

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรก
ที่จังหวัดจันทบุรี โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

**Genetic Diversity Evaluation in Early Introduced Clones of Rubber Trees
(*Hevea brasiliensis*) at Chanthaburi Province Using SSR Marker**

ภาควิชาพืชไร่นา

คณะเกษตร

DEPARTMENT OF AGRONOMY

FACULTY OF AGRICULTURE



มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กรุงเทพฯ - 10900

KASETSART UNIVERSITY
BANGKOK-10900 THAILAND

ปัญหาพิเศษปริญาตรี

ภาควิชาพืชไร่นา

เรื่อง

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรก
ที่จังหวัดจันทบุรี โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

Genetic Diversity Evaluation in Early Introduced Clones of Rubber Trees

(*Hevea brasiliensis*) at Chanthaburi Province Using SSR Marker

โดย

นางสาวจารุวรรณ จันทน์โนนแซง

ควบคุมและอนุมัติโดย

..... วันที่ 25 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2558
(ดร. สุจินต์ เจนวิวัฒน์)

..... วันที่ 25 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2558
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เฉลิมพล ภูมิไชย์)

**การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรก
ที่จังหวัดจันทบุรี โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์**

นางสาวจรรวณ จันทรโนนแซง

บทคัดย่อ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ในการปรับปรุงพันธุ์นั้น แหล่งพันธุกรรมมีความสำคัญ อย่างไรก็ตามควรมีการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมก่อนนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ จังหวัดจันทบุรีเป็นหนึ่งในพื้นที่แหล่งปลูกยางเดิมของประเทศไทย ซึ่งต้นยางพาราได้มาจากการปลูกด้วยเมล็ด การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดจันทบุรี โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ โดยการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นกล้ายางพาราที่ได้จากการเพาะจากเมล็ดที่เก็บมาจากสถานที่ต่าง ๆ ใน 4 สถานที่ ในจังหวัดจันทบุรี จำนวน 42 ต้น ร่วมกับ ต้นกล้ายางพาราที่ได้จากการเพาะเมล็ดที่เก็บมาจากแปลง พันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ RRIT 251 จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ จากผลการศึกษาพบว่า ความแปรปรวนเครื่องหมายโมเลกุล (molecular variance) ภายในประชากรเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างประชากรเท่ากับ 16 เปอร์เซ็นต์ และสามารถจำแนกกลุ่มยางพาราได้ 4 กลุ่ม

คำสำคัญ : ยางพารา โคลนที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรก ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

สาขาวิชา : วิทยาศาสตร์เกษตร (พืชไร่นา)

ปริญญา : วท.บ. (วิทยาศาสตร์เกษตร) ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก : ดร.สุจินต์ เจนวิวัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมพล ภูมิไชย

ปีที่พิมพ์ : 2558

จำนวนหน้า : 33

Genetic Diversity Evaluation in Early Introduced Clones of Rubber Trees

(*Hevea brasiliensis*) at Chanthaburi Province Using SSR Marker

Miss Jaruwan Jannonsaeng

Abstract

Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is the major economic crop of Thailand. For plant breeding, germplasm source is important, however, the germplasm source should be evaluated for genetic diversity before using for crop improvement. Chanthaburi Province is an old planting area of rubber tree for the early introduced clones of Thailand. The early introduced clones were planted by seeds. The objective of this study was to evaluate genetic diversity in early introduced clones of rubber trees at Chanthaburi province using SSR marker. The 42 early introduced clone seedlings from seeds collected from four locations in Chanthaburi province, and seedlings from seeds collected from RRIM 600 and RRIT 251 plots were evaluated using SSR marker. The results showed that percentages of molecular variance within populations and among populations were 84% and 16%, respectively, and the seedlings can be classified into four groups.

Key words : *Hevea brasiliensis*, early introduced clones, genetic diversity, SSR marker

Field : Agricultural Science (Agronomy)

Degree : B.S. (Agricultural Science), Department of Agronomy, Faculty of Agriculture,
Kasetsart University

Advisor : Dr. Sujin Jenweerawat

Co-advisor : Asst. Prof. Dr. Chalernpol Phumichai

Year : 2015

Pages : 33

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	8
ผลและวิจารณ์	16
สรุปและข้อเสนอแนะ	19
กิตติกรรมประกาศ	21
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	25

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 จำนวนพื้นที่และต้นยางที่ได้จากการเพาะเมล็ดยางที่เก็บ มาจากพื้นที่ต่าง ๆ ในจังหวัดจันทบุรี และพื้นที่อื่น ๆ	8
2 ข้อมูล SSR primer	10
3 โปรแกรม Thermocycling	13
4 Pairwise Population Matrix of Nei's Genetic Distance	17

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB64 กับตัวอย่างดีเอ็นเอของยางพารา จำนวน 63 ตัวอย่าง	16
2 เคนไดรแกรม (Dendrogram) จากการวิเคราะห์ Cluster analysis โดยวิธี Pair-Group Method (Gower's analysis) ของตัวอย่างดีเอ็นเอยางพารา จำนวน 63 ตัวอย่าง จากการใช้ SSR marker	18
3 เปรอร์เซ็นต์ความแปรปรวนโมเลกุล (Molecular Variance) ของประชากรยางพารา	19
ภาพผนวกที่	
1ก การบดใบอ่อนยางพารา ใน 2x CTAB buffer (Extraction buffer)	27
2ก การแยกชั้นระหว่างดีเอ็นเอ (ส่วนใส), ชั้นส่วนพืช และสารละลาย คลอโรฟอร์ม และไอโซโทพานอล	27
3ก ส่วนใสที่มีดีเอ็นเอ	28
4ก การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop2000	28
5ก การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	28
6ก การประกอบกระเจก เข้ากับ chamber	29
7ก การเท Acrylamide gel	29
8ก การโหลดตัวอย่างดีเอ็นเอ PCR product	29
1ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB41	31
2ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB42	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
3ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB49	31
4ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB56	32
5ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB57	32
6ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB72	32
7ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB79	33
8ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB86	33
9ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB87	33

คำนำ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นไม้ยืนต้นในเขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่บริเวณลุ่มน้ำอะเมซอน ในทวีปอเมริกาใต้ และมีการนำเมล็ดจากถิ่นกำเนิดไปปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วโลก ปัจจุบันยางพาราปลูกกันอย่างกว้างขวางในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย อินโดนีเซีย และมาเลเซีย โดยประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการผลิตและส่งออกยางธรรมชาติมากที่สุดในโลก (สถาบันวิจัยยาง, 2555) ปัจจุบันการขยายพันธุ์ยางพาราในเชิงเศรษฐกิจใช้วิธีการติดตาบนต้นตอยางพาราที่ได้จากการเพาะเมล็ด ทำให้ได้ต้นใหม่จากตาพันธุ์ดีและมีพันธุกรรมเหมือนต้นเดิมทุกประการ ในส่วนของต้นตอยางพารา ในอดีตการผลิตต้นตอยางพาราที่พบมากในประเทศไทย จะเป็นการเพาะเมล็ดของโคลนที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรก ซึ่งมีความเป็นพันธุ์ทาง (heterozygosity) สูง และมีความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่ปัจจุบันมีการโคลนต้นยางที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรก แล้วเปลี่ยนมาปลูกยางพาราพันธุ์แนะนำกันทั่วไป ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราลดลงจากเดิม และใช้เมล็ดที่เกิดจากยางพาราพันธุ์แนะนำ ซึ่งมักจะเก็บจากพื้นที่ที่ปลูกยางพาราเพียงพันธุ์เดียวมาใช้เป็นต้นตอยางพารา ทำให้ต้นตอที่ได้มีความอ่อนแอของยางพาราพันธุ์แนะนำที่ปลูกมากที่สุดในประเทศไทยขณะนี้คือพันธุ์ RRIM 600 (Nakkanong *et al.*, 2008) ปัจจุบันพบว่ามีความอ่อนแอต่อโรครากขาวมากที่สุด (สายทอง, 2556) ทำให้ต้องหาพันธุ์ยางใหม่มาทดแทน

การปรับปรุงพันธุ์ยางพารามีจุดเริ่มต้นเช่นเดียวกับพืชอื่นคือ จะต้องมีการคัดเลือกพันธุ์ที่ใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ แหล่งพันธุกรรมที่เป็นไปได้คือ ต้นยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยระยะแรก และจังหวัดจันทบุรีเป็นหนึ่งในพื้นที่แหล่งปลูกยางเดิม ซึ่งบริเวณที่ยังคงมีต้นยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกคือพื้นที่รอบ ๆ อุทยานแห่งชาติน้ำตกพลิ้ว จังหวัดจันทบุรี โดย Khonglao (2006) ระบุว่าต้นกล้ายางพาราจากโคลนที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกนั้นรากจะมีความแข็งแรงสูงกว่าต้นกล้าจากยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ถึงแม้จะมีความเชื่อว่ายางพาราในทวีปเอเชียมีพื้นฐานพันธุกรรมแคบ (Nakkanong *et al.*, 2008) การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้สามารถทราบความแตกต่าง หรือ ความเหมือนทางพันธุกรรมของต้นยางพาราในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี กับยางพาราพันธุ์แนะนำได้

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชได้ โดยเป็นวิธีที่ช่วยลดระยะเวลาในการทำงานลงได้ (Mantello *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำ สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่องอัตโนมัติ (Weigend and Romanov, 2001) สำหรับข้อเสียของวิธีการนี้ คือ ต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ ทำให้ต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรก ที่จังหวัดจันทบุรี โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ สำหรับเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราในประเทศไทย

การตรวจเอกสาร

ยางพารา

ยางพารา (rubber tree) เป็นไม้ยืนต้นเขตร้อน มีอายุยืนยาวหลายสิบปี เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. มีถิ่นกำเนิดอยู่บริเวณลุ่มน้ำอะเมซอน ประเทศบราซิล ในทวีปอเมริกาใต้ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2540; สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน, 2548; สายทอง, 2556)

ในปี พ.ศ. 2036-2039 คริสโตเฟอร์ โคลัมบัส (Christopher Columbus) เดินทางไปทวีปอเมริกาในครั้งที่ 2 พบว่า ชาวพื้นเมืองในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ รู้จักและมีการใช้ประโยชน์จากยางกัน ทำให้โคลัมบัสและคณะเกิดความสนใจและได้นำยางเข้าไปเผยแพร่ในยุโรป ชาวยุโรปจึงเริ่มมีความสนใจเกี่ยวกับยางมากขึ้น โดยมีการสำรวจ และนำเมล็ดยางจากประเทศต่าง ๆ ในทวีปอเมริกาใต้ ไปปลูกในประเทศอาณานิคมของอังกฤษหลายครั้งแต่ไม่สำเร็จ จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2419 โรเบิร์ต คروس (Robert Cross) และเซอร์เฮนรี วิคแฮม (Sir Henry A. Wicham) ส่งเมล็ดยางที่เก็บได้จากที่ราบสูง Tapajos บริเวณลุ่มน้ำอะเมซอน ประเทศบราซิล จำนวน 70,000 เมล็ด ไปเพาะในสวนพฤกษชาติคิว (Kew Royal Botanical Garden) กรุงลอนดอน ประเทศอังกฤษ ผลการเพาะปรากฏว่าเมล็ดยางออกประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดยางที่งอกนี้ ถูกส่งไปปลูกยังประเทศต่าง ๆ ที่เป็นอาณานิคมของอังกฤษ เช่น ศรีลังกา สิงคโปร์ และมาเลเซีย ยางพาราจึงปลูกกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2540; สถาบันวิจัยยาง, 2555)

เมื่อประมาณปี พ.ศ. 2442-2444 พระยารัษฎานุประดิษฐ์มหิศรภักดี (คอซิมบี๊ ณ ระนอง) นำยางพาราเข้ามาปลูกในประเทศไทยเป็นครั้งแรก โดยนำยางจากรัฐเปรี๊ต ประเทศมาเลเซีย มาปลูกที่อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง ในปี พ.ศ. 2454 หลวงราชไมตรี (ปุม ปุณศรี) ได้ซื้อเมล็ดยางพาราจากประเทศมาเลเซีย มาปลูกที่หมู่ 6 ตำบลคมบาง อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี นับว่าเป็นการแพร่กระจายยางพาราเข้าสู่ภาคตะวันออกเป็นครั้งแรก ต่อมาพระครูเพิ่ม พิตยากร เจ้าอาวาสวัดคมบาง ได้นำเมล็ดยางจากสวนของหลวงราชไมตรี ไปปลูกที่วัดปากรำ อำเภอแกลง จังหวัดระยอง ทำให้

ยางแพร่ขยายการปลูกไปยังพื้นที่ต่าง ๆ ในภาคตะวันออก โดยเฉพาะใน 3 จังหวัดที่สำคัญ ได้แก่ ระยอง จันทบุรี และตราด (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2540)

ปัจจุบันยางพาราปลูกกันอย่างกว้างขวางในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย อินโดนีเซีย และมาเลเซีย โดยประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการผลิตและส่งออกยางธรรมชาติมากที่สุดในโลก รองลงมาได้แก่ อินโดนีเซีย และมาเลเซีย ตามลำดับ ยางพาราจึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย (สถาบันวิจัยยาง, 2555; เรไร, 2556)

ยางพารามีระบบรากแก้ว (tap root system) เป็นไม้เนื้ออ่อน ลำต้นลักษณะกลมตรง ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ เนื้อไม้ เนื้อเจริญ และเปลือกไม้ ใบเป็นใบประกอบ สีเขียวเป็นมัน มีใบย่อย 3 ใบ ใบยางจะแตกออกมาเป็นชั้น ๆ เรียกว่า ฉัตรใบ (leaf storey) ยางพาราจะผลัดใบในฤดูแล้งของทุกปี ดอกมีลักษณะเป็นช่อ เกิดตามปลายกิ่งหลังจากต้นยางผลัดใบ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียเกิดแยกกันแต่อยู่ในช่อดอกเดียวกัน ผลมีลักษณะเป็นพวง (capsule) ปกติมี 3 พวง ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่มีสีน้ำตาลและแข็ง จะแตกออกเมื่อผลแก่จัด เมล็ดยางมีสีน้ำตาลลายขาวคล้ายสีเมล็ดละหุ่ง น้ำยางเป็นของเหลวสีขาวถึงขาวปนเหลืองข้นขึ้น อยู่ในท่อน้ำยางที่เรียงตัวกันอยู่ในเปลือกของต้นยาง โดยปกติในน้ำยางจะมีเนื้อยางแห้งประมาณ 25-45 เปอร์เซ็นต์ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2540; สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน, 2548; สถาบันวิจัยยาง, 2555)

การขยายพันธุ์ยางพาราสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด การติดตา สีสน้ำตาล การติดตาเขียว เป็นต้น ประเทศไทยไม่นิยมการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด เพราะประเทศไทยไม่มีสวนเก็บเมล็ด และเมล็ดยางที่นำไปปลูกมีการกลายพันธุ์มาก มีความเป็นพันธุ์ทางสูง แต่นิยมใช้เมล็ดเพาะต้นกล้าเพื่อทำต้นตอยางพาราที่ใช้สำหรับการติดตา ปัจจุบันการขยายพันธุ์ยางพาราในเชิงเศรษฐกิจ นิยมใช้วิธีการติดตาบนต้นตอยางพาราที่ได้จากการเพาะเมล็ด เพราะทำให้ได้ต้นใหม่จากตาพันธุ์ดีและมีพันธุกรรมเหมือนต้นเดิมทุกประการ (พรเทพ, 2555; สถาบันวิจัยยาง, 2555)

สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร มีการพัฒนาและวิจัยพันธุ์ยางพาราเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต และจัดทำคำแนะนำพันธุ์ยางเพื่อเผยแพร่แก่เกษตรกร โดยเริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2504 และมีการเปลี่ยนแปลงคำแนะนำพันธุ์ยางทุก ๆ 4 ปี โดยพิจารณาจากพันธุ์ยางใหม่ที่ได้รับจากผลงานวิจัยการปรับปรุงพันธุ์ยาง สภาพแวดล้อมในพื้นที่ปลูกยาง และวัตถุประสงค์การปลูกยาง

ของเกษตรกร จากเดิมที่เกษตรกรปลูกยางเพื่อผลผลิตน้ำยางเป็นหลัก แต่ปัจจุบันไม้ยางพารามีความสำคัญต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมไม้ของประเทศ เกษตรกรจึงปลูกยางเพื่อผลผลิตน้ำยางและ/หรือเนื้อไม้เพิ่มขึ้น และประเทศไทยขยายพื้นที่ปลูกยางพาราไปยังแหล่งใหม่มากขึ้น จึงจำเป็นต้องแนะนำพันธุ์ยางให้เหมาะสมกับพื้นที่ปลูก ในปี พ.ศ. 2554 สถาบันวิจัยยางจัดทำคำแนะนำพันธุ์ยางให้เหมาะสมกับพื้นที่ปลูกยางเดิมซึ่งได้แก่ ภาคใต้และภาคตะวันออก 3 จังหวัด (ระยอง จันทบุรี ตราด) และพื้นที่ปลูกยางใหม่ซึ่งได้แก่ ภาคตะวันออกเชิงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และบางส่วนของภาคตะวันออก โดยแบ่งพันธุ์ยางแนะนำเป็น 3 กลุ่ม คือ พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยาง ได้แก่ พันธุ์สถาบันวิจัยยาง 251 สถาบันวิจัยยาง 226 BPM 24 RRIM 600 เป็นต้น พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้ ได้แก่ PB 235 เป็นต้น และพันธุ์ยางเพื่อผลผลิตเนื้อไม้ ได้แก่ พันธุ์จะเชิงเทรา 50 AVROS 2037 BPM 1 เป็นต้น เพื่อให้เกษตรกรเลือกพันธุ์ยางได้ตามวัตถุประสงค์ของการปลูก (สถาบันวิจัยยาง, 2554ก)

ยางพาราพันธุ์แนะนำที่ปลูกมากที่สุดในประเทศไทยขณะนี้คือ พันธุ์ RRIM 600 (Nakkanong *et al.*, 2008) แต่พบว่ามีอาการอ่อนแอต่อโรครากขาวมากที่สุด และพันธุ์ยางพาราที่ปลูกทั่วประเทศในปัจจุบันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยมาก จึงมีความเสี่ยงต่อความเสียหายที่เกิดจากการระบาดของโรคสูง (สายทอง, 2556)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หมายถึง ความหลากหลายของหน่วยพันธุกรรมที่สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้รับการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษ และส่งต่อไปยังรุ่นต่อไป ลักษณะทางพันธุกรรม จะถ่ายทอดผ่านทางยีน (gene) ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมีลักษณะเหมือน หรือแตกต่างกันตามยีนที่ถูกถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษ เช่น ข้าวมีสายพันธุ์หลายร้อยชนิด หรือพี่น้องอาจมีสีผิว สีผิว และสีขนที่แตกต่างกัน เป็นต้น ความผันแปรทางพันธุกรรมในแต่ละหน่วยชีวิต เกิดจากการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (mutation) อาจเกิดขึ้นในระดับยีน หรือในระดับโครโมโซม ผสมกับกลไก crossingover ที่เกิดขึ้นขณะแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ทำให้ยีนสลับที่รวมตัวกันใหม่ (recombination) และเมื่อลักษณะนี้ถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลาน จะทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (ชนิชฐา, 2549; พิไลวรรณ และ วรรณนิภา, 2557)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

การศึกษาด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เช่น การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ เพื่อการรวบรวมพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาตำแหน่งยีน (gene tagging) เป็นต้น

เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ (DNA microsatellite marker) หรือเครื่องหมายเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat; SSR marker) (พัชรี, 2553) เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนล (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) (สุรินทร์, 2552)

ไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) เป็นดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) ในหนึ่งหน่วยเบสซ้ำสั้นมากประมาณ 1-6 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส เรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ในจีโนม โดยมีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นนั้น เป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ในตำแหน่งหนึ่ง ๆ เนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์มีการกระจายตัวอยู่ทั่วไปในจีโนม มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่ขนานข้างกับเบสซ้ำต่อเนื่อง ทำให้สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะได้ เรียกว่า ไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์ หรือเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ ไพรเมอร์นี้จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่างเบสจำเพาะ ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ เป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากัน ซึ่งใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (สุรินทร์, 2552; พัทรี, 2553)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite marker) หรือเครื่องหมาย SSR (SSR marker) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ คือ สามารถแยกความแตกต่างแบบข่มร่วมได้ (co-dominant) ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) และใช้ดีเอ็นเอในการตรวจสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชได้ โดยเป็นวิธีที่ง่าย ช่วยลดระยะเวลาในการทำงานลง แม่นยำ และสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่องอัตโนมัติ แต่ต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ ทำให้ต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย (พัชรวิ, 2553; Weigend and Romanov, 2001; Mantello *et al.*, 2012)

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. เชื้อพันธุ์กรรมยางพารา

ต้นกล้ายางพาราที่ได้จากการเพาะเมล็ดยางที่เก็บมาจากสถานที่ต่าง ๆ ในจังหวัดจันทบุรี จำนวน 4 สถานที่ และจากสถานที่อื่น ๆ ที่ปลูกพันธุ์ยางแนะนำ จำนวน 4 สถานที่ รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนพื้นที่และต้นยางที่ได้จากการเพาะเมล็ดยางที่เก็บมาจากพื้นที่ต่าง ๆ ในจังหวัดจันทบุรี และพื้นที่อื่น ๆ

ประชากร	รหัสพื้นที่	สถานที่เก็บเมล็ดยาง	จำนวนต้นกล้า ยางพารา
1	12	พื้นที่ป่าชุมชน โครงการอ่างเอ็ด จ.จันทบุรี	11
2	6	หมู่ที่ 2 ต.พวา อ.แก่งหางแมว จ.จันทบุรี	12
3 (Check)	E1	ศูนย์วิจัยยางจะเชิงเทรา ในแปลงปลูกยางพันธุ์ RRIM 600	5
4 (Check)	C	สถานีสิทธิพรกฤดากร จ.ประจวบคีรีขันธ์ ในแปลงปลูก ยางพันธุ์ RRIM 600	5
5 (Check)	E2	ศูนย์วิจัยยางจะเชิงเทรา ในแปลงปลูกยางพันธุ์ RRIT 251	6
6 (Check)	NE	แปลงเกษตรกร จ.น่าน ในแปลงปลูกยางพันธุ์ RRIM 600	5
7	4.1	หมู่ 10 ต.คมบาง อ.เมือง จ.จันทบุรี	10
8	2	บ้านคลองนารายณ์ บ้านคมบาง หมู่ 9 ต.คลองนารายณ์ อ.เมือง จ.จันทบุรี	9
รวม			63

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

2.1 อุปกรณ์

- โกร่งบด
- ไมโครปิเปต

- หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- ตู้อบ (Hot air oven)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- เครื่อง Nanodrop2000

2.2 สารเคมี

- 2x CTAB (Extraction buffer)
- Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)
- Isopropanol (-20 องศาเซลเซียส)
- เอทานอล 70%
- สารละลาย TE

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทำ PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.1 อุปกรณ์

- Thermal cycler (PCR machine)
- 96-well plate PCR
- PCR cover sheet

3.2 สารเคมี

- 10x *Taq* Buffer + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 25 Mm MgCl_2
- *Taq* DNA Polymerase
- 1 Mm dNTPs
- น้ำ 18 เมกกะโอห์ม
- Mineral oil
- Sequencing dye

- คู่ Primers จำนวน 10 คู่ ได้แก่ HB41, HB42, HB49, HB56, HB57, HB64, HB72, HB79, HB86 และ HB87 รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูล SSR primer

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

4.1 อุปกรณ์

- กระจก
- ชุด Gel electrophoresis
- กระดาษ Kimwipes
- กระดาษพลาสติก

4.2 สารเคมี

- Clear view
- Bind silane (3-(Trimethoxysilyl) propyl methacrylate)
- Acetic acid 0.5%
- เอทานอล 95%
- Polyacrylamide 6%
- APS 10% (Ammonium per sulfate 10%)
- TEMED
- 1x TBE buffer
- Fix solution
- Silver staining
- Develop solution
- Formaldehyde 37%

5. วิธีการ

5.1 การสกัดดีเอ็นเออย่างพารา ใช้วิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990)

- 1) ใส่ใบอ่อนยางพาราลงในโกร่ง เติม 2x CTAB buffer (extraction buffer) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วบดใบอ่อนยางพาราให้ละเอียด

2) คัดสารละลายจากข้อ 1) ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 700 ไมโครลิตร นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (พลิกหลอดไปมา ทุก ๆ 5 นาที)

3) เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมา (ประมาณ 200 ครั้ง) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 5 นาที

4) คัดสารละลายใสด้านบน ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ จะเห็นสายดีเอ็นเอปรากฏอยู่ในสารละลาย

5) ปั่นเหวี่ยงสารละลายดีเอ็นเอที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 10 วินาที จะได้ตะกอนดีเอ็นเอติดอยู่ที่ก้นหลอด

6) เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% จำนวน 2 ครั้ง

7) ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งในตู้อบ

8) เติมสารละลาย TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9) วัดความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Nanodrop2000

5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

1) เจือจาง (dilute) สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยน้ำ 18 เมกกะโอห์ม

2) เตรียม Master mix สำหรับ 100 reaction โดยมีองค์ประกอบดังนี้

- น้ำ 18 เมกกะโอห์ม	484	ไมโครลิตร
- 10x <i>Taq</i> buffer	100	ไมโครลิตร
- 25 มิลลิโมล $MgCl_2$	60	ไมโครลิตร
- 1 มิลลิโมล dNTPs	100	ไมโครลิตร
- 10 ไมโครโมล Forward primer	25	ไมโครลิตร
- 10 ไมโครโมล Reverse primer	25	ไมโครลิตร
- <i>Taq</i> polymerase	6	ไมโครลิตร
รวม	100	ไมโครลิตร

3) คัดสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วลงใน 96 well plate PCR ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติม Master mix ลงไป 8 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงให้สารละลายเข้ากัน ประมาณ 3 วินาที

4) นำเข้าเครื่อง PCR กำหนดโปรแกรม Thermocycling รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 3 โดยแต่ละคู่ Primers กำหนดอุณหภูมิในช่วง Annealing แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 3 โปรแกรม Thermocycling

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
First denaturing	94	5 นาที	
Denaturing	94	1 นาที	} 30 cycles
Annealing	(แสดงดังตารางที่ 2)	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	
Hold	16	∞	

5) ผสม Sequencing dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน PCR product แล้วเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.3 การทำ Electrophoresis ใน Polyacrylamide gel

1) วิธีเตรียมกระจก

1.1) ขั้นตอนเช็ดกระจก

- เช็ดกระจกด้วยเอทานอล 95% 3 ครั้ง
- เตรียม Binding solution โดยใช้ Acetic acid 0.5% ในเอทานอล 95% ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับ Bind silane ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร แล้วเช็ดให้ทั่วกระจก 2 ครั้ง
- เช็ดซ้ำด้วยเอทานอล 95% 2 ครั้ง

1.2) ขั้นตอนเช็ด chamber

- เช็ด chamber ด้วยเอทานอล 95% 3 ครั้ง

- หยด clear view ลงบน chamber แล้วเช็ดให้ทั่ว 2 ครั้ง
- เช็ดซ้ำด้วยเอทานอล 95% 2 ครั้ง
- แล้วประกอบกระจก chamber และ spacer เข้าด้วยกัน โดยวาง spacer ไว้ด้านข้างระหว่างกระจก และ chamber เพื่อสร้างช่องว่างสำหรับเทเจล

2) วิธีเตรียมเจล และทำ Electrophoresis ใน Polyacrylamide gel

- 2.1) ผสม Acrylamide gel 6% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร, APS 10% ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ TEMED 50 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน
- 2.2) เท Acrylamide gel ลงในช่องว่างระหว่างกระจกกับ chamber เติบหิวลงบนเจลเพื่อสร้างช่องว่างสำหรับโหลดตัวอย่าง รอกเจลแข็งตัว ประมาณ 2 ชั่วโมง
- 2.3) นำหิวออก แล้วประกอบกระจกเข้ากับเครื่อง Electrophoresis Polyacrylamide gel หลังจากนั้นเติม 1x TBE buffer และ pre-run โดยใช้กระแสไฟฟ้า 1,500 โวลต์ 100 มิลลิแอมแปร์ 100 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เจลมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส
- 2.4) กำจัดยูเรีย และเศษเจล ออกจากช่องโหลดตัวอย่าง แล้วเติบหิวลงในเจล เพื่อสร้างช่องโหลดตัวอย่าง (well)
- 2.5) โหลดตัวอย่างดีเอ็นเอลงใน well ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และโหลด 10 bp Marker ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ที่ช่องแรกและช่องสุดท้ายของเจล
- 2.6) เปิดเครื่อง Electrophoresis ที่ 1,500 โวลต์ 100 มิลลิแอมแปร์ 45 วัตต์ โดยเมื่อแถบสีดีเอ็นเอเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 เซนติเมตร หยุดการทำงานของ Power supply เพื่อนำหิวออก แล้ว Run ต่อจนแถบสีดีเอ็นเอเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 17 เซนติเมตร (เวลา 1 ชั่วโมง 30)

3) วิธีการย้อมเจลด้วยวิธี Silver staining

- 3.1) แช่กระจกใน fixer ที่อุณหภูมิประมาณ 16 องศาเซลเซียส แช่ไปมานาน 5 นาที
- 3.2) ย้อมกระจกใน Silver staining แช่ไปมานาน 7 นาที
- 3.3) ล้างกระจกโดยนำกระจกมาผ่านน้ำ ประมาณ 10 วินาที

3.4) แช่กระจกใน Developer ที่เติม formaldehyde 37% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ
เขย่าจนกว่าจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ

3.5) นำกระจกแช่ใน fixer ประมาณ 2 นาที แล้วล้างน้ำ ประมาณ 5 นาที

3.6) ตากกระจกให้แห้ง และนำไปวิเคราะห์ข้อมูล

5.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

1) สกอร์ (score) แถบดีเอ็นเอลงในโปรแกรม Microsoft Excel โดยให้ตำแหน่งที่ปรากฏ
แถบชัดเจนเป็น 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 (Gower's
analysis)

5.5 สถานที่ทำการทดลอง

การวิจัยนี้ทดลองที่โรงเรียนภาควิชาพืชไร่ฯ และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพด้าน
พืช ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

5.6 ระยะเวลาทำการทดลอง

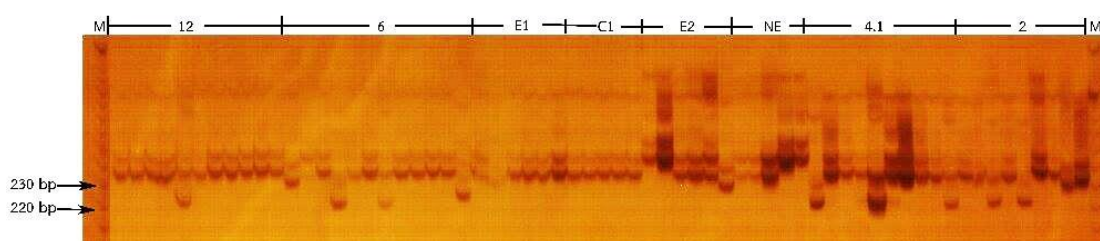
เริ่มตั้งแต่ เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557 สิ้นสุด เดือนตุลาคม พ.ศ. 2557

ผลและวิจารณ์

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดจันทบุรี โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ สามารถอธิบายผลการทดลองได้ดังนี้

1. ผลของปฏิกิริยา PCR

จากการศึกษาผลของปฏิกิริยา PCR ของคู่ Primers จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ HB41, HB42, HB49, HB56, HB57, HB64, HB72, HB79, HB86 และ HB87 ให้ผลการสกอ์แถบดีเอ็นเอของยางพารา 63 ตัวอย่างบนตำแหน่ง (loci) ที่แตกต่างกันรวมทั้งหมด 85 ตำแหน่ง



ภาพที่ 1 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB64 กับตัวอย่างดีเอ็นเอของยางพารา จำนวน 63 ตัวอย่าง (M = marker 10 bp ladder)

2. Nei's Genetic Distance

จากการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่า Nei's Genetic Distance (ตารางที่ 4) ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากร พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างยางพาราในป่าชุมชนโครงการอ่างเอ็ด จ.จันทบุรี (pop1) กับ ยางพาราจาก ต.พวา อ.แก่งหางแมว จ.จันทบุรี (pop2) มีค่า Nei's Genetic Distance ต่ำที่สุด (0.027) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ระหว่างตัวอย่างยางพาราในป่าชุมชนโครงการอ่างเอ็ด จ.จันทบุรี (pop1) กับ ยาง RRIM 600 ของ สถานีสิทธีพรกฤดากร (pop4) มีค่า Nei's Genetic Distance สูงที่สุด (0.135)

หากมีค่า Nei's Genetic Distance สูง จะมีความแตกต่างระหว่างประชากรมาก หากค่า Nei's Genetic Distance ต่ำ จะมีความใกล้เคียงกันระหว่างประชากร (Kubik *et al.*, 2009) ตัวอย่าง ยางพาราในป่าชุมชนโครงการอ่างเอ็ด จ.จันทบุรี (pop1) มีความแตกต่างจากยาง RRIM 600 ของ สถานีสิทธีพรกฤดากร (pop4) ยาง RRIT 251 (pop5) และยาง RRIM 600 จ.น่าน (pop6) มาก ยางพาราจาก ต.พวา อ.แก่งหางแมว จ.จันทบุรี (pop2) กับยางพาราจาก ต.คลองนารายณ์ อ.เมือง จ.จันทบุรี (pop8) มีความแตกต่างจากยาง RRIM 600 ของสถานีสิทธีพรกฤดากร (pop4) มากกว่า ประชากรแหล่งอื่น ยางพาราจาก ต.คมบาง อ. เมือง จ.จันทบุรี (pop7) แตกต่างจากยาง RRIM 600 ของสถานีสิทธีพรกฤดากร (pop4) และยาง RRIM 600 จ.น่าน (pop6) มาก

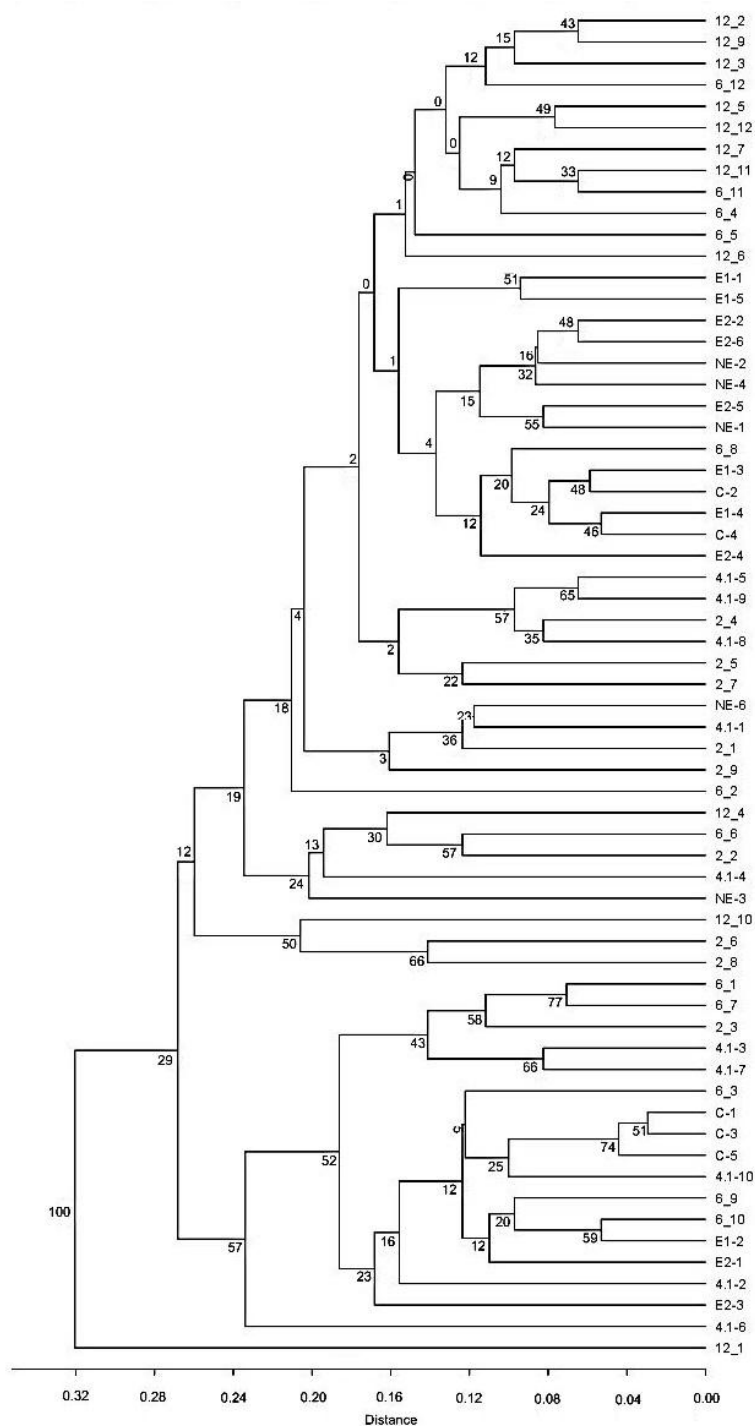
ตารางที่ 4 Pairwise Population Matrix of Nei's Genetic Distance

Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	Pop 8	
0								Pop1
0.027	0							Pop2
0.053	0.030	0						Pop3
0.135	0.096	0.063	0					Pop4
0.083	0.059	0.050	0.096	0				Pop5
0.088	0.073	0.062	0.118	0.028	0			Pop6
0.066	0.052	0.076	0.104	0.066	0.093	0		Pop7
0.077	0.046	0.065	0.119	0.052	0.059	0.044	0	Pop 8

3. เดนโดแกรม (Dendrogram)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Past โดยใช้วิธี Pair-Group Method (Gower's analysis) สร้างเดนโดแกรม (Dendrogram) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ

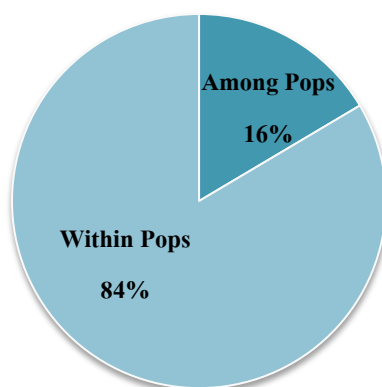
ยางพาราจำนวน 63 ตัวอย่าง มีค่า Cophenetic Correlation (Coph. Corr) ของเดนโดรแกรมเท่ากับ 0.7837 รายละเอียดแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 เดนโดรแกรม (Dendrogram) จากการวิเคราะห์ Cluster analysis โดยวิธี Pair-Group Method (Gower's analysis) ของตัวอย่างดีเอ็นเอยางพารา จำนวน 63 ตัวอย่าง จากการใช้ SSR marker

ที่ระยะ Distance 0.24 สามารถจำแนกกลุ่มยางพาราได้ 4 กลุ่ม โดยตัวอย่างยางพาราจากพื้นที่ป่าชุมชนโครงการอ่างเอ็ด จ.จันทบุรี (12) เป็นยางพาราที่มีความแตกต่างกันภายในประชากร และมีหนึ่งตัวอย่างที่แตกต่างจากประชากรกลุ่มอื่น ๆ

อัตราความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำมาประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่ามีอัตราการแปรปรวนภายในประชากรเท่ากับ 84 เปอร์เซนต์ และอัตราการแปรปรวนระหว่างประชากรเท่ากับ 16 เปอร์เซนต์ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 เปอร์เซนต์ความแปรปรวนเครื่องหมายโมเลกุล (molecular variance) ของประชากรยางพารา

สรุปและข้อเสนอแนะ

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดจันทบุรี เปรียบเทียบกับยางพาราพันธุ์ RRIT 251 จากศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา และยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา สถานีสิทธิพรกฤดากร และ จ.น่าน สามารถนำมาประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพาราได้ โดยสามารถจำแนกยางพาราจำนวน 63 ตัวอย่าง ได้เป็น 4 กลุ่ม ยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดจันทบุรีมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากยางพาราพันธุ์แนะนำทั้งสองพันธุ์

ยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในระยะแรกที่จังหวัดจันทบุรีนี้ สามารถนำมาใช้สร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราได้ เพราะมีอัตราความแปรปรวนภายในประชากร และระหว่างประชากรเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และข้อมูลชุดนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราในประเทศไทยต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สุจินต์ เจนวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เฉลิมพล ภูมิไชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ทำให้ปัญหาพิเศษเสร็จสมบูรณ์ได้

ขอขอบคุณ นางสาวภาวิดา ไชยวงศ์ ที่ดูแลให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี และนางสาวพริณพร เจริญพรรักษา ในการช่วยเหลือการทำงานทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2540. **ยางพารา: เอกสารวิชาการ**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ขนิษฐา. 2549. ความหลากหลายทางพันธุกรรม. **บทความกลุ่มวิชาการ**. แหล่งที่มา:

http://www.tpa.or.th/writer/read_this_book_topic.php?pageid=3&bookID=212&read=true&count=true#sthash.a48vFsiH.dpuf, 12 พฤษภาคม 2558.

พัชรี ลาโคตร. 2553. **เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์กับการปรับปรุงพันธุ์พืช**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท., มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

พรเทพ เข็นพิจูณ. 2555. การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของตางายพันธุ์สถาบันวิจัยยาง 408 (RRIT 408) บนต้นตอยางพาราที่ได้จากเมล็ดของโคลนพันธุ์ต่าง ๆ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิไลวรรณ ภักดีเรือง และ วรรณนิภา หนูขวัญ. 2557. ความหลากหลายทางพันธุกรรม. 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, 12 พฤษภาคม 2558.

ยสินทร์ กิดิจันทโรภาส และ ปรีชา พวงสำลี หวังสมนึก. 2550. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) สืบตามสายพันธุ์ในประเทศไทย. ว. วิทย. กษ. 38: 19-24.

เรไร ลำเจียก. 2556. **ปัญหาโรคยางพาราไทย: ข้อเสนอแนวทางแก้ไข: บทความวิชาการ**. สำนักวิชาการ. สำนักงานเลขาธิการวุฒิสภา, กรุงเทพฯ.

สถาบันวิจัยยาง. 2554ก. คำแนะนำพันธุ์ยาง ปี 2554. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สถาบันวิจัยยาง. 2554ข. คำแนะนำการปลูกยางพารา. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สถาบันวิจัยยาง. 2555. ข้อมูลวิชาการยางพารา 2555. สถาบันวิจัยยาง, กรุงเทพฯ.

สายทอง แก้วฉาย. 2556. โรครากขาวของยางพารา และการป้องกันกำจัด. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์.

สุนิสา สุชาติ. 2548. ยางธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

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

สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน. 2548. ยางพารา: เอกสารวิชาการ. กรมพัฒนาที่ดิน. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

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

Khonglao, K. 2006. Study of Root Growth and Root Profile in Ten Rubber Clones (*Hevea Brasiliensis*). Special Problem Report, Prince of Songkla University.

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

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

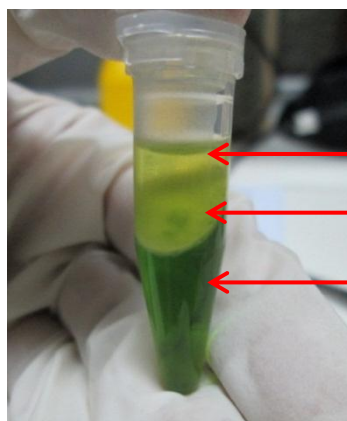
- Nakkanong, K., C. Nualsri and S. Sdoodee. 2008. Analysis of genetic diversity in early introduced clones of rubber tree (*Hevea Brasiliensis*) using RAPD and microsatellite markers. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 30: 553-560.
- Weigend, S. and M.N. Romanov. 2001 Current strategies for the assessment and evaluation of genetic diversity in chicken resources. **World's Poult. Sci.** 57: 275-288.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ภาพดำเนินการทดลอง



ภาพผนวกที่ 1ก การบดใบอ่อนยางพารา ใน 2x CTAB buffer (Extraction buffer)

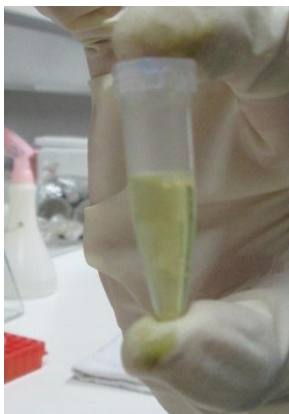


ดีเอ็นเอ (ส่วนใส)

ชั้นส่วนพืช

สารละลายคลอโรฟอร์ม และ
ไอโซโพรพานอล

ภาพผนวกที่ 2ก การแยกชั้นระหว่างดีเอ็นเอ (สารละลายส่วนใส) ชั้นส่วนพืช และสารละลายคลอโรฟอร์ม และไอโซโพรพานอล



ภาพผนวกที่ 3ก สารละลายส่วนใสที่มีดีเอ็นเอ



ภาพผนวกที่ 4ก การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop2000



ภาพผนวกที่ 5ก การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์



ภาพผนวกที่ 6 การประกอบกระจก เข้ากับ chamber



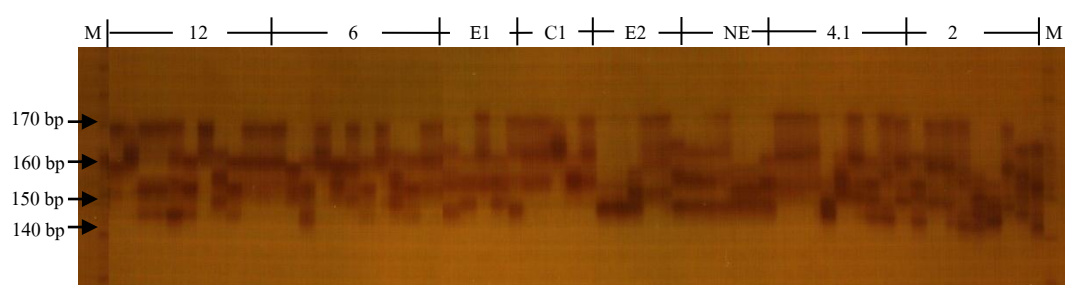
ภาพผนวกที่ 7 การเท Acrylamide gel



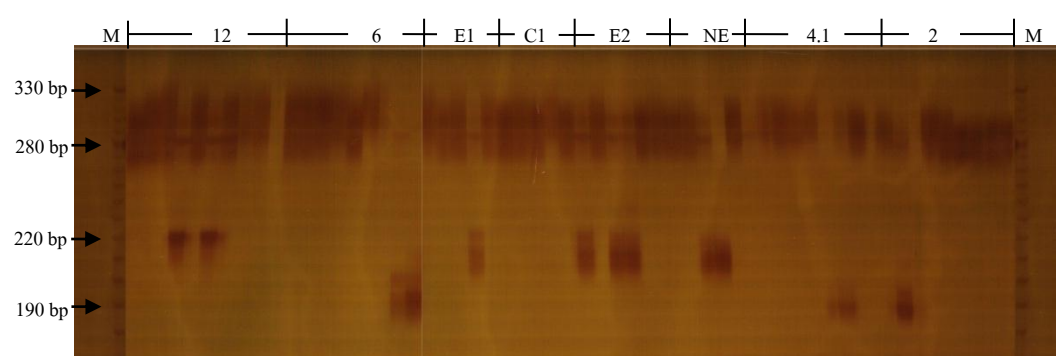
ภาพผนวกที่ 8 การโหลดตัวอย่างดีเอ็นเอ PCR product

ภาคผนวก ข

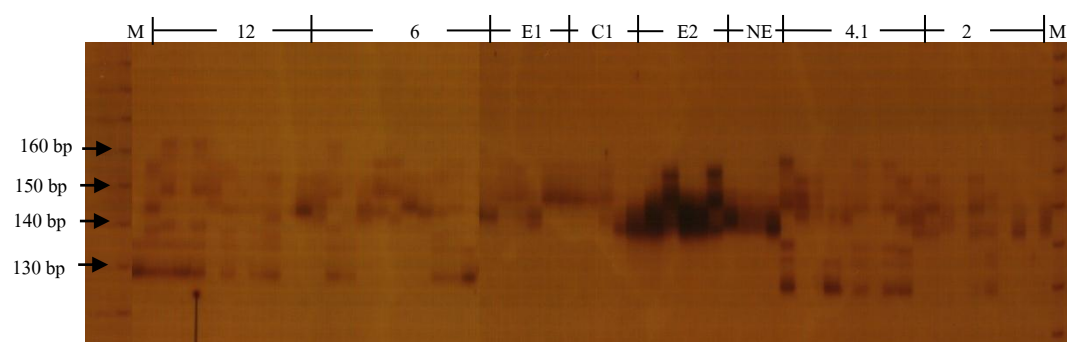
ภาพผลการทดลอง



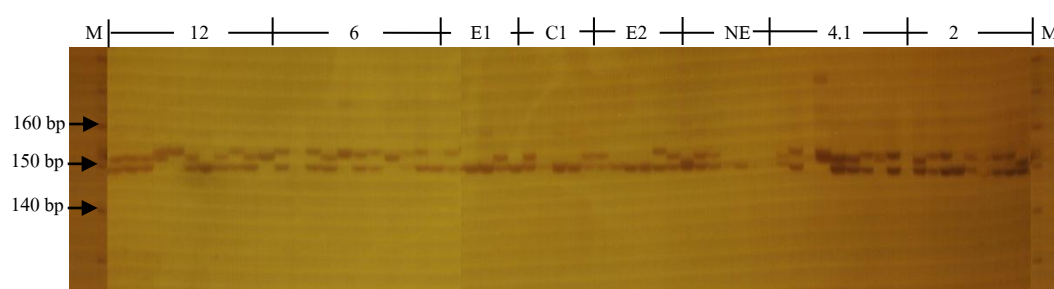
ภาพผนวกที่ 1ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB41



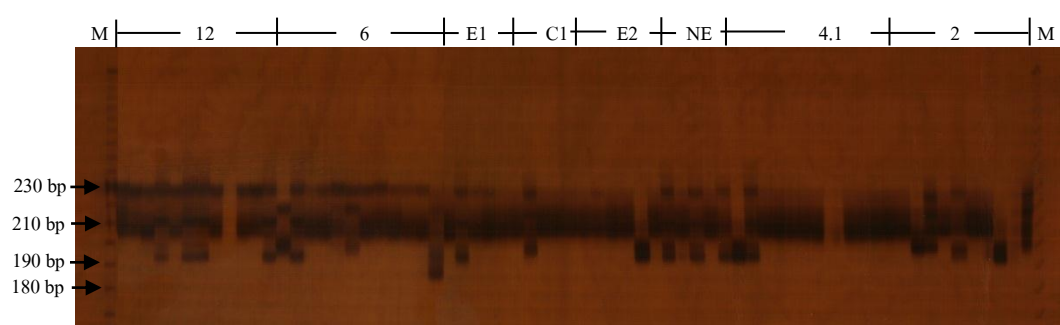
ภาพผนวกที่ 2ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB42



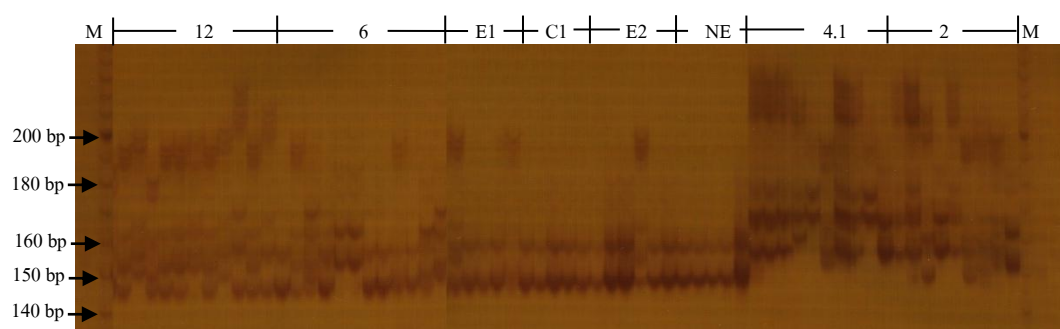
ภาพผนวกที่ 3ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB49



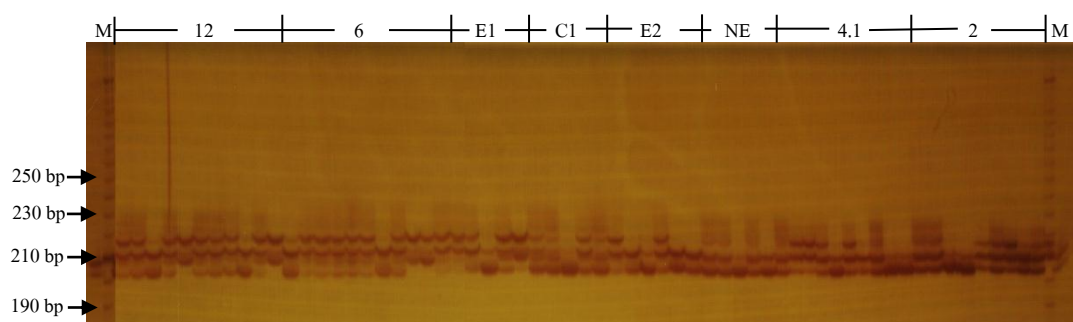
ภาพผนวกที่ 4ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB56



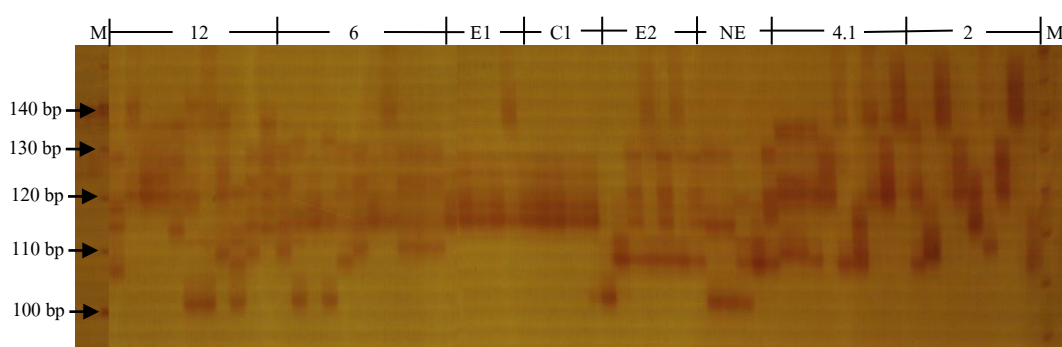
ภาพผนวกที่ 5ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB57



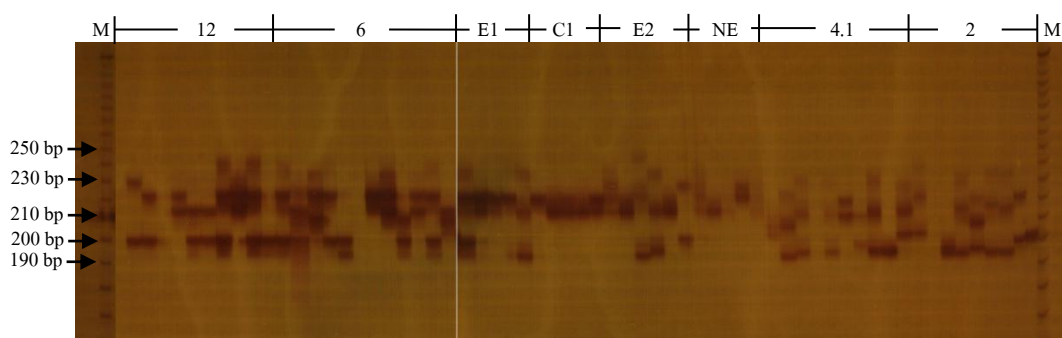
ภาพผนวกที่ 6ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB72



ภาพผนวกที่ 7ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB79



ภาพผนวกที่ 8ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB86



ภาพผนวกที่ 9ข รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ SSR primer HB87