

การจำแนก และรูปแบบการแสดงออกของยีน *NIP6;1* (Boric Acid Channel for Preferential Transport of Boron) ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า

Identification and Functional Expression Pattern of *NIP6;1*, a Boric Acid Channel for Preferential Transport of Boron in Tenera Oil Palm

อัญชญา รอดรงนก^{1,2} กนกวรรณ เทียงธรรม³ และ สอนิชัย จันทร์เปรม^{1,2,3,*}

Aunchana Rodrunnok^{1,2}, Kanokwan Teingtham³ and Sontichai Chanprame^{1,2,3,*}

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

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

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

รับเรื่อง: กรกฎาคม 2559 Received: July 2016

รับตีพิมพ์: สิงหาคม 2559 Accepted: August 2016

* Corresponding author: agrstc@ku.ac.th

ABSTRACT: Boron (B) is an essential micronutrient required for plant growth and development which affects not only yield but also the quality of crop. Boron deficiency is major agricultural problems worldwide and frequently observed because boric acid in soil is easily leached under high rainfall condition as found in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantation. Recent reports suggest that boron can be retranslocated from old tissues to young tissues or can be preferentially transported to sink tissues under boron deficiency. The objectives of this study were to clone full length of *EgNIP6;1* gene and study the expression pattern of *EgNIP6;1* gene in oil palm during boron deficiency boron sufficiency and toxicity treatment using real-time PCR technique. In this study we cloned an *NIP6;1*-like gene (named as *EgNIP6;1*) from Tenera oil palm. The full length of *EgNIP6;1* was 858 bp and encoded a protein of 285 amino acid residues. The phylogenetic tree analysis indicated that *EgNIP6;1* protein belonged to NIPs subgroup II. Sequence analysis showed the *EgNIP6;1* was highly conserved with *NIP* in other plant species such as date palm, cotton, *Arabidopsis*, and soybean. For the expression pattern analysis, root and leaves samples were collected randomly at 7, 14, 28 and 56 days after boron deficiency, boron sufficiency and boron toxicity treatment. The result showed the *EgNIP6;1* expression level in leaves was induced and increased at 7 and 28 days after boron deficiency treatment as compared with that 0 day (control) and mainly expressed in leaf as compared with root.

Keywords: Channel for preferential transport of boron, *NIP6;1*, quantitative real time PCR, oil palm

บทคัดย่อ

โบรอนเป็นธาตุอาหารรองที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช โดยส่งผลทั้งต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตของพืช ปัญหาการขาดธาตุโบรอนพบได้ในทุกประเทศทั่วโลก เนื่องจากโบรอนในดินส่วนใหญ่อยู่ในรูปของกรดบอริกที่สามารถละลายน้ำได้ จึงถูกชะล้างได้ง่ายโดยเฉพาะในพื้นที่เพาะปลูกที่มีฝนตกชุก เช่นเดียวกับพื้นที่ที่ใช้ปลูกปาล์มน้ำมัน จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ พบว่า โบรอนสามารถเคลื่อนย้ายจากเนื้อเยื่อแก่ไปยังเนื้อเยื่อที่กำลังพัฒนาผ่านทางท่อลำเลียงอาหารภายใต้สภาวะขาดโบรอน การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนก full length ของยีน *NIP6;1* ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า รวมถึงศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *NIP6;1* ในปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพืชด้วยเทคนิค real-time PCR จากการศึกษาสามารถจำแนก full-length ของยีน *NIP6;1* ในปาล์มน้ำมันภายใต้สภาวะขาดโบรอนได้ เป็นยีนที่มีขนาด 858 นิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสพันธุกรรมได้เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย 285 กรดอะมิโน และเมื่อวิเคราะห์หาค่าความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน พบว่า มีค่าความเหมือนกับยีน *NIP6;1* ที่รายงานในพืชหลายชนิด ได้แก่ อินทผลัม ฝ้าย *Arabidopsis* และถั่วเหลือง และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่า โปรตีน EgNIP6;1 จัดอยู่ในกลุ่ม NIPs subgroup II เมื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *EgNIP6;1* จากตัวอย่าง cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากรากและใบปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพืชเป็นเวลา 7 14 28 และ 56 วัน ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่ายีน *EgNIP6;1* มีระดับการแสดงออกในใบสูงกว่าราก โดยมีการแสดงออกสูงขึ้นไป 7 วันและสูงสุด 28 วันหลังได้รับสภาวะขาดโบรอนเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0

คำสำคัญ: ระบบขนส่งโบรอน, *NIP6;1*, ปริมาณ PCR, น้ำมันปาล์ม

บทนำ

โบรอน (boron, B) ในสารละลายดินตามธรรมชาติส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของกรดบอริก (boric acid, H_3BO_3) เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 2.573 Å เป็นโมเลกุลไม่มีประจุ เช่นเดียวกับยูเรีย เป็นกรดอ่อน มีค่า pK เท่ากับ 9.24 โบรอนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช diatom cyanobacteria และสาหร่ายทะเล (Loomis and Dust, 1992) นอกจากนี้ยังจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ เช่น zebrafish (*Danio rerio*) และ trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Rowe and Eckhart, 1999)

ในพืช โบรอนมีความสำคัญ เนื่องจากโบรอนจะทำปฏิกิริยาร่วม กับโมเลกุลของ rhamnoglucuronan-II (RG-II) เพื่อสร้างโมเลกุลในรูปแบบ cross-link ได้สารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของสารประกอบ pectin polysaccharide ในผนังเซลล์ (cell wall) โมเลกุลของ RG-II มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความแข็งแรงของโครงข่ายสารประกอบเพกตินในผนังเซลล์ (O'Neill et al., 2004)

อาการขาดโบรอนในพืชจะปรากฏชัดเจนในบริเวณที่กำลังมีการเจริญเติบโต เช่น ใบอ่อน บริเวณรากที่กำลังยึดตัว ผล และเมล็ด การเจริญของส่วนต่าง ๆ ดังกล่าวจะหยุดชะงักหรือถูกยับยั้งเมื่อพืชขาดโบรอน (Shorrocks, 1997) อาการขาดโบรอนเหล่านี้จึงอาจทำให้สรุปได้ว่าโบรอนในพืชไม่สามารถเคลื่อนย้ายในท่อลำเลียงอาหาร (phloem) แต่จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่า มีการเคลื่อนย้ายโบรอนในพืชจากเนื้อเยื่อแก่ (old tissue) ไปยังเนื้อเยื่อที่กำลังพัฒนา (young tissue or sink tissue) หรืออาจเรียกได้ว่าเป็นการ retranslocate ของโบรอนในพืช Brown and Shelp (1997) รายงานว่า พืชที่สามารถเคลื่อนย้ายโบรอนผ่านทางท่อลำเลียงอาหารได้นั้นเป็นพืชที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) ได้แก่ น้ำตาล mannitol และ sorbitol เนื่องจากน้ำตาล

แอลกอฮอล์มีส่วนประกอบของหมู่ *cis*-hydroxyl ภายในโมเลกุลเป็นส่วนที่สามารถจับกับโบรอนและสร้างเป็นสารประกอบ poly-boron complex ในรูปที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ผ่านทางท่อลำเลียงอาหารในพืช นอกจากนี้ยังมีรายงานการเคลื่อนที่ของโบรอนในพืชผ่านทางท่อลำเลียงอาหารในพืชที่ไม่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้ โดยเป็นการตอบสนองช่วงสั้นในสถานะที่พืชขาดโบรอน พบใน white lupin (*Lupinus albus*) (Huang *et al.*, 2008) อะราบิดีอบซิส (*Arabidopsis thaliana*) (Noguchi *et al.*, 2000) บรอกโคลี (*Brassica oleracea*) และ lupin (Shelp *et al.*, 1998) คาโนลา (*Brassica napus*) (Stangoulis *et al.*, 2001) และทานตะวัน (*Helianthus annuus*) (Matoh and Ochiai, 2005)

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันแล้วว่า กระบวนการเคลื่อนย้ายโบรอนในพืชสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ (1) passive diffusion across lipid bilayer (2) channel mediated boron transport by transporter (ยีน *NIPs*) และ (3) active boron transport (ยีน *BORs*) โดยยีนที่ควบคุมกระบวนการเคลื่อนย้ายโบรอนในพืชคือ *NIP5;1* และ *BOR1* และจัดเป็นยีนประเภท transporter (Miwa *et al.*, 2010) ยีน *NIP5;1* และ *BOR1* ที่จำแนกได้จาก *Arabidopsis thaliana* เป็นยีนที่มีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพของการเคลื่อนย้ายโบรอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช (Takano *et al.*, 2002, 2006) โดย *AtBOR1* มีการแสดงออกทั้งในส่วนยอดและราก โดยมีบทบาทในการเพิ่มประสิทธิภาพในการเคลื่อนย้ายโบรอนในส่วนของ xylem เรียกว่า xylem loading ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญที่เพิ่มการสะสมโบรอนในส่วนยอดของพืชในสถานะที่มีโบรอนจำกัด (Takano *et al.*, 2008) สำหรับ *AtNIP5;1* เป็นโปรตีนที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ มีการแสดงออกในส่วนรากมากกว่าส่วนยอด มีผลในการควบคุมกระบวนการดูดซึมโบรอนจากราก โดยมีบทบาทเป็น channel (Takano *et al.*, 2008) ในปี 2004 Wallace และ Roberts ได้รายงานการค้น

พบยีน *AtNIP6;1* ใน *A. thaliana* เป็นยีนที่มี homology กับ *AtNIP5;1* ยีนทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่มของ major intrinsic protein (MIPs) ชนิดหนึ่งในกลุ่มของ nodulin-26-like intrinsic protein (NIPs) subgroup II จากการศึกษาของ Tanaka *et al.* (2008) รายงานว่า *AtNIP6;1* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนย้ายโบรอนในพืช โดยทำหน้าที่เป็นช่องทาง (channel) แสดงออกในเนื้อเยื่อส่วนยอดที่กำลังพัฒนา *AtNIP6;1* มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการเคลื่อนย้ายกรดบอริกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ จัดเป็น plasma membrane protein มีการแสดงออกสูงสุดในส่วนข้อของลำต้นเนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการเคลื่อนย้ายสารระหว่างท่อลำเลียงน้ำและอาหารในพืช และรองลงมาคือบริเวณส่วนยอด ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนก full length ของยีน *NIP6;1* ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนดังกล่าวเมื่อกล้าปาล์มน้ำมันได้รับสถานะขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพิษ โดยใช้เทคนิค real-time PCR การศึกษาเพื่อเข้าใจถึงกระบวนการเคลื่อนย้ายโบรอนจากเนื้อเยื่อแก่ไปยังเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตในปาล์มน้ำมัน มีความสำคัญต่อการพัฒนาระบบการจัดการการเพาะปลูกปาล์มน้ำมันได้ในอนาคต

อุปกรณ์ และวิธีการ

พืชทดลอง

ปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่าอายุ 6 เดือน จำนวน 12 ต้น ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในสภาพโรงเรือน โดยปลูกในกระถางที่มี vermiculite พร้อมทั้งให้สารละลาย complete nutrient solution (CNS) (Pinho *et al.*, 2010) ที่มีธาตุอาหารครบถ้วนเป็นเวลา 1 เดือนเพื่อให้ต้นกล้าปรับตัว โดยเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก 3 วัน จากนั้นแบ่งต้นกล้าปาล์มน้ำมันออกเป็น 4 ต้นต่อการทดลอง ดังนี้ ได้รับสถานะขาดโบรอน ได้รับสถานะโบรอนเพียงพอ และได้รับสถานะโบรอนเป็นพิษ โดยให้สารละลาย CNS ที่

มีโบรอน 0, 1.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ เก็บตัวอย่างใบอ่อนและปลายรากที่ 0, 7, 14, 28 และ 56 วันหลังการได้รับโบรอนทั้ง 3 ระดับ

การสกัดอาร์เอ็นเอ และสังเคราะห์ first-strand cDNA

นำตัวอย่างใบอ่อนและรากมาสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการของ Laksana and Chanprame (2015) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วยการทำ electrophoresis บนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ และเครื่อง nanodrop spectrophotometer 8000 (Eppendorf) จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase I (Promega, USA) โดยนำตัวอย่างอาร์เอ็นเอบ่มร่วมกับเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ด้วยไพรเมอร์ oligo dT (20-mer) ร่วมกับ RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoScientific, USA) และปรับความเข้มข้นเท่ากับ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

การโคลนยีน *NIP6;1* จากปาล์มน้ำมัน

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ full-length ของยีน *NIP6;1* ในปาล์มน้ำมันโดยอาศัยหลักการ alignment เพื่อหาส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ โดยเลือกใช้ยีนในฐานข้อมูล GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov) เป็นต้นแบบ

สังเคราะห์ full-length ของยีน *NIP6;1* โดยใช้ first-strand cDNA ของปาล์มน้ำมันเป็นต้นแบบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ร่วมกับเอนไซม์ Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) และไพรเมอร์ FullEg*NIP6;1*F 5'-ATGCCGAGACGGAGACCG-3' และ FullEg*NIP6;1*R 5'-CTAGCGCGG AAGCTTCGG-3' ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra T1 Thermal Cycler) กำหนดปฏิกิริยาดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน

30 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตที่ได้โดยการทำ electrophoresis ในอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากเจลโดยใช้ PCR cleanup and gel extraction kit (Nucleospin® Extract II) จากนั้นโคลนเข้าสู่ pGEM-T® easy vector (Promega, USA) และถ่ายเข้าสู่คอมพลีเมนต์เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH5α โดยเทคนิค heat shock เพื่อเพิ่มปริมาณ และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท 1st base laboratory ประเทศมาเลเซีย

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และ bioinformatics

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full-length ของยีน *NIP6;1* ที่ได้จากปาล์มน้ำมัน แปรรหัสพันธุกรรมเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม MEGA6 จากนั้นจึงวิเคราะห์ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล GenBank (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) และ ClustalW2 (www.ebi.ac.uk) สร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยวิธี neighbor-joining (bootstrap value 1,000 replicate) และวิเคราะห์ hydrophobic plot ด้วยโปรแกรม TMpred (www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *NIP6;1* ในปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค real-time PCR

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสำหรับยีน *NIP6;1* ในปาล์มน้ำมัน ด้วยโปรแกรม primer3 (<http://simgene.com/Primer3>) ดังนี้ RT*NIP6;1*F: 5'-CATACATAGCTGCCCAAGTC-3' และ RT*NIP6;1*R: 5'-CGAACAAGAGATTGAAGGTG-3'

และ *Actin* ที่ใช้สำหรับเป็นยีนอ้างอิง (reference gene) ดังนี้ RTActinF: 5'AGGGAACATGGTTGATCCTC-3' และ RTActinR: 5'-TTGGTGCAGAGAGATTGAGG-3' สายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 152 และ 150 คู่เบสตามลำดับศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *NIP6;1* ในใบและรากปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพิษเป็นเวลา 0, 7, 14, 28 และ 56 วัน จำนวน 3 ซ้ำ ด้วยเทคนิค real-time PCR ใช้ cDNA ปริมาณ 300 นาโนกรัม เป็นต้นแบบ ร่วมกับ SensiFast SYBR No-Rox kit (BioLines, USA) ทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Mastercycler[®] ep realplex4 (Eppendorf, USA) กำหนดปฏิกิริยาดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที จำนวน 45 รอบ โดยระดับการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ 0 วัน (control) และมีจำนวน technical replication จำนวน 3 ซ้ำ

ผลการทดลอง และวิจารณ์

การโคลนยีน *NIP6;1* จากปาล์มน้ำมัน วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และ bioinformatics

จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับปลายด้าน 5' และ 3' ของยีน *NIP6;1* โดยใช้ cDNA ของปาล์มน้ำมันเป็นแม่แบบ สามารถจำแนก full-length ของยีน *NIP6;1* และตั้งชื่อว่า *EgNIP6;1* ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ขนาดเท่ากับ 858 คู่เบส (Figure 1) โดยมีปลาย 5' และ 3' เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ start และ stop codon ตามลำดับ และแปลรหัสพันธุกรรมเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 285 กรดอะมิโน (Figure 2) จากนั้นวิเคราะห์ membrane spanning region ด้วยโปรแกรม TMpred พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลงมาจากยีน *EgNIP6;1* มีส่วนประกอบของ transmembrane domain จำนวน 6 domain โดยเชื่อมต่อกันด้วย loop A-E และมี NPAs (Asn-Pro-Ala) boxes จำนวน 2 box (Figure 3)

```
ATGGGCGAAGACGGCGCCTCTGCACTGGAAAACCCCGGAGTCCACTCCTTGGAGGGCACAAGTCCAGTC
GGTTCGCCGATAGGTGGCGTTCCTACTTGGCCGCGCAATTGCTTCGCAGTTAAGCCTTGGACCATCGA
CGACGATGGCCCAAGCATCCAGCTTCCGGTTCCTTGTAAAGAAAGGTGGGGGCTGAGTTCATTGGCACT
TTCATGCTAGTGTTCGCCAGCACGGCTGCGGCAATTATCGATCAGCAGTCCAACGGTGCCGTCACCTTAT
TAGGCCTAGCAGCCTGTCCGGCATCGCCGCCATGATCATCATCCTCTCGACCGGCCACATCTCCGGTGC
TCACCTCAATCCATCTGCACTATTGCCCTTGGCACCTTCAAACACTTCTCTTGGGAGAAGGTACTGGTA
TACATCGCTGCACAATTGTCGGCATCACTATGCGCGGCATTTGCATTGAAGGCAATCTTTTATCCGATTT
TGGGAGAAGGTGTAACGGTGCCAAGTGGTAGTGCGGGTGC GGCGTTTGTAAATGGAGTTTATTATTGGATT
CAATCTCATGTTTGTACCACGGCAGTTGCCACTGATGTTAGAGCAGTTGGGGAGCTGGCTGGGATCACG
GTAGGAGCAACTGTGGCAATGAACAACATCATTGCTGGGAGGATTAGCGGGCATCTATGAATCCAGCGA
GGACGCTGGGCCCGGGTGGCGGCAACAACACTACAAGGCCATATGGGTATACTTCACGGCACCAATCCT
```

Figure 1 Nucleotide sequence of a full-length *NIP6;1* synthesized from first-strand cDNA of tenera oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

MGEDGASALENPGVPLLGGHKSSRFADRWRSLLRGNCFVAVKPWTIDDDGPSIPASGSLVRKVGAEFIGT
 FMLVFASTAAAIDQQSNGAVTLLGLAACSGIAAMIIILSTGHISGAHLNPSVTIAFATFKHFSWEKVLV
 YIAAQLSASLCAAFALKAIIFYPILGEGVTVPSGSAGAAFVMEFIIGFNLMFVTTAVATDVRVAVGELAGIT
 VGATVAMNNIIAGRISGASMNPARTLGPAAVANNYKAIWVYFTAPILGTLTGAGAYTAVKLTEDDGTPTM
 RSFRR

Figure 2 The deuced amino acid sequence of *EgNIP6;1* of tenera oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

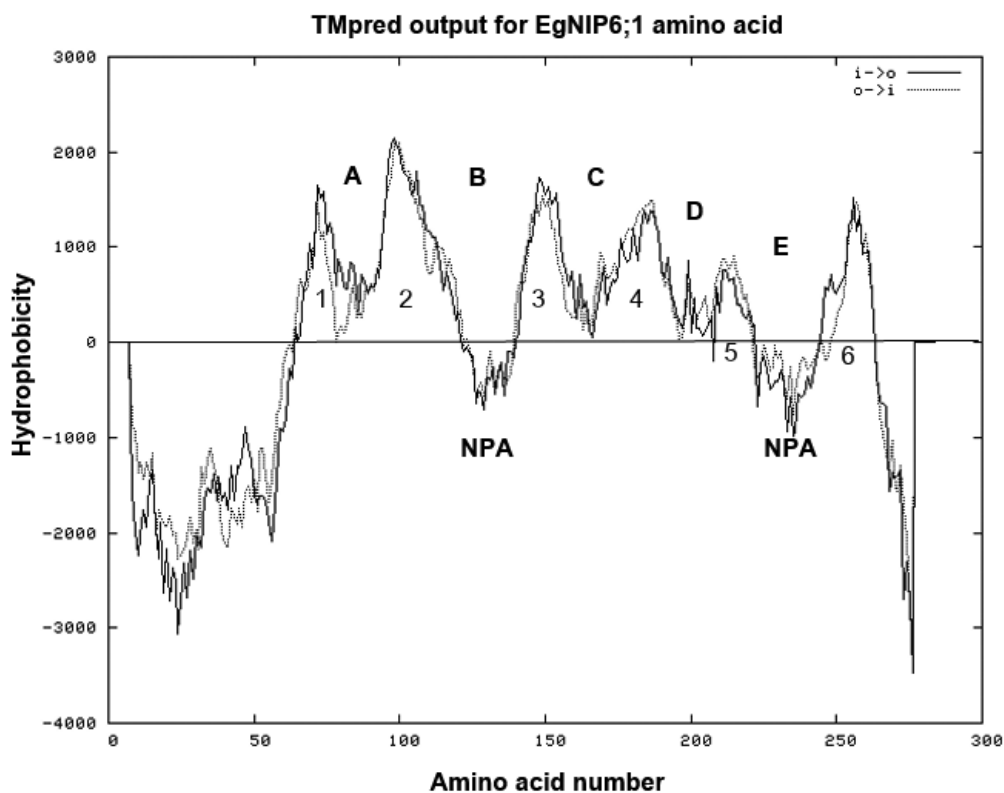


Figure 3 The hydrophobicity plot of *EgNIP6;1* amino acid sequence of tenera oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) analyzed by TMpred program. The x-axis represents the amino acid 1–285 residues. The areas above the x-axis indicate the hydrophobic amino acid residues. The protein composes of 6 hydrophobic domains and 2 NPAs (Asn–Pro–Ala) boxes

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *EgNIP6;1* มาวิเคราะห์ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสพันธุกรรมจากยีน *EgNIP6;1* มีความเหมือนกับยีน

NIP6;1 ที่รายงานในพืชหลายชนิด ได้แก่ *GaNIP6;1* (*Gossypium arboretum*) (KHG25640.1), *PtNIP6;1* (*Populus trichocarpa*) (XP002297797.2) *AtNIP6;1* (*Arabidopsis thaliana*) (NP178191.1) and *GsNIP6;1*

>> การแสดงออกของยีน *NIP6;1* ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอร์นรา

(*Glycine soja*) (KHN22407.1) มีค่าความเหมือนเท่ากับ 66%, 63%, 60% และ 60% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยบริเวณที่เรียกว่า NPAs เช่นเดียวกับที่พบในยีน *NIP6;1* ของ *Arabidopsis* (*AtNIP6;1*) (Figure 4)

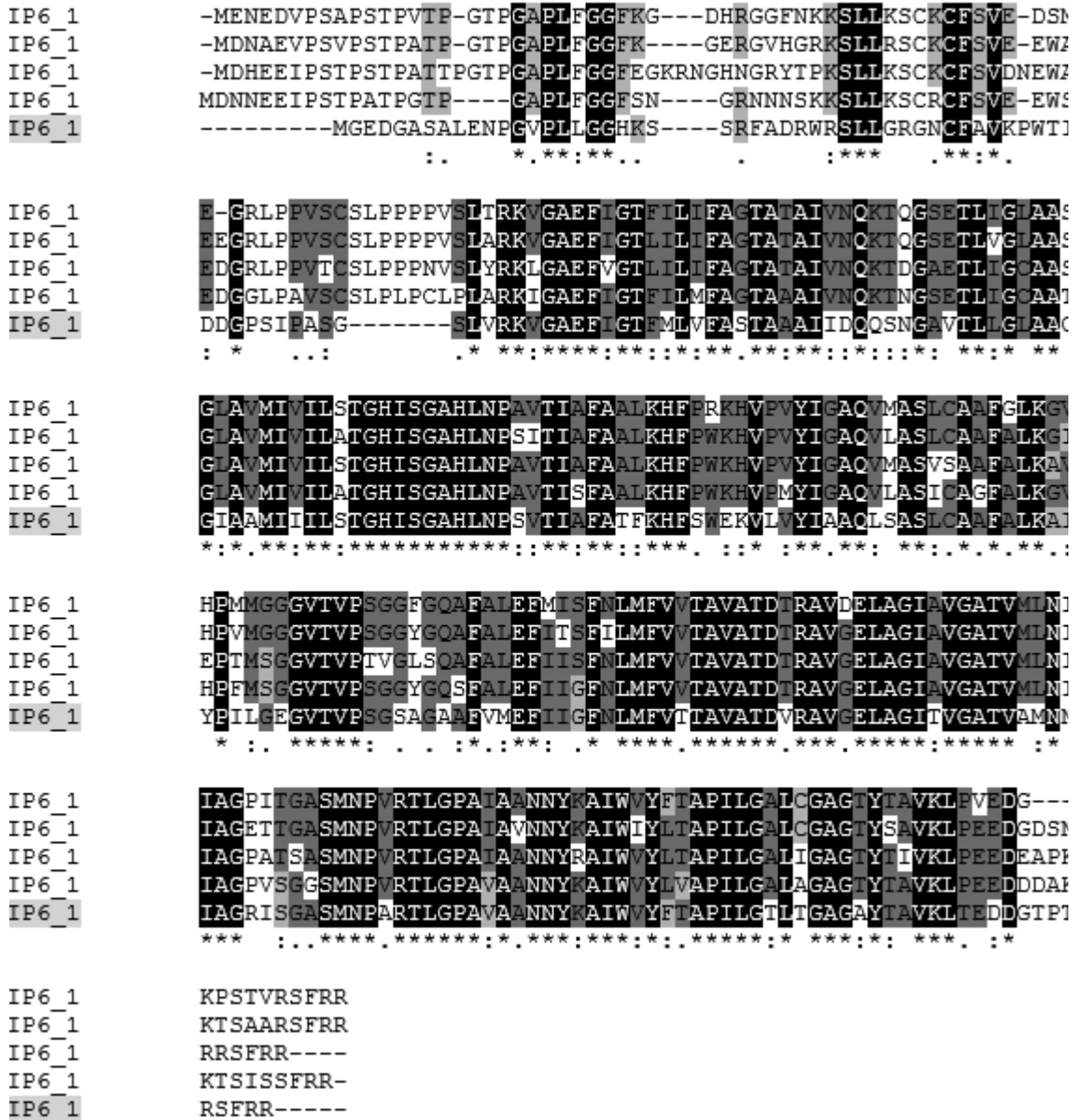


Figure 4 Multiple amino acid sequence alignment analysis of *EgNIP6;1* protein using ClustalW2 with *NIPs* proteins reported in certain plant species such as *GaNIP6;1* (*Gossypium arboreum*) (KHG25640.1) (*KHG25640.1*) *PtNIP6;1* (*Populus trichocarpa*) (XP002297797.2) *AtNIP6;1* (*Arabidopsis thaliana*) (NP178191.1) and *GsNIP6;1* (*Glycine soja*) (KHN22407.1). NPAs indicate the Asn-Pro-Ala boxes

เมื่อวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ร่วมกับยีน *NIPs* ที่รายงานในพืชชนิดต่าง ๆ และสร้างเป็น phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า โปรตีน *EgNIP6;1* จัดอยู่ในกลุ่ม *NIPs* subgroup II ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับโปรตีนจากพืชที่พบในพืชหลายชนิด

เช่น *AtNIP5;1* (Q9SV84) *OsNIP3;1* (Q01WF3) *ZmNIP3;1* (Q9ATN1) *CiNIP5;1* (AFN37617.1) *OsNIP3;3* (XP01564959.1) *OsNIP3;2* (XP01564938.1) *AtNIP7;1* (NP566271.1) และ *AtNIP6;1* (NP178191.1) (Figure 5)

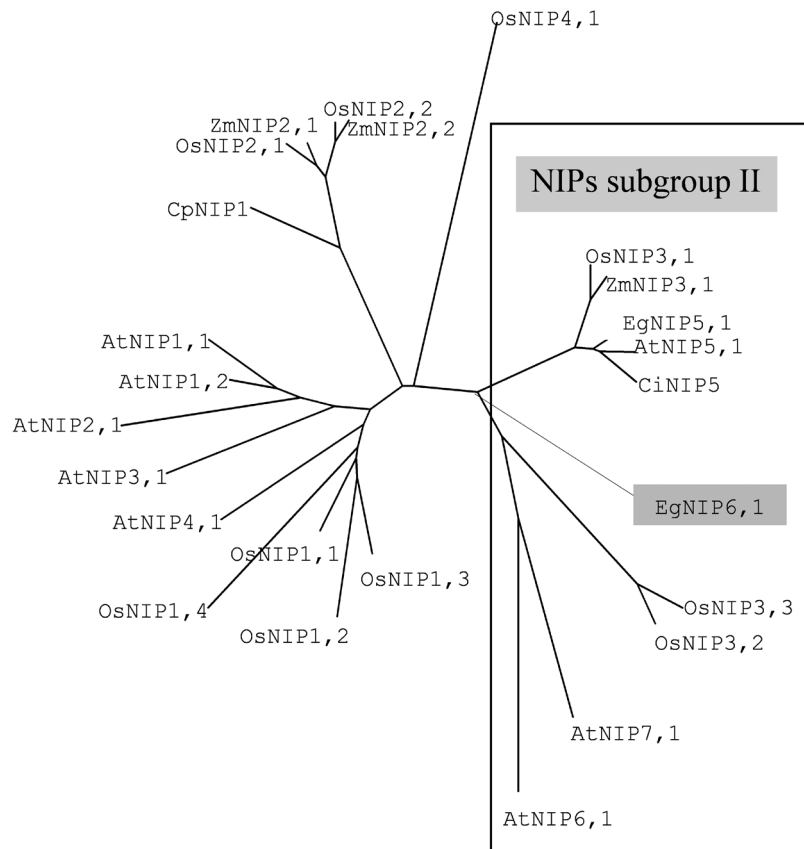


Figure 5 Phylogenetic tree among different species that was constructed based on deduced amino acid sequences by neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replication using MEGA6 program

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *NIP6;1* ในปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค real-time PCR

การศึกษาแสดงออกของยีน *EgNIP6;1* โดยใช้เทคนิค real-time PCR ในใบและรากของปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะการขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และ

โบรอนเป็นพืช พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *EgNIP6;1* ในใบมีค่าสูงกว่าราก โดยในใบมีค่าการแสดงออกของยีนสูงสุดที่ 28 วันหลังได้รับสภาวะขาดโบรอน มีค่าเท่ากับ 72.4 คิดเป็น 19 เท่าของค่าการแสดงออกของยีนในรากที่มีค่าเท่ากับ 3.69 (Figure 6B)

เมื่อพิจารณาในใบปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพิษ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *EgNIP6;1* ในใบที่ขาดโบรอนมีค่าการแสดงออกของยีน *EgNIP6;1* สูงสุด โดยมีการแสดงออกสูงขึ้นในวันที่ 7 และสูงสุดในวันที่ 28 หลังได้รับสภาวะขาดโบรอน เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่

0 (มีค่าเท่ากับ 1) หลังจากนั้นการแสดงออกจึงลดลง และการแสดงออกของยีนดังกล่าวในสภาพขาดโบรอนจะสูงกว่าในสภาพโบรอนเพียงพอและโบรอนเป็นพิษในเกือบทุกช่วงเวลา ยกเว้นในวันที่ 14 ที่สภาพที่ได้รับโบรอนเพียงพอจะกระตุ้นให้ยีนแสดงออกสูงกว่าสภาพขาดหรือโบรอนเป็นพิษ (Figure 6A)

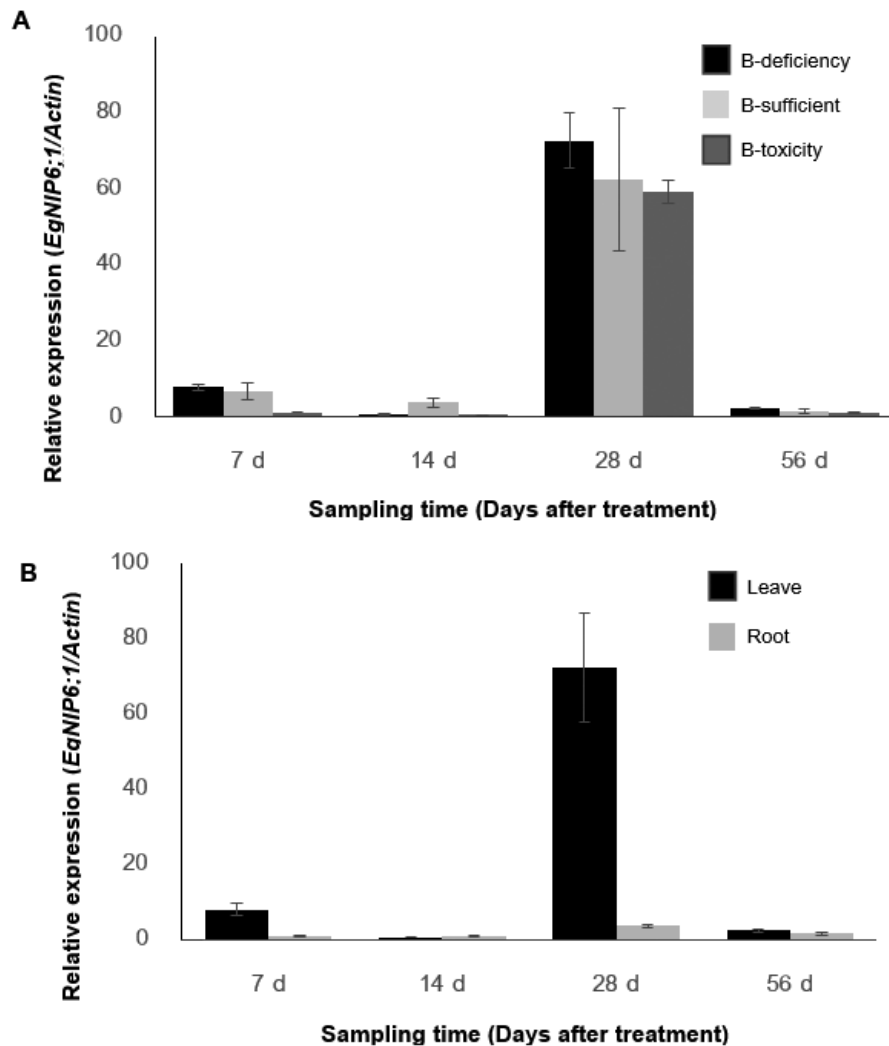


Figure 6 Relative expression of *EgNIP6;1* gene of tenera oil palm by real-time PCR (A) relative expression of *EgNIP6;1* in root receiving boron deficiency, sufficiency, and toxicity for 7, 14, 28 and 56 days (B) The comparison of relative expression of *EgNIP6;1* in root with leaves of oil palm subjected to boron deficiency for 7, 14, 28 and 56 days

วิจารณ์

กระบวนการดูดซึมและเคลื่อนย้ายโบรอนในพืชจากสารละลายดิน เริ่มต้นด้วยการดูดซึมโบรอนโดยรากพืชโดยอาศัยการทำงานของยีน *NIP5;1* (boric acid channel) จากนั้นจึงเคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อรากและเข้าสู่ท่อลำเลียงน้ำโดยอาศัยการทำงานของยีน *BOR1* (borate exporter) เพื่อเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชต่อไป (Miwa *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังมียีนที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเคลื่อนย้ายโบรอนจากเนื้อเยื่อแก่ไปสู่เนื้อเยื่ออ่อนหรือเนื้อเยื่อที่กำลังพัฒนา หรืออาจเรียกว่าการ retranslocation โดยเป็นการเคลื่อนย้ายโบรอนผ่านทางท่อลำเลียงอาหารของพืช โดยอาศัยการทำงานของยีน *NIP6;1* (Tanaka *et al.*, 2008)

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถจำแนกยีน *NIP6;1* จากปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า และให้ชื่อว่า *EgNIP6;1* โดยเป็นยีนที่มีขนาด 858 คู่เบส เมื่อแปลรหัสให้เป็นโปรตีนได้เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 285 กรดอะมิโน จากผลการวิเคราะห์ hydrophobic plot ด้วยโปรแกรม TMpred พบว่า โปรตีน *NIP6;1* มีส่วนประกอบของ transmembrane domain จำนวน 6 domain โดยเชื่อมต่อกันด้วย loop A-E และมี NPAs (Asn-Pro-Ala) boxes จำนวน 2 box ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่สามารถพบได้ในโปรตีนชนิด aquaporin หรือ MIPs เท่านั้น (Wallace *et al.*, 2006)

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสร้างเป็น phylogenetic tree โดยเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *EgNIP6;1* และยีน *NIPs* ที่รายงานในพืชหลายชนิดแสดงให้เห็นว่ายีน *EgNIP6;1* จัดอยู่ในกลุ่มของ *NIP II* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน *AtNIP6;1* และ *OsNIP3;1* (Figure 5) ที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายกรดบอริกในสภาวะที่พืชขาดโบรอน ในปัจจุบันโปรตีน *NIP* สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยตามขนาดของสารที่โปรตีน *NIP* สามารถนำพาได้ โดยขนาดของสารที่นำพาได้นี้ขึ้นอยู่กับขนาดของช่องทางที่โปรตีนชนิดนี้สร้างขึ้น ซึ่งขึ้นอยู่กับ

ตำแหน่งของ ar/R (aromatic/arginine) ที่อยู่บนสายโพลีเปปไทด์ (Wallace and Roberts, 2004) โปรตีน *NIPs* กลุ่มย่อย II มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายสารที่มีโมเลกุลขนาดกลางและไม่มีประจุ เช่น ยูเรีย และฟอรัมาไมด์ (Wallace and Robert, 2005) และกรดบอริก (Takano *et al.*, 2006)

ใน *Arabidopsis* พบว่ายีน *AtNIP5;1* และ *AtNIP6;1* มีบทบาทในการเพิ่มประสิทธิภาพการเคลื่อนย้ายโบรอน แต่พบว่ายีนทั้งสองมีการแสดงออกเพื่อส่งเสริมการเคลื่อนย้ายโบรอนในชนิดของเนื้อเยื่อที่ต่างกันคือ *AtNIP5;1* พบว่ามีแสดงออกมากในรากเพื่อช่วยดูดซึมโบรอนจากสารละลายดินเข้าสู่ราก ในขณะที่ *AtNIP6;1* มีการแสดงออกมากในส่วนลำต้นและใบเพื่อช่วยในกระบวนการ retranslocate โบรอนในพืช (Tanaka *et al.*, 2008) แต่การศึกษาในข้าว พบว่ามีเพียงยีน *OsNIP3;1* ที่ควบคุมการเคลื่อนย้ายกรดบอริกทั้งราก ลำต้น และใบ (Hanako and Fujiwara, 2007) ดังนั้นเมื่อพิจารณารูปแบบการแสดงของยีน *EgNIP1;6* ในปาล์มน้ำมัน ที่พบการแสดงออกในส่วนของใบอ่อนสูงกว่ารากอย่างเห็นได้ชัด (Figure 6B) แสดงให้เห็นว่ายีน *EgNIP6;1* มีการทำงานที่คล้ายกับยีน *AtNIP6;1* นอกจากนี้เมื่อพิจารณารูปแบบการแสดงออกนั้นยังมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน จึงอาจสรุปได้ว่า *EgNIP6;1* นั้นมีบทบาทเป็น boric acid channel ที่เกี่ยวข้องกับ การเคลื่อนย้ายโบรอนภายในเนื้อเยื่อในปาล์มน้ำมันที่มีการแสดงออกในระดับสูงภายใต้สภาวะการขาดโบรอน

สรุป

การโคลนยีนด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง สามารถจำแนกยีน *NIP6;1* ในปาล์มน้ำมันและให้ชื่อว่า *EgNIP6;1* โดยเป็นยีนที่มีขนาด 858 คู่เบส เมื่อแปลรหัสให้เป็นโปรตีนจะได้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 285 กรดอะมิโน และเมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์

คุณสมบัติต่าง ๆ ทางด้าน bioinformatics ทั้งการวิเคราะห์ hydrophobic plot การวิเคราะห์ multiple sequence alignment การสร้าง phylogenetic tree ร่วมกับการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพิษ แสดงให้เห็นถึงลักษณะเฉพาะของยีนที่คล้ายคลึงกับยีน *AtNIP6;1* ที่รายงานใน *Arabidopsis* และ *OsNIP3;1* ที่รายงานในข้าว จึงอาจสรุปได้ว่า *EgNIP6;1* ที่จำแนกได้จากปาล์มน้ำมันนี้มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายโบรอนในใบอ่อน โดยเฉพาะเมื่อปาล์มน้ำมันได้รับสภาพขาดโบรอน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมืออุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Brown, P.H. and B.J. Shelp. 1997. Boron mobility in plants. *Plant Soil*. 193: 85–101.
- Hanako, H. and T. Fujiwara. 2007. Channel-mediated boron transport in rice. *Plant Cell Physiol*. 48: S227.
- Huang, L., W.L. Bell and B. Dell. 2008. Evidence of phloem boron transport in response to interrupted boron supply in white lupin (*Lupinus albus* L. cv. Kiev Mutant) at the reproductive stage. *J. Exp. Bot*. 16: 447–456.
- Laksana, C. and S. Chanprame. 2015. A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaf of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *ISSAAS*. 21(1): 96–106.
- Loomis, W.D. and R.W. Dust. 1992. Chemistry and biology of boron. *Biofactors* 3(4): 229–239.
- Match, T. and K. Ochiai. 2005. Distribution and partitioning of newly take up boron in sunflower. *Plant Soil*. 278: 351–360.
- Miwa, K., J. Takano, T. Kamiya and T. Fujiwara. 2010. Chapter7: Molecular mechanisms of boron transport in plants: Involvement of *Arabidopsis NIP5;1* and *NIP6;1*. In T.P. Jahn and G.P. Bienert, eds. *NIPs and Their Role in the Exchange of Metalloids*. Springer, USA.
- Noguchi, K., F. Dannel, H. Pfeffer, V. Romheld, H. Hayashi and T. Fujiwara. 2000. Defect in root-shoot translocation of boron in *Arabidopsis thaliana* mutant *bor1-1*. *J. Plant Physiol*. 156: 751–755.
- O'Neill, A., T. Ishii, P. Albersheim and A.G. Darvill. 2004. Rhamnogalacturonan II. structure and function of borate cross-linked cell wall pectin polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol*. 55: 109–139.
- Pinho, L.G.R., E. Campostrini, P.H. Monnerat, A.T. Netto, A.A. Pires, C.R. Mariano and Y.J.B. Soares. 2010. Boron deficiency affects gas exchange and photochemical efficiency (JPT test parameters) in green dwarf coconut. *J. Plant Nutr*. 33: 439–351.

- Rowe, R.I. and C.D. Eckhart. 1999. Boron is required for zebrafish embryogenesis. *J. Exp. Biol.* 202: 1649–1654.
- Shelp, B.J., A.M. Kitheka, R.A. Vanderpool, O.R. van Cauwenberghe and G.A. Spiers. 1998. Xylem-to-phloem transport of boron in broccoli and lupin during early reproductive growth. *Physiol. Plant.* 104: 533–540.
- Shorrocks, V.M. 1997. The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant Soil.* 193: 121–148.
- Stangoulis, J.C., P.H. Brown, N. Bellaloui, N. Reid and R.D. Graham. 2001. The effect of boron utilization in canola. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 1109–1114.
- Takano, J., K. Miwa and T. Fujiwara. 2008. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends Plant Sci.* 13(8): 451–457.
- 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., M. Wada, U. Ludewig, G. Schaaf, N. Wiren and T. Fujiwara. 2006. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18: 1498–1509.
- Tanaka, M., I.S. Wallace, J. Takano, D.M. Roberts and T. Fujiwara. 2008. *NIP6;1* is a boric acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 20: 2860–2875.
- Wallace, I.S., W.G. Choi and D.M. Roberts. 2006. The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *BBA. Biomembranes* 1758: 1165–1175.
- Wallace, I.S. and D.M. Roberts. 2004. Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic protein classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiol.* 135: 1059–1068.
- Wallace, I.S. and D.M. Roberts. 2005. Distinct transport selectivity of two structural subclasses of the nodulin–intrinsic protein family of plant aquaglyceroporin channels. *Biochemistry* 44: 16826–16834.