



กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

Biotechnology for Identification and Crop Improvement in

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.)

หัวหน้าโครงการวิจัย

สุภาวดี ง้อเหรียญ

MRS. SUPHAWADEE NGORIAN

ปี 2564

## บทสรุปผู้บริหาร

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร อาหารสัตว์ การแพทย์ และพลังงานทดแทน ปัจจุบันมันสำปะหลังกำลังประสบปัญหาจากโรคและแมลงศัตรูพืชส่งผลกระทบต่อผลผลิตมันสำปะหลังโดยตรง ได้แก่ โรคใบด่างมันสำปะหลัง (CMD) โรคแบคทีเรียไลโบลท์ และโรครากปม เป็นต้น โดยมันสำปะหลังที่เป็นโรคนี้ผลผลิตจะลดลงมากกว่า 50 – 80% ซึ่งหากพบการแพร่ระบาดในประเทศจะสร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรและส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย ทั้งนี้ กรมวิชาการเกษตร ยังไม่พบว่ามีพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะการต้านทานต่อโรคดังกล่าว นอกจากนี้ประเทศไทยจำเป็นต้องทำการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีเป็นที่ต้องการของเกษตรกรทั้งในเรื่องของปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ได้แก่ ผลผลิตสูง (5 – 6 ตันต่อไร่) แป้งสูง (>25%) ไชยาไนต์ต่ำ (พันธุ์รับประทาน) และแป้งเหนียว (waxy starch) เป็นต้น ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งหวังในการช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว โดยมีวัตถุประสงค์ของโครงการคือ เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังสำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เพื่อการบ่งชี้ลักษณะประจำพันธุ์ การสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม รวมถึงการนำข้อมูลทางพันธุกรรมมาประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี และเพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานต่อโรคแบคทีเรียไลโบลท์ โรคใบด่าง CMD โรครากปม ให้มีผลผลิตและปริมาณแป้งสูง ไชยาไนต์ต่ำ และลักษณะแป้งเหนียว โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งเป็นการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์ในโครงการวิจัยนี้ได้นำเทคนิคด้านเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์และการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมต่องานด้านการปรับปรุงพันธุ์ และการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบ คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะการต้านทานต่อโรค ได้แก่ โรคแบคทีเรียไลโบลท์ โรคใบด่าง CMD โรครากปม และลักษณะสำคัญทางการเกษตร ได้แก่ ผลผลิตและแป้งสูง ไชยาไนต์ต่ำ และแป้งเหนียว ซึ่งต้องดำเนินการพัฒนาและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต่างๆ ดังกล่าว นำมาใช้คัดเลือกมันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์ต่างๆ ที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้จะเป็นตัวช่วยสำคัญในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากในกระบวนการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการคัดเลือก สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะที่แสดงออกได้อย่างถูกต้องแม่นยำ รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยร่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังลงได้ 3 – 4 ปี ผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ จะช่วยเพิ่มทางเลือกในการใช้พันธุ์ ลดต้นทุนค่าใช้จ่าย เพิ่มคุณภาพของผลผลิต สร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพันธุ์มันสำปะหลังของไทย สร้างรายได้ให้กับเกษตรกร และช่วยยกระดับเศรษฐกิจของประเทศให้ดีขึ้นในอนาคต

## บทคัดย่อ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Cranz.) เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร อาหารสัตว์ การแพทย์ และพลังงานทดแทน จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง เพื่อให้ได้มันสำปะหลังพันธุ์ดีที่มีคุณภาพและให้ผลผลิตสูง ดังนั้นการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์และการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง และ 2) การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบโบลท์ โรคใบด่าง โรครากปม ให้มีลักษณะผลผลิตและปริมาณแป้งสูง ไชยาไนต์ต่ำ 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) ด้วยเครื่องวิเคราะห์หัตถ์อัตโนมัติ 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 และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะความต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบโบลท์ โรคใบด่าง โรครากปม ให้มีปริมาณผลผลิตและแป้งสูง ไชยาไนต์ต่ำ และแป้งเหนียว พบว่า 1) ลักษณะต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโบลท์ 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 ที่มีแนวโน้มให้ความต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบโบลท์ 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 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน 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 ARMS-PCR 4) ลักษณะแป้งสูง สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP จำนวน 3 ตำแหน่ง ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง (% amylose) สามารถนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้งสูงโดยใช้เทคนิค Pyrosequencing ในการตรวจวิเคราะห์ได้ 5) ลักษณะไชยาไนต์ต่ำ สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP แบบ Tetra-Primer ARMS-PCR จำนวน 3 ตำแหน่ง สามารถนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไชยาไนต์ต่ำกว่า 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 แบ่งเป็นแบบเอทเทอร์โซโกต จำนวน 26 ตำแหน่ง และแบบโฮโมโซโกต จำนวน 7 ตำแหน่ง สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังแป้งเหนียวได้ และ 7) ลักษณะผลผลิต (root yield) สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ILP จากยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตแป้งในมันสำปะหลัง จำนวน 13 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs จำนวน 2 เครื่องหมาย สามารถนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างลักษณะน้ำหนักผลผลิตในมันสำปะหลังได้ ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้นี้สามารถนำไปใช้ในการจำแนก ตรวจสอบ และคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

## 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) High 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 cyanide, 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.

## กิตติกรรมประกาศ

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

กรมวิชาการเกษตร

## สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	5
กิตติกรรมประกาศ	6
สารบัญ	7
สารบัญภาพ	8
สารบัญตาราง	12
บทที่ 1 บทนำ	16
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	20
บทที่ 3 ผลการศึกษา	39
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	205
เอกสารอ้างอิง	211
ภาคผนวก	218

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 ตัวอย่างไบโอมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษาวิจัย จำนวน 18 พันธุ์	41
1.2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมันสำปะหลัง จำนวน 18 พันธุ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์	41
1.3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 18 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด SSR	43
1.4 แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 18 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด SSR	44
1.5 แสดงดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี CTAB จากตัวอย่างมันสำปะหลัง จำนวน 90 พันธุ์	47
1.6 แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 90 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง	51
1.7 แสดงผลการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง	53
1.8 แสดงตัวอย่างการบันทึกข้อมูลขนาดดีเอ็นเอ (Product Size) ของมันสำปะหลังที่ได้จากการวิเคราะห์ผล ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ	54
1.9 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของมันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม UPGMA clustering ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง	59
2.1 ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส	62
2.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 28 พันธุ์	64
2.3 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลบ์ท์ กับพันธุ์มันสำปะหลังที่ผ่านการทดสอบความต้านทานโรคแบคทีเรียไลบ์ท์ จำนวน 11 พันธุ์	65
2.4 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มอนุรักษ์พันธุ์ไทย	72
2.5 ผลการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสกับพันธุ์มันสำปะหลังบริโภค	79
2.6 ผลการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสกับพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมปี 2562	79
3.1 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์คัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค CMD ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R	89
3.2 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์คัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค CMD ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-K	91
3.3 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์คัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค CMD ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1	92
3.4 จีโนไทป์ของพันธุ์ candidate ที่คัดเลือกได้ในปี 2561 เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R และ EST-K	94
3.5 จีโนไทป์ของพันธุ์ candidate ที่คัดเลือกได้ในปี 2562 เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R และ EST-K	94
3.6 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158 และ EST-R ในลูกผสม CMR 60-36-xxx โดยใช้เทคนิค Direct PCR	97
3.7 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1 NS158 และ EST-R ในลูกผสม CMR 61-42-xxx โดยใช้เทคนิค Direct PCR	98



## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.8 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP	103
3.9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของยีนเจ้าบ้าน rbcLa และยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ ITS2-S2F/ITS4 กับดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP	103
3.10 จีโนมไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R	104
3.11 จีโนมไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1	105
3.12 จีโนมไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-K และ NS158 แบบ Multiplex PCR	105
3.13 จีโนมไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSRY28 และ NS169 แบบ Multiplex PCR	106
3.14 จีโนมไทป์ของพันธุ์มันสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R	107
3.15 จีโนมไทป์ของพันธุ์มันสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1	107
3.16 จีโนมไทป์ของพันธุ์มันสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-K และ NS158 แบบ Multiplex PCR	108
3.17 จีโนมไทป์ของพันธุ์มันสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSRY28 และ NS169 แบบ Multiplex PCR	108
3.18 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 โดยใช้เทคนิคTetra primer ARMS- PCR ในมันสำปะหลังพันธุ์ TME3 ระยะเวลา 5 และระยะเวลา 3	109
4.1 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 146 กับมันสำปะหลัง 14 พันธุ์	118
4.2 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 195 กับมันสำปะหลัง 14 พันธุ์	118
4.3 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NEM06 กับมันสำปะหลัง 14 พันธุ์	119
4.4 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SSRY4 กับมันสำปะหลัง 14 พันธุ์	119
4.5 แสดงโพลีเมอร์พืชมใน 6% polyacrylamide gel electrophoresis ในมันสำปะหลัง 14 พันธุ์ด้วยไพรเมอร์ GUN11, BGL7 และ GUN8	121
4.6 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ ใน 2% agarose gel	123
4.7 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ ใน 2% agarose gel	123
4.8 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จากเครื่อง QIAxcel	124
4.9 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL4 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จากเครื่อง QIAxcel	124
4.10 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จากเครื่อง QIAxcel	124

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.11 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 4 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จากเครื่อง QIAxcel	124
4.12 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จากเครื่อง QIAxcel	124
4.13 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ PGLR 7 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จากเครื่อง QIAxcel	124
4.14 การทำ dendrogram ความสัมพันธ์ของมันสำปะหลัง 71 พันธุ์	125
4.15 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 ใน 2% agarose gel	126
4.16 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-79 ใน 2% agarose gel	126
4.17 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จาก เครื่อง QIAxcel	126
4.18 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-79 จากเครื่อง QIAxcel	126
4.19 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel	127
4.20 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-79 จากเครื่อง QIAxcel	127
4.21 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel	127
4.22 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel	127
4.23 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel	127
4.24 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel	128
4.25 การวิเคราะห์ข้อมูล GBS แบบ GWAS โดยใช้ฐานข้อมูลจากดัชนีโรครากปมของมันสำปะหลัง 71 สายพันธุ์	130
4.26 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ทั้ง 6 ชุด	130
4.27 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ชุดที่1 Me02005300154	131
4.28 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ชุดที่2 Me02005300193	131
4.29 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ 2-154	131
4.30 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังลูกผสมสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ 2-154	133
5.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแบ่งสูง (MeES1019, MeES959 และ SSRY60) และเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะไซยาไนต์ (SSRY28, SSRY77, SSRY103, SSRY105, SSRY242) กับมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง60 และพันธุ์ห่านาที่	137
5.2 คุณภาพดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 100 สายพันธุ์ ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบจีโนมไทป์และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับจีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS	143
5.3 Phylogenetic tree แสดงระดับความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ในมันสำปะหลัง 100 สายพันธุ์	146
5.4 Manhattan plot แสดงผลการวิเคราะห์รูปแบบความเชื่อมโยงในจีโนมที่คาดว่าสัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนต์ และแบ่งในมันสำปะหลัง	146
5.5 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับจีโนมที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนต์ชุดที่ 1 (1CHN)	151
5.6 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับจีโนมที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนต์ชุดที่ 3 (3CHN)	152
5.7 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับจีโนมที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนต์ชุดที่ 13 (13CHN)	152

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
5.8	ผลโครมาโตแกรมแสดงเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับจำนวน 6 ตำแหน่ง ประกอบด้วย SNP 1, SNP 2, SNP 3, SNP 4, SNP 5, และ SNP 6 ของมันสำปะหลัง สายพันธุ์ระยอง 7 ด้วยเทคนิค Pyrosequencing	163
6.1	ตำแหน่ง SNPs บนยีน GBSSI ของมันสำปะหลัง	177
6.2	ตัวอย่างดีเอ็นเอของมันเป็นสำปะหลังที่สกัดด้วยวิธี CTAB บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์	177
6.3	ตัวอย่างดีเอ็นเอของมันเป็นสำปะหลังที่สกัดด้วยวิธี CTAB บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์	178
6.4	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบลักษณะแบ่งเหนียวในมันเป็นสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์ บนอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์	179
6.5	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีน GBSSI ขนาดความยาว 1,753 คู่เบส ของมันสำปะหลังแบ่งเหนียว จากมูลนิธิมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย	180
6.6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน GBSSI จากอาร์เอ็นเอตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์แบ่งเหนียว (waxy) พันธุ์ KU50 พันธุ์ห้วยบง 60 และข้อมูลยีน <i>M. esculenta granule-bound starch synthase</i> หมายเลข X74160.1	181
6.7	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน GBSSI ที่ขนาดความยาว 166 อะมิโน	181
6.8	ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับออกแบบไพรเมอร์ในการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SNPs ในมันเป็นสำปะหลังพันธุ์ waxy และ non waxy ด้วยวิธี TaqMan probes	181
6.9	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 82 คู่เบส ที่ตรวจสอบได้ด้วยวิธี TaqMan probes ด้วยคูไพรเมอร์ WX_F และ WX_R	182
6.10	การตรวจสอบตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs T/G โดยวิธี TaqMan probes กับตัวอย่างมันสำปะหลัง ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์	182
6.11	ดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลัง 13 ตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์ GBS	182
6.12	ผลจีโนไทป์ของตัวอย่างมันสำปะหลัง 13 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี GBS	183
6.13	ตำแหน่ง SNPs แบบ mutation ที่พบเฉพาะในมันเป็นสำปะหลังพันธุ์แบ่งเหนียว	183
6.14	ตัวอย่างตำแหน่ง SNPs ตำแหน่งที่ 1,203 และ 1,207 (แถบสีแดง) ของมันสำปะหลัง หมายเลข g 1035285084 <i>Manihot esculenta</i> cultivar AM560-2 Scaffold02252_contig_1, whole genome shotgun sequence	185
6.15	ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการย้อมสีด้วยสีไอโอดีน	186
7.1	กราฟแสดงการแจกแจงแบบปกติด้วยสถิติ Shapiro-Wilk test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 และ ปี 2564	189
7.2	1) กราฟแสดงการประมาณโครงสร้างประชากรย่อย (K) ในประชากรมันสำปะหลังที่ศึกษาโดย Delta K ( $\Delta K$ ) และ 2) โครงสร้างของกลุ่มประชากรที่อนุมานได้ โดยใช้ $K = 3$ ตามความสูงแห่งสีแดง เขียว และน้ำเงิน แสดงโอกาส (Q)	196
7.3	ความไม่สมดุลของลิงเกจ (linkage disequilibrium; LD) ของเครื่องหมาย ILP จำนวน 13 เครื่องหมาย	196
7.4	แสดงกราฟ Manhattan plots จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยใช้โมเดล General linear model (GLM) และ Mixed linear model (MLM)	198
7.5	กราฟ Boxplot ที่แสดงอิทธิพลของแอลลีลของเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง	199

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 แสดงไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ สำหรับใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ มันสำปะหลัง	42
1.2 สรุปลูมหมู่มี (Tm) ขนาดของอัลลีล (bp) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง % polymorphic และค่า polymorphism information content (PIC) ของมันสำปะหลัง จำนวน 18 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 55 เครื่องหมาย	46
1.3 แสดงไพรเมอร์ชนิด SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 4 ชนิด สำหรับใช้ในการจำแนกความแตกต่าง ระหว่างพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์	47
1.4 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์ จากต่างประเทศ (พันธุ์ที่นำเข้ามาจาก CIAT) ที่นำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์	48
1.5 สรุปลูมหมู่มี (Tm), ขนาดของอัลลีล (bp), จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง, % polymorphic, ค่าสังเกต เฮเทอโรไซโกซิตี (Ho), ค่าความหลากหลายของยีน (He) และค่า polymorphism information content (PIC) ของมันสำปะหลัง จำนวน 270 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 16 เครื่องหมาย	55
2.1 รายชื่อพ่อแม่พันธุ์มันสำปะหลังจากเชื้อพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้ จำนวน 11 พันธุ์	61
2.2 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม F1 จำนวน 80 พันธุ์	61
2.3 รายชื่อไพรเมอร์ชนิด EST-SSRs จากการออกแบบไพรเมอร์ยืนต้านทานโรคแบคทีเรียไลโบลินมันสำปะหลัง และไพรเมอร์ SSR ที่ใช้ในการทดสอบ จำนวน 31 คู่ไพรเมอร์	63
2.4 แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 105 พันธุ์	66
2.5 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม F1 ปี 58 จำนวน 76 พันธุ์	69
2.6 แสดงผลการสอบไพรเมอร์กับมันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสม F1 จำนวน 76 พันธุ์	70
2.7 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 ตัวอย่าง	73
2.8 แสดงผลการสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 ตัวอย่าง	74
2.9 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมที่เป็นพันธุ์มันบริโกล จำนวน 176 พันธุ์	77
2.10 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม ปี 2562 จำนวน 138 พันธุ์	78
2.11 แสดงผลการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลัง 200 สายพันธุ์	82
2.12 แสดงผลการคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังและการทดสอบการเกิดโรคของมันสำปะหลัง ในแปลงอนุรักษ์พันธุ์ CIAT ที่นำมาทดสอบกับเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i>	84
2.13 แสดงผลการคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังและการทดสอบการเกิดโรคของมันสำปะหลัง ในแปลงอนุรักษ์พันธุ์ไทยและลูกผสมที่นำมาทดสอบกับเชื้อ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Manihotis</i>	86

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังที่นำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2561 และปี 2562	90
3.2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ เอสเอสอาร์ และอีเอสที	90
3.3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน <i>Peroxidase</i> สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Pyrosequencing	95
3.4 รายชื่อมันสำปะหลังลูกผสมที่นำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563 และปี 2564	95
3.5 ลำดับเบสของไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน <i>Peroxidase</i> สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR	96
3.6 ผลทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน <i>Peroxidase</i> โดยใช้เทคนิค Pyrosequencing	99
3.7 สรุปลำดับเบสของพันธุ์ candidate 14 พันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3	102
3.8 ปริมาณผลผลิตและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP	108
3.9 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-78 โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR	110
3.10 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-157 โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR	110
3.11 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล Ex3-128 โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR	111
3.12 ผลการคัดเลือกลูกผสมCMR60, CMR61 และ CMR62 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563	111
3.13 ผลการคัดเลือกลูกผสมCMR62, CMRE 62, CMR64และพันธุ์จาก IITA โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2564	113
4.1 แสดงแหล่งที่มาของไพรเมอร์จากหว่าบิท (sugar beat) มันฝรั่ง ถั่วอัลมอลด์ และไพรเมอร์ SSR จำนวน 26 คู่	117
4.2 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปม จำนวน 4 ยีน, ข้อมูล EST จำนวน 6 EST	120
4.3 พันธุ์มันสำปะหลัง ดัชนีการเกิดปมและระดับความต้านทานโรครากปมของมันสำปะหลัง	122
4.4 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปมแบบ tetra primer จำนวน 4 ยีน, ข้อมูล EST จำนวน 6 EST	128
4.5 การวิเคราะห์รูปแบบ SNPs จากมันสำปะหลัง 71 พันธุ์	129
4.6 แสดงขนาดการปรากฏแถบดีเอ็นเอมันสำปะหลังในชุดไพรเมอร์ 2-154	132
4.7 มันสำปะหลังสายพันธุ์ลูกผสมสายพันธุ์ต่าง 17 สายพันธุ์	132

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
5.1 เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนต์ต่ำ	135
5.2 สายพันธุ์มันสำปะหลังที่นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล	136
5.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ กับมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ห่านาที่	137
5.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูงและเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนต์ต่ำ กับพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ จำนวน 59 พันธุ์	138
5.5 สายพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์อะไมโลสระหว่าง 3.25 – 31.08 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์มันสำปะหลัง ที่มีปริมาณไซยาไนต์ระหว่าง 87.40 - 911.60 mgHCN/kg น้ำหนักสด (วิเคราะห์ปี 2564) จำนวน 137 สายพันธุ์	142
5.6 สายพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้ง ระหว่าง 0 - 33.8 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณ ไซยาไนต์ ระหว่าง 8.26 - 815 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (วิเคราะห์ปี 2553 – 2558) จำนวน 100 สายพันธุ์	143
5.7 จำนวนและประเภทของ SNPs จากมันสำปะหลังจำนวน 100 สายพันธุ์	145
5.8 ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด tetra-primer ARMS-PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่เกี่ยวข้องกับ ลักษณะปริมาณแป้งของมันสำปะหลัง จำนวน 14 ชุด	147
5.9 ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด tetra-primer ARMS-PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่เกี่ยวข้องกับ ลักษณะปริมาณไซยาไนต์ของมันสำปะหลัง จำนวน 15 ชุด	149
5.10 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 1CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนต์ ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 108 สายพันธุ์	153
5.11 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนต์ ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 120 สายพันธุ์	156
5.12 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 13CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนต์ ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 137 สายพันธุ์	159
5.13 ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง ของมันสำปะหลังด้วยเทคนิค Pyrosequencing จำนวน 2 ชุด	163
5.14 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP2 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (%amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 118 สายพันธุ์	164
5.15 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP5 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (%amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 133 สายพันธุ์	168
5.16 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป SNP6 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (%amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 135 สายพันธุ์	172
6.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์	177
6.2 ข้อมูลชิ้นส่วนโครโมโซมที่พบตำแหน่ง SNP ที่ให้ความแตกต่าง	184

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
7.1 แสดงค่าทางสถิติของลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง (กิโกรัมต่อตัน) ทั้ง 2 ลักษณะ (Yield2554 และ Yield2564)	188
7.2 แสดง EST ของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง จากฐานข้อมูล GenBank EST database	189
7.3 แสดงรายละเอียดไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง จำนวน 110 คู่ไพรเมอร์	191
7.4 รายชื่อเครื่องหมายโมเลกุล ILP ที่ให้ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอในตัวอย่างมันสำปะหลัง	194
7.5 การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP จำนวน 13 เครื่องหมาย ที่พัฒนาจากยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้ง จำนวน 6 ยีน	194
7.6 แสดงจำนวนและประเภทของ SNPs ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจำนวน 166 พันธุ์	195
7.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะ (Association mapping) โดยวิธี GLM ของเครื่องหมาย ILP จำนวน 13 เครื่องหมาย กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 และลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564	197
7.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 และลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 โดยใช้โมเดล GLM และ MLM	198

## บทที่ 1 บทนำ

### 1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

#### วิสัยทัศน์

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

#### พันธกิจ

- 1) สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตร สู่กลุ่มเป้าหมาย
- 2) กำหนดและกำกับดูแลมาตรฐานระบบการผลิตและผลิตภัณฑ์พืชและปัจจัยการผลิต พัฒนาระบบตรวจรับรองสินค้าเกษตรด้านพืชให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
- 3) อนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืช แมลง และจุลินทรีย์
- 4) กำกับ ดูแล และพัฒนากฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ

### 2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน (โปรดเลือกเฉพาะยุทธศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับหน่วยงานของท่าน)

- ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง

เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ

- ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน

เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก

- ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์

คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษ และภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม

- ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม

สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาสให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ

- ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน

- ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ

การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”



3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 และโปรตรระบุแผนงาน/โครงการให้สอดคล้องกับโปรแกรมของแผน ววน.

โปรแกรมตามแผน ววน.	งบประมาณ (บาท)
โปรแกรม P10. ยกระดับความสามารถการแข่งขันและวางรากฐานทางเศรษฐกิจ แผนงานที่ 16: แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพระบบการผลิตมันสำปะหลังแบบบูรณาการและยั่งยืน	16,907,214
แผนงานย่อย การวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังและการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมันสำปะหลัง	
โครงการวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง	2,957,587

4. รายละเอียดโครงการ

**ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล**

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

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลัง และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังสำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์และการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

2) เพื่อคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานต่อโรคแบคทีเรียไลบอร์ท โรคใบด่าง โรครากปม ให้มีผลผลิตและปริมาณแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ และลักษณะแป้งเหนียว โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

### ขอบเขตการศึกษา

1) เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ทำการทดสอบและคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดี (polymorphism) นำเครื่องหมายที่ได้ไปใช้จำแนกพันธุ์มันสำปะหลังในกลุ่มพ่อแม่พันธุ์และกลุ่มที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ซึ่งข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้จะนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

2) เป็นการศึกษาและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะการต้านทานต่อโรค ได้แก่ แบคทีเรียไลบอร์ท ใบด่าง (CMD) รากปม และลักษณะสำคัญทางการเกษตร ได้แก่ ผลผลิตและแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ และแป้งเหนียว โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งต้องทำการพัฒนาและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต่างๆ ดังกล่าว และนำมาใช้คัดเลือกมันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์ต่างๆ ที่เก็บรวบรวมไว้ของกรมวิชาการเกษตร สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาได้จะเป็นตัวช่วยสำคัญในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ให้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

### นิยามศัพท์

**มันสำปะหลัง (Manihot esculenta Cranz)** หมายถึง พืชที่มีรากสะสมอาหารขนาดใหญ่ ปลูกในเขตร้อน ใช้ในการผลิตแป้งเพื่อเป็นอาหาร

**ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity)** หมายถึง ความหลากหลายของหน่วยพันธุกรรมหรือยีน (genes) ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ได้รับการถ่ายทอดมาจากรุ่นพ่อแม่และส่งต่อไปยังรุ่นต่อไป ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันไปตาม gene ที่ได้รับการถ่ายทอดมา ความแตกต่างผันแปรทางพันธุกรรมในแต่ละหน่วยชีวิตนั้นมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (mutation) อาจเกิดขึ้นในระดับยีน หรือในระดับโครโมโซม ผสมผสานกับกลไกที่เรียกว่า Crossingover ที่เกิดขึ้นในขณะที่มีการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เป็นผลทำให้ gene เกิดการสลับที่รวมตัวกันใหม่ (Recombination) ซึ่งจะถูกถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานต่อไปในประชากร ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น ลักษณะใบ ทรงต้น สีใบ สีก้านใบ การทนต่อโรคและแมลง เป็นต้น

**เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker)** หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกได้ และมีประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Diversity) สามารถใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในประชากรเดียวกันหรือต่างกันทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ เครื่องหมายดีเอ็นเอยังมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตร เช่น ผลผลิตสูง ต้านทานโรคและแมลง เป็นต้น สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนก ตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้

**เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR (Simple Sequence Repeat)** หมายถึง เป็นเครื่องหมายชนิด microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างแบบซ่มร่วมได้ (co-dominant) ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ จึงสามารถนำมาเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของมันสำหรับหลังได้เป็นอย่างดี เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชได้อย่างชัดเจน แม่นยำและมีประสิทธิภาพสูง

**เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดดีเอ็นเอเบสเดี่ยว (Single Nucleotide Polymorphism ; SNPs)** หมายถึง เป็นเครื่องหมายที่ใช้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายโพลีนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว SNPs มีตำแหน่งอยู่ในจีโนมที่นิวคลีโอไทด์หนึ่งตัวเกิดความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากร เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SNP (SNP markers) มีราคาถูก ประหยัดเวลา ต้องมีการออกแบบไพรเมอร์อย่างจำเพาะสูง และมีการนำมาประยุกต์ใช้หลายด้าน ได้แก่ ด้านการแพทย์ ด้านสัตว์ และด้านพืช เช่น การจำแนกสายพันธุ์ (variety identification), MAS-breeding, disease identification และ purity testing เป็นต้น

**เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด EST-SSRs R (Expressed Sequence Tags)** หมายถึง เป็นเครื่องหมายที่ได้จากการคัดเลือกและพัฒนาเครื่องหมาย microsatellite จากฐานข้อมูลสาธารณะ express sequence tags (ESTs) ของยีนที่มีการแสดงออก หรือจากการสร้าง cDNA library เป็นลำดับดีเอ็นเอส่วนที่เป็น complementary DNA (cDNA) ของ mRNA ทำหน้าที่คัดลอกรหัสดีเอ็นเอบางส่วนของจีโนม ซึ่งลำดับดีเอ็นเอที่พบใน EST มีขนาด 500 - 800 นิวคลีโอไทด์ เป็นส่วนของบริเวณ coding region และนำมาออกแบบไพรเมอร์ในตำแหน่งเฉพาะของยีนนั้นๆ ให้ต่างกัน วิธีการพัฒนาเครื่องหมาย ESTs นี้ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการพัฒนา การใช้ลำดับ EST จะสามารถระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างแผนที่ยีนและประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตได้

**เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ILP (Intron Length Polymorphism)** หมายถึง เป็นเครื่องหมายชนิดที่เป็นยีนที่ทราบหน้าที่ในการทำงาน (functional marker) ออกแบบไพรเมอร์ให้มีตำแหน่งในบริเวณ conserved exon ที่ชนาบข้างอินทรอน (intron) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดอินทรอน ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิดซ่มร่วม อาจสัมพันธ์หรือไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรก็ได้ แต่ถ้ามีความสัมพันธ์ก็จะดีเพื่อที่จะสามารถศึกษายืนยันเครื่องหมายกับลักษณะทางการเกษตรได้ชัดขึ้น

**แป้งเหนียว (Waxy starch)** หมายถึง แป้งที่มีองค์ประกอบหลักเป็น amylopectin ซึ่งไม่มีองค์ประกอบของ amylose ในบางพืช เช่น ข้าว เป็นต้น

**ลักษณะด้อย (recessive)** หมายถึง ลักษณะทางพันธุกรรมแบบอัลลีลด้อยแบบคู่ หรือ โฮโมไซกัส (homozygous)

## บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

### 1. วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ชนิด SSR (เริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2564)

หัวหน้าการทดลอง นางสาวดี จ้อเหรียญ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

#### วิธีการดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย

##### 1. การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง

###### 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.) ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

###### 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 ด้วยไพรเมอร์ ชนิด 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 เทียบขนาดของแถบ ดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp DNA ladder marker (Fermentas, USA) พร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

### 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) ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ในระดับความห่างไม่น้อยกว่า 3 – 5 คู่เบส โดยจะแสดงผลในรูปแบบของกราฟ (electropherograms) และแบบภาพขนาดของแถบดีเอ็นเอ เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลัง

### 1.4 การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

1.4.1 บันทึกข้อมูลขนาดแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่ โดยให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 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 ตัดแปลงจาก Dellaporta และคณะ (1983) ตัดใบมันสำปะหลัง 5 กรัม บดในโกร่งพร้อม กับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง 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%  $\beta$ -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 ใสหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform-isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนใสหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol 0.6 เท่าของสารละลาย DNA และ 3M NaOAc 0.1 เท่าของสารละลาย DNA ผสมโดยการเอียงหลอดคว่ำลงข้างๆ (inverted) นำไปแช่ในตู้เย็น -20°C นาน 30 นาที ระยะเวลาจะเห็นตะกอน 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 และนำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำ PCR ต่อไป

## 2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันเป็นสำปะหลัง ด้วยไพรเมอร์ชนิด SSR ที่คัดเลือกไว้

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างมันเป็นสำปะหลัง 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 1.3) 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)

## 2.3 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (Fragment Analysis) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

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

## 2.4 การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

2.4.1 บันทึกข้อมูลขนาดแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างมันเป็นสำปะหลังแต่ละพันธุ์ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่ โดยให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0

2.4.2 วิเคราะห์ค่า 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)

2.4.3 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)

## การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโพลท์ของมันสำปะหลังด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด EST-SSRs (เริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2564)

หัวหน้าการทดลอง นางบุญเรือนรัตน์ เรื่องพิเศษ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

### วิธีการดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย

#### 1. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโพลท์ในมันสำปะหลัง

1.1 คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้รับการทดสอบความสามารถในการต้านทานโรค จำนวน 30 สายพันธุ์ นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ/วิธี CTAB ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมสำหรับทำพีซีอาร์ต่อไป

1.2 ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคของมันสำปะหลังนำมาเปรียบเทียบกับโดยใช้โปรแกรม clustalW เพื่อหาส่วนที่เป็น conserve region และค้นหาข้อมูล EST-SSRs จากแหล่งข้อมูลต่างๆ ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพันธุ์มันสำปะหลังที่คัดเลือกไว้ เพื่อนำไปทดสอบความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรค สำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับติดตามยีนที่ต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโพลท์ต่อไป

1.3 คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีนและชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่างๆ

1.4 นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนต้านทานจากพันธุ์มันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ

#### 2. ตรวจสอบวิเคราะห์ความเชื่อมโยงระหว่างความต้านทานโรคกับโมเลกุลเครื่องหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์

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) เพื่อดูลักษณะของฟิโนไทป์เทียบกับลักษณะจีโนไทป์

3.2 สรุปผลและวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล

#### 4. ทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลกับประชากรมันสำปะหลังลูกผสมที่ปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

4.1 นำโมเลกุลเครื่องหมายที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์กับมันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสมใหม่

4.2 วิเคราะห์และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏว่ามีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคหรือไม่

4.3 สรุปผลการทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลกับประชากรมันสำปะหลังลูกผสม

#### 5. การตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลัง

5.1 ปลูกทดสอบพันธุ์และคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ตรงตามความต้องการไว้อย่างน้อย 200 พันธุ์

5.2 คัดเลือกต้นพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการไว้ใช้ในการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

#### 6. วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการทดลอง

บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวนต้นที่พบยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโพลท์ และข้อมูลไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

### การทดลองที่ 3 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง Cassava Mosaic Disease (CMD) (เริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2564)

หัวหน้าการทดลอง นางสาวจิราพร แก่นทรัพย์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

#### วิธีการดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย

##### การดำเนินงานวิจัยในปี 2561 – 2562

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

##### 1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลัง

ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังที่จะนำมาคัดเลือกได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวนทั้งสิ้น 250 พันธุ์ (ตารางที่ 1) โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ที่ได้รับความอนุเคราะห์ที่ใบมันสำปะหลังจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อหาพันธุ์ candidate ต้านทานโรคใบด่าง ได้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2561 จำนวน 100 พันธุ์และในปีงบประมาณ 2562 จำนวน 150 พันธุ์ โดยเก็บตัวอย่างนำใบมันสำปะหลังจากต้นอายุ 12 เดือน ในส่วนยอดของต้นมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) นำดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม Biodrop(UK) จากนั้นนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ต่อไป

##### 1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ เอสเอสอาร์ และอีเอสที

ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์และเอสเอสอาร์จากรายงานวิจัยของ Carmo *et al.* (2015) สำหรับลำดับเบสไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอีเอสทีที่คณะผู้วิจัยประยุกต์ขึ้นจากข้อมูลลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่แสดงออกในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส CMV ซึ่งสืบค้นจากฐานข้อมูล NCBI โดย EST-R protein (EST-R) รหัสในฐานข้อมูลคือ dbESTId 77982922 GenBankAcc JZ167361 และ EST-Kinase (EST-K) รหัสในฐานข้อมูลคือ dbESTId 77982924 GenBankAcc JZ167363 จากนั้นสังเคราะห์ไพรเมอร์ จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R และ EST-K ดังตารางที่ 2 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ที่นำมาคัดเลือกจำนวน 250 พันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ต้านทานชื่อ TME3 โดยใช้ *Taq* DNA Polymerase, recombinant (Thermo Scientific, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 1X *Taq* buffer with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 mM สำหรับ dNTP แต่ละชนิด, 0.4  $\mu\text{M}$  forward primer, 0.4  $\mu\text{M}$  reverse primer, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , *Taq* DNA Polymerase 1U ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำจากนั้นนำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-denaturation 94°C. 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation 94°C.40 วินาที, Annealing 55-56°C.40 วินาที, Extension 72°C. 30-60 วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension 72°C. 5 นาที อีก 1 รอบ (ตารางที่ 2) ตรวจวิเคราะห์ผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่องGel-Doc UV Transilluminator(Bio-RadLaboratories, USA)



### 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 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันเป็นสำปะหลังพันธุ์ 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  $\mu$ M forward primer, 0.2  $\mu$ M reverse primer (biotin label) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ จากนั้นนำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-denaturation 95°C. 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation 94°C. 30 วินาที, Annealing 56-62°C. 30 วินาที, Extension 72°C. 30 วินาที จำนวน 45-50 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension 72°C. 10 นาทีอีก 1 รอบ ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโพรเซสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc UV Transilluminator (Bio-Rad Laboratories, USA) จากนั้นนำผลผลิตที่ฮีอาร์ที่เหลือไปเข้าเครื่องหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ PyroMark Q48 Autoprep (Qiagen, Germany) โดยใช้ชุดน้ำยาตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป PyroMark Q48 Advance Reagents (Qiagen, Germany) ซึ่งสามารถบอกลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งที่ต้องการศึกษาได้

เมื่อทราบผลการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแล้ว ดำเนินการแจ้งผลการทดสอบจีโนไทป์และรายชื่อพันธุ์ candidate ด้านทานโรค CMD ให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงานทราบ เพื่อจะได้นำพันธุ์ candidate ดังกล่าวไปทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรค ก่อนการนำไปใช้เป็นพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์

### 1.4 การผสมข้ามพันธุ์สร้างลูกผสม

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

#### การดำเนินงานวิจัยในปี 2563 – 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 ด้านทานโรคใบต่าง 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 ใส่ น้ำกลั่นที่ปราศจากนิวคลีเอส 50 ไมโครลิตรในหลอด 1.5 มิลลิลิตร

2.1.2 ตัดใบมันสำปะหลังขนาดประมาณ 4 มิลลิเมตร x 4 มิลลิเมตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร

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 มิลลิลิตร หลอดใหม่ 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  $\mu$ M forward primer, 0.4  $\mu$ M reverse primer ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำจากนั้นนำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-denaturation 98°C. 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation 98°C. 10 วินาที, Annealing 63°C. สำหรับ EST-R/ 55°C. สำหรับ RME1/ 59°C. สำหรับ NS158 เป็นเวลา 10 วินาที, Extension 72°C. 20 วินาที สำหรับ EST-R และ NS158/ 30 วินาที สำหรับ RME1 จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension 72°C. 1 นาทีอีก 1 รอบ ตรวจสอบวิเคราะห์ผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่องGel-Doc UV Transilluminator(Bio-RadLaboratories, USA)

## 2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังเพื่อการทำซ้ำแบบ biological repeat

ดำเนินการทำซ้ำแบบ biological repeat กับมันสำปะหลังลูกผสมสายพันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ด้านทาน 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 ตัดแปลงจากวิธีของ Edwards *et al.*(1991) และวิธีของ Kotchoni and Gachomo (2009) โดยได้เพิ่ม polyvinylpyrrolidone (PVP) ในสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอและมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 ตัดใบมันสำปะหลังประมาณ 0.07 กรัม มาใส่ในโถงเติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ (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 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

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

2.2.3 เติม 70% (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 เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอซึ่งมีโพสเฟอไรต์ปะปนอยู่ด้วย ดีเอ็นเอจะละลายในน้ำแต่โพสเฟอไรต์ไม่ละลายน้ำ จากนั้นทำการตกตะกอนโพสเฟอไรต์

ไรต์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาทีและดูดน้ำใสส่วนบนที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Biodrop (UK) แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่  $-20^{\circ}\text{C}$ . สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป

### 2.3 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ เอสเอสอาร์ และอีเอสที แบบ single และ multiplex PCR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของม้านำปะหลังลูกผสมชุด biological repeat ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ candidate จากการคัดเลือกเบื้องต้นด้วยเครื่องหมาย EST-R, RME1 และ NS158 โดยใช้เทคนิค Direct PCR ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุล EST-R, RME1, EST-K, NS158, SSRY28 และ NS169 รวม 6 เครื่องหมายโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของม้านำปะหลังพันธุ์ต้านทาน 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  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 mM สำหรับ dNTP แต่ละชนิด, 0.2  $\mu\text{M}$  forward primer1, 0.2  $\mu\text{M}$  forward primer2, 0.2  $\mu\text{M}$  reverse primer1, 0.2  $\mu\text{M}$  reverse primer2, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , *Taq* DNA Polymerase 1.5 U ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ จากนั้นนำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-denaturation  $94^{\circ}\text{C}$ . 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation  $94^{\circ}\text{C}$ . 40 วินาที, Annealing  $55^{\circ}\text{C}$ . 40 วินาที, Extension  $72^{\circ}\text{C}$ . 30-60 วินาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension  $72^{\circ}\text{C}$ . 5 นาทีอีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc UV Transilluminator (Bio-Rad Laboratories, USA)

### 2.4 การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปโดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR

ออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปบนยีน *Peroxidase* จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค CMD (Wolfe *et al.*, 2016) สำหรับใช้กับเทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR เพื่อพัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปที่มีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าเทคนิค Pyrosequencing ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR ใช้ซอฟต์แวร์ Primer1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) จะได้ข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ดังตารางที่ 5 จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสม(condition)ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ *Taq* DNA Polymerase, recombinant (Thermo Scientific, USA) เมื่อค้นพบสภาวะที่เหมาะสมแล้ว จะใช้สภาวะดังกล่าวในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปตำแหน่ง Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ในม้านำปะหลังลูกผสม

เมื่อทราบผลการคัดเลือกม้านำปะหลังลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแล้ว ดำเนินการแจ้งผลการทดสอบจีโนไทป์ และรายชื่อสายพันธุ์ candidate ต้านทานโรค CMD ให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบัน วิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงานทราบ เพื่อจะได้นำสายพันธุ์ candidate ดังกล่าวไปทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรค ก่อนการนำพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์และเผยแพร่แก่เกษตรกรต่อไป

#### การทดลองที่ 4 การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

(เริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2564)

หัวหน้าการทดลอง นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

#### วิธีการดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย

##### การดำเนินการวิจัยในปี 2561

1. เตรียมพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 14 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ต้านทานโรครากปมคือ ระยะเวลา 1, ระยะเวลา 7, ระยะเวลา 86-13, ระยะเวลา 60, ระยะเวลา 72 และเกษตรศาสตร์ 50 และพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปมคือ ระยะเวลา 2, ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 9, ระยะเวลา 11, ระยะเวลา 90, หัวยง 60, หัวยง 80 และพิรุณ โดยใช้ข้อมูลจากงานวิจัยการทดสอบความต้านทานโรครากปม (นุชนารถ และคณะ, 2558)

2. รวบรวมและสังเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลที่ต้านทานโรครากปมในพืชอื่น เช่น มันฝรั่ง มะเขือเทศ หัวบีท (Bakooie *et al.*, 2015 and Asano *et al.*, 2012) ไพโรมอร์ SSR จำนวน 26 คู่ไพโรมอร์ และออกแบบไพโรมอร์จากยีน Endoglucanase ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับโรครากปมเพิ่มอีก จำนวน 11 คู่ไพโรมอร์

3. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบมันสำปะหลัง โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ®

4. ทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลโดยการทำให้ PCR กับมันสำปะหลังที่ต้านทานโรครากปม ได้แก่ ระยะเวลา 1, ระยะเวลา 7, ระยะเวลา 86-13, ระยะเวลา 60, ระยะเวลา 72 และเกษตรศาสตร์ 50 และพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปมคือ ระยะเวลา 2, ระยะเวลา 3, ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 9, ระยะเวลา 11, ระยะเวลา 90, หัวยง 60, หัวยง 80

5. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับความอ่อนแอและความต้านทานต่อโรครากปมจากแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลต่อไป

##### การดำเนินการวิจัยในปี 2562

1. ออกแบบไพโรมอร์แบบ ILP (Intron Length Polymorphism) เพิ่มอีก 3 ยีน โดยสืบค้นข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลังหรือพืชชนิดอื่นเพิ่มคือ ยีน Polygalacturonase, ยีน Pectinesterase/Pectinesterase Inhibitor, ยีน Beta-Glucosidase จำนวน 20 คู่ไพโรมอร์ เพื่อให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะมากขึ้น

2. ทำการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP โดยการนำมันสำปะหลัง 14 พันธุ์ ได้แก่ R1, R2, R3, R5, R9, R11, R60, R90, HB60, KU50, R13, R72 และ HB80 ด้วยเทคนิค PCR วิเคราะห์เครื่องหมาย ILP โดยใช้ไพโรมอร์ทั้งหมด 31 คู่ไพโรมอร์ ตรวจสอบผลเบื้องต้นด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 2% agarose gel electrophoresis แล้วนำมันสำปะหลังทั้ง 14 พันธุ์ไปวิเคราะห์หาโพลิมอร์ฟิซึมใน 6% polyacrylamide gel electrophoresis ที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

3. ทำการเก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 71 พันธุ์ ที่มีรายงานการทดสอบไล่เดือนฝอยที่ทำให้เกิดโรครากปมที่นุชนารถและคณะรายงานเมื่อปี 2558 และสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบมันสำปะหลัง โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ®

4. ทดสอบประสิทธิภาพของไพโรมอร์ที่คัดเลือกไว้ จำนวน 15 คู่ไพโรมอร์ กับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่สกัดไว้

5. วิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับความอ่อนแอและต้านทานต่อโรครากปมจากแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

##### การดำเนินการวิจัยในปี 2563

1. วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างระหว่างมันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ต้านทานโรครากปมจากแถบดีเอ็นเอคู่ไพโรมอร์ต่างๆ และดัชนีการเกิดปมของมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ

2. จับคู่ผสมมันสำปะหลังโดยใช้พันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่เป็นพันธุ์ต้านทานโรครากปมที่ได้จากผลการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรครากปม (ดำเนินการโดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง)

3. เก็บตัวอย่างไขมันสำปะหลังจากประชากรที่ได้จากคู่ผสมที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ต้านทานโรครากปมมาสกัดดีเอ็นเอ
4. ทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือกมันสำปะหลังที่ต้านทานโรครากปมโดยการทำให้ PCR จากเครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรครากปมที่คัดเลือกมาแล้ว
5. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรมันสำปะหลังลูกผสมกับเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือกลักษณะต้านทานโรครากปม

#### การดำเนินการวิจัยในปี 2564

1. วิเคราะห์ข้อมูลตำแหน่ง SNP จากข้อมูลมันสำปะหลัง 71 สายพันธุ์
2. ออกแบบไพรเมอร์ชนิด tetra primer เพื่อใช้ในการทดสอบพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ จำนวน 6 ชุด
3. ทดสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลกับมันสำปะหลังที่ต้านทาน จำนวน 2 พันธุ์ และพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปม จำนวน 2 พันธุ์
4. ทำการเพิ่มขยายใส่เดือนฝอยสาเหตุโรครากปมในมะเขือเทศ เพื่อใช้ทดสอบในมันสำปะหลังลูกผสม
5. ทำการปลูกเชื้อใส่เดือนฝอยโดยใช้ไซโตสในท่อนพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมที่ต้านทานโรครากปม โดยมีพันธุ์ต้านทานโรครากปมพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปมเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ
6. ประเมินความต้านทานโรครากปมของพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมที่ทดสอบโดยวัดดัชนีการเกิดโรครากปม
7. ทำการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรครากปมกับพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม โดยการทำให้ PCR จากเครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรครากปมที่คัดเลือกมาแล้ว
8. วิเคราะห์ข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานโรครากปม

## การทดลองที่ 5 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ดำในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง (เริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2564)

หัวหน้าการทดลอง นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

### วิธีการดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย

#### 1. รวบรวมและทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ดำในหัวมันสำปะหลัง

1.1 รวบรวมและสังเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ดำ เช่น ลักษณะแป้งสูง จำนวน 3 คู่ (MeES1019, MeES959 และ SSR960) ลักษณะไซยาไนด์ดำจำนวน 4 คู่ (SSRY28, SSR9103, SSR9105, SSR9242)

1.2 เก็บใบมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 พันธุ์ห่านาที่ กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมระหว่างห้วยบง 60 และห่านาที่ 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 นำไปปั่นที่อุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก 20 นาที เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นาน 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 ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งสูง จำนวน 3 คู่ (MeES1019, MeES959 และ SSR960) และเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะไซยาไนด์ดำ จำนวน 5 คู่ (SSRY28, SSR977, SSR9103, SSR9105, SSR9242) ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลในหัวมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ ห้วยบง60 พันธุ์ห่านาที่ กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของห้วยบง 60 และห่านาที่ (4 พันธุ์) โดยนำ gDNA ของมันสำปะหลัง ใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA) และ ใช้ไพรเมอร์ลักษณะแป้งสูง/ไพรเมอร์ลักษณะไซยาไนด์ดำ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ 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 ตรวจสอบด้วยเครื่องอ่านแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ผลภาพแถบดีเอ็นเอชนิดเร็ว (Automated Electrophoresis) ยี่ห้อ QIAxcel : pure excellence

1.4 นำเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งสูง จำนวน 3 คู่ (MeES1019, MeES959 และ SSR960) และเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะไซยาไนด์ดำ จำนวน 5 คู่ (SSRY28, SSR977, SSR9103, SSR9105, SSR9242) ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลในหัวมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ ห้วยบง60 พันธุ์ห่านาที่ กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของห้วยบง 60 และห่านาที่ (4 พันธุ์) (ตารางที่ 5.1) โดยนำ gDNA ของมันสำปะหลัง จากข้อ 1.2 ใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA) และ ใช้ไพรเมอร์ลักษณะแป้งสูง/ไพรเมอร์ลักษณะไซยาไนด์ดำ 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) และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบแยกดีเอ็นเอด้วยเครื่องอ่านแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ผลภาพแถบดีเอ็นเอชนิดเร็ว (Automated Electrophoresis) ยี่ห้อ QIAXcel : pure excellence

1.5 บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแบ่งสูงและลักษณะไฮยาไนต์ต่ำ

## 2. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปที่สัมพันธ์กับลักษณะแบ่งสูงและไฮยาไนต์ต่ำในหัวมันสำปะหลัง

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส(แป้ง)และปริมาณไฮยาไนต์ในหัวมันสดจากพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ร่วมกับ เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแบ่งสูง และลักษณะไฮยาไนต์ต่ำในหัวมันสำปะหลัง

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

2.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณไฮยาไนต์ด้วยวิธี picrate paper ตามวิธีดัดแปลงของ Haque และ Bradbury (1999)

เตรียม picric acid paper ตามวิธีของ Bradbury et al. (1999) ซึ่ง 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 ตร.ซม. ตัดบนผ้าของหลอดทดลองขนาด 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 มิลลิลิตร บดให้ละเอียด ปิดฝาที่มี picric acid paper บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานข้ามคืน นำ picric acid paper จุ่มในน้ำ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เทียบกับสีมาตรฐานของปริมาณไฮยาไนต์

เตรียมมาตรฐานของปริมาณไฮยาไนต์ เตรียมสารละลายมาตรฐาน Hydrogen cyanide (HCN) ที่ระดับ 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 20.0 และ 40.0 ไมโครกรัมต่อหลอด โดยเติม 0.1 M phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย HCN ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ลงใน แต่ละหลอด 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 ให้เติม สารละลาย 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

บันทึกข้อมูลปริมาณไฮยาไนต์

2.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสในหัวมันสดตามวิธีดัดแปลงของ Juliano (1971)

นำมันสำปะหลัง (จากข้อ 3.1)หนัก 50 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติมเอทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร 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 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เทียบกับมาตรฐานของปริมาณอะไมโลส

เตรียมสารละลายมาตรฐานอะไมโลส(แป้ง) ที่ระดับ 0, 40, 80, 120, 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อหลอด โดยเติม เอทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร 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 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอสำหรับวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS

คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำโดยคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้ง และ พันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ที่ระดับต่างๆ จากรายงานการจำแนกและประเมินลักษณะทางคุณภาพของหัวคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งและคุณภาพของท่อนพันธุ์ในเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังของจิณฉัตร และคณะ (2558)

2.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอสำหรับส่งวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS โดยเก็บใบมันสำปะหลังพันธุ์ที่ให้แป้งและใบมันสำปะหลังพันธุ์ที่ให้ปริมาณไซยาไนด์ที่ระดับต่างๆ สกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีของ 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 1 กรัม 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 นำไปวิเคราะห์จีโนมโทป์ของมันสำปะหลัง

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 ไพรมเมอร์ 2 คู่ คือ คู่ นอกและคู่ใน

2.2.2.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป



นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่ออกแบบได้ ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง โดยปฏิกิริยา 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 ตรวจสอบแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 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 ตรวจสอบแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 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 ตรวจสอบแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เหลือไปเข้าเครื่องหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ PyroMark Q48 Autoprep (Qiagen, Germany) โดยใช้ชุดนี้ตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สนิป PyroMark Q48 Advance Reagents (Qiagen, Germany) ซึ่งสามารถบอกลำดับ นิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งที่ต้องการศึกษาได้

2.2.3.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป โดยนำข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป จากข้อ 2.2.3.1 ตรวจสอบกับข้อมูลปริมาณแป้ง (ข้อ 2.1)

บันทึกข้อมูลประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป

**การทดลองที่ 6 การตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (waxy starch) ในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล**  
(เริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2564) ขอยุติงานปี 2563

หัวหน้าการทดลอง นางสาวอรุณทัย ซาววา สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

**วิธีการดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย**

**1. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธีพีซีอาร์**

**(PCR: Polymerase Chain Reaction)**

1.1 ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง ทำการเก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังจากแปลงปลูกในแหล่งรวบรวมพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 758 ตัวอย่าง นำมาเก็บรักษาตัวอย่างใบไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และแบ่งเก็บแบบแห้งโดยนำใบมันสำปะหลังผึ่งลมนาน 1 สัปดาห์ แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เก็บตัวอย่างอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างใบมันสำปะหลัง ด้วยวิธี CTAB ตามวิธีของอรุณทัยและคณะ (2552) ดังนี้เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)] เติม 0.2%  $\beta$ -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) แล้วนำตัวอย่างออกมารว้างที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform: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 Chloroform:Isoamyl alcohol(24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสให้หลอด 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 เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

1.3 โพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบเป็นโพรเมอร์ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) (ตารางที่ 6.1)

1.4 การตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ชุดน้ำยาสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Green Gotaq® Flexi (Promega, USA) ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ 5X Green Gotaq® Flexi ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 25 mM MgCl<sub>2</sub> ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 2 mM dNTP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร โพรเมอร์ forward (5uM) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โพรเมอร์ 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 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (gel electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

1.6 บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอและผลการตรวจสอบตำแหน่ง SNPs

## 2. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธี TaqMan probes

2.1 ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง แบ่งตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อการโคลนนิ่ง และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังแป้งเหนียว (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 ร่วมกับตัวอย่างมันสำปะหลังแป้งเหนียว 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น จำนวน 221 ตัวอย่าง

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2552)

2.3 การออกแบบไพรเมอร์และไพรเมอร์ ทำการโคลนนิ่ง GBSSI จากอาร์เอ็นเอมันสำปะหลัง ซึ่งมีตำแหน่ง SNPs ตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) (ภาพที่ 6.1) โดยออกแบบไพรเมอร์ด้าน Forward: 5'- ATG GCA ACT GTA ATA GCT GCA CAT -3' และ Reverse: 5'- TCA AGG CGT GGG AAC GTT CTC CTT-3' เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพันธุ์ มันสำปะหลัง waxy และ non waxy เมื่อได้ตำแหน่งเครื่องหมาย SNPs ที่เฉพาะเจาะจงกับพันธุ์แป้งเหนียวแล้วทำการออกแบบไพรเมอร์ไพรเมอร์ สำหรับการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียว ดังนี้

- คูไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่หน้าข้างของตำแหน่ง SNPs คือ WX\_F: 5'- CCGCTTCTTCCACTCCTAC-3' และ WX\_R: 5'-TTTGCCCCATACCTTCTCAAG-3'

- ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบตำแหน่ง SNPs โดยติดฉลากสีทางด้านปลาย 5' ได้แก่ VIG สำหรับตรวจสอบอัลลีล T และฉลากสี FAM สำหรับตรวจสอบอัลลีล G คือ WXprobeT: [VIC]-5'-AAAGATGAGTTGATCG-3' และ WXprobeG: [FAM]-5'-AAAGAGGAGTTGATCG-3'

2.4 การตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ด้วยวิธี TaqMan probes นำดีเอ็นเอมันสำปะหลังจำนวน 84 ตัวอย่าง มาตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ด้วยวิธี TaqMan probes โดยใช้ชุดน้ำยา Type-it® Fast SNP Probe PCR ยี่ห้อ QIAGEN ดังนี้ ใน 1 ปฏิกริยา ให้เติมน้ำยา 2x SNP Probe PCR Master Mix จำนวน 5 ไมโครลิตร 20x primer-probe mix จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 5x Q-Solution จำนวน 1 ไมโครลิตร น้ำปราศจาก RNase จำนวน 2.5 ไมโครลิตร และ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 20 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ด้วยเครื่อง Quant Studio 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 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจากไพรเมอร์และโพรบ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

2.6 บันทึกข้อมูลสรุปผลการตรวจสอบ SNPs

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

3.1 ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง ได้แก่ พันธุ์ที่มีลักษณะ non waxy จำนวน 11 ตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มอะไมโลสสูง ได้แก่ ระยะเวลา 7 ระยะ 9 ระยะ 11 เกษตรศาสตร์ 50 หัวบง 80 และ Mcol1702 กลุ่มอะไมโลสต่ำ ได้แก่ Mbar191 MBra691 MPan70 MPar104 และ MPar25 และพันธุ์ที่มีลักษณะแป้งเหนียว จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ HBW1 และ HBW2

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุณทัยและคณะ (2552) วิธีการข้อ 1.2

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

3.4 บันทึกข้อมูลสรุปผลการตรวจสอบตำแหน่งเครื่องหมาย SNPs ที่ให้ความแตกต่าง

### 4. การทดสอบแป้งในหัวมันสำปะหลังด้วยการย้อมสีไอโอดีน (Iodine Staining Test)

4.1 การทดสอบย้อมสีไอโอดีนในหัวมันสำปะหลัง โดยใช้ตัวอย่างมันสำปะหลังตัวที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วพบว่าเป็นลักษณะจีโนไทป์แบบลักษณะซมร่วม (co-dominant: Wxwx) และลักษณะด้อย (recessive: wxwx) จำนวนทั้งสิ้น 219 ตัวอย่าง ในการทดสอบปริมาณแป้งเหนียวโดยวิธี Iodine Staining Test ตามวิธีของ Aiemnaka และคณะ (2012) ด้วยการตัดสไลด์หัวมันสำปะหลังตามขวางแล้วฉีดพ่นไอโอดีน 20%

4.2 การทดสอบย้อมสีไอโอดีนกับเม็ดแป้งมันสำปะหลัง โดยคัดเลือกตัวอย่างมันสำปะหลังจากข้อ 4.1 จำนวน 51 ตัวอย่าง (ตารางที่ 6.2) มาทำการสกัดแป้งมันสำปะหลังตามวิธีของ Abera และ Rakshit (2003) ด้วยการนำหัวมันสำปะหลังมาล้างทำความสะอาด นำไปปอกเปลือก หั่นเป็นท่อน ชูดให้ละเอียด แล้วคั้นเอาน้ำทิ้ง นำเอาไปอบให้แห้ง จากนั้นนำมาบดแล้วร่อนให้ละเอียด แป้งมันสำปะหลังที่ได้จะนำมาย้อมด้วยไอโอดีนแล้วถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะ การติดสีไอโอดีนของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง

4.3 บันทึกภาพและสรุปผลการทดสอบการย้อมสีไอโอดีน

## การทดลองที่ 7 การพัฒนาเครื่องหมายยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งที่สัมพันธ์กับน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง (เริ่มต้น 2563 – สิ้นสุด 2564)

หัวหน้าการทดลอง นางสาววิภาวี ชื่นโรจน์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

### วิธีการดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย

#### 1. ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง

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

#### 2. ลักษณะผลผลิตมันสำปะหลัง (root yield)

การเก็บลักษณะผลผลิตมันสำปะหลัง (root yield) โดยการชั่งน้ำหนักหัวมันสำปะหลังทั้งหมดในหนึ่งต้นตัวอย่าง หาค่าเฉลี่ย จำนวน 5 ต้นต่อตัวอย่างพันธุ์ และมีหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อต้น

#### 3. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ILP

3.1 ออกแบบไพรเมอร์ โดยนำลำดับเบส EST ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งอย่างน้อย 7 ยีน ที่ได้จากรฐานข้อมูล GenBank เปรียบเทียบกับลำดับเบสจีโนมของมันสำปะหลังโดยใช้วิธี BLAST จากรฐานข้อมูล Phytozome (*Manihot esculenta*) เพื่อทำนายตำแหน่งอินทรอน และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณเอ็กซอนขนาบข้างบริเวณที่คาดว่าจะเป็อินทรอนและออกแบบไพรเมอร์ให้ห่างจากบริเวณที่ถูกทำนายว่าเป็นรอยต่อ exon/intron หรือ splice sites ของมันสำปะหลัง ประมาณ 20 bp ทั้งทางปลาย 5' และ 3' ด้วยโปรแกรม Primer3 โดยกำหนดให้ผลผลิตที่ซีอาร์มีขนาดอยู่ในช่วง 150 - 400 คู่เบส

3.2 ตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบ ปฏิกริยาที่ซีอาร์ปริมาตร 20  $\mu$ L ประกอบด้วย DNA 10 ng, 10X PCR buffer 2  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dNTPs 2.0 mM, ไพรเมอร์แต่ละไพรเมอร์ 0.25  $\mu$ L และ เอนไซม์ Tag DNA polymerase 1 unit อุณหภูมิในการทำพีซีอาร์ ประกอบด้วย อุณหภูมิ denature ที่ 95°C นาน 1 นาที และ 94°C นาน 3 นาที ตามด้วยรอบอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ ที่ 94°C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ตามความเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่ นาน 1 นาที 30 วินาที อุณหภูมิ extension นาน 30 วินาที และ final elongation 72°C นาน 5 นาที ตรวจสอบผลเบื้องต้นด้วยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 2% agarose gel electrophoresis ตรวจสอบวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่องอ่านแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ผลภาพ (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 *MseI* และ *EcoRI* จากนั้นเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA Library) ด้วยการคัดเลือกขนาดสายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว (ประมาณ 200-300 เบส) ต่อปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 2 ด้านด้วย Adapter 2 ชนิด ซึ่งถูกออกแบบให้เข้ากับส่วนปลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สังเคราะห์สายดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบสายเดียวให้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ (illumina platform)

#### 5. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากร

5.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP กับลักษณะน้ำหนักรวมผลผลิตมันสำปะหลัง โดยคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับค่าเฉลี่ยของลักษณะน้ำหนักรวมผลผลิตด้วยการวิเคราะห์สถิติใช้วิธี 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 กับลักษณะน้ำหนักรวมผลผลิตมันสำปะหลัง โดยคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับค่าเฉลี่ยของลักษณะน้ำหนักรวมผลผลิตด้วยการวิเคราะห์สถิติใช้วิธี Mix linear model (MLM) โดยพิจารณาอิทธิพลของโครงสร้างประชากรจากค่า  $Q$  ร่วมกับค่าความเป็นเครือญาติ (kinship) การคำนวณ Association mapping ด้วยโปรแกรม TASSEL 5.0 (Bradbury *et al.*, 2007)

#### 3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

- ไม่มี     มี ได้รับอนุมัติเมื่อวันที่..... (โปรดแสดงหลักฐานในภาคผนวก)
- เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....
- เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

## บทที่ 3 ผลการศึกษา

### 3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

สรุปผลการดำเนินงานที่ทำได้จริง โดยให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของโครงการ (สรุปภาพรวมของโครงการ)

#### การทดลองที่ 1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR สรุปผลการดำเนินงาน

##### 1. การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง (ดำเนินการปี 2561)

การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง โดยทำการศึกษาในมันสำปะหลัง จำนวน 18 ตัวอย่างพันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 54 คู่ไพรเมอร์ และได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ สำหรับนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์และกลุ่มที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีต่อไป

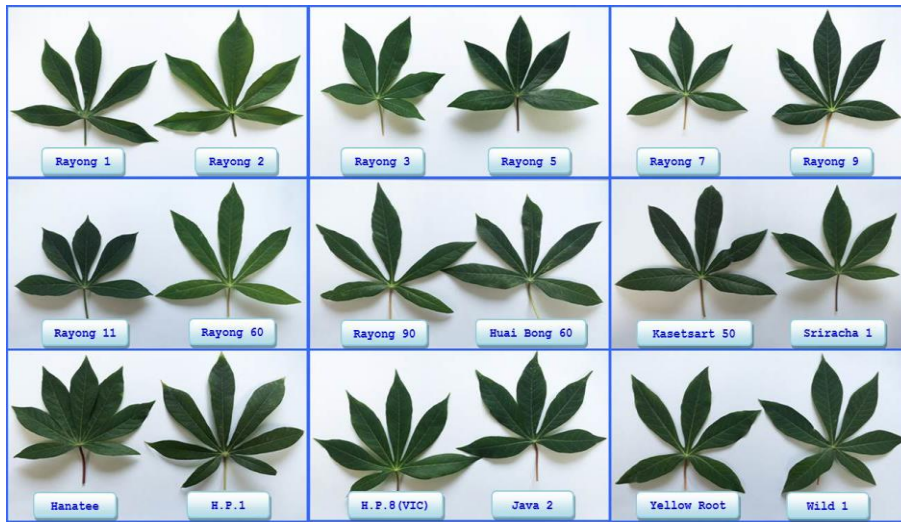
##### 2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลัง (ดำเนินการปี 2562 – 2564)

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 ได้แก่ FAM\_SS147, FAM\_SS148, FAM\_NS911, FAM\_SS20, HEX\_SS59, HEX\_SS149, HEX\_SS21, HEX\_SS151, TAMRA\_SS141, AMRA\_SS51, TAMRA\_SS4, TAMRA\_SS177, ROX\_NS169, ROX\_SS154, ROX\_NS945, และ ROX\_NS78 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 ซึ่งถือว่าการจัดกลุ่มที่มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับปานกลาง สามารถนำไปประโยชน์ในการเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อสร้างลูกผสมให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น

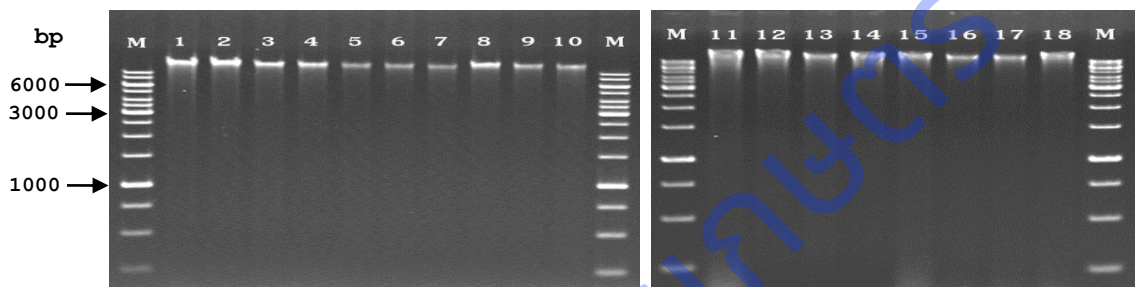
#### ผลการดำเนินงาน

##### 1. การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกพันธุ์มันสำปะหลัง

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 1.1) การสกัดดีเอ็นเอใบมันสำปะหลังโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Plant Genomic DNA Purification (Tiangen Biotech Co, China) และตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 1.2) 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 1.1 ตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษาวิจัย จำนวน 18 พันธุ์



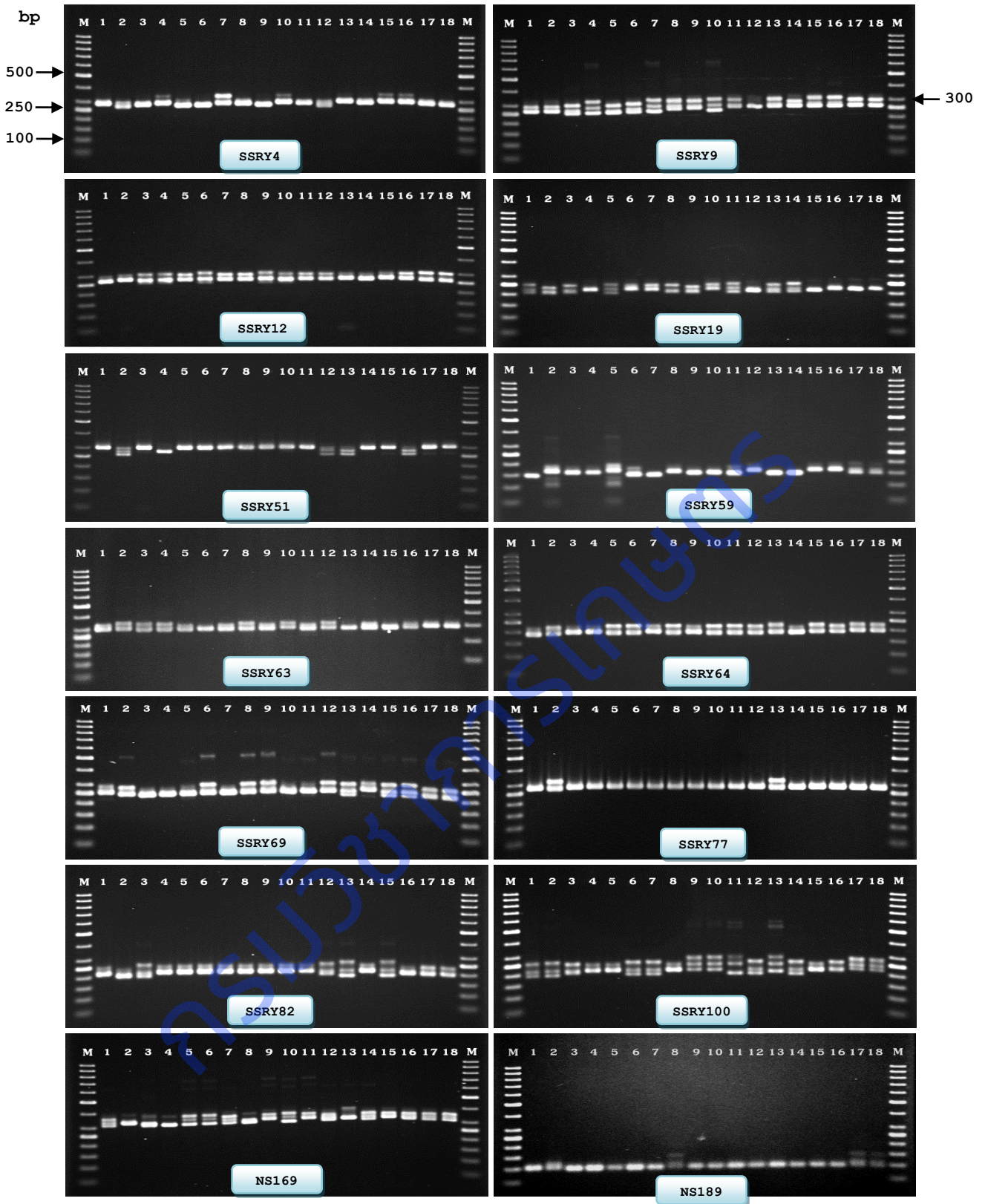
ภาพที่ 1.2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมันสำปะหลัง จำนวน 18 พันธุ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ชนิด SSR ทั้ง 60 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 1.1) พบว่า มีไพรเมอร์ ชนิด SSR จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ หรือคิดเป็น 92 เปอร์เซ็นต์ ของเครื่องหมายที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี PCR (ภาพที่ 1.3) โดยมีสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR อยู่ระหว่าง 55 – 65 องศาเซลเซียส จึงได้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



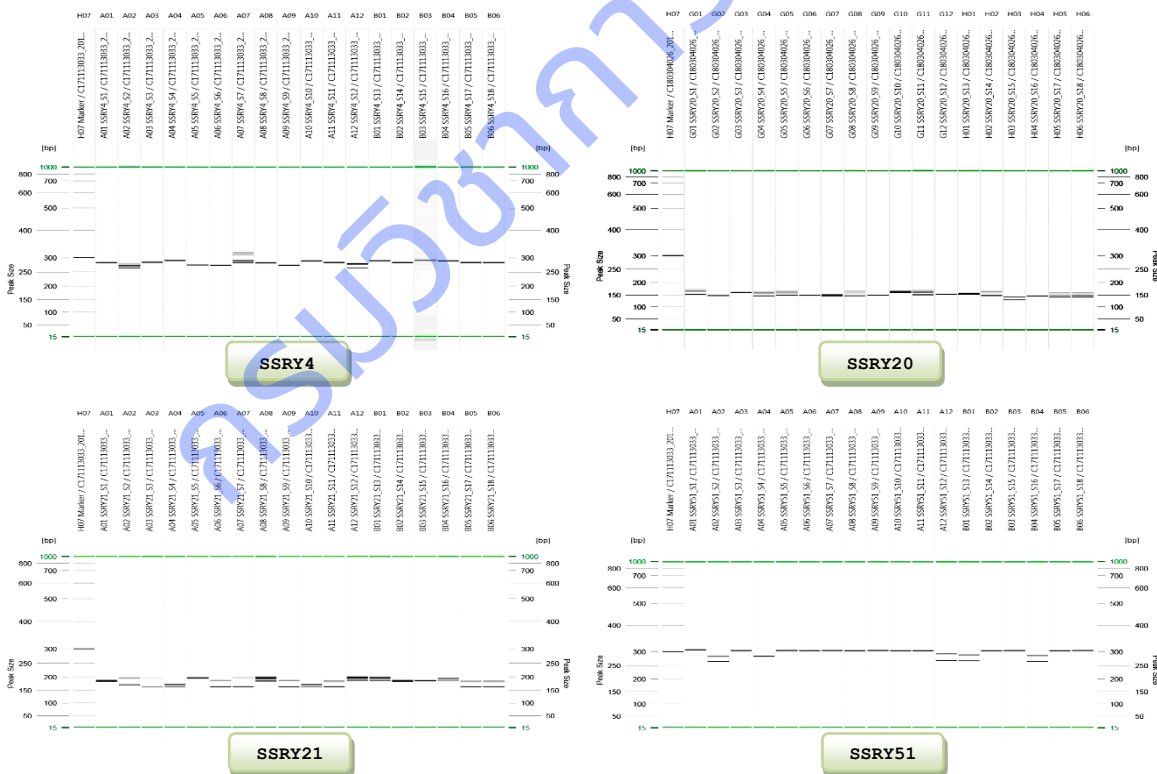
ตารางที่ 1.1 แสดงไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ สำหรับใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลัง

Primer name	Sequence	Product size	Annealing temperature (°C)	Primer name	Sequence	Product size	Annealing temperature (°C)
SSRY4	F: ATAGAGCAGAAGTGCAGGCG R: CTAACGCACACACTACGGA	287	55	SSRY148	F: GGCTTCATCATGGAAAAACC R: CAATGCTTTACGGAGAGCC	114	45
SSRY9	F: ACAATTCAATCATGATCACTCAACT R: CCGTTATTGTCTCGTGGCTCT	278	55	SSRY149	F: AGCAGAGCATTACAGCAAGG R: TGTGGAGTTAAAGGTGTGAATG	500	55
SSRY12	F: AACTGTCAACCACTTCTACTTGC R: GCCAGCAAGGTTTGCTACAT	55	266	SSRY151	F: AGTGAAATAAGCCATGTGATG R: CCCATAATTGATGCCAGGTT	182	45
SSRY19	F: TGTAAGGCATTCCAGAAATATCA R: TCTCCTGTGAAAAGTGCAATGA	214	55	SSRY154	F: ACAATGTCCCAATGGAGGA R: ACCATGGATAGAGCTCACCG	318	45
SSRY20	F: CATTGGACTTCCACAAATATGAAT R: TGATGAAAAGTGGTTATGTCTCT	143	55	SSRY155	F: CGTTGATAAAGTGAAAGAGCA R: ACTCCACTCCCAGTGTCTGC	158	55
SSRY21	R: CAACAATTGGACTAAGCAGCA F: CCTGCCCACAATATTGAAATGG	192	55	SSRY160	F: CTGGCTCTCCAGACACCTT R: GGCAAGAGAAGCCATAAAGC	151	55
SSRY32	F: CAAAATTTGCAACAAATAGAGAACA R: TCCACAAAGTCTGCCATTACA	298	55	SSRY161	F: AAGGAACACCTCTCTTGAATCA R: CCAGCTGTATGTTGAGTGAGC	220	55
SSRY34	F: TTCCAGACCTGTCCACCAT R: ATTGCAGGGATTATTGCTCG	279	55	SSRY164	F: TCAACAAAGAAATAGCAGAACTGG R: TGAGATTTCTGAATATTCATTTCACTT	187	45
SSRY38	F: GGCTGTTCTGCTTATTAAC R: GTAGTTGAGAAAATTTGCATGAG	122	55	SSRY169	F: ACAGCTCTAAAACCTGCAGCC R: AACGTAGGCCCTAACTAACCC	100	55
SSRY49	F: TGAAAATCTCAGTGGCAATATTT R: TGCAACCAATAGTCCAAGC	300	55	SSRY171	F: ACTGTGCCAAAATAGCAAATAGT R: TCATGAGTGTGGGATGTTTTTAIG	291	55
SSRY51	F: AGGTTGGATGCTTGAAGGAA R: GGTATGCAGGAGTGTCAACT	298	55	SSRY172	F: TCCAACTGGCTTAACTTGAGG R: TTTAGTTTTTGAACAATGATGAAA	201	55
SSRY59	F: GCAATGCAGTGAACCATCTTT R: CGTTGTCTTCTGATGTTCC	158	55	SSRY177	F: ACCACAAACATAGGCACGAG R: CACCAATTCCACCAATTACA	268	45
SSRY62	F: CATCTCCAGAAAGTCAATTTTG R: AGCTCATGCCATACAGCAA	250	55	SSRY179	F: CAGGCTCAGGTGAAGTAAAGG R: GCGAAAGTAAAGTCTACAACTTTTCTAA	226	55
SSRY63	F: TCAGAAATCATCTCCTTGCCA R: AAGACAATCATTTTGTGCTCCA	290	55	SSRY180	F: CCTTGGCAGAGATGATTAGAG R: GGGGCATTCTCATGATCAATAA	163	55
SSRY64	F: GACAAGTCGTATATGATATTACCGC R: GCAGAGGTGGCTAACGAGAC	194	55	SSRY181	F: GGTAGACTCGATCGAGGAGG R: CAATCGAAACCGACGATACA	199	55
SSRY69	F: CGATCTCAGTCGATACCCAG R: CACTCCGTTGCAGGCATTA	239	55	SSRY269	F: AATAGTTTCAGGCAAGGGTGA R: TCAATCACAGCCAGACACA	413	58
SSRY77	F: CAGGAGGTGGCAGATTTTGT R: GCATGTTCCACCTGCATAAG	275	55	SSRY280	F: TGTGCTGGAGAGATGACAG R: AAGTCGTTTTATTGCCGATGC	175	60
SSRY82	F: TGTGACAATTTTCAGATAGCTTCA R: CACCATCGGCATTAACCTTTG	211	55	NS77	F: GGACGCACAGTATCTCCAC R: GATAATGGCAGACCGGA	579	55
SSRY100	F: ATCTTTCCTGACATTTTGC R: TTCGCAAGTCCCAATTTTGC	210	55	NS78	F: AGCAATGCCTTGATCTTGAG R: AAGATGGCAATTCAGCAAG	379	55
SSRY102	F: TTGGCTGCTTTCATAATGTC R: TTGAACACGTTGAACAACCA	179	55	NS169	F: GTGCGAAATGGAAATCAATG R: GCCTTCTCAGCATATGGAGC	319	55
SSRY103	F: TGAGAAGGAAACTGCTTGCCAC R: CAGCAAGACCATCACCACTTT	272	55	NS189	F: TGGGCTGTTGCTGATCCTTA R: CATGAGTTTAAAAATTATCACATCCG	104	55
SSRY105	F: CAAACATCTGCACCTTTTGGC R: TCGAGTGGCTCTGCTCTTC	225	55	NS890	F: TAAATTTGGGGTTCTTGCTC R: TGCTTACTCTTTGATTCACAG	324	55
SSRY106	F: GGAACACTGCTTGCAAAAAGA R: CAGCAAGACCATCACCACTTT	270	55	NS911	F: TGTGTTTCAGACGATGTCCAA R: TTGAAGCAGTTATGAACCGT	127	55
SSRY108	F: ACGCTATGATGTCCAAAGGC R: CATGCCACATAGTCTGCTGCT	203	55	NS912	F: GAGAACTCAACCCCATACC R: AAGGGACAGACTTGGTCCAC	356	55
SSRY109	F: TGCTAATTGCAGGAAATAGGAT R: GCAGCTTTTATGCAATCAATCAA	125	55	NS928	F: GATACCCACAAGCCCAAGA R: GACCCACCCATCCACTAGAA	283	55
SSRY110	F: TTGAGTGGTGAATGCGAAAG R: AGTGCCACCTTGAAGAGCA	247	55	NS945	F: GCAAGGCTCCATTAAGTCC R: TGTTTGAAATAGTGTGCTTCTGA	394	55
SSRY132	F: CTTTTGCGACTCTTCTGTC R: TGTCCAATGCTTCTTCTCTT	196	55	NS1010	F: TAGCGATTGCATTTTACCCC R: ACTGCAAAAGCCCTTGAGAGA	500	55
SSRY135	F: CCAGAAACTGAAATGCATCG R: AACATGTGCGACAGTGATTG	253	45	NS1012	F: TGTGATACAATCTAAATGTAGCCCTTC R: TGTGAAATCCACATTTGGTG	350	55
SSRY141	F: TCCAAAATCTTGGTCATTTTGA R: TGCTGTGATTAAGGAACCACTT	262	55	NS1016	F: CTGAAAGGGAATTTTCATGCC R: TGGACTTCGTAATTTTCTGCAC	375	55
SSRY147	F: GTACATCACCACCAACGGGC R: AGAGCGGTGGGGCGAAGAGC	113	45	NS1018	F: GTGCCATGGCTTTGCTATCT R: AGAACATTTCCAGCACACCC	400	45

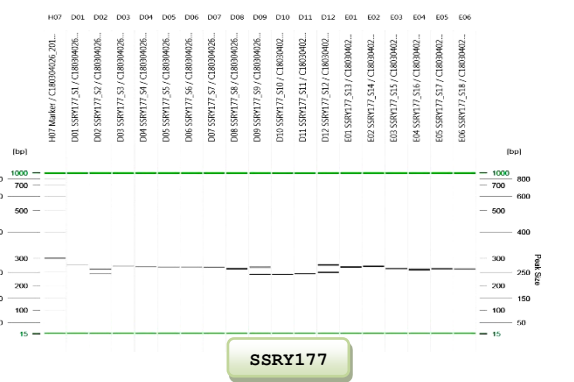
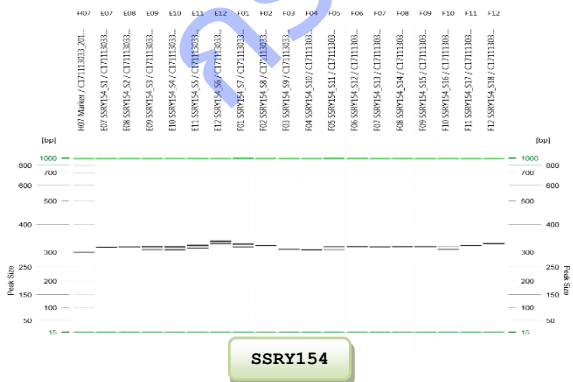
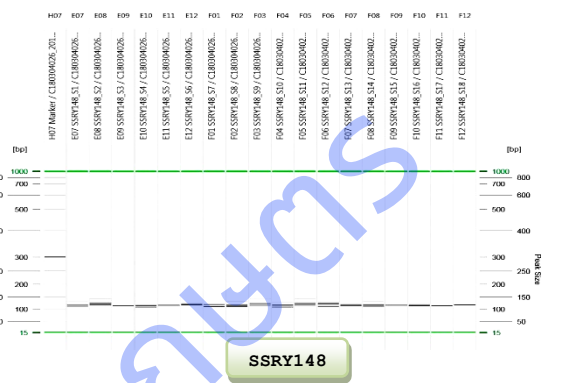
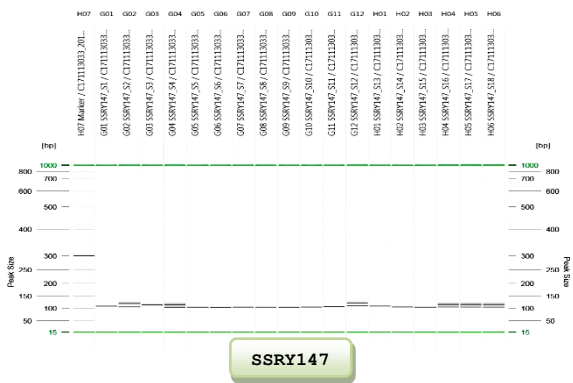
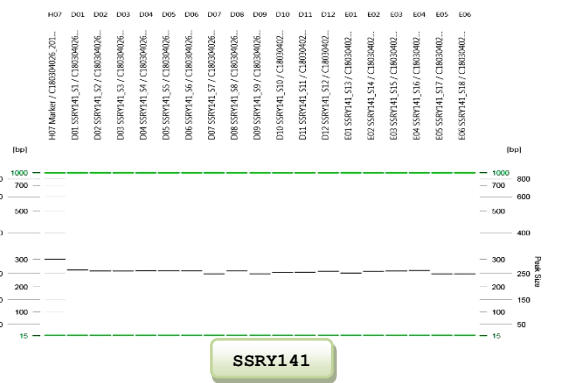
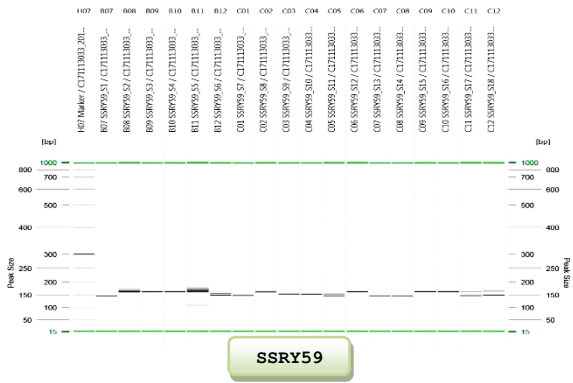


ภาพที่ 1.3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 18 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 10 คู่ ไพรเมอร์, Lane M = 50 bp DNA Ladder, Lane 1 = Rayong 1, Lane 2 = Rayong 2, Lane 3 = Rayong 3, Lane 4 = Rayong 5, Lane 5 = Rayong 7, Lane 6 = Rayong 9, Lane 7 = Rayong 11, Lane 8 = Rayong 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 ไปเข้าเครื่องวิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ผลภาพ (QIAxcel Advanced System) โดยใช้ชุดน้ำยาที่มีความละเอียดสูง (QIAxcel DNA High Resolution Kit) พบว่า ไพรเมอร์ชนิด SSR ทุกคู่ไพรเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี (ภาพที่ 1.4) โดยพบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด จำนวน 265 อัลลีล มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งตั้งแต่ 1 – 8 อัลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.82 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกัน (polymorphic) จำนวน 263 อัลลีล คิดเป็น 97.27 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ที่พบอัลลีลมากที่สุด จำนวน 8 อัลลีลคือ SSTRY100 SSTRY151 SSTRY177 และ NS78 ส่วนไพรเมอร์ที่พบอัลลีลน้อยที่สุด จำนวน 1 อัลลีลคือ SSTRY102 ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 85 – 597 คู่เบส การวิเคราะห์ค่า Polymorphism Information Content (PIC) พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.00 – 0.81 โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.58 โดยไพรเมอร์ที่มีค่า PIC สูงสุดคือ SSTRY19 และ SSTRY177 และไพรเมอร์ที่มีค่า PIC ต่ำสุดคือ SSTRY102 (ตารางที่ 1.2) นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า PIC ที่วิเคราะห์ได้มีความผันแปรตรงกับจำนวนอัลลีลที่ปรากฏ โดยไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากจะมีค่า PIC ค่อนข้างสูง ในขณะที่ไพรเมอร์ที่มีจำนวนอัลลีลน้อยจะมีค่า PIC ค่อนข้างต่ำ แสดงว่าค่า PIC ที่วิเคราะห์ได้น่าจะมีความสามารถในการระบุความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ได้ดีและมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง จึงสามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเครื่องหมายสำหรับนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังได้ดี จากนั้นทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่มีความเหมาะสมและสามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังได้ดี จำนวน 16 เครื่องหมาย ได้แก่ SSTRY4, SSTRY20, SSTRY21, SSTRY51, SSTRY59, SSTRY141, SSTRY147, SS148, SS149, SSTRY151, SSTRY154, SSTRY177, NS78, NS169, NS911 และ NS945 เกณฑ์การคัดเลือก โดยดูจากค่า PIC ที่วิเคราะห์ได้ และจำนวนอัลลีล (allele) หรือแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ซึ่งพบมีจำนวนตั้งแต่ 4 – 8 อัลลีล สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในมันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์และกลุ่มที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีต่อไป



ภาพที่ 1.4 แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 18 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด SSR ได้แก่ SSTRY4, SSTRY20, SSTRY21, SSTRY51, SSTRY59, SSTRY141, SSTRY147 และ SSTRY148 วิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System



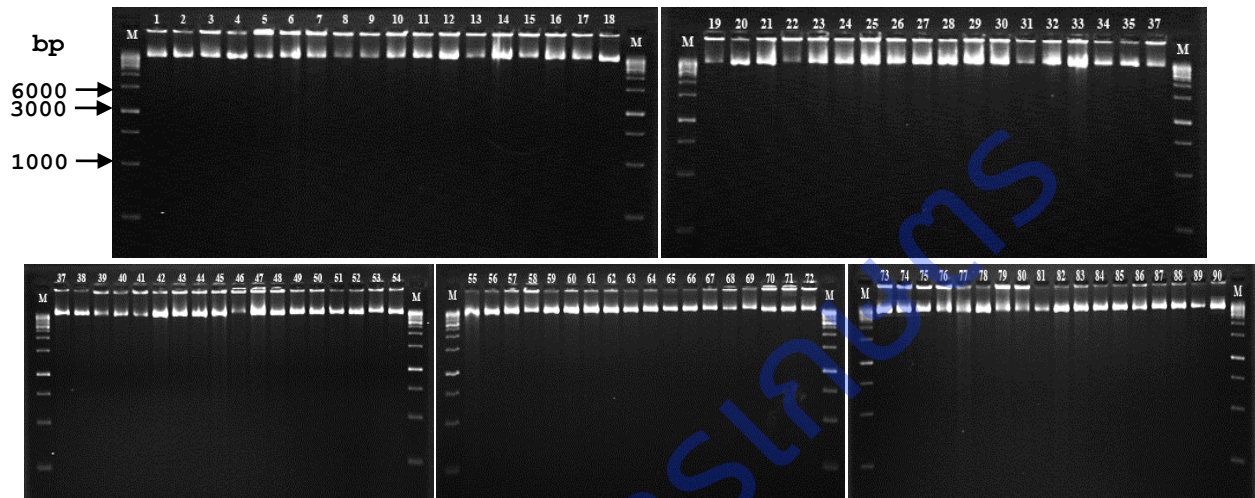
ภาพที่ 1.4(ต่อ) แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 18 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ ชนิด SSR ได้แก่ SSTRY59, SSTRY141, SSTRY148, SSTRY149, SSTRY151 และ SSTRY177 วิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System

ตารางที่ 1.2 สรุปลักษณะ (Tm) ขนาดของอัลลีล (bp) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง % polymorphic และค่า polymorphism information content (PIC) ของมันสำปะหลัง จำนวน 18 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 55 เครื่องหมาย

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

## 2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลัง

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ผ่านการคัดเลือกมาให้มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดี จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 1.3) นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ จากแหล่งรวบรวมพันธุ์ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ประกอบด้วย กลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดัดนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์จากต่างประเทศ (พันธุ์ที่นำเข้ามาจาก CIAT) (ตารางที่ 1.4) ทำการสกัดดีเอ็นเอใบมันสำปะหลังด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Dellaporta และคณะ (1983) เมื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยวัดค่าความเข้มข้น (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 1.5)



ภาพที่ 1.5 แสดงดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี CTAB จากตัวอย่างมันสำปะหลัง จำนวน 90 พันธุ์

ตารางที่ 1.3 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

ตารางที่ 1.4 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์จากต่างประเทศ (พันธุ์ที่นำเข้ามาจาก 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

ตารางที่ 1.4 (ต่อ) รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์จากต่างประเทศ (พันธุ์ที่นำเข้ามาจาก CIAT) ที่นำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์

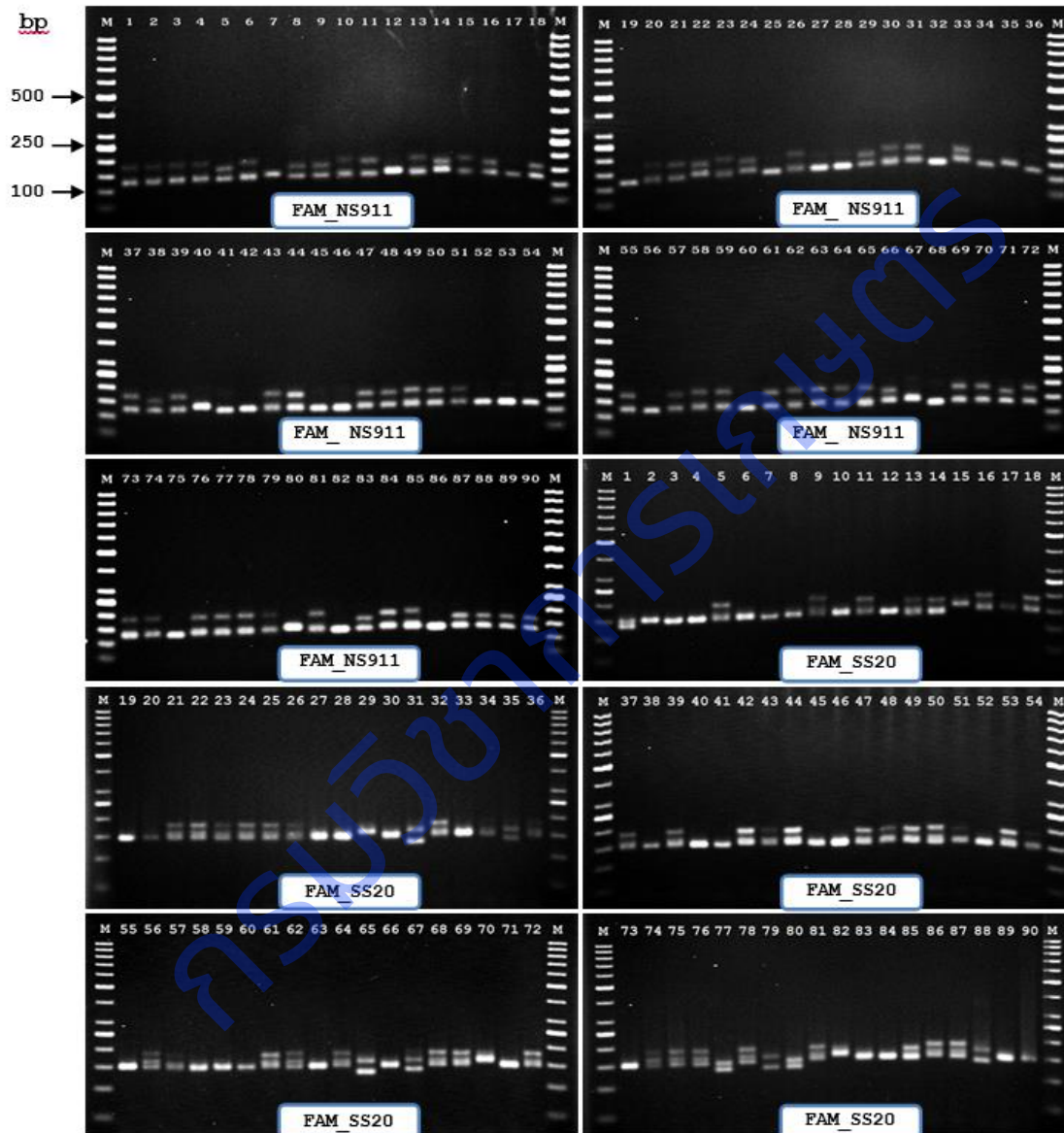
ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์
ST1	CM 125-22	ST31	CMR 26-72-2	ST61	CMR 38-106-32
ST2	CM 305-15	ST32	CMR 28-67-76	ST62	CR 17-82
ST3	CM 407-30	ST33	CMR 28-72-131	ST63	Golden Yellow
ST4	CM 523-7	ST34	CMR 29-56-101	ST64	H.P.5 (CM 305-13)
ST5	CM 781-2	ST35	CMR 29-60-15	ST65	MCOL 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



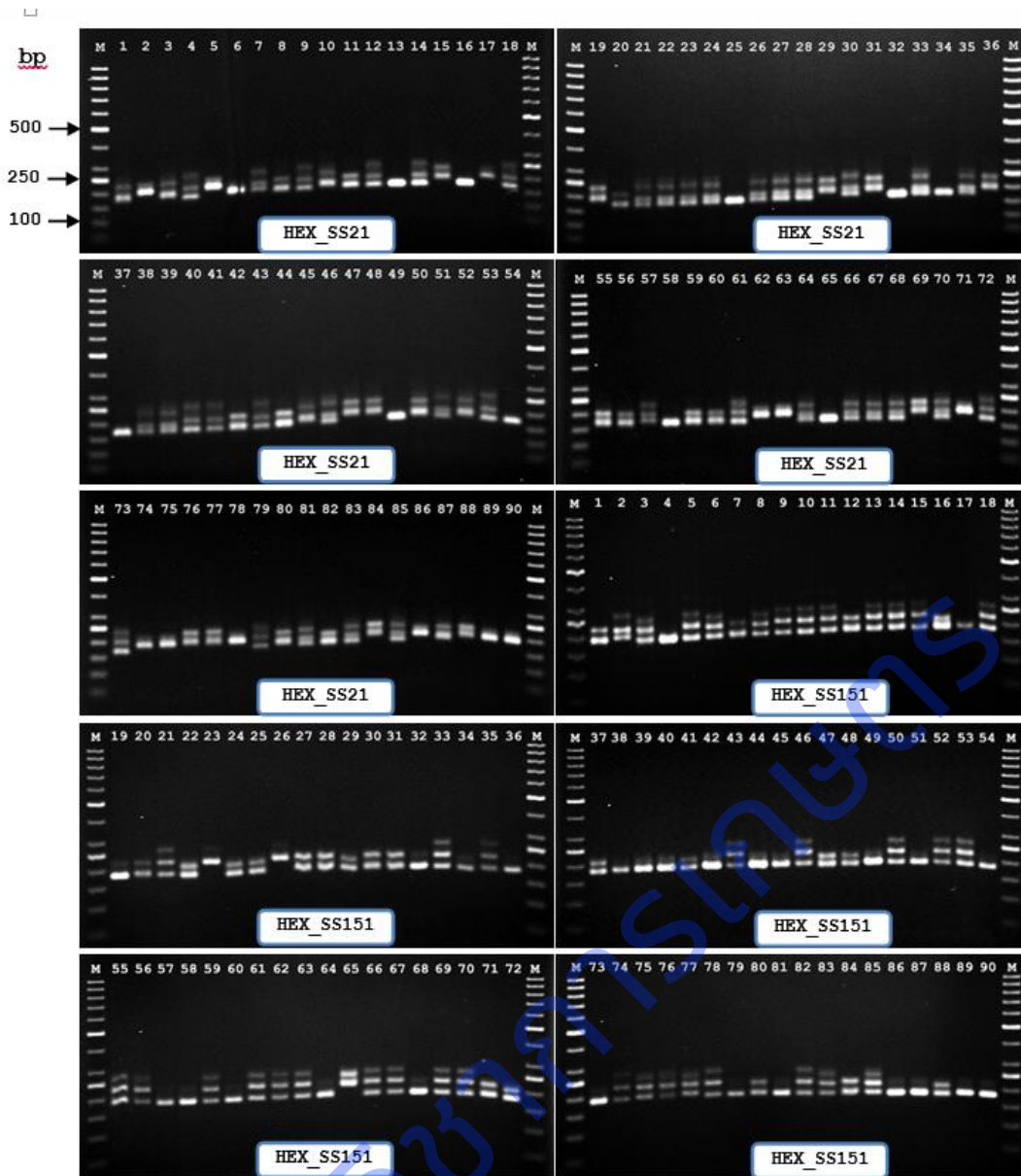
ตารางที่ 1.4 (ต่อ) รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์จากต่างประเทศ (พันธุ์ที่นำเข้ามาจาก CIAT) ที่นำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์

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

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันเป็นสำปะหลัง 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 1.6) ผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้จากดีเอ็นเอของมันสำปะหลังถูกนำไปวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (Fragment Analysis) โดยการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค capillary electrophoresis ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI3730XL และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GeneMapper Software 5 (ภาพที่ 1.7) การบันทึกข้อมูลขนาดดีเอ็นเอ (product size) ของพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์ลงในตาราง excel ได้ข้อมูลทั้งสิ้น จำนวน 4,320 ข้อมูล (ภาพที่ 1.8)



ภาพที่ 1.6 แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 90 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ที่ติดฉลากที่ด้วยสารเรืองแสง FAM\_NS911 และ FAM\_SS20 วิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 1.6 (ต่อ) แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ของมันสำปะหลัง 90 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง HEX\_SS21 และ HEX\_SS151 วิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 1.7 (ต่อ) แสดงผลการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอของน้ำมันสำปะหลัง โดยใช้ไพรมอร์ชนิด 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°S	61-77-1	27-77-10	29-77-5	29-77-19	35-77-22	36-77-3	CM 325-375	CM 343-55	CM 463-2	CM 3299-14	CM 3299-22	CM 4777-2	CM 4125-125	CMC 72	CMC 84	CMH 22-77.1	CMR 4-CMC 70	CMR 25-08-8	CMR 25-17-51		
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		249.9										160.2
3	TAMRA_SS141	Band no.(bp) 1	250.0																				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	260.6	260.7	260.6			
4	ROX_NS169	Band no.(bp) 1			299.9									299.9	300.1		299.9	260.7	260.6	260.6	260.7	260.6	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		315.5	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	158.0	157.8	157.8	157.9	157.9	157.8	157.9	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								271.0	270.9		270.8			
		Band no.(bp) 3					276.2	276.2	276.5			276.3												
		Band no.(bp) 4	278.5												276.4									
		Band no.(bp) 5													279.5				278.6	278.5		279.6	278.5	
		Band no.(bp) 6	297.8	297.6	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									310.3	
		Band no.(bp) 2	320.5	320.4	320.4	320.4	320.5	320.5	320.2	320.5	320.6	320.4	320.9	320.6	320.4							320.2	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	114.4	114.3	114.3	114.2	
		Band no.(bp) 2							118.6	118.5														
		Band no.(bp) 3		122.9																				
10	HEX_SS21	Band no.(bp) 1	126.1		126.1						126.2	126.0	126.1	126.2	126.2	126.0	126.1				127.1	126.1	126.0	
		Band no.(bp) 2		161.3																161.2		161.2		
		Band no.(bp) 3	182.8			169.3	169.2	169.1	169.2	169.1		169.2	169.3	169.3	169.2		169.3						182.8	
		Band no.(bp) 4				182.9	182.8										182.9	182.8	182.8			181.2		182.8
11	TAMRA_SS4	Band no.(bp) 1	192.6	192.6			192.6	192.6	192.7		192.6				192.6		192.6	192.6	192.6	192.6	192.6	192.6	192.6	
		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	382.6							382.4	382.5	382.5	382.5					
		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	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													
		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	142.1	142.2	142.1	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	179.9				179.9	180.0	179.9	179.9						179.9	179.8	179.9	
		Band no.(bp) 3	181.9																					
		Band no.(bp) 4																						
		Band no.(bp) 5										188.0					185.8	185.8	185.8			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.													

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 เฮเทอโรไซโกซิตี (Ho) อยู่ระหว่าง 0.07 – 0.79 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.52 และค่าคาดหมายเฮเทอโรไซโกซิตี 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 1.5)

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 กับ CMR31-42-20, HB60 กับ SPY, 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

ตารางที่ 1.5 สรุปลักษณะ (Tm), ขนาดของอัลลีล (bp), จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง, % polymorphic, ค่าสังเกตเฮเทอโรไซโกซิตี (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) พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังทั้ง 270 ตัวอย่างพันธุ์ ประกอบด้วย กลุ่มพันธุ์ไทยซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์ที่มีมาจากต่างประเทศ (CIAT Core Collection) แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ และกลุ่มย่อยอีก 6 กลุ่ม (ภาพที่ 1.9) 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

**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, CMR29-20-118, 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, CMR53-03-6, CMR47-30-8, CMR51-23-14, CR 19, CMR44-23-34, CMR50-73-6 และ V.22 และ **2)** CMR29-27-5, 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 **2)** 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

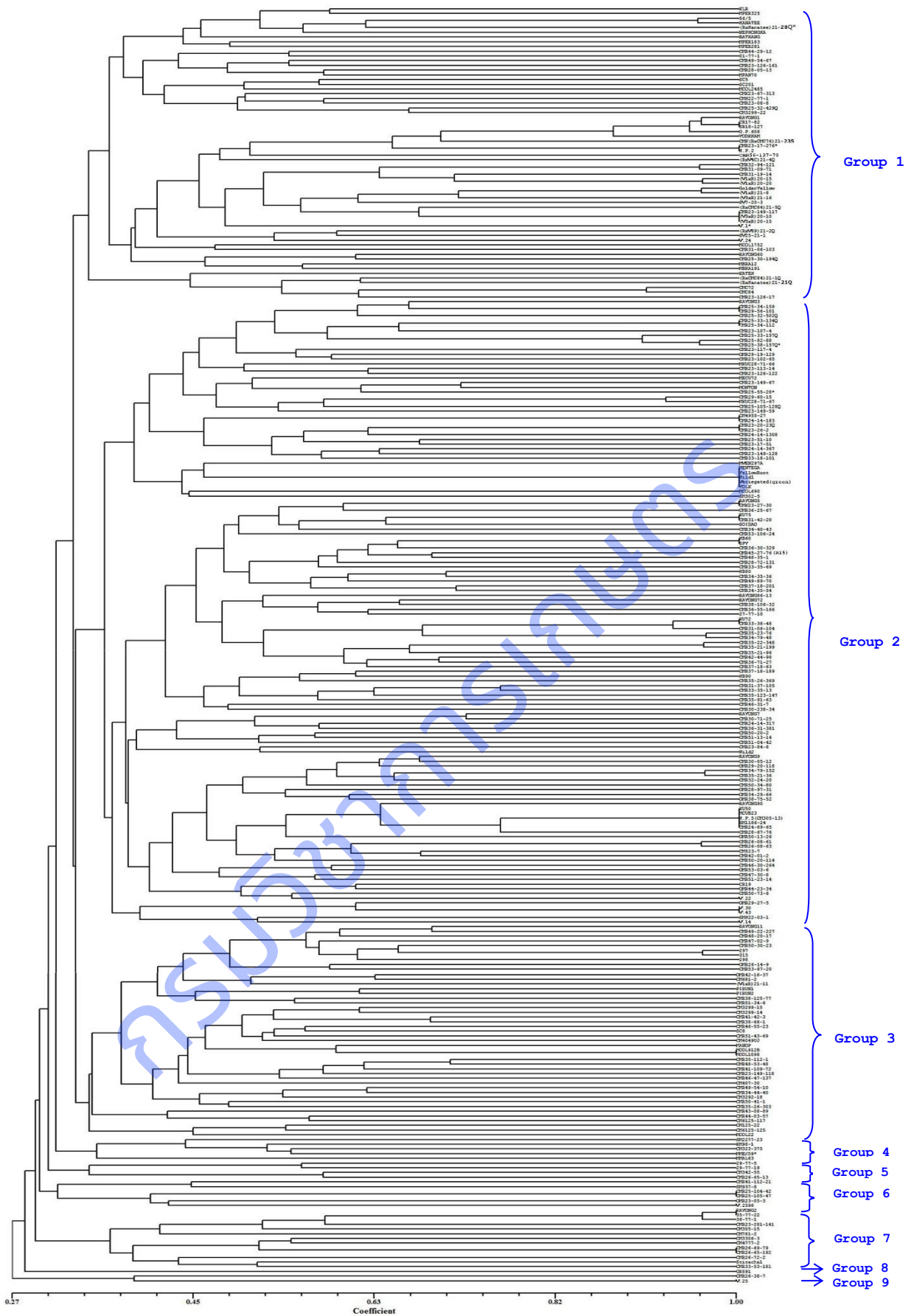
จากผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ พบว่า ในประชากรมันสำปะหลังกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย ซึ่งในกลุ่มย่อยที่ 1 พบเป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีความหลากหลายของประชากรค่อนข้างสูง มีทั้งพันธุ์พื้นเมืองของไทย เช่น เกษตรลพบุรี และ HANATEE ซึ่งคาดว่านำมาจากทางภาคใต้ของไทยผ่านมาทางประเทศมาเลเซีย 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 (สาธารณรัฐโบลิเวียแห่งเวเนซุเอลา 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 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 เป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีประชากรมันสำปะหลัง ทั้งพันธุ์พื้นเมืองของไทย 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, กลุ่มพันธุ์ลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่อยู่ในกลุ่มประชากรเดียวกัน 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 และกลุ่มพันธุ์ที่มาจาก ต่างประเทศ 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 หมายความว่า ค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ ซึ่งค่าอยู่ระหว่าง 0.7 – 0.8 ถือว่าเป็น การจัดกลุ่มที่มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับปานกลาง (Sirithunya *et al.*, 2001) จากผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ พันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ทั้ง 16 คู่ไพเมอร์ สามารถจำแนกความแตกต่าง ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี และพบว่ามันสำปะหลังบางพันธุ์ที่ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้ 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 กับ SPY, 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 ซึ่งอาจแปลผลได้ว่าพันธุ์ มันสำปะหลังดังกล่าวอาจจะเป็นพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) มีค่าเท่ากับ 1 หรือไพเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมยังไม่สามารถแยกพันธุ์ดังกล่าวออกจาก กันได้ จึงจำเป็นต้องศึกษาและค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติมเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ดังกล่าวให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น



ภาพที่ 1.9 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของมันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม UPGMA clustering ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ติดฉากด้วยสารเรืองแสง จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์

## การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียไลบอท์ของมันสำปะหลัง ด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด EST-SSRs

### สรุปผลการดำเนินงาน

#### การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลัง (ดำเนินการปี 2561-2564)

1. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ จำนวน 21 คู่ไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่ผ่านการทดสอบความต้านทานโรคแบคทีเรียไลบอท์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 9 สายพันธุ์ และพันธุ์ลูกผสม จำนวน 82 พันธุ์ ในการเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลบอท์ โดยใช้เทคนิค PCR คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลบอท์ได้ จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ MTAI8, MBBR1, MBBR5, MBBR13, MBBR14, MBBR16, MBBR17, MBBR19 และ MEXPX

2. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ จำนวน 31 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ชนิด EST, ไพรเมอร์ยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลบอท์คือ MEXTS และ MTAI8 จำนวน 21 ไพรเมอร์ และไพรเมอร์ ชนิด SSRY จำนวน 10 ไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่ผ่านการทดสอบความต้านทานโรคแบคทีเรียไลบอท์ จำนวน 11 สายพันธุ์ พบไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 18 คู่ไพรเมอร์ ดังนี้ MBBR1, MBBR4, MBBR5, MBBR7, MBBR9, MBBR10, MBBR13, MBBR17 และ SSrY1, SSrY2, SSrY3, SSrY4, SSrY5, SSrY6, SSrY7, SSrY8, SSrY9 และ SSrY10

3. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ จำนวน 18 คู่ไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 105 พันธุ์ พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ MBBR5, MBBR9, MBBR13, MBBR17 และ SSRY5 พบมันสำปะหลังที่มีแนวโน้มต้านทานโรคแบคทีเรียไลบอท์สูงกว่าพันธุ์อื่น สามารถให้แถบดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานมากถึง 5 แถบ จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ CMR 35-112-1, CMR 41-42-3, CMR 41-109-72, CMR 42-16-37 และ MVEN 297A

4. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ จำนวน 18 คู่ไพรเมอร์ กับกลุ่มพันธุ์ลูกผสม F1 ปี 2558 จำนวน 76 สายพันธุ์ พบมีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ MBBR4 (667 bp), MBBR5 (664 bp), MBBR9 (609 bp), MBBR13 (681 bp), MBBR17 (627 bp) และ SSRY5 (299 bp) ได้พันธุ์มันสำปะหลังที่สามารถคัดเลือกด้วยไพรเมอร์ EST และ SSrY จำนวน 17 สายพันธุ์ โดยมีมันสำปะหลัง จำนวน 6 สายพันธุ์ ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 4 เครื่องหมาย ได้แก่ CMR-58-133-42, CMR-58-170-55, CMR-58-74-141, CMR-58-177-29, CMR-58-35-28 และ CMR-58-20-106 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีแนวโน้มความต้านทานสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ

5. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ จำนวน 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ MBBR9, MBBR13, MBBR17 และ SSRY5 ทดสอบกับกลุ่มพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 พันธุ์ พบไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลบอท์ได้ จำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ MBBR13, MBBR17 และ SSRY5

6. ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลในการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียไลบอท์จากดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 558 พันธุ์ ประกอบด้วย กลุ่มพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 ตัวอย่างพันธุ์ กลุ่มพันธุ์ลูกผสม F1 จำนวน 76 ตัวอย่างพันธุ์ กลุ่มพันธุ์บริโศก จำนวน 144 ตัวอย่างพันธุ์ และกลุ่มพันธุ์ลูกผสมปี 2562 จำนวน 138 ตัวอย่างพันธุ์ ทดสอบกับไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ จำนวน 11 ไพรเมอร์ พบมีเพียง 6 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ คือ MBBR4 (667 bp), MBBR5 (664 bp), MBBR9 (609 bp), MBBR13 (681 bp), MBBR17 (627 bp), และ SSrY5 (299 bp)

7. คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังสำหรับทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้ *Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* ได้จำนวน 200 สายพันธุ์ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Association mapping คัดเลือกมันสำปะหลังในแปลงอนุรักษ์พันธุ์มา จำนวน 162 สายพันธุ์ นำมาปลูกในกระถาง 4 นิ้วในวัสดุปลูกขุยมะพร้าวจนมีใบจริงจำนวน 3 ใบ จึงนำไปทดสอบพีโนไทป์ด้านการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยให้คะแนนความต้านทานระดับ 0-5 จากการประเมินความรุนแรงของอาการใบไหม้สามารถคัดเลือกมันสำปะหลังที่มีแนวโน้มให้ความต้านทานต่อโรคแบคทีเรียไลบอท์ จำนวน 22 สายพันธุ์

## ผลการดำเนินงาน

### การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลและทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายกับพันธุ์มันสำปะหลัง

1. รวบรวมมันสำปะหลังที่ได้รับการทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคแล้ว จำนวน 11 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2.1) (ภาณุวัฒน์ และคณะ, 2558) และคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังและลูกผสม F1 รหัส 58 และพันธุ์ต้านทานปานกลางต่อโรคใบไหม้ จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 91 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2.2) จากนั้นนำใบมันสำปะหลังมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี 2% CTAB (ภาพที่ 2.2) และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมสำหรับทำพีซีอาร์ต่อไป

### ตารางที่ 2.1 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	ค่อนข้างอ่อนแอ
6	MBRA 781	ต้านทานปานกลาง			

### ตารางที่ 2.2 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม F1 จำนวน 80 พันธุ์ จำนวน 82 พันธุ์ และพันธุ์ต้านทานปานกลางต่อโรคไหม้ 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-
2	CMR-58-74-109	25	CMR-58-180-01	48	CMR-58-07-49	71	CMR-58-177-
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-
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		



ภาพที่ 2.1 ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

2. ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคใบไหม้ของมันสำปะหลัง (Cassava bacterial blight, CBB) ชนิด EST จากฐานข้อมูลออนไลน์ (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) จากนั้นนำมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อทดสอบหายีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลบิลท์ สามารถออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียไลบิลท์ได้ จำนวน 21 คู่ไพรเมอร์ โดยเป็นไพรเมอร์ชนิด EST จำนวน 19 ไพรเมอร์ และไพรเมอร์ยีนต้านทานแบคทีเรียไลบิลท์คือ ไพรเมอร์ MEXTS และ MTA18 และสังเคราะห์ไพรเมอร์ชนิด SSRY เพิ่มเติมอีก จำนวน 10 ไพรเมอร์ รวมทั้งสิ้น 31 คู่ไพรเมอร์

**Primer MTA18 *Manihot esculenta* cultivar MTA18 cationic peroxidase gene, partial cds**

GenBank: EF645823.1

LOCUS EF645823 1211 bp DNA linear PLN 23-JUL-2016  
 DEFINITION *Manihot esculenta* cultivar MTA18 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

```

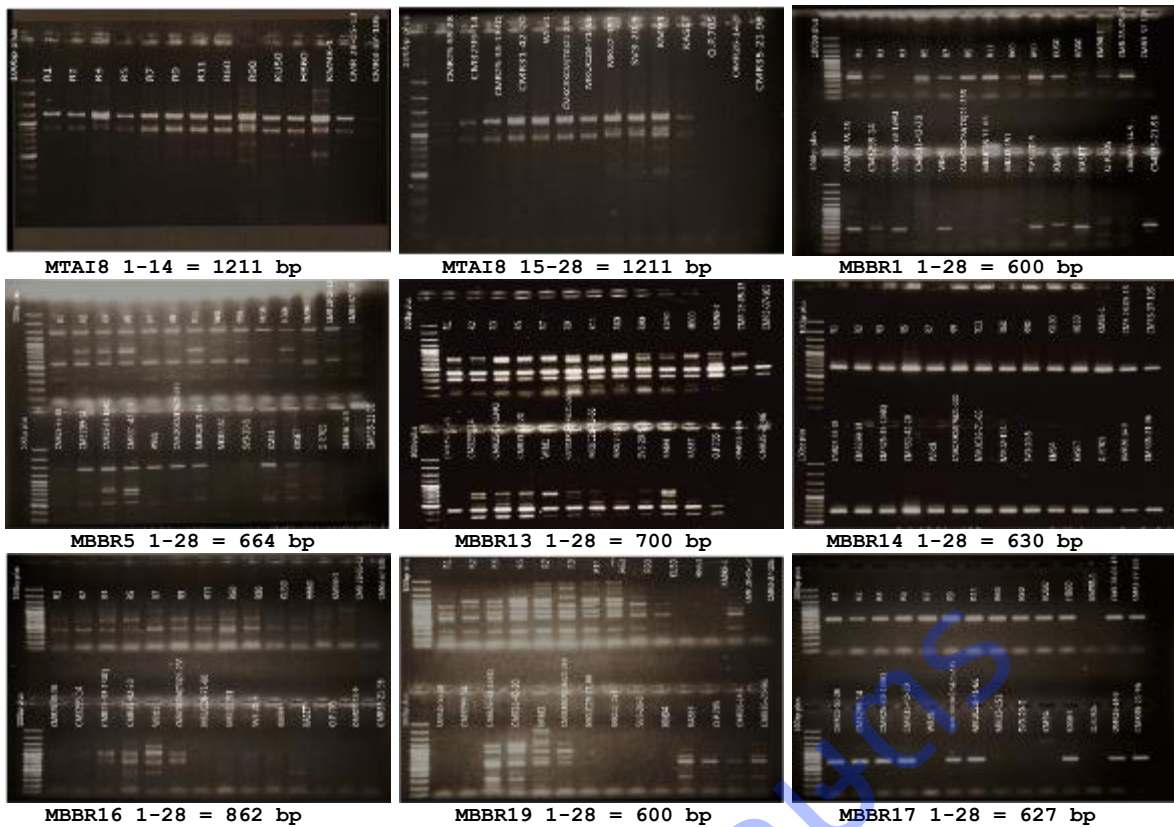
1  gtggagggat gtgagagcat tagaaaggct aaggcattgg tggagagcaa gtgtcctggg
61  gttgtatcct gtgcagatat tcttgcaatt gctgccaagag attatgtcca cctggtatgc
121 ctctgcattt caattcttga tatcccctac tcaatcctta attaaactatt tcaaaactcta
181 gatccttatcc cactcaatca aaacttatta acaatttgga atatattgat ggtaacaaag
241 tcctataaat aatccaaagc atagggctgg tttggtgata taagggaaat caaatttctt
301 gactgtaggt gaaaatataat gttggggtgc tcatactcat aatgcttcca aagtagaaag
361 gtggaaaaag gaagattggt tttgtcattt ttgacaaagt atttataaca aaacaactc
421 ttctaaaaag gcaagaaagt ataaaaaatc attaaagcca tgtgatttga acagctaggt
481 tatttgcctt ttgctagaat caatatctct atgaaagtca agaataataa tcaattaatc
541 cttcaaaaaa taggaccaat gctgtgaaa accaaatgcc tcattcactg gtaacatgat
601 gagagaacta atagacaata agactggcat ttgacttgta ttggttttct aaatgtctca
661 ttcatgggta actggatgtg gtcaatgatt tttattttct caaaactgta ctcttttagt
721 tattttctgt taggataaca atattattat atgaccccaa taataatcat ttgtattatt
781 attaaattag taatttataat tcaaatttct atataaattt tagaaaaatt aactatttag
841 atcatgctaa attcattaat cgatcgttca gttttgaaa atataataaa atatttttaa
901 aatattaaaa tatttttcat aaatctctct aaattttaat ttataaaact cctttttata
961 gacctctatt ttcttctaaa taatcctata atggagtgtc ctaattccat atgctacatt
1021 ttcatgacgc aggcaggggg accttattac caagtgaaga aagggagatg ggatggcaa
1081 atatcaatgg catcaagggt accctataat ctacctcaag caaattcaac cattgatcaa
1141 ctactgaagc ttttcaattc caaaggatta acaccacaag atctagtggg tctctcaggt
1201 gcacacaatc t
  
```

ตารางที่ 2.3 แสดงรายชื่อไพรเมอร์ชนิด EST-SSRs จากการออกแบบไพรเมอร์ยืนด้านทานโรคแบคทีเรียลโบลท์ ในมันสำปะหลัง และไพรเมอร์ SSR ที่ใช้ในการทดสอบ จำนวน 31 คู่ไพรเมอร์

ลำดับ	Primer	Forward primer	Revers primer	Size	ACCESSION
1	MEXPX	CGTCTCCACTTTCATGACTGC	GAAACCTACCCTGTGTGCACC	1561	AF078691
2	MTAI8	GTGGAGGGATGTGAGAGCATTAGA	AGATTGTGTGCACCTGAGAGAACC	1211	EF645823
3	MBBR1	GAAAGATTGAGCCTATATGAT	AAGCTTCTCCGTGTCTCTA	697	FP051588
4	MBBR2	TTGAATTATATTCATGTACAA	CCGTTGGGAGAAAGACCAACT	682	FP059867
5	MBBR3	CACGAGGGTTGAATTTCAAAG	AGATCAAAATATCTCAAATGT	676	DR998076
6	MBBR4	CGAATTCGGTTGCTGTCGCAG	TTCAATCACCACCTCCCGATGAT	667	DT042200
7	MBBR5	CTTAAAGCATCTATATGTTGAC	TGCATGATGATTCAGAATCTCTT	664	DY640542
8	MBBR6	ATCATTGAAAGGTTAGGCTCCC	GATTTGAACCACCTCATCGTGAA	623	DY654068
9	MBBR7	ATCGAATTCGGTTGCTGTCGCC	ATCATGTGACCCATCATTAGCCC	693	GO500242
10	MBBR8	ATCGAATTCGGTTGCTGTCGA	TCTTATTATCTTTTCGAAAGGGGC	623	GO525890
11	MBBR9	GCCAGCATTTTTTTTTTTTTT	TCCGTTGCTGTCGGTATCG	609	GO565744
12	MBBR10	TAATCTACAAACATTGTCAACATT	GTAGTTTGTAGATATAGAGTACGGAGAG	868	FP030363
13	MBBR11	TCTGTTTAAGTGATGAGATCATAT	GAGTCGCAATCTCACCTTTAAA	472	FP045391
14	MBBR12	TTTCTGGCAAACAATATCT	CTCATCTGTAAGAGCCTCTGTAT	703	FP059358
15	MBBR13	TTTAAGGGCAAACAATATCT	TCCTCAATCCCATCTAACTTC	681	FP071698
16	MBBR14	ACTTTTTTCATCCCACAAACA	GTAGTTAAAGATGCCATCAGATTC	630	FP066389
17	MBBR15	TCAAGCTCTCTTGACGTTTCTT	CCAAATACCTAGTATTGGGAGA	669	FP052291
18	MBBR16	TTCTTCTTCTTGAATGTGGA	TTGGCTATCAAAGGGAGAGAAC	862	FP028768
19	MBBR17	ACCAAAGCTTTGTCTACCAT	ATTACCAACGAGTCTGTCTAC	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	CCATCCACTAGAACTTTAAAAGCA	CAACTCAGCGGAGCTTTTTTC	220	
25	SSRY4	CCGCTTAACCTTCTGCTGTC	CAAGTGGATGAGCTACGCAA	271	
26	SSRY5	CATCGCAAATCGTCAAGTA	TGATGCCATGCATTTCACTT	299	
27	SSRY6	ATCTCAGCTTCCAACCTTTTCAGT	CGAAATGCTTGGAGACAGGTATAG	261	
28	SSRY7	AGTTTGCACCACCTTTTTCC	TGTCAAGTGATGAGCTGCTG	261	
29	SSRY8	GCTGCAGAATTTGAAAGATGG	CAGCTGGAGGACCAAAAATG	287	
30	SSRY9	CGATCTCAGTCGATACCCAAG	CACCTCCGTTGCAGGCATTA	239	
31	SSRY10	CGCTATTAGAATTGCCAGCAC	CGCTTGTTGTATCCATTGGC	249	

### การทดสอบหายีนด้านทานโรคใหม่ของมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิค PCR

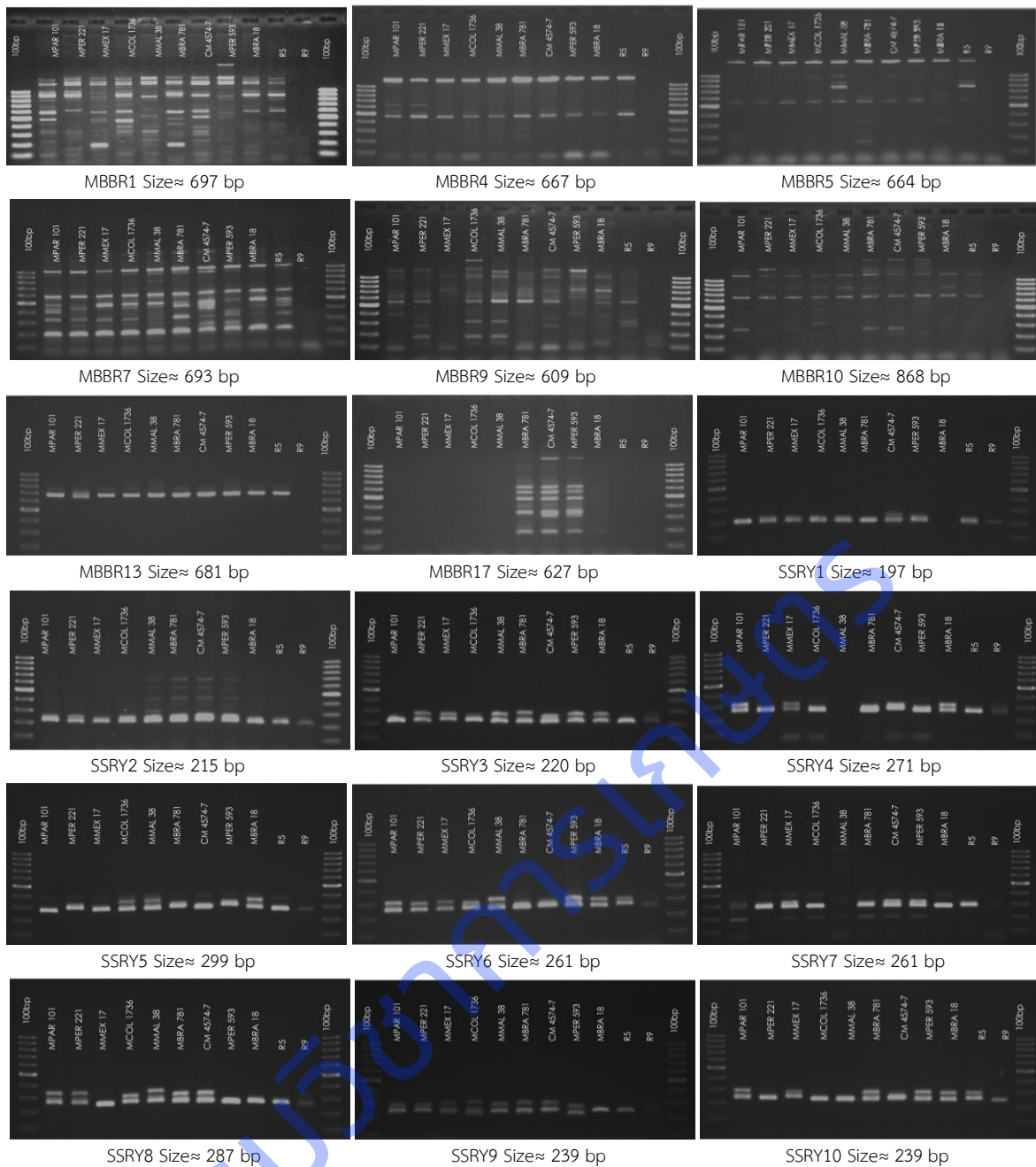
เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของพ่อแม่พันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 28 สายพันธุ์ มาเพิ่มปริมาณยีนด้านทานโรคด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ปริมาตร 20 ul ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ul, DreamTaq Green Master Mix 10 ul, 50 M Primer ด้าน forward และด้าน reverse อย่างละ 1 ul และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 7 ul ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โปรแกรมที่ใช้ทำ PCR ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 94°C (1 นาที) 1 รอบ denaturation ที่ 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 จากนั้นตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 20 ชนิด สามารถคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ 8 ชนิดคือ MTAI8, MBBR1, MBBR5, MBBR13, MBBR14, MBBR16, MBBR17 และ MBBR19 (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 28 พันธุ์

การศึกษาความสัมพันธ์และทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้ทั้งหมดกับมันสำปะหลัง 11 พันธุ์

เมื่อนำดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบความต้านทานโรคแบคทีเรียไลบ์ท์แล้ว จำนวน 11 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2.1) มาเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลบ์ท์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับไพรเมอร์ชนิด EST และ SSR จำนวน 31 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 2.3) 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 denaturation ที่ 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 ตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลบ์ท์ ได้จำนวน 18 คู่ไพรเมอร์ โดยเป็นไพรเมอร์ชนิด EST จำนวน 8 ไพรเมอร์ และ ไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 10 ไพรเมอร์ (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโบลท์กับพันธุ์มันสำปะหลังที่ผ่านการทดสอบความต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโบลท์ จำนวน 11 พันธุ์

#### การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม

เมื่อนำดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสม F1 จำนวน 80 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2.2) ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับไพรเมอร์ยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโบลท์ในมันสำปะหลัง 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 จากนั้นตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ามีเพียง 5 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มจำนวนยีนต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโบลท์ในมันสำปะหลังคือ ไพรเมอร์ MBBR5, MBBR13, MBBR14, MBBR17 และ MBBR19



### 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 2.4) และมีมันสำปะหลังที่มีแนวโน้มต้านทานโรคแบคทีเรียไลบ์ โดยพบว่าสามารถให้แถบดีเอ็นเอของยีนเกี่ยวข้องกับควมต้านทานมากถึง 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 2.4 แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 105 พันธุ์

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ไพรเมอร์					หมายเหตุ
		MBBR13	MBBR 5	MBBR 9	MBBR 17	SSRY 5	
1	เกษตรลพบุรี	✓		✓	✓	✓	เครื่องหมาย ✓ คือไพรเมอร์ที่ สามารถคัดเลือก ได้
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	✓			✓	✓	

ตารางที่ 2.4(ต่อ) แสดงผลการทดสอบไพรมอร์กับดีเอ็นเอในสำปะหลังพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 105 พันธุ์

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ไพรมอร์					หมายเหตุ
		MBBR13	MBBR 5	MBBR 9	MBBR 17	SSRY 5	
36	CMR 38-125-77	✓		✓	✓	✓	เครื่องหมาย ✓ คือไพรมอร์ที่ สามารถคัดเลือก ได้
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	✓			✓	✓	

ตารางที่ 4(ต่อ) แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพ่อแม่พันธุ์ จำนวน 105 พันธุ์

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ไพรเมอร์					หมายเหตุ
		MBBR13	MBBR 5	MBBR 9	MBBR 17	SSRY 5	
80	KM 98-1	✓				✓	เครื่องหมาย ✓ คือไพรเมอร์ที่ สามารถคัดเลือก ได้
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	✓			✓	✓	

**การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม**

จากนั้นเก็บรวบรวมใบมันสำปะหลังลูกผสม F1 ปี 58 จากแปลงศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ทั้งหมด 76 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2.5) จากนั้นนำใบมาสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอและวิธี 2% CTAB แล้ววัดคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส และเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอแล้วนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมสำหรับทำพีซีอาร์ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลโซลด้วยเทคนิค 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 denaturation ที่ 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 จากนั้นตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 2.5 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 2.6) และมีมันสำปะหลังที่มีแนวโน้มต้านทานโรคแบคทีเรียลโบลท์ 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

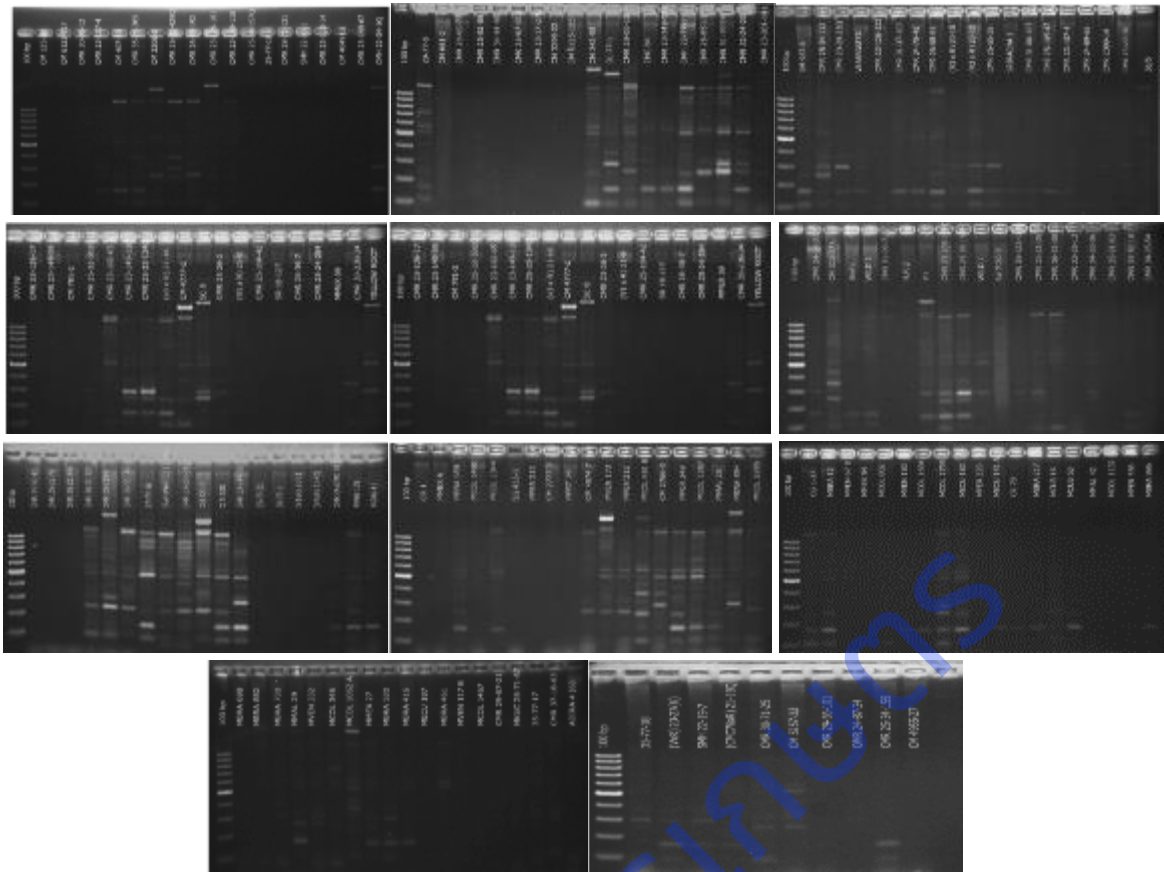
ตารางที่ 2.6 แสดงผลการสอบไพรเมอร์กับมันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสม F1 จำนวน 76 พันธุ์

ลำดับ	พันธุ์	ไพรเมอร์						หมายเหตุ
		MBBR13	MBBR4	MBBR9	MBBR5	MBBR17	SSrY5	
1	OMR-58-45-06	✓		✓		✓		เครื่องหมาย ✓ คือ ไพรเมอร์ที่ สามารถคัดเลือก ได้
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	✓		✓		✓	✓	

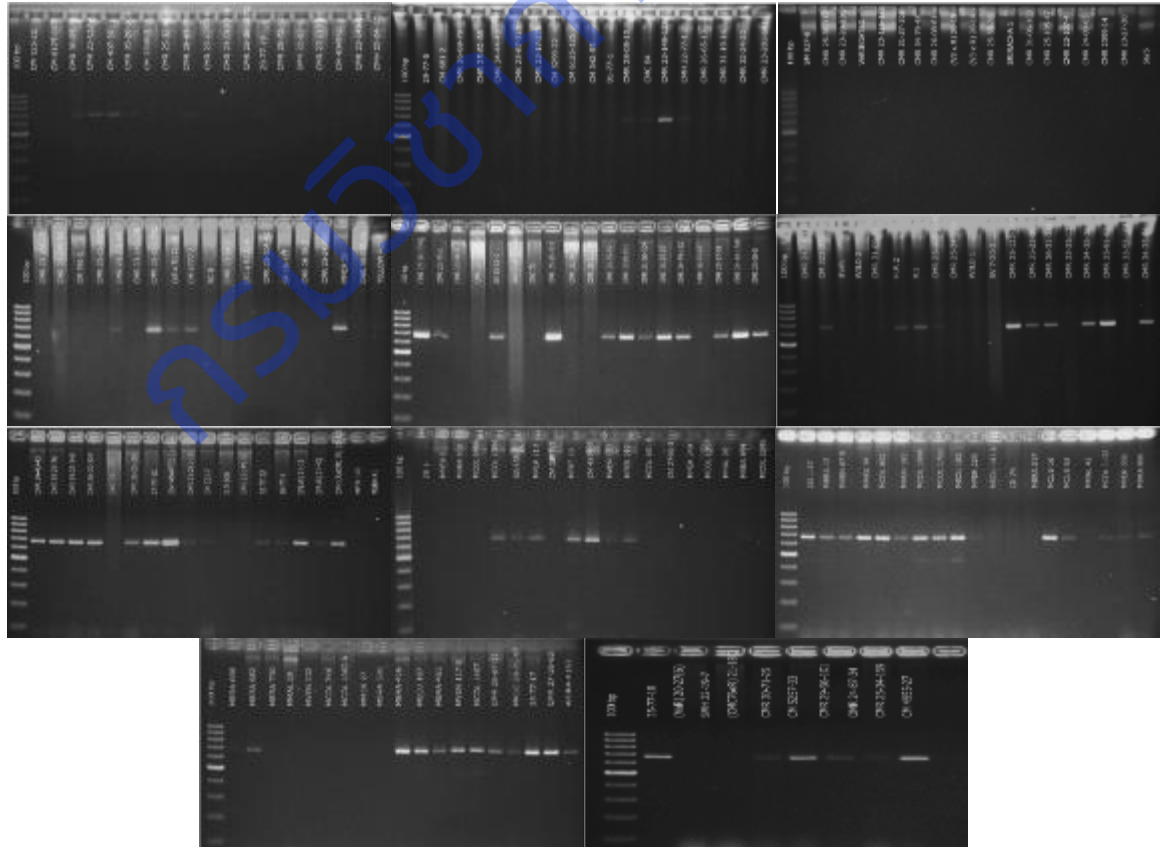
**การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย**

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 2.7) นำดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทยที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลบิลท์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) กับไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 2.4) ผลการทดสอบการเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลบิลท์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จากดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย พบว่า MBBR 9 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลบิลท์, MBBR 13 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ  $\approx$  681 bp ทั้งหมด 74 ตัวอย่าง, MBBR 17 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ  $\approx$  627 bp ทั้งหมด 142 ตัวอย่าง และ SSrY5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ  $\approx$  299 bp ทั้งหมด 99 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2.8)

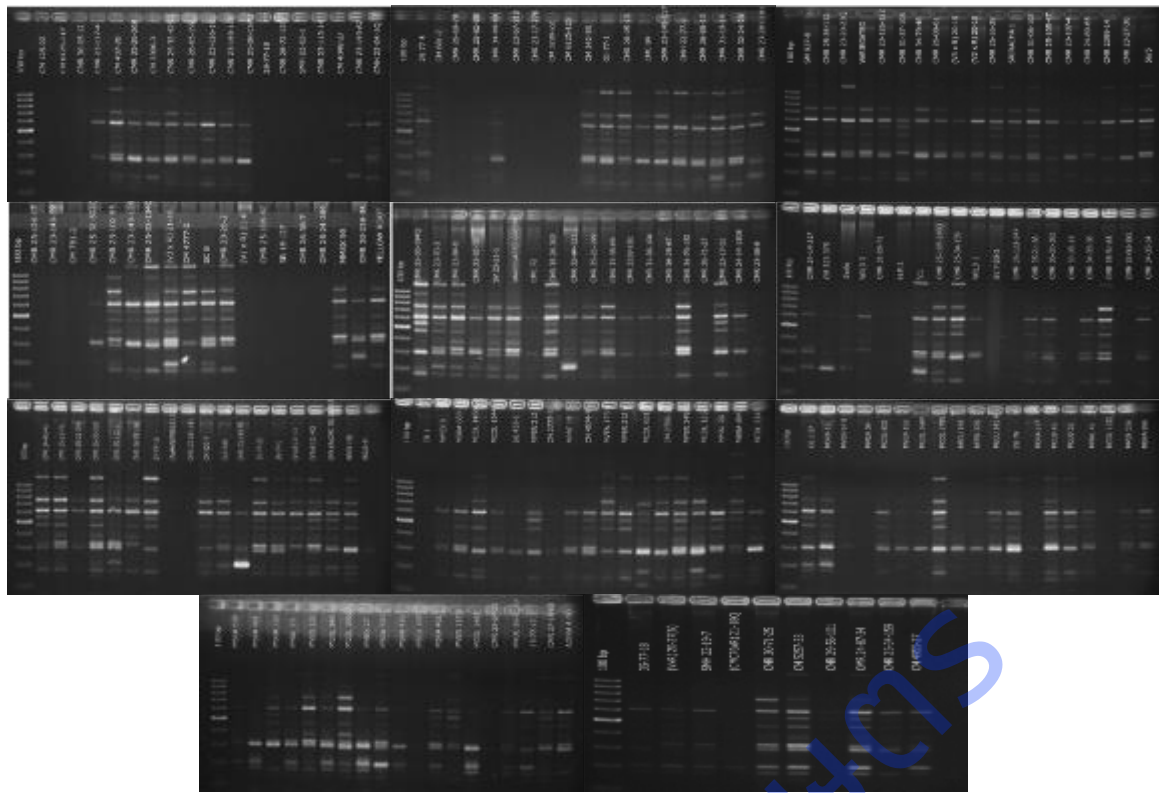
MBBR 9  $\approx$  609 bp



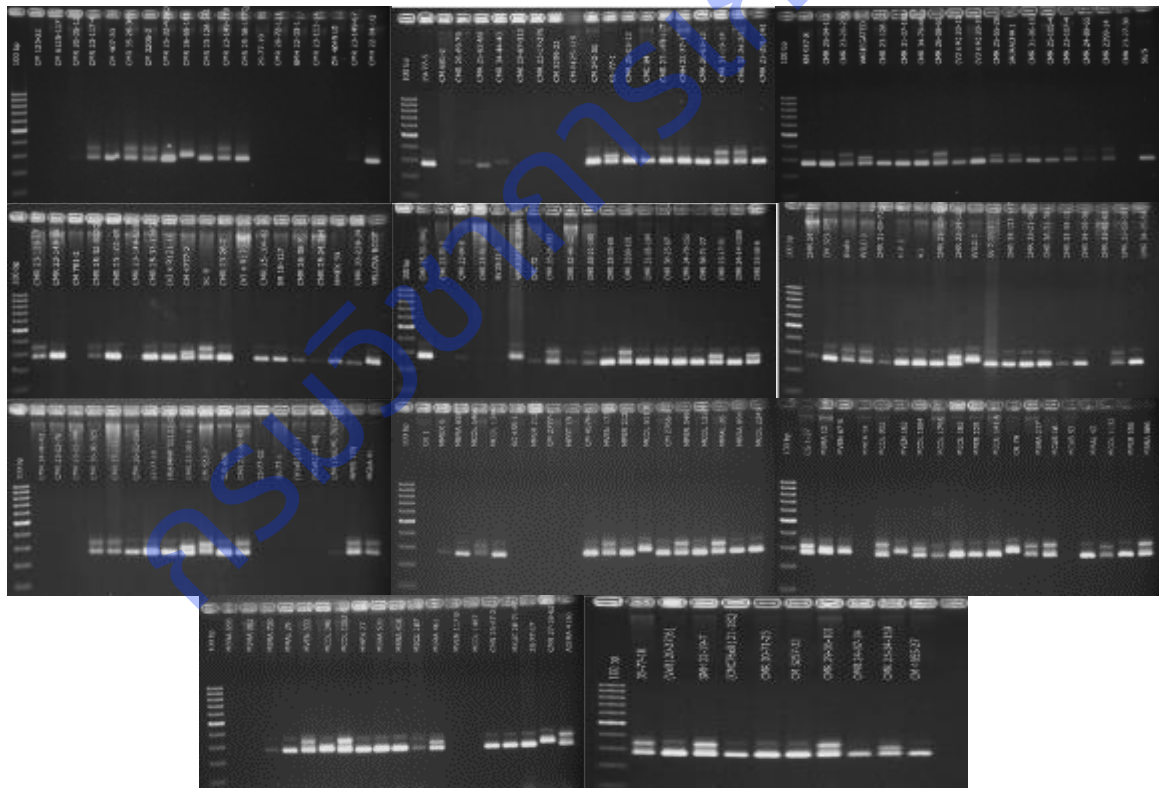
MBBR 13  $\approx$  681 bp



MBBR 17  $\approx$  627 bp



SSRY 5 ≈ 299 bp



ภาพที่ 2.4 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพเครื่องหมายไมโทคอนเดรียกับพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มอนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 พันธุ์

ตารางที่ 2.7 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	(Rx)HANATEE) 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 (Rx)CMC76)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	มันตัน	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



ตารางที่ 2.8 แสดงผลการทดสอบไพรมอร์กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 ตัวอย่าง

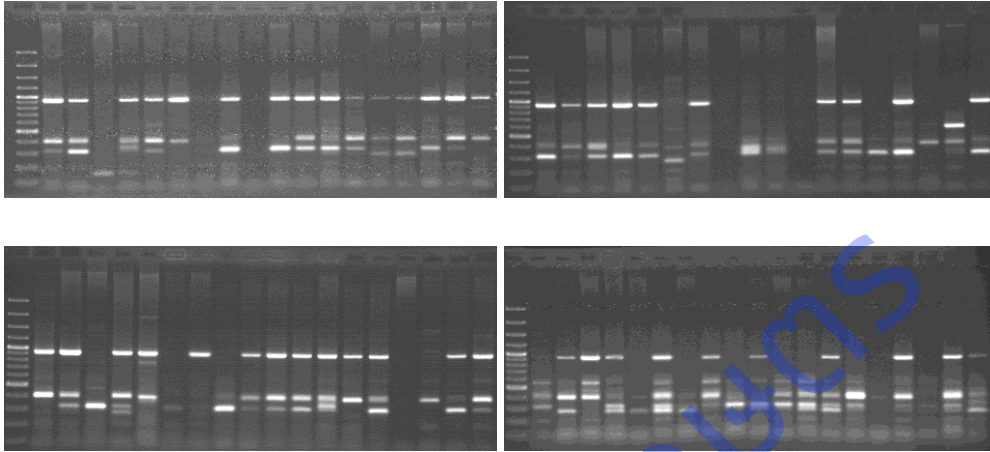
ลำดับ	ชื่อพันธุ์	MBBR1	MBBR17	SSRY5	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	MBBR13	MBBR17	SSry5
1	CM 125-22				51	CMR 31-06-103		✓	✓
2	CM 6125-117				52	CMR 25-105-47		✓	✓
3	CMR 30-05-12				53	CMR 23-107-4		✓	✓
4	CMR 23-117-4		✓	✓	54	CMR 24-89-65		✓	✓
5	CM 407-30		✓	✓	55	CMR 2399-14		✓	✓
6	CMR 35-26-369		✓	✓	56	CMK 23-27-30		✓	✓
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		✓	✓
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	มันตัน			
49	CMR 25-55-28		✓	✓	99	WILD 2		✓	
50	SRIRACHA 1		✓	✓	100	CMR 31-09-71			

ตารางที่ 2.8(ต่อ) แสดงผลการทดสอบไพรมอร์กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 ตัวอย่าง

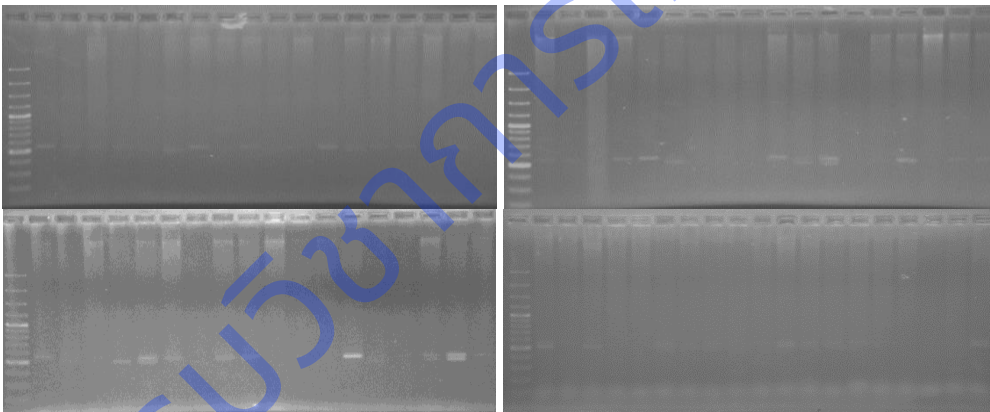
ลำดับ	ชื่อพันธุ์	MBBR1	MBBR17	SSRY5	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	MBBR13	MBBR17	SSry5
101	H.P. 2	✓			151	MBRA 894		✓	
102	V.1	✓	✓		152	MCOL 2245		✓	✓
103	CMR 25-105-		✓		153	CG 1-37	✓	✓	✓
104	CMR 25-34-159		✓	✓	154	MBRA 12	✓	✓	✓
105	WILD 1		✓	✓	155	MVEN 67 B	✓	✓	✓
106	SV 7-20-3				156	MMEX 54	✓		
107	CMR 35-123-147	✓			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	✓	✓	✓

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมาย จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ MBBR10 (868 bp), MBBR12 (703 bp), MBBR4 (667 bp), MBBR5 (644 bp), MBBR7 (693 bp), และ MBBR1 (697 bp) กับตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์สำปะหลังจากแปลงพันธุ์อนุรักษพันธุ์ไทย จำนวน 200 พันธุ์ เพื่อตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด EST และ SSR ให้ได้จำนวนเครื่องหมายเพิ่มขึ้น ผลการทดสอบพบว่า ไพรเมอร์ MBBR10 (868 bp), MBBR12 (703 bp), MBBR4 (667 bp) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ไพรเมอร์ MBBR7 (693 bp) ได้แถบดีเอ็นเอเป็นจำนวนมากแต่ไม่ได้แถบดีเอ็นเอตรงตามขนาดที่ต้องการ ไพรเมอร์ MBBR5 (644 bp) ได้แถบดีเอ็นเอ  $\approx$  500 bp และไพรเมอร์ MBBR1 (697 bp) ได้แถบดีเอ็นเอ  $\approx$  500 bp แสดงดังภาพ

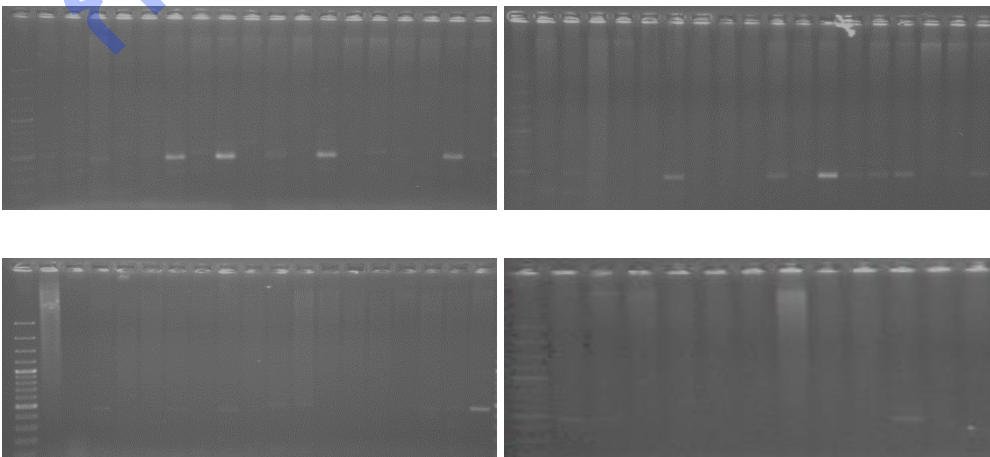
ขนาดแถบดีเอ็นเอไพรเมอร์ MBBR 7 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus



ขนาดแถบดีเอ็นเอไพรเมอร์ MBBR 5 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus



ขนาดแถบดีเอ็นเอไพรเมอร์ MBBR 1 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus



การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์บริโภคและพันธุ์ลูกผสมปี 2562

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังลูกผสมที่เป็นพันธุ์มันบริโภค จำนวน 176 พันธุ์ (ตารางที่ 2.9) และมันสำปะหลังลูกผสมปี 62 จำนวน 138 พันธุ์ (ตารางที่ 2.10) รวมทั้งหมด 314 พันธุ์ นำใบมันสำปะหลังมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัด Nano drop

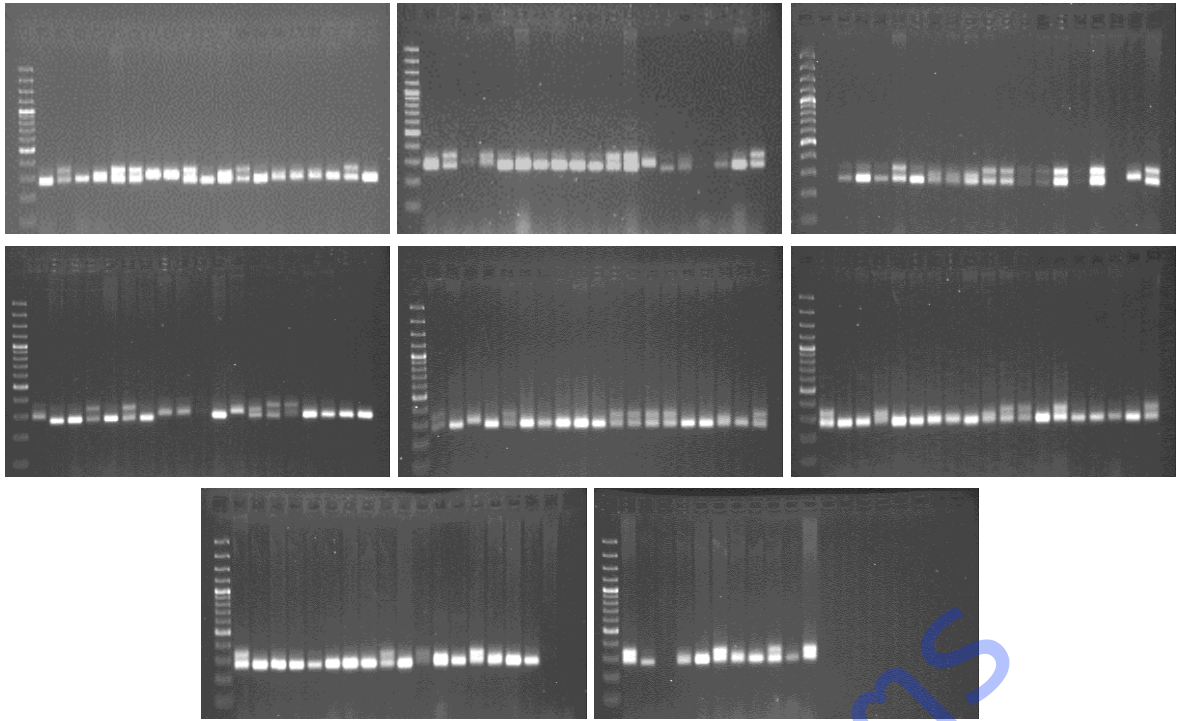
ตารางที่ 2.9 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมที่เป็นพันธุ์มันบริโภค จำนวน 176 พันธุ์

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

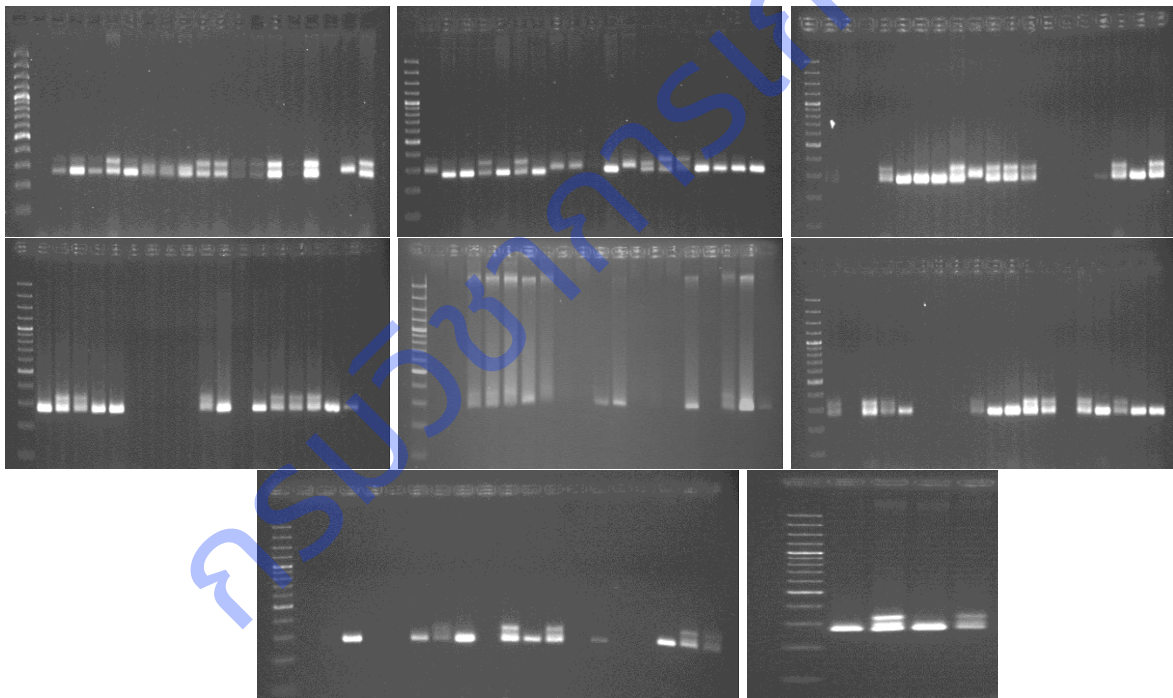
ตารางที่ 2.10 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม ปี 2562 จำนวน 138 พันธุ์

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 ที่ออกแบบและคัดเลือกแล้วกับดีเอ็นเอมันสำปะหลังพันธุ์บริโกล จำนวน 144 พันธุ์ และพันธุ์ลูกผสมปี 62 จำนวน 138 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ SSRy5 พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วได้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงตามการออกแบบคือ 299 bp (ภาพที่ 2.5 และ ภาพที่ 2.6)

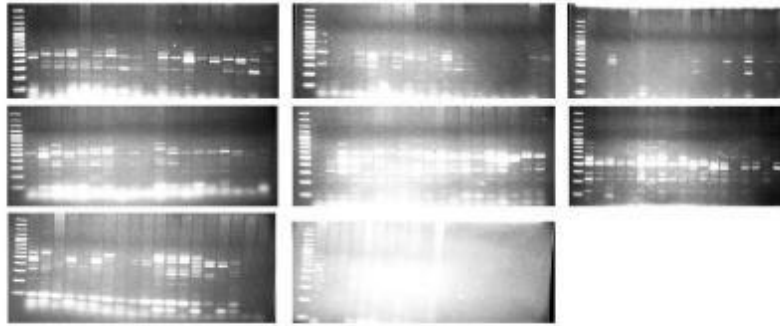


ภาพที่ 2.5 ผลการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสกับพันธุ้มันสำปะหลังบริโภค

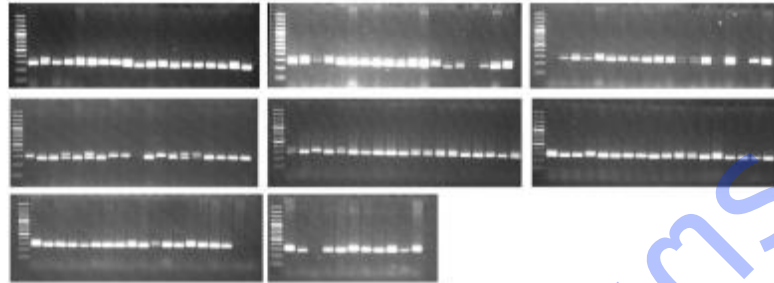


ภาพที่ 2.6 ผลการตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสกับพันธุ้มันสำปะหลังลูกผสมปี 2562

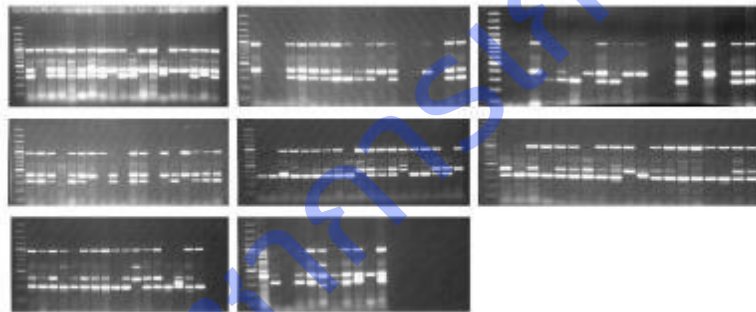
วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและประเมินความใช้ได้ของเครื่องหมายดีเอ็นเอเพิ่มเติม



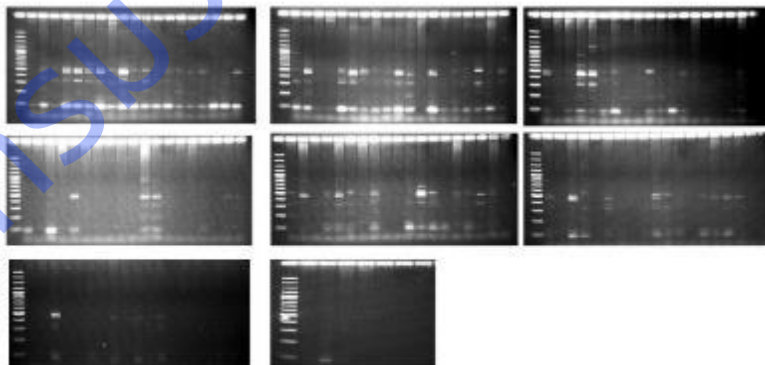
ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ทั่วโลก / โพรบ MBB1 ตัวอย่างที่ 1-144 / 100 bp marker



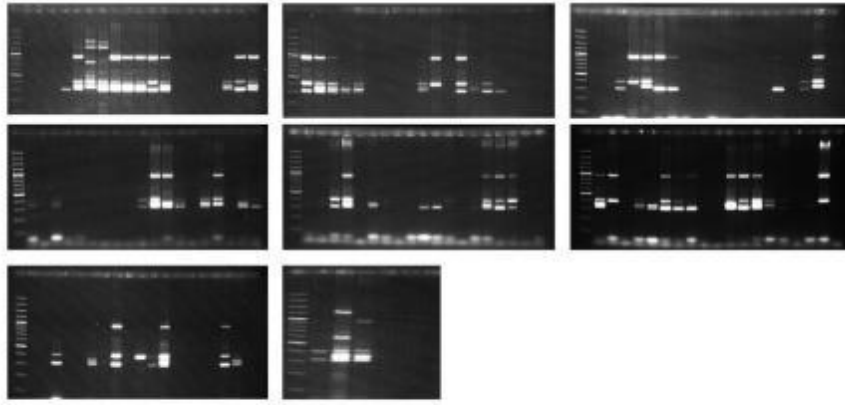
ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ทั่วโลก / โพรบ SSRY ตัวอย่างที่ 1-144 / 100 bp marker



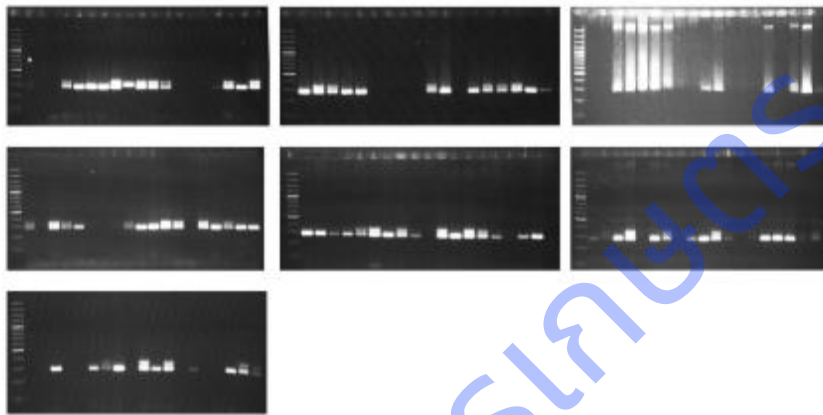
ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ทั่วโลก / โพรบ MBB7 ตัวอย่างที่ 1-144 / 100 bp marker



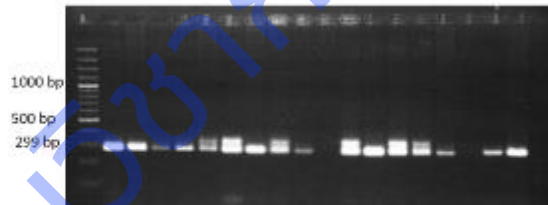
ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ลูกผสม ปี 2562 / โพรบ MBB1  
ตัวอย่างที่ 1-137 / 100 bp marker



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

ทำการคัดเลือกมันสำปะหลัง 200 สายพันธุ์ สำหรับนำมาปลูกทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้ *Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* จำนวน 200 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2.11)

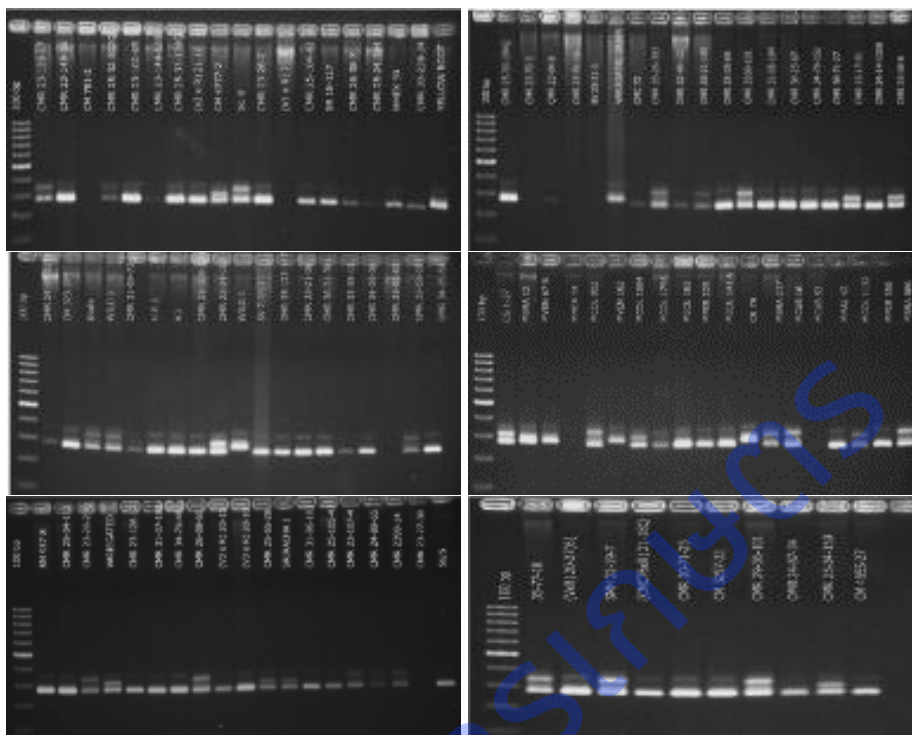


ตารางที่ 2.11 แสดงผลการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลัง 200 สายพันธุ์

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	มันตัน	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

นำโมเลกุลเครื่องหมายที่ผ่านการทดสอบแล้วมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นมันสำปะหลังที่ได้รับการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้ XAM และทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกไว้กับมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้อย่างน้อย 100 สายพันธุ์โดยการทำปฏิกิริยา PCR และตรวจแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

SSRY 5  $\approx$  299 bp



คัดเลือกมันสำปะหลัง 200 สายพันธุ์ จากเทคนิค genotyping ในห้องปฏิบัติการ นำรายชื่อที่คัดเลือกได้ ไปติดตามการปลูกอนุรักษ์ในแปลงอนุรักษ์พันธุ์มันสำปะหลัง ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองแล้วคัดเลือกต้นพันธุ์ที่มีลักษณะดีมา จำนวน 100 สายพันธุ์สำหรับนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้

เตรียมปลูกทดสอบการเกิดโรคแบคทีเรียใบสีกกับเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*

ตารางที่ 2.12 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	

ตารางที่ 2.12(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	

ตารางที่ 2.13 แสดงผลการคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังและการทดสอบการเกิดโรคของมันสำปะหลังในแปลงอนุรักษ์พันธุ์ไทย และลูกผสม 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	

ตารางที่ 2.13(ต่อ) แสดงผลการคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังและการทดสอบการเกิดโรคของมันสำปะหลังในแปลงอนุรักษ์พันธุ์ไทย และลูกผสม 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: การจัดระดับความต้านทานโรคมึเกลนท์การให้คะแนนดังนี้

ระดับความต้านทานโรค 5 ไม่พบอาการโรคใบไหม้

ระดับความต้านทานโรค 4 พบอาการโรคใบไหม้เล็กน้อย

ระดับความต้านทานโรค 3 พบอาการโรคใบไหม้ปานกลาง

ระดับความต้านทานโรค 2 พบอาการโรคใบไหม้ค่อนข้างมาก

ระดับความต้านทานโรค 1 พบอาการโรคใบไหม้มาก

### การทดลองที่ 3 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง Cassava Mosaic Disease (CMD) สรุปผลการดำเนินงาน

#### ดำเนินการปี 2561

การใช้เครื่องหมายโมเลกุล 9 เครื่องหมาย ได้แก่ RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R, EST-K, Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง จำนวนที่ทดสอบ 100 พันธุ์ พบพันธุ์มันสำปะหลัง candidate จำนวน 7 พันธุ์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอและมีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทานโรคใบด่าง TME3 ซึ่งได้แจ้งผลให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองทราบแล้วเพื่อทำการทดสอบความต้านทานกับเชื้อโรคจริง และใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์

#### ดำเนินการปี 2562

การใช้เครื่องหมายโมเลกุล 9 เครื่องหมาย ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง จำนวน 150 พันธุ์ พบพันธุ์มันสำปะหลัง candidate จำนวน 7 พันธุ์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอและมีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทานโรคใบด่าง TME3 ซึ่งได้แจ้งผลให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองทราบแล้วเพื่อทำการทดสอบความต้านทานกับเชื้อโรคจริง และใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์

#### ดำเนินการปี 2563

การใช้เครื่องหมายโมเลกุล 9 เครื่องหมาย ในการคัดเลือกมันสำปะหลังลูกผสมต้านทานโรคใบด่าง จำนวน 251 ต้น (สายพันธุ์) พบลูกผสม candidate จำนวน 46 ต้น ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือเหมือนกับพันธุ์ candidate ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในทั้งเครื่องหมาย RME1 และ NS158 ซึ่งอยู่ใกล้กับโลคัส CMD2 เป็นอันดับที่ 1 และ 2 ตามลำดับ โดยพบลูกผสมจำนวน 13 ต้น ที่มีแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ครบทั้ง 9 เครื่องหมาย 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

#### ดำเนินการปี 2564

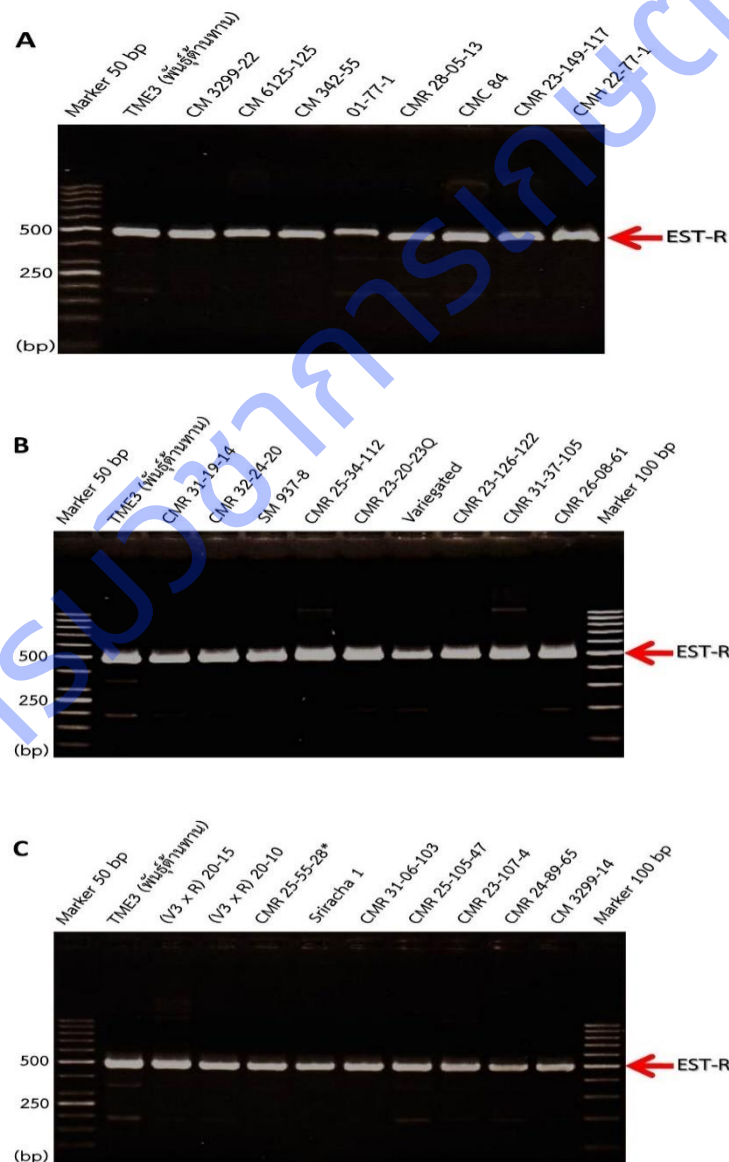
การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมและพันธุ์ต้านทานจาก IITA รวมทั้งสิ้น 401 ต้น ทำการทดสอบกับเครื่องหมาย RME1 และ NS158 ซึ่งอยู่ใกล้กับโลคัส CMD2 เป็นอันดับที่ 1 และ 2 ตามลำดับ พบลูกผสมและพันธุ์ candidate จำนวน 64 ต้น ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3 และเมื่อนำข้อมูลของนักปรับปรุงพันธุ์เกี่ยวกับลักษณะทรงต้นที่ดีสะดวกต่อการเก็บเกี่ยวและลักษณะการเป็นโรคอื่นๆ มาร่วมพิจารณา จึงตัดสินใจคัดเลือกสายพันธุ์ไว้เพื่อดำเนินการทำซ้ำแบบ biological repeat จำนวน 25 สายพันธุ์/พันธุ์ พบสายพันธุ์/พันธุ์ที่มีแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ครบทั้ง 9 เครื่องหมาย จำนวน 3 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้แก่ (1) 920057 จาก IITA (2) 980505 จาก IITA (3) 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 ลูกผสม 2 สายพันธุ์นี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะแสดงฟีโนไทป์ต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังเนื่องจากสืบเชื้อสายมาจากพันธุ์ TME3 โดยตรง

## ผลการดำเนินงาน

ปี 2561 และ 2562: การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างจากเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวนทั้งสิ้น 250 พันธุ์

### 1. การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอีเอสทีชนิดสการ์และชนิดเอสเอสอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R (ตารางที่ 3.1) เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 250 พันธุ์ (ตารางที่ 3.2) พบว่า มันสำปะหลังทุกพันธุ์ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นการยืนยันอีกทางหนึ่งว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์ที่ทำการสกัดมีคุณภาพดีสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้มันสำปะหลัง จำนวน 249 พันธุ์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp ดังภาพที่ 3.1A-C แต่มีเพียงพันธุ์ 01-77-1 เท่านั้นที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งสูงกว่า 500 bp โดยมีขนาดประมาณ 530 bp (ภาพที่ 3.1A) 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



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์คัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค CMD ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R



ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ เอสเอสอาร์ และอีเอสที

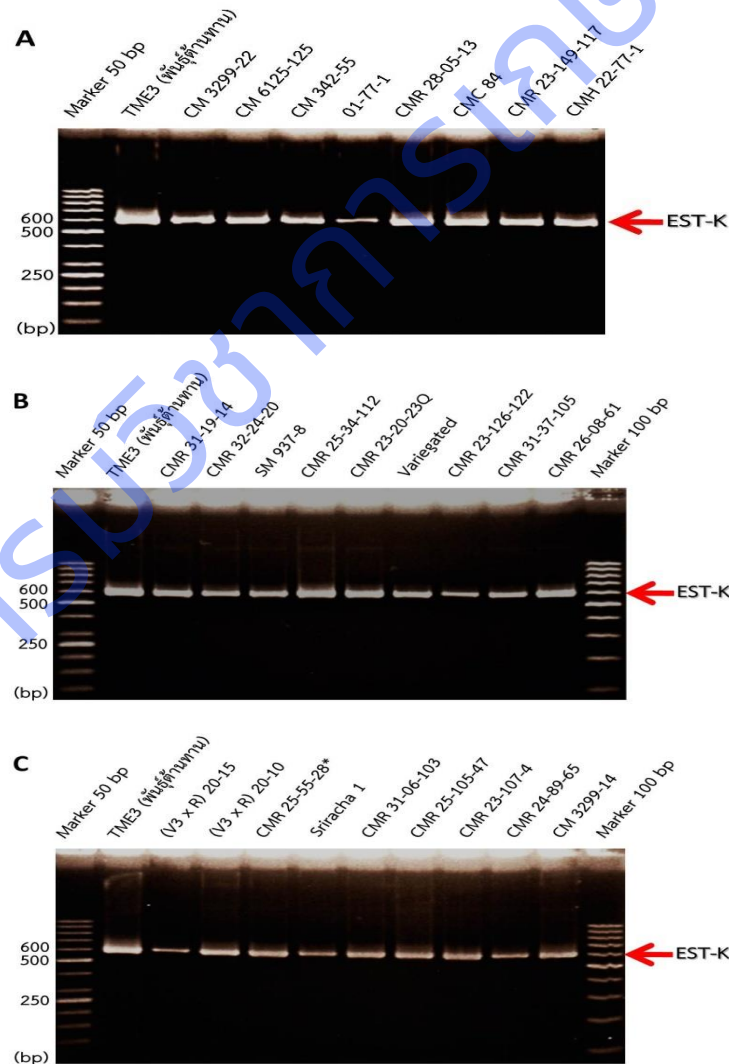
Primer name	Marker type	Sequence (5' - 3')	Annealing temperature (°C) for using with Taq DNA polymerase	Extension time per cycle (sec)	Expected allele size(bp)
RME1	SCAR	F : ATGTTAATGTAATGAAAGAGC R : AGAAGAGGGTAGGAGTTATGT	56	60	700
NS158	SSR	F : GTGCGAAATGGAAATCAATG R : TGAAATAGTGATACATGCAAAAGGA	55	30	166
SSRY28	SSR	F : TTGACATGAGTGATATTTCTTGAG R : GCTGCGTGCAAACTAAAAT	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

ตารางที่ 3.2 รายชื่อพันธุ์มันสำปะหลังที่นำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 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	Maniton	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	Soldao	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
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

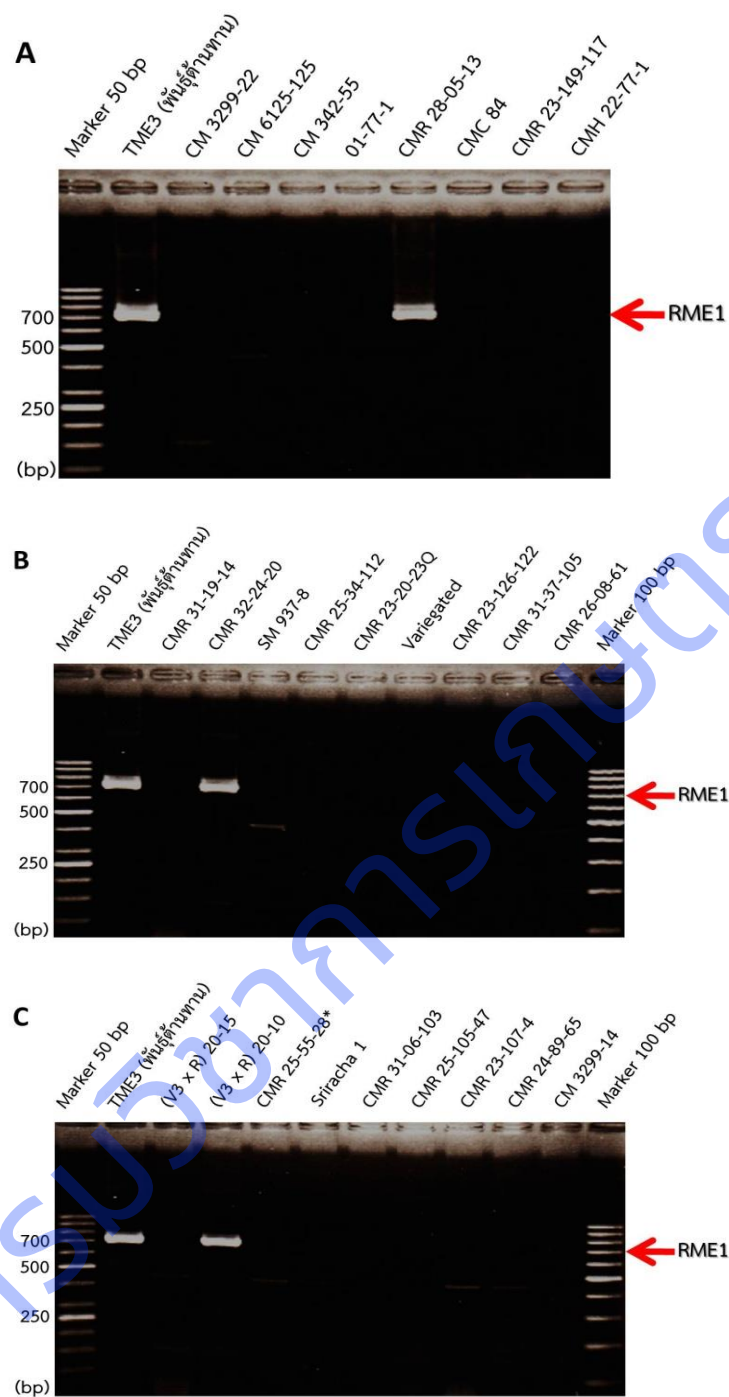
No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety	No.	Variety
25	OMR29 - 20-118	57	CMR49- 22-227	89	NANZHI 199	121	29-77-19	153	(V3 x R) 20-10	185	CMK23-70-3	217	MVEN 174	249	CR25
26	CMR30-71-25	58	CMR49-54-10	90	SC5	122	CMR28-72-131	154	CMR25-55-28*	186	CMR23-84-8	218	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		

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล EST-K เมื่อนำมาทดสอบจีโนมโทปของมันสำปะหลังจำนวน 250 พันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ ตำนาน TME3 ไม่ปรากฏความแตกต่างระหว่างพันธุ์ (ภาพที่ 3.2) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ผลได้เป็น 2 ข้อดังนี้ ข้อที่ 1 ความ ตำนานโรค CMD อาจไม่มีความเกี่ยวข้องกับยีน *Protein kinase superfamily protein* ที่ทำการทดสอบ หรือข้อที่ 2 ความ ตำนานโรค CMD อาจมีความเกี่ยวข้องกับยีน *Protein kinase superfamily protein* ที่ทำการทดสอบแต่แสดงความแตกต่าง ระหว่างพันธุ์ตำนานและพันธุ์อ่อนแอในระดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งไม่สามารถเห็นความแตกต่างได้ด้วยขนาดของแถบดีเอ็นเอ ต้องทำ การหาลำดับดีเอ็นเอหรือ DNA sequencing จึงจะสามารถเห็นความแตกต่างได้



ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างการทดสอบจีโนมโทปคัดเลือกพันธุ์ตำนานโรค CMD ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-K

นำดีเอ็นเอมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1 ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิดสกราร์ที่อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* มากที่สุดโดยมีระยะห่าง 4 เซนติเมอร์แกน (Carmo *et al.*, 2015) เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ดังภาพที่ 3.3

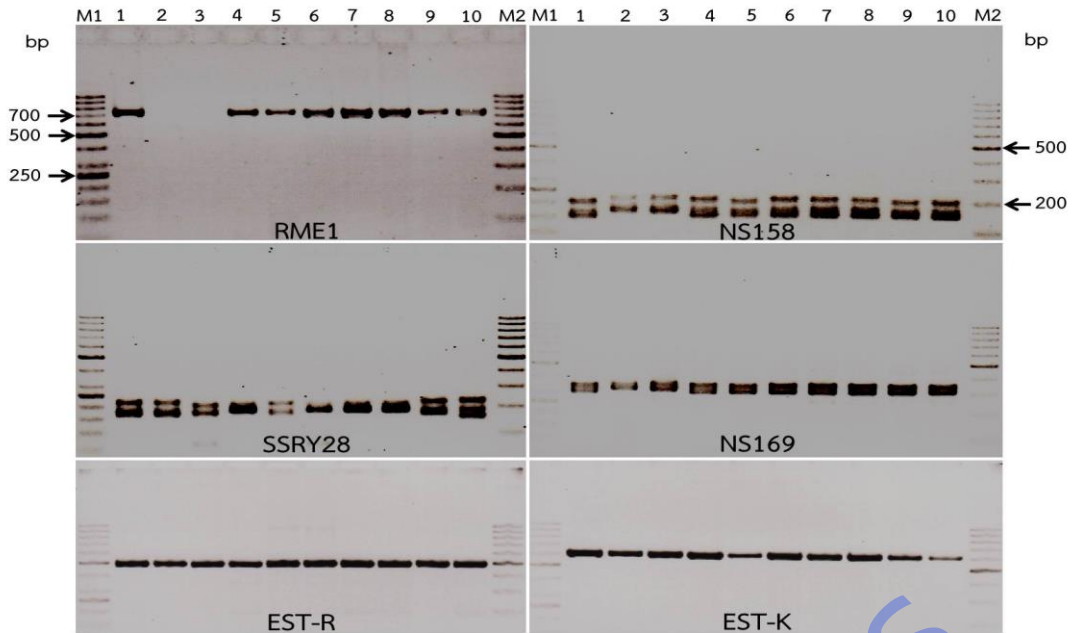


ภาพที่ 3.3 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์คัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค CMD ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1

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 ต้นที่ 7 (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, SRRY28 และ NS169 (ตารางที่ 3.2) เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน TME3 เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกหาพันธุ์ต้านทานโรค CMD

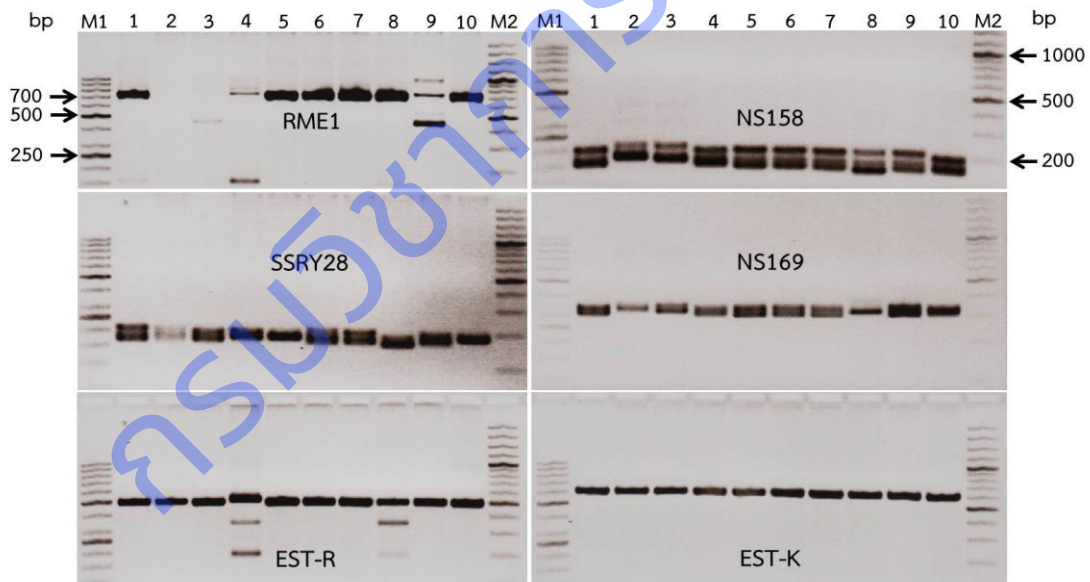
พันธุ์มันสำปะหลัง candidate ที่ต้านทานต่อไวรัสโรคใบด่างจะต้องแสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ทั้งในเครื่องหมายโมเลกุล RME1 และ NS158 เป็นอย่างน้อย เนื่องจากมีรายงานที่ 2 เครื่องหมายโมเลกุลนี้อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* มากที่สุดเป็นลำดับที่ 1 และ 2 ตามลำดับ (Carmo *et al.*, 2015) ขณะที่พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU 50) มีรายงานที่แสดงฟีโนไทป์อ่อนแอต่อโรคใบด่างมันสำปะหลังเมื่อใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะในการถ่ายโคลนไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเข้าสู่ใบมันสำปะหลังหรือเรียกว่าวิธี Agro-inoculation (Bi *et al.*, 2010) และพันธุ์ MCUB 23 แสดงจีโนมที่แตกต่างจากพันธุ์ต้านทาน 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 3.4) 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 3.5) 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



ภาพที่ 3.4 จีโนมไทป์ของพันธุ์ 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 3.5 จีโนมไทป์ของพันธุ์ 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.

## 2. การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับ

จากการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับในยีน *Peroxidase* จำนวน 3 ตำแหน่ง ประกอบด้วย Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 (ตารางที่ 3.3) ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค CMD (Wolfe *et al.*, 2016) ในพันธุ์ candidate 14 พันธุ์ ที่มีความเป็นไปได้ที่อาจจะเป็นพันธุ์ต้านทานโรค CMD จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158, SSTRY28, 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 ตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับทั้ง 3 ตำแหน่งโดยตำแหน่ง Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบโฮโมไซกัส GG, TT และ TT ตามลำดับ (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับในยีน *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

ตารางที่ 3.4 ผลทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับในยีน *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

ผลการทดลองโดยรวมของเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 กลุ่มพบว่า พันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ ตำนาน TME3 ทั้งในเครื่องหมายโมเลกุลกลุ่มที่ 1 เครื่องหมายชนิดสการ์และชนิดเอสเอสอาร์ซึ่งخابข้างอยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* และเครื่องหมายโมเลกุลกลุ่มที่ 2 ที่ประยุกต์มาจาก Expressed sequence tag (EST) ของชิ้นส่วนยีนที่แสดงออกในการ ตอบสนองต่อเชื้อไวรัส CMV รวมทั้งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ตำนาน TME3 ณ ตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นชนิดสนิป รวมทั้งสิ้น 9 เครื่องหมายโมเลกุล (ตารางที่ 3.5) มีจำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ MMAL 63 และ CMR 23-149-59 อย่างไรก็ตามสำหรับพันธุ์ CMR 23-149-59 เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล NS158 ที่อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* เป็นลำดับที่ 2 ได้แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความใกล้เคียงกับพันธุ์ตำนาน TME3 ในช่วงขนาดแถบดีเอ็นเอที่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับ ความต้านทานโรคได้แก่ 166bp (Carmo *et al.*, 2015) แต่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นที่ตำแหน่งบนสุดปรากฏมาด้วย (ภาพที่ 3.5, NS158) ซึ่งได้แจ้งผลการทดสอบจีโนไทป์และรายชื่อพันธุ์candidate ตำนานโรค CMD จำนวน 14 พันธุ์ ให้ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงานทราบ เพื่อนำพันธุ์ candidate ดังกล่าวไปทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรค และใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในการสร้างลูกผสม

ตารางที่ 3.5 สรุปลำดับจีโนไทป์ของพันธุ์ candidate จำนวน 14 พันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ตำนาน TME3

Variety	SCAR and SSR markers				EST markers		SNP markers		
	RME1	NS158	SSRY2	NS169	EST-R	EST-K	Ex2-78	Ex2-157	Ex3-128
			8						
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	✓*	✓	×	✓	×	✓	✓	✓	×

✓ : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ตำนาน TME3

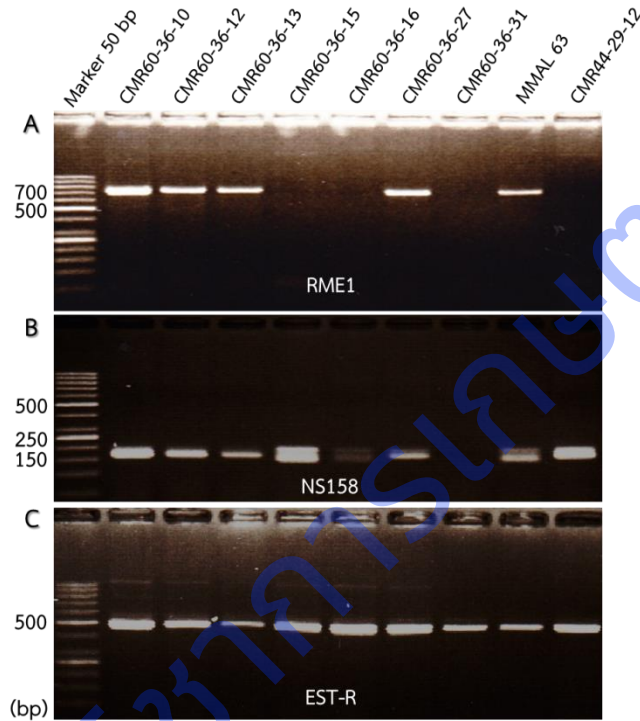
✓\* : แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ตำนาน TME3 ในช่วงขนาดแถบดีเอ็นเอที่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับ ความต้านทานโรค แต่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นปรากฏมาด้วย

× : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับพันธุ์ตำนาน TME3

ปี 2563 และ 2564 : การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างในลูกผสม จำนวนทั้งสิ้น 652 พันธุ์

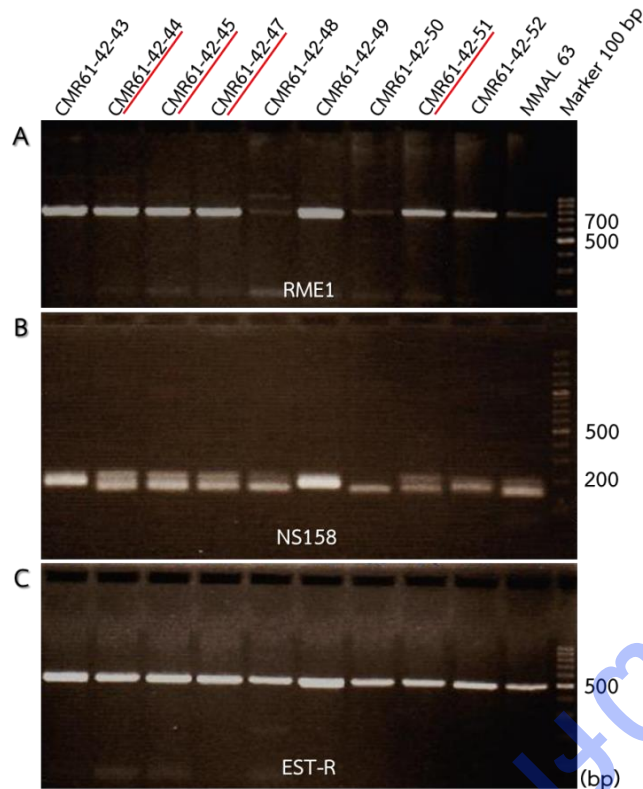
1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังลูกผสมและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Direct PCRทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล EST-R, RME1 และ NS158

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 candidate ที่คัดเลือกได้ในปี 2561) ดังภาพที่ 3.6 และ 3.7 (panel C) ผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันทางหนึ่งว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังแต่ละสายพันธุ์/พันธุ์ที่ทำการสกัดด้วยเทคนิค Direct PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้



ภาพที่ 3.6 ตัวอย่างการทดสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1, NS158 และ EST-R ในลูกผสม CMR 60-36-xxx โดยใช้เทคนิค Direct PCR





ภาพที่ 3.7 ตัวอย่างการทดสอบจีโนมไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล 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 (ตารางที่ 3.6) มีมันสำปะหลังที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ candidate ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในทั้ง 3 เครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 102 สายพันธุ์/พันธุ์คิดเป็น 15.6 เปอร์เซ็นต์ซึ่งคัดเลือกได้ใน ปี 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

ตารางที่ 3.6 รายชื่อมันสำปะหลังลูกผสมที่นำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563 และปี 2564

คู่ผสม	รหัสของลูกผสม	จำนวน (สายพันธุ์)
<b>การคัดเลือกในปี 2563</b>		
<b>ลูกผสมปี 2560</b>		
CMR 44-29-12 x MMAL 63	CMR 60-36-xxx	23
CMR 49-22-227 x MMAL 63	CMR 60-48-xxx	20
<b>ลูกผสมปี 2561</b>		
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
<b>ลูกผสมปี 2562</b>		
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

ตารางที่ 3.6 (ต่อ) รายชื่อมันสำปะหลังลูกผสมที่นำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563 และปี 2564

คู่ผสม	รหัสของลูกผสม	จำนวน (สายพันธุ์)
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
<b>การคัดเลือกในปี 2564</b>		
<b>ลูกผสมปี 2562</b>		
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

ตารางที่ 3.6 (ต่อ) รายชื่อมันสำปะหลังลูกผสมที่นำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค CMD โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 2563 และปี 2564

คู่ผสม	รหัสของลูกผสม	จำนวน (สายพันธุ์)
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
<b>ลูกผสมปี 2564</b>		
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,	8
<b>พันธุ์จาก IITA</b>		
920057	-	1
972205	-	1
980505	-	1
980581	-	1
<b>ลูกผสมมันสำปะหลังเพื่อบริโภคปี 2562</b>		
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

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 จากคู่ผสม CMR 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

## 2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังเพื่อการทำซ้ำแบบ biological repeatและการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอีเอสทีชนิดสการ์และชนิดเอสเอสอาร์

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

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 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์หีใบมันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง พบว่าการสกัดดีเอ็นเอวิธี SDS/NaCl+PVP ให้ปริมาณดีเอ็นเอและอัตราส่วน  $A_{260}/A_{280}$  ซึ่งระบุความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอไม่แตกต่างจากวิธี CTAB (ตารางที่ 3.7) 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 กรัม อัตราส่วน  $A_{260}/A_{280}$  ของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP มีค่าเฉลี่ย 1.822, 1.836 และ 1.820 ตามลำดับ แสดงถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธีมีความบริสุทธิ์หรือคุณภาพดีมีการปนเปื้อนของโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ในระดับต่ำ เนื่องจากดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีนั้นต้องมีค่า  $A_{260}/A_{280}$  อยู่ในช่วง 1.7-2.0 (Maniatis *et al.*, 1982)

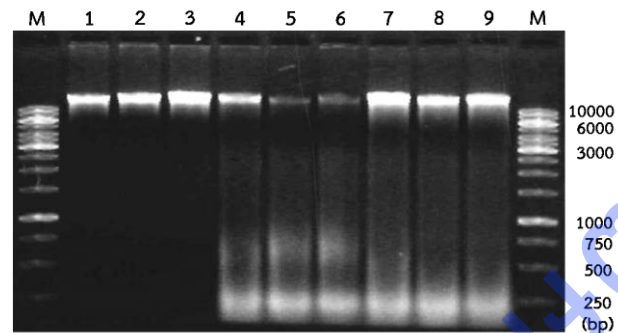
ตารางที่ 3.7 ปริมาณผลผลิตและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP

DNA extraction method	Cassava line	Weight of leaves for DNA extraction (g)	Volume of TE or ddH <sub>2</sub> O to dissolve DNA ( $\mu$ l)	DNA concentration quantified by using spectrophotometer ( $\mu$ g/ $\mu$ l)	DNA yield ( $\mu$ 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
	<b>Average</b>			<b>1.924</b>	<b>1385.5</b>	<b>1.822</b>
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
	<b>Average</b>			<b>0.485</b>	<b>830.9</b>	<b>1.836</b>
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
	<b>Average</b>			<b>0.859</b>	<b>1473.1</b>	<b>1.820</b>

การประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB มีแถบดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (intact) คมชัด (sharp and clear) อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10,000 bp และไม่มีส่วนของดีเอ็นเอที่ย่อยสลาย (ภาพที่ 3.8 Lane 1-3) ส่วนวิธี SDS/NaCl+PVP ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และคมชัดเช่นเดียวกันแม้ว่าพบการย่อยสลายของดีเอ็นเอบ้างเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl+PVP มีคุณภาพสูง ขณะที่ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl มีแถบดีเอ็นเอที่อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10,000 bp จางกว่าวิธี CTAB และ

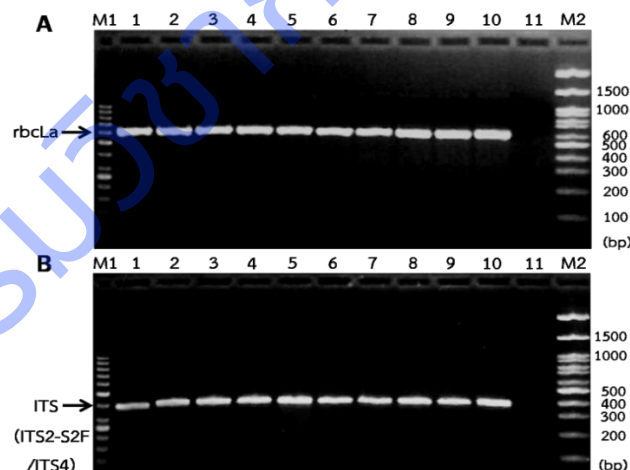
วิธี SDS/NaCl+PVP แสดงถึงการมีดีเอ็นเอน้อยกว่า (ภาพที่ 3.8 Lane 4-6) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นอกจากนี้พบว่า การย่อยสลายของดีเอ็นเอนี้มากกว่าวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl+PVP ดังปรากฏเป็นแถบกว้างในช่วง 500-750 bp (ภาพที่ 3.8 Lane 4-6) สำหรับแถบที่ปรากฏ ณ ตำแหน่งประมาณ 250 bp ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP คือ RNA (ภาพที่ 3.8 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 3.9) กล่าวคือ ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้



ภาพที่ 3.8 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP

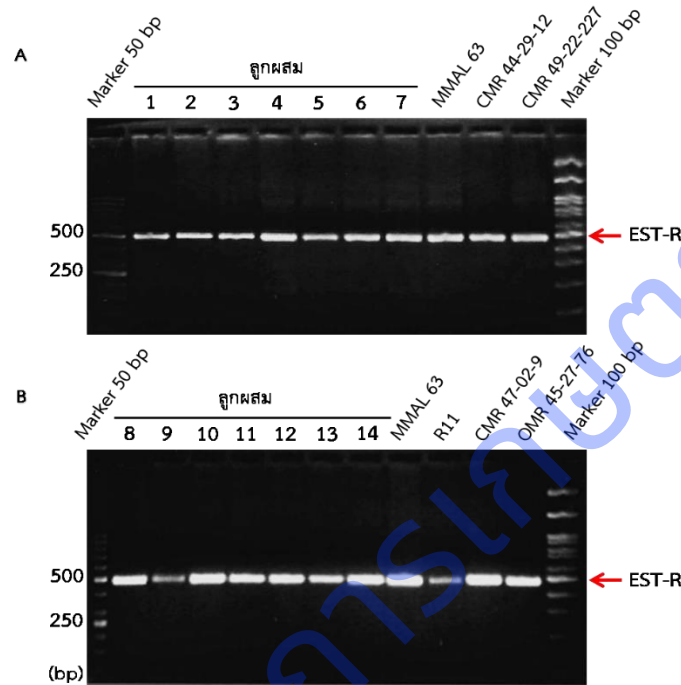
Genomic DNA extracted from leaves of different cassava lines using CTAB (1 - 3), SDS/NaCl (4 - 6) and SDS/NaCl+PVP (7 - 9) method, Lane M = 1 kb DNA Ladder, Lane 1, 4, 7 = CMR 62-51-01, Lane 2, 5, 8 = CMR 62-49-03, Lane 3, 6, 9 = CMR 62-29-09.



ภาพที่ 3.9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของยีนเจ้าบ้าน *rbcLa* (A) และยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ ITS2-S2F/ITS4 (B) กับดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP

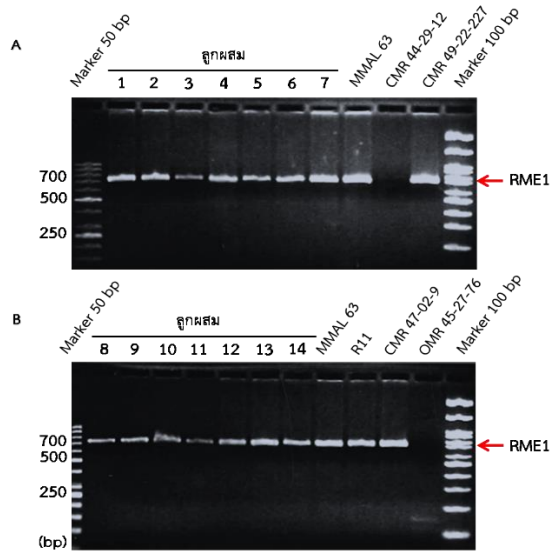
DNA was extracted from leaves of different cassava lines using CTAB (1 - 3), SDS/NaCl (4 - 6) and SDS/NaCl+PVP (7 - 9) method. Lane M1 = 50 bp DNA Ladder, Lane 1, 4, 7 = CMR 62-51-01, Lane 2, 5, 8 = CMR 62-49-03, Lane 3, 6, 9 = CMR 62-29-09, Lane 10 = TME3 (DNA was extracted from leaf using CTAB method in study of Jeeraporn *et al.* (2020) and used as a positive control), Lane 11 = ddH<sub>2</sub>O (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 พบสายพันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทานTME3 หรือพันธุ์ MMAL 63 ซึ่งเป็นพันธุ์ candidate ครบทั้ง 6 เครื่องหมายจำนวน 14 สายพันธุ์ (ภาพที่ 3.10, 3.11, 3.12 และ 3.13) 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



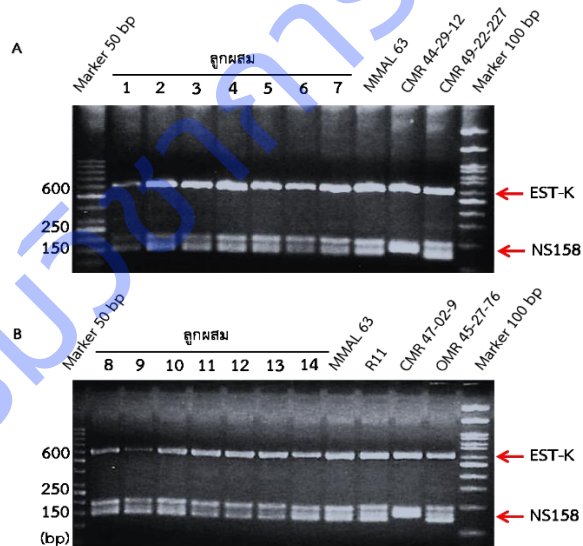
ภาพที่ 3.10 จีโนไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R

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.



ภาพที่ 3.11 จีโนไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1

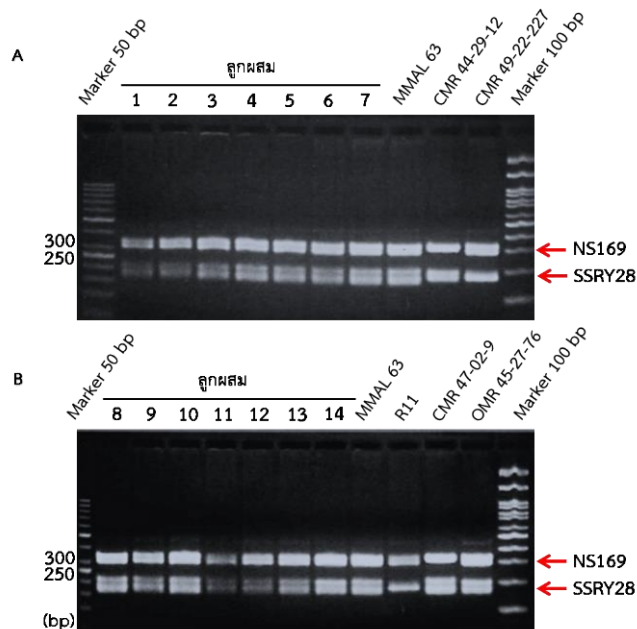
Panel A : 1 = CMR 60-36-5 , 2 = CMR 60-48-26, 3 = CMR 60-48-69, 4 = CMR 61-42-04, 5 = CMR 61-42-06, 6 = CMR 61-42-10, 7 = CMR 61-42-44, MMAL63; CMR 44-29-12; CMR 49-22-227 = พันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ โดย CMR 44-29-12 x MMAL 63= CMR 60-36-xxx, CMR 49-22-227 x MMAL 63= CMR 60-48-xxx และ CMR 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.



ภาพที่ 3.12 จีโนไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล 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 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.





ภาพที่ 3.13 จีโนไทป์ของลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2563 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSRY28 และ NS169 แบบ Multiplex PCR

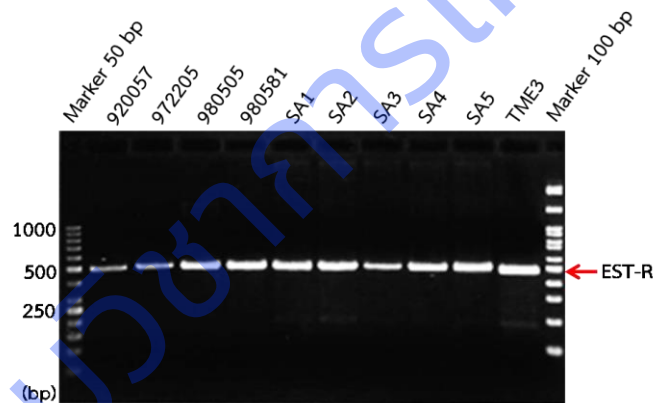
Panel A : 1 = CMR 60-36-5 , 2 = CMR 60-48-26, 3 = CMR 60-48-69, 4 = CMR 61-42-04, 5 = CMR 61-42-06, 6 = CMR 61-42-10, 7 = CMR 61-42-44, MMAL63; CMR 44-29-12; CMR 49-22-227 = พันธุ์ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ โดย CMR 44-29-12 x MMAL 63= CMR 60-36-xxx, CMR 49-22-227 x MMAL 63= CMR 60-48-xxx และ CMR 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.

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

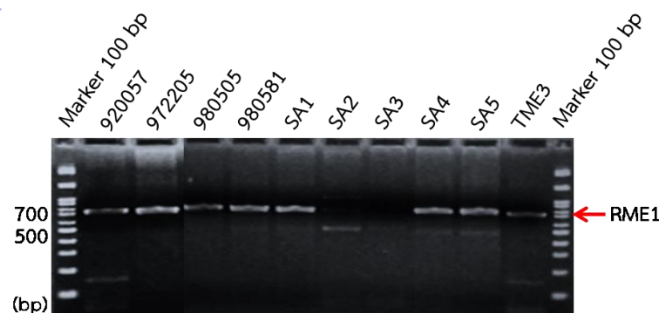
- (1) CMR 62-06-03 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)
- (2) CMR 62-06-07 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1, NS158 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)
- (3) CMR 62-06-16 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)
- (4) CMR 62-26-01 (มีเครื่องหมาย EST-R, RME1 และมีลักษณะทรงต้นที่ดีและแข็งแรง)
- (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)
- (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)

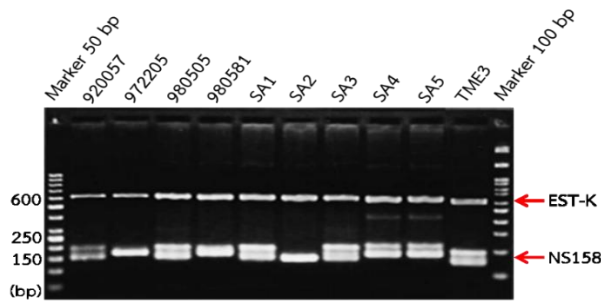
นำดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง 25 สายพันธุ์/พันธุ์ข้างต้นที่สกัดได้สำหรับการทำซ้ำแบบ biological repeat มาทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R, RME1, EST-K, NS158, SSRY28 และ NS169 รวม 6 เครื่องหมาย พบสายพันธุ์/พันธุ์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 หรือพันธุ์ MMAL 63 ซึ่งเป็นพันธุ์ candidate ครบทั้ง 6 เครื่องหมายจำนวน 3 สายพันธุ์/พันธุ์ได้แก่ (1) 920057 (2) 980505(3) SA1 (ภาพที่ 3.14, 3.15, 3.16 และ 3.17)



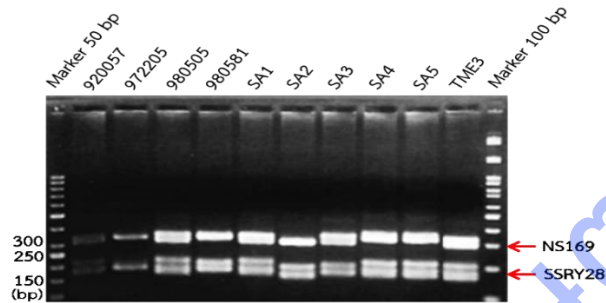
ภาพที่ 3.14 จีโนไทป์ของพันธุ์มันสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-R



ภาพที่ 3.15 จีโนไทป์ของพันธุ์มันสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RME1



ภาพที่ 3.16 จีโนไทป์ของพลาสมิดสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล EST-K และ NS158 แบบ Multiplex PCR



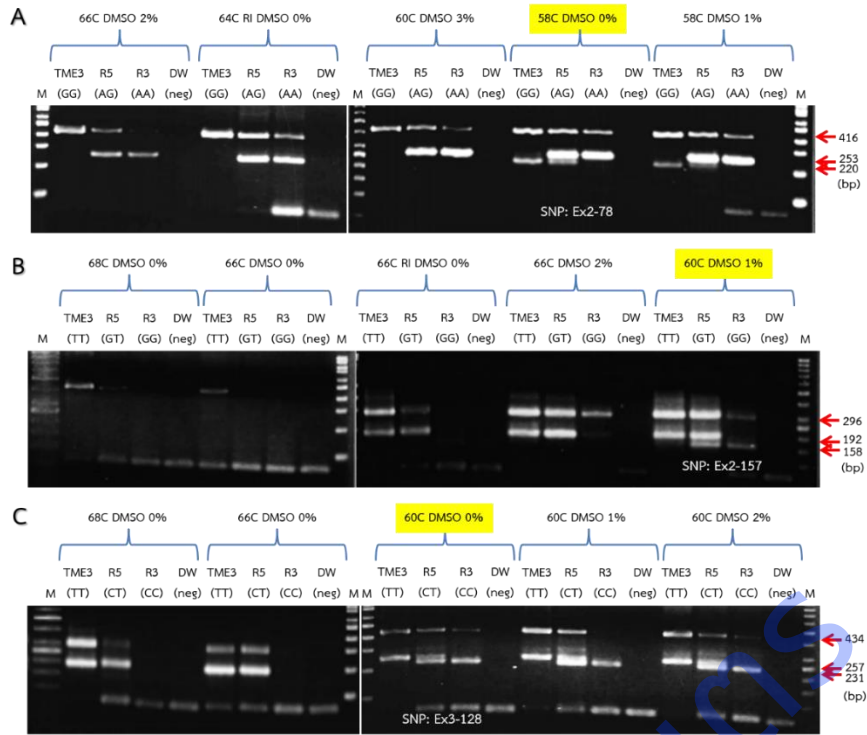
ภาพที่ 3.17 จีโนไทป์ของพลาสมิดสำปะหลังและลูกผสม candidate คัดเลือกในปี 2564 ที่ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSRY28 และ NS169 แบบ Multiplex PCR

### 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 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ตรงตามขนาดที่คาดหวังในแต่ละอัลลีล (ตารางที่ 3.8 และภาพที่ 3.18)

ตารางที่ 3.8 ลำดับเบสของไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปในยีน *Peroxidase* สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR

SNP point	Primer name	Sequence (5' – 3')	Allele	Amplicon(bp)
Ex2-78	Forward inner primer	AAAGAAGCAATCCCAAACCAACCGTA	A	253
	Reverse inner primer	TTCACAGCATCAATCACATTGAATCCTATC	G	220
	Forward outer primer	CCTTTGTTGAGAATGCATTTCCATGATT		416
	Reverse outer primer	GTCCAGTTTTAACATCCCAAATGGTCC		
Ex2-157	Forward inner primer	TGGTGTGTTTCTTGCGCTGATATCT	T	192
	Reverse inner primer	AAACTGCATCTCGAGCTACTAAGGCCAC	G	158
	Forward outer primer	TTCAAAGAGAGGCAATCAAGCTGAGAAA		296
	Reverse outer primer	GACACTCTTCCATCTCTCCGTCCAGTTT		
Ex3-128	Forward inner primer	TAAGTGAGCTTAAACAAATTTTGC GGC	C	231
	Reverse inner primer	AAGGTCCTTAACATTTAAACCCCGGA	T	257
	Forward outer primer	GTAGTCGAGATGCAGTTTCAATGGTAA		434
	Reverse outer primer	CTTTGCCTGTGAAATTGTATAAGCGGTT		



**ภาพที่ 3.18** การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพโรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-78 (A), Ex2-157 (B) และ Ex3-128 (C) โดยใช้เทคนิคTetra primer ARMS-PCR ในมันสำปะหลังพันธุ์ TME3 ระยะเวลา 5 และระยะเวลา 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.

เทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR นั้น ณ ตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลจะใช้ไพโรเมอร์ จำนวน 4 เส้น ในการตรวจสอบ ประกอบด้วย Forward inner primer (FI) Reverse inner primer (RI) Forward outer primer (FO) และ Reverse outer primer (RO) (ตารางที่ 3.5) จากภาพที่ 3.18A พบว่า annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-78 ได้แก่ 58 องศาเซลเซียสขณะที่ annealing temperature 66, 64 หรือ 60 องศาเซลเซียสไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ตรงตามขนาดที่คาดหวังในแต่ละอัลลีลได้ครบ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-78 มีรายละเอียดส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังตารางที่ 3.9 โดยผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 3 แถบดังนี้ แถบดีเอ็นเอขนาด 416 bp เกิดจาก Forward outer primer (FO) และ Reverse outer primer (RO) แถบดีเอ็นเอขนาด 253 bp ที่แสดง สนิปอัลลีล A เกิดจาก Forward inner primer(FI) และ Reverse outer primer(RO) และแถบดีเอ็นเอขนาด 220 bp ที่แสดง สนิปอัลลีล G เกิดจาก Forward outer primer (FO) และ Reverse inner primer (RI) ซึ่งพันธุ์ด้านทาน TME3 มี สนิปอัลลีล G แบบโฮโมไซกัส (GG) ณ ตำแหน่ง Ex2-78 สอดคล้องกับผลทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปโดยใช้เทคนิค Pyrosequencing (ตารางที่ 3.6) พันธุ์ระยะ 5 แสดงจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสคือ มีทั้งอัลลีล A และ G (AG) ขณะที่พันธุ์ระยะ 3 แสดงจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสของอัลลีล A (AA)

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-157 ได้แก่ annealing temperature ที่ 60 องศาเซลเซียส และมี Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% เป็นส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยพันธุ์ด้านทาน TME3 ปรากฏสนิปอัลลีล T แบบโฮโมไซกัส (TT) (ภาพที่ 3.18B และตารางที่ 3.10) สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล Ex3-128 นั้น annealing temperature ที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียสโดยไม่ต้องมี DMSO เป็นส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พันธุ์ด้านทาน TME3 ปรากฏ สนิปอัลลีล T แบบโฮโมไซกัส (TT) (ภาพที่ 3.18C และตารางที่ 3.11) จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาพบ ไปใช้ในการเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปตำแหน่ง Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ในมันสำปะหลังลูกผสม

ตารางที่ 3.9 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-78 โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR

Component	Volume ( $\mu$ l)	Final concentration
10X <i>Taq</i> buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	1X
10 mM dNTP mix	0.4	0.2 mM for each
10 uM primer FI	0.4	0.2 $\mu$ M
10 uM primer RI	0.4	0.2 $\mu$ M
10 uM primer FO	0.4	0.2 $\mu$ M
10 uM primer RO	0.4	0.2 $\mu$ M
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.3	1.5 U
25 mM $\text{MgCl}_2$	1.2	1.5 mM
DNA (50 ng/ $\mu$ l)	2.0	100 ng
DW	12.5	
<b>Total volume</b>	<b>20.0</b>	
<b>Thermal cycling condition</b>	94°C 5 min >94°C 40 sec, 58°C 40 sec, 72°C 30 sec (35 cycles) > 72°C 5 min >4°C $\infty$	

ตารางที่ 3.10 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล Ex2-157 โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR

Component	Volume ( $\mu$ l)	Final concentration
10X <i>Taq</i> buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	1X
10 mM dNTP mix	0.4	0.2 mM for each
10 uM primer FI	0.4	0.2 $\mu$ M
10 uM primer RI	0.4	0.2 $\mu$ M
10 uM primer FO	0.4	0.2 $\mu$ M
10 uM primer RO	0.4	0.2 $\mu$ M
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.3	1.5 U
25 mM $\text{MgCl}_2$	1.2	1.5 mM
DNA (50 ng/ $\mu$ l)	2.0	100 ng
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	0.2	1%
DW	12.3	
<b>Total volume</b>	<b>20.0</b>	
<b>Thermal cycling condition</b>	94°C 5 min >94°C 40 sec, 60°C 40 sec, 72°C 30 sec (35 cycles) > 72°C 5 min >4°C $\infty$	

ตารางที่ 3.11 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุล Ex3-128 โดยใช้เทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR

Component	Volume ( $\mu$ l)	Final concentration
10X <i>Taq</i> buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	1X
10 mM dNTP mix	0.4	0.2 mM for each
10 $\mu$ M primer FI	0.4	0.2 $\mu$ M
10 $\mu$ M primer RI	0.4	0.2 $\mu$ M
10 $\mu$ M primer FO	0.4	0.2 $\mu$ M
10 $\mu$ M primer RO	0.4	0.2 $\mu$ M
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.3	1.5 U
25 mM $\text{MgCl}_2$	1.2	1.5 mM
DNA (50 ng/ $\mu$ l)	2.0	100 ng
DW	12.5	
<b>Total volume</b>	<b>20.0</b>	
<b>Thermal cycling condition</b>	94°C 5 min >94°C 40 sec, 60°C 40 sec, 72°C 30 sec (35 cycles) > 72°C 5 min >4°C $\infty$	

การคัดเลือกปี 2563 นำลูกผสมจำนวน 46 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้เบื้องต้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอีเอสที ชนิดสการ์ และชนิดเอสเอสอาร์มาทดสอบเพิ่มเติมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสไนป์ไนยีน *Peroxidase* จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ เครื่องหมาย Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 พบลูกผสมสายพันธุ์ที่มีแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ ตำนาน 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 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 ดังตารางที่ 3.12 (แถบสีชมพู)

ตารางที่ 3.12 ผลการคัดเลือกลูกผสม CMR60, 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	√	√	×	√	√	√	√	√	√

ตารางที่ 3.12 (ต่อ) ผลการคัดเลือกลูกผสมCMR 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 61-42-03	√	√	×	√	√	√	√	√	√
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	√	√	×	√	√	√	√	√	√
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	√	√*	×	√	√	√	√	√	√

√ : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้นทาน TME3

√\* : แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคเช่นเดียวกับพันธุ์ต้นทาน TME3 แต่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นปรากฏมาด้วย

X : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับพันธุ์ต้นทาน TME3

- : ไม่ได้ทำการทดสอบเนื่องจากดีเอ็นเอไม่เพียงพอ

สำหรับการคัดเลือกปี 2564 นำลูกผสมหรือพันธุ์ที่คัดเลือกเบื้องต้นด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอีเอสที ชนิดสการ์ และ ชนิดเอสเอสอาร์ พิจารณาประกอบกับข้อมูลลักษณะทรงต้นและลักษณะการเป็นโรคอื่นๆ จำนวน 25 สายพันธุ์/พันธุ์ มาทดสอบเพิ่มเติมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสไนป์ 3 ตำแหน่ง พบสายพันธุ์/พันธุ์ที่มีแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ ตำนทาน TME3 ครบทั้ง 9 เครื่องหมาย จำนวน 3 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้แก่ (1) 920057 จาก IITA (2) 980505 จาก IITA (3) SA1 (CMR 64-180-01) ดังตารางที่ 3.13 (แถบสีชมพู) พันธุ์ตำนทาน 972205 และ 980581 จาก IITA แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับ นิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ตำนทาน TME3 จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ RME1, EST-R, EST-K, Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ซึ่งเครื่องหมาย RME1 อยู่ใกล้กับโลคัส CMD2 มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมาย NS158, SSR28 และ NS169 (Carmo *et al.*, 2015)

ตารางที่ 3.13 ผลการคัดเลือกลูกผสม CMR62, CMRE 62, CMR64 และพันธุ์จาก IITA โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในปี 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)	√	×	√	×	√	√	√	√	√

√ : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ตำนทาน TME3

√\* : แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์โรคเช่นเดียวกับพันธุ์ตำนทาน TME3 แต่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นปรากฏมาด้วย

X : แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับพันธุ์ตำนทาน TME3



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 3.13** 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)

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

#### การทดลองที่ 4 การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล สรุปผลการดำเนินงาน

1. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ใช้คัดเลือกโรครากปมจากหัวบีท มันฝรั่ง ถั่วอัลมอนต์ และไพรเมอร์ SSR จำนวน 26 คู่ กับดีเอ็นเอมันสำปะหลัง จำนวน 14 พันธุ์ ประกอบด้วย พันธุ์ต้านทานโรครากปมคือ ระยะเวลา 1, ระยะเวลา 7, ระยะเวลา 86-13, ระยะเวลา 60, ระยะเวลา 72 และเกษตรศาสตร์ 50 และพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปมคือ ระยะเวลา 2, ระยะเวลา 3, ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 9, ระยะเวลา 11, ระยะเวลา 90, หัวบง 60, หัวบง 80 ด้วยเทคนิค PCR พบว่า มีไพรเมอร์ 4 คู่ คือ N146, N195, NEM06 และ SSR4 ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในพันธุ์มันสำปะหลัง และออกแบบไพรเมอร์จากยีน Endoglucanase ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับโรครากปมเพิ่มอีก 11 คู่ พบมีไพรเมอร์ 2 คู่ คือ GUN5 และ GUN6 ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในพันธุ์มันสำปะหลัง มีแนวโน้มว่าไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ อาจนำมาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกโรครากปมในมันสำปะหลังได้

2. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ชนิด ILP (Intron Length Polymorphism) ที่ออกแบบเพิ่มเติมจากฐานข้อมูล GenBank รวม 4 ยีนคือ ยีน Polygalacturonase, ยีน Pectinesterase/Pectinesterase Inhibitor, ยีน Beta-Glucosidase และ ยีน Endoglucanase จำนวน 31 คู่ไพรเมอร์ ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาด 145-403 bp โดยมีค่าเฉลี่ย 225 bp กับมันสำปะหลัง จำนวน 14 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า มีไพรเมอร์ 15 คู่ ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในมันสำปะหลัง ได้แก่ PGLR7, PMEU2, BGL1, BGL2, BGL3, BGL4, BGL7, BGL9, BGL10, GUN4, GUN5, GUN6, GUN7, GUN8, GUN9 ทำการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ทั้ง 15 คู่ กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังที่มีข้อมูลการทดสอบโรครากปม จำนวน 71 พันธุ์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel และด้วยเครื่อง QIAxcel พบว่า ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ มี 6 คู่ คือ BGL2, BGL4, BGL7, GUN4, GUN 5, PGLR7

3. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างระหว่างมันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ต้านทานโรครากปม โดยจัดทำตารางข้อมูลดัชนีการเกิดปมและระดับความต้านทานโรครากปมจากมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ และจัดทำ dendrogram เพื่อดูความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังระหว่างลักษณะจีโนไทป์จากแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังและฟีโนไทป์จากการทดสอบความต้านทานโรครากปม (นุชนารถและคณะ, 2558) จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์คู่ต่างๆ พบว่า พันธุ์ที่ต้านทานโรครากปมและมีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอคือ R 1, R 7, R 86-13, R 60, R 72 และ KU 50 จึงคัดเลือกพันธุ์ลูกผสมจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยเก็บตัวอย่างลูกผสม 2 สายพันธุ์ ที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ต้านทานโรครากปมคือ ลูกผสม CMR 62-11 (พันธุ์แม่คือ CMR 32-94-12 และพันธุ์พ่อคือ KU 50 ที่ต้านทานโรครากปม) จำนวน 46 ตัวอย่าง และ ลูกผสม CMR 62-79 (พันธุ์แม่คือ CMR 50-70-76 และพันธุ์พ่อคือ R7 ที่ต้านทานโรครากปม) จำนวน 259 ตัวอย่าง ทำการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์กับมันสำปะหลังลูกผสม ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 6 คู่ คือ BGL2, BGL4, BGL7, GUN4, GUN 5, PGLR 7 พบไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของลูกผสมอย่างชัดเจนคือ BGL7 โดยไพรเมอร์ BGL7 มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในลูกผสม CMR 32-94-12 แต่ละต้น ในขณะที่แถบดีเอ็นเอในลูกผสม CMR 62-79 ไม่ค่อยมีความแตกต่างกัน ส่วนไพรเมอร์ BGL2, BGL4, GUN4, GUN 5, PGLR7 การแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ไม่ค่อยชัดเจนนัก นำผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ คือ BGL2, BGL4, BGL7, GUN 5 ตรวจสอบวิเคราะห์ผลแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QIAxcel พบไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง จำนวน 71 พันธุ์ ด้วยเทคนิค Genotyping by sequencing (GBS) พบมีรูปแบบ SNPs รวมทั้งหมด 2688 รูปแบบ คิดเป็น 100% โดยเป็นแบบ transitions ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสของดีเอ็นเอประเภทเดียวกันคือ 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 และทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางเทคโนโลยีชีวสารสนเทศจากข้อมูลพันธุ์มันสำปะหลัง ทั้ง 71 สายพันธุ์ เพื่อหาตำแหน่ง SNP โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะฟีโนไทป์ของดัชนีการเกิดปม ความต้านทานและอ่อนแอต่อโรครากปม และจัดทำ dendrogram เพื่อดูความสัมพันธ์ของพันธุ์มันสำปะหลัง 71 พันธุ์ ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล แบบ tetra primer จำนวน 6 ชุด สำหรับใช้ตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะ

ต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลัง ทดสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานและอ่อนแอต่อโรครากปม โดยใช้ตัวแทนพันธุ์ที่ต้านทานคือ Sriracha 1 และตัวแทนพันธุ์ที่อ่อนแอคือ ระยะเวลา 11 พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล 2 ชุด สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานได้ จึงเลือกพันธุ์ที่ต้านทานมาทดสอบเพิ่มคือ CMR26-38-7, MKUC28-71-66, HP7, V22 และพันธุ์ที่อ่อนแอคือ CMR23-126-122, CMR25-104-42, CMR34-35-54, ระยะเวลา 5 พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 2 ชุด สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคได้ จากนั้นนำมาทดสอบกับมันสำปะหลังทั้ง 71 สายพันธุ์ และมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 (พันธุ์แม่คือ CMR 32-94-12 และพันธุ์พ่อคือ KU 50) และ CMR62-79 (พันธุ์แม่คือ CMR 50-70-76 และพันธุ์พ่อคือ R7 ที่ต้านทานโรครากปม) พบว่า มันสำปะหลังลูกผสมมีทั้งแถบดีเอ็นเอที่แสดงความต้านทานและแถบดีเอ็นเอที่แสดงความอ่อนแอ ทำการเพิ่มปริมาณใส่เดือนฝอยสาเหตุโรครากปม โดยเก็บดินจากแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่จังหวัดกาฬสินธุ์ นำมาเพิ่มขยายใส่เดือนฝอยในมะเขือเทศ แล้วนำไปทดสอบในมันสำปะหลังลูกผสม แต่เนื่องจากปริมาณใส่เดือนฝอยมีไม่เพียงพอจึงทำให้ไม่เห็นผลของรากปมชัดเจน ได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยเก็บใบมันสำปะหลังลูกผสมที่มีต้นพ้อหรือต้นแม่เป็นพันธุ์ R11 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ จำนวนลูกผสมทั้งหมด 17 สายพันธุ์ พบว่ามีลูกผสมบางต้นที่แสดงลักษณะต้านทานโรครากปม

## **ผลการดำเนินงาน**

### **การสกัดดีเอ็นเอมันสำปะหลัง**

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

ตัวอย่างมันสำปะหลัง ในปีแรกได้นำท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 14 พันธุ์ มาปลูกในกระถางเพื่อใช้ในการทดลอง ได้แก่ พันธุ์ที่ต้านทานโรครากปมคือ ระยะเวลา 1, ระยะเวลา 7, ระยะเวลา 13, ระยะเวลา 60, ระยะเวลา 72 และเกษตรศาสตร์ 50 และพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปมคือ ระยะเวลา 2, ระยะเวลา 3, ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 9, ระยะเวลา 11, ระยะเวลา 90, หัวยบง 60 และหัวยบง 80 ส่วนในปีต่อไปได้ไปเก็บตัวอย่างจากแปลงรวบรวมพันธุ์มันสำปะหลังที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง เนื่องจากต้องใช้มันสำปะหลังจำนวนหลายพันธุ์

### **การหาเครื่องหมายโมเลกุลจากฐานข้อมูล**

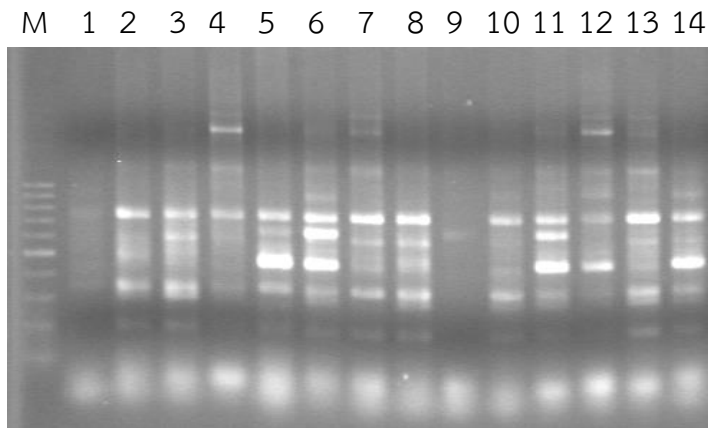
รวบรวมและสังเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลที่ต้านทานโรครากปมในพืชอื่นๆ ได้แก่ หัวบีท (sugar beat) 3 คู่ มันฝรั่ง 15 คู่ ถั่วอัลมอลต์ 5 คู่ และไพร์เมอร์ SSR 3 คู่ รวมจำนวน 26 คู่ (ตารางที่ 4.1) และทำการทดสอบทำ PCR กับมันสำปะหลัง 14 สายพันธุ์ พบว่ามีบางคู่ไพร์เมอร์ที่มีแนวโน้มว่าสามารถใช้จำแนกพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปมได้ เช่น คู่ไพร์เมอร์ 146 แถบดีเอ็นเอที่ประมาณ 700 bp จะพบในมันสำปะหลังบางพันธุ์เท่านั้น ไพร์เมอร์ N 195 พบว่า ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังบางพันธุ์ ไพร์เมอร์ NEMO6 พบแถบดีเอ็นเอด้านบนเฉพาะบางพันธุ์ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ และไพร์เมอร์ SSR4 พบแถบด้านบนในพันธุ์อ่อนแอ

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแถบที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์อ่อนแอ ในเบื้องต้น พบว่า เมื่อใช้ไพร์เมอร์ NEMO6 จะปรากฏแถบบนสุดในมันสำปะหลังพันธุ์ระยะเวลา 5 กับหัวยบง 60 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ จึงอาจจะใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลจำแนกพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปมได้

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่มาของไพรเมอร์จากหัวบีท (sugar beat) มันฝรั่ง ถั่วอัลมอนต์ และไพรเมอร์ SSR จำนวน 26 คู่ไพรเมอร์

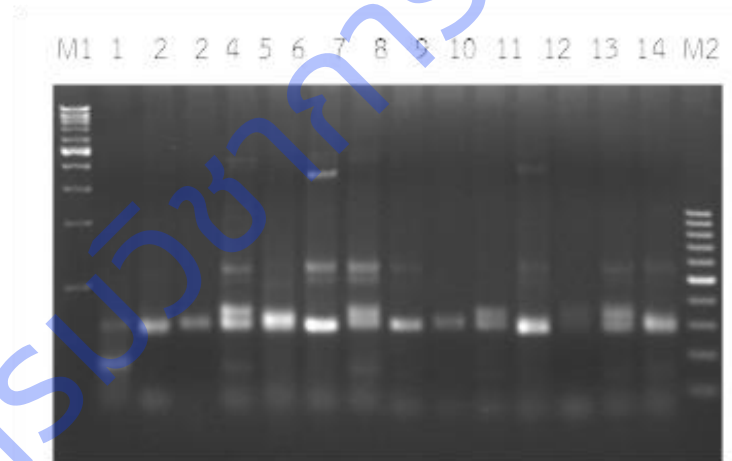
แหล่งที่มา	ชื่อ Marker	ชื่อ primer	ลำดับเบส	
หัวบีท	Nem06	Nem06FWD	TGCCGAGCTGCTTGACGGGTTGTC	
		Nem06REV	GTTTCGCTCCTCAGAATTGCTGAAG	
	nem06	nem06FWD1	TGACGGGTTGTCAATATGC	
		nem06REV1	TCCATTTCTGACCTACAATTATT	
	NEM06	NEM06FWD2	AAAGAAAGGGAACCTCAAATGTTAG	
		NEM06REV2	TCAGAATTGCTGAAGGTCATT	
มันฝรั่ง	N146	N146-17	AAGCTCTTGCTAGTGCTC	
		N146-22	AGGCGGAACATGCCATG	
	N195	N195-09	TGGAAATGGCACCCTACTA	
		N195-06	CATCATGGTTTCACTTGTCC	
	Gro1-4	Gro1-4F	TCTTTGGAGATACTGATTCTCA	
		Gro1-4R	CGACCTAAAATGAAAAGCATCT	
	Gro1-4-1	Gro1-4-1F	AAGCCACAACCTCTACTGGAG	
		Gro1-4-1R	GATATAGTACGTAATCATGCC	
	Gpa2-1	Gpa2-1F	TTTAGCACGGAATGTGGGGA	
		Gpa2-1R	GTTTCCCCATCAAACTCAC	
	Gpa2-2	Gpa2-2F	GCACTTAGAGACTCATTCCA	
		Gpa2-2R	ACAGATTGTTGGCAGCGAAA	
	TG432	TG432-F	GGACAGTCATCAGATTGTGG	
		TG432-R	GTACTCCTGCTTGAGCCATT	
	C237	C237- F	GCAGTCCTAATTGCACGTAACA	
		C237- R	CTTACTTGGCAACCCAGAAT	
	HC	HC-F	ACACCACCTGT TTGATAAAAAACT	
		HC-R	GCCTTACTTCCCTGCTGAAG	
	GBSS1-3	GBSS1-3F	AAAGGAGGCTCAAGCAG	
		GBSS1-3R	TGCAAGAGCTCTAGCAACTG	
	Plgms8	Plgms8F	AAACAGCCAGATCCGGAGTA	
		Plgms8R	TATAAGTCCGCCATCGCTTG	
	Plgms9	Plgms9F	GGTGGGAGAATTGCACTATCA	
		Plgms9R	CAACCCAATACCACGTACCC	
	Plgms19	Plgms19F	CGGGGTTCAAACCTCAACAAG	
		Plgms19R	AGACGTGCTGCTTTGTTTAC	
	STS-OPS14a	STS-OPS14aF	TTACGTGAAACAGGGAAATGAA	
		STS-OPS14aR	GCCTTAGTACAGCTCCGCC	
	STS-834b	STS-834bF	GCAGTCAAAAATTTCAAACC	
		STS-834bR	TCCGATTTCGAGCCCACTACA	
	ถั่วอัลมอนต์	19319	19319F	GCATGAGGTTGTTGGTGTG
			19319R	TGGCTAAAATTCGCACTACC
39E18		39E18F	ATCGGATTGCCACGTTATGT	
		39E18R	CCGAAAGAATTGGCTCACTC	
524K16		524K16F	CGAGAAGTCAAAATCCTTTGG	
		524K16R	TGAGAACAAACACCCAAAATCA	
56F6		56F6F	TGCATCTAGACACAATGGTTCA	
		56F6R	CCATCTTGTAACCATGCCAAT	
406L19		406L19F	AATCAGACGGGCTTTGTACG	
		406L19R	GCTTTGAAAATCATGCTTGG	
ไพรเมอร์ SSR		SSRY4	SSRY4F	ATAGAGCAGAAGTCAGGCG
			SSRY4R	CTAACGCACACGACTACGGA
	SSRY9	SSRY9F	ACAATTCATCATGAGTCATCACT	
		SSRY9R	CCGTTATTGTTCTGGTCCT	
	SSRY155	SSRY155F	CGTTGATAAAGTGAAAAGAGCA	
		SSRY155R	ACTCCACTCCCGATGCTCGC	





ภาพที่ 4.3 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 4.4 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  |

## 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 (ตารางที่ 4.2) ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดอยู่ในช่วง 145 - 403 bp โดยมีค่าเฉลี่ย 225 bp

ตารางที่ 4.2 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปมจำนวน 4 ยีน, ข้อมูล EST จำนวน 6 EST และจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 31 คู่ไพรเมอร์

Gene	EST	Chromosome	Contig	Marker	Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	Expected size
<i>Polygalacturonase</i>	XM_021779030.1	14	LTY01023726.1	PGLR1	PGLR1F	GCAATGCAATCATCTCCCG	304
					PGLR1R	TCCTGTTCAAGTCCCCAAC	
				PGLR2	PGLR2F	AGCAAGAATCGTCAGCCAT	146
					PGLR2R	CTCCTTCTTGGCACCTTCA	
				PGLR3	PGLR3F	TTATCCCACCCAGGGAGCA	167
					PGLR3R	TCCTTGGAAATGAACCTCACT	
	XM_021759956.1	1	LTY01001831.1	PGLR4	PGLR4F	AGAGGGCAAAGGATCGATTA	166
					PGLR4R	AGCCATTTCCACCTTTTTCT	
				PGLR5	PGLR5F	CTGCACACTTTTAGTTTCTGC	323
					PGLR5R	CAGTTCAAATGGCTTTGTGC	
				PGLR6	PGLR6F	AAGCCTCATTTATGGCCGC	158
					PGLR6R	CAGTTGCTGCCTTGACCAT	
PGLR7	PGLR7F	AATTCACCATTCTGGACAATCC	219				
	PGLR7R	AGAGGAGCACGGATCGTAA					
PGLR8	PGLR8F	TACGATCCGTGCTCCTCTT	403				
	PGLR8R	TGTAACAGTCCTCCGATGCAA					
<i>Pectinesterase/ Pectinesterase Inhibitor</i>	XM_021740830.1	16	LTY01027939.1	PMEU1	PMEU1F	TGCTGCTTTGGCAGCTATC	176
					PMEU1R	CTGTTTCAGCATAAATCTCTGC	
				PMEU2	PMEU2F	AAATTTTGAGATGGAGTCAA	274
					PMEU2R	AATCCCAATGCTTTGCGCA	
<i>Beta-Glucosidase</i>	XM_021770881.1	10	LTY01018044.1	BGL1	BGL1F	AGCCAAATCCCACTCGAA	224
					BGL1R	CACTGAATGATAGCTTGAGGA	
				BGL2	BGL2F	ATTGCCATGGAGCTATTATCTT	190
					BGL2R	AGAGAAATTTCAACAATCCTCCA	
				BGL3	BGL3F	GCTCTCAGGGTAGTCTCCA	161
					BGL3R	GCAGGAAGGCTGCCTCTA	
				BGL4	BGL4F	TTTGGGCACCTTCCAGAAT	355
					BGL4R	TCTTTGTGTCGCAACTGCTC	
				BGL5	BGL5F	CAAATCTTCAAAGCAGAAGTC	170
					BGL5R	GCCCTTCAAGATGAATATGGTG	
				BGL6	BGL6F	TTGTGGAAGATCCCAATGGA	191
					BGL6R	AGGAGTGAACCAAGAAGGTG	
				BGL7	BGL7F	CACCTTCTTGGTTCACTCCT	289
					BGL7R	TGGTTTGAACCTCCTCAGATT	
				BGL8	BGL8F	TCTGAAGGAGTTCAAACCAAT	154
					BGL8R	CAGGTGATGTTGCTGAGGA	
				BGL9	BGL9F	TCCTCAGCAACATCACCTG	212
					BGL9R	AGCCAAGTATTTGGGATACCT	

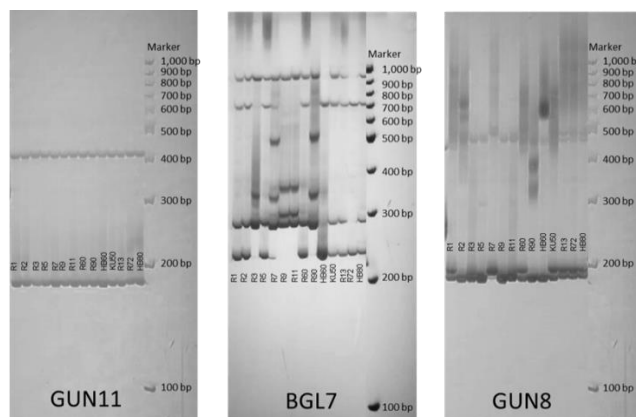
BGL10 BGL10F GGCTTCTGCCATCTGAAT 187  
 BGL10R AGGATTTTATATTTGGAGCAGCA

ตารางที่ 4.2(ต่อ) แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปมจำนวน 4 ยีน, ข้อมูล EST จำนวน 6 EST และจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 31 คู่ไพรเมอร์

Gene	EST	Chromosome	Contig	Marker	Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	Expected size
<i>Endoglucanase</i>	XM_021773326.1	11	LTY01019232.1	GUN1	GUN1F	TCCAAGTGTGGTTATGCTGT	221
					GUN1R	TACCAACAACAGACACAGGT	
				GUN2	GUN2F	GGGCACCTGTGTCTGTTG	352
					GUN2R	CTCTTGTGGCCTCTTCTCC	
				GUN3	GUN3F	CTGCAAATTGTTCCATTCTCG	152
					GUN3R	GAATGACGGCTACAACATTCA	
				GUN4	GUN4F	GTGGAAGTGTATGCCCA	186
					GUN4R	TGCTGGTGTCCAAATCCTT	
				GUN5	GUN5F	CCCTGTACAACCATGCTGC	343
					GUN5R	GCCTTACAACCTTCTTACTCC	
				GUN6	GUN6F	TTGCCCTGTACAACCATGC	145
GUN6R	AGCACTTCTACACTCTCTCA						
GUN7	GUN7F	ACGGAATCATATAAGCCCT	190				
	GUN7R	GCCTTACAACCTTCTTACTCC					
GUN8	GUN8F	TGGTCCCCTGCATCATAGT	194				
	GUN8R	CGAGGTGACTCTGGCCTTA					
XM_021758257.1	5	LTY01008938.1	GUN9	GUN9F	ACGCTGATGCTCTTAAAGTTG	214	
				GUN9R	AGCCGAATTCCTCTCCAA		
			GUN10	GUN10F	TGCTCATGCTGCGGAAAA	324	
				GUN10R	CAGGCCTGTCCCAACAC		
			GUN11	GUN11F	CAACCATCAGATCTTCGGA	177	
GUN11R	TTTCAGAGCATTGTTGCC						

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 คู่ไพรเมอร์ ไปวิเคราะห์หาโพลีเมอร์พีซีเอ็มใน 6% polyacrylamide gel electrophoresis ที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ตัวอย่างการแยกแถบดีเอ็นเอใน 6% polyacrylamide gel

ผลจากการวิเคราะห์ไพรเมอร์ ILP ที่สามารถเพิ่มปริมาณให้มันสำปะหลัง พบว่ามีไพรเมอร์ 15 คู่ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในมันสำปะหลัง ได้แก่ PGLR7, PMEU2, BGL1, BGL2, BGL3, BGL4, BGL7, BGL9, BGL10, GUN4, GUN5, GUN6, GUN7, GUN8, GUN9

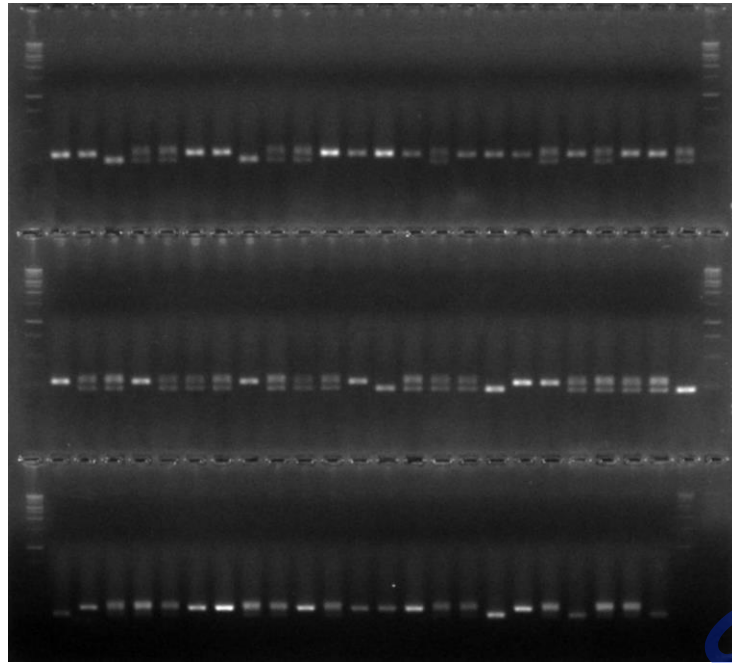




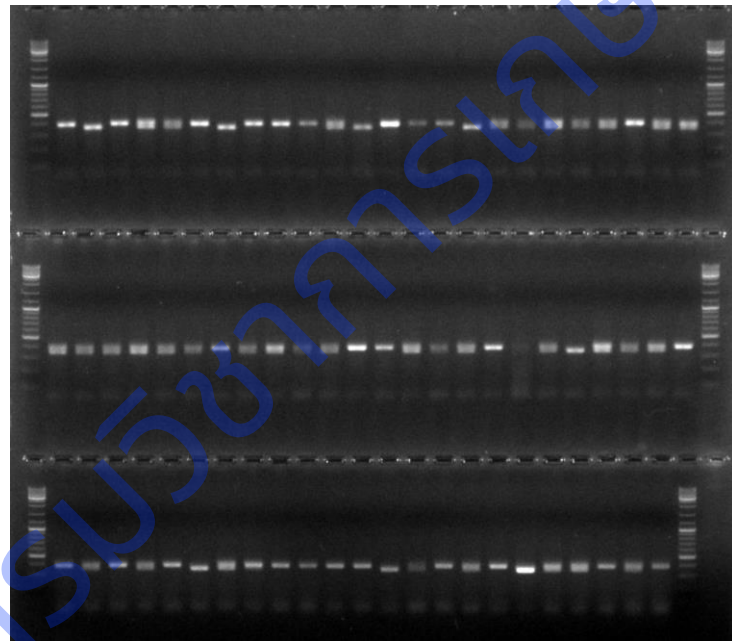
ภาพที่ 4.5 แสดงโพลีเมอร์พืชมิมใน 6% polyacrylamide gel electrophoresis ในมันสำปะหลัง 14 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ GUN11 แสดง monomorphic, ไพรเมอร์ BGL7 แสดง polymorphic และ ไพรเมอร์ GUN8 แสดง polymorphic ทำการทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 15 คู่กับมันสำปะหลังทั้ง 71 พันธุ์ (ตารางที่ 4.3) พบว่าจากการทำ PCR แล้วดูแถบผลผลิต ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใน 2% agarose gel ไพรเมอร์ที่เห็นความแตกต่างของพันธุ์ได้คือ BGL 7 และ GUN 5 ส่วนไพรเมอร์คู่อื่น ผลผลิต ดีเอ็นเอที่ได้ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 4.3 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	พิจน 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				

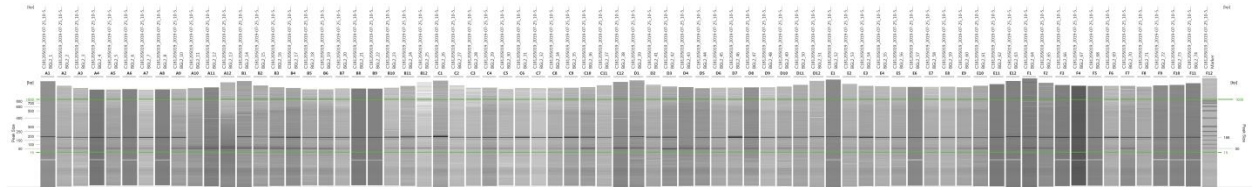


ภาพที่ 4.6 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ ใน 2% agarose gel

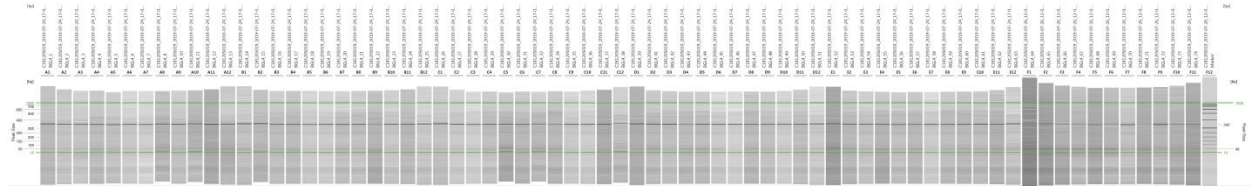


ภาพที่ 4.7 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ ใน 2% agarose gel

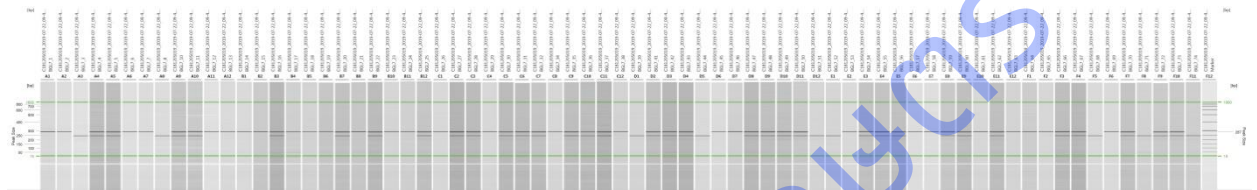
ได้ทำการนำผลผลิต PCR เข้าเครื่อง QIAxcel เพื่อดูแถบผลผลิตดีเอ็นเอ เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 15 คู่ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QIAxcel พบว่า มีไพรเมอร์ 6 คู่ ที่แถบดีเอ็นเอมีความแตกต่างกัน ได้แก่ BGL2, BGL4, BGL7, GUN4, GUN 5, PGLR7 และมีไพรเมอร์ 6 คู่ ที่ให้ผลแถบดีเอ็นเอมันสำปะหลังทั้ง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



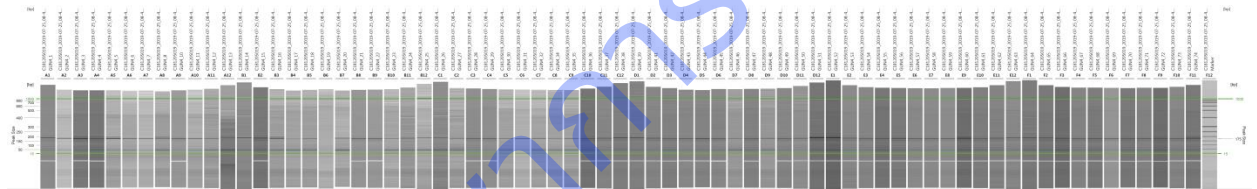
ภาพที่ 4.8 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel



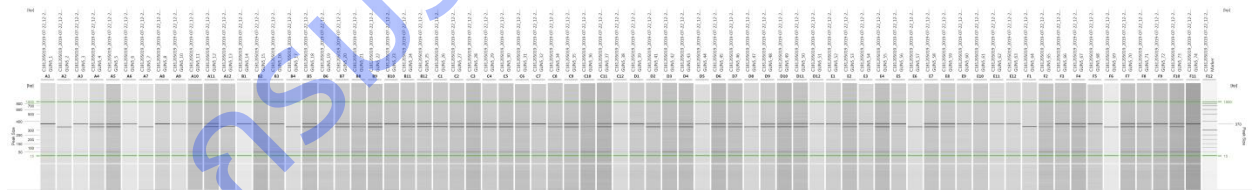
ภาพที่ 4.9 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL4 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel



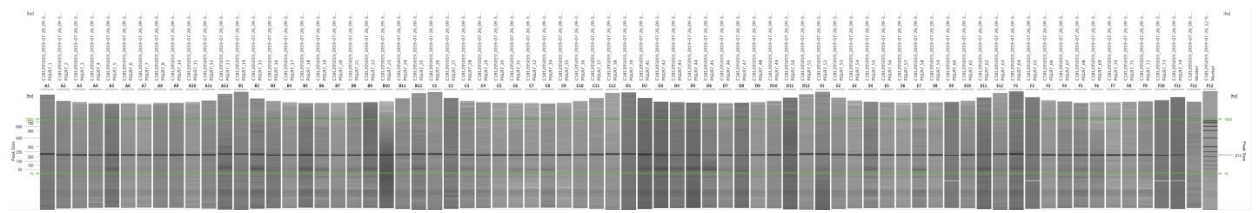
ภาพที่ 4.10 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel



ภาพที่ 4.11 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 4 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel

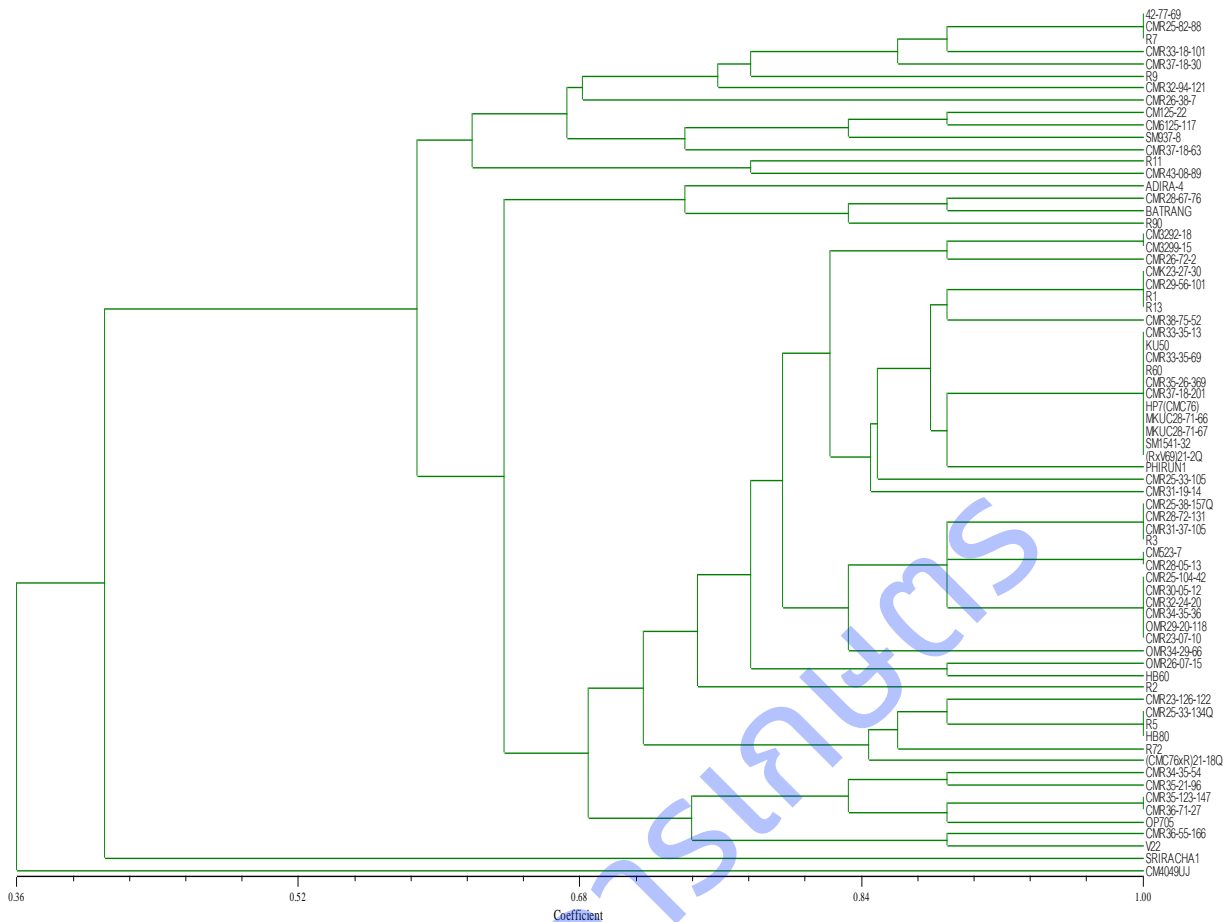


ภาพที่ 4.12 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel



ภาพที่ 4.13 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ PGLR 7 กับมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ จาก เครื่อง QIAxcel

จากนั้นได้จัดทำ dendrogram ความสัมพันธ์ของมันสำปะหลัง จำนวน 71 สายพันธุ์ ที่ได้จากข้อมูลจากเครื่อง QIAxcel ดังภาพที่ 4.14



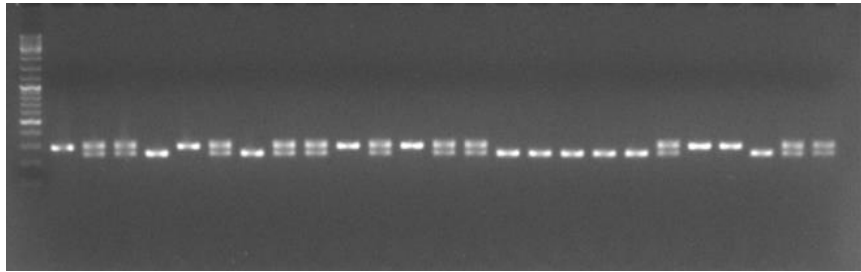
ภาพที่ 4.14 การทำ dendrogram ความสัมพันธ์ของมันสำปะหลัง 71 พันธุ์

เมื่อนำข้อมูล dendrogram มาวิเคราะห์ร่วมกับดัชนีการเกิดปมและระดับความต้านทาน ยังไม่สามารถแยกกันได้อย่างชัดเจน ระหว่างพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ต้านทานโรครากปม

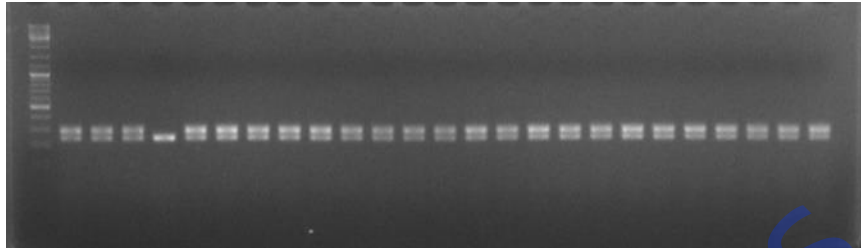
จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยดูจากการทดสอบความต้านทานโรครากปม (นุชนารถและคณะ, 2558) และการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์คู่ต่างๆ พบว่า พันธุ์ที่ต้านทานทานโรครากปมและสามารถเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้คือพันธุ์ R 1, R 7, R 13, R 60, R 72 และ KU 50 จึงได้คัดเลือกพันธุ์ลูกผสมจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยเก็บตัวอย่างลูกผสม 2 สายพันธุ์ที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ต้านทานโรครากปมจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

1. พันธุ์ลูกผสม CMR 62-11 พันธุ์แม่คือ CMR 32-94-12 และพันธุ์พ่อคือ KU 50 ที่ต้านทานโรครากปม เก็บมา 46 ตัวอย่าง
2. พันธุ์ลูกผสม CMR 62-79 พันธุ์แม่คือ CMR 50-70-76 และพันธุ์พ่อคือ R 7 ที่ต้านทานโรครากปม เก็บมา 259 ตัวอย่าง

ทำการทดสอบ PCR จากลูกผสมที่เก็บตัวอย่างมากับไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ คือ BGL2, BGL4, BGL7, GUN4, GUN5, PGLR7 พบว่าไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของลูกผสมแต่ละต้นได้อย่างชัดเจนคือ BGL7 โดยไพรเมอร์ BGL7 จะให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในลูกผสม CMR 62-11 แต่ละต้น ในขณะที่แถบดีเอ็นเอในลูกผสม CMR 62-79 จะไม่ค่อยมีความแตกต่างกันนัก



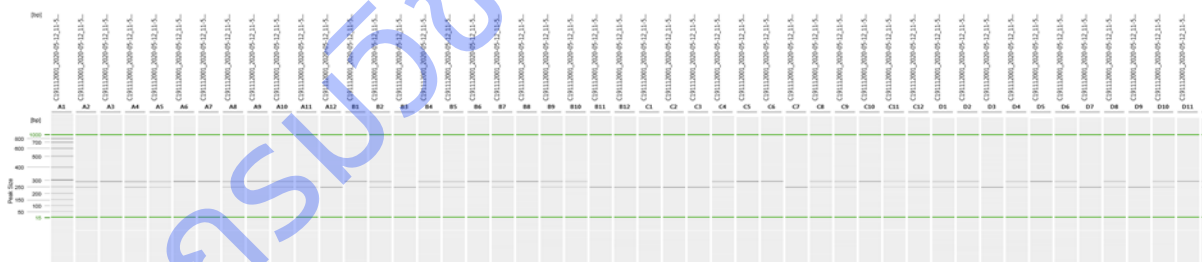
ภาพที่ 4.15 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 ใน 2% agarose gel



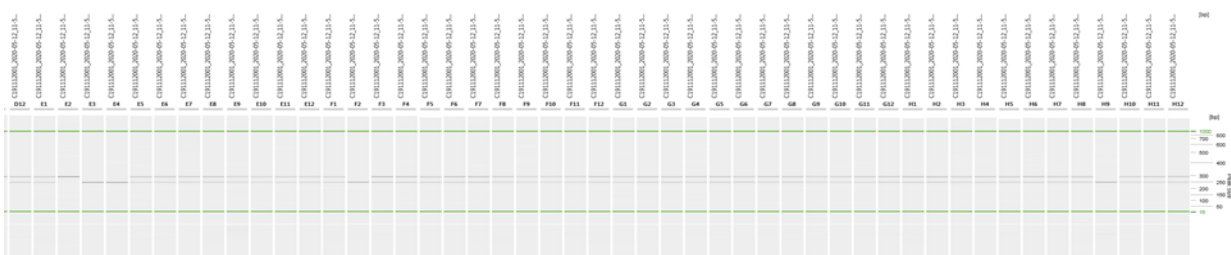
ภาพที่ 4.16 ผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL 7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-79 ใน 2% agarose gel

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

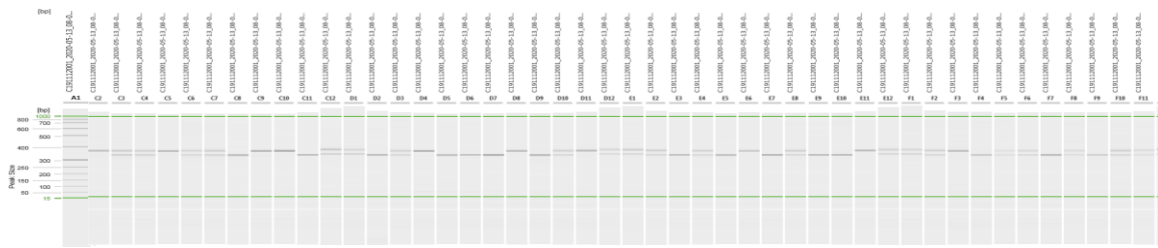
การดูแถบผลผลิตดีเอ็นเอจาก เครื่อง QIAxcel พบว่าเมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ คือ BGL2, BGL4, BGL7, GUN 5 บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QIAxcel พบว่า มีไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ BGL7 และ GUN 5 ที่ให้ความแตกต่างของลูกผสมแต่ละต้นได้อย่างชัดเจน แถบดีเอ็นเอที่บันทึกได้มีแถบเดี่ยวและสองแถบ ส่วนไพรเมอร์ BGL 2 และ BGL 4 จะให้ดีเอ็นเอแถบเดี่ยว แต่ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จะไม่เท่ากัน



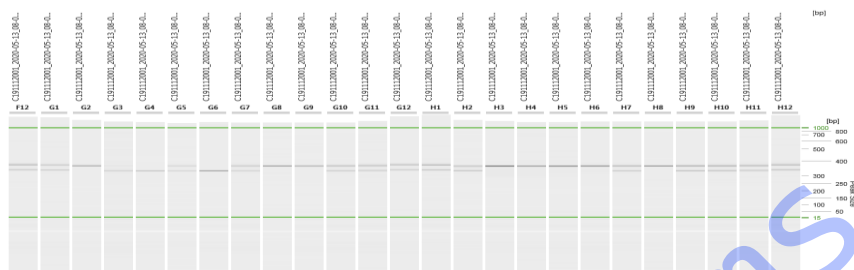
ภาพที่ 4.17 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จาก เครื่อง QIAxcel



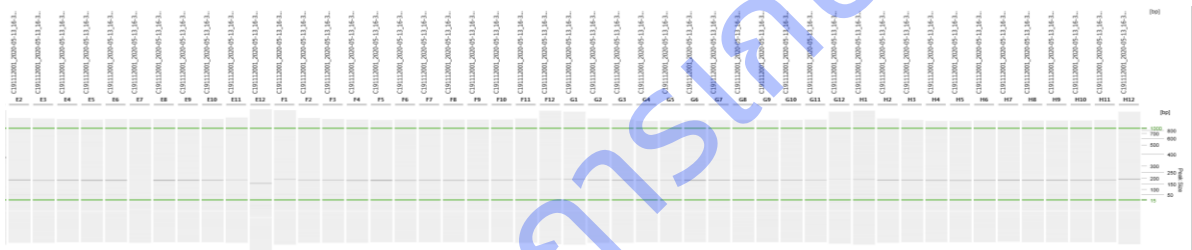
ภาพที่ 18 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL7 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-79 จากเครื่อง QIAxcel



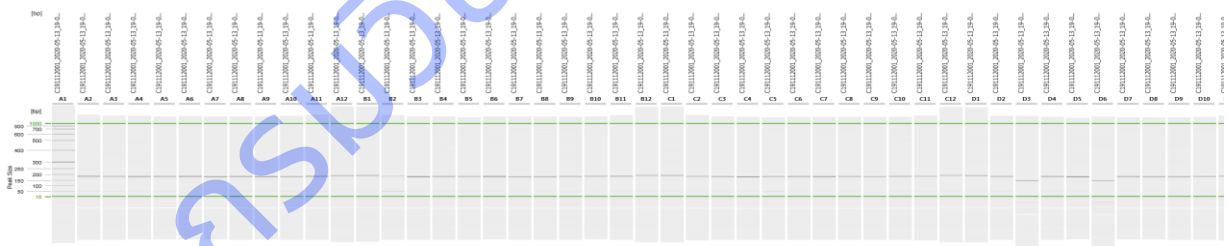
ภาพที่ 4.19 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel



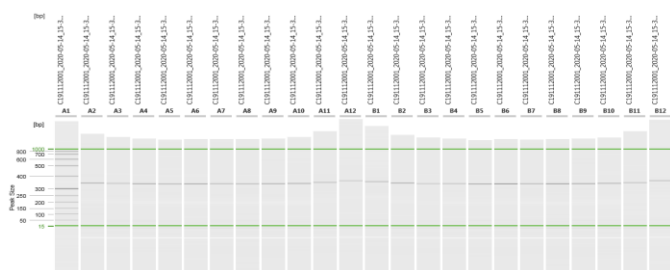
ภาพที่ 4.20 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GUN 5 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-79 จากเครื่อง QIAxcel



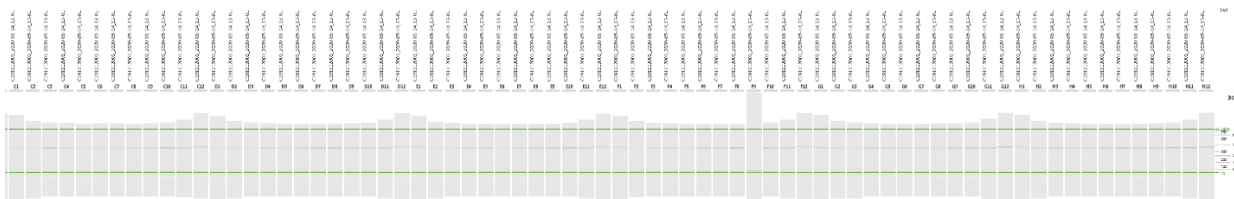
ภาพที่ 4.21 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel



ภาพที่ 4.22 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel



ภาพที่ 4.23 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel



ภาพที่ 4.24 แถบผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ BGL2 กับมันสำปะหลังลูกผสม CMR 62-11 จากเครื่อง QIAxcel

### การหาเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP

จากข้อมูลที่ได้จากผลของ GBS ของมันสำปะหลังทั้ง 71 สายพันธุ์ นำมาวิเคราะห์ SNPs (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 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

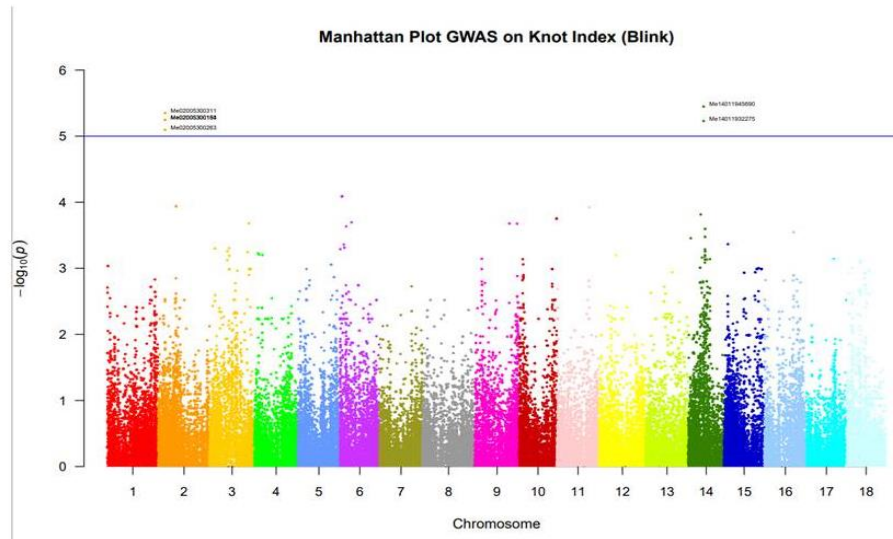
จากตารางที่ 4.5 จากผลของ Genotyping by sequencing (GBS) ในมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ มีรูปแบบ SNPs รวมทั้งหมด 2688 รูปแบบ คิดเป็น 100% โดยเป็นแบบ transitions ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสของดีเอ็นเอประเภทเดียวกัน คือ Purine เปลี่ยนเป็น Purine (A/G, G/A) Pyrimidine เปลี่ยนเป็น Pyrimidine (C/T, T/C) 70.91% 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 4.4) ร่วมกับข้อมูล GBS พบว่า สามารถหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรครากปมของมันสำปะหลัง จำนวน 6 ชุด (ตารางที่ 4.5) อยู่บนโครโมโซมที่ 2 จำนวน 4 ชุด ได้แก่ Me02005300154 Me02005300193 Me02005300263 Me02005300311 อยู่บนโครโมโซมที่ 14 จำนวน 2 ชุด ได้แก่ Me14011932275 Me14011945690 (ภาพที่ 4.25) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกมันสำปะหลังที่ต้านทานโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยจำนวน 6 ชุด ไพรเมอร์

ตารางที่ 4.5 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปมแบบ tetra primer จำนวน 4 ยีน, ข้อมูล EST จำนวน 6 EST และจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 31 คู่ไพรเมอร์

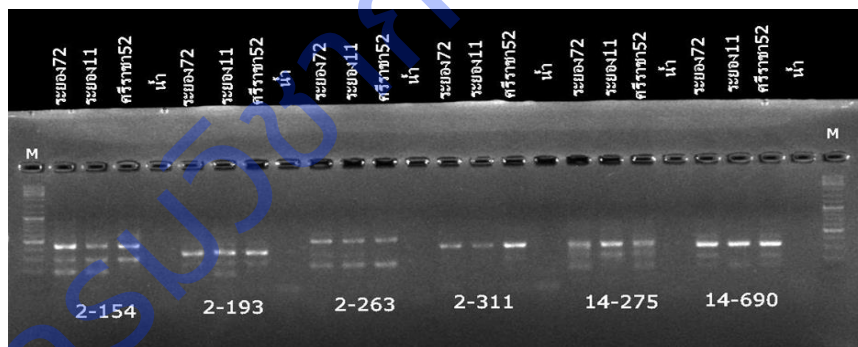
ลำดับ	ชื่อ primer	ลำดับเบส	จำนวนเบส
ชุดที่ 1 Me02005300154	2-154-1F	GAGCAAGCCGAGCCGATGTTTC	21
	2-154-2R	CAACTGCTGCACCACCGCACTA	22
	2-154-3F	TGCCGATGCTGGTCATGCTACTACT	25
	2-154-4R	TGCAAAACAGGGACCAAATGAACCT	25
Product size for C allele: 188 Product size for T allele: 276 Product size of two outer primers: 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			
ชุดที่ 3 Me02005300263	2-263-1F	GGTTTGTGCTGCTTGTAAGTTAGGC	26
	2-263-2R	AAAATTGAAGCTCTGATTCACTTCATAAA	30
	2-263-3F	CGTCATTGTGTCTGCTTCCAGATCT	25
	2-263-4R	TTTATCCTCGCACGTACAGCATTTTC	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	TCAATTTTCTGAGGTTTCATTTGGTACT	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	GATATCAAAAAGAAGGATTTATGAATTCC	28
	14-690-2R	AGAGAACTGCCAACATAGCCA	21
	14-690-3F	CATGGATATTGTCTGAGTTGAGCTTTAT	26
	14-690-4R	CTGCTTCTCAAAAATTTAAAAGGAAA	25
Product size for C allele: 161 Product size for T allele: 236 Product size of two outer primers: 348			





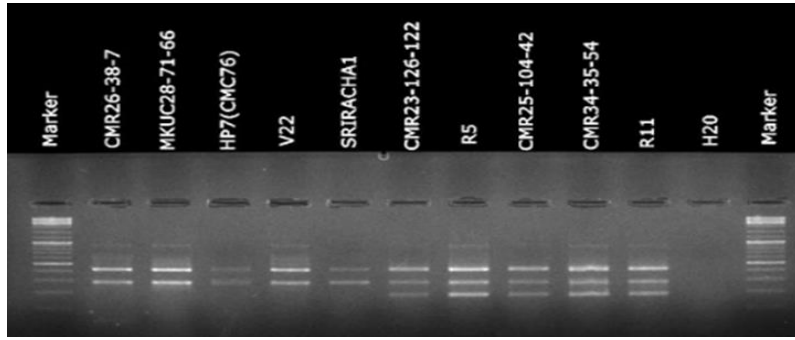
ภาพที่ 4.25 การวิเคราะห์ข้อมูล GBS แบบ GWAS โดยใช้ฐานข้อมูลจากดัชนีโรครากปมของมันสำปะหลัง 71 สายพันธุ์

ทำการทดสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์มันสำปะหลังด้านทานและอ่อนแอต่อโรครากปม โดยใช้ตัวแทนพันธุ์ที่ด้านทานคือ Sriracha 1 และตัวแทนพันธุ์ที่อ่อนแอคือพันธุ์ระยอง ระยอง 72 ระยอง 11 พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 (2-154) และ ชุดที่ 2 (2-193) ให้ผลตรงตามลักษณะ genotype ของมันสำปะหลังที่ด้านทาน สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ด้านทานได้ โดยระยอง 72 และ ระยอง 11 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอจะให้แถบ 2 แถบ ในขณะที่ ศรีราชา ซึ่งเป็นพันธุ์ด้านทาน จะให้แถบ 1 แถบ ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล ชุดที่ 3, 4, 5, 6 ให้แถบดีเอ็นเอที่ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์อ่อนแอกับพันธุ์ด้านทานมันสำปะหลังได้ (ภาพที่ 4.26)

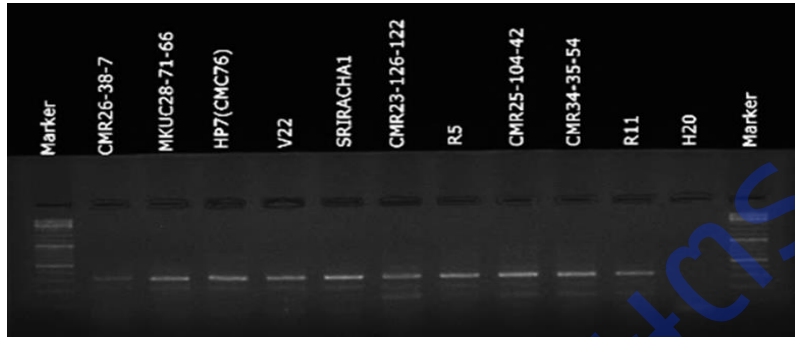


ภาพที่ 4.26 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ทั้ง 6 ชุด

จากนั้นจึงเลือกพันธุ์ที่ด้านทานมาทดสอบอีกครั้ง 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 สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ด้านทานได้ โดยแยกความแตกต่างจากแถบที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ด้านทานโรคโดยให้แถบ 2 แถบ และพันธุ์อ่อนแอต่อโรคให้แถบ 3 แถบ (ภาพที่ 4.27 และ 4.28)



ภาพที่ 4.27 แสดงแถบดีเอ็นเอของน้ำมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ชุดที่1 Me02005300154



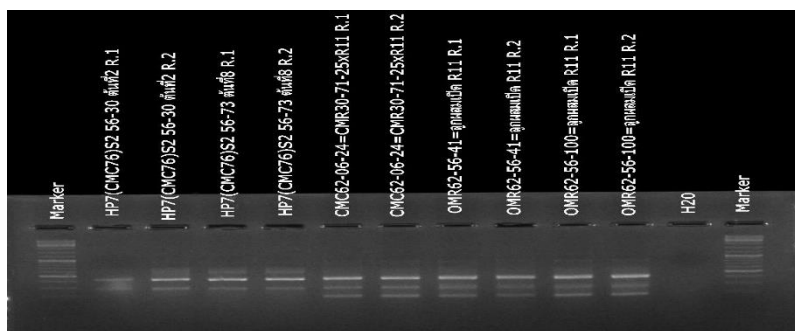
ภาพที่ 4.28 แสดงแถบดีเอ็นเอของน้ำมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ชุดที่2 Me02005300193

ทำการเตรียมเพิ่มปริมาณใส่เดือนฝอยสาเหตุโรครากปม โดยเก็บดินมาจากแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่จังหวัดกาฬสินธุ์ นำมาเพิ่มขยายใส่เดือนฝอยในมะเขือเทศ 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

หลังจากใส่ดินที่มีใส่เดือนฝอยในมันสำปะหลังทั้ง 5 พันธุ์ เป็นเวลา 1 เดือน ได้นำท่อนพันธุ์มาดูลักษณะราก ซึ่งไม่ปรากฏลักษณะรากปม น่าจะเป็นเพราะจำนวนใส่เดือนฝอยที่ใส่ในดินมีจำนวนไม่มากพอที่จะทำให้เกิดรากปมได้

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



ภาพที่ 4.29 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันเป็นสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ 2-154

ตารางที่ 4.6 แสดงขนาดการปรากฏแถบดีเอ็นเอมันสำปะหลังในชุดไพรเมอร์ 2-154 เครื่องหมาย/แสดงผลที่ปรากฏจากการรันเจล

สายพันธุ์มันสำปะหลัง	อัลลล C =188 bp	อัลลล 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	-	-	-

ทำการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติมกับมันสำปะหลังลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่เป็นพันธุ์ R11 ได้แก่ มันสำปะหลัง จำนวน 17 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 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 สายพันธุ์รวมทั้งพันธุ์พ่อแม่ไปทดสอบกับไพรเมอร์ชุดที่ 1, 2, 3 พบว่า ชุดที่ 1 จะให้แถบที่ชัดเจน สายพันธุ์ R11 ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอจะให้แถบชัดเจน ส่วนพันธุ์พ่อและแม่พันธุ์อื่นมีทั้งพันธุ์อ่อนแอและต้านทานโรครากปม ผลที่ได้ในลูกผสมแต่ละต้นจะมีลักษณะที่ต่างกันออกไปคือ จะมีทั้ง 2 แถบและ 3 แถบ ซึ่งในการปรับปรุงพันธุ์สามารถเลือกเอาต้นที่ให้ผลผลิต PCR เป็น 2 แถบ ซึ่งหมายถึงลักษณะต้านทานโรครากปม ไปปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้



ภาพที่ 4.30 แสดงแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังลูกผสมสายพันธุ์ต่างๆ จากการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ 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)     |

ในการหาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้คัดเลือกมันสำปะหลังที่ต้านทานโรครากปม ได้ทำการหาเครื่องหมายโมเลกุล โดยการออกแบบไพรเมอร์ 3 แบบด้วยกัน 1) หาเครื่องหมายโมเลกุลจากฐานข้อมูล 2) การหาเครื่องหมายโมเลกุลโดยการออกแบบ ILP 3) การหาเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP จะให้ผลดี แม่นยำกว่าสองวิธี ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะต้านทานโรครากปมได้

## การทดลองที่ 5 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังการสรุปผลการดำเนินงาน

1. เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำที่รวบรวมจากเอกสารทางวิชาการต่างๆ ได้แก่ ลักษณะแป้งสูง จำนวน 3 คู่ (MeES1019 MeES959 และ SSRY60) ลักษณะไซยาไนด์ต่ำจำนวน 5 คู่ (SSRY28 SSRY77 SSRY103 SSRY105 และ SSRY242) และเมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 8 ชนิด ทดสอบประสิทธิภาพกับมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ที่รวบรวมอยู่ในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิดใช้แยกความแตกต่างในพันธุ์ลูกผสมที่ใช้พันธุ์ห่านาที่ หรือ พันธุ์ห้วยบง 60 เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ แต่เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลทดสอบประสิทธิภาพกับพันธุ์มันสำปะหลังอื่นๆ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวไม่สามารถจำแนกลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำได้

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

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

4. ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับ ด้วยเทคนิค Pyrosequencing จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ SNP 2, SNP 5 และ SNP 6 ที่แสดงจีโนมโทป AA GG และ AG และเมื่อทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับเปรียบเทียบกับผลพีโนโทป (% amylose) แม้ว่า เครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 5 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลพีโนโทปของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 15.12 คิดเป็นร้อยละ 58.64 ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 2 และ SNP 6 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลพีโนโทปของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งสูง (% amylose) สูงถึงร้อยละ 70.94 และ 69.62 ตามลำดับ ซึ่งสามารถใช้คัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับด้วยเทคนิค Pyrosequencing มีราคาค่อนข้างสูง ซึ่งจะดำเนินการพัฒนาการตรวจสอบด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR ซึ่งมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าและมีขั้นตอนการตรวจสอบ สะดวกกว่าในอนาคตต่อไป

## ผลการดำเนินงาน

1. รวบรวมและทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในหัวมันสำปะหลัง ทำการรวบรวมเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำจากเอกสารทางวิชาการต่างๆ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำในมันสำปะหลัง เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Simple Sequence Repeat (SSR) จึงคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูง จำนวน 3 คู่ ได้แก่ MeES1019 MeES959 และ SSRY60 เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะไซยาไนด์ต่ำจำนวน 5 คู่ ได้แก่ SSRY28 SSRY77 SSRY103 SSRY105 และ SSRY242 ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำ

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

มันสำปะหลังที่นำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล ใช้สำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ ที่เก็บรวบรวมในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 59 พันธุ์ โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ พ่อแม่พันธุ์ของเครื่องหมายโมเลกุล (หัวบง60 และพันธุ์ห่านาที) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของหัวบง 60 และห่านาที (4 พันธุ์) (ตารางที่ 5.2)

ตารางที่ 5.2 สายพันธุ์มันสำปะหลังที่นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล

ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (%)	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (%)
<b>กลุ่มมันสำปะหลังแป้งสูง</b>		<b>กลุ่มมันสำปะหลังแป้งสูง</b>	
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) 21-5Q	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 25-38-157Q	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 25-32-429Q	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 (%)
<b>กลุ่มมันสำปะหลังแป้งต่ำ</b>		<b>กลุ่มมันสำปะหลังรับปะทาน</b>	
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
<b>กลุ่มมันสำปะหลังลูกผสม</b>		<b>กลุ่มมันสำปะหลังลูกผสม</b>	
(R x Hanatee) 21-21Q	22.5	พิรุณ 2	-
(R x Hanatee) 21-28Q*	-	HB 60	-
พิรุณ 1	-	HANATEE	23.0

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 8 เครื่องหมาย กับมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 และ พันธุ์ห่านาที่ ซึ่งเป็นพ่อแม่พันธุ์ของเครื่องหมายโมเลกุล พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูง SSRY60 และ MeES0959 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ห้วยบง 60 และ พันธุ์ห่านาที่ได้ โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5.1 และตารางที่ 5.3) ยกเว้นเครื่องหมายโมเลกุล MeES1019 ไม่พบแถบดีเอ็นเอในมันสำปะหลังทั้ง 2 พันธุ์ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะไซยาไนด์ SSRY28 SSRY77 SSRY103 SSRY105 และ SSRY242 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ห้วยบง 60 และ พันธุ์ห่านาที่ได้ (ภาพที่ 5.1 และตารางที่ 5.2) จึงนำเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 7 เครื่องหมาย ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลกับมันสำปะหลังจำนวน 59 พันธุ์ที่คัดเลือกไว้



ภาพที่ 5.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูง (MeES1019, MeES959 และ SSRY60) (ข) เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะไซยาไนต์ SSRY28, SSRY77, SSRY103, SSRY105, SSRY242) กับมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง60 และพันธุ์ห่านาที่

ตารางที่ 5.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ กับมันสำปะหลังพันธุ์ ห้วยบง 60 และ พันธุ์ห่านาที่

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

เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูง MeES959 และ SSRY60 และเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะไซยาไนต์ SSRY28 SSRY77 SSRY103 SSRY105 และ SSRY242 ทดสอบประสิทธิภาพกับมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ที่รวบรวมอยู่ในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 59 พันธุ์ พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิดใช้แยกความแตกต่างในพันธุ์ลูกผสมที่ใช้พันธุ์ห่านาที่ หรือ พันธุ์ห้วยบงเป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ (ตารางที่ 5.4) แต่เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลทดสอบประสิทธิภาพกับพันธุ์มันสำปะหลังอื่นๆ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 7 ชนิด ไม่สามารถจำแนกลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนต์ต่ำได้ (ตารางที่ 5.4) แสดงว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 7 ชนิด สามารถใช้คัดเลือกมันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสมที่ใช้พันธุ์ห่านาที่ หรือ พันธุ์ห้วยบงเป็นพ่อแม่พันธุ์เท่านั้น ไม่สามารถใช้คัดเลือกในมันสำปะหลังพันธุ์อื่นได้ ดังนั้นจึงต้องพัฒนาหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนต์ต่ำ ด้วยเทคโนโลยี Genotyping By Sequencing (GBS) ต่อไป



ตารางที่ 5.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแปंगสูงและเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไฮยาไนต์ต่ำกับพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ จำนวน 59 พันธุ์ ได้แก่ หัวยง 60 พันธุ์ห่านาที่ กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แปंगสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แปंगต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของหัวยง 60 และห่านาที่ (4 พันธุ์)

พันธุ์มันสำปะหลัง	เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแปंगสูง				เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไฮยาไนต์ต่ำ									
	SSRY60		MeEs0959		SSRY28	SSRY103	SSR105	SSRY242	SSRY77					
กลุ่มมันสำปะหลังแปंगสูง														
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

ตารางที่ 5.4(ต่อ) ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแปंगสูงและเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไฮยาไนด์ต่ำกับพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ จำนวน 59 พันธุ์ ได้แก่ หัวยบง 60 พันธุ์ หนานาที่ กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แปंगสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แปंगต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของหัวยบง 60 และ หนานาที่ (4 พันธุ์)

พันธุ์มันสำปะหลัง	เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแปंगสูง				เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไฮยาไนด์ต่ำ								
	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

ตารางที่ 5.4(ต่อ) ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูงและเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนต์ต่ำกับพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ จำนวน 59 พันธุ์ ได้แก่ หัวยบง 60 พันธุ์ห้านาที่ กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของหัวยบง 60 และ ห้านาที่ (4 พันธุ์)

พันธุ์มันสำปะหลัง	เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแป้งสูง				เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนต์ต่ำ									
	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	
<b>กลุ่มมันสำปะหลังแป้งต่ำ</b>														
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								
<b>กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน</b>														
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

ตารางที่ 5.4(ต่อ) ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแปงสูงและเครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนด์ต่ำกับพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ จำนวน 59 พันธุ์ ได้แก่ หัวยบง 60 พันธุ์ห่านาที่ กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แปงสูง (42 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซ็นต์แปงต่ำ (5 พันธุ์) กลุ่มมันสำปะหลังรับประทาน (6 พันธุ์) และกลุ่มมันสำปะหลังลูกผสมของหัวยบง 60 และห่านาที่ (4 พันธุ์)

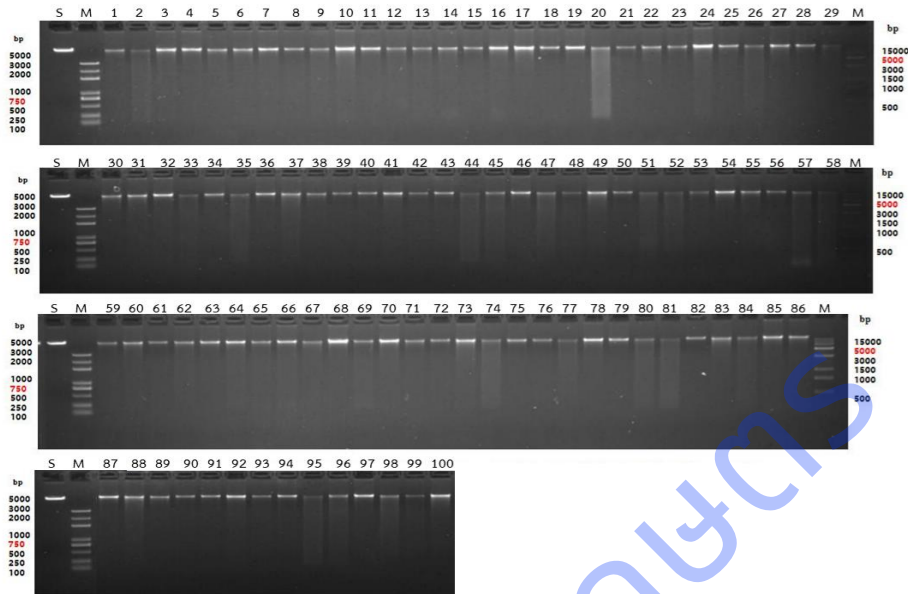
พันธุ์มันสำปะหลัง	เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะแปงสูง				เครื่องหมายโมเลกุลลักษณะไซยาไนด์ต่ำ										
	SSRY60		MeEs0959		SSRY28		SSRY103		SSR105		SSRY242		SSRY77		
<b>กลุ่มมันสำปะหลังลูกผสม</b>															
1	(R x Hanatee) 21-21Q	125	134	265		166	183	266	275	229		300	307	277	
2	(R x Hanatee) 21-28Q*	130	134	265		162	183	266	275	229		307	313	269	277
3	พิจูณ 1	121	127	270	274	166	183	262	272	230		314		277	
4	พิจูณ 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

ตารางที่ 5.5 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			

## 2.2 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอสำหรับวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคโนโลยี Genotyping By Sequencing (GBS)

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



ภาพที่ 5.2 คุณภาพดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 100 สายพันธุ์ ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบจีโนมไทป์และเครื่องหมายโมเลกุล ชนิดสนิประดับจีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS

ตารางที่ 5.6 สายพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้ง ระหว่าง 0 - 33.8 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ ระหว่าง 8.26 - 815 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (วิเคราะห์ปี 2553 - 2558) จำนวน 100 สายพันธุ์ ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบจีโนมไทป์และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิประดับจีโนมด้วยเทคโนโลยี 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
ห่านาฮี	22	59	MBra 781	11.5	120
MENTE GA	25.5	8.26	MBra 792	10.1	952

ตารางที่ 5.6(ต่อ) สายพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้ง ระหว่าง 0 - 33.8 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณ  
 ไชยาไนต์ ระหว่าง 8.26 - 815 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (วิเคราะห์ปี 2553 - 2558) จำนวน 100 สายพันธุ์ ที่นำมาสกัด  
 ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบจีโนไทป์และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีดบีจีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS

ชื่อพันธุ์	% แป้ง	ปริมาณไชยาไนต์	ชื่อพันธุ์	% แป้ง	ปริมาณไชยาไนต์
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

### 2.3 การวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS

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

นำข้อมูลจีโนมไทป์และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับระดับจีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS ของมันสำปะหลังจำนวน 100 สายพันธุ์ ซึ่งมีข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับ จำนวน 1,048,576 ตำแหน่ง ทำการกรอง (Filter) ข้อมูลที่ missing data < 10 % เหลือข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับ จำนวน 324,817 ตำแหน่ง ทำการกรอง (Filter) ข้อมูลอีกครั้งที่ missing data < 10 % Minimum minor allele frequency (MAF) < 0.05, Minimum read depth  $\geq$  20X พบข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับ 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 5.7 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 5.3)





#### 2.4 การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการตรวจ SNP กับลักษณะปริมาณแป้งและไซยาไนด์

ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้นด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR โดยพิจารณาจากการวิเคราะห์รูปแบบความเชื่อมโยงในจีโนมที่คาดว่าสัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์และแป้งในมันสำปะหลัง (Manhattan plot) ได้ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้นด้วยวิธี Tetra-Primer ARMS-PCR จำนวน 14 ชุด (ตารางที่ 5.8) และ 15 ชุด (ตารางที่ 5.9) ตามลำดับ

**ตารางที่ 5.8** 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	ATTGTTCAAATTTCCATTGCAACACTT	Product size for C allele: 266
3STARoutR	TTTGCCAGAACCATTAATCAATACAGT	Product size of two outer primers: 449
4STARinF	GCTCATATAGAAAGTTATGCATAATGGGC	
4STARinR	ATGGGTGATGCCTGAAATAGGGATTA	Product size for C allele: 253
4STARoutF	GTTCCCTTGATCAATTGTTCAAATTTCC	Product size for T allele: 282
4STARoutR	ATAAGATAAGGTTTGACATTTTGCCAG	Product size of two outer primers: 480
5STARinF	CGAAGGAAACAAGCAGAGTTTGACCATAAA	
5STARinR	TTATAGTGTGCGTGTTAGGGCGAGC	Product size for A allele: 198
5STARoutF	TTTAAAAGTGAGGTCACGAGGAGAGGG	Product size for G allele: 138
5STARoutR	TTTGCAAGTCAAACAAGAGCGTGAAA	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	GATGCGTAATTTGCAAGTCAAACAAGA	Product size of two outer primers: 373
8STARinF	TCCATGTTAGGTTGACTATTACAGAAT	
8STARinR	ATTTAAATGCATAATAGAAATTTGAGAC	Product size for T allele: 212
8STARoutF	ATAATCGATTAAAGTGAGAAACAAC	Product size for G allele: 253
8STARoutR	GTACATATGACAATTTTAGATCAGTTATG	Product size of two outer primers: 409

ตารางที่ 5.8(ต่อ) ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด tetra-primer ARMS-PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่เกี่ยวข้องกับ  
กับลักษณะปริมาณแป้งของมันสำปะหลัง จำนวน 14 ชุด

ชื่อไพรเมอร์	Sequence (5'→3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)
11STARinF	TCCAGGAGACCGAGTACTTGTTCGTA	
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	GTCCATGAGAAAGGGCCTTAGAGAT	Product size for T allele: 224
12STARoutF	TCAAAAATTTTAGTTTGCGGAACATAAA	Product size for A allele: 264
12STARoutR	CTTTGTATACACAACCAAATCCACCTTC	Product size of two outer primers: 432
13STARinF	TAGTTGTACTATTACAGGATTTGCA	
13STARinR	TTTATTCATTAATAATGCATAATAGAAAGTC	Product size for A allele: 202
13STARoutF	AGATAATCGATTAAGTGAGAAACAAC	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	CATCACATCACTTGGTTTATAGGGTTT	Product size of two outer primers: 305
16STARinF	CTAAAACAGAAAACAGATGATAAAGAACAA	
16STARinR	GCATCTGTTTCTAAAAGTGGATTCTC	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

ตารางที่ 5.9 ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด tetra-primer ARMS-PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่เกี่ยวข้องกับ ลักษณะปริมาณไขมันในตัวของมันสำปะหลัง จำนวน 15 ชุด

ชื่อไพรเมอร์	Sequence (5'→3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)
1CHNinF	CCCTTATACCTATAAACCTGTGCGTA	
1CHNinR	CCACTAGACAAAAAACTCAAAAAATCTAC	Product size for A allele: 198
1CHNoutF	TGTCTATTTTGTGTTTACACATGTTGAAAC	Product size for G allele: 138
1CHNoutR	TGCTAATATTAATGCGAGATGAAGTAGT	Product size of two outer primers: 280
2CHNinF	TTATCGATTTTTTGTGTTTTTTGTATG	
2CHNinR	GCAATCTGGCATGGGGATGCCCCCT	Product size for G allele: 254
2CHNoutF	CAAAGTCGATTTGGTAAAAGATGTGGCCT	Product size for A allele: 282
2CHNoutR	CAAACCTCATTTCAAATTGGTGCGAAG	Product size of two outer primers: 482
3CHNinF	AAAGAAGCCATGAATCCAAAGCAATT	
3CHNinR	ACCATACCTCACACTCTTTCAAGTTGCT	Product size for T allele: 186
3CHNoutF	AACTTTTCTGAATTGAATTGTTGGTG	Product size for A allele: 133
3CHNoutR	ACCATAAAGTCACTGACCAAATGGAAGT	Product size of two outer primers: 265
4CHNinF	TGATGCTCTCACTCTCAACCTCTGATC	
4CHNinR	CCTCATGCCAGACCTGAAGCTCGGA	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	ATCTGCCACCTTCTGTCAAGGTTAAAA	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	TTGATTAAGCCACTTGGGTTTCATGTCTA	Product size of two outer primers: 323
7CHNinF	AGCAATAAATAATGATAATCTAACTCCCTG	
7CHNinR	GTGATTCTGTGAGTCCACAACACTACGGA	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	TCCTACGTGATGTTGTGTCGAAATTAA	Product size for G allele: 277
8CHNoutR	AAAGAATCCAGAGATACAGATGCCCATG	Product size of two outer primers: 428

ตารางที่ 5.9(ต่อ) ชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด tetra-primer ARMS-PCR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ SNP ที่เกี่ยวข้องกับ  
กับลักษณะปริมาณไขมันในเลือดของม้าป่าหลัง 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	TGGACTCTAATTCCTGTCAAATATGTTCTG	
10CHNinR	CGTATTGTGTTATGGACAATGTTATGTGT	Product size for G allele: 211
10CHNoutF	AACCAAATAACGGTAACCAAATCATA	Product size for A allele: 167
10CHNoutR	ATTTTGATAACTTGAAGGATAAGCAAG	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	ATAACAAGAGAAAAATCGTGTGTTGA	Product size of two outer primers: 369
13CHNinF	GTGGACTCACAGAATCACAAGTCATTGTAC	
13CHNinR	GAAGGGGAGGAATTATTTCTCACCCA	Product size for C allele: 207
13CHNoutF	CTTGCAAATCTGAGGCTTATTTATGG	Product size for T allele: 246
13CHNoutR	TGGTGGTTCTTGAATCATAGGAACAAA	Product size of two outer primers: 397
14CHNinF	ATTGTTAGTCGTTCCACAGTAGAGGTAG	
14CHNinR	ACGGTGGAGGCCATGCTTTTGTACTA	Product size for G allele: 207
14CHNoutF	TCCAACACTTGAAGACCCCTGACTAGA	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	CACGCTTTTGAATCTTTTCATATTTTT	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

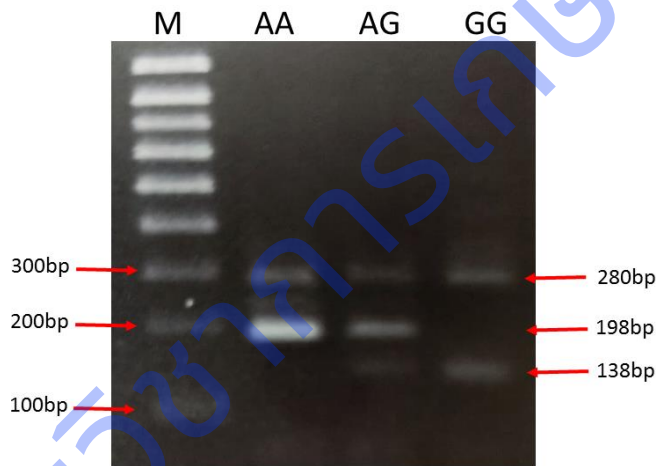
2.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณแป้งและไซยาไนด์ของมันสำปะหลัง

2.5.1 การตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง

ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้งทั้ง 14 ชุด โดยทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่มีอัลลีลต่างๆ พบว่าชุดไพรเมอร์ทั้ง 14 ชุดไม่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ดังนั้นการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่สัมพันธ์กับปริมาณแป้งด้วยเทคนิค Pyrosequencing เป็นอีกวิธีหนึ่งจะใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปได้

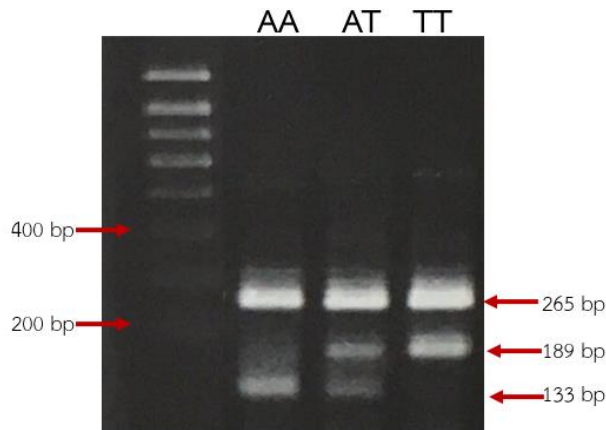
2.5.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์

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) จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 280 และ 198 คู่เบส และ มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส (homozygous: อัลลีล GG) จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 280 และ 138 คู่เบส (ภาพที่ 5)



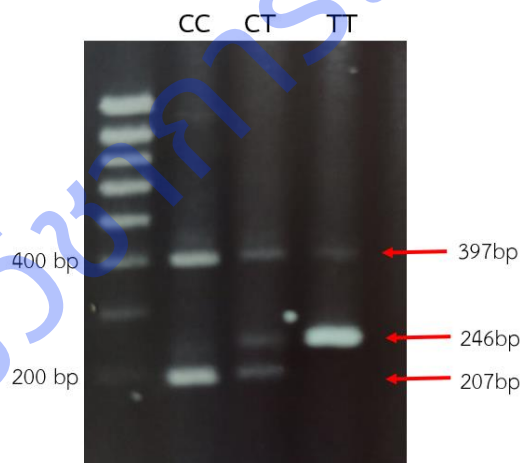
ภาพที่ 5.5 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ชุดที่ 1 (1CHN) โดยใช้มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 280 mg HCN/kg น้ำหนักสด (อัลลีล AA) และมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า 280 mg HCN/kg น้ำหนักสด (อัลลีล AG และ อัลลีล GG)

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



**ภาพที่ 5.6** ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ชุดที่ 3 (3CHN) โดยใช้มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด (อัลลีล TT) และมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด (อัลลีล AT และ อัลลีล AA)

เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป ชุดที่ 13 (13CHN) ทดสอบกับมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดเฮเทอโรไซกัส (heterozygous: อัลลีล CT) จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 397 246 และ 207 คู่เบส มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส (homozygous: อัลลีล CC) จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 397 และ 207 คู่เบส และ มันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส (homozygous: อัลลีล TT) จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 397 และ 246 คู่เบส (ภาพที่ 5.7)



**ภาพที่ 5.7** 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 สามารถใช้ในการตรวจสอบลักษณะไซยาไนด์ของมันสำปะหลังได้อย่างถูกต้องและแม่นยำพบว่า เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปชุดที่ 1 (1CHN) ชุดที่ 3 (3CHN) และชุดที่ 13 (13CHN) สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลฟีโนไทป์ (phenotype) คิดเป็นร้อยละ 64.81 73.33 และ 76.64 ตามลำดับ (ตารางที่ 10 - 12)

ตารางที่ 5.10 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิป 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



ตารางที่ 5.10(ต่อ)

รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 1CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณโซยานิติน้ำมันสำปะหลัง จำนวน 108 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณโซยานิติน	รูปแบบของการใช้		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณโซยานิติน	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

ตารางที่ 5.10(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 1CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 108 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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	ห่านาที่	178.89	1	T
จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)		True (T)	70/108 (64.81)						
		False (F)	38/108 (35.19)						

<sup>(1)</sup> รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 แถบตีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 280 mgHCN/kg น้ำหนักสด

2 และ 3 แถบตีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า 280 mgHCN/kg น้ำหนักสด

T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์

F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์

ตารางที่ 5.11 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 120 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>
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

ตารางที่ 5.11(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิป 3CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 120 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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

ตารางที่ 5.11(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิป 3CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 120 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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	ห่านาที่	178.89	1	T
<b>จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)</b>		<b>True (T)</b>	<b>88/120 (73.33)</b>						
		<b>False (F)</b>	<b>32/120 (26.67)</b>						

<sup>(1)</sup> รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 แถบตีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mgHCN/kg น้ำหนักสด  
 2 และ 3 แถบตีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า 250 mgHCN/kg น้ำหนักสด  
 T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์  
 F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์

ตารางที่ 5.12 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 13CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 137 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>
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

ตารางที่ 5.12(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปี 13CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 137 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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

ตารางที่ 5.12(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปี 13CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 137 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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



ตารางที่ 5.12(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิป 13CHN เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 137 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณไซยาไนด์ (mgHCN/kg น้ำหนักสด)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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)						

<sup>(1)</sup> รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mgHCN/kg น้ำหนักสด  
 2 และ 3 แถบดีเอ็นเอของพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์สูงกว่า 250 mgHCN/kg น้ำหนักสด  
 T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์  
 F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์

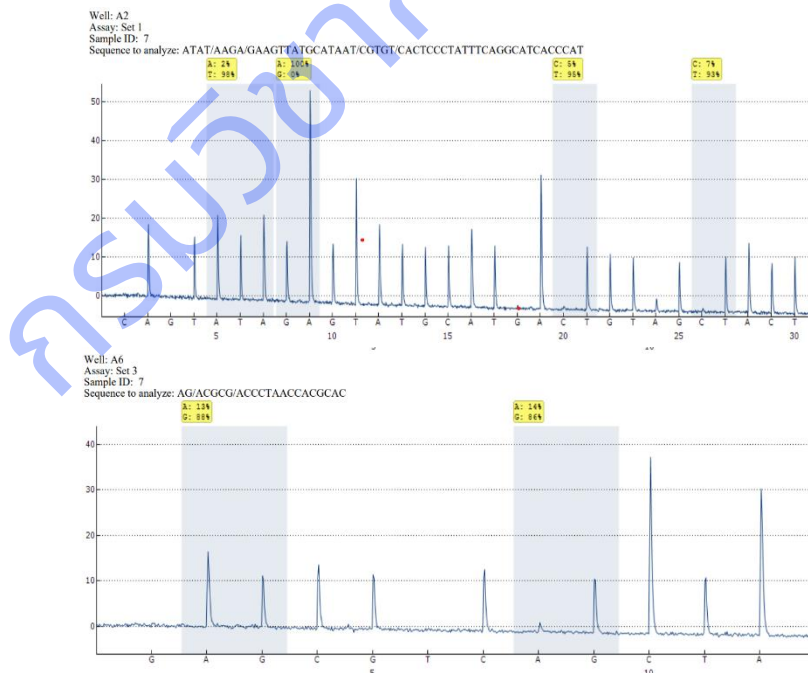
## 2.6 การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่สัมพันธ์กับปริมาณแป้งด้วยเทคนิค Pyrosequencing

ใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์รูปแบบความเชื่อมโยงในจีโนมที่คาดว่าสัมพันธ์กับปริมาณแป้งในมันสำปะหลัง (Manhattan plot) ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป ได้ไพรเมอร์ชุดที่ 1 ซึ่งสามารถครอบคลุมสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง ถึง 4 ตำแหน่ง ส่วนไพรเมอร์ชุดที่ 2 จะครอบคลุมสนิป จำนวน 2 ตำแหน่ง (ตารางที่ 5.13)

ตารางที่ 5.13 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 โดยนำจีโนไทป์เปรียบเทียบกับผลพีโนไทป์ (% amylose) พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 2 และ SNP 6 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลพีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 10.83 คิดเป็นร้อยละ 70.94 และ 69.62 ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 5 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลพีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 15.12 คิดเป็นร้อยละ 58.64 (ตารางที่ 5.14 – 5.16)



ภาพที่ 5.8 ผลโครมาโตแกรมแสดงเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป จำนวน 6 ตำแหน่ง ประกอบด้วย SNP 1, SNP 2, SNP 3, SNP 4, SNP 5, และ SNP 6 ของมันสำปะหลัง สายพันธุ์ระยอง 7 ด้วยเทคนิค Pyrosequencing

ตารางที่ 5.14 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิป SNP2 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 118 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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

ตารางที่ 5.14(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิป SNP2 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 118 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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

ตารางที่ 5.14(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้น SNP2 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 118 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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

ตารางที่ 5.14(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิป SNP2 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 118 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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
<b>จำนวนสายพันธุ์ (ร้อยละ)</b>		<b>True (T)</b>	<b>83/118 (70.33)</b>						
		<b>False (F)</b>	<b>35/118 (29.67)</b>						

<sup>(1)</sup> รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 และ 3 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 10.83

2 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) ต่ำกว่า 10.83

T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

ตารางที่ 5.15 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิป SNP5 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 133 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>
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

ตารางที่ 5.15(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้น SNP5 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 133 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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



ตารางที่ 5.15(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้น SNP5 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 133 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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	พิจิตร 2	7.02	2	T
100	MTai 1	13.06	2	T	120	ยอดดำ	16.22	2	F

ตารางที่ 5.15(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้น SNP5 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 133 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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	ห่านาที่	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)						

<sup>(1)</sup> รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 15.12

2 และ 3 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) ต่ำกว่า 15.12

T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

ตารางที่ 5.16 รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้น SNP6 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 135 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>
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

ตารางที่ 5.16(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้น SNP6 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 135 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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

ตารางที่ 5.16(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้น SNP6 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 135 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้ เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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

ตารางที่ 5.16(ต่อ) รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้น SNP6 เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose) ในหัวมันสำปะหลัง จำนวน 135 สายพันธุ์

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>		ลำดับที่	ชื่อพันธุ์	ปริมาณแป้ง (% amylose)	รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล <sup>(1)</sup>	
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	ห่านาที	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)						

<sup>(1)</sup> รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุล; 1 และ 2 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 10.83%

3 จีโนไทป์ของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) ต่ำกว่า 10.83%

T = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

F = รูปแบบของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (% amylose)

## การทดลองที่ 6 การตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (waxy starch) ในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล สรุปผลการดำเนินงาน

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

การตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (Waxy starch) ในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลตามรายงาน Aiemnaka และคณะ (2012) ซึ่งมีลักษณะจีโนไทป์ของแป้งเหนียว(Waxy) เป็นแบบด้อย หรือ wxwx ผลการตรวจสอบในตัวอย่าง มันสำปะหลัง จำนวนทั้งสิ้น 758 พันธุ์ จากแหล่งรวบรวมพันธุ์ (ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง) พบให้จีโนไทป์เป็นแบบ WxWx, Wxwx และ wxwx มีจำนวน 522 202 และ 17 ตัวอย่าง ตามลำดับ ทำการคัดเลือกลักษณะจีโนไทป์แบบข่มร่วมและด้อย ได้จำนวน 219 ตัวอย่าง นำไปตรวจสอบตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธี TaqMan probes ต่อไป

### 2. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธี TaqMan probes

การโคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GBSSI ในมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียวที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก มูลนิธิมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย ได้ขึ้นยีนขนาด 1,753 คู่เบส นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว (waxy) พันธุ์ KU50 พันธุ์ห้วยบง 60 และข้อมูลยีน M. esculenta granule-bound starch synthase หมายเลข X74160.1 ขนาด 502 คู่เบส มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 166 อะมิโน นำมาเปรียบเทียบกัน พบตำแหน่งที่ 229 ของมันสำปะหลังแป้งเหนียว (WaxyHB1) มีความแตกต่างจากลำดับเบส G เป็นเบส T เมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีน พบว่าเป็นตำแหน่งหยุดการสร้างโปรตีน (stop codon) ซึ่งมีรหัสโคดอนเป็น TGA จึงนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังด้วยวิธี TaqMan probes ผลการตรวจสอบกับตัวอย่างมันสำปะหลัง จำนวน 221 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างมันสำปะหลังแป้งเหนียว 2 ตัวอย่าง และมันสำปะหลังที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 219 ตัวอย่าง พบตำแหน่ง T เฉพาะ ตัวอย่างแป้งเหนียว 2 ตัวอย่าง สำหรับมันสำปะหลังของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองไม่พบตำแหน่ง T พบเฉพาะตำแหน่ง G

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

การค้นหาและเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ด้วยวิธี GBS จากพันธุ์ปกติ และพันธุ์แป้งเหนียว ได้นำ ตัวอย่างดีเอ็นเอ จำนวน 13 ตัวอย่าง จากตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ non waxy จำนวน 11 ตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มมะโมโล สูง ได้แก่ ระยะเวลา 7 ระยะเวลา 9 ระยะเวลา 11 เกษตรศาสตร์ 50 ห้วยบง 80 และ Mcol1702 กลุ่มมะโมโลต่ำ ได้แก่ Mbar191 Mbra691 Mpan70 Mpar104 และ Mpar25 รวมกับมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ HBW 1 และ HBW 2 ได้ข้อมูลเครื่องหมาย SNPs แบบ Bi-Allelic จำนวน 19,057 ตำแหน่ง พบตำแหน่ง SNPs เฉพาะมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว จำนวน 33 ตำแหน่ง แบ่งเป็น SNPs แบบเฮเทอโรไซโกตจำนวน 26 ตำแหน่ง และแบบโฮโมไซโกต จำนวน 7 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถใช้ในคัดเลือก ระบุ หรือจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ต่อไป

### 4. การทดสอบแป้งในหัวมันสำปะหลังด้วยการย้อมสีไอโอดีน (Iodine Staining Test)

การตรวจสอบพีโนไทป์ลักษณะแป้งเหนียวของมันสำปะหลังด้วยการย้อมสีไอโอดีน โดยนำตัวอย่างหัวมันสำปะหลังที่พบ ลักษณะจีโนไทป์เป็นแบบข่มร่วมและด้อย จำนวน 219 ตัวอย่าง มาย้อมสีไอโอดีน โดยการพ่นด้วยสีไอโอดีน 20 เปอร์เซ็นต์ พบทุก ตัวอย่างแสดงผลเป็นสีน้ำเงิน และเมื่อย้อมเม็ดแป้งที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียดด้วยไอโอดีน 12.5 เปอร์เซ็นต์ พบเม็ดแป้งเป็น สีน้ำเงินเช่นกัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) อาจไม่ สัมพันธ์กับลักษณะแป้งเหนียว ซึ่งสามารถใช้คัดเลือกประชากรรุ่นลูกที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว แต่ไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกกลุ่มประชากรอื่นได้

การทดลองนี้ขอเสนอผลการทดลอง และผลการทดลองที่ได้ตรงตามตัวชี้วัดที่ตั้งไว้ในปี 2563 คือได้พันธุ์มันสำปะหลังที่มี จีโนไทป์ลักษณะแป้งเหนียวเป็นแบบ Wxwx จำนวน 202 ตัวอย่าง และแบบ wxwx จำนวน 17 ตัวอย่าง แต่ไม่สามารถคัดเลือก พ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะแป้งเหนียวสำหรับการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงไม่พบมันสำปะหลังที่มีลักษณะพีโนไทป์เป็นแป้ง เหนียว จึงไม่สามารถจัดทำคู่มือและคัดเลือกกลุ่มผสมสำหรับการวิจัยต่อไปในปี 2564 ได้

## ผลการดำเนินงาน

### 1. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธีพีซีอาร์

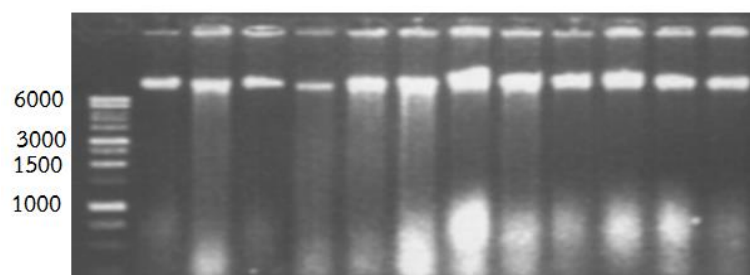
การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) ได้นำเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) (ตารางที่ 6.1 และ ภาพที่ 6.1) โดยทำการตรวจสอบกับพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมไว้ ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดระยอง จำนวน 758 ตัวอย่าง ใบมันสำปะหลังที่เก็บจากแปลงถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีของออร์โงทัยและคณะ (2552) พบดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณมากและคุณภาพที่ดี เมื่อนำไปวัดค่า (O.D) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 อยู่ในช่วง 1.8 - 2.0 (ภาพที่ 6.2)

ตารางที่ 6.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
ไพรเมอร์สำหรับเอ็นเออ้างอิง		
rbcL_F	ATGTCCACCAAAACAGAACTAAAGC	Paween <i>et al.</i> , 2011
rbcL_R	CTTCGGCACAAAATAAGAAACGATCTC	Paween <i>et al.</i> , 2011
ไพรเมอร์สำหรับอัลลีล C		
F2	(GC)ATGTTGAAGTAAGTAAAGATG <u>C</u>	Aiemnaka <i>et al.</i> , 2012
RN	TGCTCAAGGCGTGGGAACGT	Aiemnaka <i>et al.</i> , 2012
ไพรเมอร์สำหรับอัลลีล G		
F4	(GC)ATGTTGAAGTAAGTAAAGATG <u>G</u>	Aiemnaka <i>et al.</i> , 2012
RN	TGCTCAAGGCGTGGGAACGT	Aiemnaka <i>et al.</i> , 2012



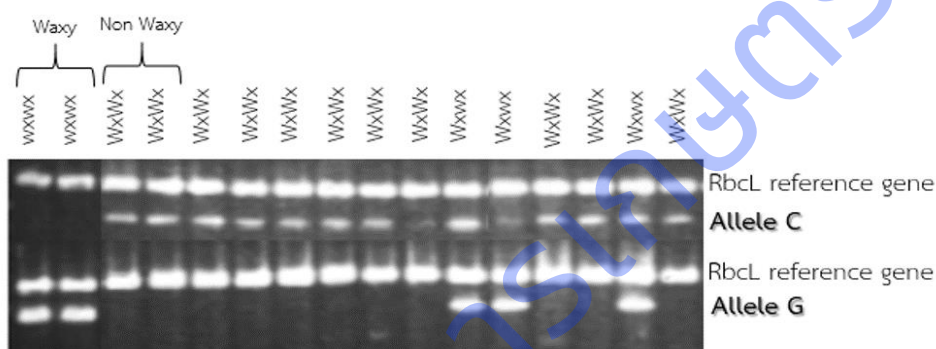
ภาพที่ 6.1 ตำแหน่ง SNPs บนยีน GBSSI ของมันสำปะหลัง (Aiemnaka *et al.*, 2012)



ภาพที่ 6.2 ตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่สกัดด้วยวิธี CTAB บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

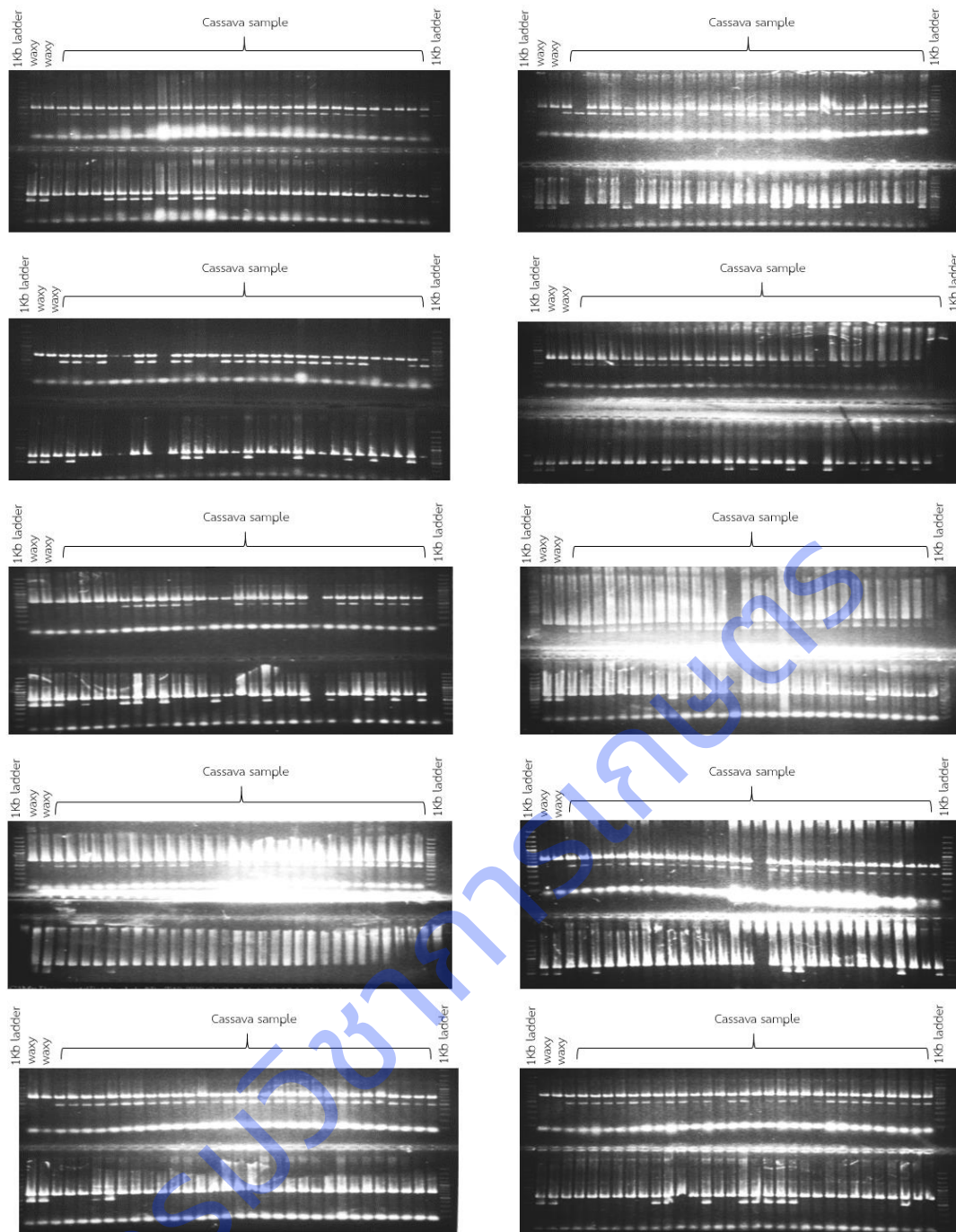


การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธีพีซีอาร์ จำเป็นต้องมีแถบ ดีเอ็นเออ้างอิง ซึ่งการทดลองนี้ได้ไพรเมอร์สากลจากยีน *RbcL* สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออ้างอิง ซึ่งยีนดังกล่าวออกแบบมาจาก ส่วนอนุรักษ์ของยีนจากจีโนมชนิดคลอโรพลาสต์ ให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ สามารถใช้ได้กับพืชทุกชนิด (Paween *et al.*, 2011) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Aiemnaka และคณะ (2012) พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบรวม ไพรเมอร์หลายคู่ได้ จึงเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอแบบแยกหลอดทดลอง เมื่อได้ปฏิกิริยาที่เสร็จสมบูรณ์แล้วนำมารวมเป็นหลอด เดียวกัน แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 1 และ 2 แถบ จำนวนแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ หมายถึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของอัลลีล C หรือ G (ภาพที่ 3) โดยใช้พันธุ์มันสำปะหลังแป้งเหนียว หรือ waxy จากมูลนิธิมัน สำปะหลังแห่งประเทศไทย 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) และ หากปรากฏทั้ง 2 อัลลีล คือจีโนไทป์ลักษณะ Co-dominant ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอจากมันสำปะหลัง จำนวน 758 ตัวอย่าง ด้วยวิธีพีซีอาร์ (ภาพที่ 6.4)



ภาพที่ 6.3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบอัลลีล C และ G ร่วมกับยีนอ้างอิง *RbcL* บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

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



ภาพที่ 6.4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีพีซีอาร์บนอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

## 2. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธี TaqMan probes

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

การโคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GBSSI* ในมันสำปะหลังพันธุ์แปงเหนียวที่ได้รับความนิยมมา จากมูลนิธิมันสำปะหลังแห่งประเทศไทยเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย ได้ขึ้นส่วนยีนขนาด 1,753 คู่เบส (ภาพที่ 6.5) เมื่อนำไป เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล 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 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์แปงเหนียว (waxy) พันธุ์ KU50 พันธุ์ห้วยบง 60 และ ข้อมูลยีน *M. esculenta* granule-bound starch synthase หมายเลข X74160.1 ขนาด 502 คู่เบส (ภาพที่ 6.6) มาแปลรหัส เป็นกรดอะมิโนได้ขนาดความยาว 166 อะมิโน แล้วเปรียบเทียบกัน พบมันสำปะหลังแปงเหนียวมีลำดับอะมิโนที่ขาดหายเมื่อเทียบ กับพันธุ์อื่นๆ (ภาพที่ 6.7) จากนั้นวิเคราะห์หาตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/X>) เพื่อค้นหาตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงกับมันสำปะหลังพันธุ์แปงเหนียว พบ ตำแหน่งที่น่าสนใจ คือ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 229 ของมันสำปะหลังแปงเหนียว (WaxyHB1) มีความแตกต่างจากลำดับเบส G เป็นเบส T เมื่อทำการแปลรหัสเป็นโปรตีนพบว่าเป็นตำแหน่งหยุดการสร้างโปรตีน (stop codon) ซึ่งมีรหัสโคดอนเป็น TGA ดัง ภาพที่ 6 จากการค้นพบตำแหน่งดังกล่าวจึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ที่เกี่ยวข้องลักษณะแปงเหนียวในการ คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังด้วยวิธี TaqMan probes ซึ่งมันสำปะหลัง non waxy จะมีรหัสโคดอน GGA ตำแหน่งที่ใช้ในการ ตรวจสอบเป็น SNPs แบบ Bi-Allelic คือตำแหน่ง T/G (T พบในพันธุ์ waxy และ G พบในพันธุ์ non waxy) การออกแบบ พารามิเตอร์ (parameters) ของไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบด้วยวิธี TaqMan จะต้องมียุค Tm อยู่ในช่วง 58-60 องศา เซลเซียส ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 15-30 คู่เบส มีเปอร์เซ็นต์ GC อยู่ในช่วง 30-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอ เป้าหมายมีความยาว 50-150 คู่เบส (Shen *et al.*, 2009; Woodward, 2014) สำหรับการทดลองนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ด้าน ปลาย 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 6.8) ได้ขึ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 82 คู่เบส (ภาพที่ 6.9) โดยไพรเมอร์ สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ในตำแหน่ง T/G นั้นทำการติดฉลากสี VIC สำหรับตำแหน่งอัลลีล T และฉลากสี FAM สำหรับ ตำแหน่งอัลลีล T โดยมีลำดับเบส ดังนี้ WXprobeT: [MC]-5'-AAAGAGTGAGTTGATCG-3' และ WxprobeG: [FAM]-5'- AAAGAGTGAGTTGATCG-3' นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปตรวจสอบกับตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 221 ตัวอย่าง ที่เป็น ตัวอย่างมันสำปะหลังแปงเหนียว 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะแปงเหนียวด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 219 ตัวอย่าง พบตำแหน่ง T เฉพาะตัวอย่างแปงเหนียว 2 ตัวอย่าง สำหรับมันสำปะหลังของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยะยังไม่พบ ตำแหน่ง T พบเฉพาะตำแหน่ง G (ภาพที่ 6.10)

>HB1

```
GTCGGCGCTAACTTGAGCATCCATGCATTAGAGACTAAGGCTAATAATTTGTCTCACACTGGACCTGGACCCAAACTATCACTCCCAATGGTTTAA
GGTCCCTCAACACTATGGATAAACTC CAAATGAAGACACAATCAAAGCTGTGAAAAAGGTCTCTGCCACCGGCAATGGTAGGCCTGCTGCCAAAAT
TATTTGTGGTCATGGAATCAATTTAATCTTTGTGGAGCTGAAGTTGGTCCCTGGAGCAAACTGGTGGACTTGGTGATGTTCTTGGAGGACTCCCC
CCTGCCATGGCCGCAAGAGGGCACCGCGTCATGACAGTGTCTCCCGCTATGACCAGTACAAGGATGCTTGGGATACCTCTGTATCGGTGGAGATTA
AAATTGCAGATAGAATTGAACTGACCGCTTCTTCCACTCCTACTAAAGA TGA GTTGATCGTGTCTTCGTGGATCATCCAATGTTACTTGAGAAGGT
ATGGGGCAAACTGGATCTAAAATATATGGGCCAAGAGCATGTTTGGAT TACCAGGACAACCAACTGCGATTTAGCTTGTATGCCTTGCTGCTCTG
AATGCACCCGAGAGTTCTGAACTTGAACAGCAGCAAAAATTTCTCAGGACCTACCAGAGAAGAAGTTGCCTTCATTGCCAACGACTGGCACACTGCTC
TGCTTCCATGTTATCTAAAAGCCATTTACCAACCTATGGGGATTACAAAACGCCAAGGTTGCCTTTTGCATCCACAACATGTCATATCAGGCAAGA
TTTGCCTTCTCAGACTTCCACGACTTAACTGTCAGATAAAATCAAGAGCTGTTTTGACTTTATCGATGGGTATGAGAAGCCCGTGAAGGGAAGGA
AAATCAATGGATGAAGGCCGGGATATTGGAATCAGACAGGGTTTGTACTGTGAGCCCTACTATGCCCAAGAAGTCATCTCTGGAGTTGAAAGAGG
CGTCGAGCTGGATAAATTCAATTCGTAAGGCTGGCATTGCTGGTATTATAAATGGCATGGACGCTCCAGGAGTGGAAATCCTGTTACAGATAAAATACATT
GACATCCACTACGATGCCACAACCTGTTATGGACGCAAAACCTTTGTGTAAGGAAGCCCTTCAAGCAGAAGTCGATGCTGCTGTTGATAGGAATGTTT
CTTTGATAGGCTTCAATGGTAGATTAGAAGAGCAGAAGGGTTCAGATATTTTTGTGTCAGCTATTTCCCAATGGTTGAACAAATGTCAGATAGT
AATCCTTGGAACTGGCAAAAAGAAATTTGAGAAGCAGATTGAGCATCTGGAGTTTGTACCTGACAAGGCAAGAGGAGTTGCAAAAATCAATGTG
CCGTTGGCGCACATGATCACAGCTGGTGTGACTTTATGCTGGTTCCAAGTAGATTTGAGCCCTGTGGTCTCATTTCAGTTGCATGCTATGCGATATG
GAACAGTTCCCATTTGCTTCTACTGGTGGTCTGTGTTGATACTGTTAAAAGAGGTTACACAGGATTCCAAATGGGGGCCCTGCATGTTGAATGTGA
CAAAAATTGATTCAGCAGATGTAGCTGCGATAGTTAAAACCTGTGGCAAGAGCTCTTGGCACTTATGCTACCGCTGCATTAAGAGAAATGATCCTGAAT
TGATGGCCCAAGACTTGTGCATGGAAGGGACCAGCCAGAAATGTGGGAGAAAATGCTCCTGGACCTGGAAGTTACTGGCAGCGAACCTGGCACTGAAG
GGAGAGA
```

ภาพที่ 6.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีน *GBSSI* ขนาดความยาว 1,753 คู่เบสของมันสำปะหลังแปงเหนียวจาก มูลนิธิมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย

>WaxyHB1

CTGCCAAAATTATTTGGTTCATGGAATGAATTTAATCTTTGTTGGAGCTGAAGTTGGTCCCTGGAGCAAACCTGGTGGACTTGGTGTATGTTCTTGGAGGACTCCCCCTG  
CCATGGCCGCAAGAGGGCACCGCGTCATGACAGTGTCTCCCCGCTATGACCAGTACAAGGATGCTTGGGATACCTCTGTATCGGTGGAGATTAATAATGGAGATAGAAATTG  
AAACTGACCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGATGAGTTGATCGTGTCTTCTGGATCATCCAATGTTACTTGAGAAGGTATGGGGCAAACCTGGATCTAAAAATATATGGCC  
CAAGAGCATGTTTGGATTACCAGGACAACCAACTGCGATTAGCTTGTATGCCTTGTCTGCTGAATGCACCGAGAGTTCTGAACCTGAACAGCAGCAAATAATTTCTCAG  
GACCTACCGAGAAGAAGTTGCCTTATTGCCAACGACTGGCACACTGCTCTGCTTCC

>KU50

CTGCCAAAATTATTTGGTTCATGGAATGAATTTAATCTTTGTTGGAGCTGAAGTTGGTCCCTGGATCAAACCTGGTGGACTTGGTGTATGATCATGGAGGACTCCCCCTG  
CCATGGCCGCAAGAGGGCACCGCGTCATGACAGTGTCTCCCCGCTATGACCAGTACAAGGATGCTTGGGATACCTCTGTATCGGTGGAGATTAATAATGGAGATAGAAATTG  
AAACTGTCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGATGAGTTGATCGGTCTTCTGGATCATCCAATGTTACTTGAGAAGGTATGGGGCAAACCTGGATCTAAAAATATATGGCC  
CAAGAGCAGGTTTGGATTACCAGGACAACCAACTGCGATTAGCTTGTATGCCTTGTCTGCTGGAGGCCACCGAGAGTTCTGAACCTGAACAGCAGCAAATAATTTCTCAG  
GACCTACCGAGAAGAAGTTGCCTTATTGCCAACGACTGGCACACTGCTCTGCTTCC

>HB60

CTGCCAAAATTATTTGGTTCATGGAATGAATTTAATCTTTGTTGGAGCTGAAGTTGGTCCCTGGATCAAACCTGGTGGACTTGGTGTATGTTCTTGGAGGACTCCCCCTG  
CCATGGCCGCAAGAGGGCACCGCGTCATGACAGTGTCTCCCCGCTATGACCAGTACAAGGATGCTTGGGATACCTCTGTATCGGTGGAGATTAATAATGGAGATAGAAATTG  
AAACTGTCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGATGAGTTGATCGGTCTTCTGGATCATCCAATGTTACTTGAGAAGGTATGGGGCAAACCTGGATCTAAAAATATATGGCC  
CAAGAGCAGGTTTGGATTACCAGGACAACCAACTGCGATTAGCTTGTATGCCTTGTCTGCTGGAGGCCACCGAGAGTTCTGAACCTGAACAGCAGCAAATAATTTCTCAG  
GACCTACCGAGAAGAAGTTGCCTTATTGCCAACGACTGGCACACTGCTCTGCTTCC

>X74160.1

CTGCCAAAATTATTTGGTTCATGGAATGAATTTAATCTTTGTTGGAGCTGAAGTTGGTCCCTGGAGCAAACCTGGTGGACTTGGTGTATGTTCTTGGAGGACTCCCCCTG  
CCATGGCCGCAAGAGGGCACCGCGTCATGACAGTGTCTCCCCGCTATGACCAGTACAAGGATGCTTGGGATACCTCTGTATCGGTGGAGATTAATAATGGAGATAGAAATTG  
AAACTGTCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGATGAGTTGATCGGTCTTCTGGATCATCCAATGTTACTTGAGAAGGTATGGGGCAAACCTGGATCTAAAAATATATGGCC  
CAAGAGCAGGTTTGGATTACCAGGACAACCAACTGCGATTAGCTTGTATGCCTTGTCTGCTGGAGGCCACCGAGAGTTCTGAACCTGAACAGCAGCAAATAATTTCTCAG  
GACCTACCGAGAAGAAGTTGCCTTATTGCCAACGACTGGCACACTGCTCTGCTTCC

ภาพที่ 6.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *GBSSI* จากอาร์เอ็นเอตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว (waxy) พันธุ์ KU50 พันธุ์ห้วยบง 60 และข้อมูลยีน *M. esculenta* granule-bound starch synthase หมายเลข X74160.1 ขนาดความยาว 502 คู่เบส

>WaxyHB1

AKIIICGHGMNLI FVGA E VGPWSKTGGLGDVLGGLPPAMAARGHRVMTVSPRYDQYKDAWD  
TSVSVEIKIADRIETDRFFHSY R-VDRVFDHMPLEKVVWKTGSKIYGPRAGLDYQDN  
QLRFSLLCLAALNAPRVLNLNSKNFSGPYREEVAFIANDWHTALL

>KU50

AKIIICGHGMNLI FVGA E VGPWIKTGGGLGDHGLPPAMAARGHRDMTVSPRYDQYKDAWD  
TSVSVEIKIGDRIETVRFHSY RGVDRVFDHMPFLEKVVWKTGSKIYGPRAGLDYQDN  
QLRFSLLCLAALNAPRVLNLNSKNFSGPYGEEVAFIANDWHTALL

>HB60

AKIIICGHGMNLI FVGA E VGPWSKTGGLGDVLGGLPPAMAARGHRVMTVSPRYDQYKDAWD  
TSVSVEIKIGDRIETVRFHSY RGVDRVFDHMPFLEKVVWKTGSKIYGPRAGLDYQDN  
QLRFSLLCLAALNAPRVLNLNSKNFSGPYGEEVAFIANDWHTALL

>X74160.1

AKIIICGHGMNLI FVGA E VGPWSKTGGLGDVLGGLPPAMAARGHRVMTVSPRYDQYKDAWD  
TSVSVEIKIGDRIETVRFHSY RGVDRVFDHMPFLEKVVWKTGSKIYGPRAGLDYQDN  
QLRFSLLCLAALNAPRVLNLNSKNFSGPYGEEVAFIANDWHTALL

ภาพที่ 6.7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *GBSSI* ที่ขนาดความยาว 166 อะมิโน

>waxy 82 bp

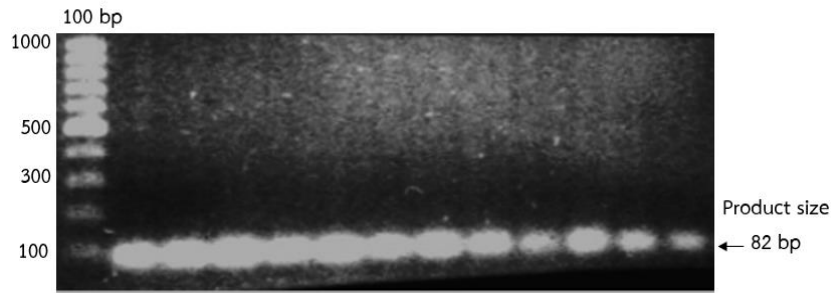
CCGCTTCTTCCACTCCTACTAAAGATGAGTTGATCGTGTCTTCTGGATCATCCAATGTTACTTGAGAAGGTATGGGGCAA

>non waxy 82 bp

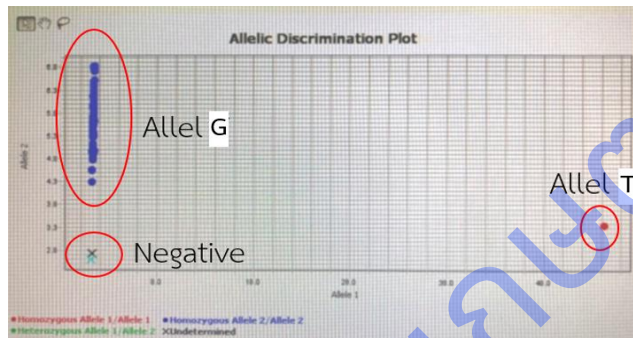
CCGCTTCTTCCACTCCTACAAAAGATGAGTTGATCGGGTCTTCTGGATCATCCAATGTTCTTGGAGAAGGTATGGGGCAA

	Forward Primer-->	Probes	
waxy	CCGCTTCTTCCACTCCTACTAAAGATGAGTTGATCGTGTCTTCTGGATCATCCAATGTT	CTTGAAGGATATGGGGCAA	82
nonwaxy	CCGCTTCTTCCACTCCTACTAAAGATGAGTTGATCGGGTCTTCTGGATCATCCAATGTT	CTTGAAGGATATGGGGCAA	82
		*****	
waxy	CTTGAAGGATATGGGGCAA		82
nonwaxy	CTTGAAGGATATGGGGCAA		82
		*****	
	<----Reverse Primer		

ภาพที่ 6.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับออกแบบไพรเมอร์และไพรเมอร์ในการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SNPs ในมันสำปะหลังพันธุ์ waxy และ non waxy ด้วยวิธี TaqMan probes



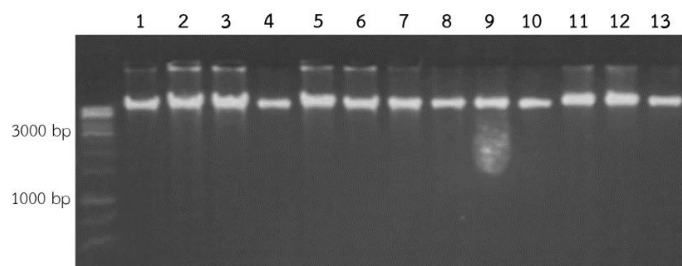
ภาพที่ 6.9 ผลผลิตพีซีอาร์ของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 82 คู่เบส ที่ตรวจสอบได้ด้วยวิธี TaqMan probes ด้วยคู่มือ WX\_F และ WX\_R



ภาพที่ 6.10 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 ระยะเวลา 7 ระยะเวลา 9 ระยะเวลา 11 เกษตรศาสตร์ 50 หัวยง 80 และ Mcol 1702 กลุ่มอะไมโลสต่ำ ได้แก่ Mbar 191 Mbra 691 Mpan 70 Mpar 104 และ Mpar 25 รวมกับมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว 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 6.11) สำหรับการนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี GBS (Genotyping by Sequencing)



ภาพที่ 6.11 ดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลัง 13 ตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์ GBS

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 13 ตัวอย่าง ถูกนำมากรองข้อมูลเฉพาะเครื่องหมาย SNPs แบบ Bi-Allelic ที่เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ไป โดยตั้งค่าความถี่อัลลีลต่ำสุด (Minimum minor allele frequency (MAF)) เป็น  $\geq 5\%$  ค่า read depth เป็น 20X และตัดค่า SNP missing ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ได้ข้อมูลจีโนมโทปแบบ SNP ทั้งสิ้น 19,057 ตำแหน่ง (ภาพที่ 6.2) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวถูกนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างหรือความเฉพาะเจาะจงของเครื่องหมายโมเลกุล พบตำแหน่ง SNPs เฉพาะมันสำปะหลังสายพันธุ์แปงเหนียวของมูลนิธิมันสำปะหลังแห่งประเทศไทยจำนวน 2 สายต้น คือ HBW 1 และ HBW 2 ทั้งหมด 33 ตำแหน่ง แบ่งเป็น SNPs แบบเฮเทอโรไซโกตจำนวน 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 6.13)

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

ภาพที่ 6.12 ผลจีโนมโทปของตัวอย่างมันสำปะหลัง 13 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี GBS

#	Chrom	Pos	Ref	AC002	AC003	AC004	AC006	AC008	AC022	AC033	AC044	AC065	AC066	AC068	HBW1	HBW3
1	g 1035283812 gb LTYI01039744	1157	G	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GA
2	g 1035283831 gb LTYI01039727	1900	G	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	CA	CA
3	g 1035283831 gb LTYI01039727	2052	G	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	CA	CA
4	g 1035283831 gb LTYI01039727	1876	G	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	CA	CA
5	g 1035284370 gb LTYI01039288	1012	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
6	g 1035284466 gb LTYI01039192	3482	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
7	g 1035284466 gb LTYI01039192	3421	C	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GA
8	g 1035284466 gb LTYI01039192	3471	C	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GA
9	g 1035284466 gb LTYI01039192	585	T	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TG	TG
10	g 1035284557 gb LTYI01039101	535	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
11	g 1035284751 gb LTYI01038907	1803	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
12	g 1035284789 gb LTYI01038865	1652	T	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TA	TA
13	g 1035284830 gb LTYI01038828	6332	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
14	g 1035284830 gb LTYI01038828	6477	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
15	g 1035285010 gb LTYI01038648	4508	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
16	g 1035285084 gb LTYI01038574	1207	A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	CA	CA
17	g 1035285084 gb LTYI01038574	1203	A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	CA	CA
18	g 1035285208 gb LTYI01038450	2663	G	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	CA	CA
19	g 1035285268 gb LTYI01038390	3479	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
20	g 1035285268 gb LTYI01038390	3505	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
21	g 1035285268 gb LTYI01038390	3582	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
22	g 1035285268 gb LTYI01038390	3635	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
23	g 1035285268 gb LTYI01038390	3661	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
24	g 1035285268 gb LTYI01038390	3661	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
25	g 1035285269 gb LTYI01038398	1216	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
26	g 1035285322 gb LTYI01038336	8461	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
27	g 1035285356 gb LTYI01038302	660	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
28	g 1035285356 gb LTYI01038302	705	T	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TG	TG
29	g 1035285387 gb LTYI01038271	4434	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
30	g 1035285454 gb LTYI01038204	1272	A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	CA	CA
31	g 1035285792 gb LTYI01037867	3695	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
32	g 1035285792 gb LTYI01037867	3745	T	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	CA	CA
33	g 1035285803 gb LTYI01037856	6559	C	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CA
34	g 1035286005 gb LTYI01037654	609	A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	??	AA	AA	AA	CA	CA

ภาพที่ 6.13 ตำแหน่ง SNPs แบบ mutation ที่พบเฉพาะในมันสำปะหลังสายพันธุ์แปงเหนียว

นำข้อมูลตำแหน่ง SNPs ที่ให้ความแตกต่าง (polymorphism) มาค้นหาชิ้นส่วนโครโมโซมบนฐานข้อมูล NCBI พบตรงกับโครโมโซมของมันสำปะหลังที่ใช้เป็นจีโนมอ้างอิง คือ *Manihot esculenta* cultivar AM560-2, whole genome shotgun sequence จำนวน 20 contig (ตารางที่ 6.2) โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวจะนำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ หรือ ชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ตัวอย่างเช่น ข้อมูลลำดับตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ต่างที่ให้ลักษณะโฮโมไซโกต G และ T ในมันสำปะหลังแปงเหนียว (ลำดับที่ 17 และ 18 ในภาพที่ 6.3) หมายเลข accession 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 6.4) ซึ่งสามารถใช้ในการคัดเลือก ระบุ หรือจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ต่อไป

ตารางที่ 6.2 ข้อมูลชิ้นส่วนโครโมโซมที่พบตำแหน่ง SNP ที่ให้ความแตกต่าง

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

```

1 acaggttata tgtcaggctt gctacgggtc ccggcggcct taagtcggcc cggatcctag
61 cgccggtagc ggtccgattt tccggggcgtt acaagtaaag acaaatcaaa tccgttgatg
121 gctgtggatt tgccaaaaat ccaatcctct catgggtata gctttcataa atggattata
181 aaaccctttt ttgatttga gattgtaatt gaaaatgggt ataatgatag aaaccatgg
241 gcagtcatta gaaaatatta tcctgagaat tggatattcc ttcctacaga ttttttaaaa
301 tctcaggaat actattcaag tatttttagaa gaaacaaatt ctgtaaaaaat aaaacataat
361 tttgataaga atgataaaac agtggtagtc tattcttctt tgcaaaaaat 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 ttgattttaa aaatgggtggc agtataaagg tatttcggaa
661 gaaataattt caccggaagt atttcaataa tatcaatatt ttaaaaccaa ttataaacct
721 cctcaaaaatg aaaagtatat tcctcccttg atgtatttct gcatgaactt ttttattccc
781 tgggtatatac aatggttctt tgattttcag tattcatcag gaactagtat acctattatt
841 gtcagaaaaac ataaaaataa atgggtggga tcattcaaaa ataccaccac agagatgggt
901 gtaaagcaat ggatacttca aagagcacag cttcctactg tgtcttatgc tggaaaaata
961 actctgcaag gagagccatc attcggagcc caaaaagccc aatgccaggc cttactagca
1021 gcatctaaaa accctgaaga gtttaagctc atttgtcaac aaatgtataa tcagcttact
1081 tcatcggaga aagaaaaatt aaatcaagag tcatccagta gtaaagaatc atcaaaacag
1141 tcttcagta 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 aggaaaaagaa
1381 aagaagaagt gggcacctc atcttcagaa tcagattaaa attcagaca gtaaagattt
1441 ggtggcaggc aagtcaactgt ttaccaacag taaagtggca gacagactat tcaccaacag
1501 taaaaaggag cagaataatg gcagacaagt cactattcat gaacagtaaa agcccgcgtg
1561 gttcaatagt aaagactccc gtgacacaac agtaaagctt aaaatttttc tataaaaggg
1621 agcctctccc cttgtgaagg cacacttgta attcctttct ctctctctct ctctctctag
1681 tttccttttc atttcttctg tgtattctct ctctatttcc agatttctgt atcagttctt
1741 aaatttttaa aaattatagt aagtttctta tttcttttat tatactgtta ctttataagt
1801 ccgtgttgac agcactcttc tcttcttccc cttcactctg acttaactct ggggatccca
1861 ggttaagggt gcaggaaccc tgacctaat agtaaaatta aaatcacat aagtatgctc
1921 tgtgggtgct gcttttgctg atcttccaca tcagaaattt gtttactata aaacttatta
1981 aaaactctga atctgtttat aaaacggtat atatatatat atatatatag ggataaaatg
2041 caggatgatc aatttgagtg ttacagaaa actttggaca gtgagggtcg gtcatttatc
2101 tttgtgactg acatatatga ctaggaaaaa aattctagtg acattctaac cattctaata

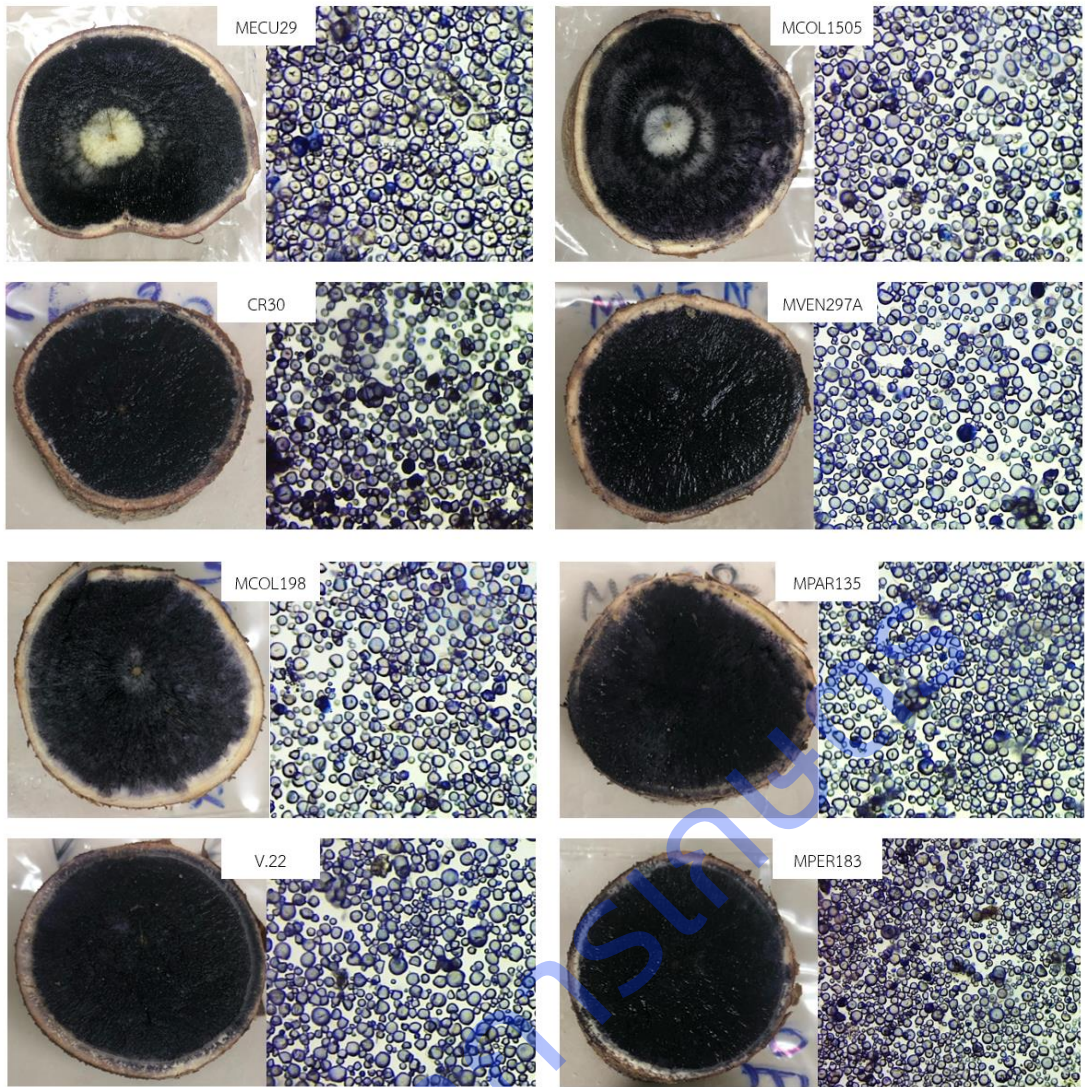
```

ภาพที่ 6.14 ตัวอย่างตำแหน่ง SNPs ตำแหน่งที่ 1,203 และ 1,207 (แถบสีแดง) ของมันสำปะหลัง หมายเลข gij1035285084  
*Manihot esculenta* cultivar AM560-2 Scaffold02252\_contig\_1, whole genome shotgun sequence

#### 4. การทดสอบแป้งในหัวมันสำปะหลังด้วยการย้อมสีไอโอดีน (Iodine Staining Test)

การตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวของมันสำปะหลังด้วยการย้อมสีไอโอดีน โดยนำตัวอย่างหัวมันสำปะหลังที่พบลักษณะจีโนไทป์เป็นแบบข่มร่วมและด้อย จำนวน 219 ตัวอย่าง มาย้อมสีไอโอดีน โดยการพ่นด้วยสีไอโอดีน 20 เปอร์เซ็นต์ พบทุกตัวอย่างแสดงผลเป็นสีน้ำเงิน และเมื่อย้อมเม็ดแป้งที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียดด้วยไอโอดีน 12.5 เปอร์เซ็นต์ พบเม็ดแป้งเป็นสีน้ำเงินเช่นกัน (ภาพที่ 6.15) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) อาจไม่สัมพันธ์กับลักษณะแป้งเหนียว ซึ่งสามารถใช้คัดเลือกประชากรรุ่นลูกที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียว แต่ไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกกลุ่มประชากรอื่นได้ ทั้งนี้ตามรายงานของ Aiemnaka และคณะ (2012) ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์การค้ากับพันธุ์แป้งเหนียวโดยตรง เครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จึงสามารถใช้คัดเลือกลักษณะแป้งเหนียวในกลุ่มประชากรรุ่นลูกได้





ภาพที่ 6.15 ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการย้อมสีด้วยสีไอโอดีน

## การทดลองที่ 7 การพัฒนาเครื่องหมายยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งที่สัมพันธ์กับน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง

### สรุปผลการดำเนินงาน

การเก็บและรวบรวมข้อมูลลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) (จีโนมจารีและคณะ 2558) และ ปี 2564 (Yield2564) จากแปลงรวบรวมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ พบว่า ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 คือ 3.23 และ 9.93 กิโลกรัมต่อต้น และจากการตรวจสอบการแจกแจงแบบปกติด้วยสถิติ Shapiro-Wilk test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าข้อมูลลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังทั้ง 2 ลักษณะมีการกระจายตัวของข้อมูลไม่เป็นโค้งปกติ ( $p < 0.05$ )

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ILP โดยการสืบค้นหายีนที่เกี่ยวข้องของกระบวนการสังเคราะห์แป้งของมันสำปะหลังโดยสืบค้นข้อมูลเป็นลำดับ EST จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI พบยีนทั้งหมด 14 ยีน และออกแบบไพรเมอร์ได้ 110 คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลังได้ 12 ยีน ผลการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ 100% และจากการอ่านแถบดีเอ็นเอ 110 คู่ไพรเมอร์ พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 13 คู่ไพรเมอร์ โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (annealing) ที่ 56 °C และมีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ตรงตามที่ย่อแบบไว้

การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมในตัวอย่างมันสำปะหลัง 166 พันธุ์ พบว่ามีจำนวนแอลลีลอยู่ในช่วง 2 ถึง 6 แอลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.7 แอลลีลต่อเครื่องหมาย มีจำนวนจีโนไทป์เฉลี่ยเท่ากับ 4.5 จีโนไทป์ต่อเครื่องหมาย เมื่อคำนวณค่าความหลากหลายของยีน พบว่ามีค่าระหว่าง 0.21 ถึง 0.68 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.40 สำหรับค่าเฮเทอโรไซโกซิตีนั้น มีค่าระหว่าง 0.02 ถึง 0.68 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.40 ค่า PIC มีค่าระหว่าง 0.19 ถึง 0.64 ค่าเฉลี่ย 0.35 ต่อเครื่องหมาย โดยเครื่องหมาย DBE4 มีค่า PIC สูงสุด

จากการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรด้วยเครื่องหมาย ILP ทั้งหมด 13 เครื่องหมาย พบว่า ประชากรมันสำปะหลังที่ศึกษามีโครงสร้างประชากรย่อย 3 กลุ่ม และเมื่อวิเคราะห์โอกาส (Q) ที่ตัวอย่างมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์จะตกอยู่ในประชากรย่อย พบว่าตัวอย่างมันสำปะหลังในกลุ่มประชากรย่อยที่อนุมาณมีลักษณะผสม (admixture) ซึ่งแสดงถึงการเกิดการผสมข้ามระหว่างสมาชิกระหว่างกลุ่มประชากรย่อย และผลการวิเคราะห์ความไม่สมดุลของลิงเกจ (linkage disequilibrium; LD) พบว่า เครื่องหมาย ILP ที่อยู่ภายในยีนเดียวกันและมีตำแหน่งใกล้เคียงกันมีแนวโน้มการเกิดความไม่สมดุลของลิงเกจมากกว่าเครื่องหมาย ILP ที่อยู่ต่างยีนกัน โดยเครื่องหมาย SuSy1 กับ SuSy6 ในยีน *sucrose synthase (SuSy)* แสดงความไม่สมดุลของลิงเกจมากที่สุด มีค่า  $R^2 = 0.41$  ( $p < 0.00001$ )

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) โดยมีค่าอิทธิพลต่อลักษณะ ( $R^2$ ) อยู่ระหว่าง 2 ถึง 3% (ตารางที่ 6) แต่ที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังทั้งหมด

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP จากตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 166 พันธุ์ ทำการหาลำดับเบสแบบ Next generation sequencing (NGS) ด้วยเทคนิค Genotyping-by-Sequencing (GBS) ตรวจสอบคัดกรองข้อมูลและค้นหาตำแหน่ง SNP โดยการเปรียบลำดับเบสระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังด้วยกันเองทั้ง 166 พันธุ์ ทำการกรองข้อมูล SNPs ที่ Minimum read depth  $\geq 4X$ , missing data  $< 10\%$  และ 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 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยใช้โมเดล General linear model (GLM) และ Mixed linear model (MLM) ผลการวิเคราะห์ของทั้ง 2 โมเดลพบว่า เครื่องหมาย S12\_4926402 และ เครื่องหมาย S12\_4945762 มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 10^{-7}$ )

โดยมีค่าอิทธิพลต่อลักษณะ ( $R^2$ ) อยู่ระหว่าง 24 ถึง 27% และเครื่องหมาย S13\_17595774 และเครื่องหมาย S3\_32267507 มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 10^{-6}$ ) โดยมีค่าอิทธิพลต่อลักษณะ ( $R^2$ ) อยู่ระหว่าง 20 ถึง 22%

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) และเครื่องหมาย S13\_17595774 บนโครโมโซมที่ 13 ตำแหน่งที่ 17595774 และ S3\_32267507 บนโครโมโซมที่ 3 ตำแหน่งที่ 32267507 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 พบความคล้ายคลึงยีน uncharacterized protein ในมันสำปะหลัง (E value  $\leq 1.00e-73$ )

เมื่อทดสอบอิทธิพลของแอลลีลของเครื่องหมาย SNP ที่มีต่อลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยการใช้ F-test เครื่องหมาย S12\_4926402 ที่มีแอลลีล G/A ประกอบด้วย 3 จีโนไทป์ ได้แก่ GG GA และ AA และในเครื่องหมาย S12\_4945762 ที่มีแอลลีล T/G ประกอบด้วย 3 จีโนไทป์ ได้แก่ TT TG และ GG พบความแตกต่างของแอลลีลในจีโนไทป์มีผลต่อลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 ที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.00001$  ใน และเครื่องหมาย 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  $p < 0.05$

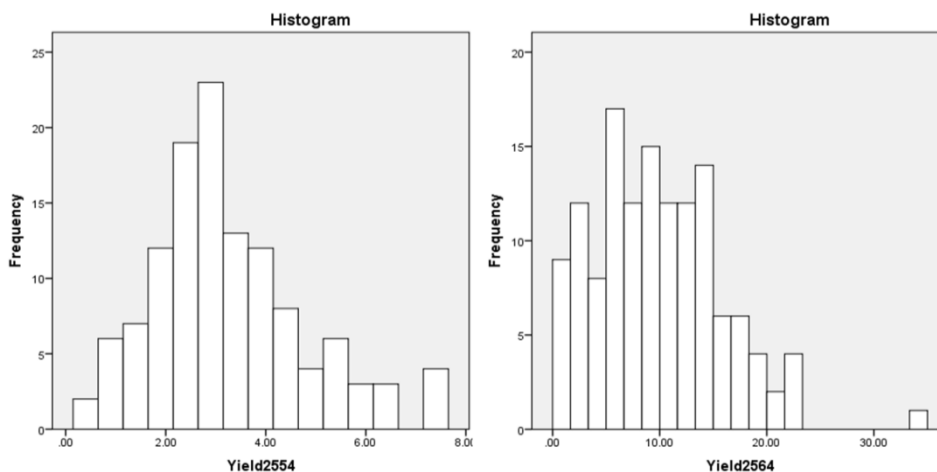
## ผลการดำเนินงาน

### 1. ข้อมูลลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง

ข้อมูลลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นค่าเฉลี่ยของน้ำหนักหัวมันสำปะหลังทั้งหมด มีหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อต้น โดยใช้ข้อมูลลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) (จินณจาร และคณะ 2559) และ ปี 2564 (Yield2564) จากแปลงรวบรวมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ (ตารางที่ 7.1) 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 7.2)

ตารางที่ 7.1 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



ภาพที่ 7.1 กราฟแสดงการแจกแจงแบบปกติด้วยสถิติ Shapiro-Wilk test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 และ ปี 2564 (Yield2554 และ Yield2564)

## 2. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ILP

จากการสืบค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งของมันสำปะหลังโดยสืบค้นข้อมูลเป็นลำดับ EST จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI พบยีนทั้งหมด 14 ยีน (ตารางที่ 7.2) 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 °C (ตารางที่ 7.3)

ตารางที่ 7.2 แสดง EST ของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง จากฐานข้อมูล GenBank EST database

No.	Starch biosynthesis pathway genes	GenBank accession no.	Full length (bp)
1	<i>sucrose synthase</i> (SuSy)	DQ443534.1	2,775
2	<i>UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase</i> (UGPase)	XM_021759711.1	2,190
3	<i>cytosolic phosphoglucomutase</i> (cPGM)	XM_021743444.1	2242
4	<i>fructokinase1</i> (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	<i>glucose-6-phosphate isomerase</i> (cPGI)	XM_021745471.1	1,535
		XM_021745472.1	1,275

ตารางที่ 7.2(ต่อ) แสดง EST ของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง จากฐานข้อมูล GenBank EST database

No.	Starch biosynthesis pathway genes	GenBank accession no.	Full length (bp)
6	<i>hexokinase1</i> (HXK)	KJ417433.1	1,546
		KJ417434.1	1,767
		KJ417435.1	1,702
		KJ417436.1	1,537
		KJ417437.1	1,567
7	<i>adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase</i> (AGPase)	KU243122.1	1,618
		KU243124.1	1,578
8	<i>plastidial phosphoglucomutase</i> (pPGM)	XM_021737252.1	2,305
		XM_021761283.1	2,266
9	<i>granule-bound starch synthase</i> (GBSS)	JF708949.1	3,366
		JF708948.1	3,477
10	<i>starch synthase</i> (SS)	XM_021741332.1	4,005
11	<i>starch branching enzyme</i> (SBE)	X77012.1	2,843
12	<i>debranching enzyme</i> (DBE)	XM_021750994.1	1,879
		XM_021750995.1	1,479
13	<i>glucan, water dikinase</i> (GWD)	JN618458.1	4,728
		JN618459.1	3,687
14	<i>sucrose transporters</i> (SUT)	DQ138373.1	2,431
		DQ138371.1	2,007

ตารางที่ 7.3 แสดงรายละเอียดไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง จำนวน 110 คู่ไพรเมอร์

Starch biosynthesis	EST accession of	The genome	Chromosome	Primer ID	Forward primer	Reverse primer	Size of
SuSy	DQ443534.1	<a href="#">LTYI01027943.1</a>	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	ACCTGGAATGTCTACGCT	GTTCCACTTAATCCTCAACAGT	165
UGPase	XM_021759711.1	<a href="#">LTYI01001497.1</a>	1	UGPase1	CTCCTCAAAGAGCCTCCAAT	CAGCAAAAGCTGGTGTGAAA	258
				UGPase2	AGGGATTGACTTAAATCGGC	TCCTTCCATTGAACTGGGTC	152
				UGPase3	GATAACGTAGCCATCCTCCA	GCCAGTCAAAGCAACTCAG	158
				UGPase4	GGAAATCGAGATCGAGGAACA	GAGTCAAGGTCTCCAGCTA	192
				UGPase5	TAGCTGGAGAACCTTGACTC	AGAGGCTGATGATTGAAGA	176
				UGPase6	ATCAGCCTCTACAAGCCTTT	TCAAGTCAATAGAGAAGTTCAAA	162
				UGPase7	TTGAACTTCTCTATTGACTTGAA	ATTGGAGATTGCACAAGTGG	452
				UGPase8	CCACTTGTGCAATCTCCAAT	AGGGTGGTACTCTCATCTCT	329
				UGPase9	TACCACCTTTTACATCAGCC	GAACAGTGGCAAGCTTGATT	444
				UGPase10	ATCTTCAACAACCAGACGAG	GGATTGACATTCTCCGACCT	448
				UGPase11	CGAGGAATGTCAATCCATTACG	ACGGATGAAGTAGTGGTTC	376
				UGPase12	AATCTTGCTCCATTCCACCT	TTCATTAGCCTTGCTCTCG	208
				UGPase13	TCGAGAGACAAGGCTAATGA	GATCACTCCCCTCAAGTCTG	215
cPGM	XM_021743444.1	<a href="#">LTYI01029534.1</a>	17	cPGM1	TGTCAGTGTAATCCGTGAA	GTCCGCCATTTTCCATGTTA	528
				cPGM2	ACCTAATGCTGATCTGCCT	CCGCCAAAATTAGTCACACC	177
				cPGM3	AGGAAGCTGCTTTCATCTCC	ATTGGGATCTGGATGACCTC	379
				cPGM4	TGATGGTGATGCAGATCGTA	ATTGCAACAGAATCCGATGG	152
				cPGM5	GTTGTGGCCAAACATCTGAA	GCCCAAATGCCATCTTTCTC	369
				cPGM6	TGGCCGCCATTATTATACTC	TAGTTCCTTTGCTGCACTTG	154
				cPGM7	TTGTTTGAGGATGGCTCTCG	CTTCTGAGCCAGTTCCTGAG	339
				cPGM8	GATTCTCAAGAAGCACTCGC	TCCTGCATCTTAGAAAGTTGAG	142
FRK1	KP009998.1	<a href="#">LTYI01001475.1</a>	1	FRK1_1	GCATTAGCGAAGTGTGAGAGC	TGTGGCTGGAATATTGTCAC	333
				FRK1_2	ATGGATCTCCCTTTAGTT	GCTGACATGTTGCTTCAAGA	540
				FRK1_3	GCAAGCATGTATCCAAATTCA	TGGTATTGCTCGTCTAGGTG	478

Starch biosynthesis	EST accession of	The genome	Chromosome	Primer ID	Forward primer	Reverse primer	Size of
cPGI1	XM_021745471.1	<u>LTYI01030415.1</u>	18	cPGI1_1	GTCCTTGTACGGAAGCACT	GGCCTCTGATGGGATAGGAT	147
				cPGI1_2	CAACATAAGGCTAGCATGGC	ATGGATGAGGCAAATAGGAA	584
				cPGI1_3	CACCAGCAAGCATTCTCTA	AATGTCTGCAGTTGGCCTT	151
				cPGI1_4	ACCATTTCTAGTTTCAGGGGT	TGAGCTGGCTTCTACTCTTG	173
				cPGI1_5	TGAGTAAAACGGCCTTCTGG	ATTGAGCTTACGCTTGACG	332
cPGI2	XM_021745472.1	<u>LTYI01030414.1</u>	18	cPGI2_1	CGGCCATGTGTGCAATAAT	TGACACTTGATGAAGTAGCTG	153
				cPGI2_2	TCATCAAGTGTCAACGGTTC	ATTAGCTCTTCAGAAGCGGG	579
				cPGI2_3	CTTCTCCTGCTGCCTTTTTC	TGTCACATGGTGTACTACC	489
				cPGI2_4	ACACCCCTCTCTCAGTTGTTG	TGGAAATAAAGGAAGCACAGA	145
				cPGI2_5	AATAGGCTGTCTTGTACGG	TTATGTTGGTACTGGGCCTC	169
				cPGI2_6	ATGCACCAGCAAGCATTTC	CAGTTGGCCTACTTCCAGC	146
AGPase1	KU243122.1	<u>LTYI01018807.1</u>	11	AGPase1_1	TGCTGTTTTAACAATCAACAATCC	GCTACATTGTTGGGTCCAC	301
				AGPase1_2	TTTCCTCTTACCAGAAGGGC	GTTGCTCATTGGAATGTCTAT	395
				AGPase1_3	CAGATGCTGTGAGGCAATTT	CGTGATATCAGCATTACTGTCA	380
				AGPase1_4	CACGATTTTATGTGCTCCAG	TTCGTCCCCTGTTGTCTATC	192
				AGPase1_5	TGAAAAACCAACTGGTGCTG	TGCAGAGATAATCCTAGATGAGT	492
				AGPase1_6	ATCTGAAGTCATCCCCGCT	TCCTATATCTTCCCAGTAGTCTCT	329
				AGPase1_7	AGACATTTTATGAAGCAAACCTGG	TGTAGAAGGGTGTCTTTGGG	446
				AGPase1_8	TCGATTTCTACCACCAACCA	CAGTTTGGTAGTGTGTACGCTC	339
				AGPase1_9	AGTCCCTATTGGTGTGGAA	TGTAAAATCCTTTTTCTGGCCT	406
AGPase2	KU243124.1	<u>LTYI01020263.1</u>	12	AGPase2_1	CAGAGCCAGAGAATCCAAA	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	<u>LTYI01023743.1</u>	14	pPGM1	CTTCCTCTTCCACCGCCATT	CTGGATCCAATTCGCCAGAT	447
				pPGM2	AGAAAATTATCTGGCGAATTGGA	TTACCAACACCATTCCTCTGC	358
				pPGM3	AAAATTGCAGCAGGGAATGG	AGGATTATGGCTTGCACTCA	455
				pPGM4	CCCCGTTTCTGACTACCTA	ACTTCTGATGAGCTCAAATC	139
				pPGM5	TTCTGTACAGCCAGATTTTC	ATAAGCACCAGTGACAGCAT	460
				pPGM6	CAAAGCCCATCTTTGTGGAC	TCAGGCCCATTTACTATACA	317
				pPGM7	ATTACAAGGAGCCATTCTCT	CATCATCCATAAGATTGCCAAA	343
				pPGM8	GGGCAACTTTTGGGAGAAAT	AGTCATCGGCATACTGAAGG	382
				pPGM9	GATGACTTCAAGTACACGGA	TGTACATTCTAACAGTTGCAC	338
				pPGM10	ATGAGATGGATGCCAAACA	ACCTGTGAAGTCTTCAATTTT	198
SS	XM_021741332.1	<u>LTYI01026526.1</u>	16	SS1	AGTAAAACCATTCCCGACCC	CTGATGCTGCTGGAATTGAT	350
				SS2	TGGTCAACATCAAACACAGT	TGGTTCCATTCCAGTTGTTT	408
				SS3	TGGGACTAGAATGAAATCAGCA	ATGAGCCACTATCACACCTG	165

Starch biosynthesis	EST accession of	The genome	Chromosome	Primer ID	Forward primer	Reverse primer	Size of
				SS4	CTTCCTTGGCTGCTCTTTTG	CCCAGACATATGGGATCCTT	596
				SS5	TCACAACATCTCCAAGTCCT	TATTGCTGTTGAAATGGCCC	349
				SS6	CTTTCACACGTGCTGTTCTT	CAGTTAAGAGAGCAGGCCAT	431
				SS7	CCAATCCAAGAGAAGGGCTC	AATCTGAGAGAAAGGACGGC	529
				SS8	TGAAATTTTTCTGCTCCTCT	TACACTCGGGGTTTCATGTG	187
SBE	X77012.1	<u>LTYI01008721.1</u>	5	SBE1	TCCTTTTTCTACCAAGAATCTCA	CTGCTGAGATTGCAAGACCT	454
				SBE2	TGAAGGTGGTCTTGAGGAAT	ACAATCCACCTGCTTCTCT	384
				SBE3	ATTGTCTATCGTGAGTGGGC	CCCAACCATTAAAGTCCCCA	154
				SBE4	TGTCTACTGGGATCCTCCAC	AGGCCGGGATACTTGAAT	275
				SBE5	GTTGACACTGAACACTTGAGA	ACAAAAACCAGGTCCCCAC	449
				SBE6	TGGATAGTGATGCTTGGGAG	AAAATGGTCCACATCATGGC	391
				SBE7	CAAAATACTCTCTGCAGCTCG	ACTGTTGTGATTTCTTCTTTT	330
DBE	XM_021750994.1	<u>LTYI01004139.1</u>	3	DBE1	TCGACCTTCTCTGTTGC	CCCAAGAAGTAAATATTAGGGGC	407
				DBE2	AATGCGCGAGATTATCGTTT	AGTATTCTCATTATAGGGAGGC	161
				DBE3	AGCAACTAGTTAGATATAAACGACA	CAGCTGCTTTTACTTCCAAGAG	366
				DBE4	GATAAGTGTCTTCCAAGGCG	GTCGACAATCTTGCATCTCA	397
				DBE5	CCAGCCAACTTGACTCAAATAA	GTTCCAAAAGCTGCAATAAAGA	335
				DBE6	TGAAACGAGTAATTTGGGAAT	CATAGATGAGAACAACAATATTCA	348
GWD	JN618458.1	<u>LTYI01021906.1</u>	13	GWD1	AGCACAACTTTCTTCTCCTCA	GGCCGTGCTTTGAGTTTTAT	490
				GWD2	CAAGAGTTTCTCCAAGTCCC	TCCATCTTCTGAGGATTCAT	169
				GWD3	CCAACGTGTTCTTCAAACCTTCC	GAAGGTCTTTTCAGATGGTTCA	421
				GWD4	TCCTTTTAGATGCGGATATT	TGAATTTGAAACCTACATCAGCA	495
				GWD5	TCGGAGATTGTCCAGAATGTT	CGACTTGATCCAGTTCTTCG	546
				GWD6	ACGAATATTTCTTCAAGTGAATATG	AGATGATAATGAAGAGTTTGTCT	465
				GWD7	TCAAGAACCAGGGTATGAA	TGTTGAAGATAGAAATGTAGAAGCA	443
				GWD8	TCAACATGTTTGAACAATAATCG	GCTATTGCAAATGTATGGGC	340
				GWD9	AGACTCAAGATCTGCACCAG	CGTGATCTCGCAACTATATG	507
				GWD10	GATGTCAAGGTCACTTTAATGTA	CAGCGAATTCGGGATGAAAT	352
				GWD11	TGCTGTACCTCTTCCATCAC	GCTGAAACACAACCTTAAAGCA	486
				GWD12	GCCTCGTTCAAAGAACTGA	CTTTAAGCTCCAAGATGCGG	405
				GWD13	TAGTTCAATACGAGCGGCTT	TCCTGCAATACAAGCCTTAGA	518
				GWD14	ATTGCAGGATCATCAATCTCT	TTCTTTGCTCCTACACTGGG	416
				GWD15	GAAGCAGAAGTGTGATTGCT	AGGAAAATTCACCTTGATGGA	179
				GWD16	CCTATGCTATTACTCATATTCCTTG	TCTGCAGTTTTAATACAGCGTT	345
SUT	DQ138373.1	<u>LTYI01008127.1</u>	5	SUT1	CACCACCAACAGTGCATC	AGGAGTCTGAATCTAGCGA	296
				SUT2	TCGCTAGATTCAGAATCCT	GCTGCCTTGATTGATTTGC	308



จากการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ 110 คู่ไพรเมอร์ คิดเป็น 100% และจากการอ่านแถบดีเอ็นเอ 110 คู่ไพรเมอร์ พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 13 คู่ไพรเมอร์ โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (annealing) ที่ 56 °C และมีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ตรงตามที่ยกแบบไว้ (ตารางที่ 7.4) ซึ่งอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมในงานวิจัยนี้น้อยกว่าอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมของการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในปาล์มน้ำมัน 53.24% จากปาล์มน้ำมันจำนวน 41 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์ 139 คู่ไพรเมอร์ แสดงโพลิมอร์ฟิซึม จำนวน 74 คู่ไพรเมอร์ (โสณิชา และกิตติพัฒน์, 2559) และอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมของการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในยางพารา 73.4% จากยางพาราจำนวน 180 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์ 173 คู่ไพรเมอร์ แสดงโพลิมอร์ฟิซึม จำนวน 127 คู่ไพรเมอร์ (Chanroj, 2016) ทั้งนี้ประสิทธิภาพการ แสดงโพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย ILP อาจให้ผลที่ใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่ใช้ในการทดลอง จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ และจำนวนตัวอย่าง

**ตารางที่ 7.4** รายชื่อเครื่องหมายโมเลกุล ILP ที่ให้ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอในตัวอย่างมันสำปะหลัง

No.	Marker	Expected size	Tm	No.	Marker	Expected size	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 พบว่ามีจำนวน แอลลิลอยู่ในช่วง 2 ถึง 6 แอลลิล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.7 แอลลิลต่อเครื่องหมาย เครื่องหมาย DBE4 แสดงจำนวน แอลลิลสูงสุด คือ 6 แอลลิล จากการวิเคราะห์จำนวนจีโนไทป์ พบว่ามีจำนวนจีโนไทป์เฉลี่ยเท่ากับ 4.5 จีโนไทป์ต่อเครื่องหมาย เครื่องหมาย DBE4 แสดงจำนวนจีโนไทป์สูงสุดคือ 17 จีโนไทป์ เมื่อคำนวณค่าความหลากหลายของยีน พบว่ามีค่าระหว่าง 0.21 ถึง 0.68 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.40 สำหรับค่าเฮเทอโรไซโกซิตีนั้น 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 7.5)

**ตารางที่ 7.5** การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมาย ILP จำนวน 13 เครื่องหมาย ที่พัฒนาจากยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้ง จำนวน 6 ยีน พารามิเตอร์ที่ประเมิน ประกอบด้วย จำนวนจีโนไทป์ จำนวนแอลลิล ค่าความหลากหลายของยีน (gene diversity) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) และ ค่า polymorphism information content (PIC)

เครื่องหมาย	จำนวนจีโนไทป์	จำนวนแอลลิล	ค่าความหลากหลายของยีน	ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี	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  $\geq 4X$  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 7.6)

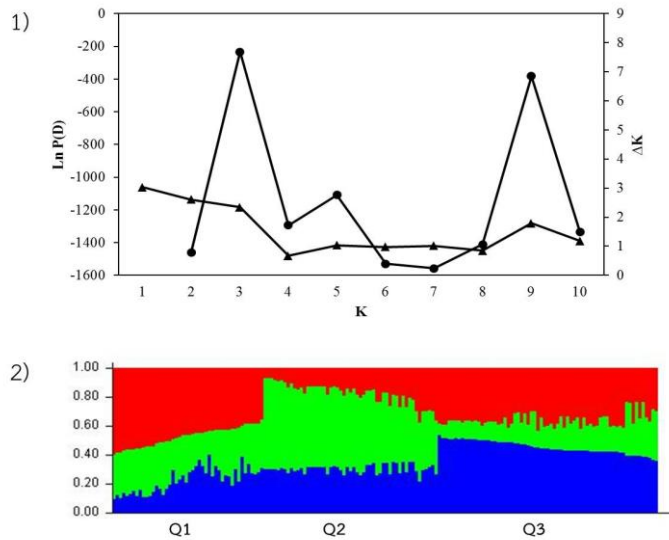
ตารางที่ 7.6 แสดงจำนวนและประเภทของ SNPs ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจำนวน 166 พันธุ์

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%

### 4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะน้ำหนักรวมผลผลิตมันสำปะหลัง

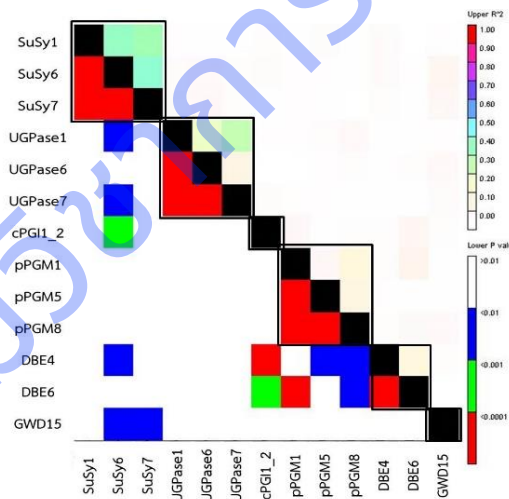
#### 4.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP กับลักษณะน้ำหนักรวมผลผลิตมันสำปะหลัง

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



ภาพที่ 7.2 1) กราฟแสดงการประมาณโครงสร้างประชากรย่อย (K) ในประชากรมันสำปะหลังที่ศึกษาโดย Delta K ( $\Delta K$ )  
 2) โครงสร้างของกลุ่มประชากรที่อนุมานได้ โดยใช้ K = 3 ตามความสูงแห่งสีแดง เขียว และน้ำเงิน แสดงโอกาส (Q)

ผลการวิเคราะห์ความไม่สมดุลของลิงเกจ (linkage disequilibrium; LD) ด้วยเครื่องหมาย ILP โดยการวิเคราะห์ค่า  $r^2$  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 7.3)



ภาพที่ 7.3 ความไม่สมดุลของลิงเกจ (linkage disequilibrium; LD) ของเครื่องหมาย ILP จำนวน 13 เครื่องหมาย จากยีน 6 ยีน กรอบสี่เหลี่ยมแสดงขอบเขตของยีน ตารางด้านใต้เส้นทแยงมุมแสดงค่า p ตารางด้านบนเส้นทแยงมุมแสดงค่า  $R^2$

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) โดยมีค่าอิทธิพลต่อลักษณะ ( $R^2$ ) อยู่ระหว่าง 2 ถึง 3% (ตารางที่ 7.7) แต่ที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังทั้งหมด

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP ในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับผลผลิตมันสำปะหลัง โดยเครื่องหมาย UGPase1 มีความเสถียรภาพต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละปี ดังนั้นจึงน่าจะเป็นเครื่องหมายที่มีศักยภาพในการนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังที่มีผลผลิตสูงได้ อย่างไรก็ตามเครื่องหมาย ILP ที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตในการทดลองนี้สมควรที่จะได้รับการยืนยันความสัมพันธ์ อาจทำได้โดยนำไปความสัมพันธ์ในประชากรอื่น หรือนำไปวิเคราะห์ QTL ในกลุ่มประชากรที่มีข้อมูลแผนที่พันธุกรรมและข้อมูลผลผลิตแล้ว

**ตารางที่ 7.7** 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 <sup>2</sup>	เครื่องหมาย	p	R <sup>2</sup>
UGPase1	0.1398	0.03	UGPase1	0.3523	0.02

#### 4.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง

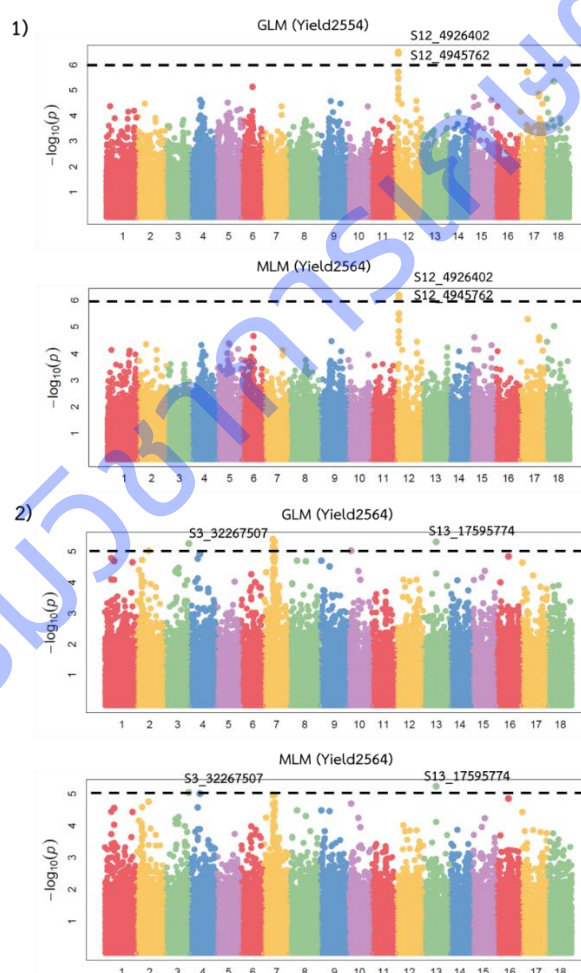
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยใช้โมเดล General linear model (GLM) และ Mixed linear model (MLM) ผลการวิเคราะห์ของทั้ง 2 โมเดลพบว่า เครื่องหมาย S12\_4926402 และเครื่องหมาย S12\_4945762 มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 10^{-7}$ ) โดยมีค่าอิทธิพลต่อลักษณะ (R<sup>2</sup>) อยู่ระหว่าง 24 ถึง 27% (ตารางที่ 7.8, ภาพที่ 7.4.1) และเครื่องหมาย S13\_17595774 และเครื่องหมาย S3\_32267507 มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 10^{-6}$ ) โดยมีค่าอิทธิพลต่อลักษณะ (R<sup>2</sup>) อยู่ระหว่าง 20 ถึง 22% (ตารางที่ 7.8, ภาพที่ 7.4.2)

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  $\leq 1.00e^{-73}$ ) 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 อย่างไรก็ตามควรมีการวิจัยเพิ่มเติมโดยอาศัยข้อมูลมากขึ้นในส่วน of ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีผลผลิตสูง

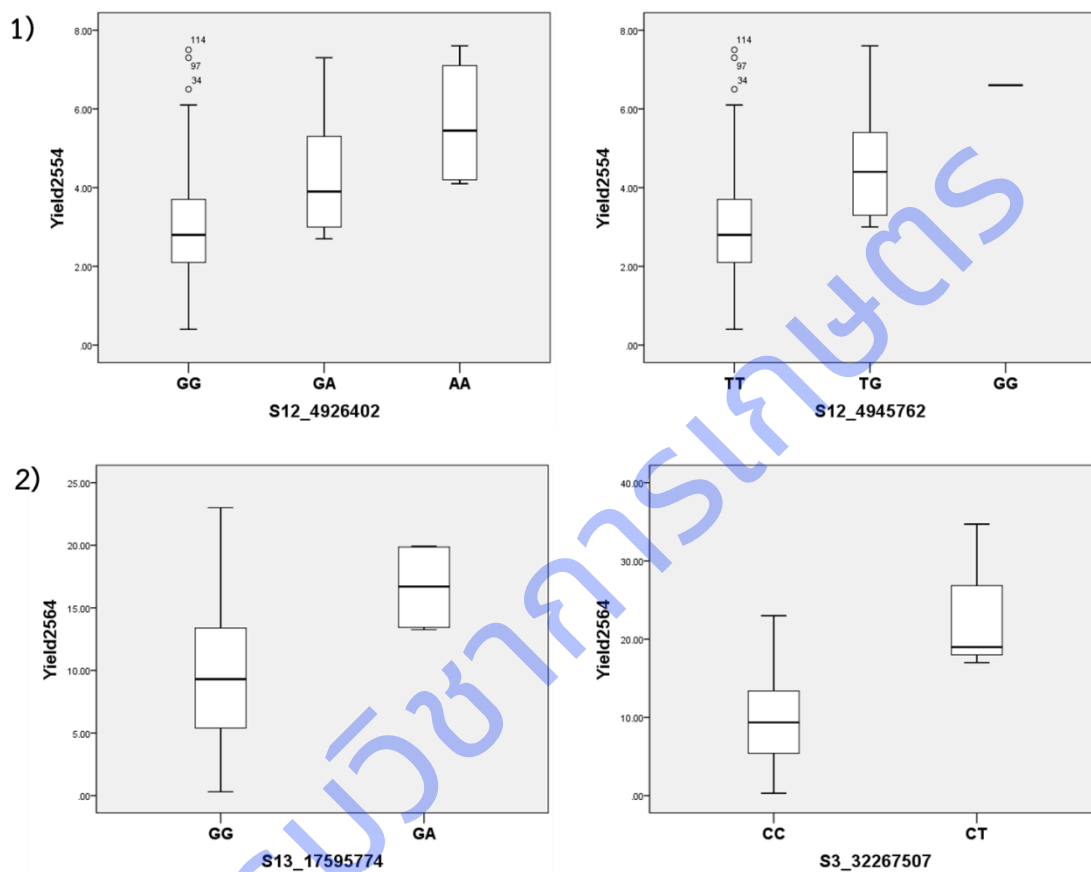
ตารางที่ 7.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) และ ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 (Yield2564) โดยใช้โมเดล GLM และ MLM

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



ภาพที่ 7.4 แสดงกราฟ Manhattan plots จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SNP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยใช้โมเดล General linear model (GLM) และ Mixed linear model (MLM) ที่แสดงค่า  $-\log_{10} p$  value ของแต่ละเครื่องหมายบนโครโมโซมทั้ง 18 โครโมโซมของมันสำปะหลัง 1) ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 (Yield2554) ที่มี cut-off value ของค่า  $-\log_{10} p$  value เท่ากับ 6 และ 2) ลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564 (Yield2564) มี cut-off value ของค่า  $-\log_{10} p$  value เท่ากับ 5

เมื่อทดสอบอิทธิพลของแอลลีลของเครื่องหมาย SNP ที่มีต่อลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง โดยใช้ F-test ในเครื่องหมาย S12\_4926402 ที่มีแอลลีล G/A ประกอบด้วย 3 จีโนไทป์ ได้แก่ GG GA และ AA และในเครื่องหมาย S12\_4945762 ที่มีแอลลีล T/G ประกอบด้วย 3 จีโนไทป์ ได้แก่ TT TG และ GG พบความแตกต่างของแอลลีลในจีโนไทป์มีผลต่อลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 ที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.00001$  (ภาพที่ 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 7.5.2)



ภาพที่ 7.5 กราฟ Boxplot ที่แสดงอิทธิพลของแอลลีลของเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง 1) เครื่องหมาย S12\_4926402 และเครื่องหมาย S12\_4945762 ที่มีต่อลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2554 2) เครื่องหมาย S13\_17595774 และเครื่องหมาย S3\_32267507 ที่มีต่อลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังปี 2564

### 3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วย นับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วย นับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
1. องค์ความรู้	6	เรื่อง	1. องค์ความรู้ มีองค์ความรู้ในการนำเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจำแนกพันธุ์ ตรวจสอบ คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ได้แก่ ลักษณะต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโพลี โรคใบด่าง โรคครากปม ลักษณะผลผลิตและแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ และแป้งเหนียว	7	เรื่อง	เอกสารองค์ความรู้ จำนวน 1 เล่ม ประกอบด้วย 7 เรื่อง ดังนี้ 1. การจำแนกพันธุ์มันสำปะหลังโดยการใช้อุปกรณ์โมเลกุล 2. การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโพลีโดยใช้อุปกรณ์โมเลกุล 3. การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังเกี่ยวกับความต้านทานโรคใบด่าง 4. การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคครากปมโดยใช้อุปกรณ์โมเลกุล 5. การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์โดยใช้อุปกรณ์โมเลกุล 6. การตรวจสอบลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลังโดยใช้อุปกรณ์ดีเอ็นเอ 7. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการตรวจสอบลักษณะผลผลิตในมันสำปะหลัง (เอกสารองค์ความรู้ เรื่อง เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการจำแนก ตรวจสอบและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง) <a href="http://www.http://online.anyflip.com/iabwg/bhlf/mobile/index.html">www.http://online.anyflip.com/iabwg/bhlf/mobile/index.html</a> (ภาคผนวก)	เทคโนโลยีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในกระบวนการจำแนก คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี มีความต้านทานต่อโรคและแมลง ซึ่งจะช่วยเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือก และตรวจสอบลักษณะได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยลดระยะเวลาค่าใช้จ่ายและแรงงานที่ใช้ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ลงได้
2. ผลงานตีพิมพ์			2. ผลงานตีพิมพ์				
2.1 ระดับชาติ	7	เรื่อง	2.1 ระดับชาติ	7	เรื่อง	1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังโดยใช้อุปกรณ์โมเลกุลชนิด SSR (วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 37 ฉบับที่ 1 มกราคม - เมษายน 2562) 2. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง (Cassava Mosaic Disease) (วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 38 ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน 2563) 3. เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานโรค	

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วย นับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วย นับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
						(วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 38 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม-สิงหาคม 2563) 4. วิธีสกัดเอ็นเอจากมันสำปะหลังที่ รวดเร็ว ประหยัด และปราศจากตัว ทำลายอินทรีย์อันตราย (วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 39 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม-สิงหาคม 2564) <b>(ภาคผนวก)</b> (เรื่องที่ 5 -7 อยู่ระหว่างเตรียม ต้นฉบับ 40%)	
<b>3. การประชุมเผยแพร่ ผลงาน/สัมมนา</b>			<b>3. การประชุมเผยแพร่ ผลงาน/สัมมนา</b>				
3.1 นำเสนอแบบโปสเตอร์	3	เรื่อง	3.1 นำเสนอแบบโปสเตอร์	3	เรื่อง	1. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการ คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทาน โรคใบด่าง ในการประชุมวิชาการ พืชศาสตร์แห่งประเทศไทย (BCT 13) ระหว่างวันที่ 14-15 มิถุนายน 2562 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 2. การพัฒนาเครื่องหมาย ILP จาก ยีนในกระบวนการสังเคราะห์แป้ง เพื่อศึกษาความหลากหลายในมัน สำปะหลัง ในการประชุมวิชาการ ระดับชาติมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 32 ประจำปี 2565 วันที่ 25 มีนาคม 2565 (ภาคผนวก) (เรื่อง ที่ 3 อยู่ระหว่างเตรียมต้นฉบับ 40%)	
3.2 นำเสนอแบบปากเปล่าในสัมมนาระดับนานาชาติ	-	เรื่อง	3.2 นำเสนอแบบปากเปล่าในสัมมนาระดับนานาชาติ	1	เรื่อง	1. Research and development of cassava varieties for cassava mosaic disease control (DOA): Marker-assisted selection for resistance to cassava mosaic disease in DOA project (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) <b>(ภาคผนวก)</b>	
<b>4. กระบวนการใหม่</b>			<b>4. กระบวนการใหม่</b>				
4.1 ระดับห้องปฏิบัติการ	5	กระบวนการ	4.1 ระดับห้องปฏิบัติการ มีเทคโนโลยีและเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมสำหรับ	6	กระบวนการ	1. เทคโนโลยีการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค	เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความ



ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วย นับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วย นับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
			ใช้ในการตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ได้แก่ ลักษณะต้านทานโรคแบคทีเรียลไบโอสท์ โรคใบต่างโรครากปม ลักษณะผลผลิตและแป้งสูง ไชยาไนต์ต่ำ และแป้งเหนียว			<p>แบคทีเรียลไบโอสท์โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล</p> <p>2. เทคโนโลยีการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค CMD โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล</p> <p>3. เทคโนโลยีการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปม โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล</p> <p>4. เทคโนโลยีการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้งสูงและไชยาไนต์ต่ำในมันสำปะหลัง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล</p> <p>5. เทคโนโลยีการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวในมันสำปะหลัง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล</p> <p>6. เทคโนโลยีการตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผลผลิตในมันสำปะหลัง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (ภาคผนวก)</p>	ต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลไบโอสท์ ใบต่างรากปม ลักษณะแป้งสูง ไชยาไนต์ต่ำ และแป้งเหนียว เข้ามาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ให้มีลักษณะที่ต้องการ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีความแม่นยำสูง อีกทั้งยังช่วยลดระยะเวลา ค่าใช้จ่ายแรงงานและขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังได้น้อยกว่า 3 ปี
5. ทรัพย์สินทางปัญญา			5. ทรัพย์สินทางปัญญา				
อนุสิทธิบัตร/สิทธิบัตร/ ลิขสิทธิ์/พันธุ์พืช	-	เรื่อง	อนุสิทธิบัตร/สิทธิบัตร/ ลิขสิทธิ์/พันธุ์พืช	1	เรื่อง	<p>การขอจดอนุสิทธิบัตรการประดิษฐ์ เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีทที่สัมพันธ์กับปริมาณไชยาไนต์ในหัวมันสำปะหลังของยีน <i>manes.16G007500</i> - เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีทที่สัมพันธ์กับปริมาณไชยาไนต์ในหัวมันสำปะหลังนี้ ใช้สำหรับการตรวจสอบลักษณะของปริมาณไชยาไนต์ในหัวมันสำปะหลัง ประกอบด้วย ชุดไพรเมอร์จำนวน 4 เส้น ถูกนำมาใช้ร่วมกันด้วยวิธีการพีซีอาร์ แล้วทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล</p> <p>(อยู่ระหว่างดำเนินการยื่นเอกสารเพื่อยื่นขอรับอนุสิทธิบัตรการประดิษฐ์กับสำนักนิติการ กรมวิชาการเกษตร เมื่อวันที่ 23 พ.ย. 64)</p> <p>(ภาคผนวก)</p>	

### 3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
นักวิจัย นักวิชาการ นักปรับปรุงพันธุ์ สามารถนำเทคโนโลยีและเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกและพัฒนาได้จากงานวิจัยในโครงการนี้ ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคใบด่าง CMD ลักษณะผลผลิต และลักษณะไซยาไนด์ต่ำ ได้นำมาพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะต้านทานโรคใบด่าง มีปริมาณผลผลิตและแป้งสูง ซึ่งอยู่ภายใต้โครงการวิจัย: วิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อผลผลิตและคุณภาพสูงสำหรับอุตสาหกรรม โครงการย่อย: การวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลัง กิจกรรม: การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง ผลผลิตและแป้งสูง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ที่ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณกองทุน สกสว ปี 2565 – 2567	2565

### 3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านสังคม : ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ และการนำเสนอผลงานวิจัยรูปแบบโปสเตอร์และปากเปล่าในการประชุมวิชาการต่างๆ เพื่อเป็นการเผยแพร่ผลงานต่อสาธารณะและแลกเปลี่ยนความรู้เกี่ยวกับการจำแนกตรวจสอบ และคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังหรือพืชอื่นที่สนใจได้ อีกทั้งยังเป็นการช่วยสนับสนุนเทคโนโลยีด้านการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความก้าวหน้ายิ่งขึ้น	2569

### 3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการ/กระบวนการผลิตภัณฑ์งานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดแนบหลักฐานเชิงประจักษ์การนำผลงานไปใช้ประโยชน์)

1. การนำองค์ความรู้และเทคโนโลยีที่ได้จากงานวิจัยนำไปเผยแพร่สู่สาธารณะในรูปแบบหนังสือองค์ความรู้ (E-book) จำนวน 1 เล่ม และการตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 4 เรื่อง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านวิชาการ



สารบัญ	หน้า
การจำแนกพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล	4
การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างด้วยเครื่องหมายโมเลกุล	33
การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง	41
การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ไวต่อโรคใบด่างโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล	54
การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch)	60
ตัววิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)	63
การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจากจีโนมที่ไวต่อโรคใบด่างและผลผลิตมันสำปะหลัง	73



2. สามารถนำองค์ความรู้ เทคโนโลยี และเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกและพัฒนาได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้เพื่อการจำแนก ตรวจสอบ และคัดเลือกพันธุ์ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะทางการเกษตรที่ตรงตามความต้องการของเกษตรกร และผู้ประกอบการ โดยนักวิจัยหรือนักปรับปรุงพันธุ์พืชจากหน่วยงานภาครัฐ หรือเอกชน สามารถนำไปต่อใช้ประโยชน์หรือต่อยอดเพื่อการพัฒนาในอนาคต

ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกและพัฒนาได้จากงานวิจัยในโครงการนี้ ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ ลักษณะความต้านทานโรคใบด่าง CMD ลักษณะผลผลิต (root yield) และลักษณะชายนัดต่ำ ได้นำมาพัฒนาต่อยอดงานวิจัย เพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะต้านทานโรคใบด่าง มีปริมาณผลผลิตและแป้งสูง ซึ่งอยู่ภายใต้โครงการวิจัย: วิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อผลผลิตและคุณภาพสูงสำหรับอุตสาหกรรม โครงการย่อย: การวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อการควบคุมโรคใบด่างมันสำปะหลัง กิจกรรม: การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง ผลผลิต และแป้งสูง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ที่ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณกองทุน สกสว ปี 2565 - 2567

**ด้านสังคม :** เกษตรกรและผู้ประกอบการ มีความต้องการมันสำปะหลังพันธุ์ดี มีความต้านทานต่อโรคและแมลง ให้ผลผลิตสูง สามารถปลูกและให้ผลผลิตที่ดีได้ในทุกสภาพแวดล้อม โดย นักวิชาการของหน่วยงานภาครัฐ ภาคเอกชน นักปรับปรุงพันธุ์ นักวิจัย สามารถนำองค์ความรู้และเทคโนโลยีที่ได้จากงานวิจัยและเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อโรคแบคทีเรียไลโบลาร์ โรคใบด่าง โรครากปม ลักษณะผลผลิตและแป้งสูง ชายนัดต่ำ และแป้งเหนียว เข้ามาช่วยในการคัดเลือก

พันธุ์ให้มีลักษณะที่ต้องการ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีความแม่นยำสูง รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดระยะเวลา ค่าใช้จ่าย แรงงานและขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังได้ อีกทั้งมันสำปะหลังพันธุ์ที่ดีจะมีความต้านทานต่อโรคและแมลง สามารถช่วยลดการใช้สารเคมีซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกร และสิ่งแวดล้อมในระยะยาว เกษตรกรมีคุณภาพชีวิตและความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น

**ด้านวิชาการ :** นักวิชาการของหน่วยงานภาครัฐและเอกชน นักปรับปรุงพันธุ์ นักวิจัย เกษตรกรและผู้ประกอบการ สามารถนำเทคโนโลยีและองค์ความรู้ในการศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลให้มีความจำเพาะกับลักษณะสำคัญทางการเกษตร ได้แก่ ลักษณะต้านทานต่อโรคแบคทีเรียลบบลท์ โรคใบด่าง โรครากปม ลักษณะผลผลิตและแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ และแป้งเหนียว เข้ามาช่วยในกระบวนการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ตรงตามความต้องการของเกษตรกรและผู้ใช้ประโยชน์อื่นๆ โดยผลงานวิจัยที่ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้วได้นำมาตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ และการนำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการต่างๆ เพื่อเผยแพร่ผลงานต่อสาธารณะ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังหรือพืชอื่นที่สนใจได้ เพื่อเป็นการสนับสนุนเทคโนโลยีด้านการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความก้าวหน้ายิ่งขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

## บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

### สรุปผล

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

2. การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคแบคทีเรียไลโบลท์ สามารถคัดเลือกได้ จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ MBBR13 (681bp) MBBR5(664bp) MBBR9(609bp) MBBR17(627bp) MBBR4(667bp) และ SSrY5 (299bp) แล้วนำเครื่องหมายโมเลกุลชุดดังกล่าว ไปคัดเลือกมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และแยกแอมพลีคอนด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 6 เครื่องหมาย มาทดสอบตรวจหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคกับมันสำปะหลัง จำนวน 663 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ได้ทดสอบการเพิ่มปริมาณยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลโบลท์จากดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์อนุรักษ์พันธุ์ไทย จำนวน 200 สายพันธุ์ พันธุ์ลูกผสม F1 รหัส 58 จำนวน 76 พันธุ์ มันสำปะหลังพันธุ์บริโภค จำนวน 144 พันธุ์ มันสำปะหลังพันธุ์ลูกผสมปี 62 จำนวน 138 สายพันธุ์ พันธุ์พ่อแม่พันธุ์ จำนวน 105 พันธุ์ สามารถคัดเลือกมันสำปะหลังได้ จำนวน 200 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Association mapping แล้วนำไปคัดเลือกในแปลงอนุรักษ์พันธุ์มา จำนวน 100 สายพันธุ์ นำมาปลูกในกระถาง 4 นิ้วในวัสดุปลูกขุยมะพร้าวจนมีใบจริงจำนวน 3 ใบ จึงนำไปทดสอบพีโนไทป์ด้านการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยให้คะแนนความต้านทานระดับ 0-5 จากการประเมินความรุนแรงของอาการใบไหม้ และคัดเลือกมันสำปะหลังได้ 22 สายพันธุ์ ที่มีแนวโน้มให้ความต้านทานต่อโรคแบคทีเรียไลโบลท์ และควรนำไปประกอบการตัดสินใจปรับปรุงพันธุ์ร่วมกับลักษณะอื่นๆ ต่อไป

3. การใช้เครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 9 เครื่องหมาย ได้แก่ RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R, EST-K, Ex2-78, Ex2-157 และ Ex3-128 ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างจากเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 250 พันธุ์ พบพันธุ์ candidate ที่แสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับพันธุ์ต้านทาน TME3 จำนวน 14 พันธุ์ ซึ่ง 2 ใน 14 พันธุ์นี้แสดงแถบดีเอ็นเอและมีลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ในทั้ง 9 เครื่องหมายโมเลกุล ได้แก่ MMAL63 และ CMR23-149-59 ซึ่งพันธุ์ candidate เหล่านี้จะถูกนำไปทดสอบความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังกับเชื้อโรคจริงสำหรับการคัดเลือกลูกผสมในปี 2563-2564 พบลูกผสม candidate จำนวน 16 ต้นที่มีแถบดีเอ็นเอ และลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ครบทั้ง 9 เครื่องหมาย นอกจากนี้ลูกผสมระหว่าง CMR 37-18-201 x TME3 จำนวน 2 ต้น แสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 ใน 7 เครื่องหมายซึ่งลูกผสม 2 ต้นนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะแสดงพีโนไทป์ต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังเนื่องจากสืบเชื้อสายมาจากพันธุ์ TME3 โดยตรง โดยในพันธุ์ TME3 มีโลคัส CMD2 ที่เป็นโลคัสหลักในการควบคุมลักษณะความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง และเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการคัดเลือก

พันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบต่างส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับโลคัส CMD2 อย่างไรก็ตาม การทดสอบความต้านทานโรคใบต่างมันสำปะหลังของพันธุ์และลูกผสม candidate ในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรคเป็นสิ่งจำเป็น

4. การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลังเบื้องต้นจากมันสำปะหลัง จำนวน 14 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ที่ต้านทานโรครากปมคือ ระยะเวลา 1, ระยะเวลา 7, ระยะเวลา 13, ระยะเวลา 60, ระยะเวลา 72 และเกษตรศาสตร์ 50 และพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากปมคือ ระยะเวลา 2, ระยะเวลา 3, ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 9, ระยะเวลา 11, ระยะเวลา 90, หัวบง 60, หัวบง 80 ทำการออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์จากรายงานที่ใช้คัดเลือกโรครากปมจากหัวบง มันฝรั่ง ถั่วอัลมอนต์ และไพรเมอร์ SSR จำนวน 26 คู่ ออกแบบไพรเมอร์จากยีน Endoglucanase ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับโรครากปมเพิ่มอีก 11 คู่ และจากยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากปม 4 ยีน ออกแบบเป็นไพรเมอร์ชนิด ILP (Intron Length Polymorphism) จำนวน 31 คู่ รวมทั้งสิ้น 57 คู่ไพรเมอร์ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้กับมันสำปะหลัง จำนวน 14 พันธุ์ พบว่า มีไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของมันสำปะหลังจำนวน 15 คู่ คือ PGLR7, PMEU2, BGL1, BGL2, BGL3, BGL4, BGL7, BGL9, BGL10, GUN4, GUN5, GUN6, GUN7, GUN8, GUN9 ทำการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ทั้ง 15 คู่ กับดีเอ็นเอมันสำปะหลังที่มีข้อมูลการทดสอบโรครากปม จำนวน 71 พันธุ์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel และด้วยเครื่อง QIAxcel พบว่า ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของมันสำปะหลัง 71 พันธุ์ มี 6 คู่ คือ BGL2, BGL4, BGL7, GUN4, GUN 5, PGLR7 จากนั้นได้คัดเลือกมันสำปะหลังลูกผสม จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ต้านทานโรครากปมคือ พันธุ์ลูกผสม CMR 62-11 (พันธุ์แม่คือ CMR 32-94-12 และพันธุ์พ่อคือ KU 50) ที่ต้านทานโรครากปม จำนวน 46 ตัวอย่าง และพันธุ์ลูกผสม CMR 62-79 (พันธุ์แม่คือ CMR 50-70-76 และพันธุ์พ่อคือ R7) ที่ต้านทานโรครากปม จำนวน 259 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ PCR กับไพรเมอร์ 6 คู่ พบว่า ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของลูกผสมแต่ละต้นได้อย่างชัดเจนคือ BGL7 และ GUN5 ในการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูล Genotyping by sequencing (GBS) ของมันสำปะหลัง จำนวน 71 พันธุ์ โดยพบรูปแบบ SNPs จำนวน 2,688 รูปแบบ คิดเป็น 100% โดยเป็นแบบ transitions ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสของดีเอ็นเอประเภทเดียวกันคือ 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% และทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางเทคโนโลยีชีวสารสนเทศ เพื่อหา SNP โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทาง Phenotype ของดัชนีรากปม ความต้านทานและความอ่อนแอต่อโรครากปม และทำ dendrogram เพื่อดูความสัมพันธ์ของพันธุ์มันสำปะหลัง 71 พันธุ์ และออกแบบไพรเมอร์ แบบ tetra primer จำนวน 6 ชุด สำหรับใช้ตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลัง พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล 2 ชุด สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานได้ โดยแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังที่ต้านทานโรคและอ่อนแอต่อโรคได้

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำที่รวบรวมจากเอกสารทางวิชาการต่างๆ กับมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ที่รวบรวมอยู่ในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง พบว่า ไม่สามารถจำแนกลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำได้ จากนั้นจึงนำเทคโนโลยี GBS ตรวจสอบจีโนมและความแตกต่างของลำดับเบส ณ ตำแหน่งใดๆ (single nucleotide polymorphism; SNP) เพื่อนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP และเมื่อนำมันสำปะหลังจำนวน 100 สายพันธุ์ วิเคราะห์จีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับ (SNP marker) ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ ด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR จำนวน 3 ชุด ได้แก่ โดย 1CHN มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 280 mg HCN/kg น้ำหนักสด ร้อยละ 64.81 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับ 3CHN และ 13CHN มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด ร้อยละ 73.33 และ 76.64 ตามลำดับ และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้ง (% amylose) ด้วยเทคนิค Pyrosequencing จำนวน 3 เครื่องหมาย โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับ SNP2 มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 15.12 คิดเป็นร้อยละ 58.64 และเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับ SNP5 และ SNP6

มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณแป้ง (% amylose) สูงกว่า 10.83 คิดเป็นร้อยละ 70.94 และ 69.62 ตามลำดับ

6. 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 เมื่อนำไปตรวจสอบพีโนไทป์ลักษณะแป้งเหนียวด้วยการย้อมสีไอโอดีน พบว่าหัวมันและเมล็ดแป้งมันสำปะหลังจากตัวอย่างจีโนไทป์ Wxwx และ wxwx ปรากฏเป็นสีน้ำเงิน และไม่พบการเกิดสีน้ำตาลทั้งในตัวอย่างหัวมันและเมล็ดแป้ง แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะแป้งเหนียวเฉพาะในกลุ่มประชากรที่มีพันธุ์ Waxy เป็นพ่อแม่พันธุ์เท่านั้น แต่ไม่สามารถใช้คัดเลือกตัวอย่างมันสำปะหลังนอกกลุ่มประชากรได้ สำหรับยีน GBSSI เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งเหนียวในพืช จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบมันสำปะหลังแป้งเหนียวพันธุ์ Waxy-HB1 ที่ได้จากมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย และพันธุ์การค้า (non-waxy) ได้แก่ หัวยบง 80 และ เกษตรศาสตร์ 50 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 229 เป็นแบบ T/G พบว่าพันธุ์มันสำปะหลัง non waxy เป็นตำแหน่ง G และพันธุ์ Waxy-HB1 เป็นตำแหน่ง T เมื่อนำไปแปลรหัสเป็นโปรตีนเป็นตำแหน่งโคดอน TGA (stop codon) ในส่วนของ coding gene จึงออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะต่อลำดับเบส 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 การค้นหาและเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNPs ด้วยวิธี GBS จากพันธุ์ปกติและพันธุ์แป้งเหนียว จำนวนทั้งสิ้น 13 ตัวอย่าง ได้ข้อมูลเครื่องหมาย SNPs แบบ Bi-Allelic จำนวน 19,057 ตำแหน่ง พบตำแหน่ง SNPs เฉพาะมันสำปะหลังพันธุ์แป้งเหนียวจำนวน 33 ตำแหน่ง แบ่งเป็น SNPs แบบเฮเทอโรไซโกต จำนวน 26 ตำแหน่ง และแบบโฮโมไซโกต จำนวน 7 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถใช้ในคัดเลือก ระบุหรือจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ต่อไป อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองที่ได้ตรงตามตัวชี้วัดที่ตั้งไว้ในปี 2563 คือ ได้พันธุ์มันสำปะหลังที่มีจีโนไทป์ลักษณะแป้งเหนียวเป็นแบบ Wxwx จำนวน 202 ตัวอย่าง และแบบ wxwx จำนวน 17 ตัวอย่าง แต่ไม่สามารถคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะแป้งเหนียวสำหรับการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงไม่พบมันสำปะหลังที่มีลักษณะพีโนไทป์เป็นแป้งเหนียว จึงไม่สามารถจัดทำคู่มือและคัดเลือกลูกผสมสำหรับการวิจัยต่อไปในปี 2564 ได้

7. การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผลผลิตในมันสำปะหลัง โดยการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ทั้งหมด 13 เครื่องหมาย จากยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง จำนวน 6 ยีน ซึ่งเครื่องหมายเหล่านี้มีค่าประสิทธิภาพของเครื่องหมาย (PIC) อยู่ระหว่าง 0.19 – 0.64 และมีค่าเฉลี่ย 0.35 ซึ่งเครื่องหมาย ILP ที่พัฒนาได้จากวิจัยมีศักยภาพในการนำไปศึกษาแยกความแตกต่างของพันธุ์มันสำปะหลังในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ILP กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เครื่องหมาย UGPase1 แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังสูงสุด (ค่า p น้อยที่สุด) โดยมีค่าอิทธิพลต่อลักษณะ (R<sup>2</sup>) 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 โดยผลจากงานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้เพื่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้

## อภิปรายผล

1. เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 16 เครื่องหมาย ที่ผ่านการคัดเลือกว่ามีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์และกลุ่มที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR ทำให้ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 3,420 ข้อมูล ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR หรือ microsatellite เป็นเครื่องหมายที่มีความจำเพาะถูกสร้างขึ้นให้จับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ณ ตำแหน่งที่ต้องการหรืออื่นที่สนใจ เป็นเครื่องหมายที่มีความเหมาะสมและนิยมนำมาใช้ในการศึกษาด้านจีโนม การสร้างแผนที่จีโนม การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช การจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เพื่อระบุจีโนไทป์ของพืชหลายชนิด ทั้งนี้เพราะ SSR มีอยู่เป็นจำนวนมากกระจายทั่วไปในจีโนม และมีความแปรปรวนสูง อีกทั้งจำนวนซ้ำของ SSR มีความแตกต่างกันในพืชชนิด (species) เดียวกัน จึงสามารถแยกความแตกต่างแบบข่มร่วมได้ (co-dominant) ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ออกจากได้ และยังสามารถทำซ้ำ (reproducibility) ได้ดีอีกด้วย (อรรถรัตน์, 2548) ทั้งนี้ เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่คัดเลือกได้ดังกล่าว สามารถนำไปใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อระบุเอกลักษณ์ประจำพันธุ์และการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังต่อไป

2. เครื่องหมายโมเลกุลที่ออกแบบโดย Veronique และคณะ (2003) และออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลโบลท์ของมันสำปะหลัง จำนวน 31 ชนิด นำมาทดสอบความใช้ได้ของมันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมในศูนย์อนุรักษ์เชื้อพันธุ์มันสำปะหลังศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองที่รวบรวมทั้งพันธุ์ไทยและพันธุ์จาก CIAT สามารถคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายได้ 6 ชนิด ซึ่งเป็นชนิดที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคแบคทีเรียไลโบลท์ของมันสำปะหลัง เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวไปตรวจสอบหาความต้านทานโรคกับมันสำปะหลัง จำนวน 663 สายพันธุ์ จนสามารถคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังด้วยลักษณะทางจีโนไทป์ได้ จำนวน 200 สายพันธุ์ และคัดเลือกต้นพันธุ์จากแปลงอนุรักษ์พันธุ์ จำนวน 100 สายพันธุ์ นำไปทดสอบลักษณะทางฟีโนไทป์เพื่อดูลักษณะการเกิดโรคแบคทีเรียไลโบลท์ สามารถคัดเลือกมันสำปะหลังได้ จำนวน 22 สายพันธุ์ จากผลการทดลองพบว่า มีความสอดคล้องกันทั้งลักษณะจีโนไทป์และฟีโนไทป์จึงนำข้อมูลนี้ไปประกอบการตัดสินใจในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ และสามารถนำโมเลกุลเครื่องหมายเหล่านี้ไปใช้คัดเลือกมันสำปะหลังลูกผสมในประชากรอื่นๆ ได้ต่อไป

3. มันสำปะหลังพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบด่างเหล่านี้ ถึงแม้ว่าแสดงแถบดีเอ็นเอและลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับพันธุ์ต้านทาน TME3 การทดสอบฟีโนไทป์ลักษณะความต้านทานโรคใบด่าง CMD กับเชื้อโรครจริงเป็นสิ่งจำเป็นและมีความสำคัญ เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ (RME1) และเอสเอสอาร์ (NS158, SSRY28, NS169) อยู่ใกล้กับโลคัส *CMD2* แต่ไม่ได้อยู่บนยีน ทำให้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวแสดงถึงเพียงความเป็นไปได้ที่อาจมียีนต้านทานโรคอยู่ในพันธุ์นั้นๆ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องนำพันธุ์รวมถึงลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแล้วไปทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรค ก่อนการนำพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์และเผยแพร่ให้แก่เกษตรกรต่อไป

4. การทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลในการทำ PCR จากสังเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกมันสำปะหลังที่ต้านทานโรครากปม พบว่า tetra primer ที่ใช้ตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรครากปมในมันสำปะหลัง สามารถให้ผลที่แม่นยำที่สุด มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรครากปมและดัชนีรากปม เมื่อนำไปทดสอบกับพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสม พบว่า สามารถให้ผลที่แตกต่างในมันสำปะหลังแต่ต้น ซึ่งสามารถนำต้นมันสำปะหลังที่มีลักษณะต้านทานโรครากปมไปปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้เพื่อนำไปใช้ในแหล่งที่มีปัญหาโรครากปมระบาด

5. ในเบื้องต้นนำเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำจากเอกสารทางวิชาการต่างๆ ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ มักพัฒนาขึ้นจากพ่อแม่พันธุ์และใช้ตรวจสอบสายพันธุ์ได้ดีกับลูกผสมที่เกิดจากพ่อแม่พันธุ์ดังกล่าว ดังนั้น เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR มาใช้ตรวจสอบมันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ ที่รวบรวมพันธุ์ไว้ในแปลงของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จึงไม่สามารถจำแนกลักษณะแป้งสูงและลักษณะไซยาไนด์ต่ำได้ จึงได้นำเทคโนโลยี GBS ตรวจสอบจีโนไทป์และความแตกต่างของลำดับเบส ณ ตำแหน่งใดๆ (SNP) เพื่อนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP งานวิจัยนี้ จึงพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสไนป์ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาไนด์ ด้วยเทคนิค tetra-primer



ARMS-PCR จำนวน 3 ชุด 1CHN 3CHN และ 13CHN และเมื่อทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของน้ำมันสำปะหลัง เพื่อเป็นการยืนยันว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้ในการตรวจสอบปริมาณไซยาไนด์ของน้ำมันสำปะหลังได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ โดยสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 1CHN ใช้คัดเลือกน้ำมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 280 mg HCN/kg น้ำหนักสด ซึ่งสามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลพีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 64.81 ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป 3CHN และ 13CHN สามารถนำไปใช้คัดเลือกน้ำมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลพีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 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 และเมื่อทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปเปรียบเทียบกับผลพีโนไทป์ (% amylose) พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 2 และ SNP 6 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลพีโนไทป์ คิดเป็นร้อยละ 70.94 และ 69.62 ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลของ SNP 5 สามารถให้ผลถูกต้องตรงกับผลพีโนไทป์ 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 และการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่เกี่ยวข้องกับปริมาณแป้งด้วยเทคนิค Pyrosequencing นี้ ถึงแม้จะมีผลการตรวจสอบที่ชัดเจน แต่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะ อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างค่อนข้างสูง จึงยังคงต้องพัฒนาการตรวจสอบปริมาณแป้งด้วยเครื่องหมายโมเลกุลให้มีขั้นตอนและค่าใช้จ่ายลดลงต่อไป ส่วนการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR นี้ เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ห่องปฏิบัติกรขนาดเล็กที่มีเพียงเครื่องทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และเครื่องตรวจแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส และยังเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบสายพันธุ์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำได้

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

7. 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 (โสธิตาและ กิตติพัฒน์, 2559) และอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมของการพัฒนาเครื่องหมาย ILP ในยางพารา 73.4% จากยางพาราจำนวน 180 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์ 173 คู่ไพรเมอร์ แสดงโพลิมอร์ฟิซึม จำนวน 127 คู่ไพรเมอร์ (Chanroj, 2016) ทั้งนี้ประสิทธิภาพการแสดงผลโพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมาย ILP อาจให้ผลที่ใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่ใช้ในการทดลอง จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ และจำนวนตัวอย่าง และผลการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรเครื่องหมาย ILP ในมันสำปะหลังจำนวน 166 พันธุ์ มีโครงสร้างประชากรย่อย 3 กลุ่ม พบว่าตัวอย่างมันสำปะหลังในกลุ่มประชากรย่อยที่อนุมาณมีลักษณะผสม (admixture) แสดงถึงการเกิดการผสมข้ามระหว่างสมาชิกระหว่างกลุ่มประชากรย่อยของมันสำปะหลังที่มีความ

หลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Adjebeng-Danquah et al., 2020) ความไม่สมดุลของลิงเกจ (linkage disequilibrium; LD) ของเครื่องหมาย ILP ที่อยู่ภายในยีนเดียวกันและมีตำแหน่งใกล้เคียงกันมีแนวโน้มการเกิดความไม่สมดุลของลิงเกจมากกว่าเครื่องหมาย 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 ( $p \leq 10^{-7}$ ) จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีผลผลิตสูง อย่างไรก็ตามควรมีการวิจัยเพิ่มเติมโดยอาศัยข้อมูลที่มากขึ้นในส่วนของลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีผลผลิตสูง

#### ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกและพัฒนาได้จากงานวิจัยภายใต้โครงการวิจัยนี้ นักวิจัย หรือนักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถนำไปใช้ในการจำแนก ตรวจสอบ หรือคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่เกี่ยวข้องกับลักษณะสำคัญทางการเกษตร ได้แก่ ลักษณะต้านทานโรคแบคทีเรียลโปสท์ โรคใบด่าง โรครากปม ลักษณะผลผลิตและแป้งสูง ไชยาไนต์ต่ำ และลักษณะแป้งเหนียว สำหรับลักษณะต้านทานโรคใบด่าง ยังมีความจำเป็นที่จะต้องนำพันธุ์รวมถึงลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแล้วไปทำการทดสอบในสภาพจริงกับเชื้อสาเหตุโรค ก่อนการนำพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์และเผยแพร่แก่เกษตรกรต่อไป ทั้งนี้สามารถนำเทคโนโลยีและองค์ความรู้ในการศึกษาวิจัยการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลให้มีความจำเพาะกับลักษณะสำคัญทางการเกษตร เพื่อเข้ามาช่วยในกระบวนการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ตรงตามความต้องการของเกษตรกรและผู้ใช้ประโยชน์อื่นๆ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังหรือพืชอื่นที่สนใจได้

#### ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

เนื่องจากสถานการณ์การระบาดของโควิด-19 ส่งผลกระทบต่อการทำงานวิจัยทั้งในส่วนของ การเก็บตัวอย่างสำหรับนำมาทดสอบ ซึ่งต้องเดินทางไปต่างจังหวัด ได้แก่ ตัวอย่างมันสำปะหลัง ตัวอย่างไส้เดือนฝอย เป็นต้น ทำให้การดำเนินการในส่วนของ การทดสอบพีไอที และการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลมีความล่าช้า ไม่ตรงตามเป้าหมายที่วางแผนการดำเนินไว้ และในส่วนของ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลัง ข้อมูลลักษณะน้ำหนักผลผลิตมันสำปะหลังที่ได้จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองไม่สมบูรณ์ เนื่องจากขึ้นกับสภาพแวดล้อม และจำนวนปีที่ปลูก

## เอกสารอ้างอิง

### การทดลองที่ 1

- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2563. มั่นสำปะหลังโรงงาน : 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. Rodriguez, P. Chavarriaga, W.M. Roca, J. Tohme and M.W. Bonierbale. 1997. A molecular genetic map for cassava (*Manihot 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)
- 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.

## การทดลองที่ 2

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 Response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* Infection in Cassava 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 M.T., Prochnik S., and Jannink J.L. 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>.

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, Polymorphisms, 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

จิราพร แก่นทรัพย์ สุวลักษณ์ อมะวัลย์ ประพิศ วงเทียม อรุโณทัย ชาววา สุภาวดี จ้อยเหรียญ ดนัย นาคประเสริฐ และ จิณณจารย์ หาญเศรษฐ์สุข. 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. สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 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.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 2007. Cassava Research and Development in Asia: Exploring New Opportunities for an Ancient Crop. Proc. 7<sup>th</sup> 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. Johnstone and 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. Sanjurjo 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 Mosaic Disease 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 mosaic diseases of cassava in Africa 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 severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by inter-specific recombination. *J. Gen. Virol.* 78: 2101-2111.

#### **การทดลองที่ 4**

- หทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2544. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP. 45 หน้า.
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, ภาณุวัฒน์ มุลจันทะ, อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช และ โอภาษ บุญเส็ง. 2558. การคัดเลือกและประเมินเชื้อพันธุ์กรรมมันสำปะหลังต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม. รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, จ.ปทุมธานี. 69 หน้า.
- วิภา หงส์ตระกูล. 2544. ผลงานวิจัยการประยุกต์ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP. 45 หน้า.
- สฤษฎ์ ขวัญแก้ว และ บัญชา ชินศรี. 2557. การใช้วิธีทางชีวโมเลกุลในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่ทำลายมันสำปะหลังในอำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา หน้า 278-283 ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 สาขาพืช

- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายโมเลกุลจากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 269 หน้า
- อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิชและบัญชา ชินศรี. 2555. การสำรวจและประเมินความเสียหายจากโรครากปมของมันสำปะหลัง หน้า 391-395 ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 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/Susceptible 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 University, The Netherlands.
- 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 tuberosum* Conferring Heat-Stable Resistance to Root-Knot Nematodes Is a Homolog of Mi-1. *Plant Physiology*, vol 143 p 1011-1054.

#### การทดลองที่ 5

- จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข, ประพิศ วงเทียม, อุมพร รักษาพรหมณ์, จิตติลักษณ์ พลพวง, จารุวรรณ บางแว และ จินดา จิตจักร. 2558. การจำแนกและประเมินลักษณะทางคุณภาพของหัวคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งและคุณภาพของท่อนพันธุ์ในเชื้อพันธุ์มันสำปะหลัง. รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด 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.
- 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 Toxicology* 39: 649-653.

#### การทดลองที่ 6

- จรุงสิทธิ์ ลิ้มศิลา และคณะ. 2547. เอกสารวิชาการ มันสำปะหลัง. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตรจตุจักร กรุงเทพฯ. 124 หน้า.
- ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. 2558. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. AG-Bio ปีที่ 7 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

- อรุณทัย ชาววา สุภาวดี ง้อเทริยญ อัญชลี ศรีสุวรรณ ประพิศ วงเทียม 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 Comparison 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
- Parveen, I., H.K. Singh., 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.

## การทดลองที่ 7

- จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุสุข ประพิศ วงเทียม อูมาพร รักษาพรหมณ์ 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 BIENNIAL REPORT ON GLOBAL FOOD MARKETS: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- 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.
- Wolfe, Marnin & Del Carpio, Dunia & Alabi, Olumide & Ezenwaka, Lydia & Ikeogu, Ugochukwu & Kayondo, Siraj Ismail & Lozano, Roberto & Okeke, Uche & Alfred, Ozimati & Esuma, Williams & Egesi, Chiedozi & 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

## ภาคผนวก

ผลผลิต (output) ตามที่ระบุไว้ในคำรับรอง

### 1. องค์ความรู้ใหม่

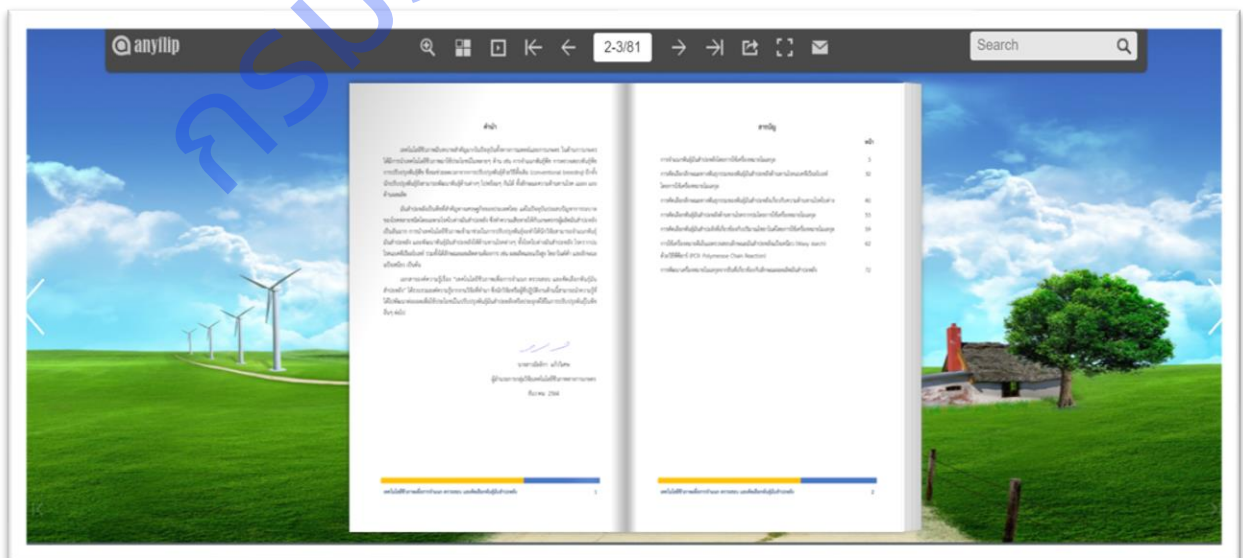
จำนวน 6 เรื่อง ส่งมอบ จำนวน 7 เรื่อง

ได้จัดทำเป็นเอกสารองค์ความรู้เรื่อง เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการจำแนก ตรวจสอบ และปรับปรุงพันธุ์ มันสำปะหลัง เว็บไซต์ของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ :

[www.http://online.anyflip.com/iabwg/bhlf/mobile/index.html](http://online.anyflip.com/iabwg/bhlf/mobile/index.html)



สารบัญ	หน้า
การจำแนกพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล	4
การคัดเลือกยีนเฉพาะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคแบคทีเรียจุดใบดำ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล	33
การคัดเลือกยีนเฉพาะทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังเกี่ยวกับความต้านทานโรคใบด่าง	41
การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคราน้ำค้างโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล	54
การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่เกี่ยวข้องกับปริมาณไซยาโนไกลโคไซด์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล	60
การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตรวจสอบลักษณะมันสำปะหลังแป้งเหนียว (Waxy starch) ด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)	63
การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจากยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะผลผลิตมันสำปะหลัง	73



## 2. กระบวนการใหม่ระดับห้องปฏิบัติการ


จำนวน 5 เรื่อง ส่งมอบ จำนวน 7 เรื่อง

ได้จัดทำเอกสารคู่มือโปรโตคอล และ Flowchart แสดงขั้นตอนกระบวนการจำแนก ตรวจสอบ หรือ คัดเลือกลักษณะสำคัญทางการเกษตรในมันสำปะหลัง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ดังนี้

### 1. โปรโตคอลการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

**โปรโตคอลการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่างโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล**

จิราพร แก้วทรัพย์



**Conventional selection**

P1 x P2 → F1 → F2 (many selection)

- Time consuming
- Some traits are difficult to phenotype
- Phenotypic selection may be influenced by environment
- Field trial and labor cost

**Marker-assisted selection**

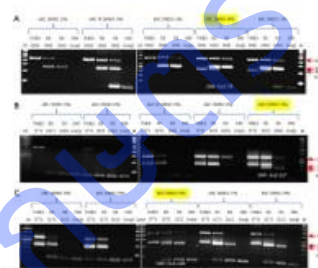
P1 x P2 → F1 → F2 (Early selection)

- Early selection
- Screening of difficult traits
- High reliability
- Accuracy and rapid

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ขยายโมเลกุลยีนดัดแปลงในยีน *Acrolyase* สำหรับตรวจสอบด้วยเทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR

SNP name	Primer name	Sequence (5' - 3')	Allele	Amplification (bp)
E42-78	Forward inner primer	TGAGGACATCCAAKCAACAGCTG	A	223
	Reverse outer primer	TTGACGGGAAATGAAATTAATTAATG	G	222
	Forward outer primer	CCTTTTTCAGAGGATTTCTCTGATTT		414
	Reverse inner primer	TCCGATTTTAAAGTTCGAAATGATTT		
E42-127	Forward inner primer	TGCTGAGCTTTTGGCTGATATCT	T	133
	Reverse outer primer	TAACTGCTTGTGATGATGATGAGG	G	134
	Forward outer primer	TTGACGGGAAATGAAATTAATTAATG		204
	Reverse inner primer	GCACCTCTGATCTCTGCTGAGTTT		
E42-128	Forward inner primer	TGATGAGCTTAAATGATGATGATG	G	201
	Reverse outer primer	AGGCTCTAAATTTTAAAGTTCG	T	202
	Forward outer primer	TGAGGACATCCAAKCAACAGCTG		404
	Reverse inner primer	CCTTTTTCAGAGGATTTCTCTGATTT		



ภาพที่ 2 ภาพจากการใช้เทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์และตรวจสอบด้วยเทคนิค E42-78 (A), E42-127 (B) และ E42-128 (C) โดยใช้เทคนิค Tetra primer ARMS-PCR ในมันสำปะหลังที่มี TMES 100% 3 และรายชื่อ 3 ชื่อยีนที่ทราบแล้วแสดงด้วยวงกลมสีแดง

### 2. การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคแบคทีเรียลบลท์ในมันสำปะหลัง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

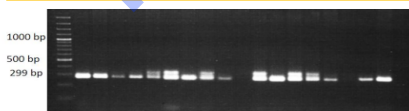
Protocol : การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแบคทีเรียลบลท์ของมันสำปะหลังด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด EST-SSRs

กระบวนการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSRs คัดเลือกลักษณะความต้านทานโรคแบคทีเรียลบลท์



1. เลือกดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังที่ต้องการตรวจสอบ
2. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSRs

3. ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 2.5% อะกาโรสเจล



ภาพแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังสายพันธุ์ลูกผสม ปี 2562 /ไพรเมอร์ SSrY5 / 100 bp marker

4. การแปลผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

1. หากเกิดแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มันสำปะหลังมีลักษณะทางจีโนไทป์เป็น heterozygous
2. หากเกิดแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ มันสำปะหลังมีลักษณะทางจีโนไทป์เป็น homozygous
3. หากเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 299 คู่เบส คือ มันสำปะหลังสายพันธุ์นั้นมีความต้านทานโรคแบคทีเรียลบลท์

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSRs ที่ใช้ในการตรวจสอบมันสำปะหลังที่มีลักษณะความต้านทานโรคแบคทีเรียลบลท์

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ
MBR13	F : TTTAAGGGCA AAACAATC T R : T CCTCAATCCC ATCTACTCT	681
MBR5	F : TCAAGCTCTC TTGACGTTCT CT R : CCAAATACC TAGTATGGG AGA	669
MBR9	F : GGTCAATCTT AGGCATTAG A R : C ATCTGAAATG TATCAAAGTG	581
MBR17	F : ACCAAGCTT TGTCTACCA T R : ATTACCA ACGAGTCTG TAC	627
MBR4	F : ACTTTTTCA TCCACAAC R : AGTAGTAAAG ATGCCATCAG ATTC	630
SSrY5	F : GATGCGCAATCTCTCAAGTA R : TGATGCCATCTTCACTT	229

การทดสอบพีซีอาร์ในการต้านทานโรคแบคทีเรียลบลท์




1. คัดเลือกมันสำปะหลังที่มียีนต้านทานโรคแบคทีเรียลบลท์ มา 100 สายพันธุ์
2. ฉีดพ่นเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* (CBB, Cassava Bacterial Blight)
3. ตรวจสอบผลการเกิดโรคเปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนไทป์
4. คัดเลือกต้นพันธุ์ที่ต้านทานโรคไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

3. การคัดเลือกลักษณะด้านทานโรครากปมในมันสำปะหลัง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

**Protocol: การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกลักษณะด้านทานโรครากปมในมันสำปะหลัง**

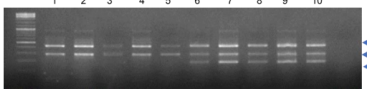
**การใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับคัดเลือกลักษณะด้านทานโรครากปม**



- 1) สกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังที่ต้องการตรวจสอบ
- 2) นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สลับที่พัฒนาขึ้น

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวน cycle
initial	95°C	2 นาที	1 รอบ
denaturation	94°C	30 วินาที	
annealing	58°C	90 วินาที	35 รอบ
extension	72°C	30 วินาที	
Final extension	72°C	5 นาที	1 รอบ

- 3) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 2% อะกาโรสเจล



- 4) แปลผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

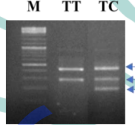
**เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการคัดเลือกลักษณะด้านทานโรครากปม**

เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถแสดงจีโนไทป์ (genotype) ให้ผลถูกต้องตรงกับฟีโนไทป์ (phenotype)

SNP ID	Primer set and sequences	product size
Me02005300154	Outer 1 F 5' TGCCGATGCTGGTCATGCTACTCT 3'	Outer 421
	Outer 1 R 5' TGCAAAAACAGGGACCAATGAACCT 3'	
	Inner 1 F 5' GAGCAAGCCGAGCGATGTTT 3'	C allele 188
	Inner 1 R 5' ACCATACCTCACACTTTTCAAGTTGCT 3'	T allele 276

**การแปลผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์**

- 1) มันสำปะหลังที่ต้านทานโรครากปมจะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 421 และ 276 คู่เบส มีจีโนไทป์ TT
- 2) มันสำปะหลังที่อ่อนแอต่อโรครากปมจะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 421 และ 276 คู่เบส มีจีโนไทป์ TC




TT = ต้านทานโรครากปม  
TC = อ่อนแอต่อโรครากปม


4. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะไซยาไนด์ต่ำในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

**Protocol: การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะไซยาไนด์ต่ำในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง**

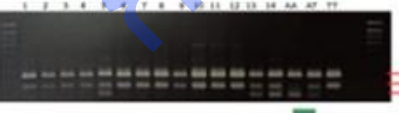
**กระบวนการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับคัดเลือกลักษณะไซยาไนด์ต่ำ**



- 1) สกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังที่ต้องการตรวจสอบ
- 2) นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ชุดเครื่องหมายโมเลกุลชนิด สลับที่พัฒนาขึ้น



- 3) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 3% อะกาโรสเจล



- 4) แปลผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์


**เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจสอบมันสำปะหลังที่มีลักษณะไซยาไนด์ต่ำ**

เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถแสดงจีโนไทป์ (genotype) ให้ผลถูกต้องตรงกับฟีโนไทป์ (phenotype) คือเป็นร้อยละ 73.33 และสามารถแยกมันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg Hydrogen cyanide (HCN)/kg น้ำหนักสดได้

SNP ID	Primer set and sequences	product size
SN_49886	Outer 1 F 5' AACTTTTCTGGAATTGAATGTTGGTG 3'	Control Fragment 265 bp
	Outer 1 R 5' ACCATAAGTCACTGACCAATGGAACT 3'	
	Inner 1 F 5' AAGAAGCCATGAATCCAAAGCAAT 3'	T allele 189 bp
	Inner 1 R 5' ACCATACCTCACACTTTTCAAGTTGCT 3'	A allele 133 bp

**การแปลผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์**

- 1) หากพบดีเอ็นเอขนาด 265 และ 133 คู่เบส มีสำปะหลังสายพันธุ์ที่ปลอดภัยไม่มีหรือมีน้อยคือ (heterozygous: AT) และ หากพบดีเอ็นเอขนาด 265 และ 133 คู่เบส มีสำปะหลังสายพันธุ์ที่ปลอดภัยไม่มีหรือมีน้อยคือ (homozygous: AA) แปลผลได้ว่า มันสำปะหลังสายพันธุ์ต่ำนี้ มีปริมาณไซยาไนด์สูงที่สุด 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด (สูง)
- 2) หากพบดีเอ็นเอขนาด 265 และ 189 คู่เบส มีสำปะหลังสายพันธุ์นี้ มีปริมาณไซยาไนด์ปลอดภัย (homozygous: TT) ซึ่งแปลผลได้ว่า มันสำปะหลังสายพันธุ์นี้มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด



จีโนไทป์ TT = มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด

5. การตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะแป้งเหนียว (waxy starch) ในมันสำปะหลัง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล



6. การใช้เครื่องหมาย ILP ในการคัดเลือกลักษณะน้ำหนักผลผลิตในมันสำปะหลัง

