

การพัฒนาการตรวจสอบเครื่องหมายสับที่สัมพันธ์กับผลผลิต น้ำยางของต้นยางพาราโดยใช้เทคนิค TaqMan Development of TaqMan Genotyping for Detection of Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Latex Yield in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*)

อินทอร โสทน และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

กัลยารัตน์ ภูสุตแสง

ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ฐิตาภรณ์ ภูมิไชย

สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย แขวงบางขุนนนท์ เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร 10700

รัชณี รัตนวงศ์

ศูนย์วิจัยยางหนองคาย ตำบลพระบาทนาสิงห์ อำเภอโพนพิสัย จังหวัดหนองคาย 43120

วิภาวี ชื่นโรจน์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ถนนรังสิต-นครนายก ตำบลรังสิต อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12100

Inthunon Sothon and Kittipat Ukoskit*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Gunlayarat Bhusudsawang

Central Scientific Instrument Center, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Thitaporn Phumichai

Rubber Authority of Thailand, Bang Khun Non, Bang Kok Noi, Bangkok 10700

Ratchanee Rattanawong

Nong Khai Rubber Research Station, Phrabat Nasing, Phon Phisai, Nong Khai 43120

Vipavee Chanroj

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture,
Rangsit-Nakhon Nayok Road, Rangsit, Thanyaburi, Pathum Thani 12100

บทคัดย่อ

ยางพาราเป็นหนึ่งในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย การคัดเลือกพันธุ์ลูกผสมที่ให้ผลผลิตน้ำยางสูงใช้ระยะเวลายาวนานและมีความแม่นยำต่ำ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค TaqMan ที่สามารถตรวจสอบเครื่องหมายสนิป ซึ่งสัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางของต้นยางพาราในช่วงฤดูแล้งและช่วงฤดูฝนอย่างมีประสิทธิภาพ ในตัวอย่างประชากรยางพาราธรรมชาติ สายพันธุ์จากบราซิล โดยเครื่องหมาย SNP6672 มียางพาราที่มีจีโนไทป์ heterozygous A/G ให้ค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำยางเฉลี่ยในช่วงฤดูแล้งลดลง 0.66 และ 0.72 กรัม/ต้น/ครั้งกรีด เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ homozygous A/A และ G/G และเครื่องหมาย SNP14857 มียางพาราที่มีจีโนไทป์ heterozygous C/T ให้ค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำยางเพิ่มขึ้นในช่วงฤดูแล้ง 1.37 กรัม/ต้น/ครั้งกรีด และในช่วงฤดูฝนเพิ่มขึ้น 3.0 กรัม/ต้น/ครั้งกรีด เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ homozygous T/T ดังนั้นการใช้เทคนิค TaqMan ในการศึกษาครั้งนี้ช่วยให้สะดวกในการคัดเลือก (marker assisted selection) ผลผลิตน้ำยางในกลุ่มประชากรขนาดใหญ่ โดยช่วยเพิ่มความมั่นใจว่าจะได้สายพันธุ์ยางพาราที่มีความเป็นเลิศภายในระยะเวลาที่สั้นลง

คำสำคัญ : ยางพารา; ผลผลิตน้ำยาง; เครื่องหมายสนิป; เทคนิค TaqMan

Abstract

The rubber tree is one of the leading commercial crops in Thailand. Phenotypic selection of hybrids performing high latex yield is time-consuming and low precision. Based on previous research showing single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with latex yield, this research aims to develop the TaqMan genotyping technique that can efficiently detect the SNPs associated with the rubber latex yield in the dry season and the wet season of Amazonian accessions. SNP genotyping of SNP6672 marker showed average latex yield in the dry season of heterozygous A/G that decreased 0.66 and 0.72 gram/tree/tapping average latex yield in the dry season of homozygous A/A and G/G. The heterozygous C/T of SNP14857 marker showed increasing in the average latex yield 1.37 gram/tree/tapping in the dry season and 3.0 gram/tree/tapping in the wet season, compared to the homozygous T/T. The TaqMan genotyping in this study would facilitate marker-assisted selection (MAS) of latex yield in large breeding populations with precision and shorter time.

Keywords: rubber tree; latex yield; single nucleotide polymorphism; TaqMan genotyping

1. บทนำ

ยางพาราเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการส่งออกยางมากเป็นอันดับหนึ่งของโลก เนื่องจากมีปริมาณการผลิตที่เพิ่มขึ้น [1] ซึ่งได้ดำเนินการทั้งการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต และการ

ขยายพื้นที่ปลูก ส่งผลให้ทางกรมวิชาการเกษตรปรับปรุงพื้นที่การปลูกยางพาราใหม่โดยขยายพื้นที่ในเขตอื่นซึ่งมีความเหมาะสมน้อยกว่าภาคใต้ในเรื่องของปริมาณน้ำฝนที่น้อยกว่า และมีช่วงอุณหภูมิระหว่างวันที่กว้างได้แก่ ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียง

เหนือ ทำให้จำเป็นที่ต้องเร่งศึกษาและปรับปรุงพันธุ์ยางพาราให้เหมาะสมกับสภาพพื้นที่

ยางพาราเป็นไม้ยืนต้นที่ต้องใช้ระยะเวลานาน การทดสอบและคัดเลือกพันธุ์ลูกผสมที่มีคุณสมบัติเด่นดังที่ต้องการ นักปรับปรุงพันธุ์ต้องเสียเวลาในการที่จะพัฒนาเพื่อหาพันธุ์ใหม่ ๆ ดังนั้นการใช้วิธีการผสมและคัดเลือกพันธุ์แบบมาตรฐาน (classical breeding) โดยที่ไม่มีข้อมูลทางพันธุกรรมอย่างละเอียดของยางพารามาประกอบ ทำให้ไม่สามารถมั่นใจว่าจะได้ผลตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ ฉะนั้นการนำความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุศาสตร์มาช่วยควบคู่กับการคัดเลือกพันธุ์ด้วยวิธีมาตรฐานจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา โดยสามารถช่วยสร้างให้เกิดความมั่นใจว่าจะได้สายพันธุ์ยางพาราที่มีความเป็นเลิศภายในระยะเวลาที่สั้นลง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับสถานการณ์ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดอื่น เช่น ข้าว ข้าวโพด แล้ว การวิจัยยางพาราในเชิงชีวภาพและพันธุศาสตร์ยังมีอยู่อย่างจำกัด หนึ่งในงานวิจัยที่กำลังได้รับแรงสนับสนุนอย่างมาก คือ การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อนำมาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ยางพารา (marker assisted selection) เครื่องหมายโมเลกุลที่เคยถูกพัฒนาและนำไปใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ในยางพารา ได้แก่ randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) [2], amplified fragment length polymorphism (AFLP) [3,4], restriction fragment length polymorphism (RFLP) [4] simple sequence repeat [5] เป็นต้น แม้ว่าจะมีความก้าวหน้าในการพัฒนาและการใช้เครื่องหมายโมเลกุล แต่ประเภทและจำนวนของเครื่องหมายโมเลกุลยังไม่เพียงพอต่อการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา ความก้าวหน้าในเทคโนโลยีการวิเคราะห์จีโนมไทป์และการวิเคราะห์ลำดับเบส ทำให้ราคาต่อชุดข้อมูลของเครื่องหมาย

โมเลกุลลดลงอย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องหมายสปี (single nucleotide polymorphism, SNP) [6,7] เครื่องหมายสปีพบในความถี่ประมาณหนึ่งต่อ 100-500 คู่เบส ในจีโนมพืช (ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์) เช่น โดยเฉลี่ยเครื่องหมายสปีหนึ่งเครื่องหมายจะพบทุก ๆ 121 คู่เบส ในมันสำปะหลัง [8] ทุก ๆ 204 คู่เบส ในข้าวโพด [9] ทุก ๆ 500 คู่เบส ใน Arabidopsis [10] และในยางพาราจะมีความถี่ของเครื่องหมายสปีอยู่ที่ 0.03 ถึง 42.62 เครื่องหมายต่อกิโลเบส [11]

งานวิจัยก่อนหน้านี้ใช้การวิเคราะห์ association mapping แบบทั้งจีโนม (genome wide association mapping) และการวิเคราะห์ความไม่สมดุลของลิงเกจ (linkage disequilibrium, LD) โดยใช้เครื่องหมายสปีในประชากรยางพาราธรรมชาติ ทำให้ค้นพบเครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมาย ได้แก่ SNP6672 ในยีนที่สัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางในช่วงฤดูแล้ง ซึ่งพบว่าเป็นยีน chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic และ SNP14857 ในยีนที่สัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางในช่วงฤดูฝน พบว่าเป็นยีน splicing factor U2af small subunit B-like [11] ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเทคนิคที่ง่ายที่สามารถตรวจสอบเครื่องหมายสปีซึ่งค้นพบในงานวิจัยดังกล่าว โดยใช้เทคนิค TaqMan เพื่อให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ยางพาราในโครงการปรับปรุงพันธุ์

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างยางพารา

พันธุ์ยางพาราธรรมชาติ 133 สายพันธุ์ จากการรวบรวมพันธุ์จาก 3 รัฐ ในประเทศบราซิล ได้แก่ Acre 11 สายพันธุ์ Mato Grosso 37 สายพันธุ์ Rondonia 83 สายพันธุ์ และไม่ทราบแหล่งกำเนิด 2

สายพันธุ์ นำมาเพาะปลูกที่ศูนย์วิจัยวิจัยยาง จังหวัดหนองคาย กรมวิชาการเกษตร สายพันธุ์ละ 5 ซ้ำ สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของแต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธี CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) [12] วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm เปรียบเทียบกับการสังเกตการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (0.8 % อะกาโรสเจล)

2.2 การเก็บข้อมูลผลผลิตน้ำยางพารา

กรีตเก็บน้ำยางความสูงลำต้น 1.5 เมตร จากผิวดิน เส้นรอบลำต้น 50 เซนติเมตร ทุก 2 วัน วัดค่าน้ำยางพาราที่เก็บได้มีหน่วยเป็นกรัมต่อต้นต่อครั้ง กรีต ช่วงเวลาเก็บน้ำยางพารา คือ ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนมกราคม งานวิจัยนี้ใช้ข้อมูลการเก็บตัวอย่างน้ำยางในเดือนพฤษภาคมและเดือนกันยายนของปี พ.ศ. 2549-2552, 2554 และ 2557 เพื่อเปรียบเทียบการให้ผลผลิตน้ำยางในช่วงช่วงฤดูฝน (YW) กับช่วงฤดูแล้ง (YD) [11]

2.3 การวิเคราะห์เครื่องหมายสปีโดยใช้เทคนิค TaqMan® probe-based real-time PCR

การวิเคราะห์เครื่องหมายสปีในการทดลองนี้ใช้เครื่องหมายสปีจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [11] ได้แก่ เครื่องหมายอยู่ในยีนที่กำหนดรหัสโปรตีน chlorophyll a-b binding protein13 ซึ่งสัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางในช่วงฤดูแล้ง (SNP6672) และ

เครื่องหมายอยู่ในยีนที่กำหนดรหัสโปรตีน splicing factor U2AF small subunit B-like ซึ่งสัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางในช่วงฤดูฝน (SNP14857) ไพร์เมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อเครื่องหมายสปีแต่ละเครื่องหมายนั้นถูกออกแบบเพื่อทดสอบด้วยวิธี TaqMan® Assay Design โดยบริษัท Applied Biosystems (ตารางที่ 1)

2.4 การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยวิธี TaqMan®

การวิเคราะห์จีโนไทป์เพื่อแสดงแอลลีลที่ต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ด้วยปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์ในพีซีอาร์เพลทชนิด 384 ช่อง แต่ละช่องประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ 4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, 2X TaqMan Genotyping Master Mix, 40X TaqMan Genotyping Assay Mix และปรับปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่ปลอดเชื้อ (ddH₂O) ดำเนินปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์ในเครื่อง Quanstudio 12K Flex เลือกการทดสอบจีโนไทป์ (genotyping) ใช้ TaqMan® เป็นสารสำหรับตรวจจับเป้าหมาย ตั้งค่าสภาวะการทำปฏิกิริยา real-time PCR เริ่มต้นด้วย pre-read stage 60 °C 30 วินาที จำนวน 1 รอบ hold stage 95 °C 10 นาที จำนวน 1 รอบ PCR stage อุณหภูมิ 95 °C 15 วินาที 60 °C 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ post-read stage 60 °C 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อเครื่องดำเนินการเสร็จสิ้น จะแสดงผลการวิเคราะห์ในหน้าโปรแกรม Quan Studio Real-time PCR Software v1.3 [13]

Table 1 Sequences of primers and probes for TaqMan® assay

Markers	Primers (5'→3')	Probes (FAM)	Probes (VIC)
SNP6672	F-CACCTTGAGCTCTGCAAATGTAAC	CTTGAGACGATCCT	CCTTGAGATGATCCT
(A/G)	R-GTGGCCAGTACTTTGATCCTCTAG		
SNP14857	F-CGCAGCCGAAGCAGAAG	ACTACGATGCCTATAAGG	ACTACGATGCCTGTAAGG
(C/T)	R-CCACGACCACCATAATAGTACTGTT		

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์การแจกแจงแบบปกติของลักษณะผลผลิตน้ำยางของยางพาราทั้งในช่วงฤดูแล้งและช่วงฤดูฝน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายสลิปกับลักษณะผลผลิตน้ำยางทั้งในช่วงฤดูแล้งและช่วงฤดูฝนของตัวอย่างยางพารา ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} < 0.05$

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การให้ผลผลิตน้ำยาง

ศึกษาเปรียบเทียบการให้ผลผลิตน้ำยางในช่วงฤดูแล้ง (YD) กับช่วงฤดูฝน (YW) โดยใช้ค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำยางในเดือนพฤษภาคมและเดือน กันยายนของปี พ.ศ. 2549-2552, 2554 และ 2557 ในตัวอย่าง

ยางพาราธรรมชาติ 133 สายพันธุ์ ค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำยางในช่วงฤดูแล้ง คือ 0.41-14.93 กรัม/ต้น/กรีด ช่วงฤดูฝนมีค่า 0.64-29.18 กรัม/ต้น/กรีด (ตารางที่ 2)

3.2 การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายสลิป

3.2.1 วิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมาย SNP6672 ด้วยโปรแกรม QuanStudio Real-time PCR Software v1.3 แสดงกลุ่มตัวอย่างระหว่างค่า fluorescence ของ VIC ซึ่งเป็นแอลลีล A และค่า fluorescence ของ FAM ซึ่งเป็นแอลลีล G พบว่าเครื่องหมาย SNP6672 ในตัวอย่างยางพาราธรรมชาติ 133 สายพันธุ์ มีจีโนไทป์ 3 รูปแบบ ได้แก่ homozygous A/A จำนวน 57 ต้น homozygous G/G จำนวน 11 ต้น และ heterozygous A/G จำนวน 65 ต้น (รูปที่ 1)

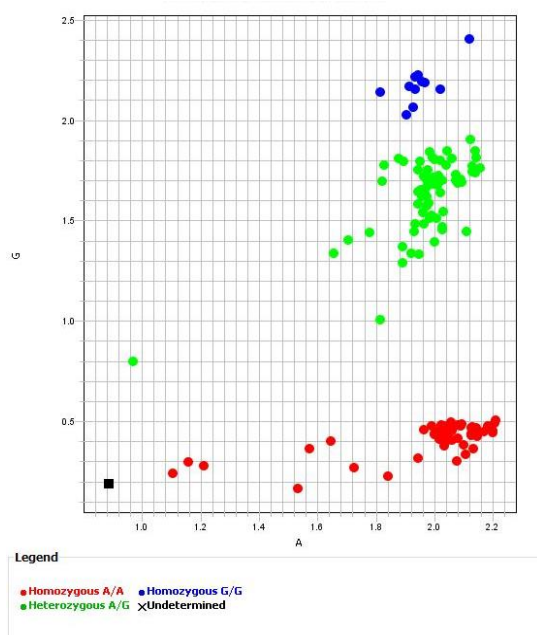


Figure 1 Allelic discrimination plot of SNP6672 marker (red: homozygous A/A, blue: homozygous G/G, green: heterozygous A/G, and black: unknown)

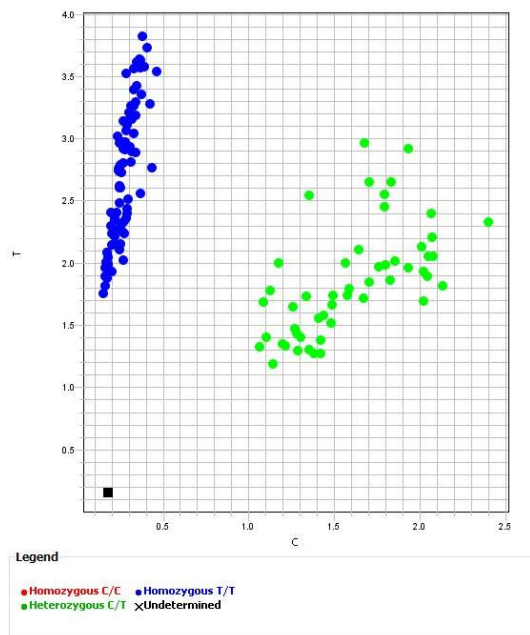


Figure 2 Allelic discrimination plot of SNP14857 marker (blue: homozygous T/T, green: heterozygous C/T, and black: unknown)

3.2.2 วิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมาย SNP14857 ด้วยโปรแกรม QuanStudio Real-time PCR Software v1.3 แสดงกลุ่มตัวอย่างระหว่างค่า fluorescence ของ VIC ซึ่งเป็นแอลลีล C และ ค่า fluorescence ของ FAM ซึ่งเป็นแอลลีล T พบว่า เครื่องหมาย SNP14857 ในตัวอย่างยางพาราธรรมชาติ 133 สายพันธุ์ มีจีโนไทป์ทั้งหมด 2 รูปแบบ ได้แก่ homozygous T/T จำนวน 82 ต้น และ homozygous C/T จำนวน 51 ต้น (รูปที่ 2)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) พบว่าเครื่องหมาย SNP6672 มีความสัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางในช่วงฤดูแล้ง (YD) อย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.033) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในกลุ่มจีโนไทป์ทั้ง 3 แบบ พบว่าจีโนไทป์ homozygous A/A (จำนวน 57 ต้น) 3.89 กรัม/ต้น/กรีด และ G/G (จำนวน 11 ต้น) 3.96 กรัม/ต้น/กรีด มีค่าใกล้เคียงกันและมากกว่าจีโนไทป์ heterozygous A/G (จำนวน 65 ต้น) 3.23 กรัม/ต้น/กรีด (รูปที่ 3) ดังนั้นแนวทางการนำเครื่องหมาย SNP6672 ไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราจะคัดเลือกพันธุ์ลูกผสมที่มีจีโนไทป์ homozygous A/A และ G/G เก็บไว้ และคัดพันธุ์ลูกผสมที่มีจีโนไทป์ heterozygous A/Gทิ้งไป จะทำให้สามารถช่วยลดระยะเวลาและลดต้นทุนในการคัดเลือกพันธุ์ยางพารา

การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) พบว่าเครื่องหมาย SNP14857 มีความสัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางทั้งในช่วงฤดูแล้งและช่วงฤดูฝนอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.02 และ 0.00) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำยางจากกลุ่มจีโนไทป์ทั้งสอง จีโนไทป์ homozygous T/T (จำนวน 82 ต้น) 3.05 กรัม/ต้น/กรีด (ช่วงฤดูแล้ง) และ 3.73 กรัม/ต้น/กรีด (ช่วงฤดูฝน) ให้ค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำยาง

น้อยกว่าจีโนไทป์ heterozygous C/T (จำนวน 51 ต้น) 4.42 กรัม/ต้น/กรีด (ช่วงฤดูแล้ง) และ 6.74 กรัม/ต้น/กรีด (ช่วงฤดูฝน) (รูปที่ 4) ในทั้งสองช่วงฤดู ดังนั้นแนวทางการนำเครื่องหมาย SNP14857 ไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราจะคัดเลือกพันธุ์ลูกผสมที่มีจีโนไทป์ heterozygous C/T เก็บไว้ และคัดพันธุ์ลูกผสมที่มีจีโนไทป์ homozygous T/Tทิ้งไป จะทำให้สามารถช่วยลดระยะเวลาและลดต้นทุนในการคัดเลือกพันธุ์ยางพารา

หากพิจารณาเครื่องหมายสนิปทั้ง 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย SNP6672 และ SNP14857 ไปพร้อมกัน แนวทางในการคัดเลือก คือ ควรเลือกยางพาราที่มีจีโนไทป์ homozygous A/A หรือ G/G ที่อยู่ในเครื่องหมาย SNP6672 และเลือกยางพาราที่มีจีโนไทป์ heterozygous C/T ที่อยู่ในเครื่องหมาย SNP14857 (ตารางที่ 2) ประกอบการพิจารณา ซึ่งจะสามารถคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่ให้ผลผลิตน้ำยางปริมาณมากทั้งในช่วงฤดูแล้งและช่วงฤดูฝนทั้งหมด 24 ต้น

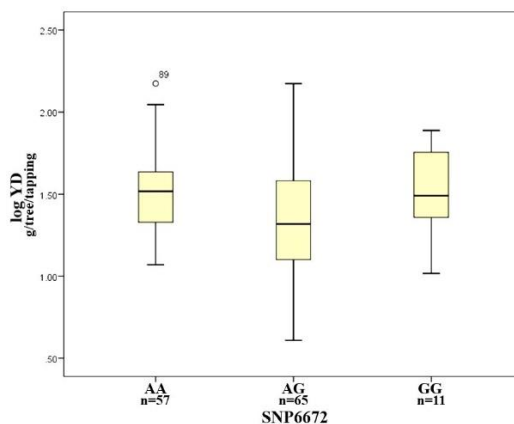


Figure 3 Box plot for allele genotyping of SNP6672 marker associated to latex yield during the dry season (YD) (p -value < 0.05)

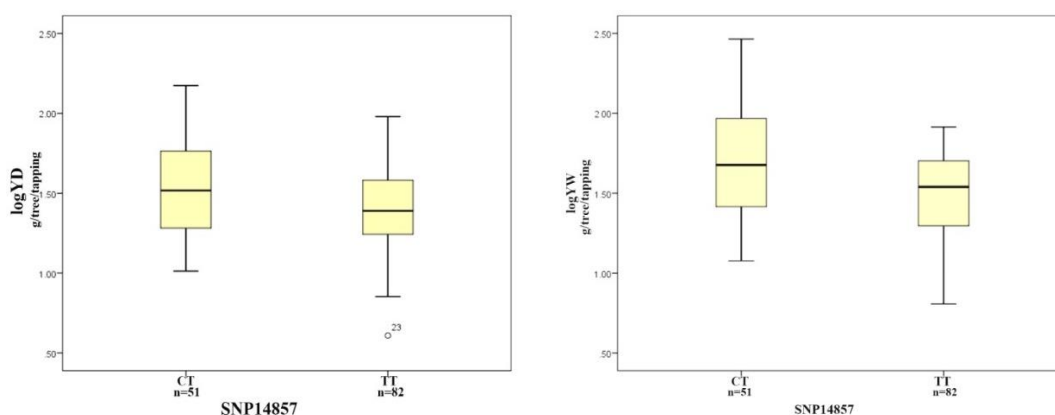


Figure 4 Box plot for allele genotyping of SNP14857 marker associated to latex yield during the dry season (YD) and the wet season (YW) (p-value < 0.05)

Table 2 Genotyping data of 133 rubber varieties using SNP6672 and SNP14857 markers

Varieties	YD	YW	SNP6672	SNP14857	Varieties	YD	YW	SNP6672	SNP14857
AC_AB_15_54_443	6.14	6.35	A/G	T/T	RO_A_9_23_83	1.03	1.32	A/G	T/T
AC_F_5_21_216	3.29	6.77	A/A	C/T	RO_C_8_24_35	1.05	1.55	A/G	C/T
AC_I_22_124	2.14	6.36	G/G	T/T	RO_C_8_24_360	1.98	1.84	G/G	T/T
AC_I_24_10	3.17	6.15	A/G	T/T	RO_CM_10_44_265	1.91	1.85	A/A	T/T
AC_I_25_11	2.44	7.35	G/G	T/T	RO_CM_10_44_420	2.09	2.26	A/A	C/T
AC_I_8_122	3.34	4.89	A/A	T/T	RO_CM_10_44_629	1.70	1.61	A/G	C/T
AC_S_11_41_155	1.2	2.51	A/G	C/T	RO_CM_10_44_669	3.10	3.40	G/G	T/T
AC_S_12_42_315	3.86	7.18	A/A	T/T	RO_CM_10_44_772	2.40	3.11	A/A	C/T
AC_S_8_35_747	2.08	2.07	A/G	T/T	RO_CM_11_63_149	5.86	8.77	G/G	C/T
AC_S_8_35_901	1.69	3.88	A/G	T/T	RO_CM_11_63_182	2.12	3.28	A/G	C/T
AC_S_9_39_38	2.51	3.79	A/G	T/T	RO_CM_11_63_189	1.43	1.55	A/G	C/T
MT_C_1_18_35	3.65	3.79	A/A	T/T	RO_CM_11_63_263	2.36	4.08	A/A	T/T
MT_C_1_18_36	2.51	5.19	A/G	T/T	RO_CM_11_63_335	1.64	1.76	A/A	T/T
MT_C_1_18_59	1.23	1.37	A/G	T/T	RO_CM_11_63_366	3.35	3.45	A/A	T/T
MT_C_1_18_66	1.78	2.65	A/G	T/T	RO_CM_11_63_7	2.61	4.48	A/G	C/T
MT_C_10_17_1	4.87	6.22	A/G	T/T	RO_CM_12_62_140	7.17	8.87	A/A	C/T
MT_C_10_17_31	3.35	4.62	A/A	T/T	RO_CM_12_62_180	1.23	1.87	A/G	C/T
MT_C_2_10_131	7.20	10.54	A/A	C/T	RO_CM_12_62_20	4.29	5.14	A/A	T/T
MT_C_2_10_41	7.05	13.00	A/A	C/T	RO_CM_12_62_UN	3.63	7.61	A/A	C/T

Table 2 (Continued)

Varieties	YD	YW	SNP6672	SNP14857	Varieties	YD	YW	SNP6672	SNP14857
MT_C_2_10_61	12.93	17.86	A/G	C/T	RO_I_10_54	1.04	1.19	G/G	C/T
MT_C_2_10_66	5.66	11.19	A/A	C/T	RO_I_100_134	5.77	9.71	A/G	C/T
MT_C_2_10_94	14.89	29.18	A/G	C/T	RO_I_104_108	2.06	2.33	A/A	T/T
MT_C_2_18_116	0.92	1.09	A/G	T/T	RO_I_105_109	3.25	5.21	A/G	C/T
MT_C_7_8_25	2.73	4.18	A/G	C/T	RO_I_109_112	3.34	5.30	A/A	T/T
MT_I_12_20	2.93	2.91	A/A	T/T	RO_I_110_113	1.85	2.28	A/A	T/T
MT_I_16_22	2.00	0.96	A/A	T/T	RO_I_112_115	1.26	1.82	A/G	C/T
MT_I_28A_37	0.72	0.97	A/G	T/T	RO_I_13_56	3.27	4.79	A/G	T/T
MT_I_39B_39	1.98	2.30	A/G	T/T	RO_I_22_60	5.81	7.04	A/A	T/T
MT_I_42_42	1.45	3.17	A/A	T/T	RO_I_29_63	7.73	7.52	G/G	T/T
MT_I_8_126	3.17	5.25	A/G	T/T	RO_I_35_68	1.82	2.30	A/A	T/T
MT_I_9_18	3.34	4.45	A/G	T/T	RO_I_5_49	1.06	1.96	A/G	T/T
MT_IT_12_26_136	7.96	8.23	A/G	T/T	RO_I_51_77	4.33	7.56	A/A	C/T
MT_IT_12_26_65	3.75	5.04	A/A	T/T	RO_I_54_79	1.98	2.98	A/G	T/T
MT_IT_12_26_70	1.76	0.98	A/A	T/T	RO_I_56_81	0.41	1.62	A/G	T/T
MT_IT_12_26_84	2.47	3.64	A/A	T/T	RO_I_60_84	6.85	4.81	A/A	T/T
MT_IT_12_26_86	2.43	3.84	A/A	T/T	RO_I_61_85	0.89	1.75	A/G	T/T
MT_IT_12_26_9	7.73	8.15	A/G	T/T	RO_I_65_87	4.46	7.91	A/G	T/T
MT_IT_14_30_134	5.34	6.34	A/A	T/T	RO_I_68_89	3.29	4.33	A/G	T/T
MT_IT_15_28_171	2.65	3.19	A/A	T/T	RO_I_7_51	2.83	3.28	A/A	T/T
MT_IT_15_28_175	1.53	2.84	A/A	T/T	RO_I_71_92	3.74	4.76	A/A	C/T
MT_IT_18_31_55	3.93	5.05	A/A	T/T	RO_I_75_94	2.72	4.72	A/A	C/T
MT_IT_18_31_86	1.25	1.37	A/G	T/T	RO_I_81_96	1.17	2.63	A/A	T/T
MT_VB_25A_57_2	1.10	0.64	A/G	T/T	RO_I_89_98	3.79	5.57	A/G	C/T
MT_VB_25A_57_37	1.54	1.98	A/G	C/T	RO_J_5_33_45	1.80	2.59	A/G	C/T
MT_VB_25A_57_53	0.71	0.81	A/G	T/T	RO_J_5_33_48	6.98	16.06	G/G	C/T
MT_VB_25A_57_69	4.17	7.14	A/G	C/T	RO_J_5_33_51	1.51	0.86	A/A	T/T
MT_VB_25A_57_74	1.61	1.98	A/G	T/T	RO_J_5_33_54	2.47	5.73	A/G	C/T
MT_VB_25A_57_86	7.23	7.46	A/G	C/T	RO_J_6_32_19	4.92	10.35	A/G	C/T
RO_A_7_25_114	2.13	3.47	A/A	T/T	RO_J_6_32_36	1.75	2.78	A/A	C/T
RO_A_7_25_115	6.56	15.01	A/A	C/T	RO_J_6_65_105	7.96	13.97	A/G	C/T

Table 2 (Continued)

Varieties	YD	YW	SNP6672	SNP14857	Varieties	YD	YW	SNP6672	SNP14857
RO_A_7_25_175	2.07	3.93	A/G	C/T	RO_JB_3_22_79	3.45	3.81	A/G	C/T
RO_A_7_25_181	2.68	5.18	A/A	T/T	RO_OP_4_20_16	1.41	2.08	A/A	C/T
RO_A_7_25_210	1.58	2.38	A/G	T/T	RO_PB_1_2_102	4.03	4.90	A/A	T/T
RO_A_7_25_216	2.15	3.22	A/A	T/T	RO_PB_1_2_194	6.54	4.59	A/G	T/T
RO_A_7_25_240	14.93	16.37	A/A	C/T	RO_PB_1_2_219	10.23	3.19	A/A	C/T
RO_A_7_25_310	1.90	4.29	A/G	T/T	RO_PB_1_2_35	1.12	1.35	A/G	T/T
RO_A_7_25_45	3.93	7.67	A/A	C/T	RO_PB_1_2_36	3.70	4.80	A/G	T/T
RO_A_7_25_6	4.83	3.08	A/A	T/T	RO_PB_1_2_59	8.67	5.54	A/A	T/T
RO_A_7_25_98	2.23	3.15	A/A	C/T	RO_PB_1_2_83	9.52	7.30	A/G	T/T
RO_A_9_23_104	1.19	1.55	A/G	C/T	RO_PB_2_3_151	2.23	1.70	A/A	T/T
RO_A_9_23_142	6.16	5.91	A/A	T/T	RO_PB_2_3_223	1.62	4.65	A/G	T/T
RO_A_9_23_163	11.11	12.64	A/A	C/T	RO_PB_2_3_250	4.03	2.30	A/G	T/T
RO_A_9_23_19	5.53	10.67	G/G	C/T	RO_PB_2_3_301	1.75	1.27	A/G	T/T
RO_A_9_23_194	2.86	6.80	G/G	C/T	RO_PB_2_3_351	2.03	2.62	A/G	C/T
RO_A_9_23_396	2.26	2.69	A/A	T/T	RO_PB_2_3_87	3.82	4.46	A/G	T/T
RO_A_9_23_413	1.030	2.13	A/G	C/T	183_53_137	5.74	3.22	A/G	C/T
					CNSAM_7701	3.85	1.55	G/G	T/T

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ยางพาราเพาะปลูกในพื้นที่ที่ปริมาณน้ำฝนน้อย เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่สามารถให้ผลผลิตน้ำยางปริมาณมาก ผลจากการวิเคราะห์เครื่องหมายสปีทิงจีโนมยางพาราด้วย association mapping พบเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางพารา คือ เครื่องหมาย SNP6672 มีความสัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางในช่วงฤดูร้อน และเครื่องหมาย SNP14857 [11] มีความสัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางในช่วงฤดูฝน งานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องหมายสปีทิง SNP6672 และ SNP 14857 ดังกล่าวด้วยเทคนิค TaqMan ในกลุ่มประชากรต้นยางในธรรมชาติกลุ่มใหม่ เทคนิค

TaqMan ช่วยเพิ่มความรวดเร็วในการตรวจจำแนกชนิดของกลุ่มสิ่งมีชีวิต [14] จำแนกสปีทิงเพื่อการค้า 48 ชนิด ด้วยเทคนิค TaqMan-MGB SNP สามารถให้ผลเร็วขึ้นจากการทดสอบ CAP-PCR ที่เคยใช้ โดยความรวดเร็วของเทคนิค TaqMan สามารถนำมาวิเคราะห์จีโนมไทป์เพื่อค้นหาเชื้อโรคสายพันธุ์ด้านทานโรค เพื่อรับมือกับไวรัสก่อโรคในมะเขือเทศที่เกิดใหม่ได้ทันเวลา [15]

เมื่อวิเคราะห์จีโนมไทป์ทางสถิติด้วย one-way ANOVA ให้ผลสอดคล้องกันกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ยกเว้นเครื่องหมาย SNP14857 มีความสัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางทั้งในช่วงฤดูแล้งและช่วงฤดูฝน เนื่องจาก p-value ที่กำหนดอยู่ที่ 0.05 ต่างจากงาน

ของ Chanroj และคณะ [11] ซึ่งวิเคราะห์ p-value ประกอบกับการใช้ covariate ระหว่างกลุ่มประชากร เครื่องหมาย SNP6672 พบการทำงานของแอลลีลที่แสดงปฏิกิริยาการข่มกันในยืนตำแหน่งเดียวกัน [16] มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำยางพาราของจีโนไทป์ G/T ต่ำกว่า A/A และ G/G เครื่องหมาย SNP14857 ค่าเฉลี่ยน้ำยางพาราที่ได้จาก จีโนไทป์ C/T มากกว่า T/T ทั้งในช่วงฤดูแล้งและช่วงฤดูฝน แสดงให้เห็นว่า แอลลีล C มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของการให้ผลผลิตน้ำยาง

แนวทางการนำเครื่องหมายสนิปที่สัมพันธ์กับผลผลิตน้ำยางไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา จะคัดเลือกพันธุ์ลูกผสมที่มีจีโนไทป์ homozygous A/A และ G/G จากเครื่องหมาย SNP6672 และ heterozygous C/T จากเครื่องหมาย SNP14857 เก็บไว้ หากพิจารณาเครื่องหมายสนิปทั้ง 2 เครื่องหมาย ไปพร้อมกัน จะสามารถคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่ให้ผลผลิตน้ำยางปริมาณมากได้ทั้งในช่วงฤดูแล้งและช่วงฤดูฝน ทำให้สามารถช่วยลดระยะเวลาและลดต้นทุนในการคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่มีลักษณะผลผลิตน้ำยางปริมาณมากตามที่ต้องการ ซึ่งจะทำให้โครงการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราเพื่อพัฒนายางพาราสายพันธุ์ดีแก่เกษตรกรลดดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย สำหรับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยในครั้งนี้

5. References

- [1] Rubber Planting Area in Rubber Academic Information 2010, The Printing House of the Agricultural Co-operative Federation of Thailand, Ltd., Rubber Research Institute Department of Agriculture, Available Source: http://www.rubber.co.th/rayong/ewt_dl_link.php?nid=58. % 20, July 13, 2010. (in Thai)
- [2] Venkatachalam, P., Priya, P., Gireesh, T., Amma C.K.S. and Thulaseedharan, A., 2006, Molecular cloning and sequencing of a polymorphic band from rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.]: The nucleotide sequence revealed partial homology with proline-specific permease gene sequence, Curr. Sci. 90: 1510-1515.
- [3] Lespinasse, D., Grivet, L., Troispoux, V., Rodier-Goud M., Pinard, F. and Seguin, M., 2000, Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree, Theor. Appl. Genet. 100: 975-984.
- [4] Lespinasse, D., Rodier-Goud, M., Grivet, L., Leconte, A., Legnate, H. and Sequin, M., 2000, A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers, Theor. Appl. Genet. 100: 127-138.
- [5] Silva, C.C., Mantello, C.C., Campos, T., Souza, L.O.M., Gonçalves, P. and Souza, A.P., 2014, Leaf-, panel- and latex-expressed sequenced tags from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) under cold-stressed and suboptimal growing

- conditions: the development of gene-targeted functional markers for stress response, *Mol. Breed.* 34: 1035-1053.
- [6] Hirschhorn, J.N. and Daly, M.J., 2005, Genome-wide association studies for common diseases and complex traits, *Nat. Rev. Genet.* 6: 95-108.
- [7] Syvanen, A.C., 2005, Toward genome-wide SNP genotyping, *Nat. genet.* 37(Suppl.): S5-10.
- [8] Kawuki, R.S., 2009, Identification, characterisation and application of single nucleotide polymorphisms for diversity assessment in cassava (*Manihot esculenta* Crantz), *Mol. breed.* 23: 669-684.
- [9] Gore, M.A., Wright, M.H., Ersoz, E.S., Bouffard, P., Szekeres, E.S., Jarvie, T.P., Hurwitz, B.L., Narechania, A., Harkins, T.T., Grills, G.S., Ware, D.H. and Buckler, E.S., 2009, Large-scale discovery of gene-enriched SNPs, *Plant Genome* 2: 121-133.
- [10] Huang, X., Wei, X., Sang, T., Zhao, Q., Feng, Q., Zhao, Y., Li, C., Zhu, C., Lu, T., Zhang, Z., Li, M., Fan, D., Guo, Y., Wang, A., Wang, L., Deng, L., Li, W., Lu, Y., Weng, Q., Liu, K., Huang, T., Zhou, T., Jing, Y., Li, W., Lin, Z., Buckler, E.S., Qian, Q., Zhang, Q.F., Li, J. and Han, B., 2010, Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces, *Nat. Genet.* 42: 961-967.
- [11] Chanroj, V., Rattanawong, R., Phumichai, T., Tangphasornruang, S. and Ukoskit, K., 2017, Genome-wide association mapping of latex yield and girth in Amazonian accessions of *Hevea brasiliensis* grown in a suboptimal climate zone, *Genomics* 109: 475-484.
- [12] Gawel, N.J. and Jarret, R.L., 1991, A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*, *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 262-266.
- [13] Lifetechnology, 2012, Applied Biosystems QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System: Multi-Well Plates and Array Card Experiments User Guide (User Guide) , (4470050 Rev. A) , Appliedbiosystems, Available Source: <http://www.lifetechnologies.com>, July 13, 2010.
- [14] Endo, T., Fujii, H., Yoshioka, T., Omura, M. and Shimada, T. 2020, TaqMan-MGB SNP genotyping assay to identify 48 citrus cultivars distributed in the Japanese market, *Breed. Sci.* 70: 363-372.
- [15] di Rienzo, V., Bubici, G., Montemurro, C. and Cillo, F., 2018, Rapid identification of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus using high resolution melting and TaqMan SNP genotyping assays as allelic discrimination techniques, *PLoS ONE* 13(4): e0196738. doi:10.1371/journal.pone.0196738
- [16] Ukoskit, K., 2006, Genetics, Thammasat University Press, Pathum Thani, 474 p.