รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2563

1. **แผนงานวิจัย** วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพระบบการผลิตมันสำปะหลัง
2. **โครงการวิจัย** เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง
3. **ชื่อการทดลองที่ (ภาษาไทย)** การตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (Waxy starch) ในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Detection and Selection of Waxy Starch Trait in Cassava Using Molecular Markers
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวอรุโณทัย ซาววา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสุภาวดี ง้อเหรียญ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสุวลักษณ์ อะมะวัลย์	ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
	นางประพิศ วองเทียม	สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

5. **บทคัดย่อ**

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Cranz) เป็นพืชอาหารที่สำคัญเป็นอันดับที่ 5 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง ปัจจุบันแป้งเหนียว (waxy starch) เป็นวัตถุดิบสำหรับเพิ่มความหนืด มีความต้องการสูงในอุตสาหกรรมอาหาร การใช้แป้งมันสำปะหลังปกติต้องเข้าสู่กระบวนการดัดแปลงทางเคมีเสียก่อนเพื่อให้เนื้อแป้งมีลักษณะเหนียว ส่วนใหญ่จึงนิยมใช้แป้งจากข้าวโพดข้าวเหนียว ซึ่งไม่ต้องผ่านกระบวนการดัดแปลงจากสารเคมีแต่มีต้นทุนสูง หากมันสำปะหลังสามารถให้เนื้อแป้งเหนียวจะผลิตได้ในปริมาณที่มากและเพิ่มเพิ่มมูลค่าแป้งให้สูงขึ้น ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (Waxy starch) ในพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวมรวมไว้ ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล เพื่อช่วยในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังสายพันธุ์แป้งเหนียว ผลการทดลอง พบว่าการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ตำแหน่ง C/G บนยีน *GBSSI* ด้วยวิธีพีซีอาร์ กับตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวนทั้งสิ้น 758 พันธุ์ แสดงจีโนไทป์เป็นแบบลักษณะเด่น (dominant: WxWx) ลักษณะข่มร่วม (co-dominant: Wxwx) และลักษณะด้อย (recessive: wxwx) จำนวน 522 202 และ 17 ตัวอย่างตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่างลักษณะข่มร่วมและลักษณะด้อย ไปตรวจสอบลักษณะแป้งด้วยการย้อมสีไอโอดีน พบหัวมันและเม็ดแป้งมันสำปะหลังทุกตัวอย่างปรากฏเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งไม่ใช่ลักษณะแป้งเหนียว การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากยีน *GBSSI* ในตำแหน่งหยุดการแปลรหัส T/G ด้วยวิธี TaqMan probe พบตำแหน่ง T เฉพาะในตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว และตำแหน่ง G ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่มีลักษณะข่มร่วมและลักษณะด้อยทั้งหมด นอกจากนี้สำหรับการค้นหาและเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ด้วยวิธี GBS จากพันธุ์ปกติและพันธุ์แป้งเหนียว จำนวน 13 ตัวอย่าง ได้ข้อมูลเครื่องหมาย SNPs แบบ Bi-Allelic จำนวน 19,057 ตำแหน่ง พบตำแหน่ง SNPs เฉพาะมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียวจำนวน 33 ตำแหน่ง แบ่งเป็น SNPs

ศรีวิชัยการเกษตร

แบบเฮทเทอโรไซโกตจำนวน 26 ตำแหน่ง และแบบโฮโมไซโกตจำนวน 7 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถใช้ในคัดเลือก ระบุหรือจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังแป้งเหนียวได้ต่อไป

Cassava (*Manihot esculenta* Cranz) is the fifth most important food crop in the world after wheat, corn, rice and potatoes. Curently, the waxy starch is used for increasing stickiness which is high demand in the food industry. The cassava starch was modified by chemical process to make the starch sticky before using. Which, waxy corn was preferred to use in the food industry because it does not to modify by chemical but it has a high cost. Therefore, if cassava is able to give waxy starch, it will provide large quantities and increase the starch value. The objective of this research is to examine and select waxy starch characteristics in cassava varieties collected in Rayong Field Crops Research Center under the Department of Agriculture through molecular markers for assisting in a breeding program. Results, the selection with SNPs markers at the C/G position of *GBSSI* gene using PCR technique in 758 varieties of cassava were showed dominant (WxWx) co-dominant (Wxwx) and recessive (wxwx), 522 202 and 17 samples respectively. The testing of all co-dominant and recessive cassava samples using iodine staining were found in blue color which it not characteristic of waxy starch. The selection with stop codon position, T/G markers of *GBSSI* gene by TaqMan probe technique were shown the T position specific in waxy cassava variety, but they showed the G position in other all co-dominant and recessive cassava samples. In addition, the investigation and comparison of SNPs markers through GBS technique in 13 samples of waxy and non-waxy cassava were found 19,057 positions of Bi-Allelic SNPs markers. Moreover, we found 33 positions, divided into 26 positions of heterozygous and 7 positions of homozygous which specific to waxy cassava. These SNPs markers could be further use for selection and identification of waxy cassava varieties.

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Cranz) มีชื่อสามัญเรียกหลายชื่อตามภาษาต่างๆ ที่ได้ยินกันมาก ได้แก่ Cassava, Yuca, Mandioa, Manioc, Tapica เป็นต้น (จรุงสิทธ์, 2547) เป็นพืชอาหารที่สำคัญเป็นอันดับที่ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง เป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศในเขตร้อน โดยเฉพาะประเทศต่างๆ ในทวีปอัฟริกา และทวีปอเมริกาใต้ ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง มากเป็นอันดับที่สี่รองจากข้าว ข้าวโพด และยางพารา แหล่งปลูก มันสำปะหลังที่สำคัญที่สุดของประเทศในปัจจุบัน คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือภาคกลาง การผลิตมันสำปะหลังนั้นต้องมีการคัดเลือกพันธุ์ที่เหมาะสมต่อสภาพพื้นที่ และภูมิอากาศของแต่ละประเทศ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดี ประเทศไทยมีความสามารถในการแข่งขันสูงในตลาดแป้งมันสำปะหลัง เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดของผลิตภัณฑ์ทั้งหมดที่ได้จากมันสำปะหลัง เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตพลังงานทดแทนของทั้งมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในวงการอุตสาหกรรม

การผลิตไบโอพอลิเมอร์อีกด้วย ทั้งนี้แป้งมันสำปะหลังเป็นสิ่งที่สกัดออกมาได้ง่าย อย่างไรก็ตาม มันสำปะหลังถูกจัดให้เป็นแหล่งกำเนิดของแป้งที่สำคัญเป็นอันดับสองของโลก ฉะนั้นผู้ผลิตมันสำปะหลังยังคงจะต้องแข่งขันกับผู้ผลิตแป้งชนิดอื่นอีก เช่น แป้งข้าวโพด ซึ่งตามความเชื่อแล้วมีความสำคัญมากกว่า สิ่งหนึ่งที่น่าสนใจก็คือ ความเหมือนกันระหว่างแป้งข้าวโพดกับแป้งมันสำปะหลัง ปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการรักษาความสามารถในการแข่งขันของประเทศไทยในฐานะผู้นำด้านการผลิตมันสำปะหลัง คือ ปริมาณผลิตผลต่อไร่ ส่วนในการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขัน และยกระดับแป้งมันสำปะหลังให้เหนือกว่าแป้งชนิดอื่นนั้น สิ่งที่สำคัญที่สุดก็คือการปรับปรุงคุณภาพของแป้งมันสำปะหลัง จุดเริ่มต้นที่น่าสนใจที่สุด คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ทำให้มันสำปะหลังแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน หนึ่งในนั้นคือพันธุ์แป้งเหนียว (waxy starch) ซึ่งสหรัฐอเมริกาได้ใช้ประโยชน์เป็นครั้งแรกโดยพบในข้าวโพด ดังนั้นอุตสาหกรรมแป้งทั่วโลกได้ทุ่มเทอย่างจริงจังในการค้นหามันสำปะหลัง พันธุ์ที่ได้ชื่อว่าเป็น waxy ซึ่งตัวแป้งไม่มีสารอะไมโลส (amylose-free) มันสำปะหลังพันธุ์ waxy แตกต่างจากมันสำปะหลังทั่วไป คือ สามารถละลายน้ำได้ดีกว่า มีความเหนียวข้นมากกว่า และมีการคืนตัวต่ำกว่า ซึ่งแป้งเหนียว (waxy starch) เป็นวัตถุดิบสำหรับเพิ่มความหนืดในอุตสาหกรรมอาหาร มีความต้องการสูงในสหรัฐอเมริกา การใช้แป้งมันสำปะหลังต้องเข้าสู่กระบวนการดัดแปลงทางเคมีเสียก่อนเพื่อให้เนื้อแป้งที่ได้มีลักษณะเหนียว ทั่วโลกจึงหันมาใช้แป้งจากข้าวโพดข้าวเหนียว เพราะแป้งเหล่านี้ไม่ต้องนำมาเข้าสู่กระบวนการดัดแปลงจากสารเคมีแต่มีต้นทุนสูง ดังนั้นศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (CIAT) มองว่าหากมันสำปะหลังสามารถให้เนื้อแป้งเหนียวได้ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าได้เป็นอย่างมาก

การปลูกมันสำปะหลังแบ่งเป็นสองประเภทได้แก่ ปลูกเพื่อใช้เป็นอาหาร และปลูกเพื่ออุตสาหกรรม มันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญลำดับที่สี่รองลงมาจากข้าว อ้อย และข้าวโพด ในประชากรมากกว่า 500 ล้านคน ของประเทศในแถบแอฟริกา เอเชีย และลาตินอเมริกา (Roa *et al*., 1997) ในประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังรวม 6.22 ล้านไร่ ในปี 2545 และปลูกมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือภาคกลางและภาคเหนือมีการปลูกน้อยที่สุด จังหวัดที่มีการปลูกมากที่สุดได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ปลูกถึง 1,320,722 ไร่ มันสำปะหลังสร้างรายได้ให้เกษตรกรมากเป็นอันดับสี่รองลงมาจากยางพารา อ้อยและข้าว (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2545) ต่อมาในปี 2556 มีพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้นเป้น 8.65 ล้านไร่ คิดเป็นผลผลิตมากกว่า 30 ล้านตัน มีปริมาณการใช้ในประเทศ 16.2 พันล้านบาท การส่งออกมันแปรรูปเบื้องต้น 94.8 พันล้านบาท และมูลค่าผลิตภัณฑ์แปรรูปจากอุตสาหกรรมต่อเนื่องมากกว่า 300 พันล้านบาท (ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร, 2558) นอกจากนี้ ประเทศไทยเป็นประเทศที่ครองแชมป์การส่งออกแป้งมันสำปะหลังมาอย่างยาวนาน ในปี พ.ศ. 2557 พบตัวเลขการส่งออกแป้งมันสำปะหลังทุกประเภทรวมกัน 3,638,801.345 ตัน (ม.ค.-พ.ย. 57) จำแนกเป็นแป้งมันสำปะหลังล้วน 2,740,151.270 ตัน แป้งมันสำปะหลังดัดแปร 872,319.222 ตัน และแป้งสาคู 26,330.853 ตัน คิดเป็นมูลค่า 57,880,506,590 บาท

แป้งเหนียว (waxy starch) เป็นวัตถุดิบสำหรับเพิ่มความหนืดในอุตสาหกรรมอาหาร มีความต้องการสูงในสหรัฐอเมริกา การใช้แป้งมันสำปะหลังต้องเข้าสู่กระบวนการดัดแปลงทางเคมีเสียก่อนเพื่อให้เนื้อแป้งที่ได้มีลักษณะเหนียว ทั่วโลกจึงหันมาใช้แป้งจากข้าวโพด ข้าวเหนียว เพราะแป้งเหล่านี้ไม่ต้องนำมาเข้าสู่กระ บวนการดัดแปลงจากสารเคมีแต่มีต้นทุนสูง แต่แป้งเหนียวที่ได้จากมันสำปะหลังเป็นเพียงหนึ่งเดียวที่ตัวแป้งไม่แยกตัว

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ออกจากน้ำเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับแป้งเหนียวที่ได้จากข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง จึงเหมาะกับอุตสาหกรรมที่ต้องผ่านการแช่เย็น และจุดเหยือกแข็งมากกว่า (Sanchez et al., 2010) ดังนั้นศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (CIAT) มองว่าหากมันสำปะหลังสามารถให้เนื้อแป้งเหนียวได้จะเป็นการเพิ่มมูลค่าได้เป็นอย่างมาก เนื่องจากมันสำปะหลังพันธุ์ waxy แตกต่างจากมันสำปะหลังทั่วไป คือ สามารถละลายน้ำได้ดีกว่า มีความเหนียวข้นมากกว่า และมีการคืนตัวต่ำกว่า (Nakasathien, 2009) ลักษณะแป้งเหนียว waxy หรือ amylose-free เกี่ยวข้องกับยีน *GBSSI* (The granule-bound starch synthase) ซึ่งยีนดังกล่าวเป็นเอ็นไซม์ที่ช่วยในการสังเคราะห์ และสะสมแป้งในพืช ทำหน้าที่โดยตรงในการสังเคราะห์แป้งชนิดอะไมโลส และยังส่งผลต่อโครงสร้างของอะไมโลแพคตินด้วย (Merida *et al*., 1999) การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังทางด้านคุณภาพของแป้งมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสามารถประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวาง การพัฒนาลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่มีความต้องการมากขึ้น การสะสมของแป้งชนิดอะไมโลส จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *GBSSI* หากมีการแสดงออกที่ต่ำมาก (down-regulation) ก็จะมีการสะสมอะไมโลสต่ำลงเช่นกัน จึงมีการพัฒนามันสำปะหลังดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค RNAi ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าว พบว่า มันสำปะหลังที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมมีอะไมโลสแค่เพียง 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับต้นปกติที่มีอะไมโลสถึง 25 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การสะสมของอะไมโลส ส่งผลให้แป้งในมันสำปะหลังมีลักษณะแป้งเหนียวขึ้น (Zhao *et al*., 2011) อย่างไรก็ตามมันสำปะหลังที่ได้รับการดัดแปลงพันธุ์กรรมในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *GBSSI* เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับพันธุ์ที่ให้ลักษณะแป้งเหนียวตามธรรมชาติ พบว่า มีน้ำหนักโดยรวมของเม็ดแป้งชนิดอะไมโลแพคตินที่ต่ำกว่าพันธุ์ปกติ (Rolland *et al*., 2013)

ปัจจุบันการใช้เครื่องหมายโมเลกุลถูกนำมาช่วยในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์พืช เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมนำมาศึกษาลักษณะจีโนไทป์แบบข่มร่วมกัน (codominance) ได้แก่ เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือ SSR (Simple Sequence Repeat) หมายถึง ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ (repetitive DNA) เรียงอยู่ต่อเนื่องกันบนจีโนม แต่ละชุดประกอบด้วยเบสซ้ำตั้งแต่ 1-6 เบส กระจายตัวทั้งจีโนมแต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ ทำให้เกิดความหลากหลาย และนอกจากนี้ยังมีเทคนิค SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ (สุรินทร์, 2552) Aiemnaka *et al*. (2012) ได้ศึกษาลักษณะของยีนที่ควบคุมลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลัง พบว่า เป็นลักษณะด้อย (recessive) wxwx จากการศึกษายีน *GBSSI* บนโครโมโซมมันสำปะหลังแป้งเหนียวกับแป้งปกติ และพบมีตำแหน่ง SNPs ที่สามารถจำแนกลักษณะ waxy (wxwx) และ non waxy (WxWx, Wxwx) ออกจากกันได้จำนวน 3 ตำแหน่ง และวิธีการพิสูจน์พันธุ์มันสำปะหลังที่ง่ายวิธีหนึ่งคือพ่นสารโพแทสเซียมไอโอดีน 2 เปอร์เซ็นต์ ลงบนหัวมันสำปะหลัง ถ้าเป็นมันสำปะหลังพันธุ์ธรรมดา หัวมันจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม แต่ถ้าเป็นมันสำปะหลังชนิด waxy จะกลายเป็นสีออกแดง ชมพู หรือเหลือง เป็นต้น

ทั้งนี้ กรมวิชาการเกษตรเป็นแหล่งรวบรวมพันธุ์มันสำปะหลังที่สำคัญแห่งหนึ่งของประเทศไทย มีพันธุ์มันสำปะหลังที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร เพื่อเป็นตัวช่วยการปรับปรุงพันธุ์ชนิด waxy

กรมวิชาการเกษตร

ให้รวดเร็วขึ้น จึงเป็นทางเลือกในสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพันธุ์มันสำปะหลังของไทยได้ ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (Waxy starch) ในพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวมรวมไว้ ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล เพื่อช่วยในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังสายพันธุ์แป้งเหนียวต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุล ได้แก่ CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), Tris-HCl, Tag DNA polymerase, sodium EDTA, PVP (Polyvinylpyrrolidone)}, Acetic acid และ Nacl ฯลฯ
2. เครื่อง spectrophotometer (PERKIN ELMER MBA2000)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (QuantStudio5)
6. ชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)
7. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

<u>วิธีการ</u>

1. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)

1.1. ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง

เก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังจากแปลงปลูกในแหล่งรวบพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 758 ตัวอย่าง (ตารางผนวกที่ 1) นำมาเก็บรักษาตัวอย่างใบไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และแบ่งเก็บแบบแห้งโดยนำใบมันสำปะหลังผึ่งลมนาน 1 สัปดาห์ แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เก็บตัวอย่างอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลัง

นำมันใบสำปะหลังมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีของอรุโณทัยและคณะ (2552) ดังนี้เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2% β-mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งใบมันสำปะหลัง 5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Choroform:Isoamyl alcohol (24:1)

ศรีวิชาการเกษตร

5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Choroform:Isoamyl alcohol(24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAC 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA(10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

1.3. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ใช้ไพรเมอร์ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

ชื่อไพรเมอร์	**ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')**	**เอกสารอ้างอิง**
ไพรเมอร์สำหรับเอ็นเออ้างอิง		
rbcL_F	ATGTCACCACAAACAGAAACTAAAGC	Paween *et al.,* 2011
rbcL_R	CTTCGGCACAAAATAAGAAACGATCTC	Paween *et al.,* 2011
ไพรเมอร์สำหรับอัลลีล C		
F2	(GC)ATGTTGAAGTAAGTAAAGATGC	Aiemnaka *et al.,* 2012
RN	TGCTCAAGGCGTGGGAACGT	Aiemnaka *et al.,* 2012
ไพรเมอร์สำหรับอัลลีล G		
F4	(GC)ATGTTGAAGTAAGTAAAGATGG	Aiemnaka *et al.,* 2012
RN	TGCTCAAGGCGTGGGAACGT	Aiemnaka *et al.,* 2012

1.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้น้ำยา Green Gotaq® Flexi (Promega, USA) ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ 5X Green Gotaq® Flexi ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 2 mM dNTP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward (5uM) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ reverse (5uM) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Gotaq DNA polymerase

กรมวิทยาศาสตร์

(5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ตามขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวน cycles
Initial denaturation	94 ℃	3 นาที	1 cycle
Denaturation	94 ℃	30 วินาที	35 cycle
Annealing	55 ℃	30 วินาที	
Extension	72 ℃	30 วินาที	
Final extension	72 ℃	7 นาที	1 cycle

1.5 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (gel electropholesis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

1.6 บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอและผลการตรวจสอบตำแหน่ง SNPs

2. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธี TaqMan probes

2.1. ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง

การทดลองนี้แบ่งตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อการโคลนยีน และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว (waxy) ได้แก่ WaxyHB1 และพันธุ์ที่มีลักษณะแป้งไม่เหนียว (non waxy) ได้แก่ KU50 HB60 มาเปรียบเทียบกับข้อมูลยีน *GBSSI* จากฐานข้อมูล GenBank หมายเลข X74160.1

สำหรับการตรวจสอบด้วยวิธี TaqMan probes ใช้ตัวอย่างใบมันสำปะหลังตัวที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วพบว่าเป็นลักษณะจีโนไทป์แบบลักษณะข่มร่วม (co-dominant: Wxwx) และลักษณะด้อย (recessive: wxwx) จำนวนทั้งสิ้น 219 ตัวอย่าง (ตารางผนวกที่ 2) ร่วมกับตัวอย่างมันสำปะหลังแป้งเหนียว 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น จำนวน 221 ตัวอย่าง

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลัง

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2552) ตามวิธีการในข้อ 1.2

ลิขสิทธิ์การเกษตร

2.3 การออกแบบโพรบและไพรเมอร์

ทำการโคลนยีน *GBSSI* จากอาร์เอ็นเอมันสำปะหลัง ซึ่งมีตำแหน่ง SNPs ตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) (ภาพที่ 1) โดยออกแบบไพรเมอร์ด้าน Forward: 5'- ATG GCA ACT GTA ATA GCT GCA CAT -3' และ Reverse: 5'- TCA AGG CGT GGG AAC GTT CTC CTT-3' เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพันธุ์มันสำปะหลัง waxy และ non waxy เมื่อได้ตำแหน่งเครื่องหมาย SNPs ที่เฉพาะเจาะจงกับพันธุ์แป้งเหนียวแล้วทำการออกแบบโพรบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียว ดังนี้

- คู่ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ขนาบข้างของตำแหน่ง SNPs คือ

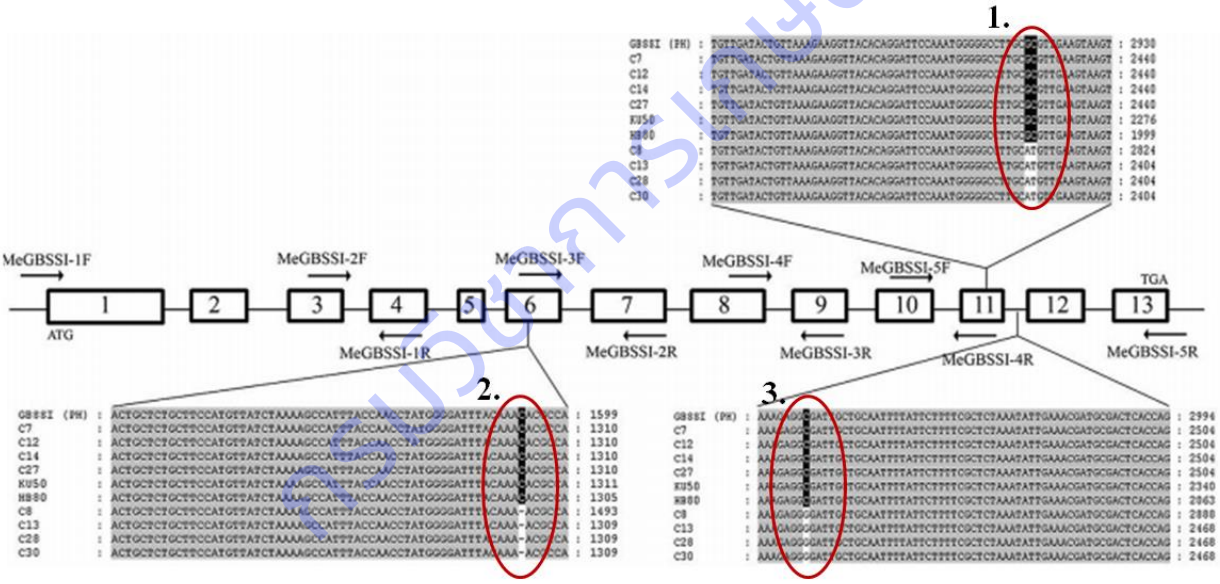
  WX_F: 5'-CCGCTTCTTCCACTCCTAC-3'

  WX_R: 5'-TTTGCCCCATACCTTCTCAAG-3'

- โพรบสำหรับตรวจสอบตำแหน่ง SNPs โดยติดฉลากสีทางด้านปลาย 5' ได้แก่ VIG สำหรับตรวจสอบอัลลี T และฉลากสี FAM สำหรับตรวจสอบอัลลี G

  WXprobeT: [VIC]-5'-AAAGA**T**GAGTTGATCG-3'

  WXprobeG: [FAM]-5'-AAAGA**G**GAGTTGATCG-3'



ภาพที่ 1 ตำแหน่ง SNPs บนยีน *GBSSI* ของมันสำปะหลัง (Aiemnaka *et al.*, 2012)

2.4 การตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ด้วยวิธี TaqMan probes

นำดีเอ็นเอมันสำปะหลังจำนวน 84 ตัวอย่าง มาตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ด้วยวิธี TaqMan probes โดยการเตรียมปฏิกิริยาตามชุด Type-it® Fast SNP Probe PCR ยี่ห้อ QIAGEN ดังนี้ ใน 1 ปฏิกิริยา ให้เติมน้ำยา 2x SNP Probe PCR Master Mix จำนวน 5 ไมโครลิตร 20x primer–probe mix จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 5x Q-Solution จำนวน 1 ไมโครลิตร น้ำปราศจาก RNase จำนวน 2.5 ไมโครลิตร และ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 20 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ด้วยเครื่อง QuantStudio 5 Real-Time PCR System ตามขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวน cycles
Pre-Read Stage	60 °C	30 วินาที	1 cycle
Hold Stage	95 °C	20 วินาที	1 cycle
PCR stage Step 1	95 °C	3 วินาที	40 cycles
PCR stage Step 2	60 °C	25 วินาที	
Post-Stage	60 °C	30 วินาที	1 cycle

2.5 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจากไพรเมอร์และโพรบ ด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (gel electropholesis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

2.6 บันทึกข้อมูลสรุปผลการตรวจสอบ SNPs

3. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียว (Waxy starch) ในมันสำปะหลังด้วยวิธี GBS (Genotyping by Sequencing)

3.1 ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง

- พันธุ์ที่มีลักษณะ non waxy จำนวน 11 ตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มอะไมโลสสูง ได้แก่ ระยอง7 ระยอง9 ระยอง11 เกษตรศาสตร์50 ห้วยบง80 และ Mcol1702 กลุ่มอะไมโลสต่ำ ได้แก่ Mbar191 MBra691 MPan70 MPar104 และ MPar25
- พันธุ์ที่มีลักษณะแป้งเหนียว จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ HBW1 และ HBW2

3.2 การสกัดดีเอ็นเอรวม

ทำการสกัดดีเอ็นเอรวมจากใบมันสำปะหลังด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2552) ตามวิธีการในข้อ 1.2

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี GBS (Genotyping by Sequencing)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี GBS (Genotyping by Sequencing) มากรองข้อมูลตำแหน่ง SNPs โดยตั้งค่าความถี่อัลลีลต่ำสุด (Minimum minor allele frequency (MAF)) เป็น ≥ 5% ค่า read depth เป็น 20X และตัดค่า SNP missing ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบและค้นหาตำแหน่ง SNPs ที่ให้ลักษณะจีโนไทป์ต่าง (polymorphism) ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะพันธุกรรม

3.4 บันทึกข้อมูลสรุปผลการตรวจสอบตำแหน่งเครื่องหมาย SNPs ที่ให้ความแตกต่าง

กรมวิชาการเกษตร

4. การทดสอบแป้งในหัวมันสำปะหลังด้วยการย้อมสีไอโอดีน (Iodine Staining Test)

4.1 การทดสอบย้อมสีไอโอดีนในหัวมันสำปะหลัง

ใช้ตัวอย่างมันสำปะหลังตัวที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วพบว่าเป็นลักษณะจีโนไทป์แบบลักษณะข่มร่วม (co-dominant: Wxwx) และลักษณะด้อย (recessive: wxwx) จำนวนทั้งสิ้น 219 ตัวอย่าง ดังแสดงไว้ในตารางภาคผนวกที่ 1 ในการทดสอบปริมาณแป้งเหนียวโดยวิธี Iodine Staining Test ตามวิธีของ Aiemnaka และคณะ (2012) ด้วยการตัดสไลด์หัวมันสำปะหลังตามขวางแล้วฉีดพ่นไอโอดีน 20 เปอร์เซ็นต์

4.2 การทดสอบย้อมสีไอโอดีนกับเม็ดแป้งมันสำปะหลัง

สุ่มคัดเลือกตัวอย่างมันสำปะหลังจากข้อ 4.2 จำนวน 51 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) มาทำการสกัดแป้งมันสำปะหลังตามวิธีของ Abera และ Rakshit (2003) ด้วยการนำหัวมันสำปะหลังมาล้างทำความสะอาด นำไปปอกเปลือก หั่นเป็นท่อน ขูดให้ละเอียด แล้วคั้นเอาน้ำทิ้ง นำเอาไปอบให้แห้ง จากนั้นนำมาบดแล้วร่อนให้ละเอียด แป้งมันสำปะหลังที่ได้จะนำมาย้อมด้วยไอโอดีนแล้วถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะการติดสีไอโอดินของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง

4.3 บันทึกภาพและสรุปผลการทดสอบการย้อมสีไอโอดีน

ตารางที่ 2 ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ใช้ทดสอบย้อมเม็ดแป้งด้วยสีไอโอดีน

No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง
1	MPER 349	14	CR 79	27	MPER 212	40	MHMC1
2	MPER 542	15	CM 4777-2	28	CM 323-375	41	MCUB42
3	MBRA 461	16	MCUB 53	29	MMEX 49	42	MPAR41
4	MCOL 1178	17	MCUB 16	30	MUSA 8	43	MPAR135
5	MCOL 2177	18	CR 19	31	MBRA 461	44	R2
6	MECU 141A	19	MCOL 965	32	CMR 23-17-276	45	MVEN297A
7	MCOL 1968	20	MBRA 217	33	MCUB 16	46	CR 59
8	MVEN 210	21	MCOL 1667	34	CR30	47	MFJI 4
9	MMAL 42	22	MECU 72	35	CM5286-3	48	MECU 23
10	MCOL 802	23	MMEX 54	36	V22	49	MVEN 276
11	MPAR 156	24	MBRA 658	37	MCOL198	50	MECU 31(R)
12	MCOL 1467	25	MCOL 1098	38	MECU29	51	MVEN 297A
13	(JKxR)13	26	MCOL1505	39	MPER183		

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

<u>เวลาและสถานที่</u>

- ระยะเวลาการทดลอง (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2563 รวม 3 ปี

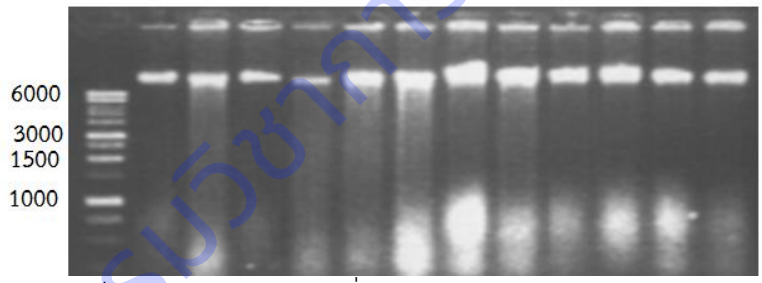
- สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) ได้นำเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) โดยทำการตรวจสอบกับพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้ ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่จังหวัดระยอง จำนวน 758 ตัวอย่าง ใบมันสำปะหลังที่เก็บจากแปลงถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีของอรุโณทัยและคณะ (2552) พบดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณมากและคุณภาพที่ดี เมื่อนำไปวัดค่า (O.D) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 อยู่ในช่วง 1.8-2.0 (ภาพที่ 2)

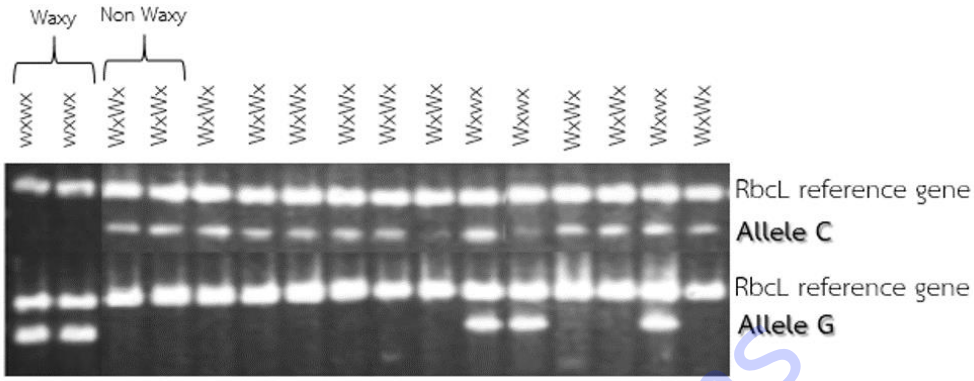


ภาพที่ 2 ตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่สกัดด้วยวิธี CTAB บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธีพีซีอาร์จำเป็นต้องมีแถบดีเอ็นเออ้างอิง ซึ่งการทดลองนี้ได้ไพรเมอร์สากลจากยีน *RbcL* สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออ้างอิง ซึ่งยีนดังกล่าวออกแบบมาจากส่วนอนุรักษ์ของยีนจากจีโนมชนิดคลอโรพลาสต์ ให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ สามารถใช้ได้กับพืชทุกชนิด (Paween *et al.*, 2011) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Aiemnaka และคณะ (2012) พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบรวมไพรเมอร์หลายคู่ได้ จึงเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบแยกหลอดทดลอง เมื่อได้ปฏิกิริยาที่เสร็จสมบูรณ์แล้วนำมารวมเป็นหลอดเดียวกัน แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 1 และ 2 แถบ จำนวนแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ หมายถึง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของอัลลีล C หรือ G (ภาพที่ 3) โดยใช้พันธุ์มันสำปะหลังแป้งเหนียว หรือ waxy จากมูลนิธิมันสำปะหลังแห่งประเทศ จำนวนสองสายพันธุ์ คือ HB1 และ HB3 เป็น Positive control การตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียว พบว่า มันสำปะหลังแป้งเหนียว หรือ waxy จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะ Allele

กรมวิชาการเกษตร

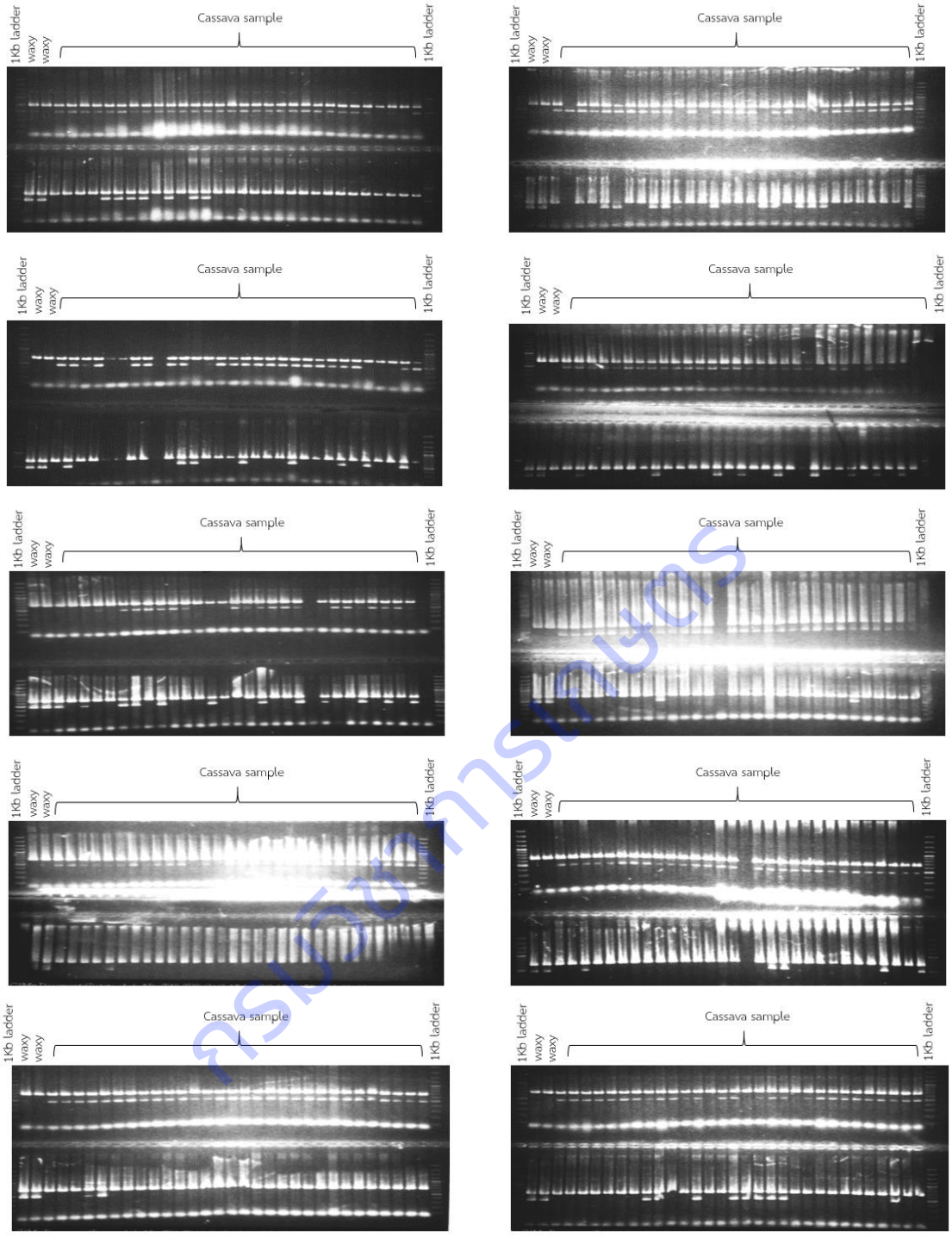
G มีลักษณะจีโนไทป์เป็นแบบลักษณะด้อย (wxwx) สำหรับมันสำปะหลังที่ไม่ใช่แป้งเหนียว หรือ non waxy จะให้แถบดีเอ็นเอเฉพาะ Allele C เป็นลักษณะเด่น (WxWx) และหากปรากฏทั้ง 2 อัลลีล คือจีโนไทป์ลักษณะ Co-dominant ซึ่งไพร์เมอร์ทั้ง 3 คู่ ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอจากมันสำปะหลัง จำนวน 758 ตัวอย่าง ด้วยวิธีพีซีอาร์ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบอัลลีล C และ G ร่วมกับยีนอ้างอิง *RbcL* บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

ผลการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ กับตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 758 ตัวอย่าง พบจีโนไทป์แบบลักษณะเด่น (dominant: WxWx) ลักษณะข่มร่วม (co-dominant: Wxwx) และลักษณะด้อย (recessive: wxwx) จำนวน 522 202 และ 17 ตัวอย่าง ตามลำดับ การตรวจสอบให้การใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs สามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีพีซีอาร์เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวก ใช้เครื่องอุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่มีราคาถูกกว่าวิธีอื่นๆ ทั้งนี้ตัวอย่างมันสำปะหลังมีจำนวนมาก การทดลองนี้จึงได้ตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบและคัดเลือกในเบื้องต้น ซึ่งจากตัวอย่างมันสำปะหลังจากจำนวน 758 ตัวอย่าง คัดเลือกลักษณะจีโนไทป์แบบข่มร่วมและด้อย ได้จำนวน 219 ตัวอย่าง (ตารางผนวกที่ 2) ซึ่งนำไปตรวจสอบด้วยตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธี TaqMan probes ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ บนอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

2. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธี TaqMan probes

วิธี TaqMan probes หรือ TaqMan hybridization probes อาศัยหลักการของ reporter dye ที่จับอยู่ปลาย 5’ ของ probe ที่ทำการติดสารสี fluorescein ได้แก่ FAM, TET หรือ HEX โดยมีส่วน Quencher dye จับที่ปลาย 3’ ของ probe เช่น TAMRA เมื่อเกิดการไฮบริไดเซชัน สี Fluorescein ของ reporter จะถูกกระตุ้น (excite) และปล่อยแสง (emit) ในปฏิกิริยา real-time PCR ในขั้นตอน extension เอ็นไซมี Taq DNA polymerase ที่มี 5’ nuclease activity จะตัด reporter dye ออกจาก probe ทำให้ reporter dye หลุดห่างออกจาก quencher dye และสามารถคายพลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถตรวจสอบได้

การโคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GBSSI* ในมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียวที่ได้รับความอนุเคราะห์ใบมาจากมูลนิธิมันสำปะหลังแห่งประเทศไทยเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย ได้ชิ้นส่วนยีนขนาด 1,753 คู่เบส (ภาพที่ 5) เมื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าคล้ายกับยีน granule-bound starch synthase ของ *Manihot esculenta Hevea brasiliensis* และ *Jatropha curcas* ที่ค่าความเหมือน (identity) 99.08 91.23 และ 86.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว (waxy) พันธุ์ KU50 พันธุ์ห้วยบง 60 และข้อมูลยีน *M. esculenta* granule-bound starch synthase หมายเลข X74160.1 ขนาด 502 คู่เบส (ภาพที่ 6) มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ขนาดความยาว 166 อะมิโน แล้วเปรียบเทียบกัน พบมันสำปะหลังแป้งเหนียวมีลำดับอะมิโนที่ขาดหายเมื่อเทียบกับพันธุ์อื่นๆ (ภาพที่ 7) จากนั้นวิเคราะห์หาตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/X) เพื่อค้นหาตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงกับมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว พบตำแหน่งที่น่าสนใจ คือ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 229 ของมันสำปะหลังแป้งเหนียว (WaxyHB1) มีความแตกต่างจากลำดับเบส G เป็นเบส T เมื่อทำการแปลรหัสเป็นโปรตีนพบว่าเป็นตำแหน่งหยุดการสร้างโปรตีน (stop codon) ซึ่งมีรหัสโคดอนเป็น TGA ดังภาพที่ 6 จากการค้นพบตำแหน่งดังกล่าวจึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ที่เกี่ยวข้องลักษณะแป้งเหนียวในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังด้วยวิธี TaqMan probes ซึ่งมันสำปะหลัง non waxy จะมีรหัสโคดอน GGA ตำแหน่งที่ใช้ในการตรวจสอบเป็น SNPs แบบ Bi-Allelic คือตำแหน่ง T/G (T พบในพันธุ์ waxy และ G พบในพันธุ์ non waxy) การออกแบบพารามิเตอร์ (parameters) ของไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบด้วยวิธี TaqMan จะต้องมีค่า Tm อยู่ในช่วง 58-60 องศาเซลเซียส ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 15-30 คู่เบส มีเปอร์เซ็นต์ GC อยู่ในช่วง 30-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายมีความยาว 50-150 คู่เบส (Shen *et al*., 2009; Woodward, 2014) สำหรับการทดลองนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ด้านปลาย 5’ ของยีนหรือ forward คือ WX_F: 5’-CCG CTT CTT CCA CTC CTA C-3’ และปลาย 3’ หรือ reverse คือ WX_R: 5’-TTT GCC CCA TAC CTT CTC AAG-3’ (ภาพที่ 8) ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 82 คู่เบส (ภาพที่ 9) โดยไพรเมอร์ สำหรับการออกแบบโพรบในตำแหน่ง T/G นั้นทำการติดฉลากสี VIC สำหรับตำแหน่งอัลลีล T และฉลากสี FAM สำหรับตำแหน่งอัลลี T โดยมีลำดับเบส ดังนี้ WXprobeT: [VIC]-5’-AAAGATGAGTTGATCG-3’ และ WxprobeG: [FAM]-5’-AAAGAGGAGTTGATCG-3’ นำโพรบไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปตรวจสอบกับตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 221 ตัวอย่างที่ เป็นตัวอย่างมัน

สำปะหลังแป้งเหนียว 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 219 ตัวอย่าง (ตารางผนวกที่ 2) พบตำแหน่ง T เฉพาะตัวอย่างแป้งเหนียว 2 ตัวอย่าง สำหรับมันสำปะหลังของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยะองไม่พบตำแหน่ง T พบเฉพาะตำแหน่ง G (ภาพที่ 10)

```
>HB1
GTCGGCGCTAACTTGAGCATCCATGCATTAGAGACTAAGGCTAATAATTTGTCTCACACTGGACCCTGGACCCAAACTATCACTCCCAATGGTTTAA
GGTCCCTCAACACTATGGATAAACTCCAAATGAAGACACAATCAAAAGCTGTGAAAAAGGTCTCTGCCACCGGCAATGGTAGGCCTGCTGCCAAAAT
TATTTGTGGTCATGGAATGAATTTAATCTTTGTTGGAGCTGAAGTTGGTCCCTGGAGCAAAACTGGTGGACTTGGTGATGTTCTTGGAGGACTCCCC
CCTGCCATGGCCGCAAGAGGGCACCGCGTCATGACAGTGTCTCCCCGCTATGACCAGTACAAGGATGCTTGGGATACCTCTGTATCGGTGGAGATTA
AAATTGCAGATAGAATTGAAACTGACCGCTTCTTCCACTCCTACTAAAGATGAGTTGATCGTGTCTTCGTGGATCATCCAATGTTACTTGAGAAGGT
ATGGGGCAAAACTGGATCTAAAATATATGGGCCAAGAGCATGTTTGGATTACCAGGACAACCAACTGCGATTTAGCTTGTTATGCCTTGCTGCTCTG
AATGCACCGAGAGTTCTGAACTTGAACAGCAGCAAAAATTTCTCAGGACCCTACCGAGAAGAAGTTGCCTTCATTGCCAACGACTGGCACACTGCTC
TGCTTCCATGTTATCTAAAAGCCATTTACCAACCTATGGGGATTTACAAAACGCCAAGGTTGCCTTTTGCATCCACAACATTGCATATCAGGCAAGA
TTTGCCTTCTCAGACTTCCCACGACTTAATCTGCCAGATAAATTCAAGAGCTGTTTTGACTTTATCGATGGGTATGAGAAGCCCGTGAAGGGAAGGA
AAATCAATTGGATGAAGGCCGGGATATTGGAATCAGACAGGGTTTTGACTGTGAGCCCATACTATGCCCAAGAAGTCATCTCTGGAGTTGAAAGAGG
CGTCGAGCTGGATAACTTCATTCGTAAAACTGGCATTGCTGGTATTATAAATGGCATGGACGTCCAGGAGTGGAATCCTGTTACAGATAAATACATT
GACATCCACTACGATGCCACAACTGTTATGGACGCAAAACCTTTGTTGAAGGAAGCCCTTCAAGCAGAAGTCGGATTGCCTGTTGATAGGAATGTTC
CTTTGATAGGCTTCATTGGTAGATTAGAAGAGCAGAAGGGTTCAGATATTTTTGTTGCAGCTATTTCCCAATTGGTTGAACACAATGTGCAGATAGT
AATCCTTGGAACTGGCAAAAAGAAATTTGAGAAGCAGATTGAGCATCTGGAGGTTTTGTACCCTGACAAGGCAAGAGGAGTTGCAAAATTCAATGTG
CCGTTGGCGCACATGATCACAGCTGGTGCTGACTTTATGCTGGTTCCAAGTAGATTTGAGCCCTGTGGTCTCATTCAGTTGCATGCTATGCGATATG
GAACAGTTCCCATTGTTGCTTCTACTGGTGGTCTTGTTGATACTGTTAAAGAAGGTTACACAGGATTCCAAATGGGGGCCTTGCATGTTGAATGTGA
CAAAATTGATTCAGCAGATGTAGCTGCGATAGTTAAAACTGTGGCAAGAGCTCTTGGCACTTATGCTACCGCTGCATTAAGAGAAATGATCCTGAAT
TGCATGGCCCAAGACTTGTCATGGAAGGGACCAGCCAGAATGTGGGAGAAAATGCTCCTGGACCTGGAAGTTACTGGCAGCGAACCTGGCACTGAAG
GGAGAGA
```

ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีน GBSSI ขนาดความยาว 1,753 คู่เบสของมันสำปะหลังแป้งเหนียวจากมูลนิธิมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตร

```
>WaxyHB1
CTGCCAAAATTATTTGTGGTCATGGAATGAATTTAATCTTTGTTGGAGCTGAAGTTGGTCCCTGGAGCAAAACTGGTGGACTTGGTGATGTTCTTGG
AGGACTCCCCCCTGCCATGGCCGCAAGAGGGCACCGCGTCATGACAGTGTCTCCCCGCTATGACCAGTACAAGGATGCTTGGGATACCTCTGTATCG
GTGGAGATTAAAATTGCAGATAGAATTGAAACTGACCGCTTCTTCCACTCCTACTAAAGATGAGTTGATCGTGTCTTCGTGGATCATCCAATGTTAC
TTGAGAAGGTATGGGGCAAAACTGGATCTAAAATATATGGGCCAAGAGCATGTTTGGATTACCAGGACAACCAACTGCGATTTAGCTTGTTATGCCT
TGCTGCTCTGAATGCACCGAGAGTTCTGAACTTGAACAGCAGCAAAAATTTCTCAGGACCCTACCGAGAAGAAGTTGCCTTCATTGCCAACGACTGG
CACACTGCTCTGCTTCC

>KU50
CTGCCAAAATTATTTGTGGTCATGGAATGAATTTAATCTTTGTTGGAGCTGAAGTTGGTCCCTGGATCAAAACTGGTGGACTTGGTGATGATCATGG
AGGACTCCCCCCTGCCATGGCCGCAAGAGGGCACCGCGACATGACAGTGTCTCCCCGCTATGACCAGTACAAGGATGCTTGGGATACCTCTGTATCG
GTGGAGATTAAAATTGGAGATAGAATTGAAACTGTCCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGAGGAGTTGATCGGGTCTTCGTGGATCATCCAATGTTCC
TTGAGAAGGTATGGGGCAAAACTGGATCTAAAATATATGGCCCAAGAGCAGGTTTGGATTACCAGGACAACCAACTGCGATTTAGCTTGTTATGCCT
TGCTGCTCTGGAGGCACCGAGAGTTCTGAACTTGAACAGCAGCAAAAATTTCTCAGGACCCTACGGAGAAGAAGTTGCCTTCATTGCCAACGACTGG
CACACTGCTCTGCTTCC

>HB60
CTGCCAAAATTATTTGTGGTCATGGAATGAATTTAATCTTTGTTGGAGCTGAAGTTGGTCCCTGGATCAAAACTGGTGGACTTGGTGATGTTCTTGG
AGGACTCCCCCCTGCCATGGCCGCAAGAGGGCACCGCGTCATGACAGTGTCTCCCCGCTATGACCAGTACAAGGATGCTTGGGATACCTCTGTATCG
GTGGAGATTAAAATTGGAGATAGAATTGAAACTGTCCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGAGGAGTTGATCGGGTCTTCGTGGATCATCCAATGTTCC
TTGAGAAGGTATGGGGCAAAACTGGATCTAAAATATATGGCCCAAGAGCAGGTTTGGATTACCAGGACAACCAACTGCGATTTAGCTTGTTATGCCT
TGCTGCTCTGGAGGCACCGAGAGTTCTGAACTTGAACAGCAGCAAAAATTTCTCAGGACCCTACGGAGAAGAAGTTGCCTTCATTGCCAACGACTGG
CACACTGCTCTGCTTCC

>X74160.1
CTGCCAAAATTATTTGTGGTCATGGAATGAATTTAATCTTTGTTGGAGCTGAAGTTGGTCCCTGGAGCAAAACTGGTGGACTTGGTGATGTTCTTGG
AGGACTCCCCCCTGCCATGGCCGCAAGAGGGCACCGCGTCATGACAGTGTCTCCCCGCTATGACCAGTACAAGGATGCTTGGGATACCTCTGTATCG
GTGGAGATTAAAATTGGAGATAGAATTGAAACTGTCCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGAGGAGTTGATCGGGTCTTCGTGGATCATCCAATGTTCC
TTGAGAAGGTATGGGGCAAAACTGGATCTAAAATATATGGCCCAAGAGCAGGTTTGGATTACCAGGACAACCAACTGCGATTTAGCTTGTTATGCCT
TGCTGCTCTGGAGGCACCGAGAGTTCTGAACTTGAACAGCAGCAAAAATTTCTCAGGACCCTACGGAGAAGAAGTTGCCTTCATTGCCAACGACTGG
CACACTGCTCTGCTTCC
```

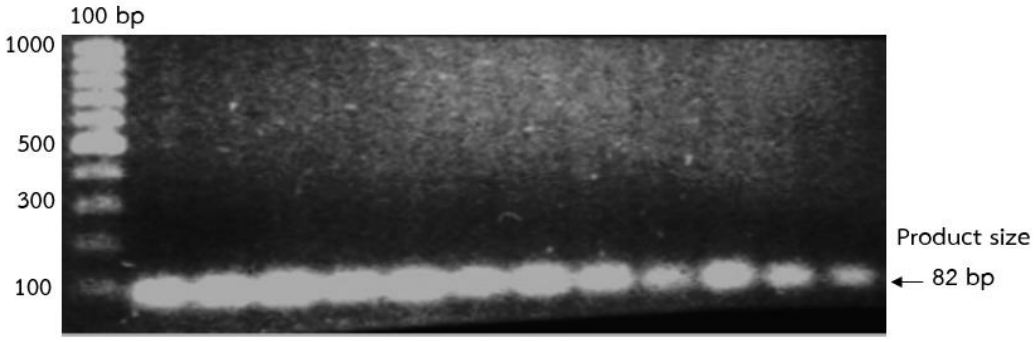
ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *GBSSI* จากอาร์เอ็นเอตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว (waxy) พันธุ์ KU50 พันธุ์ห้วยบง 60 และข้อมูลยีน *M. esculenta* granule-bound starch synthase หมายเลข X74160.1 ขนาดความยาว 502 คู่เบส

```
>WaxyHB1
AKIICGHGMNLIFVGAEVGPWSKTGGLGDVLGGLPPAMAARGHRVMTVSPRYDQYKDAWD
TSVSVEIKIADRIETDRFFHSY-R-VDRVFVDHPMLLEKVWGKTGSKIYGPRACLDYQDN
QLRFSLLCLAALNAPRVLNLNSSKNFSGPYREEVAFIANDWHTALL

>KU50
AKIICGHGMNLIFVGAEVGPWIKTGGLGDDHGGLPPAMAARGHRDMTVSPRYDQYKDAWD
TSVSVEIKIGDRIETVRFFHSYKRGVDRVFVDHPMFLEKVWGKTGSKIYGPRAGLDYQDN
QLRFSLLCLAALEAPRVLNLNSSKNFSGPYGEEVAFIANDWHTALL

>HB60
AKIICGHGMNLIFVGAEVGPWSKTGGLGDVLGGLPPAMAARGHRVMTVSPRYDQYKDAWD
TSVSVEIKIGDRIETVRFFHSYKRGVDRVFVDHPMFLEKVWGKTGSKIYGPRAGLDYQDN
QLRFSLLCLAALEAPRVLNLNSSKNFSGPYGEEVAFIANDWHTALL

>X74160.1I
AKIICGHGMNLIFVGAEVGPWSKTGGLGDVLGGLPPAMAARGHRVMTVSPRYDQYKDAWD
TSVSVEIKIGDRIETVRFFHSYKRGVDRVFVDHPMFLEKVWGKTGSKIYGPRAGLDYQDN
QLRFSLLCLAALEAPRVLNLNSSKNFSGPYGEEVAFIANDWHTALL
```

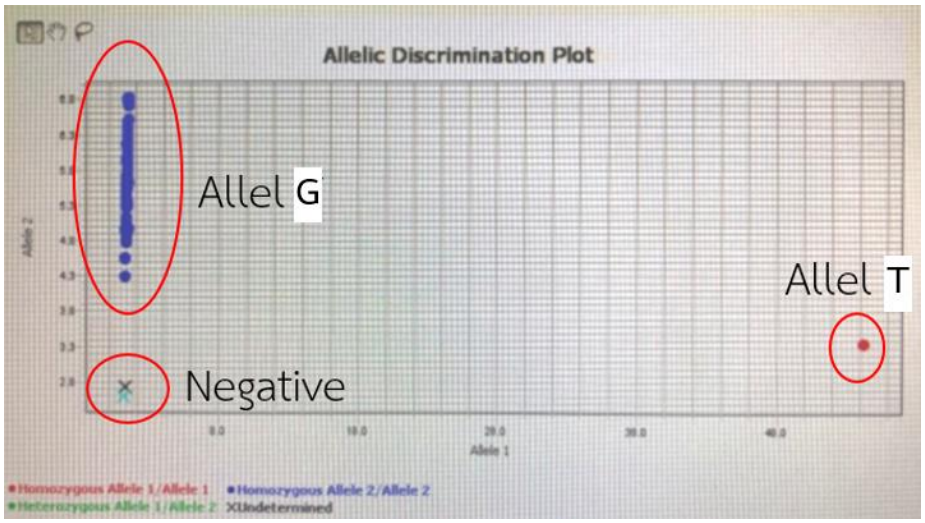
ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนเอของยีน *GBSSI* ที่ขนาดความยาว 166 อะมิโน

```
>waxy 82 bp
CCGCTTCTTCCACTCCTACTAAAGATGAGTTGATCGTGTCTTCGTGGATCATCCAATGTTACTTGAGAAGGTATGGGGCAAA
>non waxy 82 bp
CCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGAGGAGTTGATCGGGTCTTCGTGGATCATCCAATGTTCCTTGAGAAGGTATGGGGCAAA

                Forward Primer-->      Probes
waxy            CCGCTTCTTCCACTCCTACTAAAGATGAGTTGATCGTGTCTTCGTGGATCATCCAATGTT       60
nonwaxy         CCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGAGGAGTTGATCGGGTCTTCGTGGATCATCCAATGTT       60
                ****************** ***** ********** **********************

waxy            ACTTGAGAAGGTATGGGGCAAA  82
nonwaxy         CCTTGAGAAGGTATGGGGCAAA  82
                 ********************
                 <-----Reverse Primer
```

ภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับออกแบบไพรบและไพรเมอร์ในการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SNPs ในมันสำปะหลังพันธุ์ waxy และ non waxy ด้วยวิธี TaqMan probes



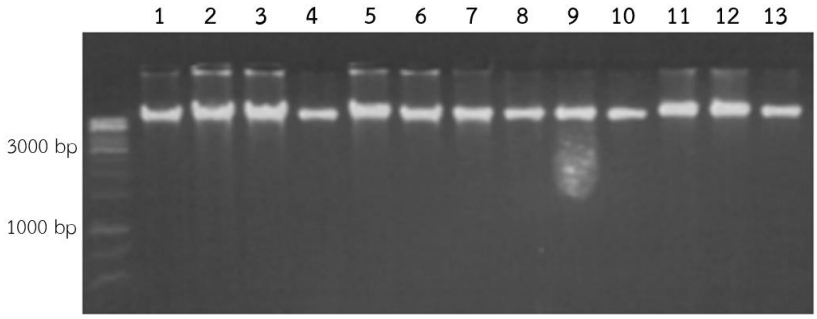
ภาพที่ 9 ผลผลิตพีซีอาร์ของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 82 คู่เบส ที่ตรวจสอบได้ด้วยวิธี TaqMan probes ด้วยคู่ไพรเมอร์ WX_F และ WX_R



ภาพที่ 10 การตรวจสอบตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs T/G โดยวิธี TaqMan probes กับตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์

3. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียว (Waxy starch) ในมันสำปะหลังด้วยวิธี GBS (Genotyping by Sequencing)

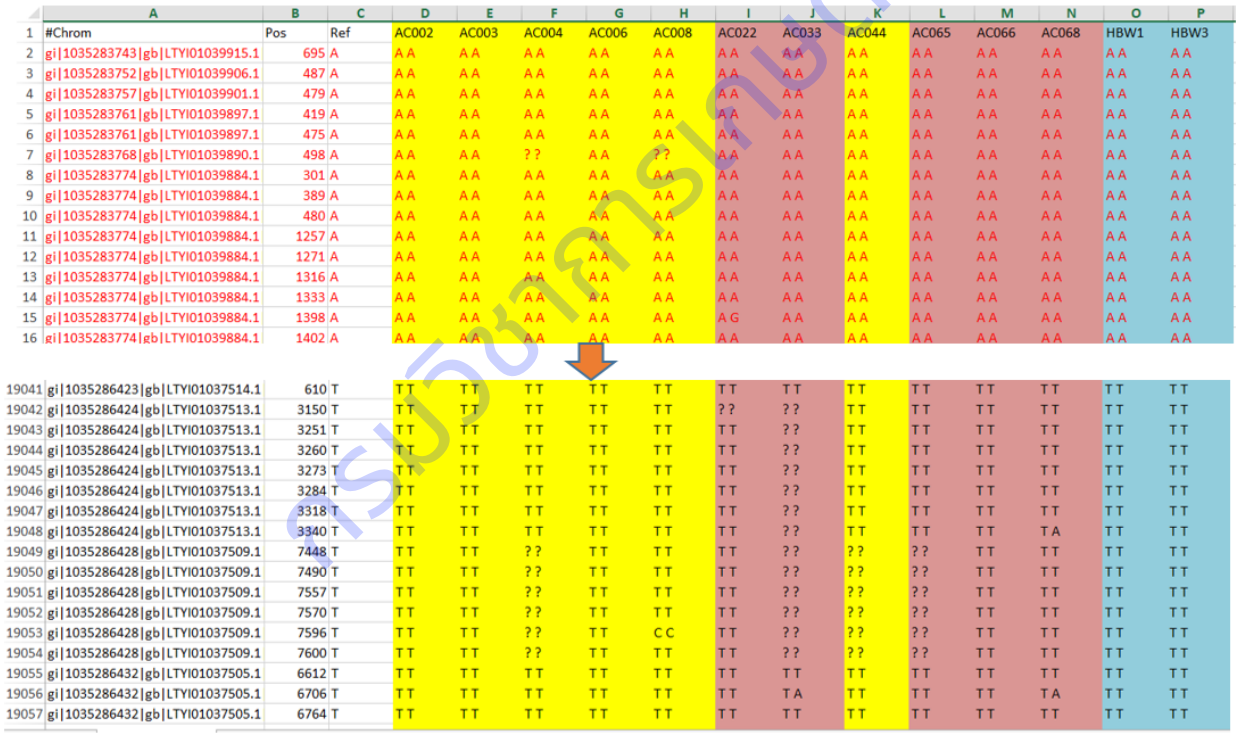
การค้นหาและเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) จากพันธุ์ปกติ และพันธุ์แป้งเหนียว ด้วยวิธี GBS (Genotyping by Sequencing ได้นำตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวนทั้งสิ้น 13 ตัวอย่าง จากตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ non waxy จำนวน 11 ตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มอะไมโลสสูง ได้แก่ ระยอง7 ระยอง9 ระยอง11 เกษตรศาสตร์50 ห้วยบง80 และ Mcol1702 กลุ่มอะไมโลสต่ำ ได้แก่ Mbar191 Mbra691 Mpan70 Mpar104 และ Mpar25 ร่วมกับมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ HBW1 และ HBW2 ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจะถูกนำไปกำจัดอาร์เอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ Rnase ให้มีค่า OD260/280 ต้องอยู่ในช่วง 1.8-2.0 มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 100-150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่ได้ต้องมีคุณภาพและปริมาณมาก ไม่มีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ และไม่เกิดการฉีกขาด (degradation) (ภาพที่ 11) สำหรับการนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี GBS (Genotyping by Sequencing)



ภาพที่ 11 ดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลัง 13 ตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์ GBS

กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 13 ตัวอย่าง ถูกนำมากรองข้อมูลเฉพาะเครื่องหมาย SNPs แบบ Bi-Allelic ที่เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ไป โดยตั้งค่าความถี่อัลลีลต่ำสุด (Minimum minor allele frequency (MAF)) เป็น ≥ 5% ค่า read depth เป็น 20X และตัดค่า SNP missing ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ได้ข้อมูลจีโนไทป์แบบ SNP ทั้งสิ้น 19,057 ตำแหน่ง (ภาพที่ 2) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวถูกนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างหรือความเฉพาะเจาะจงของเครื่องหมายโมเลกุล พบตำแหน่ง SNPs เฉพาะมันสำปะหลังสายพันธุ์แป้งเหนียวของมูลนิธิมันสำปะหลังแห่งประเทศไทยจำนวน 2 สายต้น คือ HBW1 และ HBW2 ทั้งหมด 33 ตำแหน่ง แบ่งเป็น SNPs แบบเฮทเทอโรไซโกตจำนวน 26 ตำแหน่ง และแบบโฮโมไซโกตจำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ โครโมโซมหมายเลข LTYI01038574.1 ตำแหน่ง 1203 และ 1207 เป็นเบส T และ G ตามลำดับ โครโมโซมหมายเลข LTYI01038450.1 ตำแหน่ง 2663 เป็นเบส T โครโมโซมหมายเลข LTYI01038204.1 ตำแหน่ง 1272 เป็นเบส G โครโมโซมหมายเลข LTYI01037867.1 ตำแหน่ง 3695 และ 3745 ทั้งสองตำแหน่งเป็นเบส A และโครโมโซมหมายเลข LTYI01037654.1 ตำแหน่ง 609 เป็นเบส T (ภาพที่ 13)



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	#Chrom	Pos	Ref	AC002	AC003	AC004	AC006	AC008	AC022	AC033	AC044	AC065	AC066	AC068	HBW1	HBW3
2	gi|1035283743|gb|LTYI01039915.1	695	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
3	gi|1035283752|gb|LTYI01039906.1	487	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
4	gi|1035283757|gb|LTYI01039901.1	479	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
5	gi|1035283761|gb|LTYI01039897.1	419	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
6	gi|1035283761|gb|LTYI01039897.1	475	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
7	gi|1035283768|gb|LTYI01039890.1	498	A	A A	A A	? ?	A A	? ?	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
8	gi|1035283774|gb|LTYI01039884.1	301	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
9	gi|1035283774|gb|LTYI01039884.1	389	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
10	gi|1035283774|gb|LTYI01039884.1	480	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
11	gi|1035283774|gb|LTYI01039884.1	1257	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
12	gi|1035283774|gb|LTYI01039884.1	1271	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
13	gi|1035283774|gb|LTYI01039884.1	1316	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
14	gi|1035283774|gb|LTYI01039884.1	1333	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
15	gi|1035283774|gb|LTYI01039884.1	1398	A	A A	A A	A A	A A	A A	A G	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
16	gi|1035283774|gb|LTYI01039884.1	1402	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A
19041	gi|1035286423|gb|LTYI01037514.1	610	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T
19042	gi|1035286424|gb|LTYI01037513.1	3150	T	T T	T T	T T	T T	T T	? ?	? ?	T T	T T	T T	T T	T T	T T
19043	gi|1035286424|gb|LTYI01037513.1	3251	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	? ?	T T	T T	T T	T T	T T	T T
19044	gi|1035286424|gb|LTYI01037513.1	3260	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	? ?	T T	T T	T T	T T	T T	T T
19045	gi|1035286424|gb|LTYI01037513.1	3273	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	? ?	T T	T T	T T	T T	T T	T T
19046	gi|1035286424|gb|LTYI01037513.1	3284	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	? ?	T T	T T	T T	T T	T T	T T
19047	gi|1035286424|gb|LTYI01037513.1	3318	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	? ?	T T	T T	T T	T T	T T	T T
19048	gi|1035286424|gb|LTYI01037513.1	3340	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	? ?	T T	T T	T T	T A	T T	T T
19049	gi|1035286428|gb|LTYI01037509.1	7448	T	T T	T T	? ?	T T	T T	T T	? ?	? ?	? ?	T T	T T	T T	T T
19050	gi|1035286428|gb|LTYI01037509.1	7490	T	T T	T T	? ?	T T	T T	T T	? ?	? ?	? ?	T T	T T	T T	T T
19051	gi|1035286428|gb|LTYI01037509.1	7557	T	T T	T T	? ?	T T	T T	T T	? ?	? ?	? ?	T T	T T	T T	T T
19052	gi|1035286428|gb|LTYI01037509.1	7570	T	T T	T T	? ?	T T	T T	T T	? ?	? ?	? ?	T T	T T	T T	T T
19053	gi|1035286428|gb|LTYI01037509.1	7596	T	T T	T T	? ?	T T	C C	T T	? ?	? ?	? ?	T T	T T	T T	T T
19054	gi|1035286428|gb|LTYI01037509.1	7600	T	T T	T T	? ?	T T	T T	T T	? ?	? ?	? ?	T T	T T	T T	T T
19055	gi|1035286432|gb|LTYI01037505.1	6612	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T
19056	gi|1035286432|gb|LTYI01037505.1	6706	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T A	T T	T T	T T	T A	T T	T T
19057	gi|1035286432|gb|LTYI01037505.1	6764	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T

ภาพที่ 12 ผลจีโนไทป์ของตัวอย่างมันสำปะหลัง 13 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี GBS

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	#Chrom	Pos	Ref	AC002	AC003	AC004	AC006	AC008	AC022	AC033	AC044	AC065	AC066	AC068	HBW1	HBW3
2	gi|1035283912|gb|LTYI01039746	1157	G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G A	G A
3	gi|1035283931|gb|LTYI01039727	1900	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
4	gi|1035283931|gb|LTYI01039727	2062	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
5	gi|1035283931|gb|LTYI01039727	1876	G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G A	G A
6	gi|1035284370|gb|LTYI01039288	1012	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
7	gi|1035284466|gb|LTYI01039192	3462	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C A	C A
8	gi|1035284466|gb|LTYI01039192	3421	G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G A	G A
9	gi|1035284466|gb|LTYI01039192	3471	G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G A	G A
10	gi|1035284466|gb|LTYI01039192	585	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T G	T G
11	gi|1035284557|gb|LTYI01039101	535	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C A	C A
12	gi|1035284751|gb|LTYI01038907	1803	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C C	C C	C C	C A	C A
13	gi|1035284789|gb|LTYI01038869	1652	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T A	T A
14	gi|1035284830|gb|LTYI01038828	6332	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
15	gi|1035284830|gb|LTYI01038828	6477	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
16	gi|1035285010|gb|LTYI01038648	4508	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
17	gi|1035285084|gb|LTYI01038574	1207	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	G G	G G
18	gi|1035285084|gb|LTYI01038574	1203	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	T T	T T
19	gi|1035285208|gb|LTYI01038450	2663	G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	G G	T T	T T
20	gi|1035285268|gb|LTYI01038390	3478	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
21	gi|1035285268|gb|LTYI01038390	3505	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
22	gi|1035285268|gb|LTYI01038390	3582	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
23	gi|1035285268|gb|LTYI01038390	3639	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
24	gi|1035285268|gb|LTYI01038390	3661	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
25	gi|1035285269|gb|LTYI01038389	1216	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C A	C A
26	gi|1035285322|gb|LTYI01038336	8461	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	? ?	C C	C C	C C	C T	C T
27	gi|1035285356|gb|LTYI01038302	660	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C T	C T
28	gi|1035285356|gb|LTYI01038302	705	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T G	T G
29	gi|1035285387|gb|LTYI01038271	4434	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C A	C A
30	gi|1035285454|gb|LTYI01038204	1272	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	G G	G G
31	gi|1035285792|gb|LTYI01037867	3695	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	A A	A A
32	gi|1035285792|gb|LTYI01037867	3745	T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	T T	A A	A A
33	gi|1035285803|gb|LTYI01037856	6559	C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C A	C A
34	gi|1035286005|gb|LTYI01037654	609	A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	A A	? ?	A A	A A	A A	T T	T T
35																

ภาพที่ 13 ตำแหน่ง SNPs แบบ mutation ที่พบเฉพาะในมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว

นำข้อมูลตำแหน่ง SNPs ที่ให้ความแตกต่าง (polymorphism) มาค้นหาชิ้นส่วนโครโมโซมบนฐานข้อมูล NCBI พบตรงกับโครโมโซมของมันสำปะหลังที่ใช้เป็นจีโนมอ้างอิง คือ *Manihot esculenta* cultivar AM560-2, whole genome shotgun sequence จำนวน 20 contig (ตารางที่ 3) โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวจะนำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ หรือชิ้นส่วนผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ตัวอย่างเช่น ข้อมูลลำดับตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ต่างที่ให้ลักษณะโฮโมไซโกต G และ T ในมันสำปะหลังแป้งเหนียว (ลำดับที่ 17 และ 18 ในภาพที่ 3) หมายเลข accesion gi|1035285084 ลำดับนิวคลีโอไทด์ G และ T ที่ตำแหน่ง 1,203 และ 1,207 เมื่อทำการค้นหาชิ้นส่วนโครโมโซมพบเป็นชิ้นส่วน *Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02252_contig_1, whole genome shotgun sequence (ภาพที่ 4) ซึ่งสามารถใช้ในคัดเลือก ระบุ หรือจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 3 ข้อมูลชิ้นส่วนโครโมโซมที่พบตำแหน่ง SNP ที่ให้ความแตกต่าง

ลำดับ	หมายเลข accession	ชิ้นส่วนโครโมโซม	ความยาว (คู่เบส)
1.	gi|1035283912	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02897_contig_1, whole genome shotgun sequence	2,850
2.	gi|1035283931	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02881_contig_1, whole genome shotgun sequence	3,324
3.	gi|1035284370	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02634_contig_1, whole genome shotgun sequence	2,809
4.	gi|1035284466	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02575_contig_1, whole genome shotgun sequence	7,063
5.	gi|1035284557	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02523_contig_1, whole genome shotgun sequence	7,296
6.	gi|1035284751	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02413_contig_1, whole genome shotgun sequence	7,932
7.	gi|1035284789	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02393_contig_2, whole genome shotgun sequence	2,050
8.	gi|1035284830	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02372_contig_1, whole genome shotgun sequence	8,221
9.	gi|1035285010	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02285_contig_1, whole genome shotgun sequence	5,019
10.	gi|1035285084	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02252_contig_1, whole genome shotgun sequence	9,124
11.	gi|1035285208	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02195_contig_2, whole genome shotgun sequence	3,006
12.	gi|1035285268	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02163_contig_2, whole genome shotgun sequence	7,272
13.	gi|1035285269	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02163_contig_1, whole genome shotgun sequence	1,572
14.	gi|1035285322	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02137_contig_1, whole genome shotgun sequence	10,031
15.	gi|1035285356	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02124_contig_1, whole genome shotgun sequence	4,194
16.	gi|1035285387	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02109_contig_1, whole genome shotgun sequence	10,373
17.	gi|1035285454	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02077_contig_1, whole genome shotgun sequence	10,759
18.	gi|1035285792	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold01925_contig_1, whole genome shotgun sequence	12,335
19.	gi|1035285803	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold01921_contig_1, whole genome shotgun sequence	9,917
20.	gi|1035286005	*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold01836_contig_3, whole genome shotgun sequence	1,463

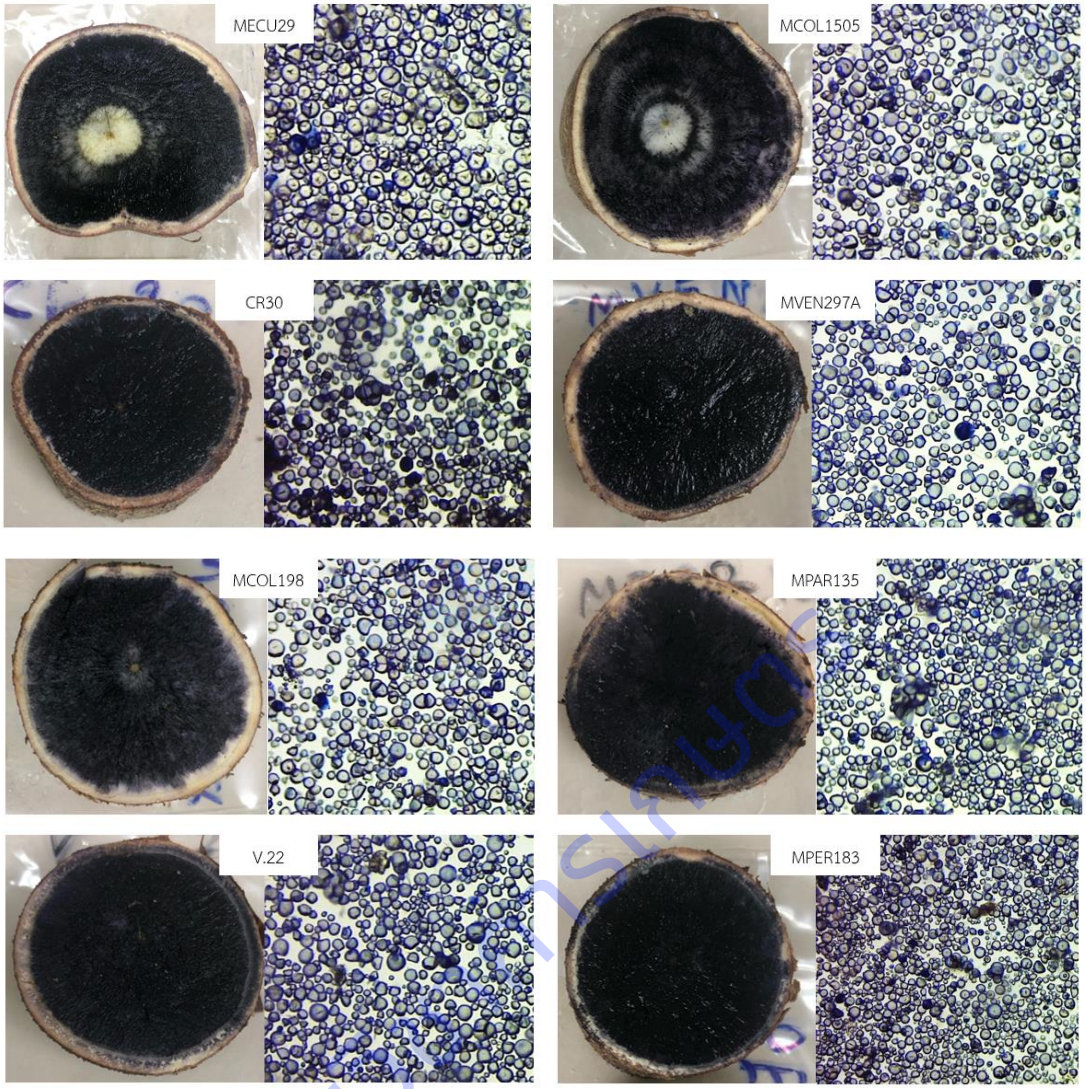
กรมวิทยาศาสตร์

ภาพที่ 14 ตัวอย่างตำแหน่ง SNPs ตำแหน่งที่ 1,203 และ 1,207 (แถบสีแดง) ของมันสำปะหลัง หมายเลข gi|1035285084 *Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02252_contig_1, whole genome shotgun sequence

กรมวิชาการเกษตร

4. การทดสอบแป้งในหัวมันสำปะหลังด้วยการย้อมสีไอโอดีน (Iodine Staining Test)

การตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวของมันสำปะหลังด้วยการย้อมสีไอโอดีน โดยนำตัวอย่างหัวมันสำปะหลังที่พบลักษณะจีโนไทป์เป็นแบบข่มร่วมและด้อย จำนวน 219 ตัวอย่าง (ตารางผนวกที่ 2) มาย้อมสีไอโอดีน โดยการพ่นด้วยสีไอโอดีน 20 เปอร์เซ็นต์ พบทุกตัวอย่างแสดงผลเป็นสีน้ำเงิน และเมื่อย้อมเม็ดแป้งที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียดด้วยไอโอดีน 12.5 เปอร์เซ็นต์ พบเม็ดแป้งเป็นสีน้ำเงินเช่นกัน (ภาพที่ 15) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) อาจไม่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งเหนียว ซึ่งสามารถใช้คัดเลือกประชากรรุ่นลูกที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว แต่ไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกกลุ่มประชากรอื่นได้ ทั้งนี้ตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์การค้ากับพันธุ์แป้งเหนียวโดยตรง เครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จึงสามารถใช้คัดเลือกลักษณะแป้งเหนียวในกลุ่มประชากรรุ่นลูกได้



ภาพที่ 15 ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการย้อมสีด้วยสีไอโอดีน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (Waxy starch) ในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลตามรายงาน Aiemnaka และคณะ (2012) ซึ่งมีลักษณะจีโนไทป์ของแป้งเหนียว(Waxy) เป็นแบบด้อย หรือ wxwx ผลการตรวจสอบในตัวอย่างมันสำปะหลัง จำนวนทั้งสิ้น 758 พันธุ์ จากแหล่งรวบรวมพันธุ์ (ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง) พบให้จีโนไทป์เป็นแบบ WxWx, Wxwx และ wxwx มีจำนวน 522 202 และ 17 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำไปตรวจสอบฟีโนไทป์ลักษณะแป้งเหนียวด้วยการย้อมสีไอโอดีน พบว่าหัวมันและเม็ดแป้งมันสำปะหลังจากตัวอย่างจีโนไทป์ Wxwx และ wxwx ปรากฏเป็นสีน้ำเงิน และไม่พบการเกิดสีน้ำตาลทั้งในตัวอย่างหัวมันและเม็ดแป้ง แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะแป้งเหนียวเฉพาะในกลุ่มประชากรที่มีพันธุ์ Waxy เป็นพ่อแม่พันธุ์เท่านั้น แต่ไม่สามารถใช้คัดเลือกตัวอย่างมันสำปะหลังนอกกลุ่มประชากรได้

2. ยีน *GBSSI* เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวในพืช จากการการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบมันสำปะหลังแป้งเหนียวพันธุ์ Waxy-HB1 ที่ได้จากมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย และพันธุ์การค้า (non-waxy) ได้แก่ ห้วยบง 80 และ เกษตรศาตร์ 50 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 229 เป็นแบบ T/G พบว่าพันธุ์มันสำปะหลัง non waxy เป็นตำแหน่ง G และพันธุ์ Waxy-HB1 เป็นตำแหน่ง T เมื่อนำไปแปลรหัสเป็นโปรตีนเป็นตำแหน่งโคดอน TGA (stop codon) ในส่วนของ coding gene จึงออกแบบไพรบไพรเมอร์ที่เฉพาะต่อลำดับเบส T/G มาตรวจสอบกับตัวอย่างมันสำปะหลังที่มีลักษณะจีโนไทป์แบบ Wxwx และ wxwx จำนวน 221 ตัวอย่าง ด้วยวิธี TaqMan probes ผลการตรวจสอบพบทุกตัวอย่างของพันธุ์ non waxy ไม่พบตำแหน่งเบส T แสดงให้เห็นว่าลักษณะแป้งเหนียวอาจเกิดจากการกลายของยีน *GBSSI* หรือยีนอื่นๆ ที่มีเฉพาะในพันธุ์ Waxy ซึ่งมีรายงานการกลายพันธุ์แบบ spontaneous mutation ที่ทำให้เกิดลักษณะแป้งเหนียว

3. การค้นหาและเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ด้วยวิธี GBS จากพันธุ์ปกติและพันธุ์แป้งเหนียว จำนวนทั้งสิ้น 13 ตัวอย่าง ได้ข้อมูลเครื่องหมาย SNPs แบบ Bi-Allelic จำนวน 19,057 ตำแหน่ง พบตำแหน่ง SNPs เฉพาะมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียวจำนวน 33 ตำแหน่ง แบ่งเป็น SNPs แบบเฮทเทอโรไซโกตจำนวน 26 ตำแหน่ง และแบบโฮโมไซโกตจำนวน 7 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถใช้ในคัดเลือก ระบุ หรือจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ต่อไป

4. มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทยมีมันสำปะหลังพันธุ์ Waxy หากนำมาผสมกับพันธุ์การค้าหรือพันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ต้องการ สามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) มาคัดเลือกลูกผสมที่ให้ลักษณะแป้งเหนียวได้ จึงเป็นอีกทางเลือกในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังแป้งเหนียวที่รวดเร็ว

5. ผลการทดลองที่ได้ตรงตามตัวชี้วัดที่ตั้งไว้ในปี 2563 คือ ได้พันธุ์มันสำปะหลังที่มีจีโนไทป์ลักษณะแป้งเหนียวเป็นแบบ Wxwx จำนวน 202 ตัวอย่าง และแบบ wxwx จำนวน 17 ตัวอย่าง แต่ไม่สามารถคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะแป้งเหนียวสำหรับการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงไม่พบมันสำปะหลังที่มีลักษณะฟีโนไทป์เป็นแป้งเหนียว จึงไม่สามารถจัดทำคู่ผสมและคัดเลือกลูกผสมสำหรับการวิจัยต่อไปในปี 2564 ได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์:

สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs จากยีน *GBSSI* และโพรบไพรเมอร์จากวิธี TaqMan probe ไปใช้ในการคัดเลือกลูกผสมระหว่างพันธุ์แป้งเหนียวจากมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทยกับพันธุ์การค้าหรือพันธุ์ดีของกรมวิชาการเกษตรได้ รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี GBS และได้ตำแหน่ง SNPs จำนวนมาก สามารถนำไปคาดเดา (predict) ด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ให้ได้ลักษณะอื่นๆ เช่น อะไมโลสสูง อะไมโลแพคตินสูง เป็นต้น เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ศรีวิชาการเกษตร

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างใบมันสำปะหลัง และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย นายฉลาด ไหวติง และนางสาวศุภรัสมิ์ พูลพัฒนสุวรรณ ที่ช่วยดำเนินงานวิจัยทั้งในส่วนของห้องปฏิบัติการและภาคสนาม เป็นอย่างดี

12. เอกสารอ้างอิง

จรุงสิทธ์ ลิ่มศิลา และคณะ. 2547. เอกสารวิชาการ มันสำปะหลัง. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตรจตุจักร กรุงเทพฯ. 124 หน้า.

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. 2558. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. AG-Bio ปีที่7 ฉบับที่ 3 เดือนกรกฎาคม-กันยายน 2558. หน้า 20-25.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2545. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/45. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เอกสารสถิติการเกษตรเลขที่ 3/2545.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ถนนพหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ. 269 หน้า

อรุโณทัย ซาววา สุภาวดี ง้อเหรียญ อัญชลี ศรีสุวรรณ ประพิศ วองเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118.

Abera, S. and S.K. Rakshit. 2003. Processing Technology Comperison of Physicochemical and Function Properties of Cassava Starch Extracted from Fresh Root and Dry Chips. Biosynthesis Nutrition Biomedical, Starch vol.55 Issue 7: 287-296.

Aiemnaka, P., A. Wongkaew, J. Chanthaworn, S.K. Nagashima, S. Boonma, J. Authapun. S. Jenweerawat, P. Kongsila, P. Kittipadakul, S. Nakasathien, T. Sreewongchai, W. Wannarat, V. Vichukit, L.A.B. Lopez-Lavalle, H. Ceballos, C. Rojanaridpiched and C. Phumichai. 2012. Molecular Characterization of a Spontaneous Waxy Starch Mutation in Cassava. Crop Science, Vol.52: 2121-2130.

Lodhi, Muhammad A., Guang-NingYe, Norman F.Weeden and Bruce I.Reisch.1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine Cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. Plant Molecular Biology Reporter 12(1): 6-13.

Merida, A., J.M. Rodriguez-Galan, C. Vincent and J.M. Remero. 1999. Expression of the Granule-Bound Starch Synthase I (*Waxy*) Gene from Snapdragon Is Developmentally and Circadian Clock Regulated. Plant Physiol. 120(2): 401-410.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Nakasathien Sutkhet. 2009. Development of Innovative Trait of Thai Waxy-Starch Cassava Variety for Industrial Uses and Export. Thai Tapioca Starch Association 2009. 3 pages

Parveen, I., H.K. Signh., S. Raghuvanshi and U.C. Pradhan. 2011. DNA barcoding of endangered Indian Paphiopedilum species. Molecular Ecology Resources. Doi:10.1111/j.1775-0998.2011.03071.x. 9 pages.

Roa, A.C., M.M. Maya, M.C. Duque, J. Tohme. A.C. Allem & M.W. Bonierbale, 1997. AFLP analysis of relationship among cassava and other *Manihot* species. Theor Appl Genet 95: 741-750.

Sanchez, T., D. Dufour, I.X. Moreno and H. Ceballos. 2010. Comparison of Pasting and Gel Stabilities of Waxy and Normal Starches from Potato, Maize, and Rice with Those of a Novel Waxy Cassava Starch under Thermal, Chemical, and Mechanical Stress. J. Agric. Food Chem., *58* (8): 5093–5099.

Shen, G.-Q., K. G. Abdullah and Q. K. Wang. 2009. The TaqMan Method for SNP Genotyping. Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols. A. A. Komar. Totowa, NJ, Humana Press: 293-306.

Woodward, J. 2014. Bi-Allelic SNP Genotyping Using the TaqMan® Assay. Crop Breeding: Methods and Protocols. D. Fleury and R. Whitford. New York, NY, Springer New York: 67-74.

Zhao, s., H. Ceballos, D. Dufour, T. Sanchez and P. Zhang. 2011. Development of waxy cassava with different biological and physio-chemical characteristics of starches for industrial applications. Biotechnol, Bioeng 108(8): 1925-1935.

กรมวิชาการเกษตร

13. ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 758 ตัวอย่าง

No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง
1	CMH 22-04-1Q	26	29-77-5	51	CM 2772-3	76	CM 523-7
2	CMH 22-77-1	27	35-77-17	52	CM 305-15	77	CM 5257-33
3	(CMC76xR) 21-18Q	28	35-77-18	53	CM 323-375	78	CM 5286-3
4	(JK x R) 13	29	35-77-22	54	CM 323-87	79	CM 6125-117
5	(JK x R) 21	30	36-77-1	55	CM 3292-18	80	CM 6125-125
6	(R x CMC 84) 21-1Q	31	42-77-69	56	CM 3299-14	81	CM 681-2
7	(R x CMC 84) 21-5Q	32	56/5	57	CM 3299-15	82	CM 781-2
8	(R x Hanatee) 21-21Q	33	ADIRA 4 (6)	58	CM 3299-22	83	CM 849-1
9	(R x V69) 21-2Q	34	BATRANG	59	CM 3299-4	84	CM 922-2
10	(RxV4C)21-4Q (5)	35	CG 1141-1	60	CM 3306-3	85	CMC 72
11	(V1 x R) 20-15	36	CG 1355-2	61	CM 3306-4	86	CMC 84
12	(V1 x R) 20-20	37	CG 1-37	62	CM 3306-9	87	CMH 22-04-4
13	(V1 x R) 21-11	38	CG 1-37	63	CM 3311-3	88	CMK 23-27-30
14	(V1 x R) 21-8	39	CG 1372-5	64	CM 3372-4	89	CMK 23-67-313
15	(V1xR)20-27 (6)	40	CG 1-56	65	CM 342-55	90	CMK 23-70-3
16	(V3 x R) 20-10	41	CG 165-7	66	CM 4049 UJ	91	CMK(R x CMC 76) 21-235
17	(V3 x R) 20-15	42	CG 402-11	67	CM 407-30	92	CMR 23-07-10
18	(V3 x R) 20-19	43	CG 5-79	68	CM 451-1	93	CMR 23-08-8
19	(V3 x R) 21-16	44	CG 7-64	69	CM 451-1 (2)	94	CMR 23-102-65
20	(V31 x CMC 76) 21-2	45	CG 915-1	70	CM 4574-7	95	CMR 23-107-4
21	(V3xR)20-19	46	CG 996-6	71	CM 4729-4	96	CMR 23-113-14
22	(V7 x R) 21-4Q	47	CM 125-22	72	CM 4777-2 (1)	97	CMR 23-117-4
23	01-77-1	48	CM 1999-5	73	CM 4777-2 (ciat)	98	CMR 23-126-120
24	27-77-10	49	CM 2502-4 (ไทย)	74	CM 4955-27	99	CMR 23-126-122
25	29-77-19	50	CM 2766-3	75	CM 507-37	100	CMR 23-126-161

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 758 ตัวอย่าง

No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง
101	CMR 23-126-17	126	CMR 25-106-26	151	CMR 30-05-12	176	CMR 35-112-1
102	CMR 23-149-117	127	CMR 25-24-384	152	CMR 30-115-5	177	CMR 35-123-147
103	CMR 23-149-118	128	CMR 25-30-194Q	153	CMR 30-238-34	178	CMR 35-21-199
104	CMR 23-149-128	129	CMR 25-32-365Q (4)	154	CMR 31-01-143	179	CMR 35-21-36
105	CMR 23-149-139	130	CMR 25-32-429Q	155	CMR 31-06-103	180	CMR 35-21-96
106	CMR 23-149-59	131	CMR 25-32-502Q	156	CMR 31-06-104	181	CMR 35-22-348
107	CMR 23-149-67	132	CMR 25-33-105	157	CMR 31-09-71	182	CMR 35-23-76
108	CMR 23-17-276	133	CMR 25-33-134Q	158	CMR 31-19-14	183	CMR 35-26-303
109	CMR 23-17-51	134	CMR 25-34-112	159	CMR 31-37-105	184	CMR 35-26-369
110	CMR 23-20-23Q	135	CMR 25-34-159	160	CMR 31-42-20	185	CMR 35-91-63
111	CMR 23-26-2	136	CMR 25-38-157Q	161	CMR 32-24-20	186	CMR 36-25-67
112	CMR 23-281-141	137	CMR 25-55-28	162	CMR 32-94-121	187	CMR 36-30-329
113	CMR 23-51-10	138	CMR 25-82-88	163	CMR 33-18-101	188	CMR 36-31-381
114	CMR 23-51-37	139	CMR 26-08-61	164	CMR 33-35-13	189	CMR 36-55-166
115	CMR 23-84-8	140	CMR 26-38-7	165	CMR 33-35-69	190	CMR 36-71-27
116	CMR 24-14-1308	141	CMR 26-65-13	166	CMR 33-38-48	191	CMR 37-18-201
117	CMR 24-14-183	142	CMR 26-65-192	167	CMR 33-53-181	192	CMR 37-18-30
118	CMR 24-14-266	143	CMR 26-69-79	168	CMR 34-35-36	193	CMR 37-18-63
119	CMR 24-14-317	144	CMR 26-72-2	169	CMR 34-35-54	194	CMR 38-106-32
120	CMR 24-14-367	145	CMR 28-05-13	170	CMR 34-40-43	195	CMR 38-125-77
121	CMR 24-43-36	146	CMR 28-67-76	171	CMR 34-44-40	196	CMR 38-66-1
122	CMR 24-89-65	147	CMR 28-72-131	172	CMR 34-79-152	197	CR 1
123	CMR 25-104-42	148	CMR 29-56-101	173	CMR 34-79-48	198	CR 100
124	CMR 25-105-128Q	149	CMR 29-60-15	174	CMR 34-82-41	199	CR 101
125	CMR 25-105-47	150	CMR 29-67-21	175	CMR 35-105-2	200	CR 12

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 758 ตัวอย่าง

No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง
201	CR 126	226	Java 2	251	MBRA 165	276	MBRA 435 (2)
202	CR 17-193	227	Java 5	252	MBRA 172	277	MBRA 461
203	CR 17-82	228	K.K. 1	253	MBRA 18	278	MBRA 467
204	CR 18	229	Kaset	254	MBRA 190	279	MBRA 474
205	CR 24	230	KM 140	255	MBRA 191	280	MBRA 475
206	CR 25	231	KM 94	256	MBRA 217	281	MBRA 507
207	CR 30	232	KM 98-1	257	MBRA 233	282	MBRA 509
208	CR 35	233	Kraburi	258	MBRA 237	283	MBRA 512
209	CR 59	234	KU 50	259	MBRA 242	284	MBRA 514
210	CR 61	235	MARG 11	260	MBRA 243	285	MBRA 522
211	CR 63	236	MARG 12 (1)	261	MBRA 258	286	MBRA 530
212	CR 65	237	MARG 15	262	MBRA 273	287	MBRA 534
213	CR 79	238	MARG 2	263	MBRA 311	288	MBRA 542
214	Gloden Yellow	239	MARG 6	264	MBRA 315	289	MBRA 590
215	GR 891	240	MARG 7	265	MBRA 325	290	MBRA 658
216	H.P. 1	241	MARG 9	266	MBRA 329	291	MBRA 658
217	H.P. 2	242	MBOL 1	267	MBRA 335	292	MBRA 671
218	H.P. 5 (CM 305-13)	243	MBRA 110	268	MBRA 356	293	MBRA 675
219	H.P. 7 (CMC 76)	244	MBRA 12	269	MBRA 359	294	MBRA 691
220	H.P. 8 (VIC)	245	MBRA 12	270	MBRA 383	295	MBRA 692
221	Hanatee	246	MBRA 125	271	MBRA 400	296	MBRA 697
222	HB 60	247	MBRA 130	272	MBRA 403	297	MBRA 698
223	HB 80	248	MBRA 132	273	MBRA 404	298	MBRA 702
224	HL 23	249	MBRA 158	274	MBRA 405	299	MBRA 712
225	Indonesia	250	MBRA 162	275	MBRA 416	300	MBRA 73

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิทยาศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 758 ตัวอย่าง

No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง
301	MBRA 730	326	MCHN 2	351	MCOL 1486	376	MCOL 2019
302	MBRA 759	327	MCOL 1055	352	MCOL 1489	377	MCOL 2025
303	MBRA 77	328	MCOL 1061	353	MCOL 1493	378	MCOL 2056
304	MBRA 781	329	MCOL 1062 A	354	MCOL 1505	379	MCOL 2089
305	MBRA 792	330	MCOL 1074 A	355	MCOL 1516	380	MCOL 2128
306	MBRA 829	331	MCOL 1084 B	356	MCOL 1517	381	MCOL 2131
307	MBRA 839	332	MCOL 1098	357	MCOL 1535	382	MCOL 2144
308	MBRA 85	333	MCOL 1107	358	MCOL 1566	383	MCOL 2157
309	MBRA 852	334	MCOL 1108	359	MCOL 1667	384	MCOL 2173
310	MBRA 854	335	MCOL 112 (4)	360	MCOL 1684	385	MCOL 2177
311	MBRA 885	336	MCOL 1132	361	MCOL 1702	386	MCOL 2182
312	MBRA 887	337	MCOL 1137	362	MCOL 1722	387	MCOL 2192
313	MBRA 890	338	MCOL 1178	363	MCOL 1734	388	MCOL 22
314	MBRA 891 (3)	339	MCOL 1185	364	MCOL 1736	389	MCOL 2212
315	MBRA 894	340	MCOL 1186 A	365	MCOL 1752	390	MCOL 2215
316	MBRA 897	341	MCOL 1344	366	MCOL 1754	391	MCOL 2245
317	MBRA 897	342	MCOL 1357	367	MCOL 1780	392	MCOL 226 A
318	MBRA 900	343	MCOL 1389	368	MCOL 1786	393	MCOL 226 B
319	MBRA 903	344	MCOL 1398	369	MCOL 1795	394	MCOL 2306
320	MBRA 915	345	MCOL 1413	370	MCOL 1805	395	MCOL 2315
321	MBRA 916	346	MCOL 1442	371	MCOL 1853	396	MCOL 2331
322	MBRA 924	347	MCOL 1459	372	MCOL 1890	397	MCOL 2360
323	MBRA 927	348	MCOL 1466	373	MCOL 1964	398	MCOL 2387
324	MBRA 931	349	MCOL 1467	374	MCOL 1968	399	MCOL 2409
325	MCHN 1	350	MCOL 148	375	MCOL 198	400	MCOL 2426

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 758 ตัวอย่าง

No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง
401	MCOL 2469	426	MCOL 608	451	MCUB 16 (5)	476	MECU 141 A
402	MCOL 2485	427	MCOL 651 B	452	MCUB 23	477	MECU 150
403	MCOL 2493	428	MCOL 690-75-33	453	MCUB 29	478	MECU 151
404	MCOL 2510	429	MCOL 707	454	MCUB 32	479	MECU 159
405	MCOL 2526	430	MCOL 712	455	MCUB 36	480	MECU 165
406	MCOL 2550	431	MCOL 72	456	MCUB 39	481	MECU 183
407	MCOL 2627	432	MCOL 725 (3)	457	MCUB 40	482	MECU 187
408	MCOL 2638	433	MCOL 774(2)	458	MCUB 42	483	MECU 23
409	MCOL 278	434	MCOL 802 (2)	459	MCUB 46	484	MECU 29
410	MCOL 304	435	MCOL 803	460	MCUB 5	485	MECU 31
411	MCOL 306	436	MCOL 809 B	461	MCUB 51	486	MECU 33
412	MCOL 310	437	MCOL 856	462	MCUB 53	487	MECU 41
413	MCOL 32	438	MCOL 87 (6)	463	MCUB 56	488	MECU 50 (7)
414	MCOL 346	439	MCOL 878	464	MCUB 58	489	MECU 71
415	MCOL 40	440	MCOL 890	465	MCUB 74	490	MECU 71
416	MCOL 40 C	441	MCOL 912 B	466	MCUB 8	491	MECU 72
417	MCOL 451	442	MCOL 922	467	MCUB 8	492	MENTE GA
418	MCOL 474	443	MCOL 941	468	MDOM 2	493	MFJI 4
419	MCOL 490	444	MCOL 955	469	MDOM 4	494	MFJI 6
420	MCOL 497	445	MCOL 965	470	MDOM 5	495	MGUA 12
421	MCOL 511	446	MCOL 976	471	MECU 10	496	MGUA 15
422	MCOL 527	447	MCOL 978	472	MECU 104	497	MGUA 22
423	MCOL 534 A	448	MCOL 979	473	MECU 117	498	MGUA 35
424	MCOL 585	449	MCOL 985	474	MECU 135	499	MGUA 41
425	MCOL 590	450	MCUB 16	475	MECU 141	500	MGUA 44

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 758 ตัวอย่าง

No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง
501	MGUA 6	526	MMAL 42	551	MNGA 16	576	MPAR 183
502	MGUA 62	527	MMAL 59	552	MNGA 2	577	MPAR 193
503	MGUA 63	528	MMAL 60 ปกติ	553	MPAN 127	578	MPAR 2
504	MGUA 74	529	MMAL 60 ย.	554	MPAN 131	579	MPAR 23
505	MGUA 78	530	MMAL 63	555	MPAN 137	580	MPAR 25
506	MHMC 1	531	MMAL 66	556	MPAN 51	581	MPAR 32
507	MIND 26	532	MMEX 102	557	MPAN 70	582	MPAR 36
508	MIND 27	533	MMEX 17	558	MPAN 97	583	MPAR 38
509	MIND 3	534	MMEX 2	559	MPAR 1	584	MPAR 4
510	MIND 33	535	MMEX 27	560	MPAR 101	585	MPAR 41
511	MIND 4	536	MMEX 36	561	MPAR 104	586	MPAR 51
512	MIND 8	537	MMEX 43 (1)	562	MPAR 105	587	MPAR 57
513	MKU 2-151	538	MMEX 45	563	MPAR 109	588	MPAR 57
514	MKU 2-162	539	MMEX 49	564	MPAR 109 (3)	589	MPAR 68
515	MKUC 28-71-66	540	MMEX 54	565	MPAR 110	590	MPAR 69
516	MKUC 28-71-67	541	MMEX 6	566	MPAR 119	591	MPAR 7
517	MMAL 1	542	MMEX 65	567	MPAR 135	592	MPAR 71
518	MMAL 13	543	MMEX 71 ล.	568	MPAR 15	593	MPAR 75
519	MMAL 2	544	MMEX 8	569	MPAR 150	594	MPAR 98
520	MMAL 24	545	MMEX 80	570	MPAR 152	595	MPER 178
521	MMAL 26	546	MMEX 86	571	MPAR 156	596	MPER 179
522	MMAL 27	547	MMEX 92	572	MPAR 161	597	MPER 183
523	MMAL 29	548	MMEX 95	573	MPAR 162	598	MPER 184
524	MMAL 35	549	MMEX 96	574	MPAR 163	599	MPER 192
525	MMAL 38	550	MNGA 1	575	MPAR 18	600	MPER 196

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 758 ตัวอย่าง

No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง
601	MPER 205	626	MPER 347	651	MPER 569	676	MVEN 167
602	MPER 206	627	MPER 349	652	MPER 589 (5)	677	MVEN 173
603	MPER 209	628	MPER 353	653	MPER 593	678	MVEN 174
604	MPER 212	629	MPER 368	654	MPER 597	679	MVEN 180
605	MPER 213	630	MPER 370 (5)	655	MPER 613	680	MVEN 183
606	MPER 221	631	MPER 377	656	MPHI 3	681	MVEN 183
607	MPER 226	632	MPER 378	657	MPHI 4	682	MVEN 185
608	MPER 229	633	MPER 383	658	MPTR 19	683	MVEN 192
609	MPER 232	634	MPER 390	659	MPTR 26	684	MVEN 200
610	MPER 234	635	MPER 436	660	MPTR 49	685	MVEN 204
611	MPER 241	636	MPER 436	661	MPTR 8	686	MVEN 208
612	MPER 243	637	MPER 438	662	MTAI 1	687	MVEN 210
613	MPER 255	638	MPER 449	663	MTAI 2	688	MVEN 210
614	MPER 259	639	MPER 458	664	MTAI 3	689	MVEN 217
615	MPER 278	640	MPER 465	665	MTAI 8	690	MVEN 219
616	MPER 279	641	MPER 484	666	MUSA 4	691	MVEN 219
617	MPER 281	642	MPER 488	667	MUSA 5	692	MVEN 23
618	MPER 283	643	MPER 489	668	MUSA 7	693	MVEN 232
619	MPER 293	644	MPER 496	669	MUSA 8	694	MVEN 24
620	MPER 295	645	MPER 503	670	MVEN 117 B	695	MVEN 244
621	MPER 297	646	MPER 534	671	MVEN 130	696	MVEN 25
622	MPER 315	647	MPER 542	672	MVEN 134	697	MVEN 276
623	MPER 325	648	MPER 546	673	MVEN 151	698	MVEN 284 B
624	MPER 328	649	MPER 552	674	MVEN 156	699	MVEN 292
625	MPER 333	650	MPER 556	675	MVEN 164	700	MVEN 297 A

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 758 ตัวอย่าง

No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง
701	MVEN 298	716	MVEN 69	731	OMR 26-14-9	746	R 7
702	MVEN 309	717	MVEN 76	732	OMR 28-97-31	747	R 72
703	MVEN 321	718	MVEN 77	733	OMR 29-19-129	748	R 86-13
704	MVEN 322	719	MVEN 82	734	OMR 29-20-118	749	R 9
705	MVEN 329 A	720	MVEV 128	735	OMR 29-27-5	750	R 90
706	MVEN 330	721	NANZHI 199	736	OMR 32-12-19 (1)	751	V. 11
707	MVEN 332	722	NEP	737	OMR 34-25-26	752	V. 14
708	MVEN 332	723	No.3 x CM 407-24-4	738	OMR 34-29-66	753	V. 22
709	MVEN 36	724	O.P. 1106	739	OMR 38-75-52	754	V. 24
710	MVEN 40 B	725	O.P. 608	740	R 1	755	V. 25
711	MVEN 45 A	726	O.P. 705	741	R 11	756	V. 2596
712	MVEN 47	727	OMR 23-05-3	742	R 2	757	V. 2C
713	MVEN 50	728	OMR 24-07-12	743	R 3	758	V. 30
714	MVEN 67 B	729	OMR 24-87-34	744	R 5		
715	MVEN 68	730	OMR 26-07-15	745	R 60		

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 2 ผลการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง
1	Recessive	MECU72	26	Co-dominant	CM4049UJ
2	Recessive	CR79	27	Co-dominant	29-77-5
3	Recessive	MECU31	28	Co-dominant	CMR 26-69-79
4	Recessive	MVAN276	29	Co-dominant	CMK 23-67-313
5	Recessive	MPAR 41	30	Co-dominant	CM3299-22
6	Recessive	V. 22	31	Co-dominant	CM342-55
7	Recessive	(JK x R) 13	32	Co-dominant	CMR 31-19-14
8	Recessive	MCOL 198	33	Co-dominant	(V3xR)21-16
9	Recessive	CM 5286-3	34	Co-dominant	CM4777-2 (CIAT)
10	Recessive	CR 30	35	Co-dominant	CM323-375
11	Recessive	MCOL 912 B	36	Co-dominant	CMR 33-53-181
12	Recessive	MCOL 1178	37	Co-dominant	27-77-10
13	Recessive	MECU 10	38	Co-dominant	MBRA658
14	Recessive	MCUB 42	39	Co-dominant	MCOL1466
15	Recessive	MECU 29*	40	Co-dominant	MPER212
16	Recessive	MPER 279	41	Co-dominant	MPER349
17	Recessive	MPAR 135	42	Co-dominant	MMEX54
18	Co-dominant	R60	43	Co-dominant	MCOL802*
19	Co-dominant	BATRANG	44	Co-dominant	MECU183
20	Co-dominant	CMR 25-32-429Q	45	Co-dominant	MCU141A
21	Co-dominant	CMR 28-72-131	46	Co-dominant	MBRA217
22	Co-dominant	CMR 26-69-79	47	Co-dominant	MCUB16
23	Co-dominant	CMR 23-17-276	48	Co-dominant	MCUB53
24	Co-dominant	CM 3299-22	49	Co-dominant	MMAL42
25	Co-dominant	CMR 31-19-14	50	Co-dominant	MBRA461

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ) ผลการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง
51	Co-dominant	(V3xR) 20-19	76	Co-dominant	CMR 25-34-112
52	Co-dominant	ADJRA4(6)	77	Co-dominant	CMR 23-20-23Q
53	Co-dominant	35-77-18	78	Co-dominant	CMR 23-107-4
54	Co-dominant	MCOL1098	79	Co-dominant	CMR 25-33-134Q
55	Co-dominant	MVEN297A	80	Co-dominant	(V3xR)21-16
56	Co-dominant	MCOL965	81	Co-dominant	MVEN117B
57	Co-dominant	MECU23	82	Co-dominant	MCOL1467
58	Co-dominant	MCOL2177	83	Co-dominant	CMR 29-67-21
59	Co-dominant	MFJI4	84	Co-dominant	CM4777-2 (CIAT)
60	Co-dominant	MCOL979	85	Co-dominant	SC8
61	Co-dominant	MPER353	86	Co-dominant	MECU33
62	Co-dominant	MCOL1968	87	Co-dominant	MPAR156
63	Co-dominant	MCOL1667	88	Co-dominant	CR59
64	Co-dominant	MMAL38	89	Co-dominant	CMR 25-104-42
65	Co-dominant	MOCL976	90	Co-dominant	SR 18-127
66	Co-dominant	MUSA8	91	Co-dominant	MPER 259
67	Co-dominant	MMAL24	92	Co-dominant	MPAR 18
68	Co-dominant	MMEX49	93	Co-dominant	MCOL 978
69	Co-dominant	MECU165	94	Co-dominant	MECU 29
70	Co-dominant	MCOL490	95	Co-dominant	MCOL 2019
71	Co-dominant	MPER542	96	Co-dominant	MVEN 77
72	Co-dominant	MVEN210	97	Co-dominant	MPAN 131
73	Co-dominant	CR19*	98	Co-dominant	MTAI 8
74	Co-dominant	MCOL1566	99	Co-dominant	CR 100
75	Co-dominant	MCOL1178	100	Co-dominant	MCOL 1734

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ) ผลการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง
101	Co-dominant	V.30	126	Co-dominant	CR 35
102	Co-dominant	R2	127	Co-dominant	MBRA 467 (5)
103	Co-dominant	CMR 30-05-12	128	Co-dominant	MPER 370 (5)
104	Co-dominant	CMR 35-26-369	129	Co-dominant	V. 2C
105	Co-dominant	CM3306-3	130	Co-dominant	OMR 26-07-15
106	Co-dominant	CMR 26-65-192	131	Co-dominant	CMR 38-125-77
107	Co-dominant	29-77-19	132	Co-dominant	Java 5
108	Co-dominant	CM 3299-4	133	Co-dominant	MCOL 32
109	Co-dominant	MCOL 2331	134	Co-dominant	MCOL 22
110	Co-dominant	MCOL 1964	135	Co-dominant	MCUB 8
111	Co-dominant	MPAR 68	136	Co-dominant	MARG 9
112	Co-dominant	MCOL 2056	137	Co-dominant	MPAR 51
113	Co-dominant	MCOL 2331	138	Co-dominant	MPAR 38
114	Co-dominant	CM 1999-5	139	Co-dominant	MPER 489
115	Co-dominant	MMEX 96	140	Co-dominant	MBRA 77
116	Co-dominant	MBRA 881*	141	Co-dominant	MMEX 65
117	Co-dominant	MMAL 60 ย.	142	Co-dominant	MPER 243
118	Co-dominant	MCOL 198	143	Co-dominant	MBRA 162
119	Co-dominant	CMR 34-82-41	144	Co-dominant	MCOL 1780
120	Co-dominant	MPAR 18	145	Co-dominant	MCOL 1055
121	Co-dominant	MKU 2-151	146	Co-dominant	MPAN 51
122	Co-dominant	Indonesia	147	Co-dominant	MARG 11
123	Co-dominant	CMR 38-66-1	148	Co-dominant	MGUA 44
124	Co-dominant	MKU 2-162	149	Co-dominant	MUSA 7
125	Co-dominant	Kraburi	150	Co-dominant	MBRA 897

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ) ผลการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง
151	Co-dominant	MECU 159	176	Co-dominant	MPAR 69
152	Co-dominant	SG 107-35	177	Co-dominant	MBRA 273
153	Co-dominant	MPER 281	178	Co-dominant	MCOL 2212
154	Co-dominant	MBRA 383	179	Co-dominant	MBRA 311
155	Co-dominant	MPAN 127	180	Co-dominant	MCOL 941
156	Co-dominant	MCOL 2331	181	Co-dominant	MIND 3
157	Co-dominant	MARG 2	182	Co-dominant	MCOL 2306
158	Co-dominant	MPER 465	183	Co-dominant	MVEN 23
159	Co-dominant	MUSA 4	184	Co-dominant	MPER 281
160	Co-dominant	MMAL 27	185	Co-dominant	MBRA 461
161	Co-dominant	MCOL 72	186	Co-dominant	MCOL 1413
162	Co-dominant	MCOL 226 B	187	Co-dominant	MBRA 590
163	Co-dominant	MBRA 243	188	Co-dominant	MBRA 165
164	Co-dominant	MMEX 96	189	Co-dominant	CM 3372-4
165	Co-dominant	MPAN 137	190	Co-dominant	MCOL 922
166	Co-dominant	MCOL 474	191	Co-dominant	MBRA 467
167	Co-dominant	MVEN 151	192	Co-dominant	MBRA 769
168	Co-dominant	MBRA 692	193	Co-dominant	MPER 283
169	Co-dominant	MPER 293	194	Co-dominant	MMEX 49
170	Co-dominant	CG 996-6	195	Co-dominant	CR 101
171	Co-dominant	MPER 293	196	Co-dominant	MGUA 12
172	Co-dominant	MCOL 802*	197	Co-dominant	CG 165-7
173	Co-dominant	MGUA 78	198	Co-dominant	MPAR 71
174	Co-dominant	MPAR 163	199	Co-dominant	MPER 325
175	Co-dominant	MBRA 887	200	Co-dominant	MPER 179

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ) ผลการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง
201	Co-dominant	SM 1541-32	211	Co-dominant	MCOL 2019
202	Co-dominant	OMR 26-14-9	212	Co-dominant	MBRA 404
203	Co-dominant	MCOL 585	213	Co-dominant	MMAL 29
204	Co-dominant	(V1 x R) 20-20	214	Co-dominant	MBRA 915
205	Co-dominant	Java 2	215	Co-dominant	MCOL 2144
206	Co-dominant	MPAR 150	216	Co-dominant	MPAR 1
207	Co-dominant	MBRA 882*	217	Co-dominant	CR 24
208	Co-dominant	MBRA 258	218	Co-dominant	MCOL 451
209	Co-dominant	MBRA 507	219	Co-dominant	(V31 x CMC 76) 21-2
210	Co-dominant	MMEX 8			

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร