

บทที่ 4

ผลของการวิจัย

1. การค้นหาและพัฒนา EST-SSR โดยการทำให้เหมือนข้อมูล

ในงานวิจัยเบื้องต้นได้นำเฉพาะฐานข้อมูล EST ของ PalmGenes จัดกลุ่มโดยโปรแกรม MetaGenome GAMBLER (Insilico biology, Yokohama, Japan) ได้ข้อมูลทั้งหมด 3,288 กลุ่ม ประกอบด้วย singlet 2,992 กลุ่ม และ contig 812 กลุ่ม จากนั้นใช้โปรแกรม WebTROLL และ RepeatMasker เพื่อค้นหา EST ที่มี SSR พบว่าได้ข้อมูล EST-SSRs จำนวน 151 กลุ่ม โดยลำดับเบสชนิด mononucleotide พบมากที่สุดคือ 43 ซ้ำ (28.18%) รองลงมาคือ di-, tri-, tetra-, penta-, hexa- และ compound nucleotide จำนวน 39 (25.83%), 31 (20.53%), 28 (18.54%), 4 (2.65%), 5 (3.31%) และ 14 (9.27%) ตามลำดับ

ในงานวิจัยนี้นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EST จากฐานข้อมูล 2 แหล่ง แหล่งแรก คือ PalmGenes ซึ่งเป็นฐานข้อมูลสาธารณะ EST ของปาล์มน้ำมันจากประเทศมาเลเซีย ประกอบด้วย EST ทั้งหมด 5,610 กลุ่ม และฐานข้อมูลลำดับเบสปาล์มน้ำมันของประเทศไทย จำนวน 75,948 ลำดับเบส นำข้อมูลทั้งหมดทำการจัดกลุ่ม (assemble และ clustering) โดยโปรแกรม CAP3 ได้ข้อมูลจำนวน 47,256 กลุ่ม ประกอบด้วย singlet 46,328 กลุ่ม และ contig 928 กลุ่ม จากนั้นใช้โปรแกรม WebTROLL และ RepeatMasker เพื่อค้นหา EST ที่มี SSR พบว่าได้ข้อมูล EST-SSRs จำนวน 1,570 กลุ่ม โดยจัดกลุ่มตามชนิดลำดับเบสซ้ำของ EST-SSRs ที่มีทั้งหมด 6 ชนิด คือ Mononucleotide, Dinucleotide, Trinucleotide, Tetranucleotide, Pentanucleotide และ Hexanucleotide ชนิดลำดับเบสซ้ำ (motif types) ที่ปรากฏมากที่สุดคือ Mononucleotide 68.78% (1,181) รองลงมาคือ Dinucleotide 15.08% (259) โดยพบว่า EST-SSRs ชนิด Mononucleotide ประกอบไปด้วย motif แบบหนึ่งเบสซ้ำ มีรูปแบบ 2 รูปแบบ คือ A/T และ G/C โดย motif ที่พบมากที่สุดคือ A/T จำนวน 1,152 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความถี่ 67.09 โดยจำนวนซ้ำของ A/T ที่พบมากที่สุดคือ 11-15 ซ้ำ มีจำนวน 707 EST (ตารางที่ 4.1)

ชนิดลำดับเบสซ้ำแบบ Dinucleotide ประกอบไปด้วย motif แบบสองเบสซ้ำ มีรูปแบบ 4 รูปแบบ คือ AC/GT, AG/CT, AT/TA และ GC/CG โดย motif ที่พบมากที่สุดคือ AG/CT จำนวน 150 ซ้ำ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความถี่ 8.74% ของลำดับเบสซ้ำชนิด Dinucleotide โดยจำนวน

ซ้ำของ AG/CT ที่พบมากที่สุดคือ 6 ซุดซ้ำ และพบ motif แบบ AT/TA, AC/GT และ GC/CG จำนวน 67, 34 และ 8 ซ้ำตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

ชนิดลำดับเบสซ้ำแบบ Trinucleotide ประกอบไปด้วย motif แบบสามเบสซ้ำ มีรูปแบบ 10 รูปแบบ คือ CAG/CTG, TTC/GAA, CAT/ATG, AAG/CTT, CCA/TGG, ATT/AAT, GCG/CGC, AGG/CCT, TAG/CTA และ GAC/GTC โดย motif ที่พบมากที่สุดคือ TTC/GAA, ATT/AAT และ CAG/CTG ซึ่งพบ 36, 31 และ 28 ซ้ำตามลำดับ โดยจำนวนซ้ำของ TTC/GAA พบมากที่สุดคือ 5 ซุดซ้ำ ในขณะที่จำนวนซ้ำของ ATT/AAT และ CAG/CTG ที่พบมากที่สุดคือ 5 ซุดซ้ำเช่นกัน (ตารางที่ 4.1)

ชนิดลำดับเบสซ้ำแบบ Tetranucleotide ประกอบไปด้วย motif แบบสี่เบสซ้ำปรากฏเพียง 17 โดยจำนวนซ้ำของ AAAT/ATTT, AAAG/CTTT และ TATG/CATA พบมากที่สุดคือ 25, 10 และ 8 ซุดซ้ำตามลำดับ ซึ่งจำนวนซ้ำของลำดับเบสที่พบมากที่สุดสามชนิดมีซุดซ้ำที่มากที่สุดคือ 5 ซุดซ้ำ ในขณะที่ชนิดลำดับเบสซ้ำแบบ Pentanucleotide ประกอบด้วย motif แบบห้าเบสซ้ำจำนวนทั้งหมด 7 EST ซึ่ง motif ที่พบมากที่สุดคือ AAAAT/ATTTT, TTTTC/GAAAA และ TGGGG/CCCCA พบจำนวน 12, 12 และ 3 ซ้ำตามลำดับ และชนิดลำดับเบสซ้ำแบบ Hexanucleotide พบว่ามีจำนวนซ้ำเป็นจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับชนิดลำดับเบสซ้ำ Mononucleotide, Dinucleotide, Trinucleotide, Tetranucleotide และ Pentanucleotide โดย Hexanucleotide จะประกอบด้วย motif ทั้งหมด 14 รูปแบบ (ตารางที่ 4.1)

นอกจากการจัดจำแนกตามชนิดของลำดับเบสซ้ำและการพิจารณา motif แล้ว ได้ทำการพิจารณาการจัดจำแนกลำดับเบสซ้ำตามรูปแบบของการปรากฏลำดับเบสซ้ำได้ 3 กลุ่มด้วยกันคือ แบบที่ 1 แบบ Perfect จะเป็นกลุ่มที่ปรากฏลำดับเบสซ้ำเพียงชนิดเดียวในหนึ่ง EST-SSR เช่น $...(AT)_n...$ แบบที่ 2 แบบ Imperfect จะเป็นกลุ่มที่ปรากฏลำดับเบสซ้ำเพียงชนิดเดียวแต่สามารถเกิดขึ้นได้หลายตำแหน่งภายในหนึ่ง EST-SSR เช่น $...(AT)_n...(AT)_n...$ และแบบที่ 3 แบบ Compound จะเป็นกลุ่มที่ปรากฏลำดับเบสซ้ำหลายชนิดและเกิดขึ้นได้หลายตำแหน่งในหนึ่ง EST-SSR เช่น $...(A)_n...(AT)_n...$ ผลจากการจัดจำแนก EST-SSR ตามรูปแบบการปรากฏลำดับเบสซ้ำแสดงดังตารางที่ 4.2 จากการจัดกลุ่มรูปแบบการปรากฏลำดับเบสซ้ำ พบว่ารูปแบบการปรากฏลำดับเบสแบบซ้ำแบบ Perfect พบมากที่สุดคือ 1,475 ตำแหน่ง คิดเป็น 93.95% ของจำนวนซ้ำ ส่วนรูปแบบการปรากฏลำดับเบสซ้ำแบบ Compound และ Imperfect พบว่ามีจำนวนเท่าๆ กัน คือ 49 และ 46 ตำแหน่งตามลำดับ คิดเป็น 3.12 และ 2.93% ตามลำดับ โดยรูปแบบการปรากฏลำดับเบสซ้ำแบบ Compound พบว่าลำดับเบสซ้ำชนิด Mono-repeat, Di-repeat

และ Tetra-repeat มีจำนวนที่ใกล้เคียงกันคือ 16, 12 และ 12 ซ้ำตามลำดับ ในขณะที่การปรากฏลำดับเบสซ้ำแบบ Imperfect พบว่าลำดับเบสซ้ำชนิด Mono-repeat พบมากที่สุดคือ 40 ซ้ำ

ตารางที่ 4.1
ความถี่ของชนิดลำดับเบสซ้ำใน EST ที่มี SSR

SSR Type	Motif	No. of repeats											Total/ motif No.	Frequency (%) within type
		3	4	5	6	7	8	9	10	11- 15	16- 20	21- 25		
Mononucleotides	A/T								383	707	59	3	1152	67.09
	G/C								10	18	1	0	29	1.69
Dinucleotides	AG/CT				74	29	15	9	8	14		1	150	8.74
	AT/TA				22	24	15	2	1	3			67	3.9
	AC/GT				9	6	11	2	2	3	1		34	1.98
	GC/CG				7	1							8	0.47
Trinucleotides	TTC/GAA	2	22	10	2								36	2.1
	ATT/AAT		15	4	7	2	2	2		1			31	1.81
	CAG/CTG	2	12	8	2	3	1						28	1.63
	GCG/CGC		5	7	2	3	2						19	1.11
	AGG/CCT		8	7	3								18	1.05
	CCA/TGG		3	5	1	1							10	0.58
	CAT/ATG		4	1	1		1						6	0.35
	AAC/TTG		2										2	0.12
	TAG/CTA		2										2	0.12
	GAC/GTC		1				1						2	0.12
Tetranucleotides	AAAT/ATTT	11	10	2	2								25	1.46
	AAAG/CTTT	10											10	0.58
	TATG/CATA	6	2										8	0.47
	ACCG/CGGT	3	2	2	1								6	0.35

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

SSR Type	Motif	No. of repeats										Total/ motif No.	Frequency (%) within type	
		3	4	5	6	7	8	9	10	11- 15	16- 20			21- 25
	TATC/GATA		2	3									5	0.29
	TCGC/GCGA	1	1										2	0.12
	CAAA/TTTG			3									3	0.17
	TGCG/CGCA		2										2	0.12
	TAAT/ATTA			2									2	0.12
	GATC/CTAG		2										2	0.12
	TCGC/GCGA	1	1										2	0.12
	CGAG/CTCG		2										2	0.12
	GGCA/CCGT	1											1	0.06
	AACC/GGTT		1										1	0.06
	AACT/AGTT		1										1	0.06
	GCAA/TTGC		1										1	0.06
	CATC/GATG		1										1	0.06
Pentanucleotides	AAAAT/ATTTT		10	2									12	0.7
	TTTTTC/GAAAA	3	6	3									12	0.7
	TGGGG/CCCCA			3									3	0.17
	TCTCT/AGAGA			1									1	0.06
	ATATA/TATAT		1										1	0.06
	AAAGC/GCTTT		1										1	0.06
	AGCAC/GTGCT		1										1	0.06

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

SSR Type	Motif	No. of repeats										Total / motif		Frequency (%) within type		
		3	4	5	6	7	8	9	10	11- 15	16- 20	21- 25	No.			
Hexanucleotides	ATTTT/AAAAT		1	1											2	0.12
	GCGAGG/CCTCGC		1	1											2	0.12
	GAGGGC/GCCCTC		1												1	0.06
	GAAGAG/CTTCTC		1												1	0.06
	GGTCTC/GAGACC		1												1	0.06
	CGATTT/AAATCG			1											1	0.06
	AATTTG/CAAAAT			1											1	0.06
	GCGGAG/CTCCGC			1											1	0.06
	GGCGCC/CCGCGG	1													1	0.06
	TCTTTT/AGAAA	1													1	0.06
	TCTCCT/AGGAGA		1												1	0.06
	GTGGGA/TCCAC			1											1	0.06
	GGGAGA/TCTCCC		1												1	0.06
	GGTTAG/CCAATC			1											1	0.06
Total		7	76	111	157	81	51	19	404	746	61	4	1717	100		
%		0.41	4.43	6.46	9.14	4.72	2.97	1.11	23.53	43.45	3.55	0.23	100			

ตารางที่ 4.2

ชนิดของลำดับเบสซ้ำและรูปแบบของการซ้ำของเครื่องหมาย EST-SSR ที่ได้จากการทำเหมือง

ข้อมูล

Repeat Class	Perfect	Imperfect	Compound	Total
Mono-repeat	1034	40	16	1090
Di-repeat	221	5	12	238
Tri-repeat	130	1	8	139
Tetra-repeat	53		12	65
Penta-repeat	26			26
Hexa-repeat	11		1	12
Total	1475	46	49	1570
%	93.949	2.9299	3.121	100

2. การวิเคราะห์หน้าที่ของ EST-SSRs

เมื่อวิเคราะห์หน้าที่คาดหมายลำดับเบส EST-SSRs เฉพาะในฐานข้อมูล

PalmGenes จากจำนวน 151 EST-SSRs พบว่า 120 EST-SSRs (79.47%) เป็นยีนที่ทราบหน้าที่การทำงาน 4 EST-SSRs (2.3%) เป็นโปรตีนสมมุติฐาน และส่วนที่เหลือ 27 EST-SSRs (17.88%) เป็น EST-SSRs ที่ไม่พบความคล้ายคลึงกับข้อมูลในฐานข้อมูล และเมื่อทำการวิเคราะห์ความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบหน้าที่ พบว่า ความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 430 นิวคลีโอไทด์ (ฐานข้อมูล PalmGenes) และเมื่อวิเคราะห์ในฐานข้อมูลลำดับเบสพาล์มน้ำมันของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ จำนวน 1,419 EST-SSRs พบว่า 69 EST-SSRs (4.93%) เป็นยีนที่ทราบหน้าที่การทำงาน 1 EST-SSRs (0.07%) เป็นโปรตีนสมมุติฐาน และส่วนที่เหลือ 1,349 EST-SSRs (95%) เป็น EST-SSRs ที่ไม่พบความคล้ายคลึงกับข้อมูลในฐานข้อมูล

ในขณะที่เมื่อทำการวิเคราะห์หน้าที่คาดหมายลำดับเบส EST-SSRs ของฐานข้อมูล PalmGenes และของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติที่ผ่านการ clustering ถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blast2Go จากจำนวน 1,570 EST-SSRs พบว่า 120 EST-SSRs เป็นยีนที่ทราบหน้าที่การทำงาน 5 EST-SSRs เป็นโปรตีนสมมุติฐาน และส่วนที่เหลือ 1,445 EST-SSRs เป็น EST-SSRs ที่ไม่พบความคล้ายคลึงกับข้อมูลในฐานข้อมูล (ภาคผนวก ก) ในการวิเคราะห์หน้าที่คาดหมายลำดับเบส EST-SSRs ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของยีน พบว่า 52 EST-SSRs เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของเซลล์ 60 EST-SSRs เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานในระดับ

โมเลกุล และ 55 EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพ และเมื่อทำการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับเบส EST-SSRs ของปาล์มน้ำมันกับพืชชนิดอื่นๆ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับข้าว (*Oryza sativa*) มากที่สุดเนื่องมาจากปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกับข้าว และข้าวเป็นพืชที่มีการศึกษาจีโนมได้ครบถ้วนแล้วและฐานข้อมูลของข้าวได้ถูกตีพิมพ์ในฐานข้อมูลสาธารณะครบถ้วนเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงมีโอกาสที่ EST-SSRs ของปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่จึงมีความคล้ายคลึงกับข้าวมากกว่าพืชชนิดอื่นๆ และพบว่าลำดับเบส EST-SSRs ของปาล์มน้ำมันยังมีความคล้ายคลึงกับพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยวแล้ว นอกจากนี้พบว่าลำดับเบส EST-SSRs ของปาล์มน้ำมันยังมีความคล้ายคลึงกับพืชใบเลี้ยงคู่รองลงมา คือ องุ่น (*Vitis vinifera*) และอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*) เนื่องจากองุ่นและอะราบิโดปซิสเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่ถูกทำการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์และมีข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสไว้อย่างครบถ้วน นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับเบส EST-SSRs ของปาล์มน้ำมันยังมีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แต่มีปริมาณที่ไม่มาก และเมื่อทำการวิเคราะห์ความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบพบว่า พบว่า ความยาวของนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 250 นิวคลีโอไทด์

3. การออกแบบไพรเมอร์และวิเคราะห์เครื่องหมาย EST-SSRs ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

จาก EST-SSRs ทั้งหมด 1,570 ลำดับเบส ได้ทำการคัดเลือก EST-SSRs เพื่อออกแบบไพรเมอร์โดยโปรแกรม Primer3 โดยใช้เกณฑ์การพิจารณาจากการปรากฏของจำนวนซ้ำเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเครื่องหมาย SSR ที่มีจำนวนซ้ำมาก มีโอกาสเกิดพอลิมอร์ฟิซึมสูง ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกชุดซ้ำ ดังนี้คือ mono- , di- , tri- , tetra- , penta- และ hexa nucleotide ให้มีจำนวนซ้ำ 16, 7, 6, 5, 4 และ 4 ตามลำดับ พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 326 คู่ไพรเมอร์ แต่จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในฐานข้อมูลสาธารณะ PalmGenes ได้กำหนดชุดซ้ำของ mono- , di- , tri- , tetra- , penta- และ hexa nucleotide ให้มีจำนวนซ้ำ 10, 5, 5, 3, 3 และ 3 ตามลำดับ สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 48 คู่ไพรเมอร์ รวมมีไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบทั้งหมด 374 คู่ไพรเมอร์ พบว่า 81 EST-SSRs เป็นยีนที่ทราบหน้าที่การทำงาน 4 EST-SSRs เป็นโปรตีนสมมุติฐาน และส่วนที่เหลือ 289 EST-SSRs เป็น EST-SSRs ที่ไม่พบความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล (ภาคผนวก ก) ในการวิเคราะห์หน้าที่คาดหมายลำดับเบส EST-SSRs ที่มีความใกล้เคียงกับลำดับเบสของยีน พบว่า 40 EST-SSRs เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของเซลล์ 47 EST-SSRs เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานในระดับโมเลกุล และ 42 EST-SSRs ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพ

เมื่อทำการจัดกลุ่มของไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ทั้งหมด 374 คู่ไพรเมอร์ (ภาคผนวก ก) โดยดูการปรากฏของลำดับเบสซ้ำ พบว่า รูปแบบการปรากฏลำดับเบสซ้ำแบบ Perfect มากที่สุดคือ 342 ซ้ำ คิดเป็น 91.94% (ตาราง 4.3) ในจำนวนนี้พบว่าเป็นการปรากฏลำดับเบสซ้ำชนิด Di-repeat สูงที่สุดคือ 143 ซ้ำ รองลงมาเป็นชนิด Tri-repeat มีจำนวนซ้ำ 86 ซ้ำ และ Mono-repeat มีจำนวนซ้ำ 65 ซ้ำ ตามลำดับ ส่วนรูปแบบการปรากฏลำดับเบสซ้ำที่พบรองลงมาเป็นอันดับสองคือ รูปแบบการปรากฏลำดับเบสซ้ำแบบ Compound จำนวน 21 ซ้ำ คิดเป็น 5.65% โดยรูปแบบการปรากฏลำดับเบสซ้ำแบบ Compound พบว่าการลำดับเบสซ้ำชนิด Mono-repeat และ Di-repeat มีจำนวนใกล้เคียงกัน คือ 8 และ 7 ซ้ำตามลำดับ ในขณะที่การปรากฏลำดับเบสซ้ำแบบ Imperfect มีจำนวนน้อยที่สุดคือ 9 ซ้ำ พบว่าการลำดับเบสซ้ำชนิด Mono-repeat พบว่าที่มากที่สุดคือ 5 ซ้ำ

ตารางที่ 4.3

เครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 374 คู่ไพรเมอร์จำแนกตามรูปแบบการปรากฏลำดับเบสซ้ำ

Repeat Class	Perfect	Imperfect	Compound	Total
Mono-repeat	67	5	7	79
Di-repeat	143	2	8	153
Tri-repeat	86	1	3	90
Tetra-repeat	32	1	1	34
Penta-repeat	5	0	1	6
Hexa-repeat	11	0	1	12
Total	344	9	21	374
%	91.94	2.42	5.65	100

จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อปรับสภาพที่เหมาะสมโดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 374 เครื่องหมาย พบว่า ในปาล์มน้ำมัน *E. guineensis* สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้สำเร็จ 302 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็นร้อยละ 80.75 ปาล์มน้ำมัน *E. oleifera* สามารถทำปฏิกิริยาสำเร็จ 254 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็นร้อยละ 67.91 และในมะพร้าว (*Cocos nucifera*) สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้สำเร็จ 195 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็นร้อยละ 52.14 และจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 302 คู่ไพรเมอร์ใน *E. guineensis* พบว่ามีบางคู่ไพรเมอร์ที่ให้ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่เกินค่าที่คาดหวังไว้เพราะเกิดจากการแทรกของอินตรอนทั้งหมด 97 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 32.12% และมีไพรเมอร์ 26 คู่ไพรเมอร์ที่เป็น duplicate marker คือไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากกว่าหนึ่งตำแหน่งในจีโนม ภาพที่ 4.1

4. การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมาย EST-SSRs ในปาล์ม *E. guineensis*

จากคู่ไพรเมอร์ 374 คู่ไพรเมอร์พบว่ามี 302 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้สำเร็จ มี 248 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 82.12% ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างพืชตัวอย่าง (ภาพที่ 4.2) และไม่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม 54 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 17.88% ในปาล์ม *E. guineensis* ผลการวิเคราะห์จำนวนแอลลีลต่อเครื่องหมาย EST-SSR ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมพบว่ามีจำนวนแอลลีล 751 แอลลีล โดยจำนวนแอลลีลที่พบจะอยู่ในช่วง 2-5 แอลลีล และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.68 แอลลีลต่อหนึ่งคู่ไพรเมอร์ (ภาพผนวก ข) มีเครื่องหมาย 5 คู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแอลลีลที่สุด คือ 5 แอลลีลต่อไพรเมอร์ คือเครื่องหมาย PESTM98, PESTM478, PESTM506, PESTM610 และ PESTM678

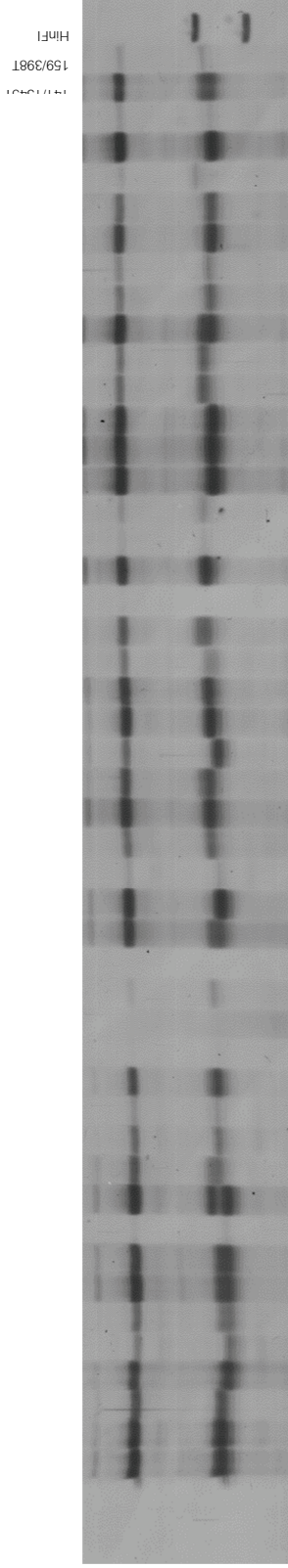
เมื่อคำนวณค่า Heterozygosity และค่า GeneDiversity พบว่า ค่า Heterozygosity และ ค่า GeneDiversity มีค่าเฉลี่ย 0.38 และ 0.4 ตามลำดับ ดังภาคผนวก ข

จำนวนซ้ำของลำดับเบสซ้ำมีความสำคัญต่อการแสดงความแตกต่างของจีโนมไทป์ ถ้าจำนวนซ้ำมากขึ้นเครื่องหมาย SSR จะสามารถแสดงความแตกต่างระหว่างจีโนมไทป์ได้มากยิ่งขึ้น (Powell, 1996) ซึ่งสามารถพิจารณาได้จากค่า PIC และค่า D จากการวิเคราะห์ค่า PIC และ D ด้วยเครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 248 คู่ไพรเมอร์ พบว่า สร้างแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 280 เครื่องหมาย โดยเป็น duplication จำนวน 26 เครื่องหมาย เมื่อนำแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ค่า PIC โดยแบ่งข้อมูลเป็น 7 ช่วงดังนี้ 0-0.09, 0.1-0.19, 0.2-0.29, 0.3-0.39, 0.4-0.49, 0.5-0.59 และ 0.6-0.69 พบว่าค่า PIC ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.035-0.69 มีค่าเฉลี่ย 0.34 ดังภาพ 4.3 และมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 0.69 ซึ่งผลของการวิเคราะห์ค่า PIC ของเครื่องหมายทั้งหมดแสดงในตารางภาคผนวก ข และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า PIC ที่ได้จากเหมืองข้อมูล PalmGenes และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.33 และ 0.34 ตามลำดับ

ในขณะที่เมื่อนำแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ค่า D ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมาย EST-SSR ในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชตัวอย่างที่ศึกษา พบว่าเมื่อแบ่งข้อมูลเป็น 9 ช่วงดังนี้ 0-0.09, 0.1-0.19, 0.2-0.29, 0.3-0.39, 0.4-0.49, 0.5-0.59, 0.6-0.69, 0.7-0.79 และ 0.8-0.89 พบว่าค่า D ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.035-0.83 มีค่าเฉลี่ย 0.48 ดังภาพ 4.4 และมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 0.83 ซึ่งผลของการวิเคราะห์ค่า D ทั้งหมดแสดงในตารางภาคผนวก ข และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า D ที่ได้จากเหมืองข้อมูล PalmGenes และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.44 และ 0.48 ตามลำดับ

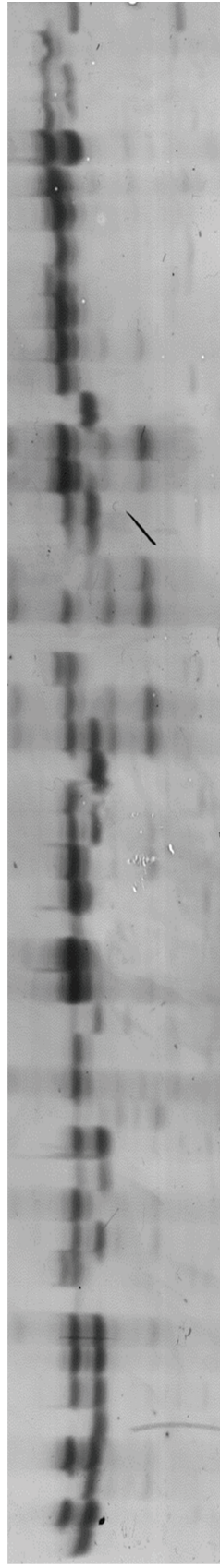
ภาพที่ 4.1

ตัวอย่างคู่ไพรเมอร์ PESTM 642 ที่หนึ่งคู่ไพรเมอร์เกิดผลผลิตพีซีอาร์ได้ 2 ตำแหน่ง



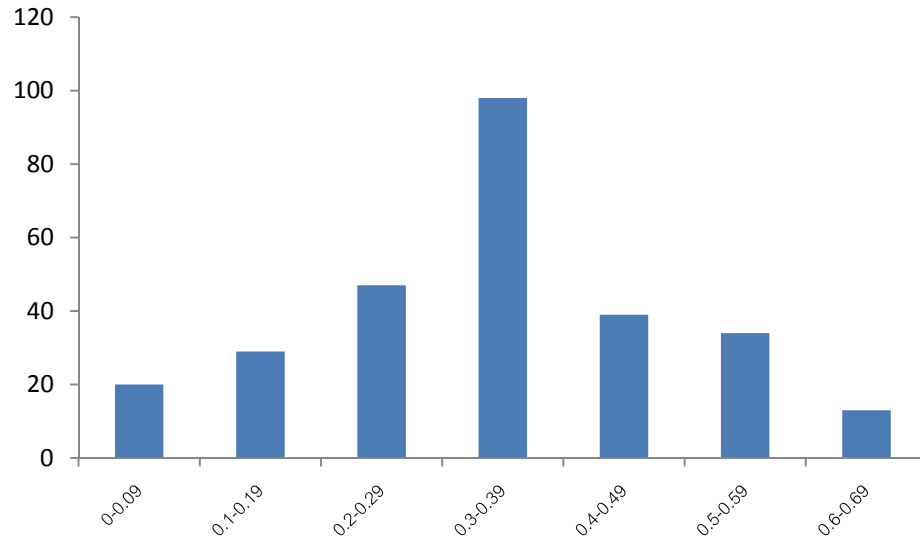
ภาพที่ 4.2

ตัวอย่างคู่ไพรเมอร์ PESTM679 ที่แสดงเฟลิมอพิซึมในพีซีอาร์อย่าง



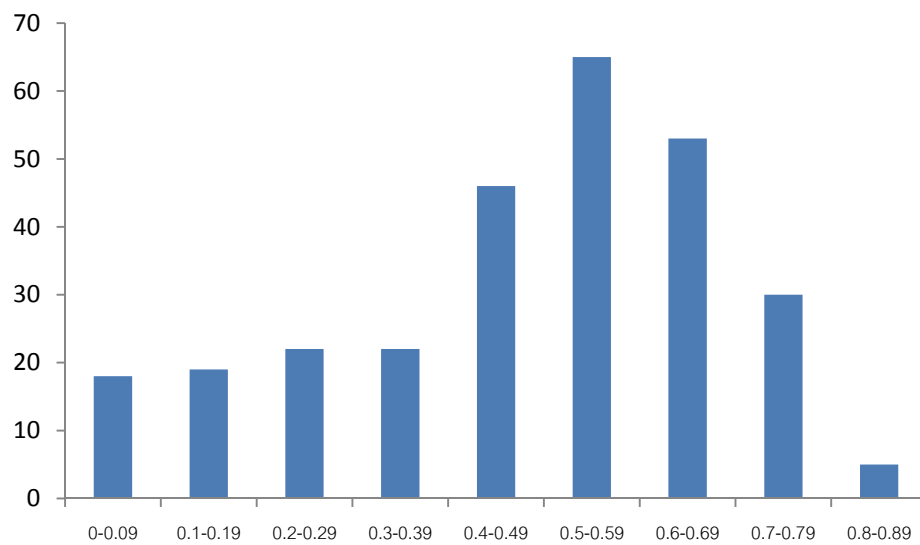
ภาพที่ 4.3

ผลการวิเคราะห์ค่า Polymorphism Information Content ที่วิเคราะห์จากแถบเครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 280 เครื่องหมาย



ภาพที่ 4.4

ผลการวิเคราะห์ค่า Discrimination Power ที่วิเคราะห์จากแถบเครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 280 เครื่องหมาย



5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมาย gSSRs และเครื่องหมาย EST-SSRs

นำเครื่องหมาย gSSRs จำนวน 33 เครื่องหมายจากการออกแบบจากงานวิจัยของ Billotte *et al.*, (2005, pp.754-765) เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเครื่องหมาย EST-SSR พบว่า มีเครื่องหมาย gSSR 96.97% (32 คู่ไพรเมอร์) ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) 57 ตัวอย่าง และสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ได้ใน *Elaeis oleifera* และมะพร้าว คิดเป็น 84.85 (28 คู่ไพรเมอร์) และ 57.57 (19 คู่ไพรเมอร์) % ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบค่า PIC พบว่าค่า PIC ของเครื่องหมาย gSSR มีค่าอยู่ระหว่าง 0.11-0.78 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.78 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.52 ในขณะที่ค่า PIC ของเครื่องหมาย EST-SSR มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.34 ซึ่งพบว่าค่า PIC ของเครื่องหมาย gSSR มีค่าที่สูงกว่า ในขณะที่ค่า D ของเครื่องหมาย gSSR มีค่าอยู่ในช่วง 0.17-0.92 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.92 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.73 ซึ่งสูงกว่าค่าเฉลี่ยของเครื่องหมาย EST-SSR ที่มีค่า 0.48

6. การวิเคราะห์ความหลากหลายของปาล์มน้ำมันโดยเครื่องหมาย EST-SSR

จากการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการใช้ข้อมูลการให้คะแนนของแถบดีเอ็นเอแบบ co-dominant เพื่อหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic similarity) และนำไปสร้าง dendrogram โดยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc ver 2.02 โดยใช้พืชตัวอย่างที่ประกอบด้วย *Elaeis guineensis* จำนวน 57 ตัวอย่าง *Elaeis oleifera* จำนวน 4 ตัวอย่างและมะพร้าว (*Cocos nucifera*) จำนวนหนึ่งตัวอย่าง พบว่า Similarity Coefficient ที่เท่ากับ 0.684 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างมะพร้าวและ *Elaeis oleifera* ออกจาก *Elaeis guineensis* ได้ ในขณะที่ Similarity Coefficient เท่ากับ 0.748 สามารถแยกกลุ่มประชากรได้ 2 กลุ่มคือ พืชตัวอย่างที่ได้มาจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี และจากบริษัทโกลเด้นเทนเอร่า ดังภาพที่ 4.5

การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) จำนวน 57 ตัวอย่าง โดยการใช้โปรแกรม STRUCTURE พบว่าพืชที่นำมาทดสอบสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ พืชตัวอย่างที่ได้มาจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี และจากบริษัทโกลเด้นเทนเอร่า ดังภาพที่ 4.6 โดยสีแดงเป็นพันธุ์ที่มีแหล่งพันธุกรรมจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี และสีเขียวเป็นพันธุ์ที่มีแหล่งพันธุกรรมจากบริษัทโกลเด้นเทนเอร่า

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc ver 2.02 และการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม STRUCTURE ให้ผลที่สอดคล้องกันคือ แบ่งกลุ่มพืชตัวอย่างได้ 2 กลุ่มคือ พืชตัวอย่างจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี และจากบริษัท

ไกลเด็นเทเนอว่า จากการวิเคราะห์การแบ่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์แบบ Analysis of Molecular Variance (AMOVA) ตารางที่ 4.4 ของปาล์มน้ำมันพบว่า ค่าความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากร 2 กลุ่มประชากร (population/region) และภายในกลุ่มประชากร มีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 18.18% และ 81.82% ตามลำดับ และพบว่า F_{ST} ที่คำนวณได้มีค่า 0.18 แสดงถึงพันธุปาล์มจากแต่ละแหล่งพันธุกรรมมีการผสมภายในแหล่งพันธุกรรมเดียวกัน มีการปะปนของเชื้อพันธุกรรมจากแต่ละแหล่งน้อย ทำให้เกิดโครงสร้างของประชากรย่อย และพบว่าค่า F_{ST} ในบริษัทไกลเด็นเทเนอว่า (0.19) มีค่าที่สูงกว่าค่า F_{ST} ในศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี (0.18) นั้นแสดงว่าในบริษัทไกลเด็นเทเนอว่านั้นปาล์มน้ำมันมีการผสมภายในประชากรกลุ่มมากกว่าในศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี แสดงถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมส่วนใหญ่เกิดจากความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากร (Individuals/Population) และเมื่อทำการวิเคราะห์ค่า Heterozygosity พบว่าค่าเฉลี่ย Heterozygosity ของบริษัทไกลเด็นเทเนอว่า (0.307) มีค่าที่ต่ำกว่าของศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี (0.335) นั้นแสดงว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมส่วนใหญ่เกิดจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี ดังตารางที่ 4.4

ตาราง 4.4

แสดงการวิเคราะห์การแบ่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้ AMOVA ในปาล์มน้ำมัน

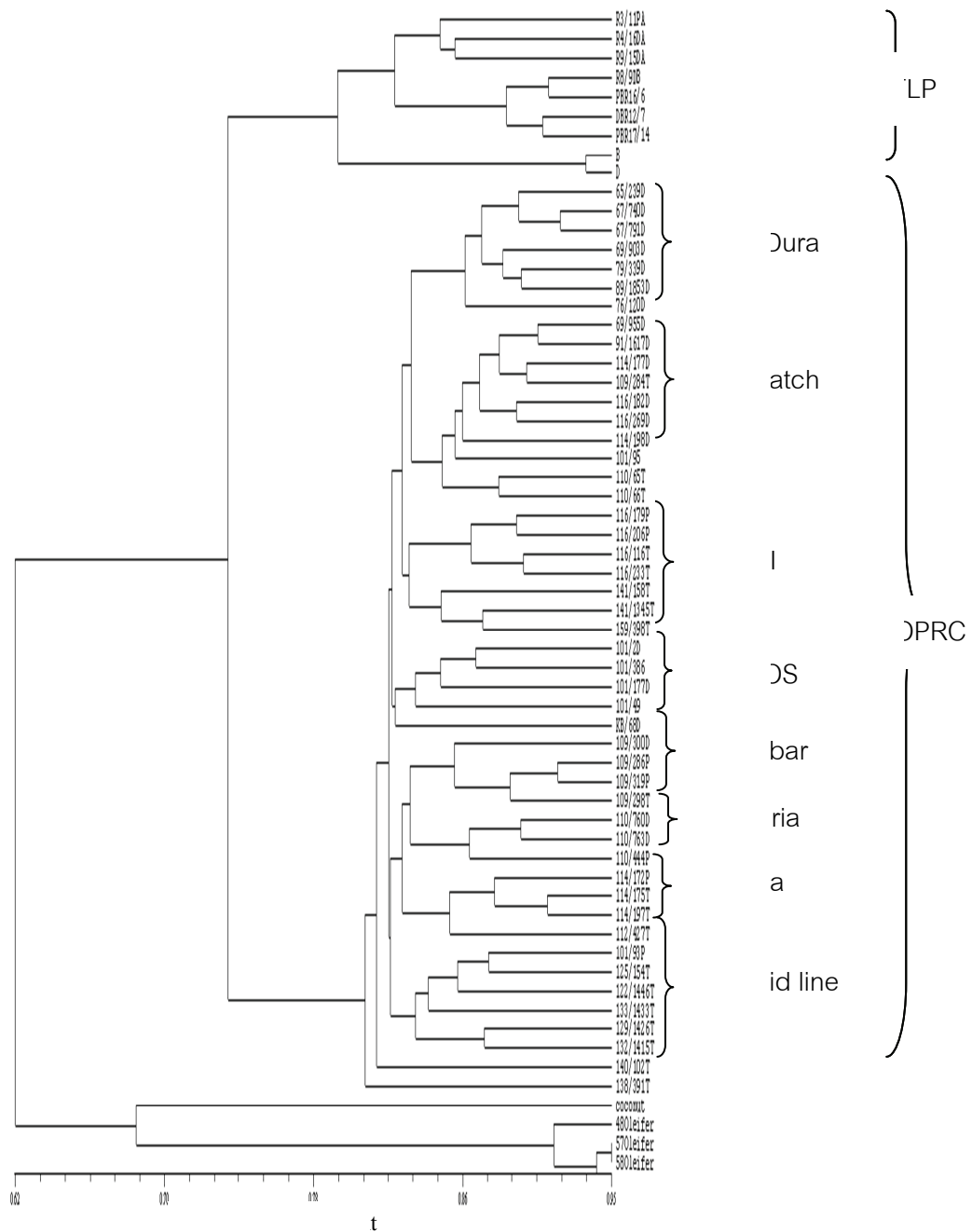
Elaeis guineensis จำนวน 57 สายพันธุ์

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	1	568.977	16.34220 Va	18.18
Within populations	112	8237.663	73.55056 Vb	81.82
Total	113	8806.64	89.89276	

Fixation Index F_{ST} : 0.18180

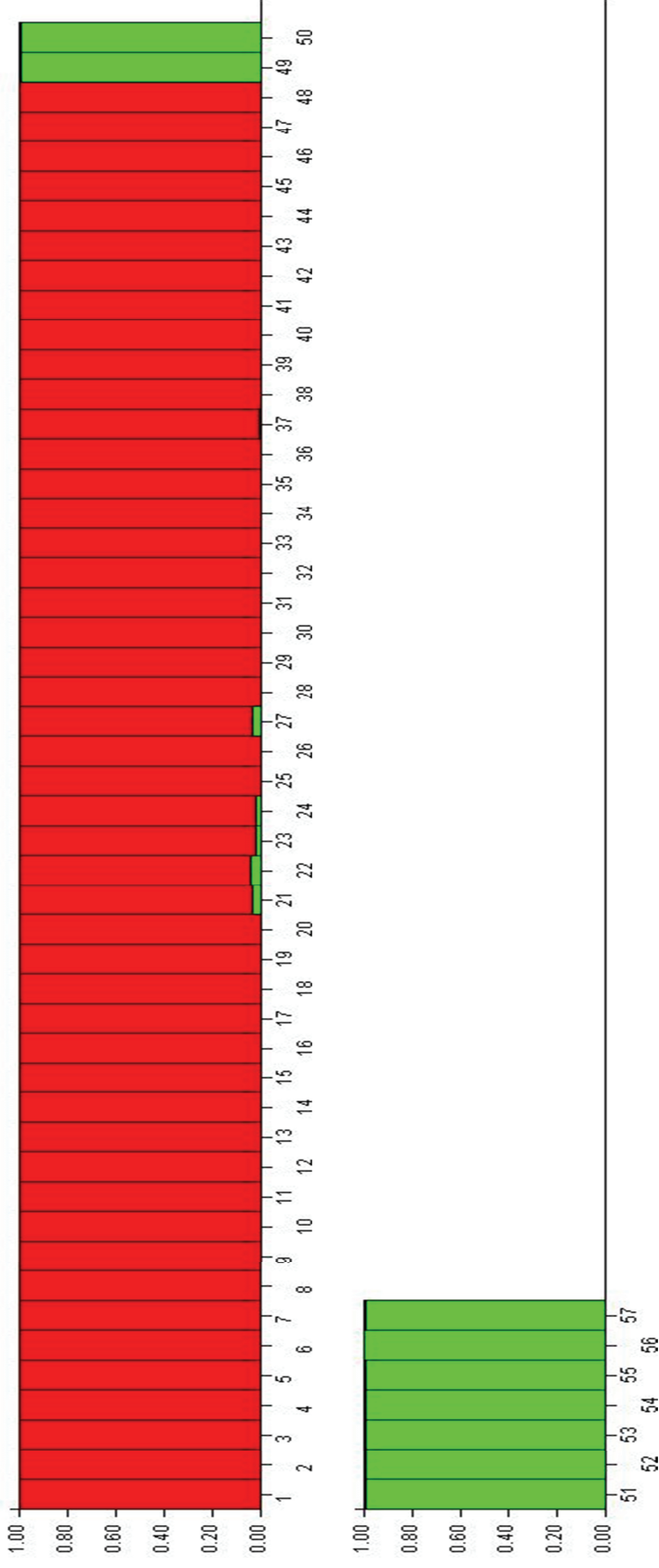
ภาพที่ 4.5

แสดง dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc ver 2.02 โดยใช้ *Elaeis guineensis* จำนวน 57 ตัวอย่าง ที่ประกอบด้วยตัวอย่างของบริษัทโกลดันเทเนอร์่า (GTLP) จำนวน 9 ตัวอย่าง และ ปาล์มจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี (SOPRC) จำนวน 48 ตัวอย่าง *Elaeis oleifera* จำนวน 4 ตัวอย่างและมะพร้าว (*Cocos nucifera*) จำนวนหนึ่งตัวอย่าง



ภาพที่ 4.6

โครงสร้างพันธกรรมของกลุ่มตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่มาจากบริษัทใกล้เคียงท่าและตัวอย่างที่มาจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี

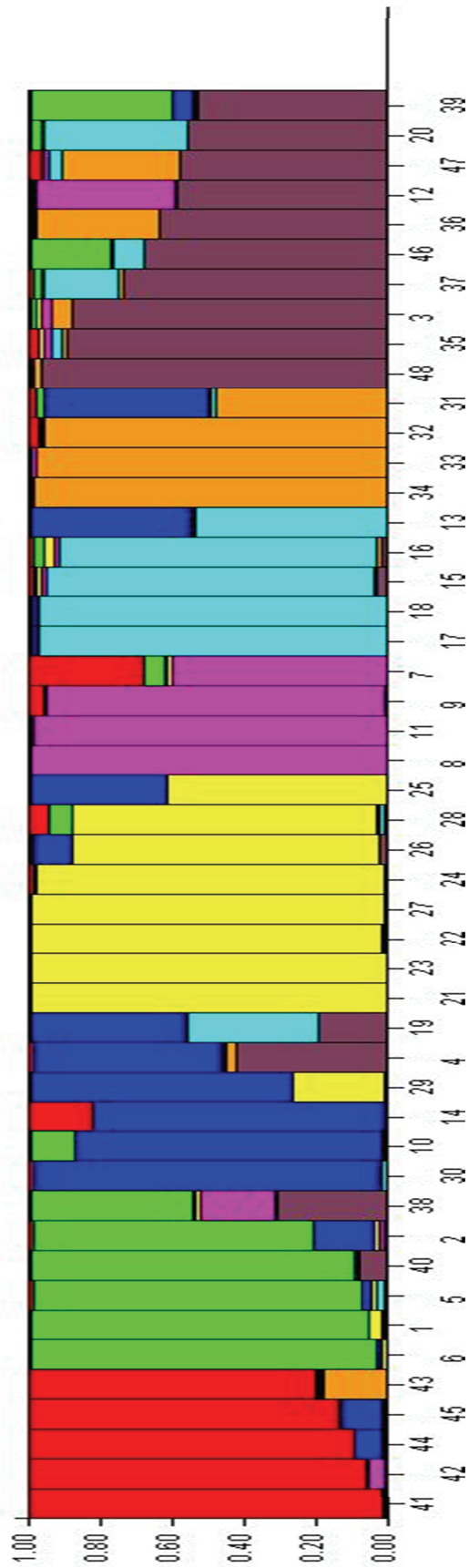


หมายเลขได้กราฟแท่ง เป็นหมายเลขตัวอย่างที่ 3.1

หมายเหตุ

ภาพที่ 4.7

แสดงความเป็นไปได้ของโครงสร้างพัฒนาของป่าสนน้ำม่นำมาจากศูนย์วิจัยป่าสนสุราษฎร์ธานีที่แบ่งตามสมมติฐาน K = 8



หมายเหตุ หมายเลขได้กราฟแท่ง เป็นหมายเลขชื่อพันธุ์ตามตารางที่ 3.1

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรมปาล์มน้ำมันที่มาจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี จำนวน 48 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 8 กลุ่มย่อย (ภาพที่ 4.7) ส่วนใหญ่สอดคล้องกับแหล่งพันธุกรรมปาล์ม โดยพบว่าในแต่ละกลุ่มประชากรมีพันธุกรรมผสมจากแหล่งอื่นด้วย เนื่องจากปาล์มน้ำมันที่ได้รับมาจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานี เป็นปาล์มน้ำมันที่รวบรวมจากแหล่งหลายแหล่งในต่างประเทศ ดังนั้นจึงพบว่าพันธุกรรมส่วนใหญ่ของปาล์มน้ำมันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในแหล่งที่มาสูง เมื่อกำหนดค่า $Q \geq 0.7$ จะพบว่า สีแดง มีเชื้อพันธุกรรมที่มาจาก Nigeria มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.86 สีเขียว มีเชื้อพันธุกรรมที่มาจาก AVROS มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.83 สีน้ำเงิน มีเชื้อพันธุกรรมที่มาจากหลากหลายแหล่งพันธุกรรมมีค่า similarity coefficient ภายในกลุ่มเท่ากับ 0.88 สีเหลือง มีเชื้อพันธุกรรมที่มาจาก Deli Dura โดยมีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.86 สีชมพู มีเชื้อพันธุกรรมที่มาจาก Calabar มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.86 สีฟ้า มีเชื้อพันธุกรรมที่มาจากบริษัท DAMI มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.86 สีส้ม มีเชื้อพันธุกรรมที่มาจาก Ghana มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.86 และสีม่วงเป็นพันธุกรรมของลูกผสม (hybrid line) โดยมีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.84 โดยมีบางพันธุ์ที่มีเชื้อพันธุกรรมที่ไม่ตรงกับแหล่งพันธุกรรมเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Structure คือ ตัวอย่างที่ 38 มีเชื้อพันธุกรรมจาก AVROS, Calabar และจากลูกผสม แต่ระบุแหล่งพันธุกรรมมาจาก Kazemba ตัวอย่างที่ 30 มีแหล่งพันธุกรรมจาก Ghana แต่ไม่พบเชื้อพันธุกรรมของ Ghana (สีส้ม) แต่เมื่อวิเคราะห์จาก dendrogram พบว่ามีความใกล้เคียงกับ Deli dura ตัวอย่างที่ 10 ระบุแหล่งพันธุกรรมมาจาก Calabar แต่ไม่พบเชื้อพันธุกรรมของ Calabar (สีชมพู) แต่เมื่อวิเคราะห์จาก dendrogram พบว่ามีความใกล้เคียงกับ Deli dura ตัวอย่างที่ 14 ระบุแหล่งพันธุกรรมจาก DAMI แต่ไม่พบเชื้อพันธุกรรมของ DAMI (สีฟ้า) แต่เมื่อวิเคราะห์จาก dendrogram พบว่าตัวอย่างที่ 14 อยู่ในกลุ่ม Unmatch แต่มีความใกล้เคียงกับปาล์มน้ำมันที่มาจาก DAMI ตัวอย่างที่ 29 ระบุแหล่งพันธุกรรมจาก Deli Dura ซึ่งส่วนใหญ่มีเชื้อพันธุกรรม Unmatch (สีน้ำเงิน) แต่อย่างไรก็ตามก็พบว่ามีเชื้อพันธุกรรมที่ยังสอดคล้องกับแหล่งพันธุกรรมของ Deli Dura (สีเหลือง) และเมื่อวิเคราะห์จาก dendrogram ก็พบว่าตัวอย่างมีความใกล้เคียงกับ Deli dura และตัวอย่างที่ 3 และ 4 ระบุแหล่งพันธุกรรมจาก AVROS แต่ไม่พบเชื้อพันธุกรรมของ AVROS (สีเขียว) แต่เมื่อวิเคราะห์จาก dendrogram พบว่ามีความใกล้เคียงกับ DAMI และจากการวิเคราะห์พบว่า ภายในแหล่งพันธุกรรมที่ระบุว่ามีเชื้อพันธุกรรมเดียวกัน อาจพบเชื้อพันธุกรรมจากแหล่งพันธุกรรมอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามในแต่ละแหล่งพันธุกรรมก็มีเชื้อพันธุกรรมในแต่ละแหล่งนั้นมากกว่า 70% และยังมีปาล์มน้ำมันบาง

พันธุ์ที่มีพันธุกรรมที่มีความบริสุทธิ์มาก คือมีค่า $Q \geq 90\%$ คือ ตัวอย่างที่ 41 และ 42, 44 ที่มาจากแหล่งพันธุกรรม Nigeria ตัวอย่างที่ 1, 5, 6 และ 40 มีพันธุกรรมของ AVROS ตัวอย่างที่ 21, 22, 23, 24 และ 27 มาจากแหล่งพันธุกรรม Deli Dura ตัวอย่างที่ 8, 9 และ 11 มาจากแหล่งพันธุกรรม Calabar ตัวอย่างที่ 15, 17 และ 18 มาจากแหล่งพันธุกรรม DAMI และตัวอย่างที่ 32, 33 และ 34 มาจากแหล่งพันธุกรรม Ghana

เมื่อแบ่งกลุ่มประชากรของปาล์มน้ำมัน 48 ตัวอย่างที่ได้จากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานีตามโครงสร้างประชากร วิเคราะห์ค่า F_{ST} เปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มประชากรเพื่อดูความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปาล์ม เมื่อนำค่า F_{ST} ที่เปรียบเทียบในแต่ละแหล่งพันธุ์ของปาล์มน้ำมันไปสร้าง dendrogram พบว่าปาล์มน้ำมันสามารถจัดออกได้เป็น 4 กลุ่มหลัก คือ ปาล์มน้ำมันที่มาจากออฟริกา, Hybrid line, Unmatch (ปาล์มน้ำมันที่ระบุแหล่งพันธุกรรมไม่สอดคล้องกับโครงสร้างประชากรที่คำนวณจากโปรแกรม STRUCTURE) และ Ghana เมื่อวิเคราะห์ปาล์มน้ำมันในกลุ่มของออฟริกา พบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย Nigeria, Deli dura และ Calabar เป็นปาล์มน้ำมันที่มาจากออฟริกาตะวันตก กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย AVORS และ DAMI เป็นปาล์มน้ำมันที่มาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีค่า F_{ST} ที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มเท่ากับ 0.102 เมื่อวิเคราะห์พันธุกรรมปาล์มน้ำมันที่มาจากออฟริกาตะวันตก พบว่า ปาล์มน้ำมันที่มาจากแหล่ง Nigeria มีความแตกต่าง ($P = 0.01$) จากปาล์มที่มาจากแหล่ง Deli dura และ Calabar ที่ F_{ST} เท่ากับ 0.116 โดยปาล์มน้ำมันจาก Nigeria และ Deli dura มี ปาล์มน้ำมันที่มาจากแหล่ง Deli dura มีค่า F_{ST} ที่แตกต่างจาก Calabar เท่ากับ 0.136 ($P = 0.01$) เมื่อวิเคราะห์ปาล์มน้ำมันที่มาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่า AVORS มีค่า F_{ST} ที่แตกต่างจาก DAMI เท่ากับ 0.111 ($P = 0.01$) เมื่อวิเคราะห์ค่า F_{ST} ที่แตกต่างกันระหว่างปาล์มน้ำมันในกลุ่มต่างๆ พบว่าปาล์มน้ำมันที่มาจากออฟริกากับ Hybrid line พบว่าอยู่คนละกลุ่มกัน โดยมีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.070 ปาล์มน้ำมันที่มาจากกลุ่มออฟริกาและ Hybrid line กับกลุ่ม Unmatch มีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.064 และปาล์มน้ำมันที่มาจากออฟริกา, Hybrid line และ Unmatch กับ Ghana มีค่า F_{ST} เท่ากับ 0.05 (ตาราง 4.5 และภาพที่ 4.8)

ตาราง 4.5

การเปรียบเทียบค่า F_{ST} ในแต่ละแหล่งที่มาของปาล์มน้ำมันโดยแบ่งกลุ่มตามโครงสร้างประชากร

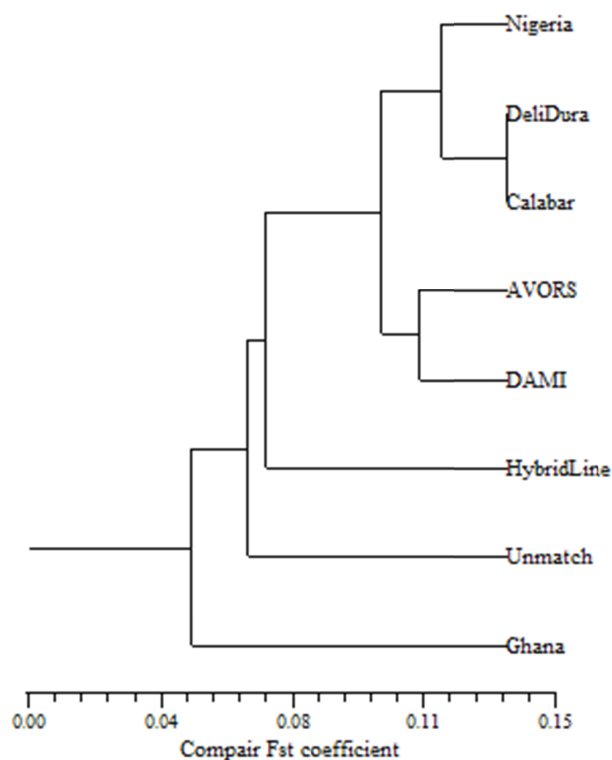
	Nigeria	AVORS	Unmatch	Deli_dura	Calabar	DAMI	Ghana	Hybrid_line
Nigeria	0							
AVORS	0.10652*	0						
Unmatch	0.03444	0.05437	0					
Deli_dura	0.11712**	0.12279**	0.04852	0				
Calabar	0.1183	0.07608	0.08714	0.13605**	0			
DAMI	0.09449	0.11098**	0.0817**	0.10236**	0.0991*	0		
Ghana	0.0763*	0.08128	0.05988	0.07882	0.02014	0.05065*	0	
Hybrid_line	0.09326**	0.09363**	0.06674**	0.09404**	0.01476*	0.0398**	-0.04366	0

* Significant 0.05

** Significant 0.001

ภาพที่ 4.8

แสดง dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc ver 2.02 โดยใช้ *Elaeis guineensis* จำนวน 48 ตัวอย่าง โดยแบ่งกลุ่มตามโครงสร้างประชากร



7. การวิเคราะห์แนวโน้มการกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากรลูกผสมสำหรับสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุล

ในการศึกษาแนวโน้มการกระจายตัวของเครื่องหมาย EST-SSRs ในลูกผสมประชากร F_1 ที่เกิดจากการผสมระหว่าง clone B และ clone D โดยการคัดเลือกแบบสุ่มจำนวน 10 ต้น พบว่า เครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 68 เครื่องหมายจากทั้งหมด 302 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 22.52% ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมระหว่าง clone B, clone D และลูกผสม F_1 จำนวน 10 ต้น ซึ่งเครื่องหมาย EST-SSRs ที่ใช้ในการศึกษาการกระจายตัวของยีนสอดคล้องกับการกระจายตัวของเมนเดล (Chi-square, $P < 0.05$) ทั้งหมด 65 เครื่องหมาย มีเครื่องหมายที่กระจายตัวตาม clone B ที่มีอัตราส่วน 1:1 จีโนไทป์แบบ $ao \times oo$ จำนวน 1 เครื่องหมาย (1.52%) และจีโนไทป์แบบ $ab \times aa$ จำนวน 15 เครื่องหมาย (22.73%) เครื่องหมายโมเลกุลที่กระจายตัวตาม clone D ที่มีอัตราส่วน 1:1 จีโนไทป์แบบ $aa \times ab$ จำนวน 15 เครื่องหมาย (22.73%) และเครื่องหมายโมเลกุลที่พ่อแม่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสทั้งคู่ มีอัตราส่วน 3:1 จีโนไทป์แบบ $ao \times ao$ จำนวน 1 เครื่องหมาย (1.52%) อัตราส่วน 1:2:1 จีโนไทป์แบบ $ab \times ab$ จำนวน 30 เครื่องหมาย (45.45%) และอัตราส่วน 1:1:1:1 (fully informative) จีโนไทป์แบบ $ab \times ac$ จำนวน 4 เครื่องหมาย (6.06%) (ภาคผนวก ก) และจากการทำแผนที่พันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในประชากรลูกผสมระหว่าง clone B และ clone D โดยการใช้เครื่องหมาย gSSR จำนวน 256 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามี 161 เครื่องหมายที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมในประชากรลูกผสม คิดเป็น 62.89% ตามงานวิจัยของวิภาวี ชัยโรจน์ (2553)

8. การวิเคราะห์ linkage disequilibrium

นำเครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 19 คู่ไพรเมอร์และเครื่องหมาย gSSRs จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ ที่นำไปสร้างแผนที่พันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในประชากรลูกผสมระหว่าง clone B และ clone D จากงานวิจัยของกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ (ยังไม่มีตีพิมพ์) (ภาคผนวก ง) พบว่า เมื่อนำเครื่องหมายทั้ง 29 คู่ไพรเมอร์ มาทดสอบสมมติฐานทางพันธุกรรม H-W equilibrium ในแต่ละตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ exact test พบว่าในประชากรรวม 57 ตัวอย่าง มีเครื่องหมาย 10 คู่ไพรเมอร์ที่มีค่าความถี่จีโนไทป์เป็นไปตามสมมติฐานทางพันธุกรรมของ Hardy-Weinberg อย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการปรับค่าโดย Bonferroni correction พบว่าในเครื่องหมายจำนวน 29 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ในประชากรรวมมีเครื่องหมายจำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ที่มีสมมติฐานทางพันธุกรรมของ Hardy-Weinberg ดังนั้นจึงนำเครื่องหมาย 16 คู่ไพรเมอร์ที่มีสมมติฐานทางพันธุกรรมเป็นไปตาม H-W frequencies มาทำการทดสอบสมมติฐานการลดลงของ heterozygote พบว่าปฏิเสธสมมติฐานของ heterozygote ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

พบว่ามีความ heterozygote ลดลง (หรือมีความ F_{ST} ที่สูง) มี 3 คู่โพรเมอร์ (PESTM515, mEgCIR3785 และ mEgCIR0802) ทั้งนี้อาจเนื่องจากปาล์มน้ำมันมีการผสมกันภายในแหล่งพันธุ์ที่นำมาทดสอบ จึงทำให้มีความ homozygote สูงขึ้นและมีความ heterozygote ลดลง ซึ่งทำให้เกิดเป็นกลุ่มของประชากรย่อย จากนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ปรับค่าด้วย Bonferroni correction พบว่ามีเพียง 1 คู่โพรเมอร์ (PESTM515) ที่มีความ heterozygote ลดลงที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ตามตารางที่ 4.6 จากนั้นวิเคราะห์ค่า r^2 เพื่อประเมิน linkage disequilibrium ระหว่างเครื่องหมายทั้ง 13 คู่โพรเมอร์ ที่ผ่านการทดสอบโดยการปรับค่า Bonferroni correction พบว่ามี 36 คู่การเปรียบเทียบที่มีความ P value น้อยกว่า 0.05 จากทั้งหมด 105 คู่การเปรียบเทียบ มี 2 คู่โพรเมอร์ที่อยู่ใน linkage group ที่ 1 (PESTM470 และ PESTM629) มีระยะห่างเท่ากับ 0.412 cM และมี 2 คู่โพรเมอร์ที่อยู่ใน linkage group ที่ 9 (PESTM475 และ PESTM464) มีระยะห่างเท่ากับ 80.707 cM (ภาคผนวก ง) มีความ linkage disequilibrium ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 บางคู่โพรเมอร์มี linkage group ที่อยู่คนละ linkage กัน โดยมีความ linkage disequilibrium ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 แต่เมื่อทำการปรับค่า Bonferroni correction ไม่มีคู่โพรเมอร์ใดที่มีความ linkage disequilibrium กัน

ตารางที่ 4.6

การวิเคราะห์สมดุลทางพันธุกรรม ของ H-W equilibrium ในแต่ละเครื่องหมายโดยการวิเคราะห์แบบ exact test โดยประเมินค่า P-value ค่า Fixation index (F_{ST}) ในตัวอย่างพันธุ์ปาล์มจำนวน 57 ตัวอย่างที่ประกอบด้วยพันธุ์ปาล์มจากบริษัทโกลเด้นเทนเนอร์จำนวน 9 ตัวอย่างและพันธุ์ปาล์มจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎร์ธานีจำนวน 48 ตัวอย่าง

Name	Marker	P-value	F_{ST}	Linkage group
2BGSSR3737	mEgCIR3737	0.0278	0.0113	2
2DESSR0470	PESTM470	0.0317	0.0239	1
2XEISSR0629	PESTM629	0.2924	0.0032	1
2DESSR0638	PESTM638	0.5348	0.1565	1
1BEISSR0607_2	PESTM607_2	0	0.0053	1
2DESSR0515	PESTM515	0.111	0.3383	1
1XEISSR0351	PESTM351	0.2764	0.0700	4
3XEISSR0678	PESTM678	0	0.0019	4
1XEISSR0567	PESTM567	0.4397	0.1467	5
2XGSSR3785	mEgCIR3785	0	0.1994	6
2BEISSR0690	PESTM690	0.0001	0.1583	6
3XEISSR0336	PESTM336	1	0.0588	6
3XGSSR3260	mEgCIR3260	0	0.0211	7
2BEISSR0692	PESTM692	0.0727	0.0019	7
2BGSSR3300	mEgCIR3300	0.0202	0.0216	8
2XEISSR0475	PESTM475	0.0106	0.0047	9
3XEISSR0464	PESTM464	0.0072	0.0053	9
2DGSSR0380	mEgCIR0380	0.0808	0.0049	10
2XGSSR0802	mEgCIR0802	0	0.1865	10
1DESSR0500	PESTM500	0.0668	0.0840	10
2XEISSR0533	PESTM533	0	0.0201	10
3XGSSR3633	mEgCIR3633	0	0.1278	11
2XEISSR0614	PESTM614	0.2832	0.0019	11
2DGSSR3427	mEgCIR3427	0	0.0556	13
2BEISSR0604	PESTM604	0	0.0509	13
2BGSSR1713	mEgCIR1713	0.0031	0.0280	15
2XEISSR0580	PESTM580	0.0002	0.0155	15
2DESSR0607_1	PESTM607_1	0	0.0217	17
4XGSSR3569	mEgCIR3569	0.0001	0.0369	18