

การรวมเครื่องหมาย EST-SSR และ gSSR เข้ากับ แผนที่เครื่องหมาย f-AFLP และเครื่องหมาย SuS ในอ้อย

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

พัทธินันท์ ภูมิพันธ์, กัลยารัตน์ ภู่อุดแสง และ กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ขยายแผนที่พันธุกรรมและเพิ่มความหนาแน่นของเครื่องหมายในแผนที่พันธุกรรมที่สร้างด้วยเครื่องหมาย f-AFLP เครื่องหมาย gSSR และเครื่องหมายจำเพาะต่อยีน sucrose synthase (SuS) ที่สร้างขึ้นก่อนหน้านี้ โดยการเติมเครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 212 คู่ไพรเมอร์ โดยใช้ประชากรลูกผสม F₁ จำนวน 283 สายพันธุ์ที่ได้จากการผสมข้ามสปีชีส์ระหว่างอ้อยพันธุ์ปรับปรุง Phil6607 กับอ้อยสายพันธุ์ป่า *Saccharum spontaneum* พันธุ์ S6 เครื่องหมายทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์แผนที่ประกอบด้วย เครื่องหมาย simplex และ double simplex จำนวน 1,511 และ 238 เครื่องหมาย ตามลำดับ ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมกำหนดค่า LOD score ตั้งแต่ 4.0 ถึง 15 ค่า recombination fraction เท่ากับ 0.35 วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ ทั้งหมด 232 ลิงค์เกจ มี 219 ลิงค์เกจที่สามารถนำไปวิเคราะห์กลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจได้ 11 กลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจ แผนที่ประกอบด้วยเครื่องหมายจำนวน 791 เครื่องหมาย แบ่งเป็นเครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 537 เครื่องหมาย เครื่องหมาย gSSR จำนวน 5 เครื่องหมาย, เครื่องหมาย f-AFLP จำนวน 246 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย SuS จำนวน 3 เครื่องหมาย รวมความยาวกลุ่มลิงค์เกจทั้งหมดได้ 3,984 cM ความยาวของกลุ่มลิงค์เกจมีความยาวตั้งแต่ 0.4 cM ถึง 100 cM มีความหนาแน่นของเครื่องหมายเท่ากับ 7.13 cM แผนที่พันธุกรรมที่สร้างได้คาดว่าจะครอบคลุมประมาณ 52.1-58.8 % ของทั้งจีโนม ในแผนที่พบเครื่องหมาย EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจศึกษา เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล (Sugarcane metabolism) จำนวน 6 EST-SSRs ,ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค (Disease response) จำนวน 7 EST-SSRs และยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Abiotic stress response) จำนวน 8 EST-SSRs แผนที่พันธุกรรมที่สร้างได้จะมีประโยชน์อย่างมากในการเครื่องหมายกำกับหน้าที่ (functional markers) ที่สัมพันธ์กับ QTLs ของลักษณะที่สนใจซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

คำสำคัญ: แผนที่พันธุกรรม, เครื่องหมาย EST-SSRs, เครื่องหมาย SSR, เครื่องหมาย f-AFLP, เครื่องหมาย SuS

Abstract

To extent the density of a previous sugarcane linkage map constructed from f-AFLP gSSRs and sucrose synthase (SuS) markers, 212 EST-SSRs were employed for integration of the markers using 283 F_1 progenies derived from an interspecific cross between a cultivated sugarcane and the wild relative *Saccharum spontaneum*. With the markers already analyzed in the previous map, 1,511 and 238 markers of simplex and double simplex markers were constructed using a LOD score ≥ 4.0 and a recombination fraction of 0.35. The integrated genetic linkage map comprised 791 linked markers, including 537 EST-SSRs, 5 gSSRs, 246 f-AFLPs and 3 SuS markers that were assigned to 232 linkage groups forming 11 putative homologous linkage groups. All linkage groups represented a total map length of 3,984 cM, ranging from 0.4 cM to 100 cM with a marker density of 7.13 cM. The expected proportion of a genome covered by the linkage map with 791 markers randomly placed was 52.1 - 58.8%. Based on high nucleotide homology searched 6, 7 and 8 EST-SSR showing putative functions of sucrose metabolism, disease response and abiotic stress response, respectively, were scattered in 5 homologous linkage groups. The integrated genetic linkage map of sugarcane constructed in this experiment can provide useful information to develop functional markers associated with QTLs of interest of which they can further be applied in marker assisted breeding in sugarcane.

Keyword: Genetic linkage map, EST-SSRs, SSR, f-AFLP, SuS

1. บทนำ

อ้อย เป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมน้ำตาลที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศ อีกทั้งยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญของการผลิตเอทานอล แต่ปัญหาที่สำคัญ คือความหวานของอ้อยต่ำ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้มีระดับความหวานเพิ่มขึ้น จึงมีความสำคัญ แต่วิธีการคัดเลือกพันธุ์แบบมาตรฐานต้องอาศัยระยะเวลายาวนาน เพื่อให้แน่ใจว่าลูกผสมมีคุณสมบัติเด่นดังที่ต้องการ การนำความรู้ทางพันธุศาสตร์มาใช้ควบคู่กับการคัดเลือกพันธุ์ด้วยวิธีมาตรฐาน ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อย ในงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาพันธุศาสตร์พื้นฐานของอ้อยโดยการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล โดยใช้เครื่องหมาย expressed sequence tags-simple

sequence repeat (EST-SSR) และเครื่องหมาย genomic simple sequence repeat (gSSR) เติบโตในแผนที่เครื่องหมาย fluorescent-amplified fragment length polymorphism (f-AFLP) และ เครื่องหมายจำเพาะต่อยีน sucrose synthase (SuS) ที่สร้างก่อนหน้านี้แล้ว เพื่อเป็นการสร้างแผนที่พันธุกรรมของอ้อยที่มีความหนาแน่นของเครื่องหมายมากขึ้น ข้อมูลแผนที่พันธุกรรมที่ได้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการประยุกต์ใช้เพื่อการสืบหาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับความหวานของอ้อยต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

ประชากรลูกผสมสำหรับทำแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล

ในการวิจัยนี้ใช้ประชากรลูกผสม F_1 จำนวน 283 ต้นที่เกิดจากการผสมข้ามสปีชีส์ระหว่างอ้อยปลูกพันธุ์ Phil6607 และอ้อยป่า *S. spontaneum* (S6) ตัวอย่างใบอ้อยทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ ประเสริฐ นัตวชิระวงษ์ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ตัวอย่างใบอ่อนจากลูกผสม F_1 ทั้งหมดรวมทั้ง Phil6607 และ S6 มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ขั้นตอนการสกัด ทำตามวิธีของ Gawel and Jarret [1] โดยดีเอ็นเอทั้งหมดได้จากการทดลองของกัลยารัตน์ ภู่อุดแสง [2]

เครื่องหมาย EST-SSR

เครื่องหมาย EST-SSR พัฒนาและออกแบบจากงานวิจัยของ เพ็ญจันทร์ ทิพย์มงคลเจริญ [3] ที่ใช้ฐานข้อมูล SUCEST (the Sugarcane Expressed Sequence Tag project) จำนวน 212 คู่ไพรเมอร์ การทำ PCR ปฏิบัติตามงานวิจัยของ เพ็ญจันทร์ ทิพย์มงคลเจริญ [3] ตรวจสอบผลเบื้องต้นด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า agarose gel electrophoresis แล้วนำไปวิเคราะห์หาฟอสโฟริเมตใน 6% polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นอ่านผลและวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากรลูกผสม

แผนที่พันธุกรรม f-AFLP, gSSR และเครื่องหมาย ยีน sucrose synthase

แผนที่พันธุกรรม f-AFLP, gSSR และเครื่องหมาย ยีน sucrose synthase ได้ถูกสร้างไว้ก่อน

หน้านี้อยู่แล้ว โดยกัลยารัตน์ ภู่อุดแสง [2] ข้อมูลการวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากรลูกผสมของเครื่องหมาย gSSR, f-AFLP และเครื่องหมาย ยีน sucrose synthase (SuS) จำนวน 28, 675 และ 7 ตามลำดับ ถูกนำมาวิเคราะห์แผนที่ร่วมกับข้อมูลการวิเคราะห์การกระจายเครื่องหมาย EST-SSR ที่ได้จากการทดลองนี้

การวิเคราะห์การกระจายตัวและการวิเคราะห์จีโนมของเครื่องหมายโมเลกุล

การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลจำแนกได้จากการอ่านค่าการกระจายตัวในประชากรลูกทั้ง 283 ต้น การกระจายตัวของเครื่องหมาย simplex และ double simplex คือ อัตราส่วน 1:1 และ 3:1 ตามลำดับ (มีแถบ DNA: ไม่มีแถบ DNA) วิเคราะห์อัตราส่วนทางสถิติ ด้วยการทดสอบทางสถิติไค-สแควร์ (χ^2)

การวิเคราะห์ลิงค์เกจและการสร้างแผนที่พันธุกรรม

วิเคราะห์ลิงค์เกจและสร้างแผนที่พันธุกรรมเครื่องหมายโมเลกุลชนิด simplex และ double simplex ด้วยโปรแกรม JoinMap Version 3.0 [4] โดยกำหนดค่า LOD score ต่ำสุดที่ 4.0 recombination fraction (r) ที่ 0.35 ระยะทางระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลใช้ mapping function แบบ Kosambi function พิจารณารูปแบบลิงค์เกจทั้ง coupling และ repulsion ขั้นตอนการจัดลำดับเครื่องหมายโมเลกุล กำหนดค่าที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ LOD มากกว่า 4.0, r น้อยกว่า 0.45, jump น้อยกว่า 5, ripple มากกว่า 1 ค้นหาขนาดประมาณของจีโนมด้วยวิธีของ Hulbert และคณะ [5]

การวิเคราะห์กลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจ

เครื่องหมาย simplex และ double simplex ที่ได้จากเครื่องหมาย gSSR, EST-SSR และ SuS ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งจำเพาะในจีโนม สามารถช่วยในการวิเคราะห์กลุ่มลิงค์เกจที่เป็นโฮโมโลกัสกันโดยพิจารณาจากกลุ่มลิงค์เกจ 2 กลุ่ม หรือมากกว่า 2 กลุ่มลิงค์เกจ ที่มีเครื่องหมาย simplex หรือ

double simplex ที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์เดียวกันปรากฏอยู่ในการวิเคราะห์กลุ่มลิงค์เกจที่เป็นโฮโมโลกัสกันโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งจำเพาะในจีโนม อยู่บนสมมุติฐานที่ว่า กลุ่มลิงค์เกจที่เป็นโฮโมโลกัสกันต้องอยู่บนชิ้นโครโมโซมที่เป็นโฮโมโลกัสกัน

3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 เครื่องหมายโมเลกุล simplex และ double simplex ที่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจได้

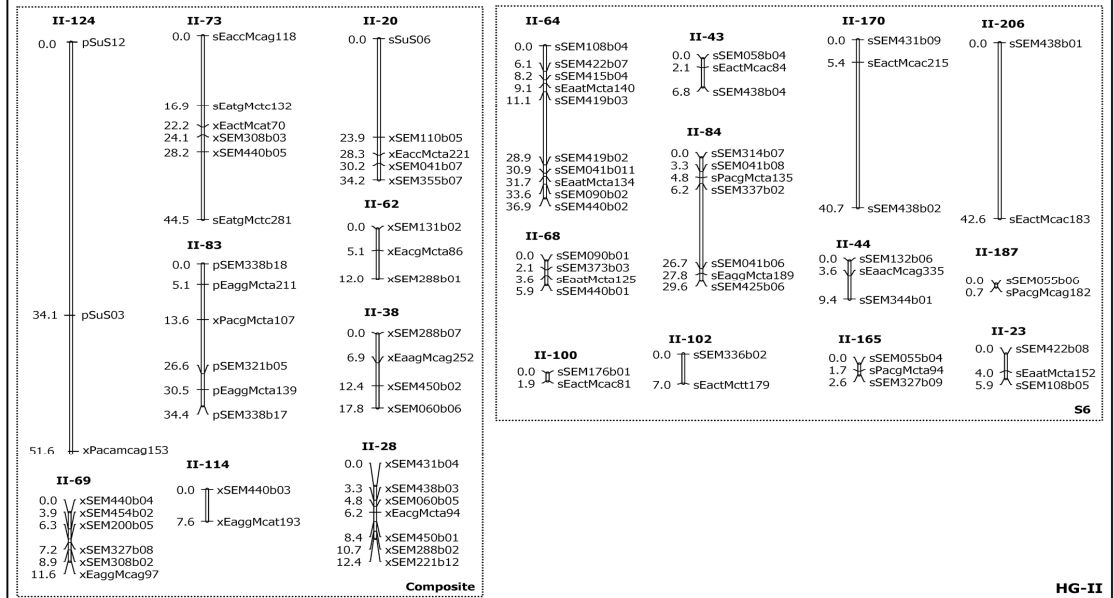
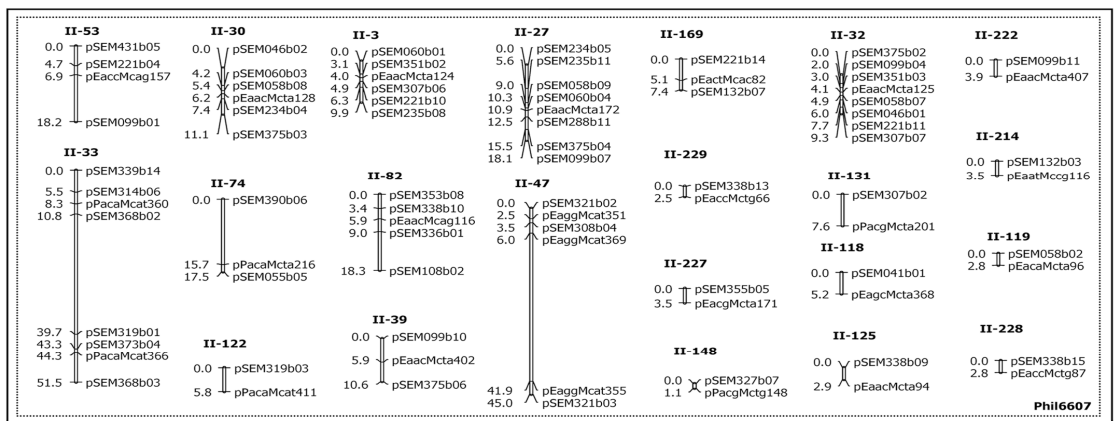
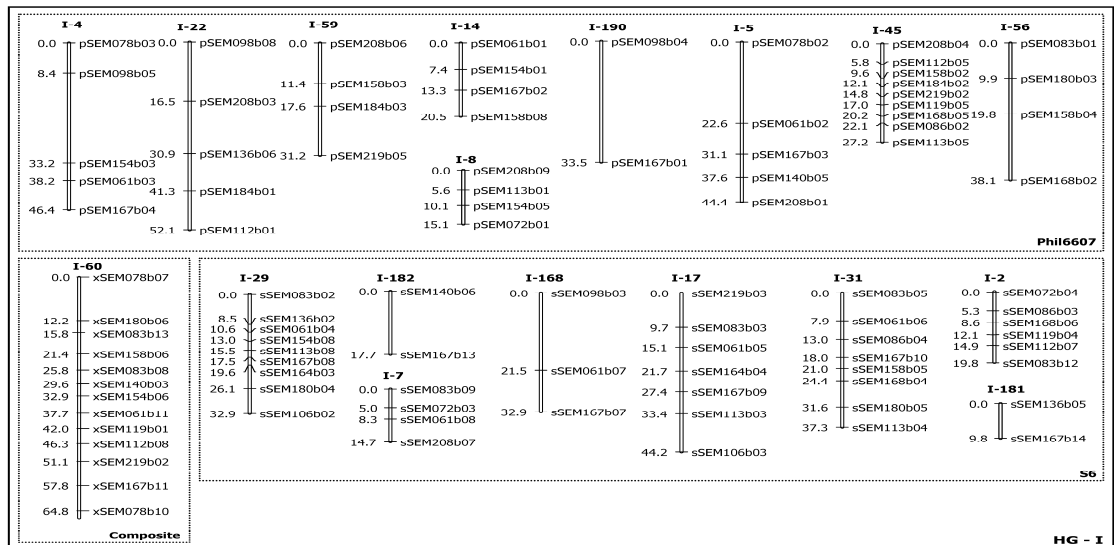
Markers	No of markers				No of linked markers				No of unlinked markers			
	EST-SSRs	SSR	f-AFLP	SuS	EST-SSRs	SSR	f-AFLP	SuS	EST-SSRs	SSR	f-AFLP	SuS
Simplex												
Phil6607	478	15	321	4	256	5	112	0	222	9	209	4
S6	377	12	301	3	196	0	99	3	181	12	202	0
Double simplex												
Sum	1,039	28	675	7	537	5	246	3	502	22	429	4
Total	1,749(100%)				791(45.2%)				958(54.7%)			

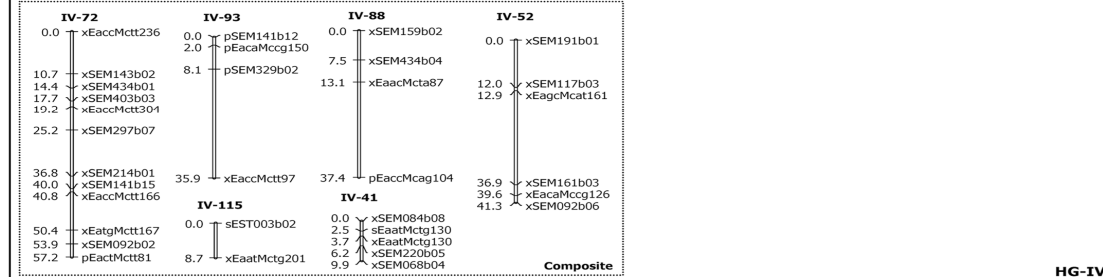
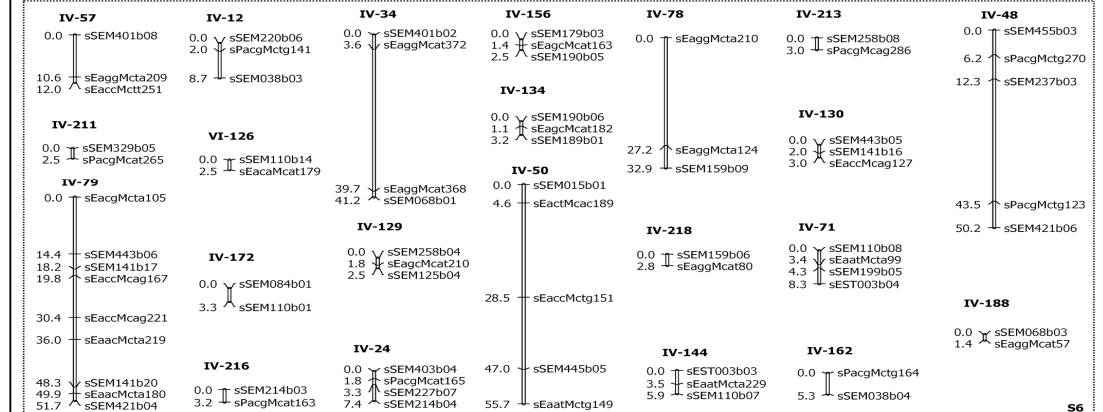
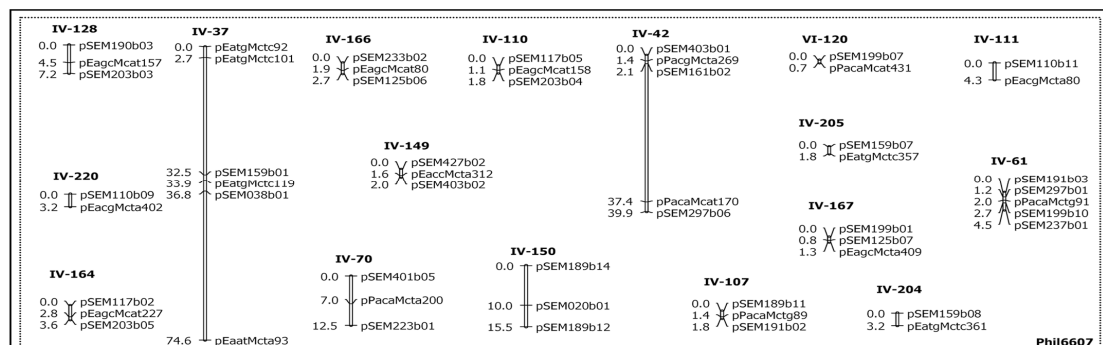
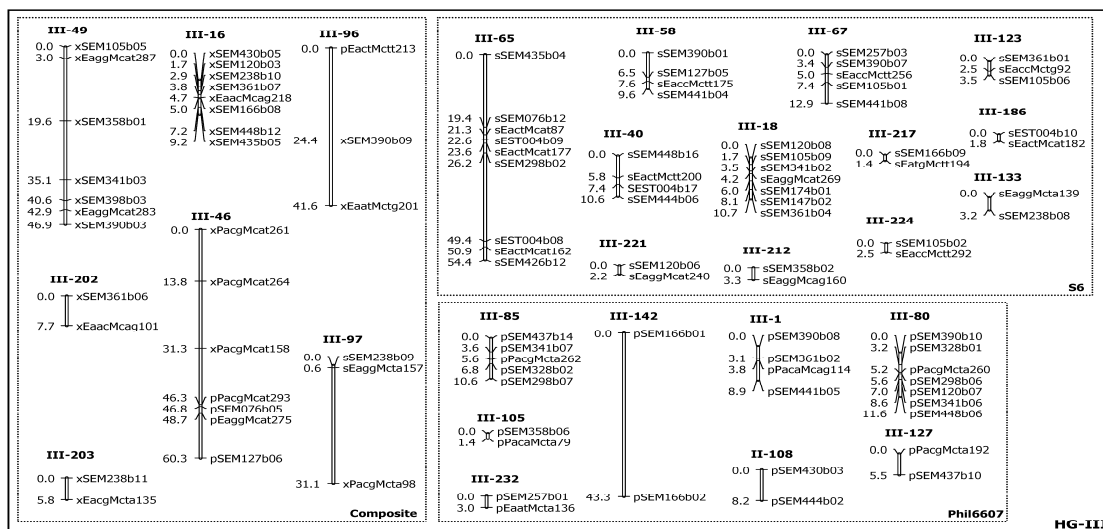
ในงานวิจัยนี้เครื่องหมายทั้งหมดที่ได้จากเครื่องหมายทั้ง 4 ชนิด มี จำนวน 1,749 เครื่องหมาย (ตารางที่ 1) แยกเป็นเครื่องหมาย gSSR, EST-SSR, f-AFLP และเครื่องหมาย SuS จำนวน 27, 1,039, 675 และ 7 ตามลำดับ แยกเป็นเครื่องหมาย simplex ได้ 1,511 เครื่องหมาย (86.3%) , เครื่องหมาย double simplex ได้ 238 เครื่องหมาย (13.6%) มีเครื่องหมายที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 791 เครื่องหมายจากทั้งหมด 1,749 เครื่องหมาย คิดเป็นอัตราส่วน 45.2% ของเครื่องหมายทั้งหมด ซึ่งมีอัตราส่วนของเครื่องหมายที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้เพิ่มขึ้น จากงานวิจัยของ กัลยรัตน์ ภูสุตแสง [1] ที่วิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด 701 เครื่องหมาย มีเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 230

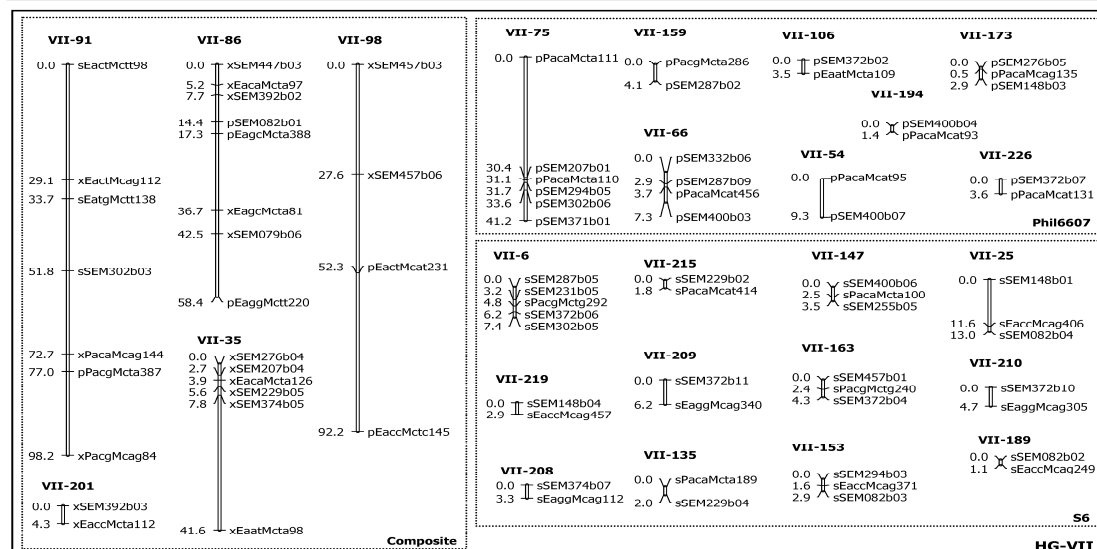
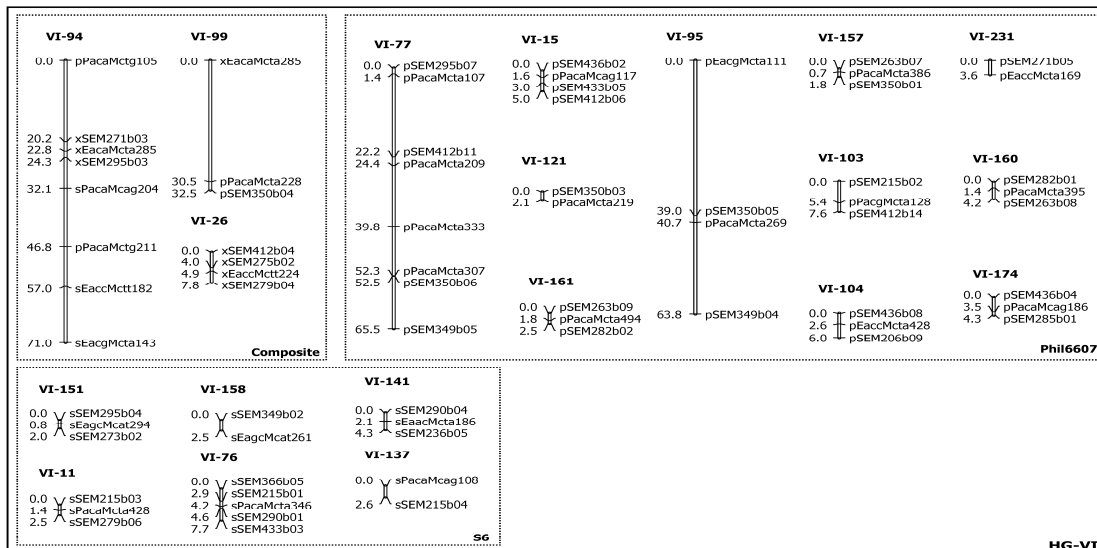
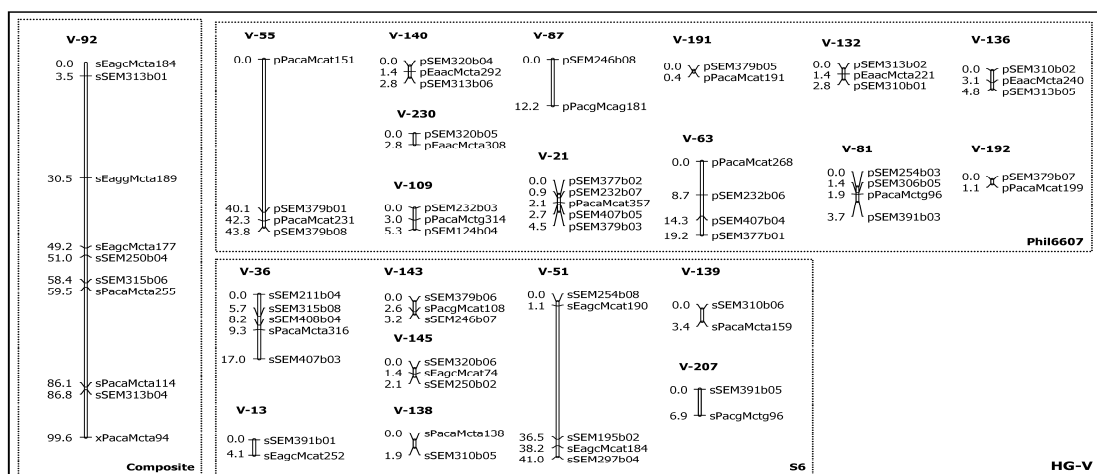
เครื่องหมายโมเลกุลคิดเป็น 32.81% ของเครื่องหมายทั้งหมด จากงานวิจัยของ Grivet และคณะ [6] Ming และคณะ [7] Garcia และคณะ [8] Oliveira และคณะ [9] มีอัตราส่วนของเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงค์เกจประมาณ 30 - 50% ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์ ในงานวิจัยนี้ ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้จำนวน 791 เครื่องหมาย คิดเป็นอัตราส่วน 45.2% ของเครื่องหมายทั้งหมด ซึ่งมีอัตราส่วนของเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงค์เกจได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากในงานวิจัยนี้และงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นใช้ประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสปีชีส์ ทำให้ยีนพันธุพ่อแม่มีความแตกต่างทางพื้นฐานพันธุกรรมมาก การเข้าคู่ของโฮโมโลกัส

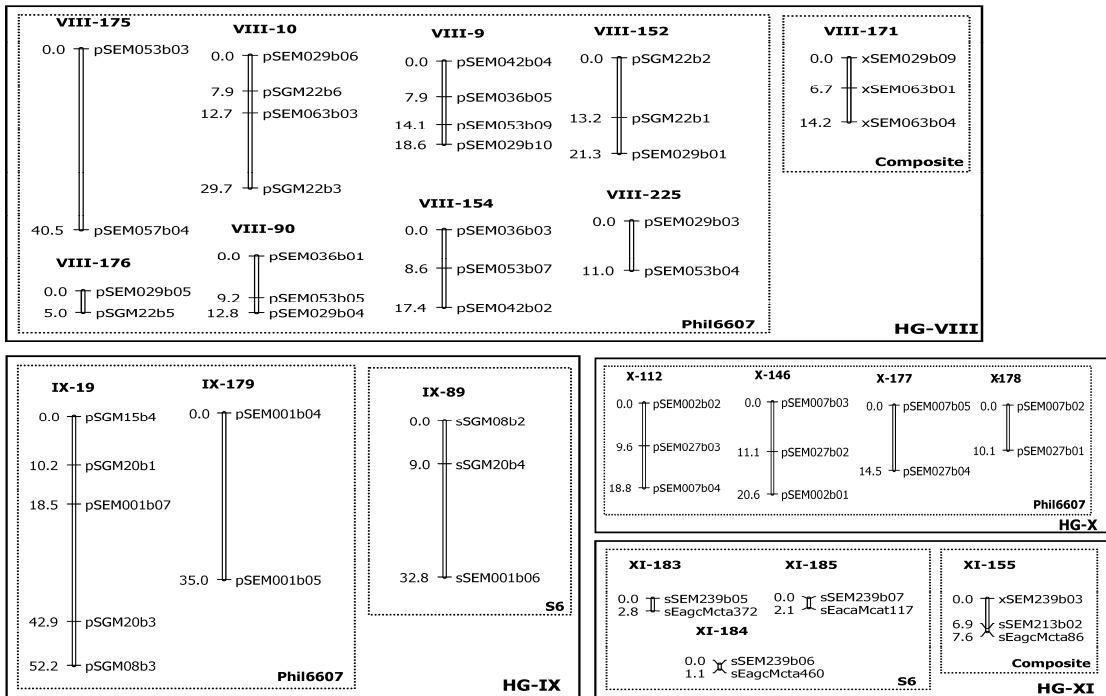
โครโมโซมจึงมีความยากมากกว่าการเข้าสู่ของโครโมโซมที่เกิดจากการผสมตัวเองหรือผสมข้ามระหว่างพ่อแม่ที่มีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงกันเช่นการผสมระหว่างอ้อยพันธุ์ปรับปรุงเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์หาลิงก์เกจได้จึงมีจำนวนน้อย ส่งผลให้โอกาสของการตรวจสอบลิงก์เกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลลดลง ส่วนงานวิจัยที่มีเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์หาลิงก์เกจได้จำนวนมากซึ่งมีอัตราส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์หาลิงก์เกจประมาณ 60 - 90% ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดที่

นำมาวิเคราะห์ (Al-Janabi และคณะ [10] Da Silva และคณะ [11] Hoarau และคณะ [12] Aitken และคณะ [13]) เนื่องจากประชากรลูกผสมที่ใช้เป็นประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมตัวเองหรือผสมข้ามระหว่างพ่อแม่ที่มีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงกันในงานวิจัยนี้สามารถเพิ่มจำนวนลิงก์เกจและกลุ่มไฮโมโลกัสลิงก์เกจจากเดิม 70 ลิงก์เกจมี 6 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงก์เกจ เป็น 232 ลิงก์เกจมี 11 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงก์เกจ (รูปที่ 1)



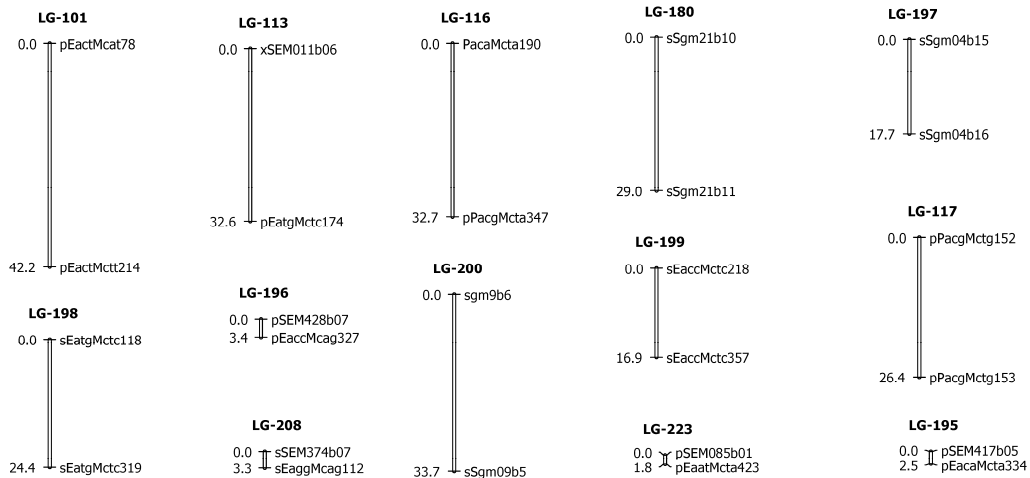






ลิงค์เกจที่ไม่สามารถจัดกลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจได้

(Unassigned linkage)



รูปที่ 1 แผนที่พันธุกรรมอ้อยที่สร้างจากประชากรลูกผสม F₁ จำนวน 283 สายพันธุ์ที่เกิดจากการผสมระหว่างอ้อยปรับปรุงพันธุ์ Phil6607 และ S6 (*S. spontaneum*) ประกอบด้วย 791 เครื่องหมายโมเลกุลของเครื่องหมาย simplex และ double simplex ระยะห่างในแผนที่ที่มีหน่วยเป็น centi-Morgans (cM) โดยใช้ Kosambi function; เครื่องหมายของ Phil6607 นำหน้าด้วยอักษร p; เครื่องหมายของ S6 นำหน้าด้วยอักษร s; เครื่องหมาย double simplex ใช้สัญลักษณ์ x ด้านหน้า; ตัวเลขโรมันหมายถึง หมายเลขกลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจของกลุ่มลิงค์เกจ; HG หมายถึงกลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจ; กรอบสี่เหลี่ยมแสดงกลุ่มโฮโมโลกัสลิงค์เกจ; เส้นปะกรอบสี่เหลี่ยมแสดงลิงค์เกจแยกตามชนิดของอัลลีลเครื่องหมาย

จากการวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจพบว่าเครื่องหมายที่มีตำแหน่งจำเพาะ gSSR , EST-SSR และ SUS สามารถจัดกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้ทั้งหมด 11 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ ประกอบด้วยกลุ่มลิงค์เกจทั้งหมด 219 ลิงค์เกจ แบ่งเป็นกลุ่มลิงค์เกจที่เป็น Phil6607 จำนวน 101 ลิงค์เกจ, กลุ่มลิงค์เกจที่เป็น S6 จำนวน 84 ลิงค์เกจ และกลุ่มลิงค์เกจที่เป็นลิงค์เกผสมระหว่าง Phil6607, S6 และ double simplex จำนวน 34 ลิงค์เกจ ในแต่ละกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจประกอบด้วยลิงค์เกจตั้งแต่ 4 - 45 ลิงค์เกจ กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจที่ใหญ่ที่สุดประกอบด้วย 43 ลิงค์เกจมีเครื่องหมายจำนวน 160 เครื่องหมาย (HG-IV) กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจที่เล็กที่สุดประกอบด้วย 4 ลิงค์เกจ มีเครื่องหมายจำนวน 9 เครื่องหมาย (HG-XI) ซึ่งมีเพียงกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจเดียว และมีลิงค์เกจที่ไม่สามารถจัดกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้จำนวน 13 ลิงค์เกจ (รูปที่ 1)

กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ ของแผนที่พันธุกรรมฮอยที่วิเคราะห์ได้จากงานวิจัยที่ผ่านมา ([6] [8] [9] [14] [15]) สามารถวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้ 10, 7, 8, 8, 12 และ 14 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ ตามลำดับ ซึ่งในแต่ละงานวิจัยวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจจากฮอยที่มีสายพันธุ์พ่อแม่แตกต่างกัน ทำให้ชุดของโครโมโซมพื้นฐานต่างกันลูกผสมที่ได้ จึงมีโครโมโซมอนิวพลอยด์ดีเกิดขึ้นขณะการเข้าคู่กันในการแบ่งเซลล์ไมโอซิส [16] ในงานวิจัยนี้วิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้จำนวน 11 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากแผนที่พันธุกรรมเดิมในงานวิจัยของ กัลยารัตน์ ภูสุตแสง [2] ที่วิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้จำนวน 6 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ แสดงให้เห็นว่าจำนวนเครื่องหมายที่เพิ่มขึ้นในแผนที่พันธุกรรมที่

สร้างได้ ช่วยในการวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจให้มีจำนวนใกล้เคียงกับกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจที่ควรจะเป็นคือ ตั้งแต่ 8 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ ขึ้นไป (ภายใต้สมมุติฐานของ autooctaploid) โดยการวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจในงานวิจัยนี้ใช้เครื่องหมายที่มีตำแหน่งจำเพาะ (gSSR , EST-SSR และ SuS) ในการวิเคราะห์ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับงานวิจัยของ Oliveira และคณะ[9] ซึ่งวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้จำนวน 14 กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ

หน้าที่คาดหมายของ EST-SSR ในแผนที่พันธุกรรม

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก EST (expressed sequence tag) เป็นการใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่มีการแสดงออกมาออกเป็นโปรเมอร์เพื่อวางเครื่องหมายโมเลกุลที่คาดว่าเป็นยีนลงในแผนที่พันธุกรรม คุณสมบัติที่สำคัญของเครื่องหมาย EST-SSR คือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลต่อยีนที่ใช้ออกแบบโปรเมอร์ พบว่า ลำดับเบส EST-SSRs ทั้งหมด 212 EST-SSRs มีลำดับเบส EST-SSRs จำนวน 186 EST-SSRs ที่วิเคราะห์ลิงค์เกจและกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้, มี EST-SSRs จำนวน 5 EST-SSRs ที่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจแต่ไม่สามารถวิเคราะห์กลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจ และอีก 21 EST-SSRs ไม่สามารถวิเคราะห์ลิงค์เกจได้ จากลำดับเบส EST-SSRs จำนวน 186 EST-SSRs ที่วิเคราะห์ลิงค์เกจและกลุ่มไฮโมโลกัสลิงค์เกจได้พบว่าแบ่งเป็น EST-SSRs ที่ไม่มีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลจำนวน 40 EST-SSRs, โปรตีนสมมุติฐาน (hypothetical protein) จำนวน 23 EST-SSRs และเป็น EST-SSRs ที่ทราบหน้าที่คาดหมาย (putative function) จำนวน 123 EST-SSRs ซึ่งในจำนวนนี้พบ

เครื่องหมาย EST-SSR จำนวน 43 เครื่องหมาย ที่มีลำดับเบส EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจศึกษา 21 EST-SSRs (ตารางที่ 2) โดยแบ่งตามหน้าที่ของยีน ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาลซูโครส (sucrose metabolism) จำนวน 6 EST-SSRs, ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค (disease response) จำนวน 7 EST-SSRs และยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (abiotic stress response) จำนวน 8 EST-SSRs ซึ่งพบเครื่องหมาย EST-SSR ที่เกี่ยวข้องกับยีนเหล่านี้กระจายอยู่ในกลุ่มโฮโมโลกส์ลิงเกจที่ HG-II, HG-III, HG-IV, HG-VI และ HG-VII จำนวน 14, 16, 7, 3

และ 3 เครื่องหมาย ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ รูปที่ 1

กล่าวโดยสรุปแผนที่พันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองนี้ประกอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์ลิงเกจได้จำนวน 791 เครื่องหมาย ได้กลุ่มลิงเกจ 219 กลุ่มลิงเกจและสามารถวิเคราะห์กลุ่มโฮโมโลกส์ได้ 11 กลุ่มโฮโมโลกส์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะ QTLs ที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบผลผลิตและความหวานของอ้อยได้

ตารางที่ 2 EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจศึกษา

Group of gene function	Cluster	HG-LG	Motif	Putative function	E-value
Sugarcane metabolism	SCSFAD1070E12.g	II-84	(gcc)5	Fructose-1,6-bisphosphatase	2.00E-26
	SCVPAM1059C01.g	III-65	(at)5	Sugar transporter family protein	1.00E-14
	SCRUSB1064F09.g	II-28,II-53,II-70	(cgg)5	putative sucrose synthase	7.00E-40
	SCJLST1019B07.g	VI-15	(gc)6	Sugar transporter family protein	3.00E-70
	SCSBST3094H07.g	IV-72	(cga)6	putative diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase	3.00E-42
	AY302083.1	VII-98,VII-163	(tgc)6	soluble acid invertase	<i>Saccharum</i> mRNA
Disease response	SCEZLB1007E12.g	III-16,III-65	(ta)7	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	8.00E-07
	SCJLRT1021D04.g	III-85,III-127	(tcc)5	disease resistance response protein-related	6.00E-45
	SCQSRT2031C10.g	II-43,II-170	(tc)5	NBS-LRR disease resistance protein homologue	2.00E-16
	SCACSB1117C07.g	II-64,II-68,II-69,II-73,II-114	(cgg)6	putative Pathogenesis-related protein PR-1	2.00E-19
	SCSFSB1097B02.g	IV-71,IV-115	(ta)8	putative disease resistance protein I2	2.00E-14
	SCACSD1018E05.g	III-1,III-58,III-67	(gac)5	disease resistance-responsive family protein	2.00E-24
	SCMCST1057C10.g	IV-79,IV-130	(gct)5	putative disease resistance protein	4.00E-49
	SCQGLR1041A05.g	III-174,VI-15,VI-104	(ga)5	putative stress-induced protein sti1	1.00E-31
	SCRLAD1040D08.g	III-40,III-65,III-186	(at)5	early-responsive to dehydration protein	6.00E-59
	SCRLAD1043B06.g	III-40,III-108	(ggt)7	dehydration responsive element binding protein	9.00E-13
	SCBGAD1027C03.g	IV-48,IV-50	(ggc)7	Dehydration-responsive element-binding protein 2D	9.00E-15
Abiotic stress response	SCCCCL3001D10.b	VII-86	(ccg)5	putative cold shock protein-1	1.00E-29
	SCEZFL5083C02.g	III-16,III-40	(gc)5	low temperature and salt responsive protein-like	4.00E-12
	SCEZLB1006B07.g	II-28,II-38	(gcc)5	Heat shock protein 81-1	5.00E-99
	SCBFRZ2045E11.g	II-69	(ggc)5	cold induced protein-like	4.00E-26

5. เอกสารอ้างอิง

- [1] Gawel NL and Jaret RL. A modified CTAB DNA extraction procedure of *Musa* and *Ipomoea*, Plant Mol Bio. Rpt, Vol. 9 , pp.262-266,1991.
- [2] กัลยารัตน์ ภู่อุดแสง, การวิเคราะห์แผนที่พันธุกรรมอ้อย ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2550.
- [3] เพ็ญจันทร์ ทิพย์มงคลเจริญ, การพัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR ของอ้อยจากเหมืองข้อมูล ESTs, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2551.
- [4] Ooijen, J.W. van, Voorrips, R.E. JOINMAP 3.0. Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, 2001.
- [5] Hulbert SH., Ilott TW., Legg EJ., Lincoln SE., Lander ES., Michelmore.RW., Genetic analysis of the fungus *Bremia lactucae* using restriction fragment length polymorphisms. Genetics Vol. 148; pp.479–494, 1988.
- [6] Grivet, L., D’Hont, A.,Roques, D., Feldmann, P., Lanaud, C., and Glaszmann, J.C.RFLP Mapping in Cultivated Sugarcane (*Saccharum*spp.), Genetic, Vol.142, pp.987-1000,1996.
- [7] Ming, R., Liu, S.C., Bowers, J.E., Moore, P.H., Irvine, M.J., and Paterson A.H. Construction of a *Saccharum* consensus genetic map from two interspecific crosses. Crop Sci Vol. 42, pp. 570 – 583, 2002.
- [8] Garcia, A.A.F., Kido, E.A., Meza, A.N., Souza, H.M.B., Pinto, L.R., Pastina, C.S., da Silva, J.A.G., Ulian, E.C., Figueira, A., Souza, A.P. Development of an Integrated Genetic Map of a Sugarcane (*Saccharum* Spp.) Commercial Cross, Based on a Maximum-Likelihood Approach for Estimation of Linkage and Linkage Phases, Theor Appl Genet, Vol.112 , pp. 298-314,2006.
- [9] Oliveira, K.M., Pinto, L.R., Marconi, T.G., Margarido, G.R.A, Pastina, M.M., Teixeira, L.H.M., Figueira, A.V., Ulian, E.C., Garcia, A.A.F., Souza, A.P. Functional integrated genetic linkage map based on ESTmarkers for a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, Mol Breeding Vol.20, pp. 189–208, 2007.
- [10] Al-Janabi, S.M., Honeycutt, R.J., McClelland, M., Sobral, B.W.S. A genetic linkagemap of *Saccharum spontaneum* L, ‘SES 208’. Genetics Vol.134, pp. 1249-1260, 1993.
- [11] Da Silva, J.A.G., Honeycutt, R.J., Burnquist, W.L., Al-Janabi ,S.M., Sorrels, M.E., Tanksley, S.D. and Sobral B.W.S. *Saccharum spontaneum* L. ‘SES208’ genetic linkage map containing RFLP and PCR-based markers. Mol Breed. Vol1, pp. 165-169, 1995.
- [12] Hoarau, J.Y., Offmann, B., D’ Hont, A., Risterucci, A.M., Roques, D., Glaszmann, J.C. and Grivet, L. Genetics dissection of a

- modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers. Theor.Appl.Genet.Vol.103, pp. 84-97, 2001.
- [13] Aitken, K.S., Jackson, P.A., McIntyre, C.L. A Combination of AFLP and SSR Markers Provides Extensive Map Coverage and Identification of Homologous Linkage Groups in Sugarcane Cultivar, Theor Appl Genet, Vol.110 , pp. 789-801, 2005.
- [14] Rossi, M., Araujo, PG., Paulet, F., Farsmeur, O., Dias, VM., Chen, H., Van Sluys, MA., D'Hont, AD. Genomic Distribution and Characterization of EST-derived Resistance Gene Analogs (RGAs) in Sugarcane. Mol Gen Genomics, Vol.269, pp. 406-419, 2003.
- [15] Reffay N, Jackson PA, Aitken KS, Hoarau J-Y, D'Hont A, Besse P, McIntyre CL ,Characterisation of Genome Regions Incorporated from an Important Wild relative into Australian sugarcane, Mol Breed, Vol. 15, pp.367-381, 2005.
- [16] Jannoo, N., Grivet, L., D'Hont, A., Glaszmann, JC. Differential Chromosome Pairing Affinities at Meiosis in Polyploidy Sugarcane Revealed by Molecular Markers, Heredity, Vol.93, pp. 460-467, 2004.