

การวิเคราะห์พันธุ์พ่อในแปลงลูกผสมพันธุ์ยางพาราสังเคราะห์ โดยใช้เครื่องหมาย Intron Length Polymorphism Paternity Analysis in a Synthetic Rubber Variety Orchard Using Intron Length Polymorphism Markers

เทชินท์ อินทรประดิษฐ์ และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

รัชณี รัตนวงศ์

ศูนย์วิจัยยางหนองคาย สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย

ตำบลพระบาทนาสิงห์ อำเภอรัตนวาปี จังหวัดหนองคาย 43120

Techin Intharapradit and Kittipat Ukoskit*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Ratchanee Rattanawong

Nongkhai Rubber Research Center, Rubber Research Institute, Rubber Authority of Thailand,

Phra Bat Na Sing, Rattanawapi, Nongkhai 43120

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์หาพันธุ์พ่อมีความสำคัญอย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา การทราบสายพันธุ์พ่อในแปลงลูกผสมจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ในการทดลองครั้งนี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด intron length polymorphism (ILP) จำนวน 6 เครื่องหมาย ในการวิเคราะห์สายพันธุ์พ่อยางพาราลูกผสม 200 สายพันธุ์ พร้อมกับพ่อแม่จำนวน 7 สายพันธุ์ (AVROS 2037, PB 260, PB 311, RRIC 110, RRIC 121, RRIC 118, RRII 118) เครื่องหมาย ILP ตรวจพบแอลลีลได้ 16 แอลลีล มีจำนวนแอลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง 2.67 ค่า polymorphism information content (PIC) มีค่าตั้งแต่ 0.17-0.68 เฉลี่ยเท่ากับ 0.42 มีค่าเฉลี่ย H_e และค่า H_o เท่ากับ 0.481 และ 0.479 ตามลำดับ และพบความถูกต้องในการตรวจสอบพันธุ์พ่อแม่ลูกด้วยความเชื่อมั่น 83.4 % โดยมีอัตราการผสมข้ามเท่ากับ 95.32 % อัตราการผสมข้ามที่มีค่าสูงรวมถึงไม่มีการปนเปื้อนของเกสรที่พบในสวนยางพาราพันธุ์สังเคราะห์ เป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการจัดการสำหรับการผลิตยางพาราพันธุ์ลูกผสมต่อไป

คำสำคัญ : ยางพารา; เครื่องหมาย ILP; การวิเคราะห์พันธุ์พ่อ

*ผู้รับผิดชอบบทความ : ku@tu.ac.th

Abstract

Paternity testing is very important for para rubber breeding program. Knowing a male parent of a hybrid rubber tree is useful in planning a breeding program effectively. In the present study, six intron length polymorphism (ILP) markers were used for paternity testing in 200 hybrids in synthetic rubber orchard including seven rubber tree parents (AVROS 2037, PB 260, PB 311, RRIC 110, RRIC 121, RRIC 118, RRII 118). A total of 16 alleles were amplified with an average of 2.67 alleles per locus. Polymorphism information content (PIC) values for ILP ranged from 0.17 to 0.68 with an average of 0.42. The average H_e and H_o was 0.48 and 0.48, respectively. The accuracy of parentage testing was 83.4 %. The overall outcrossing rate in the seed orchard was 95.32 %. Pollen contamination was not observed in this seed orchard. The high outcrossing level and the lack of pollen contamination are useful information for the management of hybrid production in synthetic rubber orchard.

Keywords: rubber tree; ILP marker; paternity analysis

1. บทนำ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell-Arg.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย จัดเป็นสินค้าที่อยู่ใน 10 อันดับแรกของการส่งออก ทำให้เกิดการกระจายรายได้ของเกษตรกรชาวสวนยางพาราที่มีอาชีพทำสวนยางพารา ซึ่งมีไม่น้อยกว่า 6 ล้านคนทั่วประเทศ ยางพาราจึงเป็นพืชที่ทำให้มีการกระจายรายได้ให้เกษตรกรเป็นจำนวนมาก ตั้งแต่ภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทำให้เกษตรกรมีรายได้แน่นอนและสม่ำเสมอเกือบตลอดทั้งปี

ต้นยางพาราเป็นพืชผสมข้ามตามธรรมชาติ ที่มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียในต้นเดียวกัน ช่วงการออกดอกจะเกิดขึ้นระหว่างการทิ้งใบและการแตกใบอ่อน ในช่วงฤดูหนาว การผสมข้ามเกิดจากพาหะพวกแมลง เช่น รัน เพลี้ย และมด การผสมข้ามพันธุ์จะเกิดขึ้นระหว่างสายพันธุ์ที่มีการบานของดอกในช่วงเวลาที่ตรงกัน [1] จากการที่ยางพาราเป็นพืชผสมข้ามตามธรรมชาติจึงทำให้พันธุ์กรรมของยางพาราเป็นเฮเทอโร-

ไซกัส แม้ว่ายางพาราจะจัดเป็นพืชผสมข้ามแต่ก็มีอัตรา การผสมภายในสายพันธุ์ (inbreeding) ประมาณ 20 % [1,2] ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ยางที่ปล่อยให้เกิดการผสมข้ามโดยธรรมชาติ โดยทั่วไปจึงออกแบบการวางแผนแปลงให้พันธุ์ที่ปลูกใกล้เคียงกันเป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างกันเพื่อป้องกันการผสมภายในสายพันธุ์ [3] เนื่องจากการผสมภายในสายพันธุ์จะทำให้ลูกที่ได้มีลักษณะด้อยลง (inbreeding depression) อันเป็นผลจากการแสดงออกของโฮโมไซกัสของแอลลีลด้อย ขณะที่การผสมแบบข้ามสายพันธุ์สามารถทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะดีเด่นเหนือพ่อแม่ อันเป็นผลมาจาก heterosis และสามารถสร้างความหลากหลายทาง พันธุกรรมได้ ดังนั้นเมล็ดพันธุ์ยางในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์จึงมีลักษณะการผสมแบบสุ่ม ซึ่งเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ได้จะทราบเฉพาะสายพันธุ์แม่ที่ให้เมล็ดพันธุ์เท่านั้น แต่ไม่ทราบสายพันธุ์พ่อว่าเป็นสายพันธุ์ใด จึงทำให้ขาด ข้อมูลพันธุ์ประวัติที่สำคัญของยางพาราพันธุ์ลูกผสม และทำให้การวางแผนการผสมพันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราทำได้อย่างไม่มีประสิทธิภาพ

ดังนั้นการวิเคราะห์สายพันธุ์พ่อ (paternity test) จึงมีความสำคัญอย่างมากในโครงการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเป็นประโยชน์ทำให้สามารถวางแผนการผสมพันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การคัดทิ้งสายพันธุ์พ่อแม่ที่ให้ลูกผสมที่มีลักษณะไม่ดี

การวิเคราะห์พันธุ์พ่อเป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุเอกลักษณ์ของพันธุ์พืชที่เป็นต้นพ่อ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดซ่มร่วม (codominant) สามารถให้ข้อมูลจีโนไทป์ที่ชัดเจน ระบุได้ว่าแอลลีลใดมาจากพ่อและแอลลีลใดมาจากแม่ จึงสามารถระบุพันธุ์พ่อได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดซ่มร่วมมีหลายชนิดเช่น SSR (simple sequence repeat) มีทั้งชนิดที่พัฒนาจากดีเอ็นเอจีโนม (genomic SSR) และที่พัฒนาจาก express sequence tag (EST-SSR) มีงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ทำการวิเคราะห์พันธุ์พ่อ เช่น มะกอก [4] ปาล์มน้ำมัน [5] รวมทั้งยางพารา [1]

เครื่องหมาย intron length polymorphism (ILP) จัดเป็นเครื่องหมายที่มาจากยีนชนิดหนึ่ง ที่พัฒนาโดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีตำแหน่งในบริเวณ conserved exon ที่ชนาบข้างอินทรอน (intron) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งผลผลิตของพีซีอาร์ที่ได้ คือ บริเวณของอินทรอน โพลิมอร์ฟิซึมที่ได้เกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดอินทรอน [6] เป็นเครื่องหมายชนิดซ่มร่วม อาจสัมพันธ์หรือไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรก็ได้ แต่ถ้ามีความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรก็จะดีเพื่อที่จะได้สามารถศึกษาถึงความสัมพันธ์ของเครื่องหมายกับลักษณะทางการเกษตรไปในตัว ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการนำเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาแล้วจากการวิจัยก่อนหน้านี้ (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์) มาวิเคราะห์สายพันธุ์พ่อใน

แปลงพันธุ์ยางพาราสังเคราะห์ ศูนย์วิจัยยางหนองคาย ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในโครงการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราของสถาบันวิจัยยาง

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างพันธุ์ยางพารา

ตัวอย่างยางพาราที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีทั้งหมด 207 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างยางพาราสายพันธุ์พ่อแม่อ้างอิง 7 สายพันธุ์ คือ AVROS2037, PB260, PB311, RRIC110, RRIC121, RRIC118, RRII118 และตัวอย่างยางพาราพันธุ์ลูกผสมที่ทราบสายพันธุ์แม่จำนวน 200 ตัวอย่าง สายพันธุ์ยาง AVROS2037 ออกดอกเร็วและออกดอกไม่ตรงกับพันธุ์อื่น ส่วนสายพันธุ์ PB260, RRIC121, RRIC110 และ PB311 ออกดอกเร็วปานกลางในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน และสายพันธุ์ RRI118 ออกดอกช้ากว่าพันธุ์อื่น ในงานวิจัยนี้สุ่มตัวอย่างลูกที่มาจากสายพันธุ์แม่ AVROS2037, PB311, RRIC110, RRIC121, RRIC118 จำนวน 50, 35, 55, 50 และ 10 ตัวอย่าง ตามลำดับ ตัวอย่างทั้งหมดเก็บจากแปลงลูกผสมพันธุ์ยางสังเคราะห์จากศูนย์วิจัยยางหนองคาย

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใบของยางพารา

นำใบสดของยางพาราแต่ละตัวอย่างมาประมาณ 500 mg สกัดดีเอ็นเอโดยวิธีของ Gaweł และ Jarret [7] บดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียดแล้วเติม extraction buffer [2 % (w/v) CTAB, 100 mM Tris HCL pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.1 % (v/v) mercaptoethanol] นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 10 ml ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมาประมาณ 15 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายใส่ส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วเติม absolute ethanol ที่

แข่งขันเย็นจัดปริมาณ 1 เท่า ของปริมาตรเดิม ใช้แท่งแก้วอเกี่ยวกับเอ็นเอ ล้างดีเอ็นเอใน 70 % ethanol แซ่ดีเอ็นเอใน 0.2 M NaOAc นาน 20 นาที แล้วล้างดีเอ็นเออีกครั้งหนึ่งใน 0.01 M NH_4OAc นาน 10 วินาที ละลายดีเอ็นเอใน TE buffer 250 μl ตรวจสอบคุณภาพและหาปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm และการวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 1 %

2.3 การวิเคราะห์พันธุ์พ้อด้วยเครื่องหมาย

ILP

การวิเคราะห์พันธุ์พ้อในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ ILP ที่พัฒนาจากการวิจัยก่อนหน้านี้ (ข้อมูลอยู่ระหว่างการตีพิมพ์) โดยพิจารณาจากค่า polymer-phism information content (PIC) จากไพรเมอร์ ILP จำนวน 30 คู่ แล้วเลือกมาใช้ในการทดลอง 6 คู่ รายละเอียดดังตารางที่ 1 ดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอของยางพาราความเข้มข้น 5 ng/ μl เป็นดีเอ็นเอแม่แบบและใช้คู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ในปริมาตรรวม 20 μl ประกอบด้วย DNA template 4 ng 2.0 μl ของ 10X PCR buffer, dNTPs 200 μM , MgCl_2 750 μM , forward primer และ reverse primer อย่างละ 0.2 μM , Taq DNA polymerase 0.5 U แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำให้มีปริมาตร 20 μl และอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ประกอบด้วยอุณหภูมิ denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยรอบอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิของขั้นตอน annealing ตามค่า T_m ของไพรเมอร์ที่ใช้ เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที ในรอบสุดท้ายใช้ อุณหภูมิ extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แล้ว

ผลผลิตปฏิกิริยาที่ได้ไปทดสอบเบื้องต้นด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 % ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ เพื่อตรวจสอบขั้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ จากนั้นนำไปวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 6 % ย้อมเจลด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza และคณะ [8] นับแถบดีเอ็นเอโดยให้คะแนน แบบการข่มร่วม โดยเทียบกับตัวอย่างยางพาราสายพันธุ์พ้อหรือแม่จำนวน 7 สายพันธุ์

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายด้วยโปรแกรม Power Marker รุ่น 3.25 [9] พารามิเตอร์ที่ศึกษาประกอบด้วย จำนวนแอลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (number of alleles per locus, NA), ค่าสังเกตค่าเฮเทอโรไซโกซิติ (observed heterozygosity, H_o), ค่าคาดหวังค่าเฮเทอโรไซโกซิติ (expected heterozygosity, H_e) และค่า PIC ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่แสดงความหลากหลายของแอลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอ การวิเคราะห์หาสายพันธุ์พ้อในตัวอย่างยางพารา ลูกผสมจะใช้โปรแกรม CERVUS รุ่น 3.0 [10,11] โปรแกรมคำนวณความน่าจะเป็นความเป็นพ้อแม่ลูก โดยการคำนวณค่าอัตราส่วนของค่า LOD ระหว่างค่าความน่าจะเป็นของพันธุ์พ้อแม่ลูกกับค่าความน่าจะเป็นที่จะไม่เป็นพ้อแม่ลูกกัน วิเคราะห์โดยตั้งค่า simulation ทั้งสองแบบคือการปฏิเสธข้ามต้นและการปฏิเสธในต้น กำหนดระดับความเชื่อมั่นแบบ relaxed ตั้งค่าเป็น 80 % และแบบ strict ตั้งค่าเป็น 95 % พารามิเตอร์การวิเคราะห์หาสายพันธุ์พ้อที่วัดประกอบด้วยค่าเฉลี่ยความน่าจะเป็นของการไม่ตัดออกจากความเป็นพันธุ์พ้อเมื่อพิจารณาเฉพาะจีโนไทป์ของลูก (average non-exclusion probability for

one candidate parent, NE-1P), ค่าเฉลี่ยความน่าจะเป็นของการไม่ตัดออกจากการเป็นพันธุ์พ่อแม่เมื่อพิจารณาจากจีโนไทป์ของแม่และลูก (average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex, NE-2P) ค่าผลรวมความน่าจะเป็นของ

การตัดออกจากการเป็นพันธุ์พ่อแม่เมื่อพิจารณาเฉพาะจีโนไทป์ของลูก [combined exclusion probability (first parent), CEP1], และค่าผลรวมความน่าจะเป็นของการตัดออกจากการเป็นพันธุ์พ่อแม่เมื่อพิจารณาจีโนไทป์ของลูกและของแม่ [combined exclusion probability (second parent), CEP2]

ตารางที่ 1 การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP และพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์พันธุ์พ่อแม่

Locus	Primer sequences	MAF	NA	H _o	H _e	PIC ¹	NE-1P ²	NE-2P ³	HW ⁶
AACT11	5'-AGTAATCCATGGCCCCAGCAGC-3' 5'-TGTGCGGGCAACACCAACAA-3'	0.6583	2	0.392	0.451	0.3487	0.899	0.826	NS
CMS2	5'-GCCCCAGAATTGCTACTGCCAC-3' 5'-CAGCCAACAGAATGACCGAAA-3'	0.8981	2	0.204	0.184	0.1663	0.983	0.917	ND
CMS5	5'-TAGTCTGCGATCCATCCTACC-3' 5'-GTCCACATTGATATTTCTTTGGC-3'	0.5473	3	0.806	0.589	0.5157	0.827	0.689	***
CMS9	5'-ACCGCAAAACACTTTGGGAA-3' 5'-AGCAAATCAGGCTTAATCACC-3'	0.6268	3	0.678	0.531	0.4670	0.860	0.724	***
GPPS5	5'-AGCTGAAATTACAGAAATGATCC-3' 5'-CTGCATCATCCAGAACATC-3'	0.3325	4	0.604	0.732	0.6806	0.694	0.520	***
GPPS7	5'-AGCTTGTGTAGCCCTTGCTT-3' 5'-TCTGCATGTTTCACCTGTCA-3'	0.7394	2	0.202	0.386	0.3111	0.926	0.844	***
ค่าเฉลี่ย		0.6337	2.67	0.481	0.479	0.4149	0.5964⁴	0.8343⁵	

MAF: Major allele frequencies; NA: Number of alleles; 1 PIC: Polymorphic information content; 2 NE-1P: Average non-exclusion probability for one candidate parent; 3 NE-2P: Average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex; 4 CEP1: Combined exclusion probability (first parent); 5 CEP2: Combined exclusion probability (second parent); 6 HW: Significance of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium; NS = not significant; * = significant at the 5 % level; ** = significant at the 1 % level; *** = significant at the 0.1 % level; ND = not determined. These significance levels include a Bonferroni correction if the Bonferroni correction option was selected.

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมาย ILP

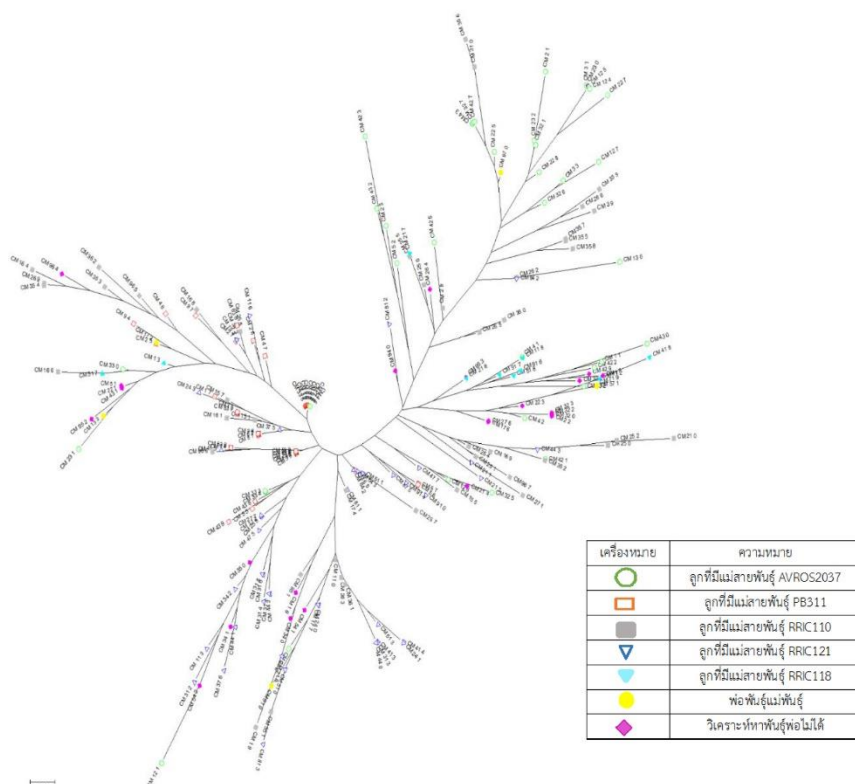
การคัดเลือก ILP ไพรเมอร์ 30 คู่ สามารถคัดเลือกได้ไพรเมอร์ 6 คู่ โดยพิจารณาจากความสามารถในการแยกความแตกต่างของแอลลีลหรือเกิด

โพลิมอร์ฟิซึม และนำไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ นี้มาวิเคราะห์หาพันธุ์พ่อแม่ของยางพาราพันธุ์ลูกผสม 200 ตัวอย่าง พร้อมกับพ่อแม่อ้างอิง 7 สายพันธุ์ ได้ผลดังตารางที่ 2 ค่าความถี่แอลลีลของแอลลีลที่มีความถี่สูงสุด (MAF) อยู่ในช่วง 0.33 ถึง 0.90 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.63 จำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (NA) อยู่ในช่วง 2 ถึง 4 มีค่าเฉลี่ย

เท่ากับ 2.67 ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (H_o) อยู่ในช่วง 0.20 ถึง 0.81 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.48 ค่าคาดหวังเฮเทอโรไซโกซิตี (H_e) อยู่ในช่วง 0.18 ถึง 0.73 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.48 มีค่า PIC อยู่ในช่วง 0.17 ถึง 0.68 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.42 จากผลการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่าจำนวนแอลลีลและค่า PIC ของเครื่องหมาย ILP ไม่สูงมากนัก เมื่อเทียบกับการทดลองวิเคราะห์พันธุ์พ่อแม่ในยางพาราโดยเครื่องหมาย SSR [1] จากข้อมูลที่ผ่านมาความหลากหลายแอลลีลหรือความสามารถทำให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย ILP จะมีค่าที่ต่ำกว่าเครื่องหมาย SSR โดยค่า PIC ของ SSR จะมีค่ามากกว่าเครื่องหมาย ILP สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา เช่น ข้าว [12] ข้าวสาลี [13] และสับปะรด [6]

การวิเคราะห์ dendrogram (รูปที่ 1) ความ

สัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ยางพาราถูกผสมในแปลงพันธุ์อย่างสังเคราะห์นี้ พบว่ายังไม่สามารถแบ่งกลุ่มประชากรเป็นกลุ่มประชากรหลัก ๆ ได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากการมีจำนวนเครื่องหมายที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตาม การจัดกลุ่มย่อยมีแนวโน้มในการจัดกลุ่มตัวอย่างของลูกที่สัมพันธ์กับสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ เช่น กลุ่มพันธุ์ยางลูกผสมที่มีแม่สายพันธุ์ AVROS2037 (วงกลมสีเขียว) จะอยู่ในแขนงที่ใกล้ของ dendrogram ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับความถี่แอลลีลของเครื่องหมาย ILP ส่วนใหญ่ในการทดลองนี้ (4 เครื่องหมายจาก 6 เครื่องหมาย) เบี่ยงเบนจากสมดุลทางพันธุกรรมตามกฎหมายของ Hardy - Weinberg (HW) (ตารางที่ 2) ซึ่งแสดงถึงการเกิดการผสมอย่างไม่สุ่มของสมาชิกในประชากร



รูปที่ 1 Dendrogram แบบ Neighbor joining tree แสดงความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มย่อยตัวอย่างลูกผสมแปลงยางพาราพันธุ์สังเคราะห์

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างที่เกิดการผสมภายในต้นและผสมข้ามต้น

สายพันธุ์แม่	เวลาการออกดอก	จำนวนตัวอย่าง	อัตราการผสมภายในต้น (%)	อัตราการผสมข้ามต้น (%)	ลูกที่มีสายพันธุ์พ่อต่าง ๆ (จำนวนตัวอย่างลูก)
AVROS2037	เร็ว	38	10.53	89.47	PB260 (2), PB311 (10), RRIC110 (17), RRIC121 (5), AVROS2037 (4)
PB311	ปานกลาง	34	0	100	PB260 (26), RRIC110 (6), RRIC121 (2)
RRIC110	ปานกลาง	47	8.51	91.49	PB260 (11), PB311 (9), RRIC121 (23), RRIC110 (4)
RRIC121	ปานกลาง	42	0	100	PB260 (6), PB311 (29), RRIC110 (7)
RRIC118	ช้า	10	0	100	PB260 (1), PB311 (5), RRIC110 (2), RRIC121 (1), RRII118 (1)
รวมทั้งหมด		171	4.68	95.32	

3.2 การวิเคราะห์สายพันธุ์พ่อของยางพาราพันธุ์ลูกผสม

การใช้โปรแกรม CERVUS วิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์หาสายพันธุ์พ่อในแปลงยางพาราพันธุ์สังเคราะห์ที่ได้ผลดังตารางที่ 1 ค่า NE-1P อยู่ในช่วง 0.69 ถึง 0.98 ค่า NE-2P อยู่ในช่วง 0.52 ถึง 0.92 โดยมีค่า CEP1 และ CEP2 เท่ากับ 0.60 และ 0.83 ตามลำดับ โดยค่า CEP2 เป็นค่าที่มีความสำคัญของการวิเคราะห์สายพันธุ์พ่อ ในการทดลองนี้การระบุพันธุ์พ่อก็มีความถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือ 83 % เมื่อเทียบกับการทดลองการวิเคราะห์พันธุ์พ่อในยางพาราโดยเครื่องหมาย SSR [1] พบว่าระบบเครื่องหมาย ILP มีความน่าเชื่อถือน้อยกว่าการใช้เครื่องหมาย SSR เมื่อใช้จำนวนเครื่องหมายเท่า ๆ กัน ทั้งนี้เนื่องจากการมีอัตราโพลิเมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย ILP ที่น้อยกว่า SSR อย่างไรก็ตาม เครื่องหมาย ILP เป็นเครื่องหมายที่พัฒนาจากยีนจึงมีความน่าสนใจในการนำมาวิเคราะห์พันธุ์พ่อ โดยเฉพาะถ้าเครื่องหมาย ILP นั้นสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรที่ศึกษาก็สามารถใช้ประโยชน์

จากข้อมูลจีโนมไปทั้งการวิเคราะห์พันธุ์พ่อ และการคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีในเวลาเดียวกัน ทั้งนี้ถ้าต้องการเพิ่มความถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือการวิเคราะห์พันธุ์พ่อให้มากขึ้นก็สามารถเพิ่มจำนวนเครื่องหมาย ILP ที่ใช้ในการวิเคราะห์พันธุ์พ่อ หรือสามารถใช้ร่วมกับเครื่องหมาย SSR ได้

การวิเคราะห์หาสายพันธุ์พ่อของยางพารา 200 ตัวอย่าง พบว่าสามารถวิเคราะห์พันธุ์พ่อได้ 171 ตัวอย่าง ใน 171 ตัวอย่าง มีตัวอย่างลูกที่มีพ่อสายพันธุ์ AVROS2037 จำนวน 4 ตัวอย่าง มีพ่อสายพันธุ์ PB260 มีจำนวน 46 ตัวอย่าง มีพ่อสายพันธุ์ PB311 มีจำนวน 53 ตัวอย่าง มีพ่อสายพันธุ์ RRIC110 มีจำนวน 36 ตัวอย่าง มีพ่อสายพันธุ์ RRIC121 มีจำนวน 31 ตัวอย่าง มีพ่อสายพันธุ์ RRII118 มีจำนวน 1 ตัวอย่าง เมื่อพิจารณาตำแหน่งปลูกแต่ละตำแหน่งของยางลูกผสมในแปลงยางพันธุ์สังเคราะห์นี้ สังเกตได้ว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งปลูกต้นพ่อพันธุ์และ ต้นแม่พันธุ์แสดงถึงตำแหน่งปลูกต้นพันธุ์พ่อแม่มีโอกาส

ผสมกันได้โดยสุ่ม

3.3 การวิเคราะห์การผสมข้ามต้นและผสมภายในต้น

ตัวอย่างที่วิเคราะห์สายพันธุ์พ่อแม่ได้ 171 จาก 200 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) มี 8 ตัวอย่างเกิดการผสมภายในต้นคิดเป็นอัตราการผสมตัวเองเท่ากับ 4.68 % โดยพันธุ์ AVROS2037 และพันธุ์ RRIC110 มีอัตราการผสมตัวเองเท่ากับ 10.53 และ 8.51 % ตามลำดับ มี 163 ตัวอย่าง เกิดการผสมข้ามต้นคิดเป็นอัตราการผสมข้ามต้นรวม เท่ากับ 95.32 % อัตราการผสมข้ามต้นอยู่ในช่วง 89.47 (AVROS2037) ถึง 100 % (RRIC121 และ RRIC118) ข้อมูลการผสมข้ามนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ระบุว่าระบบการผสมพันธุ์ของประชากรยางพารามีอัตราการผสมข้ามต้น 96.2 % [14] อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Paiva และคณะ [2] พบว่าอัตราการผสมข้ามต้นของยางพาราในธรรมชาติ มีค่า 64.46 % ส่วนงานวิจัยของ Pawsoi และคณะ [1] ระบุว่าอัตราการผสมข้ามต้น 79 % และอัตราการผสมภายในต้น 21 % สาเหตุของความแตกต่างของอัตราการผสมตัวเองและการผสมข้ามต้นอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในแปลงปลูก พาหะที่ช่วยถ่ายละอองเกสรภายในแปลง รวมถึงลักษณะช่วงเวลาการบานของดอกของสายพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ในการทดลองโดยแต่ละการทดลองอาจมีความแตกต่างกัน ทำให้เกิดการบานของดอกตัวผู้และดอกตัวเมียมีช่วงการบานที่ตรงกันหรือต่างช่วงเวลากัน และอาจเกิดจากจำนวนตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์หาสายพันธุ์พ่อแม่มีจำนวนตัวอย่างไม่เท่ากันในงานวิจัยแต่ละงานวิจัย เมื่อพิจารณาช่วงวันออกดอกพ่อแม่พันธุ์ยางพารา สังเกตได้ว่าสายพันธุ์พ่อแม่ของลูกผสมที่ศึกษาในการทดลองนี้มีแนวโน้มสัมพันธ์กับช่วงวันออกดอก เช่นกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีช่วงวันออกดอกปานกลางตรงกัน PB311, RRIC110 และ RRIC121 จะมีโอกาสเป็น

พ่อของลูกผสมใกล้เคียงกัน ส่วนพันธุ์ที่มีช่วงการออกดอกช้า เช่น RRIC118 จะมีโอกาสเป็นพันธุ์พ่อน้อยกว่าพันธุ์ที่มีช่วงการออกดอกเร็วและปานกลาง (ตารางที่ 1) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองการวิเคราะห์พันธุ์พ่อของยางพาราก่อนหน้านี้ [1] ดังนั้นการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ในแปลงพันธุ์อย่างสังเคราะห์ ปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือการพิจารณาช่วงการบานของดอกที่ตรงกันเพื่อเพิ่มโอกาสการผสมข้ามให้มากที่สุด ซึ่งจะทำให้ได้ประโยชน์สูงสุดจากการเกิด heterosis จากการผสมข้าม

4. สรุป

เครื่องหมาย ILP ที่ใช้ในการทดลองนี้มีค่า PIC น้อยกว่าเครื่องหมาย SSR ที่มีรายงานมาก่อน จากการวิเคราะห์หาพันธุ์พ่อสามารถวิเคราะห์หาสายพันธุ์พ่อแม่ได้ 171 ตัวอย่างจาก 200 ตัวอย่าง ที่มีค่าความถูกต้องที่ความเชื่อมั่น 83.4 % ซึ่งน้อยกว่าการใช้เครื่องหมาย SSR ในการวิเคราะห์หาพันธุ์พ่อ ถ้าต้องการเพิ่มความถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์พันธุ์พ่อให้มากขึ้นก็สามารถเพิ่มจำนวนเครื่องหมายที่ใช้ในการวิเคราะห์พันธุ์พ่อ หรือสามารถใช้ร่วมกับเครื่องหมาย SSR ได้ อัตราการผสมตัวเองและการผสมข้ามของลูกผสมในแปลงทดลองนี้มีอัตราการผสมข้ามต้นคิดเป็น 95.32 % ลักษณะการผสมพันธุ์มีแนวโน้มสัมพันธ์กับลักษณะการออกดอก พันธุ์พ่อของลูกผสมที่ศึกษาในการทดลองนี้มีแนวโน้มสัมพันธ์กับช่วงวันออกดอกที่ตรงกันระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ ดังนั้นช่วงวันออกดอกเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควรคำนึงถึงในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ในแปลงพันธุ์อย่างสังเคราะห์ เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดจากการเกิด heterosis จากการผสมข้าม

5. รายการอ้างอิง

- [1] Pawsoi, N., Phumichai, T., Teerawatana-
suk, K., Wongkaew, A. and Phumichai, C.,
2013, Microsatellite paternity analysis
used for evaluation of outcrossing rate
among five *Hevea* rubber clones in a
systematic seed orchard, Kasetsart J. (Nat.
Sci.) 47: 407-415.
- [2] Paiva, J.R., Kageyama, P.Y. and Vencovsky,
R., 1994, Genetics of rubber tree [*Hevea*
brasiliensis (Willd. ex Adr. de Juss) Müller.
Arg.], *Silvae. Genet.* 43: 373-376.
- [3] รัชณี รัตนวงศ์, นภาพรณ เลขะวิวัฒน์ และเพชร
รัตน์ พลชา, 2547, การผลิตเมล็ดพันธุ์สังเคราะห์
ชุดที่ 2, ศูนย์วิจัยยางหนองคาย สถาบันวิจัยยาง
และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเลย
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3.
- [4] Arbeiter, B.A., Jakse, J. and Bandelj, D.,
2014, Paternity analysis of the olive
variety "istrska belica" and identification
of pollen donors by microsatellite
markers, *Sci. World J.* Article ID 208590,
doi: 10.1155/2014/208590.
- [5] Songkran, T., Palat, T. and Hugo, V., 2010,
Microsatellites for parentage analysis in an
oil palm breeding, *Thai J. Genet.* 3(2): 172-
181.
- [6] SaiSuk, W. and Ukoskit, K. 2013, Compa-
rative analysis of EST-derived markers for
allelic variation in *Jatropha curcas* L. and
cross transferability among economically
important species of Euphorbiaceae,
Genes Genom. 35: 1-12.
- [7] Gawel, N.L. and Jarret, R.L., 1991, A modified
CTAB DNA extraction procedure of *Musa*
and *Ipomoea*, *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 262-
266.
- [8] Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin,
J.P. and Mergeai, G., 2006, Optimization of
a reliable, fast, cheap and sensitive silver
staining method to detect SSR markers in
polyacrylamide gels, *Biol. Agron. Soc. Env.*
10(2): 77-81.
- [9] Liu, K. and Muse, S.V., 2004, PowerMarker:
An integrated analysis environment for
genetic marker analysis, *Bioinformatics* 21:
2128-2129.
- [10] Kalinowski, S.T., Taper, M.L. and Marshall,
T.C., 2007, Revising how the computer
program CERVUS accommodates genoty-
ping error increases success in paternity
assignment, *Mol. Ecol.* 16: 1099-1106.
- [11] Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B. and
Pemberton, J.M., 1998, Statistical confi-
dence for likelihood-based paternity
inference in natural populations, *Mol.*
Ecol. 7: 639-655.
- [12] Zhao, X., Yang, L., Zheng, Y., Xu, Z. and
Wu, W., 2009, Subspecies-specific intron
length polymorphism markers reveal
clear genetic differentiation in common
wild rice (*Oryza rufipogon* L.) in relation to
the domestication of cultivated rice (*O.*
sativa L.), *J. Genet. Genomics* 36: 435-442.
- [13] Eujayl, I., Sorrells, M., Baum, M., Wolters,
P. and Powell, W., 2001, Assessment of
genotypic variation among cultivated

- durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs, *Euphytica* 119: 39-43.
- [14] Furlani, R.C.M., de Moraes, C.M.B., de Moraes, M.L.T., de Paiva, J.R., de Sebbenn, A.M., 2005, Mating system in a *Hevea brasiliensis* population by isozyme loci, *CBAB* 5: 402-409.