

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

เยาวลักษณ์ แหม่งปิง^{1/} รัตติกาล ปวงแก้ว^{2/} อาทิตยา สุขสะเกษ^{3/}

บทคัดย่อ

เครื่องหมายโมเลกุลเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพมากสำหรับนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกสายพันธุ์พืช หนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้รับความนิยม คือ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เนื่องจากให้ polymorphism สูง สามารถจำแนกพันธุ์ในระดับสปีชีส์ และเพิ่มลำดับดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แน่นอน เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เป็นเครื่องหมายชนิด co-dominant จึงทำให้วิเคราะห์รูปแบบพันธุกรรมที่จำเพาะกับชนิดพันธุ์ได้ สามารถนำไปใช้จำแนกชนิดและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจนและแม่นยำ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์ จำนวน 20 พันธุ์ และตรวจหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ให้รูปแบบพันธุกรรมที่จำเพาะกับหญ้าเนเปียร์แต่ละชนิดพันธุ์

จากผลการศึกษาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 36 ตำแหน่ง พบว่าเครื่องหมายที่ให้รูปแบบพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์แตกต่างกันแบบ co-dominant มีจำนวน 13 ตำแหน่ง ประกอบด้วย เครื่องหมาย CTM-10 CTM-12 PSMP2248 PSMP2266 PGIRD13 PGIRD21 PGIRD25 PGIRD56 P-S-004 P-S-151 P-S-177 Phil22756 และ Xcup63 โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 47 อัลลิล อยู่ระหว่าง 2 – 7 อัลลิล ค่าเฉลี่ย 3.62 อัลลิล มีค่า Polymorphic information content (PIC) ระดับปานกลาง โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.36 และค่า expected heterozygosity (H_e) ระดับปานกลาง โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.425 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูป phylogenetic dendrogram สามารถจัดจำแนกหญ้าเนเปียร์ออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย พันธุ์อาลาฟัล พันธุ์ทีฟตัน พันธุ์ธรรมดา พันธุ์กำแพงแสน พันธุ์มวกเหล็ก พันธุ์สุราษฎร์ 1 และพันธุ์ตากาจิมา กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พันธุ์ไต้หวัน A148 พันธุ์เพชรบูรณ์ พันธุ์ปากช่อง 1 และพันธุ์จันเฉา 4190 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย พันธุ์สีม่วงและพันธุ์หวานมหาสารคาม กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์จักรพรรดิ พันธุ์รุกโว่นา พันธุ์บาน่า พันธุ์ยักษ์ และพันธุ์ไต้หวัน A25 กลุ่มที่ 5 คือ พันธุ์แคะ กลุ่มที่ 6 คือ พันธุ์เมอครอน นอกจากนี้ยังพบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 8 ตำแหน่ง มีความจำเพาะกับชนิดพันธุ์หญ้าเนเปียร์ โดยมีหญ้าเนเปียร์ จำนวน 8 พันธุ์ ที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สามารถระบุชนิดพันธุ์ได้ ได้แก่ พันธุ์แคะ พันธุ์ยักษ์ พันธุ์สีม่วง พันธุ์ไต้หวัน A25 พันธุ์เมอครอน พันธุ์บาน่า พันธุ์ตากาจิมา และพันธุ์หวานมหาสารคาม ข้อมูลความสัมพันธ์ในระดับพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ช่วยในการตัดสินใจคัดเลือกพันธุ์ผสมข้ามที่เหมาะสม และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่มีศักยภาพสามารถนำไปใช้ในการจำแนกและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ ตลอดจนนำไปใช้ในการคัดเลือกกลุ่มผสมในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์หญ้าเนเปียร์ต่อไป

คำสำคัญ : หญ้าเนเปียร์ ไมโครแซทเทลไลต์ ความหลากหลายทางพันธุกรรม

เลขทะเบียนวิชาการ : 65(2)-0214-105

^{1/} ศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40260

^{2/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา ต.ปากช่อง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

^{3/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์มหาสารคาม ต.เชียงยืน อ.เชียงยืน จ.มหาสารคาม 44160

Study on genetic diversity of Napier grass using microsatellite

Yaowalak Mangpung^{1/} Rattikan Pongkaew^{2/} Atitiya Suksaket^{3/}

Abstract

Molecular markers are powerful tools for analyzing genetic diversity and distinguish of plant species. Among them, microsatellite is the most popular marker due to its high polymorphism, effective to distinguish in species level and DNA amplification in certain locus. Also, microsatellite is a co-dominant marker that can analyzed specific genotype to each species, therefore it can be used to distinguish and verify the purity of the species more clearly and accurately. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity among 20 Napier grasses varieties and also to determine the microsatellite markers that provide a specific genotype to each Napier grass variety.

The resulted showed that 13 microsatellite markers among 36 microsatellite markers were polymorphic with co-dominant alleles, consisting of CTM-10 CTM-12 PSMP2248 PSMP2266 PGIRD13 PGIRD21 PGIRD25 PGIRD56 P-S-004 P-S-151 P-S-177 Phil22756 and Xcup63, generating a total of 47 polymorphic alleles, ranging from 2 – 7 with an average of 3.62 alleles. Polymorphic information content (PIC) was medium with an average of 0.36 and expected heterozygosity (H_e) across all populations was medium with an average of 0.425. Genetic correlation of 20 Napier grasses was achieved with phylogenic dendrogram, all Napier grass could be divided into 6 groups. Group 1 consisted of Alafal, Tifton, Common, Kampaeng Saen, Muaklek, Surat 1 and Tanegashima. Group 2 consisted of Taiwan A148, Phetchaboon, Pakchong 1 and Jinchao 4190. Group 3 consisted of Prince (purple) and Mahasarakham. Group 4 consisted of Jakrapat, Vruckwona, Bana, King Grass and Taiwan A25. Group 5 was Mott and group 6 was Merkeron. Eight microsatellite markers among 13 microsatellite markers provided a specific genotype to each Napier grass variety. Eight Napier varieties could be specified division using microsatellite, consisting of Mott, King grass, Prince, Taiwan A25, Merkeron, Bana, Tanegashima and Mahasarakham. The genetic correlations in this study could be assisted the selection of suitable cross variety. The potential microsatellite marker could be used to distinguish and verify the purity of the species, and also to assisted the selection of Napier hybrid in further breeding program.

Keywords: *Cenchrus purpureus* Schumach, Microsatellite marker, Genetic diversity

Registered No.:

^{1/} Ruminants Feeding Standard Research and Development Center

^{2/} Nakhonratchasima Animal Nutrition Research and Development Center

^{3/} Mahasarakham Animal Nutrition Research and Development Center

บทนำ

หญ้าเนเปียร์ (*Cenchrus purpureus* Schum. ชื่อเดิม *Pennisetum purpureum* Schum.) เป็นพืชหลายฤดูที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็น allotetraploid มีการนำมาใช้เป็นพืชอาหารสัตว์อย่างแพร่หลายในประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เนื่องจากให้ผลผลิตสูงและโตเร็ว (Na *et al.*, 2015) โดยมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ด้านทานโรคและแมลง และปรับตัวได้ดีในหลายพื้นที่ (Bhandari *et al.*, 2006) หญ้าเนเปียร์มีต้นกำเนิดมาจากทวีปแอฟริกาถูกนำเข้ามาในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2472 และนำเข้ามาอีกหลายสายพันธุ์โดยหน่วยงานราชการและเอกชนเพื่อนำมาใช้ประโยชน์เป็นทั้งพืชอาหารสัตว์และพืชพลังงาน ปัจจุบันหญ้าเนเปียร์ได้รับความนิยมจากเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมและโคเนื้อเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 เนื่องจากให้ผลผลิตสูงและโตเร็ว โดยให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งสูงถึง 7 - 12 ตันต่อไร่ต่อปี (สำนักพัฒนาอาหารสัตว์, 2559) มีโปรตีน (crude protein, CP) ประมาณ 9 - 10 เปอร์เซ็นต์ มีลิกโนเซลลูโลส (acid detergent fiber, ADF) ประมาณ 40 - 42 เปอร์เซ็นต์ และผนังเซลล์ (neutral detergent fiber, NDF) ประมาณ 66 - 67 เปอร์เซ็นต์ (กรมปศุสัตว์, 2563) ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา เป็นแหล่งรวบรวมเชื้อพันธุ์กรรมหญ้าเนเปียร์มากกว่า 20 สายพันธุ์ ซึ่งรวบรวมไว้เพื่อวัตถุประสงค์ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สำหรับการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต แต่เนื่องจากหญ้าเนเปียร์หลายพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากจนทำให้ไม่สามารถจำแนกพันธุ์ได้ด้วยสายตา ด้วยเหตุนี้ เกียรติศักดิ์ และคณะ (2561) จึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมและจำแนกพันธุ์หญ้าเนเปียร์ในแหล่งเชื้อพันธุ์กรรมนี้ด้วยเครื่องหมาย Inter simple sequence repeat (ISSR) ซึ่งพบว่าเครื่องหมาย ISSR สามารถจำแนกสายพันธุ์หญ้าเนเปียร์ได้ดี แต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเครื่องหมาย ISSR ตำแหน่ง (คูไพรเมอร์) ไດให้รูปแบบพันธุกรรมที่จำเพาะกับชนิดพันธุ์หญ้าเนเปียร์ได้ เนื่องจากเครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องหมายชนิดเด่นสมบูรณ์ (dominant marker) ไม่สามารถบ่งบอกสภาพพันธุกรรมแบบ homozygous และ heterozygous จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์รูปแบบพันธุกรรม (genotype) ที่จำเพาะกับชนิดพันธุ์ได้ ดังนั้นการจำแนกและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ด้วยเครื่องหมาย ISSR จึงจำเป็นต้องสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากหลายคูไพรเมอร์แล้วนำผลมาวิเคราะห์ร่วมกัน ซึ่งทำให้ต้องสิ้นเปลืองเวลา แรงงาน และงบประมาณในการตรวจสอบและวิเคราะห์ผล

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellites) มีลำดับดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำเรียงต่อเนื่องกัน ตั้งแต่ 1-6 เบส เป็นเครื่องหมายที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลาย มีลักษณะเด่น คือ polymorphism สูง สามารถบ่งบอกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ และเพิ่มลำดับดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แน่นอน (พัชรี และคณะ, 2556) ที่สำคัญคือ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเด่นร่วม (co-dominant markers) สามารถบ่งบอกสภาพพันธุกรรมแบบ homozygous และ heterozygous ได้ จึงทำให้วิเคราะห์รูปแบบพันธุกรรมที่จำเพาะกับชนิดพันธุ์ได้ นอกจากนี้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ยังสามารถนำไปใช้เป็น marker assisted selection (MAS) เพื่อช่วยตรวจสอบและคัดเลือกกลุ่มผสมที่ตรงกับลักษณะที่นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการได้ และสามารถนำไปใช้สร้างแผนที่พันธุกรรมได้ (Li *et al.*, 2015) การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ และตรวจหาเครื่องหมายที่ให้รูปแบบพันธุกรรมที่จำเพาะกับหญ้าเนเปียร์แต่ละชนิดพันธุ์ ข้อมูลความสัมพันธ์ในระดับพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ช่วยในการตัดสินใจคัดเลือกพันธุ์ผสมข้ามที่เหมาะสม และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่มีศักยภาพสามารถนำไปใช้ช่วยในการจำแนกและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ ตลอดจนนำไปใช้ช่วยในการคัดเลือกกลุ่มผสมในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์หญ้าเนเปียร์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ระหว่างเดือนมกราคม 2563 ถึง กันยายน 2563 โดยดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การรวบรวมพันธุ์หญ้าเนเปียร์

รวบรวมพันธุ์หญ้าเนเปียร์ จำนวน 20 พันธุ์ จากแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา และหญ้าไข่มุก จำนวน 1 พันธุ์ เพื่อนำมาใช้เป็น out group จากศูนย์วิจัยและพัฒนาข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ รวมจำนวน 21 พันธุ์ ดังนี้

- 1) พันธุ์แคระ (*P. purpureum* cv. Mott)
- 2) พันธุ์จักรพรรดิ (*P. purpureum* x *P. alopecuroides*)
- 3) พันธุ์ธรรมดา (*P. purpureum*)
- 4) พันธุ์ยักษ์ (*P. purpureum* x *P. glaucum* cv. King grass)
- 5) พันธุ์สีม่วง (*P. purpureum* Prince)
- 6) พันธุ์ปากช่อง 1 (*P. purpureum* Pakchong1)
- 7) พันธุ์สุราษฎร์ 1 (*P. purpureum* Surat1)
- 8) พันธุ์ไต้หวัน A25 (*P. purpureum* Schumach)
- 9) พันธุ์ไต้หวัน A148 (*P. purpureum* Schumach cv. Taiwan A148)
- 10) พันธุ์เมอเครอน (*P. purpureum* cv. Merkeron)
- 11) พันธุ์บาน่า (*P. purpureum* x *P. glaucum* cv. Bana)
- 12) พันธุ์อาลาฟิล (*P. purpureum* x *P. glaucum* Hybrid)
- 13) พันธุ์ทากาจิมา (*P. purpureum* cv. Tanegashima)
- 14) พันธุ์รุกโวน่า (*P. purpureum* cv. VrukWona)
- 15) พันธุ์ทีฟตัน (*P. purpureum* cv. Tifton)
- 16) พันธุ์มวกเหล็ก (*P. purpureum* Mauklek)
- 17) พันธุ์เพชรบูรณ์ (*P. purpureum* Phetchaboon)
- 18) พันธุ์กำแพงแสน (*P. purpureum* Kampaeng Saen)
- 19) พันธุ์จวินเฉ่า 4190 (*P. purpureum* Jinchao 4190)
- 20) พันธุ์หวานมหาสารคาม (*P. purpureum* Mahasarakham)
- 21) หญ้าไข่มุก (*Pennisetum glaucum*)

2. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของหญ้าเนเปียร์ 20 พันธุ์ และหญ้าไข่มุก ตามวิธีการของเยาวลักษณ์ และคณะ (2558) ซึ่งประยุกต์จากวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) เก็บใบอ่อนของหญ้ามาชั่งน้ำหนักให้ได้ ประมาณ 100 มิลลิกรัม บดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ย้ายตัวอย่างที่บดลงในหลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติม 2X CTAB buffer (2% CTAB, 2% PVP, 20 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 0.2% 2-

mercaptoethanol) ที่เตรียมสดใหม่และที่อุ่นไว้แล้วที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีและนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติม chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1 v/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ย้ายส่วนใสด้านบนไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Alcohol ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ปลอ่ยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม *RNase A* (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอมาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงตึงผิว (ยี่ห้อ Denovix รุ่น DS-11 spectrophotometer, USA) ที่ใช้ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่างต่อครั้ง โดยทำการวัดค่าการดูดซับแสง (absorbance) ที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) ซึ่งหน่วยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้คือ นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนความบริสุทธิ์ของ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะดูจากสัดส่วนการดูดซับแสงของตัวอย่างที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโนเมตร (A280) ซึ่งหากดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูงควรมีค่าระหว่าง 1.8 - 2.0 ($A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0$) หากสัดส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนจากโปรตีน คลอโรฟอร์ม หรือสารเคมีอื่นๆ

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

1) การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

คัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้จากหญ้าไข่มุกและหญ้าเนเปียร์ลูกผสม รวมจำนวน 36 ตำแหน่ง (Azevedo *et al.*, 2012; Kawube *et al.* 2015; Wang *et al.*, 2017) ซึ่งคัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายที่มีรายงานผลการศึกษาล่วงหน้าว่ามีให้โพลิมอร์ฟิซึมสูง หรือมีค่า polymorphic information content (PIC) ตั้งแต่ 0.6 ขึ้นไป

2) การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งประยุกต์จากวิธีการของ Kunkeaw *et al.* (2010) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ให้ได้ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ในหลอดทดลองด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งองค์ประกอบของปฏิกิริยา ประกอบด้วย

- 1) น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 10.05 ไมโครลิตร
- 2) บัฟเฟอร์ PCR (10X) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร
- 3) $MgCl_2$ (50 mM) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร
- 4) dNTP (10 mM) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร
- 5) โพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ (ครึ่งละเครื่องหมาย) (10 μ M) ปริมาตร 0.15 ไมโครลิตร
- 6) เอนไซม์ Taq polymerase (5U/ μ l) (Invitrogen, USA) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร
- 7) ดีเอ็นเอเริ่มต้น (10 ng) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร

องค์ประกอบของปฏิกิริยารวมทั้งหมด เท่ากับ 15 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ (C1000 Touch™ Thermal Cycler, Bio-Rad) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิและเวลาทำปฏิกิริยา ดังนี้

1. Pre-denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
2. Denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 55-62 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
5. Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ตั้งโปรแกรมทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 – 4 จำนวน 35 รอบเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งประยุกต์จากวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) เตรียมอะคริลาไมด์เจลที่ความเข้มข้น 5% ประกอบด้วย 5% polyacrylamide solution ปริมาตร 80 มิลลิลิตร 10% APS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ TEMED ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เมื่อแผ่นเจลแข็งตัวแล้วให้พรีรันเจล (pre-run) ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสที่สนามแม่เหล็กไฟฟ้า 1,200 โวลต์ 30 มิลลิแอมป์ 50 วัตต์ นาน 15 นาที จากนั้น ไปเปตสาร 98% formamide loading dye ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแต่ละตัวอย่าง แล้วนำไปป้อนด้วยเครื่อง PCR ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วนำออกมาเก็บบนน้ำแข็งทันที ล้างหลุมในแผ่นเจลก่อนด้วยสารละลายยูเรีย แล้วจึงโหลดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในแผ่นเจล จากนั้นให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านสนามแม่เหล็กไฟฟ้า 1,200 โวลต์ 30 มิลลิแอมป์ 50 วัตต์ นาน 2 – 2.5 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการรันเจล นำไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรทด้วยวิธีของ Benbouza *et al.* (2006) จนกระทั่งปรากฏแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจล ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอ่านผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3. การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหญ้าเนเปียร์ โดย score จำนวนอัลลีล (allele) เป็นตัวเลขเพื่อสร้างรูปแบบพันธุกรรมที่ได้จากแต่ละเครื่องหมายของแต่ละตัวอย่าง แล้วนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์และความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในตัวอย่างหญ้าเนเปียร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้โปรแกรม CERVUS version 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007) เพื่อวิเคราะห์ค่า Polymorphic information content (PIC) ค่า observed heterozygosity (H_o) และค่า expected heterozygosity (H_e) โดยค่า PIC จะบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่นำมาใช้ในการศึกษา ถ้าค่า PIC ระดับสูง ($PIC > 0.5$) แสดงถึงเครื่องหมายนั้นให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างสูง ค่า PIC ระดับปานกลาง ($PIC 0.25 - 0.5$) แสดงถึงเครื่องหมายนั้นให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างปานกลาง และค่า PIC ระดับต่ำ ($PIC < 0.25$) แสดงถึงเครื่องหมายนั้นให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างต่ำ (Botstein *et al.*, 1980) ในขณะที่ค่า H_o และ H_e เป็นค่าที่บ่งบอกถึงสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในตัวอย่างหญ้าเนเปียร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยค่า H_o และ H_e เข้าใกล้ 1 แสดงว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาอยู่ในระดับที่เพิ่มสูงขึ้น

นำข้อมูลรูปแบบพันธุกรรมไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TFGA (Miller, 1997) เพื่อหาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และนำไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ (phylogenetic dendrogram) ตามวิธีการของ unweighted pair-group method on the basis of arithmetic average (UPGMA)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

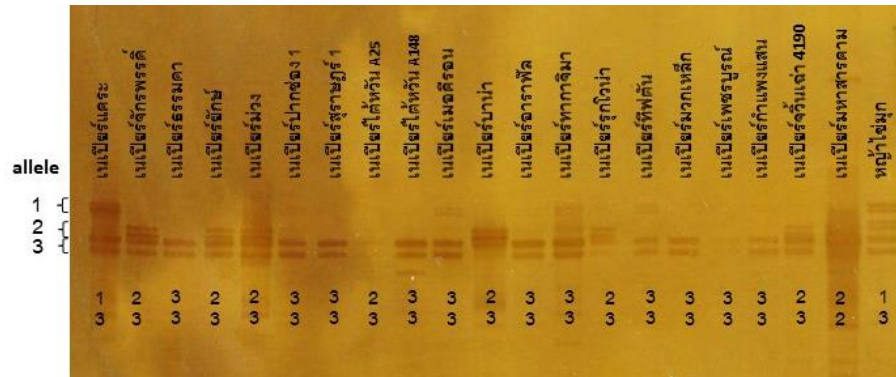
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ของหัวเนเปียร์ 20 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 36 ตำแหน่ง พบว่ามี 21 ตำแหน่ง ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (amplification) ได้ ประกอบด้วย เครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอ (DNA pattern) ไม่แตกต่างกัน (monomorphism) จำนวน 2 ตำแหน่ง และเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน (polymorphism) จำนวน 19 ตำแหน่ง โดยเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอเป็น polymorphism สามารถให้คะแนน (scoring) เพื่อบันทึกรูปแบบพันธุกรรมแบบ co-dominant ได้ มีจำนวน 13 ตำแหน่ง และที่ไม่สามารถอ่านค่าและบันทึกรูปแบบพันธุกรรมได้ มีจำนวน 6 ตำแหน่ง (ตารางที่ 1) เนื่องจากแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจนและอยู่ใกล้ชิดกันมากเกินไป (stutter bands) ซึ่งจะทำให้การอ่านค่าแถบดีเอ็นเอผิดพลาดได้ (สุริพร, 2546) แถบดีเอ็นเอที่สามารถบันทึกรูปแบบพันธุกรรมได้จะต้องมีความชัดเจนและอ่านค่าให้คะแนนได้ ดังแสดงในตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเครื่องหมาย P-S-151 ที่พบว่ามียาลิล 3 ขนาด แต่ละพันธุ์พบขนาดอัลลีลที่ลำดับเหมือนกันและแตกต่างกัน เช่น พันธุ์กระพอบอัลลีลลำดับที่ 0103 พันธุ์จักรพรรดิพบอัลลีลลำดับที่ 0203 พันธุ์ธรรมดาพบอัลลีล ลำดับที่ 0303 และพันธุ์ยักษ์พบอัลลีลลำดับที่ 0203 เป็นต้น (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

List No.	Marker name	Sequence	Tm (°C)	Amplification	DNA pattern	Scoring
1	CTM-8	5'-GCTGCATCGGAGTAGGGAA-3' 3'-CTCAGCAAGCACGCTGCTCT-5'	62	No	-	-
2	CTM-10	5'-GAGGCAAAAGTGGAGACAG-3' 3'-TTGATCCCCGGTCTATCGA-5'	58	Yes	Polymorphism	Yes
3	CTM-12	5'-GTTGCAAGCAGGAGTAGATCGA-3' 3'-CGCTCTGTAGGTTGAACCTCTT-5'	62	Yes	Polymorphism	Yes
4	CTM-59	5'-TCCTCGACATCCTCCA-3' 3'-GACACCTCGTAGCACTCC-5'	58	Yes	Monomorphism	-
5	PSMP2235	5'-GCTTTTCTGCTTCTCCGTAGAC-3' 3'-CCCAACAATAGCCACCAATAAGA-5'	62	No	-	-
6	PSMP2248	5'-TCTGTTTGTGGGTGAGGTCTTC-3' 3'-CGAATACGTATGGAGAACTGCGCATC-5'	62	Yes	Polymorphism	Yes
7	PSMP2255	5'-CATCTAAACACAACCAATCTGAAC-3' 3'-TGGCACTCTTAAATTGACGCAT-5'	58	Yes	Polymorphism	No
8	PSMP2266	5'-CAAGGATGGCTGAAGGGCTATG-3' 3'-TTTCCAGCCACACCAAGTAATC-5'	62	Yes	Polymorphism	Yes
9	PSMP2267	5'-GGAAGGCGTAGGGATCAATCTCAC-3' 3'-ATCCACCCGACGAAGGAAACGA-5'	62	Yes	Polymorphism	No
10	PGIRD5	5'-CAACCCAACCAATTATACTTATCTG-3' 3'-GCAACTCTTGCTTTCTTGG-5'	58	Yes	Polymorphism	No
11	PGIRD13	5'-CAGCAGCGAGAAGTTAGCA-3' 3'-GCGTAGACGGCGTAGATGAT-5'	58	Yes	Polymorphism	Yes
12	PGIRD21	5'-GCTATTGCCACTGCTTCACA-3' 3'-CCACCATGCAACAGCAATAA-5'	58	Yes	Polymorphism	Yes

ตารางที่ 1 (ต่อ) ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

List No.	Marker name	Sequence	Tm (°C)	Amplification	DNA pattern	Scoring
13	PGIRD25	5'-CGGAGCTCCTATCATTCCAA-3' 3'-GCAAGCCACAAGCCTATCTC-5'	58	Yes	Polymorphism	Yes
14	PGIRD46	5'-GAACAATTGCTTCTGTAATATTGCTT-3' 3'-GCCGACCAAGAAGCTTCATACA-5'	55	No	-	-
15	PGIRD56	5'-ATCACTCCTCGATCGGTGAC-3' 3'-ACCAGACACAGTGCCAGT-5'	58	Yes	Polymorphism	Yes
16	PGIRD57	5'-GGCCCCAAGTAACTTCCCTA-3' 3'-TCAAGCTAGGGCCAATGTCT-5'	58	Yes	Polymorphism	No
17	P-S-004	5'-TGAGGATCGATGTAATGCCA-3' 3'-CATTTGTTGAAAGCAGGGT-5'	55	Yes	Polymorphism	Yes
18	P-S-016	5'-CTTTCCTTATCTCCCCGAG-3' 3'-CATCCGAATTCGAAACCTA-5'	55	No	-	-
19	P-S-067	5'-ACATCTTTGTTCTGCTCGGC-3' 3'-TGCATGTACTGGTGGTGCAT-5'	55	No	-	-
20	P-S-077	5'-ACACACACACACACACGC-3' 3'-GTGTGGATGTACGATGCAGG-5'	55	No	-	-
21	P-S-084	5'-GAAGCCAGTTCCTCACTTG-3' 3'-GAGAGGTCCCTCGGCTACTT-5'	55	Yes	Monomorphism	-
22	P-S-085	5'-AGCTCCTCCAGAATTGACC-3' 3'-CGGAAGTGGTTCTTGCTGAT-5'	55	No	-	-
23	P-S-097	5'-TAGTAGTTGGGCGACAGCCT-3' 3'-GTACCTTTCGTCTTTCCCC-5'	55	No	-	-
24	P-S-135	5'-ATAGTCGTGCTGCTGCATCC-3' 3'-ACCACCATGCAGTTCCTGA-5'	55	No	-	-
25	P-S-151	5'-ATCCTCGAGTGGTGACCAAG-3' 3'-CGAGAAGGCCAAGGAGAAG-5'	65	Yes	Polymorphism	Yes
26	P-S-175	5'-GAAGAGCGGTGCTTGAG-3' 3'-CCATCGGCTTCTTCTTCTTG-5'	55	No	-	-
27	P-S-177	5'-AGCTCAGGTACTTCCAGCCA-3' 3'-GGCCTGGTCATTGTACATCC-5'	65	Yes	Polymorphism	Yes
28	P-S-186	5'-TTGCTCTTCTGCTCTTCCC-3' 3'-CTTCTGCTTCTCCGACCTT-5'	55	No	-	-
29	P-S-193	5'-CTTGATGAGCTCCAAGGGG-3' 3'-AGGAGCACGGCAAGATGAT-5'	55	No	-	-
30	Xipes0093	5'-GGATCTGCAGGTTTGGACAT-3' 3'-CCAAGCACTGAAACATGCAC-5'	58	Yes	Polymorphism	No
31	Xipes0191	5'-GAAGAACCTCCAGCTTTCCC-3' 3'-TTCTTCTCCTCAGCCTCTGC-5'	58	No	-	-
32	Xipes0219	5'-GGGGAAGAGATAGGTTGGT-3' 3'-AGCTGGGCAATAGCGAGAT-5'	58	Yes	Polymorphism	No
33	Phil227562	5'-TGATAAAGCTCAGCCACAAGG-3' 3'-ATCTCGGCTACGGCCAGA-5'	58	Yes	Polymorphism	Yes
34	Xcup14	5'-TACATCACAGCAGGGACAGG-3' 3'-CTGAAAGCCGAGCAGTATG-5'	58	No	-	-
35	Xcup63	5'-GTAAAGGGCAAGGCAACAAG-3' 3'-GCCCTACAAAATCTGCAAGC-5'	58	Yes	Polymorphism	Yes
36	XTXP278	5'-GGGTTTCAACTCTAGCCTACCGAATTCCT- 3'-ATGCCTCATCATGGTTCGTTTGCTT-5'	62	No	-	-



ภาพที่ 1 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเครื่องหมาย P-S-151 ของหญ้าเนเปียร์และหญ้าไข่มุกที่ได้จากวิธี polyacrylamide gel electrophoresis, หมายเลข 1-3 แสดงลำดับของขนาดอัลลีลที่อ่านค่าได้ในแต่ละตัวอย่าง

นำข้อมูลรูปแบบพันธุกรรมที่ได้จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 13 ตำแหน่ง มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในตัวอย่างหญ้าเนเปียร์โดยใช้โปรแกรม CERVUS version 3.0.7 พบว่าตัวอย่างหญ้าเนเปียร์ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 47 อัลลีล มีจำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 2 – 7 อัลลีล ค่าเฉลี่ย 3.62 อัลลีลต่อโลกัส โดยเครื่องหมาย PGIRD13 ให้จำนวนอัลลีลสูงสุด และเครื่องหมาย PSMP2248 PGIRD56 และ Xcup63 ให้จำนวนอัลลีลต่ำสุด มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.12 - 0.78 ค่าเฉลี่ย 0.36 โดยเครื่องหมาย PGIRD13 ให้ค่า PIC สูงสุด และเครื่องหมาย PSMP2248 ให้ค่า PIC ต่ำสุด โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่มีค่า PIC ระดับสูง ($PIC > 0.5$) ได้แก่ PSMP2266 และ PGIRD13 และค่า PIC ระดับปานกลาง ($PIC 0.25 - 0.5$) ได้แก่ PGIRD21 PGIRD25 PGIRD56 P-S-004 P-S-151 P-S-177 Phil227562 และ Xcup63 (ตารางที่ 2) เหมาะสมที่จะนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์ในอนาคต การประเมินค่า PIC ซึ่งพบว่ามีค่าเฉลี่ย 0.36 แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่นำมาใช้ในการทดลองทั้ง 13 ตำแหน่ง สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างหญ้าเนเปียร์อยู่ในระดับปานกลาง อาจเป็นเพราะเครื่องหมายที่นำมาใช้ในการทดลองมีจำนวนน้อยเกินไป จึงทำให้ค่าเฉลี่ย PIC อยู่ในระดับปานกลาง การเพิ่มจำนวนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในการทดลองให้มากยิ่งขึ้นจะช่วยเพิ่มโอกาสในการค้นพบตำแหน่งที่ให้ ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์มากยิ่งขึ้น เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างหญ้าเนเปียร์ พบว่ามีค่า observed heterozygosity (H_o) อยู่ระหว่าง 0.048 – 1.000 ค่าเฉลี่ย 0.467 โดยเครื่องหมาย Phil227562 ให้ค่า H_o สูงสุด และเครื่องหมาย PSMP2248 ให้ค่า H_o ต่ำสุด และค่า expected heterozygosity (H_e) อยู่ระหว่าง 0.136 - 0.825 ค่าเฉลี่ย 0.425 โดยเครื่องหมาย PGIRD13 ให้ค่า H_e สูงสุดและเครื่องหมาย PSMP2248 ให้ค่า H_e ต่ำสุด (ตารางที่ 2) ในการประเมินค่า H_o และ H_e ซึ่งพบว่ามีค่าเฉลี่ย 0.467 และ 0.425 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างหญ้าเนเปียร์อยู่ในระดับปานกลางค่อนข้างต่ำ อาจจะเนื่องจากกลุ่มตัวอย่างหญ้าเนเปียร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสมที่มีพ่อแม่พันธุ์เดียวกันจึงทำให้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง

2. การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์

นำข้อมูลรูปแบบพันธุกรรมมาวิเคราะห์หาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยโปรแกรม TFGA (ตารางที่ 3) พบว่าหญ้าเนเปียร์รวมถึงหญ้าไข่มุกที่นำมาใช้เป็น out group มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม

ตารางที่ 2 จำนวนอัลลีล ค่า heterozygosity และ polymorphic information content ที่วิเคราะห์จากข้อมูลรูปแบบพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์และหญ้าไข่มุก โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 13 ตำแหน่ง

Microsatellite markers	Number of alleles	Observed heterozygosity (H_o)	Expected heterozygosity (H_e)	Polymorphic information content (PIC)
CTM-10	4	0.095	0.224	0.21
CTM-12	4	0.150	0.233	0.22
PSMP2248	2	0.048	0.136	0.12
PSMP2266	6	0.619	0.584	0.53
PGIRD13	7	0.905	0.825	0.78
PGIRD21	3	0.286	0.333	0.30
PGIRD25	3	0.095	0.180	0.17
PGIRD56	2	0.286	0.483	0.36
P-S-004	3	0.650	0.522	0.40
P-S-151	3	0.429	0.417	0.35
P-S-177	3	0.600	0.496	0.43
Phil227562	5	1.000	0.581	0.47
Xcup63	2	0.905	0.508	0.37
Average	3.62	0.467	0.425	0.36

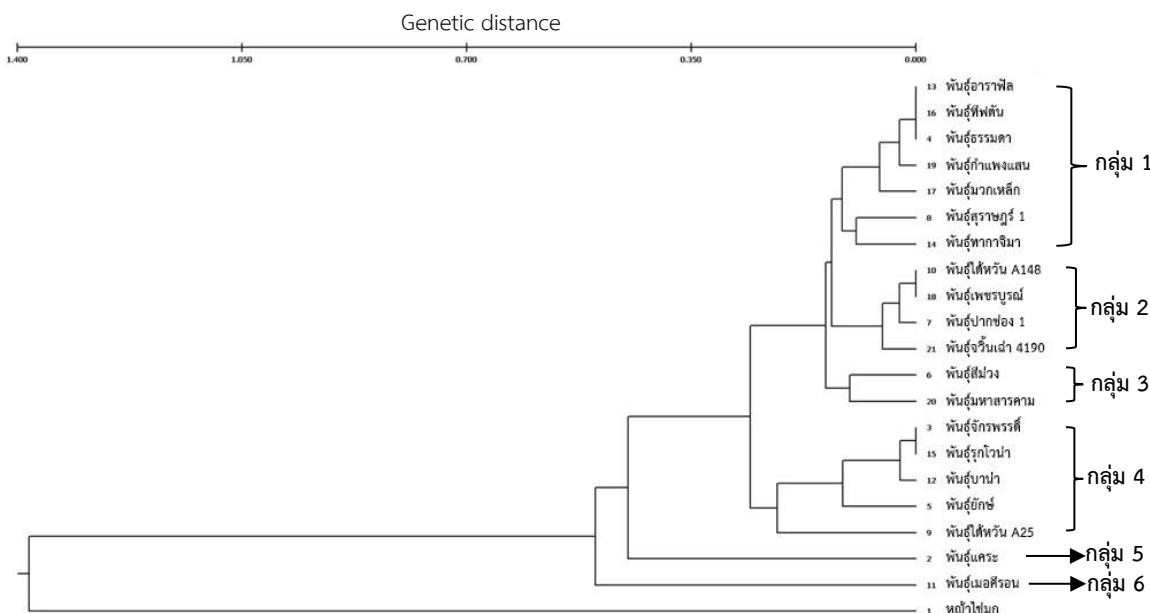
อยู่ระหว่าง 0.000 – 1.844 โดยหญ้าไข่มุกซึ่งเป็นคนละชนิดพันธุ์ (species) กับหญ้าเนเปียร์ชนิดอื่นๆ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุด เฉลี่ยเท่ากับ 1.445 ในขณะที่พันธุ์อาลาฟิล พันธุ์ทีฟตัน และพันธุ์ธรรมดา มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำสุด เฉลี่ยเท่ากับ 0.000 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความแตกต่างกันในระดับพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์และหญ้าไข่มุก ซึ่งค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่เข้าใกล้ 0 บ่งบอกว่าหญ้าเนเปียร์มีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำหรือมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง

เมื่อนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic dendrogram) ตามวิธี UPGMA (ภาพที่ 2) พบว่าหญ้าไข่มุกซึ่งมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุดถูกจำแนกออกจากกลุ่มหญ้าเนเปียร์อย่างชัดเจน ในขณะที่หญ้าเนเปียร์ จำนวน 20 พันธุ์ สามารถจัดกลุ่มจำแนกออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย พันธุ์อาลาฟิล พันธุ์ทีฟตัน พันธุ์ธรรมดา พันธุ์กำแพงแสน พันธุ์มวกเหล็ก พันธุ์สุราษฎร์ 1 และพันธุ์ทากาจิมา ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยใช้เครื่องหมาย ISSR ดังรายงานของเกียรติศักดิ์ และคณะ (2561) เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของหญ้าเนเปียร์ในกลุ่มนี้แล้วพบว่าเกือบทั้งหมดมีลักษณะทรงต้นสูงมาก โดยมีความสูงอยู่ระหว่าง 317 - 374 เซนติเมตร และมีความยาวแผ่นใบอยู่ระหว่าง 91 - 109 เซนติเมตร ยกเว้นพันธุ์มวกเหล็กที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างจากพันธุ์อื่นในกลุ่มนี้อย่างชัดเจน กล่าวคือ ต้นสูงเฉลี่ยเพียง 63 เซนติเมตร และมีความยาวแผ่นใบสั้น 58 เซนติเมตร (เกียรติศักดิ์ และคณะ, 2561) สาเหตุที่พันธุ์มวกเหล็กถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ เนื่องมาจากการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมเป็นการสร้างโดยใช้ข้อมูลความสัมพันธ์ของระยะห่างทางพันธุกรรมโดยดูจากข้อมูลทาง genotype เป็นหลัก ดังนั้นพันธุ์มวกเหล็กซึ่งเป็นพ่อพันธุ์ของพันธุ์สุราษฎร์ 1 (สมพล และคณะ, 2556) จึงมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมต่อกันสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของอานภาพและคณะ (2557) ที่รายงานเช่นกันว่าหญ้าเนเปียร์พันธุ์สุราษฎร์ 1 และพันธุ์มวกเหล็ก ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเมื่อจำแนกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมาย random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

ตารางที่ 3 แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของตัวอย่างหญ้าเนเปียร์และหญ้าไข่มุก (out group)

ตัวอย่าง		1.หญ้าไข่มุก	2.พันธุ์แคระ	3.พันธุ์จักรพรรดิ	4.พันธุ์ธรรมดา	5.พันธุ์ยักษ์	6.พันธุ์สีม่วง	7.พันธุ์ปากช่อง1	8.พันธุ์สุราษฎร์1	9.พันธุ์ไต้หวันA25	10.พันธุ์ไต้หวันA148	11.พันธุ์เมือตรอน	12.พันธุ์บ้านา	13.พันธุ์อาราฟัล	14.พันธุ์ทากาลิมา	15.พันธุ์ลูกโหนด	16.พันธุ์ทิฟตัน	17.พันธุ์มวกเหล็ก	18.พันธุ์เพชรบูรณ์	19.พันธุ์กำแพงแสน	20.พันธุ์มหาสารคาม	21.พันธุ์จันฉ่า 4190
1	หญ้าไข่มุก	*****																				
2	พันธุ์แคระ	0.503	*****																			
3	พันธุ์จักรพรรดิ	1.291	0.330	*****																		
4	พันธุ์ธรรมดา	1.634	0.478	0.279	*****																	
5	พันธุ์ยักษ์	1.743	0.425	0.105	0.130	*****																
6	พันธุ์สีม่วง	1.516	0.640	0.312	0.127	0.217	*****															
7	พันธุ์ปากช่อง1	1.204	0.452	0.288	0.130	0.288	0.187	*****														
8	พันธุ์สุราษฎร์1	1.252	0.326	0.223	0.086	0.154	0.215	0.154	*****													
9	พันธุ์ไต้หวันA25	1.315	0.503	0.217	0.211	0.187	0.241	0.248	0.286	*****												
10	พันธุ์ไต้หวันA148	1.386	0.503	0.288	0.130	0.288	0.187	0.025	0.121	0.248	*****											
11	พันธุ์เมือตรอน	0.719	0.559	0.619	0.430	0.668	0.510	0.367	0.419	0.692	0.405	*****										
12	พันธุ์บ้านา	1.411	0.403	0.024	0.370	0.130	0.337	0.381	0.324	0.241	0.381	0.743	*****									
13	พันธุ์อาราฟัล	1.634	0.478	0.279	0.000	0.130	0.127	0.130	0.086	0.211	0.130	0.430	0.370	*****								
14	พันธุ์ทากาลิมา	1.439	0.348	0.202	0.134	0.171	0.227	0.171	0.092	0.164	0.171	0.520	0.293	0.134	*****							
15	พันธุ์ลูกโหนด	1.291	0.330	0.000	0.279	0.105	0.312	0.288	0.223	0.217	0.288	0.619	0.024	0.279	0.202	*****						
16	พันธุ์ทิฟตัน	1.634	0.478	0.279	0.000	0.130	0.127	0.130	0.086	0.211	0.130	0.430	0.370	0.000	0.134	0.279	*****					
17	พันธุ์มวกเหล็ก	1.634	0.503	0.381	0.049	0.248	0.154	0.130	0.148	0.211	0.130	0.392	0.480	0.049	0.164	0.381	0.049	*****				
18	พันธุ์เพชรบูรณ์	1.386	0.503	0.288	0.130	0.288	0.187	0.025	0.121	0.248	0.000	0.405	0.381	0.130	0.171	0.288	0.130	0.130	*****			
19	พันธุ์กำแพงแสน	1.844	0.463	0.229	0.025	0.108	0.108	0.081	0.059	0.255	0.081	0.430	0.322	0.025	0.111	0.229	0.025	0.078	0.081	*****		
20	พันธุ์มหาสารคาม	1.291	0.403	0.163	0.102	0.134	0.102	0.134	0.121	0.217	0.134	0.405	0.187	0.102	0.171	0.163	0.102	0.158	0.134	0.081	*****	
21	พันธุ์จันฉ่า 4190	1.492	0.503	0.223	0.130	0.223	0.130	0.051	0.188	0.187	0.051	0.444	0.248	0.130	0.171	0.223	0.130	0.130	0.051	0.081	0.078	*****



ภาพที่ 2 แสดงการจัดกลุ่มในรูป phylogenetic dendrogram ของหญ้าเนเปียร์และหญ้าไข่มุก โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 13 ตำแหน่ง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พันธุ์ไต้หวัน A148 พันธุ์เพชรบูรณ์ พันธุ์ปากช่อง 1 และพันธุ์จวินเฉา 4190 สอดคล้องกับรายงานของเกียรติกศักดิ์ และคณะ (2561) ที่รายงานเช่นกันว่า พันธุ์ไต้หวัน A148 พันธุ์เพชรบูรณ์ พันธุ์ปากช่อง 1 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเมื่อจำแนกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมาย ISSR ในขณะที่พันธุ์จวินเฉา 4190 ซึ่งเป็นพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่ทราบที่มาอย่างชัดเจน พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมกับหญ้าเนเปียร์ทั้ง 3 พันธุ์ เท่ากับ 0.051 (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่าหญ้าพันธุ์จวินเฉา 4190 และหญ้าเนเปียร์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงมากจากการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ และเมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของหญ้ากลุ่มนี้พบว่ามีลักษณะต้นสูงทั้งหมด

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย พันธุ์สีม่วงและพันธุ์หวานมหาสารคาม พบว่ามีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกัน 0.102 (ตารางที่ 2) ซึ่งมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง แต่ลักษณะสัณฐานวิทยาของทั้งสองพันธุ์แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยพันธุ์สีม่วงมีลำต้นและใบเป็นสีม่วง ความสูงของต้นเฉลี่ย 309 เซนติเมตร (เกียรติกศักดิ์ และคณะ, 2561) ในขณะที่ พันธุ์มหาสารคาม มีลำต้นและใบเป็นสีเขียว ความสูงของต้น ประมาณ 60 เซนติเมตร (ชาวฤทธิ์และเมธา, 2560) ซึ่งทั้งสองพันธุ์ดังกล่าวไม่ทราบที่มาที่ชัดเจน การที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าทั้งสองพันธุ์มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก อาจมีความเป็นไปได้ว่าทั้งสองพันธุ์มีพ่อหรือแม่พันธุ์เป็นต้นเดียวกันหรือเป็นลูกผสมจากพ่อแม่พันธุ์เดียวกัน

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์จักรพรรดิ พันธุ์ภูพานา พันธุ์บ้านป่า พันธุ์ยักษ์ และพันธุ์ไต้หวัน A25 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยใช้เครื่องหมาย ISSR ดังรายงานของเกียรติกศักดิ์ และคณะ (2561) เช่นเดียวกันกับที่ Azevedo *et al.* (2012) รายงานเช่นกันว่าพันธุ์ภูพานาและพันธุ์ไต้หวัน A25 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเมื่อจำแนกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของหญ้าเนเปียร์ในกลุ่มนี้แล้วพบว่า มีลักษณะต้นสูงมากอยู่ระหว่าง 268-379 เมตร และมีจุดเด่นของกลุ่มนี้คือความยาวแผ่นใบยาวมากอยู่ระหว่าง 106-136 เซนติเมตร (เกียรติกศักดิ์ และคณะ, 2561)

กลุ่มที่ 5 คือ พันธุ์แคระ

กลุ่มที่ 6 คือ พันธุ์เมือศิริอน

หญ้าเนเปียร์พันธุ์แคระและพันธุ์เมือศิริอน มีระยะห่างทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.559 (ตารางที่ 3) ซึ่งจำแนกกลุ่มออกจากกันอย่างชัดเจนจากการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ ในขณะที่รายงานของ เกียรติศักดิ์ และคณะ (2561) พบว่าหญ้าสองพันธุ์นี้มีลักษณะสัณฐานวิทยาด้านความสูงที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยพันธุ์แคระมีลักษณะต้นสูงปานกลางเฉลี่ย 159 เซนติเมตร และพันธุ์เมือศิริอน มีลักษณะต้นสูงมากเฉลี่ย 268 เซนติเมตร แต่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันและถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเมื่อตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมาย ISSR เนื่องจากหญ้าเนเปียร์พันธุ์เมือศิริอนเป็นลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แคระและหญ้าเนเปียร์ (โคลน) ที่ให้ผลผลิตสูง (Burton, 1989) จึงทำให้ทั้งสองพันธุ์มีความใกล้ชิดในระดับพันธุกรรม การศึกษาในครั้งนี้ทำให้เห็นได้ชัดว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกความแตกต่างในระดับพันธุกรรมมากกว่าเครื่องหมาย ISSR เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แน่นอน (พัชรี และคณะ, 2556) และสามารถตรวจสอบลักษณะ co-dominant ได้ จึงทำให้สามารถจำแนกพันธุ์แคระและพันธุ์เมือศิริอนออกจากกันได้

ข้อมูลการจัดกลุ่มในรูป phylogenetic dendrogram ของหญ้าเนเปียร์ทั้ง 20 พันธุ์ ช่วยบอกระดับความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งจะช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถตัดสินใจคัดเลือกพันธุ์ผสมข้ามที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมสูงๆ เพื่อป้องกันการเกิดการผสมตัวเอง (In-breeding) ที่อาจจะทำให้ได้ลูกผสมที่ด้อยกว่าพ่อ-แม่พันธุ์ได้ เนื่องจากหญ้าเนเปียร์เป็นพืชผสมข้าม มีพันธุกรรมอยู่ในสภาพ heterozygous เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นการผสมตัวเองอาจจะทำให้ยีนด้อยที่ส่งผลต่อลักษณะในทางลบ มีการกระจายตัวและแสดงออกได้ (ชเนษฐ ม้าลำพอง, 2562)

3. การวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่จำเพาะกับสายพันธุ์หญ้าเนเปียร์

ข้อมูลรูปแบบพันธุกรรมที่ score ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 13 ตำแหน่ง ถูกนำมาแสดงดังตารางที่ 4 โดยรูปแบบพันธุกรรมที่เป็น homozygous จะแสดงขนาดของอัลลีลเหมือนกัน เช่น 0101 0202 0303 0404 0505 เป็นต้น และรูปแบบพันธุกรรมที่เป็น heterozygous จะแสดงขนาดของอัลลีลที่แตกต่างกัน เช่น 0103 0102 0203 0304 0407 เป็นต้น จากผลการวิเคราะห์พบว่ามีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 8 ตำแหน่ง ที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์หญ้าเนเปียร์ มีดังนี้

1. เครื่องหมาย CTM-10 แสดงรูปแบบ “0103” ที่จำเพาะกับพันธุ์แคระ และรูปแบบ “0404” ที่จำเพาะกับพันธุ์เมือศิริอน
2. เครื่องหมาย CTM-12 แสดงรูปแบบ “0204” ที่จำเพาะกับพันธุ์เมือศิริอน และรูปแบบ “0304” ที่จำเพาะกับพันธุ์ทากาจิมา
3. เครื่องหมาย PSMP2266 แสดงรูปแบบ “0104” ที่จำเพาะกับพันธุ์แคระ รูปแบบ “0304” ที่จำเพาะกับพันธุ์สีม่วง รูปแบบ “0505” ที่จำเพาะกับไต้หวัน A25 และรูปแบบ “0204” ที่จำเพาะกับพันธุ์เมือศิริอน
4. เครื่องหมาย PGIRD13 แสดงรูปแบบ “0207” ที่จำเพาะกับพันธุ์แคระ รูปแบบ “0104” ที่จำเพาะกับพันธุ์ยักษ์ รูปแบบ “0404” ที่จำเพาะกับพันธุ์สีม่วง รูปแบบ “0303” ที่จำเพาะกับพันธุ์เมือศิริอน และรูปแบบ “0405” ที่จำเพาะกับพันธุ์หวานมหาสารคาม

ตารางที่ 4 ข้อมูลรูปแบบอัลลีลของหญ้านเนเปียร์และหญ้าไข่มุกที่อ่านค่าได้จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 13 ไพรเมอร์

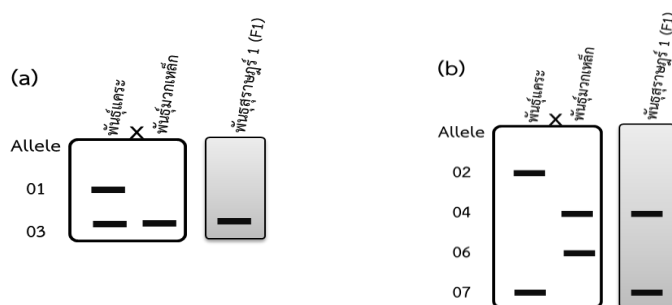
List No.	Sample name	CTM-10	CTM-12	PSMP2248	PSMP2266	PGIRD13	PGIRD21	PGIRD25	PGIRD56	P-S-004	P-S-151	P-S-177	Phil22756	Xcup63
1	หญ้าไข่มุก	0102	0101	0101	0102	0203	0202	0202	0202	0203	0103	0202	0304	0202
2	หญ้านเนเปียร์แคระ	0103*	0104	0102	0104*	0207*	0203	0103*	0202	0000	0103	0102	0205	0102
3	หญ้านเนเปียร์จักรพรรดิ	0303	0404	0202	0406	0107	0303	0303	0202	0303	0203	0203	0205	0102
4	หญ้านเนเปียร์ธรรมดา	0303	0404	0202	0404	0406	0303	0303	0101	0203	0303	0102	0205	0102
5	หญ้านเนเปียร์ยักษ์	0303	0404	0202	0404	0104*	0303	0303	0102	0303	0203	0103	0205	0102
6	หญ้านเนเปียร์สีม่วง	0303	0404	0202	0304*	0404*	0303	0303	0101	0203	0203	0202	0105*	0102
7	หญ้านเนเปียร์ปากช่อง 1	0303	0404	0202	0405	0507	0203	0303	0101	0203	0303	0202	0205	0102
8	หญ้านเนเปียร์สุราษฎร์ 1	0303	0000	0202	0404	0407	0303	0303	0102	0203	0303	0102	0205	0102
9	หญ้านเนเปียร์ไต้หวัน A25	0303	0404	0202	0505*	0406	0303	0303	0102	0303	0203	0102	0205	0202
10	หญ้านเนเปียร์ไต้หวัน A148	0303	0404	0202	0405	0507	0103	0303	0101	0203	0303	0202	0205	0102
11	หญ้านเนเปียร์เม็กซิคอน	0404*	0204*	0202	0204*	0303*	0203	0203	0102	0202	0303	0202	0205	0102
12	หญ้าบาน่า	0303	0404	0202	0406	0107	0303	0303	0202	0303	0202*	0203	0205	0102
13	หญ้านเนเปียร์อาลาฟัล	0303	0404	0202	0404	0406	0303	0303	0101	0203	0303	0102	0205	0102
14	หญ้านเนเปียร์ทากาจิมา	0303	0304*	0202	0405	0407	0303	0303	0102	0103*	0303	0102	0205	0102
15	หญ้านเนเปียร์รุโกโนน่า	0303	0404	0202	0406	0107	0303	0303	0202	0303	0203	0203	0205	0102
16	หญ้านเนเปียร์ที่พัตน์	0303	0404	0202	0404	0406	0303	0303	0101	0203	0303	0102	0205	0102
17	หญ้านเนเปียร์มวกเหล็ก	0303	0404	0202	0405	0406	0303	0303	0101	0202	0303	0102	0205	0102
18	หญ้านเนเปียร์เพชรบูรณ์	0303	0404	0202	0405	0507	0103	0303	0101	0203	0303	0202	0205	0102
19	หญ้านเนเปียร์กำแพงแสน	0303	0404	0202	0404	0407	0303	0303	0101	0203	0303	0000	0205	0102
20	หญ้าหวานมหาสารคาม	0303	0404	0202	0404	0405*	0303	0303	0102	0203	0203	0202	0205	0102
21	หญ้านเนเปียร์จันเฉ่า 4190	0303	0404	0202	0405	0507	0303	0000	0101	0203	0203	0202	0205	0102

* หมายถึง : รูปแบบพันธุกรรมที่มีความจำเพาะกับสายพันธุ์หญ้านเนเปียร์

5. เครื่องหมาย PGIRD25 แสดงรูปแบบ “0103” ที่จำเพาะกับพันธุ์แคระ
6. เครื่องหมาย P-S-004 แสดงรูปแบบ “0103” ที่จำเพาะกับพันธุ์ทากาจิมา
7. เครื่องหมาย P-S-151 แสดงรูปแบบ “0202” ที่จำเพาะกับพันธุ์บาน่า
8. เครื่องหมาย Phil227562 แสดงรูปแบบ “0105” ที่จำเพาะกับพันธุ์สีม่วง

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้ได้เครื่องหมายไมโครแซเทลโลไท์ที่จำเพาะกับหญ้าเนเปียร์ จำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แคระ พันธุ์ยักษ์ พันธุ์สีม่วง พันธุ์ไต้หวัน A25 พันธุ์เมอติรอน พันธุ์บาน่า พันธุ์ทากาจิมา และพันธุ์หวานมหาสารคาม แต่ยังไม่พบเครื่องหมายไมโครแซเทลโลไท์ที่จำเพาะกับหญ้าเนเปียร์สายพันธุ์ที่เหลือได้ อาจจะต้องศึกษาเครื่องหมายไมโครแซเทลโลไท์เพิ่มเติมในอนาคต สำหรับเครื่องหมายไมโครแซเทลโลไท์ที่จำเพาะกับสายพันธุ์หญ้าเนเปียร์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์หรือตรวจสอบพันธุ์สงสัยที่ไม่ทราบที่มาได้อย่างชัดเจนและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ รูปแบบพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ยังช่วยยืนยันยืนยันความเป็นลูกผสมของหญ้าเนเปียร์ พันธุ์สุราษฎร์ 1 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แคระและพันธุ์มวกเหล็ก โดยพบว่าพันธุ์สุราษฎร์ 1 ได้รับอัลลีลจากพันธุ์แคระและพันธุ์มวกเหล็กในทุกเครื่องหมายไมโครแซเทลโลไท์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ยกเว้น เครื่องหมาย CTM-12 และ P-S-004 ที่ไม่สามารถอ่านแถบดีเอ็นเอได้ในพันธุ์สุราษฎร์ 1 และพันธุ์แคระ ซึ่งแสดงรูปแบบ “0000” ในทั้งสองตำแหน่ง (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ยังพบว่าพันธุ์สุราษฎร์ 1 ได้รับอัลลีลจากพันธุ์มวกเหล็กมากกว่าพันธุ์แคระ จึงทำให้พันธุ์สุราษฎร์ 1 และพันธุ์มวกเหล็กมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมต่อกันสูงกว่าพันธุ์แคระ การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์แคระและพันธุ์มวกเหล็กไปยังพันธุ์สุราษฎร์ 1 ได้ ยกตัวอย่างการวิเคราะห์ความเป็นพ่อแม่ลูกกันของทั้ง 3 พันธุ์ จากรูปแบบพันธุกรรมที่ได้จากเครื่องหมาย CTM-10 และ PGIRD13 โดยเครื่องหมาย CTM-10 ให้รูปแบบ “0103” ในพันธุ์แคระ และรูปแบบ “0303” ในพันธุ์มวกเหล็ก ซึ่งพันธุ์สุราษฎร์ 1 ได้รับอัลลีล 03 จากทั้งพ่อและแม่พันธุ์ และให้รูปแบบ “0303” ซึ่งก็คือลักษณะอัลลีลเป็นแบบ homozygous (ภาพที่ 3-a) ในขณะที่เครื่องหมาย PGIRD13 ให้รูปแบบ “0207” ในพันธุ์แคระ และรูปแบบ “0406” ในพันธุ์มวกเหล็ก ซึ่งพันธุ์สุราษฎร์ 1 ได้รับอัลลีลรูปแบบ “0407” ซึ่งมีลักษณะอัลลีลเป็นแบบ heterozygous เพราะได้รับอัลลีลมาจากทั้งพันธุ์มวกเหล็กและพันธุ์แคระ (ภาพที่ 3-b) การถ่ายทอดทางพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่ลูกผ่านการวิเคราะห์รูปแบบพันธุกรรมนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการช่วยคัดเลือกลูกผสมในงานปรับปรุงพันธุ์หญ้าเนเปียร์ในอนาคตได้



ภาพที่ 3 การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์แคระและพันธุ์มวกเหล็กไปยังพันธุ์สุราษฎร์ 1 โดยวิเคราะห์จากรูปแบบพันธุกรรมที่ได้จากเครื่องหมาย CTM-10 (a) และ PGIRD13 (b)

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์ 20 พันธุ์ และหญ้าไข่มุก 1 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 36 ตำแหน่ง และตรวจหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ให้รูปแบบพันธุกรรมที่จำเพาะกับหญ้าเนเปียร์แต่ละชนิดพันธุ์ สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 36 ตำแหน่ง มีเครื่องหมายที่ให้ข้อมูลรูปแบบพันธุกรรมแตกต่างกันแบบ co-dominant จำนวน 13 ตำแหน่ง ได้แก่ CTM-10 CTM-12 PSMP2248 PSMP2266 PGIRD13 PGIRD21 PGIRD25 PGIRD56 P-S-004 P-S-151 P-S-177 Phil22756 และ Xcup63 โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 47 อัลลิล มีจำนวนอัลลิลอยู่ระหว่าง 2 – 7 อัลลิล ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.62 อัลลิลต่อโลกัส ค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.12 - 0.78 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.36 บ่งบอกว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่มีค่า PIC อยู่ในระดับปานกลาง (PIC อยู่ในช่วง 0.25 – 0.5) และระดับสูง (PIC > 0.5) เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหญ้าเนเปียร์ต่อไป และค่า H_e อยู่ระหว่าง 0.136 - 0.825 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.425 บ่งบอกว่าประชากรหญ้าเนเปียร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมปานกลาง

2. การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic dendrogram โดยใช้ค่า genetic distance ทำให้สามารถจัดจำแนกหญ้าเนเปียร์ออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย พันธุ์อาลาฟิล พันธุ์ทีฟตัน พันธุ์ธรรมดา พันธุ์กำแพงแสน พันธุ์มวกเหล็ก พันธุ์สุราษฎร์ 1 พันธุ์ทากาจิมา กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พันธุ์ไต้หวัน A148 พันธุ์เพชรบูรณ์ พันธุ์ปากช่อง 1 พันธุ์จันเฒ่า 4190 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย พันธุ์สีม่วง พันธุ์หวานมหาสารคาม กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย พันธุ์จักรพรรดิ พันธุ์รุกไวน่า พันธุ์บาน่า พันธุ์ยักษ์ พันธุ์ไต้หวัน A25 กลุ่มที่ 5 คือ พันธุ์แคะ กลุ่มที่ 6 คือ พันธุ์เมือศิริอน

3. การวิเคราะห์หาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่จำเพาะกับพันธุ์หญ้าเนเปียร์พบว่าไม่มีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 8 ตำแหน่ง ได้แก่ CTM-10 CTM-12 PSMP2266 PGIRD13 PGIRD25 P-S-004 P-S-151 และ Phil22756 ที่มีความจำเพาะกับชนิดพันธุ์หญ้าเนเปียร์ และมีหญ้าเนเปียร์ จำนวน 8 พันธุ์ เท่านั้นที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สามารถระบุชนิดพันธุ์ได้ ได้แก่ พันธุ์แคะ พันธุ์ยักษ์ พันธุ์สีม่วง พันธุ์ไต้หวัน A25 พันธุ์เมือศิริอน พันธุ์บาน่า พันธุ์ทากาจิมา และพันธุ์หวานมหาสารคาม หญ้าเนเปียร์สายพันธุ์ที่เหลือจำเป็นต้องศึกษาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพิ่มเติมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่คัดเลือกมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 36 ตำแหน่ง พบว่ามีเพียง 13 ตำแหน่งเท่านั้นที่ให้ลักษณะ polymorphism ที่สามารถอ่านลายพิมพ์ดีเอ็นเอและให้คะแนนได้ ซึ่งยังน้อยเกินไปสำหรับการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรหญ้าเนเปียร์ เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างหญ้าเนเปียร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง การเพิ่มเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จะช่วยเพิ่มการจำแนกพันธุ์หญ้าเนเปียร์ในกลุ่มตัวอย่างนี้ได้ชัดเจนและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ที่อนุเคราะห์พันธุ์หญ้าไข่มุกสำหรับการใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณผู้เชี่ยวชาญจันทกานต์ อรณนันท ผู้เชี่ยวชาญเกียรติศักดิ์ กล้าเอม คุณมะฤทัย จันทธิ์ธิติ รศ.ดร.กนกพร ไตรวิทยากรณ์ และ ดร.ศุภจิต สระเพชร ที่ให้คำปรึกษาจนผลงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอบคุณสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2563. ความต้องการโภชนะของโคนมในประเทศไทย (ฉบับแรก ปี พ.ศ. 2563). พิมพ์ครั้งที่ 1 พ.ศ. 2563 จำนวน 500 เล่ม จัดพิมพ์โดย สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์.
- เกียรติศักดิ์ กล้าเอม เยาวลักษณ์ แหม่งปิง พิเชษฐ์ จันทรเป็ง. 2561. การจำแนกพันธุ์หญ้าเนเปียร์ด้วยลักษณะ สันฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมาย Inter simple sequence repeat (ISSR). รายงาน ผลงานวิจัยสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ ประจำปี พ.ศ. 2561. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. น. 292-312.
- เชาวฤทธิ์ มาปะโท และ เมธา วรรณพัฒน์. 2560. หญ้าหวาน (*Pennisetum purpureum* cv. Mahasarakham) หญ้าทางเลือกใหม่สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง. วารสารโคนม ฉบับที่ 34, น.57-63.
- ชนเชษฐ์ ม้าลำพอง. 2562. หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พิมพ์ครั้งที่ 1, จำนวน 342 หน้า.
- พัชร ลาโคตร ชัชวาล จันทรา สุริยรัตน์ สุริพร เกตุงาม. 2556. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของสบู่ดำที่สามารถนำไปใช้ในพืชชนิดอื่นที่มีความสัมพันธ์ภายในสกุลและต่างสกุล. แก่นเกษตร 41 ฉบับพิเศษ 1, น. 636-642.
- เยาวลักษณ์ แหม่งปิง รัตติกาล ปวงแก้ว อานูภาพ เสี่ยงสาย ศศิพร ช่อลำไย. 2558. การเปรียบเทียบวิธีการสกัด ดีเอ็นเอจากใบของหญ้าและถั่วอาหารสัตว์บางชนิด. รายงานผลงานวิจัย สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ ประจำปี พ.ศ. 2558. น 182-193.
- สำนักพัฒนาอาหารสัตว์. 2559. หญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1. เผยแพร่บนเว็บไซต์สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ เมื่อวันที่ 9 กรกฎาคม 2559. แหล่งที่มา <http://nutrition.dld.go.th/nutrition/index.php/using-joomla/132-2015-08-06-07-46-16/435-1>
- สมพล ไวกัญญา อภิชาติ บุญเรืองขาว จันทกานต์ อรณนันท. 2556. การพัฒนาพันธุ์หญ้าเนเปียร์แคระและการใช้ประโยชน์. รายงานผลงานพัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์ ประจำปี 2556 สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรม ปศุ สัตว์. น. 70-80.
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีที่ 5 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม-ธันวาคม 2546, น. 37-49.

- อานูภาพ เสี่ยงสาย เกียรติศักดิ์ กล้าเอ้ม จรีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา. 2557. การสร้างลายพิมพ์จีโนมของหญ้าเนเปียร์บางสายพันธุ์ในประเทศไทยด้วยเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). โพสต์ออนไลน์ในงานประชุมงานพัฒนาเทคโนโลยีอาหารสัตว์ ประจำปี 2557.
- Azevedo, A.L.S., Costa, P.P., Machado, J.C., Machando, M.A., Pereira, A.V. and F.J.S., Ledo. 2012. Cross species amplification of *Pennisetum glaucum* microsatellite markers in *Pennisetum purpureum* and genetic diversity of Napier grass accessions. J. Crop Science, vol. 4, p 1776 – 1785.
- Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P. and G, Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnology, Agronomy and Society and Environment, vol 10: p 77-81.
- Bhandari, A.P., Sukanya, D.H. and C.R. Ramesh. 2006. Application of isozyme data in fingerprinting napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) for germplasm management. Genetic Research Crop Evolution, vol 53: p 253–264.
- Botstein D, White R.L., Skolnick M and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetic, vol 32(3): p 314-331.
- Burton G.W. 1989. Registration of “Merkeron” napiergrass. Crop Science, vol 29: p 1327.
- Doyle J. J. and J. L., Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, vol. 19: p 11-15.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. and T.C., Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology, vol 16: p 1099-1106.
- Kawube, G., Alicai, T., Wanjala, B., Njahira, M., J., Awalla and R., Skilton. 2015. Genetic Diversity in Napier Grass (*Pennisetum purpureum*) Assessed by SSR markers. Agricultural Science, vol. 7, p 147-155.
- Kunkeaw, S., Tangphatsornruang, S., Smith, D.R. and K., Triwitayakorn. 2010. Genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on AFLP and SSR markers. Plant Breeding, vol 129(1): p 112-115.
- Li, C., Bai. G., Chao, S. and Z., Wang. 2015. A high-density SNP and SSR consensus map reveals segregation distortion regions in wheat. Biomed Research Int.

- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analyses TFPGA V13: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular genetic data, Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff.
- Na, C., Sollenberger, L.E., Erickson, J.E., Woodard, K.R., Castillo, M.S., Mullenix, M.K., Vendramini, J.M.B. and M.L., Silveira. 2015. Management of perennial warm-season bioenergy grasses. II. Seasonal differences in elephant grass and energy cane morphological characteristics affect responses to harvest frequency and timing. *Bioenergy Research*, vol 8: p 618–626.
- Wang, J., Chen, Z., Jin, S., Hu, Z., Y., Huang and Y. Diao. 2017. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers based on a full-length cDNA library of Napier Grass (*Pennisetum purpureum* Schum). *Gene Genomic*, vol. 39(3): p 1.