



## การวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลสลับในยีนสังเคราะห์ซูโครสของอ้อยด้วยเทคนิค

### Restriction Site Associated DNA Sequencing (RAD-seq)

#### Investigation of SNP molecular markers in the sucrose synthesis genes of sugarcane using Restriction Site Associated DNA Sequencing (RAD-seq)

วีรกรณ์ แสงไสย์<sup>1\*</sup>, เบญจวรรณ รัตวตร์<sup>1</sup>, ศุภรัตน์ ศรีทะวงษ์<sup>2</sup>, นัฐภัทร์ คำหล้า<sup>3</sup>

รวีวรรณ เชื้อกิตติศักดิ์<sup>4</sup> และ ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล<sup>1</sup>

Weerakorn Saengsai<sup>1\*</sup>, Benjawan Rattawat<sup>1</sup>, Supparat Srithawong<sup>2</sup>, Nattapat Khumla<sup>3</sup>,

Raweevan Chueakiitisak<sup>4</sup> and Suchirat Sakuanrungsirikul<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ตำบลศิลา อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40000

<sup>1</sup>Khon Kaen Field Crops Research Center, Sila, Muang, Khon Kaen 40000, Thailand

<sup>2</sup>ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ ตำบลหนองไม้ อำเภอเมือง ศรีสะเกษ 33000

<sup>2</sup>Sisaket Horticultural Research Centre, Nong Phai, Muang, Si Sa Ket, 33000, Thailand

<sup>3</sup>ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ตำบลสุขสำราญ อำเภอดงพญา จังหวัดนครสวรรค์ 60190

<sup>3</sup>Nakhon Sawan Field Crops Research Center, Tak Fa, Nakhon Sawan, 60190, Thailand

<sup>4</sup>สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

<sup>4</sup>Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture, Bangkok, 10900, Thailand

\*Corresponding author: weerakorn.saengsai@gmail.com

Received date: 11 April 2025 Accepted date June 2025: Published date: June 2025

#### บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์อ้อยโดยส่วนใหญ่ใช้เทคนิคแบบดั้งเดิมที่มีการนำพ่อและแม่พันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการมาผสมกัน ใช้ลักษณะภายนอกที่ปรากฏในการคัดเลือก ส่งผลให้ต้องใช้ระยะเวลาจนได้พันธุ์อ้อยที่มีลักษณะที่ดีสำหรับแนะนำเกษตรกร การวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Single nucleotide polymorphism (SNP) ด้วยเทคโนโลยี Restriction site Associated DNA Sequencing (RAD-Seq) สามารถใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อตรวจเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ ตรวจสอบสายพันธุ์ลูกผสม การจัดจำแนกพันธุ์สิ่งมีชีวิตที่มีฐานพันธุกรรมใกล้เคียงกันได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หาเครื่องหมายโมเลกุลสลับ (SNP) เพื่อตรวจเอกลักษณ์ของสายพันธุ์อ้อยเพื่อใช้ในการจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของอ้อย การเทคโนโลยี RAD-seq วิเคราะห์อ้อยจากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จำนวน 16 สายพันธุ์ ได้แก่ UT17 LK92-11 KK07-250 KK09-0857 UT15 KK09-0939 K88-92 KK07-599 KK08-059 DOA-NS1 KK09-0941 DOA-KK3 DOA-KK4 KK07-037 KK09-0844 และ Si Samrong1 พบว่า ทุกสายพันธุ์มีจำนวน SNPs และ INDELs มากกว่า 1,900,000 และ 23,000 ตำแหน่ง ตามลำดับ ส่วนแผนภาพต้นไม้แสดงสายวิวัฒนาการที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มยีนสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส ด้วยวิธี Maximum Likelihood method พบการจัดกลุ่มยีนสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ที่สอดคล้องกับค่า Commercial Cane Sugar (C.C.S.) ของสายพันธุ์อ้อย โดยกลุ่มที่ 1 มีค่า C.C.S. อยู่ในช่วง 9-12 และกลุ่มที่ 2 มีค่า C.C.S. อยู่ในช่วง 13-15 นอกจากผลการจัดกลุ่มยีนสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสแล้วเทคนิคนี้ให้ลำดับเบสที่สามารถนำมาใช้เป็นลำดับเบสอ้างอิงในการศึกษาวิจัยบริเวณยีนอื่นๆที่สนใจในอ้อยในอนาคตต่อไปได้

**คำสำคัญ :** อ้อย ซูโครส ยีน เครื่องหมายโมเลกุล สลับ



### Abstract

The development of sugarcane cultivars with desirable agronomic traits remains limited in success, primarily due to the reliance on traditional breeding methods based on phenotypic selection. These conventional approaches, involving hybridization of selected parental lines and visual trait evaluation, are time-consuming and inefficient for rapid varietal improvement. The objective of this study was to identify single nucleotide polymorphism (SNP) molecular markers for the characterization and identification of sugarcane varieties. To enhance genetic selection, single nucleotide polymorphism (SNP) markers generated through Restriction-site Associated DNA Sequencing (RAD-Seq) were utilized to investigate genetic diversity and support molecular breeding. In this study, RAD-Seq was applied to analyze 16 sugarcane accessions from the Khon Kaen Field Crops Research Center. Each accession yielded over 1.9 million SNPs and more than 23,000 insertion-deletion (INDEL) polymorphisms. Phylogenetic analysis of sucrose synthesis genes using the Maximum Likelihood method revealed two major gene clusters corresponding to the commercial cane sugar (C.C.S.) values of the accessions. Group 1 comprised cultivars with C.C.S. values of 9–12, while Group 2 included those with values of 13–15. The results demonstrate that RAD-Seq is a powerful tool not only for assessing genetic relationships and identifying hybrids but also for providing reference-quality sequences that can facilitate future genomic studies of important genes in sugarcane.

**Keywords:** sugarcane, sucrose, gene, molecular marker, SN



## บทนำ

อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจประเทศไทยและยังไทยเป็นผู้ผลิตอ้อยมากอันดับ 4 ของโลก และผู้ส่งออกน้ำตาลอันดับ 2 ซึ่งอ้อยมีศักยภาพที่จะนำไปสู่การพัฒนาโครงการเขตเศรษฐกิจชีวภาพ หรือ Bioeconomy ซึ่งเป็นหนึ่งในพืชอุตสาหกรรมเป้าหมายในการเคลื่อนประเทศไทยไปสู่อุตสาหกรรม 4.0 (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2566) ปัจจัยที่ทำให้ผลผลิตอ้อยที่ตกต่ำสืบเนื่องมาจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ ประกอบด้วยการบริหารจัดการที่ไม่เป็นระบบ สภาพพื้นที่ปลูกอ้อยที่ไม่มีความเหมาะสม ความอุดมสมบูรณ์ของดินที่ปลูกอ้อย ปัญหาการระบาดของโรค แมลงศัตรูพืช และปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งคือเรื่องพันธุ์อ้อย หากนำพันธุ์อ้อยไปปลูกในสภาพพื้นที่ที่ไม่เหมาะสม ส่งผลต่อผลผลิตและคุณภาพของอ้อยต่ำ นอกจากนี้หากพันธุ์อ้อยมีความอ่อนแอหรือไม่ทนทานต่อการเข้าทำลายของโรคและแมลงศัตรูพืชอ้อย ทำให้ผลผลิตอ้อยตกต่ำ (เรวัต และคณะ, 2551) ดังนั้น การมีพันธุ์อ้อยที่ดีสามารถตอบสนองต่อพื้นที่ปลูกอ้อยได้หลากหลายตอบสนองต่อปุ๋ย ทนต่อสภาวะแล้งและน้ำท่วม สามารถไว้ต่อได้ดี และปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวเนื่องให้อ้อยสามารถให้ผลผลิตได้สูงสุด แต่อย่างไรก็ตาม ส่วนใหญ่การปรับปรุงพันธุ์อ้อยยังคงใช้เทคนิคแบบดั้งเดิม ที่มีการนำพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการมาผสมกัน จากนั้นคัดเลือกต้นอ้อยรุ่นลูก (F1) โดยใช้ลักษณะภายนอกที่ปรากฏ (Phenotype) ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการคัดเลือกอย่างน้อย 8 – 10 ปี จึงจะได้พันธุ์อ้อยที่มีลักษณะที่ต้องการนำไปใช้ประโยชน์ทางเกษตรและแนะนำเกษตรกร (เรวัต และคณะ, 2551; สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2558)

การคัดเลือกพันธุ์โดยใช้ลักษณะภายนอกที่ปรากฏ (phenotype) เป็นลักษณะที่ผันแปรได้ตามอิทธิพลสภาพแวดล้อม ซึ่งไม่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์ให้ถูกต้องแม่นยำได้ แต่ยังไม่พบรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์อ้อยให้มีระดับน้ำตาลซูโครสสูง ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยมุ่งเน้นไปที่กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับนำไปใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์อ้อยให้มีระดับน้ำตาลสูงต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์ของอ้อย แหล่งข้อมูลสำหรับการศึกษายีนของอ้อยที่ดีที่สุดในปัจจุบัน คือ ฐานข้อมูลลำดับเบส expressed sequence tags (ESTs) (Vettore et al., 2003) มีการนำลำดับเบส ESTs ของอ้อยมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อใบ (McCormick et al., 2008) และลำต้น (Papini-Terzi et al., 2009) ของอ้อยตลอดจนพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ (EST-SSR) (Ukoskit et al., 2012) เครื่องหมาย Intron length polymorphism (ILP) คือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของความยาวอินทรอนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณเอ็กซอนที่คร่อมส่วนที่คาดว่าอินทรอน ซึ่งตำแหน่งของอินทรอนสามารถทำนายได้โดยการเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบส ESTs กับลำดับเบสจีโนม (Yang et al., 2007) ความยาวของอินทรอนมีผลกระทบกับระดับการแสดงออกของยีนและฟีโนไทป์ในข้าวและอะราบิดอปซิส พบว่า กลุ่มยีนที่มีขนาดอินทรอนยาวกว่ามีระดับการแสดงออกของยีนสูงกว่ากลุ่มยีนที่มีขนาดอินทรอนสั้นกว่า (Ren et al., 2006) ซึ่งจากรายงานของ ณัฐภัทร และกิตติพัฒน์ (2559) ที่ได้พัฒนาเครื่องหมาย intron length polymorphism (ILP) จากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส โดยใช้ข้อมูลจาก KEGG pathway และผลการศึกษาการทำงานของยีนด้วยไมโครแอเรย์ จากข้อมูลลำดับเบส ESTs ของอ้อย 121,301 ลำดับเบส (42,377 sugarcane assembled sequences และ 78,924 singleton ESTs) สามารถคัดเลือก ESTs ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสได้ทั้งหมด 91 ลำดับเบส และออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 195 คู่ไพรเมอร์ การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรอ้อย (*Saccharum* spp.) พบว่าเครื่องหมาย ILP สามารถอ้อยแบ่งออกเป็น 2 ประชากร โดยสามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลซูโครสในอ้อยได้

สำหรับการพัฒนาด้านพันธุกรรมของอ้อยในประเทศไทย ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากขาดความรู้ด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาใช้ในการบ่งชี้ลักษณะประจำพันธุ์



โดยการศึกษาความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของพืชทั้งลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait) หรือลักษณะเชิงคุณภาพ (qualitative trait) นับว่าเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของพืช ระหว่าง ชนิดหรือภายในชนิด (between species or within species) ประชากร (population) พันธุ์ (varieties) และสายพันธุ์ (breeding line) ได้อย่างถูกต้อง ซึ่งเป็นการคัดเลือกจากลักษณะทางจีโนไทป์ (genotype) ที่ต้องการจากพืชโดยตรง (Lo and Shaw, 2019) โดยเทคนิค Restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) มีหลักการเหมือนกันกับ Genotyping-by-Sequencing (GBS) เป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสลับ (single nucleotide polymorphism, SNP) แบบทั่วทั้งจีโนม (genome-wide SNP discovery) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ร่วมกับการใช้เทคโนโลยี Next Generation Sequencing (NGS) (Baird et al., 2008; Lo and Shaw, 2019) ในการหาลำดับเบส เทคนิค RADseq สามารถค้นหาและจีโนไทป์สลับได้ในขั้นตอนเดียว ซึ่งสามารถค้นหาสลับได้มากถึง 50,000 - 100,000 ตำแหน่งจากจีโนม จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตได้ทุกสปีชีส์ รวมถึงสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่มีข้อมูลทางจีโนมิกส์ การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลในรูปแบบของ SNP ด้วยเทคโนโลยี RAD-seq จึงช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายได้อย่างมากเมื่อเทียบกับการหาลำดับเบสทั้งจีโนม (Whole genome sequencing) นอกจากนี้เทคนิค RAD-seq ยังมีความประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาสลับสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล (DNA marker) เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ (Marker-Assisted Selection หรือ MAS) การปรับปรุงพันธุ์ อีกทั้งยังสามารถใช้โมเลกุล เครื่องหมายเพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ ตรวจสอบสายพันธุ์ลูกผสม การจัดจำแนกพันธุ์ สิ่งมีชีวิต ที่มีฐานพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (Severn-Ellis et al., 2020; Cumer et al., 2021) การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หาเครื่องหมายโมเลกุลสลับ (SNP) เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ของสายพันธุ์เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์ต่อไป

## วิธีการดำเนินการ

1.การเตรียมพืช: ดำเนินการปลูกอ้อย ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จำนวน 16 พันธุ์/โคลน ได้แก่ UT17 LK92-11 KK07-250 KK09-0857 UT15 KK09-0939 K88-92 KK07-599 KK08-059 DOA-NS1 KK09-0941 DOA-KK3 DOA-KK4 KK07-037 KK09-0844 และ Si Samrong1 บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต เช่น ความสูง จำนวนลำ ผลผลิต และค่าซีซีเอส (Table 1)

### 2.การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลสลับ (SNP)

สกัดดีเอ็นเอ: นำใบอ้อยอายุ 8 เดือน สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (cetyltrimethylammonium ammonium bromide) ของ Tai and Tanksley (1999) (2% CTAB, 1% PVP, 100 mM TrisHCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 0.2 % 2-mercaptoethanol) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปบดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำซ้ำขั้นตอนการเติม Chloroform : Isoamyl alcohol อีก 2 รอบ จากนั้นเติม Isopropanol 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 80% Ethanol ซ้ำ 2 รอบ ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ละลายตะกอนใน TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 50 ไมโครลิตร และเติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปบดที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งานแล้วจึงตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware USA) และเครื่อง Qubit® Fluorometer (Invitrogen)

การย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ: นำดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมสำหรับจีโนมอ้อย จากนั้นทำการเชื่อมดีเอ็นเอที่ย่อยด้วย



เอ็นไซม์ PstI-HF และ MsPI ดังรายละเอียดต่อไปนี้ 10XNEB Cut Smart Buffer 1X, PstI 8U, MspI 8U และ DNA 200 นาโนกรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

การเชื่อมต่อ Adapter Ligation: การเชื่อมอะแดปเตอร์ประกอบด้วยลำดับเบสที่จำเพาะกับสารเคมีที่ใช้ในการหาลำดับเบสด้วยเครื่อง MGISEQ-2000RS ของบริษัท MGI ทำการเชื่อมต่อของดีเอ็นเออ้อยกับอะแดปเตอร์โดยเอ็นไซม์ Invitrogen T4 DNA Ligase (Life Technologies) ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นทำลายเอ็นไซม์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอของอ้อยและอะแดปเตอร์แล้ว จึงทำให้บริสุทธิ์จากอะแดปเตอร์ที่เหลือปะปนอยู่ในสารละลาย ตลอดจนเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดก็จะถูกกำจัดไปโดยใช้ Agencourt® AMPure® XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์: เพิ่มปริมาณดีเอ็นเออ้อยโดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยดีเอ็นเออ้อยที่เชื่อมกับอะแดปเตอร์ เอ็นไซม์ Phusion® polymerase, HF Buffer (New England Biolabs) ไพรมเมอร์ที่ประกอบด้วย มีลำดับเบสจำเพาะต่อ FCA ของ MGISEQ-2000RS และ index ของ MGISEQ-2000RS

การวิเคราะห์ลำดับเบส: นำลำดับเบสจากเครื่อง MGISEQ-2000RS เป็นไฟล์ข้อมูลแบบ fastq ประกอบด้วยไฟล์ 'R1' และ 'R2' แยก ตาม index ของอ้อยแต่ละจีโนมป์ ตรวจสอบจำนวน reads ของอ้อยแต่ละจีโนมป์ ใช้ open source softwares ต่างๆ เช่น fastqc, fastx trimmer (FASTXToolkit, [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)), Bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012), SAMtools (Li et al., 2009), trim galore, cutadapt, minipassNG, paSNPs (Fu and Dong, 2015) ผ่านบรรทัดคำสั่งวิเคราะห์คุณภาพข้อมูล raw reads ของ R1 และ R2 ของทุกจีโนมป์ ด้วย ให้มีคุณภาพเหมาะสมต่อการจัดการข้อมูลให้ทราบถึง single nucleotide polymorphism (SNPs) ของอ้อย โดยอ้อย 16 ตัวอย่างถูกอ่านลำดับเบสบนเครื่อง MGISEQ-2000RS โดยเทคนิค Restriction site Associated DNA Sequencing (RAD-Seq) ผลการอ่านลำดับเบสจะถูกส่งไปยังเซิร์ฟเวอร์ MegaBOLT เพื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลกับจีโนมอ้างอิงของอ้อย (<https://sugarcane.genome.cirad.fr>) และระบุความแตกต่างทางพันธุกรรม ด้วยซอฟต์แวร์ Genome Analysis Toolkit (GATK) ถูกนำมาใช้เพื่อรวมผลลัพธ์ของอ้อยทั้ง 16 ตัวอย่าง ที่เก็บอยู่ในรูปแบบ Genomic Variant Call Format (gVCF) โดยใช้คำสั่ง CombineGVCFs และ GenotypeGVCFs

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการเก็บเกี่ยวอ้อยที่อายุ 10 เดือน จากการบันทึกลักษณะทางการเกษตร พบว่า พันธุ์อ้อยที่แตกต่างกันให้ผลผลิตอ้อยที่แตกต่างกัน โดยอ้อยพันธุ์ Si Samrong1 และ DOA-NS1 มีแนวโน้มให้ผลผลิตที่สูงที่สุด เท่ากับ 18 ตันต่อไร่ ขณะที่ค่าเฉลี่ยของพันธุ์อ้อยทุกพันธุ์มีค่าเท่ากับ 13.7 ตันต่อไร่ พันธุ์อ้อยที่แตกต่างกันมีค่าชีชีเอสแตกต่างกัน พบอ้อยพันธุ์ DOA-NS1 มีค่าชีชีเอสสูงที่สุด เท่ากับ 15.7 รองลงมาเป็นพันธุ์ K88-92 เท่ากับ 14.9 (Table 1)

ผลการวิเคราะห์สามารถทราบค่าจำนวนเบสที่สามารถอ่านได้ (ReadNum) จำนวนสเนป (SNPs) และจำนวน INDELs ที่พบในแต่ละสายพันธุ์ โดยค่าจำนวนเบสที่สามารถอ่านได้ในอ้อยพันธุ์ต่างๆ อยู่ระหว่าง 35,940,182 ถึง 71,497,800 เบส จำนวนสเนป อยู่ระหว่าง 1,906,670 ถึง 2,568,358 SNPs และจำนวน จำนวน INDELs อยู่ระหว่าง 225,712 ถึง 312,556 Song et al. (2016) ได้ใช้เทคนิค probe hybridization capture sequencing (HCS) ในการตรวจสอบการเข้าถึงจีโนมของอ้อยจำนวน 12 สายพันธุ์ โดยออกแบบ probe จำนวน 55,946 probes เพื่อจับกับบริเวณจีโนมของอ้อยรวมทั้งสิ้น 6 เมกะเบส และตรวจพบความหลากหลายของตำแหน่งสเนป (SNPs) ประมาณ 1.2 ล้านตำแหน่ง (Table 2) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสระดับความหวานของอ้อยเป็นหนึ่งในลักษณะเป้าหมายที่สำคัญของโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อยในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้งและน้ำตาลโดยการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูล KEGG pathway (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) จากการศึกษา พบรายชื่อ 34 ยีนใน starch และ sucrose metabolism pathway พร้อมตำแหน่งบนโครโมโซมและความยาวอินทรอน



(SIL–Sugarcane Intron Length) ซึ่งได้จากการคำนวณตำแหน่งเริ่มต้นและสิ้นสุดของยีน พบยีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Alpha-amylase/subtilisin inhibitor, Alpha% 2 Calpha-trehalose-phosphate synthase, Alpha-amylase, Beta-amylase, Beta-D-glucosyltransferase, Beta-D-xylosidase, Beta-fructofuranosidase, Endoglucanase, ATP-dependent 6-phosphofructokinase, Glucose-1-phosphate adenylyl transferase, Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, Hexokinase, Pectinesterase, Phosphoglucomutase Alpha-1%2C4 Glucanphosphorylase, Sucrose-phosphate synthase, Alpha%2Calpha-trehalose-phosphate synthase, Trehalose 6-phosphate phosphatase, UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, 1%2C4-alpha-glucan-branching และ 4-alpha-glucanotransferase DPE2 (Table 3) ตำแหน่ง SNPs ของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้งและน้ำตาลถูกนำมาสร้างแผนภาพต้นไม้แสดงสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum Likelihood method (Figure 1) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก สอดคล้องกับค่า C.C.S. ของสายพันธุ์ย่อย กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่มีค่า C.C.S. อยู่ในช่วง 9-12 ได้แก่ KK09-0939 KK09-0941 KK09-0857 KK09-0844 DOA-KK4 และ KK08059 และกลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่มีค่า C.C.S. อยู่ในช่วง 13-15 ได้แก่ UT17 LK92-11 KK07-250 UT15 K88-92 KK08-059 DOA-NS1 DOA-KK3 และ Si Samrong1 ยกเว้นสายพันธุ์ KK07-599 และ KK07-037 ที่มีค่า C.C.S. อยู่ในช่วง 12.3 และ 11.2 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่ากลุ่มที่ 1 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2 ในการศึกษาที่มีจำนวนตัวอย่างของแต่ละสายพันธุ์มีเพียง 1 ตัวอย่างต่อสายพันธุ์ ซึ่งอาจไม่เพียงพอในการเป็นตัวแทนของประชากร หรือสายพันธุ์ เนื่องจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ย่อยรวมทั้งการฐานข้อมูล หรือการนำลำดับเบสมาใช้เป็นลำดับเบสอ้างอิง มีความสำคัญอย่างมากที่ต้องมีจำนวนตัวอย่างในแต่ละสายพันธุ์เพียงพอ ที่จะเป็นตัวแทนในแต่ละสายพันธุ์เพื่อนำไปวิเคราะห์ให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ ถูกต้อง และแม่นยำ

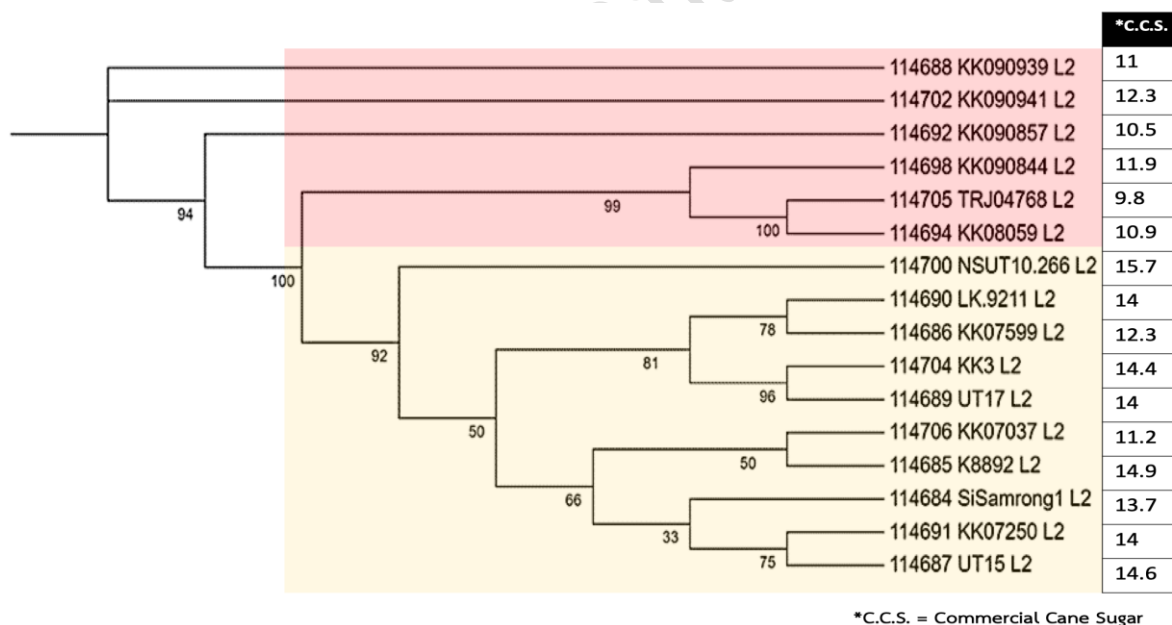


Figure 1 Phylogeny tree sequencing SNPs of sugarcane 16 varieties.

**Table 1** Agronomy characteristics of 16 sugarcane varieties.

| Variety     | High (cm) | Tiller | Yield<br>(ton/rai) | C.C.S. value |
|-------------|-----------|--------|--------------------|--------------|
| UT17        | 243       | 6      | 14.5               | 14.0         |
| LK92-11     | 312       | 7      | 14.3               | 14.0         |
| KK07-250    | 258       | 7      | 13.9               | 14.0         |
| KK09-0857   | 218       | 6      | 12.7               | 10.5         |
| UT15        | 289       | 6      | 16.9               | 14.6         |
| KK09-0939   | 152       | 4      | 9.9                | 11.0         |
| K88-92      | 256       | 5      | 11.36              | 14.9         |
| KK07-599    | 246       | 7      | 14.1               | 12.3         |
| KK08-059    | 224       | 7      | 10.4               | 10.9         |
| DOA-NS1     | 303       | 7      | 18.0               | 15.7         |
| KK09-0941   | 298       | 10     | 11.9               | 12.3         |
| DOA-KK3     | 295       | 6      | 15.8               | 14.4         |
| DOA-KK4     | 212       | 6      | 11.7               | 9.8          |
| KK07-037    | 253       | 8      | 11.8               | 11.2         |
| KK09-0844   | 279       | 10     | 13.5               | 11.9         |
| Si Samrong1 | 227       | 6      | 18.5               | 13.7         |
| Average     | 254.06    | 6.75   | 13.70              | 12.82        |

**Table 2** Number ReadNum, SNPs and INDELs of sugarcane.

| Sample      | ReadNum (bases) | SNPs      | INDELs  |
|-------------|-----------------|-----------|---------|
| UT17        | 50,200,050      | 2,163,821 | 259,881 |
| LK92-11     | 64,199,132      | 2,390,324 | 288,835 |
| KK07-250    | 35,940,182      | 1,906,670 | 225,712 |
| KK09-0857   | 43,645,164      | 2,114,304 | 251,321 |
| UT15        | 35,948,986      | 1,940,103 | 231,231 |
| KK09-0939   | 49,919,122      | 2,300,068 | 281,294 |
| K88-92      | 71,497,800      | 2,534,352 | 308,661 |
| KK07-599    | 83,713,076      | 2,568,358 | 312,556 |
| KK08-059    | 56,921,340      | 2,321,335 | 279,877 |
| DOA-NS1     | 37,383,570      | 1,988,632 | 236,475 |
| KK09-0941   | 41,832,808      | 2,099,884 | 247,962 |
| DOA-KK3     | 61,532,888      | 2,351,068 | 278,781 |
| DOA-KK4     | 51,282,918      | 2,313,781 | 282,214 |
| KK07-037    | 63,065,864      | 2,256,548 | 266,033 |
| KK09-0844   | 47,322,548      | 2,180,618 | 260,928 |
| Si Samrong1 | 51,042,900      | 1,976,452 | 235,028 |

**Table 3** List of the 34 genes from starch and sucrose metabolism pathway and the Sugarcane Intron Length (SIL) Cont.

| Chromosomes | Position (start-end) |          | Genes                                            |
|-------------|----------------------|----------|--------------------------------------------------|
| Sh01        | 948865               | 949239   | Alpha-amylase/subtilisin inhibitor;<br>type=mRNA |
| Sh01        | 60785236             | 60787255 | Alpha2%Calpha-trehalose-<br>phosphate synthase   |
| Sh02        | 21717522             | 21720380 | Alpha-amylase                                    |
|             | 43294124             | 43294878 |                                                  |
| Sh02        | 50312168             | 50313843 | Beta-amylase                                     |
| Sh06        | 38180                | 38381    | Beta-fructofuranosidase                          |
|             | 8271558              | 8274605  |                                                  |
|             | 8281155              | 8284931  |                                                  |
|             | 10968156             | 10970020 |                                                  |
| Sh01        | 10907135             | 10907790 | Endoglucanase                                    |
| Sh06        | 10965295             | 10965639 |                                                  |
|             | 16074563             | 16077093 |                                                  |

**Table 3** List of the 34 genes from starch and sucrose metabolism pathway and the Sugarcane Intron Length (SIL) Cont.

|      |          |          |                                             |
|------|----------|----------|---------------------------------------------|
| Sh01 | 33017718 | 33021182 | ATP-dependent 6-phosphofructokinase         |
| Sh01 | 10976303 | 10980647 | Glucose-1-phosphate adenylyltransferase     |
| Sh01 | 44102650 | 44103804 | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase         |
|      | 44103849 | 44105405 |                                             |
| Sh02 | 28755310 | 28758984 |                                             |
| Sh03 | 4682232  | 4685187  | Hexokinase                                  |
|      | 34702855 | 34705040 |                                             |
| Sh06 | 24339191 | 24342711 |                                             |
| Sh01 | 2318654  | 2319250  | Pectinesterase                              |
|      | 2321374  | 2321988  |                                             |
| Sh01 | 13233758 | 13239619 | Phosphoglucomutase                          |
| Sh01 | 8630407  | 8636004  | Alpha-1%2C4 Glucanphosphorylase;type        |
| Sh05 | 8857397  | 8862666  | Sucrose-phosphate synthase;type             |
|      | 8984005  | 8989096  |                                             |
| Sh01 | 60785236 | 60787255 | Alpha%2Calpha-trehalose-phosphate synthase  |
| Sh01 | 46238166 | 46238444 | Trehalose 6-phosphate phosphatase           |
|      | 46238482 | 46239893 |                                             |
|      | 46267301 | 46268329 |                                             |
| Sh04 | 1437500  | 1444011  | UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase |
| Sh04 | 20003628 | 20004292 | 1%2C4-alpha-glucan-branching                |
|      | 20004748 | 20010175 |                                             |
| Sh02 | 50241082 | 50248398 | 4-alpha-glucanotransferase DPE2             |

**สรุปผลการทดลอง**

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการรายงานลำดับเบสที่ครอบคลุมเกือบทั้งจีโนมครั้งแรกของสายพันธุ์อ้อยที่รวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จำนวน 16 สายพันธุ์ ทำให้นักวิจัยสามารถนำลำดับเบสมาให้สำหรับใช้เป็นลำดับเบอ้างอิงในการ



ศึกษาวิจัยบริเวณอื่น ๆ ที่สนใจในอนาคตและสามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลซูโครสในอ้อยได้ และข้อมูลโครงสร้างพันธุกรรมอ้อยที่ได้เป็นประโยชน์สำหรับแนวทางในการขยายฐานพันธุกรรมอ้อย เพื่อใช้เป็นข้อมูล สำหรับการคัดเลือกพันธุ์พ่อ-แม่ สำหรับสร้างคู่ผสมและประชากรพื้นฐาน สร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม ทั้งนี้เพื่อให้เกิดฐานพันธุกรรมที่กว้างขึ้น (Broaden genetic base) โดยอาศัยวิธีการและองค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย และจัดเก็บฐานข้อมูลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ที่ช่วยให้การปฏิบัติงานวิจัยสำเร็จตามวัตถุประสงค์

### เอกสารอ้างอิง

- ณัฐภัทร พงศ์ศิริพัฒน์ และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. (2559). การพัฒนาเครื่องหมาย ILPจากยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสในอ้อยและการศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมอ้อย. วารสารทางวิชาการสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. 8(2): 111-122.
- เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, อภิวิชญ์ ทรงกระสินธุ์ พชรวัลย์ สวางศิลป์, ชลิดา เข้มมา, วันดี หนูน้อย, วิชา ฮวดหนองโพธิ์, อัมรา บุญเจือ, ปิยะธิดา อินทรสุข, จิราพรพรณ สุขจิต, อติศักดิ์ นัตกระโทก, พุทธพร วิวาราย, ธนเดช ฤกษ์ปราณี, ยศพร ต้นสมรส, กฤษณ เขียวสะอาด และชนิษฐา สำราญใจ. (2551). การปรับปรุงพันธุ์อ้อยด้วยวิธี conventional method. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 1-211.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. (2558). เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์อ้อย. แหล่งที่มา <http://km.ocsb.go.th/uploads/หนังสือ%20การปรับปรุงพันธุ์อ้อย.pdf> [เข้าถึงเมื่อ 5 มิถุนายน 2565].
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2566ก. โครงการพัฒนาและส่งเสริมอุตสาหกรรมชีวภาพ (Bioeconomy Non Food). รายงานฉบับสมบูรณ์ (Final Report). แหล่งข้อมูล: <https://w2.ocsb.go.th/wpcontent/uploads/2023/04/14244-4316.pdf>. สืบค้นเมื่อ 30 มกราคม 2568.
- Baird, N.A., Etter, P.D, Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A. and Johnson, E.A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *Journal of PLoS ONE*. 3(10): 1-7.
- Cumer, T., Pouchon, C., Boyer, F., Yannic, G., Rioux, D., Bonin, A. and Capblancq, T. (2021). Double-digest RAD-sequencing: do pre- and post-sequencing protocol parameters impact biological results. *Journal of Molecular Genetics and Genomics* 296(2): 457-471.
- Langmead B. and S. Salzberg. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Journal of Nature Methods.*, 9:357-359.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N. and R. Durbin. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16), 2078-2079.
- Lo, Y.T. and Shaw, P.C. (2019). Application of next-generation sequencing for the identification of herbal products. *Biotechnology Advances*. 37(8): 107450.
- McCormick, A.J. and M.D. Cramer, and D.A. Watt. (2008). Differential expressions of genes in the leaves of sugarcane in response to sugar accumulation. *Journal of Tropical Plant Biology*. 1: 142-158.



- Papini-Terzi, F.S., Rocha, F.R., Vencio, R.Z., Felix, J.M., Branco, D.S., Waclawovsky, A.J., Del Bem, L.E., Lembke, C.G., Costa, M.D., Nishiyama Jr, M.Y., Vicentini, R., Vincentz, M.G., Ulian, E.C., Menossi, M. and G.M. Souza. (2009). Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC Genomics* 10: 120–141.
- Ren, J. L., Geng, Z. C., Liu, C. F., Xu, F., Sun, J. X., and R. C. Sun. (2006). Fractional isolation and structural characterization of hemicellulosic polymers from delignified and ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. *Journal of E-Polymers*. 67:1-12.
- Severn-Ellis, A.A., Scheben, A., Neik, T.X., Saad, N.S.M., Pradhan, A. and Batley, J. (2020). Genotyping for species identification and diversity assessment using double digest restriction site-associated DNA sequencing (ddRAD-Seq). *methods. Journal of Molecular Biology*. 2017: 159-187.
- Song J, Yang X, Resende MF Jr, Neves LG, Todd J, Zhang J, Comstock J, Wang J. (2016). Natural alleviation variations in highly polyploid *Saccharum* Complex. *Frontiers in Plant Science*.7:804.
- Tai, T.H. and S.D. Tanksley. (1990). A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter* 8: 297-303.
- 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. *African Journal of Biotechnology* 11: 1337–1363.
- Vettore, A.L., Silva, F.R.D., Kemper, E.L., Souza, G.M., Silva, A.M.D., Ferro, M.I.T., Henrique-Silva F, Giglioti, E.A., Lemos, M.V.F & L.L. Coutinho. (2003). Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Journal of Genome Research* 13: 2725–2735.
- Yang, Y., Zhao, X.L., Xia, L.Q., Chen, X.M., Xia, X.C., Yu, Z., He, Z.H. & M. Roder. 2007. Development and validation of a Viviparous-1 STS marker for preharvest sprouting tolerance in Chinese wheats. *Journal of Theoretical and Applied Genetics* 115: 971–980.