ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่ | พืชไร่นา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลจากคู่ไพรเมอร์ต่างๆ ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำของอ้อย

Comparison of Molecular Marker from Different Primer Pairs in Fiber Percentage and Diameter of Sugarcane

นามผู้วิจัย นางสาวเยาวมาลย์ ภาคภูมิ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, D.Agr.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลจากคู่ไพรเมอร์ต่างๆ ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำของอ้อย

Comparison of Molecular Marker from Different Primer Pairs in Fiber Percentage and Diameter of Sugarcane

โดย

นางสาวเยาวมาลย์ ภาคภูมิ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เยาวมาลย์ ภาคภูมิ 2554: การเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลจากคู่ไพรเมอร์ต่างๆ ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำของอ้อย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, D.Agr. 68 หน้า

ได้ทำการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลของอ้อย โดยวิธี AFLP ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่าศูนย์กลางลำ ทำการศึกษาในคู่ไพรเมอร์ 4 คู่ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT คู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG และคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ทำการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่าศูนย์กลางลำ คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง คู่ไพรเมอร์ละ 10 เครื่องหมาย ทำการวิเคราะห์ multiple regression ของ10 เครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละคู่ไพรเมอร์ วิเคราะห์ multiple regression ของ 40 เครื่องหมายโมเลกุลรวมจาก 4 คู่ไพรเมอร์ และวิเคราะห์ 10 เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกจากการวิเคราะห์รวม ได้สมการ multiple regression ที่เหมาะสมกับลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใย 2 สมการ โดยมีเครื่องหมายโมเลกุล 1 และ 4 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 7.80 และ 25.00% ตามลำดับ และได้สมการ multiple regression ที่เหมาะสมกับลักษระเส้นผ่าศูนย์กลางลำ โดยมีเครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 9.90% นอกจากนี้พบว่า การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลจากการวิเคราะห์ multiple regression รวมของเครื่องหมายโมเลกุลของทุกคู่ไพรเมอร์ เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพกว่า การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลจากการวิเคราะห์ multiple regression ของเครื่องหมายโมเลกุลของแต่ละคู่ไพรเมอร์ และการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลจากการวิเคราะห์ simple regression ของแต่ละเครื่องหมายโมเลกุล

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yaowaman Phakphum 2011: Comparison of Molecular Marker from Different Primer Pairs in Fiber Percentage and Diameter of Sugarcane. Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Associate Professor Rewat Lersrutaiyotin, D.Agr. 68 pages.

Molecular markers of sugarcane were evaluated using AFLP in fiber percentage and stem diameter. Four pairs of primer namely: E-ACT and M-CGG, E-ACT and M-CAT, E-ACC and M-CAG and E-ACT and M-CAA were studied. The 10 high correlation coefficient molecular markers were selected from each primer pair and evaluated by using multiple regression. The total 40 molecular markers from 4 primer pairs were evaluated by using multiple regression. The 10 highest partial regression were selected and evaluated by multiple regression again. The suitable multiple regression equation for fiber percentage were the equation with 1 and 4 marker having 7.80 and 25.00% of R^2 and for stem diameter were the equation with 2 marker having 9.90% of R^2. Moreover, selection of molecular marker from multiple regression of total molecular marker from all primer pair were the more effective compared to selection of molecular marker from multiple regression of molecular marker from each primer pair and selection of molecular marker from simple regression of each molecular marker.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. เรวัต เลิศฤทัยโยธิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่กรุณาให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย การดำเนินชีวิต และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สมหวัง อนุสนธิ์พรเพิ่ม ที่กรุณาให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย การดำเนินการ ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องอันเกิดจากการปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอพืชและช่วยให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการทำงาน

ขอขอบคุณ คุณพ่อสมมาตร คุณแม่กัญญา ภาคภูมิ ตลอดจนทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา ขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการด้านดีเอ็นเอพืช ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือเอื้อเฟื้อ และเป็นกำลังใจให้ตลอดเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่ครอบครัว อาจารย์ผู้ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

เยาวมาลย์ ภาคภูมิ

เมษายน 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	9
ผลและวิจารณ์	14
สรุปและข้อเสนอแนะ	55
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	56
ภาคผนวก	60
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	68

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ที่เป็น polymorphic กับเปอร์เซ็นต์เส้นใย	18
2	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ที่เป็น polymorphic กับเปอร์เซ็นต์เส้นใย	19
3	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ที่เป็น polymorphic กับเปอร์เซ็นต์เส้นใย	20
4	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ที่เป็น polymorphic กับเปอร์เซ็นต์เส้นใย	21
5	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ที่เป็น polymorphic กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ	24
6	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ที่เป็น polymorphic กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ	25
7	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ที่เป็น polymorphic กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ	26
8	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ที่เป็น polymorphic กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ	27
9	ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ต่อเปอร์เซ็นต์เส้นใย	31
10	ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ต่อเปอร์เซ็นต์เส้นใย	32
11	ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ต่อเปอร์เซ็นต์เส้นใย	33

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ต่อเปอร์เซ็นต์เส้นใย	34
13	ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำ	38
14	ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำ	39
15	ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำ	40
16	ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำ	41
17	ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของ 4 คู่ไพรเมอร์ ต่อเปอร์เซ็นต์เส้นใย	43
18	ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของ 4 คู่ไพรเมอร์ ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำ	45
19	เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ที่นำมาใช้ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ที่พิจารณาเบื้องต้นและพิจารณาในขั้นสุดท้าย	48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
20	เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ที่นำมาใช้ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ที่พิจารณาเบื้องต้นและพิจารณาในขั้นสุดท้าย	49
21	เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ที่นำมาใช้ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ที่พิจารณาเบื้องต้นและพิจารณาในขั้นสุดท้าย	50
22	เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ที่นำมาใช้ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ที่พิจารณาเบื้องต้นและพิจารณาในขั้นสุดท้าย	51
23	ค่า partial regression ของเครื่องหมายโมเลกุลจาก 4 คู่ไพรเมอร์ จากการวิเคราะห์เบื้องต้นและวิเคราะห์ขั้นสุดท้ายในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใย เมื่อพิจารณา 10 เครื่องหมายแยกแต่ละคู่ไพรเมอร์เมื่อพิจารณารวม40เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์และเมื่อพิจารณา 10 เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์	53
24	ค่า partial regression ของเครื่องหมายโมเลกุลจาก 4 คู่ไพรเมอร์ จากการวิเคราะห์ เบื้องต้นและวิเคราะห์ขั้นสุดท้าย ในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ เมื่อพิจารณา 10 เครื่องหมายแยกแต่ละคู่ไพรเมอร์เมื่อพิจารณารวม 40 เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์ และเมื่อพิจารณา 10 เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์	54

ตารางผนวกที่

1	ตัวอย่างการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ได้จากการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละคู่ไพรเมอร์	62
2	แสดงขั้นตอนการดำเนินการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล 10 เครื่องหมายสำหรับการคำนวณ multiple regression ของขั้นตอนสุดท้าย	67

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการกระจายตัวของปริมาณเส้นใยในประชากรอ้อยลูกผสม	14
2	แสดงการกระจายตัวของเส้นผ่าศูนย์กลางลำของประชากรอ้อยลูกผสม	15

ภาพผนวกที่

1	แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี AFLP	61

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลจากคู่ไพรเมอร์ต่างๆ ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำของอ้อย

Comparison of Molecular Marker from Different Primer Pairs in Fiber Percentage and Diameter of Sugarcane

คำนำ

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาเกิดปัญหาที่เกี่ยวกับพลังงานออกมามากมาย ดังจะพบจากภาวะของสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงในรูปแบบต่าง ๆที่เกิดอยู่ทุกมุมโลก ดังนั้นผู้มีส่วนเกี่ยวข้องจึงพยายามที่จะหาทางป้องกันการเปลี่ยนแปลงที่จะเกิดขึ้นอย่างฉับพลัน รวมถึงพยายามแก้ไขปัญหาโดยใช้วิธีที่เป็นมิตรกับธรรมชาติมากที่สุด จึงมีวิธีการใช้ธรรมชาติรอบตัวให้เกิดประโยชน์มากที่สุด ไม่ว่าจะเป็นการใช้ลม แสงอาทิตย์ และน้ำ ในการทำให้เกิดการขับเคลื่อนทางพลังงาน สำหรับประเทศไทยที่มีการทำการเกษตรเป็นส่วนใหญ่นั้น พบว่าสิ่งที่เหลือจากอุตสาหกรรมเกษตรของประเทศนั้นยังสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกมากมาย จึงได้มีการส่งเสริมจากรัฐบาลในด้านการผลิตกระแสไฟฟ้าในเชิงพาณิชย์ ด้วยระบบผลิตพลังงานความร้อนและไฟฟ้าร่วมโดยสามารถขายไฟฟ้าส่วนเกินจากอุตสาหกรรมเข้าสู่ระบบของการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยได้ (นิรนาม, 2551)

อ้อยเป็นพืชอุตสาหกรรมที่ นอกจากจะผลิตได้น้ำตาลแล้ว ผลพลอยได้ที่ได้จากการผลิตน้ำตาลนั้นก็ยังมีความสำคัญเช่นกัน เช่น ชานอ้อย (bagasse) ซึ่งก็คือส่วนของเส้นใย (fiber) ที่เหลือจากการหีบน้ำตาลที่มีมากกว่า 30% ของผลผผลิตอ้อยทั้งที่ได้จากการผลิตตลอดจนสิ้นสุดกระบวนการในโรงงานน้ำตาลนั้น สามารถผลิตไฟฟ้าได้ 5,000 เมกะวัตต์ ซึ่งเทียบได้กับปริมาณการใช้น้ำมันดิบกว่า 8.5 เมตริกตัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2551) ภายหลังมีเทคโนโลยีเข้ามาในอุตสาหกรรมมากขึ้น จึงมีการใช้ประโยชน์จากชานอ้อยมากขึ้นด้วย โดยนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมกระดาษ พลาสติก วัสดุก่อสร้าง วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในสำนักงาน และเพื่อเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่ใช้ในรถยนต์ ดังนั้นอ้อยที่มีปริมาณเส้นใยสูงจึงเริ่มเป็นที่ต้องการของโรงงานอุตสาหกรรมมากขึ้นตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในอดีตการปรับปรุงให้ได้พันธุ์อ้อยที่ตรงตามความต้องการนั้น ต้องใช้วิธีการคัดเลือกโดยการสังเกตจากลักษณะภายนอก แต่วิธีการแยกแบบนี้มีข้อจำกัดหลายอย่าง ต่อมาได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรมาเป็นทางเลือกในการปรับปรุงพันธุ์โดยการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล ดังเช่นวิธีเอเอฟแอลพี ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบและแยกชนิดของพืชได้ค่อนข้างแม่นยำทำได้รวดเร็วและตรวจสอบได้ในทุกระยะของพืช (สุรินทร์, 2545) ทั้งนี้ในวิธีเอเอฟแอลพีมีการใช้คู่ไพรเมอร์ที่ต่างกัน ในการกำหนดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล ในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลจากต่างคู่ไพรเมอร์ เพื่อตรวจสอบวิธีการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลและโอกาสได้เครื่องหมายโมเลกุลจากต่างคู่ไพรเมอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความแปรปรวนของปริมาณเส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำในอ้อยของพันธุ์อ้อยลูกผสมจากพ่อแม่ที่มีปริมาณเส้นใยที่แตกต่างกัน

2. ตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับปริมาณเส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำในพันธุ์อ้อยลูกผสมโดยใช้วิธี AFLP (Amplifier Fragment Length Polymorphism)

3. เปรียบเทียบโอกาสได้เครื่องหมายโมเลกุลจากต่างคู่ไพรเมอร์ ของปริมาณเส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

4. ตรวจสอบผลการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลจากขั้นตอนต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

อ้อย (Sugarcane) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum spp.* ที่อยู่ใน genus Saccharum, tribe Andropogoneae, family gramineae (ปรีชา, 2544 ;Bakker, 1999) ซึ่งพันธุกรรมของอ้อยปลูกมีลักษณะเป็น heterozygous polyploidy (Poehlman and Sleper, 1995) อ้อยเป็นพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยลำต้น (vegetative propagation) อ้อยปลูก (*Saccharum* spp. hybrids) และสายพันธุ์อ้อยป่า (wild relative) จะมีความเป็น heterozygosity สูงมาก โดยที่การสร้างสายพันธุ์แท้หรือ pure inbred line ไม่สามารถทำได้เนื่องจากความยากลำบากในการผสมตัวเองและการเข้าคู่กันอย่างสุ่มของ multiple homologous chromosome ซึ่งในประชากรที่กระจายตัว(segregating population) ที่ใช้ในการศึกษาพันธุกรรม คือลูกผสมชั่วที่ 2 (F2) ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์อ้อย 2 พันธุ์ (Kang *et al*., 1983; Milligan *et al*., 1990)

ลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยในอ้อย

โครงสร้างหลักในลำต้นอ้อยคือเส้นใย เส้นใยอ้อยมีองค์ประกอบหลักโดยประมาณคือ เซลลูโลส (cellulose) 40 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) 24 เปอร์เซ็นต์ และ ลิกนิน (lignin) 25 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากชานอ้อยมีองค์ประกอบของเถ้าต่ำ ทำให้ชานอ้อยเป็นวัตถุดิบที่มีคุณภาพสูงกว่าพืชชนิดอื่น เช่น ตอซังของข้าวและข้าวสาลี ที่มีปริมาณเถ้าสูงถึง 17.5 เปอร์เซ็นต์ และ 11.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และชานอ้อยยังเป็นวัตถุดิบที่สามารถเก็บเกี่ยวพลังงานจากแสงมากกว่าวัตถุดิบชนิดอื่นเนื่องจากมีผลผลิตสูงต่อพื้นที่คือประมาณ 80 ตันต่อเฮกตาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับ 1 ตันต่อเฮกตาร์ในข้าว 2 ตันต่อเฮกตาร์ในข้าวสาลี และ 20 ตันต่อเฮกตาร์ในพืชตระกูลหญ้าและไม้ยืนต้น (Pandey *et al*., 2000)และในอ้อยแต่ละชนิดก็มีเส้นใยไม่เท่ากัน เป็นที่ทราบกันว่าอ้อยที่ปลูกเป็นการค้าส่วนมาก มีเปอร์เซ็นเส้นใยระหว่าง 12 – 16 % และมีค่าโพลในช่วง 14 - 18 % (เกษม และคณะ, 2520) มีการแสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์เส้นใยกับปริมาณน้ำตาลไม่มีความสัมพันธ์กันโดยสามารถคัดเลือกพันธุ์ที่มีไฟเบอร์และปริมาณน้ำตาลสูงได้(Hunsigi,1993) และจากการที่พบว่าอ้อยสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์เส้นใยสูงนั้นสามารถช่วยลดการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชให้เข้าทำลายได้น้อยลง (Kang *et al*., 1989)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไพศาล (2543) และ Gravois and Milligan (1992) พบว่าค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเส้นใยกับลักษณะองค์ประกอบผลผลิตบางค่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งกันและกัน นั่นแสดงให้เห็นว่ามีโอกาสที่สามารถคัดเลือกพันธุ์อ้อยที่มีเส้นใยสูงโดยมีองค์ประกอบผลผลิตสูงด้วย

เครื่องหมายโมเลกุล

หลังจากการค้นพบกฎของเมนเดลในปี 1865 เกี่ยวกับการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีนที่ถ่ายทอดจากพ่อแม่สู่ลูกผ่านสารพันธุกรรม ทำให้สิ่งมีชีวิตแสดงความแตกต่างออกมา ซึ่งความแตกต่างที่ถ่ายทอดนั้นคือดีเอ็นเอนั่นเอง หลังจากนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงประยุกต์ทฤษฎีการถ่ายทอดลักษณะของเมนเดล เพื่อการปรับปรุงพันธุ์และคุณภาพของสิ่งมีชีวิต ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืชส่วนใหญ่ ความน่าเชื่อถือของการปรับปรุงและสร้างพันธุ์พืชใหม่ๆ ขึ้นอยู่กับขบวนการรวมตัวกันใหม่ของยีน (genetic recombination) และขบวนการกระจายตัวทางพันธุกรรม (genetic segregation) ที่เกิดขึ้นในลูกผสมที่ได้ สิ่งที่ท้าทายนักปรับปรุงพันธุ์คือการจำแนกลักษณะที่ต้องการ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันใหม่ของยีนระหว่างลูกผสมที่เกิดการกระจายตัวทางพันธุกรรม (Powell *et al.*, 1996) โดยนำความก้าวหน้าทางด้านชีวโมเลกุลมาเป็นเครื่องมือตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม ปี 1959 Markert and Moller ใช้ไอโซไซม์เป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างของอัลลีลในตำแหน่ง เพื่อชี้ให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิต วิธีนี้ได้รับความนิยมตั้งแต่ปี 1960 และได้ดัดแปลงมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์อย่างกว้างขวางจนถึงปัจจุบัน (Tanksley และ Orton, 1983) ถึงแม้ไอโซไซม์จะเป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายต่ำ แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัดคือ การแสดงออกของโปรตีนขึ้นกับระยะเวลาการพัฒนาของตัวอย่างที่ใช้และสภาวะแวดล้อม เพราะมีความจำเพาะเจาะจงกับเนื้อเยื่อที่นำมาใช้มีการพัฒนาวิธีทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแสดงวิวัฒนาการและการจำแนกพันธุ์ ตลอดจนติดตามเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) เครื่องหมายโมเลกุลสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

กลุ่มแรก เป็นวิธีการตรวจสอบโดยอาศัยหลักการไฮบริไดเซชัน คือ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstien *et al.*, 1980)ได้นำเสนอการใช้ RFLP ในการทำเครื่องหมายโมเลกุลเป็นกลุ่มแรกโดยมีขั้นตอนเริ่มจากย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิส (electrophoresis) จากนั้นย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปไว้บน membrane ด้วยวิธี Southern blot แล้วใช้ probe hybridize เพื่อบอกความแตกต่างของแต่ละจีโนม (วิสุทธิ์, 2536) ถึงแม้ว่า เครื่องหมายโมเลกุล RFLP มีการแสดงออกโดยไม่ขึ้นอยู่กับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สภาพแวดล้อม ไม่ขึ้นกับรูปแบบการข่มกันของยีน และไม่ขึ้นกับระยะเวลาการแสดงออกของยีน และเป็น Co-dominant markers ก็ตาม แต่การวิเคราะห์แบบ RFLP ต้องใช้ดีเอ็นเอคุณภาพดี ปริมาณมาก ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง และมีวิธีตรวจความแตกต่างที่ซับซ้อน

กลุ่มที่สอง เป็นวิธีการตรวจสอบที่อาศัยหลักการทาง PCR พัฒนาขึ้นโดย Williams และคณะ ในปี ค.ศ. 1990 คือวิธี RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) เป็น PCR –based marker system ใช้ primer ที่มีลำดับเบสไม่เฉพาะเจาะจงขนาดประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ เป็นวิธีที่ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ทำได้รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายต่ำ และเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย ขั้นตอนการตรวจผลไม่ซับซ้อน โดยขั้นตอนการทำเป็นวงจรดังนี้ คือ แยกสายดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง จากนั้นลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ primer เข้าจับสายดีเอ็นเอต้นแบบ และเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (extention) และตรวจสอบผลโดยอิเล็กโตรโฟริซิส (Reiter, 2001) แต่เทคนิค RAPD มีข้อจำกัดในการทำซ้ำคือ การทำซ้ำแต่ละครั้งอาจให้ผลที่แตกต่างกัน ดังนั้นเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) จึงถูกพัฒนาขึ้น เป็นการรวมข้อดีของทั้งสองเทคนิคคือ RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน ซึ่งเทคนิค AFLP ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย แต่มีประสิทธิภาพในการติดตามเครื่องหมายดีเอ็นเอสูง เมื่อนำไปตรวจสอบใน polyacrylamide gel เทคนิค AFLP มีคุณสมบัติเหนือเทคนิคอื่น ๆ คือสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบได้ทั้งจีโนม โดยใช้ genomic DNA เพียง 0.05-0.5 นาโนกรัม ขึ้นอยู่กับขนาดจีโนมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ทั้งยังให้แถบจำนวนมาก ทำซ้ำได้ และให้ผลเหมือนเดิมสูง ไม่จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสของสายดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีเพื่อตรวจสอบความแตกต่าง

Amplifier Fragment Length Polymorphism (AFLP)

AFLP คือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปฏิกิริยาด้วย PCR (polymerase chain reaction) เทคนิคถูกพัฒนาขึ้น โดย Vos *et al.* (1995)

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำโดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดยใช้ adapter ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ชิ้นสั้น ๆ ที่มีปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ จึงสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้ได้โดยใช้ปลายเหนียว และส่วนนี้จะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำ PCR โดยไพรเมอร์ ซึ่งมีลำดับเบสที่มีลำดับเบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ ก็สามารถเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมากจนไม่สามารถที่จะแยกออกจากกันได้ หรือตรวจสอบด้วยวิธีทั่วไป เช่น การทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ดังนั้นการสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำ AFLP จึงเพิ่มปริมาณเบสเพื่อคัดเลือกเข้าที่ปลาย 3' ต่อจากเบสที่เป็นตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ต่อจากบริเวณที่ตัดจำเพาะ สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์นั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วน และสามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไป ถ้าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหรือจีโนมที่ศึกษา มีส่วนประกอบของเบสทั้ง 4 ชนิด (G, A, T, C) ในสัดส่วนที่เท่ากัน การเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อคัดเลือก 1 เบส จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณเหลือเพียง 1 ใน 4 ของทั้งหมด ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 2 เบส จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ก็จะลดลงเหลือ 1 ใน 16 ของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ทั้งหมดเท่านั้น ดังนั้นสามารถควบคุมให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในจำนวนที่เหมาะสมได้ โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปแต่ละเบสจะลดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอลงเหลือ ¼ ^{n} ของทั้งหมด (n คือจำนวนเบสสำหรับคัดเลือกที่เพิ่มขึ้น) ถ้าต้องการให้มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 50 - 100 แถบ ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสใน denaturing polyacrylamind gel (สุรินทร์, 2543)

AFLP markers ถูกนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Vigna* อย่างกว้างขวาง ทั้งที่เป็นลักษณะเชิงคุณภาพและลักษณะเชิงปริมาณ โดยเครื่องหมายทางโมเลกุลที่ได้จากการสำรวจในรุ่นพ่อแม่สามารถนำไปใช้ในประชากรได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Tara *et al.*, 1997; Xu *et al.,* 2000) และเครื่องหมายโมเลกุล AFLP นี้สามารถแยกกลุ่มของ Saccharum complex ออกเป็นกลุ่มๆและผลที่ได้มีความสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล RFLP (Lu *et al*., 1994a; Basse *et al*., 1998) โดยมีเป้าหมายท้ายสุด คือการใช้เทคนิคนี้ในการช่วยเหลือการคัดเลือกความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นไปได้ใน introgression programme)

D'Hont et al., (1996) กล่าวถึงเครื่องหมายโมเลกุล AFLP มีความเหมาะสมในการใช้สร้างแผนที่ยีโนมของอ้อย เนื่องจากให้จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายจำนวนมากต่อคู่ไพรเมอร์ ทำให้สามารถศึกษาครอบคลุมยีโนมอ้อยได้รวดเร็วกว่าเครื่องหมายโมเลกุลแบบอื่น Hoarau *et al*. (2002)ใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP มาวิเคราะห์ QTL ในลักษณะความหวานของอ้อย โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล AFLP เป็นเทคนิคที่สามารถสร้างเครื่องหมายโมเลกุลได้รวดเร็วเป็นจำนวน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มาก และให้ผลการทดลองเที่ยงตรง แม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล AFLP จะเป็นการวิเคราะห์จีโนไทป์แบบการข่มสมบูรณ์ แต่ก็ไม่ได้ทำให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ linkage ลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

การปลูกอ้อยในแปลงทดสอบ

ทำการปลูกพันธุ์อ้อยลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์กำแพงแสน94-13 และ K84-200 จำนวน 138 พันธุ์ ร่วมกับพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ โดยปลูกแบบพันธุ์ต่อแถว โดยใช้ขนาดแปลงย่อย 3.9 ตารางเมตร ใช้ระยะระหว่างแถว 1.3 เมตร และแถวยาว 3 เมตร ใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ทำ 3 ซ้ำ

การดูแลรักษาแปลง

ทำการใส่ปุ๋ยก่อนปลูก โดยใส่ปุ๋ยรองพื้นสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ และหลังปลูกใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่ออ้อยอายุ 70-90 วัน และใส่ปุ๋ยสูตร 21-0-0 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่ออ้อยอายุ 120 วัน นอกจากนี้ได้ทำการฉีดพ่นสารคาเดรสะต๊อมพ์ เพื่อควบคุมการงอกของเมล็ดวัชพืช 1 ครั้ง

การเก็บข้อมูลทางเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

เมื่ออ้อยอายุ 12 เดือนวัดเส้นผ่านศูนย์กลางลำบริเวณกลางลำโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ โดยทำการวัดกลางข้ออ้อยที่โคนลำ กลางลำ และยอด จากนั้นข้อมูลมาคิดค่าเฉลี่ย ทำทุกพันธุ์ ทั้งสามซ้ำ

การเก็บข้อมูลปริมาณเส้นใย

วัดเปอร์เซ็นต์เส้นใยโดยใช้วิธีการของสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย (2537) โดยนำตัวอย่างอ้อยที่สับละเอียดโดยเครื่อง cane shredder ประมาณ 200 กรัม บรรจุลงในถุงผ้า แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างในน้ำเย็นหลายๆครั้ง หลังจากนั้นนำไปต้มอีก 2 ครั้ง จากนั้นบีบน้ำออก ตากตัวอย่างให้แห้ง แล้วอบตัวอย่างด้วยตู้อบไอร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วปล่อยตัวอย่างเย็นในโถดูดความชื้น ทำการชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์เส้นใยโดยใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\text{เปอร์เซ็นต์เส้นใย} = \frac{\text{น้ำหนักเส้นใยของตัวอย่างหลังอบ x 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างอ้อย}}$$

การสกัดดีเอ็นเอ

เมื่ออ้อยมีอายุ 2-4 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างใบอ้อยที่เป็นใบม้วน เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยตัดตัวอย่างใบม้วนของอ้อยแต่ละพันธุ์ บรรจุในถุงพลาสติก ติดป้าย มัดปากถุงและแช่น้ำแข็ง ซึ่งระหว่างที่รอการสกัดดีเอ็นเอจะเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (Genomic DNA purification kit #K0512) ของ บริษัท Fermentas โดยใช้ตัวอย่างประมาณ 0.2-0.5 กรัมต่อพันธุ์ เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้วละลายใน TE buffer pH 8.0หลังจากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำ electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5x TBE buffer โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม (GelStar®) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader® transilluminator เทียบกับLambda DNA#0011 (Fermentas) ถ่ายรูปด้วยกล้องดิจิตอล คำนวณปริมาณดีเอ็นเอโดยเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอกับ Lambda DNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม โดยใช้โปรแกรม Image J ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วย TE buffer เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

คู่ไพรเมอร์ที่ใช้

ใช้ไพรเมอร์ *Eco*RI+3 และ *Mse*I+3 จำนวน 4 คู่ โดยใช้รหัส E และ M แทนไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I ตามลำดับ

1. E-ACT และ M-CGG
2. E-ACT และ M-CAT
3. E-ACC และ M-CAG
4. E-ACT และ M-CAA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์จีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลโดยวิธี AFLP

วิเคราะห์ AFLP โดยดัดแปลงวิธีของ Vos *et al*. (1995) โดยมี 4 ขั้นตอนดังนี้

1. ตัด genomic DNA ปริมาณ 50 นาโนกรัม ในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิด (double digestion) คือ *Eco*RI (10 u/μl; Fermentas, Lithuania) จำนวน 10 units และ *Mse*I (10 u/μl; Fermentas, Lithuania) จำนวน 10 units 1 ไมโครลิตรของ 10x R buffer และ 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 *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter ในปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด 10 ไมโครลิตร, 0.5 ไมโครลิตรของ *Eco*RI adapter, 1 ไมโครลิตรของ *Mse*I adapter, 0.2 ไมโครลิตรของ ATP, 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 0.1 ไมโครลิตรของ BSA, 2 ไมโครลิตรของ Ligase (tango) และ0.5 ไมโครลิตรของ T4 ligase enzyme 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) ใช้ไพรเมอร์ที่ต่อด้วย selective nucleotide จำนวน 1 nucleotide ในปฏิกิริยาประกอบด้วย จำนวน 1 ไมโครลิตรของดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์และต่อด้วย adapter แล้ว, 2 ไมโครลิตรของ primer *Eco*RI+A, 2 ไมโครลิตรของ primer *Mse*I+C, 0.6 ไมโครลิตรของ $MgCl_2$, 1 ไมโครลิตรของ 10x Taq buffer, 1ไมโครลิตรของ 2 มิลลิโมล dNTP, 0.05 ไมโครลิตรของเอนไซม์ Taq buffer ปรับปริมาตรของตัวอย่างเป็น 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR โดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเวลา 2 นาที 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 25 รอบตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้โดยทำ agarose electrophoresis ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่ำกว่า 1,000 เบส เจือจางตัวอย่างด้วย TE buffer อัตราส่วน 1:10 (เจือจาง10 เท่า)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่ 2 หรือ selective amplified ใช้ไพรเมอร์ที่มีการต่อด้วย selective nucleotide ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 ไมโครลิตรของดีเอ็นเอเจือจางจาก PCR1, 2 ไมโครลิตรของ ไพรเมอร์ *Eco*RI+ANN, 1 ไมโครลิตรของไพรเมอร์ *Mse*I+CNN , 0.6 ไมโครลิตรของ $MgCl_2$, 1 ไมโครลิตรของ 10x PCR buffer, 1 ไมโครลิตรของ dNTP, 0.07 ไมโครลิตรของเอนไซม์ Taq DNA polymerase (5 units/μl) ปรับปริมาตรเป็น 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ และใช้อุณหภูมิในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 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 ตั้งแต่รอบที่ 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 เก็บตัวอย่างในน้ำแข็งหรือในตู้เย็นที่ อุณหภูมิ -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 ใช้วิธีย้อมเจลด้วยเกลือไนโตรเจน (silver stain method) ตามวิธีการของ Gustavo and Peter (1994) โดยเมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis แล้วทำการตรึงเจล (gel fixing) โดยใช้ 10% acetic acid glacial เป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาที แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้งครั้งละ 2 นาที หลังจากนั้นย้อมเจลด้วยสารละลายเกลือไนโตรเจน (0.1 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเกลือไนโตรเจน และ 1.5 มิลลิลิตร ของ 37 เปอร์เซ็นต์ของ formaldehyde/L เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาทีเมื่อใช้ย้อมครั้งแรก (ควรเพิ่มเป็น 1 ชั่วโมงเมื่อมีการใช้สารละลายเกลือไนโตรเจนซ้ำ) หลังจากนั้นทำ signal detection โดยใช้ developer (3 เปอร์เซ็นต์ของ Na_2SO_3, 1.5 มิลลิลิตรของ 37 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde/L และ 400 ไมโครลิตร ของ 10mg/ml Na2SO3/L) ให้คะแนนแถบโมเลกุลเครื่องหมายที่ปรากฏเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏเท่ากับ 2 โดยให้สัญลักษณ์ของโมเลกุลเครื่องหมายโดยใช้อักษร 4 โดย 2 ตัวแรกแทน selective nucleotide 2 ตัวท้ายของไพรเมอร์ *Eco*RI+3 และ อักษร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2 ตัวถัดมาแทน selective nucleotide 2 ตัวท้ายของไพรเมอร์ *Mse*I+3 และตัวเลขที่ตามหลังแทนลำดับของโมเลกุลเครื่องหมาย

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลกับปริมาณเส้นใยและเส้นผ่าศูนย์กลาง

1. วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) โดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 for windows

2. วิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุ (partial regression coefficient) โดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 for windows

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอพืช ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

2. แปลงทดลอง ต.ดอนเจดีย์ อ.พนมทวน จ.กาญจนบุรี

ระยะเวลาทำการวิจัย

เดือน เมษายน พ.ศ. 2550 - เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

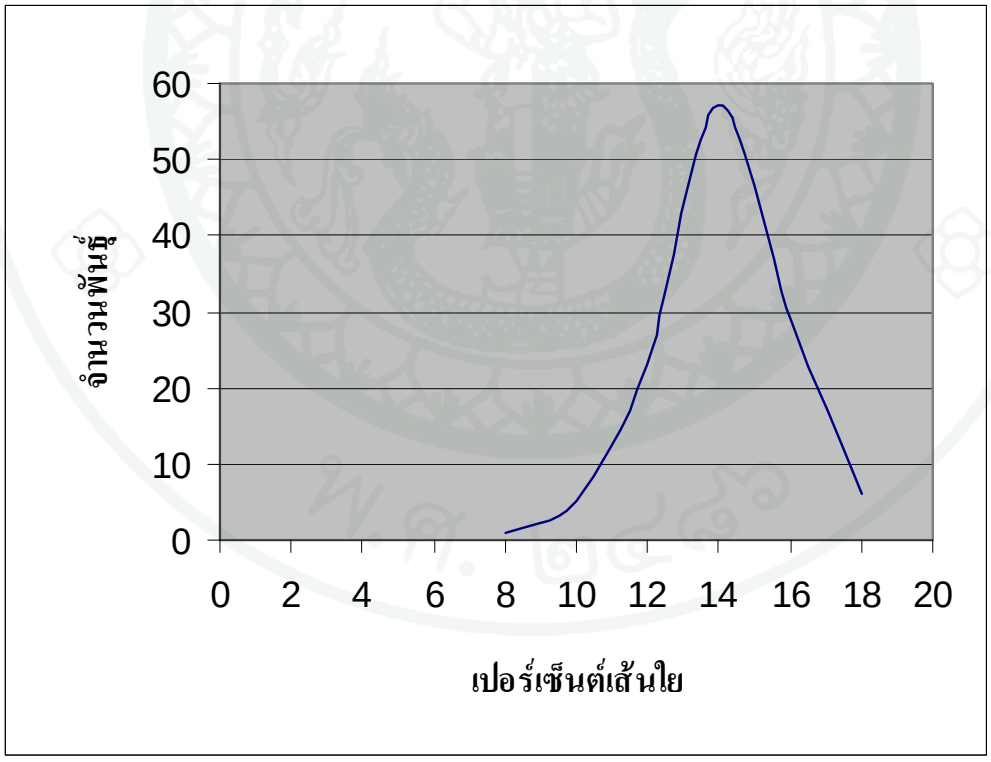
ผลและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance)

วิเคราะห์ข้อมูลปริมาณเส้นใย และ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ ของพันธุ์จำนวน140 สายพันธุ์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ได้ผลดังนี้

<u>ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เส้นใยภายในพันธุ์รวม 140 สายพันธุ์</u>

เมื่อพิจารณาจากการกระจายตัวของ ระดับเปอร์เซ็นต์เส้นใยพบว่าประชากรอ้อยส่วนมากจะมีเปอร์เซ็นต์อยู่ในช่วง 12-16 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อพิจารณา ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ย พบว่าประชากรอ้อยลูกผสมข้างต้นมีค่าเท่ากับ 9.3, 19.13, 14.79 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

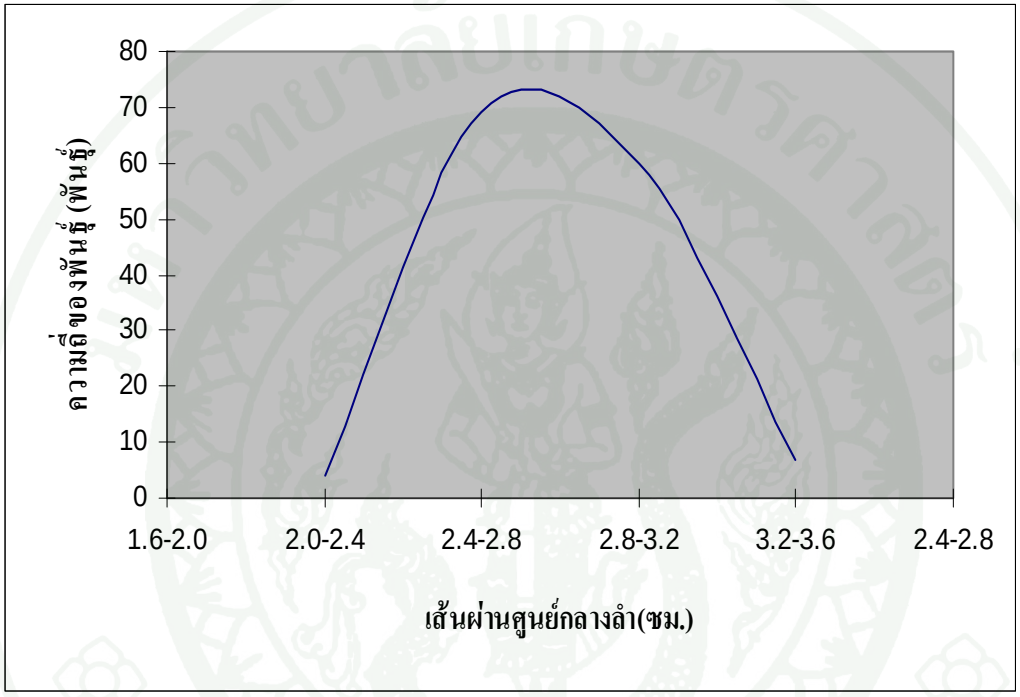


ภาพที่ 1 แสดงการกระจายตัวของปริมาณเส้นใยในพันธุ์รวม 140 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความแปรปรวนของเส้นผ่านศูนย์กลางลำในพันธุ์รวม 140 สายพันธุ์

เมื่อพิจารณาการกระจายตัวของขนาดลำอ้อยพบว่าขนาดของลำอ้อยส่วนมากมีการกระจายตัวในช่วง 2.5-3.0 นอกจากนี้เมื่อพิจารณา ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 2.18, 3.43 และ 2.79 เซนติเมตรตามลำดับ



ภาพที่ 2 แสดงการกระจายตัวของเส้นผ่าศูนย์กลางลำในพันธุ์รวม 140 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่ทดสอบ

เปอร์เซ็นต์เส้นใย

1. เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG

จากตารางที่ 1 พบว่า มีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น polymorphic ของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG เท่ากับ 44 เครื่องหมาย โดยมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก 25 เครื่องหมายโมเลกุล และมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นลบ 19 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นบวกสูงสุด ได้แก่ ctgg20 เท่ากับ 0.1507 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นลบสูงสุด ได้แก่ ctgg43 เท่ากับ -0.1242 โดยได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุด จำนวน 10 เครื่องหมาย ได้แก่ ctgg10, ctgg17, ctgg20, ctgg25, ctgg26, ctgg28, ctgg35, ctgg37, ctgg43 และctgg44 ทั้งนี้แต่ละเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์นี้ มีเปอร์เซ็นต์ของจำนวนพันธุ์ที่มีการปรากฏของเครื่องหมาย ตั้งแต่ 43.57 ถึง 98.57

2. เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT

จากตารางที่ 2 พบว่า มีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น polymorphic ของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT เท่ากับ 36 เครื่องหมาย โดยมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก 21 เครื่องหมายโมเลกุล และมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นลบ 15 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นบวกสูงสุด ได้แก่ ctat12 เท่ากับ 0.1712 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นลบสูงสุด ได้แก่ ctat32 เท่ากับ -0.1587 โดยได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุด จำนวน 10 เครื่องหมาย ได้แก่ ctat7, ctat11, ctat12, ctat13, ctat20, ctat25, ctat30, ctat32, ctat33 และctat35 ทั้งนี้แต่ละเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์นี้ มีเปอร์เซ็นต์ของจำนวนพันธุ์ที่มีการปรากฏของเครื่องหมาย ตั้งแต่ 47.14 ถึง 96.43

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3 เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG

จากตารางที่ 3 พบว่า มีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น polymorphic ของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG เท่ากับ 45 เครื่องหมาย โดยมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก 20 เครื่องหมายโมเลกุล และมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นลบ 25 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นบวกสูงสุด ได้แก่ ccag38 เท่ากับ 0.1881 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นลบสูงสุด ได้แก่ ccag32 เท่ากับ –0.2796 โดยได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุด จำนวน 10 เครื่องหมาย ได้แก่ ccag5, ccag9, ccag10, ccag11, ccag21, ccag23, ccag32, ccag33, ccag38 และ ccag43 ทั้งนี้แต่ละเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์นี้ มีเปอร์เซ็นต์ของจำนวนพันธุ์ที่มีการปรากฏของเครื่องหมาย ตั้งแต่ 47.86 ถึง 94.29

4. เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA

จากตารางที่ 4 พบว่า มีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น polymorphic ของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA เท่ากับ 43 เครื่องหมาย โดยมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก 19 เครื่องหมายโมเลกุล และมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นลบ 24 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นบวกสูงสุด ได้แก่ ctaa19 เท่ากับ 0.1299 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นลบสูงสุด ได้แก่ ctaa34 เท่ากับ –0.2125 โดยได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุด จำนวน 10 เครื่องหมาย ได้แก่ ctaa3. ctaa10, ctaa19, ctaa20, ctaa31, ctaa34, ctaa38, ctaa41, ctaa42 และ ctaa43 ทั้งนี้แต่ละเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์นี้ มีเปอร์เซ็นต์ของจำนวนพันธุ์ที่มีการปรากฏของเครื่องหมาย ตั้งแต่ 47.86 ถึง 99.29

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ที่เป็น polymorphic กับเปอร์เซ็นต์เส้นใย

เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ	เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ
ctgg1	0.0702	73.57	ctgg23	-0.0704	85.00
ctgg2	0.0111	75.00	ctgg24	-0.0548	83.57
ctgg3	0.0127	49.29	ctgg25	0.1287	45.00
ctgg4	0.0433	52.14	ctgg26	0.1330	43.57
ctgg5	-0.0262	14.29	ctgg27	-0.0011	40.72
ctgg6	0.0224	22.14	ctgg28	-0.0912	94.29
ctgg7	-0.0693	96.43	ctgg29	0.0719	74.29
ctgg8	-0.0023	21.43	ctgg30	-0.0122	62.86
ctgg9	0.0664	99.29	ctgg31	0.0859	45.72
ctgg10	-0.1002	82.14	ctgg32	0.0411	47.14
ctgg11	-0.0742	95.72	ctgg33	-0.0098	90.72
ctgg12	-0.0444	42.86	ctgg34	-0.0316	90.72
ctgg13	-0.0701	89.29	ctgg35	-0.1220	89.29
ctgg14	-0.0235	47.14	ctgg36	0.0070	85.72
ctgg15	0.0146	65.00	ctgg37	0.0952	79.29
ctgg16	0.0239	73.57	ctgg38	-0.0896	28.57
ctgg17	0.1277	76.43	ctgg39	-0.0192	68.57
ctgg18	0.0592	71.43	ctgg40	0.0672	61.43
ctgg19	0.0366	58.57	ctgg41	0.0254	53.57
ctgg20	0.1507	98.57	ctgg42	0.0007	91.43
ctgg21	0.0110	58.57	ctgg43	-0.1242	48.57
ctgg22	0.0854	34.29	ctgg44	0.0926	65.71

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ที่เป็น polymorphic กับเปอร์เซ็นต์เส้นใย

เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ	เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ
ctat1	-0.0166	15.72	ctat19	0.0949	98.57
ctat2	0.0077	99.29	ctat20	0.1272	48.57
ctat3	-0.0129	80.72	ctat21	0.0006	93.57
ctat4	-0.0390	40.00	ctat22	-0.1209	60.00
ctat5	0.0886	43.57	ctat23	0.1204	90.72
ctat6	0.0129	20.72	ctat24	0.0422	86.43
ctat7	-0.1397	92.14	ctat25	0.1545	91.43
ctat8	0.1045	50.72	ctat26	0.0189	71.43
ctat9	0.0499	55.72	ctat27	-0.1196	91.43
ctat10	-0.0436	92.29	ctat28	0.0003	95.00
ctat11	-0.1275	96.43	ctat29	-0.0526	82.86
ctat12	0.1712	68.57	ctat30	0.2745	94.29
ctat13	0.1487	78.57	ctat31	-0.0225	70.00
ctat14	0.0617	99.29	ctat32	-0.1587	94.29
ctat15	0.0360	75.00	ctat33	-0.1218	47.14
ctat16	-0.0057	59.29	ctat34	-0.0060	75.00
ctat17	-0.0234	82.86	ctat35	0.1629	82.14
ctat18	0.0852	95.72	ctat36	0.0505	99.29

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ที่เป็น polymorphic กับเปอร์เซ็นต์เส้นใย

เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ	เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ
ccag1	-0.0569	99.29	ccag23	0.1011	79.29
ccag2	-0.0446	92.14	ccag24	-0.0705	90.72
ccag3	-0.0689	82.86	ccag25	0.0998	97.14
ccag4	-0.1036	97.86	ccag26	-0.0572	21.43
ccag5	-0.2317	82.14	ccag27	-0.0811	93.57
ccag6	0.0495	79.29	ccag28	-0.1559	85.72
ccag7	-0.0406	90.00	ccag29	-0.1224	98.57
ccag8	-0.1127	92.86	ccag30	-0.0089	70.00
ccag9	0.1242	85.72	ccag31	-0.1222	97.86
ccag10	-0.1414	60.72	ccag32	-0.2796	94.29
ccag11	-0.1759	90.72	ccag33	0.1292	52.86
ccag12	0.0917	95.72	ccag34	0.0804	90.00
ccag13	-0.0035	80.72	ccag35	0.0369	39.29
ccag14	0.0245	65.72	ccag36	-0.0679	90.00
ccag15	-0.0052	95.00	ccag37	-0.0599	76.43
ccag16	0.0892	50.00	ccag38	0.1881	87.14
ccag17	0.0985	95.00	ccag39	0.0903	72.14
ccag18	-0.0479	70.72	ccag40	0.0411	97.86
ccag19	0.0974	95.72	ccag41	0.0352	95.72
ccag20	-0.0601	96.43	ccag42	0.0077	75.00
ccag21	-0.1394	65.00	ccag43	0.1365	47.86
ccag22	0.0269	66.43	ccag44	-0.0139	62.86
			ccag45	0.0162	72.14

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ที่เป็น polymorphic กับเปอร์เซ็นต์เส้นใย

เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ	เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ
ctaa1	-0.0286	97.14	ctaa23	0.0428	45.00
ctaa2	0.0087	95.00	ctaa24	-0.0549	85.72
ctaa3	-0.2042	60.72	ctaa25	0.0619	67.14
ctaa4	0.0266	70.00	ctaa26	0.0074	85.72
ctaa5	0.0008	94.29	ctaa27	-0.0764	67.86
ctaa6	-0.0260	45.72	ctaa28	-0.0525	82.14
ctaa7	-0.1147	76.43	ctaa29	-0.0058	81.43
ctaa8	0.0261	86.43	ctaa30	-0.0122	62.86
ctaa9	0.0367	88.57	ctaa31	0.0844	57.86
ctaa10	0.1241	47.86	ctaa32	0.0507	72.14
ctaa11	-0.0603	87.86	ctaa33	0.0578	97.86
ctaa12	-0.0126	90.00	ctaa34	-0.2125	82.14
ctaa13	-0.0409	97.14	ctaa35	-0.1115	88.57
ctaa14	-0.0759	84.29	ctaa36	-0.0627	75.00
ctaa15	-0.0679	70.00	ctaa37	-0.0627	90.72
ctaa16	0.0142	97.86	ctaa38	-0.1237	94.29
ctaa17	0.0516	80.00	ctaa39	-0.0627	90.72
ctaa18	0.0131	73.57	ctaa40	0.0226	77.14
ctaa19	0.1299	69.29	ctaa41	-0.1452	67.86
ctaa20	0.0650	73.57	ctaa42	-0.1587	97.86
ctaa21	-0.0253	78.57	ctaa43	0.0659	99.29
ctaa22	-0.0565	89.29			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<u>เส้นผ่านศูนย์กลางลำ</u>

1. เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG

จากตารางที่ 5 พบว่า มีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น polymorphic ของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG เท่ากับ 44 เครื่องหมาย โดยมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก 19 เครื่องหมายโมเลกุล และมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นลบ 25 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นบวกสูงสุด ได้แก่ ctgg28 เท่ากับ 0.1905 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นลบสูงสุด ได้แก่ ctgg42 เท่ากับ -0.1609 โดยได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุด จำนวน 10 เครื่องหมาย ได้แก่ ctgg3, ctgg5, ctgg6, ctgg7, ctgg11, ctgg12, ctgg13, ctgg21, ctgg28 และctgg42 ทั้งนี้แต่ละเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์นี้ มีเปอร์เซ็นต์ของจำนวนพันธุ์ที่มีการปรากฏของเครื่องหมาย ตั้งแต่ 14.29 ถึง 96.43

2. เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT

จากตารางที่ 6 พบว่า มีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น polymorphic ของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT เท่ากับ 36 เครื่องหมาย โดยมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก 21 เครื่องหมายโมเลกุล และมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นลบ 15 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นบวกสูงสุด ได้แก่ ctat24 เท่ากับ 0.2433 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นลบสูงสุด ได้แก่ ctat17 เท่ากับ -0.9656 โดยได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุด จำนวน 10 เครื่องหมาย ได้แก่ ctat11, ctat17, ctat19, ctat21, ctat23, ctat24, ctat25, ctat27, ctat32 และctat35 ทั้งนี้แต่ละเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์นี้ มีเปอร์เซ็นต์ของจำนวนพันธุ์ที่มีการปรากฏของเครื่องหมาย ตั้งแต่ 82.14 ถึง 96.43

3. เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG

จากตารางที่ 7 พบว่า มีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น polymorphic ของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG เท่ากับ 45 เครื่องหมาย โดยมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก 16 เครื่องหมายโมเลกุล และมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นลบ 29

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นบวกสูงสุด ได้แก่ ccag5 เท่ากับ 0.1236 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นลบสูงสุด ได้แก่ ccag14 เท่ากับ –0.2243 โดยได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุด จำนวน 10 เครื่องหมาย ได้แก่ ccag3, ccag4, ccag5, ccag6, ccag14, ccag16, ccag23, ccag27, ccag34 และ ccag43 ทั้งนี้แต่ละเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์นี้ มีเปอร์เซ็นต์ของจำนวนพันธุ์ที่มีการปรากฏของเครื่องหมาย ตั้งแต่ 47.86 ถึง 97.86

4. เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA

จากตารางที่ 8 พบว่า มีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น polymorphic ของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA เท่ากับ 43 เครื่องหมาย โดยมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก 16 เครื่องหมายโมเลกุล และมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นลบ 27 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นบวกสูงสุด ได้แก่ ctaa42 เท่ากับ 0.1914 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็นลบสูงสุด ได้แก่ ctaa9 เท่ากับ –0.2156 โดยได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุด จำนวน 10 เครื่องหมาย ได้แก่ ctaa6. ctaa9, ctaa11, ctaa16, ctaa23, ctaa24, ctaa30, ctaa31, ctaa36 และ ctaa42 ทั้งนี้แต่ละเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์นี้ มีเปอร์เซ็นต์ของจำนวนพันธุ์ที่มีการปรากฏของเครื่องหมาย ตั้งแต่ 45.00 ถึง 97.86

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ที่เป็น polymorphic กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ	เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ
ctgg1	-0.0512	73.57	ctgg23	-0.0159	85.00
ctgg2	-0.0240	75.00	ctgg24	0.0025	83.57
ctgg3	-0.1047	49.29	ctgg25	-0.0552	45.00
ctgg4	-0.0202	52.14	ctgg26	-0.0586	43.57
ctgg5	-0.1476	14.29	ctgg27	0.0211	40.72
ctgg6	-0.1098	22.14	ctgg28	0.1905	94.29
ctgg7	0.1552	96.43	ctgg29	0.0073	74.29
ctgg8	0.0292	21.43	ctgg30	-0.0164	62.86
ctgg9	-0.0309	99.29	ctgg31	-0.0475	45.72
ctgg10	0.0247	82.14	ctgg32	0.0651	47.14
ctgg11	0.1384	95.72	ctgg33	0.0124	90.72
ctgg12	-0.1153	42.86	ctgg34	0.0087	90.72
ctgg13	0.1690	89.29	ctgg35	0.0568	89.29
ctgg14	-0.0427	47.14	ctgg36	0.0072	85.72
ctgg15	-0.0929	65.00	ctgg37	0.0091	79.29
ctgg16	-0.0338	73.57	ctgg38	-0.0047	28.57
ctgg17	-0.0716	76.43	ctgg39	0.0164	68.57
ctgg18	-0.0722	71.43	ctgg40	-0.0144	61.43
ctgg19	0.0454	58.57	ctgg41	-0.0590	53.57
ctgg20	-0.0669	98.57	ctgg42	-0.1609	91.43
ctgg21	0.1819	58.57	ctgg43	-0.0616	48.57
ctgg22	0.0694	34.29	ctgg44	-0.0767	65.71

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ที่เป็น polymorphic กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ	เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ
ctat1	0.0135	15.72	ctat19	-0.0897	98.57
ctat2	0.1065	99.29	ctat20	-0.0323	48.57
ctat3	-0.0641	80.72	ctat21	-0.0963	93.57
ctat4	-0.0418	40.00	ctat22	0.1203	60.00
ctat5	-0.0266	43.57	ctat23	-0.1335	90.72
ctat6	0.0150	20.72	ctat24	0.2433	86.43
ctat7	0.0391	92.14	ctat25	0.1322	91.43
ctat8	-0.0076	50.72	ctat26	0.0974	71.43
ctat9	-0.0012	55.72	ctat27	0.2164	91.43
ctat10	0.0094	92.29	ctat28	0.1175	95.00
ctat11	0.1252	96.43	ctat29	0.1241	82.86
ctat12	-0.0149	68.57	ctat30	-0.0446	94.29
ctat13	0.1081	78.57	ctat31	0.0298	70.00
ctat14	0.0142	99.29	ctat32	0.1896	94.29
ctat15	0.0386	75.00	ctat33	0.0511	47.14
ctat16	0.1158	59.29	ctat34	0.0823	75.00
ctat17	-0.9656	82.86	ctat35	-0.1135	82.14
ctat18	-0.0694	95.72	ctat36	-0.0722	99.29

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ที่เป็น polymorphic กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ	เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ
ccag1	-0.1038	99.29	ccag23	0.0794	79.29
ccag2	-0.0777	92.14	ccag24	-0.0399	90.72
ccag3	-0.1725	82.86	ccag25	-0.0635	97.14
ccag4	-0.1541	97.86	ccag26	-0.0968	21.43
ccag5	0.1236	82.14	ccag27	0.0940	93.57
ccag6	0.0738	79.29	ccag28	0.0076	85.72
ccag7	0.0615	90.00	ccag29	-0.0232	98.57
ccag8	0.0202	92.86	ccag30	0.0146	70.00
ccag9	0.0618	85.72	ccag31	0.0209	97.86
ccag10	-0.1020	60.72	ccag32	-0.0476	94.29
ccag11	-0.0156	90.72	ccag33	-0.0409	52.86
ccag12	-0.0396	95.72	ccag34	-0.1603	90.00
ccag13	-0.0002	80.72	ccag35	0.0609	39.29
ccag14	-0.2243	65.72	ccag36	-0.0195	90.00
ccag15	-0.0393	95.00	ccag37	0.0373	76.43
ccag16	-0.1144	50.00	ccag38	0.0267	87.14
ccag17	-0.1823	95.00	ccag39	-0.0383	72.14
ccag18	-0.0223	70.72	ccag40	-0.1086	97.86
ccag19	-0.0484	95.72	ccag41	-0.0987	95.72
ccag20	-0.0259	96.43	ccag42	-0.0873	75.00
ccag21	0.0352	65.00	ccag43	0.0696	47.86
ccag22	0.0184	66.43	ccag44	-0.0845	62.86
			ccag45	-0.1025	72.14

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ที่เป็น polymorphic กับเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ	เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์	เปอร์เซ็นต์การปรากฏ
ctaa1	-0.0029	97.14	ctaa23	0.0992	45.00
ctaa2	0.0867	95.00	ctaa24	0.0994	85.72
ctaa3	-0.0072	60.72	ctaa25	-0.0338	67.14
ctaa4	0.0469	70.00	ctaa26	-0.0138	85.72
ctaa5	-0.0595	94.29	ctaa27	-0.0398	67.86
ctaa6	-0.0886	45.72	ctaa28	-0.0488	82.14
ctaa7	0.0169	76.43	ctaa29	-0.0412	81.43
ctaa8	-0.0545	86.43	ctaa30	0.1075	62.86
ctaa9	-0.2156	88.57	ctaa31	-0.1244	57.86
ctaa10	0.0603	47.86	ctaa32	-0.0409	72.14
ctaa11	-0.1467	87.86	ctaa33	-0.0312	97.86
ctaa12	-0.0859	90.00	ctaa34	-0.0845	82.14
ctaa13	0.0116	97.14	ctaa35	-0.0029	88.57
ctaa14	0.0456	84.29	ctaa36	-0.0899	75.00
ctaa15	0.0733	70.00	ctaa37	0.0701	90.72
ctaa16	0.1376	97.86	ctaa38	-0.0496	94.29
ctaa17	-0.0856	80.00	ctaa39	-0.0361	90.72
ctaa18	0.0490	73.57	ctaa40	-0.0082	77.14
ctaa19	-0.0107	69.29	ctaa41	0.0595	67.86
ctaa20	-0.0135	73.57	ctaa42	0.1914	97.86
ctaa21	-0.0851	78.57	ctaa43	0.0197	99.29
ctaa22	-0.0478	89.29			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') จากการคำนวณ multiple regression

เปอร์เซ็นต์เส้นใย

1. คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง 10 เครื่องหมายของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG มาคำนวณ multiple regression โดยมีจำนวนเครื่องหมายตั้งแต่ 10 เครื่องหมาย จนถึงมีเพียง 1 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 9) พบว่า เมื่อคำนวณโดยใช้ 10 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.144 และเมื่อคำนวณโดยใช้ 1 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.0230 โดยมีค่าเฉลี่ย R^2 ต่อการเพิ่ม 1 เครื่องหมายโมเลกุล ตั้งแต่ 0.0114 เมื่อคำนวณจาก 10 เครื่องหมายโมเลกุล ถึง 0.0230 เมื่อคำนวณจาก 1 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้ค่าเฉลี่ย R^2 มีค่าลดลงอย่างชัดเจน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลตั้งแต่ 5 และ 7 เครื่องหมายโมเลกุลขึ้นไป ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเหมาะสมของจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG พบว่ามีความเหมาะสมเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล 4 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.083 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0208

2. คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง 10 เครื่องหมายของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT มาคำนวณ multiple regression โดยมีจำนวนเครื่องหมายตั้งแต่ 10 เครื่องหมาย จนถึงมีเพียง 1 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 10) พบว่า เมื่อคำนวณโดยใช้ 10 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.152 และเมื่อคำนวณโดยใช้ 1 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.016 โดยมีค่าเฉลี่ย R^2 ต่อการเพิ่ม 1 เครื่องหมายโมเลกุล ตั้งแต่ 0.0130 เมื่อคำนวณจาก 3 เครื่องหมายโมเลกุล ถึง 0.0170 เมื่อคำนวณจาก 2 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้ค่าเฉลี่ย R^2 มีค่าลดลงอย่างชัดเจน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลตั้งแต่ 3 เครื่องหมายโมเลกุลขึ้นไป แต่มีค่าเฉลี่ย R^2 สูงขึ้น เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลตั้งแต่ 9 เครื่องหมายโมเลกุลขึ้นไป ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเหมาะสมของจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT พบว่ามีความเหมาะสมเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.034 และมีค่าเฉลี่ย R^2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เท่ากับ 0.0170 หรือใช้เครื่องหมายโมเลกุล 9 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.146 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0162

3. คู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง 10 เครื่องหมายของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG มาคำนวณ multiple regression โดยมีจำนวนเครื่องหมายตั้งแต่ 10 เครื่องหมาย จนถึงมีเพียง 1 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 11) พบว่า เมื่อคำนวณโดยใช้ 10 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.160 และเมื่อคำนวณโดยใช้ 1 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.078 โดยมีค่าเฉลี่ย R^2 ต่อการเพิ่ม 1 เครื่องหมายโมเลกุล ตั้งแต่ 0.0160 เมื่อคำนวณจาก 10 เครื่องหมายโมเลกุล ถึง 0.0780 เมื่อคำนวณจาก 1 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้ค่าเฉลี่ย R^2 มีค่าลดลงอย่างชัดเจน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลตั้งแต่ 2 และ 3 เครื่องหมายโมเลกุลขึ้นไป ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเหมาะสมของจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG พบว่ามีความเหมาะสมเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล 1 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.078 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0780 หรือใช้เครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.100 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0500

4. คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง 10 เครื่องหมายของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA มาคำนวณ multiple regression โดยมีจำนวนเครื่องหมายตั้งแต่ 10 เครื่องหมาย จนถึงมีเพียง 1 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 12) พบว่า เมื่อคำนวณโดยใช้ 10 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.157 และเมื่อคำนวณโดยใช้ 1 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.025 โดยมีค่าเฉลี่ย R^2 ต่อการเพิ่ม 1 เครื่องหมายโมเลกุล ตั้งแต่ 0.0157 เมื่อคำนวณจาก 10 เครื่องหมายโมเลกุล ถึง 0.0256 เมื่อคำนวณจาก 3 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้ค่าเฉลี่ย R^2 มีค่าลดลงอย่างชัดเจน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลตั้งแต่ 9 เครื่องหมายโมเลกุลขึ้นไป แต่ค่าเฉลี่ย R^2 มีค่าใกล้เคียงกันเมื่อมีเครื่องหมายโมเลกุล 1 ถึง 8 เครื่องหมาย โดยมีทั้งค่าเฉลี่ย R^2 เพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อเพิ่มจำนวนเครื่องหมายโมเลกุล ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเหมาะสมของจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA พบว่ามีความเหมาะสมเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล 1 ถึง 8 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 ที่เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกันตามจำนวนเครื่องหมายโมเลกุล และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0195 ถึง 0.0256

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการพิจารณาค่า R^2 และค่า R^2 เฉลี่ยของคู่ไพรเมอร์ต่างๆ ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใย พบว่า เมื่อมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลจำนวนน้อย คู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ให้ค่า R^2 เฉลี่ยสูงสุด แตกต่างจากคู่ไพรเมอร์อื่นอย่างชัดเจน รองลงมาได้แก่ คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA และคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG แต่เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลจำนวนมาก พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลจากคู่ไพรเมอร์ต่างๆ ให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ที่มีค่า R^2 ที่ต่ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ต่อเปอร์เซ็นต์เส้นใย

เครื่องหมายโมเลกุล	จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ctgg20	2.312	2.238	1.979	1.757	1.661	1.536	1.532	1.496	1.524	1.524
ctgg35		-0.668	-0.851	-1.258	-1.156	-1.214	-1.259	-1.288	-1.232	-1.160
ctgg25			0.564	0.501	0.515	0.535	1.033	0.823	0.920	0.855
ctgg17				0.753	0.792	0.631	0.647	0.601	0.599	0.606
ctgg10					-0.510	-0.615	-0.607	-0.610	-0.561	-0.551
ctgg37						0.449	0.454	0.485	0.411	0.397
ctgg26							-0.502	-0.322	-0.408	-0.337
ctgg44								0.329	0.313	0.307
ctgg43									-0.287	-0.290
ctgg28										-0.151
ค่า R^2	0.023	0.036	0.058	0.083	0.093	0.100	0.101	0.108	0.114	0.114
ค่า R^2 ต่อเครื่องหมาย	0.0230	0.0180	0.0193	0.0208	0.0186	0.0177	0.0144	0.0135	0.0127	0.0114

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression ($b^{/}$) ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ต่อเปอร์เซ็นต์เส้นใย

เครื่องหมายโมเลกุล	จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ctat11	-1.240	-1.165	-1.157	-1.083	-1.307	-1.165	-1.203	-0.897	-1.200	-1.157
ctat25		0.915	0.826	0.825	0.794	1.020	0.931	0.903	1.007	1.024
ctat19			1.070	1.144	1.194	1.014	0.609	1.097	1.274	1.121
ctat23				0.744	0.642	0.565	0.529	0.512	0.689	0.791
ctat22					-0.515	-0.489	-0.485	-0.481	-0.595	-0.530
ctat7						-0.975	-0.917	-0.714	-0.687	-0.680
ctat35							0.527	0.480	0.584	0.632
ctat32								-0.915	-0.774	-0.649
ctat8									0.710	0.616
ctat33										-0.316
ค่า R^2	0.016	0.034	0.039	0.053	0.071	0.091	0.102	0.113	0.146	0.152
ค่า R^2 ต่อเครื่องหมาย	0.0160	0.0170	0.0130	0.0133	0.0142	0.0152	0.0146	0.0141	0.0162	0.0152

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ต่อเปอร์เซ็นต์เส้นใย

เครื่องหมายโมเลกุล	จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ccag32	-2.067	-1.954	-1.857	-1.853	-1.520	-1.678	-1.594	-1.584	-1.528	-1.536
ccag38		0.796	0.711	0.766	0.990	0.989	0.948	0.896	0.890	0.877
ccag13			-0.728	-0.736	-0.815	-0.843	-0.746	-0.749	-0.748	-0.746
ccag21				-0.549	-0.616	-0.622	-0.640	-0.643	-0.642	-0.643
ccag33					0.534	0.536	0.564	0.577	0.577	0.566
ccag29						0.653	0.559	0.566	0.539	0.552
ccag10							-0.195	-0.177	-0.179	-0.159
ccag9								0.110	0.102	0.108
ccag28									-0.079	-0.082
ccag43										0.022
ค่า R^2	0.078	0.100	0.116	0.138	0.156	0.158	0.160	0.160	0.160	0.160
ค่า R^2 ต่อเครื่องหมาย	0.0780	0.0500	0.0387	0.0345	0.0312	0.0263	0.0229	0.0200	0.0178	0.0160

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression ($b^{/}$) ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ต่อเปอร์เซ็นต์เส้นใย

เครื่องหมายโมเลกุล	จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ctaa42	-1.820	-1.884	-1.765	-1.499	-1.417	-1.351	-1.202	-1.225	-1.102	-1.103
ctaa38		-0.932	-0.778	-0.700	-0.819	-1.057	-1.028	-0.896	-0.824	-0.828
ctaa34			-0.844	-0.771	-0.661	-0.541	-0.662	-0.593	-0.627	-0.650
ctaa3				-0.495	-0.481	-0.695	-0.606	-0.623	-0.620	-0.624
ctaa41					-0.371	-0.481	-0.542	-0.582	-0.595	-0.559
ctaa10						0.763	0.607	0.573	0.551	0.542
ctaa19							0.422	0.430	0.383	0.348
ctaa35								-0.364	-0.351	-0.332
ctaa7									-0.166	-0.165
ctaa31										0.097
ค่า R^2	0.025	0.042	0.077	0.095	0.104	0.142	0.152	0.156	0.157	0.157
ค่า R^2 ต่อเครื่องหมาย	0.0250	0.0210	0.0256	0.0238	0.0208	0.0237	0.0217	0.0195	0.0174	0.0157

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<u>เส้นผ่านศูนย์กลางลำ</u>

1. คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง 10 เครื่องหมายของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG มาคำนวณ multiple regression โดยมีจำนวนเครื่องหมายตั้งแต่ 10 เครื่องหมาย จนถึงมีเพียง 1 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 13) พบว่า เมื่อคำนวณโดยใช้ 10 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.165 และเมื่อคำนวณโดยใช้ 1 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.033 โดยมีค่าเฉลี่ย R^2 ต่อการเพิ่ม 1 เครื่องหมายโมเลกุล ตั้งแต่ 0.0165 เมื่อคำนวณจาก 10 เครื่องหมายโมเลกุล ถึง 0.0360 เมื่อคำนวณจาก 4 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้ค่าเฉลี่ย R^2 มีค่าสูงใกล้เคียงกัน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 1 ถึง 4 เครื่องหมายโมเลกุล แต่มีค่าเฉลี่ย R^2 ลดลงอย่างชัดเจน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 5 และ 8 เครื่องหมายโมเลกุล ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเหมาะสมของจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG พบว่ามีความเหมาะสมเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล 4 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.114 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0360

2. คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง 10 เครื่องหมายของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT มาคำนวณ multiple regression โดยมีจำนวนเครื่องหมายตั้งแต่ 10 เครื่องหมาย จนถึงมีเพียง 1 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 14) พบว่า เมื่อคำนวณโดยใช้ 10 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.167 และเมื่อคำนวณโดยใช้ 1 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.059 โดยมีค่าเฉลี่ย R^2 ต่อการเพิ่ม 1 เครื่องหมายโมเลกุล ตั้งแต่ 0.0167 เมื่อคำนวณจาก 10 เครื่องหมายโมเลกุล ถึง 0.0590 เมื่อคำนวณจาก 1 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้ค่าเฉลี่ย R^2 มีค่าลดลงอย่างชัดเจน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 2 และ 3 เครื่องหมายโมเลกุล ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเหมาะสมของจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT พบว่ามีความเหมาะสมเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล 1 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.059 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0590 หรือใช้เครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.080 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0400

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. คู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง 10 เครื่องหมายของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG มาคำนวณ multiple regression โดยมีจำนวนเครื่องหมายตั้งแต่ 10 เครื่องหมาย จนถึงมีเพียง 1 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 15) พบว่า เมื่อคำนวณโดยใช้ 10 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.215 และเมื่อคำนวณโดยใช้ 1 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.033 โดยมีค่าเฉลี่ย R^2 ต่อการเพิ่ม 1 เครื่องหมายโมเลกุล ตั้งแต่ 0.0215 เมื่อคำนวณจาก 10 เครื่องหมายโมเลกุล ถึง 0.0403 เมื่อคำนวณจาก 4 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้ค่าเฉลี่ย R^2 มีค่าลดลงอย่างชัดเจน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 1 และ 4 เครื่องหมายโมเลกุล และมีค่าเฉลี่ย R^2 ลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมากขึ้น ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเหมาะสมของจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG พบว่ามีความเหมาะสมเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล 4 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.171 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0438 หรือใช้เครื่องหมายโมเลกุล 3 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.121 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0403

4. คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง 10 เครื่องหมายของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA มาคำนวณ multiple regression โดยมีจำนวนเครื่องหมายตั้งแต่ 10 เครื่องหมาย จนถึงมีเพียง 1 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 16) พบว่า เมื่อคำนวณโดยใช้ 10 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.139 และเมื่อคำนวณโดยใช้ 1 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.047 โดยมีค่าเฉลี่ย R^2 ต่อการเพิ่ม 1 เครื่องหมายโมเลกุล ตั้งแต่ 0.0139 เมื่อคำนวณจาก 10 เครื่องหมายโมเลกุล ถึง 0.0470 เมื่อคำนวณจาก 1 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้ค่าเฉลี่ย R^2 มีค่าลดลงอย่างชัดเจน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 2 และ 5 เครื่องหมายโมเลกุล ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเหมาะสมของจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA พบว่ามีความเหมาะสมเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล 1 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.047 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0470 หรือใช้เครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.078 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0390

จากการพิจารณาค่า R^2 และค่า R^2 เฉลี่ยของคู่ไพรเมอร์ต่างๆ ในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ พบว่า เมื่อมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลจำนวนน้อย คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT และคู่ไพร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมอร์ E-ACT และ M-CAA ให้ค่า R^2 เฉลี่ยที่สูง โดยที่คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG และคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG มีค่าที่ต่ำกว่าและมีค่าที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลจำนวนมาก พบว่าคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG มีค่าสูงสุด รองลงมาได้แก่ คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT และคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG โดยที่คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA มีค่า R^2 และค่า R^2 เฉลี่ยที่ต่ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

เครื่องหมายโมเลกุล	จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ctgg21	0.087	0.091	0.122	0.106	0.101	0.104	0.105	0.107	0.108	0.106
ctgg42		-0.143	-0.138	-0.127	-0.126	-0.148	-0.148	-0.148	-0.134	-0.132
ctgg6			-0.129	-0.132	-0.128	-0.101	-0.101	-0.103	-0.116	-0.093
ctgg28				0.149	0.127	0.118	0.129	0.130	0.142	0.134
ctgg13					0.086	0.104	0.109	0.094	0.082	0.078
ctgg12						-0.075	-0.075	-0.077	-0.070	-0.067
ctgg7							-0.026	-0.068	-0.072	-0.083
ctgg11								0.065	0.092	0.110
ctgg3									-0.055	-0.057
ctgg5										-0.051
ค่า R^2	0.033	0.062	0.093	0.114	0.126	0.147	0.148	0.149	0.161	0.165
ค่า R^2 ต่อเครื่องหมาย	0.0330	0.0310	0.0310	0.0360	0.0252	0.0245	0.0211	0.0186	0.0179	0.0165

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression ($b^{/}$) ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

เครื่องหมายโมเลกุล	จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ctat24	0.169	0.176	0.144	0.150	0.143	0.129	0.129	0.120	0.120	0.075
ctat11		0.185	0.166	0.198	0.219	0.203	0.188	0.165	0.160	0.154
ctat27			0.117	0.112	0.106	0.126	0.122	0.115	0.123	0.139
ctat22				0.072	0.086	0.078	0.069	0.067	0.066	0.064
ctat29					0.090	0.083	0.097	0.093	0.096	0.100
ctat23						-0.079	-0.094	-0.092	-0.091	-0.100
ctat16							0.063	0.065	0.066	0.068
ctat32								0.058	0.065	0.073
ctat28									-0.026	-0.020
ctat25										0.065
ค่า R^2	0.059	0.080	0.097	0.119	0.138	0.146	0.162	0.164	0.164	0.167
ค่า R^2 ต่อเครื่องหมาย	0.0590	0.0400	0.0323	0.0298	0.0276	0.0243	0.0231	0.0205	0.0182	0.0167

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 15 ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

เครื่องหมายโมเลกุล	จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ccag17	-0.191	-0.198	-0.246	-0.249	-0.232	-0.221	-0.204	-0.205	-0.203	-0.191
ccag4		-0.254	-0.219	-0.332	-0.330	-0.350	-0.346	-0.360	-0.343	-0.343
ccag14			-0.125	-0.144	-0.148	-0.148	-0.149	-0.150	-0.141	-0.140
ccag5				0.143	0.140	0.140	0.144	0.144	0.139	0.139
ccag40					-0.141	-0.164	-0.205	-0.205	-0.210	-0.210
ccag45						-0.063	-0.067	-0.067	-0.069	-0.068
ccag16							-0.062	-0.063	-0.059	-0.059
ccag1								0.044	0.060	0.074
ccag3									-0.046	-0.047
ccag34										-0.014
ค่า R^2	0.033	0.059	0.121	0.171	0.179	0.193	0.209	0.209	0.214	0.215
ค่า R^2 ต่อเครื่องหมาย	0.0330	0.0295	0.0403	0.0438	0.0358	0.0322	0.0299	0.0261	0.0238	0.0215

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 16 ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

เครื่องหมายโมเลกุล	จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ctaa9	-0.152	-0.144	-0.151	-0.155	-0.153	-0.153	-0.148	-0.145	-0.141	-0.145
ctaa42		0.274	0.276	0.263	0.241	0.228	0.203	0.204	0.207	0.207
ctaa36			-0.059	-0.099	-0.096	-0.086	-0.085	-0.087	-0.084	-0.084
ctaa31				-0.091	-0.089	-0.087	-0.090	-0.080	-0.077	-0.078
ctaa16					0.072	0.087	0.099	0.103	0.103	0.103
ctaa24						0.045	0.046	0.048	0.055	0.055
ctaa30							0.036	0.040	0.031	0.032
ctaa6								-0.035	-0.033	-0.033
ctaa23									0.023	0.023
ctaa11										0.007
ค่า R^2	0.047	0.078	0.091	0.121	0.123	0.127	0.133	0.137	0.139	0.139
ค่า R^2 ต่อเครื่องหมาย	0.0470	0.0390	0.0303	0.0303	0.0246	0.0212	0.0190	0.0171	0.0154	0.0139

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') จากการคำนวณ multiple regression ของรวม 4 คู่ไพรเมอร์

เปอร์เซ็นต์เส้นใย

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง 10 เครื่องหมายจาก 40 เครื่องหมายของคู่ไพรเมอร์ 4 คู่ มาคำนวณ multiple regression (ตารางที่ 17) พบว่า เมื่อคำนวณโดยใช้ 10 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.383 และเมื่อคำนวณโดยใช้ 1 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.078 โดยมีค่าเฉลี่ย R^2 ต่อการเพิ่ม 1 เครื่องหมายโมเลกุล ตั้งแต่ 0.0383 เมื่อคำนวณจาก 10 เครื่องหมายโมเลกุล ถึง 0.0780 เมื่อคำนวณจาก 1 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้ค่าเฉลี่ย R^2 มีค่าลดลงอย่างชัดเจน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมายโมเลกุล แต่มีค่าเฉลี่ย R^2 สูงขึ้นเมื่อมีเครื่องหมายโมเลกุล 4 เครื่องหมาย และมีค่าเฉลี่ย R^2 ลดลงเมื่อมีจำนวนเครื่องหมายมากกว่า 4 เครื่องหมาย ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเหมาะสมของจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใย พบว่ามีความเหมาะสมเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล 1 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.078 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0708 และใช้เครื่องหมายโมเลกุล 4 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.250 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0625 โดยสมการ multiple regression ดังนี้

เปอร์เซ็นต์เส้นใย = -2.078ctag32 + 16.940

หรือ เปอร์เซ็นต์เส้นใย = -2.700ctag32 + 2.185ctgg20 +1.285ctgg17 +0.879ctaa31 + 12.584

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 17 ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression ($b^{/}$) ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของ 4 คู่ไพรเมอร์ ต่อเปอร์เซ็นต์เส้นใย

เครื่องหมายโมเลกุล	จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ctat32	-2.078	-2.056	-2.191	-2.700	-2.531	-2.194	-2.132	-2.041	-1.987	-2.124
ctgg20		2.220	1.981	2.185	2.502	2.284	2.298	2.292	1.931	1.902
ctgg17			0.830	1.285	1.241	1.377	1.433	1.403	1.208	1.236
ctaa31				0.879	0.880	1.135	1.148	1.115	1.077	1.056
ctag10					-0.570	-0.818	-0.757	-0.751	-0.945	-0.976
ctag33						0.824	0.861	0.840	1.023	1.063
ccat25							0.868	0.766	1.115	1.148
ctaa42								-0.733	-1.127	-1.082
ctgg25									0.888	0.937
ccat19										0.679
ค่า R^2	0.078	0.103	0.140	0.250	0.274	0.313	0.326	0.330	0.383	0.383
ค่า R^2 ต่อเครื่องหมาย	0.0780	0.0515	0.0467	0.0625	0.0548	0.0522	0.0466	0.0413	0.0426	0.0383

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<u>เส้นผ่านศูนย์กลางลำ</u>

จากการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูง 10 เครื่องหมายจาก 40 เครื่องหมายของคู่ไพรเมอร์ 4 คู่ มาคำนวณ multiple regression (ตารางที่ 18) พบว่า เมื่อคำนวณโดยใช้ 10 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.293 และเมื่อคำนวณโดยใช้ 1 เครื่องหมายโมเลกุล มีค่า R^2 เท่ากับ 0.047 โดยมีค่าเฉลี่ย R^2 ต่อการเพิ่ม 1 เครื่องหมายโมเลกุล ตั้งแต่ 0.0242 เมื่อคำนวณจาก 6 เครื่องหมายโมเลกุล ถึง 0.0495 เมื่อคำนวณจาก 2 เครื่องหมายโมเลกุล ทั้งนี้ค่าเฉลี่ย R^2 มีค่าสูงใกล้เคียงกัน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลตั้งแต่ 1 ถึง 3 เครื่องหมายโมเลกุล และมีค่าเฉลี่ย R^2 ลดลงอย่างชัดเจน เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลเท่ากับ 4 เครื่องหมาย ทั้งนี้เมื่อมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลมากขึ้น มีค่าเฉลี่ย R^2 ที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน ดังนั้นเมื่อพิจารณาความเหมาะสมของจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG พบว่ามีความเหมาะสมเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 สูงเท่ากับ 0.099 และมีค่าเฉลี่ย R^2 เท่ากับ 0.0495

เส้นผ่าศูนย์กลางลำ = 0.260ccat27 + -0.313ctag4 + 2.835

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 18 ค่า coefficient of determination (R^2) และค่า partial regression (b') ของสมการถดถอยที่มีจำนวนตัวแปรต่างๆ ของเครื่องหมายโมเลกุลของ 4 คู่ไพรเมอร์ ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

เครื่องหมายโมเลกุล	จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ccat27	0.183	0.260	0.260	0.255	0.353	0.366	0.462	0.466	0.448	0.426
ctag4		-0.313	-0.314	-0.318	-0.354	-0.399	-0.426	-0.413	-0.396	-0.385
ctaa9			-0.136	-0.142	-0.145	-0.145	-0.207	-0.206	-0.195	-0.153
ctag40				-0.163	-0.167	-0.166	-0.229	-0.212	-0.309	-0.284
ccat28					-0.135	-0.144	-0.228	-0.214	-0.216	-0.189
ctag1						0.120	0.251	0.252	0.239	0.228
ctag14							-0.166	-0.163	-0.155	-0.154
ccat25								0.153	0.162	0.166
ctgg13									0.163	0.168
ctat17										-0.084
ค่า R^2	0.047	0.099	0.123	0.135	0.144	0.145	0.239	0.271	0.289	0.293
ค่า R^2 ต่อเครื่องหมาย	0.0470	0.0495	0.0410	0.0338	0.0288	0.0242	0.0341	0.0339	0.0321	0.0293

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความสอดคล้องของเครื่องหมายโมเลกุลของแต่ละคู่ไพรเมอร์ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

แต่ละคู่ไพรเมอร์

1. คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG

จากตารางที่ 21 พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ที่นำมาใช้พิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่าศูนย์กลางลำ มีเพียง 1 เครื่องหมาย ได้แก่ ctgg28

2. คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT

จากตารางที่ 22 พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ที่นำมาใช้พิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่าศูนย์กลางลำ มีถึง 5 เครื่องหมาย ได้แก่ ctat11, ctat22, ctat23, ctat25 และ ctat 32

3. คู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG

จากตารางที่ 23 ไม่พบเครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ที่นำมาใช้พิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่าศูนย์กลางลำ

4. คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA

จากตารางที่ 24 พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ที่นำมาใช้พิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่าศูนย์กลางลำ มีเพียง 1 เครื่องหมาย ได้แก่ ctaa31

จากการพิจารณาความสอดคล้องของเครื่องหมายโมเลกุลในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำจากคู่ไพรเมอร์ 4 คู่ พบว่า มีทั้งที่มีความสอดคล้องสูง ซึ่งได้แก่คู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ที่มีถึง 5 เครื่องหมาย ซึ่งเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่พิจารณา ในคู่ไพรเมอร์อื่นมีความสอดคล้องค่อนข้างต่ำ โดยที่คู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ไม่พบความสอดคล้องของเครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาใช้ในลักษณะทั้ง 2 เลย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<u>รวม 4 คู่ไพรเมอร์</u>

จาก 7 เครื่องหมายเครื่องหมายโมเลกุล ที่มีความสอดคล้องในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำข้างต้น พบว่ามีถึง 4 เครื่องหมายโมเลกุลจาก 5 เครื่องหมาย ของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ได้ถูกนำมาพิจารณาเป็น 10 เครื่องหมายโมเลกุลสุดท้าย โดยเป็นเครื่องหมายที่นำมาใช้เป็น 10 เครื่องหมายสุดท้ายในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใย จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ ctat25 และ ctat 32 และเป็นเครื่องหมายที่นำมาใช้เป็น 10 เครื่องหมายสุดท้ายในลักษณะเส้นผ่าศูนย์กลางลำ จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ ctat11 และ ctat22 ส่วนอีก 2 เครื่องหมายที่มีความสอดคล้องของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG และคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA พบว่าไม่ถูกพิจารณานำมาเป็น 10 เครื่องหมายโมเลกุลสุดท้ายในทั้ง 2 ลักษณะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 19 เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CGG ที่นำมาใช้ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ที่พิจารณาเบื้องต้นและพิจารณาในขั้นสุดท้าย

เครื่องหมายโมเลกุล	เบื้องต้น		ขั้นสุดท้าย	
	เปอร์เซ็นต์เส้นใย	เส้นผ่านศูนย์กลางลำ	เปอร์เซ็นต์เส้นใย	เส้นผ่านศูนย์กลางลำ
ctgg3		-0.057		
ctgg5		-0.051		
ctgg6		-0.093		
ctgg7		-0.083		
ctgg10	-0.515			
ctgg11		0.110		
ctgg12		-0.067		
ctgg13		0.078		0.168
ctgg17	0.606		1.236	
ctgg20	1.524		1.902	
ctgg21		0.106		
ctgg25	0.855		0.937	
ctgg26	-0.337			
ctgg28	-0.151	0.134		
ctgg35	-1.160			
ctgg37	0.397			
ctgg42		-0.132		
ctgg43	-0.290			
ctgg44	0.307			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 20 เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT ที่นำมาใช้ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ที่พิจารณาเบื้องต้นและพิจารณาในขั้นสุดท้าย

เครื่องหมายโมเลกุล	เบื้องต้น		ขั้นสุดท้าย	
	เปอร์เซ็นต์เส้นใย	เส้นผ่านศูนย์กลางลำ	เปอร์เซ็นต์เส้นใย	เส้นผ่านศูนย์กลางลำ
ctat7	-0.680			
ctat8	0.616			
ctat11	-1.157	0.154		
ctat16		0.068		
ctat19	1.121		0.679	
ctat22	-0.530	0.064		
ctat23	0.791	-0.100		
ctat24		0.075		
ctat25	1.024	0.065	1.148	0.166
ctat27		0.139		0.426
ctat28		-0.020		-0.189
ctat29		0.100		
ctat32	-0.649	0.073		
ctat33	-0.316			
ctat35	0.632			

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 21 เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG ที่นำมาใช้ในลักษณะเปอร์เซ็นต์ เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ที่พิจารณาเบื้องต้นและพิจารณาในขั้นสุดท้าย

เครื่องหมายโมเลกุล	เบื้องต้น		ขั้นสุดท้าย	
	เปอร์เซ็นต์เส้นใย	เส้นผ่านศูนย์กลางลำ	เปอร์เซ็นต์เส้นใย	เส้นผ่านศูนย์กลางลำ
ccag1		0.074		0.228
ccag3		-0.047		
ccag4		-0.343		-0.385
ccag5		0.139		
ccag9	0.108			
ccag10	-0.159		-0.976	
ccag13	-0.746			
ccag14		-0.140		-0.154
ccag16		-0.059		
ccag17		-0.191		-0.084
ccag21	-0.643			
ccag28	-0.082			
ccag29	0.552			
ccag32	-1.536		-2.124	
ccag33	0.566		1.063	
ccag34		-0.014		
ccag38	0.877			
ccag40		-0.210		-0.284
ccag43	0.022			
ccag45		-0.068		

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 22 เครื่องหมายโมเลกุลของคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA ที่นำมาใช้ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ที่พิจารณาเบื้องต้นและพิจารณาในขั้นสุดท้าย

เครื่องหมายโมเลกุล	เบื้องต้น		ขั้นสุดท้าย	
	เปอร์เซ็นต์เส้นใย	เส้นผ่านศูนย์กลางลำ	เปอร์เซ็นต์เส้นใย	เส้นผ่านศูนย์กลางลำ
ctaa3	-0.624			
ctaa6		-0.033		
ctaa7	-0.165			
ctaa9		-0.145		-0.153
ctaa10	0.542			
ctaa11		0.007		
ctaa16		0.103		
ctaa19	0.348			
ctaa23		0.023		
ctaa24		0.055		
ctaa30		0.032		
ctaa31	0.097	-0.078	1.056	
ctaa34	-0.650			
ctaa35	-0.332			
ctaa36		-0.084		
ctaa38	-0.828			
ctaa41	-0.559			
ctaa42	-1.103	0.207	-1.082	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเปรียบเทียบการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลในขั้นตอนการวิเคราะห์ต่างๆ

เปอร์เซ็นต์เส้นใย

ได้พิจารณาคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาวิเคราะห์ในขั้นสุดท้าย จำนวน 1 เครื่องหมาย จากการพิจารณาค่า regression เมื่อคำนวณครั้งละ 1 เครื่องหมาย จากการพิจารณาค่า partial regression เมื่อคำนวณครั้งละ 10 เครื่องหมายของแต่ละคู่ไพรเมอร์ และจากการพิจารณาค่า partial regression เมื่อคำนวณรวม 40 เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์ ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใย (ตารางที่ 23) พบว่า การคำนวณ multiple regression โดยเครื่องหมายโมเลกุล 10 เครื่องหมาย จากการพิจารณาค่า partial regression เมื่อคำนวณรวม 40 เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์ มีค่า R^2 สูงสุดเท่ากับ 37.90% รองลงมาได้แก่ การพิจารณาค่า partial regression เมื่อคำนวณครั้งละ 10 เครื่องหมายของแต่ละคู่ไพรเมอร์และการพิจารณาค่า regression เมื่อคำนวณครั้งละ 1 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 25.50 และ 20.00% ตามลำดับ

เส้นผ่านศูนย์กลางลำ

ได้พิจารณาคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาวิเคราะห์ในขั้นสุดท้ายจำนวน 10 เครื่องหมาย จากการพิจารณาค่า regression เมื่อคำนวณครั้งละ 1 เครื่องหมาย จากการพิจารณาค่า partial regression เมื่อคำนวณครั้งละ 10 เครื่องหมายของแต่ละคู่ไพรเมอร์ และจากการพิจารณาค่า partial regression เมื่อคำนวณรวม 40 เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์ ในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ (ตารางที่ 24) พบว่า การคำนวณ multiple regression โดยเครื่องหมายโมเลกุล 10 เครื่องหมาย จากการพิจารณาค่า partial regression เมื่อคำนวณรวม 40 เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์ มีค่า R^2 สูงสุดเท่ากับ 29.70% รองลงมาได้แก่ การพิจารณาค่า partial regression เมื่อคำนวณครั้งละ 10 เครื่องหมายของแต่ละคู่ไพรเมอร์และการพิจารณาค่า regression เมื่อคำนวณครั้งละ 1 เครื่องหมาย โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 25.50 และ 17.80% ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่า การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลจากการวิเคราะห์ multiple regression ของ 40 เครื่องหมายโมเลกุลรวมของ 4 คู่ไพรเมอร์ มีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกในการศึกษาครั้งนี้ ทั้งในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 23 ค่า partial regression ของเครื่องหมายโมเลกุลจาก 4 คู่ไพรเมอร์ จากการวิเคราะห์เบื้องต้นและวิเคราะห์ขั้นสุดท้าย ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใย เมื่อพิจารณา 10 เครื่องหมายแยกแต่ละคู่ไพรเมอร์ เมื่อพิจารณารวม 40 เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์ และเมื่อพิจารณา 10 เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์

เครื่องหมาย	ค่า partial regression					
โมเลกุล	เบื้องต้น			สุดท้าย		
	Simple regression	Multiple regression แต่ละคู่ไพรเมอร์	Multiple regression รวมทุกคู่ไพร์เมอร์	Simple regression	Multiple regression แต่ละคู่ไพรเมอร์	Multiple regression รวมทุกคู่ไพร์เมอร์
ctaa31			1.011			1.081
ctaa34	-0.930			-0.598		
ctaa38	-0.882	-0.828		-0.329	-1.500	
ctaa42		-1.103	-1.587		-1.183	-1.125
ccag10			-0.929			-0.966
ccag29	-1.764			-0.076		
ccag32	-2.067	-1.536	-1.760	-1.414	-1.860	-1.970
ccag33			1.509			1.037
ccag38	0.937	0.877		0.881	0.867	
ctat7	-0.934			-0.488		
ctat11	-1.240	-1.157		-0.162	0.359	
ctat19		1.121	1.113		2.830	0.604
ctat25	0.960	1.024	1.024	0.821	0.977	1.195
ctat32	-1.234			-0.249		
ctgg17			1.156			1.221
ctgg20	2.312	1.524	1.438	2.216	1.893	1.944
ctgg25		0.855	1.514		0.940	0.877
ctgg35		-1.160			-0.166	
R^2				**0.200**	**0.255**	**0.379**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 24 ค่า partial regression ของเครื่องหมายโมเลกุลจาก 4 คู่ไพรเมอร์ จากการวิเคราะห์เบื้องต้นและวิเคราะห์ขั้นสุดท้าย ในลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ เมื่อพิจารณา 10 เครื่องหมายแยกแต่ละคู่ไพรเมอร์ เมื่อพิจารณารวม 40 เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์ และเมื่อพิจารณา 10 เครื่องหมายจาก 4 คู่ไพรเมอร์

เครื่องหมาย	ค่า partial regression					
โมเลกุล	เบื้องต้น			สุดท้าย		
	Simple regression	Multiple regression แต่ละคู่ไพรเมอร์	Multiple regression รวมทุกคู่ไพร์เมอร์	Simple regression	Multiple regression แต่ละคู่ไพรเมอร์	Multiple regression รวมทุกคู่ไพร์เมอร์
ctaa9		-0.145	-0.244		-0.121	-0.153
ctaa16	0.212			-0.086		
ctaa42	0.294	0.207		0.057	0.287	
ccag1	-0.281		0.258	0.044		0.228
ccag4	-0.243	-0.343	-0.263	-0.290	-0.379	-0.385
ccag5		0.139			0.123	
ccag14		-0.140	-0.158		-0.165	-0.154
ccag17	-0.191	-0.191	0.188	-0.164	-0.159	-0.084
ccag40		-0.210	-0.389		-0.252	-0.284
ctat11		0.154			-0.009	
ctat24	0.175			0.140		
ctat25			0.163			0.166
ctat27	0.184	0.139	0.349	0.213	0.259	0.426
ctat28			-0.220			-0.189
ctat32	0.194			0.128		
ctgg7	0.197			-0.219		
ctgg13			0.153			0.168
ctgg28	0.193	0.134		-0.044	-0.021	
R^2				**0.178**	**0.255**	**0.297**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. จากการตรวจเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำของพันธุ์อ้อยที่ศึกษา พบว่ามีการกระจายตัวที่เหมาะสมกับการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ

2. มีความแตกต่างของความสอดคล้องของเครื่องหมายโมเลกุลในลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใยและเส้นผ่านศูนย์กลางลำจากคู่ไพรเมอร์ที่ต่างกัน โดยพบว่ามีความสอดคล้องสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ในคู่ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAT และไม่พบความสอดคล้องในคู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAG

3. สมการ multiple regression ที่เหมาะสมกับลักษณะเปอร์เซ็นต์เส้นใย ได้แก่

เปอร์เซ็นต์เส้นใย = -2.078ctag32 + 16.940 (R^2 = 7.80%)

หรือ เปอร์เซ็นต์เส้นใย = -2.700ctag32 + 2.185ctgg20 +1.285ctgg17 +0.879ctaa31 + 12.584 (R^2 = 25.00%)

4. สมการ multiple regression ที่เหมาะสมกับลักษณะเส้นผ่านศูนย์กลางลำ ได้แก่

เส้นผ่าศูนย์กลางลำ = 0.260ccat27 + -0.313ctag4 + 2.835 (R^2 = 9.90%)

5. การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลจากการวิเคราะห์ multiple regression รวมของเครื่องหมายโมเลกุลของทุกคู่ไพรเมอร์ เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพกว่า การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลจากการวิเคราะห์ multiple regression ของเครื่องหมายโมเลกุลของแต่ละคู่ไพรเมอร์ และการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลจากการวิเคราะห์ simple regression ของแต่ละเครื่องหมายโมเลกุล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2551. **ศักยภาพชีวมวลประเทศไทย ปี 2544/45**, แหล่งที่มา: http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=437. 22 มีนาคม 2551.

เกษม สุขสถาน, อัมพร สุวรรณเมฆ, ถวิล ครุฑกุล, ไพโรจน์ จ๋วงพาณิช, อุดม พูลเกษ, อิสรา สุขสถาน, โกศล เจริญสม, นิพนธ์ ทวีชัย, สวาท รัตนวรพันธ์ และ พรชัย เหลืองอาภาพงษ์. 2520. **หลักการทำไร่อ้อย**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

ปรีชา สุริยพันธุ์. 2544**. การพัฒนาอ้อยและน้ำตาลไทย.** สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ไพศาล อิสสอาด. 2543. **การประเมินปริมาณเส้นใยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2536. **พันธุศาสตร์**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543ก. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ** : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2537. ประกาศคณะกรรมการบริหาร ฉบับที่ 4 เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการเก็บตัวอย่างน้ำอ้อย การวิเคราะห์คุณภาพอ้อย การตัดสินข้อโต้แย้งเกี่ยวกับการตรวจสอบคุณภาพอ้อย อ้อยไฟไหม้ และความบริสุทธิ์ของอ้อย. **วารสารน้ำตาล** 30 (5) : 1-13.

Bakker, H. 1999. **Sugar Cane Cultivation and Management.** Klwer Academic/Plenum Publishers. USA.

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.

Botstien, D., R.L. White, M. Skolnik and R.W. Davis. 1980. Constuction of a genetic linkage map in man using restriction fragmant length ploymorphisms. **Amer. J. Human Genet**. 32: 314-331.

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.

Gravios, K.A. and S.B. Milligan. 1992. Genetic relationships between fiber and sugarcane yield components. **Crop Sci**. 9: 88-91.

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, Berlin.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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.

Kang, M.S., O. Sosa and J.D. Miller. 1989. Path analyses for percent fiber and cane and sugar yield in sugarcane. **Crop Sci. 29**: 1481-1483.

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.

Markert, C.L. and F. Moller. 1959. Multiple forms of enzyme: tissue ontogenetic, and species specific patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci** . USA. 45: 753-763.

Milligan, S.B., K.A. Gravois, K.P. Bischoff. and F.A. Martin. 1990. Crop effects on broad90 sense heritabilities and genetic variances of sugarcane yield components. **Crop Sci**. 30: 344-349.

Pandey, A., C.R. Soccol, P. Nigam and V.T. Soccol. 2000. Biotechnological potential of agroindustrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology** 74. 69-80

Poehlman, J. M. and D. A. Sleper. 1995. **Breeding Field Crops. 4th ed.,** Iowa State University. Press, Iowa.

Powell, W., G.C. Machray and J. Proven. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science** 1: 215-222.

Reiter, R. 2001. PCR-based marker system, pp. 9-29. *In* L. Ronald, St. Poul and K.V. Indra, eds. **DNA-Based Markers in Plants.** 2nd ed. Kluwer Acedemic, Dordrecht.

Tanksley, S.D. and T.J. Orton. 1983. Isozyme in Plant Genetic and Breeding. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York. 516 p.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tara, T.V., J. Peng and S.K. St.Martin. 1997. Using AFLP markers to determine the genomic contribution of parents to populations. **Crop Sci.** 37: 1370-1373.

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

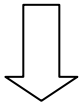
Xu, R.Q., N. Tomooka and D.A. Vaughan. 2000. AFLP markers for characterizing the azuki bean complex. **Crop Sci.** 40: 808-815.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

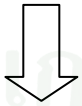
ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สกัดดีเอ็นเอ จากใบอ้อยที่อายุ 2-4 เดือน



ตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

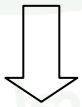


ต่อดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจะเพาะ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการทำ PCR I (pre-selective amplification)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการทำ PCR II (selective amplification)

ตรวจเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis



บันทึกการปรากฏเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในตารางตัวอย่างตามตารางผนวกที่ 1 โดยให้คะแนนการปรากฏเป็น 1 และการไม่ปรากฏเป็น 2

ภาพผนวกที่ 1 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยวิธี AFLP

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 ตัวอย่างการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ได้จากการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละคู่ไพรเมอร์

พันธุ์	ctat 1	ctat2	ctat3	ctat4	ctat5	ctat6	ctat7	ctat8
1	1	1	1	2	1	1	1	2
2	1	1	1	1	1	1	1	2
3	1	2	1	1	1	1	1	2
4	1	1	2	2	1	1	1	2
5	1	1	1	2	1	1	1	2
6	1	1	1	2	1	1	1	2
7	1	1	1	2	1	1	1	2
8	1	1	1	2	1	1	1	2
9	1	1	1	2	1	1	1	2
10	1	1	1	2	1	1	1	2
11	1	1	1	1	1	1	1	2
12	1	1	1	2	1	1	1	2
13	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	2	1	1	1	2
15	1	1	1	1	1	1	1	2
16	1	2	1	1	2	1	2	2
17	1	2	1	1	2	1	1	2
18	1	1	1	1	2	1	1	2
19	1	2	1	1	2	1	2	2
20	1	2	1	1	2	1	2	2
21	1	2	1	1	2	1	2	2
22	1	2	1	1	2	1	2	2
23	1	2	1	1	2	1	2	2
24	1	1	1	1	1	1	1	2
25	1	2	1	2	2	1	2	2
26	1	2	1	2	1	1	1	2
27	1	2	1	2	1	1	1	2
28	1	2	1	1	2	1	1	2
29	1	2	1	2	2	1	1	2
30	1	2	1	2	1	1	1	2
31	1	2	1	1	1	1	1	2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

32	1	2	1	1	2	1	1	2
33	1	2	1	2	1	1	1	2
34	1	2	1	2	1	1	1	2
35	1	2	1	1	1	1	1	2
36	1	2	1	2	2	1	1	2
37	1	2	1	2	1	1	1	2
38	1	2	1	2	1	1	1	2
39	1	2	1	1	2	1	2	2
40	1	2	1	2	2	1	1	2
41	1	2	1	1	1	1	1	2
42	1	2	1	1	1	1	2	2
43	1	2	1	1	1	1	1	2
44	1	2	1	1	1	1	2	1
45	1	2	1	1	1	1	2	1
46	1	2	1	1	1	1	2	2
47	1	2	1	1	2	1	2	2
48	1	2	1	1	2	1	2	2
49	1	2	1	1	2	1	2	2
50	1	2	1	1	2	1	2	2
51	1	2	1	1	2	1	2	2
52	1	2	1	1	2	1	2	2
53	1	2	1	1	2	1	2	2
54	1	2	1	1	2	1	2	2
55	1	2	1	1	2	1	1	2
56	1	2	1	1	2	1	2	2
57	1	2	1	1	2	1	2	2
58	1	2	1	1	2	1	1	2
59	1	2	1	1	2	1	2	2
60	1	2	1	1	2	1	2	2
61	1	2	1	1	2	1	2	1
62	1	2	1	1	2	1	2	1
63	1	2	1	1	2	1	2	1
64	1	2	1	1	2	1	2	1
65	1	2	1	1	2	1	2	1
66	1	2	1	1	2	1	2	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

67	1	2	1	1	2	1	2	1
68	1	2	1	1	2	1	2	1
69	1	2	1	1	2	1	2	1
70	1	2	1	1	2	1	2	1
71	1	2	1	1	2	1	2	1
72	1	2	1	1	2	1	2	1
73	1	2	1	1	2	1	2	1
73	1	2	1	1	2	1	2	1
75	1	2	1	1	2	1	2	1
76	1	2	1	1	2	1	2	1
77	1	2	1	1	2	1	2	1
78	1	2	1	1	2	1	2	1
79	1	2	1	1	2	1	2	1
80	1	2	1	1	2	1	1	1
81	1	2	1	1	2	1	1	2
82	1	2	1	1	2	1	1	2
83	1	2	1	1	2	1	1	2
84	1	2	1	1	2	1	2	2
85	1	2	1	1	2	1	2	2
86	1	2	1	1	1	1	2	2
87	1	2	1	1	1	1	2	2
88	1	2	1	1	1	1	2	2
89	1	2	1	1	1	1	2	2
90	1	2	1	1	1	1	2	2
91	1	2	1	1	1	1	2	2
92	1	2	1	1	1	1	2	2
93	1	2	1	1	1	1	2	2
94	1	2	1	1	1	1	2	2
95	1	2	1	1	1	1	2	2
96	1	2	1	1	1	1	2	2
97	1	2	1	1	1	1	2	2
98	1	2	1	1	1	1	2	2
99	1	2	1	1	1	1	2	2
100	1	2	1	1	1	1	2	2
101	1	2	1	1	2	1	2	2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

102	1	2	1	1	1	1	2	2
103	1	2	1	1	2	1	2	2
104	1	2	1	1	2	1	2	2
105	1	2	1	1	2	1	2	2
106	1	2	1	1	2	1	2	2
107	1	2	1	1	2	1	2	2
108	1	2	1	1	2	1	2	2
109	1	2	1	1	2	1	2	2
110	1	2	1	1	2	1	2	2
111	1	2	1	1	2	1	2	2
112	1	2	1	1	1	1	1	2
113	1	2	1	1	2	1	1	2
114	1	2	1	1	2	1	2	2
115	1	2	1	1	1	1	2	2
116	1	2	1	1	2	1	2	2
117	1	2	1	1	2	1	2	2
118	1	2	1	1	2	1	1	2
119	1	2	1	1	2	1	2	2
120	1	2	1	1	2	1	1	2
121	1	2	1	1	2	1	1	2
122	1	2	1	1	2	1	1	2
123	1	2	1	1	2	1	1	2
124	1	2	1	1	2	1	1	2
125	1	2	1	1	2	1	1	2
126	1	2	1	1	2	1	1	2
127	1	2	1	1	1	1	1	2
128	1	2	1	1	2	1	1	2
129	1	2	1	1	2	1	1	2
130	1	2	1	1	2	1	1	2
131	1	2	1	1	2	1	1	2
132	1	2	1	1	2	1	2	2
133	1	2	1	1	2	1	2	2
134	1	1	1	2	1	1	1	1
135	1	1	1	2	1	1	1	1
136	1	1	1	2	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

137	1	1	1	2	1	1	1	1
138	1	1	1	2	1	1	1	1
139	1	1	1	1	1	1	1	1
140	1	2	1	2	2	1	2	2
จำนวนการปรากฏ	140	118	1	27	84	140	79	111
ค่าสหสัมพันธ์เปอร์เซ็นต์ของเส้นใย	-	-0.0166	0.007651	-0.0128	-0.0390	-	0.0886	0.0129
ค่าสหสัมพันธ์ของเส้นผ่านศูนย์กลางลำ	-	0.013519	0.106511	-0.0641	-0.0418	-	-0.0266	0.0150

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 2 แสดงขั้นตอนการดำเนินการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล 10 เครื่องหมาย สำหรับการคำนวณ multiple regression ของขั้นตอนสุดท้าย

Simple regression	Multiple regression แต่ละคู่ไพรเมอร์	Multiple regression รวมทุกคู่ไพรเมอร์
1. ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีการ AFLP	1. ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีการ AFLP	1. ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีการ AFLP
2. คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ	2. คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ	2. คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ
3. คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงจำนวน 10 เครื่องหมายต่อคู่ไพรเมอร์	3. คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงจำนวน 10 เครื่องหมายต่อคู่ไพรเมอร์	3. คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงจำนวน 10 เครื่องหมายต่อคู่ไพรเมอร์
4. คำนวณค่า simple regression ของ 40 เครื่องหมายโมเลกุลของทุกคู่ไพรเมอร์	4. คำนวณค่า multiple regression ของ 10 เครื่องหมายโมเลกุลของแต่ละคู่ไพรเมอร์	4. คำนวณค่า multiple regression ของ 40 เครื่องหมายโมเลกุลของทุกคู่ไพรเมอร์
5. เลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่า regression สูงจำนวน 10 เครื่องหมาย	5. เลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่า partial regression สูงจำนวน 10 เครื่องหมาย	5. เลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีค่า partial regression สูงจำนวน 10 เครื่องหมาย
6. คำนวณค่า multiple regression ของ 10 เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือก	6. คำนวณค่า multiple regression ของ 10 เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือก	6. คำนวณค่า multiple regression ของ 10 เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวเยาวมาลย์ ภาคภูมิ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 29 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดกาญจนบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประสบการณ์การทำงาน	เจ้าพนักงานแรงงาน สำนักจัดหางานกรุงเทพเขตพื้นที่ 5 กรมการจัดหางาน กระทรวงแรงงาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์