รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **ชุดโครงการวิจัย** : -

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต
   กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อบริโภค

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อบริโภค : การคัดเลือกปีที่ 2 (ลูกผสมปี 2562)
   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Cassava Varietal Improvement for Edible : Cassava Second Selection (2019 Hybrids)

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**
   หัวหน้าการทดลอง : นางธนาวดี ค้ำชู[1]
   ผู้ร่วมงาน : นางสุวลักษณ์ อะมะวัลย์[1] นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ[2]
   นางสาวกุสุมา รอดแผ้วพาล[1] นายกุลชาต นาคจันทึก[1]
   นางสาววันปิติ บัวขาว[1]

5. **บทคัดย่อ**

การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีน *PSY2* และยีน *PDS* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเบต้าแคโรทีนในหัวมันสำปะหลัง ที่พัฒนาและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลจากขั้นตอนการผสมพันธุ์ จำนวน 13 ตำแหน่ง (SNPs) กับมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสมปี 2562 จำนวน 109 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ทุกตำแหน่ง เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs แต่ละตำแหน่ง พบว่า ค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.10-0.50 ค่าเฉลี่ย 0.30 โดย ตำแหน่ง SNP *PSY2* g.24155522 มีค่า PIC สูงสุด คือ 0.50 และวิเคราะห์ความแม่นยำในการจำแนกลักษณะสีเนื้อหัวสดสีขาวออกจากสีเหลืองครีมของตัวอย่างมันสำปะหลัง พบว่า ค่าความแม่นยำอยู่ระหว่าง 35.85-59.43 ค่าเฉลี่ย 47.86 โดย ตำแหน่ง SNPs *PSY2* g.24156495 มีค่าความแม่นยำสูงสุด คือ 59.43 ซึ่งสามารถนำมาใช้คัดเลือกและจัดจำแนกกลุ่มลักษณะสีเนื้อหัวสดของมันสำปะหลัง เพื่อใช้ในขั้นตอนการเปรียบเทียบเบื้องต้นต่อไป

การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อบริโภคปีที่ 2 (ลูกผสมปี 2562) ดำเนินการทดลองในปี 2563 เป็นขั้นตอนปรับปรุงพันธุ์ที่ต่อเนื่องมาจากการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อบริโภคปีที่ 1 โดยปลูกเมื่อวันที่ 23 มกราคม 2563 ในแปลงสายพันธุ์ละ 1 แถว จำนวน 109 สายพันธุ์ เป็นพันธุ์ลูกผสมข้าม (CMRE) จำนวน 50 สายพันธุ์ และพันธุ์ลูกผสมเปิด (OMRE) จำนวน 59 สายพันธุ์ ใช้พันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ โดยปลูกสลับทุก 20 แถว และเก็บเกี่ยวผลผลิตเพื่อบันทึกลักษณะที่สำคัญต่าง ๆ ที่อายุ 9 เดือน เมื่อวันที่ 2 พฤศจิกายน 2563

รหัสการทดลอง 01-61-59-01-02-00-07-63

[1] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ตำบลห้วยโป่ง อำเภอเมือง จังหวัดระยอง 21150

[2] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ซึ่งสามารถคัดเลือกมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสมสายพันธุ์ดีและมีคุณสมบัติเหมาะต่อการบริโภค คือ ทรงต้นดี ให้ผลผลิตสูง มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำ ไม่อ่อนแอต่อโรคและแมลง มีเนื้อสัมผัสและรสชาติเหมาะต่อการบริโภค สำหรับปลูกในขั้นตอนการเปรียบเทียบเบื้องต้นในปีต่อไป ได้ 28 สายพันธุ์ เป็นลูกผสมข้าม จำนวน 7 สายพันธุ์ และลูกผสมเปิด จำนวน 21 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตหัวสด 1.17-6.33 กิโลกรัมต่อต้น โดยสายพันธุ์ OMRE62-09-01 ให้ผลผลิตหัวสดสูงสุด ในขณะที่พันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 ให้ผลผลิต 0.72 และ 2.16 กิโลกรัมต่อต้น ให้ปริมาณแป้งในหัวสด 19.6-31.0 เปอร์เซ็นต์ โดยสายพันธุ์ OMRE62-04-17 ให้ปริมาณแป้งในหัวสดสูงสุด ส่วนพันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 ให้ปริมาณแป้งในหัวสด 15.1 และ 16.3 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไซยาไนด์ 14.55-88.52 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยสายพันธุ์ CMRE62-24-80 มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำสุด ในขณะที่พันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 มีปริมาณไซยาไนด์เท่ากับ 31.23 และ 52.78 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าความหวานในหัวสด 4.8-8.3 บริกซ์ โดยสายพันธุ์ CMRE62-24-34 มีค่าความหวานในหัวสดสูงสุด ในขณะที่พันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 มีค่าความหวานในหัวสดสูงสุด 4.8 และ 7.0 บริกซ์ และมีค่าดัชนีเก็บเกี่ยว 0.34-0.73 โดยสายพันธุ์ OMRE62-01-54 มีค่าดัชนีเก็บเกี่ยวสูงสุด ส่วนพันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 มีค่าดัชนีเก็บเกี่ยว 0.33 และ 0.37

คำสำคัญ: การปรับปรุงพันธุ์, มันสำปะหลังเพื่อบริโภค, การคัดเลือกปีที่ 2, เครื่องหมายโมเลกุล SNPs, ยีน *PSY2*, ยีน *PDS*

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

ประเทศไทยมีพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อการบริโภคที่สำคัญ ได้แก่ พันธุ์ห้านาที ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ระยอง 2 ซึ่งเป็นพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตร ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ซึ่งแต่ละพันธุ์มีลักษณะสีเนื้อหัวสดและเนื้อสัมผัสของเนื้อมันสุกแตกต่างกัน จึงมีการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อบริโภคที่มีลักษณะสำคัญ เช่น คุณสมบัติเหมาะต่อการบริโภค ผลผลิตสูง เปอร์เซ็นต์แป้งสูง คุณค่าทางโภชนาการสูง เพื่อเป็นทางเลือกสำหรับผู้บริโภคแต่ละกลุ่ม แต่ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังแบบมาตรฐาน (conventional method) จะใช้ระยะเวลานานประมาณ 7-10 ปี จึงมีการนำความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำ และลดระยะเวลาของกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ให้รวดเร็วยิ่งขึ้น เช่น การนำเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอมาใช้ในการจัดจำแนกและคัดเลือกพันธุ์/สายพันธุ์มันสำปะหลัง เพื่อนำมาใช้เป็นคู่ผสมพ่อ-แม่พันธุ์ สำหรับสร้างลูกผสมมันสำปะหลังให้มีลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ และใช้ในการคัดเลือกลูกผสมมันสำปะหลังที่มีลักษณะที่ต้องการ นอกจากจะเป็นทางเลือกในการเลือกใช้พันธุ์เพื่อบริโภคภายในประเทศแล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าและเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร รวมทั้งเป็นการเพิ่มโอกาสในการผลิตเพื่อส่งออกสำหรับการบริโภค และจากปัญหาเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลก และการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ๆ ที่รุนแรงเพิ่มมากขึ้น ทำให้คาดการว่าในอนาคตจะประสบภาวะ

วิกฤติด้านอาหารที่ผลิตได้ไม่เพียงพอต่อจำนวนประชากร มันสำปะหลังพันธุ์บริโภคซึ่งเป็นอาหารหลักและให้พลังงานสูง จะเป็นพืชที่เพิ่มความยั่งยืนและความมั่นคงด้านอาหารของประชากรโลกในอนาคต

เบต้า-แคโรทีน (Beta-carotene หรือ β-carotene) เป็นกลุ่มรงควัตถุสีส้ม สีเหลือง ซึ่งอยู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ที่เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ (pro vitamin A) เนื่องจากสามารถเปลี่ยนรูปเป็นเรตินอล (retinol) ได้ที่เยื่อบุผนังลำไส้เล็กและตับ โดยเมื่อผ่านเข้าสู่กลไกการทำงานของตับจะเปลี่ยนเบต้าแคโรทีนให้กลายเป็นวิตามินเอ ซึ่งเบต้าแคโรทีน 1 โมเลกุล จะเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ 2 โมเลกุล โดยเบต้าแคโรทีน มีบทบาทสำคัญในการรักษาสุขภาพ ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง และให้ระบบภูมิคุ้มกันโดยรวมของร่างกายทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นเบต้าแคโรทีนยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด การเกิดโรคมะเร็ง และเมื่อเปลี่ยนเป็นวิตามินเอจะช่วยการทำงานของการมองเห็น ให้มองเห็นในที่มืดได้ดี ลดความเสื่อมสภาพของเซลล์ของลูกตา เยื่อบุตา กระจกตา ซึ่งสารเบต้าแคโรทีน พบมากในผักผลไม้ที่มีสีเขียวเข้ม สีเหลือง สีส้ม หรือสีแดง (พิมพ์เพ็ญและนิธิยา, ม.ป.ป.; วรัทยาและมาริสา, 2557; มูลนิธิหัวใจแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, 2561) โดยสารเบต้าแคโรทีนจะถูกสังเคราะห์ขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ของพืช ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ เช่น ยีน phytoene synthase (*PSY*) ยีน phytoene desaturase (*PDS*) ยีน z-carotene desaturase (*ZDS*) ยีน carotene isomerase (*CRTISO*) และยีน lycopene β-cyclase (*LCYB*) เป็นต้น

โดยมีการศึกษาปริมาณสารเบต้าแคโรทีนและสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ในหัวสดมันสำปะหลังที่มีลักษณะสีเนื้อหัวสดต่าง ๆ กัน เช่น สีขาว สีครีม สีเหลือง และสีส้ม (Maziya-Dixon and Dixon, 2015; Carvalho *et al*., 2016; Belalcazar *et al*., 2016) และมีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการสะสมแคโรทีนอยด์ในหัวมันสำปะหลังพันธุ์พื้นเมือง (landrace) จำนวน 23 พันธุ์ โดยแบ่งตามสีเนื้อหัวสดเป็น 5 กลุ่ม โดยใช้เทคนิค microarray และ qRT-PCR (Carvalho *et al*., 2016) นอกจากนั้นมีการศึกษาจำนวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมของตำแหน่ง Single nucleotide polymorphisms (SNPs) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ pro vitamin A ของยีนต่าง ๆ โดย Welsch *et al*. (2010) ศึกษาปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ การแสดงออกของยีน และความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ (SNPs) ของยีน *PSY* เปรียบเทียบระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังที่มีสีเนื้อหัวสด สีขาวกับสีเหลือง พบว่า พันธุ์ MBRA 253 (หัวสดสีเหลือง) มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนสูงกว่าพันธุ์ CM 2772-3 (หัวสดสีครีม) และพันธุ์ CM 3306-4 (หัวสดสีขาว) และมีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง SNPs 3 ตำแหน่ง คือ SNP1 (521), SNP2 (572) และ SNP3 (819) ในหัวสด มันสำปะหลังสีขาวกับสีเหลือง และ Udoh *et al*. (2017) ศึกษายีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในมันสำปะหลังทั้งหมด 4 ยีน (*crtRB*, *PSY2*, *lcyE* และ *lcyB*) จาก IITA จำนวน 167 accessions โดยวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน พบว่า มี 37 SNPs ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกตัวอย่างมันสำปะหลังสำหรับปรับปรุงพันธุ์ และ de Albuquerque *et al*. (2018) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของมันสำปะหลังจำนวน 1,580 accessions ในประเทศบราซิล โดยใช้เทคนิค genotyping-by-sequencing (GBS) รวมทั้งมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสที่แตกต่างกันของจีโนมกับลักษณะฟีโนไทป์ (Genome-wide association study: GWAS) ในมันสำปะหลังพันธุ์/

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

สายพันธุ์ต่าง ๆ จากแหล่งต่าง ๆ เช่น International Center for Tropical Agriculture (CIAT), International Institute for Tropical Agriculture (IITA) และ Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences สำหรับเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมในมันสำปะหลัง และเปรียบเทียบความผันแปรทางพันธุกรรมของ SNPs แต่ละตำแหน่งในจีโนม ซึ่งสามารถนำข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNPs มาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุล ช่วยในการคัดเลือก (Marker Assisted Selection: MAS) เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบและจัดจำแนกกลุ่มมันสำปะหลังที่มีสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่แตกต่างกัน สำหรับการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง (Esuma *et al*., 2016; Luo *et al*., 2018)

ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อบริโภค ให้มีคุณสมบัติเหมาะต่อการบริโภคและให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ห้านาที ไม่น้อยกว่าร้อยละ 10 โดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐานร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *PSY2* และยีน *PDS* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเบต้าแคโรทีนในหัวมันสำปะหลังที่พัฒนาและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลจากขั้นตอนการผสมพันธุ์ ซึ่งการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังปีที่ 2 เป็นขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ที่ต่อเนื่องมาจากการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังปีที่ 1 โดยได้คัดเลือกลูกผสมมันสำปะหลังเพื่อบริโภคที่มาจากการผสมข้าม ซึ่งมีการกำหนดพันธุ์แม่ พันธุ์พ่อ และลูกผสมมันสำปะหลังเพื่อบริโภคที่มาจากการผสมเปิด ซึ่งทราบเฉพาะพันธุ์แม่แต่ไม่ทราบพันธุ์พ่อ แล้วนำต้นพันธุ์ที่ได้มาปลูกคัดเลือกในแปลง โดย 1 สายพันธุ์จะปลูกทั้งหมด 10 ต้น เมื่อครบ 8-10 เดือน ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิต แล้วคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ดี ทั้งการให้ผลผลิต ลักษณะหัว ทรงต้น สีเนื้อหัวสด ปริมาณไซยาไนด์ต่ำ และไม่แสดงอาการเข้าทำลายของโรคและแมลงในแปลงปลูก รวมทั้งมีคุณสมบัติเหมาะต่อการบริโภค เช่น ไม่มีรสขมเมื่อนำไปนึ่ง มีความร่วนซุยของเนื้อและมีเนื้อเหนียว รสชาติหวานและหวานเล็กน้อย เพื่อคัดเลือกไปปลูกในขั้นตอนการเปรียบเทียบเบื้องต้นต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

ดำเนินการ 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเบต้าแคโรทีนในมันสำปะหลังเพื่อบริโภค ลูกผสม ปี 2562

- วิธีการ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง :

1. มันสำปะหลังเพื่อบริโภค ลูกผสม ปี 2562 ที่ได้จากการคัดเลือกพันธุ์ปีที่ 1 จำนวน 106 สายพันธุ์ และลูกผสมที่มีลักษณะดี เหมาะสำหรับการบริโภค จำนวน 3 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 109 สายพันธุ์
2. วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ
3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ

แผนการทดลอง : การทดลองนี้ไม่ได้ใช้แผนการทดลองทางสถิติ

กรรมวิธี : มันสำปะหลังเพื่อบริโภค ลูกผสม ปี 2562 ที่ได้จากการคัดเลือกพันธุ์ปีที่ 1 จำนวน 106 สายพันธุ์ และลูกผสมที่มีลักษณะดี เหมาะสำหรับการบริโภค จำนวน 3 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 109 สายพันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างใบอ่อนมันสำปะหลังพันธุ์เพื่อบริโภค ลูกผสมปี 2562 จำนวน 109 สายพันธุ์ นำมาสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอมันสำปะหลัง โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอพืชสำเร็จรูป DNAsecure Plant Kit (Tiangen, China) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1) บดตัวอย่างใบอ่อนมันสำปะหลังปริมาณ 100 มิลลิกรัม ในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด ย้ายมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Buffer LP1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และเติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที และที่บ่มอุณหภูมิห้อง (15-25 °C) เป็นเวลา 10 นาที

2) เติมสารละลาย Buffer LP2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที

3) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm (~13,400 x g) เป็นเวลานาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

4) เติม 1.5 เท่าของสารละลาย Buffer LP3 (เช่น เติม Buffer LP3 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ต่อส่วนใสด้านบน 500 ไมโครลิตร) (ที่เติม ethanol แล้ว) และผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที

5) ดูดสารละลายจากข้อ 4) มาใส่ในหลอด Spin Column CB3 (ประกอบหลอด Spin Column CB3 เข้ากับหลอด Collection Tube) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm (~13,400 x g) เป็นเวลานาน 30 วินาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง และนำ หลอด Spin Column CB3 มาประกอบเข้ากับหลอด Collection Tube อีกครั้ง

6) เติมสารละลาย Buffer PW ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ในหลอด Spin Column CB3 (ที่เติม ethanol แล้ว) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm (~13,400 x g) เป็นเวลานาน 30 วินาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง และนำหลอด Spin Column CB3 มาประกอบเข้ากับหลอด Collection Tube อีกครั้ง

7) ทำซ้ำ ข้อ 6)

8) ปั่นเหวี่ยงหลอด Spin Column CB3 ที่ประกอบเข้ากับหลอด Collection Tube ที่ความเร็ว 12,000 rpm (~13,400 x g) เป็นเวลานาน 2 นาที จากนั้นเปิดฝาหลอด Spin Column CB3 และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15-25 °C) เป็นเวลา 5 นาที

9) ทิ้งหลอด Collection Tube และนำหลอด Spin Column CB3 มาประกอบเข้ากับหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ และเติมสารละลาย TE ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ในบริเวณแผ่นกรองของหลอด Spin Column CB3 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (15-25 °C) เป็นเวลา 5 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm (~13,400 x g) เป็นเวลานาน 2 นาที

2. นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density : OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 nm และ 280 nm จากนั้นเจือจางสารละลายดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นประมาณ 50-100 ng/ml ด้วยสารละลาย TE buffer และตรวจสอบดีเอ็นเอบน agarose gel electrophoresis

กรมวิชาการเกษตร

3. ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเบต้าแคโรทีนในมันสำปะหลัง ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนการผสมพันธุ์ กับตัวอย่างมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสม และนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบริเวณตำแหน่ง SNPs เพื่อตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP : polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)

4. ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบน polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ โดยการส่องภายใต้แสงรังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (gel documentation)

5. บันทึกข้อมูลความผันแปรทางพันธุกรรมของตำแหน่ง SNPs และขนาดของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละตัวอย่างของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs นำมาวิเคราะห์แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสม เพื่อวิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล รวมทั้งตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs โดยวิเคราะห์จากค่า polymorphic information content (PIC) ซึ่งใช้บอกความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของเครื่องหมายโมเลกุล และตรวจสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเบต้าแคโรทีนกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสม สำหรับใช้ในการคัดเลือกและจัดจำแนกกลุ่มลักษณะสีเนื้อของหัวสดมันสำปะหลัง เพื่อใช้ในขั้นตอนการเปรียบเทียบเบื้องต้นของโครงการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อบริโภคต่อไป

สูตรคำนวณความถี่จีโนไทป์ $f(AA) = AA / N$

$f(AB) = AB / N$

$f(BB) = BB / N$

เมื่อ $f(AA)$ คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous AA

$f(AB)$ คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ heterozygous AB

$f(BB)$ คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous BB

สูตรคำนวณความถี่อัลลีล $f(A) = [2(AA) + AB] / 2N$

$f(B) = [2(BB) + AB] / 2N$

เมื่อ $f(A)$ คือ ความถี่อัลลีล A

$f(B)$ คือ ความถี่อัลลีล B

AA, AB และ BB คือ จำนวนมันสำปะหลังที่มีจีโนไทป์แบบ AA, AB และ BB ตามลำดับ

และ N คือ จำนวนมันสำปะหลังทั้งหมด

สูตรคำนวณค่า $PIC = 1 - \sum pi^2$

pi คือ ความถี่ของแต่ละอัลลีล (อัลลีล 1 - i)

- การบันทึกข้อมูล

กรมวิชาการเกษตร

1. ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้
2. จำนวนและตำแหน่งของ SNPs
3. เครื่องหมายโมเลกุล SNPs
4. เอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อใช้ตัดบริเวณตำแหน่ง SNPs
5. แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังเพื่อบริโภค ลูกผสมปี 2562
6. ความผันแปรทางพันธุกรรมบริเวณตำแหน่ง SNPs
7. ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล
8. ค่า polymorphic information content (PIC)
9. ความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs

- เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ธันวาคม 2562 สิ้นสุด มิถุนายน 2564
ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ต.ห้วยโป่ง อ.เมือง จ.ระยอง

ขั้นตอนที่ 2 การคัดเลือกปีที่ 2 ในแปลงทดลอง

- วิธีการ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง :

1. มันสำปะหลังพันธุ์เพื่อบริโภค ลูกผสมปี 2562 ที่ได้จากการคัดเลือกพันธุ์ปีที่ 1 จำนวน 106 สายพันธุ์ และลูกผสมที่มีลักษณะดี เหมาะสำหรับการบริโภค จำนวน 3 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 109 สายพันธุ์
2. มันสำปะหลังพันธุ์เปรียบเทียบ 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ห้านาที และระยอง 2
3. ปุ๋ยเคมี เกรด 15-7-18
4. สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืช โรค และแมลง
5. เครื่องวัดเปอร์เซ็นต์แป้ง แบบ Reimann scale
6. อุปกรณ์สำหรับนึ่งหัวมัน
7. อุปกรณ์และสารเคมีตรวจวัดปริมาณไซยาไนด์
8. Brix refractometer

- แบบและวิธีการทดลอง

แผนการทดลอง : การทดลองนี้ไม่ได้ใช้แผนการทดลองทางสถิติ

กรรมวิธี : มันสำปะหลังพันธุ์เพื่อบริโภค ลูกผสมปี 2562 ที่ได้จากการคัดเลือกพันธุ์ปีที่ 1 จำนวน 106 สายพันธุ์ และลูกผสมที่มีลักษณะดี เหมาะสำหรับการบริโภค จำนวน 3 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 109 สายพันธุ์ และพันธุ์เปรียบเทียบ คือ พันธุ์ห้านาที และระยอง 2

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

ปลูกมันสำปะหลังพันธุ์เพื่อบริโภค ลูกผสมปี 2562 ที่ผ่านการคัดเลือกปีที่ 1 จำนวน 106 สายพันธุ์ และลูกผสมที่มีลักษณะดี เหมาะสำหรับการบริโภค จำนวน 3 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 109 สายพันธุ์ โดยปลูกแบบต้นต่อ

กรมวิชาการเกษตร

แถว แถวละ 10 ต้น ใช้ระยะระหว่างแถว 1 เมตร ระหว่างต้น 1 เมตร ปลูกพันธุ์ห้านาที และระยอง 2 เป็นพันธุ์ตรวจสอบสลับทุก 20 แถว หลังจากปลูกประมาณ 1-1.5 เดือน กำจัดวัชพืชด้วยจอบ และใส่ปุ๋ยเคมี เกรด 15-7-18 โดยขุดหลุมใส่ 2 ข้างลำต้นบริเวณชายพุ่มใบแล้วพรวนดินกลบ ตรวจแปลงทดลองสม่ำเสมอ เพื่อระวังการระบาดของโรค แมลง และวัชพืช หากพบ รีบทำการกำจัดโดยวิธีกล หรือใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูมันสำปะหลังตามความเหมาะสม เก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่ออายุครบ 9 เดือน นำผลผลิตที่ได้ไปนึ่ง เพื่อดูคุณสมบัติด้านการบริโภค คัดเลือกพันธุ์ที่ดี คือ ลักษณะทรงต้นดี ตั้งตรงไม่แตกกิ่ง หรือแตกกิ่งเล็กน้อย ผลผลิตดี สีเนื้อหัวสีขาวหรือสีเหลือง ปริมาณไซยาไนด์ต่ำ ไม่แสดงอาการอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรคและแมลง มีความร่วนซุยของเนื้อและมีเนื้อเหนียว รสชาติหวานและหวานเล็กน้อย เหมาะต่อการบริโภค เพื่อนำไปปลูกทดลองในขั้นตอนการเปรียบเทียบเบื้องต้นต่อไป

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวสดมันสำปะหลัง มีขั้นตอน ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างจากหัวมันสำปะหลังสด

ขุดหัวสดมันสำปะหลังเพื่อบริโภคและพันธุ์เปรียบเทียบ ที่อายุครบ 9 เดือน สายพันธุ์ละ 4 ต้น ๆ ละ 1 หัว จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร เจาะบริเวณกลางของหัวมันสำปะหลัง ความลึกประมาณครึ่งหนึ่งของหัวมันสำปะหลัง ตัดชิ้นส่วนมันสำปะหลังจากส่วนในให้มีน้ำหนักเท่ากับ 100 มิลลิกรัม

2. การวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ด้วยวิธี picrate paper ตามวิธีดัดแปลงของ Haque and Bradbury (1999) ดังนี้

เตรียม picric acid paper โดยชั่ง picric acid 1.4 กรัม ละลายใน 100 มิลลิลิตร 2.5% (w/v) sodium carbonate จากนั้นจุ่มกระดาษ Whatman #1 ลงในสารละลาย picric acid ปล่อยให้แห้ง ตัด picric acid paper ขนาด 1 x 3 ตารางเซนติเมตร ติดบนฝาของหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส นำมันสำปะหลัง (จากข้อ 1) หนัก 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติม 0.1 M phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บดให้ละเอียด ปิดฝาที่มี picric acid paper บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานข้ามคืน นำ picric acid paper จุ่มในน้ำ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

3. การเตรียมมาตรฐานของปริมาณไซยาไนด์

เตรียมสารละลายมาตรฐาน hydrogen cyanide (HCN) ที่ระดับ 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 20.0 และ 40.0 ไมโครกรัมต่อหลอด โดยเติม 0.1 M phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย HCN ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด ปริมาตร 0, 1, 2.5, 5, 10 และ 25 ไมโครลิตร สำหรับสารละลายมาตรฐานที่ระดับ 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อหลอด ตามลำดับ สำหรับสารละลายมาตรฐานที่ระดับ 5.0, 7.5, 10.0, 20.0 และ 40.0 ไมโครกรัมต่อหลอด ให้เติมสารละลาย HCN ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด ปริมาตร 5, 7.5, 10, 20 และ 40 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปิดฝาที่มี picric acid paper บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานข้ามคืน นำ picric acid paper จุ่มในน้ำ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นำไปสร้างกราฟสารมาตรฐาน

วิธีการวัดค่าความหวานในหัวสดมันสำปะหลัง มีขั้นตอน ดังนี้

ลิขสิทธิ์การเกษตร

1. ขุดหัวสดมันสำปะหลังเพื่อบริโภคและพันธุ์เปรียบเทียบ ที่อายุครบ 9 เดือน สายพันธุ์ละ 1 ต้น ๆ ละ 1 หัว นำมาปอกเปลือกและล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นหั่นหัวมันสำปะหลังเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 100 กรัม

2. นำหัวมันสำปะหลังไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น เมื่อได้นำใส่ในผ้าขาวบางเพื่อคั้นน้ำจากหัวสด จากนั้นนำน้ำมันสำปะหลังปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm (~13,400 x g) เป็นเวลานาน 1 นาที และดูดส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

3. ดูดส่วนใสจากหลอดทดลอง ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร หยดลงบนช่องวัดของเครื่องวัดความหวาน รุ่น PAL-1 Digital Hand-held “Pocket” Refractometer (Atago, Japan) จากนั้นอ่านค่าความหวาน ซึ่งจะแสดงผลเป็น เปอร์เซ็นต์บริกซ์ (%Brix)

- การบันทึกข้อมูล

ความงอกและจำนวนต้นอยู่รอดถึงเก็บเกี่ยว การเจริญเติบโต ลักษณะทรงต้น การแตกกิ่ง ลักษณะหัว จำนวนหัวต่อต้น น้ำหนักหัวต่อต้น น้ำหนักต้นและใบ ค่าดัชนีเก็บเกี่ยว (Harvest index) ผลผลิตหัวสด เปอร์เซ็นต์แป้ง (โดยใช้เครื่องวัดเปอร์เซ็นต์แป้งแบบ Reimann scale) ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสด (โดยใช้วิธี picrate paper ตามวิธีดัดแปลงของ Haque and Bradbury (1999)) ค่าความหวาน (โดยวัดความหวานจากปริมาณสารที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solids) ในน้ำคั้นจากหัวสดของมันสำปะหลัง โดยใช้เครื่องมือ Hand refractometer) ลักษณะเนื้อสัมผัส สี และรสชาติของเนื้อมันหลังนึ่ง (โดยการชิม) ระดับการทำลายของโรคและแมลงที่สำคัญ

- เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ธันวาคม 2562 สิ้นสุด พฤศจิกายน 2563
ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ต.ห้วยโป่ง อ.เมือง จ.ระยอง

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ขั้นตอนที่ 1

1. ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนมันสำปะหลังพันธุ์เพื่อบริโภค จากแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ลูกผสมปี 2562 จำนวน 109 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ลูกผสมข้าม (CMRE) จำนวน 50 สายพันธุ์ และลูกผสมเปิด (OMRE) จำนวน 59 สายพันธุ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอพืชสำเร็จรูป จากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง NanoDrop One UV-Vis Spectrophotometer เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น A260/A280 นาโนเมตร และ A260/A230 นาโนเมตร (Table 1, 2) ทำการเจือจางดีเอ็นเอด้วย TE buffer ให้มีความเข้มข้นประมาณ 50-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และตรวจสอบผลบน 1% agarose gel electrophoresis (Figure 1, 2)

2. ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีน *PSY2* และยีน *PDS* ที่คัดเลือกได้จากการผสมพันธุ์ จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ (13 ตำแหน่ง) (Table 3) กับตัวอย่างมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสม โดยการทำปฏิกิริยา PCR (polymerase chain reaction) ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัม, Green PCR Master Mix (2x) (Biotech rabbit, Germany), forward

กรมวิชาการเกษตร

primer (10 pmol), reverse primer (10 pmol) และ UltraPure Distilled Water และตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, Annealing 52 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, Extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และ Final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตรวจสอบผลผลิต PCR บน 6% polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ โดยการส่องภายใต้แสงรังสีอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของคู่ไพรเมอร์ทั้งหมดกับตัวอย่างมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสม ได้ครบทั้ง 109 สายพันธุ์ (Figure 3)

3. ผลการนำผลผลิต PCR ของทั้งหมด 8 คู่ไพรเมอร์ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบริเวณตำแหน่ง SNPs เพื่อตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบน 8% polyacrylamide gel electrophoresis และตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยการส่องภายใต้แสงรังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (gel documentation) พบว่าทั้ง 13 ตำแหน่ง (SNPs) แสดงลักษณะ polymorphism (Figure 4)

4. ผลการวิเคราะห์แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความผันแปรทางพันธุกรรมบริเวณตำแหน่ง SNPs ของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs จำนวนทั้งหมด 13 ตำแหน่ง ประกอบด้วย ยีน *PSY2* จำนวน 7 ตำแหน่ง และยีน *PDS* จำนวน 6 ตำแหน่ง ในมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสม ทั้งหมด 109 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ พบว่า ยีน *PSY2* และยีน *PDS* มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ทุกตำแหน่ง โดยที่ SNPs ตำแหน่ง *PSY2* g.24155522 และ g.24155894 มีความผันแปรทางพันธุกรรมสอดคล้องกับรายงานทางวิชาการของ Welsch *et al.* (2010) ซึ่งพบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ SNPs ระหว่างมันสำปะหลังที่มีลักษณะสีเนื้อหัวสดสีขาว (พันธุ์ CM3306-4) และสีเหลือง (พันธุ์ MBRA253) ทั้งหมด 3 ตำแหน่ง คือ SNP1: 521 G/C (g.24155417), SNP2: 572 C/A (g.24155522) และ SNP3: 819 A/T (g.24155894) สำหรับผลการวิเคราะห์แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล SNPs แต่ละตำแหน่ง ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดขนาดแตกต่างกัน (Table 4)

5. ผลการวิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีน *PSY2* และยีน *PDS* จำนวนทั้งหมด 13 ตำแหน่ง (SNPs) ในตัวอย่างมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสม จำนวน 109 สายพันธุ์ (Table 5)

6. ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs โดยวิเคราะห์จากค่า polymorphic information content (PIC) ซึ่งใช้บอกความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของ SNP แต่ละตำแหน่ง และวิเคราะห์ค่าความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีน *PSY2* และยีน *PDS* จำนวนทั้งหมด 13 ตำแหน่ง พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีน *PSY2* จำนวน 7 ตำแหน่ง มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.10 - 0.50 โดย SNP *PSY2* g.24155522 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.50 และมีค่าความแม่นยำในการจำแนกลักษณะสีเนื้อหัวสดสีขาวออกจากสีเหลืองครีมของตัวอย่างมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสม ทั้งหมด 109 ตัวอย่าง ได้ถูกต้อง 35.85 - 59.43 เปอร์เซ็นต์ โดย SNP *PSY2* g.24156495 มีค่าความแม่นยำสูงสุดเท่ากับ 59.43 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เครื่องหมาย

โมเลกุล SNPs ของยีน *PDS* จำนวน 6 ตำแหน่ง มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.28 - 0.48 โดย SNP *PDS* g.26662057 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.48 และมีค่าความแม่นยำในการจำแนกลักษณะสีเนื้อหัวสดได้ถูกต้อง 37.74 - 54.72 เปอร์เซ็นต์ โดย SNP *PDS* g.26674193 มีค่าความแม่นยำสูงสุดเท่ากับ 54.72 เปอร์เซ็นต์ (Table 6)

ขั้นตอนที่ 2

ทำการปลูกมันสำปะหลังพันธุ์เพื่อบริโภค ลูกผสมปี 2562 ที่ผ่านการคัดเลือกปีที่ 1 จำนวน 109 สายพันธุ์ โดยเป็นลูกผสมข้าม (CMRE) จำนวน 50 สายพันธุ์ และเป็นลูกผสมเปิด (OMRE) จำนวน 59 สายพันธุ์ เมื่อวันที่ 23 มกราคม 2563 โดยปลูกแบบต้นต่อแถว แถวละ 10 ต้น ใช้ระยะระหว่างแถว 1 เมตร ระหว่างต้น 1 เมตร ปลูกพันธุ์ห้านาที และระยอง 2 เป็นพันธุ์ตรวจสอบสลับทุก 20 แถว หลังจากปลูก 1 เดือน ทำการตรวจเช็คการอยู่รอด พบว่า ลูกผสม CMRE มีจำนวนต้นที่อยู่รอดหลังปลูก 1 เดือน จำนวน 443 ต้น จากจำนวนทั้งหมด 480 ต้น คิดเป็น 92.29 เปอร์เซ็นต์ และลูกผสม OMRE มีจำนวนต้นที่อยู่รอดหลังปลูก 1 เดือน จำนวน 575 ต้น จากจำนวนทั้งหมด 590 ต้น คิดเป็น 97.46 เปอร์เซ็นต์ ทำการวัดความสูงที่ 3 เดือน พบว่า ลูกผสม CMRE มีความสูงเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 57.00 - 106.80 เซนติเมตร และลูกผสม OMRE มีความสูงเฉลี่ย อยู่ระหว่าง 51.80 - 109.80 เซนติเมตร และทำการวัดความสูงที่ 6 เดือน พบว่า ลูกผสม CMRE มีความสูงเฉลี่ย อยู่ระหว่าง 120.00 - 270.60 เซนติเมตร และลูกผสม OMRE มีความสูงเฉลี่ย อยู่ระหว่าง 73.60 - 279.00 เซนติเมตร ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตมันสำปะหลังเมื่ออายุครบ 9 เดือน เพื่อบันทึกลักษณะที่สำคัญต่าง ๆ เมื่อวันที่ 2 พฤศจิกายน 2563 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ พบว่า สามารถคัดเลือกมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสมสายพันธุ์ดี จำนวน 28 สายพันธุ์ แบ่งเป็น ลูกผสมข้าม (CMRE) จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ CMRE62-02-07, CMRE62-19-19, CMRE62-22-01, CMRE62-24-11, CMRE62-24-34, CMRE62-24-58 และ CMRE62-24-80 และเป็นลูกผสมเปิด (OMRE) จำนวน 21 สายพันธุ์ ได้แก่ OMRE62-01-54, OMRE62-01-67, OMRE62-01-96, OMRE62-01-104, OMRE62-01-121, OMRE62-03-16, OMRE62-03-19, OMRE62-03-21, OMRE62-03-23, OMRE62-03-27, OMRE62-04-02, OMRE62-04-10, OMRE62-04-11, OMRE62-04-15, OMRE62-04-17, OMRE62-04-20, OMRE62-04-23, OMRE62-04-28, OMRE62-04-54, OMRE62-05-45 และ OMRE62-09-01 เพื่อปลูกในขั้นตอนการเปรียบเทียบเบื้องต้นในปี 2564/2565 ต่อไป

โดยคู่ผสมที่ให้ลูกผสมที่มีลักษณะดีและมีคุณสมบัติเหมาะต่อการบริโภค ที่ได้รับการคัดเลือกมากที่สุด คือ คู่ผสมเปิดของพันธุ์ Nep คัดเลือกไว้ได้ 8 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตหัวสด 1.28-4.50 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณแป้งในหัวสด 22.2-31.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไซยาไนด์ 16.84-50.48 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีดัชนีเก็บเกี่ยว 0.36-0.69 รองลงมาคือ คู่ผสมเปิดของพันธุ์ Batrang คัดเลือกไว้ได้ 5 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตหัวสด 1.48-3.30 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณแป้งในหัวสด 20.5-24.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไซยาไนด์ 33.80-54.95 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีดัชนีการเก็บเกี่ยว 0.36-0.73 คู่ผสมเปิดของพันธุ์ห้านาที คัดเลือกไว้ได้ 5 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตหัวสด 1.17-3.12 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณแป้งในหัวสด 20.4-26.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไซยาไนด์ 20.96-84.70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีดัชนีเก็บเกี่ยว 0.34-0.67 คู่ผสมข้ามระหว่างพันธุ์ระยอง 2 x ระยอง 5 คัดเลือกไว้ได้ 4 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตหัวสด 2.04-3.55 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณแป้งในหัวสด 20.9-26.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไซยาไนด์ 14.55-88.52 มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ต่อกิโลกรัม และมีดัชนีเก็บเกี่ยว 0.44-0.66 คู่ผสมข้ามระหว่างพันธุ์ Batrang x ระยอง 11 คัดเลือกไว้ได้ 1 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตหัวสด 1.65 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณแป้งในหัวสด 30.6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไซยาไนด์ 70.96 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีดัชนีเก็บเกี่ยว 0.47 คู่ผสมข้ามระหว่างพันธุ์ Nep x เกษตรศาสตร์ 50 คัดเลือกไว้ได้ 1 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตหัวสด 3.13 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณแป้งในหัวสด 26.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไซยาไนด์ 43.64 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีดัชนีเก็บเกี่ยว 0.65 คู่ผสมข้ามระหว่างพันธุ์ระยอง 2 x Mcol 2331 คัดเลือกไว้ได้ 1 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตหัวสด 1.75 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณแป้งในหัวสด 21.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไซยาไนด์ 46.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีดัชนีเก็บเกี่ยว 0.55 คู่ผสมเปิดของพันธุ์ระยอง 2 คัดเลือกไว้ได้ 1 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตหัวสด 2.52 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณแป้งในหัวสด 19.6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไซยาไนด์ 40.82 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีดัชนีเก็บเกี่ยว 0.54 และคู่ผสมเปิดของพันธุ์ระยอง 3 S1 P1 คัดเลือกไว้ได้ 1 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตหัวสด 6.33 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณแป้งในหัวสด 26.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไซยาไนด์ 54.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีดัชนีเก็บเกี่ยว 0.63 (Table 7)

ความสูงทรงต้น พบว่า สายพันธุ์มันสำปะหลังที่คัดเลือกไว้ทั้งหมด มีความสูงทรงต้นระหว่าง 160-327 เซนติเมตร เฉลี่ย 234 เซนติเมตร โดยสายพันธุ์ CMRE62-24-58 มีความสูงทรงต้นสูงสุด คือ 327 เซนติเมตร รองลงมา คือ สายพันธุ์ OMRE62-04-02 และ OMRE62-04-28 มีความสูงทรงต้น 313 และ 312 เซนติเมตร ในขณะที่พันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 มีความสูงทรงต้น 228 และ 196 เซนติเมตร ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสูงทรงต้นสูงกว่าพันธุ์ห้านาที ร้อยละ 43 37 และ 37 ตามลำดับ และสูงกว่าพันธุ์ระยอง 2 ร้อยละ 67 60 และ 59 ตามลำดับ (Table 7)

ทรงต้นและการแตกกิ่ง พบว่า สายพันธุ์มันสำปะหลังที่คัดเลือกไว้ ส่วนใหญ่มีทรงต้นแบบ v-shape รองลงมา คือ แบบ u-shape และส่วนใหญ่มีการแตกกิ่ง 2/3 ของความสูงลำต้น รองลงมา คือ แตกกิ่งปลายยอดและไม่แตกกิ่ง ในขณะที่พันธุ์ห้านาที มีทรงต้นแบบ v-shape มีการแตกกิ่งปลายยอด และระยอง 2 แตกกิ่ง 2/3 ของความสูงลำต้น (Table 7)

ผลผลิตหัวสด พบว่า สายพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมปี 2562 ส่วนใหญ่ให้ผลผลิตหัวสดน้อยกว่าการคัดเลือกปีที่ 1 (ปี 2562/2563) เนื่องจากปี 2563 มีปริมาณน้ำฝนสะสมในดินมาก ทำให้เมื่อเก็บเกี่ยวผลผลิต พบหัวสดมันสำปะหลังเน่าเป็นส่วนใหญ่ โดยสายพันธุ์มันสำปะหลังที่คัดเลือกไว้ ให้ผลผลิตหัวสด ระหว่าง 1.17-6.33 กิโลกรัมต่อต้น เฉลี่ย 2.53 กิโลกรัมต่อต้น สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตหัวสดสูงสุด คือ สายพันธุ์ OMRE62-09-01 รองลงมา คือ OMRE62-04-28 และ CMRE62-24-58 ให้ผลผลิตหัวสด 6.33 4.50 และ 3.55 กิโลกรัมต่อต้น ในขณะที่พันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 ให้ผลผลิตหัวสด 0.72 และ 2.16 กิโลกรัมต่อต้น ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้ผลผลิตหัวสดสูงกว่าพันธุ์ห้านาที ร้อยละ 779 500 และ 373 ตามลำดับ และสูงกว่าพันธุ์ระยอง 2 ร้อยละ 193 108 และ 64 ตามลำดับ (Table 7)

ปริมาณแป้งในหัวสด พบว่า สายพันธุ์มันสำปะหลังที่คัดเลือกไว้ทั้งหมด ให้ปริมาณแป้งในหัวสดสูงกว่าพันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 โดยสายพันธุ์มันสำปะหลังให้ปริมาณแป้งในหัวสด ระหว่าง 19.6-31.0 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 24.5 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณแป้งในหัวสดสูงสุด คือ สายพันธุ์ OMRE62-04-17 รองลงมา คือ CMRE62-02-07 และ OMRE62-04-11 ให้ปริมาณแป้งในหัวสด 31.0 30.6 และ 29.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พันธุ์ห้านาทีและ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ระยอง 2 ให้ปริมาณแป้งในหัวสด 15.1 และ 16.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้ปริมาณแป้งในหัวสดสูงกว่าพันธุ์ห้านาที ร้อยละ 100 102 และ 93 ตามลำดับ และสูงกว่าพันธุ์ระยอง 2 ร้อยละ 90 88 และ 79 ตามลำดับ (Table 7)

ปริมาณไซยาไนด์ พบว่า สายพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม ปี 2562 ส่วนใหญ่มีปริมาณไซยาไนด์น้อยกว่าการคัดเลือกปีที่ 1 (ปี 2562/2563) เนื่องจากปี 2563 มีปริมาณน้ำฝนสะสมในดินมาก ทำให้เกิดการเจือจางของไซยาไนด์ในหัวสดมันสำปะหลัง จึงมีปริมาณไซยาไนด์ลดลง โดยสายพันธุ์มันสำปะหลังที่คัดเลือกไว้ มีปริมาณไซยาไนด์ ระหว่าง 14.55-88.52 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เฉลี่ย 46.58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สายพันธุ์มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำสุด คือ สายพันธุ์ CMRE62-24-80 ถัดมา คือ OMRE62-04-20 และ OMRE62-04-11 มีปริมาณไซยาไนด์ 14.55 16.36 และ 16.84 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่พันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 มีปริมาณไซยาไนด์ 31.23 และ 52.78 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่าพันธุ์ห้านาที ร้อยละ 53 48 และ 46 ตามลำดับ และต่ำกว่าพันธุ์ระยอง 2 ร้อยละ 72 69 และ 68 ตามลำดับ (Table 7)

ดัชนีเก็บเกี่ยว พบว่า สายพันธุ์มันสำปะหลังที่คัดเลือกไว้ทั้งหมด มีค่าดัชนีเก็บเกี่ยวระหว่าง 0.34-0.73 เฉลี่ย 0.55 โดยสายพันธุ์มันสำปะหลังที่มีค่าดัชนีเก็บเกี่ยวสูงสุด คือ สายพันธุ์ OMRE62-01-54 รองลงมา คือ OMRE62-01-54, OMRE62-04-20 และ OMRE62-03-23, OMRE62-04-17 มีค่าดัชนีเก็บเกี่ยว 0.73 0.69 และ 0.67 ในขณะที่พันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 มีค่าดัชนีเก็บเกี่ยว 0.33 และ 0.37 ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่าดัชนีเก็บเกี่ยวสูงกว่าพันธุ์ห้านาที ร้อยละ 121 109 และ 103 ตามลำดับ และสูงกว่าพันธุ์ระยอง 2 ร้อยละ 97 86 และ 81 ตามลำดับ (Table 7)

ความหวานของมันสำปะหลัง พบว่า สายพันธุ์มันสำปะหลังที่คัดเลือกไว้ทั้งหมด มีค่าความหวานในหัวสดระหว่าง 4.8-8.3 บริกซ์ เฉลี่ย 6.7 บริกซ์ โดยสายพันธุ์ที่มีค่าความหวานในหัวสดสูงสุด คือ CMRE62-24-34 รองลงมา คือ OMRE62-03-23 และ CMRE62-02-07 มีค่าความหวาน 8.3 8.2 และ 7.9 บริกซ์ ในขณะที่พันธุ์ห้านาทีและระยอง 2 มีค่าความหวานในหัวสดสูงสุด 4.8 และ 7.0 บริกซ์ ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่าความหวานในหัวสดสูงกว่าพันธุ์ห้านาที ร้อยละ 73 71 และ 65 ตามลำดับ และสูงกว่าพันธุ์ระยอง 2 ร้อยละ 19 17 และ 13 ตามลำดับ (Table 8)

รสชาติของหัวมันสำปะหลังนึ่ง พบว่า สายพันธุ์มันสำปะหลังที่คัดเลือกไว้ทั้งหมด มีคะแนนรสชาติของหัวมันสำปะหลังหลังนึ่งมีรสชาติไม่แตกต่างกัน โดยทุกสายพันธุ์มีคะแนนความหวานอยู่ระหว่าง 0-2 คะแนน คะแนนความขมอยู่ระหว่าง 0-2 คะแนน คะแนนเนื้อสัมผัสร่วนซุยอยู่ระหว่าง 0-3 คะแนนเนื้อสัมผัสเหนียวอยู่ระหว่าง 0-3 คะแนน ในขณะที่พันธุ์ห้านาที มีคะแนนความหวาน 0 คะแนน คะแนนความขม 0 คะแนน คะแนนเนื้อสัมผัสร่วนซุย 3 คะแนน และเนื้อสัมผัสเหนียว 0 คะแนน และพันธุ์ระยอง 2 มีคะแนนความหวาน 1 คะแนน คะแนนความขม 0 คะแนน คะแนนเนื้อสัมผัสร่วนซุย 0 คะแนน และเนื้อสัมผัสเหนียว 2 คะแนน (Table 8)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ขั้นตอนที่ 1

กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีน *PSY2* และยีน *PDS* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างสารเบต้าแคโรทีนในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 13 ตำแหน่ง กับมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสมของการคัดเลือกปีที่ 2 จำนวน 109 สายพันธุ์ พบความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ (SNPs) ของทั้ง 13 ตำแหน่ง เมื่อนำมาวิเคราะห์จากค่า PIC ซึ่งใช้บอกความสามารถในการจำแนกความแตกต่าง และค่าความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุล SNP แต่ละตำแหน่งของทั้งสองยีน พบว่า ทั้งสองค่ามีความสอดคล้องและไปในทิศทางเดียวกัน โดยเครื่องหมายโมเลกุล SNP ของยีน *PSY2* ตำแหน่ง g.24155522 มีค่า PIC สูงสุด และเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีน *PSY2* ตำแหน่ง g.24156495 มีค่าความแม่นยำสูงสุด โดยมีค่าความแม่นยำมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถนำไปใช้คัดเลือกมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสมได้ แต่จากการทดลองไม่พบเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความแม่นยำมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงควรพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNPs เพิ่มเติม โดยการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PSY2* และยีน *PDS* ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่มีลักษณะสีเนื้อหัวสดสีขาวและสีเหลือง เพื่อนำมาศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของตำแหน่ง SNPs เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่มีลักษณะสีเนื้อหัวสดแตกต่างกัน จากนั้นทำการออกแบบคู่ไพรเมอร์ให้ครอบคลุมตำแหน่ง SNPs ที่แตกต่างกันและนำมาทดสอบความแม่นยำ เพื่อให้ได้เครื่องหมายโมเลกุล SNPs ที่มีความแม่นยำสูง สำหรับใช้ในการคัดเลือกและจำแนกกลุ่มลักษณะสีเนื้อหัวสดของมันสำปะหลังลูกผสมในโครงการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อบริโภคต่อไป

ขั้นตอนที่ 2

ปี 2563/2564 ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ได้ดำเนินการทดลอง การคัดเลือกปีที่ 2 มันสำปะหลังเพื่อการบริโภค ลูกผสมปี 2562 ที่คัดเลือกได้จากการคัดเลือกปีที่ 1 จำนวน 109 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นลูกผสมข้าม (CMRE) จำนวน 50 สายพันธุ์ และลูกผสมเปิด (OMRE) จำนวน 59 สายพันธุ์ และสามารถคัดเลือกมันสำปะหลังเพื่อบริโภคลูกผสมปี 2562 ที่มีลักษณะที่ดี และมีคุณสมบัติเหมาะต่อการบริโภค สำหรับปลูกในขั้นตอนเปรียบเทียบเบื้องต้นในปี 2564/2565 ได้จำนวน 28 สายพันธุ์ โดยเป็นลูกผสมข้าม จำนวน 7 สายพันธุ์ และลูกผสมเปิด จำนวน 21 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่คัดเลือก ให้ผลผลิตหัวสด ระหว่าง 1.17-6.33 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณแป้งในหัวสดอยู่ระหว่าง 19.1-31.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไซยาไนด์อยู่ระหว่าง 14.55-88.52 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความหวานในหัวสด 4.8-8.3 บริกซ์ และดัชนีเก็บเกี่ยวอยู่ระหว่าง 0.34-0.73 ในขณะที่พันธุ์เปรียบเทียบ ได้แก่ พันธุ์ห้านาที และระยอง 2 ให้ผลผลิตหัวสด 0.72 และ 2.16 กิโลกรัมต่อต้น ปริมาณแป้งในหัวสด 15.1 และ 16.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไซยาไนด์ 31.23 และ 52.78 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความหวานในหัวสดสูงสุด 4.8 และ 7.0 บริกซ์ และดัชนีเก็บเกี่ยว 0.33 และ 0.37

10. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

1. นำเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีน *PSY2* และยีน *PDS* ที่มีความแม่นยำมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไปใช้ในการคัดเลือกและจัดจำแนกกลุ่มลักษณะสีเนื้อหัวสดของมันสำปะหลังลูกผสมเพื่อบริโภค ในโครงการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อบริโภคต่อไป และสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ที่ได้ ไปทดสอบกับตัวอย่างมันสำปะหลังในกลุ่มประชากรอื่น เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ช่วยในการคัดเลือก (Marker Assisted Selection, MAS) ของลักษณะสีเนื้อหัวสดของมันสำปะหลัง

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

2. เป็นข้อมูลความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ (SNPs) ของยีน *PSY2* และยีน *PDS* ซึ่งเป็นยีนสำคัญในการสร้างสารเบต้าแคโรทีนของมันสำปะหลัง สำหรับนำไปศึกษาต่อยอดทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลต่อไป

3. นำท่อนพันธุ์ที่ได้ไปปลูกในการทดลองเปรียบเทียบเบื้องต้นต่อไป

11. เอกสารอ้างอิง

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป. Beta Carotene / บีตา-แคโรทีน. แหล่งข้อมูล: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2026/beta-carotene-บีต้า-แคโรทีน. สืบค้นเมื่อ 17 เมษายน 2562

มูลนิธิหัวใจแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์. 2561. ถึงเวลาเติมเบต้าแคโรทีนให้ร่างกายแล้ว. แหล่งข้อมูล: http://www.thaiheartfound.org/category/details/food/337. สืบค้นเมื่อ 17 เมษายน 2562

วรัทยา รักอยู่ และมาริสา ขวัญเมือง. 2557. เบต้า แคโรทีน (Beta-carotene). แหล่งข้อมูล: http://nutrition.anamai.moph.go.th/images/file/studen_beta_58.pdf. สืบค้นเมื่อ: 17 เมษายน 2562

Belalcazar, J., D. Dufour, M.S. Andersson, M. Pizarro, J. Luna, L. Londoño, N. Morante, A.M. Jaramillo, L. Pino, L.A.B. LÓpez-Lavalle, F. Davrieux, E.F. Talsma and H. Ceballos. 2016. High-throughput phenotyping and improvements in breeding cassava for increased carotenoids in the roots. *Crop Sci*. 56: 2916-2925.

Carvalho, L.J., M.A. Agustini, J.V. Anderson, E.A Vieira, C.R. de Souza, S. Chen, ,B.A. Schaal and J.P. Silva. 2016. Natural variation in expression of genes associated with carotenoid biosynthesis and accumulation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage root. *BMC Plant Biol*. 16: 133.

de Albuquerque, H.Y.G, C.D. do Carmo, A.C. Brito and E.J. de Oliveira. 2018. Genetic diversity of *Manihot esculenta* Crantz. germplasm based on single-nucleotide polymorphism markers. *Ann. Appl. Biol*. 173: 271-284.

Esuma, W., L. Herselman, M.T. Labuschagne, P. Ramu, F. Lun, Y. Baguma, E.S. Buckler and R.S. Kawuki. 2016. Genome-wide association mapping of provitamin A carotenoid content in cassava. *Euphytica*. 212: 97-110.

Haque, M.R. and J.H. Bradbury. Preparation of linamarase solution from cassava latex for use in the cassava cyanide kit. *Food Chemistry*. 67: 305-309.

Luo, X., K. I. Tomlins, L.J.C.B. Carvalho, K. Li and S. Chen. 2018. The analysis of candidate genes and loci involved with carotenoid metabolism in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) using SLAF-seq. *Acta Physiol. Plant*. 40: 66.

ศรีวิชัยการเกษตร

Maziya-Dixon, B. B. and A. G. O. Dixon. 2015. Carotenoids content of yellow-fleshed cassava genotypes grown in four agroecological zones in Nigeria and their Retinol Activity Equivalents (RAE). *J. Food Agric. Environ*. 13: 63-69.

Udoh, L., M. Gedil, E.Y. Parkes, P. Kulakow, A. Adesoye, C. Nwuba and I.Y. Rabbi. 2017. Candidate gene sequencing and validation of SNP markers linked to carotenoid content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Mol. Breed*. 37: 123.

Welsch, R., J. Arango, C. Bär, B. Salazar, S. Al-Babili, J. Beltrán, P. Chavarriaga, H. Ceballos, J. Tohme and P. Beyer. 2010. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene**.** *Plant Cell*. 22: 3348-3356.

กรมวิชาการเกษตร

12. ภาคผนวก

ขั้นตอนที่ 1

Table 1 DNA quantification and DNA purity of edible cassava second selection (2019 Hybrids) (CMRE) at Rayong Field Crops Research Center

Parent			Code	Nucleic acid concentration (ng/µL)	Ratio of absorbance at 260 and 280 nm (A260/A280)	Ratio of absorbance at 260 and 230 nm (A260/A230)
Batrang	x	Rayong 5	CMRE62-01-05	311.10	1.85	2.20
Batrang	x	Rayong 5	CMRE62-01-12	190.10	1.84	2.09
Batrang	x	Rayong 5	CMRE62-01-19	301.40	1.84	1.96
Batrang	x	Rayong 5	CMRE62-01-21	209.80	1.83	2.14
Batrang	x	Rayong 5	CMRE62-01-22	314.60	1.84	2.14
Batrang	x	Rayong 5	CMRE62-01-29	162.70	1.84	1.92
Batrang	x	Rayong 5	CMRE62-01-31	157.50	1.84	2.29
Batrang	x	Rayong 11	CMRE62-02-04	135.30	1.84	2.14
Batrang	x	Rayong 11	CMRE62-02-07	184.00	1.84	2.07
Batrang	x	Rayong 11	CMRE62-02-09	164.80	1.83	2.06
Batrang	x	Rayong 11	CMRE62-02-11	136.90	1.83	1.98
Huay Bong 80	x	CM 3299-15	CMRE62-03-09	178.90	1.82	1.87
Huay Bong 80	x	CM 3299-15	CMRE62-03-10	172.60	1.83	1.91
Huay Bong 80	x	CM 3299-15	CMRE62-03-12	208.90	1.85	2.17
Huay Bong 80	x	CM 3299-15	CMRE62-03-30	253.20	1.85	2.21
Huay Bong 80	x	CM 3299-15	CMRE62-03-31	222.70	1.84	2.13
Huay Bong 80	x	CM 3299-15	CMRE62-03-35	193.70	1.84	2.15
Huay Bong 80	x	CM 3299-15	CMRE62-03-36	154.30	1.84	2.17
Huay Bong 80	x	OMR26-14-9	CMRE62-06-07	122.20	1.83	2.05
Huay Bong 80	x	OMR26-14-9	CMRE62-06-11	217.70	1.82	1.86
Huay Bong 80	x	OMR26-14-9	CMRE62-06-16	172.30	1.82	1.82
Huay Bong 80	x	OMR26-14-9	CMRE62-06-65	54.40	1.95	0.99
Huay Bong 80	x	OMR29-20-118	CMRE62-07-09	54.80	1.96	1.05
Huay Bong 80	x	OMR29-20-118	CMRE62-07-18	118.00	1.83	2.00
Huay Bong 80	x	OMR29-20-118	CMRE62-07-21	181.40	1.84	2.05
Huay Bong 80	x	OMR29-20-118	CMRE62-07-25	130.80	1.84	2.08
Huay Bong 80	x	OMR29-20-118	CMRE62-07-41	213.30	1.83	1.95
Huay Bong 80	x	OMR29-20-118	CMRE62-07-68	213.00	1.85	2.02

กรมวิชาการเกษตร

Huay Bong 80	x	OMR29-20-118	CMRE62-07-93	207.50	1.86	2.21

Table 1 (continued)

Parent			Code	Nucleic acid concentration (ng/μL)	Ratio of absorbance at 260 and 280 nm (A260/A280)	Ratio of absorbance at 260 and 230 nm (A260/A230)
Hanatee	x	Rayong 11	CMRE62-09-03	265.20	1.84	1.84
Pirun 1	x	KU 50	CMRE62-14-04	233.80	1.84	1.98
Pirun 1	x	KU 50	CMRE62-14-06	179.80	1.86	2.12
Nep	x	CM 3299-15	CMRE62-18-09	254.60	1.82	1.77
Nep	x	CM 3299-15	CMRE62-18-17	258.30	1.83	1.99
Nep	x	KU 50	CMRE62-19-19	315.30	1.82	2.05
Rayong 2	x	Mcol 2331	CMRE62-22-01	268.50	1.84	2.11
Rayong 2	x	Mcol 2331	CMRE62-22-03	420.80	1.85	2.18
Rayong 2	x	Mcol 2331	CMRE62-22-05	258.90	1.85	2.14
Rayong 2	x	Mcol 2331	CMRE62-22-10	194.50	1.86	2.26
Rayong 2	x	Mcol 2331	CMRE62-22-23	345.40	1.84	1.97
Rayong 2	x	Mcol 2331	CMRE62-22-42	173.30	1.85	1.99
Rayong 2	x	Rayong 5	CMRE62-24-11	315.20	1.85	2.08
Rayong 2	x	Rayong 5	CMRE62-24-23	639.60	1.80	2.03
Rayong 2	x	Rayong 5	CMRE62-24-34	165.80	1.87	2.31
Rayong 2	x	Rayong 5	CMRE62-24-45	232.60	1.84	1.89
Rayong 2	x	Rayong 5	CMRE62-24-51	553.10	1.84	1.83
Rayong 2	x	Rayong 5	CMRE62-24-58	815.90	1.81	2.06
Rayong 2	x	Rayong 5	CMRE62-24-73	477.90	1.85	2.13
Rayong 2	x	Rayong 5	CMRE62-24-80	285.30	1.84	1.99
Rayong 2	x	Rayong 5	CMRE62-24-87	503.70	1.86	2.13

กรมวิชาการเกษตร

Table 2 DNA quantification and DNA purity of edible cassava second selection (2019 Hybrids) (OMRE) at Rayong Field Crops Research Center

Parent	Code	Nucleic acid concentration (ng/μL)	Ratio of absorbance at 260 and 280 nm (A260/A280)	Ratio of absorbance at 260 and 230 nm (A260/A230)
Batrang	OMRE62-01-06	414.40	1.85	1.99
Batrang	OMRE62-01-08	385.60	1.85	2.06
Batrang	OMRE62-01-10	452.80	1.84	1.88
Batrang	OMRE62-01-16	331.40	1.84	2.01
Batrang	OMRE62-01-20	212.30	1.83	1.81
Batrang	OMRE62-01-21	172.00	1.83	1.83
Batrang	OMRE62-01-23	175.60	1.83	1.95
Batrang	OMRE62-01-37	152.20	1.83	1.84
Batrang	OMRE62-01-54	271.60	1.82	1.87
Batrang	OMRE62-01-67	170.70	1.83	1.96
Batrang	OMRE62-01-77	129.80	1.83	1.85
Batrang	OMRE62-01-96	142.00	1.85	2.16
Batrang	OMRE62-01-104	200.00	1.82	1.79
Batrang	OMRE62-01-121	112.70	1.81	2.01
Batrang	OMRE62-01-123	166.40	1.83	2.11
Huay Bong 80	OMRE62-02-29	277.80	1.82	1.90
Huay Bong 80	OMRE62-02-32	143.80	1.83	2.08
Huay Bong 80	OMRE62-02-45	241.60	1.82	1.83
Huay Bong 80	OMRE62-02-69	105.60	1.82	1.93
Hanatee	OMRE62-03-16	191.30	1.82	1.82
Hanatee	OMRE62-03-19	255.10	1.85	2.18
Hanatee	OMRE62-03-20	229.70	1.84	2.04
Hanatee	OMRE62-03-21	191.70	1.83	2.10
Hanatee	OMRE62-03-23	199.10	1.84	2.10
Hanatee	OMRE62-03-27	252.40	1.83	2.19
Nep	OMRE62-04-02	205.10	1.83	2.10
Nep	OMRE62-04-04	292.70	1.83	1.94
Nep	OMRE62-04-06	234.80	1.83	2.09
Nep	OMRE62-04-10	192.60	1.82	1.86
Nep	OMRE62-04-11	273.40	1.84	2.19
Nep	OMRE62-04-15	205.90	1.85	2.09

กรมวิชาการเกษตร

Nep	OMRE62-04-17	241.70	1.84	2.10
Nep	OMRE62-04-20	306.80	1.84	2.04
Nep	OMRE62-04-23	206.30	1.83	2.12
Nep	OMRE62-04-25	267.00	1.84	2.12
Nep	OMRE62-04-26	117.70	1.84	2.03
Nep	OMRE62-04-28	149.20	1.85	2.01

Table 2 (continued)

Parent	Code	Nucleic acid concentration (ng/μL)	Ratio of absorbance at 260 and 280 nm (A260/A280)	Ratio of absorbance at 260 and 230 nm (A260/A230)
Nep	OMRE62-04-37	182.50	1.84	1.97
Nep	OMRE62-04-40	136.90	1.83	1.88
Nep	OMRE62-04-44	240.60	1.85	2.15
Nep	OMRE62-04-46	182.50	1.85	2.06
Nep	OMRE62-04-48	216.50	1.83	1.97
Nep	OMRE62-04-54	213.40	1.83	2.14
Nep	OMRE62-04-63	247.30	1.84	2.04
Rayong 2	OMRE62-05-01	194.20	1.85	2.19
Rayong 2	OMRE62-05-08	120.50	1.85	2.02
Rayong 2	OMRE62-05-09	145.70	1.83	1.87
Rayong 2	OMRE62-05-16	184.20	1.84	2.20
Rayong 2	OMRE62-05-21	155.40	1.84	2.18
Rayong 2	OMRE62-05-26	168.30	1.84	2.04
Rayong 2	OMRE62-05-32	266.50	1.82	1.62
Rayong 2	OMRE62-05-38	250.80	1.82	1.78
Rayong 2	OMRE62-05-43	221.50	1.82	1.97
Rayong 2	OMRE62-05-45	148.50	1.88	2.26
Rayong 2	OMRE62-05-51	181.50	1.88	2.34
Yodkum	OMRE62-08-21	208.70	1.87	2.30
Yodkum	OMRE62-08-23	268.50	1.85	2.34
Rayong 3 S1 P1	OMRE62-09-01	176.90	1.90	2.28
Rayong 3 S1 P1	OMRE62-09-15	136.00	2.06	2.17

สถาบันวิทยบริการ

Table 3 Primer, sequence, position, PCR product size and restriction enzyme of SNPs *PSY2* and *PDS* genes in cassava

Primer	Sequence (5' ⟶ 3')	Position	PCR product size (bp)	Restriction enzyme
PSY2 1up/1dw	F: ATGACTGTAGCATTACTATGG	g.24154113	223	*Taq*αI
	R: GTAGCTTGCGTCCGCTAC	g.24154231		*Rsa*I
PSY2 4up/4dw	F: TGATGTACTCTGCAAATGTAG	g.24155522	215	*Alu*I
	R: CTTGATTTAATAATGGCTAACC	g.24155561		*Taq*αI
PSY2 5up/5dw	F: CCATTCAAAGATATGATTGAAG	g.24155819	241	*Taq*αI
	R: CTTACTCCTCTCCGACATC	g.24155894		*HpyCH4V*
PSY2 7up/7dw	F: TTGTGGACATTGCAGGTATG	g.24156495	216	*Alu*I
	R: GATGTTCATGGTTTGCACATA			
PDS 1up/1dw	F: ATGACTTTGTACGGGAGTGTT	g.26662057	216	*Alu*I
	R: CTGCAAAGATCTGCTAGCAG			
PDS 7up/7dw	F: CACCTTCTATTTGTTAGGGAG	g.26669387	188	*Nla*III
	R: GAAATATTTTATATGTCAAGGGG			
PDS 8up/8dw	F: GAGAAACATGGTTCAAAGATG	g.26671620	217	*Bsm*I
	R: GACCTGGAGTAGCAAACAC			
PDS 12up/12dw	F: TTCACCATTCATTGTTGAGGC	g.26674187	224	*Alu*I
	R: GGATGGCCTCAAAGTCTAAC	g.26674193		*Taq*αI
		g.26674238		*Mlu*CI

กรมวิชาการเกษตร

Table 4 Genetic variation of SNPs *PSY2* and *PDS* markers in cassava by using PCR-RFLP technique

SNP Marker	Variation	PCR product size (bp)	Restriction enzyme	Genotype	PCR fragment size (bp)
PSY2 g.24154113	A/G	223	*Taq*αI	AA	148, 75
				AG	223, 148, 75
				GG	223
PSY2 g.24154231	A/C	223	*Rsa*I	AA	159, 36, 28
				AC	187, 159, 36, 28
				CC	187, 36
PSY2 g.24155522	C/A	215	*Alu*I	CC	131, 44, 40
				CA	171, 131, 44, 40
				AA	171, 44
PSY2 g.24155561	G/A	215	*Taq*αI	GG	122, 93
				GA	215, 122, 93
				AA	215
PSY2 g.24155819	T/C	241	*Taq*αI	TT	241
				TC	241, 179, 62
				CC	179, 62
PSY2 g.24155894	A/T	241	*HpyCH4V*	AA	136, 105
				AT	241, 136, 105
				TT	241
PSY2 g.24156495	A/T	216	*Alu*I	AA	190, 26
				AT	190, 121, 69, 26
				TT	121, 69, 26
PDS g.26662057	C/A	216	*Alu*I	CC	89, 69, 58
				CA	127, 89, 69, 58
				AA	127, 89
PDS g.26669387	C/A	188	*Nla*III	CC	106, 55, 27
				CA	161, 106, 55, 27
				AA	161, 27
PDS g.26671620	T/A	217	*Bsm*I	TT	217
				TA	217, 195, 22
				AA	195, 22
PDS g.26674187	A/G	224	*Alu*I	AA	224
				AG	224, 128, 103
				GG	128, 103

กรมวิชาการเกษตร

PDS g.26674193	G/C	224	*Taq*αI	GG	132, 99
				GC	224, 132, 99
				CC	224
PDS g.26674238	G/A	224	*Mlu*CI	GG	224
				GA	224, 178, 53
				AA	178, 53

Table 5 Genotype frequencies and allele frequencies of SNPs *PSY2* and *PDS* markers in edible cassava second selection (2019 Hybrids)

SNP Marker	Edible cassava second selection	Genotype frequencies			Allele frequencies	
		AA	AB	BB	A*	B
PSY2 g.24154113	CMRE62	0.00	0.13	0.87	0.06	0.94
	OMRE62	0.00	0.22	0.78	0.11	0.89
	Total	0.00	0.18	0.82	0.09	0.91
PSY2 g.24154231	CMRE62	0.00	0.13	0.87	0.06	0.94
	OMRE62	0.00	0.22	0.78	0.11	0.89
	Total	0.00	0.18	0.82	0.09	0.91
PSY2 g.24155522	CMRE62	0.04	0.96	0.00	0.52	0.48
	OMRE62	0.02	0.98	0.00	0.51	0.49
	Total	0.03	0.97	0.00	0.51	0.49
PSY2 g.24155561	CMRE62	0.00	0.13	0.87	0.06	0.94
	OMRE62	0.00	0.22	0.78	0.11	0.89
	Total	0.00	0.18	0.82	0.09	0.91
PSY2 g.24155819	CMRE62	0.98	0.02	0.00	0.99	0.01
	OMRE62	0.76	0.24	0.00	0.88	0.12
	Total	0.86	0.14	0.00	0.93	0.07
PSY2 g.24155894	CMRE62	0.00	0.11	0.89	0.05	0.95
	OMRE62	0.00	0.10	0.90	0.05	0.95
	Total	0.00	0.10	0.90	0.05	0.95
PSY2 g.24156495	CMRE62	0.74	0.21	0.05	0.85	0.15
	OMRE62	0.59	0.27	0.14	0.73	0.27
	Total	0.66	0.25	0.09	0.78	0.22
PDS g.26662057	CMRE62	0.21	0.68	0.11	0.55	0.45
	OMRE62	0.39	0.51	0.10	0.64	0.36
	Total	0.31	0.58	0.11	0.60	0.40
PDS g.26669387	CMRE62	0.07	0.46	0.47	0.29	0.71
	OMRE62	0.04	0.25	0.71	0.16	0.84
	Total	0.05	0.34	0.61	0.22	0.78

กรมวิชาการเกษตร

PDS g.26671620	CMRE62	0.43	0.52	0.05	0.70	0.30
	OMRE62	0.52	0.41	0.07	0.73	0.27
	Total	0.48	0.46	0.06	0.71	0.29
PDS g.26674187	CMRE62	0.77	0.23	0.00	0.88	0.12
	OMRE62	0.28	0.66	0.07	0.60	0.40
	Total	0.49	0.47	0.04	0.73	0.27
PDS g.26674193	CMRE62	0.70	0.30	0.00	0.85	0.15
	OMRE62	0.63	0.37	0.00	0.81	0.19
	Total	0.66	0.34	0.00	0.83	0.17

Table 5 (continued)

SNP Marker	Edible cassava second selection	Genotype frequencies			Allele frequencies	
		AA	AB	BB	A*	B
PDS g.26674238	CMRE62	0.09	0.61	0.30	0.39	0.61
	OMRE62	0.11	0.47	0.42	0.34	0.66
	Total	0.09	0.54	0.37	0.36	0.64

* Allele A represents wild type alleles of *PSY2* g.24154113G, g.24154231C, g.24155522A, g.24155561A, g.24155819T, g.24155894T, g.24156495A, *PSD* g.26662057A, g.26669387A, g.26671620T, g.26674187A, g.26674193C and g.26674238G for each marker and allele B represent mutate alleles of *PSY2* g.24154113A, g.24154231A, g.24155522C, g.24155561G, g.24155819C, g.24155894A, g.24156495T, *PDS* g.26662057C, g.26669387C, g.26671620A, g.26674187G, g.26674193G and g.26674238A for each marker.

Table 6 Polymorphic Information Contents (PICs) and percent accuracies of SNPs *PSY2* and *PDS* markers in edible cassava second selection (2019 Hybrids)

SNP marker	Edible cassava second selection	Number of phenotype	Polymorphic Information Content (PIC)	Percent accuracy (%)
PSY2 g.24154113	CMRE62	50	0.12	55.32
	OMRE62	59	0.20	58.62
	Total	109	0.16	57.14
PSY2 g.24154231	CMRE62	50	0.12	55.32
	OMRE62	59	0.20	58.62
	Total	109	0.16	57.14
PSY2 g.24155522	CMRE62	50	0.50	48.94
	OMRE62	59	0.50	25.86
	Total	109	0.50	36.19

PSY2 g.24155561	CMRE62	50	0.12	55.32
	OMRE62	59	0.20	58.62
	Total	109	0.16	57.14
PSY2 g.24155819	CMRE62	50	0.02	46.81
	OMRE62	59	0.21	47.46
	Total	109	0.13	47.17
PSY2 g.24155894	CMRE62	50	0.10	51.06
	OMRE62	59	0.10	23.73
	Total	109	0.10	35.85
PSY2 g.24156495	CMRE62	50	0.25	63.83
	OMRE62	59	0.40	55.93
	Total	109	0.34	59.43
PDS g.26662057	CMRE62	50	0.49	46.81
	OMRE62	59	0.46	30.51
	Total	109	0.48	37.74
PDS g.26669387	CMRE62	50	0.41	41.30
	OMRE62	59	0.27	38.98
	Total	109	0.34	40.00
PDS g.26671620	CMRE62	50	0.42	58.70
	OMRE62	59	0.40	49.15
	Total	109	0.41	53.33
PDS g.26674187	CMRE62	50	0.21	53.19
	OMRE62	59	0.48	43.10
	Total	109	0.40	47.62
PDS g.26674193	CMRE62	50	0.25	63.83
	OMRE62	59	0.30	47.46
	Total	109	0.28	54.72

ศรีนวิชาการเกษตร

Table 6 (continued)

SNP marker	Edible cassava second selection	Number of phenotype	Polymorphic Information Content (PIC)	Percent accuracy (%)
PDS g.26674238	CMRE62	50	0.48	48.94
	OMRE62	59	0.45	30.51
	Total	109	0.46	38.68

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 2

Table 7 Code, Parent, Plant type, Plant height, Pulp color, Fresh root weight, Starch content, Cyanide content, Harvest Index and Relative check of CMRE62 and OMRE62 that were selected from Edible Cassava Second selection (2019 Hybrids) at Rayong Field Crops Research Center

Code	Parent			Plant type	Plant height (cm)	Pulp color	Fresh root weight (kg/10 m^2)	Fresh root weight (kg/plant)	Starch content (%) [1/]	Cyanide content (mgHCN/kg)	Harvest Index (HI)	Relative check [2/] (Yield)
CMRE62-02-07	Batrang	x	Rayong 11	v-shape, branching on top	211	white	16.50	1.65	30.6	70.96	0.47	229
CMRE62-19-19	Nep	x	KU 50	v-shape, no branch	253	white	28.20	3.13	26.1	43.64	0.65	392
CMRE62-22-01	Rayong 2	x	Mcol 2331	v-shape, branching	195	yellow	14.00	1.75	21.8	46.28	0.55	194
CMRE62-24-11	Rayong 2	x	Rayong 5	v-shape, branching	224	yellow	20.40	2.04	23.7	57.74	0.66	283
CMRE62-24-34	Rayong 2	x	Rayong 5	v-shape, branching	226	yellow	18.30	2.29	26.2	88.52	0.56	254
CMRE62-24-58	Rayong 2	x	Rayong 5	u-shape, branching	327	white	35.50	3.55	20.9	39.67	0.51	493
CMRE62-24-80	Rayong 2	x	Rayong 5	v-shape, branching	242	yellow	21.10	2.34	25.3	14.55	0.44	293
OMRE62-01-54	Batrang			v-shape, branching on top	193	white	33.00	3.30	22.5	43.18	0.73	458
OMRE62-01-67	Batrang			v-shape, branching on top	239	white	13.30	1.48	20.5	64.19	0.36	185

กรมวิชาการเกษตร

OMRE62-01-96	Batrang	v-shape, branching	246	white	29.40	2.94	21.0	50.71	0.57	408
OMRE62-01-104	Batrang	v-shape, branching	201	white	24.00	2.67	21.9	33.80	0.69	333

Table 7 (continued)

Code	Parent	Plant type	Plant height (cm)	Pulp color	Fresh root weight (kg/10 m^2)	Fresh root weight (kg/plant)	Starch content (%) [1/]	Cyanide content (mgHCN/kg)	Harvest Index (HI)	Relative check [2/] (Yield)
OMRE62-01-121	Batrang	v-shape, branching on top	218	white	22.60	3.23	24.5	54.95	0.65	314
OMRE62-03-16	Hanatee	v-shape, branching	224	white	27.60	2.76	26.0	84.70	0.51	383
OMRE62-03-19	Hanatee	v-shape, branching on top	245	white	11.70	1.17	25.7	20.96	0.34	163
OMRE62-03-21	Hanatee	v-shape, branching	217	white	31.20	3.12	26.1	79.34	0.58	433
OMRE62-03-23	Hanatee	v-shape, branching on top	209	white	25.70	2.57	24.9	74.54	0.67	357
OMRE62-03-27	Hanatee	v-shape, no branch	225	white	13.90	1.39	20.4	49.62	0.60	193
OMRE62-04-02	Nep	v-shape, branching on top	313	white	25.60	2.56	28.9	50.48	0.57	356
OMRE62-04-10	Nep	v-shape, branching on top	285	white	24.80	2.48	27.9	40.99	0.52	344

กรมวิชาการเกษตร

OMRE62-04-11	Nep	v-shape, branching	160	white	19.80	1.98	29.2	16.84	0.65	275
OMRE62-04-15	Nep	v-shape, no branch	219	white	22.60	2.26	24.7	28.69	0.51	314
OMRE62-04-17	Nep	v-shape, branching	192	white	24.60	2.73	31.0	29.09	0.67	342
OMRE62-04-20	Nep	v-shape, no branch	196	white	25.20	2.52	29.5	16.36	0.69	350

Table 7 (continued)

Code	Parent	Plant type	Plant height (cm)	Pulp color	Fresh root weight (kg/10 m^2)	Fresh root weight (kg/plant)	Starch content (%) [1/]	Cyanide content (mgHCN/kg)	Harvest Index (HI)	Relative check [2/] (Yield)
OMRE62-04-23	Nep	u-shape, branching	236	white	12.80	1.28	28.7	40.73	0.36	178
OMRE62-04-28	Nep	v-shape, branching on top	312	white	45.00	4.50	22.2	49.94	0.54	625
OMRE62-04-54	Nep	v-shape, branching on top	295	white	26.20	2.62	26.2	27.81	0.48	364
OMRE62-05-45	Rayong 2	u-shape, branching	238	white	25.20	2.52	19.6	40.82	0.54	350
OMRE62-09-01	Rayong 3 S1 P1	v-shape, branching	249	white	50.60	6.33	26.2	54.33	0.63	703
Rayong 2	Mcol 113 x Mcol 22	v-shape, branching	196	yellow	10.80	2.16	16.3	52.78	0.37	150

กรมวิชาการเกษตร

Hanatee	v-shape, branching on top	228	white	7.20	0.72	15.1	31.23	0.33	100

[1/] Harvesting in November, 2020

[2/] Relative check is Hanatee

กรมวิชาการเกษตร

Table 8 Code, Parent, Sweetness, Pulp color, Sweetness level, Bitterness level, Texture (Friable and Sticky) after steaming of CMRE62 and OMRE62 that were selected from Edible Cassava Second Selection (2019 Hybrids) at Rayong Field Crops Research Center

Code	Parent			Sweetness	Steamed cassava				
				(Brix)	Pulp color	Sweetness level	Bitterness level	Friable	Sticky
CMRE62-02-07	Batrang	x	Rayong 11	7.9	white	1	0	1	2
CMRE62-19-19	Nep	x	KU 50	7.1	white	0	0	0	2
CMRE62-22-01	Rayong 2	x	Mcol 2331	6.6	yellow	0	0	1	1
CMRE62-24-11	Rayong 2	x	Rayong 5	7.9	yellow	0	1	0	2
CMRE62-24-34	Rayong 2	x	Rayong 5	8.3	yellow	1	0	0	2
CMRE62-24-58	Rayong 2	x	Rayong 5	6.4	white	0	1	1	1
CMRE62-24-80	Rayong 2	x	Rayong 5	7.8	yellow	1	0	0	3
OMRE62-01-54	Batrang			6.4	cream	0	2	3	0

OMRE62-01-67	Batrang	6.8	white	2	0	0	2
OMRE62-01-96	Batrang	5.4	white	1	0	0	2
OMRE62-01-104	Batrang	6.3	cream	1	0	0	2
OMRE62-01-121	Batrang	6.2	white	0	1	0	3
OMRE62-03-16	Hanatee	6.2	cream	0	0	1	1
OMRE62-03-19	Hanatee	6.3	white	0	0	3	1
OMRE62-03-21	Hanatee	7.5	white	0	0.5	2	1
OMRE62-03-23	Hanatee	8.2	white	1	0	0	3
OMRE62-03-27	Hanatee	6.8	white	0	0	3	0
OMRE62-04-02	Nep	7.8	cream	1	0	0	2
OMRE62-04-10	Nep	6.6	white	0	0	0	2
OMRE62-04-11	Nep	5.9	white	0	0	0	3
OMRE62-04-15	Nep	6.9	white	1	0	0	3
OMRE62-04-17	Nep	7.7	white	0	0	0	2
OMRE62-04-20	Nep	7.8	white	1	0	0	2

Table 8 (continued)

Code	Parent	Sweetness	Steamed cassava				
		(Brix)	Pulp color	Sweetness level	Bitterness level	Friable	Sticky
OMRE62-04-23	Nep	7.0	white	0	0	3	1
OMRE62-04-28	Nep	6.5	white	0	0	2	1
OMRE62-04-54	Nep	5.7	white	0	0	1	1
OMRE62-05-45	Rayong 2	4.8	white	0	0	0	2
OMRE62-09-01	Rayong 3 S1 P1	5.3	white	0	0	3	0
Rayong 2	Mcol 113 x Mcol 22	7.0	yellow	1	0	0	2

กรมวิชาการเกษตร

Hanatee	4.8	white	0	0	3	0

Remark

Texture friable and sticky

Sweetness marks 1 = Less and 3 = More

Bitterness marks 1 = Less and 3 = More

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 1

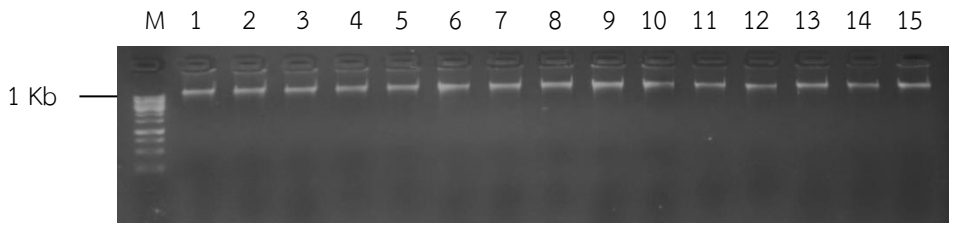


Figure 1 Genomic DNA of edible cassava second selection (2019 Hybrids) (CMRE)

Lane M = 1 Kb DNA Ladder Lane 1 = CMRE62-01-05 Lane 2 = CMRE62-01-12
Lane 3 = CMRE62-01-19 Lane 4 = CMRE62-01-21 Lane 5 = CMRE62-01-22
Lane 6 = CMRE62-01-29 Lane 7 = CMRE62-01-31 Lane 8 = CMRE62-02-04
Lane 9 = CMRE62-02-07 Lane 10 = CMRE62-02-09 Lane 11 = CMRE62-02-11
Lane 12 = CMRE62-03-09 Lane 13 = CMRE62-03-10 Lane 14 = CMRE62-03-12
Lane 15 = CMRE62-03-30

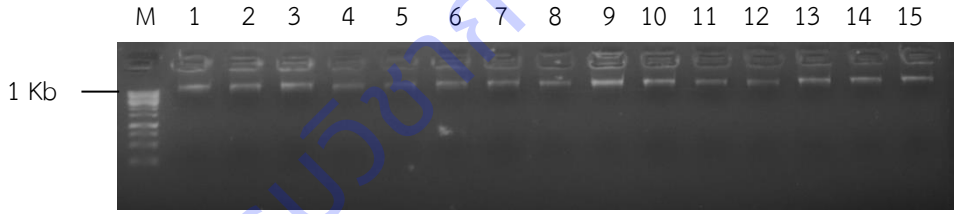
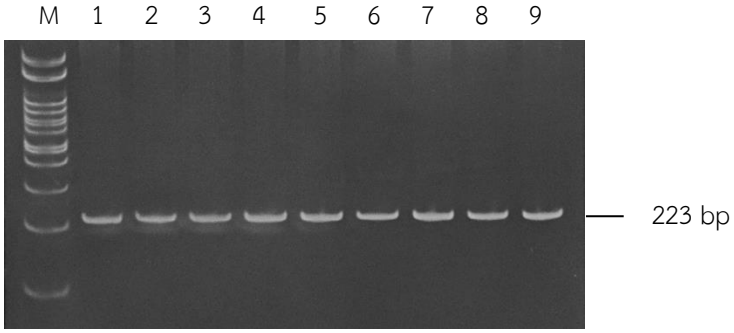


Figure 2 Genomic DNA of edible cassava second selection (2019 Hybrids) (OMRE)

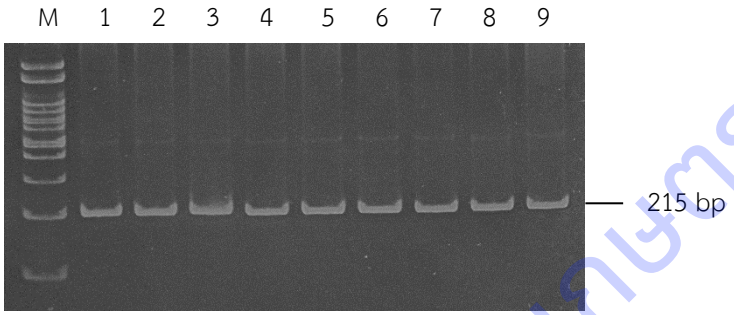
Lane M = 1 Kb DNA Ladder Lane 1 = OMRE62-01-06 Lane 2 = OMRE62-01-08
Lane 3 = OMRE62-01-10 Lane 4 = OMRE62-01-16 Lane 5 = OMRE62-01-20
Lane 6 = OMRE62-01-21 Lane 7 = OMRE62-01-23 Lane 8 = OMRE62-01-37
Lane 9 = OMRE62-01-54 Lane 10 = OMRE62-01-67 Lane 11 = OMRE62-01-77
Lane 12 = OMRE62-01-96 Lane 13 = OMRE62-01-104 Lane 14 = OMRE62-01-121
Lane 15 = OMRE62-01-123

กรมวิชาการเกษตร

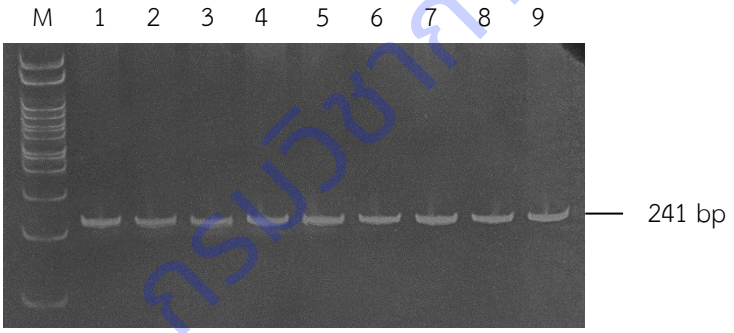
(A) PCR product of SNPs PSY2 1up/1dw primer (223 bp)



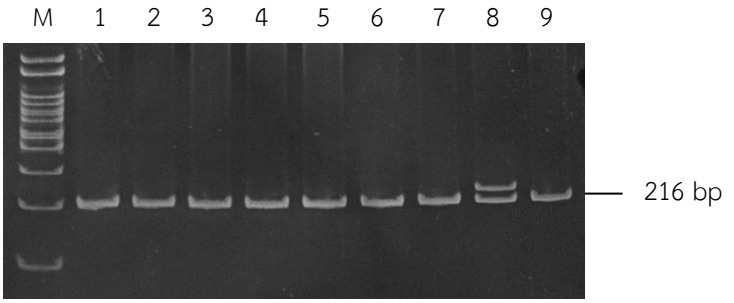
(B) PCR product of SNPs PSY2 4up/4dw primer (215 bp)



(C) PCR product of SNPs PSY2 5up/5dw primer (241 bp)

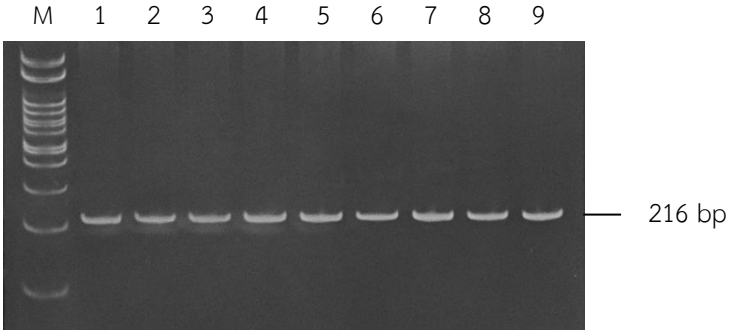


(D) PCR product of SNPs PSY2 7up/7dw primer (216 bp)

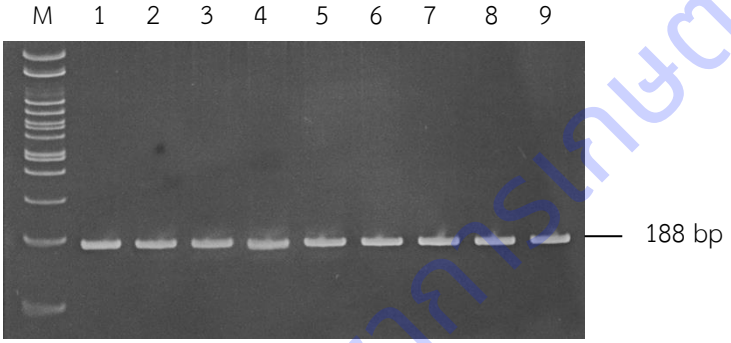


กรมวิชาการเกษตร

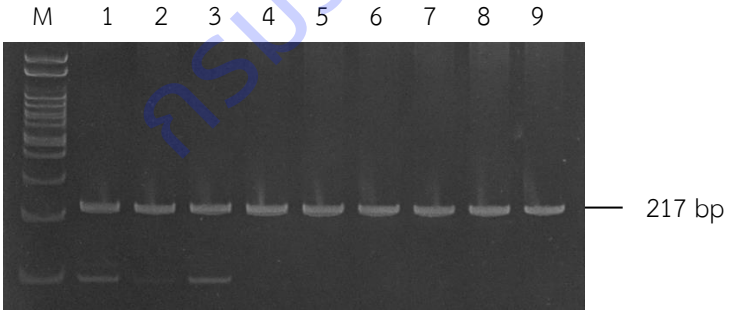
(E) PCR product of SNPs PDS 1up/1dw primer (216 bp)



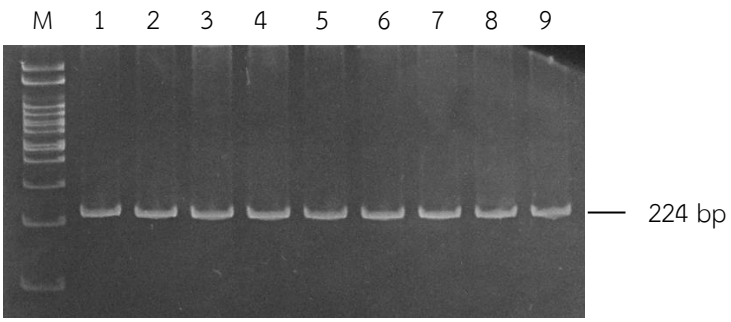
(F) PCR product of SNPs PDS 7up/7dw primer (188 bp)



(G) PCR product of SNPs PDS 8up/8dw primer (217 bp)



(H) PCR product of SNPs PDS 12up/12dw primer (224 bp)



กรมวิชาการเกษตร

Figure 3 PCR product of SNPs PSY2 (A, B, C, D) and PDS primers (E, F, G, H)

Lane M = 100 bp DNA Ladder Lane 1 = CMRE62-01-05 Lane 2 = CMRE62-01-12

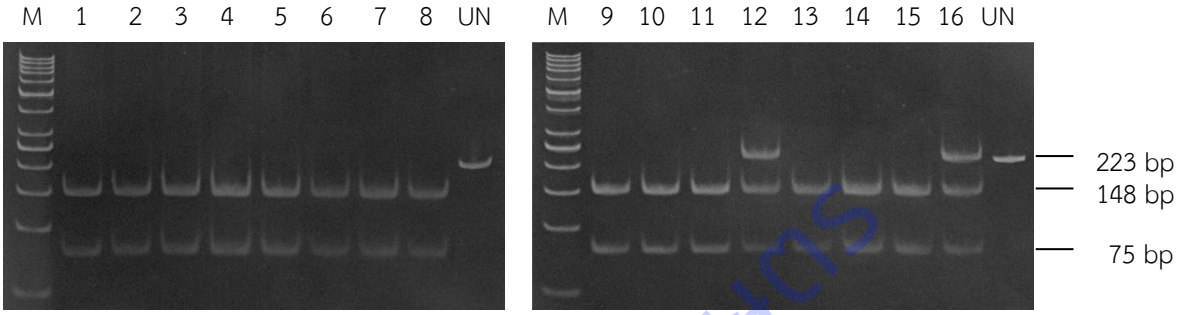
Lane 3 = CMRE62-01-19 Lane 4 = CMRE62-01-21 Lane 5 = CMRE62-01-22

Lane 6 = CMRE62-01-29 Lane 7 = CMRE62-01-31 Lane 8 = CMRE62-02-04

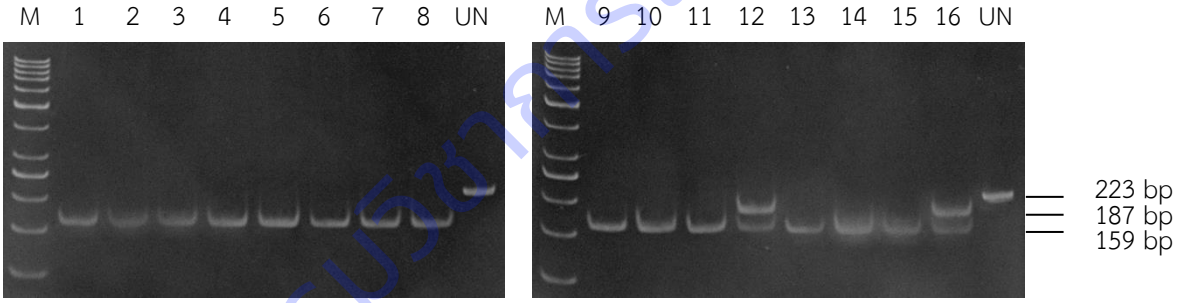
Lane 9 = CMRE62-02-07

(A) PCR product of SNPs PSY2 1up/1dw primer cut restriction enzymes

- SNP g.24154113 cut *Taq*αI

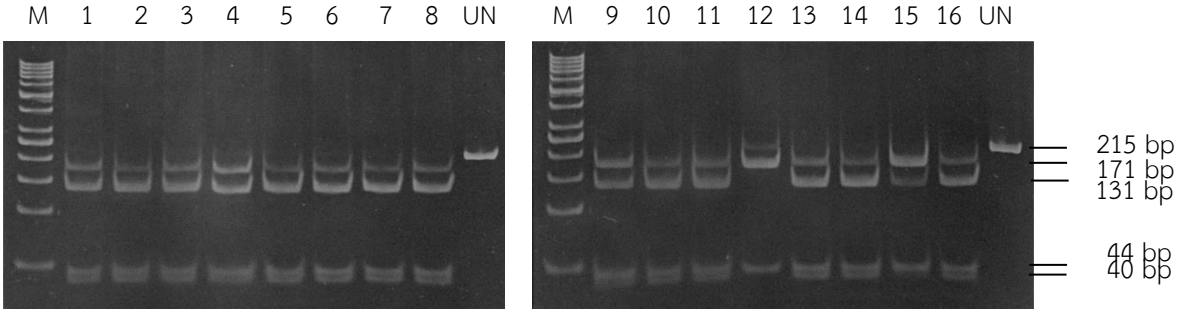


- SNP g.24154231 cut *Rsa*I



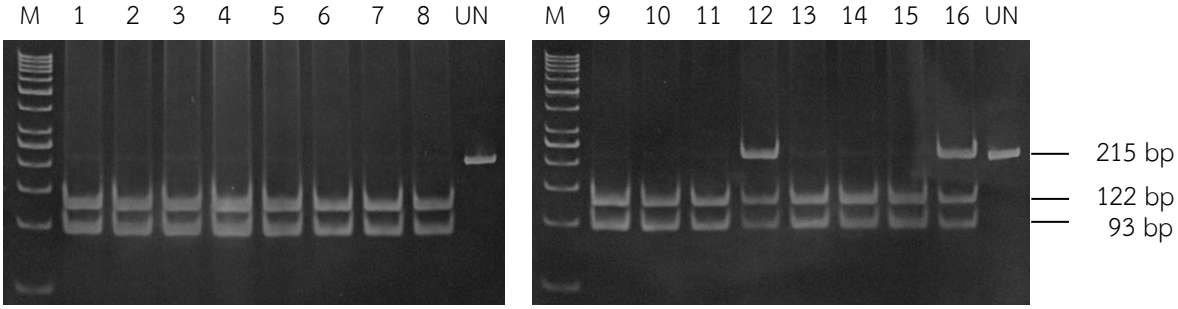
(B) PCR product of SNPs PSY2 4up/4dw primer cut restriction enzymes

- SNP g.24155522 cut *Alu*I



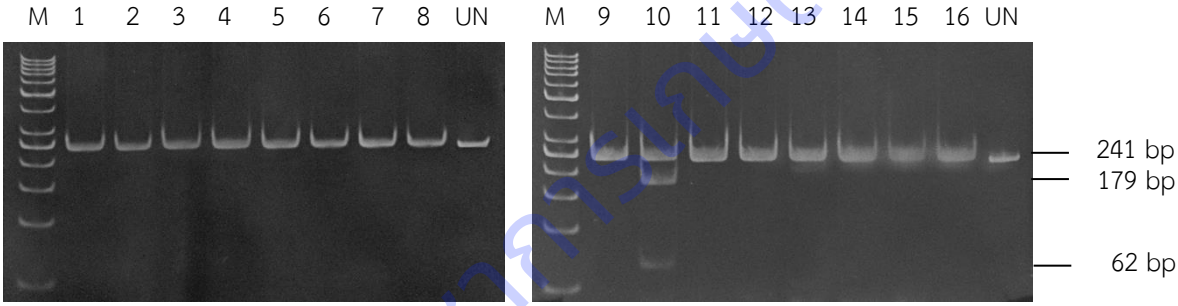
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

- SNP g.24155561 cut *Taq*αI

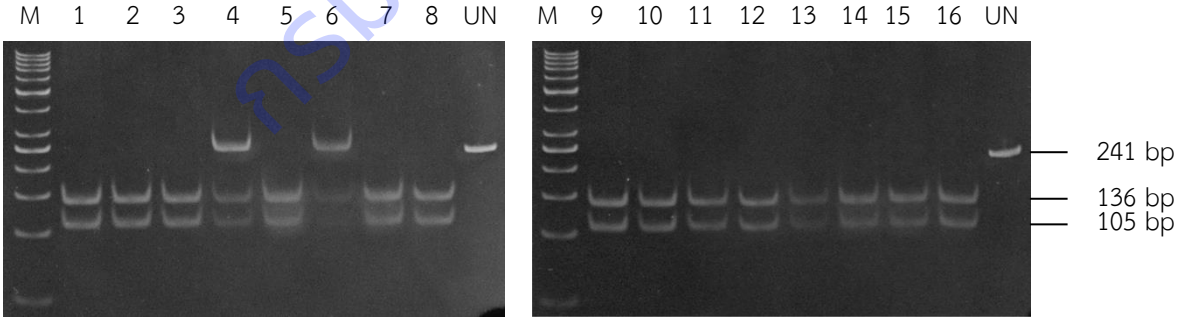


(C) PCR product of SNPs PSY2 5up/5dw primer cut restriction enzymes

- SNP g.24155819 cut *Taq*αI



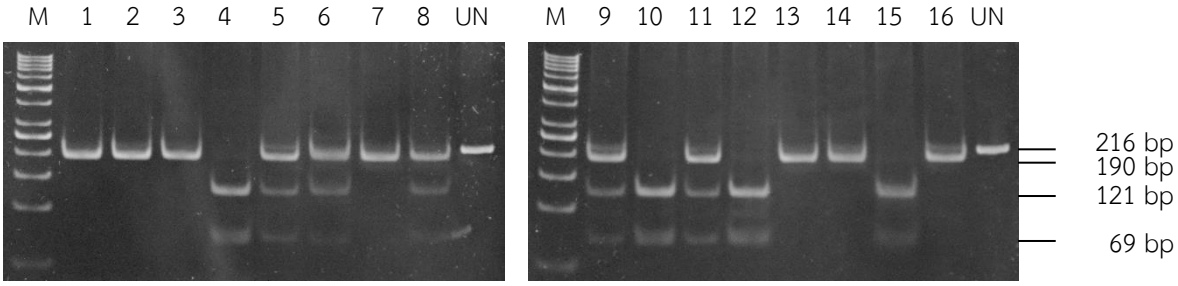
- SNP g.24155894 cut *HpyCH4*V



กรมวิชาการเกษตร

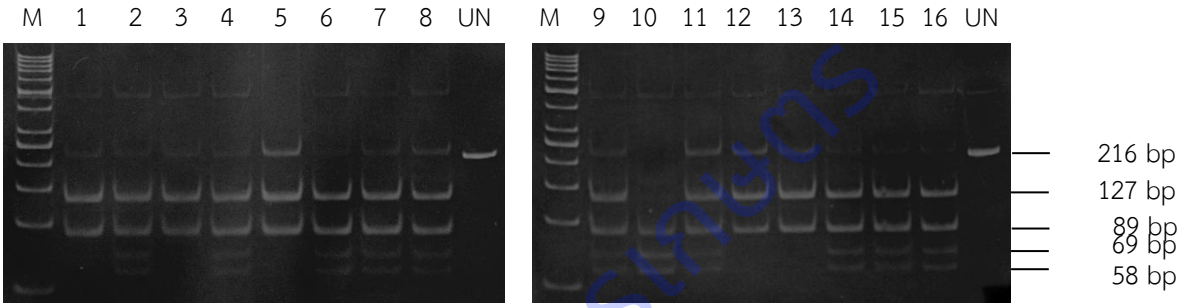
(D) PCR product of SNP PSY2 7up/7dw primer cut restriction enzyme

- SNP g.24156495 cut *Alu*I



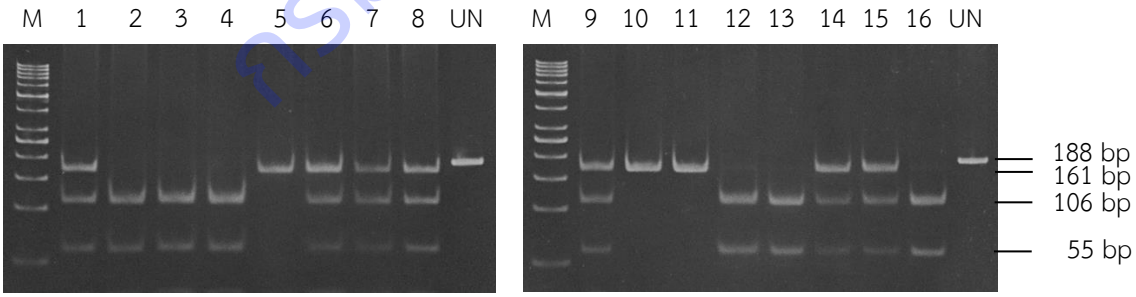
(E) PCR product of SNPs PDS 1up/1dw primer cut restriction enzymes

- SNP g.26662057 cut *Alu*I



(F) PCR product of SNPs PDS 7up/7dw primer cut restriction enzymes

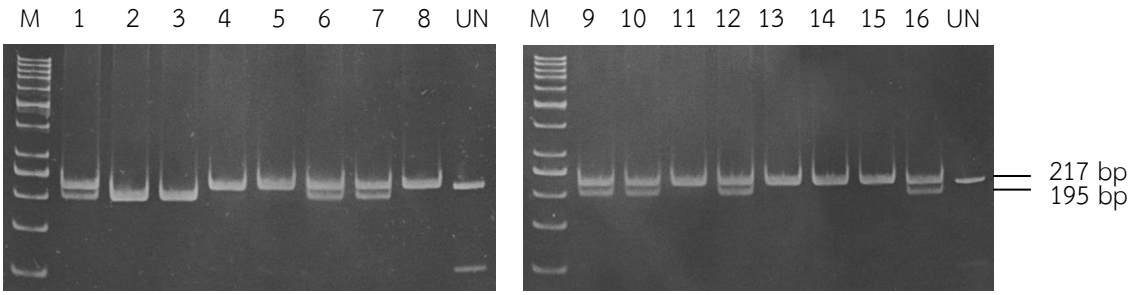
- SNP g.26669387 cut *Nla*III



กรมวิชาการเกษตร

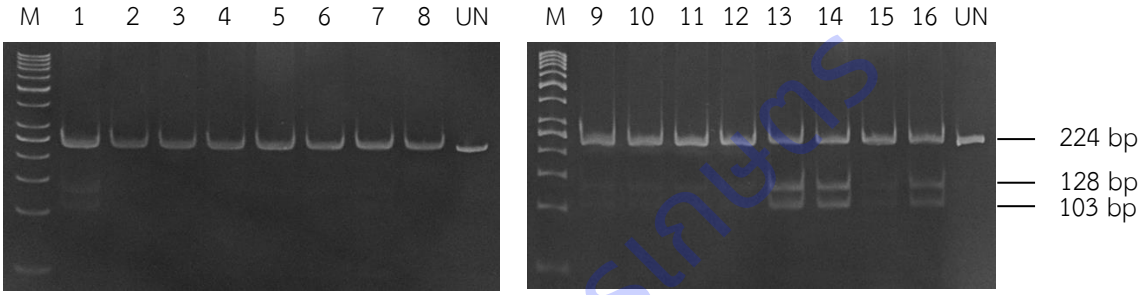
(G) PCR product of SNP PDS 8up/8dw primer cut restriction enzyme

- SNP g.26671620 cut *Bsm*I

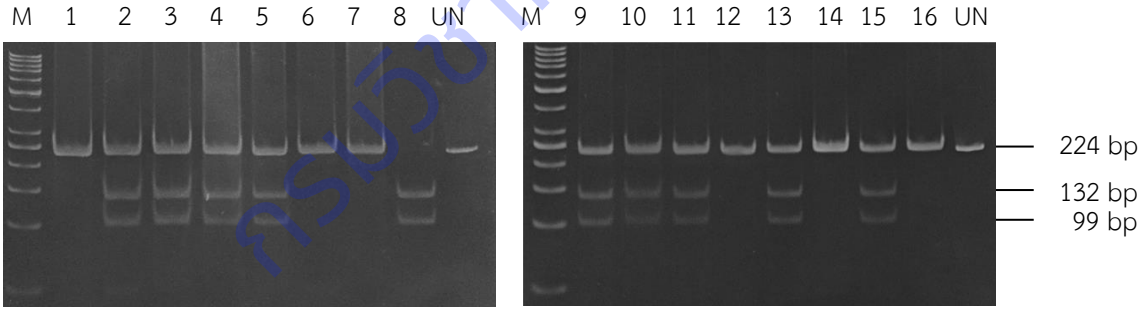


(H) PCR product of SNPs PDS 12up/12dw primer cut restriction enzymes

- SNP g.26674187 cut *Alu*I



- SNP g.26674193 cut *Taq*αI



กรมวิทยาศาสตร์

- SNP g.26674238 cut *Mlu*CI

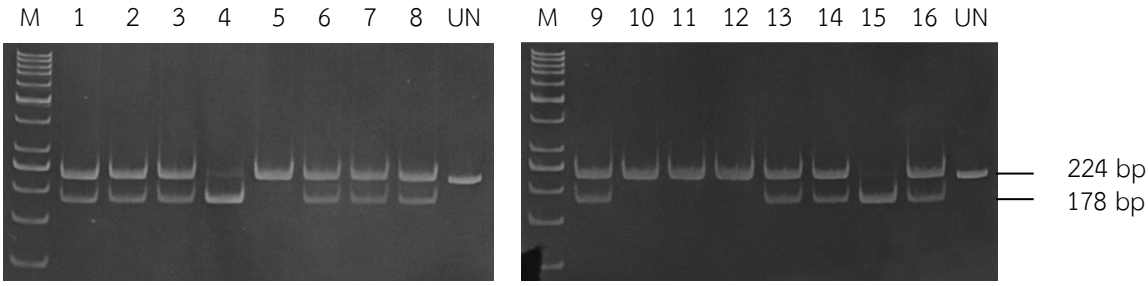


Figure 4 PCR product of SNPs PSY2 (A, B, C, D) and PDS primers (E, F, G, H) cut restriction enzymes

Lane M = 50 bp DNA Ladder Lane 1-8 = CMRE62 Lane 9-16 = OMRE62

Lane UN = Uncut

กรมวิชาการเกษตร