



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต (พืชไร่นา)

ปริญญา

พืชไร่นา

พืชไร่นา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การตรวจสอบตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณเส้นใยและลักษณะทางพืชไร่ในอ้อย
โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี

Quantitative Traits Loci (QTLs) Mapping for Fiber Content and Agronomic Characters
in Sugarcane Using AFLP Marker

นามผู้วิจัย นายสมหวัง อนุสนธิ์พรเพิ่ม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, D.Agr.)

กรรมการ

(อาจารย์ชัยณรงค์ รัตนกริชากุล, Dr.sc.agr.)

กรรมการ

(อาจารย์พิพัฒน์ วีระถาวร, Dr.Sc.nat)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์อรุณทิพย์ ธรรมชัยพินิต, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณเส้นใยและลักษณะทางพืชไร่ในอ้อย โดยใช้
เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี

Quantitative Traits Loci (QTLs) Mapping for Fiber Content and Agronomic Characters in
Sugarcane Using AFLP Marker

โดย

นายสมหวัง อนุสนธิ์พรเพิ่ม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (พืชไร่)

พ.ศ. 2551

สมหวัง อนุสนธิ์พรเพิ่ม 2551: การตรวจสอบตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณเส้นใย และลักษณะทางพืชไร่ในอ้อยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี ปรินญาปรัชญา คุชฎีบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่ ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, D.Agr. 98 หน้า

การศึกษาเกี่ยวกับควบคุมลักษณะปริมาณ (QTLs) โดยการสร้างประชากรจากการผสมพันธุ์ ระหว่างพันธุ์อ้อยการค้า (โคลนพันธุ์ K 93-207) กับโคลนพันธุ์อ้อยป่า คือ *Saccharum spontaneum* L. (โคลนพันธุ์ MPT 97-1) ปลูกทดสอบลูกผสมจำนวน 168 โคลนพันธุ์ ในแปลง ทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บข้อมูล เส้นผ่านศูนย์กลางลำ (stalk diameter) การแตกกอ (tillering) และ ปริมาณเส้นใย (fiber content) พบความแตกต่างของโคลนพันธุ์ใน 3 ลักษณะที่ทำการทดสอบ ($P<0.01$) เมื่อทดสอบลูกผสมโดยใช้เอเอฟแอลพีไพร์เมอร์ จำนวน 26 คู่ พบเครื่องหมายโมเลกุลที่ มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1 (simplex) จำนวน 263 เครื่องหมายโมเลกุล ได้ใช้เครื่องหมาย โมเลกุลเหล่านี้ ศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ พบ 38 เครื่องหมายโมเลกุล สัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ 18 เครื่องหมายโมเลกุลสัมพันธ์กับการแตกกอ และ 20 เครื่องหมายโมเลกุลสัมพันธ์กับปริมาณเส้นใย แต่เครื่องหมายโมเลกุลมีค่า PVP (phenotypic variant explained, R^2) ระหว่าง 3 ถึง 12 เปอร์เซ็นต์ และพบ 19 เครื่องหมายโมเลกุล มีความสัมพันธ์กับทั้ง 3 ลักษณะ โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจาก *Saccharum spontaneum* L. ให้อิทธิพลทางบวกกับลักษณะเส้นใย และการแตกกอสูง และอิทธิพลทางลบกับผ่านศูนย์กลางลำ เล็ก ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดมาจาก พันธุ์อ้อยการค้าให้อิทธิพลทางบวกกับลักษณะเส้น ผ่านศูนย์กลางลำ และอิทธิพลทางลบกับลักษณะการแตกกอและปริมาณเส้นใย เมื่อใช้เครื่องหมาย โมเลกุล simplex จำนวน 127 และ 136 เครื่องหมายโมเลกุลมาสร้างแผนที่ลิงเกจ โดยใช้ค่า LOD score เท่ากับ 4.0 ได้จำนวน 27 และ 25 กลุ่มลิงเกจ สำหรับแผนที่โคลนพันธุ์แม่และพ่อตามลำดับ โดยมี 110 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ไม่มีลิงเกจระหว่างกัน และพบ QTLs ในกลุ่มลิงเกจ จำนวน 23 ตำแหน่งสำหรับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ 12 ตำแหน่งสำหรับการแตกกอ และ 14 ตำแหน่ง สำหรับปริมาณเส้นใย สาเหตุที่กลุ่มลิงเกจ มีจำนวนโมเลกุลเครื่องหมายในแต่ละกลุ่มน้อย เนื่องมาจากประชากรที่ใช้ได้มาจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างโคลนอ้อยป่ากับโคลนพันธุ์การค้าจึง ทำให้พันธุกรรมที่ได้มีความซับซ้อนยิ่งขึ้น

Somwung Anusonpornpurn 2008: Quantitative Traits Loci (QTLs) Mapping for Fiber Content and Agronomic Characters in Sugarcane Using AFLP Marker. Doctor of Philosophy (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Associate Professor Rewat Lersrutaiyotin, D.Agr. 98 pages.

The population of 168 progenies derived from a cross between a sugarcane commercial variety (K 93-207) and a *S. spontaneum* L. clone (MPT 97-1) were evaluated in a three replicated field trial. Stalk diameter and tillering were recorded at harvesting and subsequently, plant material was evaluated for fiber content. Clones were significantly different ($P < 0.01$) for all traits analyzed. A total of 263 AFLP simplex markers from 26 primer combinations were used to analyze the inheritance of quantitative traits loci (QTLs) for stalk diameter, tillering and fiber content. Thirty eight putative QTLs from simplex the markers were identified for stalk diameter, 18 for tillering and another 20 for fiber content. Each QTL had PVE (phenotypic variant explained, R^2) ranged from 3 to 12% for 3 traits. The nineteen of these QTLs were identified for more than one trait. Most fiber content QTLs of *Saccharum spontaneum* L. contributed a positive effect for tillering and a negative effect for stalk diameter. The QTLs of commercial variety contributed negative effect for fiber content, number of stalk and a positive effect for stalk diameter. The 127 and 136 of simplex markers were used to establish female and male linkage maps. Linkage analysis (LOD = 4.0) placed them into 27 and 25 linkage groups for male and female linkage maps respectively. The total 110 simplex markers were unlinked. The 23 simplex QTLs for stalk diameter, 12 for tillering and 9 for fiber content were located into both linkage maps. The possible explanation for the small number of linked marker is that this map was from a cross between commercial and wild relative, with a very complex genetic system.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบพระคุณ รศ.ดร.เรวัต เลิศฤทัยโยธิน ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.ชัยณรงค์ รัตนกริธากุล กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชาเอก และรศ.ดร.อรินทิพย์ ชรรณชัยพิเนต กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชารอง ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจ แก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และกราบขอพระคุณ รศ.ดร.ยิ่งยง ไพสุขสานติวัฒนา ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอย่างสูง คุณอิสระ ว่องกุศลกิจ ประธานกรรมการบริษัท ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนการทำงานวิจัย และอำนวยความสะดวกทุกอย่างสำหรับการลาศึกษาต่อ รวมทั้งดร. พิพัฒน์ วีระถาวร กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชาเอก และผู้อำนวยการด้านวิจัยและพัฒนา บริษัท มิตรผลวิจัยพัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณอาจารย์วิชาพีชไร่นาทุกท่าน ที่ได้ช่วยให้คำปรึกษาและมอบความรู้อันเป็น ประโยชน์อย่างยิ่งในการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว เพื่อนๆ และน้องๆ ในภาควิชาพีชไร่นาทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจเสมอและให้การสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้

สมหวัง อนุสนธิ์พรเพิ่ม

กันยายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	33
สรุปและข้อเสนอแนะ	80
สรุป	80
ข้อเสนอแนะ	82
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	83
ภาคผนวก	95

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 อัตราส่วนการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอระหว่างการปรากฏ : ไม่ปรากฏของเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ multiplex (duplex, triplex และ quadruplex) ในประชากรลูกผสมทดสอบ (testcross)	29
2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน ค่าอัตราพันธุกรรม ค่าสูงสุด ต่ำสุด ค่าเฉลี่ยของปริมาณเส้นใย การแตกกอและเส้นผ่านศูนย์กลางลำของลูกผสมระหว่าง K 93-207 และ MPT 97-1 จำนวน 168 โคลนพันธุ์	34
3 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ การแตกกอและปริมาณเส้นใย	37
4 จำนวนแถบเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความแตกต่าง (polymorphic) และเปอร์เซ็นต์ของแถบที่มีการกระจายตัว 1:1	39
5 ชนิด และจำนวนของเครื่องหมายโมเลกุล จากแถบดีเอ็นเอที่มีการกระจายตัว (polymorphic)	40
6 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่สัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำอ้อย โคลนพันธุ์ที่ถ่ายทอดเครื่องหมายโมเลกุลค่า ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และอิทธิพลของ QTL	42
7 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่สัมพันธ์กับการแตกกอ โคลนพันธุ์ที่ถ่ายทอดเครื่องหมายโมเลกุล ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และอิทธิพลของ QTL	44
8 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่สัมพันธ์กับปริมาณเส้นใย โคลนพันธุ์ที่ถ่ายทอดเครื่องหมายโมเลกุล ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และอิทธิพลของ QTL	46
9 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) อิทธิพล QTL และโคลนพันธุ์ที่ให้ QTL ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์ กับลักษณะที่ทดสอบมากกว่าหนึ่งลักษณะ	48
10 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และ อิทธิพล QTL ของเครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการแตกกอ	54

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
11 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และ อิทธิพล QTL ของ เครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ มากกว่าหนึ่งลักษณะ	55
12 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และ อิทธิพล QTL ของ เครื่องหมายโมเลกุล triplex ที่มีความสัมพันธ์กับขนาดลำและปริมาณเส้นใย	56
13 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และ อิทธิพล QTL ของ เครื่องหมายโมเลกุล triplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ มากกว่าหนึ่งลักษณะ	57
14 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และจำนวนเครื่องหมาย โมเลกุลใน model ของการวิเคราะห์ multiple regression ของเครื่องหมาย โมเลกุล simplex, duplex และ triplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการ ทดสอบ	59
15 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และ อิทธิพล QTL ของ เครื่องหมายโมเลกุล simplex, duplex และ triplex ของลักษณะที่ทำการ ทดสอบทั้ง 3 ลักษณะ	61
 ตารางผนวกที่	
1 สูตรสำหรับอัตราส่วนจีโนไทป์ และฟีโนไทป์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ออโตโพลี พลอยด์ ที่ลิงค์กันในสภาพ 1&2-Asymmetric coupling, 2&2-Double coupling, 1&3-Asymmetric coupling และ 2&3-Asymmetric coupling	97
2 ค่าทดสอบ power of chi-square ที่ระดับ α 0.05	98

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ตำแหน่งศูนย์กลางของ UDP-Glucose ในขบวนการชีวเคมีของพืช	8
2 จำนวนประชากรที่ต้องการสำหรับค่าการตรวจสอบ power of linkage เท่ากับ 80 เปอร์เซนต์สำหรับรูปแบบต่างๆของลิงเกจในสภาพ repulsion	18
3 จำนวนประชากรที่ต้องการสำหรับค่าการตรวจสอบ power of linkage เท่ากับ 80 เปอร์เซนต์สำหรับรูปแบบต่างๆของลิงเกจในสภาพ coupling	18
4 กราฟแสดงการกระจายตัว (histogram) ของลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ จำนวนลำต่อกอ และ ปริมาณเส้นใยของประชากรย่อยจำนวน 168 โคลนพันธุ์	35
5 ค่า 80 เปอร์เซนต์ของ power of detection linkage ในรูปแบบลิงเกจที่แตกต่างโดยใช้จำนวนประชากรเท่ากับ 168 โคลนพันธุ์	63
6 แผนที่พันธุกรรมของเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่ (K 93-207) จากประชากรลูกผสมจำนวน 168 โคลนพันธุ์ เครื่องหมายโมเลกุลที่จัดเส้นได้เป็นแบบ duplex และตัวเอียงเป็นแบบ triplex ตัวอักษร F = ปริมาณไฟเบอร์ SD = ขนาดลำ และ SS = การแตกกอ เครื่องหมายบวกและลบคือผลของ QTL และตัวเลขในวงเล็บคือค่า R^2	71
7 แผนที่พันธุกรรมของเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์พ่อ (MPT 97-1) จากประชากรลูกผสมจำนวน 168 โคลนพันธุ์ เครื่องหมายโมเลกุลที่จัดเส้นได้เป็นแบบ duplex และตัวเอียงเป็นแบบ triplex ตัวอักษร F = ปริมาณไฟเบอร์ SD = ขนาดลำ และ SS = การแตกกอ เครื่องหมายบวกและลบคือผลของ QTL และตัวเลขในวงเล็บคือค่า R^2	79
 ภาพผนวกที่	
1 แผนภูมิการย้อมเจดด้วย silver nitrate (silver staining)	96

**การตรวจสอบตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณเส้นใย
และลักษณะทางพืชไร่ในอ้อย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี**

**Quantitative Traits Loci (QTLs) Mapping for Fiber Content and Agronomic
Characters in Sugarcane Using AFLP Marker**

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม นอกจากนี้ยังมีอุตสาหกรรมเกษตรที่ครบวงจร เพื่อนำผลผลิตทางการเกษตรออกสู่ตลาดทั้งในและนอกประเทศ ทำให้มีเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ที่สามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดในรูปของพลังงานทดแทน ในการสนับสนุนพลังงานในเชิงพาณิชย์ทั้งในภาคการขนส่งและการผลิตไฟฟ้า โดยวัสดุเหลือใช้ดังกล่าวได้แก่ ชานอ้อย แกลบ เศษไม้ กากปาล์ม ชังข้าวโพด และมันสำปะหลัง ซึ่งรัฐบาลได้มีการส่งเสริมให้ใช้ในการผลิตไฟฟ้าในเชิงพาณิชย์ ด้วยระบบผลิตพลังงานความร้อนและไฟฟ้ารวม (cogeneration หรือ combine heat and power: CHP) โดยขายไฟฟ้าส่วนเกินเข้าสู่ระบบของการไฟฟ้าการผลิตแห่งประเทศไทย (นิรนาม, 2551)

ใน พ.ศ. 2550 ความต้องการไฟฟ้าสูงสุดของประเทศเกิดขึ้นในเดือนเมษายน 2550 มีค่าเท่ากับ 22,586.1 เมกะวัตต์ ซึ่งสูงกว่าความต้องการไฟฟ้าสูงสุดใน พ.ศ. 2549 จำนวน 1,522.10 เมกะวัตต์ หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 7.22 ในขณะที่กำลังการผลิตไฟฟ้าของประเทศเมื่อสิ้นสุดเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2550 มีกำลังผลิตติดตั้งรวม 28,530.3 เมกะวัตต์ ประกอบด้วย โรงไฟฟ้า กฟผ. 15,793.6 เมกะวัตต์ (ร้อยละ 55.4) รับซื้อจากเอกชน 12,097 เมกะวัตต์ (ร้อยละ 42.4) และรับซื้อจากประเทศเพื่อนบ้าน 640 เมกะวัตต์ (ร้อยละ 2.2) ซึ่งผู้ผลิตไฟฟ้าจากเอกชนประกอบด้วยผู้ผลิตขนาดใหญ่ ซึ่งใช้ ถ่านหิน น้ำมันเตา และก๊าซธรรมชาติเป็นเชื้อเพลิง ส่วนผู้ผลิตเอกชนขนาดเล็ก (กำลังการผลิต 10-90 เมกะวัตต์) ใช้ระบบการผลิตพลังงานความร้อน และไฟฟ้าร่วมกัน (cogeneration) โดยใช้ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และใช้พลังงานหมุนเวียน (renewable energy) เช่น กาก หรือเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ขยะ ก๊าซชีวภาพ และพลังงานแสงอาทิตย์ เป็นเชื้อเพลิง จากข้อมูลเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2550 มีจำนวนผู้ผลิตไฟฟ้าเอกชนรายเล็กทั้งหมด 120 ราย มีกำลังการผลิตรวม 3,502.4 เมกะวัตต์ ในจำนวนนี้ใช้ชานอ้อยเป็นวัตถุดิบมีกำลังการผลิตติดตั้ง 710.8 เมกะวัตต์ และมีพลังไฟฟ้าตามสัญญา จำนวน 252 เมกะวัตต์ (การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย, 2551)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่สามารถผลิตน้ำตาลได้เป็นอันดับที่ 6 ของโลก และเป็นผู้บริโภคน้ำตาลอันดับที่ 12 ของโลก การผลิตอ้อยของประเทศไทยใน พ.ศ. 2548 ตั้งเป้าหมายการผลิตไว้ที่ 82.4 ล้านตัน โดยคาดว่าจะได้น้ำตาลประมาณ 8.9 ล้านตัน สำหรับด้านอ้อยแล้วข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณอ้อยเพิ่มขึ้นจาก พ.ศ. 2539 ประมาณ 32 เปอร์เซ็นต์ หรือเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 3.1 เปอร์เซ็นต์ต่อปี ขณะที่พื้นที่เพาะปลูกคาดว่าจะเพิ่มขึ้นจาก พ.ศ. 2539 แค่ 17.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการที่จะไปถึงเป้าหมายดังกล่าวนี้ ประเทศไทยจำเป็นต้องมีการเพิ่มผลผลิตน้ำตาลต่อพื้นที่ให้ได้ (FAO, 2005)

สำหรับสถานการณ์การผลิตอ้อยในประเทศไทยเมื่อสิ้นสุดฤดูหีบอ้อยปี 2549/50 พบว่าโรงงานทั้ง 46 โรงจากทั่วประเทศสามารถหีบอ้อยได้รวม 63.8 ล้านตันอ้อย โดยแบ่งเป็นภาคเหนือ 17 ล้านตัน ภาคกลาง 21.2 ล้านตัน ภาคตะวันออก 3.3 ล้านตัน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 22.2 ล้านตันอ้อย มีผลผลิตเฉลี่ยอ้อยทั้งประเทศประมาณ 10.13 ตันต่อไร่ สำหรับพื้นที่ปลูกอ้อยทั่วประเทศในปี 2549/50 มีประมาณ 6.5 ล้านไร่ เพิ่มขึ้นจากปี 2548/49 ประมาณ 6 แสนไร่ หรือประมาณ 11.3 เปอร์เซ็นต์ แบ่งออกเป็นพื้นที่เพาะปลูกในภาคเหนือ 1.25 ล้านไร่ ภาคกลาง 2.2 ล้านไร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2.7 ล้านไร่ และภาคตะวันออก 0.4 ล้านไร่ ผลการสำรวจแสดงให้เห็นว่า ปริมาณพื้นที่เพาะปลูกโดยรวมทุกภาคเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับฤดูการผลิตที่ผ่านมาสืบเนื่องจากการมีการเพาะปลูกเพิ่มขึ้นในพื้นที่ที่ประสบปัญหาภัยธรรมชาติในฤดูการผลิต 2548/49 และมีปัจจัยเอื้ออำนวยได้แก่ ปริมาณฝนที่เพิ่มขึ้น ส่งผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตเฉลี่ยต่อพื้นที่ (ตันต่อไร่) ด้วยเช่นกัน (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2550)

บริษัทน้ำตาลมิตรผลมีโรงงานน้ำตาลในประเทศไทยทั้งหมด 5 โรงงานมีกำลังการหีบอ้อยรวมประมาณ 85,000 ตันต่อวัน สามารถหีบอ้อยได้ประมาณ 10-12 ล้านตันต่อปี โดยมีพื้นที่ปลูกอ้อยรวมประมาณ 1 ล้านไร่ นอกจากนี้ยังมีโรงงานผลิตไฟฟ้า 2 แห่ง ได้แก่ บริษัทด่านช้าง ไบโอเอ็นเนอร์ยี มีกำลังผลิตไฟฟ้า 53 เมกะวัตต์ และบริษัทภูเขียว ไบโอเอ็นเนอร์ยี มีกำลังการผลิตไฟฟ้า 65 เมกะวัตต์ ทั้ง 2 โรงงานใช้ชานอ้อยจากการหีบอ้อย เป็นวัตถุดิบหลัก (กลุ่มมิตรผล, 2551) สำหรับศักยภาพของเชื้อเพลิงชีวมวลในประเทศไทยพบว่า ในกรณีที่ประเทศไทยสามารถผลิตอ้อยได้ 60 ล้านตัน เมื่อเก็บเกี่ยวและหีบอ้อยแล้วจะเหลือชานอ้อยปริมาณ 3 ล้านตัน และยอดอ้อยและใบอ้อยปริมาณ 17 ล้านตัน โดยสามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้ 764 และ 4,105 เมกะวัตต์ เทียบได้กับปริมาณน้ำมันดิบจำนวน 1.23 และ 7.32 เมตริกตันตามลำดับ (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2551)

จากข้อมูลที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าการผลิตอ้อยในประเทศไทยไม่มีความสม่ำเสมอ รวมทั้งมีการใช้ชานอ้อยในการผลิตไฟฟ้าหรือผลิตภัณฑ์ต่อเนื่องอื่นๆ ดังนั้นการเร่งปรับปรุงเทคโนโลยีการผลิตรวมทั้งวิทยาการด้านการปรับปรุงพันธุ์อ้อย ให้มีลักษณะตรงตามที่ต้องการ โดยเฉพาะในปัจจุบันอุตสาหกรรมอ้อยเริ่มปรับตัวเพื่อมุ่งไปสู่ผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น การผลิตเอทานอล ไม้อัดจากชานอ้อย และที่สำคัญคือการผลิตไฟฟ้าจากชีวมวลหรือชานอ้อย ซึ่งทำให้มีความจำเป็นต้องมีการปรับปรุงพันธุ์ให้รองรับกับความต้องการ ทั้งด้านปริมาณวัตถุดิบและคุณภาพของวัตถุดิบที่เปลี่ยนไปในอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล ดังนั้นการใช้เทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับช่วยในการคัดเลือกพันธุ์อ้อย ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศไทย จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ให้ได้ตรงกับความต้องการลดระยะเวลา และมีความแม่นยำสูงขึ้น

วัตถุประสงค์

พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณเส้นใย ความสูง จำนวนลำตอกอ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ ในพันธุ์อ้อยลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่าง โคลนพันธุ์การค้าคือ K 93-207 และโคลนพันธุ์อ้อยป่าคือ MPT 97-1 (*Saccharum spontaneum*)

การตรวจเอกสาร

พันธุกรรมอ้อย

อ้อยเป็นพืชหลักที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลของโลก โดยมีการปลูกอ้อยใน 127 ประเทศทั่วโลก อ้อยจัดเป็นพืชตระกูลหญ้าขนาดใหญ่ ที่ปลูกอยู่ในเขตร้อนและกึ่งร้อน และจัดอยู่ในสกุล (Genus) *Saccharum* เผ่า (Tribe) Andropoaceae ในวงศ์ (Family) Poaceae พืชในสกุล *Saccharum* นี้จัดเป็นพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (high ploidy) และอนิวพลอยดี (aneuploidy) (Daniels and Roach, 1987)

ในพืชที่มีโครโมโซมหลายชุดหรือพืชโพลีพลอยด์ มีความจำเป็นต้องจำแนกระหว่าง haploid number (n) หรือจำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) และ monoploid number (x) หรือจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (basic set) โดยจำนวนชุดของโครโมโซมพื้นฐานในพืชพันธุ์หนึ่งๆจะต้องมีหนึ่งโครโมโซมจากแต่ละกลุ่ม homologous พืชโพลีพลอยด์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีชุดของโครโมโซมพื้นฐานเพิ่มขึ้นหลายซ้ำ โดยจำนวนชุดโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นหลายซ้ำใช้แทนว่า m ซึ่งแทนโฮโมโลกัส โครโมโซม (homologous chromosome) ในเซลล์ร่างกาย (somatic cell) โดยในพืชดิพลอยด์มีค่า $m = 2$ ขณะที่ในพืชเทตราพลอยด์มีค่า $m = 4$ ในพืชดิพลอยด์จำนวนโครโมโซมในเซลล์ร่างกายจะมีค่าเท่ากับ $2n = mx$ ดังนั้น $m = 2$ และ n นั่นคือจำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์เท่ากับจำนวนโครโมโซม ในพืชโพลีพลอยด์เซลล์สืบพันธุ์แต่ละเซลล์จะมีจำนวนโครโมโซมครึ่งหนึ่งในแต่ละกลุ่มของ โฮโมโลกัส โครโมโซม หรือ $n = mx/2$ หรือในกรณีของอ้อยซึ่งเป็นพืช ออกทราพลอยด์ ($m = 8$) มีจำนวนโครโมโซมในเซลล์ร่างกายเท่ากับ 80 ดังนั้น $n = 40$ และ $x = 10$ ดังนั้น $2n = 8x = 80$ (Ripol *et al.*, 1999)

พืชในสกุล *Saccharum* ประกอบพืชด้วย 6 ชนิด ได้แก่ *S. spontaneum* L., *S. robustum* Brandes and Jesweit ex Grassel, *S. officinarum* L., *S. barberi* Jesw., *S. sinense* Roxb. และ *S. edule* Hassk. โดยมีอ้อย 2 ชนิดคือ *S. officinarum* และ *S. spontaneum* เป็นต้นกำเนิดอ้อยพันธุ์การค้าในปัจจุบัน (Sreenivasan *et al.*, 1987) โดย *S. officinarum* เป็นที่รู้จักในชื่อ noble cane ซึ่งเป็นชนิดที่ใช้ในการผลิตน้ำตาล ขณะที่ *S. spontaneum* เป็นอ้อยป่า (wild species) โดยมีปริมาณน้ำตาลต่ำ มีปริมาณเส้นใยสูง และมีการปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน รวมทั้งต้านทานโรคที่สำคัญหลายอย่าง อ้อยชนิดนี้มีการกระจายตัวตั้งแต่ญี่ปุ่นจนถึงแถบทะเลเมดิเตอร์เร

เนียน นอกจากอ้อย 6 ชนิดนี้แล้ว ยังมีพืชที่มีความสัมพันธ์กับอ้อย (allied genera) เช่น *Erianthus* sect. *Ripidium*, *Miscanthus* sect. *Diadora* Keng, *Narenga* Bor และ *Sclerostachya* (Hask) A. Camus ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน โดยสามารถใช้ในการผสมข้ามสกุลกันได้ ทั้งนี้สามารถรวมพืชในกลุ่มนี้กับสกุล *Saccharum* เป็นกลุ่มที่เรียกว่า “*Saccharum* complex” (Mukherjee, 1957; Daneils and Roach, 1987)

ตอนต้นศตวรรษที่ 20 นักปรับปรุงพันธุ์ของชาวอินเดียสามารถสร้างลูกผสมระหว่าง *S. officinarum* และ *S. spontaneum* และทำการผสมกลับไปยัง *S. officinarum* ซึ่งเป็น recurrent parent กระบวนการนี้เรียกว่า nobilization โดยจะทำให้ได้โคลนพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงมาก (Roach, 1972) อย่างไรก็ตามการทำ nobilization เป็นการเพิ่มความซับซ้อนของจีโนม (genome complexity) เนื่องจากกระบวนการนี้จะทำให้โคลนพันธุ์ของ *Saccharum officinarum* สามารถส่งผ่านโครโมโซมร่างกาย (somatic chromosome) ระหว่างการผสมพันธุ์ครั้งแรกและการผสมกลับครั้งแรก ซึ่งตรงกันข้ามกับ *S. spontaneum* โดยที่หลังจากการผสมกลับครั้งที่ 2 การส่งผ่านโครโมโซมจะเริ่มเข้าสู่ภาวะปกติ ดังนั้นโคลนพันธุ์ที่ได้จากกระบวนการ nobilization จะมีจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้น ($2n = 100-130$) ซึ่งโดยทั่วไป 80% ของจีโนมได้มาจาก *S. officinarum* ส่วนที่เหลือเป็นจีโนมที่ได้จาก *S. spontaneum* (Price, 1957; Roach, 1969) และเนื่องจากจำนวนสายพันธุ์พ่อแม่ (*S. officinarum* และ *S. spontaneum*) ที่ใช้ในการผสมข้ามพันธุ์ครั้งแรกมีน้อยมาก จึงมีผลให้นักปรับปรุงพันธุ์มีความกังวลเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งความหลากหลายของพันธุกรรมในพันธุ์อ้อยที่มีน้อยได้รับการยืนยันจากงานวิจัยของ Lu *et al.* (1994 a, b)

อ้อยเป็นพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยลำต้น (vegetative propagation) อ้อยปลูก (*Saccharum* spp. hybrids) และสายพันธุ์อ้อยป่า (wild relative) จะมีความเป็น heterozygosity สูงมาก โดยที่การสร้างสายพันธุ์แท้หรือ pure inbred line ไม่สามารถทำได้เนื่องจากความยากลำบากในการผสมตัวเอง และการเข้าคู่กันอย่างสุ่มของ multiple homologous chromosome ซึ่งในประชากรที่กระจายตัว (segregating population) ที่ใช้ในการศึกษาพันธุกรรม คือลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์อ้อย 2 พันธุ์ (Kang *et al.*, 1983; Milligan *et al.*, 1990) หรือการผสมระหว่างพันธุ์อ้อยปลูกและพันธุ์อ้อยป่า (Guimaraes *et al.*, 1997; Ming *et al.*, 1998) การส่งผ่านโครโมโซมจะเป็นไปอย่างปกติในคู่ผสมทั้งหมด โดยได้ $nx + xn$ progeny (Burner, 1997) แต่จะได้ $2nx + xn$ transmission predominates ใน *S. officinarum* ($2n = 80$) x *S. spontaneum* ในลูกผสม F_1 และลูกผสมที่ได้จากการผสมกลับครั้งที่ 1 (BC_1) ซึ่งลักษณะเช่นนี้เรียกว่า female restitution (Bremer, 1923; Price, 1957)

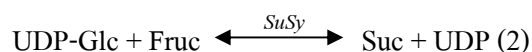
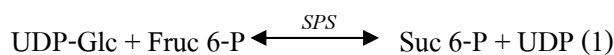
ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืชส่วนใหญ่ ความน่าเชื่อถือของการปรับปรุงและสร้างพันธุ์พืชใหม่ๆ ขึ้นอยู่กับขบวนการรวมตัวกันใหม่ของยีน (genetic recombination) และขบวนการกระจายตัวทางพันธุกรรม (genetic segregation) ที่เกิดขึ้นในลูกผสมที่ได้ สิ่งที่ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์คือการจำแนกลักษณะที่ต้องการ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันใหม่ของยีนระหว่างลูกผสมที่เกิดการกระจายตัวทางพันธุกรรม (Powell *et al.*, 1996) ชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) เริ่มมีความสำคัญในงานทางเกษตร โดยเฉพาะสามารถช่วยโครงการปรับปรุงพันธุ์แบบปกติ โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) ในการคัดเลือกพันธุ์พืช ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์ และนักพันธุศาสตร์ในการแก้ปัญหาหลายอย่างโดยผ่านทางวิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยปกติ (Caetano-Anollés *et al.*, 1991; Weising *et al.*, 1998)

เส้นใยและการใช้ประโยชน์

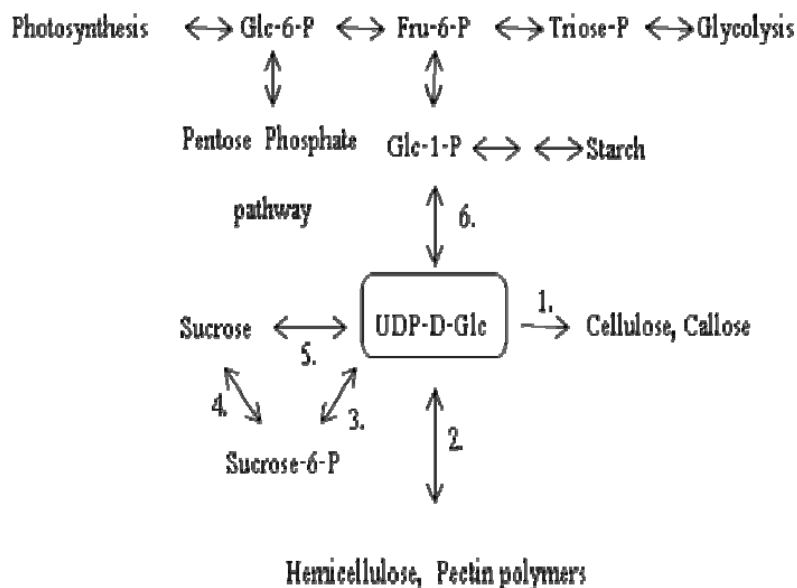
ขานอ้อย (bagasse) มีองค์ประกอบทางเคมีคือ แอลฟาเซลลูโลส (α -cellulose) ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เพนโตแซนประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเถ้า (ash content) ประมาณ 2.4 เปอร์เซ็นต์ (Pandey *et al.*, 2000) ขณะที่ Sanjuán *et al.*, (2001) พบว่าขานอ้อยมีองค์ประกอบทางเคมีที่ใกล้เคียงกัน คือประกอบด้วยแอลฟาเซลลูโลส (α -cellulose) ประมาณ 51 เปอร์เซ็นต์ เพนโตแซนประมาณ 28 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเถ้าประมาณ 3.9 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Yong (2005) รายงานว่า ขานอ้อยมีองค์ประกอบหลักโดยประมาณคือ เซลลูโลส (cellulose) 40 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) 24 เปอร์เซ็นต์ และ ลิกนิน (lignin) 25 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากขานอ้อยมีองค์ประกอบของเถ้าต่ำ ทำให้ขานอ้อยเป็นวัตถุดิบที่มีคุณภาพสูงกว่าพืชชนิดอื่น เช่น ตอซังของข้าวและข้าวสาลี ที่มีปริมาณเถ้าสูงถึง 17.5 เปอร์เซ็นต์ และ 11.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และขานอ้อยยังเป็นวัตถุดิบที่สามารถเก็บเกี่ยวพลังงานจากแสงมากกว่าวัตถุดิบชนิดอื่นเนื่องจากมีผลผลิตสูงต่อพื้นที่คือประมาณ 80 ตันต่อเฮกตาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ 1 ตันต่อเฮกตาร์ในข้าว 2 ตันต่อเฮกตาร์ในข้าวสาลี และ 20 ตันต่อเฮกตาร์ในพืชตระกูลหญ้าและไม้ยืนต้น (Pandey *et al.*, 2000)

สำหรับเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเส้นใยหรือขานอ้อย จะพบมากในผนังเซลล์พืช (cell wall) โดยคาร์บอนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงจะนำมาใช้สร้างผนังเซลล์โดยเปรียบเสมือนการสร้างแหล่งชีวมวลและพลังงานนั่นเอง สำหรับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ทั้งหมดในผนังเซลล์จะได้รับมาจากกลูโคส (glucose) โดยผ่านขบวนการทางชีวเคมีหลายขบวนการ ในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจำนวน 10 ชนิด ซึ่งเกิดขึ้นในผนังเซลล์ของพืช โดยศูนย์กลางของขบวนการเหล่านี้คือ UDP-glucose (UDP-Glc) (รูปที่ 1) ซึ่ง

พบว่าเกิดขึ้นที่ intercellular sites หรือ pools 3 ตำแหน่งได้แก่ cytosol, golgi-apparatus และ ผนังเซลล์ นอกจากนี้ UDP-Glucose ยังเป็นแหล่งของกลูโคส สำหรับการสร้างซูโครส (sucrose) ซึ่งใช้ในการเคลื่อนย้ายและการสะสมคาร์บอนในพืช โดยการสร้างซูโครสในพืชเกิดขึ้นจากขบวนการทางชีวเคมี 2 ขบวนการได้แก่



โดยซูโครสถูกสร้างขึ้นในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) โดยขบวนการสังเคราะห์แสงและในเซลล์สะสมอาหารจาก UDP-Glucose และ Fructose-6P (Fruc 6-P) ในขบวนการต่อเนื่องโดยเอนไซม์ sucrose phosphate synthase (SPS) และ sucrose phosphate phosphatase (SPP) เช่นเดียวกับการสังเคราะห์จาก UDP-Glucose และ Fructose โดยเอนไซม์ sucrose synthase (SuSy) (Bakker, 2007)



1. Cellulose/callose synthase; 2. UDP-Glucose dehydrogenase
3. Sucrose phosphate synthase; 4. Sucrose Phosphate phosphatase (Ces)
5. Sucrose synthase; 6. UDP-Glucose pyrophosphate pyrophosphorylase

ภาพที่ 1 ตำแหน่งศูนย์กลางของ UDP-Glucose ในขบวนการชีวเคมีของพืช (Yong, 2005)

อ้อยเป็นพืชที่นอกจากจะให้ผลผลิตหลักคือน้ำตาลแล้ว ยังมีผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาลที่สำคัญคือส่วนของเส้นใย (fiber) ที่เหลือจากการหีบอ้อย โดยสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกระดาษ อุตสาหกรรมเส้นใยบอร์ด (fiber board) และพาร์ทิเกิลบอร์ด (particle board) ซึ่งประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่ของเอเชีย (Hunsigi, 1993) ชานอ้อย (sugarcane bagasse) เป็นส่วนของเส้นใยที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ จากการผลิตน้ำตาลทรายดิบ โดยทั่วไปจะใช้เป็นเชื้อเพลิงในหม้อต้ม เพื่อผลิตไอน้ำหรือผลิตไฟฟ้าเพื่อใช้ในโรงงานน้ำตาล หรือ ใช้ในการผลิตเส้นใยบอร์ดที่มีความหนาแน่นปานกลาง (medium density fiberboard, MDF) ซึ่งพันธุ์อ้อยที่คัดเลือกเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบจะเป็นพันธุ์อ้อยที่คัดเลือกเพื่อให้มีปริมาณเส้นใยสูง โดยในปัจจุบันทั่วโลกมีแนวโน้มในการใช้ชานอ้อยเป็นวัตถุดิบสูงมากขึ้น เช่นการผลิตไฟฟ้า กระดาษ รวมทั้งผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่ได้จากขบวนการหมัก (fermentation) เพื่อผลิตแอลกอฮอล์ alkaloid อาหารสัตว์ที่มีโปรตีนสูง (single cell protein) และการผลิตเอนไซม์

ประเทศบราซิลเป็นประเทศผู้ผลิตน้ำตาล และแอลกอฮอล์จากอ้อยรายใหญ่ของโลกพบว่า ถ้าไม่มีการเผาใบอ้อยก่อนเก็บเกี่ยว จะสามารถใช้ส่วนยอดและใบอ้อย (trash) จากแปลงอ้อยมาใช้เป็นเชื้อเพลิง เพื่อเดินเครื่องกำเนิดไฟฟ้าพลังงานไอน้ำหรือเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ โดยมีการประมาณว่าถ้ามีการผลิตไฟฟ้าจาก trash และ bagasse จะสามารถสนับสนุนพลังงานไฟฟ้าให้กับประชาชนเป็นจำนวนถึง 7 ล้านคน จาก trash และ 5.5 ล้านคน จาก bagasse ต่อปี ตามลำดับ โดยพบว่าในอ้อย 1 ต้นเมื่อหีบแล้วจะมี bagasse เหลือ 0.26 ตันโดยมีความชื้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (Ripoli *et al.*, 2000) ในประเทศอินเดียพบว่าค่าพลังงานความร้อนที่ได้จาก bagasse 1 กิโลกรัม มีค่าประมาณ 18.11 MJ/kg. ขณะที่ค่าพลังงานความร้อนที่ได้จากใบอ้อยมีค่าเท่ากับ 17.43 MJ/kg. ซึ่งสามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลในการผลิตพลังงานความร้อนให้แก่อุตสาหกรรมได้เป็นอย่างดี (Jorapur and Rajvanshi, 1997)

ดังนั้นการคัดเลือกพันธุ์อ้อยให้มีปริมาณเส้นใยสูง ทำให้สามารถใช้ชานอ้อย (bagasse) ในการผลิตกระแสไฟฟ้า และมีไฟฟ้าส่วนเกิน จนสามารถจำหน่ายกระแสไฟเข้าสู่ระบบได้ สามารถเพิ่มรายได้ให้แก่อุตสาหกรรมน้ำตาล และลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าน้ำมันที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตกระแสไฟฟ้าได้เป็นอย่างดี ในอดีตประเทศบราซิลปลูกพันธุ์อ้อยที่มีปริมาณเส้นใยต่ำประมาณ 11 % ของน้ำหนักอ้อยสด ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีปริมาณ bagasse ไม่เพียงพอต่อการผลิตกระแสไฟฟ้า โดยต้องมีการซื้อไฟฟ้าจากภายนอกเข้ามาใช้ในโรงงานน้ำตาล ทำให้ต้นทุนในการผลิตน้ำตาลสูงขึ้น จนกระทั่งมีการวิจัยจนได้พันธุ์อ้อยที่มีปริมาณเส้นใยสูงถึง 15% การผลิตกระแสไฟฟ้าจึง

พอเพียงต่อการใช้ในโรงงาน และเมื่อมีการแก้ไขกฎหมายให้โรงงานน้ำตาลสามารถขายไฟฟ้าได้ จึงทำให้โรงงานน้ำตาลมีรายได้ในการขายไฟฟ้าส่วนเกินได้อีกทางหนึ่ง (Peres, 2005) สำหรับในประเทศไทยพบว่า อ้อยจำนวน 1 ต้นต้องการพลังงานไฟฟ้าประมาณ 25-30 kWh และไอน้ำจำนวน 0.4 ตันในขบวนการหีบอ้อย และผลิตน้ำตาลได้ประมาณ 100-121 กิโลกรัม ซึ่งจะได้ bagasse หรือ ชีวมวลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลจากอ้อยประมาณ 290 กิโลกรัม สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้ประมาณ 100 kWh (Energy policy and planning office, 2005)

เทคโนโลยีทางชีวโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืช

ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต หรือยีน (gene) หมายถึงหน่วยพันธุกรรมหรือหน่วยควบคุมลักษณะ (phenotype) ซึ่งเป็นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซม ประกอบด้วยส่วนที่ควบคุมการแสดงออก (promoter) และส่วนโครงสร้าง (structural) ความแตกต่างของยีนที่เกิดขึ้นจากการเรียงตัวของลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) จะแสดงออกในรูปแบบของฟีโนไทป์ (phenotype) โดยผ่านทางอาร์เอ็นเอ (RNA) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นๆ ลักษณะต่างๆที่ปรากฏในสิ่งมีชีวิตเกิดจากผลรวมของการทำงานร่วมกันของโปรตีนต่าง ๆ นั้นเอง กระบวนการปรับปรุงพันธุ์เป็นกระบวนการที่ทำการศึกษาและนำเอาลักษณะทางพันธุกรรมต่างๆที่ต้องการในสิ่งมีชีวิตมาใช้ จึงมีความจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำ ในการแยกความแตกต่างของลักษณะที่แสดงออกในสิ่งมีชีวิตในสายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สามารถใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์หนึ่ง ชนิดหนึ่ง หรือในระดับต่างชนิด เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่งๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในเซลล์ออร์กาเนลล์ (mitochondrial DNA และ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้ เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลนั้น (สุรินทร์, 2545)

เทคโนโลยีทางพันธุศาสตร์โมเลกุลมีความสำคัญในทางเกษตร ในการดัดแปลงสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ พืช และสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีการปกติทั่วไป (conventional breeding) ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์และนักพันธุศาสตร์ มีการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ และกลยุทธ์ในการปรับปรุงพันธุ์หลายประเภท เพื่อให้เกิดความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์ (Caetano-Anollés *et al.*, 1992; Weising *et al.*, 1998)

ในปัจจุบันนี้การสร้างแผนที่ยีนทำให้วิทยาการทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช และ การศึกษาพันธุศาสตร์ของพืช มีความก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว แผนที่ยีนที่มีรายละเอียดมากสามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลได้เป็นอย่างดีสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์พืชและนักพันธุวิศวกรรม ประโยชน์ที่ได้จากการทำแผนที่ยีนมีอย่างกว้างขวาง ประโยชน์อย่างหนึ่งที่สำคัญคือ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในแผนที่ยีนช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ (marker-assisted selection) แทนการคัดเลือกลักษณะนั้นโดยตรง ซึ่งทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการพัฒนาการของพืช ซึ่งช่วยให้สามารถวางแผนการผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ได้ก่อนที่จะออกดอก ดังนั้นจึงเป็นการย่นเวลาในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก (Allen, 1994) นอกจากนี้การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เกาะติด (linked) กับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการพร้อมๆ กับการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลของพันธุ์พืชที่ต้องการปรับปรุง (donor genome markers) ยังช่วยลดจำนวนรอบของการผสมกลับอีกด้วย (Shoemaker *et al.*, 1994)

สำหรับการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในสกุล *Saccharum* ได้มีการนำวิธีการทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ย่อย ได้แก่วิธี isozymes และ restriction fragment length polymorphisms (RFLPS) และต่อมามีการใช้วิธี PCR-based molecular marker เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP) และเทคนิคที่ได้มีการพัฒนาใหม่คือ microsatellites หรือ simple sequence repeats (SSR) (Cordeiro, 2001)

เทคนิค RFLP เป็นวิธีการที่ใช้ในการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงวิธีแรก นอกจากนี้ยังมีการทำแผนที่ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเออย่างสุ่ม โดยใช้ arbitrarily selected primers (Aljanabi *et al.*, 1993) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการพัฒนาเทคนิค AFLP ซึ่งเทคนิคนี้ใช้พื้นฐานการเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR โดยเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาจีโนมของสิ่งมีชีวิต (Vos *et al.*, 1995) โดยเมื่อทำแผนที่ดีเอ็นเอโดยใช้ single dose polymorphisms (SDMs) แถบเครื่องหมายของโมเลกุลดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมดจะมีการให้คะแนนเป็น dominant markers นอกจากนี้ข้อดีของเทคนิค AFLP คือ จะไม่ปรากฏลักษณะ co-dominant ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาโดยใช้เทคนิค PCR จะให้ข้อมูลที่มากกว่าต่อค่าใช้จ่ายที่ใช้ โดยเทคนิคนี้จะเป็นทางเลือกที่ดี ในการสร้าง linkage maps ที่สมบูรณ์ (Sobral and Honeycutt, 1993; Vos *et al.*, 1995) ดังนั้นเทคนิค AFLP จึงเป็นเทคนิคที่ให้ข้อมูลที่ดีที่สุดในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมที่เหมือนกัน ระหว่างโครโมโซมภายในสกุล *Saccharum* และระหว่างพืชตระกูลหญ้าชนิดอื่นรวมทั้งข้าวโพดและข้าวฟ่าง

โมเลกุลเครื่องหมาย AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)

คือเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) แบบหนึ่ง พื้นฐานของ AFLP คือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา พียูอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) จึงทำให้เทคนิคนี้เป็นการรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิค RFLP และประสิทธิภาพของ PCR เข้าด้วยกัน วิธีการนี้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว โดยสามารถพัฒนาได้มากกว่า 100 เครื่องหมายโมเลกุลจากดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยพบว่าวิธีการนี้มีความชัดเจนสูง ลักษณะเด่นที่สำคัญสำหรับวิธีการนี้คือความสามารถใช้ในการคัดเลือกได้พร้อมกันหลายตำแหน่งที่มีกระจายอย่างสุ่มบนจีโนมของสิ่งมีชีวิต วิธีการนี้จึงมีประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต (Lu *et al.*, 1996; Sensi *et al.*, 1996; Tohme *et al.*, 1996; Muluvi *et al.*, 1999; Loh *et al.*, 2000) ขณะที่ Basse *et al.*, 1998 และ Xu *et al.*, 1999 ได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP ในอ้อย โดย Basse *et al.* (1998) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP ในการจำแนกลักษณะของสายพันธุ์อ้อย โดยพิจารณาความหลากหลายของสายพันธุ์อ้อยป่าในแปลงรวมพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้อยที่เป็นสมาชิกของ *Saccharum complex* โดยมีเป้าหมายท้ายสุด คือการใช้เทคนิคนี้ในการช่วยเหลือการคัดเลือกความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นไปได้ใน introgression programme

การวิเคราะห์ AFLP สำหรับพืชที่มีขนาดจีโนมขนาดใหญ่ จะเป็นการทำ PCR 2 ขั้นตอน โดยอุณหภูมิในการทำ annealing เริ่มที่ 65°C และทำการลดอุณหภูมิในขั้นต่อไปให้เหลือ 55°C ในขั้นตอนแรกของการทำ PCR ใช้ AFLP primer จำนวน 2 primer ซึ่ง primer ทั้ง 2 ประกอบด้วย AFLP adapter sequence ที่มีการเพิ่ม เบสที่ปลาย 3' จำนวน 1 นิวคลีโอไทด์ ผลผลิตจากการทำ PCR ครั้งแรกจะถูกทำให้เจือจางและใช้เป็น template ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 ซึ่งโดยทั่วไป oligonucleotide primer จะมี nucleotide มาต่อที่ปลาย 3' จำนวน 3 ถึง 4 nucleotide โดยที่ primer หนึ่งตัวจะถูกติดฉลากด้วย ³³P radioactive หรือ fluorescent tag สำหรับการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล (marker) หลังจากขบวนการ amplification และ separation บนเจล polyacrylamide ขนาดใหญ่ (Vos *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1995)

เครื่องหมายโมเลกุล AFLP สามารถแยกกลุ่มของ *Saccharum complex* ออกเป็นกลุ่มๆ และผลที่ได้มีความสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล RFLP (Lu *et al.*, 1994a; Basse *et al.*, 1998) ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้มีศักยภาพในการใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในอ้อย เพื่อที่จะวิเคราะห์ความสัมพันธ์ภายในและระหว่างชนิด (species) ภายในสกุลเดียวกัน นอกจากนี้ AFLP มีลักษณะเด่นที่สามารถได้ข้อมูลอย่างรวดเร็ว ต่างจากเทคนิคอื่นๆที่ใช้หลักการของ PCR ด้วยกันคือไพรเมอร์ของ AFLP ไม่จำเป็นต้องจำเพาะเจาะจงกับสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยสามารถใช้ไพรเมอร์ของ AFLP ชุดเดียวกันได้กับสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไพรเมอร์ชนิดนี้เรียกว่า universal primer

เครื่องหมายโมเลกุล AFLP มีความเหมาะสมในการใช้สร้างแผนที่ยีนโนมของอ้อย เนื่องจากให้จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายจำนวนมากต่อคู่ไพรเมอร์ ทำให้สามารถศึกษาครอบคลุมยีนโนมอ้อยได้รวดเร็วกว่าเครื่องหมายโมเลกุลแบบอื่น (D'Hont *et al.*, 1996) Hoarau *et al.* (2002) ได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP มาวิเคราะห์ QTL ในลักษณะความหวานของอ้อย โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล AFLP เป็นเทคนิคที่สามารถสร้างเครื่องหมายโมเลกุลได้รวดเร็วเป็นจำนวนมาก และให้ผลการทดลองเที่ยงตรง แม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล AFLP จะเป็นการวิเคราะห์จีโนมโทปีแบบการข้ามสมบูรณ แต่ก็ได้ทำให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ linkage ลดลง

Wu *et al.* (1992) เสนอวิธีวิเคราะห์ลิงเกจในโพลีพลอยด์โดยใช้เทคนิค RFLP และให้คำจัดความว่า single dose restriction fragment (SDRF) หมายถึง โพลบ (probe) ที่สามารถไฮบริดซ์กับชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งเดียวกันบนโครโมโซมเพียงโครโมโซมเดียว จากไฮโมโลกัสโครโมโซมหลายแท่งของโพลีพลอยด์ ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่มีการกระจายตัวในรุ่นลูกในอัตราส่วน 1:1 โดยไม่คำนึงถึงชนิดพลอยดี (ploidy) โดยถ้าโพลบสามารถใช้กับดีเอ็นเอสองตำแหน่งหรือสามตำแหน่งบนไฮโมโลกัสโครโมโซมสองหรือสามแท่ง แถบดีเอ็นเอทั้งสองแบบนี้เรียกว่า double และ triple dose DNA fragment (DDRF หรือ TDRF ตามลำดับ) ซึ่งเทคนิคดีเอ็นเอแบบอื่นก็สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอแบบนี้ได้

สำหรับการสร้างแผนที่ยีนโนมในอ้อยนั้นมีการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย AFLP และ SSR กันมาก ซึ่ง Hoarau *et al.* (2001) และ Rossi *et al.* (2003) ใช้ประชากรที่ได้จากการผสมตัวเองของพันธุ์ R570 ในการสร้างแผนที่ยีนโนมที่มีโมเลกุลเครื่องหมายจำนวน 1,169 โมเลกุลเครื่องหมาย ซึ่งมีการกระจายตัวอยู่ในกลุ่มลิงเกจจำนวน 128 กลุ่ม ขณะที่การใช้พันธุ์ Q165 ในการสร้างแผนที่ยีนโนมโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายจำนวน 968 โมเลกุลเครื่องหมาย พบการกระจายตัวของโมเลกุล

เครื่องหมายอยู่ใน กลุ่มลิงเกจจำนวน 136 กลุ่ม (Aitken *et al.*, 2005) และจากจำนวนโมเลกุลเครื่องหมายจำนวนมากที่ใช้ในการสร้างแผนที่ยีนในอ้อยพันธุ์ R570 และ Q165 ซึ่งครอบคลุมประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของจีโนมอ้อย มีสาเหตุเนื่องจากอ้อยมีจำนวนโครโมโซมมาก ซึ่งในการใช้จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่คล้ายกันนี้ สามารถสร้างแผนที่พันธุกรรมได้ครอบคลุมทั้งจีโนมได้เป็นอย่างดี ทั้งในข้าวฟ่าง (Menz *et al.*, 2002) และในข้าวสาลี (Chalmers *et al.*, 2001)

การวิเคราะห์ QTL

QTL เป็นชื่อย่อมาจากคำว่า Quantitative Trait Loci หรือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางปริมาณ ซึ่งก่อนที่จะค้นพบเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ยีนเหล่านี้รู้จักกันในคำว่า polygenes โดยเรามีความรู้เกี่ยวกับยีนเหล่านี้้น้อยมาก นอกจากความจริงที่ว่าในลักษณะใดๆจะมียีนหลายยีนที่กระจายตัวในรูปแบบของเมนเดล (mendelian fashion) ในประชากรที่ให้มา และผลของยีนเหล่านั้นจะเป็นแบบผลบวก (Kearsey and Pooni, 1996) ซึ่งปัญหาพื้นฐานของการศึกษาลักษณะทางปริมาณที่ผ่านมาก็คือลักษณะที่พืชแสดงออก (phenotype) จะบอกเราน้อยมากเกี่ยวกับพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว ซึ่งการค้นพบทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลจะช่วยให้เราศึกษาลักษณะ QTL แต่ละลักษณะได้ง่ายขึ้น (Lander and Botstein, 1989)

การตรวจสอบค่าอัตราพันธุกรรม (heritability, h^2) เป็นการตรวจสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อลักษณะที่แสดงออก (phenotype) ได้แก่ปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ซึ่งปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีผลกระทบต่อลักษณะที่แสดงออกได้แก่ ผลของยีนแบบบวกสะสม (additive gene action, σ_a^2) เป็นการแสดงออกของยีนแต่ละแอลลีล มีผลต่อลักษณะแบบสะสมโดยทั่วไป การแสดงออกของยีนแบบนี้มีผลต่อการควบคุมในลักษณะทางปริมาณมากที่สุดนอกจากนี้ยังมีผลของยีนแบบข่ม (dominant gene action, σ_d^2) และปฏิกริยาข้ามตำแหน่งหรือปฏิกริยาระหว่างยีน (epistatic gene action, σ_i^2) ค่าอัตราพันธุกรรมเป็นดัชนีทางสถิติเพื่อใช้ประเมินว่าลักษณะที่แสดงออกมานั้น มีผลจากอิทธิพลของพันธุกรรมเท่าไร ซึ่งค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้าง (broad sense heritability) สัดส่วนความแปรปรวนทั้งหมดที่แสดงออก (total phenotypic variance) เป็นผลมาจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งสามแบบ คือ $\sigma_g^2 = \sigma_a^2 + \sigma_d^2 + \sigma_i^2$ เมื่อ σ_a^2 คือความแปรปรวนแบบบวกสะสม (additive gene variance) σ_d^2 คือความแปรปรวนแบบข่ม (additive gene variance) และ σ_i^2 คือความแปรปรวนแบบปฏิกริยาข้ามตำแหน่ง (epistatic gene variance) (ธีรยุทธ์, 2549)

ลักษณะส่วนใหญ่ที่สำคัญทางเศรษฐกิจของพืชถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง (Quantitative trait loci ; QTL) การปรับปรุงลักษณะเหล่านี้โดยคัดเลือกจากฟีโนไทป์ มีประสิทธิภาพของการคัดเลือกลดก่อนข้างต่ำ เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลมาก ข้อมูลจากแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลที่มีรายละเอียดมากสามารถใช้ศึกษาพื้นฐานของพันธุกรรมของลักษณะ QTL ได้ เช่น ศึกษาจำนวนยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะนั้น ตำแหน่งของยีนบนโครโมโซม และอิทธิพลของยีนแต่ละยีนที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะนั้น เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ ที่เกาะติดกับลักษณะ QTL สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกเพื่อให้ได้จำนวนแอลลีลที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะมากที่สุด ซึ่งจะช่วยให้ช่วยย่นระยะเวลาและลดทรัพยากร เพื่อประเมินผลของการคัดเลือกได้เป็นอย่างมาก (Peterson *et al.*, 1988; Lander and Thompson, 1990)

พันธุศาสตร์โมเลกุลจะแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สามารถให้คะแนน (score) และทำแผนที่ (map) ในประชากรที่มีการกระจายตัวได้เกือบทั้งหมด โดยการจำแนกและทำแผนที่ของเครื่องหมายโมเลกุล (marker) จำนวน 10 ถึง 15 เครื่องหมายต่อ 1 โครโมโซมเป็นสิ่งที่ไม่ทำได้ไม่ยาก โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่พบเกือบทั้งหมดจะอยู่ในบริเวณ โครโมโซมที่ไม่ได้เป็นส่วนที่เป็นรหัสสำหรับยีน (non-coding region) โดยจะไม่ส่งผลถึงลักษณะที่ทำการตรวจสอบโดยตรง แต่เครื่องหมายโมเลกุลบางเครื่องหมายจะมีความเกี่ยวโยง (linked) กับ QTL ซึ่งจะมีผลต่อลักษณะที่เราสนใจ ซึ่งการวิเคราะห์ QTL จะขึ้นอยู่กับความเป็นจริงที่ว่า จะต้องมีการเกิด linkage โดย marker locus และ QTL จะไม่มีการกระจายตัวอย่างอิสระ ซึ่งสภาพที่ยีนมีการกระจายตัวอย่างไม่เป็นอิสระ เรียกว่า linkage disequilibrium (Kearsey, 1998)

เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีจำนวนชุดของโครโมโซม และจำนวนโครโมโซมจำนวนมาก โดยเฉพาะในพันธุ์อ้อยที่ปลูกเป็นพันธุ์การค้าอยู่ทั่วไป จึงทำให้อ้อยเป็นพืชที่สร้างแผนที่ยีนได้ยากที่สุด โดยพบว่าในพันธุ์อ้อยลูกผสมมีโครโมโซม 8-14 ชุด ทำให้ต้องใช้ลูกผสมถึง 300 โคลน จึงเพียงพอในการสร้างแผนที่ยีน (Wu *et al.*, 1992) ที่สำคัญโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความแตกต่าง (polymorphic marker) ในระดับ triplex หรือระดับที่มี dose สูงไม่สามารถที่อธิบายผลได้อย่างละเอียด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโมเลกุลเครื่องหมายเหล่านี้ไม่สามารถใช้สร้างแผนที่พันธุกรรมได้ ดังนั้นจึงมีการเลือกใช้เฉพาะ โมเลกุลเครื่องหมาย simplex ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมของอ้อยซึ่งมีการใช้ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลในอ้อยอย่างหลากหลาย เช่น เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Grivet *et al.*, 1996; Ming *et al.*, 2001) เทคนิค Randomly Amplified Polymorphism (RAPD) (Da Silva *et al.*, 1993; Mudge *et al.*, 1996), เทคนิค Radio-labelled Amplified Fragments (RAF) (Jordan *et al.* 2004), เทคนิค Amplified Fragment Length

Polymorphism (AFLP) (Hoarau *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003; Aitken *et al.*, 2005; Reffay *et al.*, 2005) เทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) (Rossi *et al.*, 2003; Aitken *et al.*, 2005; McIntyre *et al.*, 2005; Reffay *et al.*, 2005) และเทคนิค single nucleotide Polymorphism (SNP) (McIntyre *et al.*, 2006)

Wu *et al.* (1992) ให้คำจำกัดความของคำว่า single dose restriction fragment (SDRF) ซึ่งโดยเทคนิค RFLP แล้วหมายถึงโพลีที่ไฮบริไดซ์ (hybridize) กับชิ้นดีเอ็นเอได้ตำแหน่งเดียวบนโครโมโซมเดียวจากหลายโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตโพลีพลอยด์ ซึ่งสามารถจำแนกได้จากการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1:1 (ปรากฏ: ไม่ปรากฏ) ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏหรือโพลีที่สามารถไฮบริไดซ์ได้สองหรือสามตำแหน่งบนโฮโมโลกัสโครโมโซมสองแท่งหรือสามแท่ง (duplex และ triplex loci) แถบดีเอ็นเอทั้งสองแบบนี้เรียกว่า double และ triple dose restriction fragment ตามลำดับ เมื่อพิจารณาชิ้นดีเอ็นเอแบบ single dose สองชิ้นจะพบความเป็นไปได้ที่จะเกิดลิงเกจกันได้ 3 แบบคือ coupling, repulsion และ ไม่เกิดลิงเกจกัน โดยลิงเกจในสภาพ coupling เกิดในกรณีที่ชิ้นดีเอ็นเอสองชิ้นมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน ขณะที่ repulsion จะมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแต่อยู่ในกลุ่มโฮโมโลกัสโครโมโซมเดียวกัน ซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้ที่เมื่อเกิดรีคอมบินชันจะนำชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นไปด้วยกัน ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่เป็น single dose และมีลิงเกจในสภาพ coupling จะมีการกระจายตัวเช่นเดียวกับฟีชีพลอยด์ ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธีวิเคราะห์มาตรฐานทั่วไปในการทดสอบลิงเกจ รวมทั้งการประมาณค่าระยะทางระหว่างชิ้นดีเอ็นเอ

แผนที่พันธุกรรม (genetic map) ของพืชออทิพอลอยด์ต้องมียีนประกอบสองส่วนที่สำคัญคือ กลุ่มลิงเกจ (linkage group) และกลุ่มโฮโมโลกัส (homologous group) โดยจำนวนของกลุ่มลิงเกจหรือโครโมโซม ($2n$) และจำนวนพลอยดี (m) จะขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด สำหรับอ้อย เช่น *Saccharum spontaneum* L. ซึ่งเป็นออททราพลอยด์ ($m=8$) โดยมีจำนวนโครโมโซมในเซลล์ร่างกาย $2n = 64$ ดังนั้นการสร้างแผนที่พันธุกรรมให้สมบูรณ์ต้องประกอบด้วย 64 กลุ่มลิงเกจ โดยจัดเป็น 8 กลุ่มโฮโมโลกัส ซึ่งแต่ละกลุ่มจะมี 8 โครโมโซม หรือ $m = 8$ (Da Silva, 1993) การสร้างแผนที่พันธุกรรมดังกล่าวมีข้อกำหนด (assumption) ดังนี้

- A1: โฮโมโลกัสโครโมโซมต้องมีการแยกตัวจากกันระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส
- A2: โครโมโซมที่ไม่ได้เป็นโฮโมโลกัสกันจะมีการแยกตัวเป็นอิสระกัน
- A3: ไม่เกิดการแยกตัวของโครโมโซมที่ผิดปกติแบบ (segregation distortion)
- A4: ไม่เกิดการรบกวนขบวนการเกิด crossing over

A5: ไม่เกิด chromatid interference

ข้อกำหนด A1 ทำให้มั่นใจว่าเซลล์สืบพันธุ์จะต้องมีโครโมโซมแต่ละแบบเท่าเทียมกัน โดยเลี่ยงการเกิดการกลายพันธุ์ ที่เกิดจากจำนวนของโครโมโซมหรือเกิดความผิดปกติของจำนวนโครโมโซม สำหรับข้อกำหนด A2 และ A3 จะทำให้เกิดการกระจายตัว 1:1 สำหรับแอลลีลที่แตกต่างกันของโลคัสใดๆ ข้อกำหนด A4 และ A4 ทำให้มั่นใจว่าโอกาสการเกิด recombination จะกระจายทั่วจีโนม และนอกจากนี้ยังต้องมีข้อกำหนดเพิ่มเติมสำหรับอโทพอลิพลอยด์ คือ

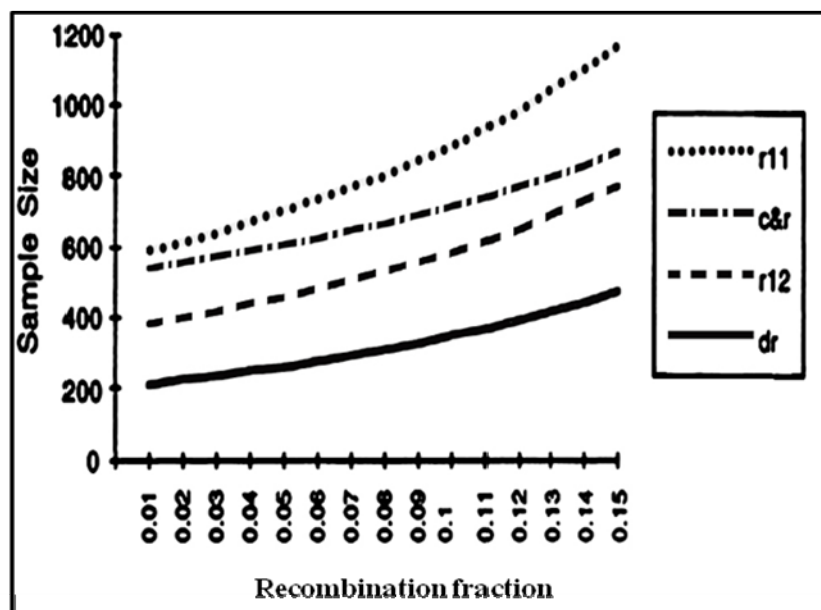
A6: แต่ละโลคัสจะปรากฏอยู่ในกลุ่มโฮโมโลคัสหนึ่งๆเท่านั้น

A7: โฮโมโลคัสโครโมโซมจะเกิดการเข้าสู่แบบสุ่มระหว่างการเกิดไมโอซิส

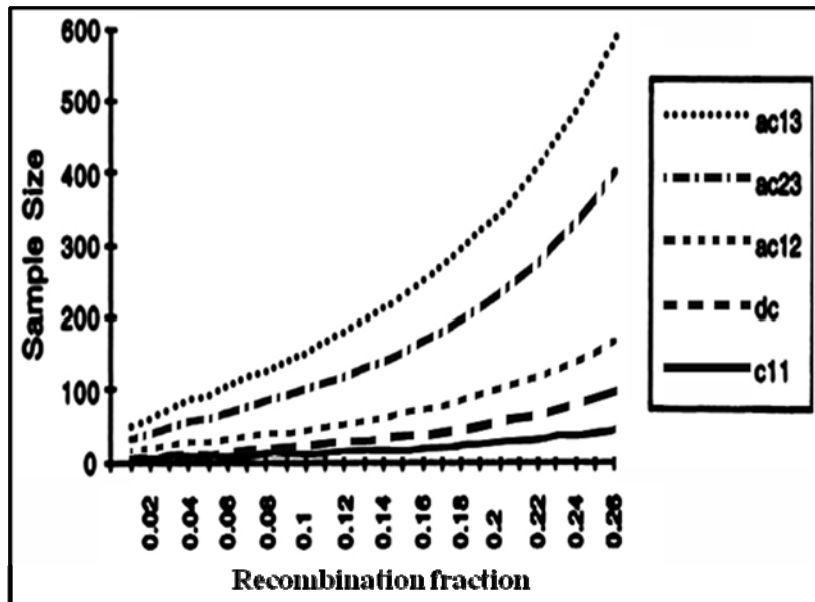
A8: ไม่เกิด double reduction คือแต่ละโครโมโซมจะแยกตัวจากคู่ระหว่างไมโอซิสไปยังคนละเซลล์สืบพันธุ์ (Ripol *et al.*, 1999)

การสร้างแผนที่พันธุกรรมหรือ linkage map ในพืชโพลีพลอยด์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีการกระจายตัวในอัตราส่วนปรากฏ:ไม่ปรากฏเท่ากับ 1: 1 หรือ simplex marker ถ้าจำนวนประชากรที่ใช้ศึกษามีจำนวนน้อยจะไม่สามารถแสดง linkage ในสภาพ repulsion phase ได้ เนื่องจากต้องการจำนวนประชากรที่ใช้ศึกษาต้องสูงถึง 750 โคลน (Aljanabi, 1993) ภาพที่ 2 แสดงจำนวนประชากรที่ต้องการสำหรับการตรวจสอบที่ระดับ 80 เปอร์เซ็นต์ของค่า power of linkage พบว่าถ้าต้องการตรวจสอบลิงเกจในในรูปแบบ repulsion 1&1 (ลิงเกจระหว่าง simplex marker) ที่ค่า recombination fraction ประมาณ 0.01 ต้องใช้ประชากรในการศึกษาประมาณ 600 โคลนพันธุ การตรวจสอบลิงเกจในรูปแบบ double repulsion ที่ค่า recombination fraction ประมาณ 0.01 ต้องใช้ประชากรในการศึกษามากกว่า 200 โคลนพันธุ และ การตรวจสอบลิงเกจในรูปแบบ repulsion 1&2 ที่ค่า recombination fraction ประมาณ 0.01 ต้องใช้ประชากรในการศึกษาประมาณ 400 โคลนพันธุ ซึ่งประชากรจำนวนมากจะทำให้การปลูกทดสอบในสภาพแปลงทดสอบต้องใช้พื้นที่มากซึ่งจะมีผลต่อความสม่ำเสมอของพื้นที่ในการทำแปลงทดสอบ (Ripol *et al.*, 1999)

Ripol *et al.* (1999) แสดงจำนวนประชากรที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ลิงเกจแบบ coupling ที่ระดับ 80 เปอร์เซ็นต์ของค่า power of detection linkage พบว่า สามารถใช้ประชากรประมาณ 100 โคลนพันธุในการวิเคราะห์ลิงเกจในรูปแบบ asymmetric coupling 1&1, double coupling, asymmetric coupling 1&2 และ asymmetric coupling 2&3 ที่ค่า recombination fraction ต่ำกว่า 0.1 ยกเว้นการวิเคราะห์ลิงเกจในรูปแบบ asymmetric coupling 1&3 ที่ต้องการจำนวนประชากรในการ



ภาพที่ 2 จำนวนประชากรที่ต้องการสำหรับค่าการตรวจสอบ power of linkage เท่ากับ 80 เปอร์เซนต์สำหรับรูปแบบต่างๆของลิงเกจในสภาพ repulsion (ที่มา Ripol *et al.*, 1999)



ภาพที่ 3 จำนวนประชากรที่ต้องการสำหรับค่าการตรวจสอบ power of linkage เท่ากับ 80 เปอร์เซนต์สำหรับรูปแบบต่างๆของลิงเกจในสภาพ coupling (ที่มา Ripol *et al.*, 1999)

วิเคราะห์ลิงเกจสูงกว่ารูปแบบอื่นโดยที่ค่า recombination fraction ประมาณ 0.1 ต้องใช้ประชากรลูกผสมมากกว่า 150 โคลนพันธุ์ สำหรับการวิเคราะห์ลิงเกจที่ระดับค่า recombination fraction ที่สูงขึ้นมีความจำเป็นต้องใช้ประชากรในการวิเคราะห์ที่มากขึ้น โดยพบว่าถ้าต้องการวิเคราะห์รูปแบบของลิงเกจ asymmetric coupling 2&3 และ asymmetric coupling 1&3 ที่ระดับ recombination fraction มากกว่า 0.2 ต้องใช้ประชากรมากกว่า 150 โคลนพันธุ์ (ภาพที่ 3)

ประโยชน์ของการวิเคราะห์รูปแบบลิงเกจของ double และ triple dose restriction fragments ร่วมกับ single dose restriction fragment (SDRF) ได้แก่ (1) ย่นย่อการจำแนกกลุ่มโฮโมโลกัสของลิงเกจ (2) เป็นการตรวจสอบการลิงค์ของ SDRF แบบ repulsion ได้ทางอ้อม และ (3) เป็นการใช้ข้อมูลที่มีอยู่อย่างคุ้มค่า โดยแนะนำให้วิเคราะห์ลิงเกจสำหรับออโตโพลีพลอยด์สำหรับรูปแบบของลิงเกจจำนวน 5 รูปแบบคือ 1&2-asymmetric coupling, 1&2 asymmetric repulsion, 1&3 asymmetric coupling, double coupling และ 2&3 asymmetric coupling แต่เนื่องจาก 1&2 asymmetric repulsion และ 1&3 asymmetric coupling ไม่สามารถศึกษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถ้าประชากรที่ใช้ศึกษามีไม่มากพอ (Da Silva and Sorrels, 1996) นอกจากนี้ Raboin *et al.* (2006) พบว่าการวิเคราะห์ลิงเกจแบบ two-point analysis ระหว่าง simplex marker ในอ้อย ทำได้โดยใช้ค่า LOD score threshold เท่ากับ 5.0 และค่า recombination threshold เท่ากับ 0.35 โดยใช้โปรแกรม Mapmaker 3.0

การสร้างแผนที่พันธุกรรมอ้อยที่สมบูรณ์ต้องการกลุ่มลิงเกจจำนวนมาก และแต่ละกลุ่มต้องถูกจัดเข้าไปในกลุ่มโฮโมโลกัส นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุล single dose จะปรากฏแค่หนึ่งตำแหน่งเท่านั้น ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุล single dose จะถูกกำหนดให้ทำหน้าที่ในการสร้างกลุ่มลิงเกจและแต่ละโลกัสจะมีตำแหน่งแค่หนึ่งกลุ่ม เมื่อเครื่องหมายโมเลกุลที่มีระดับมากกว่า single dose (multi-dose) ถูกเติมลงในแผนที่พันธุกรรมมากกว่าหนึ่งกลุ่มโครโมโซม หรือกลุ่มที่ปรากฏเครื่องหมาย multi-dose เดียวกันจะถูกจัดเข้าในกลุ่มโฮโมโลกัสเดียวกัน เครื่องหมายโมเลกุล multi-dose จะทำให้เกิดการจัดกลุ่มโฮโมโลกัส (Ripol *et al.*, 1999)

วิธีการที่ใช้อย่างกว้างขวางในจำแนกยีนเครื่องหมาย (genetic markers, QTLs) ที่เชื่อมโยงไปยังลักษณะทางปริมาณ คือการใช้แผนที่พันธุกรรม (genetic map) แต่ในพืชที่มีการศึกษาทางพันธุกรรมน้อยนั้น มักจะมีจำนวนยีนเครื่องหมายน้อย การใช้วิธีการ single marker analysis ซึ่งใช้การวิเคราะห์ simple linear regression สามารถใช้จำแนก QTL ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน (Chandra *et al.*, 2004)

Aitken *et al.* (2004) ได้ศึกษา QTL จากลูกผสมจำนวน 320 สายพันธุ์ ที่ได้จากการผสมระหว่างโคลนพันธุ์ Q 165 กับโคลนพันธุ์ IJ76-514 (*Saccharum officinarum*) โดยใช้ 1,000 เครื่องหมายโมเลกุลทั้งจาก AFLP และ SSR โดยได้ทำการศึกษากายภาพของลักษณะทางปริมาณของผลผลิต และองค์ประกอบของผลผลิต พบว่ามี 32 QTL ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่ทำการศึกษา และแต่ละ QTL สามารถอธิบายผลได้ 3-9 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวน (R^2) และมี 11 QTL มีความเกี่ยวข้องกับลักษณะที่ทำการทดสอบมากกว่า 1 ลักษณะ

Asnaghi *et al.* (2003) ใช้เทคนิค AFLP ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมบริเวณยีน *Bru1* ซึ่งเป็นยีนต้านทานโรคราสนิมที่พบในพันธุ์ R570 และสามารถวางโมเลกุลเครื่องหมายจนเข้าใกล้ยีนที่ระยะ 1.9 และ 2.2 centimorgan จากยีนทั้ง 2 ด้าน โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis ขณะที่ Raboin *et al.* (2006) ศึกษา QTL จากประชากรอ้อยลูกผสมจาก R570 x MQ76-53 จำนวน 198 โคลน พบเครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคราสนิม (rust) จำนวน 2 เครื่องหมายโมเลกุล และพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล aaccac6 มีตำแหน่งอยู่ใกล้กับยีน ซึ่งสามารถอธิบายความแปรปรวนของความต้านทานโรค (R^2) ได้ 26 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่โมเลกุลเครื่องหมาย acgcta16 ซึ่งน่าจะอยู่ใกล้ยีนที่ตำแหน่งใหม่และถ่ายทอดมาจาก MQ76-53 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้เพียง 13 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้ง 2 โมเลกุลเครื่องหมายสามารถอธิบายความแปรปรวนของความต้านทานโรคได้ 38 เปอร์เซ็นต์เมื่อวิเคราะห์ multiple regression

Reffay *et al.* (2005) ศึกษา QTL ในลักษณะที่เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำตาลและผลผลิตในประชากรอ้อยลูกผสม Q177 x MQ77-340 จำนวน 232 โคลนพันธุ์ โดยใช้เทคนิค AFLP และ SSR พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการตรวจสอบ และสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 2-7 เปอร์เซ็นต์ที่ค่า $P \leq 0.01$ โดยพบอิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลทั้งทางบวกและลบ ซึ่งมี 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเส้นใย และมีอิทธิพลทางลบกับลักษณะดังกล่าว และสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Piperidis *et al.* (2008) ศึกษาความสัมพันธ์ของโมเลกุลเครื่องหมาย กับลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลในประชากรลูกผสมเดียวกันโดยใช้เทคนิค AFLP และ SSR เช่นเดียวกัน พบว่าโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ตรวจสอบ สามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะได้ 3 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับงานทดลองของ Hoarau *et al.* (2002) และ Aitken *et al.* (2006) แต่มีความแตกต่างจากผลการทดลองของ Ming *et al.* (2002) ซึ่งพบว่าโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ตรวจสอบ สามารถอธิบายความแปรปรวนของบางลักษณะได้ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากประชากรที่ใช้ศึกษามาจากลูกผสมชั่วที่ 1 ของลูกผสม

อ้อยปลูก 2 โคลนพันธุ์กับ *S. spontaneum* จำนวน 2 โคลนพันธุ์ จึงทำให้ลูกผสมที่ได้มีความแปรปรวนสูงในลักษณะปริมาณน้ำตาล

การศึกษา QTL จากประชากรที่ได้จากการผสมตัวเองของโคลนพันธุ์ R570 พบว่าแต่ละตำแหน่งของ QTL สามารถอธิบายความแปรปรวนของแต่ละลักษณะต่ำ หรือมีค่า R^2 ประมาณ 3 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์ อาจมีผลเนื่องมาจากจำนวนชุดของโครโมโซมที่สูงและมีค่า heterozygosity สูง ซึ่งทำให้เกิดการอยู่ร่วมกันของแอลลีลหลายแอลลีลในแต่ละตำแหน่งของยีน หรือหมายถึงหลายๆ แอลลีลมีผลต่อลักษณะเดียวกัน โดยในพืชดิพลอยด์ เกิดความแตกต่างระหว่างแค่ 2 แอลลีล ที่จะมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะที่ทำการศึกษา แต่ในอ้อยตำแหน่งหนึ่งๆต้องพิจารณา 8, 10 หรือ 12 แบบของแอลลีลที่มีการกระจายตัวต่อ 1 locus ขณะที่การศึกษาโดยใช้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F1 interspecific population) ระหว่าง *Saccharum officinarum* และ *Saccharum robustum* (Sills *et al.*, 1995) และลูกผสมที่ได้จาก *Saccharum officinarum* และ *Saccharum spontaneum* (Ming *et al.*, 2001) ซึ่งพบ QTL ที่มีอิทธิพลสูง เนื่องจากในประชากรเหล่านี้ แอลลีลที่ต้องการศึกษามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงทำให้เกิดการกระจายตัวของลักษณะที่ทำการตรวจสอบชัดเจน ส่งผลให้อิทธิพลของ QTL มีสูง (Hoarau *et al.*, 2002)

การศึกษาในลูกผสมที่คล้ายกันคือในลูกผสม Q117 x 74C42 จำนวน 108 โคลนพันธุ์ ในลักษณะจำนวนลำและการเกิดหน่อลำ (suckering) โดยใช้เทคนิค RFLP และ RAFs วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมายกับลักษณะแบบ single marker analysis พบโมเลกุลเครื่องหมายจำนวน 17 โมเลกุลเครื่องหมายมีความสัมพันธ์กับขนาดลำ และ 14 โมเลกุลเครื่องหมายมีความสัมพันธ์กับหน่อลำ (sucker) โดยโพลี RFLP ที่ใช้ศึกษามีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีนที่ควบคุมการแตกกอและการเกิดรากในข้าวฟ่าง (Jordan *et al.*, 2004)

อุปกรณ์และวิธีการ

โคลนพันธุ์อ้อย

1. โคลนพันธุ์ K 93-207 เป็นลูกผสมจากคู่ผสม อู่ทอง1 x K 84-200 มีผลผลิตประมาณ 15-20 ตันต่อไร่ ความหวาน 11-13 ซีซีเอส แดกกอปานกลาง 4-5 ลำ เส้นผ่านศูนย์กลางลำใหญ่ อายุเก็บเกี่ยว 10-12 เดือน ต้านทานโรคเหี่ยวเน่าแดง กอตะไคร้ ใบจุดเหลือง
2. โคลนพันธุ์พ่อ MPT 97-1 เป็นอ้อยป่า (*Saccharum spontaneum* L.) เก็บรวบรวมจากจังหวัดหนองคายเมื่อ พ.ศ.2540 มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำเล็ก แดกกอมาก 15-20 ลำต่อกอ ปล้องค่อนข้างยาว น้ำตาลน้อยมาก เส้นใยสูง พบโรคใบจุดเหลืองและเส้นใบแดงเล็กน้อย

การปลูกแปลงทดสอบ

ปีที่ 1(อ้อยปลูก)

ทำการปลูกโคลนพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างโคลนพันธุ์ K 93 – 207 และ MPT 97-1 (*Saccharum spontaneum*) จำนวน 168 โคลนพันธุ์ ร่วมกับสายพันธุ์แม่พ่อ และพันธุ์มาตรฐานคือพันธุ์ K 84-200 โดยปลูกแบบโคลนพันธุ์ต่อแถว (clone / row) โดยใช้ขนาดแปลงย่อย 3.9 ตารางเมตร ใช้ระยะระหว่างแถว 1.3 เมตร แถวยาว 3.0 เมตร ใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ ใช้รหัสของโคลนพันธุ์เป็น MPT 03 ก่อนปลูกใส่ปุ๋ยรองพื้นสูตร 16-24-8 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ หลังปลูกฉีดพ่นสารคุมการงอกของเมล็ดวัชพืช 1 ครั้ง เมื่ออ้อยอายุ 70-90 วันใส่ปุ๋ยสูตร 21-0-0 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ และเมื่ออ้อยอายุ 120 วัน โดยใช้อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ กำจัดวัชพืชและให้น้ำตามความจำเป็น เก็บเกี่ยวเมื่ออ้อยมีอายุ 12 เดือน เก็บข้อมูลเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และส่งตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย

ปีที่ 2 (อ้อยตอ)

ทำการบำรุงตอ โดยใส่ปุ๋ย 16-24-8 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ และใส่ปุ๋ยสูตร 21-0-0 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่เมื่ออ้อยอายุได้ 90 วัน กำจัดวัชพืชและให้น้ำตามความจำเป็น เก็บเกี่ยวเมื่ออ้อยมีอายุ 12 เดือน เก็บข้อมูลเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และส่งตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย

การเก็บข้อมูลทางพืชไร่

เก็บข้อมูลการเจริญเติบโต

1. ความงอก โดยการนับจำนวนต้นที่งอกเมื่ออ้อยมีอายุ 1 เดือน
2. จำนวนลำตอกอ นับจำนวนลำทั้งหมดในแต่ละโคกต้นพันธุ์เมื่ออ้อยมีอายุ 6 เดือน นำมาหารด้วยจำนวนต้นที่งอกจะได้ข้อมูลจำนวนลำตอกอ
3. บันทึกข้อมูลเส้นผ่านศูนย์กลางลำ โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ (vernier caliper) สุ่มวัดความกว้างของลำอ้อยบริเวณกลางลำจำนวน 10 ลำ ต่อโคกต้นพันธุ์
4. นำข้อมูลอ้อยปลูกและอ้อยตอมาคำเฉลี่ย เพื่อทำการวิเคราะห์ผลการทดลองต่อไป

เก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์เส้นใย

การวัดเปอร์เซ็นต์เส้นใย นำตัวอย่างอ้อยที่สับละเอียดโดยเครื่อง cane shredder จำนวน 200 กรัม บรรจุลงในถุงผ้าแล้วบีบเอาน้ำอ้อยออกโดยเครื่อง juice squeezer แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างในน้ำเย็นหลายๆครั้ง จากนั้นบีบน้ำออกโดยเครื่อง juice squeezer อีกครั้งหนึ่ง ตากตัวอย่างให้แห้งแล้วอบตัวอย่างด้วยตู้อบไอร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วปล่อยตัวอย่างให้เย็นในโถดูดความชื้นทำการชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์เส้นใยโดยใช้สูตร

$$\text{ค่าเปอร์เซ็นต์เส้นใย} = \frac{\text{น้ำหนักเส้นใยของตัวอย่างหลังอบ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างอ้อย}}$$

การสกัดดีเอ็นเอ

เมื่อโคลนพันธุ์อ้อยมีอายุ 4-6 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างใบอ้อยที่เป็นใบม้วนเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยตัดตัวอย่างใบม้วนของอ้อยแต่ละโคลนพันธุ์ บรรจุในถุงพลาสติก ปิดปากถุง และแช่น้ำแข็ง ซึ่งระหว่างที่รอการสกัดดีเอ็นเอจะเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (Genomic DNA purification kit #K0512) ของ บริษัท Fermentas โดยใช้ตัวอย่างประมาณ 0.2-0.5 กรัมต่อโคลนพันธุ์ เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้วละลายใน TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1 mM EDTA) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำ electrophoresis ใน agarose gel ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5xTAE buffer (40 mM Tris base, pH 7.4, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม (GelStar®) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader® transilluminator เทียบกับ Lambda DNA#0011 (Fermentas) ถ่ายรูปด้วยกล้องดิจิทัล คำนวณปริมาณดีเอ็นเอโดยเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอกับ Lambda DNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม โดยใช้โปรแกรม ImageJ ปรับความเข้มของดีเอ็นเอเป็น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วย TE buffer เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

คู่ AFLP ไพรมเมอร์

ใช้ไพรมเมอร์ *EcoRI*+3 และ *MseI*+3 จำนวน 26 คู่ โดยใช้รหัส E และ M แทนไพรมเมอร์ที่ออกแบบให้มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* ตามลำดับ และอักษร 3 ตัวตามหลังคือลำดับของ selective nucleotide จำนวน 3 nucleotide ซึ่งคู่ไพรมเมอร์ที่ใช้ทั้งหมดได้แก่ E AAC/M CTA, E AAG/M CAG, E AAG/M CAA, E AAG/M CTC, E AAG/M CTG, E AAG/M CTT, E ACA/M CTC, E ACA/M CTA, E ACA/M CAT, E ACA/M CAC, E ACC/M CAA, E ACC/M CAG, E ACC/M CTG, E ACC/M CTA, E ACG/M CTT, E ACG/M CTG, E ACT/M CAT, E ACT/M CTT, E ACT/M CAG, E AGC/M CAT, E AGC/M CTA, E AGC/M CTT, E AGG/M CAT, E AGG/M CTG, E ATT/M CAC, E ATT/M CGG

การตรวจสอบจีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP

วิเคราะห์ AFLP โดยดัดแปลงวิธีของ Vos *et al.*, (1995) โดยมี 5 ขั้นตอนดังนี้

1. Digestion ตัด genomic DNA ปริมาณ 50 นาโนกรัม ในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิด (double digestion) คือ *EcoRI* (10 u/μl; Fermentas, Lithuania) จำนวน 10 units และ *MseI* (10 u/μl; Fermentas, Lithuania) จำนวน 10 units, 1 ไมโครลิตรของ 10x R buffer (18 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultrapure water) เป็น 10 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

2. ต่อเชื่อมชิ้น ดีเอ็นเอกับ adapter โดยใช้เอนไซม์ T4 ligase โดย adapter จะมีลำดับเบสที่จำเพาะกับลำดับเบสจากรอยตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดคือ

EcoRI adapter (5' CTG GTA GAC TGC GTA CC 3'/3'CTG CAT GGT TAA 5')

MseI adapter (5' GAC CAT GAG TCC TGA G 3'/3' TA CTC AGG ACT CAT 5')

ในปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด 10 ไมโครลิตร, 1 ไมโครลิตรของ 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร *EcoRI* adapter, 2 ไมโครลิตรของ 25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร *MseI* adapter, 0.4 ไมโครลิตรของ 100 มิลลิโมล ATP, 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 0.2 ไมโครลิตรของ BSA, 2 ไมโครลิตรของ 10x T4 Ligase buffer (60 mM Tris-HCl pH 7.8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% polyethylene glycol) และ 1 ไมโครลิตรของ T4 ligase enzyme (5 u/μl; Fermentas, Lithuania) ปรับปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเจือจางตัวอย่างด้วย TE buffer อัตราส่วน 1:1

3. เพิ่มปริมาณเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยา PCR ครั้งแรก (PCR1) ใช้ไพรเมอร์ที่ต่อกับ selective nucleotide จำนวน 1 nucleotide ได้แก่ *EcoRI*+1(*EcoRI*+A) และ *MseI*+1(*MseI*+C) โดยมีลำดับเบสดังนี้

EcoRI+A primer: 5' GAC TGC GTA CCA ATT CA 3'

MseI+C primer: 5' GAC GAT GAG TCC TGA GTA AC3'

ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์และต่อกับ adapter แล้ว จำนวน 2 ไมโครลิตร, 1 ไมโครลิตรของ 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร primer *EcoRI*+A, 1 ไมโครลิตรของ 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร primer *MseI*+C, 1.2 ไมโครลิตรของ 25 มิลลิโมล $MgCl_2$, 2 ไมโครลิตรของ 10x Taq buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 0.8% Nonident P40), 2 ไมโครลิตรของ 2 มิลลิโมล dNTP, 0.2 ไมโครลิตรของเอนไซม์ Taq DNA polymerase (5 units/ μ l; Fermentas, Lithuania) ปรับปริมาตรของตัวอย่างเป็น 20 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR โดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเวลา 2 นาที 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 25 รอบ ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้โดยทำ agarose electrophoresis ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่ำกว่า 1,000 เบส เจือจางตัวอย่างด้วย TE buffer อัตราส่วน 1:10 (เจือจาง 10 เท่า)

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่ 2 หรือ selective amplified ใช้ไพรเมอร์ที่มีการต่อกับ selective nucleotide จำนวน 3 nucleotide ได้แก่

EcoRI+1(*EcoRI*+ANN) 5' GAC TGC GTA CCA ATT CANN 3'

MseI+1(*MseI*+CNN) 5' GAC GAT GAG TCC TGA GTA ACNN 3'

ในปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอเจือจางจาก PCR1 จำนวน 2 ไมโครลิตร, 1 ไมโครลิตรของ 5 พิโคโมล/ไมโครลิตรไพรเมอร์ *EcoRI*+ANN, 5 พิโคโมล/ไมโครลิตรไพรเมอร์ *MseI*+CNN 1 ไมโครลิตร, 0.6 ไมโครลิตรของ 25 มิลลิโมล $MgCl_2$, 1 ไมโครลิตรของ 10x PCR buffer, 1 ไมโครลิตรของ 2 มิลลิโมล dNTP, 0.2 ไมโครลิตรของเอนไซม์ Taq DNA polymerase (5 units/ μ l) ปรับปริมาตรเป็น 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ และใช้อุณหภูมิในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาทีจำนวน 1 รอบ ตามด้วย touchdown program จำนวน 12 รอบ คือ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing step) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที โดยอุณหภูมิในช่วง annealing step ตั้งแต่วรอบที่ 2 จะลดลง 0.7 องศาเซลเซียสทุกรอบ หลังจากนั้นใช้โปรแกรมปกติคือใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 20 รอบ และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา เติม AFLP loading dye 10 ไมโครลิตร ลงในผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ เก็บตัวอย่างในน้ำแข็งหรือในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอทำ polyacrylamide gel electrophoresis

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดย polyacrylamide gel electrophoresis

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ AFLP มาทำ electrophoresis โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 5% ใน 1 x TBE buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใช้แรงดันไฟฟ้าคงที่ 40 วัตต์ โดยใช้เครื่อง Gel Sequencing Scie-Plas TVS 1400 ขนาด 33 x 41 เซนติเมตร

สำหรับการตรวจสอบ AFLP fingerprint ใช้วิธีย้อมเจลด้วย กลีโกลินโตรเจน (silver stain method) ตามวิธีการของ Gustavo and Peter (1994) โดยเมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis แล้วทำการตรึงเจล (gel fixing) โดยใช้ 10% acetic acid glacial เป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาที แล้วล้างเจลด้วย น้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้งครั้งละ 2 นาที หลังจากนั้นย้อมเจลด้วยสารละลายกลีโกลินโตรเจน (0.1 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายกลีโกลินโตรเจน และ 1.5 มิลลิลิตร ของ 37 เปอร์เซ็นต์ของ formaldehyde/L เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาทีเมื่อใช้ย้อมครั้งแรก (ควรเพิ่มเป็น 1 ชั่วโมงเมื่อมีการใช้ สารละลายกลีโกลินโตรเจนซ้ำ) หลังจากนั้นทำ signal detection โดยใช้ developer (3 เปอร์เซ็นต์ ของ Na_2SO_3 , 1.5 มิลลิลิตรของ 37 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde/L และ 400 ไมโครลิตร ของ 10mg/ml Na_2SO_3 /L) ให้คะแนนแถบโมเลกุลเครื่องหมายที่ปรากฏเท่ากับ 2 และ ไม่ปรากฏเท่ากับ 1 โดยให้ สัญลักษณ์ของโมเลกุลเครื่องหมายโดยใช้อักษร 4 โดย 2 ตัวแรกแทน selective nucleotide 2 ตัวท้ายของไพรเมอร์ *EcoRI*+3 และ อักษร 2 ตัวถัดมาแทน selective nucleotide 2 ตัวท้ายของไพรเมอร์ *MseI*+3 และตัวเลขที่ตามหลังแทนลำดับของโมเลกุลเครื่องหมาย

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของฟิโนไทป์ใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design

2. วิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะที่ทำการตรวจสอบ โดยใช้สมการการคำนวณ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient), r_{xy} ดังนี้

$$r_{xy} = \frac{\sum x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{(n-1) s_x s_y} = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}}$$

โดยที่ r = สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ x และ y

x, y = พารามิเตอร์ของ 2 ลักษณะที่นำมาคำนวณค่าสหสัมพันธ์

n = จำนวนคู่ของการเปรียบเทียบ

3. วิเคราะห์หาค่าอัตราพันธุกรรม (broad sense heritability, h^2) ของลักษณะที่ทำการตรวจสอบ จากอัตราส่วนระหว่าง genetic (σ_g^2) variance และ phenotypic (σ_p^2) variance โดยที่:

$$h^2_{BS} = \sigma_g^2 / \sigma_p^2$$

$$\sigma_g^2 = (\text{Treatment mean square} - \text{Error mean square})/r$$

$$\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_e^2/r = \sigma_g^2 + (\text{error mean square}/r)$$

$$\sigma_e^2 = \text{error variance} = \text{error mean square}$$

$$r = \text{ซ้ำของงานทดลอง}$$

4. สร้างกราฟแสดงลักษณะการกระจายตัว (histogram) ของลักษณะที่ทำการตรวจสอบ

5. ทดสอบการกระจายตัวของแถบโมเลกุลเครื่องหมายว่ามีการกระจายตัวเท่ากับ แบบ simple, duplex, triplex โดยมีอัตราส่วนของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏต่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอดังตารางที่ 1 และใช้การทดสอบไคสแควร์ (χ^2) เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของค่าการกระจายตัวที่ได้จากงานทดลองนั้นกับค่าคาดหวังทางทฤษฎี โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Observed} - \text{Expected})^2}{\text{Expected}} \text{ หรือ } = \sum \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

เมื่อ o_i = ค่าสังเกต (observed)

e_i = ค่าคาดหวัง (expected)

ถ้าค่า chi-square ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่าค่าไคสแควร์ในตาราง ($P > 0.05$) ที่ $df. = 1$ แสดงว่าค่าความถี่จากการสังเกตไม่มีความแตกต่างจากค่าคาดหวัง หรือถ้ายอมรับว่าค่าที่ได้จากการทดลองเป็นไปตามทฤษฎี

6. การวิเคราะห์ QTL โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ single marker analysis เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย AFLP กับลักษณะที่ทำการตรวจสอบ โดยพิจารณาจากค่า R^2 (phenotypic variance explained, PVE) เพื่อแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลนั้นสามารถอธิบายลักษณะที่ต้องการศึกษาได้มากน้อยเพียงใด โดยใช้โปรแกรม IRRStat for Windows ver.5.0 เนื่องจากประชากรลูกผสมในการทดลองนี้เป็น F_1 เครื่องหมายโมเลกุลแบบ simplex หรือ single dose จะมีอัตราส่วนการกระจายตัว 1 : 1 (ปรากฏ : ไม่ปรากฏ) ดังนั้นการวิเคราะห์ จึงใช้รูปแบบการวิเคราะห์แบบการผสมกลับ (backcross) หรือการผสมทดสอบ (Da Silva *et al.*, 1996; Grivet *et al.*, 1996; Guimaraes *et al.*, 1997; Ming *et al.* 1998) การสร้าง linkage map โดยใช้โปรแกรม AntMap ver.1.2 (Iwata, 2006)

7. วิเคราะห์ multiple regression ระหว่างกลุ่มเครื่องหมาย simplex duplex และ triplex เพื่อศึกษาจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลหรือ QTL ที่สามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะที่ศึกษาได้มากที่สุด รวมทั้งวิเคราะห์ multiple regression ของ QTL ที่ควบคุมลักษณะเดียวกัน และถูกจัดอยู่ในกลุ่มลิงเกจเดียวกันเพื่อตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดไปด้วยกันว่ามี ความสามารถอธิบายลักษณะที่ศึกษาได้มากน้อยเพียงใด

ตารางที่ 1 อัตราส่วนการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอระหว่างการปรากฏ : ไม่ปรากฏ ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ multiplex (duplex, triplex และ quadruplex) ในประชากรลูกผสมทดสอบ (testcross)

Number of dose	Segregation ratio in testcross
Simplex	1:1
Duplex	11:3
Triplex	13:1
Quadruplex	69:1

ที่มา: Ripol *et al.*, 1999

8. การประมาณค่า r (recombination fraction) ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling โดยจำนวนประชากรลูกผสมที่ใช้จะเป็นตัวกำหนดขนาดของ r ที่มากที่สุด ($\max r_i$) ที่สามารถคำนวณได้โดยใช้สูตร

$$\max r_1 = 0.5 \left(1 - 2.3264 \sqrt{1/n} \right)$$

โดยเป็นความสัมพันธ์ระหว่างประชากรลูกผสม n ที่สามารถใช้คำนวณค่า r ที่มากที่สุดโดยการทดสอบสถิติ Z แบบทางเดียวที่ระดับความน่าจะเป็น $\alpha = 0.01$ โดยทั่วไปขนาดของค่า r ที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์พืชจะอยู่ระหว่าง 0.1 ถึง 0.25 (Wu *et al.*, 1992)

9. การหาอัตราส่วนฟีโนไทป์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ของลิงเกจที่เกี่ยวข้องกับ duplex และ triplex ในออโตโพลีพลอยด์แบบต่างๆสามารถวิเคราะห์จากความถี่ของยีนในประชากร โดยกำหนดให้ p และ q คือแอลลีลที่แตกต่างกันในแต่ละโลกัส สำหรับชุดเซลล์ที่ลิงค์กันแบบ coupling อัตราส่วนจีโนไทป์เป็นฟังก์ชันแสดงความถี่ของยีน และสามารถแสดงในรูปของความถี่ของยีนได้โดยตรง ซึ่งสามารถสรุปเป็นสูตรทั่วไปสำหรับออโตโพลีพลอยด์แบบต่างๆได้ แต่ชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เครื่องหมายโมเลกุลลิงค์กันในสภาพ repulsion อัตราส่วนจีโนไทป์จะขึ้นกับระดับของพลอยดี และไม่สามารถแสดงในรูปความถี่ของยีนโดยลำพังได้

ถ้ากำหนดให้ p เป็นความถี่ของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีเครื่องหมายโมเลกุล q เป็นความถี่ของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่มีเครื่องหมายโมเลกุล ดังนั้น $p + q = 1$ และกำหนดให้หมายเลข 1, 2 และ 3 เป็นความถี่ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex, duplex และ triplex ตามลำดับ ในกรณีเครื่องหมายโมเลกุล simplex ค่า p_1 เท่ากับ q_1 เท่ากับ 0.5 และในกรณีเครื่องหมายโมเลกุลเครื่องหมาย duplex และ triplex ของออโตโพลีพลอยด์ p_2 เท่ากับ $1 - q_2$ และ p_3 เท่ากับ $1 - q_3$ และ

$$q_2 = \left[\frac{1}{2(x-1)} \right] \frac{x-2}{2} ; q_3 = \left[\frac{1}{2(x-1)} \right] \frac{x-4}{4}$$

โดย p_2 และ p_3 เท่ากับสัดส่วนของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex สำหรับ q_2 และ q_3 เท่ากับสัดส่วนของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่มีเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex ตามลำดับ และ x เท่ากับจำนวนโครโมโซมพื้นฐานของออโตโพลีพลอยด์ และเมื่อแทนค่า x เท่ากับ 8 จะได้ความถี่ของเครื่องหมายโมเลกุลของออโตออคตาพลอยด์คือ duplex (p_2) เท่ากับ 0.79 และ triplex (p_3) เท่ากับ 0.93

10. การวิเคราะห์และสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล multiplex (duplex และ triplex) โดยการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล ใช้สูตรคำนวณค่า r (recombination fraction) สำหรับชุดเซลล์สืบพันธุ์แต่ละแบบที่เกิดจากการลิงค์กันของเครื่องหมายโมเลกุลแบบต่างๆ จากสมมุติฐานที่ว่า

พฤติกรรมการเข้าคู่กันของโครโมโซมเป็นแบบ non-preferential bivalent pairing การหาระยะระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลสามารถประมาณจากค่า r โดยวิธี maximum likelihood ดังสมการ

$$L(p(r)|x) \propto (p_{AB}(r))^{x_{AB}} (p_A(r))^{x_A} (p_B(r))^{x_B} (p_o(r))^{x_o}$$

โดยที่ x_{AB} = ค่าสังเกตฟีโนไทป์ AB (มีแถบเครื่องหมายโมเลกุล A และ B)

x_A = ค่าสังเกตฟีโนไทป์ A (มีแถบเครื่องหมายโมเลกุล A)

x_B = ค่าสังเกตฟีโนไทป์ B (มีแถบเครื่องหมายโมเลกุล B)

x_o = ค่าสังเกตฟีโนไทป์ $\emptyset$ (ไม่มีแถบดีเอ็นเอ)

โดยค่าความน่าจะเป็นของฟีโนไทป์ (phenotype probability) แสดงในภาคผนวกที่ 1 (Ripol *et al.* 1999)

11. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรวจสอบลิงค์เกจ (power of linkage detection) โดยประสิทธิภาพการตรวจสอบลิงค์เกจสามารถคำนวณจาก power of chi-square (χ^2) ซึ่งเป็นฟังก์ชันของระดับความเชื่อมั่น α กับพารามิเตอร์ของ non-centrality (λ) กับขนาดของประชากรลูกผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยใช้สูตร

$$\lambda = \frac{n[\pi_i - \pi_i(M)]^2}{\pi(M)}$$

โดย π_i เป็นอัตราส่วนฟีโนไทป์ในกลุ่มที่ i เมื่อเครื่องหมายโมเลกุลไม่ลิงค์กัน และ $\pi_i(M)$ เป็นอัตราส่วนฟีโนไทป์ที่ได้จากการคำนวณค่า r โดยวิธี maximum likelihood โดย $\sum \pi_i = \sum \pi_i(M) = 1$ และนำค่า power of chi-square (λ) ที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับตาราง power of chi-square test ที่ α เท่ากับ 0.05 และ degree of freedom เท่ากับ 1 (ตารางผนวกที่ 2) จะได้ค่าประสิทธิภาพของการตรวจสอบลิงค์เกจ ของเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในสภาพต่างๆกัน สำหรับคู่ของเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความแตกต่างทางสถิติ (significant) ของค่าไคสแควร์แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองไม่ลิงค์กัน (Agresti, 2002)

สถานที่ทำการทดลอง

1. ผสมพันธุ์อ้อยที่แปลงผสมพันธุ์อ้อย และปลูกทดสอบลูกผสมเพื่อเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์เส้นใยและลักษณะทางพืชไร่ ที่แปลงทดลองบริษัทมิตรผลวิชัยพัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดชัยภูมิ
2. สกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบตำแหน่งยีนของลักษณะปริมาณโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล เอเอฟแอลพี ที่ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาทำการวิจัย

เดือนเมษายน 2547 ถึงเดือนธันวาคม 2550

ผลและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance)

วิเคราะห์ข้อมูลปริมาณเส้นใย เส้นผ่านศูนย์กลางลำ และ การแตกกอ ของลูกผสมจำนวน 168 โคลนพันธุ์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ได้ผลดังนี้ (ตารางที่ 2)

1.1 ค่าเฉลี่ย

พบว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางลำมีค่าเท่ากับ 1.51 เซนติเมตร ค่าสูงสุดและต่ำสุดเท่ากับ 2.62 และ 1.11 เซนติเมตรตามลำดับ โดยพบว่าโคลนพันธุ์แม่ K 93-207 มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำเฉลี่ยเท่ากับ 2.96 เซนติเมตร ขณะที่โคลนพันธุ์พ่อ MPT 97-1 มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำเฉลี่ยเท่ากับ 0.87 เซนติเมตร ค่าเฉลี่ยของการแตกกอมีค่าเท่ากับ 9.61 ลำต่อกอ โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 16.59 และค่าต่ำสุดเท่ากับ 3.22 ลำต่อกอ ขณะที่โคลนพันธุ์แม่ K 93-207 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.74 ลำต่อกอ และโคลนพันธุ์พ่อ MPT 97-1 มีค่าเฉลี่ยการแตกกอเท่ากับ 24.14 ลำต่อกอ ค่าเฉลี่ยของปริมาณเส้นใยมีค่าเท่ากับ 25.01 เปอร์เซ็นต์ ค่าสูงสุดและต่ำสุดเท่ากับ 32.57 และ 17.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยพบว่าโคลนพันธุ์แม่ K 93-207 มีปริมาณเส้นใยเฉลี่ยเท่ากับ 13.93 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่โคลนพันธุ์พ่อ MPT 97-1 มีปริมาณเส้นใยเฉลี่ยเท่ากับ 32.88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Badaloo and Ramdoyal (2003) ซึ่งพบว่าลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่าง *Saccharum officinarum* กับ *Saccharum spontaneum* จะมีค่าปริมาณเส้นใย การแตกกอที่สูงขึ้นขณะที่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางลำลดลง

1.2 ความแปรปรวน

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เส้นผ่านศูนย์กลางลำ การแตกกอและปริมาณเส้นใยของโคลนพันธุ์ที่ทดสอบมีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.001$) แสดงว่ามีความแตกต่างระหว่างโคลนพันธุ์ในลักษณะดังกล่าวหรือลูกผสมที่ได้มีความแตกต่างของลักษณะที่ใช้ตรวจสอบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน (coefficient of variation, *C.V.*) เท่ากับ 12.3, 18.6 และ 8.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน ค่าอัตราพันธุกรรม ค่าสูงสุด ต่ำสุด ค่าเฉลี่ย ของปริมาณเส้นใย การแตกกอและเส้นผ่านศูนย์กลางลำของลูกผสมระหว่าง K 93-207 และ MPT 97-1 จำนวน 168 โคลนพันธุ์

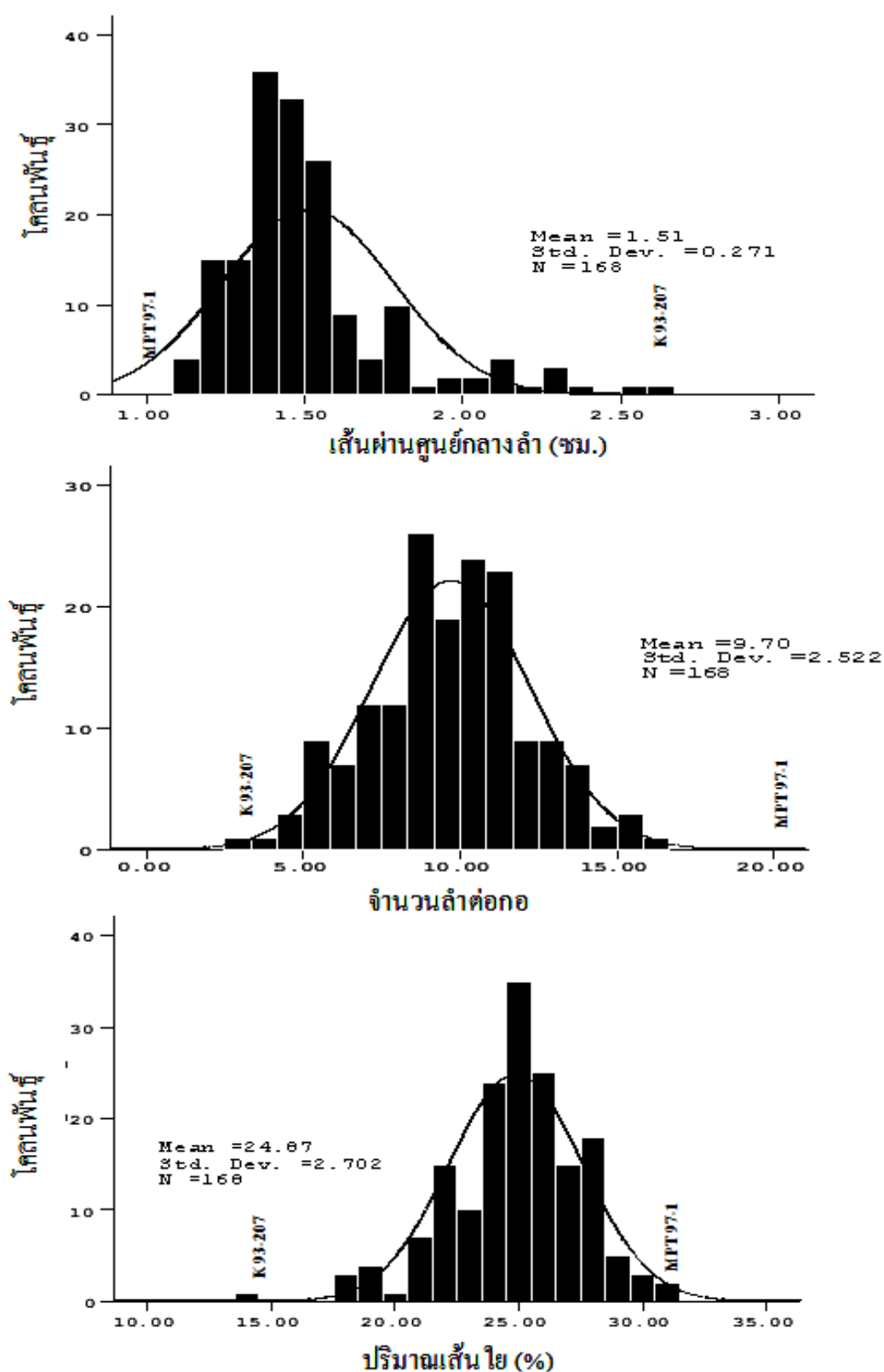
Source	df	Mean Square		
		เส้นผ่านศูนย์กลาง ลำ(ซม.)	การแตกกอ	ปริมาณเส้นใย (%)
Clones	167	0.219**	18.90**	20.48**
Blocks	2	0.508**	70.29**	30.30**
Error	334	0.030	3.19	4.08
Total	503			
C.V.(%)		12.30	18.60	8.10
ค่าสูงสุด		2.62	16.59	32.57
ค่าต่ำสุด		1.11	3.22	17.69
เฉลี่ย		1.51	9.61	24.01
K 93-207		2.96	3.74	13.93
MPT 97-1		0.87	24.14	32.88
heritability (h^2)		0.84	0.83	0.80

หมายเหตุ *,** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ

h^2 = ค่าอัตราพันธุกรรม

1.3 ค่าอัตราพันธุกรรม (heritability)

ค่าอัตราพันธุกรรมมีค่าเท่ากับ 0.84, 0.83 และ 0.80 แสดงว่าลักษณะที่แสดงออกถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมในอัตราส่วนที่สูง สำหรับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำมีค่าอัตราพันธุกรรมสูงสุดเท่ากับ 0.84 แสดงว่าลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำถูกควบคุมโดยพันธุกรรมเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับลักษณะ การแตกกอและปริมาณเส้นใยที่ถูกควบคุมโดยพันธุกรรมเท่ากับ 83 และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ค่าอัตราพันธุกรรมที่คำนวณได้มีค่าสูงแสดงว่าลักษณะทั้ง 3 ลักษณะสามารถนำไปใช้หาตำแหน่งของ QTL เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ผ่าน marker assisted selection (MAS) ได้ สำหรับค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการ



ภาพที่ 4 กราฟแสดงการกระจายตัว (histogram) ของลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ จำนวนลำต่อกอ และ ปริมาณเส้นใยของประชากรย่อยจำนวน 168 โคลนพันธุ์

แตกกอที่ได้ มีความสอดคล้องกับผลงานทดลองของ Hoarau *et. al.* (2002) ซึ่งทำการทดสอบในลูกผสมจำนวน 295 โคลนพันธุ์จากการผสมตัวเองของโคลนพันธุ์ R 570 โดยพบว่าค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการแตกกอมีค่าเท่ากับ 0.84 และ 0.86 ตามลำดับ ขณะที่ค่าอัตราพันธุกรรมของปริมาณเส้นใยมีความสอดคล้องกับงานทดลองของ Gravois and Miligan (1992) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.71 เมื่อทดสอบแปลงเดี่ยว และเท่ากับ 0.91 จากผลการทดสอบจำนวน 3 แปลง

2. การกระจายตัวของประชากร

การกระจายตัวของลูกผสมจำนวน 168 โคลนพันธุ์ในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ มีการกระจายตัวอย่างต่อเนื่อง (normal distribution) และโน้มเอียง (skewness) ไปทางด้านซ้ายของค่าที่น้อยกว่า ลักษณะเช่นนี้บ่งชี้ว่าเส้นผ่านศูนย์กลางลำอ้อยเป็นลักษณะปริมาณ (Quantitative trait) ถูกควบคุมด้วยยีนมากกว่าหนึ่งตัวและน่าจะประกอบด้วย QTL หลัก (major QTL) ที่มีอิทธิพลหลักในการควบคุม โดยมี QTL รอง (minor QTL) ช่วยเสริมการกระจายตัวของลักษณะการแตกกอและปริมาณเส้นใยให้มีการกระจายตัวอย่างต่อเนื่อง มีความโน้มเอียง น้อยกว่าลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ลักษณะเช่นนี้แสดงว่าลักษณะการแตกกอและปริมาณเส้นใยเป็นลักษณะปริมาณถูกควบคุมด้วยยีนมากกว่าหนึ่งตัว และทั้งสองลักษณะนี้น่าจะมีความซับซ้อนทางพันธุกรรมมากกว่าลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางลำของประชากรมีค่าระหว่าง 1.1 ถึง 2.7 เซนติเมตร ขณะที่โคลนพันธุ์ K 93-207 และ MPT 97-1 มีค่าเท่ากับ 2.60 และ 0.80 เซนติเมตรตามลำดับ การแตกกอของประชากรมีค่าระหว่าง 3 ถึง 16 ลำต่อกอ ขณะที่โคลนพันธุ์ K 93-207 และ MPT 97-1 มีค่าเท่ากับ 3.0 และ 21.0 ลำต่อกอตามลำดับ ปริมาณเส้นใยของประชากรมีค่าระหว่าง 13 ถึง 31 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่โคลนพันธุ์ K 93-207 และ MPT 97-1 มีค่าเท่ากับ 13.0 และ 33.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่พบพันธุ์อ้อยลูกผสมที่มีค่ามากกว่าหรือน้อยกว่าพ่อแม่ แสดงให้เห็นว่าไม่มีลักษณะ transgressive segregation ใน 3 ลักษณะของประชากรที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 4) ผลการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับ Ming *et al.* (2002) ซึ่งมีค่าปริมาณเส้นใยของประชากรลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่าง *Saccharum officinarum* และ *Saccharum spontaneum* ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 10 ถึง 28 เปอร์เซ็นต์

3. ค่าสหสัมพันธ์ (Phenotypic correlation) ของลักษณะที่ทำการทดสอบ

การตรวจสอบค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะที่ทำการทดสอบ (ตารางที่ 3) พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางลำมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ทางลบกับปริมาณเส้นใยและการแตกกอ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) แสดงว่าพันธุ์อ้อยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำใหญ่จะมีปริมาณเส้นใย และการแตกกอต่ำ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานทดลองของ Hoarau *et al.* (2002) ซึ่งพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางลำมีสหสัมพันธ์ทางลบกับการแตกกอ สำหรับปริมาณเส้นใยจะมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับการแตกกอ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงว่าพันธุ์อ้อยที่มีปริมาณเส้นใยสูงจะมีการแตกกอที่สูงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Ming *et al.* (2002) ศึกษาในประชากรอ้อยลูกผสมระหว่าง *Saccharum officinarum* และ *Saccharum spontaneum* จำนวนสองประชากร ซึ่งพบว่าค่าสหสัมพันธ์ของปริมาณเส้นใยและการแตกกามีค่าเป็นบวก โดย Gravios and milligan (1992) พบว่า ปริมาณเส้นใยมีสหสัมพันธ์ทางลบกับปริมาณน้ำตาลและน้ำหนักลำ ขณะที่ Badaloo and Ramdoyal (2003) พบว่าปริมาณเส้นใยมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับการแตกกอและมีสหสัมพันธ์ทางลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ โดยเฉพาะในกลุ่มผสมระหว่าง *Saccharum officinarum* กับ *Saccharum spontaneum* แสดงให้เห็นว่าอ้อยป่าหรือ *Saccharum spontaneum* เป็นโคลนพันธุ์ที่สามารถถ่ายทอดลักษณะการแตกกอ ปริมาณเส้นใยสูง รวมทั้งลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำเล็กไปยังลูกผสมที่ได้

ตารางที่ 3 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ การแตกกอ และ ปริมาณเส้นใย

ลักษณะ	ปริมาณเส้นใย	เส้นผ่านศูนย์กลางลำ	การแตกกอ
ปริมาณเส้นใย	1	-0.609**	0.417*
เส้นผ่านศูนย์กลางลำ		1	-0.559**
การแตกกอ			1

หมายเหตุ *,** แตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์แถบเครื่องหมายโมเลกุล AFLP

4.1 เครื่องหมายโมเลกุล simplex

จากคู่ AFLP ไพโรมอร์ที่ใช้ทดสอบจำนวน 26 คู่ พบว่ามีแถบเครื่องหมายโมเลกุล (marker) ที่มีความแตกต่างในประชากรที่ทดสอบ (polymorphism) โดยการให้คะแนนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับศูนย์และหนึ่งตามลำดับ โดยพบแถบเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความแตกต่างจำนวน 411 แถบเครื่องหมายโมเลกุล และจำนวนแถบเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความแตกต่างต่ำสุดต่อหนึ่งคู่ไพโรมอร์เท่ากับ 5 แถบเครื่องหมายโมเลกุล ในคู่ไพโรมอร์ AGC/CAT และ AAG/CAA โดยคู่ไพโรมอร์ ACG/CTG มีจำนวนแถบเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความแตกต่างกันมากที่สุดเท่ากับ 29 ค่าเฉลี่ยของจำนวนแถบเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความแตกต่างต่อคู่ไพโรมอร์เท่ากับ 15.8 (ตารางที่ 4) ซึ่งมีค่าต่ำกว่า Hoarau (2001) ที่ทดลองในประชากรที่ได้จากการผสมตัวเองของพันธุ์ R 570 ที่มีค่าเท่ากับ 32 แถบเครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้เนื่องจากความคมชัดของแถบเครื่องหมายโมเลกุลในบางคู่ไพโรมอร์มีน้อย

เมื่อทดสอบการกระจายตัวของแถบเครื่องหมายโมเลกุล 1:1 หรือ เครื่องหมายโมเลกุลแบบ simplex โดยการทดสอบไคสแควร์ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ($p > 0.05$) พบว่าจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการกระจายตัว 1:1 มีค่าระหว่าง 2-20 เครื่องหมายโมเลกุลต่อคู่ไพโรมอร์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.11 แถบเครื่องหมายโมเลกุลต่อหนึ่งคู่ไพโรมอร์ และพบว่าคู่ไพโรมอร์ ACG/CTG มีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1 มากที่สุดเท่ากับ 20 เครื่องหมายโมเลกุล โดยคู่ไพโรมอร์ AGG/CAT และ AAG/CAA มีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการกระจายตัว 1:1 น้อยที่สุดเท่ากับ 2 เครื่องหมายโมเลกุล เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1 ต่อเครื่องหมายโมเลกุลที่เกิดการกระจายตัวทั้งหมดต่อคู่ไพโรมอร์ พบว่ามีค่าต่ำสุดเท่ากับ 40.00 เปอร์เซ็นต์ในคู่ไพโรมอร์ AGG/CAT และ AAG/CAA โดยคู่ไพโรมอร์ ATT/CAC มีค่าสูงสุดเท่ากับ 71.43 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยจากทุกคู่ไพโรมอร์เท่ากับ 63.99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับ Alwala (2007) ที่ศึกษาแผนที่พันธุกรรมอ้อยโดยใช้ประชากรจำนวน 100 โคลนจากลูกผสมระหว่าง *Saccharum officinarum* กับ *Saccharum spontaneum* พบว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP จำนวน 35 คู่ไพโรมอร์ มีค่าเฉลี่ยเครื่องหมายโมเลกุล simplex ต่อหนึ่งคู่ไพโรมอร์มีค่าเท่ากับ 9.05 เครื่องหมายโมเลกุล ขณะที่ Hoarau *et al.* (2001) ศึกษาในประชากรผสมตัวเองของโคลนพันธุ์ R 570 จำนวน 295 โคลนโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP

ตารางที่ 4 จำนวนแถบเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความแตกต่าง (polymorphic) และเปอร์เซ็นต์ของแถบที่มีการกระจายตัว 1:1

Primer combination	Polymorphic band	Segregation 1:1 ¹	Percentage of segregation 1:1
AAC/CTA	11	7	62.64
AAG/CTC	8	5	62.50
AAG/CAG	9	6	66.67
AAG/CTG	11	7	63.64
AAG/CAA	5	2	40.00
AAG/CTT	10	7	70.00
ACA/CTA	8	4	50.00
ACA/CTC	25	17	68.00
ACA/CAT	19	12	63.16
ACA/CAC	17	11	64.71
ACC/CAA	17	12	70.59
ACC/CTA	12	7	58.33
ACC/CTG	21	12	57.14
ACC/CAG	20	12	60.00
ACG/CTG	29	20	68.97
ACG/CTT	28	17	60.71
ACT/CAG	16	10	62.50
ACT/CTT	26	16	61.54
ACT/CAT	20	13	65.00
AGC/CTA	12	8	66.67
AGC/CTT	13	8	61.54
AGC/CAT	5	2	40.00
AGG/CTG	12	9	75.00
AGG/CAT	17	11	64.71
ATT/CAC	14	10	71.43
ATT/CGG	26	18	69.23
เฉลี่ย	15.8	10.11	63.99
รวม	411	263	-

หมายเหตุ ¹ ทดสอบ Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่นค่า $p > 0.05$

พบว่าค่าเฉลี่ยของเครื่องหมายโมเลกุล simplex มีค่าสูงกว่าโดยมีค่าเท่ากับ 25.5 เครื่องหมายโมเลกุล

4.2 เครื่องหมายโมเลกุล multiplex

เครื่องหมายโมเลกุล multiplex (multidose) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลในระดับ duplex เท่ากับ 11:3 ระดับ triplex เท่ากับ 11:3 และระดับ quadruplex เท่ากับ 69:1 (Wu *et al.*, 1992) ซึ่งสามารถทดสอบการกระจายตัว โดยใช้การทดสอบไคสแควร์ ที่ระดับ $P > 0.05$ ที่ $df = 1$

ตารางที่ 5 ชนิด และจำนวนของเครื่องหมายโมเลกุล จากแถบดีเอ็นเอที่มีการกระจายตัว (polymorphic)

ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุล	อัตราส่วน (ปรากฏ : ไม่ปรากฏ)	จำนวน	เปอร์เซ็นต์
Simplex marker	1:1	263	63.99
Duplex marker	11:3	87	21.17
Triplex marker	13:1	51	12.41
>Triplex	>13:1	10	2.43
รวม		411	100.00

จากจำนวนเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ทั้งหมด 411 เครื่องหมายโมเลกุล เมื่อนำมาทดสอบการกระจายตัวของการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบเครื่องหมายโมเลกุล พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลแบบ simplex (single dose) จำนวน 263 เครื่องหมายโมเลกุล หรือมีส่วนเท่ากับ 63.90 เปอร์เซ็นต์ เครื่องหมายโมเลกุลแบบ duplex (double dose) จำนวน 87 เครื่องหมายโมเลกุลหรือมีส่วนเท่ากับ 21.17 เปอร์เซ็นต์ เครื่องหมายโมเลกุล triplex (triple dose) เท่ากับ 51 เครื่องหมายโมเลกุลหรือมีส่วนเท่ากับ 12.41 เปอร์เซ็นต์ และเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการกระจายตัวมากกว่า triplex จำนวน 10 เครื่องหมายโมเลกุล หรือเท่ากับ 2.43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลตั้งแต่ duplex ขึ้นไปสามารถรวมเป็นเครื่องหมายโมเลกุล multiplex ซึ่งจะมีสัดส่วนเท่ากับ 36.01 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) ขณะที่ Alwala (2007) ซึ่งศึกษาแผนที่พันธุกรรมอ้อยโดยใช้ประชากรจำนวน 100 โคลนจากลูกผสมระหว่าง *Saccharum officinarum* กับ *Saccharum spontaneum* โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP พบว่ามีสัดส่วนของเครื่องหมายโมเลกุล simplex เท่ากับ 77.00

เปอร์เซ็นต์ duplex เท่ากับ 17.00 เปอร์เซ็นต์ และเครื่องหมายโมเลกุลที่มีลักษณะการกระจายตัวที่สูงกว่า duplex เท่ากับ 6.0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล simplex จะเป็นเครื่องหมายโมเลกุลหลักที่ใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมอ้อย ซึ่งมีหลักในการเลือกใช้คือ (1) ขึ้นดีเอ็นเอต้องปรากฏในโคลนพันธุ์พ่อหรือแม่เท่านั้น และ (2) แถบเครื่องหมายโมเลกุลต้องมีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1 (Da Silva and Sorrels, 1996)

5. ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex กับลักษณะที่ทดสอบ

วิเคราะห์ตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลแบบ single marker analysis โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการกระจายตัว 1:1 หรือ simplex marker ทั้ง 263 เครื่องหมายโมเลกุล กับลักษณะที่ทำการศึกษาทั้งสามลักษณะได้แก่เส้นผ่านศูนย์กลางลำ การแตกกอและปริมาณเส้นใย โดยใช้ simple linear regression ที่ระดับความแตกต่างทางสถิติ (significant) ที่ค่า $p < 0.005$

5.1 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

การศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำพบว่า มีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีผลต่อความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางลำจำนวน 19 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 6) โดยมีค่า R^2 หรือค่า phenotypic variant explained ของแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลที่ระบุระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ มีค่าระหว่าง 3.3 ถึง 8.1 เปอร์เซ็นต์ ในเครื่องหมายโมเลกุล catc13 และ cgtt25 ตามลำดับ เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถอธิบายความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางลำลักษณะเดียวได้สูง คือเครื่องหมายโมเลกุล cgtt25, ccta5, gcat8, cctg21 และ cctg12 โดยมีค่า R^2 (%) เท่ากับ 8.1, 7.2, 6.4, 6.3 และ 5.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำมีค่าสหสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักลำ (stalk weight) โดยมีค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.72 (Tyagi and Lal, 2007) ดังนั้นจากผลการทดลองของ Ming *et al.* (2002) ซึ่งพบว่าค่า R^2 ของเครื่องหมายโมเลกุล RFLP ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักลำ (stalk weight) มีค่าระหว่าง 4.7 ถึง 16.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีผลค่อนข้างสูง อาจจะมีผลมาจากการใช้ โคลนพันธุ์ *Saccharum officinarum* (Green German และ Muntok) ผสมกับ *Saccharum spontaneum* ทำให้มีความแตกต่างระหว่างลักษณะที่ทำการทดสอบคือเส้นผ่านศูนย์กลางลำมีค่าสูงมาก จึงมีผลให้ค่า R^2 ของเครื่องหมายโมเลกุลมีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรอื่น

ตารางที่ 6 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่สัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำอ้อย โคลนพันธุ์ที่ถ่ายทอดเครื่องหมายโมเลกุลค่า ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และอิทธิพลของ QTL

เครื่องหมายโมเลกุล	โคลนพันธุ์ ¹	$R^2(\%)^2$	อิทธิพล QTL
agtc14	K 93-207	4.4	0.122
agtg9	K 93-207	3.7	0.112
cata15	K 93-207	4.4	0.122
ccag18	K 93-207	4.0	0.116
ccta5	K 93-207	7.2	-0.151
cgtt25	K 93-207	8.1	0.161
ctat32	K 93-207	4.1	0.117
gcta1	K 93-207	4.5	0.123
agtc21	MPT 97-1	5.2	-0.133
agtg21	MPT 97-1	3.5	-0.110
catc13	MPT 97-1	3.3	-0.108
catc20	MPT 97-1	3.6	0.112
cctg12	MPT 97-1	5.9	-0.138
cctg21	MPT 97-1	6.3	-0.142
cgtg7	MPT 97-1	4.9	-0.126
cgtg9	MPT 97-1	5.4	-0.132
ctat12	MPT 97-1	3.4	-0.108
gcat8	MPT 97-1	6.4	-0.143
ttgg17	MPT 97-1	3.4	-0.107

หมายเหตุ ¹ K 93-207 = พันธุ์การคำ และ MPT 97-1 = *Saccharum spontaneum*

ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $P < 0.005$

ค่าอิทธิพล QTL ซึ่งแสดงอิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลต่อลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ซึ่งมีผลทางลบและทางบวก จากการศึกษามีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีผลทางลบต่อลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำจำนวน 11 เครื่องหมายโมเลกุล โดยมีค่าอิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุล ต่อเส้นผ่าน

ศูนย์กลางลำอยู่ระหว่าง -0.151 (ccta5) ถึง -0.107 (ttgg17) และเครื่องหมายโมเลกุลที่มีผลทางบวก มีจำนวน 8 เครื่องหมายโมเลกุล โดยมีค่าอิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำระหว่าง 0.112 (catc20 และ agtg9) ถึง 0.161 (cgtt25) โดยเครื่องหมายโมเลกุล ccta5 เป็นเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีผลทางลบต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำสูงสุด สามารถอธิบายความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางลำลักษณะเดียวเท่ากับ 7.2 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล cgtt25 ที่มีผลทางบวกต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำสูงที่สุด สามารถอธิบายความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางลำลักษณะเดียวเท่ากับ 8.1 เปอร์เซ็นต์

การถ่ายทอดเครื่องหมายโมเลกุล simplex จากโคลนพันธุ์แม่คือ K 93-207 และ โคลนพันธุ์พ่อคือ MPT 97-1 สามารถตรวจสอบได้จากการปรากฏของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบในแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลที่พบในโคลนพันธุ์พ่อหรือแม่ โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำลักษณะเดียวที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์ K 93-207 มีจำนวนทั้งหมด 8 เครื่องหมายโมเลกุล และเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจาก MPT 97-1 มีจำนวน 12 เครื่องหมายโมเลกุล โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการถ่ายทอดจากพันธุ์ K 93-207 และมีผลทางบวกจำนวน 7 จาก 8 เครื่องหมายโมเลกุล ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจาก MPT 97-1 และมีผลทางลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำถึง 11 จาก 12 เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Ming *et al.* (2002) ซึ่งพบว่า อิทธิพลของ QTL ที่ถ่ายทอดจาก *Saccharum officinarum* ในลักษณะน้ำหนักลำจะมีอิทธิพลทางบวกกับลักษณะน้ำหนักลำ และ QTL ที่ถ่ายทอดจาก *Saccharum spontaneum* จะมีอิทธิพลทางลบ

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการผสมข้ามระหว่างพันธุ์การค้าและอ้อยป่าคือ *Saccharum spontaneum* จะทำให้ได้ลูกผสมส่วนใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำเล็กลง ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่มีผลทางบวกกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำและถ่ายทอดมาจากโคลนพันธุ์ MPT 97-1 เพียงเครื่องหมายโมเลกุลเดียวคือ catc20 ซึ่งมีค่าอิทธิพล QTL ก่อนข้างต่ำเท่ากับ 0.112 และสามารถอธิบายความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางลำได้ต่ำคือมีค่า R^2 เท่ากับ 3.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล simplex cgtt25 ซึ่งมีผลทางบวกต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำ รวมทั้งมีค่า R^2 ก่อนข้างสูง และถ่ายทอดมาจากโคลนพันธุ์แม่คือ K 93-207 เมื่อมีเครื่องหมายโมเลกุลนี้ปรากฏในลูกผสมจะทำให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำเพิ่มขึ้นขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล ccta5 ซึ่งมีผลทางลบต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำและถ่ายทอดมาจากโคลนพันธุ์แม่เช่นเดียวกัน ดังนั้นเมื่อมีเครื่องหมายโมเลกุลนี้ปรากฏในลูกผสมจะทำให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางลำของลูกผสมลดลง

5.2 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex กับการแตกกอ

การศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการแตกกอลักษณะเดียว พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีผลต่อความแปรปรวนของการแตกกอจำนวน 7 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 7) มีค่า R^2 ระหว่าง 3.5 (cttt4) ถึง 5.4 เปอร์เซ็นต์ (acta5) โดยเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่สามารถอธิบายความแปรปรวนของการแตกกอลักษณะเดียวได้สูงได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุล acta5, gctt27 และ ttac11 โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 5.4, 4.8 และ 4.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพบว่าค่า R^2 ของลักษณะการแตกกอที่ได้ มีค่าต่ำกว่าผลการทดลองของ Ming *et al.* (2002) :ซึ่งมีค่า R^2 ระหว่าง 5.3 ถึง 15.0 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 7 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่สัมพันธ์กับการแตกกอ โคลนพันธุ์ที่ถ่ายทอดเครื่องหมายโมเลกุล ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และอิทธิพลของ QTL

เครื่องหมายโมเลกุล	โคลนพันธุ์ ¹	$R^2(\%)^2$	อิทธิพล QTL
agag5	K 93-207	3.6	-1.028
cttt4	K 93-207	3.5	-1.025
gctt27	K 93-207	4.8	-1.178
ttgg13	K 93-207	3.8	-1.058
acta5	MPT 97-1	5.4	1.226
ttac5	MPT 97-1	3.6	1.028
ttac11	MPT 97-1	4.8	1.163

หมายเหตุ ² K 93-207 = พันธุ์การค้า และ MPT 97-1 = *Saccharum spontaneum*

¹ ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $P < 0.005$

สำหรับค่าอิทธิพลของ QTL พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่มีอิทธิพล QTL ทางลบต่อลักษณะการแตกกอมีจำนวน 4 เครื่องหมายโมเลกุลซึ่งถ่ายทอดจากพันธุ์ K 93-207 มีค่าอิทธิพล QTL ของเครื่องหมายโมเลกุลอยู่ระหว่าง -1.025 (cttt4) ถึง -1.178 (gctt27) และเครื่องหมายโมเลกุลที่มีอิทธิพล QTL ทางบวกมีจำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุลจากโคลนพันธุ์ MPT 97-1 มีค่าอิทธิพล QTL ของเครื่องหมายโมเลกุลระหว่าง 1.028 (ttac5) ถึง 1.226 (acta5) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานทดลองของ Ming *et al.* (2002) ที่พบว่าอิทธิพลของ QTL ที่ถ่ายทอดจาก *Saccharum*

officinatum ในลักษณะการแตกกอมีค่าเป็นลบ ขณะที่ QTL ที่ถ่ายทอดจาก *Saccharum spontaneum* มีค่าเป็นบวก

ผลที่ได้แสดงว่าการถ่ายทอดเครื่องหมายโมเลกุลจากโคลนพันธุ์แม่คือ K 93-207 และโคลนพันธุ์พ่อคือ MPT 97-1 สามารถตรวจสอบได้จากการปรากฏของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบในแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลที่พบในโคลนพันธุ์พ่อหรือแม่ โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอลักษณะเดียว และถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์ K 93-207 มีจำนวนทั้งหมด 4 เครื่องหมายโมเลกุล และเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์ MPT 97-1 และมีความสัมพันธ์กับการแตกกอลักษณะเดียวมีจำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุล โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการถ่ายทอดจากพันธุ์ K 93-207 ทั้งหมดมีอิทธิพล QTL ทางลบกับลักษณะการแตกกอ ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์ MPT 97-1 มีอิทธิพล QTL ทางบวกต่อการแตกกอทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการผสมข้ามระหว่างพันธุ์การค้า และอ้อยป่าคือ *Saccharum spontaneum* จะทำให้ได้ลูกผสมส่วนใหญ่มีการแตกกอมากขึ้นกว่าปกติ ขณะที่โคลนพันธุ์การค้า (K 93-207) เป็นโคลนพันธุ์ที่ถ่ายทอดการแตกกอดำ

5.3 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex กับปริมาณเส้นใย

การศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex กับลักษณะปริมาณเส้นใยลักษณะเดียว พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีผลต่อความแปรปรวนของปริมาณเส้นใยจำนวน 7 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 8) ค่า R^2 มีค่าระหว่าง 3.4 (cctg33) ถึง 5.8 เปอร์เซ็นต์ (ccta8) โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถอธิบายความแปรปรวนได้สูงกว่าเครื่องหมายโมเลกุลอื่นได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุล ccta8 เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถอธิบายความแปรปรวนของปริมาณเส้นใยต่ำได้แก่เครื่องหมายโมเลกุล cctg33 โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนของปริมาณเส้นใยได้เท่ากับ 3.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Refay *et al.* (2005) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการตรวจสอบ สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 2-7 เปอร์เซ็นต์ที่ค่า $P \leq 0.01$ โดยพบอิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลทั้งทางบวกและลบ และมี 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเส้นใย และมีอิทธิพลทางลบกับลักษณะดังกล่าว โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่งานทดลองของ Ming *et al.* (2002) มีค่า R^2 ของลักษณะปริมาณเส้นใยระหว่าง 5.6-12.1 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่สัมพันธ์กับปริมาณเส้นใย โคลนพันธุ์ที่ถ่ายทอดเครื่องหมายโมเลกุล ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และอิทธิพลของ QTL

เครื่องหมายโมเลกุล	โคลนพันธุ์ ¹	$R^2(\%)^2$	อิทธิพล QTL
agtc7	K 93-207	4.0	-1.119
cctg33	K 93-207	3.4	-1.039
ttac4	K 93-207	4.1	-1.138
ttac17	K 93-207	4.7	1.201
ccta8	MPT 97-1	5.8	1.329
cttt3	MPT 97-1	4.0	1.125
gctt3	MPT 97-1	4.3	1.165

หมายเหตุ ¹ K 93-207 = พันธุ์การคำ และ MPT 97-1 = *Saccharum spontaneum*

ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $P < 0.005$

ในการศึกษาค่าอิทธิพล QTL พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล ที่มีอิทธิพล QTL ทางลบต่อลักษณะปริมาณเส้นใย มีจำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุล โดยมีค่าอิทธิพล QTL ของเครื่องหมายโมเลกุลอยู่ระหว่าง -1.039 (cctg33) ถึง -1.138 (ttac4) และเครื่องหมายโมเลกุลที่มีอิทธิพล QTL ทางบวกมีจำนวน 4 เครื่องหมายโมเลกุล โดยมีค่าอิทธิพล QTL ของเครื่องหมายโมเลกุลระหว่าง 1.125 (cttt3) ถึง 1.329 (ccta8) ผลการทดลองการถ่ายทอดเครื่องหมายโมเลกุล simplex จากโคลนพันธุ์แม่คือ K 93-207 และโคลนพันธุ์พ่อคือ MPT 97-1 พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเส้นใยลักษณะเดียวที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์ K 93-207 มีจำนวนทั้งหมด 4 เครื่องหมายโมเลกุล และเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์ MPT 97-1 มีจำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุล โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการถ่ายทอดจากพันธุ์ K 93-207 และมีอิทธิพล QTL ทางลบมีจำนวน 3 จาก 4 เครื่องหมายโมเลกุล โดยเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีอิทธิพล QTL ทางบวกต่อปริมาณเส้นใย และถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่คือ K 93-207 ได้แก่ ttac17 ซึ่งมีค่า R^2 และ อิทธิพล QTL ก่อนข้างต่ำ ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจาก MPT 97-1 มีอิทธิพลทางบวกทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการผสมข้ามระหว่างพันธุ์การคำ และอ้อยป่าคือ *Saccharum spontaneum* จะทำให้ได้ลูกผสมส่วนใหญ่มีปริมาณเส้นใยมากขึ้นกว่าปกติ ขณะที่โคลนพันธุ์การคำ (K 93-207) เป็นโคลนพันธุ์ที่ถ่ายทอดลักษณะเส้นใยต่ำ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานทดลองของ Ming *et al.* (2002) ที่พบว่า QTL ที่ถ่ายทอดจาก *Saccharum officinarum* จะมีอิทธิพล

ทางลบกับปริมาณเส้นใยและ QTL ที่ถ่ายทอดจาก *Saccharum spontaneum* จะมีอิทธิพลทางบวกกับปริมาณเส้นใย

5.4 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะมากกว่า 1 ลักษณะ

พบเครื่องหมายโมเลกุล simplex จำนวน 19 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบมากกว่า 1 ลักษณะ (ตารางที่ 9) โดยมีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 9 โมเลกุลเครื่องหมายที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่ K 93-207 และ 10 เครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์พ่อคือ MPT 97-1 โดยทั้ง 19 เครื่องหมายโมเลกุล มีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำทั้งหมด และพบเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอ จำนวน 12 เครื่องหมายโมเลกุล และปริมาณเส้นใยจำนวน 13 เครื่องหมายโมเลกุล โดยพบ 6 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับทั้ง 3 ลักษณะคือเครื่องหมายโมเลกุล ctat5 และ gctt12 ซึ่งถ่ายทอดมาจากโคลนพันธุ์ K 93-207 และ caac9, catc4, catc30 และ ccag11 ถ่ายทอดมาจากโคลนพันธุ์ MPT 97-1 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานทดลองของ Aitken *et al.* (2004) ที่พบว่าการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP และ SSR ที่มีความสัมพันธ์กับองค์ประกอบผลผลิต ในโคลนพันธุ์ลูกผสมที่ได้จาก Q 165 และ II 76-514 จำนวน 320 โคลนพันธุ์ พบว่ามี 11 QTL มีความสัมพันธ์มากกว่าหนึ่งลักษณะ

เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและจำนวนต่อกอมีจำนวน 6 เครื่องหมายโมเลกุลโดยถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่และพ่ออย่างละสามเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่ พบว่าสองโมเลกุลเครื่องหมายมีอิทธิพลทางลบกับการแตกกอและมีอิทธิพลทางบวกกับขนาดลำ สำหรับหนึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่เหลือจะมี อิทธิพลทางบวกกับการแตกกอและมีอิทธิพลทางลบกับขนาดลำ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์พ่อทั้งสามเครื่องหมายโมเลกุลมีอิทธิพลทางลบกับขนาดลำและมีอิทธิพลทางบวกกับการแตกกอ

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและปริมาณเส้นใยมีจำนวน 7 เครื่องหมายโมเลกุลโดย 4 เครื่องหมายโมเลกุลถ่ายทอดมาจากโคลนพันธุ์แม่ และสามเครื่องหมายโมเลกุลถ่ายทอดมาจากโคลนพันธุ์พ่อ โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่จะมีอิทธิพลทางลบกับปริมาณเส้นใยและมีอิทธิพลทางบวกกับขนาดลำโดยมีเพียงหนึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่มีอิทธิพลทางบวกกับปริมาณเส้นใยและมีอิทธิพล

ตารางที่ 9 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) อิทธิพล QTL และ โคลนพันธุ์ที่ให้ QTL ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์ กับลักษณะที่ทดสอบมากกว่าหนึ่งลักษณะ

เครื่องหมาย		เส้นผ่านศูนย์กลางลำ		การแตกกอ		ปริมาณเส้นใย	
โมเลกุล	โคลนพันธุ์ ¹	$R^2(\%)^2$	อิทธิพล QTL	$R^2(\%)^2$	อิทธิพล QTL	$R^2(\%)^2$	อิทธิพล QTL
caac21	K 93-207	7.0	-0.149	8.2	1.491		
ccag7	K 93-207	8.5	0.163	4.7	-1.160		
ccag9	K 93-207	9.8	0.174	3.5	-1.011		
agtt10	MPT 97-1	6.7	-0.146	7.0	1.382		
caac14	MPT 97-1	4.7	-0.125	4.3	1.115		
ccaa22	MPT 97-1	7.2	-0.151	3.4	1.002		
ccaa18	K 93-207	11.8	0.190			3.8	-1.094
cctg2	K 93-207	8.1	0.161			6.5	-1.413
ctag10	K 93-207	11.2	0.186			7.5	-1.495
ggat6	K 93-207	6.2	-0.141			4.8	1.222
agtc4	MPT 97-1	8.0	-0.161			7.2	1.485
catc5	MPT 97-1	3.5	-0.110			7.5	1.493
cgtg20	MPT 97-1	6.5	-0.146			3.5	1.080
ctat5	K 93-207	6.6	0.145	5.1	-1.200	11.2	-1.798
gctt12	K 93-207	8.9	0.167	6.6	-1.357	3.5	-1.070
ccag11	MPT 97-1	5.9	-0.137	3.9	-1.073	3.7	1.509
caac9	MPT 97-1	4.0	-0.117	4.3	1.113	3.9	1.112
catc4	MPT 97-1	4.3	-0.119	5.8	1.268	7.5	1.081
catc30	MPT 97-1	7.6	-0.155	5.1	1.202	3.4	1.044

หมายเหตุ ¹ โคลนพันธุ์แม่ = K 93-207 โคลนพันธุ์พ่อ = MPT 97-1 (*Saccharum spontaneum*)

² ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $P < 0.005$

ทางลบกับขนาดลำ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์พ่อพบว่าทั้งสามโมเลกุล เครื่องหมายจะมีอิทธิพลทางลบกับขนาดลำและมีอิทธิพลทางบวกกับปริมาณเส้นใย

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นค่อนข้างชัดเจนว่าเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่ส่วนใหญ่จะมีอิทธิพลทางลบกับปริมาณเส้นใยและการแตกกอและมีอิทธิพลทางบวกกับขนาดลำ ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์พ่อจะมีอิทธิพลทางลบกับขนาดลำและมีอิทธิพลทางบวกกับการแตกกอและปริมาณเส้นใย

5.4.1 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ถ่ายทอดจาก K 93-207

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดมาจาก K 93-207 พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล ccac21 มีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการแตกกอโดยมีอิทธิพล QTL ทางลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และมีอิทธิพล QTL ทางบวกกับการแตกกอ โดยมีค่า R^2 สูงปานกลาง ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลนี้จะทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางลำเพิ่มขึ้นและมีการแตกกอลดลง ส่วนเครื่องหมายโมเลกุล ccaa18 มีอิทธิพล QTL ทางบวกกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และมีอิทธิพลทางลบกับปริมาณเส้นใย ซึ่งในลักษณะปริมาณเส้นใยมีค่า R^2 และอิทธิพล QTL ต่ำ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลนี้น่าจะมีผลกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำมากกว่าปริมาณเส้นใย เครื่องหมายโมเลกุล ccag7 และ ccag9 มี อิทธิพล QTL ทางบวกกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำและมี อิทธิพล QTL ทางลบกับการแตกกอ โดยมีค่า R^2 ค่อนข้างสูงในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และต่ำในลักษณะการแตกกอ โดยเครื่องหมายโมเลกุลนี้จะเพิ่มเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และลดการแตกกอ เครื่องหมายโมเลกุล cctg2 และ ctag10 มี อิทธิพล QTL ทางบวกกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และทางลบกับปริมาณเส้นใย โดยมีค่า R^2 ค่อนข้างสูงในทั้งสองลักษณะ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองจะเพิ่มเส้นผ่านศูนย์กลางลำและลดปริมาณเส้นใยและสามารถอธิบายความแปรปรวนของทั้งสองลักษณะได้สูงพร้อมกัน เครื่องหมายโมเลกุล ggat6 มี อิทธิพล QTL ทางลบกับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และทางบวกกับปริมาณเส้นใยซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลเดียวที่ถ่ายทอดจาก K 93-207 และมีผลในการลดเส้นผ่านศูนย์กลางลำและเพิ่มปริมาณเส้นใย

เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับทั้ง 3 ลักษณะและถ่ายทอดมาจาก K 93-207 คือ ctat5 และ gctt12 โดยเครื่องหมายโมเลกุล ctat5 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่า R^2 สูงที่สุดในลักษณะปริมาณเส้นใย และมี อิทธิพล QTL ทางลบกับปริมาณเส้นใยและทางบวกกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการแตกกอ ทำให้เครื่องหมายโมเลกุลนี้จะมีผลในการลดปริมาณเส้นใยและเพิ่ม

เส้นผ่านศูนย์กลางลำ รวมทั้งการแตกกอของอ้อย สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล gctt12 นั้นมี อิทธิพล QTL ทางบวกกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำและทางลบกับการแตกกอ รวมทั้งปริมาณเส้นใย ทำให้เครื่องหมายโมเลกุลนี้มีผลในการเพิ่มเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และลดการแตกกอรวมทั้งปริมาณเส้นใย ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานทดลองของ Ming *et al.* (2002) ที่พบว่า QTL ที่ถ่ายทอดจาก *Saccharum officinarum* ที่อิทธิพล QTL มีค่าเป็นบวกในลักษณะที่สัมพันธ์กับขนาดลำคือน้ำหนักลำและมีอิทธิพลทางลบกับลักษณะการแตกกอและปริมาณเส้นใยพร้อมกัน

5.4.2 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ถ่ายทอดจาก MPT 97-1

เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ถ่ายทอดมาจากโคลนพันธุ์ MPT 97-1 มีจำนวน 11 เครื่องหมายโมเลกุล โดยพบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับทั้งลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและปริมาณเส้นใยพร้อมกันคือเครื่องหมายโมเลกุล agtc4, catc5 และ cgtg20 โดยทั้ง 3 เครื่องหมายโมเลกุลมีอิทธิพล QTL ทางบวกกับปริมาณเส้นใยและทางลบเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ดังนั้นทั้งสามเครื่องหมายโมเลกุลจะลดเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และเพิ่มปริมาณเส้นใย โดยเครื่องหมายโมเลกุล agtc4 มีค่า R^2 ค่อนข้างสูงในทั้ง 2 ลักษณะ จึงสามารถอธิบายความแปรปรวนที่เกิดขึ้นในทั้ง 2 ลักษณะได้ค่อนข้างสูง ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล catc5 สามารถอธิบายความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางลำได้ดีกว่าปริมาณเส้นใย และเครื่องหมายโมเลกุล cgtg20 สามารถอธิบายความแปรปรวนของปริมาณเส้นใยได้ดีกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางลำ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจาก MPT 97-1 และมีความสัมพันธ์กับทั้งลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการแตกกอ คือเครื่องหมายโมเลกุล agtt10, caac14, ccaa22 และ cttt13 ซึ่งทั้ง 4 เครื่องหมายโมเลกุลมี อิทธิพล QTL ทางลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และบวกกับการแตกกอ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสี่จะมีอิทธิพลในการลดเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และเพิ่มการแตกกอ โดยเครื่องหมายโมเลกุล agtt10 มีค่า R^2 ปานกลาง กับทั้งลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการแตกกอจึงสามารถอธิบายความแปรปรวนของทั้งสองลักษณะดังกล่าวได้ดีกว่าเครื่องหมายโมเลกุล caac14 และ cttt13 สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล ccaa22 สามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำได้ดี เนื่องจากมีค่า R^2 ค่อนข้างสูง

เครื่องหมายโมเลกุล caac9, catc4, catc30 และ ccag11 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดมาจาก MPT 97-1 ทั้ง 4 เครื่องหมายโมเลกุล โดยพบ 3 เครื่องหมายโมเลกุลคือ caac9, catc4, และ catc30 มี อิทธิพล QTL ทางลบกับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และทางบวกกับลักษณะปริมาณเส้นใยและการแตกกอ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสามจะมีอิทธิพลในการลดเส้น

ผ่านศูนย์กลางลำและเพิ่มการแตกกอ และปริมาณเส้นใยไปพร้อมกัน โดยเครื่องหมายโมเลกุล caac9 สามารถอธิบายความแปรปรวนทั้งสามลักษณะได้ค่อนข้างต่ำเนื่องจากมีค่า R^2 ค่อนข้างต่ำในทั้ง 3 ลักษณะ ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล catc4 สามารถอธิบายความแปรปรวนในลักษณะปริมาณเส้นใยได้ดีกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และการแตกกอ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล catc30 สามารถอธิบายลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำได้ดีกว่าปริมาณเส้นใย และการแตกกอ เครื่องหมายโมเลกุล ccag11 มีอิทธิพล QTL ทางลบกับทั้งเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และการแตกกอและทางบวกกับปริมาณเส้นใย ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลนี้จะมีอิทธิพลในการเพิ่มปริมาณเส้นใย ขณะที่จะมีอิทธิพลในการลดเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และการแตกกอ โดยเครื่องหมายโมเลกุลนี้สามารถอธิบายความแปรปรวนของทั้ง 3 ลักษณะได้ค่อนข้างต่ำเนื่องจากมีค่า R^2 ค่อนข้างต่ำ

ในการพิจารณาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์ กับลักษณะที่ทดสอบมากกว่า 1 ลักษณะในการคัดเลือกพันธุ์อ้อยพบว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดจะแสดงผลต่อลักษณะที่ทดสอบ คล้ายกับผลการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะที่ทำการทดสอบ (ตารางที่ 2) ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลใดมีผลทั้งลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการแตกกอ พบว่าค่า อิทธิพล QTL จะเป็นบวกในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และแสดงผลเป็นลบในลักษณะการแตกกอ เช่น เครื่องหมายโมเลกุล ccag7, ccag9, ctat5 และ gctt12 เป็นต้น และเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงผลของ อิทธิพล QTL ต่อการแตกกอ จะแสดงผลทางลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำเช่น caac14, ccaa22 และ cttt13 สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงผลของอิทธิพล QTL ต่อปริมาณเส้นใยเป็นบวก ก็จะมีผลของ อิทธิพล QTL ของลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำเป็นลบเช่น agtc4, catc5 และ cgtg20

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีผลต่อทั้งสามลักษณะ จะมีการตอบสนองเช่นเดียวกับค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะที่ทำการทดสอบ เช่นเครื่องหมายโมเลกุล ctat5, และ gctt12 ที่มีค่าอิทธิพล QTL ของลักษณะการแตกกอและเส้นผ่านศูนย์กลางลำเป็นลบ และมีค่า อิทธิพล QTL เป็นบวกในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุล caac9, catc4 และ catc30 มีค่าอิทธิพล QTL ของค่าปริมาณเส้นใยและการแตกกอเป็นบวก แต่จะมีค่าอิทธิพล QTL ของเส้นผ่านศูนย์กลางลำเป็นลบ และมีเครื่องหมายโมเลกุล ccag11 ซึ่งมีความสัมพันธ์ที่แตกต่างกันคือมีอิทธิพล QTL ของลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการแตกกอเป็นลบ แต่มีอิทธิพล QTL ของลักษณะปริมาณเส้นใยเป็นบวก แต่มีค่า R^2 ของทั้งสามลักษณะต่ำจึงอธิบายความแปรปรวนได้น้อย ซึ่งผลที่ได้ก็น่าสอดคล้องกับงานทดลองของ Ming *et al.* (2001) ที่ทดสอบ QTL ในลักษณะความหวานของอ้อยซึ่งพบว่า QTL ที่มีความสัมพันธ์กับความหวานจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะอื่นๆ ด้วย เช่นมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับค่าโพล น้ำหนักลำ และมีสหสัมพันธ์ทางลบกับปริมาณ เถ้า (ash

content) นอกจากนี้ Ming *et al.* (2002) พบว่า QTL ที่ถ่ายทอดจาก *Saccharum spontaneum* มีอิทธิพล QTL เป็นลบในลักษณะที่สัมพันธ์กับขนาดลำคือน้ำหนักลำ และมีความอิทธิพลทางบวกกับลักษณะการแตกกอและปริมาณเส้นใย

5.5 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์

เมื่อพิจารณาลักษณะเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับ 3 ลักษณะที่ทำการทดสอบแค่ลักษณะเดียว พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล simplex เหล่านี้มีค่า R^2 และอิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลค่อนข้างต่ำ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถใช้คัดเลือกพันธุ์ได้ในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและมีค่า R^2 ค่อนข้างสูงได้แก่เครื่องหมายโมเลกุล ccta5, cggt25 และ cctg21 โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 7.2, 8.1 และ 6.3 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบมากกว่าหนึ่งลักษณะพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ส่วนใหญ่จะมีค่า R^2 และ อิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุล สูงกว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเดียว ซึ่งการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้น่าจะมีประสิทธิภาพมากกว่า

เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทดสอบมากกว่าหนึ่งลักษณะ และสามารถใช้คัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้เช่นเครื่องหมายโมเลกุล ccag9 และ ccag8 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการแตกกอ มีค่า R^2 ค่อนข้างสูง และมีอิทธิพลทางบวกกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำแต่มีอิทธิพลทางลบกับลักษณะการแตกกอ เครื่องหมายโมเลกุล ccaa18 มีค่า R^2 สูง (11.8 เปอร์เซนต์) และมีอิทธิพลทางบวกต่อลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ แต่มีค่า R^2 และอิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลต่ำต่อลักษณะปริมาณเส้นใย จึงสามารถใช้คัดเลือกลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำได้โดยมีผลในการลดปริมาณเส้นใยเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุล ctag10 ซึ่งมีค่า R^2 สูง (11.8 เปอร์เซนต์) และมีอิทธิพลทางบวกต่อทั้งลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและปริมาณเส้นใย ซึ่งเมื่อใช้คัดเลือกพันธุ์จะทำให้ได้ลักษณะลำใหญ่แต่มีปริมาณไฟเบอร์ลดลงมาก ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล ctac5 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่า R^2 ค่อนข้างสูง (7.5 เปอร์เซนต์) และมีอิทธิพลทางบวกต่อลักษณะปริมาณเส้นใย และมีค่า R^2 และอิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุล ในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำต่ำ จึงสามารถใช้คัดเลือกปริมาณเส้นใยได้โดยที่เส้นผ่านศูนย์กลางลำลดลงไม่มากนัก

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล gctt12 ซึ่งมีค่า R^2 และอิทธิพลทางบวกของเครื่องหมายโมเลกุลสูงในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ โดยมีค่า R^2 และมีอิทธิพลทางลบปานกลางในลักษณะการแตกกอ รวมทั้งมีค่า R^2 และอิทธิพลทางลบกับปริมาณเส้นใยต่ำ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลนี้จึงใช้คัดเลือกพันธุ์โดยเพิ่มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำและลดปริมาณเส้นใยไม่มากนัก แต่จะลดการแตกกอ ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล catc4 ซึ่งมีค่า R^2 และอิทธิพลทางลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำต่ำ ขณะที่ค่า R^2 และอิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลทางบวกปานกลางกับการแตกกอ และปริมาณเส้นใยจึงสามารถเพิ่มปริมาณเส้นใยและการแตกกอและมีผลในการลดขนาดลำไม่มากนัก

สำหรับใช้เครื่องหมายโมเลกุลมากกว่าหนึ่งเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกมีความจำเป็นต้องศึกษาผลกระทบ (interaction) ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งอาจจะส่งเสริมกันหรือยับยั้งกันก็ได้

6. ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล duplex กับลักษณะที่ทดสอบ

6.1 เครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบหนึ่งลักษณะ

เมื่อทดสอบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล duplex จำนวน 87 เครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่ทำการทดสอบโดยใช้ simple linear regression ที่ระดับค่า $P < 0.005$ พบเครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ ลักษณะเดียวจำนวน 5 เครื่องหมายโมเลกุล โดยเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำจำนวน 4 เครื่องหมายโมเลกุลคือ ccag21, cggt24, cttt28 และ ttgg28 โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 5.4, 4.4, 4.3 และ 4.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอจำนวน 1 เครื่องหมายโมเลกุลคือเครื่องหมายโมเลกุล cctg11 โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 6.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และมีอิทธิพลทางลบคือ ccag21, cggt24 และ ttgg28 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุล cttt28 มีอิทธิพลทางบวกกับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการแตกกอลักษณะเดียวคือ cctg11 โดยมีอิทธิพลทางบวกต่อลักษณะดังกล่าว (ตารางที่ 10)

6.2 เครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบมากกว่าหนึ่งลักษณะ โดยพบ 12 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบมากกว่าหนึ่งลักษณะ โดยค่า R^2 ของลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำมีค่าระหว่าง 4.3 เปอร์เซ็นต์ (cttt28) ถึง

33.5 เปอร์เซ็นต์ (ccaa23) ซึ่งหมายความว่าเครื่องหมายโมเลกุล ccaa23 สามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำได้สูงถึง 32.9 เปอร์เซ็นต์ ค่าอิทธิพล QTL มีค่าระหว่าง -0.442 (ccaa23) ถึง 0.163 (cttt28) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และ อิทธิพล QTL ของเครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการแตกกอ

Marker	R^2 (%)	อิทธิพล QTL
เส้นผ่านศูนย์กลางลำ		
ccag21	5.4	-0.156
cgtt24	4.4	-0.141
cttt28	4.3	0.163
ttgg28	4.4	-0.141
การแตกกอ		
cctg11	6.1	1.748

หมายเหตุ ¹ มีค่าแตกต่างทางสถิติที่ค่า $P < 0.005$

ค่า R^2 ของลักษณะการแตกกามีค่าระหว่าง 4.4 เปอร์เซ็นต์ (cttt11) ถึง 12.1 เปอร์เซ็นต์ (ccaa10) ทำให้เครื่องหมายโมเลกุล ccaa10 สามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะการแตกกอได้ 12.1 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมด ค่าอิทธิพล QTL มีค่าระหว่าง 1.372 (cttt11) ถึง 2.360 (ccaa10) สำหรับค่า R^2 ของปริมาณเส้นใยมีค่าระหว่าง 4.5 เปอร์เซ็นต์ (caat20) ถึง 19.7 เปอร์เซ็นต์ (ccaa23) แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุล ccaa23 สามารถอธิบายความแปรปรวนเนื่องจากปริมาณเส้นใยได้ 19.7 เปอร์เซ็นต์ ค่า อิทธิพล QTL มีค่าระหว่าง 1.440 (caat20) ถึง 3.307 (ccaa23)

ในจำนวน 12 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะมากกว่า 1 ลักษณะ มีเครื่องหมายโมเลกุล duplex จำนวน 7 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์ทั้ง 3 ลักษณะที่ทำการทดสอบ ได้แก่ agaa6, acta8, actc31, ccaa10, ccaa23, ccag19 และ ctat30 ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 7 เครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบในทิศทางเดียวกันคือ มีอิทธิพล QTL ทางลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และมีอิทธิพล QTL ทางบวกกับการแตกกอและปริมาณเส้นใย แสดงว่าถ้าปรากฏแถบเครื่องหมายโมเลกุล duplex เหล่านี้จะส่งผลให้อ้อยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง

ถ้าเล็กน้อยแต่มีปริมาณเส้นใยและการแตกกอเพิ่มขึ้น สำหรับ 5 เครื่องหมายโมเลกุลที่เหลือคือ caat20, catc24, ccta16, cggt11 และ cttt22 มีความสัมพันธ์กับ 2 ลักษณะซึ่งมีอิทธิพล QTL ในทิศทางเดียวกับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับทั้ง 3 ลักษณะ

ตารางที่ 11 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และ อิทธิพล QTL ของเครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบมากกว่าหนึ่งลักษณะ

Marker	R^2 (%) ¹	อิทธิพลQTL	R^2 (%) ¹	อิทธิพลQTL	R^2 (%) ¹	อิทธิพล QTL
	เส้นผ่านศูนย์กลางลำ		การแตกกอ		ปริมาณเส้นใย	
agaa6	11.7	-0.270	6.5	1.910	5.8	1.891
acta8	32.9	-0.425	11.1	2.333	15.4	2.847
caat20			7.6	1.754	4.5	1.440
catc24	11.2	-0.260			5.9	1.875
catc31	11.2	-0.260	5.4	1.523	11.2	2.229
ccaa10	27.4	-0.378	12.1	2.360	12.3	2.480
ccaa23	33.5	-0.442	9.4	2.224	19.7	3.307
ccta16	9.6	-0.235			6.2	1.848
ccag19	18.7	-0.309	9.2	2.050	5.9	1.741
cggt11	8.8	-0.202	4.4	1.372		
ctat30	26.1	-0.374	6.1	1.746	16.0	2.856
cttt22	4.4	-0.159			12.4	2.495

หมายเหตุ ¹ มีค่าแตกต่างทางสถิติที่ค่า $P < 0.005$

เครื่องหมายโมเลกุล ccaa23, acta8, ccaa10 และ ctat 30 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่า R^2 และ อิทธิพล QTL สูงกับลักษณะที่ทำการทดสอบทั้ง 3 ลักษณะ จึงน่าจะเป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบ duplex ที่เหมาะสมกับการคัดเลือกพันธุ์อ้อยได้ดี สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล acta8 และ ccaa10 มีค่า R^2 และอิทธิพล QTL สูงกว่าเครื่องหมายโมเลกุล ccaa23 ในลักษณะการแตกกอ แต่มีค่าต่ำกว่าในลักษณะปริมาณเส้นใย ทำให้ทั้ง 2 โมเลกุลเครื่องหมายนี้อธิบายลักษณะการแตกกอได้ดีกว่า ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล ctat30 ถึงแม้จะอธิบายลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำได้ต่ำกว่าเครื่องหมายโมเลกุล acta8 และ ccaa10 แต่สามารถอธิบายลักษณะปริมาณเส้นใยได้ดีกว่า

7. ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล triplex กับลักษณะที่ทดสอบ

เมื่อทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 13:1 (ปรากฏ:ไม่ปรากฏ แดบดีเอ็นเอ) หรือเครื่องหมายโมเลกุล triplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ การแตกกอ และปริมาณเส้นใย พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุล triplex จำนวน 2 และ 3 เครื่องหมาย โมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดลำและปริมาณเส้นใยตามลำดับ โดยไม่พบเครื่องหมาย

ตารางที่ 12 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และ อิทธิพล QTL ของเครื่องหมาย โมเลกุล triplex ที่มีความสัมพันธ์กับขนาดลำและปริมาณเส้นใย

Marker	R^2 (%)	อิทธิพล QTL
เส้นผ่านศูนย์กลางลำ		
cctg15	10.0	-0.329
gcta6	5.9	-0.235
ปริมาณเส้นใย		
caac1	6.1	1.748
ccta8	4.9	2.725
ccta9	4.1	1.779

หมายเหตุ ¹ มีค่าแตกต่างทางสถิติที่ค่า $P < 0.005$

โมเลกุล triplex ที่มีความสัมพันธ์กับขนาดลำที่ระดับความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p < 0.005$ (ตารางที่ 12) นอกจากนี้ยังมีเครื่องหมายโมเลกุล triplex จำนวน 6 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบมากกว่าหนึ่งลักษณะที่ระดับความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p < 0.005$ (ตารางที่ 13)

เครื่องหมายโมเลกุล cctg15 และ gcta6 มีความสัมพันธ์ กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำโดยมีค่า R^2 เท่ากับ 10.0 และ 5.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองมีอิทธิพลของ QTL เป็นลบแสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองมีอิทธิพลในการลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

เครื่องหมายโมเลกุล caac1, ccta8 และ ccta9 มีความสัมพันธ์กับปริมาณเส้นใยโดยมีค่า R^2 เท่ากับ 6.1, 4.9, 4.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 มีอิทธิพลของ QTL เป็นบวกแสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 มีอิทธิพลในการเพิ่มปริมาณไฟเบอร์

ตารางที่ 13 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และ อิทธิพล QTL ของเครื่องหมายโมเลกุล triplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบมากกว่าหนึ่งลักษณะ

Marker	R^2 (%) ¹	อิทธิพล QTL	R^2 (%) ¹	อิทธิพล QTL	R^2 (%) ¹	อิทธิพล QTL
	เส้นผ่านศูนย์กลางลำ		การแตกกอ		ปริมาณเส้นใย	
agag1	6.6	-0.361			4.4	2.929
cctg1	4.4	-0.201			12.2	3.103
agtc9	4.0	-0.203			4.5	2.063
acta14	18.9	-0.376	10.8	2.648	9.9	2.676
agag14	31.7	-0.509	13.0	3.069	11.4	2.955
cttt18	50.3	-0.608	22.6	3.861	20.9	3.823

หมายเหตุ ¹ มีค่าแตกต่างทางสถิติที่ค่า $P < 0.005$

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล triplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบมากกว่าหนึ่งลักษณะจำนวน 6 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 13) มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุลคือ agag1, cctg1 และ agtc9 มีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และปริมาณเส้นใยที่ระดับความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p < 0.005$ โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 6.6, 4.4 และ 4.0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับลักษณะขนาดลำ และ 4.4, 12.2 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับลักษณะปริมาณเส้นใย สำหรับอิทธิพลของ QTL มีค่าเป็นลบในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และมีค่าเป็นบวกในลักษณะปริมาณเส้นใย แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสามมีอิทธิพลในการลดขนาดลำและเพิ่มปริมาณเส้นใยพร้อมกัน

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล triplex ที่มีความสัมพันธ์กับทั้งสามลักษณะที่ระดับความแตกต่างทางสถิติที่ค่า $p < 0.005$ มีจำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุล ได้แก่ acta14, agag14 และ cttt18 โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 18.9, 31.7 และ 50.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และมีค่าเท่ากับ 10.8, 13.0 และ 22.6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับลักษณะการแตกกอ และมีค่าเท่ากับ 9.9, 11.4 ละ

20.9 เปอร์เซนต์ตามลำดับ สำหรับลักษณะปริมาณเส้นใย โดยเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสามมีอิทธิพลของ QTL มีค่าเป็นลบในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และมีค่าเป็นบวกในลักษณะการแตกกอและปริมาณเส้นใย แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสามมีอิทธิพลในการลดขนาดลำ เพิ่มการแตกกอและปริมาณเส้นใยพร้อมกัน

8. การศึกษาอิทธิพลของกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทดสอบ

การศึกษากลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล simplex, duplex และ triplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทดสอบโดยการวิเคราะห์ multiple regression เพื่อเลือก model ที่มีค่า R^2 สูงที่สุด (ตารางที่ 14) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์ลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำจำนวน 59 เครื่องหมายโมเลกุล มีกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 22 เครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ค่า R^2 สูงที่สุดเท่ากับ 60.2 เปอร์เซนต์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.73 เปอร์เซนต์ต่อเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งงานทดลองของ Ming *et al.* (2002) ที่ศึกษาในลักษณะที่สัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ คือลักษณะน้ำหนักลำพบว่า เมื่อวิเคราะห์โมเดลที่ประกอบด้วย 10 QTL จากคู่ผสม Green German x IND 81-146 พบว่ามีค่า R^2 เท่ากับ 62.7 เปอร์เซนต์ และในกลุ่มผสม PIN 84-1 x Muntok Java มีค่า R^2 เท่ากับ 71.6 เปอร์เซนต์ จาก 24 QTL ซึ่งพบว่างานทดลองนี้มีค่า R^2 เฉลี่ยต่อ QTL สูงกว่า และเมื่อวิเคราะห์ multiple regression ของเครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับขนาดลำจำนวน 15 เครื่องหมายโมเลกุล มีกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล duplex จำนวน 9 เครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ค่า R^2 สูงที่สุดเท่ากับ 51.0 เปอร์เซนต์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.66 เปอร์เซนต์ต่อเครื่องหมายโมเลกุล สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลแบบ triplex จำนวน 8 เครื่องหมายโมเลกุล ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ พบว่ามีกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล triplex จำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่า R^2 สูงที่สุดเท่ากับ 55.2 เปอร์เซนต์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 18.4 เปอร์เซนต์ ต่อเครื่องหมายโมเลกุล

การวิเคราะห์ multiple regression เพื่อเลือก model ที่มีค่า R^2 สูงที่สุดในกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการแตกกอพบว่า เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอจำนวน 33 เครื่องหมายโมเลกุล มีกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 14 เครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ค่า R^2 สูงที่สุดเท่ากับ 34.4 เปอร์เซนต์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.45 เปอร์เซนต์ต่อเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งจากงานทดลองของ Ming *et al.* (2002) พบว่า จำนวน QTL ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการแตกกามีจำนวนน้อยโดยพบว่าคู่ผสม Green German x IND 81-146 มี 2 QTL ที่สามารถอธิบายลักษณะการแตกกอรวมมีค่า R^2 เท่ากับ 13.9 เปอร์เซนต์ และในกลุ่มผสม

ตารางที่ 14 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลใน model ของการวิเคราะห์ multiple regression ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex, duplex และ triplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ

ลักษณะ	เครื่องหมายโมเลกุล		
	Simplex	duplex	triplex
เส้นผ่านศูนย์กลางลำ			
R^2 (%)	60.2	51.0	55.2
จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล	22	9	3
เฉลี่ย	2.73	5.66	18.4
การแตกกอ			
R^2 (%)	34.4	21.8	23.9
จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล	14	4	3
เฉลี่ย	2.45	5.45	7.96
ปริมาณเส้นใบ			
R^2 (%)	39.2	33.0	35.3
จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล	14	4	4
เฉลี่ย	2.8	8.25	8.82

PIN 84-1 x Muntok Java พบแค่หนึ่ง QTL ที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอและมีค่า R^2 เท่ากับ 6.1 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอจำนวน 11 เครื่องหมายโมเลกุล พบว่ามีกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล duplex จำนวน 4 เครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ค่า R^2 สูงที่สุดเท่ากับ 21.8 เปอร์เซ็นต์โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.45 เปอร์เซ็นต์ต่อเครื่องหมายโมเลกุล สำหรับกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล triplex ที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอจำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุล พบว่าทั้ง 3 เครื่องหมายโมเลกุลมีค่า R^2 สูงที่สุดเท่ากับ 23.9 เปอร์เซ็นต์โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.96 เปอร์เซ็นต์ต่อเครื่องหมายโมเลกุล

การวิเคราะห์ multiple regression เพื่อเลือก model ที่มีค่า R^2 สูงที่สุดในกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณเส้นใบพบว่า เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอจำนวน 32 เครื่องหมายโมเลกุล มีกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 14 เครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ค่า R^2 สูงที่สุดเท่ากับ 39.2. เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.8 เปอร์เซ็นต์

ต่อเครื่องหมายโมเลกุล ขณะที่ Ming *et al.* (2002) พบ 19 QTL จากคู่ผสม Green German x IND 81-146 ที่สามารถอธิบายลักษณะปริมาณเส้นใยมีค่า R^2 เท่ากับ 60.6 เปอร์เซ็นต์ และในคู่ผสม PIN 84-1 x Muntok Java พบหนึ่ง QTL ที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเส้นใยและมีค่า R^2 เท่ากับ 7.0 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล duplex ที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเส้นใยจำนวน 11 เครื่องหมายโมเลกุล พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุล duplex จำนวน 4 เครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ค่า R^2 สูงที่สุดเท่ากับ 33.0 เปอร์เซ็นต์โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.25 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล triplex ที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอจำนวน 8 เครื่องหมายโมเลกุล พบว่ามี 4 เครื่องหมายโมเลกุลมีค่า R^2 สูงที่สุดเท่ากับ 35.3 เปอร์เซ็นต์โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.82 เปอร์เซ็นต์ต่อเครื่องหมายโมเลกุล

9. การเปรียบเทียบ Dose ของเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทดสอบ

เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีชุดโครโมโซมหลายชุด (polyploid) ดังนั้นระดับ dosage ของยีนหรือเครื่องหมายโมเลกุลจึงมีผลกับการแสดงออกของลักษณะที่ทำการทดสอบ โดยเฉพาะลักษณะปริมาณที่ควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ซึ่งแต่ละยีนมีผลไม่มากนัก เมื่อพิจารณา dose ของยีนพบว่าลักษณะที่ทำการทดสอบทั้ง 3 ลักษณะ ค่า R^2 สูงสุดจะเพิ่มขึ้นเมื่อ marker dose เพิ่มขึ้นทั้ง 3 ลักษณะ (ตารางที่ 15) โดยพบว่าค่า R^2 สูงสุดเพิ่มขึ้นจากเครื่องหมายโมเลกุล simplex เท่ากับ 11.2 เปอร์เซ็นต์ duplex เท่ากับ 33.5 เปอร์เซ็นต์ และสูงที่สุดในเครื่องหมายโมเลกุล triplex ซึ่งเท่ากับ 50.30 เปอร์เซ็นต์ สำหรับค่าเฉลี่ยต่อหนึ่งเครื่องหมายโมเลกุลมีค่าเท่ากับ 6.41 เปอร์เซ็นต์ ในโมเลกุลเครื่องหมาย simplex เท่ากับ 10.70 เปอร์เซ็นต์ในโมเลกุลเครื่องหมาย duplex และเท่ากับ 14.63 เปอร์เซ็นต์ในโมเลกุลเครื่องหมาย triplex สำหรับค่าอิทธิพล QTL มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันโดยเพิ่มขึ้นทั้งค่าลบและค่าบวก แสดงว่าเมื่อระดับ dose ของเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เครื่องหมายโมเลกุลแต่ละเครื่องหมาย มีผลต่อการเพิ่มขึ้นและลดลงของลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และเมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ multiple regression (ตารางที่ 14) พบแนวโน้มเช่นเดียวกันว่าเมื่อ dose ของเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่ม จะมีผลทำให้ค่าเฉลี่ยและผลรวมของค่า R^2 ในกลุ่มที่ให้ค่าสูงที่สุดในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

สำหรับลักษณะการแตกกอ ค่า R^2 สูงสุดเพิ่มขึ้นจากเครื่องหมายโมเลกุล simplex ซึ่งเท่ากับ 8.2 เปอร์เซ็นต์ duplex เท่ากับ 12.1 เปอร์เซ็นต์ และสูงที่สุดในเครื่องหมายโมเลกุล triplex เท่ากับ 22.60 เปอร์เซ็นต์ สำหรับค่าเฉลี่ยต่อหนึ่งเครื่องหมายโมเลกุลมีค่าเท่ากับ 4.76 เปอร์เซ็นต์ ในโมเลกุลเครื่องหมาย simplex เท่ากับ 7.98 เปอร์เซ็นต์ในโมเลกุลเครื่องหมาย duplex และเท่ากับ

ตารางที่ 15 ระดับความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ (R^2) และ อิทธิพล QTL ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex, duplex และ triplex ของลักษณะที่ทำการทดสอบทั้ง 3 ลักษณะ

ลักษณะ		ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุล					
		Simplex		Duplex		Triplex	
		ต่ำสุด	สูงสุด	ต่ำสุด	สูงสุด	ต่ำสุด	สูงสุด
เส้นผ่านศูนย์กลางลำ	$R^2(\%)$	3.30	11.20	4.30	33.50	4.30	50.30
	เฉลี่ย $R^2(\%)$	6.41		10.70		14.63	
	อิทธิพล QTL	-0.161	0.186	-0.440	0.163	-0.608	0.43
การแตกกอ	$R^2(\%)$	3.50	8.20	4.40	12.10	10.80	22.60
	เฉลี่ย $R^2(\%)$	4.76		7.98		15.47	
	อิทธิพล QTL	-1.357	1.491	1.372	2.36	2.678	3.816
ปริมาณเส้นใย	$R^2(\%)$	3.40	11.20	4.50	19.70	4.10	20.9
	เฉลี่ย $R^2(\%)$	5.42		9.57		7.79	
	อิทธิพล QTL	-1.798	1.493	1.741	3.307	1.779	3.823

15.47 เปอร์เซ็นต์ในโมเลกุลเครื่องหมาย triplex สำหรับค่า อิทธิพล QTL มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันโดยเพิ่มขึ้นทั้งค่าลบและค่าบวก แสดงว่าเมื่อระดับ dose ของเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เครื่องหมายโมเลกุลแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลมีผลต่อการเพิ่มขึ้นและลดลงของลักษณะการแตกกอ และเมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ multiple regression ของลักษณะการแตกกอ (ตารางที่ 14) พบแนวโน้มเช่นเดียวกันว่าเมื่อ dose ของเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่ม จะมีผลทำให้ค่าเฉลี่ยและผลรวมของค่า R^2 ในกลุ่มที่ให้ค่าสูงที่สุดในลักษณะการแตกกอเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

ลักษณะปริมาณเส้นใยมีการเพิ่มขึ้นของ ค่า R^2 สูงสุด โดยเพิ่มขึ้นจากเครื่องหมายโมเลกุล simplex ซึ่งเท่ากับ 11.20 เปอร์เซ็นต์ duplex เท่ากับ 19.70 เปอร์เซ็นต์ และเครื่องหมายโมเลกุล triplex มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 21.30 เปอร์เซ็นต์ สำหรับค่าเฉลี่ยแต่ต่อหนึ่งเครื่องหมายโมเลกุลมีค่าเท่ากับ 5.42 เปอร์เซ็นต์ ในโมเลกุลเครื่องหมาย simplex เท่ากับ 9.57 เปอร์เซ็นต์ในโมเลกุลเครื่องหมาย duplex และเท่ากับ 7.59 เปอร์เซ็นต์ในโมเลกุลเครื่องหมาย triplex สำหรับค่าอิทธิพล QTL มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันโดยเพิ่มขึ้นทั้งค่าลบและค่าบวกแสดงว่าเมื่อระดับ dose ของเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เครื่องหมายโมเลกุลแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลมีผลต่อการเพิ่มขึ้นและลดลงของลักษณะปริมาณเส้นใย และเมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ multiple regression (ตารางที่ 14) ของลักษณะปริมาณเส้นใย พบแนวโน้มเช่นเดียวกันว่าเมื่อ dose ของเครื่องหมาย

โมเลกุลเพิ่ม จะมีผลทำให้ค่าเฉลี่ยและผลรวมของค่า R^2 ในกลุ่มที่ให้ค่าสูงที่สุดในลักษณะปริมาณ เส้นใยเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

10. การสร้างแผนที่พันธุกรรม (Genetic linkage map)

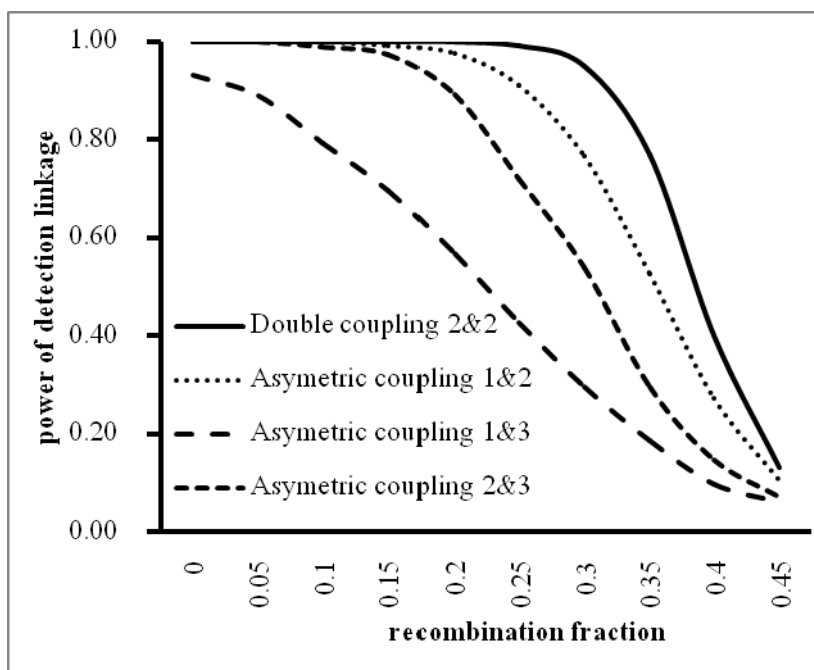
เมื่อพิจารณาค่า 80 เปอร์เซนต์ของ power of detection ของลิงเกจแบบ coupling ของ ลูกผสมจำนวน 168 โคลนพันธุ์แสดงในภาพที่ 5 ซึ่งได้จากการคำนวณจาก power of chi-square (χ^2) ซึ่งเป็นฟังก์ชันของระดับความเชื่อมั่น α กับพารามิเตอร์ของ non-centrality (λ) กับขนาดของ ประชากรลูกผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ พบว่าที่ 80 เปอร์เซนต์ของ power of detection รูปแบบลิงเกจ double coupling สามารถตรวจสอบได้จากค่า recombination fraction ตั้งแต่ 0 ถึง 0.35 ขณะที่ รูปแบบลิงเกจ asymmetric coupling 1&2 สามารถตรวจสอบได้จากค่า recombination fraction ตั้งแต่ 0 ถึง 0.3 และรูปแบบ asymmetric coupling 1&3 สามารถตรวจสอบได้จากค่า recombination fraction ตั้งแต่ 0 ถึง 0.25 ขณะที่รูปแบบลิงเกจ asymmetric coupling 2&3 สามารถตรวจสอบได้จากค่า recombination fraction ตั้งแต่ 0 ถึง 0.1 แสดงว่าลิงเกจของ simplex marker กับ triplex marker ที่ สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับ 80 เปอร์เซนต์ของ power of detection ต้องลิงค์กันโดยมีค่า recombination fraction ไม่เกิน 0.1 (ภาพที่ 5)

ดังนั้นจากค่า 80 เปอร์เซนต์ของ power of detection ของลิงเกจในรูปแบบต่างๆแสดงให้เห็นว่า ประชากรลูกผสมของอ้อยจำนวน 168 โคลนพันธุ์เหมาะสมในการวิเคราะห์ ลิงเกจ ใน รูปแบบ ของ coupling เท่านั้น โดยสามารถวิเคราะห์ลิงเกจได้อย่างมีประสิทธิภาพในรูปแบบ double coupling, asymmetric coupling 1&2 และ asymmetric coupling 2&3 สำหรับรูปแบบ asymmetric coupling 2&3 นั้นสามารถวิเคราะห์ได้ในกรณีที่โมเลกุลเครื่องหมาย duplex และ triplex นั้นลิงค์กันใกล้มากหรือมีค่า recombination fraction น้อยกว่า 0.05 สำหรับรูปแบบลิงเกจใน สภาพ repulsion นั้นต้องการประชากรอ้อยจำนวนมากจึงทำให้การทำงานทดลองจะประสบปัญหา ในด้านแปลงทดสอบและการจัดการพันธุ์จำนวนมาก

10.1.การประเมินค่า r (recombination fraction) ที่มากที่สุด ($\max r_i$)

การประเมินค่า r ที่มากที่สุดของเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling โดยใช้สูตร $\max r_i = 0.5 (1 - 2.3264\sqrt{1/n})$ โดยแทนค่าจำนวนประชากรที่ใช้ในการทดลอง นี้คือ $n = 168$ จะสามารถคำนวณค่า r ที่มากที่สุดได้เท่ากับ 0.41 แสดงว่าจำนวนประชากรที่ใช้คือ

จำนวน 168 โคลนพันธุ์สามารถใช้ประเมินค่า r ที่เหมาะสมในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพคือครอบคลุมค่า r ตั้งแต่ 0.1-0.25



ภาพที่ 5 ค่า 80 เปอร์เซนต์ของ power of detection linkage ในรูปแบบลิงเกจที่แตกต่างกันโดยใช้จำนวนประชากรเท่ากับ 168 โคลนพันธุ์

10.2 การวิเคราะห์ linkage map

การวิเคราะห์ linkage map หรือการสร้างแผนที่พันธุกรรมอ้อยใช้หลักการคือ (1) ขึ้นดิเอ็นเอหรือเครื่องหมายโมเลกุลต้องปรากฏในโคลนพันธุ์แม่ (K 93-207) หรือพ่อ (MPT 97-1) เท่านั้น และ (2) ขึ้นดิเอ็นเอหรือเครื่องหมายโมเลกุลของโคลนพันธุ์ลูกผสมต้องมีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1 (Wu *et al.*, 1992) ดังนั้นการสร้าง linkage map จะใช้เครื่องหมายโมเลกุล simplex จำนวน 263 เครื่องหมายโมเลกุล โดยใช้โปรแกรม AntMap Ver.1.2 และเนื่องจากประชากรที่ศึกษาเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ซึ่งการกระจายตัวแบบ 1:1 จะเหมือนกับการกระจายตัวของลูกผสมที่ได้จากการผสมกลับ (backcross) ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ linkage โดยแทนค่าชนิดประชากรเป็นแบบผสมกลับในโปรแกรม AntMap โดยใช้ค่า recombination fraction เท่ากับ 0.35 และค่า LOD score เท่ากับ 4 โดยใช้หน่วย Kosambi (Centimorgan, centrimorgan) โดยแยกวิเคราะห์แผนที่พันธุกรรมของพ่อและแม่โดยคัดแยกเครื่องหมายโมเลกุลจากขึ้นดิเอ็นเอว่าปรากฏในพ่อหรือแม่ หลังจากนั้นจะมีการเติมเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex ลงในแผนที่พันธุกรรม โดยพบว่า

เครื่องหมายโมเลกุล simplex ทั้ง 263 เครื่องหมายแบ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่ (female parent) จำนวน 127 เครื่องหมายโมเลกุล และถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์พ่อ (male parent) จำนวน 136 เครื่องหมายโมเลกุล

10.3 แผนที่พันธุกรรมแม่ (female parent genetic map)

10.3.1 การจัดกลุ่มลิงเกจ

ผลการวิเคราะห์ลิงเกจพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล simplex ทั้ง 127 เครื่องหมายโมเลกุลสามารถจัดกลุ่มลิงเกจได้จำนวน 27 กลุ่ม (ภาพที่ 6) ครอบคลุมยีนโมโคลนพันธุ์แม่ (female map) ได้ 1,376.3 centimorgan มีเครื่องหมายโมเลกุล simplex จำนวน 73 เครื่องหมายโมเลกุล และมีเครื่องหมายโมเลกุล simplex จำนวน 54 โมเลกุลเครื่องหมายที่ไม่สามารถจัดกลุ่มลิงเกจได้ นอกจากนี้ยังมีเครื่องหมายโมเลกุล duplex จำนวน 2 เครื่องหมายโมเลกุล (cttt22 และ agag6) และนอกจากนี้ยังมีเครื่องหมายโมเลกุล triplex จำนวน 1 เครื่องหมายโมเลกุล (cttt18) ที่สามารถจัดกลุ่มลิงเกจได้ สำหรับค่าเฉลี่ยระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 14.88 centimorgan และมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลต่อกลุ่มมากที่สุด 12 เครื่องหมายโมเลกุล (กลุ่มที่ 1) โดยมีค่าเฉลี่ย 2.9 เครื่องหมายโมเลกุลต่อกลุ่ม ขณะที่ Alwala (2007) ซึ่งศึกษาแผนที่พันธุกรรมอ้อยโดยใช้ประชากรจำนวน 100 โคลนจากลูกผสมระหว่าง *Saccharum officinarum* กับ *Saccharum spontaneum* โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดโดยโคลนพันธุ์แม่จำนวน 146 เครื่องหมายสามารถจัดกลุ่มลิงเกจได้ 49 กลุ่ม โดยครอบคลุมยีนโมเท่ากับ 1,732 centimorgan โดยมีความยาวของกลุ่มลิงเกจเท่ากับ 13 ถึง 108 centimorgan โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 12 centimorgan ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้สร้างแผนที่พันธุกรรมมีน้อยกว่า จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้มีกลุ่มลิงเกจน้อยกว่าและระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลมีมากกว่า

จากจำนวนกลุ่มลิงเกจ 27 กลุ่มพบกลุ่มลิงเกจที่มีตำแหน่งของ QTL หรือเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบคือ

กลุ่มลิงเกจที่ 1 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 12 เครื่องหมายโมเลกุล และมี 5 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ ได้แก่เครื่องหมายโมเลกุล ctag10, ccaa18, agtc14, ttac4 และ ctat32 โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล ctag10 และ ccaa18 มีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดลำและปริมาณไฟเบอร์ โดยทั้งสองเครื่องหมายโมเลกุลแสดง

อิทธิพลทางบวกกับขนาดลำและแสดงอิทธิพลทางลบกับปริมาณไฟเบอร์ โดยเครื่องหมายโมเลกุล ctag30 และ ccaa18 มีค่า R^2 ของลักษณะขนาดลำเท่ากับ 11.2 และ 6.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่ทั้งสองเครื่องหมายโมเลกุลมีค่า R^2 ของลักษณะปริมาณไฟเบอร์เท่ากับ 4.7 และ 3.8 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล agtc14 และ ctat32 มีความสัมพันธ์กับขนาดลำลักษณะเดียว และเครื่องหมายโมเลกุลแสดงอิทธิพลทางบวกกับขนาดลำโดยมีค่า R^2 เท่ากับ 4.4 และ 4.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เครื่องหมายโมเลกุล ttac4 มีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณไฟเบอร์ลักษณะเดียวโดยแสดงอิทธิพลทางลบ และมีค่า R^2 เท่ากับ 4.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลุ่มลิงเกจที่ 1 มีความยาวเท่ากับ 321.8 centimorgan เมื่อทดสอบ multiple regression ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ 4 เครื่องหมายโมเลกุลได้แก่ ctag10, ccaa18, agtc4 และ cata32 พบว่า ค่า R^2 ของ model มีค่าเท่ากับ 22.3 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบ multiple regression ของเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณไฟเบอร์ 3 เครื่องหมายโมเลกุล ได้แก่ ctag10, ccaa18 และ ttac4 พบว่ามีค่า R^2 เท่ากับ 12.2 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นกลุ่มลิงเกจที่ 1 มีเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถอธิบายลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและปริมาณไฟเบอร์ได้ประมาณ 22.3 และ 12.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

กลุ่มลิงเกจที่ 2 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจจำนวน 4 เครื่องหมายโมเลกุล โดยมี 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล ttac17 มีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณไฟเบอร์และแสดงอิทธิพลทางบวก โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 4.7 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล cgtt25 แสดงอิทธิพลทางบวกกับลักษณะการแตกกอและมีค่า R^2 เท่ากับ 8.1 เปอร์เซ็นต์ โดยกลุ่มลิงเกจที่ 2 มีความยาวเท่ากับ 81.9 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 3 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจจำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุล โดยมี 2 เครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล gctt27 มีความสัมพันธ์กับการแตกกอและแสดงอิทธิพลทางลบโดยมีค่า R^2 เท่ากับ 4.8 เปอร์เซ็นต์ เครื่องหมายโมเลกุล cctg2 แสดงอิทธิพลทางบวกกับขนาดลำโดยมีค่า R^2 เท่ากับ 8.5 เปอร์เซ็นต์ โดยกลุ่มลิงเกจที่ 3 มีความยาวเท่ากับ 62.8 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 4 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 4 มีความยาวเท่ากับ 12 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 13 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 4 เครื่องหมายโมเลกุล และมีเครื่องหมายโมเลกุล gctt12 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดลำโดยแสดงอิทธิพลทางบวกและมีค่า R^2 เท่ากับ 8.9 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลุ่มลิงเกจที่ 13 มีความยาวเท่ากับ 87.6 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 14 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 2 เครื่องหมายโมเลกุล และทั้งสองเครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบโดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล gcta1 มีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดลำ โดยแสดงอิทธิพลทางบวกและมีค่า R^2 เท่ากับ 4.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล ccag9 มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบสองลักษณะ โดยแสดงอิทธิพลทางบวกกับลักษณะขนาดลำ และแสดงอิทธิพลทางลบกับลักษณะการแตกกอโดยมีค่า R^2 เท่ากับ 9.8 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งสองเครื่องหมายโมเลกุลมีตำแหน่งอยู่ห่างกันประมาณ 34.7 centimorgan เมื่อทดสอบ multiple regression ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสอง ที่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำพบว่า ค่า R^2 ของ model มีค่าเท่ากับ 11.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ากลุ่มลิงเกจที่ 14 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับขนาดลำ โดยสามารถอธิบายลักษณะดังกล่าวได้ประมาณ 11.5 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มลิงเกจที่ 15 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 15 มีความยาวเท่ากับ 22.6 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 16 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 16 มีความยาวเท่ากับ 10.6 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 17 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 17 มีความยาวเท่ากับ 16.7 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 18 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 3 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 18 มีความยาวเท่ากับ 60.8 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 19 มีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 4 เครื่องหมายโมเลกุล และมี 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล agag5 มีความสัมพันธ์กับลักษณะการแตกกอ โดยแสดงอิทธิพลทางลบ และมีค่า R^2 เท่ากับ 3.4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล ctt4 มีความสัมพันธ์กับลักษณะการแตกกอ และแสดงอิทธิพลทางบวกโดยมีค่า R^2 เท่ากับ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งสองเครื่องหมายโมเลกุล มีตำแหน่งค่อนข้างใกล้กันโดยมีระยะห่างประมาณ 4.2 centimorgan เมื่อทดสอบ multiple regression ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอ พบว่า ค่า R^2 ของ model มีค่าเท่ากับ 3.3 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ากลุ่มลิงเกจที่ 19 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอ โดยสามารถอธิบายลักษณะดังกล่าวได้ประมาณ 3.3 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มลิงเกจที่ 20 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 4 เครื่องหมายโมเลกุล และมีเครื่องหมายโมเลกุล cata5 ที่มีความสัมพันธ์กับขนาดลำ โดยแสดงอิทธิพลทางบวกและมีค่า R^2 เท่ากับ 4.4 เปอร์เซ็นต์ โดยกลุ่มลิงเกจที่ 20 มีความยาวทั้งสิ้น 93.1 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 21 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 21 มีความยาวเท่ากับ 34.7 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 22 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 22 มีความยาวเท่ากับ 33.5 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 23 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 23 มีความยาวเท่ากับ 35.9 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 24 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 24 มีความยาวเท่ากับ 16.2 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 25 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 25 มีความยาวเท่ากับ 19.0 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 26 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 26 มีความยาวเท่ากับ 18.3 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 27 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 27 มีความยาวเท่ากับ 5.8 centimorgan

การศึกษาของกลุ่มลิงเกจจากเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดโดยโคลนพันธุ์แม่ พบ กลุ่มลิงเกจที่มีตำแหน่งของ QTL หรือเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบคือ ลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำจำนวน 6 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มลิงเกจที่ 1, 3, 11, 13, 14 และ 20 ลักษณะการแตกกอจำนวน 5 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มลิงเกจที่ 1, 2, 3, 14 และ 19 ลักษณะปริมาณไฟเบอร์ จำนวน 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มลิงเกจที่ 1 และ 2 โดยมีเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทดสอบทั้งสามลักษณะจำนวน 16 เครื่องหมายโมเลกุล

10.3.2 ลิงเกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ multiplex marker

การศึกษารูปแบบของลิงเกจแบบ coupling แบบอื่นได้แก่ double coupling, asymmetric coupling 1&2 และ asymmetric coupling 2&3 ในแผนที่พันธุกรรมของโคลนพันธุ์แม่ ทำให้สามารถเติมเครื่องหมายโมเลกุลที่มีระดับ dose สูงลงไปได้ซึ่งพบว่า กลุ่มลิงเกจที่ 25, 26 และ 27 เป็นกลุ่มลิงเกจที่มีรูปแบบของลิงเกจแบบ asymmetric coupling 1&2 ในกลุ่มที่ 25 และ 26 และ เป็นแบบ asymmetric coupling 2&3 ในกลุ่มลิงเกจที่ 27 โดยกลุ่มลิงเกจที่ 25 เป็นการลิงค์กันระหว่าง เครื่องหมายโมเลกุล simplex (caac1) กับเครื่องหมายโมเลกุล duplex (cttt22) โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลประมาณ 19.0 centimorgan และกลุ่มลิงเกจที่ 26 มีการลิงค์กันของเครื่องหมายโมเลกุล simplex (caac21) กับเครื่องหมายโมเลกุล duplex (agaa6) โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลประมาณ 18.3 centimorgan สำหรับกลุ่มลิงเกจที่ 26 เป็นการลิงค์กัน

ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex (ggat6) กับเครื่องหมายโมเลกุล triplex (cttt18) โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลประมาณ 5.8 centimorgan

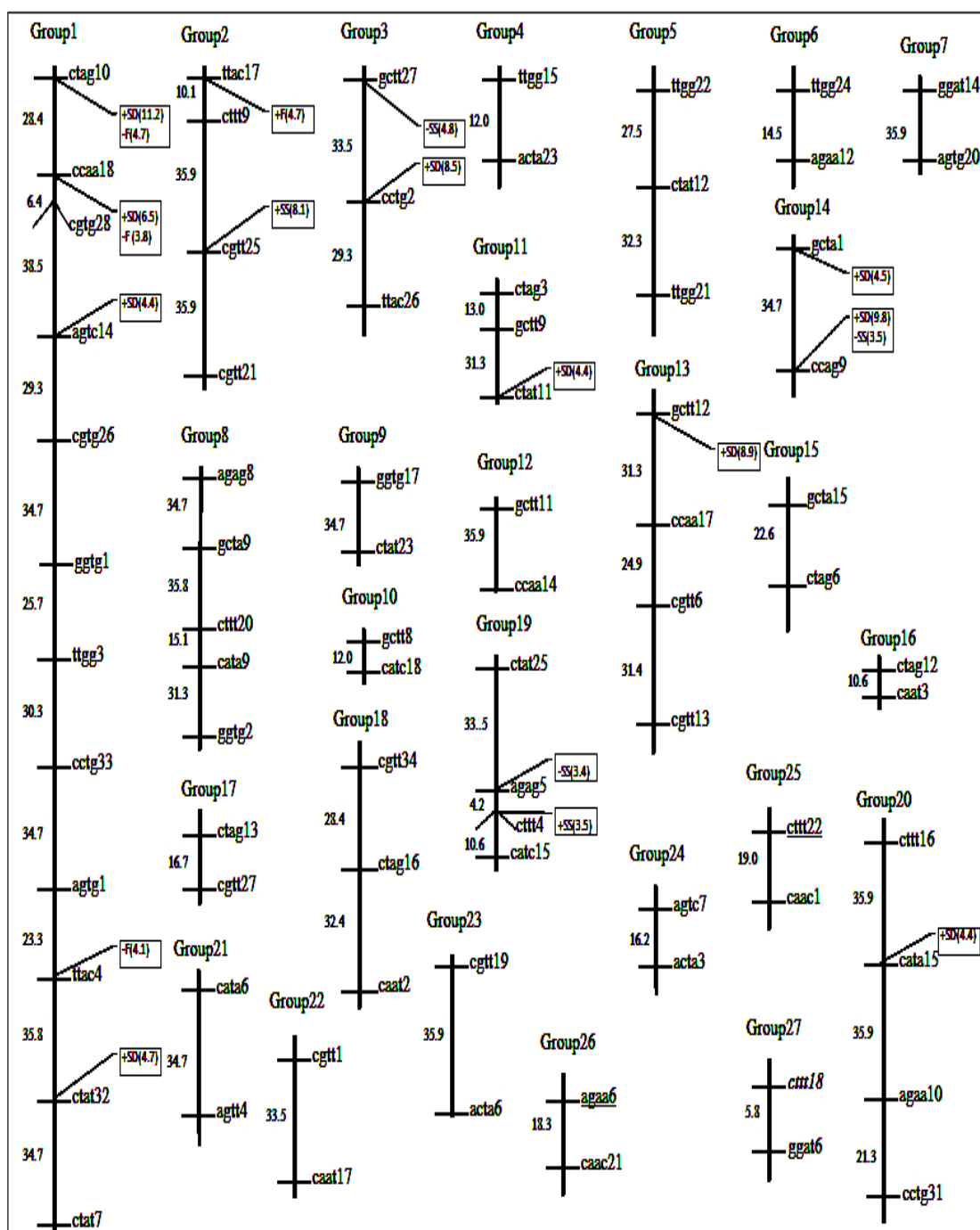
10.4 แผนที่พันธุกรรมพ่อ (male parent genetic map)

10.4.1 การจัดกลุ่มลิงเกจ

ผลการวิเคราะห์ลิงเกจพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล simplex ทั้ง 136 เครื่องหมายโมเลกุล สามารถจัดกลุ่มลิงเกจได้จำนวน 25 กลุ่ม (ภาพที่ 7) ครอบคลุมยีนโมโคลนพันธุ์พ่อได้ 1633.30 centimorgan ประกอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล simplex จำนวน 79 เครื่องหมายโมเลกุล และมีเครื่องหมายโมเลกุล simplex จำนวน 56 โมเลกุลเครื่องหมายที่ไม่สามารถจัดกลุ่มลิงเกจได้ มีเครื่องหมายโมเลกุล duplex จำนวน 9 เครื่องหมายโมเลกุล (acta8, agag20, catc24, catc30, catc31, ccaa10, ccaa23, ctat30 และ cttt22) และเครื่องหมายโมเลกุล triplex จำนวน 2 เครื่องหมายโมเลกุล (agag14 และ cttt18) ที่สามารถจัดกลุ่มลิงเกจได้ โดยมีค่าเฉลี่ยระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 15.81 centimorgan โดยมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลต่อกลุ่มมากที่สุด 8 เครื่องหมายโมเลกุล (กลุ่มลิงเกจที่ 3 และ 6) มีค่าเฉลี่ย 3.6 เครื่องหมายโมเลกุลต่อกลุ่ม ซึ่ง Alwala (2007) ซึ่งศึกษาแผนที่พันธุกรรมฮอยโดยใช้ประชากรจำนวน 100 โคลนจากลูกผสมระหว่าง *Saccharum officinarum* กับ *Saccharum spontaneum* โดยมีเครื่องหมายโมเลกุลที่จัดกลุ่มจำนวน 121 เครื่องหมายโมเลกุลพบว่าสามารถจัดกลุ่มลิงเกจได้ 45 กลุ่ม โดยครอบคลุมยีนโมโคลนพันธุ์พ่อได้ 1,491 centimorgan โดยมีความยาวของกลุ่มลิงเกจอยู่ระหว่าง 2 ถึง 85 centimorgan โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12 centimorgan ซึ่งมีจำนวนกลุ่มลิงเกจที่จัดได้มากกว่า

เมื่อพิจารณาจำนวนกลุ่มลิงเกจ 25 กลุ่ม พบจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลต่อกลุ่ม และกลุ่มลิงเกจที่มีตำแหน่งของ QTL หรือเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบคือ

กลุ่มลิงเกจที่ 1 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 7 เครื่องหมายโมเลกุล โดยมีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดลำคือ cgtg7 ซึ่งแสดงอิทธิพลทางลบและมีค่า R^2 เท่ากับ 4.9 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มลิงเกจที่ 1 มีความยาวเท่ากับ 153.2 centimorgan



ภาพที่ 6 แผนที่พันธุกรรมของเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่ (K 93-207) จากประชากรลูกผสมจำนวน 168 โคลนพันธุ์ เครื่องหมายโมเลกุลที่จัดเส้นได้เป็นแบบ duplex และตัวเอียงเป็นแบบ triplex ตัวอักษร F = ปริมาณไฟเบอร์ SD = ขนาดลำ และ SS = การแตกกอ เครื่องหมายบวกและลบคือผลของ QTL และตัวเลขในวงเล็บคือค่า R^2

กลุ่มลิงเกจที่ 1 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 7 เครื่องหมายโมเลกุล โดยมีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดลำคือ cgtg7 ซึ่งแสดงอิทธิพลทางลบและมีค่า R^2 เท่ากับ 4.9 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มลิงเกจที่ 1 มีความยาวเท่ากับ 153.2 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 2 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 4 เครื่องหมายโมเลกุลและมี 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบจำนวน 2 เครื่องหมายโมเลกุลคือ ttac5 และ agtg21 โดยเครื่องหมายโมเลกุล ttac5 แสดงอิทธิพลทางบวกกับการแตกกอและมีค่า R^2 เท่ากับ 3.6 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล agtg21 แสดงอิทธิพลทางบวกกับขนาดลำและมีค่า R^2 เท่ากับ 3.5 เปอร์เซ็นต์ โดยกลุ่มลิงเกจที่ 2 มีความยาวเท่ากับ 76.9 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 3 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 8 เครื่องหมายโมเลกุล และมี 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบคือ cgtg9 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดลำ และแสดงอิทธิพลทางลบ โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 5.4 สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล cgtg20 มีความสัมพันธ์กับสองลักษณะคือ ขนาดลำและปริมาณไฟเบอร์โดยแสดงอิทธิพลทางลบกับขนาดลำและแสดงอิทธิพลทางบวกกับปริมาณไฟเบอร์โดยมีค่า R^2 ของทั้ง สองลักษณะเท่ากับ 6.5 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยกลุ่มลิงเกจที่ 3 มีความยาวเท่ากับ 131.7 centimorgan เมื่อทดสอบ multiple regression ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางพบว่า ค่า R^2 ของ model มีค่าเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ากลุ่มลิงเกจที่ 3 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 2 เครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับจำนวนเส้นผ่านศูนย์กลางลำ โดยสามารถอธิบายลักษณะดังกล่าวได้ประมาณ 3.3 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มลิงเกจที่ 4 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 4 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 4 มีความยาวเท่ากับ 52.3 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 5 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 7 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 5 มีความยาวเท่ากับ 160.3 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 6 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 8 เครื่องหมายโมเลกุลและมีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบจำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุลคือ

agtt10, agtc4 และ catc30 เครื่องหมายโมเลกุล agtt10 มีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดลำและการแตกกอโดยแสดงอิทธิพลทางลบกับลักษณะขนาดลำและแสดงอิทธิพลทางบวกกับลักษณะการแตกกอโดยมีค่า R^2 ของทั้งสองลักษณะเท่ากับ 3.7 และ 7.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เครื่องหมายโมเลกุล agtc4 มีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดลำโดยแสดงความสัมพันธ์ทางลบและมีค่า R^2 เท่ากับ 8.0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล catc30 มีความสัมพันธ์กับทั้งสามลักษณะที่ทำการทดสอบ โดยแสดงอิทธิพลทางลบกับขนาดลำ และแสดงอิทธิพลทางบวกกับปริมาณไฟเบอร์และการแตกกอ โดยมีค่า R^2 ของทั้งสามลักษณะเท่ากับ 7.6, 3.4 และ 5.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยกลุ่มลิงเกจที่ 6 มีความยาวเท่ากับ 153.3 centimorgan เมื่อทดสอบ multiple regression ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุล agtt10, agtc4 และ catc30 และที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการแตกกอ ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุล agtt10 และ catc30 พบว่า ค่า R^2 ของ model มีค่าเท่ากับ 17.0 และ 11.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงว่ากลุ่มลิงเกจที่ 6 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และ 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับการแตกกอ โดยสามารถอธิบายลักษณะดังกล่าวได้ประมาณ 17.0 และ 11.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

กลุ่มลิงเกจที่ 7 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 4 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 7 มีความยาวเท่ากับ 85.3 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 8 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 4 เครื่องหมายโมเลกุล และมีเครื่องหมายโมเลกุล catc13 ที่มีความสัมพันธ์กับขนาดลำ โดยแสดงอิทธิพลทางลบและมีค่า R^2 เท่ากับ 3.3 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มลิงเกจที่ 8 มีความยาวเท่ากับ 59.3 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 9 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 9 มีความยาวเท่ากับ 35.9 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 10 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 3 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 10 มีความยาวเท่ากับ 12.0 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 11 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 5 เครื่องหมายโมเลกุล โดยมีเครื่องหมายโมเลกุล cttt3 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบคือลักษณะ ขนาดลำ และการแตกกอโดยแสดงอิทธิพลทางลบกับลักษณะขนาดลำและแสดงอิทธิพลทางบวกกับลักษณะการแตกกอ และมีค่า R^2 ของทั้งสองลักษณะเท่ากับ 3.5 และ 4.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และกลุ่มลิงเกจที่ 11 มีความยาวเท่ากับ 106.9 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 12 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 12 มีความยาวเท่ากับ 35.9 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 13 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 3 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 13 มีความยาวเท่ากับ 43.8 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 14 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 14 มีความยาวเท่ากับ 34.7 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 15 มีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุล 5 เครื่องหมายโมเลกุล และมีเครื่องหมายโมเลกุล cttt13 ที่มีความสัมพันธ์กับทั้งสามลักษณะที่ทำการทดสอบ โดยเครื่องหมายโมเลกุล cttt13 แสดงอิทธิพลทางลบกับลักษณะขนาดลำและแสดงอิทธิพลทางบวกกับลักษณะปริมาณไฟเบอร์และการแตกกอ โดยมีค่า R^2 ของทั้งสามลักษณะเท่ากับ 4.0, 3.5 และ 4.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกลุ่มลิงเกจที่ 15 มีความยาวเท่ากับ 116.6 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 16 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 16 มีความยาวเท่ากับ 33.5 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 17 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 6 เครื่องหมายโมเลกุลและมี 3 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบได้แก่ caac9, cctg21 และ catc5 สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล caac9 มีความสัมพันธ์กับทั้งสามลักษณะที่ทำการทดสอบโดยแสดงอิทธิพลทางลบกับลักษณะขนาดลำและแสดงอิทธิพลทางบวกกับลักษณะปริมาณไฟเบอร์ และการ

แตกกอ โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 4.0, 4.3 และ 3.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และกลุ่มลิงเกจที่ 17 มีความยาวเท่ากับ 107.3 centimorgan เมื่อทดสอบ multiple regression ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ได้แก่เครื่องหมายโมเลกุล caac9 และ cctg21 และปริมาณไฟเบอร์ได้แก่เครื่องหมายโมเลกุล caac9 และ catc5 พบว่าค่า R^2 ของ model มีค่าเท่ากับ 7.7 และ 10.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงว่ากลุ่มลิงเกจที่ 17 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ และ 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณไฟเบอร์ โดยสามารถอธิบายลักษณะดังกล่าวได้ประมาณ 7.7 และ 10.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

กลุ่มลิงเกจที่ 18 มีเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 2 เครื่องหมายโมเลกุล และมีเครื่องหมายโมเลกุล ccag11 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดลำโดยแสดงอิทธิพลทางลบและมีค่า R^2 เท่ากับ 5.9 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มลิงเกจที่ 18 มีความยาวเท่ากับ 34.7 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 19 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 19 มีความยาวเท่ากับ 33.5 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 20 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 20 มีความยาวเท่ากับ 11.0 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 21 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 21 มีความยาวเท่ากับ 13.6 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 22 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 22 มีความยาวเท่ากับ 18.4 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 23 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 23 มีความยาวเท่ากับ 18.8 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 24 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 24 มีความยาวเท่ากับ 15.0 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 25 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 25 มีความยาวเท่ากับ 17.5 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 26 มีเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มลิงเกจทั้งสิ้น 2 เครื่องหมายโมเลกุล โดยไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลใดที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบ และกลุ่มลิงเกจที่ 26 มีความยาวเท่ากับ 19.9 centimorgan

การศึกษาของกลุ่มลิงเกจจากเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดโดยโคลนพันธุ์พ่อ พบกลุ่มลิงเกจที่มีตำแหน่งของ QTL หรือเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบคือ ลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำจำนวน 8 กลุ่มได้แก่กลุ่มลิงเกจที่ 1, 3, 6, 8, 11, 15, 17 และ 18 ลักษณะการแตกกอจำนวน 5 กลุ่มได้แก่กลุ่มลิงเกจที่ 2, 6, 11, 15 และ 17 ลักษณะปริมาณไฟเบอร์จำนวน 4 กลุ่มได้แก่กลุ่มลิงเกจที่ 3, 6, 15 และ 17 โดยมีเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทดสอบทั้งสามลักษณะจำนวน 15 เครื่องหมายโมเลกุล

10.4.2 กลุ่มลิงเกจระหว่าง simplex และ multiplex marker

การศึกษารูปแบบของลิงเกจแบบ coupling แบบอื่นได้แก่ double coupling, asymmetric coupling 1&2 และ asymmetric coupling 2&3 ในแผนที่พันธุกรรมของโคลนพันธุ์พ่อ ทำให้สามารถเติมเครื่องหมายโมเลกุลที่มีระดับ dose สูงลงไปได้ โดยพบว่า

กลุ่มลิงเกจที่ 1 มีรูปแบบลิงเกจแบบ asymmetric coupling 1&2 ของเครื่องหมายโมเลกุล caac14 และ cgtg7 ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบ simplex กับเครื่องหมาย

โมเลกุล acta8 ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบ duplex โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล caac14 กับ acta8 ประมาณ 12.8 centimorgan และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล cgtg7 กับเครื่องหมายโมเลกุล acta8 ประมาณ 17.3 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 3 มีรูปแบบลิงเกจ asymmetric coupling 1&2, asymmetric coupling 1&3 และ asymmetric coupling 2&3 ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล cgtg20 (simplex) acta8 (duplex) และ cttt18 (triplex) โดยเครื่องหมายโมเลกุล cgtg20 มีลิงเกจแบบ asymmetric coupling 1&2 กับเครื่องหมายโมเลกุล acta8 โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลประมาณ 6.0 centimorgan และเครื่องหมายโมเลกุล cgtg20 มีลิงเกจแบบ asymmetric coupling 1&3 กับเครื่องหมายโมเลกุล cttt18 โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลประมาณ 2.2 centimorgan และ เครื่องหมายโมเลกุล acta8 มีลิงเกจแบบ asymmetric coupling 2&3 กับเครื่องหมายโมเลกุล cttt18 โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลประมาณ 3.9 centimorgan

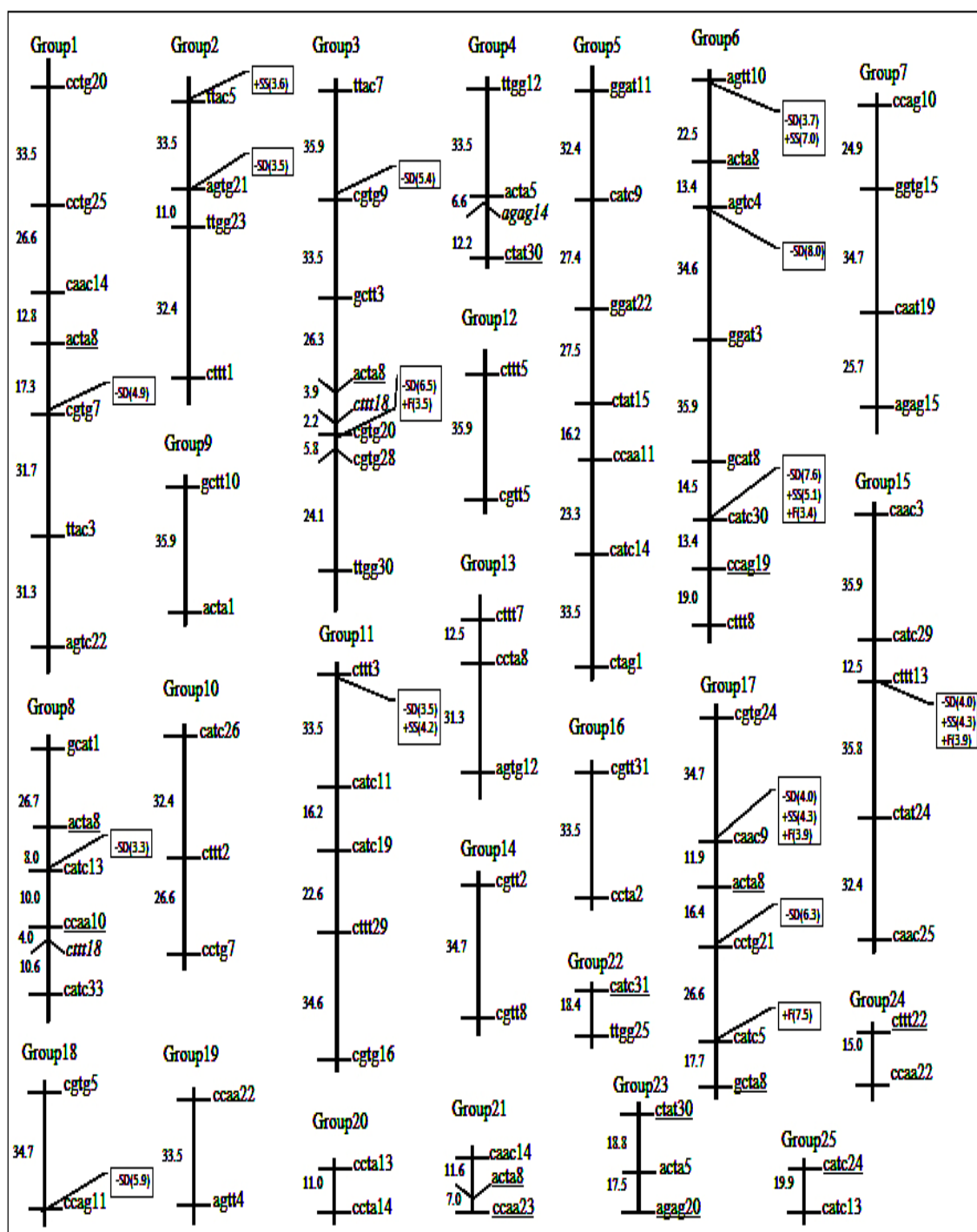
กลุ่มลิงเกจที่ 4 มีรูปแบบลิงเกจทั้ง asymmetric coupling 1&2 และ asymmetric coupling 1&3 ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล acta5 (simplex), ctat30 (duplex) และ เครื่องหมายโมเลกุล agag14 (triplex) โดยเครื่องหมายโมเลกุล acta5 มีลิงเกจแบบ asymmetric coupling 1&2 กับเครื่องหมายโมเลกุล ctat30 โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลประมาณ 18.8 centimorgan และเครื่องหมายโมเลกุล acta5 มีลิงเกจแบบ asymmetric coupling 1&3 กับเครื่องหมายโมเลกุล agag14 โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลประมาณ 6.6 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 6 มีรูปแบบลิงเกจ asymmetric coupling 1&2 ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล agtc4 (simplex) และเครื่องหมายโมเลกุล acta8 (duplex) โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลประมาณ 13.4 centimorgan และเครื่องหมายโมเลกุล catc30 (simplex) กับเครื่องหมายโมเลกุล ccag19 (duplex) โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลประมาณ 13.4 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 8 มีรูปแบบลิงเกจ asymmetric coupling 1&2 ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล catc13 (simplex) กับเครื่องหมายโมเลกุล ccaa10 (duplex) และเครื่องหมายโมเลกุล acta8 (duplex) โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 10 และ 8 centimorgan ตามลำดับ นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุล ccaa10 (duplex) ยังมีลิงเกจแบบ asymmetric coupling 2&3 กับเครื่องหมายโมเลกุล cttt18 (triplex) โดยมีระยะห่างประมาณ 4 centimorgan

กลุ่มลิงเกจที่ 17 มีรูปแบบลิงเกจ asymmetric coupling 1&2 ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex คือ caac9 และ cctg21 กับเครื่องหมายโมเลกุล duplex คือ acta8 โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล caac9 กับ เครื่องหมายโมเลกุล acta8 เท่ากับ 11.9 centimorgan และมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล cctg21 กับ เครื่องหมายโมเลกุล acta8 เท่ากับ 16.4 centimorgan นอกจากนี้ยังมีลิงเกจแบบ asymmetric coupling 1&2 ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล catc5 (simplex) กับเครื่องหมายโมเลกุล gcta8 (duplex) โดยมีระยะห่างเท่ากับ 11.9 centimorgan

สาเหตุที่มีเครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่มีการจัดกลุ่มจำนวนมาก และกลุ่มที่จัดได้มีขนาดเล็กหรือมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลต่อกลุ่มน้อย เนื่องจากแผนที่นี้ยังไม่อิ่มตัว และมีการใช้เฉพาะเครื่องหมายโมเลกุล simplex (single dose) ที่ใช้ในการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล ทำให้เกิดช่องว่างในการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งมีเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในสภาพ coupling ที่จะแสดงออกมาเมื่อมีการใช้เฉพาะ single dose marker ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม (Al-Janabi *et al.*, 1993; Da Silva *et al.*, 1993; Ming *et al.*, 1998) สาเหตุอื่นที่สามารถใช้อธิบายการสร้างกลุ่มลิงเกจจำนวนน้อย เนื่องจากคู่ผสมนี้เป็นการผสมข้ามสปีชีส์ (interspecific hybridization) ทำให้เกิดความซับซ้อนของพันธุกรรม โดยเฉพาะพันธุ์ K 93-207 ถึงแม้จะเป็นพันธุ์การค้า แต่ก็เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์การค้าที่เป็น F_1 (อุทอง1 x K 84-200) ด้วยกันซึ่งพันธุ์เหล่านี้มักจะมียีนอมเป็น aneuploidy (Garcia *et al.*, 2006) ซึ่งมักจะทำให้โครโมโซมไม่เข้าคู่กันในระยะ meiosis สำหรับพันธุ์การค้าที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์การค้าด้วยกันมักจะมีโครโมโซมระหว่าง $2n = 70-140$ เปรียบเทียบกับ *Saccharum spontaneum* L. ($2n = 36-128$) (Irvine, 1999) ซึ่งมียีนอมที่แตกต่างกัน ทำให้ความซับซ้อนทางพันธุกรรมมีมากขึ้น



ภาพที่ 7 แผนที่พันธุกรรมของเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์พ่อ (MPT 97-1) จากประชากรลูกผสมจำนวน 168 โคลนพันธุ์ เครื่องหมายโมเลกุลที่ขีดเส้นใต้เป็นแบบ duplex และตัวเอียงเป็นแบบ triplex ตัวอักษร F = ปริมาณไฟเบอร์ SD = ขนาดลำ และ SS = การแตกกอ เครื่องหมายบวกและลบคือผลของ QTL และตัวเลขในวงเล็บคือค่า R^2

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การตรวจสอบตำแหน่งยีนที่ควบคุมปริมาณเส้นใยและลักษณะทางพืชไร่โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพีในอ้อยซึ่งเป็นพืชที่มีพันธุกรรมซับซ้อน ทำให้การวางแผนที่พันธุกรรมและการศึกษา QTL ในลักษณะทางปริมาณมีความซับซ้อนเพิ่มขึ้น สำหรับการศึกษาในลูกผสมที่ได้จากอ้อยพันธุ์การค้ากับอ้อยป่าคือ *Saccharum spontaneum* L. ได้ข้อสรุปดังนี้

1. ลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำมีสหสัมพันธ์ทางลบกับลักษณะการแตกกอและปริมาณเส้นใย ขณะที่ลักษณะการแตกกอมีความสัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณเส้นใย โดยการกระจายตัวของทั้งสามลักษณะของลูกผสมที่ใช้ทดสอบจำนวน 168 โคลนพันธุ์มีการกระจายตัวปกติ (normal distribution) แสดงว่าทั้งสามลักษณะเป็นลักษณะทางปริมาณและมีความซับซ้อนทางพันธุกรรม โดยลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำมีการกระจายตัวเบ้ (skew) เล็กน้อย แสดงถึงความซับซ้อนทางพันธุกรรมที่น้อยกว่า

2. เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ AFLP จำนวน 26 คู่ไพรเมอร์ พบเครื่องหมายโมเลกุล simplex จำนวน 263 เครื่องหมายโมเลกุลแบ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่จำนวน 127 เครื่องหมายโมเลกุล และเครื่องหมายโมเลกุลที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์พ่อจำนวน 136 เครื่องหมายโมเลกุลและมีเครื่องหมายโมเลกุล 19 เครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ 7 เครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับการแตกกอ และ 7 เครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับปริมาณเส้นใย เพียงลักษณะเดียว

3. เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ทำการทดสอบมากกว่า 1 ลักษณะมีจำนวน 19 เครื่องหมายโมเลกุลโดยพบว่า 6 เครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและการแตกกอ พบเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 7 เครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำและปริมาณไฟเบอร์ และพบ 6 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับทั้งสามลักษณะที่ทำการทดสอบ

4. ค่า R^2 หรือความสามารถในการอธิบายความแปรปรวนของลักษณะจากทั้งสามลักษณะที่ทำการทดสอบ ในเครื่องหมายโมเลกุล simplex มีค่าระหว่าง 3 ถึง 12 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่า เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่คือ K 93-207 ส่วนใหญ่จะมี

อิทธิพลทางบวกกับขนาดลำและมีอิทธิพลทางลบกับการแตกกอและปริมาณเส้นใย แสดงว่าโคลนพันธุ์ K 93-207 จะเป็นโคลนพันธุ์ที่ถ่ายทอดลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำใหญ่ แรกก่อน้อยและปริมาณเส้นใยต่ำ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์พ่อหรือ MPT 97-1 (*Saccharum spontaneum* L.) จะมีอิทธิพลของ QTL ทางลบกับขนาดลำและมีอิทธิพลทางบวกกับการแตกกอและปริมาณเส้นใยแสดงว่าโคลนพันธุ์ MPT 97-1 จะถ่ายทอดลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำเล็ก การแตกกอและปริมาณเส้นใยสูง

5. เครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex มีค่า R^2 และอิทธิพลของ QTL สูงกว่าเครื่องหมายโมเลกุล simplex แสดงว่าเมื่อ dose ของเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มขึ้น จะทำให้เครื่องหมายโมเลกุลสามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะที่ทำการทดสอบได้เพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าค่า R^2 ของเครื่องหมายโมเลกุล triplex จะสูงกว่าเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ simplex ตามลำดับ

6. เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล simplex มาสร้างแผนที่พันธุกรรม (linkage map) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์แม่จำนวน 27 เครื่องหมายโมเลกุลสามารถสร้างกลุ่มลิงเกจได้จำนวน 27 กลุ่ม มีเครื่องหมายโมเลกุล simplex จำนวน 54 เครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่จัดกลุ่ม และเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ถ่ายทอดจากโคลนพันธุ์พ่อจำนวน 136 เครื่องหมายโมเลกุลมาสร้างแผนที่พันธุกรรม พบว่าสามารถจัดกลุ่มลิงเกจได้จำนวน 25 กลุ่มโดยมีเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ไม่สามารถจัดกลุ่มลิงเกจได้จำนวน 56 เครื่องหมายโมเลกุล

7. พบตำแหน่ง QTL บนแผนที่พันธุกรรมจากโคลนพันธุ์แม่จำนวน 16 ตำแหน่งจาก 8 กลุ่มลิงเกจโดยมีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำจำนวน 10 เครื่องหมายโมเลกุล การแตกกอจำนวน 5 เครื่องหมายโมเลกุล และปริมาณเส้นใยจำนวน 4 เครื่องหมายโมเลกุล โดยมี 3 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์มากกว่าหนึ่งลักษณะพร้อมกัน สำหรับตำแหน่ง QTL บนแผนที่พันธุกรรมจากโคลนพันธุ์พ่อก็มีจำนวน 15 ตำแหน่งจาก 9 กลุ่มลิงเกจ โดยมีเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำจำนวน 13 เครื่องหมายโมเลกุล การแตกกอจำนวน 7 เครื่องหมายโมเลกุล และปริมาณเส้นใยจำนวน 5 เครื่องหมายโมเลกุล โดยมี 7 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์มากกว่าหนึ่งลักษณะซึ่งในจำนวนนี้มี 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับทั้งสามลักษณะ

8. สาเหตุที่มีเครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่มีการจัดกลุ่มจำนวนมาก และกลุ่มที่จัดได้มีขนาดเล็กหรือ มีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลต่อกลุ่มน้อยเนื่องจากแผนที่นี้ยังไม่อิ่มตัว และเนื่องจากมีการใช้เฉพาะเครื่องหมายโมเลกุล simplex (single dose) ที่ใช้ในการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลทำให้เกิดช่องว่างในการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลซึ่งมีเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในสภาพ coupling ที่จะแสดงออกมาเมื่อมีการใช้เฉพาะ single dose marker ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม สาเหตุอื่นที่สามารถใช้อธิบายการสร้างกลุ่มลิงเกจจำนวนน้อยเนื่องจาก คู่ผสมนี้เป็น การผสมข้ามสปีชีส์ (interspecific hybridization) ทำให้เกิดความซับซ้อนของพันธุกรรม โดยเฉพาะ พันธุ์ K 93-207 ถึงแม้จะเป็นพันธุ์การค้าแต่ก็เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์การค้าที่เป็น F_1 (อุททอง 1 x 84-200) ด้วยกันซึ่งพันธุ์เหล่านี้มักจะมีโครโมโซมเป็น aneuploidy ซึ่งมักจะทำให้โครโมโซมไม่เข้าคู่กันในระยะ meiosis สำหรับพันธุ์การค้าที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์การค้าด้วยกันมักจะมีโครโมโซมระหว่าง $2n = 70-140$ เปรียบเทียบกับ *Saccharum spontaneum* L. ($2n = 36-128$) (Irvine, 1999) ซึ่งมีโครโมโซมที่แตกต่างกันทำให้ความซับซ้อนทางพันธุกรรมมีมากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

การสร้างแผนที่ศึกษา QTL ในประชากรนี้ยังต้องมีการเพิ่มเติมเครื่องหมายโมเลกุล simplex ลงไปอีกจำนวนมาก เพื่อให้แผนที่พันธุกรรมมีความละเอียดและครอบคลุมทั้งจีโนมของประชากรที่ศึกษาซึ่งนอกจากนี้ยังต้องใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น co-dominant marker เพื่อที่จะ ทำให้สามารถจัดกลุ่มลิงเกจให้ได้เป็นกลุ่ม homoecology group ซึ่งจะทำได้การศึกษา QTL และอธิบายพันธุกรรมของพืชโพลิพลอยด์เช่นอ้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย. 2551. แผนพัฒนากำลังการผลิตไฟฟ้าของประเทศไทย พ.ศ.

2550-2564. ฝ่ายวางแผนระบบไฟฟ้า การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย. 79 หน้า.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2551. ศักยภาพชีวมวลประเทศไทย ปี 2544/45,

แหล่งที่มา: <http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=437>. 22 มีนาคม 2551.

กลุ่มมิตรผล. 2551. ธุรกิจไฟฟ้าชีวมวล, แหล่งที่มา: http://www.mitrphol.com/th/02_business/02_biomass_power.php. 22 มีนาคม 2551

ธีรยุทธ์ ตู้จินดา. 2549. Linkage map construction (haploid and diploid). ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง Linkage map construction and quantitative trait loci (QTL) analysis. หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าวมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

นิรนาม. 2551. การส่งเสริมการใช้พลังงานทดแทนในการผลิตไฟฟ้า. วารสารนโยบายพลังงาน 79: 63-67.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545 .อีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 116 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2550. รายงานผลการศึกษานิวเคลียร์สารสนเทศพื้นที่ปลูกอ้อย ปีการผลิต 2549/50, แหล่งที่มา: <http://www.sugarzone.in.th/cane/เอกสารเผยแพร่ปี%202549-501.pdf>. 12 มกราคม 2551.

Agresti , A. 2002. Building and applying loglinear models, pp. 210-260. In: **Categorical data analysis**, John Wiley&Sons, New York.

Aitken, K., P.A. Jackson, G. Piperidis and C.L. McIntyre. 2004. **QTL identified for yield components in a cross between a sugarcane (*Saccharum spp.*) cultivar Q165 and a *S. officinarum* clone IJ76-514**, Available Source: <http://www.Cropscience.org.au/>

icsc:2004/poster/3/4/1/1752_aitkenk.htm, January 11, 2005.

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

Aljanabi, S.M., R.J. Honeycutt, M. McClelland and B.W.S. Sobral. 1993. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. **Genetics** 134: 1249-1260.

Aljanabi, S.M., Y. Parmessur, H. Kross, S. Dhayan, S. Saumtally, K. Ramdoyal, L.J.C. Autrey and A. Dookun-Saumtally. 2005. Identification of a major quantitative trait locus (QTL) for yellow spot (*Mycovellosiella koepkei*) disease resistance in sugarcane. **Mol. Breed.** 19: 1-14.

Allen, F.L. 1994. Usefulness of plant genome mapping to plant breeding, pp. 11-18. In Gresshoff, P.M. (ed.). **Plant Genome Analysis**. CRS Press Inc., Boca Raton, FL.

Asnaghi, C., D. Roques, S. Ruffel, C. Kaye, J.Y. Hoarau, H. Télismart, J.C. Girard, L.M. Raboin, A.M. Risterucci, L. Grivet and A. D'Hont. 2003. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (*Bru1*) using bulk segregant analysis and AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** 108: 759-764.

Alwala, S. 2007. **Predicting progeny performance and genome analysis in sugarcane (*Saccharum* spp.)**. Ph.D. Thesis. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.

Badaloo, M.G.H. and K. Ramdoyal. 2003. **Variation and inheritance of quantitative traits in commercial x *S. spontaneum* L. crosses**. Available Source: www.gov.mu/portal/sites/ncb/moa/farc/amas2003/pdf/s4.1.pdf, February 23, 2007.

Bakker, J.P. 2007. **Genetic manipulation of the cell wall composition of sugarcane**. Ph.D.

Thesis. Stellenbosch University.

- Basse, P., G. Taylor, B. Carroll, N. Berding, D. Burner and C.L. McIntyre. 1998. Assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collection using RFLP markers. **Euphytica** 93: 283-292.
- Bremer, G. 1923. A cytological investigation of some species and species-hybrids of the genus *Saccharum*. **Genetica** 5: 273-326.
- Burner, D.M. 1997. Chromosome transmission and meiotic behavior in various sugarcane crosses. **J. Am. Soc. of Sugar Cane Technologists** 17: 38-50.
- Caetano-Anollés, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short primer, **Biotechnology** 9: 553-557.
- Chalmers, K.J., A.W. Campbell, J. Kretschmer, A. Karakousis, P.H. Henschke, S. Pierens, N. Harker, M. Pallota, G.B. Cornish, M.R. Shariflou, L.R. Rampling, A. McLauchlan, G. Daggard, P.J. Sharp, T.A. Holton, M.W. Sutherland, R. Appels and P. Langrisge. 2001. Construction of three linkage maps in bread wheat, *Triticum aestivum*. **Aust. J. Agric. Res.** 52: 1089-1120.
- Chandra, S., K.B. Hutokshi, J. Kashiwagi, S. Harikrihna, K R. Sridevi, L. Krishnamurthi, R. Serrai and J.H. Crouch. 2004. **Identifying QTL-linked markers in marker deficient Crops**, Available Source: http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/3/4/1/795_chandras.htm, Januaary 11, 2005.
- Cordeiro, G.M. 2001. Molecular marker systems for sugarcane germplasm analysis, pp. 129-146. In Henry R.J. (ed.). **Plant Genotype: The DNA Fingerprinting of Plants**. CAB International.
- Daniels, J. and B.T. Roach. 1987. Taxonomy and evolution, pp.7-48. In Heinz, D.J.(ed.)

Sugarcane Improvement through Breeding. Elsevier, Amsterdam.

- Da Silva, J.A.G., M.E. Sorrells, W.L. Burnquist and S.D. Tanksley. 1993. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. **Genome** 36: 782-791.
- Da Silva, J.A.G., J.R. Honeycutt, W.L. Burnquist, and S.D. Tanksley. 1995. *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208' genetic map containing RFLP and PCR based markers. **Mol. Breed.** 1: 165-179.
- Da Silva, J.A.G. and M.E. Sorrells. 1996. Linkage analysis in polyploids using molecular markers, pp 211 – 228. *In* Jauhar, P.P. (ed.). **Methods of Genome Analysis in Plants.** CRC Press, New York.
- D'Hont A., L. Grivet, P. Feldmann, S. Rao, N. Berding and J.C. Grazmann. 1996. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum spp.*) by molecular genetics. **Mol Gen Genet.** 250: 405-413.
- D'Hont A., D. Ison, K. Alix, C. Roux and J.C. Grazmann. 1998. Determination of basic chromosome number in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome** 41: 221-225.
- Energy policy and planning office. 2005. **Thailand energy and natural resources.** Available Source: [www.eppo.go.th/doc/NIO-Energy And NaturalResource2003.html](http://www.eppo.go.th/doc/NIO-Energy%20And%20NaturalResource2003.html) - 47k -, March 15, 2005.
- FAO. 2005. **Future prospects of Thai sugar industry.** Available Source: www.foodmarketexchang.com, January 16, 2005.
- Gracia, A.A.F., E.A. Kido, A.N. Meza, H.M.B. Souza, L.R. Pinto, M.M. pastina, C.S. Leite, J.A.G. Da Silva, E.C. Ulian, A. Figueira and A.P. Souza. 2006. Development of 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: 298-314.

Gravois, K.A. and S.B. Milligan. 1992. Genetic relationship between fiber and sugarcane yield components. **Crop Sci.** 32:62-67

Grivet, L., A. D'Hont, D. Roques, P. Feldmann, C. Lanaud and J.C. Glaszmann. 1996. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): Genome organization in highly polyploidy and aneuploid interspecific hybrid. **Genetics** 142: 987-1000.

Guimaraes, C.T., G.R. Sills and B.W.S. Sobral. 1997. Comparative mapping of Andropogoneae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94: 14261-14266.

Gustavo, C.A. and M. G. Peter. 1994. Staining nucleic acids with silver: an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. **Promega Notes Magazine Number 45:** 13 p.

Hoarau, J.Y., B. Offman, A. D'Hont, A.M. Risterucci, D. Roques, J. C.H. Glaszmann and L. Grivet. 2001. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.) I. Genome mapping with AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** 103: 89-97.

Hoarau, J.Y., L. Grivet, B. Offmann, L.M. Raboin, J.P. Diorflar, J. Payet, M. Hellmann, A. D' Hont and J.C.H. Glaszmann. 2002. Genetics dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.) II. Detection of QTLs for yield components. **Theor. Appl. Genet.** 105: 1027-1037.

Hunsigi, G. 1993. **Production of Sugarcane: Theory and Practice.** Springer-Verlag GmbH & Co, KG, Berlin. 245p.

Irvine, J.E. 1999. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theor. Appl. Genet.** 98: 186-194.

- Iwata, H. 2006. AntMap ver.1.2: **Constructing genetic linkage maps by ant colony optimization algorithm**. Available Source: <http://cse.naro.affrc.go.jp/iwatah/antmap>, February 10, 2008.
- Jannoo, N., L. Grivet, A. Dookun, A. D'Hont and J.C. Glaszmann. 1999. Evaluation of the genetic base of sugarcane cultivars and structuration of the diversity at the chromosome level using molecular markers. **Theor. Appl. Genet.** 99: 171-184.
- Jorapur, R. and A.K. Rajvanshi. 1997. Sugarcane leaf-bagasse gasifiers for industrial heating applications. **Biomass and Bioenergy** 13. 141-146.
- Jordan, D.R., R.E. Casu, P. Basse, B.C. Carroll, N. Berding and C.L. McIntyre. 2004. Marker associated with stalk number and suckering in sugarcane co-locate with tillering and rhizomatousness QTLs in sorghum. **Genome** 47: 988-993.
- Kang, M.S., J.D. Miller and P.Y. P. Tai. 1983. Genetic and phenotypic path analyses and heritability in sugarcane. **Crop Sci.** 23: 643-647.
- Kearsey, M.J. 1998. The principle of QTL analysis (a minimal mathematics approach). **Journal of Experimental Botany** 49: 1619-1623.
- Kearsey, M.J. and H.S. Pooni. 1996. **The Genetical Analysis of Quantitative Traits**. Chapman and Hall, London.
- Lande, R. and R. Thompson. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics** 124: 743-756.
- Lander, E.S. and D. Botstein. 1989. Mapping Medelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** 121, 185-199.
- Loh, J.P., R. Kiew, A. Hay, A. Ke, L.H. Ganand and Y.Y. Gan. 2000. Intergeneric and

interspecific relationships in Araceae tribe Galadieae and development of molecular markers using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Annals of Botany** 85: 371-378.

Lu, J., M.R. Knox, M.J. Ambrose, J.K.M. Brown and T.H.N. Elli. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea aeseed by RFLP-and PCR-based methods. **Theor. Appl. Genet.** 93, 1103-1111.

Lu, Y.H., A. D'Hont, D.I.T. Walker, P.S. Rao, P. Feldmannand and J.C. Glaszmann. 1994b. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. **Euphytica** 78: 7-18.

Lu, Y.H., A. D'Hont, F. Paulet, L. Grivet, M. Arnardand and J.C. Glaszmann. 1994a. Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. **Euphytica** 78: 217-226.

McIntyre, C.L., V.A. Whan, B.C. Croft, R. Magarey and G.R. Smith. 2005. Identification and validation of molecular markers associated with Pachymetra root rot and brown rust resistance in sugarcane using map and association based approaches. **Mol. Breed.** 16: 151-161.

McIntyre, C.L., M. Jacson, G. Cordeiro, O. Amouyal, S. Hermann, K.S. Aitken, F. Elliott, R.J. Henry, R.E. Caasu and G.D. Bonnett. 2006. The identification and characterization of alleles of sucrose phosphate synthase gene family III in sugarcane. **Mol. Breed.** 18: 39-50.

Menz, M.A., R.R. Klein, J.E. Mullet, J.A. Obert, N.C. Unruh and P.E. Klein. 2002. A high-density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP(R), RFLP and SSR markers. **Plant Mol. Biol.** 48(5/6): 483-499.

Milligan, S.B., K.A. Gravois, K.P. Bischoff. and F.A. Martin. 1990. Crop effects on broad-

sense heritabilities and genetic variances of sugarcane yield components. **Crop Sci.** 30: 344-349.

- Ming, R., L. Sin-Chien, Y.-R. Lin, J. Da Silva, W. Wilson, D. Braga, A. Van Deynze, T.F. Wenslaff, K.K. Wu and P.H. Moore. 1998. Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: Comparative organization of closely-related diploid and polyploid genomes. **Genetics** 150: 1663-1682.
- Ming, R., L. Sin-Chien, P.H. Moore, J.E. Irvine and A.H. Peterson. 2002. QTL analysis in a complex autopolyploid: genetic control of sugar content in sugarcane. **Genome Res.** 11: 2075-2084.
- Ming, R., Y.W. wang, X. Draye, P.H. Moore, J.E. Irvine and A.H. Peterson. 2002. Molecular dissection of complex traits in autopolyploids: mapping QTLs affecting sugar yield and related traits in sugarcane. **Thero. Appl. Genet.** 105: 332-345.
- Mudge, J., W.R. Andersen, R.L. Kehrer and D.J. Fairbanks. 1996. A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. **Crop Sci.** 36: 1362-1363.
- Mukherjee, S.K. 1957. Origin and distribution of *Saccharum*. **Botany Gazette** 119: 55-61.
- Muluvi, G.M., J.I. Sprent, N. Soranzo, J. Proven, D. Odee, G. Folkard, J.W. McNicoland and W. Powell. 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. **Molecular Ecology** 8: 463-470.
- Pandey, A., C.R. Soccol, P. Nigam and V.T. Soccol. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology** 74. 69-80
- Peres, S. 2005. **The biomass potential for power generation in the northeast of Brazil.** Available Source: www.nrbp.org/papers/043.pdf, February 8, 2005.

- Peterson, A.H., E.S. Lander, J.D. Hewitt, S. Peterson, S.E. Lincoln and S.D. Tanksley. 1988.
Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map
of restriction fragment length polymorphisms. **Nature** 335: 721-726.
- Piperidis, G. and A. D, Hont. 2001. Chromosome composition analysis of various *Saccharum*
interspecific hybrids by genomic in situ hybridization (GISH). **Nt. Soc. Sugar Can**
Technol. Congress 11: 565.
- Piperidis, N., P.A. Jackson, A. D'Hont, P. Besse, J.Y. Hoarau, B. Coutois, K.S. Aitken. and C.L.
McIntyre. 2008. Comparative genetics in sugarcane enables structured map enhancement
and validation of marker-trait association. **Mol. Breed.** 21: 233-247.
- Powell, W., G.C. Machray and J. Proven. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence
repeats. **Trends in Plant Science** 1: 215-222.
- Price, S. 1957. Cytological studies in *Saccharum* and allied genera II. Chromosome numbers in
interspecific hybrids. **Bot. Gaz.** 118: 146-159.
- Raboin, L.M., K.M. Oliveira, L. Lecuff, H. Telismart, D. Roques, M. Butterfield, J.Y. Hoarau
and A. D'Hont. 2006. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploidy, using bi-
parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust
resistance gene. **Theor. Appl. Genet.** 112: 1382-1391.
- Reffay, N., P.A. Jackson. K.A. Aitken, A. D'Hont, P. Basse and C.L. McIntyre. 2005.
Characterization of genome regions incorporated from an important wild relative into
Australian sugarcane. **Mol. Breed.** 15: 367-381.
- Ripol, M.I., G.A. Churchill, J.A.G. Da Silva and M. Sorrells. 1999. Statisticcal aspects of genetic
mapping in autopolyploids. **Gene** 235: 31-41.
- Ripoli, T.C.C., W.F. Molina and M.L.C. Ripoli. 2000. Energy potential of sugarcane biomass in

Brazil. **Scientia Agricola** 57: p.677-681.

Roach, B.T. 1969. Cytological studies in *Saccharum* chromosome transmission in interspecific and intergeneric crosses. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.** 13: 901-920.

Roach, B.T. 1972. Nobilization of sugarcane. **Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol.** 14: 206–216.

Rossi, M., P. Araujo, F. Paulet, O. Garsmeur, V. Dias, C. Hui, M.A. Van Sluys and A. D'Hont. 2003. Genome distribution and characterization of EST derived sugarcane resistance gene analogs. **Mol. Breed.** 269: 406-419.

Sanjuán, R., J. Anzaldo, J. Vargus, J. Turrado and R. Patt. 2001. Morphology and composition of pith and fibers from Mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und Werkstoff** 59: 447-450.

Sensi, E., R. Vignani, W. Rhode and S. Biricolti. 1996. Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. sangiovese and colorino genotypes by AFLP and ISTR marker technology. **Vitis**. 35:183-1188.

Shoemaker, R.C., L.L. Lorenzen, B.W. Diers and T.C. Olson. 1994. Genome mapping and agriculture, pp. 1-10. In P.M. Gresshoff (ed.). **Plant Genome Analysis**. CRS Press Inc. Boca Raton, FL.

Sills, G.R., W. Bridges, S.M. Al-Janabi and B.W.S. Sobral. 1995. Genetic analysis of agronomic traits in a cross between sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and its presumed progenitor (*S. robustum* Brades & Jesw. Ex Grassl). **Mol. Breed.** 1: 355-363.

Sobral, B.W.S. and R.J. Honeycutt. 1993. High output genetic mapping in polyploids using PCR-generate marker. **Theor. Appl. Genet.** 86: 105-112.

- Sreenivasan, T.V., B.S. Ahloowalia and D.J. Hein. 1987. Cytogenetics, pp. 211-253. *In* Heinz, D.J. (ed.) **Sugarcane Improvement through Breeding**. Elsevier, Amsterdam.
- Thomas, C.M., P. Vos, M. Zabe, D.A. Jones, K.A. Norcott, B.P. Chadwick and J.D.G. Jones. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. **Plant Journal** 8: 785-794.
- Tohme, J., D.O. Gonzalez, S. Beebe and M.C. Duque. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Sci.** 36: 1375-1384.
- Tyagi A. P. and P. Lal. 2007. Correlation and path coefficient analysis in sugarcane. **The South Pacific Journal of Natural Science** 1: 1-10.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijmans, T.V.D. Lee, M. Hormes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414.
- Weising, K., P. Winter, B. Huttel and G. Kshl. 1998. Microsatellite markers for molecular breeding. **Journal of Crop Production** 1: 113-142.
- Wu, K.K., W. Burnquist, M.E. Sorrels, T.L. Tew, P.H. Moore and S.D. Tanksley. 1992. The detection and estimation of linkage in polyploidys using single-dose restriction fragment. **Theor. Appl. Genet.** 83:294-300.
- Xu, M.L., A.E. Melchinger, X.C. Xia and T. Lubberstedt. 1999. High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR, and AFLP markers. **Molecular and General Genetics.** 261: 574-581.
- Yong, J.L. 2005. **Oxidation of sugarcane bagasse usig a combination of hypochlorite and**

peroxide. Thesis of Master of Science. Louisiana State University. Available Source:
http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11042005-161219/unrestricted/Lee_thesis.pdf,
March 20, 2008

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ภาพแผนภูมิ

Silver Staining

แช่กระจกใน 10% Acetic acid 30 นาที เขย่าเบาๆ



ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที



ย้อมด้วย 1% Silver Nitrate (1% Silver Nitrate, 0.56% Formaldehyde) นาน 30 นาที



ล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว(ไม่เกิน 5 วินาที)



แช่เจลใน Develop Solution(30% Sodium Carbonate, 0.1% Sodium Thiosulfate, 0.56% Formaldehyde) ที่เตรียมใหม่ๆและแช่เย็น จนเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน



หยุดปฏิกิริยาโดยแช่เจลใน 10% Acetic acid



ล้างเจลในน้ำกลั่นนาน 15 นาที



ผึ่งเจลให้แห้ง

ภาพผนวกที่ 1 แผนภูมิการย้อมเจลด้วย silver nitrate (silver staining)

ตารางผนวกที่ 1 สูตรสำหรับอัตราส่วนจีโนไทป์ และฟีโนไทป์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ออโตโพลีพลอยด์ ที่ลิงก์กันในสภาพ 1&2-Asymmetric coupling, 2&2-Double coupling, 1&3-Asymmetric coupling และ 2&3-Asymmetric coupling

Class	1&2-Asymmetric coupling	2&2-Double coupling	1&3-Asymmetric coupling	2&3-Asymmetric coupling
Genotypic classes				
AABBB	-	-	-	$q_3-2q_3r+q_3r^2$
AABB	-	$q_2-2q_2r+q_2r^2$	-	$q_2-q_3+2q_3r-q_2r-q_3r^2$
AAB	-	$2q_2r-2q_2r^2$	-	$q_2r-q_3r^2$
ABBB	-	-	q_3-q_3r	$2q_3r-2q_3r^2$
ABB	q_2-q_2r	$2q_2r-2q_2r^2$	$p_1-3q_3-2q_3r$	$0.5p_2-0.5q_2-2q_3r+2q_3r^2$
AB	p_2-q_2r	$p_2-q_2-4q_2r+4q_2r^2$	$2q_3+2q_3r$	$0.5p_2-0.5q_2-2q_3r+2q_3r^2$
AA	-	q_2r^2	-	q_3r^2
A	q_2r	$2q_2r-2q_2r^2$	q_3r	$2q_3r-2q_3r^2$
BBB	-	-	q_3r	q_3r^2
BB	q_2r	q_2r^2	$2q_3+2q_3r$	$q_2r-q_3r^2$
B	p_2-q_1	$2q_2r-2q_2r^2$	$p_3-q_1-2q_3-2q_3r$	$q_2-q_3+2q_3r-q_2r-q_3r^2$
Nil	q_2-q_2r	$q_2-2q_2r+q_2r^2$	q_3-q_3r	$q_3-2q_3r+q_3r^2$
Phenotypic classes				
AB	p_1-q_2r	$p_2-2q_2r+q_2r^2$	p_1-q_3r	$p_2-2q_3r+q_3r^2$
A	q_2r	$2q_2r-q_2r^2$	q_3r	$2q_3r-q_3r^2$
B	$p_2-p_1+q_2r$	$2q_2r-q_2r^2$	$p_3-q_1+q_3r$	$q_2-q_3+(q_2-q_3)r-q_3r^2$
Nil	q_2-q_2r	$q_2-2q_2r+q_2r^2$	q_3-q_3r	$q_3-(q_2-q_3)r+q_3r^2$
Sum	$p_2+q_2=1$	$p_2+q_2=1$	$p_2+q_2=1$	$p_2+q_2=1$

ที่มา: Ripol *et al.* (1999)

ตารางผนวกที่ 2 ค่าทดสอบ power of chi-square ที่ระดับ α 0.05

df.	Noncentrality (λ)													
	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	7.0	10.0	15.0	25.0
1	.050	.073	.097	.121	.146	.170	.293	.410	.516	.609	.754	.885	.972	.998
2	.050	.065	.081	.098	.115	.133	.226	.322	.415	.504	.655	.815	.944	.996
3	.050	.062	.075	.088	.102	.116	.192	.275	.358	.440	.590	.761	.917	.993
4	.050	.060	.071	.082	.093	.106	.172	.244	.320	.396	.540	.716	.891	.989
6	.050	.057	.066	.075	.084	.094	.146	.206	.270	.336	.468	.644	.843	.980
8	.050	.056	.064	.071	.079	.087	.131	.182	.238	.296	.417	.588	.799	.968
10	.050	.053	.062	.068	.075	.082	.121	.166	.215	.268	.379	.542	.760	.956
20	.050	.052	.056	.060	.063	.066	.096	.125	.158	.193	.273	.402	.611	.883
50	.050	.052	.054	.056	.059	.061	.076	.092	.110	.129	.173	.250	.398	.687

ที่มา: Agresti (2002)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายสมหวัง อนุสนธิ์พรเพิ่ม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 15 พฤษภาคม 2512
สถานที่เกิด	นครปฐม
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยมอันดับ 2 (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ.2535 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ.2539
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักปรับปรุงพันธุ์อ้อย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัทมิตรผลวิจัยพัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	บริษัทน้ำตาลมิตรผล จำกัด