

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองสิ้นสุด

ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

โครงการวิจัย : การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์

กิจกรรม : การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

ชื่อการทดลอง : การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา

Development of SNP Marker for *Hevea* Clonal Improvement

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา
Development of SNP Marker for *Hevea* Clonal Improvement

ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง จีราพร แก่นทรัพย์

กรรณิการ์ อีระวัฒนสุข¹ รัชณี รัตนวงศ์²

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย สามารถสร้างรายได้ให้เกษตรกรทั้งในรูปของน้ำยางและไม้ยาง การปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต้องใช้เวลาอันยาวนาน การนำเอาเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์เป็นการช่วยย่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง การวิจัยนี้ได้ค้นหาตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับของยีนในยางพารา 12 พันธุ์ ได้แก่ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 และ PB235 โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน 9 ยีนนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเบสแบบสลับรวม 90 ตำแหน่ง และได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบตำแหน่งสลับอย่างง่ายโดยใช้เทคนิค ASA พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ASA จำนวน 56 ตำแหน่ง ที่สามารถตรวจสอบผลการเกิดแถบดีเอ็นเอของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้ และได้สร้างแผนที่พันธุกรรมของยางพาราโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสลับ 13 ตำแหน่ง ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR 19 ตำแหน่ง และเครื่องหมาย μ -SSR 62 ตำแหน่ง วิเคราะห์ความเชื่อมโยงและตำแหน่งการวางตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้ประชากรลูกผสม 96 พบว่าสามารถวิเคราะห์การจัดกลุ่มความเชื่อมโยงได้ทั้งหมด 18 กลุ่ม ซึ่งตรงกับจำนวนชุดจีโนมของยางพารา การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับที่พบจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา และนำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้

^{1/} ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา อ.สนามชัยเขต จ.ฉะเชิงเทรา

^{2/} ศูนย์วิจัยยางหนองคาย อ.โพนพิสัย จ.หนองคาย

Abstract

The Para rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) is an economically important plant of Thailand for its latex and wood. Breeding of this species takes time. Using molecular marker condenses timelines in the breeding. This study was to discover genetic variation by using single nucleotide polymorphism (SNP) in 12 rubber tree clones, RRIM600, PB217, Chachoengsao 50 (CH50), RRIT251, PB260, RRIC110, RRII118, RII105, RRIT226, BPM24, PB255 and PB235. DNA fragment of 9 genes were amplified and sequencing analyzed. Found that there are total 90 different SNPs. We have developed the simple method to detect SNP by using Allele Specific Amplification (ASA) technique, that we could design 56 PCR primers for ASA technique to determine these clones. We have created genetic map of rubber tree by using 13 SNPs, 19 EST-SSR markers and 62 g-SSR markers to analyze the linkage of DNA marker in 96 hybrid lines. Mapping analysis showed that there are 18 linkage groups in rubber tree genome. The SNPs discovered in this study were able to discriminate among these clones. Furthermore, they are useful in creating DNA fingerprint of the rubber tree and efficient for rubber tree breeding.

คำนำ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่ให้ผลตอบแทนสูงทั้งในรูปของน้ำยาง และเนื้อไม้ ซึ่งมีการปลูกมากในภาคใต้ และภาคตะวันออก ปัจจุบันพื้นที่ปลูกยางพาราได้ขยายไปในภาคอีสาน และภาคเหนือ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความเหมาะสมในการปลูกยางพาราน้อยกว่าภาคใต้ของประเทศ ซึ่งจะส่งผลถึงปริมาณผลผลิตน้ำยางที่น้อยลงตามมา การปรับปรุงพันธุ์ยางเพื่อให้ได้ยางพันธุ์ดีที่มีผลผลิตสูง ทนทานต่อโรค และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เป็นสิ่งที่จำเป็นมากที่ต้องดำเนินการ ซึ่งกว่าจะได้พันธุ์ยางแต่ละพันธุ์นั้นต้องผ่านกระบวนการผสมพันธุ์และทดสอบพันธุ์ โดยต้องใช้เวลาจนถึง 20 ปี วิธีการช่วยลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้น้อยลงนั้นสามารถนำเอาเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ (Marker-assisted selection, MAS) เพื่อช่วยคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะที่ตรงกับความต้องการ โดยไม่จำเป็นต้องดูฟีโนไทป์ของต้นนั้น แต่ที่สำคัญคือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับคัดเลือกนั้น ต้องอยู่ใกล้กับยีนที่สนใจ ยิ่งอยู่ใกล้กับมากเท่าใด ประสิทธิภาพในการใช้เพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการก็ยิ่งสูง และมีความแม่นยำมากขึ้น หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งของยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นโดยตรง ถือได้ว่าเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด การเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้คัดเลือกพันธุ์นั้น มักจะเลือกจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่บนแผนที่จีโนมที่มีความละเอียดมาก (สุรินทร์, 2552) สำหรับในยางพารานั้นได้มี รายงานแผนที่จีโนมแล้ว แต่ข้อมูลของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ปรากฏบนโครโมโซมแต่ละแห่งนั้นยังมีความละเอียดน้อย ซึ่งจะส่งผลให้บางลักษณะของยีนที่แสดงออกมีความสัมพันธ์น้อยกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ หรือไม่มีความสัมพันธ์กันเลย ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอในยางพาราจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้แผนที่จีโนมที่มีความละเอียดสูง ที่สามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอไปใช้วิเคราะห์ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณที่สำคัญในยางพารา ได้แก่ ผลผลิต การเจริญเติบโต การ

ทนทานต่อโรค การทนต่อความแห้งแล้ง และอื่น ๆ เป็นต้น เครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP (Single Nucleotide Polymorphism) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นความแตกต่างของลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง ที่สามารถใช้จัดทำแผนที่จีโนมให้มีความละเอียดได้สูง เนื่องจากมีกระจายอยู่ทั่วจีโนม จากการศึกษา SNP ในจีโนมมนุษย์ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล dbSNPs สามารถพบ SNP ได้ทุก ๆ 300-500 เบสตลอด (สุรินทร์, 2552) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งบนส่วนที่เป็นยีนหรือส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในการสร้างโปรตีนให้มากขึ้นหรือน้อยลง เครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP สามารถเริ่มต้นพัฒนาจากลำดับเบส EST ของยุงพารา ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI โดยวิธีการตรวจสอบการเกิด SNP สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการหาลำดับเบส ดังนั้นการศึกษาค้างนี้เพื่อให้ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ของยุงพารา

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ยางพารา 12 พันธุ์พันธุ์ ได้แก่ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 PB235 และประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ RRIM600 และ PB217 จำนวน 96 สายพันธุ์ (ได้รับการสนับสนุนจาก คุณกรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข ศูนย์วิจัย ยางฉะเชิงเทรา จ.ฉะเชิงเทรา)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
3. เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (BioDrop)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน
5. ชุดถ่ายภาพเจลและประมวลผล Gel documentation
6. ชุดน้ำยาสารเคมีและเครื่องมือที่ใช้สำหรับงานวิจัยเครื่องหมายโมเลกุล
7. โปรแกรมสำหรับจัดทำแผนที่พันธุกรรม OneMap
8. ไพรมอร์ที่ใช้ประกอบการทำแผนที่ยีน ได้แก่ EST-SSR และ g-SSR ที่พัฒนาจากยางพารา (ประสาน และ คณะ 2553) และเครื่องหมายสลับที่พัฒนาได้จากการทดลองนี้
9. สารเคมี และเครื่องมือพื้นฐานต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับงานวิจัยเครื่องหมายโมเลกุล

วิธีการ

1. การค้นหาตำแหน่งการเกิดสลับ (SNP) ในยางพารา

1.1 การสืบค้นข้อมูลยีนของยางพารา และวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาตัวแทนลำดับเบส

สืบค้นข้อมูลยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI ของยีนยางพารา โดยการวิเคราะห์ Contig Assembly แล้วตัดส่วนของลำดับเบสที่เป็นของ Vector ออก โดยใช้ VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen>) และนำตัวแทนลำดับเบสที่ต้องการไปออกแบบไพรมอร์ โดยโปรแกรม Vector NTI (ชนิดระบุระยะเวลาการใช้งาน) และสังเคราะห์ไพรมอร์ เพื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบยางพาราพันธุ์

นำใบยางพารา 12 พันธุ์พันธุ์ ได้แก่ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 PB235 โดยนำใบมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด นำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป NucleoSpin Plant II (MACHERY-NAGEL) จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยแยกด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ และวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง BioDrop แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยางพาราด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และ PB 217 ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละชนิด ทำการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

1. 10X PCR Buffer	2	ไมโครลิตร
2. 10 mM dNTP	0.4	ไมโครลิตร
3. 50 mM MgCl ₂	0.6	ไมโครลิตร
4. 10 μM Forward Primer	1	ไมโครลิตร
5. 10 μM Reverse Primer	1	ไมโครลิตร
6. ดีเอ็นเอต้นแบบ (10 ng/ul)	5	ไมโครลิตร
7. 5 U/μl Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.2	ไมโครลิตร
8. เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ	20	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็น

94 °C 2 นาที	1 รอบ	
94 °C 1 นาที	} 35 รอบ	
55-60 °C 1 นาที		
72 °C 2 นาที		
72 °C 10 นาที	1 รอบ	

1.4 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ

ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ตรวจสอบโดยการย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ

1.5 การทำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ให้บริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอที่เหลือจากข้อ 1.4 ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด PCR Purification Kit สำหรับดีเอ็นเอมีเพียงชิ้นเดียว แต่กรณีที่ปรากฏดีเอ็นเอหลายชิ้นจะใช้ชุด Gel Extraction Kit หลังจากตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้อีกครั้งตามข้อ 1.4 และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง BioDrop เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์หาลำดับเบส

1.6 นำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ส่งหาลำดับเบส (DNA Sequencing Services; <http://base-asia.com>)

1.7 นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อค้นหารูปแบบการมีลำดับเบสที่แตกต่างกันแบบ SNP ระหว่างยาลพาราพันธุ์ RRIM 600 และ PB 217 เพื่อหาตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส SNP

1.8 เมื่อพบตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบ SNP ระหว่างยาลพารา 2 พันธุ์ในข้อ 1.7 ให้หาลำดับเบสกับยาลพารา 10 พันธุ์ ได้แก่ ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 และ PB235 โดยขั้นตอนการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.4-1.7

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบตำแหน่งสปีอย่างง่ายโดยใช้เทคนิค ASA (Allele Specific Amplification)

2.1 คัดเลือกตำแหน่งการเกิดสปีที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยอาศัยข้อมูลข้อ 1.8

2.2 ออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครอบคลุมตำแหน่งการเกิดสปีที่จะตรวจสอบด้วยเทคนิค ASA โดยใช้โปรแกรม BatchPrimer3 และสังเคราะห์ไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ต่อการตรวจสอบ 1 ตำแหน่ง

2.3 สกัดดีเอ็นเอจากยาลพารา 12 พันธุ์ ได้แก่ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 PB235 โดยใช้ชุดสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากพืช ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ โดยใช้ agarose gel electrophoresis และวัดค่าการดูดกลืนแสง ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.4

2.4 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยาลพาราพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยเทคนิค PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละชนิด ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.5

2.5 เปรียบเทียบรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตรวจสอบสปีโดยใช้เทคนิค ASA ในยาลพาราพันธุ์ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 PB235

3. การสร้างแผนที่พันธุกรรม

3.1 นำใบยาลพาราของประชากรลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ RRIM600 และ PB217 จำนวน 96 สายพันธุ์ มาสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบดีเอ็นเอ ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.2

3.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดีเอ็นเอของยาลพาราลูกผสม จำนวน 96 พันธุ์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละชนิดที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.5

3.3 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ตรวจสอบโดยการย้อมเจลดด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ

3.4 นำรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอของประชากรลูกผสมทั้งหมด 96 สายพันธุ์กับเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ที่ได้จากการตรวจสอบ มากำหนดรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ ตามตามข้อกำหนดของโปรแกรม OneMap (Wu *et al.*, 2002, Margarido *et al.*, 2007)

2.5 สร้างแผนที่พันธุกรรมของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR และ g-SSR ที่ดำเนินการไปแล้ว (ประสาน และคณะ 2553) นำมาวิเคราะห์ร่วมกันโดยใช้โปรแกรม OneMap (Margarido *et al.*, 2007) ซึ่งทำงานอยู่บนโปรแกรม R โดยกำหนดค่า LOD score เท่ากับ 5 ค่า recombination fraction ที่ 0.35 ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลใช้แบบ Kosambi function และเขียนแผนที่โดยใช้โปรแกรม MapChart 2.2

เวลาและสถานที่

- ระยะเวลาดำเนินการทดลอง ตุลาคม พ.ศ. 2553 – กันยายน พ.ศ.2558)
- สถานที่ดำเนินงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การค้นหาตำแหน่งการเกิดสลับ (SNP) ในยางพารา

จากการค้นหาข้อมูล EST ของยางพาราที่ รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI นำมาจัดเก็บไว้ในรูปแบบไฟล์ FASTA และจากการนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับโปรแกรม Blastn และทำการวิเคราะห์ Contig Assembly พบว่าได้กลุ่มของข้อมูล EST ที่มีลำดับเบสเหมือนกันทั้งเส้น หรือเหมือนกันบางส่วน ที่สามารถใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มข้อมูลแต่ละกลุ่มยีน และได้ตัดส่วนของ Vector ที่ปะปนอยู่ทางด้านปลาย 5' และ ปลาย 3' ออก และได้นำข้อมูลลำดับเบสไปออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 455 คู่ สำหรับใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของดีเอ็นเอในยางพารา พันธุ์ RRIM 600 และ PB217 เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ไปทำให้บริสุทธิ์ (purify) โดยการแยกชั้นดีเอ็นเอจากเจล และส่งหาลำดับเบส พบว่าผลการวิเคราะห์ลำดับเบสระหว่างยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ PB217 มีการปรากฏตำแหน่งของการเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับ (SNP) ระหว่างยางพาราทั้งสองพันธุ์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งลำดับเบสเหล่านี้จะใช้สำหรับการออกแบบไพรเมอร์เพื่อการตรวจสอบรูปแบบการเกิดการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอชนิด SNP ในยางพาราพันธุ์อื่น ๆ เช่นในพันธุ์ชะเชิงเทรา 50 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพิ่มเติมจากที่พบอยู่ในพันธุ์ RRIM600 และ PB217 นอกจากนี้พบว่าลำดับเบสของยีนเดียวกันในแต่ละพันธุ์ จะมีลำดับเบสที่แตกต่างกัน ในบางยีนพบการเปลี่ยนแปลงหลายตำแหน่ง แต่บางยีนก็ยังไม่พบตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามหากใช้พันธุ์ยางเพิ่มมากขึ้น อาจพบตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงเบสได้ ซึ่งรูปแบบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับพบทั้งในรูปแบบของ homozygous และ heterozygous จากผลของลำดับเบสที่ได้วิเคราะห์พบว่าบางยีน หรือบางไพรเมอร์นั้นการหาลำดับเบสสามารถทำได้ยาก เนื่องจากยีนนั้นมีลำดับเบสที่ประกอบ

ลำดับของดีเอ็นเอชนิดเบสซ้ำจำนวนหลายๆ เบส ติดต่อกัน จึงทำให้บางยีนไม่ได้ข้อมูลลำดับเบส หรือได้ข้อมูลยังไม่ครบถ้วน จึงได้คัดเลือกบางยีนสำหรับศึกษาในขั้นต่อไป

จากการค้นหาและวิเคราะห์ตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยางพารา ได้ไพรเมอร์ที่ผ่านการออกแบบให้ครอบคลุมตำแหน่งการเกิดสนิป พบว่าตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของแต่ละยีนดังนี้

1.1 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *DnaJ* (chaperone *DnaJ*; *Hsp40* (heat shock protein 40 kD)) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน Accession AF085275 ที่ความเหมือน 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น *DnaJ* protein mRNA ที่แสดงออกในน้ำยางของยางพารา clone pHvDnaJ-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย ethylene และเมื่อนำลำดับเบสของยางพาราพันธุ์อื่น ๆ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยีน *DnaJ* ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 10 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *DnaJ* (chaperone *DnaJ*; *Hsp40*) ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position									
	C174T	G189C	G198T	A303T	A392G	A423G	A444T	G502C	A628G	A752G
RRIM600	C/C	G/G	G/G	T/T	G/A	A/A	T/T	G/C	G/G	G/A
PB217	C/C	G/G	G/G	T/T	A/A	A/A	T/T	C/C	G/G	A/A
RRIT251	T/T	C/C	T/T	T/T	A/A	G/G	A/A	C/C	A/A	G/G
PB260	C/T	G/C	G/T	T/A	A/A	G/A	T/A	G/C	G/G	G/A
RRIC110	C/T	G/C	G/T	T/A	G/A	G/A	T/A	G/C	A/A	-
RRII118	C/T	G/C	G/T	T/A	G/A	G/A	T/A	G/C	A/A	G/A
RRII105	-	-	-	-	A/A	G/A	-	C/C	-	-
RRIT226	C/T	G/C	G/T	T/A	A/A	G/A	T/A	G/C	G/G	G/A
BPM24	C/T	G/C	G/T	T/A	A/A	G/A	T/A	G/C	G/G	-
PB225	T/T	-	-	T/T	A/A	G/A	-	C/C	A/A	-
CH50	-	-	-	-	A/A	G/G	-	C/C	-	-
PB235	C/C	-	-	T/T	A/A	-	-	C/C	A/A	-

1.2 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *Cyclophilin* ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน Accession HQ268021 ที่ความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น *cyclophilin* mRNA ที่แสดงออกในน้ำยางของยางพารา clone RY7-33-97 และเมื่อนำลำดับเบสของยางพาราทั้ง 12 พันธุ์ไปวิเคราะห์หาตำแหน่ง

ของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยีน Cyclophilin ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 2 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน Cyclophilin) ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position	
	C184T	A187G
RRIM600	C/T	G/A
PB217	C/C	G/G
RRIT251	C/C	G/A
PB260	C/T	G/A
RRIC110	C/C	G/G
RRII118	C/C	G/G
RRII105	C/C	G/G
RRIT226	C/C	G/G
BPM24	C/T	G/A
PB225	T/T	A/A
CH50	C/C	G/G
PB235	C/C	G/G

1.3 ซีนดีเอ็นเอของยีน CuZnSOD (*Cu/Zn superoxide dismutase*) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์ จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน Accession AF457209 ที่ความเหมือน 97 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นยีน Cu/Zn superoxide dismutase (*Cu/Zn-SOD*) mRNA ที่สัมพันธ์กับผลผลิตและสภาวะเครียดในยางพารา และเมื่อนำลำดับเบสของยางพาราทั้ง 12 พันธุ์ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยีน CuZnSOD ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 8 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *Cu/Zn superoxide dismutase* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	C220T	A384T	A745T	A1006T	G1170T	A1171T	G1199C	A1274C
RRIM600	C/C	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
PB217	T/T	T/T	A/A	A/A	G/G	T/T	G/T	A/A
RRIT251	C/T	T/A	T/T	A/A	G/T	T/A	G/C	C/C

PB260	C/C	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
RRIC110	C/C	T/A	T/T	A/A	G/T	T/A	G/C	C/A
RRII118	C/T	T/T	A/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
RRII105	C/T	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T	G/G	C/A
RRIT226	C/C	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
BPM24	C/T	T/T	A/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
PB255	C/T	T/T	A/T	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A
CH50	C/T	T/A	T/T	A/T	G/T	T/A	G/C	C/C
PB235	C/T	T/T	T/T	A/A	G/G	T/T	G/G	C/A

1.4 ซีนดีเอ็นเอของยีน CCR (*cinnamoyl-CoA reductase*) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จาก ยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน *cinnamoyl-CoA reductase* mRNA และเมื่อนำลำดับเบสของยางพารา 12 พันธุ์ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับในดีเอ็นเอของยีน CCR ได้ค้นพบ ตำแหน่งการเกิดสลับ 16 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับของยีน *cinnamoyl-CoA reductase* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	C132T	A231G	A275T	A1780G	A1750T	A1745T	G1710C	A1703G
RRIM600	T/T	G/G	C/C	A/A	T/T	A/A	G/G	G/G
PB217	T/T	G/G	C/C	A/A	T/T	A/T	C/G	A/G
RRIT251	C/T	G/A	C/C	A/G	A/T	A/T	C/G	A/A
PB260	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/G
RRIC110	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/A
RRII118	T/T	G/G	A/T	A/G	A/T	A/T	G/G	A/A
RRII105	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/A
RRIT226	T/T	G/G	T/T	A/A	T/T	A/T	C/G	A/G
BPM24	-	G/G	C/C	A/-	-	-	G/G	-
PB225	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/A
CH50	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/G
PB235	-	G/G	C/C	A/-	-	-	C/G	A/G

ตารางที่ 4 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *cinnamoyl-CoA reductase* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	C1639T	A1637G	A1609G	G1604T	A1600T	C1596T	A1581G	A1537T
RRIM600	C/C	A/A	A/A	G/G	G/G	T/T	A/A	T/T
PB217	C/C	A/A	A/G	G/T	A/G	C/T	A/A	A/T
RRIT251	C/C	A/A	G/G	G/T	A/G	C/T	A/A	A/A
PB260	C/C	-	A/-	G/T	A/G	-	-	-
RRIC110	C/T	-	G/G	T/T	A/A	-	-	-
RRII118	C/T	A/G	G/G	G/G	A/A	T/T	A/G	A/A
RRII105	C/C	-	G/G	T/T	A/A	-	-	-
RRIT226	C/C	A/A	A/G	G/T	A/G	C/T	A/A	A/T
BPM24	C/C	-	A/-	G/G	-	-	-	-
PB225	C/T	-	G/G	T/T	A/A	-	-	-
CH50	C/C	-	A/-	G/T	-	-	-	-
PB235	C/C	-	A/-	G/T	-	-	-	-

1.5 ซีนตีเอ็นเอของยีน *HMGR (hydroxymethylglutaryl coenzyme A)* ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน *hydroxymethylglutaryl coenzyme A mRNA* และเมื่อนำลำดับเบสของยางพารา 12 พันธุ์ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยีน *HMGR* ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 11 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *hydroxymethylglutaryl coenzyme A* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	A96G	A292G	G349C	A384C	C425T	C842G	A1325T	C1289T
RRIM600	A/G	A/G	C/G	A/C	C/T	C/G	A/T	C/T
PB217	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	C/G	A/A	C/C
RRIT251	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/T
PB260	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C

RRIC110	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
RRII118	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
RRII105	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
RRIT226	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
BPM24	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
PB225	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
CH50	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/C
PB235	A/A	G/G	C/C	A/A	T/T	-	-	C/T

1.6 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *FDP* (*farnesyl diphosphate synthase isoform*) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน *farnesyl diphosphate synthase isoform* mRNA และเมื่อนำลำดับเบสของยางพารา 12 พันธุ์ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับในดีเอ็นเอของยีน *FDP* ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสลับ 13 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับของยีน *farnesyl diphosphate synthase isoform* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	G997C	C1348T	A1474G	A1596G	A3344G	A3321T	A3323G	C3547T
RRIM600	C/C	C/C	A/G	A/A	A/A	A/A	G/G	T/T
PB217	C/G	C/T	A/A	A/G	A/G	A/A	G/G	T/T
RRIT251	C/G	C/C	A/A	A/G	A/G	A/A	A/G	C/T
PB260	C/C	C/C	A/A	A/G	-	-	-	-
RRIC110	C/G	C/T	A/A	A/G	-	-	-	-
RRII118	C/G	C/T	A/A	A/G	G/G	A/T	G/G	T/T
RRII105	C/C	C/C	A/A	A/A	A/A	-	-	-
RRIT226	C/C	C/C	A/G	A/A	A/A	A/A	G/G	T/T
BPM24	C/G	C/T	A/A	A/G	-	-	-	-
PB225	C/C	C/C	A/A	A/G	-	-	-	-
CH50	C/G	C/C	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	T/T
PB235	C/G	C/C	A/A	A/A	A/A	-	-	-

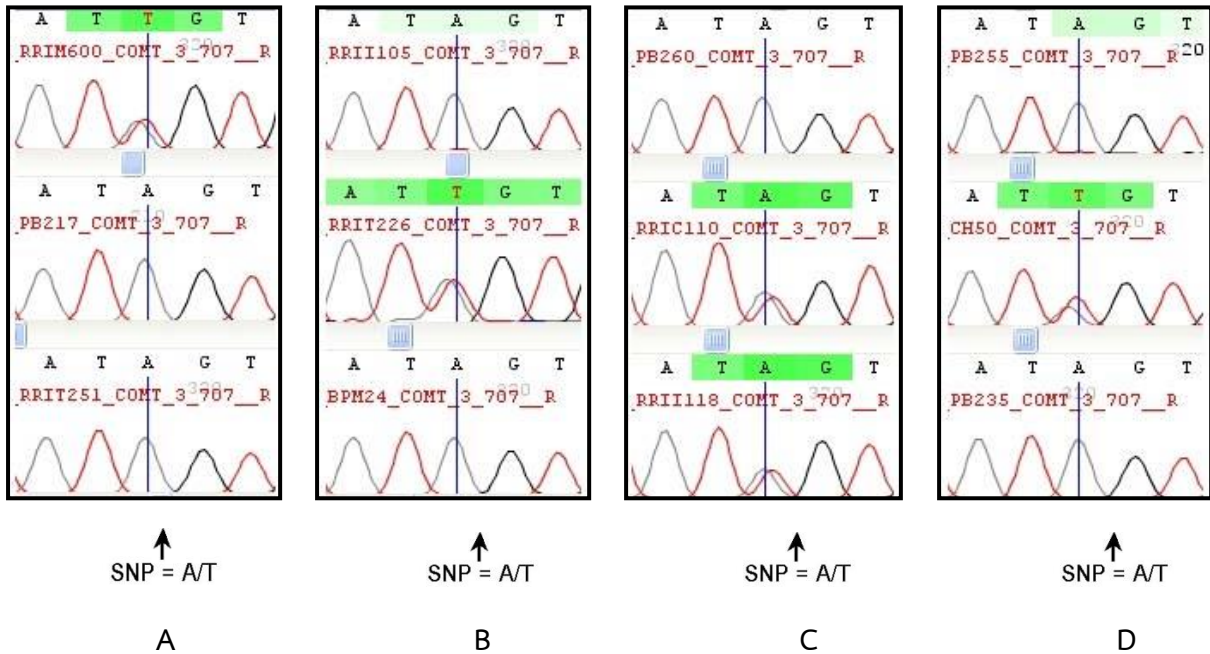
ตารางที่ 6 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *farnesyl diphosphate synthase isoform* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position				
	G3731T	A3752T	C4229T	A4415T	A4655G
RRIM600	G/T	T/T	T/T	A/A	G/G
PB217	G/G	A/T	C/T	A/T	A/G
RRIT251	G/G	A/T	C/T	A/A	A/G
PB260	G/G	-	T/T	A/A	A/G
RRIC110	G/T	-	C/T	A/T	A/G
RRII118	G/G	A/A	C/C	T/T	A/A
RRII105	G/G	-	C/T	A/A	G/G
RRIT226	G/T	T/T	T/T	A/A	A/G
BPM24	G/G	-	C/C	T/T	A/A
PB225	G/T	-	T/T	A/A	G/G
CH50	G/T	T/T	T/T	A/A	A/G
PB235	G/G	-	T/T	A/A	G/G

1.7 จีโนมของยีน *COMT* (*caffeic acid O-methyltransferase*) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์ จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจีโนม NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน *caffeic acid O-methyltransferase* mRNA และเมื่อนำลำดับเบส ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในจีโนมของยีน *COMT* ได้ค้นพบ การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *COMT* ที่เกิดกับยางพารา 12 พันธุ์ คือ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 และ PB235 เมื่อพิจารณา จากการเปรียบเทียบลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ COMT3-707 ในตำแหน่งที่ A302T จะพบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่มีลักษณะของเส้น chromatogram ปรากฏอยู่ 2 peaks ในตำแหน่งเดียวกัน แสดงว่าตำแหน่งนั้นมี genotype เป็น heterozygous แบบ A/T ที่พบได้ในยางพาราพันธุ์ RRIM600 RRIC110 RRII118 RRIT226 และ ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) ส่วนลักษณะของเส้น chromatogram ที่มี 1 peaks ในตำแหน่งเดียวกัน แสดงว่ามี genotype ที่เป็น homozygous แบบ A/A พบได้ในยางพาราพันธุ์ PB217 RRIT251 PB260 RII105 BPM24 PB255 และ PB235 จะเห็นว่าในตำแหน่งที่ A302T ไม่ปรากฏสนิป genotype ที่เป็น homozygous แบบ TT กับยางพาราทั้ง 12 พันธุ์ (ภาพที่ 1)

การเปรียบเทียบตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *COMT* กับยางพารา 12 พันธุ์ จากการใช้ไพรเมอร์ COMT3-707 COMT680-1297 และ COMT1296-1902 พบตำแหน่งที่เกิดสนิป จำนวน 15

ตำแหน่ง คือ C116T A239G A251G G272T A302T C340T C572T G590T A854T A856T C866T C1101T C1062G A1158G และ G1179C พบตำแหน่งที่มีลำดับเบสแตกต่างกันในยาร่างพาราแต่ละพันธุ์ มี genotype แบบ heterozygous คือ A/G A/T C/T และ G/C มี genotype แบบ homozygous คือ A/A C/C G/G และ T/T ดังแสดงในตารางที่ 7



ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *COMT* ในพันธุ์ยางพาราที่ตำแหน่ง A302T (A: RRIM600, PB217, RRIT251, B: RRII105, RRIT226, BPM24, C: PB260, RRIC110, RRII118, D: PB255, CH50, PB235)

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *caffeate O-methyl-transferase* ในพันธุ์ยางพารา

Varieties	SNP position							
	C136T	A264G	A276G	G297T	A327T	C366T	C601T	G619T
RRIM600	C/T	G/A	A/A	G/T	T/A	T/T	C/T	T/T
PB217	C/T	G/G	A/G	T/T	A/A	T/C	T/T	T/G
RRIT251	C/T	G/G	A/G	T/T	A/A	T/C	T/T	T/G
PB260	C/C	G/G	G/G	T/T	A/A	C/C	T/T	G/G
RRIC110	C/C	G/A	A/G	G/T	T/A	T/C	C/T	T/G
RRII118	C/C	G/A	A/G	G/T	T/A	T/C	C/T	T/G
RRII105	C/C	G/G	G/G	T/T	A/A	C/C	T/T	G/G
RRIT226	C/T	G/A	A/A	G/T	T/A	T/T	C/T	T/T
BPM24	C/T	G/G	A/G	T/T	A/A	T/C	T/T	T/G

PB225	C/C	G/G	A/A	T/T	A/A	C/C	T/T	G/G
CH50	C/C	G/A	A/G	G/T	T/A	T/C	C/T	T/G
PB235	C/C	G/G	G/G	T/T	A/A	C/C	T/T	G/G

ตารางที่ 7 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *caffeate O-methyl-transferase* ในพันธุ์
 ยางพารา

Varieties	SNP position							
	A905T	A907T	C917T	C1062T	G1113G	A1209G	G1233C	
RRIM600	A/A	A/A	C/C	C/C	C/G	A/A	G/G	
PB217	A/T	A/T	C/T	C/T	C/C	A/G	G/C	
RRIT251	A/T	A/T	C/T	C/T	C/C	A/G	G/C	
PB260	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	G/G	C/C	
RRIC110	A/A	A/A	C/T	C/T	C/G	A/A	C/C	
RRII118	A/T	A/T	C/T	C/T	C/G	A/G	G/C	
RRII105	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	-	C/C	
RRIT226	A/A	A/A	C/C	C/C	C/G	A/A	G/G	
BPM24	A/T	A/T	C/T	C/T	C/C	A/G	G/C	
PB225	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	G/G	C/C	
CH50	A/T	A/T	C/C	C/T	C/G	A/G	G/G	
PB235	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	G/G	C/C	

1.8 ซีนตีเอ็นเอของยีน *ETR1 (ethylene receptor)* ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลซีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับ *ethylene receptor* และเมื่อนำลำดับเบสของยางพารา 12 พันธุ์ ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในซีเอ็นเอของยีน *ETR1* ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 8 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน *caffeate O-methyl-transferase* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position							
	C287T	A553G	C699T	A719G	C754T	G833C	C976T	A1193T
RRIM600	C/T	A/A	C/T	A/A	C/T	G/C	C/T	A/T
PB217	C/C	A/G	C/C	A/G	T/T	G/G	T/T	A/A

RRIT251	C/C	A/A	C/C	A/G	T/T	G/G	T/T	A/A
PB260	C/C	A/G	C/C	A/A	T/T	G/G	T/T	A/A
RRIC110	C/T	A/G	C/T	A/A	C/T	G/C	C/T	A/T
RRII118	C/T	A/A	C/T	A/G	C/T	G/C	C/T	A/T
RRII105	C/T	A/A	C/T	A/A	C/T	G/C	C/T	A/T
RRIT226	C/C	A/G	C/C	A/A	T/T	G/G	T/T	A/A
BPM24	C/T	A/A	C/T	A/G	C/T	G/C	C/T	A/T
PB225	C/C	A/G	C/C	A/G	T/T	G/G	T/T	A/A
CH50	C/T	A/A	C/T	A/A	C/T	G/C	C/T	A/T
PB235	C/C	A/G	C/C	A/A	T/T	G/G	T/T	A/A

1.9 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *REF* (*rubber elongation factor*) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จาก ยางพารา เมื่อนำไปหาลำดับเบส และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ NCBI โดยวิธีการ nucleotide blast พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับ *rubber elongation factor* และเมื่อนำลำดับเบสของยางพารา 12 พันธุ์ ไป วิเคราะห์หาตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับในดีเอ็นเอของยีน *REF* ได้ค้นพบตำแหน่งการเกิดสลับ 15 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับของยีน *rubber elongation factor* ในพันธุ์ยางพารา

Clones	SNP position								
	C503T	G509T	A547G	C615T	A916T	C944T	C991T	C1072T	A1221T
RRIM600	T/T	T/T	G/G	C/T	T/T	T/T	C/T	C/T	A/T
PB217	C/T	G/T	A/G	C/T	A/T	C/T	T/T	C/C	A/A
RRIT251	T/T	G/T	G/G	C/T	T/T	T/T	C/T	C/T	A/T
PB260	T/T	G/T	G/G	C/T	T/T	T/T	C/T	C/T	A/T
RRIC110	C/T	T/T	A/G	C/T	A/T	C/T	T/T	C/C	A/A
RRII118	T/T	T/T	G/G	C/T	T/T	T/T	T/T	C/C	A/A
RRII105	T/T	T/T	G/G	C/T	T/T	T/T	T/T	C/C	A/A
RRIT226	T/T	G/T	G/G	C/T	T/T	T/T	C/T	C/T	A/T
BPM24	C/T	T/T	A/G	C/T	A/T	C/T	T/T	C/C	A/A
PB225	T/T	G/T	G/G	C/T	T/T	T/T	C/T	C/T	A/T
CH50	C/T	T/T	A/G	C/C	A/T	C/T	T/T	C/C	A/A
PB235	C/T	G/T	A/G	C/T	A/T	C/T	C/T	C/T	A/T

จะเห็นได้ว่าจำนวนอัลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปจะมีเพียง 1 ถึง 2 อัลลีลเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่มีจำนวนอัลลีลตั้งแต่ 1-16 อัลลีล (Mateescu *et al.*, 2005) เนื่องจากสนิปเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างของลำดับเบสเพียงหนึ่งเบสเท่านั้น genotype ที่เกิดขึ้นในแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีเพียง 2 รูปแบบ คือ homozygous (A/A C/C G/G T/T) และ heterozygous (A/G C/T G/C A/T G/T A/C) การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปมาใช้จึงต้องการเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ heterozygous genotype สูงสุด เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้แยกความแตกต่างของดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีนในยางพาราที่พบจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา โดยการนำไปทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งการเกิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของไม้ในยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ ต่อไป และสามารถนำรูปแบบการเกิดตำแหน่งสนิปของยีนที่ตรวจพบในยางพารา จำนวน 12 พันธุ์ นำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพารา เพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้ จากผลการทดลองของ Yameun and Boonphakdee (2013) ซึ่งได้จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพารา 10 พันธุ์ โดยใช้ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *caffeate O-methyl-transferase* นำมาเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *COMT* ด้วยเทคนิค PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด สามารถระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราได้จำนวน 7 พันธุ์ แต่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างยางพาราพันธุ์ PB235 PB255 และ PB260 ออกจากกันได้ ในขณะที่งานวิจัยครั้งนี้ได้พบตำแหน่งสนิปที่ A251G สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างยางพันธุ์ PB255 ที่ให้สนิปแบบ A/G ออกจากพันธุ์ PB235 และ PB260 ที่ให้สนิปแบบ G/G แม้ว่ายางพาราพันธุ์ PB235 และ PB260 ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้ด้วยตำแหน่งสนิปของยีน *COMT* ถ้าหากนำตำแหน่งของยีนอื่นมาตรวจสอบร่วมด้วยก็จะสามารถจำแนกความแตกต่างของพันธุ์ทั้งสองออกจากกันได้ เช่น ผู้วิจัยได้ทำการทดลองการตรวจสนิปของยีน *cyclophilin* ที่ในตำแหน่ง C91T สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ PB235 ที่มีสนิปแบบ C/C และ PB260 ที่มีสนิปแบบ C/T ดังนั้นการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปมาประยุกต์ใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพารานั้นควรเลือกใช้ตำแหน่งสนิปที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ และได้มาจากยีนหลาย ๆ ตำแหน่ง

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบตำแหน่งสนิปอย่างง่ายโดยใช้เทคนิค ASA (Allele Specific Amplification)

จากการค้นหาและวิเคราะห์ตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปในดีเอ็นเอของยางพารา ได้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค ASA เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของเทคนิค ASA และตรวจสอบผลการเกิดแถบดีเอ็นเอของยางพาราแต่ละพันธุ์ ได้ผลการทดลองดังนี้

2.1 ขึ้นดีเอ็นเอของยีน *DnaJ* (chaperone DnaJ; Hsp40 (heat shock protein 40 kD))

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 10 ตำแหน่ง ของชั้นดีเอ็นเอของยีน *DnaJ* และได้ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 10 ตำแหน่ง เพื่อใช้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิป พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 6 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ได้แก่

2.1.1 ตำแหน่งที่ 70 ใช้ไพรเมอร์ *DnaJ*_ASP70_T_F กับ *DnaJ*_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ T และ *DnaJ*_ASP70_C_F กับ *DnaJ*_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C และมีรูปแบบการเกิดสนิป ดังแสดงเป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค ASA ในภาพที่ 2

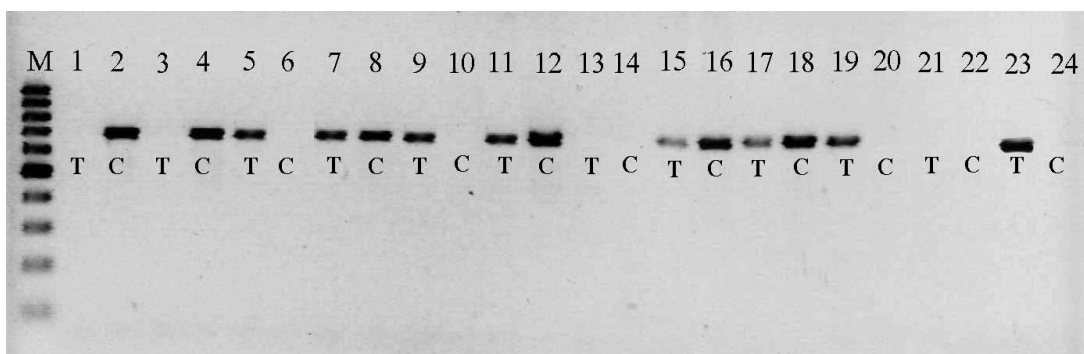
2.1.2 ตำแหน่งที่ 94 ใช้ไพรเมอร์ *DnaJ*_ASP94_G_F กับ *DnaJ*_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ G และ *DnaJ*_ASP94_T_F กับ *DnaJ*_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T

2.1.3 ตำแหน่งที่ 288 ใช้ไพรเมอร์ *DnaJ*_F กับ *DnaJ*_ASP288_G_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ G และ *DnaJ*_F กับ *DnaJ*_ASP288_A_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A

2.1.4 ตำแหน่งที่ 319 ใช้ไพรเมอร์ *DnaJ*_ASP319_G_F กับ *DnaJ*_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ G และ *DnaJ*_ASP319_A_F กับ *DnaJ*_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A

2.1.5 ตำแหน่งที่ 404 ใช้ไพรเมอร์ *DnaJ*_ASP404_G_F กับ *DnaJ*_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ G และ *DnaJ*_ASP404_C_F กับ *DnaJ*_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C

2.1.6 ตำแหน่งที่ 520 ใช้ไพรเมอร์ *DnaJ*_F กับ *DnaJ*_ASP520_G_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ G และ *DnaJ*_F กับ *DnaJ*_ASP520_A_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A



ภาพที่ 2 แสดงการตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิปในพันธุ์ยางพาราโดยใช้เทคนิค ASA ด้วยไพรเมอร์ *DnaJ*_ASP70_T_F และ *DnaJ*_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T และ *DnaJ*_ASP70_C_F และ *DnaJ*_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C โดยช่องที่ 1-2=RRIM600, 3-4= PB217, 5-6= RRIT251, 7-8= PB260, 9-10= RRIC110, 11-12= RRII118, 13-14= RRII105, 15-16= RRIT226, 17-18= BPM24, 19-20= PB225, 21-22= CH50, 23-24= PB235 และ M=100 bp. DNA Ladder

2.2 ซีนตีเอ็นเอของยีน *Cyclophilin*

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 2 ตำแหน่งของซีนตีเอ็นเอของยีน *Cyclophilin* และได้ ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 2 ตำแหน่ง ไม่พบไพรเมอร์ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วย เทคนิค ASA ในยางพารา

2.3 ซีนตีเอ็นเอของยีน *CuZnSOD (Cu/Zn superoxide dismutase)*

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 8 ตำแหน่งของซีนตีเอ็นเอของยีน *CuZnSOD* และได้ออกแบบ ไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 8 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 1 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการ เกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพารา ได้แก่

2.3.1 ตำแหน่งที่ 582 ใช้ไพรเมอร์ *CuZnSOD_ASP582_A_R* กับ *CuZnSOD_2F* ตรวจสอบการ เกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 498 คู่เบส และไพรเมอร์ *CuZnSOD_ASP582_T_F* กับ *CuZnSOD_2R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 230 คู่เบส

2.4 ซีนตีเอ็นเอของยีน *CCR (cinnamoyl-CoA reductase)*

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 16 ตำแหน่งของซีนตีเอ็นเอของยีน *CCR* และได้ออกแบบไพร เมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 11 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 6 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการ เกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพารา ได้แก่

2.4.1 ตำแหน่งที่ 189 ใช้ไพรเมอร์ *CCR_ASP189_G_F* กับ *CCR_ASP(1)_R* ตรวจสอบการเกิดส นิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 176 คู่เบส และไพรเมอร์ *CCR_ASP189_A_R* กับ *CCR_ASP(1)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 155 คู่เบส

2.4.2 ตำแหน่งที่ 233 ใช้ไพรเมอร์ *CCR_ASP233_A_F* กับ *CCR_ASP(1)_R* ตรวจสอบการเกิดส นิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 135 คู่เบส และไพรเมอร์ *CCR_ASP233_C_F* กับ *CCR_ASP(1)_R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 135 คู่เบส

2.4.3 ตำแหน่งที่ 110 ใช้ไพรเมอร์ *CCR_ASP110_G_F* กับ *CCR_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดส นิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 259 คู่เบส และไพรเมอร์ *CCR_ASP110_T_R* กับ *CCR_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 114 คู่เบส

2.4.4 ตำแหน่งที่ 145 ใช้ไพรเมอร์ *CCR_ASP145_T_F* กับ *CCR_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดส นิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 225 คู่เบส และไพรเมอร์ *CCR_ASP145_C_F* กับ *CCR_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 225 คู่เบส

2.4.5 ตำแหน่งที่ 209 ใช้ไพรเมอร์ *CCR_ASP209_G_F* กับ *CCR_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดส นิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 161 คู่เบส และไพรเมอร์ *CCR_ASP209_A_R* กับ *CCR_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 205 คู่เบส

2.4.6 ตำแหน่งที่ 216 ใช้ไพรเมอร์ CCR_ASP216_G_F กับ CCR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 156 คู่เบส และไพรเมอร์ CCR_ASP216_C_F กับ CCR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 156 คู่เบส

2.5 ซีนตีเอ็นเอของยีน *HMGR* (hydroxymethylglutaryl coenzyme A)

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสลิป 11 ตำแหน่งของซีนตีเอ็นเอของยีน *HMGR* และได้ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 9 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสลิปด้วยเทคนิค ASA ในยุงพารา จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้แก่

2.5.1 ตำแหน่งที่ 96 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP96_G_F กับ HMGR_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 438 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP96_A_F กับ HMGR_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 434 คู่เบส

2.5.2 ตำแหน่งที่ 292 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP292_G_F กับ HMGR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 484 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP292_A_F กับ HMGR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 488 คู่เบส

2.5.3 ตำแหน่งที่ 349 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP349_G_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 471 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP349_C_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 471 คู่เบส

2.5.4 ตำแหน่งที่ 384 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP384_A_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 445 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP384_C_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 445 คู่เบส

2.5.5 ตำแหน่งที่ 425 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP425_T_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 398 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP425_C_F กับ HMGR_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 397 คู่เบส

2.5.6 ตำแหน่งที่ 1289 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP1298_T_R กับ HMGR_ASP(6)_F ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 233 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP1289_C_R กับ HMGR_ASP(6)_F ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 233 คู่เบส

2.5.7 ตำแหน่งที่ 1549 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP1549_T_R กับ HMGR_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 277 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP1549_C_R กับ HMGR_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 276 คู่เบส

2.5.8 ตำแหน่งที่ 1720 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP1720_A_F กับ HMGR_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 91 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP1720_C_F กับ HMGR_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 96 คู่เบส

2.5.9 ตำแหน่งที่ 2461 ใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP2461_T_R กับ HMGR_ASP(8)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 336 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP2461_C_R กับ HMGR_ASP(8)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 336 คู่เบส

2.6 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *FDP (farnesyl diphosphate synthase isoform)*

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสปี 13 ตำแหน่งของชั้นดีเอ็นเอของยีน *FDP* และได้ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 15 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 8 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสปีด้วยเทคนิค ASA ในบางพารา ได้แก่

2.6.1 ตำแหน่งที่ 872 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP872_G_F กับ FDP_ASP_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 465 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP872_C_F กับ FDP_ASP_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 465 คู่เบส

2.6.2 ตำแหน่งที่ 1220 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP1220_T_F กับ FDP_ASP_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 109 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP1220_C_F กับ FDP_ASP_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 109 คู่เบส

2.6.3 ตำแหน่งที่ 1346 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP1346_G_F กับ FDP_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 100 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP1346_A_F กับ FDP_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 100 คู่เบส

2.6.4 ตำแหน่งที่ 1468 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP1468_G_R กับ FDP_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 265 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP1468_A_F กับ FDP_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 265 คู่เบส

2.6.5 ตำแหน่งที่ 3584 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP3584_G_R กับ FDP_ASP(4)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP3584_T_R กับ FDP_ASP(4)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 499 คู่เบส

2.6.6 ตำแหน่งที่ 4075 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP4075_T_R กับ FDP_ASP(5)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 112 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP4075_C_R กับ FDP_ASP(5)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 110 คู่เบส

2.6.7 ตำแหน่งที่ 4261 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP4261_A_R กับ FDP_ASP(5)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 309 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP4261_T_R กับ FDP_ASP(5)_F ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 296 คู่เบส

2.6.8 ตำแหน่งที่ 4500 ใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP4500_G_F กับ FDP_ASP(5)_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 199 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP4500_A_F กับ FDP_ASP(5)_R ตรวจสอบการเกิดสปีที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 203 คู่เบส

2.7 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *COMT* (*caffeic acid O-methyltransferase*)

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสลิป 15 ตำแหน่งของชั้นดีเอ็นเอของยีน *COMT* และได้ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 13 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 9 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสลิปด้วยเทคนิค ASA ในบางพารา ได้แก่

2.7.1 ตำแหน่งที่ 116 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP116_T_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 675 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP116_C_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 675 คู่เบส

2.7.2 ตำแหน่งที่ 251 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP251_G_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 540 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP251_A_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 540 คู่เบส

2.7.3 ตำแหน่งที่ 272 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP272_G_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 520 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP272_T_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 520 คู่เบส

2.7.4 ตำแหน่งที่ 302 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP302_A_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 493 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP302_T_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 493 คู่เบส

2.7.5 ตำแหน่งที่ 340 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP340_T_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 451 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP340_C_F* กับ *COMT_ASP_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 451 คู่เบส

2.7.6 ตำแหน่งที่ 572 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP572_T_R* กับ *COMT_ASP_F* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 542 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP572_C_R* กับ *COMT_ASP_F* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 542 คู่เบส

2.7.7 ตำแหน่งที่ 1011 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP1011_T_F* กับ *COMT_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 348 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP1011_C_F* กับ *COMT_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 347 คู่เบส

2.7.8 ตำแหน่งที่ 1062 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP1062_G_F* กับ *COMT_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 300 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP1062_C_F* กับ *COMT_ASP(2)_R* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 300 คู่เบส

2.7.9 ตำแหน่งที่ 1179 ใช้ไพรเมอร์ *COMT_ASP1179_G_R* กับ *COMT_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 562 คู่เบส และไพรเมอร์ *COMT_ASP1179_C_F* กับ *COMT_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสลิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 562 คู่เบส

2.8 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *ETR1* (ethylene receptor)

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 8 ตำแหน่งของชั้นดีเอ็นเอของยีน *ETR1* และได้ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 8 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 8 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพารา ได้แก่

2.8.1 ตำแหน่งที่ C287T ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP287_T_R* กับ *ETR1_ASP(1)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 301 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP287_C_R* กับ *ETR1_ASP(1)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 301 คู่เบส

2.8.2 ตำแหน่งที่ A553G ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP553_G_R* กับ *ETR1_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 454 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP553_A_R* กับ *ETR1_ASP(2)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 448 คู่เบส

2.8.3 ตำแหน่งที่ C699T ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP699_C_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 352 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP699_T_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 352 คู่เบส

2.8.4 ตำแหน่งที่ A719G ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP719_G_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 373 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP719_A_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 373 คู่เบส

2.8.5 ตำแหน่งที่ C754T ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP754_T_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 409 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP754_C_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 407 คู่เบส

2.8.6 ตำแหน่งที่ G833C ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP833_G_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 491 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP833_C_R* กับ *ETR1_ASP(3)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 489 คู่เบส

2.8.7 ตำแหน่งที่ C976T ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP976_T_R* กับ *ETR1_ASP(4)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 405 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP976_C_R* กับ *ETR1_ASP(4)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 401 คู่เบส

2.8.8 ตำแหน่งที่ A1193T ใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP1193_A_R* กับ *ETR1_ASP(5)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 463 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP1193_T_R* กับ *ETR1_ASP(5)_F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 461 คู่เบส

2.9 ชั้นดีเอ็นเอของยีน *REF* (rubber elongation factor)

ผลจากการค้นพบตำแหน่งการเกิดสนิป 9 ตำแหน่งของชั้นดีเอ็นเอของยีน *REF* สามารถออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้เทคนิค ASA ได้ จำนวน 9 ตำแหน่ง และพบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 9 ตำแหน่ง ที่สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพารา ได้แก่

2.9.1 ตำแหน่งที่ C397T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP397_T_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 269 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP397_C_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 269 คู่เบส

2.9.2 ตำแหน่งที่ G403T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP403_G_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 263 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP403_T_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 263 คู่เบส

2.9.3 ตำแหน่งที่ A441G ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP441_G_R กับ REF_ASP(1)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 329 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP441_A_R กับ REF_ASP(1)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 329 คู่เบส

2.9.4 ตำแหน่งที่ C504T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP504_T_R กับ REF_ASP(1)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 392 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP504_C_R กับ REF_ASP(1)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 392 คู่เบส

2.9.5 ตำแหน่งที่ A790T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP790_A_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP790_T_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 501 คู่เบส

2.9.6 ตำแหน่งที่ C871T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP817_T_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 484 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP817_C_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 484 คู่เบส

2.9.7 ตำแหน่งที่ C863T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP863_T_R กับ REF_ASP(2)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 128 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP863_C_R กับ REF_ASP(2)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 127 คู่เบส

2.9.8 ตำแหน่งที่ C941T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP941_T_F กับ REF_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 460 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP941_C_F กับ REF_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 458 คู่เบส

2.9.9 ตำแหน่งที่ A1086T ใช้ไพรเมอร์ REF_ASP1086_A_R กับ REF_ASP(3)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 463 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP1086_T_R กับ REF_ASP(3)_F ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 461 คู่เบส

3. การสร้างแผนที่พันธุกรรม

3.1 จากการสกัดดีเอ็นเอจากยางพาราลูกผสม ที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ RRIM600 x PB217 จำนวน 96 พันธุ์ พบว่าได้ดีเอ็นเอปริมาณความเข้มข้นมากกว่า 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 ผลการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอของยาลูกผสม 96 พันธุ์ พบว่าดีเอ็นเอของทุกพันธุ์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ได้ จึงนำไปใช้ในการตรวจสอบตำแหน่งสลับด้วยเทคนิค ASA ต่อไป

3.3 ผลจากการวิเคราะห์ตำแหน่งของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับในดีเอ็นเอของยาลูกผสม 96 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยเทคนิค ASA นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจสอบผลการเกิดแถบดีเอ็นเอของยาลูกผสมแต่ละพันธุ์ ได้ผลการทดลองดังนี้

3.3.1 ชั้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *FDP* (*farnesyl diphosphate synthase isoform*) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 15 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 8 ตำแหน่ง สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสลับด้วยเทคนิค ASA ในยาลูกผสมพันธุ์พ่อแม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ A1346G มีรูปแบบการเกิดสลับแบบ A/G สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP1346_G_F กับ FDP_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 100 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP1346_A_F กับ FDP_ASP(7)_R ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 100 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลับแบบ A/G จำนวน 64 พันธุ์ และสลับแบบ A/A จำนวน 32 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ G3584T มีรูปแบบการเกิดสลับแบบ G/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ FDP_ASP3584_G_R กับ FDP_ASP(4)_F ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบส และไพรเมอร์ FDP_ASP3584_T_R กับ FDP_ASP(4)_F ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 499 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลับแบบ G/G จำนวน 41 พันธุ์ และสลับแบบ G/T จำนวน 51 พันธุ์

3.3.2 ชั้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *CCR* (*cinnamoyl-CoA reductase*) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA จำนวน 11 ตำแหน่ง พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 6 ตำแหน่ง สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสลับด้วยเทคนิค ASA ในยาลูกผสมพันธุ์พ่อแม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ G110T มีรูปแบบการเกิดสลับแบบ G/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ CCR_ASP110_G_F กับ CCR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 259 คู่เบส และไพรเมอร์ CCR_ASP110_T_R กับ CCR_ASP(2)_F ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 114 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลับแบบ G/G จำนวน 37 พันธุ์ และสลับแบบ G/T จำนวน 59 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ G216C มีรูปแบบการเกิดสลับแบบ G/C สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ CCR_ASP216_G_F กับ CCR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 156 คู่เบส และไพรเมอร์ CCR_ASP216_C_F กับ CCR_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิด สลับที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 156 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลับในยาลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลับแบบ G/G จำนวน 38 พันธุ์ และสลับแบบ G/C จำนวน 58 พันธุ์

3.3.3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *DnaJ* (chaperone DnaJ; Hsp40 (heat shock protein 40 kD)) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ A288G มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ A/G สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ DnaJ_F กับ DnaJ_ASP288_G_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 309 คู่เบส และไพรเมอร์ DnaJ_F กับ DnaJ_ASP288_A_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 309 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ A/G จำนวน 88 พันธุ์ และสนิปแบบ A/A จำนวน 8 พันธุ์

3.3.4 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *HMGR* (hydroxymethylglutaryl coenzyme A) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ C1289T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP1298_T_R กับ HMGR_ASP(6)_F ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 233 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP1289_C_R กับ HMGR_ASP(6)_F ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 233 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 53 พันธุ์ สนิปแบบ C/T จำนวน 13 พันธุ์ และสนิปแบบ C/C จำนวน 30 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C2461T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP2461_T_R กับ HMGR_ASP(8) ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 336 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP2461_C_R กับ HMGR_ASP(8)_F ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 336 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 46 พันธุ์ สนิปแบบ C/T จำนวน 49 พันธุ์ และสนิปแบบ C/C จำนวน 1 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C1549T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ HMGR_ASP1549_T_R กับ HMGR_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 277 คู่เบส และไพรเมอร์ HMGR_ASP1549_C_R กับ HMGR_ASP(7)_F ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 276 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 1 พันธุ์ สนิปแบบ C/T จำนวน 70 พันธุ์ และสนิปแบบ C/C จำนวน 25 พันธุ์

3.3.5 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *COMT* (caffeic acid O-methyltransferase) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ C340T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ COMT_ASP340_T_F กับ COMT_ASP_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด

451 คู่เบส และไพรเมอร์ COMT_ASP340_C_F กับ COMT_ASP_R ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 451 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 96 พันธุ์

3.3.6 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *CuZnSOD* (*Cu/Zn superoxide dismutase*) จากไพรเมอร์ที่ ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ A528T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ A/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ *CuZnSOD_ASP582_A_R* กับ *CuZnSOD_2F* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 498 คู่เบส และไพรเมอร์ *CuZnSOD_ASP582_T_F* กับ *CuZnSOD_2R* ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับ เบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 230 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ A/T จำนวน 79 พันธุ์ และสนิปแบบ T/T จำนวน 17 พันธุ์

3.3.7 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *ETR1* (*ethylene receptor*) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ A719G มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ A/G สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP719_G_R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 372 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP719_A_R* ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 372 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการ ปรากฏสนิปแบบ A/A จำนวน 31 พันธุ์ และสนิปแบบ A/G จำนวน 65 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C754T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP754_T_R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 408 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP754_C_R* ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบส แบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 406 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบ การปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 2 พันธุ์ และสนิปแบบ C/T จำนวน 94 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ G833C มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ G/C สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP833_G_R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 490 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP(3)_F* กับ *ETR1_ASP833_C_R* ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 488 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการ ปรากฏสนิปแบบ G/G จำนวน 43 พันธุ์ และสนิปแบบ G/C จำนวน 53 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C976T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ *ETR1_ASP(4)_F* กับ *ETR1_ASP976_T_R* ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 404 คู่เบส และไพรเมอร์ *ETR1_ASP(4)_F* กับ *ETR1_ASP976_C_R* ตรวจสอบการเกิด สนิปที่มีลำดับเบสแบบ

C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 400 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 1 พันธุ์ และสนิปแบบ C/T จำนวน 95 พันธุ์

3.3.8 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *REF (rubber elongation factor)* จากไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยใช้เทคนิค ASA สามารถใช้ตรวจสอบการเกิดสนิปด้วยเทคนิค ASA ในยางพาราพันธุ์พ่อ-แม่ RRIM600 x PB217 และได้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ ดังนี้

- ตำแหน่งที่ G403T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ G/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP403_G_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 262 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP403_T_F กับ REF_ASP(1)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 262 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ G/T จำนวน 76 พันธุ์ และสนิปแบบ T/T จำนวน 20 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ A441T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ A/G สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP(1)_F กับ REF_ASP441_G_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ G ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 328 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP(1)_F กับ REF_ASP441_A_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 328 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ G/G จำนวน 91 พันธุ์ และสนิปแบบ G/A จำนวน 4 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ A790T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ A/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP790_A_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ A ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 499 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP790_T_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 95 พันธุ์ และสนิปแบบ A/T จำนวน 1 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C817T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP817_T_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 483 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP817_C_F กับ REF_ASP(2)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 483 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 44 พันธุ์ และสนิปแบบ C/T จำนวน 52 พันธุ์

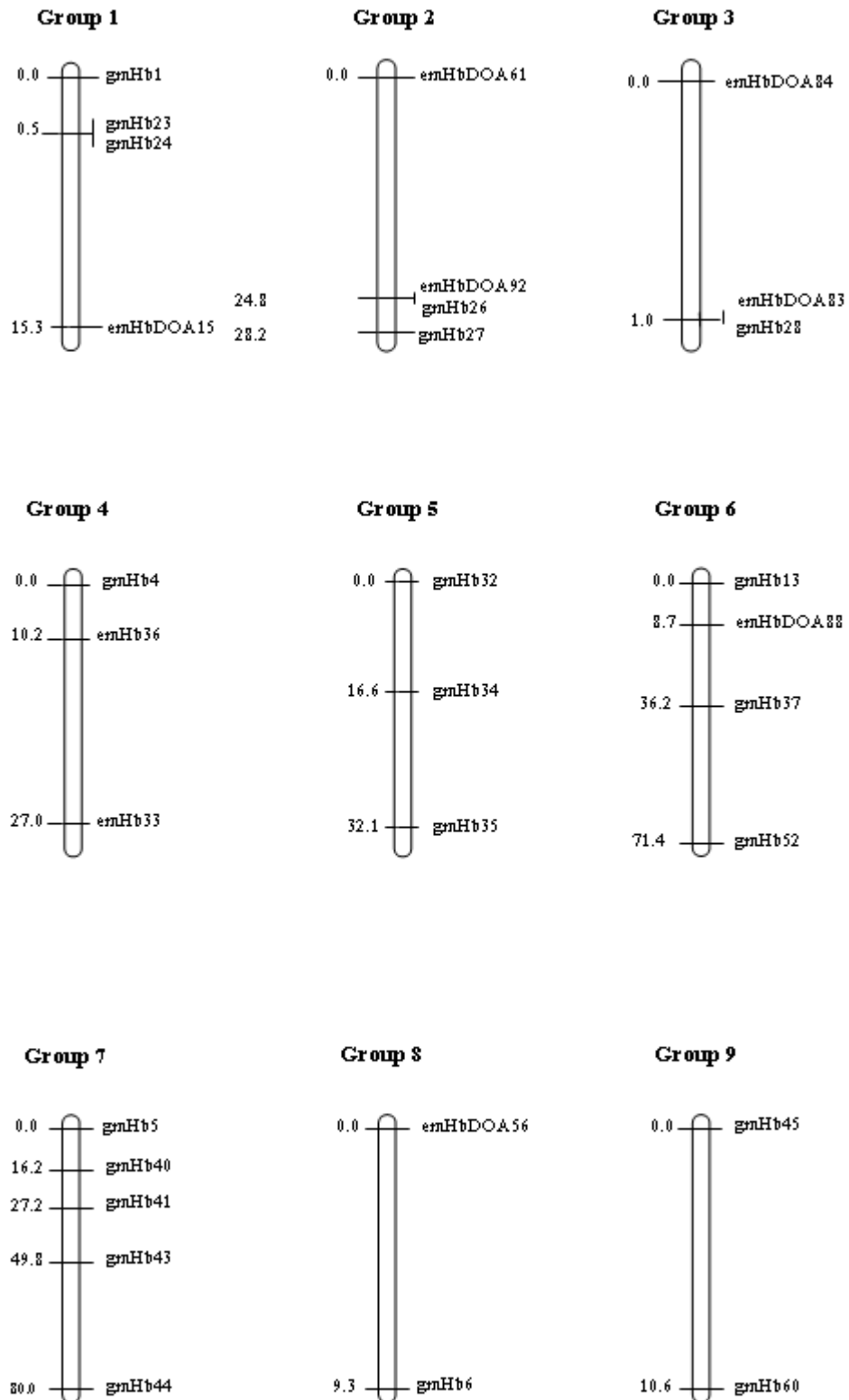
- ตำแหน่งที่ C863T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP(2)_F กับ REF_ASP863_T_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 127 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP(2)_F กับ REF_ASP863_C_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 126 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสนิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสนิปแบบ T/T จำนวน 3 พันธุ์ และสนิปแบบ C/T จำนวน 93 พันธุ์

- ตำแหน่งที่ C941T มีรูปแบบการเกิดสนิปแบบ C/T สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ REF_ASP941_T_F กับ REF_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ T ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 459 คู่เบส และไพรเมอร์ REF_ASP941_C_F กับ REF_ASP(3)_R ตรวจสอบการเกิดสนิปที่มีลำดับเบสแบบ C ได้

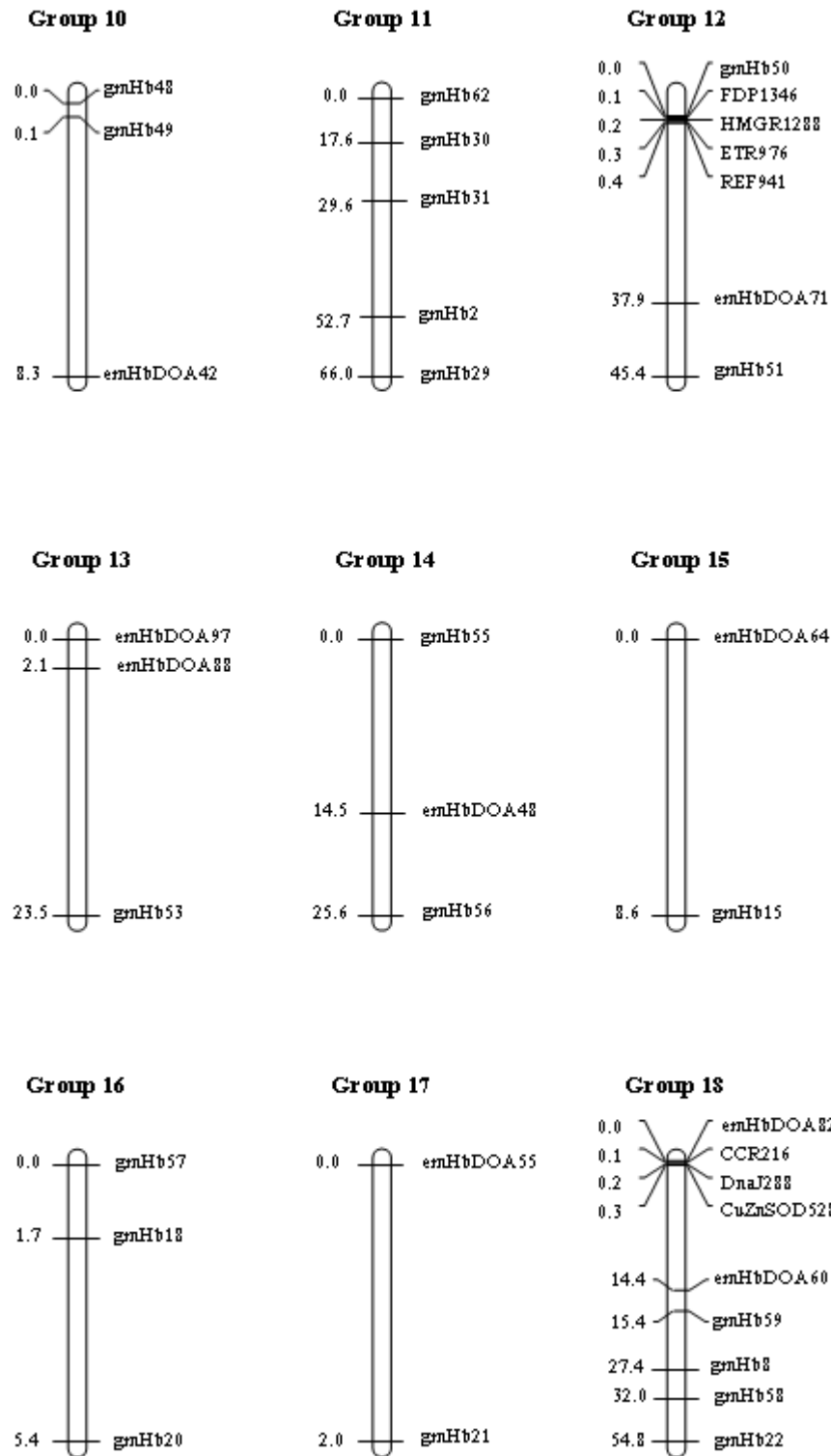
ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 457 คู่เบส เมื่อนำไปตรวจรูปแบบการเกิดสลิปในยางพาราลูกผสม 96 พันธุ์ พบการปรากฏสลิปแบบ C/C จำนวน 20 พันธุ์ และสลิปแบบ C/T จำนวน 76 พันธุ์

3.4 การสร้างแผนที่พันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายสลิป จำนวน 13 ตำแหน่ง ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR (emHbDOA) จำนวน 19 ตำแหน่ง และเครื่องหมาย g-SSR (gmHb) จำนวน 62 ตำแหน่ง รวมทั้งหมด 94 ตำแหน่ง ได้นำมาวิเคราะห์ความเชื่อมโยง (linkage) ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้ประชากรลูกผสม 96 สายพันธุ์ และทำการวิเคราะห์ความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายครั้งละ 2 เครื่องหมาย และวิเคราะห์ตำแหน่งการวางตัวของแต่ละเครื่องหมาย โดยใช้โปรแกรม OneMap (Margarido *et al.*, 2007) ซึ่งทำงานอยู่บนโปรแกรม R โดยกำหนดค่า LOD score เท่ากับ 5 ค่า recombination fraction ที่ 0.35 ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลใช้แบบ Kosambi function การวิเคราะห์อาศัยหลักการที่ว่า ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลอยู่ต่างโครโมโซมกัน การแยกตัวจะเป็นอิสระต่อกัน (independent assortment) แต่ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านั้นอยู่ใกล้ชิดกันบนโครโมโซมเดียวกัน การแยกตัวจะไม่เป็นอิสระ ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะทางระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของทั้งสองตำแหน่งนั้น ถ้าอยู่ใกล้กันมากโอกาสจะเกิดรีคอมบิเนชันก็น้อย จึงมักไปด้วยกัน

จากการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด 94 ตำแหน่ง พบว่าเครื่องหมายที่วิเคราะห์ความเชื่อมโยงได้ จำนวน 67 เครื่องหมาย จำแนกเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สลิป จำนวน 7 ตำแหน่ง เครื่องหมายชนิด EST-SSR จำนวน 16 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด g-SSR จำนวน 44 เครื่องหมาย ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่สามารถวิเคราะห์ความเชื่อมโยงได้มีจำนวน 27 เครื่องหมาย จำแนกเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สลิป จำนวน 6 ตำแหน่ง เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR จำนวน 3 ตำแหน่ง และเครื่องหมายโมเลกุล g-SSR จำนวน 18 ตำแหน่ง โดยเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 67 ตำแหน่ง สามารถวิเคราะห์การจัดกลุ่มความเชื่อมโยงได้ทั้งหมด 18 กลุ่ม ซึ่งตรงกับจำนวน haploid genome ของยางพารา ดังแสดงในภาพที่ 3 แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือโครโมโซมเดียวกันนั้น จะมีแนวโน้มที่จะแยกตัวไปด้วยกัน (co-segregation) แต่ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลอยู่ห่างกันมาก หรือต่างกลุ่มกัน จะมีการแยกตัวเป็นอิสระต่อกัน



ภาพที่ 3 แสดงแผนที่พันธุกรรมของยางพาราที่สร้างจากประชากรลูกผสม ที่เกิดจากการผสมระหว่างยางพันธุ์ RRIM600 และ PB217 จำนวน 96 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR และ g-SSR



ภาพที่ 2 (ต่อ) แสดงแผนที่พันธุกรรมของยีนพาราที่สร้างจากประชากรลูกผสม ที่เกิดจากการผสมระหว่าง ยีนพันธุ์ RRIM600 และ PB217 จำนวน 96 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR และ g-SSR

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีน 9 ยีน ในยางพารา 12 พันธุ์ ได้แก่ RRIM600 PB217 ฉะเชิงเทรา 50 (CH50) RRIT251 PB260 RRIC110 RRII118 RII105 RRIT226 BPM24 PB255 และ PB235 เมื่อผ่านการนำเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน และวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเบสแบบสนิปรวม 90 ตำแหน่ง และได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบตำแหน่งสนิปอย่างง่ายโดยใช้เทคนิค ASA พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ASA จำนวน 56 ตำแหน่ง ที่สามารถตรวจสอบผลการเกิดแถบดีเอ็นเอของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้ และได้สร้างแผนที่พันธุกรรมของยางพาราโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป 13 ตำแหน่ง ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR 19 ตำแหน่ง และเครื่องหมาย g-SSR 62 ตำแหน่ง วิเคราะห์ความเชื่อมโยงและตำแหน่งการวางตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถจัดกลุ่มความเชื่อมโยงได้ทั้งหมด 18 กลุ่ม ซึ่งตรงกับจำนวน haploid genome ของยางพารา การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปที่พบจัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา และนำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีนในยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ จัดเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราเพื่อทดสอบความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมคุณสมบัติของยางพารา
2. การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสนิปของยีนในยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ สามารถนำไปใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราแต่ละพันธุ์ได้ เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับตรวจสอบพันธุ์ยางพาราต่อไป

คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบยางพาราที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง และ กรรณิการ์ อีระวัฒนสุข. 2553. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR จากยางพารา. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552. หน้า 18-33.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ พิมพ์ครั้งที่ 1. 269 หน้า.
- Margarido, G.R.A., Souza, A.P. and Garcia, A.A.F. 2007. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. Hereditas 144: 78-79.

- Mateescu, R.G., Z. Zhang, K. Tsai, J. Phavaphutanon, N.I. Burton-Wurster, G. Lust, R. Quaas, K. Murphy, G.M. Acland and R.J. Todhunter. 2005. Analysis of allele fidelity, polymorphic information content, and density of microsatellites in a genome-wide screening for hip dysplasia in a crossbreed pedigree. *J. Hered.* 96: 847-853.
- Wu, R., Ma, C.X., Painter, I. and Zeng, Z.B. 2002. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. *Theoretical Population Biology.* 61:349-363.
- Yameun, N. and C. Boonphakdee. 2013. DNA fingerprint of the Para Rubber Trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) Based on partial sequences of the caffeate O-methyl-transferase. *Thai J. Genet.* S(1): 262-265.