ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษ์เศรษฐกิจ)

ปริญญา

พฤกษ์เศรษฐกิจ | สายวิชาวิทยาศาสตร์

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การจำแนกโซมาโคลนของอ้อยที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสโดยเครื่องหมาย SSR และ RAPD และการวิเคราะห์เซลล์พันธุศาสตร์

Identification of Sugarcane Somaclones Derived from Callus Culture by SSR and RAPD Markers and Cytogenetical Analysis

นามผู้วิจัย นายศรุต ธรรมจำรัส

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์สิริภัทร์ พราหมณีย์, Ph.D.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, Ph.D.)

กรรมการ .....

(รองศาสตร์จารย์เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, D.Agr.)

หัวหน้าสายวิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนวรรณ พาณิชพัฒน์, ปร.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจำแนกโซมาโคลนของอ้อยที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสโดยเครื่องหมาย SSR และ RAPD และการวิเคราะห์เซลล์พันธุศาสตร์

Identification of Sugarcane Somaclones Derived from Callus Culture by SSR and RAPD Markers and Cytogenetical Analysis

โดย

นายศรุต ธรรมจำรัส

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษ์เศรษฐกิจ)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศรุต ธรรมจำรัส 2553: การจำแนกโซมาโคลนของอ้อยที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสโดยเครื่องหมาย SSR และ RAPD และการวิเคราะห์เซลล์พันธุศาสตร์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษ์เศรษฐกิจ) สาขาพฤกษ์เศรษฐกิจ สายวิชาวิทยาศาสตร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สิริภัทร์ พราหมณีย์, Ph.D. 169 หน้า

อ้อยพันธุ์ K84-200 ใช้ในการชักนำให้เกิด somaclonal variation โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อนและยอดอ่อน ชักนำแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ปริมาณ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนถ่ายอาหาร 5 ครั้ง (15 สัปดาห์) ก่อนชักนำยอดในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ตรวจสอบความแปรผันของโซมาโคลนในระดับโมเลกุลด้วยวิธี SSR RAPD และ SSR ร่วมกับ RAPD ผลแสดงค่า similarity coefficient และค่า similarity matrix วิธี SSR ได้ค่าระหว่าง 0.80-1.00 และ 0.6785-1.0000 วิธี RAPD ได้ค่าระหว่าง 0.65-1.00 และ 0.4404-1.0000 วิธี SSR ร่วมกับ RAPD ได้ค่าระหว่าง 0.72-1.00 และ 0.5625-1.0000 ตามลำดับ phylogenetic tree สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ 6 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 5 และ 6 เป็นโซมาโคลนที่รอดจากอาหารที่เติม NaCl 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งพันธุกรรมแตกต่างจากอ้อยพันธุ์ K84-200 อย่างชัดเจน นอกจากนี้การวิเคราะห์ในระดับเซลล์พันธุศาสตร์ของอ้อยพันธุ์ K84-200 มีจำนวนโครโมโซม 2n=80, 83, 100 และ 108 ส่วนโซมาโคลนที่ศึกษาพบการแปรผันของจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ 2n=53-146 และบางโซมาโคลนโครงสร้างของโครโมโซมแตกหัก ได้แก่ 9S5M 99L5M 38L5M 65L5N 17L5M(T) 59L5M(T) และ 93L5M(T) พบการเพิ่มและลดลงของจำนวนโครโมโซมแบบ anueploid อย่างชัดเจน และโซมาโคลน 2L5M พบจำนวนโครโมโซมหลากหลายมากที่สุดคือ 2n=80, 90, 100, 110, 116, 146 ชุด และตัวอย่างที่รอดในอาหารเติม NaCl 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่แตกต่างจากพันธุ์ K84-200 โดยโซมาโคลน 11S5N(T) มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างออกไปมากที่สุดในกลุ่มคือ 2n=63, 65, 72 และ 90 โครโมโซม 2n=80 พบมากที่สุด 11 โซมาโคลนจากทั้งหมด 17 โซมาโคลน ส่วนใหญ่จำนวนเซลล์ที่พบคือ 2n=80 พบ 77 เซลล์จาก 193 เซลล์ จากผลการตรวจสอบในระดับโมเลกุลและวิเคราะห์ในระดับเซลล์พันธุศาสตร์สามารถตรวจสอบการเกิด somaclonal variation ได้อย่างชัดเจน

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sarut Thumjamras 2010: Identification of Sugarcane Somaclones Derived from Callus Culture by SSR and RAPD Markers and Cytogenetical Analysis. Master of Science (Economic Botany), Major Field: Economic Botany, Division of Science. Thesis Advisor: Associate Professor Siripatr Prammanee, Ph.D. 169 pages.

Sugarcane variety K84-200 was studied for somaclonal variation. Somaclones derived from callus culture. For callus induction, leaf and shoot explants were subjected to *in vitro* culture on MS medium supplemented with 3 mg/l 2,4-D for 5 times of subculture (15 weeks). Shoots were regenerated in MS medium without growth regulator. Molecular variations were detected by SSR marker, RAPD marker and SSR marker collaborate with RAPD marker. The result showed that the similarity coefficient and similarity matrix were in range of 0.80-1.00 and 0.6785-1.0000 for SSR marker, 0.65-1.00 and 0.4404-1.0000 for RAPD marker and 0.72-1.00 and 0.5625-1.0000 for SSR marker collaborate with RAPD marker, respectively. The phylogenetic tree can distinguish genetic group of sugarcane somaclone into 6 groups. In the group 5 and 6, all somaclones could be survived in 1.5% NaCl (w/v) medium which their genetics showed distinctly different from K84-200. The genetic difference of somaclones from sugarcane also clearly in cytological analysis. Sugarcane variety K84-200 contain the chromosome number of 2n=80, 83, 100 and 108. The study found variation of chromosome number from 2n=53 to 2n=146 and also found structural aberrant. Chromosome deletion were found in some somaclones as 9S5M 38L5M 65L5N 17L5M(T) 59L5M(T) and 93L5M(T). Aneuploid were mostly found in this work. The most diverse number of chromosome was found in 2L5M somaclone which chromosome numbers were 2n=80, 90, 100, 110, 116, 146. The mostly common chromosome numbers from 11 of 17 somaclones was 2n=80. The chromosome set of 2n=80 was frequently found in 77 cells from 193 cells. Result showed that molecular level detection and cytogenetical analysis were verifying the occurrence of somaclonal variation clearly.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สิริภัทร์ พราหมณีย์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา วิธีการดำเนินการวิจัย ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมถึงให้กำลังใจมาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก และ รองศาสตราจารย์ ดร.เรวัต เลิศฤทัยโยธิน กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ที่ให้คำปรึกษา ชี้แนะในการดำเนินการวิจัย และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กฤษณา กฤษณพุกต์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และขอบพระคุณทุกท่านที่เกี่ยวข้องกับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รวมถึงผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี จังหวัดสุพรรณบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ต้นพันธุ์อ้อยที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน มา ณ ที่นี้ด้วย ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลือในด้านต่างๆ ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และแม่บ้าน คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ที่ช่วยเหลือในด้านต่างๆ และเป็นกำลังใจให้เสมอ

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นผู้ให้ ผู้เสียสละอันยิ่งใหญ่ สนับสนุนการศึกษา เป็นแรงบันดาลใจให้ข้าพเจ้ามาโดยตลอด จนประสบความสำเร็จได้ในทุกวันนี้

กราบกรานแทบท่านเบื้อง ธรณี
ศิษย์และลูกหลานมี จักษ์ไซร้
พระคุณคำจำจด สอนสั่ง สถิตนา
สำเร็จลุล่วงได้ ผ่องแผ้ว สวัสดี

ศรุต ธรรมจำรัส
มีนาคม 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(9)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	26
ผลและวิจารณ์	37
ผล	37
วิจารณ์	69
สรุปและข้อเสนอแนะ	74
สรุป	74
ข้อเสนอแนะ	75
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	76
ภาคผนวก	89
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	169

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การปรับปรุงพันธุ์อ้อยด้วยวิธี somaclonal variation	12
2	ปริมาณเกลือและอิทธิพลของเกลือในดินต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช	17
3	คุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค SSR	23
4	คุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค RAPD	24
5	การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของอ้อยที่เปลี่ยนอาหารใหม่ 5 ครั้ง (สัปดาห์ที่ 15) นำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ (MS) และ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+NAA+kinetin)	41
6	การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของอ้อยที่เปลี่ยนอาหารใหม่ 10 ครั้ง (สัปดาห์ที่ 30) นำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ (MS) และ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+NAA+kinetin)	42
7	จำนวนโครโมโซมและจำนวนเซลล์ที่พบของอ้อยในแต่ละ somaclone	54
8	ความถี่ของจำนวนเซลล์อ้อยที่มีจำนวนโครโมโซมต่างกัน	55
9	คุณสมบัติของ somaclone อ้อย	68

ตารางผนวกที่

1	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ MCSA068G08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	108
2	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ MCSA175A08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	109
3	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ MCSA180E02 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	110

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
4	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ MCSA205C07 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	111
5	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SMC226CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	112
6	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SMC319CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	113
7	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SMC319CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	114
8	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SMC863CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	115
9	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ universal primer 2 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	116
10	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ universal primer 3 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	118
11	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ universal primer 6 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	120
12	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-02 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	122
13	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-04 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	124
14	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	126
15	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-01 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	127

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
16	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-10 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	129
17	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-16 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	130
18	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-18 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง	131
19	ค่าความคล้ายคลึง (similarity matrix) ของอ้อยที่ผ่านเทคนิค SSR ทั้งหมด 58 ตัวอย่าง	133
20	ค่าความคล้ายคลึง (similarity matrix) ของอ้อยที่ผ่านเทคนิค RAPD ทั้งหมด 58 ตัวอย่าง	145
21	ค่าความคล้ายคลึง (similarity) ของอ้อยที่ผ่านเทคนิค SSR ร่วมกับ RAPD ทั้งหมด 58 ตัวอย่าง	157

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไลการตอบสนองต่อสภาวะความเค็มของพืชในการเคลื่อนย้ายไอออนของเกลือออกนอกเซลล์และเก็บไว้ภายในแวคิวโอล	21
2	การเพาะเลี้ยงแคลลัสอ้อย	39
3	การเจริญเติบโตของต้นอ้อยระยะต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านแคลลัส	40
4	แถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก somaclone ของอ้อย	46
5	phylogenetic tree ของอ้อย 58 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 โดยอาศัยข้อมูลความเหมือน (similarity) ที่คำนวณจากเทคนิค SSR	51
6	phylogenetic tree ของอ้อย 58 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 โดยอาศัยข้อมูลความเหมือน (similarity) ที่คำนวณจากเทคนิค RAPD	52
7	phylogenetic tree ของอ้อย 58 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 โดยอาศัยข้อมูลความเหมือน (similarity) ที่คำนวณจากเทคนิค SSR และ RAPD	53
8	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 9S5M	56
9	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 10S5M	57
10	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 50S5M	57
11	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 56S5N	58
12	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 99S5M	58
13	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 2L5M	59
14	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 21L5M	60
15	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 38L5M	61
16	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 65L5N	62
17	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 83L5M	63
18	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 11S5N(T)	64
19	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 34S5N(T)	64
20	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 75S5M(T)	65
21	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 17L5M(T)	65

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 59L5M(T)	66
23	โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 93L5M(T)	66
24	โครโมโซมของอ้อยพันธุ์ K84-200	67

ภาพผนวกที่

1	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ MCSA068G08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))	90
2	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ MCSA175A08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))	91
3	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ MCSA180E02 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))	92
4	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ MCSA205C07 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))	93
5	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ SMC226CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))	94
6	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ SMC319CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))	95

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
7	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ SMC477CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน Φx-174/*Hin*fI))	96
8	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ SMC863CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))	97
9	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ universal primer 2 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD	98
10	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ universal primer 3 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD	99
11	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ universal primer 6 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD	100
12	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-02 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD	101
13	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-04 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD	102
14	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD	103
15	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-01 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD	104
16	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-10 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD	105
17	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-16 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD	106

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-18 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD 107

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
AFLP	=	amplified fragment length polymorphism
CCS	=	commercial cane sugar
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EST	=	expressed sequence tag
FAO	=	food and agriculture organization
MS	=	Murashige and Skoog (1962)
NAA	=	α-naphthalene acetic acid
NMU	=	nitrosomethylurea
OD	=	optical density
PCR	=	polymerase chain reaction
PEG	=	polyethylene glycol
PIC	=	polymorphism information content
RAPD	=	random amplified polymorphic DNA
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SSR	=	simple sequence repeat หรือ microsatellite
UPGMA	=	unweighted pair group method using arithmetic average
X	=	basic chromosome number

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การจำแนกโซมาโคลนของอ้อยที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสโดยเครื่องหมาย SSR และ RAPD และการวิเคราะห์เซลล์พันธุศาสตร์

Identification of Sugarcane Somaclones Dirived from Callus Culture by SSR and RAPD Markers and Cytogenetical Analysis

คำนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศไทย ปัญหาที่ทำให้ผลผลิตอ้อยโดยรวมลดน้อยลงมีหลายสาเหตุ ได้แก่ ปัญหาที่เกิดจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม โรคและแมลงศัตรูพืชเข้าทำลาย เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์อ้อยให้เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ปลูก รวมถึงสามารถต้านทานโรคและแมลงศัตรูพืชได้ ซึ่งการทำให้สารพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปเป็นสิ่งสำคัญประการแรกของนักปรับปรุงพันธุ์ที่จะทำให้ได้พันธุ์อ้อยใหม่ๆ เกิดขึ้น โดยทั่วไปแล้วใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งใช้เวลาค่อนข้างนานและใช้แรงงานมากในการคัดเลือกต้นพันธุ์ที่ต้องการ การที่จะทำให้พันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปในระยะเวลาอันสั้นประหยัดแรงงาน และกำหนดทิศทางความต้องการได้ คือการใช้เทคนิคที่ทำให้สารพันธุกรรมแปรผันไปจากเดิม หรือเรียกว่า somaclonal variation ซึ่งวิธีการนี้เป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อพืชที่ศึกษาผ่านกระบวนการเกิดแคลลัส (callus) เป็นระยะเวลาหนึ่ง หรือใช้สารเคมีที่ช่วยทำให้เกิดความแปรผันทางพันธุกรรม สามารถคัดเลือกพันธุ์ที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว การศึกษามีในพืชหลายชนิด เช่น กระเทียม (Al-Zahim *et al*.,1999) อ้อย (Arencibia *et al*., 1999, Zucchi *et al*., 2002 and Khan *et al*., 2004) เป็นต้น ความแปรผันทางพันธุกรรมสามารถตรวจสอบโดยการศึกษาจำนวนโครโมโซมที่เปลี่ยนแปลงไปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetic) ร่วมกับการใช้การตรวจสอบทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ มีความละเอียดของข้อมูลสูง และตอบปัญหาเกี่ยวกับการเกิด somaclonal variation ในอ้อยได้ รวมถึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาพันธุ์อ้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของ somaclone ของอ้อยที่เกิดจากวิธี somaclonal variation ด้วยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม และสารพันธุกรรม เพื่อจะนำอ้อยที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมดังกล่าว ใช้ในการพัฒนาอ้อยให้มีลักษณะตามต้องการต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมทั้งในระดับดีเอ็นเอและโครโมโซมของอ้อยที่พัฒนาจากวิธี somaclonal variation

เพื่อศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมทั้งในระดับดีเอ็นเอและโครโมโซมในโซมาโคลนที่ทนเค็มและไม่ทนเค็ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

อ้อยเชิงเศรษฐกิจ

อ้อยเป็นพืชที่มนุษย์รู้จักและใช้ประโยชน์มานาน ตามหลักฐานพบว่าใช้ในการอุปโภคและบริโภคมากว่า 2200 ปี เชื่อว่าถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในนิวกินี และหมู่เกาะใกล้เคียงของนิวกินี อ้อยจัดอยู่ใน tribe Andropogoneae วงศ์ Gramineae ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Saccharum* spp. ชื่อสามัญคือ sugarcane ด้วยความที่อ้อยเป็นพืชที่ให้ความหวาน นำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายรูปแบบ จึงมีการพัฒนาสายพันธุ์ให้เหมาะสมอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน อ้อยพันธุ์ปลูกในปัจจุบันจึงเป็นลูกผสมแบบ Inter-specific hybrid ระหว่างพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *S. officinarum, S. spontaneum, S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinense*. และ *S. edule*. รวมถึงพัฒนาจากอ้อยลูกผสมชนิดอื่นๆ อีกมากมาย (Sharpe, 1998) และมีพันธุกรรมเป็น heterozygous (Poehlman and Sleper, 1995)

ในประเทศไทยอ้อยนิยมปลูกเป็นการค้าเนื่องจากนำมาใช้ประโยชน์ในการอุปโภคบริโภคได้หลากหลายรูปแบบ ผลผลิตที่ได้หลักคือ น้ำตาล นอกจากนี้ยังแปรรูปเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน น้ำมันเชื้อเพลิง ผลิตแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์กระดาษจากชานอ้อย ฯลฯ ประเทศไทยผลิตอ้อยได้เป็นลำดับที่ 4 ของโลก รองจากประเทศบราซิล อินเดีย และจีน (Food and Agriculture Organization [FAO], 2007) ไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยมากถึง 6.5 ล้านไร่ สามารถผลิตอ้อยได้ประมาณ 64 ล้านตันต่อปี มูลค่าการส่งออกน้ำตาลทรายดิบและน้ำตาลทรายขาวในปี 2551 รวมไม่ต่ำกว่า 47,000 ล้านบาท และพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในทุกๆ ปี อย่างไรก็ตามผลผลิตอ้อยต่อไร่โดยเฉลี่ยเท่ากับ 11.15 ตันต่อไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) บ่งบอกถึงศักยภาพการผลิตอ้อยในเชิงคุณภาพที่ยังคงด้อยกว่าประเทศคู่แข่งรายใหญ่อื่นๆ สาเหตุอาจเนื่องมา จากปัญหาพื้นที่เพาะปลูกไม่เหมาะสม สภาพดินฟ้าอากาศ หรือสายพันธุ์อ้อยที่ไม่เหมาะกับสภาพแวดล้อม ดังนั้นการพัฒนาสายพันธุ์อ้อยให้สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเป็นทางออกหนึ่งที่ช่วยลดปัญหาเรื่องผลผลิตได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของพืชที่ใช้เทคนิค somaclonal variation

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทั่วไปเพื่อต้องการขยายพันธุ์ให้ได้พืชที่มีลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) เหมือนต้นแม่เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น แต่มีบางกรณีพืชที่ชักนำให้เป็นต้นใหม่มีลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิม โดย Heinz and Mee (1969) สังเกตเห็นว่าอ้อยที่ชักนำให้เป็นต้นใหม่โดยผ่านการเกิดแคลลัสของกระบวนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอด ใบ และก้านช่อดอกในอาหารสังเคราะห์ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างไปจากเดิม และมีความแปรผันของจำนวนโครโมโซมเกิดขึ้น จึงทำให้เป็นที่สนใจของนักวิจัยด้านปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจทำให้เกิดลักษณะใหม่ที่มีบทบาทสำคัญต่อพืชนั้นๆ ได้คุณสมบัติที่ดีเพิ่มมากขึ้น หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ดีขึ้นด้วยการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ทำให้ผลผลิตต่อต้นเพิ่มมากขึ้น ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช หรือแม้กระทั่งทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งและทนทานความเค็ม (Jain, 2001) จากข้อสังเกตดังกล่าวพืชมีพันธุกรรมที่แปรผันไปจากต้นแม่เดิมโดยผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เรียกว่า somaclonal variation (Larkin and Scowcroft, 1981) ซึ่งมีสาเหตุมาจากการแปรผันในหลายลักษณะ ดังนี้

การแปรผันในระดับโครโมโซมเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรมและการแสดงออกทางฟีโนไทป์ เป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของโครโมโซม เช่น การเพิ่มหรือลดจำนวน ขนาด และรูปร่าง ของโครโมโซม งานวิจัยจำนวนหนึ่งแสดงให้เห็นถึงการแปรผันดังกล่าว เช่น รายงานของ Gupta (1998) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวบาร์เล่ย์ ผลแสดงให้เห็นถึงความผิดปกติจากการเกิด somaclonal variation ต่อจำนวนและตำแหน่งเซนโตรเมียร์ของโครโมโซม (22+1 ring, 7+29 telocentric และ 22+2 dicentric) เปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซม พบตัวอย่างที่เป็น haploid (2n = x = 7) triploid (2n = 3x = 21) tetraploid (2n = 4x = 28) และ octaploid (2n = 8x = 56) ด้วยเช่นกัน ส่วนในรายงานของ Ladyzynski *et al.* (2002) ทดสอบเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแตงกวา *Cucumis sativas* L. พบว่าในชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนิน เป็นเวลา 10 เดือน มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างไปจากเดิม 62.5 เปอร์เซ็นต์ ชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 18 เดือน มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างไปจากเดิม 57.9 เปอร์เซ็นต์ ในชุดการทดลองที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซินเป็นเวลา 36 เดือน และ 12 เดือน พบว่าระดับโครโมโซมเปลี่ยนไปเป็น tetraploid และ mixoploid ทั้งหมด ส่วนชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนินเป็นเวลา 10 เดือน และชุดการทดลองที่ชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นระยะเวลานาน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็น tetraploid เท่านั้น (33.3 เปอร์เซ็นต์ และ 55.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนการศึกษาในอ้อยพบว่าจำนวนโครโมโซมของอ้อยพันธุ์ H37-1933 และ H50-7209 มีความแปรผันในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตั้งแต่ 2n = 94 ถึง 2n = 120 (Heinz and Mee, 1969, 1971) ส่วนรายงานของ Do *et al.* (1999) ตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของ *Allium tuburosum* Rottl. Ex. Spreng. พันธุ์ป่า เมื่อชักนำให้เกิดแคลลัสพบว่ามีการแปรผันของจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ 2n = 28, 29, 30, 31 และ 33 ซึ่งจากเดิมคือ 2n = 4x = 32 พบว่าต้นที่จำนวนโครโมโซมแปรผันไปเป็น 2n = 30 มีลักษณะที่ดีที่สุด และมีการเจริญเติบโตในอัตราที่สูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ นอกจากนี้ Wen *et al.* (2004) พบว่าโครโมโซมบางส่วนของละอองเรณูที่มีโครโมโซมแบบ haploid เพิ่มจำนวนขึ้นอีกเท่าหนึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงละอองเรณู (anther culture) ของผักกาดหอมผ่านการเกิดแคลลัส เป็นต้น

นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมในระหว่างการแบ่งเซลล์ อาจทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมขึ้นได้ ได้แก่ การขาดหายไป (deletion) การเพิ่มขึ้น (duplication) การเชื่อมต่อกันแบบกลับทิศทางของโครโมโซม (inversion) และการย้ายของชิ้นส่วนโครโมโซมหนึ่งไปยังอีกโครโมโซมหนึ่งที่ไม่เป็นคู่กัน (translocation) ลำดับเบสหรือยีนที่มีผลต่อการแสดงออกทางฟีโนไทป์มีการเคลื่อนย้ายตำแหน่งหรือสลับตำแหน่งจากเดิม ทำให้เกิดความหลากหลายขึ้นทางพันธุกรรม (อมรา, 2546) ในทำนองเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวโพด เมื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่พบว่าโครโมโซมเกิดการแตกหักทั้งหมด 11 เปอร์เซ็นต์ โดยในส่วนนี้มีโครโมโซมเกิด translocation 65 เปอร์เซ็นต์ และ deletion 35 เปอร์เซ็นต์ (Earle and Kuehnle, 1990)

การตรวจสอบจำนวนและโครงสร้างของโครโมโซมในอ้อยด้วยเทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์มีความสำคัญ เช่น การนับจำนวนโครโมโซมของต้นพืชที่แปรผันเปรียบเทียบกับจำนวนโครโมโซมของต้นควบคุม การทำคาริโอไทป์ การย้อมสีโครโมโซม เป็นต้น เนื่องด้วยอ้อยเป็นพืชที่มีความหลากหลายมีชุดโครโมโซมและมีโครโมโซมเป็นจำนวนมาก การศึกษาจึงต้องอาศัยวิธีการตรวจสอบที่ให้ประสิทธิภาพที่ดี วิธีการมีหลากหลายวิธีขึ้นกับความเหมาะสมของตัวอย่างพืช หรือแนวทางการศึกษา เช่น วิธี leaf squash technique (สุชีลา, 2530) เป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของพืชได้ โดยการนำตาอ่อนของพืชแช่ในสารละลาย paradichlorobenzene และทำ hydrolysis เพื่อให้ผนังเซลล์ของอ้อยอ่อนตัว หลังจากนั้นย้อมด้วยสี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

aceto-carmine หลังจากนั้นศึกษาจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการใช้วิธีการดังกล่าวกับอ้อยพันธุ์ป่าพบว่าใน 10 ตัวอย่าง อ้อยมีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 64, 72, 80 และ 88 จำนวนต้น 5, 2, 1 และ 2 ต้นพันธุ์ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาบริเวณปลายรากของอ้อยทำได้ด้วยวิธี enzymatic maceration/air-drying (EMA) ย้อมด้วยสารละลายสี Giemsa 2 เปอร์เซ็นต์ ก่อนถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยฟิล์มขาว-ดำ ร่วมกับการใช้เครื่องมือในการจำแนกบทบาทของโครโมโซมด้วย computer-aided imaging technology ซึ่งให้ผลที่ชัดเจน (Ha *et al.,* 1999) นอกจากนี้ยังพบวิธีที่ใช้ได้ผลกับพืชชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากการทดลองในอ้อยแล้ว เช่น ในข้าว โดยการศึกษาโครโมโซมบริเวณปลายราก ใช้วิธีการแช่รากพืชใน α- bromo-naphthalene ตรึงเซลล์ด้วย acetic ethanol และย้อมสีด้วย aceto-carmine ผลที่ได้หลังจากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถใช้ได้ผลดีเช่นกัน (Chatterjee and Gupta, 1997) ซึ่งวิธีการมีความใกล้เคียงกับการทดลองของ Kumar and Mathur (2004) ใน *Pisum sativum* L. ใช้แคลลัสแทนการใช้ปลายรากเป็นตัวอย่างในการศึกษาโครโมโซม ส่วนวิธีของ Anamthawat-jonsson (2003) และ Chokchaichamnankit *et al*. (2007) ใช้หลักการแบบเดียวกันคือ แช่ตาอ่อนและยอดอ่อนของพืชในน้ำเย็น (4˚C) เป็นเวลา 23-27 ชั่วโมง แทนการแช่ในสารเคมีต่างๆ ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ทั้งนี้เพื่อให้การแบ่งเซลล์อยู่ในระยะเมทาเฟส (metaphase) ก่อนการตรึงเซลล์ เนื่องจากเป็นระยะการแบ่งนิวเคลียสที่ศึกษาได้ชัดเจนที่สุด หลังจากนั้นใช้เอนไซม์ cellulase และ pectinase ย่อยผนังเซลล์และศึกษาโครโมโซมด้วยวิธีการ protoplast dropping ผลที่ได้ให้ประสิทธิภาพสูงและสามารถศึกษาโครโมโซมได้อย่างชัดเจน รวมถึงใช้ได้ดีกับพืชที่มีโครโมโซมขนาดเล็ก เช่น birch (*Betula*) ที่มีขนาดโครโมโซมประมาณ 0.4-5 ไมโครเมตรเท่านั้น

การแปรผันในระดับโมเลกุล ทำให้ลักษณะที่แสดงออกทางฟีโนไทป์ของพืชที่เกิดเป็นต้นใหม่หลังจากผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปลี่ยนไป คล้ายคลึงกับการผ่าเหล่าหรือยีนใดยีนหนึ่งเปลี่ยนไปทำให้เกิดลักษณะที่ผิดปกติ เช่น ด่าง แคระ เป็นต้น สาเหตุประการหนึ่งอาจเกิดจาก transposable elements บางครั้งอาจเรียกว่า jumping gene หรือ insertion elements (อมรา, 2546) กล่าวคือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสายสั้นๆ สามารถเคลื่อนย้ายจากตำแหน่งที่อยู่เดิมเข้าแทรกในตำแหน่งใหม่ภายในจีโนมและอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ ได้ ในอ้อยพบว่ามีโอกาสเกิดการแทรกของชิ้นดีเอ็นดังกล่าวที่กลุ่ม activator (AC), mutator (MuDR), suppressor-mutator (En/Spm) และ mariner (Rossi *et al.,* 2001) ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แสดงออกมาจึงมีความผิดปกติ ส่วนความผิดปกติในกระบวนการ DNA methylation เป็นสาเหตุที่ส่งผลให้เกิด somaclonal variation เช่นกัน เนื่องจากเป็นกลไกสำคัญที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไซโตซีน (cytosine) การสังเคราะห์โปรตีนและการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอที่ไม่ถูกต้องหรือเปลี่ยนไป ยีนที่แสดงหน้าที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เดิมเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย รวมถึงอาจยับยั้งการแสดงออกของยีนเกิดขึ้นในช่วงการเกิดเอ็มบริโอ (somatic embryogenesis) ในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่จากการแปรผันของสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นเองส่วนใหญ่แล้วไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้ หรือเรียกว่า epigenetic (Jain, 2001)

ในการควบคุมการเกิด somaclonal variation ให้มีทิศทางที่ต้องการนั้นจะต้องประกอบด้วยปัจจัยหลายประการ โดยมุ่งเน้นที่ลักษณะฟีโนไทป์ที่แสดงออกเป็นสำคัญ ซึ่งปัจจัยต่างๆ ที่มีส่วนกำหนดการเกิด somaclonal variation ให้เกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนครั้งในการเปลี่ยนถ่ายเนื้อเยื่อ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ชนิดของพืช อายุของพืช ชิ้นส่วนหรือตำแหน่งของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ช่วงเวลาการชักนำให้เกิดต้นใหม่ (Ogura, 1990) สายพันธุ์พืชแต่ละชนิด (Martin *et al*., 2002) ส่วนประกอบในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Ladyzynski *et al*., 2002) เป็นต้น และ Bouman and De Klerk (2001) ยังพบอีกว่าความแตกต่างของการเกิด somaclonal variation ของ *Begonia* เมื่อพัฒนาแคลลัสให้เป็นยอดหลังจากที่เพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ nitrosomethylurea (NMU) ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 2 และ10 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้การเกิด somaclonal variation เพิ่มมากขึ้นในทิศทางเดียวกับการเพิ่มความเข้มข้นของ NMU ได้แก่ 1.5, 7.8, 27.7 และ 46.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อีกทั้งศึกษาถึงชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ที่นำมาทดลอง ผลปรากฏว่าชิ้นเนื้อเยื่อที่ตำแหน่งต่างกันการเกิดการแปรผันของสารพันธุกรรมแตกต่างกันด้วยเช่นกัน ปัจจัยที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นเพียงปัจจัยที่อาจทำให้เกิด somaclonal variation แต่ยังคงควบคุมลักษณะและทิศทางการเกิดผลที่ต้องการได้ค่อนข้างยากเช่นเดียวกัน

วิธีหนึ่งที่จะได้ลักษณะของพืชที่เปลี่ยนแปลงไปตามความต้องการขึ้นอยู่กับการคัดเลือก ซึ่งมีความจำเป็นอย่างมากเนื่องด้วย somaclonal variation มีทิศทางที่ไม่แน่นอน ดังนั้นจึงขึ้นอยู่กับว่าผู้วิจัยต้องการพืชในลักษณะใด ต้องใช้การคัดเลือกในทิศทางนั้นๆ ตัวอย่างเช่น Griesbach (1989) คัดเลือกต้น *Hemero callis* หรือ Daylily ให้มีลักษณะต้นเตี้ยแคระเพื่อพัฒนาต้นให้เหมาะสมต่อความต้องการของตลาด โดยคัดเลือกจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม casein hydrolysate จำนวน 2 กรัมต่อลิตร ซึ่งสารดังกล่าวจำเป็นต่อการกำหนดทิศทางการคัดเลือกลักษณะต้นเตี้ยแคระของพืชชนิดนี้ แต่อย่างไรก็ตามจากการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมกลับพบว่าโครโมโซมมีจำนวนเท่าเดิม (2n = 2x = 22) หรือในการทดลองของ Bozorgipour and Snape (1997) คัดเลือกข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ทนทานต่อสาร difenzoquat ทำได้โดยคัดเลือกแคลลัสจากชิ้นส่วนต้นอ่อน ถ่ายเนื้อเยื่อลงอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูตร MS ที่เติม difenzoquat และ atrazine ในระดับต่างๆ (5, 10 และ 50 ไมโครโมลาร์) ข้าวสาลีที่ได้จากการชักนำให้เกิดต้นสามารถทนต่อการฉีดพ่นสาร difenzoquat ได้ และจากการตรวจสอบทำให้ทราบว่าลักษณะดังกล่าวเกิดขึ้นเอง ซึ่งไม่ได้มาจากความแปรผันที่ได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ (Non-heritable) ซึ่งผู้วิจัยให้ความเห็นว่าการใช้วิธีการคัดเลือกพืชที่ทนต่อสารกำจัดวัชพืชด้วยวิธีดังกล่าวสามารถใช้ได้ดี ส่วนการศึกษาในพีช (Peach) เพื่อให้ต้านทานเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. pruni และ *Pseudomonas syringae* pv. syringae โดยคัดเลือก somaclonal variation จากแคลลัสที่มาจากชิ้นส่วนเมล็ดอ่อนของพีชพันธุ์ Redharven จากการตรวจสอบด้วยวิธี detached-leaf bioassay พบว่าโคลนที่ 122-1 สามารถต้านทานเชื้อดังกล่าวได้ดีกว่าพันธุ์ดั้งเดิม (Hammerschlag, 2000) ส่วนการคัดเลือกพืชทนแล้งวิจัยโดย Matheka *et al.* (2008) ผ่านการเกิด somaclonal variation ในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธีการคัดเลือกต้นข้าวโพด (*Zea mays* L.) ในอาหารสูตร N6 (Chu, 1978) ที่เติม manitol ร้อยละ 3.28 และ 5.28 ของปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งหมด และเติม polyethylene glycol (PEG-6000) ร้อยละ 18 และ 20 ของปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งหมด เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าได้ต้นที่ผ่านการทดสอบใน manitol และ polyethylene glycol จำนวน 6 และ 2 ต้นตามลำดับ ได้พันธุกรรมแตกต่างจากต้นเดิมอีกด้วย หรือในการทดลองของ Biswas *et al.* (2009) คัดเลือกโคลนสตรอเบอร์รี่ (*Fragaria* sp.) พันธุ์ผสม (*fragaria* x *ananassa* Duch.) ที่ผ่านกระบวนการเกิด somaclonal variation เช่นกัน โดยทดลองปลูกในสภาพจริงของประเทศบังคลาเทศเพื่อคัดเลือกต้น เก็บบันทึกผลลักษณะของสตรอเบอร์รี่ที่มีลักษณะตามที่ต้องการ เช่น ขนาดและจำนวนของหน่อ จำนวนวันในการออกดอก จำนวนดอกต่อต้น จำนวนผลต่อต้น น้ำหนักผลเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์การรอดในช่วงฤดูร้อน เป็นต้น พบว่าได้ต้นที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือก 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มเหมาะสมที่จะนำไปปลูกเพื่อการค้าต่อไป

การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอ ยีน หรือ โปรตีนที่แปรผันเนื่องจากการเกิด somaclonal variation สามารถตรวจสอบได้ เช่น ในรายงานของ Linacero *et al.* (2000) วิเคราะห์ความแปรผันของดีเอ็นเอในต้นข้าวไรย์ (Rye) ที่พัฒนาให้เป็นแคลลัสจากต้นอ่อนและชิ้นส่วนดอก พบว่าลักษณะทางสัณฐานของข้าวไรย์แปรผันไปถึง 40 เปอร์เซ็นต์ โดยข้าวไรย์หนึ่งต้นอาจแปรผันได้มากกว่าหนึ่งลักษณะ ระดับอัตราส่วนการผ่าเหล่าต่อต้นคิดเป็น 1-12 เท่า สารพันธุกรรมของแคลลัสที่กล่าวมาข้างต้น ให้แถบแสดงผลของการวิเคราะห์ทางชีววิทยาโมเลกุล random amplified polymorphic DNA (RAPD) แตกต่างกัน ทั้งชิ้นเนื้อเยื่อตำแหน่งเดียวกัน (2.9 เปอร์เซ็นต์) และตำแหน่งต่างกัน (5.25 เปอร์เซ็นต์) แต่ถึงอย่างไรก็ตามความแม่นยำที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี RAPD มีข้อจำกัดเพราะว่าให้ค่า polymorphism ได้ดีในพืชบางชนิด ส่วนในการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทดลอง *Arabidosis thaliana* ให้ลักษณะของลำดับดีเอ็นเอแตกต่างกันเช่นกัน เมื่อผ่านกระบวนการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนราก โดยใช้เครื่องหมายตรวจสอบทางชีววิทยาโมเลกุล amplified fragment length polymorphism (AFLP) ตรวจสอบพบว่าในจำนวน 66.6 เปอร์เซ็นต์ ของพืชมีอย่างน้อยหนึ่งลักษณะที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม และอัตราส่วนระหว่างการเกิดการผ่าเหล่าต่อจำนวนต้นมีตั้งแต่ 1-18 เท่า (Polanco and Ruiz, 2002) เมื่อไม่นานมานี้การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ microsatellite หรือ simple sequence repeat (SSR) ในการตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการ somaclonal variation มีความนิยมมากขึ้น เนื่องจากมีประสิทธิภาพให้ความละเอียดทางข้อมูลค่อนข้างสูง ตัวอย่างเช่น ต้น *Populus tremuloides* สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนด้วยการใช้เครื่องหมายตรวจสอบ SSR ผู้ทดลองได้ให้ความเห็นไว้ว่า การเกิด somaclonal variation ไม่จำเป็นต้องตรวจสอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเสมอไป การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR สามารถใช้ได้ดี และมีประสิทธิภาพกับพืชชนิดนี้ (Rahman and Rajora, 2001)

การตรวจสอบความแปรผันทางชีววิทยาโมเลกุลในอ้อยเหมือนกับพืชทั่วๆไป สามารถตรวจสอบได้หลายวิธีการ เช่น การคัดเลือกแคลลัสของอ้อยพันธุ์ F36-819 ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมเกลือ (NaCl) แคลลัสดังกล่าวเมื่อพัฒนาให้เป็นต้นสามารถทนต่อสภาพความเค็มได้สูง เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD พบว่ามีลำดับดีเอ็นเอบางส่วนแตกต่างไปจากพันธุ์ควบคุมอย่างชัดเจน (Prammanee and Pitakpolrat, 2001) ถัดมา Zucchi *et al.* (2002) ตรวจสอบต้นอ้อยที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD ซึ่งต้นอ้อยที่นำมาตรวจสอบได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนจาก 2 แหล่งคือ หน่ออ่อน และเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) เพื่อศึกษาความไม่คงที่ทางพันธุกรรมในอ้อยพันธุ์ RB83-5486 และ SP80-185 และเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่จำนวนมากครั้งเป็นระยะเวลานาน พบว่าเกิดความแตกต่างจากพันธุ์เดิมทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยพันธุ์ RB83-5486 มีความแปรผันของสารพันธุกรรมมากกว่าพันธุ์ SP80-185 เช่นเดียวกับการทดลองของ สิริภัทร์และภัทรวดี (2543) ที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD ตรวจสอบถึงความแตกต่างระหว่างโคลนพันธุ์อ้อยปกติ และโคลนพันธุ์อ้อยทนเค็มที่คัดเลือกได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอจำนวนหนึ่งที่พบในโคลนพันธุ์ทนเค็ม แต่ไม่พบในโคลนปกติ และให้ความเห็นสนับสนุนการพัฒนาโคลนพันธุ์อ้อยให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและมีประสิทธิภาพด้วยการเพาะเลี้ยงแคลลัสภายในห้องทดลอง ถึงอย่างไรก็ตาม Henry (1998) ได้ให้ข้อสังเกตไว้ว่าการใช้เทคนิค RAPD นั้นง่าย และสะดวก แต่ต้องใช้ความระมัดระวังมากในเรื่องวิธีการ การทำซ้ำนั้นผลที่ออกมาอาจจะไม่ตรงกับการทดลองเดิม ซึ่งผู้ทดลองแนะนำให้ใช้เพียงพืชบางชนิดเท่านั้น จึงทำให้ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือในระดับหนึ่งเท่านั้น ซึ่งในปัจจุบันนี้ความนิยม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เทคนิค SSR เป็นที่นิยมมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากให้ข้อมูลที่มีความละเอียดของความแตกต่างของต้นพืชที่เป็น somaclonal variants ได้สูง หรือมีค่า polymorphism information content (PIC) สูง และจากการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ด้วยวิธี SSR และ RAPD แล้ว พบว่า SSR ให้ค่า polymorphism ที่ละเอียดกว่าและสูงกว่าอย่างชัดเจน (Veilleux *et al*., 1995, Henry, 1998 และ Palombi and Damiano, 2002) และเมื่อเปรียบเทียบค่า polymorphism ของ SSR กับ RFLP ผลที่ได้ในพืชส่วนใหญ่แล้ว SSR จะให้ค่าที่สูงกว่าเช่นเดียวกัน (Saghai-Maroof *et al*., 1994, Plaschke *et al*., 1995 และ Caetano-Anolles and Gresshoff, 1998) จึงอาจกล่าวได้ว่า SSR ให้ผลการทดลองที่มีประสิทธิภาพที่ดีกว่า แต่ถึงอย่างไรข้อเสียของ SSR ในเรื่องค่าใช้จ่ายในการพัฒนาและทดสอบยังคงต้องใช้เงินทุนสูงกว่าวิธีอื่นๆ เช่นกัน (สุรินทร์, 2545)

การประยุกต์ใช้เทคนิค somaclonal variation กับอ้อย

เพื่อต้องการอ้อยที่มีลักษณะต่างๆ ตามที่ต้องการ เช่น สามารถทนทานต่อสภาพดินเค็ม ทนทานต่อสภาพความแล้ง ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช โรคและแมลงศัตรูพืชต่างๆที่เข้าทำลาย การผสมข้ามชนิดหรือข้ามสายพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์นั้นเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลานานและต้นทุนในการคัดเลือกพันธุ์ค่อนข้างสูงเนื่องจากต้องคัดเลือกภายในแปลงทดลองเท่านั้น ในปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์อ้อยที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้วชักนำให้เกิดการแปรผันของสารพันธุกรรมหรือการใช้เทคนิค somaclonal variation ในการคัดเลือก สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการ รวมถึงใช้ระยะเวลาสั้นกว่าการทดลองในแปลงปลูก มีความแม่นยำและจำเพาะเจาะจงต่อความต้องการลักษณะใดลักษณะหนึ่งของอ้อย ซึ่งการทดลองของ Jain (2001) พบว่าอ้อยที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโอกาสเกิดความแปรผันของพันธุกรรมได้มากกว่าอ้อยที่ปลูกทดลองในสภาพธรรมชาติ

สิริภัทร์และคณะ (2539) ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์อ้อยทนเค็ม โดยคัดเลือกอ้อยที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่เติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าอ้อยพันธุ์ F160M, F156, 89-1-20, CP 64-388 และ KU50 สามารถเจริญได้ในอาหารที่เติมเกลือที่ความเข้มข้นมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ และอ้อยพันธุ์ F36-819 สามารถเจริญในอาหารที่เติมเกลือความเข้มข้นถึง 2 เปอร์เซ็นต์ได้อีกด้วย เช่นเดียวกับ Khan *et al.* (2004) ได้ใช้เทคนิคการคัดเลือกอ้อยทนเค็มจากการผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่นกัน โดยการพัฒนาแคลลัสของอ้อยพันธุ์ CP-43/33 ที่มีอายุ 1 เดือน ให้เป็นต้นและลงปลูกในแปลงทดลองที่เตรียมดินเค็มไว้ ทำให้ได้อ้อยที่ทนต่อสภาพดินเค็มและมีลักษณะที่ดีขึ้นคือ ยอดต่อกอ ความสูงของลำ จำนวนปล้องต่อต้นเพิ่มขึ้น โดยที่ความกว้างของลำและปริมาณน้ำตาลไม่เปลี่ยนแปลงใดๆ และยังคงมีการใช้เทคนิคทางด้านนี้ในการคัดเลือกสายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อ้อยทนเค็มและทนแล้ง ศึกษาในอ้อยพันธุ์ CoC671 โดยคัดเลือกผ่านกระบวนการเกิดแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมเกลือ และ polyethylene glycol 8000 (PEG) พบว่าเมื่อผ่านการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD ต้นที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเกลือแตกต่างจากต้นควบคุมชัดเจน แตกต่างจากต้นที่ผ่านการคัดเลือกใน PEG กลับมีความคล้ายคลึงกันกับต้นควบคุม อย่างไรก็ตามสารพันธุกรรมของทั้งสองกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างไปจากเดิม (Yadav *et al*., 2006)

มีรายงานการพัฒนาอ้อยโดยใช้หลักการของ somaclonal variation ได้แก่ Rajeswari *et al*. (2009) ใช้อ้อยทั้งสิ้น 39 ลูกผสม เป็นการผสมระหว่าง *Saccharum officinarum* กับ *S. spontaneum* และระหว่าง *S. officinarum* กับ *Erianthus arundinarum* ลูกผสมทั้งหมดใช้เป็นต้นแม่ที่จะนำมาทดลองโดยผ่านการชักนำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาปลูกทดสอบ เพื่อหาความแตกต่างด้านคุณภาพและปริมาณ พบว่าอ้อยที่ผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความแตกต่างกัน สามารถคัดเลือกอ้อยที่มีคุณสมบัติที่ดี กากใย 13% ลำต้นยาว 200 เซนติเมตร ข้อปล้องยาว 10 เซนติเมตร ค่า CCS อยู่ที่ 10% ได้ 51 ตัวอย่าง และ Hoy *et al.* (2003) ได้ใช้ตำแหน่งชิ้นส่วนที่ต่างกัน ได้แก่ ชิ้นส่วนใบอ่อน ยอดอ่อน และตาของอ้อยมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถชักนำให้เกิด somaclonal variation ขึ้นได้เช่นกัน

ในอดีตมีการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ของอ้อยให้มีลักษณะที่ต้องการและมีประสิทธิภาพมากกว่าพันธุ์เดิม ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เกิด somaclonal variation มีมาอย่างต่อเนื่อง (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมวิธีหนึ่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 การปรับปรุงพันธุ์อ้อยด้วยวิธี somaclonal variation

นักวิจัย	สายพันธุ์อ้อย	วิธีการ	ผลการวิจัย
Heinz and Mee (1969)	H37-1933	เพาะเลี้ยงแคลลัส	ลักษณะทางสัณฐานเปลี่ยนไป
Krishnamurthi (1974)*	-	คัดเลือก somaclone	ต้านทานโรคฟิจิ และราน้ำค้าง
Krishnamurthi and Tlaskal (1974)*	-	คัดเลือก somaclone	ต้านทานโรคฟิจิ และราน้ำค้าง
Heinz (1976)*	-	คัดเลือก somaclone	ต้านทานโรคฟิจิ และราน้ำค้าง
Heinz *et al.* (1977)*	CoC671	เพาะเลี้ยงแคลลัส	ต้านทานโรคแส้ดำ
Heinz *et al.* (1977)*	Q101	ฉายรังสีแกมมา	ต้านทานโรค helminthosporium eye spot
Liu and Chen (1982)*	F164 (70-6132) F160 (74-3216)	เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย	ทนเค็ม เพิ่มผลผลิตน้ำตาล
Lui and Yeh (1982)*	F164 (70-6132) F160 (74-3216)	เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย	ทนเค็ม เพิ่มผลผลิตน้ำตาล
Larkin and Scowcroft (1983)*	Q101	ฉายรังสีแกมมา	ต้านทานโรค helminthosporium eye spot
Sreenivasan and Jalaja (1983)*	Co7704	เพาะเลี้ยงแคลลัสจากใบ และคัดเลือก somaclone	ต้านทานโรคแส้ดำ และ เหี่ยวเน่า
Scowcroft (1984)*	CoC671	เพาะเลี้ยงแคลลัส	ต้านทานโรคแส้ดำ
Jalaja et al. (1987)*	CoC671	เพาะเลี้ยงแคลลัส	ต้านทานโรคแส้ดำ
Sreenivasan (1987)*	Co92007	เพาะเลี้ยงแคลัส	ต้านทานโรคราสนิม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

นักวิจัย	สายพันธุ์อ้อย	วิธีการ	ผลการวิจัย
Bonnel (1988)*	H70-0144	คัดเลือก	ต้านทานโรค
	H74-0922	somaclone	gumming
Fahmy (1990)*	Co419	-	ต้านทานโรคใบด่าง
	54C9		
Sreenivasan (1990)*	-	คัดเลือก	ต้านทานโรค
		somaclone	เหี่ยวเน่าแดง
Sreenivasan and	Co7717	เพาะเลี้ยงแคลลัส	เพิ่มผลผลิตน้ำตาล
Sreenivasan (1994)*		และฉายรังสี	
		แกมมา	
Oropeza *et al.* (1995)*	AT626	จำนวนในการ	ต้านทานโรคใบด่าง
	BT627	เปลี่ยนอาหาร	
Mohanraj (1996)*	-	คัดเลือก	ต้านทานโรค
		somaclone	เหี่ยวเน่าแดง
Arencibia (1999)	Ja60-5	เพาะเลี้ยงแคลลัส	ต้านทานแมลงศัตรูพืช
Prammanee and	F36-819 F160M	เพาะเลี้ยงแคลลัส	ทนเค็ม
Pitakpolrat (2001)	CP64-388 F156		
	F36-819 89-11-2		
	58-1-56 89-1-20		
	CP64-388 KU50		
Hoy *et al.* (2003)	CP70-321	เพาะเลี้ยงแคลลัส	ผลผลิตเพิ่มขึ้น
Khan (2004)	CP-43/33	เพาะเลี้ยงแคลลัส	ทนเค็ม

หมายเหตุ * อ้างอิงโดย Sreenivasan and Jalaja, (1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี microsatellite (SSR) และ random amplified polymorphic DNA (RAPD)

microsatellite หรือ simple sequence repeat (SSR) เป็นชิ้นส่วนลำดับดีเอ็นเอสั้นๆ เช่น AT CTT และ ATGT ซ้ำกันหลายๆ ชุด ซึ่งช่วงลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้จะมีลำดับที่เฉพาะเจาะจงในพืชแต่ละชนิด การตรวจสอบด้วยวิธีนี้เป็นการนำเอาเทคนิคของกระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) ใช้ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อลำดับดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ สามารถใช้ในงานด้านจำแนกชนิดพืช ทำให้การจำแนกชนิดพืชทำได้กว้างมากขึ้น และมีการจำแนกได้อย่างชัดเจนและมีคุณภาพ (Caetano-Anolles and Gresshoff, 1998) ในการพัฒนาเครื่องหมาย microsatellite ในอ้อยศึกษาโดย Cordeiro *et al.* (1999) หาช่วงของ microsatellite (Library number SC1, SC2, SC3, SC4 SC5 และ SC6) ที่ถูกต้อง หาวิธีการที่เหมาะสม เช่น ความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิในกระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่ ต่อการเพิ่มจำนวนของเครื่องหมาย microsatellite เพื่อนำมาพัฒนาการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของอ้อย (*Saccharum* spp.) ผลจากการพัฒนาเมื่อผ่านการวิเคราะห์ข้อมูลแล้ว พบว่าลำดับเบสส่วนใหญ่จะเป็น TG/CA ซึ่งการพัฒนาเครื่องหมาย microsatellite ในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และทำแผนที่ยีนของอ้อยในอนาคต ซึ่งในปีถัดมา Cordeiro *et al*. (2000) วิเคราะห์จีโนมของอ้อย *Saccharum spontaneum* และ *S. officinarum* ด้วยเครื่องหมาย microsatellite เพื่อตรวจหาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ระหว่างกัน โดยนำเครื่องหมาย microsatellite ที่พัฒนาจากอ้อยพันธุ์ cv. Q124 มาใช้ พบว่ามี microsatellite ที่มีลำดับ นิวคลีโอไทด์จำนวน 2 และ 3 เบสซ้ำกันอยู่ที่ 15 และ 13 ซ้ำตามลำดับ ปีถัดมา Cordeiro *et al.* (2001) นำเครื่องหมาย microsatellite มาตรวจสอบพันธุ์อ้อย 5 สายพันธุ์ด้วยไพรเมอร์มากกว่า 100 ไพรเมอร์ เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างกัน เมื่อผ่านกระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่แล้ว ได้ค่า polymorphism ที่แตกต่างกันอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเครื่องหมาย microsatellite เป็นประโยชน์ในการตรวจสอบพันธุกรรมของอ้อย คัดเลือกสายพันธุ์อ้อย การวิเคราะห์วิวัฒนาการของอ้อย และช่วยในการตรวจสอบอ้อยปรับปรุงพันธุ์ วิเคราะห์ตำแหน่ง EST (expressed sequence tag) นอกจากนี้ Cordeiro *et al*. (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอ้อยด้วยเครื่องหมาย microsatellte โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ SMC334BS [$(TG)_{36}$], SMC336BS [$(TG)_{23}(AG)_{19}$], MSSCIR5 [$(GGC)_9$], MCSA068G08 [$(CAG)_6$], MCSA042E08 [$(GAT)_7$…$(GAT)_6$] และ MCSA053C10 [$(CAG)_5$] ในการจำแนกพืชกลุ่มอ้อย 66 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ผลด้วย unweighted pair group method with arithmetic mean

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(UPGMA) พบว่าสามารถแยกกลุ่มอ้อยได้ละเอียดและชัดเจนโดยแยกได้เป็นกลุ่ม Erianthus กลุ่ม Saccharum กลุ่ม Sorghum กลุ่ม Sclerostachya และกลุ่ม Miscanthus โดยผู้ทดลองสนับสนุนในการใช้เครื่องหมาย microsatellte ซึ่งง่ายต่อการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์และกลุ่มของอ้อยได้เป็นหมวดหมู่ชัดเจน

random amplified polymorphic DNA (RAPD) เป็นวิธีการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ โดยเราไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากตำแหน่งเข้าเกาะของไพรเมอร์จะไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่ง (ไพรเมอร์เข้าเกาะแบบสุ่ม) ไพรเมอร์ที่นิยมใช้มีขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ (decamer) ข้อมูลในการวิเคราะห์ค่อนข้างมาก แต่มีข้อจำกัดในเรื่องการทดลองซ้ำถ้าควบคุมปัจจัยต่างๆ ไม่เหมือนเดิม ผลที่ได้อาจคลาดเคลื่อนไปจากเดิมได้ (สุรินทร์, 2545) ปัจจุบัน RAPD สามารถใช้ได้ในงานหลายๆ ด้าน เช่นเดียวกับเครื่องหมาย SSR ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Lal *et al.* (2008) นำเครื่องหมาย RAPD มาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของอ้อยที่ผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถึงการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีจำนวนชุดของโครโมโซมจำนวนมากจึงอาจมีการเกิด somaclonal variation ขึ้นได้ง่าย โดยมุ่งเน้นถึงกระบวนการและสูตรอาหารต่างๆ ที่หลีกเลี่ยงประเด็นดังกล่าว ผลการตรวจสอบไม่พบว่าเกิด somaclonal variation แต่อย่างใด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tawar *et al.* (2008) ใช้เครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบการเกิด somaclonal variation ในอ้อยพันธุ์ Co94012 และ VSI 434 พบว่าโดยส่วนใหญ่ให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันมีเพียงแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPA 17 และ OPA 19 เท่านั้นที่ให้ข้อมูลแตกต่างออกไปจากต้นเดิม หรืองานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดย Da Silva *et al.* (2008) ศึกษาความแตกต่างของอ้อย 8 สายพันธุ์ ได้แก่ SP90-3723, SP86-42, SP91-1049, SP90-1638, RB92-8064, RB83-5054, RB86-7515 และ RB85-5113 เป็นอ้อยที่มาจากการใช้ท่อนพันธุ์ปลูกและผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากการใช้เครื่องหมาย RAPD พบว่าความหลากหลายของพันธุ์อ้อยแตกต่างไปจากเดิม ค่าความคล้ายคลึงกัน (similarity) อยู่ในช่วง 0.63 ถึง 0.80 ผู้วิจัยได้ให้ความเห็นว่า การใช้เครื่องหมาย RAPD สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่าง somaclone ของอ้อยแต่ละต้นได้ ทำได้ง่ายและรวดเร็วอีกด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยข้อมูลด้านเซลล์วิทยา

ข้อมูลจากการศึกษาโครโมโซมมีความสำคัญในงานวิจัยหลายๆ ด้าน เช่น การปรับปรุงพันธุ์พืช การจำแนกสายพันธุ์พืชและความหลากหลายทางพันธุกรรม งานวิจัยจำนวนมากที่ใช้ข้อมูลความแตกต่างทางด้านเซลล์วิทยาช่วยในการจำแนกสายพันธุ์ของพืชชนิดต่างๆ หรือเพื่อป้องกันการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ในวงจำกัด ซึ่งจะทำให้ฐานความหลากหลายของพันธุกรรมอ้อยเริ่มแคบลง ทำให้การพัฒนาสายพันธุ์ใช้ระยะเวลานาน (Sreenivasan *et al.*, 1987) จากข้อมูลการศึกษาพบว่าอ้อยจัดเป็นพืชที่มีความหลากหลายของจำนวนโครโมโซม เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี fluorescence in situ hybridization (FISH) พบว่าสายพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าพันธุ์ดั้งเดิม *Saccharum officinarum* มีจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่ คือ 2n = 80 จำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 10 และสายพันธุ์ป่า *S. spontaneum* มีจำนวนโครโมโซม 2n= 40-128 โครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 8 (D'Hont *et al.,* 1998)

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ของเซลล์ถึงจำนวนของโครโมโซมช่วยในการจำแนกสายพันธุ์ได้ พบได้จากรายงานการจำแนกสายพันธุ์อ้อยป่าของประเทศไทยที่อาศัยข้อมูลจากการนับจำนวนโครโมโซม กล่าวคืออ้อยป่า 10 พันธุ์ มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 64, 72, 80 และ 88 อย่างใดอย่างหนึ่งเหมือนกันหรือแตกต่างกันออกไป ซึ่งมีเพียงพันธุ์เดียว (Thai 82-65) ที่มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ มีจำนวน 2n = 80 จึงสามารถแยกกลุ่มออกมาได้อย่างชัดเจน (สุชีลา, 2530)

นอกจากจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์แล้ว ยังมีโอกาสที่จำนวนโครโมโซมของอ้อยต้นเดียวกันมีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันได้ เรียกว่า "chromosome mosaics" เกิดจากความผิดปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (meiosis) หรือปัจจัยอื่นๆ มีความเป็นไปได้ที่เกิดจากความผิดปกติในการทำงานของเส้นใยสปินเดิล (spindle) ที่ทำหน้าที่ดึงโครโมโซมไปที่ขั้วของเซลล์ หรือเกิดการสูญหายของโครโมโซมในระหว่างการแบ่งเซลล์เนื่องจากโครโมโซมไม่เข้าคู่กัน (non-disjunction) (Nair, 1972)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดินเค็ม

ประเทศไทยได้รับอิทธิพลของเกลือครอบคลุมพื้นที่เป็นบริเวณกว้างถึง 19.7 ล้านไร่ ภูมิภาคที่ได้รับผลกระทบมากที่สุด คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 17.8 ล้านไร่ บางส่วนในบริเวณพื้นที่ราบภาคกลาง และบริเวณชายฝั่งทะเล ดินเค็มเกิดจากวัตถุต้นกำเนิดของดินที่มีเกลือสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก เกลือจากน้ำใต้ดินถูกดึงขึ้นสู่ผิวหน้าดิน เกลือที่สะสมบริเวณชายฝั่งทะเล การกระทำของมนุษย์ที่ขาดความรู้ในการจัดการดิน ระบบชลประทานที่ไม่ถูกต้อง การทำอ่างเก็บน้ำบนพื้นที่ดินเค็ม และการทำนาเกลือ ชนิดของเกลือที่พบได้ คือ แคลเซียม โซเดียม โปแตสเซียม ซึ่งจะอยู่ในรูปของซัลเฟต คาร์บอเนต ไนเตรต และคลอไรด์ (เอิบ, 2550)

ตามรายงานของ U.S. Salinity Laboratory Staff (1954) ได้กำหนดมาตรฐานการตรวจสอบดินเค็มโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity; ECe) ของสารละลายดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (saturation extract) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่า 2 เดซิซีเมนส์ต่อเมตร (dS/m) หรือดินที่มีระดับความเค็มจนกระทั่งทำให้การเจริญเติบโตและผลผลิตพืชลดลงครึ่งหนึ่งจะถูกกำหนดให้เป็นดินเค็ม (saline soil) ซึ่งปริมาณเกลือต่ออิทธิพลการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช สามารถตรวจสอบและประเมินได้จากค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายดิน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณเกลือและอิทธิพลของเกลือในดินต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช (U.S. Salinity Laboratory Staff , 1954; วรัญญา, 2546)

EC_e (dS/m)	เกลือในดิน (%)	ระดับความเค็มของดิน	อิทธิพลต่อพืช
2	< 0.1	ไม่เค็ม	ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช
2-4	0.1-0.2	เค็มเล็กน้อย	มีผลต่อพืชที่ไม่ทนเค็ม
4-8	0.2-0.4	เค็มปานกลาง	มีผลต่อพืชหลายชนิด
8-16	0.4-0.8	เค็มมาก	พืชทนเค็มเท่านั้นที่ยังเจริญเติบโตได้ดี
16	> 0.8	เค็มจัด	พืชทนเค็มน้อยชนิดหรือพืชชอบเกลือที่เจริญเติบโตได้ดี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากการวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 25°C แล้ว สามารถใช้ข้อมูลด้านอื่นเพื่อช่วยประกอบการวิเคราะห์ดินเค็มได้อีกด้วย ได้แก่ การใช้ค่าอัตราการดูดซับโซเดียมในดิน พิจารณาจากอัตราส่วนระหว่างปริมาณโซเดียม กับรากที่สองของครึ่งหนึ่งของผลบวกของแคลเซียมและแมกนีเซียม กล่าวคือ ถ้าผลการวิเคราะห์ได้อัตราส่วนตั้งแต่ 13 ขึ้นไป จะถือว่าเป็นดินเค็มได้ด้วยเช่นกัน หรืออีกวิธีหนึ่งที่ใช้ควบคู่กับการวัดค่าการนำไฟฟ้า คือการวัดความเค็มจากค่าความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน โดยธาตุโซเดียมเป็นธาตุที่อยู่ในกลุ่มแคตไอออนที่แลกเปลี่ยนได้ ถ้ากรณีที่ดินบริเวณนั้นๆ มีค่าการแลกเปลี่ยนไอออนที่สูงผิดปกติ อัตราร้อยละโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable sodium percentage; ESP) หรือค่าโซเดียมมากกว่าร้อยละ 15 ของค่าความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออนทั้งหมด จะถือว่าเป็นดินเค็ม และประการสุดท้ายคือค่าพีเอชสามารถเป็นตัวชี้วัดความเป็นกรด-ด่างของดินได้ในระดับหนึ่ง แต่ในบางกรณีดินที่ตรวจสอบนั้นพบว่ามีค่าพีเอชอยู่ในเกณฑ์ต่ำ แต่อาจเป็นดินเค็มได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากการแทนที่โดยไฮโดรเจนและอลูมิเนียมทำให้มีปฏิกิริยาของดินที่เรียกกันว่าพีเอชต่ำลง (เอิบ, 2550)

ผลกระทบของความเค็มต่ออ้อย

ดินเค็มส่งผลกระทบต่อภาคเกษตรกรรมถึงร้อยละ 20 ของพื้นที่เกษตรกรรมทั่วโลก (Flower and Yeo, 1995) เป็นปัญหาที่ไม่อาจหลีกเลี่ยงได้ ประกอบกับการแก้ไขปัญหายังต้องใช้เงินทุนจำนวนมาก แก้ปัญหาเบื้องต้นทำได้โดยการใช้วัสดุปลูกอ้อยที่มีการระบายน้ำที่ดีเพื่อป้องกันการสะสมของเกลือในดิน (Wiedenfeld *et al.,* 2005) เติมสารอินทรีย์ต่างๆ ลงในดินเพื่อลดการสะสมของเกลือ เช่น ยิปซัม กากชานอ้อย รวมถึงการแก้ปัญหาโดยวิธีการชะล้าง หรือเจือจางเกลือที่ละลายน้ำได้ง่ายออกไป เพื่อช่วยลดผลกระทบของเกลือลง ดังนั้นวิธีแก้ปัญหาที่ดีประการหนึ่งคือการปลูกอ้อยทนเค็มควบคู่กับการแก้ปัญหาดินเค็ม ซึ่งจะทำให้ปัญหาดินเค็มไม่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตและการเจริญเติบโตของอ้อยในเกณฑ์ที่รุนแรงจนเกินไป

อ้อยเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ในพื้นที่ดินเค็ม (Berstein *et al*., 1966) ในแต่ละสายพันธุ์ มีความทนทานต่อความเค็มในระดับที่ต่างกัน ความเค็มในระดับที่อ้อยไม่สามารถทนทานได้จะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตในระยะต่างๆ ของอ้อย เช่น ระยะย่างปล้องมีผลทำให้ปล้องอ้อยสั้นลง ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PEPCase ในกระบวนการสังเคราะห์แสง และการสร้างคลอโรฟิลล์ (Joshi and Naik, 1980) แสดงอาการใบไหม้ หรือเรียกว่า salt burn (Clements, 1980) น้ำหนักแห้งและพื้นที่ใบลดลง (Wahid, 2004) ค่าร้อยละของบริกซ์ (Brix; % Soluble solids in

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

juice) ปริมาณซูโครส (Pol; % Sucrose in juice) ค่าความบริสุทธิ์ในน้ำอ้อยลดลง (Pol as % of Brix) (Lingle and Wiegand, 1997) ขัดขวางการดึงธาตุไนโตรเจน โปแตสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี เหล็ก และแมงกานีส กระตุ้นการสะสมธาตุโซเดียม คลอรีน อลูมิเนียม โมลิบดินั่ม และ ทองแดง (Gomathi and Thandapani, 2005) และพบว่าค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 25 °C เพิ่มขึ้นหนึ่งระดับจะทำให้น้ำหนักของอ้อยลดลง 13.7 ตันต่อเฮกตาร์ (Wiegand et al., 1996) ผลกระทบที่เกิดขึ้นกับอ้อยทั้งหมดนี้ทำให้คุณภาพของน้ำตาลที่เป็นจุดมุ่งหมายหลักสูญเสียไป

ในระดับห้องปฏิบัติการความเค็มมีผลกระทบต่ออ้อย เช่น การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (86.5 mM ขึ้นไป) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่งผลให้การขยายตัวของแคลลัสและอัตราการรอดของเซลล์ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 1 เดือน (Palade *et al*., 2008) หรือทำให้แคลลัสแสดงอาการที่เรียกว่า นีโครซีส (necrosis) โดยจะมีสีเหลืองปนน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นในทิศทางเดียวกันกับการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ น้ำหนักโดยรวมของแคลลัสจะลดลงตามระดับการทนทานความเค็มของอ้อยแต่ละพันธุ์ พันธุ์ที่ทนทานจะมีน้ำหนักโดยรวมมากกว่าสายพันธุ์อ่อนแอ (Gandonou *et al.,* 2005)

วิธีการสังเกตอาการที่เกิดขึ้นกับอ้อยเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้บ่งบอกได้ว่าอ้อยเกิดความเครียดต่อสภาวะนั้นๆ โดย พัฒนศักดิ์ (2550) ได้เก็บข้อมูลความเสียหายที่เกิดขึ้นกับใบอ้อยในสภาวะที่อ้อยขาดน้ำ โดยแบ่งอาการออกเป็น 5 ระดับ (มีพื้นที่ใบสีเขียวทั้งหมด, มีพื้นที่ใบสีเขียว ¾ มีพื้นที่ใบสีเหลือง ¼ ของใบ, มีพื้นที่ใบสีเขียวและเหลืองอย่างละ ½ ของใบ, มีพื้นที่ใบสีเขียว ¼ มีพื้นที่ใบสีเหลือง ¾ ของใบ และ มีพื้นที่ใบสีเหลืองทั้งหมด) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ใบเขียว โดยคำนวณจากสูตร

เปอร์เซ็นต์ใบเขียว = {[1(จำนวนใบที่มีพื้นที่สีเขียวทั้งใบ) + ¾ (จำนวนใบที่มีพื้นที่ใบสีเขียว 3/4) + ½(จำนวนใบที่มีพื้นที่ใบสีเขียว 1/2) + ¼(จำนวนใบที่มีพื้นที่ใบสีเขียว 1/4)] / จำนวนใบทั้งหมด} X 100

ซึ่งข้อมูลตรงส่วนนี้สามารถประยุกต์ใช้กับอ้อยที่มีความเครียดจากความเค็มได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากลักษณะการแสดงอาการทางใบของอ้อยที่มีความเครียดจากการขาดน้ำและจากความเค็มคล้ายคลึงกันมาก (Cha-um and Kirdmanee, 2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลไกการปรับตัวเมื่อพืชอยู่ในสภาวะความเค็ม

กลไกการปรับตัวเมื่อพืชได้รับความเครียดจากความเค็มเป็นเรื่องที่มีความซับซ้อนควบคุมด้วยปัจจัยหลายปัจจัย ทั้งนี้เพื่อปกป้องกระบวนการการทำงานหลักๆ ของพืช เช่น กระบวนการการสังเคราะห์แสง การหายใจ กลไกการดูดน้ำเข้าสู่ต้นพืช ปกป้องผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ (Botella *et al*., 1994) โครโมโซม และโครงสร้างของโครมาติน (Walbot and Cullis, 1985; Parida et al., 2005) พืชจะปรับตัวทางชีวเคมีและในระดับโมเลกุล เกี่ยวข้องกับการสะสมและการปลดปล่อยไอออนต่างๆ ควบคุมการดูดไอออนจากรากสู่ใบ สังเคราะห์สารประเภท compatible solutes เปลี่ยนแปลงกระบวนการการสังเคราะห์แสง สร้างเอนไซม์ต่างๆ ขึ้นมาเพื่อป้องกันการออกซิไดซ์ (antioxidative enzymes) และการสร้างฮอร์โมนพืช (ภาพที่ 1) (Iyengar and Reddy, 1996) โดยในพืชแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการปรับตัวให้หลีกเลี่ยงหรือทนทานต่อความเค็มตามลักษณะที่กล่าวไปแล้วข้างต้นได้แตกต่างกันออกไป

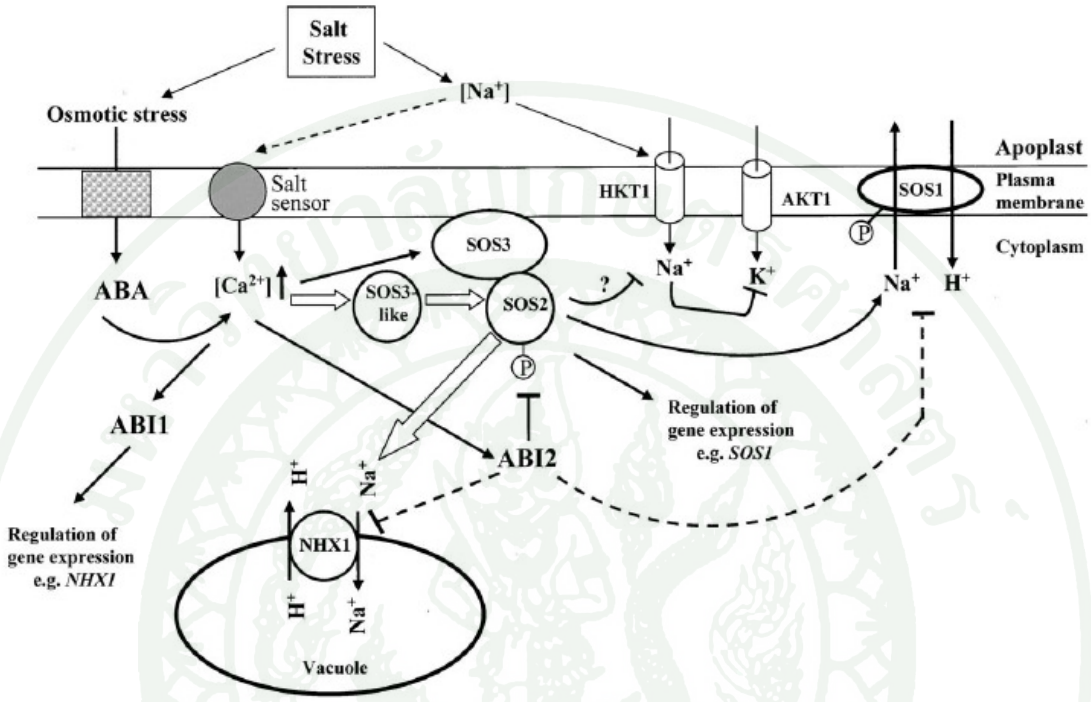
พืชสะสมแคลเซียมใน apoplast และบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาที่อยู่ในสภาวะที่มีความเค็มนั้นๆ (Hogarth, 1999) สอดคล้องกับรายงานของ Chinnusamy *et al.* (2005) ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับตัวส่งและรับสัญญาณเมื่อมีเกลือมากเกินไปในเซลล์พืช กล่าวคือ พืชจะส่งสัญญาณด้วย แคลเซียมไอออน (Ca^{+}) หรือเรียกว่า cytosolic calcium-signal โดยแคลเซียมไอออนที่เพิ่มมากขึ้นจะเข้าจับกับโปรตีน calcium sensor protein; salt overly sensitve 3 (SOS3) และรวมตัวกับ serine/threonine protein kinase; salt overly sensitve 2 (SOS2) หลังจากนั้น salt overly sensitve 1 (SOS1) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณโซเดียมไอออนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออน เพื่อขับเกลือออกนอกไซโตพลาสซึม หรือย้ายโซเดียมไอออนเก็บไว้ภายในเนื้อเยื่อใบที่แก่แล้วพร้อมจะหลุดร่วง (Chesseman, 1988; Parida and Das, 2005) ย้ายเข้าสู่ภายในแวคิวโอล (vacuole) เพื่อไม่ให้เกลือภายในไซโตพลาสซึมสะสมมากจนเป็นพิษต่อออร์กาแนล (organelles) ต่างๆ ได้ (ภาพที่ 1) (Iyengar and Reddy, 1996; Zhu, 2002)

ยีน *AtNHX1* เป็น antiporter gene ยีนทำหน้าที่เคลื่อนย้ายไอออนเมื่อพืชอยู่ในสภาวะความเค็ม (Shi and Zhu, 2002) เช่นเดียวกับในพืชชายเลน *Atriplex gmelini* มียีน *AgNHX1* ทำหน้าที่กำหนดการเคลื่อนย้ายโซเดียมไอออนเข้าสู่แวคิวโอลเช่นกัน (Hamada *et al*., 2001)

ฮอร์โมนพืช ABA, ethylene และกลุ่ม cytokinin มีผลต่อ salt-stress-induced genes (de Bruxelles *et al*., 1996) และ ABA-inducible genes ในข้าว (Gupta *et al.,* 1998) ทำให้ข้าวปิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปากใบอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เพื่อรักษาน้ำไว้ภายในเซลล์ และลดการสะสมไอออนที่เป็นพิษ (Cl^-) (GomezCadenas *et al.,* 2002)



ภาพที่ 1 กลไกการตอบสนองต่อสภาวะความเค็มของพืช ในการเคลื่อนย้ายไอออนของเกลือออกนอกเซลล์ และเก็บไว้ภายในแวคิวโอล (Chinnusamy *et al.,* 2005)

การขับเกลือออกทางต่อมเกลือ หรือ salt glands เป็นการปรับแรงดันออสโมติก (osmotic adjustments) (Hogarth, 1999) หรือผลิตสารเคมี compatible solutes เพื่อรักษาสมดุล และรักษาความสามารถในการดูดน้ำเข้าภายในเซลล์พืชได้อย่างเป็นปกติ นอกจากนี้ยังมีสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมา เช่น proline (Singh *et al.,* 2000), glycine betaine (GB) (Wang and Nil, 2000) polyols และน้ำตาล (Kerepesi and Galiba, 2000) เป็นต้น จะพบปริมาณมากเมื่ออ้อยอยู่ในสภาวะเครียด ทั้งนี้เพื่อปรับแรงดันออสโมติก (osmotic adjustment) และรักษาแรงดันออสโมติกไว้ (osmotic protection) ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำภายในเซลล์ รักษาโครงสร้างของเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนเชิงซ้อน และเอนไซม์ต่างๆ จากอนุมูลอิสระ และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของพืชในการดูดซึมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อีกด้วย (Bohnert *et al.,* 1995)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช

อ้อยพันธุ์ K84-200 จากศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี อ. อู่ทอง จ. สุพรรณบุรี

2. ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1 สารเคมีทั่วไป

ammonium nitrate (PchM Chemicals) และ potassium nitrate (Merck) (stock I)

magnesium sulfate (Merck), manganese sulfate (Fluka), zinc sulfate (Fluka) และ cupper sulfate (Merck) (stock II)

calcium chloride (Merck), potassium iodide (UNIVAR) และ cobalt chloride (Fluka) (stock III)

potassium dihydrogen phosphate (Fluka), boric acid (Merck) และ sodium molypdate (SIGMA) (stock IV)

ferrous sulphate (Fluka) และ EDTA disodium salt (Fluka) (stock V)

thiamine HCl (Fluka), nicotinic acid (Fluka) และ pyridoxin hydrochloride (Fluka) (วิตามิน)

kinetin (Fluka), α-naphthalene acetic acid (Fluka), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Fluka) และ indole-3-butyric acid (BDH) (สารควบคุมการเจริญเติบโต)

glyzine (Merck), myo-inositol (Merck), coconut water, sucrose, agar (Chile)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

methyl benzimidazol-2-ylcarbamate (Carbendazim) (ICA), streptomycin (Strepto) sodium hypochlorite (Clorox) และ tween-20 (BP) (สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ)

2.2 เครื่องมือ

autoclave (SANYO), digital balance (Sartorius), digital balance 100A-300M (Precisa), laminar air flow (Clean) และ pH meter (ORION)

3. ปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล

3.1 เครื่องหมายโมเลกุล SSR

ใช้ไพรเมอร์ที่เป็น SSR จำนวน 8 ชุด ขนาด 20-22 นิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค SSR

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	ลำดับเบสซ้ำ	T_A(°C)
MCSA068G08	F 5’ CTAATGGCATGCCCCAGAGG 3’	$(CAG)_6$	57.2
	R 5’ GCTGGTGATGTCGCCCATCT 3’		
MCSA175A08	F 5’ CAGGGGCAATGCTCGATGGA 3’	$(CGG)_6$	59.5
	R 5’ TGACACGCATGGGGTTGTCG 3’		
MCSA180E02	F 5’ CAACGACGCAGGATCGAACC 3’	$(CCG)_5$	59.5
	R 5’ AGCAGGCACGACTTCCCCAC 3’		
MCSA205C07	F 5’ GCTACCAGCTCTCGGTGCTTC 3’	$(CGA)_5$	59.5
	R 5’ GCACGGGCTAGAACCTAGAAGG 3’		
SMC226CG	F 5’ GAGGCTCAGAAGCTGGCAT 3’	$(CA)_{10}$	52.5
	R 5’ ACCCTCTATTTCCGAGTTGGT 3’		
SMC319CG	F 5’ CCTTTCATCCACAGAGGACAG 3’	$(CA)_{17}$	50
	R 5’ GGTTCACCGAAGCAAGAGAAC 3’		

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	ลำดับเบสซ้ำ	T_A(°C)
SMC477CG	F 5’ CCAACAACGAATTGTGCATGT 3’	$(CA)_{31}$	52.5
	R 5’ CCTGGTTGGCTACCTGTCTTCA 3’		
SMC863CG	F 5’ CGGTCGCTGTTGCATTGTAG 3’	$(TC)_9$	55
	R 5’ TGGATCACTCAATCTCACTTCG 3’		

อ้างอิงโดย Cordeiro *et al.* (2003)

3.2 เครื่องหมายโมเลกุล RAPD

ใช้ไพรเมอร์ที่เป็น RAPD จำนวน 10 ชุด ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค RAPD

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	T_A(°C)
primer 2*	5’ GTTTCGCTCC 3’	36
primer 3*	5’ GTAGACCCGT 3’	36
primer 6*	5’ CCCGTCAGCA 3’	36
OPA-01	5’ CAGGCCCTTC 3’	36
OPA-02	5’ TGCCGAGCTG 3’	36
OPA-04	5’ AATCGGGCTG 3’	36
OPA-08	5’ GTGACGTAGG 3’	36
OPA-10	5’ GTGATCGCAG 3’	36
OPA-16	5’ AGCCAGCGAA 3’	36
OPA-18	5’ AGGTAGCCGT 3’	36

หมายเหตุ * universal primer (pharmacia kit)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 สารเคมีทั่วไป

2-mercaptoethanol (SIGMA), acrylamide (Bio-RAD), agarose (Gibco BRL), ammonium persulphate (BDH), bind silane (plusone), bis-acrylamide (BIO BASIC), boric acid (Farmitalia carlo erba), ethanol (Merck), ethidium bromide (AppliChem), ethylenediaminetetraacetic acid (Merck), formaldehyde (Merck), formamide (Merck), glacial acetic acid (Merck), isopropanol (J.T. Baker), magnesium chloride (Invitrogen), potassium acetate (Merck), potassium chloride (Merck), silver nitrate (Merck), sodium carbonate (Merck), sodium chloride (Merck), sodium citrate (Merck), sodium dodecyl sulfate (Merck), sodium hydroxide (Merck), sodium thiosulfate (BDH), TEMED (Bio-RAD), tris base (Pasific Science), tris HCl (Merck) และ urea (Pharmacia biotech)

3.4 เอนไซม์และนิวคลีโอไทด์

Taq DNA polymerase (Invitrogen), RNase (Promega) และ dNTPs (Invitrogen)

3.5 เครื่องมือ

Fluor-s™ MultiImager (Bio-Rad), geneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer), high speed centrifuge GS-15R (Beckman), high speed centrifuge J2-MC (Beckman), power supply PowerPac 3000 (Bio-RAD) และ UV-visible spectrophotometer ultrospec 30000 (Pharmacia Biotech)

3.6 โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับประมวลผล

โปรแกรม NTSYS-pc version 2.01d

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ปฏิบัติการเซลล์วิทยา

4.1 สารเคมีทั่วไป

8-hydroxyquinoline (Merck), absolute ethanol (Merck), critic acid monohydrate (Merck), glacial acetic acid (Merck), potassium chloride (Merck) และ trisodium citrate dehydrate (Merck)

4.2 เอนไซม์

cellulase (SIGMA) และ pectinase (SIGMA)

4.3 เครื่องมือ

high speed centrifuge J2-MC (Beckman), incubator (Memmert), phase-contrast microscope CX31 (Olympus) และ stereo microscope SZ (Olympus)

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยเพื่อให้เกิด somaclonal variation

1.1 การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่ออ้อย (explant) และฟอกฆ่าเชื้อ

เตรียมชิ้นเนื้อเยื่ออ้อยจาก 2 ส่วนของอ้อย ได้แก่ ยอดอ่อน และใบอ่อน โดยใช้มีดผ่าตัดตัดใบส่วนที่ไม่ต้องการและลอกใบออกจนถึงยอดอ่อนและใบอ่อนด้านในสุด ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ (ประมาณ 5 มิลลิเมตร) หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้มาแช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่ใส่ Carbendazim 0.3 กรัม และ Streptomycin 0.2 กรัม ประมาณ 30 นาที แช่ในสารละลาย Clorox (sodium hypochlorite 5. 25% w/w) 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 (สารจับใบ) 2-3 หยด จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที และแช่ในสารละลาย Clorox 5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ครั้งละ 15 นาที จากนั้นล้างชิ้นเนื้อเยื่อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที ก่อนตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.2 การเพาะเลี้ยงใบอ่อนและยอดอ่อนของอ้อยเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

เตรียมอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) จำนวน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นำชิ้นส่วนที่เตรียมไว้ (ชิ้นส่วนใบอ่อนและยอดอ่อน) มาวางลงบนอาหารดังกล่าวเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจำนวนมาก เปลี่ยนอาหารใหม่จนครบจำนวน 5 และ 10 ครั้ง โดยทำการเปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์ เพื่อเป็นการชักนำให้เกิด somaclonal variation ก่อนการพัฒนาให้เป็นยอดต่อไป

1.3 การพัฒนาแคลลัสให้เป็นยอด

เปรียบเทียบสูตรอาหารเพื่อพัฒนาแคลลัสให้เป็นยอดจำนวน 2 สูตรอาหาร ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต α-naphthalene acetic acid (NAA) จำนวน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นำแต่ละยอดที่เกิดขึ้นกำหนดหมายเลข และเพิ่มจำนวนยอดของแต่ละหมายเลข (somaclone) บันทึกข้อมูลจำนวนยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละโคลน เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

1.4 การพัฒนาให้เป็นต้นอ้อยที่สมบูรณ์

ยอดที่ได้จากข้อ 1.3 ของ somaclone ในแต่ละเบอร์นำมาเลี้ยงในอาหารเร่งรากโดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.5 การคัดเลือกอ้อยทนต่อความเค็ม

นำ somaclone จากข้อ 1.4 ทดสอบในอาหาร MS ที่เติมเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ บันทึกผลลักษณะของ somaclone ที่ตอบสนองต่อเกลือ หลังจากนั้นย้าย somaclone ที่เหลือ ลงในอาหารสูตร MS ที่เพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นระยะเวลา 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ บันทึกผลลักษณะของ somaclone ถึงจำนวนต้นที่รอดจากสภาวะดังกล่าว โดยต้นที่ทนในเกลือระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้กำกับรหัสเป็น (T)

1.6 การปลูกอ้อยในสภาพโรงเรือน

นำต้นอ้อยที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและพร้อมปลูกในสภาพโรงเรือน ล้างรากเอาอาหารวุ้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกให้หมดเพื่อป้องกันการเกิดเชื้อรา แช่รากอ้อยในน้ำสะอาดโดยให้น้ำท่วมรากอ้อยเพียงเล็กน้อยเป็นเวลา 1 คืนในที่ร่ม เพื่อปรับสภาพอ้อยก่อนปลูก หลังจากนั้นปลูกในดินหรือขี้เถ้าแกลบชุ่มน้ำ ตั้งไว้ในที่มีแสงรำไร เมื่ออ้อยปรับตัวได้แล้วโดยสังเกตจากใบอ่อนที่แทงขึ้นมาใหม่ จึงนำไปไว้ในสภาพโรงเรือนปกติ เพื่อรอการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ somaclone ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

2.1 การสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโคลนอ้อยที่ได้คัดเลือกแบบสุ่มทั้งหมด 58 ตัวอย่าง (somaclone จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสผ่านใบอ่อนและยอดอ่อนอย่างละ 28 ตัวอย่าง และจากอ้อยต้นควบคุมพันธุ์ K84-200 อีก 2 ตัวอย่าง) โดยประยุกต์วิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) ใช้ใบอ่อนของอ้อยน้ำหนัก 0.3-0.6 กรัม บดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผงและใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี extraction buffer (Tris-HCL 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, EDTA 50 มิลลิโมลาร์, NaCl 500 มิลลิโมลาร์ และ 2-Mercaptoethanol 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

เติม sodium dodecyl sulfate (SDS) 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 21 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส กลับหลอดไปมา 5-6 ครั้ง ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 15 นาที

เติม potassium acetate 5 โมลาร์ ปริมาตร 105 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 5-6 ครั้ง บ่มทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม iso-propanol เท่ากับส่วนใสที่ดูดขึ้นมาได้ ผสมโดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ 8-10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน

นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้งจนหมด ล้างตะกอนด้วยการเติม ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง คว่ำหลอดที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตะกอนบริเวณก้นหลอดแห้ง

ละลายตะกอนโดยเติม TE buffer (tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, EDTA 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร เมื่อตะกอนละลายจนหมด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดตะกอนที่ไม่ละลายออก

ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ปริมาตร 440 ไมโครลิตร เติม sodium acetate 3 โมลาร์ ปริมาตร 168.8 ไมโครลิตร และเติม absolute ethanol ปริมาตร 440 ไมโครลิตร (ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายตะกอน) กลับหลอดไปมาเบาๆ 8-10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง คว่ำหลอดที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตะกอนบริเวณก้นหลอดแห้ง ละลายตะกอนใน TE buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

เติม RNase (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที หลังจากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ เป็นเวลา 5 นาที และแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

2.2.1 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยใช้ spectrophotometer

ตรวจสอบความบริสุทธิ์และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่า optical density (OD) ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร หรือ OD_{260} เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอดังนี้

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (µg/ml) = OD_{260} x 50 x dilution factor

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอจะวัดที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) เพื่อใช้ในการคำนวณอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ถ้าค่า OD_{260}/ OD_{280} อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์ แต่ถ้าอัตราส่วนมากกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเจือปน (Sambrook *et al*., 1989)

2.2.2 การแยกขนาดและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ผสมสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้กับ 6X loading buffer (bromophenol blue 0.25 เปอร์เซ็นต์, xylene cyanol FF 0.25 เปอร์เซ็นต์ และ glycerol 30 เปอร์เซ็นต์) ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis ใช้ lamda DNA/*Hin*dIII digest เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ใช้ agarose 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer (1X TAE ประกอบด้วย tris-base 4.84 กรัม, glacial acetic acid 11.42 มิลลิลิตร, EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0 20 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร) และใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30-40 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอจากการย้อมเจลด้วย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที ตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transilluminator บันทึกภาพโดยใช้เครื่อง Fluor-s™ MultiImager (Bio-Rad) และเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR)

2.3.1 วิธี microsatellite (SSR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกตัวอย่างมาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ SSR ได้แก่ MCSA068G08, MCSA175A08, MCSA108E02, MCSA205C07, SMC226CG, SMC319CG, SMC477CG และ SMC863CG โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารละลายความเข้มข้นสุดท้าย คือ PCR buffer 1X, magnesium chloride 1.5 มิลลิโมล, deoxynucleotide triphosphate 0.2 มิลลิโมล, primer forward และ primer reverse อย่างละ 50 พิคโคโมล และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จากตัวอย่างอ้อย ตัวอย่างละ 75 นาโนกรัม เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อจนครบปริมาตรตามที่กำหนด แล้วจึงนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400) ตั้งโปรแกรมโดยใช้อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่ 55 องศาเซลเซียส (ขึ้นอยู่กับค่า annualing ของไพรเมอร์นั้นๆ) เป็นเวลา 1 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจนครบ 30 รอบ แล้วตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ต่อ วิเคราะห์ผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

2.3.2 วิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทุกตัวอย่างมาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ RAPD ได้แก่ universal primer 2 (pharmacia kit), universal primer 3 (pharmacia kit), universal primer 6 (pharmacia kit), OPA-01, OPA-02, OPA-04, OPA-08, OPA-10, OPA-16 และ OPA-18 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารละลายความเข้มข้นสุดท้าย คือ PCR buffer 1X, magnesium chloride 2 มิลลิโมล, deoxynucleotide triphosphate 0.2 มิลลิโมล, RAPD primer 25 พิคโคโมล และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จากตัวอย่างอ้อย ตัวอย่างละ 80 นาโนกรัม เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อจนครบปริมาตรที่กำหนด แล้วจึงนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400) ตั้งโปรแกรมโดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใช้อุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่ 36 องศาเซลเซียส (เหมือนกันทุกไพรเมอร์) เป็นเวลา 1 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำจนครบ 30 รอบ หลังจากนั้นตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ต่อ วิเคราะห์ผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis

2.4 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี SSR

2.4.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลจำนวน 2 แผ่น ล้างให้สะอาด เช็ดด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย glacial acetic acid 0.5 เปอร์เซ็นต์ ใน ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อ bind silane อัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ต่อ 3 ไมโครลิตร

2.4.2 การเตรียม polyacrylamide gel 4.5 เปอร์เซ็นต์

เตรียม acrylamide 40 เปอร์เซ็นต์ (19:1) โดยชั่ง acrylamide 380 กรัม และ bis acrylamide 20 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 550 มิลลิลิตร คนจนกระทั่งสารละลายหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปกรองและเก็บในขวดทึบแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เตรียม polyacrylamide gel 4.5 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมน้ำกลั่นปริมาตร 350 มิลลิลิตรกับ 5X TBE (tris-dorate 89 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติมยูเรีย 450 กรัม คนให้ละลายจนหมด เติม acrylamide 40 เปอร์เซ็นต์ (19:1) ปริมาตร 112.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตร ให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปกรองและเก็บในขวดทึบแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ผสม acrylamide 40 เปอร์เซ็นต์, APS 10 เปอร์เซ็นต์ และ TEMED ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว อย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ช่องระหว่างกระจกทั้งสองแผ่นจนเต็ม ใส่หวีลงไปด้านบน ถ้าเป็นหวีแบบฟันฉลาม (shark tooth type) ให้ใส่ด้านตรงข้ามที่เป็นระนาบลงไป วางกระจกให้ด้านบนเอียงทำมุมกับแนวระดับประมาณ 30 องศา เพื่อป้องกันการไหลซึมของเจล ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงเพื่อให้เจลแข็งตัว ประกอบกระจกเข้ากับชุด electrophoresis เติม 1X TBE

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

buffer แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตรกับ loading buffer 1.5 ไมโครลิตร (formamide 98 เปอร์เซ็นต์, EDTA 10 มิลลิโมลาร์, bromphenol blue 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ xylene cyanol 0.1 เปอร์เซ็นต์) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ ทำลายโครงสร้างเชิงซ้อนของดีเอ็นเอ นำไปแช่ในน้ำแข็งทันที หยอดดีเอ็นเอลงในแต่ละช่องของแผ่นเจลและหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (ϕx-174/*Hin*fI) ในช่องแรกและช่องสุดท้ายของแผ่นเจล เปิดกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

2.4.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate ($AgNO_3$)

นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดมาแช่ใน fix solution (glacial acetic acid 10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 20 นาที วางแผ่นกระจกให้เนื้อเจลอยู่ด้านบนเสมอ และระมัดระวังอย่าให้เนื้อเจลมีรอยขีดข่วน แช่แผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที หลังจากนั้นแช่แผ่นเจลในสารละลาย staining solution (สารละลาย staining solution ประกอบด้วย น้ำกลั่น 1 ลิตร, silver nitrate 1 กรัม และ formaldehyde 37 เปอร์เซ็นต์ 1.5 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 5-10 วินาที และเติมสารละลาย developer (สารละลาย developer ประกอบด้วย น้ำกลั่น 1 ลิตร, sodium carbonate 30 กรัม, sodium thiosulphate ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ formaldehyde 1.5 มิลลิลิตร) ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เขย่าเบาๆ อย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 3-5 นาที หรือจนกระทั่งเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยนำกระจกมาแช่ใน stop solution (glacial acetic acid 10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 5 นาที นำแผ่นกระจกมาแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลาประมาณ 15 นาที ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.5 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี RAPD

2.5.1 การเตรียมเจล agarose gel 4 เปอร์เซ็นต์

เตรียมเจล agarose gel 4 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง agarose 8 กรัม เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งผง agarose ละลายหมด คนให้สารเข้ากันหมด นำภาชนะไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 30 นาที ก่อนที่จะเทลงบนภาชนะรองรับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่เข้ากับชุด electrophoresis รอเวลา 30-45 นาที เพื่อรอให้เจลแข็งตัว เติม 1X TBE buffer ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร กับ loading buffer 1.5 ไมโครลิตร หยอดดีเอ็นเอลงในแต่ละช่องของแผ่นเจลและหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (lamda DNA/*Hin*dIII digest) ในช่องแรกและช่องสุดท้ายของแผ่นเจล เปิดกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

2.5.2 ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide (EtBr)

นำเจลแช่ในสารละลาย EtBr (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10-15 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 15 นาที ก่อนที่จะนำมาถ่ายภาพบันทึกภาพ

2.6 การวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

วิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค SSR และ RAPD ในแต่ละตัวอย่าง ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สำคัญและชัดเจน อ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลและบันทึกข้อมูลโดยกำหนดสัญลักษณ์เลข “1” กับการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” กับการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ นำผลมาวิเคราะห์หาค่า similarity index ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-pc) รุ่น 2.01d (Rohlf, 2000) โดยใช้สูตรของ Nei and Li (1979) ซึ่งผลในส่วนนี้จะใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างระหว่าง somaclone ต่างๆ ของอ้อย ผลของการคำนวณจะเป็นตัวเลขที่อยู่ระหว่างเลข “0.0000” ถึงเลข “1.000” โดย somaclone ใดที่แตกต่างกันมากจะมีค่าดังกล่าวเข้าใกล้ค่า 0.0000 และที่มีความคล้ายคลึงกันมากค่าดังกล่าวจะเข้าใกล้ค่า 1.0000 โดยค่าทั้งหมดจะแสดงในรูปแบบของตารางดัชนีความคล้ายคลึง (similarity matrix) เพื่อง่ายต่อการตรวจสอบข้อมูลระหว่าง somaclone

หลังจากนั้นนำค่า similarity index มาคำนวณหาค่าความเหมือน ในรูปแบบการจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) แสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree เพื่อแบ่งกลุ่มของ somaclone อ้อย ค่าที่ได้จะเป็นค่า similarity coefficient หรือค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน โดยเป็นค่าที่ใช้บ่งบอกความคล้ายคลึงกันระหว่างกลุ่ม หรือบ่งบอกช่วงความคล้ายคลึงกันของตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ปฏิบัติการเซลล์วิทยา

3.1 การเก็บตัวอย่างรากอ้อย

เก็บตัวอย่างปลายรากอ้อยขนาด 2-4 เซนติเมตร ในช่วงเวลา 10.00-12.00 น.

3.2 การตรวจสอบโครโมโซมโดยประยุกต์ วิธี enzymatic root-tip squash method จากการศึกษาโครโมโซมจาก Anamthawat-Jónsson (2001) และ พวงผกา และ Anamthawat-Jónsson (2551)

นำตัวอย่างรากอ้อยที่ล้างน้ำจนสะอาดแล้ว นำมาผ่านขั้นตอน pretreatment โดยแช่ในสารละลายอิ่มตัว 8-hydroxyquinoline เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10-12˚C

นำรากใส่ในสารละลาย fixative (absolute ethanol 3 ส่วน ต่อ glacial acetic acid 1 ส่วน) ที่เตรียมใหม่ทุกครั้งเพื่อหยุดกิจกรรมของเซลล์เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลาย fixative ทุก 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (น้ำยา fixative สามารถเก็บที่อุณหภูมิ -20˚C ควรใช้ภายใน 2 เดือน)

นำรากแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที โดยเปลี่ยนน้ำใหม่ทุก 15 นาที นำปลายรากขนาด 1-2 เซนติเมตร แช่ในเอนไซม์ผสมระหว่าง cellulase 500 units; Onozuka R10 Merck #102321 และ pectinase 300 units; SIGMA P4716 ในสารละลาย enzyme buffer (citric acid monohydrate 0.1 โมลาร์ และ trisodium citrate dehydrate 0.1 โมลาร์) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30-60 นาที ขึ้นอยู่กับขนาดของราก

เมื่อปลายรากนิ่มเรียบร้อยแล้ว นำปลายรากที่ได้แช่ใน enzyme buffer อย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นนำรากวางบนสไลด์ ตัดให้เหลือปลายรากประมาณ 1-3 มิลลิเมตร หยดสารละลาย acetic acid 45 เปอร์เซ็นต์ บนสไลด์เพื่อปรับสภาพและล้างรากอีกครั้งหนึ่ง ซับด้วยกระดาษชำระจนสารละลายหมด หลังจากนั้นหยดสารละลายดังกล่าวซ้ำอีกครั้งหนึ่งก่อนที่จะใช้เข็มเขี่ยแยกเซลล์บริเวณปลายรากภายใต้กล้อง microcrope ออก โดยเอาเศษรากและขยะที่ไม่พึ่งประสงค์ออก เหลือไว้เพียงเซลล์แขวนลอยที่เราต้องการเท่านั้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม aceto-carmine ปิดแผ่นปิดสไลด์ หลังจากนั้นหุ้มสไลด์ด้วยกระดาษกรองอีกชั้นหนึ่งก่อนที่จะใช้ยางลบที่ติดกับปลายดินสอเคาะเบาๆ แทนการกดขยี้ ตรวจสอบและถ่ายภาพเซลล์เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซม บันทึกจำนวนโครโมโซมที่นับได้ระหว่าง somaclone อ้อยต่างๆ ที่ได้คัดเลือกมาทดสอบ และเก็บข้อมูล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การชักนำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรม (somaclonal variation) โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัส

1.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

นำชิ้นส่วน (explant) บริเวณใบอ่อนและยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และย้ายลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 3 สัปดาห์ (จำนวน 5 ครั้ง และ 10 ครั้ง) พบว่าแคลลัสปรากฏให้เห็นชัดเจนตั้งแต่การเปลี่ยนอาหารใหม่ในครั้งที่ 2 หรือ สัปดาห์ที่ 6 เป็นต้นไป (ภาพที่ 2ก-ง)

1.2 การพัฒนาแคลลัสให้เป็นต้นที่สมบูรณ์

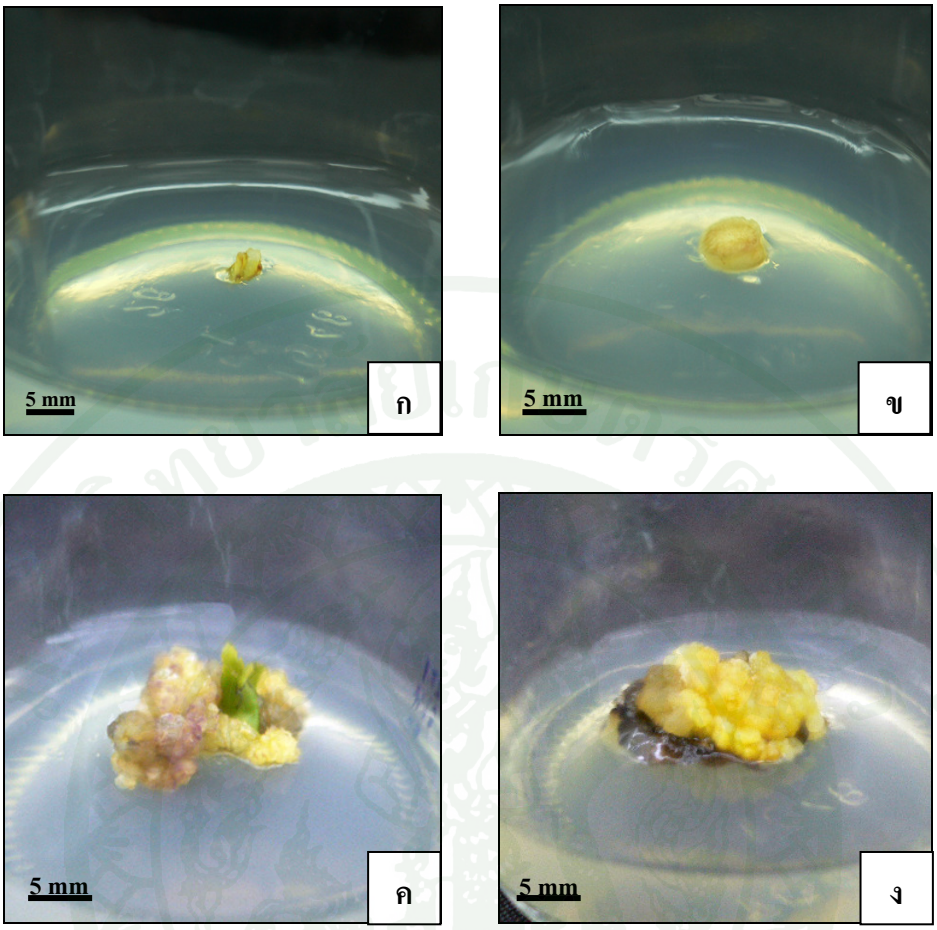
เมื่อครบกำหนดเวลาการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่แล้ว (5 และ 10 ครั้ง) แคลลัสที่ได้ทั้งหมดนำมาชักนำและพัฒนาให้เกิดยอด (ภาพที่ 3ก-ซ) โดยย้ายเนื้อเยื่อลงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรอาหารทั้งสอง ด้วยวิธีการนับจำนวนยอดที่สามารถชักนำได้จากแคลลัสที่เริ่มต้นด้วยชิ้นส่วนใบอ่อนและยอดอ่อน พบว่าการพัฒนาและชักนำให้แคลลัสเกิดยอดในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้จำนวนยอดที่มากกว่าการย้ายแคลลัสลงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในทุกๆ การทดลอง ได้แก่ สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่เริ่มต้นนำแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบอ่อนเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ 5 ครั้ง สามารถชักนำได้ 272 ยอด แคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนยอดอ่อนเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ 5 ครั้ง สามารถชักนำได้ 369 ยอด แคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนใบอ่อนเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ 10 ครั้ง สามารถชักนำได้ 10 ยอด และแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนยอดอ่อนเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่จำนวน 10 ครั้ง สามารถชักนำได้จำนวนยอด 131 ยอด นอกจากนี้สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ในระยะการเปลี่ยนถ่ายอาหารจำนวน 5 ครั้งเท่านั้น ได้แก่ การทดลองที่เริ่มต้นนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อนเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่จำนวน 5 ครั้ง สามารถชักนำได้ 212

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยอด และแคลลัสจากชิ้นส่วนยอดอ่อนเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่จำนวน 5 ครั้ง สามารถชักนำได้ 294 ยอด ส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่จำนวน 10 ครั้ง สูตรอาหารดังกล่าวไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ ดังนั้นอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำยอดได้มากกว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยได้จำนวนยอดรวมทั้งหมดจากตารางที่ 5 และตารางที่ 6 เมื่อนำมารวมกันมีค่าเท่ากับ 782 ยอด ต่อ 506 ยอด ตามลำดับ หรืออาจกล่าวได้ว่าอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำยอดได้มากกว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตรทั้งจากเปลี่ยนถ่ายอาหาร 5 ครั้ง และ 10 ครั้ง คิดเป็น 1.55 เท่า และระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารจำนวน 5 ครั้งมีโอกาสที่ชักนำแคลลัสให้เป็นยอดได้มากกว่าการเปลี่ยนถ่ายอาหารจำนวน 10 ครั้งด้วยเช่นกัน โดยระยะเวลาการเปลี่ยนอาหารจำนวน 5 ครั้ง สามารถชักนำยอดได้รวมทั้งหมด 1,147 ยอด ต่างจากระยะเวลาการเปลี่ยนอาหารจำนวน 10 ครั้ง สามารถชักนำยอดได้รวมทั้งหมดเพียง 141 ยอดเท่านั้น หรืออาจกล่าวได้ว่าระยะเวลาการเปลี่ยนอาหารจำนวน 5 ครั้ง สามารถชักนำยอดได้มากกว่าระยะเวลาการเปลี่ยนอาหารจำนวน 10 ครั้ง คิดเป็น 8.13 เท่า

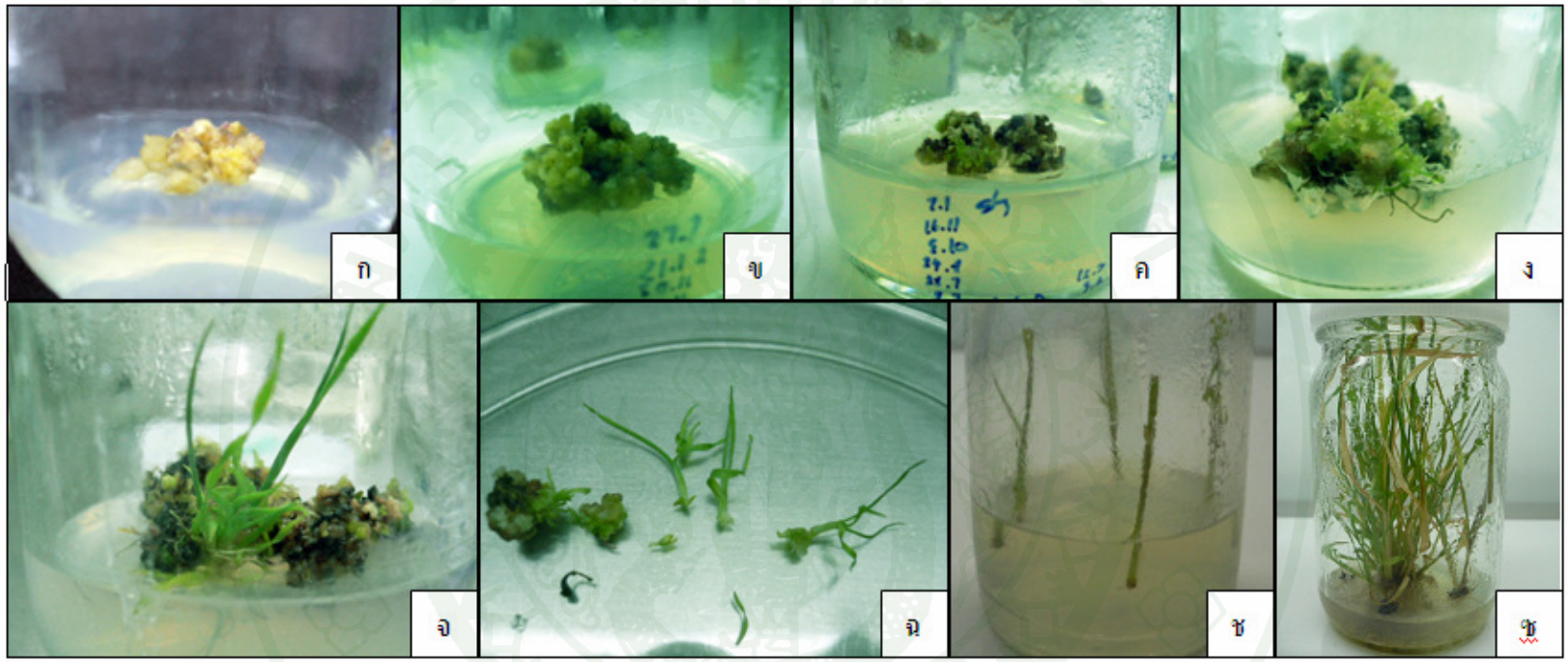
นอกจากนี้พบว่าการชักนำยอดจากแคลลัสระยะเวลาการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่จำนวน 5 ครั้ง แคลลัสที่ผ่านการชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เป็นใบอ่อนสามารถชักนำยอดได้มากที่สุดในสัปดาห์ที่ 24 ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เป็นยอดอ่อนสามารถชักนำยอดได้มากที่สุดในสัปดาห์ที่ 30 ส่วนแคลลัสที่ผ่านการชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เป็นใบอ่อนสามารถชักนำยอดได้มากที่สุดในสัปดาห์ที่ 27 ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เป็นยอดอ่อนสามารถชักนำยอดได้มากที่สุดในสัปดาห์ที่ 30 และการชักนำยอดจากแคลลัสระยะเวลาการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่จำนวน 10 ครั้ง แคลลัสที่ผ่านการชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เป็นใบอ่อนสามารถชักนำยอดได้มากที่สุดในสัปดาห์ที่ 45 ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เป็นยอดอ่อนสามารถชักนำยอดได้มากที่สุดในสัปดาห์ที่ 42 ส่วนแคลลัสที่ผ่านการชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีข้อมูล เนื่องจากอาหารสูตรดังกล่าวไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ (ตารางที่ 5 และ 6)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 การเพาะเลี้ยงแคลลัสอ้อย **ก** ชิ้นเนื้อเยื่อจากใบอ่อน, **ข** ชิ้นเนื้อเยื่อจากยอดอ่อน, **ค** แคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อนของอ้อยเมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารครั้งที่ 2 อายุ 6 สัปดาห์ และ **ง** แคลลัสจากชิ้นส่วนยอดอ่อนของอ้อยเมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารครั้งที่ 2 อายุ 6 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของต้นอ้อยระยะต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านแคลลัส **ก** แคลลัสเมื่อเปลี่ยนถ่ายเนื้อเยื่อครั้งที่ 2 อายุ 6 สัปดาห์, **ข** แคลลัสเมื่อเปลี่ยนถ่ายเนื้อเยื่อครั้งที่ 5 อายุ 15 สัปดาห์ พร้อมชักนำให้เกิดต้น, **ค** สัปดาห์ที่ 16 หลังจากชักนำให้เกิดต้น, **ง** ต้นขนาดเล็กเริ่มปรากฏให้เห็นในสัปดาห์ที่ 17, **จ** ต้นขนาดเล็กในสัปดาห์ที่ 18, **ฉ** แยกแต่ละต้นเพื่อเตรียมชักนำรากและเพิ่มจำนวน, **ช** ต้นอ้อยขนาดเล็กในอาหารชักนำราก และ **ซ** ต้นอ้อยชักนำรากและเพิ่มจำนวนต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของอ้อยที่เปลี่ยนอาหารใหม่ 5 ครั้ง (สัปดาห์ที่ 15) นำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ (MS) และ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+NAA+kinetin)

สูตรอาหาร	ชิ้นส่วน	จำนวนสัปดาห์/ยอดที่ชักนำได้ (ยอด)					
		15	18	21	24	27	30
MS	ใบอ่อน	0	4	191	272	272	272
	ยอดอ่อน	0	7	19	37	233	369
จำนวนยอด		**0**	**11**	**210**	**309**	**505**	**641**
MS+NAA+kinetin	ใบอ่อน	0	3	30	60	212	212
	ยอดอ่อน	0	20	74	151	151	294
จำนวนยอด		**0**	**23**	**104**	**211**	**363**	**506**
จำนวนยอดทั้งหมด		**0**	**34**	**314**	**520**	**868**	**1,147**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของอ้อยที่เปลี่ยนอาหารใหม่ 10 ครั้ง (สัปดาห์ที่ 30) นำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ (MS) และ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS+NAA+kinetin)

สูตรอาหาร	ชิ้นส่วน	จำนวนสัปดาห์/ยอดที่ชักนำได้ (ยอด)					
		30	33	36	39	42	45
MS	ใบอ่อน	0	0	0	4	6	10
	ยอดอ่อน	0	0	3	105	131	131
จำนวนยอด		**0**	**0**	**3**	**109**	**137**	**141**
MS+NAA+kinetin	ใบอ่อน	0	0	0	0	0	0
	ยอดอ่อน	0	0	0	0	0	0
จำนวนยอด		**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
จำนวนยอดทั้งหมด		**0**	**0**	**3**	**109**	**137**	**141**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 การคัดเลือกอ้อยทนเค็ม

ตัวอย่างที่นำมาคัดเลือกนั้นมาจาก somaclone ที่ผ่านการเกิดแคลลัส และเปลี่ยนอาหารใหม่เป็นระยะเวลา 5 ครั้งเท่านั้น (ส่วน somaclone ที่เปลี่ยนอาหารใหม่เป็นระยะเวลา 10 ครั้งไม่ได้นำมาคัดเลือก เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างไม่เพียงพอ) โดยสุ่มตัวอย่างจากชิ้นส่วนที่เริ่มต้นจากใบอ่อน และยอดอ่อน อย่างละ 40 ตัวอย่าง เป็นทั้งหมด 80 ตัวอย่าง

ผลที่ได้จากการคัดเลือกพบว่าทุกตัวอย่างรอดและสามารถทนในอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือ (NaCl) 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อเพิ่มปริมาณของเกลือ ด้วยการย้ายตัวอย่างลงในอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าอ้อยจำนวน 64 somaclone ไม่สามารถทนในอาหารสูตรดังกล่าวได้ โดยเป็นกลุ่ม somaclone ที่เริ่มต้นจากใบอ่อนและยอดอ่อนอย่างละ 32 ตัวอย่าง โดยกำหนดชื่อตัวอย่างให้ L คือ ชิ้นส่วนใบอ่อน และ S คือ ชิ้นส่วนยอดอ่อน ส่วน M คือ ผ่านการชักนำยอดด้วยอาหารสูตร MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ และ N คือ ผ่านการชักนำยอดด้วยอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนี้ somaclone ที่เริ่มต้นมาจากใบอ่อน ได้แก่ 2L5M, 2L5N, 4L5M, 5L5N, 6L5M, 7L5M, 9L5M, 9L5N, 10L5M, 11L5M, 14L5M, 21L5M, 21L5N, 26L5N, 27L5N, 30L5N, 31L5N, 32L5N, 38L5M, 51L5M, 57L5M, 58L5M, 62L5M, 65L5N, 72L5M, 77L5M, 82L5N, 88L5M, 90L5M, 91L5M, 93L5M และ 96L5N และ somaclone ที่เริ่มต้นมาจากยอดอ่อน ได้แก่ 1S5M, 5S5N, 7S5M, 8S5M, 9S5M, 9S5N, 10S5M, 11S5N, 14S5M, 15S5M, 17S5M, 18S5M, 18S5N, 20S5N, 27S5M, 27S5N, 34S5N, 42S5N, 45S5N, 50S5M, 56S5N, 58S5M, 70S5M, 79S5M, 80S5M, 81S5N, 83L5M, 86S5M, 93S5M, 96S5M, 97S5N และ 99S5M และ มี somaclone ที่สามารถทนในอาหารที่เติมเกลือจากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นทั้งหมดเพียง 16 ตัวอย่างเท่านั้น กำหนดให้ (T) เป็นต้นที่สามารถทนในอาหารเติมเกลือ 1.5% ได้ โดยเป็นกลุ่มต้นที่เริ่มจากใบอ่อน 8 ตัวอย่าง ดังนี้ 17L5M(T), 33L5N(T) ,34L5M(T), 51L5M(T), 54L5M(T), 59L5M(T), 68L5N(T) และ 93L5M(T) และยอดอ่อน 8 ตัวอย่าง ดังนี้ 11S5N(T), 14S5M(T), 17S5N(T), 34S5N(T), 42S5N(T), 45S5N(T), 75S5M(T) และ 80S5M(T) ทั้งนี้อ้อยจำนวนหนึ่งจะนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษาขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ somaclone ของอ้อยโดยตรวจสอบด้วยวิธี SSR และ RAPD และ SSR ร่วมกับ RAPD

คัดเลือก somaclone ที่เริ่มต้นจากชิ้นส่วนใบอ่อน และยอดอ่อนที่ผ่านการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่จำนวน 5 ครั้ง (ส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่จำนวน 10 ครั้งมีจำนวนตัวอย่างน้อยจึงไม่ได้นำมาศึกษา) ที่ผ่านการทดสอบเกลือแล้วในระดับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากผลการทดลองข้อ 1.3 นำต้นที่รอดทั้งหมดในอาหารดังกล่าวอย่างละ 8 somaclone รวมทั้งหมดเท่ากับ 16 somaclone และเลือกแบบสุ่มจากกลุ่มที่ไม่สามารถทนในอาหารเติมเกลือที่กล่าวมาแล้วข้างต้นทั้งจากกลุ่มต้นที่เริ่มเพาะเลี้ยงจากใบอ่อนและยอดอ่อน อย่างละ 20 somaclone รวมทั้งหมดเป็น 40 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากอ้อยพันธุ์ K84-200 ที่ไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นตัวอย่างควบคุมอีก 2 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 58 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอโดยใช้การสกัดที่ประยุกต์จากวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) ผลของดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในเกณฑ์ที่ดี ซึ่งค่าอัตราส่วนระหว่าง A260/280 มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 1.61-1.92 (ช่วงที่เหมาะสมคือ 1.8-2.0) มีเพียงบางตัวอย่างที่ต้องนำไปกำจัดอาร์เอ็นเอที่ปนเปื้อนอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งตรวจสอบได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) (ภาพที่ 4ก-ง) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ทุกตัวอย่างปรับค่าความเข้มข้นให้เท่ากันที่ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็น SSR จำนวน 8 คู่ และ RAPD จำนวน 10 สาย มีขนาดความยาว 20-23 และ 10 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ 4)

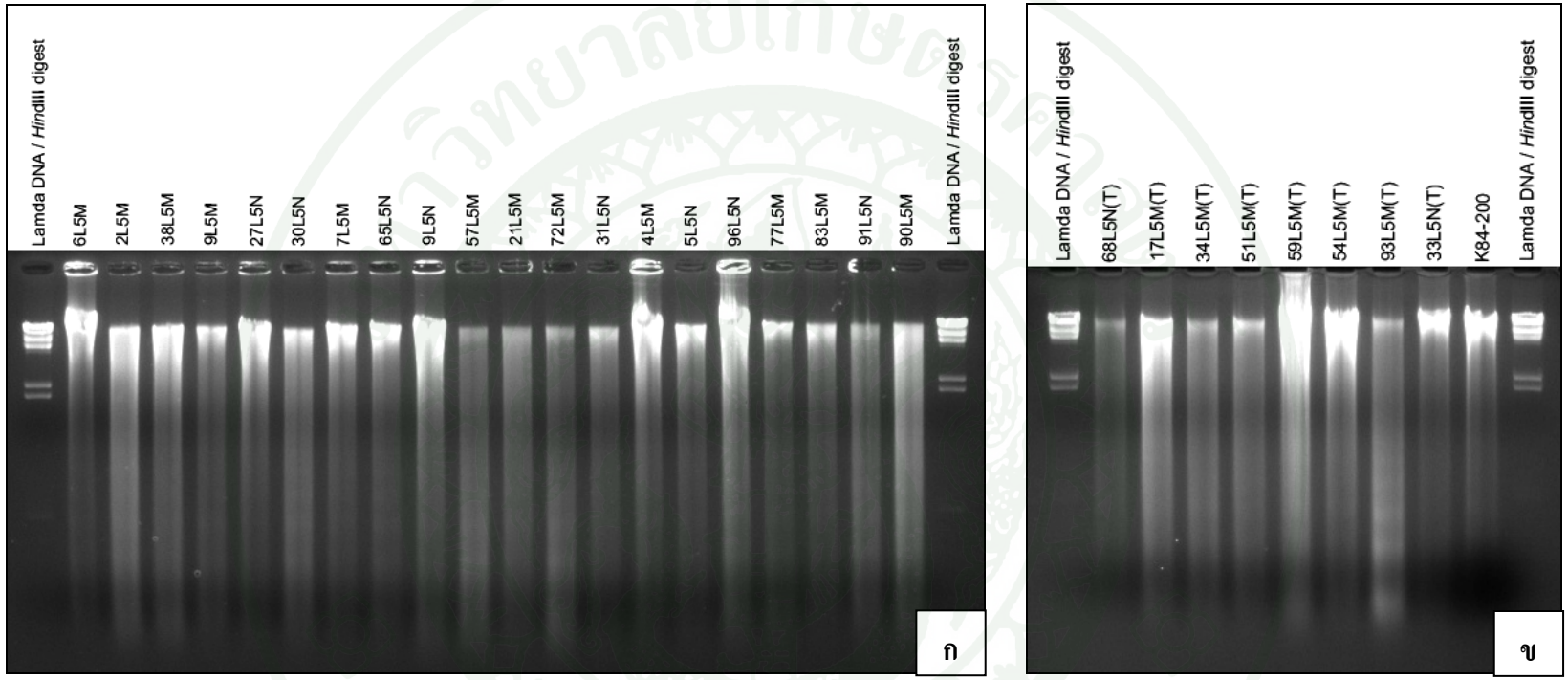
จากการใช้เทคนิค SSR และ RAPD ในการทดลองครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์รวมทั้งสิ้น 18 ไพรเมอร์ โดยเป็นไพรเมอร์ของเทคนิค SSR จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ และไพรเมอร์ของเทคนิค RAPD จำนวน 10 ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ทั้งหมดเกิดแถบดีเอ็นเอที่ค่อนข้างชัดเจน โดยรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วย SSR ไพรเมอร์ แสดงดังภาพผนวกที่ 1-8 และรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วย RAPD ไพรเมอร์ แสดงดังภาพผนวกที่ 9-18

แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจาก SSR ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ สามารถตรวจนับได้มากที่สุด 6 อัลลีล ในโลกัส SMC863CG และพบน้อยที่สุด 2 อัลลีล ในโลกัส MCSA205C07, SMC319CG และ SMC477CG แสดงดังตารางผนวกที่ 1-8 ส่วนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจาก RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ สามารถตรวจนับได้มากที่สุด 13 อัลลีล โลกัส universal primer6 (pharmacia kit) และพบน้อยที่สุด 5 อัลลีล ในโลกัส OPA-08 แสดงดังตารางผนวกที่ 9-18

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก somaclone ของอ้อย **ก** และ **ข** แถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก somaclone ที่เริ่มต้นมาจากใบอ่อนทั้งหมด 29 ตัวอย่าง **ค** และ **ง** แถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก somaclone ที่เริ่มต้นมาจากยอดอ่อนทั้งหมด 29 ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 4 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1 การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR

จากการนำผลของแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์ SSR ทั้ง 8 แบบ ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel electrophoresis) (ภาพผนวกที่ 1-8) มาลงคะแนน โดยใช้เลข “1” เกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นๆ (ตารางภาคผนวก 1-8)

นำผลที่ได้ข้างต้นมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 คำนวณหาค่า similarity จาก somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่าง ค่าที่คำนวณจากคะแนนแถบดีเอ็นเอมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ความเหมือนกันจะมีมากขึ้นเมื่อค่าที่คำนวณได้มีค่าเข้าใกล้ 1 และต่างกันมากขึ้นเมื่อค่าดังกล่าวเข้าใกล้ 0 เปรียบเทียบข้อมูลทั้งหมดด้วยตารางค่า similarity matrix หลังจากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA) เพื่อสร้าง phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง somaclone อ้อยทั้งหมด 58 ตัวอย่าง พบว่าค่า similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.79-1.00 และค่า similarity matrix อยู่ระหว่าง 0.6785-1.0000 (ตารางภาคผนวกที่ 19) และข้อมูลที่ได้จาก phylogenetic tree สามารถแบ่ง somaclone ของอ้อยได้เป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 5) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 99S5M, K84-200, K84-200, 8S5M, 97S5N และ 59L5M(T)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 10S5M, 15S5M, 79S5M, 75S5M(T), 2L5M, 65L5N, 9L5N, 57L5M, 5L5N, 77L5M, 7S5M, 9S5N, 80S5M(T), 27S5M, 93S5M, 70S5M, 17L5M(T), 90L5M, 58S5M, 14S5M(T), 4L5M, 21L5M, 31L5N, 72L5M, 91L5M, 18S5M, 20S5N, 27S5N, 17S5N(T), 68L5N(T), 9S5M, 6L5M, 83L5M, 27L5N, 9L5M, 34L5M(T), 30L5N, 7L5M, 96L5N, 69S5M และ 38L5M

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 56S5N

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 5S5N และ 50S5M

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย 34S5N(T), 11S5N(T), 45S5N(T), 51L5M(T) 42S5N(T) และ 33L5N(T)

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย 54L5M(T) และ 93L5M(T)

2.2 การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD

นำผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) มาลงคะแนน (ลักษณะเดียวกันกับการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR) ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 84 แถบ ค่าเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 8.4 แถบต่อไพรเมอร์ และวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 พบว่าค่า similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.65-1.00 ค่า similarity matrix อยู่ระหว่าง 0.4404-1.0000 (ตารางภาคผนวกที่ 20) และข้อมูลที่ได้จาก phylogenetic tree สามารถแบ่ง somaclone ของอ้อยได้เป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 6) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 99S5M, 10S5M, K84-200 และ K84-200

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 7S5M, 20S5M, 9S5M, 5S5N, 15S5M, 27S5M, 8S5M, 18S5M, 70S5M, 58S5M, 27S5N, 50S5M, 69S5M, 9S5N, 97S5N, 79S5M, 56S5N, 34S5N(T), 45S5N(T), 75S5M(T), 14S5M(T), 80S5M(T), 11S5N(T), 17S5N(T) และ 42S5N(T)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 93S5M

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 6L5M, 96L5N, 91L5M, 51L5M(T), 2L5M, 72L5M, 31L5N, 9L5M, 30L5N, 21L5M, 57L5M, 90L5M, 38L5M, 5L5N, 27L5N, 65L5N, 77L5M, 4L5M, 83L5M, 7L5M, 9L5N และ 33L5N(T)

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย 68L5N(T), 17L5M(T), 34L5M(T), 54L5M(T) และ 93L5M(T)

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย 59L5M(T)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 การวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR ร่วมกับ RAPD

นำผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR และ RAPD วิเคราะห์รวมกัน พบว่าผลจากการวิเคราะห์ในลักษณะเดียวกันกับข้อ 2.1 และ 2.2 ค่า similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.65-1.00 ค่า similarity matrix อยู่ระหว่าง 0.5625-1.0000 (ตารางภาคผนวกที่ 21) และข้อมูลที่ได้จาก phylogenetic tree สามารถแบ่ง somaclone ของอ้อยได้เป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 7) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 99S5M, K84-200, K84-200, 70S5M, 58S5M, 27S5N, 50S5M, 69S5M, 97S5N, 79S5M, 9S5N, 56S5N, 75S5M(T), 34S5N(T), 45S5N(T), 14S5M(T), 80S5M(T), 11S5N(T), 17S5N(T) และ 42S5N(T)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 7S5M, 20S5M, 9S5M, 5S5N, 15S5M, 27S5M, 8S5M, 18S5M และ 93S5M

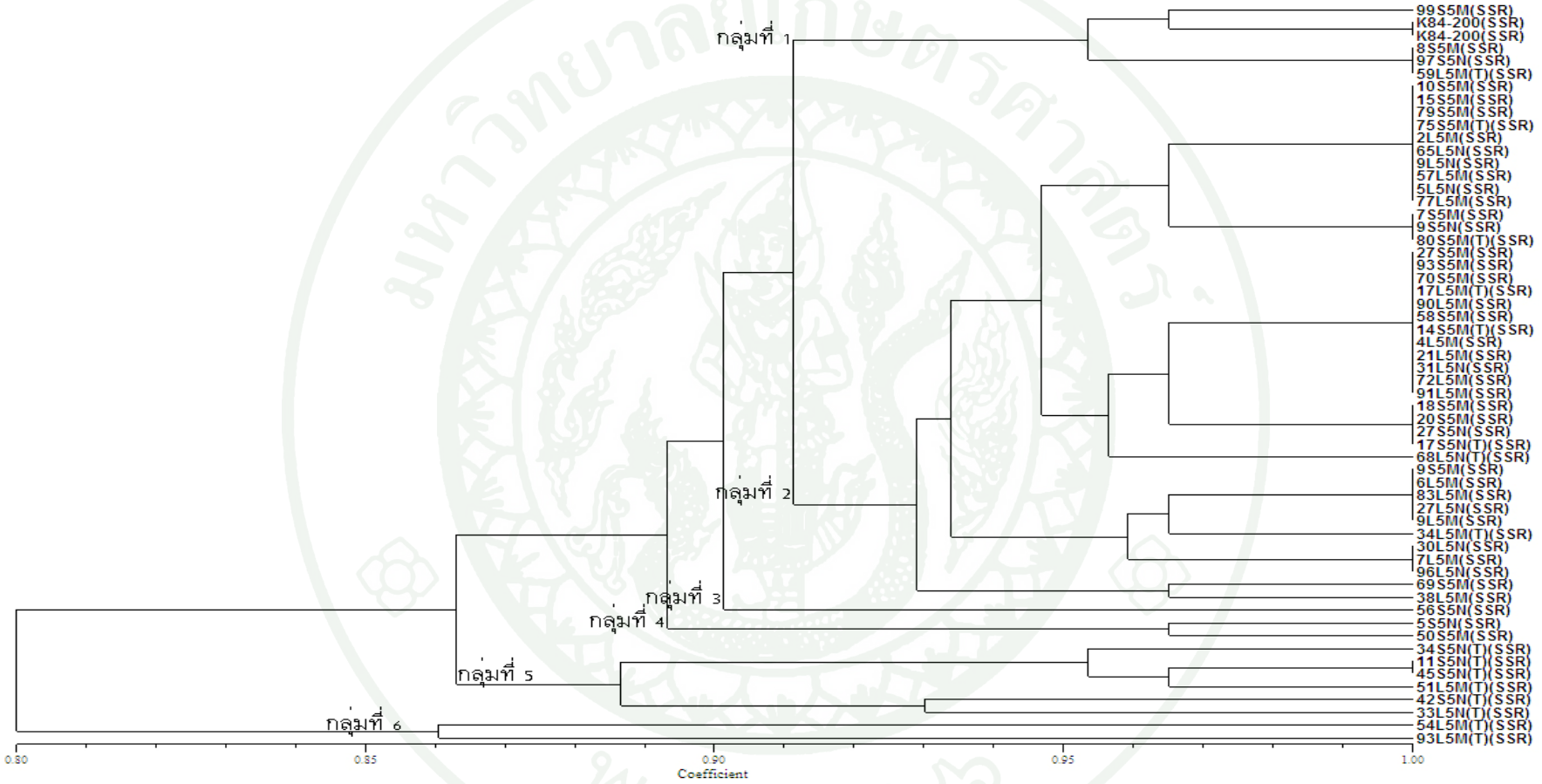
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 10S5M และ 33L5N(T)

กลุ่มที่4 ประกอบด้วย 6L5M, 96L5N, 7L5M, 9L5M, 30L5N, 21L5M, 57L5M, 90L5M, 72L5M, 31L5N, 2L5M, 38L5M, 5L5N, 27L5N, 4L5M, 65L5N, 77L5M, 9L5N, 83L5M, 91L5M และ 51L5M(T)

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย 68L5N(T), 17L5M(T), 34L5M(T), 54L5M(T) และ 93L5M(T)

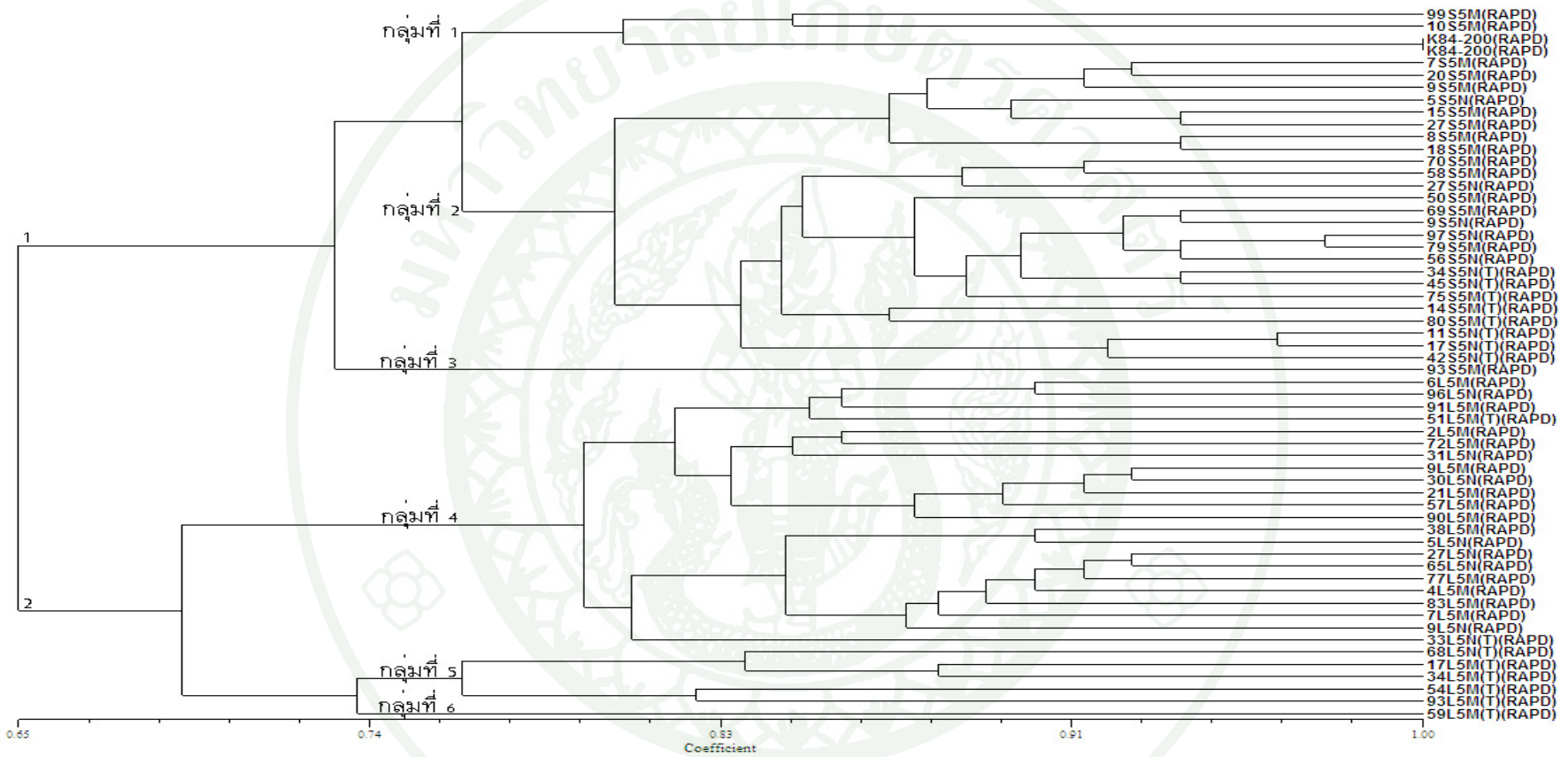
กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย 59L5M(T)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

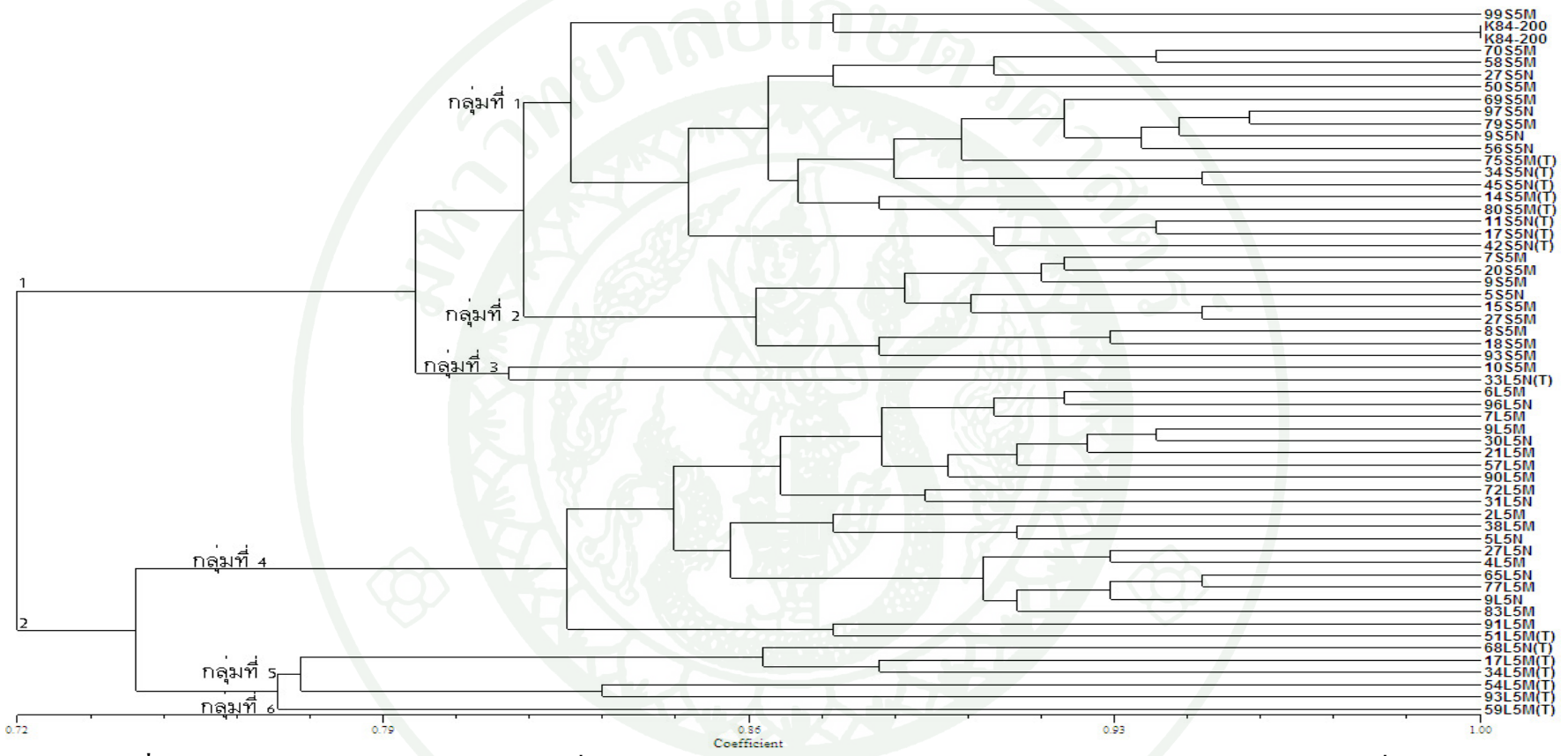


ภาพที่ 5 phylogenetic tree ของอ้อย 58 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 โดยอาศัยข้อมูลความเหมือน (similarity) ที่คำนวณจากเทคนิค SSR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 phylogenetic tree ของอ้อย 58 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 โดยอาศัยข้อมูลความเหมือน (similarity) ที่คำนวณจากเทคนิค RAPD



ภาพที่ 7 phylogenetic tree ของอ้อย 58 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 โดยอาศัยข้อมูลความเหมือน (similarity) ที่คำนวณจากเทคนิค SSR และ RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. เปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมของอ้อยที่ผ่านการเกิด somaclonal variation

somaclone ที่คัดเลือกจากตัวอย่างที่เริ่มต้นจากใบอ่อน และยอดอ่อน อย่างละ 8 ตัวอย่าง และตัวอย่างควบคุมอีก 1 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 17 ตัวอย่าง [9S5M, 10S5M, 50S5M, 56S5N, 99S5M, 2L5M, 21L5M, 38L5M, 65L5N, 83L5M, 11S5N(T), 34S5N(T), 75S5M(T), 17L5M(T), 59L5M(T), 93L5M(T) และ K84-200] พบว่าอ้อยพันธุ์ 84-200 มีจำนวนโครโมโซม 2n=80, 83, 100 และ 108 จำนวนโครโมโซมที่พบจากการตรวจสอบ somaclone ทุกตัวอย่าง มีจำนวนอยู่ระหว่าง 53-146 โดยจำนวนโครโมโซมที่พบมากที่สุดคือ 2n=80 ใน 11 จากทั้งหมด 17 ตัวอย่าง ได้แก่ 9S5M, 10S5M, 50S5M, 56S5N, 2L5M, 21L5M, 38L5M, 65L5N, 83L5M, 17L5M(T) และ K84-200 และพบว่าตัวอย่าง somaclone 2L5M มีจำนวนชุดโครโมโซมหลากหลายมากที่สุดถึง 6 ชุด ได้แก่ 2n=80, 90, 100, 110, 116 และ 146 ต้นควบคุม (K84-200) มีจำนวนชุดโครโมโซม 4 ชุด ได้แก่ 2n=80, 83, 100 และ 108 (ตารางที่ 7 และภาพที่ 8-24) พบโครงสร้างโครโมโซมแตกหักในตัวอย่าง 9S5M (ภาพที่ 8) 99L5M (ภาพที่ 12) 38L5M (ภาพที่ 15) 65L5N (ภาพที่ 16) 17L5M(T) (ภาพที่ 21) 59L5M(T) (ภาพที่ 22) และ 93L5M(T) (ภาพที่ 23) ค่าความถี่ของเซลล์ที่จำนวนโครโมโซมพบมากที่สุด คือ 80 โครโมโซม จำนวน 77 เซลล์ ลำดับรองลงมาคือ 90 และ 100 โครโมโซม พบจำนวน 37 และ 27 เซลล์ ตามลำดับ จากตัวอย่างทั้งหมด 193 เซลล์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 จำนวนโครโมโซมและจำนวนเซลล์ที่พบของอ้อยในแต่ละ somaclone

somaclone	จำนวนโครโมโซม 2n (จำนวนเซลล์ที่พบ)	จำนวนเซลล์ที่ศึกษา
9S5M	80(5), 90(2), 94(2), 105(1)	10
10S5M	80(3), 100(2)	5
50S5M	80(6), 93(2), 96(4), 103(1)	13
56S5N	80(5), 84(2)	7
99S5M	93(1), 100(6), 103(1)	8
2L5M	80(6), 90(5), 100(6), 110(2), 116(1), 146(1)	21
21L5M	64(2), 80(6), 90(5), 98(2)	15
38L5M	80(8), 96(2), 100(5), 112(1)	16
65L5N	80(6), 94(1), 108(1)	8
83L5M	53(1), 63(1), 80(11), 97(1)	14

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

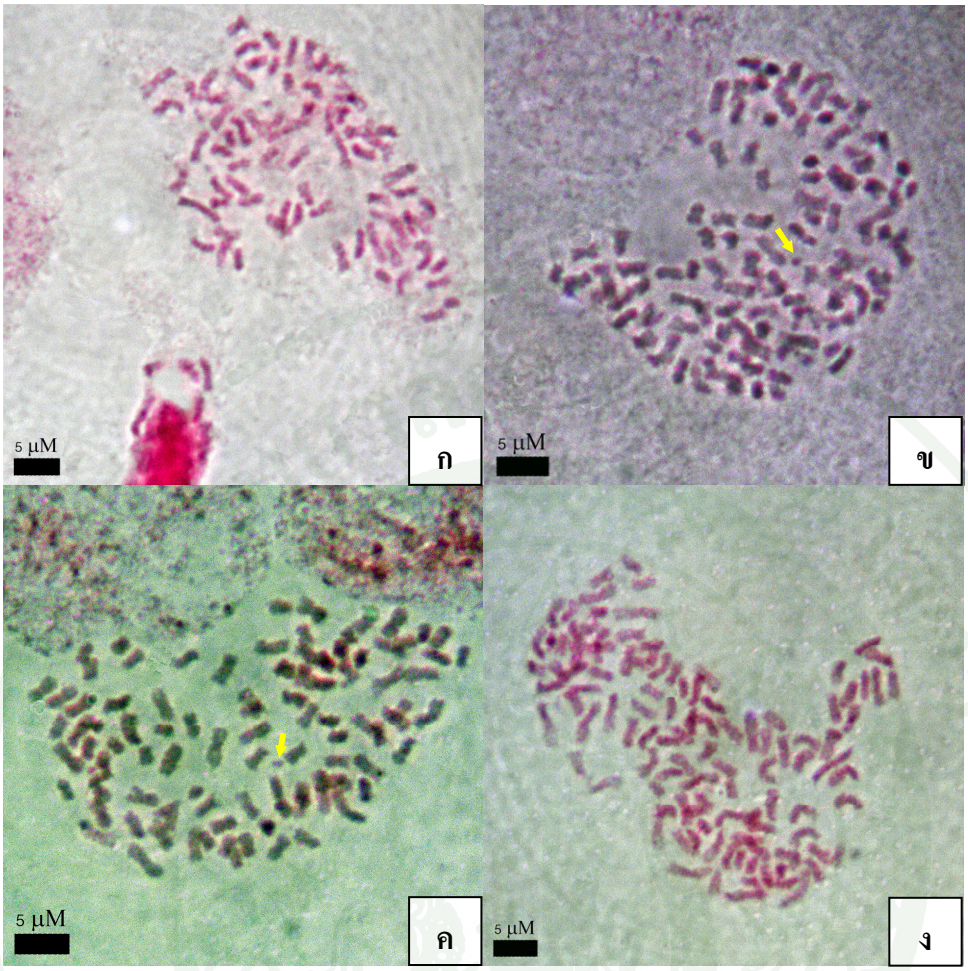
ตารางที่ 7 (ต่อ)

somaclone	จำนวนโครโมโซม 2n (จำนวนเซลล์ที่พบ)	จำนวนเซลล์ที่ศึกษา
11S5N(T)	63(1), 65(1), 72(2), 90(11)	15
34S5N(T)	94(2), 96(3)	5
75S5M(T)	90(5), 106(1)	6
17L5M(T)	80(6), 90(4), 108(1)	11
59L5M(T)	86(1), 90(5)	6
93L5M(T)	84(1), 110(6)	7
K84-200	80(15), 83(1), 100(8), 108(2)	26
จำนวนเซลล์ที่ศึกษาทั้งหมด		**193**

ตารางที่ 8 ความถี่ของจำนวนเซลล์อ้อยที่มีจำนวนโครโมโซมต่างกัน

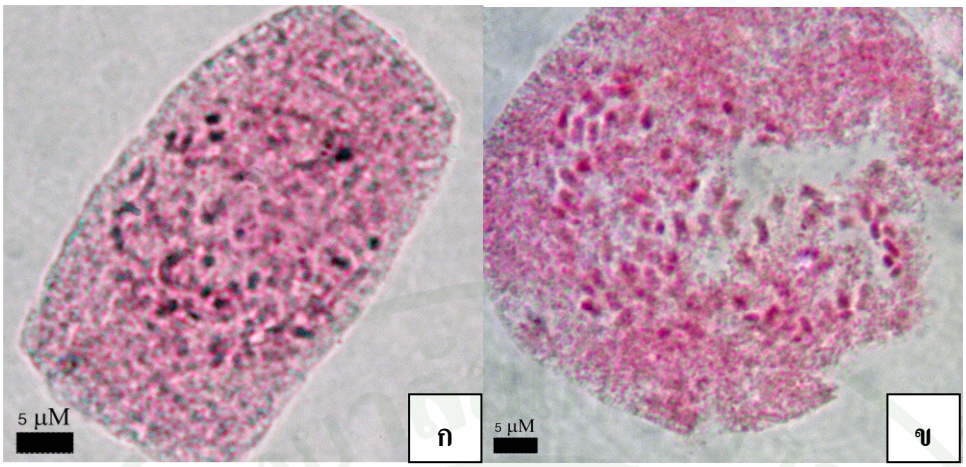
จำนวนโครโมโซม	จำนวนเซลล์	จำนวนโครโมโซม	จำนวนเซลล์
2n=53	1	2n=96	9
2n=63	2	2n=97	1
2n=64	2	2n=98	2
2n=65	1	2n=100	27
2n=72	2	2n=103	2
2n=80	77	2n=105	1
2n=83	1	2n=106	1
2n=84	3	2n=108	4
2n=86	1	2n=110	8
2n=90	37	2n=112	1
2n=93	3	2n=116	1
2n=94	5	2n=146	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

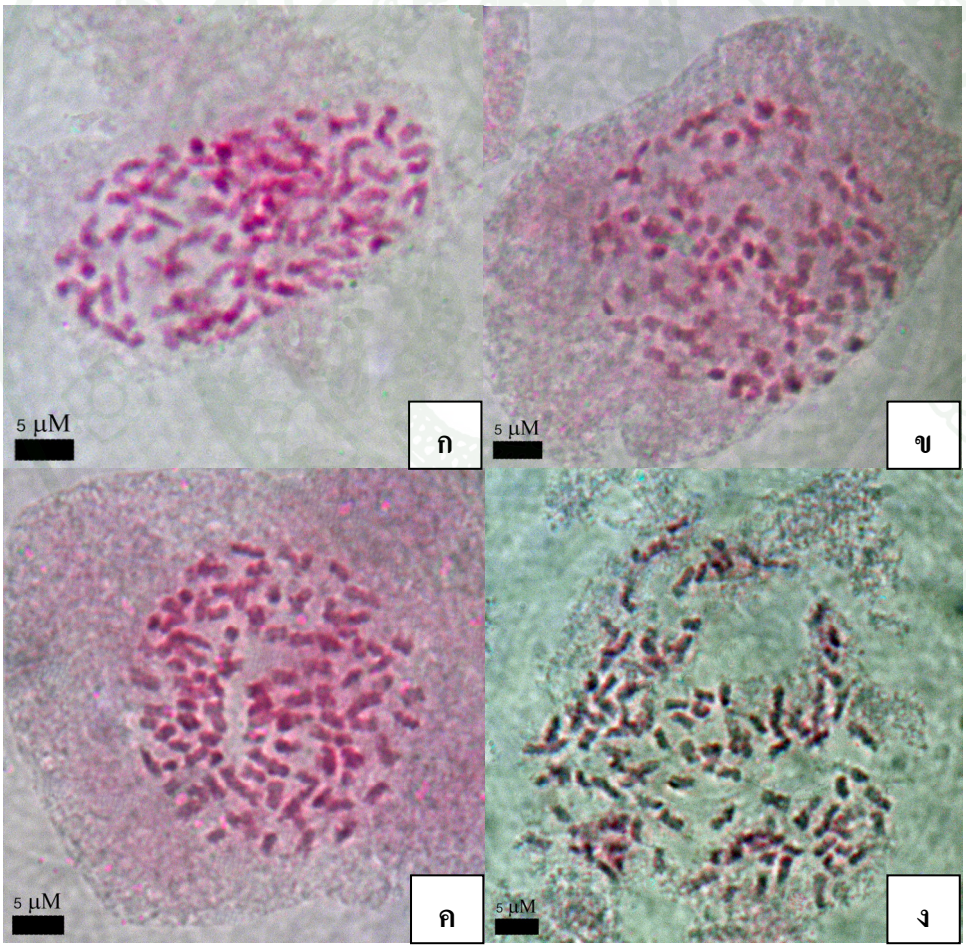


ภาพที่ 8 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 9S5M; **ก** 2n=80, **ข** 2n=90, **ค** 2n=94 และ **ง** 2n=105 (ลูกศรในภาพ คือ ชิ้นส่วนโครโมโซมแตกหัก)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

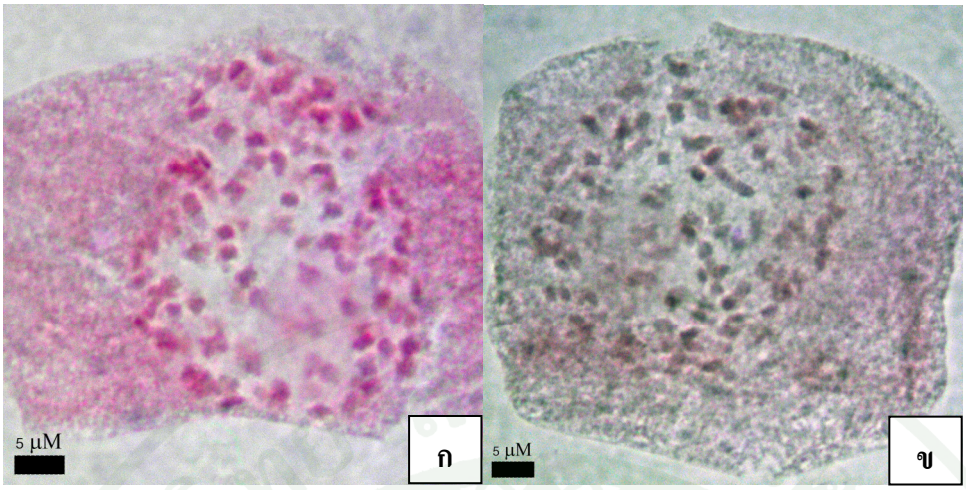


ภาพที่ 9 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 10S5M; **ก** 2n=80, **ข** 2n=100

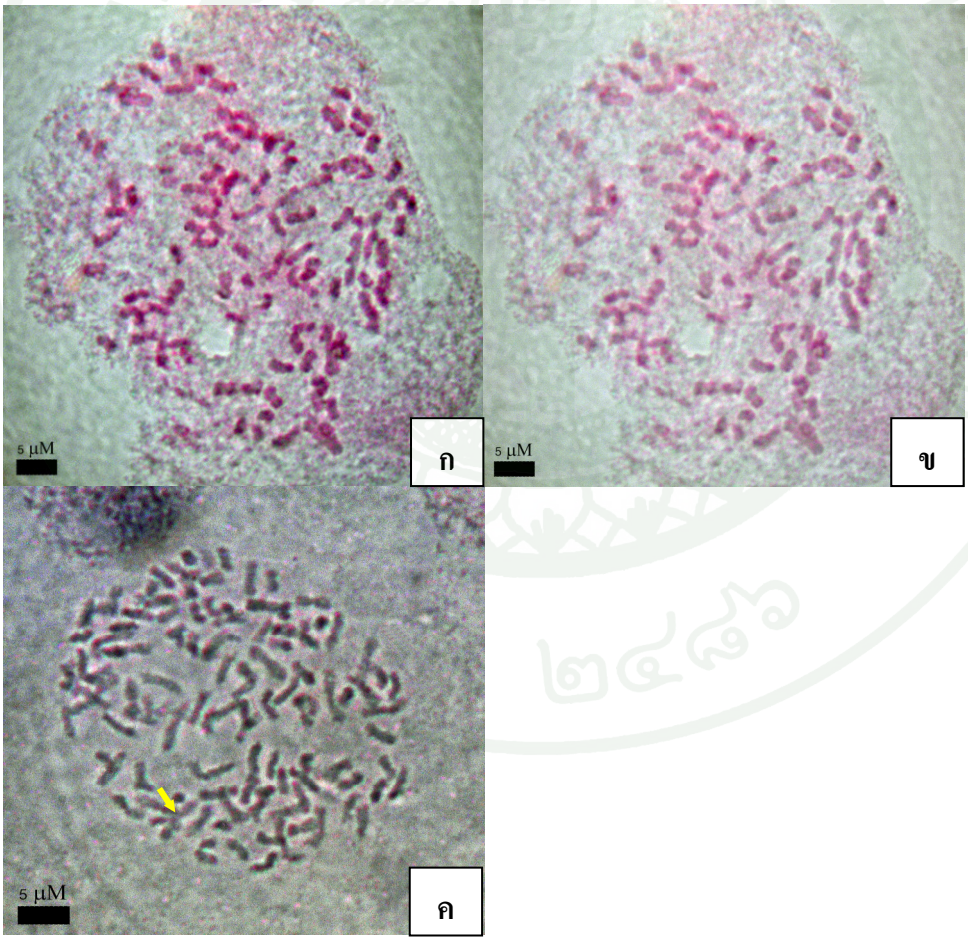


ภาพที่ 10 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 50S5M; **ก** 2n=80, **ข** 2n=93, **ค** 2n=96 และ **ง** 2n=103

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

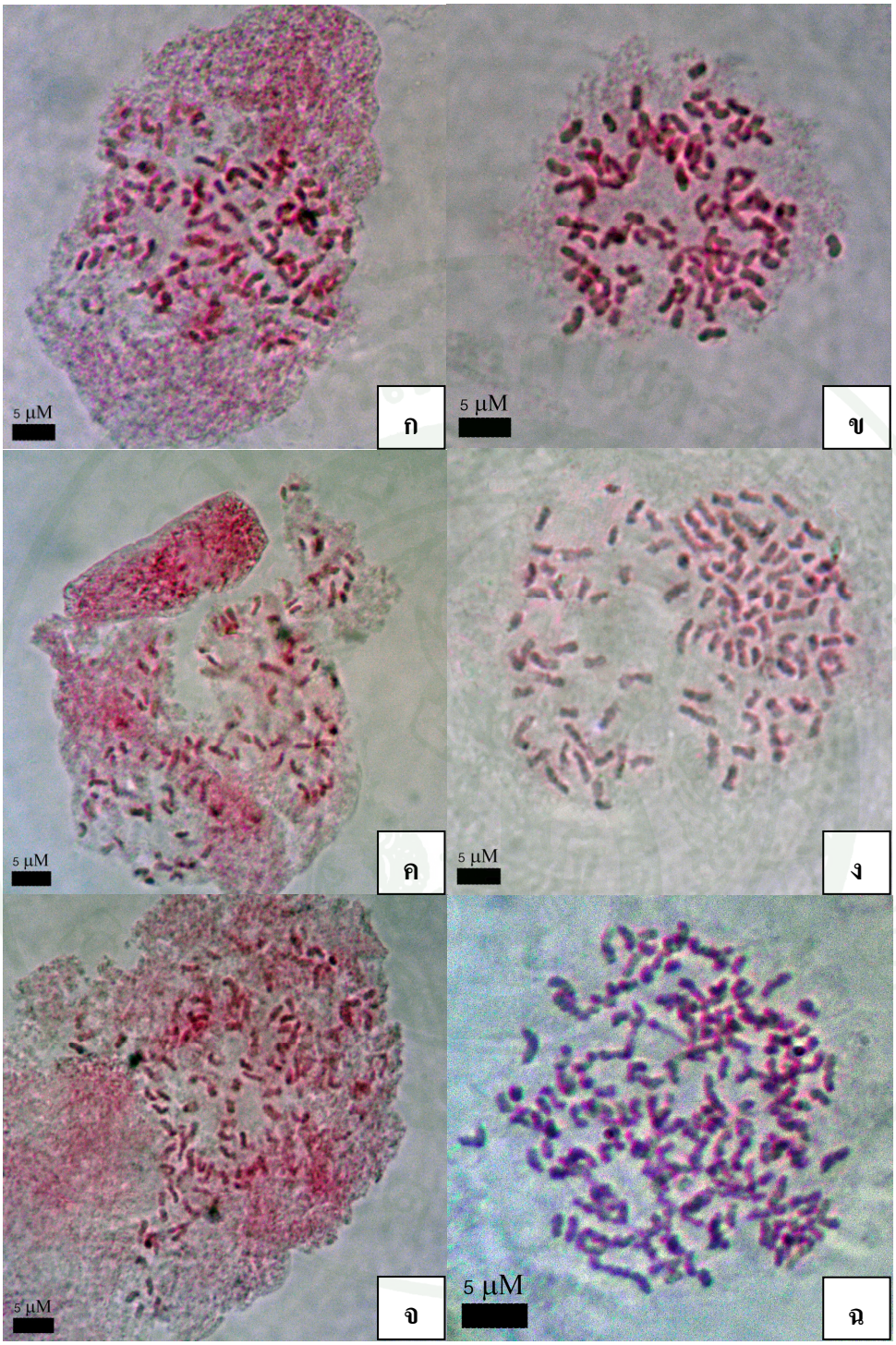


ภาพที่ 11 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 56S5N; **ก** 2n=80 และ **ข** 2n=84



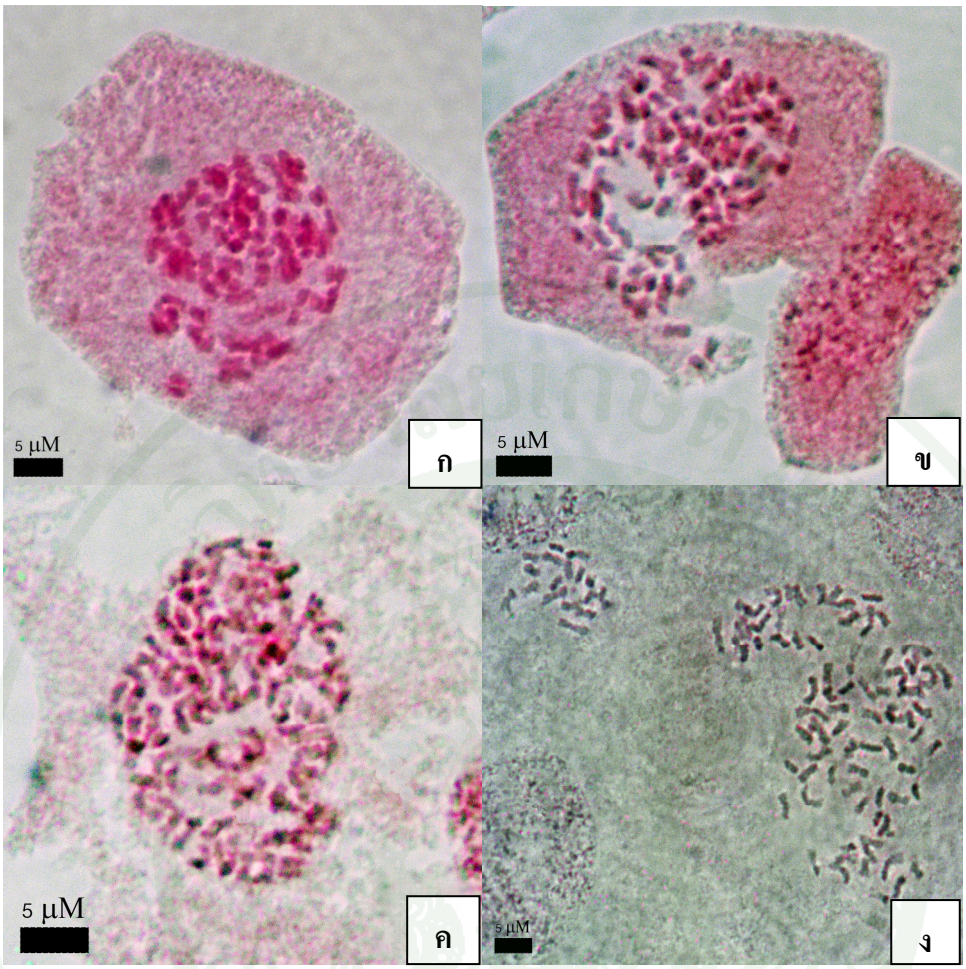
ภาพที่ 12 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 99S5M; **ก** 2n=93, **ข** 2n=100 และ **ค** 2n=103 (ลูกศรในภาพ คือ ชิ้นส่วนโครโมโซมแตกหัก)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



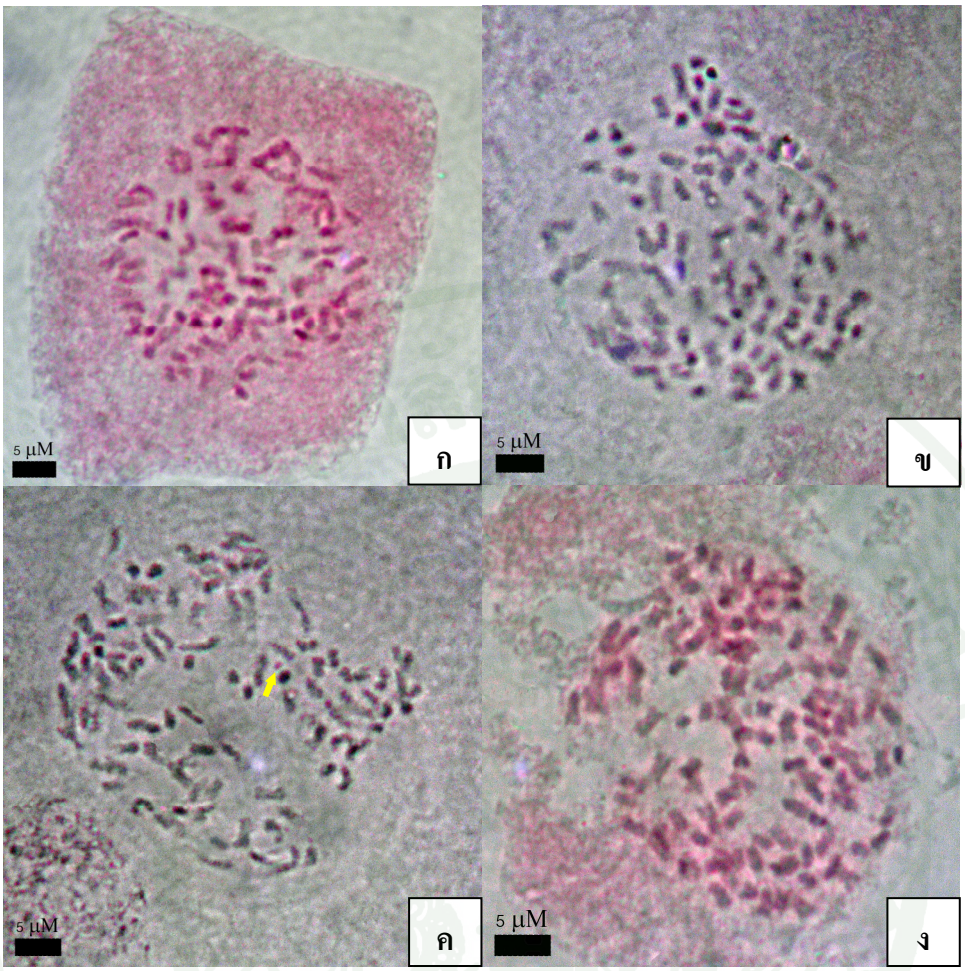
ภาพที่ 13 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 2L5M; **ก** 2n=80, **ข** 2n=90, **ค** 2n=100, **ง** 2n=110, **จ** 2n=116 และ **ฉ** 2n=146

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



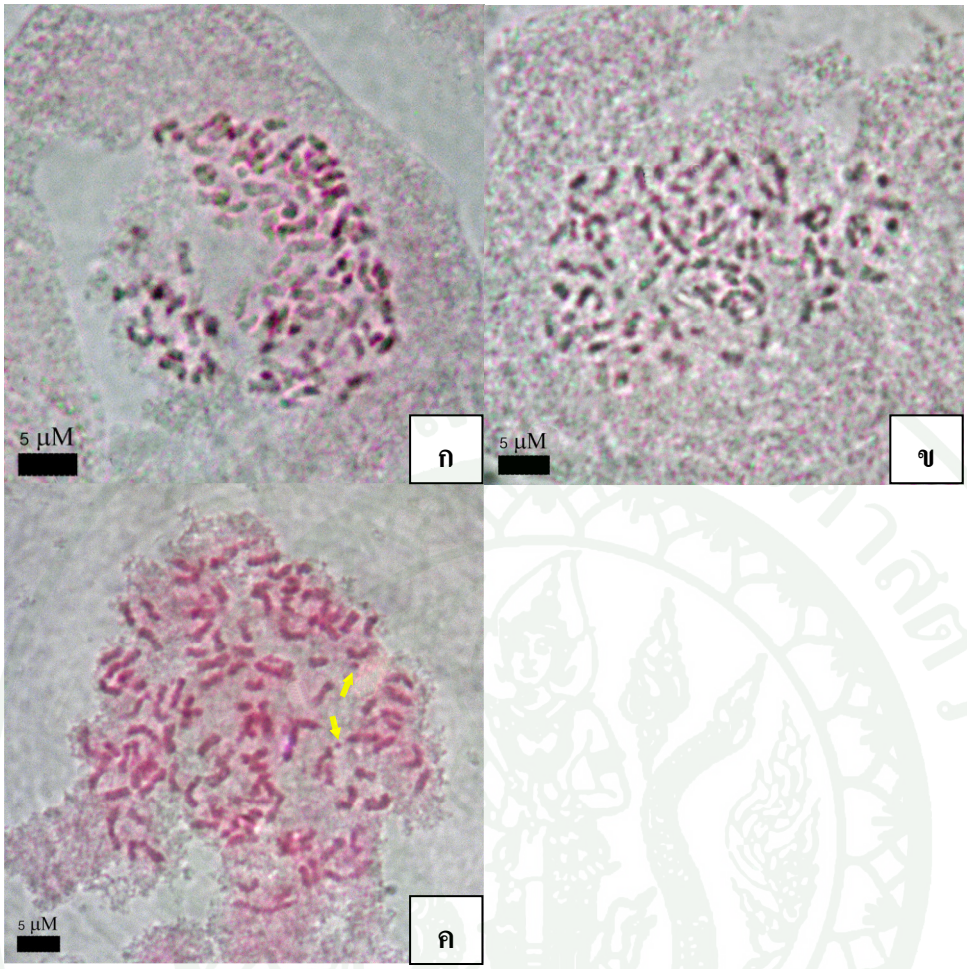
ภาพที่ 14 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 21L5M; **ก** 2n=64, **ข** 2n=80, **ค** 2n=90 และ **ง** 2n=98

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



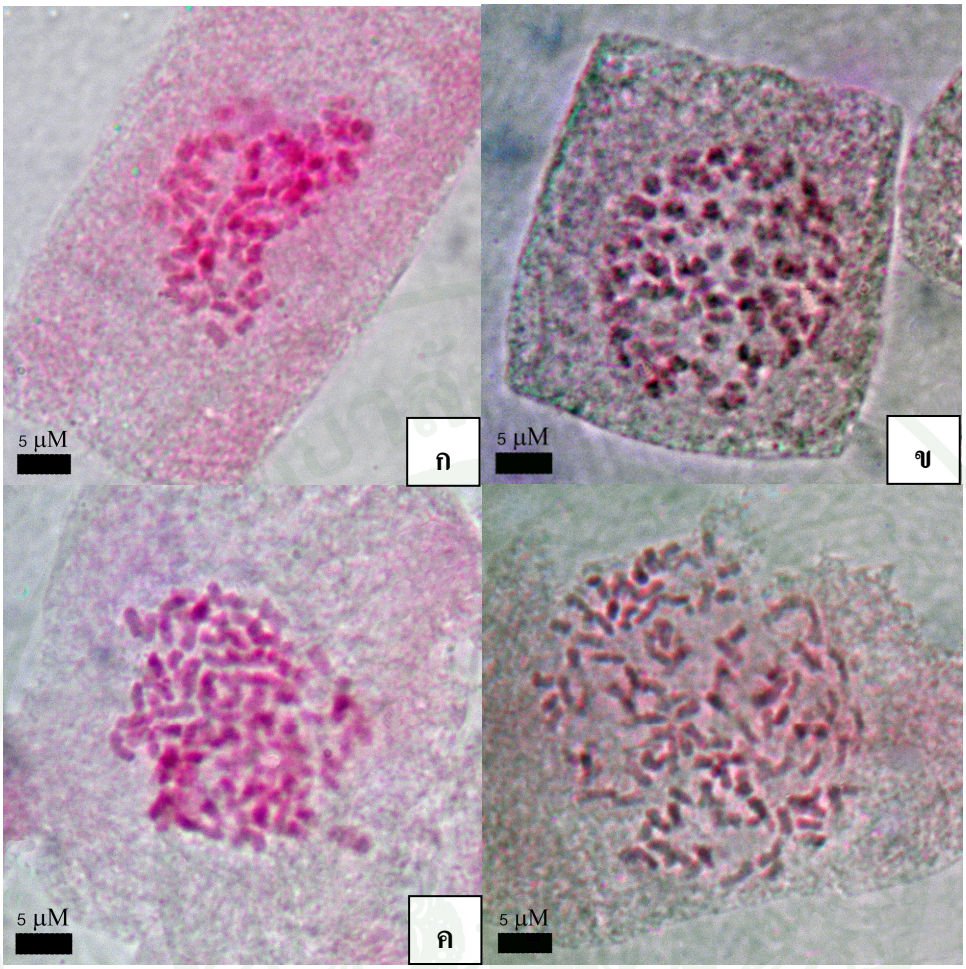
ภาพที่ 15 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 38L5M; **ก** 2n=80, **ข** 2n=96, **ค** 2n=100 และ **ง** 2n=112 (ลูกศรในภาพ คือ ชิ้นส่วนโครโมโซมแตกหัก)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



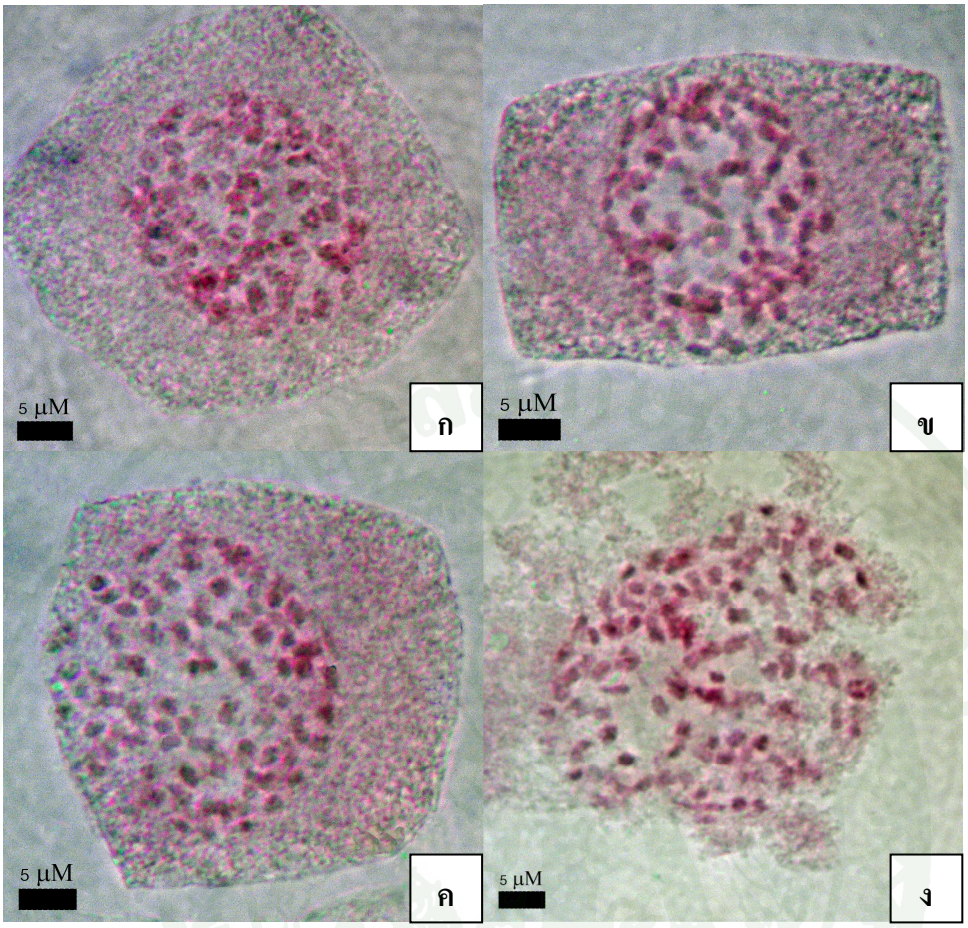
ภาพที่ 16 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 65L5N; **ก** 2n=80, **ข** 2n=94 และ **ค** 2n=108 (ลูกศรในภาพ คือ ชิ้นส่วนโครโมโซมแตกหัก)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

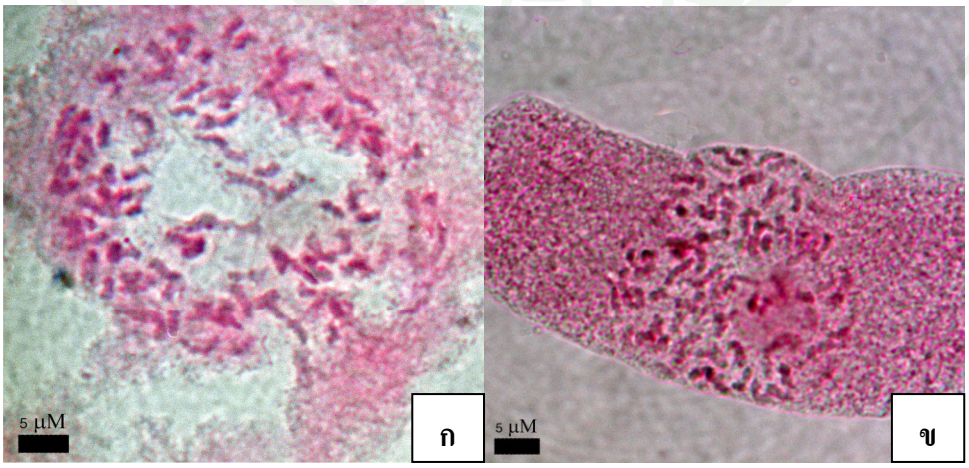


ภาพที่ 17 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 83L5M; **ก** 2n=53, **ข** 2n=63, **ค** 2n=80 และ **ง** 2n=97

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

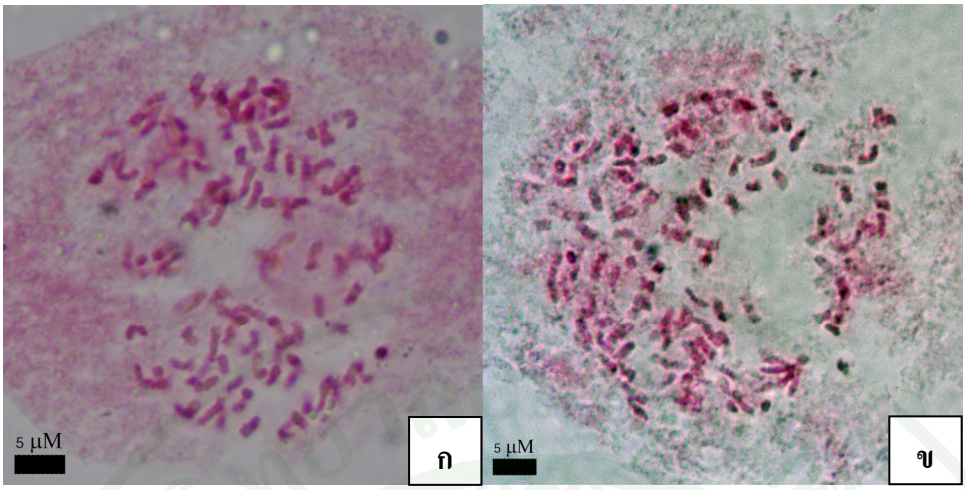


ภาพที่ 18 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 11S5N(T); **ก** 2n=63, **ข** 2n=65, **ค** 2n=72 และ **ง** 2n=90

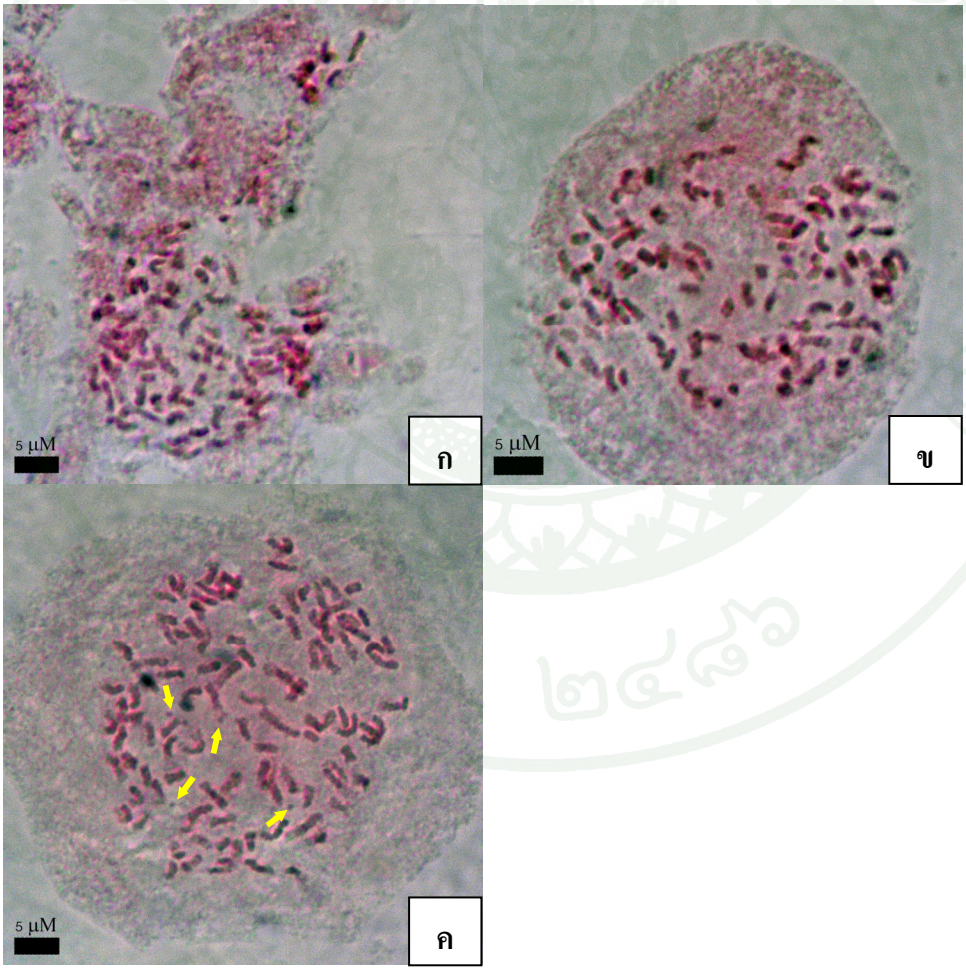


ภาพที่ 19 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 34S5N(T); **ก** 2n=94 และ **ข** 2n=96

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

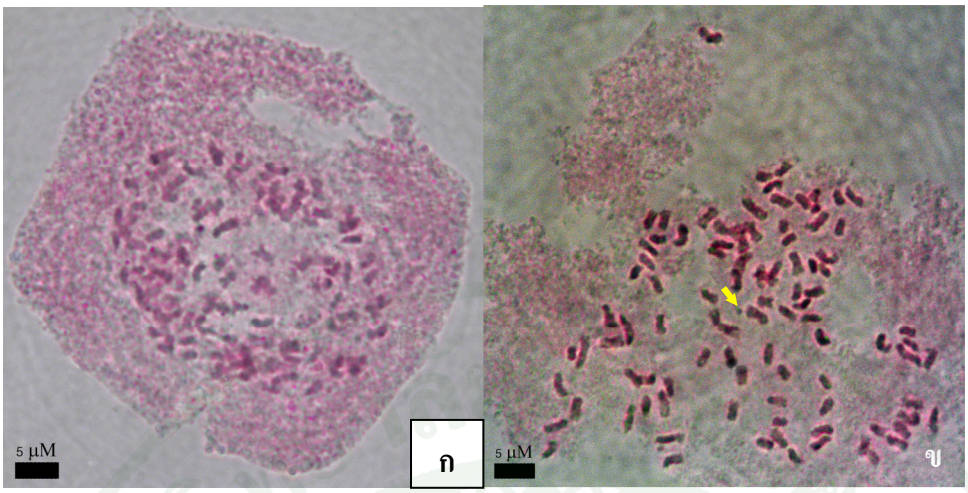


ภาพที่ 20 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 75S5M(T); **ก** 2n=90 และ **ข** 2n=106

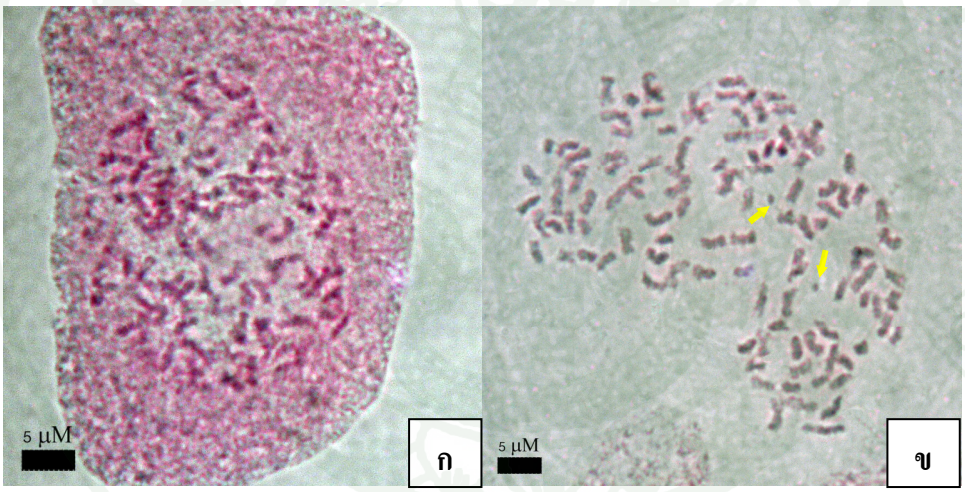


ภาพที่ 21 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 17L5M(T); **ก** 2n=80, **ข** 2n=90 และ **ค** 2n=108 (ลูกศรในภาพ คือ ชิ้นส่วนโครโมโซมแตกหัก)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

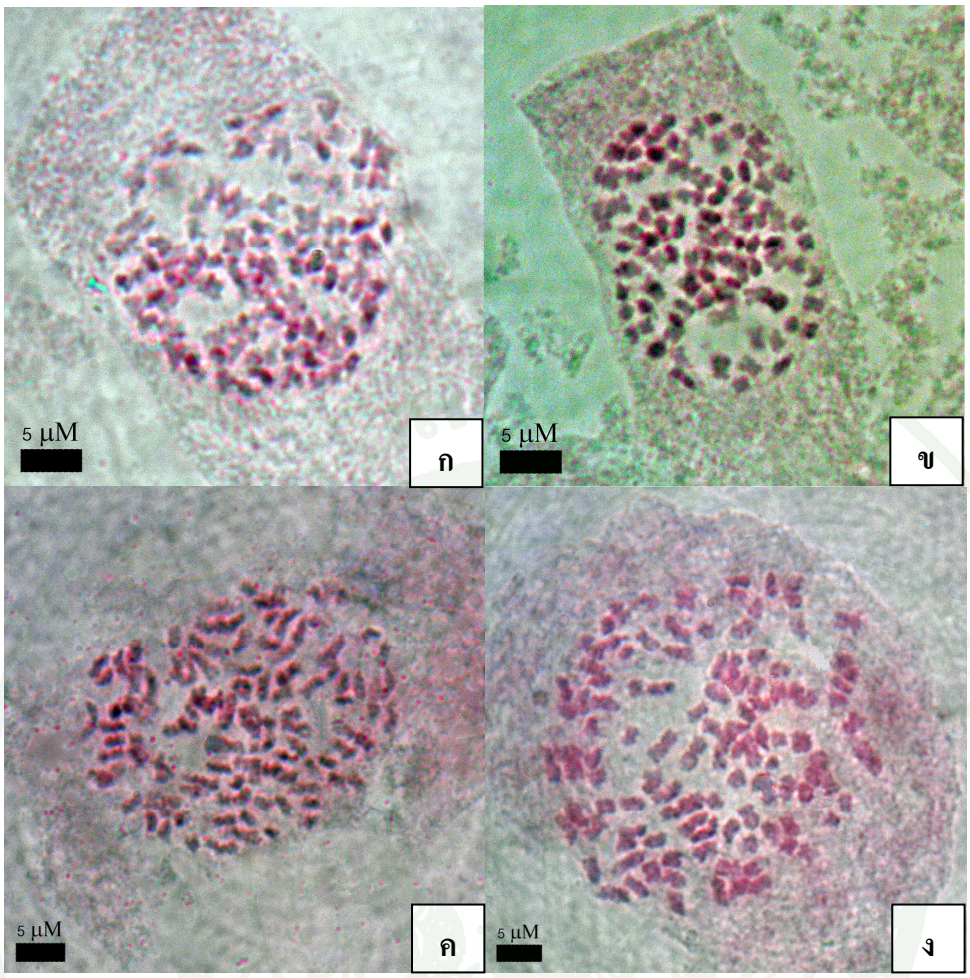


ภาพที่ 22 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 59L5M(T); **ก** 2n=86 และ **ข** 2n=90 (ลูกศรในภาพ คือ ชิ้นส่วนโครโมโซมแตกหัก)



ภาพที่ 23 โครโมโซมของอ้อยใน somaclone 93L5M(T); **ก** 2n=84 และ **ข** 2n=110 (ลูกศรในภาพ คือ ชิ้นส่วนโครโมโซมแตกหัก)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 24 โครโมโซมของอ้อยในตัวอย่าง K84-200; **ก** 2n=80, **ข** 2n=83, **ค** 2n=100 และ **ง** 2n=108

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถจำแนกความแปรผันที่เกิดขึ้นระหว่าง somaclone ทั้งหมด 17 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 คุณสมบัติของ somaclone อ้อย

ตัวอย่าง	ในอาหารเติมเกลือ 1.5% (w/v)	SSR (จัดกลุ่ม)	RAPD (จัดกลุ่ม)	SSR+ RAPD (จัดกลุ่ม)	จำนวนโครโมโซม (2n)
9S5M	ไม่รอด	2	2	2	2n=80, 90, 94, 105
10S5M	ไม่รอด	2	1	3	2n=80, 100
50S5M	ไม่รอด	4	2	1	2n=80, 93, 96, 103
56S5N	ไม่รอด	3	2	1	2n=80, 84
99S5M	ไม่รอด	1	1	1	2n=93, 100, 103
2L5M	ไม่รอด	2	4	4	2n=80, 90, 100, 110, 116, 146
21L5M	ไม่รอด	2	4	4	2n=64, 80, 90, 98
38L5M	ไม่รอด	2	4	4	2n=80, 96, 100, 112
65L5N	ไม่รอด	2	4	4	2n=80, 94, 108
83L5M	ไม่รอด	2	4	4	2n=53, 63, 80, 97
11S5N(T)	รอด	5	2	1	2n=63, 65, 72, 90
34S5N(T)	รอด	2	5	1	2n=94, 96
75S5M(T)	รอด	2	2	1	2n=90, 106
17L5M(T)	รอด	2	5	5	2n=80, 90, 108
59L5M(T)	รอด	1	6	6	2n=86, 90
93L5M(T)	รอด	6	5	5	2n=84, 110
K84-200	-	1	1	1	2n=80, 83, 100, 108

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถใช้ชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบอ่อนและยอดอ่อนของอ้อยได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Heinz and Mee (1969) และ Gandonou *et al.* (2005) ซึ่งทดสอบในอ้อยและให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองครั้งนี้ ซึ่ง 2,4-D เป็นสารในกลุ่มไซโตไคนินมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตเกี่ยวกับยอดและใบ รวมถึงการสร้างแคลลัสในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยวภายใต้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกด้วย (Ramanand *et al.,* 2006)

นอกจากนี้สูตรอาหาร MS ที่ไม่ได้เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชักนำแคลลัสให้กลายเป็นยอดได้ดี ซึ่งตรงกับวิธีการของ สิริภัทร์และคณะ (2539) แต่แตกต่างจากการทดลองของ Ali *et al.* (2008) ที่ใช้สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองนี้สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ kinetin สามารถชักนำยอดได้น้อยกว่าสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทั้งนี้การใช้อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ kinetin เพื่อต้องการศึกษาแนวทางและเปรียบเทียบการใช้อาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างรากในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และผลจากการทดลองพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มนี้ชักนำยอดได้น้อยกว่า หรือไม่สามารถชักนำยอดได้เลยเมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน

จากการคงสภาพความเป็นแคลลัสเป็นระยะเวลาต่างกัน ก่อนที่จะชักนำยอด พบว่าระยะเวลามีผลต่อความสามารถในการชักนำยอดอ้อย เมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้นจำนวนยอดที่ชักนำได้น้อยลง หรือไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เลย ทั้งนี้เป็นไปตามงานวิจัยของ Zucchi *et al.* (2002) ที่กล่าวถึงระยะเวลาเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเพาะเลี้ยงแคลลัส รวมถึงงานวิจัยของ Moriya and Iweo (1992) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการชักนำยอดจากเนื้อเยื่อแคลลัสของผักกาดหอม พบว่าในช่วง 15-30 วัน สามารถชักนำยอดได้ดี แต่เมื่อผ่านไป 50 วัน การชักนำยอดจากแคลลัสลดลงจนไม่สามารถชักนำได้

นอกจากนี้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสมีผลต่อความสามารถในการชักนำให้เกิดจำนวนยอด (Ogura, 1990) ผลจากการทดลองนี้พบว่าการนำชิ้นส่วนยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงจะสามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากกว่าการใช้ชิ้นส่วนใบอ่อน ทั้งนี้สาเหตุ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื่องจากชิ้นส่วนยอดอ่อนเป็นเนื้อเยื่อที่มีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) รวมอยู่ด้วยจำนวนมาก ซึ่งเนื้อเยื่อดังกล่าวพร้อมที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่ต่างๆ ได้ง่ายกว่า ส่วนชิ้นส่วนใบอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงในครั้งนี้เป็นเนื้อเยื่อที่ได้พัฒนาไปเป็นใบเรียบร้อยแล้ว แคลลัสและจำนวนยอดที่ชักนำได้จึงมีจำนวนน้อยตามไปด้วย

ในงานวิจัยครั้งนี้แถบดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการ PCR ทั้งเทคนิค SSR และ RAPD บางส่วนเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน หรือมีลักษณะที่ไม่เป็น single band แต่เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นแถบหนาและกว้างไม่แยกเป็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน หรือมีลักษณะที่เรียกว่า stutter band ทั้งนี้จึงทำให้การลงคะแนนแถบดีเอ็นเออาจมีความคลาดเคลื่อนได้ ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการเข้าคู่ผิดตำแหน่งระหว่างการจำลองตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอ ในกระบวนการ PCR (Schlotterer and Tautz, 1992; ชมนาถ, 2550)

จากงานวิจัยของ Oropeza *et al.* (1995) พบว่าระยะการเปลี่ยนถ่ายอาหารจำนวน 3 ครั้ง หรือเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 12 สัปดาห์ สามารถทำให้อ้อยเริ่มเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมและสามารถตรวจสอบพบลักษณะดังกล่าวได้ด้วยวิธี RAPD สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่ใช้ระยะเปลี่ยนถ่ายอาหารจำนวน 5 ครั้ง หรือเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลามากกว่า 15 สัปดาห์ ซึ่งพบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรมเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี SSR และ RAPD

การตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยวิธี SSR เพียงอย่างเดียวสามารถแยกความแปรผันของอ้อยได้ 6 กลุ่ม แต่ตัวอย่างภายในกลุ่มเดียวกันมี somaclone จำนวนมากที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ไม่แตกต่างกัน แต่จากการตรวจสอบด้วยวิธี RAPD สามารถแยกกลุ่มได้ 6 กลุ่มเช่นเดียวกัน อ้อยแต่ละ somaclone ในแต่ละกลุ่มเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมไม่มากก็น้อยในทุกตัวอย่าง ยกเว้นเพียงต้นควบคุม (K84-200) 2 ตัวอย่างเท่านั้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน ซึ่งเป็นการยืนยันว่าวิธีการตรวจสอบด้วย RAPD มีประสิทธิภาพที่ดีและเหมาะสมกับการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมอ้อยที่ใกล้ชิดกันมาก ให้ข้อมูลในการวิเคราะห์มากเพราะ RAPD ไพรเมอร์ที่ใช้ในวิธีการนี้เป็นไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนจีโนม จึงมีโอกาสที่ไพรเมอร์จะเข้าเกาะได้หลายตำแหน่ง ให้ข้อมูลในการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างมากและทำได้รวดเร็วอีกด้วย (สุรินทร์, 2545)

ในการทดลองครั้งนี้การตรวจสอบด้วยวิธี SSR ให้ข้อมูลในการวิเคราะห์ที่จำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งมาก เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อบริเวณลำดับเบสที่เรียง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวซ้ำๆ กันของพืชจำพวกอ้อย (Cordeiro *et al.,* 2000) จึงให้ข้อมูลในการวิเคราะห์ที่น้อยกว่าวิธี RAPD ถึงอย่างไรก็ตามจากการจัดกลุ่มด้วย phylogenetic tree การตรวจสอบด้วยวิธีทั้งสองให้ผลที่สอดคล้องกันมาก ถึงแม้ในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ของ SSR เพียง 8 คู่ไพรเมอร์เท่านั้น และสามารถยืนยันได้อีกครั้งหนึ่งจากการนำข้อมูลของวิธีทั้งสองมาวิเคราะห์ร่วมกันซึ่งพบว่าให้ผลการจัดกลุ่มได้สอดคล้องกัน แสดงให้เห็นว่าการใช้วิธีตรวจสอบทั้ง SSR และ RAPD สามารถแยกความแปรผันทางพันธุกรรมของอ้อยที่มีจุดกำเนิดจากอ้อยพันธุ์เดียวกันได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Selvi *et al.* (2003) ใช้ SSR ในการหาความแปรผันหรือจัดกลุ่มความหลากหลายของอ้อยที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนและมีประสิทธิภาพ และการทดสอบของ Cordeiro (2001) ใช้ไพรเมอร์ในการหาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ 21 คู่ไพรเมอร์ (มี 17 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถใช้ได้) ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของพันธุกรรมอ้อยได้เช่นกัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านการเกิดแคลลัส พบว่าการเกิด somaclonal variation ใน somaclone ที่ชักนำได้ ตรวจสอบจากข้อมูลที่ได้จากวิธี RAPD ข้อมูลที่ได้นำมาสร้างเป็น phylogenetic tree นอกจากที่จะแบ่งกลุ่มความแตกต่างได้อย่างละ 6 กลุ่มในแต่ละวิธีแล้ว ยังพบว่าสามารถแบ่งอ้อยออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้อย่างชัดเจนจำนวน 2 กลุ่ม (ภาพที่ 6 และ 7) ดังนี้ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี RAPD กลุ่มที่ 1 จากการเริ่มเพาะเลี้ยงแคลลัสมาจากยอดอ่อน ได้แก่ 99S5M, 10S5M, 7S5M, 20S5M, 9S5M, 5S5N, 15S5M, 27S5M, 8S5M, 18S5M, 70S5M, 58S5M, 27S5N, 50S5M, 69S5M, 9S5N, 97S5N, 79S5M, 56S5N, 34S5N(T), 45S5N(T), 75S5M(T), 14S5M(T), 80S5M(T), 11S5N(T), 17S5N(T), 42S5N(T) และ 93S5M รวมถึงต้นควบคุมทั้ง 2 ตัวอย่างด้วย (K84-200 และ K84-200) และกลุ่มที่ 2 จากการเริ่มเพาะเลี้ยงแคลลัสมาจากใบอ่อน ได้แก่ 6L5M, 96L5N, 91L5M, 51L5M(T), 2L5M, 72L5M, 31L5N, 9L5M, 30L5N, 21L5M, 57L5M, 90L5M, 38L5M, 5L5N, 27L5N, 65L5N, 77L5M, 4L5M, 83L5M, 7L5M, 9L5N, 33L5N(T), 68L5N(T), 17L5M(T), 34L5M(T), 54L5M(T), 93L5M(T) และ 59L5M(T) จากผลการแบ่งกลุ่มข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเริ่มต้นด้วยชิ้นส่วนยอดอ่อนและใบอ่อนในการนำมาเพาะเลี้ยงแคลลัสมีผลต่อการเกิดความแปรผันทางพันธุกรรมในทิศทางที่ต่างกัน นอกจากนี้ในการทดลองครั้งนี้พบว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์ร่วมกันระหว่าง SSR และ RAPD สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วย RAPD แต่มีความแตกต่างกันในตัวอย่าง 33LN(T) เท่านั้นที่ถูกจัดกลุ่มอยู่ในกลุ่มที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ogura (1990) ที่กล่าวถึงผลของชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่ต่างกันให้ผลของ somaclonal variation ที่ต่างกันออกไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การคัดเลือกอ้อยทนเค็มจาก somaclone ที่ได้จากการเกิด somaclonal variation เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายชีววิทยาโมเลกุล ไม่พบความชัดเจนที่แสดงถึงการทนเค็มระหว่างอ้อยที่สามารถทนและไม่สามารถทนได้ในอาหารที่เติมเกลือ แต่สามารถสังเกตได้ว่า somaclone ส่วนหนึ่งในกลุ่มทนเค็ม ถูกจัดกลุ่มให้แยกออกจากพันธุ์ควบคุมอย่างชัดเจนเมื่อนำข้อมูลมาทำ phylogenetic tree ได้แก่ กลุ่มที่ 5 และ 6 ของการตรวจสอบจากวิธี SSR และ RAPD ที่มีแต่ somaclone ที่สามารถรอดในอาหารเติมเกลืออยู่ในกลุ่มที่กล่าวไปแล้วข้างต้นเท่านั้น โดยในรายงานของ Flowers (2004) ได้อธิบายไว้ว่า ลักษณะทนเค็มของอ้อยไม่ได้ควบคุมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์หรือยีนตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งเท่านั้น แต่จำเป็นต้องควบคุมการทำงานจากหลายลักษณะ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้อาจกล่าวได้ว่า ผลที่วิเคราะห์ได้นั้นมีส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับความสามารถของอ้อยในการทนความเค็มในอาหารที่เติมเกลือ แต่ไม่สามารถบ่งบอกได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบถึงความสัมพันธ์กันระหว่างลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แสดงออกมา

อ้อยพันธุ์ปลูกการค้าดั้งเดิม *Saccharum officinarum* มีจำนวนโครโมโซม 2n=80 โครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 10 ส่วนอ้อยพันธุ์ป่า *S. spontaneum* มีจำนวนโครโมโซม 2n=40-128 โครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 8 หรือ 10 (D'Hont *et al*., 1998 and Amalraj and Balasundaram, 2006) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลของการทดลองนี้พบว่าอ้อยพันธุ์ K84-200 มีจำนวนโครโมโซม 2n=53-146 จำนวนชุด และโครโมโซมที่พบส่วนใหญ่ 11 จาก 17 somaclone คือ 2n=80 และความถี่ของเซลล์ที่พบจำนวนโครโมโซมที่มากที่สุดคือ เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n=80 พบ 77 เซลล์ จากทั้งหมด 193 เซลล์ เมื่อวิเคราะห์จากข้อมูลข้างต้นแล้วพบว่าอ้อยพันธุ์ K84-200 มีโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 10 เช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับอ้อยพันธุ์ปลูกดั้งเดิม (*S. officinarum*) โดยที่ระดับ ploidy คือ octaploid (8X)

การทดลองนี้พบข้อสังเกตประการหนึ่ง คือ somaclone ส่วนใหญ่ที่อยู่ในกลุ่มทนเค็มทั้งหมด 6 ตัวอย่าง มีถึง 5 ตัวอย่างที่จำนวนโครโมโซมแตกต่างออกไป คือไม่พบชุดโครโมโซม 2n=80 ซึ่งชุดโครโมโซมชุดดังกล่าวเป็นชุดที่พบค่อนข้างมากใน somaclone ที่ไม่ทนเค็มและต้นควบคุม อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่สังเกตได้ตรงส่วนนี้ไม่สามารถชี้วัดถึงลักษณะอ้อยทนเค็มและไม่ทนเค็ม

ข้อสังเกตอีกประการหนึ่งคือ อ้อยพันธุ์ K84-200 โครโมโซมที่ตรวจพบ คือ 2n=80, 83, 100, 108 จำนวนโครโมโซมของอ้อยที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านแคลลัส พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วงที่พบในตัวอย่าง K84-200 แต่อย่างไรก็ตามยังมีบาง somaclone ที่พบจำนวน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โครโมโซมที่ต่ำกว่า 2n=80 และบางกรณีพบจำนวนโครโมโซมที่สูงกว่า 2n=108 ซึ่งแนวโน้มตรงส่วนนี้โอกาสที่พบจำนวนโครโมโซมที่เปลี่ยนแปลงต่ำกว่ามีสัดส่วนที่มากกว่า somaclone ที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่า โดยเฉพาะตัวอย่าง 11S5N(T) อย่างไรก็ตามไม่สามารถหาสาเหตุตรงจุดนี้ได้เช่นกัน ว่าเป็นผลมาจากสาเหตุใด หรืออาจเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบสุ่มซึ่งไม่มีความแน่นอนเท่านั้น

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าจำนวนโครโมโซมไม่มีความคงที่ในทุกๆ somaclone โดยมีความแปรผันแตกต่างกันออกไปในแต่ละ somaclone พบการขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซม (anueploid) พบการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมเป็นชุดๆ (polyploid) รวมถึงการเกิดการแตกหักของโครโมโซมเป็นท่อนๆ ในบาง somaclone อีกด้วย เช่นใน somaclone 9S5M, 99S5M, 38L5M, 65L5N, 17L5M, 59L5M(T) และ 93L5M(T) (ตำแหน่งตามลูกศรที่ชี้ในภาพที่ 8, 12, 15, 16, 21, 22 และ 23 ตามลำดับ) ทั้งนี้จำนวนโครโมโซมที่ไม่แน่นอนนี้เกิดจาก chromosomal mosaics (Heinz and Mee, 1969) ซึ่งเห็นได้ชัดเจนที่สุดในตัวอย่าง somaclone 2L5M มีจำนวนชุดโครโมโซมมากที่สุด คือ 2n=80, 90, 100, 110, 116, 146 ซึ่งสอดคล้องกันกับงานด้าน somaclonal variation ที่พบการเปลี่ยนแปลงในชุดโครโมโซมและจำนวนโครโมโซมในพืชบางส่วนด้วย เช่น อ้อย (Heinz and Mee, 1971) ข้าวโพด (Earle and Kuehnle, 1990) ข้าวบาร์เล่ย์ (Gupta, 1998) กุยช่าย (Do *et al.,* 1999) แตงกวา (Ladyzynski *et al.,* 2002) และ ผักกาดหอม (Wen *et al.*, 2004) ทั้งนี้อาจเกิดจากความผิดปกติในขั้นตอนการแบ่งนิวเคลียส ผิดปกติในการทำงานของเส้นใยสปินเดิล (spindle) ที่ทำหน้าที่ดึงโครโมโซมไปที่ขั้วของเซลล์ หรือเกิดการสูญหายของโครโมโซมในระหว่างการแบ่งเซลล์ (Nair, 1972)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นเนื้อเยื่อใบอ่อนและยอดอ่อนเกิดแคลลัสในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้

2. อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ สามารถพัฒนาแคลลัสให้เป็นยอดได้ดีกว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงแคลลัสมีผลต่อจำนวนยอดที่ถูกชักนำ

4. การเลือกชิ้นเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงแคลลัสมีผลต่อทิศทางการเกิด somaclonal variation

5. การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR สามารถแบ่งกลุ่มความแปรผันทางพันธุกรรมได้ 6 กลุ่ม จากตัวอย่างอ้อย 58 ตัวอย่าง ด้วยวิธี UPGMA โดยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงอยู่ระหว่าง 0.80-1.00 และค่าความคล้ายคลึงอยู่ระหว่าง 0.6785-1.0000

6. การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD สามารถแบ่งกลุ่มความแปรผันทางพันธุกรรมได้ 6 กลุ่ม จากตัวอย่างอ้อย 58 ตัวอย่าง ด้วยวิธี UPGMA โดยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงอยู่ระหว่าง 0.65-1.00 และค่าความคล้ายคลึงอยู่ระหว่าง 0.4404-1.0000 และสามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่มใหญ่ที่แยกความแตกต่างระหว่างชิ้นส่วนใบอ่อนและยอดอ่อนได้อย่างชัดเจน

7. การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR ร่วมกับ RAPD สามารถแบ่งกลุ่มความแปรผันทางพันธุกรรมได้ 6 กลุ่ม จากตัวอย่างอ้อย 58 ตัวอย่าง ด้วยวิธี UPGMA โดยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงอยู่ระหว่าง 0.72-1.00 และค่าความคล้ายคลึงอยู่ระหว่าง 0.5625-1.0000

8. อ้อยพันธุ์ K84-200 มีโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 10 ระดับ ploidy คือ octaploid

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. somaclone ที่ได้จากการศึกษาโดยเริ่มต้นจากพันธุ์ K84-200 พบจำนวนโครโมโซมน้อยที่สุดคือ 2n=53 พบจำนวนโครโมโซมมากที่สุดคือ 2n=146 และความถี่ของเซลล์ที่พบจำนวนโครโมโซมมากที่สุดคือ 2n=80

10. somaclone 2L5M พบจำนวนชุดโครโมโซมที่มีแปรผันมากที่สุดคือ 2n=80, 90, 100, 110, 116, 146

11. จากผลการทดลองทั้งการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลและเซลล์พันธุศาสตร์ พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยโดยผ่านการเกิดแคลลัสจะทำให้ได้ somaclone ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อยตามเป้าหมายที่ต้องการในอนาคตได้

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของอ้อยควรเก็บรากอ้อยในช่วงเวลา 11.00 น. ถึง 12.00 น. เพื่อช่วยให้ง่ายต่อการมองเห็นในระยะเมทาเฟส (metaphase) ของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส (mitosis)

2. หลายกรณีพบว่าจำนวนโครโมโซมของอ้อยยากต่อการนับจำนวน เนื่องด้วยจำนวนโครโมโซมที่มีมากจึงเกิดการซ้อนทับกันได้ง่าย เกิดการแตกหักของโครโมโซม รวมถึงการย้อมด้วยสีย้อมที่ไม่ชัดเจน ส่งผลให้การนับมีความคลาดเคลื่อน ดังนั้นควรเพิ่มจำนวนเซลล์ในการศึกษาให้มากขึ้น เพื่อลดข้อผิดพลาดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชมนาถ เกิดคง. 2550. **การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของแหล่งรวบรวมพันธุ์มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค Simple Sequence Repeat Markers.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พัฒนศักดิ์ รุจิหาญ. 2550. **กิจกรรมแอนติออกซิแดนซ์และการสะสมโพรลีนต่อการทนแล้งในอ้อย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง และ K. Anamthawat Jonsson. 2551. **การเตรียมโครโมโซมพืช.** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

วรัญญา สีกัน. 2546. **การโคลนและการหาลำดับเบสของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดจากสภาพความเค็มในอ้อย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิริภัทร์ พราหมณีย์, กรึก นฤทม และ มณฑา วงมณีโรจน์. 2539. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อยทนเค็ม. **วารสารอ้อยและน้ำตาลไทย.** 3 (1): 26-32.

สิริภัทร์ พราหมณีย์ และ ภัทรวดี พิทักษ์พลรัตน์. 2543. DNA Polymorphism ของอ้อยพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส. *ใน* **รายงานการประชุมอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติ ครั้งที่ 4 15-17 สิงหาคม 2543**. สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร, นครราชสีมา.

สุชีลา สิริวเสรี. 2530. **การศึกษาทางสัณฐานวิทยา เซลล์วิทยา และพฤกษเคมีของอ้อยป่าบางต้นพันธุ์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. **อ้อยโรงงาน-น้ำตาล.** ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร. แหล่งที่มา: www.oae.go.th, 11 มกราคม 2553.

เอิบ เขียวรื่นรมย์. 2550. **ดินเค็มในประเทศไทย**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อมรา คัมภิรานนท์. 2546. **พันธุศาสตร์ของเซลล์.** ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Al-Zahim, M.A., B.V. Ford-Lloyd and H.J. Newbury. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. **Plant Cell Reports** 18: 473-477.

Anamthawat-Jonsson, K. 2001. Molecular cytogenetics of introgressive hybridization in plants. **Methods in Cell Science**. 23: 141-150.

Anamthawat-Jonsson, K. 2003. Preparation of chromosome from plant leaf meristems for karyotype analysis and *in situ* hybridization. **Methods in Cell Science**. 25: 91-95.

Arencibia, A.D., E.R. Carmona, M.T. Cornide, S. Castiglione, J. O'Relly, A. Chinea, P. Oramas and F. Sala. 1999. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell eletroporation. **Transgenic Research**. 8: 349-360.

Bernstein, L., R.A. Clark, L.E. Francois and M.D. Derderian. 1966. Salt tolerance of NCo varieties of sugar cane II. Effects of soil salinity and sprinkling on chemical composition. **Agron. J.** 58: 503–507.

Biswas, M.K., M. Dutt, U.K. Roy, R. Islam and M. Hossain. 2009. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. **Scientia Horticulturae**. 122: 409-416.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bohnert, H.J., D.E. Nelson and R.G. Jensen. 1995. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell.** 7: 1099-1111.

Botella, M.A., M.A. Quesada, A.K. Kononowicz, R.A. Bressan, F. Pliego, P.M. Hasegawa and V. Valpuesta. 1994. Characterization and *in-situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase messenger-RNA. **Plant Mol. Biol.** 25: 105–114.

Bouman, H. and G.J. De Klerk. 2001. Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. **Theor Appl Genet.** 102: 111-117.

Bozorgipour, R. and J.W. Snape. 1997. An assessment of somaclonal variation as a breeding tool for generating herbicide tolerant genotypes in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Euphytica**. 94: 335-340.

de Bruxelles, G.L., W.J. Peacock, E.S. Dennies, R. Dolferus. 1996. Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in Arabidopsis. **Plant Physiol.** 111: 381–391.

Burner, D.M. 1991. Cytogenetic analyses of sugarcane relatives (Andropogoneae: Saccharinae). **Euphytica**. 54: 125-133.

Caetano-Anolles, G. and P.M. Gresshoff. 1998. **DNA markers: protocols, application and overviews**. Wiley-vch, New York.

Chatterjee, B. and P.D. Gupta. 1997. Induction of somaclonal variation by tissue culture and cytogenetic analysis in *Oryza sativa* L. **Biologia Plantarum**. 40 (1): 25-32.

Cha-um, S. and C. Kirdmanee. 2009. Proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plantlets in response to iso-osmotic salt and water-deficit stress. **Agricultural Sciences in China.** 8 (1): 51-58.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Cheeseman, J.M. 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. **Plant Physiol.** 87: 547-550.

Chinnusamy, V., A. Jagendrof and J.K. Zhu. 2005. Under standing and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**. 45: 437-448.

Chokchaichamnankit, P., W. Chulalaksananukul, C. Phengklai and K. Anamthawat-jonsson. 2007. Karyotypes of some species of *Castanopsis, Lithocarpus* and *Quercus* (Fagaceae) from Khun Mae Kuong Forest in Chiang Mai province, northern Thailand. **THAI FOR BULL (BOT).** 35: 38-44.

Chu, C.C. 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops, pp. 43-50. *In* **Proceeding of symposium on plant tissue culture.** Science Press, Peking.

Clements, H.F. 1980. **Sugarcane crop logging and crop control**. Univ. Press of Hawii, Honolulu.

Cordeiro, G.M., G.O. Taylor and R.J. Henry. 2000. Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* sp.), a highly polyploid species. **Plant Science**. 155: 161-168.

_____, R. Casu, C.L. McIntyre, J.M. Manners and R.J. Henry. 2001. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. **Plant Science**. 160: 1115-1123.

_____, T.L. Maguire, K.J. Edwards and R.J. Henry. 1999. Optimization of a microsatellite enrichment technique in *Saccharum* spp. **Plant Molecular Biology** Reporter. 17: 225-229.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Cordeiro, G.M., Y-B. Pan and R.J. Henry. 2003. Sugarcane microsatellite for the assessment of diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science**. 165: 181-189.

Da Silva, C.M., C.A. Mangolin, A.S. Mott and M.F.P.S. Machado. 2008. Genetic diversity associated with *in vitro* and conventionnal bud propagation of Saccharum varieties using RAPD analysis. **Plant Breeding.** 127: 160-165.

Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant minipreparation: version II. **Plant Mol Rep.** 1: 19-21.

D'Hont, A., D. Ison, K. Alix, C. Roux and J.C. Glaszmann. 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome.** 41: 221-225.

Do, G.S., B.B. Seo, J.M. Ko, S.H. Lee, J.H. Pak, I.S. Kim and S.D. Song. 1999. Analysis of somaclonal variation through tissue culture and chromosomal localization of rDNA sites by flurescent in situ hybridization in wild *Allium tuburosum* and a regenerated varaint. **Plant Cell and Organ Culture.** 57: 113-119.

Earle, E.D. and A.R. Kuehnle. 1990. Somaclonal variation in maize, pp. 326-351. *In* Y.P.S. Bajaj, ed. **Biotechnology in agriculture and forestry: Somaclonal variation in crop improvement I.** Springer Verlag, Berlin.

Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany.** 55 (396): 307-319.

Flower**s,** T.J. and A.R. Yeo. 1995**.** Breeding for salinity resistance in crop plants-where next? **Australian Journal of Plant Physiology.** 22: 875–884.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Food and agriculture organization (FAO). 2007. **Food and agricuture commodities production.** FAOSTAT. Available Source: http://www.fao.org, December 2, 2009.

Gandonou, Ch., J. Abrini, M. Idaomar, N.S. Senhaji. 2005. Response of sugarcane (*Saccharum* sp.) varieties to embryogenic callus induction and *in vitro* salt stress. **African Journal of Biotechnology.** 4 (4): 350-354.

Gomathi, R. and T.V. Thandapani. 2005. Salt stress in relation to nutrient accumulation and quality of sugarcane genotypes. **Sugar Tech.** 7 (1): 39-47.

GomezCadenas, A., V. Arbona, J. Jacas, E. PrimoMillo, M. Talon. 2002. Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants. **J. Plant Growth Regu.** 21: 234-240.

Gricsbach, R.J. 1989. Selection of Dwarf *Hemero callis* through tissue culture. **Hortscience**. 24 (6): 1027-1028.

Gupta, P.K. 1998. Chromosomal basis of somaclonal variation in plants, pp. 149-168. *In* S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Alhoowalia, eds. **Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement.** Kluwer Academic Publishers, London.

Ha, S., P.H. Moore, D. Heinz, S. Kato, N. Ohmido and K. Fukui. 1999. Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence *in situ* hybridization and imaging methods. **Plant Molecular Biology**. 39: 1165-1173.

Hamada, A., M. Shono, T. Xia, M. Ohta, Y. Hayashi, A. Tanaka, T. Hayakawa. 2001. Isolation and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini.* **Plant Mol. Biol.** 46: 35-42.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hammerschlag, F.A. 2000. Resistant responses of peach somaclone 122-1 to *Xanthomonas campestris* pv. pruni and to *Pseudomonas syringae* pv. syringae. **Hortscience**. 35 (1): 141-143.

Heinz, D.J. and G.W.P. Mee. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop science**. 9: 346-348.

Heinz, D.J. and G.W.P. Mee. 1971. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in Saccharum species hybrids clones derived from callus tissue. **Am. J. Bot.** 53: 257-262.

Henry, R.J. 1998. Molecular and biochemical characterization of somaclonal variation, pp. 485-499. *In* S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Alhoowalia, eds. **Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement.** Kluwer Academic Publishers, London.

Hogarth, P.J. 1999. **The Biology of Mangroves.** Oxford University Press, NewYork.

Hoy, J.W., K.P. Bischoff, S.B. Milligan and K.A. Gravois. 2003. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. **Euphytica**. 129: 237-240.

Iyengar, E.R.R. and M.P. Reddy. 1996. Photosynthesis in highly salt tolerant plants, pp. 897-909. *In*: M. Pesserkali, ed. **Handbook of photosynthesis**, Baten Rose.

Jain, S. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**. 118: 153-166.

Joshi, G.V. and G.R. Naik. 1980. Response of sugarcane to different types of salt stress. **Plant and Soil.** 56 (2): 255-263.

Kerepesi, I., G. Galiba. 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Sci.** 40: 482-487.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Khan, S.J., M.A. Khan, H.K. Ahmad, R.D. Khan and Y. Zafar. 2004. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and subsequent screening for salt tolerance. **Asian Journal of Plant Science**. 3 (3): 330-334.

Kumar, P.S. and V.L. Mathur. 2004. Chromosomal instability in callus culture of pisum sativum. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 78: 267-271.

Ladyzynski, M., W. Burza and S. Malepszy. 2002. Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber. **Euphytica**. 125: 349-356.

Lal, M., R.K. Singh, S. Srivastava, N. Singh, S.P. Singh and M.L. Sharma. 2008. RAPD marker based analysis of micropropagated plantlets of sugarcane for early evaluation of genetic fidelity. **Sugar Tech**. 10 (1): 99-103.

Larkin, P.J. and S.C. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theor Appl Genet.** 60: 197-214.

Linacero, R., E.F. Alves and A.M. Vazquez. 2000. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. **Theor Appl Genet**. 100: 506-511.

Lingle, S.E. and C.L. Wiegand. 1997. Soil salinity and sugarcane juice quality. **Field Crops Research.** 54: 259-268.

Martin, C., E. Uberhuaga and C. Perez. 2002. Application of RAPD markers in the characterization of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. **Euphytica**. 127: 247-253.

Matheka, J.M., E. Majiri, A.O. Racha and J. Machuka. 2008. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (Zea mays L.). **Biotechnology.** 7 (4): 641-650.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Moriya, H. and K. Iwao. 1992. Growth characteristics of callus from lamina and bud regeneration ability in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Acta Horticulturae.** 319: 183-188.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant.** 15: 473-495.

Nair, M.K. 1972. Cytogenetics of *Saccharum officinarum S. spontaneum* L. and *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids. I. Chromosome mosaics. **Cytologia.** 37: 565-567.

Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endronucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76: 5269-5273.

Ogura, H. 1990. Chromosome variation in plant tissue culture, pp. 49-84. *In* Y.P.S. Bajaj, ed. **Biotechnology in agriculture and forestry: Somaclonal variation in crop improvement I.** Springer Verlag, Berlin.

Oropeza, M., P. Guevara, E. de Garcia and J.L. Ramirez. 1995. Identification of somaclonal variants of sugarcane (*Saccharum* spp.) resistant to sugarcane mosaic virus via RAPD markers. **Plant Molecular Biology Reporter**. 13 (2): 182-191.

Palade, V.Y., P. Suprasanna and V.A. Bapat. 2008. Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. **Plant Growth Regul.** 55: 169-173.

Palombi, M.A. and C. Damiano. 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). **Plant Cell Rep.** 20: 1061-1066.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Parida, A., A.B. Das and P. Das. 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. **J. Plant Biol.** 45: 28–36.

Plaschke, J., M.W. Ganal and M.S. Roder. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. **Theor Appl Genet.** 91: 1001-1007.

Poehlman, J.M. and D.A. Sleper. 1995. **Breeding Field Crops.** Iowa State University Press, Iowa.

Polanco, C. and M.L. Ruiz. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidosis thaliana* regenerated plants. **Plant Science.** 162: 817-824.

Powell, W., G.C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Sci**. 7: 215–222.

Prammanee, S. and P. Pitakpolrat. 2001. Molecular cloning and sequencing of a unique DNA fragment present in sugarcane somaclonal variants selected for salt tolerance, pp. 644-645. *In* **Proceeding of the 24th international society sugar cane technologists congress (ISSCT) in austraria**. International Society Sugar Cane Technologists Congress (ISSCT), Brisbane.

Rahman, M.H. and O.P. Rajora. 2001. Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). **Plant Cell Rep.** 20: 531-536.

Rajeswari, S., S. Thirugnanakumar, A. Anandan and M. Krishnamurthi. 2009. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and evaluation for quantitative and quality traits. **Euphytica.** 168: 71-80.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ramanand, N. Kureel, N. Subhanand, M. Lal and S.B. Singh. 2006. Plantlet Regeneration Through Leaf Callus Culture in Sugarcane. Sugar Tech. 8 (1): 85-87.

Rohlf, F.J. 2000. **NTYSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate system, version 2.1.** Exeter Publications, New York.

Rossi, M., P.G. Araujo and M.V. Sluys. 2001. Survey of transposable elements in sugarcane expressed sequence tags (ESTS). **Genetics and Molecular Biology.** 24 (1-4): 147-154.

Saghai-Maroof, M.A., R.M. Biyashev, G.P. Yang, Q. Zhang and R.W. Allard. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations and population dynamics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 5466-5470.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual,** 2nd ed. Cold Spring Harbor press, New York.

Schlotterer, C. and D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucl. Acids Res.** 20: 211-215.

Selvi, A., N.V. Nair, N. Balasundaram and T. Mohapatra. 2003. Evaluation of maize microsatellite markers for genetic diversity analysis and fingerprinting in sugarcane. **Genome.** 46: 394-403.

Sharpe, P. 1998. **Sugar Cane: Past and Present.** Southern Illinois University Carbondale, Illinois.

Shi, H. and J.K. Zhu. 2002. Regulation of expression of vacuolar Na^+/NH^+ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**. 50: 543-550.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Singh, S.K., H.C. Sharma, A.M. Goswami, S.P. Datta and S.P. Singh. 2000. *In vitro* growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. **Biol. Plant.** 43: 283-286.

Sneath, P.M. and P.R. Sokal. 1973. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. W.H. Freeman, San Francisco.

Sreenivasan, T.V., B.S. Ahloowalia, D.J. Heinz. 1987. Cytogenetics, pp. 211-254. *In* D.J. Heinz, ed. **Sugarcane Improvement through Breeding.** Elsevier Press, Amsterdam.

Sreenivasan, T.V. and N.C. Jalaja. 1998. Induced mutations and somaclonal variation in sugarcane, pp. 421-446. *In* S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Alhoowalia, eds. **Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement.** Kluwer Academic Publishers, London.

Tawar, P.N., R.A. Sawant, S.G. Dalvi, A.A. Nikam, P.G. Kawar and R.M. Devarumath. 2008. An assessment of somaclonal variation in micropropagated plants of sugarcane by RAPD markers. **Sugar Tech**. 10 (2): 124-127.

U.S. Salinity Laboratory Staff. 1954. **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils.** U.S. Government Printing Office, Washington.

Veilleux, R.E., L.Y. Shen and M.M. Paz. 1995. Analysis of the genetic composition of anther-derived potato by randomly amplified polymorphic DNA and simple sequence repeats. **Genome.** 38: 1153-1162.

Wahid, A. 2004. Analysis of toxic and osmotic effects of sodium chloride on leaf growth and economic yield of sugarcane. **Botanical Bulletin of Academia Sinica.** 45 (2): 133-141.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Walbot, V. and C.A. Cullis. 1985. Rapid genomic change in higher plants. **Annu Rev Plant Physiol.** 36: 367-396.

Wang, Y. and N. Nil. 2000. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase–oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. **J. Hortic. Sci. Biotechnol.** 75: 623-627.

Wen, F.S., E.L. Sorensen, F.L. Barnett and G.H. Liang. 1991. Callus induction and plant regeneration from anther and inflorescence culture of Sorghum. **Euphytica.** 52: 177-181.

Wiedenfeld, B., Enciso, J., Fipps, G., Robinson, J. 2005. **Irrigation of sugarcane in Texas.** Texas Cooperative Extension and Texas Agricultural Experiment Station B-6156, Texas.

Wiegand, C., G. Anderson, S. Lingle and D. Escobar. 1996. Soil salinity effects on crop growth and yield—illustration of an analysis and mapping methodology for sugarcane. **J. Plant Physiol.** 148: 418-424.

Yadav, P.V., P. Suprasanna, K.U. Gopalrao and B.V. Anant. 2006. Molecular profiling using RAPD technique of salt and drought tolerant regenerants of sugarcane. **Sugar Tech**. 8 (1): 63-68.

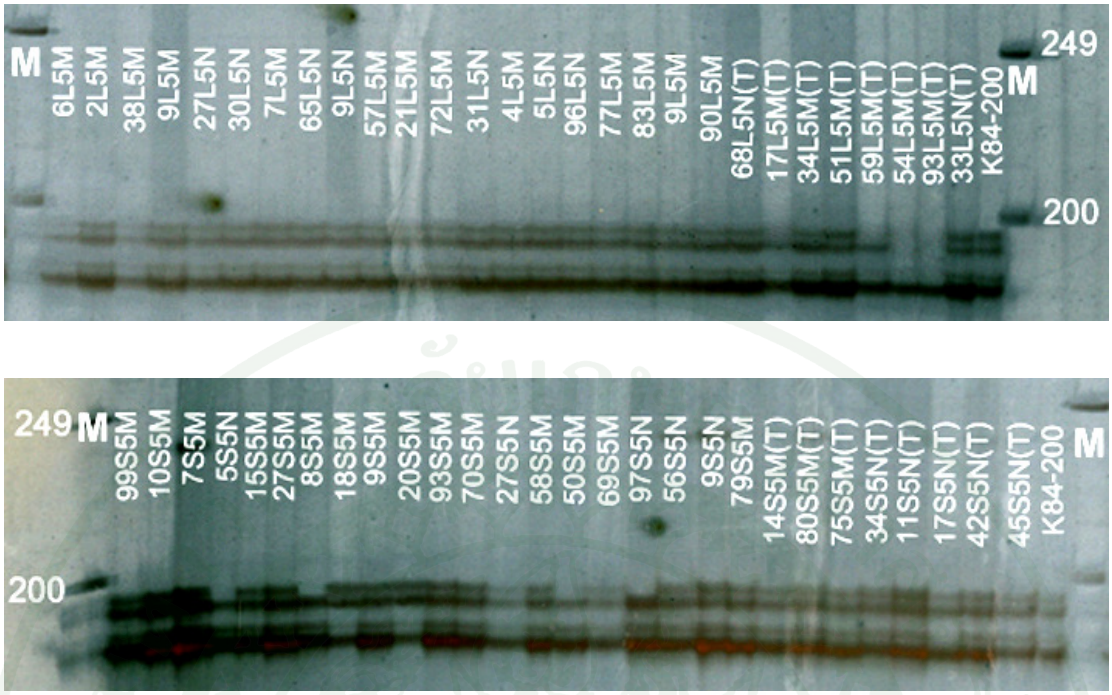
Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annu. Rev. Plant Biol**. 53: 247-273.

Zucchi, M.I., H. Arisono, V.A. Morais, M.H.P. Fungaro and M.L.C. Vieira. 2002. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. **Genetics and molecular biology**. 25 (1): 91-96.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

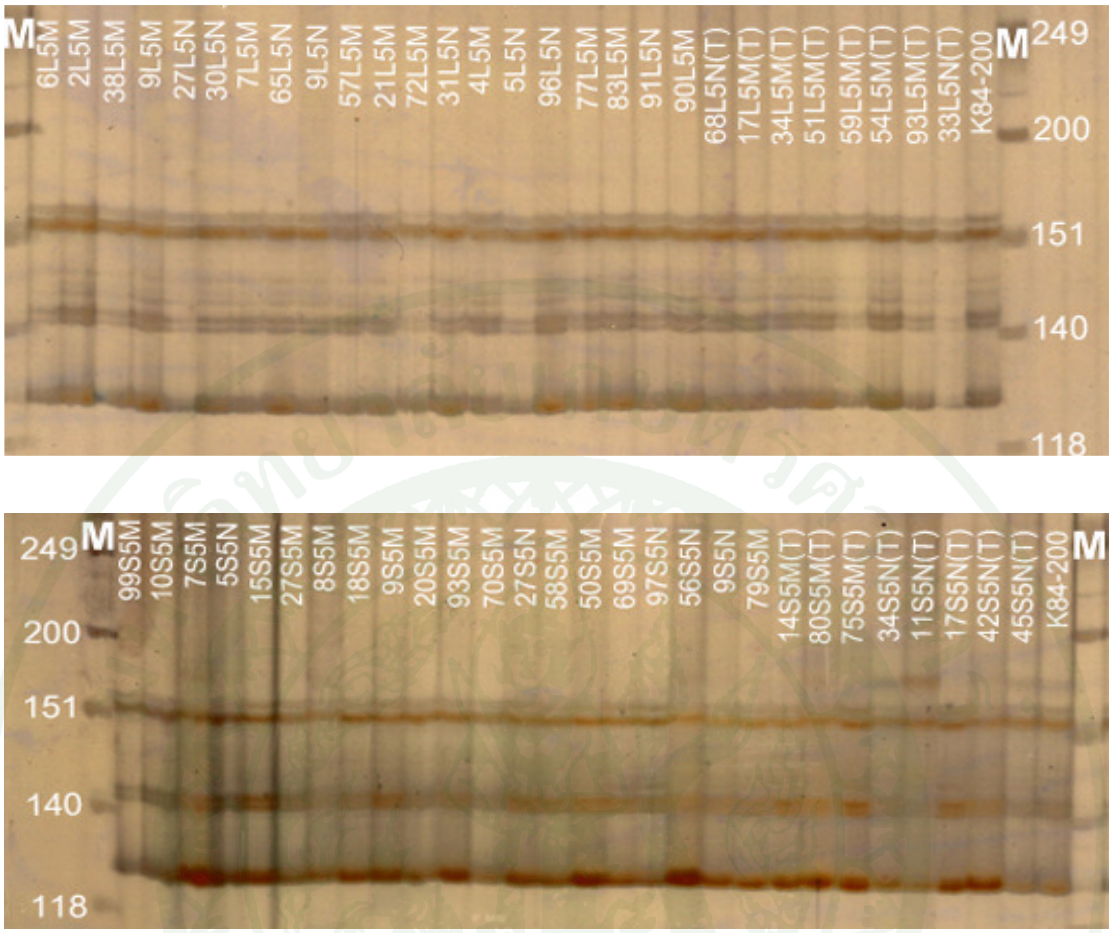
ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



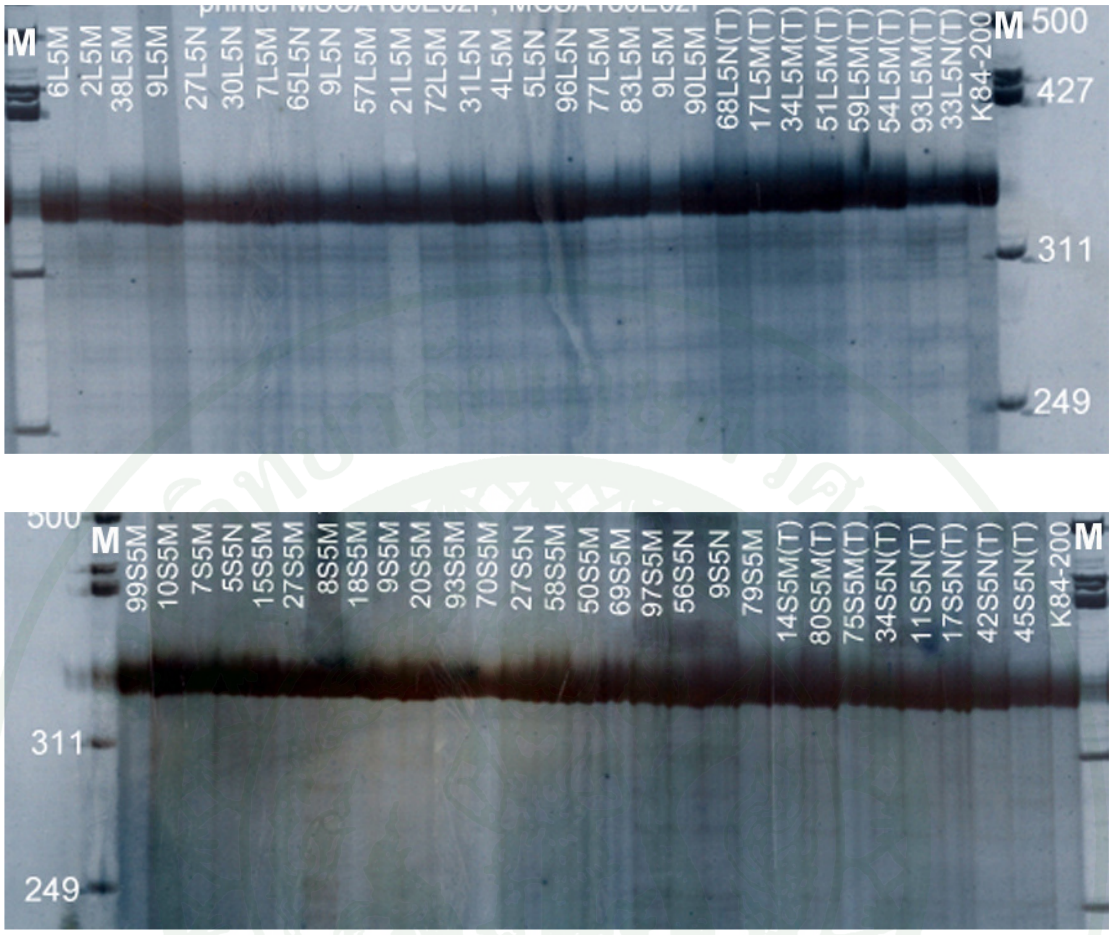
ภาพผนวกที่ 1 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ MCSA068G08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



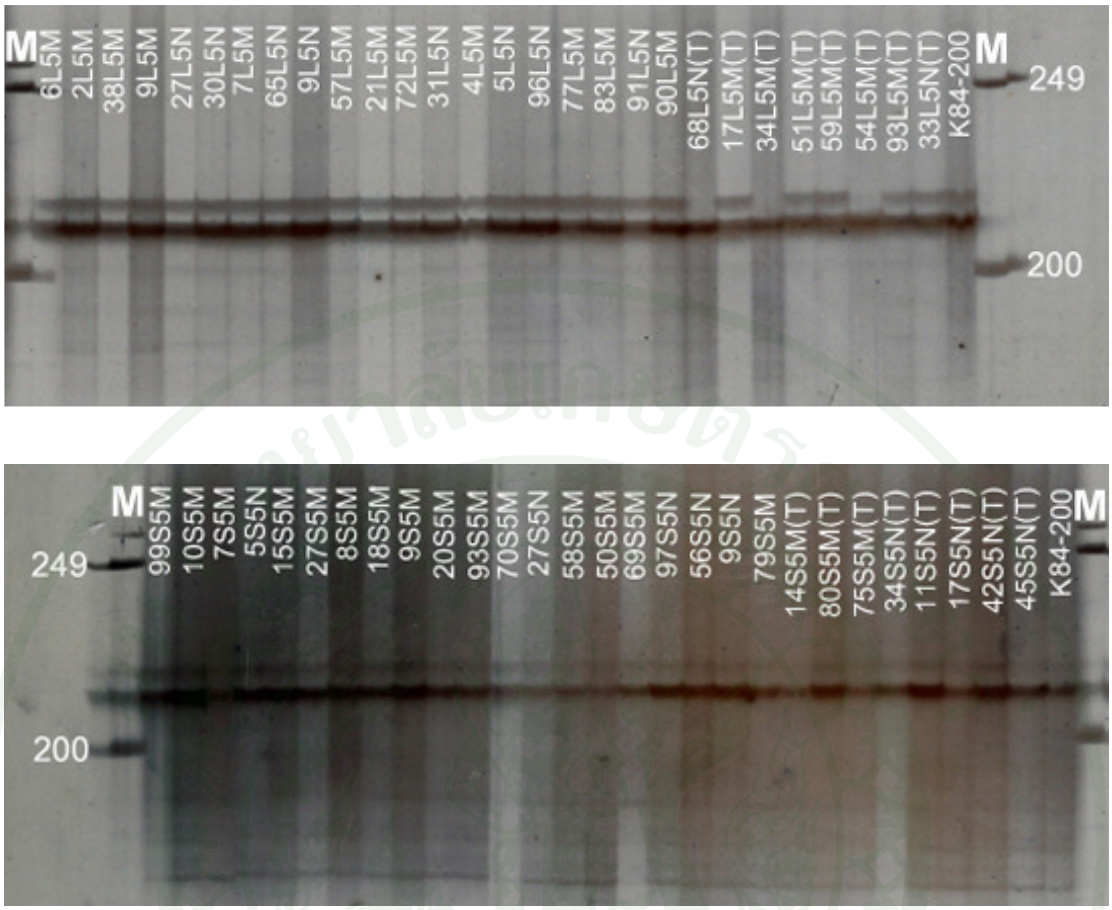
ภาพผนวกที่ 2 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ MCSA175A08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



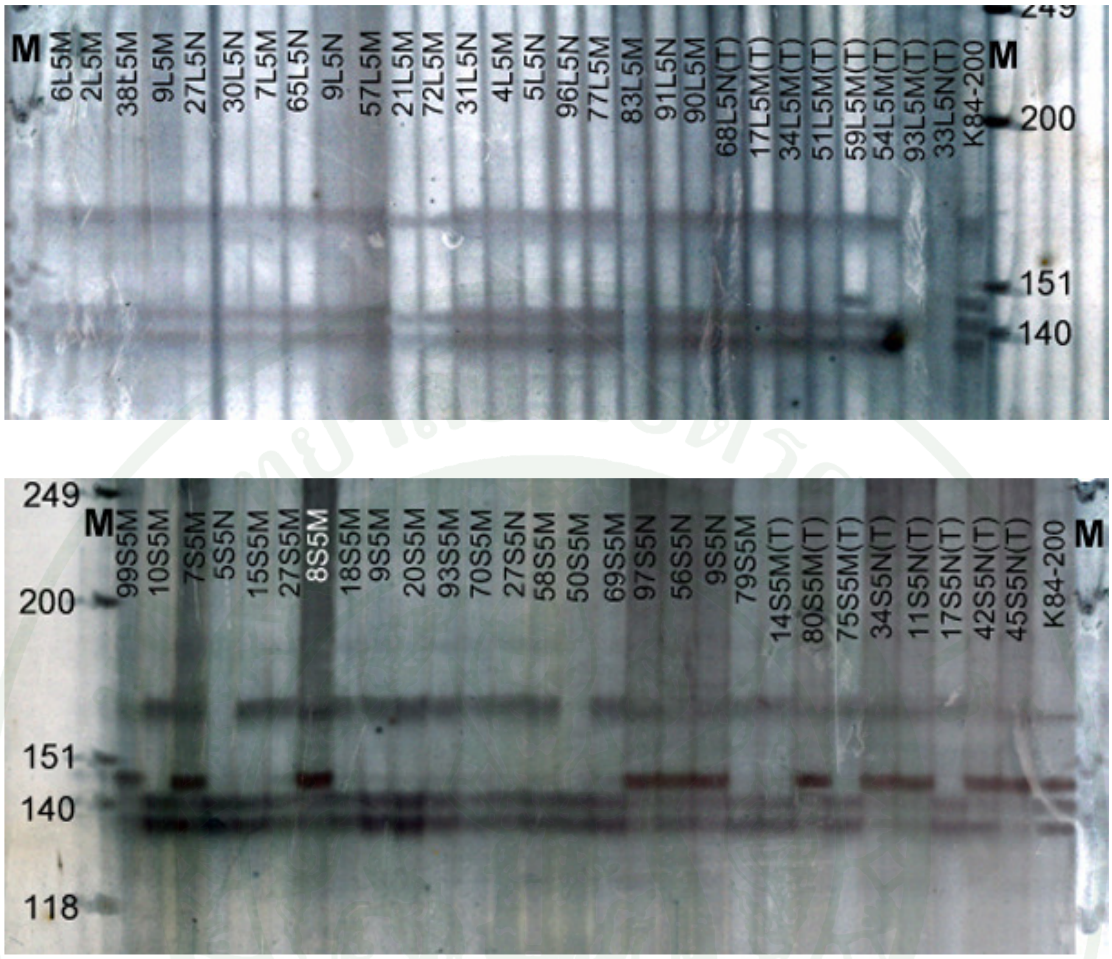
ภาพผนวกที่ 3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ MCSA180E02 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



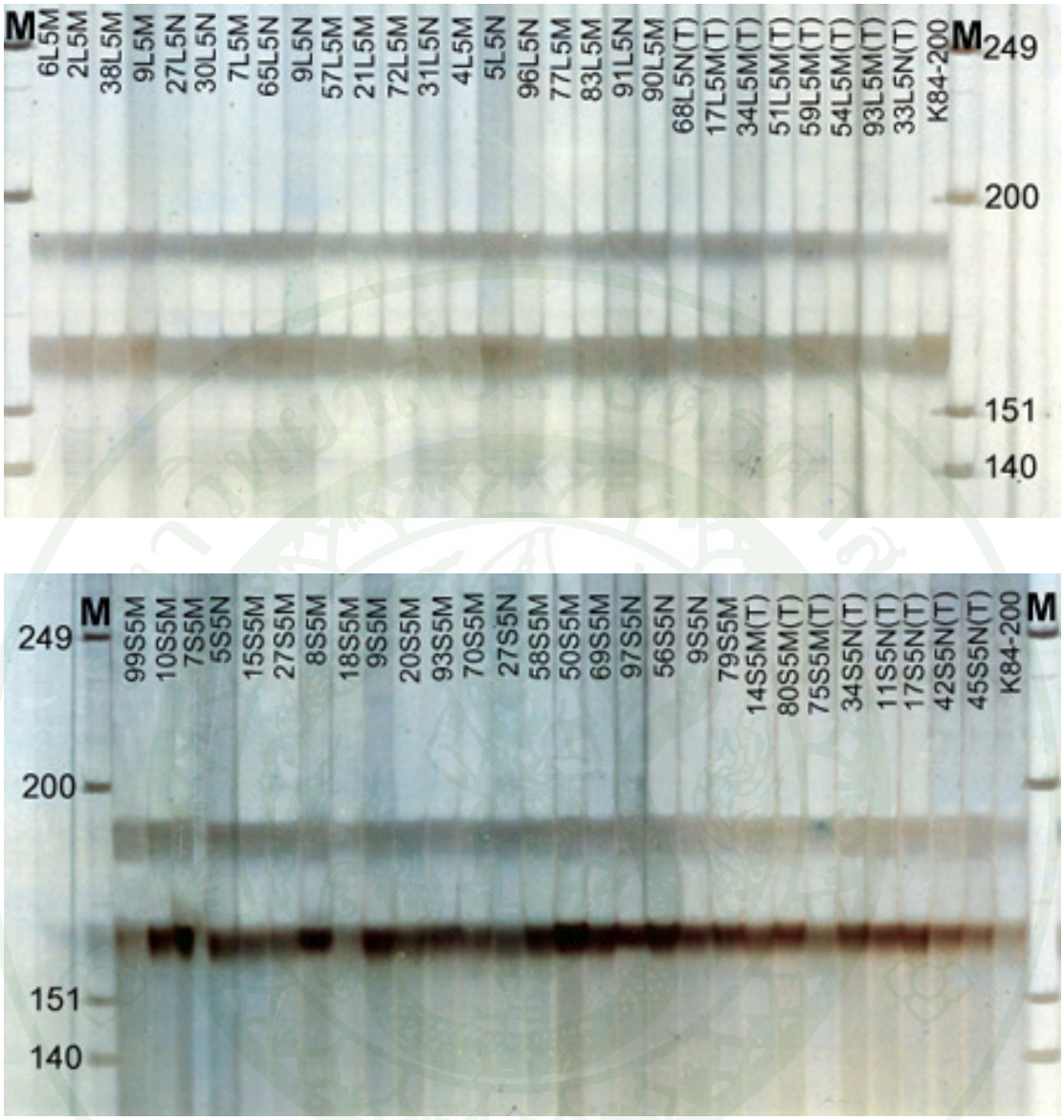
ภาพผนวกที่ 4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ MCSA205C07 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



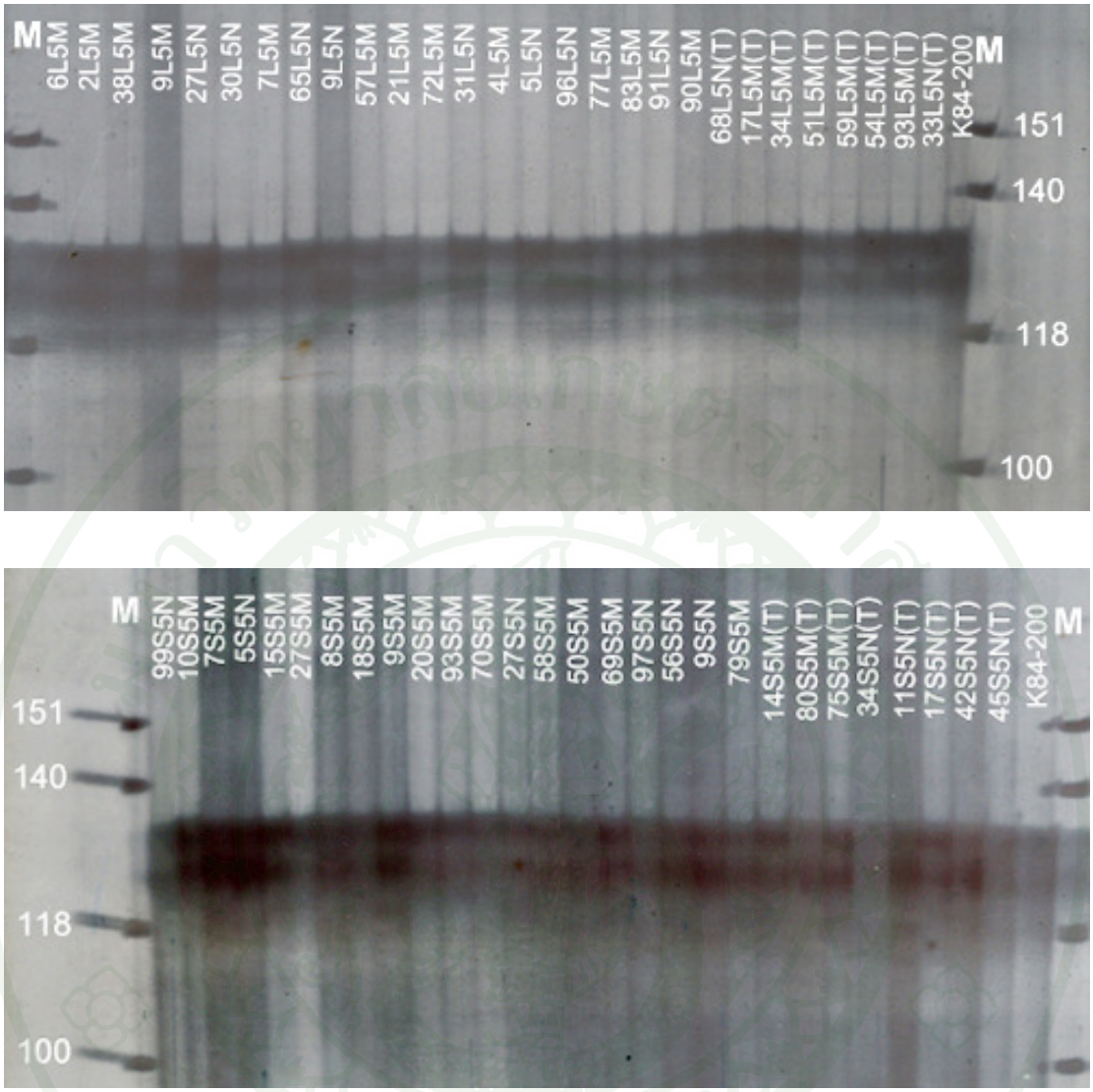
ภาพผนวกที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ SMC226CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



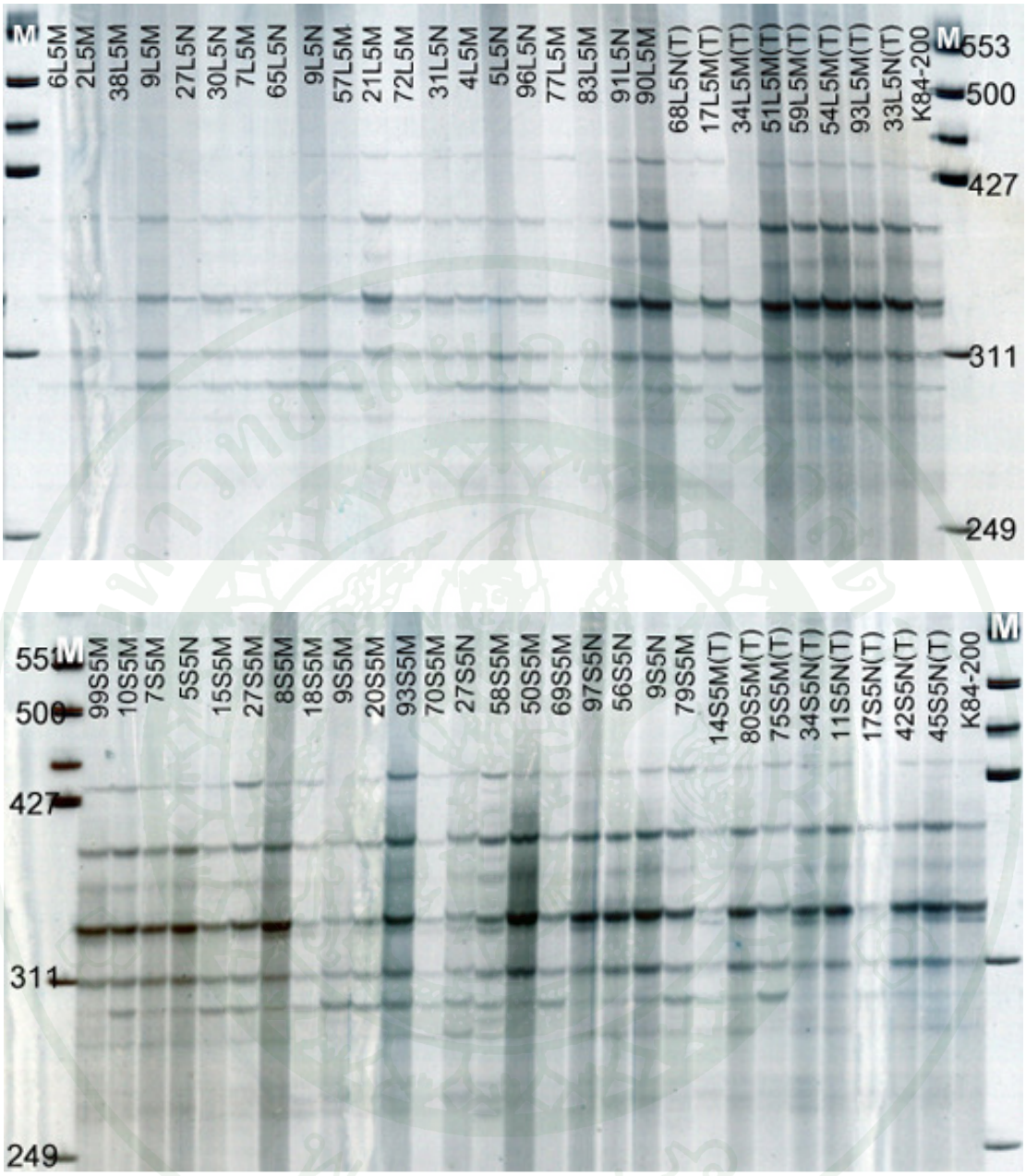
ภาพผนวกที่ 6 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ SMC319CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



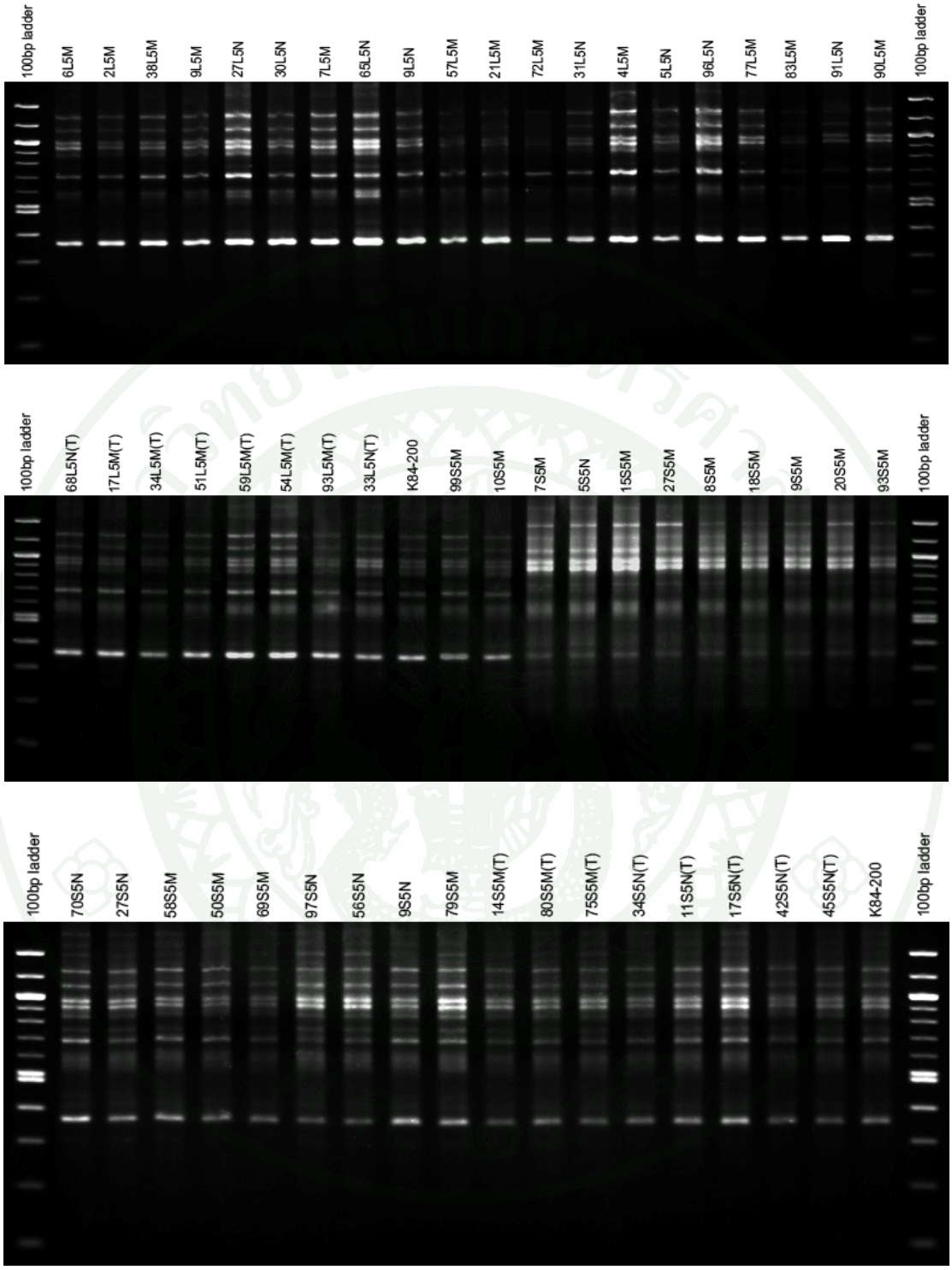
ภาพผนวกที่ 7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ SMC477CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน Φx-174/*Hin*fI))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



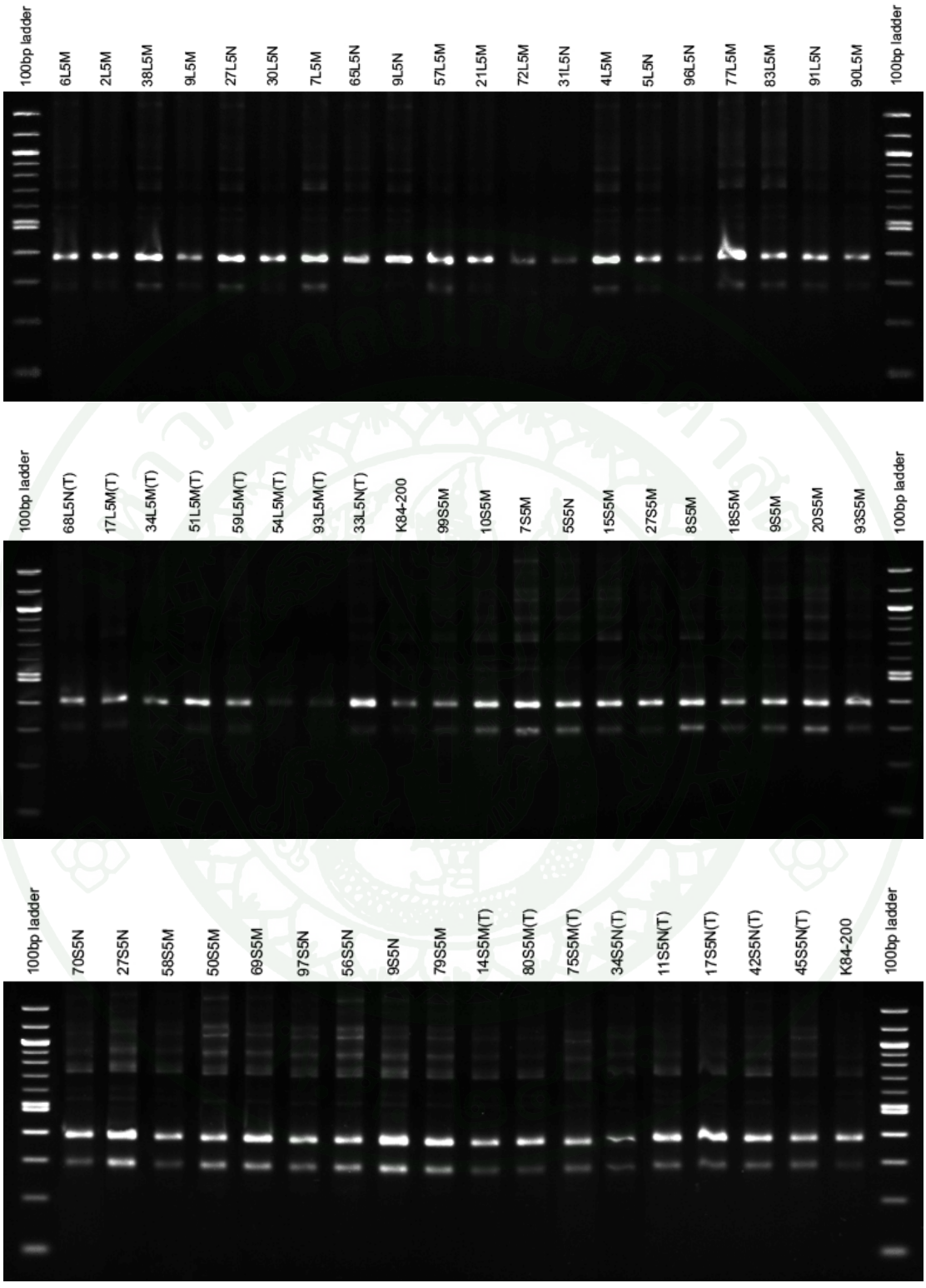
ภาพผนวกที่ 8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ SMC863CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR (M=ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Φx-174/*Hin*fI))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



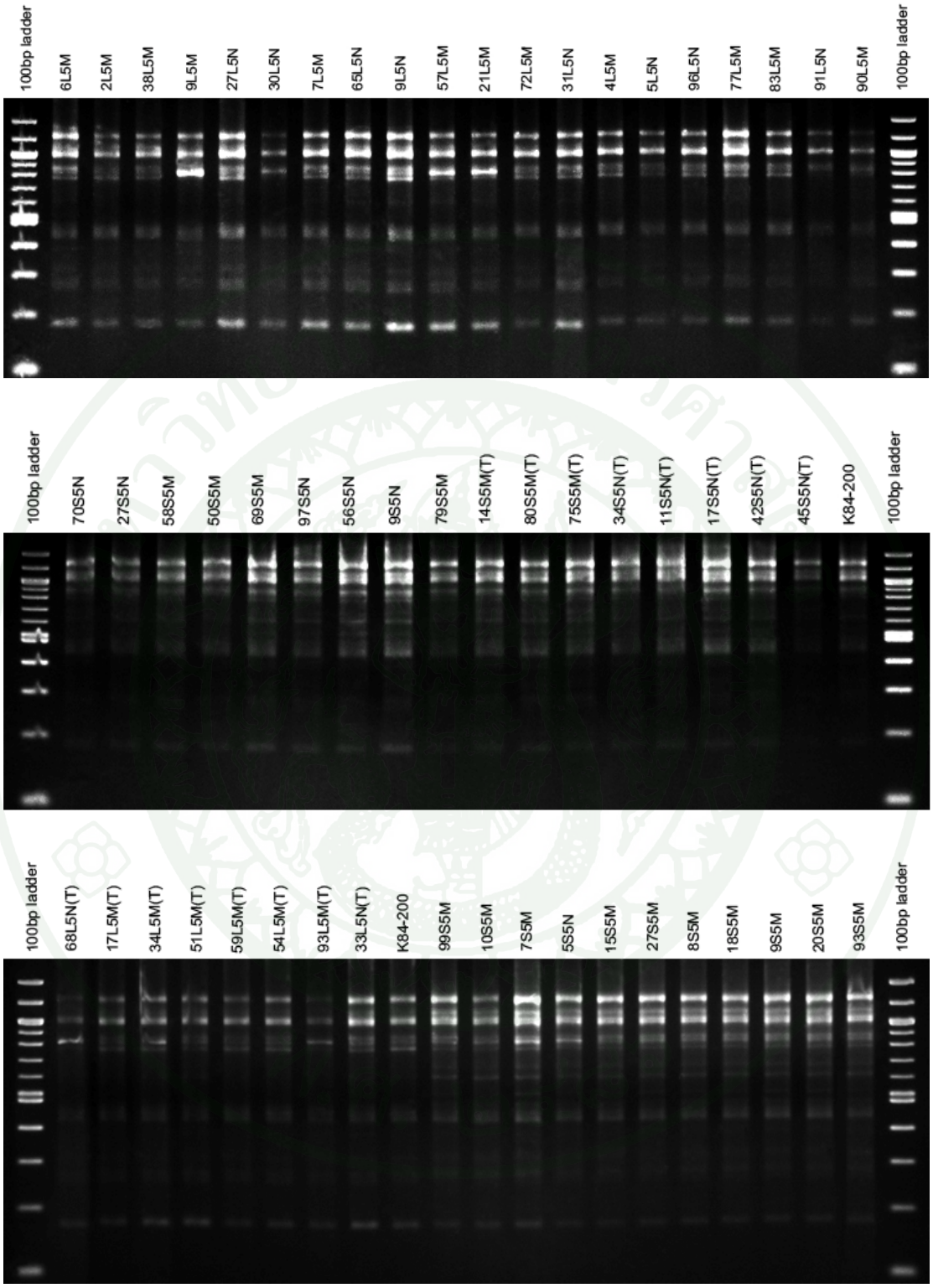
ภาพผนวกที่ 9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ universal primer 2 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



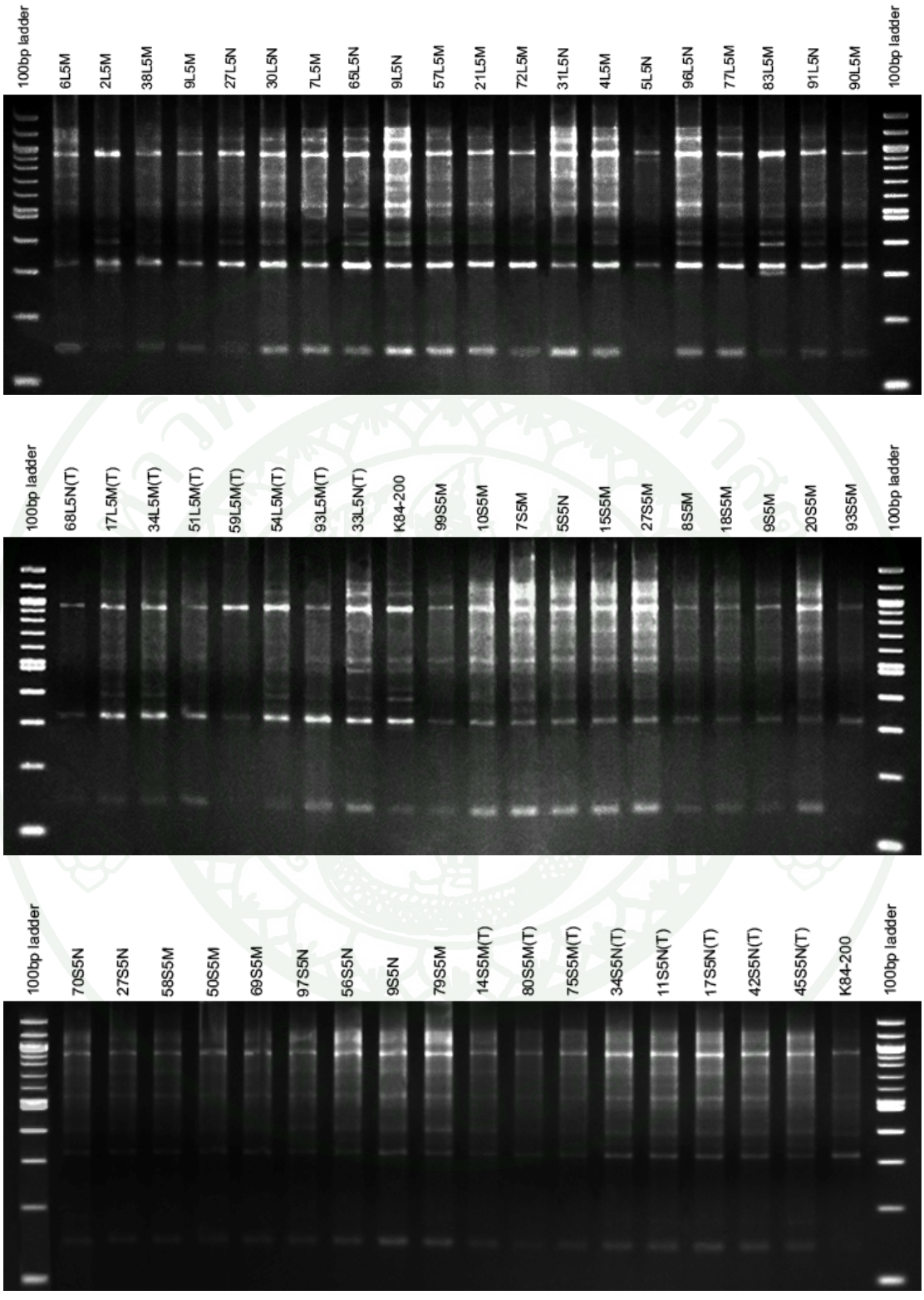
ภาพผนวกที่ 10 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ universal primer 3 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



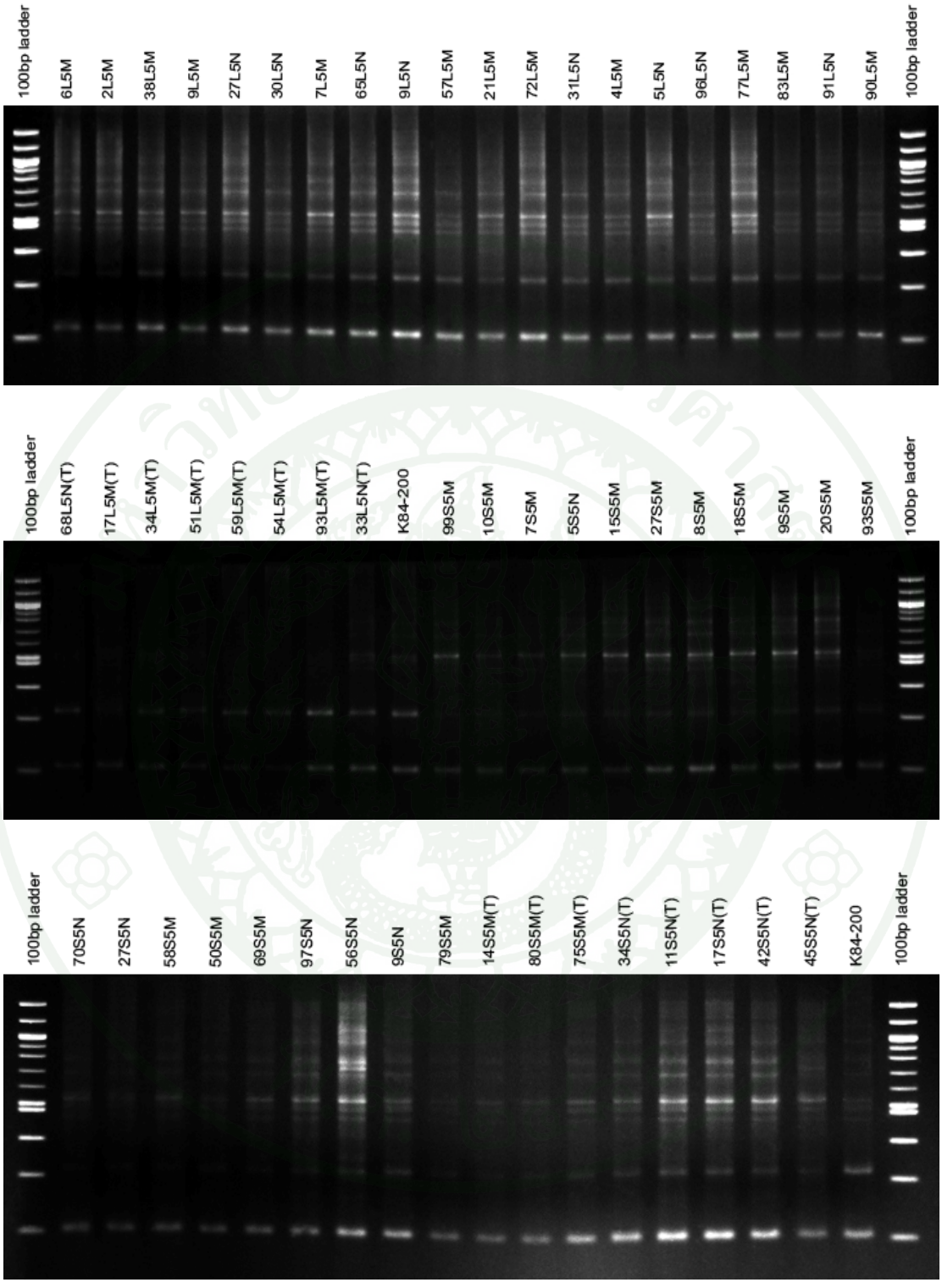
ภาพผนวกที่ 11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ universal primer 6 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



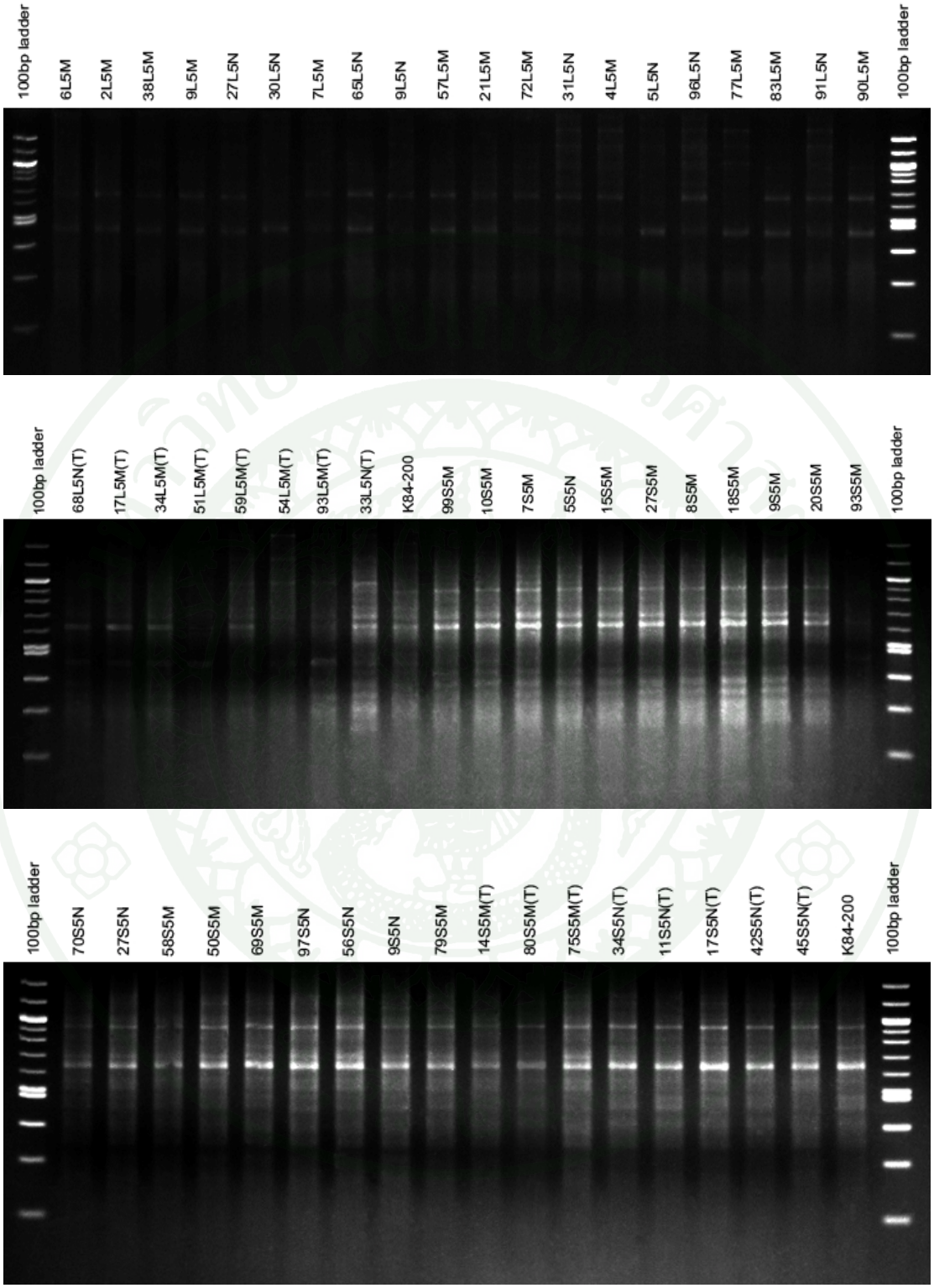
ภาพผนวกที่ 12 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-02 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



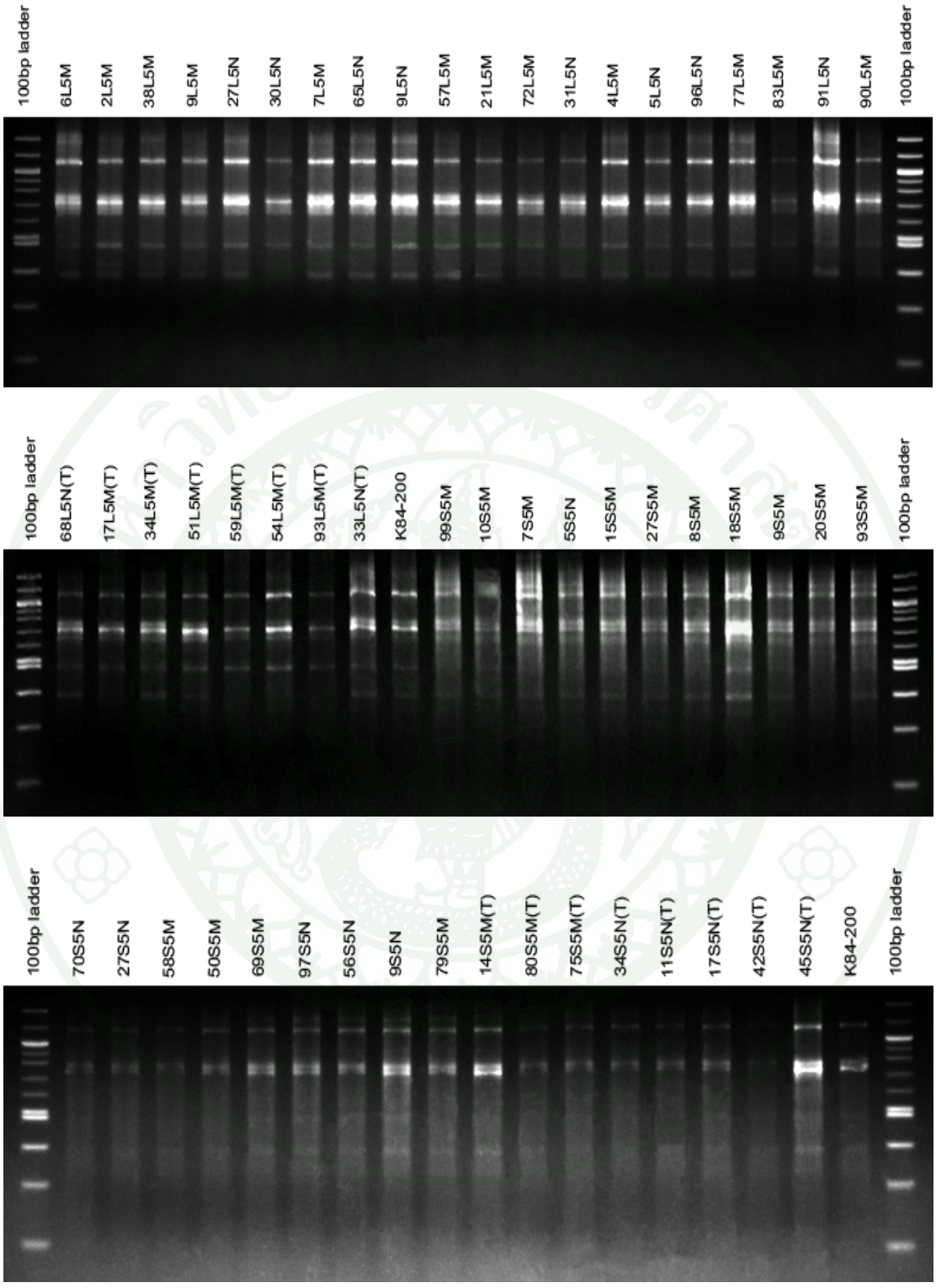
ภาพผนวกที่ 13 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-04 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



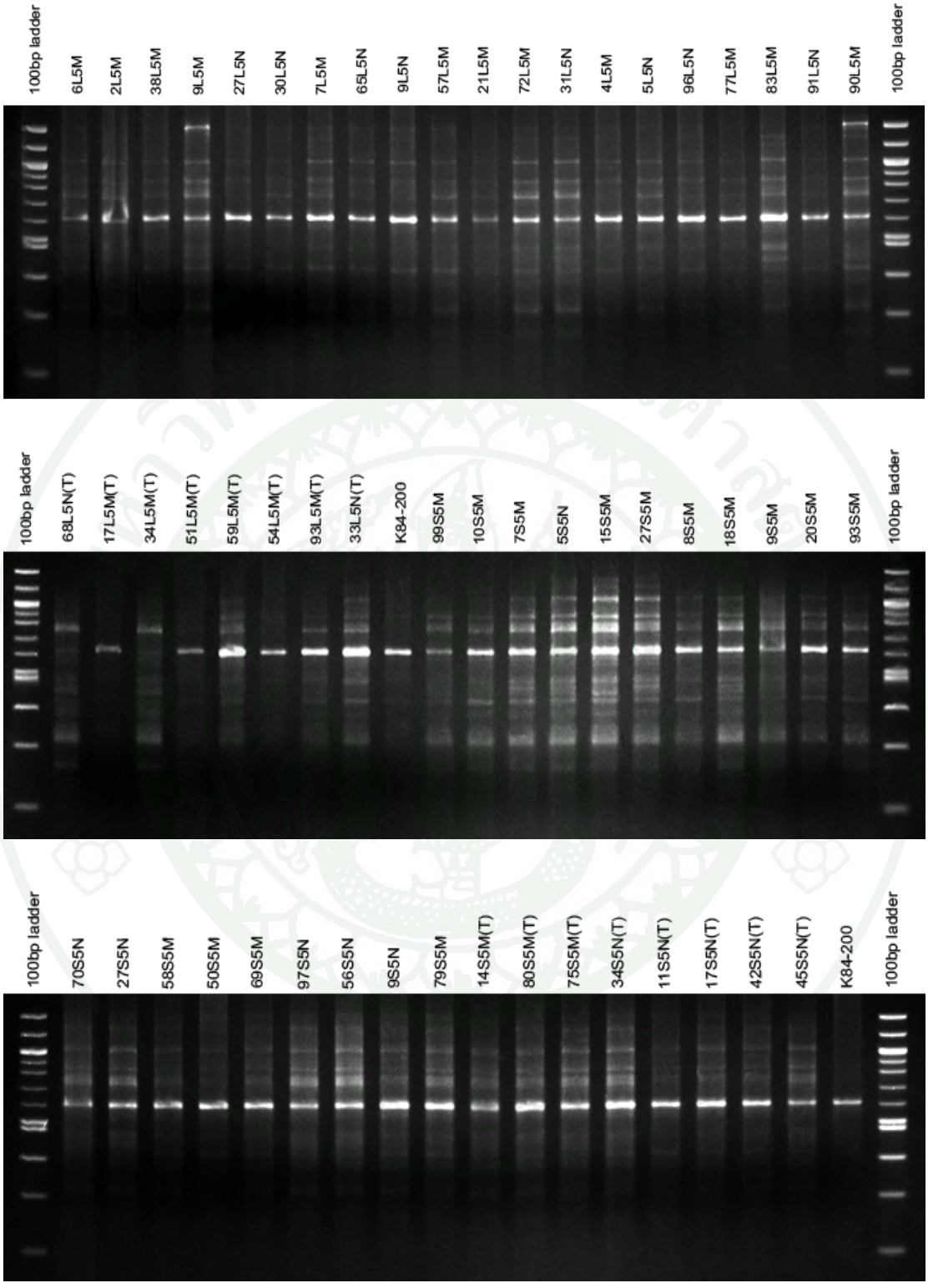
ภาพผนวกที่ 14 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



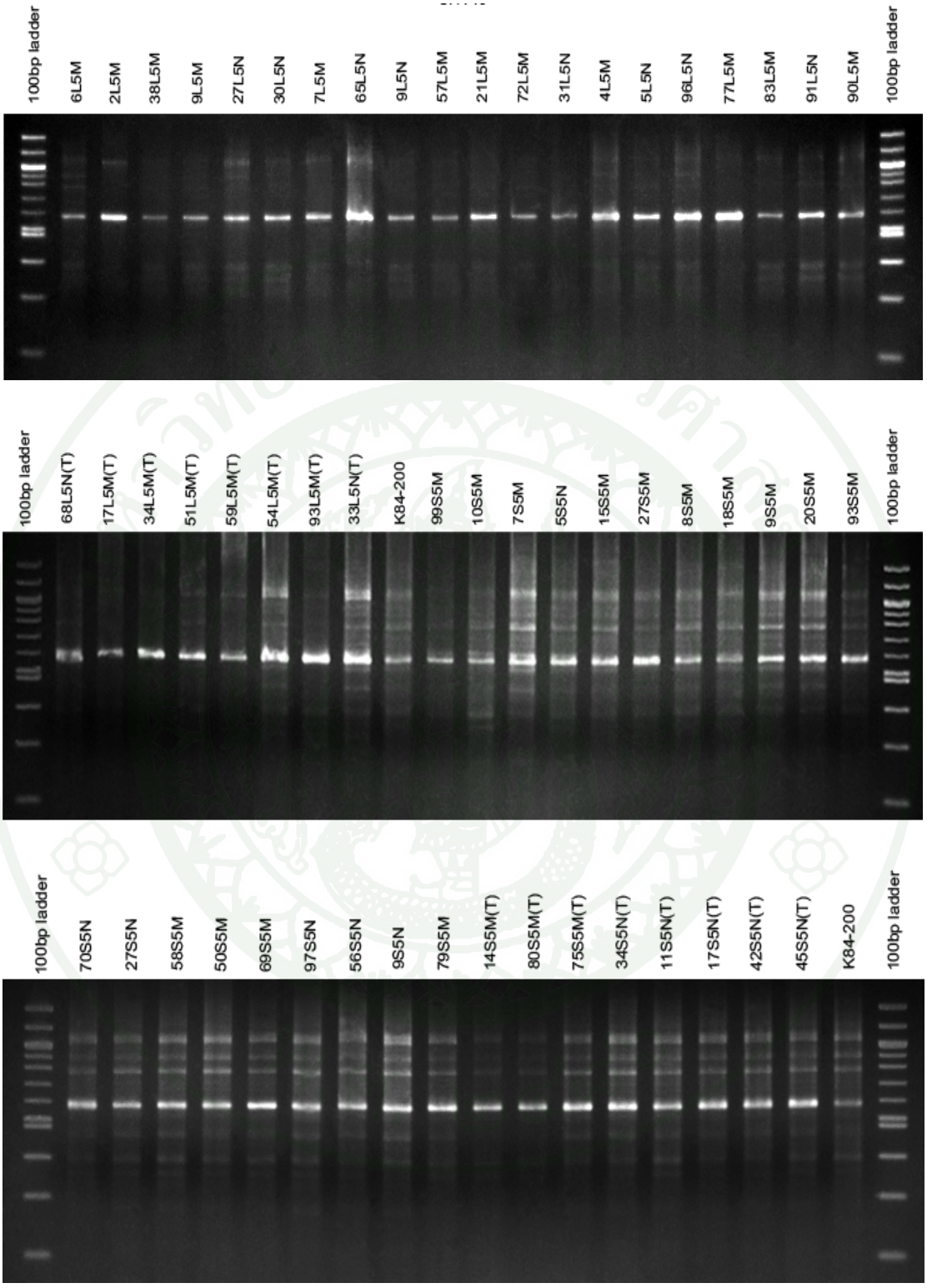
ภาพผนวกที่ 15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-01 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



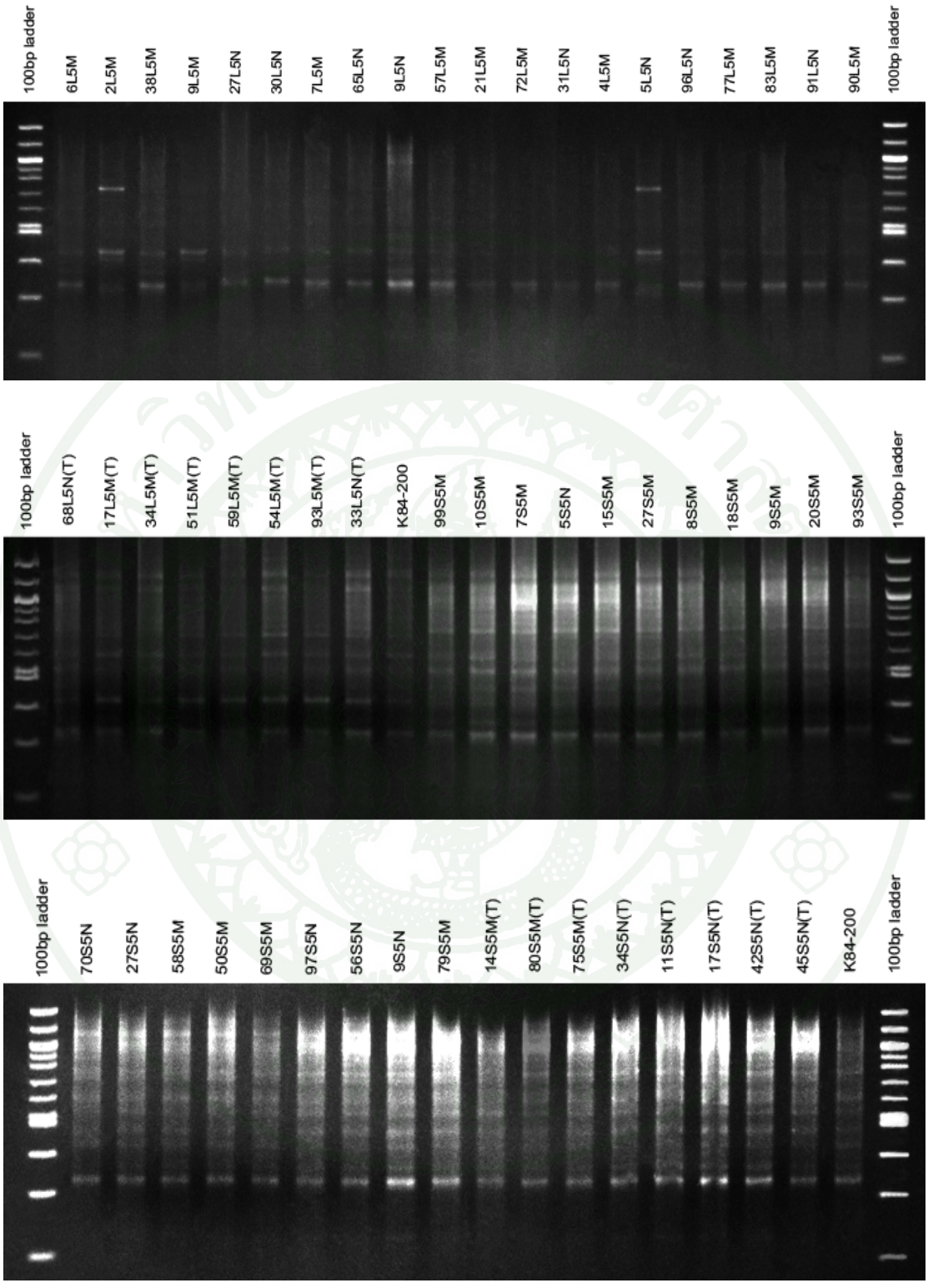
ภาพผนวกที่ 16 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-10 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ 17 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-16 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ 18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPA-18 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ MCSA068G08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ MCSA068G08				ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ MCSA068G08			
	1	2	3	4		1	2	3	4
6L5M	1	1	1	1	99S5M	1	1	1	1
2L5M	1	1	1	1	10S5M	1	1	1	1
38L5M	1	1	0	1	7S5M	1	1	1	1
9L5M	1	1	1	1	5S5N	0	1	1	1
27L5N	1	1	1	1	15S5M	1	1	1	1
30L5N	1	1	1	1	27S5M	1	1	1	1
7L5M	1	1	1	1	8S5M	0	1	1	1
65L5N	1	1	1	1	18S5M	1	1	0	1
9L5N	1	1	1	1	9S5M	1	1	1	1
57L5M	1	1	1	1	20S5M	1	1	0	1
21L5M	1	1	1	1	93S5M	1	1	1	1
72L5M	1	1	1	1	70S5M	1	1	1	1
31L5N	1	1	1	1	27S5N	1	1	0	1
4L5M	1	1	1	1	58S5M	1	1	1	1
5L5N	1	1	1	1	50S5M	0	1	1	1
96L5N	1	1	1	1	69S5M	1	1	0	1
77L5M	1	1	1	1	97S5N	0	1	1	1
83L5M	1	1	1	1	56S5N	1	1	1	1
91L5M	1	1	1	1	9S5N	1	1	1	1
90L5M	1	1	1	1	79S5M	1	1	1	1
68L5N(T)	1	1	1	1	14S5M(T)	1	1	1	1
17L5M(T)	1	1	1	1	80S5M(T)	1	1	1	1
34L5M(T)	1	1	1	1	75S5M(T)	1	1	1	1
51L5M(T)	1	1	1	1	34S5N(T)	1	1	1	1
59L5M(T)	0	1	1	1	11S5N(T)	1	1	1	1
54L5M(T)	0	0	0	1	17S5N(T)	1	1	0	1
93L5M(T)	0	0	0	1	42S5N(T)	1	1	1	1
33L5N(T)	1	1	1	1	45S5N(T)	1	1	1	1
K84-200	1	1	1	1	K84-200	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 2 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ MCSA175A08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อย แต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ MCSA175A08					ดีเอ็นเออ้อย แต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ MCSA175A08				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
6L5M	1	1	1	1	1	99S5M	1	1	1	1	1
2L5M	1	1	1	1	1	10S5M	1	1	1	1	1
38L5M	1	1	1	1	1	7S5M	1	1	1	1	1
9L5M	1	1	1	1	1	5S5N	1	1	1	1	1
27L5N	1	1	1	1	1	15S5M	1	1	1	1	1
30L5N	1	1	1	1	1	27S5M	1	1	1	1	1
7L5M	1	1	1	1	1	8S5M	1	1	1	1	1
65L5N	1	1	1	1	1	18S5M	1	1	1	1	1
9L5N	1	1	1	1	1	9S5M	1	1	1	1	1
57L5M	1	1	1	1	1	20S5M	1	1	1	1	1
21L5M	1	1	1	1	1	93S5M	1	1	1	1	1
72L5M	1	1	1	1	1	70S5M	1	1	1	1	1
31L5N	1	1	1	1	1	27S5N	1	1	1	1	1
4L5M	1	1	1	1	1	58S5M	1	1	1	1	1
5L5N	1	1	1	1	1	50S5M	1	1	1	1	1
96L5N	1	1	1	1	1	69S5M	1	1	1	1	1
77L5M	1	1	1	1	1	97S5N	1	1	1	1	1
83L5M	1	1	1	1	1	56S5N	0	1	1	1	1
91L5M	1	1	1	1	1	9S5N	1	1	1	1	1
90L5M	1	1	1	1	1	79S5M	1	1	1	1	1
68L5N(T)	1	1	1	1	1	14S5M(T)	1	1	1	1	1
17L5M(T)	1	1	1	1	1	80S5M(T)	1	1	1	1	1
34L5M(T)	1	1	1	1	1	75S5M(T)	1	1	1	1	1
51L5M(T)	1	1	1	1	1	34S5N(T)	1	1	1	1	1
59L5M(T)	1	1	1	1	1	11S5N(T)	1	1	1	1	1
54L5M(T)	1	1	1	1	1	17S5N(T)	1	1	1	1	1
93L5M(T)	1	1	1	1	1	42S5N(T)	1	1	1	1	1
33L5N(T)	1	1	1	1	1	45S5N(T)	1	1	1	1	1
K84-200	1	1	1	1	1	K84-200	1	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ MCSA180E02 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ MCSA180E02			ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ MCSA180E02		
	1	2	3		1	2	3
6L5M	1	1	1	99S5M	1	1	1
2L5M	1	1	1	10S5M	1	1	1
38L5M	1	1	1	7S5M	1	1	1
9L5M	1	1	1	5S5N	1	1	1
27L5N	1	1	1	15S5M	1	1	1
30L5N	1	1	1	27S5M	1	1	1
7L5M	1	1	1	8S5M	1	1	1
65L5N	1	1	1	18S5M	1	1	1
9L5N	1	1	1	9S5M	1	1	1
57L5M	1	1	1	20S5M	1	1	1
21L5M	1	1	1	93S5M	1	1	1
72L5M	1	1	1	70S5M	1	1	1
31L5N	1	1	1	27S5N	1	1	1
4L5M	1	1	1	58S5M	1	1	1
5L5N	1	1	1	50S5M	1	1	1
96L5N	1	1	1	69S5M	1	1	1
77L5M	1	1	1	97S5N	1	1	1
83L5M	1	1	1	56S5N	1	1	1
91L5M	1	1	1	9S5N	1	1	1
90L5M	1	1	1	79S5M	1	1	1
68L5N(T)	1	1	1	14S5M(T)	1	1	1
17L5M(T)	1	1	1	80S5M(T)	1	1	1
34L5M(T)	1	1	1	75S5M(T)	1	1	1
51L5M(T)	1	1	1	34S5N(T)	1	1	1
59L5M(T)	1	1	1	11S5N(T)	1	1	1
54L5M(T)	1	1	1	17S5N(T)	1	1	1
93L5M(T)	1	1	1	42S5N(T)	1	1	1
33L5N(T)	1	1	1	45S5N(T)	1	1	1
K84-200	1	1	1	K84-200	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 4 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ MCSA205C07 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อย แต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ MCSA205C07		ดีเอ็นเออ้อย แต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ MCSA205C07	
	1	2		1	2
6L5M	1	1	99S5M	1	1
2L5M	1	1	10S5M	1	1
38L5M	1	1	7S5M	1	1
9L5M	1	1	5S5N	1	1
27L5N	1	1	15S5M	1	1
30L5N	1	1	27S5M	1	1
7L5M	1	1	8S5M	1	1
65L5N	1	1	18S5M	1	1
9L5N	1	1	9S5M	1	1
57L5M	1	1	20S5M	1	1
21L5M	1	1	93S5M	1	1
72L5M	1	1	70S5M	1	1
31L5N	1	1	27S5N	1	1
4L5M	1	1	58S5M	1	1
5L5N	1	1	50S5M	1	1
96L5N	1	1	69S5M	1	1
77L5M	1	1	97S5N	1	1
83L5M	1	1	56S5N	1	1
91L5M	1	1	9S5N	1	1
90L5M	1	1	79S5M	1	1
68L5N(T)	0	1	14S5M(T)	1	1
17L5M(T)	1	1	80S5M(T)	1	1
34L5M(T)	0	1	75S5M(T)	1	1
51L5M(T)	1	1	34S5N(T)	1	1
59L5M(T)	1	1	11S5N(T)	1	1
54L5M(T)	0	1	17S5N(T)	1	1
93L5M(T)	1	1	42S5N(T)	1	1
33L5N(T)	1	1	45S5N(T)	1	1
K84-200	1	1	K84-200	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 5 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SMC226CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ SMC226CG				ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ SMC226CG			
	1	2	3	4		1	2	3	4
6L5M	1	0	1	1	99S5M	1	1	1	1
2L5M	1	0	1	1	10S5M	1	0	1	1
38L5M	1	0	1	1	7S5M	1	1	1	1
9L5M	1	0	1	1	5S5N	0	0	1	1
27L5N	1	0	1	1	15S5M	1	0	1	1
30L5N	1	0	1	1	27S5M	1	0	1	1
7L5M	1	0	1	1	8S5M	1	1	1	1
65L5N	1	0	1	1	18S5M	1	0	1	1
9L5N	1	0	1	1	9S5M	1	0	1	1
57L5M	1	0	1	1	20S5M	1	0	1	1
21L5M	1	0	1	1	93S5M	1	0	1	1
72L5M	1	0	1	1	70S5M	1	0	1	1
31L5N	1	0	1	1	27S5N	1	0	1	1
4L5M	1	0	1	1	58S5M	1	0	1	1
5L5N	1	0	1	1	50S5M	0	0	1	1
96L5N	1	0	1	1	69S5M	1	0	1	1
77L5M	1	0	1	1	97S5N	1	1	1	1
83L5M	1	0	1	1	56S5N	1	1	1	1
91L5M	1	0	1	1	9S5N	1	1	1	1
90L5M	1	0	1	1	79S5M	1	0	1	1
68L5N(T)	1	0	1	1	14S5M(T)	1	0	1	1
17L5M(T)	1	0	1	1	80S5M(T)	1	1	1	1
34L5M(T)	1	0	1	1	75S5M(T)	1	0	1	1
51L5M(T)	1	0	0	0	34S5N(T)	1	1	0	0
59L5M(T)	1	1	1	1	11S5N(T)	1	1	0	0
54L5M(T)	1	0	1	1	17S5N(T)	1	0	1	1
93L5M(T)	0	0	0	0	42S5N(T)	0	1	0	1
33L5N(T)	0	0	0	0	45S5N(T)	1	1	0	0
K84-200	1	1	1	1	K84-200	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 6 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SMC319CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ SMC319CG		ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ SMC319CG	
	1	2		1	2
6L5M	1	1	99S5M	1	1
2L5M	1	1	10S5M	1	1
38L5M	1	1	7S5M	1	1
9L5M	1	1	5S5N	1	1
27L5N	1	1	15S5M	1	1
30L5N	1	1	27S5M	1	1
7L5M	1	1	8S5M	1	1
65L5N	1	1	18S5M	1	1
9L5N	1	1	9S5M	1	1
57L5M	1	1	20S5M	1	1
21L5M	1	1	93S5M	1	1
72L5M	1	1	70S5M	1	1
31L5N	1	1	27S5N	1	1
4L5M	1	1	58S5M	1	1
5L5N	1	1	50S5M	1	1
96L5N	1	1	69S5M	1	1
77L5M	1	1	97S5N	1	1
83L5M	1	1	56S5N	1	1
91L5M	1	1	9S5N	1	1
90L5M	1	1	79S5M	1	1
68L5N(T)	1	1	14S5M(T)	1	1
17L5M(T)	1	1	80S5M(T)	1	1
34L5M(T)	1	1	75S5M(T)	1	1
51L5M(T)	1	1	34S5N(T)	1	1
59L5M(T)	1	1	11S5N(T)	1	1
54L5M(T)	1	1	17S5N(T)	1	1
93L5M(T)	1	1	42S5N(T)	1	1
33L5N(T)	1	1	45S5N(T)	1	1
K84-200	1	1	K84-200	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 7 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SMC477CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ SMC477CG		ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ SMC477CG	
	1	2		1	2
6L5M	1	1	99S5M	1	1
2L5M	1	1	10S5M	1	1
38L5M	1	1	7S5M	1	1
9L5M	1	1	5S5N	1	1
27L5N	1	1	15S5M	1	1
30L5N	1	1	27S5M	1	1
7L5M	1	1	8S5M	1	1
65L5N	1	1	18S5M	1	1
9L5N	1	1	9S5M	1	1
57L5M	1	1	20S5M	1	1
21L5M	1	1	93S5M	1	1
72L5M	1	1	70S5M	1	1
31L5N	1	1	27S5N	1	1
4L5M	1	1	58S5M	1	1
5L5N	1	1	50S5M	1	1
96L5N	1	1	69S5M	1	1
77L5M	1	1	97S5N	1	1
83L5M	1	1	56S5N	1	1
91L5M	1	1	9S5N	1	1
90L5M	1	1	79S5M	1	1
68L5N(T)	1	1	14S5M(T)	1	1
17L5M(T)	1	1	80S5M(T)	1	1
34L5M(T)	1	1	75S5M(T)	1	1
51L5M(T)	1	1	34S5N(T)	1	1
59L5M(T)	1	1	11S5N(T)	1	1
54L5M(T)	1	1	17S5N(T)	1	1
93L5M(T)	1	1	42S5N(T)	1	1
33L5N(T)	1	1	45S5N(T)	1	1
K84-200	1	1	K84-200	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 8 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SMC863CG กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ SMC863CG						ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ SMC863CG					
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
6L5M	0	1	1	0	1	1	99S5M	1	1	1	1	1	0
2L5M	1	1	1	0	1	1	10S5M	1	1	1	0	1	1
38L5M	0	1	1	0	1	1	7S5M	1	1	1	0	1	1
9L5M	0	1	1	0	1	1	5S5N	1	1	1	1	1	1
27L5N	0	1	1	0	1	1	15S5M	1	1	1	0	1	1
30L5N	0	1	1	1	1	1	27S5M	1	1	1	1	1	1
7L5M	0	1	1	1	1	1	8S5M	1	1	1	1	1	1
65L5N	1	1	1	0	1	1	18S5M	1	1	1	1	1	1
9L5N	1	1	1	0	1	1	9S5M	1	1	1	0	1	1
57L5M	1	1	1	0	1	1	20S5M	1	1	1	1	1	1
21L5M	1	1	1	1	1	1	93S5M	1	1	1	1	1	1
72L5M	1	1	1	1	1	1	70S5M	1	1	1	1	1	1
31L5N	1	1	1	1	1	1	27S5N	1	1	1	1	1	1
4L5M	1	1	1	1	1	1	58S5M	1	1	1	1	1	1
5L5N	1	1	1	0	1	1	50S5M	1	1	1	0	1	1
96L5N	1	1	1	1	1	1	69S5M	1	1	1	0	1	1
77L5M	1	1	1	0	1	1	97S5N	1	1	1	1	1	1
83L5M	1	1	1	0	1	1	56S5N	1	1	1	0	1	1
91L5M	1	1	1	1	1	1	9S5N	1	1	1	0	1	1
90L5M	1	1	1	1	1	1	79S5M	1	1	1	0	1	1
68L5N(T)	1	1	1	1	1	1	14S5M(T)	1	1	1	1	1	1
17L5M(T)	1	1	1	1	1	1	80S5M(T)	1	1	1	0	1	1
34L5M(T)	1	1	1	0	1	1	75S5M(T)	1	1	1	0	1	1
51L5M(T)	1	1	1	1	1	1	34S5N(T)	1	1	1	1	1	1
59L5M(T)	1	1	1	1	1	1	11S5N(T)	1	1	1	1	1	1
54L5M(T)	1	1	1	1	1	1	17S5N(T)	1	1	1	1	1	1
93L5M(T)	1	1	1	1	1	1	42S5N(T)	1	1	1	0	1	1
33L5N(T)	1	1	1	0	1	1	45S5N(T)	1	1	1	1	1	1
K84-200	1	1	1	1	1	1	K84-200	1	1	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 9 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ universal primer 2 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ universal primer 2 (pharmacia kit)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
6L5M	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
2L5M	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
38L5M	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
9L5M	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
27L5N	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
30L5N	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
7L5M	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
65L5N	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9L5N	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
57L5M	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
21L5M	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
72L5M	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
31L5N	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
4L5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5L5N	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
96L5N	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
77L5M	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
83L5M	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
91L5M	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
90L5M	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
68L5N(T)	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
17L5M(T)	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
34L5M(T)	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
51L5M(T)	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
59L5M(T)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
54L5M(T)	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
93L5M(T)	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
33L5N(T)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
K84-200	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

ดีเอ็นเออ้อย	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์										
แต่ละ	universal primer 2 (pharmacia kit)										
somaclone	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
99S5M	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
10S5M	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
7S5M	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
5S5N	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
15S5M	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
27S5M	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
8S5M	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
18S5M	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
9S5M	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
20S5M	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
93S5M	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
70S5M	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27S5N	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
58S5M	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
50S5M	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
69S5M	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
97S5N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
56S5N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9S5N	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
79S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14S5M(T)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
80S5M(T)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
75S5M(T)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34S5N(T)	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
11S5N(T)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17S5N(T)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
42S5N(T)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45S5N(T)	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
K84-200	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 10 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ universal primer 3 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ universal primer 3 (pharmacia kit)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6L5M	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
2L5M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
38L5M	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
9L5M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
27L5N	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
30L5N	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
7L5M	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
65L5N	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
9L5N	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
57L5M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
21L5M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
72L5M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
31L5N	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
4L5M	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
5L5N	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
96L5N	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
77L5M	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
83L5M	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
91L5M	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
90L5M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
68L5N(T)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
17L5M(T)	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
34L5M(T)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
51L5M(T)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
59L5M(T)	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
54L5M(T)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
93L5M(T)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
33L5N(T)	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
K84-200	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

ดีเอ็นเอ	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์									
อ้อยแต่ละ	universal primer 3 (pharmacia kit)									
somaclone	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
99S5M	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
10S5M	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
7S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5S5N	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
15S5M	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
27S5M	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
8S5M	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
18S5M	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
9S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
93S5M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
70S5M	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
27S5N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
58S5M	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
50S5M	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
69S5M	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
97S5N	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
56S5N	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
9S5N	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
79S5M	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
14S5M(T)	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
80S5M(T)	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
75S5M(T)	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
34S5N(T)	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
11S5N(T)	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
17S5N(T)	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
42S5N(T)	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
45S5N(T)	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
K84-200	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 11 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ universal primer 6 (pharmacia kit) กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ universal primer 6 (pharmacia kit)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
6L5M	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
2L5M	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
38L5M	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
9L5M	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
27L5N	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
30L5N	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
7L5M	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
65L5N	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
9L5N	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
57L5M	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
21L5M	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
72L5M	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
31L5N	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
4L5M	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
5L5N	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
96L5N	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
77L5M	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
83L5M	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
91L5M	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
90L5M	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
68L5N(T)	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
17L5M(T)	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
34L5M(T)	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
51L5M(T)	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
59L5M(T)	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
54L5M(T)	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
93L5M(T)	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
33L5N(T)	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
K84-200	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 11 (ต่อ)

ดีเอ็นเออ้อย	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์												
แต่ละ	universal primer 6 (pharmacia kit)												
somaclone	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
99S5M	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
10S5M	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
7S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5S5N	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
15S5M	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
27S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
8S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
18S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
9S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
20S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
93S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
70S5M	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
27S5N	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
58S5M	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
50S5M	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1
69S5M	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
97S5N	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
56S5N	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
9S5N	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
79S5M	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1
14S5M(T)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
80S5M(T)	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
75S5M(T)	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1
34S5N(T)	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
11S5N(T)	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
17S5N(T)	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
42S5N(T)	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
45S5N(T)	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
K84-200	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 12 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-02 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-02									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6L5M	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
2L5M	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
38L5M	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
9L5M	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1
27L5N	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
30L5N	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
7L5M	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
65L5N	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
9L5N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
57L5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21L5M	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
72L5M	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
31L5N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4L5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5L5N	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
96L5N	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
77L5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
83L5M	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
91L5M	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
90L5M	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
68L5N(T)	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
17L5M(T)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34L5M(T)	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
51L5M(T)	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
59L5M(T)	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
54L5M(T)	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
93L5M(T)	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1
33L5N(T)	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
K84-200	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 12 (ต่อ)

ดีเอ็นเออ้อย แต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-02									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
99S5M	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
10S5M	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
7S5M	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
5S5N	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
15S5M	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
27S5M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8S5M	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
18S5M	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
9S5M	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
20S5M	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
93S5M	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
70S5M	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
27S5N	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
58S5M	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
50S5M	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
69S5M	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
97S5N	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
56S5N	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
9S5N	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
79S5M	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
14S5M(T)	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
80S5M(T)	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
75S5M(T)	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
34S5N(T)	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
11S5N(T)	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
17S5N(T)	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
42S5N(T)	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
45S5N(T)	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
K84-200	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 13 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-04 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-04							
	1	2	3	4	5	6	7	8
6L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
2L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
38L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
9L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
27L5N	1	1	1	1	1	1	1	1
30L5N	1	1	1	1	1	1	1	1
7L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
65L5N	1	1	1	1	1	1	1	1
9L5N	1	1	1	1	1	1	1	1
57L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
21L5M	0	1	1	1	1	1	1	1
72L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
31L5N	0	1	1	1	1	1	1	1
4L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
5L5N	1	1	1	1	1	1	1	1
96L5N	1	1	1	1	1	1	1	1
77L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
83L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
91L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
90L5M	1	1	1	1	1	1	1	1
68L5N(T)	0	0	0	0	0	0	1	1
17L5M(T)	0	0	0	0	0	0	1	1
34L5M(T)	0	0	0	1	1	1	1	1
51L5M(T)	0	0	0	1	1	1	1	1
59L5M(T)	0	0	0	0	0	0	1	1
54L5M(T)	0	0	0	0	0	0	1	1
93L5M(T)	0	0	0	0	0	0	1	1
33L5N(T)	1	1	1	1	1	1	1	1
K84-200	1	1	1	1	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 13 (ต่อ)

ดีเอ็นเออ้อย	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์							
แต่ละ	OPA-04							
somaclone	1	2	3	4	5	6	7	8
99S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
10S5M	1	1	1	1	0	0	1	1
7S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
5S5N	1	1	1	1	1	1	1	1
15S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
27S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
8S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
18S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
9S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
20S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
93S5M	0	0	1	1	1	1	1	1
70S5M	0	1	1	1	1	1	1	1
27S5N	0	1	1	1	1	0	1	1
58S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
50S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
69S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
97S5N	1	1	1	1	1	1	1	1
56S5N	1	1	1	1	1	1	1	1
9S5N	1	1	1	1	1	1	1	1
79S5M	0	1	1	1	1	1	1	1
14S5M(T)	0	1	1	1	1	0	1	1
80S5M(T)	0	1	1	1	1	1	1	1
75S5M(T)	1	1	1	1	1	1	1	1
34S5N(T)	1	1	1	1	1	1	1	1
11S5N(T)	1	1	1	1	1	1	1	1
17S5N(T)	1	1	1	1	1	1	1	1
42S5N(T)	1	1	1	1	1	1	1	1
45S5N(T)	1	1	1	1	1	1	1	1
K84-200	1	1	1	1	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 14 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-08 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-08					ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-08				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
6L5M	0	0	0	1	1	99S5M	0	1	1	1	0
2L5M	0	0	0	1	1	10S5M	0	1	1	1	1
38L5M	0	0	0	1	1	7S5M	0	1	1	1	0
9L5M	0	0	0	1	1	5S5N	0	1	1	1	0
27L5N	0	0	0	1	1	15S5M	0	1	1	1	0
30L5N	0	0	0	0	1	27S5M	0	1	1	1	0
7L5M	0	0	0	1	1	8S5M	0	1	1	1	0
65L5N	0	0	0	1	1	18S5M	0	1	1	1	1
9L5N	0	0	0	1	1	9S5M	0	1	1	1	0
57L5M	0	0	0	1	1	20S5M	0	1	1	1	0
21L5M	0	0	0	1	1	93S5M	0	0	0	1	1
72L5M	0	0	0	0	1	70S5M	0	1	1	1	0
31L5N	0	0	1	1	1	27S5N	0	1	1	1	0
4L5M	0	0	0	0	1	58S5M	0	1	1	1	0
5L5N	0	0	0	1	1	50S5M	0	1	1	1	0
96L5N	0	0	0	0	1	69S5M	0	1	1	1	0
77L5M	0	0	0	1	1	97S5N	0	1	1	1	0
83L5M	0	0	0	1	1	56S5N	0	1	1	1	0
91L5M	0	0	0	1	1	9S5N	0	1	1	1	0
90L5M	0	0	0	1	1	79S5M	0	1	1	1	0
68L5N(T)	0	0	0	1	1	14S5M(T)	0	1	1	1	0
17L5M(T)	0	0	0	1	1	80S5M(T)	0	1	0	1	0
34L5M(T)	0	0	0	1	1	75S5M(T)	0	1	1	1	0
51L5M(T)	0	0	0	0	1	34S5N(T)	0	1	0	1	0
59L5M(T)	1	0	1	1	0	11S5N(T)	0	1	0	1	0
54L5M(T)	1	0	1	0	1	17S5N(T)	0	1	0	1	0
93L5M(T)	1	0	0	0	1	42S5N(T)	0	1	0	1	0
33L5N(T)	1	0	1	1	1	45S5N(T)	0	1	1	1	0
K84-200	0	1	0	1	0	K84-200	0	1	0	1	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 15 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-01 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-01						
	1	2	3	4	5	6	7
6L5M	0	1	1	1	1	1	1
2L5M	0	1	1	1	1	1	1
38L5M	0	1	1	1	1	1	1
9L5M	0	1	1	1	1	1	1
27L5N	0	1	1	1	1	1	1
30L5N	0	1	0	1	1	1	0
7L5M	0	1	1	1	1	1	1
65L5N	0	1	1	1	1	1	1
9L5N	0	1	1	1	1	1	1
57L5M	0	1	1	1	1	1	1
21L5M	0	1	1	1	1	1	1
72L5M	0	1	1	1	1	1	0
31L5N	0	1	1	1	1	1	1
4L5M	0	1	1	1	1	1	1
5L5N	0	1	1	1	1	1	1
96L5N	0	1	1	1	1	1	1
77L5M	0	1	1	1	1	1	1
83L5M	0	1	0	1	1	1	0
91L5M	0	1	1	1	1	1	1
90L5M	0	1	1	1	1	1	1
68L5N(T)	0	1	1	1	1	1	1
17L5M(T)	0	1	1	1	1	1	0
34L5M(T)	0	1	1	1	1	1	1
51L5M(T)	0	1	1	1	1	1	1
59L5M(T)	0	1	0	1	1	1	0
54L5M(T)	0	1	1	1	1	1	0
93L5M(T)	0	1	0	1	1	1	0
33L5N(T)	0	1	1	1	1	1	1
K84-200	0	1	0	1	0	0	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 15 (ต่อ)

ดีเอ็นเออ้อย	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์						
แต่ละ	OPA-01						
somaclone	1	2	3	4	5	6	7
99S5M	1	1	1	1	1	1	1
10S5M	1	1	1	1	1	1	1
7S5M	1	1	1	1	1	1	1
5S5N	1	1	1	1	1	0	1
15S5M	1	1	1	1	1	0	1
27S5M	1	1	1	1	1	0	1
8S5M	1	1	1	1	1	0	1
18S5M	0	1	1	1	1	1	1
9S5M	1	1	1	1	1	1	1
20S5M	1	1	1	1	1	0	0
93S5M	1	1	1	1	1	1	1
70S5M	0	1	1	1	0	0	0
27S5N	0	1	1	1	0	0	0
58S5M	0	1	1	1	0	0	0
50S5M	1	1	1	1	0	0	0
69S5M	0	1	1	1	0	0	0
97S5N	0	1	1	1	0	0	0
56S5N	1	1	1	1	0	0	0
9S5N	0	1	1	1	0	0	0
79S5M	0	1	1	1	0	0	0
14S5M(T)	0	1	1	1	0	0	0
80S5M(T)	0	1	0	1	0	0	0
75S5M(T)	0	1	1	1	0	0	0
34S5N(T)	0	1	0	1	0	0	0
11S5N(T)	0	1	0	1	0	0	0
17S5N(T)	0	1	0	1	0	0	0
42S5N(T)	0	1	0	1	0	0	0
45S5N(T)	0	1	1	1	0	0	0
K84-200	0	1	0	1	0	0	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 16 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-10 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-10						ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-10					
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
6L5M	0	1	1	1	1	0	99S5M	0	0	1	1	1	0
2L5M	0	1	1	1	1	0	10S5M	0	0	1	1	1	1
38L5M	0	1	1	1	1	1	7S5M	0	1	1	1	1	1
9L5M	1	1	1	1	1	1	5S5N	0	1	1	1	1	1
27L5N	0	1	1	1	1	1	15S5M	0	1	1	1	1	1
30L5N	0	1	1	1	1	1	27S5M	0	1	1	1	1	1
7L5M	1	1	1	1	1	1	8S5M	0	1	1	1	1	1
65L5N	0	1	1	1	1	1	18S5M	0	1	1	1	1	1
9L5N	1	1	1	1	1	1	9S5M	0	1	1	1	1	1
57L5M	1	1	1	1	1	1	20S5M	0	1	1	1	1	1
21L5M	0	0	1	1	1	1	93S5M	0	1	1	1	1	1
72L5M	1	1	1	1	1	1	70S5M	0	1	1	1	1	0
31L5N	0	1	1	1	1	1	27S5N	0	1	1	1	1	0
4L5M	0	1	1	0	1	1	58S5M	0	1	1	1	1	0
5L5N	0	1	1	1	1	1	50S5M	0	1	1	1	1	1
96L5N	0	1	1	1	1	1	69S5M	0	1	1	1	1	1
77L5M	0	1	1	1	1	1	97S5N	0	1	1	1	1	1
83L5M	1	1	1	1	1	1	56S5N	0	1	1	1	1	1
91L5M	0	0	0	0	1	0	9S5N	0	1	1	1	1	1
90L5M	1	1	1	1	1	1	79S5M	0	1	1	1	1	1
68L5N(T)	0	0	0	1	0	1	14S5M(T)	0	1	1	1	1	0
17L5M(T)	0	0	0	0	1	0	80S5M(T)	0	1	1	1	1	1
34L5M(T)	0	0	0	1	0	1	75S5M(T)	0	1	1	1	1	0
51L5M(T)	0	0	0	0	1	0	34S5N(T)	0	1	1	1	1	1
59L5M(T)	0	1	1	1	1	1	11S5N(T)	0	1	1	1	1	1
54L5M(T)	0	0	0	0	1	0	17S5N(T)	0	1	1	1	1	1
93L5M(T)	0	1	1	1	1	1	42S5N(T)	0	1	1	1	1	1
33L5N(T)	0	1	1	1	1	1	45S5N(T)	0	1	1	1	1	0
K84-200	0	0	0	0	1	0	K84-200	0	0	0	0	1	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 17 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-16 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-16						ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-16					
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
6L5M	1	1	1	1	1	1	99S5M	1	0	1	1	1	1
2L5M	1	0	0	1	0	0	10S5M	1	1	1	1	0	1
38L5M	0	0	0	1	0	0	7S5M	1	1	1	1	1	1
9L5M	0	0	0	1	1	1	5S5N	1	1	1	1	1	1
27L5N	1	1	1	1	1	1	15S5M	1	1	1	1	1	1
30L5N	0	0	0	1	1	1	27S5M	1	1	1	1	1	1
7L5M	1	0	0	1	1	1	8S5M	1	1	1	1	1	1
65L5N	1	0	0	1	1	1	18S5M	1	0	1	1	1	1
9L5N	0	0	0	1	1	1	9S5M	1	1	1	1	1	1
57L5M	0	0	0	1	1	1	20S5M	1	1	1	1	1	1
21L5M	0	0	0	1	1	1	93S5M	1	1	1	1	1	1
72L5M	0	0	0	1	0	0	70S5M	1	1	1	1	1	1
31L5N	0	0	0	1	0	0	27S5N	1	1	1	1	1	1
4L5M	1	1	1	1	1	1	58S5M	1	1	1	1	1	1
5L5N	0	0	0	1	1	1	50S5M	1	1	1	1	1	1
96L5N	1	1	1	1	1	1	69S5M	1	1	1	1	1	1
77L5M	0	0	0	1	0	0	97S5N	1	1	1	1	1	1
83L5M	1	0	0	1	1	1	56S5N	1	1	1	1	1	0
91L5M	1	1	1	1	1	1	9S5N	1	1	1	1	1	1
90L5M	1	1	1	1	1	1	79S5M	1	1	1	1	1	1
68L5N(T)	0	0	0	1	0	0	14S5M(T)	1	1	1	1	0	0
17L5M(T)	0	0	0	1	0	0	80S5M(T)	1	1	1	1	0	0
34L5M(T)	0	0	0	1	0	0	75S5M(T)	1	1	1	1	1	1
51L5M(T)	1	1	1	1	1	1	34S5N(T)	1	1	1	1	1	1
59L5M(T)	1	1	1	1	0	0	11S5N(T)	1	1	1	1	1	1
54L5M(T)	1	1	1	1	1	1	17S5N(T)	1	1	1	1	1	1
93L5M(T)	1	1	1	1	1	1	42S5N(T)	1	1	1	1	1	1
33L5N(T)	1	1	1	1	1	1	45S5N(T)	1	1	1	1	1	1
K84-200	1	1	1	1	1	1	K84-200	1	1	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 18 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-18 กับ somaclone ของอ้อย 58 ตัวอย่าง

ดีเอ็นเออ้อยแต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-18							
	1	2	3	4	5	6	7	8
6L5M	0	0	0	0	0	1	0	1
2L5M	0	0	1	0	0	1	0	1
38L5M	0	0	0	0	0	1	1	1
9L5M	0	0	0	0	0	1	0	1
27L5N	0	0	0	0	0	1	0	1
30L5N	0	0	0	0	0	1	0	1
7L5M	0	0	0	0	0	1	0	1
65L5N	0	0	0	0	0	1	0	1
9L5N	1	1	0	0	1	1	1	1
57L5M	0	0	0	0	1	1	1	1
21L5M	0	0	0	0	0	1	0	1
72L5M	0	0	0	0	0	0	0	1
31L5N	0	0	0	0	0	0	0	1
4L5M	0	0	0	0	0	1	0	1
5L5N	0	0	1	0	0	1	0	1
96L5N	0	0	0	0	0	1	0	1
77L5M	0	0	0	0	0	1	0	1
83L5M	0	0	0	0	0	1	0	1
91L5M	0	0	0	0	0	1	0	1
90L5M	0	0	0	0	0	1	0	1
68L5N(T)	1	1	0	1	1	1	0	1
17L5M(T)	1	1	0	1	1	1	0	1
34L5M(T)	1	1	0	1	1	1	0	1
51L5M(T)	0	0	0	0	0	1	0	1
59L5M(T)	1	1	0	1	1	1	0	1
54L5M(T)	1	1	0	1	1	1	0	1
93L5M(T)	0	0	0	1	1	1	0	1
33L5N(T)	1	1	1	1	1	1	0	1
K84-200	1	1	1	1	1	1	0	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 18 (ต่อ)

ดีเอ็นเออ้อย แต่ละ somaclone	แถบดีเอ็นที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-18							
	1	2	3	4	5	6	7	8
99S5M	1	1	1	1	1	0	0	1
10S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
7S5M	1	1	1	1	1	1	1	1
5S5N	1	1	1	1	1	1	0	1
15S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
27S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
8S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
18S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
9S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
20S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
93S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
70S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
27S5N	1	1	1	1	1	1	0	1
58S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
50S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
69S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
97S5N	1	1	1	1	1	1	0	1
56S5N	1	1	1	1	1	1	0	1
9S5N	1	1	1	1	1	1	1	1
79S5M	1	1	1	1	1	1	0	1
14S5M(T)	1	1	1	1	1	1	1	1
80S5M(T)	1	1	1	1	1	1	0	1
75S5M(T)	1	1	1	1	1	1	0	1
34S5N(T)	1	1	1	1	1	1	0	1
11S5N(T)	1	1	1	1	1	1	1	1
17S5N(T)	1	1	1	1	1	1	1	1
42S5N(T)	1	1	1	1	1	1	1	1
45S5N(T)	1	1	1	1	1	1	0	1
K84-200	1	1	1	1	1	1	0	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 ค่าความคล้ายคลึง (similarity matrix) ของอ้อยที่ผ่านเทคนิค SSR ทั้งหมด 58 ตัวอย่าง

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
99S5M	1.0000											
10S5M	0.8928	1.0000										
7S5M	0.9285	0.9642	1.0000									
5S5N	0.8571	0.8928	0.8571	1.0000								
15S5M	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	1.0000							
27S5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000						
8S5M	0.9285	0.8928	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	1.0000					
18S5M	0.8928	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	1.0000				
9S5M	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.8928	1.0000			
20S5M	0.8928	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	1.0000	0.8928	1.0000		
93S5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	1.0000	
70S5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	1.0000	1.0000
27S5N	0.8928	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	1.0000	0.8928	1.0000	0.9642	0.9642
58S5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	1.0000	1.0000
50S5M	0.8214	0.9285	0.8928	0.9642	0.9285	0.8928	0.8928	0.8571	0.8928	0.8571	0.8928	0.8928
69S5M	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.9642	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285
97S5N	0.9285	0.8928	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	1.0000	0.8928	0.8571	0.8928	0.9285	0.9285

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
56S5N	0.8928	0.9285	0.9642	0.8214	0.9285	0.8928	0.8928	0.8571	0.8928	0.8571	0.8928	0.8928
9S5N	0.9285	0.9642	1.0000	0.8571	0.9642	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	0.8928	0.9285	0.9285
79S5M	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642
14S5M(T)	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	1.0000	1.0000
80S5M(T)	0.9285	0.9642	1.0000	0.8571	0.9642	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	0.8928	0.9285	0.9285
75S5M(T)	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642
34S5N(T)	0.9285	0.8214	0.8571	0.7857	0.8214	0.8571	0.8571	0.8214	0.7857	0.8214	0.8571	0.8571
11S5N(T)	0.8928	0.8571	0.8928	0.8214	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.8214	0.8571	0.8928	0.8928
17S5N(T)	0.8571	0.8928	0.8571	0.8571	0.8928	0.9285	0.8571	0.9642	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285
42S5N(T)	0.8571	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.8571	0.8571	0.8214	0.8571	0.8214	0.8571	0.8571
45S5N(T)	0.8928	0.8571	0.8928	0.8214	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.8214	0.8571	0.8928	0.8928
K84-200	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9642	0.9285	0.8928	0.9285	0.9642	0.9642
6L5M	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.8928	1.0000	0.8928	0.9285	0.9285
2L5M	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642
38L5M	0.8214	0.9285	0.8928	0.8214	0.9285	0.8928	0.8214	0.9285	0.9642	0.9285	0.8928	0.8928
9L5M	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.8928	1.0000	0.8928	0.9285	0.9285
27L5N	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.8928	1.0000	0.8928	0.9285	0.9285

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
30L5N	0.8928	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642
7L5M	0.8928	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642
65L5N	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642
9L5N	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642
57L5M	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642
21L5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	1.0000	1.0000
72L5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	1.0000	1.0000
31L5N	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	1.0000	1.0000
4L5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	1.0000	1.0000
5L5N	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642
96L5N	0.8928	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642
77L5M	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	1.0000	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642
83L5M	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.9642	0.9285	0.8571	0.8928	1.0000	0.8928	0.9285	0.9285
91L5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	1.0000	1.0000
90L5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	1.0000	1.0000
68L5N(T)	0.8928	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.8928	0.9285	0.9642	0.9642
17L5M(T)	0.9642	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.8928	0.9285	0.9642	0.9642

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
34L5M(T)	0.8214	0.9285	0.8928	0.8214	0.9285	0.8928	0.8214	0.8571	0.9642	0.8571	0.8928	0.8928
51L5M(T)	0.8571	0.8928	0.8571	0.8571	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.8571	0.8928	0.9285	0.9285
59L5M(T)	0.9285	0.8928	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	1.0000	0.8928	0.8571	0.8928	0.9285	0.9285
54L5M(T)	0.7857	0.8214	0.7857	0.8571	0.8214	0.8571	0.8571	0.8928	0.7857	0.8928	0.8571	0.8571
93L5M(T)	0.7142	0.7500	0.7142	0.8571	0.7500	0.7857	0.7857	0.8214	0.7142	0.8214	0.7857	0.7857
33L5N(T)	0.7857	0.8928	0.8571	0.8571	0.8928	0.8571	0.7857	0.8214	0.8571	0.8214	0.8571	0.8571
K84-200	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	0.9642	0.9285	0.8928	0.9285	0.9642	0.9642

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

somaclone	27S5N	58S5M	50S5M	69S5M	97S5N	56S5N	9S5N	79S5M	14S5M(T)	80S5M(T)	75S5M(T)	34S5N(T)
27S5N	1.0000											
58S5M	0.9642	1.0000										
50S5M	0.8571	0.8928	1.0000									
69S5M	0.9642	0.9285	0.8928	1.0000								
97S5N	0.8928	0.9285	0.8928	0.8571	1.0000							
56S5N	0.8571	0.8928	0.8578	0.8928	0.8928	1.0000						
9S5N	0.8928	0.9285	0.8928	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000					
79S5M	0.9285	0.9642	0.9285	0. 9642	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000				
14S5M(T)	0.9642	1.0000	0.8928	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000			
80S5M(T)	0.8928	0.9285	0.8928	0.9285	0.9285	0.9642	1.0000	0.9642	0.9285	1.0000		
75S5M(T)	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9642	0.9642	1.0000	
34S5N(T)	0.8214	0.8571	0.7500	0.7857	0.8571	0.8214	0.8571	0.8214	0.8571	0.8571	0.8214	1.0000
11S5N(T)	0.8571	0.8928	0.7857	0.8214	0.8928	0.8571	0.8928	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.9642
17S5N(T)	0.9642	0.9285	0.8214	0.9285	0.8571	0.8214	0.8571	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.7857
42S5N(T)	0.8214	0.8571	0.8928	0.8571	0.8571	0.8928	0.9285	0.8928	0.8571	0.9285	0.8928	0.8571
45S5N(T)	0.8571	0.8928	0.7857	0.8214	0.8928	0.8571	0.8928	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.9642
K84-200	0.9285	0.9642	0.8571	0.8928	0.9642	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642	0.9285	0.8928

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

somaclone	27S5N	58S5M	50S5M	69S5M	97S5N	56S5N	9S5N	79S5M	14S5M(T)	80S5M(T)	75S5M(T)	34S5N(T)
6L5M	0.8928	0.9285	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	0.7857
2L5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9642	0.9642	1.0000	0.8214
38L5M	0.9285	0.8928	0.8571	0.9642	0.8214	0.8571	0.8928	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	0.7500
9L5M	0.8928	0.9285	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	0.7857
27L5N	0.8928	0.9285	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	0.7857
30L5N	0.9285	0.9642	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.8214
7L5M	0.9285	0.9642	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.8214
65L5N	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9642	0.9642	1.0000	0.8214
9L5N	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9642	0.9642	1.0000	0.8214
57L5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9642	0.9642	1.0000	0.8214
21L5M	0.9642	1.0000	0.8928	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.8571
72L5M	0.9642	1.0000	0.8928	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.8571
31L5N	0.9642	1.0000	0.8928	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.8571
4L5M	0.9642	1.0000	0.8928	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.8571
5L5N	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9642	0.9642	1.0000	0.8214
96L5N	0.9285	0.9642	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.8214
77L5M	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9642	0.9642	1.0000	0.8214

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

somaclone	27S5N	58S5M	50S5M	69S5M	97S5N	56S5N	9S5N	79S5M	14S5M(T)	80S5M(T)	75S5M(T)	34S5N(T)
83L5M	0.8928	0.9285	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	0.7857
91L5M	0.9642	1.0000	0.8928	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.8571
90L5M	0.9642	1.0000	0.8928	0.9285	0.9285	0.8928	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.8571
68L5N(T)	0.9285	0.9642	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.8214
17L5M(T)	0.9285	0.9642	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.8928	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.8928
34L5M(T)	0.8571	0.8928	0.8571	0.8928	0.8214	0.8571	0.8928	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	0.7500
51L5M(T)	0.8928	0.9285	0.8214	0.8571	0.8571	0.8214	0.8571	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.9285
59L5M(T)	0.8928	0.9285	0.8928	0.8571	1.0000	0.8928	0.9285	0.8928	0.9285	0.9285	0.8928	0.8571
54L5M(T)	0.8928	0.8571	0.8214	0.8571	0.8571	0.7500	0.7857	0.8214	0.8571	0.7857	0.8214	0.7142
93L5M(T)	0.8214	0.7857	0.8214	0.7857	0.7857	0.6785	0.7142	0.7500	0.7857	0.7142	0.7500	0.7857
33L5N(T)	0.8214	0.8571	0.8928	0.8571	0.7857	0.8214	0.8571	0.8928	0.8571	0.8571	0.8928	0.8571
K84-200	0.9285	0.9642	0.8571	0.8928	0.9642	0.9285	0.9642	0.9285	0.9642	0.9642	0.9285	0.8928

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

somaclone	11S5N(T)	17S5N(T)	42S5N(T)	45S5N(T)	K84-200	6L5M	2L5M	38L5M	9L5M	27L5N	30L5N	7L5M
11S5N(T)	1.0000											
17S5N(T)	0.8214	1.0000										
42S5N(T)	0.8928	0.7857	1.0000									
45S5N(T)	1.0000	0.8214	0.8928	1.0000								
K84-200	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	1.0000							
6L5M	0.8214	0.9285	0.8571	0.8214	0.8928	1.0000						
2L5M	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.9285	0.9642	1.0000					
38L5M	0.7857	0.9642	0.8214	0.7857	0.8571	0.9642	0.9285	1.0000				
9L5M	0.8214	0.9285	0.8571	0.8214	0.8928	1.0000	0.9642	0.9642	1.0000			
27L5N	0.8214	0.9285	0.8571	0.8214	0.8928	1.0000	0.9642	0.9642	1.0000	1.0000		
30L5N	0.8571	0.9642	0.8214	0.8571	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642	1.0000	
7L5M	0.8571	0.9642	0.8214	0.8571	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642	1.0000	1.0000
65L5N	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9642	0.9285	0.9285
9L5N	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9642	0.9285	0.9285
57L5M	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9642	0.9285	0.9285
21L5M	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642
72L5M	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

somaclone	11S5N(T)	17S5N(T)	42S5N(T)	45S5N(T)	K84-200	6L5M	2L5M	38L5M	9L5M	27L5N	30L5N	7L5M
31L5N	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642
4L5M	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642
5L5N	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9642	0.9285	0.9285
96L5N	0.8571	0.9642	0.8214	0.8571	0.9285	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642	1.0000	1.0000
77L5M	0.8571	0.8928	0.8928	0.8571	0.9285	0.9642	1.0000	0.9285	0.9642	0.9642	0.9285	0.9285
83L5M	0.8214	0.9285	0.8571	0.8214	0.8928	1.0000	0.9642	0.9642	1.0000	1.0000	0.9642	0.9642
91L5M	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642
90L5M	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.9642	0.9285	0.9642	0.8928	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642
68L5N(T)	0.8571	0.8928	0.8214	0.8571	0.9285	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.8928	0.9285	0.9285
17L5M(T)	0.8571	0.8928	0.8214	0.8571	0.9285	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.8928	0.9285	0.9285
34L5M(T)	0.7857	0.8928	0.8214	0.7857	0.8571	0.9642	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642	0.9285	0.9285
51L5M(T)	0.9642	0.8571	0.8571	0.9642	0.8928	0.8571	0.8928	0.8214	0.8571	0.8571	0.8928	0.8928
59L5M(T)	0.8928	0.8571	0.8571	0.8928	0.9642	0.8571	0.8928	0.8214	0.8571	0.8571	0.8928	0.8928
54L5M(T)	0.7500	0.8571	0.7142	0.7500	0.8214	0.7857	0.8214	0.8214	0.7857	0.7857	0.8214	0.8214
93L5M(T)	0.8214	0.7857	0.7857	0.8214	0.7500	0.7142	0.7500	0.7500	0.7142	0.7142	0.7500	0.7500
33L5N(T)	0.8928	0.7857	0.9285	0.8928	0.8214	0.8571	0.8928	0.8214	0.8571	0.8571	0.8214	0.8214
K84-200	0.9285	0.8928	0.8928	0.9285	1.0000	0.8928	0.9285	0.8571	0.8928	0.8928	0.9285	0.9285

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

somaclone	65L5N	9L5N	57L5M	21L5M	72L5M	31L5N	4L5M	5L5N	96L5N	77L5M	83L5M	91L5M
65L5N	1.0000											
9L5N	1.0000	1.0000										
57L5M	1.0000	1.0000	1.0000									
21L5M	0.9642	0.9642	0.9642	1.0000								
72L5M	0.9642	0.9642	0.9642	1.0000	1.0000							
31L5N	0.9642	0.9642	0.9642	1.0000	1.0000	1.0000						
4L5M	0.9642	0.9642	0.9642	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000					
5L5N	1.0000	1.0000	1.0000	0.9642	0.9642	0.9642	0.9642	1.0000				
96L5N	0.9285	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642	0.9642	0.9642	0.9285	1.0000			
77L5M	1.0000	1.0000	1.0000	0.9642	0.9642	0.9642	0.9642	1.0000	0.9285	1.0000		
83L5M	0.9642	0.9642	0.9642	0.9285	0.9285	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642	0.9642	1.0000	
91L5M	0.9642	0.9642	0.9642	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9642	0.9642	0.9642	0.9285	1.0000
90L5M	0.9642	0.9642	0.9642	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9642	0.9642	0.9642	0.9285	1.0000
68L5N(T)	0.9285	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642	0.9642	0.9642	0.9285	0.9285	0.9285	0.8928	0.9642
17L5M(T)	0.9285	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642	0.9642	0.9642	0.9285	0.9285	0.9285	0.8928	0.9642
34L5M(T)	0.9285	0.9285	0.9285	0.8928	0.8928	0.8928	0.8928	0.9285	0.9285	0.9285	0.9642	0.8928
51L5M(T)	0.8928	0.8928	0.8928	0.9285	0.9285	0.9285	0.9285	0.8928	0.8928	0.8928	0.8571	0.9285

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

somaclone	65L5N	9L5N	57L5M	21L5M	72L5M	31L5N	4L5M	5L5N	96L5N	77L5M	83L5M	91L5M
59L5M(T)	0.8928	0.8928	0.8928	0.9285	0.9285	0.9285	0.9285	0.8928	0.8928	0.8928	0.8571	0.9285
54L5M(T)	0.8214	0.8214	0.8214	0.8571	0.8571	0.8571	0.8571	0.8214	0.8214	0.8214	0.7857	0.8571
93L5M(T)	0.7500	0.7500	0.7500	0.7857	0.7857	0.7857	0.7857	0.7500	0.7500	0.7500	0.7142	0.7857
33L5N(T)	0.8928	0.8928	0.8928	0.8571	0.8571	0.8571	0.8571	0.8928	0.8214	0.8928	0.8571	0.8571
K84-200	0.9285	0.9285	0.9285	0.9642	0.9642	0.9642	0.9642	0.9285	0.9285	0.9285	0.8928	0.9642

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 19 (ต่อ)

somaclone	90L5M	68L5N(T)	17L5M(T)	34L5M(T)	51L5M(T)	59L5M(T)	54L5M(T)	93L5M(T)	33L5N(T)	K84-200
90L5M	1.0000									
68L5N(T)	0.9642	1.0000								
17L5M(T)	0.9642	0.9285	1.0000							
34L5M(T)	0.8928	0.9285	0.8571	1.0000						
51L5M(T)	0.9285	0.8928	0.8928	0.8214	1.0000					
59L5M(T)	0.9285	0.8928	0.8928	0.8214	0.8571	1.0000				
54L5M(T)	0.8571	0.8928	0.8214	0.8214	0.7857	0.8571	1.0000			
93L5M(T)	0.7857	0.7500	0.7500	0.6785	0.8571	0.7857	0.8571	1.0000		
33L5N(T)	0.8571	0.8214	0.8214	0.8214	0.9285	0.7857	0.7142	0.8571	1.0000	
K84-200	0.9642	0.9285	0.9285	0.8571	0.8928	0.9642	0.8214	0.7500	0.8214	1.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 ค่าความคล้ายคลึง (similarity matrix) ของอ้อยที่ผ่านเทคนิค RAPD ทั้งหมด 58 ตัวอย่าง

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
99S5M	1.0000											
10S5M	0.8452	1.0000										
7S5M	0.7500	0.7857	1.0000									
5S5N	0.7380	0.7023	0.8690	1.0000								
15S5M	0.7857	0.7738	0.8928	0.9285	1.0000							
27S5M	0.7738	0.7619	0.8571	0.8690	0.9404	1.0000						
8S5M	0.8333	0.7976	0.8452	0.8571	0.9285	0.9167	1.0000					
18S5M	0.8452	0.7857	0.8095	0.8214	0.8690	0.8571	0.9404	1.0000				
9S5M	0.7976	0.7619	0.9047	0.8690	0.8690	0.8333	0.9167	0.9047	1.0000			
20S5M	0.7261	0.7142	0.9285	0.9166	0.9167	0.8809	0.8690	0.8333	0.9285	1.0000		
93S5M	0.7619	0.7023	0.7261	0.7380	0.7857	0.8214	0.8571	0.8690	0.8214	0.7500	1.0000	
70S5M	0.7976	0.7142	0.6904	0.8214	0.7976	0.7857	0.7976	0.7857	0.7380	0.7619	0.7261	1.0000
27S5N	0.7738	0.7380	0.7619	0.7738	0.7500	0.6904	0.7500	0.7380	0.7857	0.7857	0.6547	0.8571
58S5M	0.8571	0.7500	0.7261	0.7619	0.7857	0.7738	0.8095	0.7976	0.7500	0.7500	0.7142	0.9167
50S5M	0.8095	0.7261	0.7738	0.8571	0.8333	0.7976	0.8333	0.7976	0.8452	0.8452	0.7380	0.8690
69S5M	0.8095	0.7261	0.7976	0.8571	0.8809	0.8452	0.8333	0.8214	0.8214	0.8690	0.7380	0.8452
97S5N	0.7738	0.7380	0.8333	0.8928	0.9167	0.8571	0.8452	0.8333	0.8333	0.9047	0.7261	0.8571

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
56S5N	0.7500	0.7142	0.8571	0.8928	0.8928	0.8333	0.8214	0.7857	0.8571	0.9285	0.7023	0.8095
9S5N	0.7738	0.7380	0.8333	0.8452	0.8690	0.8333	0.7976	0.7857	0.8095	0.8809	0.7023	0.8571
79S5M	0.7500	0.7142	0.8095	0.8928	0.8928	0.8333	0.8214	0.8095	0.8095	0.8809	0.7261	0.8809
14S5M(T)	0.7619	0.7500	0.7500	0.7380	0.7857	0.7738	0.7857	0.7738	0.7738	0.7976	0.7142	0.8690
80S5M(T)	0.7738	0.7142	0.6904	0.7500	0.7738	0.7380	0.7976	0.7857	0.7857	0.7619	0.7738	0.8333
75S5M(T)	0.7976	0.6904	0.7619	0.8452	0.8214	0.8095	0.8452	0.8333	0.8333	0.8333	0.7500	0.9047
34S5N(T)	0.7500	0.6904	0.7380	0.8690	0.8214	0.7857	0.7500	0.7380	0.7380	0.8095	0.6785	0.8809
11S5N(T)	0.7261	0.7142	0.7857	0.7976	0.8214	0.8333	0.7976	0.7619	0.7380	0.8095	0.7023	0.8571
17S5N(T)	0.7619	0.7261	0.7976	0.7857	0.7857	0.7976	0.7619	0.7500	0.7261	0.7976	0.6904	0.8452
42S5N(T)	0.7500	0.7619	0.7857	0.8214	0.7976	0.7619	0.7500	0.7380	0.7142	0.7857	0.6547	0.8571
45S5N(T)	0.7619	0.6785	0.7500	0.8809	0.8333	0.7976	0.7619	0.7500	0.7500	0.8214	0.6667	0.9167
K84-200	0.8452	0.7619	0.6667	0.7023	0.7261	0.7142	0.7500	0.7380	0.6904	0.6904	0.6785	0.8333
6L5M	0.7619	0.7023	0.6785	0.6667	0.6904	0.7023	0.6667	0.7023	0.6547	0.6547	0.7380	0.7023
2L5M	0.7500	0.7142	0.5714	0.5833	0.6071	0.6428	0.6309	0.6904	0.5952	0.5476	0.7261	0.6667
38L5M	0.7500	0.7619	0.6667	0.6309	0.6309	0.5952	0.6785	0.7380	0.6904	0.6190	0.6547	0.6428
9L5M	0.7142	0.6309	0.5833	0.6428	0.6190	0.6309	0.6190	0.6785	0.5833	0.5595	0.6904	0.6785
27L5N	0.7380	0.7738	0.7500	0.7380	0.7380	0.7261	0.7142	0.7500	0.7261	0.7261	0.6904	0.6785

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
30L5N	0.6667	0.6071	0.5833	0.6428	0.6190	0.6309	0.5714	0.6309	0.5357	0.5833	0.6428	0.7023
7L5M	0.7738	0.7142	0.6904	0.7023	0.7261	0.7142	0.6785	0.7380	0.6428	0.6667	0.6785	0.7142
65L5N	0.7142	0.7500	0.7261	0.6904	0.7142	0.7023	0.6904	0.7261	0.6785	0.6785	0.6428	0.6547
9L5N	0.7142	0.7738	0.7500	0.6904	0.7142	0.7023	0.6667	0.7023	0.6547	0.6785	0.6190	0.6547
57L5M	0.6667	0.6785	0.6547	0.6667	0.6667	0.7023	0.6190	0.6547	0.5595	0.5833	0.6667	0.6547
21L5M	0.6904	0.6547	0.5833	0.6428	0.6190	0.6547	0.5952	0.6547	0.5595	0.5595	0.6904	0.6785
72L5M	0.6785	0.6190	0.5238	0.5357	0.5595	0.5714	0.5833	0.6428	0.5476	0.5238	0.6785	0.6190
31L5N	0.6785	0.6667	0.5952	0.5833	0.6309	0.6667	0.5833	0.6190	0.5238	0.5476	0.6309	0.6428
4L5M	0.6667	0.7261	0.7500	0.7142	0.7380	0.7261	0.6904	0.7023	0.6785	0.7023	0.6428	0.6785
5L5N	0.7738	0.7142	0.6428	0.6309	0.6309	0.6190	0.6785	0.7380	0.6904	0.6190	0.7023	0.6904
96L5N	0.6904	0.7023	0.6547	0.6428	0.6904	0.7261	0.6428	0.6547	0.5833	0.6071	0.6904	0.6785
77L5M	0.6904	0.7500	0.7023	0.6667	0.6904	0.6785	0.6428	0.6785	0.6309	0.6547	0.5952	0.6309
83L5M	0.6785	0.7142	0.6904	0.6547	0.6785	0.6667	0.6547	0.6904	0.6428	0.6667	0.6071	0.6428
91L5M	0.7500	0.7380	0.6667	0.6547	0.7023	0.7142	0.6785	0.6904	0.6190	0.6190	0.6547	0.6904
90L5M	0.7023	0.6904	0.5952	0.6547	0.6309	0.6667	0.6547	0.6904	0.6190	0.5714	0.7500	0.7142
68L5N(T)	0.6667	0.6547	0.4642	0.5238	0.5000	0.5119	0.5476	0.6071	0.5119	0.4404	0.6904	0.6309
17L5M(T)	0.6667	0.7023	0.5595	0.5476	0.5952	0.6309	0.5476	0.5833	0.4880	0.5357	0.5952	0.6547

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
34L5M(T)	0.6904	0.7023	0.5833	0.5714	0.6190	0.6547	0.5952	0.6309	0.5357	0.5357	0.6904	0.6309
51L5M(T)	0.7261	0.6667	0.5476	0.5357	0.5833	0.5952	0.6309	0.6428	0.5714	0.5000	0.7261	0.6667
59L5M(T)	0.7261	0.7142	0.5952	0.6309	0.6309	0.6190	0.6785	0.6904	0.6428	0.5952	0.7023	0.7380
54L5M(T)	0.6428	0.6785	0.5595	0.5476	0.5952	0.6309	0.5476	0.5595	0.4880	0.5357	0.6190	0.6547
93L5M(T)	0.6309	0.6667	0.5238	0.5595	0.5595	0.5714	0.5833	0.5952	0.5238	0.5000	0.6785	0.6904
33L5N(T)	0.7976	0.7857	0.8095	0.7976	0.8214	0.8095	0.7738	0.7857	0.7380	0.7619	0.7261	0.8095
K84-200	0.8452	0.7619	0.6667	0.7023	0.7261	0.7142	0.7500	0.7380	0.6904	0.6904	0.6785	0.8333

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

somaclone	27S5N	58S5M	50S5M	69S5M	97S5N	56S5N	9S5N	79S5M	14S5M(T)	80S5M(T)	75S5M(T)	34S5N(T)
27S5N	1.0000											
58S5M	0.9166	1.0000										
50S5M	0.8690	0.8809	1.0000									
69S5M	0.8214	0.8571	0.9285	1.0000								
97S5N	0.8333	0.8452	0.8690	0.9404	1.0000							
56S5N	0.8095	0.7976	0.8690	0.8928	0.9523	1.0000						
9S5N	0.8095	0.8452	0.8690	0.9404	0.9523	0.9285	1.0000					
79S5M	0.8571	0.8452	0.8690	0.9166	0.9761	0.9285	0.9285	1.0000				
14S5M(T)	0.8214	0.8333	0.8095	0.8333	0.8452	0.8452	0.8928	0.8452	1.0000			
80S5M(T)	0.8095	0.8214	0.8452	0.8690	0.8571	0.8333	0.8571	0.8571	0.8690	1.0000		
75S5M(T)	0.8333	0.8690	0.8690	0.8928	0.9047	0.8571	0.8809	0.8809	0.8690	0.8571	1.0000	
34S5N(T)	0.7857	0.8214	0.8690	0.9166	0.9047	0.8571	0.9047	0.9047	0.7976	0.8571	0.8809	1.0000
11S5N(T)	0.7142	0.7976	0.7738	0.8452	0.8571	0.8333	0.9047	0.8333	0.8452	0.8095	0.8571	0.9047
17S5N(T)	0.7500	0.8333	0.7619	0.8333	0.8452	0.8214	0.8928	0.8214	0.8333	0.7976	0.8452	0.8928
42S5N(T)	0.8095	0.8452	0.7738	0.8214	0.8571	0.8095	0.8571	0.8571	0.7738	0.7857	0.8095	0.9047
45S5N(T)	0.8214	0.8571	0.8571	0.9047	0.9166	0.8690	0.9167	0.9167	0.8333	0.8214	0.9166	0.9404
K84-200	0.7857	0.8690	0.7976	0.7976	0.7857	0.7380	0.7857	0.7857	0.7738	0.8095	0.7857	0.8333

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

somaclone	27S5N	58S5M	50S5M	69S5M	97S5N	56S5N	9S5N	79S5M	14S5M(T)	80S5M(T)	75S5M(T)	34S5N(T)
6L5M	0.7023	0.7619	0.6904	0.7380	0.7023	0.6547	0.7023	0.7023	0.6428	0.6547	0.6785	0.7261
2L5M	0.6190	0.7023	0.6309	0.6309	0.6190	0.5952	0.6190	0.6190	0.6547	0.6904	0.6190	0.6428
38L5M	0.6904	0.7023	0.6785	0.6547	0.6428	0.6428	0.6428	0.6428	0.6547	0.6904	0.6190	0.6428
9L5M	0.6071	0.6904	0.6428	0.6667	0.6309	0.5833	0.6309	0.6309	0.5476	0.6071	0.6309	0.7023
27L5N	0.7023	0.7142	0.6904	0.7142	0.7500	0.7261	0.7023	0.7500	0.6190	0.6547	0.6547	0.7261
30L5N	0.6071	0.6904	0.6428	0.6667	0.6547	0.6071	0.6547	0.6547	0.5714	0.6071	0.6309	0.7500
7L5M	0.6667	0.7500	0.7023	0.7500	0.7380	0.6904	0.7380	0.7380	0.6547	0.6667	0.6667	0.7619
65L5N	0.6785	0.6904	0.6428	0.6667	0.7023	0.6785	0.6785	0.7023	0.5952	0.6309	0.6071	0.6785
9L5N	0.6785	0.6904	0.6667	0.6904	0.7023	0.6785	0.7023	0.7023	0.6190	0.6071	0.6071	0.7023
57L5M	0.5595	0.6428	0.6190	0.6667	0.6309	0.5833	0.6547	0.6309	0.5714	0.5595	0.6071	0.7023
21L5M	0.5833	0.6428	0.6190	0.6428	0.6071	0.5595	0.6071	0.6309	0.5476	0.5833	0.5833	0.6785
72L5M	0.5714	0.6547	0.6309	0.6071	0.5714	0.5476	0.5714	0.5714	0.5833	0.6428	0.5476	0.5952
31L5N	0.5952	0.6547	0.6071	0.6309	0.6190	0.5952	0.6190	0.6428	0.6071	0.5952	0.5476	0.6190
4L5M	0.7023	0.7142	0.6667	0.6667	0.7261	0.7023	0.6785	0.7261	0.5952	0.6071	0.6309	0.6785
5L5N	0.7142	0.7500	0.7261	0.6785	0.6428	0.6190	0.6428	0.6428	0.6071	0.6904	0.6428	0.6667
96L5N	0.6309	0.7142	0.6667	0.6904	0.6785	0.6309	0.6785	0.6785	0.5952	0.6071	0.6071	0.7023
77L5M	0.6547	0.6667	0.6428	0.6667	0.6785	0.6785	0.6547	0.6785	0.6190	0.6309	0.5833	0.6785

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

somaclone	27S5N	58S5M	50S5M	69S5M	97S5N	56S5N	9S5N	79S5M	14S5M(T)	80S5M(T)	75S5M(T)	34S5N(T)
83L5M	0.6667	0.6785	0.6785	0.6785	0.6667	0.6428	0.6428	0.6667	0.5595	0.6190	0.5714	0.6904
91L5M	0.6428	0.7261	0.6785	0.7023	0.6667	0.6190	0.6667	0.6667	0.6071	0.6190	0.6190	0.6904
90L5M	0.6190	0.7023	0.6785	0.6547	0.6190	0.5714	0.6190	0.6190	0.5833	0.6428	0.6428	0.6904
68L5N(T)	0.5833	0.6190	0.5714	0.5476	0.5119	0.4880	0.5119	0.5357	0.5714	0.6309	0.5595	0.5833
17L5M(T)	0.6309	0.6667	0.5952	0.6190	0.6071	0.5833	0.6071	0.6309	0.6428	0.6071	0.5595	0.6309
34L5M(T)	0.5833	0.6428	0.5952	0.6190	0.6071	0.5833	0.6071	0.6309	0.5952	0.6309	0.5357	0.6309
51L5M(T)	0.6428	0.7023	0.6309	0.6071	0.5714	0.5238	0.5714	0.5952	0.5833	0.6190	0.5952	0.5952
59L5M(T)	0.7142	0.7500	0.6785	0.6785	0.6667	0.6428	0.6667	0.6904	0.7261	0.7857	0.6904	0.6904
54L5M(T)	0.6309	0.6667	0.5952	0.6190	0.6071	0.5595	0.6071	0.6309	0.5952	0.5357	0.5595	0.6071
93L5M(T)	0.6190	0.6547	0.6071	0.5833	0.5714	0.5238	0.5714	0.5952	0.5833	0.6190	0.5952	0.6667
33L5N(T)	0.7857	0.8452	0.7976	0.7976	0.8095	0.7857	0.8095	0.8095	0.7261	0.7142	0.7380	0.7857
K84-200	0.7857	0.8690	0.7976	0.7976	0.7857	0.7380	0.7857	0.7857	0.7738	0.8095	0.7857	0.8333

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

somaclone	11S5N(T)	17S5N(T)	42S5N(T)	45S5N(T)	K84-200	6L5M	2L5M	38L5M	9L5M	27L5N	30L5N	7L5M
11S5N(T)	1.0000											
17S5N(T)	0.9642	1.0000										
42S5N(T)	0.9047	0.9404	1.0000									
45S5N(T)	0.8690	0.8571	0.8690	1.0000								
K84-200	0.7857	0.8214	0.8333	0.7976	1.0000							
6L5M	0.6785	0.7142	0.7500	0.7142	0.7261	1.0000						
2L5M	0.5952	0.6309	0.6428	0.6309	0.7380	0.8452	1.0000					
38L5M	0.6190	0.6547	0.7142	0.6071	0.6904	0.8214	0.8333	1.0000				
9L5M	0.6547	0.6904	0.7023	0.6667	0.6547	0.8809	0.8214	0.8214	1.0000			
27L5N	0.6785	0.7142	0.7738	0.6904	0.7261	0.8809	0.7976	0.8690	0.8095	1.0000		
30L5N	0.7023	0.7380	0.7500	0.6904	0.6785	0.8571	0.7976	0.7738	0.9285	0.7857	1.0000	
7L5M	0.7142	0.7500	0.7619	0.7261	0.7380	0.8928	0.8333	0.8571	0.8928	0.8928	0.8690	1.0000
65L5N	0.6785	0.6904	0.7500	0.6667	0.6785	0.8333	0.7976	0.8690	0.8095	0.9285	0.7857	0.8928
9L5N	0.7023	0.7142	0.7738	0.6667	0.6785	0.7857	0.7261	0.8452	0.7857	0.8571	0.7619	0.8690
57L5M	0.7023	0.7142	0.7261	0.6667	0.6309	0.8333	0.7976	0.7738	0.9047	0.7857	0.8809	0.8690
21L5M	0.6309	0.6667	0.6785	0.6428	0.6547	0.8333	0.8214	0.7738	0.9285	0.8095	0.9047	0.8452
72L5M	0.5476	0.5833	0.5952	0.5595	0.6428	0.7738	0.8571	0.8095	0.8452	0.7261	0.8452	0.8095

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

somaclone	11S5N(T)	17S5N(T)	42S5N(T)	45S5N(T)	K84-200	6L5M	2L5M	38L5M	9L5M	27L5N	30L5N	7L5M
31L5N	0.5952	0.6071	0.6190	0.6071	0.5952	0.8214	0.8333	0.7857	0.8452	0.7738	0.8452	0.8333
4L5M	0.6785	0.6904	0.7500	0.6667	0.6785	0.8333	0.7261	0.7976	0.7619	0.9285	0.7857	0.8452
5L5N	0.6190	0.6547	0.6904	0.6309	0.7380	0.8214	0.8571	0.9047	0.8452	0.8452	0.7976	0.8571
96L5N	0.6785	0.6904	0.7023	0.6667	0.6785	0.9047	0.8214	0.7500	0.8571	0.8571	0.8809	0.8690
77L5M	0.6547	0.6667	0.7261	0.6428	0.6547	0.8333	0.8214	0.9166	0.8095	0.9047	0.8095	0.8928
83L5M	0.6667	0.6785	0.7380	0.6309	0.6904	0.7976	0.7619	0.8333	0.8214	0.8928	0.8214	0.8809
91L5M	0.6667	0.6785	0.6904	0.6785	0.7857	0.8452	0.7857	0.7619	0.7976	0.8690	0.7738	0.8571
90L5M	0.6428	0.6785	0.6904	0.6547	0.6904	0.8452	0.8571	0.7619	0.8928	0.8214	0.8452	0.8333
68L5N(T)	0.5357	0.5714	0.5833	0.5476	0.6547	0.6667	0.7500	0.7023	0.7619	0.5952	0.7142	0.6547
17L5M(T)	0.6071	0.6190	0.6309	0.6190	0.7023	0.6904	0.7023	0.6785	0.6904	0.6667	0.7142	0.7261
34L5M(T)	0.6071	0.6190	0.6309	0.5952	0.6785	0.7380	0.7738	0.7261	0.7857	0.7142	0.7619	0.7500
51L5M(T)	0.5714	0.5833	0.5952	0.5833	0.7380	0.8452	0.7857	0.7380	0.7976	0.7500	0.7738	0.7619
59L5M(T)	0.6667	0.7023	0.7142	0.6785	0.7380	0.6547	0.6904	0.6904	0.6309	0.6547	0.6309	0.6666
54L5M(T)	0.5833	0.5952	0.6071	0.6190	0.6785	0.7142	0.6309	0.5357	0.6428	0.6428	0.6904	0.6547
93L5M(T)	0.6428	0.6547	0.6667	0.6071	0.6667	0.7261	0.6904	0.6428	0.7500	0.6785	0.7976	0.6904
33L5N(T)	0.7857	0.7976	0.8095	0.7976	0.7619	0.7976	0.7142	0.7380	0.7500	0.8214	0.7500	0.8333
K84-200	0.6785	0.6785	0.6309	0.6547	0.6428	0.5952	0.6785	0.7380	0.6785	0.6547	0.6904	0.7857

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

somaclone	65L5N	9L5N	57L5M	21L5M	72L5M	31L5N	4L5M	5L5N	96L5N	77L5M	83L5M	91L5M
65L5N	1.0000											
9L5N	0.9047	1.0000										
57L5M	0.8095	0.8571	1.0000									
21L5M	0.8095	0.7619	0.9047	1.0000								
72L5M	0.7500	0.7261	0.7976	0.8214	1.0000							
31L5N	0.8214	0.7976	0.8452	0.8690	0.8571	1.0000						
4L5M	0.9047	0.8333	0.7619	0.7619	0.7023	0.7738	1.0000					
5L5N	0.8452	0.7976	0.7500	0.7976	0.8095	0.7619	0.7976	1.0000				
96L5N	0.8571	0.8095	0.8571	0.8571	0.8214	0.8928	0.8809	0.7738	1.0000			
77L5M	0.9285	0.9047	0.8333	0.8095	0.7738	0.8690	0.8809	0.8452	0.8333	1.0000		
83L5M	0.9166	0.8690	0.8214	0.8214	0.7857	0.7857	0.8690	0.8333	0.8214	0.8928	1.0000	
91L5M	0.8452	0.7738	0.7976	0.8452	0.7380	0.7857	0.8690	0.7857	0.8690	0.8214	0.8571	1.0000
90L5M	0.7738	0.7261	0.8690	0.8928	0.8571	0.7857	0.7738	0.8095	0.8690	0.7500	0.8095	0.8333
68L5N(T)	0.5952	0.6190	0.6904	0.7619	0.7261	0.7023	0.5476	0.7261	0.6428	0.6428	0.5833	0.6309
17L5M(T)	0.6904	0.7380	0.7142	0.7380	0.6785	0.7738	0.6904	0.6547	0.7142	0.7619	0.7023	0.7738
34L5M(T)	0.7380	0.7619	0.7857	0.8333	0.7500	0.8452	0.6904	0.7023	0.7857	0.7857	0.7261	0.7738
51L5M(T)	0.7261	0.6547	0.7261	0.7976	0.7619	0.7619	0.7738	0.7619	0.8452	0.7023	0.7142	0.8571

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

somaclone	65L5N	9L5N	57L5M	21L5M	72L5M	31L5N	4L5M	5L5N	96L5N	77L5M	83L5M	91L5M
59L5M(T)	0.6309	0.6071	0.5833	0.6071	0.6428	0.6190	0.6071	0.6904	0.6071	0.6309	0.6190	0.6190
54L5M(T)	0.6428	0.6667	0.6667	0.6904	0.6309	0.7261	0.6904	0.5595	0.7857	0.6190	0.6309	0.7500
93L5M(T)	0.6785	0.6309	0.7261	0.7500	0.7380	0.7142	0.6785	0.6667	0.7976	0.6309	0.6904	0.6904
33L5N(T)	0.8214	0.8214	0.7500	0.7261	0.6667	0.7619	0.8452	0.7857	0.8214	0.7976	0.7857	0.8095
K84-200	0.6785	0.6785	0.6309	0.6547	0.6428	0.5952	0.6785	0.7380	0.6785	0.6547	0.6904	0.7857

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 20 (ต่อ)

somaclone	90L5M	68L5N(T)	17L5M(T)	34L5M(T)	51L5M(T)	59L5M(T)	54L5M(T)	93L5M(T)	33L5N(T)	K84-200
90L5M	1.0000									
68L5N(T)	0.7261	1.0000								
17L5M(T)	0.6309	0.8095	1.0000							
34L5M(T)	0.7261	0.8571	0.8809	1.0000						
51L5M(T)	0.8095	0.7500	0.7500	0.7976	1.0000					
59L5M(T)	0.6667	0.7976	0.7261	0.6785	0.6667	1.0000				
54L5M(T)	0.6547	0.7142	0.8571	0.7857	0.7976	0.7023	1.0000			
93L5M(T)	0.7857	0.7738	0.7261	0.7261	0.8095	0.7857	0.8214	1.0000		
33L5N(T)	0.7380	0.6309	0.7261	0.7500	0.7142	0.7380	0.7500	0.7142	1.0000	
K84-200	0.6904	0.6547	0.7023	0.6785	0.7380	0.7380	0.6785	0.6667	0.7619	1.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 ค่าความคล้ายคลึง (similarity) ของอ้อยที่ผ่านเทคนิค SSR ร่วมกับ RAPD ทั้งหมด 58 ตัวอย่าง

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
99S5M	1.0000											
10S5M	0.8571	1.0000										
7S5M	0.7946	0.8303	1.0000									
5S5N	0.7678	0.7500	0.8660	1.0000								
15S5M	0.8125	0.8303	0.9107	0.9196	1.0000							
27S5M	0.8125	0.8125	0.8750	0.8839	0.9464	1.0000						
8S5M	0.8571	0.8214	0.8660	0.8750	0.9196	0.9196	1.0000					
18S5M	0.8571	0.8214	0.8303	0.8392	0.8839	0.8839	0.9285	1.0000				
9S5M	0.8125	0.8125	0.9107	0.8660	0.8928	0.8571	0.9017	0.9017	1.0000			
20S5M	0.7678	0.7678	0.9196	0.9107	0.9196	0.9017	0.8750	0.8750	0.9196	1.0000		
93S5M	0.8035	0.7678	0.7767	0.7857	0.8303	0.8660	0.8750	0.8928	0.8482	0.8035	1.0000	
70S5M	0.8303	0.7767	0.7500	0.8482	0.8392	0.8392	0.8303	0.8303	0.7857	0.8125	0.7946	1.0000
27S5N	0.8035	0.7857	0.7946	0.8035	0.7946	0.7589	0.7857	0.8035	0.8125	0.8392	0.7321	0.8839
58S5M	0.8750	0.8035	0.7767	0.8035	0.8303	0.8303	0.8392	0.8392	0.7946	0.8035	0.7857	0.9375
50S5M	0.8125	0.7767	0.8035	0.8839	0.8571	0.8214	0.8482	0.8125	0.8571	0.8482	0.7767	0.8750
69S5M	0.8214	0.7857	0.8303	0.8571	0.9017	0.8660	0.8392	0.8571	0.8482	0.8928	0.7857	0.8660
97S5N	0.8125	0.7767	0.8571	0.9017	0.9107	0.8750	0.8839	0.8482	0.8392	0.9017	0.7767	0.8750

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 (ต่อ)

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
56S5N	0.7857	0.7678	0.8839	0.8750	0.9017	0.8482	0.8392	0.8035	0.8660	0.9107	0.7500	0.8303
9S5N	0.8125	0.7946	0.8750	0.8482	0.8928	0.8571	0.8303	0.8125	0.8392	0.8839	0.7589	0.8750
79S5M	0.7857	0.7857	0.8482	0.8928	0.9196	0.8660	0.8392	0.8392	0.8482	0.8928	0.7857	0.9017
14S5M(T)	0.8035	0.8035	0.7946	0.7857	0.8303	0.8303	0.8214	0.8214	0.8125	0.8392	0.7857	0.9017
80S5M(T)	0.8125	0.7767	0.7678	0.7767	0.8214	0.7857	0.8303	0.8125	0.8214	0.7946	0.8125	0.8571
75S5M(T)	0.8214	0.7678	0.8125	0.8571	0.8660	0.8482	0.8571	0.8571	0.8660	0.8571	0.8035	0.9196
34S5N(T)	0.7946	0.7232	0.7678	0.8482	0.8214	0.8035	0.7767	0.7589	0.7500	0.8125	0.7232	0.8750
11S5N(T)	0.7678	0.7500	0.8125	0.8035	0.8303	0.8482	0.8214	0.7857	0.7589	0.8214	0.7500	0.8660
17S5N(T)	0.7857	0.7678	0.8125	0.8035	0.8125	0.8303	0.7857	0.8035	0.7767	0.8392	0.7500	0.8660
42S5N(T)	0.7767	0.7946	0.8214	0.8303	0.8214	0.7857	0.7767	0.7589	0.7500	0.7946	0.7053	0.8571
45S5N(T)	0.7946	0.7232	0.7857	0.8660	0.8392	0.8214	0.7946	0.7767	0.7678	0.8303	0.7232	0.9107
K84-200	0.8750	0.8035	0.7410	0.7500	0.7767	0.7767	0.8035	0.7857	0.7410	0.7500	0.7500	0.8660
6L5M	0.7857	0.7678	0.7410	0.7142	0.7589	0.7589	0.7142	0.7500	0.7410	0.7142	0.7857	0.7589
2L5M	0.7857	0.7857	0.6696	0.6607	0.7053	0.7232	0.6964	0.7500	0.6875	0.6428	0.7857	0.7410
38L5M	0.7678	0.8035	0.7232	0.6785	0.7053	0.6696	0.7142	0.7857	0.7589	0.6964	0.7142	0.7053
9L5M	0.7500	0.7142	0.6696	0.6964	0.7053	0.7053	0.6785	0.7321	0.6875	0.6428	0.7500	0.7410
27L5N	0.7678	0.8214	0.7946	0.7678	0.7946	0.7767	0.7500	0.7857	0.7946	0.7678	0.7500	0.7410

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 (ต่อ)

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
30L5N	0.7232	0.6875	0.6607	0.7053	0.6964	0.7142	0.6517	0.7053	0.6428	0.6696	0.7232	0.7678
7L5M	0.8035	0.7678	0.7410	0.7500	0.7767	0.7767	0.7321	0.7857	0.7232	0.7321	0.7500	0.7767
65L5N	0.7589	0.8125	0.7857	0.7410	0.7857	0.7678	0.7410	0.7767	0.7500	0.7410	0.7232	0.7321
9L5N	0.7589	0.8303	0.8035	0.7410	0.7857	0.7678	0.7232	0.7589	0.7321	0.7410	0.7053	0.7321
57L5M	0.7232	0.7589	0.7321	0.7232	0.7500	0.7678	0.6875	0.7232	0.6607	0.6696	0.7410	0.7321
21L5M	0.7500	0.7321	0.6696	0.7142	0.7053	0.7410	0.6785	0.7321	0.6517	0.6607	0.7678	0.7589
72L5M	0.7410	0.7053	0.6250	0.6339	0.6607	0.6785	0.6696	0.7232	0.6428	0.6339	0.7589	0.7142
31L5N	0.7410	0.7410	0.6785	0.6696	0.7142	0.7500	0.6696	0.7053	0.6250	0.6517	0.7232	0.7321
4L5M	0.7321	0.7857	0.7946	0.7678	0.7946	0.7946	0.7500	0.7678	0.7410	0.7678	0.7321	0.7589
5L5N	0.8035	0.7857	0.7232	0.6964	0.7232	0.7053	0.7321	0.7857	0.7589	0.6964	0.7678	0.7589
96L5N	0.7410	0.7589	0.7142	0.7053	0.7500	0.7857	0.7053	0.7232	0.6785	0.6875	0.7589	0.7500
77L5M	0.7410	0.8125	0.7678	0.7232	0.7678	0.7500	0.7053	0.7410	0.7142	0.7232	0.6875	0.7142
83L5M	0.7232	0.7767	0.7500	0.7053	0.7500	0.7321	0.7053	0.7410	0.7321	0.7232	0.6875	0.7142
91L5M	0.7946	0.7946	0.7321	0.7232	0.7678	0.7857	0.7410	0.7589	0.6964	0.7053	0.7410	0.7678
90L5M	0.7589	0.7589	0.6785	0.7232	0.7142	0.7500	0.7232	0.7589	0.6964	0.6696	0.8125	0.7857
68L5N(T)	0.7232	0.7232	0.5714	0.6160	0.6071	0.6250	0.6339	0.6875	0.6071	0.5625	0.7589	0.7142
17L5M(T)	0.7410	0.7589	0.6428	0.6339	0.6785	0.7142	0.6339	0.6696	0.5892	0.6339	0.6875	0.7321

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 (ต่อ)

somaclone	99S5M	10S5M	7S5M	5S5N	15S5M	27S5M	8S5M	18S5M	9S5M	20S5M	93S5M	70S5M
34L5M(T)	0.7232	0.7589	0.6607	0.6339	0.6964	0.7142	0.6517	0.6875	0.6428	0.6160	0.7410	0.6964
51L5M(T)	0.7589	0.7232	0.6250	0.6160	0.6607	0.6785	0.6875	0.7053	0.6428	0.5982	0.7767	0.7321
59L5M(T)	0.7767	0.7589	0.6785	0.7053	0.6964	0.6964	0.7589	0.7410	0.6964	0.6696	0.7589	0.7857
54L5M(T)	0.6785	0.7142	0.6160	0.6250	0.6517	0.6875	0.6250	0.6428	0.5625	0.6250	0.6785	0.7053
93L5M(T)	0.6517	0.6875	0.5714	0.6339	0.6071	0.6250	0.6339	0.6517	0.5714	0.5803	0.7053	0.7142
33L5N(T)	0.7946	0.8125	0.8214	0.8125	0.8392	0.8214	0.7767	0.7946	0.7678	0.7767	0.7589	0.8214
K84-200	0.8750	0.8035	0.7410	0.7500	0.7767	0.7767	0.8035	0.7857	0.7410	0.7500	0.7500	0.8660

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 (ต่อ)

somaclone	27S5N	58S5M	50S5M	69S5M	97S5N	56S5N	9S5N	79S5M	14S5M(T)	80S5M(T)	75S5M(T)	34S5N(T)
27S5N	1.0000											
58S5M	0.9285	1.0000										
50S5M	0.8660	0.8839	1.0000									
69S5M	0.8571	0.8750	0.9196	1.0000								
97S5N	0.8482	0.8660	0.8750	0.9196	1.0000							
56S5N	0.8214	0.8214	0.8660	0.8928	0.9375	1.0000						
9S5N	0.8303	0.8660	0.8750	0.9375	0.9464	0.9375	1.0000					
79S5M	0.8750	0.8750	0.8839	0.9285	0.9553	0.9285	0.9375	1.0000				
14S5M(T)	0.8571	0.8750	0.8303	0.8571	0.8660	0.8571	0.9017	0.8750	1.0000			
80S5M(T)	0.8303	0.8482	0.8571	0.8839	0.8750	0.8660	0.8928	0.8839	0.8839	1.0000		
75S5M(T)	0.8571	0.8928	0.8839	0.9107	0.9017	0.8750	0.9017	0.9107	0.8928	0.8839	1.0000	
34S5N(T)	0.7946	0.8303	0.8392	0.8839	0.8928	0.8482	0.8928	0.8839	0.8125	0.8571	0.8660	1.0000
11S5N(T)	0.7500	0.8214	0.7767	0.8392	0.8660	0.8392	0.9017	0.8392	0.8571	0.8303	0.8571	0.9196
17S5N(T)	0.8035	0.8571	0.7767	0.8571	0.8482	0.8214	0.8839	0.8392	0.8571	0.8125	0.8571	0.8660
42S5N(T)	0.8125	0.8482	0.8035	0.8303	0.8571	0.8303	0.8750	0.8660	0.7946	0.8214	0.8303	0.8928
45S5N(T)	0.8303	0.8660	0.8392	0.8839	0.9107	0.8660	0.9107	0.9017	0.8482	0.8392	0.9017	0.9464
K84-200	0.8214	0.8928	0.8125	0.8214	0.8303	0.7857	0.8303	0.8214	0.8214	0.8482	0.8214	0.8482

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 (ต่อ)

somaclone	27S5N	58S5M	50S5M	69S5M	97S5N	56S5N	9S5N	79S5M	14S5M(T)	80S5M(T)	75S5M(T)	34S5N(T)
6L5M	0.7500	0.8035	0.7410	0.7857	0.7410	0.7142	0.7589	0.7678	0.7142	0.7232	0.7500	0.7410
2L5M	0.6964	0.7678	0.7053	0.7142	0.6875	0.6785	0.7053	0.7142	0.7321	0.7589	0.7142	0.6875
38L5M	0.7500	0.7500	0.7232	0.7321	0.6875	0.6964	0.7053	0.7142	0.7142	0.7410	0.6964	0.6696
9L5M	0.6785	0.7500	0.7053	0.7321	0.6875	0.6607	0.7053	0.7142	0.6428	0.6875	0.7142	0.7232
27L5N	0.7500	0.7678	0.7410	0.7678	0.7767	0.7678	0.7589	0.8035	0.6964	0.7232	0.7321	0.7410
30L5N	0.6875	0.7589	0.6964	0.7232	0.7142	0.6696	0.7142	0.7232	0.6696	0.6785	0.7053	0.7678
7L5M	0.7321	0.8035	0.7410	0.7857	0.7767	0.7321	0.7767	0.7857	0.7321	0.7232	0.7321	0.7767
65L5N	0.7410	0.7589	0.7142	0.7410	0.7500	0.7410	0.7500	0.7767	0.6875	0.7142	0.7053	0.7142
9L5N	0.7410	0.7589	0.7321	0.7589	0.7500	0.7410	0.7678	0.7767	0.7053	0.6964	0.7053	0.7321
57L5M	0.6517	0.7232	0.6964	0.7410	0.6964	0.6696	0.7321	0.7232	0.6696	0.6607	0.7053	0.7321
21L5M	0.6785	0.7321	0.6875	0.7142	0.6875	0.6428	0.6875	0.7142	0.6607	0.6696	0.6785	0.7232
72L5M	0.6696	0.7410	0.6964	0.6875	0.6607	0.6339	0.6607	0.6696	0.6875	0.7142	0.6517	0.6607
31L5N	0.6875	0.7410	0.6785	0.7053	0.6964	0.6696	0.6964	0.7232	0.7053	0.6785	0.6517	0.6785
4L5M	0.7678	0.7857	0.7232	0.7321	0.7767	0.7500	0.7410	0.7857	0.6964	0.6875	0.7142	0.7232
5L5N	0.7678	0.8035	0.7767	0.7500	0.7053	0.6964	0.7232	0.7321	0.6964	0.7589	0.7321	0.7053
96L5N	0.7053	0.7767	0.7142	0.7410	0.7321	0.6875	0.7321	0.7410	0.6875	0.6785	0.6875	0.7321
77L5M	0.7232	0.7410	0.7142	0.7410	0.7321	0.7410	0.7321	0.7589	0.7053	0.7142	0.6875	0.7142

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 (ต่อ)

somaclone	27S5N	58S5M	50S5M	69S5M	97S5N	56S5N	9S5N	79S5M	14S5M(T)	80S5M(T)	75S5M(T)	34S5N(T)
83L5M	0.7232	0.7410	0.7321	0.7410	0.7142	0.7053	0.7142	0.7410	0.6517	0.6964	0.6696	0.7142
91L5M	0.7232	0.7946	0.7321	0.7589	0.7321	0.6875	0.7321	0.7410	0.7053	0.6964	0.7053	0.7321
90L5M	0.7053	0.7767	0.7321	0.7232	0.6964	0.6517	0.6964	0.7053	0.6875	0.7142	0.7232	0.7321
68L5N(T)	0.6696	0.7053	0.6428	0.6339	0.6071	0.5803	0.6071	0.6339	0.6696	0.6964	0.6517	0.6428
17L5M(T)	0.7053	0.7410	0.6607	0.6875	0.6785	0.6517	0.6785	0.7053	0.7232	0.6785	0.6517	0.6964
34L5M(T)	0.6517	0.7053	0.6607	0.6875	0.6607	0.6517	0.6785	0.7053	0.6696	0.6964	0.6339	0.6607
51L5M(T)	0.7053	0.7589	0.6785	0.6696	0.6428	0.5982	0.6428	0.6696	0.6696	0.6785	0.6696	0.6785
59L5M(T)	0.7589	0.7946	0.7321	0.7232	0.7500	0.7053	0.7321	0.7410	0.7767	0.8214	0.7410	0.7321
54L5M(T)	0.6964	0.7142	0.6517	0.6785	0.6696	0.6071	0.6517	0.6785	0.6607	0.5982	0.6250	0.6339
93L5M(T)	0.6696	0.6875	0.6607	0.6339	0.6250	0.5625	0.6071	0.6339	0.6339	0.6428	0.6339	0.6964
33L5N(T)	0.7946	0.8482	0.8214	0.8125	0.8035	0.7946	0.8214	0.8303	0.7589	0.7500	0.7767	0.8035
K84-200	0.8214	0.8928	0.8125	0.8214	0.8303	0.7857	0.8303	0.8214	0.8214	0.8482	0.8214	0.8482

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 (ต่อ)

somaclone	11S5N(T)	17S5N(T)	42S5N(T)	45S5N(T)	K84-200	6L5M	2L5M	38L5M	9L5M	27L5N	30L5N	7L5M
11S5N(T)	1.0000											
17S5N(T)	0.9285	1.0000										
42S5N(T)	0.9017	0.9017	1.0000									
45S5N(T)	0.9017	0.8482	0.8750	1.0000								
K84-200	0.8214	0.8392	0.8482	0.8303	1.0000							
6L5M	0.7142	0.7678	0.7767	0.7410	0.7678	1.0000						
2L5M	0.6607	0.6964	0.7053	0.6875	0.7857	0.8750	1.0000					
38L5M	0.6607	0.7321	0.7410	0.6517	0.7321	0.8571	0.8571	1.0000				
9L5M	0.6964	0.7500	0.7410	0.7053	0.7142	0.9107	0.8571	0.8571	1.0000			
27L5N	0.7142	0.7678	0.7946	0.7232	0.7678	0.9107	0.8392	0.8928	0.8571	1.0000		
30L5N	0.7410	0.7946	0.7678	0.7321	0.7410	0.8839	0.8303	0.8125	0.9375	0.8303	1.0000	
7L5M	0.7500	0.8035	0.7767	0.7589	0.7857	0.9107	0.8571	0.8750	0.9107	0.9107	0.9017	1.0000
65L5N	0.7232	0.7410	0.7857	0.7142	0.7410	0.8660	0.8482	0.8839	0.8482	0.9375	0.8214	0.9017
9L5N	0.7410	0.7589	0.8035	0.7142	0.7410	0.8303	0.7946	0.8660	0.8303	0.8839	0.8035	0.8839
57L5M	0.7410	0.7589	0.7678	0.7142	0.7053	0.8660	0.8482	0.8125	0.9196	0.8303	0.8928	0.8839
21L5M	0.6964	0.7321	0.7232	0.7053	0.7321	0.8571	0.8571	0.8035	0.9285	0.8392	0.9196	0.8750
72L5M	0.6339	0.6696	0.6607	0.6428	0.7232	0.8125	0.8839	0.8303	0.8660	0.7767	0.8750	0.8482

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 (ต่อ)

somaclone	11S5N(T)	17S5N(T)	42S5N(T)	45S5N(T)	K84-200	6L5M	2L5M	38L5M	9L5M	27L5N	30L5N	7L5M
31L5N	0.6696	0.6875	0.6785	0.6785	0.6875	0.8482	0.8660	0.8125	0.8660	0.8125	0.8750	0.8660
4L5M	0.7321	0.7500	0.7767	0.7232	0.7500	0.8571	0.7857	0.8214	0.8035	0.9285	0.8303	0.8750
5L5N	0.6785	0.7142	0.7410	0.6875	0.7857	0.8571	0.8928	0.9107	0.8750	0.8750	0.8303	0.8750
96L5N	0.7232	0.7589	0.7321	0.7142	0.7410	0.9196	0.8482	0.7946	0.8839	0.8839	0.9107	0.9017
77L5M	0.7053	0.7232	0.7678	0.6964	0.7232	0.8660	0.8660	0.9196	0.8482	0.9196	0.8392	0.9017
83L5M	0.7053	0.7410	0.7678	0.6785	0.7410	0.8482	0.8125	0.8660	0.8660	0.9196	0.8571	0.9017
91L5M	0.7232	0.7410	0.7321	0.7321	0.8303	0.8660	0.8303	0.7946	0.8303	0.8839	0.8214	0.8839
90L5M	0.7053	0.7410	0.7321	0.7142	0.7589	0.8660	0.8839	0.7946	0.9017	0.8482	0.8750	0.8660
68L5N(T)	0.6160	0.6517	0.6428	0.6250	0.7232	0.7232	0.7946	0.7410	0.7946	0.6696	0.7678	0.7232
17L5M(T)	0.6696	0.6875	0.6785	0.6785	0.7589	0.7410	0.7589	0.7232	0.7410	0.7232	0.7678	0.7767
34L5M(T)	0.6517	0.6875	0.6785	0.6428	0.7232	0.7946	0.8125	0.7767	0.8303	0.7767	0.8035	0.7946
51L5M(T)	0.6696	0.6517	0.6607	0.6785	0.7767	0.8482	0.8125	0.7589	0.8125	0.7767	0.8035	0.7946
59L5M(T)	0.7232	0.7410	0.7500	0.7321	0.7946	0.7053	0.7410	0.7232	0.6875	0.7053	0.6964	0.7232
54L5M(T)	0.6250	0.6607	0.6339	0.6517	0.7142	0.7321	0.6785	0.6071	0.6785	0.6785	0.7232	0.6964
93L5M(T)	0.6875	0.6875	0.6964	0.6607	0.6875	0.7232	0.7053	0.6696	0.7410	0.6875	0.7857	0.7053
33L5N(T)	0.8125	0.7946	0.8392	0.8214	0.7767	0.8125	0.7589	0.7589	0.7767	0.8303	0.7678	0.8303
K84-200	0.8214	0.8392	0.8482	0.8303	1.0000	0.7678	0.7857	0.7321	0.7142	0.7678	0.7410	0.7857

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 (ต่อ)

somaclone	65L5N	9L5N	57L5M	21L5M	72L5M	31L5N	4L5M	5L5N	96L5N	77L5M	83L5M	91L5M
65L5N	1.0000											
9L5N	0.9285	1.0000										
57L5M	0.8571	0.8928	1.0000									
21L5M	0.8482	0.8125	0.9196	1.0000								
72L5M	0.8035	0.7857	0.8392	0.8660	1.0000							
31L5N	0.8571	0.8392	0.8750	0.9017	0.8928	1.0000						
4L5M	0.9196	0.8660	0.8125	0.8214	0.7767	0.8303	1.0000					
5L5N	0.8839	0.8482	0.8125	0.8392	0.8482	0.8125	0.8392	1.0000				
96L5N	0.8750	0.8392	0.8750	0.8839	0.8571	0.9107	0.9017	0.8125	1.0000			
77L5M	0.9464	0.9285	0.8750	0.8482	0.8214	0.8928	0.9017	0.8839	0.8571	1.0000		
83L5M	0.9285	0.8928	0.8571	0.8482	0.8214	0.8214	0.8839	0.8660	0.8571	0.9107	1.0000	
91L5M	0.8750	0.8214	0.8392	0.8839	0.8035	0.8392	0.9017	0.8303	0.8928	0.8571	0.8750	1.0000
90L5M	0.8214	0.7857	0.8928	0. 9196	0.8928	0.8392	0.8303	0.8482	0.8928	0.8035	0.8392	0.8750
68L5N(T)	0.6785	0.6964	0.7500	0.8125	0.7857	0.7678	0.6517	0.7767	0.7142	0.7142	0.6607	0.7142
17L5M(T)	0.7500	0.7857	0.7678	0.7946	0.7500	0.8214	0.7589	0.7232	0.7678	0.8035	0.7500	0.8214
34L5M(T)	0.7857	0.8035	0.8214	0.8482	0.7857	0.8571	0.7410	0.7589	0.8214	0.8214	0.7857	0.8035
51L5M(T)	0.7678	0.7142	0.7678	0.8303	0.8035	0.8035	0.8125	0.7946	0.8571	0.7500	0.7500	0.8750

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 (ต่อ)

somaclone	65L5N	9L5N	57L5M	21L5M	72L5M	31L5N	4L5M	5L5N	96L5N	77L5M	83L5M	91L5M
59L5M(T)	0.6964	0.6785	0.6607	0.6875	0.7142	0.6964	0.6875	0.7410	0.6785	0.6964	0.6785	0.6964
54L5M(T)	0.6875	0.7053	0.7053	0.7321	0.6875	0.7589	0.7321	0.6250	0.7946	0.6696	0.6696	0.7767
93L5M(T)	0.6964	0.6607	0.7321	0.7589	0.7500	0.7321	0.7053	0.6875	0.7857	0.6607	0.6964	0.7142
33L5N(T)	0.8392	0.8392	0.7857	0.7589	0.7142	0.7857	0.8482	0.8125	0.8214	0.8214	0.8035	0.8214
K84-200	0.7410	0.7410	0.7053	0.7321	0.7232	0.6875	0.7500	0.7857	0.7410	0.7232	0.7410	0.8303

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 21 (ต่อ)

somaclone	90L5M	68L5N(T)	17L5M(T)	34L5M(T)	51L5M(T)	59L5M(T)	54L5M(T)	93L5M(T)	33L5N(T)	K84-200
90L5M	1.0000									
68L5N(T)	0.7857	1.0000								
17L5M(T)	0.7142	0.8392	1.0000							
34L5M(T)	0.7678	0.8750	0.8750	1.0000						
51L5M(T)	0.8392	0.7857	0.7857	0.8035	1.0000					
59L5M(T)	0.7321	0.8214	0.7678	0.7142	0.7142	1.0000				
54L5M(T)	0.7053	0.7589	0.8482	0.7946	0.7946	0.7410	1.0000			
93L5M(T)	0.7857	0.7678	0.7321	0.7142	0.8214	0.7857	0.8303	1.0000		
33L5N(T)	0.7678	0.6785	0.7500	0.7678	0.7678	0.7500	0.7410	0.7500	1.0000	
K84-200	0.7589	0.7232	0.7589	0.7232	0.7767	0.7946	0.7142	0.6875	0.7767	1.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายศรุต ธรรมจำรัส
วัน เดือน ปี ที่เกิด	3 พฤศจิกายน 2524
สถานที่เกิด	ชลบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยบูรพา (พ.ศ.2546)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	รางวัลรองชนะเลิศ การประกวดนวัตกรรมของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2550 ชื่อผลงาน: ต้นเสาวรสปลอดโรคไวรัสด้วยวิธีการเสียบยอดจากยอดที่เพาะเลี้ยงปลายยอดเจริญ จากคณะกรรมการส่งเสริมและพัฒนางานนวัตกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อวันที่ 4 มกราคม 2551
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ.2548)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์