115. การสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมยางพารา การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ยางแนะนำ และพันธุ์ยางจากแหล่งกำเนิดเดิมโดยเทคนิค microsatellite และ RAPD

DNA Fingerprint of Hevea Wickham and Amazonian clones using Microsatellite and RAPD

นภาวรรณ เลขะวิพัฒน์ *กัลยา ประพาน กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข*

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ยางแนะนำและพันธุ์ยางจากแหล่งกำเนิดเดิม โดยเทคนิค microsatellite และ RAPD มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการนำเอาเครื่องหมายโมเลกุล microsatellite และ RAPD ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพันธุ์ปลูก พันธุ์ยางแนะนำ และพันธุ์ยางจากแหล่งกำเนิดเดิม ทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอยางพันธุ์ปลูกและพันธุ์ยางแนะนำของสถาบันวิจัยยางจำนวน 50 สายพันธุ์ และพันธุ์ยางจากแหล่งกำเนิดเดิมจำนวน 200 สายพันธุ์ สกัดดีเอ็นเอยางจากใบอ่อนโดยวิธี CTAB modified method เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล microsatellite จำนวน 40 คู่ไพร์เมอร์ และ RAPD จำนวน 20 ไพร์เมอร์ ตรวจสอบและวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย microsatellite บน 5% acrylamide gel ย้อมสีด้วยวิธี silver staining ตรวจสอบและวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย RAPD บน agarose gel ย้อมสีด้วย ethidium bromide ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย microsatellites พบว่ามี 4 คู่ไพร์เมอร์ คือ Mt67, M616, M622 และ M273 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มี 6 คู่ไพร์เมอร์ คือ Ma31, Ma66, Ma17, M291, Ma212 และ Ma214 ที่เมื่อนำมาทำ PCR ในพันธุ์ยางจากแหล่งกำเนิดเดิมพบแถบดีเอ็นเอที่ซับซ้อน ไม่สามารถอ่านค่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยตาเปล่าได้ microsatellite ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ Ma179 โดยให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน 15 แถบในพันธุ์ยางปลูก และ 31 แถบในพันธุ์ยางจากแหล่งกำเนิดเดิม microsatellite M264 ให้แถบดีเอ็นเอต่ำที่สุดจำนวน 2 แถบและเป็น monomorphic ในพันธุ์ยางปลูก จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สรุปได้ว่าในพันธุ์ยางจากแหล่งกำเนิดเดิมมีจำนวนแถบดีเอ็นเอและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้มากกว่าพันธุ์ยางปลูก เมื่อนำข้อมูลจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย microsatellite ไปสร้างแผนภูมิความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (dendrogram) สามารถจัดกลุ่มพันธุ์ยางปลูกออกได้เป็น 3 กลุ่ม และจัดพันธุ์ยางจากแหล่งกำเนิดเดิมได้เป็น 4 กลุ่ม ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของยางพันธุ์ปลูกและพันธุ์ยางแนะนำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD จำนวน 18 ไพร์เมอร์ พบว่าแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่ของยางพันธุ์ปลูกที่ปรากฏบน agarose gel มีความแตกต่างกันน้อย ไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของพันธุ์ยางปลูก และข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่เพียงพอที่จะนำมาจัดทำเป็น dendrogram เช่นกัน

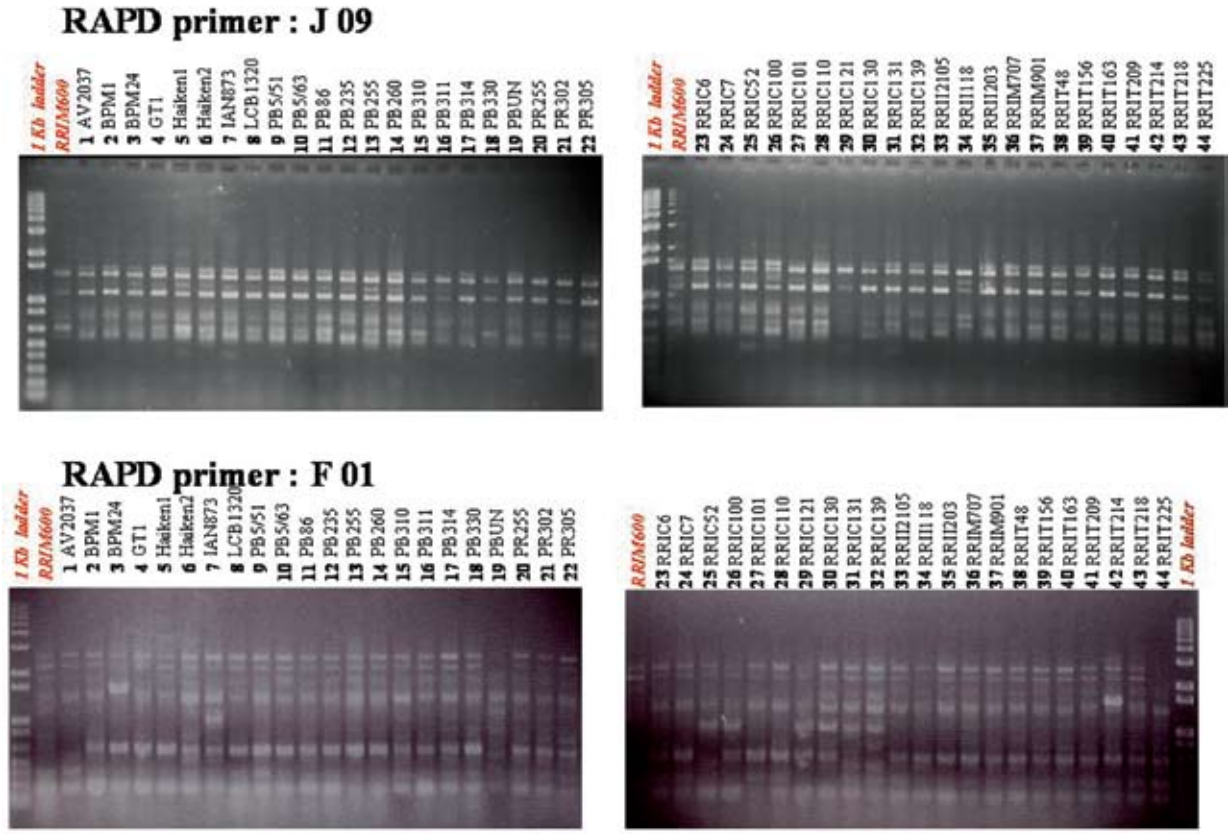
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากการศึกษาการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทิลไลต์ กับพันธุ์ยางปลูกและพันธุ์ยาง จากแหล่งกำเนิดเดิมได้มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่างๆ ดังนี้

1. จัดทำฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพารา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการอ้างอิง เพื่อเมื่อมีการตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ยาง

2. การตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ยางของเรือนเพาะชำยาง ที่เข้าร่วมโครงการ “การปลูกยางเพื่อยกระดับรายได้และความมั่นคงให้แก่เกษตรกรในพื้นที่ปลูกยางใหม่ ระยะที่ 1” โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ยางชำถุงของเรือนเพาะชำ ที่เข้าร่วมโครงการฯ ว่าเป็นพันธุ์ยางชั้น 1 ถูกต้องตามคำแนะนำของสถาบันวิจัยยาง ซึ่งได้ดำเนินงาน โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างใบยางจากเรือนเพาะชำที่เข้าร่วมโครงการฯนำมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย microsatellite M574 M425 และ MnSOD และตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติ สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ควบคู่กับการตรวจด้วยเครื่องหมายสัณฐานวิทยา ว่ายางชำถุงที่เกษตรกรได้รับเป็นพันธุ์ยางที่ถูกต้องตามข้อกำหนด

3. การตรวจพันธุ์ยางที่ไม่ทราบแหล่งที่มา เนื่องจากมีเกษตรกรสงสัยว่ายางชำถุงที่ซื้อจากเรือนเพาะชำในพื้นที่ทางภาคใต้ อ้างว่าเป็นพันธุ์ที่มียอดสีคล้ำและให้ผลผลิตน้ำยางสูง จึงได้นำเอายางชำถุงที่ถูกกล่าวอ้างว่าเป็นพันธุ์ดังกล่าวจากแหล่งต่างๆ ได้แก่จังหวัดกระบี่ 3 ตัวอย่าง จังหวัดตรัง 2 ตัวอย่าง และนครศรีธรรมราช 1 ตัวอย่าง มาตรวจสอบ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบว่าพันธุ์ยางดังกล่าวเป็นพันธุ์ RRIM600 หรือไม่ดำเนินงานโดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของยางชำถุง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย microsatellite M574 M425 และ MnSOD และตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ผลการวิเคราะห์พบว่าแถบดีเอ็นที่ได้ของพันธุ์ยางชำถุงจากทุกเรือนเพาะชำไม่แตกต่าง กับแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ RRIM600 จากแปลงกิ่งตาศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา จากผลดังกล่าวทำให้สันนิษฐานได้ว่าพันธุ์ยางที่เก็บมานั้นอาจเป็น RRIM600 แต่มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างออกไป (มีลักษณะทรงต้นคล้ายพันธุ์ RRIM600 แต่มียอดสีคล้ำกว่า และให้ผลผลิตน้ำยางสูงกว่าพันธุ์ RRIM600) ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของสภาพแวดล้อม เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของดิน การใส่ปุ๋ย และปริมาณน้ำฝน



ภาพแสดง ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ยางแนะนำ ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย RAPD primer J09 และ F01