# การแสดงออกของยีน *BOR1* และการวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุโบรอนในปาล์มน้ำมันที่ได้รับโบรอนระดับต่าง ๆ

# Expression of *BOR1* gene and determination of boron concentration in oil palm under different levels of boron supplementation

ชนากานต์ ลักษณะ[1,2,4] และสนธิชัย จันทร์เปรม[1,2,3,4*]

Chanakan Laksana[1,2,4] and Sontichai Chanprame[1,2,3,4*]

**Abstracts**

Expression of *BOR1* gene and determination of boron concentration in oil palm under different boron supplementation were carried out. Partial of *BOR1* gene from oil palm leaves cultured in boron deficiency condition was successfully isolated. Total RNA was extracted and transcribed to cDNA using RT-PCR with specific primer to *BOR1* gene, giving about 300 bp of cDNA fragment. The nucleotide sequence of this cDNA was analyzied and translated into amino acid sequence. The comparisons of amino acid sequence to the data base showed high similarity to *BOR1* gene of castor bean (93%), grape (91%) citrus (91%) and Arabidopsis (89%). The relative expression of *BOR1* gene was determined using real-time PCR. The expression of *BOR1* gene under boron deficiency (0 ppm) was highest both in leaves and root and the expression of *BOR1* gene in boron toxicity (10 ppm) was low. The level of *BOR1* gene expression in root was higher than in leaf. Under boron toxicity condition the concentration of boron in leaf was higher than that in deficiency and sufficiency conditions.

**Key words** : boron transporter gene, boron deficiency, gene expression, oil palm

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Nakhon Pathom, 73140

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
Center for Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand

[3] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[3] Dept. of Agronomy, Fac. of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom. 73140

[4] ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
Center for Advance Studies for Agriculture and Food, Kasetsart University, Bangkok 10900

รับเรื่อง : เมษายน 2557

* Corresponding author: agrstc@ku.ac.th

## บทคัดย่อ

การศึกษาการแสดงออกของยีน *BOR1* และวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุโบรอนในปาล์มน้ำมันที่ได้รับธาตุโบรอนในปริมาณต่าง ๆ กัน การแยกบางส่วนของยีน *BOR1* จากใบของปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงในสภาพที่ขาดโบรอน โดยใช้เทคนิค RT-PCR ทำโดยเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม และสังเคราะห์เป็นดีเอ็นเอคู่สมด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *BOR1* เกิดแถบดีเอ็นเอคู่สมขนาดประมาณ 300 คู่เบส นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล พบว่า มีความเหมือนกับยีน *BOR1* ในละหุ่ง องุ่น ส้ม และอะราบิดอพซิส คิดเป็น 93% 91% 91% และ 89% ตามลำดับ จึงคาดว่า ดีเอ็นเอคู่สมที่สังเคราะห์ได้เป็นส่วนหนึ่งของยีน *BOR1* ของปาล์มน้ำมัน จากนั้น ศึกษาการแสดงออกของยีน *BOR1* ในปาล์มน้ำมันที่ได้รับธาตุโบรอนในปริมาณต่าง ๆ กัน โดยใช้เทคนิค real-time PCR พบการแสดงออกของยีนทั้งที่ใบและรากจะสูงสุด เมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่ขาดโบรอน แต่เมื่อให้ธาตุโบรอนในระดับสูงที่เป็นพิษ ยีน *BOR1* มีการแสดงออกในระดับต่ำ เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *BOR1* ที่ใบกับที่รากพบว่า ที่รากจะมีการแสดงออกของยีน *BOR1* มากกว่าที่ใบ และเมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุโบรอนในใบพบว่า ต้นที่ได้รับปริมาณธาตุโบรอนในระดับที่เป็นพิษ มีการสะสมธาตุโบรอนในใบในปริมาณที่สูงกว่าต้นที่ขาดธาตุหรือได้รับธาตุโบรอนอย่างเพียงพอ


## คำนำ

โบรอนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช (Takano *et al*., 2010) โบรอน มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตทั้งทางด้านลำต้นและทางด้านการเจริญพันธุ์ เช่น บทบาทต่อผนังเซลล์ โดยโบรอนเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะกันของเพกตินในผนังเซลล์ให้เป็นโครงข่ายที่มีความแข็งแรงและยืดหยุ่น ช่วยในการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์ เคลื่อนย้ายน้ำตาล ช่วยในการตรึงไนโตรเจน เพิ่มอัตราการผสมเกสรติด ทำให้พืชติดผลมากขึ้น และเพิ่มผลผลิต (Dell and Huan, 1997; Miwa and Fujiwara, 2010) โบรอนเป็นธาตุที่พืชต้องการในปริมาณน้อย แต่มีความสำคัญต่อพืช ปัญหาการขาดธาตุโบรอนเป็นอีกปัญหาหนึ่งที่เกษตรกรประสบอยู่เสมอ การขาดธาตุโบรอนส่งผลเสียต่อการเจริญพันธุ์มากกว่า การเจริญทางด้านลำต้น โดยบางครั้งอาจพบว่า พืชให้ผลผลิตลดลงแต่ยังไม่แสดงอาการขาดโบรอน โดยพืชที่ขาดโบรอนจะมีละอองเรณูที่เป็นหมัน ยอดเกสรตัวเมียไม่รับละอองเรณู หรือถ้าละอองเรณูที่ตกลงบนยอดเกสรตัวเมียมีการงอกหลอดเรณูก็จะมีสภาพไม่สมบูรณ์ทำให้ไม่มีการปฏิสนธิ เมล็ดจึงไม่มีการพัฒนา ส่งผลให้ผลผลิตลดลง และเมล็ดที่ได้จากต้นที่ขาดโบรอนจะมีอัตราการงอกต่ำ (Dell and Huan, 1997; Camacho-Cristobal *et al*., 2008) สำหรับพืชที่ได้รับปริมาณโบรอนมากเกินความต้องการ จะมีกระบวนการเมแทบอลอซึมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่นลดการแบ่งเซลล์ในราก ลดอัตราการสังเคราะห์แสงและลดระดับของลิกนินและซูเบอริน แล้วส่งผลให้ลำต้นและรากลดขนาดลง (Nable *et al.,* 1997; Reid, 2007)

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเป็นพืชที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อไร่สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น ๆ เช่น ละหุ่ง ถั่วเหลือง เรพซีด น้ำมันจากผลปาล์มน้ำมันมีความสำคัญทั้งเพื่อการบริโภคและอุปโภค อีกทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่สำคัญของโลก มีแนวโน้มว่าความต้องการของตลาดโลกจะเพิ่มสูงขึ้นในอนาคต ดังนั้นการเพิ่มเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มดิบ โดยการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน จึงเป็นแนวทางที่จะเพิ่มกำลังและมูลค่าการผลิต เพื่อตอบสนองต่อความต้องการดังกล่าว พื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันที่สำคัญอยู่ที่ อเมริกาใต้ แอฟริกา และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Goh *et al*., 2007) พืชแต่ละชนิดจะต้องการโบรอนในปริมาณที่แตกต่างกัน (Shaaban, 2010) สำหรับความเข้มข้นที่เป็นประโยชน์ของธาตุโบรอนสำหรับปาล์มน้ำมันจะอยู่ในช่วง 0.5-5 ppm (Turner and Gillbanks, 1974; Pakpein *et al*., 1997) สำหรับประเทศ

ไทย ปาล์มน้ำมันมีพื้นที่ปลูกมากในภาคใต้ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีฝนตกชุก ซึ่งฝนตกนั้นเป็นสาเหตุหลักของการขาดธาตุโบรอน เนื่องจากมีการชะล้างธาตุโบรอนออกจากหน้าดิน (Reid, 2007) ถ้าปาล์มน้ำมันได้รับปริมาณโบรอนต่ำกว่า 0.5 ppm จะทำให้ปาล์มน้ำมันขาดธาตุโบรอน แต่ถ้าได้รับโบรอนสูงกว่า 5 ppm ก็จะเป็นพิษต่อปาล์มน้ำมัน แต่เนื่องจากพื้นที่ส่วนใหญ่ที่ปลูกปาล์มน้ำมันเป็นพื้นที่ที่มีฝนตกชุกจึงทำให้ประสบปัญหาการขาดธาตุโบรอนมากกว่าโบรอนเป็นพิษ (Turner and Gillbanks, 1974; Pakpein *et al*., 1997) ถ้าปาล์มน้ำมันขาดธาตุโบรอนจะทำให้ใบมีลักษณะผิดปกติ ย่น ผิดรูปร่าง งอเป็นรูปตะขอ (Chairat *et al*., 2001) ลักษณะความผิดปกตินี้ ส่งผลให้ผลผลิตในปาล์มน้ำมันลดลง ทำให้เกษตรกรต้องใส่ปุ๋ยโบรอนทุกปี แต่การใส่ปุ๋ยจำเป็นต้องทราบถึงอัตราที่เหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิดด้วยจึงทำให้ยากต่อการจัดการ Takano *et al*. (2002) ได้ศึกษายีนที่ควบคุมกระบวนการเคลื่อนย้ายของโบรอนในอะราบิดอพซิส พบว่า มียีนที่ทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายธาตุโบรอนซึ่งมีชื่อว่า *Boron Transporter Gene* (*BOR*) ยีน *BOR1* เป็นยีนที่ควบคุมการเคลื่อนย้ายโบรอนจากเซลล์เข้าสู่ท่อลำเลียงน้ำ (xylem) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการเคลื่อนย้ายโบรอนในเซลล์ราก โดยจะแสดงออกมาก ในสภาวะที่มีโบรอนอยู่อย่างจำกัด Nakagawa *et al.* (2007) ได้ศึกษายีน *OsBOR1* ซึ่งเป็น Boron Transporter Gene ในข้าว ยีนนี้มีการแสดงออกภายใต้สภาพที่มีโบรอนอยู่อย่างกำจัด เมื่อพืชได้รับโบรอนในปริมาณที่ไม่เพียงพอจะทำให้ยีน *OsBOR1* แสดงออกมากขึ้น เพื่อเพิ่มการดูดซึมธาตุโบรอนที่รากและการเคลื่อนย้ายธาตุโบรอนเข้าสู่ท่อลำเลียงน้ำ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกบางส่วนของยีนที่ควบคุมการเคลื่อนย้ายธาตุโบรอนในปาล์มน้ำมัน เพื่อศึกษาการตอบสนองของปาล์มน้ำมัน ในการสะสมธาตุโบรอนในใบ เมื่อปาล์มน้ำมันได้รับโบรอนในปริมาณต่าง ๆ หากทราบถึงยีนที่ควบคุมการเคลื่อนย้ายธาตุโบรอน ในปาล์มน้ำมันได้ จะนำมาซึ่งความเข้าใจในกระบวนการเมแทบอลิซึมของการเคลื่อนย้ายธาตุนี้ได้ดียิ่งขึ้น สามารถจัดการธาตุโบรอนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเตรียมตัวอย่างปาล์มน้ำมัน

นำต้นอ่อนปาล์มน้ำมันที่ได้ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลูกในเวอร์มิคูไลท์และให้อาหารสูตร Complete Nutrition Solution (CNS) (Pinho *et al*., 2010) ที่ใส่ธาตุโบรอนในระดับต่าง ๆ คือ 0 ppm (ระดับที่ขาดธาตุโบรอน) 1 ppm (ระดับที่เหมาะสม) และ 10 ppm (ระดับที่เป็นพิษ) เป็นเวลา 7 14 28 และ 56 วัน และเก็บตัวอย่างใบอ่อนและรากจากต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ระดับโบรอน และระยะเวลาต่าง ๆ ข้างต้น มาสกัดอาร์เอ็นเอรวมเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน และเก็บใบไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุโบรอน

### 2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากตัวอย่างพืช

สกัดอาร์เอ็นเอรวมโดยวิธีของ Laksana (2011) โดยนำตัวอย่างใบอ่อนของปาล์มน้ำมันหนัก 0.1 กรัม บดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ย้ายตัวอย่างลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM-HCl, 25 mM EDTA, 5M NaCl และ $DH_2O$ ที่ผ่านการกำจัด RNase ด้วย diethyl pyrocarbonate: DEPC) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วเติม β-mercaptoethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าแรง ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) หนึ่งเท่าของปริมาณส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าแรง ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ 5M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ที่แช่เย็น

ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนประมาณ 20 นาที และเติม DEPC-d$H_2O$ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส กำจัดจีโนมมิค ดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้โดยใช้ DNase I (Fermentas, USA) แล้วตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยการทำอีเล็กโทรโฟรีซีสใน 1% อะกาโรสใน 1X MOPs ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Spectrophoto meter (NanoDrop 8000 Spectrophotometer)

**4. การสังเคราะห์ first stranded cDNA**

นำอาร์เอ็นเอรวม ที่สกัดได้มาสังเคราะห์เป็น first stranded cDNA ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัท Fermentas วัดความเข้มข้นของ first stranded cDNA ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (NanoDrop 8000 Spectrophotometer)

**5. การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *BOR1***

ออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีน *BOR 1* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Boron Transporter* จากพืชชนิดต่าง ๆ จากฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.nih.gov) มาเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม GENEDOC แล้วหาตำแหน่งอนุรักษ์ นำตำแหน่งที่อนุรักษ์มาออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ได้ คือ *BOR1* Forward: 5'CATACTCTGCTGCATCCA3' และ *BOR1* Reverse: 5' GTCCTCTGGGGTTACTTT3' เมื่อได้ดีเอ็นเอคู่สมของยีน *BOR1* ที่เกิดจากปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว จึงนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นส่วนหนึ่งของยีน *BOR1* ในปาล์มน้ำมัน จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ real- time PCR อีกครั้ง ดังนี้ *BOR1* RT Forward: 5' TGGCATGGTACTCTTCAAGC 3' และ *BOR1* RT Reverse: 5' GGGTTACTTTGCCTTCA TGG 3' โดยใช้ยีน *Actin* เป็นยีนอ้างอิง โดยมีไพรเมอร์สำหรับยีน *Actin* ดังนี้ RT-ActinF 5'-CATGCCATCCTTCGAT TGG-3' และ RT-ActinR5'-CACATCTGCTGGAAGGTGC-3'

**6. การศึกษาการแสดงออกของยีน *BOR 1* ด้วยเทคนิค real-time PCR**

นำ first stranded cDNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) กับไพรเมอร์สำหรับ real- time PCR โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 10 µM *BOR1* RT Forward primer ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร 10 µM *BOR1* RT Reverse primer ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร 200 ng template แล้วปรับปริมาตรด้วย DEPC-treated water จากนั้นวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง Mastercycler® eprealplex (Eppendorf AG, Germany) ตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา PCR ดังนี้ denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส 20 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาระดับการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *Actin* โดยศึกษาระดับละ 3 ซ้ำ

**7.การวิเคราะห์หาปริมาณโบรอนในใบปาล์มน้ำมัน**

ชั่งตัวอย่างพืช 1 กรัม ใส่ใน crucible เติมสารละลาย $Ca(OH)_2$ อิ่มตัว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร คลุกให้เข้ากัน แล้วนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 270 องศา นาน 3 ชั่วโมง วางตัวอย่างไว้จนกระทั่งเย็น จึงนำตัวอย่างเข้าเครื่อง Muffle furnance ที่อุณหภูมิ 430 องศา นาน 3 ชั่วโมง จึงปิดเครื่องแล้ววางไว้ในเครื่องนาน 3 วัน นำออกมาเติม 0.36 N $H_2SO_4$ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและกรองด้วยกระดาษกรอง เพื่อแยกสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณโบรอน

การหาความเข้มข้นของโบรอน ทำโดยเติมสารละลายตัวอย่างมา 3 มิลลิลิตร ลงในขวดพลาสติก เติมสารละลาย EDTA (ประกอบด้วย disodium ethylene diamine tetraacetate 37.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร) 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ammonium acetate buffer (ประกอบด้วย ammonium acetate 250 กรัมละลายในน้ำ pH 5.5) 2 มิลลิลิตร และเติม azomethine-H (ประกอบด้วย azomethine-H 0.45

กรัม และ ascorbic acid 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีเหลือง จึงนำไปวัดความเข้มข้นของสีด้วยเครื่อง spectrophotometer (Phamaspec UV-1700) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของโบรอนในตัวอย่าง โดยเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน แล้วจึงคำนวณความเข้มข้นของโบรอนในตัวอย่างโดยใช้ความเข้มข้นที่ได้จากการเทียบกับสารละลายมาตรฐานมาคำนวณโดยใช้สูตร

ความเข้มข้นของโบรอนในตัวอย่างพืช (มิลลิกรัมโบรอน/กิโลกรัม) = $\frac{C \times Vt \times Vd}{W \times Va}$

โดยที่ C = ความเข้มข้นโบรอนจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมโบรอน/กิโลกรัม)

Vt = ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)

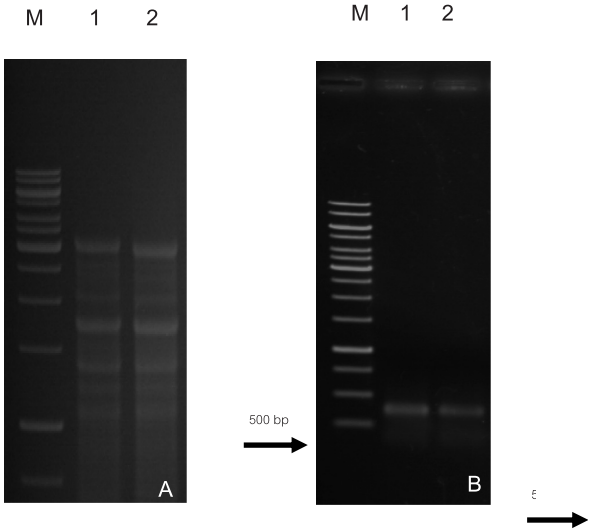
Vd = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ได้จากการย่อยสลาย (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างพืช (กรัม)

## ผลและวิจารณ์

### การแยกบางส่วนของยีน *BOR1* ในปาล์มน้ำมัน

นำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากปาล์มน้ำมัน (ภาพที่ 1A) มาสังเคราะห์เป็น first strand cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *BOR1* ด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *BOR1* ได้มาจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BOR1* ของพืชชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank มาเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม GENEDOC แล้วเลือกส่วนที่อนุรักษ์มาออกแบบไพรเมอร์ เมื่อทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำผลผลิตของปฏิกิริยาที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยการทำอีเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรสเข้มข้น 0.7% พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส (ภาพที่ 1B) จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน และนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ได้ มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน BOR1 ในละหุ่ง 93% (Accession no. XP_002519293.1) องุ่น 91% (Accession no. AEZ56957.1) ส้ม 91% (Accession no. ABQ52428.1) *Cichorium intybus* 89% (Accession no. AFQ32800.1) อะราบิดอพซิส 89% (Accession no. NP_001078071.1) จึงอาจสรุปในเบื้องต้นได้ว่า ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองนี้เป็นส่วนหนึ่งของยีน *BOR1* ในปาล์มน้ำมัน ซึ่ง Takano *et al*. (2002) ได้ศึกษายีน *BOR1* ในอะราบิดอพซิส และ Pérez-Castro *et al*. (2012) ศึกษายีน *BOR1* ในองุ่น ซึ่งทั้ง 2 งานวิจัยได้รายงานว่า ยีน *BOR1* มีหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายโบรอนจากดินสู่เซลล์พืช และสามารถทำให้พืชเจริญต่อไปได้ในสภาพที่ขาดธาตุโบรอน ดังนั้น ยีน *BOR1* จากปาล์มน้ำมันซึ่งมีค่าความเหมือนกับองุ่นถึง 91% และเหมือนในอะราบิดอพซิสถึง 89% ก็อาจจะทำหน้าที่เช่นเดียวกับยีน *BOR1* ในองุ่นและอะราบิดอพซิส อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาต่อไป เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการหาเพียงบางส่วนของยีน *BOR1* ในปาล์มน้ำมัน เพื่อให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนนี้ และทำการยืนยันว่าเป็นยีน *BOR1* หรือไม่ต่อไป




**ภาพที่ 1** A: แถบอาร์เอ็นเอของใบและรากปาล์มน้ำมัน, M: 1 kb ladder marker (Fermentas) 1: total RNA จากใบ 2: total RNA จากราก

B: การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอคู่สมที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน*BOR1*, M: 1 kb ladder marker (Fermentas)

1 และ 2 :ดีเอ็นเอคู่สมที่เกิดจาก first stranded cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากใบและราก ของปาล์มน้ำมันทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *BOR1*

C: การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอคู่สมที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน*Actin*, M: 1 kb ladder marker (Fermentas)

1 และ 2 :ดีเอ็นเอคู่สมที่เกิดจาก first stranded cDNA ที่สังเคราะห์จาก total RNA จากใบและราก ของปาล์มน้ำมันทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Actin*

**การศึกษาการแสดงออกของยีน *BOR1* ด้วยเทคนิค real-time PCR**

ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค real-time PCR โดยมียีน *Actin* เป็นยีนอ้างอิง โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากบางส่วนของยีน *BOR1* ที่สังเคราะห์เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์มาออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ real-time PCR ซึ่งไพรเมอร์คู่ใหม่นี้จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 คู่เบส เมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *BOR1* ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่า ในใบของปาล์มน้ำมันที่ขาดธาตุโบรอน (0 ppm) นาน 28 วัน มีการแสดงออกของยีน *BOR1* สูงที่สุด เช่นเดียวกับรากที่มีการแสดงออกของยีน *BOR1* สูงที่สุดในวันที่ 28 และการแสดงออกของยีน *BOR1* สูงสุดในทุกๆ วัน เมื่ออยู่ในสภาพขาดธาตุโบรอน เนื่องจากว่า ยีน *BOR1* เป็นยีนที่ควบคุมการเคลื่อนย้ายการย้ายโบรอนจากเซลล์เข้าสู่ท่อลำเลียงน้ำ ดังนั้นเมื่อพืชขาดธาตุโบรอนโปรตีน BOR1 ก็จะเพิ่มมากขึ้น เพื่อที่จะทำหน้าที่ลำเลียงโบรอนที่เซลล์รากได้รับจากดินในปริมาณน้อยเข้าสู่ระบบท่อลำเลียงน้ำให้มากขึ้น จึงทำให้มีการแสดงออกของยีน *BOR1* สูงสุดเมื่อพืชอยู่ในสภาพที่ได้รับโบรอนไม่เพียงพอ และเมื่อปาล์มน้ำมันได้รับโบรอนในปริมาณ 10 ppm (ระดับที่เป็นพิษ) พบว่า มีการแสดงออกของยีน *BOR1* ต่ำที่สุด และในทุกระยะของการทดลองพบว่า การแสดงออกของยีน *BOR1* อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Takano (2005) and Miwa and Fujiwara (2010) ที่รายงานว่า เมื่ออะราบิดอพซิสได้รับธาตุโบรอนในระดับที่สูง จะมีการเคลื่อนย้ายโบรอนออก โดยผ่านเอนโดโซมไปยังแวคิวโอลเพื่อย่อยสลายเพื่อหลีกเลี่ยงการสะสมโบรอนที่มากเกินไปจนเป็นพิษในเซลล์พืช ดังนั้นจึงทำให้มีการแสดงออกของยีน *BOR1* ต่ำ นอกจากนี้ในรากมีการแสดงออกมากกว่าในใบ เนื่องจากรากทำหน้าที่ดูดธาตุอาหารและน้ำเข้าสู่เซลล์ โดยมียีน *BOR1* ทำหน้าที่ลำเลียงธาตุโบรอนไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช จึงทำให้ยีน *BOR1* มีการแสดงออกที่รากมากกว่าที่ใบ ในใบมีการแสดงออกของยีน *BOR1* น้อยกว่าที่ราก เนื่องจากใบได้รับธาตุโบรอนจากการดูดธาตุอาหารของราก และมีการเคลื่อนย้ายไปเก็บไว้ที่ใบ (Mukda, 2001) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Canon *et al*. (2013) ที่พบว่ายีน *BOR1* ในต้นส้มที่ปลูกในสภาพที่ขาดธาตุโบรอนจะแสดงออกมากที่สุดในรากเมื่อเปรียบเทียบกับในลำต้น และต้นที่ได้รับโบรอนในปริมาณมาก (toxicity) การแสดงออกของยีน *CmBOR1* ไม่มีความแตกต่างกันในทุกระยะการทดลอง ในขณะที่ต้นที่ได้รับโบรอนในปริมาณที่เพียงพอ พบว่าการแสดงออกของยีน *BOR1* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในทุกช่วงการทดลองเนื่องจากเป็นปริมาณธาตุที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตเพราะปริมาณธาตุโบรอนที่เหมาะสมต่อปาล์มน้ำมันคือ 0.5-5 ppm.

**การวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุโบรอนในใบปาล์มน้ำมัน**

การปลูกปาล์มน้ำมันและให้ธาตุอาหารที่มีโบรอนในปริมาณต่างๆ กันคือ 0 1 และ 10 ppm และเก็บใบปาล์มน้ำมันในวันที่ 7 14 28 และ 56 วัน พบว่า ความเข้มข้นของธาตุโบรอนในใบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในปาล์มน้ำมันที่ได้รับโบรอน 1 และ 10 ppm แต่ในต้นที่ไม่ได้รับโบรอนเลย (0 ppm) ความเข้มข้นของธาตุโบรอนไม่มีการเปลี่ยนแปลงในทุกระยะของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของธาตุโบรอนกับการแสดงออก

ของยีน *BOR1* ในใบปาล์มน้ำมันพบว่า ในปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้รับธาตุโบรอน (0 ppm) การแสดงออกของยีน *BOR1* สูงขึ้นเรื่อย ๆ และจะลดต่ำลงในวันที่ 56 Tanako *et al*. (2002) กล่าวว่า ยีน *BOR1* เป็นยีนที่ควบคุมการเคลื่อนย้ายโบรอนจากดินเข้าสู่เซลล์พืช โดยจะแสดงออกมากในสภาพที่ขาดธาตุโบรอน แต่สาเหตุที่ในใบยังมีโบรอนอยู่ แม้ว่าจะไม่ได้ให้ธาตุโบรอนแล้ว อาจเนื่องมาจากว่าก่อนการทดลองต้นกล้าปาล์มน้ำมันนี้ได้ปลูกในสภาพที่มีโบรอนอย่างเหมาะสม จึงทำให้ยังมีการสะสมธาตุโบรอนอยู่ และในวันที่ 56 ความเข้มข้นของธาตุโบรอนนั้นยังเท่ากับวันอื่นๆ แต่การแสดงออกของยีน *BOR1* นั้นลดลง อาจเนื่องมาจากปาล์มน้ำมันไม่สามารถดูดซับโบรอนจากภายนอกเพิ่มเข้ามาภายในเนื้อเยื่อได้ จึงไม่มีธาตุโบรอนส่วนที่จะถูกเคลื่อนย้ายเพิ่มเติมจากเดิม ทำให้การแสดงออกของยีน *BOR1* ลดลง ผลการทดลองที่ได้นี้เป็นไปได้ในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Perez-Castro *et al*., (2012) ซึ่งการแสดงออกของยีน *BOR1* ในองุ่น นั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณธาตุโบรอน โดยได้ทำการหาความเข้มข้นของธาตุโบรอนของเมล็ดและต้นอ่อนในระยะ pre-veraison veraison post-veraison และ mature พบว่าความเข้มข้นของธาตุโบรอนมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน โดยพบว่าถ้าระยะไหนที่มีการสะสมธาตุโบรอนสูงก็จะส่งผลให้การแสดงออกของยีน *VvBOR1* ลดลง

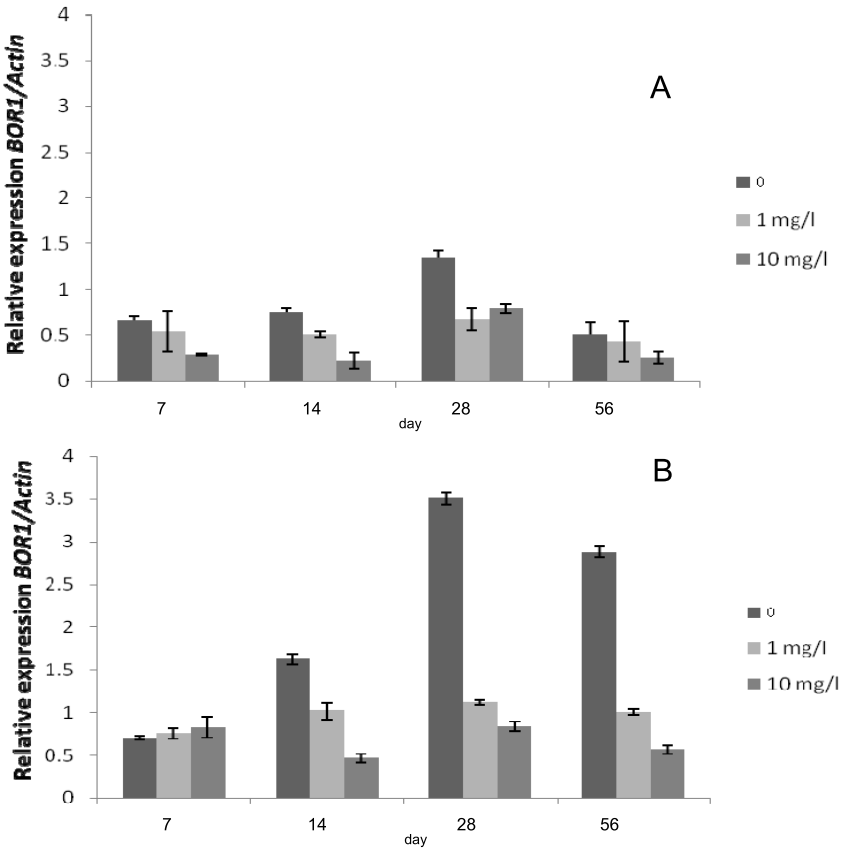
เมื่อปาล์มน้ำมันได้รับธาตุโบรอนในปริมาณ 10 ppm ซึ่งเป็นระดับที่เป็นพิษ ในใบจะมีการสะสมโบรอนสูงสุดในทุกๆ ช่วงวันที่ทดลอง ในขณะที่การแสดงออกของยีน *BOR1* ทั้งที่ใบและรากค่อนข้างคงที่ จึงอาจเป็นไปได้ว่า ยีน *BOR1* ไม่ได้ทำหน้าที่หลักในการเคลื่อนย้ายธาตุโบรอนในสภาวะที่พืชได้รับโบรอนมากจนเป็นพิษ Perez-Castro *et al*. (2012) ได้วิเคราะห์ phylogenetic ของกลุ่มยีน *BOR*s พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย *VvBOR1 AtBOR1* และ *OsBOR1* ซึ่งยีนกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ในการย้ายโบรอนจากดินเข้าสู่เซลล์พืชในสภาวะที่ขาดธาตุโบรอน และจะถูกกำจัดออกเมื่อต้นพืชอยู่ในสภาวะที่ได้รับโบรอนในปริมาณมาก ส่วนกลุ่มที่ 2 คือกลุ่มยีนที่ตอบสนองเมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่ได้รับโบรอนในระดับที่เป็นพิษ ซึ่งประกอบด้วย *AtBOR4 TaBOR2* และ *HvBOR2* ดังนั้น จึงยืนยันได้ว่ายีน *BOR1* นั้นตอบสนองเมื่อพืชขาดธาตุโบรอน

## สรุป

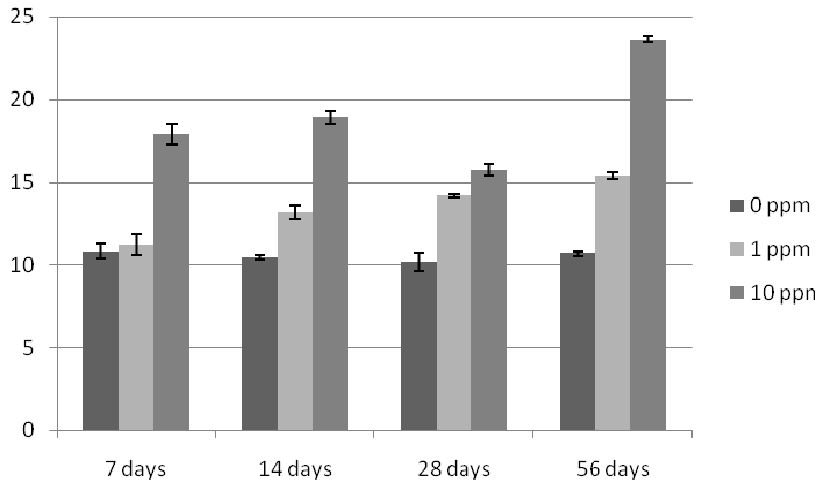
การแยกบางส่วนของยีน *BOR1* ในปาล์มน้ำมันด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนนี้ ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส และเมื่อนำดีเอ็นเอคู่สมที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน พบว่า มีความเหมือนกับยีน *BOR 1* ในพืชหลายชนิดเช่น ละหุ่ง องุ่น อะราบิดอพซิส และส้ม จากการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *BOR1* ในใบและรากของปาล์มน้ำมันที่ได้รับโบรอนในระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 7 14 28 และ 56 วัน ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่า ปาล์มน้ำมันที่อยู่ในสภาพขาดธาตุโบรอน 28 วัน มีการแสดงออกของยีน *BOR1* มากที่สุดทั้งในใบและราก โดยรากมีการแสดงออกของยีน *BOR1* มากกว่าใบในทุกระยะเวลาที่ทำการศึกษา นอกจากนี้การศึกษาความเข้มข้นของธาตุโบรอนในใบปาล์มน้ำมันที่ได้รับธาตุอาหารที่มีโบรอนในปริมาณและช่วงเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าความเข้มข้นของธาตุโบรอนในใบนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อพืชได้รับโบรอนในระดับที่เหมาะสม (1 ppm) และระดับที่เป็นพิษ (10 ppm) แต่ในต้นที่ขาดธาตุโบรอน (0 ppm) ความเข้มข้นธาตุโบรอนไม่มีการเปลี่ยนแปลงทุกช่วงการทดลอง การศึกษานี้เป็นจุดเริ่มต้นของการทำความเข้าใจกระบวนการเมแทบอลิซึมของโบรอน โดยยีนที่เกี่ยวข้องคือ *BOR1* ซึ่งจะเป็นแนวทางในการประยุกต์เพื่อการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะ และใช้คัดเลือกลักษณะทนทานต่อการขาดธาตุโบรอนของปาล์มน้ำมันได้ในที่สุด

## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ




**ภาพที่ 2** ระดับการแสดงออกของยีน *BOR1* ในใบ (A) และราก (B) ของปาล์มน้ำมันที่ขาดโบรอนเป็นระยะเวลาต่าง ๆ จากการตรวจสอบด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ยีน *Actin* เป็นยีนอ้างอิง




**ภาพที่ 3** ค่าวิเคราะห์ธาตุโบรอนในใบปาล์มน้ำมันที่ได้รับโบรอนในปริมาณต่างๆ กันที่ 7 14 28 และ 56 วัน

## เอกสารอ้างอิง


Chairat, N., T. Jantaraniyom, P. Thongkam and T. Eksomtramet. 2001. Fertilizer Management of Oil Palm. Oil Palm Research and Development Center. Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla (in Thai).

Camacho-Cristobal, J.J., J. Rexach and A. Gonzalez-Fontes. 2008. Boron in plant: deficiency and toxicity. J. Integrative Plant Biol. 50: 1247-1255.

Canon, P., F. Aquea, A. R-H. de la Guardia and P. Arce-Johnson. 2013. Functional characteri zation of *Citrus macrophylla* BOR1 as a boron transporter. Physiol. Plant. 149: 329–339.

Dell, B. and L. Huang. 1997. Physiological response of plants to low boron. Plant and Soil 193: 103-120.

Goh, K.J., H.H. Gan, K.K. Kee, P.S. Chew and K.C. Teoh. 2007. Boron requirement and distribution in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and some implications on manuring practices, pp.189-202. *In* F. Xangsen, H.E. Goldbach, P.H. Brown, R.W. Bell, T. Fujiwara, C.D. Hunt, S. Goldberg and L. Shi, eds. Advances in Plant and Animal Boron Nutrition. Springer, Netherlands.

Laksana, C. 2011. Simple and radpid RNA extraction from young and mature leave of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Ph.D special problem, Kasetsart University, Thailand.

Miwa, K. and T. Fujiwara. 2010. Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. Ann. Bot. 105: 1103-1108.

Mukda, S. 2001. Soil Fertility. Odean Store Publishing, Bangkok. 368 p.

Nable, R. O., G. S. Banuelos and J. G. Paull. 1997. Boron toxicity. Plant and Soil 193: 181–198.

Nakagawa, Y., H. Hanaoka, M. Kobayashi, K. Miyoshi, K. Miwa and T. Fujiwara. 2007. Cell-type specificity of the expression of *OsBOR1*, a rice efflux boron transporter gene, is regulated in response to boron availability for efficient boron uptake and xylem loading. Plant Cell. 19: 2624-2635.

Pakpien, P., S. Sriworavit and N. Jantapap. 1997. Boron and oil palm in South of Thailand. House Agr. Mag. 17: 171-176. (in Thai)

Pérez-Castro, R., K. Kasai, F. Gainza-Cortés, S. Ruiz-Lara, J.A. Casaretto, H. Peña-Cortés, J. Tapia, T. Fujiwara and E. González. 2012. *VvBOR1*, the grapevine ortholog of *AtBOR1*, encodes an efflux boron transporter that is differentially expressed throughout reproductive development of *Vitis vinifera* L. Plant Cell Physiol. 53: 485-494.

Pinho, L.G.R., E. Campostrini, P.H. Monnerat, A.T. Netto, A.A.Pires, C.R. Marciano and Y.J. Bastos Soares. 2010. Boron deficiency affects gas and photochemical efficiency (JPI test parameters) in green darf coconut. J. Plant Nutrition. 33: 439 - 451.

Reid, R. 2007. Update on boron toxicity and tolerance in plants, pp.83-90. *In* F. Xangsen, H.E. Goldbach, P.H. Brown, R.W. Bell, T. Fujiwara, C.D. Hunt, S. Goldberg and L. Shi, eds. Advances in Plant and Animal Boron Nutrition. Springer, Natherlands.

Shaaban, M. M. 2010. Role of boron in plant nutrition and human health. Amer. J. Plant Physiol. 5: 224-240

Takano, J., K. Noguchi, M. Yasumori, M. Kobayashi, Z. Gajdos, K. Miwa, H. Hayashi, T. Yoneyama and T. Fujiwara. 2002. Arabidopsis boron transporter for xylem loading. Nature 420: 337-340.

Takano, J., K. Miwa, L.X. Yuan, N. von Wiren, T. Fujiwara. 2005. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 12276–12281.

Takano, J., M. Tanaka, A. Toyoda, K. Miwa, K. Kasai, K. Fuji, H. Onouchi, S. Naito, and T. Fujiwara. 2010. Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. 107(11): 5220–5225.

Turner, P.D. and R.A.Gillbanks. 1974. Oil Palm Cultivation and Management. The incorporated society of planters. Kuala lumper, Malaysia.