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่นักวิจัยต้องทราบถึงกลไกควบคุมการออกดอกในระดับโมเลกุลของมะพร้าว ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีรายงาน

การออกดอก (flowering transition) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (somatic apical meristem, SAM) จากการสร้างลำต้นและใบมาเป็นการสร้างดอก โดยตลอดการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืชแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ (1) juvenile phase คือ ตั้งแต่เพิ่งงอกจนกระทั่งเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อเจริญมีความพร้อมที่จะถูกชักนำการออกดอก (2) adult phase หรือ reproductive competence คือ ระยะที่มีความพร้อมที่จะถูกชักนำโดยสิ่งแวดล้อมภายนอก หรือ ภายในต้นพืชให้เข้าสู่ระยะออกดอก และ (3) ระยะออกดอก หรือ reproductive phase คือ ระยะที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเปลี่ยนเป็นการสร้างดอก [1-4] ซึ่งอายุการออกดอกของพืชแต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับความยาวนานของระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบใน juvenile phase [5] ซึ่งการเปลี่ยนแปลงจาก juvenile phase เข้าสู่ adult phase นั้นสามารถสังเกตได้จากการ

เปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานภายนอกของพืช เช่น ขนาดใบ รูปร่างของใบ การปรากฏหนามที่ลำต้น และความสามารถในการออกรากลดลงเมื่อพืชเข้าสู่ adult phase โดยยังไม่มีรายงานในมะพร้าว

กลไกการควบคุม juvenile phase ในระดับโมเลกุลนั้นได้มีการศึกษาในพืชต้นแบบอะราบิดอปซิส มีรายงานว่าควบคุมโดยยีน *SERRATE, SUPPRESSOR OF GENE SILENCING3* และ *SUPPRESSOR OF GENE SILENCING2/ SILENCING DEFCTIVE1/ RNA DEPENDENT POLYMERASE6* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ (micro RNA) [6,7] นอกจากนี้ยังมียีน *ARGONAUTE1*, *ZIPPY*, *SQUINT* และ *HASTY* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอในการลดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย โดยการตัดหรือยับยั้งกระบวนการแปลรหัสของเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย [8-14] และเมื่อยีนเหล่านี้ถูกชักนำให้เกิดการกลายในอะราบิดอปซิส พบว่าเป็นการเร่งการเข้าสู่ระยะสมบูรณ์พันธุ์ มี juvenile phase ที่สั้นลง และออกดอกได้เร็วขึ้น จึงจัดยีนเหล่านี้ให้อยู่ในกลุ่มยับยั้งการออกดอก (floral repressor) โดยไปควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาทางลำต้นและใบ นอกจากนี้ยังมียีน *EMF1* และ *EMF2* (*EMBRYONIC FLOWER1* และ *EMBRYONIC FLOWER*2) ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญและพัฒนาทางลำต้นและใบ [15] เมื่อยีนนี้เกิดการกลาย (*Emf*) ทำให้อะราบิดอปซิสออกดอกทันทีหลังจากงอก โดยไม่มีช่วง juvenile phase โดยที่ยีน *EMF1* กำหนดรหัสโปรตีน transcription factor ส่วนยีน *EMF2* กำหนดรหัสโปรตีนในกลุ่ม polycomb (PcG) ที่รวมตัวกับโปรตีนอื่นเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในกระบวนการยับยั้งการแสดงออก (gene silencing) ของยีนเป้าหมาย โดยผ่านกลไกการดัดแปลงโปรตีนฮีสโตน (histone modification) ของโครมาทิน โดยยีนทั้งสองทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนในกลุ่มสร้างส่วนประกอบต่าง ๆ ของดอก ได้แก่ *AGAMOUS*, *PISTILATA* และ *APETALA 3* [16] ส่วนการศึกษาในไม้ยืนต้นยังไม่มีข้อมูล

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงได้ทำการค้นหายีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงจากระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบเข้าสู่ระยะออกดอก (transition) ของมะพร้าวด้วยเทคนิค DDRT-PCR (differentially display RT-PCR) รวมทั้งยีนควบคุมการเจริญเติบโตในระยะ juvenile เพื่อนำไปสู่การอธิบายกลไกการควบคุมการออกดอกของมะพร้าว และยีนใดที่มีบทบาทเกี่ยวข้องทำให้มะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูงออกดอกช้า และมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ยออกดอกเร็ว เพื่อนำผลการวิจัยในครั้งนี้ไปขยายผล พัฒนาเทคโนโลยี และประยุกต์ใช้ในอนาคตต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของมะพร้าวและสกัดอาร์เอ็นเอรวม

เก็บตัวอย่างยอดมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ยและสายพันธุ์ต้นสูงในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (vegetative growth) ได้แก่ ระยะเพิ่งงอก, 4, 6, 12 และ 24 เดือน และระยะออกดอก (reproductive growth) ได้แก่ 36 เดือนในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ย และ 60 เดือนในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูง มาสกัดอาร์เอ็นเอรวมด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Trizol® (Invitrogen, USA) ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase I (NEB, England) ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 (OD_{260}) และ 280 (OD_{280}) นาโนเมตร แล้วหาค่า OD_{260}/OD_{280} และวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำอาร์เอ็นเอรวมของมะพร้าวต้นเตี้ย ระยะเพิ่งงอก, 4, 6, 12 และ 24 เดือน แต่ละระยะในปริมาณที่เท่ากันมา

รวมกันเพื่อใช้เป็นตัวแทนของอาร์เอ็นเอรวมระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (Vg-RNA) ส่วนอาร์เอ็นเอรวมที่ระยะ 36 เดือน นั้น ใช้เป็นตัวแทนอาร์เอ็นเอรวมระยะออกดอก (Rp-RNA)

2.2 การค้นหายีนที่เกี่ยวข้องในกลไกการควบคุมออกดอกของมะพร้าวด้วยเทคนิค DDRT-PCR (differential display RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอรวมที่เป็นตัวแทนของระยะระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (Vg-RNA) และระยะออกดอก (Rp-RNA) มาค้นหายีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างเนื้อเยื่อทั้ง 2 ระยะ ด้วยเทคนิค DDRT-PCR ที่ดัดแปลงจาก Colonna-Romano และคณะ (1998) โดยตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน (differentially expressed genes, DEGs) ด้วยเจลพอลิอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ นำแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง สกัดแยกออกจากเจล นำมาเพิ่มปริมาณอีกครั้งหนึ่งด้วยไพรเมอร์คู่เดิม โคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEM®-T Easy vector (Promega, USA) ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM 109 คัดเลือกโคโลนีสีขาว นำมาสกัดแยกพลาสมิดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Presto™ mini Plasmid kit (Geneaid, Korea) แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen sequencing service (Korea) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูลสากลด้วยโปรแกรม BlastN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนจากฐานข้อมูล KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real time PCR

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอมาสังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) แล้วนำ cDNA สายแรกที่ได้ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitogen, USA) โดยใช้เครื่อง Master cycler EP Gradient S (Eppendorf, Germany) และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนแบบ relative (ΔC_T) โดยใช้ระดับการแสดงออกของยีน *Actin1* ในการปรับค่า (normalization)

3. ผลการวิจัย

การค้นหายีนที่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกัน ระหว่างเนื้อเยื่อเจริญของยอดมะพร้าวระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ และระยะออกดอกด้วยเทคนิค DDRT-PCR พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันจำนวนมาก เมื่อนำแถบดีเอ็นเอเหล่านั้นมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเปรียบเทียบความเหมือน กับยีนในฐานข้อมูล GenBank พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 4 แถบที่มีความเหมือนกับยีนที่กำหนดเอนไซม์ในวิถีการสื่อสัญญาณ (signal transduction) ของฮอร์โมน brassinosteroid (BR) ได้แก่ ยีน *FEI1* กำหนดรหัสเอนไซม์ LRR-receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1, ยีน *BZR1 homolog 3-like* กำหนดรหัสโปรตีน protein BZR1 homolog 3-like, ยีน *inactive LRR-RLK* กำหนดเอนไซม์ inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase ซึ่งแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดระยะออกดอก และยีน *SERK1-like* กำหนดรหัสเอนไซม์ somatic embryogenesis receptor kinase 1-like ซึ่งแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อเจริญระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (ตารางที่ 1)

เมื่อนำยีนเหล่านี้มาวิเคราะห์บทบาทหน้าที่

การทำงานในกระบวนการทางชีววิทยา โดยใช้ฐานข้อมูล KEGG ร่วมกับข้อมูลจากวารสารวิทยาศาสตร์ระดับสากล พบว่าเอนไซม์ LRR-receptor-like serine/ threonine- protein kinase FEI 1 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สื่อสัญญาณในวิถีควบคุมการสร้างผนังเซลล์ในพืช (การสังเคราะห์เซลลูโลส) โดยตอบสนองต่อฮอร์โมน BR ในการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาในพืช [17] ซึ่งจากการทดลองพบว่ายีนที่กำหนดเอนไซม์ชนิดนี้ถูกชักนำให้มีการแสดงออกที่สูงขึ้นในระยะออกดอก จึงชี้ให้เห็นว่าการชักนำการออกดอกในมะพร้าวนั้นเป็นการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเซลล์ที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดจากการสร้างลำต้นและใบให้เป็นการสร้างจุดกำเนิดดอก

ตารางที่ 1 ยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างระหว่างระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ และระยะออกดอก

ชื่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอ	ขนาด (คู่เบส)	กำหนดรหัสเอนไซม์/โปรตีน	หมายเลขในฐานข้อมูล	ระยะที่มีการแสดงออกสูง
Rp12.1	229	LRR-receptor-like serine/ threonine-protein kinase FEI 1	XM_008798420.1	ระยะออกดอก
Rp13.1	276	protein BZR1 homolog 3-like	XM_010926404.1	ระยะออกดอก
Rp13.3	127	Inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase	XM_010914836.1	ระยะออกดอก
Vg13.2	145	Somatic embryogenesis receptor kinase 1-like	XM_008793135.1	ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ

เอนไซม์ inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase เป็นเอนไซม์ในกระบวนการสื่อสัญญาณ ในวิถี CLAVATA (CLV)-like pathway ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงบริเวณเนื้อเยื่อเจริญให้เป็นการสร้างใบและลำต้น หรือการสร้างดอก โดยเอนไซม์นี้เป็นตัวรับสัญญาณของเพปไทด์ CLV3 ที่ทำงานร่วมกับ CLV1 และ CLV อื่น ๆ ในการชักนำการออกดอกในอะราบิดอปซิส [18] จากผลการทดลองพบยีนที่กำหนดเอนไซม์ inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase นี้มีการแสดงออกสูงในระยะออกดอก จึงชี้ให้เห็นว่ากลไกควบคุมการออกดอกในมะพร้าวนั้นถูกควบคุมด้วยวิถี CLAVATA โดยการตอบสนองต่อฮอร์โมนเช่นเดียวกับการออกดอกที่ควบคุมด้วยวิถีอิสระ (autonomous pathway) ใน อะราบิดอปซิส [19] และการออกดอกในแอปเปิ้ล [20]

โปรตีน BZR1 homolog 3-like เป็น transcription factor ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อฮอร์โมน BR ที่ทำหน้าที่ชักนำการออกดอกในพืช จากการทดลองพบยีนที่กำหนดโปรตีน BZR1 homolog 3-like นี้มีการแสดงออกสูงขึ้นในเนื้อเยื่อเจริญระยะออกดอก จึงเป็นการยืนยันได้ว่าการควบคุมการออกดอกของมะพร้าวนั้นถูกควบคุมด้วยฮอร์โมน BR

เอนไซม์ somatic embryogenesis receptor kinase 1-like (*SERK1*-like) ทำหน้าที่สื่อสัญญาณในวิถี brassinolid signaling ซึ่งเป็นสัญญาณของฮอร์โมน BR ที่ควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาของ

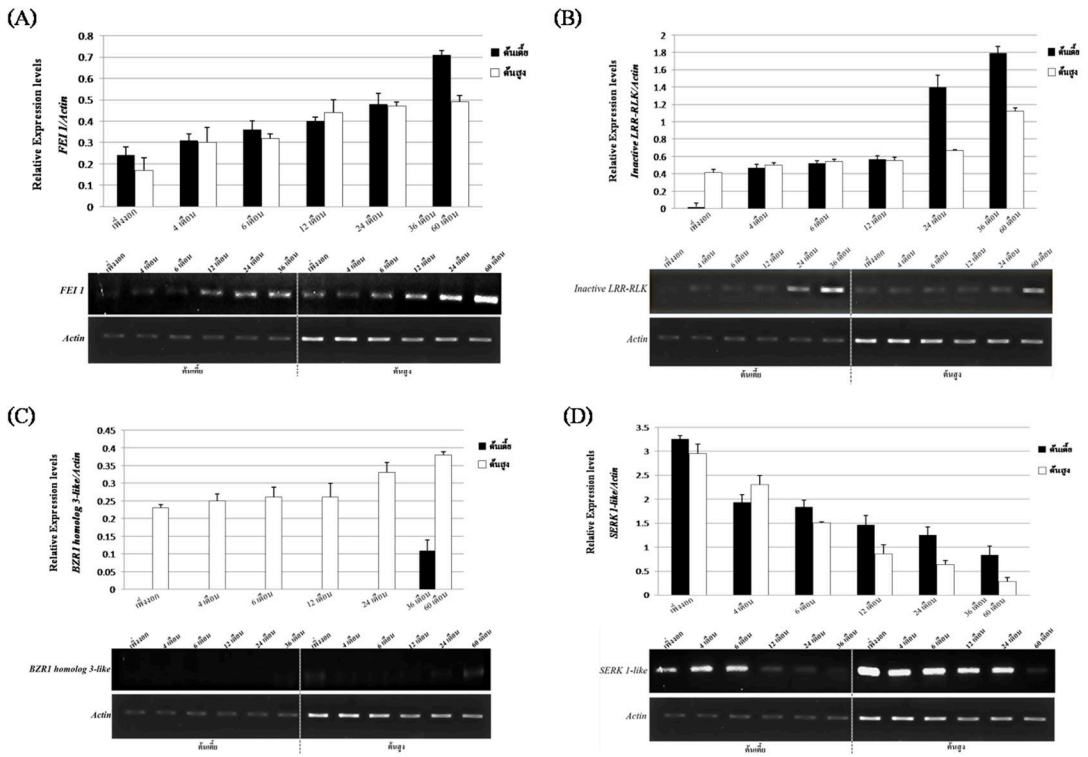
พืชตั้งแต่งอกตลอดการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ โดยทำงานร่วมกับฮอร์โมนออกซิน (auxin) ในการควบคุมการเจริญเติบโตในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบของอะราบิดอปซิส [21] โดยพบการแสดงออกสูงในระยะต้นอ่อนและลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะออกดอก เช่นเดียวกับที่พบในการทดลองนี้ จึงชี้ให้เห็นว่ายีน *SERK1*-like ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญ เติบโตทางลำต้นและใบของมะพร้าว

เพื่อค้นหาต่อไปว่ายีนที่อยู่ในวิถีการสื่อสัญญาณของฮอร์โมน BR ที่ได้จากการทดลองนี้มีรูปแบบการแสดงออกที่ตอบสนองตลอดระยะการเจริญเติบโตและพัฒนาของมะพร้าวทั้งสายพันธุ์ต้นเตี้ย (ออกดอกเร็ว) และสายพันธุ์ต้นสูง (ออกดอกช้า) อย่างไร จึงออกแบบไพรเมอร์ใหม่ให้มีความจำเพาะต่อยีน (ตารางที่ 2) แล้วนำมาตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ คือ เพิ่งงอก, 4, 6, 12, และ 24 เดือน และระยะออกดอก คือ 36 เดือน ในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ย และ 60 เดือน ในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูง ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR พบว่ายีน *FEI1* มีการแสดงออกต่ำสุดที่ระยะเพิ่งงอกแล้วเพิ่มขึ้นจนสูงสุดเมื่อเข้าสู่ระยะออกดอกทั้งในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ยและสายพันธุ์ต้นสูง (รูปที่ 1A) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนนี้ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาของมะพร้าวเพื่อให้มะพร้าวมีความสมบูรณ์และพร้อมที่จะเข้าสู่ระยะออกดอก ซึ่งคล้ายคลึงกับการแสดงออกของยีน *inactive LRR-RLK* แต่มีข้อแตกต่าง คือ การแสดงออกของยีน *inactive LRR-RLK* ในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ย ตั้งแต่ระยะเพิ่งงอกจนถึง 12 เดือนนั้น มีระดับการแสดงออกที่ใกล้เคียงกัน แล้วมีระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นอย่างชัดเจนที่อายุ 24 เดือน (รูปที่ 1B) ซึ่งต่างจากมะพร้าวต้นสูงที่การแสดงออกของยีนนี้ใกล้เคียงกันจนอายุถึง 24 เดือน แล้วจึงถูกชักนำให้มีการแสดงออกสูงในระยะออกดอกเมื่ออายุ 60 เดือน ชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *inactive LRR-RLK* ในการตอบสนองต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ยนั้นเร็วกว่ามะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูง อีกทั้งยังมีระดับการแสดงออกของยีนนี้ที่อายุ 24 และ 36 เดือน สูงกว่ามะพร้าวต้นสูงอีกด้วย (รูปที่ 1B) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการถูกชักนำให้มีแสดงออกสูงที่อายุเพียง 24 เดือน น่าจะมีบทบาทสำคัญที่ชักนำการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดจากการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบให้มีความพร้อมที่จะพัฒนาเป็นดอก ส่วนการแสดงออกของยีน *BZR1 homolog 3-like* ในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูงมีการแสดงออกที่ใกล้เคียงกันตั้งแต่อายุเพิ่งงอกจนถึงอายุ 12 เดือน และมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่ออายุ 24 และ 60 เดือน (ระยะออกดอก) ตามลำดับ ส่วนในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ยกลับไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนนี้เลย จนเข้าสู่ระยะออกดอกจึงสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนนี้ได้ (รูปที่ 1C) แสดงว่าการแสดง ออกของยีนนี้ในระยะการเจริญ เติบโตทางลำต้นและใบของมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ยนั้นต่างจากมะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูง ชี้ให้เห็นว่ายีนนี้นอกจากจะมีบทบาทเกี่ยวข้องในการชักนำการออกดอกแล้วยังอาจทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตด้านความสูงของมะพร้าวด้วย

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *SERK1* ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของมะพร้าวระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ พบว่าการแสดงออกของยีนนี้ตั้งแต่ระยะเพิ่งงอกจนเข้าสู่ระยะออกดอกนั้น มีแนวโน้มลดลงโดยไม่พบจุดเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนทั้งในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูงและสายพันธุ์ต้นเตี้ย (รูปที่ 1D) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนนี้มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อฮอร์โมน BR ในการควบคุมการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ และลดลงเมื่อมีการสร้างดอก

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในวิถีการตอบสนองต่อฮอร์โมน BR

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′→3′)	ค่า T_m (°C)	ค่า T_a (°C)
Rp12.1_F	GTT-GGA-TCA-GGT-GGA-TTT-GG	57.3	52
Rp12.1_R	CTA-AGC-TGC-CTA-AGG-CCA-AG	59.3	52
Rp13.1_F	AGC-TTG-TAG-TTG-CCG-TAC-ATC-C	60.3	55
Rp13.1_R	CTT-GAG-TCT-GAT-CCG-GTT-TCT-C	60.3	55
Rp13.3_F	CGC-AGG-TGA-GTT-ATC-CAT-GT	57.3	52
Rp13.3_R	CCA-CCT-CCA-AAC-GCT-AAG-AT	57.3	52
Vg13.2_F	TCT-TGA-GGA-GGT-GGA-GTG-TG	59.3	52
Vg13.2_R	GTT-TTC-GCA-GCT-CGT-CTT-GT	57.3	52



รูปที่ 1 รูปแบบการแสดงออกของยีน *FEI 1* (A), *Inactive LRR-RLK* (B), *BZR1 homolog 3-like* (C) และ *SERK1-like* (D) ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (เพิ่งงอก, 4, 6, 12 และ 24 เดือน) และระยะออกดอกมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ย (36 เดือน) และสายพันธุ์ต้นสูง (60 เดือน)

จากผลการวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนในกระบวนทางชีววิทยาจะเห็นได้ว่าการควบคุมการออกดอกในมะพร้าวเกี่ยวข้องกับการสื่อสัญญาณและส่งต่อของฮอร์โมน BR โดยผ่านกลไกการเปลี่ยนแปลง

ของผนังเซลล์ (cell wall signaling) ไปยังวิถี CLAVATA ที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อเจริญจากการสร้างลำต้นและใบให้เป็นการสร้างดอกโดยไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ชักนำการออกดอก โดย transcription factor ชนิด BZR1 homolog 3 like

4. วิจารณ์

การออกดอก (flowering transition) เป็นกลไกที่สลับซับซ้อน ควบคุมด้วยยีนจำนวนมากที่ทำงานร่วมกันในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดให้มีการสร้างจุดกำเนิดดอกและพัฒนาเป็นดอก ที่ถูกควบคุมการเปลี่ยนแปลงโดยวิถี CLAVATA อีกต่อหนึ่ง [22,23] ซึ่งพืชแต่ละชนิดถูกควบคุมการออกดอกด้วยวิถีที่แตกต่างกัน โดยวิถีการควบคุมการออกดอกที่มีรายงานในปัจจุบัน ได้แก่ (1) วิถีตอบสนองต่อความหนาวเย็น (vernalization pathway) เป็นกลไกทาง epigenetic ที่ควบคุมการออกดอกโดยการตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำของพืชเขตหนาว (2) วิถีการตอบสนองต่อช่วงแสง (photoperiod pathway) เป็นการตอบสนองต่อช่วงแสงที่ได้รับในแต่ละวัน (3) วิถีอิสระ (autonomous pathway) ควบคุมด้วยยีนต่าง ๆ ที่ส่งเสริมการออกดอก โดยที่ไม่ตอบสนองต่อช่วงแสงหรือความหนาวเย็นของอะราบิดอปซิส (4) วิถีตอบสนองต่อฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน (gibberellin pathway) เป็นการตอบสนองต่อฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน และ (5) วิถีตอบสนองต่อคุณภาพแสง (light quality pathway) เป็นการตอบสนองต่อคุณภาพแสง เช่น ตอบสนองต่อแสงสีน้ำเงิน [24] ซึ่งในมะพร้าวนั้นยังไม่มีรายงานว่าถูกควบคุมด้วยวิถีใด แต่จากผลการทดลองพบยีนที่ทำหน้าที่กำหนดรหัสเอนไซม์ในวิถีการส่งต่อสัญญาณของฮอร์โมน brassinosteriod (BR) ในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดทั้งในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (*SERK1-like*) และระยะออกดอก (*FEI1* และ *BZR1 homolog 3-like*) รวมทั้งยีนที่อยู่ในวิถี CLAVATA (*inactive LRR-RLK*) มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะออกดอก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลไกการออกดอกของมะพร้าวถูกควบคุมด้วยวิถีฮอร์โมน BR ที่ไปควบคุมการเปลี่ยนแปลงวิถี CLAVATA ในการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดให้มีการสร้างใบและลำต้น หรือดอก

ฮอร์โมน BR เป็นสารสเตอรอยด์ (steroid hormone) จัดเป็นฮอร์โมนชนิดใหม่ แยกได้ครั้งแรกจากละอองเรณู โดยมีสมบัติเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตในพืช (growth regulator) [25,26] เมื่อพืชเกิดการกลายไม่สามารถสังเคราะห์สารชนิดนี้ พบว่ามีผลต่อการแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโต รวมทั้งมีการออกดอกที่ล่าช้าออกไป [27] ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนชนิดนี้มีบทบาททั้งในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ และระยะออกดอก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบการแสดงออกของยีนในวิถี BR ทั้ง 2 ระยะ โดยที่ตัวรับและสื่อสัญญาณส่งต่อนั้นต่างกัน คือ SERK1-like ทำหน้าที่รับสื่อสัญญาณในการควบคุมระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ ส่วน FEI1 นั้นทำหน้าที่รับและสื่อสัญญาณในการควบคุมให้เข้าสู่ระยะออกดอก ที่จะต้องส่งต่อสัญญาณไปยัง BZR1 homolog 3-like ซึ่งเป็น transcription factor ชักนำการถอดรหัสของยีนที่ตอบสนองต่อฮอร์โมน BR

เมื่อพิจารณาผลของฮอร์โมน BR ต่อการชักนำการออกดอกในอะราบิดอปซิส มีรายงานว่าอะราบิดอปซิสพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน BR ได้นั้น (*det2* และ *dwf*) มีการออกดอกล่าช้า [28] และเมื่อศึกษาในพันธุ์กลายที่ไม่สามารถเปลี่ยน BR ให้เป็นรูป Inactive form (*ba81* และ *sob7*) กลับพบว่ามีการออกดอกเร็วขึ้น [29] จึงจัดให้ฮอร์โมน BR เป็น

ฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ชักนำการออกดอก และเมื่อศึกษาถึงการส่งสัญญาณของ BR (BR signaling) ในการสื่อสัญญาณส่งต่อและกระตุ้นการแสดงออกของยีนในวิถีชักนำการออกดอกในอะราบิดอปซิส พบว่าอะราบิดอปซิสพันธุ์กลาย *bri1* มีผลต่อวิถีการควบคุมการออกดอกแบบอิสระ (autonomous pathway) [30] โดยยีน *BRI 1* นี้กำหนดรหัส Leucine-rich repeat receptor like kinase ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ BR [31] แล้วส่งผลไปยับยั้งการแสดงออกของยีน *FLC* (*Flowering locus C*) ซึ่งเป็นยีนหลักที่ทำหน้าที่ยับยั้งการออกดอก อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบระยะเวลาออกดอก พบว่าพันธุ์กลาย *bri 1* นี้ออกดอกเร็วกว่าเมื่อเกิดการกลายของยีนในวิถีอิสระ(autonomous pathway) ดังนั้นจึงตั้งสมมติฐานว่าวิถีของ BR นี้ ไม่ได้ทำงานในการชักนำการออกดอกโดยตรง แต่ช่วยยับยั้งการแสดงออกของยีนในกลุ่มยับยั้งการออกดอก (floral repressor) เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อเจริญมีความสามารถที่จะตอบสนองต่อสัญญาณชักนำการออกดอก (floral inductive signal) โดยยีนที่มีการแสดงออกตอบสนองวิถีการส่งต่อสัญญาณ BR คือ ยีน *BES1/BZR1* ซึ่งเป็น transcription factor ที่จับกับโปรตีน *EARLY FLOWERING 6* (*ELF6*) และ *RELATIVE EARLY FLOWERING 6* (*RLF6*) [32] โดยโปรตีนทั้งสองนี้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงร่างโครมาทิน (chromatin remodeling) ในบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *FLC* [33] ซึ่งการทดลองในครั้งนี้พบการแสดงออกของยีน *BZR1* homolog 3-like ในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดระยะออกดอก ซึ่งเป็นการยืนยันว่าฮอร์โมน BR มีบทบาทต่อกลไกการออกดอกของมะพร้าว อีกทั้งยังพบอีกว่าการแสดงออกของยีนในวิถีสื่อสัญญาณ คือ *FEI 1* นั้นเริ่มแสดงออกตั้งแต่งอกและเพิ่มขึ้นทั้งในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูงและสายพันธุ์ต้นเตี้ย ในขณะที่ยีน *BZR 1 homolog 3-like* นั้นถูกชักนำให้มีการแสดงออกสูงเมื่อเข้าสู่ระยะออกดอก จึงเป็นการยืนยันว่า *BZR1 homolog 3-like* นี้เป็นส่วน downstream ของวิถีสัญญาณ BR ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในวิถีออกดอกเป็นลำดับถัดไป โดยที่ยีน *inactive LRR-RLK* ในมะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ยมีการแสดงออกที่ตอบสนองต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาที่เร็วกว่ามะพร้าวต้นสูง (24 เดือน) จึงทำให้บริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ถูกควบคุมด้วยวิถี CLAVATA นั้นมีความพร้อมที่จะรับสารสื่อสัญญาณแล้วชักนำให้เข้าสู่กระบวนการสร้างดอก จึงเสนอว่ายีนนี้มีบทบาทสำคัญที่ทำให้มะพร้าวสายพันธุ์ต้นเตี้ยมีความพร้อมที่จะเข้าสู่ระยะออกดอกเร็วกว่ามะพร้าวสายพันธุ์ต้นสูง นั่นคือ ร่นอายุระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบของมะพร้าวนั่นเอง

5. สรุป

กลไกการออกดอกของมะพร้าวถูกควบคุมด้วยวิถีฮอร์โมน brassinosteriod ที่ทำหน้าที่ควบคุมตลอดการเจริญเติบโตและพัฒนาของมะพร้าว ทั้งระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ และระยะออกดอก โดยยีนที่กำหนดรหัสเอนไซม์ SERK1-like ทำหน้าที่รับสื่อสัญญาณเพื่อควบคุมระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ โดยมีรูปแบบการแสดงออกที่ลดลงเมื่อมีการเจริญเติบโตเพื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะออกดอก ในขณะเดียวกันยีนที่กำหนดรหัสเอนไซม์ FEI1 ถูกชักนำให้มีการแสดงออกสูงขึ้นเพื่อพัฒนาให้มะพร้าวมีความพร้อมที่จะเข้าสู่ระยะออกดอกโดยสื่อสัญญาณไปเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *inactive LRR-RLK* ที่ควบคุมวิถี CLAVATA ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดให้พัฒนาเป็นดอกโดยชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ส่งต่อสัญญาณกระตุ้นการแสดงออกของยีน *BZR1 homolog 3-like* เพื่อกระตุ้นการถอดรหัสยีนที่ทำ

หน้าที่ชักนำการออกดอก โดยยีน *inactive LRR-RLK* มีบทบาทเกี่ยวข้องในการร่นอายุระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบของมะพร้าวต้นเตี้ย จึงทำให้มะพร้าวต้นเตี้ยออกดอกเร็วกว่ามะพร้าวต้นสูง

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. รายการอ้างอิง

[1] Lawson, E.J. and Poethig, R.S., 1995, Shoot development in plant: time for a change, Trends Genet. 11: 263-268.

[2] Simpson, G.G., Gendall, A.R. and Dean, C., 1999, When switch to flowering, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 15: 519-550.

[3] Araki, T., 2001, Transition from vegetative to reproductive phase, Curr. Opin. Plant Biol. 4: 63-68.

[4] Hackett, W.P., 1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plant, Horti. Rev. 7: 109-155.

[5] Martin-Trillo, M. and Martinez-Zapater, J.M., 2002, Growing up fast: manipulating the generation time of trees, Curr. Opin. Biotechnol. 13: 151-155.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] Telfer, A. And Poethig, R.S., 1998, *HASTY*: A gene that regulates the timing of shoot maturation in *Arabidopsis thaliana*, Development 125: 1889-1898.

[10] 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.

[11] Hunter, C., Sun, H. and Poethig, R.S., 2003, The *Arabidopsis* heterochronic gene *ZIPPY* is an ARGONAUTE family member, Curr. Biol. 13: 1734-1739.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] Moon, Y.H., Chen, L., Pan, R.L., Chang, H.S., Zhu, T., Maffeo, D.M. and Sung, Z.R., 2003, *EMF* genes maintain vegetative development by repressing the flower program in Arabidopsis, Plant Cell 15: 681-693.

[16] Kim, S.Y. , Zhu, T. and Sung, Z.R. , 2010, Epigenetic regulation of gene programs by EMF1 and EMF2 in *Arabidopsis*, Plant Physiol. 152: 516-518.

[17] Xu, S.L. , Rahman, A. , Baskin, T.I. and Kieber, J.J., 2008, Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signaling linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in *Arabidopsis*, Plant Cell 20: 3065-3079.

[18] Sablowski, R. , 2007, The dynamic plant stem cell niches, Curr. Opin. Plant Biol. 10: 639-644.

[19] Durbak, A.R. and Tax, F.E., 2011, CLAVATA signaling pathway receptors of *Arabidopsis* regulate cell proliferation in fruit organ formation as well as in meristems, Genetics 189: 177-194.

[20] Xing, L.B. , Zhang, D. , Li, Y.M. , Shen, Y.W. , Zhao, C.P., Ma, J.J., An, N. and Han, M.Y., 2015, Transcription profiles reveal sugar and hormone signaling pathways mediating flower induction in apple (*Malus domestica* Borkh) , Plant Cell Physiol. 56: 2052-2068.

[21] Hecht, V. , Vielle-Calzada, J. , Hartog, M. , Schmidt, E. , Boutilier, K. , Grossniklaus, U. and de Vries, S. , 2001, The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture, Plant Physiol. 127: 803-816.

[22] Brand, U. , Fletcher, J. C. , Hobe, M. , Meyerowitz, E. M. and Simon, R. , 2000, Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity, Science 289: 617-619.

[23] Bishop, G. J. and Koncz, C. , 2002, Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling, Plant Cell 14: 97-110.

[24] Mouradov, A. , Cremer, F. and Coupland, G. , 2002, Control of flowering time, Plant Cell 14: 111-130.

[25] Mitchell, J.W. , Mandava, N. , Worley, J.F. , Plimmer, J. R. and Smith M. V. , 1970, Brassins – a new family of plant hormones from rape pollen, Nature 225: 1065-1066.

[26] Grove, M.D. , Spencer, F.G. , Rohwededer, W.K., Mandava, N.B., Worley, J.F., Warthen, J.D. , Steffens, G.L. , Flippen-Anderson, J.L and Cook, J.C., 1979, Brassinolide, a plant growth- promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen, Nature 281: 216-217.

[27] Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T.C. and Chory, J. , 1996, A role for brassinosteroids in light- dependent development of *Arabidopsis*, Science 272: 398-401.

[28] Azpiroz, R., Wu, Y., Cascio, J.C. L and Feldmann, K. A. , 1998, An *Arabidopsis* brassinosteroid- dependent mutant is blocked in cell elongation, Plant Cell 10: 219-230.

[29] Turk, E.M., Fujioka, S., Seto, H., Shimada, Y., Takatsuto, S., Yoshida, S., Wang, H., Torres, Q.I., Ward, J.M., Murthy, G., Zhang, J., Walker, J.C. and Neff, M.M., 2005, BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate *Arabidopsis* photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms, Plant J. 42: 23-34.

[30] Domagalska, M.A., Schomburg, F.M., Amasino, R.M., Vierstra, R.D., Nagy, F. and Davis, S. J. , 2007, Attenuation of brassinosteroid signaling enhances FLC expression and delays flowering, Development 134: 2841-2850.

[31] Li, J. and Chory, J., 1997, A putative leucine- rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction, Cell 90: 929-938.

[32] Yu, X., Li, L., Li, L., Guo, M., Chory, J. and Yin, Y. , 2008, Modulation of brassino-steroid- regulated gene expression by Jumonji domain containing proteins ELF6 and REF6 in *Arabidopsis*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105: 7618-7623.

[33] Clouse, S. D. , 2008, The molecular intersection of brassinosteroid regulated growth and flowering in *Arabidopsis*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105: 7345-7346.