



การรวมเครื่องหมาย EST-SSR เข้ากับแผนที่เครื่องหมาย f-AFLP
ในอ้อย

โดย

นางสาวพัทธินันท์ ภูมิพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
พ.ศ. 2551

การรวมเครื่องหมาย EST-SSR เข้ากับแผนที่เครื่องหมาย f-AFLP
ในอ้อย

โดย

นางสาวพัทธนันท์ ภูมิพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
พ.ศ. 2551

Integration of EST-SSR markers into f-AFLP linkage maps
in sugarcane

By

Miss Patthinun Poomipant

A Thesis Submitted in partial Fulfillment of the Requirement
For the Degree of Master of Science
Department of Biotechnology
Faculty of Science and Technology
Thammasat University
2008

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวพัทธินันท์ ภูมิพันธ์

เรื่อง

การรวมเครื่องหมาย EST-SSR เข้ากับแผนที่เครื่องหมาย f-FLP ในอ้อย

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

เมื่อ วันที่ 4 พฤษภาคม พ.ศ. 2552

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ดร.ธีรยุทธ ตูจันดา)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีระชัย รัตนันต์)

คณบดี

(รองศาสตราจารย์สายทอง อมรวิเศษฐ์)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ได้ขยายขนาดแผนที่พันธุกรรมและเพิ่มความหนาแน่นของเครื่องหมายในแผนที่พันธุกรรมที่สร้างด้วยเครื่องหมาย f-AFLP และเครื่องหมายจำเพาะต่อยีน sucrose synthase (SuS) ที่สร้างขึ้นก่อนหน้านี้ โดยการเติมเครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 212 คู่ไพรเมอร์ และเครื่องหมาย gSSR จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ โดยใช้ประชากรลูกผสม F_1 จำนวน 283 สาย พันธุ์ที่ได้จากการผสมข้ามสปีชีส์ระหว่างอ้อยพันธุ์ปรับปรุง Phil6607 กับ อ้อยสายพันธุ์ป่า *Saccharum spontaneum* พันธุ์ S6 เมื่อรวมเครื่องหมาย f-AFLP และ SuS ที่ใช้สร้างแผนที่ก่อนหน้านี้ มีเครื่องหมายทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์แผนที่ประกอบด้วย เครื่องหมาย simplex และ double simplex จำนวน 1,511 และ 238 เครื่องหมาย ตามลำดับ ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม กำหนดค่า LOD score ตั้งแต่ 4.0 ถึง 15 ค่า recombination fraction เท่ากับ 0.35 คำนวณระยะห่างระหว่างเครื่องหมายด้วย Kosambi function วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ ทั้งหมด 232 ลิงค์เกจ ประกอบด้วยเครื่องหมายจำนวน 791 เครื่องหมาย แบ่งเป็นเครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 537 เครื่องหมาย เครื่องหมาย gSSR จำนวน 5 เครื่องหมาย, เครื่องหมาย f-AFLP จำนวน 246 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย SuS จำนวน 3 เครื่องหมาย รวมความยาวกลุ่มลิงค์เกจทั้งหมดได้ 3,984 cM ความยาวของกลุ่มลิงค์เกจมีความยาวตั้งแต่ 0.4 cM ถึง 100 cM มีความหนาแน่นของเครื่องหมายเท่ากับ 7.13 cM แผนที่พันธุกรรมที่สร้างได้คาดว่าจะครอบคลุมประมาณ 52.1- 58.8 % ของทั้งจีโนม จากลิงค์เกจทั้งหมด 232 ลิงค์เกจมี 219 ลิงค์เกจที่สามารถนำไปวิเคราะห์กลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจได้ 11 กลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจ และพบ EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจศึกษา ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล (Sugarcane metabolism) จำนวน 6 EST-SSRs , ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค (Disease response) จำนวน 11 EST-SSRs และยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Abiotic stress response) จำนวน 4 EST-SSRs แผนที่พันธุกรรมที่สร้างได้จะมีประโยชน์อย่างมากในการเครื่องหมายกำกับหน้าที่ (functional markers) ที่สัมพันธ์กับ QTLs ของลักษณะที่สนใจซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์อ้อยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

Abstract

To extend the density of a previous sugarcane linkage map constructed from f-AFLP and sucrose synthase (SuS) markers, 212 EST-SSRs and 10 gSSRs were employed for integration of the markers using 283 F₁ progenies derived from an interspecific cross between a cultivated sugarcane and the wild relative *Saccharum spontaneum*. With the markers already analyzed in the previous map, 1,511 and 238 markers of simplex and double simplex markers were constructed using a LOD score \geq 4.0 and a recombination fraction of 0.35 with map distances estimated by Kosambi function. The final integrated genetic linkage map comprised 791 linked markers, including 537 EST-SSRs, 5 gSSRs, 246 f-AFLPs and 3 SuS markers that were assigned to 232 linkage groups (LG). All linkage groups represented a total map length of 3,984 cM, ranging from 0.4 cM to 100 cM with a marker density of 7.13 cM. The expected proportion of a genome covered by the linkage map with 791 markers randomly placed was 52.1 - 58.8%. Two hundred and nineteen out of 232 linkage groups were formed into 11 putative homologous linkage groups. Based on high nucleotide homology searched 6, 11 and 4 interesting putative functions of sucrose metabolism, disease response and abiotic stress response, respectively, were scattered in 5 homologous linkage groups. The integrated genetic linkage map of sugarcane constructed in this experiment can provide useful information to develop functional markers associated with QTLs of interest of which they can further applied in marker assisted breeding in sugarcane.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ให้โอกาสในการศึกษาระดับปริญญาโท ให้ความรู้และ คำปรึกษาแนะนำในการทำงานวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์นี้จึงสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ผู้สนับสนุนทุนวิจัยในการทำแผนที่พันธุกรรมอ้อยโดยมีวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัย

ขอขอบคุณ คณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในข้อสงสัยต่าง ๆ อย่างเต็มที่ นอกจากนี้ด้วยน้ำใจและความเป็นมิตรจากเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ทำให้การทำงานวิจัยเป็นไปในบรรยากาศที่ดี

ขอขอบคุณพี่กัลยารัตน์ ภูสุดแสงว พี่ปราโมทย์ เล่าแก๊ง ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำในการทำแลปและการวิเคราะห์ผล รวมถึงเพื่อนๆและน้องๆในแลปที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด

ที่ขาดไม่ได้คือ คุณพ่อยุทธพงษ์ คุณแม่สมทรง และสมาชิกในครอบครัวภูมิพันธ์ ทุกคน ที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือทั้งร่างกาย แรงใจอย่างเต็มที่ ทำให้การทำแลปและงานวิจัยสำเร็จลุล่วงมาด้วยดี ขอขอบพระคุณมากๆคะ

พัทธินันท์ ภูมิพันธ์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

พ.ศ. 2551

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อ | (1) |
| กิตติกรรมประกาศ..... | (3) |
| สารบัญตาราง | (7) |
| สารบัญภาพประกอบ..... | (8) |
| | |
| บทที่ | |
| 1. บทนำ..... | 1 |
| ความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย | 3 |
| 2. ผลงานวิจัยและงานเขียนอื่นๆที่เกี่ยวข้อง | 4 |
| ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับอ้อย | 4 |
| อนุกรมวิธาน..... | 4 |
| ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของอ้อย | 5 |
| ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของอ้อย | 7 |
| เครื่องหมายโมเลกุล..... | 8 |
| เครื่องหมายโมเลกุลกับการปรับปรุงพันธุ์พืช | 10 |
| เครื่องหมาย EST-SSR | 11 |
| การสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในพืชอ้อยโตโพล์พลอยด์ | 14 |
| การทำแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในอ้อย | 17 |

| | |
|--|----|
| 3. วิธีการวิจัย..... | 20 |
| ประชากรลูกผสมที่ใช้ในการทำแผนที่พันธุกรรม | 20 |
| การสกัดดีเอ็นเอ | 20 |
| การสร้างเครื่องหมาย genomic SSR (gSSR) | 21 |
| การสร้างเครื่องหมาย Express Sequence Tag SSR(EST-SSR) | 22 |
| การวิเคราะห์การกระจายตัวและจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล | 22 |
| การตั้งชื่อเครื่องหมายโมเลกุล | 23 |
| การวิเคราะห์ลิงค์เกจและการสร้างแผนที่พันธุกรรม | 24 |
| การวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ | 25 |
| 4. ผลการทดลอง..... | 26 |
| การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุล | 26 |
| เครื่องหมาย gSSR | 26 |
| เครื่องหมาย EST-SSR..... | 27 |
| เครื่องหมาย f-AFLP | 28 |
| เครื่องหมาย sucrose synthase | 28 |
| การวิเคราะห์ลิงค์เกจและการสร้างแผนที่พันธุกรรม | 29 |
| วิเคราะห์ลิงค์เกจระหว่างเครื่องหมาย simplex และ double simplex | 29 |
| การวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ | 31 |
| หน้าที่คาดหมายของ EST-SSR ในแผนที่พันธุกรรม | 41 |
| 5. วิจารณ์ผลการทดลอง | 56 |
| 6. สรุปผลการทดลอง | 59 |
| บรรณานุกรม | 61 |

ภาคผนวก

| | |
|---|----|
| ก. ข้อมูลไพรมเมอร์และผลการคัดเลือกการกระจายตัวในลูก | 72 |
| ข. การคำนวณค่าขนาดจีโนมและอัตราส่วนจีโนม | 88 |
| ประวัติการศึกษา | 91 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 4.1 | เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดแบ่งตามชนิดของเครื่องหมาย gSSR , EST-SSR , f-AFLP และ SuS | 28 |
| 4.2 | เครื่องหมายโมเลกุล simplex และ double simplex ที่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจได้ | 30 |
| 4.3 | ลิงค์เกจที่สามารถวิเคราะห์กลุ่มโฮโมโลกัสได้ | 31 |
| 4.4 | เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR ในแต่ละกลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจและหน้าที่อื่น | 43 |
| 4.5 | EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจศึกษา | 54 |

สารบัญภาพประกอบ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 2.1 | เครื่องหมายโมเลกุลชนิด simplex marker, duplex marker และ triplex marker บนไฮโมโลกัสโครโมโซม 8 แห่ง ของออตโตอกตาพลอย | 16 |
| 4.1 | ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย gSSR (SGM 001) | 26 |
| 4.2 | ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย EST-SSR (SEM282) | 27 |
| 4.3 | แผนที่พันธุกรรมย่อยที่สร้างจากประชากรลูกผสม F_1 จำนวน 283 สายพันธุ์ที่เกิดจากการผสมระหว่างอ้อยปรับปรุงพันธุ์ Phil6607 และ S6 (<i>S. spontaneum</i>) ประกอบด้วย 791 เครื่องหมาย ของเครื่องหมาย simplex และ double simplex ระยะห่างในแผนที่มีหน่วยเป็น centi-Morgans (cM) โดยใช้ Kosambi function เครื่องหมายของ Phil6607 นำหน้าด้วยอักษร p ; เครื่องหมายของ S6 นำหน้าด้วยอักษร s ; เครื่องหมาย double simplex ใช้สัญลักษณ์ x ด้านหน้า ; ตัวเลขโรมัน หมายถึง หมายเลขกลุ่มไฮโมโลกัสลิงเกจของกลุ่มลิงเกจ ; HG หมายถึง กลุ่มไฮโมโลกัสลิงเกจ ; กรอบสี่เหลี่ยมแสดงกลุ่มไฮโมโลกัสลิงเกจ; เส้นประกอบสี่เหลี่ยมแสดงลิงค์เกจแยกตามชนิดของอัลลีลเครื่องหมาย | 34 |

บทที่ 1 บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากเป็นวัตถุดิบหลักในอุตสาหกรรมน้ำตาล ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลของไทยได้มีการเติบโตอย่างต่อเนื่อง จนทำให้ไทยกลายเป็นประเทศผู้ส่งออกน้ำตาลติดอันดับหนึ่งในสี่ของโลก ซึ่งสามารถสร้างรายได้จากการจำหน่ายน้ำตาลในประเทศและส่งออกมากกว่าปีละ 50,000 ล้านบาท นอกจากนี้ ยังเป็นแหล่งสร้างงานและสร้างรายได้ให้แก่ผู้เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลเป็นจำนวนมาก นับตั้งแต่อดีตแนวโน้มการบริโภคน้ำตาลของมนุษย์ได้เพิ่มสูงขึ้นมาโดยตลอด ในปัจจุบันอัตราการบริโภคน้ำตาลโดยเฉลี่ยของมนุษย์อยู่ที่ 21 กิโลกรัมต่อคนต่อปี ความต้องการจากผู้บริโภคที่มีสูงขึ้นอย่างรวดเร็วนี้เอง ทำให้อ้อยซึ่งเป็นพืชหลักที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลกลายมาเป็นหนึ่งในสิบพืชเศรษฐกิจหลักของโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2551)

อย่างไรก็ตาม จากแนวโน้มการใช้พลังงานในประเทศและสภาวะราคาน้ำมันที่เพิ่มสูงขึ้นในช่วงที่ผ่านมาได้ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศโดยรวม ทำให้ไทยจำเป็นต้องนำเข้าพลังงานในปริมาณและมูลค่าที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง การหาพลังงานทดแทนจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถช่วยลดการพึ่งพาการนำเข้าน้ำมัน ดังนั้นการนำพืชพลังงาน เช่น อ้อย มาใช้ในการผลิตเอทานอลจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตพลังงานทดแทน โดยรัฐบาลได้กำหนดแผนปฏิบัติการพัฒนาด้านอ้อย ตามระเบียบวาระอ้อยแห่งชาติ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล ซึ่งหนึ่งในแผนปฏิบัติการก็คือการสนับสนุนงานวิจัยการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ได้รับงบประมาณดำเนินการอย่างต่อเนื่องเพื่อขยายอ้อยพันธุ์ดีไปยังเกษตรกรผู้ปลูกอ้อย

เป้าหมายของแผนปฏิบัติการพัฒนาด้านอ้อย คือ ภายในระยะ 3 ปี (ฤดูการผลิตปี 2552-2554) จะต้องเพิ่มผลผลิตอ้อยให้ได้ถึง 95 ล้านตันต่อปี หรือประมาณ 15 ตัน/ไร่ และต้องมีค่าความหวาน 13 ซีซีเอส จากปัจจุบันที่ผลิตได้ 73.3 ล้านตันต่อปีหรือประมาณ 11.8 ตัน/ไร่ และค่าความหวานอยู่ที่ 12 ซีซีเอส จากข้อมูลผลผลิตอ้อยและค่าความหวานในปี 2551 จะเห็นได้ว่าผลผลิตอ้อยยังไม่เพียงพอต่อความต้องการและค่าความหวานของอ้อยต่ำโดยเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 12 ซีซีเอส (CCS = Commercial Cane Sugar คือน้ำตาลซูโครสที่มีในอ้อยจำนวนหนึ่ง) ดังนั้นการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้มีผลผลิตและค่าความหวานเพิ่มมากขึ้นจึงเป็นแนวทางสำคัญอีก

แนวทางหนึ่งที่จะทำให้ แผนปฏิบัติการพัฒนาด้านอ้อย ตามระเบียบวาระอ้อยแห่งชาติบรรลุผลตามเป้าหมาย ซึ่งจะส่งผลต่อเกษตรกรชาวไร่อ้อยและการพัฒนาอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลในระยะยาว (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล, 2551)

ในอดีตการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์อ้อย ให้มีผลผลิตและค่าความหวานสูง จะใช้วิธีการคัดเลือกพันธุ์แบบมาตรฐาน (classical breeding) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามวิธีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีแบบมาตรฐานนี้มีข้อเสียคือต้องอาศัยระยะเวลาที่ยาวนานในการทดสอบและคัดเลือกพันธุ์เพื่อให้แน่ใจว่าลูกผสมที่ได้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ ซึ่งขั้นตอนการทดสอบพันธุ์จะต้องใช้เวลาโดยเฉลี่ยประมาณ 10-15 ปี หากผลลัพธ์ที่ได้ไม่เป็นไปตามที่ต้องการ นักคัดเลือกพันธุ์ก็ต้องเสียเวลาในการที่จะพัฒนาเพื่อหาพันธุ์ใหม่ๆอีก ความไม่แน่นอนของการคัดเลือกพันธุ์แบบมาตรฐานนี้เป็นผลมาจากลักษณะทางพันธุกรรมภายในที่กำหนดคุณสมบัติภายนอกที่แสดงออก ซึ่งการใช้วิธีการผสมและคัดเลือกพันธุ์แบบมาตรฐาน โดยที่ไม่มีข้อมูลทางพันธุกรรมของอ้อยมาประกอบจะทำให้ไม่สามารถมั่นใจได้ว่าผลที่ได้จะเป็นไปตามที่คาดหวัง ดังนั้นการนำความรู้ทางพันธุศาสตร์มาใช้ควบคู่กับการคัดเลือกพันธุ์ด้วยวิธีมาตรฐานจึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์อ้อย

จากข้อจำกัดของวิธีการคัดเลือกพันธุ์แบบมาตรฐาน ทำให้ในปัจจุบันผู้เชี่ยวชาญในด้านการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์อ้อย หันมาพึ่งความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุศาสตร์เพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ แต่เมื่อเทียบพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดอื่น เช่น ข้าว และ ข้าวโพดแล้ว การวิจัยอ้อยในเชิงชีวภาพและพันธุศาสตร์ยังมีอยู่อย่างจำกัด สิ่งหนึ่งที่เป็นอุปสรรคสำคัญต่อการพัฒนาเทคโนโลยีทางชีวภาพ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อยนั้นเป็นผลมาจากโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ซับซ้อนของอ้อย จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางโครโมโซมของอ้อยได้แสดงให้เห็นว่า พันธุ์อ้อยที่ใช้ปลูกเพื่อการค้าในปัจจุบันนั้นมีจำนวนโครโมโซมที่ไม่แน่นอน โดยมีจำนวนอยู่ระหว่าง 100 -130 โครโมโซม และเมื่อวิเคราะห์อย่างละเอียดพบว่า ในจำนวน 100-130 โครโมโซมนี้อาจแบ่งออกเป็นโครโมโซมพื้นฐานจำนวน 8-10 ชุด โดยในแต่ละชุดจะประกอบด้วยโครโมโซมจำนวน 8 -10 แห่ง ซึ่งหมายความว่ายีนต่างๆที่มีอยู่ในจีโนมอ้อยจะมีจำนวนอัลลีล (allele) โดยเฉลี่ยถึง 8 -10 อัลลีล นอกจากนี้ การจับคู่ของโครโมโซมอ้อยยังมีรูปแบบที่ไม่แน่นอน จึงทำให้ได้ลูกผสมที่มีรูปแบบโครโมโซมได้ไม่จำกัด อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการปรับปรุงพันธุ์อ้อยโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพจะมีอุปสรรคสูงกว่าในพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ แต่ด้วยความต้องการของผู้บริโภคที่สูงขึ้นและความต้องการใช้อ้อยเป็นพืชพลังงานทดแทน ได้

ส่งผลให้ประเทศผู้ผลิตอ้อยและน้ำตาลรายใหญ่ของโลก หันมาให้ความสนใจและลงทุนกับงานวิจัยในแขนงนี้ ทำให้มีการพัฒนาความรู้ความเข้าใจทางเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุศาสตร์ของอ้อยขึ้นมาอย่างรวดเร็ว

ในงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษพันธุศาสตร์พื้นฐานของอ้อยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล 4 ชนิด คือ 1) เครื่องหมาย genomic simple sequence repeat (gSSR) 2) เครื่องหมาย expressed sequence tags-simple sequence repeat (EST-SSR) 3) เครื่องหมาย fluorescent-amplified fragment length polymorphism (f-AFLP) และ 4) เครื่องหมายจำเพาะต่อยีน sucrose synthase (SuS) เพื่อสร้างแผนที่พันธุกรรมอ้อยโดยข้อมูลแผนที่พันธุกรรมที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการประยุกต์ใช้เพื่อการสืบหาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะ QTL ของอ้อยต่อไป

วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

การสร้างแผนที่พันธุกรรมอ้อยด้วยเครื่องหมายชนิด simplex และ double simplex ของเครื่องหมาย genomic simple sequence repeat (gSSR) และ เครื่องหมาย expressed sequence tags-simple sequence repeat (EST-SSR) ลงบนแผนที่ที่มีอยู่เดิมของเครื่องหมาย fluorescent-amplified fragment length polymorphism (f-AFLP) และ เครื่องหมายจำเพาะต่อยีน sucrose synthase (SuS)

ผลงานวิจัยและงานเขียนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

(Review of Literature)

ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับอ้อย

อนุกรมวิธานของอ้อย

Class : Angiospermae

Subclass : Monocotyledoneae

Order : Graminales

Family : Gramineae

Tribe : Andropogoneae

Genus : *Saccharum*

Species : *officinatum*, *spontaneum*, *robustum*, *sinense*, *barberi* และ *edule*

Scientific name : *Saccharum officinarum* L.

Common name : Sugar cane, The Noble canes

อ้อยเป็นพืชตระกูลหญ้าในเขตร้อนชื้นและเป็นพืชที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับข้าวโพด (*Zea* sp.) และข้าวฟ่าง (*Sorghum* sp.) มีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (vegetative) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เชื่อกันว่าชาวอินเดียเป็นชาติแรกที่ปลูกเพื่อเก็บเกี่ยว ต่อมาได้มีการนำไปปลูกที่ฮาวาย ทวีปอเมริกาและทวีปอื่น ๆ ตามลำดับ จัดอยู่ในจีนัส (genus) *Saccharum* ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ (species) ดังนี้

1. *S. officinarum* ชื่อทั่วไปว่า The Noble Canes ถิ่นกำเนิดแถบหมู่เกาะนิวกีนี ลักษณะที่สำคัญคือ ลำต้นใหญ่ ใบกว้าง ปริมาณน้ำตาลสูง ปริมาณเส้นใยต่ำ แตกกอแน่น ไม่ค่อยทนทานต่อโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อ้อยชนิดนี้ที่ปลูกในประเทศไทย เรียกว่าอ้อยเคี้ยว เช่น อ้อยสิงคโปร์, Mauritius และ Badila เป็นต้น อ้อยชนิดนี้ใช้ประโยชน์มากในอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล

2. *S. spontaneum* ชื่อทั่วไปว่า Tropical wild canes เป็นอ้อยป่า ที่ขึ้นอยู่ทั่วไปแถบเส้นศูนย์สูตร มีลักษณะสำคัญคือ ลำต้นขนาดเล็กเมื่อเทียบกับ *officinatum* ปริมาณน้ำตาลต่ำ ปริมาณ

เส้นใยสูง มี 2 ประเภท คือ (1) เจริญเติบโตเป็นกอคล้ายหญ้า (2) เจริญเติบโตลักษณะทางต้นสูง ทั้ง 2 ประเภท มีเหง้า (rhizome) ใบเรียวยาวเล็ก ขอบใบคม ดอกมีขนาดเล็ก เป็นปุ๋ยสีเขียว ช่อดอกยาว ประมาณ 10-12 เซนติเมตร และที่โคนช่อดอกจะมีขนอย่างเด่นชัด อ้อยชนิดนี้ในประเทศไทย มีชื่อเรียกว่า เล้าหรือพง ปรับตัวเข้ากับสภาพแห้งแล้ง และอากาศหนาวได้ดี ต้านทานโรค จึงมีความสำคัญมากในแง่เชื้อพันธุกรรม ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์อ้อยใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผสมข้ามกับชนิดอื่น ๆ

3. *S. robustum (brassel)* ชื่อทั่วไปว่า The wild Canes of new Guinea เป็นอ้อยป่า ถิ่นกำเนิดแถบหมู่เกาะนิวกินี รูปร่างลักษณะภายนอกคล้ายกับ officinarum แต่มีปริมาณน้ำตาลต่ำ และปริมาณเส้นใยสูง ลำต้นแข็งแรง ขนาดใหญ่ ความสูงอาจถึง 10 เมตร ลำต้นโป่งออกที่ข้อ growth ring หนุนเห็นได้ชัดเจน ไม่ทนทานต่อโรค ชาวเกาะปลูกไว้เพื่อทำรั้วหรือที่ปักอาศัย

4. *S. sinese* ชื่อทั่วไปว่า Chinese canes ถิ่นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เมืองไทยเรียก อ้อยจีน ลักษณะสำคัญคือ ลำต้นขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 2 เซนติเมตร ปล้องขาว สีเขียว หรือเขียวออกแดง ใบยาวแคบ แข็งแรง ทนทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้ดี ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม ดินเลวได้ดี ปริมาณน้ำตาลต่ำ ปริมาณเส้นใยสูง อ้อยชนิดนี้ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล ปลูกทั่วไปทางตอนเหนือของอินเดีย จีน ทางตอนใต้ของญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และฮาวาย

5. *S. barberi* ชื่อทั่วไปว่า The northern indian canes ถิ่นกำเนิดแถบตอนเหนือของอินเดีย เมืองไทยเรียกว่าอ้อยอินเดีย ลักษณะคล้ายกับอ้อยจีนมาก แต่ลำต้นและใบเล็กกว่า ลักษณะสำคัญคือ ที่ฐานกาบใบมีขนโดยรอบ ต้านทานโรคได้ดี

6. *S. edule* ถิ่นกำเนิดแถบหมู่เกาะนิวกินี อ้อยชนิดนี้สันนิษฐานว่า เกิดการผสมข้ามชนิดระหว่าง *Miscanthus floridus* กับ *S. robustum* ช่อดอกที่เป็นหมันจะมีลักษณะคล้ายกับ cauliflower ใช้เป็นอาหารมนุษย์ได้ (อุดม พูลเกษ, 2527, น. 52-64)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของอ้อย

1. ราก (Root) ด้วยเหตุที่ว่าอ้อยจัดเป็นพืชตระกูลหญ้า จำพวกพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ดังนั้นเมื่อนำเมล็ดอ้อยมาเพาะ รากที่เจริญออกมาจากเมล็ดอ้อยนั้นก็จะมีระบบรากแบบรากฝอยเช่นเดียวกับธัญพืชทั่วไป แต่เนื่องจากว่าอ้อยมีการขยายพันธุ์โดยใช้ท่อนพันธุ์ (sett or cutting) ซึ่งท่อนพันธุ์ที่ได้นี้มาจากการตัดลำต้นออกเป็นท่อน แต่ละท่อนมีตาอย่างน้อยหนึ่งตา เมื่อนำท่อนพันธุ์อ้อยไป

ปลูกในดิน ตากก็จะเจริญขึ้นมาเป็นต้นอ่อน ขณะเดียวกันมูมราก (root primodia or root initial) ที่ข้อของท่อนพันธุ์จะเจริญออกมาเพื่อทำหน้าที่ดูดน้ำและธาตุอาหารให้กับต้นอ่อน รากที่งอกออกมาจากท่อนพันธุ์นี้เรียกว่า รากของท่อนพันธุ์ (sett root or cutting root) ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นเล็ก ๆ และแตกแขนงมาก ต่อมาเมื่อต้นอ่อนเจริญเติบโตขึ้น ที่ข้อของต้นอ่อนที่อยู่ในดินจะงอกรากที่เรียกว่า รากของหน่อ (shoot root) ทำหน้าที่ดูดน้ำและธาตุอาหารแทน ส่วนรากของท่อนพันธุ์ก็จะสิ้นสภาพและแห้งตายไป รากของหน่อนี้มีลักษณะใหญ่กว่าและแข็งแรงกว่ารากของท่อนพันธุ์ ซึ่งรากนี้จะเจริญเติบโตเป็นรากถาวรของต้นอ้อยต่อไป

2. ลำต้น (Stem) ลำต้นอ้อย (cane or culm or stalk) มีลักษณะเป็นลำตั้งตรงและมีกาบใบหุ้ม ความสูงประมาณ 2.5-6 เมตร ไม่แตกกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วยข้อ (node) และปล้อง (internode) ความยาวของปล้องจากรอยกาบใบ (leaf scar or sheath scar) อันหนึ่งถึงรอยกาบใบอีกอันหนึ่งรวมกันเรียกว่า joint ดังนั้นลำต้นอ้อยจะประกอบด้วย joint หลาย ๆ อัน ขนาดของ joint แตกต่างไปตามพันธุ์ โดยทั่วไป joint แต่ละอันมีความยาวประมาณ 5-25 เซนติเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-6 ซม.

3. ใบ (Leaf) ใบอ้อยประกอบด้วยกาบใบ (leaf sheath) ที่หุ้มลำอ้อยกับแผ่นใบ (leaf blade) ที่แผ่กางออกไปจากลำอ้อยสลับกันทั้งสองข้าง ใบแรก ๆ ที่เจริญจากตาเป็นใบเกล็ด (scale leaf) เมื่ออ้อยเจริญเติบโตขึ้น ใบอ้อยก็จะมีขนาดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีขนาดสูงสุด หลังจากนั้นใบอ้อยจะค่อย ๆ มีขนาดเล็กลงเมื่ออ้อยใกล้ออกดอก

4. ช่อดอก (Inflorescence) เมื่ออ้อยแก่เต็มที่และอยู่ในช่วงออกดอก อ้อยจะแทงช่อดอกออกจากกาบของใบธง (flag leaf) ที่อยู่ตรงส่วนบนสุดของลำต้น ช่อดอกอ้อยนี้เรียกว่า arrow or tassel มีลักษณะเป็นพู่ เป็นช่อดอกแบบ panicle รูปร่าง ขนาด และสีของช่อดอกจะแตกต่างกันไปตามลักษณะประจำพันธุ์ ช่อดอกประกอบด้วยแกนกลาง (main axis or rachis) ก้านแขนงแรก (lateral axis or primary branch) และก้านแขนงชั้นที่สอง (secondary branch) ความยาวของแกนกลางช่อดอกอาจยาวตั้งแต่ 25-50 เซนติเมตร และมีก้านแขนงแตกออกโดยรอบ

5. ผล (Fruits) ผลมีขนาดเล็กละเอียดมีขนาดความยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร เรียกว่า caryopsis ผลที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วประมาณ 3 อาทิตย์ จะแก่และร่วงปลิวไปตามลม โดยอาศัย silky hairs ช่วยพยุงตัว (จเร สดากร, 2527, น. 64-66)

ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของอ้อย

อ้อย จัดเป็นพืชที่มีโครโมโซมแบบออโตโพลีพลอย (autopolyploid) และอนิวพลอย (aneuploid) ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมพื้นฐานหลายชุด(Daniels&Roach,1987,pp.7-84) อ้อยที่ใช้เพาะปลูกนั้นมีจำนวนโครโมโซมที่ไม่แน่นอน โดยมีจำนวนโครโมโซมอยู่ระหว่าง 100 - 130 โครโมโซม สามารถแบ่งเป็นโครโมโซมพื้นฐานจำนวน 8 -10 ชุด แต่ละชุดประกอบด้วยไฮโมโดกัสโครโมโซมจำนวน 8 -10 แท่ง การจับคู่ของโครโมโซมมีรูปแบบที่ไม่แน่นอนจึงทำให้ได้ลูกผสมที่มีรูปแบบโครโมโซมได้ไม่จำกัด ในที่นี้จะกล่าวถึงอ้อย 2 สปีชีส์ที่สำคัญ คือ

Saccharum officinarum จัดเป็นสปีชีส์ที่ปลูกเพื่อผลิตน้ำตาล มีจำนวนชุดโครโมโซม $2n = 80$ จำนวน พื้นฐาน $x = 10$ (Bremer,1961,pp.59-78;D'Hont et al.,1998,pp.121-225) สปีชีส์นี้มีลักษณะคุณภาพที่สำคัญเชิงพาณิชย์คือมีปริมาณน้ำตาลและความบริสุทธิ์สูง มีปริมาณแป้งและเส้นใยต่ำ (Sreenivasan et al.,1987,pp.211-254) การผสมข้ามสปีชีส์ระหว่าง *S. officinarum* และ *S. spontaneum* ทำให้เกิดอ้อยปลูกพันธุ์ใหม่และเข้าใจว่าการผสมข้ามสปีชีส์ตามธรรมชาติของ 2 สปีชีส์นี้ทำให้เกิด *Saccharum sinense* ($2n = 111-124$) และ *Saccharum barberi* ($2n = 81 - 120$) (Price,1968,pp.155-164) อ้อยทั้ง *S. officinarum* และ *S. spontaneum* ถูกเสนอว่าเป็นพืชที่มีต้นกำเนิดเป็นออโตโพลีพลอย (autopolyploid) จากอ้อยพันธุ์ป่า *Saccharum robustum* ($2n = 80$) ที่พบในแถบปากัวนิวกินี โดยยังไม่พบพืชที่มีโครโมโซมดิพลอยที่มีความสัมพันธ์ด้วย (Grassel,1946,pp.234-252)

Saccharum spontaneum เป็นอ้อยพันธุ์ป่าที่พบกระจายอยู่บริเวณประเทศญี่ปุ่น ปากัวนิวกินี จนถึงแถบเมดิเตอร์เรเนียนและแอฟริกา อ้อยสปีชีส์นี้มีลักษณะที่สำคัญทางพืชไร่หลายลักษณะคือ ลักษณะต้านทานโรคและทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้อ้อยสปีชีส์นี้มีความสามารถปรับตัวได้ดีในหลายๆ ถิ่นที่อยู่ *S. spontaneum* ประกอบด้วยทั้งพวกที่มีโครโมโซมแบบยูพลอย (euploid) และอนิวพลอย ($2n = 40 -128$) มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน $x = 8$ (Sreenivasan et al,1987,pp.211-254) อ้อยสปีชีส์นี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับต้นกำเนิดของอ้อยปลูกในปัจจุบัน โดยเฉพาะการผสมข้ามกับ *S. officinarum*

อ้อยปลูกสมัยใหม่เกิดจากการผสมข้ามสปีชีส์ในหลายรูปแบบที่นักปรับปรุงพันธุ์อ้อยชาวต่างชาติในประเทศอินโดนีเซียได้ทำขึ้นในช่วงต้นของศตวรรษที่ 20(Berding&Roach,1987,pp.143-210) การผสมพันธุ์ระหว่าง *S. officinarum* กับ *S. spontaneum* และ *S. barberi* ทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มความต้านทานโรคความสามารถในการปรับตัวและการทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยวิธีการผสมจะใช้วิธีการที่เรียกว่า nobilization คือทำให้ลูกผสมมีลักษณะของ *S. officinarum* มากที่สุด ซึ่งวิธีนี้จะ

ทำให้สามารถรวมลักษณะดีเข้าไว้ในอ้อยสมัยใหม่ได้ คือ เพิ่มความต้านทานโรค เพิ่มผลผลิต เพิ่มความสามารถในการไว้ตอ และเพิ่มความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม วิธีการทำโดยการใช้ต้นแม่เป็น *S. officinarum* ถ่ายทอดโครโมโซมไปยังลูก F1 และ BC1 (Bhat and Gill 1985,pp.377-384 ; Bremer,1961,pp.59-78)

การถ่ายทอดโครโมโซม ($2n = 80$) จาก *S. officinarum* ให้ลูกผสมในรุ่นแรก ๆ ได้อ้อยพันธุ์สมัยใหม่ที่มีจำนวนโครโมโซม ส่วนใหญ่เกิน 100 แท่ง โดยมากกว่า 80 แท่งมาจาก *S. officinarum* ส่วนโครโมโซมที่เหลือจะมาจาก *S. spontaneum* (Bremer, 1961a,pp.121-133 1962b,pp.65-80,1963c,pp.178-188) อย่างไรก็ตามอ้อยสมัยใหม่ การเข้าสู่ของโครโมโซมในการแบ่งเซลล์ไมโอซิสยังคงเป็นแบบ bivalents มีเพียงเล็กน้อยที่เป็นแบบ univalents หรือ multivalents (Price,1963,pp.97-105) เนื่องจากการผสมพันธุ์ในช่วงต้นใช้ตออ้อยของสปีชีส์นี้จำนวนน้อย ดังนั้นฐานพันธุกรรมของพันธุ์อ้อยปลูกสมัยใหม่จึงแคบและนี่เป็นเหตุผลที่สำคัญ เหตุผลหนึ่งที่ทำให้ความก้าวหน้าของการปรับปรุงพันธุ์อ้อยดำเนินไปได้ไม่เร็วเท่าที่ควร (Berding & Roach,1987,pp.143-210)

เครื่องหมายโมเลกุล

ในปัจจุบันนี้การสร้างแผนที่ยีนทำให้วิทยาการทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช และการศึกษาพันธุศาสตร์ของพืชมีความก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว แผนที่ยีนที่มีรายละเอียดมากสามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลได้เป็นอย่างดี สำหรับนักปรับปรุงพันธุ์พืชและนักพันธุวิศวกรรม ประโยชน์ที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในแผนที่ยีนช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ (marker-assisted selection) แทนการคัดเลือกลักษณะนั้นโดยตรง ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการพัฒนาการของพืช ทำให้สามารถวางแผนการผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ได้ก่อนที่พืชจะออกดอก ดังนั้นจึงเป็นการลดระยะเวลาในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชได้อย่างมาก (Allen,1994,pp.11-18) นอกจากนี้การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เกาะติด (linked) กับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการพร้อม ๆ ไปด้วยกับการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลของพันธุ์พืชที่ต้องการปรับปรุง (donor genome markers) ยังช่วยลดจำนวนรอบของการผสมกลับอีกด้วย (Shoemaker et al., 1994,pp.1-10)

ลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของพืชส่วนใหญ่ถูกควบคุม โดยยีนหลายตำแหน่ง QTLs (Quantitative trait loci) ดังนั้นการปรับปรุงลักษณะเหล่านี้โดยการคัดเลือกจากพีโนไทป์เพียงอย่างเดียวจะทำให้ประสิทธิภาพในการคัดเลือกค่อนข้างต่ำ เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีอิทธิพล

มาก ข้อมูลจากแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลที่มีรายละเอียดมากสามารถใช้ศึกษาพื้นฐานของพันธุกรรมของลักษณะ QTLs ได้ เช่น การศึกษาจำนวนยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะ QTLs การศึกษาตำแหน่งของยีนบนโครโมโซมและอิทธิพลของยีนแต่ละยีนที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออก ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ ที่เกาะติดกับลักษณะ QTLs สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกเพื่อให้ได้จำนวนแอลลีลที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะมากที่สุด (Peterson et al., 1988, pp.721-726 ; Lande & Thompson, 1990, pp.743-756)

นอกจากนี้แผนที่ยีนที่มีเครื่องหมายโมเลกุลที่เกาะติดชิดกับยีนที่สนใจ สามารถนำมาใช้ในเทคนิค chromosome walking (Bender et al., 1983, pp.17-33) เพื่อแยกสกัดยีนนั้นได้ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถใช้แยกสกัดยีนได้โดยไม่ต้องรู้ข้อมูลของผลผลิตของยีน แต่ฟีโนไทป์ที่เกิดจากการควบคุมของยีนที่สนใจนั้นมีความสำคัญ

ในปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้มีด้วยกันหลายชนิด เช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Bostein et al., 1980, pp.314-331) เทคนิคนี้เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของขนาด DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้ปฏิกิริยา hybridization ระหว่างชิ้น DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับโมเลกุลตัวติดตามที่ติดฉลาก เครื่องหมาย RFLP ได้ถูกนำมาใช้สร้างแผนที่ยีนในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดเช่น ข้าวโพด มันฝรั่ง มะเขือเทศ

ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA โดยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) (Saiki et al., 1985, pp.1350-1354) จึงได้มีผู้นำเอาเทคนิค PCR นี้มาดัดแปลงต่อเพื่อทำเป็นเครื่องหมายโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่มเพิ่มปริมาณ DNA ในตำแหน่งต่าง ๆ ของจีโนมที่ไพรเมอร์สามารถจับกับโมเลกุล DNA ได้ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตมีจีโนมที่แตกต่างกัน ตำแหน่งของ DNA ที่ถูกจับโดยไพรเมอร์จึงแตกต่างกัน ขนาดของชิ้น DNA ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณ DNA โดยปฏิกิริยา PCR จึงมีความแตกต่างกัน (PCR-based DNA polymorphism) และสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ เทคนิคเหล่านี้ประกอบด้วย Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) (Welsh & McClelland, 1990, pp.7213-7218) , DNA Amplification Fingerprinting (DAF) (Caetano-Anolles et al., 1992, pp.18-25) และ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Williams et al., 1990, pp.6531-6535)

ต่อมาได้มีการผสมเทคนิคของ RFLP และ PCR based DNA polymorphism เข้าด้วยกัน เรียกเทคนิคนี้ว่า Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism (AFLP) พัฒนาขึ้นโดย Vos et al. (1995, pp.4407-4414) วิธีนี้เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของขนาด DNA ที่เกิด

จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้ปฏิกิริยา PCR เพิ่มปริมาณชิ้น DNA เหล่านั้นที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์

เครื่องหมายโมเลกุลแต่ละชนิดที่นำมาใช้ในการสร้างแผนที่ยีนมี ข้อดี และ ข้อเสียแตกต่างกันไป เช่น เครื่องหมายโมเลกุล RFLP สามารถแสดงการถ่ายทอดพันธุกรรมทั้งแบบข่มสมบูรณ์ (completely dominant) และข่มร่วม (co-dominant) ซึ่งการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วมจะให้ข้อมูลในการวิเคราะห์การเกาะติดกันของยีนได้มากกว่าแบบข่มสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ประชากรจากลูก F₂ มาสร้างแผนที่ยีน อย่างไรก็ตามเทคนิคในการทำค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน นอกและมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงเนื่องจากมีการใช้สารกัมมันตภาพรังสี อีกทั้งจำนวนแถบ DNA ที่เกิดจากการทำแต่ละครั้งก็มีเป็นจำนวนน้อย (1-2 แถบ) ส่วนเครื่องหมายโมเลกุล RAPD แสดงการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบเดียวคือแบบข่มสมบูรณ์ ซึ่งให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์การเกาะติดกันของยีนน้อยกว่าแบบข่มร่วม แต่เทคนิคในการทำไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่ผลที่ได้อาจมีข้อเสียเรื่องการทำซ้ำบางครั้งอาจได้ผลต่างจากเดิม เมื่อเปรียบเทียบค่าใช้จ่าย RAPD มีค่าใช้จ่ายต่ำกว่า RFLP จำนวนแถบ DNA ที่เกิดจากการทำแต่ละครั้งมีจำนวนมากกว่า RFLP (5-10 แถบ) ทำให้มีผู้นิยมนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืช สำหรับเครื่องหมาย AFLP มีข้อได้เปรียบกว่า RAPD ตรงที่จำนวนแถบ DNA ที่ได้จากการทำแต่ละครั้งได้เป็นจำนวนมาก (ตั้งแต่ 30 ถึงมากกว่า 100 แถบ) และให้ผลในการทำซ้ำดีกว่า RAPD แต่อย่างไรก็ตามขั้นตอนการปฏิบัติก็มีความยุ่งยากมากกว่า RAPD (Vos et al., 1995, pp.4407-4414) สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล SSR คุณสมบัติที่สำคัญคือความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลบนจีโนม การเป็น multiple allele และสามารถตรวจสอบได้ทั้งจีโนมที่เป็นโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส แต่ข้อเสียที่สำคัญคือการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่มีขั้นตอนการสร้างหลายขั้นตอนและมีค่าใช้จ่ายสูงในขั้นตอนการพัฒนา (Powell et al., 1996, pp.1360 -1385)

เครื่องหมายโมเลกุลกับการปรับปรุงพันธุ์พืช

ประโยชน์ที่สำคัญของเครื่องหมายโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืช คือ เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรืออยู่บนยีนที่ต้องการถ่ายทอดนั้นได้เข้ามามีบทบาทสำคัญ ในการเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกพันธุ์โดยลดช่วยระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ และเป็นการประหยัดงบประมาณโดยสามารถทดแทนการทดสอบในสภาพจริง ซึ่งปฏิบัติได้ยากในบางลักษณะ นอกจากนั้นยังเป็นการตรวจสอบยีนที่ไม่เกี่ยวข้องแต่อยู่ใกล้เคียงกับยีนที่ต้องการได้อีกด้วย โดยการปรับปรุงพันธุ์พืชดังกล่าวเรียกว่า Marker-

assisted selection (MAS) ซึ่งประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัย 3 ประการดังนี้

1. ความถูกต้องแม่นยำในการวางตำแหน่งยีนโดยใช้หลักการวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะปริมาณ
2. ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลและยีนที่ทำการถ่ายทอด
3. ประสิทธิภาพของการทำ MAS เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการคัดเลือกแบบปกติที่ยังขึ้นอยู่กับต้นทุนการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล ต้นทุนในการวัดลักษณะขนาดประชากรที่ใช้ จำนวนซ้ำและค่า heritability ของลักษณะ การใช้ MAS จะมีประสิทธิภาพและคุ้มค่ามากเมื่อลักษณะที่ต้องการมีค่า heritability ต่ำ และมีจำนวนตัวอย่างในการวัดมาก

พบว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกสามารถเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะทางระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับ QTL เป้าหมาย ดังนั้นหากเครื่องหมายโมเลกุลคือ ยีนที่ควบคุม QTL การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลจะมีความถูกต้องแม่นยำมากที่สุด

เครื่องหมาย EST- SSR (Expressed Sequence Tags -Simple Sequence Repeat)

เครื่องหมายโมเลกุล SSR (simple sequence repeat) คือเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือ SSLP (simple sequence length polymorphism) เป็นลำดับเบสซ้ำที่มีจำนวนเบสในหนึ่งหน่วยซ้ำไม่มากนัก (simple sequence repeat ; SSR หรือ shot tandem repeat ; STR) ตั้งแต่ 1-6 เบส เช่น (A)_n, (CA)_n, (TAT)_n, (GATA)_n เป็นต้น เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำมีจำนวนตั้งแต่ไม่กี่ซ้ำจนถึงจำนวนหลายสิบซ้ำ (ไม่เกิน 100 ซ้ำ) ไมโครแซทเทลไลท์พบกระจายทั่วไปในจีโนมสิ่งมีชีวิตยูคาริโอท อาจพบได้หลายพันตำแหน่งในจีโนม (Toth et al., 2000, pp. 967-981) ในพืชชั้นสูงทั่วไปมีการประมาณว่าไมโครแซทเทลไลท์ของหน่วยซ้ำที่มีสองเบส (di-repeat) มีการปรากฏทุก ๆ 30 ถึง 100 กิโลเบส ของจีโนม ความหนาแน่นของไมโครแซทเทลไลท์นี้มีเท่า ๆ กับไมโครแซทเทลไลท์ของหน่วยซ้ำที่มีสามหรือสี่เบส (tri หรือ tetra-repeat) (Morgante & Olivieri, 1993, pp. 145-182) การเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำนี้อาจเกิดจากการแทรก หรือการแทนที่ของลำดับเบสที่ไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำแล้วทำให้เกิดลำดับเบสซ้ำเรียงตัวติดกัน (Zhu et al., 2000, pp. 1379-1389) ในเบื้องต้นจำนวนซ้ำจะมีไม่มากนักต่อมาจำนวนซ้ำจะเพิ่มจำนวนขึ้นซึ่ง

เกิดจากการทำงานที่ผิดพลาดของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสโดยเกิดการลื่นไถล (polymerase slippage) ในบริเวณลำดับเบสซ้ำระหว่างกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ปกติการเกิดนี้ ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของจำนวนซ้ำที่ตำแหน่งเดียวกันของจีโนมและเกิดโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างจีโนไทป์ โพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดจากความแตกต่างของจำนวนซ้ำนี้อาจเรียกว่า VNTR (variable number of tandem repeat) ดังนั้นนอกจากคุณสมบัติข้อดีของไมโครแซทเทลไลท์ที่มีการกระจายตัวทั่วจีโนมแล้ว อัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างจีโนไทป์ก็มีค่อนข้างสูง

เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์ปรากฏเป็นจำนวนมาก มีหลายตำแหน่งในจีโนมการวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน โดยใช้โพลบไมโครแซทเทลไลท์จะทำให้การอ่านจีโนไทป์ทำได้ยาก เนื่องจากการปรากฏของแถบดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำเพาะตำแหน่ง (locus-specific marker) เป็นวิธีการวิเคราะห์จีโนไทป์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่า เนื่องจากสามารถแสดงจีโนไทป์แบบข่มร่วมและให้โพลิมอร์ฟิซึมสูงระหว่างจีโนไทป์ แม้ว่าลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์เป็นลำดับเบสซ้ำที่ไม่ใช่ลำดับเบสจำเพาะ แต่ลำดับเบสส่วนที่ไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำทั้งสองข้างของไมโครแซทเทลไลท์เป็นลำดับเบสจำเพาะตำแหน่งของจีโนม ดังนั้นไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้มีลำดับเบสที่เกาะกับลำดับเบสจำเพาะทั้งสองข้างของไมโครแซทเทลไลท์จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ได้ โพลิมอร์ฟิซึมของความแตกต่างของขนาดผลผลิตดีเอ็นเอเป็นผลจากจำนวนซ้ำที่แตกต่างกัน ถ้าขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันมากพอ สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ใช้เจลอะกาโรสเป็นตัวกลางการแยกขนาด แต่ส่วนใหญ่จะใช้เจลโพลีอะคริลามิเดต์เพราะมีความละเอียดในการแยกขนาดดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเล็กน้อยได้ (Becker&Heun, 1995,pp.835-845)

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มีขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก โดยต้องใช้ทั้ง เวลาและค่าใช้จ่าย ขั้นตอนการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์โดยวิธีมาตรฐาน (Powell et al., 1996,pp.215-221) เริ่มจากการสร้างคลังดีเอ็นเอของจีโนมโดยขึ้นดีเอ็นเอที่นำไปโคลนนั่นจะเป็นขึ้นดีเอ็นเอขนาดเล็ก เทคนิคในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ส่วนใหญ่จะพัฒนาขั้นตอนนี้ให้ขึ้นดีเอ็นเอที่นำไปโคลนมีอัตราส่วนของโคลนดีเอ็นเอที่มีไมโครแซทเทลไลท์มาก (microsatellite enriched library) จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้โพลบที่มีลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์ในกระบวนการไฮบริดเซชัน โคลนดีเอ็นเอที่ได้รับการคัดเลือกจะถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อนำข้อมูลลำดับเบสไปออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีไมโครแซทเทลไลท์ ไพรเมอร์จะถูกนำไปทดสอบเพื่อปรับสภาวะของ

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาโพลิมอร์ฟิซึม ในการวิเคราะห์โพลิมอร์ฟิซึม โดยทั่วไปไพรเมอร์จะออกแบบให้มีความยาว 17 - 22 นิวคลีโอไทด์ มีอัตราส่วนของ GC ประมาณ 50% โดยมีค่า T_m (melting temperature ; อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพธรรมชาติ 50%) ประมาณ 60 องศาเซลเซียส (McCouch et al.,2000,pp.119-207) ขนาดของดีเอ็นเอ เป้าหมายที่ถูกเพิ่มปริมาณจะถูกออกแบบให้มีขนาดประมาณ 100 - 250 คู่เบส

สำหรับสิ่งมีชีวิตบางสปีชีส์ที่มีข้อมูลลำดับเบสเป็นจำนวนมาก ในฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ โดยเฉพาะลำดับเบสของยีนที่เกิดการแสดงออกหรืออีเอสที (expressed sequence tag ; EST) หรือลำดับเบสดีเอ็นเอจากจีโนม การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สามารถทำได้ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเหล่านั้นจากฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากฐานข้อมูลนี้สามารถสร้างเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ชนิด $(AT)_n$ และ $(GC)_n$ ได้ ซึ่งเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สองชนิดนี้ไม่สามารถพัฒนาได้ด้วยกระบวนการไฮบริดเซชันของโพลีไมโครแซทเทลไลท์ เนื่องจากลำดับเบสซ้ำ AT หรือ GC มีลำดับเบสแบบพาลินโดรม สายดีเอ็นเอจะจับกันเองทั้งภายในสายเดียวกันและคนละสาย ข้อได้เปรียบการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จาก EST คือ ตำแหน่งยีนที่ทราบหน้าที่แล้ว สามารถวางตำแหน่งลงในแผนที่พันธุกรรมได้ EST เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่มีการแสดงออกมาออกแบบไพรเมอร์ เฉพาะตำแหน่งของยีนนั้นๆจากนั้นใช้หลักการ PCR เพื่อเพิ่มขยายส่วนของดีเอ็นเอ ผลผลิตของการทำ PCR นั้นจะนำไปแยกขนาดโดยใช้ agarose gel eletrophoresis หรือ polyacryimide gel eletrophoresis แล้วแต่ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นๆ คุณสมบัติที่สำคัญของเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR คือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลต่อยีนที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ การค้นพบ SSR ในลำดับเบส EST ทำให้เกิดแนวทางหนึ่งของการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR โดยการทำเหมืองข้อมูล (data mining) จากฐานข้อมูลสาธารณะของลำดับเบส EST

งานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR ในการทดลองซึ่งมีการทดลองทั้งในสัตว์และพืช เช่น Maneeruttanarungroj et al.(2006,pp.363-368) ได้ทำการทดลองโดยทำเหมืองข้อมูลจากฐานข้อมูลสาธารณะของลำดับเบส EST ในกิ้งกูดดำ (*Penaeus monodon*) จำนวน 10,100 ลำดับเบส พบว่ามี 997 ESTs เป็นยีนที่รู้หน้าที่ 8.6% เป็น hypothetical proteins 27.8% และเป็น ESTs ที่ไม่รู้หน้าที่อื่นอีก 63.6% เมื่อออกแบบไพรเมอร์จำนวน 50 คู่ พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจได้ 144 เครื่องหมายและวิเคราะห์ลิงค์เกจได้ทั้งหมด 83 ลิงค์เกจ Scott et al.(2000,pp.723-726) ได้ทำการทดลองในองุ่นโดยทำเหมือง

ข้อมูลจากฐานข้อมูลสาธารณะของลำดับเบส EST จำนวน 5,000 เบส พบว่าประมาณ 2.5% ของจำนวนโคลน cDNA ทั้งหมดเป็นชนิด di-repeat ที่มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 7 หรือมากกว่า มีชนิด tri-repeat ที่มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 5 หรือมากกว่า เมื่อทดลองออกแบบไพรเมอร์จำนวน 16 คู่ พบว่าไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามขนาดที่คาดหมายไว้ และเครื่องหมาย SSR ทั้งหมดแสดงโพลิมอร์ฟิซึม Sledge et al. (2005,pp.980-992) ได้ทำการทดลองในถั่วอัลฟัลฟา (*Medicago sativa*) โดยวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 1,182 เครื่องหมาย ด้วยเครื่องหมาย EST-SSR ได้เครื่องหมายที่วิเคราะห์ลิงเกจได้ 285 เครื่องหมาย วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ทั้งหมด 41 ลิงค์เกจ Yi et al. (2006,pp.113-130) ได้ทำการทดลองในพริกไทยโดยวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 150 เครื่องหมาย ด้วยเครื่องหมาย EST-SSR ในประชากรที่เกิดจากการผสมระหว่าง *Capsicum annuum* กับ *Capsicum chinense* ได้เครื่องหมายที่วิเคราะห์ลิงเกจได้ 139 เครื่องหมาย วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ทั้งหมด 14 ลิงค์เกจ

การสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในพืชออตโตพอลิพลอยด์

การสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในพืชที่มีชุดโครโมโซมแบบ ออตโตพอลิพลอยด์ (พืชที่มีชุดโครโมโซมที่มีโฮโมโลกัสโครโมโซมมากกว่าสองแห่ง) ทำให้มีความยุ่งยากซับซ้อนในการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลมากกว่าในดิพลอยด์ เนื่องจาก

1. การมีจำนวนจีโนมไทป์เป็นจำนวนมากในประชากรลูกผสมที่มีการกระจายตัวทางพันธุกรรม
2. ความยากในการวิเคราะห์ความถี่จีโนมไทป์ในรุ่นลูกด้วยวิธีผสมทดสอบ
3. ความไม่ชัดเจนของพฤติกรรมการจับคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Da Silva and Sorrells, 1996,pp.211-228)

ขั้นตอนการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในออตโตพอลิพลอยด์ มี 5 ขั้นตอน ดังนี้

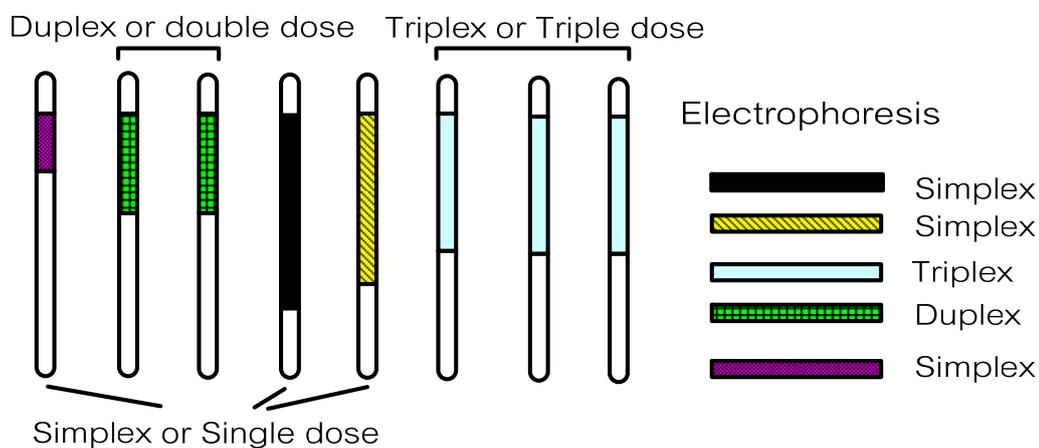
1. การสร้างประชากรลูกผสมสำหรับการวิเคราะห์ลิงเกจของเครื่องหมายโมเลกุล
2. การวิเคราะห์และการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล simplex
3. การวิเคราะห์ชนิดของพอลิพลอยด์
4. การวิเคราะห์และการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล multiplex
5. การวิเคราะห์กลุ่มลิงเกจ (linkage group) ที่เป็นโฮโมโลกัส (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, 2548,น.52-69)

เทคนิคในการทำแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในพืชโพลีพลอยด์ สามารถทำได้จากการวิเคราะห์ทางอ้อมจากพืชดิพลอยด์พันธุ์ป่าที่เป็นต้นกำเนิดของพืชโพลีพลอยด์ เช่น มันฝรั่ง (Bonierbale *et al.*, 1988, pp.1095-1103) ข้าวสาลี (Kam Morgan., 1989, pp.724-732) อีกเทคนิคหนึ่ง ใช้พืชพวกอนิวพลอยด์ช่วยในการวิเคราะห์ตำแหน่งยีนหรือตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุล โดยอาศัยการวิเคราะห์ตำแหน่งโพลิบที่เกาะกับแท่งโครโมโซมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Anderson, 1992, pp.1035-1043) เทคนิคนี้ไม่จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ลิงค์เกจ (linkage) มีข้อดี คือสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดจากความผิดปกติของการจับคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซม เนื่องจากเทคนิคนี้ไม่ขึ้นกับการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแท่งโครโมโซมและความเป็นหมันที่เกิดจากการใช้พันธุ์ป่าในการผสม แต่ข้อเสียที่สำคัญคือพืชอนิวพลอยด์ไม่สามารถหาได้ในพืชหลายชนิด

ในปัจจุบันมีเครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดที่นำมาวิเคราะห์แผนที่ในพืชออโตโพลีพลอยด์ เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Al-Janabi *et al.*, 1993, pp.1249-1260 ; Ukoskit & Thompson, 1996, pp.818-821) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Da Silva & Sorrells, 1996, pp.211-228; Ming *et al.* 2001, pp.2075-2084) และ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Hoarau *et al.*, 2001, pp.1027-1037) โดย Wu. *et al.* (1992, pp.294-300) ได้เสนอวิธีการวิเคราะห์ลิงค์เกจในพืชออโตโพลีพลอยด์โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล restriction fragment length polymorphism (RFLP) วิเคราะห์ลักษณะ single-dose restriction fragment (SDRF) คือ มีแอลลีลที่พิจารณา (แอลลีลในกรณีของ RFLP คือการใช้ โพลิบของโมเลกุล DNA) ปรากฏบนโครโมโซมเพียง 1 แท่ง (จากโฮโมโลกัสโครโมโซมหลายแท่ง) โดยไม่คำนึงถึงว่าพืชนั้นจะมีจำนวนชุดของโครโมโซมพื้นฐานกี่ชุด (ploidy level) เครื่องหมายโมเลกุลที่มีการกระจายตัวลักษณะนี้เรียกว่า simplex marker หรือ single dose marker ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีแอลลีลปรากฏในโฮโมโลกัสโครโมโซมมากกว่า 1 แท่ง เช่น 2 แท่งหรือ 3 แท่ง เรียกเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะนี้ว่า duplex หรือ double-dose marker และ triplex หรือ triple-dose marker ตามลำดับ เรียกโดยรวมว่า multiplex หรือ multi-dose marker

ภาพที่ 2.1

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด simplex marker, duplex marker และ triplex marker บนไฮโมโลกัสโครโมโซม 8 แห่ง ของออโตออคตาพลอยด์ (autooctaploid)



ที่มา : กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, 2548,น.52-69

ในกรณี simplex marker สามารถนำมาใช้สร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในพืชโพลีพลอยด์ได้ โดยใช้วิธีการเดียวกับพืชดิพลอยด์ ส่วน multiplex marker สามารถนำมาใช้วิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้ (Da Silva, 1993,pp.165-179; Ukoskit & Thompson, 1997,pp.818-821) สำหรับพืชออโตโพลีพลอยด์ เมื่อพิจารณาถึงค้เกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมาย สามารถสร้างชุดเซลล์สืบพันธุ์ (gamete series) ได้หลายแบบ ดังนี้

Simplex coupling : ลิงค์เกจระหว่าง 2 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพcoupling

Simplex repulsion : ลิงค์เกจระหว่าง 2 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพrepulsion

Simplex–duplex (1&2) asymmetrical coupling : ลิงค์เกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex กับเครื่องหมายแบบ duplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling

Simplex–duplex (1&2) asymmetrical repulsion : ลิงค์เกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex กับเครื่องหมาย duplex ที่ลิงค์กันในสภาพ repulsion

Double coupling (duplex coupling) : ลิงค์เกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลแบบ duplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling

Duplex coupling–repulsion : ลิงค์เกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล duplex โดยคู่หนึ่งของเครื่องหมายโมเลกุลลิงค์กันในสภาพ coupling อีกคู่หนึ่งลิงค์กันในสภาพ repulsion

ในการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลของ multiplex marker (duplex marker และ triplex marker) หลังจากคำนวณหาอัตราส่วนจีโนไทป์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ในเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันกับ duplex marker และ triplex marker ในลิงค์เกจแบบต่าง ๆ แล้ว การคำนวณระยะ

ห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลชนิด simplex marker และ multiplex marker สามารถประมาณค่าได้จาก ค่า recombination fraction (r) ด้วยวิธี Maximum likelihood (กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, 2548 ,pp.52-69)

การสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในพืชที่มีโครโมโซมออโตโพลีพลอยด์ สามารถสร้างประชากรลูกผสมจากพืชที่มีความเป็นเฮเทอโรไซกัสสูง จะทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีโพลีมอร์ฟิซึมเป็นจำนวนมาก ซึ่งในจำนวนนี้ก็รวมทั้งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด simplex และ multiplex ประกอบกัน ซึ่งจะสามารถทราบชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลได้จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรลูกผสม การสร้างแผนที่จะเริ่มจากการวิเคราะห์ลิงค์เกจของเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling จากนั้นจึงเติมตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex ลงในแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล simplex โดยการประมาณค่า r จากอัตราส่วนฟีโนไทป์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เกิดจากเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในสภาพ coupling และเกี่ยวข้องกับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีจำนวน dose ต่ำ เช่น simplex ,duplex หรือ triplex ในการสร้างเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex นี้ ไม่มีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น และเป็นการใช้ข้อมูลการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลให้เกิดประโยชน์อย่างเต็มที่

การทำแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในอ้อย

อ้อยเป็นพืชพอลิพลอยด์ คือ เป็นพืชที่มีชุดของโครโมโซมมากกว่าสองชุดโดยมีจำนวนชุดโครโมโซมอยู่ที่ 8 - 10 ชุด การเข้าคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมแบบสุ่ม มีความเป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygosity) สูงและไม่มีพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์แท้ในธรรมชาติ การผสมตัวเองของอ้อยจะได้ลูก F_1 ที่มีการกระจายตัวทำนองเดียวกับลูก F_2 ที่เกิดจากการผสมข้ามสปีชีส์ของพืชดิพลอยด์ ดังนั้นประชากร F_1 นี้จึงเรียกว่าประชากร F_2 เทียม (pseudo F_2) เครื่องหมายโมเลกุลจะมีการกระจายตัวในอัตราส่วน 3:1 (ปรากฏแถบดีเอ็นเอ : ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) สำหรับการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์หรือข้ามสปีชีส์ประชากร F_1 ที่ได้จะมีการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลเหมือนการผสมทดสอบ (testcross) ของพืชดิพลอยด์ คือมีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1 ประชากรลูกผสมลักษณะนี้เรียกว่า pseudo-testcross (Weeden, 1994, pp.57-67) ขณะเดียวกันก็มีบางโลไซ (loci) ที่เครื่องหมายโมเลกุลจะมีการกระจายตัวในอัตราส่วน 3 : 1 ดังนั้น ในกรณีอ้อยจึงเป็นการวิเคราะห์ลิงค์เกจจากประชากรลูกผสมแบบ pseudo F_2 หรือ pseudo - testcross

การทำแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลย่อยซึ่งเป็นพีชอโตโพลีพลอยด์ นอกจากการวิเคราะห์แผนที่ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex marker แล้ว สิ่งที่ต้องวิเคราะห์ต่อไปคือการวิเคราะห์กลุ่มลิงค์เกจที่เป็นโฮโมโลกัสกัน โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล simplex marker ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งจำเพาะ เช่น SSR, EST-SSR และ RFLP ซึ่งใช้วิเคราะห์กลุ่มลิงค์เกจ 2 กลุ่มหรือมากกว่า 2 กลุ่ม ที่เป็นโฮโมโลกัสกันได้ นอกจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งจำเพาะในการวิเคราะห์กลุ่มลิงค์เกจที่เป็นโฮโมโลกัสแล้ว การวิเคราะห์แผนที่ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด multiplex ก็สามารถช่วยวิเคราะห์โฮโมโลกัสลิงค์เกจได้เช่นกัน มีหลายงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุล simplex marker และ multiplex marker ในการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลของอ้อย เช่น Wu et al.(1992,pp.294-300) ได้วิเคราะห์ลิงค์เกจโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล simplex marker ในการคัดเลือกการกระจายตัวของลูกเรียกวิธีการนี้ว่า SDRF (single-dose restriction fragment) , Al-Janabi et al. (1993,pp.1249-1260) ได้วิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 336 เครื่องหมายด้วยวิธีการ arbitrarily primed PCR โดยใช้ประชากรลูกผสมที่เกิดจากอ้อยพันธุ์ SES208 ผสมกับ double haploid ของ SES208 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 279 เครื่องหมาย วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ทั้งหมด 42 ลิงค์เกจ Da Silva et al.(1995,pp.158-159) ได้วิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 484 เครื่องหมายด้วยวิธีการ arbitrarily primed PCR โดยใช้ประชากรลูกผสมที่เกิดจากอ้อยพันธุ์ SES208 ผสมกับ double haploid ของ SES208 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 461 เครื่องหมาย วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ทั้งหมด 64 ลิงค์เกจ Hoarau et al.(2001,pp.84-97) ได้วิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 1185 เครื่องหมายเครื่องหมายโมเลกุล AFLP โดยใช้ประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมตัวเองของอ้อยปลูกพันธุ์ R570 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 939 เครื่องหมาย วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ทั้งหมด 120 ลิงค์เกจ และสามารถวิเคราะห์โฮโมโลกัสกลุ่มลิงค์เกจได้ 10 โฮโมโลกัสกลุ่มลิงค์เกจ Aitken et al. (2005,pp.789-801) ได้วิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 1365 เครื่องหมายด้วยเครื่องหมายโมเลกุล AFLP RAF และ SSR โดยใช้ประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่าง *S. Spontaneum* กับ *S. officinarum* ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 967 เครื่องหมาย วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ทั้งหมด 116 ลิงค์เกจ และสามารถวิเคราะห์โฮโมโลกัสกลุ่มลิงค์เกจได้ 8 โฮโมโลกัสกลุ่มลิงค์เกจ Garcia et al.(2006,pp.298-314) ได้วิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 1118 เครื่องหมายด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RFLP SSR และ AFLP โดยใช้ประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างอ้อยปลูกสองสายพันธุ์ ได้เครื่องหมาย

โมเลกุลที่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 357 เครื่องหมาย วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ทั้งหมด 98 ลิงค์เกจ และสามารถวิเคราะห์ไฮโมโลกัสมูล์กลิงค์เกจได้ 12 ไฮโมโลกัสมูล์กลิงค์เกจ

การใช้เครื่องหมาย EST-SSR สร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในอ้อย da Silva (2001,pp.155-159) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLASTn ทำเหมือง SSR จากบางส่วนของฐานข้อมูล SUCEST สามารถค้นหา EST ที่มี SSR ได้ 402 เครื่องหมาย เมื่อทดลองออกแบบไพรเมอร์จำนวน 20 คู่ พบว่า ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่สามารถแสดง polymorphism จากอ้อยที่ทดสอบจำนวน 8 สายพันธุ์ Pinto et al.(2004,pp.795-804) ทำการทดลองสำรวจฐานข้อมูล SUCEST พบว่ามี EST 2,005 cluster จากทั้งหมด 43,141 SSRs เมื่อทดลองออกแบบไพรเมอร์จำนวน 30 คู่ พบว่า ไพรเมอร์จำนวน 23 คู่สามารถแสดง polymorphism จากอ้อยที่ทดสอบจำนวน 18 สายพันธุ์ Oliveira et al. (2007,pp.189-208) ได้สร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในอ้อย โดยวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 1,669 เครื่องหมาย ด้วยเครื่องหมาย gSSR ,EST-SSR, RFLP และ EST-RFLP ในประชากรลูกผสมที่เกิดจากอ้อยพันธุ์ SP80-180 กับ SP80-4966 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 664 เครื่องหมาย วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ทั้งหมด 192 ลิงค์เกจ และสามารถวิเคราะห์ไฮโมโลกัสมูล์กลิงค์เกจได้ 14 ไฮโมโลกัสมูล์กลิงค์เกจ

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

(Methodology)

ประชากรลูกผสมที่ใช้ในการทำแผนที่พันธุกรรม

ในงานวิจัยนี้ใช้ลูกผสมจำนวน 283 ต้นที่เกิดจากการผสมข้ามสปีชีส์ระหว่างอ้อยปลูก Phil6607 และอ้อยป่า *S. spontaneum* (S6) อ้อยพันธุ์ Phil6607 เป็นอ้อย ซึ่งผ่านการผสมกลับไปยัง *S. officinarum* หลายรอบจึงไม่ใช่ *S. officinarum* แท้ ๆ ลักษณะเด่นของอ้อยพันธุ์ Phil6607 คือ งอกเร็ว เจริญเติบโตเร็ว เส้นผ่าศูนย์กลางลำปานกลาง ค่อนข้างทนแล้ง ออกกาบใบได้ง่ายและให้ความหวานสูง อ้อยพันธุ์นี้เคยปลูกได้ดีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง บริเวณจังหวัดบุรีรัมย์และนครราชสีมาชื่อที่ชาวบ้านเรียกกันทั่วไปว่า พันธุ์มาร์กอส แต่ในปัจจุบันเหลืออยู่น้อยมาก ส่วนอ้อยป่า *S. spontaneum* (S6) มีลักษณะเด่นคือ เจริญเติบโตเร็ว แตกกอดี ทนแล้งมาก ปริมาณเส้นใยสูง เส้นผ่าศูนย์กลางลำขนาดเล็ก ต้านทานโรคได้หลายชนิดและไม่หวาน เป็นอ้อยที่รวบรวมโดยโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อยสำหรับเขตสภาพแวดล้อมเฉพาะจากบริเวณเขตนอุทยานแห่งชาติทุ่งใหญ่นเรศวร

การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบของอ้อยจากลูกผสมจำนวน 283 ตัวอย่าง รวมทั้ง Phil6607 และ S6 มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) มีขั้นตอนการสกัด ทำตามวิธีของ Gawel and Jarnet. (1991, pp.262-266) โดยนำตัวอย่างใบอ่อน 2-3 ใบประมาณ 300 กรัม ใส่ลงในถุงเติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมตัวอย่างบดให้ละเอียดแล้วเติม CTAB extraction buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสประมาณ 10 ml ใช้ที่คนสารผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในหลอดทดลอง centrifuge ขนาด 50 ml นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เขย่าตัวอย่างเป็นครั้งคราวแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม chloroform: isoamylalcohol(24:1,v/v) 10 ml เขย่าให้สารละลายผสมกัน เพื่อตกตะกอนโปรตีนจากนั้นนำไปปั่นแยกสารละลายดีเอ็นเอที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วเปิดสารละลายส่วนใสของดีเอ็นเอด้านบน ใส่หลอดทดลอง centrifuge ขนาด 50 ml แล้วค่อยๆเติม absolute ethanol เย็นจัดในปริมาตร 2 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ปิดฝาแล้วพลิกหลอดไปมาหลายๆครั้งจนเห็นสายดีเอ็นเอเกาะตัวเป็นก้อน ใช้แท่งแก้วปลายอเกวดีเอ็นเอขึ้นมาล้างด้วย 70% ethanol จากนั้นนำดีเอ็นเอไปใส่ในหลอดทดลอง microtube ที่มี 0.2 M NaAc 1 ml อยู่ แช่ดีเอ็นเอไว้ 10 นาที นำดีเอ็นเอออกไปใส่ในหลอดทดลอง microtube ที่มี 0.01 M NH₄Ac 1 ml อยู่ล้างดีเอ็นเอประมาณ 10 วินาที ทำดีเอ็นเอ

ให้แห้งโดยการสัมผัสกับกระดาษกรอง นำดีเอ็นเอมาละลายในหลอดทดลอง microtube ที่มี 50 μ l ของ TE buffer อยู่ จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เทียบกับการวัดความเข้มข้นด้วยการสังเกตการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

การสร้างเครื่องหมายโมเลกุล SSR (SSR markers)

การสร้างเครื่องหมาย genomic SSR (gSSR)

ดีเอ็นเอย่อยทั้ง 285 ตัวอย่าง (รวม phil6607 และ S6) ถูกนำมาวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล gSSR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากงานวิจัย Cordeiro et al. (2000,pp.161-168) ซึ่งมีจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ (ภาคผนวก ก) การทำ PCR มีการปรับเล็กน้อยจากงานวิจัยของ Cordeiro et al. (2000,pp.161-168) ใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 25 μ l ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8.3 , 50 mM KCl ,2.5 mM MgCl₂ ,0.5 U ของเอนไซม์ *Tag* polymerase , 0.2 mM ของ dNTP,2.0 mM ไพรเมอร์ และ 25 ng ดีเอ็นเอต้นแบบ คุณหมุมิในการทำ PCR ประกอบด้วยคุณหมุมิ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตามด้วยรอบคุณหมุมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 25 รอบ ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที คุณหมุมิ annealing ตามความเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่ นาน 3 นาทีและคุณหมุมิ extension 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที ตรวจสอบผลเบื้องต้นด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า agarose gel eletrophoresis แล้วนำไปวิเคราะห์หาฟอสโฟริซึมใน 6% polyacrylamide gel eletrophoresis จากนั้นอ่านผลและวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากร ลูกผสม เครื่องหมาย SSR ที่แสดงฟอสโฟริซึมจะถูกนำไปวิเคราะห์หาชนิดของเครื่องหมายโมเลกุล

การสร้างเครื่องหมาย Express Sequence Tag SSR (EST-SSR)

ดีเอ็นเอย่อยทั้ง 285 ตัวอย่าง (รวม phil6607 และ S6) ถูกนำมาวิเคราะห์เครื่องหมาย EST-SSR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากงานวิจัยของ Thipmongkoljaruan

(2007,p.55) ที่ใช้ฐานข้อมูล SUCEST (the Sugarcane Expressed Sequence Tag project) ในการออกแบบไพรเมอร์ซึ่งนับเป็นฐานข้อมูล ESTs ที่มีความสมบูรณ์ ในการทำเหมืองข้อมูล EST ในอ้อย จากเหมืองข้อมูล ESTs ทั้งหมดของฐานข้อมูล SUCEST ซึ่งมีจำนวน 42,189 กลุ่ม จากคลังข้อมูล cDNA ที่พัฒนาจากเนื้อเยื่ออ้อยจำนวน 37 ชนิด พบว่าได้ EST-SSRs ทั้งหมด 1,425 กลุ่ม จากนั้นทำการคัดเลือก ลำดับเบส EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับความหวาน,การต้านทานโรค ,ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและ EST-SSR ที่มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 8 ซ้ำขึ้นไปได้ทั้งหมด 462 ลำดับเบสเพื่อออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นทำการคัดเลือกโดยพิจารณาจากลำดับเบสที่มียีนที่สำคัญและแนวโน้มการกระจายตัวแบบ simplex ในประชากรลูกผสม F₁ จากการคัดเลือก สามารถเลือกไพรเมอร์ได้จำนวน 212 คู่ไพรเมอร์ (ภาคผนวก ก) เพื่อสร้างเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR การทำ PCR ปฏิบัติตามงานวิจัยของ Thipmongkoljaruan (2007) ใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8.3 , 50 mM KCl ,2.5 mM MgCl₂ ,0.5 U ของเอนไซม์ Tag polymerase , 0.2 mM ของ dNTP,2.0 mM ไพร์เมอร์ และ 25 ng ดีเอ็นเอต้นแบบ คุณหมุมิในการทำ PCR ประกอบด้วยคุณหมุมิ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตามด้วยรอบคุณหมุมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 25 รอบที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที คุณหมุมิ annealing ตามความเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่ นาน 3 นาที และคุณหมุมิ extension 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที ตรวจสอบผลเบื้องต้นด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า agarose gel eletrophoresis แล้วนำไปวิเคราะห์หาพอลิมอร์ฟิซึมใน 6% polyacrylamide gel eletrophoresis จากนั้นอ่านผลและวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากรลูกผสม เครื่องหมาย SSR ที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึมจะถูกนำไปวิเคราะห์หาชนิดการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุล

การวิเคราะห์การกระจายตัวและการวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุล (Marker segregation and genotyping)

ชนิดของเครื่องหมาย simplex , double simplex และ multiplex จำแนกได้จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย ในประชากรลูกทั้ง 283 สายพันธุ์ ในกรณีเครื่องหมาย SSR , EST-SSR และ SuS ดูจากการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ส่วนเครื่องหมาย f-AFLP ดูจากยอดกราฟแต่ละยอดซึ่งเทียบได้กับแถบดีเอ็นเอ (Bhusudsawang ,2007) โดยจะขอใช้คำว่า แถบดีเอ็นเอ สำหรับทุกชนิดของเครื่องหมาย แถบดีเอ็นเอทั้งหมดถูกนำมาอ่านผลเพื่อแยกแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม (Polymorphic band) ในประชากรลูกผสม การอ่านค่า 1

เท่ากับ มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ การอ่านค่า 0 เท่ากับไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ ในกรณีที่ประชากร ลูกสายพันธุ์ใดแสดงผลไม่ชัดเจนจะไม่อ่านผล ให้ผลที่ได้เป็นไม่มีข้อมูล (missing data) ค่าที่ได้จากการอ่านการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในประชากรลูก 283 สายพันธุ์ ถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยการทดสอบทางสถิติแบบ ไค-สแควร์ (chi-square test; χ^2) ที่ค่าความเชื่อมั่น $P = 0.05$ ในการวิจัยนี้ นำเฉพาะเครื่องหมาย simplex และ double simplex มาใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม เครื่องหมาย simplex อ่านค่าจากแถบดีเอ็นเอ ที่ปรากฏเฉพาะในพ่อหรือแม่เท่านั้น การกระจายตัวในลูกมีอัตราส่วนของการปรากฏแถบดีเอ็นเอและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1:1 เครื่องหมาย double simplex อ่านค่าจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งในพ่อและแม่ การกระจายตัวในลูกมีอัตราส่วนของการปรากฏแถบดีเอ็นเอและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 3:1 ในงานวิจัยนี้ได้รับข้อมูลเครื่องหมายชนิด simplex และ double simplex ของเครื่องหมาย f-AFLP และ เครื่องหมาย SuS จากงานวิจัยของ Bhusudsawang, 2007 เพื่อใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมในอ้อย

การตั้งชื่อเครื่องหมายโมเลกุล (Marker notation)

SSR marker ตั้งชื่อด้วยอักษร SGM (Sugar cane Genomic Microsattelite) หรือ SEM (Sugar cane EST-SSR Marker) ตามด้วยตัวเลขลำดับของคูไพรเมอร์, อักษรบี แทนแถบดีเอ็นเอ (band) และ ลำดับของแถบดีเอ็นเอ ตัวอย่าง : SGM022b02 , SEM007b03 เครื่องหมายของ Phil6607 นำหน้าด้วยอักษร p ; เครื่องหมายของ S6 นำหน้าด้วยอักษร s ; เครื่องหมาย double simplex นำหน้าด้วยอักษร x

f-AFLP marker ตั้งชื่อเครื่องหมายโมเลกุลตามชื่อคูไพรเมอร์และตามด้วยตัวเลขบอกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ตัวอย่าง : EaatMcta93 เครื่องหมายของ Phil6607 นำหน้าด้วยอักษร p ; เครื่องหมายของ S6 นำหน้าด้วยอักษร s ; เครื่องหมาย double simplex นำหน้าด้วยอักษร x

เครื่องหมายโมเลกุลซูโครสซินเทส ตั้งชื่อด้วยอักษร SuS (sucrose synthase) และตัวเลขบอกลำดับของแถบดีเอ็นเอ ตัวอย่าง : SuS3 เครื่องหมายของ Phil6607 นำหน้าด้วยอักษร p ; เครื่องหมายของ S6 นำหน้าด้วยอักษร s ; เครื่องหมาย double simplex นำหน้าด้วยอักษร x

การวิเคราะห์ลิ้งค์เกจและการสร้างแผนที่พันธุกรรม

(Linkage analysis and map construction)

สร้างแผนที่พันธุกรรมเครื่องหมาย simplex และ double simplex ด้วยโปรแกรม JoinMap Version 3.0 (Stam & Van Ooijen, 1995) โดยกำหนดให้เครื่องหมายที่มีการกระจายตัวแบบ simplex ของ Phil6607 คือ lmxll (l : ปรากฏแถบดีเอ็นเอ, m : ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) และเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวแบบ simplex ของ S6 คือ nmxnp (n : ปรากฏแถบดีเอ็นเอ, p : ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) และเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวแบบ double simplex คือ hxxhk (h : ปรากฏแถบดีเอ็นเอ, k : ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) กำหนดค่า LOD score ตั้งแต่ 4 ถึง 15 และกำหนดค่า recombination fraction (r) ที่ 0.35 ระยะทางระหว่างเครื่องหมายใช้ mapping function แบบ Kosambi function พิจารณารูปแบบลิงค์เกจทั้ง coupling และ repulsion

กำหนดค่าที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ LOD ตั้งแต่ 4 ถึง 15, r น้อยกว่า 0.35 การจัดลำดับเครื่องหมายกำหนดค่า jump น้อยกว่า 5, ripple มากกว่า 1 (เพื่อตรวจสอบความถูกต้องในการจัดลำดับเครื่องหมายโมเลกุล)

วิเคราะห์ขนาดประมาณของจีโนมด้วยวิธีการของ Hulbert et al. (1988, pp.947-958) จากเครื่องหมาย simplex ออกมาในหน่วย cM ตามสูตร

$$G_z = \frac{\left[\frac{M(M-1)}{2} (2X_z) \right]}{K_z}$$

G_z คือขนาดของจีโนมมีหน่วยเป็น cM M คือ จำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาสร้างแผนที่โครโมโซม X_z คือระยะห่างระหว่างสองเครื่องหมายโมเลกุล K_z คือจำนวนของ two-point linkage

คำนวณสัดส่วนของแผนที่พันธุกรรม ที่สร้างได้เทียบกับขนาดประมาณจีโนม

$$E(C_n) = 1 - \rho_{1,n}$$

โดยที่ $\rho_{1,n}$ คือค่าความน่าจะเป็น ของแผนที่พันธุกรรมที่เหลือของจีโนมทั้งหมดที่ไม่อยู่ในแผนที่พันธุกรรมที่สร้างได้

$$\rho_{1,n} = \frac{2r}{n+1} * \left\{ \left(1 - \frac{X}{2G} \right)^{n+1} - \left(1 - \frac{X}{G} \right)^{n+1} \right\} + \left\{ \left(1 - \frac{rX}{G} \right) \left(1 - \frac{X}{G} \right)^n \right\}$$

r คือ จำนวนโครโมโซม (100 -120) X คือระยะระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลมีหน่วย cM G คือขนาดประมาณของจีโนมมีหน่วย cM (Bishop *et al.*, 1983,pp. 351-362)

การวิเคราะห์กลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจ (Homologous Linkage analysis)

เครื่องหมาย simplex และ double simplex ที่ได้จากเครื่องหมาย gSSR, EST-SSR และ SUS ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งจำเพาะในจีโนมสามารถช่วยในการวิเคราะห์กลุ่มลิงเกจที่เป็นโฮโมโลกัสกัน โดยพิจารณาจากกลุ่มลิงเกจ 2 กลุ่ม หรือมากกว่า 2 กลุ่มลิงเกจที่มีเครื่องหมาย simplex หรือ double simplex ที่เกิดจากคู่พริเมอร์เดียวกันปรากฏอยู่ ในการวิเคราะห์กลุ่มลิงเกจที่เป็นโฮโมโลกัสกันโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งจำเพาะในจีโนม อยู่บนสมมุติฐานที่ว่า กลุ่มลิงเกจที่เป็นโฮโมโลกัสกันต้องอยู่บนชิ้นโครโมโซมที่เป็นโฮโมโลกัสกัน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุล (marker segregation)

เครื่องหมาย gSSR

จากคู่ไพรเมอร์ gSSR ทั้งหมด 10 คู่ไพรเมอร์แสดงโพลิมอร์ฟิซึมในประชากรลูกผสมและมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน เมื่ออ่านผลเพื่อแยกแถบดีเอ็นเอที่แสดงการกระจายตัวในประชากรลูกผสม พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 27 แถบ แถบดีเอ็นเอที่แสดงการกระจายตัวในลูกผสมมีจำนวนตั้งแต่ 2 ถึง 7 แถบ มีค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอโพลิมอร์ฟิกเท่ากับ 3.9 แถบต่อไพรเมอร์ เมื่อวิเคราะห์ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลด้วยการทดสอบทางสถิติแบบไค-สแควร์ ($P = 0.05$) ได้ชนิดของเครื่องหมายดังนี้ เครื่องหมาย simplex ของ Phil6607 จำนวน 14 เครื่องหมาย (51.8%) , เครื่องหมาย simplex ของ S6 จำนวน 12 เครื่องหมาย (44.4%) และ เครื่องหมาย double simplex จำนวน 1 เครื่องหมาย (3.7%) (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 แสดงตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย SGM 001 ตัวอย่างดีเอ็นเอ lane ที่ 1 ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 179-222 bp; lane ที่ 2 ดีเอ็นเอของ Phil6607 lane ที่ 3 ดีเอ็นเอของ S6; lane ที่เหลือทั้งหมดเป็นดีเอ็นเอของลูกผสม F1 ที่มีการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอแบบต่างๆ; เครื่องหมายสามเหลี่ยมแสดงเครื่องหมายของ Phil6607; เครื่องหมายลูกศรแสดงเครื่องหมายของ S6

เครื่องหมาย EST-SSR

นำผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย EST-SSR จำนวน 212 คู่ไพรเมอร์ มาอ่านผลเพื่อแยกแถบดีเอ็นเอที่แสดงการกระจายตัวในประชากรลูกผสมจำนวน 283 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1,532 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอโมโนลิมอร์ฟิก 368 แถบและ แถบดีเอ็นเอโพลิมอร์ฟิก 1,164 แถบ แถบดีเอ็นเอที่แสดงการกระจายตัวในลูกผสมของแต่ละคู่ไพรเมอร์มีจำนวนตั้งแต่ 3 ถึง 19 แถบ มีค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอโพลิมอร์ฟิกเท่ากับ 6.3 แถบต่อไพรเมอร์

เครื่องหมาย simplex ของ S6 จำนวน 301 เครื่องหมาย (44.5%) และ เครื่องหมาย double simplex จำนวน 53 เครื่องหมาย (7.8%) (ตารางที่ 4.1)

เครื่องหมาย sucrose synthase

ผลการทดลองนี้ได้จากงานวิจัยของ Bhusudsawang (2007) ในโครงการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลของอ้อย ซึ่งทำในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน ตัวอย่างจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพโรเมอริ์ที่ออกแบบได้ ใน Phil6607, S6 และประชากรลูกจำนวน 283 ตัวอย่าง ได้เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด 7 เครื่องหมายแบ่งเป็น เครื่องหมาย simplex ของ Phil6607 จำนวน 4 เครื่องหมาย (57.1%) และ เครื่องหมาย simplex ของ S6 จำนวน 3 เครื่องหมาย (42.8%) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1

เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดแบ่งตามชนิดของเครื่องหมาย gSSR, EST-SSR , f-AFLP และ SuS

| markers | No. of markers | | | | Total |
|------------------------------------|----------------|--------------|-------------|-----------|------------------|
| | gSSR | EST-SSR | f-AFLP | SuS | |
| Simplex marker (1:1) | | | | | |
| Phil6607 (lmxlI) | 14 (51.8%) | 478 (46.0%) | 321 (47.5%) | 4 (57.1%) | 817 (46.7%) |
| S6 (nnxnp) | 12 (44.4%) | 377 (36.2%) | 301 (44.5%) | 3 (42.8%) | 693 (39.6%) |
| Sum | 26 (96.2%) | 855(82.2%) | 622(92.1%) | 7 (100%) | 1,511 (86.3%) |
| Double simplex marker (3:1) | 1 (3.7%) | 184 (17.7%) | 53 (7.8%) | 0 (0.0%) | 238 (13.6%) |
| Total | 27 (100%) | 1,039 (100%) | 675 (100%) | 7(100%) | 1,749 (100%) |

เครื่องหมายทั้งหมดที่ได้จากเครื่องหมายทั้ง 4 ชนิด มีจำนวน 1,749 เครื่องหมาย แยกเป็นเครื่องหมาย gSSR ,EST-SSR, f-AFLP และเครื่องหมาย SuS จำนวน 27, 1,039, 675 และ 7 ตามลำดับ แยกเป็นเครื่องหมาย simplex ได้ 1,511 เครื่องหมาย (86.3%) , เครื่องหมาย double simplex ได้ 238 เครื่องหมาย (13.6%)

เป็นที่น่าสังเกตว่าเครื่องหมาย double simplex มีจำนวนน้อยกว่าเครื่องหมาย simplex มากคือ 238 เครื่องหมาย (13.6%) เมื่อเทียบกับงานทดลองของ Garcia et al. (2006,pp.298-314) ที่มีเครื่องหมาย double simplex จำนวน 677 เครื่องหมาย (60.55%)

เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้ประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสปีชีส์ระหว่าง *S. officinarum* (Phil6607) และ *S. spontaneum* เมื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์การกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอซึ่งลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมของ 2 สปีชีส์มีความต่างกันมากกว่าการผสมตัวเองหรือการผสมที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน ดังนั้นข้อมูลของเครื่องหมาย double simplex ที่ได้จึงมีจำนวนน้อย

การวิเคราะห์ลิ้งค์เกจและการสร้างแผนที่พันธุกรรม

(Linkage analysis and map construction)

วิเคราะห์ลิ้งค์เกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ double simplex

เครื่องหมาย gSSR, EST-SSR, f-AFLP และ SuS รวมทั้งหมด 1,749 เครื่องหมายของเครื่องหมาย simplex ของ Phil6607 , S6 และเครื่องหมาย double simplex เครื่องหมายทั้งหมด ถูกนำมาวิเคราะห์ลิ้งค์เกจระหว่างเครื่องหมาย simplex และ double simplex ด้วยโปรแกรม JoinMap Version 3.0 (Stam and Van Ooijen, 1995) ใช้ LOD score ในการจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลตั้งแต่ 4 ถึง 15 และกำหนดค่า recombination fraction (r) เท่ากับ 0.35 ระยะทางระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลใช้ mapping function แบบ Kosambi function พิจารณารูปแบบลิ้งค์เกจทั้ง coupling และ repulsion จากการวิเคราะห์เครื่องหมาย simplex และ double simplex ซึ่งประกอบด้วยเครื่องหมาย gSSR, EST-SSR, f-AFLP และ SuS จำนวน 27 , 1,039 , 675 และ 7 เครื่องหมายตามลำดับ พบว่าเครื่องหมายที่วิเคราะห์ลิ้งค์เกจได้มีจำนวนทั้งหมด 791 เครื่องหมายโมเลกุล จำแนกเป็นเครื่องหมาย gSSR, EST-SSR, f-AFLP และ SuS จำนวน 5 , 537, 246 และ 3 เครื่องหมายตามลำดับ เป็นเครื่องหมาย simplex ของ Phil6607 , เครื่องหมาย simplex ของ S6 และ double simplex จำนวน 373 , 298 และ 120 เครื่องหมายตามลำดับ เครื่องหมายที่วิเคราะห์ลิ้งค์เกจไม่ได้มีจำนวน 958 เครื่องหมายจำแนกเป็นเครื่องหมาย gSSR, EST-SSR, f-AFLP และ SuS จำนวน 22, 502, 429 และ 4 เครื่องหมายลำดับ เป็นเครื่องหมาย simplex ของ Phil6607 , เครื่องหมาย simplex ของ S6 และ double simplex จำนวน 444 , 395 และ 118 เครื่องหมายตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2

เครื่องหมายโมเลกุล simplex และ double simplex ที่สามารถวิเคราะห์ลิ้งค์เกจได้

| markers | No. of markers | | | | No. of linked markers | | | | No. of unlinked markers | | | |
|-----------------|----------------|----------|--------|-----|-----------------------|----------|--------|-----|-------------------------|----------|--------|-----|
| | gSSR | EST-SSRs | f-AFLP | SuS | gSSR | EST-SSRs | f-AFLP | SuS | gSSR | EST-SSRs | f-AFLP | SuS |
| simplex | | | | | | | | | | | | |
| Phil6607(lmxll) | 15 | 478 | 321 | 4 | 5 | 256 | 112 | 0 | 9 | 222 | 209 | 4 |
| S6(nnxnp) | 12 | 377 | 301 | 3 | 0 | 196 | 99 | 3 | 12 | 181 | 202 | 0 |
| double | 1 | 184 | 53 | 0 | 0 | 85 | 35 | 0 | 1 | 99 | 18 | 0 |
| simplex | | | | | | | | | | | | |
| Sum | 28 | 1,039 | 675 | 7 | 5 | 537 | 246 | 3 | 22 | 502 | 429 | 4 |
| Total | 1,749(100%) | | | | 791(45.2%) | | | | 958(54.7%) | | | |

ในงานวิจัยนี้ มีเครื่องหมายที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 791 เครื่องหมายจากทั้งหมด 1,749 เครื่องหมาย คิดเป็นอัตราส่วน 45.2% ของเครื่องหมายทั้งหมด ซึ่งมีอัตราส่วนของเครื่องหมายที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้เพิ่มขึ้นจากงานวิจัยของ Bhusudsawang (2007) ที่วิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด 701 เครื่องหมาย มีเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 230 เครื่องหมายโมเลกุลคิดเป็น 32.81% ของเครื่องหมายทั้งหมด และในงานวิจัยนี้สามารถเพิ่มจำนวนลิงค์เกจและกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจจากเดิม 70 ลิงค์เกจมี 6 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ เป็น 232 ลิงค์เกจมี 11 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้จำนวนเครื่องหมายโมเลกุลในการวิเคราะห์ลิงค์เกจมากขึ้นจึงสามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจได้เพิ่มขึ้น โดยพบว่า กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจที่ 1,2,3,4,5 และ 6 ในงานวิจัยของ Bhusudsawang (2007) สามารถจัดลงในกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจที่ได้ในงานวิจัยนี้ในกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ ที่ 3,5,4,9,8 และ 2 ตามลำดับ

จากงานวิจัยของ Grivet et al., 1996 ,pp.987-1000 , Ming et al., 2002 ,pp. 570-583, Garcia et al. ,2006 ,pp.298-314 และ Oliveira et al. ,2007,pp.189-208 มีอัตราส่วนของเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงค์เกจประมาณ 30 - 50% ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์ ในงานวิจัยนี้ ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 791 เครื่องหมาย คิดเป็นอัตราส่วน 45.2% ของเครื่องหมายทั้งหมด ซึ่งมีอัตราส่วนของเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากในงานวิจัยนี้และงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น ใช้ประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสปีชีส์ ทำให้ข้อผิดพลาดที่พบมีความแตกต่างทางพื้นฐานพันธุกรรมมาก การเข้าสู่ของไฮโมโลกัสโครโมโซมจึงมีความยากมากกว่าการเข้าสู่ของโครโมโซมที่เกิดจากการผสมตัวเองหรือผสมข้ามระหว่างพ่อแม่ที่มี

พื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงกันเช่น การผสมระหว่างอ้อยพันธุ์ปรับปรุง เครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้จึงมีจำนวนน้อย ส่งผลให้ออกาสของการตรวจสอบลิงค์เกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลลดลง ส่วนงานวิจัยที่มีเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวนมาก ซึ่งมีอัตราส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงค์เกจประมาณ 60 - 90% ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์ (Al-Janabiet al.,1993,pp.1249-1260 ; Da Silva et al.,1995,pp.165-169 ; Hoarau et al., 2001,pp. 84-97 ; Aitken et al.,2005,pp. 789-801) เนื่องจากประชากรลูกผสมที่ใช้เป็นประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมตัวเองหรือผสมข้ามระหว่างพ่อแม่ที่มีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงกัน

ผลรวมของความยาวแผนที่ทั้งหมด 232 ลิงค์เกจเท่ากับ 3,984 cM ซึ่งเพิ่มขึ้นจากงานวิจัยของ Bhusudsawang (2007) ที่ได้ผลรวมของความยาวแผนที่ทั้งหมด 3,604.6 cM จากลิงค์เกจทั้งหมด 70 ลิงค์เกจ ในงานวิจัยนี้ลิงค์เกจมีขนาดตั้งแต่ 0.7 cM (VI-120) ถึง 99.6 cM (V-92) ความยาวเฉลี่ยของกลุ่มลิงค์เกจเท่ากับ 17.17 cM มีระยะห่างระหว่างสองเครื่องหมายโมเลกุลตั้งแต่ 0.2 cM (VI-158) ถึง 43 cM (III-96) ค่าเฉลี่ยของระยะห่างระหว่างสองเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 7.13 cM เมื่อตั้งสมมุติฐานให้มีจำนวนโครโมโซม 100 - 120 โครโมโซม ค่าประมาณอัตราส่วนของแผนที่พันธุกรรมที่สร้างได้จากงานวิจัยนี้คิดเป็น 52.1-58.8% เมื่อเทียบกับขนาดประมาณของแผนที่พันธุกรรมอ้อยในงานวิจัยนี้

การวิเคราะห์กลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจ (Homologous Linkage analysis)

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด simplex และ double simplex ที่ได้จากเครื่องหมาย SSR, EST-SSR และ SUS เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งจำเพาะในจีโนม ดังนั้นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏหลายแถบจากการใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันในแต่ละลิงค์เกจจึงเป็นโลกัสเดียวกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์พบมี 219 ลิงค์เกจ จากทั้งหมด 232 ลิงค์เกจที่สามารถวิเคราะห์หากกลุ่มโฮโมโลกัสระหว่างกลุ่มลิงค์เกจได้ 11 กลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจ

ตารางที่ 4.3

ลิงค์เกจที่สามารถวิเคราะห์กลุ่มโฮโมโลกัสได้

| Homologous linkage | Phil6607 | S6 | Composite | Total number of |
|--------------------|----------|----|-----------|-----------------|
|--------------------|----------|----|-----------|-----------------|

| groups (HG) | (LG) | (LG) | map (LG) | linkage (LG) |
|----------------|------|------|-------------|--------------|
| 1.HGI | 9 | 8 | 1 | 18 |
| 2.HGII | 22 | 12 | 9 | 43 |
| 3.HGIII | 8 | 12 | 7 | 27 |
| 4.HGIV | 17 | 22 | 6 | 45 |
| 5.HGV | 12 | 8 | 1 | 21 |
| 6.HGVI | 11 | 6 | 3 | 20 |
| 7.HGVII | 8 | 12 | 5 | 25 |
| 8.HGVIII | 2 | 1 | 0 | 3 |
| 9.HGIX | 8 | 0 | 1 | 9 |
| 10.HGX | 4 | 0 | 0 | 4 |
| 11.HGXI | 0 | 3 | 1 | 4 |
| Sum | 101 | 84 | 34 | |
| Total | 219 | | | 219 |

จากการวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ พบว่าเครื่องหมายที่มีตำแหน่งจำเพาะ gSSR , EST-SSR และ SUS สามารถจัดกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้ทั้งหมด 11 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ ประกอบด้วยกลุ่มลิงค์เกจทั้งหมด 219 ลิงค์เกจ แบ่งเป็นกลุ่มลิงค์เกจที่เป็น Phil6607 จำนวน 101 ลิงค์เกจ , กลุ่มลิงค์เกจที่เป็น S6 จำนวน 84 ลิงค์เกจ และกลุ่มลิงค์เกจที่เป็นลิงค์เกจผสมระหว่าง Phil6607 , S6 และ double simplex จำนวน 34 ลิงค์เกจ ในแต่ละกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจประกอบด้วยลิงค์เกจตั้งแต่ 4 - 45 ลิงค์เกจ กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจที่ใหญ่ที่สุดประกอบด้วย 43 ลิงค์เกจมีเครื่องหมายจำนวน 160 เครื่องหมาย (HG-IV) กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจที่เล็กที่สุดประกอบด้วย 4 ลิงค์เกจ มีเครื่องหมายจำนวน 9 เครื่องหมาย (HG-XI) ซึ่งมีเพียงกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจเดียว และมีลิงค์เกจที่ไม่สามารถจัดกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้จำนวน 13 ลิงค์เกจ (ภาพที่ 4.3)

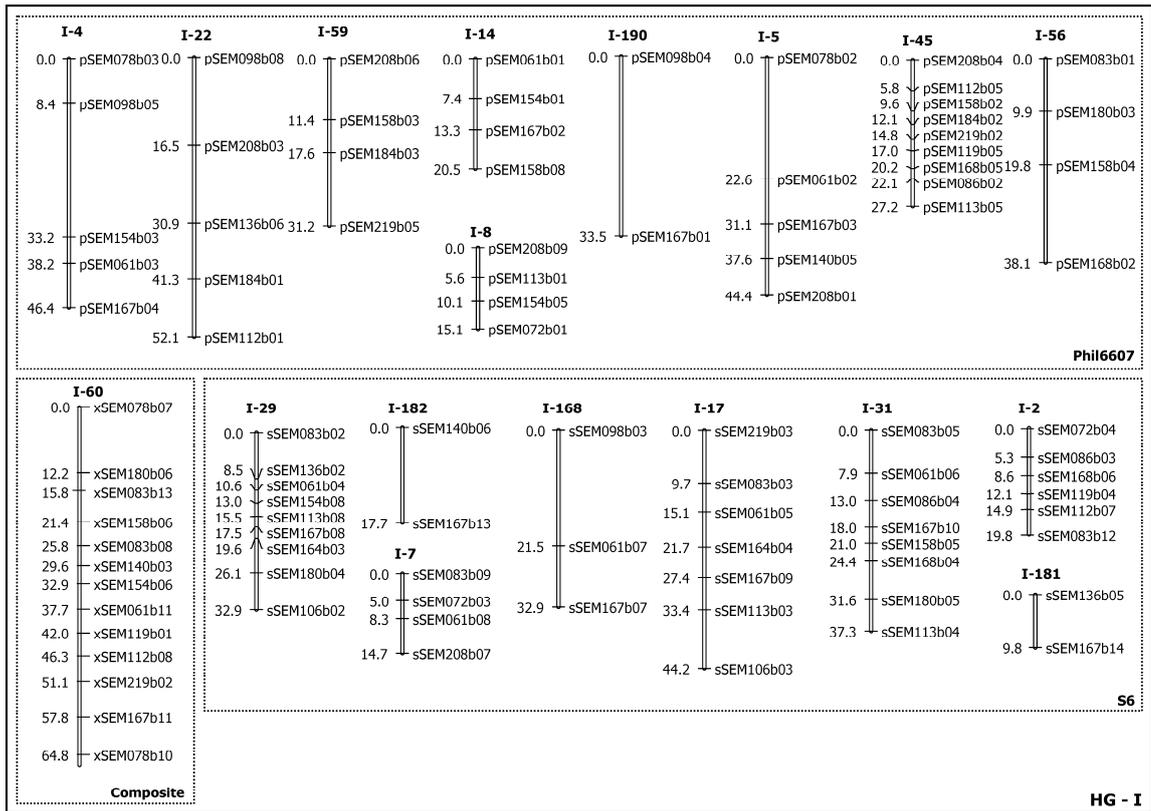
กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจของแผนที่พันธุกรรมย่อยที่วิเคราะห์ได้จากงานวิจัยที่ผ่านมา (Grivet et al.,1996,pp. 987-1000 ;Rossi et al. ,2003,pp.406-419 ;Aitken et al. ,2005,pp. 789-801 ; Reffay et al. ,2005,pp. 367-381 ;Garcia et al. ,2006,pp. 298-314 ; Oliveira et al. ,2007,pp.189-208) สามารถวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้ 10,7,8,8,12 และ 14 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ ตามลำดับ ซึ่งในแต่ละงานวิจัยวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจจากอ้อยที่มีสายพันธุ์พ่อแม่แตกต่างกัน ทำให้ชุดของโครโมโซมพื้นฐานต่างกันลูกผสมที่ได้จึงมี

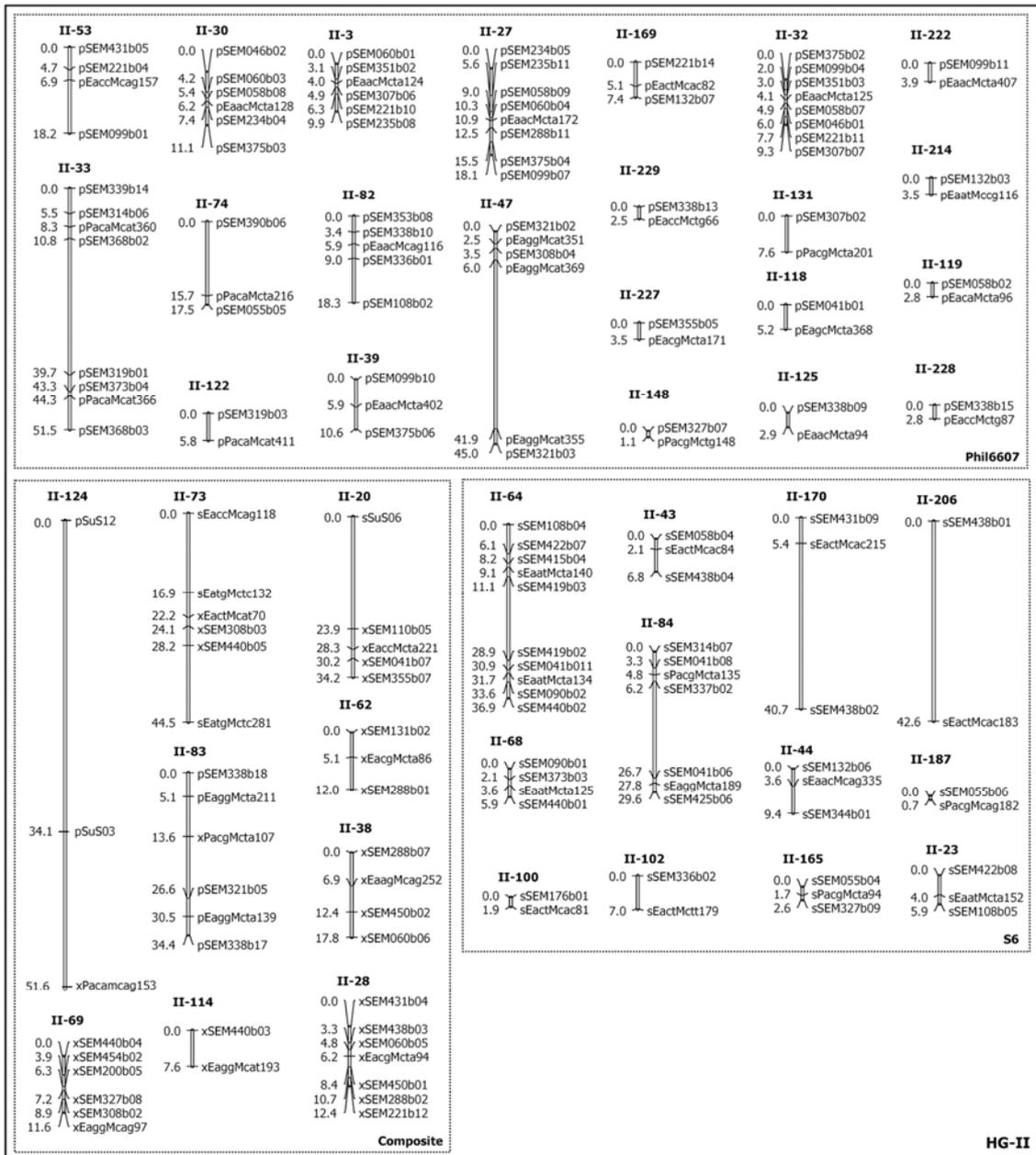
โครโมโซมอเนียวพลอยดีที่เกิดขึ้นขณะการเข้าคู่กันในการแบ่งเซลล์ไมโอซิส (Jannoo et al., 2004, pp. 460-467; Irvine, 1999, pp. 186-194) ในงานวิจัยนี้วิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้จำนวน 11 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากแผนที่พันธุกรรมเดิมในงานวิจัยของ Bhusudsawang (2007) ที่วิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้จำนวน 6 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ แสดงให้เห็นว่าจำนวนเครื่องหมายที่เพิ่มขึ้นในแผนที่พันธุกรรมที่สร้างได้ ช่วยในการวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจให้มีจำนวนใกล้เคียงกับกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจที่ควรจะเป็นคือ ตั้งแต่ 8 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจขึ้นไป (ภายใต้สมมุติฐานของ autooctaploid) โดยการวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจในงานวิจัยนี้ใช้เครื่องหมายที่มีตำแหน่งจำเพาะ (gSSR, EST-SSR และ SUS) ในการวิเคราะห์ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับงานวิจัยของ Oliveira et al. (2007, pp. 189-208) ซึ่งวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้จำนวน 14 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ

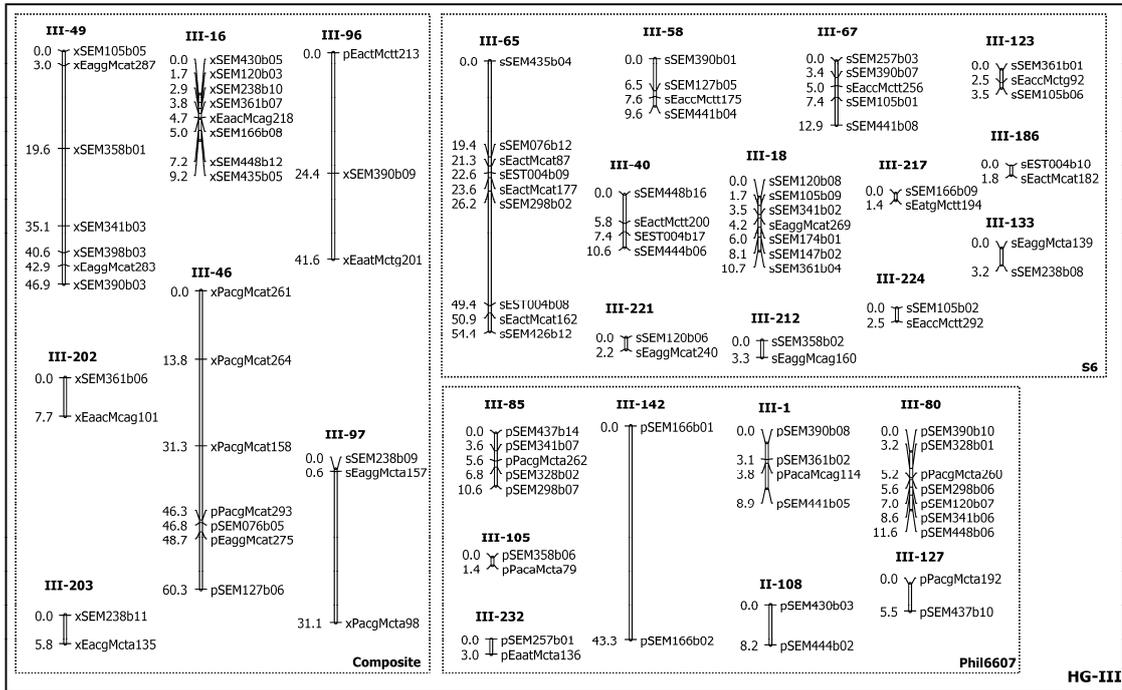
ภาพที่ 4.3

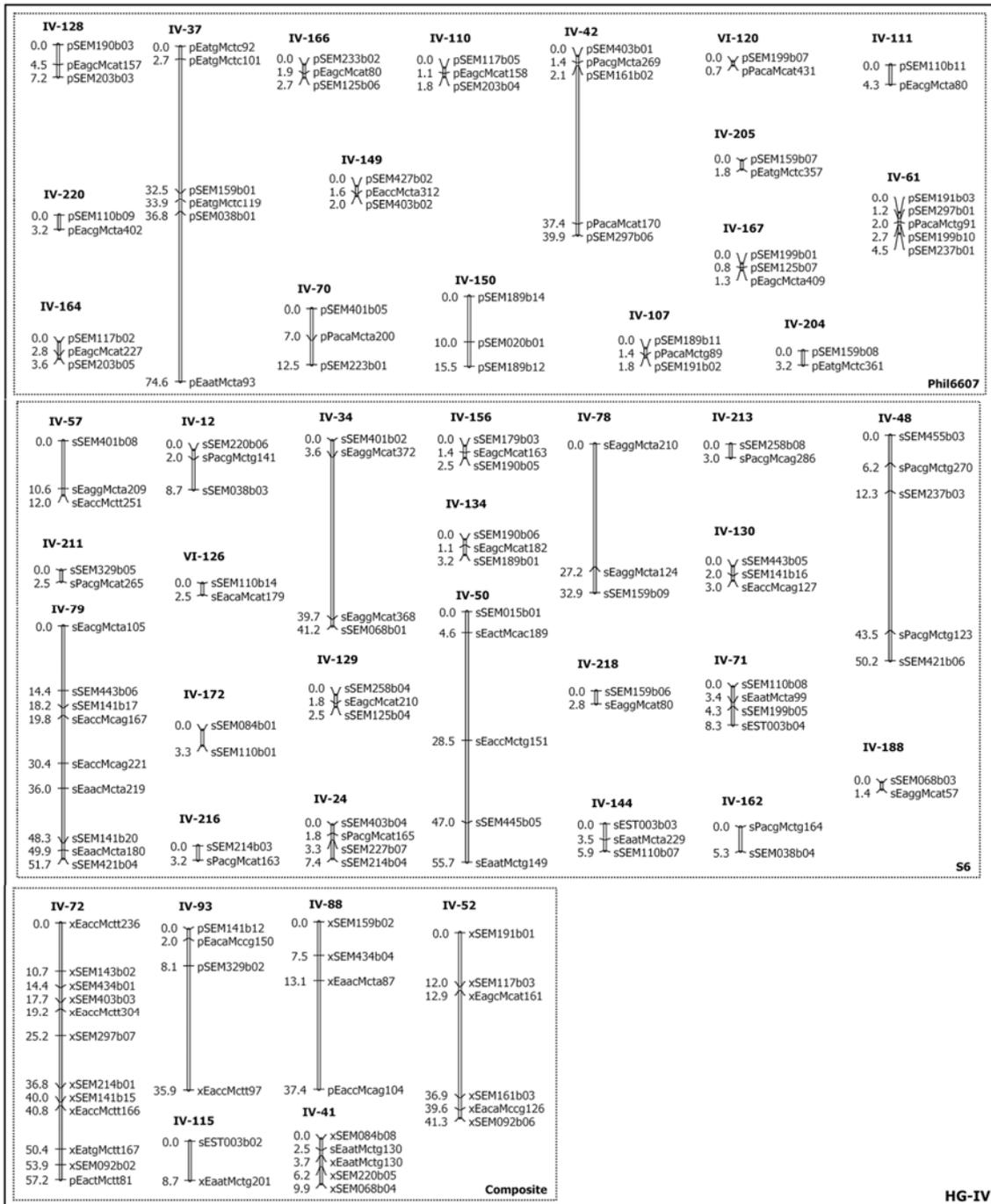
แผนที่พันธุกรรมย่อยที่สร้างจากประชากรลูกผสม F_1 จำนวน 283 สายพันธุ์ที่เกิดจากการผสมระหว่างอ้อยปรับปรุงพันธุ์ Phil6607 และ S6 (*S. spontaneum*) ประกอบด้วย 791 เครื่องหมายโมเลกุลของเครื่องหมาย simplex และ double simplex ระยะห่างในแผนที่มีหน่วยเป็น centi-Morgans (cM) โดยใช้ Kosambi function ; เครื่องหมายของ Phil6607 นำหน้าด้วยอักษร p ; เครื่องหมายของ S6 นำหน้าด้วยอักษร s ; เครื่องหมาย double simplex ใช้สัญลักษณ์ x

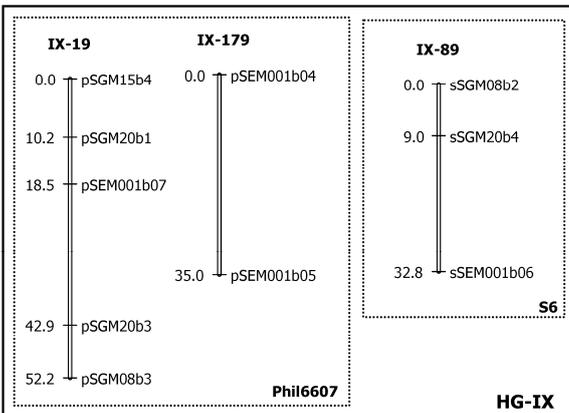
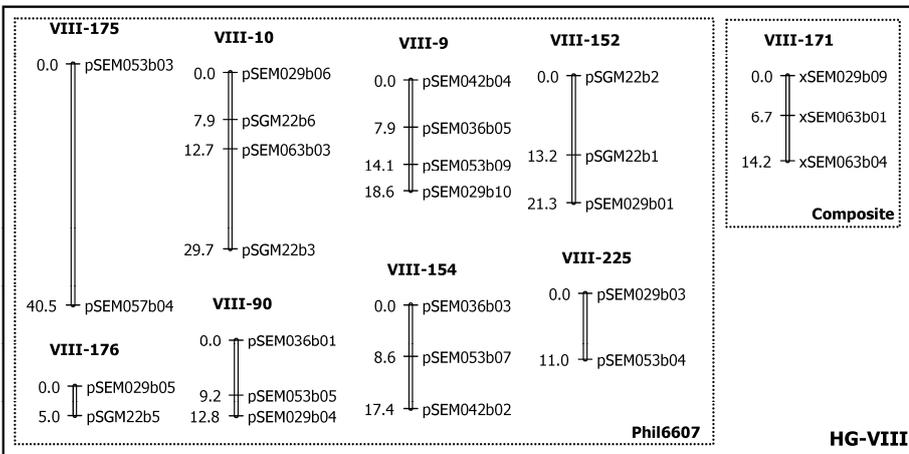
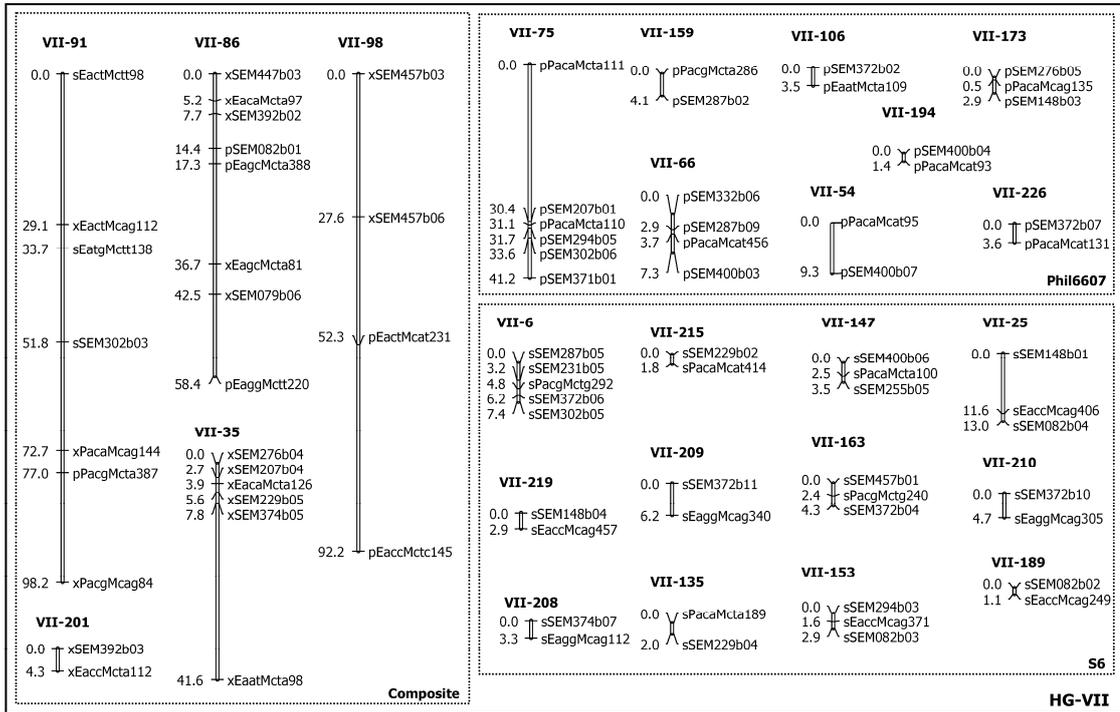
ด้านหน้า ; ตัวเลขโรมันหมายถึง หมายเลขกลุ่มไฮโมโลกัสลิงเกจของกลุ่มลิงเกจ ; HG หมายถึง กลุ่มไฮโมโลกัสลิงเกจ ; กรอบสี่เหลี่ยมแสดงกลุ่มไฮโมโลกัสลิงเกจ ; เส้นปะกรอบสี่เหลี่ยมแสดงลิงค์ เกจแยกตามชนิดของอัลลีลเครื่องหมาย

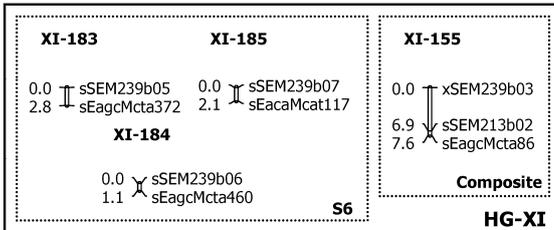
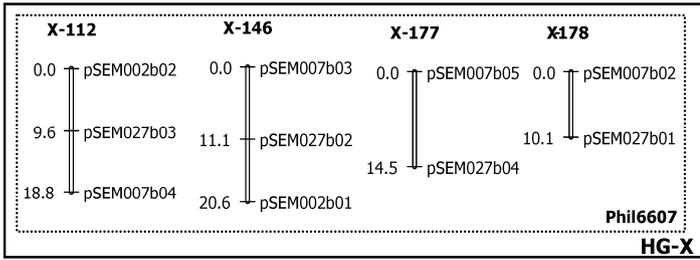




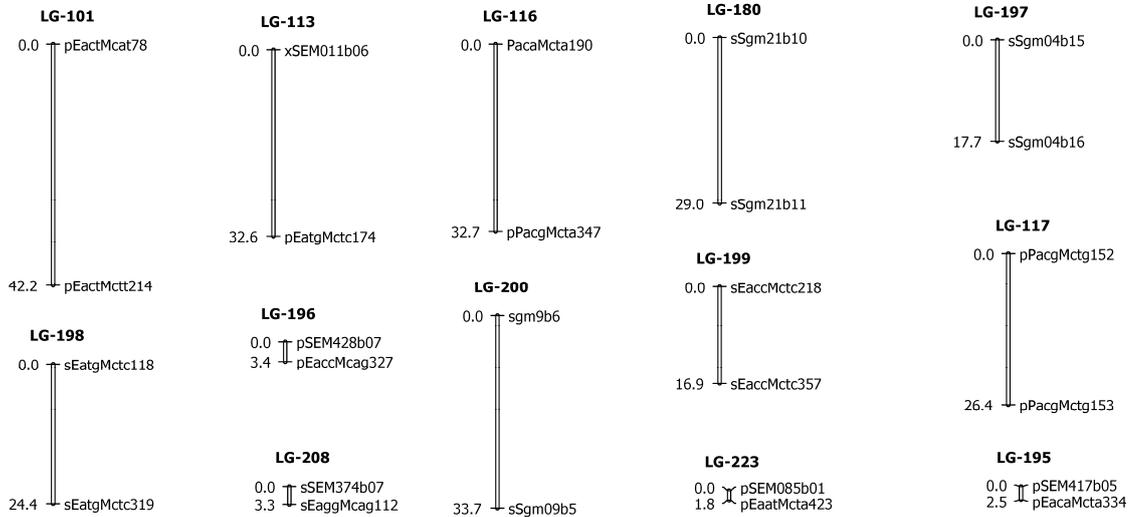








ลิงค์เกจที่ไม่สามารถจัดกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้
(Unassigned linkage)



หน้าที่คาดหมายของ EST-SSR ในแผนที่พันธุกรรม

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก EST (expressed sequence tag) เป็นการใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่มีการแสดงออกมาออกแบบไพรเมอร์ เพื่อวางเครื่องหมายโมเลกุลที่คาดว่าเป็นยีนลงในแผนที่พันธุกรรม ในงานวิจัยนี้ใช้ฐานข้อมูล SUCEST (the Sugarcane Expressed Sequence Tag project) ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาลำดับเบส EST-SSRs ที่ใช้วิเคราะห์เครื่องหมาย EST-SSR ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของเครื่องหมาย EST-SSR คือความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลต่อยีนที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ จากตารางที่ 4.4 พบว่า ลำดับเบส EST-SSRs ทั้งหมด 212 EST-SSRs มีลำดับเบส EST-SSRs จำนวน 186 EST-SSRs ที่วิเคราะห์ลิงค์เกจและกลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจได้ , มี EST-SSRs จำนวน 5 EST-SSRs ที่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจแต่ไม่สามารถวิเคราะห์กลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจ(unassigned) และอีก 21 EST-SSRs ไม่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจ(unlink) จากลำดับเบส EST-SSRs จำนวน 186 EST-SSRs ที่วิเคราะห์ลิงค์เกจและกลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจได้ พบว่าแบ่งเป็น EST-SSRs ที่ไม่มี ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลจำนวน 40 EST-SSRs , โปรตีนสมมุติฐาน (hypothetical protein) จำนวน 23 EST-SSRs และเป็น EST-SSRs ที่ทราบหน้าที่คาดหมาย (putitive function) จำนวน 123 EST-SSRs ซึ่งในจำนวนนี้พบเครื่องหมาย EST-SSR จำนวน 43 เครื่องหมาย ที่มีลำดับเบส EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจศึกษา 21 EST-SSRs (ตารางที่ 4.5) โดยแบ่งตามหน้าที่ของ ยีนได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล (sugarcane metabolism) จำนวน 6 EST-SSRs , ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค (disease response) จำนวน 11 EST-SSRs และยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (abiotic stress reponse) จำนวน 5 EST-SSRs ซึ่งพบเครื่องหมาย EST-SSR ที่เกี่ยวข้องกับยีนเหล่านี้กระจายอยู่ในกลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจที่ HG-II, HG-III, HG-IV, HG-VI และ HG-VII จำนวน 14 , 16 , 7 , 3 และ 3 เครื่องหมาย ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.3

แผนที่พันธุกรรมที่ได้ในงานวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบส EST-SSRs ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์กับงานวิจัยของ Oliveira et al. (2007,pp.189-208) ที่มี EST-SSRs ทั้งหมด 119 EST-SSRs เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบจาก EST-SSRs ที่มี cluster ที่เหมือนกัน พบว่า มี EST-SSRs ที่ cluster เหมือนกัน 18 cluster และมี 4 cluster ที่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจเดียวกันทั้งในงานวิจัยของ Oliveira et al. (2007) และงานวิจัยนี้ คือ 1) SCEQSD2077B12.g 2) SCMCRT2103A12.g 3) SCRLAD1139G03.g และ 4) SCEZHR1048C09.g ซึ่ง cluster ที่ 1 , 2 , 3 และ 4 มีหน้าที่คาดหมายเป็นโปรตีนสมมุติฐาน

(hypothetical protein) , *Lipid transfer protein-like protein* , EST-SSRs ที่ไม่มีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล และ เป็น *cysteine protease* ตามลำดับ และมี 2 cluster ที่พบทั้งในงานวิจัยของ Oliveira et al. (2007) และงานวิจัยนี้แต่ในงานวิจัยของ Oliveira et al. (2007) สามารถวิเคราะห์กลุ่มลิงค์เกจได้ คือ SCSGLV1008C05.g และ SCQGST1032E05.g ซึ่งมีหน้าที่คาดหมายเป็น *Fructose 1,6 bisphosphate aldolase* และ *Transcription factor TFIIb* ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบแผนที่พันธุกรรมที่ได้จากงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของ Oliveira et al. (2007) ยังพบว่า EST-SSRs ที่มีหน้าที่คาดหมายเหมือนกันแต่มีชื่อ cluster ต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็น EST ที่มาจาก mRNA ที่เป็นยีนเดียวกันแต่ถูกพัฒนามาจากคนละส่วนของ mRNA เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบจากหลักการดังกล่าวพบว่า ในงานวิจัยของ Oliveira et al. (2007) กับ งานวิจัยนี้ มี EST-SSRs ที่มีหน้าที่คาดหมายเหมือนกันแต่มีชื่อ cluster ต่างกัน จำนวน 4 ยีน คือ 1) หน้าที่คาดหมายยีน *sucrose synthase* เป็น cluster : SCCCLR1001A05.g ในวิจัยของ Oliveira et al. (2007) แต่เป็น cluster : SCRUSB1064F09.g ในงานวิจัยนี้ 2) หน้าที่คาดหมายยีน *Fructose-1,6-bisphosphatase* เป็น cluster SCAGLR1021D10.g ในวิจัยของ Oliveira et al. (2007) แต่เป็น cluster : SCSFAD1070E12.g ในงานวิจัยนี้ 3) หน้าที่คาดหมายยีน *diphosphate - fructose-6-phosphate 1 phosphotransferase* เป็น cluster SCCST1006B01.g ในวิจัยของ Oliveira et al. (2007) แต่เป็น cluster : SCSBST3094H07.g ในงานวิจัยนี้ 4) หน้าที่คาดหมายยีน *Sugar transporter family protein* เป็น cluster SCEZRZ1014H07.g ในวิจัยของ Oliveira et al. (2007) แต่เป็น cluster : SCJLST1019B07.g ในงานวิจัยนี้

จากงานวิจัยของ Oliveira et al. (2007) และงานวิจัยนี้พบว่าแผนที่ EST-SSR ที่ได้มีความแตกต่างกัน ประการแรกเนื่องมาจากการคัดเลือก EST ที่แตกต่างกัน ทำให้การพัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR ที่ได้มีความแตกต่างกัน ประการที่สองเนื่องมาจากการใช้ประชากรลูกผสมที่เกิดจากพ่อแม่ที่มีสายพันธุ์แตกต่างกันจึงแสดงโพลิมอร์ฟิซึมที่แตกต่างกันของเครื่องหมาย EST-SSR ดังนั้นแผนที่ EST-SSR ของงานวิจัยนี้จึงค่อนข้างมีความแตกต่างอย่างมาก จากวิจัยของ Oliveira et al. (2007) ในอนาคตถ้ามีการเพิ่มเติมเครื่องหมาย EST-SSR ให้มีจำนวนมากขึ้น ก็จะสามารถเปรียบเทียบแผนที่เครื่องหมาย EST-SSR ได้ดีขึ้น ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากต่อการวิเคราะห์ QTLs ของลักษณะที่สนใจจากแผนที่เครื่องหมาย EST-SSR จากงานวิจัยต่างๆ

ตารางที่ 4.4
เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR ในแต่ละกลุ่มไฮโมโลกส์ลิงค์เกจและหน้าที่ยีน (Putitive Function)

| HG-LG ^a | Marker ^b | Cluster ^c | Motif | Allele-type ^d | Putitive Function ^e | E-value |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|----------------|--------------------------|---|-----------|
| I-4,5,7,14,17,29,31,60,68 | SEM061 | SCEQAM1041H02.g | (ct)12 | p,s,x | putative zinc-finger protein | 1.00E-11 |
| I-2,7,8 | SEM072 | SCEQSD2075F10.g | (ag)14 | p,s | 30S ribosomal protein S17, chloroplast precursor | 0.081 |
| I-4,5,60 | SEM078 | SCEZRT2023F09.g | (ggt)5(atag)14 | p,x | ubiquitin-protein ligase-like | 4.00E-15 |
| I-2,7,17,29,31,56,60 | SEM083 | SCEZRZ3096G10.g | (atg)10 | p,s,x | mnb1a_maizedof zinc finger protein mnb1a | 5.00E-12 |
| I-2,31,45 | SEM086 | SCJFLR1035E04.g | (ga)10 | p,s | chitin-inducible gibberellin-responsive protein | 1.00E-81 |
| I-4,22,168,190 | SEM098 | SCJLRT1019D02.g | (tg)15 | p,s | Hit not found | |
| I-29 | SEM106 | SCMCCL6027C07.g | (tc)24 | s | hypothetical protein | 2.00E-10 |
| I-22,45,60 | SEM112 | SCMCST1057D03.g | (tc)14 | p,s,x | S-adenosylmethionine decarboxylase | 7.00E-31 |
| I-8,17,29,31,45 | SEM113 | SCPIRT3024F01.g | (ga)17(gga)5 | p,s | hypothetical protein | 8.00E-39 |
| I-2,45,60 | SEM119 | SCQSHR1020F04.g | (ct)16 | p,s,x | hypothetical protein OsI_018669 | 1.00E-35 |
| I-22136 | SEM136 | SCSBAM1085C09.g | (cgg)12 | p,s | Hit not found | |
| I-60 | SEM140 | SCSFAD1114H02.g | (at)23 | x | Hit not found | |
| I-4,8,14,29,60 | SEM154 | SCUTCL6035D02.g | (ct)14 | p,s,x | ribosomal protein L4/L1 family protein, expressed | 8.00E-133 |
| I-31,45,56,59,60 | SEM158 | SCVPCL6044A06.g | (ag)12 | p,s,x | Hit not found | |
| I-17,29 | SEM164 | SCVPLR2019H04.g | (ag)18 | s | Hit not found | |
| I-4,5,14,29,31,60,168,181,182,190 | SEM167 | SCVPRT2083D03.g | (gt)30 | p,s,x | Hit not found | |
| I-2,31,45,56 | SEM168 | SCVPRZ2037E02.g | (ct)11 | p,s | glycosyl hydrolase family 17 protein | 1.00E-42 |

| HG-LG ^a | Marker ^b | Cluster ^c | Motif | Allele-type ^d | Putitive Function ^e | E-value |
|---------------------|---------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------|--|-----------|
| I-22,45,59 | SEM184 | SCVPFL1073A11.g | (ga)10(ggc)7 | p | transcription elongation factor spt4 | 2.00E-46 |
| I-5,7,8,22,45,59 | SEM208 | SCACAM2044B11.g | (ca)8(ac)5 | p,s | phytoene synthase | 1.00E-76 |
| I-45,59,60 | SEM219 | SCMCAM2084A04.g | (cag)6(cag)5- (gca)5(cag)5 | p,x | zinc finger | 1.00E-32 |
| II-20,64,84,118 | SEM041 | SCCCRT2001B06.g | (ag)24 | p,s,x | Hit not found | |
| II-30,32 | SEM046 | SCCCST1002H09.g | (gct)11 | p | pi starvation-induced protein | 588 |
| II-74165187 | SEM055 | SCEPAM2057B09.g | (ct)15(ct)5 | p,s | zinc transporter | 1.00E-49 |
| II-27,130,32,43,119 | SEM058 | SCEPSB1130G10.g | (cacta)15 | p,s | sugar-starvation induced protein | 0.001 |
| II-3,27,128,30,38 | SEM060 | SCEQAM1041B03.g | (ag)12 | p,x | myb family transcription factor | 1.00E-53 |
| II-64,68 | SEM090 | SCJFRZ2010C01.g | (ag)17 | s | hypothetical protein | 9.00E-18 |
| II-27,132,39,222 | SEM099 | SCJLRT3076A02.g | (ta)12 | p | Hit not found | |
| II-23,64,82 | SEM108 | SCMCFL5008F03.g | (ag)10 | p,s | VP15 | 4.00E-30 |
| II-62 | SEM131 | SCRUFL4024B04.g | (ac)18(cgc)6 | x | type 1 non specific lipid transfer protein precursor | 1.00E-28 |
| II-44169214 | SEM132 | SCRURT2010E12.g | (ct)18 | s,p | rna recognition motif-containing protein | 1.00E-16 |
| II-100 | SEM176 | SCRFFL1029H06.g | (cctc)5(ct)10 | s | drb3 (dsrna-binding protein 3) double-stranded rna binding | 1.00E-55 |
| II-69 | SEM200 | SCEPAM1050A03.g | (tc)9 | x | cytochrome p450 | 5.00E-66 |
| II-3,28,32,53,169 | SEM221 | SCQGAM2028B01.g | (ccg)8 | p,x | ssxt protein containingexpressed | 1.00E-54 |
| II-27,30 | SEM234 | SCACCL6009D08.g | (acc)8 | p | family transcription factor containing protein, expressed | 6.00E-11 |
| II-3,27 | SEM235 | SCACCL6010C05.g | (tc)9 | p | gh3 like protein | 5.00E-34 |
| II-27,28,138,62 | SEM288 | SCACLR1057E07.g | (ca)8(ac)5 | p,x | ring-h2 finger proteinexpressed | 1.00E-140 |

| HG-LG ^a | Marker ^b | Cluster ^c | Motif | Allele-type ^d | Putitive Function ^e | E-value |
|----------------------|---------------------|----------------------|------------------|--------------------------|--|-----------|
| II-3,32,131 | SEM307 | SCJFLR1074A10.g | (ac)5(ca)9(ag)7 | p | Hit not found | |
| II-47,69,73 | SEM308 | SCJLLR1101F02.g | (gt)8 | p,x | Hit not found | |
| II-33,84 | SEM314 | SCVPLR1049G12.g | (ct)8(ct)5(cgc)7 | p,s | zinc transporter | 9.00E-56 |
| II-33122 | SEM319 | SCAGLR2026C05.g | (cgc)8 | p,x | Hit not found | |
| II-47,83 | SEM321 | SCQGLR2032D06.g | (ga)8(gc)5 | P | transcription factor | 3.00E-40 |
| II-69148165 | SEM327 | SCCART1001G10.g | (cct)8 | p,s,x | carrier protein | 1.00E-84 |
| II-82102 | SEM336 | SCJLRT1006C08.g | (at)5(aag)8 | p,s | ubiquitin-conjugating enzyme -like | 8.00E-45 |
| II-84 | SEM337 | SCJLRT1013F12.g | (ga)8 | s | Hit not found | |
| II-82,83,125,228,229 | SEM338 | SCJLRT1018G02.g | (ga)8 | p | nodulin21 familyexpressed | 5.00E-73 |
| II-33 | SEM339 | SCJLRT1019C06.g | (ag)8 | p | Hypoxia induced protein conserved region containing protein, expressed | 6.00E-18 |
| II-44 | SEM344 | SCEPRT2047A05.g | (ct)15 | s | putative enhancer of rudimentary | 6.00E-53 |
| II-3,32 | SEM351 | SCMCRT2085E08.g | (tg)8 | p | Hit not found | |
| II-82 | SEM353 | SCQSRT2033C08.g | (ttg)9 | p | reverse transcriptase family member | 1.00E-120 |
| II-20227 | SEM355 | SCSFRT2067E08.g | (ag)8 | p,x | Hypoxia induced protein conserved region containing protein,expressed | 8.00E-23 |
| II-33 | SEM368 | SCCZRZ2004C05.g | (gcg)9 | p | protein tyrosine phosphatase | 2.00E-84 |
| II-33,68 | SEM373 | SCVPRZ2038E05.g | (ccg)8 | p,s | hypothetical protein OsI_028313 | 1.00E-50 |
| II-27,30,32,39 | SEM375 | SCEPRZ3128D05.g | (ct)6(tc)9 | p | zinc ribbon 1 | 4.00E-20 |
| II-64 | SEM415 | SCMCST1050H06.g | (tc)8 | s | small gtp-binding proteinac3 | 8.00E-65 |

| HG-LG ^a | Marker ^b | Cluster ^c | Motif | Allele-type ^d | Putitive Function ^e | E-value |
|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------|--------------------------|---|----------|
| II-23,64 | SEM422 | SCSGST1072B03.g | (ag)8 | s | cytochrome p450 | 8.00E-32 |
| II-84 | SEM425 | SCSFAD1070E12.g | (gcc)5 | s | Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplast precursor (FBPase) | 2.00E-26 |
| II-28,53,170 | SEM431 | SCRUSB1064F09.g | (cgg)5 | p,s,x | putative sucrose synthase | 7.00E-40 |
| II-28,43,170,206 | SEM438 | SCQSRT2031C10.g | (tc)5 | x,s | NBS-LRR disease resistance protein homologue | 2.00E-16 |
| II-64,69,114 | SEM440 | SCACSB1117C07.g | (cgg)6 | s,x | putative Pathogenesis-related protein PR-1 | 2.00E-19 |
| II-28,38 | SEM450 | SCEZLB1006B07.g | (gcc)5 | x | Heat shock protein 81-1 | 5.00E-99 |
| II-69 | SEM454 | SCBFRZ2045E11.g | (ggc)5 | x | cold induced protein-like | 4.00E-26 |
| III-46,65 | SEM076 | SCEZHR1048C09.g | (gata)14 | p,s | cysteine protease | 3.00E-53 |
| III-18,49,-67,123,224 | SEM105 | SCMCAM1100G01.g | (ctttt)18 | s,x | retrotransposon protein, putative, unclassified, expressed | 6.00E-46 |
| III-16,18,80,118,221 | SEM120 | SCQSRT2032H08.g | (ccg)10 | p,s | putative protein | 1.00E-29 |
| III-58 | SEM127 | SCRLAD1139G03.g | (ag)23 | s | Hit not found | |
| III-8 | SEM147 | SCSGHR1070F11.g | (tcc)10 | s | crr7 (chlororespiratory reduction 7) | 1.00E-18 |
| III-16,217 | SEM166 | SCVPRT2080G09.g | (gt)22 | s | Hit not found | |
| III-18 | SEM174 | SCQGFL3059G12.g | (ta)11 | s | hypothetical protein | 3.00E-05 |
| III-133,203 | SEM238 | SCEPCL6029D06.g | (gcg)8 | p,s | protein kinase domain containingexpressed | 5.00E-15 |
| III-67,232 | SEM257 | SCEZFL5084A01.g | (tg)8 | p,s | Hit not found | |
| III-67,80,85 | SEM298 | SCCLLR1076A04.g | (ca)8 | p,s | gpi-anchored protein | |
| III-80,85 | SEM328 | SCCCRT1003H03.g | (cgg)8 | p | wd-40 repeat family protein | 3.00E-28 |
| III-18,48,80,85 | SEM341 | SCAGRT2041D09.g | (cgg)8 | p,s,x | cellulase containingexpressed | 3.00E-46 |
| III-105,212 | SEM358 | SCAGRT3048C12.g | (gaa)9 | p,s | Hit not found | |

| HG-LG ^a | Marker ^b | Cluster ^c | Motif | Allele-type ^d | Putitive Function ^e | E-value |
|-----------------------|---------------------|----------------------|------------------|--------------------------|---|-----------|
| III-1,49,58,80,96 | SEM390 | SCSGSB1005B12.g | (ag)8 | p,s,x | cytochrome p450 | 1.00E-57 |
| III-49 | SEM398 | SCEPSD1006D03.g | (ta)9 | x | Hit not found | |
| III-65 | SEM426 | SCVPAM1059C01.g | (at)5 | s | Sugar transporter family protein, expressed | 1.00E-14 |
| III-16,108 | SEM430 | SCBFSB1047F11.g | (ggc)5 | p,s | PREDICTED: similar to glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2 | 3.9 |
| III-16,65 | SEM435 | SCEZLB1007E12.g | (ta)7 | s | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative | 8.00E-07 |
| III-85,127 | SEM437 | SCJLRT1021D04.g | (tcc)5 | p | putative disease resistance response protein-related/dirigent protein-related | 6.00E-45 |
| III-1,58,67 | SEM441 | SCACSD1018E05.g | (gac)5 | p,s | disease resistance-responsive family protein, putative, expressed | 2.00E-24 |
| III-40,108 | SEM444 | SCRLAD1043B06.g | (ggt)7 | p,s | dehydration responsive element binding protein | 9.00E-13 |
| III-16,40,80 | SEM448 | SCEZFL5083C02.g | (gc)5 | p,s | low temperature and salt responsive protein-like | 4.00E-12 |
| III-65 | SEST004 | SCRLAD1040D08.g | (at)5 | s | early-responsive to dehydration protein, putative, expressed | 6.00E-59 |
| IV-50 | SEM015 | SCBGLR1119D12.g | (ta)26(at)5 | s | Hit not found | |
| IV-150 | SEM020 | SCCCL4004D08.g | (ataga)12 | p | NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K | 1.00E-100 |
| IV-12,-37,162 | SEM038 | SCCCLR1080G12.g | (ca)10 | p,s | putative WD-repeat containing protein | 0 |
| IV-188 | SEM068 | SCEQRT1032H07.g | (ta)6(ac)11(tc)6 | s | Hit not found | |
| IV-41 | SEM084 | SCEZSB1094A08.g | (tc)10 | x | Hit not found | |
| IV-52,72 | SEM092 | SCJFSB1010B12.g | (tc)10 | x | putative bZIP transcription factor | 7.00E-24 |
| IV-71,111,126,144,220 | SEM110 | SCMCRT2103A12.g | (at)12(tg)25 | p,s | cortical cell delineating proteinexpressed | 3.00E-24 |
| IV-52,110,164 | SEM117 | SCQGLV1018G08.g | (at)41 | p,x | putative nuclease I | 1.00E-71 |

| HG-LG ^a | Marker ^b | Cluster ^c | Motif | Allele-type ^d | Putitive Function ^e | E-value |
|-------------------------|---------------------|----------------------|-------------------|--------------------------|--|-----------|
| IV-72,79,93,130 | SEM141 | SCSFFL4083B01.g | (ac)16(ag)13(gt)5 | p,s,x | glutaredoxin-like family protein | 1.00E-43 |
| IV-72 | SEM143 | SCSFHR1045G08.g | (ct)9(ct)12 | x | Hit not found | |
| IV-37,78,88,204,205,218 | SEM159 | SCVPHR1089A09.g | (ag)13 | p,s,x | AF064707_1exhydrolase II | 1.00E-18 |
| IV-42,52 | SEM161 | SCVPHR1094C01.g | (agg)10 | p,x | putative auxin efflux carrier | 1.00E-37 |
| IV-156 | SEM179 | SCSBFL1101G01.g | (aaag)10 | s | protein kinase family protein | 1.00E-50 |
| IV-107,134,150 | SEM189 | SCJFAD1013E12.g | (agg)6(ggaa)8 | p,s | auxin efflux carrier | 3.00E-62 |
| IV-128134156 | SEM190 | SCRLAD1098A04.g | (ct)9 | p,s | Hit not found | |
| IV-52,61,107 | SEM191 | SCRLAD1138A05.g | (gcc)8(cca)5 | p,x | Hit not found | |
| IV-61,71,120,167 | SEM199 | SCEPAM1021B02.g | (tg)9 | p,s | falciparum resa-like protein withdomain | 1.00E-29 |
| IV-110164 | SEM203 | SCEQAM1036D03.g | (cgc)6(cgc)8 | p | wd40 repeat protein | 1.00E-171 |
| IV-72,216 | SEM214 | SCEQAM2037C11.g | (cag)8(cg)5 | s,x | Hit not found | |
| IV-12,41 | SEM220 | SCMCAM2084F10.b | (at)8 | s,x | scarecrow gene regulator | 2.00E-56 |
| IV-70 | SEM223 | SCSGAM2076E10.g | (tc)8 | p | rna polymerase iv second largest subunit | 8.00E-24 |
| IV-24 | SEM227 | SCCCCL3005D03.b | (ct)8 | s | putative GT-2 factor | 0.001 |
| IV-100 | SEM233 | SCCCCL4015B01.g | (tgt)8 | p | gene X-like protein | 4.00E-49 |
| IV-48,61 | SEM237 | SCEPCL6023G01.g | (gca)8 | p,s | hypothetical protein | 0.011 |
| IV-129,213 | SEM258 | SCEZFL5091D04.g | (cac)9 | s | TPA_exp: GRP21 | 7.7 |
| IV-42,72,149 | SEM297 | SCCCLR1075D10.g | (cgc)8(cac)6 | p,x | g-patch domain containingexpressed | 3.00E-104 |
| IV-93,211 | SEM329 | SCEQRT1025C10.g | (cgg)8 | p,s | beta--glucanase precursor | 3.00E-36 |
| IV-34,57,70 | SEM401 | SCMCSD1059G09.g | (ct)9 | p,s | alcohol dehydrogenase | 3.00E-100 |

| HG-LG ^a | Marker ^b | Cluster ^c | Motif | Allele-type ^d | Putitive Function ^e | E-value |
|--------------------|---------------------|----------------------|--------------|--------------------------|--|-----------|
| IV-48,79 | SEM421 | SCSGST1069F04.g | (gga)5(ctc)8 | s | hypothetical protein Osl_010647 | 1.00E-16 |
| IV-72,88 | SEM434 | SCSBST3094H07.g | (cga)6 | x | putative diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase | 3.00E-42 |
| IV-79,1130 | SEM443 | SCMCST1057C10.g | (gct)5 | s | putative disease resistance protein | 4.00E-49 |
| IV-48 | SEM445 | SCBGAD1027C03.g | (ggc)7 | s | Dehydration-responsive element-binding protein 2D (DREB2D protein) | 9.00E-15 |
| IV-71,144 | SEST003 | SCSFSB1097B02.g | (ta)8 | s | putative disease resistance protein I2 | 2.00E-14 |
| V-109 | SEM124 | SCRFLB1055F01.g | (tcc)11 | p | bet v i allergen-like | 4.00E-70 |
| V-51 | SEM195 | SCSGAD1008F08.g | (ggc)9(gag)5 | s | Hit not found | |
| V-36 | SEM211 | SCCCAM2001E04.g | (cgc)8 | s | hypothetical protein Osl_020099 | 7.00E-38 |
| V-109 | SEM232 | SCCCCL4014F09.g | (ga)8 | p | ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein | 1.00E-101 |
| V-87 | SEM246 | SCJLFL4097F08.b | (cg)5(gaaa)8 | p | hypothetical protein | 5.5 |
| V-145 | SEM250 | SCRLFL4109G12.g | (ga)8 | s | putative flavonol 4'-sulfotransferase | 5.00E-13 |
| V-51 | SEM254 | SCBGFL5080G03.g | (cgg)8 | s | uv-damaged dna-binding | 3.00E-92 |
| V-81 | SEM306 | SCJFLR1013A08.g | (cag)8(cag)9 | p | ccr4-not transcription complex subunit 7 | 2.00E-14 |
| V-132 | SEM310 | SCQGLR1019C10.g | (ga)8 | p | Hit not found | |
| V-132 | SEM313 | SCSGLR1084A02.g | (gcg)9 | p | bicoid-interacting 3 | 6.00E-52 |
| V-36 | SEM315 | SCACLR2007A01.g | (ca)5(ag)9 | s | hypothetical protein Osl_012959 | 1.00E-41 |
| V-140 | SEM320 | SCCCLR2002F05.g | (ag)9(ag)7 | p | Hit not found | |
| V-21 | SEM377 | SCEQRZ3020E12.g | (gcg)8 | p | pr4_phavuwound-induced basic protein | 3.00E-11 |

| HG-LG ^a | Marker ^b | Cluster ^c | Motif | Allele-type ^d | Putitive Function ^e | E-value |
|---------------------|---------------------|----------------------|--------------|--------------------------|--|-----------|
| V-81 | SEM391 | SCUTSB1033C02.g | (ag)8 | p | Hit not found | |
| V-36,63,193 | SEM407 | SCCCST1006B01.g | (cga)8 | p | pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase | 4.00E-69 |
| V-36 | SEM408 | SCJFST1048G04.g | (ga)9 | p,s | putative growth-regulating factor 6 | 5.00E-72 |
| VI-104 | SEM206 | SCVPAM1056A04.g | (tct)9 | p | lysine decarboxylase-like protein | 3.00E-86 |
| VI-11,103 | SEM215 | SCEZAM2033H10.g | (tc)8 | p,s | Hit not found | |
| VI-94,141 | SEM236 | SCCCCL6003H04.g | (ct)9 | | S-receptor kinase homolog precursor-like | 4.00E-04 |
| VI-157,160,161 | SEM263 | SCRLFL8053B05.g | (gga)5(gca)8 | p,s | hypothetical protein OsJ_008782 | 1.00E-12 |
| VI-94,231 | SEM271 | SCJFHR1034E09.g | (ccg)9 | p,x | acetylornithine deacetylase | 9.00E-77 |
| VI-151 | SEM273 | SCQSHR1022B03.g | (cat)9 | s | cdc2 protein kinases-like | 1.00E-126 |
| VI-26 | SEM275 | SCRUHR1074E09.g | (gag)9 | x | putative iron deficiency protein lds3 | 3.00E-12 |
| VI-11 | SEM279 | SCVPHR1092G06.g | (gt)8 | s | phospholipid transfer protein | 1.00E-19 |
| VI-160,161 | SEM282 | SCQGLB1038F11.g | (gcc)9 | p | 40s ribosomal protein s19 | 2.00E-75 |
| VI-94,99,174 | SEM285 | SCVPLB1020B05.g | (gcc)9 | p,x | 40s ribosomal protein s19 | 1.00E-75 |
| VI-76,141 | SEM290 | SCBGLR1002F11.g | (cgc)9 | s | 20s proteasome subunit pac1 | 5.00E-80 |
| VI-77,94 | SEM295 | SCCCLR1066F12.g | (tc)8 | p,x | Hit not found | |
| VI-158 | SEM349 | SCEQRT2099E08.g | (gca)8 | s,x | hga1-like protein | 6.00E-62 |
| VI-77,95,99,121,157 | SEM350 | SCJFRT2057F04.g | (gca)9 | p | ring-h2 zinc finger protein | 5.00E-51 |
| VI-76 | SEM366 | SCBFRZ2045C02.g | (ca)9 | s | Hit not found | |
| VI-15,26,77 | SEM412 | SCJLST1022C09.g | (ct)8(ga)7 | p,x | Hit not found | |
| VI-15,433 | SEM433 | SCJLST1019B07.g | (gc)6 | p,s | Sugar transporter family protein, expressed | 3.00E-70 |

| HG-LG ^a | Marker ^b | Cluster ^c | Motif | Allele-type ^d | Putitive Function ^e | E-value |
|--------------------|---------------------|----------------------|-------------------|--------------------------|--|-----------------------|
| VII-86 | SEM079 | SCEZRT2024C04.g | (ac)13 | x | Nitrilase-associated protein, putative, expressed | 1.00E-11 |
| VII-25,86,153,189 | SEM082 | SCEZRZ3017G04.g | (ga)12 | p,s | cbs domain-containing expressed | 6.00E-74 |
| VII-25,173,219 | SEM148 | SCSGLR1025D03.g | (tca)12 | p,s | Hit not found | |
| VII-35,75 | SEM207 | SCACAM2043G03.g | (gct)8 | p,x | leucine-rich repeat family protein | 3.00E-104 |
| VII-35,135,215 | SEM229 | SCCCCL4007E05.g | (cga)9 | s,x | putative diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase | 0 |
| VII-98 | SEM231 | SCCCCL4013B10.g | (cgt)5(gcg)9(cg)5 | p | lateral root primordia | 3.00E-40 |
| VII-147 | SEM255 | SCCCFL5062D10.g | (ag)8 | s | hypothetical protein OsI_008838 | 1.00E-16 |
| VII-35,173 | SEM276 | SCSFHR1043F12.g | (tg)5(tg)8(ag)5 | p,x | indeterminate spikelet 1 | 3.00E-96 |
| VII-6,66 | SEM287 | SCRULB2062C01.b | (ac)5(ac)9 | p,s | branched-chain amino acid aminotransferase | 9.00E-38 |
| VII-75,153 | SEM294 | SCCCLR1066D07.g | (cca)5(ccg)8 | p,s | hypothetical protein OsJ_014087 | 1.00E-12 |
| VII-6,75,91 | SEM302 | SCEPLR1008H10.g | (ggc)5(cgg)8 | p,s | Hit not found | |
| VII-66 | SEM332 | SCJFRT1009B09.g | (ggc)8 | p | rna recognition motif-containing | 2.00E-89 |
| VII-75,153 | SEM371 | SCJFRZ2034B06.g | (tg)9 | p,s | phosphatidate cytidylyltransferase family expressed | 5.00E-53 |
| VII-106,209,210 | SEM372 | SCVPRZ2036E01.g | (at)8 | p,s | hypothetical protein | 3.00E-14 |
| VII-86,201 | SEM392 | SCUTSB1075H09.g | (ta)8 | x | cytochrome p450 | 1.00E-59 |
| VII-66,147,194 | SEM400 | SCEZSD1081A02.g | (ccg)8 | p,s | Hit not found | |
| VII-86 | SEM447 | SCCCCL3001D10.b | (ccg)5 | x | putative cold shock protein-1 | 1.00E-29 |
| VII-163 | SEM457 | AY302083.1 | (tgc)6 | s | Saccharum hybrid cultivar soluble acid invertase (ShinvA) mRNA | <i>Saccharum</i> mRNA |

| HG-LG ^a | Marker ^b | Cluster ^c | Motif | Allele-type ^d | Putitive Function ^e | E-value |
|------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|---|-----------|
| VIII-9,10,90,152,171,176,225 | SEM029 | SCCCCL6005F10.g | (ct)21(ccg)7 | p,x | Probable mediator complex subunit SOH1 | 0.42 |
| VIII-9,90,154 | SEM036 | SCCCLR1078G05.g | (ta)12 | p | Hit not found | |
| VIII-9154 | SEM042 | SCCCRZ2004G11.g | (aag)7(ta)15 | p | hypothetical protein | 2.00E-18 |
| VIII-9,90,154,175,225 | SEM053 | SCEPAM1020C01.g | (ct)20(ct)20 | p | hypothetical protein OsJ_026388 | 2.00E-18 |
| VIII-175 | SEM057 | SCEPRT2048F09.g | (cag)11 | p | bag domain containing | |
| VIII-10,171 | SEM063 | SCEQHR1078A09.g | (ag)25 | p,x | Hit not found | |
| IX19,89,79 | SEM001 | SCEPRZ1008B02.g | (agc)10 | p,s | hypothetical protein | |
| X-112146 | SEM002 | SCACAD1035F09.g | (cg)7(ct)14 | p | glycosyl hydrolase family protein 17 | 6.00E-19 |
| X-112,146,177,178 | SEM007 | SCAGLB2047G03.g | (tttc)15 | p | Hit not found | |
| X-112,146,177,178 | SEM027 | SCCCCL6001F08.g | (ag)16 | p | cgi-125 protein | 3.00E-54 |
| XI-155 | SEM213 | SCCCAM2C08B11.g | (tc)5(tc)5(ct)5(ct)6 | s | Hit not found | 3.00E-34 |
| XI-155,183,184,185 | SEM239 | SCRLCL6030D09.g | (cag)6(cag)5 | x,s | hypothetical protein OsI_003665 | 3.00E-21 |
| Unassigned-113 | SEM011 | SCAGRT2041A11.g | (ta)8 | | hypothetical protein OsJ_018777 | 1.00E-11 |
| Unassigned-223 | SEM085 | SCJFAD1011F07.b | (ga)10(agag)5 | | putative pectin-glucuronyltransferase | 1.00E-37 |
| Unassigned-208 | SEM374 | SCCCRZ3003B01.g | (ag)9 | | mitochondrial carrier protein | 8.00E-50 |
| Unassigned-195 | SEM417 | SCQGST1032E05.g | (agga)9 | | transcription factor iib | 7.00E-114 |
| Unassigned-196 | SEM428 | SCSGLV1008C05.g | (cg)7 | | putative fructose-bisphosphate aldolase | 3.00E-07 |
| Unlink | SEM013 | SCBFAM2022D09.g | (gaaa)11 | | lysine decarboxylase-like protein | 3.00E-50 |
| Unlink | SEM014 | SCBGAM1091A05.g | (ta)10(cag)5 | | Hit not found | |
| Unlink | SEM016 | SCCCAD1003H03.g | (aag)15 | | harpin-induced protein 1 family (HIN1)-like | 5.00E-14 |

| HG-LG ^a | Marker ^b | Cluster ^c | Motif | Allele-type ^d | Putitive Function ^e | E-value |
|--------------------|---------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------|--|-----------|
| Unlink | SEM019 | SCCCCL4002A08.g | (gca)5(caa)13 | | ARFE_ORYSJAuxin response factor 5 | 1.00E-177 |
| Unlink | SEM024 | SCCCCL4015G07.g | (gc)8 | | Hit not found | |
| Unlink | SEM037 | SCCCLR1079D03.g | (ga)15 | | unknown protein | 1.00E-30 |
| Unlink | SEM080 | SCEZRZ3015G05.g | (ta)27 | | heavy meromyosin-like | 8.00E-19 |
| Unlink | SEM094 | SCJFST1014E07.g | (tc)10 | | Hit not found | |
| Unlink | SEM097 | SCJLLR1033A04.g | (cgt)10 | | ankyrin-like protein | 3.00E-17 |
| Unlink | SEM217 | SCEZAM2096F07.g | (ga)9 | | hypothetical protein | 3.00E-16 |
| Unlink | SEM261 | SCAGFL8042E05.g | (cgg)8 | | hypothetical protein | 1.00E-08 |
| Unlink | SEM265 | SCAGHR1018C11.g | (cca)8 | | Hit not found | |
| Unlink | SEM280 | SCCCLB1002D05.g | (ac)5(tac)8(ct)7-(act)5 | | peroxidase atp8a | 6.00E-147 |
| Unlink | SEM303 | SCEPLR1030D11.g | (agg)8 | | hypothetical protein | 8.00E-23 |
| Unlink | SEM367 | SCCCRZ2001C02.g | (ag)8 | | Hit not found | |
| Unlink | SEM369 | SCJFRZ2015A10.g | (ga)8 | | transcriptional coactivator-like protein | 2.00E-71 |
| Unlink | SEM418 | SCQGST1032G11.g | (gt)8 | | Hit not found | |
| Unlink | SEM427 | SCSBFL1105H11.b | (ca)6 | | putative dTDP-glucose 4-6-dehydratase | 1.00E-50 |
| Unlink | SEM451 | SCEZLB1007E12.g | (ta)7 | | light-dependent short hypocotyl 1 | 2.00E-46 |
| Unlink | SEM455 | SCSBRZ3122D09.g | (gga)6 | | water-stress protein-like protein | 4.00E-16 |

a : ตำแหน่งลิงค์เกจในกลุ่มไฮโมโลกส์ลิงค์เกจ b : ชื่อเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR c : หมายเลข Accession number จากฐานข้อมูล SUCEST (Sugarcane Expressed Sequence Tag project) d : ชนิด allele-type โดย p : phil6607 (lm x ll), s : S6 (nn x np), x : double simplex (hk x hk) e : putative Expected EST homology

ตารางที่ 4.5
EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจศึกษา

| Group of gene function | Cluster | HG-LG | Motif | Putative function | E-value |
|------------------------|-----------------|--------------------------------|--------|--|-----------------------|
| Sugarcane metabolism | SCSFAD1070E12.g | II-84 | (gcc)5 | Fructose-1,6-bisphosphatase | 2.00E-26 |
| | SCVPAM1059C01.g | III-65 | (at)5 | Sugar transporter family protein | 1.00E-14 |
| | SCRUSB1064F09.g | II-28,II-53,II-70 | (cgg)5 | putative sucrose synthase | 7.00E-40 |
| | SCJLST1019B07.g | VI-15 | (gc)6 | Sugar transporter family protein | 3.00E-70 |
| | SCSBST3094H07.g | IV-72 | (cga)6 | putative diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase | 3.00E-42 |
| | AY302083.1 | VII-98,VII-163 | (tgc)6 | soluble acid invertase | <i>Saccharum</i> mRNA |
| Disease response | SCEZLB1007E12.g | III-16,III-65 | (ta)7 | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative | 8.00E-07 |
| | SCJLRT1021D04.g | III-85,III-127 | (tcc)5 | disease resistance response protein-related | 6.00E-45 |
| | SCQSRT2031C10.g | II-43,II-170 | (tc)5 | NBS-LRR disease resistance protein homologue | 2.00E-16 |
| | SCACSB1117C07.g | II-64,II-68,II-69,II-73,II-114 | (cgg)6 | putative Pathogenesis-related protein PR-1 | 2.00E-19 |
| | SCSFSB1097B02.g | IV-71,IV-115 | (ta)8 | putative disease resistance protein I2 | 2.00E-14 |
| | SCACSD1018E05.g | III-1,III-58,III-67 | (gac)5 | disease resistance-responsive family protein | 2.00E-24 |
| | SCMCST1057C10.g | IV-79,IV-130 | (gct)5 | putative disease resistance protein | 4.00E-49 |
| | SCQGLR1041A05.g | III-174,VI-15,VI-104 | (ga)5 | putative stress-induced protein sti1 | 1.00E-31 |
| | SCRLAD1040D08.g | III-40,III-65,III-186 | (at)5 | early-responsive to dehydration protein | 6.00E-59 |
| | SCRLAD1043B06.g | III-40,III-108 | (ggg)7 | dehydration responsive element binding protein | 9.00E-13 |
| | SCBGAD1027C03.g | IV-48,IV-50 | (ggc)7 | Dehydration-responsive element-binding protein 2D | 9.00E-15 |

| Group of gene function | Cluster | HG-LG | Motif | Putative function | E-value |
|-------------------------|-----------------|---------------|--------|--|----------|
| Abiotic stress response | SCCCCL3001D10.b | VII-86 | (ccg)5 | putative cold shock protein-1 | 1.00E-29 |
| | SCEZFL5083C02.g | III-16,III-40 | (gc)5 | low temperature and salt responsive protein-like | 4.00E-12 |
| | SCEZLB1006B07.g | II-28,II-38 | (gcc)5 | Heat shock protein 81-1 | 5.00E-99 |
| | SCBFRZ2045E11.g | II-69 | (ggc)5 | cold induced protein-like | 4.00E-26 |

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

(Discussion)

การสร้างแผนที่พันธุกรรมที่กำหนดค่า LOD score มีความสำคัญต่อการสร้างกลุ่มลิงเกจของแผนที่พันธุกรรม จากงานวิจัยแผนที่พันธุกรรมอ้อยที่ผ่านมาพบว่าการกำหนดค่าการวิเคราะห์โดยใช้ค่า LOD score ตั้งแต่ 3 ถึง 9 และกำหนดค่า recombination fraction ตั้งแต่ 0.25 ถึง 0.35 (Al-Janabi et al., 1993, pp. 1249-1260 ; Da Silva et al., 1993, pp. 782-791 ; Mudge et al. 1996, pp. 1362-1366 ; Ming et al., 1998, pp. 1663-1682 ; Hoarau et al., 2001, pp. 84-97 ; Garcia et al., 2006, pp. 298-314) ในงานวิจัยนี้การวิเคราะห์แผนที่เครื่องหมาย simplex และ double simplex ใช้ LOD score ในการจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าตั้งแต่ 4 ถึง 15 เนื่องจากในการสร้างแผนที่พันธุกรรมของอ้อยมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเป็นจำนวนมากประกอบกับอ้อยเป็นพืชที่มีโครโมโซมมากกว่า 100 แท่ง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มระดับความเข้มงวดของ LOD score และการกำหนดค่า recombination fraction เท่ากับ 0.35 แม้เป็นค่าที่ค่อนข้างสูง แต่ในงานวิจัยนี้ใช้ประชากรสำหรับสร้างแผนที่พันธุกรรมเป็นจำนวนมากถึง 283 ต้น จึงสามารถหลีกเลี่ยงการเกิดลิงค์เกจแบบไม่แท้ได้

สำหรับจำนวนเครื่องหมาย double simplex ที่สร้างได้จะขึ้นกับความแตกต่างทางพันธุกรรมของพ่อแม่พันธุ์อ้อยที่ใช้ในการผสมเพื่อสร้างประชากรสำหรับทำแผนที่ ในงานวิจัยนี้มีเครื่องหมาย double simplex จำนวน 238 เครื่องหมาย จากเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดจำนวน 1,749 เครื่องหมาย คิดเป็นอัตราส่วน 13.6% ของเครื่องหมายทั้งหมด ในขณะที่งานวิจัยของ Garcia et al. (2006, pp. 298-314) มีเครื่องหมาย double simplex จำนวน 667 เครื่องหมาย จากเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดจำนวน 1118 เครื่องหมาย คิดเป็นอัตราส่วน 60% ของเครื่องหมายทั้งหมด ซึ่งมีความแตกต่างจากการทดลองนี้ เนื่องจากทั้งพ่อแม่ที่นำมาใช้ในงานวิจัยของ Garcia et al. (2006, pp. 298-314) เป็นพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงแล้วโดยการผสมกลับไปยังอ้อย *S. officinarum* ทำให้อ้อยพันธุ์พ่อแม่มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสเหมือนกัน จึงมีจำนวนเครื่องหมาย double simplex มากกว่างานวิจัยนี้ที่ใช้พ่อแม่พันธุ์อ้อยที่แตกต่างกัน คือ เป็นอ้อยสายพันธุ์ป่า *S. spontaneum* (S6) ผสมกับอ้อยพันธุ์ปรับปรุง *S. officinarum* (Phil6607) ทำให้มีจีโนไทป์ของเครื่องหมายที่แตกต่างกันมากคือมีทั้งจีโนไทป์โฮโมไซกัสผสมกับเฮเทอโรไซกัส

จากการวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกส์ลิงค์เกจที่ได้ในงานวิจัยนี้ พบว่าในทุกกลุ่มไฮโมโลกส์ลิงค์เกจจะประกอบด้วยลิงค์เกจขนาดเล็กที่มีเครื่องหมายจำนวน 2-3 เครื่องหมายเป็นจำนวนมาก (138 ลิงค์เกจ) ซึ่งการมีลิงค์เกจขนาดเล็กเป็นจำนวนมากนั้น สาเหตุประการแรกเนื่องจากการกระจายตัวของเครื่องหมายในแท่งโครโมโซมยังไม่สม่ำเสมอ จึงทำให้พบลิงค์เกจขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก ประการที่สองอาจมีสาเหตุมาจากการผสมข้ามระหว่างอ้อย 2 สปีชีส์ ที่มีชุดของโครโมโซมพื้นฐานต่างกัน คือ อ้อยพันธุ์ป่า *S. spontaneum* (S6) มีจำนวนชุดโครโมโซมพื้นฐาน $x = 8$ ส่วน Phil6607 เป็นอ้อยพันธุ์ปรับปรุง คาดว่าจะมีโครโมโซมมากกว่า 100 (Sreenivasan et al., 1987, pp. 211-254; Bremer, 1961, pp. 59-78; D'Hont et al., 1998, pp. 221-225) การมีโครโมโซมพื้นฐานแตกต่างกัน ทำให้การเข้าคู่ของไฮโมโลกส์โครโมโซมในช่วงการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสจะเข้าคู่กันได้ยากมากขึ้น ลิงค์เกจที่มีขนาดใหญ่อาจเกิดจากความชอบกันในการเข้าคู่ของไฮโมโลกส์โครโมโซมบางแท่ง ทำให้มีโอกาสที่เครื่องหมาย simplex เป็นจำนวนมากวิเคราะห์ลิงค์เกจได้ ขณะที่ลิงค์เกจขนาดเล็กอาจเกิดจากโครโมโซมบางแท่งที่มีความชอบกันน้อยในการเข้าคู่ของไฮโมโลกส์โครโมโซม จึงทำให้ลดโอกาสของการวิเคราะห์ลิงค์เกจของเครื่องหมาย simplex ทำให้ได้ลิงค์เกจที่มีขนาดเล็ก

นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นส่วนของโครโมโซม (duplication) ของเครื่องหมาย gSSR, EST-SSR และ SUS ที่เกิดจากไพรเมอร์คู่เดียวกันภายในลิงค์เกจเดียวกัน จำนวน 15 ลิงค์เกจ (I-60, II-33, II-47, II-64, II-83, II-84, III-142, IV-150, V-92, VII-98, VIII-179, IX-10, IX-152 และ IX-171) ซึ่งอาจมีสาเหตุจากความแตกต่างกันของสปีชีส์ทำให้การเข้าคู่กันของไฮโมโลกส์โครโมโซมเกิดความผิดปกติ เช่น การย้ายตำแหน่ง (translocation) หรือการเกิดการเพิ่มขึ้นส่วนของโครโมโซมในบริเวณใกล้เคียงเพื่อให้โครโมโซมสามารถเข้าคู่กันได้แบบสนิทที่สูงสุดขณะเกิดโครงสร้าง bivalent ในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่มีโอกาสพบมากในการผสมข้ามระหว่างสปีชีส์อ้อย (D'Hont et al., 1998, pp. 221-225; Jannoo et al., 2004, pp. 460-467)

การนำลำดับเบส ESTs ที่มีลำดับเบสซ้ำ มาใช้ในการสร้างเครื่องหมาย EST-SSR สามารถช่วยลดระยะเวลาและต้นทุนในกระบวนการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์อ้อยได้ เนื่องจากการใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่มีการแสดงออกและทราบหน้าที่คาดหมาย (putative function) ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญ ในงานวิจัยนี้พบ EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สนใจศึกษาในอ้อย จำนวน 21 EST-SSRs โดยแบ่งเป็น ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล (Sugarcane metabolism) จำนวน 6 EST-SSRs, ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค (Disease response) จำนวน 11 EST-SSRs และยีนที่เกี่ยวข้องกับ

การทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Abiotic stress reponse) จำนวน 5 EST-SSRs ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะ QTLs ที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบผลผลิตและความหวานของอ้อยได้

สรุปผลการทดลอง

แผนที่พันธุกรรมอ้อยสร้างจากประชากรลูกผสม F_1 จำนวน 283 สายพันธุ์ที่ได้จากการผสมข้ามสปีชีส์ระหว่างอ้อยพันธุ์ปรับปรุง Phil6607 และ อ้อยสายพันธุ์ป่า *Saccharum spontaneum* พันธุ์ S6 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล 4 ชนิดคือ 1) เครื่องหมาย simple sequence repeat (gSSR) จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ 2) เครื่องหมาย expressed sequence tags-simple sequence repeat (EST-SSRs) จำนวน 212 คู่ไพรเมอร์ 3) เครื่องหมาย fluorescent-amplified fragment length polymorphism (f-AFLP) จำนวน 35 คู่ไพรเมอร์ 4) เครื่องหมายจำเพาะต่อยีน sucrose synthase (SuS) ได้จำนวนเครื่องหมายทั้งหมดที่มีการกระจายตัวในประชากรลูกผสมมีจำนวน 1,749 เครื่องหมาย แบ่งเป็นเครื่องหมาย simplex ซึ่งมีอัตราการกระจายตัวของเครื่องหมายที่เกิดจากการผสมทดสอบ คือ 1:1 จำนวน 1,511 เครื่องหมาย และ double simplex ซึ่งมีอัตราการกระจายตัวของเครื่องหมายที่เกิดจากการผสมตัวเองของจีโนมไทป์เฮเทอไรซัส คือ 3:1 จำนวน 238 เครื่องหมาย

ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมกำหนดค่า LOD score ตั้งแต่ 4.0 – 15.0 ค่า recombination fraction เท่ากับ 0.35 คำนวณระยะห่างระหว่างเครื่องหมายด้วย Kosambi function วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ ทั้งหมด 232 ลิงเกจ ประกอบด้วยเครื่องหมายจำนวน 791 เครื่องหมาย แบ่งเป็นเครื่องหมาย gSSR จำนวน 5 เครื่องหมาย , เครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 537 เครื่องหมาย , เครื่องหมาย f-AFLP จำนวน 246 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย SuS จำนวน 3 เครื่องหมาย รวมความยาวกลุ่มลิงค์เกจทั้งหมดได้ 3,984 cM ความยาวของกลุ่มลิงค์เกจมีความยาวตั้งแต่ 0.4 - 100 cM มีระยะห่างเฉลี่ยระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 7.13 cM แผนที่พันธุกรรมที่สร้างได้คาดว่าจะครอบคลุมประมาณ 52.1- 58.8 % ของทั้งจีโนม เมื่อตั้งสมมุติฐานให้มีจำนวนโครโมโซม 100 – 120 โครโมโซม จากลิงค์เกจทั้งหมด 232 ลิงค์เกจ มี 219 ลิงเกจที่สามารถนำไปวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้ 11 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ โดยแบ่งเป็นกลุ่มลิงค์เกจจากโครโมโซม *S. officinarum* จำนวน 101 กลุ่มลิงค์เกจ กลุ่มลิงค์เกจที่มาจากโครโมโซม *S. spontaneum* จำนวน 84 กลุ่มลิงค์เกจ และกลุ่มลิงค์เกจจำนวน 34 กลุ่มมาจากโครโมโซมที่เกิดการรวมตัวกันใหม่ระหว่าง *S. officinarum* และ *S. spontaneum*

นอกจากนี้ยังพบว่าเครื่องหมายมี EST-SSR จำนวน 43 เครื่องหมาย ที่มีลำดับเบส EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจศึกษา โดยแบ่งตามหน้าที่ของยีนได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล (Sugarcane metabolism) จำนวน 6 EST-SSRs , ยีนที่

เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค (Disease response) จำนวน 11 EST-SSRs และยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Abiotic stress reponse) จำนวน 5 EST-SSRs ซึ่งพบเครื่องหมาย EST-SSR ที่เกี่ยวข้องกับยีนเหล่านี้กระจายอยู่ในกลุ่มไฮโมโลกัสลิงเกจที่ HG-II, HG-III, HG-IV, HG-VI และ HG-VII จำนวน 14 , 16 , 7 ,3 และ 3 เครื่องหมาย ตามลำดับ

บรรณานุกรม

บทความ

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. “วิธีการสร้างแผนที่จีโนมในอโตโพลีพลอย” วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ,(2548) : 52-69.

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. “เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)” , ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์,(2548) : 1-44.

เพ็ญจันทร์ ทิพย์มงคลเจริญ. “Development of EST-SSR markers by data mining from sugarcane ESTs” , ศูนย์ประชุมสิริกิติ์ : การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Bioasia ครั้งที่1 (2550) น. 55 .

อุดม พูลเกษ. “อ้อย พืชเศรษฐกิจ” วารสารเกษตรศาสตร์ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , (2527) : 52-64.

เอกสารอื่น ๆ

จเร สดากร.” การสำรวจรวบรวมพืชสกุลอ้อยในประเทศไทย” การสัมมนาเรื่อง แหล่งพันธุกรรมทางพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 2, กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สภาวิจัยแห่งชาติ (11-12 ตุลาคม 2527):64-66.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย,

<http://www.ocsb.go.th> (อัปเดตล่าสุด)

อภิชาติ วรรณวิจิตร. “การพัฒนาและประยุกต์ใช้เครื่องหมายกำกับหน้าที่ในการปรับปรุงพันธุ์พืช”
การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “Molecular Breeding Training Course” (25-26
เมษายน 2548) (อัครา)

Articles

Aitken, K.S., Jackson, P.A., McIntyre, C.L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homologous linkage groups in sugarcane cultivar. Theor Appl Genet 110 (2005) : 789-801.

Aitken, K.S., Jackson, P.A., McIntyre, C.L. Construction of a genetic linkage map for *Saccharum officinarum* incorporating both simplex and duplex markers to increase genome coverage. Genome 50 (2007) : 742-756.

Allen, P.A., Patterson, M.B. and Propper, R.E. Influence of letter size on age difference in letter matching. Plant . genome analysis 17(1994) : 11-18.

Al-Janabi, Sm., Honeycutt, R.J., McClelland, M., Sobral, BWS. "A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L, 'SES 208'." Genetics 134 (1993) : 1249-1260.

Anderson, J.A., Ogihara, Y., Sorrells, M.E., and Tanksley, S.D. "Development of chromosomal arm maps for wheat based on RFLP markers." Theor.Apple.Genet. 83 (1992) : 1035-1043.

Berding, N., and Roach, B.T. "Germplasm collection, maintenance, and use." In : Heinz D.J. (ed.) Sugarcane Improvement through Breeding. Elsevier, Amsterdam (1987) : 143-210.

Bender.W.,Spierer.p.,and Hogness.DS. "Chromosome walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *Rosy* loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*" Mol.Biol168 (1983) :17-33.

- Bhat, S.R., and Gill, B.S. "The implication of 2n egg gametes in nobilisation and breeding of sugarcane." Euphytica 34 (1985) : 377-384.
- Bishop, D.T., Cannings,C.,Sholnick,M. and Williamson , J.A." The number of polymorphic clones required to map human genome ." Genetics 168(1983): 351-362.
- Bonierbale, M.W., Plaisted, R.L., and Tanksley, S.D. "RFLP Maps Based on a Common Set of Clones Reveal Modes of Chromosomal Evolution in Potato and Tomato." Genetics 120 ;(1988) : 1095 – 1103.
- Bostein,D.,White,R.L.,Skolnick,M.and Davis,R.W."Construction of a genetic Linkage map in man using restriction fragment length polymorphism" Amer.J.Hum.Genet 32 (1980):314 -331.
- Bremer, G. "Problems in breeding and cytology of sugarcane. I. A short history of sugarcane breeding-the original forms of Saccharum." Euphytica 10 (1961a.) : 59-78.
- Bremer, G. "Problems in breeding and cytology of sugarcane. I. A short history of sugarcane breeding-the original forms of Saccharum." Euphytica 10 (1961b.) : 121-133.
- Bremer, G. "Problems in breeding and cytology of sugarcane. I. A short history of sugarcane breeding-the original forms of Saccharum." Euphytica 10 (1961c.) : 229-243.
- Bremer, G. "Problems in breeding and cytology of sugarcane. I. A short history of sugarcane breeding-the original forms of Saccharum." Euphytica 10 (1961d.) : 325-342.

- Bremer, G. "Problems in breeding and cytology of sugarcane. I. A short history of sugarcane breeding-the original forms of *Saccharum*." Euphytica 11 (1962) : 65-80.
- Bremer, G. "Problems in breeding and cytology of sugarcane. I. A short history of sugarcane breeding-the original forms of *Saccharum*." Euphytica 12 (1963) : 178-188.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. "DNA fingerprinting using very short primer" Plant Breeding (1992) : 18-25.
- Cordeiro, G.M., Taylor, G.O. and Henry, R.J. "Characterization of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum sp.*) a highly polyploidy species" Plant science 155 (2000):161-168.
- Cordeiro, G.M. "Molecular marker system for sugarcane germplasm analysis." In : Henry, R.J (ed.) Plant genotyping : the DNA fingerprinting of plants. CAB International (2001) : 129-146.
- Corderio, G.M., Pan, Y-B., Henry, R.J., "Sugarcane Microsatellites for the Assessment of Genetic Diversity in Sugarcane Germplasm." , Plant science 165 (2003) :181-189.
- D'Hont, A., Ison, D., Alix, K., Roux, C., and Glaszmann, J.C. "Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping RNA genes." Genome 41 (1998) : 221-225.
- Daniels, J., and Roach, B.T. "Taxonomy and evolution. In D.J. Heinz (ed.) Sugarcane improvement through breeding. Elsevier, New York (1987) : 7-84.

- Da Silva, JAG., Sorrells, ME., Burnquist, WL., Tanksley SD. "RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*." Genome 36 (1993) : 782-791.
- Da Silva, JAG., Honeycutt, RJ., Burnquist, WL., Al-Janabi, SM., Sorrells, ME., Tanksley, SD., Sobral, BWS. "*Saccharum spontaneum* L. 'SES208' genetic linkage map containing RFLP and PCR-based markers." Mol Breed 1 (1995) :165-169.
- Da Silva, J.A.G., and Sorrells, M.E. "Linkage Analysis in Polyploids using molecular markers." In : Jauhar, P.P. (ed.) Methods of genome analysis in plants CRC Press, New York (1996) : 211-228.
- Garcia, A.A.F., Kido, E.A., Meza, A.N., Souza, H.M.B., Pinto, L.R., Pastina, C.S., da Silva, J.A.G., Ulian, E.C., Figueira, A., Souza, A.P. "Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* Spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases" Theor Appl Genet 112 (2006) : 298-314.
- Gawel NL and Jaret RL. A modified CTAB DNA extraction procedure of *Musa* and *Ipomoea*. Plant Mol Bio. Rpt. 9 (1991) : 262-266.
- Gibum Yi, Je Min Lee, Sanghyeob Lee. "Exploitation of pepper EST-SSRs and SSR-based linkage map" Theor Appl Genet 114 (2006) : 113-130.
- Grassel, C.O. "Saccharum robustum and other wild relatives of noble sugarcanes." Journal of the Arnold Arboretum Harvard University 27(1946): 234-252.
- Grivet, L., D'Hont, A., Roques, D., Feldmann, P., Lanaud, C., and Glaszmann, J.C. "RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.)" Genetic 142 (1996) :987-1000.

Hoarau, J.-Y., Offmann, B., D' Hont, A., Risterucci, A.-M., Roques, D., Glaszmann, J.-Ch., and Grivet, L. "Genetics dissection of a modern sugarcane cultivar (saccharum spp.). I. Genome mapping with AFLP markers." Theor.Appl.Grenet.103 (2001) : 84-97.

Hoarau, J.-Y., Grivet, L., Offmann, B., Raboin, L.-M., Diorflar, J.-P., Payet J., Hellmann, M., D' Hont, A., and Glaszmann, J.-Ch. "Genetics dissection of a modern sugarcane cultivar (saccharum spp.). II. Detection of QTLs for yield components." Theor.Appl.Grenet. 105 (2001) : 1027-1037.

Hulbert, S.H., Illott, T.W., Legg, E.J., Lincoln, S.E., Lander, E.S., and Michelmore, R.W. "Genetic analysis of the fungus *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms." Genetics 120 (1988) : 947-958.

Jannoo, N., Grivet, L., D'Hont, A., Glaszmann, JC. "Differential chromosome pairing affinities at meiosis in polyploidy sugarcane revealed by molecular markers." Heredity 93 (2004) : 460-467.

Kam-Morgan, L.N.W., and Gell, B.S. "DNA restriction fragment length polymorphism : Strategy for genetic mapping of D genome of wheat." Genome 32 (1989) :724 - 732.

Karine M. Oliveira , Luciana R. Pinto , Thiago G. Marconi , Gabriel R. A. Margarido , Maria Marta Pastina , Laura Helena M. Teixeira , Antonio V. Figueira , Eugenio Cesar Ulian , Antonio Augusto F. Garcia , Anete Pereira Souza.
" Functional integrated genetic linkage map based on EST markers for a sugarcane (Saccharum spp.) commercial cross." Mol Breeding 20 (2007) : 189-208.

Hatch, M.D., and Glasziou K.T. "Sugar accumulation cycle in sugarcane. II. Relationship of invertase activity of sugar content and growth rate in storage tissue of plants growth in controlled environments." Plant Physiology 38 (1963) : 344-348.

Lende,R.and Thompson,R." Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantative trait." Genetics 124 (1990) :743-756.

Maneeruttanarungroj, C., Pongsomboon, and at. el., "Development of polymorphic expressed sequence tag-derived microsatellites for the extension of the genetic linkage map of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)." Animal Genetics 37(2006) : 363 - 368.

McCouch,S.R., Teyleman,L., and at el., "Development and mapping of 2,240 new SR markers for rice (*Oryza sativa* L.)." DNA Res 9 (2002) : 119-207.

Ming, R., Liu, SC., Lin, YR., Da Silva, J., Wilson, W., Braga, D., VanDeynze, A., Wenslaff, TF., Wu, KK., Moore, PH., Burnquist, W., Sorrells, ME., Irvine, JE., Paterson, AH. "Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: Comparative organization of closely related diploid and polyploidy genomes." Genetics 150 (1998) : 1663-1682.

Ming, R., Liu, SC., Bowers, JE., Moore, PH., Irvine, MJ., Paterson, AH. "Construction of a *Saccharum* consensus genetic map from two interspecific crosses." Crop Sci 42 (2002) : 570 - 583.

Morganate,M., and Olivievi,A.M., "PCR Amplification microsatellites as marker in plant Genetics." Plant J 3 ,(2001): 145-182.

- Mudge, J., Andersen, WR., Kehrer, R., Fairbanks, DJ. "A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*." Crop Sci 36 (1996) : 1362-1366.
- Paterson,A.H.,Lander,E.S.,Hewitt,J.D., Paterson,S.,Lincoln,S.E. and Tanksley, S.D ." Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphism ." Nature 335 (1988) : 721-726.
- Pinto LR,Oliveira KM,Ulian EC,Garcia AA,de Souza AP, " Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats." Genome 47 ,2004) :795-804
- Powell,W., Machray,G.C., and Provan,J., "Polymorphism revealed by simple sequence Repeats." Trends Plant sci 1 (1996) : 215-221.
- Price, S. "Cytogenetics of modern sugarcane." Economic Botany 17 (1963) : 97-105.
- Price,S. "Cytology of Chinese and North Indian sugarcane." Ecological Botany 22 (1968) : 155-164.
- Reffay N, Jackson PA, Aitken KS, Hoarau J-Y, D'HontA, Besse P, McIntyre CL "Characterisation of genome regions incorporated from an important wild relative into Australian sugarcane." Mol Breed 15(2005) : 367-381.
- Rossi, M., Araujo, PG., Paulet, F., Farsmeur, O., Dias, VM., Chen, H., Van Sluys, MA., D'Hont, AD. "Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane." Mol Gen Genomics 269 (2003) : 406-419.

Saiki , S.K., Scahrf, F., Faloona, S., Mullis, K.B., Hom, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.

"Enzymatic amplification of Bata-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science 10 (2003) : 1350-1354.

Scott, K.D., Eggler, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E.M., Lee, L.S., and Henry, R.J.,

"Analysis of SSRs derived from grape ESTs." Theor Appl Genet 100(2000): 723-726.

Shoemaker, C.B., "The Schistosoma mansoni phosphagen kinase gene contains two closely approach transcription initiation sites and arose from a fused gene duplication." Science 8 (1994) : 1-10.

Sledge M.K., I.M. Ray, G. Jiang. "An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.)." Theor Appl Genet 111(2005): 980-992.

Sreenivasan, T.V., Ahloowalia, B.S., and Hein, D.J. Cytogenetics. In: Heinz, D.J. (ed.)

"Sugarcane Improvement through Breeding." Elsevier, Amsterdam (1987) : 211-254.

Toth, G., Zoltan, G., and Jurkaet, J., "Microsatellites in different eukaryotic genomes : survey and analysis." Genomes Res 10 (2000) : 967-981

Ukoskit, K., and Thompson, P.G. "Autopolyploid versus allopolyploid and low density Randomly Amplified Polymorphic DNA linkage maps of sweetpotato."

J.Amer.Soc.Hort.Sci 122 (1984) :818-821.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. "AFLP : a new technique for DNA fingerprinting." Nucleic Acids Res 23 (1995) : 4407-4414.

Weeden, N.F. "Approaches to mapping in horticulture crops.: In : Gresshoff, P.M.(ed.) Plant genome analysis CRS Press, Inc. Fl. (1994) : 57-67.

Welsh, J.,and McClland,M."Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers." Acids Res 18 (1990) : 7213-7218

Wu, K.K., Burnquist, W., Sorrells, M.E. Tew, T.L., Moore, P.H., and Tanksley, S.D. "The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragment." Theor.Appl.Grenet. 83 (1992) : 294-300.

Zhu,H., Celinski,S.A., Scholiz,J.M., and H,J.C., "The contribution of buried polar groups to the conformational stability of the GCN4 Coiled-Coli.J. " Mol,Bio 300 (2000) : 1379-1389

Other Materials

Stam, P., Johan, W. van Ooijen. JoinMap (tm) version 3.0 : Softwqre for the calculation of genetic linkage maps. CIP-DTA KONINKLIJKE, DEN HAAG : Piet Stam and Johan W. van Ooijen, 1995.

วิทยานิพนธ์

กัลยารัตน์ ภู่อุดแสง.(2550). การวิเคราะห์แผนที่พันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต,มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์,คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงคู่ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่จากงานวิจัย Cordeiro et al. (2000,pp.161-168)

| SSR primers* | Fwd Sequence (5_ _ 3_) | Rev Sequence (5_ _ 3_) | Motif | Tm(°C) |
|--------------|------------------------|-------------------------|--------|--------|
| 1.MCS003B02 | TCTTCCTCGCCTCCGATGGC | GAACCGCAACCCGCAAGGAC | (GGC)5 | 62.4 |
| 2.MCS015B03 | CGAGTTCGACGAGGCATCTAC | CGATGTCGTTCCAGAAGAAGTG | (CAG)5 | 55.6 |
| 3.MCSA068G08 | CTAATGCCATGCCCCAGAGG | GCTGGTGATGTCGCCCATCT | (CAG)6 | 57.2 |
| 4.MCSA077C02 | CAACCACCTCGCTCGATTCTG | TGATGAGCCAGCAATCCTCCT | (AGG)8 | 59.1 |
| 5.MCSA175A08 | CAGGGGCAATGCTCGATGGA | TGACACGCATGGGGTTGTCG | (CGG)6 | 60.1 |
| 6.MCSA175G03 | CCATCGAGCAATCGAGCTGC | GTTTGACAGGCGGATGTTCTGA | (CGG)6 | 57.7 |
| 7.MCSA180E02 | CAACGACGCAGGATCGAACC | AGCAGGCACGACTTCCCAC | (CCG)5 | 59.5 |
| 8.YCS24.043 | CCAAAGCCCAACTGAAAGAGC | GAGGTTAGCGAAGTGGATCACG | (GCC)5 | 58.4 |
| 9.SMC222CG | TTTCACGAACACCCACCTA | AGGGACTAGCACACATTATTGTG | (CA)24 | 55.0 |
| 10.SMC226CG | GAGGCTCAGAAGCTGGCA T | ACCCTCTATTTCCGAGTTGGT | (CA)10 | 50.0 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางแสดงคู่ไพรเมอร์จำนวน 213 คู่ที่ใช้ในการสร้างเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR

| Primers | Accession ID | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (3'-5') | Tm (°C) |
|----------|-----------------|--------------------------|--------------------------|---------|
| 1.SEM1 | SCEPRZ1008B02.g | ACCATCGCAATCGATGTTTA | AACTGGATGGCGTACAATCA | 56 |
| 2.SEM2 | SCACAD1035F09.g | ACACCCGAGCTGTCCCAAT | GCATCTGATGAGCCTGTGAA | 56 |
| 3.SEM7 | SCAGLB2047G03.g | GGAAGGTATGGGTGCTATGC | ACAGGGCAATAACAGGGGTA | 58 |
| 4.SEM11 | SCAGRT2041A11.g | AGGGCTTGGAAAGAAAGGAAT | TGGCAAGCAACAGCTAAAAC | 58 |
| 5.SEM13 | SCBFAM2022D09.g | GCGAGAGAAGCTAGGAAGCA | CGCAGATCCTCTTGAACCTC | 62 |
| 6.SEM14 | SCBGAM1091A05.g | GAGCAACGAGCTGAAAAGTG | TGTCCTGACCTAGGATGTGC | 59 |
| 7.SEM15 | SCBGLR1119D12.g | TGTCCACAATTTTGGCTGAT | GTTGCTTGCCTGATCATTGT | 56 |
| 8.SEM16 | SCCCAD1003H03.g | CCTTCCTTGGCCTCTTCTCT | TGCTGGTCGCAGTACTTGAT | 58 |
| 9.SEM19 | SCCCCL4002A08.g | CAGCCCATTAAACCAAGCAAT | GAAGCAGCTGTTGCTCACTG | 58 |
| 10.SEM20 | SCCCCL4004D08.g | CCGGCTGTGAAAATTAGGTT | TCGAATTGGTCAAGACTCTCC | 58 |
| 11.SEM24 | SCCCCL4015G07.g | CAATTCGTGGCTTGTGTTTG | AGCAGAATCGGCAAGGTA | 58 |
| 12.SEM27 | SCCCCL6001F08.g | AGGTCTCGGCACTTGGAGTA | GATCGATCCTCCCTCTTTCC | 62 |
| 13.SEM29 | SCCCCL6005F10.g | GATCGATCCTCCCTCTTTCC | AGGTCTCGGCACTTGGAGTA | 62 |
| 14.SEM36 | SCCCLR1078G05.g | CCATGTGCAGCATTAAACAA | TGGACATGTAATGACTACTGC | 56 |
| 15.SEM37 | SCCCLR1079D03.g | CTTCCTGCTTGAACATTTG | ACGAGGTAGATCCCGAAGG | 56 |
| 16.SEM38 | SCCCLR1080G12.g | TGAATTGCACAAAACACCAA | GACGGTGTAACAAGCTGTGA | 55 |
| 17.SEM41 | SCCART2001B06.g | CCCCCTTGACACCTCTGTAT | TAGAACGAACCAGACGACCA | 59 |
| 18.SEM42 | SCCART2004G11.g | GACTTCGGGAAGAAGGAGGT | ACCAAGCACATCCAGCAGTA | 59 |
| 19.SEM46 | SCCCST1002H09.g | GCGGTCTGTAGTGGTAGAGC | TGATCCTCTGTTCTCACA | 59 |
| 20.SEM53 | SCEPAM1020C01.g | CCGCCTTCTCCTTAGTGACA | CCACAAGCCTAATACAGCTCAA | 62 |
| 21.SEM55 | SCEPAM2057B09.g | ACGGCATCAGATTCAGATCA | ATGGCTTCCATCTCGTGAC | 56 |
| 22.SEM57 | SCEPRT2048F09.g | TCCAGAAGTACGTGGAGACG | ACGACAGCAGGTGCAACAT | 56 |
| 23.SEM58 | SCEPSB1130G10.g | CCAACCAACCTCGACATTCT | CCATGTGATCTGACCTGGTG | 60 |
| 24.SEM60 | SCEQAM1041B03.g | TGCTAACACATTTCAAGAAAGAGA | GATCCAATCCGAGGAAAAGT | 58 |
| 25.SEM61 | SCEQAM1041H02.g | GTTCAGAACACGTGCAGCAT | CACGCTTGACATGAGAGGAA | 59 |
| 26.SEM63 | SCEQHR1078A09.g | GGTCGGTGCTCTGTTCTTTT | CCTGCAGCAGAGACGAGAT | 59 |
| 27.SEM68 | SCEQRT1032H07.g | CCCTGAGGTCTCTCTCCACT | TGCCATAGGACAAGAGTTTAAACA | 64 |
| 28.SEM72 | SCEQSD2075F10.g | GAACCTTATCGGTAGCCTCCT | GAGCGCCATAGGAGAAGTG | 58 |
| 29.SEM76 | SCEZHR1048C09.g | ATATGCCATGCACGTGTGAC | CAATGTAACCATCGCAGCAT | 58 |
| 30.SEM78 | SCEZRT2023F09.g | GTGGTCGACAGCAGAGGTC | CTCCGCATTAGCCATTTCC | 58 |
| 31.SEM79 | SCEZRT2024C04.g | GATGGAACAGATGCGACAAG | GTTTCATCGTAACCTGCTGGA | 58 |
| 32.SEM80 | SCEZRZ3015G05.g | GCAGATGAGAGGGCAAAAAGT | CGCCTGCAGATGAATCATAG | 59 |

| | | | | |
|----------|-----------------|----------------------|-----------------------|----|
| 33.SEM82 | SCEZRZ3017G04.g | AGTACAAGGCACAGCCAGAG | GGACATGAGGTACACCCAGA | 62 |
| 34.SEM83 | SCEZRZ3096G10.g | TCCTCCTCTTGTTCAGTTG | GTCGTCGTCACGATCATCTC | 58 |
| 35.SEM84 | SCEZSB1094A08.g | TGTAGCAATTCCTTGCGTTG | CAACAAATACAATGCCAATCG | 58 |
| 36.SEM85 | SCJFAD1011F07.b | CACCTAGTGAAGGGGCAAA | CCTGAAGCCTTGGTAGCATC | 59 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| Primers | Accession ID | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (3'-5') | Tm (°C) |
|------------|-----------------|------------------------|------------------------|---------|
| 37. SEM86 | SCJFLR1035E04.g | CGAGAACTAGCATAGCACAAGA | AACAACCTGGTGAAGTCCAT | 58 |
| 38.SEM90 | SCJFRZ2010C01.g | CGTGGGCTAATACAGCTCAA | CCCCTGGCACAATCTTCTT | 60 |
| 39.SEM92 | SCJFSB1010B12.g | TGTGCCGTTGCCAATAACA | GGCAAGCTTCTCAGTTTCTT | 56 |
| 40.SEM94 | SCJFST1014E07.g | TTATCTCTCCCTGCGGTCT | CTGGCTGGGGAGCAACTT | 56 |
| 41.SEM97 | SCJLLR1033A04.g | TTTGGGGTCTTAGTCCAG | GAAGACAGTGGACGAGGTCA | 59 |
| 42.SEM98 | SCJLRT1019D02.g | GCCAGCAGAATGCTTAACAA | TCTTACTCTGTCCCCAACCC | 58 |
| 43.SEM99 | SCJLRT3076A02.g | TTACCTCCGGCAACGTTAAA | TGCAGGCATATGGTAGTCCA | 56 |
| 44.SEM105 | SCMCAM1100G01.g | AGGGGCCTCAAGTTGTTCTT | CGGTCTCATGGTCACTTTT | 58 |
| 45. SEM106 | SCMCCL6027C07.g | AGGTTGCTGATGGTCTCAC | CAAGAAGGGAAGCAGGGACT | 62 |
| 46.SEM108 | SCMCFL5008F03.g | CGACTTGTGTGGAGGTGAAA | TGGATCAATGTGAACAAAATCG | 58 |
| 47.SEM110 | SCMCRT2103A12.g | GTCTCCTCCTCAACCACTGC | GTGGGTATGTAACCCATGC | 62 |
| 48. SEM112 | SCMCST1057D03.g | CCTTCTGCAGACGAGTTGAA | ACCTGACCAGCAAATCAACA | 58 |
| 49.SEM113 | SCPIRT3024F01.g | TTCCGGTTTACCCTGCATAG | TTCTCAGGGCCCTTTTATT | 58 |
| 50.SEM117 | SCQGLV1018G08.g | GCGTGGCACTGACTACAAGT | CAATGTTCTGTGGTCTGCACT | 56 |
| 52.SEM119 | SCQSHR1020F04.g | CCGCGTGTCTCTCTCTCT | ATTGCCATCACCTCATGCTT | 56 |
| 52.SEM120 | SCQSRT2032H08.g | TAGCAGCTCGATTACAGATT | ATCCTAGTGTGGTGGGTGCT | 58 |
| 53.SEM124 | SCRFLB1055F01.g | CCTTGATGTGCTTGACGAG | CCAACGAGCAAAAGTAAACG | 56 |
| 54.SEM125 | SCRFR13058D07.g | TATTCTCTCCGGATCCCTA | ATTCAAAGCGCAACACAGTC | 58 |
| 55.SEM127 | SCRAD1139G03.g | GCAGGATAAGCTTGGCAGTT | CTCAAGGCAAGGAACGAATC | 58 |
| 56.SEM131 | SCRUFL4024B04.g | AAAGGAAAGCAAACCAAGG | GCAGTCGTTGTCGTAGCAGA | 58 |
| 57.SEM132 | SCRURT2010E12.g | CCCTCCACCTCTTTGCTC | TAGAAAGACCTGCCCTCTG | 58 |
| 58.SEM136 | SCSBAM1085C09.g | CTCTGACCCGAGCAAAGG | GCCAATAAACAGCAGGGGTA | 56 |
| 59. SEM140 | SCSFAD1114H02.g | GTGTTTTGGAGACCGTGCA | CGATTGTTGCGCTGTACATC | 58 |
| 60.SEM141 | SCSFLL4083B01.g | ATCATCCACAGCTAGCAGCA | GGTTTTGCCTTGGTTTTGA | 56 |
| 61.SEM143 | SCSFHR1045G08.g | CCCCTCCTCCTCAGTCTTCT | CCATGCTGTGAGGATCCAC | 60 |
| 62.SEM147 | SCSGHR1070F11.g | GCCTCTCCTCCTCCACTC | GACGACCGTCCTTGTGAG | 58 |
| 63.SEM148 | SCSGLR1025D03.g | GCTACCGGATGGATAAAAGC | CTGACCGAAATGATCAAGGA | 56 |
| 64. SEM154 | SCUTCL6035D02.g | ACCGAGGTAGGAGGGAGTGT | GCTCGCCATGAATAGAAAGG | 58 |
| 65. SEM158 | SCVPCL6044A06.g | GGATGGTTAAAGCGGAAACA | GGAAACAGTGTACGCCAGT | 56 |
| 66.SEM159 | SCVPHR1089A09.g | CTGGTGGAAATAACTCGCTGA | CTCAAGGCAAGAACGAATCC | 60 |
| 67.SEM161 | SCVPHR1094C01.g | GAAGTCTCACTGGCTCCTC | GTAGAAGTCGTCGCCGTAA | 58 |
| 68. SEM164 | SCVPLR2019H04.g | GAGGTTATGGGAAACCAGA | GATTGCAGCCGTAAACTTGA | 56 |
| 69.SEM166 | SCVPRT2080G09.g | AGCGCATCTTGCTTATTGA | ATGCATGATCATCGAGGAAG | 56 |

| | | | | |
|-----------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----|
| 70.SEM167 | SCVPRT2083D03.g | CGGATCTTGGCTCCTTCTCT | AGCCTTGATTGGCAATGGTA | 58 |
| 71.SEM168 | SCVPRZ2037E02.g | AACGTCAGCCGCTACAACCTT | CTTCCCTTTTGC GAAGAAAA | 56 |
| 72.SEM174 | SCQGFL3059G12.g | CTCACC GCAGCTCTTTTCT | CACAAGCTATGCGGTCAAAA | 58 |
| 73.SEM176 | SCRFFL1029H06.g | CGCCATAACCATAACCACAG | CCTCCCTCCGCTACTTCTTA | 58 |
| 74.SEM179 | SCSBFL1101G01.g | TATCCACC GGGAACAAGAA | GGGATTGTAGCGACGAGTTG | 58 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| Primers | Accession ID | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (3'-5') | Tm (°C) |
|------------|------------------|------------------------|------------------------|---------|
| 75.SEM180 | SCSBFL1104E01.b | TTCCACATCAAGCAAGCAAG | ATGACATCAGGAGGGAGACC | 58 |
| 76.SEM184 | SCVPFL1073A11.g | ACCAACGC GACGAGAGAG | GCCTGAACTGGTCGTAGGTC | 58 |
| 77.SEM189 | SCJFAD1013E12.g | GAAGTGTCTACTGGCTCCTC | GTAGAAGCCGTCGCCGTAA | 59 |
| 78.SEM190 | SCR LAD1098A04.g | CTAGCACGGCAATACAGGC | AGATCTGTTGGGTGCTCGTC | 59 |
| 79.SEM191 | SCR LAD1138A05.g | CCAGTCGCGATTCTCCAC | AAGGGACGGGGAGAAAAATA | 55 |
| 80.SEM195 | SCSGAD1008F08.g | CTTCCCGTCGCTTTACCT | CTCCTCCTCCTCTCCAC | 60 |
| 81.SEM199 | SCEPAM1021B02.g | CTCTCGAGGAGGTGGATGAG | CTGCAAGTTTGGTGGCTGAA | 56 |
| 82.SEM200 | SCEPAM1050A03.g | CTGCAGGATCACCTGGAAC | TAAACCCACGCTGACAGACA | 56 |
| 83.SEM203 | SCEQAM1036D03.g | GCGGCCTCATACTGTAGAT | TCTTTCCCTCACCAGAAA | 56 |
| 84.SEM206 | SCVPAM1056A04.g | CATGGTAGCTCCGCTTCTTC | GCGAGAAGCTAGGAAGCACA | 59 |
| 85.SEM207 | SCACAM2043G03.g | GGCACACCTCGAGAGACC | ACTCCTCCTCCTCGCTTAGG | 60 |
| 86.SEM208 | SCACAM2044B11.g | TGAAGACGATGATGGATGA | TCTGTTTGGCTCCTCCGTCT | 56 |
| 87.SEM211 | SCCCAM2001E04.g | CGGTCGTCTTCTCCTCCTC | CTACTACCACCCGGACCAGA | 59 |
| 88.SEM213 | SCCCAM2C08B11.g | CTCTCCGACTCGTCTTCCAC | GCGGACTGCAAAGAGAGAT | 56 |
| 89.SEM214 | SCEQAM2037C11.g | ATCGGCTCCAGTCAGAGAGA | CCTGGTGAAGGCTCATGATT | 59 |
| 90.SEM215 | SCEZAM2033H10.g | GCCGAAGAGGAATCTACGAG | GTTTGTCTTCTCCTGTGC | 56 |
| 91.SEM217 | SCEZAM2096F07.g | CACGGGGAGACGAGAGAC | CCAACAACAACCAGAAATATCG | 54 |
| 92.SEM219 | SCMCAM2084A04.g | AAGTACGGAGCGCAGTGTAG | ACCGCCTTGTACTCCAATC | 56 |
| 93.SEM220 | SCMCAM2084F10.b | AAGCTCCTTGCTGCTACTC | CAAAGGCATCCTTTCTGAT | 55 |
| 94.SEM221 | SCQGAM2028B01.g | GCCTCTCTGCTCAGCCTA | CTCCTCATCTCTCGCCAAA | 56 |
| 95.SEM223 | SCSGAM2076E10.g | CACAGCACTTGCCAAGCTAA | AGTTTCAACAAGGGCGACTG | 56 |
| 96.SEM227 | SCCCCL3005D03.b | GCTACAGTGCCTCTCCCTCT | CTAGAAGCAGAAGTGGAGTGCT | 59 |
| 97.SEM229 | SCCCCL4007E05.g | AGAACCACAACCACCAGGAG | ACAGTTGAATAGGCCGGATG | 58 |
| 98.SEM231 | SCCCCL4013B10.g | CCGTTCTACACCTCCAACAT | GACCGTGACCATCTGCTG | 57 |
| 99.SEM232 | SCCCCL4014F09.g | CAACTCCAGCTCCAGTCTCC | CTTTTGCGAAGTGAACACA | 58 |
| 100.SEM233 | SCCCCL4015B01.g | TTGCTTGGGACAAAAGGCTA | ATCTTGCAAAGGAAGGAGCA | 55 |
| 101.SEM234 | SCACCL6009D08.g | GGACATGCTGCTCCCTACAT | AGGAGGACTGGTGGTTGAGG | 60 |
| 102.SEM235 | SCACCL6010C05.g | CATCGGCTCATCATAACGAA | AGCTACTTCAGCCCCAAGTG | 55 |
| 103.SEM236 | SCCCCL6003H04.g | CCCTTTGCTTCCCCTTACT | GAGGCGCCTTACTGTTCTTG | 56 |
| 104.SEM237 | SCEPCL6023G01.g | AGGGAAAGAGACGAGGGAGA | CGTATCTCCGACCACTCCAC | 59 |
| 105.SEM238 | SCEPCL6029D06.g | CTCTCCCCAACTCTCTCTG | TCCGACGTCAACGTCTCAG | 59 |
| 106.SEM239 | SCR LCL6030D09.g | CGAGAAACCGTGTCCCTA | CCCTCTCCTCTTCTCCT | 59 |

| | | | | |
|------------|-----------------|----------------------|----------------------|----|
| 107.SEM246 | SCJLFL4097F08.b | AATCGATCTTAGGGCCGGTA | ACGCCGACGAGTGAGGAC | 58 |
| 108.SEM250 | SCRLFL4109G12.g | ACGACTGTTTGTTCGTGCTC | TCAAAGGGGCTATCTTGCT | 55 |
| 109.SEM254 | SCBGFL5080G03.g | ACCTTACAGAGCCCCTGCT | TCGCGATAATGAGATTGAGC | 59 |
| 110.SEM255 | SCCFL5062D10.g | CGGCGTCCACTGAAAGAG | CAGCCTCGAGTTGGGATG | 56 |
| 111.SEM257 | SCEZFL5084A01.g | TGCTGGAGACGGAGTAGCTT | ATCAGGCAAGCACACAATCA | 57 |
| 112.SEM258 | SCEZFL5091D04.g | GGAAGAGGAGGCTTCGAGAT | CTGGATAATCACGCCCAAAT | 55 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| Primers | Accession ID | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (3'-5') | Tm (°C) |
|------------|-----------------|------------------------|------------------------|---------|
| 113.SEM261 | SCAGFL8042E05.g | CCATCCATCCTCTCATCTCC | AAGAGTGCTTGAGCGGATCT | 56 |
| 114.SEM263 | SCRLFL8053B05.g | AGCCTCTGACGCTAAGATCC | CACACGCTGCAGATGTTGTT | 56 |
| 115.SEM265 | SCAGHR1018C11.g | ACACTAGCTAGCCAGCCACA | GAAGCGAGGCTATGGCTATG | 57 |
| 116.SEM271 | SCJFHR1034E09.g | AGCAGATTCACCTCGCCACT | CGATGAGCTTGAGAGGAG | 55 |
| 117.SEM273 | SCQSHR1022B03.g | TTTCTTTTCGTACACCCAAT | ACTCCCGTCACTCACCTGAC | 55 |
| 118.SEM275 | SCRUHR1074E09.g | TTCATCGGATTCACACACA | GGGCAGCTTCGTAATGGT | 55 |
| 119.SEM276 | SCSFHR1043F12.g | AACCCGTTCTTCTCCCTA | CAGAGGAGATTTGCCATGT | 55 |
| 120.SEM279 | SCVPHR1092G06.g | AACCTAAACGACGACGATGG | AGCGAGGAAACGTCGTACAT | 58 |
| 121.SEM280 | SCCCLB1002D05.g | ATGGAGCTCCGCTTCTTGT | AGTACCGTAGTTGGGGTTG | 54 |
| 122.SEM282 | SCQGLB1038F11.g | GAACCTCGCAGTTCACAA | CACTACCTGCCTTCTCTCG | 56 |
| 123.SEM285 | SCVPLB1020B05.g | TCCTGAACCTCGCAGTCTT | CTACCTGCCTCTCTCGTTCC | 54 |
| 124.SEM287 | SCRULB2062C01.b | CCAATTCAACAAGCATCGAG | GGGAGGACATGAAGTCTGGT | 59 |
| 125.SEM288 | SCACLR1057E07.g | TCCGATCACAATCACAGACC | GCTGCAGCAGATGACAACT | 58 |
| 126.SEM290 | SCBGLR1002F11.g | AAACGCAACCCCTATCTCG | GCTTGAGGTCACCTTCTTC | 55 |
| 127.SEM294 | SCCCLR1066D07.g | CCATACCCTGTACCGTACCC | GATGCTTGCATTATCCTTG | 55 |
| 128.SEM295 | SCCCLR1066F12.g | CACCTCCAGACTCTTCTCC | GTGACCATGCTCCTGAAG | 56 |
| 129.SEM297 | SCCCLR1075D10.g | CACCAAACAGACTCGATTT | CGGATCGAACTCTGTGACAT | 54 |
| 130.SEM298 | SCCCLR1076A04.g | ACGCGAGAGGGAGAGAGATA | GTCAGCAGCACGAACAGC | 59 |
| 131.SEM302 | SCEPLR1008H10.g | GCGGTTTCTTGTTCCTTC | ACCACGACCTCGATCTCAAC | 56 |
| 132.SEM303 | SCEPLR1030D11.g | CGAAAACCCTCAAACCCTAA | CTCCTCTAGCTCCGCTTGT | 55 |
| 133.SEM306 | SCJFLR1013A08.g | ACCACCAATACCACCACCAC | TCGACGTTGGACTTGAGAAG | 56 |
| 134.SEM307 | SCJFLR1074A10.g | CAAACCTTTGCCGATAGGT | CGGACATACCAAGTGAAGA | 54 |
| 135.SEM308 | SCJLLR1101F02.g | TCTCGACTCCCTAATCACC | CGGACAGAAAGATCGCAGTA | 55 |
| 136.SEM310 | SCQGLR1019C10.g | AAGAAACCAACCCTCAAAGC | GTAGGGTAGCGCTGGTAAT | 55 |
| 137.SEM313 | SCSGLR1084A02.g | GAGGGAACACATCCCTTCTC | GCCGTAGATGAAGACCTCCT | 56 |
| 138.SEM314 | SCVPLR1049G12.g | GAATATAACCGCCACCTTGC | TGGCTTCCATCTCGTACT | 58 |
| 139.SEM315 | SCACLR2007A01.g | GAGGTCCTGGGAGAGACAGA | GTCTGGCCCGTAAGCTGT | 60 |
| 140.SEM319 | SCAGLR2026C05.g | ATCGTCATCGCAAAATGC | CAACCGGAGGCACTGAGTA | 56 |
| 141.SEM320 | SCCCLR2002F05.g | GAGGCAGCTCGACGACAC | GTCAGCTCCGCTCCTGCT | 62 |
| 142.SEM321 | SCQGLR2032D06.g | GTCCGTCTCCACTCGAAAAC | GCGGTTGAGGTCGAGGTAG | 59 |
| 143.SEM327 | SCCCLR1001G10.g | CTCCCTCTCGCTCATCA | AGGTTGACGATGGTGGTGAC | 59 |

| | | | | |
|------------|-----------------|----------------------|----------------------|----|
| 144.SEM328 | SCCCRT1003H03.g | TCTTGCCTGTTCTCCT | ATTCCGATTCCGATTCCAAC | 55 |
| 145.SEM329 | SCEQRT1025C10.g | CACCCAGCTCAAGTACAGCA | GCCTGTAAAAGCCTCCTGTG | 59 |
| 146.SEM332 | SCJFRT1009B09.g | CCGCAAGGAAGAACACCTT | GCAGTGAAGTCGACGTAGG | 56 |
| 147.SEM336 | SCJLRT1006C08.g | GCCAGGGTCTTCAAGTAT | TTCGTCATAGCCATCGTCAT | 55 |
| 148.SEM337 | SCJLRT1013F12.g | AGCAATGGTACGCACAAGAG | TTGCTAGTCGTCGTTCTTGG | 55 |
| 149.SEM338 | SCJLRT1018G02.g | GATCGGATCGAGAGGATTTT | ATACGACGAGGACGAAGTGG | 56 |
| 150.SEM339 | SCJLRT1019C06.g | AAGCGAGCGTACACCAAATC | ACGGCTCAGATGGTTGAGAG | 58 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| Primers | Accession ID | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (3'-5') | Tm (°C) |
|------------|-----------------|------------------------|------------------------|---------|
| 151.SEM341 | SCAGRT2041D09.g | GTGGTTTGAGTACGCTCGTG | AGAGGGATGGCAGTATCCAG | 56 |
| 152.SEM344 | SCEPRT2047A05.g | CGTGCGCTCTCTCTCTCTCT | ATTTTGAGATGGCTGCATCA | 57 |
| 153.SEM349 | SCEQRT2099E08.g | CGAGAGGCCTTCTCTCTCTG | CGCTGACGTAGTCCTGGTAG | 59 |
| 154.SEM350 | SCJFRT2057F04.g | CCAATGGAGACGACACTCCT | GCGGACGTAGATGGAGAAGA | 59 |
| 155.SEM351 | SCMCRT2085E08.g | CGACTGTGGGAGGAGTTTGT | TTGCAGCAGTTGCTAGCTGT | 57 |
| 156.SEM353 | SCQSRT2033C08.g | TTGCTTCTGTTGGGTTTCAA | TGGTTAAGGTTTGTGGTGA | 54 |
| 157.SEM355 | SCSFRT2067E08.g | ACCAAATCCAACACAGCAG | CGATGGTTGAGAGCTTGTGT | 57 |
| 158.SEM358 | SCAGRT3048C12.g | CTGGCCTCAAGAGGAAACTG | ACCAACCTCTTGACCAGCAC | 59 |
| 159.SEM361 | SCCCRT3001D09.g | GTAGCCGTGGAGCATGAAGT | CTGCTGCCATTAGGAGCAAT | 59 |
| 160.SEM366 | SCBFRZ2045C02.g | CCACCTTCTGCCAAGAAC | CATCTTAAACTCCGGTCCACA | 55 |
| 161.SEM367 | SCCCRZ2001C02.g | AGTCAGCATCCATCCAGTCC | ATTTCTCCTGCCCTCCTCTC | 59 |
| 162.SEM368 | SCCCRZ2004C05.g | AAACCCTCGCCTCCGATT | CCCAATGGTACCAGCAGAGT | 59 |
| 163.SEM369 | SCJFRZ2015A10.g | CGCTTCCATATCTTCTTCTTGG | TGACTCTCCGGTCCCTACAC | 55 |
| 164.SEM371 | SCJFRZ2034B06.g | GGAGAAGCATTCAGCAACC | CCCGCTTTTCTCTTTCTTT | 54 |
| 165.SEM372 | SCVPRZ2036E01.g | GCCAAGCTAAATAGCTGCTG | ACCACCGTTTCTTCTGAC | 57 |
| 166.SEM373 | SCVPRZ2038E05.g | GCGACCAAATCTGCCGTAT | CATGTAGTCGAGCGCAGAGA | 58 |
| 167.SEM374 | SCCCRZ3003B01.g | GCCTCCTCCCTCCTCTTA | GACTGGCTCGGAAACCCTA | 59 |
| 168.SEM375 | SCEPRZ3128D05.g | ATGGAGGCTCGTTGTCTTTG | CCGTAATCGCTCCACTAAA | 55 |
| 169.SEM377 | SCEQRZ3020E12.g | GGAGAGGACGAAACCCTAGC | CGCATTGAACGAGTTTCTA | 55 |
| 170.SEM379 | SCJFRZ3C03A08.b | ACGAGGCCACCATAGAACAT | GCACAAGGTGATTGTGCTGT | 56 |
| 171.SEM384 | SCUTRZ3103F01.g | TAGTAGCAAGCGAGGCGATA | GTCTGTTGCCTTTGATCGTG | 55 |
| 172.SEM390 | SCSGSB1005B12.g | GGGGAAGTAAGTCTCAGGTCA | GCCACCACCTCCATTATCTT | 57 |
| 173.SEM391 | SCUTSB1033C02.g | GTTCAGACTCGCGTGTITTT | GCTGAGAACCCTTCAGCTCT | 55 |
| 174.SEM392 | SCUTSB1075H09.g | TCATGCTCACCAGCAAAGAC | TCCCGATCAGTGTGTAGACG | 55 |
| 175.SEM398 | SCEPSD1006D03.g | CGTGCAAGCTCCAATATGAT | TGCCACTGTATAGCAGCGTA | 54 |
| 176.SEM400 | SCEZSD1081A02.g | CAGCTCATCCTCGTCAACCT | CTCCTCTGCTCCTTGTGCT | 59 |
| 177.SEM401 | SCMCSD1059G09.g | GCTCCATTCAATTCCTCCTC | TTCGATCGATTGATGGTTGA | 53 |
| 178.SEM403 | SCEQSD2077B12.g | CCTGCATCAACCTCTCCAC | GAAGGCGAGAGAGAAGATCG | 55 |
| 179.SEM407 | SCCCST1006B01.g | GCGAAACTAGCGCTGCTAAA | GGAGGTTCCGGTACGAGTC | 58 |
| 180.SEM408 | SCJFST1048G04.g | CAGAGCCAGCCAGGTAAG | TCATCGTGTGCTGCTGGT | 58 |

| | | | | |
|------------|-----------------|----------------------|----------------------|----|
| 181.SEM412 | SCJLST1022C09.g | CAAGGCTGCTTCTGGTGTC | CCTCTTTGGTTCTCTGCTC | 58 |
| 182.SEM415 | SCMCST1050H06.g | CAGCAGACGAGACGAGAGAG | AGGGTGATGAAGGGAATGAG | 56 |
| 183.SEM417 | SCQGST1032E05.g | GTCTCCTCCCCCTCCTCTC | AGAAGGAGTCGCTCATCTCG | 60 |
| 184.SEM418 | SCQGST1032G11.g | CGGACGTCTCATGTTCTTTG | CAGTGTCCAGTGCAAGTTCC | 55 |
| 185.SEM419 | SCSFST1066E06.g | TGCGTGGTTGATTGAAGAAG | AGAAGCCTTCTCTGCTGCTG | 60 |
| 186.SEM421 | SCSGST1069F04.g | CACCCTGCTGGTCTCCTC | TCGACGTCGTGTAGTGAACC | 59 |
| 187.SEM422 | SCSGST1072B03.g | GAAGAGTGGGGACGTCTCAG | GCCAGAGGATGTGGTAGAGG | 59 |
| 188.SEM425 | SCSFAD1070E12.g | GTGCCACCAGCAGCAAT | TCTCGTAGCTGCTCGACTTC | 56 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| Primers | Accession ID | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (3'-5') | Tm (°C) |
|-------------|-----------------|-------------------------|------------------------|---------|
| 189.SEM426 | SCVPAM1059C01.g | TCGAGAGCGGTTTCATCTTT | CTTTCCTGTCAGCCAAGTGA | 56 |
| 190.SEM427 | SCSBFL1105H11.b | AAGTAGCGGAAGCATTAGTTCA | CCAAGTTCCTCCTCACCAGTA | 57 |
| 191.SEM428 | SCSGLV1008C05.g | CAGGAAGAAACAGTAGGAAGCA | AGGTACTTGGCGGTCTTGAT | 57 |
| 192.SEM430 | SCBFSB1047F11.g | GCTCTCATTGCTACTCCTGAT | TGTTCACCCATGTCCTTTACTG | 55 |
| 193.SEM431 | SCRUSB1064F09.g | TCCGACTACCTCAAGTCAAG | GACGGCATCTTCTTCTTCTCC | 55 |
| 194.SEM433 | SCJLST1019B07.g | CGCGTCCGTAGATTAGTAGCTC | AGCGAGTAGATGTTGATGACCC | 56 |
| 195.SEM434 | SCSBST3094H07.g | GACACGCCAAAGGAAAAG | GAGATCCGGACACACATGG | 54 |
| 196.SEM435 | SCEZLB1007E12.g | TTCTTGCTTCTTTCTTCCGTC | TCAAATCGTGCTTGCTTGAG | 52 |
| 197.SEM436 | SCQGLR1041A05.g | AGGCTGAGAGAGCAAAGAAAGA | CCTAGGATCCTTCGGGTTTC | 55 |
| 198.SEM437 | SCJLRT1021D04.g | GGTCCCATACATAACACAAGCA | TGCATGAAGAAGCTCAGGTG | 57 |
| 199.SEM438 | SCQSR2031C10.g | CCTGGTTCCTGCACTTGCT | CATCACTTGCCATCTGCATT | 57 |
| 200.SEM440 | SCACSB1117C07.g | CGTCAAGCTGTAGTCCGAGAG | CTCGTCCCAGACCAGGAG | 59 |
| 201.SEM441 | SCACSD1018E05.g | AGCAACCTAATCACAGCAACAA | CCATCATCCGATCATCCTTC | 56 |
| 202.SEM443 | SCMCST1057C10.g | CATTTATTTGCCACCTAGAAGGG | AAACAGAAACCGGACAGCAC | 56 |
| 203.SEM444 | SCRLAD1043B06.g | GGAATGGGAACAGCCACTAAC | AAGAAGGCTATCGAGGTGGG | 55 |
| 204.SEM445 | SCBGAD1027C03.g | CACGGTTCCTGCTGAAAG | GACGGGGTTGTTGAAGGTG | 55 |
| 205.SEM447 | SCCCCL3001D10.b | GAGCAGTCCCTTGCCATGT | GCCGTGAGTACACCGTC | 59 |
| 206.SEM448 | SCEZFL5083C02.g | TGAGTTCAGTTCCTCCCC | AGAACTCCAAGGAGCAGCAG | 56 |
| 207.SEM450 | SCEZLB1006B07.g | TGGTGTGAGTTAGTGCCTGAGT | TAGAAGGTGTTGATGATGAGCG | 55 |
| 208.SEM454 | SCBFRZ2045E11.g | AGCGACATGAGCTACCGTCT | TAGTACCGGACAGACCTTCT | 58 |
| 209.SEM455 | SCSBRZ3122D09.g | GTAAGTACGAGCAACCCTAGCC | ATCCTCTTTGCCTCCCCT | 55 |
| 210.SEM457 | AY302083 | TCGTCTACAACCACGACTACA | GAGAGGCAAGCAAGGAAAGAT | 56 |
| 211.SEST003 | SCSFSB1097B02.g | CCCCGAAGATCAAGGATAGG | CGCATCTCAAATGGGAAAAT | 56 |
| 212.SEST004 | SCRLAD1040D08.g | CAGGCACTGATGTCATGGAT | GAACACTACTCGCCGCTCAC | 56 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ชนิดเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรลูกผสมจำนวน 283 ตัวอย่าง
ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล gSSR จำนวน 10 คู่ไพรมอร์

| คู่ที่ | ไพรมอร์ | Simplex | | Double simplex | Duplex | |
|--------|---------|------------|------------|-------------------|------------|-----------|
| | | Phil6607 | S6 | | Phil6607 | S6 |
| 1 | SSR01 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | SSR04 | 1 | 3 | 0 | 1 | 2 |
| 3 | SSR08 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | SSR09 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 5 | SSR11 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | SSR12 | 2 | 1 | 0 | 2 | 2 |
| 7 | SSR15 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 8 | SSR20 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | SSR21 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| 10 | SSR22 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 14(35.89%) | 12(30.76%) | 1(2.56%) | 5(12.82%) | 7(17.94%) |
| Total | | 26(66.66%) | | 1(2.56%) | 12(30.76%) | |

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ชนิดเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรลูกผสมจำนวน 283
ตัวอย่างด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR จำนวน 212 ไพรมอร์

| คู่ที่ | ไพรมอร์ | Simplex | Double | Duplex |
|--------|---------|---------|--------|--------|
|--------|---------|---------|--------|--------|

| | | Phil6607 | S6 | simplex | Phil6607 | S6 |
|---|--------|----------|----|---------|----------|----|
| 1 | SEM001 | 5 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 2 | SEM002 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 3 | SEM007 | 4 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 4 | SEM011 | 4 | 2 | 1 | 3 | 0 |
| 5 | SEM013 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | SEM014 | 2 | 4 | 1 | 1 | 1 |
| 7 | SEM015 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| คู่มือ | โปรแกรม | Simplex | | Double simplex | Douplex | |
|--------|---------|----------|----|-------------------|----------|----|
| | | Phil6607 | S6 | | Phil6607 | S6 |
| 8 | SEM016 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 9 | SEM019 | 5 | 2 | 1 | 2 | 0 |
| 10 | SEM020 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| 11 | SEM024 | 4 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 12 | SEM027 | 6 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| 13 | SEM029 | 5 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 14 | SEM036 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 15 | SEM037 | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 16 | SEM038 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | SEM041 | 4 | 8 | 1 | 0 | 0 |
| 18 | SEM042 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 19 | SEM046 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | SEM053 | 6 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 21 | SEM055 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 22 | SEM057 | 4 | 2 | 0 | 4 | 0 |
| 23 | SEM058 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 24 | SEM060 | 4 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 25 | SEM061 | 3 | 5 | 2 | 1 | 0 |

| | | | | | | |
|----|--------|---|---|---|---|---|
| 26 | SEM063 | 1 | 0 | 2 | 2 | 1 |
| 27 | SEM068 | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 28 | SEM072 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 29 | SEM076 | 6 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | SEM078 | 3 | 0 | 3 | 2 | 2 |
| 31 | SEM079 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 32 | SEM080 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 33 | SEM082 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | SEM083 | 1 | 6 | 2 | 3 | 2 |
| 35 | SEM084 | 3 | 4 | 3 | 0 | 0 |
| 36 | SEM085 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| คู่มือ | โปรแกรมเมอร์ | Simplex | | Double simplex | Douplex | |
|--------|--------------|----------|----|-------------------|----------|----|
| | | Phil6607 | S6 | | Phil6607 | S6 |
| 36 | SEM085 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 37 | SEM086 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 38 | SEM090 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 39 | SEM092 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 |
| 40 | SEM094 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 41 | SEM097 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 42 | SEM098 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 43 | SEM099 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 44 | SEM105 | 1 | 5 | 2 | 0 | 0 |
| 45 | SEM106 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| 46 | SEM108 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 47 | SEM110 | 3 | 9 | 2 | 0 | 0 |
| 48 | SEM112 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 49 | SEM113 | 2 | 3 | 2 | 1 | 2 |
| 50 | SEM117 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 |

| | | | | | | |
|----|--------|---|---|---|---|---|
| 51 | SEM119 | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 |
| 52 | SEM120 | 2 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| 53 | SEM124 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 54 | SEM125 | 2 | 3 | 0 | 2 | 0 |
| 55 | SEM127 | 1 | 3 | 0 | 1 | 0 |
| 56 | SEM131 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 57 | SEM132 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 58 | SEM136 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 59 | SEM140 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 60 | SEM141 | 6 | 6 | 2 | 0 | 0 |
| 61 | SEM143 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 62 | SEM147 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| 63 | SEM148 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 64 | SEM154 | 4 | 1 | 1 | 0 | 2 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| คู่มือ | โปรแกรม | Simplex | | Double simplex | Duplex | |
|--------|---------|----------|----|-------------------|----------|----|
| | | Phil6607 | S6 | | Phil6607 | S6 |
| 65 | SEM158 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 66 | SEM159 | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 67 | SEM161 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 68 | SEM164 | 1 | 4 | 1 | 3 | 0 |
| 69 | SEM166 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 70 | SEM167 | 4 | 7 | 2 | 1 | 0 |
| 71 | SEM168 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| 72 | SEM174 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 73 | SEM176 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| 74 | SEM179 | 0 | 2 | 0 | 1 | 2 |
| 75 | SEM180 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 76 | SEM184 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 |

| | | | | | | |
|----|--------|---|---|---|---|---|
| 77 | SEM189 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| 78 | SEM190 | 2 | 3 | 0 | 1 | 1 |
| 79 | SEM191 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 80 | SEM195 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 81 | SEM199 | 6 | 3 | 1 | 1 | 0 |
| 82 | SEM200 | 2 | 1 | 4 | 1 | 0 |
| 83 | SEM203 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 84 | SEM206 | 2 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 85 | SEM207 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 86 | SEM208 | 6 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 87 | SEM211 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| 88 | SEM213 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 89 | SEM214 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 90 | SEM215 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 91 | SEM217 | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 92 | SEM219 | 3 | 1 | 2 | 0 | 2 |
| 93 | SEM220 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| คู่มือ | โปรแกรมเมอร์ | Simplex | | Double simplex | Duplex | |
|--------|--------------|----------|----|-------------------|----------|----|
| | | Phil6607 | S6 | | Phil6607 | S6 |
| 94 | SEM221 | 5 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 95 | SEM223 | 7 | 4 | 0 | 1 | 0 |
| 96 | SEM227 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 97 | SEM229 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 98 | SEM231 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 99 | SEM232 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | SEM233 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 101 | SEM234 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 102 | SEM235 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|-----|--------|---|---|---|---|---|
| 103 | SEM236 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 104 | SEM237 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 105 | SEM238 | 3 | 7 | 2 | 0 | 0 |
| 106 | SEM239 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 107 | SEM246 | 2 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 108 | SEM250 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 109 | SEM254 | 4 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| 110 | SEM255 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 111 | SEM257 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 112 | SEM258 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| 113 | SEM261 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 114 | SEM263 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 115 | SEM265 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 116 | SEM271 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 117 | SEM273 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 118 | SEM275 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 119 | SEM276 | 1 | 1 | 1 | 3 | 0 |
| 120 | SEM279 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 |
| 121 | SEM280 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 122 | SEM282 | 4 | 1 | 2 | 1 | 1 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| คู่มือที่ | โปรแกรมเมอร์ | Simplex | | Double simplex | Duplex | |
|-----------|--------------|----------|----|----------------|----------|----|
| | | Phil6607 | S6 | | Phil6607 | S6 |
| 123 | SEM285 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 124 | SEM287 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 125 | SEM288 | 1 | 1 | 4 | 0 | 0 |
| 126 | SEM290 | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 127 | SEM294 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 128 | SEM295 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|-----|--------|----|---|---|---|---|
| 129 | SEM297 | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 130 | SEM298 | 3 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| 131 | SEM302 | 3 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| 132 | SEM303 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 133 | SEM306 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 134 | SEM307 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 135 | SEM308 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 136 | SEM310 | 2 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| 137 | SEM313 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 138 | SEM314 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 139 | SEM315 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| 140 | SEM319 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 141 | SEM320 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 142 | SEM321 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 143 | SEM327 | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 144 | SEM328 | 4 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 145 | SEM329 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 146 | SEM332 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 147 | SEM336 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 148 | SEM337 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 149 | SEM338 | 11 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 150 | SEM339 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| 151 | SEM341 | 5 | 3 | 1 | 1 | 0 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| คู่มือ | โปรแกรม | Simplex | | Double simplex | Duplex | |
|--------|---------|----------|----|-------------------|----------|----|
| | | Phil6607 | S6 | | Phil6607 | S6 |
| 152 | SEM344 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 153 | SEM349 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 154 | SEM350 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|-----|--------|---|---|---|---|---|
| 155 | SEM351 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 156 | SEM353 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 157 | SEM355 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| 158 | SEM358 | 5 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 159 | SEM361 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| 160 | SEM366 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 161 | SEM367 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 162 | SEM368 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 163 | SEM369 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 164 | SEM371 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 165 | SEM372 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 166 | SEM373 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 167 | SEM374 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 168 | SEM375 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 169 | SEM377 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 170 | SEM379 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 171 | SEM384 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 172 | SEM390 | 6 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| 173 | SEM391 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 174 | SEM392 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 175 | SEM398 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 176 | SEM400 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 177 | SEM401 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 178 | SEM403 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 |
| 179 | SEM407 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 180 | SEM408 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| คู่มือ | โปรแกรมเมอร์ | Simplex | | Double simplex | Duplex | |
|--------|--------------|----------|----|-------------------|----------|----|
| | | Phil6607 | S6 | | Phil6607 | S6 |
| | | | | | | |

| | | | | | | |
|-----|--------|---|---|---|---|---|
| 181 | SEM412 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 182 | SEM415 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 183 | SEM417 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 184 | SEM418 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| 185 | SEM419 | 2 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 186 | SEM421 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 187 | SEM422 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 188 | SEM425 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 189 | SEM426 | 2 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 190 | SEM427 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 191 | SEM428 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 192 | SEM430 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 193 | SEM431 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 194 | SEM433 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 195 | SEM434 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 196 | SEM435 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 |
| 197 | SEM436 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 198 | SEM437 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 199 | SEM438 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| 200 | SEM440 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 |
| 201 | SEM441 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 202 | SEM443 | 1 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| 203 | SEM444 | 1 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| 204 | SEM445 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 205 | SEM447 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 206 | SEM448 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| 207 | SEM450 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 208 | SEM454 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 209 | SEM455 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |

ภาคผนวก ก (ต่อ)

| คู่มือ | โปรแกรม | Simplex | | Double simplex | Duplex | |
|--------|---------|-------------|-------------|-------------------|-------------|-----------|
| | | Phil6607 | S6 | | Phil6607 | S6 |
| 210 | SEM457 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| 211 | SEST003 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 212 | SEST004 | 0 | 6 | 3 | 0 | 0 |
| | | 478(41.17%) | 377(32.39%) | 184(15.80%) | 85(7.30%) | 40(3.43%) |
| Total | | 855(73.45%) | | 184(15.80%) | 125(10.73%) | |

ภาคผนวก ข

การคำนวณขนาดประมาณของจีโนมและสัดส่วนของแผนที่พันธุกรรม ที่สร้างได้

วิเคราะห์ขนาดประมาณของจีโนมด้วยวิธีการของ Hulbert และคณะ (1988) จากเครื่องหมาย

$$\text{simplex ออกมาในหน่วย cM ตามสูตร } G_z = \frac{\left[\frac{M(M-1)}{2} (2X_z) \right]}{K_z}$$

G_z คือขนาดของจีโนมมีหน่วยเป็น cM M คือ จำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาสร้างแผนที่โครโมโซม X_z คือระยะเฉลี่ยระหว่างสองเครื่องหมายโมเลกุล K_z คือจำนวนของ two-point linkage

$M = 791$, X_z ; ระยะเฉลี่ย two point $(3984/559) = 7.13$ cM , $K_z; (791-232) = 559$

$$G_z K_z = \frac{M(M-1)(2X_z)}{2}$$

$$G_z 559 = \frac{791(791-1)}{2} (2 \times 7.13)$$

$$= (624,890/2)(14.26)$$

$$G_z = 7,970.42 \text{ cM}$$

คำนวณสัดส่วนของแผนที่พันธุกรรม ที่สร้างได้เทียบกับขนาดประมาณจีโนม

$$E(C_n) = 1 - \rho_{1,n}$$

โดยที่ $\rho_{1,n}$ คือค่าความน่าจะเป็น ของแผนที่พันธุกรรมที่เหลือของจีโนมทั้งหมดที่ไม่อยู่ในแผนที่พันธุกรรมที่สร้างได้

$$\rho_{1,n} = \frac{2r}{n+1} * \left\{ \left(1 - \frac{X}{2G}\right)^{n+1} - \left(1 - \frac{X}{G}\right)^{n+1} \right\} + \left\{ \left(1 - \frac{rX}{G}\right) \left(1 - \frac{X}{G}\right)^n \right\}$$

r คือ จำนวนโครโมโซม (80-120) X คือระยะระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลมีหน่วย cM G คือขนาดประมาณของจีโนมมีหน่วย cM (Bishop et al., 1983)

เมื่อใช้ค่า r = 100 X คือระยะระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลมีหน่วย cM G คือขนาดประมาณของจีโนมมีหน่วย cM (Bishop et al., 1983)

$$\rho_{1,n} = \frac{2r}{n+1} * \left\{ \left(1 - \frac{X}{2G}\right)^{n+1} - \left(1 - \frac{X}{G}\right)^{n+1} \right\} + \left\{ \left(1 - \frac{rX}{G}\right) \left(1 - \frac{X}{G}\right)^n \right\}$$

$$G = 7970.42 \text{ cM} \quad , \quad r = 100 \quad , \quad X ; (3,984/232) = 17.17$$

$$= \frac{2(100)}{284} * \left\{ \frac{(1 - 17.17)^{284}}{2 * 7970.42} - \frac{(1 - 17.17)^{284}}{7970.42} \right\} + \frac{(1 - 100 * 17.17)(1 - 17.17)^{283}}{7970.42}$$

$$= \frac{200}{284} * \left\{ (1 - 0.0013)^{284} - (1 - 0.0026)^{284} \right\} + (1 - 0.210)(1 - 0.0026)^{283}$$

$$= [200/284 * (0.566 - 0.426)] + (0.790)(0.427)$$

$$= (200/284)(0.140) + 0.314$$

$$= 0.098 + 0.314$$

$$= 0.412$$

คำนวณสัดส่วนของแผนที่พันธุกรรม ที่สร้างได้เทียบกับขนาดประมาณจีโนม

$$E(C_n) = 1 - \rho_{1,n}$$

$$= 1 - 0.412$$

$$= 0.588 = 58.8\%$$

เมื่อใช้ค่า $r = 120$ X คือระยะระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลมีหน่วย cM G คือขนาดประมาณของจีโนมมีหน่วย cM (Bishop *et al.*, 1983)

$$\rho_{1,n} = \frac{2r}{n+1} * \left\{ \left(1 - \frac{X}{2G}\right)^{n+1} - \left(1 - \frac{X}{G}\right)^{n+1} \right\} + \left\{ \left(1 - \frac{rX}{G}\right) \left(1 - \frac{X}{G}\right)^n \right\}$$

$$G = 7970.42 \text{ cM} \quad , \quad r = 120 \quad , \quad X; (3,984/232) = 17.17$$

$$= \frac{2(120)}{284} * \left\{ \frac{(1-17.17)^{284}}{2*7970.42} - \frac{(1-17.17)^{284}}{7970.42} \right\} + \frac{(1-120*17.17)(1-17.17)^{283}}{7970.42}$$

$$= \frac{240}{284} * \left\{ (1-0.0013)^{284} - (1-0.0026)^{284} \right\} + (1-0.316)(1-0.0026)^{283}$$

$$= [240/284 * (0.566 - 0.426)] + (0.684)(0.426)$$

$$= (240/284)(0.140) + 0.291$$

$$= 0.188 + 0.291$$

$$= 0.479$$

คำนวณสัดส่วนของแผนที่พันธุกรรม ที่สร้างได้เทียบกับขนาดประมาณจีโนม

$$E(C_n) = 1 - \rho_{1,n}$$

$$= 1 - 0.479$$

$$= 0.521 = 52.1\%$$

ประวัติการศึกษา

ชื่อ

พัทธนันท์ ภูมิพันธ์

วันเดือนปีเกิด

19 มีนาคม 2525

วุฒิการศึกษา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต

(ตั้งแต่ระดับปริญญาตรี)

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

