การตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 โดยใช้เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี

Monitoring Genetic Variation in RRIM 600 and RRIT 251 Rubber Clones by HAT-RAPD and AFLP Markers

สุนันทา แซ่ลิ่ม

Sunantha Saelim

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 โดยใช้เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี

ผู้เขียน นางสาวสุนันทา แซ่ลิ่ม

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……

(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……

(ดร.กรกช นาคคนอง)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ

(ดร.ระวี เจียรวิภา)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)

…….....กรรมการ

(ดร.กรกช นาคคนอง)

…….....กรรมการ

(ดร.ชัชมณฑ์ แดงกนิษฐ์ นาถาวร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……..……..

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวสุนันทา แซ่ลิ่ม)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวสุนันทา แซ่ลิ่ม)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 โดยใช้เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี

ผู้เขียน นางสาวสุนันทา แซ่ลิ่ม

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ในสวนยางพาราเกษตรกรทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 171 ตัวอย่าง และ RRIT 251 จำนวน 21 ตัวอย่าง ในพื้นที่ปลูกยางทางภาคใต้ของประเทศไทย เปรียบเทียบกับพันธุ์ยางแนะนำจากสถาบันวิจัยยาง จำนวน 14 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี จากการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 เบส จำนวน 11 ไพรเมอร์ คัดเลือกไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างได้ชัดเจน จำนวน 6 ไพรเมอร์ คือ OPAD-01, OPAD-10, OPB-12, OPB-17, OPC-05 และ OPN-08 นำไพรเมอร์มาทดสอบกับตัวอย่างที่เก็บมาทั้งหมด พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 78 แถบ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างกัน จำนวน 52 แถบ คิดเป็น 70.27 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอเพื่อหาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และสร้างเดนโดรแกรมโดยวิธี UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages) จากโปรแกรม NTSYS (version 2.1) พบว่า มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.68-1.0 สามารถจัดกลุ่มได้ 8 กลุ่ม เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 พบความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่าง โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.76-1.00 และ 0.78-1.00 ตามลำดับ จากนั้นสุ่มตัวอย่างพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 5 ตัวอย่าง และ RRIT 251 จำนวน 2 ตัวอย่าง ทดสอบกับเทคนิคเอเอฟแอลพีเพื่อยืนยันผล โดยมีพันธุ์แนะนำจำนวน 14 พันธุ์ จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานีเป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการทดสอบกับไพรเมอร์ 4 คู่ คือ E-AGG/P-GGG, E-AAG/P-GAC, E-ACG/P-GAC และ E-ACG/P-GCA พบว่า สามารถจัดกลุ่มยางพาราได้ 7 กลุ่ม จากผลของแฮตอาร์เอพีดี

และเอเอฟแอลพี แสดงให้เห็นว่ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 จากแปลงเกษตรกรมีความผันแปรทางพันธุกรรม

Thesis Title Monitoring Genetic Variation in RRIM 600 and RRIT 251 Rubber Clones by HAT-RAPD and AFLP Markers.

Auther Miss Sunantha Saelim

Major Program Plant Science

Academic Year 2014

ABSTRACT

The purpose of this study is to monitor the genetic variation of RRIM 600 and RRIT 251 clones in rubber plantations, southern Thailand. Leaf samples of 171 RRIM 600 and 21 RRIT 251 were collected and two molecular techniques ; HAT-RAPD (High Annealing Temperature RAPD) and AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) were used in this study. Fourteen Recommended clones from Rubber Research Institute of Thailand were included to compare DNA pattern with collected samples. Eleven 10-base oligonucleotide primers for HAT-RAPD were initially screened and 6 primers (OPAD-01, OPAD-10, OPB-12, OPB-17, OPC-05 and OPN-08) were chosen to assess genetic variation among samples. From total 78 fragments generated by those primers, 52 were polymorphism (70.27%). Dendrogram from cluster analysis based on polymorphic band of HAT-RAPD was performed by UPGMA (Unweighted Pair-groups Method using Arithmetic averages) using NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version-2.1.) (version 2.1). It was found that all samples were classified into 8 groups with genetic similarity index value range from 0.68-1.00. When considered genetic similarity within RRIM 600 and RRIT 251 populations, genetic variation were observed. Genetic similarity index in RRIM 600 and RRIT 251 ranged from 0.76-1.00 and 0.78-1.00, respectively. AFLP technique was used to confirm genetic variation found in RRIM 600 and RRIT 251 population. Five and two samples of RRIM 600 and RRIT 251 were chosen for further studied, and 12 recommended clones from Surat Thani agricultural research and development center

were included. According to the AFLP analysis with 4 primer-pairs (E-AGG/P-GGG, E-AAG/P-GAC, E-ACG/P-GAC and E-ACG/P-GCA) samples can be classified into 7 groups. Result obtained from HAT-RAPD and AFLP confirmed genetic variation in RRIM 600 and RRIT 251 at rubber plantation in southern Thailand. No specific DNA fragment was found for RRIM 600 and RRIT 251.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ดี ข้าพเจ้าขอกราบ ขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร.กรกช นาคคนอง กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะในการทำวิจัย การเขียนงานวิจัย ให้ความรู้ ให้แง่คิด และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนแล้วเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร.ระวี เจียรวิภา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.ชัชมณฑ์ แดงกนิษฐ์ นาถาวร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย และภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนเงินทุนในการทำวิทยานิพนธ์ และให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ ตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี และสวนเกษตรกรที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างพืชในการศึกษาครั้งนี้ ร่วมทำการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่อักษร แคล้วคลาด พี่ณัฏฐากร อะซิ่ม พี่สมศักดิ์ โพธารส พี่ฮูดา แก้วศรีสม พี่กษมา เชิงฉลาด พี่ศัลยา จันทร์อุ่ย นางสาวเด่นดวง เพชรหิน นายวีระ มณีเลิศ นายพลนรินทร์ อินแพง นางสาววิภารัตน์ ด้วงเอียด น้องพรทิพย์ แสงศิลป์ รวมถึงคณาจารย์ บุคลากรภาควิชาพืชศาสตร์ทุกท่าน พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ คณะทรัพยากรธรรมชาติที่มีส่วนร่วมในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์เล่มนี้

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อสุทนธ์ แซ่ลิ่ม คุณแม่อำนวย พุ่มขำ ที่ได้อบรมสั่งสอน ให้ความรัก และเป็นกำลังใจให้ผู้เขียนตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

สุนันทา แซ่ลิ่ม

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	15
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ และอุปกรณ์	16
วิธีการ	20
3 ผล	26
4 วิจารณ์	64
5 สรุป	70
เอกสารอ้างอิง	71
ภาคผนวก	78
ประวัติผู้เขียน	82

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คำแนะนำพันธุ์ยางของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554	4
2	สายพันธุ์ (clone) จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่างใบยางพาราพันธุ์แนะนำ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ใช้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม	16
3	แสดงชนิดของไพรเมอร์ ลำดับเบส และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์จากดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600, RRIT 251 และพันธุ์ยางแนะนำจากการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี	27
4	อัตราส่วนระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อ 280 นาโนเมตร ความบริสุทธิ์ของดีเอ็น และปริมาณดีเอ็นเอต่อไมโครลิตร	55
5	แสดงชนิดของไพรเมอร์ ลำดับเบส และจำนวนแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์จากดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์ RRIM 600, RRIT 251 และพันธุ์ยางแนะนำ	56

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะสัณฐานของยางพาราพันธุ์ RRIM 600	7
2	ลักษณะสัณฐานของยางพาราพันธุ์ RRIT 251	10
3	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAD-01	28
4	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAD-10	31
5	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-12	34
6	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-17	37
7	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPC-05	40
8	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPN-08	43
9	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 171 ตัวอย่าง ยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จำนวน 21 ตัวอย่าง และยางพาราพันธุ์แนะนำจำนวน 14 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี	46
10	แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600, RRIT 251 จากแปลงเกษตรกร และพันธุ์ยางแนะนำจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จากการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี	49
11	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 171 ตัวอย่าง และยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จากการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี	51

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จำนวน 21 ตัวอย่าง และยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จากการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี	53
13	แสดงสภาพที่สมบูรณ์ของดีเอ็นเอ จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสดีเอ็นเอจากใบยางพารา ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	54
14	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ของคู่ไพรเมอร์ E-AGG/P-GGG	58
15	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ของคู่ไพรเมอร์ E-AAG/P-GAC	59
16	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ของคู่ไพรเมอร์ E-ACG/P-GCA	60
17	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ของคู่ไพรเมอร์ E-ACG/P-GAC	61
18	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของยางพาราพันธุ์แนะนำ จำนวน 14 สายพันธุ์ และตัวอย่างพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่คัดเลือกจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค แฮตอาร์เอพีดีที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือน และต่างกับ RRIM 600 และ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี	63

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพาราเป็นพืชอุตสาหกรรมที่สำคัญของประเทศไทย และภูมิภาคอาเซียน ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกอันดับหนึ่งของโลก โดยมีพื้นที่ปลูกยาง 18.76 ล้านไร่ (สถาบันวิจัยยาง, 2555) จากการเพิ่มพื้นที่ปลูกยางจากแหล่งปลูกยางเดิมในภาคใต้ และภาคตะวันออกไปยังแหล่งปลูกยางใหม่ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือตามนโยบายรัฐบาลในช่วงปี พ.ศ. 2547-2549 (สถาบันวิจัยยาง, 2550) ทำให้เกิดการขาดแคลนต้นตอตายางประกอบกับแปลงกิ่งตาของเอกชนที่ได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรมีไม่เพียงพอ เป็นผลให้มีการนำตายางพาราจากแหล่งที่ไม่ได้มีการรับรองพันธุ์ หรือตรวจสอบพันธุ์ที่ถูกต้อง หรือแปลงกิ่งตาของเอกชนที่ปลูกสร้างขึ้นอาจไม่ตรงตามพันธุ์ โดยเฉพาะพันธุ์ยางชั้น 1 ได้แก่ RRIT 251 และ RRIM 600 โดยพันธุ์ RRIT 251 เป็นพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตสูงเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ(สถาบันวิจัยยาง, 2550) ให้ผลผลิต 10 ปีกรีดเฉลี่ย 462 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ในพื้นที่ปลูกยางเดิม ให้ผลผลิต 8 ปีกรีดเฉลี่ย 343 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ในพื้นที่ปลูกยางใหม่ มีความต้านทานปานกลางต่อโรคใบร่วงไฟทอปโทรา โรคราแป้ง โรคใบจุดคอลเลโทตริกัม (Colletotrichum leaf spot) โรคใบจุดก้างปลา และโรคราสีชมพู และค่อนข้างต้านทานต่อโรคเส้นดำ (สถาบันวิจัยยาง, 2554ก) ส่วน RRIM 600 ให้ผลผลิต 10 ปีกรีดเฉลี่ย 297 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ในพื้นที่ปลูกยางเดิม ให้ผลผลิต 10 ปีกรีดเฉลี่ย 263 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ในพื้นที่ปลูกยางใหม่ แต่อ่อนแอต่อโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา โรคราสีชมพู ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคใบจุดก้างปลา และเส้นดำ ค่อนข้างต้านทานต่อโรคราแป้ง และใบจุดคอลเลโทตริกัม แต่พันธุ์ RRIM 600 สามารถปรับตัว และให้ผลผลิตได้ดีในเกือบทุกพื้นที่ ทนทานต่อการกรีดถี่ได้มากกว่าพันธุ์อื่น ๆ ทำให้ RRIM 600 ได้รับความนิยมจากเกษตรกรมาเป็นเวลานาน โดยประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ของพันธุ์ยางที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพันธุ์นี้ (สถาบันวิจัยยาง, 2554ก) จากความไม่แน่ใจในพันธุ์ยางพาราที่ปลูกในแปลงเกษตรกรในปัจจุบัน จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการตรวจสอบพันธุ์ยางพาราเพื่อเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวัง

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของยางพารา เนื่องจากมีความสะดวก รวดเร็ว และให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ เช่น การใช้เครื่องหมาย

SSR (Simple Sequence Repeat) หรือ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (นภาวรรณ และคณะ, 2553) โดยเฉพาะเครื่องหมาย RAPD ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่มีข้อเสียเรื่องการทดลองซ้ำ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาเทคนิคที่สามารถนำไปสู่การพัฒนาต่อยอด เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปปฏิบัติจริง ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค HAT-RAPD (High Annealing Temperature Random Amplified Polymorphic DNA) และAFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพันธุ์ยาง สำหรับใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการตรวจสอบยางพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 เพื่อเป็นข้อมูลให้กับหน่วยราชการที่เกี่ยวข้องในการควบคุมกำกับการขยายพันธุ์เพื่อการค้า ปกป้องผลประโยชน์ให้กับเกษตรกรชาวสวนยาง สร้างความมั่นใจให้กับเกษตรกรว่าจะได้รับยางพันธุ์ดีที่ตรงตามพันธุ์เพื่อนำไปปลูกในพื้นที่ของตน

ตรวจเอกสาร

1. ประวัติการปลูกยางพาราในประเทศไทย

ยางพาราจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae สกุล *Hevea* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 36 มีถิ่นกำเนิดบริเวณลุ่มน้ำอเมซอน ประเทศบราซิล และประเทศเปรู ทวีปอเมริกาใต้ มีการค้นพบว่ากลุ่มยางพันธุ์ที่ดีที่สุดคือ *Hevea brasiliensis* ซึ่งมีคุณภาพดีกว่า *Hevea* ชนิดอื่นๆ การปลูกยางในประเทศไทย ไม่มีบันทึกหรือประวัติที่แน่นอน แต่เชื่อกันว่า พ.ศ. 2443 (กลางรัชกาลที่ 5) พระยารัษฎานุประดิษฐ์มหิศรภักดี (คอซิมบี้ณระนอง) เจ้าเมืองตรังเป็นผู้นำต้นยางพาราเข้ามาปลูกเป็นครั้งแรกที่อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง ต่อมามีราษฎรนำมาปลูกเป็นสวนยางในแถบจังหวัดตรัง และนราธิวาส ตามลำดับ ในจังหวัดจันทบุรี หลวงราชไมตรี (ปูม ปุณศรี) ได้เป็นผู้นำไปปลูกเมื่อประมาณ พ.ศ. 2451 สวนยางส่วนใหญ่ของประเทศขณะนั้นเป็นสวนยางที่ปลูกด้วยเมล็ด แต่หลังจากที่มีการจัดตั้งสำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยางขึ้นมาในปี พ.ศ. 2503 เพื่อดำเนินการปลูกยางพันธุ์ดีทดแทนยางพันธุ์ดั้งเดิมที่ให้ผลผลิตต่ำ สวนยางของประเทศไทยจึงได้พัฒนาขึ้นมาเป็นลำดับ (เรวัต, 2542) พันธุ์ยางที่เกษตรกรนิยมปลูกทดแทนยางพันธุ์ดั้งเดิมในช่วงแรกคือ Tjir 1, PB 5/51, PR 107 และ RRIM 623 ต่อมายางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ GT 1 เริ่มได้รับความนิยมโดยเป็นพันธุ์ยางชั้น 1 ในคำแนะนำพันธุ์ยางปี พ.ศ. 2509 ซึ่งยางพันธุ์ RRIM 600 จัดเป็นพันธุ์ยางที่ได้รับความนิยมต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน (ชูสิทธิ์ และเวท, 2542) ขณะที่ RRIT 251 เป็นพันธุ์ยางของไทยที่ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ RRIM 600 และมีลักษณะ

อื่นๆ ที่ดี เช่น การเจริญเติบโต ความต้านทานโรค ตามคำแนะนำพันธุ์ยางปี พ.ศ.2546 (สถาบันวิจัยยาง, 2549)

2. การขยายพันธุ์ยางพารา

การขยายพันธุ์ยางพาราสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ใช้วิธีการติดตาเขียว และติดตาสีน้ำตาล เป็นต้น

การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด (แบบอาศัยเพศ) ไม่เป็นที่นิยม เพราะยางพาราเป็นพืชผสมข้าม การขยายพันธุ์โดยเมล็ดจะไม่ตรงตามพันธุ์ เมล็ดยางจึงนิยมนำไปใช้เพาะเป็นต้นกล้าเพื่อใช้ในการทำเป็นต้นตอ (stock) สำหรับติดตาต่อไป ส่วนการขยายพันธุ์โดยวิธีการติดตา (bud grafting) เป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แบ่งออกเป็นการติดตาเขียว และการติดตาสีน้ำตาล แต่ส่วนใหญ่นิยมติดตาเขียวมากกว่า เพราะการติดตาเขียว ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีโอกาสสำเร็จในการติดสูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2552ก) การขยายพันธุ์ยางด้วยวิธีการติดตาเขียวเป็นวิธีการที่พบครั้งแรกในรัฐซาบาร์ประเทศมาเลเซีย เมื่อ พ.ศ. 2503 หลังจากนั้นได้ปรับปรุงแก้ไขวิธีการให้ดีขึ้น จนได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2552ข) การติดตาเป็นวิธีการขยายพันธุ์โดยนำชิ้นส่วนของตาเพียงตาเดียวของต้นพันธุ์หนึ่งมาเชื่อมต่อกับเนื้อเยื่อของต้นอีกพันธุ์หนึ่ง วัตถุประสงค์เพื่อต้องการเปลี่ยนพันธุ์เดิมจากตาที่จะเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ วิธีการติดตาสามารถทำได้รวดเร็วกว่าการต่อกิ่ง และประสบผลสำเร็จสูงถึง 90 - 100 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นวิธีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศที่นักขยายพันธุ์พืชนิยมเลือกใช้ นอกจากนั้นการติดตายังเป็นวิธีการที่ใช้ชิ้นส่วนของกิ่งพันธุ์ดีในการขยายพันธุ์ต้นใหม่ได้จำนวนมาก และยังไม่สิ้นเปลืองกิ่งพันธุ์ดี เมื่อแผ่นตาเกิดรอยเชื่อมประสานกับต้นตอแล้วยังจะให้รอยต่อที่แข็งแรงกว่าการต่อกิ่งบางวิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะแรก หลังจากการเชื่อมต่อแล้วกิ่งพันธุ์ดีจะไม่ฉีกออกง่ายเมื่อมีลมแรง ตามหลักทฤษฎีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะไม่เกิดการกลายพันธุ์ หรือสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรม (Loveless and Hamrick, 1984)

3. พันธุ์ยางแนะนำ

พันธุ์ยางที่แนะนำให้ปลูกโดยสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร (2554) แบ่งเป็น 3 ชั้น

พันธุ์ยางชั้น 1 เป็นยางพันธุ์ดี ที่ผ่านการทดลอง และศึกษาลักษณะต่างๆ อย่างละเอียด แนะนำให้ปลูกโดยไม่จำกัดพื้นที่ปลูก

พันธุ์ยางชั้น 2 เป็นยางพันธุ์ดีที่อยู่ระหว่างการทดลอง และศึกษาลักษณะบางประการเพิ่มเติม แนะนำให้ปลูกได้ไม่เกินร้อยละ 30 ของเนื้อที่ปลูกยางที่ถือครอง แต่ละพันธุ์ควรปลูกไม่น้อยกว่า 7 ไร่ ภายใต้การแนะนำของสถาบันวิจัยยาง

พันธุ์ยางชั้น 3 เป็นยางพันธุ์ดีที่อยู่ระหว่างการทดลอง และยังมีข้อมูลจำกัด แนะนำให้ปลูกได้ไม่เกินร้อยละ 20 ของเนื้อที่ปลูกยางที่ถือครอง แต่ละพันธุ์ควรปลูกไม่น้อยกว่า 7 ไร่ ภายใต้การแนะนำของสถาบันวิจัยยาง

นอกจากนี้พันธุ์ยางสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (สถาบันวิจัยยาง, 2554ก) ตามวัตถุประสงค์การปลูกคือ

กลุ่ม 1 **พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยาง** เป็นพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตน้ำยางสูงเป็นหลัก

กลุ่ม 2 **พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยาง และเนื้อไม้** เป็นพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตน้ำยาง และเนื้อไม้ โดยให้ผลผลิตน้ำยางสูง และมีการเจริญเติบโตดี ลักษณะลำต้นตรง ให้ปริมาณเนื้อไม้ในส่วนลำต้นสูง

กลุ่ม 3 **พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตเนื้อไม้** เป็นพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตเนื้อไม้สูงเป็นหลัก ลักษณะลำต้นตรง ให้ปริมาณเนื้อไม้ในส่วนลำต้นสูงมาก ผลผลิตน้ำยางอยู่ในระดับต่ำกว่าพันธุ์ยางในกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2

พันธุ์ยางที่แนะนำให้ปลูกตามคำแนะนำในปี พ.ศ. 2554 โดยแบ่งตามพื้นที่ปลูกยางเดิม และพื้นที่ปลูกยางใหม่ในประเทศไทยดังแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คำแนะนำพันธุ์ยางของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554

พันธุ์ยางแนะนำในพื้นที่ปลูกยางเดิม				
พันธุ์ยางชั้น 1				
กลุ่ม 1	RRIT 251	RRIT 226	BPM 24	RRIM 600
กลุ่ม 2	PB 235	PB 255	PB 260	
กลุ่ม 3	ฉะเชิงเทรา 50	AVROS 2037	BPM 1	

ตารางที่ 1 (ต่อ) คำแนะนำพันธุ์ยางของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554

พันธุ์ยางแนะนำในพื้นที่ปลูกยางใหม่					
พันธุ์ยางชั้น 1					
กลุ่ม 1	RRIT 408	RRIT 251	RRIT 226	BPM 24	RRIM 600
กลุ่ม 2	RRII 118	PB 235			
กลุ่ม 3	ฉะเชิงเทรา 50	AVROS 2037	BPM 1		

ที่มา : สถาบันวิจัยยาง (2554ก)

4. การจำแนกพันธุ์ยางโดยอาศัยลักษณะสัณฐาน

การจำแนกพันธุ์ยางโดยอาศัยลักษณะสัณฐานเป็นการจำแนกพันธุ์ยางโดยลักษณะต่างๆ ที่มองเห็นด้วยสายตา เป็นวิธีการที่ทำได้สะดวกรวดเร็ว สามารถนำไปปฏิบัติในแปลงได้อย่างกว้างขวาง ประหยัดค่าใช้จ่าย แรงงาน และวัสดุอุปกรณ์ อย่างไรก็ตามในการจำแนกพันธุ์ยางที่ได้ผลถูกต้องแม่นยำต้องอาศัยการเรียนรู้ และฝึกทักษะอย่างต่อเนื่อง จนเกิดความชำนาญ สำหรับแนวทางการจำแนกพันธุ์ยางโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ช่วง (ศุภมิตร, 2554) ดังนี้

1. ช่วงยางอ่อนยังไม่แตกกิ่ง

ต้นยางที่อยู่ในระยะนี้ได้แก่ต้นยางชำถุงต้นกิ่งตายาง และต้นยางอายุ 1-2 ปี ลักษณะต่างๆ ที่ใช้ประกอบการพิจารณามีดังนี้

ฉัตรใบ	พิจารณาฉัตรใบแก่ที่ 1-2 นับจากยอดซึ่งอยู่ในสภาพสมบูรณ์และคงที่
ใบ	พิจารณาใบแก่ในฉัตรที่ 2 นับจากยอดลงมาซึ่งมีสภาพสมบูรณ์และใบแก่เต็มที่
ก้านใบ	พิจารณารูปร่างและฐานก้านใบ ลักษณะของฐานและทิศทางของก้านใบที่ทำกับลำต้น
ก้านใบย่อย	พิจารณาการแผ่การทำมุม และความยาวของก้านใบย่อย
เปลือกตา	พิจารณาลักษณะของเปลือกทั้งส่วนสีเขียว และส่วนสีน้ำตาล

2. **ช่วงยางใหญ่**

ช่วงที่ต้นยางอายุมากกว่า 2 ปีขึ้นไป มีความสูงจนไม่อาจพิจารณารายละเอียดปลีกย่อยเหมือนช่วงยางอ่อน ลักษณะต่างๆ ที่ใช้ประกอบการพิจารณามีดังนี้

ลำต้น	พิจารณารูปร่างและลักษณะผิวเปลือกของลำต้น
ทรงพุ่ม	พิจารณารูปทรงระดับความสูงและความหนาแน่น
การแตกกิ่ง	พิจารณาการแตกกิ่งหลักที่แตกจากลำต้นกิ่งรองและกิ่งแขนง
เมล็ด	พิจารณาขนาดรูปร่างลักษณะส่วนหลังและอก ความหนา และสีลวดลาย

5. **ยางพาราพันธุ์** RRIM 600

ประวัติพันธุ์ แม่-พ่อพันธุ์ Tjir 1 X PB 86

แหล่งที่มาของพันธุ์ มาเลเซีย

การแนะนำของพันธุ์ พันธุ์ยางชั้น 1

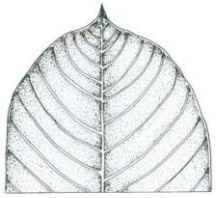
ลักษณะประจำพันธุ์ ทรงฉัตรรูปกรวยขนาดของฉัตรเล็ก (ภาพที่ 1ก) ใบสีเขียวอมเหลือง เส้นกลางใบนูน ฐานใบสอบเรียว ปลายใบเป็นติ่งแหลม ลักษณะแผ่นใบเรียบ รูปร่างของใบกลางป้อมปลายใบ ขอบใบเรียบ (ภาพที่ 1ข) รูปร่างของก้านใบตรง ความยาวก้านใบปานกลาง รอยแผลก้านใบรูปหัวใจ (ภาพที่ 1ค) ตาก้านใบนูนน้อยตั้งอยู่ในฐานก้านใบ ตาคิ้วฝังในลำต้น ทิศทางของตาคิ้วโค้งสมดุล (ภาพที่ 1ง) น้ำยางสีขาว รูปร่างของลำต้นตรง ลักษณะทรงพุ่มรูปพัด ความหนาแน่นของทรงพุ่มปานกลาง การแตกกิ่งสมดุล (ภาพที่ 1จ) ขนาดเมล็ดปานกลางรูปร่างของเมล็ดทรงสี่เหลี่ยม (squarished) ลักษณะส่วนหัวเรียบ ลักษณะส่วนท้ายเรียบ ลักษณะส่วนอกสันนูน ลักษณะส่วนหลังเรียบ (ภาพที่ 1ฉ) (วิชา และคณะ, 2545)

ลักษณะทางการเกษตร ในระยะก่อนเปิดกรีด และระหว่างกรีด การเจริญเติบโตปานกลาง เปลือกเดิมบาง เปลือกงอกใหม่หนาปานกลาง ผลผลิตระยะแรกอยู่ในระดับปานกลาง แต่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในปีต่อมา ในพื้นที่ปลูกยางเดิม ให้ผลผลิต 10 ปีกรีดเฉลี่ย 297 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ในพื้นที่ปลูกยางใหม่ ให้ผลผลิต 10 ปีกรีดเฉลี่ย 263 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี อ่อนแอต่อโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา และโรคราสีชมพู ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคใบจุดก้างปลา และเส้นดำ ค่อนข้างต้านทานต่อโรคราแป้ง และใบจุดคอลเลโทตริกัม ปรับตัวและให้ผลผลิตได้ดีในเกือบทุกพื้นที่ ทนทานต่อการกรีดถี่ได้มากกว่าพันธุ์อื่น ๆ และมีจำนวนต้นยางแสดงอาการเปลือกแห้งน้อย ต้านทานลมปานกลาง (สถาบันวิจัยยาง, 2554ก)

ก)

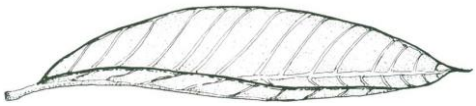
รูปกรวย (conical)

ข)



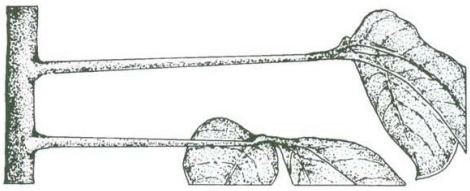
ติ่งแหลม (cuspidate)

สอบเรียว (attenuate)

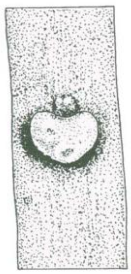


ขอบใบเรียบ (entire)

ค)



ก้านใบตรง (straight)



รูปหัวใจ (heart shaped)

ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานของยางพาราพันธุ์ RRIM 600

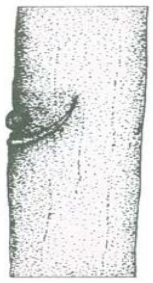
ก) ทรงฉัตร

ข) ลักษณะใบ

ค) รูปร่างของก้านใบและรอยแผลก้านใบ

ที่มา : วิชา และคณะ (2545)

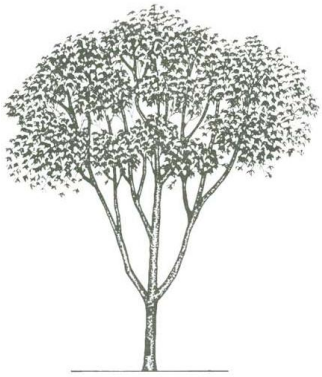
ง)



ตาคิ้วฝังในลำต้น (sunken)

โค้งสมดุล (smooth)

จ)



รูปพัด (broom shaped)

สมดุล (balanced)

ฉ)

ทรงสี่เหลี่ยม (squared)

เรียบ (flat)

สันนูน (protrude)

ภาพที่ 1 (ต่อ) ลักษณะสัณฐานของยางพาราพันธุ์ RRIM 600

ง) ตาก้านใบ ตาคิ้ว และทิศทางของตาคิ้ว

จ) ทรงพุ่ม และการแตกกิ่ง

ฉ) รูปร่างเมล็ด

ที่มา : วิชา และคณะ (2545)

6. **ยางพาราพันธุ์** RRIT 251

ประวัติพันธุ์ คัดเลือกพันธุ์มาจากสวนของนายชิ่ว บุญไผ่ ต. ปลักหนู อ. นาทวี จ. สงขลา

ชื่อเดิม พันธุ์นาทวี

แหล่งที่มาของพันธุ์ ไทย

การแนะนำของพันธุ์ พันธุ์ยางชั้น 1

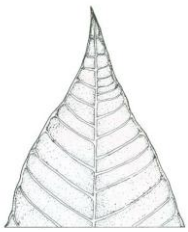
ลักษณะประจำพันธุ์ ลักษณะทรงฉัตรครึ่งวงกลม (ภาพที่ 2ก) ขนาดของฉัตรใหญ่ ใบสีเขียวแก่ เส้นกลางใบนูน ฐานใบรูปลิ่ม ปลายใบเรียวแหลม ลักษณะแผ่นใบเรียบ ขอบใบเป็นคลื่น (ภาพที่ 2ข) ใบย่อยซ้าย-ขวาเปรียบเทียบกับใบกลางมีรูปร่างแบบเดียวกัน แต่ขนาดเล็กกว่า รูปร่างก้านใบรูปตัวเอส ความยาวก้านใบยาว ฐานก้านใบเรียบสองชั้น รอยแผลก้านใบรูปหัวใจ (ภาพที่ 2ค) ลักษณะการแผ่ของก้านใบย่อยยกขึ้นทำมุมแคบระหว่างก้านใบย่อย ความยาวก้านใบย่อยปานกลาง ตาก้านใบนูนน้อยตั้งอยู่ชิดฐานก้านใบ ตาคิ้วเสมอลำต้น ทิศทางของตาคิ้วเอียงด้านใดด้านหนึ่ง (ภาพที่ 2ง) น้ำยางสีขาว ลักษณะทรงพุ่มรูปกลม ความหนาแน่นของทรงพุ่มขนาดใหญ่ การแตกกิ่งไม่สมดุล (ภาพที่ 2จ) (วิชา และคณะ, 2545)

ลักษณะทางการเกษตร การเจริญเติบโตระยะก่อนเปิดกรีด และระหว่างกรีดเจริญเติบโตปานกลาง ความสม่ำเสมอของขนาดลำต้นทั้งแปลงดี ทำให้มีจำนวนต้นเปิดกรีดมาก การแตกกิ่งไม่สมดุล พุ่มใบทึบ ทรงพุ่มมีขนาดใหญ่ เป็นรูปทรงกลม ความหนาของเปลือกเดิมและเปลือกงอกใหม่หนาปานกลาง ในพื้นที่ปลูกยางเดิม ให้ผลผลิต 10 ปีกรีดเฉลี่ย 462 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ในพื้นที่ปลูกยางใหม่ ให้ผลผลิต 8 ปีกรีดเฉลี่ย 343 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ในช่วงผลัดใบผลผลิตลดลงเล็กน้อย มีความต้านทานปานกลางต่อโรคใบร่วงไฟทอปโทรา โรคราแป้ง โรคใบจุดคอลเลโทตริกัม โรคใบจุดก้างปลา และโรคราสีชมพู และค่อนข้างต้านทานต่อโรคเส้นดำ มีจำนวนต้นยางแสดงอาการเปลือกแห้งน้อย ความต้านทานลมปานกลาง ไม่แนะนำให้ปลูกในพื้นที่ลาดชันพื้นที่ที่มีหน้าดินตื้น และพื้นที่ที่มีระดับน้ำใต้ดินสูง (สถาบันวิจัยยาง, 2554ก)

ก)

ครึ่งวงกลม (hemisphere)

ข)

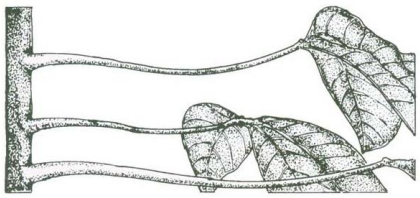


เรียวแหลม (acuminate)

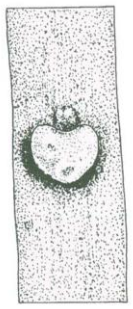
รูปลิ่ม (cuneaete)

คลื่น (wavy)

ค)



รูปตัวเอส (S-shaped)



รูปหัวใจ (heart shaped)

ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานของยางพาราพันธุ์ RRIT 251

ก) ทรงฉัตร

ข) ลักษณะใบ

ค) รูปร่างของก้านใบและรอยแผลก้านใบ

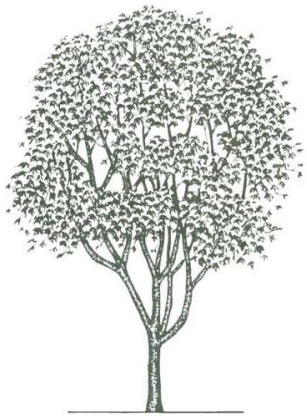
ที่มา : วิชา และคณะ (2545)

จ)

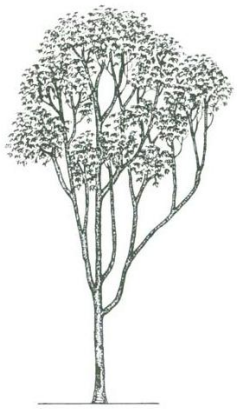
ตาเสมอลำต้น (normal)

เอียงด้านใดด้านหนึ่ง (unbalanced)

ฉ)



ทรงกลม (rounded)



ไม่สมดุล (unbalanced)

ภาพที่ 2 (ต่อ) ลักษณะสัณฐานของยางพาราพันธุ์ RRIT 251

ง) ตาก้านใบ ตาคิ้ว และทิศทางของตาคิ้ว

จ) ทรงพุ่ม และการแตกกิ่ง

ที่มา : วิชา และคณะ (2545)

7. การจำแนกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุล หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ เป็นเครื่องหมายที่สร้างจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซม ซึ่งสามารถบอกถึงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบ และมีการถ่ายทอดสู่รุ่นลูกได้ เครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาใช้ในการศึกษา และตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของยางพารา ได้แก่ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Low and Gale, 1991), RAPD (Random Amplified

Polymorphic DNA) (Chen *et al*.,1994), DAF (DNA amplification fingerprinting) (Low *et al*., 1996) และ SSR (Simple sequence repeats) (Low *et al*., 1996) เป็นต้น โดยเครื่องหมายโมเลกุลมีข้อได้เปรียบที่ชิ้นดีเอ็นเอมีจำนวนมาก สภาพแวดล้อม และระยะการเจริญเติบโตไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายโมเลกุล มีความถูกต้องแม่นยำสูง จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจแยกสายพันธุ์ อนุรักษ์พันธุกรรมยาง รวมถึงการทำแผนที่พันธุกรรมยาง (genetic mapping) เพื่อใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ (นภาวรรณ, 2551)

1. แฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD: High Annealing Temperature RAPD)

แฮตอาร์เอพีดีเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ประยุกต์มาจากเทคนิคอาร์เอพีดีที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการทำพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นๆ ประมาณ 8-10 เบส เพียงชนิดเดียว มีลำดับเบสแบบสุ่ม เป้าหมายการเกาะของไพรเมอร์ คือ บริเวณที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน โดยไม่คำนึงถึงทิศทางของไพรเมอร์ที่เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่จำเพาะกับยีนใด โดยจะนำมาแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟริซีสบนอะกาโรสเจล ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงนั้นได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะดีเอ็นเอสายเดียวกันในทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสาย แต่ทิศทางแยกออกจากกัน หรือเกาะได้สองสายห่างไกลกันมาก แม้ทิศทางเข้าหากันก็ไม่สามารถเกิดผลผลิตได้ข้อได้เปรียบของเทคนิคนี้คือ ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยประมาณ 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา แต่มีข้อจำกัดบ้างในเรื่องการทดลองซ้ำ เนื่องจากเทคนิคนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ สูง จึงต้องควบคุมสภาพต่างๆ ให้คงที่ และอาร์เอพีดียังแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างลักษณะพันธุ์แท้ และพันธุ์ทางได้ (สุรินทร์, 2552) แฮตอาร์เอพีดีแตกต่างจากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยทั่วๆ ไปที่ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ประมาณ 35-42 องศาเซลเซียส แต่ในแฮตอาร์เอพีดีจะเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 46-62 องศาเซลเซียส Anuntalabhochai และคณะ (2000) รายงานว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ annealing มากกว่า 46 องศาเซลเซียส ในปฏิกิริยา หรือทำการเพิ่มอุณหภูมิ annealing สูงกว่าเทคนิค RAPD ปกติ 10 องศาเซลเซียส ทำให้การเข้าเกาะกันของดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์มีความจำเพาะมากขึ้น ทำให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความคมชัดมากขึ้น และสามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้

สูงขึ้นกว่าเดิมมากกว่า 10 องศาเซลเซียส ทำให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็น non-specific ลดลงทำให้ผลการทดลองแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ในการเข้าจับดีเอ็นเอต้นแบบได้ดี (Eimert *et al*., 2003) เทคนิคนี้ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัด (high resolution) และการทำซ้ำให้ผลคงเดิม (reproducibility) นอกจากนี้ยังให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างสูง (polymorphism) ตัวอย่างการใช้แฮตอาร์เอพีดีในการศึกษาด้าพืช ได้แก่ การศึกษาความแตกต่างในระดับพันธุกรรมของพืชในสกุล Ficus 25 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 143 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่าง จำนวน 140 แถบ คิดเป็น 97.90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำซ้ำสามารถเกิดแถบดีเอ็นเอเช่นเดิม แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี มีความแน่นอนในการเกิดแถบดีเอ็นเอ (reproducible) (วิศัย และสมบูรณ์, 2548) Anuntalabhochai และคณะ (2003) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของลิ้นจี่ของไทย โดยใช้เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี พบว่า dendrogram ของแฮตอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ของลิ้นจี่ทั้ง 10 สายพันธุ์ไปในทางเดียวกัน ฐิติพร และคณะ (2556) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซา จำนวน10 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี พบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ และสามารถจำแนกกล้วยทั้ง 10 พันธุ์ออกจากกันได้ นฤมล และคณะ (2555) สามารถจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ทั้ง 8 พันธุ์ ออกจากกันได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์ จาตุรงค์ และคณะ (2556) ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในถั่วเขียว โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแฮตอาร์เอพีดี พบว่า สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ในถั่วเขียวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ

2. **เอเอฟแอลพี** (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism)

เอเอฟแอลพีเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเออีกแบบหนึ่งที่ใช้หลักการของพีซีอาร์ (PCR-based marker) มีการพัฒนาขึ้นโดย Zebeau และ Vos นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ และได้จดสิทธิบัตรในปี ค.ศ. 1993 เอเอฟแอลพีเป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวหรือปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้น เอเอฟแอลพีจึงรวมจุดเด่นหรือความน่าเชื่อถือของอาร์เอฟแอลพี และประสิทธิภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (PCR) เข้าด้วยกัน (Vos *et al*., 1995) สารพันธุกรรมจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีตำแหน่ง

จดจำแตกต่างกัน ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะถูกต่อเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ทราบรหัส (adapter) สองชนิด จากนั้นหากมีการเข้าคู่ที่เฉพาะเจาะจงระหว่างชิ้นดีเอ็นเอรหัสเริ่มต้นจำลองตัว (primer) กับชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ทราบรหัส (adapter) และเบสคัดเลือกในชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายจะทำให้ดีเอ็นเอเหล่านั้นมีการเพิ่มปริมาณขึ้นโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เรียกขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะนี้ว่า selective amplification ต่อจากนั้นจึงนำชิ้นดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มปริมาณนั้นมาแยกด้วยเทคนิค อิเลกโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel electrophoresis แบบเดียวกับที่ใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (sequencing gel) (Vos *et al*., 1995) แถบดีเอ็นเอ (DNA profile) ที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เอเอฟแอลพีไพร์เมอร์ (AFLP primer) คู่หนึ่งๆ นี้เรียกว่าลายพิมพ์เอแอฟแอลพี (AFLP fingerprint) ดังนั้น เอเอฟแอลพี จึงเป็นวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเออีกวิธีหนึ่ง แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างพืชที่ตรวจสอบจะบ่งบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เครื่องหมายเอเอฟแอลพี จัดเป็น high throughput markers ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาแต่ละครั้งสามารถให้เครื่องหมายโมเลกุลได้จำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีลักษณะดีเด่นหลายประการ คือ จำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีอย่างมากมาย (abundance) และครอบคลุมทั้งจีโนม (extensive genome coverage) ในปฏิกิริยาหนึ่งๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multi locus) พร้อมๆ กัน ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาจำนวนน้อย และเมื่อทำการตรวจสอบซ้ำจะให้ผลเหมือนเดิม (reproducibility) นอกจากนี้ยังไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพีมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นระหว่างพืชที่ตรวจสอบ เกิดจากการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะข่ม (dominance) ต่อการไม่มีแถบดีเอ็นเอ (Mackill *et al*., 1996) จากลักษณะเด่นเฉพาะตัวของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี ทำให้มีผู้นิยมนำมาใช้ในการศึกษากันอย่างกว้างขวาง เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) การบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสายพันธุ์พืช (varietal identification) การสร้างแผนที่ยีนในพืชหลายชนิด และเป็นข้อมูลสำคัญในการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืช (plant patent) (Paterson, 1996; Staub *et al*., 1996; Mohan *et al*., 1997; Ridout and Donini, 1999; Katengam, 2002)สำหรับตัวอย่างการใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีในการศึกษายางพารา ได้แก่ การวิเคราะห์หาชิ้นดีเอ็นเอเครื่องหมายสำหรับบ่งชี้สายพันธุ์ หรือคัดเลือกสายพันธุ์ยางต้านทานโรค และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ในยางพารา 25 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยสายพันธุ์

Wickham 15 สายพันธุ์ และยางป่า 10 สายพันธุ์ได้ (Ding *et al*., 2001) Medina และคณะ (2007) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพีใน somatic embryos ของยางพาราพันธุ์ IAN 710 และ IAN 873 และพืชต้นใหม่ที่ได้จากการพัฒนาจากชิ้นส่วนของใบในกระบวนการ somatic embryogenesis พบว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีมีประสิทธิภาพสามารถตรวจสอบความแปรปรวนภายในพืช และพบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของยางพาราพันธุ์ IAN 710 และ IAN 873 มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง เช่นเดียวกับความแปรปรวนระหว่างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและพืชต้นใหม่ ดังนั้นเทคนิคเอเอฟแอลพีมีประสิทธิภาพสามารถตรวจสอบความแปรปรวนภายในพืชได้

3. วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 พันธุ์ RRIT 251 จากแปลงเกษตรกร และเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับยางพาราพันธุ์แนะนำของประเทศไทย โดยอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลแฮตอาร์เอพีดี และเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุพืช

ทำการเก็บรวบรวมใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 บริเวณสวนยางพาราทางภาคใต้ ในพื้นที่จังหวัดสงขลา นครศรีธรรมราช ตรัง และสุราษฎร์ธานี และพันธุ์ยางแนะนำอื่นๆ จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 สายพันธุ์ (clone) จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่างใบยางพาราพันธุ์แนะนำ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ใช้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม

สายพันธุ์	สถานที่เก็บ	จำนวน
AVROS 2037	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
GT 1	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
BPM 1	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
BPM 24	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
PB 235	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
PB 255	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
PB 260	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
RRIC 110	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
RRIT 226	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
RRIT 408	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
Tjir 1	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
CH 50	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	1
RRIM 600	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	3
RRIT 251	แปลงรวบรวมพันธุ์ยาง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี	3
	รวม	18

ตารางที่ 2 (ต่อ) สายพันธุ์ (clones) จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่างใบยางพาราพันธุ์แนะนำ พันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่ใช้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม

สายพันธุ์	สถานที่เก็บ	จำนวน
RRIM 600	แปลงเกษตรกรในอำเภอฉวาง จังหวัดนครศรีธรรมราช (M25-M36)	12
	แปลงเกษตรกรในอำเภอช้างกลาง จังหวัดนครศรีธรรมราช (M37-M45)	9
	แปลงเกษตรกรในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา (M46-M105)	60
	แปลงเกษตรกรในอำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา (M106-M138)	33
	แปลงเกษตรกรในอำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา (M139-M171)	33
	รวม	171
RRIT 251	แปลงเกษตรกรในอำเภอนาโยง จังหวัดตรัง (T1-T9)	9
	แปลงเกษตรกรในอำเภอพระแสง จังหวัดสุราษฎร์ธานี (T10-T21)	12
	รวม	21

หมายเหตุ CH 50 หมายถึง ฉะเชิงเทรา 50

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide)
- β-mercaptoethanol
- PVP-40 (Polyvinyl pyrrolidone)
- NaCl (Sodium chloride)
- Na_2EDTA (Disodium ethylene diaminetetraacetate)
- Tris-HCl pH 8.0
- Chloroform
- Isopropanol
- TE buffer
- Ethanol

- RNase

1.2.2 สารเคมีสำหรับใช้ทำอิเลคโทรโฟรีซิส

- LE agarose (FMC Bioproduct, USA)
- Seakem agarose (FMC Bioproduct, USA)
- Glacial acetic acid
- Boric acid
- Tris-base
- Ethidium bromide
- Loading buffer
- Lamda DNA
- 100 bp DNA Ladder (Operon, USA)
- Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis
- Acrylamide : bis-acrylamide solution (29:1)
- Bind silane
- Repel silane
- Formamind
- Formaldehyde
- Urea
- TEMED (N,N,N',N' – tetramethethyenediamine)
- Ammoniuim persulfate
- Sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)
- Sodium carbonate (Na_2CO_3)
- Silver nitrate ($AgNO_3$)

1.2.3 สารเคมีที่ใช้ทำพีซีอาร์

- dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- ไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี จำนวน 11 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPAD-01, OPAD-10, OPAD-12, OPB-12, OPB-17, OPC-05, OPN-08, OPN-16, OPR-02, OPR-11 และ OPZ-4

- ไพรเมอร์สำหรับเทคนิคเอเอฟแอลพี จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ E-AGG/P-GGG, E-AAG/P-GAC, E-ACG/P-GAC และ E-ACG/P-GCA
- $MgCl_2$
- 10X *Taq* buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase B (Promega, USA)
- *Eco*RI และ *Pst*I

1.3 อุปกรณ์

1.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างใบพืช

- ถุงพลาสติก
- กรรไกร
- กล่องโฟม
- ปากกาเขียนเครื่องแก้ว

1.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเลคโทรโฟรีซิส และการทำพีซีอาร์

- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง
- เครื่องไมโครเซนติฟิวส์
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
- เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ
- แท่งแม่เหล็ก
- ปิเปตปรับปริมาตร
- เครื่องเขย่า
- หม้อนึ่งความดันไอ
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส
- เครื่องพีซีอาร์
- โกร่งบดตัวอย่าง
- หลอดเอฟเพนดอร์ฟ

- ไมโครเวฟ
- ตู้ดูดควัน
- UV Documentation
- Tip
- Gel Documentation
- น้ำแข็ง และกระติกน้ำแข็ง
- เครื่องแก้ว กระบอกตวง และขวดต่างๆ

2. วิธีการ

2.1 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแฮตอาร์เอพีดี

2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 และใบยางพาราพันธุ์ต่างๆ จากแปลงทดลองของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร เป็นตัวอย่างอ้างอิงของพันธุ์ยาง จำนวน 14 พันธุ์ ได้แก่ AVROS 2037, BPM 1, BPM 24, GT 1, PB 235, PB 255, PB 260, RRIC 110, RRIT 226, RRIT 408, Tjir 1, CH 50, RRIM 600 และ RRIT 251 (ตารางที่ 2)

2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบยางพาราระยะเพสลาด โดยใช้สารละลาย CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromind) ซึ่งดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1990) โดยใช้ตัวอย่างใบยางพาราประมาณ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักสด มาล้างทำความสะอาด ซับให้แห้ง บดใน CTAB buffer (PVP-40, NaCl, EDTA 0.5 M pH 8.0, CTAB 2%) ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2% ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในโกร่งให้ละเอียด จากนั้นใส่ในหลอดแอฟเพนดอร์ฟ เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะได้สารละลายที่แยกชั้นใส ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดแอฟเพนดอร์ฟใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล ความเข้มข้น 70% ที่ผ่านการแช่เย็น 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 70 ไมโครลิตร [Tris-HCl (pH 7.5)

10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA (pH 7.0) 1 มิลลิโมลาร์] ที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.1.3 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรส (LE Agarose, Promega, USA) เข้มข้น 1.0 % แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE buffer (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เอทิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ด้วยเครื่อง Gel documentation

2.1.4 การวิเคราะห์แฮตอาร์เอพีดี

ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างของยางพาราโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มซึ่งมีลำดับเบสยาว 10 เบสที่มีผู้ศึกษามาก่อนในยางพารา ประกอบด้วยไพรเมอร์ 11 ชนิดที่ ได้แก่ OPAD-01, OPAD-10, OPAD-12, OPB-12, OPB-17, OPC-05, OPN-08, OPN-16, OPR-02, OPR-11 และ OPZ-4 จาก Operon, USA (กรกช, 2550) นอกจากนั้นจะทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มเติมอีกจำนวนหนึ่งเพื่อประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1X PCR buffer ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 3 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 0.5 ยูนิต โดยเติมองค์ประกอบต่างๆ ลงในหลอด microcentrifuge tube แล้วจึงนำไปเข้าเครื่อง PCR (Thermal cycler) โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยการทำ electrophoresis

2.2 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี

2.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดเลือกดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราจากสวนเกษตรกรที่ให้แถบดีเอ็นเอไม่แตกต่าง และแตกต่างกับพันธุ์เปรียบเทียบของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใต้วอย่างยางพารา

พันธุ์ RRIM 600 จำนวน 1 และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ จากตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIT 251 อย่างละ 1 ตัวอย่าง และยางพาราพันธุ์แนะนำจำนวน 14 สายพันธุ์ มาเติมเอนไซม์ RNase 5 unit นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2.3 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ และปริมาณดีเอ็นเอ

2.2.3.1 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของดีเอ็น

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอนำดีเอ็นเอ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยเทียบอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เปรียบเทียบอัตราส่วนซึ่งดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ ค่าอัตราส่วน OD_{260} ต่อ OD_{280} ควรจะอยู่ในระหว่าง 1.70-1.90 ค่าที่ดีที่สุดคือ 1.80 (Rogers and Bendich, 1988)

2.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอ

เนื่องจากเบสพิวรีนและไพริมิดีนที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอนั้น สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้ดีที่สุดอยู่ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) จึงนำค่า OD_{260} นำมาใช้ในการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยค่ามาตรฐาน 1 OD_{260} มีค่าเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.3.3 การวิเคราะห์สภาพที่สมบูรณ์ของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรส (LE Agarose, Promega, USA) เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE buffer (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation

2.2.4 การวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

ทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Vos และคณะ (1995) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพารา

2.2.4.1 การย่อยดีเอ็นเอ (DNA digestion)

นำดีเอ็นเอของยางพาราแต่ละสายพันธุ์ เจือจางให้ได้ความเข้มข้นสายพันธุ์ละ 500 นาโนกรัม ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Pst*I

เข้มข้นอย่างละ 5 Units, NE Buffer และ BSA (promega) ผสมให้เข้ากันให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 30 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.2.4.2 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ adeptor (DNA ligation)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Pst*I ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ *Eco*RI adapter 14 พิโคโมล, *Pst*I adapter 140 พิโคโมล, T4 buffer, T4 DNA ligase 200 units ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณ ด้วย *Eco*RI adapter และ *Pst*I adapter

2.2.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

2.2.4.3.1 preselective PCR เป็นการเพิ่มปริมาณโดยการใช้ preselective primer ที่มีเบสคัดเลือก 1 เบส ที่ปลาย 3' โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ adaptor แล้ว ผสมกับ E-A ไพรเมอร์ 5 พิโคโมล, P-G ไพรเมอร์ 50 พิโคโมล , 10 มิลลิโมลาร์ dNTPs, 1X buffer, Taq DNA polymerase 0.5 units ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR โดยใช้โปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบและตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาทีจำนวน 40 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.2.4.3.2 selective PCR เป็นการนำผลผลิตที่ได้จากขั้นแรก (preselective PCR) มาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ selective primer ที่มีการเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' ซึ่งเพิ่มโอกาสในการคัดเลือก จำนวน 3 เบส โดยเจือจางดีเอ็นเอจาก preselective amplification product ลง 10 เท่า ใช้ selective primer 9 คู่ ซึ่งไพรเมอร์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม touch down PCR ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และลดอุณหภูมิขั้น annealing ลงรอบละ 1 องศาเซลเซียส จำนวนทั้งหมด 4 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 36 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.2.5 การแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสใน denaturation polyacrylamide gel

2.2.5.1 การเตรียมกระจกโดยใช้กระจก 2 แผ่น โดยนำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ให้สะอาดทั้ง 2

แผ่น แล้วเช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane 1 ไมโครลิตร ผสมกับ acidic ethanol (0.5 เปอร์เซ็นต์ glacial acetic acid ใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol) 999 ไมโครลิตร ใช้กระดาษที่ไม่เป็นขนเช็ดไปในทางเดียวกันจนทั่วทั้งแผ่น ทิ้งให้แห้งนาน 5 นาที แล้วเช็ดด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก สำหรับกระจกแผ่นหน้าใช้ repel silane 1 มิลลิลิตร หยดลงบนกระจกแผ่นสั้น ใช้กระดาษเช็ดกระจกไปทางเดียวกัน ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุดโดยหันแผ่นที่เช็ดด้วย bind silane และ repel silane เข้าหากันโดยวาง spacer ซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกแถบยาวเท่ากับกระจก และมีความหนาเท่ากับเจลที่ต้องการ ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง ใช้กระดาษกาวปิดกระจกด้านท้าย และด้านข้างทั้ง 2 ด้านแล้วใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่ติดกับที่เพื่อป้องกันการไหลซึมของเจล

2.2.5.2 การเตรียมเจล denaturation polyacrylamide เข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมยูเรีย 36 กรัม 40 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide (39 : 1 = acrylamide : bis acrylamide) 10 มิลลิลิตร 10X TBE 10 มิลลิลิตร และ น้ำ deionized 19 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้ยูเรียละลายหมด จากนั้นจึงเติม 10 เปอร์เซ็นต์ ammonium persulfate 500 ไมโครลิตร และ TEMED 40 ไมโครลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว จากนั้นรีบเทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ระวังอย่าให้เจลเป็นฟองอากาศ แล้วเสียบหวีด้านบนเพื่อให้เกิดช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง ปล่อยให้เจลแข็งประมาณ 20 นาที

2.2.5.3 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยการทำอิเลคโตรโฟรีซีสใน polyacrylamide gel โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอผสมกับ loading dye (98 เปอร์เซ็นต์ formamide, 10 มิลลิโมลาร์ EDTA, 0.1 เปอร์เซ็นต์ bromophenol blue, 0.1 เปอร์เซ็นต์ xylene cyanol) อัตราส่วน 2 :1 นำไป heat ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว แล้วทำอิเลคโตรโฟรีซีส ใน 0.5x TBE บัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส ค่าคงที่กระแสไฟฟ้า 200 วัตต์ ความต่างศักย์ 500 โวลต์ สังเกตสีของ bromophenol blue อยู่บริเวณด้านล่าง (3 ใน 4 ส่วน) ของแผ่นกระจกแล้วหยุดกระแสไฟฟ้าซึ่งใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง

2.2.5.4 การย้อมแถบดีเอ็นเอ ด้วยวิธี silver staining ที่ดัดแปลงจาก Bassam และคณะ (1991) โดยแช่เจลใน 10 เปอร์เซ็นต์ acetic acid นาน 30 นาที เขย่าเบาๆ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 30 นาที เขย่าเบาๆ เปลี่ยนน้ำแล้วเขย่าเพิ่มอีก 5 นาที ย้อมเจลในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำ deionized อย่างรวดเร็ว ประมาณ 5 วินาที แช่เจลในสารละลาย develop ที่ประกอบด้วย Na_2CO_3 25 กรัม, น้ำ deionized 1,000 มิลลิลิตร, 37

เปอร์เซ็นต์ formaldehyde 624 ไมโครลิตร, 5 เปอร์เซ็นต์ sodium thiosulfate 250 ไมโครลิตร อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เขย่าเบาๆ จนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน แช่เจลใน 10 เปอร์เซ็นต์ acetic acid เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยานำกระจกตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบให้แห้ง

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์โดยแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอให้ตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 1 และตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0 โดยคิดเฉพาะแถบ DNA ที่มีความชัดเจน และเพิ่มปริมาณได้สม่ำเสมอเมื่อมีการทำพีซีอาร์ซ้ำ วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version-2.1. (NTSYS version 2.1) (Rohlf, 2002)

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแฮตอาร์เอพีดี

1.1 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแฮตอาร์เอพีดี

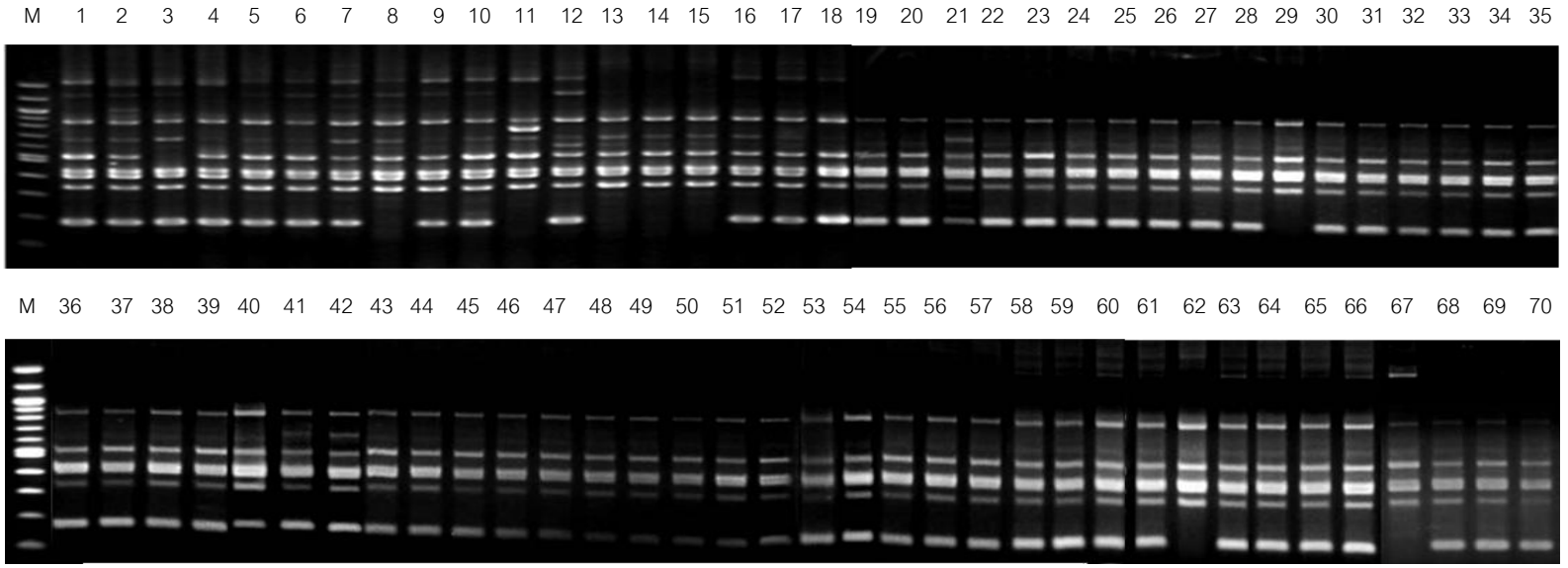
1.1.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างของยางพาราพันธุ์แนะนำโดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์

จากการทดสอบหาไพรเมอร์จำนวน 11 ชนิด ที่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ระหว่างยางพาราพันธุ์แนะนำจำนวน 14 สายพันธุ์ ได้แก่ AVROS 2037, BPM 1, BPM 24, GT 1, PB 235, PB 255, PB 260, RRIC 110, RRIT 226, RRIT 408, Tjir 1, CH 50, RRIM 600 และ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี พบว่า มีไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุดจำนวน 6 ไพรเมอร์ คือ OPAD-01, OPAD-10, OPB-12, OPB-17, OPC-05 และ OPN-08 เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่สุ่มมาทั้งหมดจากแหล่งต่างๆ จำนวน 171 ตัวอย่าง และตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จำนวน 21 ตัวอย่าง กับยางพาราพันธุ์เปรียบเทียบ จำนวน 14 สายพันธุ์ จากการทดสอบพบว่า ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 74 แถบ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 52 แถบ คิดเป็น 70.27 เปอร์เซ็นต์ และแถบที่ไม่ให้ความแตกต่างจำนวน 22 แถบ คิดเป็น 29.73 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ OPB-17 เป็นไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด 18 แถบ และให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างสูงสุด 17 แถบ คิดเป็น 94.44 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ OPN-08 ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างต่ำสุด 4 แถบ คิดเป็น 44.44 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงชนิดของไพรเมอร์ ลำดับเบส และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์จากดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600, RRIT 251 และพันธุ์ยางแนะนำจากการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

Primers	Sequences 5' to 3'	Amplified fragments	Monomorphic fragments	Polymorphic fragments	Polymorphism (%)
OPAD-01	CAAAGGGCGG	14	3	11	78.57
OPAD-10	AAGAGGCCAA	12	5	7	58.33
OPB-17	AGGGAACGAG	18	1	17	94.44
OPB-12	CCTTGACGCA	9	3	6	66.67
OPC-05	GATGACCGCC	12	5	7	58.33
OPN-08	ACCTCAGCTC	9	5	4	44.44
Total		74	22	52	70.27

รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำแฮตอาร์เอพีดีพีซีอาร์แต่ละไพรเมอร์ มีความแตกต่างกันทั้งภายในสายพันธุ์เดียวกัน และระหว่างสายพันธุ์ OPAD-01 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 14 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 11 แถบ (ภาพที่ 3) OPAD-10 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 12 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 7 แถบ (ภาพที่ 4) OPB-12 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 9 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 6 แถบ (ภาพที่ 5) OPB-17 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 18 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 17 แถบ (ภาพที่ 6) OPC-05 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 12 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 7 แถบ (ภาพที่ 7) OPN-08 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 9 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 4 แถบ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 3 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAD-01

M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

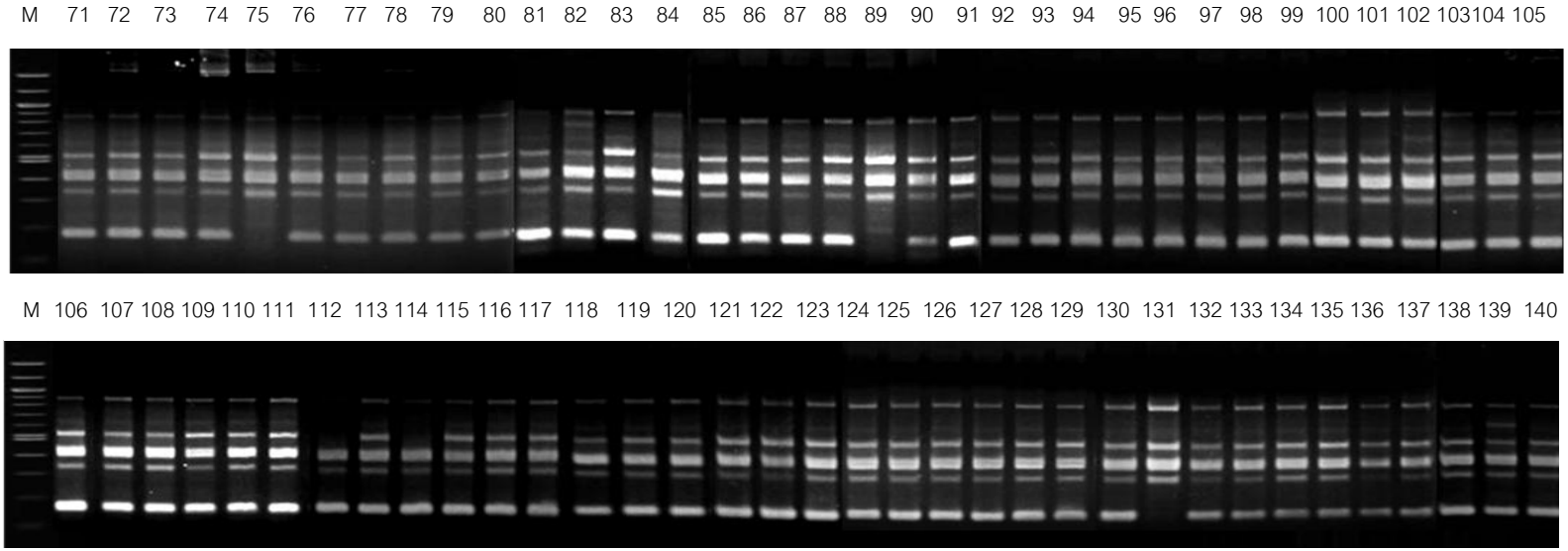
Lane 1-18: พันธุ์แนะนำจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี (1 = AVROS 2037, 2 = BPM 1, 3 = BPM 24, 4 = GT 1, 5 = PB 235, 6 = PB 255, 7 = PB 260, 8 = RRIC 110, 9 = RRIT 226, 10 = RRIT 408, 11 = Tjir 1, 12 = CH 50 , 13-15 = RRIT 251, 16-18 = RRIM 600)

Lane 19-42: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 43-54: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 55-63: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ช้างกลาง จ.นครศรีธรรมราช)

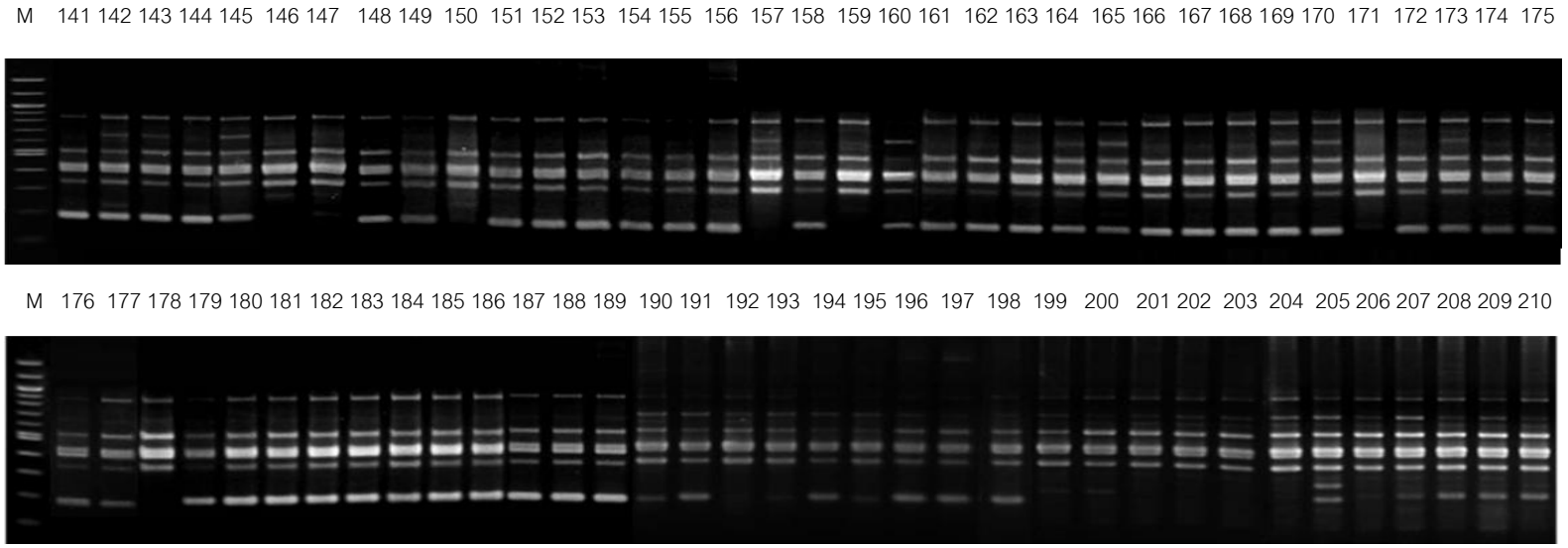
Lane 64-70: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)



ภาพที่ 3 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAD-01 M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 71-102: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา) Lane 103-123: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ฉลุง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)

Lane 124-140: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)



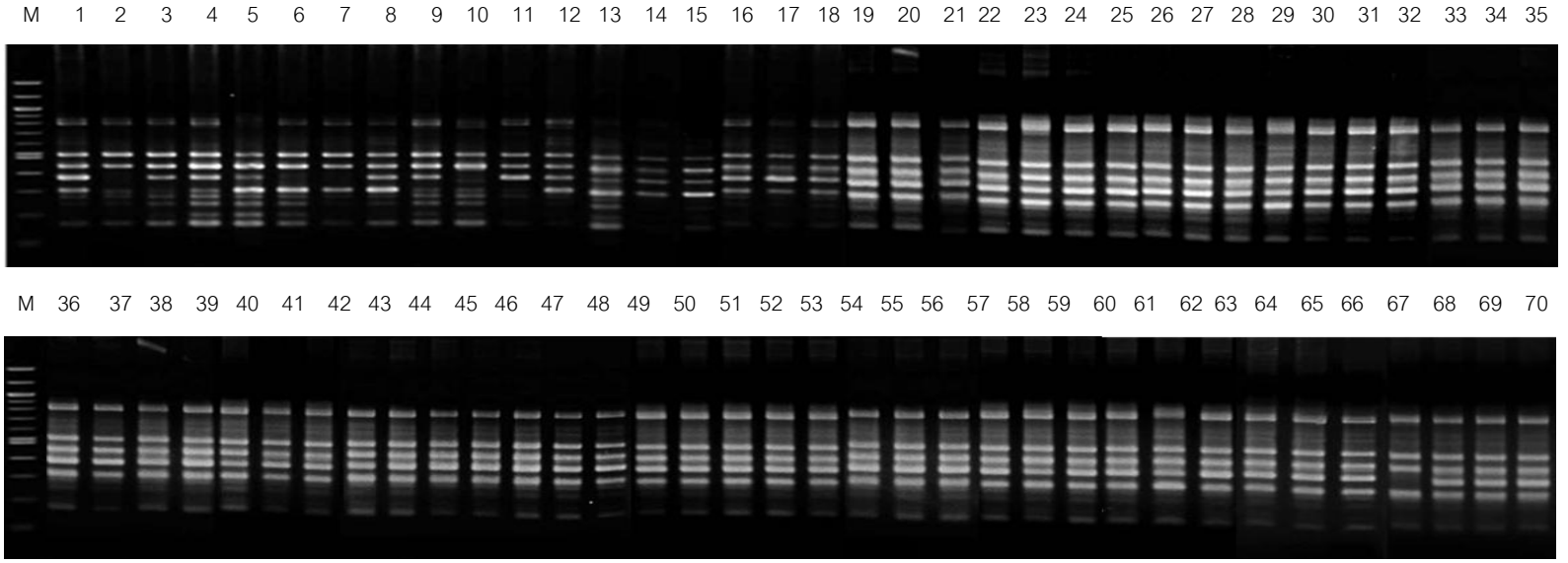
ภาพที่ 3 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAD-01 M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 141-156: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)

Lane 157-189: พันธุ์ RRIM 600 (อ.จะนะ จ.สงขลา)

Lane 190-198: พันธุ์ RRIT 251(จ.ตรัง)

Lane 199-210: พันธุ์ RRIT 251 (จ.สุราษฎร์ธานี)



ภาพที่ 4 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAD-10

M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

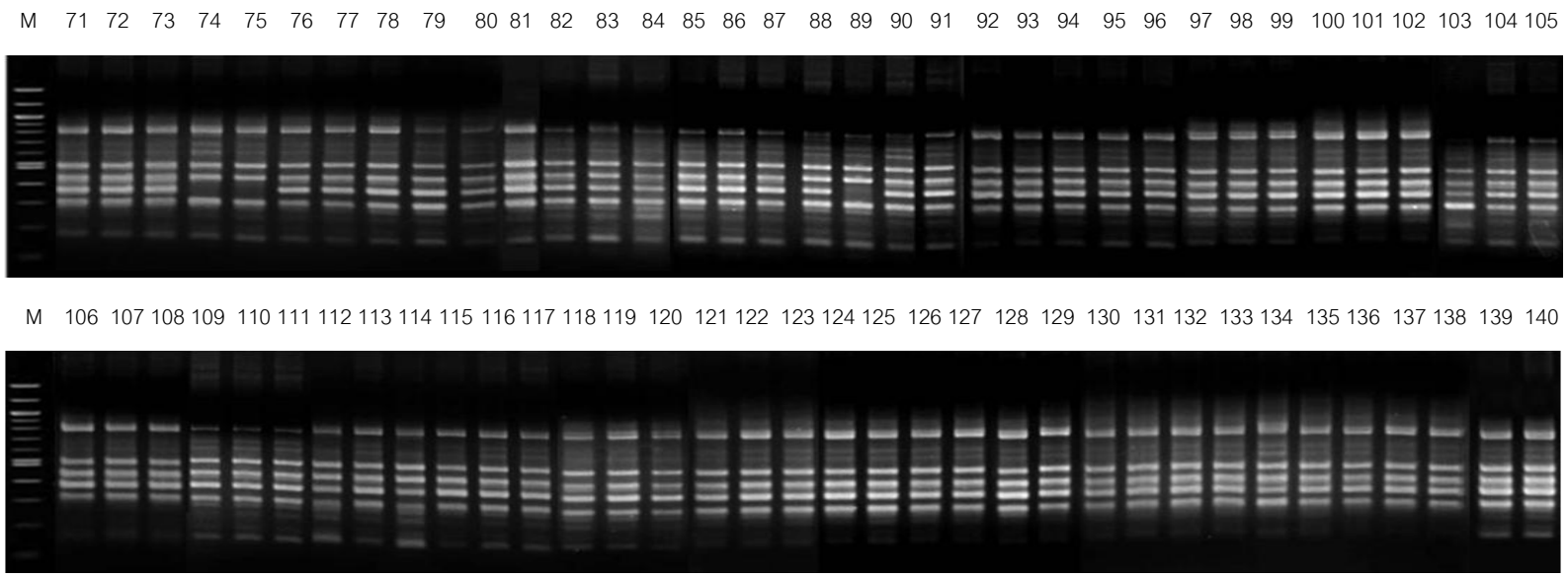
Lane 1-18: พันธุ์แนะนำจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี (1 = AVROS 2037, 2 = BPM 1, 3 = BPM 24, 4 = GT 1, 5 = PB 235, 6 = PB 255, 7 = PB 260, 8 = RRIC 110, 9 = RRIT 226, 10 = RRIT 408, 11 = Tjir 1, 12 = CH 50 , 13-15 = RRIT 251, 16-18 = RRIM 600)

Lane 19-42: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 43-54: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 55-63: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ช้างกลาง จ.นครศรีธรรมราช)

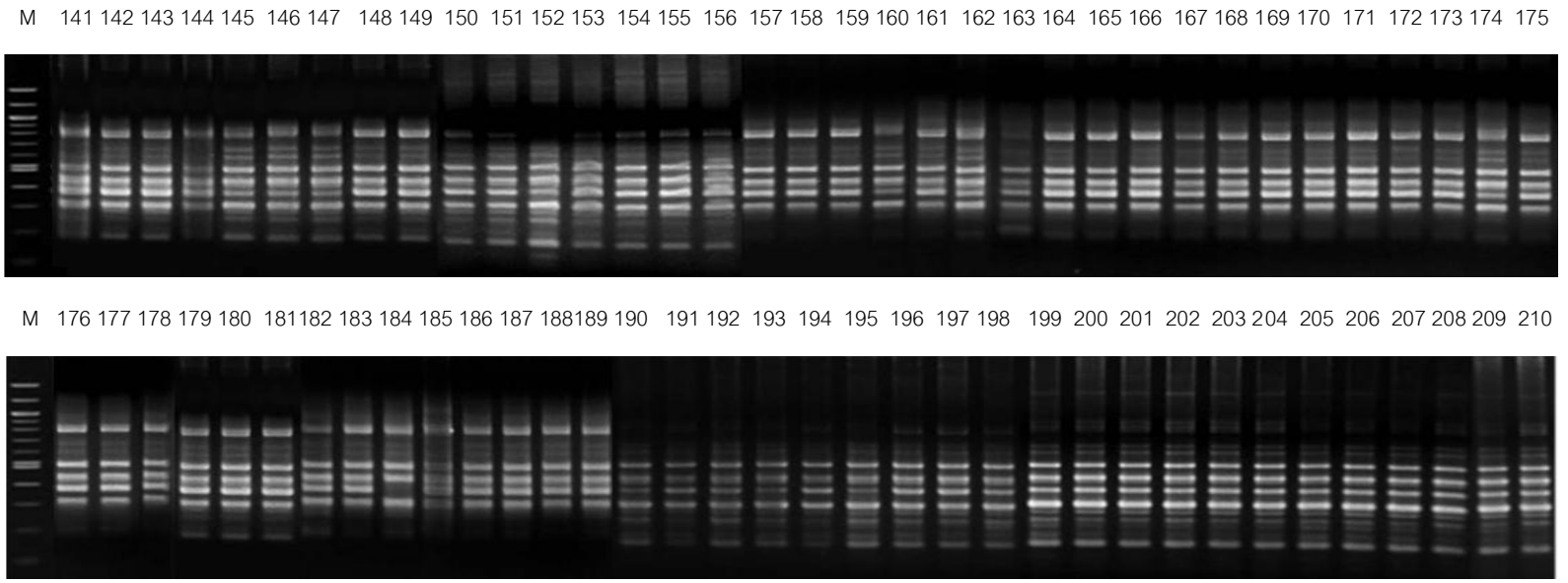
Lane 64-70: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)



ภาพที่ 4 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAD-01 M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 71-102: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา) Lane 103-123: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ฉลุง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)

Lane 124-140: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)



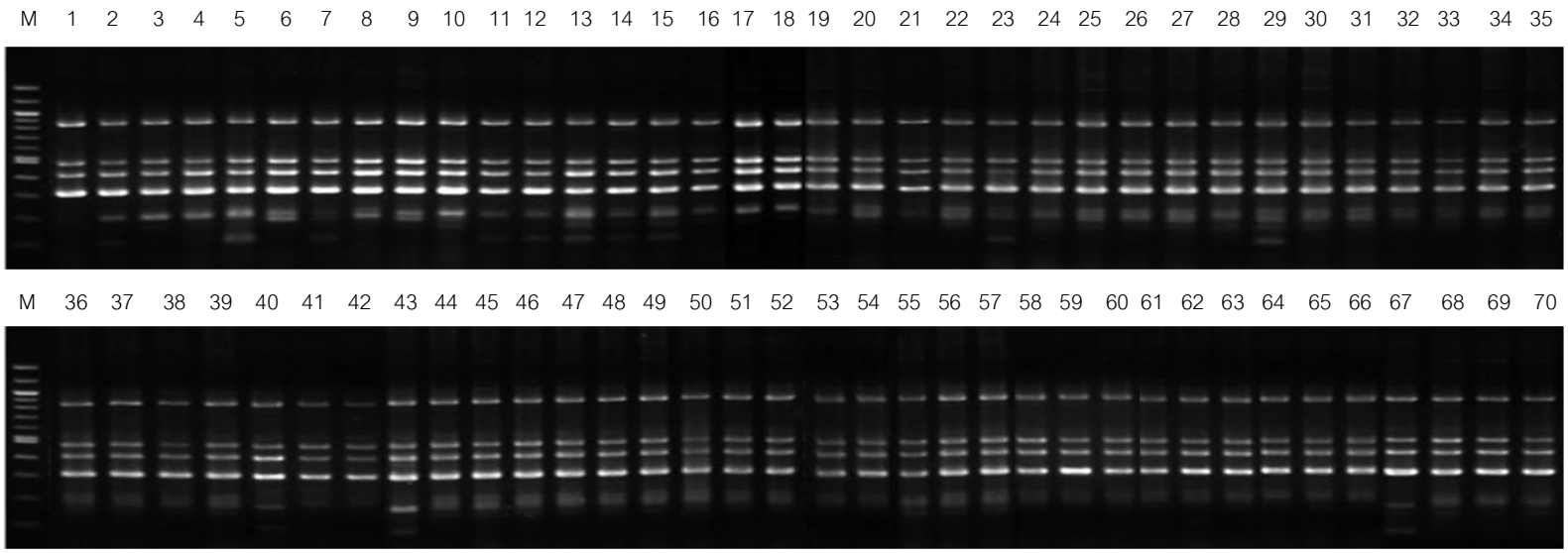
ภาพที่ 4 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAD-10 M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 141-156: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)

Lane 157-189: พันธุ์ RRIM 600 (อ.จะนะ จ.สงขลา)

Lane 190-198: พันธุ์ RRIT 251(จ.ตรัง)

Lane 199-210: พันธุ์ RRIT 251 (จ.สุราษฎร์ธานี)



ภาพที่ 5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-12

M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

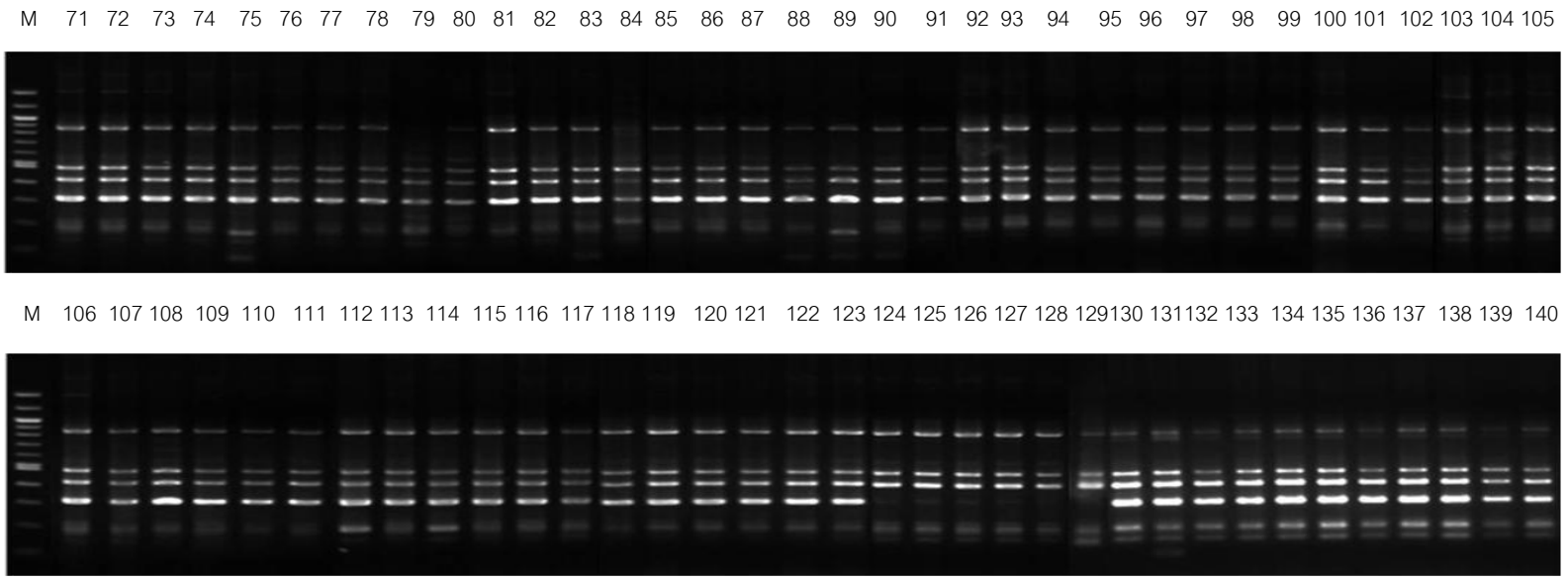
Lane 1-18: พันธุ์แนะนำจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี (1 = AVROS 2037, 2 = BPM 1, 3 = BPM 24, 4 = GT 1, 5 = PB 235, 6 = PB 255, 7 = PB 260, 8 = RRIC 110, 9 = RRIT 226, 10 = RRIT 408, 11 = Tjir 1, 12 = CH 50 , 13-15 = RRIT 251, 16-18 = RRIM 600)

Lane 19-42: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 43-54: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 55-63: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ช้างกลาง จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 64-70: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)

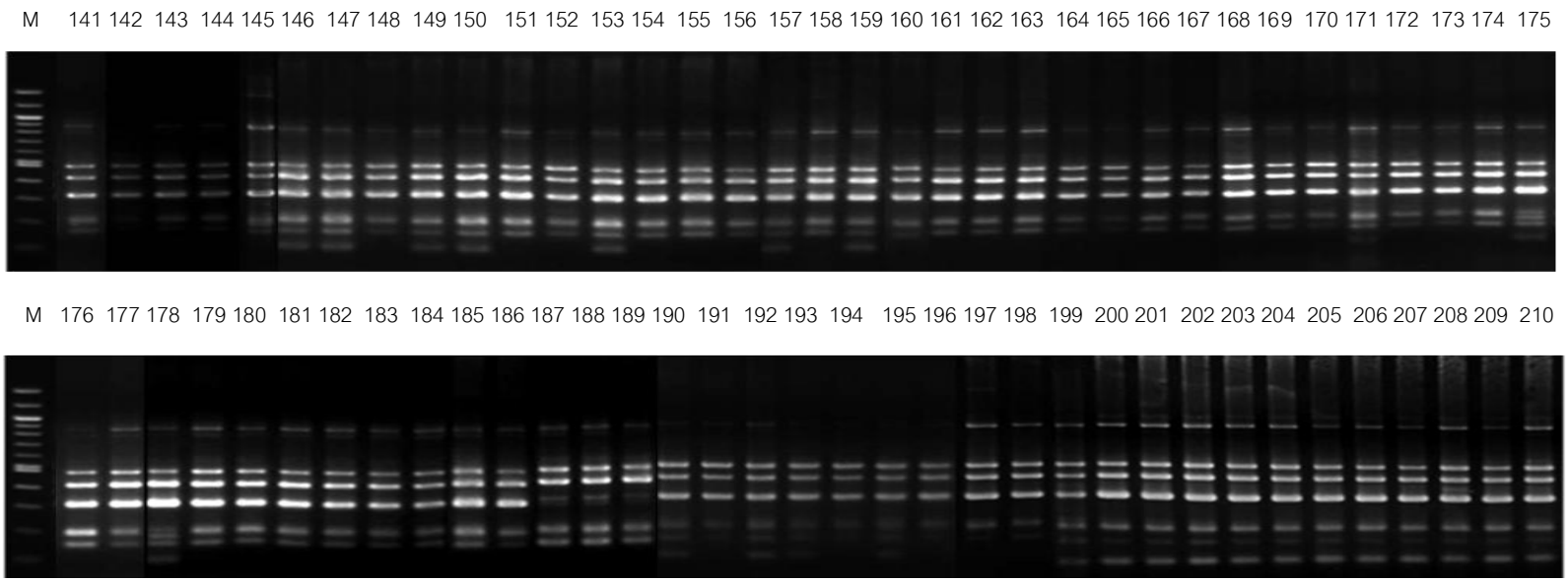


ภาพที่ 5 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-12

M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 71-102: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา) Lane 103-123: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ฉลุง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)

Lane 124-140: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)



ภาพที่ 5 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-12

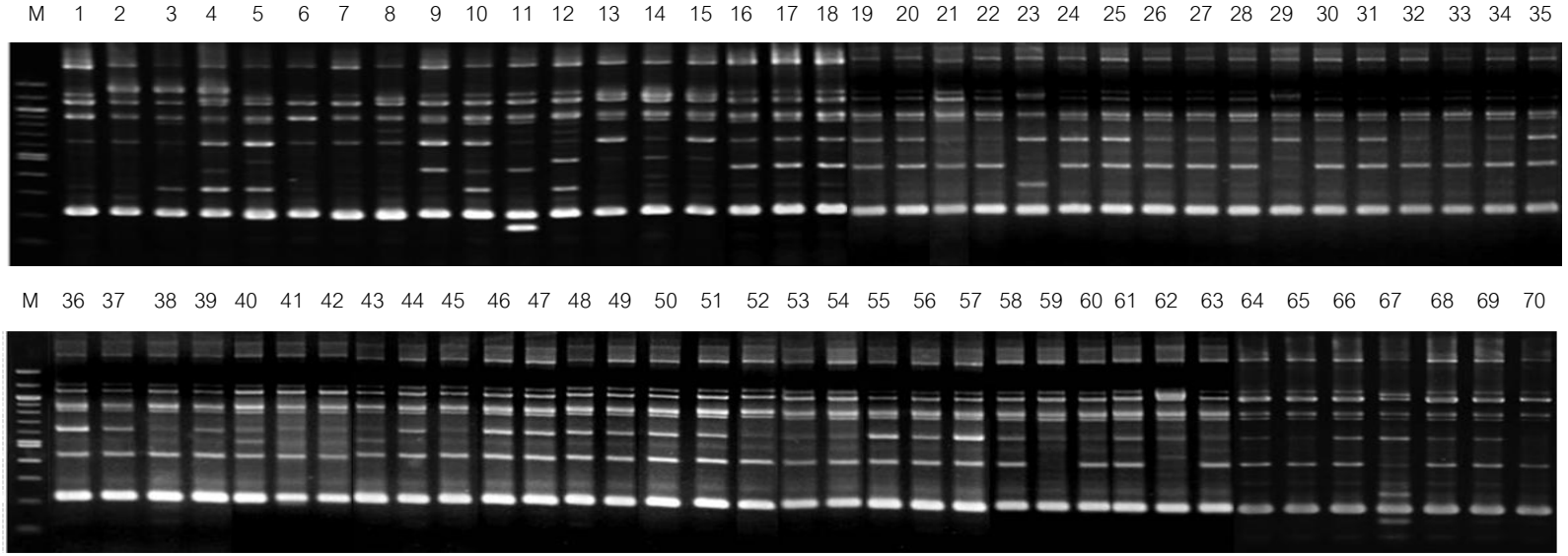
M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 141-156: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)

Lane 157-189: พันธุ์ RRIM 600 (อ.จะนะ จ.สงขลา)

Lane 190-198: พันธุ์ RRIT 251(จ.ตรัง)

Lane 199-210: พันธุ์ RRIT 251 (จ.สุราษฎร์ธานี)



ภาพที่ 6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-17 M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

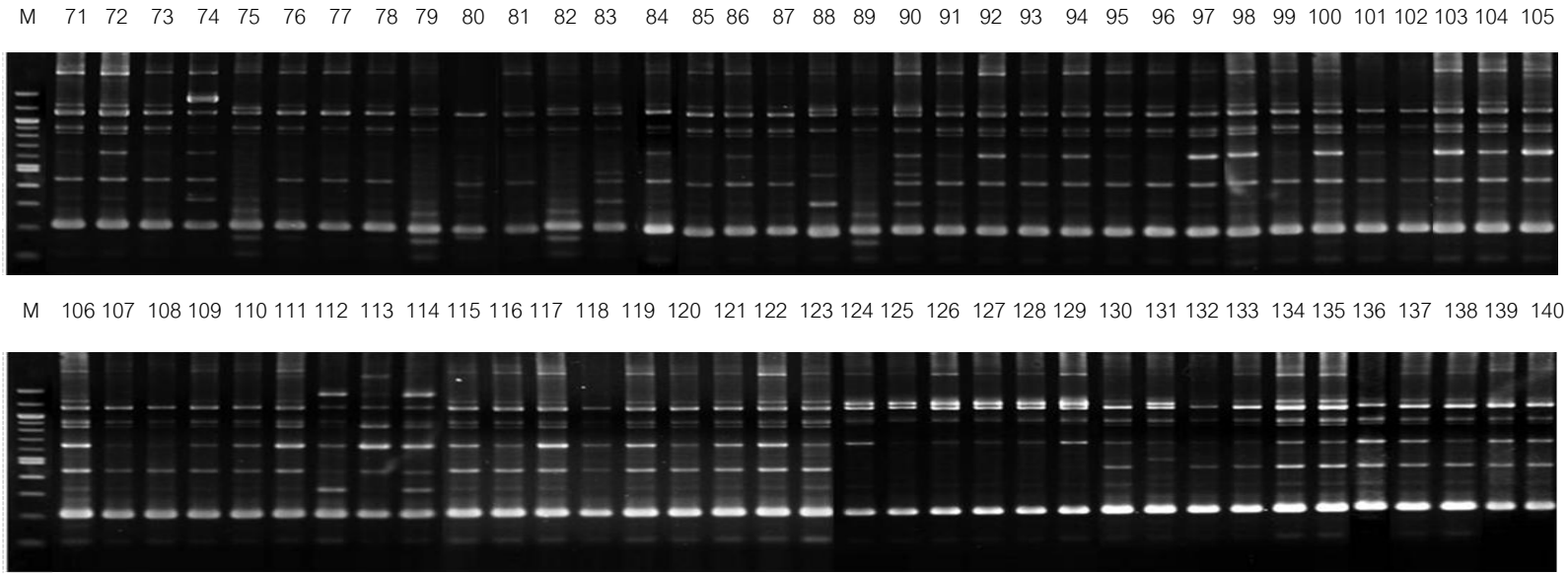
Lane 1-18: พันธุ์แนะนำจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี (1 = AVROS 2037, 2 = BPM 1, 3 = BPM 24, 4 = GT 1, 5 = PB 235, 6 = PB 255, 7 = PB 260, 8 = RRIC 110, 9 = RRIT 226, 10 = RRIT 408, 11 = Tjir 1, 12 = CH 50 , 13-15 = RRIT 251, 16-18 = RRIM 600)

Lane 19-42: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 43-54: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 55-63: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ช้างกลาง จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 64-70: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)

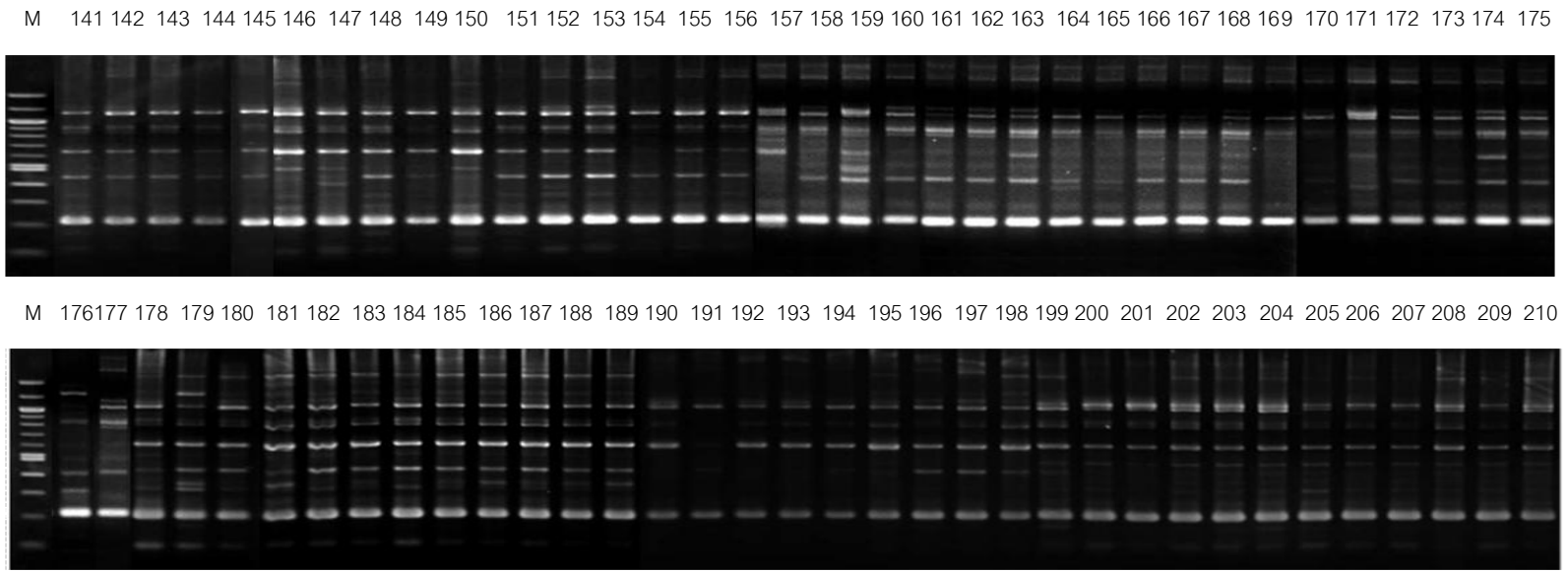


ภาพที่ 6 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-17

M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 71-102: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา) Lane 103-123: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ฉลุง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)

Lane 124-140: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)



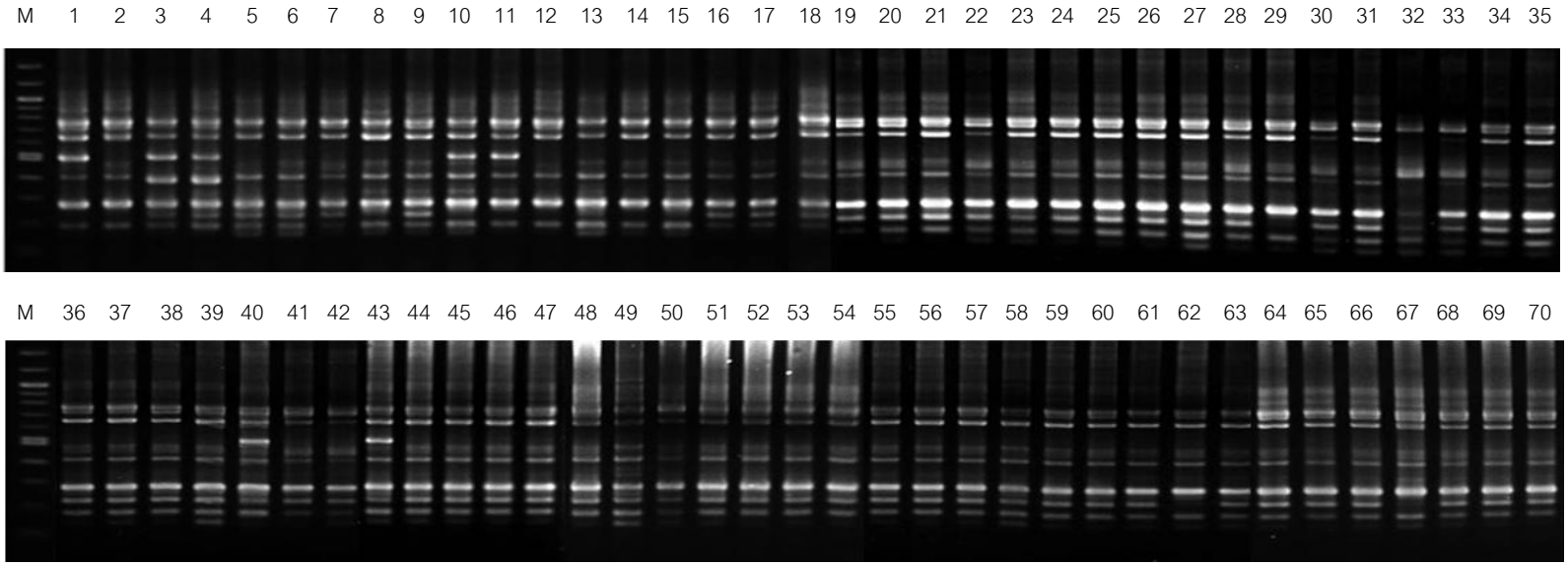
ภาพที่ 6 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-17 คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 141-156: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)

Lane 157-189: พันธุ์ RRIM 600 (อ.จะนะ จ.สงขลา)

Lane 190-198: พันธุ์ RRIT 251(จ.ตรัง)

Lane 199-210: พันธุ์ RRIT 251 (จ.สุราษฎร์ธานี)



ภาพที่ 7 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPC-05 M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

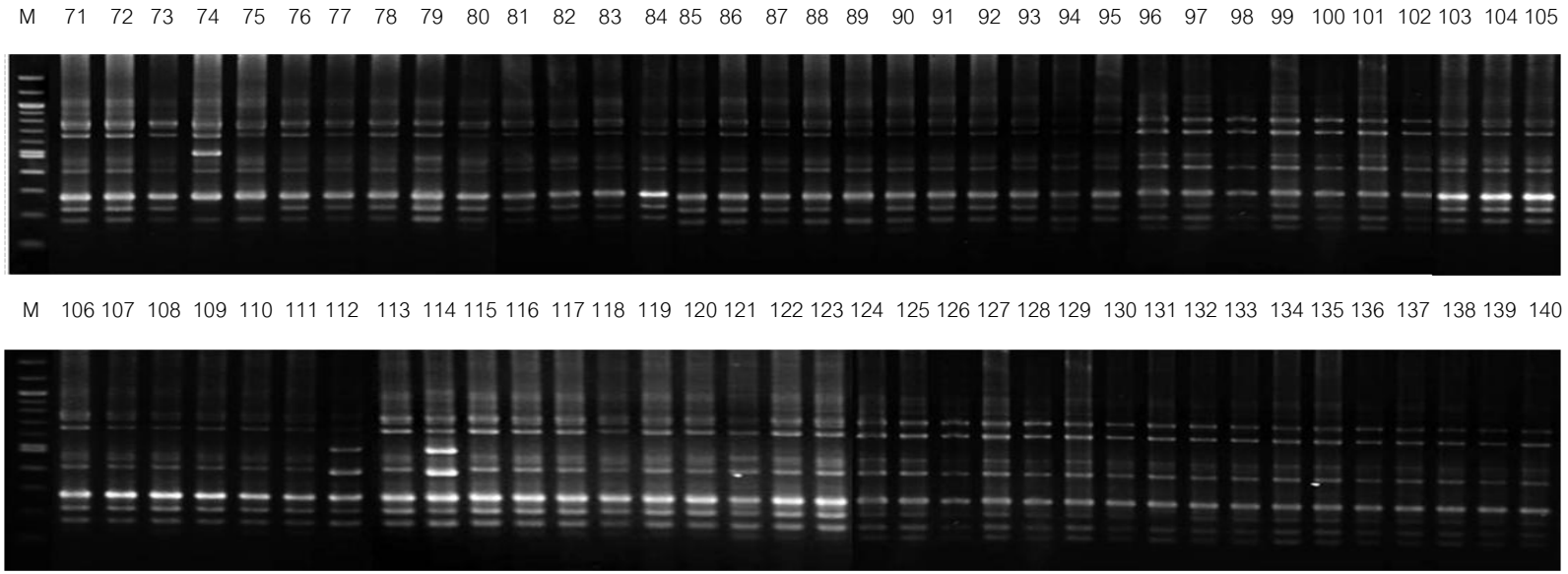
Lane 1-18: พันธุ์แนะนำจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี (1 = AVROS 2037, 2 = BPM 1, 3 = BPM 24, 4 = GT 1, 5 = PB 235, 6 = PB 255, 7 = PB 260, 8 = RRIC 110, 9 = RRIT 226, 10 = RRIT 408, 11 = Tjir 1, 12 = CH 50 , 13-15 = RRIT 251, 16-18 = RRIM 600)

Lane 19-42: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 43-54: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 55-63: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ช้างกลาง จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 64-70: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)



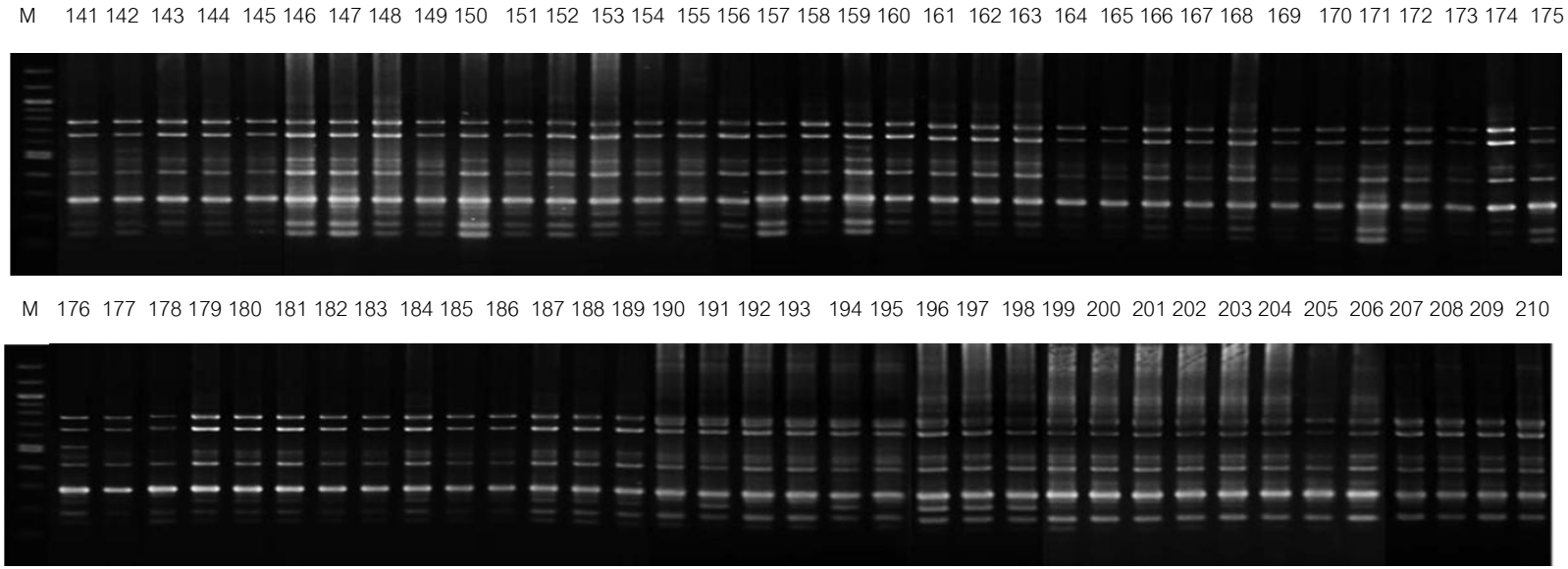
ภาพที่ 7 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPC-05

M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 71-102: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)

Lane 103-123: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ฉลุง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)

Lane 124-140: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)



ภาพที่ 7 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPC-05

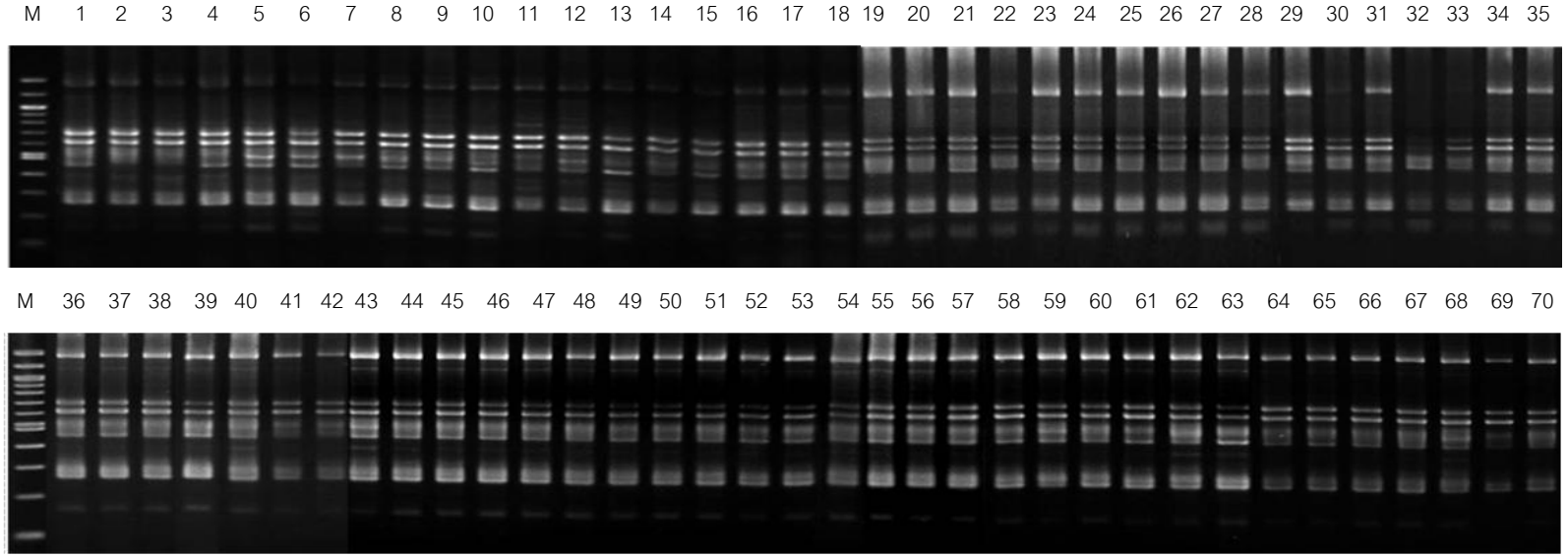
M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 141-156: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)

Lane 157-189: พันธุ์ RRIM 600 (อ.จะนะ จ.สงขลา)

Lane 190-198: พันธุ์ RRIT 251(จ.ตรัง)

Lane 199-210: พันธุ์ RRIT 251 (จ.สุราษฎร์ธานี)



ภาพที่ 8 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPN-08 M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

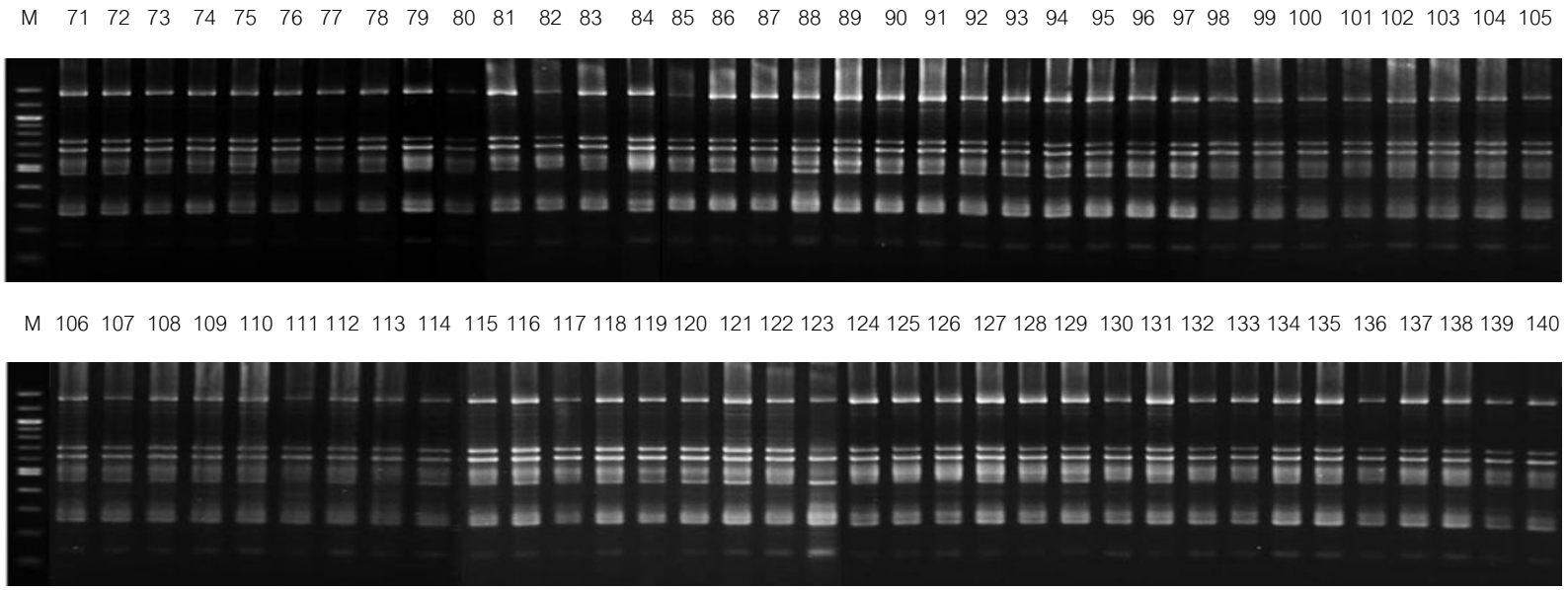
Lane 1-18: พันธุ์แนะนำจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี (1 = AVROS 2037, 2 = BPM 1, 3 = BPM 24, 4 = GT 1, 5 = PB 235, 6 = PB 255, 7 = PB 260, 8 = RRIC 110, 9 = RRIT 226, 10 = RRIT 408, 11 = Tjir 1, 12 = CH 50 , 13-15 = RRIT 251, 16-18 = RRIM 600)

Lane 19-42: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 43-54: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 55-63: พันธุ์ RRIM 600 (อ.ช้างกลาง จ.นครศรีธรรมราช)

Lane 64-70: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)

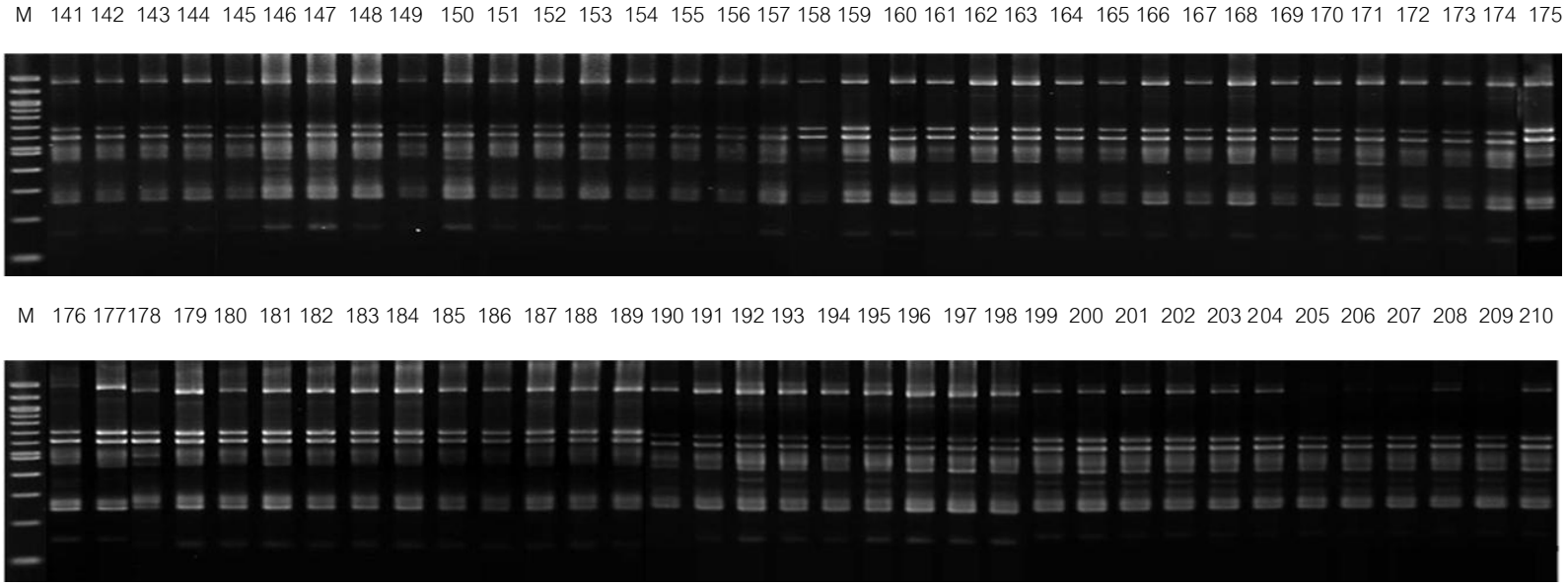


ภาพที่ 8 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPN-08

M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 71-102: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา) Lane 103-123: พันธุ์ RRIM 600 (ต.ฉลุง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)

Lane 124-140: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)



ภาพที่ 8 (ต่อ) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และยางพาราจากแปลงเกษตรกร จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPN-08 คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

Lane 141-156: พันธุ์ RRIM 600 (อ.นาทวี จ.สงขลา)

Lane 157-189: พันธุ์ RRIM 600 (อ.จะนะ จ.สงขลา)

Lane 190-198: พันธุ์ RRIT 251(จ.ตรัง)

Lane 199-210: พันธุ์ RRIT 251 (จ.สุราษฎร์ธานี)

1.1.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยางพารา จากการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

1.1.2.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 จากแปลงเกษตรกร ร่วมกับพันธุ์ยางแนะนำ

จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 171 ตัวอย่าง และตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จำนวน 21 ตัวอย่าง ที่เก็บจากแหล่งปลูกยางพาราในภาคใต้ของประเทศไทย กับยางพันธุ์แนะนำจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จำนวน 14 พันธุ์ โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี นำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis หาค่า similarity coefficient โดยใช้โปรแกรม NTSYS

ผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่า มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.68-1.00 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.92 โดยที่ยางพาราพันธุ์ PB 255 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับยางพาราพันธุ์ PB 260 ซึ่งมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.93 ขณะที่ยางพาราพันธุ์ RRIT 408 มีความห่างไกลทางพันธุกรรมสูงสุดกับยางพาราพันธุ์ GT 1 และ RRIC 110 โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.70 เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 กับยางพาราพันธุ์แนะนำ พบว่ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับยางพาราพันธุ์ RRIT 226 มากที่สุด โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.88 และมีความห่างไกลทางพันธุกรรมกับยางพาราพันธุ์ RRIT 408 มากที่สุด โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.76 ขณะที่ยางพาราพันธุ์ RRIT 251 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับยางพันธุ์ PB 235 มากที่สุด โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.89 และมีความห่างไกลทางพันธุกรรมกับยางพันธุ์ RRIT 408 มากที่สุด โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.74 จากเดนโดรแกรมสามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเป็น 8 กลุ่ม (ภาพที่ 9) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มี 4 ตัวอย่าง ประกอบด้วย AVROS 2037, BPM 1, CH 50 และ RRIC 110

กลุ่มที่ 2 มี 2 ตัวอย่าง ประกอบด้วย GT 1 และ BPM 24

กลุ่มที่ 3 มี 25 ตัวอย่าง ประกอบด้วย PB 235, RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างพันธุ์ RRIT 251 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกร จำนวน 21 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 4 มี 169 ตัวอย่าง ประกอบด้วย RRIM 600 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างพันธุ์ RRIM 600 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกร จำนวน 166 ตัวอย่าง

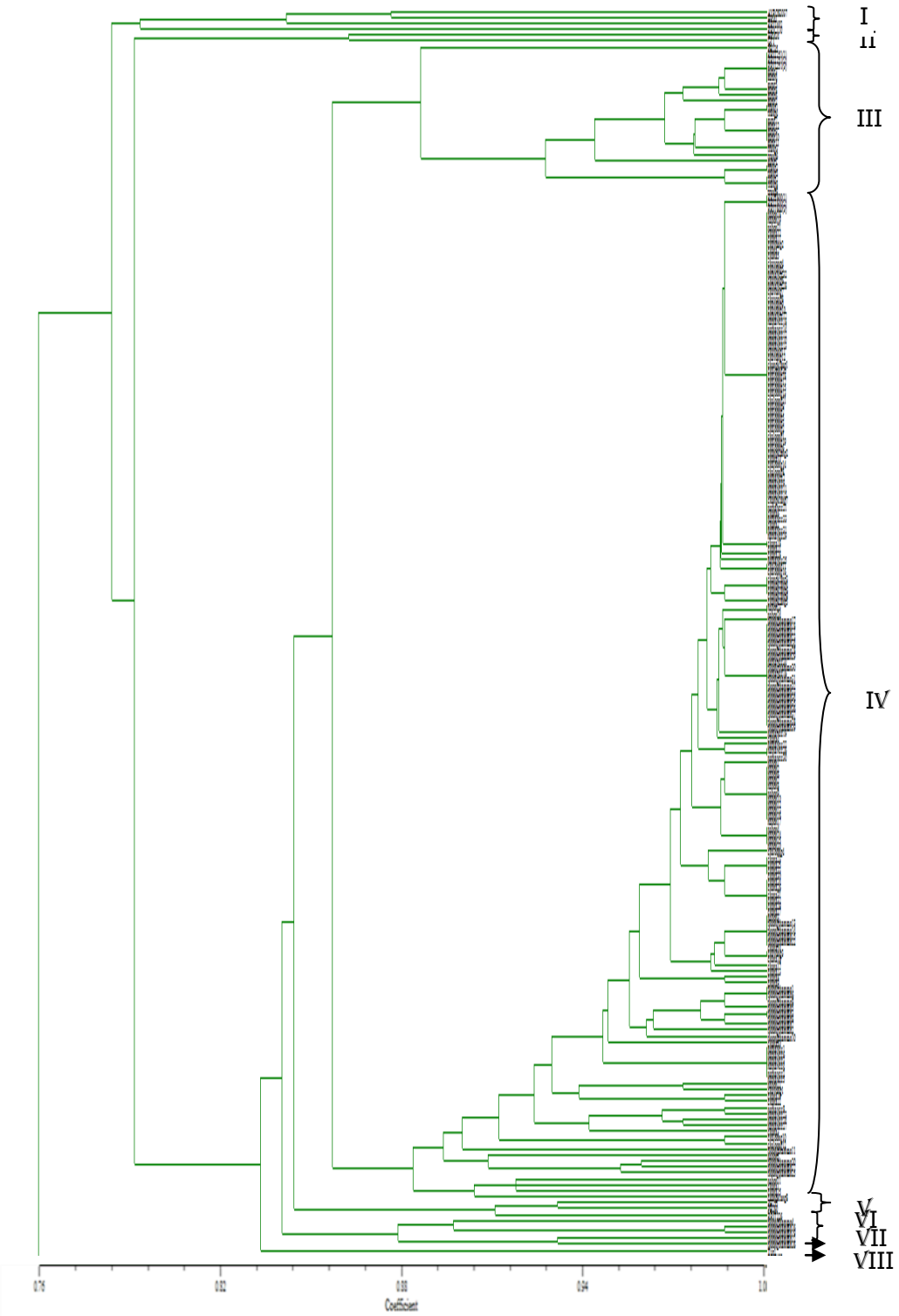
กลุ่มที่ 5 มี 3 ตัวอย่าง คือ PB 255, PB 260 และ RRIT 226

กลุ่มที่ 6 มี 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วย RRIM 600 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกร จำนวน 5 ตัวอย่าง

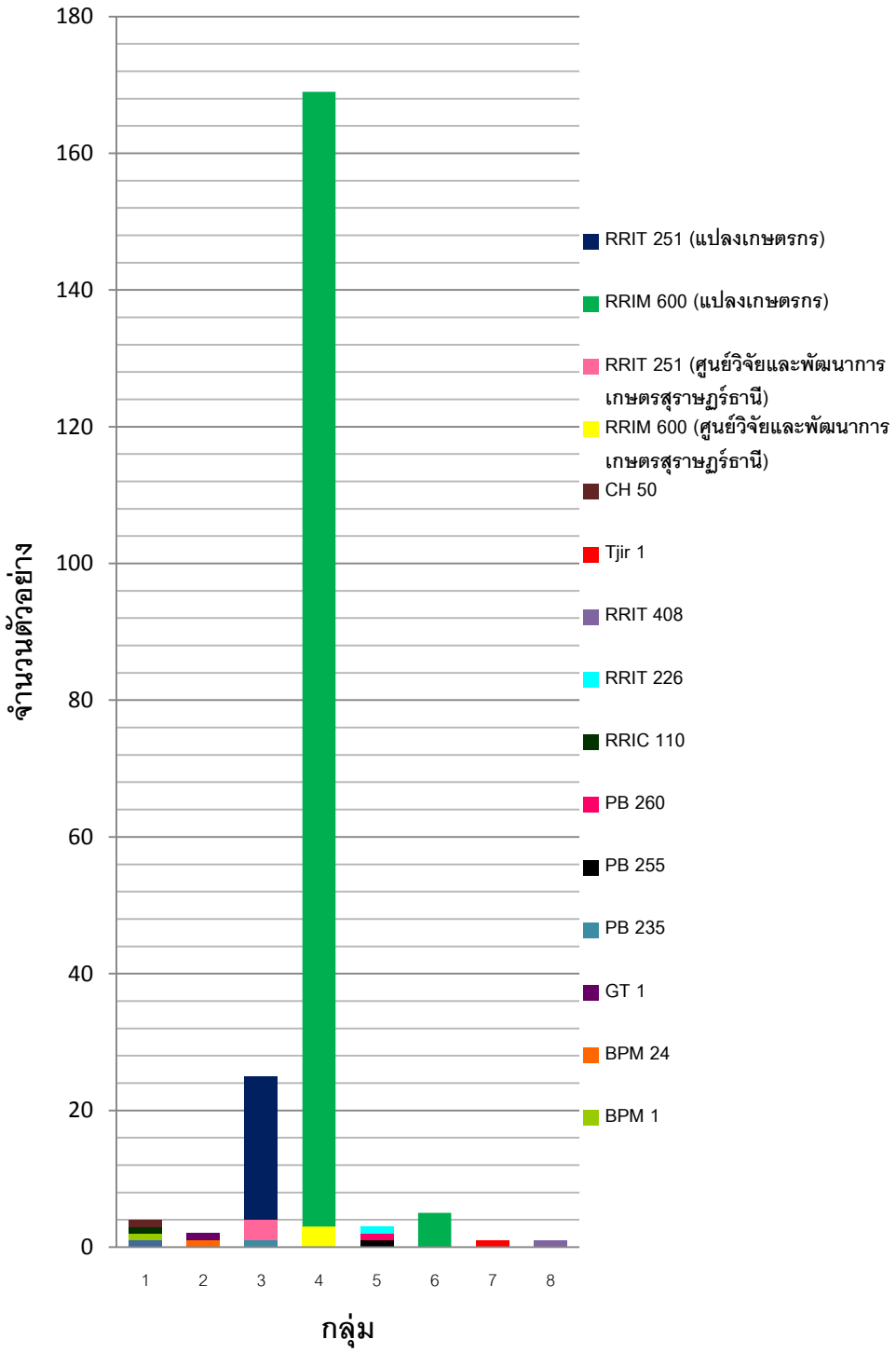
กลุ่มที่ 7 มี 1 ตัวอย่าง คือ Tjir 1

กลุ่มที่ 8 มี 1 ตัวอย่าง คือ RRIT 408

เมื่อพิจารณาการกระจายตัวของตัวอย่างประชากรพบว่า ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกร มีการกระจายตัวอยู่ 2 กลุ่ม จากที่มีการจัดกลุ่มทั้งสิ้น 8 กลุ่ม (ภาพที่ 10) โดยประชากรส่วนใหญ่ประมาณ 97.08 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในกลุ่มที่ 4 และ 2.92 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในกลุ่ม 6 ขณะที่ยางพาราพันธุ์ RRIT 251 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกร จัดอยู่ในกลุ่ม 3 ทั้งหมด คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 9 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 171 ตัวอย่าง ยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จำนวน 21 ตัวอย่าง และยางพาราพันธุ์แนะนำจำนวน 14 สายพันธุ์ จากการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี



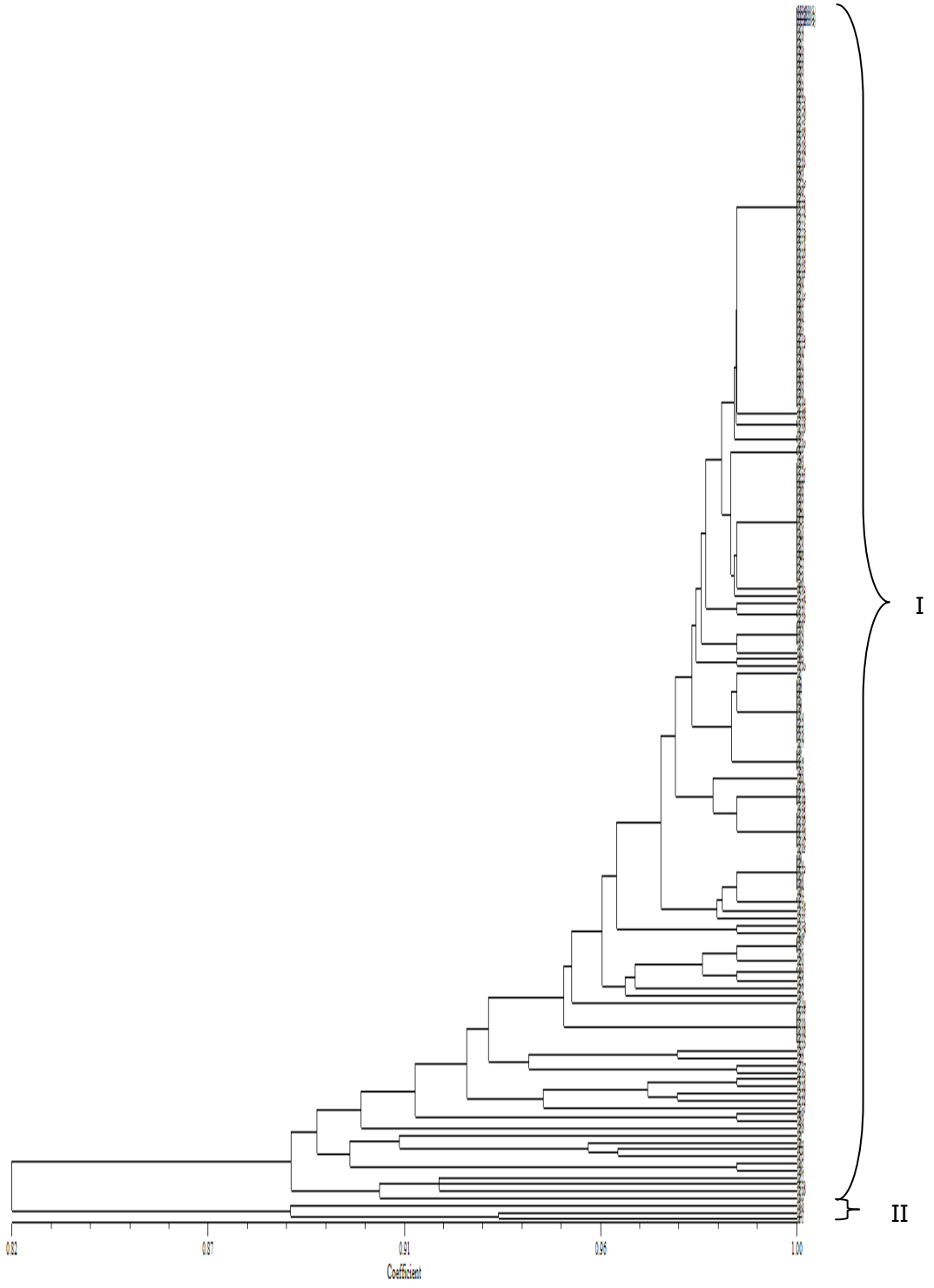
ภาพที่ 10 แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600, RRIT 251 จากแปลงเกษตรกร และพันธุ์ยางแนะนำจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จากการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

1.1.2.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากแปลงเกษตรกร ร่วมกับ RRIM 600 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี

จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่ปลูกยางทางภาคใต้ของประเทศไทย เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี นำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis หาค่า similarity coefficient โดยใช้โปรแกรม NTSYS ผลการวิเคราะห์หาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่ปลูกยางทางภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 171 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่า มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.76-1.00 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.88 จากเดนโดรแกรมสามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 11) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี 3 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่ปลูกยางทางภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 168 ตัวอย่าง ได้แก่ แปลงเกษตรกรในอำเภอนาบอน จังหวัดนครศรีธรรมราช ทั้งหมด 24 ตัวอย่าง, แปลงเกษตรกรในอำเภอฉวาง จังหวัดนครศรีธรรมราช ทั้งหมด 12 ตัวอย่าง, แปลงเกษตรกรในอำเภอช้างกลาง จังหวัดนครศรีธรรมราช ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง, แปลงเกษตรกรในตำบลทุ่งตำเสา อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 36 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 39 ตัวอย่าง, แปลงเกษตรกรในตำบลฉลุง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ทั้งหมด 21 ตัวอย่าง แปลงเกษตรกรในอำเภอนาทวี จังหวัดสงขลา ทั้งหมด 33 ตัวอย่าง และแปลงเกษตรกรในอำเภอ จะนะ จังหวัดสงขลา 33 ตัวอย่าง ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 55 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกับ RRIM 600 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี คิดเป็น 32.16 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 2 คือ ตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่ปลูกยางทางภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ แปลงเกษตรกรในตำบลทุ่งตำเสา อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 39 ตัวอย่าง



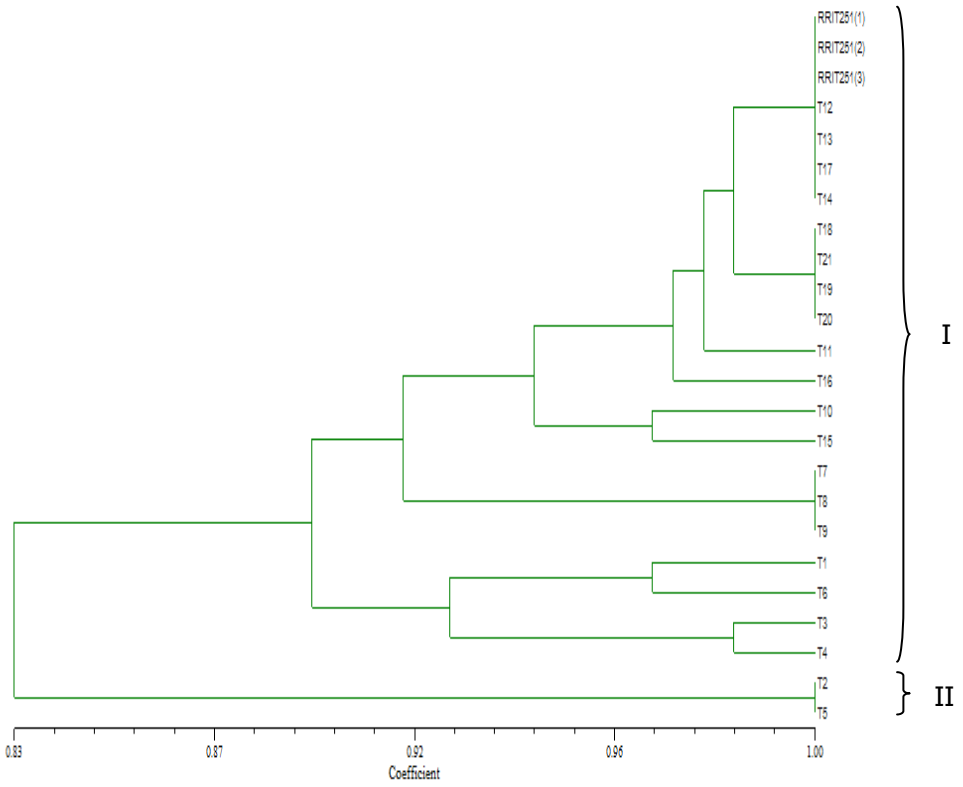
ภาพที่ 11 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 171 ตัวอย่าง และ ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานีจากการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

1.1.2.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จากแปลงเกษตรกร ร่วมกับ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี

จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีของยางพาราพันธุ์ RRIT 251 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่ปลูกยางทางภาคใต้ของประเทศไทย เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี นำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis หาค่า similarity coefficient โดยใช้โปรแกรม NTSYS ผลการการวิเคราะห์หาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIT 251 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่ปลูกยางทางภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 21 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่า มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.78-1.00 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.89 จากเดนโดรแกรมสามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 12) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี 3 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIT 251 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกรในอำเภอนาโยง จังหวัดตรัง จำนวน 7 ตัวอย่าง และ แปลงเกษตรกรในอำเภอพระแสง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 12 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 19 ตัวอย่าง ยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จำนวน 4 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกับ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี คิดเป็น 19.05 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 2 คือ ตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIT 251 ที่เก็บจากแปลงเกษตรกรในอำเภอนาโยง จังหวัดตรัง จำนวน 2 ตัวอย่าง

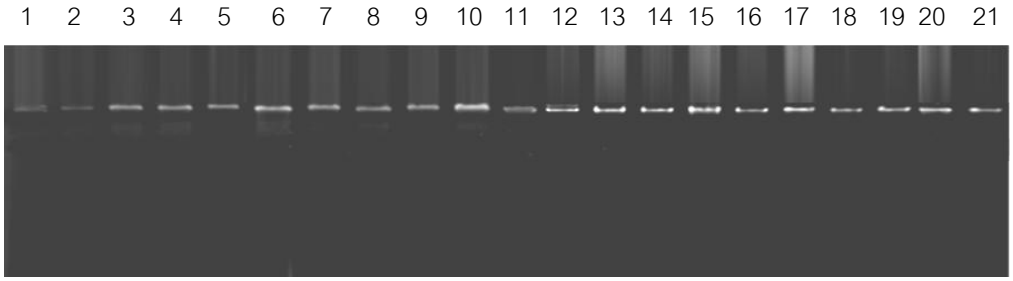


ภาพที่ 12 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จำนวน 21 ตัวอย่าง และยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จากการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

2. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี

2.1 ผลของการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และปริมาณของดีเอ็นเอ

จากการเตรียมดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์แนะนำจำนวน 14 สายพันธุ์ ตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่คัดเลือกจากตัวอย่างที่แสดงแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี จำนวน 5 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบว่า ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นแถบ 1 แถบชัดเจน และปราศจากการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ (ภาพที่ 13) เมื่อนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยเทียบอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่า อยู่ในช่วง 1.78-1.89 ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น 3.93 – 8.70 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี และมีปริมาณเพียงพอสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 13 แสดงสภาพที่สมบูรณ์ของดีเอ็นเอ จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสดีเอ็นเอจากใบยางพารา ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (1 = AVROS 2037, 2 = BPM 1, 3 = BPM 24, 4 = GT 1, 5 = PB 235, 6 = PB 255, 7 = PB 260, 8 = RRIC 110, 9 = RRIT 226, 10 = RRIT 408, 11 = Tjir1, 12 = CH 50, 13 = RRIT 251, 14 = RRIM 600, 15 = RRIM 600 (1), 16 = RRIM 600 (2), 17 = RRIM 600 (3), 18 = RRIM 600 (4), 19 = RRIM 600 (5), 20 = RRIT 251 (1) และ 21 = RRIT 251 (2))

ตารางที่ 4 อัตราส่วนระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อ 280 นาโนเมตร ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นและปริมาณดีเอ็นเอต่อไมโครลิตร

สายพันธุ์ยางพารา	OD_{260}	OD_{280}	**ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ** $OD_{260/280}$	**ปริมาณดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)**
AVROS2037	0.310	0.222	1.89	7.75
BPM 1	0.300	0.162	1.85	7.50
BPM 24	0.157	0.084	1.87	3.93
GT 1	0.185	0.102	1.81	4.60
PB 235	0.179	0.099	1.81	4.48
PB 255	0.180	0.099	1.82	4.50
PB 260	0.099	0.055	1.80	2.48
RRIC 110	0.217	0.118	1.83	5.43
RRIT 226	0.348	0.185	1.88	8.70
RRIT 408	0.324	0.176	1.84	8.10
Tjir 1	0.264	0.149	1.78	6.60
CH 50	0.200	0.108	1.85	5.00
RRIM 600	0.250	0.138	1.81	6.25
RRIT 251	0.205	0.113	1.81	5.13
RRIM 600 (1)	0.277	0.152	1.82	6.93
RRIM 600 (2)	0.238	0.132	1.80	5.95
RRIM 600 (3)	0.217	0.117	1.85	5.43
RRIM 600 (4)	0.257	0.142	1.81	6.43
RRIM 600 (5)	0.271	0.149	1.82	6.78
RRIT 251 (1)	0.280	0.151	1.85	7.00
RRIT 251 (2)	0.210	0.116	1.81	5.25

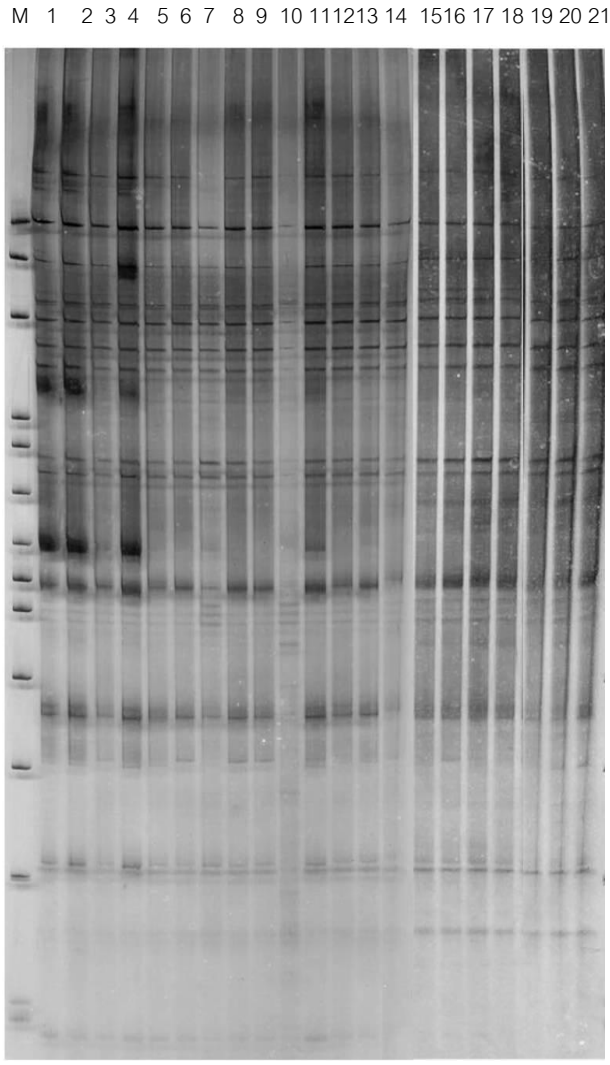
2.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยางพารา จากการใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

จากการนำไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ E-AGG/P-GGG, E-AAG/P-GAC, E-ACG/P-GAC และ E-ACG/P-GCA มาเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอน selective amplified ของยางพาราพันธุ์แนะนำจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จำนวน 14 สายพันธุ์ และตัวอย่างพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่พบความแตกต่าง หลังจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HAT-RAPD และแยกขนาดด้วย 6 เปอร์เซ็นต์ denature polyacrylamide gel พบว่าไพรเมอร์ในแต่ละคู่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน เป็นคู่ที่แสดงความแตกต่างของยางพาราแต่ละสายพันธุ์ โดยทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 389 แถบ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 249 แถบ คิดเป็น 64.01 เปอร์เซ็นต์ โดยคู่ไพรเมอร์ E-ACG/P-GAC ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 113 แถบ และให้แถบที่แสดงความแตกต่างสูงสุด 69 แถบ คิดเป็น 61.06 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ E-ACG/P-GCA ให้แถบที่แสดงความแตกต่างต่ำสุด 79 แถบ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 47 แถบ คิดเป็น 59.49 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

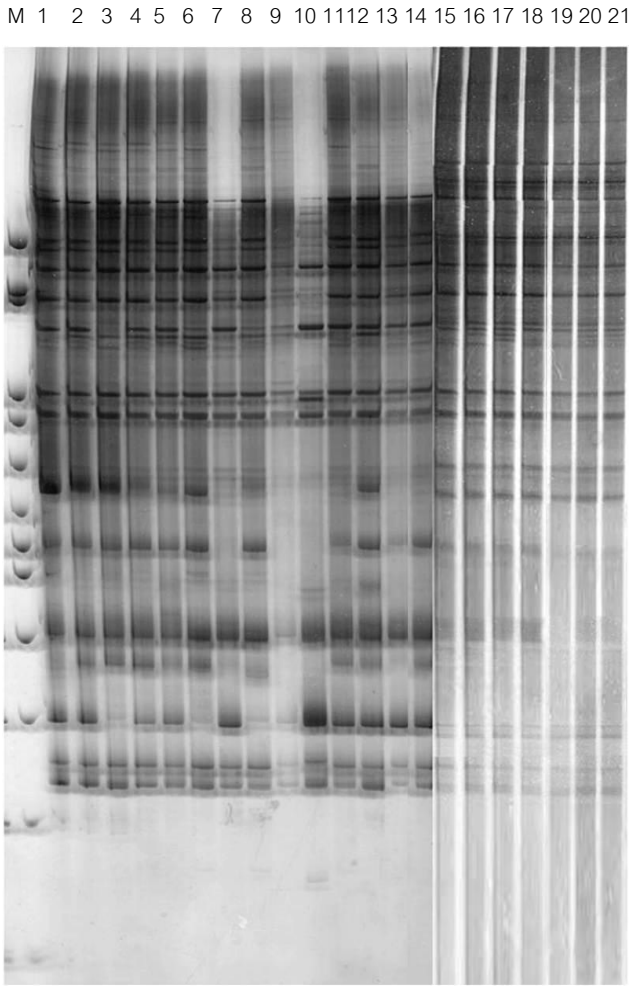
ตารางที่ 5 แสดงชนิดของไพรเมอร์ ลำดับเบส และจำนวนแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์จากดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์ RRIM 600, RRIT 251 และพันธุ์ยางแนะนำ

Primer	Amplified fragments	Monomorphic fragments	Polymorphic fragments	Polymorphism (%)
E-AGG/P-GGG	99	34	65	65.66
E- AAG/P-GAC	98	30	68	69.39
E-ACG/P-GCA	79	32	47	59.49
E-ACG/P-GAC	113	44	69	61.06
Total	389	64	249	64.01

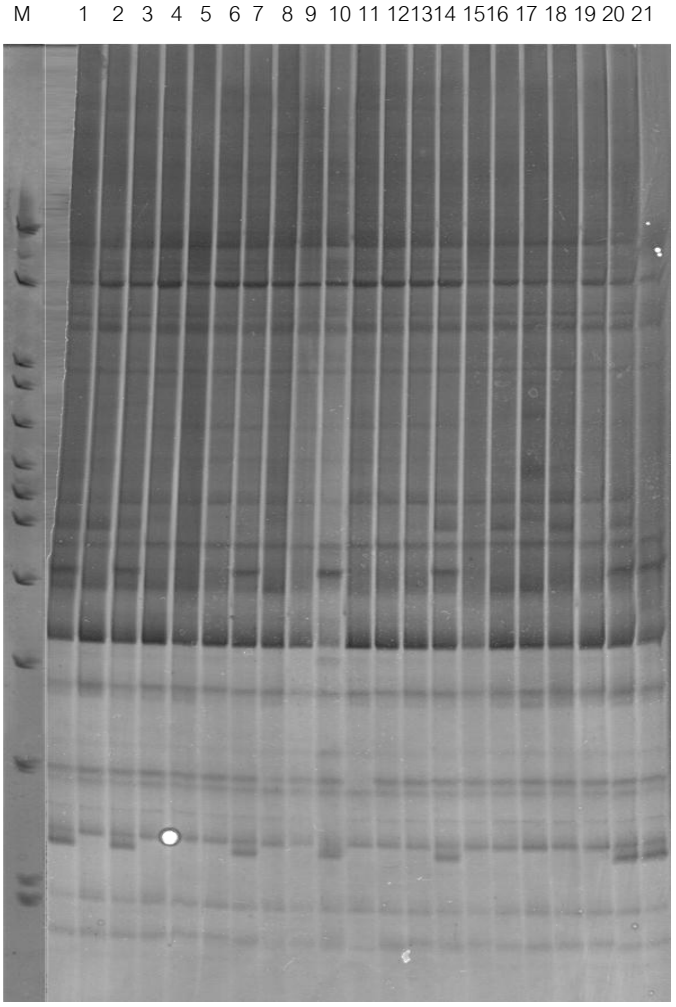
รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเอเอฟแอลพีพีซีอาร์แต่ละคู่ไพรเมอร์ มีความแตกต่างกันทั้งภายในสายพันธุ์เดียวกัน และระหว่างสายพันธุ์ คู่ไพรเมอร์ E-AGG/P-GGG ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 99 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 65 แถบ (ภาพที่ 14) E- AAG/P-GAC ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 98 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 68 แถบ (ภาพที่ 15) E-ACG/P-GCA ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 79 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 47 แถบ (ภาพที่ 16) E-ACG/P-GAC ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 113 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 69 แถบ (ภาพที่ 17)



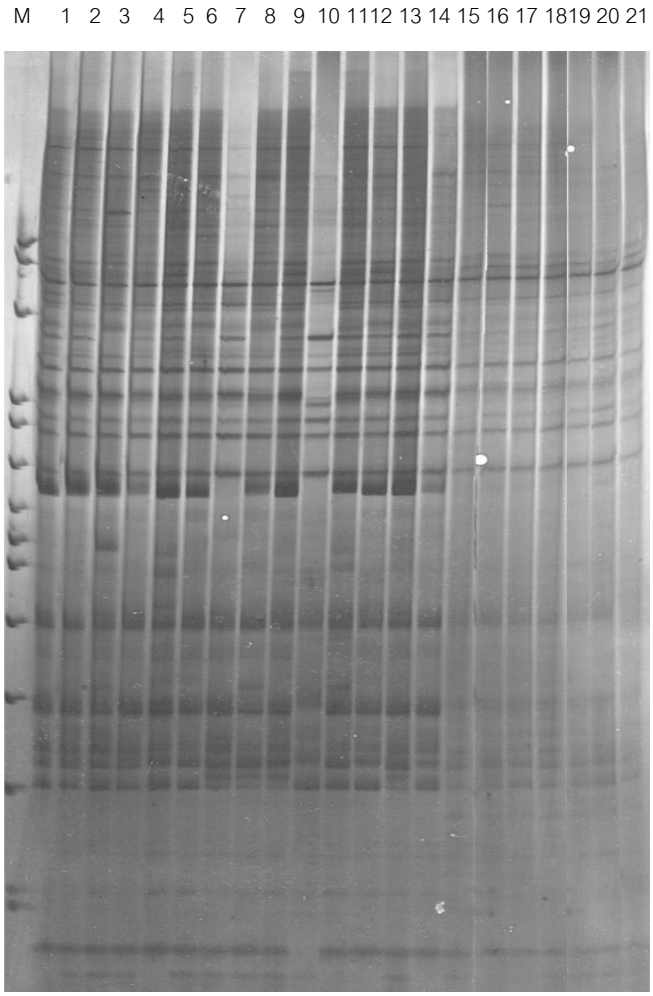
ภาพที่ 14 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ของคู่ไพรเมอร์ E-AGG/P-GGG (M= DNA Ladder, 1= AVROS 2037, 2= BPM 1, 3= BPM 24, 4= GT 1, 5= PB 235, 6= PB 255, 7= PB 260, 8= RRIC 110, 9= RRIT 226, 10= RRIT 408, 11= Tjir 1, 12= CH 50, 13= RRIM 600, 14= RRIT 251, 15=RRIM 600(1), 16= RRIM 600(2), 17= RRIM 600(3), 18= RRIM 600(4), 19= RRIM 600(5), 20= RRIT 251(1) และ 21 = RRIT 251(2))



ภาพที่ 15 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ของคู่ไพรเมอร์ E-AAG/P-GAC (M= DNA Ladder, 1= AVROS 2037, 2= BPM 1, 3= BPM 24, 4= GT 1, 5= PB 235, 6= PB 255, 7= PB 260, 8= RRIC 110, 9= RRIT 226, 10= RRIT 408, 11= Tjir 1, 12= CH 50, 13= RRIM 600, 14= RRIT 251, 15=RRIM 600(1), 16= RRIM 600(2), 17= RRIM 600(3), 18= RRIM 600(4), 19= RRIM 600(5), 20= RRIT 251(1) และ 21 = RRIT 251(2))



ภาพที่ 16 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ของคู่ไพรเมอร์ E-ACG/P-GCA (M= DNA Ladder, 1= AVROS 2037, 2= BPM 1, 3= BPM 24, 4= GT 1, 5= PB 235, 6= PB 255, 7= PB 260, 8= RRIC 110, 9= RRIT 226, 10= RRIT 408, 11= Tjir 1, 12= CH 50, 13= RRIM 600, 14= RRIT 251, 15=RRIM 600(1), 16= RRIM 600(2), 17= RRIM 600(3), 18= RRIM 600(4), 19= RRIM 600(5), 20= RRIT 251(1) และ 21 = RRIT 251(2))



ภาพที่ 17 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอิเลคโตรโฟรีซีสในเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ของคู่ไพรเมอร์ E-ACG/P-GAC (M= DNA Ladder, 1= AVROS 2037, 2= BPM 1, 3= BPM 24, 4= GT 1, 5= PB 235, 6= PB 255, 7= PB 260, 8= RRIC 110, 9= RRIT 226, 10= RRIT 408, 11= Tjir 1, 12= CH 50, 13= RRIM 600, 14= RRIT 251, 15=RRIM 600(1), 16= RRIM 600(2), 17= RRIM 600(3), 18= RRIM 600(4), 19= RRIM 600(5), 20= RRIT 251(1) และ 21 = RRIT 251(2))

เมื่อคำนวณหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเพื่อนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA พบว่า จากกลุ่มตัวอย่างยางพาราพันธุ์แนะนำ และพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 จากแปลงเกษตรกร และแปลงกิ่งตาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.60-1.0 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.80 เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเฉพาะกลุ่มตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600 พบว่า RRIM 600 (5) จากแปลงเกษตรกรใน ต.ทุ่งตำเสา อ.หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา มีความห่างไกลทางพันธุกรรมสูงสุดกับยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี โดยค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.94 ขณะที่กลุ่มตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIT 251 พบว่า RRIT 251 (2) มีความห่างไกลทางพันธุกรรมกับยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี มากที่สุดโดยค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.97 (ตารางที่ 6) จากเดนโดรแกรมที่จัดกลุ่มตามความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสามารถแบ่งกลุ่มยางพาราพันธุ์ RRIM 600, RRIT 251 และพันธุ์แนะนำได้เป็น 5 กลุ่ม (ภาพที่ 19) ดังนี้

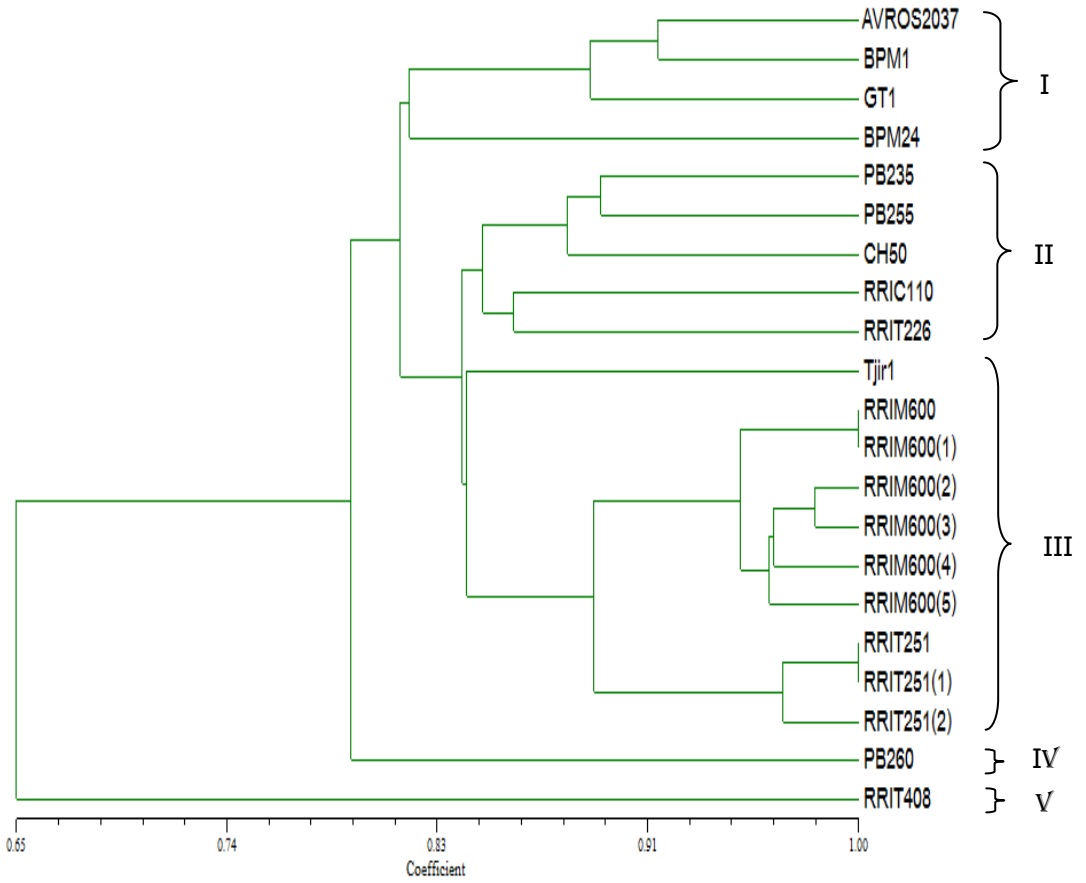
กลุ่มที่ 1 มี 4 ตัวอย่าง ประกอบด้วย AVROS 2037, GT 1, BPM 1, BPM 24

กลุ่มที่ 2 มี 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วย PB 235, PB 255, RRIT 226 RRIC 110 และ CH 50

กลุ่มที่ 3 มี 10 ตัวอย่าง ประกอบด้วย Tjir 1, RRIM 600 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี, RRIM 600 ที่คัดเลือกจากการวิเคราะห์แฮตอาร์เอพีดี ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี และ RRIT 251 ที่คัดเลือกจากการวิเคราะห์แฮตอาร์เอพีดี ทั้งหมด 2 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 4 มี 1 ตัวอย่าง คือ PB 260

กลุ่มที่ 5 มี 1 ตัวอย่าง คือ RRIT 408



ภาพที่ 18 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของยางพาราพันธุ์แนะนำ จำนวน 14 สายพันธุ์ และตัวอย่างพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่คัดเลือกจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค แฮต อาร์เอพีดีที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือน (RRIM 600(1) และ RRIT 251(1)) และต่าง (RRIM 600(2), RRIM 600(3), RRIM 600(4), RRIM 600(5) และ RRIT 251(2)) กับ RRIM 600 และ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี

บทที่ 4

วิจารณ์

การขยายพันธุ์โดยวิธีการติดตาซึ่งนิยมใช้ในการขยายพันธุ์ยางพารา เป็นการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ โดยทั่วไปการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ โดยใช้ส่วนของต้นที่เกิดมาจากการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส (mitosis) จึงคงลักษณะเดิมไว้ได้ การขยายพันธุ์ยางพาราด้วยวิธีนี้ โดยทฤษฎีแล้วเกษตรกรควรได้รับพันธุ์ยางที่ตรงตามพันธุ์ แต่ในความเป็นจริงที่เกิดขึ้น มีหลายคนไม่แน่ใจในพันธุ์ยางที่ตนเองจะปลูกจากการซื้อพันธุ์ยางจากผู้ประกอบการทำยางชำถุง หรือต้นตอยาง จากเหตุผลดังกล่าวจึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบพันธุ์ยางที่ปลูกในแปลงเกษตรกรว่าได้รับพันธุ์ยางที่ตรงตามพันธุ์หรือไม่ จึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์แนะนำ RRIM 600 และ RRIT 251 โดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล 2 เทคนิคคือ แฮตอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี

การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อย แต่ต้องเป็นดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ และอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ (integrity) ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อความคมชัดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ การสกัดดีเอ็นเอในใบยางพาราโดยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1990) พบว่ามีคุณภาพและปริมาณเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์แฮตอาร์เอพีดี ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดี ใช้เวลาในการสกัดน้อย คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุและความสดของใบยางพาราที่นำมาสกัด สำหรับใบยางพาราที่เลือกมาสกัดควรเป็นใบในระยะเพสลาด เนื่องจากเป็นใบที่ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป เช่นเดียวกับการทดลองของ กรกช (2550) นอกจากการสกัดในยางพาราแล้วยังมีการใช้สารละลาย CTAB ในพืชอื่นหลายชนิด เช่น พืชสกุล *Ficus* spp. (วิศัย และสมบูรณ์, 2548) และข้าว (อรวรรณ, 2553) เป็นต้น ส่วนเทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า ดีเอ็นเอต้องมีความบริสุทธิ์สูงและต้องปราศจากการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ และอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ จึงสามารถย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Pst*I ได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากการทำเอเอฟแอลพีนิยมใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ จำนวน 6 คู่เบส ร่วมกับเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส

ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะใช้ *Eco*RI ร่วมกับ *Mse*I (สุรินทร์, 2545) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ *Eco*RI ร่วมกับ *Pst*I เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด rare cutter ทั้งคู่ จากการทดลองของ ศัลยา (2547) ใช้ *Eco*RI ร่วมกับ *Mse*I แล้วได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กค่อนข้างมาก แถบดีเอ็นเอชิดกันมาก และไม่ค่อยชัดเจน ทำให้การนับแถบดีเอ็นเอมีโอกาสผิดพลาดได้ แต่เมื่อใช้ *Eco*RI ร่วมกับ *Pst*I แถบดีเอ็นเอมีความคมชัด

การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เป็นเครื่องหมายที่สร้างจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือเป็นลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบ และมีการถ่ายทอดสู่รุ่นลูกได้ เครื่องหมายโมเลกุลมีข้อได้เปรียบที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีจำนวนมาก สภาพแวดล้อม และระยะการเจริญเติบโตไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายโมเลกุล มีความแม่นยำสูง จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจแยกสายพันธุ์ อนุรักษ์พันธุกรรมยาง รวมถึงการทำแผนที่พันธุกรรมยาง (genetic mapping) เพื่อใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ (นภาวรรณ, 2551) แฮตอาร์เอพีดีเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ดัดแปลงจากอาร์เอพีดีซึ่งมี sensitivity สูง การทำซ้ำอาจไม่เหมือนเดิม หากไม่มีการควบคุมสภาวะในการทำพีซีอาร์ที่ดีพอ การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีจึงต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ แฮตอาร์เอพีดีประยุกต์จากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยการเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้สูงขึ้นกว่าเดิมมากกว่า 10 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ได้มีความคมชัดสูงขึ้น และพบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่าเดิม ผลการทดลองสามารถทำซ้ำได้ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็น non-specific ลดลง ทำให้ผลการทดลองแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ในการเข้าจับดีเอ็นเอต้นแบบได้ดี (Eimert *et al*., 2003) มีการนำเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมาศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น การตรวจสอบลูกผสมในลิ้นจี่ (Chundet *et al*., 2007) การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (นฤมล และคณะ, 2555) การตรวจสอบการกลายในถั่วเขียว (จาตุรงค์ และคณะ, 2556) เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีเพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ซึ่งเป็นพันธุ์ยางแนะนำชั้น 1 พันธุ์ RRIM 600 เป็นพันธุ์ที่มีการปลูกอย่างแพร่หลายมาเป็นระยะเวลานาน ส่วนใหญ่พันธุ์ยางที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพันธุ์นี้ ส่วนพันธุ์ RRIT 251 เป็นพันธุ์แนะนำในปี 2546 ให้ผลผลิตสูงกว่ายางพันธุ์ RRIM 600 พัฒนามาจากพันธุ์ยางในพื้นที่ อ.นาทวี จ.สงขลา (สถาบันวิจัยยาง, 2554ก) จากการเก็บตัวอย่างใบยางพาราทั้งสองพันธุ์จากแปลงของเกษตรกรในบางพื้นที่ของจังหวัดนครศรีธรรมราช, สงขลา, ตรัง และสุราษฎร์ธานี เปรียบเทียบ

รูปแบบแถบดีเอ็นเอกับยางพาราพันธุ์แนะนำของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร จำนวน 14 สายพันธุ์ โดยใช้ 6 ไพรเมอร์ คือ OPAD-01, OPAD-10, OPB-12, OPB-17, OPC-05 และ OPN-08 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างเฉลี่ย 70.27 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ที่มีการศึกษาในยางพารามาก่อนหน้านี้ กรกช (2550) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีวิเคราะห์พันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม และพันธุ์แนะนำ จำนวน 21 พันธุ์ พบว่า จำนวนของแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยทุกไพรเมอร์เท่ากับ 8.75 แถบ ในขณะที่การศึกษาโดยแฮตอาร์เอพีดีจากการศึกษาครั้งนี้ใช้ 6 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 78 แถบ เฉลี่ย 13 แถบต่อไพรเมอร์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างยางพาราโดยวิธี UPGMA หาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมจากตัวอย่างทั้งหมด พบว่า มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.68-1.00 จากการศึกษานี้ ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 แต่พบว่า ไพรเมอร์ OPB-17 ให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 150 และ 600 คู่เบส ที่มีความจำเพาะกับยางพาราพันธุ์ Tjir 1 และ CH 50 ตามลำดับ ขณะที่ไพรเมอร์ OPAD-01 แสดงแถบดีเอ็นเอ ขนาด 200 และ 750 คู่เบส มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์ RRIT 408 และ Tjir 1 ตามลำดับ แต่จากการทดลองของ กรกช (2550) ซึ่งใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบแถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส ที่มีความจำเพาะกับยางพาราพันธุ์ Tjir1 จากการใช้ไพรเมอร์ OPAD-01 แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ OPAD-01 เป็นไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาพันธุ์ยางพารา ไม่ว่าจะใช้เทคนิคอาร์เอพีดีหรือแฮตอาร์เอพีดี ชมภูนุช (2553) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยน้ำว้าจำนวนทั้งหมด 9 สายพันธุ์ด้วยวิธีแฮตอาร์เอพีดี พบว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันมาก โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.96 อาจต้องตรวจสอบโดยการเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ การใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific primer) มากขึ้น หรืออาศัยเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและความจำเพาะมากขึ้น เช่น เทคนิคเอเอฟแอลพี

จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นชัดเจนว่า มีความผันแปรทางพันธุกรรมของพันธุ์ยาง ทั้งพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ในแปลงปลูกของเกษตรกร และเพื่อยืนยันผล จึงทำการเลือกตัวอย่างที่ผ่านการศึกษาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมาแล้ว นำมาทดสอบต่อด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี ซึ่งจัดเป็น high throughput markers เนื่องจากปฏิกิริยาแต่ละครั้งสามารถให้เครื่องหมายโมเลกุลได้จำนวนมาก มีข้อดีหลายประการ คือ ในปฏิกิริยาหนึ่งๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมๆ กัน ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาจำนวนน้อย และเมื่อทำการตรวจสอบซ้ำจะให้ผลเหมือนเดิม จำนวนเครื่องหมายมีมาก และครอบคลุมทั้งจีโนม นอกจากนี้ ยัง

ไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพี มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นระหว่างพืชที่ตรวจสอบ เกิดจากการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะข่ม (dominance) ต่อการไม่มีแถบดีเอ็นเอ (สุรีพร, 2546) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบเอเอฟแอลพีจากตัวอย่างดีเอ็นเอ พันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่คัดเลือกจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี จำนวน 5 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยมียางพาราพันธุ์แนะนำจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จำนวน 14 สายพันธุ์ เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ใช้ไพรเมอร์ จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ คือ E-AGG/P-GGG, E- AAG/P-GAC, E-ACG/P-GAC และ E-ACG/P-GCA พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และแสดงแถบดีเอ็นเอที่ความแตกต่างกันในยางพาราแต่ละสายพันธุ์ ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 389 แถบ เฉลี่ย 97.25 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกัน จำนวน 249 แถบ (64.01 เปอร์เซ็นต์) คู่ไพรเมอร์ E-ACG/P-GAC แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 113 แถบ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างกันจำนวน 69 แถบ (61.06 เปอร์เซ็นต์) ส่วนคู่ไพรเมอร์ E-ACG/P-GCA แสดงแถบดีเอ็นน้อยที่สุดจำนวน 79 แถบ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างกันจำนวน 47 แถบ (59.49 เปอร์เซ็นต์) วิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมจากตัวอย่างทั้งหมด พบว่า มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.60-1.00 ส่วนค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ RRIM 600 มีค่าเท่ากับ 0.94-1.00 พันธุ์ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี และอีกจำนวน 2 ต้น จากสวนเกษตรกรมีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.97-1.00

เมื่อพิจารณาค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมภายในกลุ่มตัวอย่างของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และกลุ่มตัวอย่างของยางพาราพันธุ์ RRIT 251 เปรียบเทียบกับพันธุ์ดังกล่าวจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี พบว่า มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.76-1.00 และ 0.78-1.00 ตามลำดับ แสดงว่าลักษณะภายนอก เช่น ลักษณะใบ ผล ลำต้น เป็นต้น ไม่สามารถจำแนกความแปรปรวนได้ แต่เมื่อนำมาตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี จากการสุ่มคัดเลือกตัวอย่างของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ RRIT 251 ที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนและต่างจากพันธุ์เปรียบเทียบของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี เพื่อนำมายืนยันผลโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า ให้ผลสอดคล้องกัน แสดงว่า การจำแนกพันธุ์หรือการศึกษาความแปรปรวนของพันธุ์ยางพาราโดยการใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี มีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับรายงานการ

วิจัยของ Anuntalabhochai และคณะ (2003) ที่ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลิ้นจี่ 10 สายพันธุ์ พบว่า เดนโดรแกรมของเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ของลิ้นจี่ทั้ง 10 สายพันธุ์ ไปในทิศทางเดียวกัน และสอดคล้องกับประวัติพันธุ์

ความผันแปรทางพันธุกรรมที่พบในการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับการทดลองของปรียาและคณะ (2551) ที่ตรวจสอบพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์การค้า (RRIM 600) จำนวน 24 ตัวอย่าง จากแปลงเกษตรกรในเขตจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ จังหวัดสกลนคร โดยใช้เครื่องหมาย AP-PCR และรายงานว่า พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพันธุ์ดังกล่าวค่อนข้างสูงเช่นเดียวกัน ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่พบอาจมีหลายสาเหตุ แต่ส่วนหนึ่งเกิดจากผู้ผลิตกล้ายางไม่ได้มาตรฐาน ไม่มีการตรวจสอบพันธุ์ก่อนขายให้กับเกษตรกร ทำให้เกษตรกรได้รับต้นกล้ายางที่มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน ที่สำคัญคือ พันธุ์ยางไม่ถูกต้องตามสายพันธุ์ นอกจากนี้แล้ว ในบางกรณีแม้พันธุ์ยางจะถูกต้องตามพันธุ์ แต่ต้นกล้าไม่ได้มาตรฐาน อาจเป็นเพราะนำกิ่งตาพันธุ์จากแปลงที่ไม่ได้รับการรับรองพันธุ์มาติดตา แต่นำกิ่งตาสอยหรือกิ่งตาลานจากต้นที่ให้ผลผลิตน้ำยางแล้วมาติดตา ทำให้เปอร์เซ็นต์น้ำยางต่ำกว่ามาตรฐาน 30-40 เปอร์เซ็นต์ ต้นกล้ายางพารามีอัตราการตายสูงเมื่อปลูกลงในแปลง และอัตราการเจริญเติบโตช้าจนอาจส่งผลกระทบในระยะยาวต่อผลผลิตน้ำยาง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าที่มีคุณภาพ (พนม, ม.ป.ป.)

แนวทางการแก้ไขปัญหาเหล่านี้ ควรมีความเข้มงวดในการขึ้นทะเบียนผู้ประกอบการผลิตกล้ายาง และต้องมีการตรวจสอบอย่างใกล้ชิด ทั้งนี้กฎระเบียบการผลิตกล้ายาง สำหรับขยายพันธุ์และจำหน่าย ต้องเป็นพันธุ์ยางที่กรมวิชาการเกษตรแนะนำอยู่ในปัจจุบัน และต้นแม่พันธุ์ในแปลงขยายพันธุ์กิ่งตายาง ต้องผ่านการตรวจจำแนกพันธุ์พร้อมทั้งมีหนังสือรับรองจากกรมวิชาการเกษตร จึงสามารถนำพันธุ์ยางมาขยายพันธุ์เพื่อจำหน่ายได้ (กรมวิชาการเกษตร, 2532) ตามข้อกำหนดของกรมวิชาการเกษตร ผู้ประกอบการผู้ผลิตพันธุ์ยางจะต้องมีแปลงกิ่งตายางเนื้อที่ไม่น้อยกว่าครึ่งไร่ จำนวนต้นกิ่งตายางที่ปลูกในแปลงมีไม่น้อยกว่า 500 ต้นต่อไร่ และไม่มากกว่า 1,600 ต้นต่อไร่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดกิ่งตาที่ต้องการผลิต แปลงกิ่งตายางจะต้องเป็นแปลงตั้งอยู่เอกเทศไม่มีไม้ยืนต้นอื่นขึ้นปะปน ทุกแปลงต้องได้รับการดูแลรักษาอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ พันธุ์ยางแต่ละพันธุ์จัดแบ่งเป็นแปลงย่อยเด่นชัด ไม่ปะปนกัน และมีป้ายแสดงชื่อพันธุ์ไว้หน้าแปลงผลิตแต่ละพันธุ์อย่างชัดเจน เมื่อแปลงกิ่งตายางแปลงใดต้องการเปลี่ยนพันธุ์ยาง ขยายเนื้อที่ หรือลดเนื้อที่ปลูก เปลี่ยนแปลงจากที่ได้รับอนุญาต ต้องแจ้งให้ศูนย์วิจัยยาง กรมวิชาการเกษตรทราบ (กรมวิชาการเกษตร, 2532) นอกจากนี้แล้ว ความแปรปรวนที่เกิดขึ้น อาจมา

จากความแตกต่างเดิมของพันธุ์อยู่ก่อนแล้ว โดยเฉพาะพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ปรับปรุงพันธุ์จากประเทศมาเลเซีย และมีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทย เมื่อหลายสิบปีมาแล้ว การนำเข้าอาจมีบางส่วนที่เกษตรกรนำเข้ามาเองโดยไม่ผ่านการตรวจสอบ โดยเฉพาะเขตจังหวัดทางภาคใต้ที่มีชายแดนติดกับประเทศมาเลเซีย พันธุ์ยาง RRIM 600 มาเลเซียออกพันธุ์เป็นชุด (series) เรียกว่า ชุดพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งมีหลายพันธุ์ย่อย และมีลักษณะใกล้เคียงกัน (Anonymous, 1960) การลักลอบนำเข้าอาจเป็นอีกสาเหตุของความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น ส่วนพันธุ์ RRIT 251 เป็นพันธุ์ยางที่คัดเลือกจากแปลงเกษตรกร อำเภอนาทวี จังหวัดสงขลาในปี พ.ศ. 2518 จากงานรวบรวมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยยางสงขลา แล้วนำมาทดสอบตามขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ยาง ตั้งแต่เปรียบเทียบพันธุ์ขั้นต้น เปรียบเทียบพันธุ์ขั้นปลายและทดสอบพันธุ์ในพื้นที่ต่างๆ จนได้รับการพิจารณาเป็นพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตรในปี พ.ศ. 2542 (สถาบันวิจัยยาง, 2549) ก่อนที่กรมวิชาการเกษตรจะนำไปทดสอบ ก็มีการขยายพันธุ์ปลูกไปบ้างแล้ว ดังนั้นความแปรปรวนที่เกิดขึ้นน่าจะมาจาก การผลิตที่ไม่มีการควบคุมของผู้ประกอบการผลิตต้นกล้ายาง ตั้งแต่กิ่งตาที่นำมาใช้ผลิตต้นตอตา และยางชำถุง จึงพบความแปรปรวนสูง ลักษณะดังกล่าวนี้ คล้ายคลึงกับที่พบในพืชชนิดอื่น เช่น ทุเรียน ประวัติของทุเรียนในยุครัตนโกสินทร์ พบว่าแหล่งพันธุ์ส่วนหนึ่งได้จากการเพาะเมล็ด และคัดเลือกพันธุ์ที่ดีไว้เพื่อขยายพันธุ์ต่อโดยการเสียบยอดหรือตอนกิ่ง แต่ก็มีจำนวนจำกัดทำให้การกระจายพันธุ์ดีทำได้ยาก การปลูกจึงอาศัยการเพาะเมล็ดจากผลของพันธุ์ดี ทำให้เกิดการแปรผันของทุเรียนพันธุ์ในแหล่งต่างๆ เตือนใจ และปิยะศักดิ์ (2556) รายงานพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ชะนี และพวงมณี จากแหล่งปลูกต่างกันบนพื้นฐานของเทคนิค DAF สอดคล้องกับประวัติพันธุ์ที่พบว่า ภายหลังที่ได้รับการคัดเลือกและกระจายพันธุ์ เกษตรกรไม่สามารถหากิ่งพันธุ์ที่ดีได้อย่างสะดวก จึงมีเกษตรกรที่ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดหรือการใช้กิ่งตอนหรือทาบกิ่งปะปนกัน

ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นการยืนยันว่าพันธุ์ยางที่ปลูกในแปลงเกษตรกรอย่างน้อย 2 พันธุ์ คือ RRM 600 และ RRIT 251 บางส่วนไม่ตรงตามพันธุ์จึงเป็นข้อมูลที่ต้องเฝ้าระวัง ต่อการผลิตต้นตอตา และยางชำถุงให้ตรงตามพันธุ์และมีความสม่ำเสมอ และเพื่อให้การผลิตกล้ายางมีคุณภาพ ต้องมีการควบคุมผู้ประกอบการที่จดทะเบียนผลิตกล้ายาง ได้แก่ ต้นตอตา กิ่งตาเขียว และต้นยางชำถุงให้เป็นไปตามระเบียบที่เข้มงวดยิ่งขึ้น เพื่อไม่ให้เกิดผลเสียหายแก่ผู้ปลูกยาง และเป็นข้อควรตระหนักสำหรับเกษตรในการซื้อต้นพันธุ์ยางชำถุง เกษตรกรควรซื้อจากร้านค้าหรือจากหน่วยงานที่เชื่อถือได้ เพื่อให้การปลูกสร้างสวนยางเป็นไปอย่างยั่งยืน

บทที่ 5

สรุป

1. การคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับแฮตอาร์เอพีดี จำนวน 11 ไพรเมอร์ เพื่อค้นไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง และชัดเจน สามารถคัดเลือกได้ 6 ไพรเมอร์ คือ OPAD-01, OPAD-10, OPB-12, OPB-17, OPC-05 และ OPN-08 ไพรเมอร์สำหรับเอแอฟแอลพี จำนวน 4 คู่ คือ E-AGG/P-GGG, E- AAG/P-GAC, E-ACG/P-GAC และ E-ACG/P-GCA

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 171 ตัวอย่าง และ RRIT 251 จำนวน 21 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับพันธุ์ยางพาราแนะนำของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี จำนวน 14 พันธุ์ ได้แถบดีเอ็นเอจากแฮตอาร์เอพีดีทั้งหมด 78 แถบ เป็นแถบที่แตกต่าง 52 แถบ คิดเป็น 70.27 เปอร์เซ็นต์ มีค่าดัชนีความใกล้ชิดอยู่ระหว่าง 0.68-1.00 และสามารถจัดกลุ่มยางพาราได้ 8 กลุ่ม

3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 171 ตัวอย่าง และ RRIT 251 จำนวน 21 ตัวอย่าง กับพันธุ์เปรียบเทียบจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี พบว่า กลุ่มตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีค่าดัชนีความใกล้ชิดอยู่ระหว่าง 0.76-1.00 กลุ่มตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIT 251 มีค่าดัชนีความใกล้ชิดอยู่ระหว่าง 0.78-1.00

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของตัวอย่างยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ RRIT 251 ที่คัดเลือกจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HAT-RAPD ที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนและพันธุ์เปรียบเทียบจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี มาจำนวน 5 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ ตรวจสอบด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับการวิเคราะห์ด้วยแฮตอาร์เอพีดี

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่า พันธุ์ยางพาราทั้งสองพันธุ์คือ RRIM 600 และ RRIT 251 มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ดังนั้นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูล เพื่อการเฝ้าระวังการผลิตต้นตอยาง หรือยางชำถุง เพื่อให้เกษตรกรได้รับต้นยางพาราที่ตรงตามพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

กรกช นาคคนอง. 2550. การวิเคราะห์พันธุกรรมของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)พันธุ์ดั้งเดิมและพันธุ์แนะนำ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

กรมวิชาการเกษตร. 2532. การจดทะเบียนแปลงขยายพันธุ์ยางและจำหน่ายพันธุ์ยาง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2552ก. การขยายพันธุ์ยางพารา. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตร และสหกรณ์.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2552ข. การติดตายาง. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ธีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์. 2556. การประยุกต์เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบการกลายในถั่วเขียว. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์ แห่งชาติครั้งที่ 18 วันที่ 17-19 กรกฎาคม 2556 ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ สุขุมวิท กรุงเทพมหานคร.

ชูสิทธิ์ โอภาวงศ์ และเวท ไทยนุกูล. 2542. 100 ปี ยางพาราไทย. วารสารยางพาราไทย 2 : 14-20.

ชมภูนุช ลิ้มประสาท. 2553. การจำแนกสายพันธุ์กล้วยน้ำว้าด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มที่มีจำนวนเบส GC ร้อยละ 70. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ฐิติพร โท้มโสภา, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์. 2556. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี. เอกสารการประกอบการ ประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18 วันที่ 17-19 กรกฎาคม 2556 ณ โรงแรม แอมบาสเดอร์ สุขุมวิท กรุงเทพมหานคร.

เตือนใจ โก้สกุล และปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2556. รูปแบบการขยายพันธุ์เพื่อการค้ากับหลักฐานความแปรปรวนทางพันธุกรรมของทุเรียนการค้าของไทย. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 18 วันที่ 17-19 กรกฎาคม 2556 ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ สุขุมวิท กรุงเทพมหานคร.

นภาวรรณ เลขะวิพัฒน์. 2551. การตรวจสอบพันธุ์ยางด้วยวิธีทางวิทยาศาสตร์. วารสารยางพารา 29 : 30-39.

นภาวรรณ เลขะวิพัฒน์, กัลยา ประพาน และกรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข. 2553. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ยางแนะนำและพันธุ์ยางจากแหล่งกำเนิดเดิมโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทิลไลต์ และ RAPD. จดหมายข่าว ผลิใบ 13 : 8-9.

นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์. 2555. การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี. Thai Journal of Science and Technology 1 : 169-179.

ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก, วิภาวดี ฤทธิธรรม และพินิจ หวังสมนึก. 2551. พันธุกรรมของยางพาราจากแปลงเกษตรกรในจังหวัดสกลนคร. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39 : 94-97.

พนม เกิดแสง. ม.ป.ป. การผลิตกล้ายางพาราคุณภาพดี. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เรวัต เลิศฤทัยโยธิน. 2542. ยางพารา. *ใน* พืชเศรษฐกิจ, หน้า 416-445. กรุงเทพฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชา ธิติประเสริฐ, มานิตย์ ใจฉกรรจ์ และดวงเดือน ศรีโพทา. 2545. ฐานข้อมูลพันธุ์พืช : ยางพารา (Plant Germplasm Database : Para rubber). กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 120 หน้า.

วิศัย พรหมเทพ และสมบูรณ์ อนันตลาโภชัย. 2548. การวิเคราะห์พันธุกรรมพืชสกุล *Ficus* spp. โดยเทคนิค HAT-Random Amplified Polymorphic DNA. วารสารศูนย์วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร 2 : 39-52.

ศุภมิตร ลิมปิชัย. 2554. ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของยางพันธุ์สถาบันวิจัยยาง 408 (RRIT 408). วารสารยางพารา 32 : 18-22.

ศัลยา จันทร์อุ่ย. 2547. การเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA ของยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 กับยางพาราที่ไม่ระบุสายพันธุ์ด้วย Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). โครงงานวิจัยทางชีววิทยา มหาวิทยาลัยทักษิณ.

สถาบันวิจัยยาง. 2549. คำแนะนำพันธุ์ยาง สถาบันวิจัยยาง 251. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 30 หน้า.

สถาบันวิจัยยาง. 2550. คำแนะนำการปลูกยางพาราในพื้นที่ปลูกยางใหม่. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 47 หน้า.

สถาบันวิจัยยาง. 2554ก. คำแนะนำพันธุ์ยางปี 2554. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 49 หน้า.

สถาบันวิจัยยาง. 2554ข. รายงานผลการวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2554. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 123 หน้า.

สถาบันวิจัยยาง. 2555. ข้อมูลวิชาการยางพารา 2555. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 123 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณานุกูล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 269 หน้า.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5 : 37-59.

อรวรรณ สมใจ. 2550. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองในภาคใต้โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเมล็ด และเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Anonymous. 1960. RRIM 600 series clones. Planters' Bulletin of The Rubber Research Institute of Malaysia 46 : 8-13.

Anuntalabhochai, S. 2003. Molecular study of intervarietal genetic relationships of lychee (*Litchi* spp.) in Thailand by techniques in molecular biology. Thailand Research Fund.

Anuntalabhochai, S., Junjeera, C. and Ruttapron, C. 2000. Genetic diversity within lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPDs analysis. Acta Horticulturae 575 : 253–259.

Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 196 : 80-83.

Chen, S.C., Shao, H.S., Hu, D.Q. and Zhen, X.Q. 1994. Identification of mildew resistance gene from *Hevea* tree by RAPD technique. Chinese Journal of Tropical Crops 15 : 21-26.

Chundet, R., Cutler, R.W., Taranon, M. and Anuntalabhochai, S. 2007. Hybrid detection in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars using HAT-RAPD markers. Science Asia 33 : 307-311.

Ding, A.L., Cai, S.C., Xin, K.W. and Ping, S.F. 2001. AFLP fingerprinting analysis of elite *Hevea brasiliensis* germplasm. Acta Botanica Sinica 43 : 941-947.

Doyle, J.J and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12 : 13-15.

Eimert, K., Reutter, G. and Strolka, B. 2003. Fast and reliable detection of doubled haploids in *Asparagus officinalis* by stringent RAPD-PCR. Journal of Agricultural Science 141 : 73-78.

Katengam, S., Crane, J.M. and Knapp, S.J. 2002. The development of genetic map for meadowfoam comprised of amplified fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics 104 : 92-96.

Loveless, M.D. and Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetics structure in plant populations. Annual Review of Ecology and Systematics 15 : 65–95.

Low, F.C., Atan, S., Jaafar, H. and Tan, H. 1996. Recent advances in the development of molecular markers for *Hevea* studies. Journal of Natural Rubber Research 11 : 32-44.

Low, F.C. and Gale, M.D.1991. Development of molecular markers for *Hevea*. Journal of Natural Rubber Research 6 : 152-157.

Mackill, D.J., Zhang, Z., Redona, E.D. and Colowit, P.M. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome 39 : 969-977.

Medina, C., Garcia, I., Caro, M. and Aristizabal, F.A. 2007. AFLP analysis of somaclonal variation in *Hevea brasiliensis* somatic embryos. Revista Colombiana de Ciencias Quimico-Farmaceuticas 36 : 70-80.

Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R., and Sasaki, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Molecular Breeding 3 : 87-103.

Paterson, A.H. 1996. Genome mapping in plants. Academic Press. San Diego.

Ridout, J., and Donini, P. 1999. Use of AFLP in cereals research. Trends in Plant Science 4 : 76-79.

Rogers, S.O. and Bendich, A.J. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual A6 : 1-10.

Rohlf, F.J. 2002. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version-2.1. Applied Biostatistics. New York.

Staub, J.E., and Serquen, F.C. 1996. Genetic markers, map construction, and their applications in plant breeding. Horticultural Science 31 : 729-741.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabue, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23 : 4407-4414.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นจากพืช

1) CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

PVP-40	1.0	กรัม
$NaCl_2$	8.12	กรัม
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	4.0	กรัม
1.0 M Tris-HCl (pH 8.0)	10.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติม CTAB ปริมาตร 2 กรัม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าสารจะละลายหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เติมสาร β-mercaptoethanolเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำมาใช้

2) TE buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.0 M Tris-HCl (pH 7.5)	500	ไมโครลิตร
0.25 M Na_2EDTA (pH 8.0)	4.0	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทำ Agarose gel electrophoresis

1) TAE buffer ความเข้มข้น 5 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Tris Base	121.1	กรัม
Acetic acid	28.5	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	80	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

2) TBE buffer ความเข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	216.0	กรัม
Boric acid	110.0	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	80.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 4 ลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

3) DNA sample buffer

Bromophenol blue	125	มิลลิกรัม
Xylene cyanol FF	125	มิลลิกรัม
Glycerol	15.0	มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

4) Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรต่อ Ethidium bromide 1 กรัม

สารเคมีที่ใช้ในการทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

1) 30% Acrylamide Bis-Acrylamide solution ที่ผสมแล้วในอัตราส่วน 29 : 1 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) TBE buffer เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	216.0	กรัม
Boric acid	110.0	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	80.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 4 ลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

3) 10% (w/v) Ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Ammonium persulfate1.0 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4) 6X gel loading buffer (สำหรับ denaturing polyacrylamide gel) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

Formamide	950	ไมโครลิตร
5% Bromophenol blue	10	ไมโครลิตร
5% Xylene cyanol	10	ไมโครลิตร
1 M EDTA	20	ไมโครลิตร

5) Bind silaneสำหรับทากระจกแผ่นหลังที่ติดกับเจล

Bind silane	10	ไมโครลิตร
Glacial acetic acid	2.5	ไมโครลิตร
95% Ethanol	500	ไมโครลิตร

การเตรียมสารเคมีย้อมดีเอ็นเอด้วย Silver nitrate

1) 10% Acetic acid เตรียมปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Glacial acetic acid 100 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

2) 0.2% Silver nitrate ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Silver nitrate2.0 กรัม

3) Develop solution ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Sodium carbonate 2.5 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขณะใช้ให้เติม 40% Formaldehyde 500 ไมโครลิตร และ Sodium thiosulfate เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุนันทา แซ่ลิ่ม

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5410620024

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2554

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนโครงการเรียนดี คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

อยู่ระหว่างการตีพิมพ์