

<b>ชุดโครงการวิจัย</b>	การพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยาง
<b>โครงการวิจัย</b>	การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตจากพันธุ์กรรมของยางพารา
<b>กิจกรรม</b>	การค้นหายีนและเครื่องหมายโมเลกุลควบคุมการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตจากพันธุ์กรรมของยางพาราโดยวิธี Quantitative Trait Loci (QTL) Mapping
<b>การทดลอง</b>	การทดสอบโมเลกุลเครื่องหมายที่ควบคุมการให้ผลผลิตและการเจริญเติบโตในยางพาราลูกผสม

### คณะผู้ดำเนินงาน

นภาพรรณ เลขาวิวัฒน์<sup>1/</sup> จิตาภรณ์ ภูมิไชย<sup>2/</sup> กรรณิการ์ ธีระวัฒน์สุ<sup>3/</sup> นางสาวรัชณี รัตนวงศ์<sup>1/</sup>

### บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ เพื่อทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่ควบคุมการให้ผลผลิตและการเจริญเติบโตของยางพารา ที่ได้จากการทำแผนที่พันธุ์กรรมของกลุ่มผสม RRIM600 x PB217 เริ่มจากการตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ยางลูกผสมในแปลงเปรียบเทียบพันธุ์ยางขั้นต้นชุด RRI-CH-36/1/3 ในศูนย์วิจัยยางหนองคาย มีลูกผสมจำนวน 167 สายพันธุ์ จำนวน 3,199 ต้น และพันธุ์ยางลูกผสมในแปลงเปรียบเทียบพันธุ์ยางขั้นต้นชุด RRI-CH-39/1/1 จำนวน 1,610 ต้น ในศูนย์วิจัยยางหนองคาย มีลูกผสมจำนวน 97 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Simple sequence repeats (SSRs) จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ M574 Ma179 Ma17 Mt65 จากผลการทดลองพบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์ สามารถใช้ในการตรวจสอบการติดพันธุ้ได้ดี โดยสามารถแยกความแตกต่างของยางพาราที่ติดพันธุ้ได้อย่างชัดเจน จากการตรวจสอบยางพาราลูกผสม RRI-CH-36 จากศูนย์วิจัยยางหนองคาย พบยางพาราที่ติดพันธุ้จำนวน 552 ต้น คิดเป็นร้อยละ 19.62 จาก และยางพาราพันธุ์ลูกผสม RRI-CH-39 พบยางพาราติดพันธุ้จำนวน 52 ต้น คิดเป็นร้อยละ 3.23 ซึ่งยางพาราที่ติดพันธุ้ทั้งหมดจะพิจารณาคัดออกจากการทดลอง เพื่อป้องกันการติดผลจากการนำแม่-พ่อพันธุ์ที่ติดพันธุ้มาผสมพันธุ์ นำกิ่งตาจากต้นที่ติดพันธุ้ไปขยาย และการคลาดเคลื่อนของข้อมูลที่ใช้ในการประเมินพันธุ์จากการเก็บข้อมูลในแปลงเปรียบเทียบพันธุ์ยางขั้นต้น จากการศึกษาสามารถใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำแนกพันธุ์ยางพาราและพันธุ์ยางพาราลูกผสมได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืช หรือการรับรองพันธุ์ และนำมาใช้ประโยชน์ทางการปรับปรุงพันธุ์ และเมื่อตรวจความถูกต้องของพันธุ์ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่แล้ว ก็

สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุล g16a131 และ g3a312 มาตรวจสอบลูกผสม เพื่อทดสอบเครื่องหมาย  
เครื่องหมายโมเลกุล g16a131 และ g3a312 ต่อไป

<sup>1/</sup>ศูนย์วิจัยยางหนองคาย

<sup>2/</sup>สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร

<sup>3/</sup>ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา

## คำนำ

ยางพาราเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้มากพืชหนึ่ง  
และเพื่อเป็นการรักษาสภาพการผลิตและการส่งออกไม่ให้ลดต่ำกว่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน พันธุ์ยางใหม่ที่มีการ  
เจริญเติบโตดีและมีผลผลิตสูงจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกยาง  
ปัจจุบันนี้การปรับปรุงพันธุ์ยางพาราส่วนใหญ่ยังใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม (Conventional  
Breeding) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 25 -30 ปี เพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ การใช้เทคนิคทาง  
เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker) จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์  
แบบดั้งเดิม โดยสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกลักษณะของต้นพืชตามที่ต้องการได้  
โดยไม่ต้องรอการแสดงออกของลักษณะที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือก เพราะเครื่องหมายโมเลกุลจะไม่ถูก  
ควบคุมการแสดงออกโดยสภาพแวดล้อม ไม่ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตของพืช จึงสามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่  
ในระยะแรกของการเจริญเติบโต ทำให้ลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการจัดการ ดังนั้นการหาโมเลกุล  
เครื่องหมายที่สัมพันธ์กับการแสดงออกของการเจริญเติบโตและผลผลิต จะเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการ  
คัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่มีคุณสมบัติของการเจริญเติบโตที่ดีและผลผลิตสูง ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้

การศึกษาลักษณะเชิงปริมาณที่ควบคุมลักษณะการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของยางพารา  
ที่ผ่านมาจะเป็นการทำ QTL (Quantitative Trait Loci) Mapping (Rattanawong *et al.* 2009) ข้อจำกัด  
ของ QTL Mapping คือ QTL ที่ได้จะมีความเฉพาะเจาะจงกับเฉพาะประชากรที่ทำการทดสอบ ซึ่งบางครั้ง  
อาจไม่แสดงออกในประชากรกลุ่มอื่น และการสร้างประชากรเพื่อทำ QTL Mapping มีค่าใช้จ่ายที่สูง  
เนื่องจากต้องสร้างประชากรที่เป็น biparental และใช้เวลานานสำหรับพืชที่เป็นไม้ยืนต้น ถึงแม้จะได้ยีนที่  
ควบคุมลักษณะการให้ผลผลิตยาง (Hbg16a131) ที่อยู่บนตำแหน่งโครโมโซมคู่ที่ 16 แล้ว แต่ก็ได้เพียง  
ตำแหน่งเดียว เนื่องจากยีนที่ควบคุมการแสดงออกทั้งสองลักษณะเป็นกลุ่มของยีน จึงมีความจำเป็นต้อง  
ตรวจสอบว่ายีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตและผลผลิตที่ตำแหน่งอื่นอีกหรือไม่ ดังนั้นการทำ Association  
mapping อาจจะเป็นวิธีหนึ่งในการค้นหายีนควบคุมการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิต การทำ Association  
mapping เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทาง Phenotype กับพันธุกรรม โดยไม่ต้องอาศัยการสร้าง  
ประชากร ซึ่งสามารถใช้ข้อมูลของยีนตรวจสอบลักษณะเป้าหมายได้โดยตรงหรือใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาหา

ความสัมพันธ์กับลักษณะทาง Phenotype และสามารถตรวจสอบ alleles per locus ได้หลาย alleles ในเวลาเดียวกัน

จากงานวิจัยของ Rattanawong *et al.* 2009 ในการศึกษายีนที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะภายนอก (QTL analysis) ลักษณะทางปริมาณ (QTL) ที่ศึกษาเป็นผลการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะการเจริญเติบโต (ขนาดรอบลำต้น และความสูง) และการให้ผลผลิตน้ำยาง พบ QTL ที่สำคัญ 2 ลักษณะคือ 1) ยีนหรือกลุ่มยีนที่ควบคุมการให้ผลผลิตน้ำยางอยู่ที่ ตำแหน่ง 5.8 บน linkage group 16 ซึ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุล g16a131 บน group 16 เรียก QTL นี้ว่า Hbg16a131 และมีความสัมพันธ์กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างน้ำยาง - การหยุดไหลของน้ำยาง ได้แก่ค่า Pi (R<sup>2</sup>=52%), DRC (R<sup>2</sup>=52%) และ PI (R<sup>2</sup> =64%) การกระจายตัวของข้อมูล ลักษณะพันธุกรรม (genotype) ของลักษณะการให้ผลผลิตควรเป็น “ab x cd” และ 2) ยีนหรือกลุ่มยีนที่ ควบคุมการเจริญเติบโตของต้นยาง (ขนาดรอบลำต้น และความสูง) อยู่ที่ตำแหน่ง 60.2 บน linkage group 3 และอยู่ใกล้กับตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุล g3a312 บน group 3 เรียก QTL นี้ว่า Hbg3a312 มีความสัมพันธ์อย่างมากกับขนาดรอบลำต้นของต้นยาง ซึ่งพบว่ากระจายตัวในรูปแบบ genotype “ef x eg” ผลจากการทำแผนที่พันธุกรรม และทราบตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลบนโครโมโซมที่สัมพันธ์กับลักษณะที่ แสดงออก สามารถประยุกต์มาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ยาง โดยนำเอา QTL Hbg3a312 และ Hbg16a131 มาใช้เป็น marker assisted selection (MAS) จากข้อมูลที่มีการศึกษาถึงตำแหน่งของยีนไว้อย่างละเอียดรวมถึงดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีอยู่ ทำให้สามารถแยกสกัดยีนนี้โดยอาศัยแผนที่โครโมโซมยาลพารา (Map based gene cloning)ได้ การแยกสกัดยีนควบคุมการให้ผลผลิตโดยอาศัยข้อมูลจากแผนที่โครโมโซมยาลพาราที่ได้ทำการศึกษามาแล้ว จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อช่วยในการคัดเลือก (Marker Assisted Selection) และเป็นเครื่องมือช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป และเพื่อเป็นการตรวจสอบตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลว่าสัมพันธ์กับลักษณะที่ต้องการหรือไม่ จึงควรที่จะนำเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสอง 2 ตำแหน่ง ไปทดสอบกับพันธุ์ยางลูกผสมคู่อื่นๆ เพื่อเป็นการตรวจสอบความแน่นอนของตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่ต้องการ และนำไปใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ยางต่อไป

### วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

#### 1. ตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ลูกผสม

##### 1.1 ประชากรลูกผสมและไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ประกอบด้วย

- 1) ประชากรของพันธุ์ยางลูกผสมในแปลงเปรียบเทียบพันธุ์ยางขั้นต้นชุด RRI-CH-36/1/3 ในศูนย์วิจัยยางหนองคาย มีลูกผสมจำนวน 167 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1)

- 2) ประชากรของพันธุ์อย่างลูกผสมในแปลงเปรียบเทียบพันธุ์อย่างขั้นต้นชุด RRI-CH-39/1/1 ใน ศูนย์วิจัยยางหนองคาย มีลูกผสมจำนวน 97 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2)
- 3) สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR และการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้
- 4) ไมโครแซทเทลไลท์ ไพรมเมอร์ (Microsatellite Primer) สืบค้นจากฐานข้อมูลยีนสากล (National Center for Biotechnology Information, NCBI) ตารางที่ 3 และไพรมเมอร์ g16a131 และ g3a312 ตารางที่ 4

## 1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยประยุกต์ใช้ตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1987) บดใบยางพาราใน ไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่งให้ละเอียด นำมาใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Extraction buffer (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 1% PVP, 0.1% Sodiummetabisulfite, 20 mM EDTA (pH8.0) และ 100 mM Tris-HCL (pH8)) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย Chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ กลับไปกลับมา ประมาณ 200 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ ล้างก้อนดีเอ็นเอ ด้วย 70% Ethanol นำไปผึ่งจนแห้ง เติมสารละลาย 1xTE buffer (10mM Tris-HCL (pH8), 1mM EDTA) 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

## 1.3 การตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด ด้วยการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ นำไปเปรียบเทียบกับ DNA ที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน (Lambda DNA Standard) โดยนำมาวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้น} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร (Absorbance, ABS)} \times 500$$

เมื่อได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างแล้ว ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ ไมโครลิตร เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 1.4 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้ ไมโครแซทเทลไลท์ไพรมเมอร์

นำดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัม มาทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3) ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 50 mM KCl , 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> , 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 0.2 mM dNTPs และ Taq DNA polymerase 0.3 unit ในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ 9700 thermal cycler (บริษัท Gene Systems จำกัด) มีรายละเอียดของอุณหภูมิดังนี้

Denaturation	94 °C	5 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	94 °C	5 นาที	
Annealing	50-58 °C	45 วินาที	
Extension	70-72 °C	1 นาที	
Extension	70 °C	7 นาที	

จากนั้นนำมาเติม loading dye (95% formamide, 10 mM NaOH, 0.05% Bromophenol Blue และ 0.05% xylene cyanol) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

#### 1.5 การตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโพลีซิส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ มาแยกความแตกต่าง ในเจลอะคริลลาไมด์ 6 เปอร์เซ็นต์ {6% (acrylamide:bis-acrylamide = 19:1), 7.5 M urea, 1xTBE Buffer [0.045 M Tris-Borate, 0.001M EDTA (pH8)]} โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโพลีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (Benbouza *et al.* (2006) นำแผ่นเจลแช่และเขย่า ใน 10% Absolute ethanol, 0.5% acetic acid ปริมาตร 1 ลิตร 5 นาที แล้วนำมาย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (1.5 g AgNO<sub>3</sub>, 1.5 ml 37% HCOH, 22-24 องศาเซลเซียส) 7 นาที นำเจลผ่านน้ำสะอาดแล้วทำให้เจลปรากฏแถบดีเอ็นเอด้วย Developer Solution (15 g NaOH, 2 ml 37% HCOH) ที่อุณหภูมิประมาณ 22-24 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 ลิตร เขย่าจนปรากฏแถบดีเอ็นเอ จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% Absolute ethanol, 0.5% acetic ปริมาตร 1 ลิตร ล้างเจลด้วยน้ำสะอาด 3 นาที แล้วผึ่งเจลให้แห้งเพื่อตรวจสอบผลต่อไป

#### 1.6 การตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์

เพื่อเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบจึงทำการตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์เบื้องต้นแบบวิธีรวมดีเอ็นเอ (Bulk DNA analysis) โดยนำเอาใบของทุกต้นที่เป็นพันธุ์หรือสายพันธุ์เดียวกัน มาบดรวมกัน และสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นำมาตรวจสอบเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิงของแต่ละพันธุ์ โดยดูจากแถบดีเอ็นเอ ถ้าพันธุ์ที่มีต้นที่ผลิตพันธุ์ป้อนอยู่จะมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากตัวอย่างอ้างอิง คัดเลือกพันธุ์นั้นมาตรวจสอบโดยสกัดดีเอ็นเอแต่ละต้น และนำมาตรวจสอบด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยแยกแต่ละต้นเพื่อตรวจสอบหาต้นที่ผลิตพันธุ์

## 2. ทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล g16a131 และ g3a312

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบลูกผสมในขั้นตอนที่ 1 มาสายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ใช้เครื่องหมาย g16a131 และ g3a312 เป็นไพรเมอร์ และตรวจผล PCR ด้วย วิธี electrophoresis และนำมาย้อมสีด้วยวิธี Silver staining

### ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด)

เริ่มต้น ตุลาคม พ.ศ. 2555      สิ้นสุด กันยายน พ.ศ. 2556

### สถานที่ดำเนินการ

ดำเนินการที่ ศูนย์วิจัยยางหนองคาย และ ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. ตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ลูกผสม

##### 1.1 การตรวจสอบยารูปารูกลูกผสม RRI-CH-36 ในศูนย์วิจัยยางหนองคาย

ผลการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซเทลไลท์ จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ M574, Ma179, mT65 และ mA17 ในการตรวจสอบความถูกต้องเบื้องต้นของพันธุ์ยางพารา ใช้วิธีการรวมดีเอ็นเอโดยแยกเป็นซ้ำ จำนวน 167 พันธุ์ จากศูนย์วิจัยยางหนองคาย 2,813 ต้น พบยางพาราที่ผิดพันธุ์มีแถบดีเอ็นเอที่ไม่เหมือนกับตัวอย่างอ้างอิง 138 พันธุ์ ไพรเมอร์ที่สามารถตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ได้ดีที่สุดคือ ไพรเมอร์ mA17 ตรวจพบพันธุ์ยางพาราที่ผิดพันธุ์จำนวน 102 พันธุ์ ได้แก่ RRI-CH-36-73 RRI-CH-36-81 RRI-CH-36-96 RRI-CH-36-101, RRI-CH-36-105, RRI-CH-36-110, RRI-CH-36-116, RRI-CH-36-119, RRI-CH-36-122, RRI-CH-36-123, RRI-CH-36-132, RRI-CH-36-133, RRI-CH-36-144, RRI-CH-36-146, RRI-CH-36-172, RRI-CH-36-174, RRI-CH-36-193, RRI-CH-36-194, RRI-CH-36-255, RRI-CH-36-257, RRI-CH-36-258, RRI-CH-36-300, RRI-CH-36-303, RRI-CH-36-324, RRI-CH-36-328, RRI-CH-36-336, RRI-CH-36-371, RRI-CH-36-373, RRI-CH-36-385, RRI-CH-36-387, RRI-CH-36-389, RRI-CH-36-408, RRI-CH-36-414, RRI-CH-36-441, RRI-CH-36-455, RRI-CH-36-504, RRI-CH-36-508, RRI-CH-36-605, RRI-CH-36-607, RRI-CH-36-613, RRI-CH-36-666, RRI-CH-36-688, RRI-CH-36-696, RRI-CH-36-702, RRI-CH-36-711, RRI-CH-36-713, RRI-CH-36-716, RRI-CH-36-722, RRI-CH-36-727, RRI-CH-36-835, RRI-CH-36-838,

RRI-CH-36-841, RRI-CH-36-847, RRI-CH-36-849, RRI-CH-36-868, RRI-CH-36-888, RRI-CH-36-897, RRI-CH-36-898, RRI-CH-36-925, RRI-CH-36-928, RRI-CH-36-945, RRI-CH-36-959, RRI-CH-36-960, RRI-CH-36-961, RRI-CH-36-962, RRI-CH-36-966, RRI-CH-36-973, RRI-CH-36-979, RRI-CH-36-980, RRI-CH-36-98, RRI-CH-36-994, RRI-CH-36-1025, RRI-CH-36-1030, RRI-CH-36-1035, RRI-CH-36-1039, RRI-CH-36-1057, RRI-CH-36-1079, RRI-CH-36-1125, RRI-CH-36-1177, RRI-CH-36-1181, RRI-CH-36-1187, RRI-CH-36-1190, RRI-CH-36-1224, RRI-CH-36-1248, RRI-CH-36-1276, RRI-CH-36-1282, RRI-CH-36-1286, RRI-CH-36-1292, RRI-CH-36-1308, RRI-CH-36-1387, RRI-CH-36-1390, RRI-CH-36-1395, RRI-CH-36-1399, RRI-CH-36-1446, RRI-CH-36-1453, RRI-CH-36-1456, RRI-CH-36-1475, RRI-CH-36-1515, RRI-CH-36-1521, RRI-CH-36-1522, RRI-CH-36-1539, RRI-CH-36-1542,

รองลงมาคือ ไพรมเมอร์ Ma179 ตรวจพบพันธุ์ยุงพาราที่ผิดพันธุ์จำนวน 95 พันธุ์ ได้แก่ ลูกผสมพันธุ์ RRI-CH-36-59, RRI-CH-36-67ม RRI-CH-36-101, RRI-CH-36-123, RRI-CH-36-132, RRI-CH-36-133, RRI-CH-36-144, RRI-CH-36-146, RRI-CH-36-172, RRI-CH-36-174, RRI-CH-36-187, RRI-CH-36-193, RRI-CH-36-194, RRI-CH-36-255, RRI-CH-36-257, RRI-CH-36-258, RRI-CH-36-269, RRI-CH-36-300, RRI-CH-36-303, RRI-CH-36-324, RRI-CH-36-328, RRI-CH-36-336, RRI-CH-36-371, RRI-CH-36-373, RRI-CH-36-382, RRI-CH-36-384, RRI-CH-36-385, RRI-CH-36-387, RRI-CH-36-389, RRI-CH-36-408, RRI-CH-36-414, RRI-CH-36-416, RRI-CH-36-426, RRI-CH-36-441, RRI-CH-36-455, RRI-CH-36-504, RRI-CH-36-508, RRI-CH-36-595, RRI-CH-36-605, RRI-CH-36-607, RRI-CH-36-613, RRI-CH-36-646, RRI-CH-36-666, RRI-CH-36-688, RRI-CH-36-711, RRI-CH-36-722, RRI-CH-36-835, RRI-CH-36-838, RRI-CH-36-841, RRI-CH-36-847, RRI-CH-36-849, RRI-CH-36-878, RRI-CH-36-897, RRI-CH-36-925, RRI-CH-36-928, RRI-CH-36-957, RRI-CH-36-959, RRI-CH-36-960, RRI-CH-36-961, RRI-CH-36-966, RRI-CH-36-973, RRI-CH-36-979, RRI-CH-36-980, RRI-CH-36-990, RRI-CH-36-994, RRI-CH-36-1007, RRI-CH-36-1025, RRI-CH-36-1032, RRI-CH-36-1035, RRI-CH-36-1079, RRI-CH-36-1125, RRI-CH-36-1177, RRI-CH-36-1181, RRI-CH-36-1187, RRI-CH-36-1190, RRI-CH-36-1248, RRI-CH-36-1276, RRI-CH-36-1282, RRI-CH-36-1286, RRI-CH-36-1289, RRI-CH-36-1290, RRI-CH-36-1292, RRI-CH-36-1308, RRI-CH-36-1390, RRI-CH-36-1395, RRI-CH-36-1399, RRI-CH-36-1446, RRI-CH-36-1453, RRI-CH-36-1456, RRI-CH-36-1475, RRI-CH-36-1515, RRI-CH-36-1521, RRI-CH-36-1525, RRI-CH-36-1539 และ RRI-CH-36-1542

ไพรมอร์ mT65 ตรวจสอบพันธุ์อย่างลูกผสมที่ผิดพันธุ์จำนวน 90 สายพันธุ์ ได้แก่ RRI-CH-36-53, RRI-CH-36-59, RRI-CH-36-61, RRI-CH-36-67, RRI-CH-36-73, RRI-CH-36-76, RRI-CH-36-110, RRI-CH-36-123, RRI-CH-36-132, RRI-CH-36-133, RRI-CH-36-144, RRI-CH-36-146, RRI-CH-36-172, RRI-CH-36-174, RRI-CH-36-187, RRI-CH-36-194, RRI-CH-36-255, RRI-CH-36-269, RRI-CH-36-273, RRI-CH-36-303, RRI-CH-36-324, RRI-CH-36-328, RRI-CH-36-373, RRI-CH-36-385, RRI-CH-36-389, RRI-CH-36-408, RRI-CH-36-414, RRI-CH-36-426, RRI-CH-36-441, RRI-CH-36-455, RRI-CH-36-501, RRI-CH-36-595, RRI-CH-36-607, RRI-CH-36-610, RRI-CH-36-613, RRI-CH-36-646, RRI-CH-36-688, RRI-CH-36-696, RRI-CH-36-702, RRI-CH-36-711, RRI-CH-36-713, RRI-CH-36-716, RRI-CH-36-719, RRI-CH-36-722, RRI-CH-36-727, RRI-CH-36-841, RRI-CH-36-847, RRI-CH-36-848, RRI-CH-36-851, RRI-CH-36-868, RRI-CH-36-878, RRI-CH-36-888, RRI-CH-36-890, RRI-CH-36-897, RRI-CH-36-899, RRI-CH-36-925, RRI-CH-36-928, RRI-CH-36-959, RRI-CH-36-973, RRI-CH-36-979, RRI-CH-36-980, RRI-CH-36-994, RRI-CH-36-1007, RRI-CH-36-1033, RRI-CH-36-1035, RRI-CH-36-1039, RRI-CH-36-1079, RRI-CH-36-1105, RRI-CH-36-1125, RRI-CH-36-1151, RRI-CH-36-1181, RRI-CH-36-1187, RRI-CH-36-1190, RRI-CH-36-1248, RRI-CH-36-1276, RRI-CH-36-1282, RRI-CH-36-1286, RRI-CH-36-1290, RRI-CH-36-1292, RRI-CH-36-1308, RRI-CH-36-1399, RRI-CH-36-1446, RRI-CH-36-1453, RRI-CH-36-1456, RRI-CH-36-1515, RRI-CH-36-1521, RRI-CH-36-1522, RRI-CH-36-1525, RRI-CH-36-1539 และ RRI-CH-36-1542

และไพรมอร์ M574 ตรวจสอบพันธุ์อย่างลูกผสมที่ผิดพันธุ์จำนวน 86 สายพันธุ์ ได้แก่ RRI-CH-36-67, RRI-CH-36-101, RRI-CH-36-123, RRI-CH-36-132, RRI-CH-36-144, RRI-CH-36-146, RRI-CH-36-172, RRI-CH-36-174, RRI-CH-36-187, RRI-CH-36-194, RRI-CH-36-257, RRI-CH-36-258, RRI-CH-36-269, RRI-CH-36-300, RRI-CH-36-324, RRI-CH-36-328, RRI-CH-36-336, RRI-CH-36-358, RRI-CH-36-371, RRI-CH-36-373, RRI-CH-36-384, RRI-CH-36-385, RRI-CH-36-389, RRI-CH-36-408, RRI-CH-36-414, RRI-CH-36-416, RRI-CH-36-440, RRI-CH-36-441, RRI-CH-36-455, RRI-CH-36-501, RRI-CH-36-504, RRI-CH-36-508, RRI-CH-36-605, RRI-CH-36-607, RRI-CH-36-610, RRI-CH-36-613, RRI-CH-36-666, RRI-CH-36-688, RRI-CH-36-696, RRI-CH-36-702, RRI-CH-36-838, RRI-CH-36-847, RRI-CH-36-849, RRI-CH-36-878, RRI-CH-36-897, RRI-CH-36-925, RRI-CH-36-928, RRI-CH-36-945, RRI-CH-36-959, RRI-CH-36-960, RRI-CH-36-961, RRI-CH-36-962, RRI-CH-36-966, RRI-CH-36-973, RRI-CH-36-979, RRI-CH-36-980, RRI-CH-36-994, RRI-CH-36-1007, RRI-CH-36-1030, RRI-CH-36-1035, RRI-CH-36-1057, RRI-CH-36-1079, RRI-CH-36-1177, RRI-CH-36-1187, RRI-CH-36-1190, RRI-CH-36-1248, RRI-



CH-36-1249, RRI-CH-36-1276, RRI-CH-36-1282, RRI-CH-36-1286, RRI-CH-36-1290, RRI-CH-36-1292, RRI-CH-36-1308, RRI-CH-36-1390, RRI-CH-36-1394, RRI-CH-36-1395, RRI-CH-36-1399, RRI-CH-36-1446, RRI-CH-36-1456, RRI-CH-36-1457, RRI-CH-36-1475, RRI-CH-36-1515, RRI-CH-36-1521, RRI-CH-36-1522, RRI-CH-36-1539 และ RRI-CH-36-1542 นำตัวอย่างดีเอ็นเอของพันธุ์ยางพารา 138 พันธุ์ ที่มีการตรวจสอบพบการติดพันธุ์มาตรวจสอบให้ละเอียดยิ่งขึ้น โดยการนำดีเอ็นเอของพันธุ์ยางจากแต่ละต้นมาตรวจสอบอีกครั้งว่า ต้นไหนที่ไม่ใช่พันธุ์แท้จริง เพื่อคัดออกจากแปลงปลูก ผลของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ 4 ไพรเมอร์ ตรวจสอบยางพาราที่ติดพันธุ์ 138 พันธุ์ พบยางพาราที่ติดพันธุ์จำนวน 552 ต้น คิดเป็นร้อยละ 35.82 (ภาพที่ 1)

## 1.2 การตรวจสอบยางพาราลูกผสม RRI-CH-39

ผลการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ M574, Ma179, mT65 และ mA17 ในการตรวจสอบความถูกต้องเบื้องต้นของพันธุ์ยางลูกผสม RRI-CH-39/1/1 ใช้วิธีการรวมดีเอ็นเอภายในแต่ละซ้า และแยกเป็นซ้า จำนวน 97 พันธุ์ จากศูนย์วิจัยยางหนองคาย 1,610 ต้น พบยางพาราที่ติดพันธุ์มีแถบดีเอ็นเอที่ไม่เหมือนกับตัวอย่างอ้างอิง 20 พันธุ์ ไพรเมอร์ที่สามารถตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ได้ดีที่สุดคือ ไพรเมอร์ mT65 ตรวจพบพันธุ์ยางพาราที่ติดพันธุ์จำนวน 13 สายพันธุ์ ได้แก่ ลูกผสมพันธุ์ RRI-CH-39-24, RRI-CH-39-34, RRI-CH-39-137, RRI-CH-155, RRI-CH-39-254, RRI-CH-39-348, RRI-CH-39-383, RRI-CH-39-2078, RRI-CH-39-2093, RRI-CH-39-2101, RRI-CH-39-2176, RRI-CH-39-2194, RRI-CH-39-2200 (ภาพที่ 2)

รองลงมาคือ ไพรเมอร์ mA17 ตรวจพบพันธุ์ยางลูกผสมที่ติดพันธุ์จำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ ลูกผสมพันธุ์ RRI-CH-39-34, RRI-CH-39-62, RRI-CH-39-74, RRI-CH-39-155, RRI-CH-39-253, RRI-CH-39-307, RRI-CH-39-377, RRI-CH-39-2078, RRI-CH-39-2093, RRI-CH-39-2176 และ RRI-CH-39-2200 (ภาพที่ 3)

ไพรเมอร์ M574 ตรวจพบพันธุ์ยางลูกผสมที่ติดพันธุ์จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ ลูกผสมพันธุ์ RRI -CH-39-62, RRI -CH-39-74, RRI -CH-39-137, RRI -CH-39-348, RRI -CH-39-2078, RRI -CH-39-2093, RRI -CH-39-2176, RRI -CH-39-2192 และ RRI -CH-39-2200 (ภาพที่ 4)

ไพรเมอร์ Ma179 ตรวจพบพันธุ์ยางลูกผสมที่ติดพันธุ์จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ RRI -CH-39-34, RRI -CH-39-74, RRI -CH-39-348, RRI -CH-39-480, RRI-CH-39-2078, RRI -CH-39-2093 และ RRI -CH-39-2176 (ภาพที่ 5)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของพันธุ์ยางพารา 20 พันธุ์ ที่มีการตรวจสอบพบการผิดพันธุ์มาตรวจสอบให้ละเอียดยิ่งขึ้น โดยการนำดีเอ็นเอของพันธุ์ยางจากแต่ละต้นมาตรวจสอบอีกครั้งว่า ต้นไหนที่ไม่ใช่พันธุ์แท้จริง เพื่อคัดออกจากแปลงปลูก ผลของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ 4 โพรเมอร์ ตรวจสอบยางพาราที่ผิดพันธุ์ 20 พันธุ์ พบยางพาราที่ผิดพันธุ์จากศูนย์วิจัยยางหนองคายจำนวน 52 ต้น คิดเป็นร้อยละ 16.25

## 2. ทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล g16a131 และ g3a312

เมื่อตรวจความถูกต้องของพันธุ์ด้วยโพรเมอร์ทั้ง 4 คู่แล้ว สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุล g16a131 และ g3a312 มาตรวจสอบลูกผสมสายพันธุ์ที่ถูกต้อง เพื่อทดสอบเครื่องหมายเครื่องหมายโมเลกุล g16a131 และ g3a312 เปรียบเทียบกับลักษณะที่ควบคุมผลผลิตของน้ำยาง และการเจริญเติบโตของลำต้นต่อไป

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ในการตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ยางลูกผสม RRI-CH-36/1/3 และ RRI-CH-39/1/1 ในแปลงเปรียบเทียบพันธุ์ขั้นต้น ศูนย์วิจัยยางหนองคายพบว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สามารถใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ความถูกต้องของพันธุ์ยางลูกผสมได้ดี โดยสามารถแยกความแตกต่างของยางพาราที่ไม่ถูกต้องตามแม่-พ่อพันธุ์ได้อย่างชัดเจนจากการตรวจสอบยางพาราลูกผสม RRI-CH-36/1/3 จำนวน 167 สายพันธุ์ จำนวน 3,199 ต้น พบว่ามียางพาราที่มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากแม่-พ่อพันธุ์จำนวน 138 สายพันธุ์ จำนวน 552 ต้น คิดเป็นร้อยละ 35.82 และพันธุ์ยางลูกผสม RRI-CH-39/1/1 จำนวน 97 สายพันธุ์ จำนวน 1,610 ต้น พบลูกผสมที่มีแถบไม่เหมือนกับแม่-พ่อพันธุ์เท่ากับ 20 สายพันธุ์ จำนวน 52 ต้น คิดเป็นร้อยละ 16.25 ซึ่งลูกผสมที่ผิดพันธุ์ทั้งหมดจะคัดออกจากการทดลอง เพื่อนำลูกผสมที่ถูกต้องมาตรวจสอบอีกครั้งด้วยเครื่องหมายโมเลกุล g16a131 และ g3a312 ต่อไป และเพื่อป้องกันการผิดพลาดจากการนำแม่-พ่อพันธุ์ที่ผิดพันธุ์มาขยายในแปลงกิ่งตา หรือนำไปใช้เป็นแม่-พ่อพันธุ์ต่อไป และป้องกันการคลาดเคลื่อนของข้อมูลที่ใช้ในการประเมินพันธุ์จากการเก็บข้อมูลในแปลงเปรียบเทียบพันธุ์ขั้นต้น

### การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประเมินลักษณะประจำพันธุ์ โครงสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรม และใช้เป็นข้อมูลในการอนุรักษ์พันธุ์กรรมยางพารา

2. สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลไปใช้ตรวจสอบพันธุ์ที่ปลูกอยู่ในแปลงรวบรวมพันธุ์ แปลงลูกผสม ขึ้นต้น และแปลงลูกผสมใหม่ให้ถูกต้องตรงตามพันธุ์ เนื่องจากพันธุ์เหล่านี้ยังไม่มีการศึกษาทางลักษณะ สันฐานวิทยา จึงเป็นการยากที่จะตรวจสอบพันธุ์โดยใช้ลักษณะภายนอก ซึ่งการตรวจสอบโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เป็นวิธีที่สามารถใช้ตรวจสอบพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำในลูกผสมใหม่

3. สามารถนำเอาเครื่องหมายโมเลกุล Hbg3a312 และ Hbg16a131 ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการ ให้ผลผลิตและการเจริญเติบโตมาใช้เป็น marker assisted selection (MAS) ตรวจสอบลูกผสม RRI-CH-36 และ ลูกผสมRRI-CH-39 เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลว่าสัมพันธ์กับลักษณะที่ต้องการหรือไม่ เพื่อเป็นการตรวจสอบความแน่นอนของตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่ต้องการ และนำไปใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์อย่างต่อเนื่อง

#### เอกสารอ้างอิง

- ศูนย์พันธุวิศวกรรม. 2542. การศึกษาจีโนมในสิ่งมีชีวิต. ใน เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง เทคนิค คอญ พันธุศาสตร์ในการผลิตปศุสัตว์. ระหว่างวันที่ 26-30 กันยายน 2542 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม. 9 น.
- สุทัศน์ ด่านสกุลผล. 2543. ลักษณะประจำพันธุ์ยาง (ตอน 2). *วารสารยางพารา*. 20 (3) :1-41.
- อรรถัน มงคลพร. 2548. เทคนิคโมเลกุลเครื่องหมาย. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. หน้า 13-19.
- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. and Cregan, P.B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131 – 1139.
- Beckmann, J.S. and Soller, M. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica*, 35: 111-124.
- Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P., Mergeai, G.: Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10: 77–81, 2006.
- Besse, P., M. Suguin, P. Lebrun, M.H. Chevallier, D. Nicolas and C. Lanaud. 1994. Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theor Appl Genet.* 88 : 199-207.

- Besse, P., P. Lebrun, M. Suguin and C. Lanaud. 1993. DNA fingerprints in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) using human minisatellite probes. *Heredity*. 70 : 237-244.
- Chevallier, M.H. 1988. Genetic variability of *Hevea brasiliensis* germplasm using isozyme markers. *J. nat. Rubb. Res.* 3 : 42-53.
- Cregan, P.B. 1992. Simple sequence repeat DNA length polymorphisms. *Probe*, 2: 18-22.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- James, C.M., Wilson, F., Hadonou, A.M. and Tobutt, K.R. 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in diploid strawberry (*Fragaria vesca* L.) for mapping diversity studies and clone identification. *Mol. Eco. Notes.* 3:171-173.
- Seguin, M., P. Besse, D. Lespinasse, P. Lebrun, M. Rodier-Goud and D. Nicolas. 1996. *Hevea* molecular genetics. *Plantations Rech Dev.* 3 : 77-88.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., and Kuiper, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Williams, J.G. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990 22 : 6531-6535.

ตารางที่ 1 รายชื่อพันธุ์ยางลูกผสม RRI-CH-36/1/3 ที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอ

ลำดับ	พันธุ์	ลำดับ	พันธุ์	ลำดับ	พันธุ์	ลำดับ	พันธุ์
1	RRI-CH-36-0053	46	RRI-CH-36-0373	91	RRI-CH-36-0873	136	RRI-CH-36-1248
2	RRI-CH-36-0059	47	RRI-CH-36-0382	92	RRI-CH-36-0878	137	RRI-CH-36-1249
3	RRI-CH-36-0060	48	RRI-CH-36-0384	93	RRI-CH-36-0880	138	RRI-CH-36-1276
4	RRI-CH-36-0061	49	RRI-CH-36-0385	94	RRI-CH-36-0888	139	RRI-CH-36-1282
5	RRI-CH-36-0067	50	RRI-CH-36-0387	95	RRI-CH-36-0890	140	RRI-CH-36-1286
6	RRI-CH-36-0073	51	RRI-CH-36-0389	96	RRI-CH-36-0897	141	RRI-CH-36-1288
7	RRI-CH-36-0076	52	RRI-CH-36-0408	97	RRI-CH-36-0898	142	RRI-CH-36-1289
8	RRI-CH-36-0081	53	RRI-CH-36-0414	98	RRI-CH-36-0899	143	RRI-CH-36-1290
9	RRI-CH-36-0083	54	RRI-CH-36-0416	99	RRI-CH-36-0925	144	RRI-CH-36-1292
10	RRI-CH-36-0096	55	RRI-CH-36-0426	100	RRI-CH-36-0928	145	RRI-CH-36-1308

11	RRI-CH-36-0101	56	RRI-CH-36-0440	101	RRI-CH-36-0945	146	RRI-CH-36-1324
12	RRI-CH-36-0105	57	RRI-CH-36-0441	102	RRI-CH-36-0950	147	RRI-CH-36-1387
13	RRI-CH-36-0106	58	RRI-CH-36-0455	103	RRI-CH-36-0955	148	RRI-CH-36-1390
14	RRI-CH-36-0110	59	RRI-CH-36-0501	104	RRI-CH-36-0957	149	RRI-CH-36-1394
15	RRI-CH-36-0116	60	RRI-CH-36-0502	105	RRI-CH-36-0959	150	RRI-CH-36-1395
16	RRI-CH-36-0119	61	RRI-CH-36-0504	106	RRI-CH-36-0960	151	RRI-CH-36-1399
17	RRI-CH-36-0122	62	RRI-CH-36-0505	107	RRI-CH-36-0961	152	RRI-CH-36-1446
18	RRI-CH-36-0123	63	RRI-CH-36-0508	108	RRI-CH-36-0962	153	RRI-CH-36-1453
19	RRI-CH-36-0132	64	RRI-CH-36-0595	109	RRI-CH-36-0966	154	RRI-CH-36-1457
20	RRI-CH-36-0133	65	RRI-CH-36-0605	110	RRI-CH-36-0973	155	RRI-CH-36-1463
21	RRI-CH-36-0144	66	RRI-CH-36-0607	111	RRI-CH-36-0979	156	RRI-CH-36-1475
22	RRI-CH-36-0146	67	RRI-CH-36-0610	112	RRI-CH-36-0980	157	RRI-CH-36-1515
23	RRI-CH-36-0172	68	RRI-CH-36-0613	113	RRI-CH-36-0987	158	RRI-CH-36-1519
24	RRI-CH-36-0174	69	RRI-CH-36-0646	114	RRI-CH-36-0990	159	RRI-CH-36-1521
25	RRI-CH-36-0187	70	RRI-CH-36-0652	115	RRI-CH-36-0994	160	RRI-CH-36-1522
26	RRI-CH-36-0189	71	RRI-CH-36-0666	116	RRI-CH-36-1007	161	RRI-CH-36-1525
27	RRI-CH-36-0193	72	RRI-CH-36-0688	117	RRI-CH-36-1019	162	RRI-CH-36-1536
28	RRI-CH-36-0194	73	RRI-CH-36-0694	118	RRI-CH-36-1025	163	RRI-CH-36-1539
29	RRI-CH-36-0255	74	RRI-CH-36-0696	119	RRI-CH-36-1030	164	RRI-CH-36-1540
30	RRI-CH-36-0257	75	RRI-CH-36-0702	120	RRI-CH-36-1032	165	RRI-CH-36-1541
31	RRI-CH-36-0258	76	RRI-CH-36-0711	121	RRI-CH-36-1033	166	RRI-CH-36-1542
32	RRI-CH-36-0269	77	RRI-CH-36-0713	122	RRI-CH-36-1035	167	RRI-CH-36-1558
33	RRI-CH-36-0273	78	RRI-CH-36-0716	123	RRI-CH-36-1039		
34	RRI-CH-36-0300	79	RRI-CH-36-0719	124	RRI-CH-36-1042		
35	RRI-CH-36-0301	80	RRI-CH-36-0722	125	RRI-CH-36-1055		
36	RRI-CH-36-0303	81	RRI-CH-36-0726	126	RRI-CH-36-1057		
37	RRI-CH-36-0324	82	RRI-CH-36-0727	127	RRI-CH-36-1079		
38	RRI-CH-36-0327	83	RRI-CH-36-0835	128	RRI-CH-36-1105		
39	RRI-CH-36-0328	84	RRI-CH-36-0838	129	RRI-CH-36-1151		
40	RRI-CH-36-0336	85	RRI-CH-36-0841	130	RRI-CH-36-1177		
41	RRI-CH-36-0357	86	RRI-CH-36-0847	131	RRI-CH-36-1181		
42	RRI-CH-36-0358	87	RRI-CH-36-0848	132	RRI-CH-36-1184		
43	RRI-CH-36-0360	88	RRI-CH-36-0849	133	RRI-CH-36-1187		
44	RRI-CH-36-0361	89	RRI-CH-36-0851	134	RRI-CH-36-1190		
45	RRI-CH-36-0371	90	RRI-CH-36-0868	135	RRI-CH-36-1224		

ตารางที่ 2 รายชื่อพันธุ์ยางลูกผสม RRI-CH-39/1/1 ที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอ

ลำดับ	ลูกผสม	ลำดับ	ลูกผสม	ลำดับ	ลูกผสม
1	RRI-CH-39-0007	46	RRI-CH-39-0308	94	RRI-CH-39-2185
2	RRI-CH-39-0008	47	RRI-CH-39-0318	95	RRI-CH-39-2191
3	RRI-CH-39-0010	48	RRI-CH-39-0322	96	RRI-CH-39-2192
4	RRI-CH-39-0017	49	RRI-CH-39-0323	97	RRI-CH-39-2194
5	RRI-CH-39-0023	50	RRI-CH-39-0333	98	RRI-CH-39-2195

6	RRI-CH-39-0024	51	RRI-CH-39-0334	99	RRI-CH-39-2200
7	RRI-CH-39-0029	52	RRI-CH-39-0343	100	RRI-CH-39-2202
8	RRI-CH-39-0033	53	RRI-CH-39-0344		
9	RRI-CH-39-0034	54	RRI-CH-39-0348		
10	RRI-CH-39-0040	55	RRI-CH-39-0349		
11	RRI-CH-39-0057	56	RRI-CH-39-0354		
12	RRI-CH-39-0062	57	RRI-CH-39-0357		
13	RRI-CH-39-0065	58	RRI-CH-39-0362		
14	RRI-CH-39-0067	59	RRI-CH-39-0372		
15	RRI-CH-39-0072	60	RRI-CH-39-0377		
16	RRI-CH-39-0074	61	RRI-CH-39-0378		
17	RRI-CH-39-0082	62	RRI-CH-39-0383		
18	RRI-CH-39-0089	63	RRI-CH-39-0398		
19	RRI-CH-39-0090	64	RRI-CH-39-0404		
20	RRI-CH-39-0127	65	RRI-CH-39-0405		
21	RRI-CH-39-0130	66	RRI-CH-39-0409		
22	RRI-CH-39-0132	67	RRI-CH-39-0434		
23	RRI-CH-39-0137	68	RRI-CH-39-0450		
24	RRI-CH-39-0139	69	RRI-CH-39-0454		
25	RRI-CH-39-0142	70	RRI-CH-39-0477		
26	RRI-CH-39-0144	71	RRI-CH-39-0480		
27	RRI-CH-39-0147	72	RRI-CH-39-0483		
28	RRI-CH-39-0148	73	RRI-CH-39-2076		
29	RRI-CH-39-0153	74	RRI-CH-39-2077		
30	RRI-CH-39-0155	75	RRI-CH-39-2078		
31	RRI-CH-39-0162	76	RRI-CH-39-2079		
32	RRI-CH-39-0164	77	RRI-CH-39-2084		
33	RRI-CH-39-0165	78	RRI-CH-39-2085		
34	RRI-CH-39-0205	79	RRI-CH-39-2091		
35	RRI-CH-39-0215	80	RRI-CH-39-2092		
36	RRI-CH-39-0253	81	RRI-CH-39-2093		
37	RRI-CH-39-0254	82	RRI-CH-39-2095		
38	RRI-CH-39-0264	83	RRI-CH-39-2100		
39	RRI-CH-39-0269	84	RRI-CH-39-2101		
40	RRI-CH-39-0270	85	RRI-CH-39-2103		
41	RRI-CH-39-0278	86	RRI-CH-39-2164		
42	RRI-CH-39-0299	87	RRI-CH-39-2174		
43	RRI-CH-39-0300	88	RRI-CH-39-2175		
44	RRI-CH-39-0303	89	RRI-CH-39-2176		
45	RRI-CH-39-0307	90	RRI-CH-39-2184		

ตารางที่ 3 ชนิดของคู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกและลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์ที่ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่

Primer	Sequence (5' to 3')	จำนวนเบสของไพรเมอร์
--------	---------------------	---------------------

M574	(F) TGT GTC CTC TAC TTG TCT TCA TTT G	25
	(R) GCC TCT ACT TTT CTT TCT CCT TTA T	25
Ma179	(F) CAA AGT TGA AAA TGT TAA AGG GAA	24
	(R) CAT ATC AAG AAA CAC AGC AAA AAA	24
mA17	(F) AAA CAT GCA CAC ACA CAA ACC T	22
	(R) CTT GCT CTT ACC CCT TCC TG	20
mT65	(F) ATA ATT CCA GGC CAG TTC AAA G	22
	(R) GCT CAA AGC AAC GAA AAC AAG	21

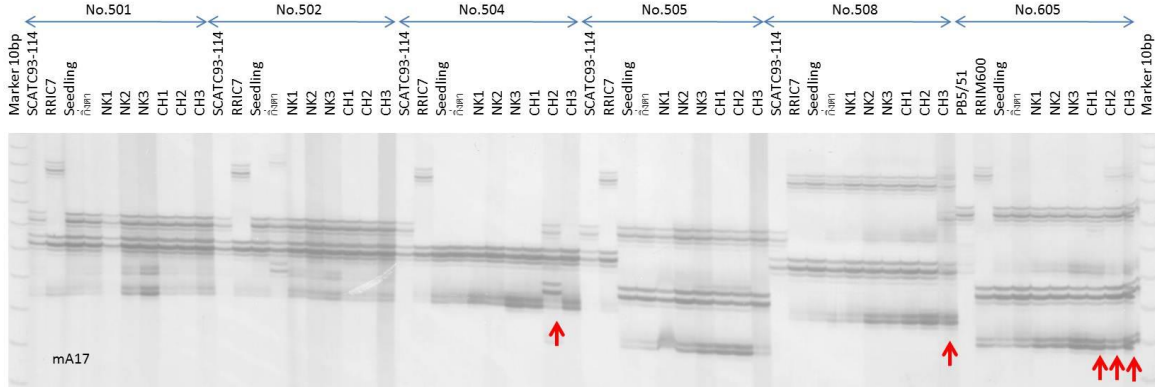
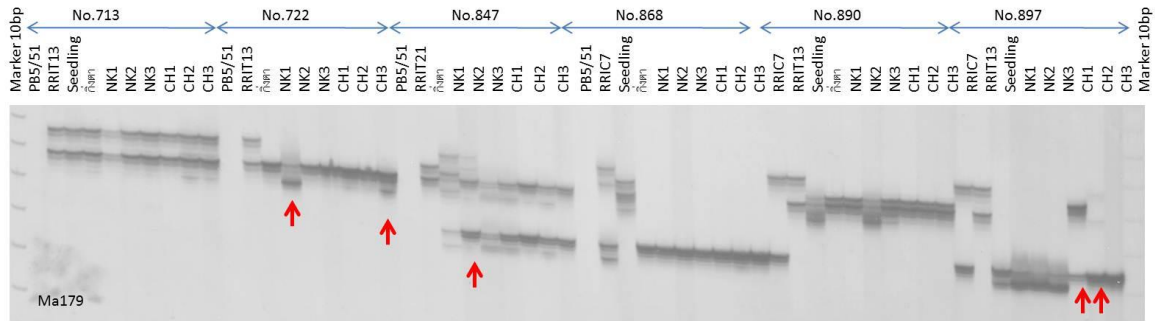
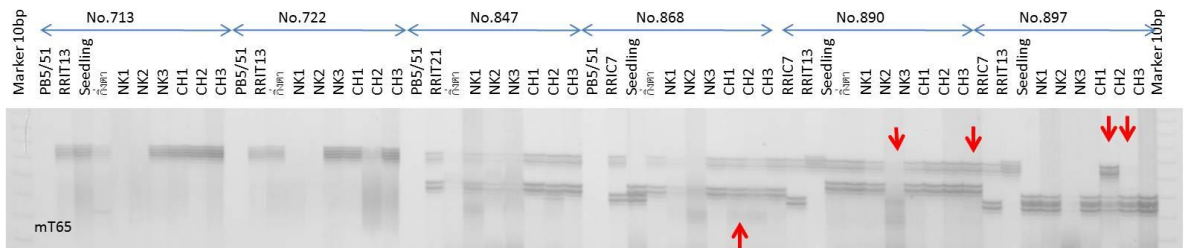
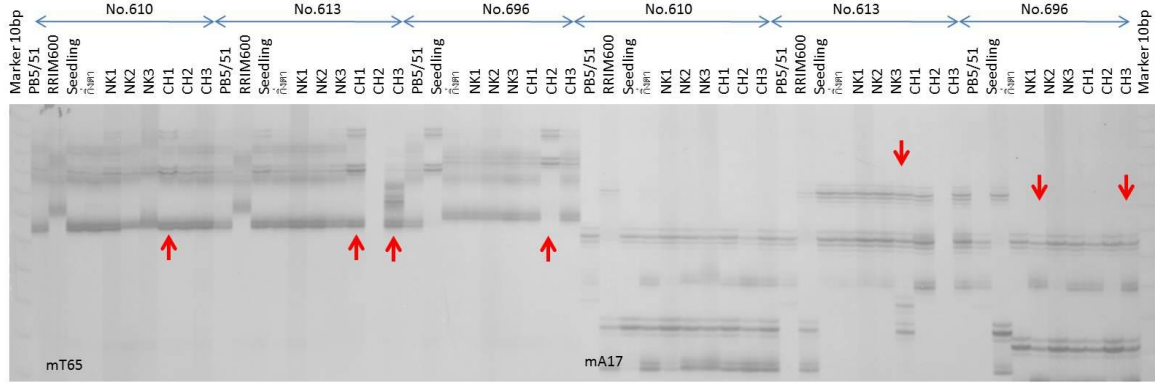
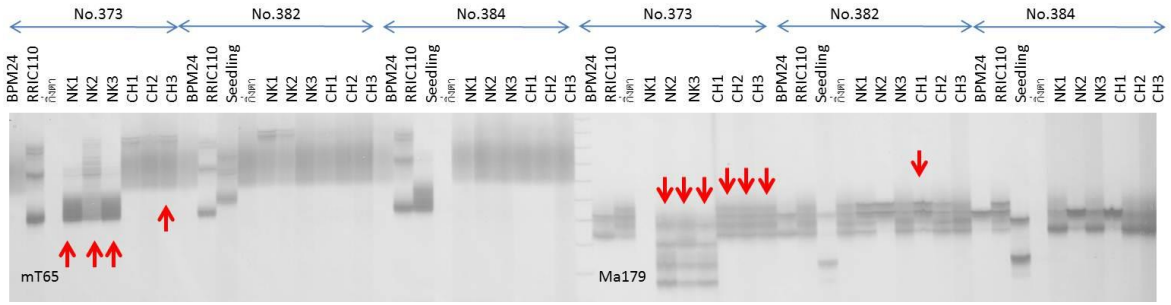
ตารางที่ 3 ชนิดของคู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกและลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่

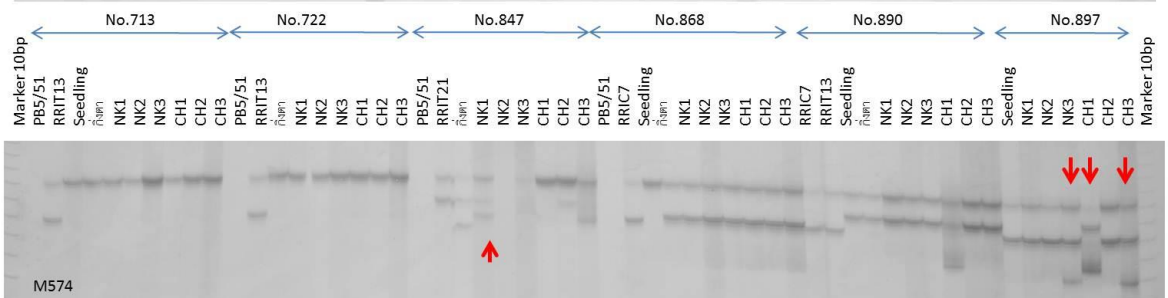
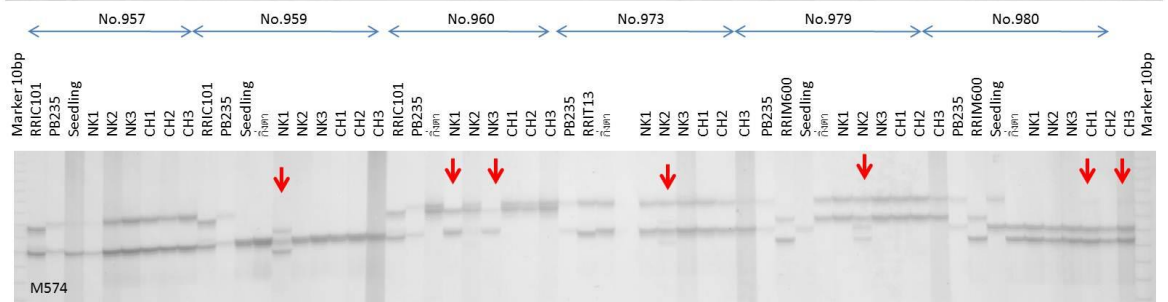
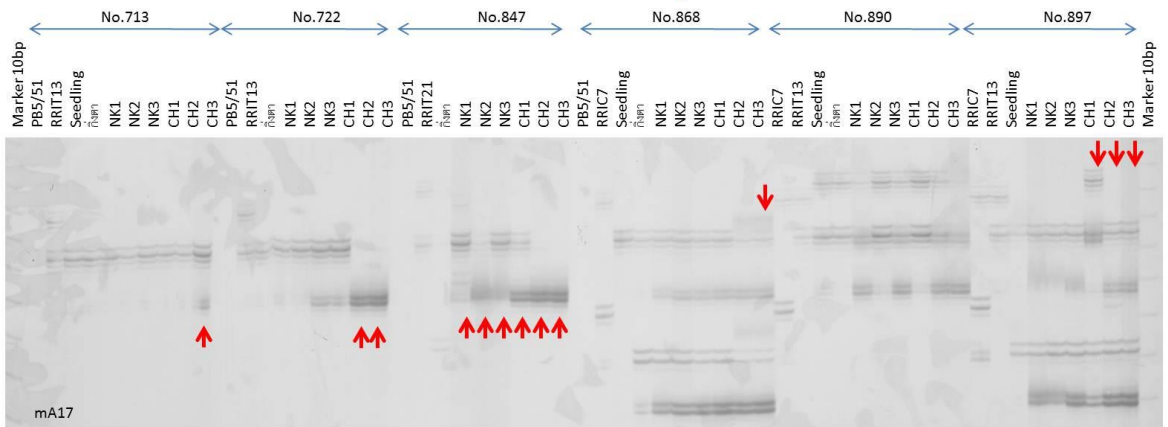
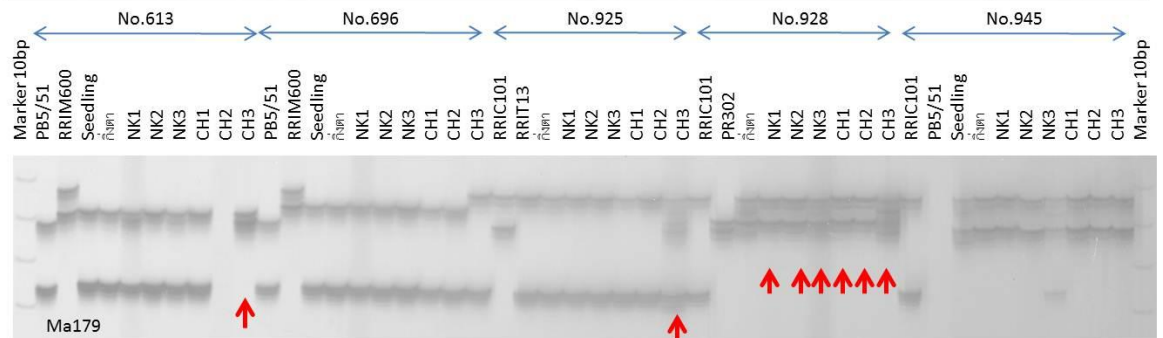
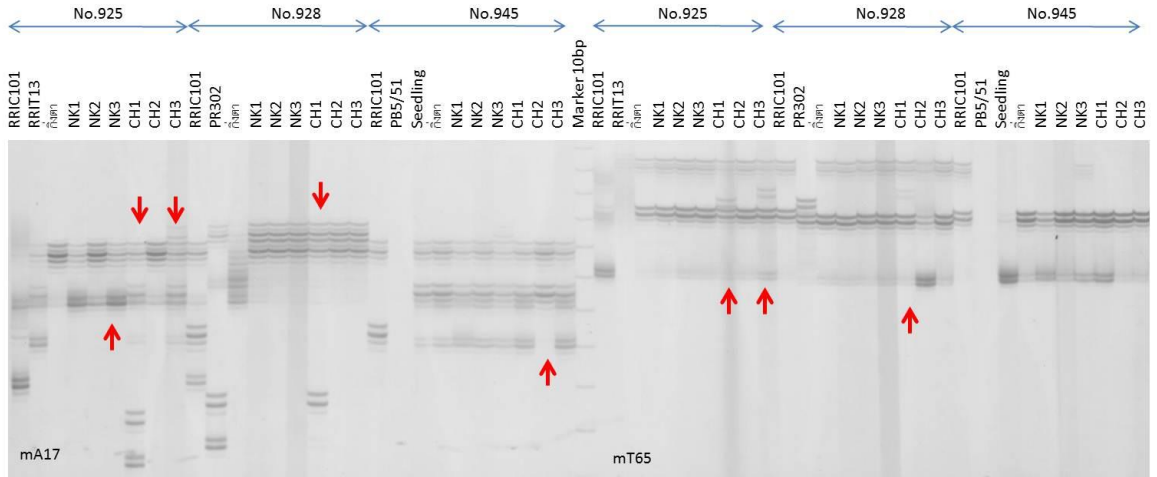
Primer	Sequence (5' to 3')	จำนวนเบสของไพรเมอร์
a131 F	CCT ATA TTG AAT TGG GCT TTT GA	23
a131 R	AAG ATG AAG TGA TGG AAG ACA ACA	24
a312 F	GGG GTC CTG TAT TCC TTT CA	20
a312 R	TGC CTC TTG CTG GAT GCT AT	20

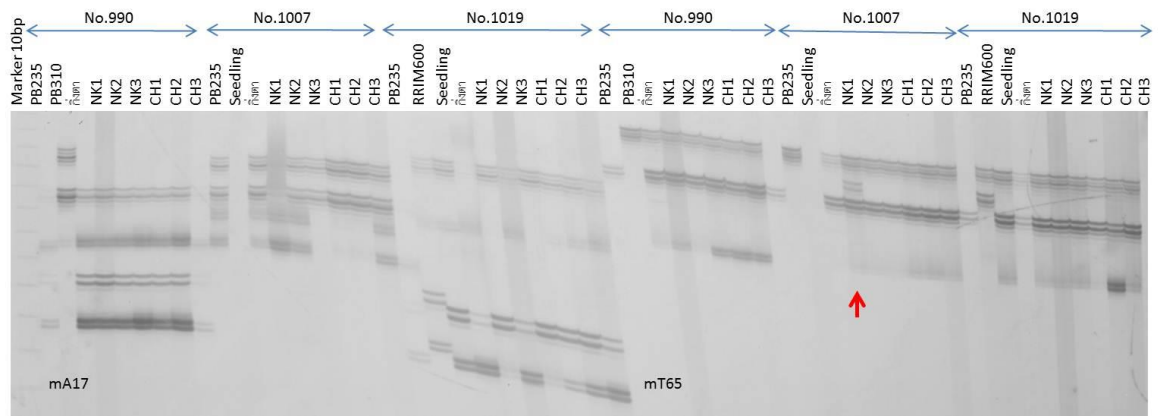
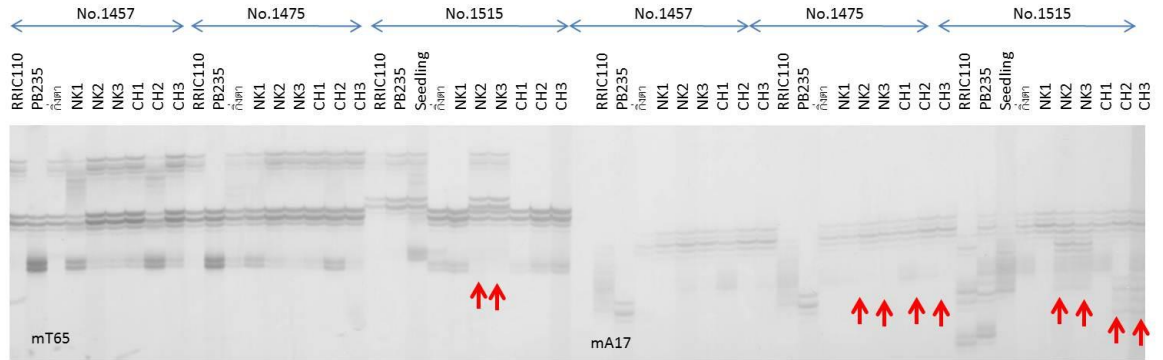
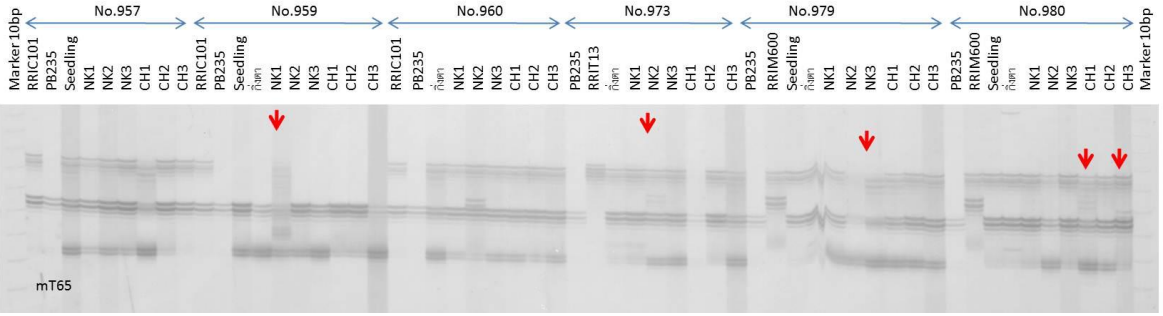
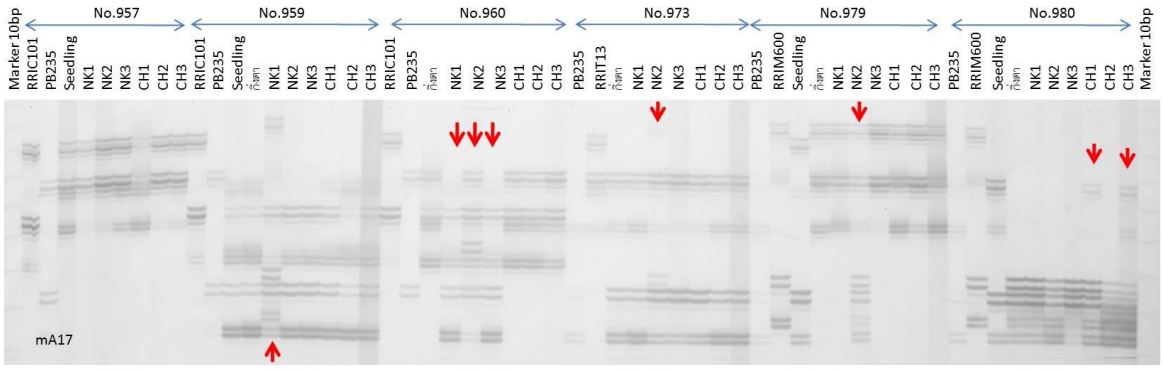
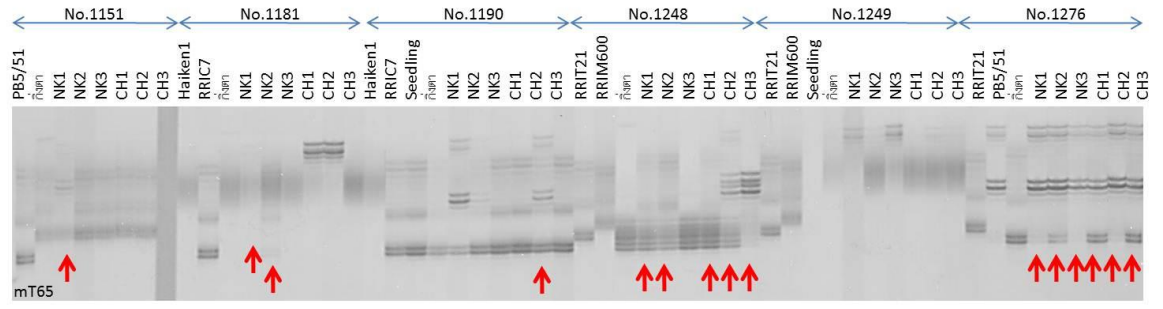


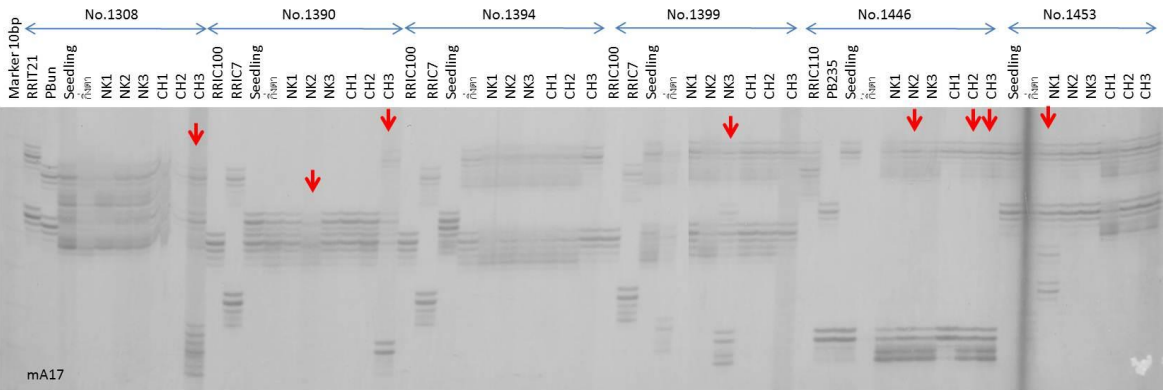
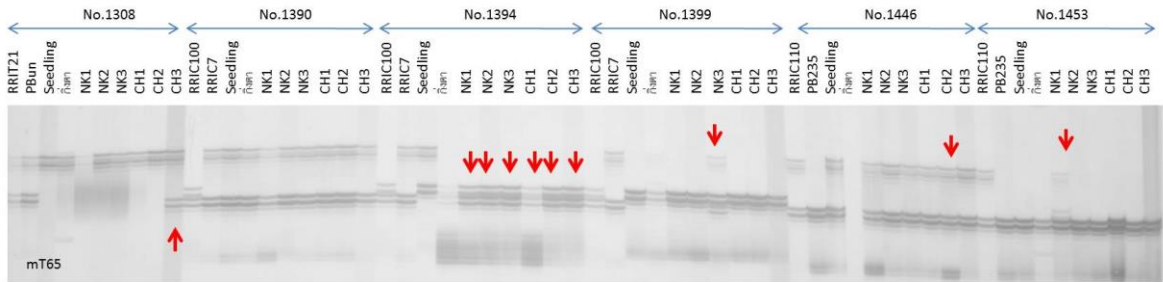
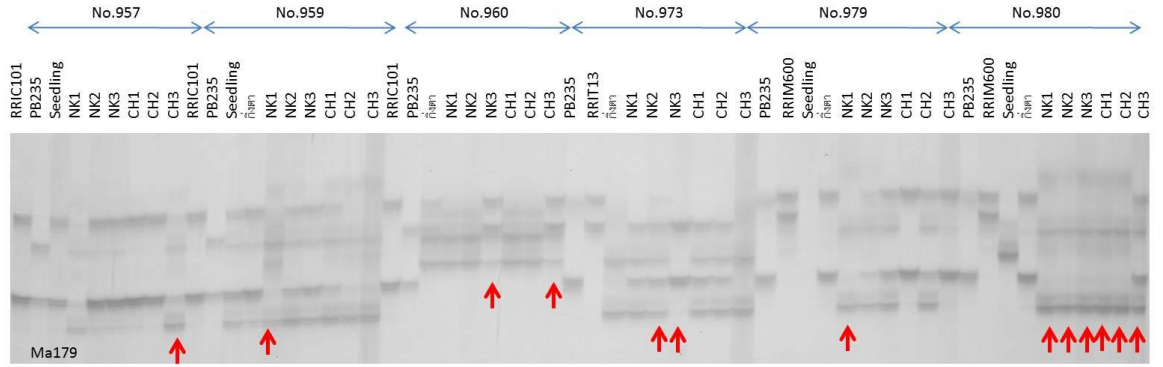


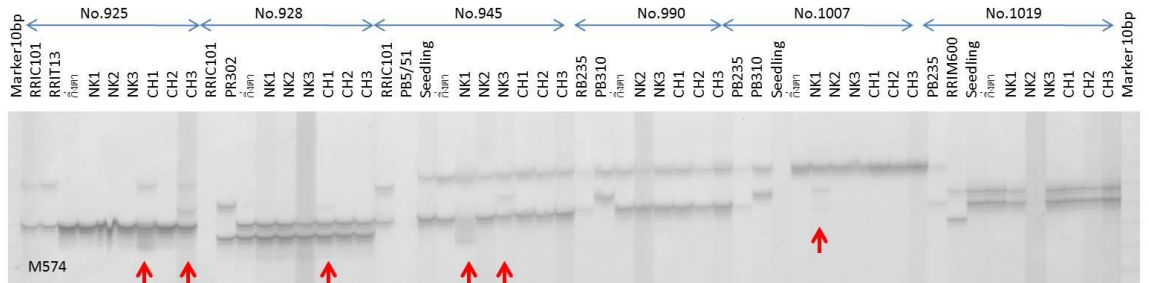
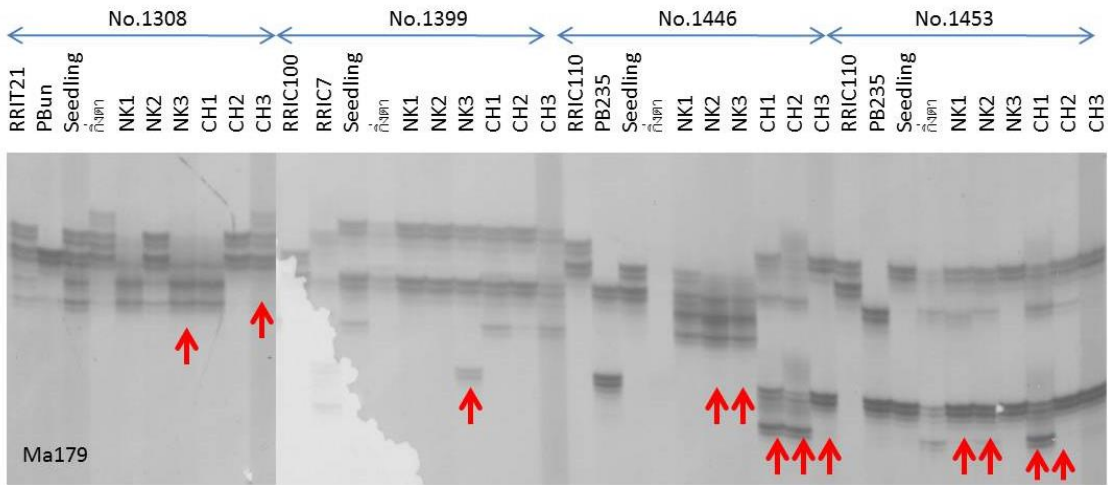
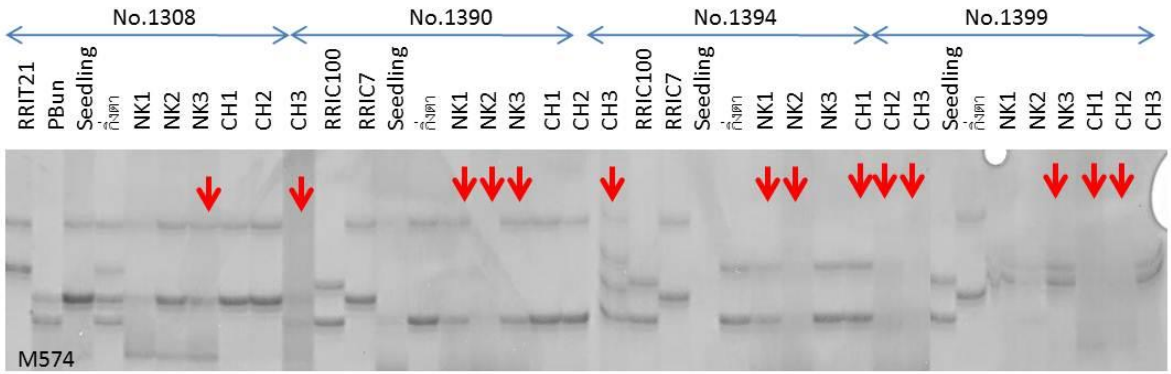












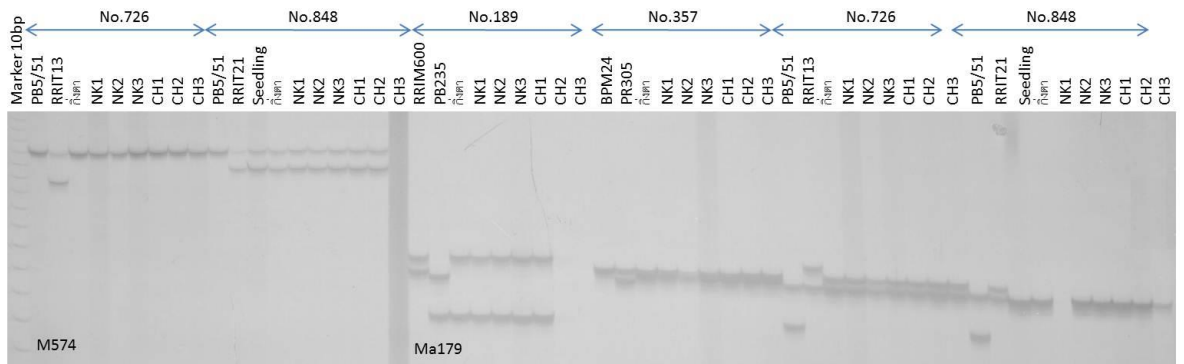
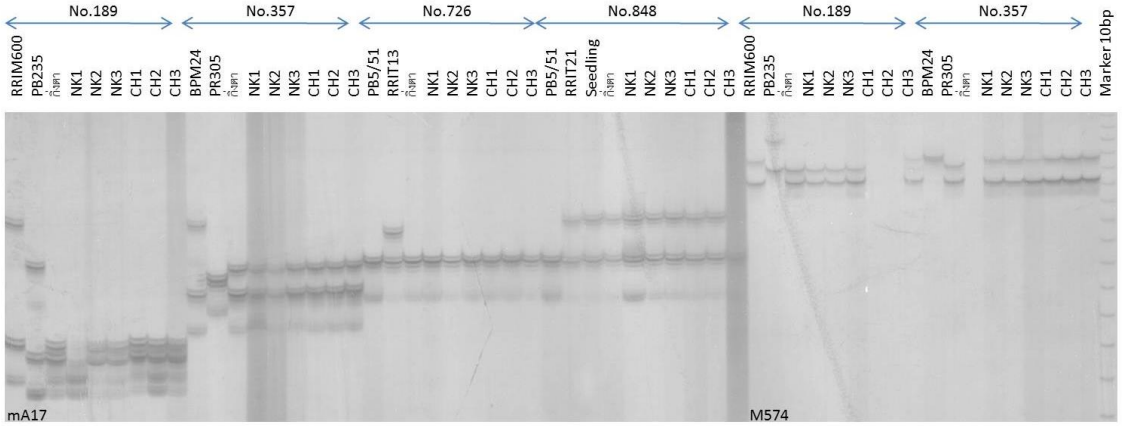
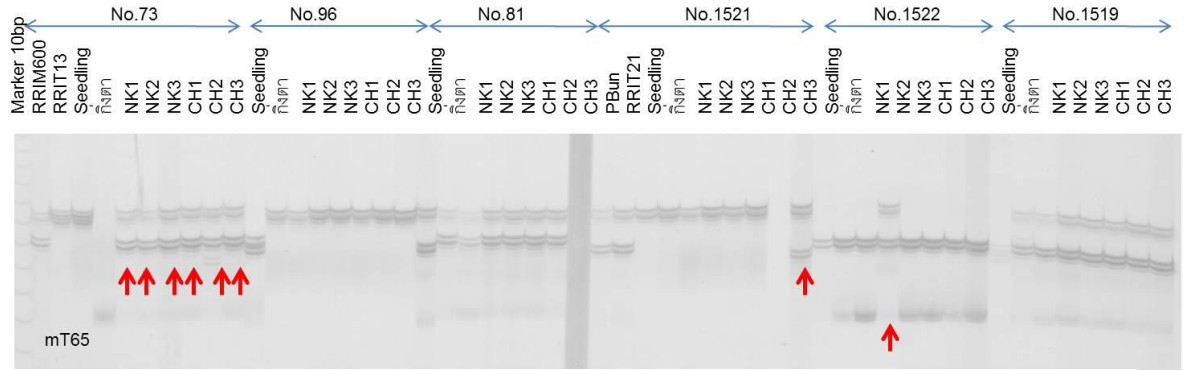




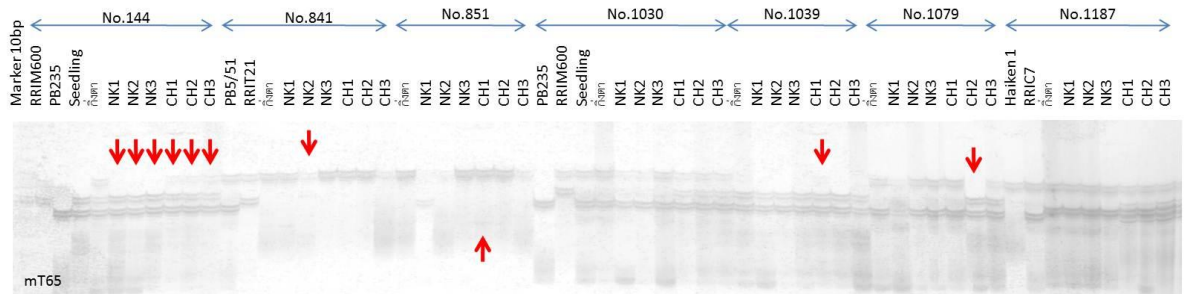
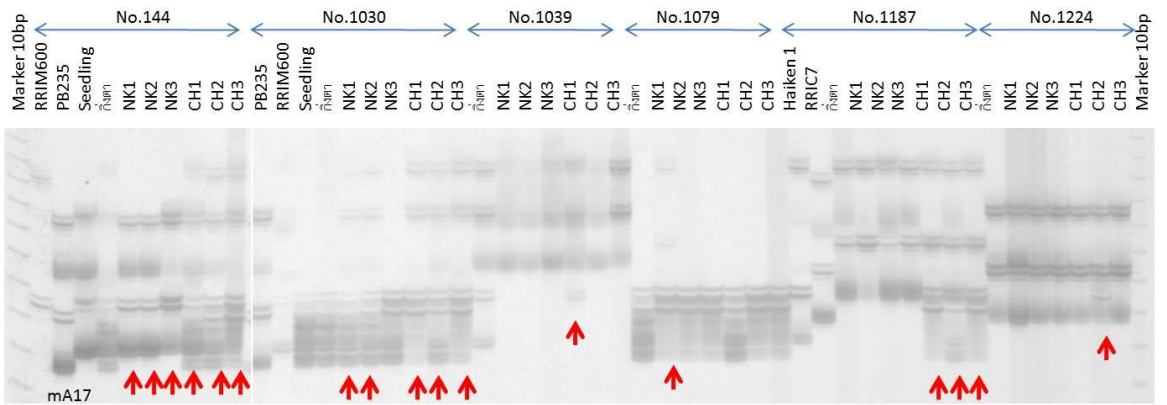
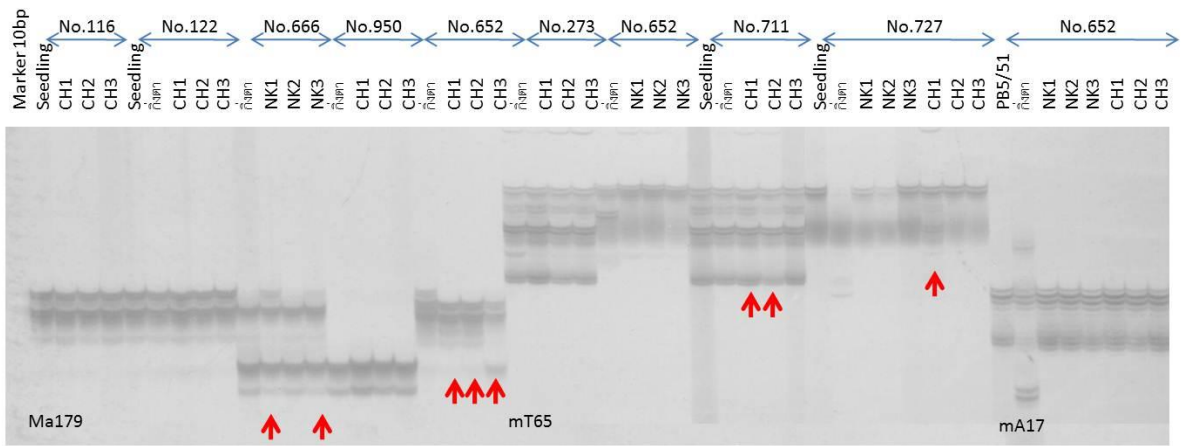
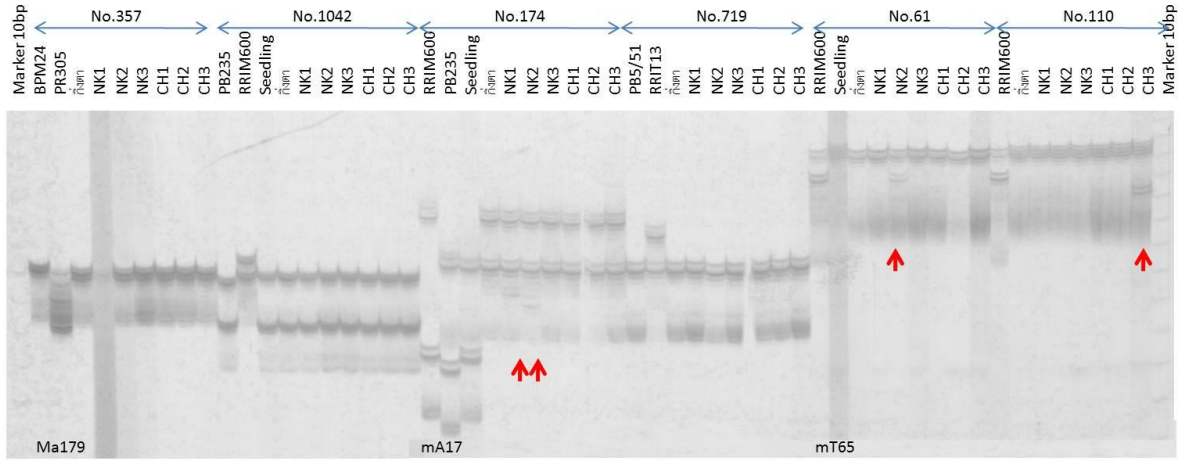


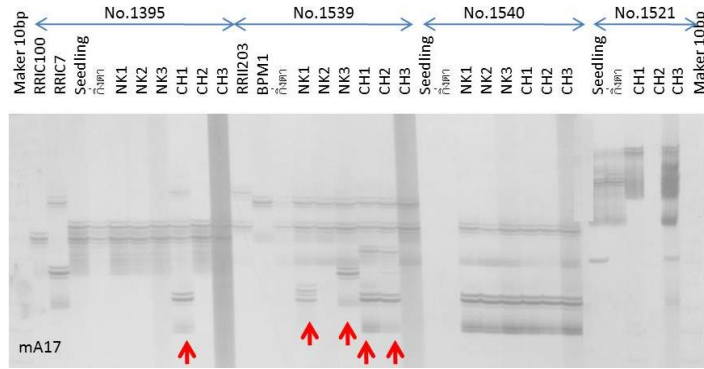
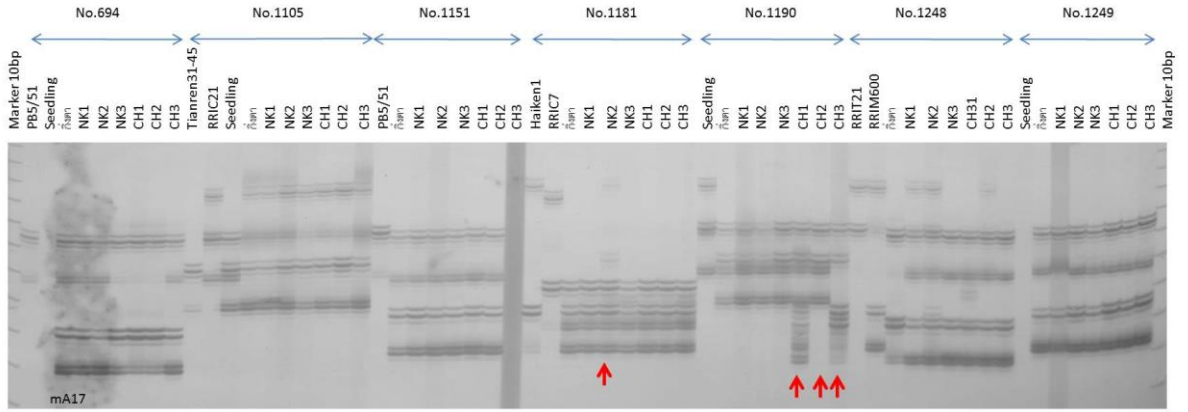
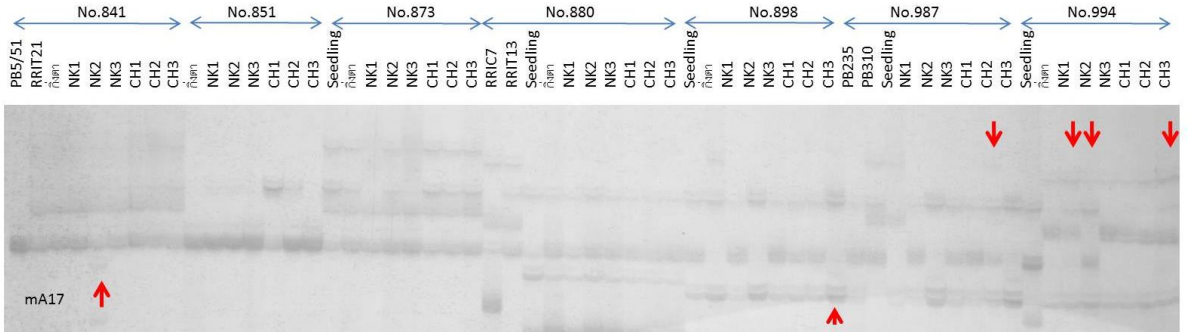
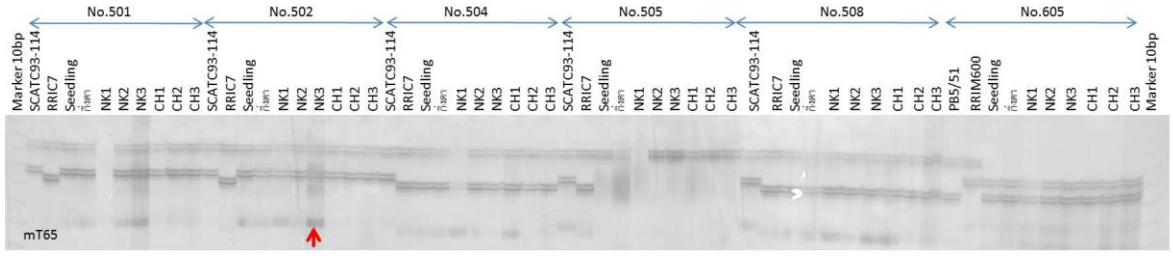


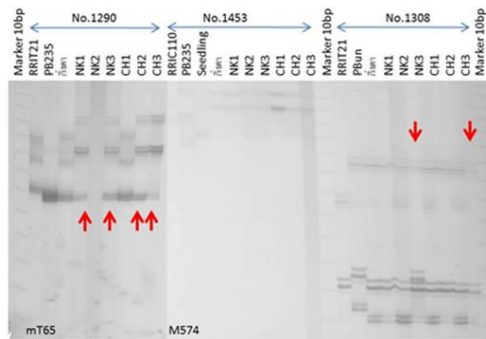
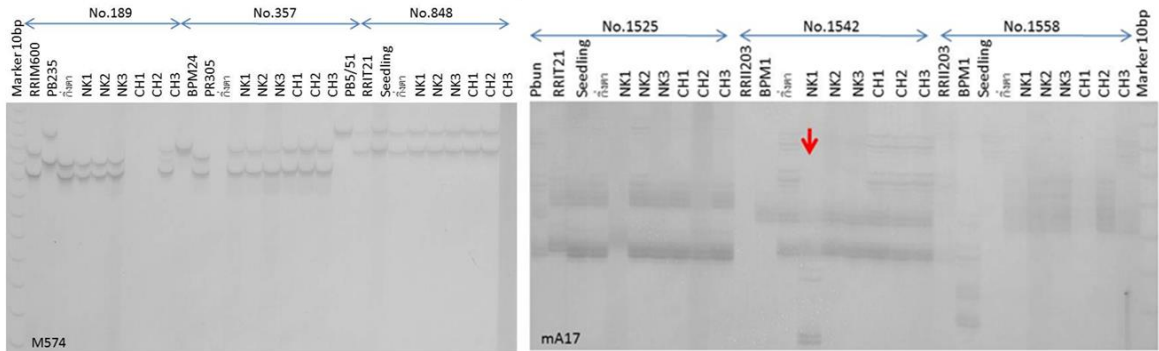
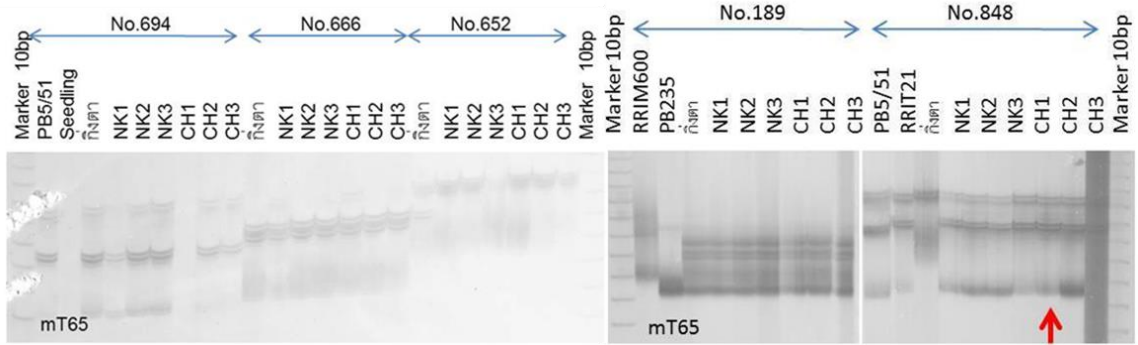
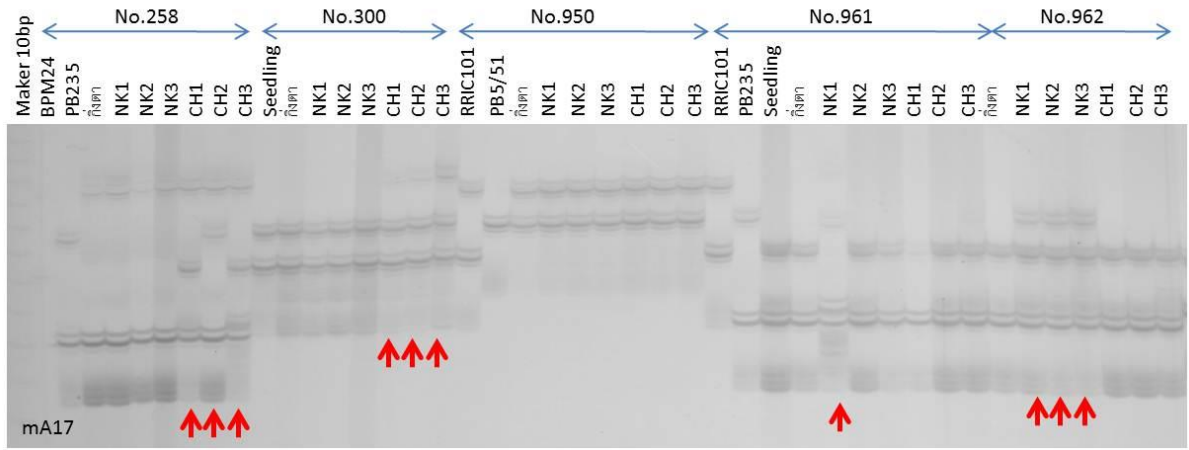


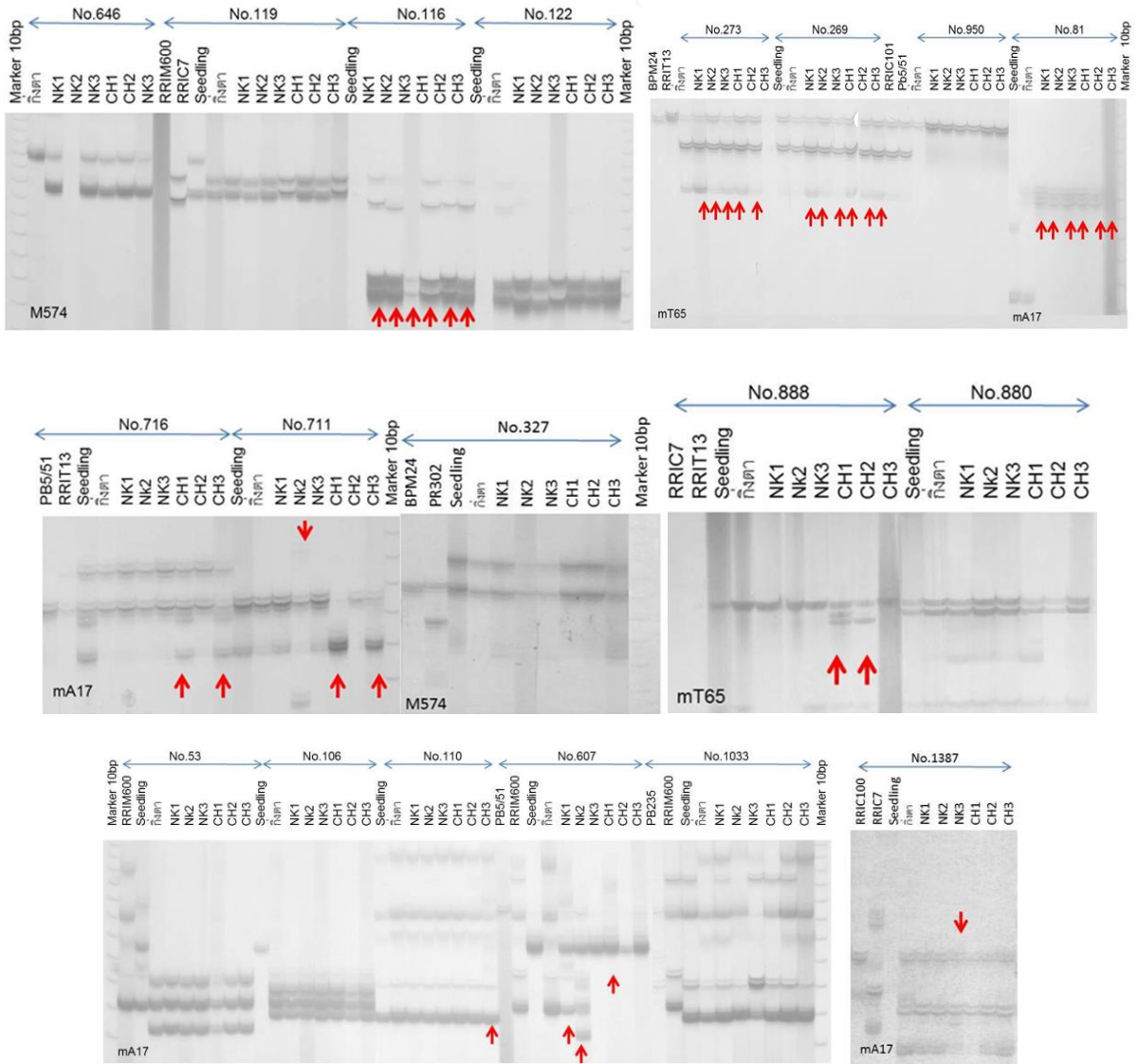






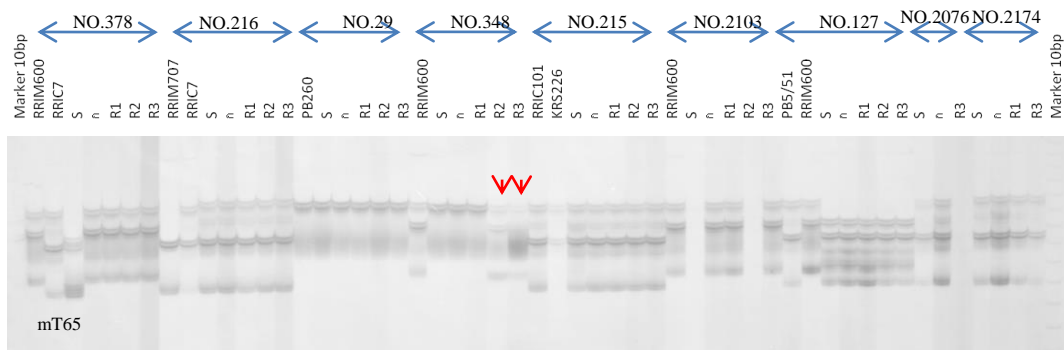
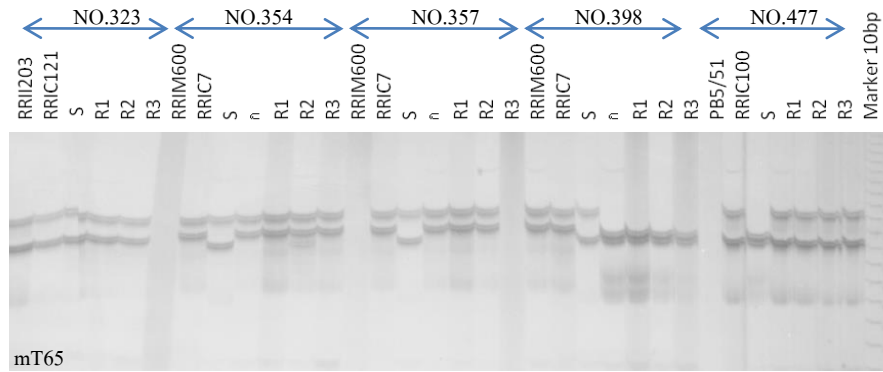
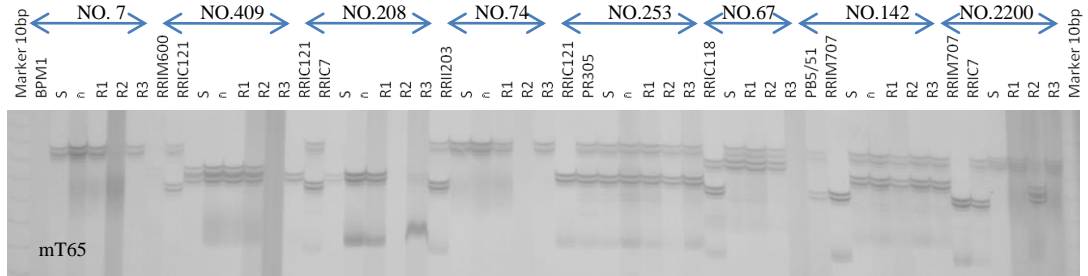






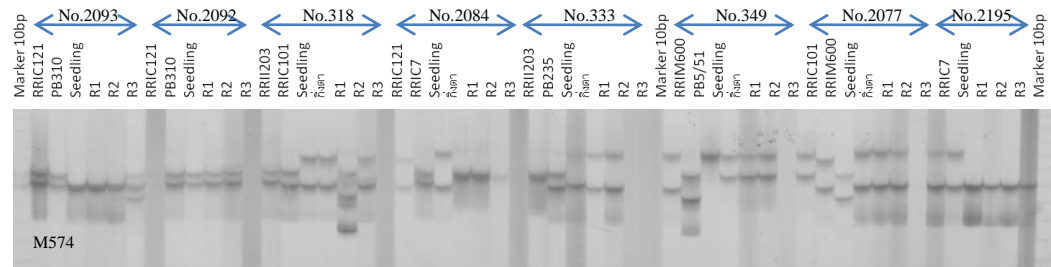
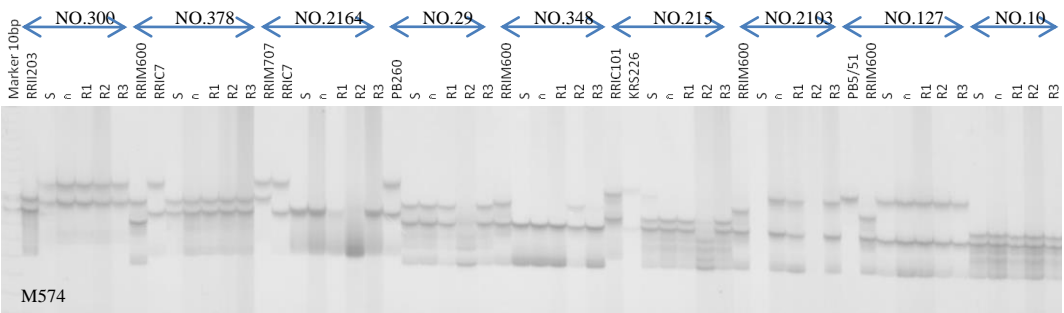
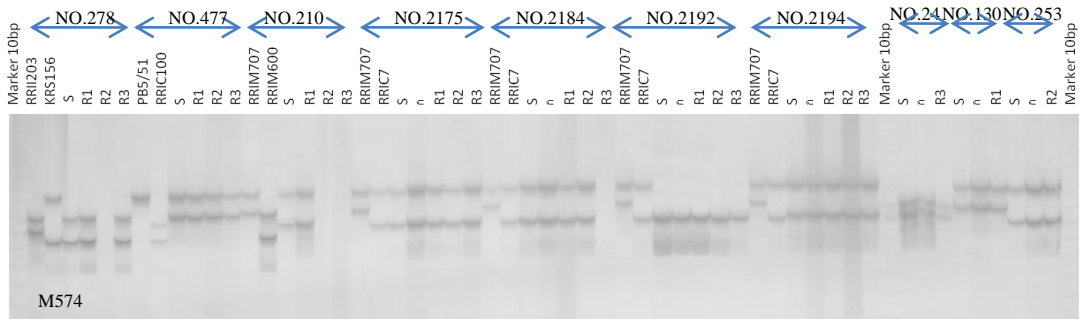
รูปที่ 1 การตรวจสอบพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยยางหนองคายและละเชิงเทราด้วยไพรเมอร์ M574, Ma179, mt65 และ mA17 โดยการรวมดีเอ็นเอ (bulk) เปรียบเทียบกับข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาตรฐาน



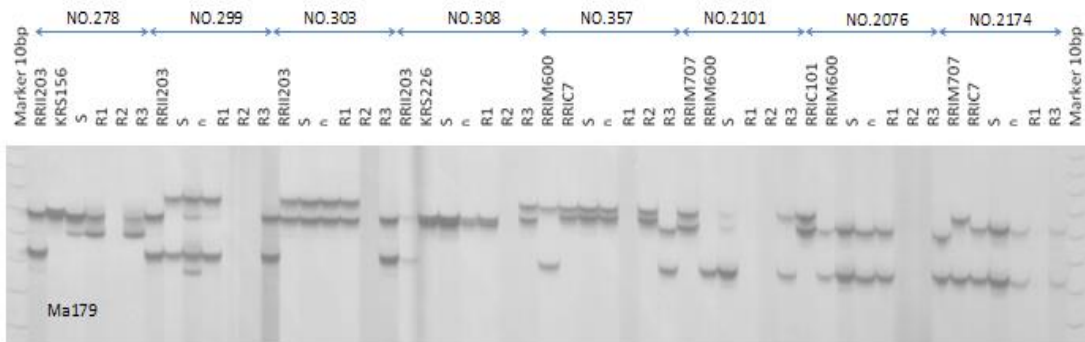
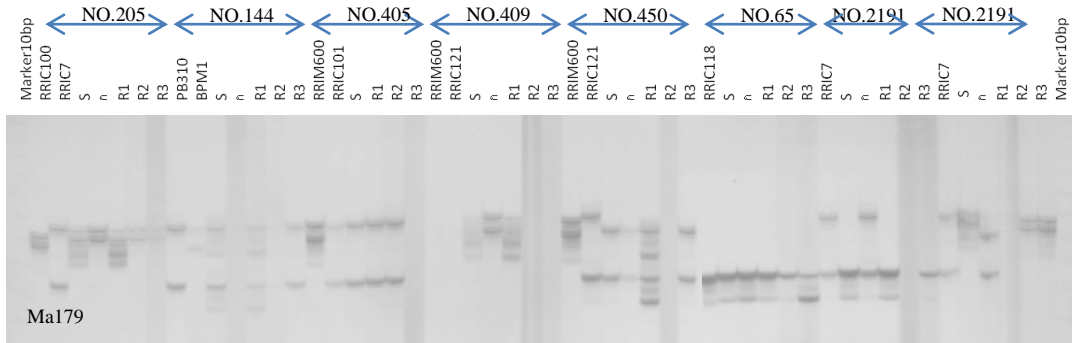
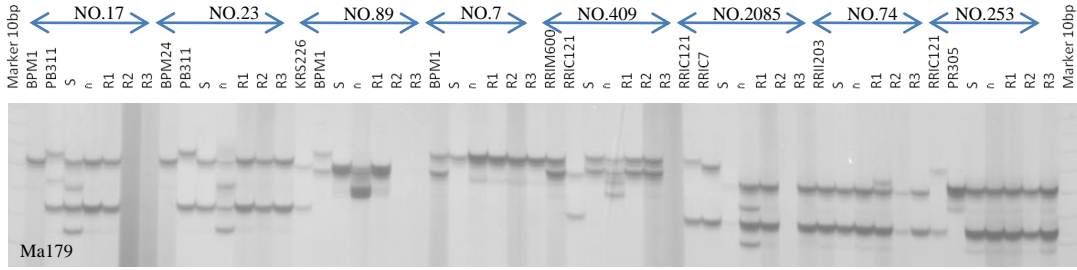


รูปที่ 2 การตรวจสอบพันธุ์ยางลูกผสม RRI-CH-39/1/1 ที่ศูนย์วิจัยยางหนองคายด้วยไพรเมอร์ mT65 โดยการรวมดีเอ็นเอ (bulk) เปรียบเทียบกับข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาตรฐาน





รูปที่ 4 การตรวจสอบพันธุ์อย่างลูกผสม RRI-CH-39/1/1 ที่ศูนย์วิจัยยางหนองคายด้วยไพรเมอร์ M574 โดยการรวมดีเอ็นเอ (bulk) เปรียบเทียบกับข้อมูลสายพันธุ์ดีเอ็นเอมาตรฐาน



รูปที่ 5 การตรวจสอบพันธุ์ยางลูกผสม RRI-CH-39/1/1 ที่ศูนย์วิจัยยางหนองคายด้วยไพรเมอร์ Ma179 โดยการรวมดีเอ็นเอ (bulk) เปรียบเทียบกับข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาตรฐาน