

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน cellulose synthase และยีน phenylalanine ammonia-lyase ในหญ้าเนเปียร์ลูกผสม (*Pennisetum hybrid*)

Expression analysis of cellulose synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in Napier grass hybrids (*Pennisetum hybrid*)

กัญญ์ญ์ เลิศกุลโชติภักดิ์, สกาแลท ชนิกา เดสโครซ์, ศรีณยพร มากทรัพย์*

Kanyanat Loedkunchotipat, Scarlett Shanika Desclaux, Sarunyaporn Maksup*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

Department of Biology, Silpakorn University, Nakornpathom 73000, Thailand

*Corresponding author: MAKSUP_S@su.ac.th; srypms@yahoo.com

บทคัดย่อ

ไบโอเอทานอล (bioethanol) เป็นหนึ่งในพลังงานทางเลือกที่มีความสำคัญอย่างมากในปัจจุบัน แต่พืชวัตถุดิบในการผลิตส่วนใหญ่ยังคงเป็นพืชอาหาร เช่น อ้อย ข้าวโพด และมันสำปะหลัง ทำให้พืชอาหารอาจขาดแคลนและมีราคาสูงได้ ดังนั้นหญ้าเนเปียร์ซึ่งไม่ใช่พืชอาหาร มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลสสูง และมีปริมาณลิกนินซึ่งเป็นผลเสียต่อกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลต่ำ จึงเป็นพืชที่มีศักยภาพอย่างมากในการพัฒนาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอล การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสและลิกนิน ได้แก่ ยีน Cellulose synthase (*CesA5* และ *CesA7*) และยีน Phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) ในหญ้าเนเปียร์ลูกผสม (*Pennisetum hybrid*) จำนวน 19 สายพันธุ์ เพื่อเป็นแนวทางคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเอทานอล จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ เนเปียร์ยักษ์ลำปาง (NL), เนเปียร์ไต้หวัน A25 (NT), บานา (BN), เนเปียร์ปากช่อง 1 LP (NLP), อาลาฟัล (AF), เนเปียร์ยักษ์ (NY), เนเปียร์เพชรบูรณ์ (NP) และ เนเปียร์จักรพรรดิสุราษฎร์ (NS) มีระดับการแสดงออกของยีน *CesA7* และค่าสัดส่วนการแสดงออกของยีน *CesAs/PAL* สูง และมีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสูง 64–74% ซึ่งเห็นว่าหญ้าเนเปียร์กลุ่มนี้มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลที่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมและพัฒนาต่อยอดต่อไป

ABSTRACT

Bioethanol has become one of the most important alternative energy sources. However, the main shortcoming has been that most plant materials being used for bioethanol production are food crops such as sugarcane, corn and cassava. Using these crops might raise the production cost of bioethanol and also create the problem of food scarcity. Napier grass (*Pennisetum purpureum*) is a non-food crop that has high potential to be used as plant material for bioethanol production due to presence of high cellulose content, and low level of lignin which limits bioethanol production efficiency. This research aims to study the expression of genes involve in cellulose and lignin biosynthesis, including cellulose synthase (*CesA5* and *CesA7*) and phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*), in 19 Napier grass hybrids. The results showed that Napier Yak Lampang (NL), Napier Taiwan A25 (NT), Bana (BN), Napier Pakchong1 LP (NLP), Alafal (AF), Napier Yak (NY), Napier Phetchaboon (NP) and Napier Jak-Ka-Pat-Surat (NS) had high expression level of *CesA7* and *CesA7/PAL* ratio and also contained high amount of cellulose and hemicellulose (64–74%). These Napier grass hybrids were then selected for further physiological investigations to evaluate their potentials as plant materials for bioethanol production.

คำสำคัญ: ไบโอเอทานอล; หญ้าเนเปียร์; เซลลูโลส; ลิกนิน

Keywords: bioethanol; cellulose; lignin; Napier grass

บทนำ

ไบโอเอทานอล (bioethanol) เป็นหนึ่งในพลังงานทางเลือกที่ยั่งยืนและมีความเหมาะสมสำหรับนำมาทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม (fossil fuel) ซึ่งกำลังจะหมดไปในอนาคตอันใกล้นี้ อย่างไรก็ตามน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเอทานอลส่วนใหญ่ได้มาจากพืชผลทางการเกษตรซึ่งมักเป็นพืชอาหาร เช่น อ้อย ข้าวโพด ปาล์ม และมันสำปะหลัง เมื่อมูลค่าของพืชอาหารเหล่านี้สูงขึ้น อาจทำให้ราคาวัตถุดิบต้นทุนในการผลิตไบโอเอทานอลสูงตามไปด้วย ดังนั้นการใช้วัตถุดิบซึ่งไม่เป็นพืชอาหารของมนุษย์จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการลดผลกระทบดังกล่าว จากรายงานการวิจัยพบว่าพืชที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเอทานอล ควรเป็นพืชซึ่งผนังเซลล์มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) สูง เช่น หญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) และ Kans grass (*Saccharum spontaneum*) (Keshwani and Cheng, 2009; Kataria and Ghosh, 2011) แต่ไม่ควรมีสารลิกนินเป็นองค์ประกอบสูง เนื่องจากลิกนินจะขัดขวางการเข้าถึงของเอนไซม์ต่าง ๆ ในการย่อยเซลลูโลส ทำให้ต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายสูงในการกำจัดเอาลิกนินออกไป (Kumar *et al.*, 2008) ปัจจุบันนอกจากหญ้า Switchgrass ซึ่งนิยมปลูกเป็นพืชพลังงานแล้ว ยังพบว่าหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) กำลังได้รับการพัฒนาเป็นพืชพลังงานใหม่ เนื่องจากหญ้าเนเปียร์เป็นพืชโตเร็ว ให้ผลผลิตสูง ต้นทุนการผลิตต่ำ สามารถเป็นได้ทั้งพืชอาหารสัตว์ และมีองค์ประกอบเป็นสารลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) สูง เหมาะต่อการผลิตไบโอเอทานอล (Yasuda *et al.*, 2013; Yasuda *et al.*, 2014) ในประเทศไทยพบหญ้าเนเปียร์หลากหลายสายพันธุ์ ทั้งยังมีการนำเข้าต้นพันธุ์จากต่างประเทศ และการผสมพันธุ์ลูกผสมขึ้นมาใหม่จำนวนมาก โดยหญ้าเนเปียร์แต่ละชนิดอาจมีปริมาณเซลลูโลสและลิกนินแตกต่างกัน จึงมีความเหมาะสมต่อการใช้เป็นพืชพลังงานแตกต่างกัน และเนื่องจากมีรายงานวิจัยพบว่าระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์หลักในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสและ

ลิกนิน ได้แก่ Cellulose synthase gene (*CesAs*) และ Phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL*) มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณสารเซลลูโลสและลิกนินที่พืชสร้างขึ้นเมื่อมีการยับยั้งหรือทำให้ระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลสและลิกนินลดลง จะทำให้ปริมาณ mRNA ของยีนดังกล่าวลดลง และส่งผลให้มีการสร้างเซลลูโลสและลิกนินลดลง (Sewalt *et al.*, 1997; Burton *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2007; Fornalé *et al.*, 2012) นอกจากนี้มีรายงานว่ายีน *CesA5* และยีน *CesA7* มีระดับการแสดงออกสูงที่สุดในส่วนของใบ และลำต้นของหญ้า Switchgrass ตามลำดับ (Gimeno *et al.*, 2014) ซึ่งส่วนดังกล่าวเป็นส่วนที่ใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *CesA5*, *CesA7* และ *PAL* เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดเลือกพันธุ์หญ้าเนเปียร์ที่มีแนวโน้มในการสะสมเซลลูโลสสูงแต่มีปริมาณลิกนินต่ำ เพื่อนำพันธุ์ดังกล่าวไปศึกษาเพิ่มเติมและพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การปลูก และการเก็บตัวอย่างหญ้าเนเปียร์

ทำการปักชำหญ้าเนเปียร์ลูกผสม 19 สายพันธุ์ ได้แก่ อาลาฟัล (Alafal, AF) บานา (Bana, BN) เนเปียร์ยักษ์ลำปาง (Napier Yak Lampang, NL) เนเปียร์ปากช่อง 1 นครราชสีมา (Napier Pakchong1 Nakhonratchasima, NK) เนเปียร์เพชรบูรณ์ (Napier Phetchaboon, NP) เนเปียร์สีม่วง (Napier Muang, NV) เนเปียร์จักรพรรดิสุราษฎร์ (Napier Jak-Ka-Pat-Surat, NS) เนเปียร์ไต้หวัน A25 (Napier Taiwan A25, NT) เนเปียร์ปากช่อง 1 LP (Napier Pakchong1 LP, NLP) เนเปียร์ยักษ์ (Napier Yak, NY) เนเปียร์ธรรมดา (Common Napier, N) เนเปียร์สุราษฎร์ 1 (Napier Surat1, SU) เนเปียร์ราชบุรี (Napier Ratchaburi, NJ) เนเปียร์ปากช่อง 1 สระแก้ว (Napier Pakchong1 Sakaeo, PS) เนเปียร์คิงกลาส (Kinggrass, KI) เนเปียร์แคระสระแก้ว (Dwarf Napier Sakaeo, ND) เนเปียร์มาจิโร (Napier Ma-Ji-Ro, MJ) เนเปียร์ม่วงเหล็ก (Napier Muaklek, NM) และเนเปียร์ยักษ์สุราษฎร์ธานี (Napier Yak Suratthani, YSU) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจากสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ สายพันธุ์ละ 3 กระถาง กระถางละ 1 ต้น

ปลูกในเรือนกระจกที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 29.88 ± 4.4 °C ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 68.75 ± 6.70 % และปริมาณแสงเฉลี่ย 15.07 ± 4.67 klx รดน้ำทุกวันเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปและกายวิภาคของใบหญ้าเนเปียร์แต่ละสายพันธุ์ จากนั้นเก็บตัวอย่างใบที่ 2 จากยอดของแต่ละสายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 3 ใบ เก็บตัวอย่างใบลงในไนโตรเจนเหลวทันทีก่อนนำไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนต่อไป

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบหญ้าเนเปียร์ด้วยสารละลาย TRIzol reagent (Invitrogen, USA) จากนั้นกำจัดการปนเปื้อนของจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase I แล้วทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม โดยใช้ชุดสาร ImProm-II™ Reverse Transcription

System (Promega, USA) เพิ่มปริมาณในส่วนที่ยีนเป้าหมายและยีนอ้างอิงด้วยเทคนิค PCR เริ่มจากขั้นตอน predenature ที่อุณหภูมิ 94 °C, 3 นาที ขั้นตอน denature ที่ 94 °C, 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่ 57 °C, 30 วินาที ขั้นตอน extension ที่ 72 °C, 1 นาที จำนวน 35 รอบ และขั้นตอน final extension ที่ 72 °C นาน 5 นาที ที่มาและคุณสมบัติของไพรเมอร์ของยีน *CesA5*, *CesA7*, *PAL* และยีนอ้างอิง *EP* ซึ่งเป็นยีนที่มีระดับการแสดงออกคงที่สูงในข้าว (Maksup *et al.*, 2013) ดังแสดงรายละเอียดใน Table 1 ผลิตภัณฑ์จาก PCR จะถูกนำมาทำอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และบันทึกภาพภายใต้แสง UV ด้วยชุดอุปกรณ์ gel documentation (รุ่น InGenius3, Syngene, USA) วัดระดับการแสดงออกของยีนโดยเทียบสัดส่วนการแสดงออกระหว่างยีนเป้าหมายกับยีนอ้างอิง วิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tool (Syngene, USA) โดยแต่ละยีนมีการทำซ้ำ 3 ครั้ง

Table 1 List of oligonucleotides used in this study.

Genes	Sequences	Amplicon (bp)	References
Cellulose synthase 5 (<i>CesA5</i>)	F 5'-AGAAGGGTGGTTTCTTGTCATCA-3' R 5'-CTGTCCACATGCTTCTGTGACTTT-3'	95	Gimeno <i>et al.</i> , 2014
Cellulose synthase 7 (<i>CesA7</i>)	F 5'-AATCGAAAAAGCCACCATCA-3' R 5'-CCTGGAGCACCTTCATCAAT-3'	199	Gimeno <i>et al.</i> , 2014
Phenylalanine ammonia- lyase (<i>PAL</i>)	F 5'-CCATGGCCTCCTACTGCTC-3' R 5'-CGGTCTTCCTGGAGGAGATG-3'	123	This study
Expressed protein (<i>EP</i>)	F 5'-TTAGCAAAATGGTGGAAGC-3' R 5'-CAGTTGCAACCCTGTATGA-3'	97	Maksup <i>et al.</i> , 2013

การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ทำการปลูกหญ้าเนเปียร์ลูกผสมทั้ง 19 สายพันธุ์ จนมีอายุครบ 3 เดือน จากนั้นเก็บส่วนใบและลำต้นนำมาตากและอบแห้งก่อนส่งไปวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหาร สัตว์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ซึ่งทำการวิเคราะห์หาค่า acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF) และ acid detergent lignin (ADL) โดยอ้างอิงตามวิธีของ Goering and Van Soest

(1970) และ Van Soest *et al.* (1991)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยปริมาณการแสดงออกของยีน และความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ถูกวิเคราะห์ด้วยสถิติ One way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range test (DMRT) ของซอฟต์แวร์ Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), Chicago, USA เวอร์ชัน 11.5 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ($P \leq 0.01$)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาลักษณะทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไป เช่น ลักษณะความสูง จำนวนข้อปล้อง ความยาวปล้อง เส้นรอบวงของลำต้น หรือสัดส่วนของความกว้างต่อความยาวใบของหญ้าเนเปียร์แต่ละสายพันธุ์ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในหญ้าบางสายพันธุ์ (ไม่ได้แสดงผลข้อมูล) อย่างไรก็ตามพบว่าลักษณะขอบใบของหญ้าเนเปียร์ทั้ง 19 สายพันธุ์ มีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยสามารถแบ่งได้เป็น 4 แบบ คือ จักฟันเลื่อยที่มีซี่ใบสั้น (serrate with short teeth) ได้แก่ สายพันธุ์ BN, NS, NLP, NP, SU และ MJ จักฟันเลื่อยที่มีซี่ใบยาว (serrate with long teeth) ได้แก่ สายพันธุ์ NM, NL, N และ YSU จักฟันเลื่อยซ้อนที่มีซี่ใบสั้น (doubly serrate with short teeth) ได้แก่ สายพันธุ์ AF, NT, PS และ ND และจักฟันเลื่อยซ้อนที่มีซี่ใบยาว (doubly serrate with long teeth) ได้แก่ สายพันธุ์ NV,

NK, NY, NJ และ KI (Figure 1) ส่วนการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของใบหญ้าเนเปียร์ พบว่าแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะภาพตัดขวางของใบและเส้นกลางใบคล้ายคลึงกัน โดยเส้นกลางใบด้านหลังใบ (adaxial leaf) จะประกอบไปด้วยกลุ่มของท่อลำเลียง (vascular bundles) กระจายอยู่เป็นระยะดังแสดงใน Figure 2 โดยบริเวณเส้นกลางใบจะประกอบด้วยเซลล์ต่างๆ ได้แก่ epidermis, parenchyma cell, vascular bundle, xylem, phloem และ fiber (Figure 2) ซึ่งบริเวณที่ติดสีแดงคือผนังเซลล์และลิกนิน จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ส่วนใหญ่สามารถจำแนกได้โดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาค แต่อย่างไรก็ตามการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม เช่น AFLP และ microsatellite ร่วมในการจัดจำแนกจะเป็นประโยชน์อย่างมาก ในการจำแนกสายพันธุ์ของหญ้าเนเปียร์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน (Sousa Azevedo *et al.*, 2012; Wanjala *et al.*, 2013)

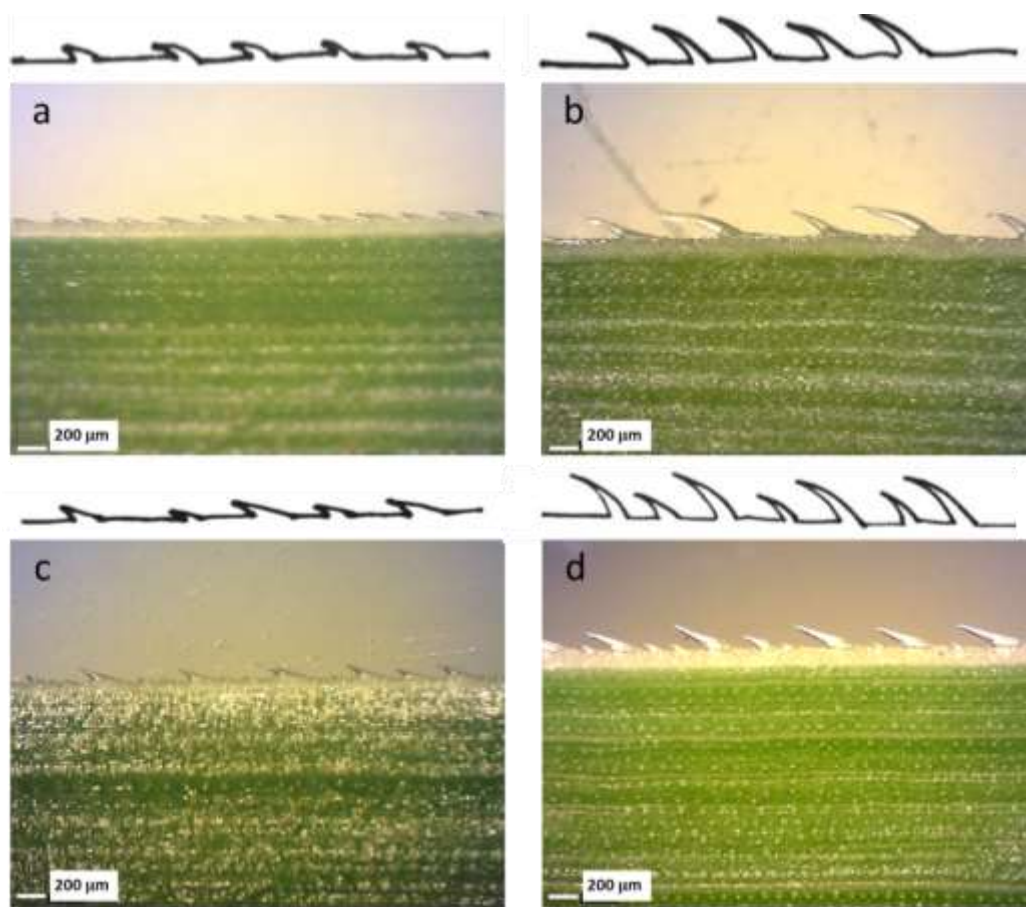


Figure 1 Four types of leaf margin from 19 Napier grass hybrids; serrate with short teeth (a), serrate with long teeth (b), doubly serrate with short teeth (c) and doubly serrate with long teeth (d). The drawing line above each photograph represents the pattern of each type of leaf margin.

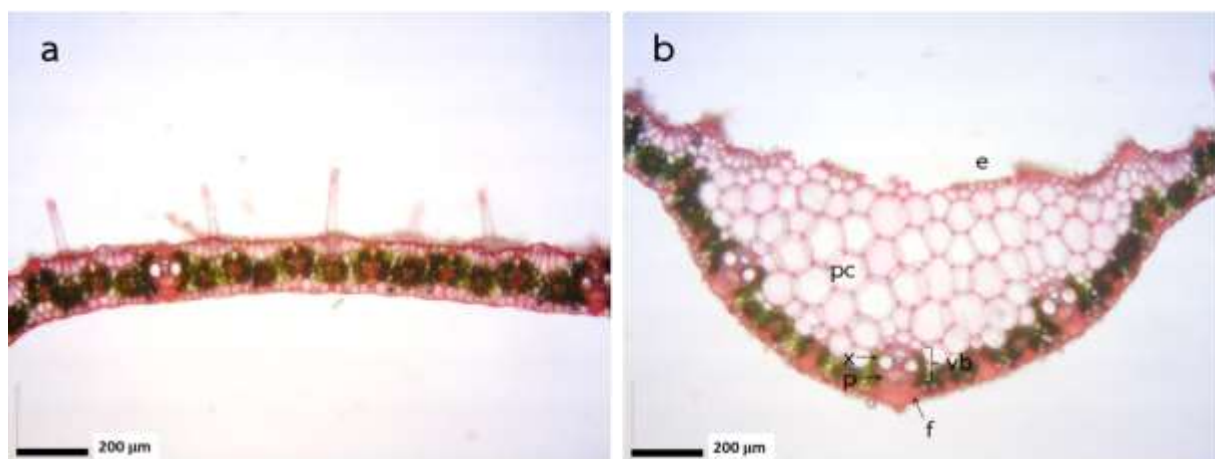


Figure 2 Safranin o staining of a Napier leaf blade (a) and vein (b) cross section; epidermis (e), parenchyma cell (pc), vascular bundle (vc), xylem (x), phloem (p) and fiber (f). These structures were found in all 19 Napier grass hybrids.

ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลส (*CesA5* และ *CesA7*) และลิกนิน (*PAL*) ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่าหญ้าเนเปียร์ลูกผสมทั้ง 19 สายพันธุ์ มีระดับการแสดงออกของยีน *CesA5* และ *CesA7* แตกต่างกันอย่าง

มีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) โดยในใบหญ้าเนเปียร์ส่วนใหญ่พบว่ามีการแสดงออกของยีน *CesA7* สูงกว่า *CesA5* (Figure 3, 4a และ 4b) ซึ่งต่างจากผลการทดลองที่ศึกษาในหญ้า Switchgrass (*P. virgatum* L.) ที่พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *CesA5* สูงกว่า *CesA7* ใน

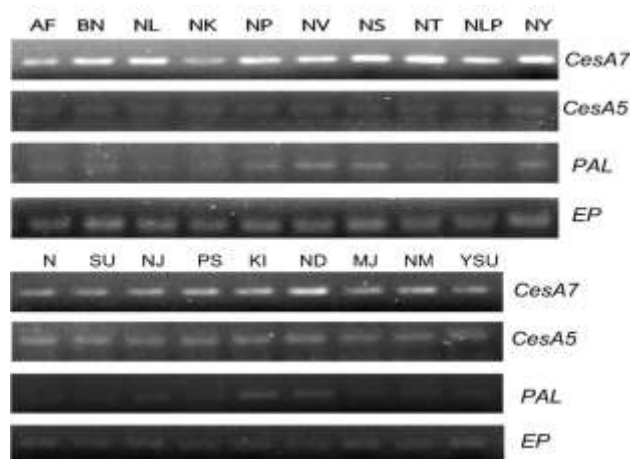


Figure 3 Semi-quantitative RT-PCR analysis showed expression levels of *CesA5*, *CesA7*, *PAL* and *EP* genes from 19 Napier grass hybrids; Alafal (AF), Bana (BN), Napier Yak Lampang (NL), Napier Pakchong1 Nakhonratchasima (NK), Napier Phetchabun (NP), Napier Muang (NV), Napier Jak-Ka-Pat-Surat (NS), Napier Taiwan A25 (NT), Napier Pakchong1 LP (NLP), Napier Yak (NY), Common Napier (N), Napier Surat1 (SU), Napier Ratchaburi (NJ), Napier Pakchong1 Sakaeo (PS), Kinggrass (KI), Dwarf Napier Sakaeo (ND), Napier Ma-Ji-Ro (MJ), Napier Muaklek (NM) and Napier Yak Suratthani (YSU).

ส่วนของใบ และพบ *CesA7* สูงมากที่บริเวณกาบใบหรือ ลำต้น (Gimeno *et al.*, 2014) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน *CesA7* สูง จะมีการแสดงออกของยีน *CesA5* ต่ำ แต่สายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน *CesA7* ต่ำ จะมีการแสดงออกของยีน

CesA5 สูง จึงอาจเป็นไปได้ว่าทั้ง 2 ยีนนี้สามารถทำงานแทนกันได้โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ จากผลการทดลองสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีน *CesA7* เมื่อเทียบกับยีนอ้างอิงสูงเรียงลำดับจากมากไปน้อย ได้แก่ NY, NT, NL, BN, NS, NLP, NP, ND, NK, AF และ NV ตามลำดับ

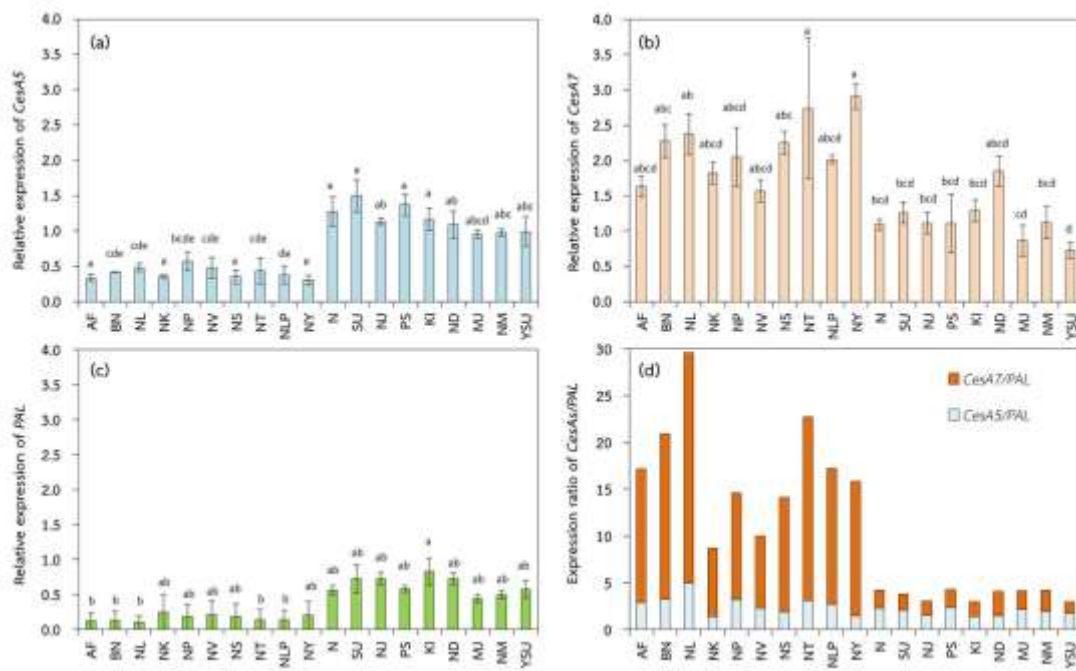


Figure 4 Relative expressions of *CesA5* (a), *CesA7* (b) and *PAL* (c) genes and expression ratio of *CesA5*/*PAL*, *CesA7*/*PAL* (d) from 19 Napier grass hybrids; Alafal (AF), Bana (BN), Napier Yak Lampang (NL), Napier Pakchong1 Nakhonratchasima (NK), Napier Phetchabun (NP), Napier Muang (NV), Napier Jak-Ka-Pat-Surat (NS), Napier Taiwan A25 (NT), Napier Pakchong1 LP (NLP), Napier Yak (NY), Common Napier (N), Napier Surat1 (SU), Napier Ratchaburi (NJ), Napier Pakchong1 Sakaeo (PS), Kinggrass (KI), Dwarf Napier Sakaeo (ND), Napier Ma-Ji-Ro (MJ), Napier Muaklek (NM) and Napier Yak Suratthani (YSU). Error bars represent standard errors, $n = 3$, and the different letters indicate highly significant difference ($P \leq 0.01$).

โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับสายพันธุ์ที่เหลือ (Figure 4b) ส่วนยีน *PAL* พบว่ามีระดับการแสดงออกต่ำเมื่อเทียบกับยีนควบคุม (Figure 3 และ 4c) เมื่อพิจารณาค่าสัดส่วนการแสดงออกของยีน *CesAs* เมื่อเทียบกับยีน *PAL* พบว่าสายพันธุ์ที่มีค่าสัดส่วนสูงเรียงลำดับจากมากไปน้อย ได้แก่ NL, NT, BN, NLP, AF, NY, NP, NS, NV และ NK ตามลำดับ (Figure 4d) จะเห็นได้ว่าทั้ง 10 สายพันธุ์นี้มีระดับการแสดงออกของยีน *CesA7* สูงสุดด้วย (Figure 4b) และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวยกเว้น NS และ

NV มีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสูงกว่า 64% (Figure 5a) อย่างไรก็ตามพบว่าบางสายพันธุ์ เช่น KI, NJ และ NM มีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูงแต่มีระดับการแสดงออกของยีน *CesA7* ต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมียีน *CesAs* อื่นๆ ทำงานร่วมกันซึ่งเห็นได้จากสายพันธุ์ดังกล่าวจะมีระดับการแสดงออกของยีน *CesA5* สูงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น (Figure 4a) นอกจากนี้พบว่าบางสายพันธุ์ที่มีค่าสัดส่วนปริมาณเซลลูโลสต่อลิกนินสูงก็ไม่ได้มีระดับการแสดงออกของยีน *CesA7* สูง ดังนั้นเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์ของข้อมูลจึงควร

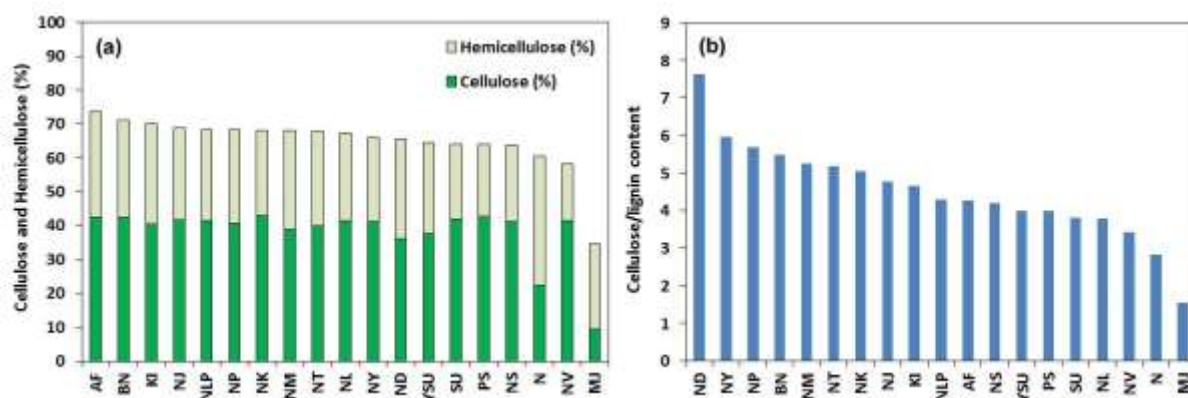


Figure 5 Percentage of cellulose and hemicellulose contents (a) and the ratios of cellulose to lignin contents (b) in 19 Napier grass hybrids; Alafal (AF), Bana (BN), Napier Yak Lampang (NL), Napier Pakchong1 Nakhonratchasima (NK), Napier Phetchabun (NP), Napier Muang (NV), Napier Jak-Ka-Pat-Surat (NS), Napier Taiwan A25 (NT), Napier Pakchong1 LP (NLP), Napier Yak (NY), Common Napier (N), Napier Surat1 (SU), Napier Ratchaburi (NJ), Napier Pakchong1 Sakaeo (PS), Kinggrass (KI), Dwarf Napier Sakaeo (ND), Napier Ma-Ji-Ro (MJ), Napier Muaklek (NM) and Napier Yak Suratthani (YSU).

มีการศึกษาการแสดงออกของยีน *CesAs* อื่นๆ เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสายพันธุ์ NL, NT, BN, NLP, AF, NY, NP และ NS มีระดับการแสดงออกของยีน *CesA7* และค่าสัดส่วนการแสดงออกของยีน *CesAs/PAL* สูง และมีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็น องค์ประกอบสูง 64–74% ดังนั้นจึงเป็นสายพันธุ์ที่ เหมาะสมต่อการเลือกไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาเป็น วัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรม ปศุสัตว์ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์หญ้าเนเปียร์ และ ขอบพระคุณ สุพรรณภูมิฯ เสงสัย ที่ให้คำปรึกษาในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Burton RA, Gibeaut DM, Bacic A, Findlay K, Roberts K, Hamilton A, Baulcombe DC, Fincher GB (2000) Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell* 12: 691–705.
- Chu Z, Hao C, Zhang Y, Zhang Z, Zheng N, Yin B, Yan H, Zhu L, Zhao X, Yuan M, *et al.* (2007) Knockout of the *AtCESA2* gene affects microtubule

orientation and causes abnormal cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143: 213–224.

- Fornalé S, Capellades M, Encina A, Wang K, Irar S, Lapierre C, Ruel K, Joseleau JP, Berenguer J, Puigdomènech P, *et al.* (2012) Altered lignin biosynthesis improves cellulosic bioethanol production in transgenic maize plants down-regulated for cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Molecular Plant* 5: 817–830.
- Gimeno J, Eattock N, Deynze AV, Blumwald E (2014) Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in switchgrass (*Panicum virgatum*) using quantitative real-time RT-PCR. *PLoS ONE* 9: e91474. doi:10.1371/journal.pone.0091474.
- Goering HK, Van Soest, PJ (1970) Forage fibre analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Agriculture Handbook No. 379, Agric Res Serv, USDA, Washington, DC, USA
- Kataria R, Ghosh S (2011) Saccharification of Kans grass using enzyme mixture from *Trichoderma reesei* for bioethanol production. *Bioresour Technol.* 102: 9970 – 9975.

- Keshwani DR, Cheng JJ (2009) Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. *Bioresour Technol.* 100: 1515–1523.
- Kumar R, Singh S, Singh O (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 377–391.
- Maksup S, Supaibulwatana K, Selvaraj G (2013) High-quality reference genes for quantifying the transcriptional responses of *Oryza sativa* L. (ssp. *indica* and *japonica*) to abiotic stress conditions. *Chin Sci Bull* 58: 1919–1930.
- Sewalt VJH, Ni W, Blount JW, Jung HC, Masoud SA, Howles PA, Lamb C, Dixon RA (1997) Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol* 115: 41–50.
- Sousa Azevedo AL, Costa PP, Machado JC, Machado MA, Pereira AV, Silva Léo FJ (2012) Cross species amplification of microsatellite markers in and genetic diversity of Napier grass accessions. *Crop Sci Soc Amer* 52: 1776–1785.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74: 3583–3597.
- Wanjala BW, Obonyo M, Wachira FN, Muchugi A, Mulaa M, Harvey J, Skilton RA, Proud J, Hanson J (2013) Genetic diversity in Napier grass (*Pennisetum purpureum*) cultivars: implications for breeding and conservation. *AoB Plants* 5: plt022 doi:10.1093/aobpla/plt022.
- Yasuda M, Nagai H, Takeo K, Ishii Y, Ohta K (2014) Bio-ethanol production through simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of a low-moisture anhydrous ammonia (LMAA)-pretreated napiegrass (*Pennisetum purpureum* Schumach). *Springer Plus* 3: 333.
- Yasuda M, Takeo K, Nagai H, Uto T, Yui T, Matsumoto T, Ishii Y, Ohta K (2013) Enhancement of ethanol production from Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) by a low-moisture anhydrous ammonia pretreatment. *J Sustain Bioener Systems* 3: 179–185.