

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ non-coding ดีเอ็นเอ
ในไมโทคอนเดรียของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

นำอ้อย ใจแสน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

พฤษภาคม 2560

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ น้ำอ้อย ใจแสน ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตานันท์ บุญภักดี)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดาร์ตน์ ถนนแก้ว)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตานันท์ บุญภักดี)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ)

.....กรรมการ
(ดร.สลิล ชันโรจน์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ศรีสุข

วันที่...25...เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญภักดี ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมาในโอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุदारัตน์ ถนอมแก้ว ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาคภูมิ พระประเสริฐ และ ดร. สลิล ชื่นโรจน์ ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขและวิจารณ์ผลงาน ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบเป็นกตัญญูตเวทิตาแด่ บุปการี บุรพจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

น้ำอ้อย ใจแสน

56990001: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)

คำสำคัญ: เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ ยางพารา/ Internal Transcribed Spacer 1/ ITS1/

non-coding DNA/ PCR

นำอ้อย ใจแสน: การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ non-coding ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) (ANALYSIS OF ITS1 AND NON-CODING MITOCHONDRIAL DNA OF RUBBER TREE (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชูตา บุญภักดี, Ph.D. 46 หน้า. ปี พ.ศ. 2560.

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่ประเทศไทยส่งเป็นสินค้าออกอันดับหนึ่งของโลก ปัจจุบันการระบุสายพันธุ์ของยางพาราทำได้โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาซึ่งจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบ การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ระหว่างยีน *tRNA^{Phe}* และ *tRNA^{Pro}* ในไมโทคอนเดรียของยางพารา จำนวน 10 สายพันธุ์ ผลการวิจัยพบว่า ในบริเวณ ITS1 ของยางพาราทุกสายพันธุ์ มีขนาดเท่ากับ 226 คู่เบส มีลำดับเบสต่างกัน 2 ตำแหน่ง คิดเป็น 0.88 เปอร์เซ็นต์ (2/226) บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ มีขนาดเท่ากับ 256 คู่เบส ลำดับเบสแตกต่างกัน 1 ตำแหน่ง คิดเป็น 0.39 เปอร์เซ็นต์ (1/256) แสดงว่าบริเวณ ITS1 และ non-coding ดีเอ็นเอของยางพารามีความแปรปรวนต่ำ ไม่สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุสายพันธุ์ของยางพาราได้

56990001: MAJOR: BIOLOGICAL EDUCATION; M.Sc. (BIOLOGICAL EDUCATION)

KEYWORDS: DNA MARKER/ RUBBER TREE/ INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 1/

ITS1/ NON-CODING DNA/ PCR

NUMOI CHAISAN: ANALYSIS OF ITS1 AND NON-CODING MITOCHONDRIAL
DNA OF RUBBER TREE (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) ADVISORY COMMITTEE:

CHUTA BOONPHAKDEE, Ph.D. 46 P. 2017.

Rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) is an important economic crop of Thailand which currently is the world's top exporter. However, the conventional morphological characterization of the rubber tree requires specialists. This study aims to analyze nucleotide sequences of the nuclear Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) region and non-coding region between *tRNA^{Phe}* and *tRNA^{Pro}* genes of the mitochondrial DNA of ten para rubber cultivars. The size of the ITS1 region of all cultivars was 226 base pairs, with 0.88% difference (2/226) and the non-coding region was 256 base pairs, with 0.39% difference (1/256) indicating low variation between cultivars. Therefore, the ITS1 and non-coding regions were not suitable for use as the DNA marker for the rubber tree identification at the cultivar level.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฌ
บทที่.....	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของยางพารา.....	5
เครื่องหมายทางพันธุกรรม.....	12
จีโนมพืช.....	13
ดีเอ็นเอบาร์โค้ด.....	16
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์.....	16
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
วัตถุประสงค์และอุปกรณ์.....	23
สารเคมี.....	23
การเตรียมตัวอย่าง.....	24
วิธีการทดลอง.....	24
4 ผลการวิจัย.....	27
5 อภิปรายและสรุปผล.....	36
อภิปรายผล.....	36
สรุปผลการวิจัย.....	38
ข้อเสนอแนะ.....	38
บรรณานุกรม.....	39
ภาคผนวก.....	45
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	47

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1	ขนาดของบริเวณ ITS1 ในพืชวงศ์ Moraceae และ Zingiberaceae..... 20
2-2	ขนาดของไมโทคอนเดรียจีโนมในพืช..... 21
4-1	ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS1 ของยางพารา 10 สายพันธุ์..... 29
4-2	ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS1 ของยางพาราเปรียบเทียบกับพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เดียวกัน และต่างวงศ์ คือ Vitaceae และ Fabaceae..... 29
4-3	ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพารา 10 สายพันธุ์..... 33
4-4	ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพาราเปรียบเทียบกับพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เดียวกัน และต่างวงศ์ คือ Vitaceae และ Fabaceae..... 33
4-5	ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ของยางพารา พืชในวงศ์ Euphorbiaceae เดียวกัน และต่างวงศ์ คือ Vitaceae และ Fabaceae..... 35

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 สัณฐานวิทยาของยางพารา.....	8
2-2 นิวเคลียสดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 18S กับ 5.8S และระหว่างชนิด 5.8S กับ 26S.....	14
2-3 ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ระหว่างยีน <i>tRNA^{Phe}</i> และ <i>tRNA^{Pro}</i>	15
2-4 ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ใน 1 รอบปฏิกิริยา.....	18
4-1 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนในปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ITS1 Mes L และ ITS1 Mes R ขนาด 503 คู่เบส ของยางพารา 10 สายพันธุ์.....	27
4-2 บริเวณ ITS1 ระหว่างยีน 18S และ 5.8S <i>rRNA</i> ของยางพารา.....	27
4-3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของยางพาราขนาด 226 คู่เบส.....	28
4-4 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS1 ของยางพาราจำนวน 10 สายพันธุ์กับตัวอย่างนอกกลุ่ม.....	30
4-5 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนในปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ <i>trnF</i> และ <i>trnP</i> ขนาด 345 คู่เบสของยางพารา 10 สายพันธุ์.....	31
4-6 บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอระหว่างยีน <i>tRNA^{Phe}</i> และ <i>tRNA^{Pro}</i> ของยางพารา.....	31
4-7 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพารา ขนาด 256 คู่เบส.....	32
4-8 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพาราจำนวน 10 สายพันธุ์กับตัวอย่างนอกกลุ่ม.....	34

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชที่ลำต้นให้น้ำยาง (latex crops) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยเป็นผู้ผลิตยางธรรมชาติส่งออกรายใหญ่ของโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) ปัจจุบันมีความต้องการใช้ยางพาราและผลิตภัณฑ์จากยางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ยางรถจักรยานยนต์ ยางล้อรถยนต์ ยางล้อรถบรรทุก ยางรัดของ ถุงมือยาง ถุงยางอนามัย กาว รองเท้า เครื่องมือทางการแพทย์และวิทยาศาสตร์ ยางปูพื้น และน้ำนํายางพาราผสมกับยางมะตอยเพื่อใช้เป็นวัสดุอุดบิในการทำถนน เป็นต้น สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย (2559) จำแนกยางพาราตามวัตถุประสงค์ของการใช้ประโยชน์โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มพันธุ์ยางเพื่อผลิตน้ำยาง เป็นพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตน้ำยางสูง เช่น สายพันธุ์ BPM24, RRIT251 และ RRIT226 2) กลุ่มพันธุ์ยางเพื่อผลิตน้ำยางและเนื้อไม้ เป็นพันธุ์ยางที่ให้ทั้งผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้ เช่น สายพันธุ์ PB235 และ PB260 และ 3) กลุ่มพันธุ์ยางเพื่อผลิตเนื้อไม้ เป็นพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตเนื้อไม้สูง เช่น สายพันธุ์ RRIT402 และ BPM1 จากการใช้ยางพาราแต่ละสายพันธุ์มีข้อกำหนดของการใช้ประโยชน์แตกต่างกัน ดังนั้นเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราจึงมีความจำเป็นต้องคัดเลือกพันธุ์ให้ถูกต้องและตรงตามลักษณะที่ต้องการ อย่างไรก็ตามการคัดเลือกพันธุ์ยางพาราโดยใช้ลักษณะภายนอก เช่น รูปร่างใบ สีของใบ รูปร่างทรงพุ่ม การแตกกิ่ง ความต้านทานต่อโรค และความต้านทานต่อสภาพแวดล้อม จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ และใช้เวลานาน

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมของพืชในการจัดจำแนกและระบุชนิดที่ทำได้รวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา (Kress & Erickson, 2012; Li et al., 2015) โดยเฉพาะข้อความพันธุกรรมบริเวณ ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) ที่อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) ชนิด 18S และ 5.8S ซึ่งเป็นช่วงดีเอ็นเอที่มีความยาวไม่มากนัก และข้อมูลพันธุกรรมมีความแปรผันที่สามารถใช้จำแนกชนิดในพืชได้หลายชนิด (Wang et al., 2015) รวมถึงระดับสายพันธุ์ได้ เช่น *Ficus carica* L. (Ghada et al., 2009) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ที่สมบูรณ์ของยางพาราจำนวน 10 สายพันธุ์ เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพิ่มเติมจากที่ลักษณะ ชาติประสิทธิ์ และชุตตา บุญภักดี

(2557) ทำการศึกษาไว้แล้วในบางส่วนของ บริเวณ ITS1 ที่มีขนาดประมาณ 60 คู่เบส ร่วมกับ ไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 5.8S และบางส่วนของบริเวณ ITS2 (ระหว่าง 5.8S และ 28S) และพบ ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของยางพาราเพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้น ร่วมกับทำการศึกษาบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียของพืช ที่อยู่ระหว่างยีน *tRNA^{Phe}* และ *tRNA^{Pro}* ซึ่งยังไม่มี รายงานการศึกษาในยางพารา ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาเพื่อให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ดังกล่าว ในยางพาราจำนวน 10 สายพันธุ์ เพื่อจะสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบ่งชี้ความ เป็นเอกลักษณ์ในระดับสายพันธุ์ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียของยางพารา จำนวน 10 สายพันธุ์

สมมติฐานของการวิจัย

บริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียของยางพาราแต่ละ สายพันธุ์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน สามารถระบุเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละสายพันธุ์ ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอใน ไมโทคอนเดรียของยางพาราแต่ละสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา
2. สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบ และการยืนยันสายพันธุ์หรือชนิดของยางพารา สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

ขอบเขตของการวิจัย

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของยางพาราที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยยาง ฉะเชิงเทรา จำนวน 10 สายพันธุ์ จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และส่งอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้น นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้อง เทียบเคียงความเหมือนกับฐานข้อมูล

GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST และเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ
ยางพาราทั้งหมด 10 สายพันธุ์ วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วย
โปรแกรม MEGA version 6

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยางพารา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ ยางพาราถูกนำมาปลูกในประเทศแถบเอเชียครั้งแรกในปี พ.ศ. 2416 แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2419 Sir Henry Wickham ชาวอังกฤษได้นำเมล็ดยางพาราจากถิ่นกำเนิดในประเทศบราซิลและเปรู จำนวน 70,000 เมล็ดมาปลูกที่สวนพฤกษศาสตร์คิว (Kew Botanical Garden) ประเทศอังกฤษ และได้ส่งต้นกล้ายางพาราจำนวน 1,900 ต้นไปปลูกที่สวนพฤกษศาสตร์ฮีเนอราโทโกดา (Heneratogoda) ประเทศศรีลังกา และนำต้นกล้าอีกจำนวน 50 ต้น ไปปลูกที่สวนพฤกษศาสตร์สิงคโปร์ ประเทศสิงคโปร์ และในปี พ.ศ. 2420 ได้มีการส่งต้นกล้าของยางพาราจากสวนพฤกษศาสตร์ฮีเนอราโทโกดา (Heneratogoda) ประเทศศรีลังกา จำนวน 13 ต้นไปปลูกที่สวนพฤกษศาสตร์สิงคโปร์ ประเทศสิงคโปร์ เนื่องจากต้นกล้าที่ส่งมาครั้งแรกจากสวนพฤกษศาสตร์คิวได้ตายทั้งหมด และอีกส่วนหนึ่งจำนวน 9 ต้นนำไปปลูกที่เมืองกัวลาแกงซา ประเทศมาเลเซีย โดยต้นกล้ายางพาราทั้ง 22 ต้น จัดเป็นบรรพบุรุษของยางพาราที่ปลูกในทวีปเอเชียในปัจจุบัน ยางพาราจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae พืชวงศ์นี้มีลักษณะที่สำคัญคือ ส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ มีน้ำยางเป็นองค์ประกอบ (ศานิต สวัสดิการุญณ์, 2557) ตัวอย่างพืชในวงศ์นี้ เช่น มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) กระจับปี่ (*Ricinus communis* L.) มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) มะไฟ (*Baccaurea ramiflora* Lour) ใป้ยเหียน (*Euphorbia milli* Desmoul) และสบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.) เป็นต้น สำหรับยางพารานั้น เป็นพืชที่มีโมเลกุลของยางที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมได้ และยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมยางมากที่สุด (กรรณิการ์ ธีระวัฒน์สุข, 2556) เนื่องจากให้ผลผลิตสูงและมีคุณสมบัติยางที่ดี มีเปอร์เซ็นต์น้ำยางแห้ง (dry rubber content: DRC) องค์ประกอบทางเคมีของน้ำยาง ความหนืดของน้ำยางและอัตราการไหลของน้ำยางดีกว่าพืชที่ให้น้ำยางชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพดินฟ้าอากาศ ภูมิประเทศ และปริมาณน้ำฝนของประเทศไทยได้เป็นอย่างดี

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของยางพารา

ยางพาราประกอบด้วยอวัยวะหลายส่วนที่สำคัญ เช่น ราก ลำต้น ใบ ช่อดอก ดอก ผล และเมล็ด (ศานิต สวัสดิศึกษาญณ์, 2557) ซึ่งแต่ละส่วนมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่สำคัญ ดังนี้

ราก

ระบบรากเป็นระบบรากแก้ว (tap root system) รากแก้ว (primary root) งอกออกมาเมื่อต้นกล้ามีอายุประมาณ 1 เดือน รากนี้เจริญเติบโตสู่ผิวดินด้านล่าง และสามารถหยั่งลึกลงสู่ดินได้ลึกถึง 2.50 เมตร บริเวณรอบ ๆ รากแก้วมีรากแขนง (lateral root หรือ secondary root) แดกกระจายออกไปทางด้านข้าง (ภาพที่ 2-1 ก) รากแขนงของยางพารามีความยาวและความแข็งแรงตามอายุที่เพิ่มขึ้น โดยรากแขนงที่มีอายุ 1-3 ปี มีความยาวประมาณ 5-10 เมตร และมีความแข็งแรงสูง เมื่อยางพารามีอายุเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 4 ปีขึ้นไป รากแขนงมีความยาว 10-50 เมตรหรือมากกว่า โดยระยะนี้รากมีความแข็งแรงต่ำ รากแขนงที่มีอายุ 1-3 ปี แดกออกมาจากส่วนของรากแก้ว ส่วนรากแขนงที่มีอายุ 4 ปีขึ้นไปแตกออกมาจากส่วนของลำต้น และเมื่อรากแขนงชุดนี้ตายไปจะมีรากแขนงจากส่วนล่างของรากแก้วแตกออกมาทำหน้าที่แทน แต่รากแก้วที่แตกออกมาใหม่มีขนาดเล็กกว่า

ลำต้น

ยางพารามีลำต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน มีความสูงโดยทั่วไปประมาณ 15-25 เมตร แต่สามารถสูงเต็มที่ได้ถึง 40 เมตร เปลือกนอกของลำต้นมีสีน้ำตาลเทา ส่วนใต้เปลือกของลำต้นมี 2 สี คือ สีแดงหรือสีม่วงอ่อน เปลือกมีความหนา 7-15 มิลลิเมตร โดยต้นอ่อนมีเปลือกที่มีความหนากว่าต้นแก่ เมื่อผ่าลำต้นยางพาราตามขวางสามารถจำแนกเป็นชั้น ๆ (ภาพที่ 2-1 ข-ค) ดังนี้

1. ชั้นนอกสุดคือเปลือก ชั้นนี้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ จำนวน 4 ชั้น คือ
 - 1.1 ชั้นคอร์ค (cork layer) เป็นชั้นบาง ๆ มีสีน้ำตาล
 - 1.2 ชั้นคอร์คแคมเบียม (cork cambium) มีสีน้ำตาลเช่นเดียวกับชั้นคอร์ค
 - 1.3 ชั้นเปลือกแข็ง (hard bark) มีสีน้ำตาลอมส้ม ประกอบด้วยท่อน้ำยาง และ

stem cell ที่วนไปทางขวาเป็นเกลียวรอบลำต้น

- 1.4 ชั้นเปลือกอ่อน (soft bark) เป็นชั้นที่มีท่อน้ำยางหนาแน่นและมีจำนวนมากที่สุด
2. ชั้นเนื้อเยื่อเจริญ
3. ชั้นเนื้อไม้ (wood)
4. แกนกลางลำต้น (pith)

ใบ

ใบของยางพาราเป็นใบประกอบ ซึ่งประกอบด้วยใบย่อยจำนวน 3 ใบ มีตัวใบยาวประมาณ 10-20 เซนติเมตร ก้านใบยาวประมาณ 15 เซนติเมตร ส่วนก้านใบย่อยมีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร (ภาพที่ 2-1 ง) นอกจากนี้เมื่อพิจารณารูปร่างใบ พบว่า ใบยางพารามีรูปร่างใบแตกต่างกัน เช่น รูปไข่ หรือวงรี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ยางที่ใช้ปลูก การเกิดใบของยางพาราจะเวียนเป็นเกลียวรอบลำต้น การเกิดของใบ 1 รอบ เรียกว่า ชั้นหรือฉัตร (leaf store) ใบที่อยู่ด้านบนสุดของฉัตรเป็นใบอ่อนมีก้านใบสั้น ส่วนใบที่อยู่ด้านล่างสุดเป็นใบที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีก้านใบยาว สำหรับสีใบของยางพารามีหลายสี แต่ที่พบส่วนใหญ่มี 2 สี คือ ใบอ่อนมีสีม่วงเงิน ส่วนใบแก่มีสีเขียว

ช่อดอกและดอก

ยางพารามีช่อดอกเป็นแบบแพนิกิล (panicle) เป็นช่อดอกที่เกิดตามมุมใบบริเวณปลายกิ่งแขนงเกิดพร้อมกับการแตกใบใหม่ (ภาพที่ 2-1 จ) ยางพาราจัดเป็นพืชที่มีช่อดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในช่อดอกเดียวกัน เรียกว่า พืชรวมต้น (monoecious plant)

ช่อดอกของยางพารามีหลายสี เช่น สีเหลืองอ่อน เหลือง หรือขาว ขึ้นอยู่กับพันธุ์ยางที่ใช้ปลูก ดอกของยางพารามีลักษณะพิเศษอยู่ 4 ประการ คือ มีกลิ่นหอม ก้านดอกสั้น ไม่มีกลีบดอก และมีต่อมน้ำหวานอยู่ที่ฐานด้านนอกของกลีบเลี้ยง เนื่องจากยางพาราเป็นพืชที่ไม่มีกลีบดอก ทำให้ดอกเป็นดอกที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete flower) ดอกยางพาราจึงมีส่วนประกอบเหลือเพียง 3 ส่วน คือ กลีบเลี้ยง เกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมีย โดยกลีบเลี้ยงมีสีเขียว จำนวน 5 อัน เชื่อมติดกันที่โคน โดยส่วนปลายแตกออกเป็นสามเหลี่ยมจำนวน 5 แฉก ดอกตัวผู้ของยางพารามีลักษณะคล้ายรูปกรวย มีขนาดเล็กกว่าดอกตัวเมีย เมื่อดอกตัวผู้บานจะมองเห็นละอองเกสรที่มีสีเหลือง และมีเมือกเหนียวจับอยู่รอบ ๆ ดอกทั้งดอก ดอกตัวเมียของยางพารามีรูปร่างกลมรี มีขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้ มีตำแหน่งที่เกิดบริเวณปลายสุดของกิ่งแขนง ภายในดอกประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญคือ

1. รังไข่ (ovary) ซึ่งมีขนปกคลุม รังไข่แบ่งออกเป็น 3 ช่อง (carpels) แต่ละช่องมี 3 โลคูล (locule) แต่ละโลคูลมี 1 ออวูล (ovule)
2. ก้านเกสรตัวเมีย (style) มีลักษณะสั้น
3. ยอดเกสรตัวเมีย (stigma) มีสีขาวและมีลักษณะเป็นหยัก (lobe)

ผลและเมล็ด

ผลของยางพาราเป็นแบบแคปซูล (capsule) มีลักษณะเป็นรอยหยัก มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4.5-5.0 เซนติเมตร ผลของยางพาราโตเต็มที่และสุกแก่ เมื่อมีอายุประมาณ

5-6 เดือนหลังจากผสมเกสร ผลเมื่อแก่มีการแตกออก และเมล็ดที่อยู่ภายในดีดตัวออก แล้วกระเด็นไปได้ไกลจากลำต้น ยางพารา 1 ต้นให้ผลประมาณ 45-50 ผล ในแต่ละผลประกอบด้วยเมล็ดจำนวน 3 เมล็ด (ภาพที่ 2-1 ฉ-ข) เมล็ดของยางพารามีหลายลักษณะ เช่น รูปไข่ วงรีหรือวงกลม ขึ้นอยู่กับพันธุ์ยาง มีขนาดยาว 2.0-4.0 เซนติเมตร และกว้าง 1.0-2.5 เซนติเมตร

เมล็ดยางพาราประกอบด้วยเนื้อเยื่อจำนวน 3 ชั้น คือ

1. เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) มีลักษณะแข็ง เปลือกเป็นมันวาว มีสีเทาหรือน้ำตาล และมีวอดลายบนเยื่อหุ้มเมล็ดหลายสี เช่น สีดำ น้ำตาล ม่วงหรือเทา
2. เอนโดสเปิร์ม (endosperm) เป็นชั้นที่อยู่ถัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดเข้ามา มี 2 สี คือ สีขาวเมื่อเมล็ดยังมีชีวิตอยู่ และมีสีน้ำตาล เมื่อเมล็ดตายแล้ว เอนโดสเปิร์มมีหน้าที่สะสมอาหาร
3. ไบเลียง (cotyledon) เป็นชั้นที่อยู่ถัดจากชั้นเอนโดสเปิร์มเข้าไป เป็นชั้นที่มีส่วนประกอบของน้ำมากที่สุด

ลักษณะประจำสายพันธุ์ของยางพารา

พันธุ์ยางพาราที่สถาบันวิจัยยางแนะนำให้เกษตรกรปลูก แบ่งตามวัตถุประสงค์ของการใช้ประโยชน์ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มพันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยาง เป็นพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตน้ำยางสูง 2) กลุ่มพันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้ เป็นพันธุ์ยางที่ให้ทั้งผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้ และ 3) กลุ่มพันธุ์ยางเพื่อผลผลิตเนื้อไม้ เป็นพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตเนื้อไม้สูง (สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย, 2559)

1) **พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยางสูง** เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตน้ำยางสูงเป็นหลัก การเลือกปลูกพันธุ์ยางในกลุ่มนี้ ควรมุ่งเน้นผลผลิตน้ำยาง ประกอบด้วยสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้

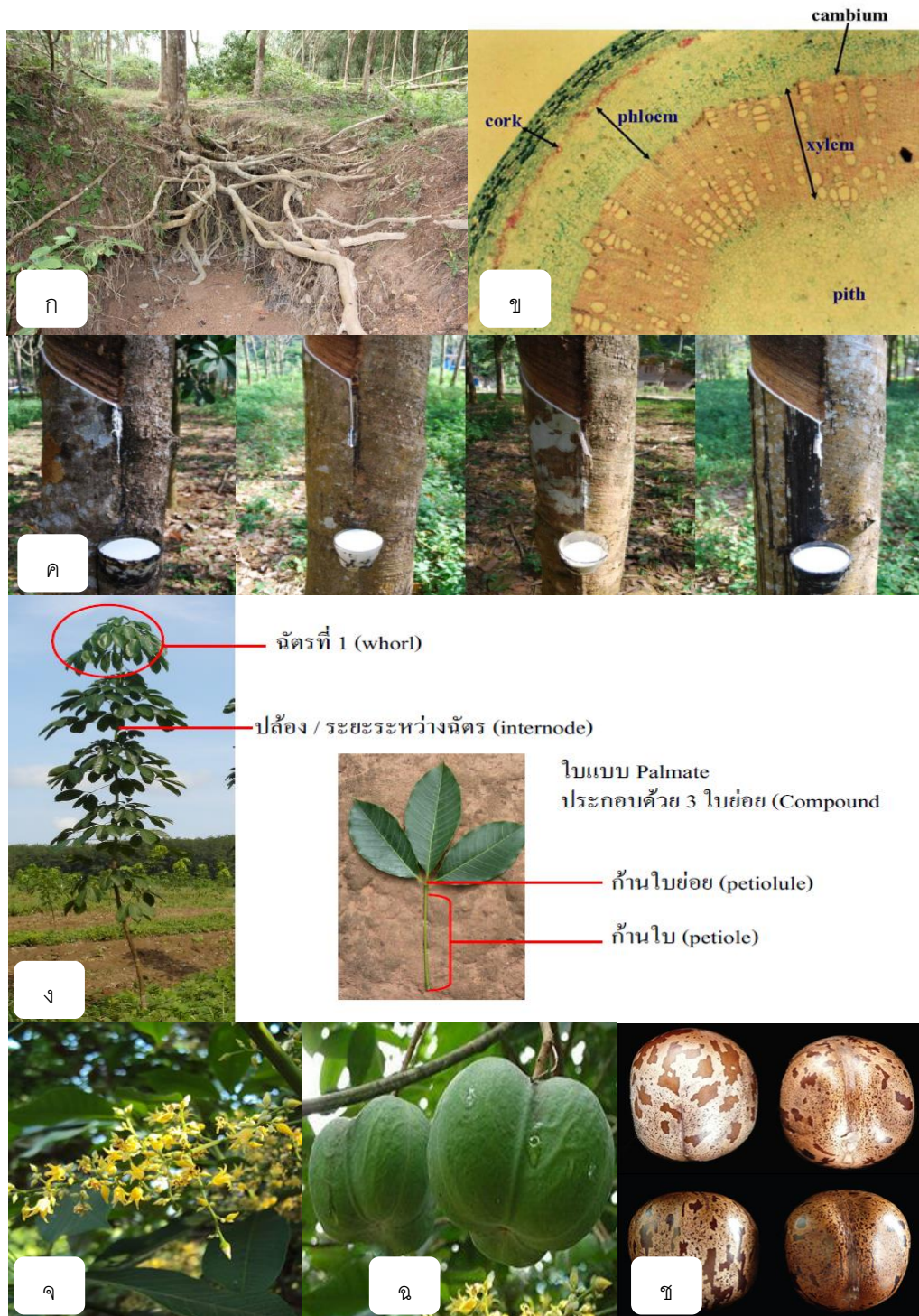
1. พันธุ์สถาบันวิจัยยาง 226 (RRIT226)

แม่ x พ่อ: PB5/51 x RRIM600

แหล่งกำเนิด: ประเทศไทย

ลักษณะเด่น: ให้ผลผลิตน้ำยางสูง ต้านทานต่อโรคราสีชมพูได้ดี ต้านทานระดับปานกลางต่อโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทราและโรคเส้นดำ มีจำนวนต้นที่แสดงอาการเปลือกแห้งน้อย

ลักษณะประจำพันธุ์: ฉัตรใบมีลักษณะเป็นรูปกรวย มีขนาดเล็ก ใบมีรูปร่างบวมปลายใบ ใบมีสีเขียว ลักษณะลำต้นตรง กิ่งมีขนาดปานกลาง และแตกกิ่งเล็ก ๆ จำนวนมาก ทรงพุ่มมีขนาดปานกลางเป็นรูปพัด



ภาพที่ 2-1 สัณฐานวิทยาของยางพารา

ก ระบบราก ข ภาพตัดขวางส่วนประกอบของลำต้น ค ลำต้น

ง ใบและฉัตร จ ช่อดอกและดอก ฉ ผล ช เมล็ดยางพารา

ที่มา: สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย (2559)

2. พันธุ์สถาบันวิจัยยาง 251 (RRIT251)

แม่ x พ่อ: คัดเลือกจากต้นกล้ายางแปลงเอกชนในจังหวัดสงขลา

แหล่งกำเนิด: ประเทศไทย

ลักษณะเด่น: ให้ผลผลิตน้ำยางสูงมาก มีจำนวนต้นเปิดกรีดมาก มีความต้านทานโรคเส้นดำได้ดี ต้านทานระดับปานกลางต่อโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา โรคราแป้ง โรคใบจุดคอลลเลโทตริกัม โรคใบจุดก้างปลา และโรคราสีชมพู มีจำนวนต้นที่แสดงอาการเปลือกแห้งน้อย

ลักษณะประจำพันธุ์: ฉัตรใบมีขนาดใหญ่และเป็นรูปกรวย ใบมีรูปร่างป้อมปลายใบขอบใบเป็นคลื่น ปลายใบเรียวแหลม ใบมีสีเขียวแก่ เส้นใบมีสีเขียวอ่อน เส้นกลางใบนูนมองเห็นเด่นชัด

3. พันธุ์สถาบันวิจัยยาง 408 (RRIT408)

แม่ x พ่อ: PB5/51 x RRIC101

แหล่งกำเนิด: ประเทศไทย

ลักษณะเด่น: ให้ผลผลิตน้ำยางสูง สามารถทนความแห้งแล้งได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ต้านทานระดับปานกลางต่อราแป้ง โรคใบจุดคอลลเลโทตริกัม โรคเส้นดำ โรคใบจุดก้างปลา และราสีชมพู

ลักษณะประจำพันธุ์: ฉัตรใบมีขนาดปานกลางรูปครึ่งวงกลม มีลักษณะโปร่ง ใบมีรูปร่างกลางใบป้อมค่อนมาทางปลายใบ สีเขียวอมเหลือง ผิวใบเป็นมัน ฐานใบสอบเรียว ปลายใบเป็นติ่งแหลม เส้นกลางใบเด่นชัดมีสีเขียวอมเขียว ทรงพุ่มเป็นรูปกรวย มีขนาดใหญ่ พุ่มใบโปร่ง

4. พันธุ์บีพีเอ็ม 24 (BPM24)

แม่ x พ่อ: GT1 x AVROS1734

แหล่งกำเนิด: ประเทศอินโดนีเซีย

ลักษณะเด่น: ให้ผลผลิตน้ำยางสูงในระยะแรกของการเปิดกรีด เปลือกหนาและเรียบทำให้กรีดง่าย มีความต้านทานโรคได้ดี โดยเฉพาะโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทราและโรคเส้นดำ

ลักษณะประจำพันธุ์: ฉัตรใบมีลักษณะเป็นรูปกรวย ทรงพุ่มมีขนาดปานกลาง ใบมีรูปร่างป้อมกลางใบ ใบมีสีเขียว พุ่มใบค่อนข้างทึบ ลักษณะลำต้นตรง แตกกิ่งมาก กิ่งมีขนาดปานกลาง มีการทิ้งกิ่งน้อย เริ่มผลัดใบเร็วและทยอยผลัดใบ ความสม่ำเสมอของขนาดลำต้นทั้งแปลงปานกลาง เปลือกเดิมหนามาก ส่วนเปลือกงอกใหม่หนาปานกลาง

5. พันธุ์สงขลา 36 (SONGKRA36)

แม่ x พ่อ: PB5/63 x PB107

แหล่งกำเนิด: ประเทศไทย

ลักษณะเด่น: ให้ผลผลิตสูงมากในระยะ 2 ปีแรก และปีถัดต่อ ๆ มา ในช่วงผลัดใบ ผลผลิตจะลดลง มีความต้านทานต่อโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทราดี แต่อ่อนแอต่อโรคราสีชมพู และโรคใบจุดคอลลีเลตโทตริกัม มีอาการเปลือกแห้งปานกลาง มีความต้านทานลมปานกลาง

ลักษณะประจำพันธุ์: ระยะก่อนเปิดกรีด และระหว่างกรีดมีการเจริญเติบโตปานกลาง ทรงพุ่มมีขนาดปานกลาง เปลือกเดิมและเปลือกงอกใหม่หนาปานกลาง ปลูกได้ในพื้นที่ที่มีหน้าดินตื้น ไม่ควรปลูกในที่ลาดชัน และมีระดับน้ำใต้ดินสูง

6. พันธุ์บางปิด หรือยางพันธุ์สิงหนาท (BANGPID)

ผู้ค้นพบยางพาราพันธุ์บางปิด คือ คุณสิงหนาท แสงประทุม บ้านบางปิด ตำบลบางปิด อำเภอแหลมงอบ จังหวัดตราด สนใจที่จะทดลองเพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ยางให้มีผลผลิตสูง โดยในปี พ.ศ. 2513 ได้สังเกตต้นยาง 10 ต้นในสวนยางให้ผลผลิตดี จึงศึกษาและเก็บข้อมูลเกี่ยวกับต้นยางเหล่านี้เป็นเวลา 16 ปี ในจำนวนยาง 10 ต้น มีต้นหนึ่งมีคุณสมบัติพิเศษคือให้ผลผลิตสูง มีความต้านทานโรคสูง จึงได้นำกิ่งมาขยายพันธุ์ รวบรวมประมาณ 6 ปี พร้อมทั้งจะกรีดได้ และไม่ปรากฏว่ากลายพันธุ์ จึงทำให้ยางต้นนี้มีชื่อเสียงและแพร่หลายไปในหมู่ชาวสวนยาง แต่ไม่ทราบว่าเป็นพันธุ์อะไร จึงเรียกว่า ยางพันธุ์สิงหนาท แต่สำหรับหน่วยงานราชการบางแห่งเรียกว่า ยางพันธุ์บางปิด ตามชื่อหมู่บ้าน กรมวิชาการเกษตรได้ติดตามผลการทดลองเพื่อปรับปรุงพันธุ์ยางพาราของคุณสิงหนาท และกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยางตราดได้ส่งเสริมให้เกษตรกรนำยางพันธุ์บางปิดไปปลูก เนื่องจากให้ผลผลิตสูง และมีความต้านทานโรคดี

2) พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้ เป็นสายพันธุ์ที่ให้ทั้งผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้ โดยให้ผลผลิตน้ำยางสูง และมีการเจริญเติบโตดี ลักษณะลำต้นตรง และให้ปริมาณเนื้อไม้ในส่วนลำต้นสูง ประกอบด้วยสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้

1. พันธุ์พีบี 235 (PB235)

แม่ x พ่อ: PB5/51 x PB5/78

แหล่งกำเนิด: ประเทศมาเลเซีย

ลักษณะเด่น: ให้ผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้สูง สามารถเจริญเติบโตได้ดีมากในทุกพื้นที่ และต้านทานต่อโรคราสีชมพูและโรคจุดก้ำปลาได้ดี

ลักษณะประจำพันธุ์: ฉัตรใบมีลักษณะเป็นรูปกรวย ฉัตรมีขนาดใหญ่ ใบมีรูปร่างป้อม กลางใบ ใบมีสีเขียวอมเหลือง ปลายใบเรียวแหลม แผ่นใบขรุขระเป็นมัน เส้นกลางใบนูนมองเห็นเด่นชัดและเส้นใบมีสีเขียวอ่อน ระยะเวลาอ่อนจะแตกกิ่งเร็วมาก มีกิ่งขนาดเล็กจำนวนมากและทยอยทิ้งกิ่งด้านล่าง เมื่ออายุมากขึ้นจะเหลือกิ่งขนาดกลางจำนวน 4-5 กิ่งในระดับสูง ลักษณะการแตกกิ่งไม่สมดุลง มีพุ่มใบค่อนข้างบาง ทรงพุ่มมีขนาดใหญ่ เป็นรูปกลม ลักษณะลำต้นตรง เปลือกเดิมหนาปานกลาง ส่วนเปลือกที่อกใหม่บาง มีจำนวนต้นที่แสดงอาการเปลือกแห้งค่อนข้างมาก น้ำยางมีสีครีม

2. พันธุ์พีบี 255 (PB255)

แม่ x พ่อ: PB5/51 x PB32/36

แหล่งกำเนิด: ประเทศมาเลเซีย

ลักษณะเด่น: ให้ผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้สูง เปลือกหนาและนิ่มกรีดง่าย ต้านทานลมค่อนข้างดี และการเจริญเติบโตระยะก่อนเปิดกรีดเร็วมาก ทำให้เปิดกรีดได้เร็ว

ลักษณะประจำพันธุ์: ฉัตรใบมีลักษณะเป็นรูปครึ่งวงกลม ฉัตรมีขนาดใหญ่ ใบมีสีเขียวอ่อน ใบมีรูปร่างป้อมกลางใบ ปลายใบเรียวแหลม แผ่นใบเรียบ ไม่เป็นมัน ขอบใบหยักถี่ เส้นกลางใบนูนมองเห็นเด่นชัด เส้นใบมีสีเขียวอมเขียว ลักษณะลำต้นตรง ระยะเวลาอ่อนจะแตกกิ่งเร็ว แตกกิ่งขนาดเล็กจำนวนมาก พุ่มใบทึบ ทรงพุ่มมีขนาดใหญ่มีรูปกลม เริ่มผลัดใบค่อนข้างช้า

3. พันธุ์พีบี 260 (PB260)

แม่ x พ่อ: PB5/51 x PB49

แหล่งกำเนิด: ประเทศมาเลเซีย

ลักษณะเด่น: ให้ผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้สูง ต้านทานต่อโรคโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา โรคจุดก้ำปลาและโรคเส้นดำได้ดี และมีความต้านทานลมดี

ลักษณะประจำพันธุ์: ฉัตรใบมีขนาดเล็กและมีลักษณะเป็นรูปกรวย ใบมีสีเขียวเข้ม ใบมีรูปร่างป้อมปลายใบ แผ่นใบเรียบไม่เป็นมัน ปลายใบเรียวแหลม ขอบใบเป็นคลื่นหยาบ เส้นกลางใบนูนมองเห็นเด่นชัด เส้นใบมีสีเขียวอมเขียว ก้านใบและก้านใบย่อยสั้น ลักษณะลำต้นตรง แตกกิ่งน้อย กิ่งมีขนาดปานกลาง ในแต่ละกิ่งจะมีกิ่งขนาดเล็กจำนวนมากเป็นชั้น ๆ การแตกกิ่งสมดุลงดี ในช่วงอายุน้อยพุ่มใบทึบ พออายุมากจะทิ้งกิ่งด้านล่างทำให้พุ่มใบค่อนข้างบาง ทรงพุ่มมีขนาดปานกลางเป็นรูปกลม เริ่มผลัดใบค่อนข้างช้า

3) พันธุ์ยางเพื่อผลผลิตเนื้อไม้สูง เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเนื้อไม้สูงเป็นหลัก มีการเจริญเติบโตดีมาก ลักษณะลำต้นตรง ให้ปริมาณเนื้อไม้ในส่วนลำต้นสูงมาก ผลผลิตน้ำยางจะอยู่ในระดับต่ำ เหมาะสำหรับปลูกเป็นสวนป่าเพื่อการผลิตเนื้อไม้ ประกอบด้วยสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้

1. พันธุ์อะเซิงเทรา 50 (RRIT402)

แม่ x พ่อ: RRIC110 ill.

แหล่งกำเนิด: ประเทศไทย

ลักษณะเด่น: ให้ผลผลิตเนื้อไม้สูง และต้านทานต่อโรคใบจุดคอกเลโทตริกัม โรคเส้นดำ และโรคราสีชมพูได้ดี

ลักษณะประจำพันธุ์: ฉัตรใบมีลักษณะเป็นรูปกรวย โป่ง และมีขนาดเล็ก ใบมีสีเขียวเข้ม ใบมีรูปร่างป้อมปลายใบ แผ่นใบเป็นมัน ขอบใบเรียบ ขอบใบย่อยแยกจากกัน ก้านใบตรงและสั้น ลักษณะลำต้นกลมใหญ่และตรง ทรงพุ่มมีขนาดค่อนข้างใหญ่ เป็นรูปกรวย ในช่วงยางอ่อนแตกกิ่งขนาดกลางและเล็กจำนวนมาก การแตกกิ่งอยู่ในระดับสูง การแตกกิ่งสมดุล

เครื่องหมายทางพันธุกรรม

เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) หมายถึง ลักษณะที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ การที่จะสามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมได้ สิ่งมีชีวิตนั้นต้องมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หรือ มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) (นภาพรรณ เลขะวิวัฒน์, 2551) เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่นำมาใช้ตรวจสอบพันธุ์ยางพารา แบ่งออกเป็น 3 ประเภทตามลักษณะของการแสดงออก ดังนี้

1. เครื่องหมายสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นการใช้ลักษณะที่ปรากฏภายนอกที่สามารถสังเกตได้ด้วยสายตาเป็นเครื่องหมาย ได้แก่ รูปร่างของใบ สีของใบ ลักษณะทรงพุ่ม และผลผลิตน้ำยาง เป็นต้น เครื่องหมายพันธุกรรมในระดับสัณฐานวิทยาที่สามารถใช้จำแนกพันธุ์ยางได้ด้วยวิธีง่าย ๆ และทำได้ทันทีในแปลงปลูก ไม่ต้องเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์ และไม่ต้องอาศัยวิธีทางวิทยาศาสตร์ที่ยุ่งยากซับซ้อน อย่างไรก็ตามเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาก็มีข้อจำกัด เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยามักได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ รูปร่างของใบ สีของใบ ขนาดทรงพุ่ม ผลผลิตน้ำยาง จะได้รับผลกระทบโดยตรงจากความอุดมสมบูรณ์ของดินและปุ๋ย และบางลักษณะสามารถจำแนกได้ในบางระยะของการเจริญเติบโต เช่น ทรงฉัตร จะเห็นเป็นรูปร่างต่าง ๆ ได้ชัดเจนเฉพาะในยางอ่อน 1-2 ปี ซึ่ง

เจ้าหน้าที่ที่จะสามารถตรวจสอบความแตกต่างของพันธุ์ยางได้ถูกต้องแม่นยำ จะต้องเป็นผู้ที่มีความชำนาญและประสบการณ์สูง

2. เครื่องหมายชีวเคมี (biochemical marker) เป็นเครื่องหมายที่ได้จากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในต้นยาง ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ เครื่องหมายชีวเคมีมีข้อจำกัดที่การแสดงออกของเอนไซม์จะได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อม และระยะเวลาเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เครื่องหมายชีวเคมีมีข้อจำกัดคือ การเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการค่อนข้างยุ่งยาก และเฉพาะเจาะจงกับระยะที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ที่จะตรวจสอบ

3. เครื่องหมายโมเลกุล หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (molecular marker or DNA marker) เป็นเครื่องหมายที่สร้างจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือเป็นลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซม ซึ่งสามารถบอกถึงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบและมีการถ่ายทอดสู่รุ่นลูกได้ เครื่องหมายโมเลกุลมีข้อได้เปรียบคือชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีจำนวนมาก สภาพแวดล้อมและระยะเวลาเจริญเติบโตไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายโมเลกุล มีความถูกต้องแม่นยำสูง จึงมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบเพื่อจำแนกสายพันธุ์ อนุรักษ์พันธุ์กรรม รวมถึงการทำแผนที่พันธุกรรม (genetic mapping) เพื่อใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ยาง ถึงแม้ว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุลจะมีความถูกต้องแม่นยำสูง แต่ก็มีข้อจำกัดในเรื่องของเทคนิคปฏิบัติมีรายละเอียดขั้นตอนทางวิทยาศาสตร์ค่อนข้างซับซ้อน ต้องทำในห้องปฏิบัติการ และมีค่าใช้จ่ายสูง

จีโนมพืช (plant genome) (สุชาติดา สุขหรั่ง, 2553)

จีโนมพืช หมายถึง สารพันธุกรรมทั้งหมดของพืชซึ่งบรรจุอยู่ในเซลล์ ประกอบด้วย นิวเคลียร์จีโนม (nuclear genome) และออร์กาเนลล์จีโนม (organelle genome) ออร์กาเนลล์จีโนมแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่ คลอโรพลาสต์จีโนม (chloroplast genome) หรือคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA หรือ cpDNA) และไมโทคอนเดรียจีโนม (mitochondrial genome) หรือไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA หรือ mtDNA)

จีโนมครอบคลุมดีเอ็นเอทั้งส่วนที่เป็นยีน (genic DNA) ซึ่งทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่ใช้ในการทำงานของเซลล์ และดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non-genic DNA) ซึ่งพบเป็นส่วนใหญ่ในจีโนมประมาณ 95% และยังไม่ทราบบทบาทที่ชัดเจน

นิวเคลียร์จีโนม เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสของพืช มีลักษณะเป็นเส้น (linear) อัดเรียงตัวกันเป็นโครโมโซม เป็นองค์ประกอบที่ใหญ่ที่สุดของจีโนม ได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่คนละครึ่ง ขนาดของนิวเคลียร์จีโนมแปรผันมากในสิ่งมีชีวิต ในพืชพบได้ตั้งแต่ 10 ถึง 125,000 เมกะเบส สาเหตุที่ต่างกันได้มาส่วนใหญ่เกิดจากจำนวนชุดของโครโมโซม (ploidy) ของพืชที่ต่างกัน ส่วนในมนุษย์มีประมาณ 3 ล้านกิโลเบสเท่านั้น

ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) จะจัดเรียงตัวเป็นหน่วยซ้ำ (repeat unit) เป็นพันๆ หน่วยซ้ำ ในจีโนมพืช ครอบคลุมประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอทั้งหมด หน่วยซ้ำของไรโบโซมอลดีเอ็นเอแยกจากกันโดย intergenic spacer (IGS) แต่ละหน่วยซ้ำประกอบด้วยส่วนที่ถูกถอดรหัสจากดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอ (transcribed region) เริ่มตั้งแต่ส่วน external transcribed spacer (ETS) ถัดมาเป็น ยีน 18S, ITS1 (internal transcribed spacer 1), ยีน 5.8S, ITS2 และ ยีน 26S หรือ 28S ซึ่งบริเวณ ITS มีขนาดความยาวและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับการชนิดของพืช

ดีเอ็นเอบริเวณ ITS แบ่งได้เป็น 2 บริเวณ ได้แก่ ITS1 และ ITS2 ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S กับ 5.8S และ 5.8S กับ 26S ตามลำดับ (ภาพที่ 2-2) บริเวณ ITS1 และ ITS2 เป็นส่วนหนึ่งของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ถูกถอดรหัสเป็นไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอแต่ไม่ได้ประกอบอยู่ในโครงสร้างของไรโบโซมที่เป็นส่วนหนึ่งของการสร้างโปรตีน แต่ดีเอ็นเอส่วน ITS1 และ ITS2 ทำหน้าที่เป็นเพียงตัวช่วยให้ 26S และ 5.8S รวมกันเป็น large subunit ribosome และ 18S รวมเป็นองค์ประกอบของ small subunit ribosome

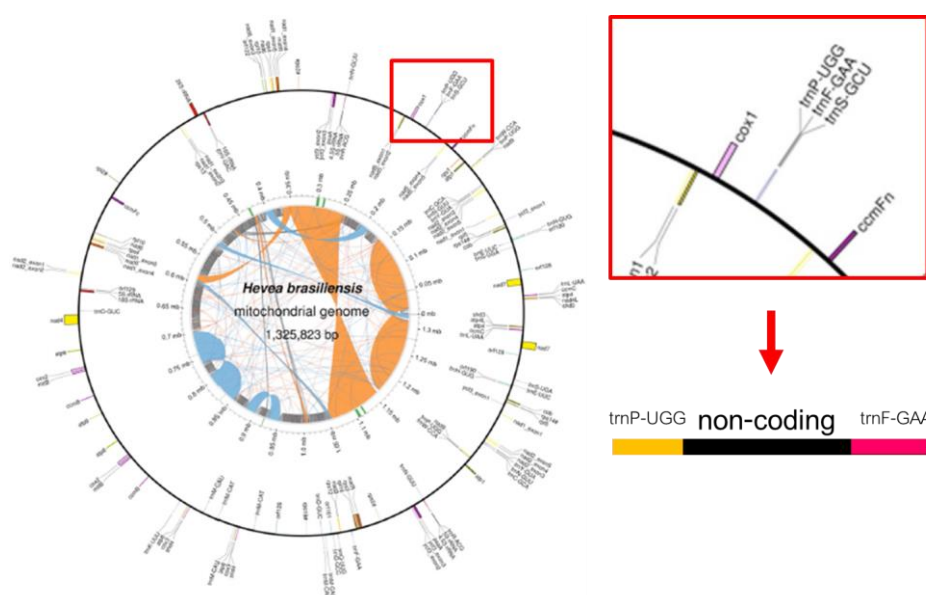


ภาพที่ 2-2 นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 18S กับ 5.8S และระหว่างชนิด 5.8S กับ 26S

ที่มา: ประสพอร รินทอง, ภัทรพล เพ็ชรชนะ และวนิดา ไทรขมภู (2556)

ปัจจุบันบริเวณ ITS ถูกนำไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในกลุ่มสมุนไพรมากที่สุด เนื่องจากมีบริเวณอนุรักษ์ จึงสามารถใช้เป็นตำแหน่งเข้าจับของไพรเมอร์สากล (universal primer) ที่ไพรเมอร์คู่เดียวกันนี้สามารถนำไปใช้ได้กับพืชหลายชนิด นอกจากนี้บริเวณ ITS ยัง

สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ได้ง่าย มีความยาวเหมาะสมในการนำไปหาลำดับเบส ส่วนไมโทคอนเดรียจีโนมของพืชนั้น ประกอบด้วยยีนที่สร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (cellular respiration) กระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) และเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ มีดีเอ็นเอของตัวเอง มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ และสังเคราะห์โปรตีนได้เอง (Burger, Gray, & Lang, 2003) โดยทั่วไปจะมีไมโทคอนเดรียเป็นพัน ๆ ในแต่ละเซลล์ (Pereira, Carneiro, & Asch, 2010) โครงสร้างของไมโทคอนเดรียจีโนมมีลักษณะเป็นวงแหวนเกลียวคู่ (double stranded circular DNA) ซึ่งมีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมผ่านทางด้านแม่ (maternal inheritance) ไมโทคอนเดรียจีโนมของพืชมีขนาดค่อนข้างใหญ่ และมีขนาดต่างกันมาก ประมาณ 200-2,400 กิโลเบส (Asaf et al., 2016) อัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียจีโนมของพืชช้ากว่าในสัตว์ 40-100 เท่า และช้ากว่าในนิวเคลียสจีโนมและคลอโรพลาสต์จีโนม 12 และ 3-4 เท่า ตามลำดับ ทำให้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับที่สูงกว่าระดับชนิด (species) หรือวงศ์ (family) เช่นในระดับชั้นคลาส (subclass) หรือไฟลัม (phylum) ได้ดี



ภาพที่ 2-3 ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ระหว่างยีน $tRNA^{Phe}$ และ $tRNA^{Pro}$ ที่มา: Shearman et al. (2014)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) (สุชาติดา สุขหรั่ง, 2553)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือรหัสแท่งของดีเอ็นเอ เป็นเครื่องมือชนิดหนึ่งที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่งหรือหลายบริเวณร่วมกันในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว คุณสมบัติที่เหมาะสมของดีเอ็นเอบาร์โค้ดคือเป็นดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ ประมาณ 400-800 คู่เบส และต้องสามารถใช้ดีเอ็นเอช่วงนี้ในการระบุชนิดกับสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิดหรือมากที่สุด ดีเอ็นเอบาร์โค้ดนอกจากจะช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแล้ว ยังช่วยในการค้นพบสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ ๆ ที่ยังไม่เคยรู้จักมาก่อน และช่วยในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอีกด้วย

คุณสมบัติของดีเอ็นเอบริเวณที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1. ต้องมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic variability) ในระดับชนิด
2. มีบริเวณขนาบข้างที่อนุรักษ์ (conserved flanking site) เพื่อใช้เป็นตำแหน่งเข้าเกาะของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์
3. เป็นดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ เพื่อให้ง่ายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ในปัจจุบันดีเอ็นเอบาร์โค้ดถูกนำไปประยุกต์ใช้กับกลุ่มสัตว์มากกว่าในพืช เนื่องจากในพืชมีอัตราการวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในจีโนมพืชต่ำกว่าในสัตว์ (Kress & Erickson, 2007) โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการระบุและจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต (Vijayan & Tsou, 2010; Xiang, Zhang, Lu, & Li, 2011; Liu et al., 2014) ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา (Kress & Erickson, 2012; Li et al., 2015)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ Polymerase Chain Reaction เรียกสั้น ๆ ว่า พีซีอาร์ (PCR) เป็นเทคนิคพื้นฐานทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอในหลอดทดลอง จากปริมาณ DNA ที่ใช้เป็นแม่แบบเพียงเล็กน้อย จนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล ปฏิกิริยาพีซีอาร์ คิดค้นพัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis และคณะ ในปี ค.ศ. 1985 ตั้งแต่นั้นมาได้มีการปรับปรุงและพัฒนาวิธีการเพื่อให้เกิดประโยชน์และการประยุกต์ใช้งานมากขึ้น

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วยสารตั้งต้นที่สำคัญ ดังนี้

1. ดีเอ็นเอแม่แบบหรือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้มาจากเซลล์ของมนุษย์ สัตว์ พืช หรือสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

2. ดีเอ็นเอสายเริ่มต้นขนาดสั้น ๆ เรียกว่า ไพรมเมอร์ (primer) มีความยาวประมาณ 18-25 เบส จำนวน 2 สาย เรียกว่า forward primer และ reverse primer แต่ละสายจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่ (complementary) กับลำดับเบสด้านปลาย 3' ของสายดีเอ็นเอแม่แบบ และสามารถจับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบได้ โดยจับที่ตำแหน่งที่อยู่ขนานข้าง (flanking region) ของสายดีเอ็นเอคู่สมกัน กำหนดส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน

3. นิวคลีโอไทด์หรือเบส มี 4 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (adenine, A) กัวนีน (guanine, G) ไซโทซีน (cytosine, C) และไทมีน (thymine, T) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของโครงสร้างดีเอ็นเอ

4. เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ เอนไซม์นี้มีหลายชนิด ที่นิยมใช้กันทั่วไปเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียชื่อ *Thermus aquaticus* จึงเรียกเอนไซม์นี้ว่า Taq DNA polymerase แบคทีเรียชนิดนี้อาศัยในน้ำพุร้อน มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 95 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือประมาณ 72 องศาเซลเซียส

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นสารเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase

6. บัฟเฟอร์ (buffer) เป็นสารที่ทำให้สภาพของสารในหลอดทดลองมีสภาวะความเป็นกรด-ต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

7. น้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease free water) ซึ่งใช้ผสมกับสารตั้งต้นดังกล่าวทั้งหมด

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

1. การแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิสูง 94-95 °C เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวคู่ออกจากกันเป็นสายเดี่ยว และทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

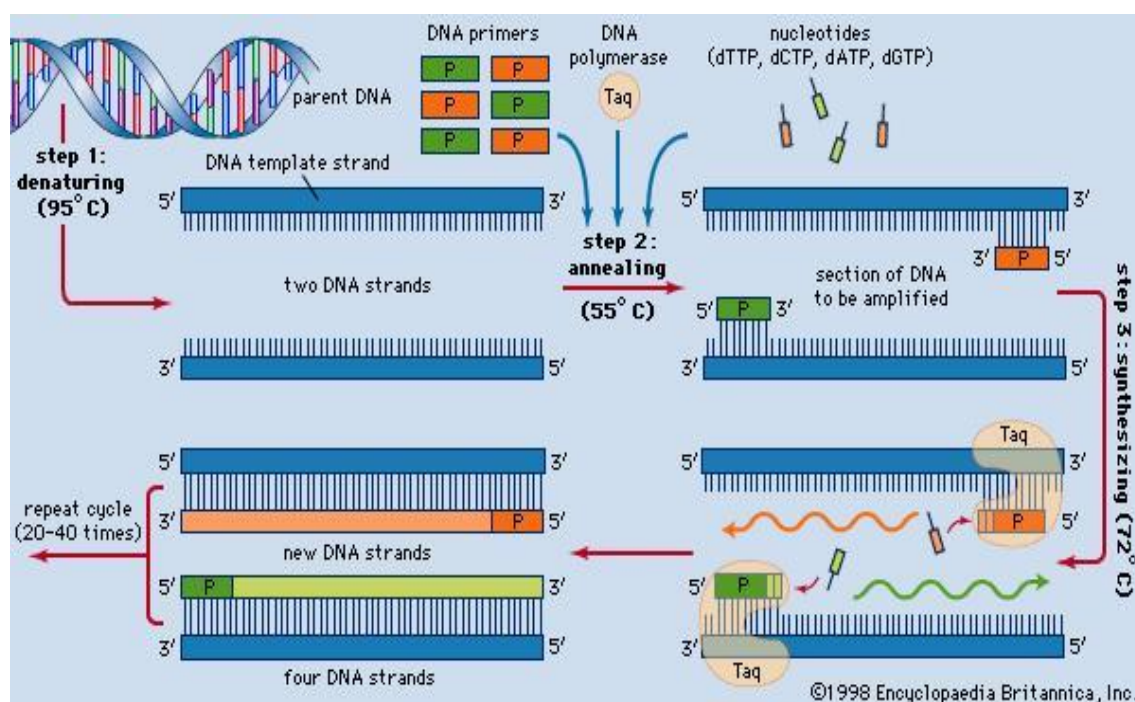
2. การจับของสายไพรมเมอร์ (primer annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 50-65 °C เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ไพรมเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบในบริเวณที่ลำดับเบสเข้าคู่กัน

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการต่อสายไพรมเมอร์ (primer extension) โดยใช้อุณหภูมิ 70-75 °C เป็นเวลาประมาณ 30-120 วินาที ขึ้นอยู่กับความยาวของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ขั้นตอนนี้เอนไซม์ DNA polymerase จะทำหน้าที่นำเบส (A, T, C, G) ที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบมาต่อเข้ากับปลายของสายไพรมเมอร์ทั้งสองเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่

ปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนหลักรวมเรียกว่า 1 รอบพีซีอาร์ (PCR cycle) เกิดขึ้นโดยนำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมดังกล่าวข้างต้นเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ ซึ่งเป็นเครื่องที่สามารถ

เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง-ต่ำได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งกำหนดจำนวนรอบและเวลาสำหรับปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนได้อย่างอัตโนมัติ

ปฏิกิริยาพีซีอาร์จะเกิดขึ้นซ้ำ ๆ ประมาณ 25-40 รอบ โดยสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นในแต่ละรอบจะถูกใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในรอบต่อ ๆ ไปจนสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้นผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จึงเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ เรียกการเพิ่มจำนวนแบบนี้ว่า exponential amplification ซึ่งปฏิกิริยาทั้งหมดใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2-4 ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ใน 1 รอบปฏิกิริยา

ที่มา: <https://global.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีรายงานการศึกษานิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่อยู่ระหว่าง 18S, 5.8S และ 26S ไรบโซมอลดีเอ็นเอ ที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกพืชในระดับชนิดได้ รวมทั้งบริเวณ ITS นี้ยังถูกเสนอให้ใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับกลุ่มพืชมีเมล็ด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชชั้นสูง (Kress, Wurdack, Zimmer, Weigt, & Janzen, 2005; China Plant BOL Group, 2011; Fazekas, Kuzmima, Newmaster, & Hollongsworth, 2012; Wang et al., 2015) โดยมีตัวอย่างที่ถูกนำไปใช้จำแนกพืชในระดับชนิดในวงศ์ค้ำหัด (Juglandaceae) เช่น *Cyclocarya paliurus*,

Engelhardia acerifolia (Xiang et al., 2011) วงศ์ตีนปลีน้ำ (Potamogetonaceae) เช่น ผักตบชวา (*Potamogeton crispus*) (Du, Qimike, Yang, Chen, & Wang, 2011) และวงศ์ผักชี (Apiaceae) เช่น โกรฐเขียวยง (*Angelica sinensis*), *Ligusticum chuanxiong* (Liu et al., 2014) เป็นต้น นอกจากนี้บริเวณ ITS ยังถูกนำไปใช้จำแนกในระดับชนิดในสกุลเสาวรส (*Passiflora* spp.) (อนุรักษ โปธิเอียม, สุพัตรา โปธิเอียม และทัศนารถ กระจ่างวุฒิ, 2556) และ *Pterygiella* (Dong, Wortley, Wang, Li, & Lu, 2011) หรือนำไปใช้ร่วมกับยีน *rbcL*, *matK* และบริเวณ *trnH-psbA* ในคลอโรพลาสต์จีโนมในการระบุเอกลักษณ์ของยาสมุนไพรมะขามหวาน (Li, Cao, But, & Shaw, 2011) หรือใช้ร่วมกับยีน *SucS* ในไมโทคอนเดรียจีโนม ยีน *matK*, *rbcL*, *rps16*, *rpl16*, บริเวณ *trnL-F* และ *trnD-T* ในคลอโรพลาสต์จีโนม เพื่อจำแนก subfamily ใหม่ของพืชในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) (The Legume Phylogeny Working Group, 2017) และใช้จำแนกสายพันธุ์มะขามหวาน (*Tamarindus indica* L.) สายพันธุ์แสงอาทิตย์ออกจากมะขามหวานพันธุ์อื่นได้ (สุวนิดา อัญจิรวโรจน์, อัจฉริยา รังษิรุจิ และธวัช ดอนสกุล, 2551)

บริเวณ ITS1 ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S และ 5.8S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ในพืชมีขนาดไม่เท่ากัน พบได้ตั้งแต่ 100-681 คู่เบส (Wang et al., 2015) บริเวณ ITS1 มีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดพืชได้ดี เช่น จำแนกชนิดของเครื่องยาเร่งด่วนยอ (*Amomum uliginosum*) (ประสพอร รินทอง, วัชรินทร์ พากวิพัทธ์, ปิลาธนา เลิศสถิตธนกร และวนิดา ไทรชมภู, 2557) เร่วแดง (*A. villosum*) (Qiao et al., 2009) และเร่วใหญ่ (*Alpinia mutica*) (ประสพอร รินทอง และคณะ, 2556) หรือบริเวณ ITS1 ถูกนำไปใช้ร่วมกับยีน *matK* เพื่อใช้จำแนกความแตกต่างระหว่าง *Hypericum perforatum* และ *H. androsaemum* (Costa et al., 2016) และใช้จำแนกสายพันธุ์ในมะเดื่อ (*F. carica* L.) (Ghada et al., 2009) ได้ เป็นต้น (ตารางที่ 2-1) ในบางพารามีการศึกษาบางส่วน ของบริเวณ ITS1 ที่มีขนาดประมาณ 60 คู่เบส ไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 5.8S และบางส่วนของบริเวณ ITS2 (ระหว่าง 5.8S และ 28S) และพบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของบางพารา เพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้น จึงไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์บางพาราได้ (ลักษณะ ชัยประสิทธิ์ และชุตตา บุญภักดี, 2557)

ไมโทคอนเดรียจีโนมในพืชมีขนาดใหญ่มาก พบได้ตั้งแต่ 200-2,400 กิโลเบส (Asaf et al., 2016) (ตารางที่ 2-2) ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในพืชมีวิวัฒนาการช้ากว่านิวเคลียสดีเอ็นเอ และคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (Mustapha, Tamarzizt, Baraket, Abdallah, & Hannachi, 2015; Asaf et al., 2016; Kerten et al., 2016) ซึ่งพืชแต่ละชนิดมีขนาดของจีโนมและจำนวนยีนในไมโทคอนเดรียจีโนมแตกต่างกัน ทำให้มีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด (Liu et al., 2013)

นักวิจัยกลุ่มนี้จึงใช้ไมโทคอนเดรียจีโนมบอกความสัมพันธ์และนำไปใช้จำแนกพืชในระดับชนิดในหญ้าละมาน (*Oryza minuta*) และหญ้าข้าวผี (*O. rufipogon*) (Asaf et al., 2016) และยางพารา (Shearman et al., 2014) เป็นต้น การศึกษาจีโนมในไมโทคอนเดรียของพืชมีไม่มากนัก เนื่องจากมีขนาดใหญ่และมีจำนวนยีน และลำดับเบสแบบต่าง ๆ ซับซ้อนกว่าของสัตว์ ทำให้การจัดเรียงตัวของยีนต่าง ๆ แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด และอัตราการแทนที่เบสต่ำ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) และยังไม่มียางพาราการศึกษาบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ถอดรหัส อยู่ระหว่าง ยีน *tRNA^{Phe}* และ *tRNA^{Pro}* ในยางพารา ซึ่งอาจจะพบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ และนำมาใช้บ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ในระดับสายพันธุ์ได้

ตารางที่ 2-1 ขนาดของบริเวณ ITS1 ในพืชวงศ์ Moraceae และ Zingiberaceae

วงศ์	ชนิด	ขนาด (คู่เบส)	แหล่งอ้างอิง
Moraceae	มะเดื่อ	200-279	Ghada et al. (2009)
	(<i>Ficus carica</i> L.)		
	<i>F. carica</i> Zidi	200	
	<i>F. carica</i> Besbessi2	251	
	<i>F. carica</i> Besbessi1	252	
	<i>F. carica</i> Bidhi1	252	
	<i>F. carica</i> Delgane	253	
	<i>F. carica</i> Bither abiadh	254	
	<i>F. carica</i> Bidhi2	254	
	<i>F. carica</i> Soltani	258	
	<i>F. carica</i> Bidh beghal	258	
	<i>F. carica</i> Hemri	259	
	<i>F. carica</i> Besbessi3	278	
	<i>F. carica</i> Jrani	279	

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

วงศ์	ชนิด	ขนาด (คู่เบส)	แหล่งอ้างอิง
Zingiberaceae	เง้าแดง (<i>Amomum villosum</i>)	178	Qiao et al. (2009)
	เครื่องยาเง้าน้อย (<i>Amomum uliginosum</i>)	180	ประสพอร รินทอง และ คณะ (2557)
	เง้าใหญ่ (<i>Alpinia mutica</i>)	184	ประสพอร รินทอง และ คณะ (2556)

ตารางที่ 2-2 ขนาดของไมโทคอนเดรียจีโนมในพืช

วงศ์	ชนิด	ขนาด (คู่เบส)	แหล่งอ้างอิง
Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	366,924	Liu et al. (2013)
	ผักกาดก้านขาว (<i>Brassica napus</i>)	221,853	Liu et al. (2013)
Caricaceae	มะละกอ (<i>Carica papaya</i>)	476,890	Liu et al. (2013)
Solanaceae	ยาสูบ (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	430,597	Liu et al. (2013)
Caryophyllaceae	<i>Silene latifolia</i>	253,413	Liu et al. (2013)
Fabaceae	ถั่วเขียว (<i>Vigna radiata</i> L.)	401,262	Liu et al. (2013)
Malvaceae	ฝ้ายขน (<i>Gossypium hirsutum</i>)	621,884	Liu et al. (2013)
Euphorbiaceae	ละหุ่ง (<i>Ricinus communis</i>)	502,773	Liu et al. (2013)
	ยางพารา (<i>Hevea brasiliensis</i>)	1,325,823	Shearman et al. (2014)

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

วงศ์	ชนิด	ขนาด (คู่เบส)	แหล่งอ้างอิง
Gesneriaceae	<i>Boea hypgrometrica</i>	510,519	Zhang et al. (2012)
Amaryllidaceae	หอมหัวใหญ่ (<i>Allium cepa</i> L.)	316,363	Kim, Kim, Yang, and Kim (2016)
Vitaceae	องุ่นแดง (<i>Vitis vinifera</i> L.)	773,279	Pereira et al. (2010)
Salicaceae	<i>Populus tremula</i>	783,442	Kersten et al. (2016)
Poaceae	หญ้าละมาน (<i>Oryza minuta</i>)	515,022	Asaf et al. (2016)
	ข้าว (<i>O. sativa japonica</i>)	490,520	Asaf et al. (2016)
	ข้าว (<i>O. sativa indica</i>)	491,515	Asaf et al. (2016)
	หญ้าข้าวผี (<i>O. rufipogon</i>)	559,045	Asaf et al. (2016)
	ข้าวโพด (<i>Zea mays</i>)	569,630	Clifton et al. (2016)
	ข้าวสาลี (<i>Triticum aestivum</i>)	452,528	Liu et al. (2013)
	ข้าวฟ่าง (<i>Sorghum bicolor</i>)	468,628	Liu et al. (2013)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) (Sigma, Germany)
2. เครื่องไมโครเวฟ (LG)
3. ชุดอุปกรณ์ gel documentation (Ingenius Syngene, United Kingdom)
4. เครื่องถ่ายภาพเจล (Syngene international Ltd., England)
5. เครื่องเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra, Germany)
6. เครื่อง Vortex
7. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Tanita, Japan)
8. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Mettler GmbH)
9. อุปกรณ์ผ่าตัด ปากคีบ ไบมีด
10. ปิเปตอัตโนมัติ (Auto pipette) ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
11. ทิปและทิวปกรอง ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
12. หลอด microcentrifuge ขนาด 0.2, 0.6, 1.5 และ 2.0 ไมโครลิตร
13. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ
14. Nanodrop 2000/2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)

สารเคมี

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ SP plant DNA Kit (OMEGA bio-tek, USA)
2. ชุดสกัดพลาสมิด Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid, Taiwan)
3. Agarose (Seakem, USA)
4. Ethidium bromide (Vivantis Technologies Sdn Bhd, Malaysia)
5. 6X Loading dry
6. Absolute ethanol (Merck, Germany)
7. Go taq green Master mix, 2X (Promega, USA)
8. 100 bp DNA Ladder
9. LB broth (Hardy diagnostics)

10. โพรเมอร์จำเพาะบริเวณ ITS1
11. โพรเมอร์จำเพาะบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ
12. 1x SB buffer

การเตรียมตัวอย่าง

สายพันธุ์ยางพาราที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยยางพารา ตำบลลาดกระทิง อำเภอสนามชัยเขต จังหวัดฉะเชิงเทรา ได้แก่ สายพันธุ์ 1) PB235 2) PB255 3) PB260 4) BPM24 5) RRIT226 6) RRIT251 7) RRIT402 8) RRIT408 9) BANGPID และ 10) SONGKRA36 และตัวอย่างนอกกลุ่มซึ่งชื่อมาจากตลาดพันธุ์ไม้ จังหวัดชลบุรี ที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เดียวกันกับยางพาราอีก 2 ชนิด คือ มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) และมะพร้าว (*Ricinus communis* L.) และพืชต่างวงศ์ 1 ชนิด คือ ถั่วเขียว (*Vigna radiata* L.)

วิธีการทดลอง

การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของยางพาราและใบพืชนอกกลุ่ม โดยนำไปที่มีขนาด ความยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร จำนวน 2-3 ใบ ล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นใช้มีดผ่าตัดหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร น้ำหนักประมาณ 60-70 กรัม แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศ (Speed vacuum concentrator) เป็นเวลา 30 นาที แล้วใช้แท่งแก้วบดลงในหลอดทดลองจนใบละเอียด จากนั้นเติม Buffer SP1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยการ vortex แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Buffer SP2 ปริมาตร 140 ไมโครลิตร แล้วนำไป vortex ให้เข้ากัน นำไปปั่นในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ลงใน Omega Homogenizer Column ที่สวมอยู่ใน collection tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol เท่ากับส่วนใสที่ดูมาในอัตราส่วน 1:1 นำไป vortex ให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 2 นาที ถ่ายสารละลายที่อยู่ใน collection tube ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer SP3 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ absolute ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 650 ไมโครลิตร ถ่ายลงใน HiBind DNA Min Column ที่สวมอยู่ใน collection tube ขนาด 2

มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนที่ไหลผ่านทิ้งและวาง collection tube ไว้ที่เดิม เติม Buffer SPW Wash ปริมาตร 650 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนไหลผ่านทิ้ง สวม collection tube ไว้ที่เดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นย้าย HiBind DNA Column ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม nuclease free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยดีเอ็นเอของยางพาราหรือของพืชนอกกลุ่ม แต่ละตัวอย่าง (200 นาโนกรัม) 1 ไมโครลิตร, 10 mM ไพโรเมอริ ITS1 Mes L และ ITS1 Mes R ที่ออกแบบขึ้นใหม่โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลัง (GenBank accession no. JQ743203) ข้างละ 0.4 ไมโครลิตร, 2x taq master mix (200 μ M dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 1.5 mM MgCl 0.6 ไมโครลิตร และ 10XBufferA 2 ไมโครลิตร) จำนวน 3.2 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปราศจาก Nuclease ให้ครบ 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

Pre-denaturation	94 °C	2 นาที	} จำนวน 30 รอบ
Denaturation	94 °C	45 นาที	
Annealing	62 °C	10 นาที	
Extension	72 °C	20 นาที	
Final extension	72 °C	7 นาที	

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 1% อะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas, Germany) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ส่งวิเคราะห์อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่ได้มา ตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้งแล้วเทียบเคียงความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nlm.nih.gov/) และเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของยางพาราทั้งหมด 10 สายพันธุ์ วิเคราะห์

ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยโปรแกรม MEGA version 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013) และเลือก model BIC (Bayesian Information Criterion) ที่ให้ค่าต่ำสุด

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

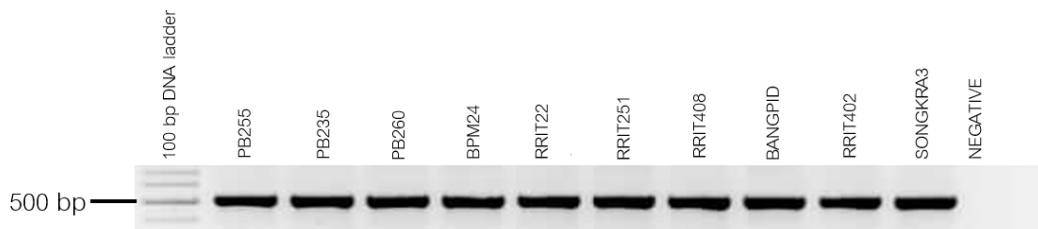
ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยดีเอ็นเอของยางพารา หรือของพืชนอกกลุ่ม แต่ละตัวอย่าง (200 นาโนกรัม) จำนวน 1 ไมโครลิตร, 10 mM ไพโรเมออร์ *trnF* และ *trnP* ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพารา (GenBank accession no. AP014526) ใช้ข้างละ 0.4 ไมโครลิตร, 2x goTaq master mix (400 μ M dATP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dTTP และ 3 mM MgCl) จำนวน 10 ไมโครลิตร และปรับปริมาตร สุดท้ายด้วยน้ำปราศจาก Nuclease ให้ครบ 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

Pre-denaturation	94 °C	2 นาที	} จำนวน 30 รอบ
Denaturation	94 °C	45 นาที	
Annealing	60 °C	20 นาที	
Extension	70 °C	30 นาที	
Final extension	72 °C	7 นาที	

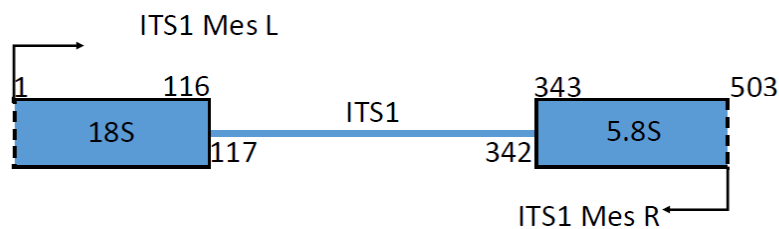
เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 1% อะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas, Germany) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ส่งวิเคราะห์อ่านลำดับ นิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่ได้มาตรวจสอบ ความถูกต้องอีกครั้งแล้วเทียบเคียงความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nlm.nih.gov/) และเปรียบเทียบความแตกต่างของ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพาราทั้งหมด 10 สายพันธุ์ วิเคราะห์ ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยโปรแกรม MEGA version 6 (Tamura et al., 2013) และเลือก model BIC ที่ให้ค่าต่ำสุด

บทที่ 4 ผลการวิจัย

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 Mes L และ ITS1 Mes R และนำผลผลิตพีซีอาร์ส่งอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ของยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์ (ส่วนมันสำปะหลัง ละหุ่ง และถั่วเขียว ไม่ได้แสดงผล) มีขนาดเท่ากับ 503 คู่เบส (ภาพที่ 4-1) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพาราไปเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank พบว่าเทียบเคียงได้กับบริเวณ ITS1 ของ *Plukenetia lorentensis* (accession no. KP794453) ดังภาพที่ 4-2 ซึ่งเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกับของยางพารา และพบว่า บริเวณ ITS1 ของยางพาราทุกสายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 226 คู่เบส (ภาพที่ 4-3)

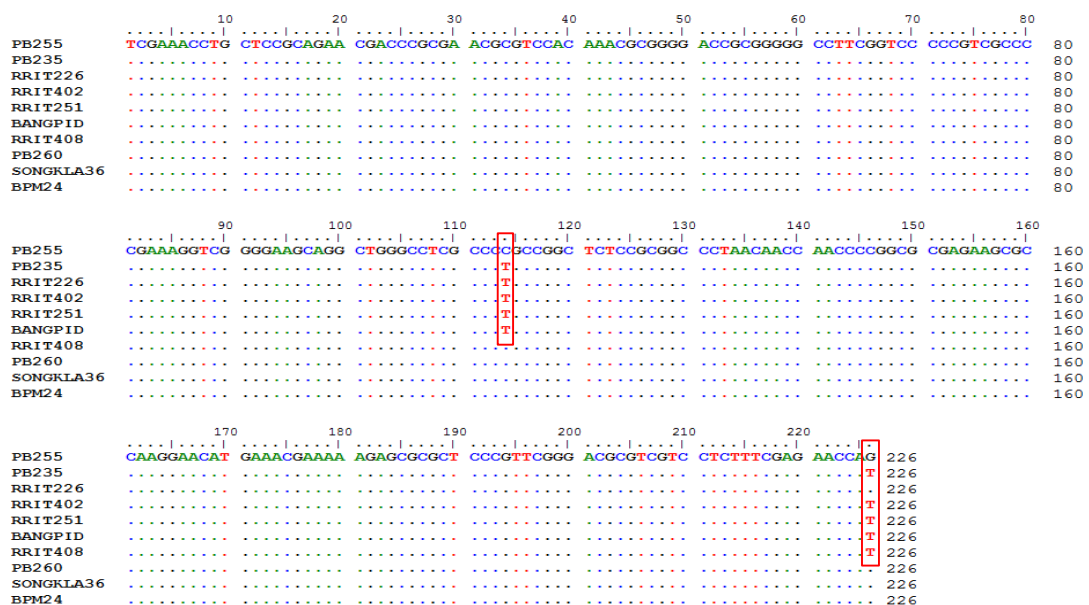


ภาพที่ 4-1 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนในปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ITS1 Mes L และ ITS1 Mes R ขนาด 503 คู่เบส ของยางพารา 10 สายพันธุ์ ตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้น 1% ความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที



ภาพที่ 4-2 บริเวณ ITS1 ระหว่างยีน 18S และ 5.8S rRNA ของยางพารา

ทั้งนี้พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์มีลำดับเบสแตกต่างกัน 2 ตำแหน่ง คิดเป็น 0.88 เปอร์เซ็นต์ (2/226) คือ ตำแหน่งที่ 114 ของยางพาราสายพันธุ์ PB235, RRIT226, RRIT251, RRIT402 และ BANGPID แทนที่เบส C ด้วยเบส T และตำแหน่งที่ 226 ของยางพาราสายพันธุ์ PB235, RRIT251, RRIT402, RRIT408 และ BANGPID แทนที่เบส G ด้วยเบส T (ภาพที่ 4-3) ยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.005 โดยไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมในยางพาราสายพันธุ์ RRIT251, RRIT402, PB235 และ BANGPID และไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมในยางพาราสายพันธุ์ BPM24, PB255, PB260 และ SONGKRA36 แต่ยางพาราทั้งสองกลุ่มมีระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.005 และยางพาราสายพันธุ์ RRIT408 และ RRIT226 มีระยะห่างทางพันธุกรรมจากยางพาราทั้ง 8 สายพันธุ์เท่ากับ 0.002 และมีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกันเท่ากับ 0.005 ดังแสดงในตารางที่ 4-1 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพาราไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชในวงศ์เดียวกัน คือ มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) ละหุ่ง (*Ricinus communis*) และ *P. lorentensis* มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.118-0.410 และพืชต่างวงศ์ คือ ถั่วเขียว (*Vigna radiata*) และองุ่นแดง (*Vitis vinifera* L.) (GenBank accession no. AF365988) พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.738-1.033 (ตารางที่ 4-2)



ภาพที่ 4-3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของยางพาราขนาด 226 คู่เบส สัญลักษณ์จุด (.) หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกัน

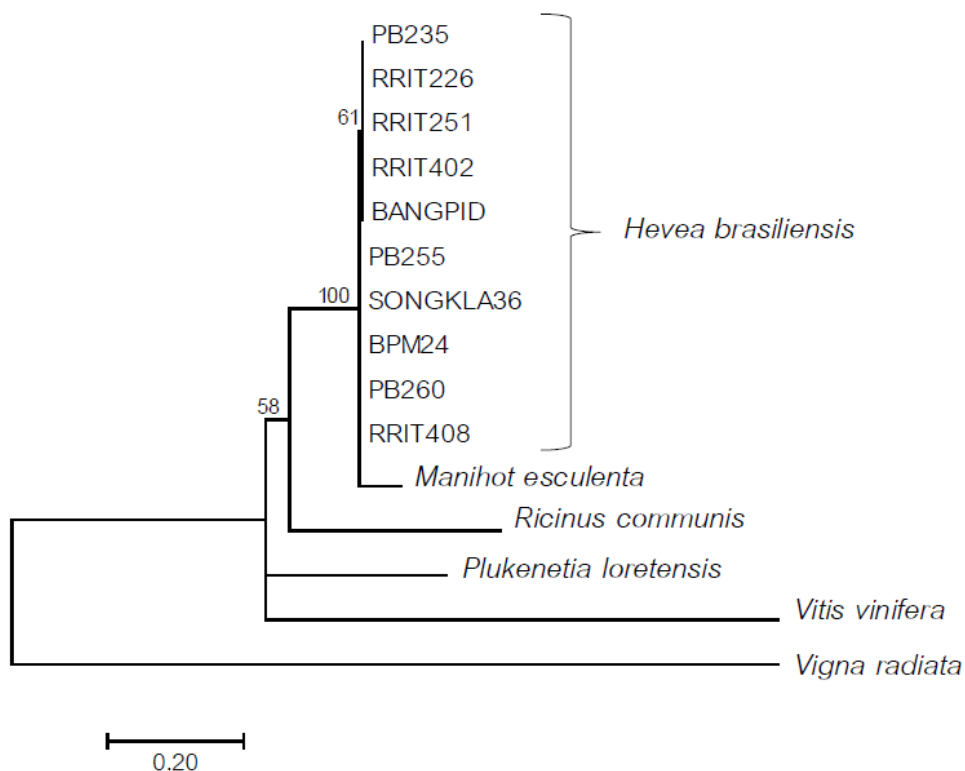
ตารางที่ 4-1 ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1
ของยางพารา 10 สายพันธุ์

Cultivar	BANG PID	BPM 24	PB 255	PB 235	PB 260	RRIT 226	RRIT 251	RRIT 402	RRIT 408	SONG KRA36
BANGPID	0.000									
BPM24	0.005	0.000								
PB255	0.005	0.000	0.000							
PB235	0.000	0.005	0.005	0.000						
PB260	0.005	0.000	0.000	0.005	0.000					
RRIT226	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000				
RRIT251	0.000	0.005	0.005	0.000	0.005	0.002	0.000			
RRIT402	0.000	0.005	0.005	0.000	0.005	0.002	0.000	0.000		
RRIT408	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.005	0.002	0.002	0.000	
SONGKRA36	0.005	0.000	0.000	0.005	0.000	0.002	0.005	0.005	0.002	0.000

ตารางที่ 4-2 ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1
ของยางพาราเปรียบเทียบกับพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เดียวกันและต่างวงศ์
คือ Vitaceae และ Fabaceae

Cultivar	Family Euphorbiaceae			Family Vitaceae	Family Fabaceae
	<i>Manihot esculenta</i>	<i>Plukenetia loretensis</i>	<i>Ricinus communis</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vigna radiata</i>
PB235					
RRIT226					
RRIT402	0.123	0.378	0.410	0.752	1.033
RRIT251					
BANGPID					
PB255					
RRIT408					
PB206	0.118	0.369	0.401	0.738	1.012
SONGKRA36					
BPM24					

เมื่อนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่า ยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งแยกออกจากตัวอย่างนอกกลุ่ม คือ มันสำปะหลัง ละหุ่ง ถั่วเขียว *P. lorentensis* และองุ่นแดง อย่างชัดเจน โดยมีความใกล้เคียงกับมันสำปะหลังมากกว่าพืชตัวอย่างนอกกลุ่มอื่น ๆ แสดงดังภาพที่ 4-4

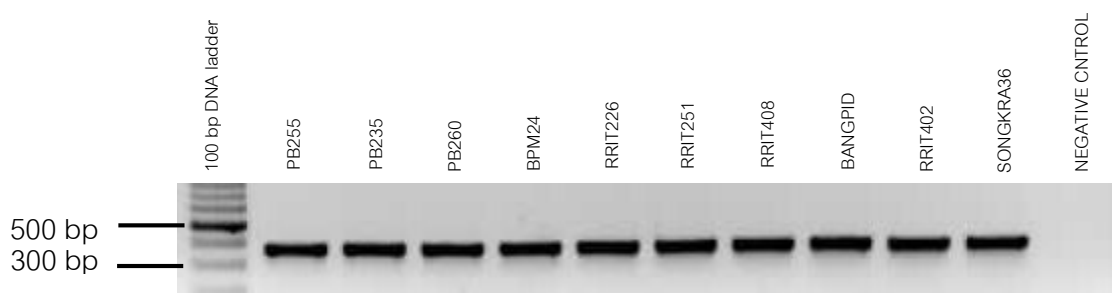


ภาพที่ 4-4 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS1 ของยางพาราจำนวน 10 สายพันธุ์กับตัวอย่างนอกกลุ่ม มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*), ละหุ่ง (*Ricinus communis*), ถั่วเขียว (*Vigna radiata*), *Plukenetia lorentensis* และองุ่นแดง (*Vitis vinifera*) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 6 ด้วยวิธี Neighbor-joining สับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

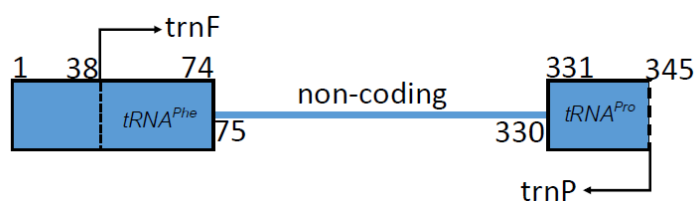
หมายเหตุ ตัวเลข 0.20 = ค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง และตัวเลขบนกิ่ง (%) = ค่าความเชื่อมั่นที่เกิดจากการสับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ *trnF* และ *trnP* ที่จำเพาะในบริเวณยีน *tRNA^{Phe}* และ *tRNA^{Pro}* ที่ขนานข้างบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอและนำผลผลิตพีซีอาร์ส่งอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ของยารักษาทั้ง 10 สายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 345 คู่เบส (ภาพที่ 4-5) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยารักษาไปเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank พบว่าเทียบเคียงได้กับบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยารักษา (GenBank accession no. AP014526) ดังภาพที่ 4-6 และพบว่า บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยารักษาทุกสายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 256 คู่เบส (ภาพที่ 4-6)



ภาพที่ 4-5 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนในปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ *trnF* และ *trnP* ขนาด 345 คู่เบส ของยารักษา 10 สายพันธุ์ ตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้น 1% ความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที



ภาพที่ 4-6 บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอระหว่างยีน *tRNA^{Phe}* และ *tRNA^{Pro}* ของยารักษา

ทั้งนี้พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยารักษาทั้ง 10 สายพันธุ์มีลำดับเบสแตกต่างกัน 1 ตำแหน่ง คิดเป็น 0.39 เปอร์เซ็นต์ (1/256) คือ ตำแหน่งที่ 33 ของยารักษาสายพันธุ์ BPM24

แผนที่เบส T ด้วยเบส G (ภาพที่ 4-7) ยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.000-0.004 โดยยางพาราสายพันธุ์ PB235, PB255, PB260, RRIT226, RRIT251, RRIT402, RRIT408, BANGPID และ SONGKRA36 ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่ ยางพาราสายพันธุ์ BPM24 มีระยะห่างทางพันธุกรรมจากยางพาราทั้ง 9 สายพันธุ์เท่ากับ 0.004 ดังแสดงในตารางที่ 4-3 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพาราไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ของพืชในวงศ์เดียวกัน คือ มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) และละหุ่ง (*Ricinus communis*) มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.056-0.088 และพืชต่างวงศ์ คือ ถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris* L.) และองุ่นแดง (*Vitis vinifera* L.) (GenBank accession no. AF365988) พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.051-0.116 (ตารางที่ 4-4)



ภาพที่ 4-7 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพารา ขนาด 256 คู่เบส
สัญลักษณ์จุด (.) หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกัน

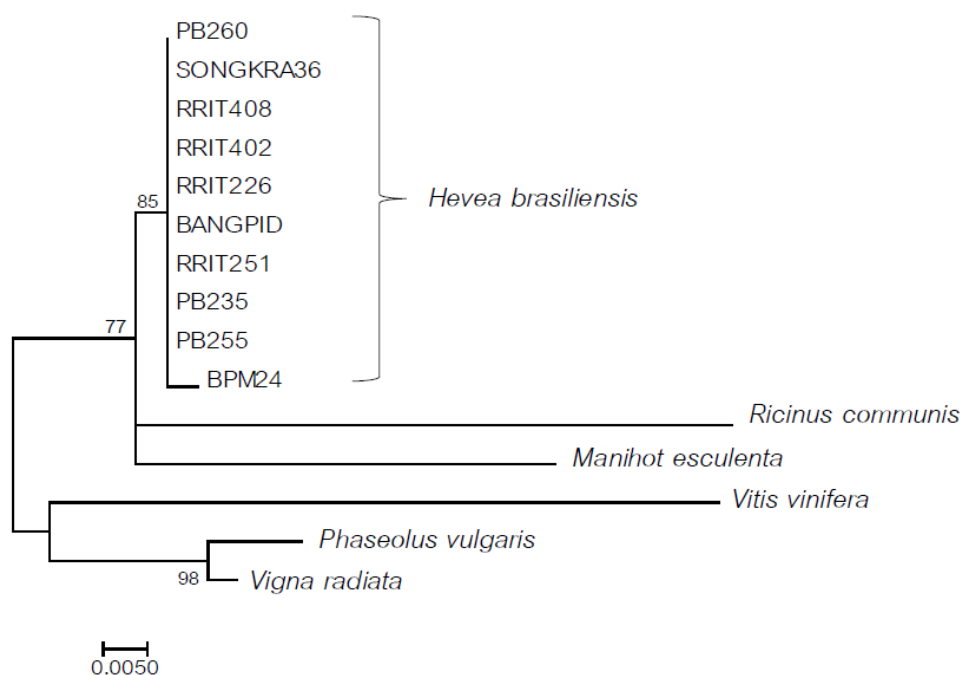
ตารางที่ 4-3 ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพารา 10 สายพันธุ์

Cultivar	BANG PID	BPM 24	PB 255	PB 235	PB 260	RRIT 226	RRIT 251	RRIT 402	RRIT 408	SONG KRA36
BANGPID	0.000									
BPM24	0.004	0.000								
PB255	0.000	0.004	0.000							
PB235	0.000	0.004	0.000	0.000						
PB260	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000					
RRIT226	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000				
RRIT251	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
RRIT402	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
RRIT408	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
SONGKRA36	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

ตารางที่ 4-4 ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพาราเปรียบเทียบกับพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เดียวกัน และต่างวงศ์ คือ Vitaceae และ Fabaceae

Cultivar	Family Euphorbiaceae		Family Vitaceae	Family Fabaceae	
	<i>Manihot esculenta</i>	<i>Ricinus communis</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Vigna radiata</i>
PB235					
RRIT226					
RRIT402					
RRIT251					
BANGPID	0.060	0.088	0.116	0.060	0.051
PB255					
RRIT408					
PB206					
SONGKLA36					
BPM24	0.056	0.088	0.116	0.065	0.056

เมื่อนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่า ยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งแยกออกจากตัวอย่างนอกกลุ่ม คือ มันสำปะหลัง ละหุ่ง ถั่วเขียว ถั่วแขก และองุ่นแดง อย่างชัดเจน แสดงดังภาพที่ 4-8



ภาพที่ 4-8 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพาราจำนวน 10 สายพันธุ์กับตัวอย่างนอกกลุ่ม มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*), ละหุ่ง (*Ricinus communis*), ถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) และองุ่นแดง (*Vitis vinifera*) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 6 ด้วยวิธี Neighbor-joining สับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

หมายเหตุ ตัวเลข 0.005 = ค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง และตัวเลขบนกิ่ง (%) = ค่าความเชื่อมั่นที่เกิดจากการสับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

เมื่อพิจารณาความแปรปรวนในบริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของ ยางพาราพบว่า บริเวณ ITS1 มีความแปรปรวนมากกว่าบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอทั้งใน ระหว่างสายพันธุ์ของยางพารา (มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม บริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเออยู่ในช่วง 0.000-0.005 และ 0.000-0.004 ตามลำดับ) ภายในวงศ์เดียวกัน (มีค่า ระยะห่างทางพันธุกรรม บริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเออยู่ในช่วง 0.118-0.410 และ 0.056-0.088 ตามลำดับ) และระหว่างวงศ์ (มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม บริเวณ ITS1 และ บริเวณ non-coding ดีเอ็นเออยู่ในช่วง 0.738-1.033 และ 0.051-0.116 ตามลำดับ) ดังแสดงใน ตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ของยางพารา พี่ชในวงศ์ Euphorbiaceae เดียวกัน และต่างวงศ์ คือ Vitaceae และ Fabaceae

ตัวอย่าง	ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม	
	บริเวณ ITS1	บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ
ระหว่างสายพันธุ์	0.000-0.005	0.000-0.004
ระหว่างชนิดในวงศ์เดียวกัน	0.118-0.410	0.056-0.088
ระหว่างวงศ์	0.738-1.033	0.051-0.116

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

บริเวณ ITS1

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 Mes L และ ITS1 Mes R ที่ออกแบบขึ้นใหม่โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลัง (GenBank accession no. JQ743203) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกับยางพารา เนื่องจากปัจจุบันยังไม่ปรากฏข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ของยางพาราในฐานข้อมูล GenBank และเมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ส่งอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าทั้ง 10 สายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 503 คู่เบส เมื่อนำมาเทียบเคียงได้เหมือนสูงสุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank ของ *P. lorentensis* (accession no. KP794453) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกับยางพารา และพบว่าบริเวณ ITS1 ของยางพารามีขนาดเท่ากับ 226 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับ Wang et al. (2015) ที่ระบุว่าบริเวณ ITS1 ในพืชมีขนาด 100-681 คู่เบส ซึ่งบริเวณ ITS1 ของยางพารา มีขนาดใกล้เคียงกับ มะเดื่อ (*F. carica* L.) ที่มีขนาดเท่ากับ 200-279 คู่เบส โดยมะเดื่อสายพันธุ์ Zidi, Besbessi2, Besbessi1, Bidhi1, Delgane, Bither abiadh, Bidhi2, Soltani, Bidh beghal, Hemri, Besbessi3 และ Jrani มีขนาดเท่ากับ 200, 251, 252, 252, 253, 254, 254, 258, 258, 259, 278 และ 279 คู่เบส ตามลำดับ (Ghada et al., 2009) แต่ ITS1 ของยางพารามีขนาดยาวกว่า เร่วดง (*A. villosum*) ที่มีขนาดเท่ากับ 178 คู่เบส (Qiao et al., 2009) เครื่องยาเร่วน้อย (*A. uliginosum*) ที่มีขนาดเท่ากับ 180 คู่เบส (ประสพอร รินทอง และคณะ, 2557) และเร่วใหญ่ (*A. mutica*) ที่มีขนาดเท่ากับ 184 คู่เบส (ประสพอร รินทอง และคณะ, 2556) และยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์มีลำดับเบสแตกต่างกัน 2 ตำแหน่ง (0.88%) แสดงว่าบริเวณ ITS1 ระหว่างสายพันธุ์ของยางพารามีความแปรปรวนต่ำ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมในช่วง 0-0.005 นอกจากนี้ ในรายงานวิจัยที่ผ่านมาของลักษณะ ชัยประสิทธิ์ และชูตา บุญภักดี (2557) ที่ศึกษาบางส่วน of บริเวณ ITS1 ที่มีขนาดประมาณ 60 คู่เบส ร่วมกับไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 5.8S และบางส่วน of บริเวณ ITS2 (ระหว่าง 5.8S และ 28S) รวมมีขนาดทั้งสิ้น 382 คู่เบส พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของยางพาราเพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้น ซึ่งไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ยางพาราได้ ในขณะที่ Ghada et al. (2009) ได้ศึกษาบริเวณ ITS1 ในมะเดื่อจำนวน 12 สายพันธุ์ พบว่าสามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ในมะเดื่อได้ บริเวณ ITS1 ของ

ยางพารามีความแปรปรวนต่ำ ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกันภายในชนิดเดียวกัน ดังนั้นจึงคาดว่าจะสามารถนำบริเวณ ITS1 มาใช้ระบุเอกลักษณ์ในระดับชนิดของยางพาราได้ สอดคล้องกับ Wang et al. (2015) ที่ระบุว่า บริเวณ ITS1 มีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดพืชได้ดี เช่นสามารถจำแนกชนิดของเครื่องยาเร่วน้อย (*A. uliginosum*) (ประสพอร รินทอง และคณะ, 2557) เร่วแดง (*A. villosum*) (Qiao et al., 2009) และเร่วใหญ่ (*A. mutica*) (ประสพอร รินทอง และคณะ, 2556) หรือใช้บริเวณ ITS1 ร่วมกับยีน *matK* เพื่อใช้จำแนกความแตกต่างระหว่าง *H. perforatum* และ *H. androsaemum* (Costa et al., 2016) ได้ เป็นต้น

บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ *trnF* และ *trnP* ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพารา (GenBank accession no. AP014526.1) ที่จำเพาะในบริเวณยีน *tRNA^{Phe}* และ *tRNA^{Pro}* ที่ขนานข้างบริเวณ non-coding เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ส่งอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ของยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 345 คู่เบส เมื่อนำมาเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank ของยางพารา (accession no. AP014526.1) พบว่า บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพารามีขนาดเท่ากับ 256 คู่เบส และยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์มีลำดับเบสแตกต่างกัน 1 ตำแหน่ง (0.39%) มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมในช่วง 0-0.004 แสดงว่าบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ของยางพารามีความแปรปรวนต่ำ อาจเนื่องจากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในพืชมีวิวัฒนาการช้า (Mustapha et al., 2015; Asaf et al., 2016) โดยยางพาราสายพันธุ์ BPM24 มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมจากยางพาราสายพันธุ์อื่น ๆ เท่ากับ 0.004 เนื่องจากมีแม่พันธุ์ คือ GT1 และพ่อพันธุ์ คือ AVROS1734 มาจากประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งต่างจากสายพันธุ์อื่น และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับพืชในวงศ์เดียวกัน คือมันสำปะหลัง และละหุ่ง มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำอยู่ในช่วง 0.056-0.088 และพืชต่างวงศ์ คือ ถั่วเขียว ถั่วแขก และองุ่นแดง พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำอยู่ในช่วง 0.051-0.116 แสดงให้เห็นว่าบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของพืชมีความแปรปรวนต่ำ น่าจะเหมาะสมนำมาใช้ระบุเอกลักษณ์ในระดับชนิดของพืชได้

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่มีความแปรปรวนต่ำ ไม่สัมพันธ์กับลักษณะสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ ซึ่งถูกนำไปใช้จัดกลุ่มพันธุ์ยางพารา โดยสถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย ที่จัดยางพาราสายพันธุ์ RRIT226, RRIT 251, RRIT408, BPM24, SONGKRA36 และ BANGPID เป็นกลุ่มที่ให้ผลผลิตน้ำยางสูง และจัดสายพันธุ์ PB235, PB255 และ PB260 เป็นกลุ่มที่ให้ผลผลิตน้ำยางและ

เนื้อไม้สูง และแยกสายพันธุ์ RRIT402 ไว้ในกลุ่มที่ให้ผลผลิตเนื้อไม้สูง ลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) ที่แสดงออกของยางพารา อาจถูกควบคุมด้วยยีนอื่น ๆ รวมถึงมีปัจจัยภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น สภาพดินฟ้าอากาศ ภูมิประเทศ และปริมาณน้ำ ที่ส่งผลต่อลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นลักษณะดังกล่าว จะไม่ได้รับอิทธิพลจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอในยางพารา

สรุปผลการวิจัย

บริเวณ ITS1 ของยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์มีขนาดเท่ากันคือ 226 คู่เบส มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 2 ตำแหน่ง (0.88%) และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากันคือ 256 คู่เบส มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 1 ตำแหน่ง (0.39%) แสดงว่าบริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพารามีความแปรปรวนต่ำ ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุเอกลักษณ์ในระดับสายพันธุ์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรพิจารณาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นเช่น ยีน *matK*, *rbcL* และบริเวณ *trnH-psbA* สำหรับการบ่งชี้ในระดับสายพันธุ์

บรรณานุกรม

- กรรณิการ์ วีระวัฒน์สุข. (2556). พฤกษศาสตร์และพันธุ์ยาง. การจัดการสวนยางอย่างยั่งยืน (1-25). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- นภาพรรณ เลขะวิวัฒน์. (2551). การตรวจสอบพันธุ์ยางด้วยวิธีการทางวิทยาศาสตร์. วารสารยางพารา, 29(3), 30-39.
- ประสพอร รินทอง, ภัทรพล เพ็ชรชนะ และวนิดา ไทรชมภู. (2556). การศึกษาแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเร่วใหญ่โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacer 1. ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ, 8(3), 93-97.
- ประสพอร รินทอง, วชิรินทร์ พากวิพัทธ์, ปิณฑนา เลิศสถิตธนกร และวนิดา ไทรชมภู. (2557). การตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาเร่วน้อย (*Amomum uliginosum* K.D.Koenig) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ตำแหน่ง ITS1 ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ. เภสัชศาสตร์อีสาน, 10(1), 32-41.
- ลักษณะ ชัยประสิทธิ์ และชุตตา บุญภักดี. (2557). ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacer ของยางพารา. ใน รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6, 166-169.
- ศานิต สวัสดิกาญจน์. (2557). พืชอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย. (2559). คำแนะนำพันธุ์ยาง ปี 2559. วารสารยางพารา, 37(2), 2-41.
- สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. (2548). สารานุกรม อณูพันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2560). ยางพารา. วารสารเศรษฐกิจการเกษตร, 63(723), 31-33.
- สุชาดา สุขหรั่ง. (2553). ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- สุนิดา อัญจิรวโรจน์, อัจฉริยา รังษิรุจิ และธวัช ดอนสกุล. (2551). คาร์โบไฮเดรตและชีววิทยา ระดับโมเลกุลของมะขามหวาน (พืชสกุลมะขาม) ในจังหวัดเพชรบูรณ์. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*, 24(1), 183-198.
- อนุรักษ์ โปธิ์เยี่ยม, สุพัตรา โปธิ์เยี่ยม และทัศนารถ กระจ่างวุฒิ. (2556). ใน *รายงานการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18*, 214-217.
- Asaf, S., Khan, A. L., Khan, A. R., Waqas, M., Kang, S- M., Khan, M. A., Shahzad, R., Seo, C- W., Shin, J- H., & Lee, I- J. (2016). Mitochondrial genome analysis of wild rice (*Oryza minuta*) and its comparison with other related species. *Public Library of Science ONE*, 11(4), 1-14.
- Burger, G., Gray, M. W., & Lang, B. F. (2003). Mitochondrial genomes: Anything goes. *Trends in Genetics*, 19(12), 709-176.
- China Plant BOL Group., Li, D- Z., Gao, L- M., Li, H- T., Wang, H., Ge, X- J., Liu, J- Q., Chen, Z- D., Zhou, S- L., Chen, S- L., Yang, J- B., Fu, C- X., Zeng, C- X., Yan, H- F., Zhu, Y- Z., Sun, Y- S., Chen, S- Y., Zhao, L., Wang, K., Yang, T., & Duan, G-W. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19641-19646.
- Clifton, S. W., Minx, P., Fauron, C. M., Gibson, M., Allen, J. O., Sun, H., Thompson, M., Barbazuk, W. B., Kanuganti, S., Tayloe, C., Meyer, L., Wilson, R. K., & Newton, K. J. (2016). Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiology*, 136, 3486-3503.
- Costa, J., Campos, B., Amaral, J. S., Nunes, M. E., Oliveira, M. B., & Mafra, I. (2016). HRM analysis targeting ITS1 and *matK* loci as potential DNA mini-barcodes for the authentication of *Hypericum perforatum* and *Hypericum androsaemum* in herbal infusions. *Food Control*, 61, 105-114.
- Dong, L- N., Wortley, A. H., Wang, H., Li, D- Z., & Lu, L. (2011). Efficiency of DNA barcodes for species delimitation: A case in *Pterygiella* Oliv.(Orobanchaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3), 189-202.

- Du, Z- Y., Qimike, A., Yang, C- F., Chen, J- M., & Wang, Q- F. (2011), Testing four barcoding markers for species identification of Potamogetonaceae. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3), 246-251.
- Fazekas, A. J., Kuzmima, M. L., Newmaster, S. G., & Hollongsworth, P. M. (2012). DNA barcoding methods for land plants. In W. J. Kress, & D. L. Erickson, (Eds.). *DNA barcodes: Methods and protocols* (223-252). Human Press: NewYork.
- Ghada, B., Olfa, S., Khaled, C., Messaoud, M., Mohamed, M., Mokhtar, T., & Amel, S. H. (2009). Sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in fig cultivars (*Ficus carica* L.) *Scientia Horticulturae*, 120, 34-40.
- Kersten, B., Rampant, P. F., Mader, M., Paslier, M- C., Bounon, R., Berard, A., Vettori, C., Schroeder, H., Leple, J- C., & Fladung, M. (2016). Genome sequence of *Populus Tremula* chloroplast and mitochondrial: Implications for holistic poplar breeding. *Public Library of Science ONE*, 11(1), 1-21.
- Kim, B., Kim, K., Yang, T- J., & Kim, S. (2016). Completion of the mitochondrial genome sequence of onion (*Allium cepa* L.) containing the CMS-S male-sterile cytoplasm and identification of an independent event of the *ccmF_N* gene split. *Current Genetic*, 62(4), 873-885.
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007), A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *Public Library of Science ONE*, 2(6), 1-10.
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (Eds.). (2012). *DNA barcodes: Methods and protocols*, Human Press, NewYork.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8369-8374.
- Li, M., Cao, H., But, P. P., & Shaw, P- C. (2011). Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3), 271-283.

- Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., & Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Review*, *90*, 157-166.
- Liu, G., Cao, D., Li, S., Su, A., Geng, J., Grover, C. E., Hu, S., & Hua, J. (2013). The complete mitochondrial genome of *Gossypium hirsutum* and evolutionary analysis of higher plant mitochondrial genomes. *Public Library of Science ONE*, *8*(8), 1-14.
- Liu, J., Shi, L., Han, J., Li, G., Lu, H., Hou, J., Zhou, X., Meng, F., & Downies, S. R. (2014). Identification of species in the angiosperm family Apiaceae using DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, *14*, 1231-1238.
- Mustapha, S. B., Tamarzizt, H. B., Baraket, G., Abdallah, D., & Hannachi, A. S. (2015). Genetic diversity and differentiation in *Prunus* species (Rosaceae) using chloroplast and mitochondrial DNA CAPS markers. *Genetic and Molecular Research*, *14*(2), 4177-4188.
- Pereira, F., Carneiro, J., & Asch, B. (2010). A guide for mitochondrial DNA analysis in non-human forensic investigations. *The Open Forensic Science Journal*, *3*, 33-44.
- Qiao, C- F., Han, Q- B., Zhao, Z- L., Wang, Z- T., Xu, L- S., & Xu, H- X. (2009), Sequence analysis based on ITS1 region of nuclear ribosomal DNA of *Amomum villosum* and ten species of *Alpinia*. *Journal of Food and Drug Analysis*, *17*(2), 142-145.
- Shearman, J. R., Sangsrakru, D., Ruang-areerate, P., Sonthirod, C., Uthapaisanwong, P., Yoocha, T., Poopear, S., Theerawattanasuk, K., Tragoonrung, S., & Tangphatsornruang, S. (2014). Assembly and analysis of a male sterile rubber tree mitochondrial genome reveals DNA rearrangement events and a novel transcript. *Biology Medicine Central Plant Biology*, 1-11.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725-2729.

- The Legume Phylogeny Working Group, Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A. R., Pinto, R. B., Boatwright, J. S., Borges, L. M., Brown, G. K., Bruneau, A., Candido, E., Cardoso, D., Chung, K- F., Clark, R. P., Conceicao, A. S., Crisp, M., Cubas, P., Delgado-Salinas, A., Dexter, K. G., Doyle, J. J., Duminil, J., Egan, A. N., Estrella, M., Falcao, M. J., Filatov, D. A., Fortuna-Perez, A. P., Fortunato, R. H., Gagnon, E., Gasson, P., Rando, J. G., Tozzi, G. A., Gunn, B., Harris, D., Haston, E., Hawkins, J. A., Herendeen, P. S., Hughes, C. E., Iganci, J. R., Javadi, F., Kanu, S. A., Dazempour-Osaloo, S., Kite, G. C., Klitgaard, B. B., Kochanovski, F. J., Koenen, E. J., Kovar, L., Lavin, M., Roux, M., Lewis, G. P., Lima, H. C., Lopez-Roberts, M. C., Mackinder, B., Maia, V. H., Malecot, Valery., Mansano, V. F., Marazzi, B., Mattapha, S., Miller, J. T., Mitsuyuki, C., Moura, T., Murphy, D. J., Nageswara- Rao, M., Nevado, B., Neves, D., Ojeda, D. I., Pennington, R. T., Prado, D. E., Prenner, G., Queiroz, L. P., Ramos, G., Filardi, F. L., Ribeiro, P. G., Rico- Arce, M. L., Sanderson, M. J., Santos- Silva, J., Sao- Mateus, W. M., Silva, M. J., Simon, M. F., Sinou, C., Snak, C., Souza, E. R., Sprent, J., Streele, K. P., Steier, J. E., Steeves, R., Stirton, C. H., Tagane, S., Torke, B. M., Toyama, H., Cruz, D. T., Vatanparast, M., Wieringa, J. J., Wink, M., Wojciechowski, M. F., Yahara, T., Yi, T., & Zimmerman, E. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66(1), 44-77.
- Vijayan, K., & Tsou, C. H. (2010). DNA barcoding in plants: Taxonomy in a new perspective. *Current Science*, 99 (11), 1530-1541.
- Wang, X- C., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J- H., Cai, D., & Li, J- Q. (2015). ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Molecular Ecology Resources*, 15, 573-586.
- Xiang, X- G., Zhang, J- B., Lu, A- M., & Li, R- Q. (2011). Molecular identification of species in Juglandaceae: A tired method. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3), 252-260.

Zhang, T., Fang, Y., Wang, X., Deng, X., Zhang, X., Hu, S., & Yu, J. (2012).

The complete chloroplast and mitochondrial genome sequences of *Boea hygrometrica*: Insights into the evolution of plant organellar genomes.

Public Library of Science ONE, 7(1), 1-13.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สารเคมีและวิธีการเตรียม

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA plus)

เตรียมปริมาณ 50 µg 100 reaction

Stock 100 bp DNA ladder plus (0.5 µg/µl) 50 µl

TE buffer 200 µl

6X Orange DNA loading dye 20 µl

6X DNA loading dye 30 µl

2. 1X SB buffer (เตรียมสารละลายปริมาตร 1,000 ml)

NaOH 8 g

Boric acid 45 g

น้ำกลั่น 1,000 ml