

การพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางลำต้น ในอ้อย เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

และโครงสร้างทางพันธุกรรมในอ้อย

Development of ILP Markers from Genes related to Stalk Traits in Sugarcane to Assess Genetic Diversity and Genetic Structure of Sugarcane

พัชรี หมื่นอินกุด และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Patcharee Mueninkood and Kittipat Ukoskit*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญอย่างมากในโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ประสบความสำเร็จได้อ้อยพันธุ์ดี การศึกษานี้ได้พัฒนาเครื่องหมาย intron length polymorphism (ILP) จากยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางลำต้น จำนวน 32 ยีน เพื่อใช้วิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของอ้อยจำนวน 200 พันธุ์ พบว่าเครื่องหมาย ILP ตรวจพบแอลลิล 116 แอลลิล มีค่า polymorphism information content (PIC) เฉลี่ย 0.27 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรอ้อย 5 กลุ่ม แบ่งตามแหล่งที่มาของตัวอย่าง พบว่าค่า coefficient of gene differentiation และ gene flow index แสดงให้เห็นถึงระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรทั้ง 5 กลุ่ม ที่ค่อนข้างต่ำ สอดคล้องกับผลของ analysis of molecular variance พบว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมส่วนใหญ่ (97.7 %) อยู่ภายในกลุ่มประชากร การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม พบว่าตัวอย่างอ้อยแบ่งออกเป็น 2 ประชากรย่อย ($K = 2$) โดยมีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.04 แสดงว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสองกลุ่มประชากรย่อยอยู่ในระดับที่น้อย บ่งชี้ว่าการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมอ้อยระหว่างโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อยทั่วโลกส่งผลให้พันธุ์อ้อยในปัจจุบันไม่มีความแตกต่างกันมากนัก เครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้นี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างพันธุกรรมของอ้อยได้ ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับใช้คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : อ้อย; เครื่องหมาย ILP; ความหลากหลายทางพันธุกรรม; โครงสร้างทางพันธุกรรม

Abstract

Understanding genetic structure and diversity of sugarcane is important for sugarcane breeding programs. In the present study, intron length polymorphism (ILP) markers were developed from 32 genes involving in stalk traits in sugarcane to assess genetic diversity and genetic structure of 200 sugarcane cultivars. A total of 116 alleles were detected by ILP markers. The average polymorphism information content (PIC) value was 0.27. The analysis of genetic diversity based on geographic sources of sugarcane indicated that the coefficient of gene differentiation and gene flow index revealed low level of genetic differentiation among the five groups, which corresponded to the result of analysis of molecular variance (AMOVA). The majority (97.7 %) of genetic variation was within populations. The analysis of population structure indicated that the number of subpopulations (K) of sugarcane germplasm was two (K=2). The overall F_{ST} value of 0.04, suggesting the germplasm exchange among breeding programs around the world. The ILPs markers developed in present study have been proved to be useful for genetic diversity and genetic structure assessment in sugarcane, which could be advantageous for selecting parents with a greater combination capacity in breeding program.

Keywords: sugarcane; ILP marker; genetic diversity; genetic structure

1. บทนำ

อ้อย (*Saccharum* spp. L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย และเป็นวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลทรายของโลก ปัจจุบันประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกน้ำตาลทรายสูงเป็นอันดับที่ 2 ของโลก [1] อย่างไรก็ตาม พบว่าปริมาณผลผลิตอ้อยต่อพื้นที่ได้นั้นยังต่ำอยู่มาก จึงควรที่จะเพิ่มปริมาณผลผลิตต่อพื้นที่ให้มากขึ้น แต่ปัญหาหนึ่งที่เป็นสาเหตุทำให้ผลผลิตอ้อยของประเทศไทยต่ำ เนื่องมาจากการขาดแคลนอ้อยพันธุ์ดีที่มีผลผลิตสูง ความหวานสูง ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์อ้อยพันธุ์ใหม่ ๆ จึงเป็นแนวทางที่จะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตอ้อยต่อพื้นที่ได้ ซึ่งการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอ้อยนั้น มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการเลือกพ่อแม่เข้าสู่โครงการ

ปรับปรุงพันธุ์ การที่ทราบถึงความห่างทางพันธุกรรมของแต่ละพันธุ์นั้น จะทำให้สามารถวางแผนการผสมพันธุ์ เลือกคู่ผสมที่เหมาะสมเพื่อให้ประสบความสำเร็จได้อ้อยพันธุ์ดี การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าและมีความถูกต้องและแม่นยำสูงกว่าวิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด intron length polymorphism (ILP) เป็นเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของขนาดอินตรอน (intron) ซึ่งมีความแปรปรวนของลำดับเบสมากกว่าเอ็กซอน (exon) วิธีพัฒนาเครื่องหมาย ILP สามารถทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน โดยการใช้ข้อมูลลำดับเบส ESTs ของพืชที่ต้องการ

ศึกษาได้โดยตรงหรืออาจใช้ข้อมูลจากพืชอื่นที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันได้ จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับบริเวณเอ็กซอนที่ครอบคลุมที่เป็นตำแหน่งของอินทรอนซึ่งสามารถทำนายได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบส ESTs กับลำดับเบสจีโนม [2] เนื่องจากบริเวณเอ็กซอนมีความอนุรักษ์สูง จึงสามารถนำไปใช้ข้ามสปีชีส์และข้ามสกุลของสิ่งมีชีวิตได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาเครื่องหมาย ILP เพื่อใช้ศึกษาพันธุกรรมในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง ยางพารา ข้าวโพด สับปะรด และปาล์มน้ำมัน [3-7]

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่การพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตทางลำต้นจากการรวบรวมข้อมูลจากงานวิจัยต่าง ๆ ที่ศึกษายีนที่มีความเกี่ยวกับการแตกกอและการเจริญเติบโตทางลำต้นในอ้อยและพืชชนิดอื่นที่อยู่ในวงศ์ Poaceae เช่นเดียวกับอ้อย พบว่ามียีน 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญด้านข้าง (axillary meristem) และกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีของฮอร์โมนต่าง ๆ ในพืชที่ทำหน้าที่ควบคุมการเกิดตาข้างและความสูงของต้น

[8-10] โดยเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้จะนำไปใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างทางพันธุกรรมอ้อย ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อยต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1. ตัวอย่างอ้อยและการสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างอ้อยที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดมี 200 พันธุ์ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่รวบรวมมาจากแหล่งในทวีปต่าง ๆ ทั่วโลก แบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างจากทวีปอเมริกา 56 พันธุ์ ทวีปออสเตรเลีย 38 พันธุ์ ทวีปแอฟริกา 16 พันธุ์ ทวีปเอเชีย 74 พันธุ์ และกลุ่มที่ไม่ทราบแหล่งที่มาของตัวอย่าง 16 พันธุ์ (ตารางที่ 1) ซึ่งปลูกที่ บริษัท มิตรผล วิจัยพัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดชัยภูมิ นำใบอ่อนจากแต่ละตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) ของ Gowel และ Jarret [11] ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสและวัดค่าการดูดกลืนแสง ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาและจำนวนตัวอย่างอ้อยที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 200 ตัวอย่าง ที่รวบรวมมาจากแหล่งในทวีปต่าง ๆ ทั่วโลก ได้แก่ อเมริกา ออสเตรเลีย แอฟริกา เอเชีย และกลุ่มที่ไม่ทราบแหล่งที่มาของตัวอย่าง

Sources	Country	No.
Americas	USA, Argentina, Barbados, Cuba, Brazil, Guyana	56
Asia	Thailand, Philippines, Taiwan, India, Indonesia, Japan, China	74
Australia	Australia, Fiji	38
Africa	South Africa, Mauritius	16
Unknown	16	
Total	200	

2.2. การพัฒนาเครื่องหมาย ILP

นำข้อมูลลำดับเบส ESTs ของอ้อยจากฐานข้อมูล Gene Index Project [12] มาคัดเลือกหา

ลำดับ ESTs ที่เกี่ยวข้องกับการแตกกอและการเจริญเติบโตทางลำต้นของอ้อยรวมถึงพืชอื่น ๆ ที่มีสกุลใกล้เคียงกับอ้อยโดยอ้างอิงจากรายงานของ Hussien

และคณะ [9] และ Kong และคณะ [10] จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบส ESTs ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสจีโนมของข้าวฟ่าง จากฐานข้อมูล Phytozome [13] เนื่องจากอ้อยมีโครงสร้างจีโนมที่ซับซ้อนและมีขนาดจีโนมใหญ่มากทำให้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของอ้อยทำได้ยากและยังไม่มีในปัจจุบันนี้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ลำดับเบสจีโนมของข้าวฟ่างที่มีวิวัฒนาการร่วมกับอ้อย [14] ในการเปรียบเทียบเพื่อทำนายตำแหน่งของอินทรอนที่อยู่ภายใน ESTs ของแต่ละยีนด้วยโปรแกรม GeneSeqer [15] จากนั้นออกแบบคู่ไพรเมอร์บนบริเวณของเอ็กซอนซึ่งขนาดทั้งสองข้างของอินทรอนด้วยโปรแกรม Primer3 [16] ร่วมกับโปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 [17] โดยกำหนดให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ซีอาร์อยู่ในช่วง 100-500 คู่เบส

2.3. การวิเคราะห์จีโนไทป์

วิเคราะห์จีโนไทป์ของอ้อยโดยใช้คู่ไพรเมอร์ของเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาขึ้นมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันปริมาตร 25 μ l ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 25 ng, 1x PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, คู่ไพรเมอร์อย่างละ 0.32 μ M และ 1 units RBC *Taq* DNA Polymerase ใช้สภาวะในการทำพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 94 °C 3 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 94 °C 30 วินาที (52-66) °C 1 นาที 72 °C 35 วินาที และสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 °C 5 นาที วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์เบื้องต้นด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 % จากนั้นนำไปวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลโพลีอะคริลามัดความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตตามวิธีการของ Benbouza และคณะ [18] นับแถบดีเอ็นเอโดยให้คะแนนเป็น 1 สำหรับตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ และให้คะแนนเป็น 0 สำหรับตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน

นั้นและวิเคราะห์โพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างอ้อย 200 พันธุ์

2.4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยพารามิเตอร์ที่ศึกษาประกอบด้วยค่าความหลากหลายของยีน (GD) และค่า polymorphism information content (PIC) [19] คำนวณสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันด้วยวิธีของ Nei และ Li [20] นำค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงมาวิเคราะห์การจัดกลุ่มสร้างเป็นเดนโดแกรมด้วยวิธี neighbour-joining (NJ) ด้วยโปรแกรม PowerMarker [21] และแสดงผลด้วยโปรแกรม MEGA5 [22] วิเคราะห์ค่าตัวแปรความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรโดยโปรแกรม POPGENE [23] ประกอบด้วยค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ Nei (H) ค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ Shanon (I) ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยรวมของประชากรทั้งหมด (Ht) ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเฉลี่ยภายในประชากร (Hs) ค่าสัมประสิทธิ์ของความแตกต่างของยีน (G_{ST}) และค่าการถ่ายเทยีน (Nm) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ analysis of molecular variance (AMOVA) ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN 3.0 [24] ซึ่งค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมจะแบ่งเป็นความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากรและความแปรปรวนภายในกลุ่มประชากร โดยการใช้การสับเปลี่ยนลำดับ (permutation) แบบสุ่มจำนวน 1,000 ครั้ง เพื่อทดสอบนัยสำคัญ และคำนวณค่า F_{ST} (phi-statistic, ϕ_{ST}) ที่แสดงถึงระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความน่าจะเป็นแบบเบย์ (Bayesian clustering method) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE V.2.2 [25] เพื่อประเมินจำนวนกลุ่มประชากรที่

เหมาะสม (K) โดยคำนวณค่าของ K ตั้งแต่ 1-10 วิเคราะห์ซ้ำจำนวน 10 ครั้ง กำหนดให้ค่า iteration เท่ากับ 100,000 รอบ และ burn-in เท่ากับ 10,000 จากนั้นใช้ค่า log-likelihood ของ K ในการหาค่า K ที่เหมาะสม ซึ่งจำนวนกลุ่มประชากรย่อยที่เหมาะสมจะ ให้ค่า delta K สูงที่สุด [26] โดยกำหนดให้พันธุ์ย่อยจัดอยู่ในกลุ่มประชากรเดียวกันเมื่อมีค่า Q มากกว่าหรือเท่ากับ 0.70 และวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี principal component analysis (PCA) ด้วยโปรแกรม NTSysPc ver. 2.0 [27]

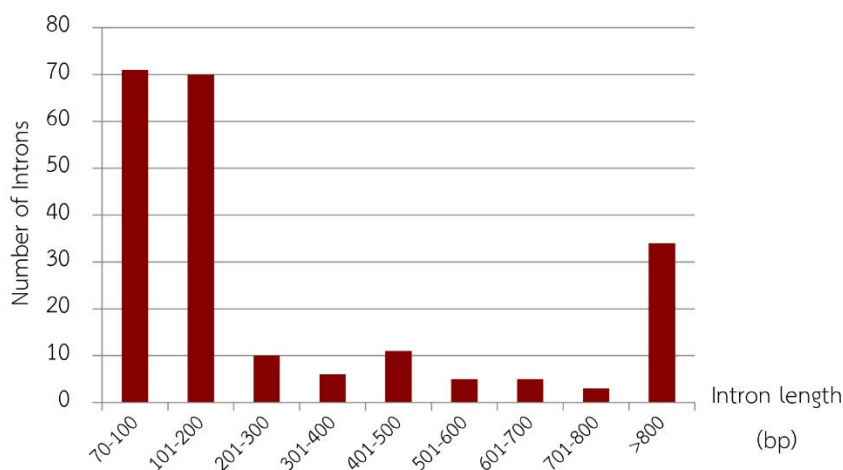
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การพัฒนาเครื่องหมาย ILP

การสืบค้นข้อมูลลำดับเบส ESTs ที่เกี่ยวข้องกับกระดูกและการเจริญเติบโตทางลำต้น สามารถค้นหาลำดับ ESTs ที่ได้จำนวน 56 ESTs จาก ยีน 32 ยีน (ตารางที่ 2) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับ ESTs กับลำดับเบสจีโนมของข้าวฟ่าง เพื่อหาตำแหน่งของอินทรอนและความหลากหลายของขนาดอินทรอน พบว่าสามารถทำนายอินทรอนได้ 214 ตำแหน่ง ซึ่งมีขนาดอินทรอนกระจายตัวตั้งแต่ 30 ถึง 5,374 คู่เบส (รูปที่ 1) อินทรอนมากกว่า 50 % มีขนาดเล็กกว่า 300 คู่เบส และจากจำนวนอินทรอนทั้งหมดที่ทำนายได้ สามารถนำมาพัฒนาเครื่องหมาย ILP ได้จำนวน 149 คู่ไพรเมอร์ จาก 32 ยีน เมื่อนำไปทำพีซีอาร์ พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้สำเร็จตาม

ตารางที่ 2 รายชื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการแตกกอและการเจริญเติบโตทางลำต้นที่นำมาใช้พัฒนาเครื่องหมาย ILP

Gene symbol	Gene name	Gene symbol	Gene name
LAX1	<i>lax panicle 1</i>	IPT	<i>isopentenyl transferase</i>
MOC1	<i>Monoculm 1</i>	GA2ox6	<i>gibberellin 2-oxidase 6</i>
TAD1	<i>tillering and dwarf 1</i>	GA2ox5	<i>gibberellin 2-oxidase 5</i>
MIP1	<i>MOC1 interacting protein</i>	GA2ox4	<i>gibberellin 2-oxidase 4</i>
AP2	<i>APETALA 2 transcription factor</i>	HTD2	<i>high tillering dwarf 2</i>
LGD1	<i>lagging growth and development 1</i>	D27	<i>dwarf 27</i>
LNT1	<i>low number of tillers 1</i>	D3	<i>dwarf 3</i>
LIC	<i>leaf and tiller angle increased controller</i>	CUL4	<i>uniculm 4</i>
CCD7	<i>carotenoid cleavage dioxygenase 7</i>	LHD2	<i>leafy head 2</i>
CCD8	<i>carotenoid cleavage dioxygenase 8</i>	APO7	<i>shootless 4</i>
GSK2	<i>glycogen synthase kinase 2</i>	RNC1	<i>reduced culm number 1</i>
TE	<i>tiller enhancer</i>	PIN1	<i>pinformed protein 1</i>
TIL1	<i>tillering 1</i>	PIN2	<i>pinformed protein 2</i>
RFL	<i>rice flo-ly homolog</i>	TLD1	<i>gretchen hagen3</i>
MADS57	<i>MADS-box transcription factor 57</i>	HB3	<i>class III HD-zip</i>
ASP1	<i>aberrant spikelet and panicle 1</i>	GT1	<i>grassy tillers 1</i>



รูปที่ 1 การกระจาย
ตัวของขนาด
อินทรอนใน
ลำดับ ESTs
ของอ้อย

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์, EST accession numbers, ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ และค่า gene diversity (GD) ของเครื่องหมาย ILP จำนวน 5 เครื่องหมาย ที่มีค่า polymorphic information content (PIC) สูงที่สุด

SILP no.	Primer sequence (5'→3')	EST Acc. no.	Expected size (bp)	GD	PIC
126-2	GCTCCAATGCTGTTTCATAAG GCCATCATTCGTGTCATTTG	TC151324	224	0.61	0.54
126-3	GCTCCAATGCTGTTTCATAAG GCCATCATTCGTGTCATTTG	TC151324	224	0.55	0.45
126-1	GCTCCAATGCTGTTTCATAAG GCCATCATTCGTGTCATTTG	TC151324	224	0.45	0.40
154-2	AAGGGCGACTACAACTGG TAGTGATCCTATTGGCGAGG	TC132909	231	0.50	0.37
168-2	TTCCACCACCTGTTTCGAC CTGTTGGGGTTGTCCGTG	TC137205	263	0.50	0.37

ขนาดที่คาดหมายไว้จำนวน 137 คู่ คิดเป็น PCR success rate 92 % บ่งชี้ว่าตำแหน่งและขนาดของอินทรอนบนจีโนมข้าวฟ่างกับอ้อยมีความใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการระบุว่ามีทั้งสองชนิดมีบรรพบุรุษร่วมกันก่อนจะแยกสายวิวัฒนาการมาเป็นอ้อยและข้าวฟ่างในปัจจุบัน และยีนบนจีโนมของข้าวฟ่างและอ้อยมีลำดับการเรียงตัวที่คล้ายกัน (synteny) [14,28,29] สำหรับไพรเมอร์ ILP

ที่ตรวจพบความแตกต่างของขนาดอินทรอนมีจำนวน 38 คู่ คิดเป็นอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 28 % ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Jaikishan และคณะ [30] ที่พัฒนาเครื่องหมาย ILP ในข้าวฟ่างจำนวน 24 พันธุ์ ใช้ไพรเมอร์จำนวน 172 คู่ พบว่ามีอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 27.9 % และงานวิจัยของ Shang และคณะ [31] ที่ได้พัฒนาเครื่องหมาย ILP ในข้าวสาลี 94 พันธุ์ ใช้ไพรเมอร์ 135 คู่ พบอัตราการเกิดโพลิมอร์

พืชมเท่ากับ 36 % ในขณะทำงานวิจัยของ โสณิชา [32] ที่พัฒนาเครื่องหมาย ILP ในปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์จำนวน 139 คู่ พบเครื่องหมายที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม จำนวน 74 คู่ คิดเป็น 53.24 % ประสิทธิภาพการแสดงโพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย ILP อาจให้ผลที่ใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับจำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ จำนวนตัวอย่าง และแหล่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่ใช้ในการทดลอง

3.2 ความแปรปรวนแอลลิลของเครื่องหมาย ILP

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอลลิลในอ้อย 200 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย ILP จำนวน 38 คู่ พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ทั้งหมด 116 แอลลิล โดยมีจำนวนแอลลิลผันแปรอยู่ในช่วง 2-8 แอลลิล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.05 มีค่าความหลากหลายของยีนตั้งแต่ 0.05-0.61 โดยเฉลี่ย 0.33 และมีค่า PIC ผันแปรอยู่ในช่วง 0.05-0.54 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.27 โดยเครื่องหมายที่มีค่า PIC สูงสุดคือ เครื่องหมาย SILP 126-2 มีค่าเท่ากับ 0.54 ส่วนเครื่องหมายที่มีค่า PIC ต่ำสุด คือ เครื่องหมาย SILP165-1 มีค่าเท่ากับ 0.05 ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างเครื่องหมาย ILP จำนวน 5 เครื่องหมาย ที่มีค่า PIC สูง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ ณัฐภัทร และกิตติพัฒน์ [33] ที่ใช้เครื่องหมาย ILP ซึ่งพัฒนาจาก ESTs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสในอ้อย พบว่ามีค่าเฉลี่ย PIC เท่ากับ 0.23 เมื่อเปรียบเทียบกับค่า PIC ของเครื่องหมาย EST-SSR ในอ้อย จากงานวิจัยของ Ukoskit และคณะ [34] และ Singh และคณะ [35] ที่มีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.74 และ 0.85 ตามลำดับ บ่งชี้ว่าเครื่องหมาย ILP มีประสิทธิภาพในการแสดงโพลิมอร์ฟิซึมน้อยกว่าเครื่องหมาย EST-SSR สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการ

เปรียบเทียบระหว่างเครื่องหมาย ILP กับเครื่องหมาย SSR ในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ข้าว [36] และพืชตระกูลหญ้า [37] เนื่องจากการแสดงโพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย SSR จะอาศัยความแปรปรวนของลำดับเบสจากความแตกต่างของจำนวนลำดับเบสซ้ำจากการทำงานผิดพลาดของเอนไซม์พอลิเมอเรส ที่มีโอกาสพบได้มากกว่าเครื่องหมาย ILP ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมจากความแปรปรวนของขนาดอินทรอนอันเกิดจากการเพิ่มหรือขาดหาย (indel) ของชิ้นดีเอ็นเอบนโครโมโซม อย่างไรก็ตาม เครื่องหมาย ILP มีโอกาสในการพัฒนาเป็นเครื่องหมาย EST ได้ในทุกยีน แต่เครื่องหมาย EST-SSR จะพัฒนาได้เฉพาะกับยีนที่มี SSR ภายในยีนเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าประสิทธิภาพในการถ่ายโอนข้ามสปีชีส์และข้ามสกุลสูงกว่าเครื่องหมาย EST-SSR [6] ซึ่งจะเป็นประโยชน์และให้ผลดีต่อการนำเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาขึ้นไปใช้ศึกษาต่อในพืชชนิดอื่น ๆ ได้ เนื่องจากอินทรอนเป็นลำดับเบสดีเอ็นเอที่พบในยีนซึ่งเป็นส่วนที่จะไม่มีการแปลรหัส ทำให้ความแปรปรวนของขนาดอินทรอนไม่มีผลต่อการทำงานของยีนโดยตรง อย่างไรก็ตาม พบว่าความยาวอินทรอนอาจมีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนซึ่งมีผลทำให้การแสดงออกของฟีโนไทป์ในสิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน [38] เช่น งานวิจัยของ Yang และคณะ [39] พบว่าการเกิด indel ภายในอินทรอนของยีน *Viviparous-1* ในข้าวสาลี มีผลต่อระดับการทนต่อการงอกก่อนเก็บเกี่ยว นอกจากนี้ตำแหน่งของความแปรปรวนลำดับเบสในอินทรอนอาจเกิดความไม่สมดุลลิงเกจ (linkage disequilibrium) กับตำแหน่งความแปรปรวนลำดับเบสที่ในเอ็กซอนและเป็นตำแหน่งที่อาจเกี่ยวข้องกับการแสดงออกยีน ดังนั้นเครื่องหมาย ILP มีศักยภาพที่จะนำไปใช้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้คัดเลือกได้ (marker-assisted selection) ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อย

ตารางที่ 5 ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่าง
อ้อย 5 กลุ่ม โดยวิเคราะห์จากเครื่องหมาย
ILP

Group	n	H	I
Americas	56	0.32	0.49
Asia	74	0.33	0.50
Australia	38	0.31	0.47
Africa	16	0.29	0.44
Unknown	16	0.31	0.46
Total	200	0.33	0.50
Ht	Hs	G_{ST}	Nm
0.33	0.31	0.05	9.55

n = number of accessions; H = Nei's (1973) gene diversity; I = Shannon's information index; Ht = total gene diversity; Hs = gene diversity within groups; Nm = estimate of gene flow; G_{ST} = coefficient of gene differentiation

3.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมในอ้อย

การแบ่งตัวอย่างอ้อย 200 พันธุ์ ออกเป็น 5 กลุ่ม ตามแหล่งที่มาทางภูมิศาสตร์ เพื่อวิเคราะห์ AMOVA พบว่าค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมส่วนใหญ่อยู่ภายในกลุ่มประชากร คือ 97.67 % ของความแปรปรวนทั้งหมด และ F_{ST} มีค่าเท่ากับ 0.02 (ตารางที่ 4) ซึ่งไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าไม่มีความแตกต่างของความหลากหลายพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรทั้ง 5 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (H) (ตารางที่ 5) และค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรมของชาวนอน (I) ตั้งแต่ 0.29-0.33

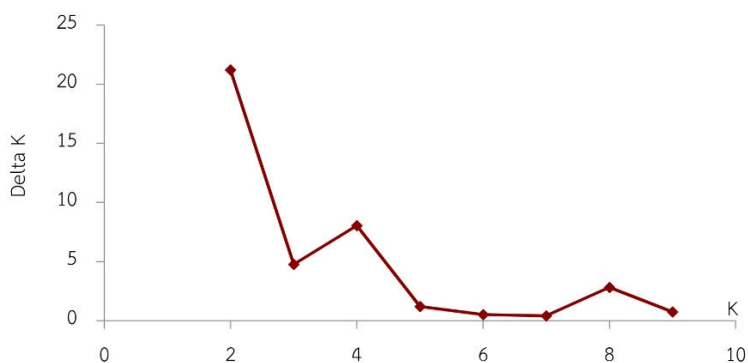
และ 0.44-0.50 มีค่าเฉลี่ย 0.33 ± 0.13 และ 0.50 ± 0.16 ตามลำดับ ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยรวม (Ht) ของประชากรอ้อยที่ศึกษามีค่าเท่ากับ 0.33 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเฉลี่ยภายในกลุ่มประชากร (Hs) ที่มีค่าเท่ากับ 0.31 จากข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าตัวอย่างอ้อยที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถแบ่งเป็นกลุ่มประชากรย่อยตามแหล่งที่มาทางภูมิศาสตร์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ ค่าสัมประสิทธิ์ของความแตกต่างของยีน (G_{ST}) เท่ากับ 0.05 แสดงว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรทั้ง 5 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก และมีค่าการถ่ายยีน (Nm) ในระดับสูง (9.55) แสดงให้เห็นว่ามีการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรในอัตราสูง ซึ่งเกิดจากการที่นักปรับปรุงพันธุ์ได้มีการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมกันอย่างอิสระระหว่างพื้นที่ที่แตกต่างกันเพื่อใช้ในการพัฒนาพันธุ์ใหม่ ๆ ให้มีลักษณะที่ต้องการ

3.4 การจัดกลุ่มโครงสร้างของประชากร

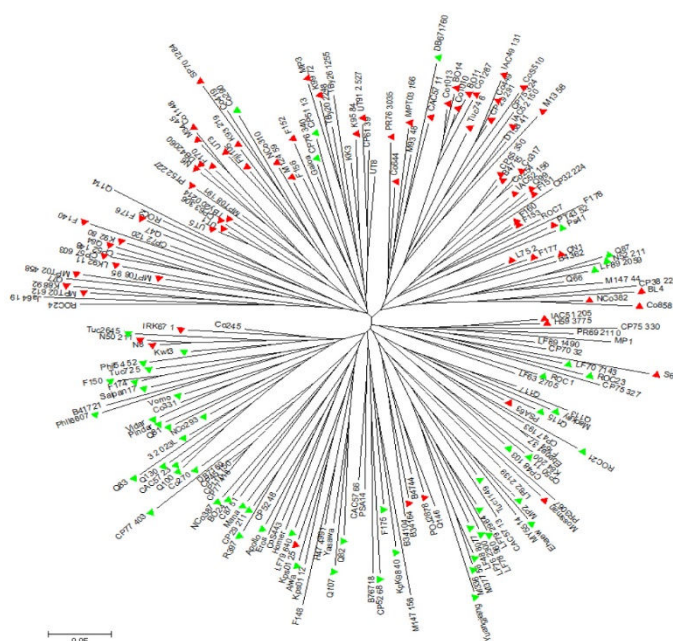
ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมอ้อยโดยใช้เครื่องหมาย ILP ด้วยวิธีวิเคราะห์ความน่าจะเป็นแบบเบย์ พบว่าความเป็นไปได้ของจำนวนกลุ่มประชากร (K) คือ K=2 (รูปที่ 2) แสดงว่าอ้อยที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มประชากรย่อย สอดคล้องกับผลการจัดกลุ่มด้วยวิธีสร้างเดนโดรแกรม (รูปที่ 3) และวิธี PCA (รูปที่ 4) ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะถูกตัดสินว่าเป็นกลุ่มประชากรเดี่ยวเมื่อค่า $Q \geq 70\%$ โดยประชากรย่อยกลุ่มที่ 1 (สีแดง) มีจำนวน 85 พันธุ์, ประชากรย่อยกลุ่มที่ 2 (สีเขียว)

ตารางที่ 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) ระหว่าง/ภายในกลุ่มประชากร 5 กลุ่ม

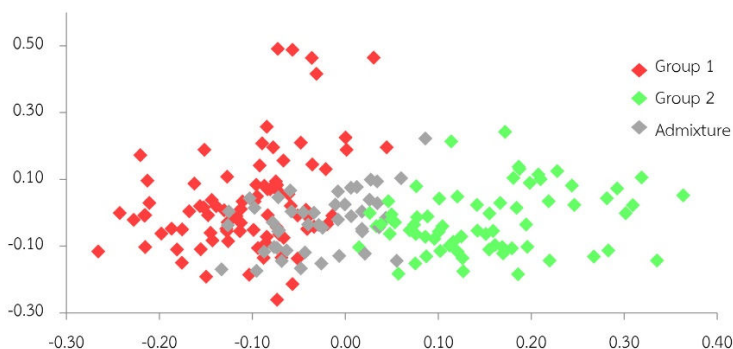
Source of Variation	d.f.	Sum of squares	Variance Component	Percentage of Variation	F_{ST}
Among groups	4	117.39	0.37 Va	2.33	0.02
Within groups	195	3050.41	15.64 Vb	97.67	



รูปที่ 2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมย่อย 200 พันธุ์ จากค่า delta K



รูปที่ 3 การจัดกลุ่มประชากรย่อย 200 พันธุ์ โดยการสร้างเดนโดรแกรมด้วยวิธี neighbor-joining (NJ)



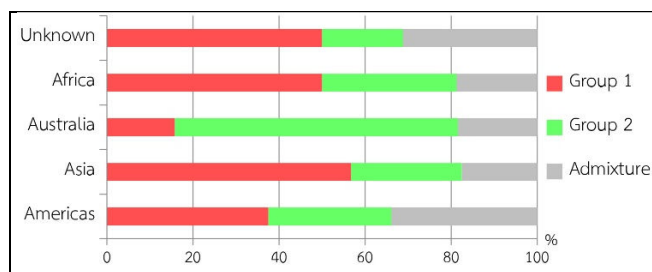
รูปที่ 4 การจัดกลุ่มประชากรย่อย 200 พันธุ์ด้วยวิธี PCA

จำนวน 68 พันธุ์ และจำนวน 47 พันธุ์ มีลักษณะเป็น พันธุ์กรรมผสม (สีเทา) ระหว่างสองกลุ่มประชากร (admixture) เมื่อพิจารณาผลการจัดกลุ่มร่วมกับ

แหล่งที่มาและข้อมูลพันธุ์ประวัติของอ้อยจากรายงานของ Wongpraneekul [40] พบว่าส่วนใหญ่ตัวอย่างอ้อยที่มาจากทวีปเอเชีย (56.8 %) และแอฟริกา (50

%) จะอยู่ในประชากรย่อยกลุ่มที่ 1 ในขณะที่ตัวอย่าง อ้อยจากทวีปออสเตรเลียส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มประชากร ย่อยกลุ่มที่ 2 (65.8 %) ส่วนตัวอย่างจากทวีปอเมริกามี การกระจายตัวอยู่ในทั้งสองกลุ่มประชากรย่อยใน สัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 5) การวิเคราะห์ค่า F_{ST} ระหว่างประชากรย่อยสองกลุ่ม พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.04 ซึ่งไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่าความแตกต่างทาง พันธุกรรมระหว่างสองกลุ่มประชากรย่อยอยู่ในระดับที่ น้อย และเมื่อสืบพันธุ์ประวัติของอ้อยพบว่าอ้อยจาก แหล่งในทวีปต่าง ๆ มีฐานพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมาก โดยส่วนใหญ่มีอ้อยพันธุ์ Black Cheribon, Chunnee,

Bandjermasin Hitam, Loethers และ Korpi เป็น บรรพบุรุษดั้งเดิม [41] แสดงให้เห็นว่าการแลกเปลี่ยน เชื้อพันธุกรรมอ้อยระหว่างโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อย ทั่วโลกส่งผลให้พันธุ์อ้อยที่มีในปัจจุบันไม่มีความ แตกต่างกันมากนัก [42] ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์อ้อย ในอนาคตจึงควรหาแนวทางในการเพิ่มฐานพันธุกรรม ให้กับพันธุ์อ้อยที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ขึ้นใหม่ เช่น การนำเชื้อพันธุกรรมอ้อยชนิดใหม่เข้ามาใช้ในโครงการ ปรับปรุงพันธุ์ การผสมข้ามระหว่างสปีชีส์โดยใช้แหล่ง พันธุกรรมใหม่ เป็นต้น



รูปที่ 5 สัดส่วนของประชากรอ้อยจากแต่ละ แหล่งที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มประชากร ย่อย 2 กลุ่ม ที่ประมาณขึ้นจาก STRUCTURE (K = 2)

4. สรุป

งานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาเครื่องหมาย ILP 149 เครื่องหมาย จากยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางลำต้น และสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และโครงสร้างทางพันธุกรรมอ้อยที่รวบรวมพันธุ์จาก แหล่งต่าง ๆ ทั่วโลกได้ โดยมีระดับความแปรปรวนทาง พันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรที่สูง แต่ความแตกต่าง ทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรที่ค่อนข้างต่ำ แสดงให้เห็นว่าพันธุ์อ้อยที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุง พันธุ์ในปัจจุบันไม่มีโครงสร้างของความหลากหลายทาง พันธุกรรมที่ชัดเจน เนื่องจากมีแลกเปลี่ยนเชื้อ พันธุกรรมอ้อยระหว่างโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อยทั่ว โลก ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์อ้อยในอนาคตจึงควรเพิ่ม ฐานพันธุกรรม โดยการนำเข้าเชื้อพันธุกรรมอ้อยจาก แหล่งใหม่ ๆ มาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ให้มากขึ้น

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก บริษัท มิตร ผลวิจัย พัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด และศูนย์พันธุ วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงาน พัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

6. รายการอ้างอิง

- [1] สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, ภาวะการส่งออกน้ำตาลประจำปี 2558, แหล่ง ที่มา : <http://www.ocsb.go.th/upload/cun try/fileupload/6758-8738>, 9 สิงหาคม 2560.
- [2] Wei, H., Fu, Y. and Arora, R., 2005, Intron-flanking EST-PCR markers: From genetic marker development to gene structure analysis in *Rhododendron*, Theor. Appl.

- Genet. 111: 1347-1356.
- [3] Shu, Y., Li, Y., Zhu, Y., Zhu, Z., Lv, D., Bai, X., Cai, H., Ji, W. and Guo, D., 2010, Genome-wide identification of intron fragment insertion mutations and their potential use as SCAR molecular markers in the soybean, *Theor. Appl. Genet.* 121: 1-8.
- [4] Li, D., Xia, Z., Deng, Z., Liu, X., Dong, J. and Feng, F., 2012, Development and characterization of intron-flanking EST-PCR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), *Mol. Biotechnol.* 51: 148-159.
- [5] Liu, H., Lin, Y., Chen, G., Shen, Y., Liu, J. and Zhang, S., 2012, Genome-scale identification of resistance gene analogs and the development of their intron length polymorphism markers in maize, *Mol. Breed.* 29: 437-447.
- [6] SaiSug, W. and Ukoskit, K., 2013, Comparative analysis of EST-derived markers for allelic variation in *Jatropha curcas* L. and cross transferability among economically important species of *Euphorbiaceae*, *Genes Genom.* 35: 1-12.
- [7] โสณิชา อุทุมพร และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, 2016, การพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอกปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.), *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 24: 299-308.
- [8] Wang, Y. and Li, J., 2008, Molecular basis of plant architecture, *Plant Biol.* 59: 253-279.
- [9] Hussien, A., Tavakol, E., Horner, D.S., Muñoz-Amatriáin, M., Muehlbauer, G.J. and Rossini, L., 2014, Genetics of tillering in rice and barley, *Plant Genom.* 7: 1-20.
- [10] Kong, W., Guo, H., Goff, V.H., Lee, T.H., Kim, C. and Paterson, A.H., 2014, Genetic analysis of vegetative branching in sorghum, *Theor. Appl. Genet.* 127: 2387-2403.
- [11] Gawal, N. and Jarret, R., 1991, A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomea*, *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 262-266.
- [12] Telles, G.P., Braga, M.D., Dias, Z., Tzy-Li, L., Quitau, J.A., da Silva, F.R. and Meidanis, J., 2001, Bioinformatics of the sugarcane EST project, *Genet. Mol. Biol.* 24: 9-15.
- [13] Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U. and Putnam, N., 2011, Phytozome: a comparative platform for green plant genomics, *Nucl. Acids Res.* 40: 1178-1186.
- [14] Jannoo, N., Grivet, L., Chantret, N., Garsmeur, O., Glaszmann, J.C., Arruda, P. and D'Hont, A., 2007, Orthologous comparison in a gene-rich region among grasses reveals stability in the sugarcane polyploid genome, *Plant J.* 50: 574-585.
- [15] Schlueter, S.D., Dong, Q. and Brendel, V., 2003, GeneSequer@PlantGDB: Gene structure prediction in plant genomes, *Nucl. Acids Res.* 31: 3597-3600.

- [16] Rozen, S. and Skaletsky, H., 1999, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, *Meth. Mol. Biol.* 132: 365-386.
- [17] Owczarzy, R., Tataurov, A.V., Wu, Y., Manthey, J.A., McQuisten, K.A., Almabrazi, H.G., Pedersen, K.F., Lin, Y., Garretson, J. and McEntaggart, N.O., 2008, IDT SciTools: A suite for analysis and design of nucleic acid oligomers, *Nucl. Acids Res.* 36: 163-169.
- [18] Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P. and Mergeai, G., 2006, Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels, *Biol. Agron. Soc. Env.* 10: 77-81.
- [19] Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- [20] Nei, M. and Li, W.H., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76: 5269-5273.
- [21] Liu, K. and Muse, S.V., 2005, PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis, *Bioinformatics* 21: 2128-2129.
- [22] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- [23] Yeh, F., Yang, R., Boyle, T., Ye, Z. and Xiyan, J., 2000, PopGene32; Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, 28 p.
- [24] Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S., 2005, Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis, *Evol. Bioinf. Online* 1: 47-50.
- [25] Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P., 2000, Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics* 155: 945-959.
- [26] Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J., 2005, Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study, *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- [27] Rohlf, F., 1998, NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system (version 2.02), Exeter Software Publishers Ltd., Setauket., New York, 38 p.
- [28] Guimarães, C.T., Sills, G.R. and Sobral, B.W., 1997, Comparative mapping of Andropogoneae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94: 14261-14266.

- [29] Wang, J., Roe, B., Macmil, S., Yu, Q., Murray, J.E., Tang, H., Chen, C., Najar, F., Wiley, G. and Bowers, J., 2010, Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes, BMC Genom. 11: 261.
- [30] Jaikishan, I., Rajendrakumar, P., Madhusudhana, R., Elangovan, M. and Patil, J.V., 2015, Development and utility of PCR-based intron polymorphism markers in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], J. Crop. Sci. Biotechnol. 18: 309-318.
- [31] Zhou, R., Jia, J. and Gao, L., 2010, RGA-ILP, a new type of functional molecular markers in bread wheat, Euphytica 172: 263-273.
- [32] โสณิชา อุทุมพร, 2559, การวิเคราะห์ยีนลักษณะปริมาณที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมาย Intron Length Polymorphism, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี, 131 น.
- [33] ณัฐภัทร พงศ์ศิริพัฒน์ และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, 2015, การพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสในอ้อย และการศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมอ้อย, Thai J. Genet. 8: 111-122.
- [34] Ukoskit, K., Thipmongkolcharoen, P. and Chatwachirawong, P., 2012, Novel expressed sequence tag-simple sequence repeats (EST-SSR) markers characterized by new bioinformatic criteria reveal high genetic similarity in sugarcane (*Saccharum* spp.) breeding lines, Afr. J. Biotechnol. 11: 1337-1363.
- [35] Singh, R.K., Jena, S.N., Khan, S., Yadav, S., Banarjee, N., Raghuvanshi, S., Bhardwaj, V., Dattamajumder, S.K., Kapur, R. and Solomon, S., 2013, Development, cross-species/genera transferability of novel EST-SSR markers and their utility in revealing population structure and genetic diversity in sugarcane, Gene 524: 309-329.
- [36] Wang, X., Zhao, X., Zhu, J. and Wu, W., 2005, Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice, DNA Res. 12: 417-427.
- [37] Zeid, M., Yu, J., Goldowitz, I., Denton, M., Costich, D.E., Jayasuriya, C., Sahac, M., Elshire, R. Benscher, D. and Breseghello, F., 2010, Cross-amplification of EST-derived markers among 16 grass species, Field Crop Res. 118: 28-35.
- [38] Parra, G., Bradnam, K., Rose, A.B. and Korf, I., 2011, Comparative and functional analysis of intron-mediated enhancement signals reveals conserved features among plants, Nucl. Acids Res. 39: 5328-5337.
- [39] Yang, Y., Zhao, X., Xia, L., Chen, X., Xia, X., Yu, Z. and Röder, M., 2007, Development and validation of a *Viviparous-1* STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats, Theor. Appl. Genet. 115: 971-980.

-
- [40] Wongpraneekul, A., 2008, Pedigree analysis of Thai sugarcane germplasm, M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 135 p.
- [41] Deren, C., 1995, Genetic base of US mainland sugarcane, Crop Sci. 35: 1195-1199.
- [42] Raboin, L.M., Pauquet, J., Butterfield, M., D'Hont, A. and Glaszmann, J.C., 2008, Analysis of genome-wide linkage disequilibrium in the highly polyploid sugarcane, Theor. Appl. Genet. 116: 701-714.