



การแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์เซลลูโลสและลิกนินและการตอบสนองของ หญ้าเปียร์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะความเค็ม

Expression of Cellulose and Lignin Biosynthetic Genes and Responses of Five Napier Grass Hybrids under Salt Stress

ศรัณยพร มากทรัพย์, สุพรรณนิกา เส็งสาย, กาญจนา เหล่าสันติสุข และ กันยารัตน์ บุรณะ
Sarunyaporn Maksup^{*}, Supanyika Sengsai, Kanjana Laosuntisuk and Kanyarat Burana

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University

Received : 3 May 2019

Revised : 6 July 2019

Accepted : 4 November 2019

บทคัดย่อ

หญ้าเนเปียร์เป็นพืชพลังงานที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตไบโอเอทานอล แต่อย่างไรก็ตามหญ้าเนเปียร์ลูกผสม (Pennisetum Hybrids) แต่ละสายพันธุ์อาจมีคุณภาพของลิกนินเซลลูโลส ความสามารถทนเค็ม และกลไกในการตอบสนองต่อความเค็มที่ต่างกันไป ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเค็มที่มีผลต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยา กายวิภาค และการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์เซลลูโลส ได้แก่ *CesA1*, *CesA2*, *CesA3*, *CesA4*, *CesA5*, และ *CesA7* และยีนที่สังเคราะห์ลิกนิน ได้แก่ *CAD* และ *PAL* ด้วยเทคนิค Reverse transcription PCR (RT-PCR) เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกหญ้าเนเปียร์ที่สามารถปลูกในพื้นที่ดินเค็มและเหมาะสมต่อการผลิตไบโอเอทานอล ผลการทดลอง พบว่าเมื่อพิจารณาจากความสามารถในการรักษาปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์และลักษณะของรากหลังจากได้รับความเค็ม หญ้าเนเปียร์ลูกผสมสายพันธุ์อาลาฟีด (AF) เนเปียร์ยักษ์ลำปาง (NL) และเนเปียร์เพชรบูรณ์ (NP) สามารถทนเค็มได้ดีกว่าเนเปียร์ได้หวน A25 (NT) และเนเปียร์มาจิโร (MJ) ตามลำดับ และพบระดับการแสดงออกของยีนในสายพันธุ์ AF ที่เป็นพันธุ์ทนเค็มมีแนวโน้มในการสังเคราะห์เซลลูโลสเพิ่มขึ้น (*CesA2*, *CesA3* และ *CesA7*) แต่สร้างลิกนินน้อยลง (*CAD*) ภายใต้สภาวะความเค็มสูง ดังนั้นหญ้าเนเปียร์ AF จึงน่าจะเหมาะสมต่อการปลูกเพื่อผลิตไบโอเอทานอลมากที่สุด อย่างไรก็ตามพบว่าระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลสและลิกนินในใบของหญ้าเนเปียร์ลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ ไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับลักษณะความทนเค็ม

คำสำคัญ : ไบโอเอทานอล, เซลลูโลสซินเทส, ลิกนินเซลลูโลส, หญ้าเนเปียร์ลูกผสม, ทนเค็ม

*Corresponding author. E-mail : maksup_s@silpakorn.edu, srypms@yahoo.com



Abstract

Napier grass is a plant that has a high potential for bioethanol production. Currently, there are many hybrids of Napier grass (*Pennisetum* Hybrids) which each hybrid may have different lignocellulose quality and differ in its tolerance and response mechanisms to salinity stress. Therefore, this research aims to study the effect of salinity on the physiological and anatomical responses and examines the expression of cellulose (*CesA1*, *CesA2*, *CesA3*, *CesA4*, *CesA5* and *CesA7*) and lignin (*CAD* and *PAL*) associated genes using reverse transcription PCR (RT-PCR) technique in order to obtain a guideline for selecting Napier grass that can be grown in saline soil and suitable for bioethanol production. The results showed that when considering the ability to maintain the amount of chlorophyll pigments and root characteristics after receiving salinity, Alafal (AF), Napier Yak Lampang (NL) and Napier Phetchaboon (NP) were able to tolerate salinity better than Napier Taiwan A25 (NT) and Napier Ma-Ji-Ro (MJ), respectively. The level of expression of genes in the AF, salt tolerance hybrid, is likely to increase cellulose synthesis (*CesA2*, *CesA3* and *CesA7*) but produce less lignin (*CAD*) under high salinity conditions. Thus, AF may be the most suitable hybrid for bioethanol production. However, the expression level of cellulose and lignin associated genes in leaves of all five hybrids is not directly related with salinity tolerance.

Keywords : bioethanol, cellulose synthase, lignocellulose, *Pennisetum* hybrids, salt tolerance

บทนำ

ไบโอเอทานอล (bioethanol) เป็นพลังงานทดแทนที่กำลังได้รับความสนใจมาก เพราะจัดว่าเป็นพลังงานทางเลือกที่สะอาดไม่ใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล และสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตร โดยพืชที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่คือ อ้อย มันสำปะหลัง ข้าว และข้าวโพด ซึ่งเป็นพืชอาหาร แต่การนำเอาพืชอาหารมาใช้ในการผลิตเอทานอล อาจส่งผลให้สินค้าจากพืชชนิดนั้นมีราคาสูงขึ้น ดังนั้นการผลิตเอทานอลจากหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum* Schumach) ซึ่งเป็นหญ้าที่โตเร็ว ใช้ปุ๋ยไนโตรเจนต่ำ ให้ผลผลิตต่อไร่สูง และมีปริมาณลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic biomass) สูงจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ (Ra *et al.*, 2012; Yasuda *et al.*, 2014) โดยจากงานวิจัยพบว่าหญ้าเนเปียร์มีปริมาณเซลลูโลส 38 ถึง 49% ซึ่งสูงกว่าอ้อย (35%), หญ้า Switchgrass (35%) และ *Eucalyptus globulus* (30%) ตามลำดับ ในขณะที่พบว่า มีปริมาณลิกนินต่ำที่สุดในกลุ่มพืชพลังงานดังกล่าว (Basso *et al.*, 2014) ลิกโนเซลลูโลสมีส่วนประกอบหลักคือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) โดยสารพวกลิกนินจะห่อหุ้มหรือเคลือบโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสไว้ทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ยาก ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลง (Polprasert, 2014; Li *et al.*, 2015) ดังนั้นการเลือกใช้หญ้าเนเปียร์ที่มีปริมาณเซลลูโลสสูงและลิกนินต่ำจึงช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอทานอลลงได้

นอกจากปัญหาเรื่องเชื้อเพลิงฟอสซิลที่กำลังจะหมดไปแล้ว ปัจจุบันยังพบว่าโลกมีพื้นที่ดินเค็มซึ่งไม่เหมาะสมต่อการทำการเกษตรเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าพื้นดินบนโลกมากกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ ประสบกับปัญหาดินเค็ม (Munns & Tester, 2008)



ความเค็มมีผลต่อการเจริญเติบโต ปริมาณผลผลิต และการสร้างผนังเซลล์ของพืช รวมถึงมีผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของลิกโนเซลลูโลสด้วย (Le Gall *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016) ความเค็มยังส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลสและลิกนิน เช่น ใน Alfalfa (*Medicago sativa* L. var. Giulia) ที่ได้รับสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พบว่ายีน *CesA7B* และ *CesA8* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Behr *et al.*, 2015) ส่วนในหญ้า Switchgrass พบว่าความเค็มมีผลทำให้ยีน *SGCesAs* ทุกชนิดแสดงออกเพิ่มมากขึ้น โดย *SGCesA7* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุด ตามด้วย *SGCesA5*, *SGCesA6*, *SGCesA1*, *SGCesA3*, *SGCesA4* และ *SGCesA2* ตามลำดับ (Gimeno *et al.*, 2014) ส่วนในข้าว (*Oryza sativa* L. ssp. Indica) พบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิกนิน ได้แก่ phenylalanine ammonia-lyase (PAL), caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase (COMT) และ caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT) มีปริมาณลดลง (Li *et al.*, 2010) แต่รูปแบบการตอบสนองของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ เช่น *CesAs*, PAL, COMT อาจแตกต่างกันไปในรากพืชแต่ละชนิด (Zhao *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามจากการทบทวนเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์ผนังเซลล์เมื่อได้รับความเค็ม พบว่ารูปแบบการแสดงออกของยีนซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ลิกนินยังไม่ชัดเจน พืชบางชนิดอาจมีการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้เพิ่มขึ้น แต่พืชบางชนิดอาจพบการแสดงออกลดลงหรือไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังขาดงานวิจัยโดยตรงที่ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลลูโลสภายใต้สภาวะเครียดจากความเค็ม ทำให้ยังขาดองค์ความรู้ที่จะอธิบายความสัมพันธ์ของความเค็มต่อกลไกการสังเคราะห์เซลลูโลสและลิกนินอีกมาก (Le Gall *et al.*, 2015)

จากงานวิจัยของ Loedkunchotipat *et al.* (2015) พบว่าหญ้าเนเปียร์ลูกผสมสายพันธุ์อาลาฟัล (AF), เนเปียร์ยักษ์ลำปาง (NL), เนเปียร์เพชรบูรณ์ (NP), เนเปียร์ใต้หวัน A25 (NT), บานา, เนเปียร์ปากช่อง 1 นครราชสีมา, เนเปียร์ปากช่อง 1 LP และเนเปียร์ยักษ์ เป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณเซลลูโลสสูงและลิกนินต่ำ ดังนั้นหญ้าเนเปียร์ลูกผสมสายพันธุ์ดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นพืชพลังงานเพื่อการผลิตไบโอเอทานอล ในขณะที่หญ้าเนเปียร์ลูกผสมสายพันธุ์มาจิโร (MJ) มีปริมาณเซลลูโลสต่ำจึงไม่เหมาะต่อการใช้เป็นพืชพลังงาน อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาความสามารถในการทนเค็มและกลไกการตอบสนองต่อความเค็มของหญ้าดังกล่าว อีกทั้งยังไม่ทราบว่าความเค็มมีผลต่อการสังเคราะห์เซลลูโลสและลิกนินของหญ้าเนเปียร์หรือไม่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของความเค็มต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของใบและการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคของรากหญ้าเนเปียร์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ ได้แก่ AF, NL, NP, NT และ MJ รวมถึงศึกษากลไกการตอบสนองในระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลส ได้แก่ ยีน cellulose synthases (*CesA1*, *CesA2*, *CesA3*, *CesA4*, *CesA5* และ *CesA7*) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิกนิน ได้แก่ cinnamyl alcohol dehydrogenase (*CAD*) และ phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) ด้วยเทคนิค Reverse transcription PCR (RT-PCR) เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกหญ้าเนเปียร์ที่สามารถปลูกในพื้นที่ดินเค็มและมีแนวโน้มที่จะสังเคราะห์เซลลูโลสสูงแต่มีลิกนินต่ำ ซึ่งเหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น



วิธีดำเนินการวิจัย

1. การปลูกหนุ่บ้านเป็ยร์ลูกผสมเพื่อศึกษาผลของระดับความเค็มต่อปริมาณรงควัตถุและการแสดงออกของยีน

นำท่อนพันธุ์ของหนุ่บ้านเป็ยร์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจากสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ มาปลูกลงในสารละลาย half-strength Hoagland solution ในเรือนกระจก (อุณหภูมิ 30 ± 2 °C, ความชื้นสัมพัทธ์ 68.75 ± 3.32 %, ความเข้มแสง $279.07 \pm 27.78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่า มีปริมาณคลอโรฟิลล์และเฮมิคลอโรฟิลล์สูงจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ AF, NL, NP และ NT ส่วนอีกหนึ่งสายพันธุ์ คือ MJ ให้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ เนื่องจากมีปริมาณคลอโรฟิลล์และเฮมิคลอโรฟิลล์ต่ำ (Loedkunchotipat *et al.*, 2015) จากนั้นย้ายลงปลูกในสารละลาย half-strength Hoagland solution ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 50, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ (มีค่าเทียบเท่ากับค่า electrical conductivity of a saturated-paste extract หรือ ECe เท่ากับ 3.11, 16.83, 28.40, 36.60 และ 55.30 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร ตามลำดับ) เป็นเวลา 3 วัน บันทึกสีของใบด้วยภาพถ่าย จากนั้นเก็บตัวอย่างใบที่ 2 จากยอด สายพันธุ์ละ 3 ใบ ห่ออะลูมิเนียมฟอยล์ แช่ในไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ และสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และลิพิดินโดยวิธี RT-PCR ต่อไป

2. การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบหนุ่บ้านเป็ยร์ลูกผสม

วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยวิธีดัดแปลงมาจาก Linchtenthaler (1987) โดยเก็บตัวอย่างใบของหนุ่บ้านเป็ยร์ลูกผสม จากแต่ละกลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 3 ใบ ซึ่งตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิกรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด นำตัวอย่างใส่ขวดแก้ว (glass vial) หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ แล้วเติมอะซิโตน 95.5% (v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรงให้รงควัตถุละลาย จากนั้นจึงปิดฝาและพันด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการระเหยของอะซิโตน และวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 644 และ 662 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Visible spectrophotometer (Optizen 3220UV, Mecasys Co., Ltd., Daejeon, Korea) และใช้อะซิโตน 95.5% (v/v) เป็น blank โดยวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณรงควัตถุแต่ละชนิดตามวิธีการของ Shabala *et al.* (1998) และ Cha-um *et al.* (2010) ดังสมการ

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (Chl a) } (\mu\text{g/ml}) = 9.784 A_{662} - 0.99 A_{644}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (Chl b) } (\mu\text{g/ml}) = 21.42 A_{644} - 4.65 A_{662}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (Total Chl) } (\mu\text{g/ml}) = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

จากนั้นจึงคำนวณปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ($\mu\text{g g}^{-1}\text{FW}$)

3. การศึกษาผลของระดับความเค็มต่อการเจริญและลักษณะทางกายวิภาคของรากหนุ่บ้านเป็ยร์ลูกผสม

นำท่อนพันธุ์ของหนุ่บ้านเป็ยร์ลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ มาปลูกลงในสารละลาย half-strength Hoagland solution ในเรือนกระจก เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงปลูกในสารละลายอาหารที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 50, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นศึกษาการเจริญของรากโดยการวัดความยาวรากและนับจำนวน



ราก และศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของราก โดยเลือกรากที่มีขนาดใหญ่มากที่สุด แล้วตัดส่วนปลายรากยาว 2 เซนติเมตร นับจากบริเวณปลายของรากนำมาแช่ในน้ำก่อนทำการตัดเนื้อเยื่อตามขวางด้วยมือ (free-hand section) และย้อมด้วยสี Safranin O จากนั้นนำสไลด์มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และถ่ายภาพที่กำลังขยาย 40 เท่า โดยใช้กล้องถ่ายภาพยี่ห้อ Dino-Lite และโปรแกรม DinoCapture 2.0 (CHOSEN Technology Co.,Ltd.)

4. การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Reverse transcription PCR (RT-PCR)

สกัด RNA จากตัวอย่างใบของหญ้าเนเปียร์ลูกผสม (100 มิลลิกรัม) ด้วยชุดสกัด FavorPrep™ Tri-RNA Reagent (Favorgen, Taiwan) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัท นำ RNA ที่สกัดได้มาวัดปริมาณและคุณภาพโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000) โดย RNA ที่ได้มีค่า OD₂₃₀/OD₂₆₀ มากกว่า 1.0 และมีค่า OD₂₃₀/OD₂₈₀ อยู่ระหว่าง 1.8-2.0 และวัดคุณภาพของ RNA อีกครั้งด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% (w/v) agarose gel ใน 0.5X TBE buffer จากนั้นกำจัดการปนเปื้อนของจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase I แล้วทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอปริมาณ 2 ไมโครลิตร โดยใช้ชุดสาร ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, USA) จากนั้นนำ cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาใช้เป็น DNA template ของปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยชุดน้ำยา GoTaq qPCR Master Mix (Promega, USA) ตามวิธีการที่ปรากฏในคู่มือทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่อง T100™ Thermol Cycler (Life Science Research, Bio-Rad) ซึ่งตั้งโปรแกรมดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนที่ 2 denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่ 3 annealing ที่อุณหภูมิ 57 °C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่ 4 extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอนที่ 5 final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ ใช้ยีน GAPDH และ EP เป็นยีนอ้างอิง ยีนอ้างอิงและยีนเป้าหมายมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำ PCR products ไปรันเจลโดยวิธี agarose gel electrophoresis ใน 2% agarose gel โดยใช้ 100 bp DNA Ladder RTU (GeneDirex) เป็น standard DNA marker ระดับการแสดงออกของยีนสัมพันธ์ (relative quantities of gene product) จะถูกประมาณด้วยอุปกรณ์และซอฟต์แวร์ InGenius3 gel imaging and analysis system (SYNGENE, UK) และแสดงผลข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกสัมพันธ์ของแต่ละยีนจากตัวอย่าง 3 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกัน



ตารางที่ 1 ข้อมูลของไพรเมอร์ (primers) ของยีนที่ใช้ในการทดลอง

Genes	Gene description	Primer pairs (5'→3')	PCR product size (bp)	References
CesA1	Cellulose synthase 1	F: AAGAAGAAGGCTGAAAGAAGTGAGA R: CGTAGTTGTCAATTTCCCGAAGA	110	Jimeno <i>et al.</i> , 2014
CesA2	Cellulose synthase 2	F: GCAGTCCCTCAGAGGTTTGAT R: AGTGCCTGCCGTCTAAAGACA	170	
CesA3	Cellulose synthase 3	F TCTTCAGAAGGCAGGCATTA R CAGCAACAGCAAATCACCACCT	140	
CesA4	Cellulose synthase 4	F: CTTTGTACGGCTATGATCCTGTATTG R: TGGGAGCCGAAGATTCTGTT	192	
CesA5	Cellulose synthase 5	F 5'-AGAAGGGTGGTTTCTGTGCATCA-3' R 5'-CTGTCCACATGCTTCTGTGACTTT-3'	120	
CesA7	Cellulose synthase 7	F: AATCGAAAAAGCCACCATCA R: CCTGGAGCACCTTCATCAAT	230	
CAD	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	F: TCACATCAAGCATCCACCATCT R: GTTCTCGTGTCCGAGGTGTGT	161	Shen <i>et al.</i> , 2013
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase	F: CATATAGTGTGCGTGCGTGTGT R: CTGGCCCCGCAATCG	126	
EP	Expressed protein	F: TGAGCAAATGGTGGAAAGC R: CAGTTGCAACCCCTGTATGA	117	Maksup <i>et al.</i> , 2013
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: GTCTGCATCAGAGGGAAAGC R: AGAGCAATTCCAGCCTTGG	87	

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

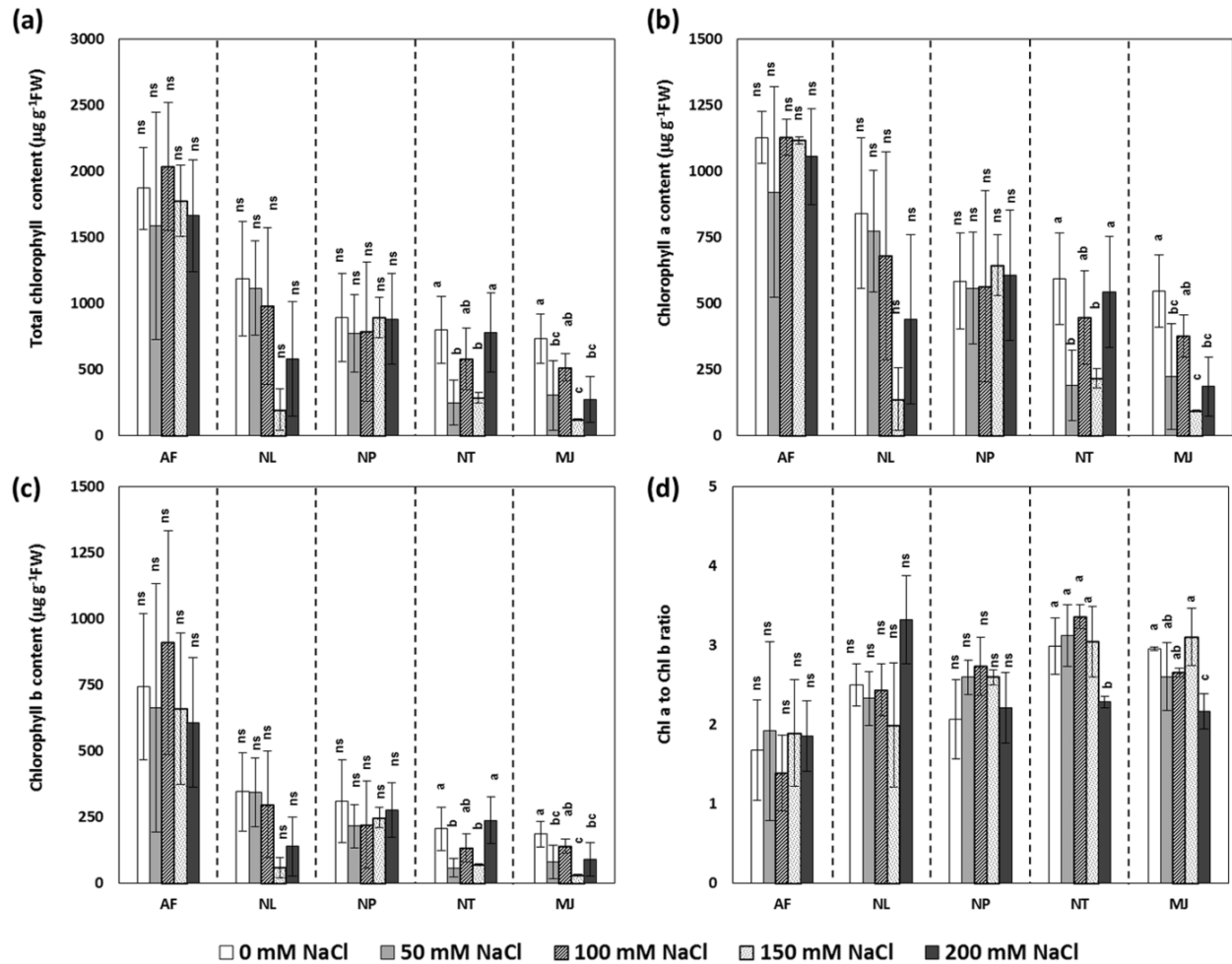
การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้ศึกษา โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)

ผลการวิจัย

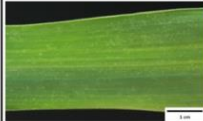



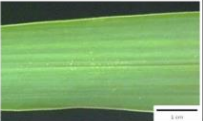




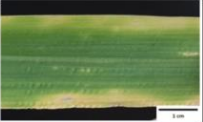















1. ผลของระดับความเค็มต่อปริมาณรงควัตถุในใบของหญ้าเนเปียร์ลูกผสม

จากผลการทดลองจะเห็นว่าความเค็มของเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 50-200 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 3 วัน ไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณของคลอโรฟิลล์รวม (Total Chl) คลอโรฟิลล์เอ (Chl a) คลอโรฟิลล์บี (Chl b) และอัตราส่วนของคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บี (Chl a/ Chl b) ในใบของหญ้าเนเปียร์ลูกผสมสายพันธุ์ AF, NL และ NP อย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นสายพันธุ์ NT ส่วนสายพันธุ์ MJ พบว่า Total Chl, Chl a และ Chl b ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ที่ความเข้มข้นของเกลือ 50 มิลลิโมลาร์ และ Chl a/ Chl b ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของเกลือ 200 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 1)

สอดคล้องกับลักษณะใบและสีใบดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่ง MJ จะมีลักษณะใบเหี่ยวและมีสีเหลืองมากกว่าสายพันธุ์ AF, NL และ NP อย่างชัดเจน



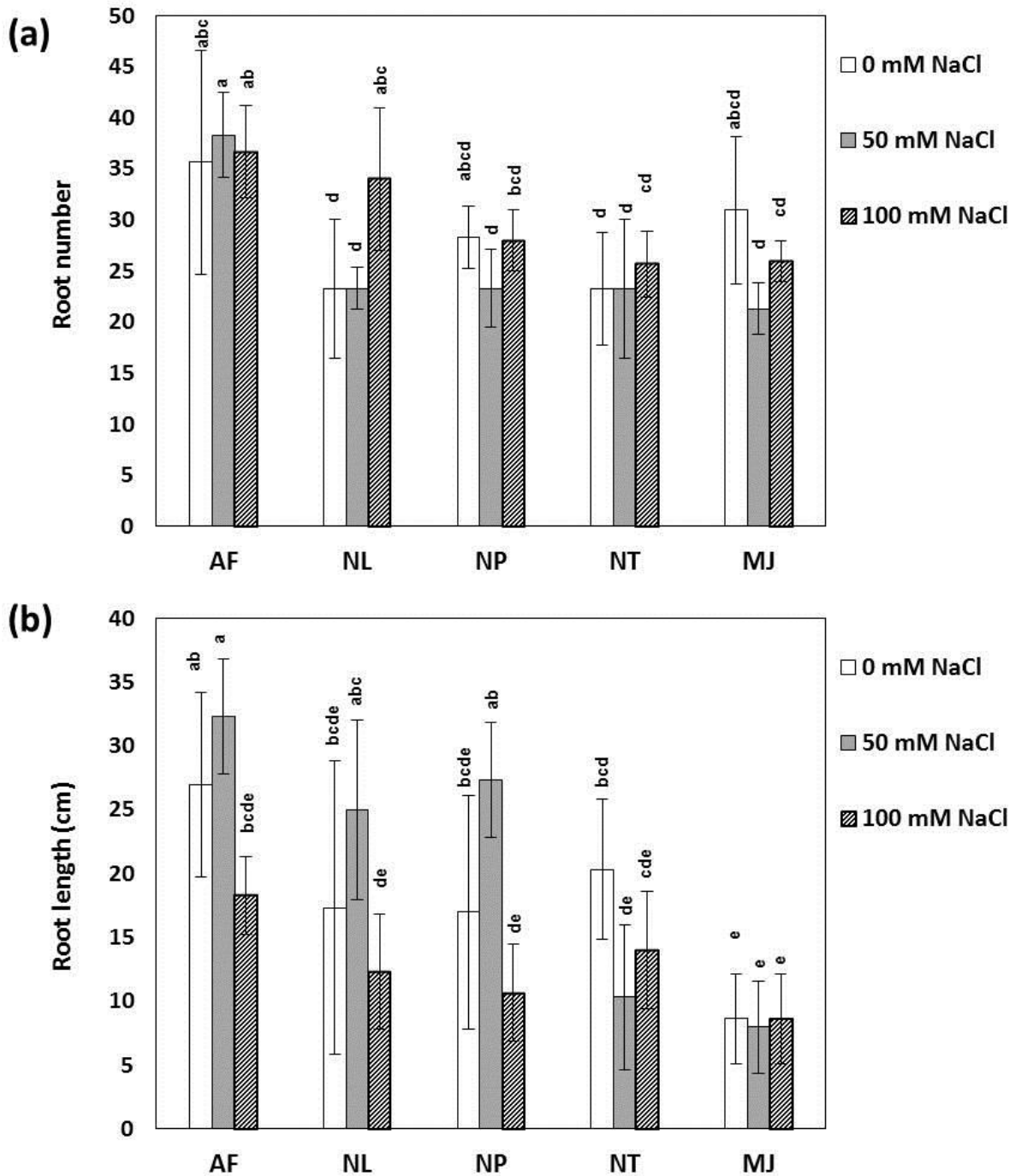
ภาพที่ 1 ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (a) คลอโรฟิลล์เอ (b) คลอโรฟิลล์บี (c) และอัตราส่วนของคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บี (d) ในใบของหญ้าเนเปียร์ลูกผสมสายพันธุ์ AF, NL, NP, NT และ MJ หลังจากได้รับเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ของปริมาณรงควัตถุในใบโดยเปรียบเทียบภายในหญ้าเนเปียร์สายพันธุ์เดียวกัน ns หมายถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

Napier grass hybrids	0 mM NaCl (Control)	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl	200 mM NaCl
AF					
NL					
NP					
NT					
MJ					

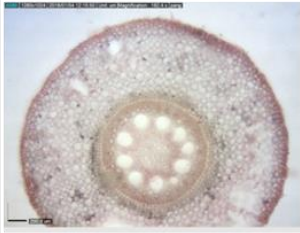
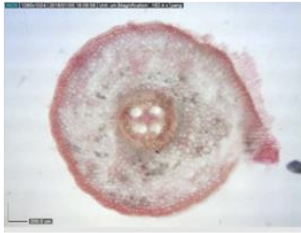
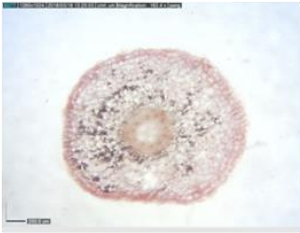


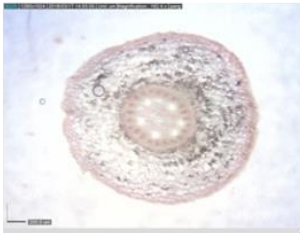

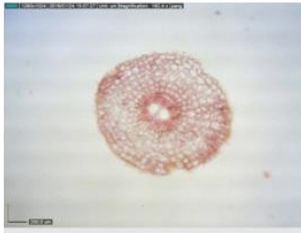
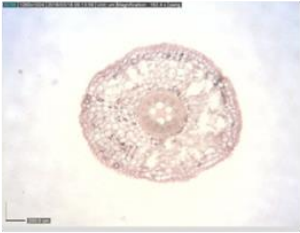
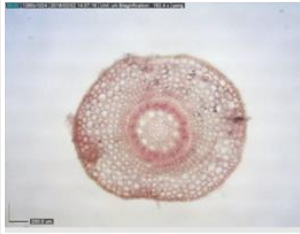




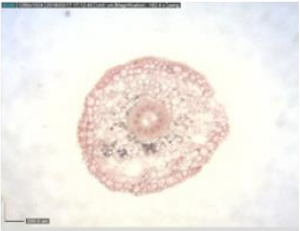
ภาพที่ 2 สีของใบหญ้าเนเปียร์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ หลังจากได้รับเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0-200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน (สเกลบาร์ = 1 เซนติเมตร)

2. ผลของความเค็มต่อการเจริญและลักษณะทางกายวิภาคของรากหญ้าเนเปียร์ลูกผสม

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อได้รับเกลือความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 วัน ความยาวรากและจำนวนรากไม่แตกต่างกันกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญในหญ้าทุกสายพันธุ์ แต่ที่ความเข้มข้นของเกลือ 50 มิลลิโมลาร์ สายพันธุ์ AF มีความยาวรากและจำนวนรากสูงที่สุด และสายพันธุ์ AF, NL และ NP มีความยาวรากสูงกว่าสายพันธุ์ NT และ MJ ตามลำดับ (ภาพที่ 3) เมื่อศึกษาภาคตัดขวางของเนื้อเยื่อรากของหญ้าเนเปียร์ลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ หลังจากได้รับเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 วัน พบว่ารากที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของหญ้าเนเปียร์แต่ละสายพันธุ์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เท่ากัน โดยรากของสายพันธุ์ AF และ NL จะมีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ MJ, NT และ NP ตามลำดับ และเมื่อได้รับเกลือระดับความเข้มข้นสูงขึ้นรากจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กลง ส่วนตัวอย่างที่ได้รับเกลือความเข้มข้น 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ แสดงการเหี่ยวอย่างถาวรและตายในที่สุดจึงไม่ได้แสดงภาพถ่าย นอกจากนี้สังเกตเห็นได้ว่าการได้รับเกลือที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ นาน 30 วัน จะส่งผลให้เนื้อเยื่อรากมีลักษณะอ่อนนุ่ม ทำให้เมื่อทำการตัดชิ้นส่วนภาคตัดขวางจึงเห็นเซลล์บริเวณชั้นคอร์เทกซ์ (cortex) คล้ายถูกทำลาย ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 จำนวนราก (a) และความยาวราก (b) ของหญ้าเนเปียร์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ หลังจากได้รับเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 วัน

Napier grass hybrids	0 mM NaCl (Control)	50 mM NaCl	100 mM NaCl
AF			
NL			
NP			
NT			
MJ			

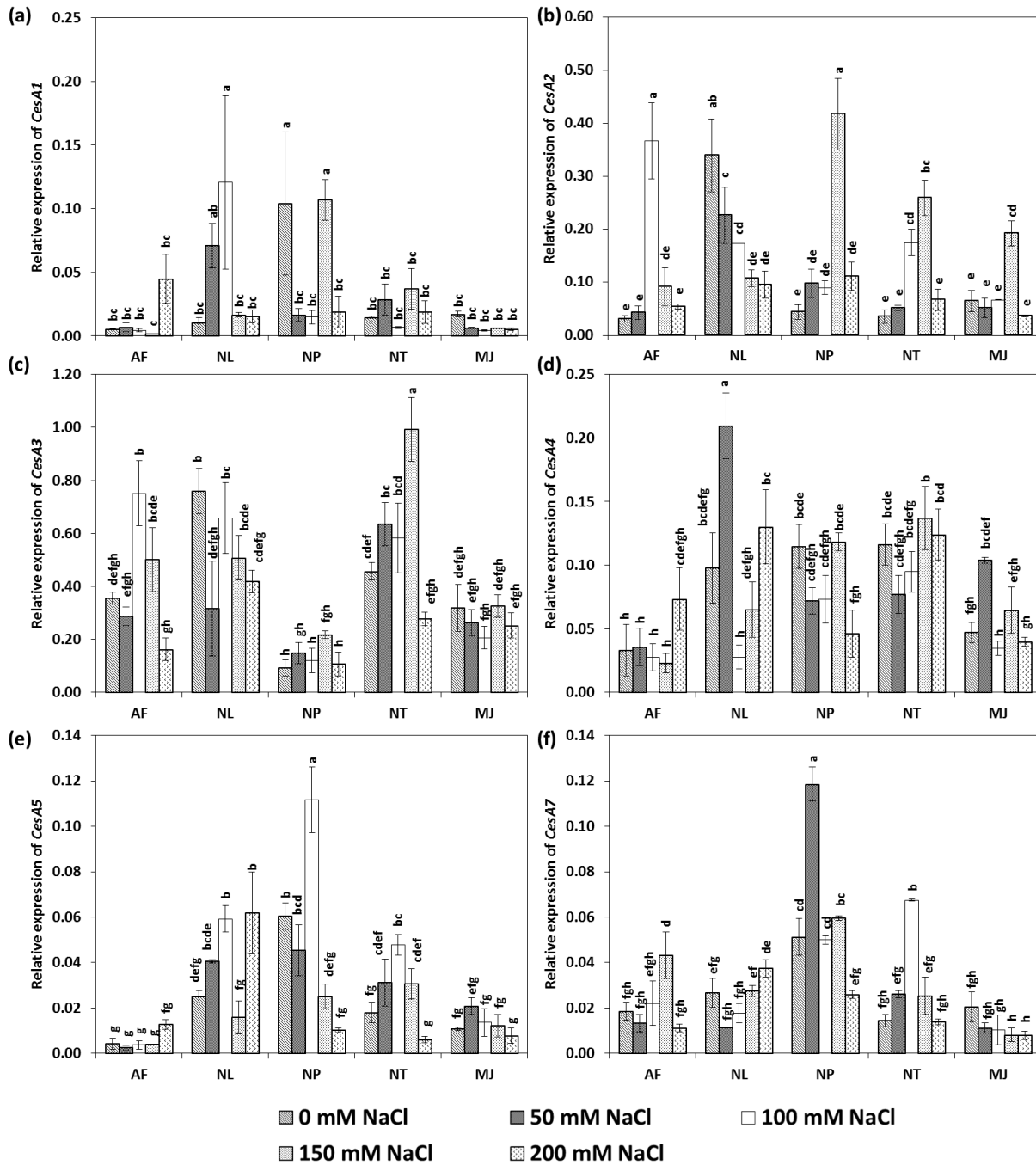
ภาพที่ 4 ภาคตัดขวางของเนื้อเยื่อรากของหญ้าเนเปียร์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ หลังจากได้รับเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 วัน (สเกลบาร์ = 200 ไมโครเมตร)

3. ผลของความเค็มต่อระดับการแสดงออกของยีนในใบของหญ้าเนเปียร์ลูกผสม

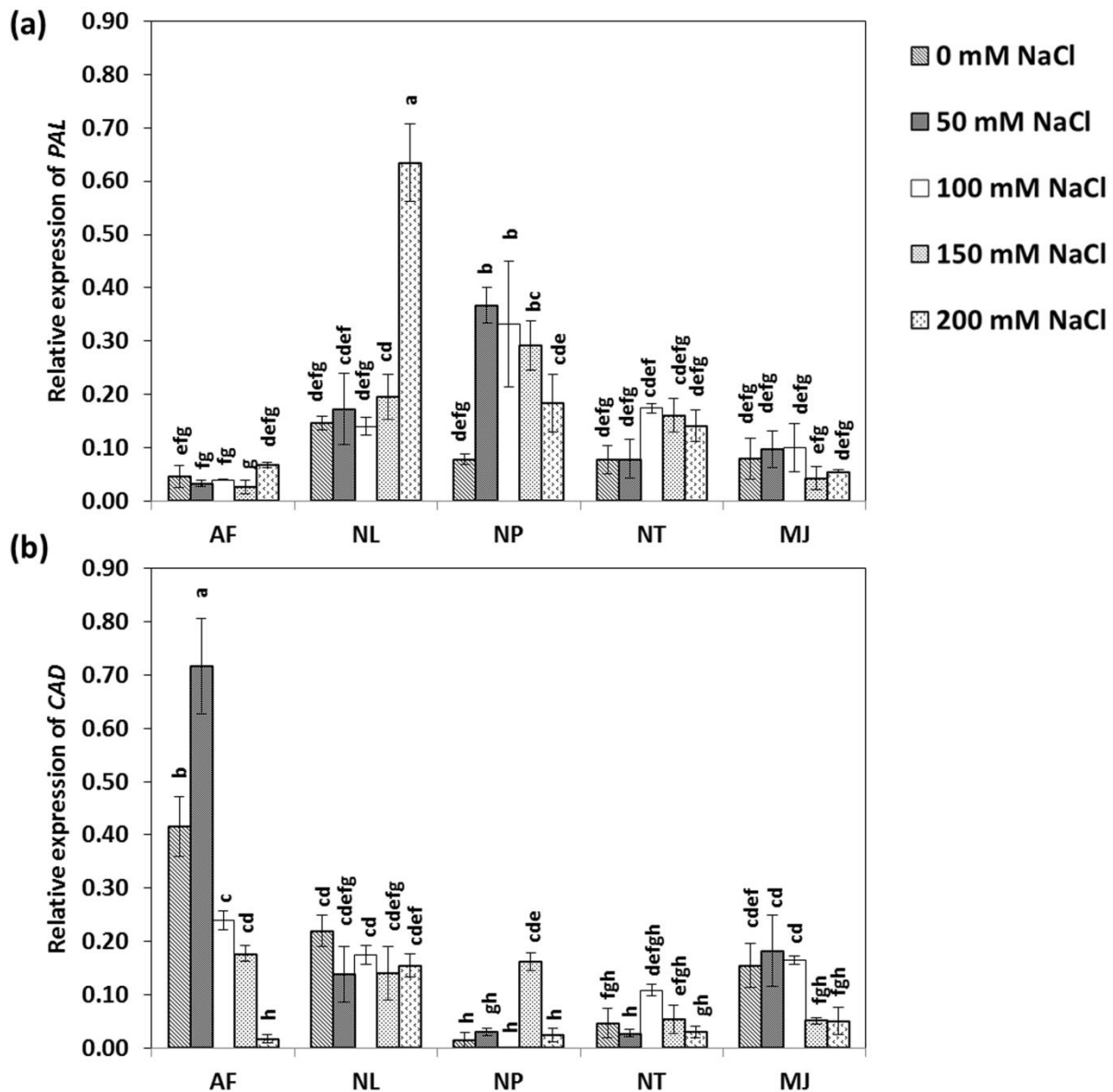
เมื่อนำตัวอย่างใบจากหญ้าเนเปียร์ลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่ปลูกในสารละลายอาหารที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 3 วัน มาวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ เซลลูโลสและลิกนินด้วยวิธี RT-PCR พบว่าระดับการแสดงออกของยีน ได้แก่ ยีน *CesA1*, *CesA2*, *CesA3*, *CesA4*, *CesA5*,



CesA7, CAD และ PAL มีการแสดงออกแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์เห็ดนางฟ้าและระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl ดังแสดงในภาพที่ 5 และ 6 จากภาพที่ 5 จะเห็นว่าที่ความเค็มระดับ 50-150 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของยีน CesAs ต่างๆ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในสายพันธุ์ AF, NL, NP และ NT มากกว่าที่พบในสายพันธุ์ MJ โดยความเค็มที่ระดับต่างๆ ส่งผลให้ยีน CesAs ในเห็ดนางฟ้าแต่ละสายพันธุ์มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญแตกต่างกัน ได้แก่ สายพันธุ์ AF มีการแสดงออกของยีน CesA2, CesA3 และ CesA7 สูงขึ้น สายพันธุ์ NL มีการแสดงออกของยีน CesA1, CesA4 และ CesA5 สูงขึ้น สายพันธุ์ NP มีการแสดงออกของยีน CesA2, CesA5 และ CesA7 สูงขึ้น สายพันธุ์ NT มีการแสดงออกของยีน CesA2, CesA3, CesA5 และ CesA7 สูงขึ้น ส่วนสายพันธุ์ MJ ซึ่งมีลักษณะไม่ทนเค็ม มีแสดงออกของยีน CesA2 สูงขึ้นเพียงยีนเดียว (ภาพที่ 5) นอกจากนี้พบว่ายีน CesA2 มีค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกของยีนสูงขึ้นชัดเจนเมื่อได้รับเกลือความเข้มข้น 100 หรือ 150 มิลลิโมลาร์ ในเห็ดนางฟ้าทุกสายพันธุ์ยกเว้นสายพันธุ์ NL (ภาพที่ 5b) และยีน CesA3 มีค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกสูงกว่ายีน CesAs อื่นๆ (ภาพที่ 5c) ส่วนยีน PAL มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นในเห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ NL และ NP ที่ระดับความเค็ม 200 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และยีน CAD มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นในเห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ AF และ NP ที่ระดับความเค็ม 50 และ 150 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แต่พบว่ายีน CAD มีระดับการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับเกลือความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลส ได้แก่ Cesa1 (a), Cesa2 (b), Cesa3 (c), Cesa4 (d), Cesa5 (e) และ Cesa7 (f) ในใบหญ้าเนเปียร์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ หลังจากได้รับเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0-200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ 6 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิคินิน ได้แก่ PAL (a) และ CAD (b) ในใบหญ้าเนเปียร์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ หลังจากได้รับเกลือ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0-200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน

วิจารณ์ผลการวิจัย

หญ้าเนเปียร์เป็นพืช C4 ที่นิยมปลูกเป็นพืชอาหารสัตว์และสามารถใช้เป็นพืชพลังงานที่มีศักยภาพสูง (Yasuda et al., 2014; Turano et al., 2016) ปัจจุบันทั่วโลกมีหญ้าเนเปียร์สกุล *Pennisetum* อยู่ประมาณ 140 ชนิด และมีสายพันธุ์ลูกผสม (*Pennisetum* hybrids) ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้มีความเหมาะสมต่อวัตถุประสงค์ในการใช้และสภาพพื้นที่ปลูกอีกมากกว่า 300 สายพันธุ์ (accessions) (Kandel et al., 2016; Negawo et al., 2017) โดยสายพันธุ์ต่างๆ อาจมีปริมาณเซลลูโลสและลิกินินแตกต่างกันทำให้มีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลต่างกัน (Basso



et al., 2014) และแต่ละสายพันธุ์อาจมีความสามารถทนเค็มแตกต่างกัน ดังในงานวิจัยของ Hu et al. (2015) ที่พบว่าหญ้าซึ่งมีความคล้ายคลึงกันกับหญ้าเนเปียร์ เช่น Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) จำนวน 30 สายพันธุ์ มีความสามารถทนเค็มแตกต่างกัน ซึ่งสามารถจำแนกได้โดยใช้ลักษณะทางสรีรวิทยา เช่น ความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง ปริมาณน้ำในพืช และอัตราการคายน้ำ เป็นต้น นอกจากนี้ปริมาณคลอโรฟิลล์ยังสามารถใช้ในการจัดจำแนกความสามารถในการทนเค็มในข้าวได้อีกด้วย (Wanichananan et al., 2003) ในงานวิจัยนี้พบว่าหญ้าเนเปียร์ลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ มีปริมาณคลอโรฟิลล์แตกต่างกัน โดยปริมาณ Total Chl ที่สภาวะควบคุมของสายพันธุ์ AF มีค่าสูงสุด รองลงมาคือสายพันธุ์ NL, NP, NT และ MJ ตามลำดับ (ภาพที่ 1a) เมื่อได้รับเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 50-200 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าปริมาณ Total Chl, Chl a, Chl b และ Chl a/ Chl b ของสายพันธุ์ AF, NL และ NP ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพที่ 1) แสดงว่าหญ้าเนเปียร์ลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มีความสามารถทนเค็มได้ดี สอดคล้องกับ AL-Shoaibi (2008) ซึ่งรายงานว่าหญ้าเนเปียร์สามารถทนความเค็มที่ระดับ 100-200 มิลลิโมลาร์ได้โดยค่าประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง (Fv/Fm) และอัตราการสังเคราะห์แสงสุทธิไม่ลดลง สำหรับสายพันธุ์ NT พบว่าปริมาณ Total Chl, Chl a และ Chl b ลดลงที่ความเค็มระดับ 50 มิลลิโมลาร์ แล้วเพิ่มขึ้นเท่าเดิมที่ความเค็มระดับ 200 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการสูญเสียน้ำของเซลล์และความพยายามในการปรับแรงดันออสโมติกของหญ้าสายพันธุ์นี้ นอกจากนี้พบว่า Chl a/ Chl b ของสายพันธุ์ NT มีค่าลดลงที่ความเค็มระดับ 200 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mane et al. (2010) ที่พบว่าใบของ *Pennisetum alopecuroides* มี Chl a/ Chl b ลดลงที่ระดับความเค็ม 100-300 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าความเค็มมีผลต่อการลดลงของปริมาณ Chl a มากกว่า Chl b ในงานวิจัยของ Kleima et al. (1999) รายงานว่า Chl b สามารถแทนที่ Chl a ใน light-harvesting complex II ของระบบแสง 2 ได้ ทำให้สัดส่วนของ Chl a/ Chl b ลดลง และส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานของระบบแสง 2 ลดลง จึงส่งผลกระทบต่ออัตราการสังเคราะห์แสงได้ ดังนั้นสายพันธุ์ NT และ MJ ซึ่งพบว่ามีค่า Chl a/ Chl b ลดลงที่ความเค็มระดับ 200 มิลลิโมลาร์ อาจมีความสามารถทนเค็มได้น้อยกว่าสายพันธุ์อื่นที่ระดับความเค็มเดียวกัน ส่วนสายพันธุ์ MJ พบว่าปริมาณ Total Chl, Chl a และ Chl b ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ที่ระดับความเค็ม 50 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าสายพันธุ์ MJ ไม่ทนเค็ม จากงานวิจัยของ Loedkunchotipat et al. (2015) มีรายงานว่าปริมาณเซลล์ลูโลสรวมกับเฮมิเซลล์ลูโลส และอัตราส่วนของปริมาณเซลล์ลูโลสต่อลิกนินของหญ้าเนเปียร์สายพันธุ์ MJ มีค่าต่ำกว่าสายพันธุ์ AF, NL, NP และ NT ดังนั้นอาจอนุมานได้ว่าสายพันธุ์ MJ ไม่ทนเค็มเนื่องจากมีปริมาณเซลล์ลูโลส เฮมิเซลล์ลูโลส และลิกนินต่ำทำให้โครงสร้างของต้นไม่แข็งแรง เมื่อได้รับความเค็มจึงได้รับผลกระทบมากกว่าสายพันธุ์อื่น ซึ่งผลการอนุมานนี้สอดคล้องกับลักษณะภาคตัดขวางของเนื้อเยื่อรากภายใต้สภาวะความเค็มในภาพที่ 4 โดยจะเห็นได้ชัดว่าความเค็มที่ระดับเพิ่มขึ้นส่งผลให้ขนาดของรากเล็กลง และที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ รากของสายพันธุ์ MJ มีขนาดเล็กลงและเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ได้รับความเสียหายมากที่สุด ทั้งนี้จากการสังเกตพบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือสูงจะส่งผลให้รากมีลักษณะไม่แข็งแรง จึงฉีกขาดได้ง่ายเมื่อทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อนั้นเอง

จากการศึกษาผลของความเค็มต่อระดับการแสดงออกของยีนพบว่าสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มว่าทนเค็มและสามารถสังเคราะห์เซลล์ลูโลสเพิ่มขึ้นแต่สร้างลิกนินน้อยลงภายใต้สภาวะความเค็มสูง คือ สายพันธุ์ AF เมื่อพิจารณาจากระดับการแสดงออกของยีน *CesAs* (*CesA2*, *CesA3* และ *CesA7*) ที่เพิ่มขึ้น และยีน *CAD* ที่ลดลงหลังได้รับเกลือความเข้มข้น 100-150 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 5 และ 6) ส่วนสายพันธุ์ NL, NP และ NT มีการแสดงออกของยีน *CesAs* บางยีนสูงขึ้นเมื่อได้รับเกลือที่



ความเข้มข้นน้อยกว่า 150 มิลลิโมลาร์ เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 5) อย่างไรก็ตามสามารถสังเกตได้ว่าระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลสและลิกนินไม่สอดคล้องกับลักษณะความสามารถทนเค็มของหญ้าเนเปียร์ ดังจะเห็นได้จากสายพันธุ์ MJ ซึ่งไม่ทนเค็มก็มีรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ศึกษาลักษณะคล้ายกับที่พบในสายพันธุ์ AF, NP และ NT คือมีการแสดงออกของยีน *CesA2* สูงขึ้นที่ความเข้มข้นของเกลือ 150 มิลลิโมลาร์ แล้วจึงมีการแสดงออกลดลง จากข้อมูลก่อนหน้านี้ที่เสนอว่าความสามารถทนเค็มสัมพันธ์กับปริมาณของเซลลูโลสและลิกนิน (MJ ที่มีเซลลูโลสและลิกนินต่ำจึงทนเค็มได้น้อย) แต่จากการทดลองนี้ที่พบว่าระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลสและลิกนินไม่สอดคล้องกับลักษณะความสามารถทนเค็มของหญ้าเนเปียร์ ทำให้อนุมานได้ว่าระดับการแสดงออกของยีน *CesAs*, *PAL* และ *CAD* อาจไม่สัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเซลลูโลสและลิกนินที่สร้างขึ้นก็ได้ ทั้งนี้เนื่องจากการสังเคราะห์เซลลูโลสไม่ได้ถูกควบคุมด้วยเอนไซม์ cellulose synthase (*CesA*) เพียงอย่างเดียว แต่ยังถูกควบคุมโดยโดยโปรตีนอื่นๆ เช่น companion of cellulose synthase 1 (*CC1*), companion of cellulose synthase 2 (*CC2*), chitinase-like protein (*CTL1*), fasciclin-like arabinogalactan protein (*SOS5*), glycosyltransferase-like protein (*KOB*) และ endoglucanase (*KOR*) เป็นต้น (Wang *et al.*, 2016) เช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์ลิกนินซึ่งมีความซับซ้อนและอาจถูกควบคุมด้วยยีนและ transcription factors อื่นๆ อีกมากมาย (Vanholme *et al.*, 2010) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องอื่นๆ เพิ่มเติม และควรทำการวัดปริมาณลิกนินเซลลูโลสในหญ้าเนเปียร์ที่นำมาทดสอบเพื่อให้สามารถสรุปผลได้ชัดเจนมากขึ้น นอกจากนี้จากการทดลองเห็นได้ว่าเมื่อระดับความเค็มเพิ่มขึ้นจะมีผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีน *CesAs*, *PAL* และ *CAD* เช่นเดียวกับที่ปรากฏในผลการทดลองในต้นอัลฟัลฟา (*Medicago sativa* L.) ซึ่งเมื่อได้รับเกลือความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำให้มีระดับการแสดงออกของยีน *MsCesA1*, *MsCesA3*, *MsCesA6-B*, *MsCesA6-C*, *MsCesA7-B*, *MsCesA8*, *PAL* และ *CAD* สูงขึ้น (Guerriero *et al.*, 2014) แต่หากความเข้มข้นของเกลือสูงเกินไป (150-200 มิลลิโมลาร์) ก็จะส่งผลให้ระดับการแสดงออกของยีนลดลงในหญ้าเนเปียร์ทุกสายพันธุ์ยกเว้น NL (ภาพที่ 5) แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ NL อาจมีกลไกทนเค็มต่างไปจากสายพันธุ์ AF และ NP นั่นเอง

สรุปผลการวิจัย

หญ้าเนเปียร์ลูกผสมสายพันธุ์ AF, NL และ NP สามารถทนเค็มได้ดีกว่าสายพันธุ์ NT และ MJ ตามลำดับ เนื่องจากสามารถรักษาปริมาณรงควัตถุ Total Chl, Chl a, Chl b และ Chl a/ Chl b ให้คงที่ได้ภายใต้สภาวะความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50-200 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน อีกทั้งยังมีจำนวนและความยาวคงที่และเนื้อเยื่อมีความแข็งแรงมากกว่าที่สังเกตได้จากสายพันธุ์ NT และ MJ ทั้งนี้สายพันธุ์ AF มีแนวโน้มว่าทนเค็มและมีระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลสเพิ่มขึ้น (*CesA2*, *CesA3* และ *CesA7*) แต่มีระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิกนินน้อยลง (*CAD*) ภายใต้สภาวะความเค็มสูง อย่างไรก็ตามพบว่าระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลลูโลสและลิกนินในใบหญ้าเนเปียร์ลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ ไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับลักษณะความทนเค็ม



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (สัญญาทุนเลขที่ SRF-JRG-2560-07) ผู้สนับสนุนเงินทุนวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ซึ่งให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์ของหญ้าเนเปียร์ลูกผสมที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- AL-Shoaibi, A.A. (2008). Photosynthetic response of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) to NaCl salinity. *Journal of Biological Sciences*, 8, 610-615.
- Basso, V., Machado, J.C., da Silva Lédo, F.J., da Costa Carneiro, J., Fontana, R.C., Dillon, A.J.P., & Camassola, M. (2014). Different elephant grass (*Pennisetum purpureum*) accessions as substrates for enzyme production for the hydrolysis of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, 71, 155-161.
- Behr, M., Legay, S., Hausman, J.F., & Guerriero, G. (2015). Analysis of cell wall-related genes in organs of *Medicago sativa* L. under different abiotic stresses. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 16104-16124.
- Cha-um, S., Nhung, N.T.H., & Kirdmanee, C. (2010) Effect of mannitol- and salt-induced iso-osmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of rice cultivars (*Oryza sativa* L. spp. indica). *Pakistan Journal of Botany*, 42(2), 927-941.
- Gimeno, J., Eattock, N., Van Deynze, A., & 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, 1-12.
- Guerriero, G., Legay, S., & Hausman, J.F. (2014). Alfalfa cellulose synthase gene expression under abiotic stress: a Hitchhiker's guide to RT-qPCR normalization. *PLoS ONE*, 9, 1-13.
- Hu, G., Liu, Y., Zhang, X., Yao, F., Huang, Y., Ervin, E. H., & Zhao, B. (2015). Physiological evaluation of alkali-salt tolerance of thirty switchgrass (*Panicum virgatum*) lines. *PLoS ONE*, 10, 1-17.
- Kandel, R., Singh, H.P., Singh, B.P., Harris-Shultz, K.R., & Anderson, W.F. (2016). Assessment of genetic diversity in Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) using microsatellite, single-nucleotide polymorphism and insertion-deletion markers from pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 34, 265-272.
- Kleima, F. J., Hobe, S., Calkoen, F., Urbanus, M. L., Peterman, E. J. G., van Grondelle, R., Paulsen, H., & van Amerongen, H. (1999). Decreasing the chlorophyll a/b ratio in reconstituted LHCII: structural and functional consequences. *Biochemistry*, 38, 6587-6596.
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J.M., Gillet, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, 4, 112-166.



- Li, X.J., Yang, M.F., Chen, H., Qu, L.Q., Chen, F., & Shen, S.H. (2010). Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: proteomic evidence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(4), 929-940.
- Li, Y., Zhang, Y., Zheng, H., Du, J., Zhang, H., Wu, J., & Huang, H. (2015). Preliminary evaluation of five elephant grass cultivars harvested at different time for sugar production. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 23, 1188-1193.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, 148, 350-382.
- Loedkunchotipat, K., Desclaux, S.S., & Maksup, S. (2015). Expression analysis of cellulose synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in Napier grass hybrids (*Pennisetum* hybrid). *Thai Journal of Genetics*, 8, 167-174. (in Thai)
- 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. *Chinese Science Bulletin*, 58, 1919-1930.
- Mane, A.V., Karadge, B.A., & Samant, J.S. (2010). Salt stress induced alteration in photosynthetic pigments and polyphenols of *Pennisetum alopecuroides* (L.). *Journal of Ecophysiology and Occupational Health*, 10, 177-182.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Negawo, A., Teshome, A., Kumar, A., Hanson, J., & Jones, C. (2017). Opportunities for Napier grass (*Pennisetum purpureum*) improvement using molecular genetics. *Agronomy*, 7, 1-21.
- Polprasert, S. (2014). Pretreatment of lignocellulosic materials for ethanol production. *Thai Journal of Science and Technology*, 22(5), 641-649. (in Thai)
- Ra, K., Shiotsu, F., Abe, J., & Morita, S. (2012). Biomass yield and nitrogen use efficiency of cellulosic energy crops for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 37, 330-334.
- Shabala, S.N., Shabala, S.I., Martynenko, A.I., Babourina, O., & Newman, I.A. (1998) Salinity effect on bioelectric activity, growth, Na⁺ accumulation and chlorophyll fluorescence of maize leaves: A comparative survey and prospects for screening. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25, 609-616.
- Shen, H., Mazarei, M., Hisano, H., Escamilla-Trevino, L., Fu, C., Pu, Y., ... Dixon, R.A. (2013). A genomics approach to deciphering lignin biosynthesis in switchgrass. *The Plant Cell*, 25(11), 4342-4361.
- Turano, B., Tiwari, U. P., & Jha, R. (2016). Growth and nutritional evaluation of Napier grass hybrids as forage for ruminants. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 4, 168-178.



- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153, 895-905.
- Wang, T., McFarlane, H.E., & Persson, S. (2016). The impact of abiotic factors on cellulose synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 67, 543-552.
- Wanichananan, P., Kirdmanee, C., & Vutiyano, C. (2003). Effect of salinity on biochemical and physiological characteristics in correlation to selection of salt tolerance in aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *Science Asia*, 29, 333-339.
- Yasuda, M., Ishii, Y., & Ohta, K. (2014). Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) as raw material for bioethanol production: pretreatment, saccharification, and fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19, 943-950.
- Zhao, Q., Zhang, H., Wang, T., Chen, S., & Dai, S. (2013). Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots. *Journal of proteomics*, 82, 230-253.