บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

สารเคมี

1. Absolute ethanol (Merck, Germany)
2. Acetic acid (Lab Scan, Ireland)
3. Acrylamide (Vivantis, Malaysia)
4. Agarose gel (Vivantis, Malaysia)
5. Ammonium persulfate (APS) (Vivantis, Malaysia)
6. Chloroform (Lab Scan, Ireland)
7. DNA marker (100 bp) (Fermentas, USA)
8. dNTP (RBC Bioscience, Taiwan)
9. Formaldehyde (BDH and PROLABO, USA)
10. Isopropanol (Lab Scan, Ireland)
12. Liquid Nitrogen
13. Loading dye (Fermentas, USA)
14. $MgCl_2$ (RBC Bioscience, Taiwan)
15. Nitric acid (Lab Scan, Ireland)
16. Bis-acrylamide (Vivantis, Malaysia)
17. Rain-off
18. Silver nitrate (BDH and PROLABO, USA)
19. Sodium carbonate (Merck, Germany)
20. Sodium hydroxide (Merck, Germany)
21. Sodium chloride (BDH and PROLABO, USA)
22. TEMED (N,N,N',N'– tetramethylethylenediamine) (Invitrogen, USA)
23. Urea (Vivantis, Malaysia)
24. Ethidium bromide (Invitrogen, USA)
25. EDTA (Vivantis, Malaysia)

เอนไซม์

1. *Taq* DNA polymerase (RBC Bioscience, Taiwan)
2. *Eco*RI (Fermentas, USA)
3. *Mse*I (Fermentas, USA)
4. *Taq*I (Fermentas, USA)
5. T4DNA ligase (Fermentas, USA)

อุปกรณ์

1. Electrophoresis for agarose gel, My Run (CosMo BIO, Japan)
2. Electrophoresis, vertical apparatus, TVS1400 (SCIE-PLUS, England)
3. Incubator, UNB 100-500 (Memmert, Germany)
4. Thermal Cycle, My Cycler (BioRad, USA)
5. AutoPipette, 2, 10, 20, 200, 1000 µl (BioRad, USA)
6. Shaking incubator, NB 205 (N-Biotek, Korea)
7. Gel documentation (BioRad, USA)
9. Gel dryer, EC 355 (E-C Apparatus Corporation, USA)
10. Microcentrifuge tube, 1.5 ml (Molecular BioProducts, USA)
11. PCR tube, (Molecular BioProducts, USA)
12. Balances, AB204 (Mettler Toledo, Thailand)
13. Vortex mixer, VX 100 (GIBTHAI Co., LTD, Thailand)
14. Centrifugation, UNIVERSAL 320R (Hettich Zentrifugen, Germany)
15. Autoclave (Sanyo, Thailand)
16. Mini-centrifugation (GIBTHAI Co., LTD, Thailand)
17. Spectrophotometer, UVmini-1240 (Shimadzu, Japan)
18. pH meter (Toledo, Switzerland)
19. Refrigerator (Sanyo, Thailand)
20. Power supply, EC 600-90 (E-C Apparatus corporation, USA)
21. Tip, 50, 200, 1000 µl ((Molecular Bioproducts, USA)
22. Centrifuge tube, 15, 50 ml (CLP (Neptune), USA)
23. Petri dish (Pyrex, USA)

24. Laboratory Glass Bottle, 50, 250, 1000 ml (Duran, USA)

25. Microwave oven (Sharp, Japan)

1. การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่าง *Ficus hirta* และ *Ficus hispida* จากป่าธรรมชาติดงเซ่งและพื้นที่ฟื้นฟูป่าบ้านแม่สาใหม่ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ ที่ระดับความสูง 1,000-1,300 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง แปลงเก็บตัวอย่างประกอบด้วย แปลงควบคุมที่ไม่มีการปลูกพรรณไม้โครงสร้าง แปลงปลูกปี ค.ศ 1998 (พ.ศ.2541) และแปลงปลูกปี ค.ศ. 2002 (พ.ศ.2545) โดยแต่ละแปลงมี 3 แปลงย่อยที่มีขนาดพื้นที่ 40 X 40 ตารางเมตร มีวิธีการดังนี้

1.1 เลือกเก็บตัวอย่างใบจาก *F. hirta* และ *F.hispida* โดยเลือกใบอ่อนประมาณใบที่ 3-4 จากยอด

1.2 นำใบใส่ถุงพลาสติก เก็บไว้ในกล่องน้ำแข็ง

1.3 ทำสัญลักษณ์ไว้ที่ต้นมะเดื่อทั้งสองชนิด

1.4 วัดค่าพิกัด (GPS) ของทุกต้น

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 ทำให้ใบมะเดื่อแข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วบดในโกร่งจนเป็นผงละเอียด

2.2 เติมตัวอย่างที่บดไว้ 0.1 กรัม ลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่มี extraction buffer ปริมาตร 700 µl ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และผสมให้เข้ากันโดย vortex เป็นเวลา 1 นาที

2.3 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง ทุก ๆ 10 นาที

2.4 นำหลอดมาไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เพื่อให้อุณหภูมิลดลง แล้วเติมสารละลาย phenol : chloroform : isopropanol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 700 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ

2.5 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.6 ถ่ายสารละลายใส (supernatant) ลงใน Eppendorf tube ใหม่ ขนาด 1.5 ml

2.7 ทำซ้ำตามขั้นตอนที่ 2.4-2.6 อีก 2 รอบ โดยใช้เฉพาะสารละลาย Chloroform สกัด

2.8 เติม isopropanol ปริมาตร 500 µl ทิ้งให้ตกตะกอน 1 คืน ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.9 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

2.10 เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 500 µl

2.11 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง

2.12 คว่ำหลอดลงบนกระดาษเพื่อให้ของเหลวระเหย หรือปล่อยให้แห้งในอากาศ

2.13 เติมน้ำปริมาตร 50 µl เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

2.14 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ต่อไป

3. การวัดปริมาณและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัด โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance: A) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm (A260) และ 280 nm (A280) และ 1% Agarose gel electrophoresis

3.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดค่าดูดกลืนแสง

นำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางด้วย 1X TE buffer ในอัตราส่วน 1:100 แล้วนำไปวัดค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm โดยความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอสามารถคำนวณได้จากสูตร ดังต่อไปนี้

ความเข้มข้น dsDNA = OD_{260} x 50 µg/ml x Dilution Factor

โดย OD_{260} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ของสารละลายดีเอ็นเอ

50 µg/ml คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ที่ OD_{260} = 1

Dilution Factor คือ อัตราส่วนที่ใช้ในการเจือจาง (ในที่นี้ใช้ 100)

สำหรับการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ สามารถคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างค่า OD_{260} และ OD_{280} โดย ดีเอ็นเอ ที่บริสุทธิ์จะมีค่าประมาณ 1.8

3.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ดีเอ็นเอ โดย 1% Agarose gel electrophoresis

ทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว นำไปแยกขนาดด้วย 1% Agarose gel electrophoresis แล้วนำไปย้อมด้วย Ethidium Bromide (EtBr) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documetator ถ่ายภาพเก็บไว้เพื่อนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอ สารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอนนี้แล้วจะถูกนำไปเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 100 ng/µl

4. การวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอด้วย AFLP

วิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Vos *et al.* (1995) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Taq*I แต่เนื่องจากผลการวิจัยที่ได้แสดงแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยนเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น *Eco*RI และ *Mse*I ดังขั้นตอนต่อไปนี้

4.1 การตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Mse*I โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

10X buffer *Mse*I	5.0	µl
deionized water	16.5	µl
*Mse*I (Fermentas)	0.5	µl
*Eco*RI (Fermentas)	0.5	µl
genomic DNA	2.5	µl
ปริมาตรรวม	**25.0**	**µl**

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.2 การต่อปลายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วย DNA adapter

นำชิ้นส่วนที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I มาต่อปลาย 5' และ 3' ด้วย adapter (ตาราง 1) โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase และมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

10X T4 buffer	5.0	µl
*Eco*RI adapter	2.0	µl
*Mse*I adapter	2.0	µl
deionized water	15.5	µl
T4 DNA ligase (Fermentas)	0.5	µl
Double digested DNA	25.0	µl
ปริมาตรรวม	**50.0**	**µl**

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และต่อด้วยที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ตาราง 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA adapter และ primer ที่ใช้ในการวิเคราะห์ AFLP โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I

Primer			**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'⟶3')**
Adapter	*Eco*RI	top strand	CTC GTA GAC TGC GTA CC
		bottom strand	AAT TGG TAC GCA GTC TAC
	*Mse*I	top strand	GAC GAT GAG TCC TGA G
		bottom strand	TAC TCA GGA CTC AT
Primer	*Eco*RI	E-A	GAC TGC GTA CCA ATT CA
		E-AAC	GAC TGC GTA CCA ATT CAA C
		E-AAG	GAC TGC GTA CCA ATT CAA G
		E-ACA	GAC TGC GTA CCA ATT CAC A
		E-ACG	GAC TGC GTA CCA ATT CAC G
		E-ACT	GAC TGC GTA CCA ATT CAC T
		E-AGA	GAC TGC GTA CCA ATT CAG A
		E-AGC	GAC TGC GTA CCA ATT CAG C
		E-AGG	GAC TGC GTA CCA ATT CAG G
Primer	*Mse*I	M-C	GAT GAG TCC TGA GTA AC
		M-CAC	GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
		M-CAT	GAT GAG TCC TGA GTA ACA T
		M-CCA	GAT GAG TCC TGA GTA ACC A
		M-CCG	GAT GAG TCC TGA GTA ACC G
		M-CGC	GAT GAG TCC TGA GTA ACG C
		M-CGG	GAT GAG TCC TGA GTA ACG G
		M-CTA	GAT GAG TCC TGA GTA ACT A
		M-CTG	GAT GAG TCC TGA GTA ACT G

4.3 Pre-selective amplification

ชิ้นส่วน DNA ที่เชื่อมต่อด้วย adapter แล้ว จะถูกนำไปเจือจางด้วย 1X TE buffer ด้วยอัตราส่วน 1:10 แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

10X buffer A	2.0	µl
E-A primer	0.5	µl
M-C primer	0.5	µl
10 mM dNTP	0.5	µl
deionized water	14.25	µl
Taq DNA polymerase	0.25	µl
DNA template	2.0	µl
ปริมาตรรวม	**20.0**	**µl**

โดยมีโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1	Pre Denaturation	95°C	5 นาที
ขั้นที่ 2	Denaturation	95°C	30 วินาที
	Annealing	56°C	1 นาที
	Extension	72°C	1 นาที
	ควบคุมอุณหภูมิในขั้นที่ 2 ซ้ำจำนวน 30 รอบ		
ขั้นที่ 3	Final Extension	72°C	10 นาที

4.4 Selective amplification

PCR product ที่ได้จากขั้นตอน Pre-selective amplification ถูกนำไปเจือจางด้วย 1X TE buffer ด้วยอัตราส่วน 1:20 แล้วจะถูกนำไปใช้เป็น DNA template สำหรับขั้นตอน Selective amplification โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

10X buffer A	2.0	µl
*Mse*I selective primer	0.5	µl
*Eco*RI selective primer	0.5	µl
10 mM dNTP	0.5	µl
deionized water	14.25	µl
Taq DNA polymerase	0.25	µl

DNA template	2.0	µl
ปริมาตรรวม	**20.0**	**µl**

โดยมีโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาในขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1	Pre-denaturation	95°C	5 นาที
ขั้นที่ 2	Denaturation	95°C	30 วินาที
	Annealing	65°C	30 วินาที
	Extension	72°C	1 นาที
	ควบคุมอุณหภูมิในขั้นที่ 2 ซ้ำจำนวน 13 รอบ โดยในแต่ละรอบ		
จะทำการลดอุณหภูมิ annealing ลงรอบละ 0.7°C			
ขั้นที่ 3	Denaturation	95°C	30 วินาที
	Annealing	56°C	30 วินาที
	Extension	72°C	1 นาที
	ควบคุมอุณหภูมิในขั้นที่ 3 ซ้ำจำนวน 23 รอบ		
ขั้นที่ 4	Final Extension	72°C	10 นาที

5. การตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

5.1 เตรียมกระจก โดยเช็ดด้วย 75% Ethanol ทั้งสองแผ่น แล้วทาด้วย Rain-off ลงบนกระจกแผ่นเล็ก เช็ดให้แห้ง แล้วเช็ดด้วย 75% Ethanol อีก 1 ครั้ง ประกบกระจกทั้งสองแผ่นเข้าด้วยกัน

5.2 เตรียม 6% polyacrylamide gel (acrylamind : bisacrylamind = 19:1, 7.5 M urea) เทเจลลงบนกระจกที่เตรียมไว้ แล้วเสียบแผ่นหวีระหว่างช่องกระจก รอให้เจลแข็งประมาณ 2 ชั่วโมง

5.3 นำกระจกไปประกอบเข้าเครื่อง electrophoresis ใส่สารละลาย 1X TBE buffer ลงใน Electrophoresis chamber เปิดเครื่อง prerun โดยให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 1800 V เป็นเวลา 30 นาที

5.4 นำผลผลิต PCR ผสมกับ 3X loading dye ในอัตราส่วน 1:2 µl ผสมให้เข้ากันใส่ลงในช่องเจลจำนวน 6 µl ที่ให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 1800 V ในการทำงานและ run เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จนกว่าสี xylene cyanol (สีที่อยู่ด้านบน) จะเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล

5.5 ขั้นตอนการย้อมดีเอ็นเอและพักเจลในสารละลาย fixative

5.5.1 นำเจลออกจากเครื่อง electrophoresis แล้วพักเจลในสารละลาย 10% acetic acid เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า ในขั้นนี้อาจแช่ไว้ข้ามคืนได้

5.5.2 พักเจลในสารละลาย 1% nitric acid เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง โดยเขย่าตลอดเวลา

5.5.3 ย้อมเจลด้วย 0.2% silver nitrate เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่าตลอดเวลา แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง

5.5.4 เขย่าเจลด้วย developer ที่เตรียมใหม่ ๆและเจือจาง (developer : dH_2O ในอัตราส่วน 1: 1) แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 5-10 นาที

5.5.5 เขย่าเจลด้วย developer เจือจางอีกครั้งจนเห็นแถบดีเอ็นเอและใส่ developer ลงไปให้เห็นแถบชัดขึ้น

5.5.6 หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid เป็นเวลา 5 นาที

5.5.7 ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ แล้วทำให้เจลแห้งโดยผึ่งให้แห้งในอากาศโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน แล้ววิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ลายพิมพ์ของดีเอ็นเอได้จากการนับแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจาก *F. hirta* และ *F. hispida* ในแต่ละประชากรในลักษณะการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอบนเจลที่ตำแหน่งเดียวกัน ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอเทียบได้กับ ตำแหน่งยีน 1 ตำแหน่ง โดยกำหนดสัญลักษณ์ “1” เมื่อเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “2” เมื่อไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน และนำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม TFPGA (Tool for Population Genetic Analysis) เวอร์ชั่น 1.3 (Miller, 1997) และกำหนดสัญลักษณ์ “1” เมื่อเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” เมื่อไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน และนำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม POPGENE เวอร์ชั่น 1.32 (Yeh *et al.*, 2000) และโปรแกรม AFLP-SURV เวอร์ชั่น 1.0 (Vekemans, 2002) คำนวณค่าต่างๆ ทางพันธุกรรมดังนี้

6.1 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิก (Polymophic Loci : *PL*)

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแปรผันทางพันธุกรรม (polymorphism) ประชากร *F. hirta* และ *F. hispida* ตามวิธีการของ Hawksworth (1995)

จากสูตร $P = 100\ (p/n)$

เมื่อ p คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความผันแปรจากจำนวนแถบทั้งหมด n แถบ

6.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วย

6.2.1 จำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส (Observed number of alleles, N_a) คำนวณจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสในแต่ละประชากร ตามสูตร

$$N_a = \frac{\text{จำนวนของอัลลีลรวมทุกโลคัส}}{\text{จำนวนโลคัสทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

6.2.2 Effective number of alleles, N_e (Kimura and Crow, 1964) คำนวณได้จาก

$$N_e = 1/\sum xi$$

เมื่อ Xi คือความถี่ของอัลลีลที่ i

6.2.3 Gene diversity, H (Nei, 1978)

$$H = 1-\sum_{i=1}^{k} pi^2$$

เมื่อ pi คือความถี่ของอัลลีลที่ i และ k คือจำนวนอัลลีลที่พบที่ตำแหน่งนั้น

6.2.4 Shannon's Information index, I

$$H = -\sum_{i=1}^{k} p_i \log_e p_i$$

เมื่อ pi คือความถี่ของอัลลีลที่ i และ k คือจำนวนอัลลีลที่พบที่ตำแหน่งนั้น

6.3 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างประชากร

คำนวณค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Genetic identity, I) และระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance, D) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างประชากร *F. hirta* และ *F. hispida* โดยคำนวณค่า Nei's unbiased (1978) minimum distances ระหว่างประชากร *F. hirta* และ *F. hispida* ตามวิธีการของ Nei (1978)

6.4 ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient)

เป็นวิธีที่ใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างประชากร คือ ค่า F โดยเป็นการเปรียบเทียบระหว่างประชากรย่อยที่รวมเป็นประชากรใหญ่ โดยโปรแกรม AFLP-SURV เวอร์ชั่น 1.0 (Vekemans, 2002)

$$Fst = \frac{Ht - Hw}{Ht}$$

เมื่อ Ht = the total gene diversity

Hw = the mean gene diversity within populations

6.5 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic dendrogram)

นำระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยวิธี unweighted pairgroup method with arithmetic means (UPGMA) ตามวิธีการของ Sneath and Sokal (1973) โดยใช้โปรแกรม TFPGA (Tool for Population Genetic Analysis) เวอร์ชั่น 1.3 (Miller, 1997) โดยการทำ bootstrap 1,000 ครั้ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%