



ปัญหาพิเศษ

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามา
ปลูกในระยะแรกที่จังหวัดกระบี่และสกลนครเปรียบเทียบกับเชื้อ
พันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิลโดยใช้เครื่องหมาย
ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

**Genetic Diversity Evaluation in Early Introduced Clones of
Rubber Trees (*Hevea brasiliensis*) at Krabi and Sakon Nakhon
Provinces Compared with Rubber Clone Germplasm Collected
from Brazil Using SSR Marker**

นางสาวพิรุณพร เจริญพรรักษา

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

DEPARTMENT OF AGRONOMY

FACULTY OF AGRICULTURE KASETSART UNIVERSITY

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัด
กระบี่และสกลนครเปรียบเทียบกับเชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิลโดยใช้
เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

Genetic Diversity Evaluation in Early Introduced Clones of Rubber Trees (*Hevea brasiliensis*) at
Krabi and Sakon Nakhon Provinces Compared with Rubber Clone Germplasm Collected from
Brazil Using SSR Marker

โดย

นางสาวพริณพร เจริญพรรักษา

เสนอ

ภาควิชาพืชไร่นา

คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2557

พิรุณพร เจริญพรรักษา 2557: การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดกระบี่และสกลนครเปรียบเทียบกับเชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิลโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์
ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เกษตร ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษา
ปัญหาพิเศษหลัก: ดร.สุจินต์ เจนวิวัฒน์, 42 หน้า

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เกษตรกรผู้ปลูกยางพารามีความต้องการยางพันธุ์ดีมากขึ้น ในขณะที่ประเทศไทยมีฐานพันธุกรรมของยางพาราไม่มากนัก การศึกษานี้เป็นการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดกระบี่และจังหวัดสกลนครเปรียบเทียบกับเชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิล โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ HB41, HB42, HB49, HB56, HB57, HB64, HB72, HB79, HB86 และ HB87 และทำ Acrylamide gel electrophoresis เพื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GenAlEx 6.501 และ โปรแกรม past จากผลการศึกษพบว่า Molecular Variance ภายในประชากรเท่ากับ 76% ระหว่างประชากรเท่ากับ 24% และผล Dendrogram จากสูตร Jaccard's analysis พบว่าช่วง Similarity ที่ 0.2 สามารถจำแนกยางพาราได้ 5 กลุ่ม

Pirunporn Charoenpornraksa 2014: Genetic Diversity Evaluation in Early Introduced Clones of Rubber Trees (*Hevea brasiliensis*) at Krabi and Sakon Nakhon Provinces Compared with Rubber Clone Germplasm Collected from Brazil Using SSR Marker. Special Problems, Bachelor's Degree (Agriculture), Major Field Agriculture Science, Department of Agronomy. Special Problems Advisor : Dr.Sujin Jenweerawat, 42 pages.

The rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is the major economic crop. Farmers need better cultivated clones but currently Thailand has not much genetic database. This case of study was about genetic diversity evaluation in early introduced clones of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) at Krabi and Sakon Nakhon provinces compared with rubber clone germplasm collected from Brazil using SSR Marker. Using primers that were screened 10 primers (HB41, HB42, HB49, HB56, HB57, HB64, HB72, HB79, HB86 and HB87) for PCR (Polymerase Chain Reaction) technique and making Acrylamide gel electrophoresis. The data were analyzed using GenAlEx 6.501 and Past program. The results showed that percentages of molecular variance within populations are 76% and 24% are among populations. Dendrogram using data from Jaccard's analysis showed that rubber samples could be clustered into 5 groups with similarity at 0.2.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สุจินต์ เจนวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมพล ภูมิไชย อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษร่วม ที่ให้คำปรึกษาตลอดจนการตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาฟิสิกส์ไร่นาทุกท่านที่มอบความรู้ต่างๆ เพื่อมาใช้ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอขอบคุณนางสาวภาวิดา ไชยวงศ์ ที่ให้คำแนะนำและดูแลช่วยเหลือในการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ และนางสาวจารุวรรณ จันทรโนนแซง ที่ช่วยเหลือในขั้นตอนการดำเนินงานจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พริณพร เจริญพรรักษา

ธันวาคม 2557

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
อุปกรณ์	16
วิธีการ	20
การวิเคราะห์ข้อมูล	25
สถานที่ทำการทดลอง	26
ระยะเวลาทำการทดลอง	26
ผลและวิจารณ์ผล	27
สรุปและข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	34

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สถานที่เก็บรวบรวมเมล็ดยางพาราและจำนวนต้นกล้ายางพารา	16
2	ข้อมูล SSR primer	18
3	ส่วนประกอบของ Master mix	21
4	โปรแกรม Thermocycling	22
5	การวิเคราะห์ Pairwise Population Matrix of Nei's Genetic Distance	28
6	การจัดกลุ่มตัวอย่างยางพารา	30

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB64	21
2	เดนโดรแกรม (Dendrogram) จากการวิเคราะห์ cluster analysis ด้วยวิธี Pair-Group Method (Jaccard's analysis) โดยการใช้ SSR marker	29
3	เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Variance) ของประชากรยางพารา	30

ภาพผนวกที่

1	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB41	36
2	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB42	36
3	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB49	36
4	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB56	37
5	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB57	37
6	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB72	37
7	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB79	38
8	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB86	38
9	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB87	38
10	การบดตัวอย่างใบอ่อนยางพาราด้วย 2x CTAB	40
11	การแยกชั้นระหว่างส่วนใสกับChloroform: Isoamyl alcohol (24:1)	40
12	ส่วนใสที่มีดีเอ็นเอ	40
13	การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop2000	41
14	PCR product	41
15	การประกอบ Chamber เข้ากับกระจก	41
16	การเทเจลพอลิอะคริลาไมด์	42
17	ชุดเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	42
18	การโหลดตัวอย่าง PCR product ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	42

**การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่
จังหวัดกระบี่และสกลนครเปรียบเทียบกับเชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศ
บราซิลโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์**

**Genetic Diversity Evaluation in Early Introduced Clones of Rubber Trees (*Hevea
brasiliensis*) at Krabi and Sakon Nakhon Provinces Compared with Rubber Clone
Germplasm Collected from Brazil Using SSR Marker**

คำนำ

การปลูกยางพาราของประเทศไทยเริ่มในปี พ.ศ. 2442 โดยพระยารัษฎานุประดิษฐ์ มหิศรภักดี (คอซิมบี๊ ณ ระนอง) ได้เดินทางไปดูงานที่ประเทศมาเลเซีย เห็นว่าอาชีพทำสวนยางให้ผลดี ปี พ.ศ. 2444 มีการนำกล้ายางจากอินโดนีเซียกลับมาเมืองไทยและแจกจ่ายส่งเสริมให้ราษฎรปลูกยางแพร่หลายไปทั่วจึงได้รับการยกย่องเป็นบิดาแห่งยางพาราไทย (สุนิสา, 2548) ปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตยางธรรมชาติมากที่สุดในโลก มีปริมาณการผลิตยางเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และยังเป็นประเทศที่ส่งออกยางธรรมชาติมากที่สุดในโลกด้วย (สถาบันวิจัยยาง, 2550) ความต้องการของเกษตรกรในการใช้พันธุ์ยางมีเพิ่มมากขึ้น ก่อให้เกิดความต้องการพันธุ์ที่มีศักยภาพและคุณภาพดี (สุรพล, 2548) ความแปรปรวนทางพันธุกรรมเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้เกิดความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ ในระยะหลังที่เกษตรกรเลือกปลูกยางพันธุ์แนะนำเพิ่มมากขึ้นทำให้โคลนยางพาราที่นำเข้ามาในระยะแรกเริ่มสูญหายไป แนวทางการปรับปรุงพันธุ์ยางจึงพยายามเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยมีการนำเข้าเชื้อพันธุกรรมยางจากประเทศบราซิล แต่การใช้เชื้อพันธุกรรมจากแหล่งที่ต่างกัน (exotic germplasm) อาจพบปัญหาในเรื่องการปรับตัว จึงมีแนวคิดว่าจะอาจใช้โคลนยางพาราที่นำเข้ามาในระยะแรกซึ่งยังมีหลงเหลือในบางสถานที่ของพื้นที่แหล่งปลูกยางเดิม

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์
เปรียบเทียบโคลนยางพาราที่นำเข้ามาในระยะแรก เชื้อพันธุกรรมจากประเทศบราซิล และพันธุ์ยาง
แนะนำจะทำให้สามารถตัดสินใจเลือกใช้เชื้อพันธุกรรมยางในการปรับปรุงพันธุ์ยางได้เหมาะสม ดังนั้น
การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามา
ปลูกในระยะแรกที่จังหวัดกระบี่และจังหวัดสกลนครเปรียบเทียบกับเชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวม
มาจากประเทศบราซิล โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำมาปลูกในระยะแรกที่จังหวัด
กระบี่ สกลนคร เปรียบเทียบกับเชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิล

การตรวจเอกสาร

1. ยางพารา

Hevea brasiliensis หรือยางพาราเป็นไม้ยืนต้น เจริญได้ดีในเขตร้อนชื้น มีฝนตกชุก ถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตป่าฝนลุ่มน้ำอเมซอน เป็นพืช Diploid ($2n=36$, $x=9$) ยางพาราเป็นพืชผสมข้าม และเป็น Monoecious plant คือในหนึ่งต้นมีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียในต้นเดียวกันแต่อยู่ต่างตำแหน่งกัน (Mantello *et al.*, 2012)

ยางพาราเป็นพืชในสกุล (Genus) *Hevea* วงศ์ (Family) *Euphorbiaceae* ไม้ในวงศ์นี้มีอยู่ด้วยกันไม่น้อยกว่า 10 ชนิด ยางธรรมชาติที่นิยมปลูกอยู่ในปัจจุบันกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ คือ *Hevea brasiliensis* ซึ่งเป็นพืชที่ได้มาจากเมืองท่าชื่อ พารา (Para) บนฝั่งแม่น้ำอเมซอน ประเทศบราซิล องค์การสากลระหว่างประเทศจึงยอมรับคำว่า ยางพารา (Para rubber) และยาง *Hevea brasiliensis* ถือเป็นตัวแทนของยางธรรมชาติทั่วไป เนื่องจากเป็นยางชนิดที่ดีที่สุดในการให้น้ำยางและเหมาะสมในการปลูก จึงนิยมปลูกแพร่หลายเฉพาะชนิดนี้ มีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อได้ผลผลิตน้ำยางสูงขึ้น ผลผลิตต่อไร่สูง ดูแลรักษาได้ง่าย ต้านทานโรค (สุนิสา, 2548)

1.1. ประวัติความเป็นมา

ชาวพื้นเมืองอเมริกากลางและอเมริกาใต้เรียกต้นไม้ที่ให้ยางว่า คาอูทช์ (Caoutchouc) แปลว่าต้นไม้ร้องไห้ (องค์การสวนยาง, ม.ป.ป.) ชาวอินเดียแดงเผ่ามายัน นำน้ำยางจากต้นยางพารามาใช้ประโยชน์ เช่น ทำรองเท้า โดยรองน้ำยางใส่ภาชนะแล้วจุ่มเท้าลงในน้ำยางทิ้งไว้แห้งและทำซ้ำจนได้รองเท้าที่มีความหนาและขนาดเข้ากับเท้าพอดีตามต้องการ และในอเมริกาได้นำน้ำยางมาเคลือบผ้าเพื่อทำเสื้อกันฝนและผ้ากันน้ำ เมื่อปี พ.ศ. 2036 คริสโตเฟอร์ โคลัมบัส (Christopher Columbus) ได้ค้นพบลูกบอลยางที่เคี้ยวกระดอนได้จากชาวพื้นเมืองไฮติ จนถึงปี

พ.ศ.2313 โจเซฟ พรีสตี (Joseph Priestley) พบว่ายางสามารถบร่ายคำของดินสอได้โดยที่กระดาษไม่เสีย จึงเรียกยางว่า Rubber ซึ่งเป็นคำเรียกเฉพาะในอังกฤษและฮอลแลนด์เท่านั้น และเรียกของเหลวที่ออกมาจากต้นยางว่า Latex ส่วนในประเทศยุโรปอื่นๆ ในสมัยนั้น เรียกยางว่า คาอูท์ชุก ทั้งสิ้น (สุนิสา, 2548)

ในปี พ.ศ.2386 ชาลส์ กูดเยียร์ ได้ค้นพบการทำให้ยางคงรูปโดยการอบความร้อน (Vulcanization) และยางที่ผสมกำมะถันและตะกั่วขาว เมื่อย่างไฟแล้วแม้ยางจะกระทบความร้อนหรือเย็นจัดจะเปลี่ยนรูปไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งนับได้ว่าเป็นการเปิดโอกาสในการพัฒนาและใช้ประโยชน์จากยางมากขึ้นจนถึงปัจจุบัน (องค์การสวนยาง, ม.ป.ป.)

1.2. การปลูกยางพาราในเอเชีย

ปี พ.ศ. 2402 เซอร์ คลีเมนส์ มาร์คแฮม (Sir Clements Markham) นำพันธุ์ยางมาทดลองปลูกในอินเดียเป็นครั้งแรกแต่ไม่ประสบความสำเร็จ จึงได้ทดลองปลูกยางในพื้นที่ต่างๆ ที่เป็นอาณานิคมของอังกฤษ และพบว่ายางพาราที่ปลูกบริเวณแหลมมลายูให้ผลดี ในเอเชียนิยมปลูกยางพารากันอย่างแพร่หลาย อาจเนื่องมาจากมีองค์ประกอบที่เหมาะสม ทั้งภูมิประเทศ สภาพดิน ปริมาณฝน แรงงานที่หาได้ง่าย สามารถปลูกยางบนเนินเขาได้ ยางพาราเป็นพืชปลูกง่าย ไม่ต้องดูแลรักษามากนัก โรคและศัตรูพืชน้อย ผลผลิตยางสามารถขายได้ตลอด และใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วนของต้นยาง และในปี พ.ศ.2419 เซอร์ เฮนรี ริคแฮม (Sir Henry Wickham) เริ่มปลูกยางในศรีลังกาจนประสบความสำเร็จ จึงได้รับการยกย่องว่าเป็นบิดาแห่งการปลูกยาง ปี พ.ศ.2427 เซอร์ ทริแมน (Sir Trimman) ได้เริ่มพัฒนาการกรีดยางครั้งแรกที่ประเทศศรีลังกา จนกระทั่งปี พ.ศ.2432 ริดลีย์ (Ridley) ได้เริ่มพบวิธีการกรีดยางและเวลาการกรีดยางที่เหมาะสม จึงเป็นต้นกำเนิดสู่รากฐานของสวนยางพารา ซึ่งเป็นอาชีพของเกษตรกรในภูมิภาคนี้ตั้งแต่นั้นมา จนกลายเป็นแหล่งผลิตยางพาราที่ใหญ่ที่สุดของโลกในปัจจุบัน (สุนิสา, 2548)

1.3. การปลูกยางพาราในประเทศไทย

เริ่มในปี พ.ศ.2442 โดยพระยารัษฎานุประดิษฐ์ มหิศรภักดี (คอซิมบี๊ ณ ระนอง) ขณะดำรงตำแหน่งเจ้าเมืองตรัง เดินทางไปดูงานที่ประเทศมาเลเซีย ได้เล็งเห็นว่าอาชีพทำสวนยางให้ผลดี เมื่อปี พ.ศ.2444 พระสถลสถานพิทักษ์ นำกล้ายางจากอินโดนีเซียกลับมาเมืองไทยโดยการนำสำลิจับน้ำหุ้มราก แล้วห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์บรรจุลงในลังใส่เรือนำกลับมาปลูกบริเวณหน้าบ้านพัก อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง หลังจากนั้นพระยารัษฎานุประดิษฐ์ มหิศรภักดีได้ส่งคนไปเรียนรู้วิธีปลูกยางมาเพื่อมาสอนประชาชน นักเรียนของท่านที่ส่งไปนั้น ส่วนแต่เป็นเจ้าเมือง นายอำเภอ กำนัน และผู้ใหญ่บ้านทั้งสิ้น พร้อมกันนั้นท่านได้สั่งให้กำนันและผู้ใหญ่บ้าน นำพันธุ์ยางไปแจกจ่ายและส่งเสริมให้ราษฎรปลูกกันทั่วไป ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเป็นยุคต้นยาง ชาวบ้านเรียกยางนี้ว่า “ยางเทศา” พระยารัษฎานุประดิษฐ์ มหิศรภักดี จึงได้รับการยกย่องเป็น “บิดาแห่งยางพาราไทย” อนุสาวรีย์ของท่านตั้งอยู่ที่ตำบลนาค้อนอกชาย ตำบลทับเที่ยง จังหวัดตรัง (สุนิสา, 2548)

ต่อมาปี พ.ศ.2454 หลวงราชไมตรี (ปุม ปุณศรี) ได้นำพันธุ์ยางพาราไปปลูกที่จังหวัดจันทบุรี ภาควะวันออก ส่งผลให้อาชีพการทำสวนยางแพร่หลายและขยายออกไปอย่างรวดเร็วยางจึงมีความสำคัญ และเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศไทยมาจนทุกวันนี้ (สุนิสา, 2548)

1.4. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

- 1.2.1. ลำต้น เป็นส่วนสำคัญที่สุดของต้นยางเพราะเป็นบริเวณที่เก็บเกี่ยวผลผลิตในรูปของน้ำยางสดและการนำไม้ยางไปใช้ประโยชน์เมื่อถึงกำหนดเวลาในการโค่นเพื่อปลูกใหม่ทดแทน ต้นยางเป็นไม้เนื้ออ่อนมีเนื้อไม้สีเขียวปนเหลือง ลำต้นประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ คือ
 1. เนื้อไม้ (Wood) แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นเนื้อไม้แข็ง (Pith) และส่วนที่เป็นเนื้อไม้ จะมีส่วนที่เป็นเนื้อไม้แข็งอยู่ด้านในตรงกลางลำต้น ส่วนที่เป็นเนื้อไม้จะอยู่ถัดออกมา

2. เนื้อเยื่อเจริญ (Cambium) เป็นส่วนสำคัญมากจะเป็นเนื้อเยื่อบางๆ อยู่โดยรอบเนื้อไม้ มีหน้าที่สร้างความเจริญเติบโตให้กับต้นยาง
3. เปลือกไม้ (Bark) อยู่ถัดออกมาจากเนื้อเยื่อเจริญด้านนอกสุดเป็นส่วนที่มีความสำคัญเพราะท่อน้ำยางอยู่ในส่วนนี้ เปลือกยางพาราจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนนอกสุดเรียกว่า Epidermis มีสีเขียวเมื่ออายุอ่อน แต่เมื่ออายุมากกลายเป็นสีน้ำตาลและหนาขึ้นเรียกว่า Cork ส่วนกลางเป็นส่วนที่มีเปลือกแข็งประกอบด้วย Stone cell จะมีมากน้อยแตกต่างกันไปตามพันธุ์ Stone cell นี้ทำให้เปลือกแข็ง มีสีเหลืองประปราย ถ้ามีจำนวนมากทำให้กรีดยางลำบากขึ้น ส่วนในเป็นเปลือกอ่อน มีท่อน้ำยางเรียงตัวมาก โดยเฉพาะด้านในสุดที่ติดกับเนื้อเยื่อเจริญจะยังมีท่อน้ำยางมากขึ้น ส่วนเปลือกแข็งจะมีท่อน้ำยางอยู่ประปราย ส่วนนอกสุดมีสีน้ำตาล ตกกระและไม่มีท่อน้ำยางอยู่ (สุนิสา, 2548)

1.2.2. **ทรงพุ่ม** ประกอบด้วยใบและกิ่งก้านสาขาที่ประกอบขึ้นเป็นหน่วยที่มีรูปร่างแตกต่างไปตามลักษณะพันธุ์ มีหน้าที่หลักในการสังเคราะห์แสง และลำเลียงแร่ธาตุ ธาตุอาหารต่างๆ (สุนิสา, 2548)

1.2.3. **ใบ** ใบยางเป็นใบประกอบ (Compound leaf) หนึ่งก้านใบมีใบย่อย (Leaf let) 3 ใบ เช่น พันธุ์ RRIM 600, GT 1, และ PR 255 เป็นต้น แต่ยางบางพันธุ์อาจมีใบย่อย 4-5 ใบ เช่น พันธุ์ RRIM 701, RRIM 703 และ PB 235 เป็นต้น ลักษณะและขนาดของใบ สีใบมีสีเขียวเข้มเป็นมัน เข้มหรือจางมากน้อยจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ ใบยางแตกออกเป็นชั้นเรียกว่า “ฉัตร” ฉัตรแตกต่างกันไปตามพันธุ์ ระยะเวลาที่เริ่มแตกฉัตรจนถึงใบฉัตรแรกนั้นแก่เต็มที่ 2-3 เดือน (สุนิสา, 2548)

1.2.4. **กิ่งก้าน** ประกอบด้วยกิ่งขนาดใหญ่ซึ่งเป็นส่วนที่เจริญต่อจากลำต้น 2-3 กิ่ง เป็นกิ่งหลัก ส่วนกิ่งที่แตกออกจากกิ่งหลักเป็นกิ่งรอง ขนาดและมุมของการแตกกิ่งหลัก กิ่งรอง มีผลทำให้ลักษณะและรูปทรงของทรงพุ่มแตกต่างกัน

ระหว่างพันธุ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งจะมีผลต่อความแข็งแรง ความต้านทานลม พายุ โรคและแมลงต่างๆ โดยส่งผลรวมต่อการเจริญเติบโต ปกติต้นยางจะมีการผลัดใบในฤดูแล้งหรือช่วงเดือนกลางฤดูหนาวทุกปี ยกเว้นต้นยางเล็กที่ยังไม่แตกกิ่งก้านสาขาหรือยางเล็กที่มีอายุไม่ถึง 3 ปี จะไม่ผลัดใบ ช่วงเวลาที่ยางผลัดใบนับตั้งแต่ใบร่วงจนถึงใบออกใหม่แตกออกและแก่เต็มที่ประมาณ 2-3 เดือน ซึ่งช่วงดังกล่าวจะหยุดกรีดยางและเป็นช่วงที่ต้นยางได้หยุดพัก (สุนิสา, 2548)

- 1.2.5. **ดอก** ทำหน้าที่ผสมพันธุ์เพื่อขยายพันธุ์ ดอกยางจะออกดอกตามปลายกิ่ง หลังจากที่ยืนผลัดใบ โดยออกพร้อมกันกับใบอ่อนที่แตกออกใหม่ ดอกยางมีลักษณะเป็นช่อแบบ Compound raceme หรือ panicle ในแต่ละช่อดอกมีหลายกิ่งซึ่งจะมีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในช่อเดียวกัน โดยปกติจะมีดอกตัวผู้มากกว่าดอกตัวเมีย ปกติยางจะออกดอกปีละ 2 ครั้ง ราวๆเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมิถุนายนครั้งหนึ่ง และในเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคมอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งการออกดอกครั้งแรกเป็นการออกดอกตามฤดูกาล ซึ่งจะได้ผลผลิตเมล็ดมากกว่าการออกดอกครั้งที่สอง (สุนิสา, 2548)
- 1.2.6. **ผลและเมล็ด** ผลยางเกิดจากการผสมเกสรของเกสรตัวผู้กับเกสรตัวเมีย เป็นพืชที่มีการผสมพันธุ์แบบเปิด พันธุ์ไหนจะผสมกับพันธุ์ไหนหรือเกสรตัวผู้จากต้นใดจะไปผสมกับเกสรตัวเมียจากต้นใดก็ได้ ทำให้เมล็ดที่ได้มีโอกาสเป็นลูกผสมมาก จึงไม่นิยมนำเมล็ดพันธุ์ยางไปปลูกโดยตรงเพราะอาจกลายพันธุ์ได้ ผลยางมีลักษณะเป็นพู ปกติมี 3 พู ในแต่ละพูจะมีเมล็ดอยู่ภายใน ผลอ่อนมีสีเขียว ถ้าแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแข็ง ผลโตเต็มที่ใช้เวลา 2 เดือนครึ่งถึง 3 เดือน เมื่อผลแก่จัดแล้วผลจะแตกและร่วงหล่นออกมาตกลงสู่พื้นดิน ส่วนเมล็ดยางมีสีน้ำตาลลายขาวคล้ายสีเมล็ดละหุ่ง มีขนาดเมล็ดยาว 2-2.5 เซนติเมตร กว้าง 1.5-2.5 เซนติเมตร หนัก 3-6 กรัม เมล็ดประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ

1. เปลือกเมล็ด (Seed coat) ทำหน้าที่ป้องกันเอ็นโดสเปิร์มและต้นอ่อนมิให้ได้รับอันตรายจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ
2. เอ็นโดสเปิร์ม (Endosperm) ทำหน้าที่สะสมอาหารสำหรับต้นอ่อนในระยะแรก
3. ต้นอ่อน (Embryo) ประกอบด้วยใบเลี้ยง ปลายราก ยอดอ่อน ทำหน้าที่เจริญเติบโตเป็นต้นต่อไป

เมล็ดขางเมื่อหล่นใหม่ๆ จะมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงและจะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยเปอร์เซ็นต์ความงอกจะลดลงวันละประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ฉะนั้นในสภาพปกติเมล็ดขางจะสามารถรักษาความงอกไว้ได้ประมาณ 20 วัน ถ้าต้องการนำเมล็ดขางไปเพาะสำหรับใช้ประโยชน์จะต้องเลือกเมล็ดที่หล่นใหม่ๆ และต้องรีบนำไปเพาะทันที

เมล็ดขางจะไม่นิยมนำมาปลูกทำสวนยางโดยตรง แต่จะมีความสำคัญในการใช้สร้างแปลงกล้าขาง เพื่อจะใช้เป็นต้นตอในการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการติดตา (สุนิสา, 2548)

- 1.2.7. ราก เป็นส่วนสำคัญที่ทำหน้าที่เกาะยึดพื้นที่ดินและหาอาหาร ในขณะที่เริ่มงอกใหม่ๆ มีส่วนของ radical งอกออกมาและเจริญเติบโตเป็นรากแก้ว (Tap root) ซึ่งมีขนาดใหญ่ ต่อมาจะมีรากแขนง (Lateral root) แดกออกจากรากแก้วแผ่ออกไปไกลรอบทรงพุ่มทำหน้าที่ยึดลำต้นและดูดซึมธาตุอาหารและน้ำ ส่วนรากฝอยเป็นรากที่แดกออกจากรากแขนงแผ่กระจายทั่วไปบริเวณทรงพุ่มและอยู่หนาแน่นมากบริเวณผิวหน้าดินที่มีความลึกลงไปไม่เกิน 30 เซนติเมตร ทำหน้าที่ดูดซึมธาตุอาหารนำไปเลี้ยงลำต้นและกิ่งก้านสาขาในระยะแรกของการเจริญเติบโต รากขางจะแผ่ขยายออกนอกลำต้นช้าๆ เป็นบริเวณไม่กว้างนัก แต่หลังจากต้นขางอายุ 3 ปีขึ้นไปแล้วนั้นรากจะแผ่ขยายออกไปกว้างเต็มตลอดทั้งแถวของขาง (สุนิสา, 2548)

- 1.2.8. **น้ำยาง** เป็นของเหลวสีขาวถึงขาวปนเหลืองข้นขึ้น ท่อน้ำยางมีการจัดเรียงตัวอยู่ในเปลือกของต้นยางโดยเฉพาะอย่างยิ่งเปลือกด้านในที่อยู่ติดกับเนื้อเยื่อเจริญ การที่จะนำน้ำยางออกมาจากต้นยางจะต้องใช้มีดกรีดเปลือกต้นยางเพื่อตัดท่อน้ำยางออกจากกัน น้ำยางมีส่วนประกอบสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นเนื้อยางและส่วนที่ไม่ใช่เนื้อยาง ตามปกติในน้ำยางสดจะมีเนื้อยางแห้งอยู่ประมาณ 25-45 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนของเนื้อยางแห้งเป็นส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ (สุนิสา, 2548)

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอและการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA marker and DNA fingerprinting)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งต่างๆ บน โครโมโซม (Nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนล (Mitochondrial DNA หรือ Chloroplast DNA) (สุนิสา, 2548) พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์และมีความแตกต่าง (Polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ (จุฑาพร, 2555)

ไมโครแซทเทลไลต์ (Microsatellite) หมายถึง ลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งต่างๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วย 1-6 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส เรียงตัวต่อกันในทิศทางเดียวกัน ที่ตำแหน่งหนึ่งอาจมีลำดับเบสซ้ำยาวต่อเนื่องกันได้หลายร้อยคู่เบส มีชื่อเรียกแบบอื่นได้แก่ Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ Short Tandem Repeat (STR) ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์นี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม แต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณก็พบมาก บางบริเวณก็พบน้อยกว่า ตามแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิต การกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีนหรือส่วนนำรหัสของยีน (Non-coding region) โดยเฉพาะพวกพวกที่ชุดซ้ำมีขนาดไม่เท่ากับ 3 เบส เพราะถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนของชุดซ้ำจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) มีส่วนน้อยที่พบอยู่ในส่วนนำรหัสของยีน หรือส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน โปรแกรมที่ใช้จึงต้อง

สามารถจับกับดีเอ็นเอได้ทั้ง 2 ทิศทาง โดยมีปลาย 3' เข้าหากัน ซึ่งจะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งดังกล่าวได้ เรียกว่าวิธีตรวจสอบดีเอ็นเอแบบนี้ว่า Microsatellite-primed PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา (สุรินทร์, 2552)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (Microsatellite marker)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ หรือเครื่องหมาย SSR (SSR marker) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (Single-locus marker) จากการที่ทราบว่าลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์พบได้มากมาย กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนม โดยลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลต์ มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงชุดเดียวในจีโนม (Unique sequence) ดังนั้นถ้าสามารถหาลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่งใดได้ นำมาออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว การใช้เทคนิค PCR จึงต้องการไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีลำดับเบสเหมือน (หรือเป็นคู่สม) กับลำดับเบสที่อยู่ขนาบข้างของไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่งดังกล่าว และจำเป็นต้องมีข้อมูลลำดับเบสที่ต้องการ และเนื่องจากส่วนไมโครแซทเทลไลต์เป็นส่วนที่มีการกลายพันธุ์โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งที่รวมเอาส่วนไมโครแซทเทลไลต์ไว้ภายใน จึงมีโอกาสดูขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จึงพบพอลิมอร์ฟิซึมค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (Codominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ ข้อเสียของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ ต้องทราบลำดับเบสที่อยู่ข้างเคียงตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ คือ ต้องมีข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จึงยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง (สุรินทร์, 2552)

การตรวจสอบดีเอ็นเอส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ทำได้หลายวิธี ได้แก่การทำ Southern blot hybridization ซึ่งวิธีนี้จะตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลต์แบบใดแบบหนึ่งตามชนิดของโพรบ (Probe) จากหลายตำแหน่งพร้อมกัน (Multi-locus marker) และอาจดัดแปลง

มาใช้เทคนิค PCR โดยสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ นำมาใช้เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์จะไปจับกับลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลต์ ชนิดเดียวกันได้หลายตำแหน่ง และเกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากหลายบริเวณ (สุรินทร์, 2552)

ความแตกต่าง หรือ พอลิมอร์ฟิซึม (Polymorphism) ที่เกิดจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ คือความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่มีในไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่งเดียวกันในตัวอย่างแต่ละตัวอย่างไม่เท่ากัน ซึ่งจะตรวจสอบได้ทันทีเมื่อนำมาแยกขนาดโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลพอลิอะคริลาไมด์ที่มีสารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (Denaturing polyacrylamide gel) ขนาดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอาจเป็นเพียง 1 ชุดซ้ำ คือ 2 คู่เบส ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จึงต้องเลือกตำแหน่งที่ไม่ห่างกันมากนัก โดยผลผลิต PCR ที่คาดหมายควรมีขนาดไม่เกิน 300 คู่เบส เพื่อให้การแยกขนาดของดีเอ็นเอที่มีความยาวต่างกันน้อยๆ มีประสิทธิภาพ ผลผลิต PCR ที่ได้ อาจตรวจสอบโดยวิธีติดฉลากไพรเมอร์ ชนิดหนึ่งด้วยสารกัมมันตรังสี หรือสารเรืองแสง แล้วติดตามผลโดยทำออโตเรดิโอกราฟหรือใช้เครื่องอัดโนมดี หรือการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ในเทรพ หรือสีย้อมดีเอ็นเอชนิดอื่น ตัวอย่างที่เป็นโฮโมไซโกตจะพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ส่วนที่เป็นเฮเทอโรไซโกตจะพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ (สุรินทร์, 2552)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย เนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณโดย PCR จึงต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบก็มีขนาดเล็ก จึงไม่ต้องใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีคุณภาพดีมากนัก ผลการตรวจสอบยังมีความแม่นยำ สามารถส่งข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการใดก็ได้ มีพอลิมอร์ฟิซึมสูง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีการข่มแบบ Codominance จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ มีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม เหมาะสำหรับการใช้ในการทำแผนที่จีโนม ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้ (สุรินทร์, 2552)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมพ์หรือแบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะ สามารถตรวจสอบพอลิมอร์ฟิซึมได้ เดิมได้จากการนำดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ (Genomic DNA) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้ายขึ้นดีเอ็นเอที่แยกแล้วทั้งหมดไปยังแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (Membrane filter) ไฮบริไดซ์กับโพรบ (Probe) ซึ่งมาจากดีเอ็นเอส่วนที่เป็นมินิแซเทไลต์ สามารถตรวจสอบขึ้นดีเอ็นเอได้จากหลายตำแหน่ง (Multi-locus) พร้อมๆกัน เกิดเป็นลายพิมพ์ที่จำเพาะกับแต่ละบุคคล มีความหมายเดียวกับคำว่า DNA profiling หรือ DNA typing การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปัจจุบันยังหมายรวมถึงวิธีตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ที่เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งพร้อมๆกัน (Multi-locus PCR) เพราะทำให้เกิดแบบแผนของดีเอ็นเอจำเพาะเช่นเดียวกัน (สุรินทร์, 2552)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่จำเพาะกับช่วงของดีเอ็นเอหรือยีนหนึ่งๆ โดยต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน เพื่อเป็นข้อมูลในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ แล้วจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในการตรวจสอบพอลิมอร์ฟิซึมระหว่างพันธุ์พืชหรือสัตว์ เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตำแหน่งจำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว (Single-locus) การตรวจสอบดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งโดยวิธี PCR ทำได้โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม ไพรเมอร์ที่เป็นไมโครแซเทไลต์ดีเอ็นเอ (SSR) หรือไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จากลำดับเบสบางส่วนของมินิแซเทไลต์ดีเอ็นเอ เพื่อให้สามารถเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้หลายตำแหน่ง และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากหลายบริเวณ เกิดเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะโดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว ซึ่งมีรายงานว่าใช้ได้ผลดีกับพืชหลายชนิด (สุรินทร์, 2552)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอหากนำมาบันทึกความเหมือนและความต่างของแถบดีเอ็นเอ สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสายพันธุ์หรือชนิดต่างๆ ได้โดยการคำนวณค่าตัวแปรทางพันธุกรรม เช่น ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarity, GS) หรือระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance, GD) เป็นต้น (จุฑาพร, 2555)

เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

เนื่องจากการได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) จึงมีการใช้ประโยชน์จากเทคนิคดังกล่าวเพื่อการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของสิ่งมีชีวิตด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ ซึ่งเครื่องหมายดี

เอ็นเอที่มีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตจะมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการใช้ระบุชนิดสิ่งมีชีวิต การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ จากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Gel electrophoresis) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การระบุสายพันธุ์หรือชนิดของสิ่งมีชีวิต การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์หรือเมล็ดพันธุ์ ศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต และการวิเคราะห์ความแตกต่างของฐานพันธุกรรมเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ (จุฑาพร, 2555)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอหากนำมาบันทึกความเหมือนและความต่างของแถบดีเอ็นเอ สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสายพันธุ์หรือชนิดต่างๆ ได้โดยการคำนวณค่าตัวแปรทางพันธุกรรม เช่น ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Genetic similarity, GS) หรือระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance, GD) เป็นต้น (จุฑาพร, 2555)

Distance-based method เป็นการสร้าง Tree หรือ Dendrogram ที่ใช้สำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเริ่มจากการเปลี่ยนข้อมูลทางโมเลกุลให้เป็นค่า Distance ก่อน โดยคำนวณค่า Distance ระหว่างแต่ละตัวอย่างเป็นคู่ๆ นำมาทำเป็น เมทริกซ์ (Metrix) แล้วจึงสร้าง Tree ซึ่งค่า Distance คำนวณมาจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือโปรตีนที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายแบบต่างๆ ในการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง นิยมใช้ระบบตัวเลข 1 และ 0 โดยตัวเลข 1 แสดงการมีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง 0 แสดงการไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันนั้น ซึ่งใช้ได้ทั้งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบครั้งละ 1 ตำแหน่ง และหลายตำแหน่ง การคำนวณค่า Distance มีหลายวิธี เริ่มแรกจะคำนวณค่าความคล้ายคลึง Genetic similarity (GS) หรือ Similarity coefficient (S) แล้วจึงคำนวณค่า Genetic distance (GD) จากสูตร $GD = 1 - GS$ และค่า GS สามารถคำนวณได้หลายวิธี เช่น วิธีของ Jaccard (1908) ที่จะคิดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันและให้ความสำคัญกับ 3 เหตุการณ์ที่พบแถบดีเอ็นเอ คือ การพบแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งสองตัวอย่าง การพบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ 1 แต่ไม่พบในตัวอย่างที่ 2 และการพบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ 2 แต่ไม่พบในตัวอย่างที่ 1 เมื่อได้ค่า GS แล้วจึงคำนวณค่า Distance เพื่อนำมาใช้สร้าง Tree ต่อไป (สุรินทร์, 2552)

3. ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity)

หน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดเป็นส่วนประกอบที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต มีบทบาทต่อการกำหนดลักษณะความจำเพาะ และความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งสิ่งมีชีวิตต่างๆ จะมีความแตกต่างกันมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของจุดกำเนิดและการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เช่น ม้ากับลาเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีจุดกำเนิดและการวิวัฒนาการที่คล้ายคลึงกัน จึงย่อมจะมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมากกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ (ศูนย์ข้อมูลสิ่งแวดล้อมฯ, ม.ป.ป.) สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้รับการถ่ายทอดมาจากรุ่นพ่อแม่และส่งต่อไปยังรุ่นต่อไป ลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดนั้นผ่านทางยีนส์ (Genes) ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งส่งผลให้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันไปตาม Gene ที่ได้รับการถ่ายทอดมา ตัวอย่างของความหลากหลายทางพันธุกรรมมีอยู่ทุกครอบครัวของสิ่งมีชีวิต ฟีน้องอาจมีสีผม สีผิวและสีของนัยน์ตาที่แตกต่างกัน เป็นต้น (ภาควิชาชีววิทยาฯ, ม.ป.ป.)

ความแปรผันทางพันธุกรรม (Genetic variation) มีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับความอยู่รอดของชนิดพันธุ์ ในแต่ละหน่วยชีวิตนั้นมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (Mutation) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในระดับ Gene หรือในระดับโครโมโซม ผสมผสานกับกลไกที่เรียกว่า Crossing-over ที่เกิดขึ้นในขณะที่มีการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เป็นผลทำให้ Gene สลับที่รวมตัวกันใหม่ (Recombination) ซึ่งจะถูกถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานต่อไปในประชากร (ภาควิชาชีววิทยาฯ, ม.ป.ป.)

อุปกรณ์และวิธีการ

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัด กระบี่และสกลนครเปรียบเทียบกับเชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิลโดยใช้ เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

อุปกรณ์

1. ยางพาราที่ใช้ในการทดลอง

ต้นกล้ายางพาราที่ได้จากการเพาะเมล็ดยางที่เก็บมาจาก จ.กระบี่ จ.สกลนคร แปลงเชื้อ พันธุกรรมยางที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิล ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรภูเก็ต และจากสถานที่อื่น ๆ ที่ปลูกพันธุ์ยางแนะนำใน 4 สถานที่ รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สถานที่เก็บรวบรวมเมล็ดยางพาราและจำนวนต้นกล้ายางพารา

ประชากร	รหัสสถานที่	สถานที่เก็บเมล็ดยางพารา	จำนวนต้นกล้า ยางพารา
1	SKN	วัดหลวงปู่มั่น จ.สกลนคร	9
2	S14	ยาง อายุอย่างน้อยประมาณ 40 ปี มีจำนวนประมาณ 200 ต้น ในพื้นที่ของคุณสุรัตน์ บุญชูวงศ์ หมู่ที่ 2 ต.เหนือ คลอง อ.เหนือคลอง จ.กระบี่	12
3	S18	แปลงรวบรวมเชื้อพันธุกรรมยางในแปลงเปรียบเทียบ พันธุ์ยางขึ้นต้น จากกิ่งตาที่ได้จากประเทศบราซิล จำนวน 98 สายพันธุ์ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรภูเก็ต อ. ถลาง จ.ภูเก็ต	12
4	E1	ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา ในแปลงปลูกยางพันธุ์ RRIM 600	5

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ประชากร	รหัสสถานที่	สถานที่เก็บเมล็ดยางพารา	จำนวนต้นกล้า ยางพารา
5	C1	สถานีสิทธิพรกฤษฎดากร จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในแปลงปลูก ยางพันธุ์ RRIM 600	
6	E2	ศูนย์วิจัยยางยะหริ่งเทรา ในแปลงปลูกยางพันธุ์ RRIT 251	6
7	NE	แปลงเกษตรกร จ.น่าน ในแปลงปลูกยางพันธุ์ RRIM 600	5

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

2.1. อุปกรณ์

- 2.1.1 โกร่งบด
- 2.1.2 Micropipette
- 2.1.3 Microcentrifuge tubes (volume 1.5 ml)
- 2.1.4 Water bath
- 2.1.5 Hot air oven
- 2.1.6 Nanodrop2000

2.2. สารเคมี

- 2.2.1 2x CTAB
- 2.2.2 Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)
- 2.2.3 Isopropanol
- 2.2.4 Ethanol 70%
- 2.2.5 1x TE

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทำ PCR

3.1. อุปกรณ์

- 3.1.1 Thermal cycler (PCR machine)
- 3.1.2 96-well plate PCR

3.1.3 PCR Cover sheet

3.1.4 Microcentrifuge tube (volume 1.5 ml)

3.1.5 Micropipette

3.2. สารเคมี

3.2.1 10x *Taq* Buffer + (NH₄)₂SO₄

3.2.2 25 mM MgCl₂

3.2.3 *Taq* DNA Polymerase

3.2.4 1 mM dNTPs

3.2.5 18 megOhms water

3.2.6 Mineral oil

3.2.7 Sequencing dye

3.2.8 คู่ Primers จำนวน 10 คู่ รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 2.

ตารางที่ 2. ข้อมูล SSR primer

SSR primer	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Annealing temperature (°C)	Allele number
HB41	AACCAGCCACTCTTTTGACCT TCCTTGCATGTTGATTTCTGTT	(AC) ₂₃	56	5
HB42	AAATTGGCAGCTTGTTCTTG TCGGTTGGATATGGTGTCA	(TG) ₁₀ C(GT) ₆	56	5
HB49			56	
HB56	TTGAATTGAGAAGAAGGTGAA CCGACAACCTGGAACATACT	(AG) ₅	56	1
HB57	AGCCTGCGATCACAACAAT TGCCTCACACCCTCACCT	(AG) ₁₆	60	5

ตารางที่ 2. (ต่อ)

SSR primer	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Annealing temperature (°C)	Allele number
HB64	AATCCACCCAGCCTTACAG AATTGGTGAGCTTCGTTTTT	(AG) ₁₇	60	7
HB72			60	
HB79	CTGGTGTGAAAACGGTAGAA AGAATAGAAAAAGCCTCAAAAT	(ATT) ₅	56	1
HB86	AGTGGCCAAGAAAGAAAAAG TGTGTAAATGTATGCGTGAGTC	(GGA) ₄	56	1
HB87	TCACTGAGAGGGAGGGGAAGAG GGCCAAACCATCGCAAACA	(AGG) ₄	56	1

4. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทำ Polyacrylamide gel electrophoresis

4.1 อุปกรณ์

4.1.1 กระชก

4.1.2 ชุด Gel electrophoresis

4.1.3 ขวดสำหรับเทเจล

4.1.4 Micropipette

4.1.5 ภาชนะบรรจุสารเคมีในชั้นตอน Staining

4.2 สารเคมี

4.2.1 Ethanol 95%

4.2.2 Bind silane (3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate)

4.2.3 Acetic acid 5%

4.2.4 Clear view

- 4.2.5 Polyacrylamide 6%
- 4.2.6 APS 10% (Ammonium persulfate 10%)
- 4.2.7 TEMED
- 4.2.8 1x TBE buffer
- 4.2.9 Fix solution
- 4.2.10 Silver staining
- 4.2.11 Develop solution
- 4.2.12 Formaldehyde 37%

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเออย่างพาราโดยวิธี CTAB method (Doyle and Doyle, 1987)

- 1.1. นับและจดบันทึกจำนวนต้นกล้าอย่างพาราที่ได้จากการเพาะเมล็ดอย่างที่ได้เก็บมาจากสถานที่ต่าง ๆ
- 1.2. เก็บใบอ่อนของยางพาราแต่ละตัวอย่างมาประมาณต้นละ 1-1.5 ใบ นำมาแยกใส่โถงบด เติม 2x CTAB ปริมาตร 750 ไมโครลิตร บดใบให้ละเอียด
- 1.3. เทของเหลวทั้งหมดในโถงลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ปิดฝา แช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยพลิกหลอดทุก ๆ 5 นาที
- 1.4. เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 5 นาที สารละลายจะมีการแยกชั้น แล้วดูดสารละลายใสขึ้นบนปริมาตรประมาณ 400 ไมโครลิตรใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ใหม่
- 1.5. เติม Isopropanol อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าจนเห็นดีเอ็นเอสีขาว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 20 วินาที จะพบว่าดีเอ็นเอสีขาวติดอยู่ก้นหลอด
- 1.6. เทส่วนของเหลวทิ้ง แล้วล้างดีเอ็นเอด้วย Ethanol 70% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 วินาที เทสารละลายทิ้ง โดยล้างดีเอ็นเอ 2 ครั้ง
- 1.7. นำหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ไปเข้าเครื่อง Hot air oven อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

1.8. เมื่อดีเอ็นเอแห้งแล้ว เติม 1x TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บเป็น DNA Samples Stock

1.9. วัดความเข้มข้นของ DNA Samples Stock ด้วยเครื่อง NanoDrop2000

2. เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)

2.1. เตรียม DNA Samples ให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยเจือจาง DNA Samples Stock ด้วย 18 megaohms water

2.2. ปิเปตดีเอ็นเอความเข้มข้น 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตรของแต่ละตัวอย่าง ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของ PCR Plate ขนาด 96 หลุม (96-well plate PCR)

2.3. เตรียม Master Mix ส่วนประกอบดังตารางที่ 3. สำหรับ PCR plate ขนาด 96 หลุม จะเตรียม Master mix ปริมาตร 100 เท่า ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน

ตารางที่ 3. ส่วนประกอบของ Master mix

ส่วนประกอบ	ปริมาตร ต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)	ปริมาตร 100 เท่า (ไมโครลิตร)	
DNA	2	2 ไมโครลิตร ต่อตัวอย่าง	(ปิเปตใส่ Plate PCR)
dH ₂ O (18 MΩ water)	4.84	484	(หลอด Master mix)
10x <i>Taq</i> buffer	1	100	"
25 mM MgCl ₂	0.6	60	"
1 mM dNTPs	1	100	"
10 μM Primer (Forward)	0.25	25	"
10 μM Primer (Reverse)	0.25	25	"
<i>Taq</i> Polymerase	0.06	6	"
รวม	10	100	

2.4. ปิเปต Master Mix ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ PCR Plate ปั่นเหวี่ยงให้สารละลายเข้ากันนาน 5 วินาที

- 2.5. หยด mineral oil ลงในแต่ละหลุมของ PCR Plate หลุมละ 1 หยด แล้วปิดด้วย PCR Cover sheet
- 2.6. นำเข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดโปรแกรม Thermocycling ดังตารางที่ 4. โดยแต่ละคู่ Primers ตั้งอุณหภูมิในช่วง Annealing ดังตารางที่ 2. ซึ่งอุณหภูมิช่วง Annealing (Annealing temperature) ของแต่ละคู่ Primer เป็นไปตามค่า Melting temperature (T_m)

ตารางที่ 4. โปรแกรม Thermocycling

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
First denaturing	94	5 นาที
Denaturing	94	1 นาที
Annealing	(ดูจากตารางที่ 2.)	45 วินาที
Extension	72	1 นาที
Final extension	72	7 นาที
Hold	16	∞

- 2.7. เมื่อทำ PCR เสร็จแล้ว เติม Sequencing dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เก็บ PCR Plate ให้เรียบร้อย ทำเช่นนี้จนครบ 10 คู่ Primers
- 2.8. นำ PCR product ไปแยกขนาดโดยใช้ 6% Polyacrylamide gel

3. Gel electrophoresis

3.1. การเตรียม Polyacrylamide gel

1. เตรียม Chamber

- 1.1 ใช้ Paper towel เช็ดหน้า Chamber ด้วย Ethanol 95% จำนวน 3 ครั้ง
- 1.2 ใช้ Kimwipes เช็ดหน้า Chamber ด้วย Clear view จำนวน 1 ครั้ง
เพื่อไม่ให้เจลติด Chamber
- 1.3 ใช้ Kimwipes เช็ดหน้า Chamber ด้วย Ethanol 95% จำนวน 2 ครั้ง

2. เตรียมกระจก

- 2.1 ใช้ Kimwipes เช็ดด้านหนึ่งของกระจก ด้วย Ethanol 95% จำนวน 3 ครั้ง
- 2.2 เตรียม Binding solution โดยใช้ Acetic acid 0.5% in ethanol 95% ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับ Bind silane ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร แล้วแบ่งเช็ดกระจกด้านเดิม 2 ครั้ง โดยใช้ Kimwipes เช็ดให้ทั่วกระจก
- 2.3 ใช้ Kimwipes เช็ดกระจก ด้วย Ethanol 95% จำนวน 2 ครั้ง
3. ประกอบ Chamber และกระจกเข้าด้วยกัน โดยวาง Chamber ไว้ด้านล่างแล้ววาง Spacer ที่ด้านข้างของ Chamber ทั้ง 2 ข้าง
4. วางกระจก (ด้านที่เช็ดด้วย Binding solution) ประกบลงบน Chamber ใช้ Clamp ยึด Chamber กับกระจกให้ติดกัน วางกระจกที่ประกอบแล้วโดยกระจกอยู่ด้านล่าง ส่วน Chamber อยู่ด้านบน
5. เตรียม Gel mix โดยใช้ Polyacrylamide 6% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร APS 10% ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดสำหรับเทเจลแล้วผสมให้เข้ากัน
6. เทเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจกกับ Chamber (ช่องว่างจาก Spacer) ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ
7. เมื่อเจลเต็มช่องว่างใส่หัวด้านขอบเรียบลึกประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อสร้างพื้นที่ในการโหลดตัวอย่าง (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศที่หน้าเจล) แล้วใช้คลิปหนีบยึดไว้
8. ทิ้งเจลให้แข็งตัว ประมาณ 2 ชั่วโมง

3.2. Polyacrylamide gel electrophoresis

1. เติม 1x TBE ลงในช่องสำหรับบัฟเฟอร์ (Tank) ให้ท่วมเส้นลวด
2. นำ Chamber ที่เตรียมไว้ มาตั้งบน Tank แล้วประกอบตัวล็อกและขั้วที่ต่อกับ Tank
3. เท 1X TBE ใส่ใน Chamber ให้ท่วมขอบ Chamber จากนั้นค่อยๆดึงหัวออก แล้วใช้ Dropper บีบไล่เศษเจลที่ติดอยู่
4. ประกอบขั้วด้านบนของ Chamber เข้ากับ Power supply ตั้งค่าไฟฟ้าที่ 1,500 โวลต์ 100 mA 100 วัตต์ ติดแถบวัดอุณหภูมิไว้ที่กระจกแล้ว Pre-run เป็นเวลา 30 นาที สังเกตอุณหภูมิที่ต้องการให้อยู่ในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส

5. หยุดการทำงานของ Power supply แล้วถอดขั้วด้านบนของ Chamber ออก ใช้ Dropper บีบไล้ยูเรียและเศษเจล บริเวณที่เสียบหัวออกไป
6. ใส่หัวลงไปให้ปลายหัวจิกขอบเจลเล็กน้อยเพื่อสร้างช่องว่างในการไหลตัวอย่าง
7. โหลดตัวอย่าง ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละช่อง (well) โดยเว้นช่องแรกไว้สำหรับโหลด Marker
8. โหลด 10 bp Marker ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงไปในช่องแรกและช่องสุดท้าย ท้าย แล้วใส่ขั้วด้านบนของ Chamber ปิดลงไป ตั้งค่าไฟฟ้าที่ 1,500 โวลต์ 100 mA 45 วินาที แล้วเริ่ม Run
9. เมื่อแถบสีดีเอ็นเอลงมาประมาณ 2 เซนติเมตร หยุดการทำงานของ Power supply เพื่อนำหัวออกแล้ว Run ต่อจนแถบสีลงมาประมาณ 17 เซนติเมตร
10. หยุดการทำงานของ Power supply ถอดขั้วของ Chamber และ Clamp ออก และนำกระจกออกจาก Chamber

3.3. การย้อม Polyacrylamide gel

ย้อมสีกระจกด้วยวิธี Silver staining

1. นำกระจกที่ได้ไปแช่ Fixer ที่มีอุณหภูมิประมาณ 16 องศาเซลเซียส เข้าไปนาน 5 นาที
2. แช่ Silver staining เข้าไปนาน 7 นาที
3. ล้างกระจก โดยนำกระจกมาผ่านน้ำ ประมาณ 10 วินาที
4. แช่ Develop solution เข้าไปจนเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน
5. แช่ Fix solution เข้าไปนาน 2 นาที แล้วล้างน้ำ 5 นาที
6. ผึ่งกระจกให้แห้ง และนำผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากทั้ง 10 กระจก ไปวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. สกอร์ (score) ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอลงในโปรแกรม Microsoft Excel โดยให้ตำแหน่งที่ปรากฏแถบชัดเจนเป็น 1 ตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบเป็น 0 และตำแหน่งที่ข้อมูลสูญหาย (missing data) เป็น -1 ตามรูปแบบ binary data
2. ใช้โปรแกรม GenAlEx 6.501 วิเคราะห์ Principal Coordinates Analysis และ Pairwise Population Matrix of Nei's Genetic Distance
3. ใช้โปรแกรม Past วิเคราะห์ cluster analysis โดยวิธี Pair-Group Method เลือกใช้สูตร Jaccard's analysis

สถานที่ทำการทดลอง

การวิจัยนี้ทดลองที่โรงเรียนภาควิชาพืชไร่นาและห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการทดลอง

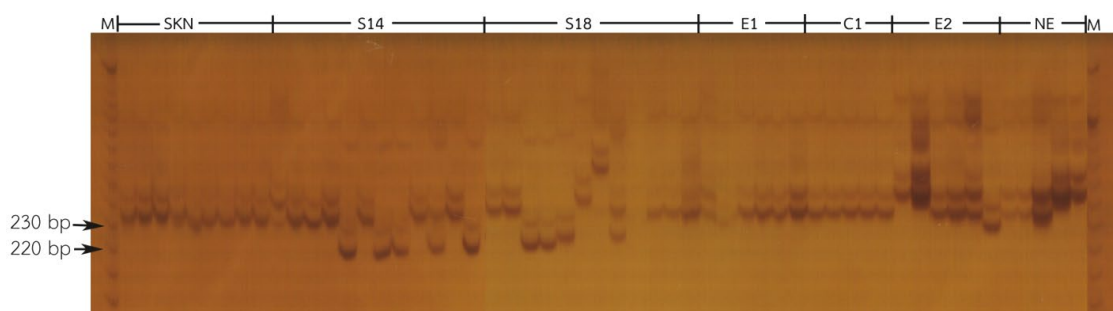
เริ่มตั้งแต่ เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2557 สิ้นสุด เดือนตุลาคม พ.ศ. 2557

ผลและวิจารณ์ผล

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดกระบี่และสกลนครเปรียบเทียบกับเชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิลโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ สามารถอธิบายผลการทดลองได้ดังนี้

1. ผลของปฏิกิริยา PCR

จากการศึกษาผลของปฏิกิริยา PCR ของคู่ Primers จำนวน 10 คู่ ได้แก่ HB41, HB42, HB49, HB56, HB57, HB64, HB72, HB79, HB86 และ HB87 โดยใช้ 6% Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis ให้ผลการสกอ์แถบดีเอ็นเอของต้นกล้ายางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดกระบี่ สกลนคร เชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิล ยางจากแปลงปลูกพันธุ์ RRIM600 และยางจากแปลงปลูกพันธุ์ RRIT251 จำนวน 54 ตัวอย่าง บนตำแหน่ง (loci) ที่แตกต่างกัน รวมทั้งหมด 85 ตำแหน่ง ในช่วงระหว่าง 110-300 bp



ภาพที่ 1 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB64 (lane 1 = marker 10 bp ladder)

2. Nei's Genetic Distance

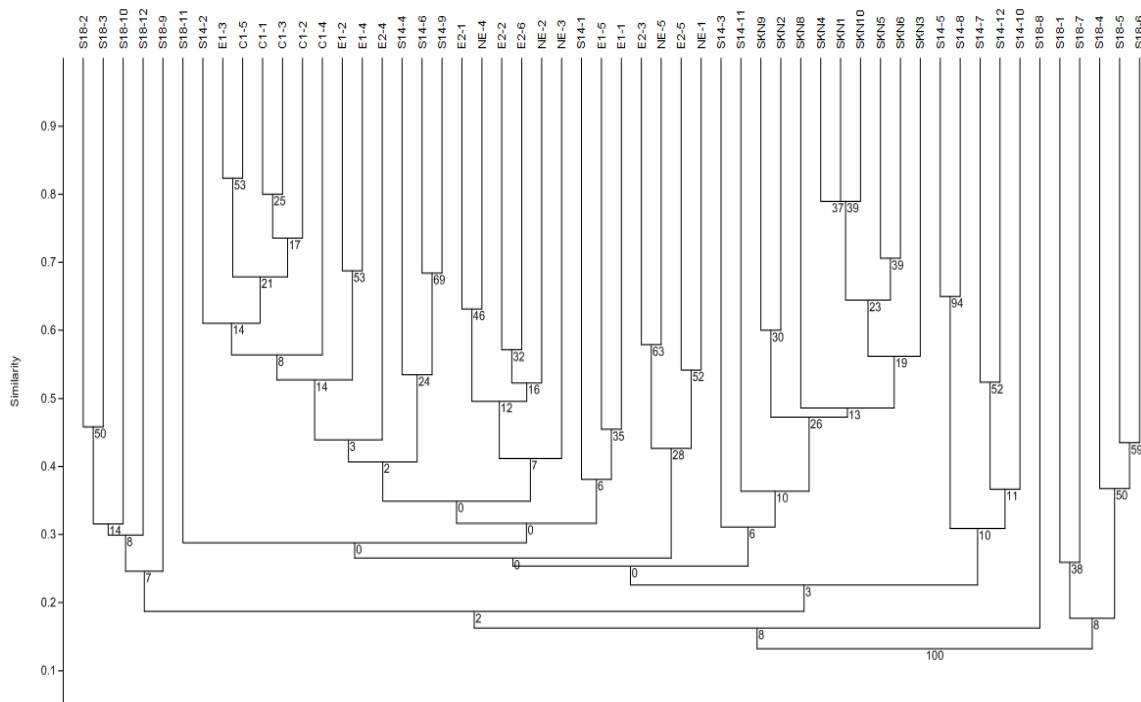
จากการวิเคราะห์ข้อมูล ค่า Nei's Genetic Distance (ตารางที่ 5) ทำให้ทราบว่าแต่ละประชากรมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมห่างหรือใกล้ชิดกัน โดยค่าน้อยคือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ค่ายิ่งมาก ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมก็จะแตกต่างกันมากขึ้น ตัวอย่างจากแปลงรวบรวมเชื้อพันธุกรรมยางในแปลงเปรียบเทียบพันธุกรรมยางขึ้นต้น จากกิ่งตาที่ได้จากประเทศบราซิล (Pop3) มีความแตกต่างจากตัวอย่างยางโบราณวัดหลวงปู้มั้น จ.สกลนคร (Pop1) อยู่ 13.2% แตกต่างกับตัวอย่างยางโบราณ จ.กระบี่ (Pop2) อยู่ 3.9% แตกต่างกับตัวอย่างจากแปลงปลูกยางพารา RRIM 600 ของศูนย์วิจัยยางยะเชิงเทรา (Pop4) อยู่ 5.4% แตกต่างกับตัวอย่างยางพาราจากแปลงปลูก RRIM 600 ของสถานีสิทธิพรกฤษฎากร (Pop5) อยู่ 12.70% แตกต่างกับตัวอย่างยางพาราจากแปลงปลูก RRIT 251 ของศูนย์วิจัยยางยะเชิงเทรา (Pop6) อยู่ 6.2% และแตกต่างกับตัวอย่างยางพาราจากแปลงปลูก RRIM 600 ของแปลงเกษตรกร จ.น่าน (Pop7) อยู่ 6.7%

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ Pairwise Population Matrix of Nei's Genetic Distance

Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	
0							Pop1
0.084	0						Pop2
0.132	0.039	0					Pop3
0.121	0.051	0.054	0				Pop4
0.154	0.119	0.127	0.063	0			Pop5
0.126	0.060	0.062	0.050	0.096	0		Pop6
0.146	0.078	0.067	0.062	0.118	0.028	0	Pop7

3. เดนโดแกรม (Dendrogram)

ข้อมูลจากการสกรีนแถบดีเอ็นเอ เมื่อนำไปสร้างเดนโดแกรม (Dendrogram) ด้วยสูตร Jaccard's analysis มีค่า Cophenetic Correlation (Coph. Corr.) เท่ากับ 0.8283 รายละเอียดแสดงดังภาพที่ 2



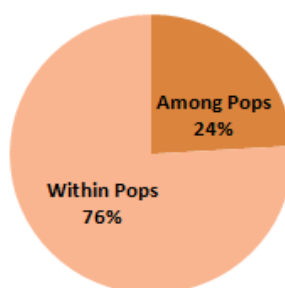
ภาพที่ 2 เดนโดแกรม (Dendrogram) จากการวิเคราะห์ cluster analysis ด้วยวิธี Pair-Group Method (Jaccard's analysis) โดยการใช้ SSR marker

จากผลเดนโดแกรมที่ช่วงของค่า Similarity เท่ากับ 0.2 สามารถจำแนกยาลงได้ 5 กลุ่ม และพบว่าตัวอย่างยาลงจากแปลงรวบรวมเชื้อพันธุกรรมภายในแปลงเปรียบเทียบกับพันธุกรรมยาลงขั้นต้น จากกิ่งตาที่ได้จากประเทศบราซิล (S18) เป็นยาลงที่มีความแตกต่างกันภายในประชากรและแตกต่างจากยาลงแหล่งอื่น ๆ ดังตารางที่ 6.

ตารางที่ 6. การจัดกลุ่มตัวอย่างยางพารา

กลุ่ม	จำนวนตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง
1	5	S18-2, S18-3, S18-9, S18-10, S18-12
2	43	S18-11, S14-2, E1-3, C1-5, C1-1, C1-3, C1-2, E1-2, E1-4, E2-4, S14-4, S14-6, S14-9, E2-1, NE-4, E2-2, E2-6, NE-2, NE-3, S14-1, E1-5, E1-1, E2-3, NE-5, E2-5, NE-1, S14-3, S14-11, SKN9, SKN2, SKN8, SKN4, SKN1, SKN10, SKN5, SKN6, SKN3
3	1	S18-8
4	2	S18-1, S18-7
5	3	S18-4, S18-5, S18-6

อัตราการแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำมาประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่ามีอัตราการแปรปรวนภายในประชากรเท่ากับ 76% และอัตราการแปรปรวนระหว่างประชากรเท่ากับ 24%



รูปที่ 3 เปรอ์เซ็นต์ความแปรปรวนเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Variance) ของประชากรยางพารา

สรุปและข้อเสนอแนะ

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดกระบี่และจังหวัดสกลนคร เปรียบเทียบกับเชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิล ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา สถานีสิทธิพรกฤษฎากร และ จ.น่าน และพันธุ์ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา มีอัตราการแปรปรวนภายในประชากรเท่ากับ 76% มีอัตราการแปรปรวนระหว่างประชากรเท่ากับ 24% และสามารถจำแนกยางพาราทั้ง 54 ตัวอย่าง ออกได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งตัวอย่างเชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิลมีความแตกต่างกับตัวอย่างยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดกระบี่และสกลนคร และแตกต่างกับตัวอย่างยางพาราจากแปลงปลูกยางพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ RRIT 251 ที่เป็นยางพาราพันธุ์แนะนำ โดยมี Similarity อยู่ที่ 0.2 คือมีความคล้ายคลึงกันประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

เชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิล และยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดกระบี่และสกลนคร สามารถนำมาใช้สร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราได้ เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกันประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ แต่จะต้องพิจารณาลักษณะฟีโนไทป์ และความสามารถในการปรับตัวของเชื้อพันธุกรรมยางพาราที่รวบรวมมาจากประเทศบราซิลเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. **KHON KAEN AGR. J.** 40: 299-308.

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์. ม.ป.ป. ความหลากหลายทางชีวภาพ.

แหล่งที่มา:

http://www.sci.nu.ac.th/Biology/Biodiversity/%E0%B8%9A%E0%B8%97%E0%B8%97%E0%B8%B5%E0%B9%88%201/chap1_file1.htm, 10 พฤษภาคม 2558.

สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. 2550. ข้อมูลวิชาการยางพารา 2550. สถาบันวิจัยยาง, กรุงเทพฯ.

สุนิสา สุขชาติ. 2548. ยางธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

สุรพล มุละดา. 2548. รายงานการสัมมนาวันยางพาราแห่งชาติปี 2548: ก้าวเข้าสู่ศูนย์กลางยางพาราโลก. สำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์ข้อมูลสิ่งแวดล้อม ภาคใต้ตอนบน. ม.ป.ป. ความหลากหลายทางชีวภาพคือชีวิต (Biodiversity is life). แหล่งที่มา:

http://eic.wu.ac.th/Data_Download/document/Biodiversity_books/01%20Biodiversity%20is%20life.pdf, 10 พฤษภาคม 2558.

องค์การสวนยาง. ม.ป.ป. ประวัติยางพารา. แหล่งที่มา: <http://www.reothai.co.th/content-ประวัติยางพารา-4-6825-93994-1.html>, 20 ธันวาคม 2557.

Mantello, C.C., Suzuki, F.I., Souza, L.M., Goncalves, P.S. and Souza, A.P. 2012. Microsatellite marker development for the rubber tree (*Hevea brasiliensis*): characterization and cross-amplification in wild *Hevea* species. **BMC Research Notes**. 5: 329.

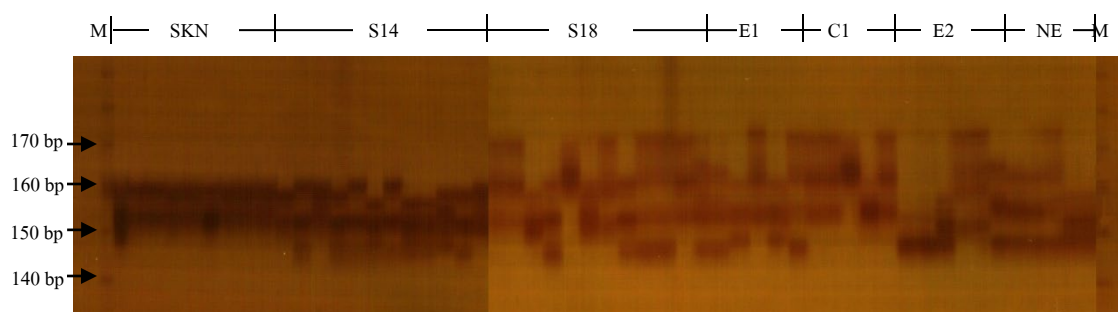
Kubik, C., Honig, J., Meyer, W. A., and Bonos, S. A. 2009. Genetic diversity of creeping bentgrass cultivars using SSR markers. **Int'l Turfgrass Soc. Res. J.** 11: 533-547.

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

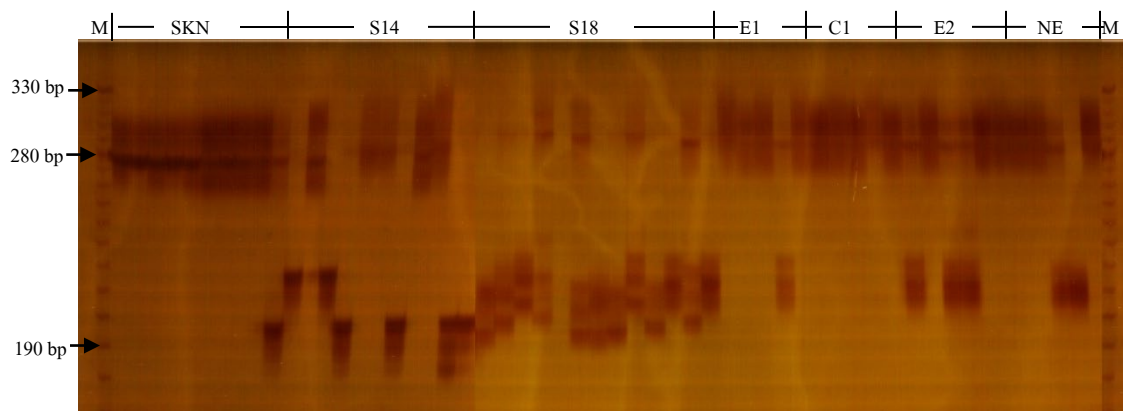
Nakkanong, K., Nualsri, C. and Sdoodee, S. 2008. Analysis of Genetic diversity in early introduced clones of rubber tree (*Hevea Brasiliensis*) using RAPD and Microsatellite markers. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 30 (5): 553-560.

ภาคผนวก

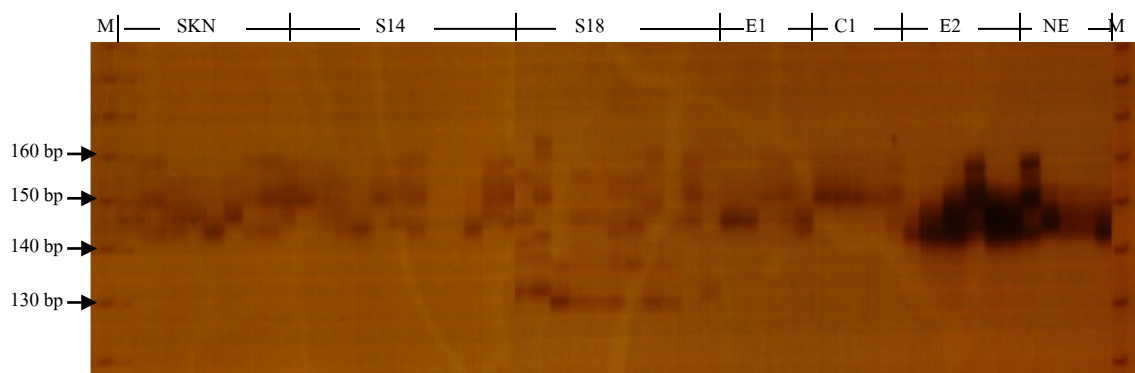
ภาคผนวก ก
ภาพผลการทดลอง



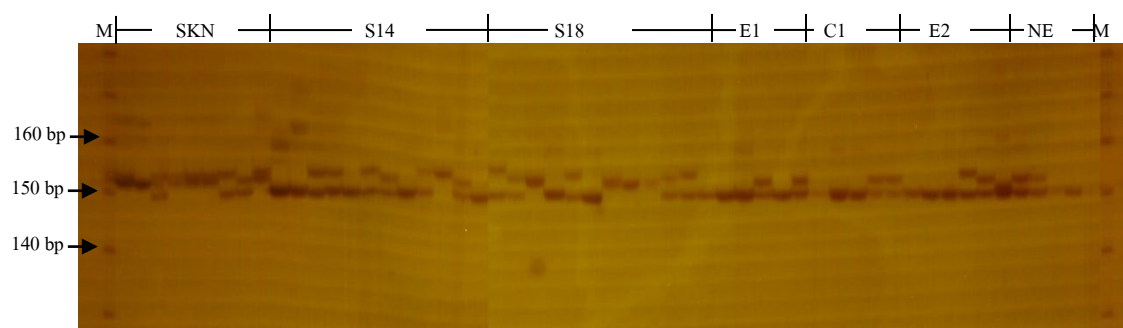
ภาพผนวกที่ 1 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB41



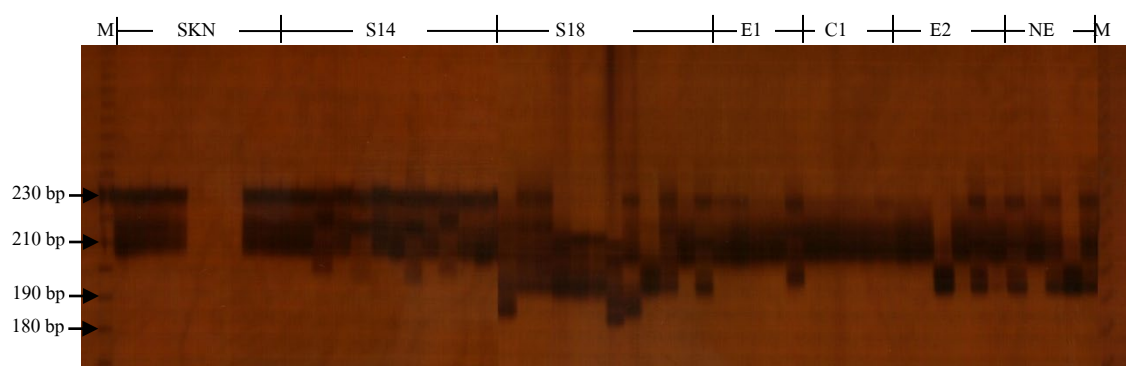
ภาพผนวกที่ 2 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB42



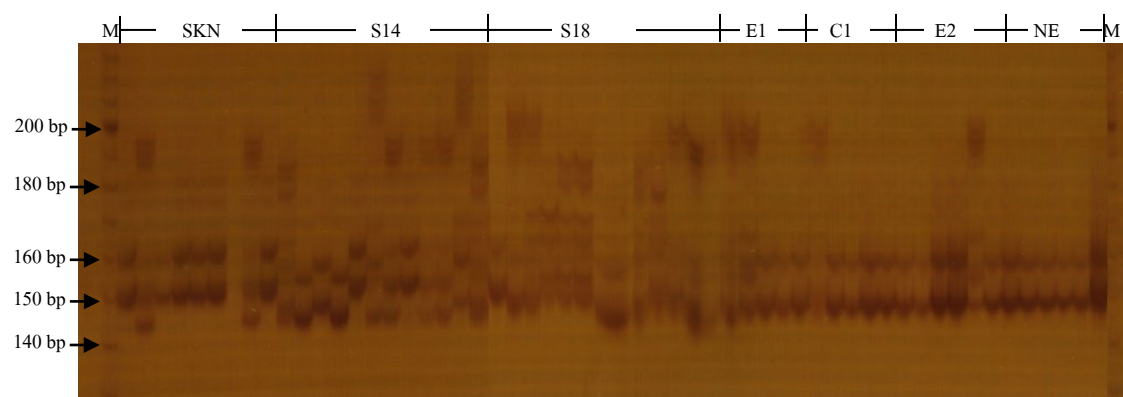
ภาพผนวกที่ 3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB49



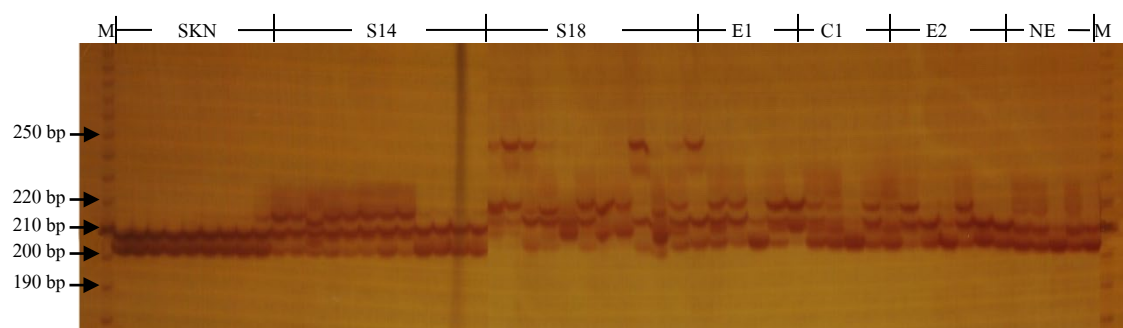
ภาพผนวกที่ 4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB56



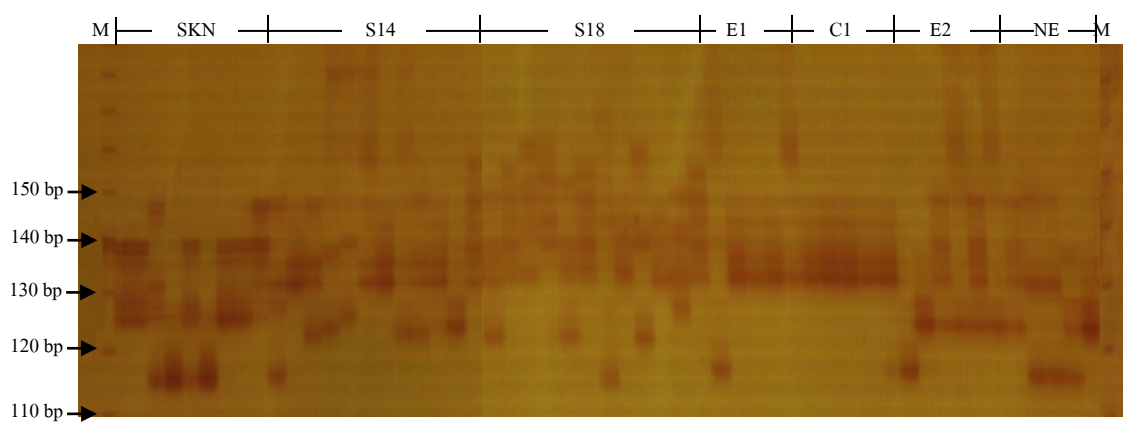
ภาพผนวกที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB57



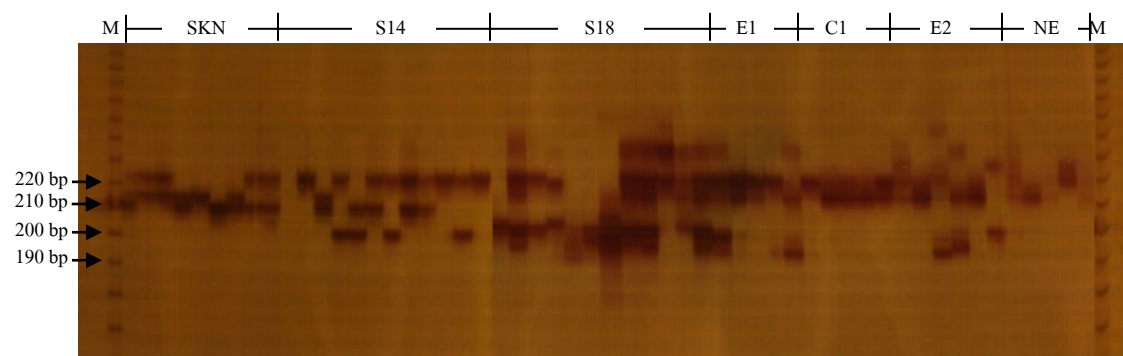
ภาพผนวกที่ 6 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB72



ภาพผนวกที่ 7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB79



ภาพผนวกที่ 8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB86

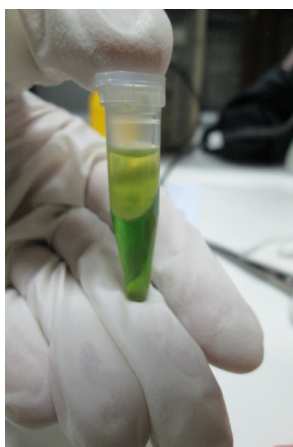


ภาพผนวกที่ 9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB87

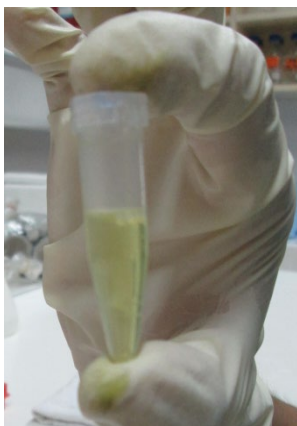
ภาคผนวก ข
ภาพดำเนินการทดลอง



ภาพผนวกที่ 10 การบดตัวอย่างใบอ่อนขางพารา
ด้วย 2x CTAB



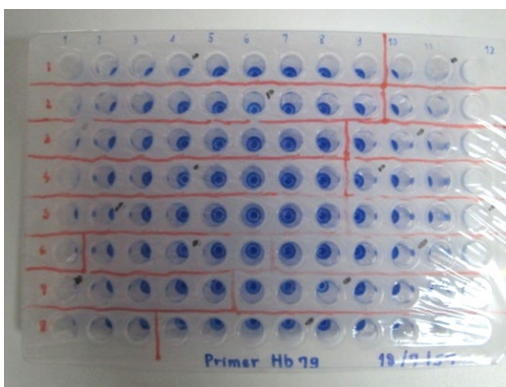
ภาพผนวกที่ 11 การแยกชั้นระหว่างส่วนใสกับ
Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)



ภาพผนวกที่ 12 ส่วนใสที่มีดีเอ็นเอ



ภาพผนวกที่ 13 การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วย
เครื่อง Nanodrop2000



ภาพผนวกที่ 14 PCR product



ภาพผนวกที่ 15 การประกอบ Chamber เข้ากับกระฉก



ภาพผนวกที่ 16 การเทเจลพอลิอะคริลาไมด์



ภาพผนวกที่ 17 ชุดเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส



ภาพผนวกที่ 18 การโหลดตัวอย่าง PCR product ในการทำ
เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส