บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาเครื่องหมาย EST-SSR ด้วยวิธีการค้นหา SSR จากฐานข้อมูล EST นับเป็นวิธีการที่สะดวก สามารถลดขั้นตอน ระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการพัฒนาเครื่องหมาย SSR เป็นอย่างมากเมื่อเทียบกับการพัฒนาเครื่องหมาย SSR ด้วยวิธีการมาตรฐานเนื่องจากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์แบบนี้เป็นวิธีการที่ใช้ประโยชน์จากเหมืองข้อมูลสาธารณะได้โดยตรง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการรวบรวมข้อมูล EST ปาล์มน้ำมันได้รับจากฐานข้อมูลสาธารณะ PalmGenes และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จำนวน 5,610 และ 75,948 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดทำการจัดกลุ่ม (cluster) และรวบรวมข้อมูล (assemble) ได้ 47,256 กลุ่ม ประกอบด้วย singletons จำนวน 46,328 กลุ่มและ contigs จำนวน 928 กลุ่ม จากการค้นหา SSR โดยกำหนดชุดซ้ำของ mono- , di- , tri- , tetra- , penta- และ hexa nucleotide ให้มีจำนวนซ้ำ 10, 5, 5, 3, 3 และ 3 ตามลำดับ พบว่ามี EST ที่ภายในมี SSR จำนวน 1,570 EST-SSRs โดยชนิดของลำดับเบสที่พบมากที่สุด คือ Mononucleotide 68.78% (1,181) โดย motif ที่พบมากที่สุดคือ A/T คิดเป็น 67.09% (1,152) รองลงมาคือ Dinucleotide 15.08% (259) โดย motif ที่พบมากที่สุดคือ AG/CT คิดเป็น 8.74% (150)

จากการวิเคราะห์หน้าที่ พบว่า120 ลำดับเบส เป็นยีนที่ทราบหน้าที่การทำงาน 5 ลำดับเบส เป็นโปรตีนสมมุติฐาน และ 1,445 ลำดับเบสเป็นกลุ่มที่ไม่พบความคล้ายคลึงกับอะไรเลยในฐานข้อมูล เมื่อนำ EST-SSRs ที่มีจำนวนซ้ำที่สูงจำนวน 374 EST-SSRs ไปออกแบบไพรเมอร์ พบว่า 302 คู่ไพรเมอร์สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำเร็จ จากการประเมินโพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย EST-SSR ระหว่างปาล์มน้ำมัน 57 ตัวอย่าง พบว่ามี 284 คู่ไพรเมอร์ ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม และสามารถสร้างแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 2.68 แอลลีลต่อคู่ไพรเมอร์ มีค่า PIC และ D เฉลี่ยเท่ากับ 0.34 และ 0.48 ตามลำดับ ในขณะที่เครื่องหมาย EST-SSRs สามารถเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ได้ใน *E. oleifera* จำนวน 254 คู่ไพรเมอร์และ *Cocos nucifera* จำนวน 195 คู่ไพรเมอร์ เมื่อนำเครื่องหมาย EST-SSRs และ gSSR ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างปาล์มน้ำมัน 57 ตัวอย่าง จำนวน 284 และ 33 คู่ไพรเมอร์ตามลำดับ พบว่า ค่า PIC และ D ของเครื่องหมาย EST-SSR มีค่าที่ต่ำกว่าในเครื่องหมาย gSSR

เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลากของปาล์มน้ำมัน พบว่าปาล์มน้ำมัน ที่นำมาทดสอบสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ปาล์มน้ำมันที่ได้มาจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎ์ธานี และจากบริษัทโกลเด้นเทเนอร่า สอดคล้องกับการวิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน และเมื่อวิเคราะห์การแบ่งความแปรปรวนทางพันธุกรรม พบว่าพันธุ์ปาล์มจากแต่ละแหล่งพันธุกรรมมีการผสมภายในแหล่งพันธุกรรมเดียวกัน มีการปะปนของเชื้อพันธุกรรมจากแต่ละแหล่งน้อย และเมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรมปาล์มน้ำมันที่มาจากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎ์ธานี จำนวน 48 ตัวอย่าง พบว่าปาล์มน้ำมันสามารถแบ่งออกได้เป็น 8 กลุ่มย่อย โดยพันธุ์ปาล์มส่วนใหญ่สามารถแยกแหล่งพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่บางพันธุ์ไม่สามารถแยกแหล่งพันธุ์ได้ และเมื่อทำการแบ่งกลุ่มประชากรของปาล์มน้ำมัน 48 ตัวอย่างที่ได้จากศูนย์วิจัยปาล์มสุราษฎ์ธานีตามโครงสร้างประชากร แล้วทำการวิเคราะห์ค่า F_{ST} เพื่อสร้าง dendrogram พบว่าปาล์มน้ำมันสามารถจัดออกได้เป็น 4 กลุ่มหลัก คือปาล์มน้ำมันที่มาจากอัฟริกา, Hybrid line, Unmatch (ปาล์มน้ำมันที่ระบุแหล่งพันธุกรรมไม่สอดคล้องกับโครงสร้างประชากร) และ Ghana เมื่อวิเคราะห์ปาล์มน้ำมันในกลุ่มของอัฟริกา พบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย Nigeria, Deli dura และ Calabar เป็นปาล์มน้ำมันที่มาจากอัฟริกาตะวันตก กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย AVORS และ DAMI เป็นปาล์มน้ำมันที่มาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จึงมีความใกล้ชิดกันมากกว่ากลุ่มอื่นๆ Hybrid line และ Unmatch เป็นกลุ่มที่อยู่ระหว่างกลุ่มอัฟริกาและ Ghana เนื่องจากพันธุ์ปาล์มที่มีการนำเข้ามาจากแหล่งอื่นอาจผ่านกระบวนการผสมข้ามพันธุ์จากแหล่งพันธุ์นั้นมาก่อนหน้าแล้ว จึงทำให้มีเชื้อพันธุกรรมจากแหล่งอื่นมาปะปนด้วย จึงอาจทำให้กลุ่ม hybrid line และ Unmatch มีความใกล้เคียงกับกลุ่มอื่นๆ ในขณะที่ Ghana ก็เป็นปาล์มจากอัฟริกาตะวันตก แต่ไม่เข้ากลุ่มใดๆ

เมื่อวิเคราะห์แนวโน้มการกระจายตัวของเครื่องหมาย EST-SSR เพื่อดูศักยภาพในการสร้างแผนที่พันธุกรรม พบว่า 65 เครื่องหมายมีการกระจายตัวเป็นไปตามกฎของเมนเดล นอกจากนี้พบว่าพ่อแม่ clone B และ clone D มีแอลลีลที่เหมือนกันในอัตราส่วนสูง ดังนั้น clone B และ clone D จึงมีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันมาก

เมื่อทำการวิเคราะห์ Linkage disequilibrium ระหว่างคู่แอลลีลของเครื่องหมาย EST-SSRs และ gSSRs ที่สร้างแผนที่ได้ในงานวิจัยอื่น พบว่าไม่มีคู่ไพรเมอร์ใดที่มีค่า linkage disequilibrium เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ผสมข้ามต้นกัน ซึ่งส่งผลทำให้ค่า heterozygous ต่ำทำให้ช่วง LD ที่พบมีค่าที่แคบมาก ดังนั้นแนวทางในการวิเคราะห์ LD ในปาล์มน้ำมันเพื่อการ

ทำ association mapping จึงอาจต้องใช้ การวิเคราะห์ค่า LD ภายในยีน (candidate gene approach) จากเครื่องหมาย SNPs