การวิเคราะห์จีโนไทป์ของกล้ายางพารา RRIM 600 จากเนอสเซอรีกล้ายาง ในจังหวัดขอนแก่น และหนองคาย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

Genotype Analysis of RRIM 600 Rubber Seedlings from Rubber Nursery in Khon Kaen and Nong Khai Provinces by Molecular Markers

ปัณณพร เชื้อป้อง (Pannapon Chueapong)* ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก (Preeya Puangsomlee Wangsomnuk)**
สุภัทร์อิศรางกูร ณ อยุธยา (Supat Isarangkool Naayutthaya)*** พินิจ หวังสมนึก (Pinich Wangsomnuk)****

บทคัดย่อ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและภูมิภาคอาเซียน ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกยางธรรมชาติเป็นอันดับหนึ่งของภูมิภาคและของโลก โดยพันธุ์ RRIM 600 เป็นที่นิยมปลูกมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การตรวจสอบความถูกต้องของพันธุกรรมที่ใช้ในปัจจุบันขึ้นอยู่กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งอาจสังเกตได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจความถูกต้องของพันธุ์ยางพาราชำถุง RRIM 600 จำนวน 16 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจากผู้ประกอบการแปลงกล้ายางพาราเป็นการค้าในจังหวัดขอนแก่นและหนองคาย โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบเป็นข้อมูลเบื้องต้น เปรียบเทียบกับพันธุ์ RRIM 600 อ้างอิง การตรวจจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมาย SSR ตำแหน่งที่เฉพาะกับพันธุ์ RRIM 600 อ้างอิง จากการตรวจจีโนไทป์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบให้ผลสอดคล้องกัน พบว่าต้นกล้ายางพารา 15 ตัวอย่าง (95%) มีลักษณะของใบสอดคล้องกับพันธุ์ RRIM 600 อ้างอิง และมีเพียงหนึ่งตัวอย่างจากจังหวัดหนองคายที่มีลักษณะของใบแตกต่างกับ RRIM 600 อ้างอิง ผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับค่าเฉลี่ยเลขคณิตของจีโนไทป์สี่พันธุ์อ้างอิง (BPM 24, RRIM 600, RRIT 226 and RRIT 251) และโคลนยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 16 ตัวอย่าง ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีค่าตั้งแต่ 0.40 - 1.00 การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงการใช้งานจริงของระบบการตรวจสอบโคลนยางพารา ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการปลูกสร้างสวนยางพารา เกษตรกรสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกต้นกล้ายางคุณภาพของแท้ก่อนซื้อต้นกล้ายางพารา เนื่องจากการทำสวนยางพาราเป็นเงินลงทุนระยะยาว

ABSTRACT

Para rubber tree (*Heveabrasiliensis* Muell. Arg.) is an important economic plant in Thailand as well as the ASEAN region. Thailand has been ranked the first in production and export of natural rubber products when compared to other countries in the world. The para rubber tree variety PRIM600 is the most popular variety cultured in northeast Thailand. The current approach for validating genetic accuracy of para rubber seeding is mainly based on morphological characteristics. The present study aimed to determine the genetic accuracy of rubber seeding producing in northeast Thailand. A total number of 16 samples were collected from entrepreneurs' shops at

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา สำหรับครู คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
***** รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

Khon Kaen and Nong Khai provinces. Morphological features of leaf and SSR markers which are specific to referent RMMI600 were used for genotypic validation. The morphological examination revealed that the leaf of 15 studied samples (93.75%) were similar to the referent RPMI600, only one samples from Nong Khai province exhibited differences in leaf morphology. Based on four referent varieties (BMP24, PRIM600, RRIT226 and RRIT25), the cluster analysis using unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) showed that the coefficients of genetic relatedness ranged of 0.40 - 1.00. The results of the present study highlighted the practical application of clonal authentication which can be useful for para rubber plantation. This method can be used by rubber farmers as a tool for selecting genuine clone of para rubber tree before purchasing the saddling since the rubber plantation is a long-term investment.

คำสำคัญ: ต้นยางพาราชำถุง ลักษณะสัณฐานวิทยา เครื่องหมายโมเลกุล SSR

Keywords: Rubber seedling, morphological character, Simple Sequence Repeat (SSR) marker

บทนำ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและภูมิภาคอาเซียน ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกยางธรรมชาติเป็นอันดับหนึ่งของภูมิภาคและของโลก ในปี พ.ศ.2558 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางพาราจำนวน 77.98 ล้านไร่ สร้างรายได้จำนวนมากให้กับเกษตรกรชาวสวนยาง ตลอดจนอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง ยางพาราจึงมีบทบาทสำคัญต่อความเป็นอยู่ของเกษตรกรไทย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) การให้ผลผลิตของยางพาราเป็นผลจากอิทธิพลของพันธุ์ยางพารามากกว่าสิ่งแวดล้อม (Mantello *et al*., 2012) เกษตรกรควรพิจารณาคัดเลือกพันธุ์ยางพาราให้เหมาะสมกับผลผลิตที่ต้องการ พันธุ์ยางพาราที่แนะนำให้ปลูกในประเทศไทยในปัจจุบันแบ่งออกเป็นพันธุ์ยางพาราเพื่อผลิตน้ำยาง พันธุ์ยางพาราเพื่อผลิตน้ำยางและเนื้อไม้ พันธุ์ยางเพื่อผลิตเนื้อไม้ (กรมวิชาการเกษตร, 2554) วัสดุปลูกยางพารานิยมใช้ต้นกล้ายางพาราชำถุง โดยวิธีเพาะเมล็ดและติดตาในถุงหรือติดตาในแปลงกล้าแล้วนำมาเลี้ยงในถุงจนได้ต้นยางพาราชำถุงขนาด 1 ถึง 2 ฉัตร ตามมาตรฐานต้นยางชำถุงที่กำหนด ทั้งนี้การผลิตกล้ายางพันธุ์ใดมักเป็นไปตามกลไกตลาดที่ผู้ซื้อมีความต้องการ

จากข้อมูลการสำรวจพันธุ์ยางพาราของวิภาวดีและคณะ (2556) พบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือใช้พันธุ์ RRIM 600 มาปลูก ร้อยละ 96 เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ได้รับการสนับสนุนจากรัฐบาลในช่วงที่มีการส่งเสริมให้ปลูกยางพาราในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือระยะแรก โดยมีการปลูกยางพาราพันธุ์ RRIT 251 ร้อยละ 2.33 ซึ่งให้ผลผลิตน้ำยางมากกว่า RRIM 600 ทำให้เกษตรกรบางส่วนนำยางพาราพันธุ์นี้มาทดลองปลูกในแปลงของตน และยังพบว่ามีการนำพันธุ์ BPM 24 มาปลูกร่วมกับพันธุ์ RRIM 600 ร้อยละ 1.67 ยางพาราแต่ละพันธุ์มีลักษณะประจำพันธุ์และให้ผลผลิตแตกต่างกัน การวิเคราะห์พันธุ์ยางพาราเป็นกระบวนการสำคัญที่จะสร้างความมั่นใจให้เกษตรกรให้ความเชื่อมั่นในผลผลิตในอนาคต (กรมวิชาการเกษตร, 2554) การใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการระบุพันธุ์ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญ โดยพิจารณาจากลักษณะใบ เช่น ลักษณะปลายใบ ฐานใบ รูปร่างใบ ขอบใบ ตำแหน่งขอบใบย่อย โดยใบย่อยทั้ง 3 ใบจะมีตำแหน่งแยกจากกัน ทับกัน หรือสัมผัสกัน (Ong, 2012; Anjomshoae *et al*., 2015) Anjomshoae (2014) ได้แยกตำแหน่งใบย่อยออกเป็น 2 แบบ คือ แยกจากกันและไม่แยกจากกันขึ้นอยู่กับมุมของก้านใบ ซึ่ง Anjomshoae and Rahim (2016) รายงานวิธี template-based เพื่อแยกโคลน PB 350, RRIM 2001, RRIM 2002,

RRIM 2025 และ RRIM 3001 ออกจากกัน อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติได้รายงานลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยางพาราไว้หลายพันธุ์ แต่ยังไม่พบรายงานการใช้ลักษณะใบในการระบุโคลนยางพารา RRIM 600 จากยางพาราพันธุ์อื่นๆ

นอกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาในการระบุพันธุ์พืชแล้ว มีรายงานการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยคัดเลือกจีโนไทป์ของพืชหลายชนิด (Dmitry *et al*., 2015) เครื่องหมายโมเลกุล simple sequence repeats เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการระบุอัตลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีความจำเพาะ แสดงลักษณะข่มร่วม (codominance) Hailin *et al*., (2016) ได้พัฒนาระบบการทดสอบ SSR-based เพื่อระบุพันธุกรรมของ *Populus tremula* L. นำ ไปประยุกต์ใช้สำหรับจำแนกจีโนไทป์ ศึกษาโครงสร้างของโคลน และความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากร poplar วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาเบื้องต้นในการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบและเครื่องหมายโมเลกุล Simple Sequence Repeat (SSR) ในการตรวจสอบกล้ายางพาราชำถุงก่อนนำไปปลูก อันจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรในระยะยาว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจลักษณะสัณฐานวิทยาของใบยางพาราชำถุงพันธุ์ RRIM600 ที่รวบรวมจากผู้ประกอบการแปลงขยายพันธุ์ต้นยางพาราเพื่อการค้าในจังหวัดขอนแก่นและหนองคาย
2. ตรวจจีโนไทป์ยางพาราชำถุง RRIM600 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Simple Sequence Repeat

วิธีการวิจัย

ตัวอย่างพืชในงานวิจัย

ต้นกล้ายางพาราชำถุงติดตาด้วยพันธุ์ RRIM 600 จากแปลงขยายพันธุ์ยางพาราเพื่อการค้า จำนวน 16 ตัวอย่าง จากผู้ประกอบการ จำนวน 7 ราย ในจังหวัดขอนแก่น และหนองคาย นอกจากนี้ยังเก็บตัวอย่างใบยางพาราพันธุ์มาตรฐานชั้น 1 ที่สถาบันวิจัยยางแนะนำให้ปลูก จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ BPM 24, RRIM 600, RRIT 226 และ RRIT 251 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยยางฉะเชิงเทรา กรมวิชาการเกษตร

การตรวจลักษณะสัณฐานวิทยาของใบยางพาราชำถุง

ตรวจลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ 3 ลักษณะ ได้แก่ รูปร่างและขนาดของใบกลาง และตำแหน่งขอบใบย่อย เปรียบเทียบกับลักษณะประจำพันธุ์ RRIM 600 ที่ระบุไว้โดยสำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ (2545) (ภาพที่ 1)

การวิเคราะห์จีโนไทป์ตัวอย่างยางพาราชำถุงเปรียบเทียบกับพันธุ์อ้างอิง RRIM 600 โดยใช้เทคนิค SSR จากสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร ตามขั้นตอนดังนี้

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบสดน้ำหนัก 0.05 กรัม ด้วยวิธีของ Wangsomnuk *et al*., (2014) แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย TE buffer (ประกอบด้วย 10 mMTris-HCl pH 8 และ 1 mM EDTA pH 8) กำจัดอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ RNase A

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิสอาศัยการเรืองแสงกับเอธิเดียมโบรไมด์ และเครื่อง Thermo Scientific NanoDrop™ spectrometer (Fisher Scientific, USA)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 2 โลกัสได้แก่ HB 45 (Mantello *et al*., 2012) และgSSR 165 (Pootakham *et al*., 2012) ซึ่งวิภาวดีและคณะ (2557) ได้รายงานว่าเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างของยางพาราพันธุ์ BPM24, GT 1, RRIM 600, RRIT 251 และ RRIT 408 ออกจากพันธุ์อื่นๆ

จำนวน14 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ BPM 24, GT 1, RRIC 110, PB 235, BPM 1, RRII 118, PB 255, RRIM 600, RRIT 408, RRIT 928, RRIT 3001, RRIT 226, RRIT 251 และ RRIT 3902 ในงานวิจัยนี้ได้นำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวมาประเมินการระบุพันธุ์ RRIM 600 จากยางพาราทั้งหมด 4 พันธุ์ (ภาพที่ 6) และตัวอย่างยางพาราชำถุง 16 ตัวอย่าง โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ประกอบด้วย ขั้นที่ 1 การใช้อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลานาน 3 นาทีขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลานาน 30 วินาที อุณหภูมิ 53°C เป็นเวลานาน 40 วินาที และอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลานาน 40 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลานาน 5 นาที

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบขนาดของอัลลีลจากผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซีสในวุ้นอะกาโรสเข้มข้น 4% แล้วย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (VC100bp DNA ladder plus) (Vivantis)

วิเคราะห์อัลลีลของแต่ละโลกัส จากขนาดแถบดีเอ็นเอโดยเทียบกับดีเอนเอมาตรฐานด้วยโปรแกรม Photo-captMW แปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่างของแต่ละโลกัสให้เป็นสัญลักษณ์ “1” แสดงการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” แสดงการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) จากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม Simple Matching ((Sokal and Michener, 1958) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (Applied Biostatistics Inc., USA)

ผลการวิจัย

เมื่อวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบยางพาราชำถุงจากผู้ประกอบการแปลงขยายพันธุ์ยางพาราเพื่อการค้ารวมจำนวน 16 ตัวอย่าง จำนวน 3 และ 4 ราย จากจังหวัดขอนแก่น และจังหวัดหนองคาย ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ 3 ลักษณะ ด้วยตาเปล่า ประกอบด้วย ตำแหน่งขอบใบย่อย รูปร่างและขนาดของใบกลาง เปรียบเทียบกับลักษณะประจำพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งสำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ (2545) รายงานว่า พันธุ์ดังกล่าวตำแหน่งของขอบใบย่อยแยกจากกัน มีรูปร่างใบกลางแบบป้อมปลายใบ และมีใบกลางขนาดใหญ่ พบว่ามีต้นกล้ายางมีลักษณะตรงตามพันธุ์ จำนวน 15 ตัวอย่าง มีเพียงตัวอย่างที่ 11 ซึ่งมาจากผู้ประกอบการรายที่ 1 จังหวัดหนองคาย มีลักษณะรูปร่างใบกลาง ไม่ตรงตามพันธุ์อ้างอิง RRIM 600 (ภาพที่ 2)

สำหรับการตรวจจีโนไทป์ของกล้ายางพาราด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR นั้น เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Thermo Scientific NanoDrop™ (Fisher Scientific, USA) พบว่าดีเอ็นเอจากยางชำถุงทั้งหมด 16 ตัวอย่างมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.92 ถึง 5.65 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เฉลี่ย 2.53ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร อัตราส่วน A_{260}/A_{280} อยู่ระหว่าง 1.81ถึง 1.96 เฉลี่ย 1.91 และอัตราส่วน A_{260}/A_{230} อยู่ระหว่าง 1.60 ถึง 2.06 เฉลี่ย 1.84 ซึ่งแสดงว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพสูง (Sambrook, 1989) เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้ายางชำถุงดังกล่าวที่โลกัส gSSR 165 จากดีเอ็นเอต้นแบบของยางพาราอ้างอิงจากสถาบันวิจัยยาง พันธุ์ RRIM 600 พบอัลลีล 2 ตำแหน่ง ได้แก่ 244 bp และ 268 bp ซึ่งยางพาราชำถุงจำนวน 15 ตัวอย่างที่มีลักษณะใบตรงตามพันธุ์อ้างอิง มีรูปแบบดีเอเหมือนกันทั้งหมดเช่นกัน ในขณะที่ยางพาราชำถุงตัวอย่างที่ 11 ซึ่งมีรูปร่างใบกลางไม่สอดคล้องกับ RRIM 600 นั้นมี อัลลีล 3 ตำแหน่ง ได้แก่ 220 bp, 244 bp และ 271 bp (ภาพที่ 5)

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่โลกัส HB45 พบว่า ยางพาราอ้างอิงจากสถาบันวิจัยยาง พันธุ์ RRIM 600 มีอัลลีลขนาด 160 bp ซึ่งพบในยางชำถุงจำนวน 15 ตัวอย่างที่รวบรวมมาเช่นกันในขณะที่ ยางชำถุงตัวอย่างที่ 11 มีอัลลีลขนาด 176 bp ผลการวิเคราะห์อัลลีลของทั้งสองโลกัสยืนยันความแตกต่างทางพันธุกรรมของยางชำถุงตัวอย่างที่ 11 จากร้านค้าใน

ตำบลโพนพิสัย อำเภอกุดบง จังหวัดหนองคาย (ตารางที่ 1) และยังสอดคล้องกับผลความต่างของรูปร่างใบกลางซึ่งเป็นหนึ่งใน 3 ลักษณะของใบที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ (ภาพที่ 5)

วิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมจากค่าดัชนีความเหมือน โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ simple matching (SM) มีค่าอยู่ในช่วง 0.40 ถึง 1.00 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.85 ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างยางพาราตัวอย่างลำดับที่ 1-10,12-16 กับพันธุ์อ้างอิง RRIM 600 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 1.00 ส่วนตัวอย่างที่ 11 มีความเหมือนทางพันธุกรรมกับพันธุ์อ้างอิง RRIM 600, BPM 24, RRIT 226 และ RRIT 251 ตามลำดับ ดังนี้ 0.5, 0.5, 0.6 และ 0.8 (ภาพที 6) คิดเป็นร้อยละ 6.25 ได้แก่ ตัวอย่างหมายเลข 11จากผู้ประกอบการรายที่ 1จังหวัดหนองคาย ซึ่งพบว่ามีความแปรผันที่โลกัส gSSR165 และ HB 45

การใช้เครื่องหมายสัณฐานวิทยาจำแนกความแตกต่างระดับพันธุ์ของยางพาราสามารถทำได้ง่าย แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาประจำพันธุ์ไม่ใช่ลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ จำเป็นต้องใช้หลายลักษณะในการจำแนก (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2545) การจำแนกพันธุ์ต้นยางชำถุงควรใช้ลักษณะ ฉัตรใบ ใบ ก้านใบ ก้านใบย่อย เปลือก ตา สีน้ำยางสด (ศุภมิตร, 2554) ร่วมกับลักษณะของตำแหน่งขอบใบย่อย ซึ่ง Anjomshoae and Rahim (2016) รายงานว่าเมื่อใช้วิธี template-based จากลักษณะดังกล่าว สามารถระบุโคลนยางพาราที่ศึกษาได้ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพเหมาะสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ (Fei *et al*., 2011) โลกัส HB45 และ gSSR165 มีความจำเพาะต่อยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีความเหมาะสามารถใช้เป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือกได้อย่างแม่นยำ และวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างปริมาณมาก (วิภาวดีและคณะ, 2556)

ตารางที่ 1 การตรวจสัณฐานวิทยาของใบ จีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และแหล่งที่มาของต้นยางพาราชำถุงในพื้นที่ศึกษา 2 จังหวัด

ลำดับตัวอย่าง	สัณฐานวิทยาพันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ RRIM 600			จีโนไทป์ เปรียบเทียบกับพันธุ์อ้างอิง RRIM 600	แหล่งที่มาของกล้ายางพารา		
	รูปร่างใบกลาง (ป้อมปลายใบ)	ขนาดของใบกลาง (ใหญ่)	ตำแหน่งขอบใบย่อย (แยกจากกัน)		จังหวัด	อำเภอ	ตำบล
1	+	+	+	+	รายที่1 ขอนแก่น	ดงเย็น	บ้านฝาง
2	+	+	+	+			
3	+	+	+	+	รายที่2 ขอนแก่น	กุดกว้าง	หนองเรือ
4	+	+	+	+			

ตารางที่ 1 การตรวจสัณฐานวิทยาของใบ จีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และแหล่งที่มาของต้นยางพาราชำถุง ในพื้นที่ศึกษา 2 จังหวัด (ต่อ)

ลำดับตัวอย่าง	สัณฐานวิทยาพันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ RRIM 600			จีโนไทป์ เปรียบเทียบกับพันธุ์อ้างอิง RRIM 600	แหล่งที่มาของกล้ายางพารา		
	รูปร่างใบกลาง (ป้อมปลายใบ)	ขนาดของใบกลาง (ใหญ่)	ตำแหน่งขอบใบย่อย (แยกจากกัน)		จังหวัด	อำเภอ	ตำบล
5	+	+	+	+	รายที่3 ขอนแก่น	ภูเวียง	ภูเวียง
6	+	+	+	+			
7	+	+	+	+	รายที่ 4 ขอนแก่น	โนนอุดม	ชุมแพ
8	+	+	+	+			
9	+	+	+	+	รายที่ 5 หนองคาย	กุดบง	โพนพิสัย
10	+	+	+	+			
11	-	+	+	-			
12	+	+	+	+			
13	+	+	+	+	รายที่6 หนองคาย	กุดบง	โพนพิสัย
14	+	+	+	+			
15	+	+	+	+	รายที่7 หนองคาย	กุดบง	โพนพิสัย
16	+	+	+	+			

หมายเหตุ + หมายถึง ตรงตามลักษณะพันธุ์อ้างอิง RRIM 600
- หมายถึง ไม่ตรงตามลักษณะพันธุ์อ้างอิง RRIM 600

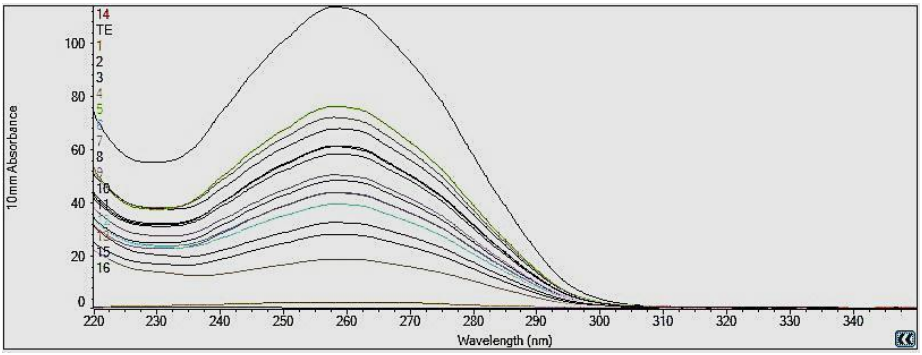
ตำแหน่งขอบใบย่อย แยกจาก | รูปร่างใบกลาง ป้อมปลายใบ | ขนาดของใบกลางใหญ่

ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยายางพาราพันธุ์อ้างอิง RRIM 600

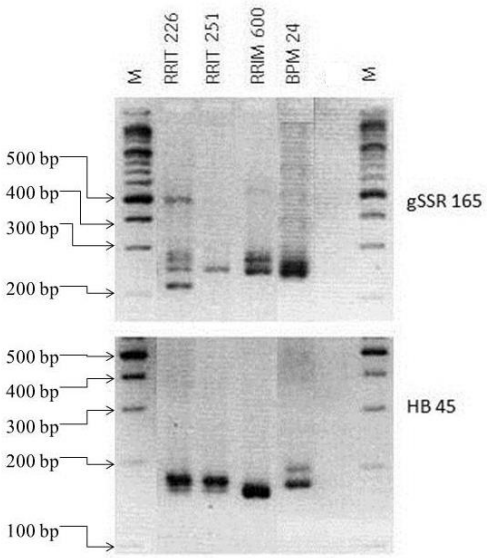
ที่มา: ดัดแปลงจากสำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ (2545) และกรมวิชาการเกษตร (2555)

ใบของตัวอย่างที่ 9 ใบของตัวอย่างที่ 11

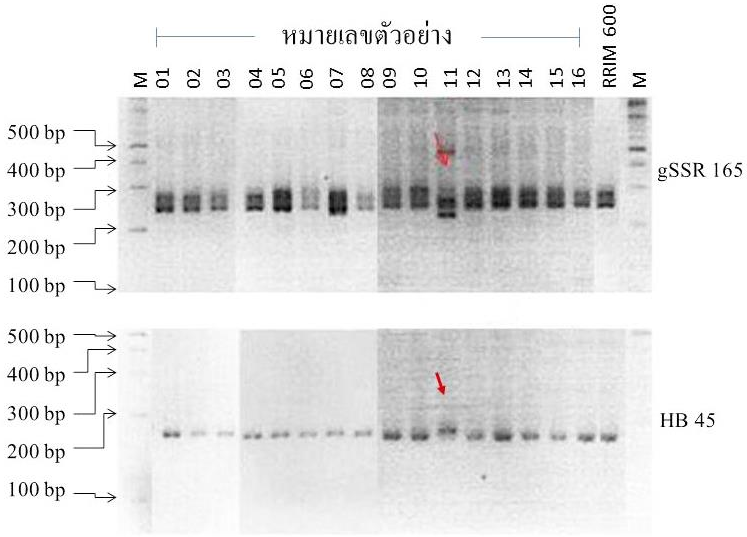
ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบยางพาราชำถุงซึ่งผู้ประกอบการแปลงขยายพันธุ์ต้นยางพาราชำถุงเพื่อการค้าระบุว่าเป็นพันธุ์ 600



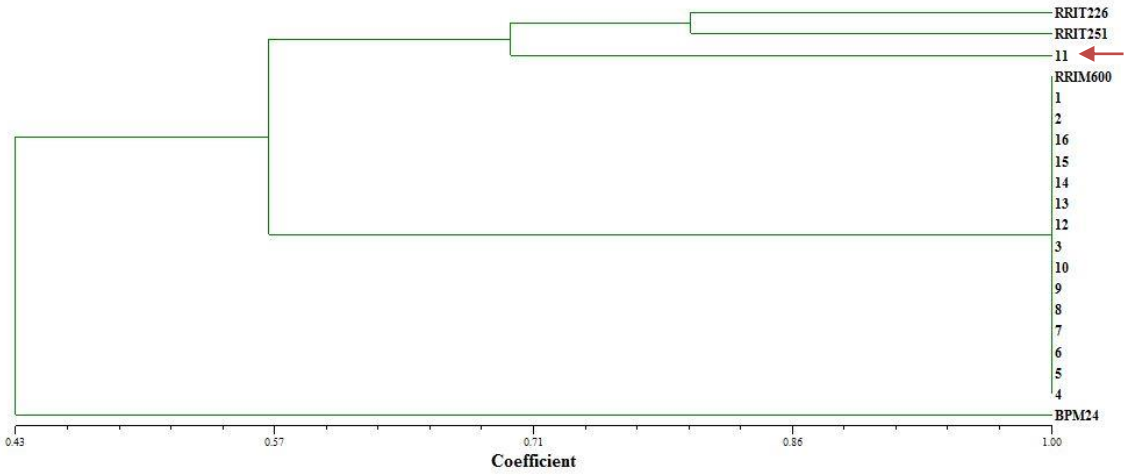
ภาพที่ 3 คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอจากใบของยางพาราชำถุงจากการวัดด้วยเครื่อง Thermo Scientific NanoDrop™ spectrometer (Fisher Scientific, USA)



ภาพที่ 4 รูปแบบของแถบของแถบดีเอ็นเอ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์อ้างอิง RRIT 226, RRIT 251, RRIM 600 และ BPM 24 ด้วยไพรเมอร์ gSSR 165 และ HB 45 จากเทคนิค SSR เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)



ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบของแถบดีเอนเอ จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอของยางพาราชำถุงจำนวน 16 ตัวอย่าง จากจังหวัดขอนแก่นและหนองคาย เปรียบเทียบกับพันธุ์อ้างอิง RRIM 600 ด้วยไพรเมอร์ gSSR 165 และ HB 45 ลูกศรแสดงอัลลีลที่ต่างจากอัลลีลของพันธุ์อ้างอิง RRIM 600



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างยางพาราพันธุ์อ้างอิง RRIM 600, RRIT 251, RRIT 226 และ BPM 24 กับยางพาราชำถุงจำนวน 16 ตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่นและหนองคายจากข้อมูลอัลลีลที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ HB45 และ gSSR165 ลูกศรแสดงตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์อ้างอิง RRIT 251 มากกว่าพันธุ์อ้างอิง RRIM 600

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การตรวจลักษณะสัณฐานวิทยาพันธุ์ของยางพาราชำถุงที่ผู้ประกอบการแปลงขยายพันธุ์ต้นยางพาราเพื่อการค้าระบุพันธุ์ 600 พบว่าผู้ประกอบการในจังหวัดหนองคายมีตัวอย่างที่มีลักษณะไม่ตรงตามลักษณะพันธุ์อ้างอิง RRIM 600 และเมื่อตรวจโดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุล SSR ของ โลกัส HB 45 และ gSSR 165 พบว่ามียางพาราตัวอย่างจำนวน1 ตัวอย่างมีลักษณะจีโนไทป์ไม่ตรงกับพันธุ์อ้างอิง RRIM 600

ลักษณะสัณฐานวิทยาของยางพาราแต่ละพันธุ์อาจเหมือนกับพันธุ์อื่นในบางลักษณะ ดังนั้นในการจำแนกพันธุ์จึงต้องใช้หลายลักษณะร่วมกัน และผู้จำแนกต้องมีความชำนาญจึงจะสามารถระบุพันธุ์ได้อย่างถูกต้อง ความผันแปรที่เกิดขึ้นในผลการวิจัยนี้ อาจเนื่องจากผู้ประกอบการพิจารณาเพียงตำแหน่งขอบใบย่อยและไม่พิจารณารูปร่างใบกลาง ทำให้การระบุพันธุ์ไม่ถูกต้อง แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงของเกษตรกรที่ซื้อต้นยางพาราชำถุงได้พันธุ์ที่ไม่ตรงตามความต้องการไปใช้ในการปลูกสร้างสวนยางพารา เครื่องหมายโมเลกุล SSR ของโลกัส HB 45 และ gSSR 165 มีความเหมาะสมนำไปประยุกต์ใช้สำหรับคัดเลือกพันธุ์ยางพาราก่อนการจัดซื้อยางพาราชำถุง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2558, 2559 และกลุ่มวิจัย “การพัฒนาองค์ความรู้ทางด้านยางพาราในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ”

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. ข้อมูลวิชาการยางพารา 2550. กรุงเทพมหานคร: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแหงประเทศไทย; 2550.

ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก, วิภาวดี ฤทธิธรรม, พินิจ หวังสมนึก. พันธุกรรมของยางพาราจากแปลงเกษตรกรในจังหวัดสกลนคร. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร39(33); 2551. หน้า 94-97.

วิภาวดี ฤทธิธรรม, ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก, พินิจ หวังสมนึก. การพัฒนาเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยางพาราที่แสดงอาการเปลือกแห้ง. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 29. หน้า 336. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง,เชียงราย; 2556.

กรมวิชาการเกษตร. คำแนะนำพันธุ์ยางปี 2554. โรงพิมพ์ชุมนุม สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, กรุงเทพมหานคร; 2554.

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร. ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์พืช: ยางพารา Plant Germplasm Database: Para rubber.ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพมหานคร; 2545.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. Agricultural EconomicOutlook ภาวะเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2557 และแนวโน้มปี 2558. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด สาขา 4. กรุงเทพมหานคร; 2557.

สุจินต์ แม้นเหมือน. อนาคตยางพารากับประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน. วารสารยางพาราฉบับอิเล็กทรอนิกส์ 12 มกราคม – มีนาคม 2556; 2556. หน้า 7-16.

ศุภมิตร ลิมปิชัย. ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของยางพันธุ์สถาบันวิจัยยาง 408 (RRIT 408). วารสารยางพาราฉบับอิเล็กทรอนิกส์ 6 กรกฎาคม– กันยายน 2554; 2554. หน้า 18-22.

Anjomshoae, S.T. A new feature extraction algorithm for overlapping leaves of rubber tree. Master Thesis, Teknologi Malasia University. Faculty of Computing; 2014.

Anjomshoae, S.T., Rahim, M.S.M. and Javanmardi, A.. Hevea leaf boundary identification based on morphological transformation and edge detection. Pattern Recognit. Image Anal. 25 (2); 2015. p. 291-294.

Anjomshoae, S.T., Rahim, M.S.M.. Enhancement of template-based method for overlapping rubber tree leaf identification. Computers and Electronics in Agriculture 122; 2016. p. 176-184.

Dmitry V. P., Maryana M. B., Yuri S. B., Tatyana A. P., Anna V. S., Elena A. M., Anna B. A., Mikhail V. F., and

Konstantin A. S. Application of microsatellite loci for molecular identification of elite genotypes, analysis of clonality, and genetic diversity in aspen *Populus tremula* L. (Salicaceae). International Journal of Plant Genomics; 2015.

Fei, Y., Bao-Hua W., Su-Ping F., Jing-Yi W., Wei-Guo L. and Yao-Ting, W. Development, characterization, and cross-species/genera transferability of SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Plant Cell Report 30; 2011. p. 33-344.

Hailin, L., Wanxu Y.Jing H., Nan H.,Tongming Y. and Shuxian L. Genetic identification of 43 elite clonal accessions of *Populus deltoides* by SSR fingerprinting. Canadian Journal of Plant Science 96(3); 2016. p. 494-502,

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

Ong C. W. Digital Image Recognition System for Rubber Clones Produced In Malaysia. Irc 2012 International Rubber Conference; May 21-24; Jeju, Korea; 2012.

Pootakham, W., Chanprasert, J., Jomchai, N., Sangsrakru, D., Yoocha, T.,Tragoonrung, S. and Tangphatsornruang, S.. Development of genomic-derived simple sequence repeat markers in *Heveabrasiliensis* from 454 genome shotgun sequences. Plant Breeding 131; 2012. p. 555—562

Sokal, R.R. and Michener, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Kans. Sci. Bull. 38; 1958. p. 1409-1438.