รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : ความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ

2. **โครงการวิจัย** : ความหลากหลายทางชีวภาพและฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ

   กิจกรรม : ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชไร่

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายของพันธุกรรมของมันสำปะหลัง

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : -

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นายธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

   ผู้ร่วมงาน : นางสาวกาญจนา พฤกษพันธ์ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช
   นางประพิศ วองเทียม สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน
   นายภาคภูมิ ถิ่นคำ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

5. **บทคัดย่อ** :

การประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่มีคุณลักษณะเหมาะสม โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์สากลจากดีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียร์ไรโบโซมอลและคลอโรพลาสต์ 10 ยีน แล้วตรวจสอบคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี BlastN และทดสอบประสิทธิภาพของการจำแนกชนิดและพันธุ์มันสำปะหลังด้วยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Neighbor-joining พบว่า ไพรเมอร์สากลของยีน *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK* และ *ITS2* สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะมีผลสำเร็จสูง 100 94 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ 615, 426, 794 และ 317 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าบริเวณของดีเอ็นเอดังหล่าวนี้ทำได้ง่ายมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูง แต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันกับมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) บนฐานข้อมูลสากล NCBI ที่ระดับความเหมือนสูง 99.05-100% เมื่อพิจารณาความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 4 ยีน พบว่า มี *matK* และ *ITS2* ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มีเพียง ระยอง 86-13 เท่านั้นที่แตกต่างจากพันธุ์อื่น ๆ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* มีความผันแปรทางพันธุกรรมมากกว่า และสามารถใช้เป็นข้อมูลนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสามารถมันสำปะหลังออกเป็น 5 กลุ่ม และสามารถจำแนกชนิดมันสำปะหลังออกจากพืชนอกกลุ่มทดลอง คือ สกุลยางพาราได้อย่าง

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ชัดเจน ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐาน *ITS2* สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อเป็นเครื่องมือจำแนกระดับพันธุ์ของมันสำปะหลังได้ ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* จึงเหมาะสำหรับการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้อย่างหนึ่ง เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างที่เก็บมา (unknown) ที่ข้อมูลกันกับข้อมูลมาตรฐานอ้างอิงบนฐานข้อมูล NCBI 100 เปอร์เซ็น และข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ที่ปรากฏ ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *ITS2* จึงมีประสิทธิภาพสามารถใช้เป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันสำหะหลังได้

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ดีเอ็นเอมาตรฐาน ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

6. คำนำ :

มันสำปะหลัง เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตทั้งอาหารมนุษย์ อาหารสัตว์ สิ่งอุปโภค เครื่องมือทางการแพทย์ และเป็นพืชพลังงานทดแทน ซึ่งมีตลาดอุตสาหกรรมรองรับผลผลิตทางการเกษตร ภาวะการผลิตมันสำปะหลัง ปี 2564 คาดว่ามีพื้นที่เก็บเกี่ยว 9.09 ล้านไร่ ผลผลิต 29.883 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 3.29 ตัน เมื่อเทียบกับปี 2563 พบว่า พื้นที่เก็บเกี่ยว ผลผลิตและผลผลิตต่อไร่ เพิ่มขึ้นร้อยละ 1.91 ร้อยละ 3.05 และร้อยละ 1.23 ตามลำดับ (ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมันสำปะหลัง ให้ได้ผลผลิตต่อไร่สูง เกษตรกรจำเป็นต้องมีระบบการจัดการที่ดี ทั้งการเตรียมดินปลูก การจัดการปุ๋ยและน้ำอย่างเหมาะสม ตรงตามความต้องการของพืช การดูแล ป้องกัน กำจัดวัชพืช โรคและแมลงศัตรูพืช รวมทั้งการเลือกใช้พันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ดีและตรงตามพันธุ์ การใช้พันธุ์มันสำปะหลังที่ไม่ตรงตามพันธุ์ มีผลทำให้ผลผลิตต่ำมาก สร้างความเสียหายให้เกษตรกรค่อนข้างมากโดยเฉพาะเกษตรรายย่อย ดังนั้นการจำแนกและระบุพันธุ์มันสำปะหลังให้ชัดเจนและถูกต้องเป็นเรื่องที่สำคัญอย่างยิ่ง การจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ 50 ลักษณะ แบ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์หลังจากการเพาะปลูก หลังเพาะปลูก 6 เดือน หลังเพาะปลูก 9 เดือน และช่วงการเก็บเกี่ยว (Fuเกษตรศาสตร์da et al., 1998) ขั้นตอนการจำแนกและระบุพันธุ์ของมันสำปะหลังตามลักษณะดังกล่าว ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง มีความไม่สม่ำเสมอของตัวอย่างเนื่องจากสภาพแวดล้อม และใช้ระยะเวลาในการพิสูจน์นาน รายงานทางด้านชีวโมเลกุลที่ผ่านมายังมุ่งเน้นที่ความหลากหลายเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ จึงยังไม่มีข้อมูลทางพันธุกรรมระดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์มันสำปะหลังของกรมวิชาการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast DNA; cpDNA) และดีเอ็นเอในนิวเคลียร์ไรโบโซมอล (nuclear ribosomal DNA; nrDNA) ซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกพืชกันมากในปัจจุบัน สำหรับพืชดีเอ็นเอบนคลอโรพลาสต์ซึ่งมีตำแหน่งจำเพาะได้แก่ยีน *rbc*L *mat*K *rpo*C1 *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน intergenic spacers *trn*H-*psb*A (Hajibabaei et al., 2007; Ford et al., 2009) การใช้ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสบริเวณ intergenic spacers 5´-*trn*S-*trn*G, 3´-*trn*s-*trn*G และ *trn*T-*trn*L พบว่าบริเวณดังกล่าวมีความผันแปรสูงและสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับสปีชีส์ของ *Pilosocereus aurisetus* group (Cactaceae) ได้มากว่าการวิเคราะห์ด้วยการใช้อนุกรมวิธาน (Bonatelli et al., 2013) ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรบางชนิดเช่นขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) เร่ว (*Amomum uliginosum* K.D.Koenig) โดยการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากข้อมูลลำดับนิวคลีโมไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ

ศรีวิชาการรุ่นที่

internal transcribed spaceระยอง 1 (ITS1) ที่อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 18S และ 5.8S (Jiang et al., 2002; Qiao et al., 2009) อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของของดีเอ็นเอพืชควรใช้ตำแหน่งดีเอ็นเอมากกว่า 1 ตำแหน่งร่วมกันเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำเพิ่มขึ้น ในการจำแนกพืชระดับชนิดสามารถทำได้ด้วยการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ *trn*H-*psb*A ร่วมกับ ITS2 ในการสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Pang et al., 2012) การจำแนกพืช *Hippophae* species (Shaji) ด้วยการอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำได้ยาก แต่ก็สามารถจำแนกได้ทั้งระดับชนิดและชนิดย่อยได้ด้วยการประยุกต์ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ *trn*H-*psb*A ร่วมกับ ITS2 (Liu et al., 2015) วัตถุประสงค์การทดลองนี้ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ มันสำปะหลัง และจัดเก็บเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลัง เพื่ออนุรักษ์และเก็บรักษาในธนาคารเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพแปลงปลูก และธนาคารดีเอ็นเอ (DNA bank)

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์ -

1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์
   1.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์
   1.2 เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า แบบแนวนอน
   1.3 เครื่องปั่นแยกสารควบคุมอุณหภูมิได้ชนิดตั้งโต๊ะ
   1.4 เครื่องดูดจ่ายสารละลาย
2. ชุดน้ำยาและสารเคมีที่ใช้สำหรับงานด้านเครื่องหมายโมเลกุล
3. กล้องถ่ายภาพพร้อมเลนส์

- วิธีการ -

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาข้อมูล DNA barcode เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานของมันสำปะหลัง

1. การรวบรวมตัวอย่างพืชทดลองและการจัดทำพรรณไม้อ้างอิง

ตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลังในกลุ่มที่ศึกษา (Ingroup) ได้แก่พันธุ์มันสำปะหลังที่ปรับปรุงพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตรจำนวน 11 พันธุ์ พันธุ์มันสำปะหลังที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากแหล่งอื่นๆ จำนวน 4 พันธุ์ และพันธุ์พื้นเมืองที่นิยมปลูกจำนวน 1 พันธุ์ รวมทั้งสิ้น 16 พันธุ์ ที่ถูกเก็บรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร ส่วนตัวอย่างนอกกลุ่มที่ศึกษา (Outgroup) ใช้ยางพารา (*Hevea brasiliensis* (เกษตรศาสตร์nth) Muell. Arg.) บันทึกลักษณะประจำพันธุ์ที่อายุ 4 และ 11 เดือนหลังปลูก เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของพันธุ์ มีการอัดแห้งพรรณไม้เพื่อเก็บรักษาหลักฐานพรรณไม้อ้างอิง (Voucher specimen) ไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร (Bangkok Herbarium, BK)

2. การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำใบมันสำปะหลังมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผง แล้วสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดสำเร็จรูป Plant DNA Extraction kit (Vivantis Technology)

กรมวิชาการเกษตร

จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำสารสกัดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 17 พันธุ์ มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 ng/ul จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนมาตรฐาน 10 ยีน ได้แก่ *rpoC1*, *rbcL*, *matK*, *ITS*, *ITS2*, *TrnH-psbA*, *trnL-F*, *psbK-psbI*, *atpF-atpH* และ *rpoB* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะสากลจำนวน 29 คู่ไพรเมอร์ ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยใช้เจลอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis) ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 หลังจากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอได้ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ (DNA purification) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (DNA sequencer) ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบความถูกต้อง โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Nucleotide Blast (BlastN) เพื่อวิเคราะห์ค่าความเหมือนของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เทียบกับฐานข้อมูลยีนสากล GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) และบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ลงในฐานข้อมูล GenBank ด้วยเครื่องมือ Sequin เพื่อใช้ในการอ้างอิง นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลังทั้ง 4 ตำแหน่ง มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างโดยใช้โปรแกรม ClustalW ด้วยวิธี Multiple alignment แล้วใช้เมตริกซ์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates

ขั้นตอนที่ 2 การสร้างข้อมูล DNA barcode ของมันสำปะหลัง

1. การสกัดดีเอ็นเอ

เก็บส่วนของใบตัวอย่างมันสำปะหลัง ที่ปลูกในแปลงการรักษาเชื้อพันธุกรรมแปลงพันธุ์ไทย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง นำใบมาสกัดดีเอ็นเอนำใบมันสำปะหลังมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผง แล้วสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดสำเร็จรูป Plant DNA Extraction kit (Vivantis Technology) จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำสารสกัดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 120 พันธุ์ จากนั้นให้นำสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้มาประเมินคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A_{260}/A_{280}

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็นสารพันธุกรรมดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ 1) rbcL-Fwd/Rev 2) KIM A/1R KIM 3) ITS3/ITS4 4) psbA3_F(fwd)/trnHf_05(rev) ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนมาตรฐานบริเวณ ดังนี้ *rbcL*, *matK*, *TrnH-psbA* และ *ITS2* ตามลำดับ ตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยวิธี Electrophoresis เมื่อได้ผลผลิตที่มีขนาดของชิ้น

กรมวิชาการเกษตร

ที่ถูกต้อง นำมาแยกบริสุทธิ์ ด้วยชุดแยกบริสุทธิ์สำเร็จรูป ส่งผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ และดีเอ็นเอของนิวเคลียร์ไรโบโซมอลของมันสำปะหลังไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยตาเปล่า โดยใช้โปรแกรม BioEdit Version 7.2.5 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ความเหมือน โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอที่มีการระบุชื่อที่ถูกต้องแล้วใน NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม Blast N เพื่อวิเคราะห์การระบุชนิดของมันสำปะหลังด้วยเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ประเมินคุณภาพลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้วิธีการคำนวณหาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เพื่อประเมินความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของ DNA barcode

1. การสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังจากแหล่งปลูกต่างๆ บันทึกข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ นำใบมาสกัดดีเอ็นเอนำใบมันสำปะหลังมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผง แล้วสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดสำเร็จรูป Plant DNA Extraction kit (Vivantis Technology) จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยไพรเมอร์สากลที่มีจำเพาะสูงที่คัดเลือกได้จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ตามกรรมวิธีขั้นตอนที่ 2 นำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี Electrophoresis ส่งผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยตาเปล่า โดยใช้โปรแกรม BioEdit Version 7.2.5 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบกับชุดข้อมูลดีเอ็นมาตรฐานอ้างอิง คำนวณประสิทธิภาพของ DNA barcode ในรูปของเปอร์เซ็นต์

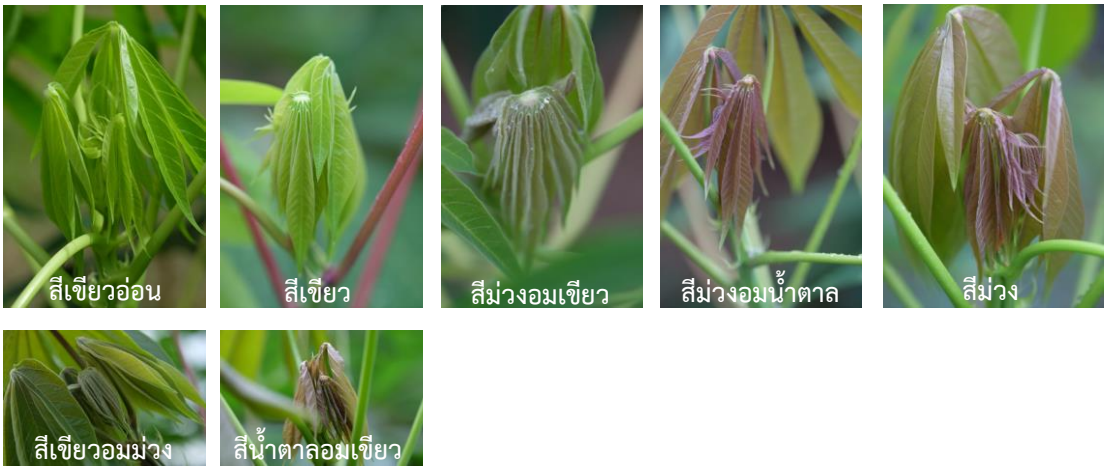
- เวลาและสถานที่ - ระยะเวลาโครงการ 3 ปี 0 เดือน
วันที่เริ่มต้น 1 ตุลาคม 2560 วันที่สิ้นสุด 30 กันยายน 2563

กรมวิชาการเกษตร

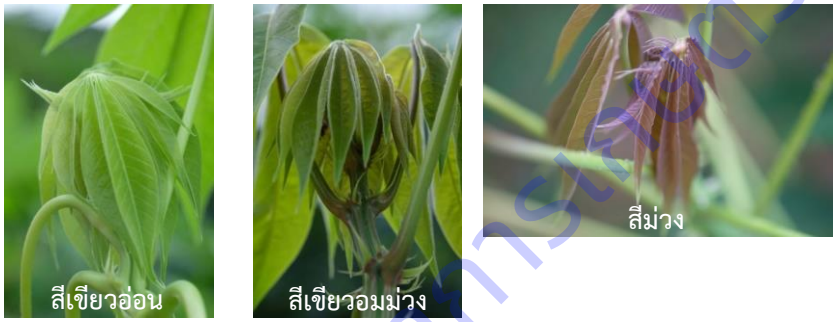
8. ผลการทดลองและวิจารณ์ (เป็นส่วนสำคัญของการทำงานวิจัย)

1. ผลการศึกษาข้อมูล DNA barcode เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานของมันสำปะหลัง

จากการบันทึกลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังจากตัวอย่างต้นที่เก็บมาสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ 1) สียอดอ่อน 2) สีของใบอ่อน 3) ขนที่ยอดอ่อน 4) สีก้านใบ 5) รูปร่างของแฉกที่อยู่กลางใบ 6) ลักษณะหูใบที่ระยะ 4 เดือน และ 7) สีของลำต้น 8) การมีขั้วของหัว 9) สีผิวเปลือกชั้นนอกของหัว 10) สีเนื้อของหัว ที่ระยะ 11 เดือน ภาพที่ 1 (1-10) และตารางที่ 1 ผลของการบันทึกข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังที่เก็บใบมาสกัด ดีเอ็นเอ พบว่า แต่ละพันธุ์ของมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์ที่นำมาศึกษา DNA barcode เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานของมันสำปะหลังนั้น ถูกต้องตามลักษณะประจำพันธุ์



ภาพที่ 1-1 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง ; สียอดอ่อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 7 สี ดังนี้ สีเขียวอ่อน สีเขียว สีม่วงอมเขียว สีม่วงอมน้ำตาล สีม่วง สีเขียวอมม่วง สีน้ำตาลอมเขียว



ภาพที่ 1-2 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง ; สีของใบอ่อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 สี ดังนี้ สีเขียวอ่อน สีเขียวอมม่วง สีม่วง

ภาพที่ 1-3 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง ; ขนที่ยอดอ่อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้ มีขน และ ไม่มีขน

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1-4 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง ; สีก้านใบ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 สี ดังนี้ สีเขียวอ่อน สีเขียวอมชมพู สีเขียวอมแดง สีแดงเข้ม

ภาพที่ 1-5 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง ; รูปร่างของแฉกที่อยู่กลางใบ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 รูปแบบ ดังนี้ ใบหอกปลายมน ใบแหลมแบบใบหอก ใบหอก และ ใบหอกกลับ

กรมวิชาการเกษตร

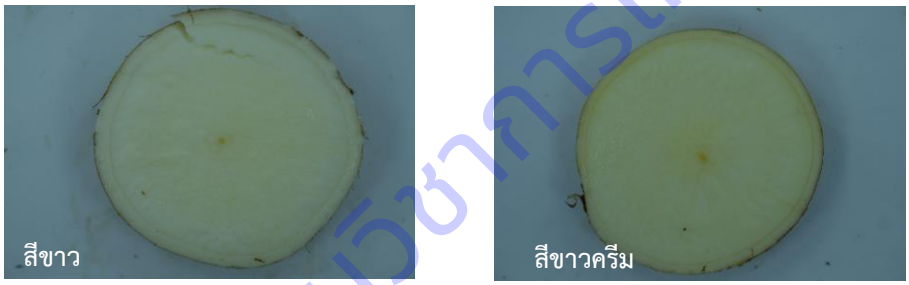
ภาพที่ 1-6 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง ; ลักษณะหูใบ ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์

ภาพที่ 1-7 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง ; สีของลำต้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 สี ดังนี้ สีเขียวเงิน สีเขียวอมน้ำตาล สีน้ำตาลอมเหลือว สีน้ำตาลอมส้ม สีน้ำตาลอ่อน

ภาพที่ 1-8 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง ; การมีขั้วของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้ มีขั้วของหัว และไม่มีขั้วของหัว

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1-9 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง ; สีผิวเปลือกชั้นนอกของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 สี ดังนี้ สีน้ำตาลอ่อน สีขาวครีม สีน้ำตาล สีน้ำตาลเข้ม



ภาพที่ 1-10 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง ; สีเนื้อของหัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สี ดังนี้ สีขาว และ สีขาวครีม

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังพันธุ์ต่างๆ ที่อายุ 4 และ 11 เดือน

ชื่อตัวอย่าง	ลักษณะประจำพันธุ์								
	สียอดอ่อน	สีใบอ่อน	ขนยอดอ่อน	สีก้านใบ	รูปร่างของแฉกที่อยู่กลาง	สีของลำต้น	การมีขั้วของหัว	สีผิวเปลือกชั้นนอกของหัว	สีเนื้อของหัว
ระยอง 1	ม่วง	ม่วง	มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอกปลายมน	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว
ระยอง 2	เขียวอมม่วง	เขียวอมม่วง	มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	เหลืองอ่อน
ระยอง 3	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	มีขน	เขียวอมชมพู	ใบหอกปลายมน	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว
ระยอง 5	ม่วงอมน้ำตาล	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	เขียวอมน้ำตาล	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว
ระยอง 7	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	เขียวอมชมพู	ใบหอก	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	ขาวนวล	ขาว
ระยอง 9	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	เขียวอมชมพู	ใบหอก	น้ำตาลอมเหลือง	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว
ระยอง 11	น้ำตาลอมเขียว	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาล	ขาว
ระยอง 86-13	ม่วงอมน้ำตาล	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอกกลับ	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว
ระยอง 60	ม่วงอมเขียว	เขียวอมม่วง	มีขน	เขียวอมแดง	ใบแหลมแบบใบหอก	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาวครีม
ระยอง 72	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	เขียวเงิน	มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว
ระยอง 90	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	เขียวอ่อน	ใบหอก	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	น้ำตาลเข้ม	ขาว
เกษตรศาสตร์ 50	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาล	ขาว
ห้วยบง 60	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว
ห้วยบง 80	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาลอ่อน	ขาว
ห้านาที	เขียว	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	น้ำตาลอมเขียว	ไม่มี	น้ำตาลเข้ม	ขาว
พิรุณ 1	ม่วงอมเขียว	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก	เขียวเงิน	ไม่มี	น้ำตาลเข้ม	ขาว
พิรุณ 2	เขียว	เขียวอ่อน	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก	น้ำตาลอ่อน	ไม่มี	น้ำตาลเข้ม	ขาว

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 29 คู่ไพรเมอร์ ของยีนมาตรฐาน 10 บริเวณ มีไพรเมอร์เพียง 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ rbcLFwd/Rev ของบริเวณ *rbcL*, ไพรเมอร์ psbA3_F/trnHf_05 ของบริเวณ *trnH-psbA*, ไพรเมอร์ matK_3F_KIM_A/1R_KIM ของบริเวณ *matK* และ ไพรเมอร์ ITS3/4 ของบริเวณ *ITS2* ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลังได้ครบทั้ง 17 พันธุ์ โดยมีขนาดดีเอ็นเอ 615, 426 794 และ 317 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้ง 4 ยีน บนฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความเหมือนกันกับ *Manihot esculenta* Crantz ที่ 100%, 99.77%, 99.87-100% และ 99.05-100% ตามลำดับยีน ซึ่งข้อมูลนี้ยืนยันได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์มีความถูกต้อง และแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณทั้ง 4 ยีน นี้ทำได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR และจัดส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เก็บบันทึกไว้บนระบบฐานข้อมูลสากล NCBI ได้หมายเลขอ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number) ดังแสดงใน ตารางที่ 2

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK* และ *ITS2* ในมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *trnH-psbA* ไม่มีตำแหน่งที่ผันแปรระหว่างพันธุ์ ในขณะที่ยีน *matK* และ *ITS2* มีตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ผันแปรระหว่างพันธุ์ ตารางที่ 3 ยีน *matK* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผันแปรกันระหว่างพันธุ์ในรูปแบบพิวรินทรานสิชัน 1 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ A561G) ทำให้เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของพันธุ์ระยอง 86-13 เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* ของมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์ พบว่า มีตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผันแปรระหว่างพันธุ์อยู่ 5 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ผันแปรแบบไพริมิดินทรานสิชัน 2 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ T97C และ T290C), ทรานสเวอร์ชัน 1 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ A120C) และพิวรินทรานสิชัน 2 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ A148G และ A249G) ซึ่งตำแหน่งที่ 97 แสดงเอกลักษณ์จำเพาะของพันธุ์ระยอง 72 ตำแหน่งที่ 120 แสดงเอกลักษณ์จำเพาะของพันธุ์ห้านาที ตำแหน่งที่ 148 และ 249 แสดงเอกลักษณ์จำเพาะของพันธุ์ระยอง 3 เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *trnH-psbA* ไม่มีตำแหน่งที่ผันแปรระหว่างพันธุ์ จึงไม่นำมากล่าวเปรียบเทียบและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในลำดับถัดไปจะใช้เพียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *ITS2* เพื่อสร้างแผนภูมิและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเท่านั้น

กรมวิทยาศาสตร์

ตารางที่ 2 หลักฐานพรรณไม้อ้างอิงและหมายเลขอ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลัง 17 พันธุ์

พันธุ์มันสำปะหลัง	หลักฐานพรรณไม้อ้างอิง	หมายเลขอ้างอิงนิวคลีโอไทด์ของยีน	
		matK	*ITS2*
ระยอง 1	T. Wongwarat *et al*. no. 01-001	MK834326	MK809337
ระยอง 2	T. Wongwarat *et al*. no. 01-002	MK834327	MK809338
ระยอง 3	T. Wongwarat *et al*. no. 01-003	MK834328	MK809339
ระยอง 5	T. Wongwarat *et al*. no. 01-004	MK834329	MK809340
ระยอง 7	T. Wongwarat *et al*. no. 01-005	MK834330	MK809341
ระยอง 9	T. Wongwarat *et al*. no. 01-006	MK834331	MK809342
ระยอง 11	T. Wongwarat *et al*. no. 01-007	MK834332	MK809343
ระยอง 86-13	T. Wongwarat *et al*. no. 01-008	MK834333	MK809344
ระยอง 60	T. Wongwarat *et al*. no. 01-009	MK834334	MK809345
ระยอง 72	T. Wongwarat *et al*. no. 01-010	MK834335	MK809346
ระยอง 90	T. Wongwarat *et al*. no. 01-011	MK834336	MK809347
เกษตรศาสตร์ 50	T. Wongwarat *et al*. no. 01-012	MK834337	MK809348
ห้วยบง 60	T. Wongwarat *et al*. no. 01-013	MK834338	MK809349
ห้วยบง 80	T. Wongwarat *et al*. no. 01-014	MK834339	MK809350
พิรุณ 1	T. Wongwarat *et al*. no. 01-015	MK834340	MK809351
พิรุณ 2	T. Wongwarat *et al*. no. 01-016	MK834341	MK809352
ห้านาที	T. Wongwarat *et al*. no. 01-017	MK834342	MK809353

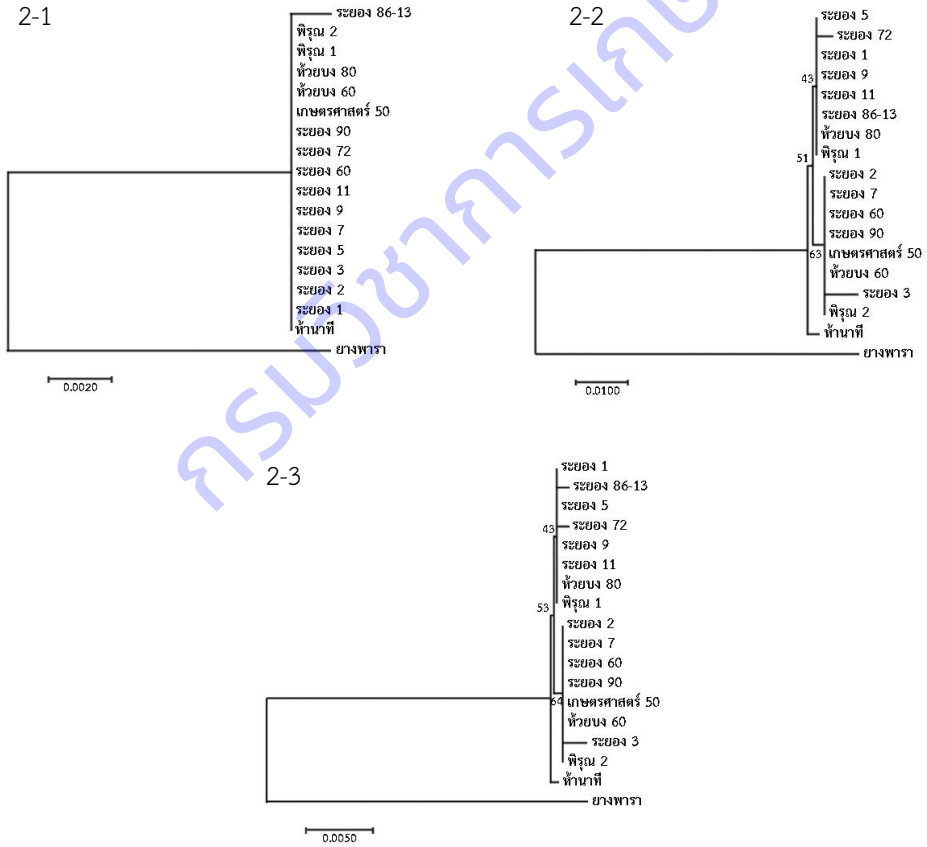
กรมวิทยาศาสตร์

ตารางที่ 3 หลักฐานพรรณไม้อ้างอิงและหมายเลขอ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลัง 17 พันธุ์

ยีน	รูปแบบความปรวนทางพันธุกรรม	พันธุมันสำปะหลัง
matK	เพียวรินทรานสิชัน (A561G)	ระยอง 86-13
		ระยอง 1, ระยอง 2, ระยอง 3, ระยอง 5, ระยอง 7, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 60, ระยอง 72, ระยอง 90, เกษตรศาสตร์ 50, ห้วยบง 60, ห้วยบง 80, พิรุณ 1, พิรุณ 2, ห้านาที
ITS2	ไพริมิดินทรานสิชัน (T97C)	ระยอง 72
		ระยอง 1, ระยอง 2, ระยอง 3, ระยอง 5, ระยอง 7, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 86-13, ระยอง 60, ระยอง 90, เกษตรศาสตร์50, ห้วยบง60, ห้วยบง 80, พิรุณ 1, พิรุณ 2, ห้านาที
	ทรานสเวอชัน (A120C)	ห้านาที
		ระยอง 1, ระยอง 2, ระยอง 3, ระยอง 5, ระยอง 7, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 86-13, ระยอง 60, ระยอง 72, ระยอง 90, เกษตรศาสตร์50, ห้วยบง 60, ห้วยบง80, พิรุณ 1, พิรุณ 2
	เพียวรินทรานสิชัน (A148G)	ระยอง 3
		ระยอง 1, ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 7, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 86-13, ระยอง 60, ,ระยอง 72, ระยอง 90, เกษตรศาสตร์50, ห้วยบง60, ห้วยบง80, พิรุณ 1, พิรุณ 2, ห้านาที
	เพียวรินทรานสิชัน (A249G)	ระยอง 3
		ระยอง 1, ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 7, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 86-13, ระยอง 60, ,ระยอง 72, ระยอง 90, เกษตรศาสตร์50, ห้วยบง60, ห้วยบง80, พิรุณ 1, พิรุณ 2,ห้านาที
	ไพริมิดินทรานสิชัน (T290C)	ระยอง 2, ระยอง 3, ระยอง 7, ระยอง 60, ระยอง 90, เกษตรศาสตร์50, ห้วยบง60, พิรุณ 2
		ระยอง 1, ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 86-13, ระยอง 72, ห้วยบง80, พิรุณ 1, ห้านาที

กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของมันสำปะหลังด้วยวิธี neighbor-Joining พบว่า แผนภูมิของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* แสดงให้เห็นว่ามันสำปะหลังพันธุ์ Rayong86-13 แยกตัวออกจากมันสำปะหลังอื่นอีก 17 พันธุ์ โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น ภาพที่ 2-1 ส่วนแผนภูมิของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *ITS2* ภาพที่ 2-2 แสดงให้เห็นว่ามันสำปะหลังพันธุ์ห้านาที แยกตัวออกจากมันสำปะหลังพันธุ์อื่น ๆ โดยไม่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น และพันธุ์อื่น ๆ อีก 17 พันธุ์ ถูกแบ่งกลุ่มเป็น 2 กลุ่ม ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นในระดับต่ำ (51% NJ BS) ซึ่งกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยมันสำปะหลังพันธุ์ 7 พันธุ์ คือ ระยอง 1, ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 86-13, ห้วยบง 80, พิรุณ 1 และ ระยอง 72 ซึ่งรวมกลุ่มอยู่ด้วยกันที่ค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นต่ำมาก (<50% NJ BS) และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยมันสำปะหลังพันธุ์ 7 พันธุ์ คือ ระยอง 2, ระยอง 7, ระยอง 60, ระยอง 90, เกษตรศาสตร์ 50, ห้วยบง 60 และ พิรุณ 2 ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นในระดับต่ำ (63% NJ BS) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลังร่วมกันของยีน *matK* และ *ITS2* ภาพที่ 2 (1-3) พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงผลการทดลองเช่นเดียวกับแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *ITS2* เพียงบริเวณเดียว โดยมีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นของมันสำปะหลังแต่ละกลุ่มที่กล่าวมาข้างต้นสูงกว่าในแผนภูมิของยีน *ITS2*



ภาพที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ของมันสำปะหลังที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K (2-1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS*2 (2-2) และการรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *ITS*2 (2-3) วิเคราะห์ด้วยการจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 แบบวิธี neighbor-joining โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

งานวิจัยนี้ได้ยึดหลักเกณฑ์การพิจารณายีนที่สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ต้องมีคุณลักษณะที่สำคัญ 3 ประการ (ณัฐกร และคณะ, CBOL Plant Working Group, 2009) ได้แก่ 1) ความเป็นสากล (universality) คือ ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นสากล ต้องสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันในพืชอื่นได้ด้วยเทคนิค PCR งานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์สากลทั้งหมด 29 คู่ จากบริเวณยีนทั้งหมด 10 ยีน ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเของมันสำปะหลังจำนวน 17 พันธุ์ ได้สำเร็จ มีเพียงคู่ไพรเมอร์ของยีน *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK* และ *ITS2* ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลังได้ครบทุกตัวอย่าง จึงถือได้ว่า 4 ยีนดังกล่าวผ่านเกณฑ์ข้อแรก 2) คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence quality) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลสากล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์ของทั้ง 4 ยีน มีความเหมือนกันกับยีน *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK* และ *ITS2* ของมันสำปะหลังที่ความเหมือนสูงถึง 99.05-100% ซึ่งยืนยันได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความถูกต้อง จึงผ่านเกณฑ์ข้อ 2 และ 3) ประสิทธิภาพในการแยกพืชแต่ละชนิดออกจากกัน (species discrimination) มีรายงานวิจัยยืนยันว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันของยีน *matK* และ *rbcL* สามารถแยกกล้วยไม้ในระดับสกุลสิงโตกลอกตาได้ (นฤมล และคณะ, 2557) นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnH-psbA* มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการศึกษาพืชสกุล *Cymbidium* และ *Piper* (Siripiyasing *et al*., 2012; Sudmoon *et al*., 2012) และมีรายงานว่า *trnH-psbA* เป็นส่วนที่มีความแปรผันของดีเอ็นเอภายในสปีชีส์สูงที่สุดในพลาสมิด (Yang *et al*., 2012) อย่างไรก็ดี มันสำปะหลังที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นพืชชนิดเดียวกัน คือ *M. esculenta* ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันสูง ทำให้ยากต่อการจำแนกระดับพันธุ์ แต่กลับพบว่าผลการวิเคราะห์ร่วมกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *ITS2* แสดงให้เห็นแนวโน้มในการแยกมันสำปะหลังทั้ง 17 พันธุ์ออกได้เป็น 3 กลุ่ม และสามารถจำแนกชนิดมันสำปะหลังออกจากพืชนอกกลุ่มทดลอง คือ สกุลยางพาราได้อย่างชัดเจน (Figure 2) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Mayer (1999) การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ cpDNA ร่วมกันเพื่อเป็นเครื่องมือในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันได้ง่ายและสะดวกมากขึ้น และเป็นทางเลือกสำหรับนักวิจัยในการใช้แยกพันธุ์มันสำปะหลัง เนื่องจากมีรายงานวิจัยมาก่อนหน้านี้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Trn-Ple* และ *Trn-F* ไม่สามารถแยกความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ของมันสำปะหลังจำนวน 18 พันธุ์ ออกจากกันได้ (ยุรนันท์ และชูตา, 2560) ดังนั้น ยีน *matK* และ *ITS2* ที่คัดเลือกมาใช้ในงานวิจัยนี้จึงผ่านเกณฑ์ข้อ 3

2. ผลการสร้างข้อมูล DNA barcode ของมันสำปะหลัง

การทดลองนี้ได้เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังจากแปลงการรักษาเชื้อพันธุกรรมแปลงพันธุ์ไทย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวน 120 พันธุ์ เก็บใบของแต่ละพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอ นำสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ universal primer ที่คัดเลือกแล้วจำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ rbcLFwd/Rev ไพรเมอร์ psbA3_F/trnHf_05 ของบริเวณ ไพรเมอร์ matK_3F_KIM_A/1R_KIM และ ไพรเมอร์ ITS3/4 โดยมีขนาดดีเอ็นเอ 615, 426 794 และ 317 คู่เบส ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนบริเวณ *rbcL trnH-psbA matK* และ *ITS2* ตามลำดับ พบว่า การใช้ไพรเมอร์ rbcLFwd/Rev ของบริเวณ *rbcL*, ไพรเมอร์ psbA3_F/trnHf_05 ของบริเวณ *trnH-psbA* สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะมีผลสำเร็จสูง 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าบริเวณของดีเอ็นเอดังหล่าวนี้ทำได้ง่ายมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูง ในขณะที่การใช้

ไพรเมอร์ matK_3F_KIM_A/1R_KIM ของบริเวณ *matK* และ ไพรเมอร์ ITS3/4 ของบริเวณ *ITS2* มีผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จ 94 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์สากล

ยีน	คู่ไพรเมอร์	ไพรเมอร์	ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (เปอร์เซ็นต์)
rbcL	rbcL-C	Fwd/Rev	100
TrnH-psbA	*TrnH-psbA* - A	psbA3_F (fwd)/ trnHf_05 (rev)	100
matK	matK-A	3F KIM A/1R KIM	94
ITS2	ITS2-B	ITS3/ITS4	91

ชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ หลังจากถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วถูกส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ DNA barcode 26 รูปแบบ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนที่ได้มาเรียงเทียบด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *rbcL TrnH-psbA และ matK* ไม่มีความผันแปรระหว่างพันธุ์ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *ITS2* มีความผันแปรระหว่างพันธุ์ ดังนั้นจึงได้นำเอาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณดังกล่าวมาใช้เป็นข้อมูลวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี neighbor-joining มีค่า Bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำของการสุ่มดึงลำดับนิวคลีโอไทด์ออกในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง ค่า Bootstrap มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า สามารถแบ่งกลุ่ม 5 กลุ่ม ดังภาพที่ 3 ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ CMR 31-37-105

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ CM 523-7

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ CMR 34-44-40

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ พิรุณ 2 (PR2) ระยอง 2 (R2) เกษศาสตร์ 50 (KU50) ระยอง 7 (R7) ระยอง 60 (R60) ห้วยบง 60 (HB60) ระยอง 90 (R90) CMR 25-82-88 CMR 23-84-8 CMR 23-149-117 CMR 25-221-384 V.1 SC5 SUAN (V3xR)20-15 HP5 KASET Golden yellow MCOL22 CM 3299-15 V.25 CMR 25-55-28 ADIRA 4 MKUC 28-71-67 OP.706 NEP ยอดดำ CMR 25-105-47 มันต้น CMR 31-42-20 V.11 ระยอง 3 (R3) MENTEGA

กลุ่มที่ 5 แยกออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

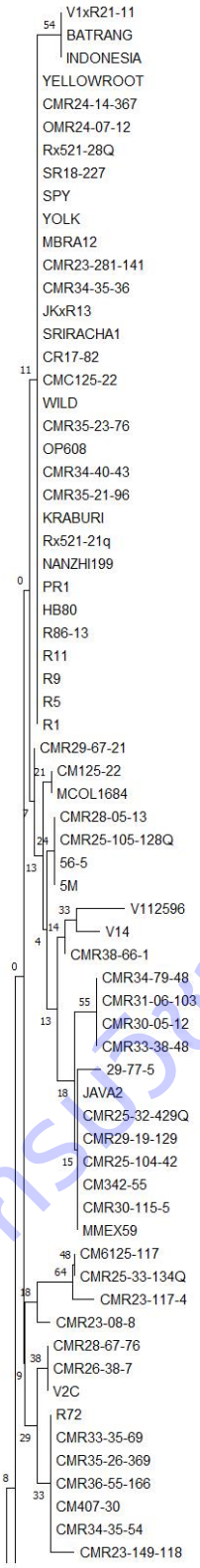
กลุ่มที่ 5.1 ประกอบด้วย 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 5.1.1 ได้แก่ ระยอง 72 (R72) CMR 33-35-69 CMR 35-26-369 CMR 36-55-166 CM 407-30 CMR 34-35-54 CMR 23-149-118 CMR 23-67-76 CMR 26-38-7 V2C

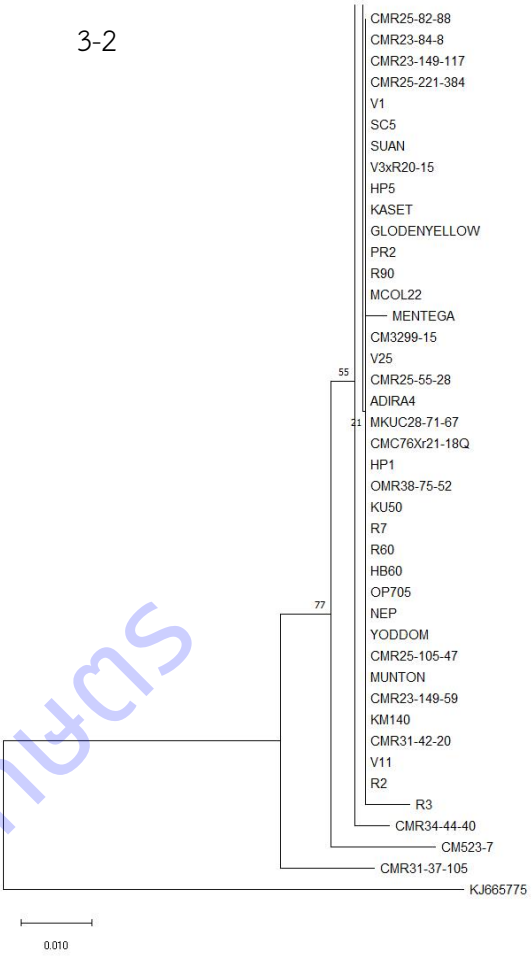
กลุ่มที่ 5.1.2 ได้แก่ CMR 23-08-8 CMR 23-117-4 CMR 25-33-134Q CM 6125-117

กรมวิชาการเกษตร

3-1



3-2



ศูนย์วิทยทรัพยากร

ภาพที่ 3 (1-2) แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ของมันสำปะหลังที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* วิเคราะห์ด้วยการจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 แบบวิธี neighbor-joining โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 โดยใช้ยางพารา *Hevea brasiliensis* (KJ665775) เป็น out group

กลุ่มที่ 5.2 ประกอบด้วย 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 5.2.1 ได้แก่ 5นาที (5M) CM 125-22 MCOL1684 CMR 28-05-13 CMR 25-105-128Q 56/5 V112596 V.14 CMR 38-66-1 CMR 34-79-48 CMR 31-06-103 CMR 30-05-12 CMR 33-38-48 29-77-5 JAVA 2 CMR 25-32-429Q CMR 29-19-129 CMR 25-104-42 CMR 342-55 CMR 30-115-5 MMEX59

กลุ่มที่ 5.2.2 ได้แก่ พิรุณ 1 (PR1) ห้วยบง 80 (HB80) ระยอง 86-13 (R86-13) ระยอง 11 (R11) ระยอง 9 (R9) ระยอง 5 (R5) ระยอง 1 (R1) NANZHI199 (RXHanatee)21-21q Kraburi CMR 35-21-96 CMR 34-40-43 O.P.608 CMR 35-23-76 WILD CMC 125-22 CR 17-82 SRIRACHA1 JKxR13 CMR34-35-36 CMR23-281-141 MBRA12 YOLK SPY SR18-227 (RxHanatee)21-28Q OMR 4-07-12 CMR24-14-367 Yellow root Indonesia BATRANG (V1xR) 21-11

อย่างไรก็ตามจากการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีนทั้ง 4 ยีนนั้น สามารถแยกยางพารา *Hevea brasiliensis* (KJ665775) ที่ใช้เป็น out group ได้

3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ DNA barcode

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังจากแหล่งปลูกต่างๆ ในพื้นที่ อ. น้ำพอง และ อ. บ้านไผ่ จำนวน 50 ตัวอย่าง ที่อายุ 5 เดือน มีลักษณะสัณฐานวิทยาดังตารางที่ 5 พบว่า ลักษณะปรากฏที่บันทึกข้อมูลได้ มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก ยกเว้นสีของก้านใบ เก็บตัวอย่างใบมาสกัดดีเอ็นเอและนำสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ universal primer ชนิด ITS3/4 โดยมีขนาดดีเอ็นเอ 317 คู่เบสซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนบริเวณ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะมีผลสำเร็จสูง 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าบริเวณของดีเอ็นเอดังหล่าวนี้ทำได้ง่ายมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูง เมื่อตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดบนฐานข้อมูล NCBI พบว่า ตัวอย่าง unknow 01-40 มีความเหมือนกันกับ *Manihot esculenta* Crantz ที่ 100% ซึ่งข้อมูลตรงกับข้อมูลดีเอ็นเอหมายเลขอ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number) MK809346 ซึ่งเป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และ unknow 41-50 มีความเหมือนกันกับ *Manihot esculenta* Crantz ที่ 100% ซึ่งข้อมูลตรงกับข้อมูลดีเอ็นเอหมายเลขอ้างอิงลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number) MK809348 ซึ่งเป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันสำปะหลังพันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างมันสำปะหลังที่อายุ 5 เดือน ซึ่งเก็บมาจากแหล่งปลูกต่างๆ

ชื่อตัวอย่าง	ตำแหน่งที่เก็บ	ลักษณะประจำพันธุ์				
		สียอดอ่อน	สีใบอ่อน	ขนยอดอ่อน	สีก้านใบ	รูปร่างของแฉกที่อยู่กลาง
unknow01	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow02	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow03	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow04	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow05	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow06	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow07	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow08	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow09	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow10	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow11	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow12	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow13	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow14	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow15	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow16	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow17	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow18	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow19	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow20	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow21	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow22	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow23	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow24	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow25	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow26	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow27	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow28	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow29	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow30	ต. บัวเงิน อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow31	ต. ภูเหล็ก อ. บ้านไผ่ จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow32	ต. ภูเหล็ก อ. บ้านไผ่ จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow33	ต. ภูเหล็ก อ. บ้านไผ่ จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ชื่อตัวอย่าง	ตำแหน่งที่เก็บ	ลักษณะสัณฐานวิทยา				
		สียอดอ่อน	สีใบอ่อน	ขนยอดอ่อน	สีก้านใบ	รูปร่างของแฉกที่อยู่กลาง
unknow34	ต. ภูเหล็ก อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow35	ต. ภูเหล็ก อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow36	ต. ภูเหล็ก อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow37	ต. ภูเหล็ก อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow38	ต. ภูเหล็ก อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow39	ต. ภูเหล็ก อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow40	ต. ภูเหล็ก อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	แดงเข้ม	ใบหอก
unknow41	ต. ป่าปอ อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก
unknow42	ต. ป่าปอ อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก
unknow43	ต. ป่าปอ อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก
unknow44	ต. ป่าปอ อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก
unknow45	ต. ป่าปอ อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก
unknow46	ต. ป่าปอ อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก
unknow47	ต. ป่าปอ อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก
unknow48	ต. ป่าปอ อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก
unknow49	ต. ป่าปอ อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก
unknow50	ต. ป่าปอ อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น	ม่วง	ม่วง	ไม่มีขน	เขียวอมแดง	ใบหอก

กรมวิชาการเกษตร

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

การพิจารณาคัดเลือกยีนสำหรับนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดซึ่งต้องผ่านเกณฑ์คุณลักษณะที่สำคัญ 3 ประการ ได้แก่ 1) ความเป็นสากล (universality) คือ ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นสากล ต้องสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันในพืชอื่นได้ด้วยเทคนิค PCR 2) คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence quality) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูลสากล NCBI ต้องมีความถูกต้องและมีความเหมือนกันกับข้อมูลบนฐานข้อมูลสากล และ 3) ประสิทธิภาพในการแยกพืชแต่ละชนิดออกจากกัน (species discrimination) ผลการวิจัย ลำดับนิวคลีโฮไทด์ที่ได้จากบริเวณของยีน พบว่า *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK* และ *ITS2* สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะมีผลสำเร็จสูง 100 94 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าบริเวณของดีเอ็นเอดังหล่าวนี้ทำได้ง่ายมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูง เมื่อพิจารณาความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 4 ยีน พบว่า มี *matK* และ *ITS2* ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มีเพียง ระยอง 86-13 เท่านั้นที่แตกต่างจากพันธุ์อื่น ๆ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* มีความผันแปรทางพันธุกรรมมากกว่า และสามารถใช้เป็นข้อมูลนำมา

สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสามารถมันสำปะหลังออกเป็น 5 กลุ่ม และสามารถแยกยางพารา *Hevea brasiliensis* (KJ665775) ที่ใช้เป็น out group ได้ ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS2* จึงเหมาะสำหรับการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้อย่างหนึ่ง เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างที่เก็บมา (unknown) ที่ข้อมูลกันกับข้อมูลมาตรฐานอ้างอิงบนฐานข้อมูล NCBI 100 เปอร์เซ็น และข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ที่ปรากฏ ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีน *ITS2* จึงมีประสิทธิภาพสามารถใช้เป็นข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของมันสำหะหลังได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

1. การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ประโยชน์การจำแนกพันธุ์ การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ การอนุรักษ์พันธุกรรมตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

2. การเผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ งานเกษตรนเรศวรครั้งที่ 16 เป็นนำเสนอผลงาน สาขาวิทยาศาสตร์เกษตร ภาคบรรยาย รหัส OA-1 เรื่อง การประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด สำหรับการจำแนกระดับพันธุ์ของมันสำปะหลัง วันที่ 2 กรกฎาคม 2560 ห้อง AG 2109 คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

3. ตีพิมพ์ลงวารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 50 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) กรกฎาคม-ตุลาคม 2562 http://www.agi.nu.ac.th/conference/agiscijournal_vol50_no1(suppl)/science

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ช่วยเหลือให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมปฏิบัติงานด้วย

12. เอกสารอ้างอิง :

ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. สถานการณ์การผลิตและการตลาดรายสัปดาห์ 4-10 มกราคม 2564. http://www.oae.go.th/

ณัฐกร เพชรชา, ดวงกมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข. 2554. การประเมินดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ rpoC1 และ rpoB ในการใช้ เป็น DNA barcode และกรณีศึกษาในพืชสกุล *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับ บัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 14 มหาวิทยาลัยขอนแก่น 554-563.

นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ไต่ และธีระชัย ธนานันต์. 2557. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 523-530.

กรมวิชาการเกษตร

ยุรนันท์ ทรวงทองหลาง และชูตา บุญภักดี. 2560. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ไม่มีความแปรปรวน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 22: 433-438.

Bonatelli, I.A.S., D.C. Zappi, N.P. Taylor and E.M. Moraes. 2013. Usefulness of cpDNA markers for phylogenetics and phylogeographic analyses of closely related cactus species. Genetics and Molecular Research 12(4): 4579-4585.

CBOL plant work group. 2009. A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 106: 12794-12797.

Fuเกษตรศาสตร์da, W.M.G., C.L. Guevara, R. Kawuki and M.E. Ferguson. 1998. Selected morphologocal and agronomic descriptors for the characterization of cassava. International institute of tropical agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria. 19 pp.

Ford, C.S., K.L. Ayres, N. Toomey, N. Stahl, J.V.A. Kelly, L.J. Wikström, P.M. Hollingsworth, M.W. Chase and M.J. Wilkinson. 2009. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plant. Botanical Journal of the Linnean Society 159: 1-11.

Hajibabaei, M., G.A.C Singer, P.D.N Hebert, and D.A. Hickey. 2007. DNA barcoding: How it complements taxinomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trend genet 23: 167-172.

Jiang, H., Z. Xie and H.J. Koo. 2006. Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medical Zingiber species: Tools for authentication of giger (*Zingiber officinale* Rosc.) Phytochemistry 67: 1673-1685.

Liu, Y., W. Sun, C. Liu, Y. Zhang, Y. Chen, M. Song, G. Fan, X. Liu, L. Xiang and Y. Zhang. 2015. Identification of Hippophae species (Shaji) through DNA barcodes. Biomed central 10(28):1-11.

Pang, X., C. Liu, L. Shi, R. Liu, D. Liang, H. Li, S.S. Cherny and S. Chen. 2012. Utility of the trnH-psbA intergenic spacer region and its combinations as plant DNA Barcodes: A meta-analysis. Plos one 7(11): 1-9.

Qiao, C.F., Q.B. Han, Z.L. Zhao, Z.T. Wang, L.S. Xu and H.X. Xu. 2009. Sequence analysis based on ITS1 region nuclear ribosomal DNA of *Amomum villosum* and ten species of Alpinia. J. Food Drug Anal 17: 142-145.

Mayer, M.S. 1999. Intraspecific phylogenetic analysis usig ITS sequences: Insights from studies of the *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae). Syst. Bot. 24(1): 47-61.

Siripiyasing P., K. Kaenratana, P. Mokkamul, T. Tanee, R. Sudmoon and A. Chaveerach. 2012.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

DNA barcoding of the Cymbidium species (Orchiaceae) in Thailand. Agricultural research 7(3): 393-404.

Sudmoon R., T. Tanee, V. Wongpanich, N. Bletter, A. Chaveerach. 2012. Ethnobotany and species specific molecular markers of some medicinal sakhan (*Piper*, Piperaceae). Medicinal Plants Research 6(7); 1166-1175.

Yang H., Y. Dong, Z. Gu, N. Liang and J. Yang. 2012. A preliminary assessment of matK, rbcL and trnH-psbA as DNA barcodes for Calamus (Arecaceae) species in China with a note on ITS. Ann. Bot. Fenn. 49: 319-330.

กรมวิชาการเกษตร