

การโคลนและศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *NIP5;1* ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า Cloning and Expression Pattern Study of *NIP5;1*, a Boron Transport Gene in Tenera Oil Palm

อัญชานา รอดรงนง^{1,2} ชนาکانต์ ลักษณะ⁴ และ สนิชชัย จันทรเปรม^{1,2,3,*}
Aunchana Rodrungnok^{1,2}, Chanakan Laksana⁴ 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

⁴ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว สระแก้ว 27160

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

⁴ Faculty of Agricultural Technology, Burapha University Sa Kaeo Campus, Sa Kaeo 27160, 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. In Thailand, boron deficiency is the major problem in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantation, causes abnormal leaves and abortion of fruit which lead to decrease of crop yield. In recent year, the channels for boric acid mediate boron uptake under boron deficiency (*NIP5;1*) had been identified in many plant species. The *NIP5;1* gene encodes a member of major intrinsic protein (MIPs) family also known as aquaporin. The objectives of this study were to clone full length of *EgNIP5;1* gene and to study of expression pattern of *EgNIP5;1* gene in oil palm during boron deficiency, sufficiency, and toxicity treatments using real-time PCR technique. In this study, we cloned an *NIP5;1* like gene (named as *EgNIP5;1*) from Tenera oil palm. The full length of *EgNIP5;1* was 894 bp and encoded a protein of 297 amino acid residues. Sequence analysis showed the *EgNIP5;1* was highly conserved with *NIPs* gene in other plant species such as *Arabidopsis*, rice, citrus and maize. The phylogenetic tree analysis indicated that *EgNIP5;1* protein belonged to *NIPs* subgroup II. For the expression pattern analysis, root samples were collected randomly at 7, 14, 28 and 56 days after boron treatments. Total RNA was extracted and the cDNA was synthesized. The specific primers were designed and real-time PCR was performed. For the result, the *EgNIP5;1* expression levels in root were induced and increased continuously to 3 and 2 folds at 14 day after boron deficiency and boron toxicity treatment, respectively as

compared with that 0 day and the expression levels were decreased after that.

Keywords: Channel mediated boron transport, *NIP5;1*, quantitative real time PCR, boron

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(2): 160–173

ว. วิทย. กษ. (2560) 48(2): 160–173

บทคัดย่อ

โบรอน (B) เป็นธาตุอาหารรองที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช ในประเทศไทยพบว่า การขาดโบรอนเป็นปัญหาหลักในพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นสาเหตุให้เกิดความผิดปกติของใบ ช่อดอกและผล ส่งผลโดยตรงต่อผลผลิตปาล์มน้ำมัน จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้สามารถจำแนกยีน *NIP5;1* จากพืชหลายชนิด โดยยีนดังกล่าวมีบทบาทเป็นช่องทางที่ช่วยส่งเสริมการเคลื่อนย้ายโบรอนในพืชภายใต้สภาวะการขาดโบรอน โปรตีน NIP5;1 จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน major intrinsic protein (MIPs) หรือ aquaporin วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อจำแนก full-length ของยีน *NIP5;1* ในปาล์มน้ำมันภายใต้สภาวะขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพิษ และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค real-time PCR จากการศึกษาสามารถโคลน full-length ของยีน *NIP5;1* (ให้ชื่อว่า *EgNIP5;1*) จากปาล์มน้ำมันชนิดเทเนอร์่า ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ขนาด 894 คู่เบส และเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนขนาด 297 กรดอะมิโน เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน พบว่า มีค่าความเหมือนกับยีน *NIP5;1* ที่รายงานในพืชชนิดอื่น ได้แก่ *Arabidopsis* ข้าว ส้ม และข้าวโพด และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่า โปรตีน *EgNIP5;1* จัดอยู่ในกลุ่ม NIPs subgroup II สำหรับการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *EgNIP5;1* ด้วยเทคนิค real-time PCR วิเคราะห์จากตัวอย่างรากที่เก็บได้จากต้นปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพิษ ที่ 7 14 28 และ 56 วัน โดยนำมาสกัดอาร์เอ็นเอและสังเคราะห์เป็น cDNA

ทำปฏิกิริยาร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *EgNIP5;1* ในรากถูกชักนำให้มีการแสดงออกสูงขึ้น และเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็น 3 และ 2 เท่าในวันที่ 14 เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 หลังจากได้รับสภาวะขาดโบรอน และโบรอนเป็นพิษตามลำดับ หลังจากนั้นระดับการแสดงออกจะลดลง

คำสำคัญ: Channel mediated boron transport, *NIP5;1*, quantitative real time PCR, boron

บทนำ

โบรอน (boron, B) เป็นธาตุอาหารรองที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช มีบทบาทสำคัญในการเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช โดยทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างโมเลกุลของ rhamnogalacturonan II (RG-II) และเพกติน เพื่อให้เกิดโครงสร้างและการทำงานของผนังเซลล์ที่ปกติ (Kobayashi *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 2004) นอกจากนี้โบรอนยังมีบทบาทต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์พืช (Brown *et al.*, 2002; Goldbach and Wimmer, 2007) และการส่งสัญญาณในระดับเซลล์ผ่านทาง transcription factors (Gonzales-Fontes *et al.*, 2008)

ในปัจจุบันพบว่า การขาดธาตุโบรอนเป็นปัญหาสำคัญที่พบได้บ่อยในการทำการเกษตรทั่วโลก ซึ่งล้วนส่งผลกระทบทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิต มีรายงานทั้งในประเทศบราซิล สหรัฐอเมริกา สเปน จีน และไทย เป็นต้น (Shorrocks, 1997) สาเหตุสำคัญในการขาดธาตุโบรอนในสารละลายดินเนื่องจากโบรอนในสารละลายดินส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ

กรดบอริก (boric acid, H_3BO_3) เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีค่า molecular radius เท่ากับ 2.573 Å โมเลกุลไม่มีประจุ เป็นกรดอ่อนมีค่า pKa เท่ากับ 9.24 (Marschner, 2012) ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ที่ physiological pH ดังนั้นในพื้นที่เพาะปลูกพืชที่มีฝนตกชุกจึงมักพบปัญหาการชะล้างธาตุโบรอนในสารละลายดิน และส่งผลให้เกิดการขาดโบรอนในที่สุด (Reid, 2007; Miwa *et al.*, 2010) เช่นเดียวกับพื้นที่เพาะปลูกทางภาคใต้ของประเทศไทย

ดังนั้นการศึกษาถึงกระบวนการการดูดซึมโบรอนและการเคลื่อนย้ายโบรอนในพืช จึงเป็นสิ่งสำคัญในการจัดการกับปัญหาการขาดโบรอนในพืช ปัจจุบันมีการศึกษาและค้นพบยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการการดูดซึมโบรอนและการเคลื่อนย้ายโบรอนในพืช เช่น *Arabidopsis* boron transporter (*AtBOR1*) ซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความสำคัญในการส่งเสริมกระบวนการเคลื่อนย้ายโบรอนภายในท่อไซเลม (Takano *et al.*, 2002) และ *Arabidopsis* channel for boron transporter (*AtNIP5;1* และ *AtNIP6;1*) ที่มีบทบาททำหน้าที่เป็นช่องทางส่งเสริมการเคลื่อนย้ายโบรอนในรากและใบพืชตามลำดับ (Takano *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2008) จึงเป็นการลบล้างทฤษฎีก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่าโบรอนสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์พืชได้โดยกระบวนการ passive diffusion เพียงรูปแบบเดียว (Dannel *et al.*, 2002)

AtNIP5;1 และ *AtNIP6;1* เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่มของ Major Intrinsic Protein (MIPs) หรือ plant aquaporin (Takano *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2008) MIPs เป็นโปรตีนที่มีบทบาทเป็นช่องทางสำหรับเคลื่อนย้ายสารกลุ่ม water-selective หรือ relative non-selective สำหรับน้ำ สารโมเลกุลขนาดเล็กที่ไม่มีประจุ (uncharged) เช่น ยูเรีย กลิเซอรอล และ แอมโมเนีย (Tyerman *et al.*, 2002) MIPs สามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ the tonoplast intrinsic protein (TIPs), the plasma membrane

intrinsic protein (PIPs), the small uncharged intrinsic protein (SIPs) และ NOD26-like intrinsic protein (NIPs) โดยที่ NIPs เป็นโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน nodulin 26 (NOD-26) ที่พบในถั่วเหลือง (Ishikawa *et al.*, 2005)

โปรตีน *AtNIP5;1* มีบทบาทเป็นช่องทางส่งเสริมการเคลื่อนย้ายโบรอนในรากในสภาวะขาดธาตุโบรอน ใน *Arabidopsis* พบว่ายีน *AtNIP5;1* มีการแสดงออกอย่างมากในบริเวณ root elongation zone ของรากภายใต้สภาวะการขาดธาตุโบรอน เพื่อให้การดูดซึมโบรอนดีขึ้นในระยะสั้น ๆ (Kato *et al.*, 2009) มีการแสดงออกในบริเวณ membrane domain ของเซลล์ lateral root cap และเซลล์ epidermis ในราก และถูกควบคุมกระบวนการย่อยสลายของโปรตีนนี้ด้วยส่วน 5'-untranslated region (5'-UTR) เมื่อพืชมีสภาวะโบรอนในระดับสูงเพียงพอ ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญของพืชในการตอบสนองต่อระดับของโบรอนในเซลล์ (Tanaka *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบยีน *NIP5;1* ในพืชชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ส้ม (citrus) (An *et al.*, 2012) เป็นต้น การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนก full-length ของยีน *NIP5;1* ในปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่าภายใต้สภาวะขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพิษ และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค real-time PCR การศึกษาถึงกระบวนการดูดซึมและเคลื่อนย้ายโบรอนในปาล์มน้ำมันมีความสำคัญต่อการพัฒนาระบบการจัดการการเพาะปลูกปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อคัดเลือกพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะทนทานต่อการขาดโบรอนได้ในอนาคต

อุปกรณ์ และวิธีการ

พืชทดลอง

ปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่าสาย

พันธุ์เตา อายุ 6 เดือน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต คณะทรัพยากรธรรมชาติและสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในกระถางที่มี vermiculite จำนวน 12 ต้น ในสภาพโรงเรือน ให้สารละลาย complete nutrient solution (CNS) (Pinho *et al.*, 2010) ที่มีธาตุอาหารครบถ้วนเป็นเวลา 1 เดือน เปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก 3 วัน เพื่อปรับสภาพต้นกล้า จากนั้นแบ่งต้นกล้าปาล์มน้ำมันออกเป็น 4 ต้นต่อการทดลอง ให้ได้รับโบรอนที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ดังนี้ ได้รับสภาวะขาดโบรอน ได้รับสภาวะโบรอนเพียงพอ และได้รับสภาวะโบรอนเป็นพิษ โดยให้สารละลาย CNS ที่มีโบรอน 0 1.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เก็บตัวอย่างใบอ่อนและปลายรากที่ 0 7 14 28 และ 56 วันหลังการทดลอง

การสกัดอาร์เอ็นเอและสังเคราะห์ first-strand cDNA

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบอ่อนและรากตามวิธีการของ Laksana and Chanprame (2015) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer 8000 (Eppendorf) ที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 nm และ 1.2% agarose gel electrophoresis จากนั้นกำจัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase I (Promega, USA) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และนำมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ด้วยไพรเมอร์ oligo dT (20-mer) ร่วมกับ RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoScientific, USA)

การโคลนยีน *NIP5;1* จากปาล์มน้ำมัน

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ full-length ของยีน *NIP5;1* ในปาล์มน้ำมัน โดยเลือกใช้ยีน putative African oil palm *NIP5;1* ที่มีรายงานบนโครโมโซม 4 และ 11 (Gene ID: 105043497 และ 105054067 ตามลำดับ) ในฐานข้อมูล GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov) เป็นต้นแบบ (Table 1)

สังเคราะห์ full-length ของยีน *NIP5;1* โดยใช้ first-strand cDNA ของปาล์มน้ำมันเป็นต้นแบบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ร่วมกับเอนไซม์ Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA) และไพรเมอร์ที่แสดงใน Table 1 ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra T1 Thermal Cycler, Germany) 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 1.0% agarose gel electrophoresis แล้วจึงสกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก agarose gel โดยใช้ PCR cleanup and gel extraction kit (Nucleospin® Extract II, Mecherey-Nagel) จากนั้นโคลนเข้าสู่ pGEM-T easy® vector (Promega, USA) และถ่ายเข้าสู่คอมพลีเทนต์เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH5 α โดยเทคนิค heat shock เพื่อเพิ่มปริมาณ และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท 1st base laboratory ประเทศมาเลเซีย

Table 1 Primers for full-length amplification of *NIP5;1* gene

Primers	Sequence
FullEg <i>NIP5;1</i> F	5'-ATGCCGGAGACGGAGACCG-3'
FullEg <i>NIP5;1</i> R	5'-CTAGCGGCGGAAGCTTCGG-3'

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และ bioinformatics

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full-length ของยีน *NIP5;1* ที่ได้จากปาล์มน้ำมัน เปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม MEGA6 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Protein 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 *NIP5;1* ในปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค real-time PCR

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสำหรับยีน *NIP5;1* และ *Actin* ในปาล์มน้ำมันด้วยโปรแกรม primer3 (<http://simgene.com/Primer3>) (Table 2) โดยให้สาย

ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 156 และ 150 คู่เบสตามลำดับ ศึกษาาระดับการแสดงออกของยีน *NIP5;1* ในใบและรากปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพิษเป็นเวลา 0 7 14 28 และ 56 วัน ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้ยีน *Actin* เป็น internal control (reference gene) โดยใช้ cDNA ปริมาณ 300 นาโนกรัม เป็นต้นแบบ ร่วมกับ SensiFast SYBR No-Rox kit (BioLines, USA) และไพรเมอร์ที่แสดงใน Table 2 ทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Mastercycler[®] ep realplex4 (Eppendorf, USA) กำหนดปฏิกิริยาดังนั้น 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

Table 2 Primers for amplification of partial *EgNIP5;1* and *Actin* used for real time PCR

Remark	Primers	Sequences
Amplified partial <i>EgNIP5;1</i> for real time PCR	RT <i>NIP5;1</i> F	5' -CATACATAGCTGCCCAAGTC-3'
	RT <i>NIP5;1</i> R	5' -CGAACAAGAGATTGAAGGTG-3'
Amplified partial <i>Actin</i> for real time PCR	RT <i>Actin</i> F	5' -AGGGAACATGGTTGATCCTC-3'
	RT <i>Actin</i> R	5' -TTGGTGCAGAGAGATTACAGG-3'

ผลการทดลอง

การโคลนยีน *NIP5;1* จากปาล์มน้ำมัน วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และ bioinformatics

การโคลนยีนด้วยเทคนิคทางอณูวิทยาและใช้

ไพรเมอร์จำเพาะ สามารถโคลน full-length ของยีน *NIP5;1* จากตัวอย่างใบและรากปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่า และให้ชื่อว่า *EgNIP5;1* เมื่อวิเคราะห์ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความยาวเท่ากับ 894 คู่เบส (Figure 1) โดยมีปลาย 5' และ 3' เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

start และ stop codon ตามลำดับ เมื่อเปลี่ยนลำดับ นิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า ได้สาย โพลีเปปไทด์ขนาด 297 กรดอะมิโน (Figure 2) เมื่อนำ ลำดับกรดอะมิโนมาหาค่าความเหมือนด้วยโปรแกรม Protein BLAST บนฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีค่าความ เหมือนกับยีน *NIP5;1* ที่รายงานในพืชชนิดอื่น ได้แก่ อินทผลัม (XP008803617.1) กล้วย (XP192776.1) สับปะรด (XP012086588.1) ส้ม (AT1137617.1) และ *Arabidopsis* (NP192776.1) เท่ากับ 95%, 86%, 82%, 79% และ 79% ตามลำดับ

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนมาวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม TMpred เพื่อวิเคราะห์ส่วนของ membrane spanning region พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน *EgNIP5;1* มีส่วนประกอบของ transmembrane

domain จำนวน 6 domain โดยเชื่อมต่อกันด้วย loop A-E และมี NPAs (Asn-Pro-Ala) boxes จำนวน 2 box (Figure 3) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่สามารถพบได้ ในโปรตีนชนิด aquaporin หรือ MIPs เท่านั้น

การวิเคราะห์ multiple sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนของยีน *EgNIP5;1* ด้วย โปรแกรม ClustalW2 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสพันธุกรรมจากยีน *EgNIP5;1* ในปาล์มน้ำมัน มีความ เหมือนกับยีน *NIP5;1* ที่รายงานในพืชชนิดอื่น ได้แก่ *Arabidopsis* (Q9SV84) ส้ม (AFN37617.1) ข้าว (Q01WF3) และข้าวโพด (Q9ATN1) และประกอบด้วย NPAs และ A, I, G, R residues สำหรับ ar/R (aromatic/ arginine) selectivity filter เช่นเดียวกับที่พบในยีน *NIP5;1* ของ *Arabidopsis* (*AtNIP5;1*) (Figure 4)

```
ATGCCGGAGACGGAGACCGGAACGCCAACGTGTCGGCTCCGCCACGCCCGGCACGCCGGGTGCGCCAC
TCTTCTCGTCAGTCCGAGTCGACTCGCTGTCTACGATAGGAACTCGATGCCGCGGTGCGGCAAGTGCTT
GCCGGTGGACTCCTGGGCCTCCCTGGCAGTGCTTCACCGAGTTGCCGAAGCCCAACGTGTCCCTCGCC
CGCAAGCTTGGAGCAGAGTTCGTGGGCACCTTCATTCTGATATTTGGTGCCACCGCAGGCCCCATCGTGA
ACCAAAAGTACAACGGAGCCGAGACTCTCATCGGCAATGCTGCGTGCGCCGGGCTTGCGGTCATGGTGGT
CATCCTCTCCACCGCCACATCTCCGGTGCCACCTCAACCCCTCCCTCACCATCGCCTTCCGATGCCTC
CGCCACTTCCCTGGGTCCAAGTCCCGCATACATAGCTGCCCAAGTCTCAGCATCCATCTGTGCTTCCT
TCGCACTCAAGGGCATCTTCCATCCTTTCCTCTCCGGCGGCGTCACGGTCCCTTCGGTCACCACCGCCCA
GGCGTTCTTCTCGAGTTTTTCATCACCTTCAATCTCTTGTTCGTGCTCACTGCCGTGCTACAGATACT
CGAGCCGTAGGAGAACTGGCCGGAATAGCAGTTGGCGCTACGGTTATGCTTAATATCCTCGTCGCTGGGC
CATCGAGCGGTGGATCGATGAACCCGGTGAGGACGCTGGGCCCGGCGGTGGCCGCCGGGAACTACAAGCA
GGTGTGGATATATCTGGTGGCGCCACTGCAGGGCCATCGCTGGAGCTGCCACCTACACCTTGTGAAG
CTGACAGACGAAAACGGGGTGACACCACGCTCGGCCCGAAGCTTCCGCCGCTAG
```

Figure 1 The full-length of *EgNIP5;1* of tenera oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

```
MPETETGTPNVSAPPTPGTAPLFFSSVRVDSLSDRNSMPCRGKCLPVDSWASPGTCFT
ELPKPNVSLARKLGAEFVGTFFILIFGATAGPIVNQKYNGAETLIGNAACAGLAVMVIILS
TGHISGAHLNPSLTIAFACLRHFPWVQVPAYIAAQVSASICASFALKGIFHPFLSGGVTV
PSVTTAQAFFLEFFITFNLLFVVTAVATDTRAVGELAGIAGVATVMLNILVAGPSSGSM
NPVRTLGPAVAAGNYKQVWIYLVAPTAGAIAGAATYTLVKLTDENGVTPRSARSRFR
```

Figure 2 The deduced amino acid sequence of *EgNIP5;1* of tenera oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

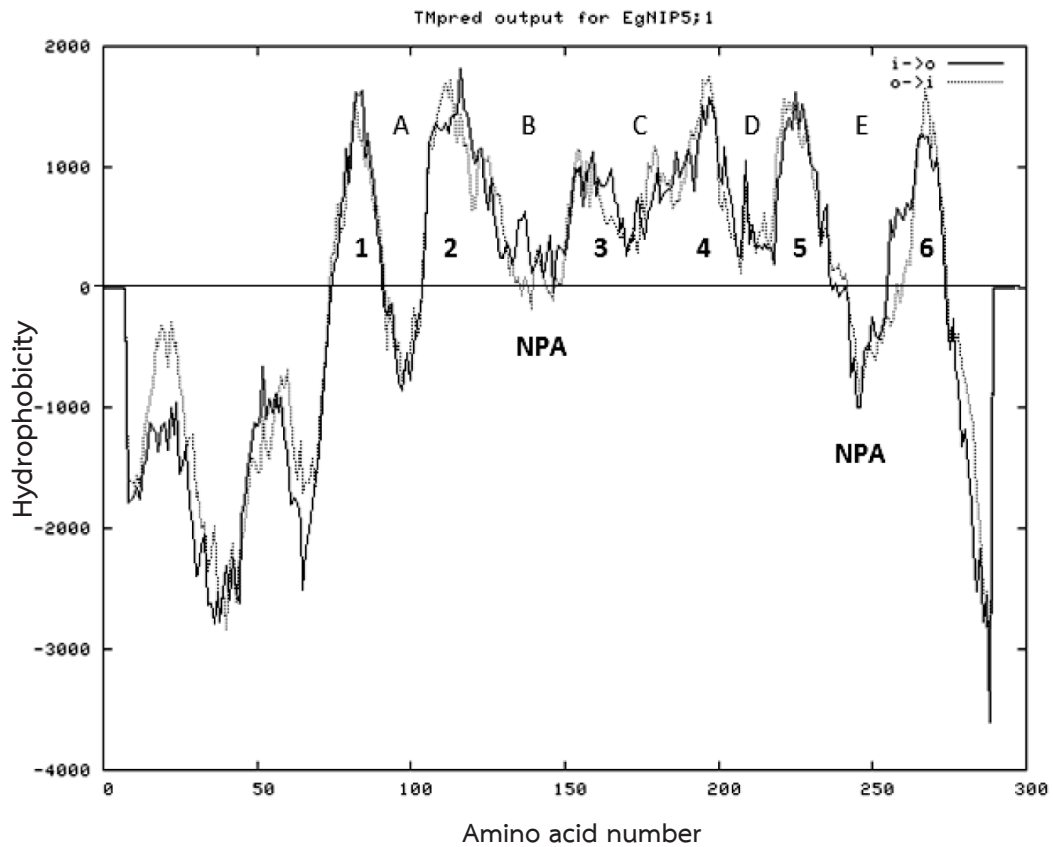


Figure 3 The hydrophobicity plot of *EgNIP5;1* amino acid sequence of tenera oil palm (*Elaeisguineensis* Jacq.) analyzed by TMpred program. The x-axis represents the amino acid 1–297 residues. The areas above the x-axis indicate the hydrophobic amino acid residues. The protein composes of 6 hydrophobic domains and 2 NPAs (Asn–Pro–Ala) boxes

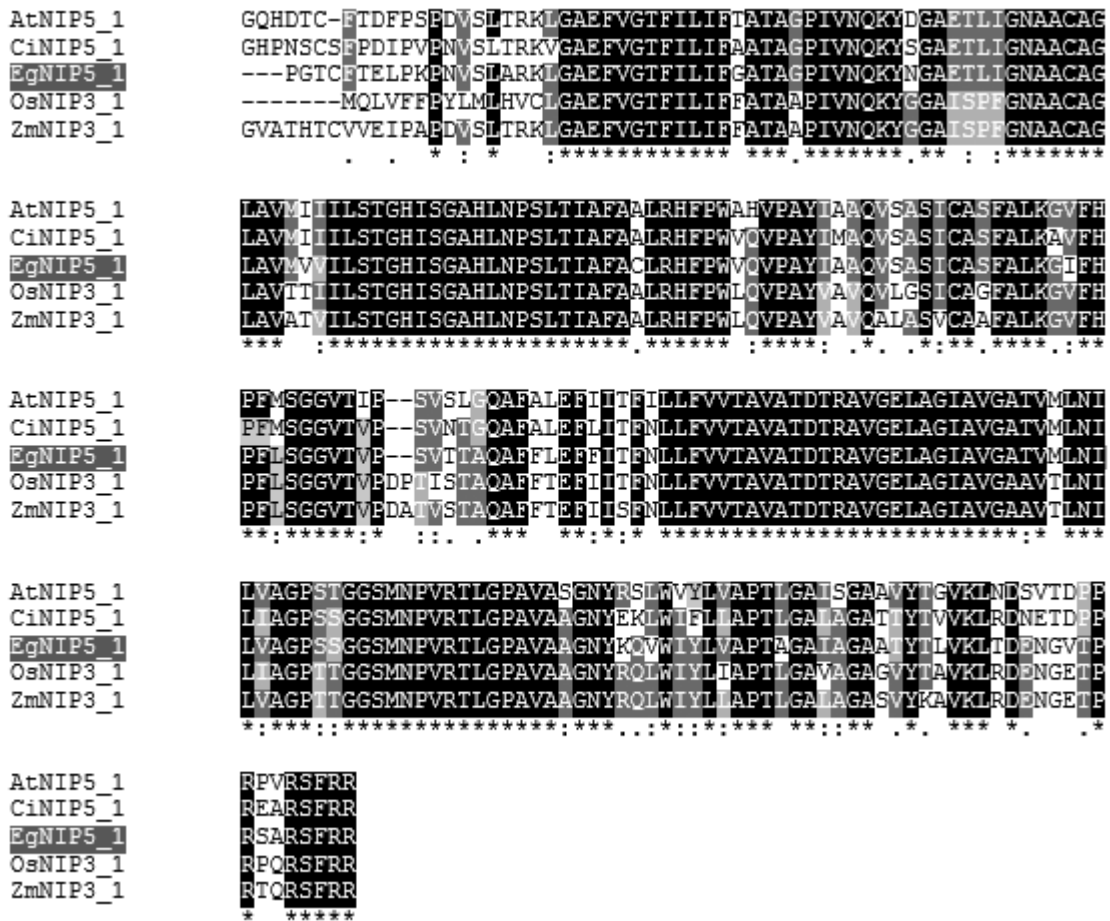


Figure 4 Multiple amino acid sequence alignment analysis of *EgNIP5;1* protein using ClustalW2 compared with NIPs proteins reported in certain plant species such as *Arabidopsis* (Q9SV84), citrus (AFN37617.1), rice (Q01WF3) and corn (Q9ATN1) using ClustalW2 program. NPAs indicate the Asn-Pro-Ala boxes

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *EgNIP5;1* ในกลุ่ม NIPs subgroup II ซึ่งประกอบไปด้วย มาวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับ *AtNIP5;1* (Q9SV84) *OsNIP3;1* (Q01WF3) ยีน NIPs ที่รายงานในพืชชนิดต่าง ๆ จากนั้นสร้าง *ZmNIP3;1* (Q9ATN1) และ *CiNIP5;1* (AFN37617.1) phylogenetic tree พบว่า โปรตีน *EgNIP5;1* จัดอยู่ (Figure 5)

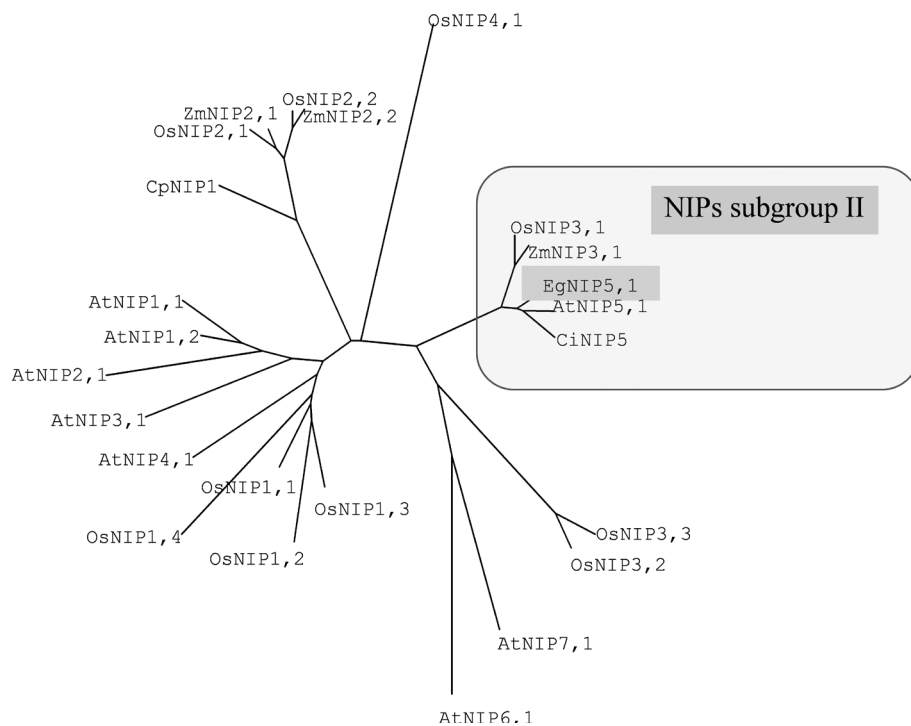


Figure 5 Phylogenetic tree among different species that was constructed based on deduced amino acid sequences by neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replication using MEGA6 program

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *EgNIP5;1* ในปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค real-time PCR

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *EgNIP5;1* โดยเทคนิค real-time PCR ในใบและรากของปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะการขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพิษ พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *EgNIP5;1* ในรากมีค่าสูงกว่าที่ใบ โดยในรากมีการแสดงออกของยีนสูงสุดที่ 14 วัน หลังได้รับสภาวะขาดโบรอน มีค่าเท่ากับ 3.61 คิดเป็น 16 เท่าของค่าการแสดงออกของยีนในใบที่มีค่าเท่ากับ 0.213 (Figure 6B)

เมื่อพิจารณารูปแบบการแสดงออกของยีน *EgNIP5;1* ในรากปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดโบรอนเปรียบเทียบกับรากที่ได้รับโบรอนเพียงพอ

และโบรอนเป็นพิษ พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *EgNIP5;1* ในรากที่ขาดโบรอนมีค่าการแสดงออกของยีนสูงสุด โดยมีการแสดงออกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 จนสูงสุดที่วันที่ 14 หลังได้รับสภาวะขาดโบรอน มีค่าเท่ากับ 3.61 และคิดเป็น 1.88 และ 1.71 เท่าของรากที่ได้รับโบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพิษตามลำดับ (Figure 6A)

และเมื่อพิจารณารูปแบบการแสดงออกของยีน *EgNIP5;1* ในรากปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะโบรอนเป็นพิษ พบว่า รูปแบบการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีค่าสูงสุดในวันที่ 7 หลังได้รับสภาวะโบรอนเป็นพิษ มีค่าเท่ากับ 1.91 จากนั้นมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 56 หลังได้รับสภาวะโบรอนเป็นพิษ (Figure 6A)

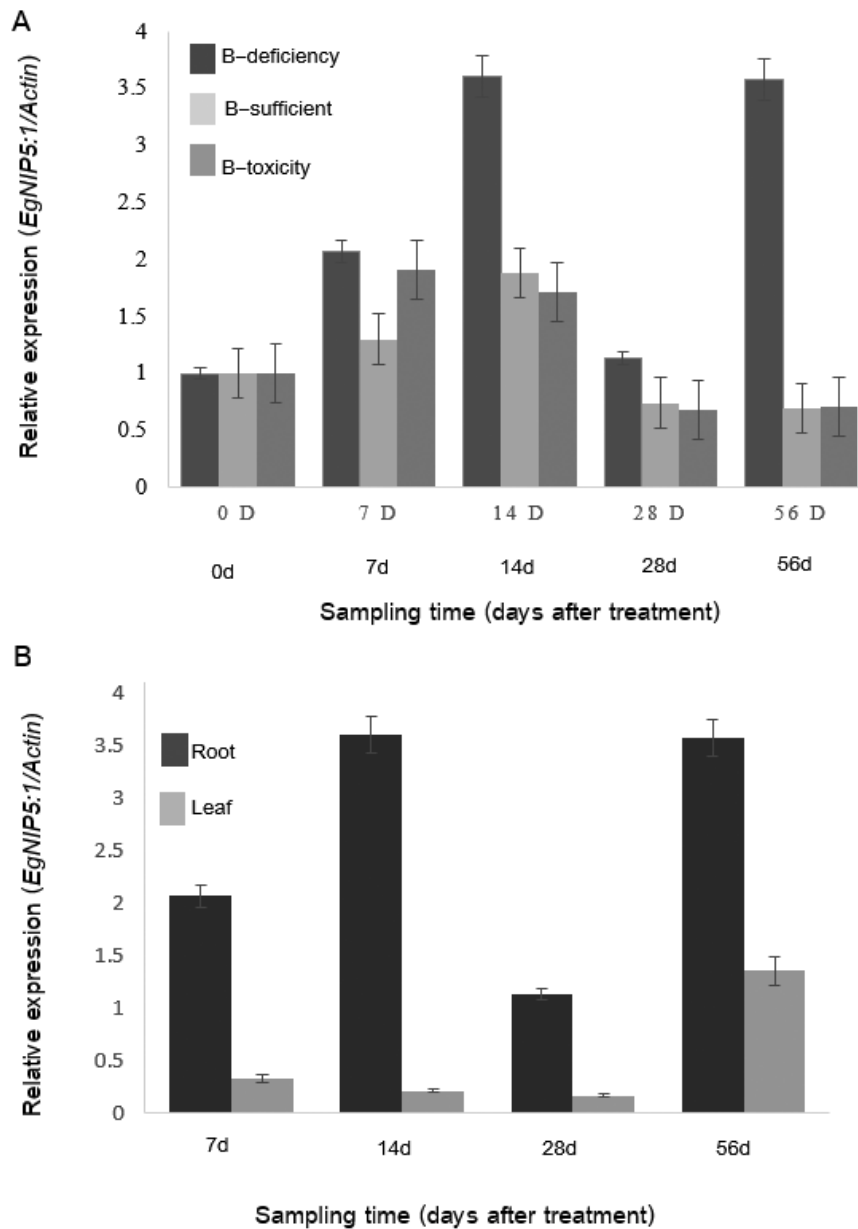


Figure 6 Relative expression of *EgNIP5;1* gene of tenera oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) by real-time PCR (A) relative expression of *EgNIP5;1* in root receiving boron deficiency, sufficiency, and toxicity for 0, 7, 14, 28 and 56 days (B) The comparison of relative expression of *EgNIP5;1* in root with leaves of oil palm subjected to boron deficiency for 7, 14, 28 and 56 days

วิจารณ์

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันแล้วว่า กระบวนการการเคลื่อนย้ายโบรอนในพืชสามารถแบ่งออกได้เป็น 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*) จากการศึกษาที่ผ่านมาเปิดเผยให้เห็นถึงกระบวนการการเคลื่อนย้ายโบรอนในพืชที่ใช้พลังงานเพื่อช่วยในการเคลื่อนย้าย โดยมีโปรตีนในกลุ่ม transporter เป็นปัจจัยสำคัญ (Miwa *et al.*, 2010) ตัวอย่างเช่น ยีน *NIP5;1* และ *BOR1* ที่จำแนกได้จาก *Arabidopsis thaliana* ซึ่งเป็นยีนที่ให้โปรตีนที่มีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพของการเคลื่อนย้ายโบรอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช (Takano *et al.*, 2002, 2006) โดยพบว่ายีน *AtBOR1* มีการแสดงออกทั้งในส่วนยอดและราก มีบทบาทในการเพิ่มประสิทธิภาพในการเคลื่อนย้ายโบรอนในส่วนของ xylem เรียกว่า xylem loading ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญที่เพิ่มการสะสมโบรอนในส่วนยอดของพืชในสถานะที่มีโบรอนจำกัด (Takano and Fujiwara, 2008) สำหรับ *AtNIP5;1* เป็นโปรตีนที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ มีการแสดงออกในส่วนรากมากกว่าส่วนยอด มีผลในการควบคุมกระบวนการดูดซึมโบรอนจากผิวยางโดยมีบทบาทเป็น channel (Takano and Fujiwara, 2008) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งความสนใจไปยังยีน *NIP5;1* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายโบรอนเข้าสู่ไซเลมเมื่อพืชขาดโบรอน

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถจำแนกยีน *NIP5;1* (*EgNIP5;1*) จากปาล์มน้ำมันชนิดเทอเนร่าภายใต้สภาวะขาดโบรอน โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 894 คู่เบส และแปลรหัสพันธุกรรมเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 297 กรดอะมิโน ยีนในกลุ่ม *NIPs* (nodulin-26-like intrinsic protein) เป็นกลุ่มที่มีความเหมือนกับยีนในกลุ่ม major intrinsic protein ที่มีความจำเพาะในพืช โดยที่ยีนในกลุ่ม *NIPs*

มีลักษณะเฉพาะคือประกอบด้วยกรดอะมิโน ar/R (aromatic/arginine) และ NPA (asparagine-proline-alanine) ในลำดับกรดอะมิโนเพื่อสร้างโครงสร้างที่เป็นตัวกรองในส่วนกลางของ channel ในรูปแบบของ α -helical fold (Wallace *et al.*, 2006) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *EgNIP5;1* มาพิจารณาเปรียบเทียบกับยีน *NIP5;1* ที่รายงานใน *Arabidopsis* ข้าว ส้ม และข้าวโพด พบว่ามีส่วน ar/R และ NPA ที่เหมือนกันในพืชทั้ง 5 ชนิด

นอกจากนี้ยีนในกลุ่ม *NIPs* ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยคือ I, II, III โดยแบ่งตามตำแหน่ง ar/R (Wallace and Roberts, 2004) การศึกษาบทบาทของยีนในกลุ่ม *NIPs* พบว่า *NIPs* I มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายโมเลกุลของสารที่ไม่มีประจุตั้งแต่โมเลกุลของน้ำ แอมโมเนีย ไปจนถึงกลีเซอรอล ในขณะที่ *NIPs* II มีบทบาทในการเคลื่อนย้ายสารโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่า *NIPs* I เช่น ยูเรีย และ ฟอรัมาไมด์ (Wallace and Robert, 2005) และ กรดบอริก (Takano *et al.*, 2006) จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสร้างเป็น phylogenetic tree โดยเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง *EgNIP5;1* และยีน *NIPs* ที่รายงานในพืชชนิดอื่น แสดงให้เห็นว่า *EgNIP5;1* จัดอยู่ในกลุ่มของ *NIP* II ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *AtNIP5;1* และ *CiNIP5* (Figure 5) ที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายกรดบอริกในสถานะที่พืชขาดโบรอน ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า *EgNIP5;1* อาจมีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายโบรอนหรือกรดบอริกในต้นปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดโบรอนเป็นเหมือน boric acid channel

และจากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *EgNIP5;1* ในปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะโบรอนในระดับต่าง ๆ ทั้งในตัวอย่างใบอ่อนและราก พบว่าให้ผล การแสดงออกสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *NIP5;1* ที่รายงานทั้งใน *Arabidopsis* (Takano *et al.*, 2006) และ ส้ม (An *et al.*, 2012) โดยการแสดงออกของยีนดังกล่าวในส่วนรากของพืชสูงกว่าในใบหรือยอด

ภายใต้สภาวะขาดโบรอน และมีการแสดงออกในสัดส่วนที่ต่ำกว่าภายใต้สภาวะโบรอนเป็นพิษ จึงอาจสรุปได้ว่า ยีน *EgNIP5;1* ในปาล์มน้ำมันมีบทบาทเช่นเดียวกับยีน *AtNIP5;1* และ *CiNIP5;1* ที่พบใน *Arabidopsis* และส้ม

ส้ม แสดงให้เห็นว่า *EgNIP5;1* มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อโบรอนทั้งในสภาวะที่ขาดและเป็นพิษ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถระบุชนิดหรือประเภทของยีนนี้ที่แน่นอนในที่สุด

สรุป

จากการศึกษาเพื่อจำแนกยีน *NIP5;1* ในปาล์ม น้ำมันชนิดเทอเนร่าที่ได้รับโบรอนในระดับต่างๆ พบว่าสามารถใช้เทคนิคการโคลนยีนเพื่อจำแนกยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 894 คู่เบส และแปลงเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 297 กรดอะมิโน โดยให้ชื่อว่า *EgNIP5;1* และเมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางด้าน bioinformatics ร่วมกับการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนในปาล์มน้ำมันที่ได้รับสภาวะขาดโบรอน โบรอนเพียงพอ และโบรอนเป็นพิษ เปรียบเทียบกับยีน *NIP5;1* ที่รายงานใน *Arabidopsis* และ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- An, J., Y. Liu, C. Yang, G. Zhou, Q. Wei and S. Peng. 2012. Isolation and expression analysis of *CiNIP5*, a citrus boron transport gene involved in tolerance to boron deficiency. *Sci. Hort.* 142: 149–154.
- Brown, P.H., N. Bellaloui, M.A. Wimmer, E.S. Bassil, J. Ruiz, H. Hu, H. Pfeffer, F. Dannel and V. Romheld. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biol.* 4: 205–223.
- Dannel, F., H. Pfeffer and H. Romheld. 2002. Update on boron in higher plants: uptake, primary translocation and compartmentation. *Plant Biol.* 4: 193–204.
- Goldbach, H.E. and M. Wimmer. 2007. Boron in plants and animals: Is there a role beyond cell-wall structure. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170: 39–48.
- Gonzalez-Fontes, A., A. Rexach, J. Navarro-Gochicoa, M.T. Herrera-Rodríguez, M.B. Beato, V.M. Maldonado and J.J. Camacho-Cristobal. 2008. Is boron involved solely in structural roles in vascular plants. *Plant Signal. Behav.* 3: 24–26.
- Ishikawa, F., S. Suga, T. Uemura, M.H. Sato and M. Maeshima. 2005. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 579: 5814–5820.

- Kato, Y., K. Miwa, J. Takano, M. Wada and T. Fujiwara. 2009. Highly boron deficiency-tolerant plants generated by enhanced expression of *NIP5;1*, a boric acid channel. *Plant Cell Physiol.* 50(1): 58–65.
- Kobayashi, M., T. Matoh and J. Azuma. 1996. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.* 110: 1017–1020.
- 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.). *J. ISSAAS.* 21(1): 96–106.
- Marschner, P. 2012. Mineral Nutrition of Higher Plant. Third edition. Elsevier Ltd., USA.
- 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. *MIPs and Their Role in the Exchange of Metalloids*. Springer, USA.
- O'Neill, M.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.
- Reid, R. 2007. Physiology and metabolism of boron in plants. pp 83–90. In X.U. Fangsen, 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*.
- Shorrocks, V.M. 1997. The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant Soil* 193: 121–148.
- 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.
- Takano, J. and T. Fujiwara. 2008. Physiological role and transport mechanism of boron: Perspectives from plants. *Plfugers Arch.* 456: 671–677.
- 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.
- Tyerman, S.D., C.M. Niemietz and H. Bramley. 2002. Plant aquaporin: multifunctional water and solute channels with expanding role. *Plant Cell Environ.* 25: 173–194.

- 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. *Biochim. Biophys. Acta.* 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. *Biochem.* 44: 16826–16834.