การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราในหลอดทดลองโดยเครื่องหมาย Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Analysis of Somaclonal Variation from In Vitro-Derived Plantlets of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker

วุฒิชัย ศรีช่วย วท.ม. (Wutthichai Srichuay, M.Sc.)[1]
สมปอง เตชะโต Ph.D. (Sompong Te-chato, Ph.D.)[2]

บทคัดย่อ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย จากความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงแคลลัส และชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของยางพารา โคลน 2-NR โดยใช้อาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) เติมน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร kinetin (KN) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ α-naphthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำ โซมาติกเอ็มบริโอจากแคลลัสอายุ 8 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ 6-benzyladenine (BA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ gibberellic acid (GA_3) เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้ มาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับต้นแม่โดยเครื่องหมาย RAPD ใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01, OPAD-01, OPAD-10, OPB-17, OPN-16, OPR-02 และ OPZ-04 พบว่า ไพรเมอร์ OPZ-04 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากแคลลัส แสดงว่าแคลลัสที่ชักนำได้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม ดังนั้นการใช้เทคนิค RAPD และไพรเมอร์ OPZ-04 สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการตรงตามพันธุ์ของต้นยางพาราจากกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้

คำสำคัญ : ยางพารา ความแปรปรวนทางพันธุกรรม เครื่องหมาย RAPD โซมาติกเอ็มบริโอเจนิซีส

Abstract

Hevea brasiliensis is an important economic crop of Thailand. The successful somatic embryogenesis has been induced from immature anther. Somaclonal variation of callus and somatic embryos (SEs) of rubber tree clone 2-NR were verified by RAPD marker. Callus was induced from anther on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 5% sucrose, 1 $mg.L^{-1}$ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1 $mg.L^{-1}$ KN and 1 $mg.L^{-1}$ NAA. SEs were induced from 8 week-old callus on MS medium supplemented with 3% sucrose, 1 $mg.L^{-1}$ BA, 3 $mg.L^{-1}$ KN, 0.2 $mg.L^{-1}$ NAA and 0.05 $mg.L^{-1}$ GA_3. Mothernal plant, calli and SEs obtained by this procedure were subjected to verify genetic instability by RAPD marker. Seven primers of RAPD, OPAB-01, OPAD-01,

[1] นักศึกษาปริญญาเอก คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
[2] ศาสตราจารย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

OPAD-10, OPB-17, OPN-16, OPR-02 and OPZ-04 were employed to amplify genomic DNA from those plant materials. The results suggested that one out of seven primers, OPZ-04 gave polymorphism in the profiles of DNA among materials tested. callus that derived from above protocol were somaclonal variation. Hence, RAPD and OPZ-04 primer could be used to check stability and exact type of cloned rubber tree in the future.

Keywords : *Hevea brasiliensis*, somaclonal variation, RAPD marker, somatic embryogenesis

บทนำ

ปัจจุบันความต้องการใช้ยางพาราเพิ่มสูงขึ้นตามการขยายตัวของเศรษฐกิจโลก ประกอบกับนโยบายขยายพื้นที่การปลูกยางพาราล้านไร่ ทำให้ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางพาราเพิ่มขึ้น เป็น 16,889,686 ไร่ กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ (กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข และ นภาวรรณ เลขะวิพัฒน์, 2554) ประเทศไทยเป็นผู้ผลิต และส่งออกยางพาราเป็นอันดับหนึ่งของโลก ซึ่งยางพารา และผลิตภัณฑ์จากยางพารานำรายได้เข้าประเทศในปี พ.ศ. 2551 คิดเป็นมูลค่า 402,563 ล้านบาท (คณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ, 2553) การผลิตพันธุ์ยางพาราที่มีความเหมาะสมกับพื้นที่ปลูกและเพียงพอกับความต้องการจึงเป็นปัญหาสำคัญ การขยายพันธุ์ยางพาราโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่เพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการยางพาราพันธุ์ดี ในประเทศจีนเริ่มมีการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเพิ่มปริมาณกิ่งตา และต้นตอยางพารา ทำให้เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร แม้ว่ามีราคาของต้นพันธุ์ที่จำหน่ายสูงกว่าต้นที่ได้จากการติดตา (วิทยา พรหมมี, 2553) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีความสำคัญในการสร้างพืชต้นใหม่มีมีลักษณะที่ดีเหมือนต้นแม่ทุกประการ ดังนั้นจำเป็นต้องใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการตรวจสอบการเกิด Somaclonal variation เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรม

Somaclonal variation หรือ ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นปัญหาสำคัญสำหรับกระบวนการผลิตต้นพืชที่ต้องการพืชที่ตรงตามสายพันธุ์ (Bairu, Aremu & Staden, 2011) นอกจากการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมในพืชแต่ละชนิดเพื่อลดการเกิดการกลายพันธุ์ได้แล้วก็ตาม การตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่อาศัยวิธีการที่รวดเร็ว แม่นยำ และมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำโดยเฉพาะการใช้เครื่องหมายโมเลกุลนับเป็นวิธีที่จำเป็น และนิยมใช้ในการตรวจสอบความแปรรวนทางพันธุกรรม ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลนิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ RAPD (Morimoto et al., 2006; Zhang et al., 2003) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Matthes et al., 2001) และ Simple sequence repeat (SSR) (Thawaro & Te-chato, 2009) สำหรับยางพารา ยุพาภรณ์ ศิริโสม และ สมปอง เตชะโต (2556) พบว่าเครื่องหมาย RAPD เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราได้ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ จากการรายงานความสำเร็จการใช้เครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบ Somaclonal variation ในพืชหลายชนิด เช่น prickly pear (Zoghlami et al., 2012) กล้วยไม้ฟาแลนนอปซีส (Khoddamzadeh et al., 2010)

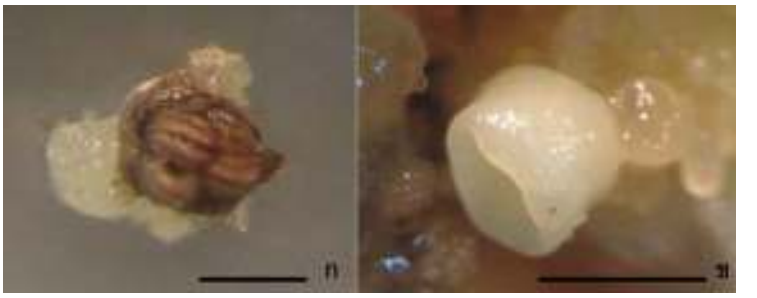
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของยางพาราโดยเครื่องหมาย RAPD

ระเบียบวิธีวิจัย

การเตรียมวัสดุพืช

การศึกษานี้ใช้ใบอ่อนที่เก็บจากยางพาราต้นแม่ แคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ (ภาพที่ 1) จากต้นยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม โคลน 2-NR ที่ปลูกภายในบริเวณ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา สำหรับการนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอับละอองเกสรยางพาราพันธุ์ดังกล่าว บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ทำการย้ายเลี้ยงทุก 4 สัปดาห์ และการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้จากการย้ายแคลลัสอายุ 8 สัปดาห์ ไปวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงภายใต้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.5 $\mu mol/m^2/s$ ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 1 การชักนำแคลลัส (ก) จากการวางเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน และโซมาติกเอ็มบริโอ (ข)ที่ชักนำจากแคลลัสอายุ 8 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ในยางพาราโคลน 2-NR

การสกัดและตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วน ใบอ่อน แคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอตามวิธีการของ Doyle และ Doyle (1990) ใช้ตัวอย่างหนัก 200 มิลลิกรัม ตักใส่โกร่ง เทไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเทใส่หลอดเอพเพนดอร์ฟเติม CTAB บัฟเฟอร์ (PVP-40, NaCl, EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0, CTAB 2 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบปริมาณด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลอะกาโรส (LE Agarose, Promega, USA) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation นำดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่อไป

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD

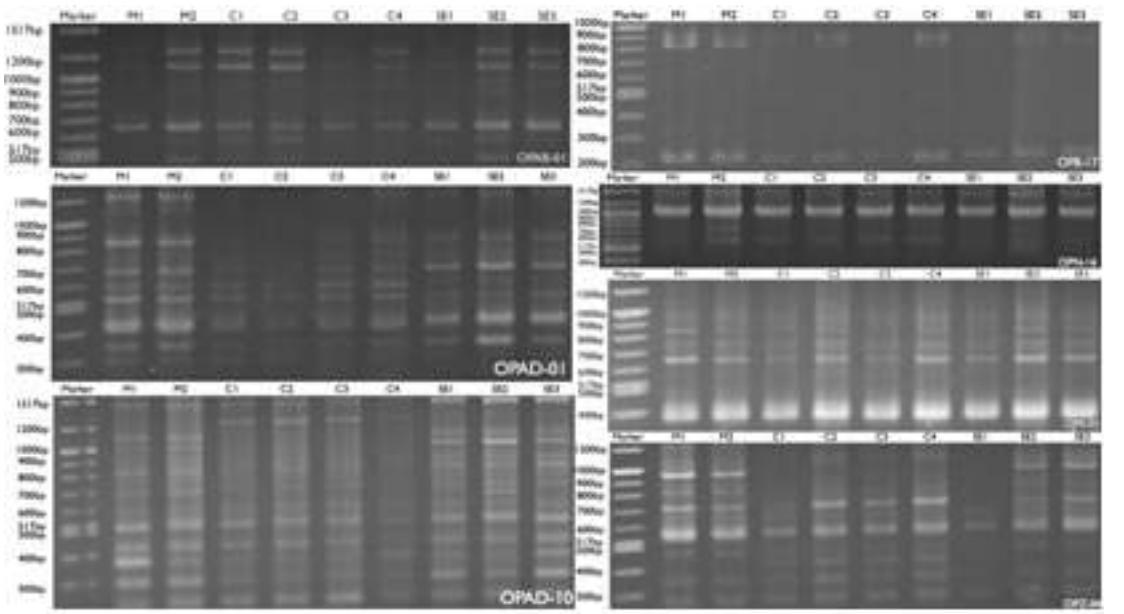
นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบเสถียรภาพทางพันธุกรรมโดยใช้ 7 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01, OPAD-01, OPAD-10, OPB-17, OPN-16, OPR-02 และ OPZ-04 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase chain reaction) ตามวิธีการของ Nakkanog et al. (2008) จากนั้นนำผลผลิต PCR ปริมาณ 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอ โดยการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลอะกาโรส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Boric acid, Na$_2$EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ เพื่อประเมินเสถียรภาพทางพันธุกรรม

ผลการวิจัย

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักจากกระบวนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพาราโดยการเทียบกับต้นแม่ด้วยเครื่องหมาย RAPD ด้วยไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01, OPAD-01, OPAD-10, OPB-17, OPN-16, OPR-02 และ OPZ-04 โดยหลังทำปฏิกิริยา PCR แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส พบว่าไพรเมอร์ OPZ-04 ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจากแคลลัสที่ 950 คู่เบส 1 แถบ คิดเป็น 11.11 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนเมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอจากต้นแม่ (ภาพที่ 2) จากการตรวจสอบไม่พบการความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแถบดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อเทียบกับแถบ ดีเอ็นเอจากต้นแม่ ดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของยางพาราเปรียบเทียบกับต้นแม่ โดยใช้ไพรเมอร์ 7 ไพรเมอร์ แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือน และแตกต่าง จากการใช้เทคนิค RAPD

Primer	Sequence fragments	Amplified fragments	Monomorphic fragments	Polymorphic fragments	Polymorphic (%)	Band mol. Weight (bps)
OPAB-01	CCGTCGGTAG	5	5	0	0	500-1300
OPAD-01	CAAAGGGCGG	11	11	0	0	350-1250
OPAD-10	AAGAGGCCA	13	13	0	0	300-1500
OPB-17	AGGGAACGAG	3	3	0	0	250-900
OPN-16	AAGCGACCTG	4	4	0	0	600-1517
OPR-02	CACAGCTGCC	6	6	0	0	400-1000
OPZ-04	AGGCTGTGCT	9	8	1	11.11	250-1100
Total band scored		51	50	1	1.96	



ภาพที่ 2 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นแม่ แคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอชักจากกระบวนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพาราจากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพเมอร์ 7 ชนิด คือ OPAB-01, OPAD-01, OPAD-10, OPB-17, OPN-16, OPR-02 และ OPZ-04

Marker คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส
M1, M2 คือ ยางพาราต้นแม่
C1-C4 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของแคลลัส
SE1-SE3 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของโซมาติกเอ็มบริโอ

อภิปรายผล

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยการเทียบกับต้นแม่ของชิ้นส่วนแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอที่ชักจากกระบวนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพาราด้วยเครื่องหมาย RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ พบว่าชิ้นส่วนแคลลัสยางพาราที่นำมาตรวจสอบในแต่ละไพรเมอร์นั้นมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม แต่การไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอเพราะส่วนของโซมาติกเอ็มบริโอนั้นพัฒนามาจากเซลล์ที่ปกติ หรือการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากแคลลัสที่มีการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาที่สั้น (8 สัปดาห์) อาจยังไม่ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ของแคลลัส Bairu, Aremu & Staden(2011) ได้รายงานว่าแคลลัสเป็นชิ้นส่วนที่มีการเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมมากที่สุดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลานานมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนของยางพารา ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแคลลัสมีการปรับสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์พืช ซึ่งมีการรายงานว่ากระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโอกาสที่จะกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เนื่องจากมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต และระยะเวลาในการย้ายเลี้ยง (Sun et al., 2013) Lopes et al. (2006) ได้มีการรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ cork oak เป็นระยะเวลานานทำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นจำนวน 2.5 เปอร์เซ็นต์ Srichuay & Te-chato (2012) ได้รายงานการใช้ซิลเวอร์ไนเตรทซึ่งเป็น

สารยับยั้งผล Khoddamzadeh ของเอธิลีนในการชักนำแคลลัส ส่งผลให้ได้แคลลัส 3 ชนิด ที่มีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งตรงกับรายงานผลของเอธิลีนทำให้ยางพารามีการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Piyatrakul et al., 2012) สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบในครั้งนี้ Nakkanong et al. (2008) รายงานว่าสามารถใช้จำแนกความแตกต่างในยางพาราได้ โดยยุพาภรณ์ ศิริโสม และ สมปอง เตชะโต (2556) รายงานว่าการใช้เครื่องหมาย RAPD และไพรเมอร์ 4 ชนิด สามารถตรวจสอบเสถียรภาพของพันธุกรรมในยางพาราจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ซึ่งตรงกับการรายงานในพืชหลายชนิดที่สามารถใช้เครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในหลอดทดลอง (ยุพาภรณ์ ศิริโสม และ สมปอง เตชะโต, 2556; ทรรศณีย์ นิยะกิจ และ สมปอง เตชะโต, 2555; อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์ และ สมปอง เตชะโต, 2555; Thawaro & Te-chato, 2009) อย่างไรก็ตามในบางตัวอย่างไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน เนื่องจากเครื่องหมาย RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ทำให้บางครั้งเมื่อมีการทำซ้ำทำได้ผลต่างจากเดิม (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

สรุป

จากการตรวจสอบชิ้นส่วนยางพาราที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยเครื่องหมาย RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPAB-01, OPAD-01, OPAD-10, OPB-17, OPN-16, OPR-02 และ OPZ-04 พบว่าชิ้นส่วนที่นำมาทำการทดสอบให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย RAPD และ ไพรเมอร์ OPZ-04 สามารถใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราในหลอดทดลองได้ และชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลานานมากกว่า 8 สัปดาห์ มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอเมื่อเทียบกับต้นแม่

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอื่นมาตรวจสอบเพิ่มเติม เช่น เครื่องหมาย SSR เป็นต้น เนื่องจากเครื่องหมาย SSR มีความจำเพาะ สามารถทำซ้ำได้ ผลที่ได้แน่นอน การเพาะเลี้ยงแคลลัสยางพาราในหลอดทดลองเป็นเวลานานทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น ดังนั้นควรหาสาเหตุของการกลายพันธุ์ และวิธีการเพาะเลี้ยงที่มีความเหมาะสมไม่เกิดการแปรปรวนทางพันธุกรรมขึ้น

รายการอ้างอิง

กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข และนภาวรรณ เลขะวิพัฒน์. (2554). “สถาบันวิจัยยาง 408” พันธุ์ยางใหม่ของสถาบันวิจัยยาง. **วารสารยางพารา ฉบับอิเล็กทรอนิกส์, 6**, 2-17.

คณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ. (2553). **ยุทธศาสตร์พัฒนายางพารา พ.ศ. 2552-2556.** กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ทรรศณีย์ นิยะกิจ และสมปอง เตชะโต. (2555). การชักนำและเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราและการตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. **วารสารเกษตร, 28**(3), 273-283.

ยุพาภรณ์ ศิริโสม และ สมปอง เตชะโต. (2556). การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นยางพาราที่ได้จากกระบวนการไมโครคัตติ้งด้วยเครื่องหมาย RAPD. **การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 12 พืชสวนสู่ AEC ภายใต้สภาวะโลกร้อน วันที่ 9-12 พฤษภาคม 2556** ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ. หน้า 24. (Oral presentation).

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). **เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิทยา พรหมมี. (2553). จีนกับยางพาราโคลนนิ่งที่ไม่หยุดนิ่ง. **วารสารยางพารา, 31**(3), 28-33.

อัญชลี อาธิปัจจาภรณ์ และ สมปอง เตชะโต. (2555). การประเมินความแปรปรวนของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสปาล์มน้ำมันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวโดยเทคนิค RAPD และ SSR. **แก่นเกษตร, 40**, 157-166.

Bairu, M.W., Aremu, A.O. & Staden, J.V. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regul, 63**, 147–173.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus, 12**, 13-15.

Khoddamzadeh, A.A., Sinniah, U.R., Kadir, M.A., Kadzimin, S.B., Mahmood, M. & Sreeramanan, S. (2010). Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of Phalaenopsis bellina (Rchb.f.) **Christenson. African Journal of Biotechnology, 9**, 6632–6639.

Lopes T, Pinto, G, Loureiro, J, Costa, A. & Santos, C. (2006) Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers. **Tree Physiology, 26**, 1145–1152.

Matthes, M., Singh, R., Cheah, S.C. & Karp, A. (2001). Variation in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLP with methylation-sensitive enzymes. **Theoretical and Applied Genetics, 102**, 971-979.

Morimoto, Y., Maundu, P., Kawase, M., Fujimaki, H. and Morishima, H. 2006. RAPD polymorphism of the white-flowered gourd (Lagenaria siceraria (Molina) Standl.) landraces and its wild relatives in Kenya. **Genetic Resources and Crop Evolution, 53**, 963–974.

Nakkanong, K., Nualsri, C. & Sdoodee, S. (2008). Analysis of genetic diversity in early introduced clones of rubber tree (Hevea brasiliensis) using RAPD and microsatellite markers. **Sonklanakarin Journal of Science and Technology, 30**, 553-560.

Piyatrakul, P., Putranto, R.A., Martin, F., Rio, M., Dessailly, F., Leclercq, J., Dufayard, J.F., Lardet, L. & Montoro, P. (2012). Some ethylene biosynthesis and AP2/ERF genes reveal a specific pattern of expression during somatic embryogenesis in Hevea brasiliensis. **BMC plant biology, 12**, 244.

Srichuay, W. & Te-chato, S. (2012). The effect of explants, plant growth regulators and silver nitrate on in vitro callus induction in Hevea brasiliensis Muell. Arg. **Journal of Agricultural Technology, 8**, 2127–2135.

Sun, S., Zhong, J., Li, S. & Wang, X. (2013). Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in torenia (Torenia fournieri Lind.). **Botanical Studies, 54**, 36.

Thawaro, S. & Te-chato, S. (2009). Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from oil palm propagated in vitro. **ScienceAsia, 35**(2), 142-149.

Zhang, G.Q., Zhou, W.J., Gu, H.H., Song, W.J. & Momoh, E.J. (2003). Plant regeneration from the hybridization of Brassica juncea and B. napus through embryo culture. **Journal of Agronomy and Crop Science, 189**, 347-350.

Zoghlami, N., Bouamama, B., Khammassi, M. & Ghorbel, A. (2012). Genetic stability of long-term micropropagated Opuntia ficus-indica (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for in vitro conservation. **Industrial Crops and Products, 36**, 59-64.