

วิธีการสร้างแผนที่จีโนมในออโตโพลีพลอย

A Methodology for Genome Mapping of Autopolyploids

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12121

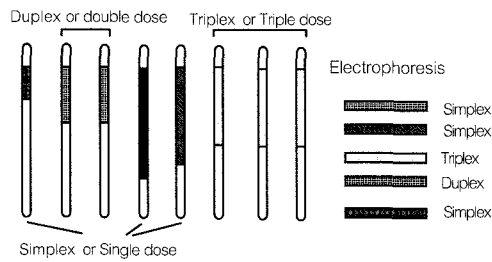
1. บทนำ

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) มีความสำคัญอย่างมากในการวิเคราะห์จีโนมทั้งในสิ่งมีชีวิตดิพลอย (diploid) ทั่วไป และในสิ่งมีชีวิตที่มีความโครโมโซมมากกว่าสองชุดหรือโพลีพลอย (polyploid) ซึ่งส่วนใหญ่พบได้ในพืช การสร้างแผนที่ยีนหรือแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในโพลีพลอยโดยเฉพาะโพลีพลอยที่มีชุดโครโมโซมแบบออโตโพลีพลอย (autopolyploid ; ชุดโครโมโซมที่มีโฮโมโลกัสโครโมโซมมากกว่าสองแห่ง) มีความยุ่งยากซับซ้อนมากกว่าในดิพลอยด้วยปัจจัยหลายอย่าง คือ 1) การกระจายตัวของลูกผสมมีจีโนไทป์เป็นจำนวนมากที่ใช้ในการวิเคราะห์ 2) ความไม่ชัดเจนของการเข้าสู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมในการแบ่งเซลล์ไมโอซิสเพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ 3) การปรากฏของแถบเครื่องหมายโมเลกุลเป็นจำนวนมาก (แม้ว่าจะใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR หรือ RFLP) ทำให้เกิดความซับซ้อนในการวิเคราะห์จีโนไทป์ ในบทความนี้เป็นการอธิบายถึงวิธีการวิเคราะห์เพื่อสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในออโตโพลีพลอย โดยการวิเคราะห์ลิ้งเกจ (linkage) ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการถ่ายทอดพันธุกรรมในรูปแบบของออโตโพลีพลอย (polysomic inheritance) แบบต่าง ๆ เพื่อให้เข้าใจพฤติกรรมการเข้าสู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซม

2. คำนิยามศัพท์ที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีเครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดที่นำมาวิเคราะห์แผนที่ในพืชออโตโพลีพลอย เช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP; Da Silva et al.,

1995; Ming et al. 2001) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD ; Al-Janabi et al., 1993; Ukoskit and Thompson , 1996) และ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP ; Hoarau et al., 2001) โดย Wu. et al. (1992) ได้เสนอวิธีการวิเคราะห์ลิ้งเกจในโพลีพลอยโดยใช้เทคนิค RFLP และให้คำจำกัดความของคำว่า single dose restriction fragment (SDRF) หมายถึง โพลบ (probe) ที่สามารถไฮบริไดซ์ (hybridize) กับชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งเดียวบนโครโมโซมเพียงโครโมโซมเดียวจากโฮโมโลกัสโครโมโซมหลายแห่งของโพลีพลอย ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่มีการกระจายตัวในรุ่นลูก 1:1 (ปรากฏ : ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) โดยไม่คำนึงว่าชนิดของพลอยดี (ploidy) จะเป็นอัลโลโพลีพลอย (allopolyploid) หรือออโตโพลีพลอย (รูปที่ 1) ถ้าโพลบสามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอสองตำแหน่งหรือสามตำแหน่งบนโฮโมโลกัสโครโมโซมสองแห่งหรือสามแห่ง แถบดีเอ็นเอทั้งสองแบบนี้จะเรียกว่า double หรือ triple dose restriction fragment ตามลำดับ (DDRF หรือ TDRF ตามลำดับ) และจัดว่าเป็น multiple dose DNA fragment อย่างไรก็ตามเทคนิคการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลแบบอื่นที่มีพื้นฐานจากปฏิกิริยา PCR (polymerase chain reaction) เช่น RAPD หรือ AFLP ก็สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอชนิด SDRF DDRF หรือ TDRF ได้ ดังนั้นการเรียกชื่อชนิดของแถบดีเอ็นเอของโพลีพลอยสามารถใช้ simplex duplex หรือ triplex แทน ตามลำดับ ซึ่งเป็นคำศัพท์ที่เสนอโดย De Winton and Haldane (1931)



รูปที่ 1 แสดงเครื่องหมายโมเลกุล simplex duplex และ triplex บนไฮโมโลกัสโครโมโซม 8 แห่งของออโตออคตาพลอย (autooctaploid)

ออโตโพลีพลอยสามารถสร้างชุดเซลล์สืบพันธุ์ (gametic series) ได้หลายแบบ เมื่อพิจารณาถึงเกาะระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลสองเครื่องหมาย (two point linkage) ตัวอย่าง คำศัพท์ที่ควรทราบเกี่ยวกับลิงเกจ มีดังนี้ (รูปที่ 2)

Simplex coupling: ลิงเกจระหว่าง 2 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling

Simplex repulsion: ลิงเกจระหว่าง 2 เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ repulsion

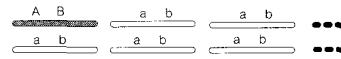
Simplex–duplex (1&2) asymmetrical coupling: ลิงเกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex กับเครื่องหมายแบบ duplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling

Simplex–duplex (1&2) asymmetrical repulsion: ลิงเกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex กับเครื่องหมาย duplex ที่ลิงค์กันในสภาพ repulsion

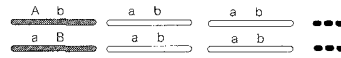
Double coupling (duplex coupling): ลิงเกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลแบบ duplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling

Duplex coupling–repulsion: ลิงเกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล duplex โดยคู่หนึ่งของเครื่องหมายโมเลกุลลิงค์กันในสภาพ coupling อีกคู่หนึ่งลิงค์กันในสภาพ repulsion

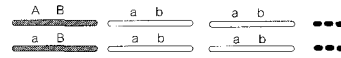
Simplex (A) & Simplex (B) coupling



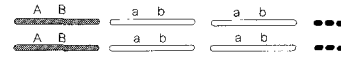
Simplex (A) & Simplex (B) repulsion



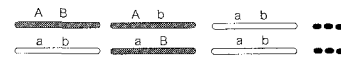
Simplex (A) & Duplex (B) asymmetrical coupling



Duplex (A) & Duplex (B) coupling



Duplex (A) & Duplex (B) coupling–repulsion



รูปที่ 2 แสดงลิงเกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ duplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling และ repulsion โดยมีสมมุติฐานการเข้าสู่ของไฮโมโลกัสโครโมโซมแบบ non-preferential bivalent pairing โครโมโซมแท่งสีเข้มเป็นโครโมโซมที่มีเครื่องหมายโมเลกุล (informative chromosome)

3. การวิเคราะห์ลิงเกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลในออโตโพลีพลอย

ขั้นตอนการวิเคราะห์ลิงเกจ ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในออโตโพลีพลอย มีลำดับขั้นตอนดังนี้ 1) การสร้างประชากรลูกผสมสำหรับการวิเคราะห์ลิงเกจของเครื่องหมายโมเลกุล 2) การวิเคราะห์และการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล simplex 3) การวิเคราะห์ชนิดของโพลีพลอยดี 4) การวิเคราะห์และการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล multiplex (duplex และ triplex) 5) การวิเคราะห์กลุ่มลิงเกจ (linkage group) ที่เป็นไฮโมโลกัสกัน

3.1 การสร้างประชากรลูกผสมสำหรับการวิเคราะห์ลิงเกจของเครื่องหมายโมเลกุล (Mapping population)

ประชากรลูกผสมที่ใช้สำหรับสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับโพลีพลอยสามารถใช้พืชดิพลอยที่เป็นเครือญาติกัน (diploid relative) การใช้พืชที่มีชุด

โครโมโซมอเนิวพลอยแบบต่าง ๆ (aneuploid stock) การใช้ประชากรลูกที่เป็นแฮพลอยหรือดับเบิลแฮพลอย (haploid or double haploid) และการใช้ประชากรลูกผสมระหว่างโพลีพลอยด้วยกันเองประชากรลูกผสมเหล่านี้อาจมีความเหมาะสมในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป

การใช้พืชดิพลอยที่เป็นเครือญาติกันสามารถนำมาใช้สร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในมันฝรั่ง (Bonierbale et al., 1988) อัลฟัลฟา (Echt et al., 1994) และข้าวสาลี (Kam-Morgan, 1989) โพลิบ ของ RFLP ที่อยู่ในตำแหน่งแผนที่ของดิพลอย สามารถถ่ายทอดไปสู่โพลีพลอยได้ถ้าลำดับของยีนหรือเครื่องหมายโมเลกุลในจีโนมของพืชดิพลอยเหมือนกับในโพลีพลอย ซึ่งในบางกรณีเครื่องหมายโมเลกุลในแผนที่ของดิพลอยก็อาจยุ่งยากในการวางตำแหน่งในโพลีพลอย เนื่องจากสามารถวางตำแหน่งได้หลายตำแหน่งในโพลีพลอย และในบางกรณีการใช้พืชดิพลอยหรือพืชที่เป็นเครือญาติกับโพลีพลอยก็อาจมีปัญหาเรื่องการผสมพันธุ์ หรือเมล็ดที่ได้เป็นหมัน

การใช้พืชที่มีโครโมโซมอเนิวพลอยแบบต่าง ๆ ประชากรแบบนี้เหมาะสมสำหรับพืชที่มีการศึกษาทางเซลล์พันธุ์ศาสตร์อย่างละเอียดและมีสายพันธุ์ที่เป็นอเนิวพลอยที่ต้องการศึกษา เช่น ข้าวสาลี (Anderson, 1992) การวางตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุล RFLP บนแขนโครโมโซมทำได้โดยการคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยกของแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายหลัก (major band) แทนที่จะเป็นการคัดเลือกหาโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ระหว่างสองจีโนไทป์ ในกรณีนี้ไม่ต้องการวิเคราะห์หลังแยกและลำดับของเครื่องหมายโมเลกุลแผนที่ที่เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้อเนิวพลอยในการวิเคราะห์สามารถนำไปเสริมกับแผนที่ที่เครื่องหมายโมเลกุลปกติได้โดยการวิเคราะห์การถ่ายทอดลักษณะในลูกผสมสายพันธุ์แท้ ข้อดีของการใช้อเนิวพลอยในการทำแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล คือสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดจากเข้าสู่ของโครโมโซมที่ผิดปกติในโพลีพลอยได้ และไม่มีปัญหาเรื่องความเป็นหมันของเมล็ด แต่อย่างไรก็ตามอเนิวพลอยก็ไม่มีในพืชหลาย ๆ ชนิด

การใช้ประชากรลูกผสมแฮพลอยหรือดับเบิลแฮพลอย Wu et al. (1992) แนะนำว่าเป็นประชากรที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้างแผนที่ยีนในโพลีพลอยด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SDRF เนื่องจากลูกแฮพลอยเหล่านี้เป็นตัวแทนของเซลล์สืบพันธุ์จากจีโนไทป์ของพ่อแม่โดยตรงประสิทธิภาพของการสร้างแผนที่ที่จะมีมากที่สุดถ้าประชากรแฮพลอยนั้นเกิดจากพืชที่มีความเป็นเฮเทอโรไซโกสิด์สูง (heterozygosity) เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุล SDRF ทุกเครื่องหมาย (มีการกระจายตัว 1:1) สามารถนำมาใส่ลงในแผนที่ได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามเทคนิคในการสร้างพืชแฮพลอยหรือดับเบิลแฮพลอยอาจยังไม่ได้รับการพัฒนาในพืชหลาย ๆ ชนิด นอกจากนี้ เกสรตัวผู้ก็นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจไม่ใช่ตัวแทนของเซลล์สืบพันธุ์อย่างสุ่มโดยแท้จริง เนื่องจากการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเกสรตัวผู้กับสารเคมีหรือสภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในระหว่างการเลี้ยงคลัสต์เกสรตัวผู้ (Da Silva et al., 1993 ; Baenziger et al., 1984)

การใช้ประชากรลูกผสมระหว่างโพลีพลอยที่มีจีโนไทป์ที่มีความเป็นเฮเทอโรไซโกสิด์สูง ก็สามารถนำมาใช้การทำแผนที่ในโพลีพลอยได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ในยูคาลิปตัส (Grattapaglia and Sederoff, 1994) แอปเปิ้ล (Hemmat et al., 1994) มันเทศ (Ukoskit and Thompson, 1997) อ้อย (Da Silva, 1993; Hoarau et al., 2001; Ming et al., 2001) ประชากรลูกผสมลักษณะนี้เรียกว่า ลูกผสมทดสอบเทียม (pseudo testcross population) การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรลูกผสมแบบนี้จะกระจายตัว 1:1 ยกเว้นในกรณีที่พ่อแม่ทั้งคู่เป็นเฮเทอโรไซโกสของเครื่องหมายโมเลกุลโลคัส (locus) นั้น ซึ่งจะมีการกระจายตัวแบบ 3:1 หรือ 1:2:1 หรือ 1:1:1:1 การทำแผนที่ยีนที่เกิดจากการใช้ประชากรลูกผสมทดสอบเทียมจะทำให้ได้แผนที่ยีนทั้งในพ่อแม่และแม่ที่นำมาผสม

3.2 การวิเคราะห์หลังเกษและการสร้างแผนที่เครื่อง หมายโมเลกุล simplex

เครื่องหมายโมเลกุล simplex สามารถจำแนกได้โดยใช้ประชากรลูกผสมที่เกิดการกระจายตัว คุณลักษณะของเครื่องหมายโมเลกุล simplex มีดังนี้

3.2.1 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลจะปรากฏในฝ่ายพ่อหรือแม่เพียงฝ่ายเดียว

3.2.2 อัตราส่วนการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอในประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมทดสอบ หรือผสมทดสอบเทียม มีอัตราส่วน 1:1 (ปรากฏแถบดีเอ็นเอ : ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) โดยไม่คำนึงว่าชนิดพลอยดีจะเป็นอัลโลโพลีพลอยหรือออโตโพลีพลอย เครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่ใช่ชนิด simplex จะมีการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรลูกผสมทดสอบ ดังตัวอย่างในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วน การปรากฏ : การไม่ปรากฏของเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ multiplex (duplex, triplex และ quadruplex) ในประชากรลูกผสมทดสอบ

Number of dose	Segregating ratio in testcross (presence : absence)		
	Tetraploid	Hexaploid	Octaploid
Simplex	1:1	1:1	1:1
Duplex	5:1	4:1	11:3
Triplex	All presence	19:1	13:1
Quadruplex	All presence	All presence	69:1

3.2.3 ขนาดของประชากรลูกผสมที่ใช้ในการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล simplex ต้องมีจำนวนที่มากพอในการแยกความแตกต่างของอัตราส่วน 1:1 ออกจาก 3:1 เนื่องจากอัตราส่วน 3:1 เป็นอัตราส่วนที่ใกล้เคียงที่สุดของการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด multiplex (ตั้งแต่ duplex ขึ้นไป) ของออโตโพลีพลอย (แสดงดังตารางที่ 2) และอัลโลโพลีพลอย Wu et al., (1992) ได้คำนวณให้เห็นว่าขนาดของประชากรลูกผสมจำนวน 54 75 หรือ 92 สามารถใช้แยกความแตกต่างอัตราส่วน 1:1 จาก 3:1 ด้วยความเชื่อมั่น 95% 98% และ 99% ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงอัตราส่วนการกระจายตัว (การปรากฏ : การไม่ปรากฏ) ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ multiplex ในออโตโพลีพลอยแบบต่างๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุล multiplex มีค่าเข้าใกล้ 3:1

Number of dose	Tetraplo id h = 4	Hexaplo id h = 6	Octaploi d h = 8	decaploi d h = 10	h becomes large
Simplex	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
Duplex	5:1	4:1	3.7:1	3.5:1	(3h-2)/(h-2)
Multiplex	Various ratios all higher than 3:1				

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างการคัดเลือกเครื่องหมาย โมเลกุล simplex (2A และ 7B)

Marker	Band no.	Parent		Progeny											
		P ₁	P ₂	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
i	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2(A)	-		-	-			-		-		-	-		
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-		-	-	-	-	-		-	-		-	-	-
j	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-			-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
	7(B)	-		-	-			-		-		-		-	
	8		-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
A&B linkage				AB(a)	AB(a)	Nil(d)	Nil(d)	AB(a)	Nil(d)	AB(a)	Nil(d)	AB(a)	A(b)	B(c)	Nil(d)

3.2.4 การตรวจสอบลิงเกอร์หว่างเครื่องหมาย โมเลกุล simplex สามารถใช้การทดสอบ χ^2 ได้ในทำนองเดียวกับในดีพลอยทั่วไป ดังตัวอย่างข้อมูลในตารางที่ 3 โดย $\chi^2 = (a-b-c+d)^2 / (a+b+c+d)$; df = 1 (Mather, 1951) ค่า χ^2 ที่แสดงนัยสำคัญ แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุล simplex ทั้งสองลิงค์กันซึ่งอาจเป็นในสภาพ coupling หรือ repulsion ก็ได้ จากตารางที่ 3 เครื่องหมายโมเลกุล A และ B เท่านั้นที่เป็นเครื่องหมายโมเลกุล simplex เครื่องหมายโมเลกุลที่ 1 3 และ 5 ไม่เกิดโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างพ่อกับแม่ เครื่องหมายโมเลกุลที่ 4 6 และ 8 แม้แสดงโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างพ่อกับแม่ แต่การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลไม่ใช่ 1:1 จึงไม่ใช่เครื่องหมายโมเลกุล simplex

3.2.5 การประมาณค่า r (recombination fraction) ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling สามารถคำนวณโดยใช้หลักการเดียวกับการคำนวณค่า r ของดีพลอยดังตารางที่ 4 (แถวตั้งที่ 2 ลิงเกอร์ในสภาพ coupling) โดยจำนวนประชากรลูกผสมที่ใช้จะเป็นปัจจัยที่กำหนด ขนาดของค่า r ที่มากที่สุด ($\max r_1$) ที่สามารถคำนวณได้ โดยค่า $\max r_1 = 0.5(1-2.3264\sqrt{1/n})$

(Wu et al., 1992) เป็นความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของประชากรลูกผสม n ที่สามารถใช้ในการคำนวณค่า r ที่มากที่สุด โดยการทดสอบสถิติ Z- แบบทางเดียวที่ระดับความน่าจะเป็น $\alpha = 0.01$ (แสดงดังรูปที่ 3) โดยทั่วไปขนาดของค่า r ที่เหมาะสมในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชจะอยู่ระหว่าง 0.1 ถึง 0.25 ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์ลิงเกอร์กับยีนที่สนใจ ดังนั้น ขนาดของประชากรลูกผสมเท่ากับ 75 ก็เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ลิงเกอร์ โดยมีค่า $r_1 \leq 0.25$

ตารางที่ 4 แสดงอัตราส่วนฟีโนไทป์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เกิดจากเครื่องหมายโมเลกุล simplex ลิงค์กันในสภาพ coupling และ repulsion

Gamete type	Coupling	Repulsion	No. observed
AB	$0.5 (1-r_1)$	$0.25 (1-w) + 0.5 wr_2$	a
A	$0.5 r_1$	$0.25 (1-w) + 0.5 w(1-r_2)$	b
B	$0.5 r_1$	$0.25 (1-w) + 0.5 w(1-r_2)$	c
Nil	$0.5 (1-r_1)$	$0.25 (1-w) + 0.5 wr_2$	d

หมายเหตุ

: r_1 recombination fraction ของลิงเกจที่ลิงค์กันในสภาพ coupling;

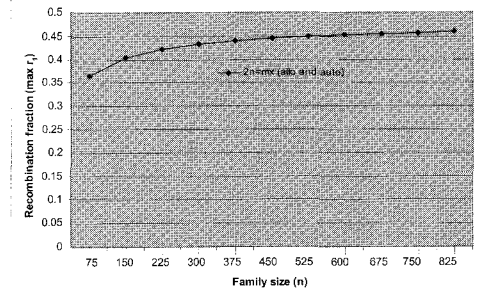
r_2 recombination fraction ของลิงเกจที่ลิงค์กันในสภาพ repulsion

$w = 1/h-1$ เมื่อ h เป็นจำนวนโฮโมโลกัสโครโมโซม โดย $1/h-1$ เป็นโอกาสที่ informative chromosome มาเข้าคู่กัน; $1-(1/h-1)$ เป็นโอกาสที่ informative chromosome เข้าคู่กับ non-informative chromosome

สำหรับการประมาณค่า r ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ repulsion นั้น โพลีพลอยชนิดอัลโตโพลีพลอยสามารถตรวจสอบได้ในทำนองเดียวกับดิพลอย เนื่องจากการเข้าคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมเป็นแบบ preferential bivalent pairing ซึ่งเป็นพฤติกรรมการเข้าคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมของดิพลอย จำนวนประชากรลูกผสมที่ใช้ในการคำนวณค่า r ที่มีขนาดมากที่สุด ($\max r_2$) จะเป็นความสัมพันธ์ทำนองเดียวกับลิงเกจในสภาพ coupling แต่การประมาณค่า r ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ repulsion ของออโตโพลีพลอยจะมีความแตกต่างออกไป เนื่องจากลิงเกจในสภาพ repulsion จะเกี่ยวข้องกับการเข้าคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมคู่อุปสรรคที่มีเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในสภาพ repulsion โดยจะสัมพันธ์กับจำนวนโฮโมโลกัสโครโมโซม (basic chromosome number; x) ของออโตโพลีพลอย

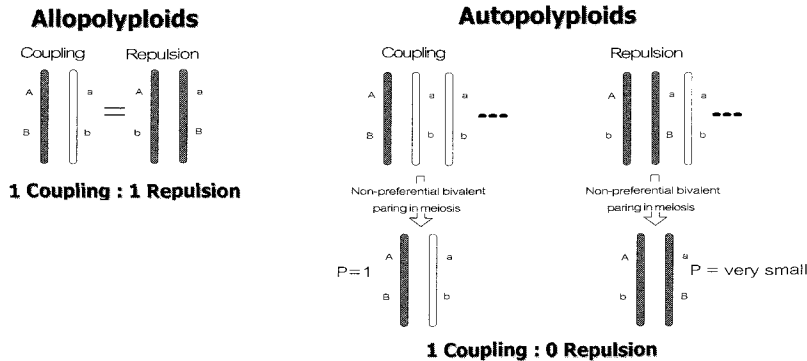
เนื่องจากการเข้าคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมในโมโอซิสเป็นแบบ non-preferential bivalent pairing รูปที่ 4 แสดงการเข้าคู่ของโครโมโซมที่มีเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในสภาพ coupling และ repulsion เปรียบเทียบกันระหว่างอัลโตโพลีพลอยและออโตโพลีพลอย ดังนั้น ค่า $\max r_2$ นอกจากจะสัมพันธ์กับขนาดของประชากรลูกผสม

แล้วจะสัมพันธ์กับจำนวนโฮโมโลกัสโครโมโซมของออโตโพลีพลอยด้วย โดยค่า $\max r_2 = 0.5 (1-2.3264 (h-1) \sqrt{1/n})$ (กราฟแสดงดังรูปที่ 5; Wu et al., 1992) โดย h เป็นจำนวนโฮโมโลกัสโครโมโซมของออโตโพลีพลอย

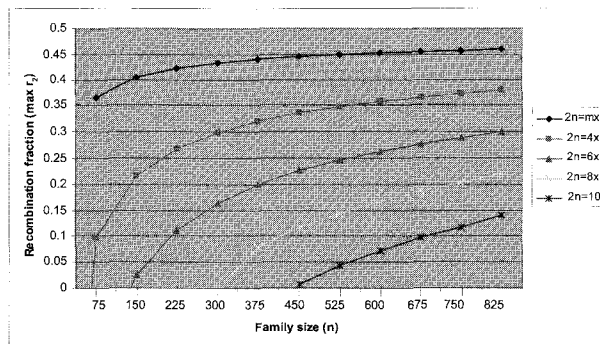


รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของประชากรลูกผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ลิงเกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex ในสภาพ coupling สำหรับอัลโตโพลีพลอยและออโตโพลีพลอย กับขนาดของค่า r ที่มากที่สุด ($\max r_1$) ที่สามารถคำนวณได้ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% สมการของกราฟคือ $\max r_1 = 0.5(1-2.3264 \sqrt{1/n})$ (Wu et al., 1992)

จากกราฟในรูปที่ 5 จำนวนประชากรลูกผสมที่ควรใช้เพื่อใช้ในการประมาณค่า $\max r_2$ ของเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในสภาพ repulsion ของออโตโพลีพลอยต้องใช้ประชากรเป็นจำนวนมากเมื่อจำนวนโฮโมโลกัสโครโมโซมมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งไม่สามารถทำได้ในทางปฏิบัติ ดังนั้นการวางแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในออโตโพลีพลอยสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling โดยสามารถใช้วิธีการเดียวกับการวางแผนที่ในดิพลอย



รูปที่ 4 แสดงการจับกันของโฮโมโลกัสโครโมโซมของอัลโลโพลีพลอยเทียบกับออโตโพลีพลอย โดยการเข้าคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมของอัลโลโพลีพลอยเป็นแบบ preferential bivalent pairing แต่ของออโตโพลีพลอยเป็นแบบ non-preferential bivalent pairing ลิงเกจของเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling และ repulsion จะมีโอกาสเกิดเท่ากันในอัลโลโพลีพลอย (ทำนองเดียวกับดิพลอย) แต่ในออโตโพลีพลอยลิงเกจของเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ repulsion สัมพันธ์กับจำนวนโฮโมโลกัสโครโมโซม (basic chromosome number; x) ของออโตโพลีพลอย ซึ่งมีโอกาสพบน้อยมากถ้าจำนวนประชากรลูกผสมไม่มากพอ



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของประชากรลูกผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ลิงเกจระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ repulsion สำหรับอัลโลโพลีพลอยและออโตโพลีพลอย กับขนาดของค่า r ที่มากที่สุด ($\max r_2$) ที่สามารถคำนวณได้ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% สมการของกราฟคือ $\max r_2 = 0.5 (1 - 2.3264 (h-1) \sqrt{1/n})$ (Wu et al., 1992)

3.3 การวิเคราะห์ชนิดของโพลีพลอย

องค์ประกอบจีโนมของพืชโพลีพลอยส่วนหนึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นอัลโลโพลีพลอย หรือออโตโพลีพลอย แต่โดยส่วนใหญ่แล้วมักตั้งสมมติฐานว่าเป็นอัลโลโพลีพลอย โดยอยู่บนพื้นฐานของโครโมโซมที่มีพฤติกรรมในการเข้าคู่แบบ preferential bivalent pairing ซึ่งเป็น

การเข้าคู่กันอย่างจำเพาะของคู่โฮโมโลกัสโครโมโซมในขบวนการไมโอซิสทำนองเดียวกับพฤติกรรมในการเข้าคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมของดิพลอย ในกรณีของออโตโพลีพลอยการจับกันของโฮโมโลกัสโครโมโซมอาจเป็น univalent, bivalent หรือ multivalent ก็ได้ แต่ในการศึกษาลิงเกจในออโตโพลีพลอยต้องตั้งสมมติฐานว่าโฮโมโลกัส

โครโมโซมจับกันแบบ bivalent โดยโฮโมโลกัสโครโมโซมจับคู่กันแบบไม่จำเพาะหรือเรียกว่า non-preferential bivalent pairing ภายใต้สมมติฐานการจับคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมที่แตกต่างกันระหว่างอัลโลโพลีพลอยและออโตโพลีพลอยทำให้สามารถวิเคราะห์ชนิดของโพลีพลอยโดยใช้หลักเกณฑ์สองประการ ดังนี้

3.3.1 การเปรียบเทียบค่าสังเกตและค่าคาดหวังของจำนวนลิงเกจของเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงก์กันในสภาพ coupling กับ repulsion จากที่กล่าวไปข้างต้นในหัวข้อ 2.5 การตรวจสอบลิงเกจในสภาพ repulsion ของอัลโลโพลีพลอยสามารถพบได้ในโอกาสเท่ากับลิงเกจในสภาพ coupling (เปรียบเทียบเส้นกราฟในรูปที่ 3 กับเส้นกราฟของอัลโลโพลีพลอยในรูปที่ 5) แต่ในกรณีของออโตโพลีพลอยลิงเกจในสภาพ repulsion จะขึ้นกับระดับของพลอยดี (จำนวนโฮโมโลกัสโครโมโซม) และจำนวนประชากรลูกผสมซึ่งไม่สามารถตรวจสอบได้ ถ้าจำนวนประชากรลูกผสมไม่มากพอ นั่นคืออัตราส่วนของค่าคาดหวังของลิงเกจในสภาพ repulsion : ลิงเกจในสภาพ coupling ของอัลโลโพลีพลอยจะเท่ากับ 1:1 อัตราส่วนที่น้อยกว่านี้ (0:1) ก็แสดงว่าพืชนั้นมีชุดโครโมโซมแบบออโตโพลีพลอย

3.3.2 การเปรียบเทียบค่าสังเกตกับค่าคาดหวังของอัตราส่วนระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ multiplex (non-simplex) ยกตัวอย่างการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลในการผสมทดสอบของเฮกซาพลอย (6x) ดังนี้

Autohexaploid

Simplex	Aaaaaa X aaaaaa	Simplex $1 - 0.25 = 0.75$
Phenotypic ratio	1 A : 1 a	
Duplex	AAaaaa X aaaaaa	Non-simplex $1/5 + 1/20 = 0.25$
Phenotypic ratio	4 A : 1 a	
Triplex	AAAaaa X aaaaaa	
Phenotypic ratio	19 A : 1 a	

Allohexaploid

Simplex	$A_1a_1a_2a_2a_3a_3$ X $a_1a_1a_2a_2a_3a_3$	Simplex $1 - 0.375 = 0.625$
Phenotypic ratio	1 A : 1 A	
Duplex	$A_1a_1A_2a_2a_3a_3$ X $a_1a_1a_2a_2a_3a_3$	Non-simplex $1/4 + 1/8 = 0.375$
Phenotypic ratio	3 A : 1 A	
Triplex	$A_1a_1A_2a_2A_3a_3$ X $a_1a_1a_2a_2a_3a_3$	
Phenotypic ratio	7 A : 1 A	

โดยการวิเคราะห์ชนิดของพลอยดีสามารถใช้ค่าสถิติ χ^2 เปรียบเทียบค่าคาดหวังกับค่าสังเกตที่ได้จากการทดลองตารางที่ 5 แสดงตัวอย่างอัตราส่วนของ simplex และ multiplex ของเตตราพลอย เฮกซาพลอย และออกตาพลอย

ตารางที่ 5 แสดงอัตราส่วนของค่าคาดหวังของเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ multiplex เปรียบเทียบกันระหว่างอัลโลโพลีพลอยกับออโตโพลีพลอย ที่ได้จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมทดสอบ

Dosage	Tetraploid		Hexaploid		Octaploid	
	Allo	Auto	Allo	Auto	Allo	Auto
Simplex	0.75	0.83	0.625	0.75	0.56	0.70
Multiplex	0.25	0.17	0.375	0.25	0.44	0.30

โดยการใช้หลักเกณฑ์ทั้งสองประการนี้ Ukoskit and Thompson (1997) สามารถวิเคราะห์ชนิดของพลอยดีในมันเทศ (sweetpotato) ได้โดยวิเคราะห์อัตราส่วนเครื่องหมายโมเลกุล RAPD จำนวน 188 เครื่องหมาย ในประชากรลูกผสมทดสอบเทียม พบว่าอัตราส่วนของ multiplex ต่อ simplex เท่ากับ 0.25 : 0.75 และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนลิงเกจของเครื่องหมาย simplex ที่ ลิงเกจในสภาพ coupling กับ repulsion โดยใช้ประชากรลูกผสม

จำนวน 76 พบว่าไม่สามารถตรวจพบลิงเกจในสภาพ repulsion เลย ดังนั้นผลการทดลองจึงยืนยันได้ว่ามันเทศมีโครโมโซมที่มีพฤติกรรมแบบ โพลีโซมิกที่มีชุดโครโมโซม 6x ข้อมูลนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีชุดโครโมโซมแบบโพลีพลอย ซึ่งจะทำให้ช่วยกำหนดวิธีการปรับปรุงพันธุ์ ขนาดประชากรลูกผสม และวิธีการคัดเลือกที่เหมาะสม

ตารางที่ 6 ชุดเซลล์สืบพันธุ์ (gametic series) ของตัวอย่างออโตโพลีพลอย 3 ชนิดที่เกิดจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดข่มสมบูรณ์ (complete dominance) ที่ลิงค์กันในแบบต่างๆ

	Ploidy level	Locus A	Locus B	Linkage phase
Tetraploid Hexaploids 16 types	Simplex	Simplex	Simplex	Coupling; Repulsion
	Simplex	Duplex	Duplex	Coupling; Repulsion
	Duplex	Duplex	Duplex	2-Coupling; Coupling&Repulsion; 2Repulsion
Octaploid 30 types	Simplex	Triplex	Triplex	Coupling; Repulsion
	Duplex	Triplex	Triplex	2-Coupling; Coupling & Repulsion; 2-Repulsion
	Triplex	Triplex	Triplex	3-Coupling; 2-Coupling & Repulsion; Coupling & 2-Repulsion; 3-Repulsion
	Simplex	Duadruplex	Duadruplex	Coupling; Repulsion
	Triplex	Duadruplex	Duadruplex	2-Coupling; Coupling & Repulsion; 2-Repulsion
	Triplex	Duadruplex	Duadruplex	3-Coupling; 2-Coupling & Repulsion; Coupling & 2-Repulsion; 3-Repulsion
	Duadruplex	Duadruplex	Duadruplex	4-Coupling; 3-Coupling & Repulsion; 2-Coupling & 2-Repulsion; Coupling & 3-Repulsion; 4-Repulsion

3.4 การวิเคราะห์และการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลแบบ multiplex (duplex และ triplex)

ตามขั้นตอนการทำแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในออโตโพลีพลอย หลังจากสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล

simplex แล้วขั้นตอนต่อไป คือ การเติมเครื่องหมายโมเลกุล multiplex ในที่นี้จะขอกล่าวเฉพาะ duplex และ triplex โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้

3.4.1 การหาอัตราส่วนจีโนไทป์และอัตราส่วนฟีโนไทป์

ในดิพลอยชุดเซลล์สืบพันธุ์ (gametic series) ของเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันจำกัดอยู่เพียง 2 แบบ คือ coupling และ repulsion ในออตโตพอลิพลอยชุดเซลล์สืบพันธุ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันจะมีได้หลายแบบยิ่งจำนวนโฮโมโลกัสโครโมโซมมีมากขึ้น จำนวนชนิดของชุดเซลล์สืบพันธุ์ยิ่งเพิ่มจำนวนมากขึ้น (ดังตารางที่ 6) ในการพิจารณาแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อวิเคราะห์หาอัตราส่วนจีโนไทป์และอัตราส่วนฟีโนไทป์ จะทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอแต่ละแถบและพิจารณาการถ่ายทอดลักษณะแบบข่มสมบูรณ์ (complete dominance) แม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลจะเป็นประเภท RFLP หรือ SSR ทั้งนี้เนื่องจากแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุล RFLP หรือ SSR จะปรากฏเป็นจำนวนหลายแถบ (มากกว่า 2 แถบ) การอ่านจีโนไทป์แบบข่มร่วม (codominance) ไม่สามารถอ่านได้ โดยแถบเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละแถบอาจเป็นเครื่องหมายโมเลกุล simplex หรือ multiplex ก็ได้ โดยพิจารณาจากการกระจายตัวในประชากรลูกผสมดังตารางที่

ในการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล multiplex จำเป็นต้องสร้างสูตรสำหรับการคำนวณค่า r สำหรับชุดเซลล์สืบพันธุ์แต่ละแบบที่เกิดจากการลิงค์กันของเครื่องหมายโมเลกุลในแบบต่างๆ โดยตั้งสมมติฐานว่าพฤติกรรมกรรมการเข้าสู่ของโครโมโซมเป็นแบบ non-preferential bivalent pairing ขั้นตอนการวิเคราะห์เริ่มจากการวิเคราะห์หาอัตราส่วนจีโนไทป์ ซึ่งต้องคำนวณจากโอกาสของการจับคู่กันของโฮโมโลกัสโครโมโซมแต่ละแบบ จากนั้นจึงรวมอัตราส่วนจีโนไทป์เป็นอัตราส่วนฟีโนไทป์ ดังตัวอย่างในชุดเซลล์สืบพันธุ์ simplex-duplex asymmetrical coupling ของออตโตเซกซาพลอย ดังนี้

กำหนดให้

: หมายเลข 1-6 คือ หมายเลขโฮโมโลกัสโครโมโซมที่ 1-6

: A, B เป็นแถบเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ duplex ตามลำดับ ซึ่งมีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 1 และ 2 ตาม

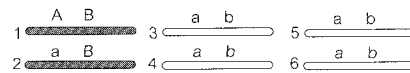
ลำดับ (โครโมโซมที่ 1 และ 2 นี้เป็นโครโมโซมที่มีเครื่องหมายโมเลกุลหรือ informative chromosome)

: a, b การไม่ปรากฏของแถบเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ duplex ตามลำดับ ซึ่งมีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 3-6 (โครโมโซมที่ 3-6 นี้เป็นโครโมโซมที่ไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลหรือ non-

informative chromosome)

การเข้าสู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมเกิดได้ใน 2 กรณี คือ

กรณีที่ 1) การเข้าสู่ระหว่างโครโมโซมที่มีเครื่องหมายโมเลกุลด้วยกันเอง (AB/aB) มีโอกาสเป็นไปได้ 3 แบบ คือ (12, 34, 56) (12, 35, 46) และ (12, 36, 45)



ในกรณีนี้การเกิด crossing over ระหว่าง A และ B ของคู่โครโมโซมของ AB/aB ไม่ทำให้ได้ลูกที่เป็น recombinant อัตราส่วนจีโนไทป์จะเป็น ดังนี้

Chromosome pairings	Possible gametes	Frequency
12 (AB/ab)	AB	1/2
	aB	1/2
34, 35, or 36 (ab/ab)	ab	1
56, 46, or 45 (ab/ab)	ab	1

Genotypes	Frequency
AaaBbb	1/2
aaaBbb	1/2

กรณีที่ 2) การเข้าสู่ระหว่างโครโมโซมที่มีเครื่องหมายโมเลกุลกับโครโมโซมที่ไม่มีเครื่องหมายโมเลกุล (AB/ab หรือ aB/ab) มีโอกาสเป็นไปได้ทั้งหมด 12 แบบ คือ

(13 24 56), (14 23 56), (15 23 46), (16 23 45), (13 25 46), (14 25 36), (15 24 36), (16 25 34), (13 26 45), (14 26 35), (15 26 34), (16 25 34)

ในกรณีนี้การเกิด crossing over ระหว่าง A และ B ของคู่โครโมโซมของ AB/ab จะทำให้ได้ลูกที่เป็น recombinant อัตราส่วนจีโนไทป์จะเป็น ดังนี้

Chromosome pairings	Possible gametes	Frequency
13, 14, 15, 16 (AB/ab)	AB	$(1-r)/2$
	ab	$(1-r)/2$
	Ab	$r/2$
	aB	$r/2$
23, 24, 25, or 26 (aB/ab)	aB	$1/2$
	ab	$1/2$
34, 35, 36, 45, 46, 56 (ab/ab)	ab	1

Genotypes	Frequency	Phenotype	Frequency
AaaBBb	$1-r$	AB	$0.5r-0.2r$
AaaBbb	$3/2$		
Aaabbb	r	A	$0.2r$
aaaBBb	r	B	$0.3+0.2r$
aaaBbb	$3/2$		
aaabbb	$1-r$	Nil	$0.2-0.2r$

สำหรับตัวอย่างอัตราส่วนฟีโนไทป์ในชุดเซลล์สืบพันธุ์แบบอื่นของออโตเฮกซาพลอย แสดงดังตารางที่ 7

Genotypes	Frequency
AaaBBb	$((1-r)/2)(1/2)(4)$
AaaBbb	$((1-r)/2)(1/2)(4)$
aaaBbb	$((1-r)/2)(1/2)(4)$
aaabbb	$((1-r)/2)(1/2)(4)$
AaaBbb	$(r/2)(1/2)(4)$
Aaabbb	$(r/2)(1/2)(4)$
aaaBBb	$(r/2)(1/2)(4)$
aaaBbb	$(r/2)(1/2)(4)$

เมื่อรวมอัตราส่วนจีโนไทป์ที่เหมือนกันจากกรณีที่ 1 และ กรณีที่ 2 จะได้อัตราส่วนฟีโนไทป์ 4 แบบ ดังนี้

ตารางที่ 7 แสดงอัตราส่วนฟีโนไทป์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เกิดจากเครื่องหมายโมเลกุล simplex duplex และ triplex ที่ลิงก์กัน และไม่ลิงก์กันในสภาพ coupling แบบต่างๆ และสูตรของอัตราส่วนฟีโนไทป์ที่ใช้ในการคำนวณค่า recombination fraction (r) ของชุดเซลล์สืบพันธุ์แบบต่างๆ (Ukoskit and Thompson, 1997)

Gametic series	Phenotypic Classes	Phenotypic proportions		General gametic proportions
		Linked	Non-linked	
1&2 Asymmetrical coupling	AB	0.5	0.4	$0.5r-0.2r$
	A	0	0.1	$0.2r$
	B	0.3	0.4	$0.3+0.2r$
	Nil	0.2	0.1	$0.2-0.2r$
2&2 Double coupling	AB	0.8	0.65	$0.8r-0.4r+0.2r^2$
	A	0	0.15	$0.4-0.2r^2$
	B	0	0.05	$0.4-0.2r^2$
	Nil	0.2	0.05	$0.2r-0.4r+0.2r^2$
1&3 Asymmetrical coupling	AB	0.5	0.475	$0.5r-0.5r$
	A	0	0.025	$0.5r$
	B	0.45	0.475	$0.45+0.5r$
	Nil	0.05	0.025	$0.05-0.05r$
2&2 Asymmetrical coupling		0.8	0.7625	$0.8r-0.1r+0.05r^2$
		0	0.0375	$0.1r-0.05r^2$
		0.15	0.1875	$0.15+0.01r-0.05r^2$
		0.05	0.0125	$0.05-0.01r+0.05r^2$

สูตรทั่วไปที่ใช้ในการหาอัตราส่วนฟีโนไทป์ของชุดสืบพันธุ์ที่เกิดจากลิงก์ที่เกี่ยวข้องกับ duplex และ triplex ในออโตโพลิพลอยแบบต่าง ๆ สามารถวิเคราะห์จากความถี่ของยีนในประชากรของออโตโพลิพลอยแบบต่างๆ โดย p และ q เป็นความถี่ของแอลลีลที่แตกต่างกันในแต่ละโลคัส สำหรับชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เครื่องหมายโมเลกุลลิงก์กันในสภาพ coupling อัตราส่วนของจีโนไทป์เป็นฟังก์ชันของความถี่ และสามารถแสดงในรูปของความถี่ยีนได้โดยตรงซึ่งสามารถสรุปเป็นสูตรทั่วไปสำหรับออโตโพลิพลอยแบบต่างๆ ได้ แต่ชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เครื่องหมายโมเลกุลลิงก์กันในสภาพ repulsion อัตราส่วนจีโน

ไทป์จะขึ้นกับระดับของพลอยดีและไม่สามารถแสดงในรูปของความถี่ยีนโดยลำพัง (Da Silva, 1993)

ถ้ากำหนดให้ p เป็นความถี่ของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีเครื่องหมายโมเลกุล q เป็นความถี่ของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่มีเครื่องหมายโมเลกุล ดังนั้น $p+q=1$ และกำหนดให้หมายเลข 1 2 และ 3 เป็นความถี่ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex duplex และ triplex ตามลำดับ ตัวอย่างเช่น ชุดเซลล์สืบพันธุ์ simplex-duplex (1&2) Asymmetrical coupling ค่า p_1 และ p_2 หมายถึง ความถี่ของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ duplex ตามลำดับ ส่วน q_1 , q_2 หมายถึง ความถี่ของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่มีเครื่องหมายโมเลกุล simplex และ duplex ตามลำดับ ในกรณี

เครื่องหมายโมเลกุล simplex ค่า p_1 และ q_1 เท่ากับ 0.5 ในกรณีเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex ของออโตโพลีพลอย $p_2 = 1 - q_2$; $p_3 = 1 - q_3$ โดย

$$q_2 = \frac{\frac{\square}{2} \frac{1}{2(x-1)} \frac{\square}{2} x - 2}{2} \quad q_3 = \frac{\frac{\square}{2} \frac{1}{2(x-1)} \frac{\square}{4} x - 4}{4}$$

p_2 และ p_3 เป็นความถี่ของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex ตามลำดับ q_2 และ q_3 เป็นความถี่ของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่มีเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex ตามลำดับ x เป็นจำนวนโครโมโซมพื้นฐานของออโตโพลีพลอย โดยการแทนค่า x ลงในสมการของ q_2 และ q_3 แล้วหาค่า p_2 และ p_3 ออกมา จะทำให้ได้ความถี่ของฮีนของออโตโพลีพลอยแบบต่าง ๆ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ความถี่ฮีนของเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex ในออโตโพลีพลอยแบบต่างๆ p_2 และ p_3 เป็นความถี่ของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex ตามลำดับ โดย $p_2 = 1 - q_2$; $p_3 = 1 - q_3$

Dosage	Ploidy level						
	4	6	8	10	12	14	16
Duplex (p_2)	0.83	0.80	0.79	0.78	0.77	0.77	0.77
Triplex (p_3)	1.00	0.95	0.93	0.92	0.91	0.90	0.90

สำหรับสูตรทั่วไปของอัตราส่วนจีโนไทป์และอัตราส่วนฟีโนไทป์ (วิธีการสร้างสูตรทั่วไปใช้วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง simplex-duplex asymmetrical coupling ในออโตเฮกซาพลอยข้างต้น) ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เครื่องหมายโมเลกุลลิงก์กันในสภาพ coupling แสดงได้ดังตารางที่ 9

จากตัวอย่าง simplex-duplex asymmetrical coupling ในออโตเฮกซาพลอย เมื่อแทนค่าความถี่ฮีนของ p_1 , p_2 และ q_2 ด้วย 0.5, 0.8 และ 0.2 ตามลำดับ ลงในสูตรทั่วไปของ 1&2 Asymmetrical coupling ของตารางที่ 9 จะทำให้ได้สูตรดังตารางที่ 7

ตารางที่ 9 แสดงสูตรทั่วไปของอัตราส่วนจีโนไทป์และอัตราส่วนฟีโนไทป์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เกิดจากการลิงค์กันในสภาพ coupling ของเครื่องหมายโมเลกุล simplex duplex และ triplex แบบต่างๆ (Da Silva, 1993)

Class	1&2 Asymmetrical coupling	2&2 Double coupling	Class	1&3 Asymmetrical coupling	2&3 Asymmetrical coupling
Genotypic classes			Genotypic classes		
AABB	-	$q_2-2q_2r+q_2r^2$	AABB	-	$q_3-2q_3r+q_3r^2$
AAB	-	$2q_2r-2q_2r^2$	AABB	-	$q_2-q_3+2q_3r-q_2r-q_3r^2$
ABB	q_2-q_2r	$2q_2r-2q_2r^2$	AAB		$q_2r-q_3r^2$
AB	p_2-q_1	$p_2-q_2-q_2-4q_2r+4q_2r^2$	ABBB	q_3-q_3r	$2q_3r-2q_3r^2$
AA	-	q_2r^2	ABB	$p_1-3q_3-2q_3r$	$p_2/2-q_2/2-2q_3r+2q_3r^2$
A	q_2r	$2q_2r-2q_2r^2$	AB	$2q_3+2q_3r$	$p_2/2-q_2/2-2q_3r+2q_3r^2$
BB	q_2r	q_2r^2	AA	-	q_3r^2
B	p_2-q_1	$2q_2r-2q_2r^2$	A	q_3r	$2q_3r-2q_3r^2$
Nil	$q_2-q_{2,1}$	$q_2-2q_2r+q_2r^2$	BBB	q_3r	q_3r^2
phenotypic classes			BB	$2q_3+2q_3r$	$q_2r-q_3r^2$
AB	p_1-q_2r	$p_2-2q_2r+q_2r^2$	B	$p_3-q_1-2q_3-2q_3r$	$q_2-q_3+2q_3r-q_2r-q_3r^2$
A	q_2r	$2q_2r-2q_2r^2$	Nil	q_3-q_3r	$q_3-2q_3r+q_3r^2$
B	$p_2-q_1+q_2r$	$2q_2r-2q_2r^2$	Phenotypic classes		
Nil	q_2-q_2r	$q_2-2q_2r+q_2r^2$	AB	p_1-q_3r	$p_2-2q_3r+q_3r^2$
Sum	$p_2+q_2 = 1$	$p_2+q_2 = 1$	A	q_3r	$2q_3r-2q_3r^2$
			B	$p_3-q_1+q_3r$	$q_2-q_3+(q_2-q_3)r-q_3r^2$
			Nil	q_3-q_3r	$q_3-(q_2-q_3)r+q_3r^2$
			Sum	$p_3+q_3 = 1$	$p_2+q_2 = 1$

3.4.2 การประมาณค่า recombination fraction (r)

หลังจากได้สูตรของอัตราส่วนฟีโนไทป์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เครื่องหมายโมเลกุลลิงค์กันในแบบที่วิเคราะห์แล้ว ระยะทางระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลสามารถประมาณจากค่า r โดยวิธี Maximum likelihood ดังสมการ

$$\frac{dL}{dr} = a_1 \frac{d \log m_1}{dr} + a_2 \frac{d \log m_2}{dr} + \dots + a_t \frac{d \log m_t}{dr} = 0$$

โดย r = recombination fraction; $m_1 \dots m_t$ เป็นอัตราส่วนฟีโนไทป์ที่คาดหมายของฟีโนไทป์แบบที่ 1 ถึง t; $a_1 \dots a_t$ เป็นค่าสังเกตฟีโนไทป์แบบที่ 1 ถึง t

3.4.3 ประสิทธิภาพของการตรวจสอบลิงเกจ

(Power of linkage detection)

การวิเคราะห์ลิงเกจในออโตโพลีพลอยต้องใช้สูตรอัตราส่วนฟีโนไทป์ที่เกิดจากชุดเซลล์สืบพันธุ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในแบบต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น เพื่อประมาณค่า r หรือระยะทางระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลอย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ลิงเกจของชุดเซลล์สืบพันธุ์แบบต่าง ๆ นี้มีข้อจำกัดเกี่ยวกับอัตราส่วนที่คล้ายคลึงกันระหว่างอัตราส่วนฟีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันกับอัตราส่วนฟีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่ลิงค์กัน โดยความคล้ายคลึงของอัตราส่วนฟีโนไทป์ทั้งสองนี้จะเกี่ยวข้องกับชนิดของชุดเซลล์สืบพันธุ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กัน โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในสภาพ coupling และเกี่ยวข้องกับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีจำนวน dose ต่ำเช่น simplex จะมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบลิงเกจได้ดีกว่าการลิงค์กันในสภาพ repulsion ที่เกี่ยวข้องกับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีจำนวน dose สูงเช่น duplex และ triplex

ประสิทธิภาพของการตรวจสอบลิงเกจสามารถวัดโดยการคำนวณหา Power of χ^2 (Agresti, 1990) ซึ่งเป็นฟังก์ชันของระดับความเชื่อมั่น α กับพารามิเตอร์ของ non-centrality (λ) กับขนาดของประชากรลูกผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ลิงเกจ โดย

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

โดย π_i เป็นอัตราส่วนฟีโนไทป์ในกลุ่มที่ i เมื่อเครื่องหมายโมเลกุลไม่ลิงค์กัน และ $\pi_i(M)$ เป็นอัตราส่วนฟีโนไทป์ที่ได้จากการคำนวณค่า r โดยวิธี maximum likelihood โดย $\sum \pi_i = \sum \pi_i(M) = 1$

ตัวอย่างการคำนวณ Power of χ^2 เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างอัตราส่วนฟีโนไทป์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ simplex-duplex asymmetrical coupling ของออโตเฮกซาพลอยที่ลิงค์กันอย่างสมบูรณ์ (r=0) เปรียบเทียบกับอัตราส่วนฟีโนไทป์ที่เครื่องหมายโมเลกุลไม่ลิงค์กัน (r = 0.5) เมื่อใช้จำนวนประชากรลูกผสมในการวิเคราะห์ลิงเกจเท่ากับ 76

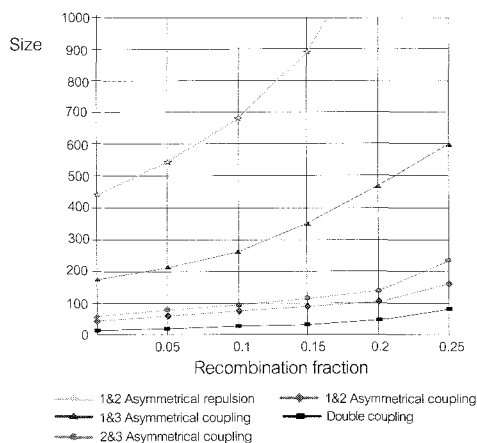
Phenotypes	Ratio of linked	Ratio of non-linked
AB	0.5	0.4
A	0	0.1
B	0.3	0.4
Nil	0.2	0.1

$$\lambda = 76[(((0.5-0.4)2/0.4)+((0-0.1)2/0.1)+((0.3-0.4)2/0.4)+((0.2-0.1)2/0.1))] = 19$$

Power of χ^2 test ที่ค่า $\lambda = 19$, df=1 มีค่า 99% (เปิดตาราง Power of χ^2 จาก Agresti, 1990)

จากการคำนวณหา Power of χ^2 ทำให้สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของประชากรลูกผสมที่ต้องใช้เมื่อต้องการประมาณค่า r ที่ระดับต่าง ๆ ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เครื่องหมายโมเลกุลลิงค์กันในแบบต่าง ๆ ดังรูปที่ 6 จากกราฟจะเห็นได้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในสภาพ coupling และเกี่ยวข้องกับจำนวน dose ที่ต่ำของเครื่องหมายโมเลกุล (เช่น simplex, duplex) จำเป็นต้องใช้จำนวนประชากรลูกผสมน้อยกว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในสภาพ repulsion ดังนั้นแม้ว่าในออโตโพลี-

พลอยจะมีชนิดของชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เกิดจากเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงก์กันได้หลายแบบ การประมาณค่า r คงจำกัดอยู่ในชนิดของชุดเซลล์สืบพันธุ์เพียงไม่กี่แบบ เนื่องจากข้อจำกัดในการทดลองที่ไม่สามารถใช้จำนวนประชากรลูกผสมเป็นจำนวนมากได้ ดังตัวอย่าง ในกรณีของออโต-ออกตาพลอย (autooctaploid) ถ้ามีประชากรลูกผสมจำนวน 250 เฉพาะชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่มีเครื่องหมายโมเลกุลลิงก์กันแบบ double coupling , simplex-duplex asymmetrical coupling และ duplex-triplex asymmetrical coupling จะสามารถตรวจสอบลิงก์ที่ค่า $r = 0.25$ ได้โดยมีประสิทธิภาพการตรวจสอบลิงก์ที่ 80 %

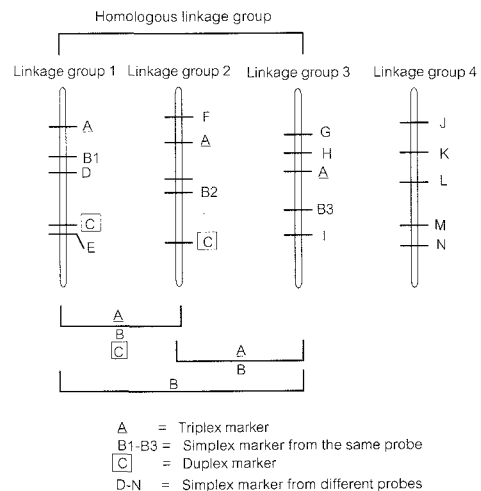


รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของประชากรลูกผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ลิงก์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์แบบต่างๆ เพื่อการประมาณค่า recombination fraction ที่ระดับต่างๆ โดยมีค่า Power of χ^2 เท่ากับ 80% (Da Silva, 1993)

3.5 การวิเคราะห์กลุ่มลิงก์ที่เป็นโฮโมโลกัสกัน

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด simplex ที่ได้จาก RFLP หรือ SSR สามารถช่วยในการวิเคราะห์กลุ่มลิงก์ที่เป็นโฮโมโลกัสกัน โดยพิจารณาจากกลุ่มลิงก์สองกลุ่ม x และ y (หรือมากกว่า 2 กลุ่มลิงก์) ที่มีเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่เกิดจากการใช้โพลี 2 แบบ ใน RFLP หรือคู่

ไพรเมอร์ 2 คู่ ใน SSR โดยกลุ่มลิงก์ x จะมีเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่เกิดจากโพลี 2 แบบ หรือคู่ไพรเมอร์ 2 คู่ ขณะเดียวกันกลุ่มลิงก์ y ก็มีเครื่องหมายโมเลกุล simplex (ต่างแถบดีเอ็นเอกับเครื่องหมายโมเลกุล simplex แรก) ที่เกิดจากโพลี หรือคู่ไพรเมอร์เดียวกัน ดังเครื่องหมายโมเลกุล simplex B ในรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงตัวอย่างกลุ่มลิงก์ที่เป็นโฮโมโลกัสกันคือกลุ่มลิงก์ที่ 1 , 2 และ 3 โดยพิจารณาจาก เครื่องหมายโมเลกุล triplex A เครื่องหมายโมเลกุล simplex B และเครื่องหมายโมเลกุล duplex C กลุ่มลิงก์ที่ 4 ไม่อยู่ในกลุ่มโฮโมโลกัสลิงก์นี้

กลุ่มลิงก์ที่เป็นโฮโมโลกัสกันประกอบด้วยกลุ่มลิงก์ที่ 1 , 2 และ 3 โดยวิเคราะห์จาก 1) เครื่องหมายโมเลกุล triplex A ที่ปรากฏทั้ง 3 กลุ่มลิงก์ 2) เครื่องหมายโมเลกุล simplex B โดย B1 B2 และ B3 เกิดจากโพลีของ RFLP ชนิดเดียวกัน หรือ คู่ไพรเมอร์ SSR คู่เดียวกันแต่เป็นแถบดีเอ็นเอคนละแถบ 3) เครื่องหมายโมเลกุล duplex C ส่วน D E F G H และ I เป็นเครื่องหมายโมเลกุล simplex ในกลุ่มลิงก์ที่ไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์กลุ่มลิงก์ที่เป็นโฮโมโลกัสกัน กลุ่มลิงก์ที่ 4 ไม่อยู่ในกลุ่มลิงก์ที่เป็นโฮโมโลกัส

ในการวิเคราะห์กลุ่มลิงเกจที่เป็นโฮโมโลกัสกัน โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล simplex ต้องอยู่บนสมมุติฐานที่ว่า กลุ่มลิงเกจที่เป็นโฮโมโลกัสกันต้องอยู่บนชิ้นโครโมโซมที่โฮโมโลกัสกัน ซึ่งในบางกรณีการเกิด duplication หรือ translocation ระหว่างโครโมโซมที่ไม่เป็นโฮโมโลกัสกัน ก็ทำให้เกิดกลุ่มลิงเกจที่เป็นโฮโมโลกัสกันได้ การยืนยันความถูกต้องของกลุ่มลิงเกจที่เป็นโฮโมโลกัสกันสามารถทำได้โดยการสร้างแผนที่ของเครื่องหมายโมเลกุล multiplex เช่น duplex หรือ triplex ดังเช่นตัวอย่างในรูปที่ 7 หลังจากที่เราวิเคราะห์กลุ่มลิงเกจที่เป็นโฮโมโลกัสกันได้แล้ว ถ้าข้อมูลแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลมีความละเอียดก็สามารถรวมกันเป็นแผนที่ของแต่ละโครโมโซมได้ ซึ่งจะมีค่าเท่ากับจำนวน x (basic chromosome number) และจะช่วยให้สามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับทำแผนที่ในประชากรลูกผสมอื่นได้

4. สรุป

การสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในพืชที่มีโครโมโซมออโตโพลีพลอย สามารถใช้วิธีการดังที่กล่าวมาข้างต้นนี้ การสร้างประชากรลูกผสมจากพืชที่มีความเป็นเฮเทอโรไซกัสสูง จะทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีโพลิโมर्फิซึมเป็นจำนวนมาก ซึ่งในจำนวนนี้ก็มีทั้งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด simplex และ multiplex ประกอบกันในการทดลองผู้วิจัยจะสามารถทราบชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลได้จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรลูกผสม การสร้างแผนที่จะเริ่มจากการวิเคราะห์ลิงเกจของเครื่องหมายโมเลกุล simplex ที่ลิงค์กันในสภาพ coupling จากนั้นจึงเติมตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุล duplex และ triplex ลงในแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล simplex โดยการประมาณค่า r จากอัตราส่วนฟีโนไทป์ของชุดเซลล์สืบพันธุ์ที่เกิดจากเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กันในสภาพ coupling และเกี่ยวข้องกับเครื่องหมายโมเลกุลที่มีจำนวน dose ค่าเช่น simplex duplex หรือ triplex ในการสร้างเครื่องหมายโมเลกุล

duplex และ triplex นี้ ไม่มีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นแต่ประการใด และเป็นการใช้ข้อมูลจากการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลอย่างเต็มที่

5. เอกสารอ้างอิง

- [1] Agresti, A. Building and applying loglinera models: Categorical data analysis, John Wiley&Sons, New York, NY, 1990.
- [2] Al-Janabi, S.M., R.J. Honeycutt, M. McClland, and B.W.S. Sorbral. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. Genetics 134: 1249-1260, 1993.
- [3] Anderson, J.A., Y. Ogihara, M.E. Sorrels, and S.D. Tanksley. Development of a chromosomal arm map for wheat based on RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 83: 1035-1043, 1992.
- [4] Baenziger, P.S., D.T. Kudirka, G.W. Schaeffer, and M.D. Lazar. The significance of doubled haploid variation. Stadler Genet. Symp. 16:385-414, 1984.
- [5] Bonierbale, M. W., R.L. Plaisted, and S.D. Tanksley. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. Genetics 120: 1095-1103, 1988.
- [6] Da Silva, J.A.G. A Methodology for genome mapping of antopolyploid and its application to sugarcane (*Saccharum spp.*) Ph.D. Dissertation, Cornell University, Ithaca,NV, 108 pp, 1993.
- [7] De Winton, D. and J.B.S. Haldane. Linkage in the tetraploid *Primula sinensis*. J. Genet. 24:121-144, 1931.
- [8] Echt, C.S., K.K. Kidwell, S.J. Knapp, T.C. Osborn, and T.J. McCoy. Linkage mapping in

- diploid alfalfa (*Medicago sativa*). Genome 37: 61-71, 1994.
- [9] Grattapaglia, D. and R. Sederoff. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. Genetics. 137:1121-1137, 1994.
- [10] Hemmat, M., N.F. Weeden, A.G. Manganaris, and D.M. Lawson. Molecular marker linkage map for apple, J. Hered. 85:4-11, 1994.
- [11] Hoarau, J.-Y., B. Offmann, A. D' Hont, A.-M Risterucci, D. Roques, J.-Ch. Glaszmannand, L. Grivet. Genetics dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum spp.*). I. Genome mapping with AFLP markers. Theor. Appl. Genet.103: 84-97, 2001.
- [12] Kam-Morgan, L.N.W., B.S. Gill, and S. Muthukrishnan. DNA restriction fragment length polymorphism: a strategy for genetic mapping of D genome of wheat. Genome 32:724-732, 1989.
- [13] Mather, K. The measurement of linkage in heredity. Metuen, London, p149, 1951.
- [14] Ming, R., S.-C. Liu, P.H. Moore, J.E. Irvine, and A.H. Paterson. QTL analysis in a complex autopolyploid: Genetic control of sugar content in sugarcane. Gemone Res. 11: 2075-2084, 2001.
- [15] Ukoskit, K. and P.G. Thompson. Autopolyploid versus allopolyploid and low density Randomly Amplified Polymorphic DNA linkage maps of sweetpotato. J. Amer. Soc. Hort Sci. 122(6):818-821, 1997.
- [16] Wu, K.K., W. Burnquist, M.E. Sorrells, T.L. Tew, P.H. Moore, and S.D. TanksleyThe detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragment. Theor. Appl. Genet. 83:294-300, 1992.