ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

Genetic Diversity and DNA Fingerprint of Cassava *(Manihot esculenta* Crantz.) using SSR Markers

สุภาวดี ง้อเหรียญ[1/] จีราพร แก่นทรัพย์[1/] วิภาวี ชั้นโรจน์[1/] สุวลักษณ์ อะมะวัลย์[2/] ประพิศ วองเทียม[3/]

Suphawadee Ngorian[1/] Jeeraporn Kansup[1/] Vipavee Chanroj[1/] Suwaluk Amawan[2/] Prapit Wongtiem[3/]

Received 11 Apr. 2022/Revised 18 May 2022/Accepted 13 Jul. 2022

ABSTRACT

The genetic diversity of cassava is an important information for conducting research and development to improve cassava variety. This research aimed to assess the genetic diversity and to analyse clusters of 270 cassava varieties from DOA germplasm collection at Rayong Field Crops Research Center, Department of Agriculture using 16 fluorescent-labeled SSR markers. Results showed that 16 SSR markers were able to differentiate well in the cassava genome, generating polymorphic alleles in total of 88 alleles varying from 3 – 9 alleles per locus, with an average of 5.5 alleles per locus. All 88 alleles showed the polymorphic bands accounted for 100%. Sizes of DNA fragments ranged from 100 – 418 base pairs. The Polymorphism Information Content (PIC) value ranged from 0.38 – 0.78, with an average of 0.63. Cluster analysis based on UPGMA and genetic relationships using NTSYSpc version 2.10e showed similarity in coefficient value in range of 0.10 – 1.00, and revealed 3 major distinct groups, consistent with pedigree and geographical locations, with cophenetic correlation (r) of 0.70. Therefore, SSR markers in this study were suitable for identifying the genetic differences of cassava varieties, and the genetic diversity database of cassava is useful for parental selection in cassava breeding programs.

Keywords: *Manihot esculenta*, SSR marker, genetic diversity, DNA fingerprint

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[1/] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanyaburi Pathumthani 12110

[2/] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง อ.เมือง จ.ระยอง 21150

[2/] Rayong Field Crops Research Center, Muang, Rayong 21150

[3/] กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพ 10900

[3/] Planning and Technical Division, Department of Agriculture, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900.

***Corresponding author: fringer_1234@yahoo.com**

บทคัดย่อ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญต่อการวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลัง เพื่อให้ได้พันธุ์ดีและมีคุณภาพสูง การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ และจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ ที่เก็บรวบรวมไว้ ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ ทั้ง 16 คู่ไพรเมอร์ สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี โดยพบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด 88 อัลลีล มีจำนวน 3 – 9 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีค่าเฉลี่ย 5.5 อัลลีลต่อตำแหน่ง อัลลีลทั้งหมดแสดงความแตกต่างกัน คิดเป็น 100 % แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 100 – 418 คู่เบส มีค่า polymorphism information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.38 – 0.78 หรือค่าเฉลี่ย 0.63 เมื่อทำการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic averages และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10e พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม อยู่ระหว่าง 0.1-1.0 สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ซึ่งสอดคล้องกับประวัติพันธุ์และแหล่งกระจายพันธุ์ โดยมีค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.70 จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมเพื่อระบุเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง และข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังต่อไป

คำสำคัญ : มันสำปะหลัง, เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

บทนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) จัดเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายรูปแบบทั้งการบริโภคโดยตรงและการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ สำหรับใช้ภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ ปัจจุบันพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมของกรมวิชาการเกษตร โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง มีจำนวนมาก ได้แก่ พันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ป่าที่มีอยู่ในประเทศ พันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ พันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ในประเทศ และพันธุ์ที่ได้จากศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (CIAT) ซึ่งได้มีการนำเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังที่มีอยู่มาใช้ประโยชน์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ลักษณะที่ดี เช่น ผลผลิตสูง แป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ โปรตีนสูง และต้านทานต่อโรคและแมลง เป็นต้น ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังโดยทั่วไปอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกพันธุ์ ได้แก่ สียอดอ่อน สีใบอ่อน ขนที่ยอดอ่อน สีก้านใบ รูปร่างของแฉกที่อยู่กลางใบ ลักษณะทรงต้น สีลำต้น ลักษณะหูใบ การมีขั้วของหัว สีผิวเปลือกชั้นนอกของหัวและสีของเนื้อหัว และลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ ปริมาณแป้ง ปริมาณไซยาไนด์ ปริมาณอะมิโลส เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดหรือระบุสายพันธุ์มันสำปะหลังได้อย่างชัดเจน ดังนั้น จึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งจะทำให้ได้ผลการตรวจสอบที่มีความแม่นยำ รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ โดยไม่ขึ้นกับ

สภาพแวดล้อม ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลด้านเครื่องหมายโมเลกุลที่หลากหลายเข้ามาช่วยในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ โดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง (Eliais *et al*., 2000 ; Jorge *et al*., 2000 ; Pillai *et al*., 2004 ; Vsquez and Lpez, 2014 ; Lpez *et al*., 2005) ซึ่งเทคนิคต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้เกิดความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ สามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้ และจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนหรือเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจจำแนกความแตกต่าง และใช้ประโยชน์จากการเกิดความแตกต่าง (polymorphism) ของลำดับดีเอ็นเอนี้ เรียกว่าเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ซึ่งมีทั้งข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด simple sequence repeat (SSR) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่สามารถแยกความแตกต่างแบบข่มร่วม (co-dominant) ได้ ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮทเทอโรไซกัส (heterozygous) ออกจากกันได้ จึงนิยมนำมาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของมันสำปะหลังได้เป็นอย่างดี (Hokanson *et al*., 1998) และเป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหลาย ๆ ชนิด สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้อย่างชัดเจน รวดเร็ว มีความแม่นยำและประสิทธิภาพสูง

อย่างไรก็ตาม การวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้ได้มันสำปะหลังพันธุ์ดีและมีคุณภาพสูง จำเป็นต้องมีข้อมูลด้านพันธุกรรมมาประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์สำหรับใช้งานด้านการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งข้อมูลด้านพันธุกรรมของมันสำปะหลังที่มีอยู่ยังไม่ครบถ้วนเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ผ่านการคัดเลือก สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี ซึ่งได้ดำเนินงานวิจัยในปี พ.ศ. 2561 โดยการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ กับมันสำปะหลัง จำนวน 18 พันธุ์ พบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด 265 อัลลีล มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งตั้งแต่ 1 – 8 อัลลีล ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.82 อัลลีล มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกันจำนวน 263 อัลลีล คิดเป็น 97.27% มีค่า polymorphism information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0–0.36 มีค่าเฉลี่ย 0.24 สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ (สุภาวดี และคณะ, 2562) เข้ามาช่วยในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังที่เก็บรวบรวมของกรมวิชาการเกษตร สำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์และสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังของไทยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการทรัพยากรเชื้อพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลัง

เก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังจากแปลงรวบรวมพันธุ์ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ ประกอบด้วยประชากรกลุ่มพันธุ์ไทย จำนวน 30 พันธุ์ กลุ่มพันธุ์ลูกผสม จำนวน 160 พันธุ์ และกลุ่มพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ (CIAT core collection) จำนวน 80 พันธุ์ นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก

Dellaporta *et al.* (1983) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวัดค่าความเข้มข้น (optical density, O.D.) ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลังด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ผ่านการคัดเลือกให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดี จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ (สุภาวดี และคณะ, 2562) นำมาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 4 ชนิดสี ได้แก่ FAM (blue), HEX (green), TAMRA (yellow) และ ROX (red) จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ (Table 1) โดยใช้ชุด GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 60-100 นาโนกรัม, 1X GoTaq® Green Master Mix, 0.4 M upstream primer, 0.4 M downstream primer ปรับปริมาตร ให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 95°ซ. 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°ซ. 30 วินาที, Annealing 55-64°ซ. 45 วินาที, Extension 70°ซ. 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Extension 72°ซ. 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)

Table 2 List of 16 fluorescent-labeled SSR primers used in the study of genetic diversity of 270 cassava varieties

Primer Name	Sequence (5' → 3')		Size of alleles (bp)	Temperature (°C)
	Forward Primer	Reverse Primer		
SSRY4	F: TAMRA-ATAGAGCAGAAGTGCAGGCG	R: CTAACGCACACGACTACGGA	260-289	62
SSRY20	F: FAM-CATTGGACTTCCTACAAATATGAAT	R: TGATGGAAAGTGGTTATGTCCTT	124-163	62
SSRY21	F: HEX-CCTGCCACAATATTGAAATGG	R: CAACAATTGGACTAAGCAGCA	161-193	60
SSRY51	F: TAMRA-AGGTTGGATGCTTGAAGGAA	R: GGATGCAGGAGTGCTCAACT	258-298	60
SSRY59	F: HEX-GCAATGCAGTGAACCATCTTT	R: CGTTTGTCCTTTCTGATGTTC	126-162	63
SSRY141	F: TAMRA-TCCAAAATCTTGGTCATTTTGA	R: TGCTGTGATTAAGGAACCAACTT	249-262	60
SSRY147	F: FAM-GTACATCACCACCAACGGGC	R: AGAGCGGTGGGGCGAAGAGC	100-120	62
SSRY148	F: FAM-GGCTTCATCATGGAAAAACC	R: CAATGCTTTACGGAAGAGCC	103-118	62
SSRY149	F: HEX-AGCAGAGCATTTACAGCAAGG	R: TGTGGAGTTAAAGGTGTGAATG	157-181	62
SSRY151	F: HEX-AGTGGAAATAAGCCATGTGATG	R: CCCATAATTGATGCCAGGTT	175-217	62
SSRY154	F: ROX-ACAATGTCCCAATTGGAGGA	R: ACCATGGATAGAGCTCACCG	310-335	55
SSRY177	F: TAMRA-ACCACAAACATAGGCACGAG	R: CACCCAATTCACCAATTACCA	234-270	62
NS78	F: ROX-AGCAATGCCTTGATCTTGAG	R: AAGATGGCAATTCAAGCAAG	369-418	62
NS169	F: ROX-GTGCGAAATGGAAATCAATG	R: GCCTTCTCAGCATATGGAGC	299-331	65
NS911	F: FAM-TGTTGTTCAGACGATGTCCAA	R: TTGAAGCAGTTATGAACCGT	114-127	62
NS945	F: ROX-GCAAGGCTCCATTAAAAGTCC	R: TGTTTGAAATAGTGTTGCTTCTTGA	382-399	65

3. การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ (fragment analysis) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้จากดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง ไปเข้าเครื่องวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ (Applied Biosystems ™ 3730XL DNA Analyzer, Foster City, CA) สามารถวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค capillary electrophoresis ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ในระดับความห่างไม่น้อยกว่า 2 – 3 คู่เบส โดยจะแสดงผลในรูปแบบของกราฟ (eletropherograms) และสามารถแสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้ เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลัง

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกข้อมูลขนาดแถบดีเอ็นเอของแต่ละพันธุ์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่ลงในตาราง ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0 แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า PIC จากข้อมูล genotype เป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่แสดงความหลากหลายของอัลลีลที่ได้จากแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ จากสูตร

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p^2_i - 2 \left[\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} p^2_i p^2_j \right]$$

กำหนดให้ค่า p_i, p_j เป็นความถี่ของอัลลีล i และ j ตามลำดับ และ n เป็นจำนวนอัลลีล (Botstein *et al*., 1980) และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (cluster analysis) ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc 2.01e ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard (Jaccard's coefficient) การวิเคราะห์ข้อมูลและแสดงผลในรูปแบบ dendrogram ทำการคำนวณค่า cophenetic correlation (r) (Rohlf, 2000)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลัง

ผลการศึกษาพบว่า SSR ทุกคู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค PCR และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและมีหลายแถบดีเอ็นเอหรืออัลลีล (4 – 9 อัลลีล/เครื่องหมาย) (Figure 1) อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้ จึงนำผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้จากดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ขนาด ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI3730XL สามารถจำแนกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอแต่ละพันธุ์ได้ในระดับที่แตกต่างกันเพียง 2 – 3 เบส ซึ่งผลที่ได้มีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ ได้ข้อมูลขนาดดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังทั้งสิ้น จำนวน 4,320 ข้อมูล และนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์มันสำปะหลัง นอกจากนี้ ยังได้นำข้อมูลทางพันธุกรรมมาจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกลุ่มพันธุ์รับรอง/พันธุ์แนะนำของกรมวิชาการเกษตร รวมถึงกลุ่มพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูก เพื่อการบ่งชี้และสร้างเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเอกลักษณ์ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 แสดงใน Figure 2 ซึ่งแสดงค่าขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละคู่ไพรเมอร์ได้อย่างชัดเจน และมีความจำเพาะกับพันธุ์ โดยไพรเมอร์ SSRY147 ให้แถบดีเอ็นเอ 1 อัลลีล ขนาด 100 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ SSRY148 ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 อัลลีล ขนาด 103 และ 111 คู่เบส และไพรเมอร์ SSRY151 ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 อัลลีล ขนาด 179 และ 216 คู่เบส เป็นต้น ทั้งนี้ สามารถนำข้อมูลทางพันธุกรรมมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เพื่อการตรวจสอบพันธุ์ การรับรองพันธุ์ การคุ้มครองพันธุ์ ให้มีความถูกต้องตรงตามพันธุ์

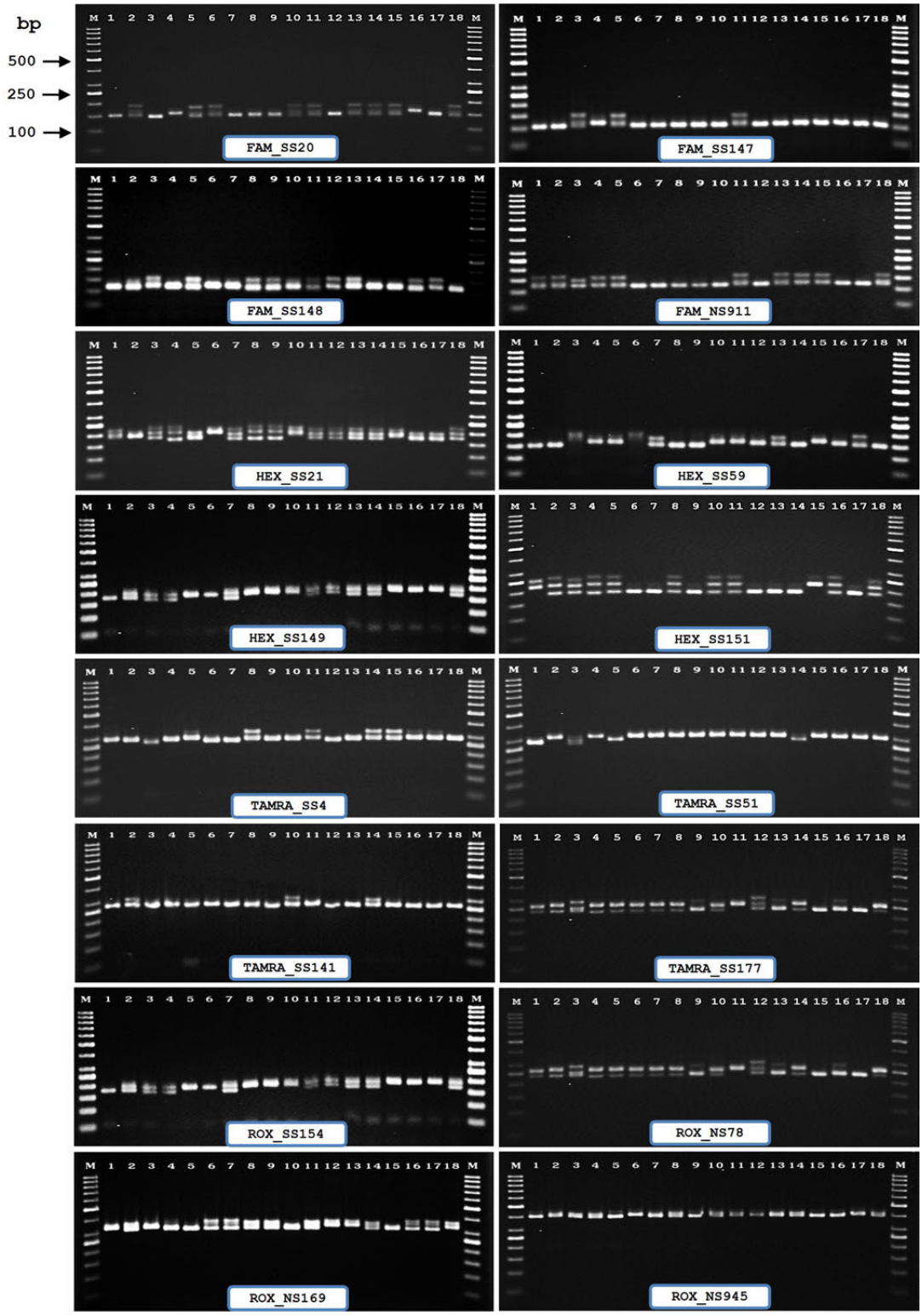

Figure 1 PCR amplification profiles of 18 cassava varieties using 16 fluorescent-labeled SSR primers separated by 2% agarose gel electrophoresis, Lane M = 50 bp DNA Ladder, Lane 1 = KLR, Lane 2 = R 1, Lane 3 = R 2, Lane 4 = R 3, Lane 5 = R 5, Lane 6 = R 7, Lane 7 = R 9, Lane 8 = R 11, Lane 9 = R 86-13, Lane 10 = R 60, Lane 11 = R 72, Lane 12 = R 90, Lane 13 = KU 50, Lane 14 = KU 72, Lane 15 = KU 75, Lane 16 = HB 60, Lane 17 = HB 80, Lane 18 = PIRUN 1

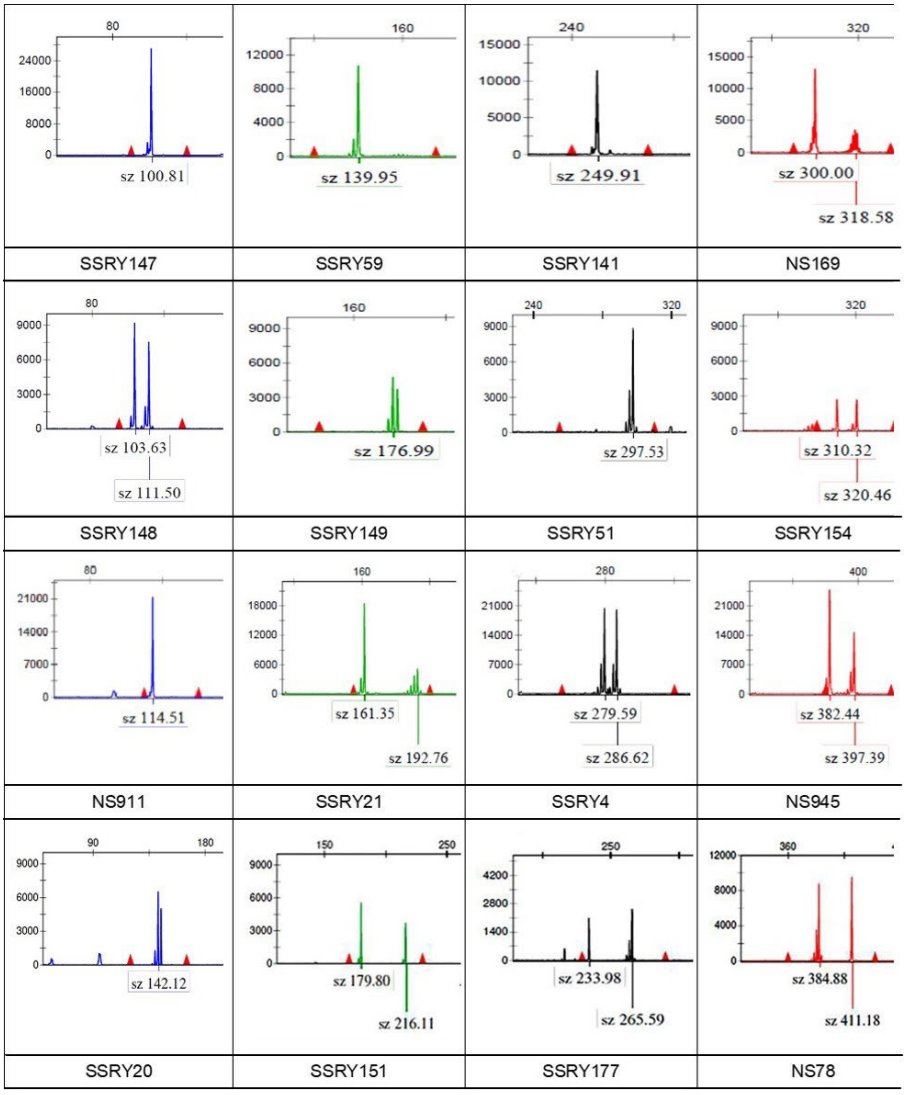

Figure 2 DNA fingerprint profiles of cassava variety "RAYONG 11" using 16 fluorescent-labeled SSR primers

2. การวิเคราะห์ข้อมูลและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง

การวิเคราะห์ข้อมูลขนาดดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละคู่ พบว่า อัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด จำนวน 88 อัลลีล มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งตั้งแต่ 3 – 9 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 5.5 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกัน (polymorphic) จำนวน 88 อัลลีล คิดเป็น 100 % โดยไพรเมอร์ที่พบอัลลีลมากที่สุด จำนวน 9 อัลลีล คือ SSRY20 ส่วนไพรเมอร์ที่พบอัลลีลน้อยที่สุด จำนวน 3 อัลลีล คือ SSRY141 ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอ ที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 100 – 418 คู่เบส ค่าสังเกตเฮทเทอโรไซโกซิตี้ (*Ho*) อยู่ระหว่าง 0.07 – 0.79 มีค่าเฉลี่ย 0.52 ค่าคาดหมายเฮทเทอโรไซโกซิตี้ หรือ ค่าความหลากหลายของยีน (gene diversity; He) อยู่ระหว่าง 0.48 – 0.81 มีค่าเฉลี่ย 0.68 การวิเคราะห์ค่า PIC พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.38 – 0.78 ค่าเฉลี่ย 0.63 โดยไพรเมอร์ที่มีค่า PIC สูงสุดคือ SSRY20 และไพรเมอร์ที่มีค่า PIC ต่ำสุด คือ SSRY147 ตามรายงานของ Yu *et al.* (2012) ระบุว่าค่า PIC > 0.50 แสดงถึงความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับสูง ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.25-0.50 ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่าง

ระดับปานกลาง และค่า PIC < 0.25 ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับที่ต่ำ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ค่า PIC ของไพรเมอร์ที่คัดเลือกและนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง มีค่าอยู่ระหว่าง 0.38 – 0.78 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้อยู่ในระดับปานกลางจนถึงระดับสูง (Table 3)

Table 3 Results of The genetic diversity analysis of 270 cassava varieties using 16 SSR markers

Primer/ (Locus)	Number of Alleles	Number of Polymorphic	% Polymorphic	Size of alleles (bp)	Mean of alleles (bp)	Observed Heterozygosity (*Ho*)	Expected Heterozygosity (*He*)	Polymorphism Information Contents (PIC)
SSRY4	5	5	100	260-289	278	0.27	0.74	0.70
SSRY20	9	9	100	124-163	312	0.79	0.81	0.78
SSRY21	5	5	100	161-193	288	0.24	0.62	0.59
SSRY51	6	6	100	258-298	176	0.74	0.74	0.69
SSRY59	5	5	100	126-162	148	0.48	0.75	0.71
SSRY141	3	3	100	249-262	258	0.61	0.61	0.56
SSRY147	4	4	100	100-120	106	0.47	0.48	0.38
SSRY148	5	5	100	103-118	111	0.24	0.74	0.69
SSRY149	4	4	100	157-181	172	0.64	0.71	0.66
SSRY151	8	8	100	175-217	318	0.46	0.52	0.44
SSRY154	4	4	100	310-335	193	0.65	0.67	0.63
SSRY177	7	7	100	234-270	389	0.65	0.65	0.57
NS78	8	8	100	369-418	393	0.67	0.78	0.75
NS169	6	6	100	299-330	312	0.50	0.72	0.68
NS911	4	4	100	114-127	258	0.07	0.54	0.48
NS945	5	5	100	382-401	249	0.79	0.78	0.75
Mean	5.5		100		247.6	0.52	0.68	0.63

การวิเคราะห์ similarity coefficient พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.10 - 1.00 โดยพันธุ์ที่มีค่า similarity coefficient สูงสุด คือ SR18-127 กับ CR17-82, H.P.2 กับ CMR23-17-276*, (V3 x R) 20-10 กับ (V3 x R) 20-15 กับ CMR23-149-117, CMR29-56-101 กับ CMR25-34-159, CMR25-34-112 กับ CMR25-33-134Q, CMR24-14-183 กับ CM4955-27, CMR23-26-2 กับ CMR23-20-23Q, MENTEGA กับ Yellow Root กับ Wild1 กับ Variegated (green) กับ YOLK, CMK23-27-30 กับ RAYONG 5, CMR31-42-20 กับ KU 75, SPY กับ HB 60, CMR33-38-48 กับ KU 72, MCUB23 กับ H.P.5 (CM305-13) กับ SM1186-24 กับ CMR24-89-65 กับ KU 50, V.30 กับ V.43, MCOL1098 กับ MCOL912B, CMR25-105-47 กับ CMR25-104-42, 35-77-22 กับ RAYONG 2 และ CMR26-65-192 กับ CMR26-69-79 ซึ่งมีค่าดัชนีความเหมือนสูงสุดเท่ากับ 1.00 และพันธุ์ที่มีค่า similarity coefficient ต่ำสุดเท่ากับ 0.10 คือ HANATEE กับ CMR47-30-8

เมื่อนำค่า similarity matrix ที่ได้มาทำการวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (cluster analysis) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships)

พบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง ทั้ง 270 ตัวอย่างพันธุ์ แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ และกลุ่มย่อยอีก 6 กลุ่ม 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

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

2) RAYONG 5, CMK23-27-30, CMR36-25-67, KU75, CMR31-42-20, SOID-AO, CMR34-40-43, CMR53-106-24, HB 60, SPY, CMR36-30-329, CMR45-27-76 (RAY-ONG 15), CMR48-35-1, CMR28-72-131, CMR33-35-69, HB 80, CMR34-35-36, CMR49-89-70, CMR37-18-201, CMR34-35-54, RAYONG 86-13, RAYONG 72, CMR38-106-32, CMR36-55-166, 27-77-10, KU 72, CMR33-38-48, CMR31-06-104, CMR35-23-76, CMR34-79-48, CMR35-22-348, CMR35-21-199, CMR35-21-96, CMR42-44-98, CMR36-71-27, CMR37-18-63, CMR37-18-189, HB 90, CMR35-26-369, CMR31-37-105, CMR33-35-13, CMR35-123-147, CMR35-91-63, CMR46-31-7, CMR30-238-34, RAYONG 7, CMR30-71-25, CMR24-14-317, CMR36-31-381, CMR50-20-2, CMR51-13-14, CMR51-04-42, CMR23-84-8, WILD 2, RAYONG 9, CMR30-05-12, OMR29-20-118, CMR34-79-152, CMR35-21-36, CMR32-24-20, CMR50-34-80, CMR28-97-31, CMR34-29-66, CMR38-75-52, RAYONG 90, KU 50, MCUB23, H.P.5 (CM305-13), SM1186-24, CMR24-89-65, CMR28-67-76, CMR50-13-26, CMR26-08-61, CMR26-08-63, CM523-7, CMR42-01-2, CMR50-20-114, CMR46-30-264, OMR53-03-6, CMR47-30-8, CMR51-23-14, CR 19, CMR44-23-34, CMR50-73-6, V.22, OMR29-27-5, V.30, V.43, SMH22-03-1 และ V.14

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

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

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

ผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง พบว่า ส่วนใหญ่มีการจัดกลุ่มตัวอย่างสอดคล้องกับประวัติพันธุ์และแหล่งกระจายพันธุ์นั้น ๆ โดยประชากรมันสำปะหลังกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีความหลากหลายของประชากรค่อนข้างสูง มีทั้งพันธุ์พื้นเมืองของไทย เช่น เกษตรลพบุรี และ HANATEE ซึ่งคาดว่านำมาจากทางภาคใต้ของไทยผ่านมาทางประเทศมาเลเซีย กลุ่มพันธุ์ลูกผสมซึ่งมีฐานพันธุกรรมมาจากประชากรพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่อยู่ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน เช่น CMR32-94-121 (ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่าง (V1 x R) 20-15 x 27-77-10), CMR49-54-67 (คู่ผสมระหว่าง CMR42-44-98 x CM3299-22), กลุ่มพันธุ์ลูกผสม (V1 x R) 20-15, (V1 x R) 20-20, (V1 x R) 21-8, (V3 x R) 21-16, (V3 x R) 20-10, (V3 x R) 20-15, (R x V69) 21-2Q, (R x HANATEE) 21-21Q, (R x HANATEE) 21-28Q* และ (R x CMC84) 21-1Q เป็นต้น และพันธุ์ที่รวบรวมจากต่างประเทศหรือพันธุ์ที่ได้จากการนำเมล็ด F1 จากต่างประเทศมาปลูกคัดเลือก เช่น RAYONG 1 (มาเลเซีย), YOD KHAM (ลาว), NEP HONGHA และ BATHANG (เวียดนาม), KATEH (อินโดนีเซีย), SC5 และ SC201 (จีน), MCOL1725 และ MCOL2485 (โคลัมเบีย), MECU72 (เอกวาดอร์), MPER183, MPER281 และ MPER325 (เปรู), MBRA12 และ MBRA191 (บราซิล), MPAN70 (ปานามา), V.24 (บริติชเวอร์จิน), CMC72, CMC84 และ CM3299-22 (CIAT Breeding Lines) และ CR17-82 (คอสตาริกา) นอกจากนี้ยังพบพันธุ์ RAYONG 60 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่คือ MCOL1684 กับ RAYONG 1 (Figure 3a)

สำหรับประชากรในกลุ่มที่ 2 พบเป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีความสัมพันธ์ของประชากรภายในกลุ่มค่อนข้างสูง ประกอบด้วยกลุ่มพันธุ์พื้นเมืองของไทย ได้แก่ YELLOW ROOT และ SPY กลุ่มพันธุ์ไทยที่เกษตรกรนิยมปลูกหรือนิยมนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ ได้แก่ RAYONG 5 (ได้มาจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง 27-77-10 x R 3), RAYONG 7 (CMR30-71-25 x OMR29-20-118), RAYONG 9 (CMR31-19-23 x OMR29-20-118), RAYONG 15 (ลูกผสมเปิด

ของ 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 (ลูกผสมเปิดของ HB 60), KU 50 (R 1 x R 90), KU 72 (R 5 x OMR29-20-118) และ KU 75 (R 60 x R 7) กลุ่มพันธุ์ลูกผสม ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการจับคู่ผสมพันธุ์โดยการใช้พันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่อยู่ภายในกลุ่มประชากรเดียวกันจึงมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง 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 และกลุ่มพันธุ์จากต่างประเทศหรือพันธุ์ที่ได้จากการนำเมล็ด F1 จากต่างประเทศมาปลูกคัดเลือก ได้แก่ RAYONG 3 เมล็ด F1 จากโคลัมเบีย (M. MEX55 x M.VEN307)), MCOL690 (โคลัมเบีย), MVEN297A (เวเนซุเอลา), MENTEGA (ติมอร์-เลสเต), MECU72 (เอกวาดอร์), CR19 (คอสตาริกา), MCUB23 (คิวบา), H.P.5 (CM305-13), CM523-7, CM4955-27, SM302-5, SM1186-24 และ SMH22-03-1 (CIAT Breeding Lines), WILD 1 และ WILD 2 (CIAT), V.14, V.22, V.30 และ V.43 (บริติชเวอร์จิน) เป็นต้น (Figure 3b)

สำหรับประชากรในกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยกลุ่มพันธุ์ไทยที่เกษตรกรนิยมปลูกหรือนิยมนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ ได้แก่ RAYONG 11 (ได้มาจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง R 5 x OMR29-20-118), PIRUN 1 (HB 60 x HANATEE), PIRUN 2 (HB 60 x HANATEE), 297, 315, 298 กลุ่มพันธุ์ลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่อยู่ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน เช่น CMR46-55-23 (CMR37-18-201 x CM3299-15), CMR49-54-10 (CMR42-44-98 x CM3299-15) และ CMR50-30-23 (R 11 x CM3299-15) เป็นต้น และกลุ่มพันธุ์ที่มาจากต่างประเทศ ได้แก่ CM125-22, CM6125-125, CM407-30, CM681-2, CM3299-15, CM3292-18, CM3299-14, CM4049UJ, CM6125-117, MCOL22, MCOL912B และ MCOL1098 (Figure 3c)

เมื่อวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) พบว่า ค่า r มีค่า 0.70 ซึ่งเป็นค่าบวก หมายความว่า ค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ ซึ่งค่าอยู่ระหว่าง 0.7 – 0.8 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับปานกลาง (Sirithunya *et al*., 2001) จากผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ทั้ง 16 คู่ไพรเมอร์สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี และพบว่า มันสำปะหลังบางพันธุ์ที่ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้ เช่น 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 เป็นต้น จึงจำเป็นต้องศึกษาและค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติมเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ดังกล่าวให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังทั้ง 270 พันธุ์ เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากสามารถบ่งบอกถึงความห่างหรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ นักปรับปรุงพันธุ์สามารถนำข้อมูลไปประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์และการจับคู่ผสมในการปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างเหมาะสม ทำให้สามารถเพิ่มโอกาสที่จะได้พันธุ์ที่มีลักษณะดีเด่นและลูกผสมที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น

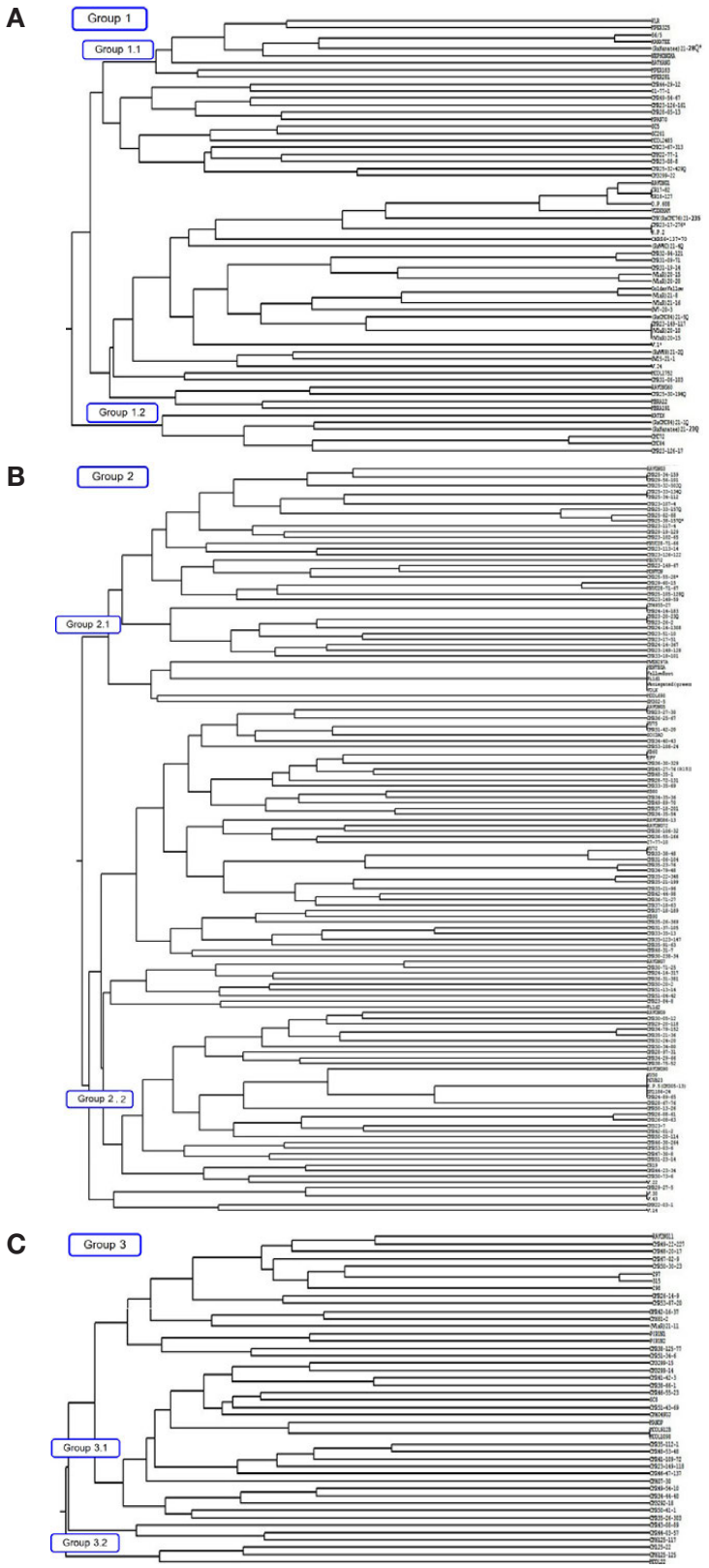

Figure 3 Dendrogram of 270 cassava varieties generated by UPGMA clustering using 16 SSR marker

A group 1 consist of 62 varieties

B group 2 consist of 132 varieties

C group 3 consist of 45 varieties

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์มันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์ไทย กลุ่มพันธุ์ลูกผสม และกลุ่มพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 270 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์ต่างๆ และเป็นวิธีการที่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้ดีและมีความแม่นยำสูง ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอทั้งสิ้น 4,320 ข้อมูล สามารถนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ได้เป็น 3 กลุ่มหลักที่แสดงความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับประวัติพันธุ์และแหล่งกระจายพันธุ์ ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลในการบ่งชี้ลักษณะประจำพันธุ์เพื่อสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม และนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังได้ นอกจากนี้ ยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในงานปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างลูกผสมให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อการจัดการทรัพยากรเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

สุภาวดี ง้อเหรียญ จีราพร แก่นทรัพย์ บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ วิภาวี ชั้นโรจน์ สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ และประพิศ วองเทียม. 2562. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR. *ว.วิชาการเกษตร.* 37(1): 2-13.

Botstein, D., R.L. White., M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. *J. Hum. Genet.* 32(3): 314-331.

Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II, *Plant Mol. Biol.* Rep. 1(4): 19-21.

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

Hokanson, S.C. A.K. Szewc-McFadden. W.F. Lamboy and J.R. McFerson. 1998. Microsatellite (SRR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships 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). *Theor. Appl. Genet.* 101(5): 865 – 872.

Lpez, 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). *Theor. Appl. Genet.* 110(3): 425 – 431.

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

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 workshop on molecular genetic analysis on diversity of blast pathogen in Thailand. Yothee laboratory Unit Bangkok, Thailand.

Vsquez A. and C. Lpez. 2014. In Silico Genome Comparison and Distribution Analysis of Simple Sequences Repeats in Cassava. *Int. J. Genomics.* 2014: 471461.

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(2): 203-213.