

### Abstract

---

**Project Code :** MRG6080358

**Project Title :** Characterization and functional analysis of the EgNF-Y transcription factor family genes, regulates fatty acid synthesis in *Elaeis guineensis* Jacq

**Investigator :** Dr. Alisa Nakkaew Faculty of Science Prince of Songkla University

**E-mail Address :** joy\_alisa@yahoo.com, alisa.n@psu.ac.th

**Project Period :** April 2017- April 2019

**Keywords :** *Elaeis guineensis*, transcription factor, fatty acid synthesis, EgDofs, EgNF-Ys

Oil palm is an economics crop with its products currently in high demand and necessary to quickly disseminate these elite genotypes by using marker-aided selection genes that link to the yield. In our previous work, the genes encoding the heteromeric acetyl-CoA carboxylase (ht-ACCase), *EgaccA*, *EgaccB* and *EgaccC*, *EgaccD* were found to involve in regulation of the production of fatty acid and enhancing oil production. The promoter of *EgaccD* was sequenced and analyzed. Transcriptional activators have been shown to play important for regulation of fatty biosynthesis and oil accumulation in seed or fruit of plant oil. In this study, we identified, annotated, and further characterized of the transcription factor genes, NF-Ys and Dofs family, in oil palm. Then, *EgNF-YA*, *EgNF-YB1*, *EgNF-YB3*, *EgNF-YC*, *EgDof300*, *EgDof314*, *EgDof318*, *EgDof343* and *EgDof347* were cloned from mesocarp and leave oil palm tissue. The bioinformatic analysis of EgNF-Ys indicated it encodes NF-YA/B/C subunits and revealed a conserved domain of the NF-YA/B/C subfamilies. Phylogenetic tree analyses showed closely to date palm NF-YA/B/C subunits and the other plant HAP2/3/5 subunits. While as EgDofs were classified to Dofs protein family and closely to date palm and the other DNA-binding one zinc finger transcription factor family in plants and found zinc finger Dof-type signature and conserve domains of zinc finger Dof-type profile. Gene expression patterns showed that most EgNF-Ys were widely expressed in different tissues while as EgDofs was found have expression in a particular tissues. Moreover, we found *EgNF-YB1* have high expression levels in high accumulated oil which different from *EgDof318* that found decreased of gene expression in higher oil accumulation tissues. Moreover, this research found that *EgNF-YB1* expression level were shown high in high oil yield cultivar and low expression level of *EgDof318* in low oil yield

plants. *In silico* EgNF-Ys -DNA binding results found that EgNF-YB1 and EgDof318 have highest DNA binding domains in EgNF-Ys and EgDofs family. Thus, we were chosen EgNF-YB1 for DNA-Protein interaction enzyme linked immunosorbent assay (DPI-ELISA). The result showed the binding of EgNF-YB1 protein and *EgaccD* promoter was strongly interaction than the controls. Based on this results, enhance the expression of the *EgNF-YB1* gene possibly to be one of the methods to increase the oil content and *EgNF-YB1* and *EgDof318* uses as a marker to assist selection of possible high oil yielding cultivars in oil palm breeding programs.

## บทคัดย่อ

**รหัสโครงการ :** MRG6080358

**ชื่อโครงการ :** การศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของยีน *EgDofs* และ *EgNFY* transcription factor ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมันในปาล์มน้ำมัน

**ชื่อนักวิจัย :** ดร.อลิษา นักแก้ว คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์

**E-mail Address :** joy\_alisa@yahoo.com, alisa.n@psu.ac.th

**ระยะเวลาโครงการ :** เมษายน 2560-เมษายน 2562

**คำหลัก:** ปาล์มน้ำมัน, ทรานสคริปชันแฟกเตอร์, การสังเคราะห์กรดไขมัน, *EgDofs*, *EgNF-Ys*

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความต้องการใช้น้ำมันในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างสูง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการคัดเลือกพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ดี โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความเชื่อมโยงกับยีนที่มีความเชื่อมโยงกับปริมาณผลผลิต โดยในการศึกษาก่อนหน้านี้ทางผู้วิจัยได้พบว่ากลุ่มยีนในหน่วยย่อยของเอนไซม์ heteromeric acetyl-CoA carboxylase ได้แก่ยีน *EgaccA*, *EgaccB*, *EgaccC* และ *EgaccD* นั้นมีส่วนในการควบคุมในการสร้างกรดไขมันและส่งผลให้มีการเพิ่มน้ำมัน นอกจากนั้นลำดับดีเอ็นเอของโปรโมเตอร์ของยีน *EgaccD* ได้ถูกวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอและพบว่ามีตำแหน่งอนุรักษ์ของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่สำคัญซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความสำคัญในการควบคุมวิถีการสังเคราะห์เป็นกรดไขมันและการสะสมน้ำมันในเมล็ดหรือผลของพืชให้น้ำมัน ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกโคลนและวิเคราะห์ข้อมูลของกลุ่มยีนแฟมิลีชนิด *NF-Y* และ *Dofs* ซึ่งผลการจำแนกระบุลักษณะสมบัติความจำเพาะของยีนแฟมิลี *NF-Y* ได้แก่ *EgNF-YA*, *EgNF-YB1*, *EgNF-YB3* และ *EgNF-YC* จากปาล์มน้ำมันด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าจัดอยู่กลุ่มยีนแฟมิลีชนิด *NF-YA/B/C* การจำแนกระบุลักษณะสมบัติความจำเพาะของยีนแฟมิลี *Dofs* ได้แก่ยีน *EgDof300*, *EgDof314*, *EgDof318*, *EgDof343* และ *EgDof347* จากเนื้อเยื่อใบและผลอ่อนปาล์มน้ำมัน เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า เป็นกลุ่มยีนแฟมิลีชนิด DNA-binding One Zinc Finger family พบทั้งตำแหน่งอนุรักษ์ของ Zinc finger Dof-type signature และ Zinc finger Dof-type profile โดยเมื่อศึกษาการแสดงออกของกลุ่มยีนแฟมิลีชนิด *EgNF-Ys* และ *EgDofs* พบว่ามีการแสดงออกได้ในทุกเนื้อเยื่อของต้นปาล์มน้ำมันและพบว่า *EgNF-YB1* มีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อที่มีการสะสมน้ำมัน ในขณะที่ *EgDof318* มีการแสดงออกต่ำลงในเนื้อเยื่อที่มีการสะสมน้ำมันมากขึ้น เมื่อทำการวิเคราะห์ทาง *In silico* ของโปรตีนแฟมิลีชนิด *EgNF-Ys* และ *EgDofs* พบว่า *EgNF-YB1* *EgDof318* มีตำแหน่งที่สามารถจับกับตำแหน่งอนุรักษ์บนสายดีเอ็นเอมากที่สุด และเมื่อนำโปรตีน *EgNF-YB1* ที่ผลิตได้มาทำการทดสอบการจับกับลำดับดีเอ็นเอของโปรโมเตอร์ของยีน *EgaccD* ด้วยเทคนิค DNA-Protein interaction

enzyme linked immunosorbent พบว่า สามารถจับกับตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *EgaccD* ได้อย่างแข็งแรงเมื่อเทียบกับตำแหน่งโปรโมเตอร์ในกลุ่มควบคุม

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อทำการโคลนและวิเคราะห์ลักษณะของกลุ่มยีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF-Y และ Dofs ในปาล์มน้ำมัน
- 2) เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของกลุ่มยีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF-Y และ Dofs ในปาล์มน้ำมัน
- 3) ทำการโคลนชิ้นส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *EgaccD* และ *EgaccB* จากปาล์มน้ำมัน
- 4) ศึกษาความจำเพาะของโปรตีนกลุ่มทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF-Y และ Dofs ในการจับกับโปรโมเตอร์ของยีน *EgaccD* และ *EgaccB* จากปาล์มน้ำมันปาล์มน้ำมัน
- 5) ศึกษาสมบัติและหน้าที่ของโปรตีนกลุ่มทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF-Y และ Dofs ในการควบคุมการเพิ่มน้ำมันในเอมบริโอจินิกแคลลัส

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทำวิจัย

เก็บตัวอย่างใบหรือผลจากปาล์มน้ำมันพันธุ์ *E. guineensis* สายพันธุ์ เทเนอร่า จังหวัดสงขลาที่ทราบข้อมูลทางด้านผลผลิตเพื่อใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอในการทดลองวิจัย โดยตัวอย่างเมื่อเก็บมาให้ทำความสะอาดและแยกชิ้นส่วนที่ต้องการเช่น ตัวอย่างใบ ลำต้น ราก เนื้อเยื่อ Mesocarp ที่ช่วงอายุของผลตั้งแต่ 12-26 สัปดาห์หลังการผสม ในการศึกษาปัจจัยภายนอก (Abiotic stress) ที่จะส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF-Y และ Dofs จะเลือกทดสอบผลอันเนื่องมาจาก NaCl, PEG, Light, Dark, sodium nitrate และ sodium acetate ที่ระยะเวลาและความเข้มข้นต่างๆ เมื่อครบตามสภาวะที่ต้องการนำตัวอย่างที่ได้นั้นทำการแช่ในไนโตรเจนเหลวทันทีก่อนเก็บ -80 °C จนกว่าจะใช้งาน ในขณะที่เอมบริโอจะแยกจากผลปาล์มอายุ 16-20 สัปดาห์หลังการผสมแล้วนำมาเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อบน MS medium, pH 5.7 ที่มี 2 mg/L 2,4-D หรือ 1 mg/L BA และ 1 mg/L NAA เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสได้ภายในสัปดาห์ 4-6 และทำการย้ายเลี้ยงบน MS medium, pH 5.7 เป็นระยะเวลา 2-4 สัปดาห์ ก่อนนำไปทำการถ่ายฝากยีน

#### 2.2 โคลนและวิเคราะห์ลักษณะของกลุ่มยีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF-Y และ Dofs

2.2.1 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนยีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF-Y และ Dofs ออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนยีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF-Y และ Dofs ในปาล์มน้ำมันจากข้อมูล transcriptome ของปาล์มน้ำมันเพื่อโคลนยีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ NF-Y และ Dofs แต่ละ ไอโซฟอร์ม สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วย เครื่องมือ