

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

1. พันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ในงานวิจัยนี้ ตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่ใช้ได้มาจาก 2 แหล่งคือ บริษัทโกลเด้น เทนเนอร์่า และศูนย์วิจัยปาล์มจังหวัดสุราษฎร์ธานี (ศวป.สฎ.) (ตารางที่ 3.1) ซึ่งปาล์มน้ำมันที่ใช้มี ดังนี้ คือ *Elaeis guineensis* ทั้งจาก 2 แหล่ง จากบริษัทโกลเด้นเทนเนอร์่า 7 ต้น และศูนย์วิจัยปาล์ม 48 ต้น, *Elaeis oleifera* จากศูนย์วิจัยปาล์มจังหวัดสุราษฎร์ธานีจำนวน 4 ต้นเพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่พัฒนาได้เมื่อใช้ในพืชต่างสปีชีส์ และมะพร้าว (*Cocos nucifera*) เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายในพืชข้ามจีนัสในตระกูลเดียวกัน นอกจากนี้ยังศึกษา โพลิมอร์ฟิซึมของปาล์มน้ำมันใน clone B และ clone D ซึ่งเป็นพ่อและแม่ของประชากรลูกผสม สำหรับสร้างแผนที่และเพื่อวิเคราะห์แนวโน้มการกระจายตัวของเครื่องหมายในลูกผสม F_1 จำนวน 10 ต้น

ตารางที่ 3.1
พันธุ์ตัวอย่างปาล์มน้ำมัน มะพร้าว

No.	Accession	Pedigree	Source	Fruit Type
1	101/2D	AVROS	ศวป.สฎ.	Dura
2	101/177D	AVROS	ศวป.สฎ.	Dura
3	101/93P	AVROS	ศวป.สฎ.	Pisifera
4	101/95	AVROS	ศวป.สฎ.	Pisifera
5	101/49	AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
6	101/386	AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
7	109/300D	Calabar	ศวป.สฎ.	Dura
8	109/286P	Calabar	ศวป.สฎ.	Pisifera
9	109/319P	Calabar	ศวป.สฎ.	Pisifera
10	109/284T	Calabar	ศวป.สฎ.	Tenera
11	109/298T	Calabar	ศวป.สฎ.	Tenera
12	122/1446T	Calabar-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
13	116/182D	DAMI	ศวป.สฎ.	Dura
14	116/269D	DAMI	ศวป.สฎ.	Dura
15	116/179P	DAMI	ศวป.สฎ.	Pisifera
16	116/206P	DAMI	ศวป.สฎ.	Pisifera
17	116/116T	DAMI	ศวป.สฎ.	Tenera
18	116/233T	DAMI	ศวป.สฎ.	Tenera
19	141/158T	DAMI	ศวป.สฎ.	Tenera
20	141/1345T	DAMI	ศวป.สฎ.	Tenera
21	65/239D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
22	67/740D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
23	67/791D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
24	69/903D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
25	69/955D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
26	76/120D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
27	79/339D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
28	89/1853D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

No.	Accession	Pedigree	Source	Fruit Type
29	91/1617D	Deli Dura	ศวป.สฎ.	Dura
30	114/177D	Ghana	ศวป.สฎ.	Dura
31	114/198D	Ghana	ศวป.สฎ.	Dura
32	114/172P	Ghana	ศวป.สฎ.	Pisifera
33	114/175T	Ghana	ศวป.สฎ.	Tenera
34	114/197T	Ghana	ศวป.สฎ.	Tenera
35	125/154T	Ghana-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
36	133/1433T	Ghana-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
37	140/102T	Ghana-Yangambi	ศวป.สฎ.	Tenera
38	KB/68D	Kazemba	ศวป.สฎ.	Dura
39	129/1426T	La Me-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
40	138/391T	La Me-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
41	110/760D	Nigeria	ศวป.สฎ.	Dura
42	110/763D	Nigeria	ศวป.สฎ.	Dura
43	110/444P	Nigeria	ศวป.สฎ.	Pisifera
44	110/65T	Nigeria	ศวป.สฎ.	Tenera
45	110/66T	Nigeria	ศวป.สฎ.	Tenera
46	159/398T	Tanzania	ศวป.สฎ.	Tenera
47	112/427T	Yangambi	ศวป.สฎ.	Tenera
48	132/1415T	Yangambi-AVROS	ศวป.สฎ.	Tenera
49	R3/11PA	-	บ.โกลดั้นเทนเนอระ	Pisifera
50	R4/16DA	-	บ.โกลดั้นเทนเนอระ	Dura
51	R8/9DB	-	บ.โกลดั้นเทนเนอระ	Dura
52	R9/15DA	-	บ.โกลดั้นเทนเนอระ	Dura
53	PBR16/6	-	บ.โกลดั้นเทนเนอระ	Pisifera
54	DBR12/7	-	บ.โกลดั้นเทนเนอระ	Dura
55	PBR17/14	-	บ.โกลดั้นเทนเนอระ	Pisifera
56	clone B	-	บ.โกลดั้นเทนเนอระ	Tenera
57	cloneD	-	บ.โกลดั้นเทนเนอระ	Tenera
58	48 Oleifera	-	ศวป.สฎ.	-
59	57 Oleifera	-	ศวป.สฎ.	-

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

No.	Accession	Pedigree	Source	Fruit Type
60	58 Oleifera	-	ศวป.สฎ.	-
61	164 Oleifera	-	ศวป.สฎ.	-
62	coconut	-	-	-

2. วิธีทดลอง

2.1 การค้นหา EST-SSR โดยการหาเหมือนข้อมูล

ในงานวิจัยนี้ นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EST จากฐานข้อมูล 2 แห่ง แหล่งแรก คือ PalmGenes (<http://palmoilis.mpob.gov.my/palmgenes.html>) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลสาธารณะ EST ของปาล์มน้ำมันจากประเทศมาเลเซีย ซึ่งสร้างฐานข้อมูล EST โดยวิธีการโคลนยีน ด้วยวิธีมาตรฐานแล้วทำการหาลำดับเบส EST (Brown *et al.*, 1996; Paterson, 1996) จำนวน 5,610 กลุ่มและ ฐานข้อมูลจีโนมปาล์มน้ำมันของประเทศไทย โดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) โดยหาลำดับเบสด้วยวิธี pyrosequencing (Cole *et al.*, 2009) จำนวน 75,948 ลำดับเบส จากนั้นทำการจัดกลุ่ม (assemble และ clustering) ของข้อมูลนิวคลีโอไทด์ โดยการใช้โปรแกรม CAP3 (Huang and Madan, 1999) เพื่อให้ได้ข้อมูล 2 กลุ่ม คือ singlets และ contigs นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดค้นหา EST ที่มีลำดับเบสของ SSR โดยใช้โปรแกรม WebTROLL (Martins *et al.*, 2009) กำหนดชุดซ้ำของ mono-, di-, tri-, tetra-, penta- และ hexa nucleotide ให้มีจำนวนซ้ำ 10, 5, 5, 3, 3 และ 3 ตามลำดับ และคัดกรองชุดเบสซ้ำแท้จริง โดยใช้โปรแกรม RepeatMasker Web Server (Arian and Robert, 2003) ซึ่งทำการคัดกรองลำดับเบสซ้ำที่เป็น interspersed repeats และ low complexity ออกจากนั้นนำข้อมูล EST-SSRs วิเคราะห์หน้าที่โปรตีนคาดหมายโดยใช้โปรแกรม Blast2Go (Conesa *et al.*, 2005) โดยทำการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลโปรตีน (BLASTX) กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยกำหนดเปอร์เซ็นต์ similarity และ E-value เท่ากับ 75% และ 10^{-6} ตามลำดับ

2.2 การออกแบบไพรเมอร์

นำข้อมูล EST ที่มี SSRs จำนวน 1,570 ตำแหน่ง ทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยการใช้โปรแกรม Primer3 (Steve and Helen, 2000) โดยการออกแบบไพรเมอร์นั้น จะเลือกไพรเมอร์จาก EST ที่มีชุดซ้ำของ mono-, di-, tri-, tetra-, penta- และ hexa nucleotide ให้มีจำนวนซ้ำ 16,

7, 6, 5, 4 และ 4 ตามลำดับ กำหนดขนาดของผลผลิตพีซีอาร์อยู่ในช่วง 100-300 คู่เบส และกำหนด Tm ของเครื่องหมายแต่ละเครื่องหมายให้อยู่ในช่วง 50-60°C ทำการตั้งชื่อเครื่องหมายดีเอ็นเอ EST-SSRs จะใช้ตัวอักษรว่า PESTM ซึ่งย่อมาจาก palm EST marker แล้วตามด้วยลำดับของไพรเมอร์ เช่น PESTM1 ย่อมาจาก palm EST marker ลำดับที่ 1 เป็นต้น

2.3 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการ cetyltrimethylammonium bromide (CTAB method) ขั้นตอนการสกัดทำตามวิธีของ Gawel and Jarnet (1991) แต่ได้มีการปรับเปลี่ยนเพื่อให้เหมาะสมกับตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัยดังนี้ เริ่มจากการนำตัวอย่างใบอ่อนประมาณ 500 กรัม (3-4 ใบ) ใส่ลงในโถงและเติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมตัวอย่าง บดตัวอย่างใบด้วยที่บดให้ละเอียด ในขณะที่ไนโตรเจนเหลวยังไม่ระเหยไป ใส่ CTAB extraction buffer (20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH. 8.0, 1.4 M NaCl, 2% (W/V) CTAB ผสมกับ 0.1% ของ β -mercaptoethanol เมื่อต้องการใช้) ที่อุ่นให้ร้อนแล้วที่อุณหภูมิ 65 °C ประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับตัวอย่างใบที่บดละเอียดแล้ว (ต้องใส่ก่อนที่ตัวอย่างใบจะละลาย) ใช้ที่บดคนสารละลายบัพเพอร์ให้ผสมเข้ากับตัวอย่างใบที่บดแล้ว จากนั้นเทสารละลายลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 30 นาที เขย่าตัวอย่างเป็นครั้งคราว หลังจากนั้นนำตัวอย่างออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตกตะกอนโปรตีนโดยเติม chloroform : isoamylalcohol (24:1, V/V) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมเข้ากันดี ทำการปั่นแยกสารละลายดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ปิเปตสารละลายส่วนใสของดีเอ็นเอด้านบนด้วย Pasteur pipette ใส่ลงในหลอดทดลอง centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วค่อยๆเติม absolute ethanol ที่เย็นจัดในปริมาตรสองเท่าตัวของสารละลายที่ได้เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อปิดฝาหลอดแล้วพลิกหลอดไปมาหลายๆ ครั้งจนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอเกาะตัวเป็นก้อน จากนั้นเกี่ยวสายดีเอ็นเอขึ้นมาจาก absolute ethanol โดยใช้แท่งแก้วที่จุ่มเป็นขอเกี่ยว ล้างดีเอ็นเอในหลอดทดลอง centrifuge ที่มี 70% ethanol หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอออกไปใส่หลอดทดลอง microfuge ที่มี 0.2 M NaAc 1 มิลลิลิตร แช่ดีเอ็นเอนาน 10 นาที แล้วนำดีเอ็นเอออกไปใส่ในหลอดทดลอง microfuge ที่มี 0.01 M NH₄Ac 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างดีเอ็นเอประมาณ 10 วินาที จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยสัมผัสกับกระดาษกรอง เมื่อดีเอ็นเอแห้งนำมาละลายในหลอดทดลอง microfuge ที่มี 50 ไมโครลิตรของ TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง

(spectrophotometer) ที่ความยาวแสง 260 และ 280 นาโนเมตร เทียบกับการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) จากนั้นทำการเก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิที่ -20°C

2.4 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมาย EST-SSR และเครื่องหมาย gSSR

นำดีเอ็นเอปาล์มมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมาย EST-SSR โดยใช้ไพรเมอร์ที่พัฒนาได้ และเครื่องหมาย gSSR ที่ได้จากการวิจัยของ Billotte *et al.* (2005, pp.754-765) จำนวน 33 คู่ไพรเมอร์ โดยใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 20 μl ประกอบด้วย 2 μl 10X PCR buffer, 25 mM MgCl_2 , 5 U/ μl ของเอนไซม์ *Taq* polymerase, 2.0 mM dNTPs, 2.5 pmole/ μl ไพรเมอร์ และ 10 ng ดีเอ็นเอต้นแบบ อุณหภูมิในการทำพีซีอาร์ประกอบด้วยอุณหภูมิ denature ที่ 95°C นาน 1 นาที และ 94°C นาน 3 นาที ตามด้วยรอบอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ ที่ 94°C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ตามความเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่ นาน 1 นาที 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72°C นาน 30 วินาที ตรวจสอบผลเบื้องต้นด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 2% agarose gel electrophoresis แล้วนำไปวิเคราะห์หาโพลิมอร์ฟิซึมใน 6% polyacrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ในเทรทโดยวิธีการของ Benbouza *et al.*, (2006) จากนั้นอ่านผลและวิเคราะห์โพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างปาล์ม

2.5 การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมาย EST-SSR

ทำการวิเคราะห์โพลิมอร์ฟิซึมเพื่อการศึกษาความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมัน *Elaeis guineensis* ที่ได้จาก 2 แหล่ง คือบริษัทโกลเด้นเทนเนอราและศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี ความแตกต่างระหว่างพืชข้ามสปีชีส์ คือ *Elaeis oleifera* และความแตกต่างระหว่างพืชข้ามจีนัส คือมะพร้าว (*Cocos nucifera*) พารามิเตอร์ที่ศึกษาประกอบด้วย

1) การวิเคราะห์จำนวนแอลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (number of alleles per locus) โดยนับจำนวนแอลลีลที่ศึกษาทั้งหมดทุกตำแหน่ง แล้วนำมาหารด้วยจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายทั้งหมดที่ทำการศึกษา

$$n = \frac{\sum_{i=1}^K n_i}{K}$$

$$\begin{aligned} \text{โดย } K &= \text{จำนวนโลไซ} \\ n_i &= \text{จำนวนแอลลีลในแต่ละโลกัส} \end{aligned}$$

2) การวิเคราะห์ค่า PIC (Polymorphism information content) เป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่แสดงความหลากหลายของแอลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ค่า PIC ในงานวิจัยนี้ใช้ปาล์มน้ำมันที่เป็น *Elaeis guineensis* เท่านั้น สูตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่า PIC คำนวณจาก

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2 p_i^2 p_j^2$$

เมื่อ p เป็นความถี่ของแถบดีเอ็นเอที่ j ของเครื่องหมายที่ i (Botstein *et al.*, 1980)

3) การวิเคราะห์ค่า discrimination power (D) เป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชตัวอย่างที่ศึกษา โดยการวิจัยนี้ใช้ปาล์มน้ำมันที่เป็น *Elaeis guineensis* เท่านั้น โดยคำนวณจาก

$$D = 1 - C = 1 - \sum_{i=1}^l p_i N p_i^{-1}$$

เมื่อ D เป็นค่าประสิทธิภาพการแยกความแตกต่าง
 C เป็นค่าความน่าจะเป็นที่พืชตัวอย่างที่ศึกษาจะมีพันธุกรรมเหมือนกัน
 p_j เป็นค่าความถี่ของแถบดีเอ็นเอที่ l เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ j
 N จำนวนพืชตัวอย่างทั้งหมดที่ศึกษา
 l เป็นจำนวนแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ j (Sarri *et al.*, 2006)

4) การวิเคราะห์เฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) หมายถึงความถี่ของเฮเทอโรไซโกตีต่อยีน 1 ตำแหน่ง จะคำนวณทั้งค่าจริง (H_0) และค่าตามทฤษฎี (H_e) โดยที่ค่า

H_0 (observed heterozygosity) หรือ Heterozygosity คือ สัดส่วนของเฮเทอโรไซโกตจีโนไทป์เฉลี่ยต่อตำแหน่ง คำนวณได้จากข้อมูลจริง

H_e (expected heterozygosity) เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Gene Diversity เป็นค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการคำนวณทางอ้อม โดยตั้งสมมุติฐานว่าประชากรนั้นอยู่ในสภาวะสมดุล ดังนั้นความถี่ของอัลลีล p^2+q^2 และ ความถี่ของเฮเทอโรไซโกต = $1-(p^2+q^2)$ สามารถเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่าง H_0 และ H_e โดยวิธีทดสอบไคสแควร์ (X^2) = $(H_0 - H_e)_2 / H_e$ เพื่อทดสอบความเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี – ไวน์เบิร์ก (Hardy – Weinberg principle)

5) ค่า F_{ST} คือ ค่าสัมประสิทธิ์ที่แสดงถึงการผสมภายในสายพันธุ์ที่แสดงถึงความแตกต่างของความถี่ของอัลลีลในเฮเทอโรไซโกตระหว่างประชากรย่อยกับประชากรรวม ซึ่งคำนวณโปรแกรม PopGene (Francis C., 1999) จากสูตร

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T = 1 - (H_S / H_T)$$

เมื่อ H_T คือความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งหมด หรือค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกตในประชากรทั้งหมดโดยประมาณจากค่าความถี่แอลลีลรวม

H_S คือค่าเฉลี่ยค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกตที่ประมาณจากประชากรย่อยในแต่ละประชากร

6) การวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ใช้ข้อมูลการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอแบบ co-dominant เพื่อหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic similarity) เพื่อสร้าง dendrogram โดยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc ver 2.02

7) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดย Analysis of molecular variance (AMOVA, Excoffier et al., 1992) โดยทำการวิเคราะห์ค่า F_{ST} ซึ่งเป็นค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรป่าล้ม และวิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรมของประชากรป่าล้มน้ำมัน ด้วยโปรแกรม STRUCTURE (Pritchard and Falush, 2007) โดยการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมจะแบ่งเป็นสองส่วนคือ การวิเคราะห์โครงสร้างในตัวอย่างพันธุ์ป่าล้มจำนวน 57 ตัวอย่างที่ประกอบด้วยพันธุ์ป่าล้มจากบริษัทโกลเด้นเทเนอราจำนวน 9 ตัวอย่างและพันธุ์ป่าล้มจากศูนย์วิจัยป่าล้มสุราษฎร์ธานีจำนวน 48 ตัวอย่าง และการวิเคราะห์โครงสร้าง

พันธุกรรมในพันธุ์ปาล์มจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานีจำนวน 48 ตัวอย่าง โดยขั้นแรกในการวิเคราะห์จะทำการจัดกลุ่มประชากร โดยดูค่าความเป็นไปได้ของจำนวนกลุ่มประชากร (K) โดยพิจารณาจากค่า Variance of Ln likelihood ($\text{Var}[\text{LnP}(D)]$) ที่มีค่ามากที่สุด เมื่อทำการจัดกลุ่มของประชากรแล้ว จากนั้นทำการวิเคราะห์โครงสร้างในตัวอย่างพันธุ์ปาล์ม โดยกำหนดค่าความน่าจะเป็นของกลุ่มพันธุ์ที่มีฐานพันธุกรรมจากแหล่งเดียวกัน (Q) อย่างน้อย 70%

2.6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมาย EST-SSR และ gSSR

นำไพรเมอร์ EST-SSR ที่ออกแบบได้และแสดงโพลิมอร์ฟิซึมในปาล์มน้ำมัน *Elaeis guineensis* และเครื่องหมาย genomic SSR (gSSR) ที่ได้จากการวิจัยของ Billotte *et al.* (2005, pp.754-765) จำนวน 33 คู่ไพรเมอร์มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบค่า PIC และ D ของเครื่องหมาย EST-SSR และ gSSR เปรียบเทียบกัน เพื่อดูประสิทธิภาพของเครื่องหมาย EST-SSR ที่พัฒนาได้ว่ามีความสามารถในการแยกความแตกต่างของปาล์มน้ำมันใกล้เคียงกับเครื่องหมาย gSSR โดยการวิเคราะห์ค่า PIC คำนวณโดยใช้โปรแกรม PowerMarker (Jack Liu, 1996)

2.7 การศึกษาการกระจายตัวในลูกผสม F_1 ที่เกิดระหว่าง clone B และ clone D

ทำการวิเคราะห์แนวโน้มการกระจายตัวของเครื่องหมาย EST-SSR ในประชากรลูกผสม F_1 ที่ได้จากการผสมระหว่าง clone B และ clone D ใช้ลูกผสม 10 ต้นคัดเลือกโดยการสุ่มตัวอย่างเพื่อดูความสอดคล้องกับการกระจายตัวของเมนเดล โดยเครื่องหมาย EST-SSR ที่ใช้วิเคราะห์ ต้องแสดงโพลิมอร์ฟิซึมใน clone B, clone D และลูกผสม F_1 จำนวน 10 ตัวอย่าง จากนั้นอ่านค่าโพลิมอร์ฟิซึมแบบ co-dominant marker ดูแอลลีลและจีโนไทป์ของพ่อและแม่ (clone B และ clone D) ซึ่งในลูกจะมีรูปแบบของแอลลีลและจีโนไทป์ตามกฎของเมนเดล จีโนไทป์ $ab \times aa$ มีอัตราส่วน $aa:ab$ เป็น 1:1, จีโนไทป์ $aa \times ab$ มีอัตราส่วน $ab:aa$ เป็น 1:1, จีโนไทป์ $ab \times ab$ มีอัตราส่วน $aa:ab:bb$ เป็น 1:2:1 และจีโนไทป์แบบ $ab \times ac$ มีอัตราส่วน $ab:ac:bb:bc$ เป็น 1:1:1:1 และการอ่านค่าแบบ dominant marker การอ่านค่า a เท่ากับมีแถบดีเอ็นเอปรากฏ การอ่านค่า o เท่ากับไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ การกระจายตัวในลูกตามกฎของเมนเดล จีโนไทป์แบบ $ao \times oo$ หรือ $oo \times ao$ มีอัตราส่วนการปรากฏแถบดีเอ็นเอและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 3:1

2.8 การวิเคราะห์ linkage disequilibrium

ทำการวิเคราะห์ค่า linkage disequilibrium (LD) โดยการวิเคราะห์ค่า r^2 (the

square of correlation coefficient) ระหว่างแอลลีลของแต่ละคู่ไพโรเมอร์ โดยตั้งสมมติฐานว่า ตัวอย่างของปาล์มน้ำมันเป็นประชากรมีการผสมกันแบบสุ่มด้วยโปรแกรม PowerMarker (Jack Liu, 1996) ทดสอบสมมติฐานแบบ exact test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในแต่ละตำแหน่งของแอลลีล โดยแต่ละแอลลีลที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องเป็นไปตาม H-W equilibrium ดังนั้นก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ค่า LD ต้องทำการวิเคราะห์ค่า H-W equilibrium ในแต่ละตำแหน่งของแอลลีล โดยใช้เครื่องหมายทั้งหมด 29 เครื่องหมายประกอบด้วยเครื่องหมาย EST-SSR จำนวน 19 เครื่องหมาย และ gSSR จำนวน 10 เครื่องหมาย โดยเครื่องหมายทั้ง 29 เครื่องหมายนี้ปรากฏในแผนที่พันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในประชากรลูกผสม F_1 ที่เกิดจากการผสมของ clone B และ clone D ตามงานวิจัยของกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ (ภาคผนวก ง) โดยวิเคราะห์จากโปรแกรม PowerMarker (Jack Liu., 1996) โดยทำการวิเคราะห์ค่า P-value แบบ exact test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทั้ง 29 เครื่องหมาย จากนั้นทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างประชากรรวมและแต่ละกลุ่มประชากรย่อย (F_{ST}) ในแต่ละเครื่องหมาย