รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

Biotechnology for Identification and Crop Improvement in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.)

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสุภาวดี ง้อเหรียญ

MRS. SUPHAWADEE NGORIAN

พ.ศ. 2564

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

Biotechnology for Identification and Crop Improvement in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.)

กรมวิชาการเกษตร

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสุภาวดี ง้อเหรียญ

MRS. SUPHAWADEE NGORIAN

พ.ศ. 2564

คำปรารภ

รายงานโครงการวิจัยเรื่อง เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง เป็นรายงานผลงานวิจัย ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2561 - กันยายน 2564 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังสำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์และการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง และ 2) เพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบลท์ โรคใบด่าง โรครากปม ให้มีผลผลิตและปริมาณแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ และลักษณะแป้งเหนียว โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ ประกอบด้วย เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่เหมาะสมสำหรับใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ phylogenetic tree ที่จัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง สำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง เครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะการต้านทานต่อโรค ได้แก่ แบคทีเรียลไบลท์ ใบด่าง (CMD) รากปม และลักษณะสำคัญทางการเกษตร ได้แก่ ผลผลิตและแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ และแป้งเหนียว และได้ข้อมูลทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะสำคัญทางการเกษตรดังกล่าว โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้จะเป็นตัวช่วยสำคัญในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น อีกทั้งยังช่วยร่นระยะเวลาขั้นตอน และค่าใช้จ่ายในการปรับปรุงพันธุ์ลงได้

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานเล่มนี้จะมีประโยชน์แก่นักวิจัย นักวิชาการเกษตร ตลอดจนเกษตรกร และผู้สนใจโดยทั่วไป ที่จะได้ศึกษาและนำเทคโนโลยีที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

(นางสุภาวดี ง้อเหรียญ)

หัวหน้าโครงการฯ

28 กุมภาพันธ์ 2565

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		1
ผู้วิจัย		2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ		3
บทนำ		4
บทคัดย่อ		7
การทดลองที่ 1	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR	10
การทดลองที่ 2	การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ของมันสำปะหลังด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด EST-SSRs	41
การทดลองที่ 3	การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง Cassava Mosaic Disease (CMD)	76
การทดลองที่ 4	การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล	119
การทดลองที่ 5	การใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง	148
การทดลองที่ 6	การตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (waxy starch) ในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล	201
การทดลองที่ 7	การพัฒนาเครื่องหมายยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งที่สัมพันธ์กับน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง	223
บทสรุปและข้อเสนอแนะ		244
บรรณานุกรม		249
ภาคผนวก		258

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเริ่มดำเนินการในปี 2561 – 2564 จนบรรลุวัตถุประสงค์ โดยได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัยสำนักงานวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัย กรมวิชาการเกษตร โดยสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองที่อนุเคราะห์แหล่งพันธุกรรมมันสำปะหลังสำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ นักวิจัยและผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยเหลืองานวิจัยในด้านต่างๆ นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ได้ให้การสนับสนุนงานในด้านอื่นๆ แต่มิได้เอ่ยนามไว้ ซึ่งล้วนมีส่วนช่วยส่งเสริมให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินงานจนประสบผลสำเร็จ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย

1. นางสุภาวดี ง้อเหรียญ	Suphawadee Ngorian	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
2. นางสาวบุญเรือนรัตน์ เพียรงาน	Boonreunrat Peanngan	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
3. นางสาวจีราพร แก่นทรัพย์	Jeeraporn Kansup	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
4. นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ	Mallika Kaewwises	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
5. นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	Adcharapun Chaicharoen	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
6. นางสาวอรุโณทัย ซาววา	Aroonothai Sawwa	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
7. นางสาววิภาวี ชั้นโรจน์	Vipavee Chanroj	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
8. นางสุวลักษณ์ อะมะวัลย์	Suwaluk Amawan	ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
9. นางสาวกุสุมา รอดแผ้วพาน	Kusuma Rodpeawpan	ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
10. นายภานุวัฒน์ มูลจันทะ	Panuwat Moonjuntha	ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
11. นางสาวศิริลักษณ์ ล้านแก้ว	Sirilux Lankaew	ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
12. นางจิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข	Jinnajar Hansethasuk	ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
13. นางประพิศ วองเทียม	Prapit Wongtiem	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 อุบลราชธานี
14. นางสาวกฤตยา เพชรผึ้ง	Krittaya Petchpoung	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
15. นายกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ	Kittipat Ukoskit	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

กรมวิชาการเกษตร

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ม.ล. = มิลลิลิตร	ก.ก. = กิโลกรัม	ซ.ม. = เซนติเมตร
ชม. = ชั่วโมง	% = เปอร์เซ็นต์	°C = องศาเซลเซียส
µl = ไมโครลิตร	µM = ไมโครโมล	ml = มิลลิลิตร
L = ลิตร	mM = Millimoles	ng = นาโนกรัม
mg = มิลลิกรัม	g = กรัม	kg = กิโลกรัม
rpm = จำนวนรอบต่อนาที	U/mL = Unit/mL	nm =*nanometers*

OD_{600}= optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

มันสำปะหลัง (Manihot esculenta Crantz.) จัดเป็นพืชอาหารที่สำคัญของโลกและเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในประเทศไทย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ตั้งแต่ส่วนยอดจนถึงรากสะสมอาหาร แป้งมันสำปะหลังสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์ นอกจากนี้ยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และพลังงานทดแทน ปัจจุบันมันสำปะหลังกำลังประสบปัญหาจากโรคและแมลงส่งผลกระทบต่อผลผลิตมันสำปะหลังโดยตรง ได้แก่ โรคใบด่างมันสำปะหลัง (CMD) เกิดจากเชื้อไวรัส Cassava mosaic virus (CMV) มีแมลงหวี่ขาวเป็นพาหะนำโรค พบปัญหาการแพร่ระบาดในเขตพื้นที่ประเทศกัมพูชา ซึ่งมีชายแดนติดกับประเทศไทย โดยมันสำปะหลังที่เป็นโรคนี้ผลผลิตจะลดลงมากกว่า 80% กรมวิชาการเกษตรจึงกำหนดแนวทางป้องกันและเฝ้าระวังโรค CMD อย่างใกล้ชิด ซึ่งหากมีการแพร่ระบาดเข้ามาในประเทศจะสร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรและส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย สำหรับโรคแบคทีเรียลไบลท์ และโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอย หากพบการระบาดของโรค จะทำให้ผลผลิตลดลงมากกว่า 50% นับเป็นโรคที่สร้างปัญหาให้กับมันสำปะหลังในเรื่องของผลผลิตเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ กรมวิชาการเกษตร ยังไม่พบว่ามีพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะการต้านทานต่อโรคดังกล่าว นอกจากนี้ประเทศไทยจำเป็นต้องทำการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะที่ดีเป็นที่ต้องการของเกษตรกรทั้งในเรื่องของปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ได้แก่ ผลผลิต (5 – 6 ตันต่อไร่) แป้งสูง (>25%) ไซยาไนด์ต่ำ (พันธุ์รับประทาน) และแป้งเหนียว (waxy starch) ซึ่งที่ผ่านมาการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะทางการเกษตรที่ต้องการจะใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) ต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 8 - 10 ปี และมีหลายขั้นตอนกว่าจะสามารถคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะตามต้องการได้ ปัจจุบันเทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการวิจัยและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์พืชมากขึ้น โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในกระบวนการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชที่เหมาะสมจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการคัดเลือกและสามารถแยกความแตกต่างของลักษณะที่แสดงออกได้อย่างถูกต้องแม่นยำ รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ กรมวิชาการเกษตรเป็นแหล่งรวบรวมพันธุ์มันสำปะหลังที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมจำนวนมาก ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะทางการเกษตรที่ต้องการ สามารถช่วยร่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังลงได้ 3 – 4 ปี จึงเป็นตัวช่วยสำคัญในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ให้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพันธุ์มันสำปะหลังของไทยได้ นอกจากนี้ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสำหรับนำข้อมูลที่ได้มาใช้ประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและเป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการทรัพยากรเชื้อพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลัง และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังสำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์และการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

2. เพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบลท์ โรคใบด่าง โรครากปม ให้มีผลผลิตและปริมาณแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ และลักษณะแป้งเหนียว โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ทำการทดสอบและคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดี นำเครื่องหมายที่ผ่านการคัดเลือกมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์ต่างประเทศ จากแปลงรวบรวมพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้จะนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

2. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ของมันสำปะหลังด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด EST-SSRs ทำการค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ในมันสำปะหลัง ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้กับมันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบลักษณะจีโนไทป์กับลักษณะฟีโนไทป์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ในมันสำปะหลัง จากนั้นจึงนำเครื่องหมายโมเลกุลที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพแล้ว นำมาใช้คัดเลือกลูกผสมของมันสำปะหลังเพื่อได้ต้นมันสำปะหลังที่มีลักษณะความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์

3. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง Cassava Mosaic Disease (CMD) ทำการคัดเลือกและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคใบด่าง CMD นำมาใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีความเป็นไปได้ว่าเป็นพันธุ์ต้านทานโรคใบด่าง CMD จากแปลงรวบรวมพันธุ์ และกลุ่มพันธุ์ลูกผสม เพื่อช่วยในกระบวนการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

4. การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ทำการค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ต้านทานโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอย ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล เปรียบเทียบลักษณะจีโนไทป์กับลักษณะฟีโนไทป์ความต้านทานต่อโรครากปมในมันสำปะหลังพันธ์ต่างๆ จากนั้นจึงนำเครื่องหมายโมเลกุลที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพแล้ว นำมาใช้คัดเลือกลูกผสมของมันสำปะหลังเพื่อได้ต้นมันสำปะหลังที่มีความต้านทานโรครากปม

5. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง ทำการคัดเลือกและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในมันสำปะหลัง ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้กับมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ที่ทราบลักษณะทางกายภาพ

กรมวิชาการเกษตร

แล้ว ทำการเปรียบเทียบลักษณะจีโนไทป์กับลักษณะฟีโนไทป์ ได้แก่ ปริมาณไซยาไนด์ และปริมาณแป้งในมันสำปะหลังแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นจึงนำเครื่องหมายโมเลกุลที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพแล้ว นำมาใช้คัดเลือกลูกผสมของมันสำปะหลังเพื่อได้ต้นมันสำปะหลังที่มีลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำ

6. การตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (waxy starch) ในมันสำปะหลัง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ทำการตรวจสอบและคัดเลือกท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะแป้งเหนียวจากแหล่งรวบรวมพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดระยอง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) บนยีน *GBSSI* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดแป้งเหนียวในมันสำปะหลังมาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลัง ทำการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธี Iodine Staining Test เปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มพันธุ์มันสำปะหลังที่มีเครื่องหมายโมเลกุลต่างกัน จากนั้นนำลักษณะพันธุ์ที่เป็นแบบเฮทเทอโรไซโกต Wxwx มาผสมตัวเองแล้วใช้เครื่องหมายโมเลกุลข้างต้นมาช่วยคัดเลือกลูกผสมให้ได้จีโนไทป์แบบโฮโมไซโกตลักษณะด้อย wxwx (recessive) ซึ่งเป็นลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังสามารถนำไปปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ลักษณะดีและเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของไทยต่อไป

7. การพัฒนาเครื่องหมายยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งที่สัมพันธ์กับน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง ทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับจำเพาะกับบริเวณลำดับเบสภายในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้กับมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ที่ทราบลักษณะทางกายภาพแล้ว ทำการเปรียบเทียบลักษณะจีโนไทป์กับลักษณะฟีโนไทป์ปริมาณน้ำหนักผลผลิตในมันสำปะหลังแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นจึงนำเครื่องหมายโมเลกุลที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพแล้ว นำมาใช้เพื่อการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะน้ำหนักผลผลิตสูง

ขั้นตอนการดำเนินงานโครงการ

บทคัดย่อ

มันสำปะหลัง (Manihot esculenta Cranz.) เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร อาหารสัตว์ การแพทย์ และพลังงานทดแทน จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้ได้มันสำปะหลังพันธุ์ดีที่มีคุณภาพและให้ผลผลิตสูง ดังนั้นการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังสำหรับใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์และการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง และ 2) การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบลท์ โรคใบด่าง โรครากปม ให้มีลักษณะผลผลิตและปริมาณแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ และแป้งเหนียว โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ดำเนินการวิจัยที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี ระหว่างเดือน ตุลาคม 2560 – ธันวาคม 2564 งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังจากแปลงรวบรวมพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ ด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (Fragment Analysis) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ พบว่า ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวนทั้งสิ้น 4,320 ข้อมูล มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกันถึง 88 อัลลีล และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยวิธี UPMGA แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มหลัก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.10 – 1.00 สามารถนำข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้มาใช้ในการจำแนกพันธุ์และการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในงานปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างลูกผสมให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะความต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบลท์ โรคใบด่าง โรครากปม ให้มีปริมาณผลผลิตและแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ และแป้งเหนียว พบว่า 1) ลักษณะต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย Xanthomonas axonopodis pv. Manihotis (XAM) สามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSRs จำนวน 6 เครื่องหมาย นำไปตรวจสอบหาความต้านทานโรคกับมันสำปะหลัง จำนวน 663 พันธุ์/สายพันธุ์ พบมีพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 200 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคได้ นำมาทดสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ด้านการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค พบมีพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 22 สายพันธุ์/พันธุ์ ที่มีแนวโน้มให้ความต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบลท์ 2) ลักษณะต้านทานโรคใบด่าง CMD สามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR SSR EST-SSRs และ SNP จำนวน 9 เครื่องหมาย นำมาคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ ลูกผสม และพันธุ์ต้านทานจาก IITA จำนวน 902 พันธุ์/สายพันธุ์ พบมีพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 18 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในทั้ง 9 เครื่องหมาย ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นพันธุ์ต้านทานโรคใบด่าง 3) ลักษณะต้านทานโรครากปม สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP จำนวน 2 ตำแหน่ง ที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานโรครากปมที่ได้จากการใช้เทคโนโลยี Genotyping by sequencing (GBS) มาวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างลักษณะจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของดัชนีรากปมของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 71 พันธุ์ รวมถึงได้พัฒนาไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ด้วยเทคนิค Tetra-Primer

กรมวิชาการเกษตร

ARMS-PCR 4) ลักษณะแป้งสูง สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP จำนวน 3 ตำแหน่ง ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง (% amylose) สามารถนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้งสูงโดยใช้เทคนิค Pyrosequencing ในการตรวจวิเคราะห์ได้ 5) ลักษณะไซยาไนด์ต่ำ สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP แบบ Tetra-Primer ARMS–PCR จำนวน 3 ตำแหน่ง สามารถนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg และ 280 mg HCN/kg น้ำหนักสด 6) ลักษณะแป้งเหนียว สามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ตำแหน่ง C/G บนยีน GBSSI จำนวน 2 ตำแหน่ง นำมาตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวกับพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 758 พันธุ์ พบจีโนไทป์แบบลักษณะเด่น (dominant: WxWx) ลักษณะข่มร่วม (co-dominant: Wxwx) และลักษณะด้อย (recessive: wxwx) จำนวน 522 202 และ 17 ตัวอย่าง ตามลำดับ การตรวจสอบลักษณะแป้งด้วยการย้อมสีไอโอดีนในตัวอย่างลักษณะข่มร่วมและลักษณะด้อย ไม่พบลักษณะแป้งเหนียว และได้ข้อมูลเครื่องหมาย SNPs แบบ Bi-Allelic จำนวน 19,057 ตำแหน่ง พบตำแหน่ง SNPs เฉพาะมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว จำนวน 33 ตำแหน่ง แบ่งเป็นแบบเฮทเทอโรไซโกต จำนวน 26 ตำแหน่ง และแบบโฮโมไซโกต จำนวน 7 ตำแหน่ง สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังแป้งเหนียวได้ และ 7) ลักษณะผลผลิต (root yield) สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ILP จากยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตแป้งในมันสำปะหลัง จำนวน 13 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs จำนวน 2 เครื่องหมาย สามารถนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างลักษณะผลผลิตในมันสำปะหลังได้ ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้นี้สามารถนำไปใช้ในการจำแนก ตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Cassava is an economically important food crop of Thailand. It is useful for food industry, animal feed, medical and renewable energy. Cassava breeding is necessary in order to obtain good quality and high yielding cassava varieties. Therefore, biotechnology research for identification and crop improvement in cassava aimed to 1) The study of genetic differences and cluster analysis for genetic relationship of cassava varieties for identification of the genetic differences and for parental selection in cassava breeding programs. 2) The selection and cassava breeding for disease resistance such as bacterial blight disease, cassava mosaic disease (CMD), root knot disease and for characteristic such as root yield, starch, cyanide and waxy starch using molecular markers. The research was conducted at the Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathumthani Province during October 2017 - September 2021. In this study, the genetic diversity of 270 cassava varieties from DOA collection germplasm using 16 SSR markers were labeled with fluorescent by PCR technique and fragments were analyzed by ABI3730XL DNA Analyzer. The result showed that 4,320 genetic diversity data of cassava varieties were generated with polymorphic allele in total of 88 alleles and cluster analysis based on UPGMA revealed 3 major distinct groups, similarity coefficient value in range of 0.10 – 1.00. Therefore, SSR markers in this

study were appropriate to identify the genetic differences of cassava varieties, and the genetic diversity database of cassava is useful for parental selection in cassava breeding programs. And the development of molecular markers for selection of cassava variety for traits of resistance to bacterial blight, CMD, root knot disease, as well as high yield, high starch, low cyanide and waxy starch provided results as following, 1) For the resistance to bacterial blight disease caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. Manihotis (*XAM*), 6 EST-SSRs molecular markers were used in selection and 200 varieties from 663 cassava varieties were selected by the amplification of disease resistance genes and used to tested for phenotypic response to pathogenic bacteria. 22 cassava varieties tended to be resistant to bacterial blight. 2) For CMD resistance, 9 molecular markers of SCAR SSR EST-SSRs and SNP types were used in selection 902 cassava varieties including parent group, cassava hybrids and some resistant varieties from IITA, and found 18 cassava varieties showing the same DNA band patterns and nucleotide sequences as TME3 in all 9 molecular markers. These lines/varieties may be resistant to CMD. 3) For root knot disease resistance, 2 positions of SNP molecular marker related to root knot disease gene were developed using Genotyping by sequencing (GBS) technology and analyse the differences between genotype and phenotype characteristics of root knot index of 71 cassava varieties, as well as developed primers to detect these SNPs using tetra-primer ARMS-PCR technique. 4) Hight starch, 3 positions of SNPs molecular marker related to starch content (% amylose) were developed and can be used to selection of the cassava varieties with high starch content by using the pyrosequencing technique. 5) Low cynide, 3 positions of SNPs molecular marker related to cyanide content as well as the primers for detection using tetra-primer ARMS-PCR techniques were developed and can be used to selection the cassava varieties with cyanide content less than 250 mg and 280 mg HCN/kg fresh weight. 6) Waxy starch, 2 SNPs of molecular markers, C/G position on GBSSI gene were used in selection and the waxy starch characteristics were examined with 758 cassava varieties using PCR technique, showing 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 found none of characteristic of waxy starch and found 19,057 positions of Bi-Allelic SNPs markers. This study found SNPs 33 positions, divided into 26 positions of heterozygous and 7 positions of homozygous which specific to waxy cassava. These SNPs markers could be further used for selection and identification of waxy cassava varieties and 7) Root yield, 13 ILP and 2 SNPs of molecular markers were developed from gene involved to starch synthesis in cassava can be used to analyse the differences between root yield in cassava. From results of all research in this project, the developed molecular markers can be used for identification, verification and selection of cassava varieties for breeding purposes.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

Genetic Diversity of Cassava (*Manihot esculenta*) Parent Cultivars Using SSR Markers

สุภาวดี ง้อเหรียญ จีราพร แก่นทรัพย์ อรุโณทัย ซาววา บุญเรือนรัตน์ เพียรงาน วิภาวี ชั้นโรจน์ สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ กุสุมา รอดแพ้วพาล ประพิศ วองเทียม

Suphawadee Ngorian Jeeraporn Kansup Aroonothai Sawwa Boonraunrat Pearnngan Vipavee Chanroj Suwaluk Amawan Kusuma Rodpeawpan Prapit Wongtiem

คำสำคัญ (Key words)

มันสำปะหลัง (cassava (*Manihot esculenta* Crantz.), ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity), การปรับปรุงพันธุ์พืช (plant breeding), เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker), เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอสเอสอาร์ (SSR markers)

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ และจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร สำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง ดำเนินการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 – กันยายน 2564 ดำเนินการคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง โดยการทดสอบไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 60 ไพรเมอร์ กับพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 18 พันธุ์ พบว่า มี 54 คู่ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี PCR และจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี โดยพบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด 265 อัลลีล มีอัลลีลต่อตำแหน่ง 1 – 8 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 4.82 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกัน (polymorphic) จำนวน 263 อัลลีล คิดเป็น 97.27 เปอร์เซ็นต์ แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 85 – 597 คู่เบส มีค่า Polymorphism Information Content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.00 – 0.81 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.58 จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี นำไปติดฉลากไพรเมอร์ด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ สำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ โดยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (Fragment Analysis) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI3730XL พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 16 คู่ไพรเมอร์ สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี โดยพบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด 88 อัลลีล มีอัลลีลต่อตำแหน่ง 3 – 9 อัลลีล

มีค่าเฉลี่ย 5.5 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกัน (polymorphic) จำนวน 88 อัลลีล คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 100 – 418 คู่เบส มีค่า Polymorphism Information Content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.38 – 0.78 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.63 เมื่อทำการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.10e พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.10 – 1.00 สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ที่แสดงความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยมีค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.7 จากการศึกษาสามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมเพื่อระบุเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง และข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสำหรับนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังต่อไป

ABSTRACT

The study of genetic diversity of cassava varieties using SSR molecular markers aimed to assess the genetic diversity and to analyze cluster of cassava varieties from DOA collection germplasm for breeding. The research was conducted at the Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathumthani Province during October 2017 – September 2021. In this study, A total of 60 SSR markers with 18 cassava varieties were amplified by PCR technique. The result showed that 54 SSR markers were able to amplify DNA fragments from all varieties and generated polymorphic allele in total of 265 alleles varying from 1 – 8 allele per locus, with an average of 4.82 alleles per locus, and 263 alleles showed the polymorphic bands accounted for 97.27%. Sizes of DNA fragments ranged from 85 – 597 base pairs. The Polymorphism Information Content (PIC) value ranged from 0.00 – 0.81, with an average of 0.58. The 16 SSR markers were labeled with fluorescent for studying the genetic diversity of 270 cassava varieties by PCR technique and fragment analysis by ABI3730XL DNA Analyzer. The result showed that 16 SSR markers were generated polymorphic allele in total of 88 alleles varying from 3 – 9 allele per locus, with an average of 5.5 alleles per locus. All of 88 alleles showed the polymorphic bands accounted for 100%. Sizes of DNA fragments ranged from 100 – 418 base pairs. The PIC value ranged from 0.38 – 0.78, with an average of 0.63. Cluster analysis based on UPGMA and genetic relationships using NTSYSpc version 2.10e showed similarity coefficient value in range of 0.10 – 1.00, and revealed 3 major distinct groups with cophenetic correlation (r) of 0.70. Therefore, SSR markers in this study were appropriate to identify the genetic differences of cassava varieties, and the genetic diversity database of cassava is useful for parental selection in cassava breeding programs.

กรมวิทยาศาสตร์

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มันสำปะหลัง (Manihot esculenta Crantz.) จัดเป็นพืชอาหารที่สำคัญของโลกและเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในประเทศไทย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ตั้งแต่ส่วนยอดจนถึงรากสะสมอาหาร แป้งมันสำปะหลังสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์ นอกจากนี้ยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และพลังงานทดแทน ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ในการเพาะปลูกมันสำปะหลัง 9.44 ล้านไร่ ผลผลิตของมันสำปะหลังในปี 2563 เท่ากับ 29 ล้านตัน โดยมีผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่เท่ากับ 3.25 ตัน มันสำปะหลังเป็นพืชที่สามารถทำรายได้เข้าประเทศจำนวนมากจากการส่งออกในรูปของผลิตภัณฑ์มันเส้น มันอัดเม็ด สาคู และแป้งมัน โดยในปี 2563 มีปริมาณการส่งออกมันสำปะหลังทุกชนิด 7 พันล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 82,346 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2563) จากรายงานการรวบรวมพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยที่ผ่านมาได้มีการนำเข้าพันธุ์มันสำปะหลังจากประเทศต่างๆ ได้แก่ มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และหมู่เกาะเวอร์จินไอร์แลนด์ จนกระทั่งมีการร่วมมือกันในด้านการวิจัยและพัฒนาเพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังระหว่างหน่วยงานภาครัฐกับศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (International Center for Tropical Agriculture: CIAT) โดยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมจาก CIAT เพื่อนำมาใช้ในการวิจัยและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังทำให้ได้มันสำปะหลังพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงแนะนำสู่เกษตรกร ปัจจุบันพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง มีเป็นจำนวนมาก ได้แก่ พันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ป่าที่มีอยู่ในประเทศ พันธุ์นำเข้ามาจากต่างประเทศ พันธุ์ที่ได้จากปรับปรุงพันธุ์ในประเทศ และพันธุ์ที่ได้จากศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (CIAT) ซึ่งได้มีการนำเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังที่มีอยู่มาใช้ประโยชน์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีตามต้องการ เช่น ผลผลิตสูง ปริมาณแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ โปรตีนสูง และต้านทานต่อโรคและแมลง เป็นต้น

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังโดยทั่วไปอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ในการจำแนกพันธุ์ ซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดของพันธุ์มันสำปะหลังออกจากกันได้อย่างชัดเจน ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง ซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้อย่างชัดเจน รวดเร็ว มีความแม่นยำและประสิทธิภาพสูง โดยเทคนิคที่มีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการตรวจสอบพันธุ์ เช่น RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Pillai *et al*., 2004), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Fregene *et al*., 1997; Jorge *et al*., 2000), SSR (Simple Sequence Repeat) (Fregene *et al*., 1997), AFLP (Amplified Fragment Length Polymophisms) (Elais *et al*., 2000), SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) (Vásquez and López, 2014) และ SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) (López *et al*., 2005) เป็นต้น เทคนิคต่างๆ เหล่านี้ทำให้เกิดความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ (polymorphism) สามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้และจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ มีทั้งข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน สำหรับเทคนิคการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (Simple Sequence Repeat) หรือ microsatellites เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างแบบข่มร่วม (co-dominant) ได้ ทำให้แยกความแตกต่าง

กรมวิชาการเกษตร

ระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮทเทอโรไซกัส (heterozygous) ออกจากได้ จึงนำมาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของมันสำปะหลังได้เป็นอย่างดี (Hokanson *et al*., 1998) อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชได้อย่างชัดเจน แม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง ปัจจุบันการวิจัยและพัฒนาด้านพันธุกรรมของมันสำปะหลังในประเทศไทยยังมีข้อจำกัดเนื่องจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังที่มีอยู่ยังมีข้อมูลไม่ครบถ้วนเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR เข้ามาช่วยในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร สำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เพื่อการบ่งชี้ลักษณะประจำพันธุ์และสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปเป็นแนวทางในการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังของไทยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการทรัพยากรเชื้อพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
2. เพื่อสร้าง phylogenetic tree ที่จัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังสำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

ขอบเขตการวิจัย

เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 250 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ป่าที่มีอยู่ในประเทศ แปลงรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ แปลงรวบรวมพันธุ์ที่ได้จากปรับปรุงพันธุ์ในประเทศ และแปลงรวบรวมพันธุ์ที่ได้จากศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (CIAT) ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลัง จำนวน 2 ชุด ชุดแรกเก็บไว้ในธนาคารดีเอ็นเอ (DNA bank) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และอีกชุดหนึ่งนำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการศึกษาวิจัย ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลังด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR หรือ microsatellite ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดี ทำการทดสอบเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์สูงสุด จากนั้นนำไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้มาติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์นำไปวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมแบบอัตโนมัติและนำข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอที่ได้มาทำการสร้าง phylogenetic tree เพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่สำหรับการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้ได้ลักษณะต่างๆ ที่ต้องการต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประเด็นวิจัย : ปัจจุบันการวิจัยและพัฒนาด้านพันธุกรรมของมันสำปะหลังในประเทศไทยยังมีข้อจำกัดเนื่องจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังที่มีอยู่ยังมีข้อมูลไม่ครบถ้วนเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR หรือ microsatellites ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้อย่างชัดเจน เข้ามาใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร สำหรับนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เพื่อการบ่งชี้ลักษณะประจำพันธุ์และสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปเป็นแนวทางในการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังของไทยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการทรัพยากรเชื้อพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ต่อไป

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี

ระยะเวลาดำเนินงาน : ตุลาคม 2560 - กันยายน 2564

วิธีการดำเนินงาน

1. การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง

1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลัง

นำท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 18 ตัวอย่างพันธุ์ มาปลูกในกระถางพลาสติกที่ใส่วัสดุปลูก ขนาด 18 นิ้ว และติดป้ายชื่อระบุพันธุ์มันสำปะหลัง หลังจากใบอ่อนงอก ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่ออายุ 1 เดือน นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Plant Genomic DNA Purification (Tiangen Biotech Co, China) ตัดใบมันสำปะหลัง 100 มิลลิกรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer LP1 400 ไมโครลิตร และ RNaseA (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 6 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ นาน 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (15 – 25°C) นาน 10 นาที เติม Buffer LP2 130 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ นาน 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ย้ายน้ำใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer LP3 750 ไมโครลิตร (1.5 เท่าของสารละลาย) เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 15 วินาที วาง Spin Columns CB3 ลงใน Collection Tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ย้ายน้ำใสใส่ Spin Columns CB3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ทิ้งน้ำใส และวาง Spin Columns CB3 กลับลงใน Collection Tube เติม Buffer PW 600 ไมโครลิตร ลงใน Spin Columns CB3 (เพื่อล้างเมมเบรน) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ทิ้งน้ำใส (ทำซ้ำ 2 รอบ) และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 2 นาที อีกรอบ (เพื่อให้ Spin Columns CB3 แห้ง) ย้าย Spin Columns CB3 ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer TE 50 – 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (15 – 25°C) นาน 15 – 25 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของ ดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร

1.2 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิค SSR

ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสไพรเมอร์ชนิด SSR ของมันสำปะหลังจากรายงานวิจัยของ Mba *et al*., (2001) และ Raghu *et al*., (2007) โดยค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล NCBI (file://H:\Manihot\MapViewer.htm) และสังเคราะห์ไพรเมอร์ จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ **(ตารางที่ 1)** ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 18 ตัวอย่างพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ชนิด SSR โดยใช้ชุด GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 60-100 นาโนกรัม, 1X GoTaq® Green Master Mix, 0.4 µM upstream primer, 0.4 µM downstream primer ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 95°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Annealing 55-64°C 45 วินาที, Extension 70°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp DNA ladder marker (Fermentas, USA) พร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

ตารางที่ 1 แสดงไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ สำหรับใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลัง

Primer name	Sequence	Product size	Annealing temperature (°C)	Primer name	Sequence	Product size	Annealing temperature (°C)
SSRY4	F: ATAGAGCAGAAGTGCAGGCG	287	55	SSRY148	F: GGCTTCATCATGGAAAAACC	114	45
	R: CTAACGCACACGACTACGGA				R: CAATGCTTTACGGAAGAGCC		
SSRY9	F: ACAATTCATCATGAGTCATCAACT	278	55	SSRY149	F: AGCAGAGCATTTACAGCAAGG	500	55
	R: CCGTTATTGTTCCTGGTCCT				R: TGTGGAGTTAAAGGTGTGAATG		
SSRY12	F: AACTGTCAAACCATTCTACTTGC	55	266	SSRY151	F: AGTGGAAATAAGCCATGTGATG	182	45
	R: GCCAGCAAGGTTTGCTACAT				R: CCCATAATTGATGCCAGGTT		
SSRY19	F: TGTAAGGCATTCCAAGAATTATCA	214	55	SSRY154	F: ACAATGTCCCAATTGGAGGA	318	45
	R: TCTCCTGTGAAAAGTGCATGA				R: ACCATGGATAGAGCTCACCG		
SSRY20	F: CATTGGACTTCCTACAAATATGAAT	143	55	SSRY155	F: CGTTGATAAAGTGGAAAGAGCA	158	55
	R: TGATGGAAAGTGGTTATGTCCTT				R: ACTCCACTCCCGATGCTCGC		
SSRY21	R: CAACAATTGGACTAAGCAGCA	192	55	SSRY160	F: CTGGCTCTTCCAGACACCTT	151	55
	F:CCTGCCACAATATTGAAATGG				R: GGCAAGAGAAGCCATAAAGC		
SSRY32	F: CAAATTTGCAACAATAGAGAACA	298	55	SSRY161	F: AAGGAACACCTCTCCTAGAATCA	220	55
	R: TCCACAAAGTCGTCCATTACA				R: CCAGCTGTATGTTGAGTGAGC		
SSRY34	F: TTCCAGACCTGTTCCACCAT	279	55	SSRY164	F: TCAAACAAGAATTAGCAGAACTGG	187	45
	R: ATTGCAGGGATTATTGCTCG				R: TGAGATTTCGTAATATTCATTTCACTT		
SSRY38	F: GGCTGTTCGTGATCCTTATTAAC	122	55	SSRY169	F: ACAGCTCTAAAAACTGCAGCC	100	55
	R: GTAGTTGAGAAAACTTTGCATGAG				R: AACGTAGGCCCTAACTAACCC		
SSRY49	F: TGAAAATCTCACTGGCATTATTT	300	55	SSRY171	F: ACTGTGCCAAAATAGCCAAATAGT	291	55
	R: TGCAACCATAGTGCCAAGC				R: TCATGAGTGTGGGATGTTTTTATG		
SSRY51	F: AGGTTGGATGCTTGAAGGAA	298	55	SSRY172	F: TCCAACTGGCTTAACTTGAGG	201	55
	R: GGATGCAGGAGTGCTCAACT				R: TTTAGTTTTTGAAACAATGATGAAA		
SSRY59	F: GCAATGCAGTGAACCATCTTT	158	55	SSRY177	F: ACCACAAACATAGGCACGAG	268	45
	R: CGTTTGTCCTTTCTGATGTTC				R: CACCCAATTCACCAATTACCA		
SSRY62	F: CATTCTCCAGGAAAGTCATTTTG	250	55	SSRY179	F: CAGGCTCAGGTGAAGTAAAGG	226	55
	R: AGCTCATGCCATACAAGCAA				R: GCGAAAGTAAGTCTACAACTTTTCTAA		
SSRY63	F: TCAGAATCATCTACCTTGGCA	290	55	SSRY180	F: CCTTGGCAGAGATGAATTAGAG	163	55
	R: AAGACAATCATTTTGTGCTCCA				R: GGGGCATTCTACATGATCAATAA		
SSRY64	F: GACAAGTCGTATATGTAGTATTCACGC	194	55	SSRY181	F: GGTAGATCTGGATCGAGGAGG	199	55
	R: GCAGAGGTGGCTAACGAGAC				R: CAATCGAAACCGACGATACA		
SSRY69	F: CGATCTCAGTCGATACCCAAG	239	55	SSRY269	F: AATAGTTTCAGGCAAGGGTGA	413	58
	R: CACTCCGTTGCAGGCATTA				R: TCAATCACAAGCCAGACACA		
SSRY77	F: CAGGAGGTGGCAGATTTTGT	275	55	SSRY280	F: TGTGCATGGAGAGATTGACAG	175	60
	R: GCATGTTCCACCTGCATAAG				R: AAGTCGTTTATTGCCGATGC		
SSRY82	F: TGTGACAATTTTCAGATAGCTTCA	211	55	NS77	F: GGACGCACAGTATTCTCCAC	579	55
	R: CACCATCGGCATTAAACTTTG				R: GATAATGGCAAGACCGGA		
SSRY100	F: ATCCTTGCCTGACATTTTGC	210	55	NS78	F: AGCAATGCCTTGATCTTGAG	379	55
	R: TTCGCAGAGTCCAATTGTTG				R: AAGATGGCAATTCAAGCAAG		
SSRY102	F: TTGGCTGCTTTCACTAATGC	179	55	NS169	F: GTGCGAAATGGAAATCAATG	319	55
	R: TTGAACACGTTGAACAACCA				R: GCCTTCTCAGCATATGGAGC		
SSRY103	F: TGAGAAGGAAACTGCTTGCAC	272	55	NS189	F: TGGGCTGTTCGTGATCCTTA	104	55
	R: CAGCAAGACCATCACCAGTTT				R: CATGAGTTTAAAAATTATCACATCCG		
SSRY105	F: CAAACATCTGCACTTTTGGC	225	55	NS890	F: TAAATTGGGGGTTCTTGCTC	324	55
	R: TCGAGTGGCTTCTGGTCTTC				R: TGCTTACTCTTTGATTCCACG		
SSRY106	F: GGAAACTGCTTGCACAAAGA	270	55	NS911	F: TGTTGTTCAGACGATGTCCAA	127	55
	R: CAGCAAGACCATCACCAGTTT				R: TTGAAGCAGTTATGAACCGT		
SSRY108	F: ACGCTATGATGTCCAAAGGC	203	55	NS912	F: GAGAACTCAACCCCATACC	356	55
	R: CATGCCACATAGTTCGTGCT				R: AAGGGACACGACTTGGTCAC		
SSRY109	F: TGCTAATTGCAGGAAATAGGAT	125	55	NS928	F: GATACCCACAAGCCCAAAGA	283	55
	R: GCAGCTTTTTAGCATAACAATCAA				R: GACCCACCCATCCACTAGAA		
SSRY110	F: TTGAGTGGTGAATGCGAAAG	247	55	NS945	F: GCAAGGCTCCATTAAAAGTCC	394	55
	R: AGTGCCACCTTGAAAGAGCA				R: TGTTTGAAATAGTGTTGCTTCTTGA		
SSRY132	F: CTTTTTGCCAGTCTTCCTGC	196	55	NS1010	F: TAGCGATTGCATTTTACCCC	500	55
	R: TGTCCAATGTCTTCCTTTCCTT				R: ACTGCAAAGCCCTTGAGAGA		
SSRY135	F: CCAGAAACTGAAATGCATCG	253	45	NS1012	F: TGTTGATACAATCTAAATGTAGCCTTC	350	55
	R: AACATGTGCGACAGTGATTG				R: TGTTGAATCCCACATTGGTG		
SSRY141	F: TCCAAAATCTTGGTCATTTTGA	262	55	NS1016	F: CTGAAAGGGAATTTCATGCC	375	55
	R: TGCTGTGATTAAGGAACCAACTT				R: TGGACTTCGTAATTTTCTGCAC		
SSRY147	F: GTACATCACCACCAACGGGC	113	45	NS1018	F: GTGCCATGGCTTTGCTATCT	400	45
	R: AGAGCGGTGGGGCGAAGAGC				R: AGAACATTTCCAGCACACCC		

กรมวิชาการเกษตร

1.3 การวิเคราะห์ PCR Product ด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced

คัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR และสภาวะของปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสม ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลังทั้ง 18 ตัวอย่างพันธุ์ และให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่เหลือจากข้อ 1.2 ไปเข้าเครื่องวิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ผลภาพ (QIAxcel Advanced System) โดยใช้ชุดน้ำยาที่มีความละเอียดสูง QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen, USA) ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ในระดับความห่างไม่น้อยกว่า 3 – 5 คู่เบส โดยจะแสดงผลในรูปแบบของกราฟ (eletropherograms) และแบบภาพขนาดของแถบดีเอ็นเอ เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลัง

1.4 การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

1.4.1 บันทึกข้อมูลขนาดแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่ โดยให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ มีค่าเท่ากับ 0

1.4.2 วิเคราะห์หาค่า Polymorphic Information Content (PIC) จากข้อมูล genotype เป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่แสดงความหลากหลายของอัลลีลที่ได้จากแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้สูตรในการคำนวณคือ

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 - 2\left[\sum_{i=1}^{n-1}\sum_{j=i+1}^{n} p_i^2 p_j^2\right]$$

กำหนดให้ค่า p_i, p_j เป็นความถี่ของอัลลีล i และ j ตามลำดับ และ n เป็นจำนวนอัลลีล (Botstein *et al*., 1980)

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลัง

2.1 การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างมันสำปะหลัง

เก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ ประกอบด้วย ประชากรกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ และกลุ่มที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Dellaporta และคณะ (1983) ตัดใบมันสำปะหลัง 5 กรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติม extraction buffer [2X CTAB; 2% (W/V) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), 100 mM Tris – HCl pH 8.0, 20 mM sodium EDTA, 1.4 M NaCl] เติม 0.2% β-mercaptoethanol (ก่อนใช้บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C) 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ส่วนผสมเข้ากัน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าทุกๆ 20 นาที เติม Chloroform-isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ หรือใช้เครื่อง shaker เบาๆ นาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน 750 ไมโครลิตร ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform-isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูด

กรมวิชาการเกษตร

น้ำใสส่วนบนใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol 0.6 เท่าของสารละลาย DNA และ 3M NaOAC 0.1 เท่าของสารละลาย DNA ผสมโดยการเอียงหลอดคว่ำลงช้าๆ (inverted) นำไปแช่ในตู้เย็น -20°C นาน 30 นาที ระยะนี้จะเห็นตะกอน DNA เป็นเส้นใยสีขาวใส นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 750 ไมโครลิตร (2 ครั้ง) โดยเขย่าเบาๆ 2 - 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทน้ำใสทิ้ง รอให้ดีเอ็นเอแห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที หรือ 37°C นาน 30 นาที ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร ทำการแบ่งเก็บสารละลายดีเอ็นเอ (original) ที่สกัดได้เป็น 2 ชุด โดยชุดแรกเก็บไว้ในธนาคารดีเอ็นเอ (DNA bank) ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส และอีก 1 ชุด นำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการศึกษาวิจัยต่อไป และนำสาร ละลายดีเอ็นเอมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำ PCR ต่อไป

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างมันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 4 ชนิดสี ได้แก่ FAM (blue) HEX (green) TAMRA (yellow) และ ROX (red) จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ FAM_SS147, FAM_SS148, FAM_NS911, FAM_SS20, HEX_SS59, HEX_SS149, HEX_SS21, HEX_SS151, TAMRA_SS141, TAMRA_SS51, TAMRA_SS4, TAMRA_SS177, ROX_NS169, ROX_SS154, ROX_NS945, และ ROX_NS78 **(ตารางที่ 2)** โดยใช้ชุด GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 60-100 นาโนกรัม, 1X GoTaq® Green Master Mix, 0.4 µM upstream primer, 0.4 µM downstream primer ปรับปริมาตร ให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 95°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Annealing 55-64°C 45 วินาที, Extension 70°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp DNA ladder marker (Fermentas, USA) พร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 2 แสดงไพรเมอร์ชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 4 ชนิด สำหรับใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์

Primer Name	Sequence (5′→3′)	Size of alleles (bp)	Temperature (C°)
FAM_SS147	FAM-GTA CAT CAC CAC CAA CGG GC	100-120	62
FAM_SS148	FAM-GGC TTC ATC ATG GAA AAA CC	103-118	62
FAM_NS911	FAM-TGT TGT TCA GAC GAT GTC CAA	114-127	62
FAM_SS20	FAM-CAT TGG ACT TCC TAC AAA TAT GAA T	124-163	62
HEX_SS59	HEX-GCA ATG CAG TGA ACC ATC TTT	126-162	63
HEX_SS149	HEX-AGC AGA GCA TTT ACA GCA AGG	157-181	62
HEX_SS21	HEX-CCT GCC ACA ATA TTG AAA TGG	161-193	60
HEX_SS151	HEX-AGT GGA AAT AAG CCA TGT GAT G	175-217	62
TAMRA_SS141	TAMRA-TCC AAA ATC TTG GTC ATT TTG A	249-262	60
TAMRA_SS51	TAMRA-AGG TTG GAT GCT TGA AGG AA	258-298	60
TAMRA_SS4	TAMRA-ATA GAG CAG AAG TGC AGG CG	260-289	62
TAMRA_SS177	TAMRA-ACC ACA AAC ATA GGC ACG AG	234-270	62
ROX_NS169	ROX-GTG CGA AAT GGA AAT CAA TG	299-331	65
ROX_SS154	ROX-ACA ATG TCC CAA TTG GAG GA	310-335	55
ROX_NS945	ROX-GCA AGG CTC CAT TAA AAG TCC	382-401	65
ROX_NS78	ROX-AGC AAT GCC TTG ATC TTG AG	369-418	62

2.3 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (Fragment Analysis) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้จากดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ นำไปเข้าเครื่องวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ (Applied Biosystems™ 3730XL DNA Analyzer, Foster City, CA) สามารถวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (Fragment Analysis) โดยการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค capillary electrophoresis ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ในระดับความห่างไม่น้อยกว่า 2 – 3 คู่เบส โดยจะแสดงผลในรูปแบบของกราฟ (eletropherograms) และสามารถแสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลัง

2.4 การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

2.4.1 บันทึกข้อมูลขนาดแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่ โดยให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0

2.4.2 วิเคราะห์หาค่า Polymorphic Information Content (PIC) จากข้อมูล genotype เป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่แสดงความหลากหลายของอัลลีลที่ได้จากแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้สูตรในการคำนวณคือ

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 - 2\left[\sum_{i=1}^{n-1}\sum_{j=i+1}^{n} p_i^2 p_j^2\right]$$

กำหนดให้ค่า p_i, p_j เป็นความถี่ของอัลลีล i และ j ตามลำดับ และ n เป็นจำนวนอัลลีล (Botstein *et al*., 1980)

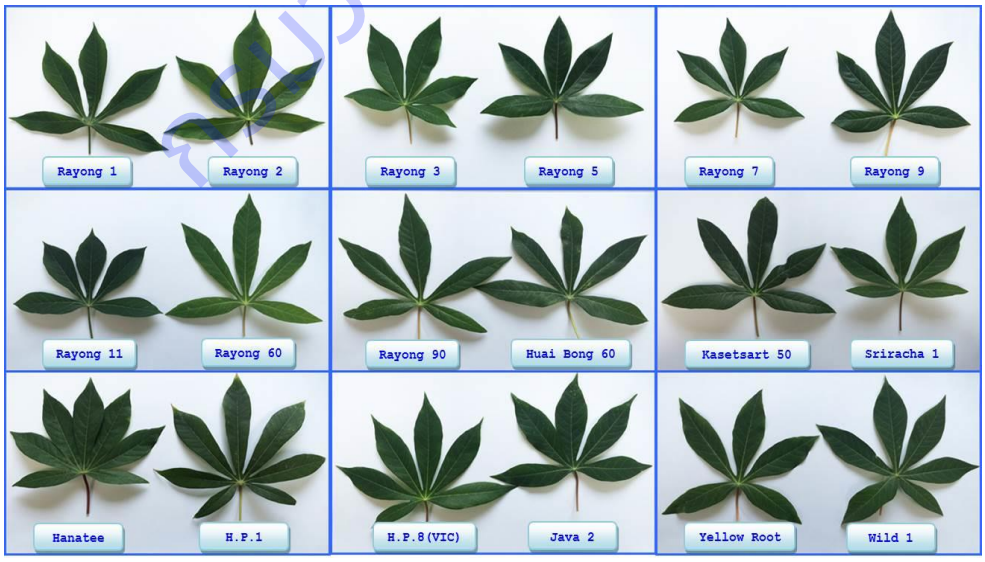
กรมวิชาการเกษตร

2.4.3 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (cluster analysis) ด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-pc) version 2.01e ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard (Jaccard's coefficient) การวิเคราะห์ข้อมูลและแสดงผลในรูปแบบ Dendrogram ทำการคำนวณค่า cophenetic correlation (r) (Rohlf, 2000)

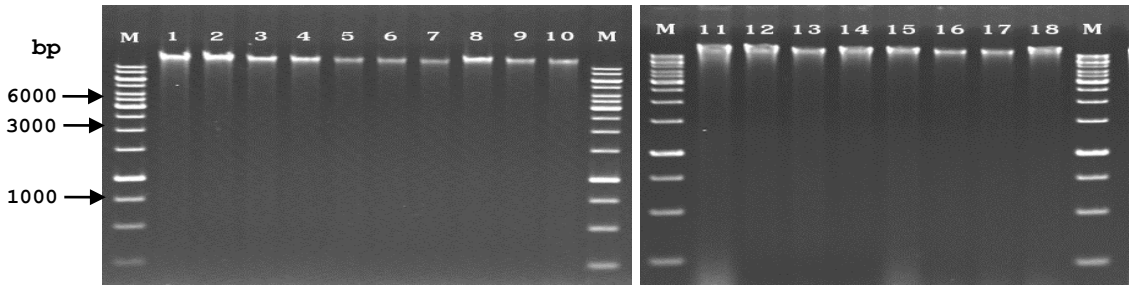
ผลการทดลองและอภิปราย

1. การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง

การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR สำหรับใช้ในการจำแนกพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง โดยการสุ่มเลือกตัวแทนประชากรมันสำปะหลัง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 18 ตัวอย่างพันธุ์ ได้แก่ Rayong 1, (R1), Rayong 2 (R2), Rayong 3 (R3), Rayong 5 (R5), Rayong 7 (R7), Rayong 9 (R9), Rayong 11 (R11), Rayong 60 (R60), Rayong 90 (R90), Huai Bong 60 (HB60), Kasetsart 50 (KU50), Sriracha 1, Hanatee, H.P.1, H.P.8 (VIC), Java 2, Yellow Root และ Wild 1 **(ภาพที่ 1)** การสกัดดีเอ็นเอใบมันสำปะหลังโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Plant Genomic DNA Purification (Tiangen Biotech Co, China) และตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis **(ภาพที่ 2)** เมื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการวัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร พบว่า ค่าที่วัดได้อยู่ระหว่าง 1.8 – 2.0 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี และมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 150 – 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

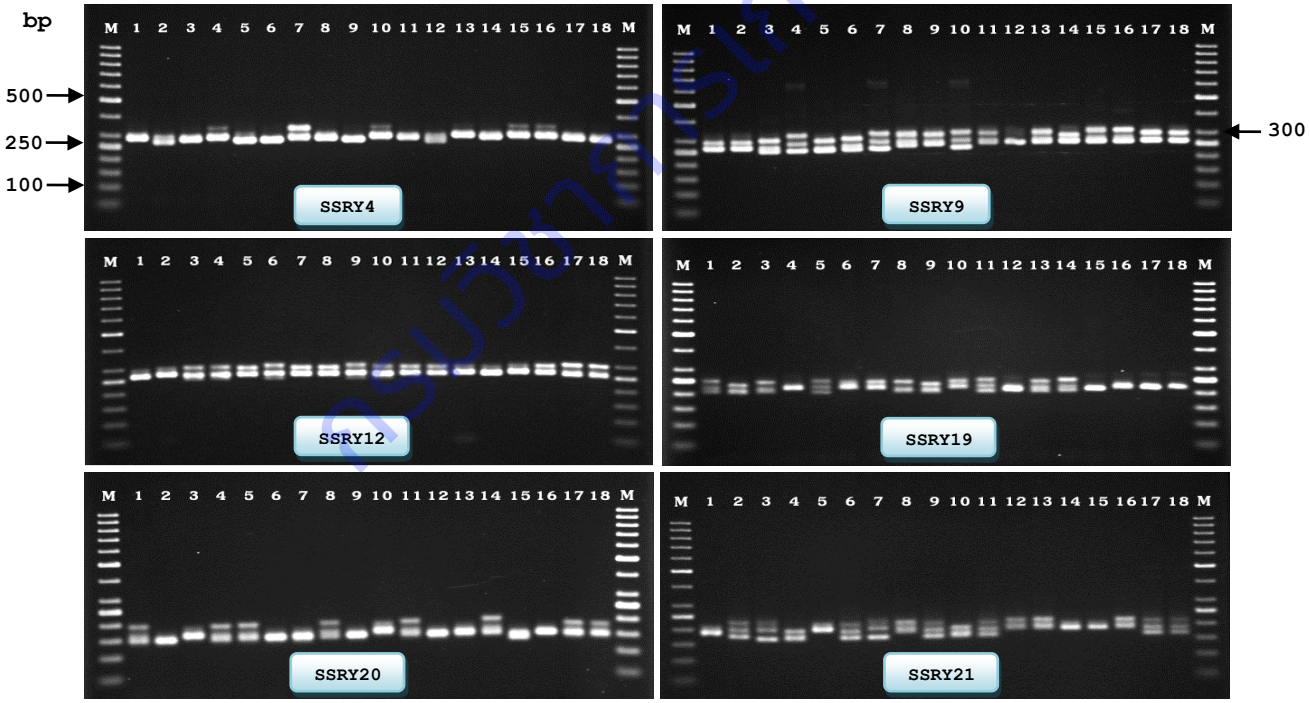


ภาพที่ 1 ตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษาวิจัย จำนวน 18 พันธุ์



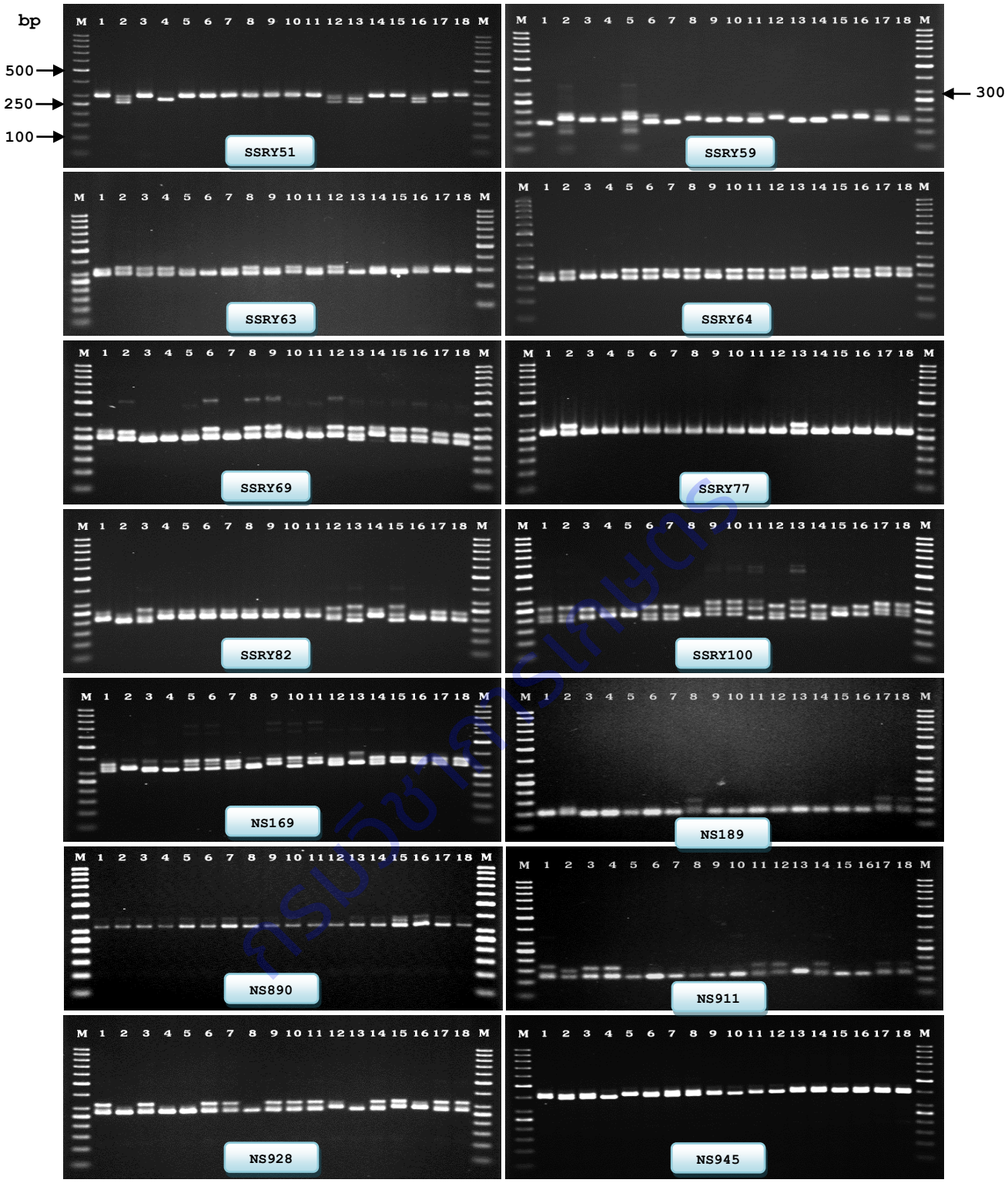
ภาพที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมันสำปะหลัง จำนวน 18 พันธุ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ชนิด SSR ทั้ง 60 คู่ไพรเมอร์ พบว่า มีไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ หรือคิดเป็น 92 เปอร์เซ็นต์ ของเครื่องหมายที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี PCR **(ภาพที่ 3)** โดยมีสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR อยู่ระหว่าง 55 – 65 องศาเซลเซียส จึงได้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลังเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 18 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์, Lane M = 50 bp DNA Ladder, Lane 1 = Rayong 1, Lane 2 = Rayong 2, Lane 3 = Rayong 3, Lane 4 = Rayong 5, Lane 5 = Rayong 7, Lane 6 = Rayong 9, Lane 7 = Rayong 11, Lane 8 = Rayong 60, Lane 9 = Rayong 90, Lane 10 = Huai Bong 60, Lane 11 = Kasetsart 50, Lane 12 = Sriracha 1, Lane 13 = Hanatee, Lane 14 = H.P.1, Lane 15 = H.P.8 (VIC), Lane 16 = Java 2, Lane 17 = Yellow Root, Lane 18 = Wild 1 วิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis

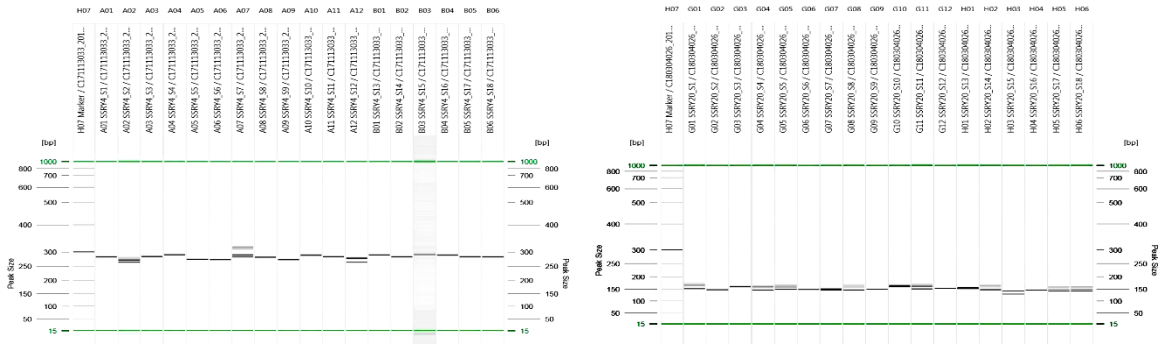
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

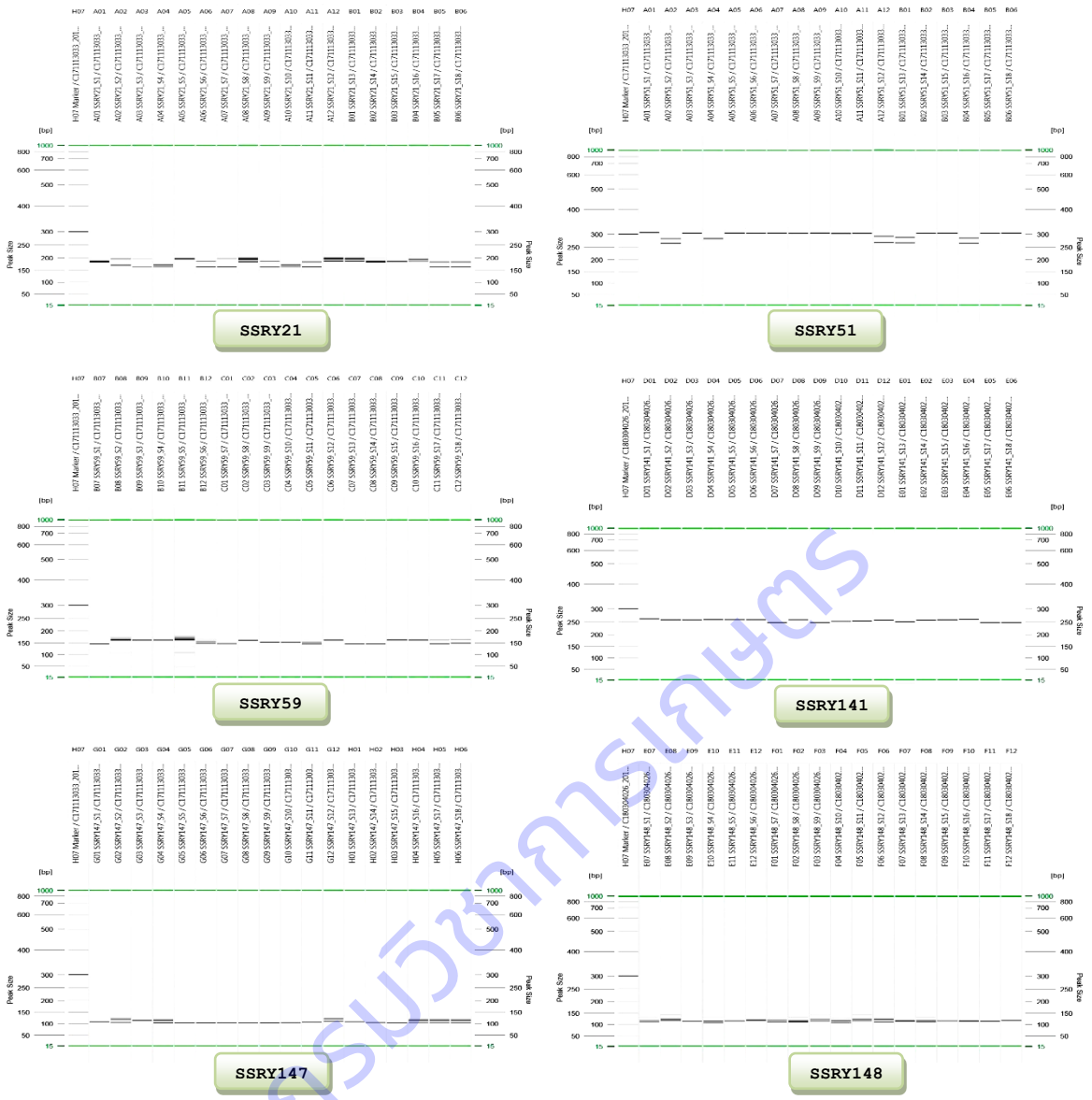


ภาพที่ 3(ต่อ) แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 18 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์, Lane M = 50 bp DNA Ladder, Lane 1 = Rayong 1, Lane 2 = Rayong 2, Lane 3 = Rayong 3, Lane 4 = Rayong 5, Lane 5 = Rayong 7, Lane 6 = Rayong 9, Lane 7 = Rayong 11, Lane 8 = Rayong 60, Lane 9 = Rayong 90, Lane 10 = Huai Bong 60, Lane 11 = Kasetsart 50, Lane 12 = Sriracha 1, Lane 13 = Hanatee, Lane 14 = H.P.1, Lane 15 = H.P.8 (VIC), Lane 16 = Java 2, Lane 17 = Yellow Root, Lane 18 = Wild 1 วิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis

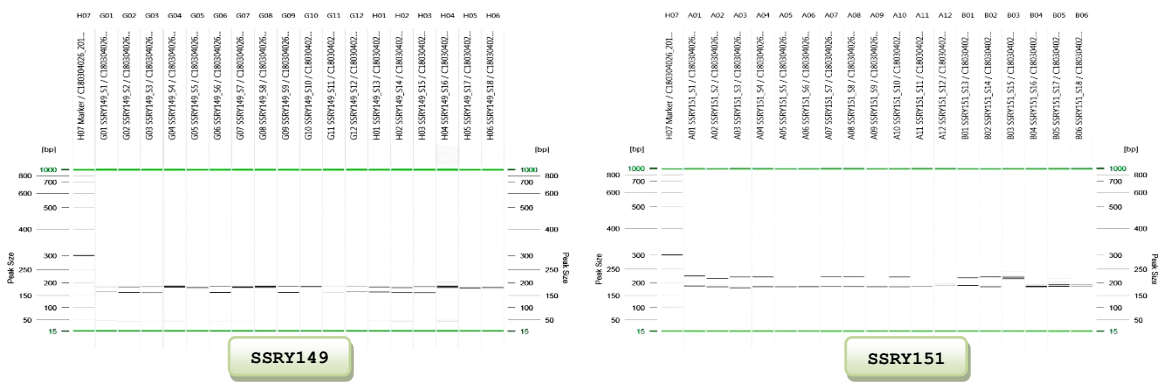
การวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอ (PCR Product) ของตัวอย่างมันสำปะหลัง จำนวน 18 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ โดยนำผลผลิต PCR ที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel ไปเข้าเครื่องวิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ผลภาพ (QIAxcel Advanced System) โดยใช้ชุดน้ำยาที่มีความละเอียดสูง (QIAxcel DNA High Resolution Kit) พบว่า ไพรเมอร์ชนิด SSR ทุกคู่ไพรเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี **(ภาพที่ 4)** โดยพบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด จำนวน 265 อัลลีล มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งตั้งแต่ 1 – 8 อัลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.82 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกัน (polymorphic) จำนวน 263 อัลลีล คิดเป็น 97.27 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ที่พบอัลลีลมากที่สุด จำนวน 8 อัลลีล คือ SSRY100 SSRY151 SSRY177 และ NS78 ส่วนไพรเมอร์ที่พบอัลลีลน้อยที่สุด จำนวน 1 อัลลีลคือ SSRY102 ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 85 – 597 คู่เบส การวิเคราะห์ค่า Polymorphism Information Content (PIC) พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.00 – 0.81 โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.58 โดยไพรเมอร์ที่มีค่า PIC สูงสุดคือ SSRY19 และ SSRY177 และไพรเมอร์ที่มีค่า PIC ต่ำสุดคือ SSRY102 **(ตารางที่ 3)** นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า PIC ที่วิเคราะห์ได้มีความผันแปรตรงกับจำนวนอัลลีลที่ปรากฏ โดยไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากจะมีค่า PIC ค่อนข้างสูง ในขณะที่ไพรเมอร์ที่มีจำนวนอัลลีลน้อยจะมีค่า PIC ค่อนข้างต่ำ แสดงว่า ค่า PIC ที่วิเคราะห์ได้น่าจะมีความสามารถในการระบุความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ได้ดีและมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง จึงสามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเครื่องหมายสำหรับนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังได้ดี จากนั้นทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่มีความเหมาะสมและสามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี จำนวน 16 เครื่องหมาย ได้แก่ SSRY4, SSRY20, SSRY21, SSRY51, SSRY59, SSRY141, SSRY147, SS148, SS149, SSRY151, SSRY154, SSRY177, NS78, NS169, NS911 และ NS945 เกณฑ์การคัดเลือก โดยดูจากค่า PIC ที่วิเคราะห์ได้ และจำนวนอัลลีล (allele) หรือแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ซึ่งพบมีจำนวนตั้งแต่ 4 – 8 อัลลีล สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในมันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์และกลุ่มที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

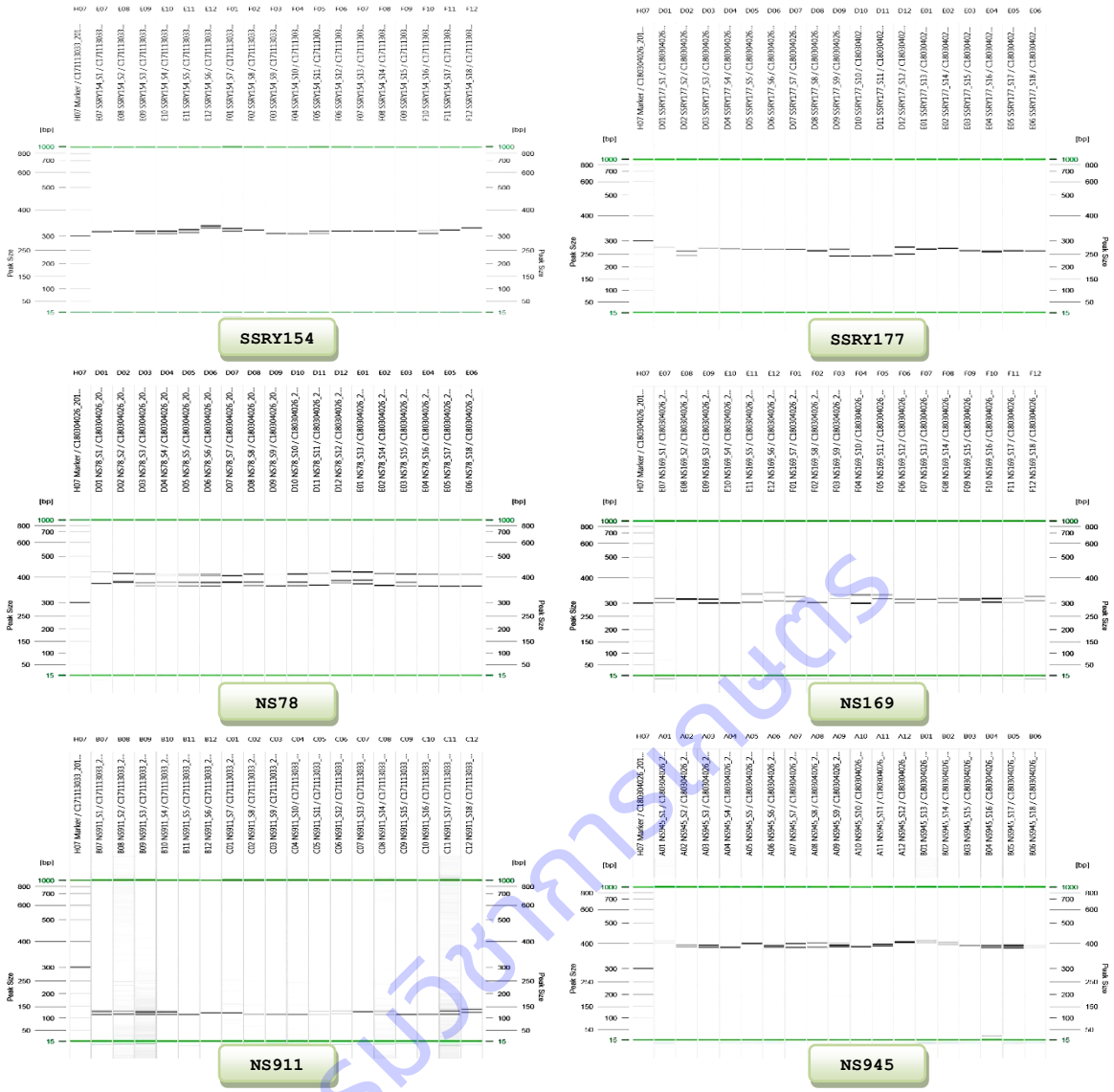




ภาพที่ 4 แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 18 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด SSR ได้แก่ SSRY4, SSRY20, SSRY21, SSRY51, SSRY59, SSRY141, SSRY147 และ SSRY148 วิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System



ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพที่ 4(ต่อ) แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 18 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด SSR ได้แก่ SSRY148, SSRY149, SSRY151, SSRY177, NS78, NS169, NS911 และ NS945 วิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System

ตารางที่ 3 สรุปอุณหภูมิ (Tm) ขนาดของอัลลีล (bp) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง % polymorphic และค่า polymorphism information content (PIC) ของมันสำปะหลัง จำนวน 18 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 55 เครื่องหมาย

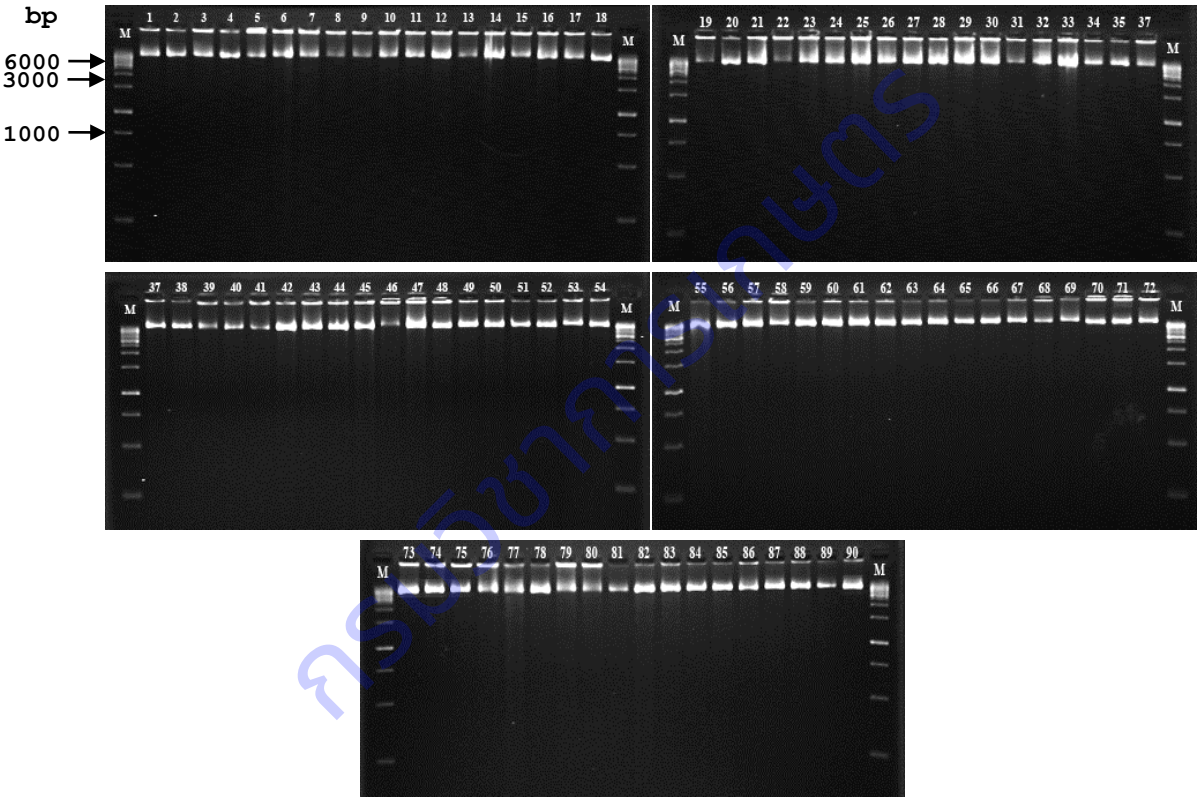
กรมวิชาการเกษตร

Primer name	Temperature (°C)	Number of Alleles	Number of Polymorphic	% Polymorphic	Size of alleles (bp)	Mean of alleles (bp)	Polymorphism Information Contents (PIC)
SSRY4	62	7	7	100	264-319	282	0.73
SSRY9	62	7	7	100	253-292	272	0.79
SSRY12	65	3	3	100	259-292	266	0.47
SSRY19	63	7	7	100	206-236	219	0.81
SSRY20	60	4	4	100	128-161	150	0.53
SSRY21	60	4	4	100	163-197	181	0.65
SSRY32	60	3	3	100	289-309	305	0.42
SSRY34	60	5	5	100	274-310	288	0.60
SSRY38	60	2	1	50	107-125	111	0.25
SSRY49	63	7	7	100	269-315	296	0.79
SSRY51	60	5	5	100	264-307	293	0.56
SSRY59	63	3	3	100	146-164	155	0.52
SSRY63	55	4	4	100	284-300	290	0.61
SSRY64	64	5	5	100	194-213	201	0.64
SSRY69	64	4	4	100	222-257	241	0.60
SSRY77	60	4	4	100	269-302	280	0.39
SSRY82	60	7	7	100	185-222	208	0.73
SSRY100	63	8	8	100	193-256	220	0.80
SSRY102	55	1	0	0	179-183	180	0.00
SSRY103	58	4	4	100	263-284	272	0.69
SSRY105	64	6	6	100	196-237	225	0.72
SSRY106	60	6	6	100	256-280	266	0.76
SSRY108	62	4	4	100	174-211	190	0.62
SSRY109	62	3	3	100	120-148	125	0.41
SSRY110	52	5	5	100	248-269	257	0.47
SSRY132	55	2	2	100	200-207	202	0.24
SSRY135	60	5	5	100	243-267	256	0.68
SSRY141	60	4	4	100	248-262	255	0.61
SSRY147	55	4	4	100	104-121	109	0.55
SSRY148	62	4	4	100	107-122	115	0.57
SSRY149	62	4	4	100	161-186	176	0.64
SSRY151	64	8	8	100	180-224	198	0.70
SSRY154	55	6	6	100	309-339	320	0.68
SSRY155	62	4	4	100	152-167	160	0.56
SSRY160	62	6	6	100	113-161	138	0.56
SSRY161	60	6	6	100	180-245	206	0.69
SSRY164	60	6	6	100	157-192	170	0.63
SSRY169	57	4	4	100	85-109	103	0.39
SSRY171	64	3	3	100	278-302	295	0.35
SSRY177	63	8	8	100	242-281	263	0.81
SSRY179	64	7	7	100	188-239	213	0.72
SSRY180	64	6	6	100	164-196	171	0.58
SSRY181	66	4	4	100	191-208	198	0.59
SSRY269	63	6	6	100	161-196	177	0.72
SSRY280	55	2	2	100	178-187	180	0.24
NS78	64	8	8	100	364-427	392	0.80
NS169	65	7	7	100	300-342	315	0.77
NS189	55	3	3	100	94-110	98	0.43
NS890	63	3	3	100	320-331	327	0.31
NS911	55	4	4	100	115-137	122	0.59
NS928	55	6	6	100	270-298	280	0.71
NS945	65	6	6	100	384-415	394	0.75
NS1010	55	5	5	100	571-597	580	0.69
NS1012	60	2	2	100	356-369	359	0.24
NS1016	60	4	4	100	342-396	367	0.55
Mean		4.82		97.27		235	0.58

สนับสนุนโดย สวช

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลัง

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ผ่านการคัดเลือกว่าให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดี จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ จากแหล่งรวบรวมพันธุ์ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ประกอบด้วย กลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีนิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์จากต่างประเทศ (พันธุ์ที่นำเข้าจาก CIAT) **(ตารางที่ 4)** ทำการสกัดดีเอ็นเอใบมันสำปะหลังด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Dellaporta และคณะ (1983) เมื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณที่มาก ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1,500 –2,500 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และค่าความเข้มข้น (O.D.) อยู่ระหว่าง 1.8 – 1.9 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี **(ภาพที่ 5)**



ภาพที่ 5 แสดงดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี CTAB จากตัวอย่างมันสำปะหลัง จำนวน 90 พันธุ์

ตารางที่ 5 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์จากต่างประเทศ (พันธุ์ที่นำเข้าจาก CIAT) ที่นำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์
P1	เกษตรลพบุรี	P31	CMR 35-112-1	P61	CMR 50-30-23
P2	ระยอง 1	P32	CMR 36-55-166	P62	CMR 50-34-80
P3	ระยอง 2	P33	CMR37-18-189	P63	CMR 50-41-1
P4	ระยอง 3	P34	CMR 37-18-201	P64	CMR 50-73-6
P5	ระยอง 5	P35	CMR 38-125-77	P65	OMR 50-13-26
P6	ระยอง 7	P36	CMR 41-42-3	P66	CMR 51-04-42
P7	ระยอง 9	P37	CMR 41-109-72	P67	CMR 51-13-14
P8	ระยอง 11	P38	CMR 41-112-21	P68	CMR 51-23-14
P9	ระยอง 86-13	P39	CMR 42-44-98	P69	CMR 51-34-6
P10	ระยอง 60	P40	OMR 42-16-37	P70	CMR 51-43-69
P11	ระยอง 72	P41	CMR 43-08-89	P71	CMR 53-87-20
P12	ระยอง 90	P42	CMR 44-03-57	P72	CMR 53-106-24
P13	KU 50	P43	CMR 44-29-12	P73	OMR 53-03-6
P14	KU 72	P44	OMR 44-23-34	P74	มานพ
P15	KU 75	P45	OMR 45-27-76	P75	สอยดาว
P16	HB 60	P46	CMR 46-30-264	P76	GR 891
P17	HB 80	P47	CMR 46-31-7	P77	KATEH
P18	พิรุณ 1	P48	CMR 46-47-137	P78	KM 98-1
P19	พิรุณ 2	P49	CMR 46-55-23	P79	MBRA 12
P20	CM 3299-15	P50	CMR 47-02-9	P80	MCOL 912B
P21	CR 19	P51	CMR 47-30-8	P81	MCOL 1098
P22	SM 2277-23	P52	CMR 48-20-17	P82	MCUB 23
P23	CMR 26-08-61	P53	CMR 48-35-1	P83	MECU 72
P24	OMR 26-14-9	P54	CMR 48-53-48	P84	MMAL 63
P25	OMR 29-20-118	P55	CMR 49-22-227	P85	MPER 325
P26	CMR 30-71-25	P56	CMR 49-54-10	P86	MVEN 297A
P27	CMR 31-42-20	P57	CMR 49-54-67	P87	SC 5
P28	CMR 32-94-121	P58	CMR 49-89-70	P88	SC 201
P29	CMR 33-38-48	P59	CMR 50-20-2	P89	YOD KHAM
P30	CMR 35-22-348	P60	CMR 50-20-114	P90	MCOL 1752

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 (ต่อ) รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์จากต่างประเทศ (พันธุ์ที่นำเข้าจาก CIAT) ที่นำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์
ST1	CM 125-22	ST31	CMR 26-72-2	ST61	CMR 38-106-32
ST2	CM 305-15	ST32	CMR 28-67-76	ST62	CR 17-82
ST3	CM 407-30	ST33	CMR 28-72-131	ST63	Golden Yellow
ST4	CM 523-7	ST34	CMR 29-56-101	ST64	H.P.5 (CM 305-13)
ST5	CM 781-2	ST35	CMR 29-60-15	ST65	MCOL 690-75-33
ST6	CM 3292-18	ST36	CMR 30-05-12	ST66	MKUC 28-71-66
ST7	CM 3306-3	ST37	CMR 30-238-34	ST67	MKUC 28-71-67
ST8	CM 4049 UJ	ST38	CMR 31-06-103	ST68	OMR 23-05-3
ST9	CM 4955-27	ST39	CMR 31-06-104	ST69	OMR 28-97-31
ST10	CM 6125-117	ST40	CMR 31-09-71	ST70	OMR 29-19-129
ST11	CMK 23-27-30	ST41	CMR 31-19-14	ST71	OMR 29-27-5
ST12	CMK 23-67-313	ST42	CMR 31-37-105	ST72	OMR 34-29-66
ST13	CMR 23-20-23Q	ST43	CMR 33-18-101	ST73	OMR 38-75-52
ST14	CMR 23-51-10	ST44	CMR 33-35-13	ST74	O.P. 608
ST15	CMR 23-117-4	ST45	CMR 34-35-36	ST75	(R x CMC 84) 21-1Q
ST16	CMR 23-149-118	ST46	CMR 34-35-54	ST76	(R x CMC 84) 21-5Q
ST17	CMR 24-14-317	ST47	CMR 34-79-152	ST77	(R x V4 C) 21-4Q
ST18	CMR 24-14-367	ST48	CMR 35-21-36	ST78	(R x V69) 21-2Q
ST19	CMR 25-30-194Q	ST49	CMR 35-21-96	ST79	SM 302-5
ST20	CMR 25-32-429Q	ST50	CMR 35-23-76	ST80	SM 937-8
ST21	CMR 25-32-502Q	ST51	CMR 35-26-369	ST81	SM 1186-24
ST22	CMR 25-33-134 Q	ST52	CMR 35-26-303	ST82	SPY
ST23	CMR 25-33-157Q	ST53	CMR 35-91-63	ST83	SMH 22-03-1
ST24	CMR 25-34-112	ST54	CMR 35-123-147	ST84	Sriracha 1
ST25	CMR 25-34-159	ST55	CMR 36-25-67	ST85	V. 14
ST26	CMR 25-82-88	ST56	CMR 36-30-329	ST86	V. 22
ST27	CMR 25-104-42	ST57	CMR 36-31-381	ST87	V. 24
ST28	CMR 25-105-47	ST58	CMR 36-71-27	ST88	V. 25
ST29	CMR 26-38-7	ST59	CMR 37-18-63	ST89	V. 30
ST30	CMR 26-69-79	ST60	CMR 38-66-1	ST90	V. 43

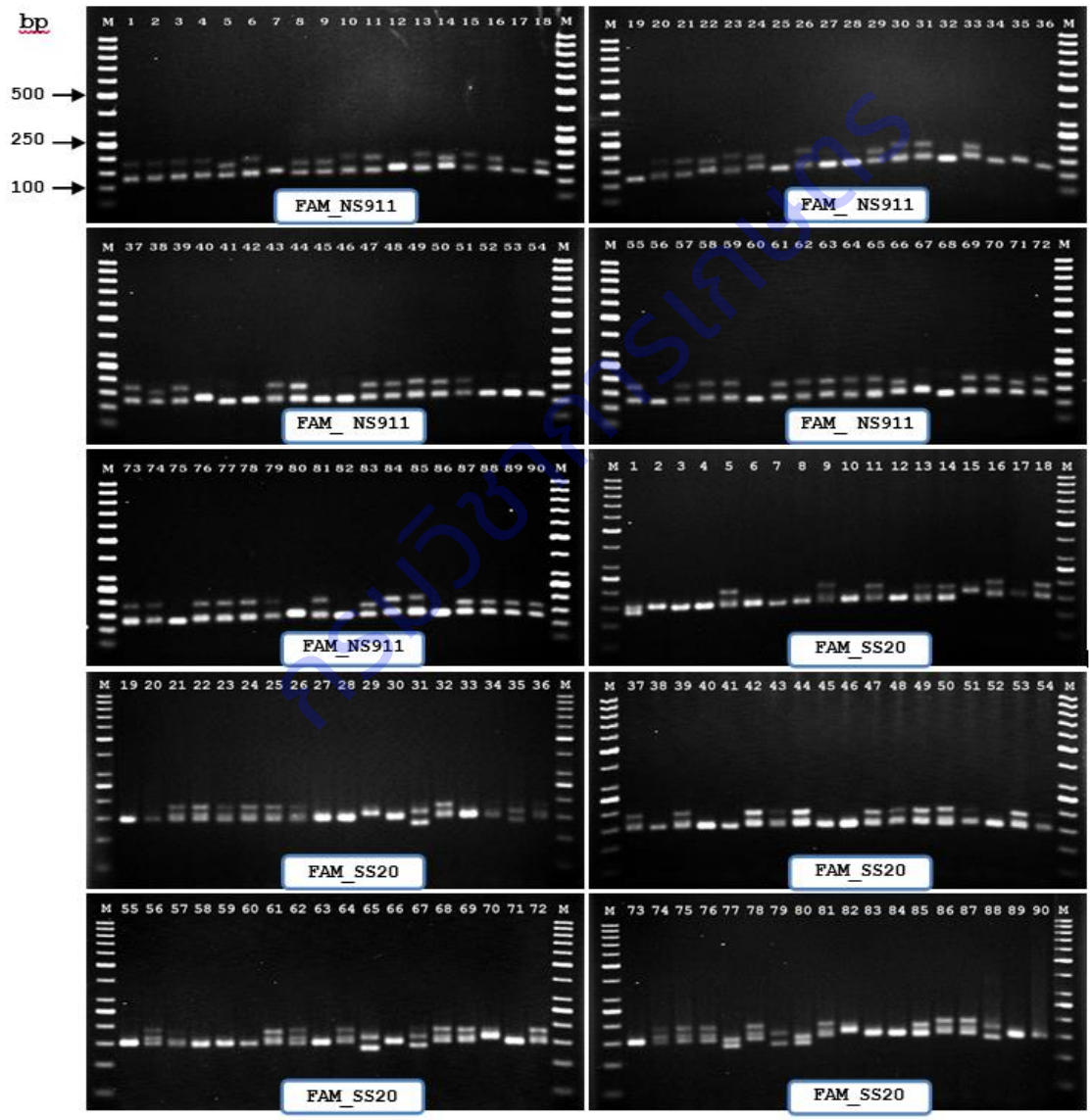
กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 (ต่อ) รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์จากต่างประเทศ (พันธุ์ที่นำเข้าจาก CIAT) ที่นำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์

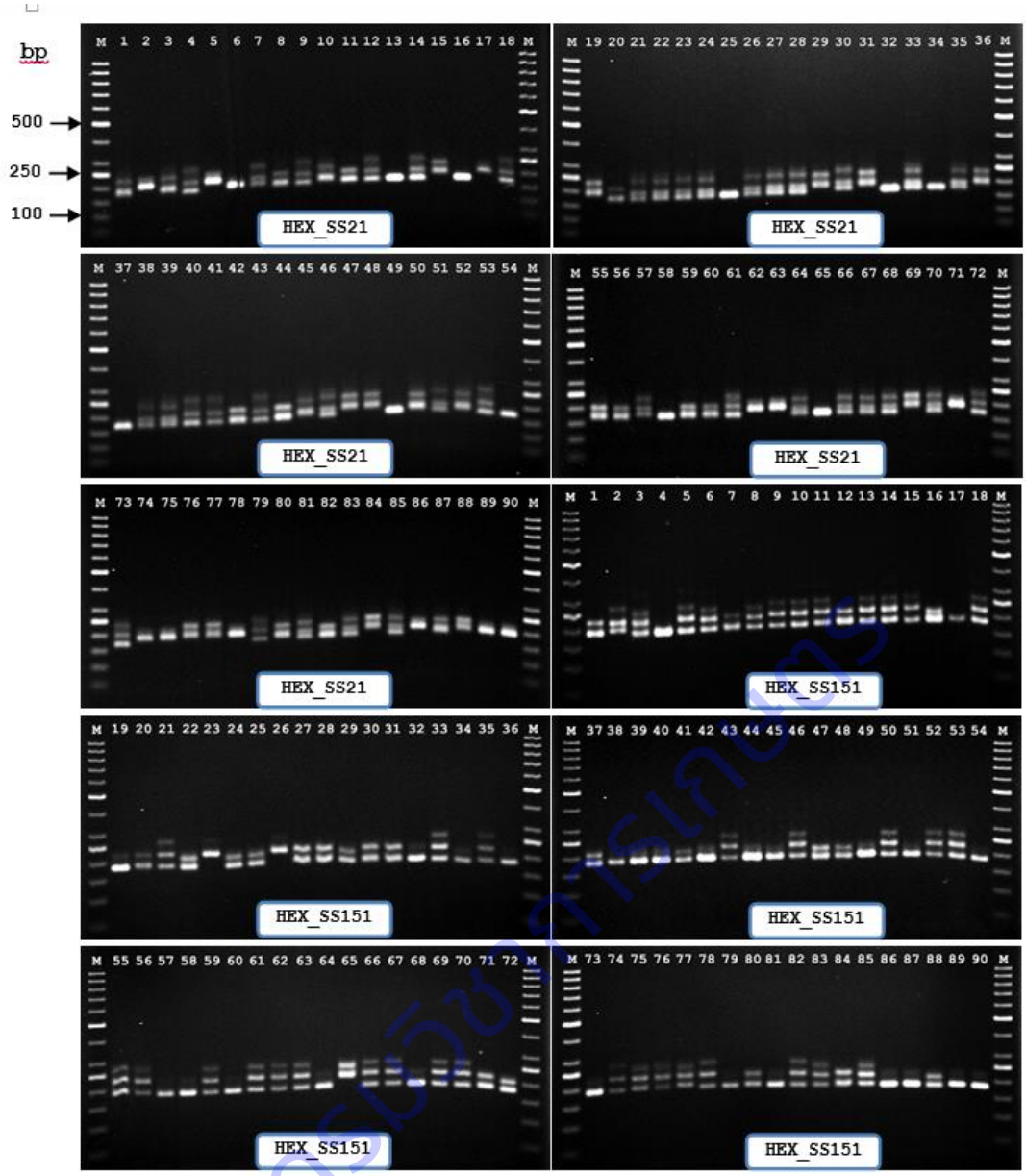
ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์
T1	56/5	T31	CMR 23-149-67	T61	MPER 183
T2	01-77-1	T32	CMR 23-149-117	T62	HANATEE
T3	27-77-10	T33	CMR 23-149-128	T63	BATHANG
T4	29-77-5	T34	CMR 23-281-141	T64	MCOL 22
T5	29-77-19	T35	CMR 24-14-183	T65	MENTEGA
T6	35-77-22	T36	CMR 24-14-1308	T66	NEP HONGHA
T7	36-77-1	T37	CMR 24-89-65	T67	YOLK
T8	CM 323-375	T38	CMR 25-38-157Q*	T68	297
T9	CM 342-55	T39	CMR 25-55-28*	T69	298
T10	CM 681-2	T40	CMR 25-105-128Q	T70	315
T11	CM 3299-14	T41	CMR 26-08-63	T71	456
T12	CM 3299-22	T42	CMR 26-65-13	T72	CMR 35-21-199
T13	CM 4777-2	T43	CMR 26-65-192	T73	CMR 42-01-2
T14	CM 6125-125	T44	CMR 28-05-13	T74	V. 2596
T15	CMC 72	T45	CMR 32-24-20	T75	Variegated (green)
T16	CMC 84	T46	CMR 33-35-69	T76	(V1 x R) 20-15
T17	CMH 22-77-1	T47	CMR 33-53-181	T77	(V1 x R) 20-20
T18	CMK(R x CMC 76)21-235	T48	CMR 34-40-43	T78	(V1 x R) 21-8
T19	CMR 23-08-8	T49	CMR 34-44-40	T79	(V3 x R) 20-10
T20	CMR 23-17-51	T50	CMR 34-79-48	T80	(V3 x R) 20-15
T21	CMR 23-17-276*	T51	H.P. 2	T81	(V3 x R) 21-16
T22	CMR 23-26-2	T52	MMEX 59*	T82	Wild 1
T23	CMR 23-84-8	T53	MONTON	T83	Wild 2
T24	CMR 23-102-65	T54	SC 8	T84	Yellow root
T25	CMR 23-107-4	T55	(R x Hanatee) 21-28Q*	T85	(R x Hanatee) 21-21Q
T26	CMR 23-113-14	T56	SR 18-127	T86	MBRA 191
T27	CMR 23-126-17	T57	SV 7-20-3	T87	MPAN 70
T28	CMR 23-126-161	T58	SV 25-21-1	T88	MCOL 2485
T29	CMR 23-126-122	T59	V. 1*	T89	MPER 281
T30	CMR 23-149-59	T60	(V1 x R) 21-11	T90	HB 90

กรมวิชาการเกษตร

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 4 ชนิดสี จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ FAM_SS147, FAM_SS148, FAM_NS911, FAM_SS20, HEX_SS59, HEX_SS149, HEX_SS21, HEX_SS151, TAMRA_SS141, TAMRA_SS51, TAMRA_SS4, TAMRA_SS177, ROX_NS169, ROX_SS154, ROX_NS945, และ ROX_NS78 พบว่า ไพรเมอร์ชนิด SSR ทุกคู่ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค PCR และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี **(ภาพที่ 6)** ผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้จากดีเอ็นเอของมันสำปะหลังถูกนำไปวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (Fragment Analysis) โดยการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค capillary electrophoresis ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI3730XL และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GeneMapper Software 5 **(ภาพที่ 7)** การบันทึกข้อมูลขนาดดีเอ็นเอ (product size) ของพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์ลงในตาราง excel ได้ข้อมูลทั้งสิ้น จำนวน 4,320 ข้อมูล **(ภาพที่ 8)**



ภาพที่ 6 แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 90 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ที่ติดฉลากที่ด้วยสารเรืองแสง FAM_NS911 และ FAM_SS20 วิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 6 (ต่อ) แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 90 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง HEX_SS21 และ HEX_SS151 วิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 7 (ต่อ) แสดงผลการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FAM_SS148, HEX_SS149, TAMRA_SS51 และ ROX_SS154 และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ โดยใช้โปรแกรม GeneMapper Software 5

No.	Primer	Alleles/ Name		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20
				56/5	01-77-1	27-77-10	29-77-5	29-77-19	35-77-22	36-77-1	CM 323-375	CM 342-55	CM 681-2	CM 3299-14	CM 3299-22	CM 4777-2	CM 6125-125	CMC 72	CMC 84	CMH 22-77-1	CMK(R x CMC 76) 21-235	CMR 23-08-8	CMR 23-17-51
1	FAM_SS147	Band no.(bp)	1	100.8	100.9	100.8	100.8	100.7	100.8	100.8		100.8	100.8	101.0	101.1	100.8	100.8	100.7		100.7	100.8	100.8	100.9
		Band no.(bp)	2		110.8		110.7				110.7	110.6	110.6	110.9		110.6	110.7	110.7	110.8				110.9
		Band no.(bp)	3						114.8	114.8													
		Band no.(bp)	4																				
2	HEX_SS59	Band no.(bp)	1												126.5								
		Band no.(bp)	2	139.9														140.1	140.1		139.8		
		Band no.(bp)	3										146.3			146.3							
		Band no.(bp)	4			154.6					154.5			154.6			154.5	154.6	154.5	154.6			154.6
		Band no.(bp)	5		160.1		160.1	160.4	160.2	160.3		160.2										160.2	
3	TAMRA_SS141	Band no.(bp)	1	250.0									249.9										250.0
		Band no.(bp)	2				255.0				254.9	255.0				255.0	254.9						
		Band no.(bp)	3		260.7	260.6		260.6	260.6	260.7				260.6	260.7			260.7	260.6	260.6	260.7	260.6	
4	ROX_NS169	Band no.(bp)	1			299.9								299.9	300.1		299.9			299.9		299.9	300.1
		Band no.(bp)	2		303.9						303.9	303.8			304.1			305.7	305.6		303.9		
		Band no.(bp)	3	312.8			314.5	314.5															
		Band no.(bp)	4			315.5			315.5	315.5	315.5		315.5	315.6		315.5	315.5	315.5	315.4	315.4		315.5	
		Band no.(bp)	5		318.4																318.4		
		Band no.(bp)	6																				329.9
5	FAM_SS148	Band no.(bp)	1		103.8	103.7	103.8																
		Band no.(bp)	2																				
		Band no.(bp)	3	109.7							109.7	109.7						109.7	109.6				109.8
		Band no.(bp)	4		111.7	111.6	111.6	111.6	111.7	111.7			111.7	111.6	112.0	111.7	111.6			111.6	111.7	111.6	
		Band no.(bp)	5						117.7	117.8						117.8				117.7			
6	HEX_SS149	Band no.(bp)	1	157.8	157.9	157.8	157.9		157.8	157.9				157.8	158.0	157.8		157.8	157.9	157.9	157.8	157.9	157.8
		Band no.(bp)	2	177.0	177.0						176.9	176.9	176.9	176.9	177.1	176.9	176.9	177.0		176.9	176.9		
		Band no.(bp)	3			178.9	178.9	178.8	178.8	179.0													
		Band no.(bp)	4														180.8		180.8			180.9	
7	TAMRA_SS51	Band no.(bp)	1	258.5				258.6	258.6	258.6	258.6			258.6									
		Band no.(bp)	2								270.8			270.9				271.0	270.9		270.8		
		Band no.(bp)	3					276.2	276.2	276.5		276.3			276.4					276.3			
		Band no.(bp)	4	278.5											279.5			278.6	278.5		279.6		278.5
		Band no.(bp)	5																				
		Band no.(bp)	6	297.8	297.6	297.5	297.5			297.5		297.5	297.5	297.7		297.6	297.5	297.7	297.6			297.6	297.8
8	ROX_SS154	Band no.(bp)	1				310.3	310.4					310.5	310.3	310.6			310.7	310.3				310.3
		Band no.(bp)	2	320.5	320.4	320.4	320.4	320.5	320.5	320.5	320.2	320.5	320.6	320.4	320.9	320.6	320.4			320.2	320.5	320.4	320.5
		Band no.(bp)	3															328.6	328.6				
		Band no.(bp)	4																				
9	FAM_NS911	Band no.(bp)	1		114.4	114.4	114.4	114.3	114.3	114.3	114.5	114.3		114.5	114.4	114.3	114.3	114.3	114.4	114.4	114.3	114.3	114.2
		Band no.(bp)	2						118.6	118.5													
		Band no.(bp)	3		122.9																		
		Band no.(bp)	4	126.1		126.1					126.2	126.0	126.1	126.2	126.2	126.0	126.1				127.1	126.1	126.0
10	HEX_SS21	Band no.(bp)	1			161.3														161.2		161.2	
		Band no.(bp)	2			169.3	169.2	169.1	169.2	169.1		169.2	169.3	169.3	169.2		169.3						
		Band no.(bp)	3	182.8			182.9	182.8						183.0			182.9	182.8	182.8		181.2		182.8
		Band no.(bp)	4																				
		Band no.(bp)	5	192.6	192.6				192.6	192.6	192.7		192.6			192.6		192.6	192.6	192.6	192.8	192.6	192.6
11	TAMRA_SS4	Band no.(bp)	1						260.0	260.0													
		Band no.(bp)	2		267.8				267.9	267.9						267.8	267.9	268.0	267.9				
		Band no.(bp)	3				271.8									271.7	273.4	271.8	271.7				
		Band no.(bp)	4			279.6		279.6					279.6		279.5						279.5		
		Band no.(bp)	5	286.5	287.4	286.6					286.6	286.6		286.6						286.6		286.7	286.6
12	ROX_NS945	Band no.(bp)	1			382.6		382.5	382.5	382.6		382.6				382.4	382.5	382.5	382.5			382.6	
		Band no.(bp)	2				387.5	387.5															
		Band no.(bp)	3	390.6	391.5	390.6	390.5		390.6	390.5	390.4	390.5	391.3	391.4	391.4	390.5		390.6	390.5	390.5	391.4	390.6	390.5
		Band no.(bp)	4																				
		Band no.(bp)	5	399.4									397.3				399.4						
13	FAM_SS20	Band no.(bp)	1				124.4	124.4			124.5		124.4			124.5	124.4						
		Band no.(bp)	2																				
		Band no.(bp)	3											137.3									
		Band no.(bp)	4	142.2	142.1	142.1	142.1		142.2	142.1		142.2	142.1	142.1	142.1	142.1		142.1	142.1	142.2	142.1	142.1	
		Band no.(bp)	5																				144.4
		Band no.(bp)	6								149.5	149.4											
		Band no.(bp)	7					155.8									155.9						
		Band no.(bp)	8																		157.9		
		Band no.(bp)	9																				162.1
14	HEX_SS151	Band no.(bp)	1																				
		Band no.(bp)	2		179.9	179.9	179.9	179.9	179.9	179.8	179.9		179.8	180.0	179.9	179.9				179.9	179.8	179.9	179.8
		Band no.(bp)	3	181.9																			
		Band no.(bp)	4														185.8	185.8	185.8				
		Band no.(bp)	5									188.0								187.8			
		Band no.(bp)	6																				
		Band no.(bp)	7	210.0	210.4				210.4	210.4				210.4				210.4	210.4			210.5	
		Band no.(bp)	8				216.3	216.3			216.3	216.4			216.3						216.3		216.1
15	TAMRA_SS177	Band no.(bp)	1								234.1	234.1		234.1	234.1	234.1	234.0			234.0		234.1	234.0
		Band no.(bp)	2						240.0	240.0		240.0	240.0	240.0		239.9							
		Band no.(bp)	3						255.8	255.8								256.1	255.8				
		Band no.(bp)	4	259.8	259.7		259.8	259.7														259.7	
		Band no.(bp)	5		265.6								265.7				265.6	266.0	265.7		265.7		
		Band no.(bp)	6			267.6	267.6	267.6															
		Band no.(bp)	7																	269.7	269.8		269.7
16	ROX_NS78	Band no.(bp)	1	369.5			369.4	369.4			369.4	369.5			369.4		369.5	369.5	369.5		369.5		369.4
		Band no.(bp)	2																				
		Band no.(bp)	3										377.3	377.2									
		Band no.(bp)	4		380.9				381.0	380.9										380.9		380.9	
		Band no.(bp)	5													382.9	382.9						
		Band no.(bp)	6	384.9	384.8	384.9	384.8	384.8	385.0	384.9		384.9	385.0	384.9	384.8			384.9	384.9	384.9		384.9	384.9
		Band no.(bp)	7			411.1		411.2										411.2	411.2				
		Band no.(bp)	8	417.4	417.4	417.3	417.3	417.4	417.4	417.4	417.4	417.4	417.5	417.4	417.4	417.4	417.4	417.3	417.4	417.4	417.3	417.4	417.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 8 แสดงตัวอย่างการบันทึกข้อมูลขนาดดีเอ็นเอ (Product Size) ของมันสำปะหลังที่ได้จากการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

การวิเคราะห์ข้อมูลขนาดดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละคู่ พบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด จำนวน 88 อัลลีล มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งตั้งแต่ 3 – 9 อัลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.5 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกัน (polymorphic) จำนวน 88 อัลลีล คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ที่พบอัลลีลมากที่สุด จำนวน 9 อัลลีลคือ FAM_SS20 ส่วนไพรเมอร์ที่พบอัลลีลน้อยที่สุด จำนวน 3 อัลลีลคือ TAMRA_SS141 ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 100 – 418 คู่เบส ค่าสังเกต เฮทเทอโรไซโกซิตี้ (Ho) อยู่ระหว่าง 0.07 – 0.79 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.52 และค่าคาดหมายเฮทเทอโรไซโกซิตี้ หรือ ค่าความหลากหลายของยีน (Gene diversity; He) อยู่ระหว่าง 0.48 – 0.81 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.68 การวิเคราะห์ค่า Polymorphism Information Content (PIC) พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.38 – 0.78 โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.63 โดยไพรเมอร์ที่มีค่า PIC สูงสุดคือ FAM_SS20 และไพรเมอร์ที่มีค่า PIC ต่ำสุดคือ FAM_SS147 ตามรายงานของ Yu และคณะ (2012) ระบุว่าค่า PIC > 0.50 แสดงถึงความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับสูง ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.25 <PIC <0.50 ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระดับปานกลาง และค่า PIC < 0.25 ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับที่ต่ำ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ค่า PIC ของไพรเมอร์ที่คัดเลือกและนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง มีค่าอยู่ระหว่าง 0.38 – 0.78 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้อยู่ในระดับสูง **(ตารางที่ 6)**

เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) โดยวิธี Jaccard coefficient index พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.10 – 1.00 โดยพันธุ์ที่มีค่า similarity coefficient สูงสุดคือ CR17-82 กับ SR18-127, H.P.2 กับ CMR23-17-276*, CMR23-149-117 กับ (V3 x R) 20-10 กับ (V3 x R) 20-15, CMR25-34-129 กับ CMR29-56-101, CMR25-33-134Q กับ CMR25-34-112, CMR24-14-183 กับ CM4955-27, CMR23-26-2 กับ CMR23-20-23Q, MENTEGA กับ Yellow Root กับ Wild1 กับ Variegated (green) และ YOLK, RAYONG 5 กับ CMK23-27-30, KU 75 กับCMR31-42-20, HB60 กับSPY, KU 72 กับ CMR33-38-48, KU50 กับ MCUB23 กับ H.P.5 (CM305-13) กับ SM1186-24 กับ CMR24-89-65, V.30 กับ V. 43, MCOL1098 กับ MCOL912B, CMR25-105-47 กับ CMR25-104-42, RAYONG 2 กับ 35-77-22 และ CMR26-65-192 กับ CMR26-69-79 และพันธุ์ที่มีค่า similarity coefficient ต่ำสุดคือ HANATEE กับ CMR47-30-8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 สรุปอุณหภูมิ (Tm), ขนาดของอัลลีล (bp), จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง, % polymorphic, ค่าสังเกตเฮทเทอโรไซโกซิตี้ (Ho), ค่าความหลากหลายของยีน (He) และค่า polymorphism information content (PIC) ของมันสำปะหลัง จำนวน 270 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 16 เครื่องหมาย

Primer / (Locus)	Temperature (°C)	Number of Alleles	Number of Polymorphic	% Polymorphic	Size of alleles (bp)	Mean of alleles (bp)	Observed heterozygosity (Ho)	Gene Diversity (He)	Polymorphism Information Contents (PIC)
FAM_SS147	55	4	4	100	100-120	106	0.47	0.48	0.38
FAM_SS148	62	5	5	100	103-118	111	0.24	0.74	0.69
FAM_NS911	55	4	4	100	114-127	258	0.07	0.54	0.48
FAM_SS20	60	8	8	100	124-163	312	0.79	0.81	0.78
HEX_SS59	63	5	5	100	126-162	148	0.48	0.75	0.71
HEX_SS149	62	4	4	100	157-181	172	0.64	0.71	0.66
HEX_SS21	60	5	5	100	161-193	288	0.24	0.62	0.59
HEX_SS151	64	7	7	100	175-217	318	0.46	0.52	0.44
TAMRA_SS141	60	3	3	100	249-262	258	0.61	0.61	0.56
TAMRA_SS51	60	6	6	100	258-298	176	0.74	0.74	0.69
TAMRA_SS4	62	5	5	100	260-289	278	0.27	0.74	0.70
TAMRA_SS177	63	7	7	100	234-270	389	0.65	0.65	0.57
ROX_NS169	64	6	6	100	299-330	312	0.50	0.72	0.68
ROX_SS154	55	4	4	100	310-335	193	0.65	0.67	0.63
ROX_NS945	64	5	5	100	382-401	249	0.79	0.78	0.75
ROX_NS78	64	8	8	100	369-418	393	0.67	0.78	0.75
Mean	60	5.4		100		247.56	0.52	0.68	0.63

เมื่อนำค่า similarity matrix ที่ได้มาทำการวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (cluster analysis) ด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) ซึ่งแสดงผลในรูปแบบของ dendrogram และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.10e (Rohlf, 2000) พบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังทั้ง 270 ตัวอย่างพันธุ์ ประกอบด้วย กลุ่มพันธุ์ไทยซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์ที่มาจากต่างประเทศ (CIAT Core Collection) แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ และกลุ่มย่อยอีก 6 กลุ่ม **(ภาพที่ 10)** ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ **1)** เกษตรลพบุรี (KLR), MPER325, 56/5, HANATEE, (R x HANATEE) 21-28Q*, NEPHONGHA, BATHANG, MPER183, MPER281, CMR44-29-12, 01-77-1, CMR49-54-67, CMR23-126-161, CMR28-05-13, MPAN70, SC5, SC201, MCOL2485, CMK23-67-313, CMH22-77-1, CMR23-08-8, CMR25-32-429Q, CM3299-22, RAYONG 1, CR17-82, SR18-127, O.P.608, YOD KHAM, CMK(R x CMC76)21-235, CMR23-17-276*, H.P.2, CMR56-137-70, (R x V4C) 21-4Q, CMR32-94-121, CMR31-09-71, CMR31-19-14, (V1 x R) 20-15, (V1 x R) 20-20, Golden Yellow, (V1 x R) 21-8, (V3 x R) 21-16, SV7-20-3, (R x CMC84) 21-5Q, CMR23-149-117, (V3 x R) 20-10, (V3 x R) 20-15, V.1*, (R x V69) 21-2Q, SV25-21-1, V.24, MCOL1725, CMR31-06-103, RAYONG 60, CMR25-30-194Q, MBRA12 และ MBRA191 และ **2)** KATEH, (R x CMC84) 21-1Q, (R x HANATEE) 21-21Q, CMC72, CMC84 และ CMR23-126-17

ศูนย์วิทยทรัพยากร

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ **1)** RAYONG 3, CMR25-34-159, CMR29-56-101, CMR25-32-502Q, CMR25-33-134Q, CMR25-34-112, CMR23-107-4, CMR25-33-157Q, CMR25-82-88, CMR25-38-157Q*, CMR23-117-4, CMR29-19-129, CMR23-102-65, MKUC28-71-66, CMR23-113-14, CMR23-126-122, MECU72, CMR23-149-67, MONTON, CMR25-55-28*, CMR29-60-15, MKUC28-71-67, CMR25-105-128Q, CMR23-149-59, CM4955-27, CMR24-14-183, CMR23-20-23Q, CMR23-26-2, CMR24-14-1308, CMR23-51-10, CMR23-17-51, CMR24-14-367, CMR23-149-128, CMR33-18-101, MVEN297A, MENTEGA, YELLOW ROOT, WILD 1, VARIEGATED (GREEN), YOLK, MCOL690, SM302-5, RAYONG 5, CMK23-27-30, CMR36-25-67, KU 75, CMR31-42-20, SOIDAO, CMR34-40-43, CMR53-106-24, HB 60, SPY, CMR36-30-329, CMR45-27-76 (RAYONG 15), CMR48-35-1, CMR28-72-131, CMR33-35-69, HB 80, CMR34-35-36, CMR49-89-70, CMR37-18-201, CMR34-35-54, RAYONG 86-13, RAYONG 72, CMR38-106-32, CMR36-55-166, 27-77-10, KU 72, CMR33-38-48, CMR31-06-104, CMR35-23-76, CMR34-79-48, CMR35-22-348, CMR35-21-199, CMR35-21-96, CMR42-44-98, CMR36-71-27, CMR37-18-63, CMR37-18-189, HB 90, CMR35-26-369, CMR31-37-105, CMR33-35-13, CMR35-123-147, CMR35-91-63, CMR46-31-7, CMR30-238-34, RAYONG 7, CMR30-71-25, CMR24-14-317, CMR36-31-381, CMR50-20-2, CMR51-13-14, CMR51-04-42, CMR23-84-8, WILD 2, RAYONG 9, CMR30-05-12, OMR29-20-118, CMR34-79-152, CMR35-21-36, CMR32-24-20, CMR50-34-80, CMR28-97-31, CMR34-29-66, CMR38-75-52, RAYONG 90, KU 50, MCUB23, H.P.5 (CM305-13), SM1186-24, CMR24-89-65, CMR28-67-76, CMR50-13-26, CMR26-08-61, CMR26-08-63, CM523-7, CMR42-01-2, CMR50-20-114, CMR46-30-264, OMR53-03-6, CMR47-30-8, CMR51-23-14, CR 19, CMR44-23-34, CMR50-73-6 และ V.22 และ **2)** OMR29-27-5, V.30, V.43, SMH22-03-1 และ V.14

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ **1)** RAYONG 11, CMR49-22-227, CMR48-20-17, CMR47-02-9, CMR50-30-23, 297, 315, 298, CMR26-14-9, CMR53-87-20, CMR42-16-37, CM681-2, (V1 x R) 21-11, PIRUN 1, PIRUN 2, CMR38-125-77, CMR51-34-6, CM3299-15, CM3299-14, CMR41-42-3, CMR38-66-1, CMR46-55-23, SC8, CMR51-43-69, CM4049UJ, MANOP, MCOL912B, MCOL1098, CMR35-112-1, CMR48-53-48, CMR41-109-72, CMR23-149-118, CMR46-47-137, CM407-30, CMR49-54-10, CMR34-44-40, CM3292-18, CMR50-41-1, CMR35-26-303, CMR43-08-89, CMR44-03-57 และ CM6125-117 และ **2)** CM125-22, CM6125-125 และ MCOL22

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย SM2277-23, KM98-1, CM323-375, MMEX59* และ MMAL63

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย 29-77-5, 29-77-19, CM342-55 และ CMR26-65-13

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย CMR41-112-21, SM937-8, CMR25-104-42, CMR25-105-47, CMR23-05-3 และ V.2596

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย RAYONG 2, 35-77-22, 36-77-1, CMR23-281-141, CM305-15, CM781-2, CM3306-3, CM4777-2, CMR26-69-79, CMR26-65-192, CMR26-72-2, Sriracha 1 และ CMR33-53-181

กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วย GR891

กลุ่มที่ 9 ประกอบด้วย CMR26-38-7 และ V.25

กรมวิชาการเกษตร

จากผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ พบว่า ในประชากรมันสำปะหลังกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย ซึ่งในกลุ่มย่อยที่ 1 พบเป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีความหลากหลายของประชากรค่อนข้างสูง มีทั้งพันธุ์พื้นเมืองของไทย เช่น เกษตรลพบุรี และ HANATEE ซึ่งคาดว่านำมาจากทางภาคใต้ของไทยผ่านมาทางประเทศมาเลเซีย พันธุ์ลูกผสมซึ่งมีฐานพันธุกรรมมาจากประชากรพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่อยู่ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน เช่น CMR32-94-121 ((V1 x R) 20-15 x 27-77-10), CMR49-54-67 (CMR42-44-98 x CM3299-22), (R x V4C) 21-4Q, (V1 x R) 20-15, (V1 x R) 20-20, (V1 x R) 21-8, (V3 x R) 21-16, (R x CMC84) 21-5Q, (V3 x R) 20-10, (V3 x R) 20-15, V.1*, (R x V69) 21-2Q, (R x HANATEE) 21-28Q* เป็นต้น และพันธุ์ที่รวบรวมได้จากต่างประเทศหรือพันธุ์ที่ได้จากการนำเมล็ด F1 จากต่างประเทศมาปลูกคัดเลือก เช่น RAYONG 1 (เมล็ด F1 จากโคลัมเบีย), YOD KHAM (สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว CIAT), NEP HONGHA และ BATHANG (สาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม CIAT), MCOL1725 และ MCOL2485 (สาธารณรัฐโคลัมเบีย CIAT), MECU72 (สาธารณรัฐเอกวาดอร์ CIAT), MPER183 กับ MPER281 และ MPER325 (สาธารณรัฐเปรู CIAT), MBRA12 และ MBRA191 (สาธารณรัฐบราซิล CIAT), MPAN70 (สาธารณรัฐปานามา CIAT), SC5 และ SC201 (สาธารณรัฐจีน CIAT), V.24 (Virgin Island), CM3299-22 (CIAT Breeding Lines), CR17-82 (สาธารณรัฐคอสตาริกา CIAT) และ RAYONG 60 ซึ่งมีพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่อยู่ภายในกลุ่มประชากรนี้คือ MCOL1684 X R1 ในขณะที่กลุ่มย่อยที่ 2 พบมีทั้งพันธุ์จากต่างประเทศ ได้แก่ CMC72, CMC84, KATEH (สาธารณรัฐอินโดนีเซีย CIAT) และพันธุ์ลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่อยู่ภายในกลุ่มประชากรนี้เช่นกัน ได้แก่ (R x CMC84) 21-1Q, (R x HANATEE) 21-21Q, และ CMR23-126-17

สำหรับประชากรในกลุ่มที่ 2 พบเป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย ซึ่งในกลุ่มย่อยที่ 1 พบกลุ่มพันธุ์พื้นเมืองของไทย ได้แก่ MONTON และ YELLOW ROOT กลุ่มพันธุ์ลูกผสม CMR25-34-159, CMR29-56-101, CMR25-32-502Q, MKUC28-71-66 และ MKUC28-71-67 เป็นต้น และกลุ่มพันธุ์จากต่างประเทศหรือพันธุ์ที่ได้จากการนำเมล็ด F1 จากต่างประเทศมาปลูกคัดเลือก ได้แก่ RAYONG 3 (เมล็ด F1 จากโคลัมเบีย (M.MEX55 x M.VEN307)), MVEN297A (สาธารณรัฐโบลีวาร์แห่งเวเนซุเอลา CIAT), MENTEGA (สาธารณรัฐประชาธิปไตยติมอร์-เลสเต CIAT), MECU72 (สาธารณรัฐเอกวาดอร์ CIAT), MCOL690 (สาธารณรัฐโคลัมเบีย CIAT), CM4955-27 และ SM302-5 (CIAT Breeding Lines), WILD 1 (CIAT), YOLK (สาธารณรัฐประชาชนจีน CIAT) และ VARIEGATED (GREEN) เป็นต้น กลุ่มย่อยที่ 2 พบเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ของประชากรภายในกลุ่มค่อนข้างสูง ได้แก่ กลุ่มพันธุ์ไทยที่เกษตรกรนิยมปลูกหรือนิยมนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ ได้แก่ RAYONG 5 (27-77-10 x R 3), RAYONG 7 (CMR30-71-25 x OMR29-20-118), RAYONG 9 (CMR31-19-23 x OMR29-20-118), CMR45-27-76 (RAYONG 15) (ลูกผสมเปิด KU 50), RAYONG 86-13 (R 11 x KU 50), RAYONG 72 (R 1 x R 5), RAYONG 90 (CMC76 x V.43), HB 60 (KU 50 x R 5), HB 80 (R 5 x KU 50), HB 90 (ลูกผสมเปิด HB 60), KU 50 (R 1 x R 90), KU 72 (R 5 x OMR29-20-118), KU 75 (R 60 x R 7) กลุ่มพันธุ์ลูกผสม ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มพันธุ์นี้ จะเป็นกลุ่มที่มีการจับคู่ผสมพันธุ์โดยการใช้พันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่อยู่ภายในกลุ่มประชากรเดียวกันจึงมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เช่น CMR30-71-25 (R 60 x R 90), CMR31-42-20 (R 5 x R 60), CMR37-18-189 (R 5 x KU 50), CMR37-18-201 (R 5 x KU 50) และ CMR49-89-70 (R 5 x R 9) เป็นต้น และกลุ่มพันธุ์จากต่างประเทศ ได้แก่

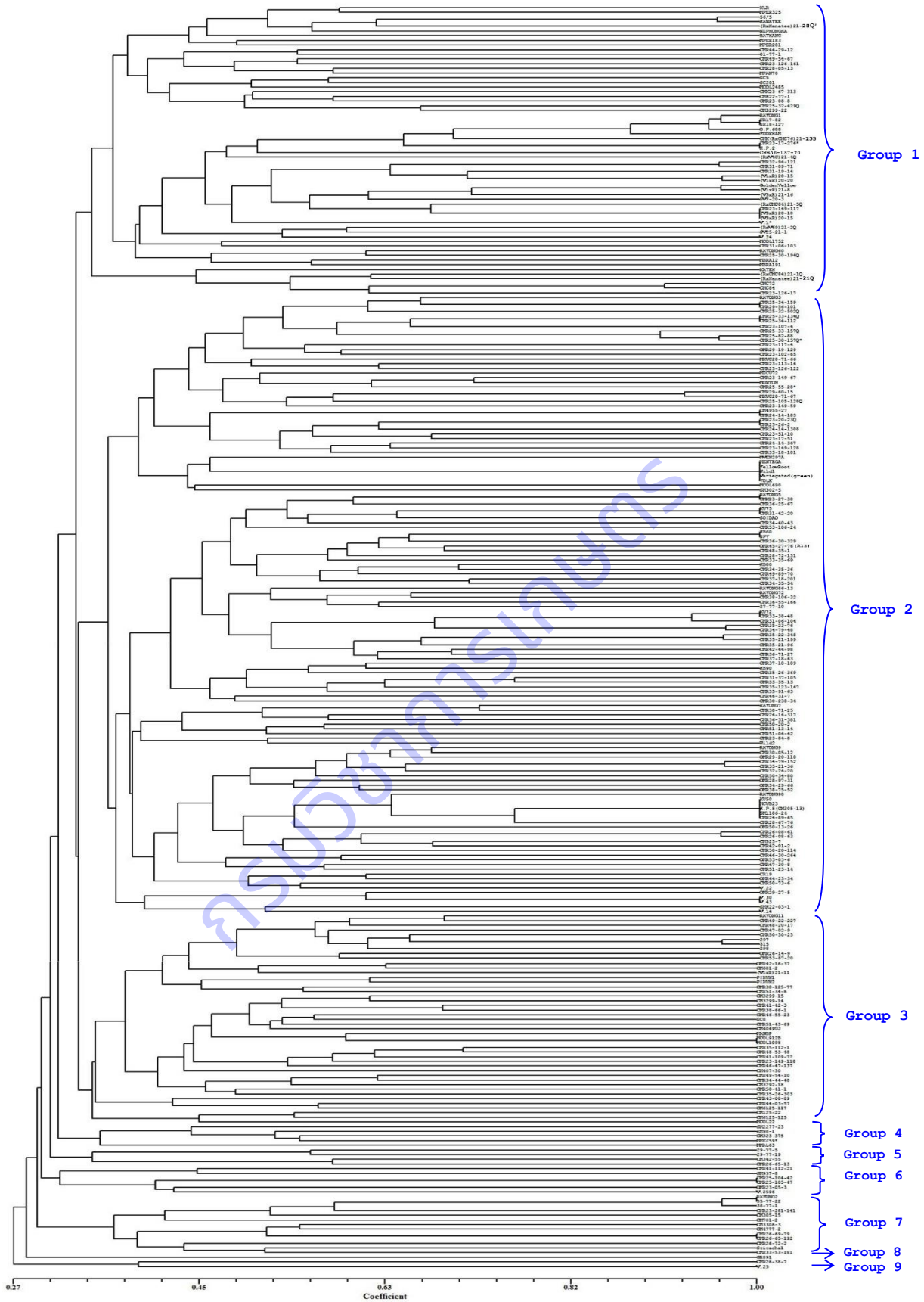
ศูนย์วิทยทรัพยากร

27-77-10 (CIAT Breeding Lines), CM523-7, CR 19 (สาธารณรัฐคอสตาริกา CIAT), SPY, MCUB23 (สาธารณรัฐคิวบา CIAT), H.P.5 (CM305-13) (CIAT Breeding Lines), SM1186-24 (CIAT Breeding Lines), SMH22-03-1 (CIAT Breeding Lines), WILD 2 (CIAT), V.14, V.22, V.30 และ V.43 (Virgin island)

สำหรับกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มคือ กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยที่ 1 เป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีประชากรมันสำปะหลังทั้งพันธุ์พื้นเมืองของไทย ได้แก่ MANOP กลุ่มพันธุ์ไทยที่เกษตรกรนิยมปลูกหรือนิยมนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ ได้แก่ RAYONG 11 (R 5 x OMR29-20-118), PIRUN 1 (HB 60 x HANATEE), PIRUN 2 (HB 60 x HANATEE), 297, 315, 298, กลุ่มพันธุ์ลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่อยู่ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน เช่น CMR46-55-23 (CMR37-18-201 x CM3299-15), CMR49-54-10 (CMR42-44-98 x CM3299-15) และ CMR50-30-23 (R 11 x CM3299-15) เป็นต้น และกลุ่มพันธุ์ที่มาจากต่างประเทศ ได้แก่ CM407-30, CM681-2, CM3299-15, CM3292-18, CM3299-14, CM4049UJ, CM6125-117, MCOL912B, MCOL1098 (สาธารณรัฐโคลัมเบีย CIAT) และ SC8 เป็นต้น และกลุ่มย่อยที่ 2 พบเป็นกลุ่มพันธุ์ที่มาจากต่างประเทศทั้งหมด ได้แก่ CM125-22, CM6125-125 และ MCOL22

เมื่อวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) พบว่า ค่า r มีค่าเท่ากับ 0.70 ซึ่งเป็นค่าบวก หมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ ซึ่งค่าอยู่ระหว่าง 0.7 – 0.8 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับปานกลาง (Sirithunya *et al*., 2001) จากผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ทั้ง 16 คู่ไพรเมอร์ สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี และพบว่ามีมันสำปะหลังบางพันธุ์ที่ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้ อาทิเช่น 1) CR17-82 กับ SR18-127, 2) H.P.2 กับ CMR23-17-276*, 3) CMR23-149-117 กับ (V3 x R) 20-10 กับ (V3 x R) 20-15, 4) CMR25-34-129 กับ CMR29-56-101, 5) CMR25-33-134Q กับ CMR25-34-112, 6) CMR24-14-183 กับ CM4955-27, 7) CMR23-26-2 กับ CMR23-20-23Q, 8) MENTEGA กับ Yellow Root กับ Wild1 กับ Variegated (green) กับ YOLK, 9) RAYONG 5 กับ CMK23-27-30, 10) KU 75 กับ CMR31-42-20, 11) HB60 กับSPY, 12) KU 72 กับ CMR33-38-48, 13) KU50 กับ MCUB23 กับ H.P.5 (CM305-13) กับ SM1186-24 กับ CMR24-89-65, 14) V.30 กับ V. 43, 15) MCOL1098 กับ MCOL912B, 16) CMR25-105-47 กับ CMR25-104-42, 17) RAYONG 2 กับ 35-77-22 และ 18) CMR26-65-192 กับ CMR26-69-79 ซึ่งอาจแปลผลได้ว่าพันธุ์มันสำปะหลังดังกล่าวอาจจะเป็นพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) มีค่าเท่ากับ 1 หรือไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมยังไม่สามารถแยกพันธุ์ดังกล่าวออกจากกันได้ จึงจำเป็นต้องศึกษาและค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติมเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ดังกล่าวให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของมันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม UPGMA clustering ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง โดยทำการศึกษาในมันสำปะหลัง จำนวน 18 ตัวอย่างพันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 54 คู่ไพรเมอร์ และได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ สำหรับนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์และกลุ่มที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีต่อไป

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ (CIAT Core Collection) จากแปลงรวบรวมพันธุ์ ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 4 ชนิดคือ FAM (blue) HEX (green) TAMRA (yellow) และ ROX (red) จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ ด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (Fragment Analysis) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI3730XL พบว่า ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวนทั้งสิ้น 4,320 ข้อมูล และได้ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังทั้ง 270 ตัวอย่างพันธุ์ นำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (cluster analysis) โดยวิธี UPMGA แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มหลักที่แสดงความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.10 – 1.00 และค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.70 ซึ่งถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับปานกลาง สามารถนำไปประโยชน์ในการเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อสร้างลูกผสมให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ของมันสำปะหลัง ด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด EST-SSRs

Genetic Diversity of Cassava related to Bacterial Blight Resistance Genes Using EST-SSRs

บุญเรือนรัตน์ เพียรงาน ภานุวัฒน์ มูลจันทะ ประพิศ วองเทียม สุภาวดี ง้อเหรียญ
Boonruanrat Pearngan Phanuwat Moonjuntha Prapit Wongtiem Suphawadee Ngorian

คำสำคัญ (Key words)

มันสำปะหลัง (cassava (*Manihot esculenta*), โรคใบไหม้มันสำปะหลัง (cassava bacterial blight), ความหลากหลายของพันธุกรรม (genetic diversity), ยีนต้านทานโรค (resistance gene), เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด EST-SSRs (EST – SSRs markers)

บทคัดย่อ

โรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. Manihotis (XAM) หรือ bacterial blight ในมันสำปะหลังเป็นโรคระบาดที่พบในอเมริกาใต้และระบาดมายังอาฟริกาและทำความเสียหายมากในพื้นที่ดังกล่าว ซึ่งกำลังระบาดมากขึ้นในประเทศไทยเช่นกัน โดยจะระบาดมากในช่วงปลายฤดูฝน ปัจจุบันยังไม่มีการป้องกันกำจัดที่เหมาะสมที่มีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ การใช้พันธุ์ต้านทานจึงเป็นทางเลือกที่สำคัญโดยการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ จะช่วยลดระยะเวลาเพิ่มความแม่นยำให้มีทิศทางชัดเจนตรงตามวัตถุประสงค์คือ การพัฒนาความต้านทานโรคจากแบคทีเรีย ในการวิจัยได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล EST - SSRs และ SSRs จำนวน 31 เครื่องหมาย ที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ เข้ามาคัดเลือกพันธุ์ต้านทานในประชากรมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สามารถคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายได้ 6 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนต้านทานโรค ได้แก่ ไพรเมอร์ MBBR13 (681bp) MBBR5(664bp) MBBR9(609bp) MBBR17(627bp) MBBR4(667bp) และ SSrY5 (299bp) แล้วนำเครื่องหมายโมเลกุลชุดดังกล่าว ไปคัดเลือกมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเจลอิเลคโตรโฟริซิส ได้ทดสอบการเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์จากดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 สายพันธุ์ พันธุ์ลูกผสม F1 รหัส 58 จำนวน 76 พันธุ์ มันสำปะหลังพันธุ์บริโภค จำนวน 144 พันธุ์ มันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสมปี 62 จำนวน 138 สายพันธุ์ พันธุ์พ่อแม่พันธุ์ จำนวน 105 พันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง รวมทั้งสิ้น 663 สายพันธุ์ สามารถคัดเลือกมันสำปะหลังได้ 200 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Association mapping แล้วนำไปคัดเลือกในแปลงอนุรักษ์พันธุ์มา จำนวน 100 สายพันธุ์ นำมาปลูกในกระถาง 4 นิ้ว ในวัสดุปลูกขุยมะพร้าวจนมีใบจริง จำนวน 3 ใบ จึงนำไปทดสอบฟีโนไทป์ด้านการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรีย

กรมวิชาการเกษตร

สาเหตุโรค โดยให้คะแนนความต้านทานระดับ 0 - 5 จากการประเมินความรุนแรงของอาการใบไหม้ และคัดเลือกมันสำปะหลังได้ จำนวน 22 สายพันธุ์ ที่มีแนวโน้มให้ความต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบลท์

Abstract

Blight caused by the bacterium Xanthomonas axonopodis pv. Manihotis (XAM), or cassava bacterial blight, is an epidemic that occurs in South America and has spread to Africa and is causing considerable damage in those areas. Which is spreading more and more in Thailand as well. It will be very epidemic at the end of the rainy season. At present, there is no economically viable proper prevention. The use of resistant varieties is therefore an important alternative by applying molecular markers to assist in breeding. This will reduce the time to increase the accuracy. To have a clear direction in accordance with the objective is to develop resistance to bacterial disease. In the research, 31 molecular markers EST - SSRs and SSRs were correlated with blyte bacterial disease resistance. came to select resistant varieties in the cassava population collected at the Rayong Field Crops Research Center ,Six molecular markers that augment resistance gene fragments were selected: primers MBBR13 (681bp), MBBR5(664bp), MBBR9(609bp), MBBR17(627bp), MBBR4(667bp), and SSrY5 (299bp). such a set to select cassava collected in Rayong Field Crops Research Center by PCR technique and the DNA band is separated by gel electrophoresis. 200 cultivars of Thai conservation cassava, F1 clones, code 58, 76 varieties, 144 cultivars of edible cassava, 138 cultivars of cassava hybrids year 2019, 105 cultivars of parents variety from the Rayong Field Crops Research Center, A total of 663 species. 200 cultivars of cassava were selected by association mapping method and 100 cultivars were selected in conservation plots and were planted in 4-inch pots in Coconut coir planting material until it has 3 true leaves is used to test the response phenotype of pathogenic bacteria. The resistance rating was 0-5 based on the severity of leaf blight assessment. And 22 cassava strains were selected that were likely to provide resistance to cassava bacterial blight.

ศรีปทุมมหาวิทยาลัย

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคใบไหม้ของมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* เป็นโรคที่พบระบาดทั่วไปในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังในทวีปอเมริกาใต้และทวีปอาฟริกาทำความเสียหายให้กับพื้นที่ดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ ประเทศไทยยังไม่มีการประเมินความต้านทานโรคนี้อย่างชัดเจน ทำให้มีความเสี่ยงที่ไม่ได้ป้องกันในพืชที่มีความสำคัญทางเสรษฐกิจสูง และเป็นพืชที่สำคัญของเกษตรกร

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์นั้น กำลังมีบทบาทสำคัญที่จะช่วยลดระยะเวลา เพิ่มความแม่นยำในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีทิศทางชัดเจน ตรงตามวัตถุประสงค์ ช่วยแก้ปัญหาได้อย่างตรงจุด ทำให้การปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพสูง สามารถนำเอาลักษณะที่ดีที่เราสนใจเข้ามาร่วมอยู่ในสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกและรับรองพันธุ์มาอย่างดีแล้วนั้นให้มีคุณสมบัติต่างๆ เพิ่มมากขึ้นด้วยการผสมพันธุ์ ระหว่างพันธุ์ดีกับพันธุ์ที่มีลักษณะที่เราสนใจ แล้วคัดเลือกเอาต้นพันธุ์ดีที่มีลักษณะดีเหล่านั้นโดยการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่ผ่านการทดสอบว่าเชื่อมโยงหรือเกี่ยวข้องกับลักษณะที่เราสนใจนั้นๆ ตั้งแต่ยังเป็นต้นขนาดเล็ก แล้วนำไปปลูกทดสอบ และคัดเอาต้นที่มีลักษณะดีมาผสมกลับจนมีความเสถียรโดยมียีนที่เราสนใจร่วมอยู่ด้วย ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพสูงจะช่วยให้เราติดตามลักษณะที่สนใจได้อย่างแม่นยำและมีโอกาสในการตรวจพบได้ง่ายมีการเชื่อมโยงกับยีนที่สนใจ จึงสนใจในการทดสอบและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSRs และ SNPs ของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ ที่เริ่มมีผู้ค้นคว้าวิจัยไว้บ้างแล้วกับมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ ทั่วโลกทดสอบกับมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมในประเทศไทยที่มีการประเมินความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์แล้วและกลุ่มพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ ในการวิจัยนี้ได้ค้นหาและทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSRs กับมันสำปะหลังในไทย ประเมินศักยภาพเบื้องต้นของเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาและคัดเลือกได้ เพื่อประเมินศักยภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาและคัดเลือกได้กับลูกผสมรุ่น F1 และมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมไว้ จำนวน 600 สายพันธุ์

การสร้างเทคโนโลยีฐานในการพัฒนาและใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ที่บ่งชี้ลักษณะสำคัญๆ ของมันสำปะหลัง เป็นโครงการนำร่องเพื่อการมุ่งปรับปรุงลักษณะ ที่เป็นที่ต้องการของภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมของประเทศไทย โดยในช่วงปีแรก ได้ทำการค้นหาลำดับเบส Transcriptome ของมันสำปะหลัง 16 สายพันธุ์ ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างกว้างขวาง จากผลการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ที่พบบน 8427 ยีน ทีมวิจัยได้วิเคราะห์ SNP และทำการจีโนไทป์เครื่องหมายโมเลกุล SNP ในมันสำปะหลังประชากรลูกผสม สร้างแผนที่พันธุกรรมและวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ SNP กับ Trait โดยการวิเคราะห์ QTL ในงานวิจัยด้านชีวโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังนั้น มีผู้ค้นคว้าวิจัยเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะด้านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อต้านทานโรค เช่น Lopez และคณะ (2005) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ปรากฏเมื่อมันสำปะหลังได้รับเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. Manihotis (*XAM*) โดยใช้ cDNA microarray จากมันสำปะหลังพันธุ์ต้านทาน MBra 685 ที่เก็บตัวอย่างหลังได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *XAM* ที่ระยะเวลา 12, 24, 48 ชั่วโมง และ 7 วัน 15 วัน ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

พบว่ามียีนที่แสดงออกแตกต่างกันจำนวน 199 ยีน โดยมียีนที่ปรากฏเพิ่มขึ้น (up regulater) 126 ยีน และยีนที่หายไป (down regulater) จำนวน 73 ยีน พบว่าต้นที่ได้รับการปลูกเชื้อในวันที่ 7 ให้ผลดีที่สุด เมื่อนำยีนทั้งหมดมาวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าเป็นยีน oxidative burst, protein degradation, และยีน phathenogenesis - related (PR) ส่วนยีนที่หายไปได้แก่ยีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แสงและเมตาโบลิซึ่ม โดยกระบวนการนี้จะเกิดในพันธุ์ต้านทานรวดเร็วกว่าในพันธุ์ที่อ่อนแอ ต่อมา Lopez CE และคณะ (2007) ได้ทำแผนที่ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST และทำ QTL ของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานและกลไกการป้องกันตัวของพืชต่อโรคแบคทีเรียลไบลท์ ได้ตรวจวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด EST – SSR ได้จำนวน 21 ตำแหน่ง เมื่อนำลำดับเบสมาเปรียบเทียบพบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนต้านทานโรคและพบ 2 ตำแหน่งที่มีความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์

Raji AA และคณะ (2009) ได้พัฒนาและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 846 เครื่องหมาย โดยคัดเลือกจาก 8,577 เครื่องหมายที่มีระยะทุกๆ 7 kb บนจีโนมของมันสำปะหลังและได้คัดเลือกมาตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและศึกษาระยะห่างของพันธุกรรมจำนวน 192 เครื่องหมาย นำไปทดสอบกับมันสำปะหลังพันธุ์ป่า 4 ชนิด และพืชอื่นในวงศ์ Euphobiaceae อื่นอีก 2 ชนิด พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน 124 คู่ คิดเป็น 73.8% โดยให้ความแตกต่างได้ดีสามารถอ่านได้แม้บนอะกะโรสเจล นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR จำนวน 85 คู่ พบว่ามี 80 คู่ (94.1%) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากกว่า 1 อัลลีล ในมันสำปะหลังพันธุ์ป่า และมี 13 คู่ (15.3%) ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชอื่นในวงศ์เดียวกัน นอกจากนี้ ยังได้ทำการค้นหาตำแหน่งของ EST-SSRs อีก 20 ตำแหน่งบนโครโมโซม โดยใช้การติดฉลากสีฟลูโอเรสเซนต์ ได้ค่า 2-10 อัลลีลต่อ 1 โลคัส มีค่าเฉลี่ยที่ 4.55 อัลลีล โดยมีค่าระยะห่างของพันธุกรรมที่ 0.19 - 0.75 ค่าเฉลี่ยที่ 0.55 เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกไว้เหล่านี้สามารถนำไปจำแนกชนิดและสายพันธุ์มันสำปะหลังได้

ยีน R (R genes) เป็นกลุ่มยีนต้านทานโรคและสภาวะที่ไม่เหมาะสมของพืชพบในพืชเกือบทุกชนิด มีองค์ประกอบ 2 ส่วนคือ nucleotide binding site domain และ luecine-rich repeat domain (NBS-LRR) มีความสำคัญมากในจีโนมของมันสำปะหลังในการวิเคราะห์ความต้านทานโรค CBB (cassava bacterial blight) นั้น Lazano R. และ คณะ (2015) ได้ค้นหายีนกลุ่มดังกล่าวในมันสำปะหลัง สามารถจำแนกยีนกลุ่ม NBS-LRR ออกได้ถึง 228 ชนิด และบางส่วนของยีน NBS อีก 99 ชนิด ซึ่งเป็นสัดส่วน 1% ของยีนที่คาดหวัง พบว่ามีความคล้ายกับโปรตีนของพืชชนิดอื่นด้วย จากการศึกษาพบว่า R genes จำนวน 63% จาก 327 ยีน ที่อยู่ในตำแหน่งต่างๆ บนโครโมโซม 39 ตำแหน่งนั้น มีความคล้ายคลึงกับ NBS-LRR จากพืชที่พบในยุคโบราณ ซึ่งเขาได้สรุปว่า วิวัฒนาการของกลุ่มยีนนี้ที่ปรากฏในจีโนมของมันสำปะหลังจะช่วยให้การศึกษาคุณลักษณะและหน้าที่ของยีนกลุ่ม R genes ได้ดียิ่งขึ้น

ยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ของมันสำปะหลังที่สำคัญยีนหนึ่งได้แก่ ยีน peroxidase (MEPX1) ซึ่ง Luiz และคณะ (2003) ได้โคลนยีนนี้จากมันสำปะหลังด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GENBANK พบว่ามีความคล้ายกันกับยีนนี้ของพืชอื่นๆ โดยมีส่วนของอินทรอนขนาดยาวเป็นองค์ประกอบเมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนจะได้ส่วนของยีน 3 ชนิดคือ phosphorelation, muristoylation และ glucosylation และตรวจสอบพบความความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างกันที่มีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านทานโรคแบลคทีเรียลไบลท์ จึงสันนิษฐานว่า MEPX1 สามารถนำไปใช้

ลิขสิทธิ์การรมหาวิทยาลัย

เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการติดตามลักษณะความต้านทานโรคในมันสำปะหลังได้ ซึ่งพบว่า Peroxidase เป็นเอนไซม์ที่ช่วย oxidation ของ H2O2 เมื่อพืชเกิดแผลจะกระตุ้นการสร้างเอนไซม์นี้เพิ่มขึ้น เป็นกลไกความต้านทานของพืชต่อเชื้อโรค ความเครียดต่างๆ เช่นความเค็ม รังสี และมลพิษ เอนไซม์ peroxidase ของพืชจะช่วยป้องกันพืช โดยทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างฟีโนลิคคอมปาวด์ เพื่อสร้างลิกนินและซูเบรินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของพืชที่ทำหน้าที่เป็นปราการป้องกันเชื้อโรคพืชต่างๆ แม้แต่ในโรคแบคทีเรียลไบลท์ของมันสำปะหลัง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาและทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSRs กับมันสำปะหลังในไทย
2. เพื่อประเมินศักยภาพเบื้องต้นของเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาและคัดเลือกได้
3. เพื่อประเมินศักยภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาและคัดเลือกได้กับมันสำปะหลังลูกผสม

ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ของมันสำปะหลังด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด EST-SSRs ทำการค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ในมันสำปะหลัง ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้กับมันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบลักษณะจีโนไทป์กับลักษณะฟีโนไทป์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ในมันสำปะหลัง จากนั้นจึงนำเครื่องหมายโมเลกุลที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพแล้ว นำมาใช้คัดเลือกลูกผสมของมันสำปะหลังเพื่อได้ต้นมันสำปะหลังที่มีลักษณะความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย

<u>ประเด็นวิจัย :</u> โรคใบไหม้ของมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. Manihotis พบระบาดทั่วไปในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังทำความเสียหายให้กับผลผลิตมันสำปะหลังอย่างมีนัยสำคัญการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ สามารถช่วยลดระยะเวลา เพิ่มความแม่นยำในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีทิศทางชัดเจนและมีประสิทธิภาพสูง สามารถนำเอาลักษณะที่ดีที่เราสนใจเข้ามาร่วมอยู่ในสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกและรับรองพันธุ์มาอย่างดีแล้วนั้นให้มีคุณสมบัติต่างๆ เพิ่มมากขึ้นด้วยการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ดีกับพันธุ์ที่มีลักษณะที่เราสนใจ แล้วคัดเลือกเอาต้นพันธุ์ดีที่มีลักษณะดีเหล่านั้นโดยการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่ผ่านการทดสอบว่าเชื่อมโยงหรือเกี่ยวข้องกับลักษณะที่เราสนใจนั้นๆ ตั้งแต่ระยะต้นกล้า แล้วนำไปปลูกทดสอบและคัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีมาผสมกลับจนมีความเสถียรโดยมียีนที่เราสนใจร่วมอยู่ด้วย ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพสูงจะช่วยให้เราติดตามลักษณะที่สนใจได้อย่างแม่นยำ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSRs ของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะดังกล่าว สำหรับใช้ในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังต่อไป

<u>สถานที่ทดลอง :</u> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี

<u>ระยะเวลาดำเนินงาน :</u> ตุลาคม 2560 - กันยายน 2564

<u>วิธีการดำเนินงาน</u>

1. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ในมันสำปะหลัง

1.1 คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้รับการทดสอบความสามารถในการต้านทานโรค จำนวน 30 สายพันธุ์ นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ/วิธี CTAB ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมสำหรับทำพีซีอาร์ต่อไป

1.2 ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคของมันสำปะหลังนำมาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม clustalW เพื่อหาส่วนที่เป็น conserve region และค้นหาข้อมูล EST-SSRs จากแหล่งข้อมูลต่างๆ ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพันธุ์มันสำปะหลังที่คัดเลือกไว้ เพื่อนำไปทดสอบความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรค สำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับติดตามยีนที่ต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์

1.3 คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีนและชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่างๆ

1.4 นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนต้านทานจากพันธุ์มันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ

2. ตรวจวิเคราะห์ความเชื่อมโยงระหว่างความต้านทานโรคกับโมเลกุลเครื่องหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์

2.1 คัดเลือกมันสำปะหลังพันธุ์ต้านทานโรค จำนวน 5 สายพันธุ์ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยโมเลกุลเครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานด้วยเทคนิคพีซีอาร์ นำผลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏไปวิเคราะห์ความเชื่อมโยง

2.2 สรุปผลความเชื่อมโยงระหว่างความต้านทานโรคกับโมเลกุลเครื่องหมาย แล้วคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3. ศึกษาความสัมพันธ์และทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้ทั้งหมดกับลูกผสม F1 จากแปลงปรับปรุงพันธุ์ของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

3.1 ตรวจสอบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล โดยนำโมเลกุลเครื่องหมายที่ผ่านการทดสอบแล้วมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับต้นมันสำปะหลัง จำนวน 100 ต้น เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เปรียบเทียบกับความสามารถในการต้านทานโรค ด้วยการปลูกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. Manihotis (*XAM*) เพื่อดูลักษณะของฟีโนไทป์เทียบกับลักษณะจีโนไทป์

3.2 สรุปผลและวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลและคัดเลือกต้นมันที่ต้านทานโรค

4. ทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลกับประชากรมันสำปะหลังลูกผสมที่ปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

4.1 นำโมเลกุลเครื่องหมายที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์กับมันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสมใหม่

4.2 วิเคราะห์และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏว่ามีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคหรือไม่

กรมวิชาการเกษตร

4.3 สรุปผลการทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลกับประชากรมันสำปะหลังลูกผสม

5. การตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลัง

5.1 ปลูกทดสอบพันธุ์และคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ดีตรงตามความต้องการไว้อย่างน้อย 100 พันธุ์

5.2 คัดเลือกต้นพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการไว้ใช้ในการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

6. วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการทดลอง

บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวนต้นที่พบยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์และข้อมูลไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

ผลการวิจัยและอภิปราย

<u>การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลและทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายกับพันธุ์มันสำปะหลัง</u>

1. รวบรวมมันสำปะหลังที่ได้รับการทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคแล้ว จำนวน 11 สายพันธุ์ **(ตารางที่ 1)** (ภานุวัฒน์ และคณะ, 2558) และคัดเลือกพันธุ์ต้านทานปานกลางต่อโรคใบไหม้จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 91 สายพันธุ์ **(ตารางที่ 2)** จากนั้นนำใบมันสำปะหลังมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี 2% CTAB **(ภาพที่ 2)** และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมสำหรับทำพีซีอาร์ต่อไป

ตารางที่ 1 รายชื่อพ่อแม่พันธุ์มันสำปะหลังจากเชื้อพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้ จำนวน 11 พันธุ์

ลำดับ	สายพันธุ์	ระดับความต้านทาน	ลำดับ	สายพันธุ์	ระดับความต้านทาน
1	MPAP 101	ต้านทานปานกลาง	7	CM 4574-7	ต้านทานปานกลาง
2	MPAR 221	ต้านทานปานกลาง	8	MPER 593	ต้านทานปานกลาง
3	MMEX 17	ต้านทานปานกลาง	9	MBRA 18	ต้านทานปานกลาง
4	MCOL 1736	ต้านทานปานกลาง	10	R5	ค่อนข้างอ่อนแอ
5	MMAL 38	ต้านทานปานกลาง	11	R9	ค่อนข้างอ่อนเอ
6	MBRA 781	ต้านทานปานกลาง			

ภาพที่ 1 ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม F1 จำนวน 80 พันธุ์ จำนวน 82 พันธุ์ และพันธุ์ต้านทานปางกลางต่อโรคไหม้ จำนวน 9 พันธุ์

ลำดับ	สายพันธุ์	ลำดับ	สายพันธุ์	ลำดับ	สายพันธุ์	ลำดับ	สายพันธุ์
1	CMR-58-20-29	24	CMR-58-178-56	47	CMR-58-106-85	70	CMR-58-178-47
2	CMR-58-74-109	25	CMR-58-180-01	48	CMR-58-07-49	71	CMR-58-177-29
3	CMR-58-25-14	26	CMR-58-35-64	49	CMR-58-17-05	72	CMR-58-37-20
4	CMR-58-11-41	27	CMR-58-19-33	50	CMR-58-173-04	73	CMR-58-19-81
5	OMR-58-45-06	28	CMR-58-193-06	51	CMR-58-74-147	74	CMR-58-69-08
6	CMR-58-116-03	29	CMR-58-157-84	52	CMR-58-19-26	75	CMR-58-45-84
7	CMR-58-07-12	30	CMR-58-11-13	53	CMR-58-75-38	76	CMR-58-75-40
8	CMR-58-76-76	31	OMR-58-54-07	54	CMR-58-07-09	77	CMR-58-51-88
9	CMR-58-10-22	32	CMR-58-157-120	55	CMR-58-07-01	78	CMR-58-178-23
10	CMR-58-35-46	33	CMR-58-37-80	56	CMR-58-25-47	79	CMR-58-35-28
11	CMR-58-35-85	34	CMR-58-11-102	57	CMR-58-170-55	80	CMR-58-20-06
12	CMR-58-17-14	35	CMR-58-170-53	58	CMR-58-74-141	81	R 9
13	CMR-58-76-14	36	CMR-58-75-53	59	CMR-58-19-57	82	KU 50
14	CMR-58-76-29	37	CMR-58-11-22	60	CMR-58-69-09	83	MPAR 101
15	CMR-58-10-25	38	OMR-58-07-10	61	CMR-58-76-39	84	MPER 221
16	CMR-58-128-31	39	CMR-58-180-11	62	CMR-58-72-29	85	MMEX 17
17	OMR-58-20-12	40	CMR-58-37-95	63	CMR-58-144-03	86	MCOL 1736
18	CMR-58-23-20	41	CMR-58-10-12	64	CMR-58-45-14	87	MMAL 38
19	CMR-58-10-08	42	CMR-58-11-32	65	CMR-58-177-25	88	MBRA 781
20	CMR-58-199-01	43	CMR-58-179-12	66	CMR-58-71-67	89	CM 4574-7
21	CMR-58-133-42	44	CMR-58-170-75	67	CMR-58-35-15	90	MPER 593
22	CMR-58-75-110	45	CMR-58-75-99	68	CMR-58-75-135	91	MBRA 18
23	CMR-58-37-49	46	OMR-58-05-19	69	CMR-58-75-119		

กรมวิชาการเกษตร

2. ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคใบไหม้ของมันสำปะหลัง (Cassava bacterial blight, CBB) ชนิด EST จากฐานข้อมูลออนไลน์ (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) จากนั้นนำมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อทดสอบหายีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ สามารถออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ได้ จำนวน 21 คู่ไพรเมอร์ โดยเป็นไพรเมอร์ชนิด EST จำนวน 19 ไพรเมอร์ และไพรเมอร์ยีนต้านทานแบคทีเรียลไบลท์คือ ไพรเมอร์ MEXTS และ MTAI8 และสังเคราะห์ไพรเมอร์ชนิด SSRY เพิ่มเติมอีกจำนวน 10 ไพรเมอร์ รวมทั้งสิ้น 31 คู่ไพรเมอร์

Primer MTAI8 Manihot esculenta cultivar MTAI8 cationic peroxidase gene, partial cds

GenBank: EF645823.1

```
LOCUS       EF645823                1211 bp    DNA    linear PLN 23-JUL-2016
DEFINITION  Manihot esculenta cultivar MTAI8 cationic peroxidase gene, partial cds.
ACCESSION   EF645823
VERSION     EF645823.1
SOURCE      Manihot esculenta (cassava)
  ORGANISM  Manihot esculenta
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
            Pentapetalae; rosids; fabids; Malpighiales; Euphorbiaceae;
            Crotonoideae; Manihoteae; Manihot.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1211)
ORIGIN
        1 gtggagggat gtgagagcat tagaaaggct aaggcattgg tggagagcaa gtgtcctggt
       61 gttgtatcct gtgcagatat tcttgcaatt gctgccagag attatgtcca cctggtatgc
      121 ctctgcattt caattcttga tatcccctac tcaatcctta attaactatt tcaaactcta
      181 gatcttatcc cactcaatca aaacttatta acaatttgga atatattgat ggtaacaaag
      241 tcctataaat aatccaaagc atagggctgg tttgttgata taagggaaat caaatttctt
      301 gactgtaggt gaaaatatat gttggggtgc tcatactcat aatgcttcca aagtagaaag
      361 gtggaaaaag gaagattggt tttgtcattt ttgacaaagt atttataaca aaacaaactc
      421 ttctaaaagg gcaagaaagt ataaaaaatc attaagtcca tgtgatttga acagctaggt
      481 tatttgtcct ttgctagaat caatatctct atgaaagtca agaatattaa tcaattaatc
      541 cttccaaaaa taggaccaat gctgtgaaaa accaaatgcc tcattcactg gtaacatgat
      601 gagagaacta atagacaata agactggcat ttgacttgta ttggttttct aaatgtctca
      661 ttcattggta actggatgtg gtcaatgatt tttatttttct caaaactgta ctcttttagt
      721 tattttctgt taggataaca atattattat atgaccccaa taataatcat ttgtattatt
      781 attaaattag taatttatat tcaaatttct atataaattt tagaaaaatt aactatttag
      841 atcatgctaa attcattaat cgatcgttca gttttgaaaa atatattaaa atatttttaa
      901 aatattaaaa tatttttcat aaatctctct aaatttttaat ttataaaact ccttttttata
      961 gacctctatt ttcttctaaa taatcctata atggagtgct ctaattccat atgctacatt
     1021 ttcatgacgc aggcaggggg accttattac caagtgaaga aagggagatg ggatggcaaa
     1081 atatcaatgg catcaagggt accctataat ctacctcaag caaattcaac cattgatcaa
     1141 ctactgaagc ttttcaattc caaaggatta acaccacaag atctagtggt tctctcaggt
     1201 gcacacaatc t
```

กรมวิชาการเกษตร

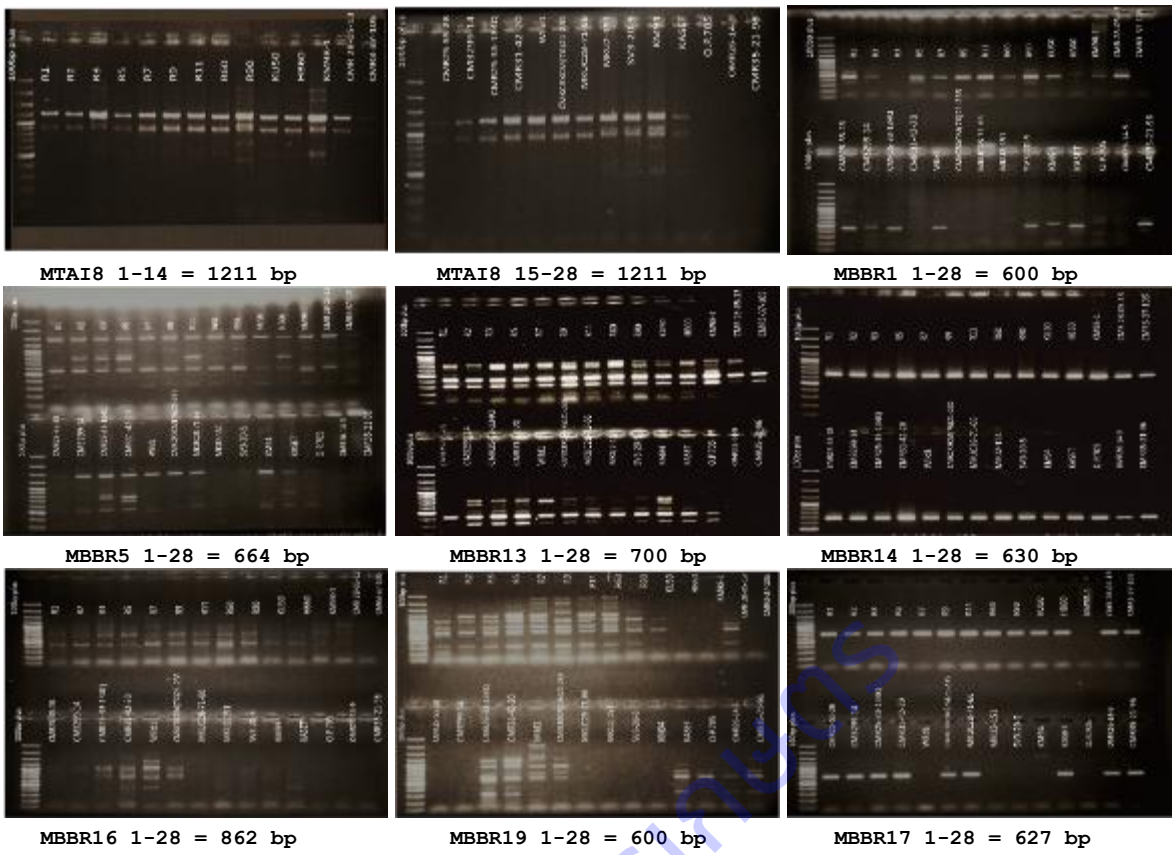
ตารางที่ 3 แสดงรายชื่อไพรเมอร์ชนิด EST-SSrs จากการออกแบบไพรเมอร์ยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ในมันสำปะหลัง และไพรเมอร์ SSR ที่ใช้ในการทดสอบ จำนวน 31 คู่ไพรเมอร์

ลำดับ	Primer	Forward primer	Revers primer	Size	ACCESSION
1	MEXPX	CGTCTCCACTTTCATGACTGC	GAAACCTACCGTGTGTGCACC	1561	AF078691
2	MTAI8	GTGGAGGGATGTGAGAGCATTAGA	AGATTGTGTGCACCTGAGAGAACC	1211	EF645823
3	MBBR1	GAAAGATTGAGCCTATATGAT	AAGCTTCTTCCGTGTTCTCTA	697	FP051588
4	MBBR2	TTGAATTATATTCATGTACAA	CCGTTGGGAGAAAGACCAACT	682	FP059867
5	MBBR3	CACGAGGGTTGAATTTCAAAG	AGATCAAAATATCTCAAATGT	676	DR998076
6	MBBR4	CGAATTCCGTTGCTGTCGCAG	TTCAATCACCACCCTCCCCGATGAT	667	DT042200
7	MBBR5	CTTAAAGCATCTATATGTTGAC	TGCATGATGTATTCAGAATCTCTT	664	DY640542
8	MBBR6	ATCATTGAAAGGTTAGGCTCCC	GATTTGAACCACCTCATCGTGAA	623	DY654068
9	MBBR7	ATCGAATTCCGTTGCTGTCGCC	ATCATGTGACCCATCATTAGCCC	693	GO500242
10	MBBR8	ATCGAATTCCGTTGCTGTCGA	TCTTATTATCTTTCGAAAGGGGC	623	GO525890
11	MBBR9	GCCAGCATTTTTTTTTTTT	TCCGTTGCTGTCGGTATCG	609	GO565744
12	MBBR10	TAATCTACAAACATTGTCAACATT	GTAGTTTAGATATAGAGTACGGAGAG	868	FP030363
13	MBBR11	TCTGTTTAAGTGATGAGATCATAT	GAGTCGCAATCTCACCTTTAAA	472	FP045391
14	MBBR12	TTTCCTGGCAAAACAATATCT	CTCATCTGTAAGAGCCTCTGTAT	703	FP059358
15	MBBR13	TTTAAGGGCAAAACAATATCT	TCCTCAATCCCATCTAACTTC	681	FP071698
16	MBBR14	ACTTTTTTCATCCCACAAACA	GTAGTTAAAGATGCCATCAGATTC	630	FP066389
17	MBBR15	TCAAGCTCTCTTGACGTTTCCT	CCAAATACCTAGTATTGGGAGA	669	FP052291
18	MBBR16	TTCTTCTTCTTGGAATTGTGGA	TTGGCTATCAAAGGGAGAGAAC	862	FP028768
19	MBBR17	ACCAAAGCTTTGTCCTACCAT	ATTACCAACGAGTCTGCTAC	627	FP032507
20	MBBR18	TTTAAGGGCTAAACAATATCTTG	CCTTCTAATAACTTCTCATCA	108	FP073410
21	MBBR19	GGTCAATCTTAGGCATTTAGA	CATCTGAAATGTATCAAAGTG	581	FP043053
22	SSRY1	GCAGCTGCCGCTAATAGTTT	CCAAGAGATTGCACTAGCGA	197	
23	SSRY2	TGAAAGCCTGCATTCAAACA	TGATGCAGGTAGCAAGGATG	215	
24	SSRY3	CCATCCACTAGAAACTTTAAAAGCA	CAACTCAGCGGAGCTTTTTC	220	
25	SSRY4	CCGCTTAACTCCTTGCTGTC	CAAGTGGATGAGCTACGCAA	271	
26	SSRY5	CATCGCCAAATCGTCAAGTA	TGATGCCATGCATTTCACTT	299	
27	SSRY6	ATCTCAGCTTCCAACTCTTTCAGT	CGAAATGCTTGGAGACAGGTATAG	261	
28	SSRY7	AGTTTGCACCACCTTTTTCC	TGTCAAGTGATGAGCTGCTG	261	
29	SSRY8	GCTGCAGAATTTGAAAGATGG	CAGCTGGAGGACCAAAAATG	287	
30	SSRY9	CGATCTCAGTCGATACCCAAG	CACTCCGTTGCAGGCATTA	239	
31	SSRY10	CGCTATTAGAATTGCCAGCAC	CGCTTGTTGTATCCATTGGC	249	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ของมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิค PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของพ่อแม่พันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 28 สายพันธุ์ มาเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ปริมาตร 20 ul ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ul, DreamTaq Green Master Mix 10 ul, 50 M Primer ด้าน forward และด้าน reverse อย่างละ 1 ul และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 7 ul ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โปรแกรมที่ใช้ทำ PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 94°C (1 นาที) 1 รอบ denaturationที่ 94°C (30 วินาที) annealing 50°C (20 วินาที) และ extension ที่ 72°C (50 วินาที) เป็นจำนวน35 รอบ และ final extension ที่ 72°C (5 นาที) 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส โดยการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 20 ชนิด สามารถคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ 8 ชนิดคือ MTAI8, MBBR1, MBBR5, MBBR13, MBBR14, MBBR16, MBBR17และ MBBR19 **(ภาพที่ 2)**

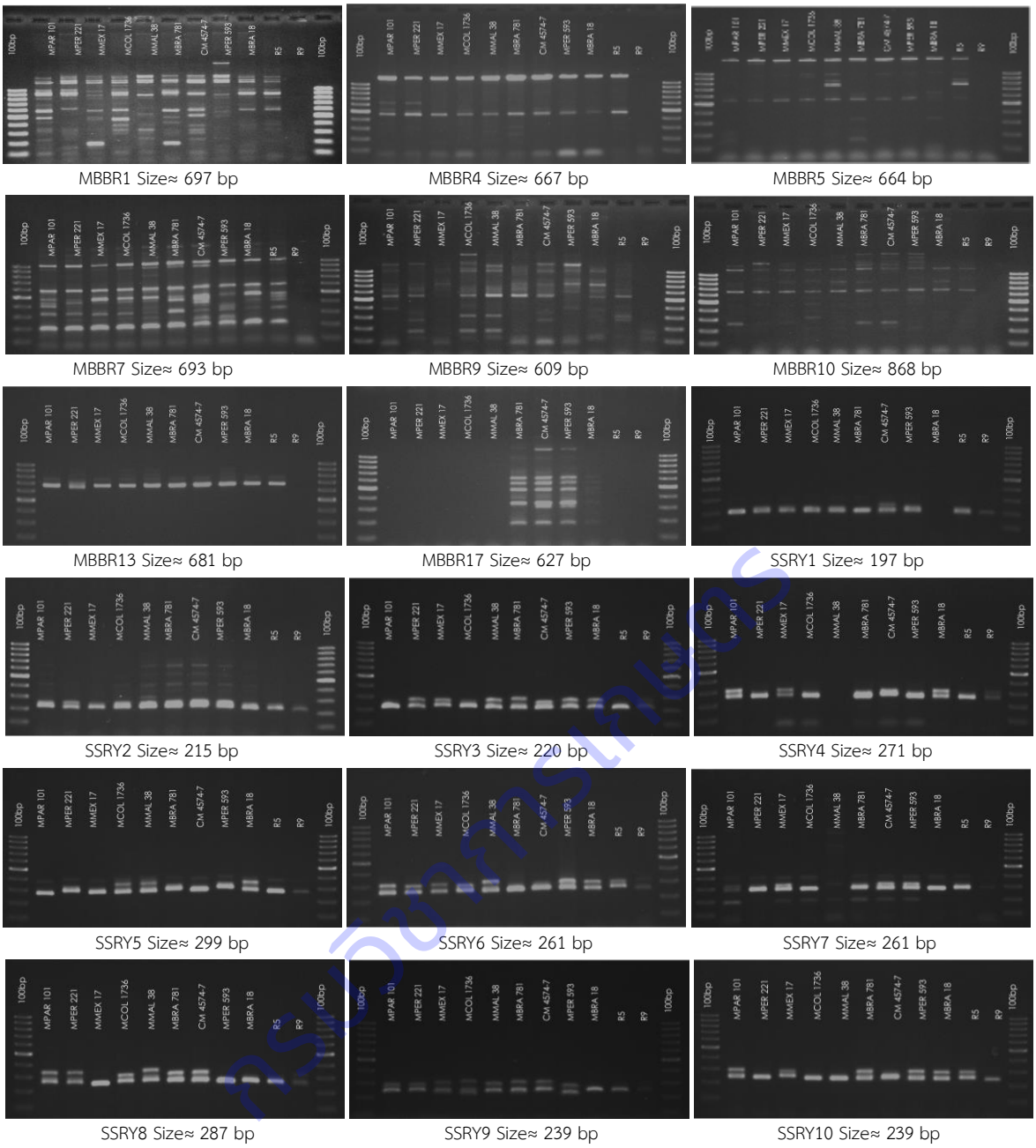


ภาพที่ 2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 28 พันธุ์

การศึกษาความสัมพันธ์และทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้ทั้งหมดกับมันสำปะหลัง 11 พันธุ์

เมื่อนำดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์แล้ว จำนวน 11 สายพันธุ์ **(ตารางที่ 1)** มาเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด EST และ SSr จำนวน 31 คู่ไพรเมอร์ **(ตารางที่ 3)** ในปริมาตร 20 ul ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ul, DreamTaq Green Master Mix 10 ul, 50 M Primer ด้าน forward และด้าน reverse อย่างละ 1 ul และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 7 ul ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โปรแกรมที่ใช้ทำ PCR โปรแกรมที่ใช้ทำ PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 94°C (1 นาที) 1 รอบ denaturationที่ 94°C (30 วินาที) annealing 50°C (20 วินาที) และ extension ที่ 72°C (50 วินาที) เป็นจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72°C (5 นาที) 1 รอบ ตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ ได้จำนวน 18 คู่ไพรเมอร์ โดยเป็นไพร์เมอร์ชนิด EST จำนวน 8 ไพรเมอร์ และ ไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 10 ไพรเมอร์ **(ภาพที่ 3)**

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์กับพันธุ์มันสำปะหลังที่ผ่านการทดสอบความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ จำนวน 11 พันธุ์

การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม

เมื่อนำดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสม F1 จำนวน 80 สายพันธุ์ **(ตารางที่ 2)** ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับไพรเมอร์ยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ในมันสำปะหลัง จำนวน 14 คู่ไพรเมอร์ ในปริมาตร 20 ul ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ul, DreamTaq Green Master Mix 10 ul, 50 M Primer ด้าน forward และด้าน reverse อย่างละ 1 ul และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 7 ul ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โปรแกรมที่ใช้ทำ PCR จากนั้นตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส พบว่า มีเพียง 5 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มจำนวนยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบท์ในมันสำปะหลังคือ ไพรเมอร์ MBBR5, MBBR13, MBBR14, MBBR17 และ MBBR19

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้ จำนวน 18 คู่ไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 105 พันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง พบว่า มี 5 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วได้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงตามการออกแบบ ดังนี้ MBBR13 (681 bp), MBBR5 (664 bp), MBBR9 (609bp), MBBR17 (627bp) และ SSRY5 (299bp) **(ตารางที่ 4)** และมีมันสำปะหลังที่มีแนวโน้มต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ โดยพบว่าสมารถให้แถบดีเอ็นเอของยีนเกี่ยวข้องกับความต้านทานมากถึง 5 เครื่องหมาย จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ CMR 35-112-1, CMR 41-42-3, CMR 41-109-72, CMR 42-16-37 และ MVEN 297A

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 105 พันธุ์

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ไพรเมอร์					หมายเหตุ
		MBBR13	MBBR 5	MBBR 9	MBBR 17	SSRY 5	
1	เกษตรลพบุรี	✓		✓	✓	✓	เครื่องหมาย ✓ คือ ไพรเมอร์ที่สามารถคัดเลือกได้
2	ระยอง 1	✓		✓	✓	✓	
3	ระยอง 2	✓		✓	✓	✓	
4	ระยอง 3	✓			✓	✓	
5	ระยอง 5	✓			✓	✓	
6	ระยอง 7	✓				✓	
7	ระยอง 9	✓		✓	✓	✓	
8	ระยอง 11	✓		✓	✓	✓	
9	ระยอง 86-13	✓		✓	✓	✓	
10	ระยอง 60	✓			✓	✓	
11	ระยอง 72	✓			✓	✓	
12	ระยอง 90	✓		✓		✓	
13	KU 50	✓				✓	
14	KU 72	✓			✓	✓	
15	KU 75	✓			✓	✓	
16	KU 60	✓				✓	
17	KU 80	✓		✓	✓	✓	
18	พิรุณ 1	✓		✓	✓	✓	
19	พิรุณ 2	✓		✓	✓	✓	
20	CM 3299-15	✓		✓	✓		
21	CR 19	✓		✓	✓	✓	
22	SM 2277-23	✓		✓	✓	✓	
23	CMR 26-08-61	✓		✓	✓	✓	
24	OMR 16-14-9	✓		✓	✓	✓	
25	OMR 29-20-118	✓		✓	✓	✓	
26	CMR 30-71-25	✓		✓	✓	✓	
27	CMR 31-42-20	✓		✓	✓	✓	
28	CMR 32-94-121	✓		✓	✓	✓	
29	CMR 33-38-48	✓		✓	✓	✓	
30	CMR 35-21-199	✓		✓	✓	✓	
31	CMR 35-22-348	✓		✓	✓	✓	
32	CMR 35-112-1	✓	✓	✓	✓	✓	
33	CMR 36-55-166	✓			✓	✓	
34	CMR 37-18-189	✓			✓	✓	
35	CMR 37-18-201	✓			✓	✓	

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 105 พันธุ์ (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ไพรเมอร์					หมายเหตุ
		MBBR13	MBBR 5	MBBR 9	MBBR 17	SSRY 5	
36	CMR 38-125-77	✓		✓	✓	✓	เครื่องหมาย ✓ คือ ไพรเมอร์ที่สามารถคัดเลือกได้
37	CMR 41-42-3	✓	✓	✓	✓	✓	
38	CMR 41-109-72	✓	✓	✓	✓	✓	
39	CMR 41-112-21	✓		✓	✓	✓	
40	CMR 42-01-2	✓			✓	✓	
41	CMR 42-44-98	✓		✓	✓	✓	
42	CMR 42-16-37	✓	✓	✓	✓	✓	
43	CMR 43-08-89	✓		✓	✓	✓	
44	CMR 44-03-57	✓			✓	✓	
45	CMR 44-29-12	✓		✓	✓	✓	
46	CMR 44-23-34	✓		✓		✓	
47	CMR 45-27-76	✓		✓	✓	✓	
48	CMR 46-30-264	✓		✓	✓	✓	
49	CMR 46-31-7	✓		✓	✓	✓	
50	CMR 46-47-137	✓		✓	✓	✓	
51	CMR 46-55-23	✓		✓	✓	✓	
52	CMR 47-02-9	✓		✓	✓	✓	
53	CMR 47-30-8	✓	✓	✓	✓		
54	CMR 48-20-17	✓		✓		✓	
55	CMR 48-35-1	✓		✓	✓	✓	
56	CMR 48-53-48	✓		✓	✓	✓	
57	CMR 49-22-227	✓			✓	✓	
58	CMR 49-54-10	✓		✓	✓	✓	
59	CMR 49-54-67	✓		✓	✓		
60	CMR 49-89-70	✓			✓	✓	
61	CMR 50-20-2	✓			✓	✓	
62	CMR 50-20-114	✓			✓	✓	
63	CMR 50-30-23	✓			✓	✓	
64	CMR 50-34-80	✓		✓	✓	✓	
65	CMR 50-41-1	✓		✓	✓	✓	
66	CMR 50-73-6	✓	✓		✓	✓	
67	CMR 50-13-26	✓		✓	✓		
68	CMR 51-04-42	✓			✓	✓	
69	CMR 51-13-14	✓			✓	✓	
70	CMR 51-23-14	✓			✓	✓	
71	CMR 51-34-6	✓			✓	✓	
72	CMR 51-43-69	✓		✓	✓		
73	CMR 53-87-20	✓			✓	✓	
74	CMR 53-106-24	✓			✓	✓	
75	OMR 53-03-6	✓	✓		✓		
76	มานพ	✓			✓	✓	
77	สอยดาว	✓			✓	✓	
78	GR 891	✓			✓	✓	
79	KATEH	✓			✓	✓	

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 105 พันธุ์ (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ไพรเมอร์					หมายเหตุ
		MBBR13	MBBR 5	MBBR 9	MBBR 17	SSRY 5	
80	KM 98-1	✓				✓	เครื่องหมาย ✓ คือ ไพรเมอร์ที่สามารถคัดเลือกได้
81	MBRA 12	✓			✓	✓	
82	MCOL 912B	✓			✓	✓	
83	MCOL 1098	✓			✓	✓	
84	MCUB 23	✓			✓	✓	
85	MECU 72	✓		✓	✓	✓	
86	MMAL 63	✓		✓	✓	✓	
87	MPER 325	✓			✓	✓	
88	MVEN 297A	✓	✓	✓	✓	✓	
89	NANZHI 199	✓		✓	✓	✓	
90	SC 5	✓			✓	✓	
91	SC 201	✓			✓	✓	
92	V 13						
93	YOD KHAM	✓			✓	✓	
94	MCOL 1752	✓		✓	✓	✓	
95	MPER 183	✓			✓		
96	HANATEE	✓			✓	✓	
97	BATHANG	✓			✓	✓	
98	MCOL 22	✓				✓	
99	MENTEGA	✓			✓		
100	NEP HONGHA	✓			✓	✓	
101	YOLK	✓			✓		
102	297	✓			✓	✓	
103	298	✓			✓	✓	
104	315	✓			✓	✓	
105	456	✓			✓	✓	

กรมวิชาการเกษตร

การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม

จากนั้นเก็บรวบรวมใบมันสำปะหลังลูกผสม F1 ปี 58 จากแปลงศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ทั้งหมด 76 สายพันธุ์ **(ตารางที่ 5)** จากนั้นนำใบมาสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอและวิธี 2% CTAB แล้ววัดคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอแล้วนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมสำหรับทำพีซีอาร์ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) กับไพรเมอร์ จำนวน 18 คู่ไพรเมอร์ ในปริมาตร 20 ul ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ul, DreamTaq Green Master Mix 10 ul, 50 M Primer ด้าน forward และด้าน reverse อย่างละ 1 ul และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 7 ul ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โปรแกรมที่ใช้ทำ PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 94°C (1 นาที) 1 รอบ denaturationที่ 94°C (30 วินาที) annealing 50°C (20 วินาที) และ extension ที่ 72°C (50 วินาที) เป็นจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72°C (5 นาที) 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 5 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม F1 ปี 58 จำนวน 76 พันธุ์

ลำดับ	สายพันธุ์	ลำดับ	สายพันธุ์	ลำดับ	สายพันธุ์	ลำดับ	สายพันธุ์
1	CMR-58-74-109	20	CMR-58-75-110	39	CMR-58-179-12	58	CMR-58-72-29
2	CMR-58-25-14	21	CMR-58-37-49	40	CMR-58-170-75	59	CMR-58-144-03
3	CMR-58-11-41	22	CMR-58-180-01	41	CMR-58-75-99	60	CMR-58-45-14
4	OMR-58-45-06	23	CMR58-35-64	42	OMR-58-05-19	61	CMR-58-177-25
5	CMR-58-116-03	24	CMR-58-19-33	43	CMR-58-106-85	62	CMR-58-71-67
6	CMR-58-07-12	25	CMR-193-06	44	CMR-58-07-49	63	CMR-58-35-15
7	CMR-58-76-76	26	CMR-58-157-84	45	CMR-58-17-05	64	CMR-58-75-135
8	CMR-58-10-22	27	CMR-58-11-13	46	CMR-58-173-04	65	CMR-58-75-119
9	CMR-58-35-46	28	CMR-58-157-120	47	CMR-58-74-147	66	CMR-58-178-47
10	CMR-58-35-85	29	CMR-58-37-80	48	CMR-58—19-26	67	CMR-58-177-29
11	CMR-58-17-14	30	CMR-58-11-102	49	CMR-58-75-38	68	CMR-58-37-20
12	CMR-58-76-29	31	CMR-58-170-53	50	CMR-58-63-70	69	CMR-58-19-81
13	CMR-58-10-25	32	CMR-58-75-53	51	CMR-58-07-01	70	CMR-58-69-08
14	CMR-58-128-31	33	CMR-58-11-22	52	CMR-58-25-47	71	CMR-58-45-84
15	OMR-58-20-12	34	OMR-58-07-10	53	CMR-58-170-55	72	CMR-58-75-40
16	CMR-58-23-20	35	CMR-58-180-11	54	CMR-58-74-141	73	CMR-58-51-88
17	CMR-58-10-08	36	CMR-58-37-95	55	CMR-58-19-57	74	CMR-58-178-23
18	CMR-58-199-01	37	CMR-58-10-12	56	CMR-58-69-09	75	CMR-58-35-28
19	CMR-58-133-42	38	CMR-58-11-32	57	CMR-58-76-39	76	CMR-58-20-106

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกไว้ จำนวน 18 คู่ไพรเมอร์ กับมันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสม F1 ปี 58 จำนวน 76 พันธุ์ พบว่า มีไพรเมอร์ จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วได้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงตามการออกแบบดังนี้ ไพรเมอร์ MBBR13 (681bp), MBBR5 (664bp), MBBR9 (609bp), MBBR17 (627bp), MBBR4 (667bp) และ SSRY5 (299bp) **(ตารางที่ 6)** และมีมันสำปะหลังที่มีแนวโน้มต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ โดยพบว่าสามารถให้แถบดีเอ็นเอของยีนเกี่ยวข้องกับความต้านทานมากถึง 4 เครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ CMR-58-133-42, CMR-58-170-55, CMR-58-74-141, CMR-58-177-29, CMR-58-35-28 และ CMR-58-20-10

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6 แสดงผลการสอบไพรเมอร์กับมันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสม F1 จำนวน 76 พันธุ์

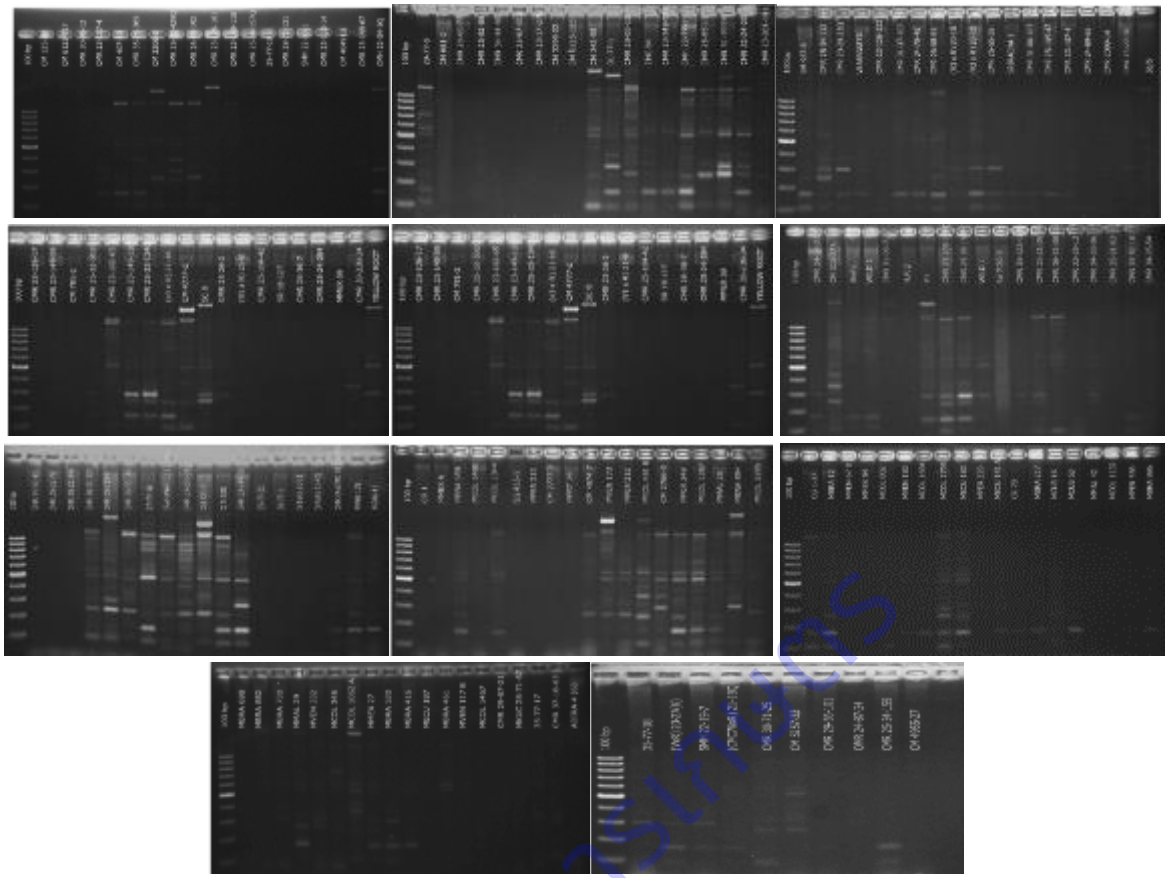
ลำดับ	พันธุ์	ไพร์เมอร์						หมายเหตุ
		MBBR13	MBBR4	MBBR9	MBBR5	MBBR17	SSrY5	
1	OMR-58-45-06	✓		✓		✓		เครื่องหมาย ✓คือ ไพรเมอร์ที่สามารถ คัดเลือกได้
2	CMR-58-07-12	✓		✓		✓		
3	CMR-58-76-76	✓		✓		✓		
4	CMR-58-133-42	✓		✓		✓	✓	
5	CMR-58-37-49	✓				✓	✓	
6	CMR-58-11-102	✓		✓		✓		
7	CMR-58-75-53	✓	✓			✓		
8	CMR-58-170-75	✓				✓	✓	
9	CMR-58-170-55	✓		✓		✓	✓	
10	CMR-58-74-141	✓		✓		✓	✓	
11	CMR-58-75-135	✓		✓		✓		
12	CMR-58-178-47	✓		✓		✓		
13	CMR-58-177-29	✓			✓	✓	✓	
14	CMR-58-51-88	✓		✓		✓		
15	CMR-58-178-23	✓		✓		✓		
16	CMR-58-35-28	✓		✓		✓	✓	
17	CMR-58-20-106	✓		✓		✓	✓	

การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย

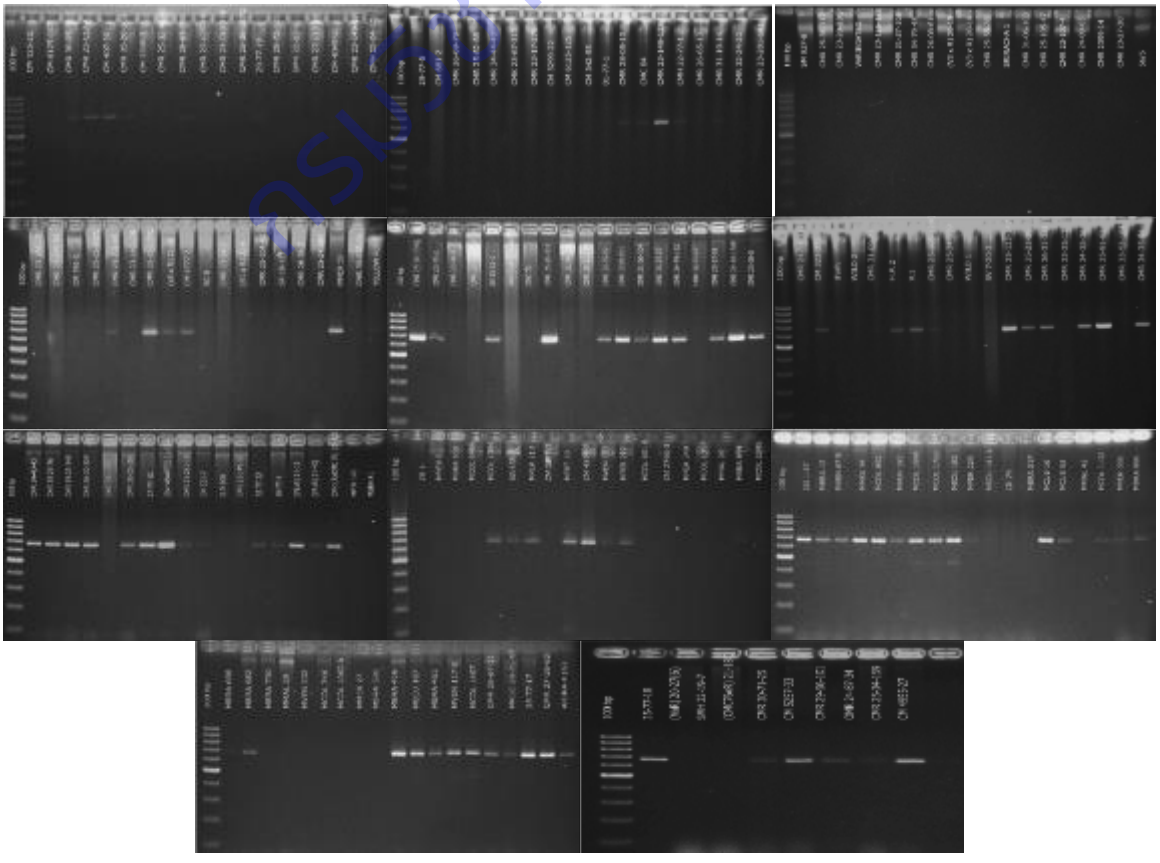
เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลโดยนำโมเลกุลเครื่องหมายที่ผ่านการทดสอบแล้วมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นมันสำปะหลัง จำนวนไม่น้อยกว่า 200 ต้น กับไพรเมอร์อย่างน้อย 10 คู่ รวมจำนวน 2,000 ตัวอย่าง พบว่า ได้ไพรเมอร์ชนิด EST และ SSr จำนวน 4 ไพรเมอร์ ดังนี้ MBBR 9, MBBR 13, MBBR 17 และ SSrY5 จึงนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับตัวอย่างมันสำปะหลังจากแปลงพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 พันธุ์ **(ตารางที่ 7)** นำดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทยที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) กับไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส **(ภาพที่ 4)** ผลการทดสอบการเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบท์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จากดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย พบว่า MBBR 9 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์, MBBR 13 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ≈ 681 bp ทั้งหมด 74 ตัวอย่าง, MBBR 17 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ≈ 627 bp ทั้งหมด 142 ตัวอย่าง และ SSrY5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ≈ 299 bp ทั้งหมด 99 ตัวอย่าง **(ตารางที่ 8)**

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

MBBR 9 ≈ 609 bp

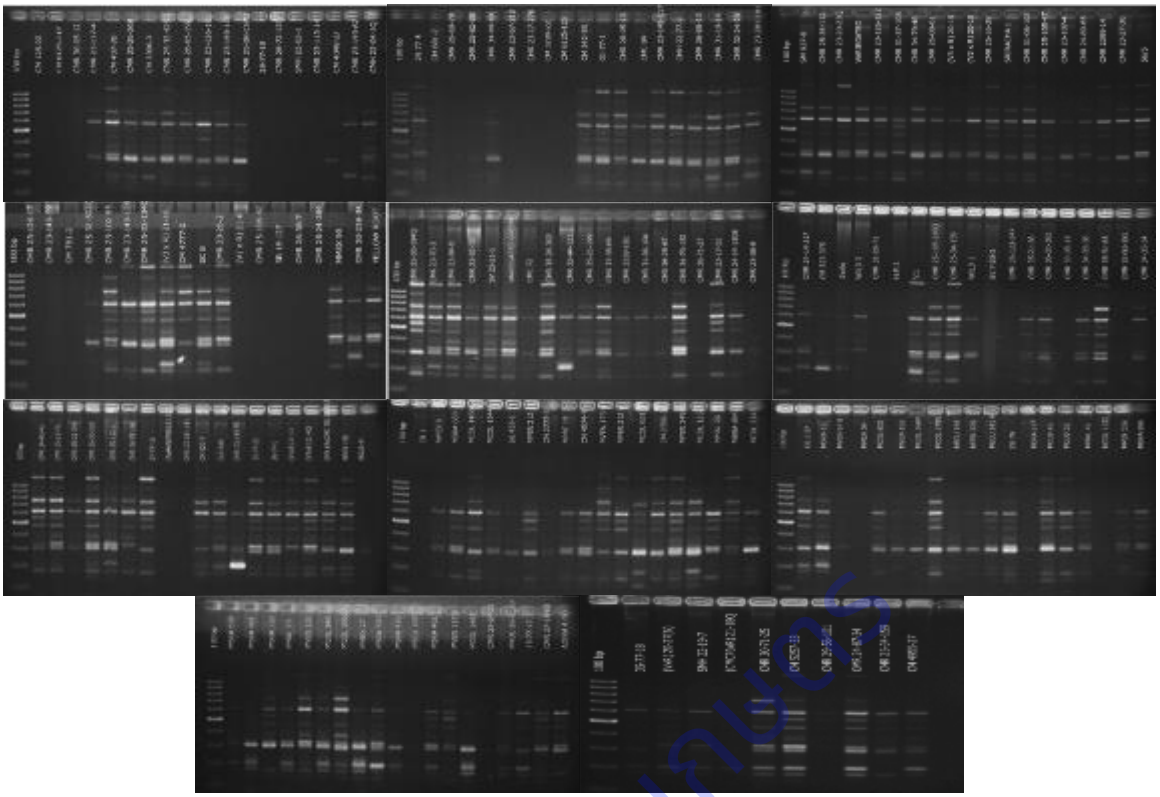


MBBR 13 ≈ 681 bp

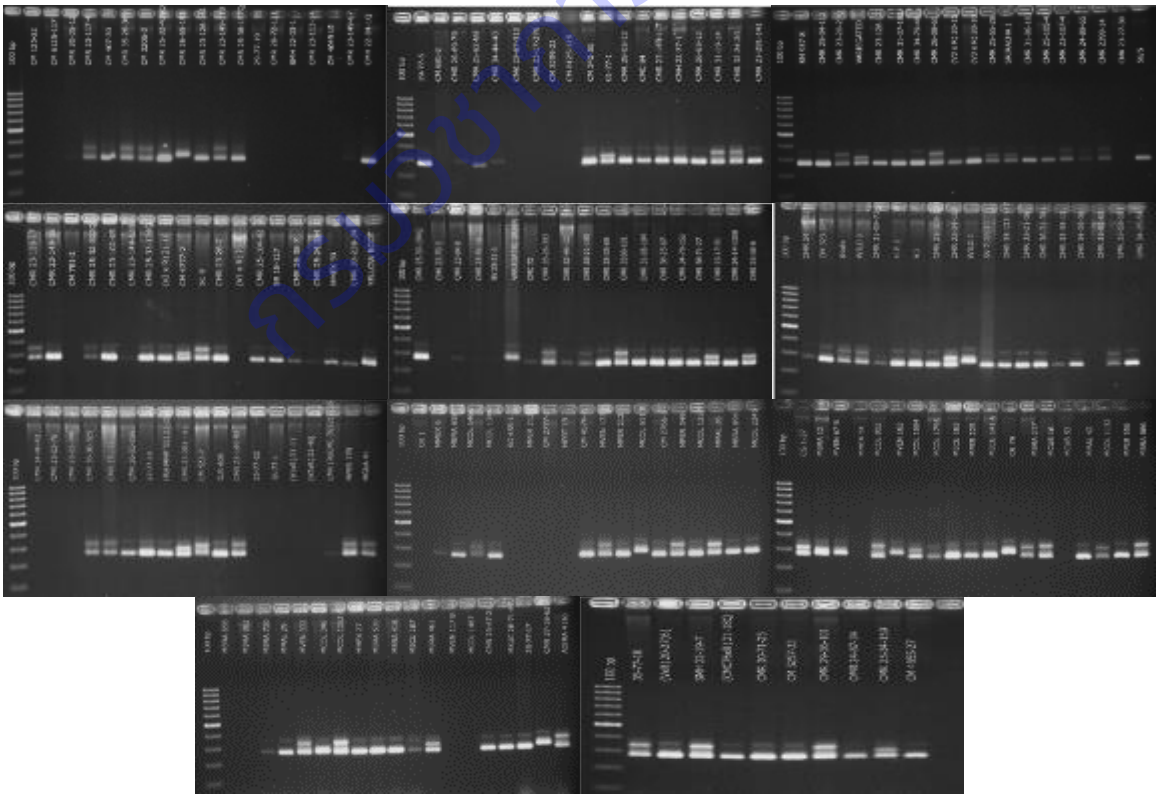


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

MBBR 17 ≈ 627 bp



SSRY 5 ≈ 299 bp



ภาพที่ 4 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มอนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 พันธุ์

ตารางที่ 7 แสดงรายชื่อมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 ตัวอย่าง

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์
1	CM 125-22	51	CMR 31-06-103	101	H.P. 2	151	MBRA 894
2	CM 6125-117	52	CMR 25-105-47	102	V.1	152	MCOL 2245
3	CMR 30-05-12	53	CMR 23-107-4	103	CMR 25-105-128Q	153	CG 1-37
4	CMR 23-117-4	54	CMR 24-89-65	104	CMR 25-34-159	154	MBRA 12
5	CM 407-30	55	CMR 2399-14	105	WILD 1	155	MVEN 67 B
6	CMR 35-26-369	56	CMK 23-27-30	106	SV 7-20-3	156	MMEX 54
7	CM 3306-3	57	56/5	107	CMR 35-123-147	157	MCOL 802
8	CMR 25-32-429Q	58	CMR 23-126-17	108	CMR 35-21-36	158	MVEN 183
9	CMR 26-65-192	59	CMR 23-149-59	109	CMR 36-31-381	159	MCOL 1684
10	CMR 23-126-161	60	CM 781-2	110	CMR 33-35-13	160	MCOL 1795
11	CMR 23-149-118	61	CMR 25-32-502Q	111	CMR 34-35-36	161	MECU 183
12	CMR 25-38-157Q	62	CMR 23-102-65	112	CMR 35-91-63	162	MPER 229
13	29-77-19	63	CMR 23-149-128	113	CMR 33-53-181	163	MECU 141 A
14	CMR 28-72-131	64	CMR 25-33-134Q	114	CMR 34-35-54	164	CR 79
15	SMH 22-03-1	65	(v3 x R) 21-16	115	CMR 34-40-43	165	MBRA 217
16	CMR 23-113-14	66	CM 4777-2	116	CMR 35-23-76	166	MCUB 16
17	CM 4049 UJ	67	SC 8	117	CMR 35-22-348	167	MCUB 53
18	CMR 23-149-67	68	CMR 23-26-2	118	CMR 36-30-329	168	MMAL 42
19	CMH 22-04-1Q	69	(V1 x R) 21-8	119	CMR 35-112-1	169	MCOL 1132
20	29-77-5	70	CMR 25-104-42	120	CMR 36-55-166	170	MPER 556
21	CM 681-2	71	SR 18-127	121	27-77-10	171	MBRA 886
22	CMR 26-69-79	72	CMR 26-38-7	122	(RxHANATEE) 21-28Q	172	MBRA 698
23	CMR 25-82-88	73	CMR 25-24-384	123	CMR 23-281-141	173	MBRA 882
24	CMR 34-44-40	74	MMEX 59	124	CM 523-7	174	MBRA 730
25	CMK 23-67-313	75	CMR 30-238-34	125	O.P. 608	175	MMAL 29
26	CMR 23-17-276	76	YELLOW ROOT	126	CMR 23-149-59	176	MVEN 332
27	CM 3299-22	77	CMR 25-30-194Q	127	35-77-22	177	MCOL 346
28	CM 6125-125	78	CMK 23-70-3	128	36-77-1	178	MCOL 1062 A
29	CM 342-55	79	CMR 23-84-8	129	(V1xR) 21-11	179	MMEX 27
30	01-77-1	80	CMR 23-51-10	130	(V7xR) 21-4Q	180	MBRA 530
31	CMR 28-05-13	81	SV 25-21-1	131	CMK (RxCMC76)21-235	181	MBRA 416
32	CMC 84	82	VARIEGATED GREEN	132	MPER 178	182	MECU 187
33	CMR 23-149-117	83	CMC 72	133	MGUA 41	183	MBRA 461
34	CMH 22-77-1	84	CMR 35-26-303	134	CR 1	184	MVEN 117 B
35	CMR 26-65-13	85	CMR 32-94-121	135	MMEX 6	185	MCOL 1467
36	CMR 31-19-14	86	CMR 35-21-199	136	MBRA 658	186	CMR 29-67-21
37	CMR 32-24-20	87	CMR 33-35-69	137	MCOL 1466	187	MKUC 28-71-67
38	CMR 23-281-141	88	CMR 3318-101	138	MCOL 1344	188	35-77-17
39	SM 937-8	89	CMR 31-06-104	139	SG 455-1	189	CMR 37-18-63
40	CMR 25-34-112	90	CMR 36-25-67	140	MPER 213	190	ADIRA 4 (6)
41	CMR 23-20-23Q	91	CMR 34-79-152	141	CM 2777-3	191	35-77-18
42	VARIEGATED	92	CMR 36-71-27	142	MPRT 19	192	(VxR) 20-27(6)
43	CMR 23-126-122	93	CMR 23-17-51	143	CM 4574-7	193	SMH 22-19-7
44	CMR 31-37-105	94	CMR 24-14-1308	144	MVEN 173	194	(CMC76xR) 21-18Q
45	CMR 34-79-48	95	CMR 23-08-8	145	MPER 212	195	CMR 30-71-25
46	CMR 26-08-61	96	CMR 24-14-317	146	MCOL 651 B	196	CM 5257-33
47	(V3 x R) 20-15	97	CM 323-375	147	CM 2766-3	197	CMR 29-56-101
48	(V3 x R) 20-10	98	มันต้น	148	MPER 349	198	OMR 24-87-34
49	CMR 25-55-28	99	WILD 2	149	MCOL 1357	199	CMR 25-34-159
50	SRIRACHA 1	100	CMR 31-09-71	150	MMAL 26	200	CM 4955-27

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200ตัวอย่าง

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	MBBR13	MBBR17	SSRY5	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	MBBR13	MBBR17	SSry5
1	CM 125-22				51	CMR 31-06-103		✓	✓
2	CM 6125-117				52	CMR 25-105-47		✓	✓
3	CMR 30-05-12				53	CMR 23-107-4		✓	✓
4	CMR 23-117-4		✓	✓	54	CMR 24-89-65		✓	✓
5	CM 407-30		✓	✓	55	CMR 2399-14		✓	✓
6	CMR 35-26-369		✓	✓	56	CMK 23-27-30		✓	✓
7	CM 3306-3		✓	✓	57	56/5		✓	✓
8	CMR 25-32-429Q		✓	✓	58	CMR 23-126-17			✓
9	CMR 26-65-192		✓		59	CMR 23-149-59			✓
10	CMR 23-126-161		✓	✓	60	CM 781-2			
11	CMR 23-149-118		✓	✓	61	CMR 25-32-502Q		✓	✓
12	CMR 25-38-157Q		✓	✓	62	CMR 23-102-65		✓	✓
13	29-77-19				63	CMR 23-149-128		✓	
14	CMR 28-72-131				64	CMR 25-33-134Q	✓	✓	✓
15	SMH 22-03-1				65	(v3 x R) 21-16	✓	✓	✓
16	CMR 23-113-14				66	CM 4777-2	✓	✓	✓
17	CM 4049 UJ				67	SC 8		✓	✓
18	CMR 23-149-67		✓		68	CMR 23-26-2		✓	✓
19	CMH 22-04-1Q		✓	✓	69	(V1 x R) 21-8			
20	29-77-5		✓	✓	70	CMR 25-104-42			✓
21	CM 681-2				71	SR 18-127			✓
22	CMR 26-69-79				72	CMR 26-38-7			✓
23	CMR 25-82-88				73	CMR 25-24-384			✓
24	CMR 34-44-40		✓		74	MMEX 59	✓	✓	✓
25	CMK 23-67-313				75	CMR 30-238-34		✓	✓
26	CMR 23-17-276				76	YELLOW ROOT		✓	✓
27	CM 3299-22				77	CMR 25-30-194Q	✓	✓	✓
28	CM 6125-125				78	CMK 23-70-3	✓	✓	
29	CM 342-55		✓	✓	79	CMR 23-84-8		✓	
30	01-77-1		✓	✓	80	CMR 23-51-10		✓	
31	CMR 28-05-13		✓	✓	81	SV 25-21-1	✓	✓	
32	CMC 84		✓	✓	82	VARIEGATED GREEN		✓	✓
33	CMR 23-149-117	✓	✓	✓	83	CMC 72			
34	CMH 22-77-1		✓	✓	84	CMR 35-26-303	✓	✓	
35	CMR 26-65-13		✓	✓	85	CMR 32-94-121		✓	
36	CMR 31-19-14		✓	✓	86	CMR 35-21-199		✓	
37	CMR 32-24-20		✓	✓	87	CMR 33-35-69	✓	✓	
38	CMR 23-281-141		✓	✓	88	CMR 3318-101	✓	✓	
39	SM 937-8		✓	✓	89	CMR 31-06-104	✓	✓	
40	CMR 25-34-112		✓	✓	90	CMR 36-25-67	✓	✓	
41	CMR 23-20-23Q		✓	✓	91	CMR 34-79-152	✓	✓	
42	VARIEGATED		✓	✓	92	CMR 36-71-27			
43	CMR 23-126-122		✓	✓	93	CMR 23-17-51	✓	✓	
44	CMR 31-37-105		✓	✓	94	CMR 24-14-1308	✓	✓	
45	CMR 34-79-48		✓	✓	95	CMR 23-08-8	✓		
46	CMR 26-08-61		✓	✓	96	CMR 24-14-317		✓	✓
47	(V3 x R) 20-15		✓	✓	97	CM 323-375	✓		
48	(V3 x R) 20-10		✓	✓	98	มันต้น			
49	CMR 25-55-28		✓	✓	99	WILD 2		✓	
50	SRIRACHA 1		✓	✓	100	CMR 31-09-71			

กรมวิชาการเกษตร

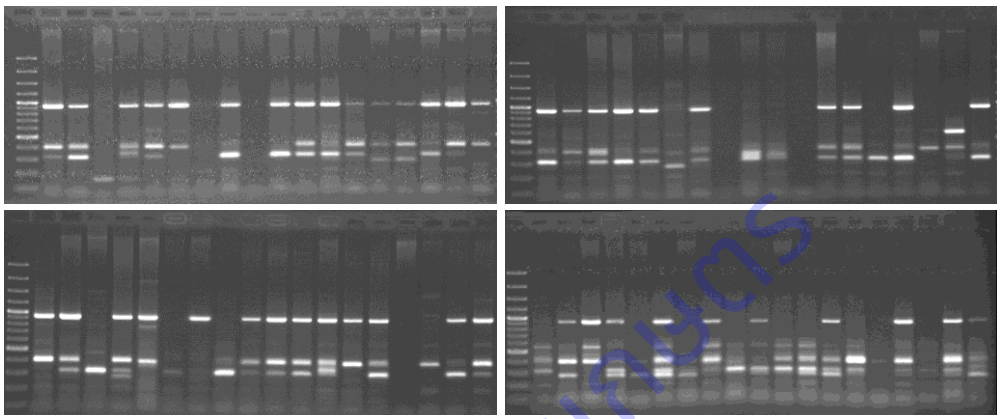
ตารางที่ 8(ต่อ) แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 ตัวอย่าง

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	MBBR13	MBBR17	SSRY5	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	MBBR13	MBBR17	SSry5
101	H.P. 2	✓			151	MBRA 894		✓	
102	V.1	✓	✓		152	MCOL 2245		✓	✓
103	CMR 25-105-128Q		✓		153	CG 1-37	✓	✓	✓
104	CMR 25-34-159		✓	✓	154	MBRA 12	✓	✓	✓
105	WILD 1		✓	✓	155	MVEN 67 B	✓	✓	✓
106	SV 7-20-3				156	MMEX 54	✓		
107	CMR 35-123-147	✓			157	MCOL 802	✓	✓	✓
108	CMR 35-21-36	✓	✓		158	MVEN 183			
109	CMR 36-31-381	✓	✓		159	MCOL 1684	✓		✓
110	CMR 33-35-13				160	MCOL 1795	✓	✓	✓
111	CMR 34-35-36	✓	✓		161	MECU 183	✓		✓
112	CMR 35-91-63	✓	✓		162	MPER 229			✓
113	CMR 33-53-181				163	MECU 141 A		✓	✓
114	CMR 34-35-54	✓	✓		164	CR 79		✓	
115	CMR 34-40-43	✓	✓		165	MBRA 217			✓
116	CMR 35-23-76	✓	✓		166	MCUB 16	✓	✓	✓
117	CMR 35-22-348	✓	✓		167	MCUB 53	✓	✓	
118	CMR 36-30-329	✓	✓	✓	168	MMAL 42		✓	✓
119	CMR 35-112-1		✓	✓	169	MCOL 1132	✓		✓
120	CMR 36-55-166	✓	✓	✓	170	MPER 556	✓	✓	✓
121	27-77-10	✓	✓	✓	171	MBRA 886	✓	✓	✓
122	(RxHANATEE) 21-	✓		✓	172	MBRA 698			
123	CMR 23-281-141			✓	173	MBRA 882	✓		
124	CM 523-7		✓	✓	174	MBRA 730		✓	✓
125	O.P. 608		✓	✓	175	MMAL 29		✓	✓
126	CMR 23-149-59		✓	✓	176	MVEN 332		✓	✓
127	35-77-22	✓	✓		177	MCOL 346		✓	✓
128	36-77-1	✓	✓		178	MCOL 1062 A		✓	✓
129	(V1xR) 21-11	✓	✓		179	MMEX 27		✓	✓
130	(V7xR) 21-4Q	✓	✓		180	MBRA 530		✓	✓
131	CMK (RxCMC 76)	✓	✓	✓	181	MBRA 416	✓		✓
132	MPER 178		✓	✓	182	MECU 187	✓	✓	✓
133	MGUA 41			✓	183	MBRA 461	✓	✓	✓
134	CR 1				184	MVEN 117 B	✓		
135	MMEX 6		✓		185	MCOL 1467	✓		
136	MBRA 658		✓		186	CMR 29-67-21	✓		✓
137	MCOL 1466		✓		187	MKUC 28-71-67	✓	✓	✓
138	MCOL 1344	✓	✓	✓	188	35-77-17	✓	✓	✓
139	SG 455-1	✓			189	CMR 37-18-63	✓	✓	
140	MPER 213	✓	✓		190	ADIRA 4 (6)	✓	✓	✓
141	CM 2777-3				191	35-77-18	✓	✓	✓
142	MPRT 19	✓	✓		192	(VxR) 20-27(6)			✓
143	CM 4574-7	✓	✓		193	SMH 22-19-7		✓	✓
144	MVEN 173		✓	✓	194	(CMC76xR) 21-18Q			✓
145	MPER 212	✓	✓		195	CMR 30-71-25	✓	✓	✓
146	MCOL 651 B		✓	✓	196	CM 5257-33	✓	✓	✓
147	CM 2766-3		✓		197	CMR 29-56-101	✓		✓
148	MPER 349		✓	✓	198	OMR 24-87-34		✓	✓
149	MCOL 1357		✓		199	CMR 25-34-159	✓	✓	✓
150	MMAL 26		✓	✓	200	CM 4955-27	✓	✓	✓

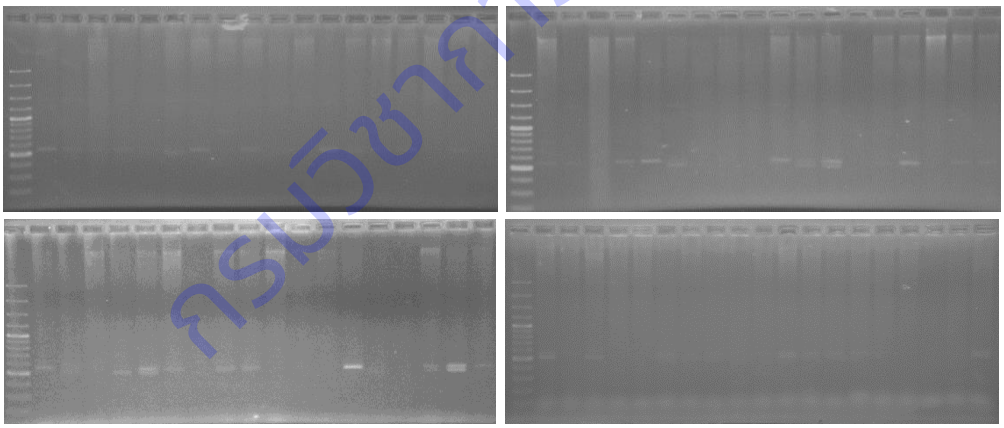
กรมวิชาการเกษตร

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมาย จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ MBBR10 (868 bp), MBBR12 (703 bp), MBBR4 (667 bp), MBBR5 (644 bp), MBBR7 (693 bp), และ MBBR1 (697 bp) กับตัวอย่างดีเอ็นเอมันสำปะหลังจากแปลงพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 พันธุ์ เพื่อตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด EST และ SSrY ให้ได้จำนวนเครื่องหมายเพิ่มขึ้น ผลการทดสอบพบว่า ไพรเมอร์ MBBR10 (868 bp), MBBR12 (703 bp), MBBR4 (667 bp) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ไพรเมอร์ MBBR7 (693 bp) ได้แถบดีเอ็นเอเป็นจำนวนมากแต่ไม่ได้แถบดีเอ็นเอตรงตามขนาดที่ต้องการไพรเมอร์ MBBR5 (644 bp) ได้แถบดีเอ็นเอ ≈ 500 bp และไพรเมอร์ MBBR1 (697 bp) ได้แถบดีเอ็นเอ ≈ 500 bp แสดงดังภาพ

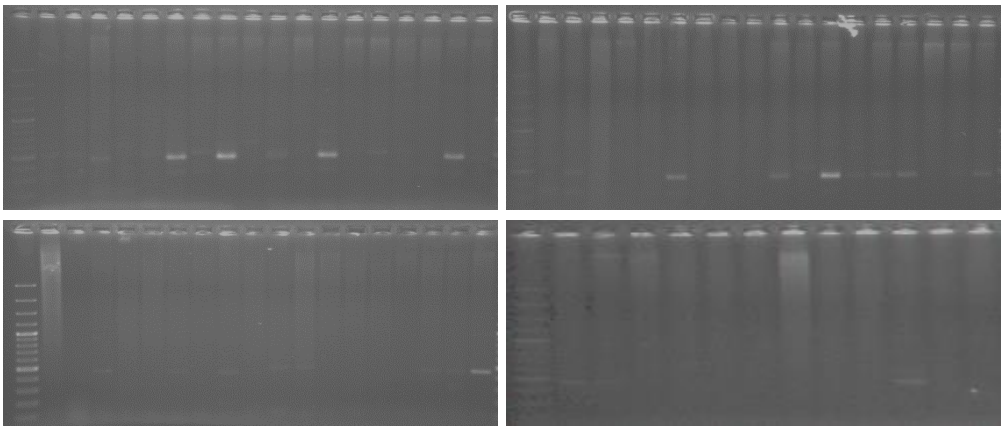
ขนาดแถบดีเอ็นเอไพรเมอร์ MBBR 7 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus



ขนาดแถบดีเอ็นเอไพรเมอร์ MBBR 5 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus



ขนาดแถบดีเอ็นเอไพรเมอร์ MBBR 1 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus



กรมวิชาการเกษตร

การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์บริโภคและพันธุ์ลูกผสมปี 2562

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังลูกผสมที่เป็นพันธุ์มันบริโภค จำนวน 176 พันธุ์ **(ตารางที่ 9)** และมันสำปะหลังลูกผสมปี 62 จำนวน 138 พันธุ์ **(ตารางที่ 10)** รวมทั้งหมด 314 พันธุ์ นำใบมันสำปะหลังมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัด Nano drop

ตารางที่ 9 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมที่เป็นพันธุ์มันบริโภค จำนวน 176 พันธุ์

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์
1	MPAR25	45	CMRE62-24-80	89	CMRE62-03-15	133	OMRE62-05-08
2	MBRA158	46	CMRE62-24-108	90	CMRE62-03-8	134	OMRE62-05-01
3	HB80	47	CMRE62-24-73	91	CMRE62-01-4	135	OMRE62-05-09
4	KM140	48	CMRE62-24-45	92	CMRE62-06-4	136	OMRE62-05-16
5	MVEN47	49	CMRE62-24-51	93	CMRE62-24-94	137	OMRE62-05-21
6	CM4574-7	50	CMRE62-24-34	94	CMRE62-14-7	138	OMRE62-08-23
7	พิรุณ2	51	CMRE62-24-11	95	CMRE62-06-34	139	OMRE62-08-21
8	OMR26-14-9	52	CMRE62-22-42	96	CMRE62-06-75	140	OMRE62-01-6
9	R9	53	CMRE62-07-21	97	CMRE62-07-50	141	OMRE62-01-8
10	CMR25-32-4290	54	CMRE62-03-30	98	CMRE62-07-78	142	OMRE62-01-10
11	MCOL22	55	CMRE62-03-31	99	CMRE62-03-20	143	OMRE62-01-16
12	MBRA792	56	CMRE62-01-5	100	CMRE62-01-19	144	OMRE62-01-18
13	CM3299-15	57	CMRE62-03-9	101	CMRE62-07-13	145	OMRE62-01-20
14	OMR29-20-118	58	CMRE62-03-10	102	CMRE62-22-1	146	OMRE62-01-21
15	MVEN2974	59	CMRE62-02-7	103	CMRE62-07-94	147	OMRE62-01-23
16	MCOL2331	60	CMRE62-02-11	104	CMRE62-18-14	148	OMRE62-01-37
17	YOLK	61	CMRE62-03-35	105	CMRE62-06-9	149	OMRE62-01-39
18	R72	62	CMRE62-03-36	106	CMRE62-24-87	150	OMRE62-01-54
19	Wild1	63	CMRE62-06-7	107	CMRE62-24-23	151	OMRE62-01-67
20	KU50	64	CMRE62-07-93	108	CMRE62-03-12	152	OMRE62-01-77
21	Hanatee	65	CMRE62-22-10	109	OMRE62-03-38	153	OMRE62-01-96
22	MCOL1466	66	CMRE62-22-5	110	OMRE62-03-27	154	OMRE62-01-104
23	พิรุณ2	67	CMRE62-22-3	111	OMRE62-03-16	155	OMRE62-01-121
24	MBRA534	68	CMRE62-18-17	112	OMRE62-03-19	156	OMRE62-01-123
25	MENTEGA	69	CMRE62-18-9	113	OMRE62-03-22	157	OMRE62-04-63
26	HB60	70	CMRE62-14-4	114	OMRE62-03-21	158	OMRE62-04-54
27	SG455-1	71	CMRE62-14-6	115	OMRE62-03-20	159	OMRE62-04-46
28	R5	72	CMRE62-07-68	116	OMRE62-03-23	160	OMRE62-04-44
29	MVEN204	73	CMRE62-24-104	117	OMRE62-03-26	161	OMRE62-04-40
30	MUSA8	74	CMRE62-19-19	118	OMRE62-02-29	162	OMRE62-04-35
31	CR1	75	CMRE62-14-1	119	OMRE62-02-32	163	OMRE62-04-37
32	Hanatee	76	CMRE62-01-26	120	OMRE62-02-45	164	OMRE62-04-23
33	CMRE62-02-9	77	CMRE62-22-34	121	OMRE62-02-69	165	OMRE62-04-25
34	CMRE62-06-16	78	CMRE62-24-86	122	OMRE62-09-23	166	OMRE62-04-26
35	CMRE62-22-23	79	CMRE62-25-1	123	OMRE62-09-01	167	OMRE62-04-28
36	CMRE62-22-29	80	CMRE62-06-3	124	OMRE62-09-15	168	OMRE62-04-20
37	CMRE62-07-41	81	CMRE62-03-18	125	OMRE62-05-51	169	OMRE62-04-19
38	CMRE62-07-18	82	CMRE62-07-12	126	OMRE62-05-49	170	OMRE62-04-17
39	CMRE62-06-11	83	CMRE62-17-9	127	OMRE62-05-45	171	OMRE62-04-15
40	CMRE62-07-9	84	CMRE62-07-53	128	OMRE62-05-43	172	OMRE62-04-11
41	CMRE62-06-65	85	CMRE62-07-6	129	OMRE62-05-38	173	OMRE62-04-10
42	CMRE62-02-4	86	CMRE62-06-49	130	OMRE62-05-34	174	OMRE62-04-06
43	CMRE62-22-19	87	CMRE62-13-11	131	OMRE62-05-32	175	OMRE62-04-04
44	CMRE62-06-37	88	CMRE62-05-4	132	OMRE62-05-26	176	OMRE62-04-02

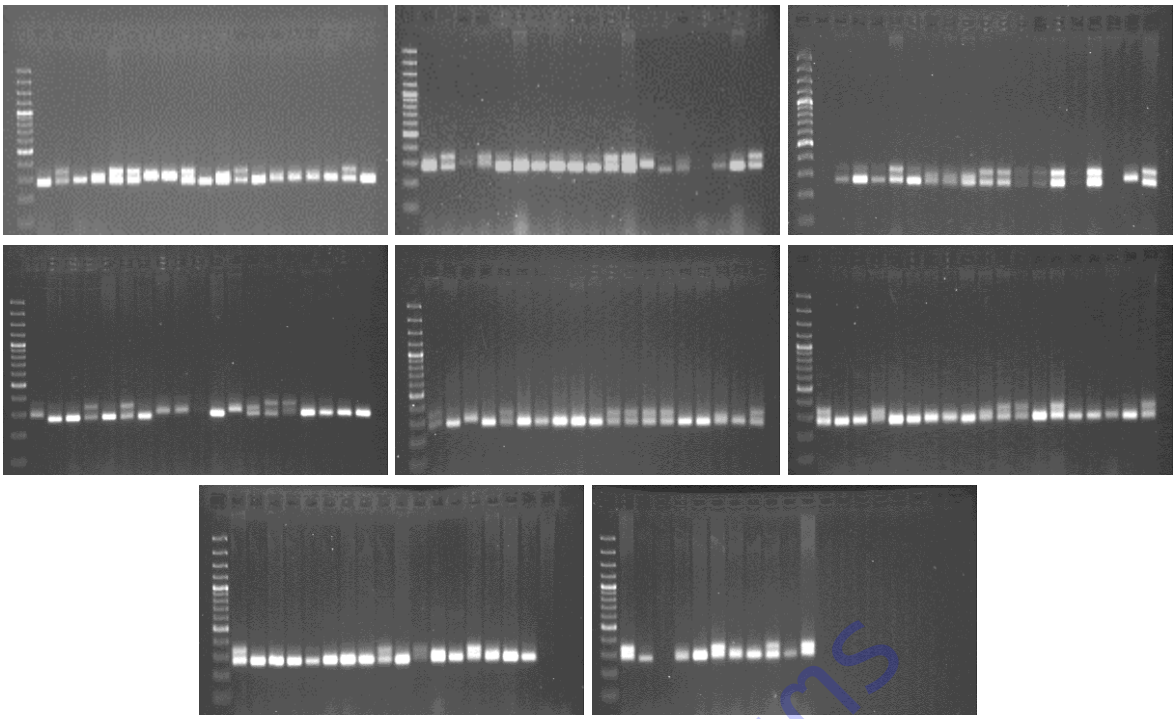
กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 10 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม ปี 2562 จำนวน 138 พันธุ์

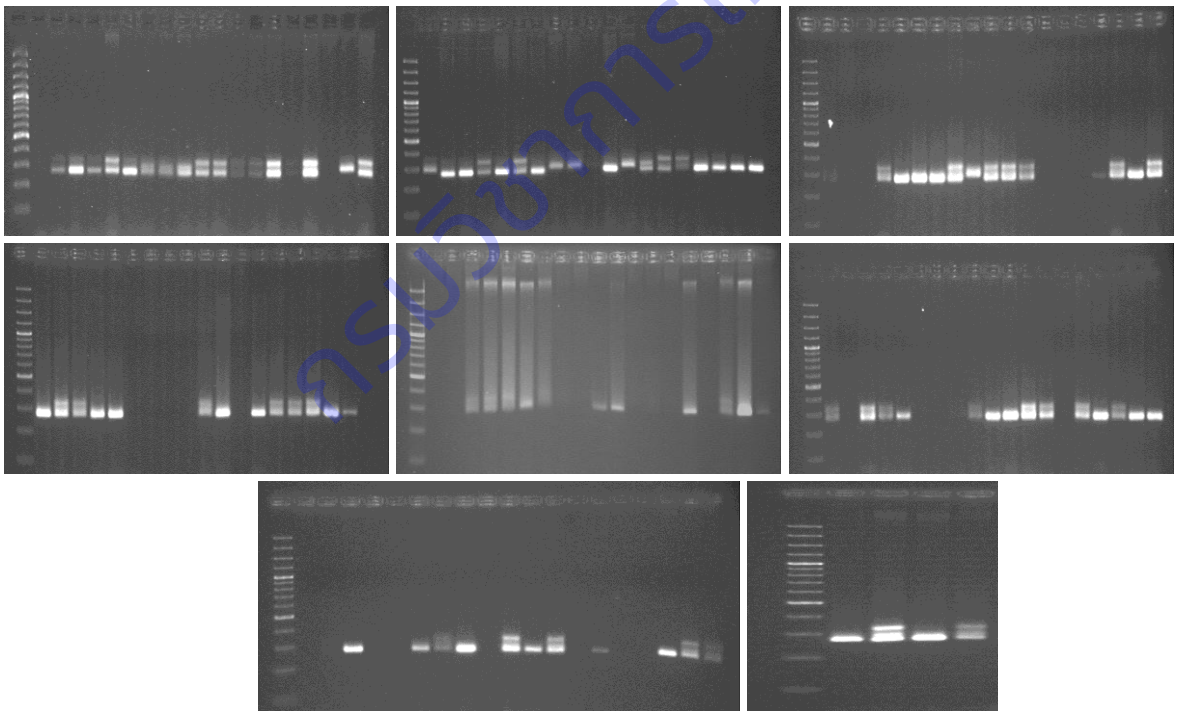
ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์
1	CMR-62-79-3	36	CMR-62-79-48	71	CMR-62-79-97	106	CMR-62-79-143
2	CMR-62-79-4	37	CMR-62-79-50	72	CMR-62-79-98	107	CMR-62-79-144
3	CMR-62-79-5	38	CMR-62-79-51	73	CMR-62-79-100	108	CMR-62-79-145
4	CMR-62-79-6	39	CMR-62-79-52	74	CMR-62-79-101	109	CMR-62-79-147
5	CMR-62-79-7	40	CMR-62-79-53	75	CMR-62-79-102	110	CMR-62-79-148
6	CMR-62-79-8	41	CMR-62-79-55	76	CMR-62-79-104	111	CMR-62-79-149
7	CMR-62-79-9	42	CMR-62-79-56	77	CMR-62-79-105	112	CMR-62-79-150
8	CMR-62-79-10	43	CMR-62-79-57	78	CMR-62-79-107	113	CMR-62-79-151
9	CMR-62-79-11	44	CMR-62-79-59	79	CMR-62-79-108	114	CMR-62-79-152
10	CMR-62-79-12	45	CMR-62-79-61	80	CMR-62-79-109	115	CMR-62-79-153
11	CMR-62-79-14	46	CMR-62-79-62	81	CMR-62-79-110	116	CMR-62-79-154
12	CMR-62-79-17	47	CMR-62-79-63	82	CMR-62-79-111	117	CMR-62-79-155
13	CMR-62-79-19	48	CMR-62-79-65	83	CMR-62-79-112	118	CMR-62-79-157
14	CMR-62-79-21	49	CMR-62-79-67	84	CMR-62-79-114	119	CMR-62-79-158
15	CMR-62-79-22	50	CMR-62-79-70	85	CMR-62-79-116	120	CMR-62-79-159
16	CMR-62-79-23	51	CMR-62-79-71	86	CMR-62-79-117	121	CMR-62-79-160
17	CMR-62-79-24	52	CMR-62-79-72	87	CMR-62-79-118	122	CMR-62-79-161
18	CMR-62-79-25	53	CMR-62-79-73	88	CMR-62-79-119	123	CMR-62-79-162
19	CMR-62-79-26	54	CMR-62-79-76	89	CMR-62-79-120	124	CMR-62-79-163
20	CMR-62-79-28	55	CMR-62-79-77	90	CMR-62-79-121	125	CMR-62-79-164
21	CMR-62-79-31	56	CMR-62-79-78	91	CMR-62-79-122	126	CMR-62-79-165
22	CMR-62-79-32	57	CMR-62-79-79	92	CMR-62-79-123	127	CMR-62-79-166
23	CMR-62-79-33	58	CMR-62-79-81	93	CMR-62-79-126	128	CMR-62-79-167
24	CMR-62-79-34	59	CMR-62-79-84	94	CMR-62-79-127	129	CMR-62-79-168
25	CMR-62-79-35	60	CMR-62-79-85	95	CMR-62-79-129	130	CMR-62-79-169
26	CMR-62-79-36	61	CMR-62-79-86	96	CMR-62-79-130	131	CMR-62-79-170
27	CMR-62-79-37	62	CMR-62-79-87	97	CMR-62-79-131	132	CMR-62-79-173
28	CMR-62-79-39	63	CMR-62-79-88	98	CMR-62-79-134	133	CMR-62-79-174
29	CMR-62-79-40	64	CMR-62-79-90	99	CMR-62-79-135	134	CMR-62-79-175
30	CMR-62-79-41	65	CMR-62-79-91	100	CMR-62-79-136	135	CMR-62-79-176
31	CMR-62-79-42	66	CMR-62-79-92	101	CMR-62-79-137	136	CMR-62-79-177
32	CMR-62-79-43	67	CMR-62-79-93	102	CMR-62-79-138	137	CMR-62-79-178
33	CMR-62-79-44	68	CMR-62-79-94	103	CMR-62-79-139	138	CMR-62-79-179
34	CMR-62-79-45	69	CMR-62-79-95	104	CMR-62-79-141		
35	CMR-62-79-46	70	CMR-62-79-96	105	CMR-62-79-142		

ทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุล ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์กับไพรเมอร์ ชนิด EST และ SSr ที่ออกแบบและคัดเลือกแล้วกับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพันธุ์บริโภค จำนวน 144 พันธุ์ และพันธุ์ลูกผสม ปี 62 จำนวน 138 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ SSrY5 พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วได้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงตามการออกแบบคือ 299 bp **(ภาพ 5 และ ภาพที่ 6)**

กรมวิชาการเกษตร



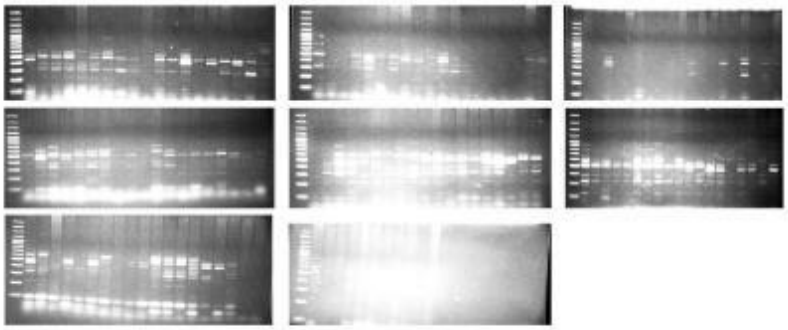
ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิสกับพันธุ์มันสำปะหลังบริโภค



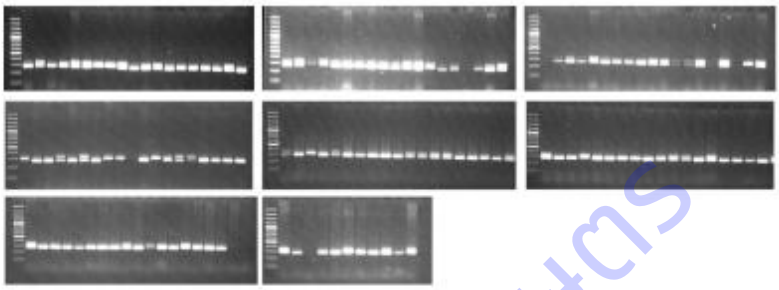
ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิสกับพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมปี 2562

กรมวิชาการเกษตร

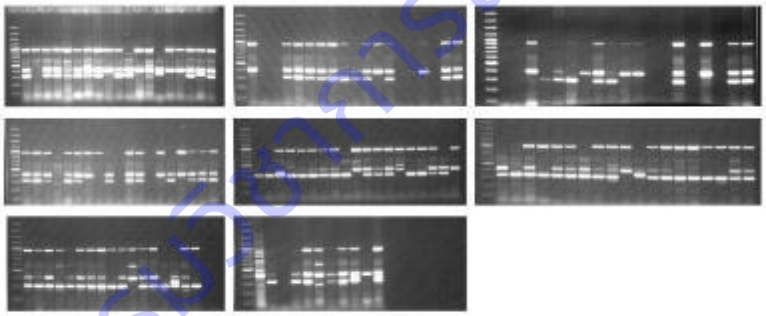
วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและประเมินความใช้ได้ของเครื่องหมายดีเอ็นเอเพิ่มเติม



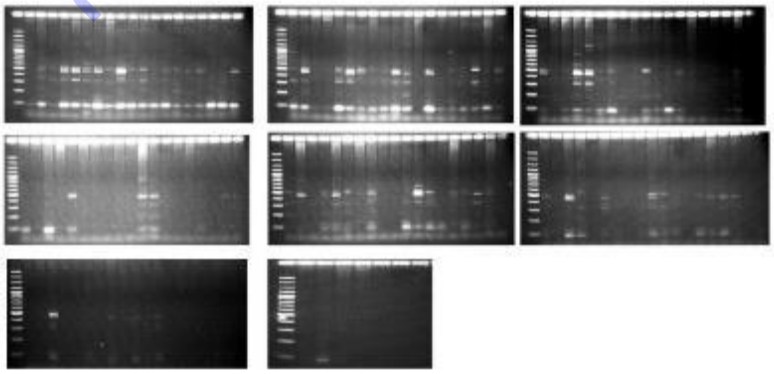
ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์บริโภค ไพรเมอร์ **MBB1** ตัวอย่างที่ **1-144 / 100 bp marker**



ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์บริโภค ไพรเมอร์ **SSRY** ตัวอย่างที่ **1-144 / 100 bp marker**

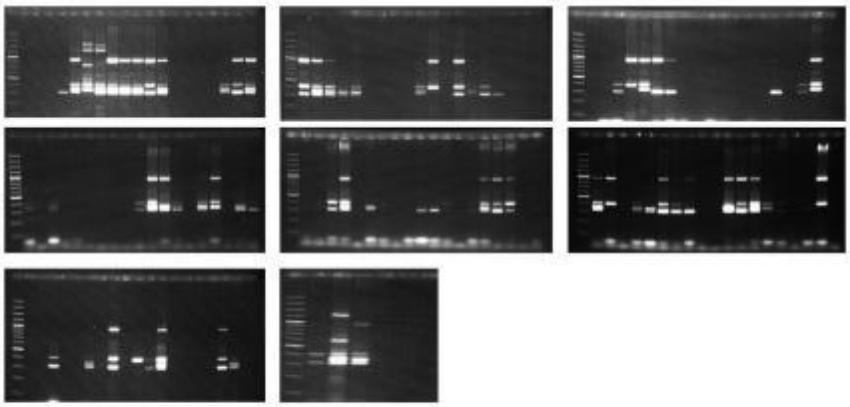


ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์บริโภค ไพรเมอร์ **MBB7** ตัวอย่างที่ **1-144 / 100 bp marker**

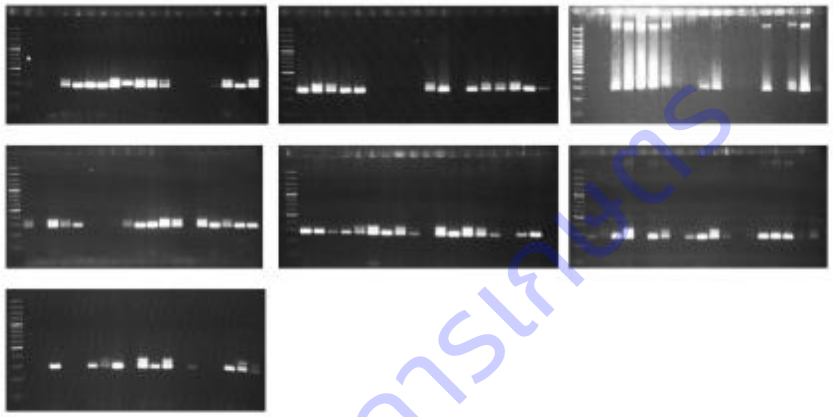


ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ลูกผสม ปี 2562 ไพรเมอร์ **MBB1**
ตัวอย่างที่ **1-137 / 100 bp marker**

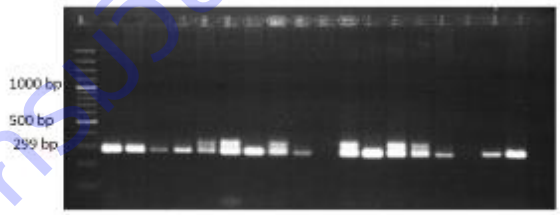
ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ลูกผสม ปี 2562 /ไพรเมอร์ **MBB7**
ตัวอย่างที่ **1-137 / 100 bp marker**



ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ลูกผสม ปี 2562 /ไพรเมอร์ **SSRY**
ตัวอย่างที่ **1-137 / 100 bp marker**



ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ลูกผสม ปี 2562 /ไพรเมอร์ **SSrY5**
/ 100 bp marker

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ทำการคัดเลือกมันสำปะหลัง 200 สายพันธุ์ สำหรับนำมาปลูกทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้ *Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* จำนวน 200 สายพันธุ์ **(ตารางที่ 11)**

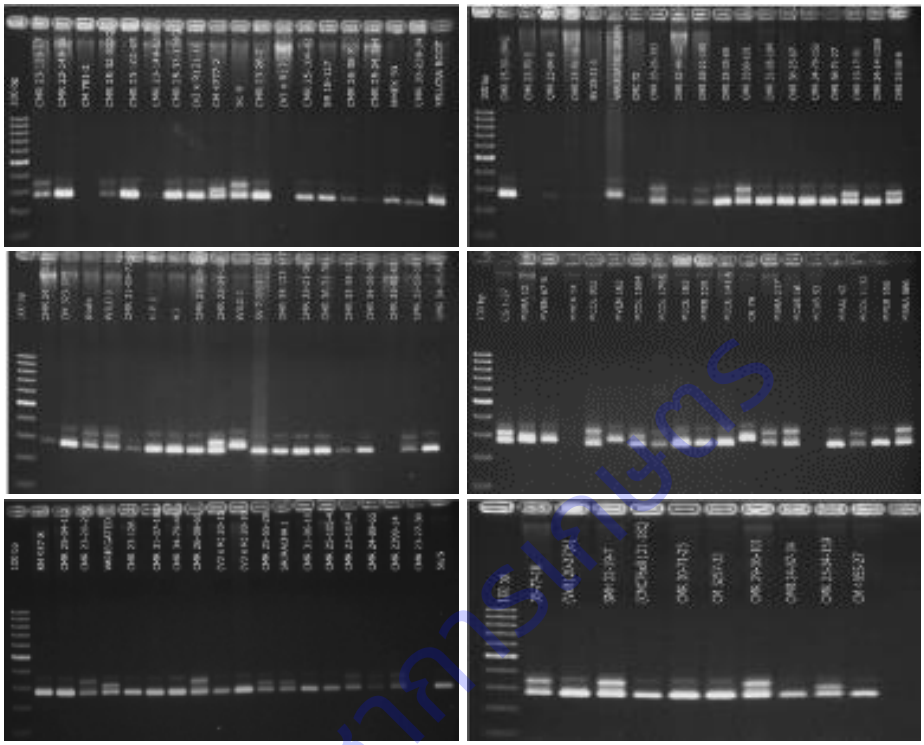
ตารางที่ 11 แสดงผลการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลัง 200 สายพันธุ์

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์
1	เกษตรลพบุรี	51	CMR-58-74-141	101	H.P. 2	151	MBRA 894
2	ระยอง 1	52	CMR-58-177-29	102	V.1	152	MCOL 2245
3	ระยอง 2	53	CMR-58-35-28	103	CMR 25-105-128Q	153	CG 1-37
4	ระยอง 9	54	CMR-58-20-106	104	CMR 25-34-159	154	MBRA 12
5	ระยอง 11	55	CMR-58-133-42	105	WILD 1	155	MVEN 67 B
6	ระยอง 86-13	56	CMK 23-27-30	106	SV 7-20-3	156	MMEX 54
7	KU 80	57	56/5	107	CMR 35-123-147	157	MCOL 802
8	พิรุณ 1	58	CMR 23-126-17	108	CMR 35-21-36	158	MVEN 183
9	พิรุณ 2	59	CMR 23-149-59	109	CMR 36-31-381	159	MCOL 1684
10	CR 19	60	CM 781-2	110	CMR 33-35-13	160	MCOL 1795
11	SM 2277-23	61	CMR 25-32-502Q	111	CMR 34-35-36	161	MECU 183
12	CMR 26-08-61	62	CMR 23-102-65	112	CMR 35-91-63	162	MPER 229
13	OMR 16-14-9	63	CMR 23-149-128	113	CMR 33-53-181	163	MECU 141 A
14	OMR 29-20-118	64	CMR 25-33-134Q	114	CMR 34-35-54	164	CR 79
15	CMR 30-71-25	65	(v3 x R) 21-16	115	CMR 34-40-43	165	MBRA 217
16	CMR 31-42-20	66	CM 4777-2	116	CMR 35-23-76	166	MCUB 16
17	CMR 32-94-121	67	SC 8	117	CMR 35-22-348	167	MCUB 53
18	CMR 33-38-48	68	CMR 23-26-2	118	CMR 36-30-329	168	MMAL 42
19	CMR 35-21-199	69	(V1 x R) 21-8	119	CMR 35-112-1	169	MCOL 1132
20	CMR 35-22-348	70	CMR 25-104-42	120	CMR 36-55-166	170	MPER 556
21	CMR 35-112-1	71	SR 18-127	121	27-77-10	171	MBRA 886
22	CMR 38-125-77	72	CMR 26-38-7	122	(RxHANATEE) 21-28Q	172	MBRA 698
23	CMR 41-42-3	73	CMR 25-24-384	123	CMR 23-281-141	173	MBRA 882
24	CMR 41-109-72	74	MMEX 59	124	CM 523-7	174	MBRA 730
25	CMR 41-112-21	75	CMR 30-238-34	125	O.P. 608	175	MMAL 29
26	CMR 42-44-98	76	YELLOW ROOT	126	CMR 23-149-59	176	MVEN 332
27	CMR 42-16-37	77	CMR 25-30-194Q	127	35-77-22	177	MCOL 346
28	CMR 43-08-89	78	CMK 23-70-3	128	36-77-1	178	MCOL 1062 A
29	CMR 44-29-12	79	CMR 23-84-8	129	(V1xR) 21-11	179	MMEX 27
30	CMR 45-27-76	80	CMR 23-51-10	130	(V7xR) 21-4Q	180	MBRA 530
31	CMR 46-30-264	81	SV 25-21-1	131	CMK (RxCMC 76) 21-235	181	MBRA 416
32	CMR 46-31-7	82	VARIEGATED GREEN	132	MPER 178	182	MECU 187
33	CMR 46-47-137	83	CMC 72	133	MGUA 41	183	MBRA 461
34	CMR 46-55-23	84	CMR 35-26-303	134	CR 1	184	MVEN 117 B
35	CMR 47-02-9	85	CMR 32-94-121	135	MMEX 6	185	MCOL 1467
36	CMR 47-30-8	86	CMR 35-21-199	136	MBRA 658	186	CMR 29-67-21
37	CMR 48-35-1	87	CMR 33-35-69	137	MCOL 1466	187	MKUC 28-71-67
38	CMR 48-53-48	88	CMR 3318-101	138	MCOL 1344	188	35-77-17
39	CMR 49-54-10	89	CMR 31-06-104	139	SG 455-1	189	CMR 37-18-63
40	CMR 50-34-80	90	CMR 36-25-67	140	MPER 213	190	ADIRA 4 (6)
41	CMR 50-41-1	91	CMR 34-79-152	141	CM 2777-3	191	35-77-18
42	CMR 50-73-6	92	CMR 36-71-27	142	MPRT 19	192	(VxR) 20-27(6)
43	MECU 72	93	CMR 23-17-51	143	CM 4574-7	193	SMH 22-19-7
44	MMAL 63	94	CMR 24-14-1308	144	MVEN 173	194	(CMC76xR) 21-18Q
45	MVEN 297A	95	CMR 23-08-8	145	MPER 212	195	CMR 30-71-25
46	NANZHI 199	96	CMR 24-14-317	146	MCOL 651 B	196	CM 5257-33
47	MCOL 1752	97	CM 323-375	147	CM 2766-3	197	CMR 29-56-101
48	(V3 x R) 20-10	98	มันต้น	148	MPER 349	198	OMR 24-87-34
49	CMR-58-133-42	99	WILD 2	149	MCOL 1357	199	CMR 25-34-159
50	CMR-58-170-55	100	CMR 31-09-71	150	MMAL 26	200	CM 4955-27

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำโมเลกุลเครื่องหมายที่ผ่านการทดสอบแล้วมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นมันสำปะหลังที่ได้รับการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้ *XAM* และทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกไว้กับมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้อย่างน้อย 100 สายพันธุ์โดยการทำปฏิกิริยา PCR และตรวจแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

SSRY 5 ≈ 299 bp



คัดเลือกมันสำปะหลัง 200 สายพันธุ์ จากเทคนิค genotyping ในห้องปฏิบัติการ นำรายชื่อที่คัดเลือกได้ไปติดตามการปลูกอนุรักษ์ในแปลงอนุรักษ์พันธุ์มันสำปะหลัง ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองแล้วคัดเลือต้นพันธุ์ที่มีลักษณะดีมา จำนวน 100 สายพันธุ์ สำหรับนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้

เตรียมปลูกทดสอบการเกิดโรคแบคทีเรียลไบลท์กับเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 12 แสดงผลการคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังและการทดสอบการเกิดโรคของมันสำปะหลังในแปลงอนุรักษ์พันธุ์ CIAT ที่นำมาทดสอบกับเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*

ลำดับที่	ตำแหน่ง	ชื่อพันธุ์	ผลการทดสอบเชื้อ	หมายเหตุ
1	2-11	CMR 32-9-121	4	
2	4-8	MCOL 1467	4	
3	4-10	MCOL 1344	4	
4	4-11	CMR 35-112-1	4	
5	5-5	MMEX 6	4	
6	5-11	CR 19	4	
7	7-4	MBRA 886	4	
8	8-4	MMEX 54	4	
9	10-10	MCOL1466	4	
10	11-3	MMAL 26	4	
11	11-4	MBRA698	4	
12	11-9	CM 2766-3	4	
13	11-10	MBRA 416	4	
14	12-2	MPAN 70	4	
15	12-3	MBRA 461	4	
16	16-7	MCOL 346	4	DEAD
17	18-5	MCUB 53	4	
18	20-1	MPTR 8	4	
19	20-7	MCOL 802	4	*47-7
20	20-9	MBRA 698	5	
21	22-1	MMAL 29	4	
22	22-5	MPER 212	4	
23	23-8	MBRA 658	4	
24	24-11	CMR 24-14-1308	4	
25	25-7	MPER 556	4	**
26	26-6	CR 1	4	
27	26-7	MPER 349 L	4	**
28	27-6	MBRA894	4	
29	27-10	MMEX 27	5	
30	29-11	MVEN 73	4	
31	30-9	MBRA 242	4	
32	31-5	MECU 141 A	4	
33	33-7	MPTR 19	4	
34	33-9	MVEN 332	4	
35	33-10	5G 455-1	4	
36	37-7	MPER 178	4	
37	38-7	MBRA 882	4	

สถาบันวิชาการเกษตร

ตารางที่ 12(ต่อ) แสดงผลการคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังและการทดสอบการเกิดโรคของมันสำปะหลังในแปลงอนุรักษ์พันธุ์ CIAT ที่นำมาทดสอบกับเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*

ลำดับที่	ตำแหน่ง	ชื่อพันธุ์	ผลการทดสอบเชื้อ	หมายเหตุ
38	38-11	CR 19	4	
39	39-7	MMEX 27	5	
40	39-9	MCUB 16	4	
41	39-10	MMAL 63	4	
42	39-11	MPER 229	4	
43	40-2	MBRA 882	5	
44	41-6	MBRA 698	4	
45	42-4	MCOL 40	4	
46	42-7	MMEX 54	5	
47	44-2	CG 1-37	4	
48	44-5	CM 2766-3	4	
49	45-2	CM 4574-7	4	
50	45-7	MBRA 530	5	
51	45-9	CM 4777-2	4	
52	46-4	MCOL 2245	4	
53	46-6	MVEN 67 B	4	
54	47-7	MCOL 802	4	• 20-7
55	47-9	MPER 213	5	
56	49-1	MVEN 204	4	
57	49-10	MVEN 332	3	
58	51-11	CM 2766-3	3	
59	52-1	MBRA 461	5	
60	52-9	MPER 613	3	
61	54-3	MCOL 802	2	
62	55-1	MCOL 2192	4	
63	55-5	MPER 349	4	
64	56-2	MPER 213	4	
65	56-4	MBRA 242	5	
66	58-1	MBRA 730	3	
67	58-2	MCOL 1752	4	
68	58-9	MBRA 217	4	
69	58-10	MECU 72	5	

กลุ่มวิชาการเกษตร

ตารางที่ 13 แสดงผลการคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังและการทดสอบการเกิดโรคของมันสำปะหลังในแปลงอนุรักษ์พันธุ์ไทยและลูกผสม ที่นำมาทดสอบกับเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*

ลำดับที่	ตำแหน่ง	ชื่อสายพันธุ์	ผลการทดสอบเชื้อ	หมายเหตุ
1	1-1	R1	4	
2	1-2	CMR 36-30-329	4	
3	1-5	CMR 36-25-67	4	
4	1-8	35-77-18	4	
5	2-1	R 2	4	
6	2-4	CMR 23-08-8	3	
7	2-5	CMR 33-35-69	3	
8	2-6	CMR 31-42-20	3	
9	2-7	MMEX 59	5	
10	2-8	CMR 33-18-101	4	
11	5-3	CMR 26-08-61	4	
12	5-5	CMR 38-125-77	5	
13	5-6	OMR 24-87-34	4	
14	6-2	CMR 31-09-71	4	
15	6-4	(V7 X R) 21-4Q	3	
16	7-1	R 11	4	
17	7-2	CMR 31-06-104	3	
18	7-3	CMR 35-26-303	4	
19	7-5	CMR 23-102-65	4	
30	7-6	CMR 34-40-43	4	
31	7-7	CMR 26-38-7	4	
32	8-1	R 86-13	5	
33	8-2	CMR 23-17-51	4	
34	9-5	CMR 35-21-199	4	
35	9-7	CMR 30-71-25	4	
36	10-3	CM 323-75	3	
37	10-6	O.P. 608	4	
38	10-8	CMR 23-84-8	5	
39	11-3	CMC 72	4	
40	11-4	YELLOW ROOT	3	
41	11-5	CMR 23-26-2	4	
42	11-7	CMR 37-18-63	4	
43	11-8	CMR 23-51-10	4	
44	12-7	CMR 30-238-34	4	
45	13-2	SR 18-127	4	
46	13-6	CMR 34-79-152	3	
47	13-8	ADIRA 4	3	
48	14-6	CMR 34-35-54	4	
49	15-2	NANZHI 199	3	
50	15-4	27-77-10	3	
51	16-5	CMR 35-123-147	5	
52	16-7	CMR 35-19-129	4	
53	17-1	พิรุณ 1	4	
54	17-4	CM523-7	4	

ลิขสิทธิ์การเกษตร

ตารางที่ 13(ต่อ) แสดงผลการคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังและการทดสอบการเกิดโรคของมันสำปะหลังในแปลงอนุรักษ์พันธุ์ไทยและลูกผสม ที่นำมาทดสอบกับเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*

ลำดับที่	ตำแหน่ง	ชื่อสายพันธุ์	ผลการทดสอบเชื้อ	หมายเหตุ
55	18-1	พิรุณ 2	4	
56	18-2	CMR 35-22-348	5	
57	18-3	CMR 23-126-17	4	
58	18-4	CMR 33-38-48	4	
59	18-5	CMR 35-23-76	4	
60	18-6	CMR 23-281-141	4	
61	18-8	MKUC 28-71-67	4	
62	19-2	CMR 35-21-36	3	
63	19-4	(R x HANATEE)21-28Q	3	
64	19-5	Wild 1	5	
65	20-5	(V3x R) 20-10	3	
66	20-6	H.P.2	-	DEAD
67	21-1	36-77-1	3	
68	21-2	CMR 36-71-27	4	
69	21-4	CMR 23-149-59	4	
70	21-5	(CMC 76 x R)21-18 Q	4	
71	21-8	MBRA 12	5	
72	22-2	CMR 25-105-128Q	4	
73	22-3	CMR 25-104-42	4	
74	23-1	CMR 29-67-21	4	
75	23-2	(V1xR) 21-8	3	
76	24-7	CMR 25-34-159	5	
77	24-8	SMH 22-19-7	3	
78	25-2	SV 25-21-1	3	
79	26-4	SV 7-20-3	3	
80	27-1	CMR 25-30-194Q	4	
81	27-6	CMR 25-33-134Q	-	ตาย
82	28-1	OMR 29-20-118	3	
83	28-2	CMR 34-35-36	5	
84	28-7	MMEX 59	4	
85	29-4	CMR 29-56-101	5	
86	29-5	CMR 33-53-181	4	
87	30-1	CMK 23-27-30	4	
88	30-2	56/5	4	
89	30-4	CMR 24-14-317	3	
90	30-5	CMR 36-31-381	4	
91	31-2	Variegate (green)	4	
92	32-1	ADIRA 4	5	
93	32-2	CM 5257-33	3	

หมายเหตุ: การจัดระดับความต้านทานโรคมีเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

ระดับความต้านทานโรค 5 ไม่พบอาการโรคใบไหม้ ระดับความต้านทานโรค 4 พบอาการโรคใบไหม้เล็กน้อย

ระดับความต้านทานโรค 3 พบอาการโรคใบไหม้ปานกลาง ระดับความต้านทานโรค 2 พบอาการโรคใบไหม้ค่อนข้างมาก

ระดับความต้านทานโรค 1 พบอาการโรคใบไหม้มาก

ลิขสิทธิ์เกษตร

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับคัดเลือกมันสำปะหลังต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์จำนวน 31 เครื่องหมาย นำมาทดสอบกับมันสำปะหลังจำนวน 5 สายพันธุ์ ปรากฏว่าสามารถคัดเลือกได้จำนวน 6 เครื่องหมาย ที่เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนต้านทานโรค ได้แก่ ไพร์เมอร์ MBBR13 (681bp) MBBR5(664bp) MBBR9(609bp) MBBR17(627bp) MBBR4(667bp) และ SSrY5 (299bp) แล้วนำเครื่องหมายโมเลกุลชุดดังกล่าว ไปคัดเลือกมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเจลอิเลคโตรโฟริซิส นำเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 6 นั้นมาทดสอบตรวจหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคกับมันสำปะหลังจำนวน 663 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ได้ทดสอบการเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบท์จากดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 สายพันธุ์ พันธุ์ลูกผสม F1 รหัส 58 จำนวน 76 พันธุ์ มันสำปะหลังพันธุ์บริโภค จำนวน 144 พันธุ์ มันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสมปี 62 จำนวน 138 สายพันธุ์ พันธุ์พ่อแม่พันธุ์จำนวน 105 พันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง รวมทั้งสิ้น 663 สายพันธุ์ สามารถคัดเลือกมันสำปะหลังได้ 200 สายพันธุ์ด้วยวิธี Association mapping แล้วนำไปคัดเลือกในแปลงอนุรักษ์พันธุ์มาจำนวน 100 สายพันธุ์ นำมาปลูกในกระถาง 4 นิ้ว ในวัสดุปลูกขุยมะพร้าวจนมีใบจริงจำนวน 3 ใบ จึงนำไปทดสอบฟีโนไทป์ด้านการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยให้คะแนนความต้านทานระดับ 0-5 จากการประเมินความรุนแรงของอาการใบไหม้ และคัดเลือกมันสำปะหลังได้ 22 สายพันธุ์ ที่มีแนวโน้มให้ความต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบลท์ และควรนำไปประกอบการตัดสินใจปรับปรุงพันธุ์ร่วมกับลักษณะอื่นๆ ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง Cassava Mosaic Disease (CMD)

Marker-assisted selection for resistance to cassava mosaic disease (CMD) in *Manihot esculenta* Crantz.

จีราพร แก่นทรัพย์ ประพิศ วงเทียม สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ กุสุมา รอดแผ้วพาล ศิริลักษณ์ ล้านแก้ว
อัจฉราพรรณ ใจเจริญ สุภาวดี ง้อเหรียญ อรุโณทัย ซาววา บุญเรือนรัตน์ เพียรงาน
Jeeraporn Kansup Prapit Wongtiem Suwaluk Amawan Kusuma Rodpeawpan Sirilak Lankaew
Adcharapun Chaicharoen Suphawadee Ngorian Aroonothai Sawwa Boonreunrat Peanngan

คำสำคัญ (Key words)

มันสำปะหลัง (cassava (*Manihot esculenta* Crantz), โรคใบด่างมันสำปะหลัง (cassava mosaic disease (CMD)), การคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (marker-assisted selection)

บทคัดย่อ

โรคใบด่างมันสำปะหลัง (Cassava Mosaic Disease; CMD) เป็นโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายต่อผลผลิตมันสำปะหลังเป็นอย่างมาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลโดยในปี 2561 และปี 2562 ได้ทำการทดสอบกับเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวน 250 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล 3 กลุ่มในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง กลุ่มที่ 1 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ (Sequence Characterized Amplified Region, SCAR) และเอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat, SSR) ที่ขนาบข้างอยู่ใกล้กับโลคัสต้านทานโรคใบด่างชื่อ *CMD2* จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ RME1, NS158, SSRY28 และ NS169 กลุ่มที่ 2 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ประยุกต์จากชิ้นส่วนยีนที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคใบด่าง จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ EST-*LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein* (EST-R protein) และ EST-*Protein kinase superfamily protein* (EST-Kinase) กลุ่มที่ 3 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ในยีน *Peroxidase* จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 รวมทั้งสิ้น 9 เครื่องหมาย นำมาคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทานโรคใบด่าง TME3 พบว่า มีพันธุ์มันสำปะหลัง 2 พันธุ์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอและมีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในทั้ง 9 เครื่องหมายโมเลกุล ได้แก่ พันธุ์ MMAL63 และ CMR23-149-59 ในปี 2563 และ 2564 คัดเลือกมันสำปะหลังลูกผสมและพันธุ์ต้านทานจาก IITA จำนวน 652 สายพันธุ์/พันธุ์ พบมันสำปะหลัง 16 สายพันธุ์/พันธุ์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอและมีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในทั้ง 9 เครื่องหมายโมเลกุลพันธุ์และลูกผสมเหล่านี้อาจมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นพันธุ์ต้านทานโรคใบด่าง อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นที่จะต้องนำพันธุ์และ

กรมวิชาการเกษตร

ลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไปทำการทดลองกับเชื้อโรคจริง และในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคต่างๆ 3 เทคนิค ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังที่รวดเร็ว ประหยัด และปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายโดยใช้วิธี SDS/NaCl+PVP การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังแบบไพรเมอร์หลายคู่ในหนึ่งปฏิกิริยา (multiplex PCR) และการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สนิปในยีน *Peroxidase* โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR เป็นการช่วยประหยัดงบประมาณ และลดระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ เพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์

Abstract

Cassava Mosaic Disease (CMD) is a very important disease that causes damage to cassava production. The objective of this research was to select cassava varieties resistant to CMD by using molecular markers. In 2018 and 2019, 250 varieties from Rayong Field Crops Research Center were collected and examined using molecular markers. In this research, three groups of molecular markers were used in selection for resistance to CMD. Group 1 included 4 Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) and Simple Sequence Repeat (SSR) markers, namely RME1, NS158, SSRY28 and NS169 which are flanking nearby the CMD resistance locus called *CMD2*. Group 2 consisted of 2 molecular markers, namely EST-*LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein* (EST-R protein) and EST-*Protein kinase superfamily protein* (EST-Kinase) which were obtained from the expressed sequence tags of genes in response to cassava mosaic virus, the cause of CMD. Group 3 contained 3 positions of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers in *Peroxidase* gene, namely Ex2-78, Ex2-157 and Ex3-128. In total, 9 molecular markers were used to find out cassava varieties showing DNA band patterns and nucleotide sequences similar to those of the CMD resistant variety named TME3. The results found that there were 2 varieties showing the same DNA band patterns and nucleotide sequences as TME3 in all 9 molecular markers, namely MMAL63 and CMR23-149-59. In 2020 and 2021, cassava hybrids and some resistant varieties from IITA in total of 652 lines/varieties were selected using molecular markers, and found 16 lines/varieties showing the same DNA band patterns and nucleotide sequences as TME3 in all 9 molecular markers. These lines/varieties may be resistant to CMD. However, it is necessary to evaluate the resistance of these cassava lines/varieties against the existing cassava mosaic virus. In addition, three techniques were developed in this research as follows; (1) a rapid, economical and hazardous organic solvent free method for DNA extraction from cassava using SDS/NaCl+PVP (2) Multiplex PCR of molecular markers for CMD resistance and (3) detection of SNP molecular markers in *Peroxidase* gene using Tetra-Primer ARMS–PCR technique. These techniques were cost-savings and shorten the time in selection and breeding process.

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชอาหารที่สำคัญอันดับ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญอันดับ 3 ของประเทศในเขตร้อนรองจากข้าวและข้าวโพด โดยเฉพาะประเทศต่างๆ ในทวีปแอฟริกาและทวีปอเมริกาใต้ ส่วนในทวีปเอเชีย ประเทศอินโดนีเซียและอินเดียมีการบริโภคมันสำปะหลังเป็นจำนวนมาก มันสำปะหลังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย ทั้งเป็นอาหารของมนุษย์และอาหารสัตว์ ตลอดจนในอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งใช้มันสำปะหลังในรูปแป้งเป็นวัตถุดิบ เช่น อุตสาหกรรมการทำกาว การทำกระดาษการทอผ้า การผลิตน้ำตาลกลูโคส และเด็กซ์โทรส เป็นต้น รวมถึงใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยมีพื้นที่เพาะปลูกทั้งประเทศกว่า 8.5 ล้านไร่ เป็นพืชที่ปลูกง่ายทนทานต่อสภาพดินฟ้าอากาศที่แปรปรวน สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ๆ ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ มันสำปะหลังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลายทั้งเป็นอาหารของมนุษย์และอาหารสัตว์ ตลอดจนในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ซึ่งใช้มันสำปะหลังในรูปแป้งเป็นวัตถุดิบรวมถึงใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังที่สำคัญโดยมีปริมาณผลผลิตเป็นอันดับ 3 ของโลก (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) ในปี 2563 มีเนื้อที่เก็บเกี่ยว 8.92 ล้านไร่ ผลผลิต 29.00 ล้านตัน และผลผลิตต่อไร่ 3,252 กิโลกรัม ซึ่งประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง (มันเส้นมันอัดเม็ดและแป้งมัน) รายใหญ่ที่สุดของโลก (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2563) มูลค่าการส่งออกมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์ปี 2563 เป็นเงิน 82,312 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564)

โรคใบด่างมันสำปะหลัง (Cassava mosaic disease, CMD) เกิดจากเชื้อไวรัส Cassava mosaic virus (CMV) โดยมีแมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะนำโรค จนถึงปัจจุบันมีการค้นพบเชื้อไวรัส CMV หลายสายพันธุ์(strain) เช่น African cassava mosaic virus (ACMV), East African cassava mosaic virus (EACMV), Ugandan variant of EACMV (ugA), South African cassava mosaic virus (SACMV), Madagascar cassava mosaic virus (MCMV), Indian cassava mosaic virus (ICMV) และ SriLankan cassava mosaic virus (SLCMV) (Malathi *et al.,* 1987; Geddes, 1990; Hong *et al*., 1993; Zhou *et al.,* 1997; Thresh *et al.,* 1998) พบการแพร่ระบาดของโรค CMD ในประเทศทางแอฟริกา เช่น ยูกันดา แทนซาเนีย และมาดากัสการ์ส่วนในทวีปเอเชียพบการระบาดในประเทศอินเดียและประเทศศรีลังกา ขณะนี้เกิดปัญหาการแพร่ระบาดของโรค CMD ในพื้นที่ประเทศกัมพูชา ประเทศเวียดนามและประเทศไทย ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ SLCMV มันสำปะหลังที่เป็นโรคนี้จะแสดงอาการคือใบด่างจนถึงเหลือง ใบเสียรูปทรง ต้นเตี้ย ลำต้นแคระแกร็นและทำให้ผลผลิตลดลงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกรมวิชาการเกษตรกำหนดแนวทางป้องกันแก้ไขและเฝ้าระวังโรค CMD อย่างใกล้ชิด การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยป้องกันปัญหาโรค CMD ได้

กรมวิชาการเกษตร

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) เป็นลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตทางพันธุกรรม (สุรีพร, 2546) และบางเครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรที่สนใจ เช่น ผลผลิตสูง ต้านทานโรค (Collard and Mackill, 2008) การนำเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ได้หรือที่เรียกว่า การคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (marker-assisted selection, MAS) การคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเป็นการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่ทราบแล้วว่ามีตำแหน่งอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ มาใช้เพื่อช่วยในการคัดเลือกพันธุ์พืชหรือสัตว์ที่คาดว่ามีลักษณะนั้นๆ (Ribaut and Hoisington, 1998; Rosyara, 2006) โดยไม่จำเป็นต้องตรวจฟีโนไทป์ของพืชหรือสัตว์ที่ต้องการ ไม่ต้องทราบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะนั้นมีการทำงานหรือหรือให้ผลผลิตอะไรไม่ต้องทราบลำดับเบสของยีนหรือตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม การคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมีความสะดวก รวดเร็วและแม่นยำกว่าการสังเกตลักษณะทางการเกษตรจากภายนอก นอกจากนี้สามารถช่วยลดระยะเวลา พื้นที่และแรงงานในการปรับปรุงพันธุ์ได้ด้วย เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้สำหรับ MAS ต้องอยู่ใกล้กับยีนที่สนใจ ยิ่งอยู่ใกล้มากเท่าใดประสิทธิภาพในการใช้เพื่อช่วยคัดเลือกลักษณะดังกล่าวก็ยิ่งสูงและมีความแม่นยำมากขึ้น

Akano *et al*. (2002) รายงานว่าตำแหน่งบนโครโมโซมโลคัส *CMD2* เป็นโลคัสเดี่ยวและเป็นตัวหลักลักษณะเด่นที่ควบคุมความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังซึ่งโลคัส *CMD2* มีที่มาจากมันสำปะหลังพันธุ์ TME3 และมีการพบเครื่องหมายโมเลกุลที่ขนาบข้างอยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ RME1, NS158, SSRY28 และ NS169 โดยมีตำแหน่งบนโครโมโซมห่างจากโลคัส *CMD2* เป็นระยะทาง 4 cM, 7 cM, 9 cM และ 16 cM ตามลำดับ (Akano *et al*., 2002; Lokko *et al*., 2005; Fregene *et al*., 2006; Okogbenin *et al*., 2007) ซึ่งมีรายงานความสำเร็จในการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรค CMD (Bi *et al*., 2010; Ribeiro *et al*., 2012; Carmo *et al*., 2015) ขณะที่ Wolfe *et al*. (2016) รายงานตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase* (Cassava4.1_029175) ที่ให้ความแตกต่างระหว่างมันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์ต้านทานกับกลุ่มพันธุ์ที่อ่อนแอกว่า จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Ex2-78 (Exon2 นิวคลีโอไทด์ที่ 78), Ex2-157 (Exon2 นิวคลีโอไทด์ที่ 157) และ Ex3-128 (Exon3 นิวคลีโอไทด์ที่ 128)

จากฐานข้อมูล NCBI รายงานชิ้นส่วนยีนของมันสำปะหลังที่แสดงออกในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส CMV ได้แก่ ยีน *LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein* และยีน *Protein kinase superfamily protein* ซึ่งยีน *LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein* เมื่อถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้วจะทำหน้าที่ในการรับรู้เชื้อโรค (Recognition) และส่งสัญญาณกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงาน(Van Ooijen *et al*., 2008) สำหรับยีน *Protein kinase superfamily protein* เมื่อถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้วจะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์เติมหมู่ฟอสเฟตให้โมเลกุลของโปรตีนต่างๆ (Protein phosphorylation) ซึ่งมีรายงานว่าโปรตีนไคเนสเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในเซลล์หลังจากการรับรู้เชื้อโรคของพืช (Romeis, 2001) งานวิจัยนี้จึงนำเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 9 เครื่องหมาย มาใช้ในการคัดเลือกมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ เพื่อค้นหาพันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทานโรค CMD ซึ่งพันธุ์ที่คัดเลือกได้จะเป็นพันธุ์ candidate ที่อาจมีความต้านทานต่อโรคใบด่างมันสำปะหลัง ซึ่งจะแจ้งผลให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองทราบเพื่อนำพันธุ์ candidate ไปทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรค ก่อนการนำพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์และเผยแพร่แก่เกษตรกรต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานโรคใบด่าง Cassava Mosaic Disease (CMD) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ขอบเขตการวิจัย

การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานโรคใบด่าง Cassava Mosaic Disease (CMD) โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล การนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรค CMD มาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ จะทำให้ทราบว่ามันสำปะหลังพันธุ์ใดที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นพันธุ์ต้านทานโรค CMD การคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมีความสะดวก รวดเร็วและแม่นยำกว่าการสังเกตลักษณะทางการเกษตรจากภายนอก นอกจากนี้สามารถช่วยลดระยะเวลา พื้นที่และแรงงานในการปลูกทดสอบได้ด้วยซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเป็นอย่างยิ่ง

ระเบียบวิธีการวิจัย

<u>ประเด็นวิจัย :</u> เนื่องจากปัจจุบันนี้ประเทศไทยประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังที่สร้างความสูญเสียแก่ผลผลิตมากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ยังไม่มีพันธุ์ต้านทานที่พร้อมใช้ในประเทศไทย จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการพัฒนาพันธุ์ต้านทานต่อโรคดังกล่าว นอกจากนี้การทดสอบฟีโนไทป์ลักษณะความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังดำเนินการได้ยากเนื่องจากเป็นโรคกักกัน อีกทั้งขั้นตอนปฏิบัติการทดสอบมีความซับซ้อน งานวิจัยนี้จึงนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน

<u>สถานที่ทดลอง :</u> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี

<u>ระยะเวลาดำเนินงาน :</u> ตุลาคม 2560 - กันยายน 2564

<u>วิธีการดำเนินงาน</u>

1. ปี 2561 และปี 2562 ดำเนินการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลใน 4 กลุ่มเชื้อพันธุ์ประกอบด้วยพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูก พันธุ์ที่เป็นพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ของพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกพันธุ์ที่ นักปรับปรุงพันธุ์นิยมใช้เป็นพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ และพันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีมีความโดดเด่น รวมทั้งสิ้น 250 พันธุ์ ประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลัง

ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่จะนำมาคัดเลือกได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวนทั้งสิ้น 250 พันธุ์ **(ตารางที่ 1)** โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ที่ได้รับความอนุเคราะห์ใบมันสำปะหลังจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อหาพันธุ์ candidate ต้านทานโรคใบด่าง ได้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2561 จำนวน 100 พันธุ์ และในปีงบประมาณ

กรมวิชาการเกษตร

2562 จำนวน 150 พันธุ์ โดยเก็บตัวอย่างนำใบมันสำปะหลังจากต้นอายุ 12 เดือน ในส่วนยอดของต้นมาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) นำดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นด้วย*เครื่อง*วัดปริมาณสารพันธุกรรม Biodrop(UK) จากนั้นนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ต่อไป

ตารางที่ 1 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังที่นำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ในปี 2561 และปี 2562

No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety
1	Kaset Lopburi	33	CMR36-55-166	65	CMR50-41-1	97	MCOL 2306	129	CM681-2	161	CMK23-27-30	193	CMR33-18-101	225	27-77-10
2	Rayong1 (R1)	34	CMR37-18-189	66	CMR50-73-6	98	MCOL 2016*	130	CMR25-82-88	162	56/5	194	CMR31-06-104	226	CM3306-4
3	Rayong2 (R2)	35	CMR37-18-201	67	OMR50-13-26	99	MCOL 1890	131	CMR34-44-40	163	CMR23-126-17	195	CMR36-25-67	227	CM4574-7
4	Rayong3 (R3)	36	CMR38-125-77	68	CMR51-04-42	100	MBRA18	132	CMK23-67-313	164	CMR23-149-59	196	CMR34-79-152	228	CMR60-36-16
5	Rayong5 (R5)	37	CMR41-42-3	69	CMR51-13-14	101	MCOL22	133	CMR23-17-276*	165	CM781-2	197	CMR36-71-27	229	CMR60-36-27
6	Rayong7 (R7)	38	CMR41-109-72	70	CMR51-23-14	102	MENTEGA	134	CM3299-22	166	CMR25-32-502Q	198	CMR23-17-51	230	CMR60-36-48
7	Rayong9 (R9)	39	CMR41-112-21	71	CMR51-34-6	103	NEP HONGHA	135	CM6125-125	167	CMR23-102-65	199	CM323-375	231	CMR60-48-14
8	Rayong11 (R11)	40	CMR42-01-2	72	CMR51-43-69	104	YOLK	136	CM342-55	168	CMR23-149-128	200	Monton	232	CMR60-48-29
9	Rayong 86-13	41	CMR42-44-98	73	CMR53-87-20	105	297	137	01-77-1	169	CMR25-33-134Q	201	MCOL 198	233	CMR60-36-12
10	Rayong60 (R60)	42	OMR42-16-37	74	CMR53-106-24	106	298	138	CMR28-05-13	170	(V3 x R) 21-16	202	MCOL 32	234	CR35
11	Rayong72 (R72)	43	CMR43-08-89	75	OMR53-03-6	107	315	139	CMC84	171	CM4777-2 (ciat)	203	MCOL 2360	235	CR1
12	Rayong90 (R90)	44	CMR44-03-57	76	Manop	108	456	140	CMR23-149-117	172	SC8	204	MBRA 781	236	CR79
13	KU50	45	CMR44-29-12	77	Soidao	109	CM125-22	141	CMH22-77-1	173	CMR23-26-2	205	MPAR 75	237	CR61
14	KU72	46	OMR44-23-34	78	GR 891	110	CM6125-117	142	CMR26-65-13	174	(V1 x R) 21-8	206	MMEX 92	238	CR59
15	KU75	47	OMR45-27-76	79	KATEH	111	CMR30-05-12	143	CMR31-19-14	175	CMR25-104-42	207	MVEN 164	239	CR17-193
16	HB60	48	CMR46-30-264	80	KM98-1	112	CMR23-117-4	144	CMR32-24-20	176	SR18-127	208	MCUB8	240	CR30
17	HB80	49	CMR46-31-7	81	MBRA12	113	CM407-30	145	SM937-8	177	CMR26-38-7	209	MIND4	241	CR100
18	Pirun1	50	CMR46-47-137	82	MCOL 912B	114	CMR35-26-369	146	CMR25-34-112	178	CMR24-14-183	210	MARG9	242	CR61
19	Pirun2	51	CMR46-55-23	83	MCOL 1098	115	CM3306-3	147	CMR23-20-23Q	179	CMR25-24-384	211	MPAR 51	243	CR126
20	CM3299-15	52	CMR47-02-9	84	MCUB23	116	CMR25-32-429Q	148	Variegated	180	MMEX 59*	212	MPAR 38	244	CR63
21	CR19	53	CMR47-30-8	85	MECU72	117	CMR26-65-192	149	CMR23-126-122	181	CMR30-238-34	213	MBRA 233	245	C101
22	SM2277-23	54	CMR48-20-17	86	MMAL63	118	CMR23-126-161	150	CMR31-37-105	182	Yellow root	214	MCUB 40	246	CR18

ศรีวิชัยการเกษตร

No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety
23	CMR26-08-61	55	CMR48-35-1	87	MPER325	119	CMR23-149-118	151	CMR26-08-61	183	V.30	215	MPER 489	247	CR24
24	OMR26-14-9	56	CMR48-53-48	88	MVEN 297A	120	CMR25-38-157Q*	152	(V3 x R) 20-15	184	CMR25-30-194Q	216	MECU 41	248	CR12
25	OMR29 -20-118	57	CMR49-22-227	89	NANZHI 199	121	29-77-19	153	(V3 x R) 20-10	185	CMK23-70-3	217	MVEN 174	249	CR25
26	CMR30-71-25	58	CMR49-54-10	90	SC5	122	CMR28-72-131	154	CMR25-55-28*	186	CMR23-84-8	218	CG7-64	250	CMR60-36-1
27	CMR31-42-20	59	CMR49-54-67	91	SC201	123	SMH22-03-1	155	Sriracha1	187	CMR23-51-10	219	R3S1_1		
28	CMR32-94-121	60	CMR49-89-70	92	YOD KHAM	124	CMR23-113-14	156	CMR31-06-103	188	SV25-21-1	220	R5S1_7		
29	CMR33-38-48	61	CMR50-20-2	93	MCOL 1752	125	CM4049 UJ	157	CMR25-105-47	189	Variegated (green)	221	MCOL 1684		
30	CMR35-21-199	62	CMR50-20-114	94	MPER183	126	CMR23-149-67	158	CMR23-107-4	190	CMC72	222	MCOL 22		
31	CMR35-22-348	63	CMR50-30-23	95	HANATEE	127	CMH22-04-1Q	159	CMR24-89-65	191	CMR35-26-303	223	MECU 71		
32	CMR35-112-1	64	CMR50-34-80	96	BATHANG	128	29-77-5	160	CM3299-14	192	CMR33-35-69	224	MNGA1		

1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ เอสเอสอาร์ และอีเอสที

ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์และเอสเอสอาร์จากรายงานวิจัยของ Carmo *et al*. (2015) สำหรับลำดับเบสไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอีเอสทีคณะผู้วิจัยประยุกต์ขึ้นจากข้อมูลลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่แสดงออกในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส CMV ซึ่งสืบค้นจากฐานข้อมูล NCBI โดย EST-R protein (EST-R) รหัสในฐานข้อมูล คือ dbESTId 77982922 GenBankAcc JZ167361 และ EST-Kinase (EST-K) รหัสในฐานข้อมูล คือ dbESTId 77982924 GenBankAcc JZ167363 จากนั้นสังเคราะห์ไพรเมอร์ จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R และ EST-K **ดังตารางที่ 2** ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ที่นำมาคัดเลือกจำนวน 250 พันธุ์โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ต้านทานชื่อ TME3 โดยใช้ *Taq* DNA Polymerase, recombinant (Thermo Scientific, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 1X *Taq* buffer with $(NH_4)_2SO_4$, 0.2 mM สำหรับ dNTP แต่ละชนิด, 0.4 µM forward primer, 0.4 µM reverse primer, 1.5 mM $MgCl_2$, *Taq* DNA Polymerase 1U ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำจากนั้นนำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-denaturation 94°ซ. 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation 94°ซ.40 วินาที, Annealing 55-56°ซ.40 วินาที, Extension 72°ซ. 30-60 วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension 72°ซ. 5 นาทีอีก 1 รอบ **(ตารางที่ 2)** ตรวจวิเคราะห์ผล โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc UV Transilluminator(Bio-RadLaboratories, USA)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ เอสเอสอาร์ และอีเอสที

Primer name	Marker type	Sequence (5' – 3')	Annealing temperature (°C) for using with *Taq* DNA polymerase	Extension time per cycle (sec)	Expected allele size(bp)
RME1	SCAR	F : ATGTTAATGTAATGAAAGAGC R : AGAAGAGGGTAGGAGTTATGT	56	60	700
NS158	SSR	F : GTGCGAAATGGAAATCAATG R : TGAAATAGTGATACATGCAAAAGGA	55	30	166
SSRY28	SSR	F : TTGACATGAGTGATATTTTCTTGAG R : GCTGCGTGCAAAACTAAAAT	55	30	180
NS169	SSR	F : GTGCGAAATGGAAATCAATG R : GCCTTCTCAGCATATGGAGC	55	30	319
EST-R	EST	F : TGAGAAGGGAAATCGCAGGA R : GAGGACTTCAACCATGCCAT	55	60	500
EST-K	EST	F : ACTTGCTCATGGCCATGCTC R : CAGAGCCTTGTTCTGAAGAAG	55	60	600

1.3 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปโดยใช้เทคนิค Pyrosequencing

เทคนิค Pyrosequencing เป็นการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์โดยการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอและอาศัยการตรวจจับ pyrophosphate ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก nucleotide triphosphate ในระหว่างการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (มณฑล, 2554) ทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase* 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 จำนวน 7 เส้น **ดังตารางที่ 3** เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ candidate ที่อาจจะเป็นพันธุ์ต้านทานโรค CMD จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R protein และ EST-Kinase เรียบร้อยแล้ว เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ต้านทาน TME3 โดยใช้ชุด PyroMark PCR (Qiagen, Germany) ในปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1XPyroMark PCR Master Mix, 1X CoralLoad Concentrate, 0.2 µM forward primer, 0.2 µM reverse primer (biotin label) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ จากนั้นนำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-denaturation 95°ซ. 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation 94°ซ. 30 วินาที, Annealing 56-62°ซ. 30 วินาที, Extension 72°ซ. 30 วินาทีจำนวน 45-50รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension 72°ซ. 10 นาทีอีก 1 รอบ ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc UV Transilluminator (Bio-RadLaboratories, USA) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่เหลือไปเข้าเครื่องหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ PyroMark Q48 Autoprep (Qiagen, Germany) โดยใช้ชุดน้ำยาตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป PyroMark Q48 Advance Reagents (Qiagen, Germany) ซึ่งสามารถบอกลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งที่ต้องการศึกษาได้

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อทราบผลการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลแล้ว ดำเนินการแจ้งผลการทดสอบจีโนไทป์และรายชื่อพันธุ์ candidate ต้านทานโรค CMD ให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทน พลังงานทราบ เพื่อจะได้นำพันธุ์ candidate ดังกล่าวไปทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรค ก่อนการนำไปใช้เป็นพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase* สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Pyrosequencing

SNP point	Primer name	Sequence (5' – 3')	Purpose
Exon2 (78/157)	Ex2_78-157FP	GTAGCTGTTTGCAGGGATGTGAC	DNA amplification
	Ex2_78-157RPB : Biotin label	TTGAAACTGCATCTCGAGCTACTA	
Ex2-78	Ex2_78SP	TCCCAAACCAAACCT	Sequencing
Ex2-157	Ex2_157SP	TCTTGCGCTGATACC	Sequencing
Exon3 (128)	Ex3_128FP	CCATCTCCTTTTGCCAACATAA	DNA amplification
	Ex3_128RPB : Biotin label	ACAAGGTCCTTAACATTTAAACCC	
Ex3-128	Ex3_128SP	CTTAAACAAAATTTTGCTG	Sequencing

1.4 การผสมข้ามพันธุ์สร้างลูกผสม

ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองดำเนินการผสมข้ามพันธุ์เพื่อสร้างลูกผสมในปี 2562 และ 2563 โดยใช้พันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่เป็นพันธุ์ candidate ต้านทานโรค CMD จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล จากนั้นนำลูกผสมที่ได้มาทำการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563 และ 2564

2. ปี 2563 และปี 2564 ดำเนินการคัดเลือกมันสำปะหลังลูกผสมที่มีความต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล รวมทั้งสิ้น 652 สายพันธุ์ (ต้น) ประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังลูกผสมและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Direct PCR

ตัวอย่างมันสำปะหลังลูกผสมที่จะนำมาคัดเลือกได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวนทั้งสิ้น 652 สายพันธุ์ **(ตารางที่ 4)** โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ candidate ที่คัดเลือกได้ในปี 2561 และปี 2562 ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ การคัดเลือกมันสำปะหลังลูกผสมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อหาสายพันธุ์ candidate ต้านทานโรคใบด่าง ได้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2563 จำนวน 251 สายพันธุ์ (ต้น) และในปีงบประมาณ 2564 จำนวน 401 สายพันธุ์(ต้น) โดยเก็บตัวอย่างนำใบมันสำปะหลังมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Direct PCR โดยใช้ชุดน้ำยา Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 ใส่น้ำกลั่นที่ปราศจากนิวคลีเอส 50 ไมโครลิตรในหลอด 1.5 มิลลิลิตร

2.1.2 ตัดใบมันสำปะหลังขนาดประมาณ 4 มิลลิเมตร x 4 มิลลิเมตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร

กรมวิชาการเกษตร

2.1.3 ใช้ก้านบดตัวอย่าง (pestle) บดใบมันสำปะหลังให้ละเอียด

2.1.4 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที

2.1.5 ดูดน้ำใสส่วนบน (supernatant) ซึ่งมีดีเอ็นเอละลายอยู่ภายใน ปริมาณ 20 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ และเติม Dilution Buffer จากชุดน้ำยา Phire Plant Direct PCR Master Mix ปริมาณ 40 ไมโครลิตร

2.1.6 นำสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 2.1.5 ไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุล EST-R, RME1 และ NS158 แต่ละเครื่องหมาย ซึ่ง RME1 และ NS158 เป็นเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* เป็นลำดับที่ 1 และลำดับที่ 2 ตามลำดับ โดยใช้ชุดน้ำยา Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) ในปริมาตร ทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ (จากข้อ 2.1.5) 0.8 ไมโครลิตร, 1X Phire Plant Direct PCR Master Mix, 0.4 µM forward primer, 0.4 µM reverse primer ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำจากนั้นนำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-denaturation 98°ซ. 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation 98°ซ. 10 วินาที, Annealing 63°ซ. สำหรับ EST-R/ 55°ซ. สำหรับ RME1/ 59°ซ. สำหรับ NS158 เป็นเวลา 10 วินาที, Extension 72°ซ. 20 วินาที สำหรับ EST-R และ NS158/ 30 วินาที สำหรับ RME1 จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension 72°ซ. 1 นาทีอีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่องGel-Doc UV Transilluminator(Bio-RadLaboratories, USA)

ตารางที่ 4 รายชื่อมันสำปะหลังลูกผสมที่นำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563 และปี 2564

คู่ผสม	รหัสของลูกผสม	จำนวน (สายพันธุ์)
การคัดเลือกในปี 2563		
ลูกผสมปี 2560 CMR 44-29-12 x MMAL 63	CMR 60-36-xxx	23
CMR 49-22-227 x MMAL 63	CMR 60-48-xxx	20
ลูกผสมปี 2561 CMR 47-02-9 x MMAL 63	CMR 61-37-xxx	1
CMR 49-22-227 x MMAL 63	CMR 61-42-xxx	27
MMAL 63 x KU 50	CMR 61-70-xxx	3
R 11 x MMAL 63	CMR 61-97-xxx	27

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4(ต่อ) รายชื่อมันสำปะหลังลูกผสมที่นำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563 และปี 2564

คู่ผสม	รหัสของลูกผสม	จำนวน (สายพันธุ์)
ลูกผสมปี 2562		
CMR 26-08-61 x CM 4574-7	CMR 62-02-xxx	4
CMR 35-21-199 x CM 4574-7	CMR 62-13-xxx	4
CMR 38-125-77 x CM 4574-7	CMR 62-29-xxx	4
CMR 41-01-2 x CM 4574-7	CMR 62-33-xxx	4
CMR 42-44-98 x CM 4574-7	CMR 62-41-xxx	4
CMR 42-44-98 x MMAL 63	CMR 62-42-xxx	8
CMR 47-02-9 x CM 4574-7	CMR 62-59-xxx	3
CMR 46-30-264 x MMAL 63	CMR 62-51-xxx	9
CMR 46-30-264 x CM 4574-7	CMR 62-49-xxx	3
CMR 44-29-12 x MMAL 63	CMR 62-48-xxx	3
CMR 44-29-12 x CM 4574-7	CMR 62-46-xxx	1
CMR 47-02-9 x MMAL 63	CMR 62-60-xxx	12
CMR 49-22-227 x MMAL 63	CMR 62-69-xxx	14
CMR 51-04-42 x CM 4574-7	CMR 62-83-xxx	1
CMR 51-43-69 x CM 4574-7	CMR 62-90-xxx	1
ยอดคำ x CM 4574-7	CMR 62-115-xxx	2
OMR 26-14-9 x CM 4574-7	CMR 62-119-xxx	6
OMR 45-27-76 x MMAL 63	CMR 62-133-xxx	4
R 1 x CM 4574-7	CMR 62-137-xxx	4
R 5 x CM 4574-7	CMR 62-143-xxx	1
R 9 x CM 4574-7	CMR 62-151-xxx	6
R 11 x CM 4574-7	CMR 62-157-xxx	31
SC 201 x CM 4574-7	CMR 62-172-xxx	2
สอยดาว x CM 4574-7	CMR 62-174-xxx	1
112 x MMAL 63	CMR 62-183-xxx	6
114 x MMAL 63	CMR 62-184-xxx	2
CMR 49-22-227 ผสมเปิด	OMR 62-24-xxx	10

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4(ต่อ) รายชื่อมันสำปะหลังลูกผสมที่นำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563 และปี 2564

คู่ผสม	รหัสของลูกผสม	จำนวน (สายพันธุ์)
การคัดเลือกในปี 2564		
ลูกผสมปี 2562 CMR 26-08-61 x CM 4574-7	CMR 62-02-xxx	4
CMR 30-71-25 x R 11	CMR 62-06-xxx	19
CMR 35-21-199 x CM 4574-7	CMR 62-13-xxx	2
CMR 37-18-201 x R 11	CMR 62-26-xxx	19
CMR 38-125-77 x CM 4574-7	CMR 62-29-xxx	4
CMR 41-01-2 x CM 4574-7	CMR 62-33-xxx	2
CMR 41-42-3 x MMAL 63	CMR 62-37-xxx	14
CMR 42-44-98 x MMAL 63	CMR 62-42-xxx	2
CMR 46-30-264 x MMAL 63	CMR 62-51-xxx	5
CMR 47-02-9 x CM 4574-7	CMR 62-59-xxx	4
CMR 47-02-9 x MMAL 63	CMR 62-60-xxx	6
CMR 49-22-227 x MMAL 63	CMR 62-69-xxx	5
CMR 50-73-6 x R 11	CMR 62-81-xxx	43
CMR 51-34-6 x CM 4574-7	CMR 62-88-xxx	1
CM 3299-15 x R 11	CMR 62-95-xxx	9
OMR 26-14-9 x CM 4574-7	CMR 62-119-xxx	2
OMR 26-14-9 x R 11	CMR 62-121-xxx	25
OMR 45-27-76 x MMAL 63	CMR 62-133-xxx	1
R 1 x CM 4574-7	CMR 62-137-xxx	3
R 5 x CM 4574-7	CMR 62-143-xxx	1
R 11 x 22-77-10	CMR 62-155-xxx	1
R 11 x CM 3299-15	CMR 62-156-xxx	20
R 11 x CM 4574-7	CMR 62-157-xxx	9
R 11 x R 90	CMR 62-158-xxx	40
R 11 x KU 50	CMR 62-159-xxx	12
R 11 x R 90 S1 ต้นที่ 8	CMR 62-160-xxx	49
R 11 x CMR 56-137-70	CMR 62-161-xxx	18
SC 5 x R 11	CMR 62-170-xxx	2
สอยดาว x R 11	CMR 62-176-xxx	2

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4(ต่อ) รายชื่อมันสำปะหลังลูกผสมที่นำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563 และปี 2564

คู่ผสม	รหัสของลูกผสม	จำนวน (สายพันธุ์)
ลูกผสมปี 2564		
MNGA 1 x MMAL 63	SA1, SA2, SA3	3
CMR 37-18-201 x TME3	SA4, SA5	2
CMR 26-08-61 x TME3	SA6, SA7, SA8, SA9, SA10, SA11, SA12, SA13	8
พันธุ์จาก IITA		
920057	-	1
972205	-	1
980505	-	1
980581	-	1
ลูกผสมมันสำปะหลังเพื่อบริโภคปี 2562		
Batrang x R 11	CMRE 62-02-xxx	1
Hanatee x R 11	CMRE 62-09-xxx	2
Pirun 1 x KU 50	CMRE 62-14-xxx	2
Pirun 2 x KU 50	CMRE 62-17-xxx	1
R 2 x MCOL 2331	CMRE 62-22-xxx	9
R 2 x R 5	CMRE 62-24-xxx	10
Hauybong 81 ผสมเปิด	OMRE 62-02-xxx	1
Hanatee ผสมเปิด	OMRE 62-03-xxx	9
NEP ผสมเปิด	OMRE 62-04-xxx	8
R 2 ผสมเปิด	OMRE 62-05-xxx	13
Yodkum ผสมเปิด	OMRE 62-08-xxx	2
R3 S1 P1 ผสมเปิด	OMRE 62-09-xxx	2
พันธุ์จาก IITA		
920057	-	1
972205	-	1
980505	-	1
980581	-	1
ลูกผสมปี 2564		
MNGA 1 x MMAL 63	SA1, SA2, SA3	3
CMR 37-18-201 x TME3	SA4, SA5	2
CMR 26-08-61 x TME3	SA6, SA7, SA8, SA9, SA10, SA11, SA12, SA13	8

กรมวิชาการเกษตร

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังเพื่อการทำซ้ำแบบ biological repeat

ดำเนินการทำซ้ำแบบ biological repeat กับมันสำปะหลังลูกผสมสายพันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ candidate จากการคัดเลือกเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค Direct PCR ทดสอบกับเครื่องหมาย EST-R, RME1 และ NS158 โดยเก็บใบมันสำปะหลังมาสกัดดีเอ็นเออีกครั้งด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA) หรือด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้น เพื่อนำไปทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R, RME1, EST-K, NS158, SSRY28 และ NS169 รวม 6 เครื่องหมาย ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังด้วยวิธี SDS/NaCl+ PVP ดัดแปลงจากวิธีของ Edwards *et al*. (1991) และวิธีของ Kotchoni and Gachomo (2009) โดยได้เพิ่ม polyvinylpyrrolidone (PVP) ในสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอและมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 ตัดใบมันสำปะหลังประมาณ 0.07 กรัม มาใส่ในโกร่งเติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% (w/v) SDS, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0, 2% (w/v) PVP)ปริมาณ 400 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเออีก 200 ไมโครลิตร บดตัวอย่างจนเนียนละเอียดและดูดสารที่บด 400 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที และดูดน้ำใสส่วนบน (supernatant) 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่

2.2.2 เติม isopropanol ที่แช่เย็นปริมาณ 300 ไมโครลิตร และผสมเบาๆ จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาทีเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และเทน้ำใสส่วนบนทิ้ง

2.2.3 เติม70% (v/v) ethanol 500 ไมโครลิตรเพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ (DNA pellet) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และเทน้ำใสส่วนบนทิ้งด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้ตะกอนดีเอ็นเอตกหล่นออกไป ดูดน้ำส่วนที่เหลือออกให้หมด และผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง

2.2.4 เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากนิวคลีเอส (nuclease-free water) 120 ไมโครลิตรลงในหลอด เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอซึ่งมีโพลีแซคคาไรด์ปะปนอยู่ด้วย ดีเอ็นเอจะละลายในน้ำแต่โพลีแซคคาไรด์ไม่ละลายน้ำ จากนั้นทำการตกตะกอนโพลีแซคคาไรด์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาทีและดูดน้ำใสส่วนบนที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Biodrop (UK) แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20°ซ. สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป

2.3 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ เอสเอสอาร์ และอีเอสที แบบ single และ multiplex PCR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลังลูกผสมชุด biological repeat ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ candidate จากการคัดเลือกเบื้องต้นด้วยเครื่องหมาย EST-R, RME1 และ NS158 โดยใช้เทคนิค Direct PCR ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุล

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

EST-R, RME1, EST-K, NS158, SSRY28 และ NS169 รวม 6 เครื่องหมายโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ candidate ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ เครื่องหมาย EST-R และ RME1 ดำเนินการแบบ single PCR ที่เป็นการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์เพียง 1 คู่ ดังเช่นวิธีการข้อ 1.2 โดยใช้ *Taq* DNA Polymerase, recombinant (Thermo Scientific, USA)

สำหรับไพรเมอร์ของเครื่องหมาย EST-K ร่วมกับ NS158 (2 คู่) และเครื่องหมาย SSRY28 ร่วมกับ NS169 (2 คู่) ผู้วิจัยได้พัฒนาการตรวจสอบแบบ multiplex PCR ที่เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ตั้งแต่ 2 คู่ขึ้นไป ส่วนประกอบของสารในปริมาตร 20 ไมโครลิตรประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 1X *Taq* buffer with $(NH_4)_2SO_4$, 0.2 mM สำหรับ dNTP แต่ละชนิด, 0.2 µM forward primer1, 0.2 µM forward primer2, 0.2 µM reverse primer1, 0.2 µM reverse primer2, 1.5 mM $MgCl_2$, *Taq* DNA Polymerase 1.5 U ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ จากนั้นนำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิPre-denaturation 94°ซ. 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation 94°ซ. 40 วินาที, Annealing 55°ซ. 40 วินาที, Extension 72°ซ. 30-60 วินาที จำนวน 40รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension 72°ซ. 5 นาทีอีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc UV Transilluminator (Bio-Rad Laboratories, USA

2.4 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปโดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR

ออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปบนยีน *Peroxidase* จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค CMD (Wolfe *et al*., 2016) สำหรับใช้กับเทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR เพื่อพัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่มีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าเทคนิค Pyrosequencing

เทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR ณ 1 ตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลจะใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 เส้นในการตรวจสอบ ประกอบด้วย Forward inner primer(FI) Reverse inner primer(RI) Forward outer primer (FO) และ Reverse outer primer(RO)การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR ใช้ซอฟต์แวร์ Primer1 (http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html) จะได้ข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ **ดังตารางที่ 5** จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสม(condition)ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ *Taq* DNA Polymerase, recombinant (Thermo Scientific, USA) เมื่อค้นพบสภาวะที่เหมาะสมแล้วจะใช้สภาวะดังกล่าวในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปตำแหน่ง Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ในมันสำปะหลังลูกผสม

เมื่อทราบผลการคัดเลือกมันสำปะหลังลูกผสมโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลแล้ว ดำเนินการแจ้งผลการทดสอบจีโนไทป์และรายชื่อสายพันธุ์ candidate ต้านทานโรค CMD ให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบัน วิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงานทราบ เพื่อจะได้นำสายพันธุ์ candidate ดังกล่าวไปทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรค ก่อนการนำพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์และเผยแพร่แก่เกษตรกรต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 ลำดับเบสของไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase* สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR

SNP point	Primer name	Sequence (5’ – 3’)	Allele	Amplicon (bp)
Ex2-78	Forward inner primer	AAAGAAGCAATCCCAAACCAAACCGTA	A	253
	Reverse inner primer	TTCACAGCATCAATCACATTGAATCCTATC	G	220
	Forward outer primer	CCTTTGTTGAGAATGCATTTCCATGATT		416
	Reverse outer primer	GTCCAGTTTTAACATCCCAAAATGGTCC		
Ex2-157	Forward inner primer	TGGTGTGGTTTCTTGCGCTGATATCT	T	192
	Reverse inner primer	AAACTGCATCTCGAGCTACTAAGGCCAC	G	158
	Forward outer primer	TTCAAAGAGAGGCAATCAAGCTGAGAAA		296
	Reverse outer primer	GACACTCTTCCATCTCTCCGTCCAGTTT		
Ex3-128	Forward inner primer	TAAGTGAGCTTAAACAAAATTTTGCGGC	C	231
	Reverse inner primer	AAGGTCCTTAACATTTAAACCCCGGA	T	257
	Forward outer primer	GTAGCTCGAGATGCAGTTTCAATGGTAA		434
	Reverse outer primer	CTTTGCCTGTGAAATTGTATAAGCGGTT		

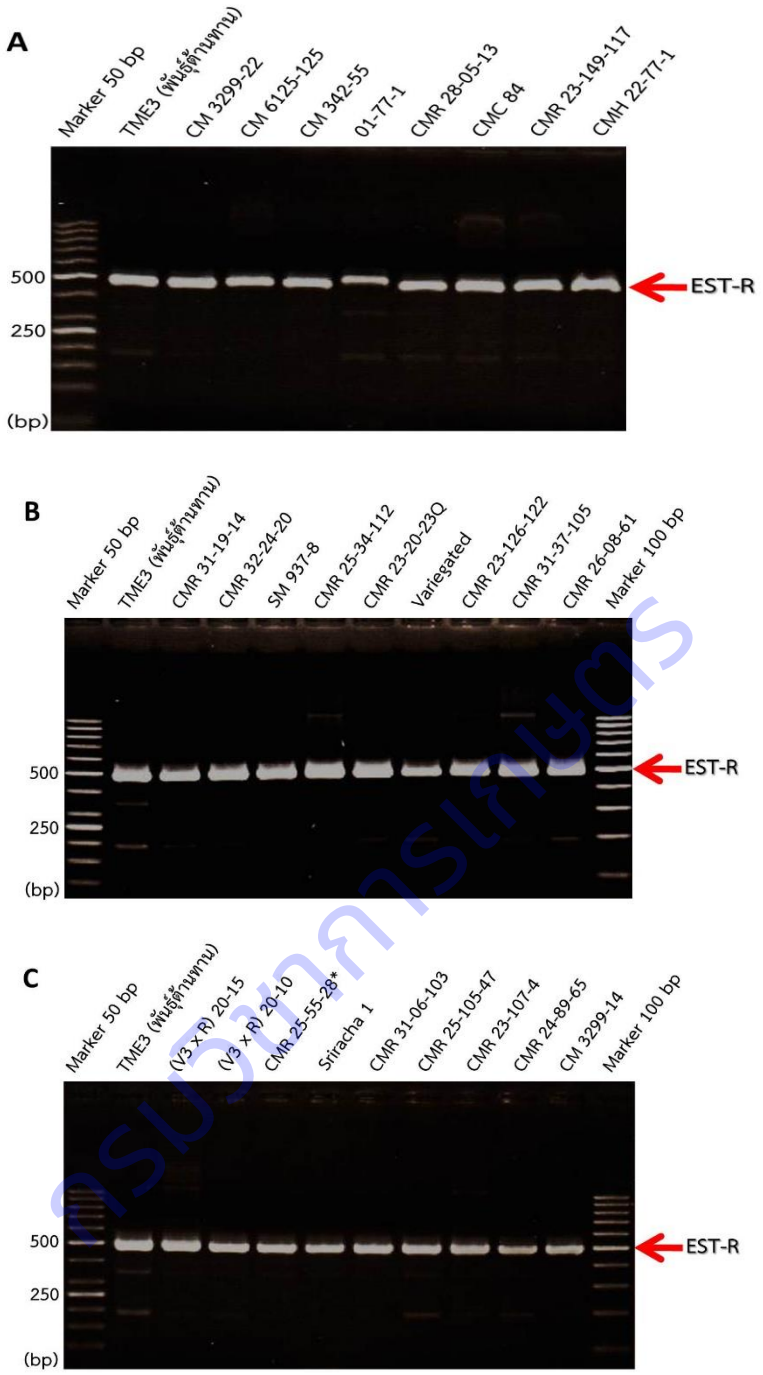
ผลการวิจัยและอภิปราย

<u>ปี 2561 และ 2562 :</u> การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างจากเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวนทั้งสิ้น 250 พันธุ์

1. การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอีเอสทีชนิดสการ์และชนิดเอสเอสอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 250 พันธุ์ พบว่า มันสำปะหลังทุกพันธุ์ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นการยืนยันอีกทางหนึ่งว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์ที่ทำการสกัดมีคุณภาพดีสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้มันสำปะหลัง249 พันธุ์ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp **ดังภาพที่ 1A-C** แต่มีเพียงพันธุ์ 01-77-1 เท่านั้นที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งสูงกว่า 500 bp โดยมีขนาดประมาณ 530 bp **(ภาพที่ 1A)** ซึ่งวิเคราะห์ได้ว่าพันธุ์ 01-77-1 มีลำดับดีเอ็นเอของยีน *LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein*หรือ *R protein* แตกต่างจากพันธุ์ต้านทาน TME3 รวมถึงแตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ ที่ทดสอบ ทำให้มีความเป็นไปได้ที่พันธุ์ 01-77-1 นี้จะมีลักษณะความต้านทานโรค CMD แตกต่างจากพันธุ์อื่น อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นต้องทำการทดสอบพันธุ์ 01-77-1 กับเชื้อโรคจริงเพื่อศึกษาความต้านทานโรค CMD

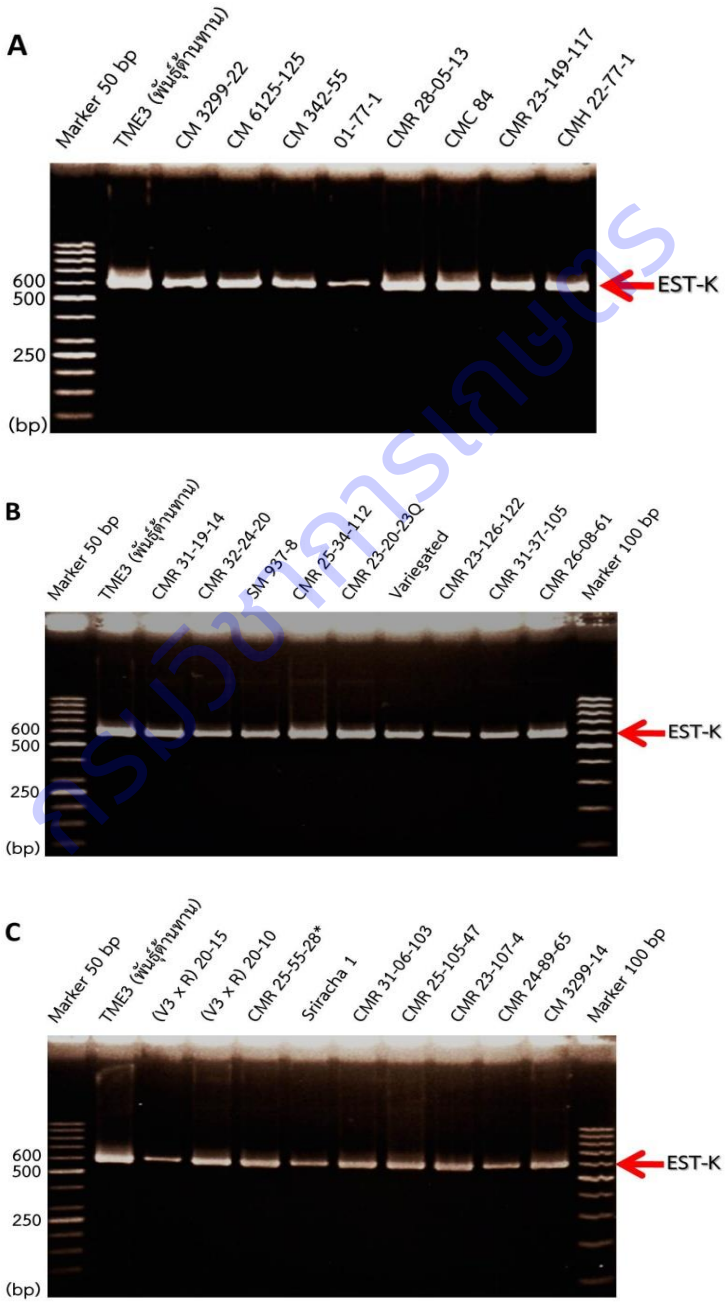
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์คัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค CMD ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R

กรมวิชาการเกษตร

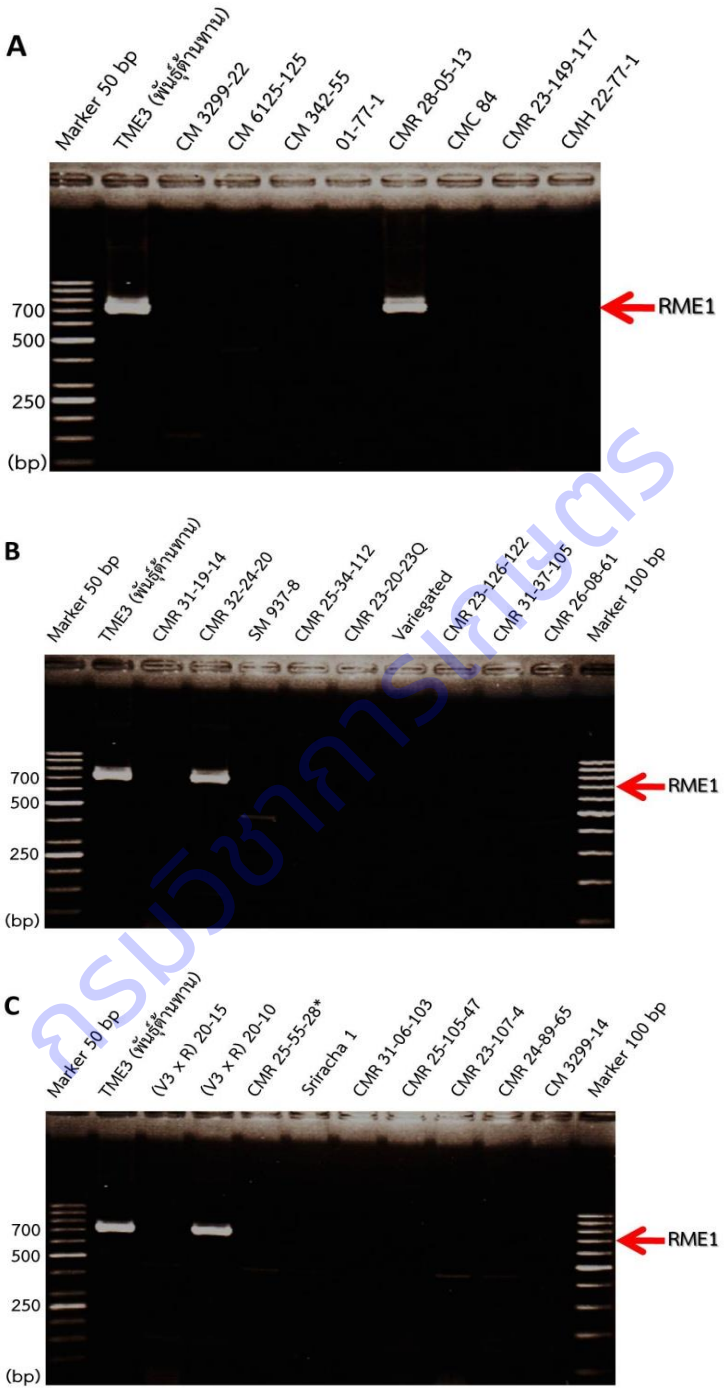
สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล EST-K เมื่อนำมาทดสอบจีโนไทป์ของมันสำปะหลังจำนวน 250 พันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ไม่ปรากฏความแตกต่างระหว่างพันธุ์ **(ภาพที่ 2)** ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลได้เป็น 2 ข้อดังนี้ ข้อที่ 1 ความต้านทานโรค CMD อาจไม่มีความเกี่ยวข้องกับยีน *Protein kinase superfamily protein*ที่ทำการทดสอบ หรือข้อที่ 2 ความต้านทานโรค CMD อาจมีความเกี่ยวข้องกับยีน *Protein kinase superfamily protein* ที่ทำการทดสอบแต่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธ์อ่อนแอในระดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งไม่สามารถเห็นความแตกต่างได้ด้วยขนาดของแถบดีเอ็นเอ ต้องทำการหาลำดับดีเอ็นเอหรือ DNA sequencing จึงจะสามารถเห็นความแตกต่างได้



ภาพที่ 2 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์คัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค CMD ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-K

ศูนย์วิทยทรัพยากร

นำดีเอ็นเอมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1 ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิดสการ์ที่อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* มากที่สุดโดยมีระยะห่าง 4 เซนติมอร์แกน (Carmo *et al*., 2015) เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 **ดังภาพที่ 3**



ภาพที่ 3 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์คัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค CMD ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1

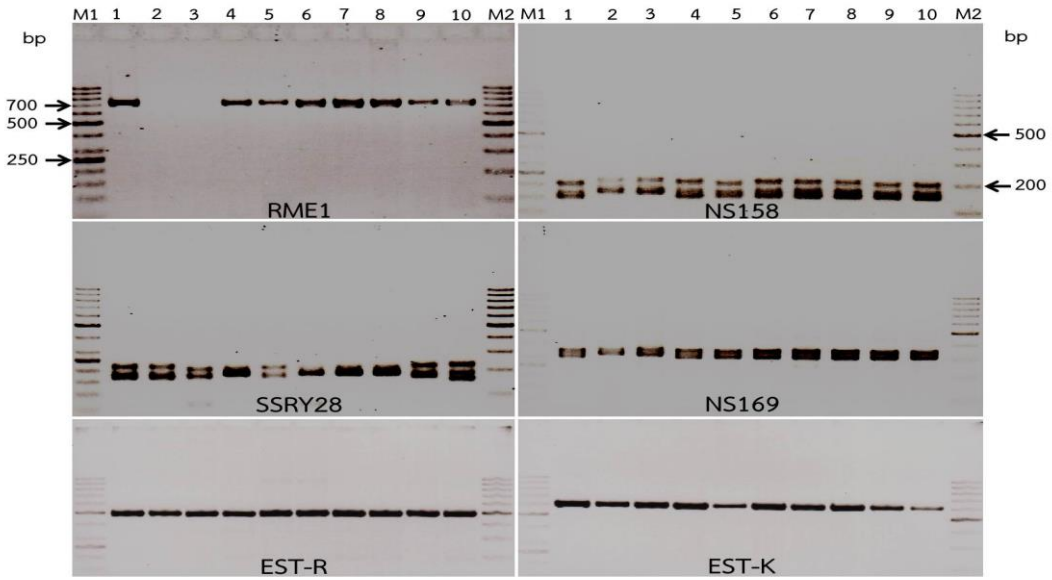
กรมวิชาการเกษตร

จากการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล RME1 กับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 250 พันธุ์ พบพันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 โดยแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 700 bp จำนวน 58 พันธุ์ ได้แก่ (1) เกษตรลพบุรี (2) ระยอง 2 (3) ระยอง 11 (4) ระยอง 90 (5) พิรุณ 1 (6) พิรุณ 2 (7) SM 2277-23 (8) CMR 38-125-77 (9) CMR 42-44-98 (10) CMR 44-03-57 (11) CMR 47-02-9 (12) CMR 48-20-17 (13) CMR 48-35-1 (14) CMR 49-22-227 (15) CMR 49-54-10 (16) CMR 49-54-67 (17) CMR 50-20-2 (18) CMR 50-34-80 (19) CMR 51-13-14 (20) CMR 51-23-14 (21) MMAL 63 (22) MPER 325 (23) MCOL 1752 (24) HANATEE (25) MCOL 2016* (26) MBRA 18 (27) 315 (28) CM 6125-117 (29) CM 407-30 (30) SMH 22-03-1 (31) CMR 28-05-13 (32) CMR 32-24-20 (33) (V3 x R) 20-10 (34) 56/5 (35) CMR 23-149-59 (36) (V3 x R) 21-16 (37) (V1 x R) 21-8 (38) CMR 26-38-7 (39) CMR 24-14-183 (40) CMR 25-24-384 (41) MMEX 59* (42) V. 30 (43) CMR 33-35-69 (44) CM 323-375 (45) MCOL 198 (46) R5S1 ต้นที่7 (47) MECU 71 (48) MNGA 1 (49) CM 4574-7 (50) CMR 60-36-27 (51) CMR 60-48-29 (52) CMR 60-36-12 (53) CR 35 (54) CR 79 (55) CR 30 (56) CR 63 (57) CR 25 (58) CMR 60-36-1 ซึ่งพันธุ์ candidate เหล่านี้อาจมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นพันธุ์ต้านทานโรค CMD จากนั้นนำ candidate ของพันธุ์ต้านทานโรค CMD จำนวน 58 พันธุ์ ไปทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์อีก 3 เครื่องหมาย ได้แก่ NS158, SSRY28 และ NS169 เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกหาพันธุ์ต้านทานโรค CMD

พันธุ์มันสำปะหลัง candidate ที่ต้านทานต่อไวรัสโรคใบด่างจะต้องแสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ทั้งในเครื่องหมายโมเลกุล RME1 และ NS158 เป็นอย่างน้อย เนื่องจากมีรายงานว่า 2 เครื่องหมายโมเลกุลนี้อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* มากที่สุดเป็นลำดับที่ 1 และ2 ตามลำดับ (Carmo *et al*., 2015) ขณะที่พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU 50) มีรายงานว่าแสดงฟีโนไทป์อ่อนแอต่อโรคใบด่างมันสำปะหลังเมื่อใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะในการถ่ายโคลนไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเข้าสู่ใบมันสำปะหลังหรือเรียกว่าวิธี Agro-inoculation (Bi *et al*., 2010) และพันธุ์ MCUB 23 แสดงจีโนไทป์ที่แตกต่างจากพันธุ์ต้านทาน TME3 ในเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์และเอสเอสอาร์ทั้ง 4 เครื่องหมาย จึงนำ 2 พันธุ์นี้ (KU 50 และ MCUB 23) มาใช้เป็น negative control

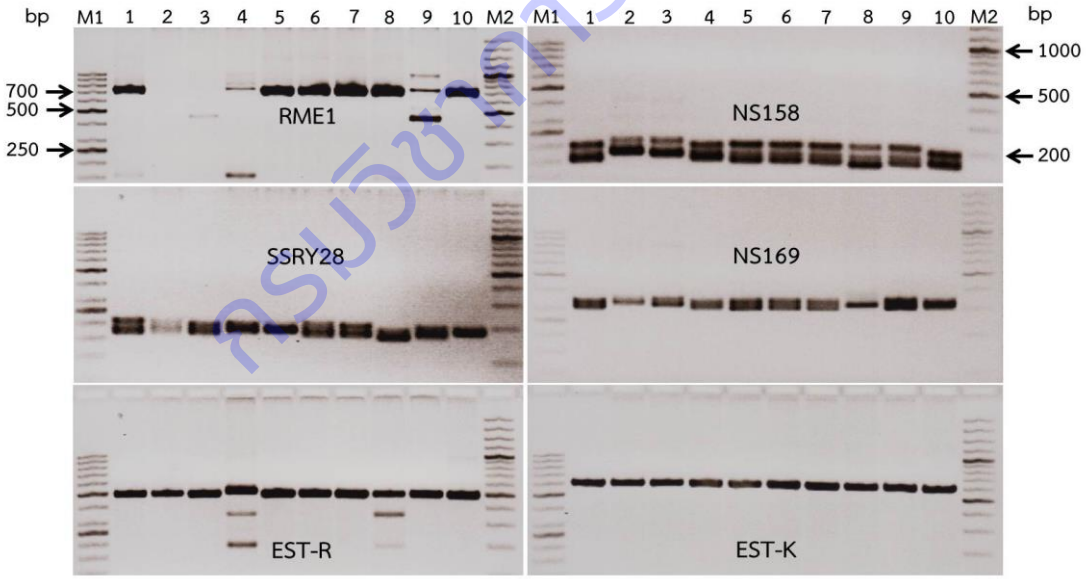
จากผลการทดลองพบพันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอใกล้เคียงกับพันธุ์ต้านทาน TME3 และมีแนวโน้มที่จะเป็นพันธุ์ต้านทานรวมทั้งสิ้น 14 พันธุ์ โดยพันธุ์ candidate ที่คัดเลือกได้ในปี 2561 ได้แก่ MMAL63, พิรุณ 2, MBRA 18, ระยอง 11, CMR 49-22-227, CMR 49-54-10 และ CMR 49-54-67 **(ภาพที่ 4)** พันธุ์ candidate ที่คัดเลือกได้ในปี 2562 ได้แก่ CMR 23-149-59, MNGA 1, CMR 33-35-69, CMR 28-05-13, CM 4574-7, MECU 71 และ 01-77-1 **(ภาพที่ 5)** ซึ่ง CIAT (2007) รายงานว่าพันธุ์ MNGA 1 แสดงฟีโนไทป์ต้านทานต่อโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ Indian (ICMV) พันธุ์ MECU 71 และ CM 4574-7 ได้รับคัดเลือกให้เป็นพันธุ์ candidate เนื่องจากมีรายงานในต่างประเทศว่าพันธุ์ MECU 71 และ CM 4574-7 แสดงฟีโนไทป์ต้านทานโรค CMD (unpublished data) โดยทั้ง 2 พันธุ์นี้แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในเครื่องหมายโมเลกุล RME1 ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* มากที่สุดด้วย

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 4 จีโนไทป์ของพันธุ์ candidate ที่คัดเลือกได้ในปี 2561 เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R และ EST-K เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3

Lane M1 = 50 bp DNA Ladder, Lane 1 = TME3 (resistant), Lane 2 = KU 50 (negative control), Lane 3 = MCUB 23 (negative control), Lane 4 = Rayong 11, Lane 5 = Pirun 2, Lane 6 = CMR 49-22-227, Lane 7 = CMR 49-54-10, Lane 8 = CMR 49-54-67, Lane 9 = MMAL 63, Lane 10 = MBRA 18, Lane M2 = 100 bp DNA Ladder.



ภาพที่ 5 จีโนไทป์ของพันธุ์ candidate ที่คัดเลือกได้ในปี 2562 เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R และ EST-K เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3

Lane M1 = 50 bp DNA Ladder, Lane 1 = TME3 (resistant), Lane 2 = KU 50 (negative control), Lane 3 = MCUB 23 (negative control), Lane 4 = 01-77-1, Lane 5 = CMR28-05-13, Lane 6 = CMR23-149-59, Lane 7 = CMR33-35-69, Lane 8 = MECU 71, Lane 9 = MNGA 1, Lane 10 = CM 4574-7, Lane M2 = 100 bp DNA Ladder plus.

กรมวิชาการเกษตร

2. การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป

จากการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase* จำนวน 3 ตำแหน่ง ประกอบด้วย Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค CMD (Wolfe *et al*., 2016) ในพันธุ์ candidate 14 พันธุ์ ที่มีความเป็นไปได้ที่อาจจะเป็นพันธุ์ต้านทานโรค CMD จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R และ EST-K เรียบร้อยแล้ว โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 พบว่าพันธุ์ MMAL63, ระยอง11, CMR49-22-227, CMR 23-149-59, MNGA 1, CMR 28-05-13 และ MECU 71 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ณ ตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปทั้ง 3 ตำแหน่งโดยตำแหน่ง Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบโฮโมไซกัส GG, TT และ TT ตามลำดับ **(ตารางที่ 6)**

ตารางที่ 6 ผลทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase*โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing

Cassava variety	Ex2-78	Ex2-157	Ex3-128
TME3	GG	TT	TT
KU 50	GG	TT	TT
MCUB 23	GA	TT	CT
MMAL 63	GG	TT	TT
Pirun 2	GA	TT	CT
MBRA 18	GA	TT	CT
Rayong 11	GG	TT	TT
CMR 49-22-227	GG	TT	TT
CMR 49-54-10	GG	TT	CT
CMR 49-54-67	GG	TT	CT
CMR 23-149-59	GG	TT	TT
MNGA 1	GG	TT	TT
CMR 33-35-69	GG	TT	CT
CMR 28-05-13	GG	TT	TT
CM 4574-7	GG	TT	CT
MECU 71	GG	TT	TT
01-77-1	GG	TT	CT

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองโดยรวมของเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 กลุ่มพบว่า พันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ทั้งในเครื่องหมายโมเลกุลกลุ่มที่ 1 เครื่องหมายชนิดสการ์และชนิดเอสเอสอาร์ซึ่งขนาบข้างอยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* และเครื่องหมายโมเลกุลกลุ่มที่ 2 ที่ประยุกต์มาจาก Expressed sequence tag (EST) ของชิ้นส่วนยีนที่แสดงออกในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส CMV รวมทั้งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ณ ตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นชนิดสนิป รวมทั้งสิ้น 9 เครื่องหมายโมเลกุล **(ตารางที่ 7)** มีจำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ MMAL 63 และ CMR 23-149-59 อย่างไรก็ตามสำหรับพันธุ์ CMR 23-149-59 เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล NS158 ที่อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* เป็นลำดับที่ 2 ได้แสดงแถบดีเอ็นเอที่มี

ความใกล้เคียงกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในช่วงขนาดแถบดีเอ็นเอที่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคได้แก่ 166bp (Carmo *et al*., 2015) แต่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นที่ตำแหน่งบนสุดปรากฏมาด้วย **(ภาพที่ 5, NS158)** ซึ่งได้แจ้งผลการทดสอบจีโนไทป์และรายชื่อพันธุ์candidate ต้านทานโรค CMD จำนวน 14 พันธุ์ ให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงานทราบ เพื่อนำพันธุ์ candidate ดังกล่าวไปทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรคและใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในการสร้างลูกผสม

ตารางที่ 7 สรุปจีโนไทป์ของพันธุ์ candidate จำนวน 14 พันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3

Variety	SCAR and SSR markers				EST markers		SNP markers		
	RME1	NS158	SSRY28	NS169	EST-R	EST-K	Ex2-78	Ex2-157	Ex3-128
TME 3	√	√	√	√	√	√	√	√	√
KU 50	×	×	√	×	√	√	√	√	√
MCUB 23	×	×	×	×	√	√	×	√	×
MMAL 63	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Pirun 2	√	√	×	√	√	√	×	√	×
MBRA 18	√	√	×	√	√	√	×	√	×
Rayong 11	√	√*	×	√	√	√	√	√	√
CMR 49-22-227	√	√*	×	√	√	√	√	√	√
CMR 49-54-10	√	√*	×	√	√	√	√	√	×
CMR 49-54-67	√	√*	×	√	√	√	√	√	×
CMR 23-149-59	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
MNGA 1	√*	√*	×	√	√	√	√	√	√
CMR 33-35-69	√	√*	√	√	√	√	√	√	×
CMR 28-05-13	√	√*	×	√	√	√	√	√	√
CM 4574-7	√	×	×	√	√	√	√	√	×
MECU 71	√	×	×	×	√*	√	√	√	√
01-77-1	√*	√	×	√	×	√	√	√	×

√ : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3

√*: แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในช่วงขนาดแถบดีเอ็นเอที่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค แต่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นปรากฏมาด้วย

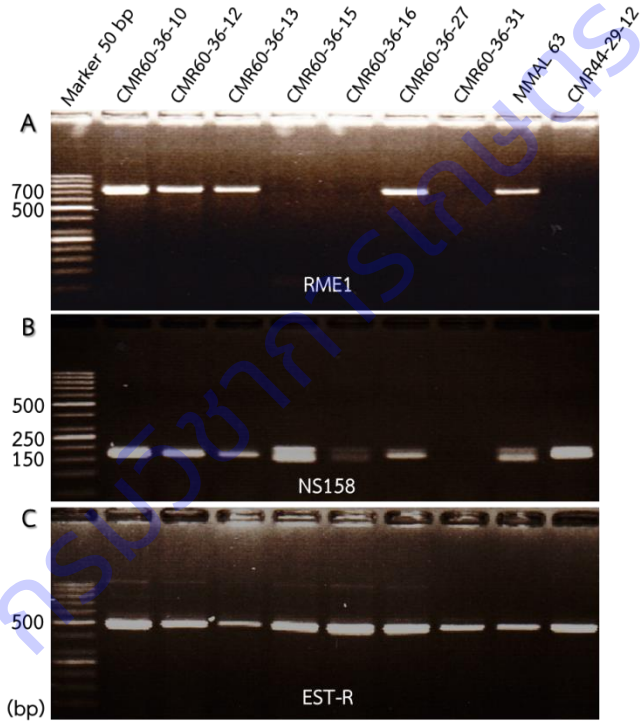
× : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3

กรมวิชาการเกษตร

<u>ปี 2563 และ 2564 :</u> การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างในลูกผสม จำนวนทั้งสิ้น 652 พันธุ์

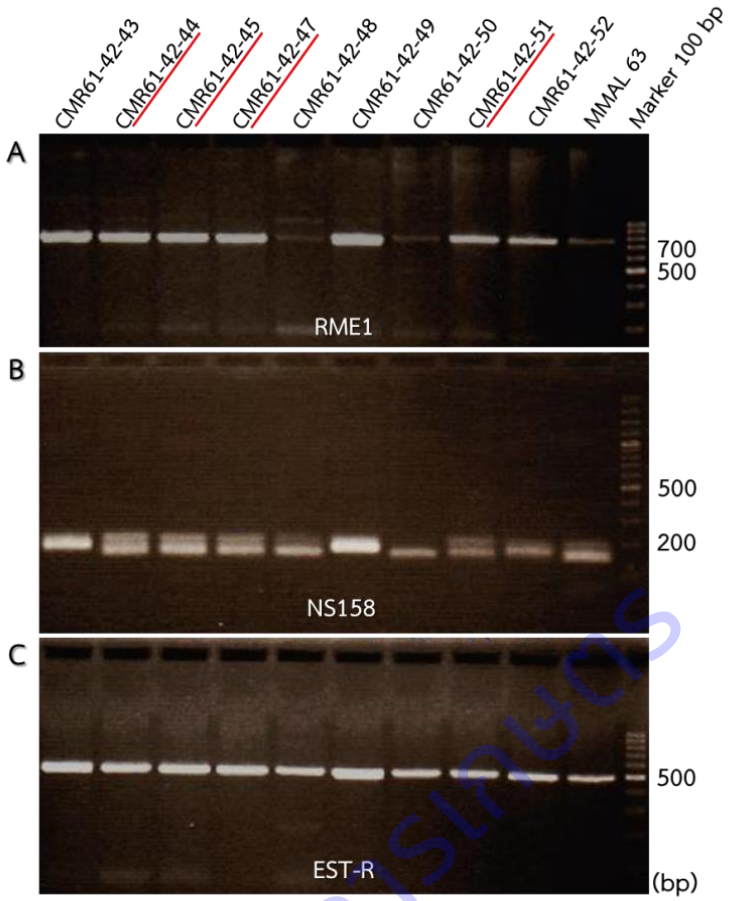
1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังลูกผสมและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Direct PCRทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล EST-R, RME1 และ NS158

นำใบมันสำปะหลังลูกผสมรวมถึงพันธุ์ต้านทานโรค CMD จาก IITA มาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Direct PCRทดสอบกับเครื่องหมาย EST-R, RME1 และ NS158 เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมาย EST-R พบว่า มันสำปะหลังทุกสายพันธุ์/พันธุ์ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 และพันธุ์ MMAL 63 (พันธุ์ candidateที่คัดเลือกได้ในปี 2561) **ดังภาพที่ 6 และ 7 (panel C)** ผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันทางหนึ่งว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังแต่ละสายพันธุ์/พันธุ์ที่ทำการสกัดด้วยเทคนิค Direct PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้



ภาพที่ 6 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158 และ EST-R ในลูกผสม CMR 60-36-xxx โดยใช้เทคนิค Direct PCR

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 7 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1 NS158 และ EST-R ในลูกผสม CMR 61-42-xxx โดยใช้เทคนิค Direct PCR เส้นสีแดงระบุสายพันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ candidate (MMAL 63) ในทั้ง 3 เครื่องหมาย

จากนั้นดำเนินการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์/พันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ candidate ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ ในทั้งเครื่องหมาย EST-R, RME1 และ NS158 ผลการทดลองพบว่าจากมันสำปะหลังจำนวน 652 สายพันธุ์/พันธุ์ที่ทำการทดสอบ มีมันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ candidate ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในทั้ง 3 เครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 102 สายพันธุ์/พันธุ์คิดเป็น 15.6 เปอร์เซ็นต์ซึ่งคัดเลือกได้ในปี 2563 และปี 2564 จำนวน 46 และ 56 สายพันธุ์ตามลำดับ โดยมีรายชื่อสายพันธุ์มันสำปะหลังดังนี้

ปี 2563 (1) CMR 60-36-5 (2) CMR 60-36-48 (3) CMR 60-48-4 (4) CMR 60-48-21 (5) CMR 60-48-23 (6) CMR 60-48-26 (7) CMR 60-48-39 (8) CMR 60-48-55 (9) CMR 60-48-64 (10) CMR 60-48-69 (11) CMR 60-48-72 (12) CMR 60-48-73 (13) CMR 61-42-03 (14) CMR 61-42-04 (15) CMR 61-42-06 (16) CMR 61-42-10 (17) CMR 61-42-18 (18) CMR 61-42-19 (19) CMR 61-42-24 (20) CMR 61-42-44 (21) CMR 61-42-45 (22) CMR 61-42-47 (23) CMR 61-42-51 (24) CMR 61-42-59 (25) CMR 61-42-60

(26) CMR 61-97-01 (27) CMR 61-97-02 (28) CMR 61-97-04 (29) CMR 61-97-05 (30) CMR 61-97-08 (31) CMR 61-97-13 (32) CMR 61-97-14 (33) CMR 62-49-03(34) CMR 62-49-08 (35) CMR 62-60-21 (36) CMR 62-60-28 (37) CMR 62-133-10 (38) CMR 62-157-22 (39) CMR 62-157-29 (40) CMR 62-157-31 (41) CMR 62-157-39 (42) CMR 62-157-62 (43) CMR 62-184-46 (44) OMR 62-24-18 (45) OMR 62-24-19 (46) OMR 62-24-40

ปี 2564 (47) CMR 62-06-03 (48) CMR 62-06-07 (49) CMR 62-06-29 (50) CMR 62-26-08 (51) CMR 62-26-19 (52) CMR 62-26-36 (53) CMR 62-29-09 (54) CMR 62-29-12 (55) CMR 62-33-01 (56) CMR 62-37-30 (57) CMR 62-60-14 (58) CMR 62-60-38 (59) CMR 62-60-41 (60) CMR 62-69-07 (61) CMR 62-69-12 (62) CMR 62-69-15 (63) CMR 62-69-19 (64) CMR 62-81-06 (65) CMR 62-81-07 (66) CMR 62-81-17 (67) CMR 62-81-24 (68) CMR 62-81-25 (69) CMR 62-81-29 (70) CMR 62-81-36 (71) CMR 62-81-41 (72) CMR 62-81-48 (73) CMR 62-81-50 (74) CMR 62-81-53 (75) CMR 62-121-01 (76) CMR 62-121-10 (77) CMR 62-155-01 (78) CMR 62-156-04 (79) CMR 62-156-05 (80) CMR 62-156-07 (81) CMR 62-156-18 (82) CMR 62-157-58 (83) CMR 62-157-70 (84) CMR 62-158-02 (85) CMR 62-158-08 (86) CMR 62-158-30 (87) CMR 62-160-10 (88) CMR 62-160-21 (89) CMR 62-160-33 (90) CMR 62-160-37 (91) CMR 62-160-71 (92) CMR 62-161-07 (93) CMR 62-161-19 (94) CMR 62-161-25 (95) CMR 62-161-40 (96) CMRE 62-24-45 (97) CMRE 62-24-87 (98) CMRE 62-24-104 (99) MORE 62-03-27 (100) MORE 62-05-32 (101) MORE 62-05-34 (102) MORE 62-05-38

การคัดเลือกในปี 2564 นอกจากสายพันธุ์ข้างต้นแล้วได้รับพันธุ์ต้านทานโรค CMD จาก IITA จำนวน 4 พันธุ์ เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมาย RME1 และ EST-R พบว่า ทั้ง 4 พันธุ์แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ขณะที่เครื่องหมาย NS158 นั้นพันธุ์ 920057 และพันธุ์ 980505 แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 แต่พันธุ์ 972205 และพันธุ์ 980581 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างออกไป สำหรับมันสำปะหลังลูกผสมปี 2564 จากคู่ผสม MNGA 1 x MMAL 63 (MNGA 1 และ MMAL 63 เป็นพันธุ์ candidate ที่คัดเลือกได้ในปี 2561 และ 2562) ได้แก่ SA1 และ SA3 แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 จำนวน 2 ใน 3 เครื่องหมาย มันสำปะหลังลูกผสมปี 2564 จากคู่ผสมCMR 37-18-201 x TME3 ได้แก่ SA4 และ SA5 แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในเครื่องหมาย RME1 และ EST-R แต่แสดงแถบดีเอ็นเอไม่เหมือนในเครื่องหมาย NS158 อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าเครื่องหมาย RME1 อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* มากกว่าเครื่องหมาย NS158 (Carmo *et al*., 2015) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกลูกผสม SA1, SA3, SA4 และ SA5 เป็น candidate ที่อาจเป็นสายพันธุ์ต้านทานโรค CMD ด้วย โดยสรุปในปี 2564 ผลการคัดเลือกเบื้องต้นด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R, RME1 และ NS158 ด้วยเทคนิค Direct PCR พบสายพันธุ์/พันธุ์ candidate ที่อาจเป็นสายพันธุ์/พันธุ์ต้านทานโรค CMD จำนวน 64 สายพันธุ์/พันธุ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังเพื่อการทำซ้ำแบบ biological repeat และการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอีเอสทีชนิดสการ์และชนิดเอสเอสอาร์

ดำเนินการทำซ้ำแบบ biological repeat กับมันสำปะหลังสายพันธุ์/พันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ candidate จากการคัดเลือกเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค Direct PCR ทดสอบกับเครื่องหมาย EST-R, RME1 และ NS158 โดยเก็บใบมันสำปะหลังมาสกัดดีเอ็นเออีกครั้งด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA)หรือด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้น เพื่อให้สามารถสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังได้อย่างสะดวกรวดเร็ว ปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายไม่จำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนเหลวประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลา

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี ได้แก่ วิธี SDS/NaCl + PVP, วิธี SDS/NaCl และวิธี CTAB โดยใช้ตัวอย่างมันสำปะหลัง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ CMR 62-51-01, CMR 62-49-03 และ CMR 62-29-09 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ใบมันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง พบว่าการสกัดดีเอ็นเอวิธี SDS/NaCl+PVP ให้ปริมาณดีเอ็นเอและอัตราส่วน A_{260}/A_{280}ซึ่งระบุความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอไม่แตกต่างจากวิธี CTAB **(ตารางที่ 8)** ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่วัดจากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Biodrop (UK) พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้น 1.924, 0.485, 0.859 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับและมีปริมาณผลผลิตดีเอ็นเอจากวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl+PVP เฉลี่ย 1385.5 และ 1473.1 ไมโครกรัมต่อใบมันสำปะหลัง 1 กรัมตามลำดับ ขณะที่วิธี SDS/NaCl ให้ผลผลิตดีเอ็นเอต่ำกว่า 2 วิธีดังกล่าวโดยมีค่าเฉลี่ยที่ 830.9 ไมโครกรัมต่อใบมันสำปะหลัง 1 กรัมอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP มีค่าเฉลี่ย 1.822, 1.836 และ 1.820 ตามลำดับ แสดงถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธีมีความบริสุทธิ์หรือคุณภาพดีมีการปนเปื้อนของโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ในระดับต่ำ เนื่องจากดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีนั้นต้องมีต้องมีค่า A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.7-2.0 (Maniatis *et al*., 1982)

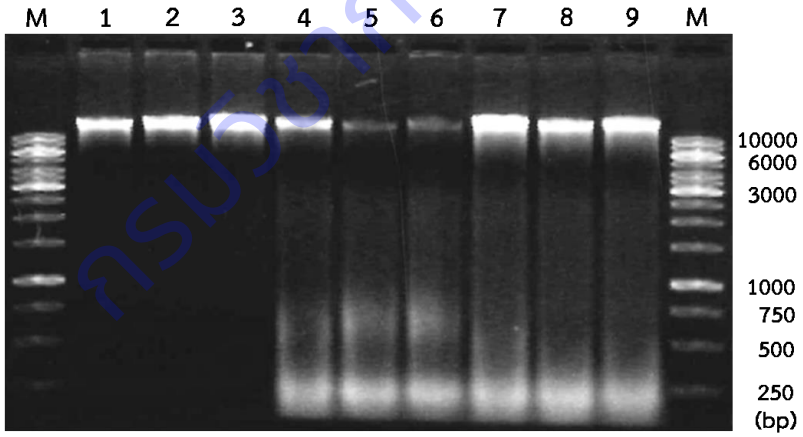
ตารางที่ 8 ปริมาณผลผลิตและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP

DNA extraction method	Cassava line	Weight of leaves for DNA extraction (g)	Volume of TE or ddH_2O to dissolve DNA (µl)	DNA concentration quantified by using spectrophotometer (µg/ul)	DNA yield (µg/g of sample)	Purity (A_{260}/A_{280})
CTAB	CMR 62-51-01	1	720	1.511	1087.9	1.886
	CMR 62-49-03	1	720	1.978	1424.2	1.839
	CMR 62-29-09	1	720	2.284	1644.5	1.740
	Average			**1.924**	**1385.5**	**1.822**
SDS/NaCl	CMR 62-51-01	0.07	120	0.513	879.4	1.872
	CMR 62-49-03	0.07	120	0.453	776.6	1.883
	CMR 62-29-09	0.07	120	0.488	836.6	1.752
	Average			**0.485**	**830.9**	**1.836**
SDS/NaCl + PVP	CMR 62-51-01	0.07	120	0.835	1431.4	1.902
	CMR 62-49-03	0.07	120	0.881	1510.3	1.817
	CMR 62-29-09	0.07	120	0.862	1477.7	1.741
	Average			**0.859**	**1473.1**	**1.820**

ศูนย์วิทยทรัพยากร

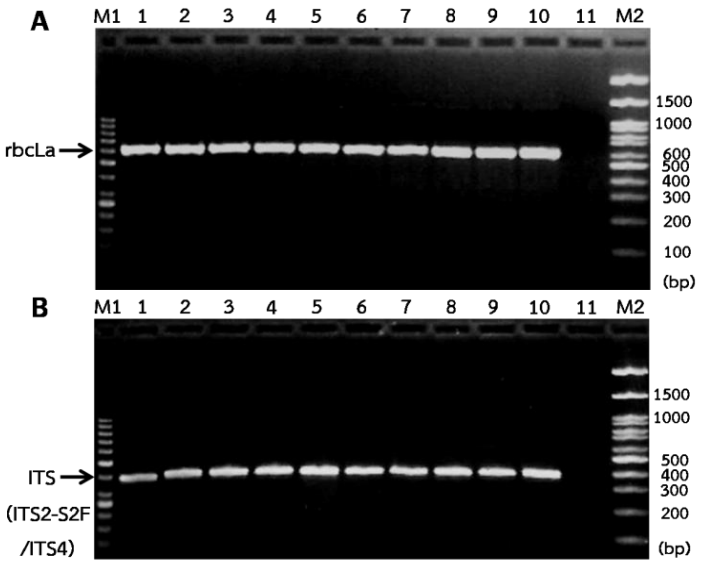
การประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB มีแถบดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (intact) คมชัด (sharp and clear) อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10,000 bp และไม่มีส่วนของดีเอ็นเอที่ย่อยสลาย **(ภาพที่ 8 Lane 1-3)** ส่วนวิธี SDS/NaCl+PVP ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และคมชัดเช่นเดียวกันแม้ว่าพบการย่อยสลายของดีเอ็นเอบ้างเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl+PVP มีคุณภาพสูง ขณะที่ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl มีแถบดีเอ็นเอที่อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10,000 bp จางกว่าวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl+PVP แสดงถึงการมีดีเอ็นเอน้อยกว่า **(ภาพที่ 8 Lane 4-6)** ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นอกจากนี้พบว่า การย่อยสลายของดีเอ็นเอมากกว่าวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl+PVP ดังปรากฏเป็นแถบกว้างในช่วง 500-750 bp (ภาพที่ 8 Lane 4-6) สำหรับแถบที่ปรากฏ ณ ตำแหน่งประมาณ 250 bp ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP คือ RNA **(ภาพที่ 8 Lane 4-9)** เนื่องจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP ไม่มีขั้นตอนการกำจัด RNA ด้วย RNase A ดังเช่นวิธี CTAB

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของยีนเจ้าบ้าน rbcLa (Levin, 2003; Kress *et al*., 2009) และยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ ITS2-S2F/ITS4 (White *et al*., 1990; Yao *et al*., 2010) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP สามารถใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกับดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl **(ภาพที่ 9)** กล่าวคือ ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้



ภาพที่ 8 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP Genomic DNA extracted from leaves of different cassava lines using CTAB (1 - 3), SDS/NaCl (4 - 6) and SDS/NaCl+PVP (7 – 9) method, Lane M = 1 kb DNA Ladder, Lane 1, 4, 7 = CMR 62-51-01, Lane 2, 5, 8 = CMR 62-49-03, Lane 3, 6, 9 = CMR 62-29-09.

กรมวิชาการเกษตร

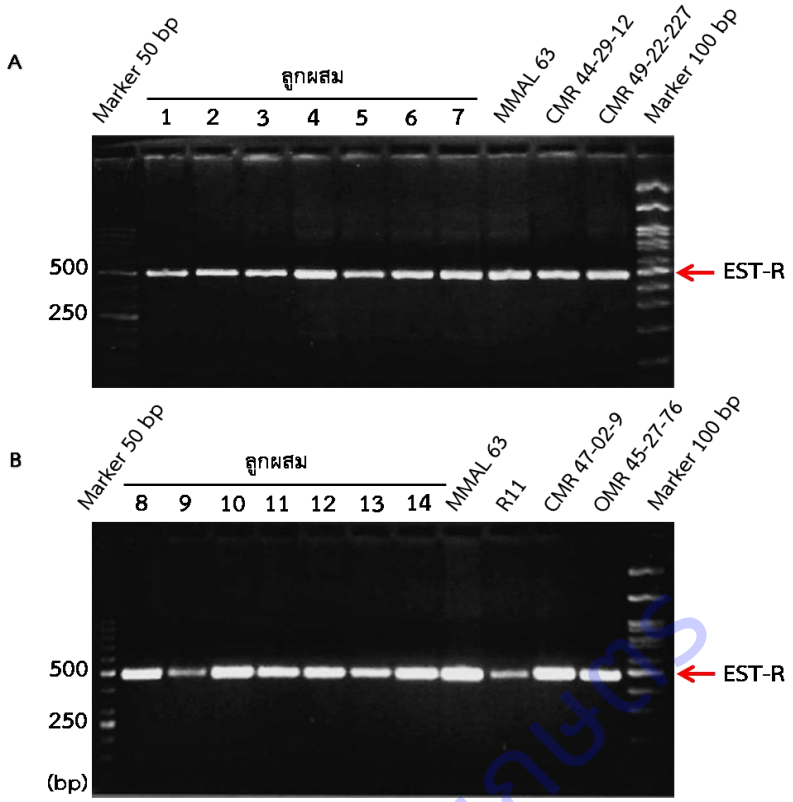


ภาพที่ 9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของยีนเจ้าบ้าน rbcLa (A) และยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ ITS2-S2F/ITS4 (B) กับดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP

DNA was extracted from leaves of different cassava lines using CTAB (1 - 3), SDS/NaCl (4 - 6) and SDS/NaCl+PVP (7 – 9) method. Lane M1 = 50 bp DNA Ladder, Lane 1, 4, 7 = CMR 62-51-01, Lane 2, 5, 8 = CMR 62-49-03, Lane 3, 6, 9 = CMR 62-29-09, Lane 10 = TME3 (DNA was extracted from leaf using CTAB method in study of Jeeraporn *et al*. (2020) and used as a positive control), Lane 11 = ddH_2O (negative control), Lane M2 = 100 bp DNA Ladder

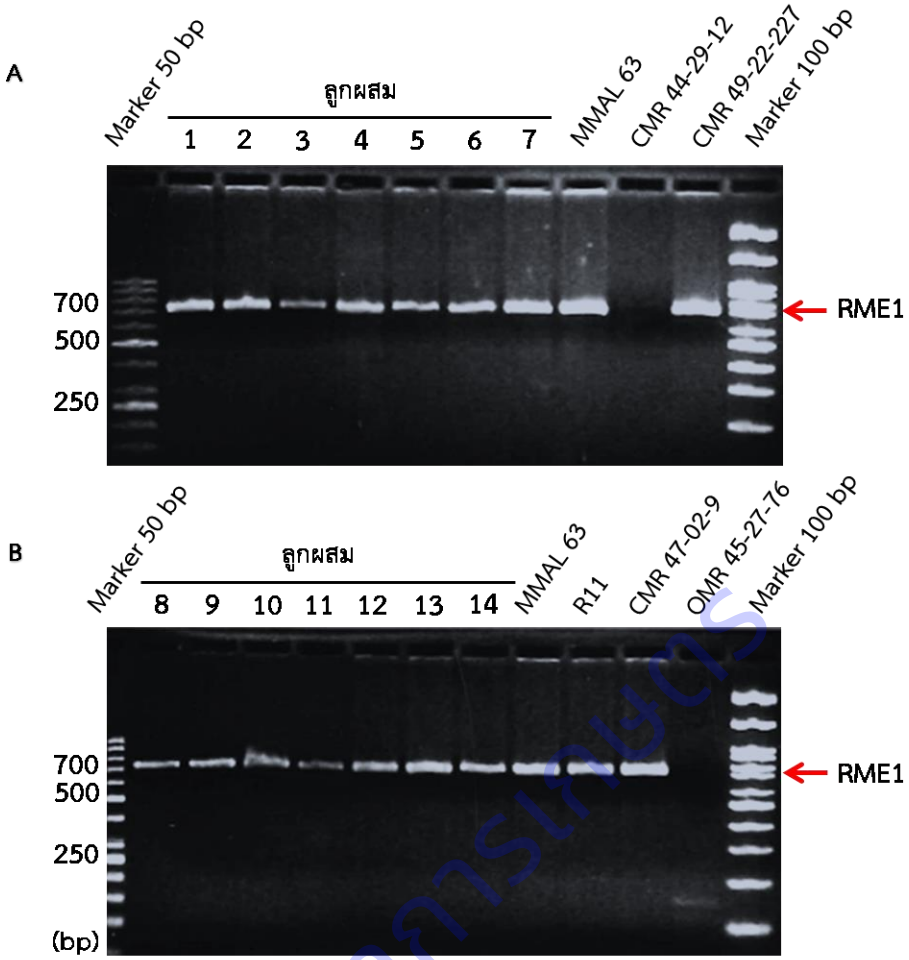
นำดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่สกัดได้สำหรับการทำซ้ำแบบ biological repeat มาทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R, RME1, EST-K, NS158, SSRY28 และ NS169 รวม 6 เครื่องหมาย การคัดเลือกปี 2563 จากสายพันธุ์ที่คัดเลือกเบื้องต้น 46 สายพันธุ์ พบสายพันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ MMAL 63 ซึ่งเป็นพันธุ์ candidate ครบทั้ง 6 เครื่องหมายจำนวน 14 สายพันธุ์ **(ภาพที่ 10, 11, 12 และ 13)** มีรายชื่อดังนี้ (1) CMR 60-36-5 (2) CMR 60-48-26 (3) CMR 60-48-69 (4) CMR 61-42-04 (5) CMR 61-42-06 (6) CMR 61-42-10 (7) CMR 61-42-44 (8) CMR 61-97-01 (9) CMR 61-97-04 (10) CMR 61-97-05 (11) CMR 61-97-08 (12) CMR 61-97-13 (13) CMR 62-60-21 (14) CMR 62-133-10

กรมวิชาการเกษตร



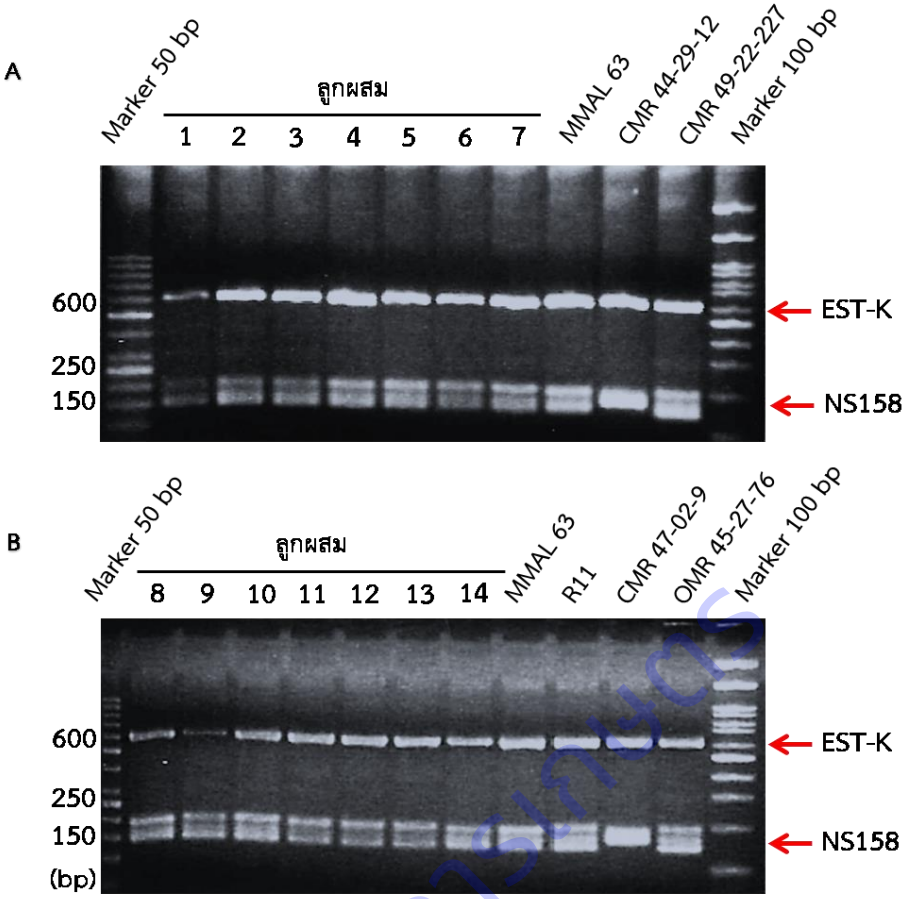
ภาพที่ 10 จีโนไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R **Panel A** : 1 = CMR 60-36-5 , 2 = CMR 60-48-26, 3 = CMR 60-48-69, 4 = CMR 61-42-04, 5 = CMR 61-42-06, 6 = CMR 61-42-10, 7 = CMR 61-42-44, MMAL63; CMR 44-29-12; CMR 49-22-227 = พันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ โดย CMR 44-29-12 x MMAL 63= CMR 60-36-xxx, CMR 49-22-227 x MMAL 63= CMR 60-48-xxx และ CMR 61-42-xxx. **Panel B** : 8 = CMR 61-97-01, 9 = CMR 61-97-04, 10 = CMR 61-97-05, 11 = CMR 61-97-08, 12 = CMR 61-97-13, 13 = CMR 62-60-21, 14 = CMR 62-133-10, MMAL63; R11; CMR 47-02-9; OMR 45-27-76 = พันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ โดย R 11 x MMAL 63= CMR 61-97-xxx, CMR 47-02-9 x MMAL 63= CMR 62-60-xxx, OMR 45-27-76 x MMAL 63= CMR 62-133-xxx.

ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพที่ 11 จีโนไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1 **Panel A** : 1 = CMR 60-36-5 , 2 = CMR 60-48-26, 3 = CMR 60-48-69, 4 = CMR 61-42-04, 5 = CMR 61-42-06, 6 = CMR 61-42-10, 7 = CMR 61-42-44, MMAL63; CMR 44-29-12; CMR 49-22-227 = พันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ โดยCMR 44-29-12 x MMAL 63= CMR 60-36-xxx, CMR 49-22-227 x MMAL 63= CMR 60-48-xxx และ CMR 61-42-xxx. **Panel B** : 8 = CMR 61-97-01, 9 = CMR 61-97-04, 10 = CMR 61-97-05, 11 = CMR 61-97-08, 12 = CMR 61-97-13, 13 = CMR 62-60-21, 14 = CMR 62-133-10, MMAL63; R11; CMR 47-02-9; OMR 45-27-76 = พันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ โดย R 11 x MMAL 63= CMR 61-97-xxx, CMR 47-02-9 x MMAL 63= CMR 62-60-xxx, OMR 45-27-76 x MMAL 63 = CMR 62-133-xxx.

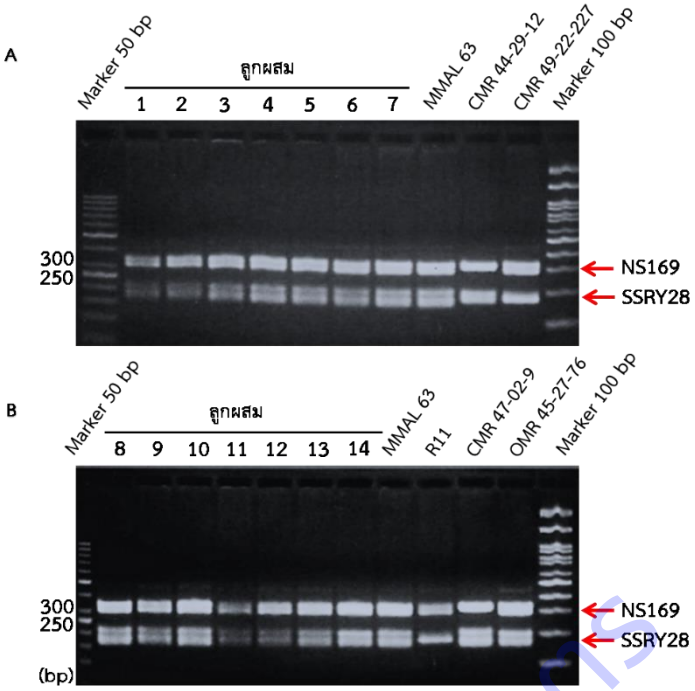
ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพที่ 12 จีโนไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-K และ NS158 แบบ Multiplex PCR

Panel A : 1 = CMR 60-36-5 , 2 = CMR 60-48-26, 3 = CMR 60-48-69, 4 = CMR 61-42-04, 5 = CMR 61-42-06, 6 = CMR 61-42-10, 7 = CMR 61-42-44, MMAL63; CMR 44-29-12; CMR 49-22-227 = พันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ โดยCMR 44-29-12 x MMAL 63= CMR 60-36-xxx, CMR 49-22-227 x MMAL 63= CMR 60-48-xxx และ CMR 61-42-xxx. **Panel B** : 8 = CMR 61-97-01, 9 = CMR 61-97-04, 10 = CMR 61-97-05, 11 = CMR 61-97-08, 12 = CMR 61-97-13, 13 = CMR 62-60-21, 14 = CMR 62-133-10, MMAL63; R11; CMR 47-02-9; OMR 45-27-76 = พันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ โดย R 11 x MMAL 63= CMR 61-97-xxx, CMR 47-02-9 x MMAL 63= CMR 62-60-xxx, OMR 45-27-76 x MMAL 63= CMR 62-133-xxx.

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 13 จีโนไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSRY28 และ NS169 แบบ Multiplex PCR

Panel A : 1 = CMR 60-36-5 , 2 = CMR 60-48-26, 3 = CMR 60-48-69, 4 = CMR 61-42-04, 5 = CMR 61-42-06, 6 = CMR 61-42-10, 7 = CMR 61-42-44, MMAL63; CMR 44-29-12; CMR 49-22-227 = พันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ โดยCMR 44-29-12 x MMAL 63= CMR 60-36-xxx, CMR 49-22-227 x MMAL 63= CMR 60-48-xxx และ CMR 61-42-xxx. **Panel B** : 8 = CMR 61-97-01, 9 = CMR 61-97-04, 10 = CMR 61-97-05, 11 = CMR 61-97-08, 12 = CMR 61-97-13, 13 = CMR 62-60-21, 14 = CMR 62-133-10, MMAL63; R11; CMR 47-02-9; OMR 45-27-76 = พันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ โดย R 11 x MMAL 63 = CMR 61-97-xxx, CMR 47-02-9 x MMAL 63 = CMR 62-60-xxx, OMR 45-27-76 x MMAL 63 = CMR 62-133-xxx.

สำหรับการคัดเลือกปี 2564 จากพันธุ์ที่คัดเลือกได้เบื้องต้นด้วยเครื่องหมาย EST-R, RME1 และ NS158 โดยเทคนิค Direct PCR จำนวน 64 สายพันธุ์/พันธุ์ รวมถึงนำข้อมูลของนักปรับปรุงพันธุ์เกี่ยวกับลักษณะทรงต้นที่ดีสะดวกต่อการเก็บเกี่ยวและลักษณะการเป็นโรคอื่นๆ มาร่วมพิจารณา จึงตัดสินใจดำเนินการทำซ้ำแบบ biological repeat จำนวน 25 สายพันธุ์/พันธุ์ได้แก่

(1) CMR 62-06-03 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)
(2) CMR 62-06-07 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)
(3) CMR 62-06-16 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)
(4) CMR 62-26-01 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)
(5) CMR 62-26-07 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)
(6) CMR 62-26-09 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1 และมีลักษณะทรงต้นที่ดี)
(7) CMR 62-26-19 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)

กรมวิชาการเกษตร

(8) CMR 62-26-36 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)

(9) CMR 62-29-09 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1 และมีลักษณะทรงต้นที่ดี)

(10) CMRE 62-09-06 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)

(11) CMRE 62-24-45 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)

(12) CMRE 62-24-87 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)

(13) CMRE 62-24-104 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)

(14) OMRE 62-03-27 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)

(15) OMRE 62-05-32 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)

(16) OMRE 62-05-34 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)

(17) OMRE 62-05-38 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)

(18) 920057 (พันธุ์ต้านทานจาก IITA มีเครื่องหมาย EST-R, RME1 และ NS158)

(19) 972205 (พันธุ์ต้านทานจาก IITA มีเครื่องหมาย EST-R และ RME1)

(20) 980505 (พันธุ์ต้านทานจาก IITA มีเครื่องหมาย EST-R, RME1 และ NS158)

(21) 980581 (พันธุ์ต้านทานจาก IITA มีเครื่องหมาย EST-R และ RME1)

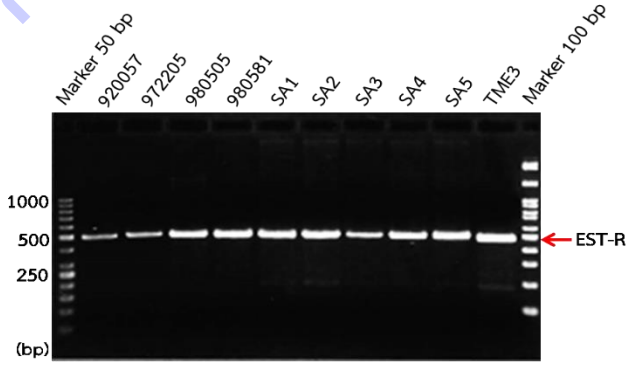
(22) SA1 (ลูกผสมของ MNGA 1 x MMAL 63 มีเครื่องหมาย EST-R, RME1 และ NS158)

(23) SA3 (ลูกผสมของ MNGA 1 x MMAL 63 มีเครื่องหมาย EST-R และ NS158)

(24) SA4 (ลูกผสมของ CMR 37-18-201 x TME3 มีเครื่องหมาย EST-R และ RME1)

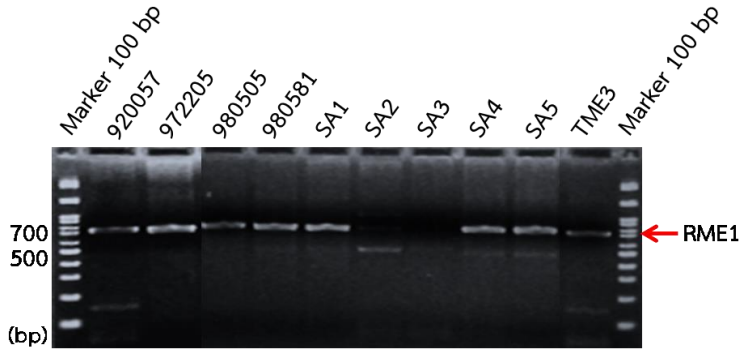
(25) SA5 (ลูกผสมของ CMR 37-18-201 x TME3 มีเครื่องหมาย EST-R และ RME1)

นำดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง25 สายพันธุ์/พันธุ์ข้างต้นที่สกัดได้สำหรับการทำซ้ำแบบ biological repeat มาทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R, RME1, EST-K, NS158, SSRY28 และ NS169 รวม 6 เครื่องหมาย พบสายพันธุ์/พันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ MMAL 63 ซึ่งเป็นพันธุ์ candidate ครบทั้ง 6 เครื่องหมายจำนวน 3สายพันธุ์/พันธุ์ได้แก่ (1) 920057 (2) 980505(3) SA1 **(ภาพที่ 14, 15, 16 และ 17)**

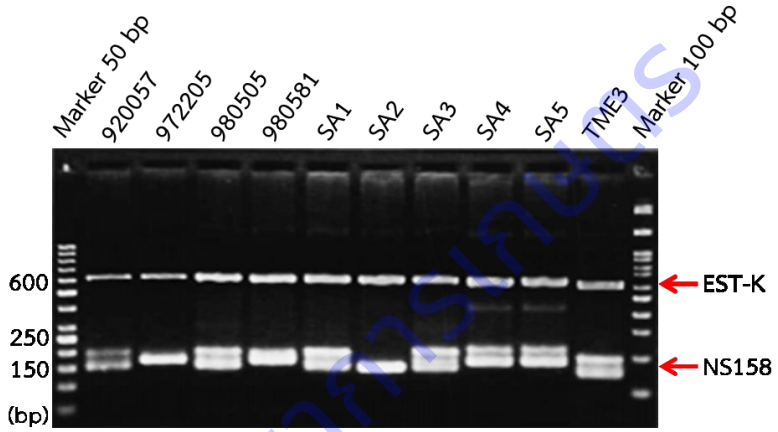


ภาพที่ 14 จีโนไทป์ของพันธุ์มันสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R

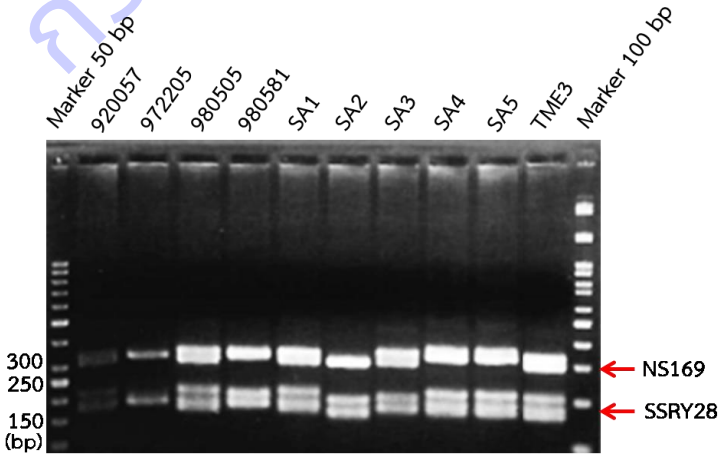
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 15 จีโนไทป์ของพันธุ์มันสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1



ภาพที่ 16 จีโนไทป์ของพันธุ์มันสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-K และ NS158 แบบ Multiplex PCR

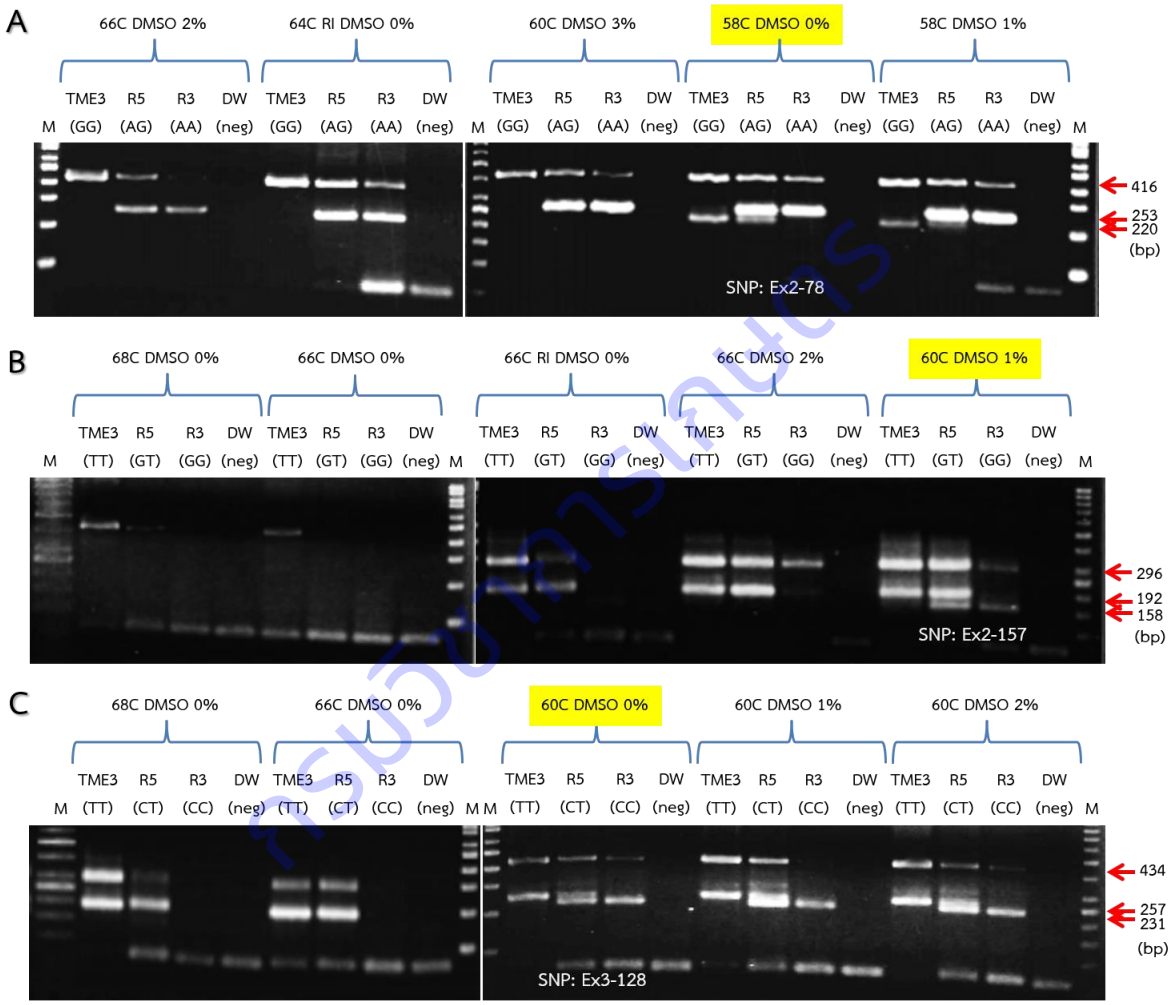


ภาพที่ 17 จีโนไทป์ของของพันธุ์มันสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSRY28 และ NS169 แบบ Multiplex PCR

กรมวิชาการเกษตร

3. การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปโดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR

ดำเนินการพัฒนาไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับเทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR และศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (condition) เพื่อการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase* จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ซึ่งเทคนิคนี้มีต้นทุนค่าใช้จ่ายต่ำกว่าเทคนิค Pyrosequencing จึงเป็นการช่วยประหยัดงบประมาณผลการศึกษาพบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ตรงตามขนาดที่คาดหมายในแต่ละอัลลีล **(ตารางที่ 5 และภาพที่ 18)**



ภาพที่ 18 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-78 (A), Ex2-157 (B) และ Ex3-128 (C) โดยใช้เทคนิคTetra primer ARMS-PCR ในมันสำปะหลังพันธุ์ TME3 ระยอง 5 และระยอง 3 Tetra primer ARMS-PCR optimization for Ex2-78, Ex2-157 and Ex3-128 detection with different annealing temperatures and different DMSO amount. PCR products were separated by 2.5% agarose gel electrophoresis. The optimum PCR conditions were highlight in yellow.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR นั้น ณ 1 ตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลจะใช้ไพรเมอร์ จำนวน 4 เส้น ในการตรวจสอบ ประกอบด้วย Forward inner primer (FI) Reverse inner primer (RI) Forward outer primer (FO) และ Reverse outer primer (RO) **(ตารางที่ 5) จากภาพที่ 18A** พบว่า annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-78 ได้แก่ 58 องศาเซลเซียสขณะที่ annealing temperature 66, 64 หรือ 60 องศาเซลเซียสไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ตรงตามขนาดที่คาดหมายในแต่ละอัลลีลได้ครบซึ่งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-78 มีรายละเอียดส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ **ดังตารางที่ 9** โดยผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 3 แถบดังนี้ แถบดีเอ็นเอขนาด 416 bp เกิดจาก Forward outer primer (FO) และ Reverse outer primer (RO) แถบดีเอ็นเอขนาด 253 bp ที่แสดงสนิปอัลลีล A เกิดจาก Forward inner primer(FI) และ Reverse outer primer(RO) และแถบดีเอ็นเอขนาด 220 bp ที่แสดงสนิปอัลลีล G เกิดจากForward outer primer (FO) และ Reverse inner primer (RI) ซึ่งพันธุ์ต้านทานTME3 มีสนิปอัลลีล G แบบโฮโมไซกัส (GG) ณ ตำแหน่ง Ex2-78 สอดคล้องกับผลทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปโดยใช้เทคนิค Pyrosequencing **(ตารางที่ 6)** พันธุ์ระยอง 5 แสดงจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสคือ มีทั้งอัลลีล A และ G (AG) ขณะที่พันธุ์ระยอง 3 แสดงจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสของอัลลีล A (AA)

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-157 ได้แก่ annealing temperature ที่ 60 องศาเซลเซียส และมี Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% เป็นส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยพันธุ์ต้านทาน TME3 ปรากฏสนิปอัลลีล T แบบโฮโมไซกัส (TT) **(ภาพที่ 18B และตารางที่ 10)** สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล Ex3-128 นั้น annealing temperature ที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียสโดยไม่ต้องมี DMSO เป็นส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พันธุ์ต้านทาน TME3 ปรากฏสนิปอัลลีล T แบบโฮโมไซกัส (TT) **(ภาพที่ 18C และตารางที่ 11)** จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาพบ ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปตำแหน่ง Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ในมันสำปะหลังลูกผสม

ตารางที่ 9 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-78โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR

Component	Volume (µl)	Final concentration
10X *Taq* buffer with $(NH_4)_2SO_4$	2.0	1X
10 mM dNTP mix	0.4	0.2 mM for each
10 uM primer FI	0.4	0.2 µM
10 uM primer RI	0.4	0.2 µM
10 uM primer FO	0.4	0.2 µM
10 uM primer RO	0.4	0.2 µM
Taq DNA Polymerase (5 U/ul)	0.3	1.5 U
25 mM $MgCl_2$	1.2	1.5 mM
DNA (50 ng/ul)	2.0	100 ng
DW	12.5	
Total volume	**20.0**	
Thermal cycling condition	94°C 5 min >94°C 40 sec, 58°C 40 sec, 72°C 30 sec (35 cycles) > 72°C 5 min >4°C ∞	

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 10 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-157 โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR

Component	Volume (µl)	Final concentration
10X *Taq* buffer with $(NH_4)_2SO_4$	2.0	1X
10 mM dNTP mix	0.4	0.2 mM for each
10 uM primer FI	0.4	0.2 µM
10 uM primer RI	0.4	0.2 µM
10 uM primer FO	0.4	0.2 µM
10 uM primer RO	0.4	0.2 µM
Taq DNA Polymerase (5 U/ul)	0.3	1.5 U
25 mM $MgCl_2$	1.2	1.5 mM
DNA (50 ng/ul)	2.0	100 ng
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	0.2	1%
DW	12.3	
Total volume	**20.0**	
Thermal cycling condition	94°C 5 min >94°C 40 sec, 60°C 40 sec, 72°C 30 sec (35 cycles) > 72°C 5 min >4°C ∞	

ตารางที่ 11 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลEx3-128โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR

Component	Volume (µl)	Final concentration
10X *Taq* buffer with $(NH_4)_2SO_4$	2.0	1X
10 mM dNTP mix	0.4	0.2 mM for each
10 uM primer FI	0.4	0.2 µM
10 uM primer RI	0.4	0.2 µM
10 uM primer FO	0.4	0.2 µM
10 uM primer RO	0.4	0.2 µM
Taq DNA Polymerase (5 U/ul)	0.3	1.5 U
25 mM $MgCl_2$	1.2	1.5 mM
DNA (50 ng/ul)	2.0	100 ng
DW	12.5	
Total volume	**20.0**	
Thermal cycling condition	94°C 5 min >94°C 40 sec, 60°C 40 sec, 72°C 30 sec (35 cycles) > 72°C 5 min >4°C ∞	

กรมวิทยาศาสตร์

การคัดเลือกปี 2563 นำลูกผสมจำนวน 46 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้เบื้องต้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอีเอสที ชนิดสการ์ และชนิดเอสเอสอาร์มาทดสอบเพิ่มเติมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase* จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ เครื่องหมาย Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 พบลูกผสมสายพันธุ์ที่มีแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ครบทั้ง 9 เครื่องหมาย (RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R, EST-K, Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128) จำนวน 13 สายพันธุ์ ได้แก่ (1) CMR 60-36-5 (2) CMR 60-48-26 (3) CMR 60-48-69 (4) CMR 61-42-04 (5) CMR 61-42-06 (6) CMR 61-42-10 (7) CMR 61-42-44 (8) CMR 6 1- 97- 01 (9) CMR 6 1- 97- 04 (10) CMR 6 1- 97- 05 (11) CMR 6 1- 97- 08 (12) CMR 6 1- 97- 13 (13) CMR 62-60-21 **ดังตารางที่ 12** (แถบสีชมพู)

ตารางที่ 12 ผลการคัดเลือกลูกผสมCMR60, CMR61 และ CMR62 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563

ชื่อลูกผสม	เครื่องหมาย SCAR และ SSR				เครื่องหมาย EST		เครื่องหมาย SNP		
	RME1	NS158	SSRY28	NS169	EST-R	EST-K	Ex2-78	Ex2-157	Ex3-128
CMR 60-36-5	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 60-36-48	√	√	×	√	√	√	×	√	√
CMR 60-48-4	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 60-48-21	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 60-48-23	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 60-48-26	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 60-48-39	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 60-48-55	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 60-48-64	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 60-48-69	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 60-48-72	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 60-48-73	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 61-42-03	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 61-42-04	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 61-42-06	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 61-42-10	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 61-42-18	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 61-42-19	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 61-42-24	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 61-42-44	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 61-42-45	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 61-42-47	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 61-42-51	√	√	×	√	√	√	√	√	-
CMR 61-42-59	√	√	×	√	√	√	√	√	√

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 12 (ต่อ) ผลการคัดเลือกลูกผสม CMR 60, CMR 61 และ CMR 62 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563

ชื่อลูกผสม	เครื่องหมาย SCAR และ SSR				เครื่องหมาย EST		เครื่องหมาย SNP		
	RME1	NS158	SSRY28	NS169	EST-R	EST-K	Ex2-78	Ex2-157	Ex3-128
CMR 61-42-60	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 61-97-01	√	√	√	√	√	√	√	√	√
CMR 61-97-02	√	√*	×	√	×	√	-	-	-
CMR 61-97-04	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 61-97-05	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 61-97-08	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 61-97-13	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 61-97-14	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 62-49-03	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 62-49-08	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 62-60-21	√	√*	√	√	√	√	√	√	√
CMR 62-60-28	√	√	×	√	√	√	√	√	√
CMR 62-133-10	√	√	√	√	√	√	×	×	×
CMR 62-157-22	√	×	×	√	√	√	×	×	×
CMR 62-157-29	√	×	×	√	√	√	√	×	√
CMR 62-157-31	√	√*	×	√	√	√	×	×	×
CMR 62-157-39	√	√*	×	√	√	√	×	×	×
CMR 62-157-62	√	√*	×	√	√	√	√	√	√
CMR 62-184-46	√	√*	×	√	√	√	×	×	×
OMR 62-24-18	√	√*	×	√	√	√	√	√	√
OMR 62-24-19	√	√*	×	√	√	√	√	√	√
OMR 62-24-40	√	√*	×	√	√	√	√	√	√

√ : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3

√* : แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 แต่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นปรากฏมาด้วย

X : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3

- : ไม่ได้ทำการทดสอบเนื่องจากดีเอ็นเอไม่เพียงพอ

สำหรับการคัดเลือกปี 2564 นำลูกผสมหรือพันธุ์ที่คัดเลือกเบื้องต้นด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอีเอสทีชนิดสการ์ และชนิดเอสเอสอาร์ พิจารณาประกอบกับข้อมูลลักษณะทรงต้นและลักษณะการเป็นโรคอื่นๆ จำนวน 25 สายพันธุ์/พันธุ์ มาทดสอบเพิ่มเติมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3 ตำแหน่ง พบสายพันธุ์/พันธุ์ที่มีแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ครบทั้ง 9 เครื่องหมาย จำนวน 3 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้แก่ (1) 920057จาก IITA (2) 980505 จาก IITA(3) SA1 (CMR 64-180-01) **ดังตารางที่ 13** (แถบสีชมพู) พันธุ์ต้านทาน 972205 และ 980581 จาก IITA แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ RME1, EST-R, EST-K, Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ซึ่งเครื่องหมาย RME1 อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมาย NS158, SSRY28 และ NS169 (Carmo *et al*., 2015)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 13 ผลการคัดเลือกลูกผสม CMR62, CMRE 62, CMR64 และพันธุ์จาก IITA โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ในปี 2564

ชื่อลูกผสม/พันธุ์	เครื่องหมาย SCAR และ SSR				เครื่องหมาย EST		เครื่องหมาย SNP		
	RME1	NS158	SSRY28	NS169	EST-R	EST-K	Ex2-78	Ex2-157	Ex3-128
CMR 62-06-03	√	√*	×	√	√	√	√	√	√
CMR 62-06-07	√	√*	×	√	√	√	√	√	√
CMR 62-06-16	√	×	√	×	√	√	√	√	√
CMR 62-26-01	√	×	√	×	×	√	√	√	√
CMR 62-26-07	√	×	√	×	×	√	√	√	√
CMR 62-26-09	√	×	√	×	√	√	√	√	√
CMR 62-26-19	√	√*	×	√	√	√	×	×	×
CMR 62-26-36	√	√*	×	√	√	√	×	×	×
CMR 62-29-09	√	×	√	×	√	√	√	√	√
CMRE 62-09-06	√	×	√	×	√	√	×	×	×
CMRE 62-24-45	√	√	×	√	√	√	×	×	×
CMRE 62-24-87	√	√	×	√	√	√	×	×	×
CMRE 62-24-104	√	√	×	√	√	√	×	×	×
OMRE 62-03-27	√	√*	√	×	√	√	×	×	×
OMRE 62-05-32	√	√	×	×	√	√	×	×	×
OMRE 62-05-34	√	√	×	√	√	√	×	×	×
OMRE 62-05-38	√	√	×	√	√	√	×	×	×
920057 (IITA)	√	√	√	√	√	√	√	√	√
972205 (IITA)	√	×	×	×	√	√	√	√	√
980505 (IITA)	√	√	√	√	√	√	√	√	√
980581 (IITA)	√	×	×	×	√	√	√	√	√
SA1 (CMR 64-180-01)	√	√	√	√	√	√	√	√	√
SA3 (CMR 64-180-03)	×	√*	×	√	√	√	√	√	√
SA4 (CMR 64-181-01)	√	×	√	×	√	√	√	√	√
SA5 (CMR 64-181-02)	√	×	√	×	√	√	√	√	√

√ : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3

√* : แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 แต่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นปรากฏมาด้วย

X : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3

กรมวิชาการเกษตร

โดยสรุปผลการคัดเลือกมันสำปะหลังลูกผสมและพันธุ์จาก IITA ในปี 2563 และปี 2564 โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล พบสายพันธุ์/พันธุ์ที่มีแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ครบทั้ง 9 เครื่องหมาย จำนวน 16 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้แก่ (1) CMR 60-36-5 (2) CMR 60-48-26 (3) CMR 60-48-69 (4) CMR 61-42-04 (5) CMR 61-42-06 (6) CMR 61-42-10 (7) CMR 61-42-44 (8) CMR 61-97-01 (9) CMR 61-97-04 (10) CMR 61-97-05 (11) CMR 61-97-08 (12) CMR 61-97-13 (13) CMR 62-60-21 (14) 920057 จาก IITA (15) 980505 จาก IITA (16) SA1 (CMR 64-180-01)

สำหรับสายพันธุ์ SA4 (CMR 64-181-01) และ SA5 (CMR 64-181-02) ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง CMR 37-18-201 x TME3 แม้ว่าแสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 จำนวน 7 เครื่องหมาย (ไม่ครบ 9 เครื่องหมาย) ได้แก่ RME1, SSRY28, EST-R, EST-K, Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 **ดังตารางที่ 13** ลูกผสม 2 สายพันธุ์นี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะแสดงฟีโนไทป์ต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังเนื่องจากสืบเชื้อสายมาจากพันธุ์ TME3 โดยตรง ซึ่งในพันธุ์ TME3 มีโลคัส *CMD2* ที่เป็นโลคัสหลักในการควบคุมลักษณะความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังและเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158, SSRY28, NS169 ที่ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มีความสัมพันธ์กับโลคัสดังกล่าวโดยมีตำแหน่งบนโครโมโซมห่างจากโลคัส *CMD2* เป็นระยะทาง 4 cM, 7 cM, 9 cM และ 16 cM ตามลำดับ (Carmo *et al*., 2015)

อภิปรายผล

มันสำปะหลังพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบด่าง ถึงแม้ว่าแสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 การทดสอบฟีโนไทป์ลักษณะความต้านทานโรคใบด่าง CMD กับเชื้อโรคจริงเป็นสิ่งจำเป็นและมีความสำคัญ เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ (RME1) และเอสเอสอาร์ (NS158, SSRY28, NS169) อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* แต่ไม่ได้อยู่บนยีน ทำให้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวแสดงถึงเพียงความเป็นไปได้ที่อาจมียีนต้านทานโรคอยู่ในพันธุ์นั้นๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องนำพันธุ์รวมถึงลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแล้วไปทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรค ก่อนการนำพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์และเผยแพร่แก่เกษตรกรต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 9 เครื่องหมาย ได้แก่ RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R, EST-K, Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างจากเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวนทั้งสิ้น 250 พันธุ์ ในปี 2561 – 2562 พบพันธุ์ candidate ที่แสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับพันธุ์ต้านทาน TME3 จำนวน 14 พันธุ์ ซึ่ง 2 ใน 14 พันธุ์นี้แสดงแถบดีเอ็นเอและมีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในทั้ง 9 เครื่องหมายโมเลกุลได้แก่ พันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

MMAL63 และ CMR23-149-59 พันธุ์ candidate เหล่านี้จะถูกนำไปทดสอบความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังกับเชื้อโรคจริง

2. ในปี 2563 และ 2564 ดำเนินการคัดเลือกมันสำปะหลังลูกผสมและพันธุ์ต้านทานจาก IITA จำนวนทั้งสิ้น 652 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล พบมันสำปะหลัง 16 สายพันธุ์/พันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอและมีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในทั้ง 9 เครื่องหมายโมเลกุล นอกจากนี้มีสายพันธุ์ promising ที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะแสดงฟีโนไทป์ต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังอีก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SA4 (CMR 64-181-01) และ SA5 (CMR 64-181-02) เนื่องจากเป็นลูกผสมระหว่าง CMR 37-18-201 x TME3 แม้ว่าทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 จำนวน 7 เครื่องหมาย (ไม่ครบ 9 เครื่องหมาย) ได้แก่ RME1, SSRY28, EST-R, EST-K, Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 แต่ลูกผสม 2 สายพันธุ์นี้สืบเชื้อสายมาจากพันธุ์ TME3 โดยตรง ซึ่งในพันธุ์ TME3 มีโลคัส *CMD2* ที่เป็นโลคัสหลักในการควบคุมลักษณะความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังและเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158, SSRY28, NS169 ที่ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มีความสัมพันธ์กับโลคัสดังกล่าว

3. มันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ หรือลูกผสมที่คัดเลือกได้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ ถึงแม้ว่าแสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 การทดสอบฟีโนไทป์ลักษณะความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังกับเชื้อโรคจริงเป็นสิ่งจำเป็นและมีความสำคัญ เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์และเอสเอสอาร์อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* แต่ไม่ได้อยู่บนยีน ทำให้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวแสดงถึงเพียงความเป็นไปได้ที่อาจมียีนต้านทานโรคอยู่ในพันธุ์นั้นๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องนำพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแล้วไปทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรค หากตรวจสอบพบว่าพันธุ์ที่คัดเลือกได้แสดงฟีโนไทป์ต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง ก็จะสามารถแก้ปัญหาการระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังและลดการสูญเสียผลผลิตรวมถึงรายได้ของเกษตรกร

4. ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคต่างๆ 3 เทคนิค ได้แก่ (1) การสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังที่รวดเร็วประหยัด และปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายโดยใช้วิธี SDS/NaCl+PVP (2) การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังแบบไพรเมอร์หลายคู่ในหนึ่งปฏิกิริยา (multiplex PCR) และ (3) การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase* โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR เป็นการช่วยประหยัดงบประมาณ และลดระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบเพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 4

การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

Evaluation of cassava varieties for resistance root knot disease by molecular markers

มัลลิกา แก้ววิเศษ บุญเรือนรัตน์ เพียรงาน สุภาวดี ง้อเหรียญ วิภาวี ชั้นโรจน์ สุวลักษณ์ อะมะวัลย์
Mallika Kaewwises Boonruanrat Pearngan Suphawadee Ngorian Vipavee Chonroj Suwaluk Amawan

คำสำคัญ (Key words)

มันสำปะหลัง (cassava), เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker), รากปม (root knot), ไส้เดือน (nematode)

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

โรครากปมของมันสำปะหลังเกิดจากไส้เดือนฝอย สามารถทำลายรากมันสำปะหลังได้ตั้งแต่รากเริ่มงอกหลังปักท่อนพันธุ์ โดยไม่แสดงอาหารผิดปกติใดๆ บนส่วนเหนือดิน ในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจะทำให้การปรับปรุงพันธุ์เป็นไปได้อย่างรวดเร็ว สามารถคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะตามต้องการตั้งแต่ต้นเล็กๆ โดยไม่จำเป็นต้องทดสอบความต้านทานโรครากปม ได้ทำการหาเครื่องหมายโมเลกุล 3 แบบ โดยการหาเครื่องหมายโมเลกุลจากฐานข้อมูล จากรายงานที่ใช้คัดเลือกโรครากปมจากหัวบีท มันฝรั่ง ถั่วอัลมอนด์ และไพรเมอร์ SSR ทดสอบ PCR ในพันธุ์มันสำปะหลัง 14 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ที่ต้านทานโรครากปมคือ R 1, R 7, R86-13, R 60, R 72 และ KU 50 และพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปมคือ R 2, R 3, R 5, R 9, R 11, R 90, HB 60 และ HB 80 พบว่ามีไพรเมอร์ 4 คู่ คือ N 146 N 195 NEM06 และ SSR 4 ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในพันธุ์มันสำปะหลัง แต่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างมันสำปะหลังที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรครากปมได้ วิธีที่สองคือ การหาเครื่องหมายโมเลกุลโดยการออกแบบ ILP (Intron Length Polymorphism) ได้ออกแบบยีน 4 ยีน คือ ยีน Polygalacturonase, ยีน Pectinesterase/ Pectinesterase Inhibitor, ยีน Beta-Glucosidase และ ยีน Endoglucanase 31 คู่ไพรเมอร์ เมื่อนำไปทำ PCR กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของมันสำปะหลังมี 6 คู่ คือ BGL2, BGL4, BGL7, GUN4, GUN5, PGLR7 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์คู่ต่างๆ พบว่า พันธุ์ที่ต้านทานทานโรครากปมและสามารถเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้คือ R 1, R 7, R 13, R 60, R 72 และ KU 50 ทำการทดสอบพันธุ์ลูกผสมจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยเก็บตัวอย่างลูกผสม 2 สายพันธุ์ที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ต้านทานโรครากปมคือ พันธุ์ลูกผสม CMR 62-11 พันธุ์แม่คือ CMR 32-94-12 และพันธุ์พ่อคือ KU 50 ที่ต้านทานโรครากปม และพันธุ์ลูกผสม CMR 62-79 พันธุ์แม่คือ CMR 50-70-76 และพันธุ์พ่อคือ R 7 ที่ต้านทานโรครากปม ทำการทดสอบ PCR จากลูกผสมที่เก็บตัวอย่างมากับไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ พบว่า ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของลูกผสมแต่ละต้นได้อย่างชัดเจนคือ BGL7 และ GUN5 แต่ผลที่ได้ยังไม่สอดคล้องกับดัชนีรากปม

และความต้านทานและอ่อนแอของโรครากปมที่มีรายงาน จึงได้หาเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังทั้ง 71 พันธุ์เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เทคนิค Genotyping by sequencing (GBS) และทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางเทคโนโลยีชีวสารสนเทศเพื่อหา SNP โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทาง Phenotype ของดัชนีรากปม ความต้านทานและความอ่อนแอต่อโรครากปม และทำ dendrogram เพื่อดูความสัมพันธ์ของพันธุ์มันสำปะหลัง 71 พันธุ์ และออกแบบไพรเมอร์แบบ tetra primer จำนวน 6 ชุด สำหรับใช้ตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลัง พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล 2 ชุด สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานได้ โดยแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานโรคและอ่อนแอต่อโรคได้จากแถบดีเอ็นเอที่มีจำนวนแตกต่างกัน ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยเก็บใบมันสำปะหลังลูกผสมที่มีต้นพ่อหรือต้นแม่เป็นพันธุ์ R 11 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ จำนวนลูกผสมทั้งหมด 17 สายพันธุ์ พบว่า มีลูกผสมบางต้นที่แสดงลักษณะต้านทานโรครากปม จึงสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNPs ไปใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานโรครากปมต่อไปได้

Abstract

Cassava root knot disease is caused by nematodes. Cassava roots can be destroyed when the roots begin to germinate after planting the cassava root. The symptom is not showed any abnormal on the above ground. Breeding using molecular markers will be fast and can select hybrid cassavas with the desired characteristics from small seeding without testing for root knot resistance. Three molecular markers were studied. The first was using molecular markers from the root knot resistant database in beet, potato, almond and SSR primers. PCR method was performed on 14 cassava cultivars, including cultivars resistant to root knot disease, namely R 1, R 7, R 86-13, R 60, R 72 and KU 50, and the cultivars susceptible to root knot disease, namely R 2, R 3, R 5, R 9, R 11, R 90, HB 60, HB 80. The results of four pairs of primers, namely N 146, N 195, NEM 06 and SSR 4, showed that DNA bandings were different in cassava varieties. However, they were not separate between resistant and susceptible of root knot disease in cassave. The second was using molecular markers by ILP (Intron Length Polymorphism). Thirty-one primer pairs were designed from four genes, namely the Polygalacturonase, Pectinesterase/Pectinesterase Inhibitor gene, Beta-Glucosidase gene, and Endoglucanase genes. PCR method was performed on 71 cultivars of cassava. The results showed that there were 6 primers, namely BGL 2, BGL 4, BGL 7, GUN 4, GUN 5, PGLR 7 that showed different bands of the cultivars resistant to root knot disease namely, R 1, R 7, R 13, R 60, R 72 and KU 50. The sample of 2 hybrids of cassava whose father or mother was resistant to root knot disease were collected from Rayong Field Crops Research Center. There were CMR 62-11 hybrid, mother was CMR 32-94-12, father was KU 50 that resistant to root knot,

กรมวิทยาศาสตร

and CMR 62-79 hybrid, mother was CMR 50-70-76 and father was R7 that resistant to root knot. PCR method was performed on hybrids by using six primers. The results showed that that the primers that clearly differentiated from each hybrid were BGL 7 and GUN 5, but the results were inconsistent with the root knot index and root knot resistance from previous report. The third was using molecular markers by SNPs. DNA samples of all 71 cassava cultivars were sent for genotyping by sequencing (GBS) sequencing. Moreover, bioinformatics data analysis was performed to determine SNPs using phenotype correlation of the root-knot index, resistance and susceptibility to root knot disease. A dendrogram was performed to examine the association of 71 cassava cultivars and six tetra primers were designed to determine the location of SNPs of genes related to resistance traits. The results showed that two sets of molecular markers could be used to select resistant cassava cultivars. They can use for distinguishing between disease resistant and susceptible cassava cultivars from different DNA bands. Further testing was performed by collecting cassava leaves from 17 hybrid cassava cultivars with either parent plant as the susceptible of root knot disease, R 11. The results showed that some hybrids showed resistance to root knot disease. Therefore, molecular markers of SNPs could be used for further selection and breeding of cassava cultivars resistant to root knot disease.

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรครากปมของมันสำปะหลังที่เกิดจากไส้เดือนฝอย Meloidogyne spp. จากการศึกษาทางชีวโมเลกุล พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปมในเขตร้อนชื้น (*Meloidogyne incognita*, *M. javanica* และ *M. arenaria*) (สญชัยและบัญชา, 2557) พบในประเทศต่างๆที่ปลูกมันสำปะหลัง เช่น บราซิล เวเนซุเอลา สหรัฐอเมริกา โมซัมบิก ยูกันดา มาลาวี ไนจีเรีย และไนเจอร์ (Coyne, 1994) ในประเทศไทยมีรายงานโรคนี้เมื่อปีพ.ศ. 2521 (สืบศักดิ์และคณะ, 2521) จากการสำรวจและประเมินความเสียหายในปีพ.ศ. 2554 ที่ อ.บำเหน็จณรงค์ จ.ชัยภูมิ พบว่าไส้เดือนฝอยเข้าทำลายมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 70% (อุดมศักดิ์และบัญชา,2555) โดยตัวอ่อนระยะเข้าทำลายแพร่กระจายในดินปลูก สามารถเข้าทำลายรากมันสำปะหลังได้ตั้งแต่รากเริ่มงอกหลังปักท่อนพันธุ์ ไส้เดือนฝอยเคลื่อนตัวตามความชื้นในดินเข้าเจาะไชบริเวณปลายรากและเคลื่อนที่สู่ท่อน้ำท่ออาหารของราก จากนั้นเริ่มดูดกินน้ำเลี้ยงของพืชและเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ตัวเมียสามารถสร้างไข่เป็นกลุ่มๆ ละ 200 - 300 ฟองต่อตัวเมีย 1 ตัว และฟักเป็นตัวอ่อนลงดินและกลับเข้าทำลายรากได้อย่างต่อเนื่อง ในเวลาเพียง 20 - 25 วัน มันสำปะหลังจะไม่ลงหัวหรือลงหัวไม่สมบูรณ์เมื่อถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย มันสำปะหลังที่เป็นโรครากปมนี้จะไม่แสดงอาหารผิดปกติใดๆบนส่วนเหนือดิน ที่จะทำให้ทราบว่ามันสำปะหลังถูกไส้เดือนฝอยทำลาย แต่ในกรณีที่ถูกไส้เดือนฝอยทำลายอย่างรุนแรงจะแสดงอาการเหี่ยวคล้ายอาหารขาดน้ำ (อุดมศักดิ์, 2555) ดังนั้นเกษตรกรจึงไม่ทราบว่าผลผลิตหัวมันสำปะหลังมีปริมาณและคุณภาพเป็นอย่างไร หลังจากที่ต้องใช้เวลาใน

กรมวิชาการเกษตร

การปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวนาน 10 - 12 เดือน นุชนารถ (2558) ได้ศึกษาพันธุ์มันสำปะหลังที่พันธุ์ต้านทานต่อรากปม คือ ระยอง 7, ระยอง 13, ระยอง 60, ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 ส่วนพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรครากปมคือ ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 90, ห้วยบง 60, ห้วยบง 80 และพิรุณ ในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาร่วมด้วยจะทำให้การปรับปรุงพันธุ์เป็นไปได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากสามารถคัดเลือกลูกผสมกลับที่คาดว่ามีจีโนไทป์ที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว ไม่ต้องรอให้แสดงลักษณะที่สนใจ เช่น ลักษณะต้านทานโรคก็ไม่จำเป็นต้องทดสอบความต้านทานโรคนั้น สามารถคัดเลือกตั้งแต่ต้นเล็กๆ ได้เลย (สุรินทร์, 2552)

ในต่างประเทศไม่มีการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลของโรครากปมในมันสำปะหลังโดยตรง แต่มีการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลในพืชชนิดอื่นๆ Jablonska *et al*. (2007) ได้ศึกษายีนที่ต้านทานไส้เดือนฝอยในมะเขือเทศ พบว่าคือ ยีน *Mi* Bakooie *et al*. (2015) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ในการคัดเลือกพันธุ์หัวบีท ให้ต้านทานไส้เดือนฝอย Draaistra (2006) ได้ศึกษายีนที่ต้านทานโรครากปมจากไส้เดือนฝอยในมันฝรั่ง พบว่ายีนที่ต้านทาน *M. chitwoodi* คือ Rmc1 การทำโมเลกุลเครื่องหมายมีหลายวิธีด้วยกัน เทคนิคหนึ่งที่เป็นที่รู้จักคือ (Amplified Fragment Length Polymorphism) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อยู่ระหว่าง RFLP และ RAPD ทำให้สามารถศึกษาชิ้นของดีเอ็นเอได้คราวละ 50-200 ชิ้น สามารถแยกความแตกต่างได้ 2 แบบ คือ 1) point mutation ในบริเวณ restriction site หรือใน selective nucleotide of primers 2) small insertion/deletion ภายในช่วงของ restriction fragment ผลคือได้แถบดีเอ็นเอขนาดต่างกัน (หทัยรัตน์, 2544) เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการสำรวจจีโนมพืชหรือสัตว์ที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อน เป็นวิธีการที่รวดเร็วในการค้นหายีนหรือ DNA marker ที่อยู่ติดกับลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ ช่วยให้การสร้าง satured linkage map ประสบผลในระยะเวลาสั้น ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสของการได้ marker ที่ link กับลักษณะสำคัญและยังสามารถวิเคราะห์ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต (วิภา, 2544) ดังนั้น การนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ต้านทานโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลัง จะทำให้ทราบว่ามันสำปะหลังพันธุ์ใดที่ต้านทานโรครากปม ซึ่งการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลนี้มีความสะดวก รวดเร็วและแม่นยำ ช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้น้อยกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบเดิม (conventional breeding) ได้

กรมวิชาการเกษตร

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานโรครากปมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ขอบเขตการวิจัย

การคัดเลือกและปรับปรุงมันสำปะหลังให้ต้านทานโรครากปม โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ เทคนิค ILP และ Genotyping by Sequencing (GBS) ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับลักษณะต้านทานโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอย สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรครากปมได้ จะทำให้ทราบว่ามันสำปะหลังพันธุ์ใดที่ต้านทานโรครากปม ซึ่งการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลนี้มีความสะดวก รวดเร็วและแม่นยำ ช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้น้อยกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบเดิม (conventional breeding)

ระเบียบวิธีการวิจัย

<u>ประเด็นวิจัย :</u> โรครากปมของมันสำปะหลังที่เกิดจากไส้เดือนฝอย Meloidogyne spp. เป็นปัญหาสำคัญหากพบการระบาดจะทำให้ผลผลิตมันสำปะหลังลดลงได้มากถึง 70% โดยตัวอ่อนระยะเข้าทำลายจะแพร่กระจายในดินปลูก สามารถเข้าทำลายรากมันสำปะหลังได้ตั้งแต่รากเริ่มงอกหลังปักท่อนพันธุ์ มันสำปะหลังจะไม่ลงหัวหรือลงหัวไม่สมบูรณ์ ซึ่งมันสำปะหลังที่เป็นโรคนี้จะไม่แสดงอาหารผิดปกติใดๆ บนส่วนเหนือดิน แต่ในกรณีที่ถูกไส้เดือนฝอยทำลายอย่างรุนแรงจะแสดงอาการเหี่ยวคล้ายอาหารขาดน้ำ ดังนั้น การวิจัยพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ต้านทานโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอย มาใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลัง จะทำให้ทราบว่ามันสำปะหลังพันธุ์ใดที่ต้านทานโรครากปม ซึ่งการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลนี้มีความสะดวกรวดเร็วและแม่นยำ ช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้น้อยกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบเดิม

<u>สถานที่ทดลอง :</u> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี

<u>ระยะเวลาดำเนินงาน :</u> ตุลาคม 2560 - กันยายน 2564

<u>วิธีการดำเนินงาน</u>

การสกัดดีเอ็นเอมันสำปะหลัง

ทำการสกัดดีเอ็นเอมันสำปะหลัง โดยเก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลัง จำนวน 2 - 3 ใบต่อต้น แล้วสกัดดีเอ็นเอได้ 2 วิธีคือ

1. การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ® ซึ่งขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอทำตามคู่มือของชุดสกัด

2. การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB มีขั้นตอนการทำดังนี้

2.1 ตัดใบมันสำปะหลัง 2 กรัม ใส่ลงในโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้แห้งเป็นผงแป้ง

2.2 นำใบมันสำปะหลังที่บดแล้ว ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม extraction buffer (บ่มอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ส่วนผสมเข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าทุกๆ 20 นาที

2.3 เติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (1 เท่าของข้อ 2) ผสมให้เข้ากัน โดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ หรือใช้เครื่อง shaker เบาๆ นาน 10 นาที

2.4 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 12000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.5 เติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ นาน 10 นาที

2.6 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 12000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.7 ตกตะกอนด้วย isopropanol 0.6 เท่า ของสารละลายดีเอ็นเอ

กรมวิชาการเกษตร

2.8 เติม isopropanol 0.6 เท่า ของสารละลายดีเอ็นเอ และ 3M NaOAC 0.1 เท่า ของสารละลายดีเอ็นเอ ผสมโดยการเอียงหลอดคว่ำลงช้าๆ (inverted) นำไปแช่ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ระยะนี้จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอเป็นเส้นใยสีขาวใส

2.9 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีอ็นเอ เทน้ำใสทิ้ง

2.10 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 750 ไมโครลิตร (2 ครั้ง) โดยเขย่าเบาๆ 2-3 นาที นำไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นาน 5 นาที เทน้ำใสทิ้ง

2.11 ละลายดีเอ็นเอที่แห้งแล้วด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.12 เก็บ Original DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การหาเครื่องหมายโมเลกุลจากฐานข้อมูล

1. เตรียมพันธ์มันสำปะหลังที่จะใช้ในการทดลอง จำนวน 14 พันธุ์ ได้แก่ พันธ์ที่ต้านทานโรคราก่ปมคือ ระยอง 1, ระยอง 7, ระยอง 86-13, ระยอง 60, ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 และพันธุ์อ่อนแอต่อโรคราก่ปมคือ ระยอง 2, ระยอง 3, ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 90, ห้วยบง 60 และ ห้วยบง 80
2. รวบรวมและสังเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลที่ต้านทานโรคราก่ปมในพืชอื่นๆ ได้แก่ หัวบีท (sugar beat) 3 คู่ มันฝรั่ง 15 คู่ ถั่วอัลมอลต์ 5 คู่ และไพร์เมอร์ SSR 3 คู่ รวมจำนวน 26 คู่ **(ตารางที่ 1)**

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งที่มาของไพรเมอร์จากหัวบีท (sugar beat) มันฝรั่ง ถั่วอัลมอลต์ และไพรเมอร์ SSR จำนวน 26 คู่ไพรเมอร์

แหล่งที่มา	ชื่อ Marker	ชื่อ primer	ลำดับเบส
หัวบีท	Nem06	Nem06FWD	TGCCGAGCTGCTTGACGGGTTGTC
		Nem06REV	GTTTCGCTCCTCAGAATTGCTGAAG
	nem06	nem06FWD1	TGACGGGTTGTCAATATGC
		nem06REV1	TCCATTTCCTGACCTACAATTATT
	NEM06	NEM06FWD2	AAAGAAAGGGAACTCAAATGTTAG
		NEM06REV2	TCAGAATTGCTGAAGGTCATT
มันฝรั่ง	N146	N146-17	AAGCTCTTGCCTAGTGCTC
		N146-22	AGGCGGAACATGCCATG
	N195	N195-09	TGGAAATGGCACCCACTA
		N195-06	CATCATGGTTTCACTTGTCAC
	Gro1-4	Gro1-4F	TCTTTGGAGATACTGATTCTCA
		Gro1-4R	CGACCTAAAATGAAAAGCATCT
	Gro1-4-1	Gro1-4-1F	AAGCCACAACTCTACTGGAG
		Gro1-4-1R	GATATAGTACGTAATCATGCC
	Gpa2-1	Gpa2-1F	TTTAGCACGGAATGTGGGGA
		Gpa2-1R	GTTTCCCCATCAAAACTCAC
	Gpa2-2	Gpa2-2F	GCACTTAGAGACTCATTCCA
		Gpa2-2R	ACAGATTGTTGGCAGCGAAA
	TG432	TG432-F	GGACAGTCATCAGATTGTGG
		TG432-R	GTACTCCTGCTTGAGCCATT

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 1(ต่อ) แสดงแหล่งที่มาของไพรเมอร์จากหัวบีท (sugar beat) มันฝรั่ง ถั่วอัลมอลต์ และไพรเมอร์ SSR จำนวน 26 คู่ไพรเมอร์

แหล่งที่มา	ชื่อ Marker	ชื่อ primer	ลำดับเบส
มันฝรั่ง	C237	C237- F	GCAGTCCTAATTGCACGTAACA
		C237- R	CTTACTTGGGCAACCCAGAAT
	HC	HC-F	ACACCACCTGTTTGATAAAAAACT
		HC-R	GCCTTACTTCCCTGCTGAAG
	GBSS1-3	GBSS1-3F	AAAGGAGGCTCAAGCAG
		GBSS1-3R	TGCAAGAGCTCTAGCAACTG
	Plgms8	Plgms8F	AAACAGCCAGATCCGGAGTA
		Plgms8R	TATAAGTCCGCCATCGCTTG
	Plgms9	Plgms9F	GGTGGGAGAATTCGACTATCA
		Plgms9R	CAACCCAATACCACGTACCC
	Plgms19	Plgms19F	CGGGGTTCAAACTCAACAAG
		Plgms19R	AGACGTGCTGCTTTGTTCAC
	STS-OPS14a	STS-OPS14aF	TTACGTGAAACAGGGAAATGAA
		STS-OPS14aR	GCCTTAGTACAGCTCCGCCC
	STS-834b	STS-834bF	GCAGTCAAAAATTTCAAACC
		STS-834bR	TCCGATTCGAGCCCACTACA
ถั่วอัลมอนต์	19319	19319F	GCATGAGGTTGTTGGTGTTG
		19319R	TGGCTAAATTCCGCACTACC
	39E18	39E18F	ATCGGATTGCCACGTTATGT
		39E18R	CCGAAAGAATTGGCTCACTC
	524K16	524K16F	CGAGAAGTCAAAATCCTTTGG
		524K16R	TGAGAACAACAACCCAAAATCA
	56F6	56F6F	TGCATCTAGACACAATGGTTCA
		56F6R	CCATCTTGTAACCATGCCAAT
	406L19	406L19F	AATCAGACGGGCTTTGTACG
		406L19F	GCTTTGAAAAATCATGCTTGG
ไพรเมอร์SSR	SSRY4	SSRY4F	ATAGAGCAGAAGTGCAGGCG
		SSRY4R	CTAACGCACACGACTACGGA
	SSRY9	SSRY9F	ACAATTCATCATGAGTCATCAACT
		SSRY9R	CCGTTATTGTTCCTGGTCCT
	SSRY155	SSRY155F	CGTTGATAAAGTGGAAAGAGCA
		SSRY155R	ACTCCACTCCCGATGCTCGC

3. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบมันสำปะหลังจากพันธ์ที่เตรียมไว้ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ®

4. ทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลกับมันสำปะหลังที่ต้านทานโรครากปมคือ ระยอง 1, ระยอง 7, ระยอง 13, ระยอง 60, ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 และพันธ์อ่อนแอต่อโรครากปมคือ ระยอง 2, ระยอง3, ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 90, ห้วยบง 60 และ ห้วยบง 80 โดยการทำ PCR เพื่อดูแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปม ใช้ปริมาตร 20 µl ในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย

กรมวิทยาศาสตร์

DNA (~50 ng)	1 µl
10 X Dream Taq buffer	2 µl
forward primer (10 ρM)	1 µl
reverse primer (10 ρM)	1 µl
Dream Taq DNA Polymerease	0.50 µl
Water	14.50 µl

การเพิ่มปริมาณ จะถูกทำใน thermal cycle PCR ดังนี้

มีรอบการทำ PCR คือ 95°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95°C 30 วินาที 55°C 30 วินาที 72°C 60 วินาที จำนวน 35 รอบ และ 72°C นาน 5 นาที

5. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับความอ่อนแอและต้านทานต่อโรครากปมจากแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง

การหาเครื่องหมายโมเลกุลโดยการออกแบบ ILP (Intron Length Polymorphism)

1. ออกแบบไพร์เมอร์ แบบ ILP (Intron Length Polymorphism) โดยสืบค้นข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลังหรือพืชชนิดอื่น รวมทั้งสิ้น 4 ยีน คือ ยีน Polygalacturonase, ยีน Pectinesterase/Pectinesterase Inhibitor, ยีน Beta-Glucosidase และ ยีน Endoglucanase ทั้งหมด 31 คู่ไพรเมอร์ลผลิตพีซีอาร์มีขนาดอยู่ในช่วง 145 - 403 bp โดยมีค่าเฉลี่ย 225 bp **(ตารางที่ 2)**

ตารางที่ 2 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปมจำนวน 4 ยีน, ข้อมูล EST จำนวน 6 EST และจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 31 คู่ไพรเมอร์

Gene	EST	Chromosome	Contig	Marker	Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	Expected size
Polygalacturonase	XM_021779030.1	14	LTYI01023726.1	PGLR1	PGLR1F	GCAATGCAATCATCTCCCG	304
					PGLR1R	TCCTGTTCAAGTCCCCAAC	
				PGLR2	PGLR2F	AGCAAGAATCGTCAGCCAT	146
					PGLR2R	CTCCTTCTTGGCACCTTCA	
				PGLR3	PGLR3F	TTATCCCACCAGGGAGCA	167
					PGLR3R	TCCTTGGAATGAACCTCACT	
				PGLR4	PGLR4F	AGAGGGCAAAGGATCGATTA	166
					PGLR4R	AGCCATTTCACCCTTTTTCT	
				PGLR5	PGLR5F	CTGCACACTTTTAGTTTCTGC	323
					PGLR5F	CAGTTCAAATGGCTTTGTGC	
	XM_021759956.1	1	LTYI01001831.1	PGLR6	PGLR6F	AAGCCTCATTTATGGCCGC	158
					PGLR6R	CAGTTGCTGCCTTGACCAT	
				PGLR7	PGLR7F	AATTCACCATTCTGGACAATCC	219
					PGLR7R	AGAGGAGCACGGATCGTAA	
				PGLR8	PGLR8F	TACGATCCGTGCTCCTCTT	403
					PGLR8F	TGTAACAGTCCTCGATGCAA	
Pectinesterase/ Pectinesterase Inhibitor	XM_021740830.1	16	LTYI01027939.1	PMEU1	PMEU1F	TGCTGCTTTGGCAGCTATC	176
					PMEU1R	CTGTTTCAGCATAAACTCCTGC	
				PMEU2	PMEU2F	AAATTTTGCAGATGGAGTTCAA	274
					PMEU2R	AATCCCATTGCTTTCGCCA	

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2(ต่อ) แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคราก้ปมจำนวน 4 ยีน, ข้อมูล EST จำนวน 6 EST และจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 31 คู่ไพรเมอร์

Gene	EST	Chromosome	Contig	Marker	Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	Expected size
Beta-Glucosidase	XM_021770881.1	10	LTYI01018044.1	BGL1	BGL1F	AGCCAAATTCCCACTCGAA	224
					BGL1R	CACTGAATGATAGCTTGAGGA	
				BGL2	BGL2F	ATTGCCATGGAGCTATTATCTT	190
					BGL2R	AGAGAAATTTCAACAATCCTCCA	
				BGL3	BGL3F	GCTCTCAGGGTAGTCTCCA	161
					BGL3R	GCAGGAAGGCTGCCTCTA	
				BGL4	BGL4F	TTTGGGCACCTTCCAGAAT	355
					BGL4R	TCTTTGTCATGCAACTGCTC	
				BGL5	BGL5F	CAAACTCTTCAAAGCAGAAGTC	170
					BGL5R	GCCCTTCAAGATGAATATGGTG	
				BGL6	BGL6F	TTGTGGAAGATCCCAATGGA	191
					BGL6R	AGGAGTGAACCAAGAAGGTG	
				BGL7	BGL7F	CACCTTCTTGGTTCACTCCT	289
					BGL7R	TGGTTTGAACTCCTTCAGATT	
				BGL8	BGL8F	TCTGAAGGAGTTCAAACCAAT	154
					BGL8R	CAGGTGATGTTGCTGAGGA	
				BGL9	BGL9F	TCCTCAGCAACATCACCTG	212
					BGL9R	AGCCAAGTATTTGGGATACCT	
				BGL10	BGL10F	GGCTTCCTGCCATCTGAAT	187
					BGL10R	AGGATTTTATATTTGGAGCAGCA	
Endoglucanase	XM_021773326.1	11	LTYI01019232.1	GUN1	GUN1F	TCCAAGTGTTGGTTATGCTGT	221
					GUN1R	TACCAACAACAGACACAGGT	
				GUN2	GUN2F	GGGCACCTGTGTCTGTTG	352
					GUN2R	CTCTTGTTGGCCTCTTCTCC	
				GUN3	GUN3F	CTGCAAATTGTTCCATTCTCG	152
					GUN3R	GAATGACGGCTACAACATTCA	
				GUN4	GUN4F	GTGGAAGTGTATGCGCCA	186
					GUN4R	TGCTGGTGTCCAAATCCTT	
				GUN5	GUN5F	CCCTGTACAACCATGCTGC	343
					GUN5R	GCCTTACAACTCTTCTTACTCC	
				GUN6	GUN6F	TTGCCCTGTACAACCATGC	145
					GUN6R	AGCACTTCTACACCTCCTCA	
				GUN7	GUN7F	ACGGAATCATCATAAAGCCCT	190
					GUN7R	GCCTTACAACTCTTCTTACTCC	
				GUN8	GUN8F	TGGTCCCCTGCATCATAGT	194
					GUN8R	CGAGGTGACTCTGGCCTTA	
	XM_021758257.1	5	LTYI01008938.1	GUN9	GUN9F	ACGCTGATGCTCTTAAAGTTG	214
					GUN9R	AGCCGAATTCCCTCTCCAA	
				GUN10	GUN10F	TGCTCATGCTGCGGAAAA	324
					GUN10R	CAGGCCTGTCCCAACAAC	
				GUN11	GUN11F	CAAACCATCAGATCTTCGGA	177
					GUN11R	TTTCAGAGCATTGTTGCCC	

กรมวิชาการเกษตร

2. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบมันสำปะหลังจากพันธ์ที่เตรียมไว้ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ®

3. ทำการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP โดยการนำมันสำปะหลัง 14 พันธุ์ ได้แก่ R 1, R 2, R 3, R 5, R 7, R 9, R 11, R 86-13, R 60, R 72, R 90, KU 50, HB 60 และ HB 80 วิเคราะห์เครื่องหมาย ILP โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 31 คู่ไพรเมอร์ ตรวจสอบผลเบื้องต้นด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 2% agarose gel electrophoresis แล้วนำมันสำปะหลังทั้ง 14 พันธุ์ ไปวิเคราะห์หาโพลีมอร์ฟิซึมใน 6% polyacrylamide gel electrophoresis ที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

4. ทำการเก็บตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่มีรายงานการทดสอบไส้เดือนฝอยที่ทำให้เกิดโรครากปมที่นุชนารถและคณะรายงานเมื่อปี 2558 โดยเก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง 71 พันธุ์ ดังนี้

ตารางที่ 3 พันธุ์มันสำปะหลัง ดัชนีการเกิดปมและระดับความต้านทานโรครากปมของมันสำปะหลัง

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์/สายพันธุ์	ดัชนีปม (ค่าเฉลี่ย)	ระดับความต้านทาน	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์/สายพันธุ์	ดัชนีปม (ค่าเฉลี่ย)	ระดับความต้านทาน
1	42-77-69	3.4	S	37	CMR37-18-63	2.9	S
2	ADIRA 4	2.6	S	38	HP7(CMC76)	1.0	R
3	CM125-22	2.6	S	39	MKUC28-71-66	0.9	R
4	CM3292-18	2.8	S	40	MKUC28-71-67	1.5	R
5	CM3299-15	3.2	S	41	OMR 26-07-15	2.6	S
6	CMR 25-38-157Q	3.2	S	42	OMR29-20-118	2.7	S
7	CM523-7	3.1	S	43	OMR34-29-66	3.1	S
8	CM 6125-117	2.9	S	44	CMR38-75-52	3.6	S
9	CMK23-27-30	3.9	S	45	OP705	1.8	R
10	CMR23-126-122	4.4	S	46	(RxV69)21-2Q	2.0	R
11	CMR25-104-42	4.0	S	47	SM1541-32	2.8	S
12	CM4049UJ	3.4	S	48	SM 937-8	2.8	S
13	CMR25-82-88	3.7	S	49	SRIRACHA1	1.5	R
14	CMR26-38-7	0.7	R	50	V22	1.1	R
15	CMR26-72-2	1.3	R	51	CMR 25-33-134Q	1.0	R
16	CMR28-05-13	3.3	S	52	CMR25-33-105	2.0	R
17	CMR28-67-76	3.1	S	53	(CMC76xR)21-18Q	2.0	R
18	CMR28-72-131	3.7	S	54	BATRANG	1.0	R
19	CMR29-56-101	3.3	S	55	CMR 23-07-10	2.0	R
20	CMR30-05-12	2.2	R	56	R1	2.1	R
21	CMR31-19-14	3.1	S	57	R2	3.2	S
22	CMR31-37-105	3.4	S	58	R3	3.2	S
23	CMR32-24-20	2.8	S	59	R5	4.2	S
24	CMR32-94-121	3.4	S	60	R7	2.4	R
25	CMR33-18-101	2.1	R	61	R9	3.2	S
26	CMR33-35-13	2.3	R	62	R11	4.0	S
27	CMR33-35-69	1.2	R	63	R13	2.0	R
28	CMR34-35-36	3.3	S	64	R60	1.8	R
29	CMR34-35-54	4.0	S	65	R72	1.0	R
30	CMR35-123-147	2.9	S	66	R90	3.1	S
31	CMR35-21-96	1.7	R	67	KU50	1.5	R
32	CMR35-26-369	2.6	S	68	HB60	2.7	S
33	CMR36-55-166	3.6	S	69	HB80	2.8	S
34	CMR36-71-27	2.0	R	70	พิรุณ 1	3.4	S
35	CMR37-18-201	3.9	S	71	CMR43-08-89	3.4	S
36	CMR37-18-30	2.7	S				

5. ทำการสกัดดีเอ็นเอใบมันสำปะหลังทั้ง 71 พันธุ์ แล้วทำการทดสอบกับไพร์เมอร์ที่คัดเลือกไว้ 15 คู่ไพรเมอร์

6. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับความอ่อนแอและต้านทานต่อโรครากปมจากแถบดีเอ็นเอของ agarose gel และดูแถบผลผลิตดีเอ็นเอจากเครื่อง QIAxcel

7. เก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังจากประชากรที่ได้จากคู่ผสมที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ต้านทานโรคราก ปมจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ได้แก่ พันธุ์ลูกผสม CMR 62-11 พันธุ์แม่คือ CMR 32-94-12 และพันธุ์พ่อคือ KU 50 ที่ต้านทานโรคราก ปม เก็บมา 46 ตัวอย่าง และพันธุ์ลูกผสม CMR 62-79 พันธุ์แม่คือ CMR 50-70-76 และพันธุ์พ่อคือ R7 ที่ต้านทานโรคราก ปม เก็บมา 259 ตัวอย่าง

8. ทำการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือกมันสำปะหลังที่ต้านทานโรคราก ปมโดยการทำ PCR จากเครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรคราก ปมที่คัดเลือกมาแล้ว

9. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรมันสำปะหลังลูกผสมกับเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือกลักษณะต้านทานโรคราก ปม

การหาเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP

1. สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างมันสำปะหลังทั้ง 71 สายพันธุ์ด้วยวิธี CTAB

2. ส่งตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังทั้ง 71 พันธุ์เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เทคนิค Genotyping by sequencing (GBS) เพื่อให้ได้ข้อมูลลำดับเบสในการที่จะวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ต้านทานต่อไป

3. ทำการวิเคราะห์หา SNP จากข้อมูลมันสำปะหลัง 71 สายพันธุ์

4. ออกแบบ primer เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล แบบ tetra primer จำนวน 6 ชุด โดยโดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทาง Phenotype ของดัชนีรากปม ความต้านทานและความอ่อนแอต่อโรคราก ปมของพันธุ์มันสำปะหลัง 71 พันธุ์

ตารางที่ 4 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคราก ปมแบบ tetra primer จำนวน 4 ยีน, ข้อมูล EST จำนวน 6 EST และจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 31 คู่ไพรเมอร์

ลำดับ	ชื่อ primer	ลำดับเบส	จำนวนเบส
ชุดที่ 1 Me02005300154	2-154-1F	GAGCAAGCCGAGCCGATGTTC	21
	2-154-2R	CAACTGCTGCACCACCGCACTA	22
	2-154-3F	TGCCGATGCTGGTCATGCTACTACT	25
	2-154-4R	TGCAAAACAGGGACCAAATGAACCT	25
Product size for C allele: 188 Product size for T allele: 276 Product size of two outer primers: 421			
ชุดที่ 2 Me02005300193	2-193-1F	CAGTTGCTTGAGTTTGCAGTTGGC	24
	2-193-2R	GTGCTGAAGTCTGACCTCTCCAAAGAA	27
	2-193-3F	TCGTCATTGTGTCTGCTTCCAGATCT	26
	2-193-4R	GCAAAACAGGGACCAAATGAACCTC	25
Product size for C allele: 151 Product size for T allele: 222 Product size of two outer primers: 322			

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4(ต่อ) แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปมแบบ tetra primer จำนวน 4 ยีน, ข้อมูล EST จำนวน 6 EST และจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 31 คู่ไพรเมอร์

ลำดับ	ชื่อ primer	ลำดับเบส	จำนวนเบส
ชุดที่ 3 Me02005300263	2-263-1F	GGTTTGTGCTGCTTGTAAAGTTAGGC	26
	2-263-2R	AAAATTGAAGCTCTGGATTCACTTCATAAA	30
	2-263-3F	CGTCATTGTGTCTGCTTCCAGATCT	25
	2-263-4R	TTTATCCTCGCACGTACAGCATTTC	25
Product size for C allele: 208 Product size for T allele: 294 Product size of two outer primers: 446			
ชุดที่ 4 Me02005300311	2-311-1F	TCAATTTTCTGAGGTTCATTTGGTACT	27
	2-311-2R	AATCTAACACAATCAGGTATGCAAAAAAG	29
	2-311-3F	ATTTTGATTTAATTTTGATGGGGGA	25
	2-311-4R	AGGGACAGGGACAAATAAACCTAAA	25
Product size for T allele: 187 Product size for C allele: 248 Product size of two outer primers: 379			
ชุดที่ 5 Me14011932275	14-275-1F	CCTTTTACCTATACTGCATCGTTTTACGA	29
	14-275-2R	GAGAATAAAGGTTTTTATACGTGTGCGC	28
	14-275-3F	CAACTCCCTTCCATGAATGTAGGAA	25
	14-275-4R	TTTTTGAAGAATGAAGAAGGCGGTA	25
Product size for A allele: 173 Product size for G allele: 259 Product size of two outer primers: 375			
ชุดที่ 6 Me14011945690	14-690-1F	GATATCAAAAGAAGGATTTATGAATTCC	28
	14-690-2R	AGAGAACTGCCAACATAGCCA	21
	14-690-3F	CATGGATATTGTCAGTTGAGCTTTAT	26
	14-690-4R	CTGCTTCTCAAAAATTAAAAGGAAA	25
Product size for C allele: 161 Product size for T allele: 236 Product size of two outer primers: 348			

8. ทำการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือกมันสำปะหลังที่ต้านทานโรครากปมโดยการทำ PCR จากเครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรครากปมที่คัดเลือกมาแล้ว

9. นำเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ได้ ไปทดสอบในมันสำปะหลังลูกผสม

10. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรมันสำปะหลังลูกผสมกับเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือกลักษณะต้านทานโรครากปม

กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิจัยและอภิปราย

การสกัดดีเอ็นเอมันสำปะหลัง

การสกัดดีเอ็นเอมันสำปะหลังในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการสกัด 2 วิธี โดยการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ® ซึ่งมีข้อดีคือสะดวก รวดเร็ว แต่ปริมาณที่ได้แต่ละครั้งจะมีปริมาณน้อย เนื่องจากดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองต้องใช้เป็นจำนวนมาก จึงได้เปลี่ยนวิธีการสกัดดีเอ็นเอเป็นวิธี CTAB ซึ่งจะใช้เวลามากกว่าวิธีใช้ชุดสกัด แต่สามารถสกัดได้ดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ในการทดสอบทำ PCR ได้หลายครั้ง

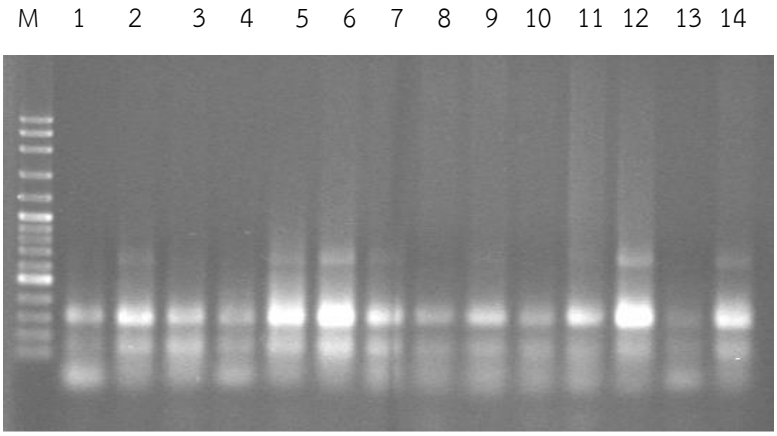
ตัวอย่างมันสำปะหลัง ในปีแรกได้นำท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 14 พันธุ์ มาปลูกในกระถางเพื่อใช้ในการทดลอง ได้แก่ พันธ์ที่ต้านทานโรคราก็ปมคือ ระยอง 1, ระยอง 7, ระยอง 13, ระยอง 60, ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 และพันธ์อ่อนแอต่อโรคราก็ปมคือ ระยอง 2, ระยอง3, ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 90, ห้วยบง 60 และ ห้วยบง 80 ส่วนในปีต่อไปได้ไปเก็บตัวอย่างจากแปลงรวบรวมพันธุ์มันสำปะหลังที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง เนื่องจากต้องใช้มันสำปะหลังจำนวนหลายพันธุ์

การหาเครื่องหมายโมเลกุลจากฐานข้อมูล

รวบรวมและสังเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลที่ต้านทานโรคราก็ปมในพืชอื่นๆ ได้แก่ หัวบีท (sugar beat) 3 คู่ มันฝรั่ง 15 คู่ ถั่วอัลมอลต์ 5 คู่ และไพรเมอร์ SSR 3 คู่ รวมจำนวน 26 คู่ และทำการทดสอบทำ PCR กับมันสำปะหลัง 14 สายพันธุ์ พบว่า มีบางคู่ไพรเมอร์ที่มีแนวโน้มว่าสามารถใช้จำแนกพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์อ่อนแอต่อโรคราก็ปมได้ เช่น คู่ไพร์เมอร์ 146 แถบดีเอนเอที่ประมาณ 700 bp จะพบในมันสำปะหลังบางพันธุ์เท่านั้น ไพรเมอร์ N 195 พบว่า ไม่ปรากฏแถบดีเอนเอของมันสำปะหลังบางพันธุ์ ไพรเมอร์ NEM06 พบแถบดีเอนเอด้านบนเฉพาะบางพันธุ์ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ และไพรเมอร์ SSR4 พบแถบด้านบนในพันธุ์อ่อนแอ

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแถบที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์อ่อนแอ ในเบื้องต้นพบว่าเมื่อใช้ไพร์เมอร์ NEM06 จะปรากฏแถบบนสุดในมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 5 กับห้วยบง 60 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอจึงอาจจะใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลจำแนกพันธุ์อ่อนแอต่อโรคราก็ปมได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพที่ 1 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 146 กับมันสำปะหลัง 14 พันธุ์ M=marker 100 bp

1= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 1 2= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 2

3= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 3 4= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5

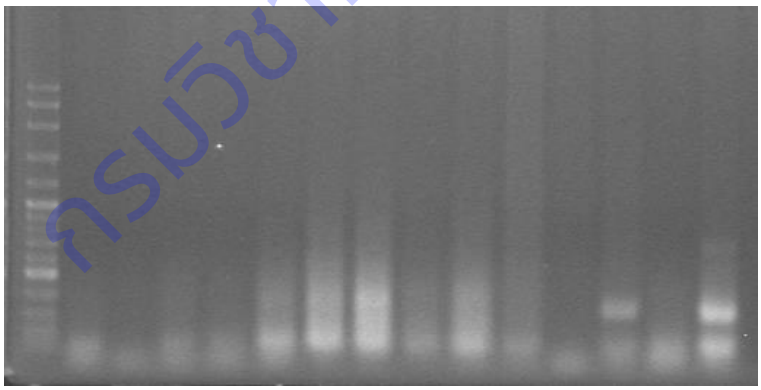
5= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 7 6= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9

7= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 8= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 60

9= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 10= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 90

11= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 1 12= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60

13= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 14= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 13



ภาพที่ 2 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 195 กับมันสำปะหลัง 14 พันธุ์ M=marker 100 bp

1= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 1 2= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 2

3= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 3 4= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5

5= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 7 6= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9

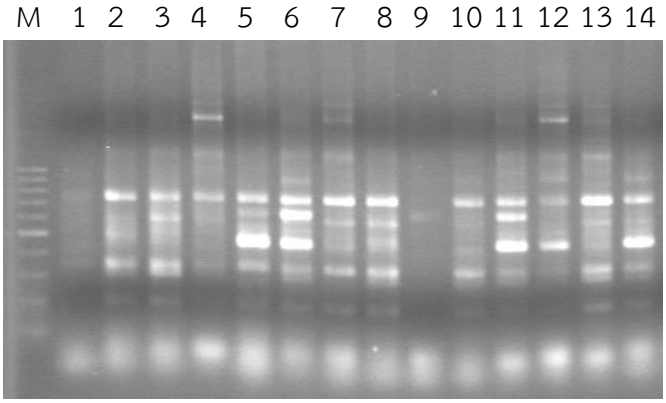
7= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 8= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 60

9= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 10= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 90

11= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 1 12= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60

13= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 14= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 13

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NEM06 กับมันสำปะหลัง 14 พันธุ์ M=marker 100 bp

1= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 1 2= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 2

3= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 3 4= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5

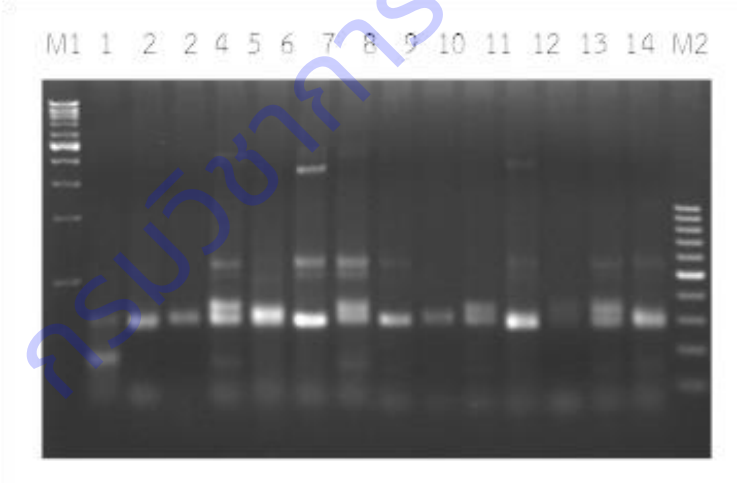
5= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 7 6= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9

7= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 8= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 60

9= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 10= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 90

11= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 1 12= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60

13= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 14= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 13



ภาพที่ 4 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SSRY4 กับมันสำปะหลัง 14 พันธุ์ M1 =marker 1 kb M2 = marker 100 bp

1= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 1 2= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 2

3= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 3 4= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5

5= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 7 6= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9

7= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 8= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 60

9= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 10= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 90

11= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 1 12= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60

13= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 14= ผลผลิต PCR ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 13

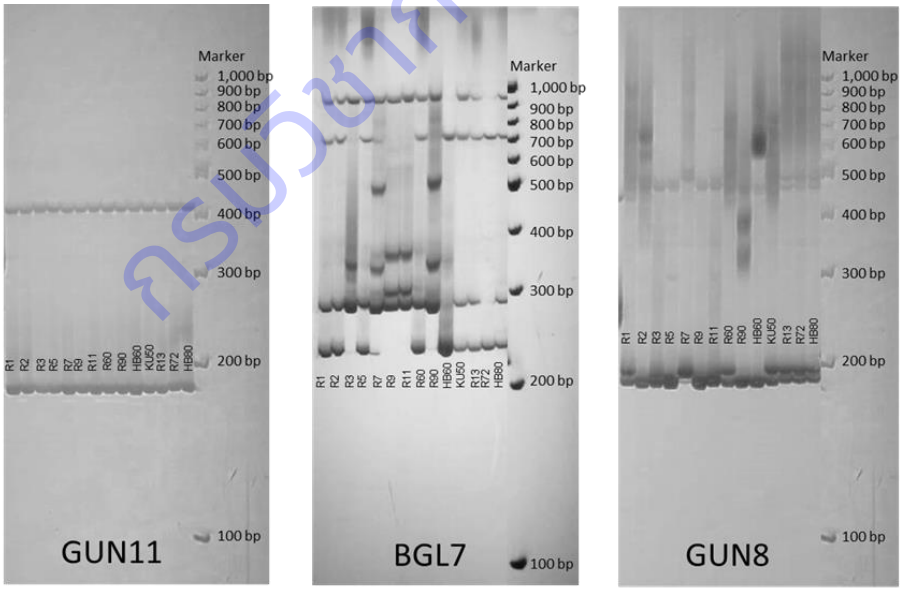
กรมวิชาการเกษตร

การหาเครื่องหมายโมเลกุลโดยการออกแบบ ILP (Intron Length Polymorphism)

ทำการสืบค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปมในพืชเพื่อออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้การออกแบบ ILP (Intron Length Polymorphism) พบยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ที่อ่อนแอและต้านทานต่อโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอย Meloidogyne incognita โดยสืบค้นข้อมูลเป็นลำดับ EST จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI รวมทั้งสิ้น 4 ยีนคือ ยีน Polygalacturonase, ยีน Pectinesterase/Pectinesterase Inhibitor, ยีน Beta-Glucosidase และ ยีน Endoglucanase ได้ลำดับ EST จำนวน 6 EST ที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมมันสำปะหลัง 6 โครโมโซม และสามารถนำไปออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 31 คู่ไพรเมอร์ ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดอยู่ในช่วง 145 - 403 bp โดยมีค่าเฉลี่ย 225 bp

จากไพรเมอร์ ILP ทั้งหมด 31 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ในมันสำปะหลังได้ จำนวน 30 คู่ ยกเว้นไพรเมอร์ PMEU1 จากนั้นนำมันสำปะหลังทั้ง 14 พันธุ์ได้แก่ R 1, R 2, R 3, R 5, R 7, R 9, R 11, R 60, R 90, HB 60, KU 50, R 86-13, R 72 และ HB 80 ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้ง 30 คู่ไพรเมอร์ไปวิเคราะห์หาโพลีมอร์ฟิซึมใน 6% polyacrylamide gel electrophoresis ที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ตัวอย่างการแยกแถบดีเอ็นใน 6% polyacrylamide gel

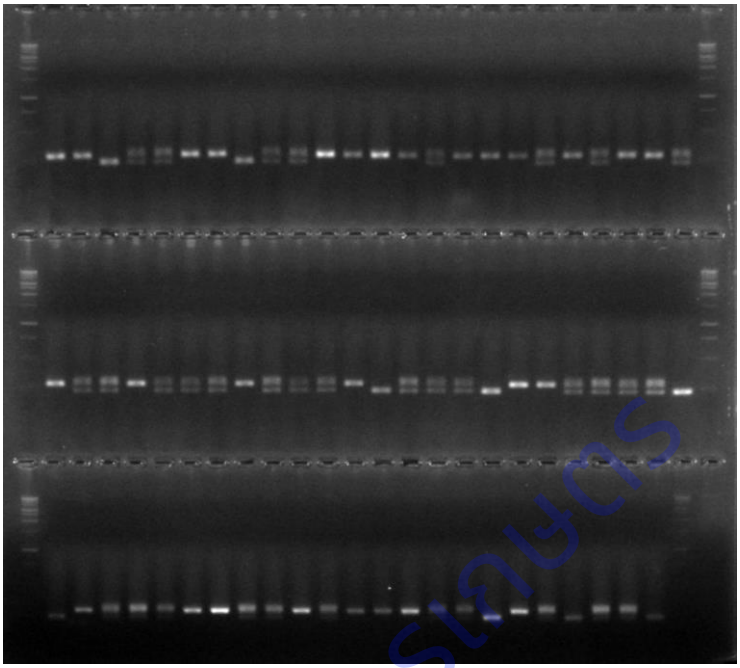
ผลจากการวิเคราะห์ไพร์เมอร์ ILP ที่สามารถเพิ่มปฏิกิริยาให้มันสำปะหลัง พบว่ามีไพร์เมอร์ 15 คู่ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในมันสำปะหลัง ได้แก่ PGLR7, PMEU2, BGL1, BGL2, BGL3, BGL4, BGL7, BGL9, BGL10, GUN4, GUN5, GUN6, GUN7, GUN8, GUN9



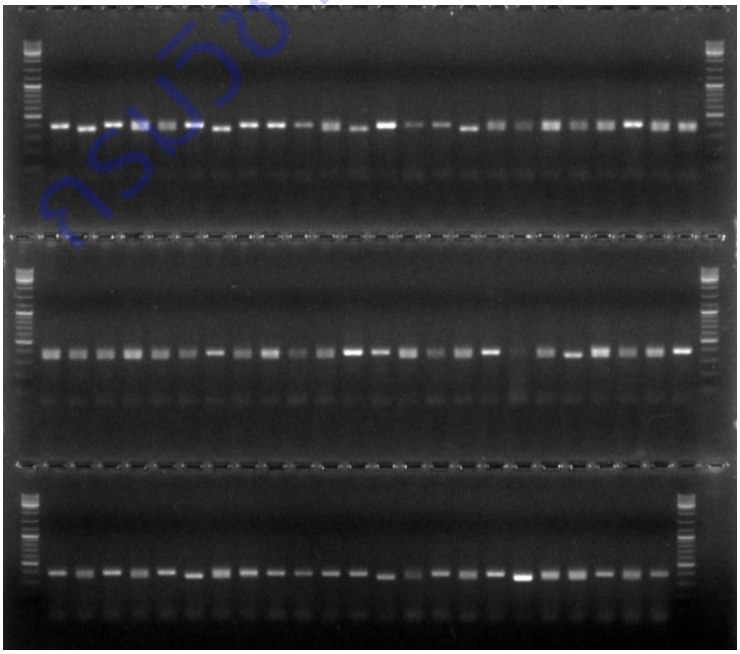
ภาพที่ 5 แสดงโพลีมอร์ฟิซึมใน 6% polyacrylamide gel electrophoresis ในมันสำปะหลัง 14 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ GUN11 แสดง monomorphic, ไพรเมอร์ BGL7 แสดง polymorphic และ ไพรเมอร์ GUN8 แสดง polymorphic

กรมวิชาการเกษตร

ทำการทดสอบไพร์เมอร์ทั้ง 15 คู่กับมันสำปะหลังทั้ง 71 พันธุ์ พบว่าจากการทำ PCR แล้วดูแถบผลผลิตดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใน 2% agarose gel ไพรเมอร์ที่เห็นความแตกต่างของพันธุ์ได้คือ BGL 7 และ GUN 5 ส่วนไพรเมอร์คู่อื่น ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน



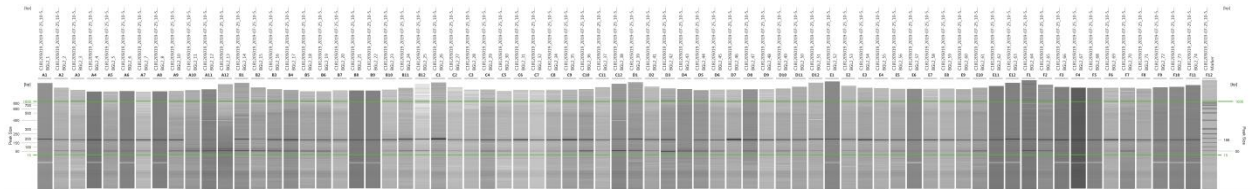
ภาพที่ 6 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ ใน 2% agarose gel



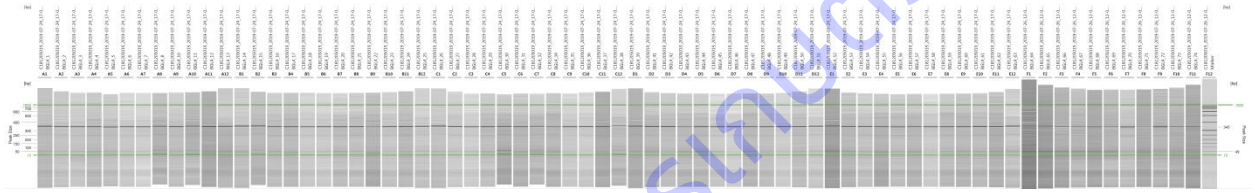
ภาพที่ 7 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ ใน 2% agarose gel

กรมวิชาการเกษตร

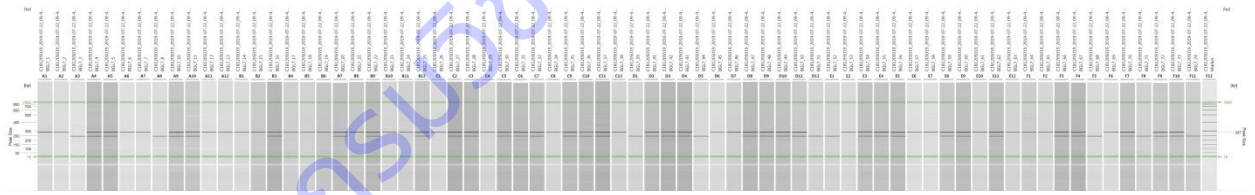
ได้ทำการนำผลผลิต PCR เข้าเครื่อง QIAxcel เพื่อดูแถบผลผลิตดีเอ็นเอ เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพร์เมอร์ทั้ง 15 คู่ บันทึกแถบดีเอ็นด้วยเครื่อง QIAxcel พบว่า มีไพรเมอร์ 6 คู่ ที่แถบดีเอ็นเอมีความแตกต่างกัน ได้แก่ BGL2, BGL4, BGL7, GUN4, GUN 5, PGLR7 และมีไพร์เมอร์ 6 คู่ ที่ให้ผลแถบดีเอ็นเอมันสำปะหลังทั้ง 71 สายพันธุ์ไม่ต่างกัน ได้แก่ BGL1, BGL3, BGL10, GUN7, GUN9, PMEU2 ส่วนไพรเมอร์อีก 3 คู่ให้ผลไม่ชัดเจน ได้แก่ BGL9, GUN6, GUN8



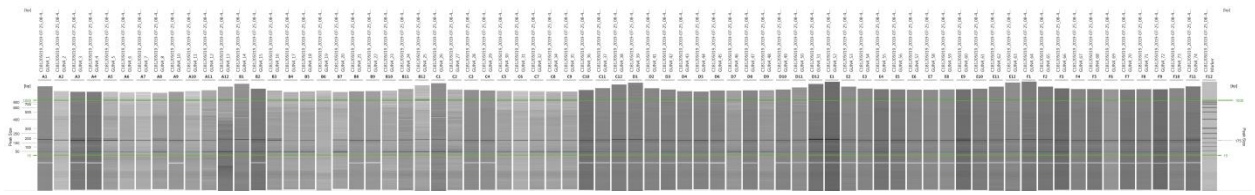
ภาพที่ 8 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel



ภาพที่ 9 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL4 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel

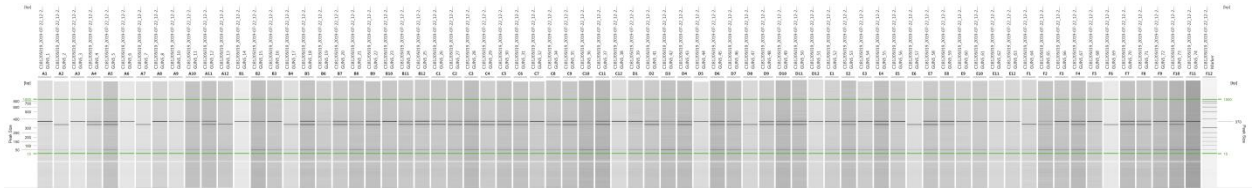


ภาพที่ 10 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel

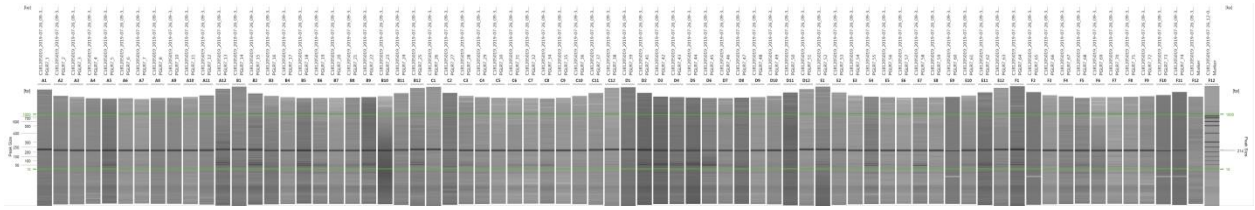


ภาพที่ 11 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 4 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel

กรมวิชาการเกษตร

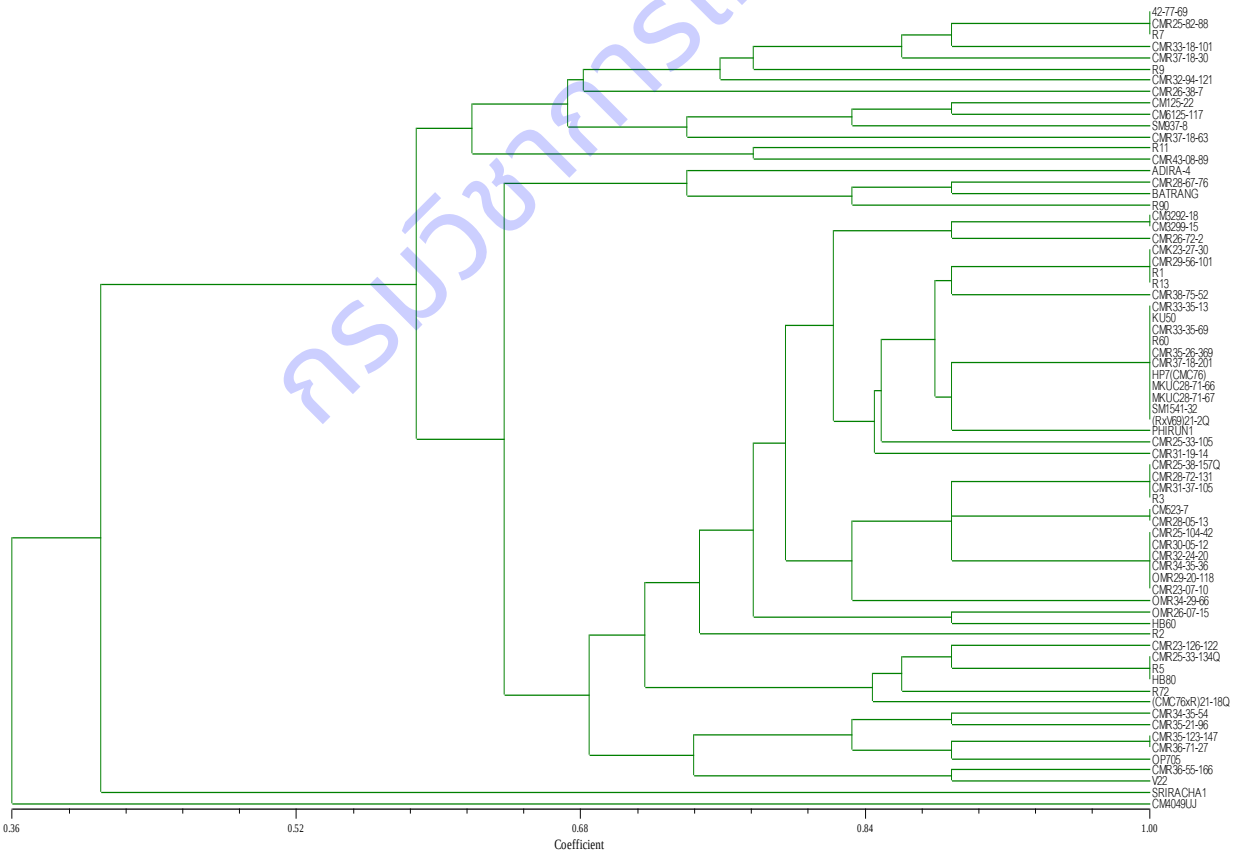


ภาพที่ 12 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel



ภาพที่ 13 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ PGLR 7 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel

จากนั้นได้จัดทำ dendrogram ความสัมพันธุ์ของมันสำปะหลัง จำนวนว 71 สายพันธุ์ ที่ได้จากข้อมูล จาก เครื่อง QIAxcel **ดังภาพที่ 14**



ภาพที่ 14 การทำ dendrogram ความสัมพันธุ์ของมันสำปะหลัง 71 พันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

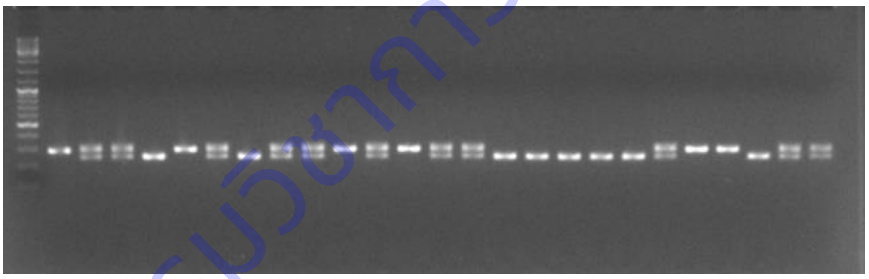
เมื่อนำข้อมูล dendrogram มาวิเคราะห์ร่วมกับดัชนีการเกิดปมและระดับความต้านทาน ยังไม่สามารถแยกกันได้อย่างชัดเจน ระหว่างพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ต้านทานโรคราก้ปม

จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยดูจากการทดสอบความต้านทานโรคราก้ปม (นุชนารถและคณะ,2558) และการวิเคราะห์แถบดีเอนเอจากไพร์เมอร์คู่ต่างๆ พบว่า พันธุ์ที่ต้านทานทานโรคราก้ปมและสามารถเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้คือพันธุ์ R 1, R 7, R 13, R 60, R 72 และ KU 50 จึงได้คัดเลือกพันธุ์ลูกผสมจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยเก็บตัวอย่างลูกผสม 2 สายพันธุ์ที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ต้านทานโรคราก้ปมจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

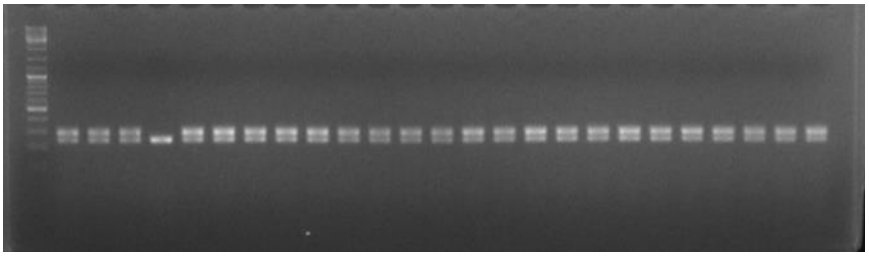
1. พันธุ์ลูกผสม CMR 62-11 พันธุ์แม่คือ CMR 32-94-12 และพันธุ์พ่อคือ KU 50 ที่ต้านทานโรคราก้ปม เก็บมา 46 ตัวอย่าง

2. พันธุ์ลูกผสม CMR 62-79 พันธุ์แม่คือ CMR 50-70-76 และพันธุ์พ่อคือ R 7 ที่ต้านทานโรคราก้ปม เก็บมา 259 ตัวอย่าง

ทำการทดสอบ PCR จากลูกผสมที่เก็บตัวอย่างมากับไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ คือ BGL2, BGL4, BGL7, GUN4, GUN5, PGLR7 พบว่าไพร์เมอร์ที่ให้ความแตกต่างของลูกผสมแต่ละต้นได้อย่างชัดเจนคือ BGL7 โดยไพรเมอร์ BGL7 จะให้แถบดีเอนเอที่แตกต่างในลูกผสม CMR 62-11 แต่ละต้น ในขณะที่แถบดีเอนเอในลูกผสม CMR 62-79 จะไม่ค่อยมีความแตกต่างกันนัก



ภาพที่ 15 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 ใน 2% agarose gel

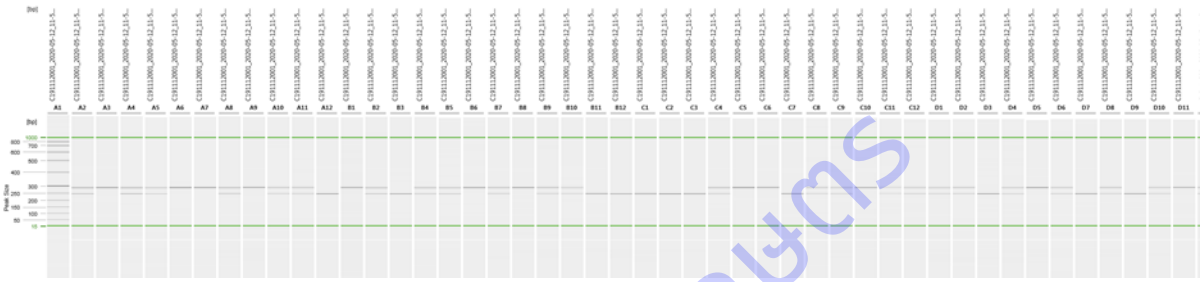


ภาพที่ 16 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-79 ใน 2% agarose gel

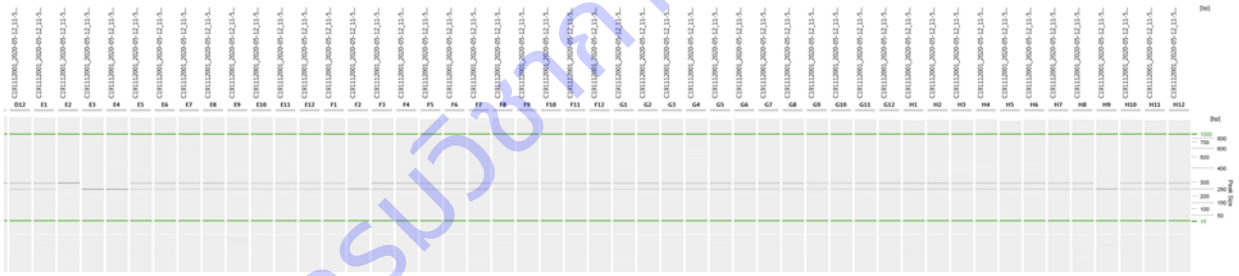
กรมวิชาการเกษตร

ส่วนไพรเมอร์ BGL2, BGL4, GUN4, GUN 5, PGLR7 การแยกความแตกต่างของแถบดีเอนเอ ใน 2% agarose gel ยังเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ไม่ค่อยชัดเจนนัก จึงนำไปตรวจสอบและบันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QIAxcel ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างได้ละเอียดขึ้นกว่าการดูแถบดีเอ็นเอใน 2% agarose gel

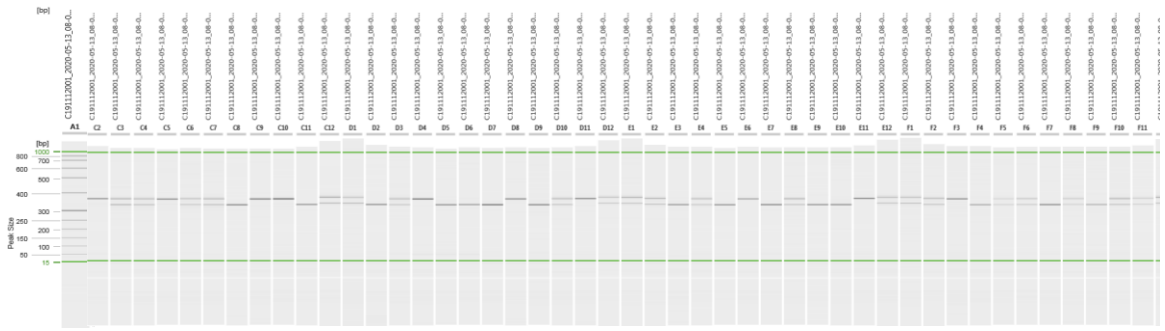
การดูแถบผลผลิตดีเอ็นเอจาก เครื่อง QIAxcel พบว่าเมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ คือ BGL2, BGL4, BGL7, GUN 5 บันทึกแถบดีเอ็นด้วยเครื่อง QIAxcel พบว่า มีไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ โดยไพร์เมอร์ BGL7 และ GUN 5 ที่ให้ความแตกต่างของลูกผสมแต่ละต้นได้อย่างชัดเจน แถบดีเอ็นเอที่บันทึกได้มีแถบเดียวและสองแถบ ส่วนไพรเมอร์ BGL 2 และ BGL 4 จะให้ดีเอ็นเอแถบเดียว แต่ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จะไม่เท่ากัน



ภาพที่ 17 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จาก เครื่อง QIAxcel

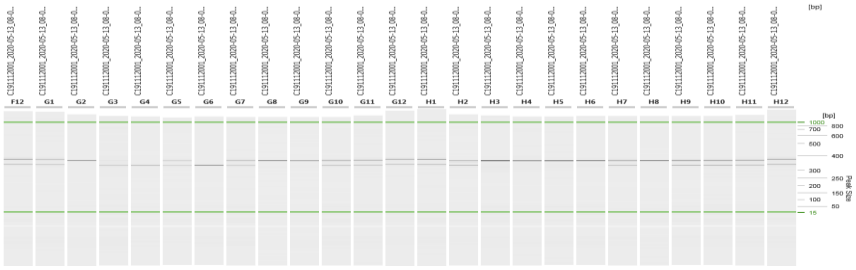


ภาพที่ 18 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-79 จากเครื่อง QIAxcel

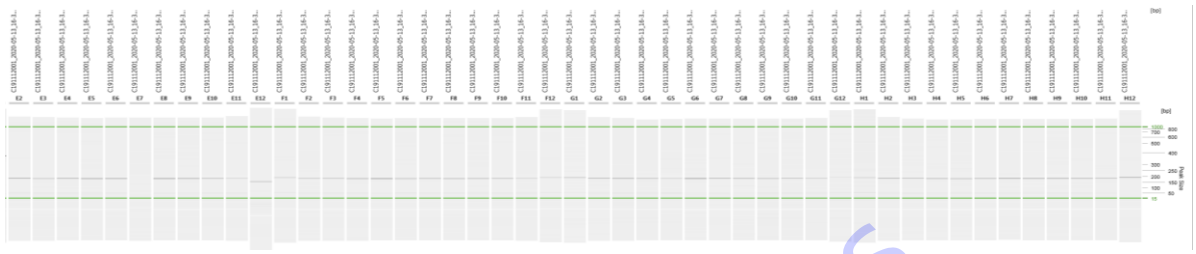


ภาพที่ 19 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel

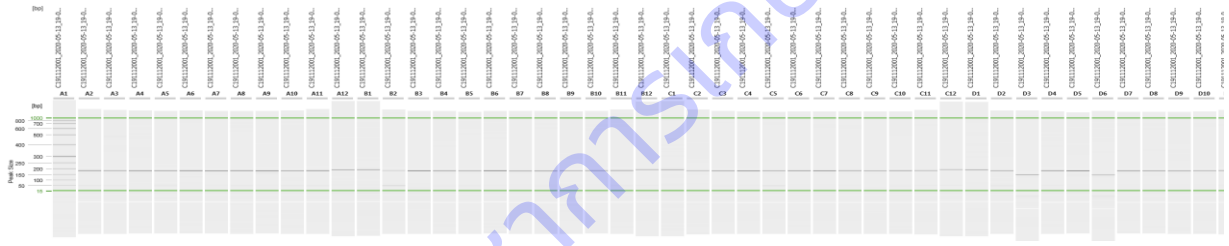
กรมวิชาการเกษตร



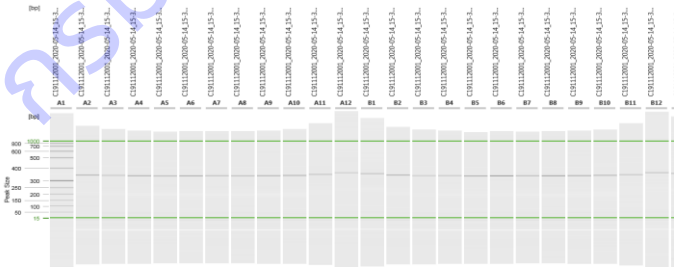
ภาพที่ 20 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-79 จากเครื่อง QIAxcel



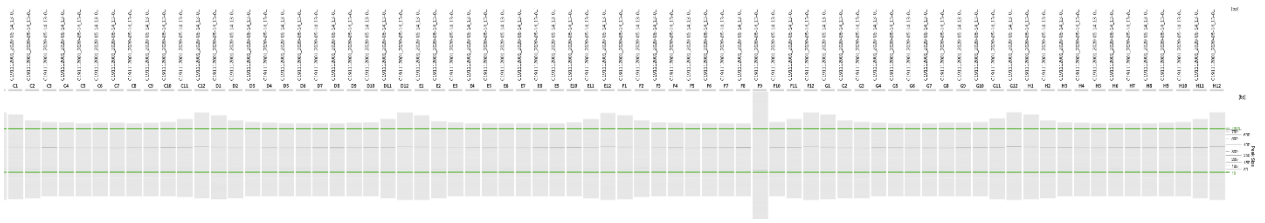
ภาพที่ 21 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel



ภาพที่ 22 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel



ภาพที่ 23 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel



ภาพที่ 24 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel

กรมวิชาการเกษตร

การหาเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP

จากข้อมูลที่ได้จากผลของ GBS ของมันสำปะหลังทั้ง 71 สายพันธุ์ นำมาการวิเคราะห์ SNPs **(ตารางที่ 5)**

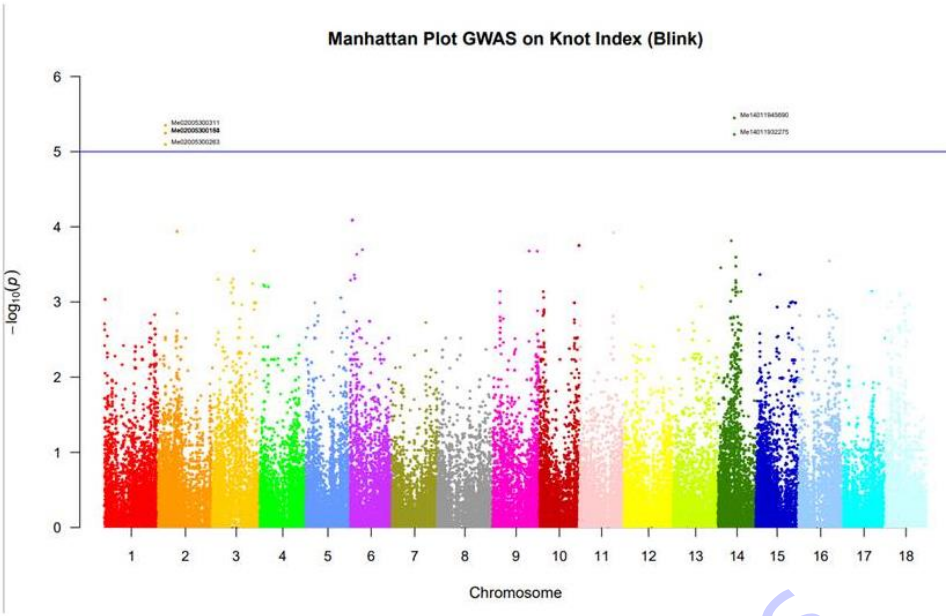
ตารางที่ 5 การวิเคราะห์รูปแบบ SNPs จากมันสำปะหลัง 71 พันธุ์

รูปแบบ SNP	**จำนวน**	**%**
Transition		
A/G	394	14.66
G/A	625	23.25
C/T	559	20.80
T/C	328	12.20
Transversion		
A/C	150	5.58
C/A	78	2.90
A/T	112	4.17
T/A	137	5.10
C/G	24	0.89
G/C	28	1.04
G/T	99	3.68
T/G	154	5.73
รวม	**2688**	**100**

จากตารางที่ 5 จากผลของ Genotyping by sequencing (GBS) ในมันมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ มีรูปแบบ SNPs รวมทั้งหมด 2688 รูปแบบ คิดเป็น 100% โดยเป็นแบบ transitions ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสของดีเอ็นเอประเภทเดียวกัน คือ Purine เปลี่ยนเป็น Purine (A/G, G/A)) Pyrimidine เปลี่ยนเป็น Pyrimidine (C/T, T/C) 70.91% และแบบ transversion คือ Purine เปลี่ยนเป็น Pyrimidine และจาก Pyrimidine เปลี่ยนเป็น Purine (A/C, C/A, A/T, T/A, C/G, G/C, G/T, T/G) 29.09% ซึ่ง SNPs แบบ G/A พบมากที่สุด 23.25% และพบ SNPs แบบ C/G น้อยที่สุด 0.89% อัตราส่วนระหว่าง transition:transversion คิดเป็น 2.44

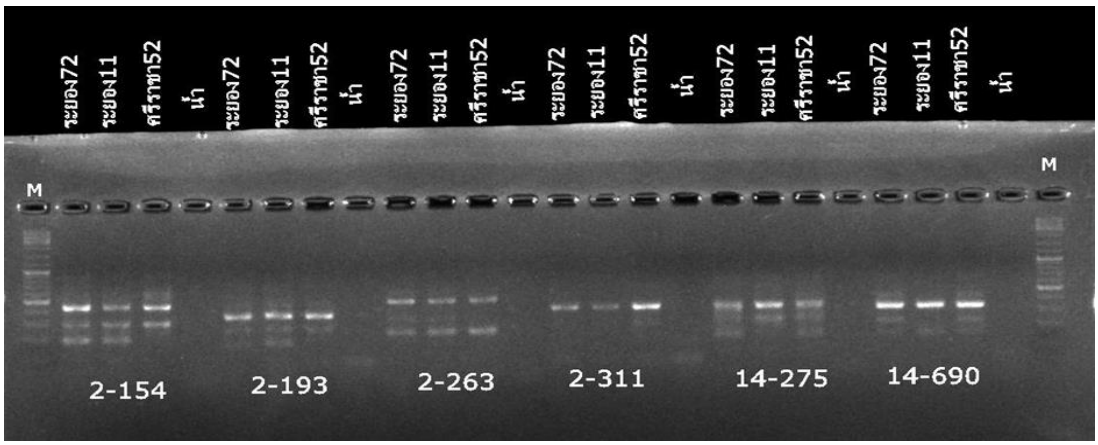
วิเคราะห์ข้อมูลดัชนีรากปม ความต้านทานโรครากปมของมันสำปะหลัง ทั้ง 71 สายพันธุ์ **(ตารางที่ 3)** ร่วมกับข้อมูล GBS พบว่าสามารถหาเครื่องหมายโมเลกลุที่สัมพันธุ์กับความต้านทานโรครากปมของมันสำปะหลัง จำนวน 6 ชุด อยู่บนโครโมโซมที่ 2 จำนวน 4 ชุด ได้แก่ Me02005300154 Me02005300193 Me02005300263 Me02005300311อยู่บนโครโมโซมที่ 14 จำนวน 2 ชุด ได้แก่ Me14011932275 Me14011945690 **(ภาพที่ 25)** ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาออกแบบไพร์เมอร์เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกมันสำปะหลังที่ต้านทานโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยจำนวน 6 ชุด ไพร์เมอร์

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 25 การวิเคราะห์ข้อมูล GBS แบบ GWAS โดยใช้ฐานข้อมูลจากดัชนีโรคราก้ปมของมันสำปะหลัง 71 สายพันธุ์

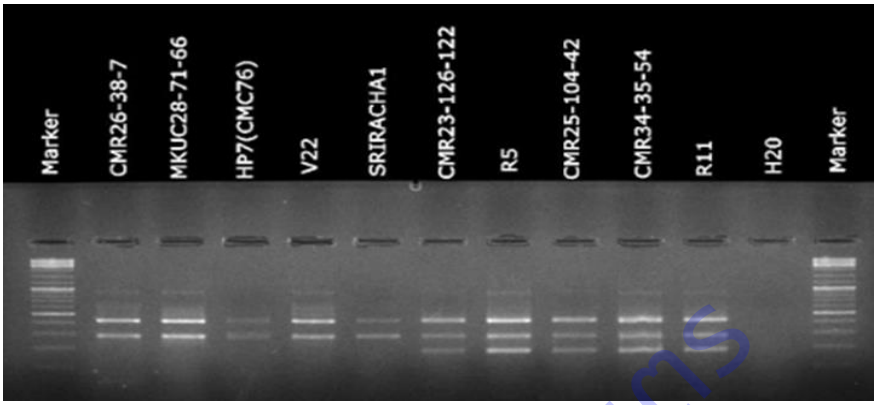
ทำการทดสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานและอ่อนแอต่อโรครากปม โดยใช้ตัวแทนพันธุ์ที่ต้านทานคือ Sriracha 1 และตัวแทนพันธุ์ที่อ่อนแอคือพันธุ์ระยอง ระยอง 72 ระยอง 11 พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล 2 ชุด คือชุดที่ 1 (2-154) และ ชุดที่ 2 (2-193) ให้ผลตรงตามลักษณะ genotype ของมันสำปะหลังที่ต้านทาน สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานได้ โดยระยอง 72 และ ระยอง 11 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอจะให้แถบ 2 แถบ ในขณะที่ ศรีราชา ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน จะให้แถบ 1 แถบ ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล ชุดที่ 3, 4, 5, 6 ให้แถบดีเอ็นเอที่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์อ่อนแอกับพันธุ์ต้านทานมันสำปะหลังได้ **(ภาพที่ 26)**



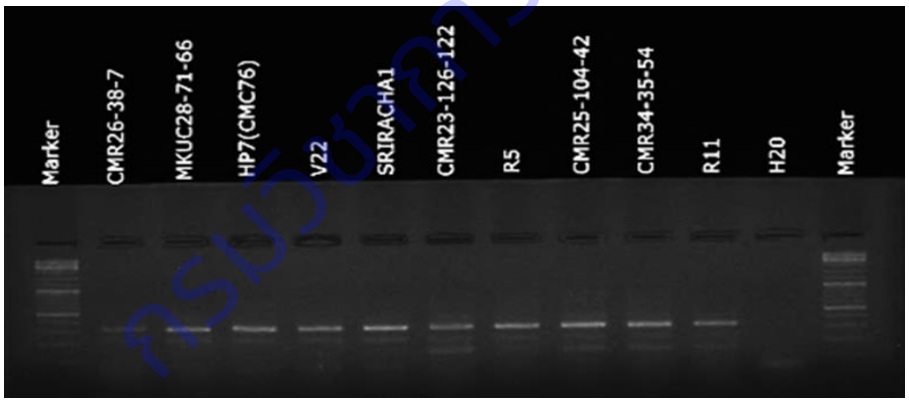
ภาพที่ 26 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ทั้ง 6 ชุด

กรมวิชาการเกษตร

จากนั้นจึงเลือกพันธุ์ที่ต้านทานมาทดสอบอีกครั้ง 5 พันธุ์ คือพันธุ์ CMR26-38-7, MKUC28-71-66, HP7, V22, SRIRACHA โดยเลือกลักษณะพันธุ์ที่ให้ดัชนีรากปมต่ำสุด และพันธุ์ที่อ่อนแอคือพันธุ์ CMR23-126-122, CMR25-104-42, CMR34-35-54, ระยอง 5, ระยอง 11 โดยเลือกพันธุ์ที่ให้ดัชนีรากปมสูงสุด พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล 2 ชุด สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานได้ โดยแยกความแตกต่างจากแถบที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานโรคโดยให้แถบ 2 แถบ และพันธุ์อ่อนแอต่อโรคให้แถบ 3 แถบ **(ภาพที่ 27, 28)**



ภาพที่ 27 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพร์เมอร์ ชุดที่1 Me02005300154



ภาพที่ 28 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพร์เมอร์ ชุดที่2 Me02005300193

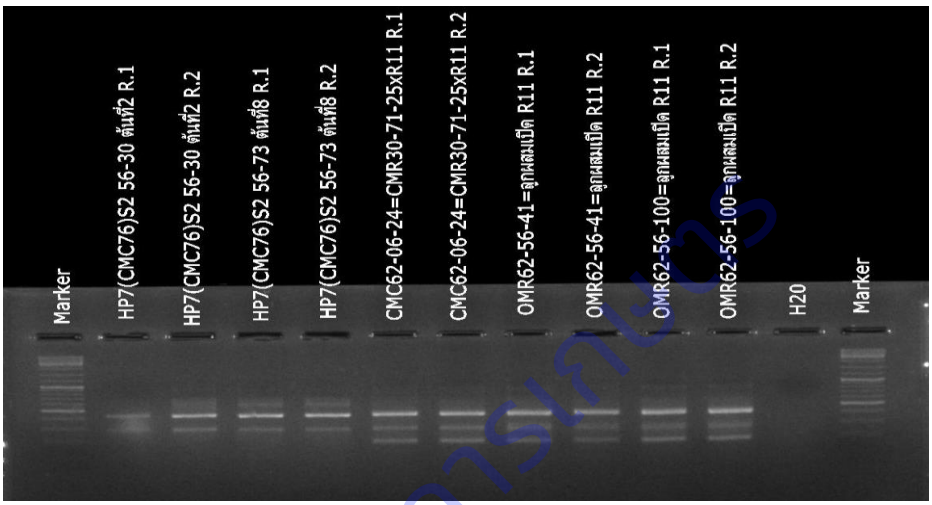
ทำการเตรียมเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปม โดยเก็บดินมาจากแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่จังหวัดกาฬสินธุ์ นำมาเพิ่มขยายไส้เดือนฝอยในมะเขือเทศ แล้วผสมในดินปลูกมันสำปะหลังลูกผสม 5 พันธุ์ ได้แก่

1. HP7 (CMC76) 5256-30 ต้นที่ 2
2. HP7 (CMC76) 5256-73 ต้นที่ 8
3. CMC62-06-24=CMR30-71-25xR11
4. OMR62-56-41=ลูกผสมเปิด R11
5. OMR62-56-100=ลูกผสมเปิด R11

กรมวิชาการเกษตร

หลังจากใส่ดินที่มีไส้เดือนฝอยในมันสำปะหลังทั้ง 5 พันธุ์ เป็นเวลา 1 เดือน ได้นำท่อนพันธุ์มาดูลักษณะราก ซึ่งไม่ปรากฏลักษณะรากปม น่าจะเป็นเพราะจำนวนไส้เดือนฝอยที่ใส่ในดินมีจำนวนไม่มากพอที่จะทำให้เกิดรากปมได้

เก็บใบมันสำปะหลังทั้ง 5 สายพันธุ์ไปสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำไปทดสอบกับไพร์เมอร์ทั้ง 6 ชุด พบว่า ไพรเมอร์ชุดที่ 1 Me02005300154 ชุดที่ 2 Me02005300193 และชุดที่ 3 Me02005300263 ให้ผลตรงตามรายงานของ GBS โดยชุดที่ 2 และ ชุดที่3 ต้องมีการปรับวิธีการเพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสม ชุดที่ 4 ปรากฏน้ำขึ้นและต้องทดสอบหลายครั้งถึงจะได้วิธีที่เหมาะสม ส่วน ชุดที่ 4 Me14011932275 และชุดที่ 5 Me14011945690 ให้ผลไม่ตรงรายงานของ GBS



ภาพที่ 29 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพร์เมอร์ 2-154

ตารางที่ 6 แสดงขนาดการปรากฏแถบดีเอ็นเอมันสำปะหลังในชุดไพรเมอร์ 2-154 เครื่องหมาย / แสดงผลที่ปรากฏจากการรันเจล

สายพันธุ์มันสำปะหลัง	อัลลัล C =188 bp	อัลลัล T =276 bp	Two outer primer = 421 bp
HP7 (CMC76) 5256-30 ต้นที่ 2 (ซ้ำที่1)	-	/	/
HP7 (CMC76) 5256-30 ต้นที่ 2 (ซ้ำที่2)	-	/	/
HP7 (CMC76) 5256-73 ต้นที่ 8 (ซ้ำที่1)	-	/	/
HP7 (CMC76) 5256-73 ต้นที่ 8 (ซ้ำที่2)	-	/	/
CMC62-06-24=CMR30-71-25xR11 (ซ้ำที่1)	/	/	/
CMC62-06-24=CMR30-71-25xR11 (ซ้ำที่2)	/	/	/
OMR62-56-41=ลูกผสมเปิด R11 (ซ้ำที่1)	/	/	/
OMR62-56-41=ลูกผสมเปิด R11 (ซ้ำที่2)	/	/	/
OMR62-56-100=ลูกผสมเปิด R11 (ซ้ำที่1)	/	/	/
OMR62-56-100=ลูกผสมเปิด R11 (ซ้ำที่2)	/	/	/
น้ำ	-	-	-

กรมวิชาการเกษตร

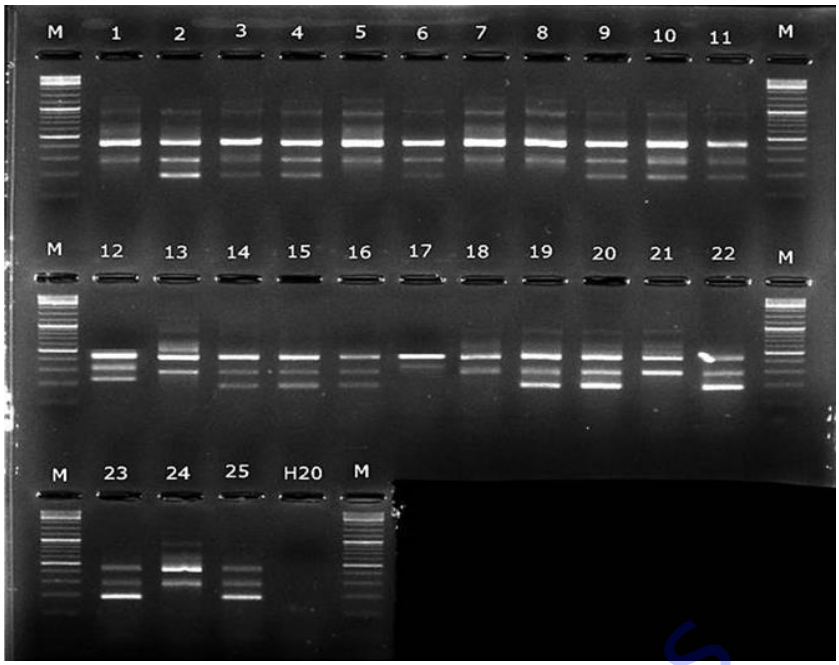
ทำการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติมกับมันสำปะหลังลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่เป็นพันธุ์ R11 ได้แก่มันสำปะหลัง 17 สายพันธุ์ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 มันสำปะหลังสายพันธุ์ลูกผสมสายพันธุ์ต่าง 17 สายพันธุ์

ลำดับที่	สายพันธุ์	ต้นแม่พันธุ์	ต้นพ่อพันธุ์
1	CMR61-52-101	CMR50-73-6	R11
2	CMR61-52-111	CMR50-73-6	R11
3	CMR61-52-113	CMR50-73-6	R11
4	CMR61-52-134	CMR50-73-6	R11
5	CMR61-74-28	KM98-1	R11
6	CMR62-81-63	CMR50-73-6	R11
7	CMR62-81-23	CMR50-73-6	R11
8	CMR62-81-31	CMR50-73-6	R3 S1 ต้นที่ 1
9	CMR62-160-20	R11	R3 S1 ต้นที่ 1
10	CMR62-160-40	R11	R3 S1 ต้นที่ 1
11	CMR62-160-59	R11	R3 S1 ต้นที่ 1
12	CMR62-161-16	R11	R3 S1 ต้นที่ 1
13	CMR62-170-17	SC5	R11
14	CMR62-06-07	CMR30-71-25	R11
15	CMR62-06-24	CMR30-71-25	R11
16	CMR62-06-41	CMR30-71-25	R11
17	CMR62-26-14	CMR37-18-201	R11

นำลูกผสมทั้ง 17 สายพันธุ์รวมทั้งพันธุ์พ่อพันธุ์แม่ ไปทดสอบกับไพร์เมอร์ชุดที่ 1, 2, 3 พบว่า ชุดที่ 1 จะให้แถบที่ชัดเจน สายพันธุ์ R11 ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอจะให้แถบชัดเจน ส่วนพันธุ์พ่อและแม่พันธุ์อื่นมีทั้งพันธุ์อ่อนแอและต้านทานโรคราก้ปม ผลที่ได้ในลูกผสมแต่ละต้นจะมีลักษณะที่ต่างกันออกไปคือ จะมีทั้ง 2 แถบและ 3 แถบ ซึ่งในการปรับปรุงพันธุ์สามารถเลือกเอาต้นที่ให้ผลผลิต PCR เป็น 2 แถบ ซึ่งหมายถึงลักษณะต้านทานโรคราก้ปมไปปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 30 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังลูกผสมสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพร์เมอร์ 2-154

1 = CMR61-52-01	2 = CMR61-52-111	3 = CMR61-52-113	4 = CMR61-52-134	5 = CMR61-74-28
6 = CMR62-81-03	7 = CMR62-81-23	8 = CMR62-81-31	9 = CMR62-160-20	10 = CMR62-160-40
11 = CMR62-160-59	12 = CMR62-161-16	13 = CMR62-170-17	14 = CMR62-06-07	15 = CMR62-06-24
16 = CMR62-06-41	17 = CMR62-26-14	18 = CMR50-73-6	19 = KM98-1	20 = R11
21 = SC5	22 = CMR30-71-25	23 = CMR37-18-201	24 = R3S1 ต้นที่ 1	25 = R5S1 (7)

กรมวิชาการเกษตร

อภิปรายผล

ในการหาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้คัดเลือกมันสำปะหลังที่ต้านทานโรคราก ปม ได้ทำการหาเครื่องหมายโมเลกุลโดยการออกแบบไพร์เมอร์ 3 แบบด้วยกัน 1) หาเครื่องหมายโมเลกุลจากฐานข้อมูล 2) การหาเครื่องหมายโมเลกุลโดยการออกแบบ ILP 3) การหาเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP จะให้ผลดี แม่นยำกว่าสองวิธี ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะต้านทานโรคราก ปมได้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคราก ปมในมันสำปะหลังเบื้องต้น ได้ใช้ตัวแทนจากมันสำปะหลัง14 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ที่ต้านทานโรคราก ปมคือ ระยอง 1, ระยอง 7, ระยอง 13, ระยอง 60, ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50 และพันธ์อ่อนแอต่อโรคราก ปมคือ ระยอง 2, ระยอง 3, ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 90, ห้วยบง 60 และ ห้วยบง 80 สังเคราะห์ไพร์เมอร์ 26 คู่จากรายงานที่ใช้คัดเลือกโรคราก ปมจากหัวบีท มันฝรั่ง ถั่วอัลมอนด์ และไพรเมอร์ SSR พบว่า มีไพรเมอร์ 4 คู่ คือ N 146 N 195 NEM06 และ SSR 4 ที่ให้แถบดีเอนเอแตกต่างกันในพันธุ์มันสำปะหลัง แต่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างมันสำปะหลังที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคราก ปมได้

ทำการออกแบบไพร์เมอร์เพิ่ม โดยทำการสืบค้นเพิ่มเติมหายีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปมในพืช เพื่อใช้การออกแบบ ILP (Intron Length Polymorphism) ได้ออกแบบยีน 4 ยีน คือ ยีน Polygalacturonase, ยีน Pectinesterase/Pectinesterase Inhibitor, ยีน Beta-Glucosidase และ ยีน Endoglucanase 31 คู่ไพรเมอร์ เมื่อนำไปทำ PCR กับมันสำปะหลัง 14 พันธุ์ พบว่า มีไพรเมอร์ 15 คู่ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในมันสำปะหลัง ได้แก่ PGLR7, PMEU2, BGL1, BGL2, BGL3, BGL4, BGL7, BGL9, BGL10, GUN4, GUN5, GUN6, GUN7, GUN8, GUN9 ทำการเก็บตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่มีข้อมูลการทดสอบโรครากปมเพิ่มรวมกับของเดิมที่มีอยู่เป็น 71 พันธุ์ ทำการสกัดดีเอ็นเอ และทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 15 คู่ ทำการดูแถบดีเอ็นเอด้วย Agarose gel 2% และเครื่อง QIAxcel พบว่า ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของมันสำปะหลัง 71 พันธุ์มี 6 คู่ คือ BGL2, BGL4, BGL7, GUN4, GUN 5, PGLR7 การวิเคราะห์แถบดีเอนเอจากไพร์เมอร์คู่ต่างๆ พบว่า พันธุ์ที่ต้านทานทานโรครากปมและสามารถเห็นความแตกต่างของแถบดีเอนได้ คือพันธุ์ R1, R7, R13, R60, R72 และ KU 50 จึงได้คัดเลือกพันธุ์ลูกผสมจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยเก็บตัวอย่างลูกผสม 2 สายพันธุ์ที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ต้านทานโรครากปม จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง คือ พันธุ์ลูกผสม CMR 62-11 พันธุ์แม่คือ CMR 32-94-12 และพันธุ์พ่อคือ KU 50 ที่ต้านทานโรครากปม เก็บมา 46 ตัวอย่าง และพันธุ์ลูกผสม CMR 62-79 พันธุ์แม่คือ CMR 50-70-76 และพันธุ์พ่อคือ R7 ที่ต้านทานโรครากปม เก็บมา 259 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ PCR จากลูกผสมที่เก็บตัวอย่างมากับไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ คือ BGL2, BGL4, BGL7, GUN4, GUN 5, PGLR7 พบว่า ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของลูกผสมแต่ละต้นได้อย่างชัดเจนคือ BGL7 และ GUN 5 แต่ผลที่ได้ยังไม่สอดคล้องกับดัชนีรากปมและความต้านทานและอ่อนแอของโรครากปมที่นุชนารถ (2558) ได้รายงานไว้ จึงได้ส่งตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังทั้ง 71 พันธุ์เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เทคนิค Genotyping by sequencing (GBS) และทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางเทคโนโลยีชีวสารสนเทศ เพื่อหา SNP โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางPhenotype ของดัชนีรากปม ความต้านทานและความอ่อนแอต่อโรครากปม และทำ dendrogram เพื่อดูความสัมพันธ์ของพันธุ์มันสำปะหลัง 71 พันธุ์ และออกแบบไพร์เมอร์ แบบ tetra primer จำนวน 6 ชุด สำหรับใช้ตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลัง พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล 2 ชุด สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานได้ โดยแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานโรคและอ่อนแอต่อโรคได้ จากแถบดีเอ็นเอที่มีจำนวนแตกต่างกัน ได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยเก็บใบมันสำปะหลังลูกผสมที่มีต้นพ่อหรือต้นแม่เป็นพันธุ์ R11 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ จำนวนลูกผสมทั้งหมด 17 สายพันธุ์ พบว่า มีลูกผสมบางต้นที่แสดงลักษณะต้านทานโรครากปม

เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ที่ได้ในการทดลองครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกมันสำปะหลังที่ต้านทานโรครากปมได้ เพราะให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ ซึ่งจะช่วยประหยัดเวลาและแรงงานในการคัดเลือกพันธุ์เนื่องจากไม่ต้องเสียเวลาไปทดสอบความต้านทานโรครากปม ซึ่งไม่สามารถเห็นลักษณะดังกล่าวบนต้นมันสำปะหลังเหนือพื้นดิน ต้องขุดดินดูรากมันสำปะหลังถึงจะเห็นรากปม และยังสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวร่วมกับเครื่องหมายโมกุลที่จำแนกลักษณะอื่นที่ต้องการ เช่น โรคใบด่างแป้งสูง ทำให้มันสำปะหลังที่ปรับปรุงสามารถมีหลายๆ ลักษณะที่ต้องการได้ในต้นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 5

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

The use of molecular markers for screening high starch and low cyanide in cassava

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ ประพิศ วองเทียม สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ อรุโณทัย ซาววา
ศิริลักษณ์ ล้านแก้ว กุสุมา รอดแพ้วพาล กฤตยา เพชรผึ้ง
Acharapun Chaicharean Prapit Wongtiem Suwaluk Amawan Aroonothai Sawwa
Sililux Langaew Kusuma Rodpeawpan Krittaya Petchpoung

คำสำคัญ (Key words)

มันสำปะหลัง (cassava), เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker), แป้ง (starch), ไซยาไนด์ (cyanide)

บทคัดย่อ

มันสำปะหลังจัดเป็นพืชอาหารที่สำคัญอันดับ 5 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวและมันฝรั่ง และเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่ให้พลังงานกับคนและสัตว์ได้ดีที่สุด ปัจจุบันการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามามีบทบาททางด้านการเกษตรเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะใช้กับงานปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะที่ดี ตรงตามความต้องการของตลาด ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการผลิตแป้งและไซยาไนด์ งานวิจัยได้ดำเนินการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคโนโลยี Genotyping By Sequencing (GBS) และพบเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งและไซยาไนด์ จากนั้นพัฒนาไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป (single nucleotide polymorphism marker; SNP marker) ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ โดย 1CHN มีความถูกต้องในการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 280 mg HCN/kg น้ำหนักสด ร้อยละ 64.81 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN และ 13CHN มีความถูกต้องในการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด ร้อยละ 73.33 และ 76.64 ตามลำดับ และพัฒนาไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง (% amylose) สำหรับใช้กับเทคนิค Pyrosequencing จำนวน 3 ตำแหน่ง โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP 2 มีความถูกต้องในการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 15.12% คิดเป็นร้อยละ 58.64 และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP 5 และ SNP 6 มีความถูกต้องในการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 10.83% คิดเป็นร้อยละ 70.94 และ 69.62 ตามลำดับ เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำไปใช้คัดเลือกมันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้งสูงและปริมาณไซยาไนด์ต่ำได้ โดยไม่จำเป็นต้องรอเก็บเกี่ยวหัวมันสำปะหลังเพื่อประเมินปริมาณแป้งและไซยาไนด์ ทำให้ลดเวลาและค่าใช้จ่ายลงได้เป็นอันมาก

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Cassava is the 5th most important food crop in the world after wheat, maize, rice and potatoes, and is the best source of carbohydrates for energy for humans and animals. Nowadays, Modern plant breeding with the aid of molecular markers has played an important role in agriculture. Especially for plant breeding to improve the characters of interest in plants as the marker demand. The objective of this study is to develop SNP markers to detect high starch and low cyanide trait in cassava. The research was carried out with genotype analysis using Genotyping By Sequencing (GBS) technology and found makers associated with starch and cyanide content. After that, the primers of SNP marker associated with cyanide content 3 positions were developed using tetra-primer ARMS-PCR techniques: 1CHN was effective in selection of cassava cultivars with cyanide content less than 280 mg HCN/kg fresh weight with 64.81% accuracy. The SNP markers 3CHN and 13CHN were effective in the selection of cassava cultivars with cyanide content less than 250 mg HCN/kg fresh weight with 73.33% and 76.64% accuracy respectively. Meanwhile, the primers of SNP markers related to starch content (% amylose) 3 positions were developed for using in pyrosequencing technique. The SNP 2 was effective in the selection of cassava cultivars with a starch content (%amylose) more than 15.12% with to 58.64% accuracy. And the SNP 5 and SNP 6 were effective in the selection of for cassava cultivars with a starch content (% amylose) more than 10.83% with to 70.94% and 69.62% accuracy respectively. These markers will be used in marker assisted selection (MAS). MAS can perform with seeding, therefore no need to wait for the harvest of cassava tubers to assess starch and cyanide content. This reduces time and costs greatly.

กรมวิทยาศาสตร์

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มันสำปะหลัง (Cassava) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ บราซิล/เมกซิโก เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ อยู่ในตระกูล Euphobiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz จัดเป็นพืชอาหารที่สำคัญอันดับ 5 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง และเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจลำดับต้นๆ ของไทย มันสำปะหลังเป็นพืชที่ปรับตัวได้ดีในเขตแล้ง หรือแม้แต่ในที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำและเป็นพืชที่ให้ผลผลิตแป้งสูง เป็นแหล่งของพลังงานที่ดี มันสำปะหลังเป็นพืชที่เก็บสะสมอาหารไว้ในราก เมื่อพืชมีการสร้างอาหารจากใบและส่วนที่เป็นสีเขียวแล้ว จะสะสมในรูปของคาร์โบไฮเดรต คือ แป้งไว้ในราก ความสามารถในการสร้างและสะสมแป้งในรากมีความแตกต่างกันบ้าง เนื่องมาจาก พันธุ์ของมันสำปะหลัง อายุเก็บเกี่ยว ปริมาณน้ำฝนในช่วงแรกก่อนการเก็บเกี่ยว และปัจจัยอื่น ๆ จึงทำให้ส่วนประกอบของหัวมันอาจจะแตกต่างกันไป องค์ประกอบส่วนใหญ่ในรากนั้น มีแป้งถึงร้อยละ 70-80 จึงถือว่ามันสำปะหลังเป็นพืชที่เป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่ให้พลังงานกับคนและสัตว์ได้ดีที่สุด

มันสำปะหลังเป็นพืชส่งออกที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย มันสำปะหลังเป็นพืชที่ใช้ประโยชน์ได้ทุกๆ ส่วน ตั้งแต่ยอดจนถึงราก (หัวมัน) มีการนำมาใช้ประโยชน์ในครัวเรือน เพื่อการบริโภคเป็นอาหารมนุษย์และอาหาร สัตว์ และใช้แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เพื่อการใช้ประโยชน์ กับมนุษย์และสัตว์ ในหลายๆ รูปแบบ ตลอดทั้งใช้ในอุตสาหกรรมแป้งแปรรูป (Modified Starch) ใช้ประโยชน์อุตสาหกรรมต่างๆได้มากมายหลายชนิด และในวงการแพทย์ จึงกล่าว ได้ว่าการใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลังแยกได้ 3 ประเภท คือ บริโภคโดยตรง แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ (มันเส้น มันอัดเม็ด และแป้งมัน) และแป้งมันสำปะหลังแปรรูป (ทางเคมีและกายภาพใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่างๆ)

มันสำปะหลังที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นชนิดขม เป็นมันสำปะหลังที่มีปริมาณกรดไฮโดรไซนานิคสูง เป็นพิษและมีรสขม ไม่เหมาะสำหรับการบริโภคของมนุษย์หรือใช้หัวสดเลี้ยงสัตว์โดยตรง แต่จะใช้สำหรับในอุตสาหกรรมแปรรูปต่างๆ ดังนั้นมันสำปะหลังที่เป็นที่ต้องการคือให้ผลผลิตสูง ทั้งในด้านน้ำหนักหัวและปริมาณแป้ง กรมวิชาการเกษตร และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จึงทำการปรับปรุงพันธุมันสำปะหลัง จนในปจจุบันมีพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อการอุตสาหกรรมที่ไดรับการรับรองพันธุเปนพันธุแนะนำแล้ว เช่น เกษตรศาสตร์ 50 ห้วยบง 60 และระยอง 7 เป็นต้น

อย่างไรก็ตามในมันสำปะหลังมีสารไซยาโนเจนิคกลูโคไซด์ที่สะสมในรูปกรดไฮโดรไซยานิก ซึ่งจะสะสมอยู่ในรากของมันสำปะหลัง เมื่อรับประทานเข้าไปแล้วจะสามารถถูกเปลี่ยนเป็นไซยาไนด์ที่เป็นสารพิษร้ายแรงได้ สารพิษชนิดนี้ จะทำให้เกิดอาการผิดปกติทางระบบประสาท โดยมีอาการชา ความรู้สึกผิดปกติตาพร่ามัว สูญเสียการมองเห็น เสียการทรงตัว หูหนวก และอาการอัมพาต ดังนั้นจึงต้องมีกระบวนการกำจัดสารไซยาโนเจนิคกลูโคไซด์ออกจากมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลังก่อนการส่งออกเพื่อให้ได้มาตรฐานของประเทศคู่ค้าและมาตรฐานสากล ซึ่งคณะกรรมาธิการโครงการมาตรฐานอาหารขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก (Codex Alimentarius Commission, CAC) ได้กำหนดระดับมาตรฐานความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ให้มีปริมาณไซยาไนด์อยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง (FAO/WHO, 1991)

กรมวิชาการเกษตร

จากรายงานของ Yeoh and Sun (2001) พบว่าหลังกระบวนการผลิตแป้ง มีปริมาณไซยาไนด์ตกค้างประมาณ 28-88 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบวนการผลิตแป้งไม่สามารถลดปริมาณไซยาไนด์ตกค้างให้หมดไปได้ และ Albert *et al*. (2005) รายงานว่าแป้งฟลาวร์จากมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 พันธุ์ระยอง 5 พันธุ์ระยอง 2 และพันธุ์ห้านาที มีปริมาณไซยาไนด์ตกค้างอยู่ 28.8 26.8 12.5 และ 8.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในประเทศไทยมีการใช้มันสำปะหลัง พันธุ์ระยอง 5 และพันธุ์ห้านาทีเป็นวัตถุดิบในการผลิตแป้งฟลาวร์ พบว่าแป้งฟลาวร์จากมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5 ยังคงมีปริมาณไซยาไนด์ที่เหลือตกค้างอยู่สูงกว่ามาตรฐานที่ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามถึงแม้มันสำปะหลังพันธุ์ห้านาทีจะมีปริมาณไซยาไนด์น้อยแต่ก็มีปริมาณแป้งน้อยด้วย เมื่อเทียบกับพันธุ์การค้าอื่นๆ ดังนั้นจึงควรมีการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังที่มีไซยาไนด์ต่ำและมีผลผลิตแป้งสูง เพื่อการใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมผลิตแป้งฟลาวร์เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมอาหาร การปรับปรุงมันสำปะหลังที่ผ่านมาใช้วิธีการแบบดั้งเดิม ซึ่งการประเมินปริมาณแป้งและไซยาไนด์ในหัวเพื่อคัดเลือกหัวมันสำปะหลังนั้น จะต้องรอจนถึงเวลาเก็บเกี่ยวที่ประมาณ 10 - 12 เดือน ซึ่งใช้เวลานาน จึงจะได้พันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการ

ปัจจุบันเทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามามีบทบาททางด้านการเกษตรเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะใช้กับงานปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะที่ดี ตรงตามความต้องการ และมีผลผลิตสูงเป็นไปความต้องการของตลาด โดยเฉพาะการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เป็นเครื่องหมายที่สร้างจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอ สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์พืชทั้งลักษณะทางปริมาณและคุณภาพ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ จึงได้นำมาช่วยคัดเลือกลักษณะที่สำคัญ โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาใช้คัดเลือกต้องมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับลักษณะนั้นๆ เช่น การให้แป้งสูงในมันสำปะหลัง ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสด การต้านโรค ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการผลิตแป้งและไซยาไนด์และนำมาใช้คัดเลือกมันสำปะหลังเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้หัวสดของมันสำปะหลังมีปริมาณแป้งสูงและมันสำปะหลังที่มีไซยาไนด์ต่ำ

วัตถุประสงค์

คัดเลือกและใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องลักษณะปริมาณแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำเพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป (single nucleotide polymorphism marker ; SNP marker) ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย ออกแบบ SNP marker คัดเลือก SNP marker ที่ให้ผล polymorphism ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าว เพื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้น ไปใช้คัดเลือกลูกผสมของมันสำปะหลังเพื่อได้ต้นมันสำปะหลังที่มีลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย

ประเด็นวิจัย : พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป (SNP marker) ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย ออกแบบ SNP marker โดยอาศัยข้อมูลจากฐานข้อมูลจีโนม คัดเลือก SNP marker โดยการตรวจคัดกรองจากทุกสายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด คัดเลือก SNP markers ที่ให้ผล polymorphism ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าว ว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพหรือไม่ โดยทดสอบกับมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ที่ทราบลักษณะทางกายภาพแล้ว เพื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้น ไปใช้คัดเลือกลูกผสมของมันสำปะหลังเพื่อได้ต้นมันสำปะหลังที่มีลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำต่อไป

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี

ระยะเวลาดำเนินงาน : ตุลาคม 2560 - กันยายน 2564

วิธีการดำเนินงาน

1. รวบรวมและทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในหัวมันสำปะหลัง

1.1 รวบรวมและสังเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำ เช่น ลักษณะแป้งสูง จำนวน 3 คู่ (MeES1019, MeES959 และ SSRY60) ลักษณะไซยาไนด์ต่ำจำนวน 4 คู่ (SSRY28, SSRY103, SSRY105, SSRY242)

1.2 เก็บใบมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 พันธุ์ห้านาที กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมระหว่างห้วยบง 60 และห้านาที จำนวน 59 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลัง ตามวิธีของ Plant DNA Extraction Protocol อุ่นสารละลาย extraction buffer (0.35 M sorbitol 0.1 M TrisHCl pH 8.0 5 mM EDTA pH 8.0) ที่ 65 องศาเซลเซียส บดใบพืช 1 กรัม ในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ตักใส่หลอด microtube เติม extraction buffer 700 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก 20 นาที เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 30 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol (เย็น) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 10 รอบ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer (10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 30 ไมโครลิตร วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel

1.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในหัวมันสำปะหลัง โดยนำ gDNA ของมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยลง 60 (HB 60) และห้านาที (HANATEE) จากข้อ 3 ใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X GoTaq® Colorless Master Mix *(Promega, USA)* และ ใช้ไพรเมอร์ลักษณะแป้งสูง จำนวน 3 คู่ (MeES1019, MeES959 และ SSRY60) ไพรเมอร์ลักษณะไซยาไนด์ต่ำจำนวน 5 คู่

ศรีวิชัยการเกษตร

(SSRY28, SSRY77, SSRY103, SSRY105, SSRY242) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจแยกดีเอ็นเอด้วยเครื่องอ่านแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ผลภาพแถบดีเอ็นเอชนิดเร็ว (Automated Electrophoresis) ยี่ห้อ QIAxcel : pure excellence

1.4 นำเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งสูง จำนวน 3 คู่ (MeES1019, MeES959 และ SSRY60) และเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะไซยาไนด์ต่ำ จำนวน 5 คู่ (SSRY28, SSRY77, SSRY103, SSRY105, SSRY242) ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลในหัวมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ ห้วยบง60 พันธุ์ห้านาที กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่ มมันสำปะหลังลูกผสมของห้วยบง 60 และห้านาที (4 พันธุ์) **(ตารางที่ 1)** โดยนำ gDNA ของมันสำปะหลัง จากข้อ 1.2 ใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA) และ ใช้ไพรเมอร์ลักษณะแป้งสูง/ไพรเมอร์ลักษณะไซยาไนด์ต่ำ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจแยกดีเอ็นเอด้วยเครื่องอ่านแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ผลภาพแถบดีเอ็นเอชนิดเร็ว (Automated Electrophoresis) ยี่ห้อ QIAxcel : pure excellence

1.5 บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำ

2. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในหัวมันสำปะหลัง

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส(แป้ง)และปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสดจากพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูง และลักษณะไซยาไนด์ต่ำในหัวมันสำปะหลัง

2.1.1 การเก็บตัวอย่างจากหัวมันสำปะหลังสด โดยคัดเลือกมันสำปะหลังเชื้อพันธุ์ที่ส่งวิเคราะห์จีโนไทป์ จำนวน 100 เชื้อพันธุ์จากแปลงรวบรวมศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร ขุดหัวมันสำปะหลัง อายุ 13 เดือน (มิถุนายน 2561 - กรกฎาคม 2562) สายพันธุ์ละ 3 ต้นๆ ละ 1 หัว จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร เจาะบริเวณกลางของหัวมันสำปะหลัง ความลึกประมาณครึ่งหนึ่งของหัวมัน ตัดชิ้นส่วนมันสำปะหลังจากส่วนในให้มีน้ำหนักเท่ากับ 100 มิลลิกรัม สำหรับการวิเคราะห์ประมาณแป้ง ตัดหัวมันบริเวณกลาง ให้เป็นแว่นขนาดประมาณ 1 - 1.5 เซนติเมตร นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำมาบดให้ละเอียด

2.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ด้วยวิธี picrate paper ตามวิธีดัดแปลงของ Haque และ Bradbury (1999)

กรมวิชาการเกษตร

เตรียม picric acid paper ตามวิธีของ Bradbury *et al*. (1999) ชั่ง 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 ต.ร.ซม. ติดบนฝาของหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส นำมันสำปะหลัง (จากข้อ 3.1) หนัก 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติม 0.1 M phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 0.5 มิลิลิตร บดให้ละเอียด ปิดฝาที่มี picric acid paper บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนานข้ามคืน นำ picric acid paper จุ่มในน้ำ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เทียบกับสีมาตรฐานของปริมาณไซยาไนด์

เตรียมมาตรฐานของปริมาณไซยาไนด์ 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 มิลิลิตร 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

บันทึกข้อมูลปริมาณไซยาไนด์

2.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสในหัวมันสดตามวิธีดัดแปลงของ Juliano (1971)

นำมันสำปะหลัง (จากข้อ 3.1) หนัก 50 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติมเอทานอล ปริมาตร 0.5 มิลิลิตร และ 1 M NaOH ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มบนอ่างน้ำร้อน 15 นาที รอให้เย็น ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม 1 M acetic ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลายไอโอดีน ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เทียบกับมาตรฐานของปริมาณอะไมโลส

เตรียมสารละลายมาตรฐานอะไมโลส(แป้ง) ที่ระดับ 0, 40, 80, 120, 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อหลอด โดยเติมเอทานอล ปริมาตร 0.5 มิลิลิตร และ 1 M NaOH ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มบนอ่างน้ำร้อน 15 นาที รอให้เย็น ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม 1 M acetic ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลายไอโอดีน ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร นำไปสร้างกราฟสารมาตรฐาน

บันทึกข้อมูลปริมาณอะไมโลส

2.2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำ

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นสำหรับวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS

คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำโดยคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้ง และ พันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ที่ระดับต่างๆ จากรายงานการจำแนกและประเมินลักษณะทางคุณภาพของหัวคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งและคุณภาพของท่อนพันธุ์ในเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังของจิณณจาร์ และคณะ (2558)

2.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นสำหรับส่งวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS โดยเก็บใบมันสำปะหลังพันธุ์ที่ให้แป้งและใบมันสำปะหลังพันธุ์ที่ให้ปริมาณไซยาไนด์ที่ระดับต่างๆ สกัดดีเอ็นจากใบมันสำปะหลังสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีของ Plant DNA Extraction Protocol ดังนี้ อุ่นสารละลาย extraction buffer (0.35 M sorbitol 0.1 M TrisHCl pH 8.0 5 mM EDTA pH 8.0) ที่ 65 องศาเซลเซียส บดใบพืช 1กรัม ในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ตักใส่หลอด microtube เติม extraction buffer 700 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก 20 นาที เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol (เย็น) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 10 รอบ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer (10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 30 ไมโครลิตร วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel จากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดูดสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน 96-well microtiter plates หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิดฝาให้สนิท นำไปวิเคราะห์จีโนไทป์ของมันสำปะหลัง

2.2.1.2 เมื่อได้รับข้อมูลรูปแบบความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งสนิป ทำการกรอง (Filter) ข้อมูลที่ call rate > 0.8 และ Polymorphic Information Content (PIC) > 0.1 ซึ่งสนิปที่ผ่านการคัดกรองคุณภาพถูกนำไปวิเคราะห์และจัดการข้อมูลด้วยโปรแกรม TASSEL 5.0 (Bradbury *et al*., 2007)

2.2.1.3 การวิเคราะห์รูปแบบความเชื่อมโยงในจีโนม (Genome-wide Association Mapping) นำฐานข้อมูลความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ มาวิเคราะห์หาความเชื่อมโยงจีโนมเพื่อค้นหาตำแหน่งสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้งและปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง โดยวิเคราะห์แบบ Mixed linear model (MLM) (Kang *et al*., 2008) ด้วยโปรแกรม TASSEL 5.0 เพื่อระบุสนิปที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณแป้งและปริมาณไซยาไนด์

2.2.2 การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่สัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์และปริมาณแป้งด้วยเทคนิค tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction

2.2.2.1 นำข้อมูล SNP ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณไซยาไนด์และปริมาณแป้ง ไปใช้ในการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป ด้วยวิธี tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (tetra-primer ARMS-PCR) โดยใช้โปรแกรม Primer1 ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้ จะประกอบด้วย ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ คู่นอกและคู่ใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

2.2.2.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป

นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่ออกแบบได้ ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังโดยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA) และ ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง/ปริมาณไซยาไนด์ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30-40 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส 30-40 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล

บันทึกข้อมูลความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป

2.2.2.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป

นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ จากข้อ 2.2.2.2 ตรวจสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่มีข้อมูลปริมาณไซยาไนด์และปริมาณแป้ง (ข้อ 2.1) ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA) และ ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง/ปริมาณไซยาไนด์ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30-40 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส 30-40 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลโดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอกับปริมาณแป้ง/ไซยาไนด์

บันทึกข้อมูลประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล

2.2.3 การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่สัมพันธ์กับปริมาณแป้งด้วยเทคนิค Pyrosequencing

2.2.3.1 ออกแบบชุดไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บริเวณรอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่สัมพันธ์กับปริมาณแป้ง 6 ตำแหน่ง จำนวน 6 เส้น เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 137 สายพันธุ์ โดยใช้ชุด PyroMark PCR (Qiagen, Germany) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1XPyroMark PCR Master Mix, 1X Coral Load Concentrate, 0.2 µM forward primer, 0.2 µM reverse primer (biotin label) จากนั้น นำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 45 รอบ ของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสใน 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เหลือไปเข้าเครื่องหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ PyroMark Q48 Autoprep (Qiagen, Germany) โดยใช้ชุดน้ำยาตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สนิป PyroMark Q48 Advance Reagents (Qiagen, Germany) ซึ่งสามารถบอกลำดับ นิวคลีโอไทด์ณ ตำแหน่งที่ต้องการศึกษาได้

2.2.3.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป โดยนำข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป จากข้อ 2.2.3.1 ตรวจสอบกับข้อมูลปริมาณแป้ง (ข้อ 2.1)

บันทึกข้อมูลประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป

ผลการวิจัยและอภิปราย

1. รวบรวมและทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในหัวมันสำปะหลัง

ทำการรวบรวมเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำจากเอกสารทางวิชาการต่างๆ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำในมันสำปะหลัง เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Simple Sequence Repeat (SSR) จึงคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูง จำนวน 3 คู่ ได้แก่ MeES1019 MeES959 และ SSRY60 เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะไซยาไนด์ต่ำจำนวน 5 คู่ ได้แก่SSRY28 SSRY77 SSRY103 SSRY105 และ SSRY242 **ดังแสดงในตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำ

Name		Sequence (5'->3')	Annealing temperature(°C)
SSRY60	SSRY60-F	: 5’-CGGCCACCAACTCAAATAAC -3’	55
	SSRY60-R	: 5’-TTGCAATGATATCAACGGCT-3’	
MeES1019	MeES1019-F	: 5’-AGAATGGATGCAGGAGTGCT -3’	55
	MeES1019-R	: 5’-AAGTTGGATGCTTGATGGAA -3’	
MeES0959	MeES0959-F	: 5’-GATTGTGTGATCATGGCTGG -3’	55
	MeES0959-R	: 5’-GAATCCATCGCGTGATTTG -3’	
SSRY28	SSRY28-F	: 5’-TTGACATGAGTGATATTTTCTTGAG -3’	55
	SSRY28-R	: 5’-GCTGCGTGCAAAACTAAAAT -3’	
SSRY77	SSRY77-F	: 5’-CAGGAGGTGGCAGATTTTGT -3’	55
	SSRY77-R	: 5’-TGTTCCACCTGCATAAG -3’	
SSRY103	SSRY103-F	: 5’-TGAGAAGGAAACTGCTTGCAC -3’	55
	SSRY103-R	: 5’-CAGCAAGACCATCACCAGTTT -3’	
SSRY105	SSRY105-F	: 5’-CAAACATCTGCACTTTTGGC -3’	55
	SSRY105-R	: 5’-TCGAGTGGCTTCTGGTCTTC -3’	
SSRY242	SSRY242-F	: 5’-TGGGTTCGAAAACAGCAAAC -3’	61.04
	SSRY242-R	: 5’-TAATGCCTGGAGGGTAATGG -3’	

มันสำปะหลังที่นำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล ใช้สำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ ที่เก็บรวบรวมในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 59 พันธุ์ โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ พ่อแม่พันธุ์ของเครื่องหมายโมเลกุล (ห้วยบง60 และพันธุ์ห้านาที) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของห้วยบง 60 และห้านาที (4 พันธุ์) **(ตารางที่ 2)**

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 สายพันธุ์มันสำปะหลังที่นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล

ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (%)	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (%)
กลุ่มมันสำปะหลังแป้งสูง		**กลุ่มมันสำปะหลังแป้งสูง**	
CMR 35-22-348	32.0	CMH 22-04-1Q	27.2
SM 302-5	31.7	CMR 32-94-121	27.0
OMR 29-20-118	30.9	(R x CMC 84)	27.0
CMR 33-18-101	30.2	CMR 38-106-32	26.8
ระยอง 11	30.0	SM 1541-32	26.8
SM 1186-24	29.5	OMR 28-97-31	26.7
(V1 x R) 20-15	29.4	ระยอง 60	26.6
Variegated (green)	29.2	OMR 24-87-34	26.5
(V7 x R) 21-4Q	29.0	HB 80	26.4
CMR 38-125-77	28.8	(V3 x R) 21-16	26.4
ระยอง 7	28.4	(V3 x R) 20-15	26.3
CMR 25-82-88	28.3	CMR 25-38-	26.2
Yellow root	28.3	CMR 34-35-36	26.2
OMR 29-19-129	28.2	CMR 37-18-201	26.2
Wild 1	28.2	OMR 26-14-9	26.1
CMR 35-26-303	28.1	CMR 31-09-71	26.0
CM 407-30	28.0	CMR 35-91-63	26.0
Wild 2	28.0	V.22	26
CMR 38-66-1	27.5	CMR 25-32-	25.8
CM 3306-3	27.4	CMR 31-06-103	25.8
ระยอง 9	27.2	KU 50	25.3
ชื่อพันธุ์	**ปริมาณแป้ง (%)**	**ชื่อพันธุ์**	**ปริมาณแป้ง (%)**
กลุ่มมันสำปะหลังแป้งต่ำ		**กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน**	
MBRA 191	0.0	ระยอง 2	-
MPAN 70	2.6	BATHANG	-
MPAR 1	3.0	MCOL 22	-
MCOL 2485	3.9	MENTEGA	25.5
MPER 281	3.9	NEP HONGHA	-
		YOLK	21.6
กลุ่มมันสำปะหลังลูกผสม		**กลุ่มมันสำปะหลังลูกผสม**	
(R x Hanatee) 21-21Q	22.5	พิรุณ 2	-
(R x Hanatee) 21-28Q*	-	HB 60	-
พิรุณ 1	-	HANATEE	23.0

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 8 เครื่องหมาย กับมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ห้านาที ซึ่งเป็นพ่อแม่พันธุ์ของเครื่องหมายโมเลกุล พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูง SSRY60 และ MeES0959 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ห้วยบง 60 และ พันธุ์ห้านาทีได้ โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน **(ภาพที่ 1 และตารางที่ 3)** ยกเว้นเครื่องหมายโมเลกุล MeES1019 ไม่พบแถบดีเอ็นเอในมันสำปะหลังทั้ง 2 พันธุ์ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะไซยาไนด์ SSRY28 SSRY77 SSRY103 SSRY105 และ SSRY242 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ห้วยบง 60 และ พันธุ์ห้านาทีได้ **(ภาพที่ 1 และตารางที่ 2)** จึงนำเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 7 เครื่องหมาย ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับมันสำปะหลังจำนวน 59 พันธุ์ที่คัดเลือกไว้

ภาพที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูง (MeES1019, MeES959 และ SSRY60) และเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะไซยาไนด์ SSRY28, SSRY77, SSRY103, SSRY105, SSRY242) กับมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง60 และพันธุ์ห้านาที

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ กับมันสำปะหลังพันธุ์ ห้วยบง 60 และพันธุ์ห้านาที

Marker name	Cassava	Size of DNA (bp)	
SSRY60	HB60	119	-
	HANATEE	126	135
MeES1019	HB60	-	-
	HANATEE	-	-
MeES0959	HB60	267	271
	HANATEE	268	272
SSRY28	HB60	166	-
	HANATEE	162	182
SSRY77	HB60	277	-
	HANATEE	269	277
SSRY103	HB60	262	266
	HANATEE	266	276
SSRY105	HB60	228	234
	HANATEE	228	-
SSRY242	HB60	304	312
	HANATEE	312	-

เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูง MeES959 และ SSRY60 และเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะไซยาไนด์ SSRY28 SSRY77 SSRY103 SSRY105 และ SSRY242 ทดสอบประสิทธิภาพกับมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ที่รวบรวมอยู่ในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 59 พันธุ์ พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิดใช้แยกความแตกต่างในพันธุ์ลูกผสมที่ใช้พันธุ์ห้านาที หรือ พันธุ์ห้วยบงเป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ **(ตารางที่ 4)** แต่เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลทดสอบประสิทธิภาพกับพันธุ์มันสำปะหลังอื่นๆ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 7 ชนิด ไม่สามารถจำแนกลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำได้ **(ตารางที่ 4)** แสดงว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 7 ชนิด สามารถใช้คัดเลือกมันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสมที่ใช้พันธุ์ห้านาที หรือ พันธุ์ห้วยบงเป็นพ่อแม่พันธุ์เท่านั้น ไม่สามารถใช้คัดเลือกในมันสำปะหลังพันธุ์อื่นได้ ดังนั้นจึงต้องพัฒนาหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำ ด้วยเทคโนโลยี Genotyping By Sequencing (GBS) ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูงและเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนด์ต่ำกับพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ จำนวน 59 พันธุ์ ได้แก่ ห้วยบง 60 พันธุ์ห้านาที กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของห้วยบง 60 และห้านาที (4 พันธุ์)

	พันธุ์มันสำปะหลัง	เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูง				เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนด์ต่ำ								
		SSRY60		MeEs0959		SSRY28		SSRY103		SSR105		SSRY242		SSRY77
	กลุ่มมันสำปะหลังแป้งสูง													
1	CMR 35-22-348	120	135	269	274	166	183	261	279	207	230	305	313	278
2	SM 302-5	114	127	271		166	177	265		215	229	300	311	277
3	OMR 29-20-118	114	133	270		166	183	265	276	207	234	304	312	277
4	CMR 33-18-101	115	125	266	270	166	183	261	279	215	229	304		278
5	ระยอง 11	125	134	265	269	183		261	265	207	229	312		278
6	SM 1186-24	119	134	269		166	183	265	274	206	234	304	312	277
7	(V1 x R) 20-15			266		160	183	264		215				
8	Variegated (green)	119	130	266	271	166	183	267	276	229		307	312	277
9	(V7 x R) 21-4Q	130	134	266	271	183		252	263	207	215	300	311	278
10	CMR 38-125-77	119	134	266	270	166	183	262	266	207	229	304	313	277
11	ระยอง 7	134		273		166	183	262	280	207	216	305	322	278
12	CMR 25-82-88	116	135	275		160	183	263	281	208	231	306		278
13	Yellow root	121	131	270		166	182	268	276	229		308	313	278
13	Yellow root	121	131	270		166	182	268	276	229		308	313	278
14	OMR 29-19-129	126	130	267	271	160	183	269	287	215	229	304	312	277
15	Wild 1	119	130	266	270	166	183	262						
16	CMR 35-26-303	114	125	266	270	166		261	279	229	234	304	312	277
17	CM 407-30	119	130	265		176		261	265	194	215	300	303	277

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4(ต่อ) ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูงและเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนด์ต่ำกับพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ จำนวน 59 พันธุ์ ได้แก่ ห้วยบง 60 พันธุ์ห้านาที กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของห้วยบง 60 และห้านาที (4 พันธุ์)

	พันธุ์มันสำปะหลัง	เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูง				เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนด์ต่ำ								
		SSRY60		MeEs0959		SSRY28		SSRY103		SSR105		SSRY242		SSRY77
18	Wild 2	121	129	269		166	183	261	265	206	231	306	312	277
19	CMR 38-66-1	119	125	265		177	183	261	265	228		303	311	277
20	CM 3306-3	119	130	266	270	166	183	265	283	215	229	306		277
21	ระยอง 9	119	134	269		166	183	262	280	229	234	304		277
22	CMH 22-04-1Q	115	134	265	270	160	166	266	277	207	215	292	305	277
23	CMR 32-94-121	120	135	267	272	166	183	262		207	216	313		278
24	(R x CMC 84) 21-5Q	127	131	270		154	183	263	274	208	230	307	315	278
25	CMR 38-106-32	116	126	270	274	182		262	281	230	235	305		278
26	SM 1541-32	120	134	271		166	183	266	275	207	234	304	312	277
27	OMR 28-97-31	114		266	270	160	166	279		215		304	312	277
28	ระยอง 60	119	134	266	270	183		261		207	229	311	319	278
29	OMR 24-87-34	114	133	269		160	183	261	279	207	229	312		277
30	HB 80	125	134	266	270	166		262	266	207	229	304	312	278
31	(V3 x R) 21-16	129		265		183		252						
32	(V3 x R) 20-15	115	134	265	270	183		266	275	207	229	292	304	277
33	CMR 25-38-157Q	115	134	266	270	169	183	261		216	229	311		277
34	CMR 34-35-36	119	125	266	270	169	183	262	266	216	229	304		277
35	CMR 37-18-201	120	126	268	271	166		262	273	230	235	313		277

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4(ต่อ) ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูงและเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนด์ต่ำกับพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ จำนวน 59 พันธุ์ ได้แก่ ห้วยบง 60 พันธุ์ห้านาที กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของห้วยบง 60 และห้านาที (4 พันธุ์)

	พันธุ์มันสำปะหลัง	เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูง						เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนด์ต่ำ							
		SSRY60		MeEs0959		SSRY28		SSRY103		SSR105		SSRY242		SSRY77	
36	OMR 26-14-9	121	131	270	275	166	177	267	278	217	236	294	306	278	
37	CMR 31-09-71	116	121	269	274	160	183	263	281	216		293	312	279	
38	CMR 35-91-63	120	135	267	271	166	183	262	280			304		277	
39	V.22	117	126	265		166	177	265		215	229	299		277	
40	CMR 25-32-429Q	119		266	270	183		262	280	216	229	304	312	277	
41	CMR 31-06-103	125	134	266		168	183	262	272	229		312		277	
42	KU 50	119	134	270		166	183	265	275	207	234	303	311	277	
	กลุ่มมันสำปะหลังแป้งต่ำ														
1	MBRA 191	123	133	265	271	172	182	266		215	229	299	303	277	
2	MPAN 70	115	134	270		160	183	262	280	207	229	312		277	
3	CMR 37-18-201	120	126	268	271	166		262	273	230	235	313		277	
4	MCOL 2485	115	119	271	276	166	177								
5	MPER 281	120	126	267		166	183								
	กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน														
1	ระยอง 2	116		271		177				195	216	295	303	279	270
2	BATHANG	115	134	270		166	184	262	266	207	215	304	321	277	
3	MCOL 22	119		265	270	166	177	266		215	229	292	300	268	276
4	MENTEGA	119	130	266	270	166	184	267	276	229		306	312	277	
5	NEP HONGHA	129	134	265	270	162	166	276	280	229		304	312	277	
6	YOLK	119	130	267	271	166	183	267	276	229		306	312	269	277

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4(ต่อ) ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูงและเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนด์ต่ำกับพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ จำนวน 59 พันธุ์ ได้แก่ ห้วยบง 60 พันธุ์ห้านาที กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของห้วยบง 60 และห้านาที (4 พันธุ์)

	พันธุ์มันสำปะหลัง	เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูง				เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนด์ต่ำ									
		SSRY60		MeEs0959		SSRY28		SSRY103		SSR105		SSRY242		SSRY77	
	กลุ่มมันสำปะหลังลูกผสม														
1	(R x Hanatee) 21-21Q	125	134	265		166	183	266	275	229		300	307	277	
2	(R x Hanatee) 21-28Q*	130	134	265		162	183	266	275	229		307	313	269	277
3	พิรุณ 1	121	127	270	274	166	183	262	272	230		314		277	
4	พิรุณ 2	120	126	267	271	169	183	262	275	230	235	312		277	
1	HB 60	119		267	271	166		262	266	228	234	304	312	277	
2	HANATEE	126	135	268	272	162	182	266	276	228		312		269	277

กรมวิชาการเกษตร

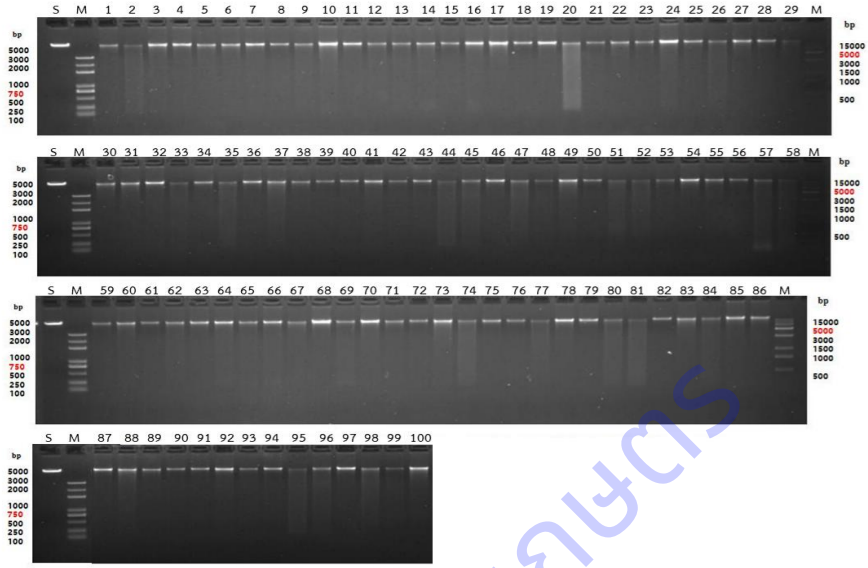
ตารางที่ 5 สายพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์อะไมโลส ระหว่าง 3.25–31.08 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ ระหว่าง 87.40-911.60 mgHCN/kg น้ำหนักสด (วิเคราะห์ปี 2564) จำนวน 137 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สนิปที่พัฒนาขึ้น

ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)
Golden Yellow	18.19	268.20	MCol 2493	10.23	812.28
HL 23	19.72	208.28	MCol 2627	14.74	163.24
KM 140	21.51	172.52	MCol 310	8.67	137.82
MBra 158	18.07	358.28	MCol 32	13.22	162.62
MBra 191	12.65	286.15	MCub 42	5.16	174.56
MBra 273	19.73	451.00	MEcu 135	12.39	846.71
MBra 325	15.67	911.60	MECU 71	14.96	111.75
MBra 403	17.48	474.53	MECU 72	9.23	123.55
MBra 461	6.76	553.22	MENTE GA	22.65	223.92
MBra 514	22.02	321.40	MGua 78	16.40	216.83
MBra 534	13.83	777.94	MMal 26	19.99	87.40
MBra 542	23.18	114.99	MMAL 63	27.40	238.29
MBRA 759	18.35	158.26	MMex 65	6.78	497.40
MBra 781	10.38	196.03	MNGA 1	14.19	225.73
MPan 127	13.07	253.78	MVen 67 B	20.58	208.56
MPan 137	5.77	202.03	MVen 68	28.35	92.28
MPar 104	6.98	122.88	MVen 69	12.87	153.45
MPar 25	15.39	173.71	OMR 26-14-9	18.76	137.35
MPar 4	21.20	132.09	OMR 29-20-118	11.90	112.93
MPer 179	14.92	117.46	OMR 44-23-34	11.84	208.98
MPER 183	7.84	232.91	OMR 50-13-26	22.20	746.75
MPer 234	6.14	164.43	Wild 1	25.94	106.37
Mper 281	13.74	242.57	Wild 2	9.06	258.97
MPer 283	13.07	151.48	Yolk	16.03	111.00
MPer 349	13.75	247.34	เกษตรศาสตร์ 50	7.17	567.82
MPer 353	18.54	123.99	พิรุณ 2	7.02	728.25
MPer 484	6.07	230.22	ยอดดำ	16.22	344.17
MPer 534	3.72	163.05	ระยอง 1	3.72	195.58
MPer 569	6.84	106.77	ระยอง 11	10.93	343.29
MPer 613	18.82	142.17	ระยอง 2	17.07	120.63
MPtr 26	24.05	249.19	ระยอง 3	16.62	186.48
MPtr 8	7.17	598.05	ระยอง 5	8.64	221.15
MTai 1	13.06	155.05	ระยอง 60	13.43	307.03
MTai 3	6.38	150.44	ระยอง 7	14.92	191.96
MUsa 5	11.20	140.02	ระยอง 72	5.53	496.99
MUsa 8	9.72	706.51	ระยอง 9	8.73	324.97
MVen 174	16.08	205.35	ระยอง 90	19.24	227.00
MVen 204	11.06	169.31	ห้วยบง 60	19.30	389.58
MVen 276	8.27	374.18	ห้วยบง 80	23.01	508.23
MVen 297 A	12.99	220.16	ห้านาที	17.12	178.89
MVen 47	19.75	146.73			

กรมวิชาการเกษตร

2.2 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นสำหรับวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคโนโลยี Genotyping By Sequencing (GBS)

ทำการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้ง ระหว่าง 0 - 33.8 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ ระหว่าง 8.26 - 815 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้จำนวน 100 สายพันธุ์ ดังแสดงใน **ตารางที่ 6** นำใบมันสำปะหลังสกัดดีเอ็นเอ ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 200-800 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ พบว่า ไม่มีการปนเปื้อนของ RNA สามารถใช้ในการวิเคราะห์ GBS ด้วยวิธี Next Generation Sequencing **(ภาพที่ 2)**



ภาพที่ 2 คุณภาพดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 100 สายพันธุ์ ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบจีโนไทป์และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิประดับจีโนมด้วยเทคโนโลยี *GBS*

ตารางที่ 6 สายพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้ง ระหว่าง 0 - 33.8 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ ระหว่าง 8.26 - 815 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (วิเคราะห์ปี 2553 – 2558) จำนวน 100 สายพันธุ์ ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิประดับจีโนมด้วยเทคโนโลยี *GBS*

ชื่อพันธุ์	% แป้ง	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	ชื่อพันธุ์	% แป้ง	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)
ระยอง 5	28.5	250	MBra 325	25	647
ระยอง 7	31.5	134	MBra 403	12.7	200
ระยอง 9	31.2	566	MBra 461	20.8	474
ระยอง 11	33.8	281	MBra 509	23.3	857
ระยอง 72	19.7	393	MBra 514	27.9	222
เกษตรศาสตร์ 50	28.3	812	MBra 534	20.5	368
ห้วยบง 60	23.5	56	MBra 542	21.3	60
ห้วยบง 80	29.8	397	MBra 691	2.6	210
MVen 297 A	17.1	1183	MBra 702	21.6	372
ห้านาที	22	59	MBra 781	11.5	120
MENTE GA	25.5	8.26	MBra 792	10.1	952

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6(ต่อ) สายพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้ง ระหว่าง 0-33.8 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ ระหว่าง 8.26 - 815 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (วิเคราะห์ปี 2553–2558) จำนวน 100 สายพันธุ์ ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบจีโนไทป์และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิประดับจีโนมด้วยเทคโนโลยี *GBS*

ชื่อพันธุ์	% แป้ง	ปริมาณไซยาไนด์	ชื่อพันธุ์	% แป้ง	ปริมาณไซยาไนด์
Yolk	18.7	89	MBra 885	22.9	179
CG 165-7	20.3	408	MBra 890	19.2	406
CR 1	12	63	MBra 894	5.5	658
CR 126	22	86	MBra 903	20.2	60
Golden Yellow	22.2	33.8	MBra 931	19.6	646
HL 23	13.7	401	MCol 1084 B	19.5	92
KM 140	27.8	62	MCol 1466	21.8	92
MBol 1	4.6	804	MCol 1702	29.2	91
MBra 110	8.5	216	MCol 2089	19.4	466
MBra 158	23.1	395	MCol 2157	18	39
MBra 191	0.0	12.47	MCol 2173	14.3	93
MBra 242	18.5	339	MCol 2192	22.5	522
MBra 273	17.5	71	MCol 2331	3.9	776
MBra 311	14.2	1158	MCol 2493	16.6	865
MCol 2627	15.2	96	MPer 436	11.5	20
MCol 278	18.7	815	MPer 484	7.6	54
MCol 310	6.4	96	MPer 534	9.7	46
MCol 32	20.5	202	MPer 546	13.6	55
MCol 912 B	27	39	MPer 569	5.7	55
MCub 42	7.9	154	MPer 613	21.5	65
MEcu 104	23.6	223	MPtr 26	14.3	304
MEcu 135	20.7	68	MPtr 8	24	427
MEcu 159	20.7	88	MTai 1	20.5	487
MGua 78	21	53	MTai 3	23.9	201
MMal 26	9.7	138	MUsa 5	11.6	127
MMex 65	25.2	386	MUsa 8	17.9	860
MPan 127	20	93	MVen 174	26	215
MPan 137	25.5	33	MVen 219	7.8	203
MPan 70	2.6	8.46	MVen 276	8.5	813
MPar 104	3	174	Mven 204	22	165
MPar 193	11.8	112	MVen 47	26.3	106
MPar 25	1.3	96	MVen 67 B	10	76
MPar 4	18.3	81	MVen 68	23.4	150
MPer 179	14.8	56	MVen 69	15.8	50
MPer 234	18.5	38	SG 455-1	15.5	629
Mper 281	3.9	10.63	SPY	22.0	35.41
MPer 283	24.9	129	Wild 1	28.2	20.52
MPer 349	7	137	Wild 2	28.0	77.09
MPer 353	16.4	49	ยอดดำ	17.2	356

กรมวิชาการเกษตร

2.3 การวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคโนโลยี *GBS*

มันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจำนวน 100 สายพันธุ์ ที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้ง ระหว่าง 0 - 33.8 เปอร์เซ็นต์ และ พันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ ระหว่าง 8.26 - 815 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการตรวจสอบจีโนไทป์และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิประดับจีโนมด้วยเทคโนโลยี *GBS*

นำข้อมูลจีโนไทป์และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิประดับจีโนมด้วยเทคโนโลยี *GBS* ของมันสำปะหลังจำนวน 100 สายพันธุ์ ซึ่งมีข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป จำนวน 1,048,576 ตำแหน่ง ทำการกรอง (Filter) ข้อมูลที่ missing data < 10 % เหลือข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป จำนวน 324,817 ตำแหน่ง ทำการกรอง (Filter) ข้อมูลอีกครั้งที่ missing data < 10 % Minimum minor allele frequency (MAF) < 0.05, Minimum read depth ≥ 20X พบข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป จำนวน 5,144 ตำแหน่ง

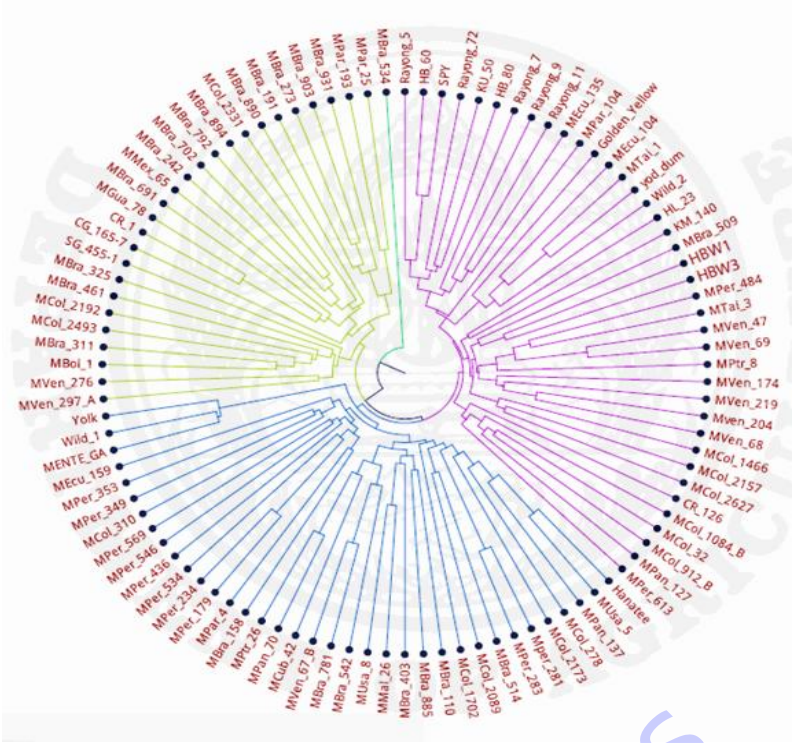
จากการวิเคราะห์พบ SNPs แบบ transitions (A/G หรือ C/T) 72.10% และแบบ transversion (A/C, A/T, C/G หรือ G/T) 27.90% ซึ่ง SNPs แบบ C/T พบมากที่สุด 32.08% และพบ SNPs แบบ C/G น้อยที่สุด 4.59 % อัตราส่วนระหว่าง transition : transversion คิดเป็น 2.59 **(ตารางที่ 7)**

ตารางที่ 7 จำนวนและประเภทของ SNPs จากมันสำปะหลังจำนวน 100 สายพันธุ์

ชนิด	จำนวน	เปอร์เซ็นต์
SNPs	6,392,886	100%
Transition		
A/G	2,302,948	36.02%
C/T	2,306,702	36.08%
Transversion		
A/C	523,819	8.19%
A/T	448,655	7.02%
C/G	293,192	4.59%
G/T	517,570	8.10%

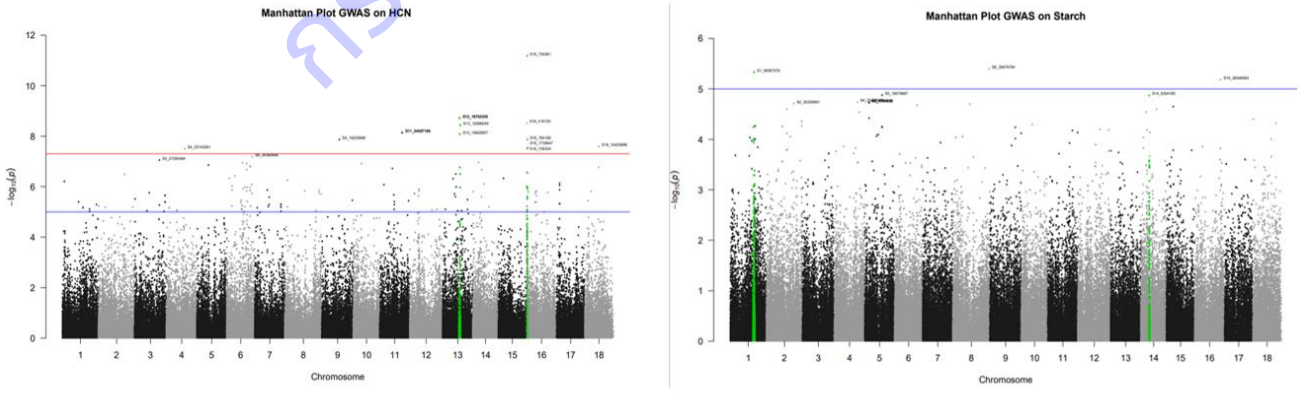
หาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์มันสำปะหลัง โดยใช้ 5144 SNPs ในการจัดกลุ่มสายพันธุ์มันสำปะหลัง 100 สายพันธุ์ พบว่า มีค่า polymorphic information contents (PICs) ของ SNPs อยู่ระหว่าง 0.000 – 0.712 เมื่อทำการจัดกลุ่มด้วยวิธี *UPGMA* สามารถแบ่งกลุ่มมันสำปะหลังได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่อย่างชัดเจน **(ภาพที่ 3)**

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree แสดงระดับความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ในมันสำปะหลัง 100 สายพันธุ์

จากนั้นสร้างแผนที่พันธุกรรมแสดงรูปแบบความเชื่อมโยงในจีโนม โดยใช้ฐานข้อมูล SNPs จำนวน 1,048,576 ตำแหน่ง เครื่องหมายโมเลกุลสนิป ซึ่งเกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณของไซยาไนด์จะกระจายตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 13 และ 16 และเครื่องหมายโมเลกุลสนิป ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณของแป้งจะกระจายตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 1 และ 14 ในจีโนมของมันสำปะหลัง จากผลการวิเคราะห์รูปแบบความเชื่อมโยงในจีโนม พบ SNP จำนวน 40 และ 26 ตำแหน่ง ที่คาดว่าสัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์และแป้งในมันสำปะหลังอย่างมีนัยสำคัญ **(ภาพที่ 5.4)** โดยพิจารณาจากค่า logarithm of significant level [$-\log_{10}$ (P)] ไม่น้อยกว่า 4



ภาพที่ 4 Manhattan plot แสดงผลการวิเคราะห์รูปแบบความเชื่อมโยงในจีโนมที่คาดว่าสัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์และแป้งในมันสำปะหลัง

กรมวิชาการเกษตร

2.4 การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการตรวจ SNP กับลักษณะปริมาณแป้งและไซยาไนด์

ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR โดยพิจารณาจากการวิเคราะห์รูปแบบความเชื่อมโยงในจีโนมที่คาดว่าสัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์และแป้งในมันสำปะหลัง (Manhattan plot) ได้ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปด้วยวิธี Tetra-Primer ARMS–PCR จำนวน 14 ชุด **(ตารางที่ 8)** และ 15 ชุด **(ตารางที่ 9)** ตามลำดับ

ตารางที่ 8 ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด tetra-primer ARMS-PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณแป้งของมันสำปะหลัง จำนวน 14 ชุด

ชื่อไพรเมอร์	Sequence (5'->3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)
1STARinF	TTGACATATTTCCCTATGGCTCACAT	
1STARinR	AGGGAGTACACATTATGCATAACTTTTTT	Product size for T allele: 163
1STAROutF	TGGGTTTATATTTGTTCTTCAATGTCAA	Product size for A allele: 210
1STAROutR	GAATCTGTTCCAAATAATGAAAACCATT	Product size of two outer primers: 318
2STARinF	ACATATTTCCCTATGGCTCATATCGA	
2STARinR	AATAGGGAGTACACATTATGCATAACGTC	Product size for A allele: 163
2STAROutF	TGGGTTTATATTTGTTCTTCAATGTCAA	Product size for G allele: 213
2STAROutR	GAAGAATCTGTTCCAAATAATGAAAACC	Product size of two outer primers: 321
3STARinF	CTATGGCTCATATAGAAAGTTATGCATCAT	
3STARinR	GTGATGCCTGAAATAGGGAGTACCCG	Product size for T allele: 239
3STAROutF	ATTGTTCAAAATTTCCATTGCAACACTT	Product size for C allele: 266
3STAROutR	TTTGGCCAGAACCATTAATCAATACAGT	Product size of two outer primers: 449
4STARinF	GCTCATATAGAAAGTTATGCATAATGGGC	
4STARinR	ATGGGTGATGCCTGAAATAGGGATTA	Product size for C allele: 253
4STAROutF	GTTCCTTGATCAATTGTTCAAAATTTCC	Product size for T allele: 282
4STAROutR	ATAAGATAAGGTTTGACATTTTGGCCAG	Product size of two outer primers: 480
5STARinF	CGAAGGAAACAAGCAGAGTTTGACCATAAA	
5STARinR	TTATAGTGTGCGTGGTTAGGGCGAGC	Product size for A allele: 198
5STAROutF	TTTAAAAGTGGAGGTCACGAGGAGAGGG	Product size for G allele: 138
5STAROutR	TTTGCAAGTCAAAACAAGAGCGTGAAAA	Product size of two outer primers: 280
6STARinF	ACAAGCAGAGTTTGACCATCAGCTCA	
6STARinR	ACATAAGCTTATAGTGTGCGTGGTTAGTGC	Product size for A allele: 199
6STAROutF	AAATGTTTTGGAATTGGGATGAATTGAT	Product size for G allele: 230
6STAROutR	GATGCGTAATTTGCAAGTCAAAACAAGA	Product size of two outer primers: 373
8STARinF	TCCATGTTAGGTTGTACTATTACAGAAT	
8STARinR	ATTAAAATGCATAATAGAAATTTGAGAC	Product size for T allele: 212
8STAROutF	ATAATCGATTAAAGTGAGAAACAACT	Product size for G allele: 253
8STAROutR	GTACATATGACAATTTTAGATCAGTTATG	Product size of two outer primers: 409

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 8(ต่อ) ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด tetra-primer ARMS-PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณแป้งของมันสำปะหลัง จำนวน 14 ชุด

ชื่อไพรเมอร์	Sequence (5'->3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)
11STARinF	TCCAGGAGACCGAGTACTTGTTTTCGTA	
11STARinR	GTCTCAACACAATGGAGCCAAAACAA	Product size for A allele: 188
11STAROutF	CAAGGATCAGTTGATGATTGCAAGGATA	Product size for T allele: 209
11STAROutR	AGAAGCACTACGCAAACAGCATCTCTCT	Product size of two outer primers: 343
12STARinF	GAAACTTAAATTTGCTGTGTAGAATCACTT	
12STARinR	GTCCATGAGAAAGGGGCCTTAGAGAT	Product size for T allele: 224
12STAROutF	TCAAAAATTTTAGTTTGCGGAACATAAA	Product size for A allele: 264
12STAROutR	CTTTGTATACACAACCAAATCCACCTTC	Product size of two outer primers: 432
13STARinF	TAGGTTGTACTATTACAGGATTTGCA	
13STARinR	TTTATTCATTAAAATGCATAATAGAAAGTC	Product size for A allele: 202
13STAROutF	AGATAATCGATTAAAGTGAGAAACAACT	Product size for G allele: 262
13STAROutR	CATATGACAATTTTAGATCAGTTATGGA	Product size of two outer primers: 408
14STARinF	ATGCAACATCGGCGAAAGGAAACTCGT	
14STARinR	TCTTAGCCTGCTTGTGGAAGTCAAATAGTC	Product size for T allele: 203
14STAROutF	GCCAAAAGCGACCATAGCAAACGTAGAG	Product size for G allele: 169
14STAROutR	GGACCAACCCTTCGAAGCAAGTCATTTA	Product size of two outer primers: 315
15STARinF	AAGACTGGCCTCTAGTCAGTGACATGATA	
15STARinR	AACACAAGGAGCCTCTGGTTATTTCTG	Product size for A allele: 200
15STAROutF	ATCTTAGAAGATTATGTTCAAGCCCCCA	Product size for C allele: 161
15STAROutR	CATCACATCACTTGGGTTTATAGGGTTT	Product size of two outer primers: 305
16STARinF	CTAAAACAGAAAACAGATGATAAAGAACAA	
16STARinR	GCATCTGTTTCTAAAACTGGATTCTC	Product size for A allele: 162
16STAROutF	GATAGACTTAAGAAAAATGTTGGACCAT	Product size for G allele: 217
16STAROutR	AGAATAATTTAATTGGACTGAATTCCAG	Product size of two outer primers: 323
17STARinF	CAATGCCTCACATTCACACGACCCCT	
17STARinR	GATGACCTTTTTCCAATAAGTAGCCAATAC	Product size for T allele: 203
17STAROutF	ATGACTCCATGCACGGATATAAGCACAT	Product size for G allele: 255
17STAROutR	TGGAATTCACATAGAAAGCACCAATCGT	Product size of two outer primers: 402

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 9 ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด tetra-primer ARMS-PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณไซยาไนด์ของมันสำปะหลัง จำนวน 15 ชุด

ชื่อไพรเมอร์	Sequence (5'->3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)
1CHNinF	CCCTTATACCTATAAACCTGTGCGTA	
1CHNinR	CCACTAGACAAAAAAACTCAAAAAATCTAC	Product size for A allele: 198
1CHNoutF	TGTCTATTTTGTTTTACACATGTTGAAAC	Product size for G allele: 138
1CHNoutR	TGCTAATATTAATGCGAGATGAAGTAGT	Product size of two outer primers: 280
2CHNinF	TTATCGATTTTTTGAGTTTTTTTGTATG	
2CHNinR	GCAATCTGGCATGGGGATGCCCCCCT	Product size for G allele: 254
2CHNoutF	CAAAGTCGATTTGGTAAAAGATGTGGCCT	Product size for A allele: 282
2CHNoutR	CAAACCTCATTTCAAAATTGGTGCGAAG	Product size of two outer primers: 482
3CHNinF	AAAGAAGCCATGAATCCAAAGCAATT	
3CHNinR	ACCATACCTCACACTCTTTCAAGTTGCT	Product size for T allele: 186
3CHNoutF	AACTTTTTCCTGAATTGAATTGTTGGTG	Product size for A allele: 133
3CHNoutR	ACCATAAAGTCACTGACCAAATGGAACT	Product size of two outer primers: 265
4CHNinF	TGATGCTCTCTCACTCTCAACCTCTGATC	
4CHNinR	CCTCATGCCCAGACCTGAAGCTCGGA	Product size for C allele: 229
4CHNoutF	CAGGGTTCAGATTACAGACTCCAGGGAGG	Product size for T allele: 170
4CHNoutR	GACCACAGAAGATCTGGGTTGACATGGA	Product size of two outer primers: 344
5CHNinF	AATCGGAATCAACAATCCAAAAATGC	
5CHNinR	TGTGTCTACGTGAGCAAAGAACCAATC	Product size for C allele: 195
5CHNoutF	AGCAAGTCTGTGGTCTATGATTGGTTCA	Product size for G allele: 246
5CHNoutR	ATCTGCCACCTTCTGTCAAGGTTTAAAA	Product size of two outer primers: 388
6CHNinF	CAGAGCAGAAGTGGTCGAGCAATATATG	
6CHNinR	ACAACAGAGATGCTCTCGTTATGATCTTGT	Product size for G allele: 175
6CHNoutF	CCTTGTCGTTCTGTTAATTCATGGTGTT	Product size for A allele: 206
6CHNoutR	TTGATTAAGCCACTTGGGTTCATGTCTA	Product size of two outer primers: 323
7CHNinF	AGCAATAAATAATGATAATCTAACTCCCTG	
7CHNinR	GTGATTCTGTGAGTCCACAACTACGGA	Product size for G allele: 225
7CHNoutF	TTTTTGTGGAATTTGTCTTCCCTATTAA	Product size for T allele: 157
7CHNoutR	GGAACAAAGTGAGGAAGAGTTTCATATG	Product size of two outer primers: 325
8CHNinF	GGGAGATCACATGGGAAACCCATATT	
8CHNinR	AAAAATTTGGCTTTTTTACAGATCCAGCC	Product size for T allele: 206
8CHNoutF	TCCTACGTCGATGTTGTGTCGAAATTAA	Product size for G allele: 277
8CHNoutR	AAAGAATCCAGAGATACAGATGCCCATG	Product size of two outer primers: 428

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 9(ต่อ) ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด tetra-primer ARMS-PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณไซยาไนด์ของมันสำปะหลัง จำนวน 15 ชุด

ชื่อไพรเมอร์	Sequence (5'->3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)
9CHNinF	GGAGATCACATGGGAAACCCATGCGT	
9CHNinR	AAAAATTTGGCTTTTTTACAGATCCGAC	Product size for T allele: 200
9CHNoutF	GAAGAGTCCTACGTCGATGTTGTGTCGA	Product size for G allele: 283
9CHNoutR	ATCCAGAGATACAGATGCCCATGCAAAG	Product size of two outer primers: 429
10CHNinF	TGGACTCTAATTCTTGTCAAATATGTTCTG	
10CHNinR	CGTATTGTGTTATGGACAATGTTATGTGT	Product size for G allele: 211
10CHNoutF	AACCAAAATAACGGTAACCAAAATCATA	Product size for A allele: 167
10CHNoutR	ATTTTGATAACTTGGAAGGATAAGCAAG	Product size of two outer primers: 319
12CHNinF	CATATTAGATTTGAAACTGGACTCTAAGTT	
12CHNinR	GTTATGGGCATAACATATTTGACCAG	Product size for T allele: 191
12CHNoutF	ATTTTCAGCCTCTTAAAATTAATTCAGA	Product size for C allele: 234
12CHNoutR	ATAACAAGAGAAAAATCGTGTTTGAACT	Product size of two outer primers: 369
13CHNinF	GTGGACTCACAGAATCACAAGTCATTGTAC	
13CHNinR	GAAGGGGAGGAATTATTTCTCACCCA	Product size for C allele: 207
13CHNoutF	CTTGGCAAATTCTGAGGCTTATTTATGG	Product size for T allele: 246
13CHNoutR	TGGTGGTTCTTGAAATCATAGGAACAAA	Product size of two outer primers: 397
14CHNinF	ATTGTTAGTCGTTCCACAGTAGAGGTAG	
14CHNinR	ACGGTGGAGGCCATGCTTTTGTACTA	Product size for G allele: 207
14CHNoutF	TCCAACTACTTGAAGACCCCTGACTAGA	Product size for T allele: 140
14CHNoutR	CTTGATCTCACAAGATGTGACAATCGAT	Product size of two outer primers: 293
15CHNinF	AACACTCGTTTATAATGCCTAGTCACTTAC	
15CHNinR	TTCTTATTTTATGGCCCAAAGATTGA	Product size for C allele: 231
15CHNoutF	CACGCTTTTGTAATCTTTTCATATTTTT	Product size for T allele: 165
15CHNoutR	TAATTAAGACCATAATACAGTCTTCGCC	Product size of two outer primers: 340
16CHNinF	TCGAAAAATTGATAATAATGGCTACAGCA	
16CHNinR	TTCATGTCTGCAGCATGATGCAAAAA	Product size for A allele: 227
16CHNoutF	ATGGCAAATCAGAGGAGAAGACAACAAC	Product size for T allele: 283
16CHNoutR	CGGGATTATCTTCTTTACACGCTGCATA	Product size of two outer primers: 455

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

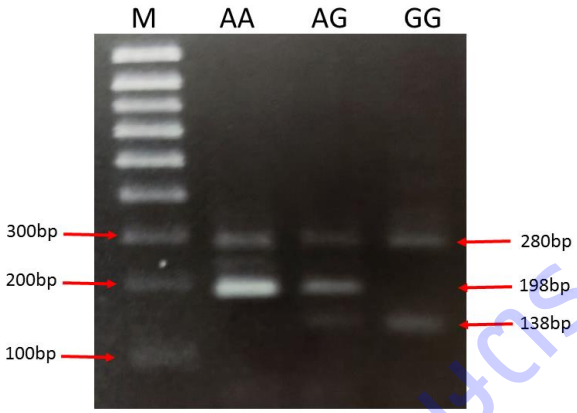
2.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณแป้งและไซยาไนด์ของมันสำปะหลัง

2.5.1 การตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง

ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้งทั้ง 14 ชุด โดยทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่มีอัลลีลต่างๆ พบว่าชุดไพรเมอร์ทั้ง 14 ชุดไม่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ดังนั้นการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่สัมพันธ์กับปริมาณแป้งด้วยเทคนิค Pyrosequencing เป็นอีกวิธีหนึ่งจะใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปได้

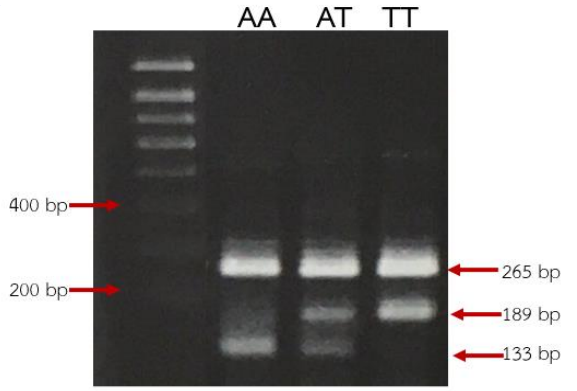
2.5.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์

ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ทั้ง 15 ชุด ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป ชุดที่ 1 (1CHN) ชุดที่ 3 (3CHN) และชุดที่ 13 (13CHN) สามารถแยกจีโนไทป์ของแต่ละอัลลีลของมันสำปะหลังได้ชัดเจน โดยเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป ชุดที่ 1 (1CHN) ทดสอบกับมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดเฮเทอโรไซกัส (heterozygous: อัลลีล AG) จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 280 198 และ 138 คู่เบส มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส (homozygous: อัลลีล AA) จะเกิดแถบดีเอ็นขนาด 280 และ 198 คู่เบส และมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส (homozygous: อัลลีล GG) จะเกิดแถบดีเอ็นขนาด 280 และ 138 คู่เบส **(ภาพที่ 5)**



ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ชุดที่ 1 (1CHN) โดยใช้มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 280 mg HCN/kg น้ำหนักสด (อัลลีล AA) และมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า 280 mg HCN/kg น้ำหนักสด (อัลลีล AG และ อัลลีล GG)

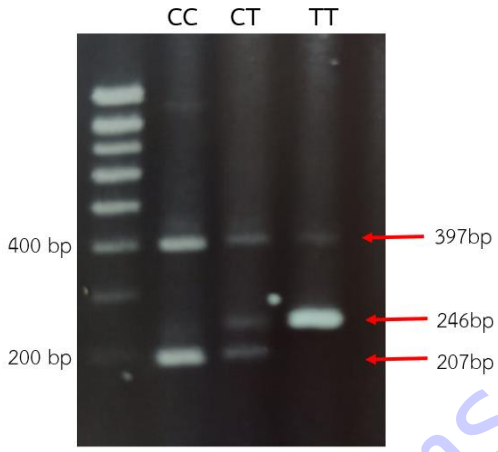
เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป ชุดที่ 3 (3CHN) ทดสอบกับมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดเฮเทอโรไซกัส (heterozygous: อัลลีล AT) จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 265 189 และ 133 คู่เบส มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส (homozygous: อัลลีล AA) จะเกิดแถบดีเอ็นขนาด 265 และ 133 คู่เบส และ มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส (homozygous: อัลลีล TT) จะเกิดแถบดีเอ็นขนาด 265 และ 189 คู่เบส **(ภาพที่ 6)**



ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ชุดที่ 3 (3CHN) โดยใช้มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด (อัลลีล TT) และมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด (อัลลีล AT และ อัลลีล AA)

กรมวิชาการเกษตร

เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป ชุดที่ 13 (13CHN) ทดสอบกับมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดเฮเทอโรไซกัส (heterozygous: อัลลีล CT) จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 397 246 และ 207 คู่เบส มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิด โฮโมไซกัส (homozygous: อัลลีล CC) จะเกิดแถบดีเอ็นขนาด 397 และ 207 คู่เบส และ มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส (homozygous: อัลลีล TT) จะเกิดแถบดีเอ็นขนาด 397 และ 246 คู่เบส **(ภาพที่ 7)**



ภาพที่ 7 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ชุดที่ 13 (13CHN) โดยใช้มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด (อัลลีล CC) และมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด (อัลลีล CT และ อัลลีล TT)

2.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป

นำชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปชุดที่ 1 (1CHN) ชุดที่ 3 (3CHN) และชุดที่ 13 (13CHN) ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ที่อยู่ในช่วง 87.40 - 911.60 mg HCN/kg น้ำหนักสด เพื่อเป็นการยืนยันว่าชุดไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบนี้ สามารถใช้ในการตรวจสอบลักษณะไซยาไนด์ของมันสำปะหลังได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปชุดที่ 1 (1CHN) ชุดที่ 3 (3CHN) และชุดที่ 13 (13CHN) สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลฟีโนไทป์ (phenotype) คิดเป็นร้อยละ 64.81 73.33 และ 76.64 ตามลำดับ **(ตารางที่ 10 - 12)**

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 10 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 1CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 108 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/k	รูปแบบของการใช้		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์	รูปแบบของการใช้	
1	01-77-1	373.03	3	T	25	CMR 47-30-8	399.99	1	F
2	CM 4574-7	599.87	1	F	26	CMR 48-20-17	294.46	1	F
3	CMR 23-149-59	186.57	1	T	27	CMR 48-35-1	545.94	1	F
4	CMR 26-08-61	283.58	1	T	28	CMR 48-53-48	164.11	1	T
5	CMR 28-05-13	624.98	1	F	29	CMR 49-89-70	195.57	1	T
6	CMR 30-71-25	251.89	3	F	30	CMR 50-30-23	211.79	1	T
7	CMR 31-42-20	240.27	1	T	31	CMR 50-41-1	136.52	1	T
8	CMR 32-94-121	540.56	1	F	32	CMR 50-73-6	205.17	1	T
9	CMR 33-35-69	253.09	1	T	33	CMR 51-04-42	412.60	1	F
10	CMR 33-38-48	253.55	1	T	34	CMR 51-13-14	320.56	1	F
11	CMR 35-112-1	280.05	1	T	35	CMR 51-23-14	396.74	1	F
12	CMR 35-22-348	257.95	1	T	36	CR 126	294.20	1	F
13	CMR 37-18-201	549.62	1	F	37	Golden Yellow	268.20	1	T
14	CMR 38-125-77	116.13	1	T	38	HL 23	208.28	2	F
15	CMR 41-109-72	280.72	1	T	39	MBra 158	358.28	1	F
16	CMR 41-112-21	467.11	1	F	40	MBra 191	286.15	1	T
17	CMR 41-42-3	313.40	1	F	41	MBra 273	451.00	1	F
18	CMR 42-01-2	166.51	1	T	42	MBra 461	553.22	3	T
19	CMR 43-08-89	262.34	1	T	43	MBra 514	321.40	1	F
20	CMR 44-29-12	265.63	1	T	44	MBra 534	777.94	1	F
21	CMR 46-30-264	507.77	1	F	45	MBra 542	114.99	1	T
22	CMR 46-31-7	470.17	1	F	46	MBRA 759	158.26	1	T
23	CMR 46-55-23	312.56	1	F	47	MBra 781	196.03	1	T
24	CMR 47-02-9	521.73	1	F	48	MBra 885	346.39	1	F

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 10(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 1CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 108 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์	รูปแบบของการใช้		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์	รูปแบบของการใช้	
49	MBra 894	449.79	2	T	73	MPer 234	164.43	3	F
50	MBra 931	297.24	1	F	74	MPer 283	151.48	1	T
51	MCol 1084 B	425.10	1	F	75	MPer 484	230.22	1	T
52	MCol 1466	115.51	1	T	76	MPer 534	163.05	1	T
53	MCol 1702	168.35	1	T	77	MPer 569	106.77	1	T
54	MCol 2089	354.09	3	T	78	MPtr 26	249.19	1	T
55	MCol 2157	103.87	1	T	79	MPtr 8	598.05	1	F
56	MCol 2173	168.43	1	T	80	MTai 1	155.05	1	T
57	MCol 2331	685.56	2	T	81	MTai 3	150.44	1	T
58	MCol 2493	812.28	3	T	82	MUsa 5	140.02	1	T
59	MCol 2627	163.24	1	T	83	MUsa 8	706.51	3	T
60	MCol 32	162.62	1	T	84	MVen 174	205.35	1	T
61	MEcu 135	846.71	1	F	85	MVen 204	169.31	1	T
62	MECU 72	123.55	1	T	86	MVen 276	374.18	2	T
63	MENTE GA	223.92	1	T	87	MVen 68	92.28	1	T
64	MGua 78	216.83	1	T	88	MVen 69	153.45	1	T
65	MMAL 63	238.29	1	T	89	OMR 26-14-9	137.35	1	T
66	MNGA 1	225.73	1	T	90	OMR 29-20-118	112.93	1	T
67	MPan 127	253.78	1	T	91	OMR 44-23-34	208.98	1	T
68	MPan 137	202.03	1	T	92	Wild 1	106.37	1	T
69	MPar 104	122.88	1	T	93	Yolk	111.00	1	T
70	MPar 25	173.71	1	T	94	เกษตรศาสตร์ 50	567.82	1	F
71	MPer 179	117.46	3	F	95	พิรุณ 2	728.25	1	F
72	MPER 183	232.91	3	F	96	ยอดดำ	344.17	1	F

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 10(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 1CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 108 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
97	ระยอง 1	195.58	1	T	103	ระยอง 72	496.99	1	F
98	ระยอง 2	120.63	1	T	104	ระยอง 9	324.97	1	F
99	ระยอง 3	186.48	1	T	105	ระยอง 90	227.00	1	T
100	ระยอง 5	221.15	1	T	106	ห้วยบง 60	389.58	1	F
101	ระยอง 60	307.03	2	T	107	ห้วยบง 80	508.23	1	F
102	ระยอง 7	191.96	1	T	108	ห้านาที	178.89	1	T
จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)		**True (T)**	**70/108 (64.81)**						
		False (F)	**38/108 (35.19)**						

[1] รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 280 mgHCN/kg น้ำหนักสด

2 และ 3 แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า 280 mgHCN/kg น้ำหนักสด

T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์

F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 11 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 120 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
1	01-77-1	373.03	3	T	23	CMR 46-31-7	470.17	3	T
2	CM 4574-7	599.87	3	T	24	CMR 46-47-137	725.62	2	T
3	CMR 23-149-59	186.57	3	F	25	CMR 46-55-23	312.56	3	T
4	CMR 26-08-61	283.58	3	T	26	CMR 47-02-9	521.73	3	T
5	CMR 28-05-13	624.98	1	F	27	CMR 47-30-8	399.99	3	T
6	CMR 30-71-25	251.89	3	T	28	CMR 48-20-17	294.46	3	T
7	CMR 31-42-20	240.27	3	F	29	CMR 48-35-1	545.94	3	T
8	CMR 32-94-121	540.56	1	F	30	CMR 48-53-48	164.11	1	T
9	CMR 33-35-69	253.09	1	T	31	CMR 49-54-67	452.28	2	T
10	CMR 33-38-48	253.55	3	T	32	CMR 49-89-70	195.57	3	F
11	CMR 35-112-1	280.05	3	T	33	CMR 50-20-114	312.85	2	T
12	CMR 35-22-348	257.95	1	F	34	CMR 50-20-2	662.95	2	T
13	CMR 37-18-201	549.62	3	T	35	CMR 50-30-23	211.79	3	F
14	CMR 38-125-77	116.13	3	F	36	CMR 50-41-1	136.52	3	F
15	CMR 41-109-72	280.72	3	T	37	CMR 50-73-6	205.17	1	T
16	CMR 41-112-21	467.11	3	T	38	CMR 51-04-42	412.60	1	F
17	CMR 41-42-3	313.40	3	T	39	CMR 51-13-14	320.56	3	T
18	CMR 42-01-2	166.51	1	T	40	CMR 51-23-14	396.74	3	T
19	CMR 43-08-89	262.34	1	F	41	CR 126	294.20	1	F
20	CMR 44-03-57	434.40	2	T	42	Golden Yellow	268.20	3	F
21	CMR 44-29-12	265.63	3	T	43	HL 23	208.28	2	F
22	CMR 46-30-264	507.77	3	T	44	KM 140	172.52	1	T

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 11(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 120 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
45	MBra 158	358.28	3	F	67	MEcu 135	846.71	3	T
46	MBra 273	451.00	1	T	68	MECU 71	111.75	1	T
47	MBra 403	474.53	3	F	69	MECU 72	123.55	1	T
48	MBra 461	553.22	3	T	70	MENTE GA	223.92	1	T
49	MBra 534	777.94	3	T	71	MGua 78	216.83	1	T
50	MBra 542	114.99	1	T	72	MMAL 63	238.29	1	T
51	MBRA 759	158.26	1	T	73	MNGA 1	225.73	3	F
52	MBra 781	196.03	1	T	74	MPan 127	253.78	1	T
53	MBra 792	660.09	3	T	75	MPan 137	202.03	1	T
54	MBra 885	346.39	3	T	76	MPar 25	173.71	1	T
55	MBra 890	797.90	2	T	77	MPar 4	132.09	1	T
56	MBra 894	449.79	2	F	78	MPer 179	117.46	1	T
57	MBra 931	297.24	3	T	79	MPER 183	232.91	1	T
58	MCol 1084 B	425.10	2	T	80	MPer 234	164.43	1	T
59	MCol 1466	115.51	3	F	81	Mper 281	242.57	2	F
60	MCol 2089	354.09	2	T	82	MPer 283	151.48	3	F
61	MCol 2157	103.87	1	T	83	MPer 349	247.34	1	T
62	MCol 2173	168.43	1	T	84	MPer 353	123.99	1	T
63	MCol 2493	812.28	3	T	85	MPer 484	230.22	1	T
64	MCol 2627	163.24	1	T	86	MPer 569	106.77	1	T
65	MCol 32	162.62	1	T	87	MPtr 26	249.19	1	T
66	MCub 42	174.56	3	F	88	MPtr 8	598.05	1	F

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 11(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 120 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
89	MTai 1	155.05	3	F	105	Yolk	111.00	1	T
90	MTai 3	150.44	1	T	106	เกษตรศาสตร์ 50	567.82	3	T
91	MUsa 5	140.02	1	T	107	พิรุณ 2	728.25	1	F
92	MUsa 8	706.51	3	T	108	ยอดดำ	344.17	3	T
93	MVen 174	205.35	1	T	109	ระยอง 1	195.58	3	T
94	MVen 204	169.31	1	T	110	ระยอง 2	120.63	1	T
95	MVen 276	374.18	2	T	111	ระยอง 3	186.48	1	F
96	MVen 297 A	220.16	3	F	112	ระยอง 5	221.15	1	T
97	MVen 47	146.73	1	T	113	ระยอง 60	307.03	2	T
98	MVen 67 B	208.56	1	T	114	ระยอง 7	191.96	3	F
99	MVen 68	92.28	1	T	115	ระยอง 72	496.99	3	T
100	OMR 26-14-9	137.35	1	T	116	ระยอง 9	324.97	3	F
101	OMR 29-20-118	112.93	1	T	117	ระยอง 90	227.00	1	T
102	OMR 44-23-34	208.98	3	F	118	ห้วยบง 60	389.58	1	F
103	OMR 50-13-26	746.75	2	T	119	ห้วยบง 80	508.23	1	F
104	Wild 1	106.37	1	T	120	ห้านาที	178.89	1	T
จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)		**True (T))**	**88/120 (73.33)**						
		False (F)	**32/120 (26.67)**						

[1] รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mgHCN/kg น้ำหนักสด

2 และ 3 แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า 250 mgHCN/kg น้ำหนักสด

T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์

F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 12 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 13CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 137 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
1	01-77-1	373.03	3	T	21	CMR 43-08-89	262.34	1	F
2	CG 165-7	315.81	3	T	22	CMR 44-03-57	434.40	2	T
3	CM 4574-7	599.87	3	T	23	CMR 44-29-12	265.63	3	T
4	CMR 23-149-59	186.57	3	F	24	CMR 46-30-264	507.77	3	T
5	CMR 26-08-61	283.58	3	T	25	CMR 46-31-7	470.17	3	T
6	CMR 28-05-13	624.98	1	F	26	CMR 46-47-137	725.62	2	T
7	CMR 30-71-25	251.89	3	T	27	CMR 46-55-23	312.56	3	T
8	CMR 31-42-20	240.27	3	F	28	CMR 47-02-9	521.73	3	T
9	CMR 32-94-121	540.56	1	F	29	CMR 47-30-8	399.99	3	T
10	CMR 33-35-69	253.09	3	T	30	CMR 48-20-17	294.46	3	T
11	CMR 33-38-48	253.55	3	T	31	CMR 48-35-1	545.94	3	T
12	CMR 35-112-1	280.05	3	T	32	CMR 48-53-48	164.11	1	T
13	CMR 35-22-348	257.95	1	T	33	CMR 49-54-67	452.28	2	T
14	CMR 37-18-201	549.62	3	T	34	CMR 49-89-70	195.57	3	F
15	CMR 38-125-77	116.13	3	F	35	CMR 50-20-114	312.85	2	T
16	CMR 41-109-72	280.72	3	T	36	CMR 50-20-2	662.95	2	T
17	CMR 41-112-21	467.11	3	T	37	CMR 50-30-23	211.79	3	F
18	CMR 41-42-3	313.40	3	T	38	CMR 50-41-1	136.52	3	F
19	CMR 42-01-2	166.51	1	T	39	CMR 50-73-6	205.17	1	T
20	CMR 42-44-98	484.46	2	T	40	CMR 51-04-42	412.60	1	F

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 12(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 13CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 137 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
41	CMR 51-13-14	320.56	3	T	61	MBra 890 1:1	797.90	2	T
42	CMR 51-23-14	396.74	3	T	62	MBra 894	449.79	2	T
43	CR 1	146.30	1	T	63	MBra 931	297.24	3	T
44	CR 126	294.20	1	F	64	MCol 1084 B	425.10	1	F
45	Golden Yellow	268.20	1	F	65	MCol 1466	115.51	3	F
46	HL 23	208.28	2	F	66	MCol 1702	168.35	3	F
47	KM 140	172.52	1	T	67	MCol 2089	354.09	3	T
48	MBra 158	358.28	3	T	68	MCol 2157	103.87	1	T
49	MBra 191	286.15	1	F	69	MCol 2173	168.43	1	T
50	MBra 273	451.00	1	F	70	MCol 2331	685.56	2	T
51	MBra 325	911.60	2	T	71	MCol 2493	812.28	3	T
52	MBra 403	474.53	3	T	72	MCol 2627	163.24	1	T
53	MBra 461	553.22	3	T	73	MCol 310	137.82	1	T
54	MBra 514	321.40	3	T	74	MCol 32	162.62	1	T
55	MBra 534	777.94	2	T	75	MCub 42	174.56	3	F
56	MBra 542	114.99	1	T	76	MEcu 135	846.71	3	T
57	MBRA 759	158.26	1	T	77	MECU 71	111.75	1	T
58	MBra 781	196.03	1	T	78	MECU 72	123.55	1	T
59	MBra 792	660.09	3	T	79	MENTE GA	223.92	1	T
60	MBra 885	346.39	3	T	80	MGua 78	216.83	1	T

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 12(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 13CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 137 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
81	MMal 26	87.40	3	F	101	MPtr 26	249.19	1	T
82	MMAL 63	238.29	1	T	102	MPtr 8	598.05	1	F
83	MMex 65	497.40	3	T	103	MTai 1	155.05	3	F
84	MNGA 1	225.73	3	F	104	MTai 3	150.44	1	T
85	MPan 127	253.78	1	T	105	MUsa 5	140.02	1	T
86	MPan 137	202.03	1	T	106	MUsa 8	706.51	3	T
87	MPar 104	122.88	3	F	107	MVen 174	205.35	1	T
88	MPar 25	173.71	1	T	108	MVen 204	169.31	1	T
89	MPar 4	132.09	1	T	109	MVen 276	374.18	2	T
90	MPer 179	117.46	1	T	110	MVen 297 A	220.16	2	F
91	MPER 183	232.91	1	T	111	MVen 47	146.73	1	T
92	MPer 234	164.43	1	T	112	MVen 67 B	208.56	1	T
93	Mper 281	242.57	3	F	113	MVen 68	92.28	1	T
94	MPer 283	151.48	3	F	114	MVen 69	153.45	1	T
95	MPer 349	247.34	1	T	115	OMR 26-14-9	137.35	1	T
96	MPer 353	123.99	1	T	116	OMR 29-20-118	112.93	1	T
97	MPer 484	230.22	1	T	117	OMR 44-23-34	208.98	3	F
98	MPer 534	163.05	1	T	118	OMR 50-13-26	746.75	2	T
99	MPer 569	106.77	1	T	119	Wild 1	106.37	1	T
100	MPer 613	142.17	1	T	120	Wild 2	258.97	1	T

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 12(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 13CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 137 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
121	Yolk	111.00	1	T	130	ระยอง 60	307.03	2	T
122	เกษตรศาสตร์ 50	567.82	3	T	131	ระยอง 7	191.96	1	T
123	พิรุณ 2	728.25	1	F	132	ระยอง 72	496.99	3	T
124	ยอดดำ	344.17	3	T	133	ระยอง 9	324.97	3	T
125	ระยอง 1	195.58	3	F	134	ระยอง 90	227.00	1	T
126	ระยอง 11	343.29	3	T	135	ห้วยบง 60	389.58	1	F
127	ระยอง 2	120.63	1	T	136	ห้วยบง 80	508.23	1	F
128	ระยอง 3	186.48	1	T	137	ห้านาที	178.89	1	T
129	ระยอง 5	221.15	1	T					
จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)		**True (T))**	**105/137 (76.64)**						
		False (F)	**32/137 (23.36)**						

[1] รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mgHCN/kg น้ำหนักสด

2 และ 3 แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า 250 mgHCN/kg น้ำหนักสด

T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์

F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไน

กรมวิชาการเกษตร

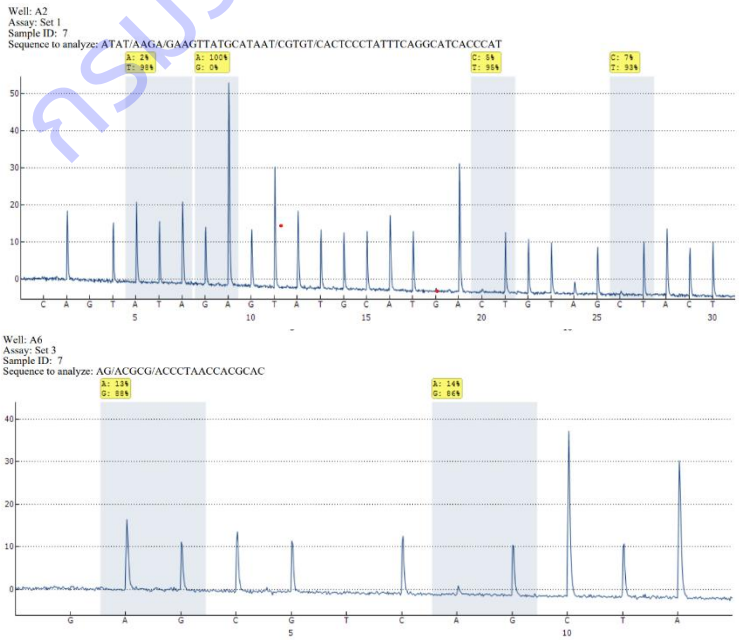
2.6 การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่สัมพันธ์กับปริมาณแป้งด้วยเทคนิค Pyrosequencing

ใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์รูปแบบความเชื่อมโยงในจีโนมที่คาดว่าสัมพันธ์กับปริมาณแป้งในมันสำปะหลัง (Manhattan plot) ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป ได้ไพรเมอร์ชุดที่ 1 ซึ่งสามารถครอบคลุมสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง ถึง 4 ตำแหน่ง ส่วนไพรเมอร์ชุดที่ 2 จะครอบคลุมสนิป จำนวน 2 ตำแหน่ง **(ตารางที่ 13)**

ตารางที่ 13 ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้งของมันสำปะหลังด้วยเทคนิค Pyrosequencing จำนวน 2 ชุด

SNP name	Primer name	Sequence (5'->3')
SNP 1	Set1-forward primer	5'-CTGTGCTTGTCAATGGACTACAAT-3'
SNP 2	Set1-reverse primer Biotin	5'-TCCAATAGTCATGGGTGATGC-3'
SNP 3	Set1-SP	5'-CATATTTCCCTATGGCTC-3'
SNP 4	Set2- forward primer	5'-AGAGGGGTCCAGTAGAAAGGTG-3'
SNP 5	Set2- reverse primer Biotin	5'-AGCTTATAGTGTGCGTGGTTAGG-3'
SNP 6	Set2-SP	5'-AGCAGAGTTTGACCATC-3'

จากการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป จำนวน 6 ตำแหน่ง ประกอบด้วย SNP 1, SNP 2, SNP 3, SNP 4, SNP 5, และ SNP 6 ด้วยเทคนิค Pyrosequencing (ภาพที่ 8) พบว่า มีเพียงตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 2, SNP 5 และ SNP 6 ที่แสดงจีโนไทป์ทั้ง 3 รูปแบบ คือ จีโนไทป์ AA GG และ AG จากนั้นจึงทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป โดยนำจีโนไทป์เปรียบเทียบกับผลฟีโนไทป์ (% amylose) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 2และ SNP 6 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลฟีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 10.83 คิดเป็นร้อยละ 70.94 และ 69.62 ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 5 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลฟีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 15.12 คิดเป็นร้อยละ 58.64 **(ตารางที่ 14 – 16)**



ภาพที่ 8 ผลโครมาโตแกรมแสดงเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป จำนวน 6 ตำแหน่ง ประกอบด้วย SNP 1, SNP 2, SNP 3, SNP 4, SNP 5, และ SNP 6 ของมันสำปะหลัง สายพันธุ์ระยอง 7 ด้วยเทคนิค Pyrosequencing

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 14 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP2 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 118 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
1	01-77-1	19.44	1	T	17	CMR 41-42-3	3.25	1	F
2	CG 165-7	12.95	1	T	18	CMR 42-44-98	6.10	3	F
3	CM 4574-7	20.72	1	T	19	CMR 43-08-89	20.11	1	T
4	CMR 23-149-59	10.71	1	F	20	CMR 44-03-57	10.37	1	F
5	CMR 26-08-61	17.91	1	T	21	CMR 46-31-7	9.80	1	F
6	CMR 28-05-13	19.84	1	T	22	CMR 46-47-137	12.12	1	T
7	CMR 30-71-25	18.66	1	T	23	CMR 46-55-23	18.26	1	T
8	CMR 31-42-20	17.66	1	T	24	CMR 47-02-9	5.63	1	F
9	CMR 32-94-121	18.99	1	T	25	CMR 47-30-8	27.61	1	T
10	CMR 33-35-69	15.04	1	T	26	CMR 48-20-17	17.15	1	T
11	CMR 33-38-48	6.52	1	F	27	CMR 48-35-1	8.32	1	F
12	CMR 35-112-1	12.38	3	T	28	CMR 48-53-48	17.44	1	T
13	CMR 35-22-348	18.74	1	T	29	CMR 50-20-2	12.60	1	T
14	CMR 37-18-201	16.96	3	T	30	CMR 50-41-1	10.82	2	T
15	CMR 41-109-72	11.57	1	T	31	CMR 51-13-14	14.81	1	T
16	CMR 41-112-21	10.10	3	T	32	CR 1	15.47	3	T

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 14(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP2 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 118 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
33	CR 126	25.94	1	T	49	MBra 885	8.33	1	F
34	Golden Yellow	18.19	1	T	50	MBra 890	12.12	1	T
35	HL 23	19.72	1	T	51	MBra 894	8.59	1	F
36	KM 140	21.51	1	T	52	MBra 931	11.83	3	T
37	MBra 158	18.07	1	T	53	MCol 1084 B	14.04	1	T
38	MBra 191	12.65	3	T	54	MCol 1466	18.36	1	T
39	MBra 273	19.73	3	T	55	MCol 1702	7.49	1	F
40	MBra 325	15.67	1	T	56	MCol 2089	15.94	1	T
41	MBra 403	17.48	1	T	57	MCol 2157	14.42	1	T
42	MBra 461	6.76	1	F	58	MCol 2173	15.28	1	T
43	MBra 514	22.02	1	T	59	MCol 2493	10.23	1	F
44	MBra 534	13.83	3	T	60	MCol 2627	14.74	1	T
45	MBra 542	23.18	1	T	61	MCol 310	8.67	1	F
46	MBRA 759	18.35	1	T	62	MCub 42	5.16	3	F
47	MBra 781	10.38	1	F	63	MEcu 135	12.39	1	T
48	MBra 792	10.35	1	F	64	MECU 71	14.96	1	T

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 14(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP2 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 118 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
65	MENTE GA	22.65	1	T	81	MPer 353	18.54	1	T
66	MGua 78	16.40	3	T	82	MPer 534	3.72	1	F
67	MMal 26	19.99	1	T	83	MPer 569	6.84	1	F
68	MMex 65	6.78	3	F	84	MPer 613	18.82	1	T
69	MNGA 1	14.19	1	T	85	MPtr 26	24.05	3	T
70	MPan 127	13.07	1	T	86	MPtr 8	7.17	1	F
71	MPan 137	5.77	1	F	87	MTai 1	13.06	1	T
72	MPar 104	6.98	1	F	88	MTai 3	6.38	1	F
73	MPar 25	15.39	3	T	89	MUsa 8	9.72	1	F
74	MPar 4	21.20	1	T	90	MVen 174	16.08	1	T
75	MPer 179	14.92	1	T	91	MVen 276	8.27	1	F
76	MPER 183	7.84	1	F	92	MVen 297 A	12.99	1	T
77	MPer 234	6.14	1	F	93	MVen 47	19.75	1	T
78	Mper 281	13.74	1	T	94	MVen 67 B	20.58	1	T
79	MPer 283	13.07	1	T	95	MVen 68	28.35	3	T
80	MPer 349	13.75	1	T	96	MVen 69	12.87	1	T

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 14(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP2 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 118 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
97	OMR 26-14-9	18.76	1	T	108	ระยอง 2	17.07	1	T
98	OMR 29-20-118	11.90	1	T	109	ระยอง 3	16.62	1	T
99	OMR 50-13-26	22.20	1	T	110	ระยอง 5	8.64	1	F
100	Wild 1	25.94	1	T	111	ระยอง 60	13.43	1	T
101	Wild 2	9.06	3	F	112	ระยอง 7	14.92	1	T
102	Yolk	16.03	1	T	113	ระยอง 72	5.53	1	F
103	เกษตรศาสตร์ 50	7.17	1	F	114	ระยอง 9	8.73	1	F
104	พิรุณ 2	7.02	1	F	115	ระยอง 90	19.24	1	T
105	ยอดดำ	16.22	1	T	116	ห้วยบง 60	19.30	1	T
106	ระยอง 1	3.72	1	F	117	ห้วยบง 80	23.01	1	T
107	ระยอง 11	10.93	1	T	118	ห้านาที	17.12	1	T
จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)		**True (T))**	**83/118 (70.33)**						
		False (F)	**35/118 (29.67)**						

[1] รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 และ 3 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 10.83

2 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) ต่ำกว่า 10.83

T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

ลิขสิทธิ์การเกษตร

ตารางที่ 15 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP5 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 133 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
1	01-77-1	19.44	2	F	21	CMR 43-08-89	20.11	2	F
2	CG 165-7	12.95	3	T	22	CMR 44-03-57	10.37	2	T
3	CM 4574-7	20.72	2	F	23	CMR 44-29-12	11.56	2	T
4	CMR 23-149-59	10.71	2	T	24	CMR 46-30-264	31.08	2	F
5	CMR 26-08-61	17.91	2	F	25	CMR 46-31-7	9.80	2	T
6	CMR 28-05-13	19.84	2	F	26	CMR 46-47-137	12.12	2	T
7	CMR 30-71-25	18.66	2	F	27	CMR 46-55-23	18.26	2	F
8	CMR 31-42-20	17.66	2	F	28	CMR 47-02-9	5.63	2	T
9	CMR 32-94-121	18.99	2	F	29	CMR 47-30-8	27.61	2	F
10	CMR 33-35-69	15.04	2	T	30	CMR 48-20-17	17.15	2	F
11	CMR 33-38-48	6.52	2	T	31	CMR 48-35-1	8.32	2	T
12	CMR 35-112-1	12.38	2	T	32	CMR 48-53-48	17.44	2	F
13	CMR 35-22-348	18.74	2	F	33	CMR 49-54-67	6.14	2	T
14	CMR 37-18-201	16.96	2	F	34	CMR 49-89-70	9.34	2	T
15	CMR 38-125-77	26.15	2	F	35	CMR 50-20-114	13.59	2	T
16	CMR 41-109-72	11.57	2	T	36	CMR 50-20-2	12.60	2	T
17	CMR 41-112-21	10.10	2	T	37	CMR 50-30-23	7.79	2	T
18	CMR 41-42-3	3.25	2	T	38	CMR 50-41-1	10.82	2	T
19	CMR 42-01-2	11.84	2	T	39	CMR 50-73-6	13.52	2	T
20	CMR 42-44-98	6.10	2	T	40	CMR 51-04-42	14.84	3	T

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 15(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP5 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 133 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
41	CMR 51-13-14	14.81	2	T	61	MBra 890	12.12	2	T
42	CMR 51-23-14	22.22	2	F	62	MBra 894	8.59	2	T
43	CR 1	15.47	2	F	63	MBra 931	11.83	3	T
44	CR 126	25.94	2	F	64	MCol 1084 B	14.04	2	T
45	Golden Yellow	18.19	2	F	65	MCol 1466	18.36	2	F
46	HL 23	19.72	2	F	66	MCol 1702	7.49	2	T
47	KM 140	21.51	2	F	67	MCol 2089	15.94	2	F
48	MBra 158	18.07	2	F	68	MCol 2157	14.42	2	T
49	MBra 191	12.65	3	T	69	MCol 2173	15.28	2	F
50	MBra 273	19.73	3	F	70	MCol 2493	10.23	2	T
51	MBra 325	15.67	2	F	71	MCol 2627	14.74	2	T
52	MBra 403	17.48	2	F	72	MCol 310	8.67	2	T
53	MBra 461	6.76	2	T	73	MCol 32	13.22	2	T
54	MBra 514	22.02	2	F	74	MCub 42	5.16	3	T
55	MBra 534	13.83	2	T	75	MEcu 135	12.39	2	T
56	MBra 542	23.18	3	F	76	MECU 72	9.23	2	T
57	MBRA 759	18.35	3	F	77	MENTE GA	22.65	2	F
58	MBra 781	10.38	2	T	78	MGua 78	16.40	2	F
59	MBra 792	10.35	2	T	79	MMal 26	19.99	2	F
60	MBra 885	8.33	2	T	80	MMAL 63	27.40	2	F

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 15(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP5 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 133 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
81	MMex 65	6.78	2	T	101	MTai 3	6.38	2	T
82	MNGA 1	14.19	2	T	102	MUsa 5	11.20	2	T
83	MPan 127	13.07	2	T	103	MUsa 8	9.72	2	T
84	MPan 137	5.77	2	T	104	MVen 174	16.08	2	F
85	MPar 104	6.98	2	T	105	MVen 276	8.27	2	T
86	MPar 25	15.39	3	F	106	MVen 297 A	12.99	2	T
87	MPar 4	21.20	2	F	107	MVen 47	19.75	2	F
88	MPer 179	14.92	2	T	108	MVen 67 B	20.58	2	F
89	MPer 234	6.14	2	T	109	MVen 68	28.35	2	F
90	Mper 281	13.74	2	T	110	MVen 69	12.87	2	T
91	MPer 283	13.07	2	T	111	OMR 26-14-9	18.76	2	F
92	MPer 349	13.75	2	T	112	OMR 29-20-118	11.90	2	T
93	MPer 353	18.54	2	F	113	OMR 44-23-34	11.84	2	T
94	MPer 484	6.07	2	T	114	OMR 50-13-26	22.20	2	F
95	MPer 534	3.72	2	T	115	Wild 1	25.94	2	F
96	MPer 569	6.84	2	T	116	Wild 2	9.06	2	T
97	MPer 613	18.82	2	F	117	Yolk	16.03	2	F
98	MPtr 26	24.05	1	T	118	เกษตรศาสตร์ 50	7.17	2	T
99	MPtr 8	7.17	2	T	119	พิรุณ 2	7.02	2	T
100	MTai 1	13.06	2	T	120	ยอดดำ	16.22	2	F

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 15(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP5 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 133 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
121	ระยอง 1	3.72	2	T	128	ระยอง 72	5.53	2	T
122	ระยอง 11	10.93	2	T	129	ระยอง 9	8.73	2	T
123	ระยอง 2	17.07	2	F	130	ระยอง 90	19.24	2	F
124	ระยอง 3	16.62	2	F	131	ห้วยบง 60	19.30	2	F
125	ระยอง 5	8.64	2	T	132	ห้วยบง 80	23.01	2	F
126	ระยอง 60	13.43	2	T	133	ห้านาที	17.12	3	F
127	ระยอง 7	14.92	2	T					
จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)		**True (T))**	**78/133 (58.64)**						
		False (F)	**55/133 (41.36)**						

[1] รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 15.12

2 และ 3 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) ต่ำกว่า 15.12

T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 16 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP6 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 135 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
1	01-77-1	19.44	2	T	21	CMR 43-08-89	20.11	2	T
2	CG 165-7	12.95	2	T	22	CMR 44-03-57	10.37	2	T
3	CM 4574-7	20.72	2	T	23	CMR 44-29-12	11.56	2	T
4	CMR 23-149-59	10.71	3	T	24	CMR 46-30-264	31.08	2	T
5	CMR 26-08-61	17.91	2	T	25	CMR 46-31-7	9.80	2	F
6	CMR 28-05-13	19.84	2	T	26	CMR 46-47-137	12.12	2	T
7	CMR 30-71-25	18.66	2	T	27	CMR 46-55-23	18.26	2	T
8	CMR 31-42-20	17.66	2	T	28	CMR 47-02-9	5.63	2	F
9	CMR 32-94-121	18.99	2	T	29	CMR 47-30-8	27.61	2	T
10	CMR 33-35-69	15.04	2	T	30	CMR 48-20-17	17.15	3	F
11	CMR 33-38-48	6.52	2	F	31	CMR 48-35-1	8.32	2	F
12	CMR 35-112-1	12.38	2	T	32	CMR 48-53-48	17.44	3	F
13	CMR 35-22-348	18.74	2	T	33	CMR 49-54-67	6.14	2	F
14	CMR 37-18-201	16.96	2	T	34	CMR 49-89-70	9.34	2	F
15	CMR 38-125-77	26.15	2	T	35	CMR 50-20-114	13.59	2	T
16	CMR 41-109-72	11.57	2	T	36	CMR 50-20-2	12.60	2	T
17	CMR 41-112-21	10.10	2	T	37	CMR 50-30-23	7.79	2	F
18	CMR 41-42-3	3.25	2	F	38	CMR 50-41-1	10.82	2	T
19	CMR 42-01-2	11.84	2	T	39	CMR 50-73-6	13.52	2	T
20	CMR 42-44-98	6.10	2	F	40	CMR 51-04-42	14.84	2	T

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 16(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP6 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 135 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
41	CMR 51-13-14	14.81	2	T	61	MBra 890	12.12	2	T
42	CMR 51-23-14	22.22	2	T	62	MBra 894	8.59	2	F
43	CR 1	15.47	2	T	63	MBra 931	11.83	3	F
44	CR 126	25.94	2	T	64	MCol 1084 B	14.04	2	T
45	Golden Yellow	18.19	2	T	65	MCol 1466	18.36	2	T
46	HL 23	19.72	2	T	66	MCol 1702	7.49	2	F
47	KM 140	21.51	2	T	67	MCol 2089	15.94	2	T
48	MBra 158	18.07	2	T	68	MCol 2157	14.42	2	T
49	MBra 191	12.65	3	F	69	MCol 2173	15.28	2	T
50	MBra 273	19.73	1	T	70	MCol 2493	10.23	2	T
51	MBra 325	15.67	2	T	71	MCol 2627	14.74	2	T
52	MBra 403	17.48	2	T	72	MCol 310	8.67	2	F
53	MBra 461	6.76	2	F	73	MCol 32	13.22	2	T
54	MBra 514	22.02	2	T	74	MCub 42	5.16	1	F
55	MBra 534	13.83	3	F	75	MEcu 135	12.39	2	T
56	MBra 542	23.18	1	T	76	MECU 71	14.96	2	T
57	MBRA 759	18.35	3	F	77	MECU 72	9.23	2	F
58	MBra 781	10.38	3	T	78	MENTE GA	22.65	2	T
59	MBra 792	10.35	2	T	79	MGua 78	16.40	2	T
60	MBra 885	8.33	3	T	80	MMal 26	19.99	2	T

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 16(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP6 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 135 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
81	MMAL 63	27.40	2	T	101	MPtr 8	7.17	2	F
82	MMex 65	6.78	2	F	102	MTai 1	13.06	2	T
83	MNGA 1	14.19	2	T	103	MTai 3	6.38	2	F
84	MPan 127	13.07	2	T	104	MUsa 5	11.20	2	T
85	MPan 137	5.77	2	F	105	MUsa 8	9.72	2	F
86	MPar 104	6.98	2	F	106	MVen 174	16.08	2	T
87	MPar 25	15.39	3	F	107	MVen 276	8.27	2	F
88	MPar 4	21.20	2	T	108	MVen 297 A	12.99	2	T
89	MPer 179	14.92	2	T	109	MVen 47	19.75	2	T
90	MPER 183	7.84	2	F	110	MVen 67 B	20.58	2	T
91	MPer 234	6.14	2	F	111	MVen 68	28.35	2	T
92	Mper 281	13.74	2	T	112	MVen 69	12.87	2	T
93	MPer 283	13.07	2	T	113	OMR 26-14-9	18.76	2	T
94	MPer 349	13.75	2	T	114	OMR 29-20-118	11.90	2	T
95	MPer 353	18.54	2	T	115	OMR 44-23-34	11.84	2	T
96	MPer 484	6.07	2	F	116	OMR 50-13-26	22.20	2	T
97	MPer 534	3.72	2	F	117	Wild 1	25.94	2	T
98	MPer 569	6.84	2	F	118	Wild 2	9.06	3	T
99	MPer 613	18.82	2	T	119	Yolk	16.03	2	T
100	MPtr 26	24.05	1	T	120	เกษตรศาสตร์ 50	7.17	2	F

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 16(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP6 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 135 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล[1]	
121	พิรุณ 2	7.02	2	F	129	ระยอง 7	14.92	2	T
122	ยอดดำ	16.22	2	T	130	ระยอง 72	5.53	2	F
123	ระยอง 1	3.72	2	F	131	ระยอง 9	8.73	2	F
124	ระยอง 11	10.93	2	T	132	ระยอง 90	19.24	2	T
125	ระยอง 2	17.07	2	T	133	ห้วยบง 60	19.30	2	T
126	ระยอง 3	16.62	2	T	134	ห้วยบง 80	23.01	2	T
127	ระยอง 5	8.64	2	F	135	ห้านาที	17.12	3	F
128	ระยอง 60	13.43	2	T					
จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)		**True (T))**	**94/135 (69.62)**						
		False (F)	**41/135 (30.38)**						

[1] รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 และ 2 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 10.83%

3 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) ต่ำกว่า 10.83%

T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

กรมวิชาการเกษตร

อภิปรายผล

จากการทดลองนำเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำจากเอกสารทางวิชาการต่างๆ ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ มักพัฒนาขึ้นจากพ่อแม่พันธุ์และใช้ตรวจสอบสายพันธุ์ได้ดีกับลูกผสมที่เกิดจากพ่อแม่พันธุ์ดังกล่าว ดังนั้น เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR มาใช้ตรวจสอบมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ ที่รวบรวมพันธุ์ไว้ในแปลงของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จึงไม่สามารถจำแนกลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำได้ จึงนำเทคโนโลยี GBS ตรวจสอบจีโนไทป์และความแตกต่างของลำดับเบส ณ ตำแหน่งใดๆ (SNP) เพื่อนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP

จากงานวิจัยนี้ พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ ด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR จำนวน 3 ชุด 1CHN 3CHN และ 13CHN และเมื่อทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง เพื่อเป็นการยืนยันว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ในการตรวจสอบปริมาณไซยาไนด์ของมันสำปะหลังได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ โดยสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 1CHN ใช้คัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 280 mg HCN/kg น้ำหนักสด ซึ่งสามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลฟีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 64.81 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN และ 13CHN สามารถนำไปใช้คัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลฟีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 73.33 และ 76.64 ตามลำดับ โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN อยู่ระหว่างยีน adenylyl-sulfate reductase (thioredoxin) / thioredoxin-dependent 5'-adenylylsulfate reductase (Manes.16G006000) และ glyoxalase I homolog (Manes.16G006100) ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 16 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 13CHN อยู่บน intron ของยีน calcium-dependent protein kinase (Manes.16G007500) และเมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN และ 13CHN วิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ร่วมกัน ทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจสอบของเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 78.33

สำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง ด้วยเทคนิค Pyrosequencing มีเพียงตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 2, SNP 5 และ SNP 6 ที่แสดงจีโนไทป์ทั้ง 3 รูปแบบ คือ จีโนไทป์ AA GG และ AG และเมื่อทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปเปรียบเทียบกับผลฟีโนไทป์ (% amylose) พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 2 และ SNP 6 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลฟีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 70.94 และ 69.62 ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 5 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลฟีโนไทป์ คิดเป็นร้อยละ 58.64 โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP 2 อยู่ระหว่างยีน PHD finger, swib/mdm2 and GYF domain-containing protein (Manes.01G142800) และ Manes.01G142900 (ยังไม่มีรายละเอียดของยีน) ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 5 และ SNP 6 อยู่ระหว่างยีน Manes.01G159400 (ยังไม่มีรายละเอียดของยีน) และ Manes.01G159500 (ยังไม่มีรายละเอียดของยีน) บนโครโมโซมที่ 1 เช่นเดียวกัน

การตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้งด้วยเทคนิค Pyrosequencing นี้ ถึงแม้จะมีผลการตรวจสอบที่ชัดเจน แต่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะ อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

ค่อนข้างสูง จึงยังคงต้องพัฒนาให้เครื่องหมายโมเลกุลนี้ต่อไป ส่วนการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR นี้ เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่มีเพียงเครื่องทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และเครื่องตรวจแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่พัฒนาขึ้นไปใช้ได้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำที่รวบจากเอกสารทางวิชาการต่างๆ ได้แก่ ลักษณะแป้งสูง จำนวน 3 คู่ (MeES1019 MeES959 และ SSRY60) ลักษณะไซยาไนด์ต่ำจำนวน 5 คู่ (SSRY28 SSRY77 SSRY103 SSRY105 และ SSRY242) และเมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 8 ชนิด ทดสอบประสิทธิภาพกับมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ที่รวบรวมอยู่ในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นแต่ละชนิดใช้แยกความแตกต่างในพันธุ์ลูกผสมที่ใช้พันธุ์ห้านาที หรือ พันธุ์ห้วยบงเป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ แต่เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลทดสอบประสิทธิภาพกับพันธุ์มันสำปะหลังอื่นๆ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวไม่สามารถจำแนกลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำได้

2. วิเคราะห์จีโนไทป์และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิประดับจีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS ในมันสำปะหลังจำนวน 100 สายพันธุ์ และหาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์มันสำปะหลัง โดยใช้ 5144 SNPs ในการจัดกลุ่มสายพันธุ์มันสำปะหลังด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ของสายพันธุ์มันสำปะหลังได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ วิเคราะห์รูปแบบความเชื่อมโยงในจีโนม พบสนิป จำนวน 40 และ 26 ตำแหน่ง ที่คาดว่าสัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์และปริมาณแป้งในมันสำปะหลัง

3. ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป ด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR (1CHN) เทคนิค tetra-primer ARMS-PCR จำนวน 3 ชุด 1CHN 3CHN และ 13CHN โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 1CHN มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 280 mg HCN/kg น้ำหนักสด ร้อยละ 64.81 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN และ 13CHN มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด ร้อยละ 73.33 และ 76.64 ตามลำดับ ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4. ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป ด้วยเทคนิค Pyrosequencing จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ SNP 2, SNP 5 และ SNP 6 ที่แสดงจีโนไทป์ AA GG และ AG และเมื่อทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปเปรียบเทียบกับผลฟีโนไทป์ (% amylose) แม้ว่า เครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 5 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลฟีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 15.12 คิดเป็นร้อยละ 58.64 ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 2 และ SNP 6 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลฟีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งสูง (% amylose) สูงถึงร้อยละ 70.94 และ 69.62 ตามลำดับ ซึ่งสามารถใช้คัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป ด้วยเทคนิค Pyrosequencing มีราคาค่อนข้างสูง ซึ่งจะดำเนินการพัฒนาการตรวจสอบด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR ซึ่งมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าและมีขั้นตอนการตรวจสอบ สะดวกกว่าในอนาคตต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 6

การตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (waxy starch) ในมันสำปะหลัง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

Detection and Selection of Waxy Starch Trait in Cassava Using Molecular Markers

อรุโณทัย ซาววา อัจฉราพรรณ ใจเจริญ สุภาวดี ง้อเหรียญ สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ ประพิศ วองเทียม
Aroonothai Sawwa Acharapun Chaicharean Suphawadee Ngorian Suwaluk Amawan Prapit Wongtiem

คำสำคัญ (Key words)

มันสำปะหลัง (Cassava (*Manihot esculenta Crantz*), แป้งเหนียว (Waxy starch), การตรวจสอบด้วยเทคนิค (*GBSSI* gene), สนิป (SNPs)

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 แบบเฮทเทอโรไซโกตจำนวน 26 ตำแหน่ง และแบบโฮโมไซโกตจำนวน 7 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถใช้ในคัดเลือก ระบุหรือจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังแป้งเหนียวได้ต่อไป

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Abstract

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.

กรมวิทยาศาสตร์

บทนำ

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 นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในวงการอุตสาหกรรมการผลิตไบโอพอลิเมอร์อีกด้วย 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) มองว่าหากมันสำปะหลังสามารถให้เนื้อแป้งเหนียวได้จะเป็นการเพิ่มมูลค่าได้เป็นอย่างมาก

การปลูกมันสำปะหลังแบ่งเป็นสองประเภทได้แก่ ปลูกเพื่อใช้เป็นอาหาร และปลูกเพื่ออุตสาหกรรม มันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญลำดับที่สี่รองลงมาจากข้าว อ้อย และข้าวโพด ในประชากรมากกว่า 500 ล้านคน ของประเทศในแถบแอฟริกา เอเชีย และลาตินอเมริกา (Roa *et al*., 1997) ในประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังรวม 6.22 ล้านไร่ ในปี 2545 และปลูกมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือภาคกลาง และภาคเหนือมีการปลูกน้อยที่สุด จังหวัดที่มีการปลูกมากที่สุดได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ปลูกถึง 1,320,722 ไร่ มันสำปะหลังสร้างรายได้ให้เกษตรกรมากเป็นอันดับสี่รองลงมาจากยางพารา อ้อยและข้าว (ศูนย์สารสนเทศ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

การเกษตร, 2545) ต่อมาในปี 2556 มีพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้นเป็น 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 เพราะแป้งเหล่านี้ไม่ต้องนำมาเข้าสู่กระบวนการดัดแปลงจากสารเคมีแต่มีต้นทุนสูง แต่แป้งเหนียวที่ได้จากมันสำปะหลังเป็นเพียงหนึ่งเดียวที่ตัวแป้งไม่แยกตัวออกจากน้ำเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -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)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (Waxy starch) ในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษาวิธีการตรวจสอบและคัดเลือกท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะแป้งเหนียวจากแหล่งรวบรวมพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดระยอง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) บนยีน *GBSSI* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดแป้งเหนียวในมันสำปะหลังด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ วิธีพีซีอาร์ วิธี TaqMan probes รวมถึงศึกษาตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุล SNP เพิ่มเติมด้วยเทคนิค Genome by Sequencing (GBS) เพื่อช่วยในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังจากแหล่งรวบรวมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังแป้งเหนียว

ระเบียบวิธีการวิจัย

<u>ประเด็นวิจัย :</u> ประเทศไทยมีความสามารถในการแข่งขันสูงในตลาดแป้งมันสำปะหลัง ปัจจัยที่สำคัญในการรักษาความสามารถในการแข่งขันของประเทศไทยในฐานะผู้นำด้านการผลิตมันสำปะหลังคือ ปริมาณผลิตผลต่อไร่ ส่วนในการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขัน และยกระดับแป้งมันสำปะหลังให้เหนือกว่าแป้งชนิดอื่นนั้น สิ่งที่สำคัญที่สุดก็คือการปรับปรุงคุณภาพของแป้งมันสำปะหลัง จุดเริ่มต้นที่น่าสนใจที่สุดคือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ทำให้มันสำปะหลังแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน หนึ่งในนั้นคือพันธุ์แป้งเหนียว (waxy starch) ซึ่งอุตสาหกรรมแป้งทั่วโลกมีความต้องการมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว ซึ่งตัวแป้งไม่มีสารอะไมโลส (amylose-free)

กรมวิชาการเกษตร

มันสำปะหลังพันธุ์ waxy แตกต่างจากมันสำปะหลังทั่วไป คือ สามารถละลายน้ำได้ดีกว่า มีความเหนียวข้นมากกว่า และมีการคืนตัวต่ำ เป็นวัตถุดิบสำหรับเพิ่มความหนืดในอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งนี้กรมวิชาการเกษตรซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมพันธุ์มันสำปะหลังที่สำคัญแห่งหนึ่งของประเทศไทย มีพันธุ์มันสำปะหลังที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร เพื่อเป็นตัวช่วยการปรับปรุงพันธุ์ชนิด waxy ให้รวดเร็วขึ้น จึงเป็นทางเลือกในสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพันธุ์มันสำปะหลังของไทยได้

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี

ระยะเวลาดำเนินงาน : ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

วิธีการดำเนินงาน

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) 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 มิลลิลิตร หลอดใหม่ 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 ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย 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

กรมวิชาการเกษตร

1.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ใช้ไพรเมอร์ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
ไพรเมอร์สำหรับดีเอ็นเออ้างอิง		
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 (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ตามขั้นตอนดังนี้

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

กรมวิชาการเกษตร

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

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 ที่เฉพาะเจาะจงกับพันธุ์แป้งเหนียวแล้ว ทำการออกแบบโพรบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียว ดังนี้

- คู่ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ขนาบข้างของตำแหน่ง SNPs คือ

  WX_F: 5’-CCGCTTCTTCCACTCCTAC-3’

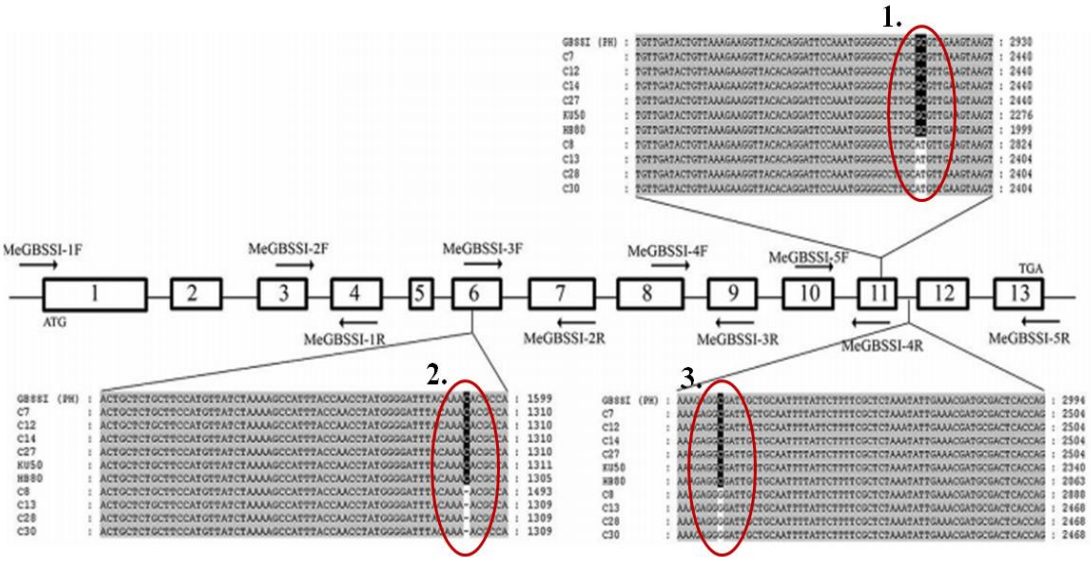
  WX_R: 5’-TTTGCCCCATACCTTCTCAAG-3’

- โพรบสำหรับตรวจสอบตำแหน่ง SNPs โดยติดฉลากสีทางด้านปลาย 5’ ได้แก่ VIC สำหรับตรวจสอบอัลลี T และฉลากสี FAM สำหรับตรวจสอบอัลลี G

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

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

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร



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 นาโนกรัมปริมาตร 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

กรมวิชาการเกษตร

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

3.1 ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง

- พันธุ์ที่มีลักษณะ non waxy จำนวน 11 ตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มอะไมโลสสูง ได้แก่ ระยอง 7 ระยอง 9 ระยอง 11 เกษตรศาสตร์ 50 ห้วยบง 80 และ Mcol 1702 กลุ่มอะไมโลสต่ำ ได้แก่ Mbar 191 MBra 691 MPan 70 MPar 104 และ MPar 25
- 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

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 เพื่อดูลักษณะการติดสีไอโอดีนของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง

4.3 บันทึกภาพและสรุปผลการทดสอบการย้อมสีไอโอดีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 2 ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ใช้ทดสอบย้อมเม็ดแป้งด้วยสีไอโอดีน

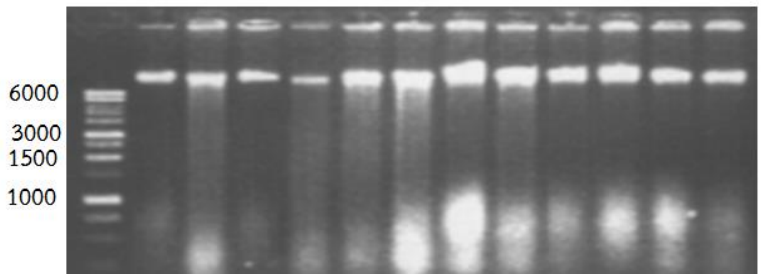
No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง
1	MPER 349	14	CR 79	27	MPER 212	40	MHMC1
2	MPER 542	15	CM 4777-2	28	CM 323-375	41	MCUB42
3	MBRA 461	16	MCUB 53	29	MMEX 49	42	MPAR41
4	MCOL 1178	17	MCUB 16	30	MUSA 8	43	MPAR135
5	MCOL 2177	18	CR 19	31	MBRA 461	44	R2
6	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

ผลการทดลองและอภิปราย

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

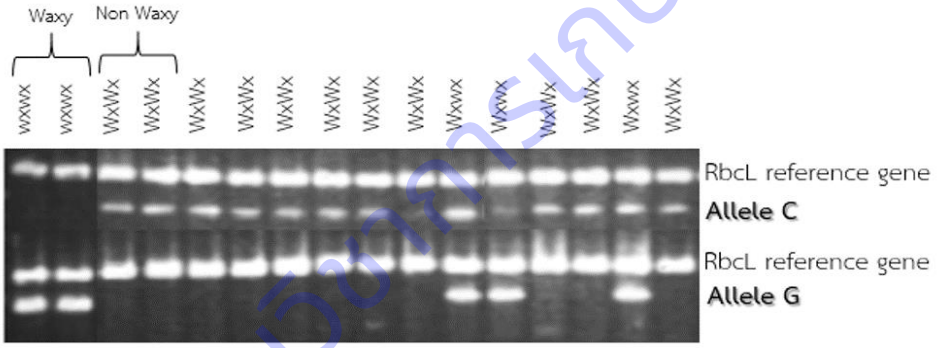
การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) ได้นำเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) โดยทำการตรวจสอบกับพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้ ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่จังหวัดระยอง จำนวน 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

กรมวิชาการเกษตร

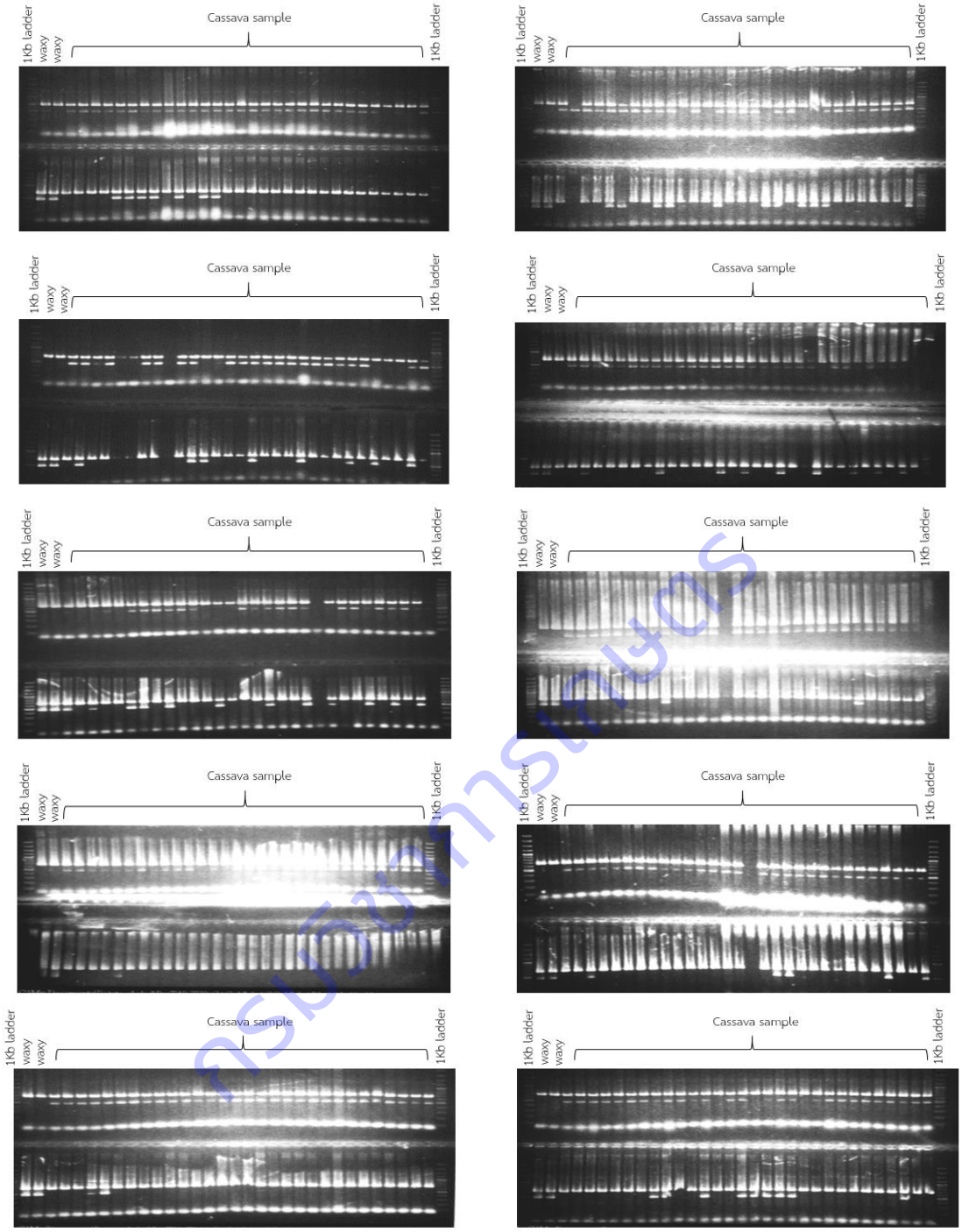
การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธีพีซีอาร์ จำเป็นต้องมีแถบดีเอ็นเออ้างอิง ซึ่งการทดลองนี้ได้ไพรเมอร์สากลจากยีน *RbcL* สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออ้างอิง ซึ่งยีนดังกล่าวออกแบบมาจากส่วนอนุรักษ์ของยีนจากจีโนมชนิดคลอโรพลาสต์ ให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ สามารถใช้ได้กับพืชทุกชนิด (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 G มีลักษณะจีโนไทป์เป็นแบบลักษณะด้อย (wxwx) สำหรับมันสำปะหลังที่ไม่ใช่แป้งเหนียว หรือ non waxy จะให้แถบดีเอ็นเอเฉพาะ Allele C เป็นลักษณะเด่น (WxWx) และหากปรากฏทั้ง 2 อัลลีล คือจีโนไทป์ลักษณะ Co-dominant ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 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 ซึ่งจากตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 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)

กรมวิชาการเกษตร

และปล่อยแสง (emit) ในปฏิกิริยา real-time PCR ในขั้นตอน extension เอ็นไซม์ 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 ตัวอย่าง ที่เป็นตัวอย่างมันสำปะหลังแป้งเหนียว 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 219 ตัวอย่าง **(ตารางผนวกที่ 2)** พบตำแหน่ง T เฉพาะตัวอย่างแป้งเหนียว 2 ตัวอย่าง สำหรับมันสำปะหลังของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยะองไม่พบตำแหน่ง T พบเฉพาะตำแหน่ง G **(ภาพที่ 10)**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

>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

>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

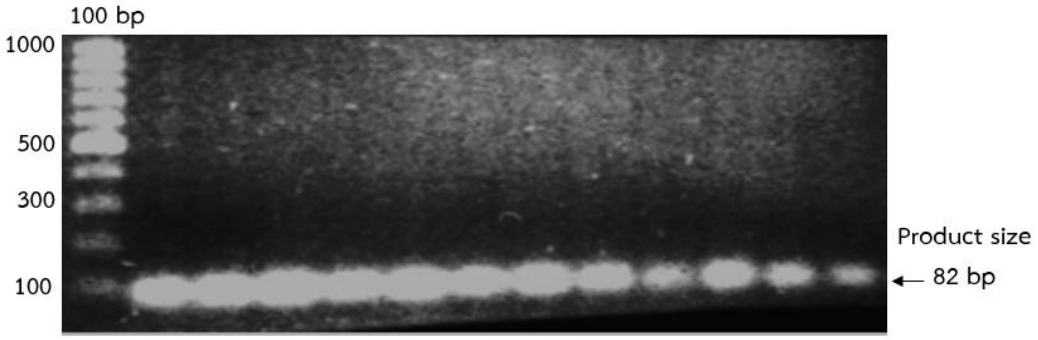
ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

```
>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

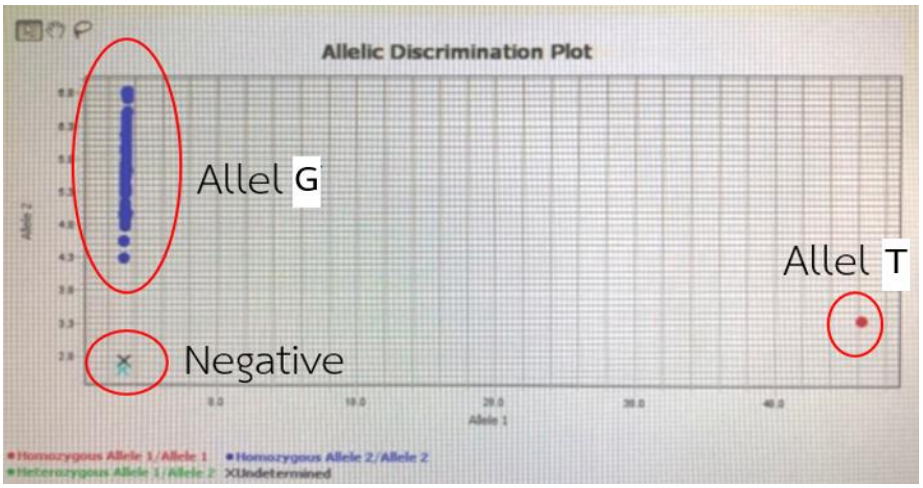
```
>waxy 82 bp
CCGCTTCTTCCACTCCTACTAAAGATGAGTTGATCGTGTCTTCGTGGATCATCCAATGTTACTTGAGAAGGTATGGGGCAAA
>non waxy 82 bp
CCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGACGAGTTGATCGGGTCTTCGTGGATCATCCAATGTTCCTTGAGAAGGTATGGGGCAAA

                Forward Primer-->      Probes
waxy            CCGCTTCTTCCACTCCTACTAAAGATGAGTTGATCGTGTCTTCGTGGATCATCCAATGTT      60
nonwaxy         CCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGACGAGTTGATCGGGTCTTCGTGGATCATCCAATGTT      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

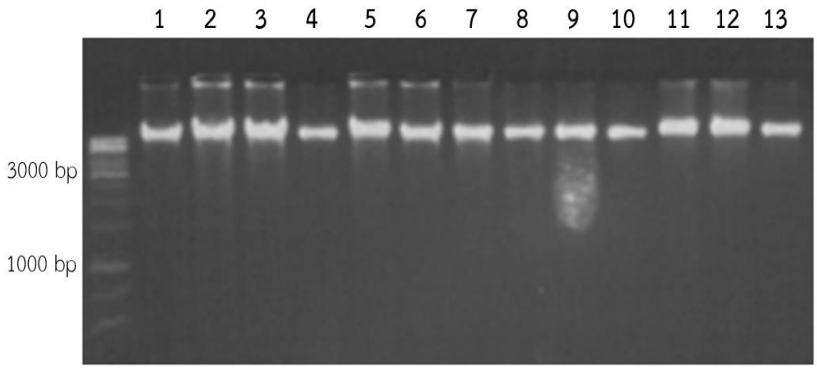
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 10 การตรวจสอบตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs T/G โดยวิธี TaqMan probes กับตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์

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

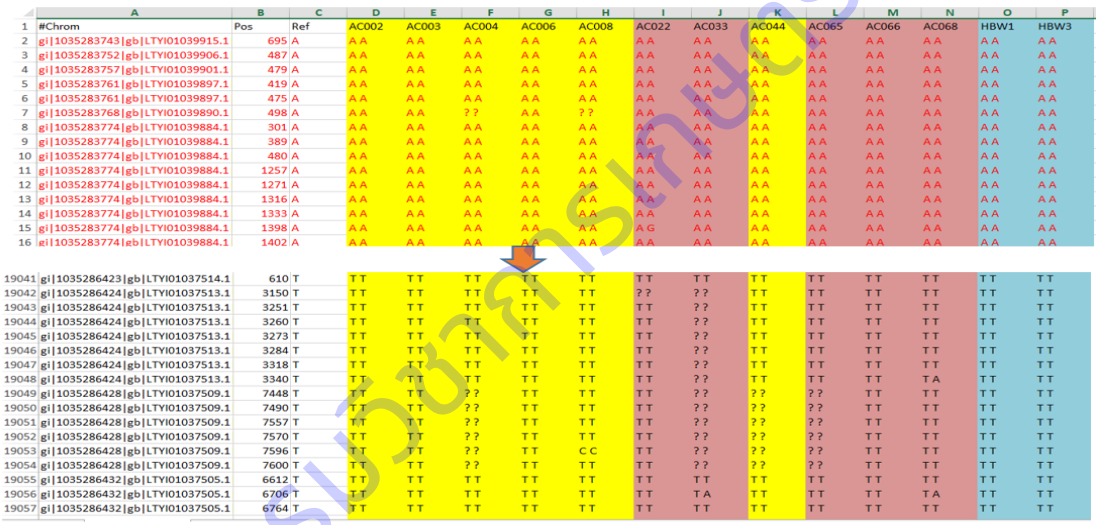
การค้นหาและเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) จากพันธุ์ปกติ และพันธุ์แป้งเหนียว ด้วยวิธี GBS (Genotyping by Sequencing ได้นำตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวนทั้งสิ้น 13 ตัวอย่าง จากตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ non waxy จำนวน 11 ตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มอะไมโลสสูง ได้แก่ ระยอง 7 ระยอง 9 ระยอง 11 เกษตรศาสตร์ 50 ห้วยบง 80 และ Mcol 1702 กลุ่มอะไมโลสต่ำ ได้แก่ Mbar 191 Mbra 691 Mpan 70 Mpar 104 และ Mpar 25 ร่วมกับมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ HBW 1 และ HBW 2 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)



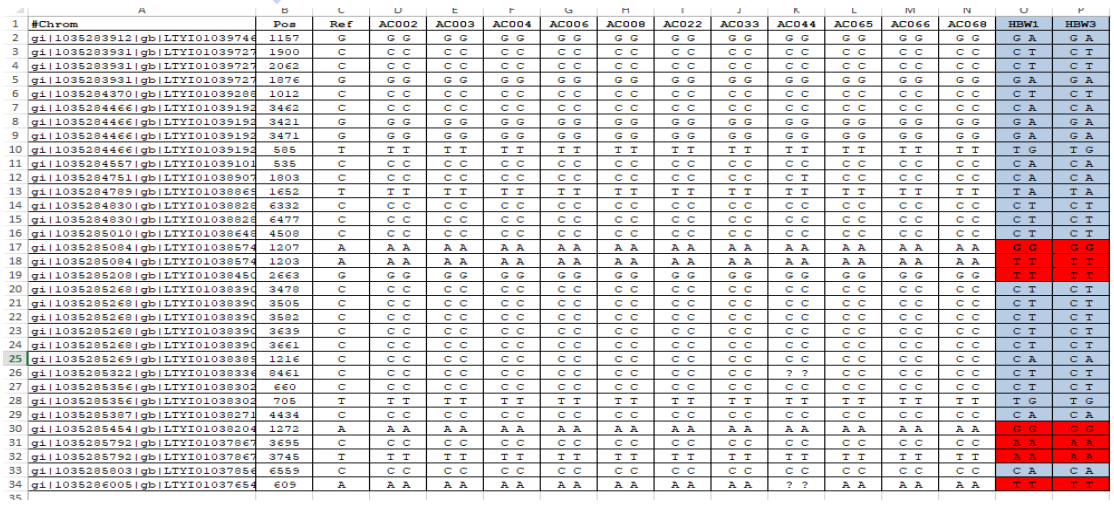
ภาพที่ 11 ดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลัง 13 ตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์ GBS

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 HBW 1 และ HBW 2 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)**



ภาพที่ 12 ผลจีโนไทป์ของตัวอย่างมันสำปะหลัง 13 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี GBS



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)** ซึ่งสามารถใช้ในการคัดเลือก ระบุ หรือจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ต่อไป

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

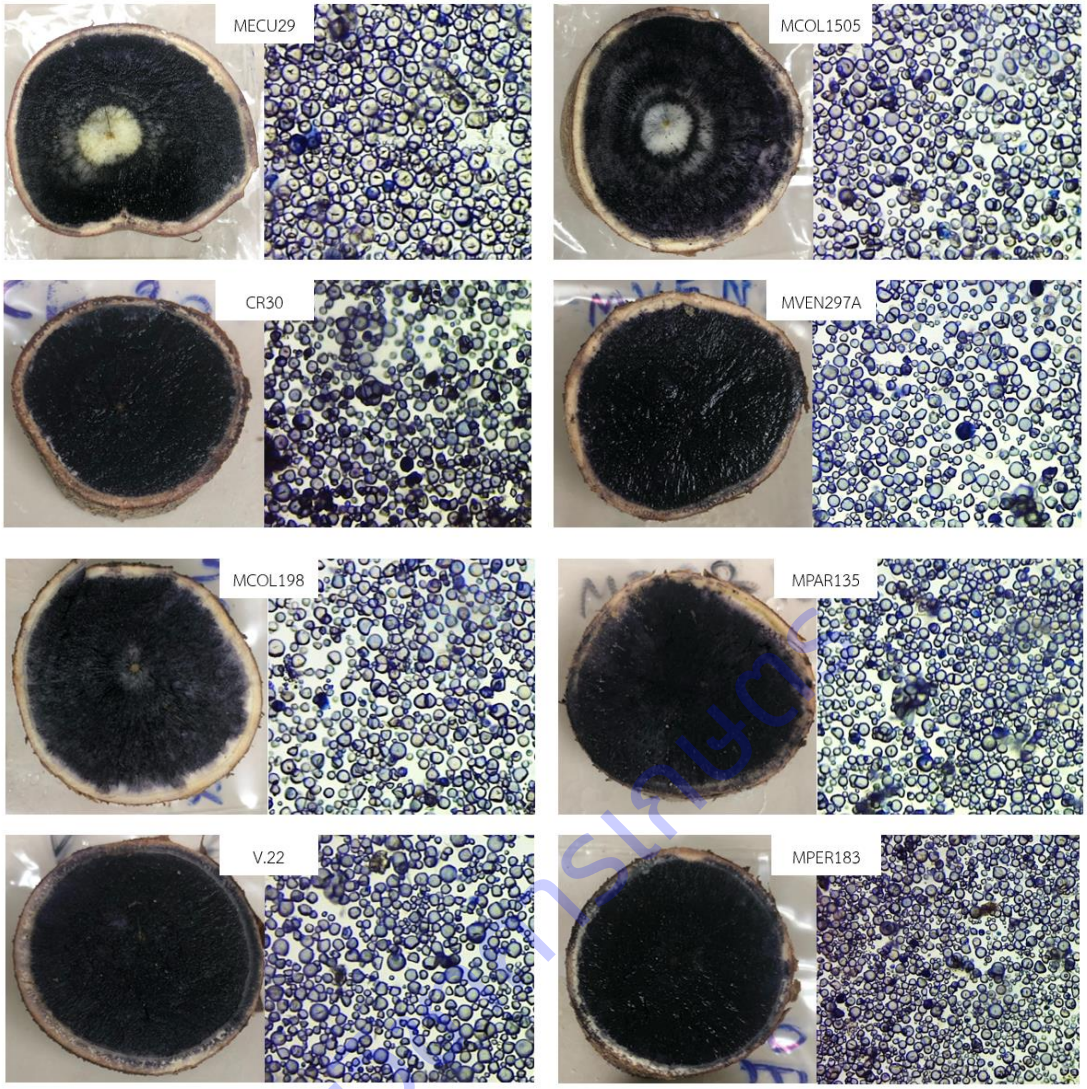
```
   1 acaggttata tgtcaggctt gctacgggtc ccggcggcct taagtcggcc cggatcctag
  61 cgccggtagc ggtccgattt tcggggcgtt acaagtaaag acaaatcaaa tccgttgatg
 121 gctgtggatt tgccaaaaat ccaatcctct catgggtata gctttcataa atggattata
 181 aaaccccttt ttgattttga gattgtaatt gaaaatggtt ataatgatat aaacccatgg
 241 gcagtcatta gaaaatatta tcctgagaat tggtatttcc ttcctacaga ttttttaaaa
 301 tctcaggaat actattcaag tattttagaa gaaacaaatt ctgtaaaaat aaaacataat
 361 tttgataaga atgataaaac agtggtagtc tattcttctt tgcaaataaa aagggttatc
 421 catcccagag attggctagt cccaacatta tatacaaaaa taacatttaa aactttaaaa
 481 aagcatgcta tttcttataa ctattttgat tatatggatg cttgggaaaa cgttttctgt
 541 gtccagaatc cagcccatac tcattcctgg ttactatatt ttgatcagtc aaaaatcaaa
 601 actaccaccc aatttccaaa ttgattttta aaatggtggc agtataaagg tatttcggaa
 661 gaaataattt cacccgaagt atttcaaata tatcaatatt ttaaaaccaa ttataaacct
 721 cctcaaaatg aaaagtatat tcctcccttg atgtatttct gcatgaactt ttttattccc
 781 tgggtatatc aatggttctt tgattttcag tattcatcag gaactagtat acctattatt
 841 gtcagaaaac ataaaataaa atggtgggga tcattcaaaa ataccaccac agagatggtt
 901 gtaaagcaat ggatacttca aagagcacag cttcctactg tgtcttatgc tggaaaatta
 961 actctgcaag gagagccatc attcggagcc caaaaagccc aatgccaggc cttactagca
1021 gcatctaaaa accctgaaga gtttaagctg atttgtcaac aaatgtataa tcagcttact
1081 tcatcggaga aagaaaaatt aaatcaagag tcatccagta gtaaagaatc atcaaaacag
1141 tcttccagta agaagatggt caagaaaaaa tccagcagga gaaagtctaa aaaatagtcc
1201 agatcgaata cggagtcgac agcgtccgag acgtcatcct ccgaaaaccc ggcatcttca
1261 tgcgatagta atgaagatga ctgttacggt atacttccag ctatcaagat aaagagcaag
1321 actgaaaaag taaaaaagga aaagaaaaag aaagaaaaag taaaaaagaa aggaaaagaa
1381 aagaagaagt gggacacctc atcttcagaa tcagattaaa attcagcaca gtaaagattt
1441 ggtggcaggc aagtcactgt ttaccaacag taaagtggca gacagactat tcaccaacag
1501 taaaaaggag cagaataatg gcagacaagt cactattcat gaacagtaaa agcccgcgtg
1561 gttcaatagt aaagactccc gtgacacaac agtaaagctt aaatttttc tataaaaggg
1621 agcctctccc cttgtgaagg cacacttgta attcctttct ctctctctct ctctctctag
1681 tttccttttc atttcttctg tgtattctct ctctatttcc agatttctgt atcagttctt
1741 aaattttaaa aaattatagt aagtttctta tttcttttat tatactgtta ctttataagt
1801 ccgtgttgac agcactcttc tcttcttccc cttcactctg acttaactct ggggatccca
1861 ggttaaggtt gcaggaaccc tgaccttaat agtaaaatta aaatcaccat aagtatgctc
1921 tgtggttgcg gcttttgctg atcttccaca tcagaaattt gtttactata aaacttatta
1981 aaaactctga atctgtttat aaaacggtat atatatatat atatatatag ggataaaatg
2041 caggatgatc aatttgagtg ttacaggaaa actttggaca gtgagggtcg gtcatttatc
2101 tttgtgactg acatatatga ctaggaaaaa aattctagtg acattctaac cattctaata
```

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

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

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 15 ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการย้อมสีด้วยสีไอโอดีน

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

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

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 7

การพัฒนาเครื่องหมายยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งที่สัมพันธ์กับน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง

Development of Gene Specific Markers in Starch Biosynthesis Pathway Associated with Root Yield in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

วิภาวี ชั้นโรจน์ Vipavee Chonroj

มัลลิกา แก้ววิเศษ Mallika Kaewwises

สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ Suwaluk Amawan

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ Kittipat Ukoskit

คำสำคัญ (Key words)

มันสำปะหลัง (cassava), เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker), ยีนสังเคราะห์แป้ง (Starch biosynthesis genes), ผลผลิตมันสำปะหลัง (root yield)

บทคัดย่อ

ความต้องการพืชอาหารของโลกได้ขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่มีปริมาณแป้งสูงและมีราคาถูกกว่าพืชอาหารที่ให้แป้งประเภทอื่น การเพิ่มน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง จึงเป็นเป้าหมายหลักในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณและมูลค่าในมันสำปะหลังให้แก่เกษตรกร งานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาเครื่องหมาย ILP (intron length polymorphism) และเครื่องหมาย SNP (single-nucleotide polymorphism) ด้วยเทคนิค Genotyping-by-Sequencing (GBS) ในตัวอย่างมันสำปะหลัง 166 พันธุ์ ซึ่งได้พัฒนาเครื่องหมาย ILP ทั้งหมด 13 เครื่องหมาย จากยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลังจำนวน 6 ยีน มีจำนวนแอลลีลอยู่ในช่วง 2 ถึง 6 แอลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3 แอลลีลต่อเครื่องหมาย มีค่า PIC (polymorphism information content) อยู่ระหว่าง 0.19 – 0.64 และมีค่าเฉลี่ย 0.35 แสดงถึงศักยภาพของเครื่องหมาย ILP ในการนำไปศึกษาแยกความแตกต่างของพันธุ์มันสำปะหลังในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังด้วยวิธี mixed linear model (MLM) พบว่าเครื่องหมาย UGPase1 ภายในยีน UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังสูงสุด (ค่า p-value น้อยที่สุด) โดยมีค่าอิทธิผลต่อลักษณะ (R2) เท่ากับ 2% และพัฒนาเครื่องหมาย SNPs ได้ทั้งหมด 383,828 เครื่องหมาย ทั่วทั้ง 18 โครโมโซมของมันสำปะหลัง การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังด้วยวิธี MLM พบเครื่องหมาย SNP บนโครโมโซมที่ 12 ได้แก่ เครื่องหมาย S12_4926402 (p-value = 6.33 x 10-7) และเครื่องหมาย S12_4945762 (p-value = 8.73 x 10-7) มีความสัมพันธ์มากที่สุดกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง มีค่าอิทธิผลต่อลักษณะ (R2) เท่ากับ 25.2% และ 24.5% ตามลำดับ โดยเครื่องหมาย SNP เหล่านี้อยู่ภายในยีน splicing factor ESS-2 homolog ในมันสำปะหลัง (E value = 0) เป็นโปนตีนนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยผลจากงานวิจัยในครั้งนี้ได้สร้างข้อมูลพื้นฐานความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายยีน (ILP และ SNP) กับน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The world's demand for food crops has grown rapidly. Cassava (Manihot esculenta Crantz), a high starch producer, is less expensive than other starch crops. Increasing the root yield is the main goal of breeding to increase the quantity and value of cassava for farmers. In the present study, Intron Length Polymorphism (ILP) developed from genes involved in starch biosynthesis pathway and single nucleotide polymorphism (SNP) markers using Genotyping-by-Sequencing (GBS) were conducted in 166 diverse cassava varieties. Of 110 ILP primers designed, 13 developed from 6 genes were polymorphic among cassava varieties and amplified alleles in a range of 2–6 with an average of 3 alleles per primer. Polymorphism information content (PIC) ranged from 0.19 to 0.64 with an average of 0.35. The ILP markers developed have been proved to be useful for genetic diversity assessment which could be beneficial for cassava breeding. Using a mixed linear model (MLM) corrected for population structure and familial relatedness, significant associations were obtained for one marker-trait association. UGPase1 representing UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase gene showed the most significant association with cassava root yield (the smallest P-values) and explained 2% of the phenotypic variance. Genome-wide association study (GWAS) was conducted using 383,828 SNPs covering all 18 chromosomes. The MLM performed in accounting for population structure and relatedness. The strongest association with cassava root yield was found S12_4926402 (p-value = 6.33 x 10-7) and S12_4945762 (p-value = 8.73 x 10-7) located on chromosome 12 explaining 25.2% and 24.5% of the phenotypic variance, respectively. These SNPs are annotated as a splicing factor ESS-2 homolog in cassava (E value = 0) regulating gene expression. This work provides the basis of further study of the potential function of these candidate genes. Future research may focus on validating the effects of these candidate genes and their functional variants to verify that these gene specific markers (ILP and SNP) can be applied in marker assisted selection for root yield in cassava breeding program.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มันสำปะหลัง (Manihot esculenta Crantz) เป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจและเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของโลก รองจากข้าว อ้อย และข้าวโพด (Baguma, 2004) ประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังรายใหญ่ที่สุดของโลก ประมาณ 70 - 80% ของผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังรวมทั้งหมดของโลก (FAO, 2013) มันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มยืนต้น ปลูกได้ตลอดทั้งปี และเป็นพืชที่เก็บสะสมอาหารในรูปของคาร์โบไฮเดรตหรือแป้งไว้ในราก องค์ประกอบส่วนใหญ่ในรากหรือหัวมันสำปะหลัง (root yield) คือแป้ง มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลักที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ, อุตสาหกรรมอาหาร และอื่นๆ โดยการจำหน่ายผลผลิตให้กับโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังของเกษตรกรนั้น ราคามันสำปะหลังขึ้นอยู่กับน้ำหนักผลผลิตและเปอร์เซ็นต์แป้งในมันสำปะหลัง ดังนั้นการเพิ่มน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังจึงเป็นเป้าหมายหลักในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณและมูลค่าในมันสำปะหลังให้แก่เกษตรกร

อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบกับสถานการณ์ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดอื่น เช่น ข้าว และ ข้าวโพดแล้ว การวิจัยมันสำปะหลังในเชิงชีวภาพและพันธุศาสตร์ยังมีอยู่อย่างจำกัด การพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยที่ผ่านมานั้น ในการปรับปรุงพันธุ์ยังคงใช้วิธีการคัดเลือกพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) ซึ่งมีข้อจำกัดทั้งในด้านระยะเวลาที่ยาวนานและการลงทุนที่สูงมาก เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นไม้ยืนต้นที่ต้องใช้ระยะเวลายาวนานประมาณ 8 - 10 ปี ในการทดสอบและคัดเลือกพันธุ์ เพื่อให้แน่ใจว่าลูกผสมที่ได้จะมีคุณสมบัติเด่นดังที่ต้องการ ซึ่งหากผลลัพธ์ที่ได้ไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง นักปรับปรุงพันธุ์ก็ต้องเสียเวลาในการที่จะพัฒนาเพื่อหาพันธุ์ใหม่ๆ อีก ดังนั้นการวิจัยเพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยในการคัดเลือก (MAS; marker assisted selection) ในมันสำปะหลัง ที่สามารถช่วยนักปรับปรุงพันธุ์ในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าและช่วยร่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังได้ 3-4 ปี (Wolfe et al., 2017) จึงมีความจำเป็นเพื่อเพิ่มข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลและเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง โดยสามารถช่วยสร้างให้เกิดความมั่นใจในการคัดเลือกพันธุ์ที่ตรงตามความต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์และช่วยลดระยะเวลา พื้นที่ และแรงงานในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังเป็นลักษณะปริมาณ (quantitative trait) คือ ลักษณะที่ยีนหลายยีนควบคุมการแสดงออก และมีอิทธิพลทางสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้อง (Sraphet et al., 2017) ลักษณะนี้จึงขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อมที่ปลูก การใช้พันธุ์ดีให้น้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังสูงถือว่าเป็นเทคโนโลยีที่สะดวก และง่ายสำหรับเกษตรกรในการเพิ่มผลผลิตหรือปรับปรุงคุณภาพของมันสำปะหลัง ประกอบกับในปัจจุบันปริมาณความต้องการมันสำปะหลังเพื่อใช้ภายในประเทศสูงมากขึ้น ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ที่มีลักษณะผลผลิตน้ำหนักมันสำปะหลังที่สูงนั้นจึงเป็นวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการคัดเลือกจากฟีโนไทป์ เนื่องจากเป็นการคัดเลือกจากพันธุกรรมโดยตรง สามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จึงมีส่วนช่วยประหยัดเวลา ลดแรงงาน ลดต้นทุน และพื้นที่ในการเพาะปลูกได้

สำนักวิทยบริการฯ

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งที่สัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง สำหรับใช้คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

ขอบเขตการวิจัย

เป็นการศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจับจำเพาะกับบริเวณลำดับเบสภายในยีนและตรวจสอบพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อดูประสิทธิภาพและความสามารถในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม การวิเคราะห์ตรวจสอบหาเครื่องหมายโมเลกุลในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งที่สัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตในมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้โดยศูนย์วิจัยพืชระยอง เพื่อการคัดเลือกและปรับปรุงมันสำปะหลังให้มีลักษณะน้ำหนักผลผลิตสูง

ระเบียบวิธีการวิจัย

<u>ประเด็นวิจัย :</u> เป็นการศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง ตรวจสอบพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อดูประสิทธิภาพและความสามารถในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม และวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตในมันสำปะหลัง เพื่อช่วยในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะน้ำหนักผลผลิตสูง

<u>สถานที่ทดลอง :</u> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี

<u>ระยะเวลาดำเนินงาน :</u> ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564

<u>วิธีการดำเนินงาน</u>

1. ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง

พันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองเป็นพันธุ์มันสำปะหลังจากแปลงรวบรวมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 166 พันธุ์ การสกัดดีเอ็นเอของใบมันสำปะหลังทั้ง 166 พันธุ์ **(ตารางที่1)** ด้วยวิธี CTAB (Gawel and Jarret, 1991) วัดปริมาณและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ โดยการวัดที่ค่าการดูดคลื่นแสง 260/2 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) และวิธี Electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1% Agarose gel เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอในสภาพแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 พันธุ์มันสำปะหลังจากแปลงรวบรวมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวน 166 พันธุ์

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์
1	ระยอง 1	43	CMR 47-02-9	85	MBra 792	127	MCol 912 B
2	ระยอง 2	44	CMR 47-30-8	86	MBra 890	128	MPer 534
3	ระยอง 3	45	CMR 48-20-17	87	MPer 613	129	MBra 273
4	ระยอง 5	46	CMR 48-35-1	88	MCol 2627	130	MVen 47
5	ระยอง 7	47	CMR 48-53-48	89	MBRA 759	131	MBra 311
6	ระยอง 9	48	CMR 49-22-227	90	MPtr 26	132	MTai 1
7	ระยอง 11	49	CMR 49-54-10	91	MPer 353	133	MCol 2089
8	ระยอง 60	50	CMR 49-54-67	92	MBra 242	134	MPER 183
9	ระยอง 72	51	CMR 49-89-70	93	MNGA 1	135	MBRA 18
10	ระยอง 90	52	CMR 50-20-2	94	MECU 71	136	MPer 234
11	เกษตรศาสตร์ 50	53	CMR 50-20-114	95	MUsa 8	137	MCol 2192
12	ห้วยบง 60	54	CMR 50-30-23	96	MUsa 5	138	MVen 69
13	ห้วยบง 80	55	CMR 50-34-80	97	MCol 1702	139	MBra 514
14	CMR 26-08-61	56	CMR 50-41-1	98	MVen 276	140	MCol 2173
15	OMR 26-14-9	57	CMR 50-73-6	99	MBra 542	141	CR 126
16	OMR 29-20-118	58	OMR 50-13-26	100	MBra 325	142	MPan 70
17	CMR 30-71-25	59	CMR 51-04-42	101	MEcu 104	143	MPer 283
18	CMR 31-42-20	60	CMR 51-13-14	102	MMal 26	144	MBra 191
19	CMR 32-94-121	61	CMR 51-23-14	103	MPer 546	145	MBra 691
20	CMR 33-38-48	62	MECU 72	104	HL 23	146	MGua 78
21	CMR 35-21-199	63	MMAL 63	105	MVen 219	147	MVen 68
22	CMR 35-22-348	64	MVen 297 A	106	MCol 2493	148	MCol 1084 B
23	CMR 35-112-1	65	ห้านาที	107	SPY	149	MPar 4
24	CMR 36-55-166	66	MENTE GA	108	MPer 484	150	MVen 174
25	CMR37-18-189	67	Yolk	109	MBra 509	151	MPer 569
26	CMR 37-18-201	68	01-77-1	110	KM 140	152	MPer 436
27	CMR 38-125-77	69	CMR 28-05-13	111	Golden Yellow	153	CG 165-7
28	CMR 41-42-3	70	CMR 23-149-59	112	MBol 1	154	MPer 179
29	CMR 41-109-72	71	CMR 33-35-69	113	MCol 32	155	MEcu 159
30	CMR 41-112-21	72	ยอดดำ	114	MBra 781	156	MCub 42
31	CMR 42-01-2	73	Wild 2	115	MPar 104	157	Mper 281
32	CMR 42-44-98	74	Wild 1	116	MPtr 8	158	MPan 127
33	OMR 42-16-37	75	CR 1	117	MMex 65	159	MCol 2331
34	CMR 43-08-89	76	MCol 1466	118	MCol 310	160	MPan 137
35	CMR 44-03-57	77	SG 455-1	119	Mven 204	161	MCol 2157
36	CMR 44-29-12	78	MBra 158	120	MPar 25	162	MEcu 135
37	OMR 44-23-34	79	CM 4574-7	121	MBra 534	163	MBra 403
38	OMR 45-27-76	80	MPer 349	122	MTai 3	164	MBra 903
39	CMR 46-30-264	81	MBra 894	123	MPar 193	165	MBra 702
40	CMR 46-31-7	82	MVen 67 B	124	MCol 278	166	MBra 931
41	CMR 46-47-137	83	MBra 461	125	MBra 110		
42	CMR 46-55-23	84	พิรุณ 2	126	MBra 885		

กรมวิชาการเกษตร

2. ลักษณะผลผลิตมันสำปะหลัง (root yield)

การเก็บลักษณะผลผลิตมันสำปะหลัง (root yield) โดยการชั่งน้ำหนักหัวมันสำปะหลังทั้งหมดในหนึ่งต้นตัวอย่าง หาค่าเฉลี่ย จำนวน 5 ต้นต่อตัวอย่างพันธุ์ และมีหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อต้น

3. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ILP

3.1 ออกแบบไพรเมอร์ โดยนำลำดับเบส EST ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งอย่างน้อย 7 ยีน ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank เปรียบเทียบกับลำดับเบสจีโนมของมันสำปะหลังโดยใช้วิธี BLAST จากฐานข้อมูล Phytozome (*Manihot esculenta*) เพื่อทำนายตำแหน่งอินทรอน และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณเอ็กซอนขนาบข้างบริเวณที่คาดว่าจะเป็นอินทรอนและออกแบบไพรเมอร์ให้ห่างจากบริเวณที่ถูกทำนายว่าเป็นรอยต่อ exon/intron หรือ splice sites ของมันสำปะหลัง ประมาณ 20 bp ทั้งทางปลาย 5’ และ 3’ ด้วยโปรแกรม Primer3 โดยกำหนดให้ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดอยู่ในช่วง 150 - 400 คู่เบส

3.2 ตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล โดยการเพิ่มปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 µL ประกอบด้วย DNA 10 ng, 10X PCR buffer 2 µl, MgCl2 25 mM, dNTPs 2.0 mM, ไพรเมอร์แต่ละไพร์เมอร์ 0.25 µl และเอนไซม์ Tag DNA polymerase 1 unit อุณหภูมิในการทำพีซีอาร์ ประกอบด้วยอุณหภูมิ denature ที่ 95°C นาน 1 นาที และ 94°C นาน 3 นาที ตามด้วยรอบอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ ที่ 94°C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ตามความเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่นาน 1 นาที 30 วินาที อุณหภูมิ extension นาน 30 วินาที และ final elongation 72°C นาน 5 นาที ตรวจสอบผลเบื้องต้นด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 2% agarose gel electrophoresis ตรวจวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่องอ่านแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ผลภาพ (QIAxcel Advanced System)

3.3 ประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมายโมเลกุลและวิเคราะห์โครงสร้างประชากร โดยการบันทึกแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย ILP แบบข่มร่วม ข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากเครื่องหมาย ILP ถูกนำมาวิเคราะห์ โดยใช้โปรแกรม PowerMarker (Liu and Muse, 2005) และทำการประเมินจำนวนกลุ่มประชากร (K) ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจะใช้วิธีวิเคราะห์ความน่าจะเป็นแบบเบย์ (Bayesian) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE v.2.3 (Pritchard *et al*., 2000)

4. การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล

พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP ในมันสำปะหลัง โดยการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) 2 ชนิด *Mse*I และ *Eco*RI จากนั้นเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA Library) ด้วยการคัดเลือกขนาดสายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว (ประมาณ 200-300 เบส) ต่อปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 2 ด้านด้วย Adapter 2 ชนิด ซึ่งถูกออกแบบให้เข้าคู่กับส่วนปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สังเคราะห์สายดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวให้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ (illumina platform)

กรมวิชาการเกษตร

5. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากร

5.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับค่าเฉลี่ยของลักษณะน้ำหนักผลผลิตด้วยการวิเคราะห์สถิติใช้วิธี Mix linear model (MLM) โดยพิจารณาอิทธิพลของโครงสร้างประชากรจากค่า Q ร่วมกับค่าความเป็นเครือญาติ (kinship) การคำนวณ LD และ Association mapping ด้วยโปรแกรม TASSEL 2.0.1 (Bradbury *et al*., 2007)

5.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับค่าเฉลี่ยของลักษณะน้ำหนักผลผลิตด้วยการวิเคราะห์สถิติใช้วิธี Mix linear model (MLM) โดยพิจารณาอิทธิพลของโครงสร้างประชากรจากค่า Q ร่วมกับค่าความเป็นเครือญาติ (kinship) การคำนวณ Association mapping ด้วยโปรแกรม TASSEL 5.0 (Bradbury *et al*., 2007)

ผลการวิจัยและอภิปราย

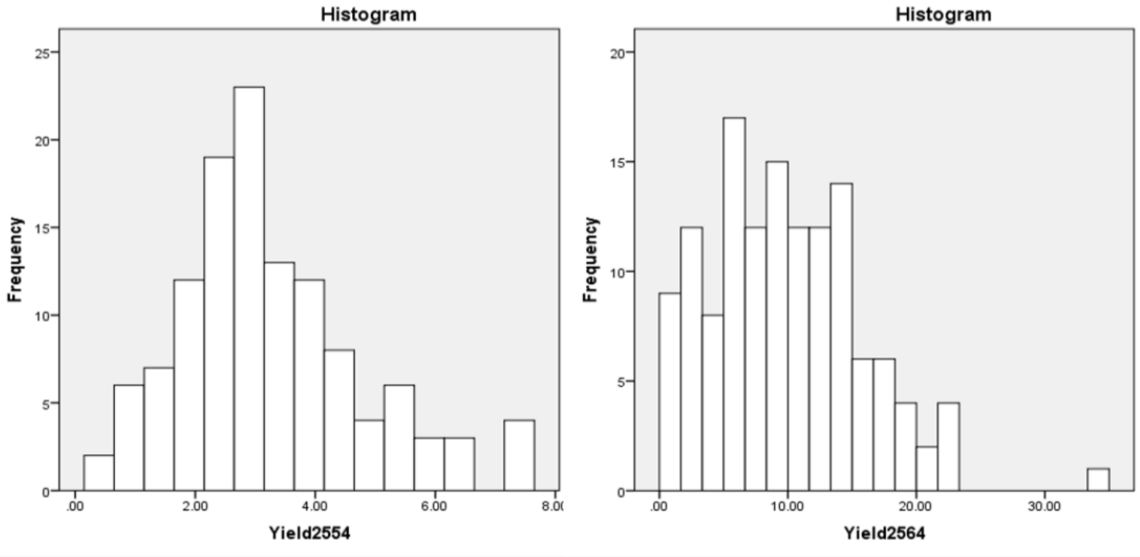
1. ข้อมูลลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง

ข้อมูลลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นค่าเฉลี่ยของน้ำหนักหัวมันสำปะหลังทั้งหมด มีหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อต้น โดยใช้ข้อมูลลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) (จิณณจาร์และคณะ 2559) และ ปี 2564 (Yield2564) จากแปลงรวบรวมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ **(ตารางที่ 2)** แสดงค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความแปรปรวน พบว่า ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 คือ 3.23 และ 9.93 กิโลกรัมต่อต้น และจากการตรวจสอบการแจกแจงแบบปกติด้วยสถิติ Shapiro-Wilk test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าข้อมูลลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังทั้ง 2 ลักษณะมีการกระจายตัวของข้อมูลไม่เป็นโค้งปกติ ($p < 0.05$) **(ภาพที่ 1)**

ตารางที่ 2 แสดงค่าทางสถิติของลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง (กิโลกรัมต่อต้น) ทั้ง 2 ลักษณะ (Yield2554 และ Yield2564)

ลักษณะ	จำนวนตัวอย่าง	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าความแปรปรวน (Variance)	การแจกแจงแบบปกติ (Normal Distribution)
Yield2554	122	0.40	7.60	3.23	1.53	2.34	0.000
Yield2564	134	0.30	34.70	9.92	5.95	35.4	0.001

ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพที่ 1 กราฟแสดงการแจกแจงแบบปกติด้วยสถิติ Shapiro-Wilk test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 และ ปี 2564 (Yield2554 และ Yield2564)

2. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ILP

จากการสืบค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกระบวนการสังเคราะห์แป้งของมันสำปะหลังโดยสืบค้นข้อมูลเป็นลำดับ EST จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI พบยีนทั้งหมด 14 ยีน **(ตารางที่ 3)** และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลังได้ 12 ยีน ได้แก่ *sucrose synthase* (SuSy), *UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase* (UGPase), *cytosolic phosphoglucomutase* (cPGM), *fructokinase* (FRK), *glucose-6-phosphate isomerase* (cPGI), *adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase* (AGPase), *plastidial phosphoglucomutase* (pPGM), *starch synthase* (SS), *starch branching enzyme* (SBE), *debranching enzyme* (DBE), *glucan, water dikinase* (GWD) และ *sucrose transporters* (SUT) ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งทั้งหมด 110 คู่ไพรเมอร์ โดยมีขนาดผลผลิตพีซีอาร์อยู่ระหว่าง 139 – 596 bp และมีอุณหภูมิ annealing อยู่ที่ประมาณ 56 ºC **(ตารางที่ 4)**

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 แสดง EST ของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง จากฐานข้อมูล GenBank EST database

No.	Starch biosynthesis pathway genes	GenBank accession no.	Full length (bp)
1	*sucrose synthase* (SuSy)	DQ443534.1	2,775
2	*UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase* (UGPase)	XM_021759711.1	2,190
3	*cytosolic phosphoglucomutase* (cPGM)	XM_021743444.1	2242
4	*fructokinase1* (FRK)	KP009998.1	1,295
		KP009999.1	1,182
		KP010000.1	1,133
		KP010001.1	1,046
		KR338981.1	997
		KP010002.1	1,222
5	*glucose-6-phosphate isomerase* (cPGI)	XM_021745471.1	1,535
		XM_021745472.1	1,275
6	hexokinase1 (HXK)	KJ417433.1	1,546
		KJ417434.1	1,767
		KJ417435.1	1,702
		KJ417436.1	1,537
		KJ417437.1	1,567
7	adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase (AGPase)	KU243122.1	1,618
		KU243124.1	1,578
8	plastidial phosphoglucomutase (pPGM)	XM_021737252.1	2,305
		XM_021761283.1	2,266
9	*granule-bound starch synthase* (GBSS)	JF708949.1	3,366
		JF708948.1	3,477
10	*starch synthase* (SS)	XM_021741332.1	4,005
11	*starch branching enzyme* (SBE)	X77012.1	2,843
12	*debranching enzyme* (DBE)	XM_021750994.1	1,879
		XM_021750995.1	1,479
13	*glucan, water dikinase* (GWD)	JN618458.1	4,728
		JN618459.1	3,687
14	*sucrose transporters* (SUT)	DQ138373.1	2,431
		DQ138371.1	2,007

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง จำนวน 110 คู่ไพรเมอร์

Starch biosynthesis pathway genes	EST accession of cassava	The genome shortgun accession of cassava	Chromosome	Primer ID	Forward primer	Reverse primer	Size of corresponding intron(s) (bp)
SuSy	DQ443534.1	LTYI01027943.1	16	SuSy1	CTCTGCTCATCGCAATGAAAT	GGTGGTGCTGAAGAATTCCC	251
				SuSy2	GCTGAGTTTGAGGAAATCCC	ACAGCAAGAGCAACCCAG	216
				SuSy3	TGTTGCTGAGTATCTGCACT	TGCATTGAATGGCTCAAAGT	188
				SuSy4	GCATCCTCTGCTTGAGTTTC	CCTCTGCCTTTCTCAGAACAT	403
				SuSy5	ACAATGTTTTGGGGTATCCG	TCTGTCTCTAAGGCACGAAC	168
				SuSy6	AAAGCAGCAAGGACTCGATA	ACCACAAGTGGTTCCTACTG	178
				SuSy7	TCTCAAGATTTGAAGTGTGGC	GCCCTGAAACTCCTTACCAA	166
				SuSy8	GGAAACATCGTTGCCTCTTT	CGATTCCGGATATTTGGTCT	189
				SuSy9	CATCATCACCAGCACATTCC	GTGTGGCTCTCATATTGGC	153
				SuSy10	GAGGAGCTTCTCTACAGCC	GCCATGGTGAAGATAATTGGC	176
				SuSy11	GGATCAAGATCTCCGAGGGA	GTCAACAGCCTCTGAGAGTA	163
				SuSy12	ACCTGGAAATGTTCTACGCT	GTTCCACTTAATCCTCAACAGT	165
UGPase	XM_021759711.1	LTYI01001497.1	1	UGPase1	CTCCTCAAAGAGCCTCCAAT	CAGCAAAAGCTGGTGTGAAA	258
				UGPase2	AGGGATTGACTTAAATCGGC	TCCTTCCATTGAACTGGGTC	152
				UGPase3	GATAACGTAGCCATCCTCCA	GCCAGTGAAAGCAACTTCAG	158
				UGPase4	GGAATCGAGATCGAGGAACA	GAGTCAAGGTTCTCCAGCTA	192
				UGPase5	TAGCTGGAGAACCTTGACTC	AGAGGCTGATGCATTGAAGA	176
				UGPase6	ATCAGCCTCTACAAGCCTTT	TCAAGTCAATAGAGAAGTTCAAA	162
				UGPase7	TTGAACTTCTCTATTGACTTGAA	ATTGGAGATTGCACAAGTGG	452
				UGPase8	CCACTTGTGCAATCTCCAAT	AGGGTGGTACTCTCATCTCT	329
				UGPase9	TACCACCCTTTACATCAGCC	GAACAGTGGCAAGCTTGATT	444
				UGPase10	ATCTTCAACAACCAGACGAG	GGATTGACATTCCTCGACCT	448
				UGPase11	CGAGGAATGTCAATCCATTACG	ACGGATGAAGTAGTGGTTCC	376
				UGPase12	AATCTTGCTCCATTCCACCT	TTCATTAGCCTTGTCTCTCG	208
				UGPase13	TCGAGAGACAAGGCTAATGA	GATCACTCCCCTCAAGTCTG	215
cPGM	XM_021743444.1	LTYI01029534.1	17	cPGM1	TGTCAGCTGTAATCCGTGAA	GTCCGCCATTTTCCATGTTA	528
				cPGM2	ACCTAATTGCTGATCTGCCT	CCGCCAAAATTAGTCACACC	177
				cPGM3	AGGAAGCTGCTTTCATCTCC	ATTGGGATCTGGATGACCTC	379
				cPGM4	TGATGGTGATGCAGATCGTA	ATTGCAACAGAATCCGATGG	152
				cPGM5	GTTGTGGCCAAACATCTGAA	GCCCAAATGCCATCTTTCTC	369
				cPGM6	TGGCCGCCATTATTATACTC	TAGTTCCTTTGCTGCACTTG	154
				cPGM7	TTGTTTGAGGATGGCTCTCG	CTTCTGAGCCAGTTCCTGAG	339
				cPGM8	GATTCTCAAGAAGCACTCGC	TCCTGCATCTTAGAAAGTTTGAG	142
FRK1	KP009998.1	LTYI01001475.1	1	FRK1_1	GCATTAGCGAACTTGAGAGC	TGTGGCTGGAATATTGTCAC	333

กรมวิชาการเกษตร

Starch biosynthesis pathway genes	EST accession of cassava	The genome shortgun accession of cassava	Chromosome	Primer ID	Forward primer	Reverse primer	Size of corresponding intron(s) (bp)
				FRK1_2	ATGGATCCTCCCCTTTAGTT	GCTGACATGTTGCTTCAAGA	540
				FRK1_3	GCAAGCATGTATCCAAATTCA	TGGTATTGCTCGTCTAGGTG	478
cPGI1	XM_021745471.1	LTYI01030415.1	18	cPGI1_1	GTCCTTGTACGGAAGCACT	GGCCTCTGATGGGATAGGAT	147
				cPGI1_2	CAACATAAGGCTAGCATGGC	ATGGATGAGGCAAATAGGAA	584
				cPGI1_3	CACCAGCAAGCATTTCTCTA	AATGTCTGCAGTTGGCCTT	151
				cPGI1_4	ACCATTTCTAGTTTCAGGGGT	TGAGCTGGCTTCTACTCTTG	173
				cPGI1_5	TGAGTAAAACGGCCTTCTGG	ATTGAGCTTACGCTTGACG	332
cPGI2	XM_021745472.1	LTYI01030414.1	18	cPGI2_1	CGGCCATGTGTGCAATAAT	TGACACTTGATGAAGTAGCTG	153
				cPGI2_2	TCATCAAGTGTCAACGGTTC	ATTAGCTCTTCAGAAGCGGG	579
				cPGI2_3	CTTCTCCTGCTGCCTTTTTC	TGTCACATGTGGTGACTACC	489
				cPGI2_4	ACACCCTCTCTCAGTTGTTG	TGGAAATAAAGGAAGCACAGA	145
				cPGI2_5	AATAGGCTGTCCTTGTACGG	TTATGTTGGTACTGGGCCTC	169
				cPGI2_6	ATGCACCAGCAAGCATTTC	CAGTTGGCCTACTTCCAGC	146
AGPase1	KU243122.1	LTYI01018807.1	11	AGPase1_1	TGCTGTTTTAACATCAAACAATCC	GCTACATTTGTTGGGTCCAC	301
				AGPase1_2	TTTCCTCTTACCAGAAGGGC	GTTGCTCATTGGAATGTCTAT	395
				AGPase1_3	CAGATGCTGTGAGGCAATTT	CGTGATATCAGCATTACTGTCA	380
				AGPase1_4	CACGATTTCATGTGCTCCAG	TTCGTCCCCTGTTGTCTATC	192
				AGPase1_5	TGAAAAACCAACTGGTGCTG	TGCAGAGATAATCCTAGATGAGT	492
				AGPase1_6	ATCTGAAGTCATCCCCGCT	TCCTATATCTTCCCAGTAGTCTCT	329
				AGPase1_7	AGACATTTTATGAAGCAAACTTGG	TGTAGAAGGGTGTCTTTGGG	446
				AGPase1_8	TCGATTTCTACCACCAACCA	CAGTTTGGTAGTTGTCAGCTC	339
				AGPase1_9	AGTCCCTATTGGTGTTGGAA	TGTAAAATCCTTTTTCTGGCCT	406
AGPase2	KU243124.1	LTYI01020263.1	12	AGPase2_1	CAGAGCCCAGAGAATCCAAA	TGCTCTTCAAATAACCACAAGT	386
				AGPase2_2	AAAGGGGAGCAATTGAAAGC	GCTCTCTCATCATCAAGACCT	195
				AGPase2_3	AGTGAAGTTATTCCTGGTGCT	CCAATATCTTCCCAGTAGCCA	596
				AGPase2_4	AATGCCAATCTGGGTATAACT	GAAGCCCAACCACAGAGT	490
				AGPase2_5	GCAATCATAGAGGATACATTACT	GCCAGAAACCTCCTGTCA	230
pPGM	XM_021737252.1	LTYI01023743.1	14	pPGM1	CTTCCTCTTCCACCGCCATT	CTGGATCCAATTCGCCAGAT	447
				pPGM2	AGAAAATTATCTGGCGAATTGGA	TTACCAACACCATTCCCTGC	358
				pPGM3	AAAATTGCAGCAGGGAATGG	AGGATTATGGCTTGCACTCA	455
				pPGM4	CCCCGTTTCTGACTACCTA	ACTTCTGATGAGCTCAAAATC	139
				pPGM5	TTCTGTCACGGCCAGATTTC	ATAAGCACCAGTGACAGCAT	460
				pPGM6	CAAAGCCCATCTTTGTGGAC	TCAGGCCCATTCTTACTATACA	317
				pPGM7	ATTCACAAGGAGCCATTCCT	CATCATCCATAAGATTGCCAAA	343
				pPGM8	GGGCAACTTTTGGGAGAAAT	AGTCATCGGCATACTGAAGG	382
				pPGM9	GATGACTTCAAGTACACGGA	TGTACATTCTAACAGTTGCAC	338
				pPGM10	ATGAGATGGATGCCCAAACA	ACCTGTGAAGTCCTTCAATTTT	198

Starch biosynthesis pathway genes	EST accession of cassava	The genome shortgun accession of cassava	Chromosome	Primer ID	Forward primer	Reverse primer	Size of corresponding intron(s) (bp)
SS	XM_021741332.1	LTYI01026526.1	16	SS1	AGTAAAACCATTCCCGACCC	CTGATGCTGCTGGAATTGAT	350
				SS2	TGGTCAACATCAAACACAGT	TGGTTCCATTCCAGTTGTTC	408
				SS3	TGGGACTAGAATGAAATCAGCA	ATGAGCCACTATCACACCTG	165
				SS4	CTTCCTTGGCTGCTCTTTTG	CCCAGACATATGGGATCCTT	596
				SS5	TCACAACATCTCCAAGTCCT	TATTGCTGTTGAAATGGCCC	349
				SS6	CTTTCACACGTGCTGTTCTT	CAGTTAAGAGAGCAGGCCAT	431
				SS7	CCAATCCAAGAGAAGGGCTC	AATCTGAGAGAAAGGACGGC	529
				SS8	TGAAATTTTTCTCTGTCTCCTCT	TACACTCGGGGTTTCATGTG	187
SBE	X77012.1	LTYI01008721.1	5	SBE1	TCCTTTTTCTACCAAGAATCTCA	CTGCTGAGATTGCAAGACCT	454
				SBE2	TGAAGGTGGTCTTGAGGAAT	ACAATTCCACCTGCTTCTCT	384
				SBE3	ATTGTCTATCGTGAGTGGGC	CCCAACCATTAAAGTCCCCA	154
				SBE4	TGTCTACTGGGATCCTCCAC	AGGCCGGGGATACTTGAAT	275
				SBE5	GTTGACACTGAACACTTGAGA	ACAAAAACCAGGTCCCCAC	449
				SBE6	TGGATAGTGATGCTTGGGAG	AAAATGGTCCACATCATGGC	391
				SBE7	CAAAATACTCTCTGCAGCTCG	ACTGTTGTGATTTCCTTCTTTT	330
DBE	XM_021750994.1	LTYI01004139.1	3	DBE1	TCGACCTTCTTCTCTGTTGC	CCCAAGAAGTAAATATTAGGGGC	407
				DBE2	AATGCGCGAGATTATCGTTT	AGTATTCTCATTATAGGGAGGC	161
				DBE3	AGCAACTAGTTAGATATAAACGACA	CAGCTGCTTTACTTCCAAGAG	366
				DBE4	GATAAGTGTCTTCCAAGGCG	GTCGACAATCTTGCATCTCA	397
				DBE5	CCAGCCAACTTGACTCAAATAA	GTTCCAAAAGCTGCAATAAAGA	335
				DBE6	TGAAACGAGTAATTTGGGAACT	CATAGATGAGAACAACAATATTTCA	348
GWD	JN618458.1	LTYI01021906.1	13	GWD1	AGCACAACTTTCTCTTCCTCA	GGCCGTGCTTTGAGTTTTAT	490
				GWD2	CAAGAGTTTCTCCAAGTCCC	TCCATCTTCTGAGGATTCAT	169
				GWD3	CCAACTGTTTCTTCAAAACTTCC	GAAGGTTCTTTCAGATGGTTCA	421
				GWD4	TCCTTTTAGATGCGCGATATT	TGAATTTGAAACCTACATCAGCA	495
				GWD5	TCGGAGATTGTCCAGAATGTT	CGACTTGATCCAGTTCTTCG	546
				GWD6	ACGAACTATTTCTTCAGTGAATATG	AGATGATAATGAAGAGTTTGTCT	465
				GWD7	TCAAGAACCAGGGTGATGAA	TGTTGAAGATAGAAATGTAGAAGCA	443
				GWD8	TCAACATGTTTGAGAACAAATCG	GCTATTGCAAATTGTATGGGC	340
				GWD9	AGACTCAAGATCTGCACCAG	CGTGATCTCGGCAACTATATG	507
				GWD10	GATGTCAAGGTCACTTTTAATGTA	CAGCGAATTCGGGATGAAAT	352
				GWD11	TGCTGTACCTCTTCCATCAC	GCTGAAACACAACTTAAAAGCA	486
				GWD12	GCCTCGTTCAAAGAAACTGA	CTTTAAGCTCCAAGATGCGG	405
				GWD13	TAGTTCAATACGAGCGGCTT	TCCTGCAATACAAGCCTTAGA	518
				GWD14	ATTGCAGGATCATCAATCTCT	TTCTTTGCTCCTACACTGGG	416
				GWD15	GAAGCAGAAGTGTGATTGCT	AGGAAAATTCAACCTTGATGGA	179
				GWD16	CCTATGCTATTACTCATATTCCTTG	TCTGCAGTTTTAATACAGCGTT	345
SUT	DQ138373.1	LTYI01008127.1	5	SUT1	CACCACCAAACAGTGCATC	AGGAGTTCTGAATCTAGCGA	296
				SUT2	TCGCTAGATTCAGAACTCCT	GCTGCCTTGATTGTATTTGC	308

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ 110 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 100% และจากการอ่านแถบดีเอ็นเอ 110 คู่ไพรเมอร์ พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 13 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็นอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 12% และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (annealing) ที่ 56 °C และมีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ตรงตามที่ออกแบบไว้ **(ตารางที่ 5)** ซึ่งอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมในงานวิจัยนี้น้อยกว่าอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมของการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในปาล์มน้ำมัน 53.24% จากปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์ 139 คู่ไพรเมอร์ แสดงโพลิมอร์ฟิซึม จำนวน 74 คู่ไพรเมอร์ (โสณิชาและกิตติพัฒน์, 2559) และอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมของการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในยางพารา 73.4% จากยางพาราจำนวน 180 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์ 173 คู่ไพรเมอร์ แสดงโพลิมอร์ฟิซึม จำนวน 127 คู่ไพรเมอร์ (Chanroj, 2016) ทั้งนี้ประสิทธิภาพการแสดงโพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย ILP อาจให้ผลที่ใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่ใช้ในการทดลอง จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้และจำนวนตัวอย่าง

ตารางที่ 5 รายชื่อเครื่องหมายโมเลกุล ILP ที่ให้ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอในตัวอย่างมันสำปะหลัง

No.	Marker	Expected size (bp)	Tm (°C)	No.	Marker	Expected size (bp)	Tm (°C)
1	SuSy1	251	56	8	pPGM1	447	56
2	SuSy6	178	56	9	pPGM5	460	56
3	SuSy7	166	56	10	pPGM8	382	56
4	UGPase1	258	56	11	DBE4	397	56
5	UGPase6	162	56	12	DBE6	348	56
6	UGPase7	452	56	13	GWD15	179	56
7	cPGI1_2	584	56				

จากการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างมันสำปะหลัง 166 พันธุ์ พบว่ามีจำนวนแอลลีลอยู่ในช่วง 2 ถึง 6 แอลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.7 แอลลีลต่อเครื่องหมาย เครื่องหมาย DBE4 แสดงจำนวน แอลลีลสูงที่สุด คือ 6 แอลลีล จากการวิเคราะห์จำนวนจีโนไทป์ พบว่ามีจำนวนจีโนไทป์เฉลี่ยเท่ากับ 4.5 จีโนไทป์ต่อเครื่องหมาย เครื่องหมาย DBE4 แสดงจำนวนจีโนไทป์สูงที่สุดคือ 17 จีโนไทป์ เมื่อคำนวณค่าความหลากหลายของยีน พบว่ามีค่าระหว่าง 0.21 ถึง 0.68 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.40 สำหรับค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้นั้น มีค่าระหว่าง 0.02 ถึง 0.68 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.40 ค่า PIC มีค่าระหว่าง 0.19 ถึง 0.64 เฉลี่ย 0.35 ต่อเครื่องหมาย โดยเครื่องหมาย DBE4 มีค่า PIC สูงสุด **(ตารางที่ 6)**

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 6 การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP จำนวน 13 เครื่องหมาย ที่พัฒนาจากยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้ง จำนวน 6 ยีน พารามิเตอร์ที่ประเมิน ประกอบด้วย จำนวนจีโนไทป์ จำนวนแอลลีล ค่าความหลากหลายของยีน (gene diversity) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) และ ค่า polymorphism information content (PIC)

เครื่องหมาย	จำนวนจีโนไทป์	จำนวนแอลลีล	ค่าความหลากหลายของยีน	ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้	PIC
SuSy1	2	2	0.23	0.26	0.20
SuSy6	5	3	0.45	0.43	0.38
SuSy7	3	3	0.45	0.42	0.40
UGPase1	3	2	0.46	0.45	0.35
UGPase6	2	2	0.26	0.31	0.23
UGPase7	3	2	0.50	0.50	0.37
cPGI1_2	2	2	0.24	0.28	0.21
pPGM1	3	3	0.25	0.20	0.23
pPGM5	6	3	0.65	0.51	0.58
pPGM8	6	3	0.46	0.48	0.41
DBE4	17	6	0.68	0.68	0.64
DBE6	3	2	0.21	0.21	0.19
GWD15	3	2	0.40	0.43	0.32

3. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP

จากตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 166 พันธุ์ ทำการหาลำดับเบสแบบ Next generation sequencing (NGS) ด้วยเทคนิค Genotyping-by-Sequencing (GBS) ตรวจคัดกรองข้อมูลและค้นหาตำแหน่ง SNP โดยการเปรียบลำดับเบสระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังด้วยกันเองทั้ง 166 พันธุ์ ทำการกรองข้อมูล SNPs ที่ Minimum read depth ≥ 4X missing data < 10 % Minimum minor allele frequency (MAF) < 0.05 ได้จำนวน SNPs 383,828 เครื่องหมาย พบว่ามี SNPs แบบ Transitions (A/G หรือ C/T) 67.07% และแบบ Transversion (A/C, A/T, C/G หรือ G/T) 32.93% ซึ่ง SNPs แบบ A/G พบมากที่สุด 33.56% และพบ SNPs แบบ C/G น้อยที่สุด 5.81% อัตราส่วนระหว่าง Transition:Transversion คิดเป็น 2.03 **(ตารางที่ 7)**

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนและประเภทของ SNPs ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจำนวน 166 พันธุ์

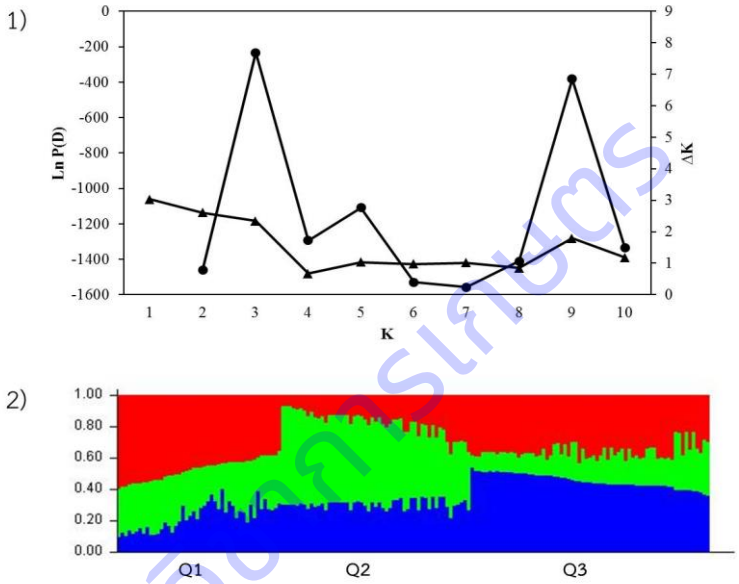
ประเภท	จำนวน	เปอร์เซ็นต์
SNPs	383,828	100%
Transition		
A/G	128,801	33.56%
C/T	128,631	33.51%
Transversion		
A/C	35,383	9.22%
A/T	33,244	8.66%
C/G	22,301	5.81%
G/T	35,468	9.24%

กรมวิชาการเกษตร

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง

4.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง

จากการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรด้วยเครื่องหมาย ILP ทั้งหมด โดยใช้ Likelihood ของการเกิดโครงสร้างประชากรย่อย (K) พบว่าจุดสูงสุดของ Delta K (ΔK) เป็นที่ตำแหน่ง K = 3 ซึ่งแสดงถึง ประชากรมันสำปะหลังที่ศึกษามีโครงสร้างประชากรย่อย 3 ประชากรย่อย (ภาพที่ 2.1) และเมื่อวิเคราะห์โอกาส (Q) ที่ตัวอย่างมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์จะตกอยู่ในประชากรย่อย (ภาพที่ 2.2) โดยใช้โปรแกรม Structure พบว่าตัวอย่างมันสำปะหลังในประชากรย่อยที่อนุมานมีลักษณะผสม (admixture) แสดงถึงการเกิดการผสมข้ามระหว่างสมาชิกระหว่างกลุ่มประชากรย่อยของมันสำปะหลังที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Adjebeng-Danquah et al., 2020)

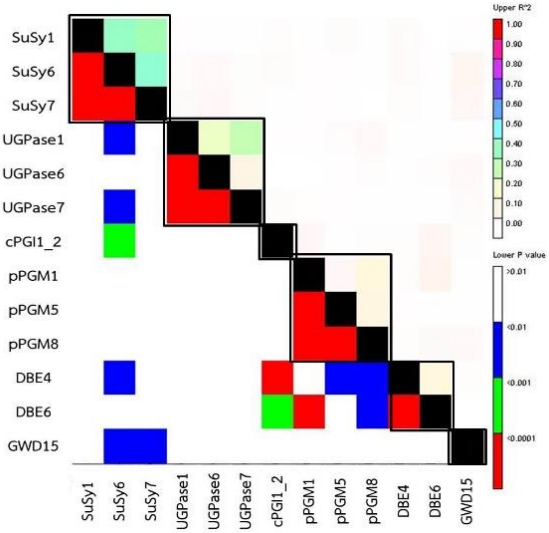


ภาพที่ 2 1) กราฟแสดงการประมาณโครงสร้างประชากรย่อย (K) ในประชากรมันสำปะหลังที่ศึกษาโดย Delta K (ΔK)

2) โครงสร้างของกลุ่มประชากรที่อนุมานได้ โดยใช้ K = 3 ตามความสูงแท่งสีแดง เขียว และน้ำเงิน แสดงโอกาส (Q)

ผลการวิเคราะห์ความไม่สมดุลของลิงเกจ (linkage disequilibrium; LD) ด้วยเครื่องหมาย ILPโดยการวิเคราะห์ค่า r^2 ของเครื่องหมาย ILP จำนวน 13 เครื่องหมาย พบว่าเครื่องหมาย ILP ที่อยู่ภายในยีนเดียวกันและมีตำแหน่งใกล้กันมีแนวโน้มการเกิดความไม่สมดุลของลิงเกจมากกว่าเครื่องหมาย ILP ที่อยู่ต่างยีนกันโดยเครื่องหมาย SuSy1 กับ SuSy6 ในยีน *sucrose synthase* (*SuSy*) แสดงความไม่สมดุลของลิงเกจมากที่สุด มีค่า R^2 = 0.41 (p < 0.00001) **(ภาพที่ 3)**

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3 ความไม่สมดุลของลิงเกจ (linkage disequilibrium; LD) ของเครื่องหมาย ILP จำนวน 13 เครื่องหมาย จากยีน 6 ยีน กรอบสี่เหลี่ยมแสดงขอบเขตของยีน ตารางด้านใต้เส้นทะแยงมุมแสดงค่า p ตารางด้านบนเส้นทะแยงมุมแสดงค่า R^2

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP ทั้ง 13 เครื่องหมาย กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง 2 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) และลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 (Yield2564) พบว่าในการใช้โมเดล General linear model (GLM) เครื่องหมาย UGPase1 แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังสูงสุด (ค่า p น้อยที่สุด) โดยมีค่าอิทธิผลต่อลักษณะ (R^2) อยู่ระหว่าง 2 ถึง 3% **(ตารางที่ 8)** แต่ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังทั้งหมด

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP ในยีนที่เกี่ยวข้องกระบวนการสังเคราะห์แป้งกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับผลผลิตมันสำปะหลัง โดยเครื่องหมาย UGPase1 มีความเสถียรภาพต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไปในแต่ละปี ดังนั้นจึงน่าจะเป็นเครื่องหมายที่มีศักยภาพในการนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังที่มีผลผลิตสูงได้ อย่างไรก็ตามเครื่องหมาย ILP ที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตในการทดลองนี้สมควรที่จะได้รับการยืนยันความสัมพันธ์ อาจทำโดยนำไปความสัมพันธ์ในประชากรอื่น หรือนำไปวิเคราะห์ QTL ในกลุ่มประชากรที่มีข้อมูลแผนที่พันธุกรรมและข้อมูลผลผลิตแล้ว

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะ (Association mapping) โดยวิธี GLM ของเครื่องหมาย ILP จำนวน 13 เครื่องหมาย กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) และ ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 (Yield2564)

ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554)			**ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 (Yield2564)**		
เครื่องหมาย	p	R^2	เครื่องหมาย	p	R^2
UGPase1	0.1398	0.03	UGPase1	0.3523	0.02

กรมวิชาการเกษตร

4.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง

การพัฒนาเครื่องหมาย SNP จากตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 166 พันธุ์ ด้วยเทคนิค Genotyping-by-Sequencing (GBS) ได้เครื่องหมาย SNPs จำนวน 383,828 เครื่องหมาย ที่มีการกระจายทั่วทั้ง 18 โครโมโซมของมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับการพัฒนาเครื่องหมาย SNP ด้วยเทคนิค Amplified-fragment single nucleotide polymorphism and methylation (AFSM) ในตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 158 พันธุ์ ได้เครื่องหมาย SNPs จำนวน 349,827 เครื่องหมาย (Zhang et al., 2018) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยใช้โมเดล General linear model (GLM) และ Mixed linear model (MLM) ผลการวิเคราะห์ของทั้ง 2 โมเดลพบว่า เครื่องหมาย S12_4926402 และเครื่องหมาย S12_4945762 มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 10^{-7}$) โดยมีค่าอิทธิผลต่อลักษณะ (R^2) อยู่ระหว่าง 24 ถึง 27% **(ตารางที่ 9, ภาพที่ 4.1)** และเครื่องหมาย S13_17595774 และเครื่องหมาย S3_32267507 มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 10^{-6}$) โดยมีค่าอิทธิผลต่อลักษณะ (R^2) อยู่ระหว่าง 20 ถึง 22% **(ตารางที่ 9, ภาพที่ 4.2)**

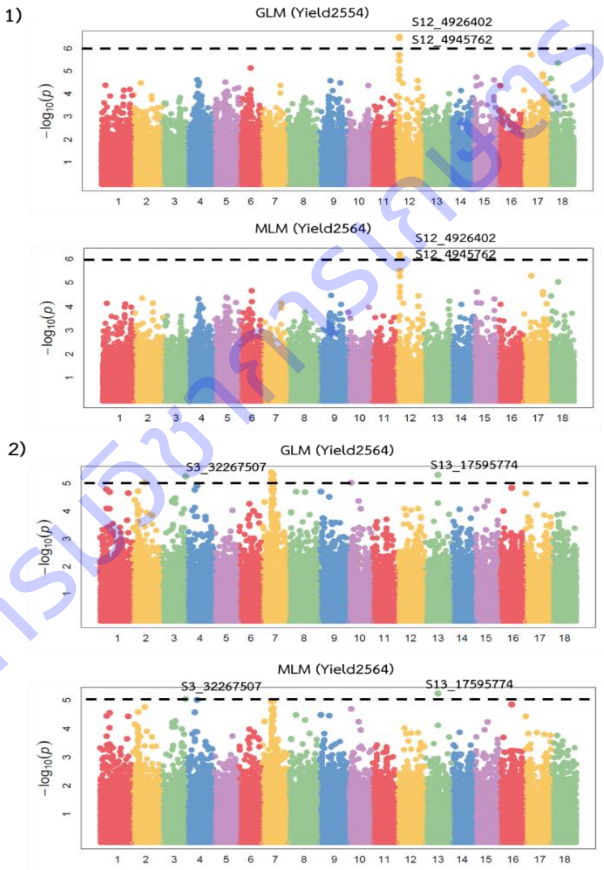
ผลจากการ Blastx ในฐานข้อมูล NCBI ของเครื่องหมาย SNP ที่สัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 ได้แก่ เครื่องหมาย S12_4926402 และเครื่องหมาย S12_4945762 บนโครโมโซมที่ 12 ตำแหน่งที่ 4926402 และ 4945762 พบว่า มีความคล้ายคลึงยีน splicing factor ESS-2 homolog ในมันสำปะหลัง (E value = 0) และพบความคล้ายคลึงของยีน uncharacterized protein ในมันสำปะหลัง (E value ≤ 1.00e-73) ของทั้งเครื่องหมาย S13_17595774 บนโครโมโซมที่ 13 ตำแหน่งที่ 17595774 และ S3_32267507 บนโครโมโซมที่ 3 ตำแหน่งที่ 32267507 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564

ผลของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เครื่องหมาย SNP บนโครโมโซมที่ 12 ได้แก่ เครื่องหมาย S12_4926402 และเครื่องหมาย S12_4945762 มีความสัมพันธ์มากที่สุดกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง อย่างมีนัยสำคัญ (p ≤ 10-7) จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีผลผลิตสูง อย่างไรก็ตามควรมีการวิจัยเพิ่มเติมโดยอาศัยข้อมูลที่มากขึ้นในส่วนของลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีผลผลิตสูง

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) และลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 (Yield2564) โดยใช้โมเดล GLM และ MLM

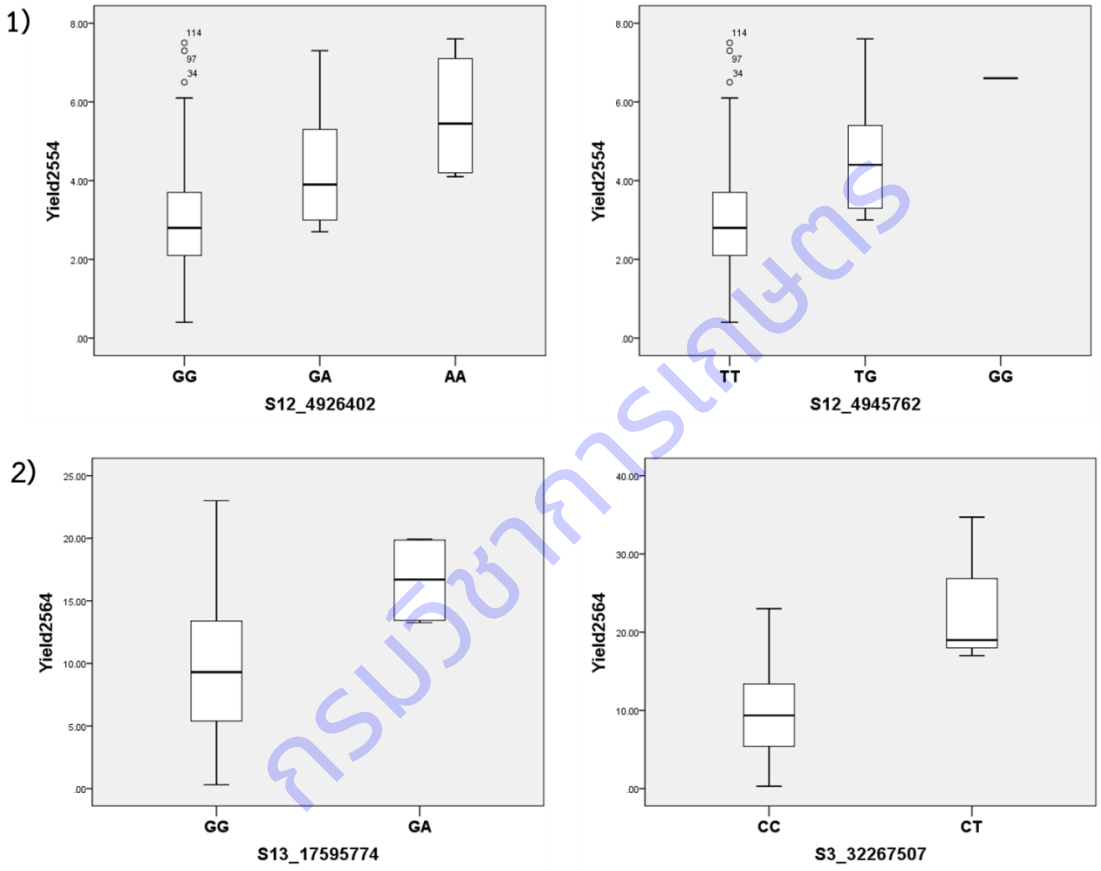
ลักษณะ	เครื่องหมาย	แอลลีล	โครโมโซม	ตำแหน่ง	GLM		MLM	
					p	R^2	p	R^2
Yield2554	S12_4926402	G/A	12	4926402	3.21×10^{-07}	0.272	6.33×10^{-07}	0.252
	S12_4945762	T/G	12	4945762	3.64×10^{-07}	0.269	8.73×10^{-07}	0.245
	S12_4926383	T/C	12	4926383	1.96×10^{-06}	0.236	3.15×10^{-06}	0.220
	S12_4926397	G/A	12	4926397	1.96×10^{-06}	0.236	3.15×10^{-06}	0.220
	S17_10963260	C/A	17	10963260	1.91×10^{-06}	0.237	5.11×10^{-06}	0.211
	S12_4940836	C/T	12	4940836	3.52×10^{-06}	0.225	5.45×10^{-06}	0.210
	S18_11872898	C/A	18	11872898	4.56×10^{-06}	0.220	9.28×10^{-06}	0.200
Yield2564	S13_17595774	G/A	13	17595774	4.83×10^{-06}	0.225	5.89×10^{-06}	0.215
	S3_32267507	C/T	3	32267507	5.49×10^{-06}	0.223	9.22×10^{-06}	0.208
	S7_12577920	C/T	7	12577920	3.92×10^{-06}	0.229	1.06×10^{-05}	0.205
	S7_14820266	A/G	7	14820266	4.78×10^{-06}	0.225	1.09×10^{-05}	0.205
	S7_12577963	G/A	7	12577963	3.99×10^{-06}	0.228	1.15×10^{-05}	0.204



ภาพที่ 4 แสดงกราฟ Manhattan plots จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยใช้โมเดล General linear model (GLM) และ Mixed linear model (MLM) ที่แสดงค่า -log10 p value ของแต่ละเครื่องหมายบนโครโมโซมทั้ง 18 โครโมโซมของมันสำปะหลัง 1) ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) ที่มี cut-off value ของค่า -log10 p value เท่ากับ 6 และ 2) ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 (Yield2564) มี cut-off value ของค่า -log10 p value เท่ากับ 5

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อทดสอบอิทธิพลของแอลลีลของเครื่องหมาย SNP ที่มีต่อลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยการใช้ F-test ในเครื่องหมาย S12_4926402 ที่มีแอลลีล G/A ประกอบด้วย 3 จีโนไทป์ ได้แก่ GG GA และ AA และใน เครื่องหมาย S12_4945762 ที่มีแอลลีล T/G ประกอบด้วย 3 จีโนไทป์ ได้แก่ TT TG และ GG พบความแตกต่างของแอลลีลในจีโนไทป์มีผลต่อลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.00001$ (รูปที่ 5.1) และในเครื่องหมาย S13_17595774 ที่มีแอลลีล G/A ประกอบด้วย 2 จีโนไทป์ ได้แก่ GG และ GA และในเครื่องหมาย S3_32267507 ที่มีแอลลีล C/T ประกอบด้วย 2 จีโนไทป์ ได้แก่ CC และ CT พบความแตกต่างของแอลลีลในจีโนไทป์มีผลต่อลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ **(ภาพที่ 5.2)**



ภาพที่ 5 กราฟ Boxplot ที่แสดงอิทธิพลของแอลลีลของเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง 1) เครื่องหมาย S12_4926402 และเครื่องหมาย S12_4945762 ที่มีต่อลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 2) เครื่องหมาย S13_17595774 และเครื่องหมาย S3_32267507 ที่มีต่อลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564

กรมวิชาการเกษตร

อภิปรายผล

จากการพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากยีนที่เกี่ยวข้องกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลังจำนวน 166 พันธุ์ ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 110 คู่ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ตรวจพบความแตกต่างของขนาดอินทรอนมีจำนวน 13 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็นอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 12% ซึ่งน้อยกว่าอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมของการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในปาล์มน้ำมัน 53.24% จากปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์ 139 คู่ไพรเมอร์ แสดงโพลิมอร์ฟิซึม จำนวน 74 คู่ไพรเมอร์ (โสณิชาและกิตติพัฒน์, 2559) และอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมของการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในยางพารา 73.4% จากยางพาราจำนวน 180 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์ 173 คู่ไพรเมอร์ แสดงโพลิมอร์ฟิซึม จำนวน 127 คู่ไพรเมอร์ (Chanroj, 2016) ทั้งนี้ประสิทธิภาพการแสดงโพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย ILP อาจให้ผลที่ใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่ใช้ในการทดลอง จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ และจำนวนตัวอย่าง และผลการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรเครื่องหมาย ILP ในมันสำปะหลังจำนวน 166 พันธุ์ มีโครงสร้างประชากรย่อย 3 กลุ่ม พบว่าตัวอย่างมันสำปะหลังในกลุ่มประชากรย่อยที่อนุมานมีลักษณะผสม (admixture) แสดงถึงการเกิดการผสมข้ามระหว่างสมาชิกระหว่างกลุ่มประชากรย่อยของมันสำปะหลังที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Adjebeng-Danquah et al., 2020) ความไม่สมดุลของลิงเกจ (linkage disequilibrium; LD) ของเครื่องหมาย ILP ที่อยู่ภายในยีนเดียวกันและมีตำแหน่งใกล้กันมีแนวโน้มการเกิดความไม่สมดุลของลิงเกจมากกว่าเครื่องหมาย ILP ที่อยู่ต่างยีนกัน ทั้งนี้เนื่องจากระยะห่างระหว่างเครื่องหมาย ILP ภายในยีนเดียวกันมีระยะทางที่ใกล้กันและมีโอกาสที่จะไม่แยกตัวกันและไปด้วยกันในเซลล์สืบพันธุ์ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP ในยีนที่เกี่ยวข้องกระบวนการสังเคราะห์แป้งกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับผลผลิตมันสำปะหลัง โดยเครื่องหมาย UGPase1 มีความเสถียรภาพต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไปในแต่ละปี ดังนั้นจึงน่าจะเป็นเครื่องหมายที่มีศักยภาพในการนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังที่มีผลผลิตสูงได้ อย่างไรก็ตามเครื่องหมาย ILP ที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตในการทดลองนี้สมควรที่จะได้รับการยืนยันความสัมพันธ์ อาจทำโดยนำไปความสัมพันธ์ในประชากรอื่น หรือนำไปวิเคราะห์ QTL ในกลุ่มประชากรที่มีข้อมูลแผนที่พันธุกรรมและข้อมูลผลผลิตแล้ว การพัฒนาเครื่องหมาย SNP จากตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 166 พันธุ์ ด้วยเทคนิค Genotyping-by-Sequencing (GBS) ได้เครื่องหมาย SNPs จำนวน 383,828 เครื่องหมาย ที่มีการกระจายทั่วทั้ง 18 โครโมโซมของมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับการพัฒนาเครื่องหมาย SNP ด้วยเทคนิค Amplified-fragment single nucleotide polymorphism and methylation (AFSM) ในตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 158 พันธุ์ ได้เครื่องหมาย SNPs จำนวน 349,827 เครื่องหมาย (Zhang et al., 2018) ผลของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เครื่องหมาย SNP บนโครโมโซมที่ 12 ได้แก่ เครื่องหมาย S12_4926402 และเครื่องหมาย S12_4945762 มีความสัมพันธ์มากที่สุดกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 10\text{-}7$) จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีผลผลิตสูง อย่างไรก็ตามควรมีการวิจัยเพิ่มเติมโดยอาศัยข้อมูลที่มากขึ้นในส่วนของลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีผลผลิตสูง

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาเครื่องหมาย ILP ทั้งหมด 13 เครื่องหมาย จากยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง จำนวน 6 ยีน โดย เครื่องหมายเหล่านี้มีค่าประสิทธิภาพของเครื่องหมาย (PIC) อยู่ระหว่าง 0.19 – 0.64 และมีค่าเฉลี่ย 0.35 ซึ่งเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้จากวิจัยมีศักยภาพในการนำไปศึกษาแยกความแตกต่างของพันธุ์มันสำปะหลังในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เครื่องหมาย UGPase1 แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังสูงสุด (ค่า p น้อยที่สุด) โดยมีค่าอิทธิผลต่อลักษณะ (R2) อยู่ระหว่าง 2 ถึง 3% แต่ไม่ถึงระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ นอกจากนี้ สามารถพัฒนาเครื่องหมาย SNPs ได้ทั้งหมด 383,828 เครื่องหมาย โดยสามารถระบุตำแหน่งบนทั้ง 18 โครโมโซมของมันสำปะหลัง การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง พบเครื่องหมาย SNP บนโครโมโซมที่ 12 ได้แก่ เครื่องหมาย S12_4926402 และเครื่องหมาย S12_4945762 มีความสัมพันธ์มากที่สุดกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยเครื่องหมายเหล่านี้อยู่ภายในยีน splicing factor ESS-2 homolog ในมันสำปะหลัง (E value = 0) โดยโปรตีนนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยผลจากงานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังควรมีการวิจัยเพิ่มเติมโดยอาศัยข้อมูลที่มากขึ้นในส่วนของลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีผลผลิตสูง

กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิจัยของโครงการ (output) ประกอบด้วย

1. มีองค์ความรู้ในการนำเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจำแนกพันธุ์ ตรวจสอบ คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ได้แก่ ลักษณะต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ โรคใบด่างโรครากปม ลักษณะผลผลิตและแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ และแป้งเหนียว ดังนี้

1.1 การนำเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้จำแนกพันธุ์มันสำปะหลังมีข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลัง และได้ phylogenetic tree ที่จัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังเก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร จำนวน 270 พันธุ์ สำหรับนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์มันสำปะหลังและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

1.2 การนำเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบลท์ โดยสามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์และให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ จำนวน 6 เครื่องหมาย

1.3 การนำเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะต้านทานโรคใบด่าง CMD โดยสามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรค CMD จำนวน 9 เครื่องหมาย และมีข้อมูลพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคใบด่าง CMD จำนวน 18 พันธุ์/สายพันธุ์ จากการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ ลูกผสม และพันธุ์ต้านทานจาก IITA จำนวน 902 พันธุ์/สายพันธุ์

1.4 การนำเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะต้านทานโรครากปม โดยได้ข้อมูลยีนที่แตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรครากปม โดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ของดัชนีรากปมมาวิเคราะห์หาความแตกต่างด้วยเทคนิค GBS และได้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ Tetra-Primer ARMS-PCR จำนวน 6 ชุด สำหรับใช้ตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลัง

1.5 การนำเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะแป้งสูง และไซยาไนด์ต่ำ โดยการใช้เทคนิค GBS ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Tetra-Primer ARMS-PCR ที่สัมพันธ์กับลักษณะปริมาณแป้งและไซยาไนด์ในมันสำปะหลัง จำนวน 11 ชุด และ 12 ชุด ตามลำดับ ซึ่งพบเครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 2 ชุด สามารถใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณไซยาไนด์ของมันสำปะหลัง และมีข้อมูลปริมาณแป้งและไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 100 พันธุ์

1.6 การนำเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะแป้งเหนียว โดยสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังได้ จำนวน 2 เครื่องหมาย และการใช้เทคนิค GBS ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ที่พบเฉพาะในมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว Waxy-HB1 จำนวน 33 ตำแหน่ง แบ่งเป็น SNPs แบบเฮทเทอโรไซโกตจำนวน 26 ตำแหน่ง และแบบโฮโมไซโกตจำนวน 7 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถใช้ในคัดเลือก ระบุ หรือจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

1.7 การนำเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจำแนกและคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผลผลิต โดยการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ILP ที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง และให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ จำนวน 13 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP จำนวน 2 เครื่องหมาย ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง

2. มีผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง ดังนี้

2.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 37 ฉบับที่ 1 มกราคม - เมษายน 2562)

2.2 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทาน โรคใบด่าง (Cassava Mosaic Disease) (วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 38 ฉบับที่ 1 มกราคม - เมษายน 2563)

2.3 เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานโรค (วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 38 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม - สิงหาคม 2563)

2.4 วิธีสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังที่รวดเร็ว ประหยัด และปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์อันตราย (วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 39 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม - สิงหาคม 2564)

3. มีการนำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์และการนำเสนอปากเปล่าระดับนานาชาติในงานประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์ มันสำปะหลัง ได้แก่

3.1 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง ในการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย (BCT 13) ระหว่างวันที่ 14-15 มิถุนายน 2562 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

3.2 Research and development of cassava varieties for cassava mosaic disease control (DOA): Marker-assisted selection for resistance to cassava mosaic disease in DOA project. ในการประชุมสัมมนาวิชาการ The International Symposium “Towards Development of Cassava Mosaic Disease (CMD) Resistant Varieties in South-east Asia” on 29 November 2021 co-organized by SATREPS and ACIAR

4. มีเทคโนโลยีและเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ได้แก่ ลักษณะต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ โรคใบด่าง โรครากปม ลักษณะผลผลิตและแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ และแป้งเหนียว ดังนี้

4.1 การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกและออกแบบไว้ จำนวน 6 เครื่องหมาย

4.2 การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้มีความต้านทานโรค CMD โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งมีรายงานเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค CMD จำนวน 7 เครื่องหมาย ได้แก่ RME1, NS158, SSRY28, NS169, Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 สำหรับนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค CMD โดยเครื่องหมาย Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 คณะผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสม (condition) สำหรับการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ด้วยเทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR ได้แล้ว

4.3 การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้มีความต้านทานโรครากปม โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ tetra primer จำนวน 2 ชุด ที่ได้จากการใช้เทคโนโลยี GBS มาวิเคราะห์หา

กรมวิชาการเกษตร

ความแตกต่างระหว่างลักษณะจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของดัชนีรากปมของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 71 พันธุ์ สำหรับใช้ตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลัง

4.4 การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้งสูงในมันสำปะหลัง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ SNP2, SNP5 และ SNP6 ที่แสดงจีโนไทป์ AA GG และ AG ที่ได้จากการใช้เทคโนโลยี GBS ในมันสำปะหลัง จำนวน 166 พันธุ์ สำหรับใช้ตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณแป้งสูงในมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิค Pyrosequencing

4.5 การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ต่ำ โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP ด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR จำนวน 3 ชุด (1CHN, 3CHN, 13CHN) ที่ได้จากการใช้เทคโนโลยี GBS ในมันสำปะหลัง จำนวน 166 พันธุ์ สำหรับใช้ตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณไซยาไนด์ต่ำในมันสำปะหลัง

4.6 การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลัง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลจากรายงาน Aiemnaka และคณะ (2012) จำนวน 2 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ที่พบเฉพาะในมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว Waxy-HB1 จำนวน 33 ตำแหน่ง แบ่งเป็น SNPs แบบเฮทเทอโรไซโกตจำนวน 26 ตำแหน่ง และแบบโฮโมไซโกตจำนวน 7 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถใช้ในคัดเลือก ระบุ หรือจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ต่อไป

4.7 การตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผลผลิตในมันสำปะหลัง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ILP จำนวน 13 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs จำนวน 2 เครื่องหมาย ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตในมันสำปะหลัง

ข้อเสนอแนะ (outcome) และการนำไปใช้ประโยชน์ ประกอบด้วย

1. สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในมันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์ต่างๆ เพื่อตรวจสอบการตรงตามพันธุ์ นอกจากนี้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้ สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เพื่อการบ่งชี้ลักษณะประจำพันธุ์และสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง อีกทั้งยังสามารถนำข้อมูลความแตกต่างทางพันธุกรรมและความกว้างของฐานพันธุกรรมมาใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังของไทยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการทรัพยากรเชื้อพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ต่อไปในอนาคต

2. สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSRs และ SSRs ที่ผ่านการคัดเลือกความสามารถในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ MBBR13 (681bp) MBBR5(664bp) MBBR9(609bp) MBBR17(627bp) MBBR4(667bp) และ SSrY5 (299bp) มาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังที่มียีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการคัดเลือกสาย

กรมวิชาการเกษตร

พันธุ์มันสำปะหลังที่มียีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบลท์ เพื่อนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการพัฒนาหรือปรับปรุงพันธุ์และเผยแพร่แก่เกษตรกรต่อไป

3. สามารถช่วยคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังหรือลูกผสมที่ต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล เพื่อจะได้นำพันธุ์หรือลูกผสม candidate ดังกล่าวไปตรวจสอบกับเชื้อโรคจริง และเมื่อพบว่าเป็นพันธุ์หรือต้นต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง สามารถนำไปใช้เป็นพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์หรือพัฒนาพันธุ์ และเผยแพร่แก่เกษตรกรต่อไป ซึ่งช่วยร่นระยะเวลาในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง ทั้งนี้ได้มีการต่อยอดงานวิจัยในปี 2565 - 2567 กิจกรรมการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง ผลผลิตและแป้งสูง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ภายใต้แผนงานวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อผลผลิตและคุณภาพสูงสำหรับอุตสาหกรรม ซึ่งกิจกรรมดังกล่าวเป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์และพีระมิดยีนเพื่อรวมลักษณะทางการเกษตรที่ต้องการ ได้แก่ ลักษณะต้านทานต่อโรคใบด่างมันสำปะหลังรวมถึงมีผลผลิตและปริมาณแป้งสูงรวมอยู่ในสายพันธุ์เดียว เพื่อให้ได้พันธุ์ดีสำหรับเผยแพร่แก่เกษตรกรใช้ปลูกทดแทนพันธุ์อ่อนแอต่อโรคใบด่างมันสำปะหลัง เป็นการช่วยแก้ปัญหาการแพร่ระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลัง นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ ประกอบด้วย (1) การสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังที่รวดเร็ว ประหยัด และปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายโดยใช้วิธี SDS/NaCl+PVP (2) การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังแบบไพรเมอร์หลายคู่ในหนึ่งปฏิกิริยา (multiplex PCR) และ (3) การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase* โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR ซึ่งได้ทำการเผยแพร่โดยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการและเอกสารองค์ความรู้แล้ว เพื่อเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัย นักปรับปรุงพันธุ์ และผู้ที่สนใจ ให้สามารถนำไปใช้ในงานวิจัยซึ่งจะช่วยประหยัดงบประมาณ และลดระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบเพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์

4. สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ที่พัฒนาขึ้นได้ไปใช้ในการคัดเลือกมันสำปะหลังที่มีลักษณะต้านทานโรครากปมได้ โดยจะพบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ ทำให้ช่วยประหยัดเวลาและแรงงานในการคัดเลือกพันธุ์ไม่ต้องเสียเวลาในการทดสอบความต้านทานโรครากปม เนื่องจากต้นมันสำปะหลังที่เป็นโรคดังกล่าวจะไม่สามารถเห็นอาการของโรคได้บนต้นมันสำปะหลังเหนือพื้นดิน ต้องขุดดินดูรากมันสำปะหลังถึงจะเห็นรอยโรครากปม และยังสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลที่จำแนกลักษณะอื่นที่ต้องการ เช่น โรคใบด่าง แป้งสูง ทำให้มันสำปะหลังที่ปรับปรุงสามารถมีหลายๆ ลักษณะที่ต้องการได้ในต้นเดียวกัน

5. สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN และ 13CHN ที่พัฒนาขึ้นนี้ ไปใช้คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสดได้ โดยกระบวนการในการนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปไปใช้คัดเลือกลักษณะไซยาไนด์ของมันสำปะหลัง สามารถทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังที่ต้องการตรวจสอบ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่พัฒนาขึ้น จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล หากใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 265 และ 189 คู่เบส ส่วนการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 13CHN มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสดจะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 397 และ 207 คู่เบส นอกจากนี้ยังสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป

กรมวิชาการเกษตร

SNP 2 และ SNP 6 ไปใช้คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 10.83% ได้ โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing ในการตรวจสอบปริมาณแป้ง สามารถทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังที่ต้องการตรวจสอบ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่พัฒนาขึ้น จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว เข้าเครื่องหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ PyroMark Q48 Autoprep (Qiagen, Germany) หากใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP 2 มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 10.83% จะแสดงจีโนไทป์ AA และ AG ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP 6 มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 10.83% จะแสดงจีโนไทป์ AA และ GG

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

7. การพัฒนาเครื่องหมายยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งที่สัมพันธ์กับน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังมีระยะเวลาในการดำเนินการงานวิจัย 2 ปี ดังนั้น ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังควรมีการวิเคราะห์เพิ่มเติม โดยใช้ข้อมูลจำนวนปีในการเก็บเกี่ยวลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังที่เพิ่มมากขึ้น เพื่อความถูกต้องของเครื่องหมายโมเลกุลที่จะนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีผลผลิตสูง และควรพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบลักษณะผลผลิตในมันสำปะหลังโดยการใช้เครื่องหมาย SNP ที่ได้จากงานวิจัยนี้ ตัวอย่างเช่น การพัฒนาวิธี tetra-primer allele specific PCR (tetra-primer AS-PCR) หรือ วิธี TaqMan hybridization probes โดยใช้ Real Time PCR เป็นต้น เพื่อให้ง่ายและประหยัดค่าใช้จ่ายต่อการตรวจสอบจีโนไทป์ของตัวอย่างมันสำปะหลังที่ต้องการตรวจสอบ ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ILP และ SNP และการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังนั้น เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้มีศักยภาพในการใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างของพันธุ์มันสำปะหลัง เพื่อช่วยตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์มันสำปะหลัง และได้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เพื่อช่วยในการคัดเลือกมันสำปะหลัง โดยการคัดเลือกจีโนไทป์ที่ให้น้ำหนักผลผลิตสูงเก็บไว้หรือคัดจีโนไทป์ที่สัมพันธ์กับน้ำหนักผลผลิตต่ำทิ้งไปในระหว่างการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะน้ำหนักผลผลิตสูง ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลา พื้นที่เพาะปลูก ค่าใช้จ่าย และแรงงาน

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2563. มันสำปะหลังโรงงาน : เนื้อที่ปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2563 และข้อมูลการนำเข้า-ส่งออกสินค้าที่สำคัญ. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/download/prcai/DryCrop/cassava.pdf,

Bostein, D, R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in human using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics 32: 314-331.

Elias, M., O. Panaudà and T. Robertà. 2000. Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. The Genetical Society of Great Britain. Heredity. 85(2000): 219 – 230.

Fregene, M., F. Angel, R. Gomez, F. Rodrignez, P. Chavarriaga, W.M. Roca, J. Tohme and M.W. Bonierbale. 1997. A molecular genetic map for cassava (*Manihiot esculenta* Crantz). Theoretical and Applied Genetics. 95: 431 – 441.

Hokanson, S.C., A.K. Szewc-McFadden, W.F. Lamboy, and J.R. McFerson. 1998. Microsatellite (SRR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationship in a Malus x domestica Borkh. core subset collection. Theor. Appl. Genet. 97:671–683.

Jorge, V., M.A. Fregene, M.C. Durque, M.W. Bonierbale, J. Tohme and V. Verdier. 2000. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Theoretical and Applied Genetics 101: 865 – 872.

López, C., B. Piegu, R. Cooke, M. Delseny, J. Tohme and V. Verdier. 2005. Using cDNA and genomic sequences as tools to develop SNP strategies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Theoretical and Applied Genetics 110: 425 – 431.

Mba, R.E.C., P. Stephenson, K. Edwards, S. Mezer, J. Nkumbira, U. Gulberg, K. Apel, M. Gale, J. Tohme and M.A. Fregene. 2001. Simple sequence repeat (SSR) marker survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: toward a SSR-based molecular genetic map of cassava. Theoretical and Applied Genetics. 102: 21 – 31.

Pillai, S.V., S.P. Manjusha and S. Sundaresan. 2004. Molecular diversity in the land races of cassava in India based on RAPD markers. Paper presented in the Sixth International Scientific meeting of the Cassava Biotechnology Network. CIAT, Cali, Colombia, March 8-14. 45 p (Abstract)

กรมวิทยาศาสตร์

Raghu, D., N. Senthil, T. Saraswathi, M. Raveendran, R. Gnanam, R. Venkatachalam, P. Shanmugasundaram and C. Mohan. 2007. Morphological and Simple Sequence Repeats (SSR) based finger printing of south indian Cassava germplasm. International Journal of Integrative Biology. 1(2): 141 – 149.

Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Exeter Publishing Setauket, New York.

Sirithunya, P., E. Roumen, S. Mongkolsomrit, S. Sriprakhon, P. Hutamekalin and T. Sreewongchai. 2001. Instruction manual work shop on molecular genetic analysis on diversity of blast pathogen in Thailand. Yothee laboratory Unit Bangkok, Thailand.

Vásquez A. and C. López. 2014. In Silico Genome Comparison and Distribution Analysis of Simple Sequences Repeats in Cassava. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Genomics. Volume 2014, Article ID 471461. 9 p.

Yu, J. Z., D. D., Fang, R. J., Kohel, M., Ulloa, L. L., Hinze, R. G., Percy and D. C. Jones. 2012. Development of a core set of SSR markers for the characterization of Gossypium germplasm. Euphytica. 187: 203-213.

<u>การทดลองที่ 2</u>

สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง. 2556. การพัฒนาเครื่องมือการตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังในระดับดีเอ็นเอเบสเดี่ยว. บทคัดย่อผลงานวิจัยที่มุ่งเป้าตอบสนองความต้องการในการพัฒนาประเทศด้านมันสำปะหลังประจำปีงบประมาณ 2556. หน้า 21-60.

วัฒนะ วัฒนานนท์ . 2550. การผลิต การใช้ประโยชน์ งานวิจัยและพัฒนามันสำปะหลังในปัจจุบันและอนาคตของประเทศไทย. เอกสารทางวิชาการ ประชุมเพื่อปรึกษาหารือเรื่อง. “การจัดทำแผนวิจัยมันสำปะหลัง” วันที่ 25 มิถุนายน 2550 ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. 22 หน้า.

Lopez C.,Soto M., Restrepo S., Piegu B., Cooke R., Delseny M., Tohme J., and Verdier V. 2005. Gene Expression Profile in Respone to *Xanthomonas axonopodis pv. Manihotis* Infection in Cassva using a cDNA microarray. Plant Mol Biol. : 57(3) :393-410 . http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15830129.

Lopez C.E., Quesada-Ocampo L.M., Bohorquez A., Duque M.C., Vargas J., Tohme J. and Verdier V. 2007. Mapping EST- derived SSRs and ESTs involved in Resistance to Bacterial Blight in Manihot esculenta. Genome. 2007. Dec:50(12) : 1078-88. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059536.

Lozano R., Hamblin MT., Prochnik S., and Jannink JL. 2015. Identification and distribution of the NBS-LRR gene family in the Cassava Genome. BMC Genomics. 2015 May 7; 16:360. Doi: 10.1186/s 12864-015-1554-9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25948536.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Luiz F.P., Paul H.G., and Larry E.. 2003. Cloning of Peroxidase Gene from Cassava with Potential as a Molecular Marker for Resistance to Bacterial Blight. Braz. Arch. Technol. Vol.46 no. 2 Curitiba Mar. 2003. http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132003000200002.

Veronique J. and Valerie V. 2003. Qualitative and Quantitative Evaluation of Cassava Bacterial Blight Resistance in F1 Progeny of a Cross between Elite Cassava Clones. Euphytica. V. 123, Issue 1, pp 41-48. http://link.springer.com/article/10.1023-1014400823817.

Raji A.A., Anderson J.V., Kolade O.A., Ugwu C.D., Dixon A.G., and Ingelbrecht I.L. 2009. Gene-based Microsatellites for Cassava (Manihot esculenta Crantz) : Prevalence, Polimorphisms, and Cross-taxa Utility. BMC Plant Biol. 2009. Sep. 11;9:118. Doi: 10.1186/1471-2229-9-118. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747391.

การทดลองที่ 3

จีราพร แก่นทรัพย์ สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ ประพิศ วองเทียม อรุโณทัย ซาววา สุภาวดี ง้อเหรียญ ดนัย นาคประเสริฐ และ จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข. 2563. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง Cassava Mosaic Disease. *ว.วิชาการเกษตร.*38(1): 68-79.

มณฑล เลิศวรปรีชา. 2554. Pyrosequencing :วิธีการใหม่สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการประยุกต์ในงานวิจัยทางจุลชีววิทยา. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 หน้า 111 – 118.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2: 37-59.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2563. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 214 หน้า.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2563. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2564. สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 240 หน้า.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศ ปี 2563. ศูนย์สารสนเทศการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 164 หน้า.

Akano, A.O., A.G.O. Dixon, C. Mba, E. Barrera and M. Fregene. 2002. Genetic mapping of a dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease. *Theor. Appl. Genetics*. 105: 521-525.

Bi, H., M. Aileni and P. Zhang. 2010. Evaluation of cassava varieties for cassava mosaic disease resistance jointly by agro-inoculation screening and molecular markers. *Afr. J. Plant Sci.* 4: 330-338.

Carmo, C.D., M.S. Silva, G.A.F. Oliveira and E.J. Oliveira. 2015. Molecular-assisted selection for resistance to cassava mosaic disease in *Manihot esculenta*Crantz. *Sci. Agric*. 72(6): 520-527.

กรมวิชาการเกษตร

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 2007. Cassava Research and Development in Asia: Exploring New Opportunities for an Ancient Crop. Proc. 7th Regional Workshop, held in Bangkok, Thailand. Oct 28- Nov 1, 2002. 668 p.

Collard, B.C.Y. and D.J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 363: 557–572.

Edwards, K., C. Johnstoneand C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res*. 19: 1349.

Fregene, M., N. Morante, T. Sánchez, J. Marin, C. Ospina, E. Barrera, J. Gutierrez, J. Guerrero, A. Bellotti, L. Santos, A. Alzate, S. Moreno and H. Ceballos. 2006. Molecular markers for introgression of useful traits from wild *Manihot* relatives of cassava, marker-assisted selection (MAS) of disease and root quality traits. *J. Root. Crops*. 32: 1-31.

Geddes, A.M. 1990. The relative importance of crop pests in sub Saharan Africa. Bulletin 36; Chatham Natural Resource Institute (NRI).

Hong, Y.G., D.J. Robinson and B.D. Harrison. 1993. Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted geminiviruses in cassava. J.Gen. Virol. 74: 2437-2443.

Kotchoni, S.O. and E.W. Gachomo.2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. *Mol. Biol. Rep*. 36: 1633–1636.

Kress, W.J., D.L. Erickson, F.A. Jones, N.G. Swenson, R. Perez, O. Sanjur and E. Bermingham. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *PNAS*. 106 (44): 18621-18626.

Levin, R.A., W.L. Wagner, P.C. Hoch, M. Nepokroeff, J.C. Pires, E.A. Zimmer and K.J. Sytsma. 2003. Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast rbcL and ndhF data. *Am. J. Bot*. 90(1): 107-115.

Lokko, Y., E.Y. Danquah, S.K. Offei, A.G.O. Dixon and M.A. Gedil. 2005. Molecular markers associated with a new source of resistance to the cassava mosaic disease. *Afr. J. Biotechnol*. 4 (9): 873-881.

Malathi, V.G., M. Thankappan, N.G. Nair, B. Nambison and S.P. Ghosh. 1987. Cassava mosaic disease in India. In: The International Seminar on African Cassava MosaicDisease and its Control. Yamoussoukro, Cote d' Ivoire, CTA/FAO/ORSTOM/IITA/IAPC, pp. 189–198.

Maniatis,T., J. Sambrook and E.F. Fritsch. 1982. Molecular cloning, pp. 76-85. *In:A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Okogbenin, E., M.C.M. Porto, C. Egesi, C. Mba, E. Ospinosa, L.G. Santos, C. Ospina, J. Marin, E. Barera, J. Gutierrez, I. Ekanayake, C. Iglesias and M. Fregene. 2007. Marker aided introgression of CMD resistance in Latin American germplasm for genetic improvement of cassava in Africa. *Crop. Sci*. 47: 1895-1904.

Ribaut, J.M. and D.A. Hoisington. 1998. Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends. Plant. Sci.*3(6): 236–239.

Ribeiro, P.F., R. Akromah and J. Manu-Aduening. 2012. Using marker assisted selection to hasten screening of cassava cultivars developed through introgression of Cassava Mosaic Disease (CMD) resistance into cassava landraces in Ghana. *J. Agr. Sci. Tech. B* 2: 74-80.

Romeis, T. 2001. Protein kinases in the plant defence response. *Curr. Opin. Plant. Biol*. 4: 407–414.

Rosyara,U.R. 2006. Mini-Review: Requirement of robust molecular marker technology for plant breeding applications. Journal of Plant Breed. Gr. 1: 67-72.

Thresh, J.M., G.W. Otim-Nape, M. Thankappan and V. Muniyappa. 1998. The mosaicdiseases of cassava inAfrica and India caused by whitefly-borne geminiviruses. Rev. Plant.Pathol. 77: 935–946.

Van Ooijen, G., G. Mayr, M.M.A. Kasiem, M. Albrecht, B.J.C. Cornelissen and F.L.W. Takken. 2008. Structure–function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. *J. Exp. Bot*. 59(6): 1383–1397.

White, T.J., T.D. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White eds. PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, California.

Wolfe, M. D., I. Y. Rabbi, C. Egesi, M. Hamblin, R. Kawuki, P. Kulakow, R. Lozano, D. P. D. Carpio, P. Ramu, and J. Jannink. 2016. Genome-wide association and prediction reveals genetic architecture of cassava mosaic disease resistance and prospects for rapid genetic improvement. *Plant Genome* 9. doi:10.3835/plantgenome2015.11.0118

Yao, H., J. Song, C. Liu, K. Luo, J. Han, Y. Li, X. Pang, H. Xu, Y. Zhu, P. Xiao and S. Chen. 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS One*. 5(10): e13102.

Zhou, X., Y. Liu, L. Calvert, C. Munoz, G.W. Otim-Nape, D.J. Robinson and B.D. Harrison. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severecassava mosaic disease in Uganda has arisen by inter-specific recombination. J. Gen.Virol. 78: 2101-2111.

<u>การทดลองที่ 4</u>

หทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2544. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP. 45 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, ภานุวัฒน์ มูลจันทะ, อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช และ โอภาษ บุญเส็ง. 2558. การคัดเลือกและประเมินเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม. รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, จ.ปทุมธานี. 69 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร

วิภา หงส์ตระกูล. 2544. ผลงานวิจัยการประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP. 45 หน้า.

สญชัย ขวัญเกื้อ และบัญชา ชิณศรี. 2557. การใช้วิธีทางชีวโมเลกุลในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่ทำลายมันสำปะหลังในอำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา หน้า 278-283 ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 สาขาพืช

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายโมเลกุลจากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ. 269 หน้า

อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิชและบัญชา ชิณศรี. 2555. การสำรวจและประเมินความเสียหายจากโรครากปมของมันสำปะหลัง หน้า 391-395 ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50 สาขาพืช.

Bakooie, M., E. Pourjam, S.B. Mahmoudi, N. Safaie and M. Naderpour. 2015. Development of and SNP Marker for Sugar Beet Resistance/Suscptible Genotyping to Root-Knot Nematode. J. Agr. Sci. Tech. Vol 17:443-454.

Coyne, D.L. 1994. Nematode Pests of Cassava. African Crop Science Journal 2(4): 355 - 359.

Draaistra, J. 2006. Genetic analysis of root-knot nematode resistance in potato. Thesis Wageningen Universissty, The Netherland.

Jablonska, B., J.S.S. Ammiraju, K.K. Bhattarai, S. Mantelin, O. M. Ilarduya, P.A.Robert and I. Kaloshian. 2007. The Mi-9 Gene from Solanum Arcanum Conferring Heat-Stable Resistance to Root-Knot Nematodes Is a Homolog of Mi-1. Plant Physiology, vol 143 p 1011-1054.

<u>การทดลองที่ 5</u>

จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข, ประพิศ วองเทียม, อุมาพร รักษาพราหมณ์, จิตติลักษณ์ พลพวก,จารุวรรณ บางแวก และ จินดา จิตจักร. 2558. การจำแนกและประเมินลักษณะทางคุณภาพของหัวคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งและคุณภาพของท่อนพันธุ์ในเชื้อพันธุ์มันสำปะหลัง. รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด กรมวิชาการเกษตร. 185 หน้า.

Albert, L.C., K. Sriroth, and T.C. Huang. 2005. Proximate composition, mineral content, hydrogen cyanide and phytic acid of 5 cassava genotypes. Food Chem. 92: 615-620

Bradbury, P. J., Zhang, D. E. Kroon, T. M. Casstevens, Y. Ramdoss and E. S. Buckler. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics. 23: 2633-2635.

FAO/WHO. 1991. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission XII, Supplement 4, FAO, Rome, Italy.

Haque, M. R. and J. H. Bradbury. 1999. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. Food Chemistry. 77: 107–114.

Juliano, B. O. 1971. A simplified assay for milled-rice amylose. Cereal Sci. Today. 16: 334-340.

กรมวิชาการเกษตร

Kang, H. M., N. A. zaitlen, C. M. Wade, A. Kirby, D. Heckerman, M.J. Daly and E. Eskin. 2008. Efficient control of population structure in model organism association mapping. Genetics. 178: 1709-1723.

Yeoh H.H. and F. Sun. 2001. Assessing cyanogen content in cassava-based food using the enzyme-dipstick method. Food and Chemical Toxicology39: 649–653.

การทดลองที่ 6

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.

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

กรมวิชาการเกษตร

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.

<u>การทดลองที่ 7</u>

จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข ประพิศ วองเทียม อุมาพร รักษาพราหมณ์ จิตติลักษณ์ พลพวก จารุวรรณ บางแวก และจินดา จิตจักร. 2559. การจำแนกและประเมินลักษณะทางคุณภาพของหัวคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งและคุณภาพของท่อนพันธุ์ในเชื้อพันธุ์มันสำปะหลัง. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553-2558. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร

โสณิชา อุทุมพร และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. 2559. การพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอกปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 24(2):.299-308

Adjebeng-Danquah, J., Manu-Aduening, J., Asante, I. K., Agyare, R. Y., Gracen, V., & Offei, S. K. (2020). Genetic diversity and population structure analysis of Ghanaian and exotic cassava accessions using simple sequence repeat (SSR) markers. *Heliyon, 6*(1), e03154. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e03154

Baguma, Y. (2004). *Regulation of Starch Synthesis in Cassava.* (Doctoral Thesis), Swedish University, Uppsala, Sweden.

Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y., & Buckler, E. S. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics, 23(19), 2633-2635. doi: 10.1093/bioinformatics/btm308

Chanroj, V. (2016). *Association mapping of latex yield in rubber tree (Hevea brasiliensis)* (degree of doctor), Thammasat University, Faculty of Science and technology.

FAO. (2013). Food Outlook BIANNUAL REPORT ON GLOBAL FOOD MARKETS: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

กรมวิชาการเกษตร

Gawel, N. J., and Jarret, R. L. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Mol. Biol. Rep.,* 9(3), 262-266.

Liu, K., and Muse, S. V. (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics,* 21(9), 2128-2129. doi: 10.1093/bioinformatics/bti282

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. Genetics Society of America, 155, 945–959.

Tappiban, Piengtawan & Smith, Duncan & Triwitayakorn, K. & Bao, Jinsong. 2019. Recent understanding of starch biosynthesis in cassava for quality improvement: A review. Trends in Food Science & Technology. 83. 10.1016/j.tifs.2018.11.019.

Wolfe, Marnin & Del Carpio, Dunia & Alabi, Olumide & Ezenwaka, Lydia & Ikeogu, Ugochukwu & Kayondo, Siraj Ismail & Lozano, Roberto & Okeke, Uche & Alfred, Ozimati & Esuma, Williams & Egesi, Chiedozie & Kawuki, R. & Kulakow, Peter & Rabbi, Ismail & Jannink, Jean-Luc. (2017). Prospects for Genomic Selection in Cassava Breeding. The Plant Genome. 10. 10.3835/plantgenome2017.03.0015.

Zhang, S., Chen, X., Lu, C., Ye, J., Zou, M., Lu, K., Feng, S., Pei, J., Liu, C., Zhou, X., Ma, P., Li, Z., Liu, C., Liao, Q., Xia, Z., and Wang, W. (2018). Genome-Wide Association Studies of 11 Agronomic Traits in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Front Plant Sci,* 9, 503. doi: 10.3389/fpls.2018.00503

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 6

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	31	42-77-69	61	CM 3306-4	91	CMK(R x CMC 76)
2	CMH 22-77-1	32	56/5	62	CM 3306-9	92	CMR 23-07-10
3	(CMC76xR) 21-18Q	33	ADIRA 4 (6)	63	CM 3311-3	93	CMR 23-08-8
4	(JK x R) 13	34	BATRANG	64	CM 3372-4	94	CMR 23-102-65
5	(JK x R) 21	35	CG 1141-1	65	CM 342-55	95	CMR 23-107-4
6	(R x CMC 84) 21-1Q	36	CG 1355-2	66	CM 4049 UJ	96	CMR 23-113-14
7	(R x CMC 84) 21-5Q	37	CG 1-37	67	CM 407-30	97	CMR 23-117-4
8	(R x Hanatee) 21-21Q	38	CG 1-37	68	CM 451-1	98	CMR 23-126-120
9	(R x V69) 21-2Q	39	CG 1372-5	69	CM 451-1 (2)	99	CMR 23-126-122
10	(RxV4C)21-4Q (5)	40	CG 1-56	70	CM 4574-7	100	CMR 23-126-161
11	(V1 x R) 20-15	41	CG 165-7	71	CM 4729-4	101	CMR 23-126-17
12	(V1 x R) 20-20	42	CG 402-11	72	CM 4777-2 (1)	102	CMR 23-149-117
13	(V1 x R) 21-11	43	CG 5-79	73	CM 4777-2 (ciat)	103	CMR 23-149-118
14	(V1 x R) 21-8	44	CG 7-64	74	CM 4955-27	104	CMR 23-149-128
15	(V1xR)20-27 (6)	45	CG 915-1	75	CM 507-37	105	CMR 23-149-139
16	(V3 x R) 20-10	46	CG 996-6	76	CM 523-7	106	CMR 23-149-59
17	(V3 x R) 20-15	47	CM 125-22	77	CM 5257-33	107	CMR 23-149-67
18	(V3 x R) 20-19	48	CM 1999-5	78	CM 5286-3	108	CMR 23-17-276
19	(V3 x R) 21-16	49	CM 2502-4 (ไทย)	79	CM 6125-117	109	CMR 23-17-51
20	(V31 x CMC 76) 21-2	50	CM 2766-3	80	CM 6125-125	110	CMR 23-20-23Q
21	(V3xR)20-19	51	CM 2772-3	81	CM 681-2	111	CMR 23-26-2
22	(V7 x R) 21-4Q	52	CM 305-15	82	CM 781-2	112	CMR 23-281-141
23	01-77-1	53	CM 323-375	83	CM 849-1	113	CMR 23-51-10
24	27-77-10	54	CM 323-87	84	CM 922-2	114	CMR 23-51-37
25	29-77-19	55	CM 3292-18	85	CMC 72	115	CMR 23-84-8
26	29-77-5	56	CM 3299-14	86	CMC 84	116	CMR 24-14-1308
27	35-77-17	57	CM 3299-15	87	CMH 22-04-4	117	CMR 24-14-183
28	35-77-18	58	CM 3299-22	88	CMK 23-27-30	118	CMR 24-14-266
29	35-77-22	59	CM 3299-4	89	CMK 23-67-313	119	CMR 24-14-317
30	36-77-1	60	CM 3306-3	90	CMK 23-70-3	120	CMR 24-14-367

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
121	CMR 24-43-36	156	CMR 31-06-104	191	CMR 37-18-201	226	Java 2
122	CMR 24-89-65	157	CMR 31-09-71	192	CMR 37-18-30	227	Java 5
123	CMR 25-104-42	158	CMR 31-19-14	193	CMR 37-18-63	228	K.K. 1
124	CMR 25-105-128Q	159	CMR 31-37-105	194	CMR 38-106-32	229	Kaset
125	CMR 25-105-47	160	CMR 31-42-20	195	CMR 38-125-77	230	KM 140
126	CMR 25-106-26	161	CMR 32-24-20	196	CMR 38-66-1	231	KM 94
127	CMR 25-24-384	162	CMR 32-94-121	197	CR 1	232	KM 98-1
128	CMR 25-30-194Q	163	CMR 33-18-101	198	CR 100	233	Kraburi
129	CMR 25-32-365Q (4)	164	CMR 33-35-13	199	CR 101	234	KU 50
130	CMR 25-32-429Q	165	CMR 33-35-69	200	CR 12	235	MARG 11
131	CMR 25-32-502Q	166	CMR 33-38-48	201	CR 126	236	MARG 12 (1)
132	CMR 25-33-105	167	CMR 33-53-181	202	CR 17-193	237	MARG 15
133	CMR 25-33-134Q	168	CMR 34-35-36	203	CR 17-82	238	MARG 2
134	CMR 25-34-112	169	CMR 34-35-54	204	CR 18	239	MARG 6
135	CMR 25-34-159	170	CMR 34-40-43	205	CR 24	240	MARG 7
136	CMR 25-38-157Q	171	CMR 34-44-40	206	CR 25	241	MARG 9
137	CMR 25-55-28	172	CMR 34-79-152	207	CR 30	242	MBOL 1
138	CMR 25-82-88	173	CMR 34-79-48	208	CR 35	243	MBRA 110
139	CMR 26-08-61	174	CMR 34-82-41	209	CR 59	244	MBRA 12
140	CMR 26-38-7	175	CMR 35-105-2	210	CR 61	245	MBRA 12
141	CMR 26-65-13	176	CMR 35-112-1	211	CR 63	246	MBRA 125
142	CMR 26-65-192	177	CMR 35-123-147	212	CR 65	247	MBRA 130
143	CMR 26-69-79	178	CMR 35-21-199	213	CR 79	248	MBRA 132
144	CMR 26-72-2	179	CMR 35-21-36	214	Gloden Yellow	249	MBRA 158
145	CMR 28-05-13	180	CMR 35-21-96	215	GR 891	250	MBRA 162
146	CMR 28-67-76	181	CMR 35-22-348	216	H.P. 1	251	MBRA 165
147	CMR 28-72-131	182	CMR 35-23-76	217	H.P. 2	252	MBRA 172
148	CMR 29-56-101	183	CMR 35-26-303	218	H.P. 5 (CM 305-13)	253	MBRA 18
149	CMR 29-60-15	184	CMR 35-26-369	219	H.P. 7 (CMC 76)	254	MBRA 190
150	CMR 29-67-21	185	CMR 35-91-63	220	H.P. 8 (VIC)	255	MBRA 191
151	CMR 30-05-12	186	CMR 36-25-67	221	Hanatee	256	MBRA 217
152	CMR 30-115-5	187	CMR 36-30-329	222	HB 60	257	MBRA 233
153	CMR 30-238-34	188	CMR 36-31-381	223	HB 80	258	MBRA 237
154	CMR 31-01-143	189	CMR 36-55-166	224	HL 23	259	MBRA 242
155	CMR 31-06-103	190	CMR 36-71-27	225	Indonesia	260	MBRA 243

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 1(ต่อ) ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 758 ตัวอย่าง

No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	รหัส ศวร.* ระยอง
261	MBRA 258	296	MBRA 697	331	MCOL 1084 B	366	MCOL 1754
262	MBRA 273	297	MBRA 698	332	MCOL 1098	367	MCOL 1780
263	MBRA 311	298	MBRA 702	333	MCOL 1107	368	MCOL 1786
264	MBRA 315	299	MBRA 712	334	MCOL 1108	369	MCOL 1795
265	MBRA 325	300	MBRA 73	335	MCOL 112 (4)	370	MCOL 1805
266	MBRA 329	301	MBRA 730	336	MCOL 1132	371	MCOL 1853
267	MBRA 335	302	MBRA 759	337	MCOL 1137	372	MCOL 1890
268	MBRA 356	303	MBRA 77	338	MCOL 1178	373	MCOL 1964
269	MBRA 359	304	MBRA 781	339	MCOL 1185	374	MCOL 1968
270	MBRA 383	305	MBRA 792	340	MCOL 1186 A	375	MCOL 198
271	MBRA 400	306	MBRA 829	341	MCOL 1344	376	MCOL 2019
272	MBRA 403	307	MBRA 839	342	MCOL 1357	377	MCOL 2025
273	MBRA 404	308	MBRA 85	343	MCOL 1389	378	MCOL 2056
274	MBRA 405	309	MBRA 852	344	MCOL 1398	379	MCOL 2089
275	MBRA 416	310	MBRA 854	345	MCOL 1413	380	MCOL 2128
276	MBRA 435 (2)	311	MBRA 885	346	MCOL 1442	381	MCOL 2131
277	MBRA 461	312	MBRA 887	347	MCOL 1459	382	MCOL 2144
278	MBRA 467	313	MBRA 890	348	MCOL 1466	383	MCOL 2157
279	MBRA 474	314	MBRA 891 (3)	349	MCOL 1467	384	MCOL 2173
280	MBRA 475	315	MBRA 894	350	MCOL 148	385	MCOL 2177
281	MBRA 507	316	MBRA 897	351	MCOL 1486	386	MCOL 2182
282	MBRA 509	317	MBRA 897	352	MCOL 1489	387	MCOL 2192
283	MBRA 512	318	MBRA 900	353	MCOL 1493	388	MCOL 22
284	MBRA 514	319	MBRA 903	354	MCOL 1505	389	MCOL 2212
285	MBRA 522	320	MBRA 915	355	MCOL 1516	390	MCOL 2215
286	MBRA 530	321	MBRA 916	356	MCOL 1517	391	MCOL 2245
287	MBRA 534	322	MBRA 924	357	MCOL 1535	392	MCOL 226 A
288	MBRA 542	323	MBRA 927	358	MCOL 1566	393	MCOL 226 B
289	MBRA 590	324	MBRA 931	359	MCOL 1667	394	MCOL 2306
290	MBRA 658	325	MCHN 1	360	MCOL 1684	395	MCOL 2315
291	MBRA 658	326	MCHN 2	361	MCOL 1702	396	MCOL 2331
292	MBRA 671	327	MCOL 1055	362	MCOL 1722	397	MCOL 2360
293	MBRA 675	328	MCOL 1061	363	MCOL 1734	398	MCOL 2387
294	MBRA 691	329	MCOL 1062 A	364	MCOL 1736	399	MCOL 2409
295	MBRA 692	330	MCOL 1074 A	365	MCOL 1752	400	MCOL 2426

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

ลิขสิทธิ์ของ

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	436	MCOL 809 B	471	MECU 10	506	MHMC 1
402	MCOL 2485	437	MCOL 856	472	MECU 104	507	MIND 26
403	MCOL 2493	438	MCOL 87 (6)	473	MECU 117	508	MIND 27
404	MCOL 2510	439	MCOL 878	474	MECU 135	509	MIND 3
405	MCOL 2526	440	MCOL 890	475	MECU 141	510	MIND 33
406	MCOL 2550	441	MCOL 912 B	476	MECU 141 A	511	MIND 4
407	MCOL 2627	442	MCOL 922	477	MECU 150	512	MIND 8
408	MCOL 2638	443	MCOL 941	478	MECU 151	513	MKU 2-151
409	MCOL 278	444	MCOL 955	479	MECU 159	514	MKU 2-162
410	MCOL 304	445	MCOL 965	480	MECU 165	515	MKUC 28-71-66
411	MCOL 306	446	MCOL 976	481	MECU 183	516	MKUC 28-71-67
412	MCOL 310	447	MCOL 978	482	MECU 187	517	MMAL 1
413	MCOL 32	448	MCOL 979	483	MECU 23	518	MMAL 13
414	MCOL 346	449	MCOL 985	484	MECU 29	519	MMAL 2
415	MCOL 40	450	MCUB 16	485	MECU 31	520	MMAL 24
416	MCOL 40 C	451	MCUB 16 (5)	486	MECU 33	521	MMAL 26
417	MCOL 451	452	MCUB 23	487	MECU 41	522	MMAL 27
418	MCOL 474	453	MCUB 29	488	MECU 50 (7)	523	MMAL 29
419	MCOL 490	454	MCUB 32	489	MECU 71	524	MMAL 35
420	MCOL 497	455	MCUB 36	490	MECU 71	525	MMAL 38
421	MCOL 511	456	MCUB 39	491	MECU 72	526	MMAL 42
422	MCOL 527	457	MCUB 40	492	MENTE GA	527	MMAL 59
423	MCOL 534 A	458	MCUB 42	493	MFJI 4	528	MMAL 60 ปกติ
424	MCOL 585	459	MCUB 46	494	MFJI 6	529	MMAL 60 ย.
425	MCOL 590	460	MCUB 5	495	MGUA 12	530	MMAL 63
426	MCOL 608	461	MCUB 51	496	MGUA 15	531	MMAL 66
427	MCOL 651 B	462	MCUB 53	497	MGUA 22	532	MMEX 102
428	MCOL 690-75-33	463	MCUB 56	498	MGUA 35	533	MMEX 17
429	MCOL 707	464	MCUB 58	499	MGUA 41	534	MMEX 2
430	MCOL 712	465	MCUB 74	500	MGUA 44	535	MMEX 27
431	MCOL 72	466	MCUB 8	501	MGUA 6	536	MMEX 36
432	MCOL 725 (3)	467	MCUB 8	502	MGUA 62	537	MMEX 43 (1)
433	MCOL 774(2)	468	MDOM 2	503	MGUA 63	538	MMEX 45
434	MCOL 802 (2)	469	MDOM 4	504	MGUA 74	539	MMEX 49
435	MCOL 803	470	MDOM 5	505	MGUA 78	540	MMEX 54

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
541	MMEX 6	576	MPAR 183	611	MPER 241	646	MPER 534
542	MMEX 65	577	MPAR 193	612	MPER 243	647	MPER 542
543	MMEX 71 ล.	578	MPAR 2	613	MPER 255	648	MPER 546
544	MMEX 8	579	MPAR 23	614	MPER 259	649	MPER 552
545	MMEX 80	580	MPAR 25	615	MPER 278	650	MPER 556
546	MMEX 86	581	MPAR 32	616	MPER 279	651	MPER 569
547	MMEX 92	582	MPAR 36	617	MPER 281	652	MPER 589 (5)
548	MMEX 95	583	MPAR 38	618	MPER 283	653	MPER 593
549	MMEX 96	584	MPAR 4	619	MPER 293	654	MPER 597
550	MNGA 1	585	MPAR 41	620	MPER 295	655	MPER 613
551	MNGA 16	586	MPAR 51	621	MPER 297	656	MPHI 3
552	MNGA 2	587	MPAR 57	622	MPER 315	657	MPHI 4
553	MPAN 127	588	MPAR 57	623	MPER 325	658	MPTR 19
554	MPAN 131	589	MPAR 68	624	MPER 328	659	MPTR 26
555	MPAN 137	590	MPAR 69	625	MPER 333	660	MPTR 49
556	MPAN 51	591	MPAR 7	626	MPER 347	661	MPTR 8
557	MPAN 70	592	MPAR 71	627	MPER 349	662	MTAI 1
558	MPAN 97	593	MPAR 75	628	MPER 353	663	MTAI 2
559	MPAR 1	594	MPAR 98	629	MPER 368	664	MTAI 3
560	MPAR 101	595	MPER 178	630	MPER 370 (5)	665	MTAI 8
561	MPAR 104	596	MPER 179	631	MPER 377	666	MUSA 4
562	MPAR 105	597	MPER 183	632	MPER 378	667	MUSA 5
563	MPAR 109	598	MPER 184	633	MPER 383	668	MUSA 7
564	MPAR 109 (3)	599	MPER 192	634	MPER 390	669	MUSA 8
565	MPAR 110	600	MPER 196	635	MPER 436	670	MVEN 117 B
566	MPAR 119	601	MPER 205	636	MPER 436	671	MVEN 130
567	MPAR 135	602	MPER 206	637	MPER 438	672	MVEN 134
568	MPAR 15	603	MPER 209	638	MPER 449	673	MVEN 151
569	MPAR 150	604	MPER 212	639	MPER 458	674	MVEN 156
570	MPAR 152	605	MPER 213	640	MPER 465	675	MVEN 164
571	MPAR 156	606	MPER 221	641	MPER 484	676	MVEN 167
572	MPAR 161	607	MPER 226	642	MPER 488	677	MVEN 173
573	MPAR 162	608	MPER 229	643	MPER 489	678	MVEN 174
574	MPAR 163	609	MPER 232	644	MPER 496	679	MVEN 180
575	MPAR 18	610	MPER 234	645	MPER 503	680	MVEN 183

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
681	MVEN 183	701	MVEN 298	721	NANZHI 199	741	R 11
682	MVEN 185	702	MVEN 309	722	NEP	742	R 2
683	MVEN 192	703	MVEN 321	723	No.3 x CM 407-24-4	743	R 3
684	MVEN 200	704	MVEN 322	724	O.P. 1106	744	R 5
685	MVEN 204	705	MVEN 329 A	725	O.P. 608	745	R 60
686	MVEN 208	706	MVEN 330	726	O.P. 705	746	R 7
687	MVEN 210	707	MVEN 332	727	OMR 23-05-3	747	R 72
688	MVEN 210	708	MVEN 332	728	OMR 24-07-12	748	R 86-13
689	MVEN 217	709	MVEN 36	729	OMR 24-87-34	749	R 9
690	MVEN 219	710	MVEN 40 B	730	OMR 26-07-15	750	R 90
691	MVEN 219	711	MVEN 45 A	731	OMR 26-14-9	751	V. 11
692	MVEN 23	712	MVEN 47	732	OMR 28-97-31	752	V. 14
693	MVEN 232	713	MVEN 50	733	OMR 29-19-129	753	V. 22
694	MVEN 24	714	MVEN 67 B	734	OMR 29-20-118	754	V. 24
695	MVEN 244	715	MVEN 68	735	OMR 29-27-5	755	V. 25
696	MVEN 25	716	MVEN 69	736	OMR 32-12-19 (1)	756	V. 2596
697	MVEN 276	717	MVEN 76	737	OMR 34-25-26	757	V. 2C
698	MVEN 284 B	718	MVEN 77	738	OMR 34-29-66	758	V. 30
699	MVEN 292	719	MVEN 82	739	OMR 38-75-52		
700	MVEN 297 A	720	MVEV 128	740	R 1		

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 2 ผลการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง
1	Recessive	MECU72	31	Co-dominant	CM342-55
2	Recessive	CR79	32	Co-dominant	CMR 31-19-14
3	Recessive	MECU31	33	Co-dominant	(V3xR)21-16
4	Recessive	MVAN276	34	Co-dominant	CM4777-2 (CIAT)
5	Recessive	MPAR 41	35	Co-dominant	CM323-375
6	Recessive	V. 22	36	Co-dominant	CMR 33-53-181
7	Recessive	(JK x R) 13	37	Co-dominant	27-77-10
8	Recessive	MCOL 198	38	Co-dominant	MBRA658
9	Recessive	CM 5286-3	39	Co-dominant	MCOL1466
10	Recessive	CR 30	40	Co-dominant	MPER212
11	Recessive	MCOL 912 B	41	Co-dominant	MPER349
12	Recessive	MCOL 1178	42	Co-dominant	MMEX54
13	Recessive	MECU 10	43	Co-dominant	MCOL802*
14	Recessive	MCUB 42	44	Co-dominant	MECU183
15	Recessive	MECU 29*	45	Co-dominant	MCU141A
16	Recessive	MPER 279	46	Co-dominant	MBRA217
17	Recessive	MPAR 135	47	Co-dominant	MCUB16
18	Co-dominant	R60	48	Co-dominant	MCUB53
19	Co-dominant	BATRANG	49	Co-dominant	MMAL42
20	Co-dominant	CMR 25-32-429Q	50	Co-dominant	MBRA461
21	Co-dominant	CMR 28-72-131	51	Co-dominant	(V3xR) 20-19
22	Co-dominant	CMR 26-69-79	52	Co-dominant	ADJRA4(6)
23	Co-dominant	CMR 23-17-276	53	Co-dominant	35-77-18
24	Co-dominant	CM 3299-22	54	Co-dominant	MCOL1098
25	Co-dominant	CMR 31-19-14	55	Co-dominant	MVEN297A
26	Co-dominant	CM4049UJ	56	Co-dominant	MCOL965
27	Co-dominant	29-77-5	57	Co-dominant	MECU23
28	Co-dominant	CMR 26-69-79	58	Co-dominant	MCOL2177
29	Co-dominant	CMK 23-67-313	59	Co-dominant	MFJI4
30	Co-dominant	CM3299-22	60	Co-dominant	MCOL979

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 2(ต่อ) ผลการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง
61	Co-dominant	MPER353	91	Co-dominant	MPER 259
62	Co-dominant	MCOL1968	92	Co-dominant	MPAR 18
63	Co-dominant	MCOL1667	93	Co-dominant	MCOL 978
64	Co-dominant	MMAL38	94	Co-dominant	MECU 29
65	Co-dominant	MOCL976	95	Co-dominant	MCOL 2019
66	Co-dominant	MUSA8	96	Co-dominant	MVEN 77
67	Co-dominant	MMAL24	97	Co-dominant	MPAN 131
68	Co-dominant	MMEX49	98	Co-dominant	MTAI 8
69	Co-dominant	MECU165	99	Co-dominant	CR 100
70	Co-dominant	MCOL490	100	Co-dominant	MCOL 1734
71	Co-dominant	MPER542	101	Co-dominant	V.30
72	Co-dominant	MVEN210	102	Co-dominant	R2
73	Co-dominant	CR19*	103	Co-dominant	CMR 30-05-12
74	Co-dominant	MCOL1566	104	Co-dominant	CMR 35-26-369
75	Co-dominant	MCOL1178	105	Co-dominant	CM3306-3
76	Co-dominant	CMR 25-34-112	106	Co-dominant	CMR 26-65-192
77	Co-dominant	CMR 23-20-23Q	107	Co-dominant	29-77-19
78	Co-dominant	CMR 23-107-4	108	Co-dominant	CM 3299-4
79	Co-dominant	CMR 25-33-134Q	109	Co-dominant	MCOL 2331
80	Co-dominant	(V3xR)21-16	110	Co-dominant	MCOL 1964
81	Co-dominant	MVEN117B	111	Co-dominant	MPAR 68
82	Co-dominant	MCOL1467	112	Co-dominant	MCOL 2056
83	Co-dominant	CMR 29-67-21	113	Co-dominant	MCOL 2331
84	Co-dominant	CM4777-2 (CIAT)	114	Co-dominant	CM 1999-5
85	Co-dominant	SC8	115	Co-dominant	MMEX 96
86	Co-dominant	MECU33	116	Co-dominant	MBRA 881*
87	Co-dominant	MPAR156	117	Co-dominant	MMAL 60 ย.
88	Co-dominant	CR59	118	Co-dominant	MCOL 198
89	Co-dominant	CMR 25-104-42	119	Co-dominant	CMR 34-82-41
90	Co-dominant	SR 18-127	120	Co-dominant	MPAR 18

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 2(ต่อ) ผลการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง
121	Co-dominant	MKU 2-151	151	Co-dominant	MECU 159
122	Co-dominant	Indonesia	152	Co-dominant	SG 107-35
123	Co-dominant	CMR 38-66-1	153	Co-dominant	MPER 281
124	Co-dominant	MKU 2-162	154	Co-dominant	MBRA 383
125	Co-dominant	Kraburi	155	Co-dominant	MPAN 127
126	Co-dominant	CR 35	156	Co-dominant	MCOL 2331
127	Co-dominant	MBRA 467 (5)	157	Co-dominant	MARG 2
128	Co-dominant	MPER 370 (5)	158	Co-dominant	MPER 465
129	Co-dominant	V. 2C	159	Co-dominant	MUSA 4
130	Co-dominant	OMR 26-07-15	160	Co-dominant	MMAL 27
131	Co-dominant	CMR 38-125-77	161	Co-dominant	MCOL 72
132	Co-dominant	Java 5	162	Co-dominant	MCOL 226 B
133	Co-dominant	MCOL 32	163	Co-dominant	MBRA 243
134	Co-dominant	MCOL 22	164	Co-dominant	MMEX 96
135	Co-dominant	MCUB 8	165	Co-dominant	MPAN 137
136	Co-dominant	MARG 9	166	Co-dominant	MCOL 474
137	Co-dominant	MPAR 51	167	Co-dominant	MVEN 151
138	Co-dominant	MPAR 38	168	Co-dominant	MBRA 692
139	Co-dominant	MPER 489	169	Co-dominant	MPER 293
140	Co-dominant	MBRA 77	170	Co-dominant	CG 996-6
141	Co-dominant	MMEX 65	171	Co-dominant	MPER 293
142	Co-dominant	MPER 243	172	Co-dominant	MCOL 802*
143	Co-dominant	MBRA 162	173	Co-dominant	MGUA 78
144	Co-dominant	MCOL 1780	174	Co-dominant	MPAR 163
145	Co-dominant	MCOL 1055	175	Co-dominant	MBRA 887
146	Co-dominant	MPAN 51	176	Co-dominant	MPAR 69
147	Co-dominant	MARG 11	177	Co-dominant	MBRA 273
148	Co-dominant	MGUA 44	178	Co-dominant	MCOL 2212
149	Co-dominant	MUSA 7	179	Co-dominant	MBRA 311
150	Co-dominant	MBRA 897	180	Co-dominant	MCOL 941

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 2(ต่อ) ผลการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง	No.	ลักษณะพันธุกรรม	รหัส ศวร.* ระยอง
181	Co-dominant	MIND 3	201	Co-dominant	SM 1541-32
182	Co-dominant	MCOL 2306	202	Co-dominant	OMR 26-14-9
183	Co-dominant	MVEN 23	203	Co-dominant	MCOL 585
184	Co-dominant	MPER 281	204	Co-dominant	(V1 x R) 20-20
185	Co-dominant	MBRA 461	205	Co-dominant	Java 2
186	Co-dominant	MCOL 1413	206	Co-dominant	MPAR 150
187	Co-dominant	MBRA 590	207	Co-dominant	MBRA 882*
188	Co-dominant	MBRA 165	208	Co-dominant	MBRA 258
189	Co-dominant	CM 3372-4	209	Co-dominant	MBRA 507
190	Co-dominant	MCOL 922	210	Co-dominant	MMEX 8
191	Co-dominant	MBRA 467	211	Co-dominant	MCOL 2019
192	Co-dominant	MBRA 769	212	Co-dominant	MBRA 404
193	Co-dominant	MPER 283	213	Co-dominant	MMAL 29
194	Co-dominant	MMEX 49	214	Co-dominant	MBRA 915
195	Co-dominant	CR 101	215	Co-dominant	MCOL 2144
196	Co-dominant	MGUA 12	216	Co-dominant	MPAR 1
197	Co-dominant	CG 165-7	217	Co-dominant	CR 24
198	Co-dominant	MPAR 71	218	Co-dominant	MCOL 451
199	Co-dominant	MPER 325	219	Co-dominant	(V31 x CMC 76) 21-2
200	Co-dominant	MPER 179			

หมายเหตุ: ศวร. คือ ศูนย์วิจัยพืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร