รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย :

2. โครงการวิจัย : การปรับปรุงพันธุ์มันขี้หนู

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การจำแนกพันธุ์มันขี้หนูโดยเครื่องหมายโมเลกุล

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) :

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต

ผู้ร่วมงาน

: นางสาวฉันทนา คงนคร

นายจิระ สุวรรณประเสริฐ

4. บทคัดย่อ

มันขี้หนูเป็นพืชพื้นเมืองที่มีสรรพคุณทางยาและส่วนหัวสามารถนำมารับประทานได้เพราะมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก หรือกินร่วมกับพืชตระกูลถั่ว ผัก หรือธัญพืช ในปัจจุบันการแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์จะใช้ลักษณะทางสัณฐานซึ่งต้องใช้เวลาและมีความยุ่งยาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการจำแนกพันธุ์มันขี้หนูเพื่อใช้วางแผนการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป โดยเก็บมันขี้หนู 12 พันธุ์/สายพันธุ์ ในภาคใต้ของประเทศไทยเพื่อนำมาจำแนกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวไม่สามารถจำแนกพันธุ์ได้จึงได้ปรับใช้เทคนิคอื่น ได้แก่ การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นสำหรับการอ่านข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค๊ด โดยการเพิ่มขยายยีนในบริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ได้แก่ *rpo*B, *mat*K, *rpo*C1, *rbc*L และ *trn*L โดยใช้ไพรเมอร์สากลที่ใช้กันทั่วไป และนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทียบเคียงโดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B, *mat*K, *rpo*C1, *rbc*L และ *trn*L ไม่สามารถจำแนกมันขี้หนูทั้ง 12 พันธุ์ ออกจากกันได้ทั้งหมดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B, *rbc*L และ *trn*L ในมันขี้หนูทั้ง 12 พันธุ์ มีความแตกต่างกันเพียง 2 ตำแหน่งในแต่ละยีน ดังนั้นจึงควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นร่วมด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรและเหมาะสมสำหรับการจำแนกพันธุ์มันขี้หนู

Abstract

Hausa potato is an indigenous medicinal plant. The tubers are eaten as a main starchy staple or part of it in combination with legumes, vegetables or cereals. It is a classification using morphological features often require long and complicated. This research was focused on identification of Hausa potato cultivars for conservation and improvement cultivars in the future. Twelve Hausa potato cultivars in Southern part of Thailand were collected to identification. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplification of SSR primer. It not had primer that could be identified cultivar. Hence, we are developed and tested to DNA barcoding including *rpo*B, *mat*K,

*rpo*C1, *rbc*L and *trn*L with each of universal primer pairs followed by DNA sequencing, and then compared by ClustalW for multiple sequences alignment. The results indicated that the nucleotide sequences of *rpo*B, *mat*K, *rpo*C1, *rbc*L and *trn*L could not be distinguished all of 12 Hausa potato cultivars. The nucleotide sequences of *rpo*B, *rbc*L and *trn*L had 2 polymorphic site each gene. Thus, it is suggested that the specific DNA sequences must simultaneously contain enough variability to be used for species identification. Although, used together with region-specific DNA sequences will be increase efficiency.

5. คำนำ :

มันขี้หนู ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Plectranthus rotundifolius* วงศ์ : LAMIACEAE เป็นพืชล้มลุก ลำต้นตั้งตรง สูง 35-55 ซม. ลำต้นและกิ่งก้านเป็นเหลี่ยม มีขนปกคลุม อวบน้ำ เมื่อโตเต็มที่แล้วจะสร้างหัวขนาดเล็ก ลักษณะเรียวยาว ทรงกระบอก หัวท้ายป้าน สีน้ำตาลอมดำหรืออมแดง ขนาดหัว 1-3 ซม. ยาว 3-6 ซม. เปลือกหัวบาง เนื้อหัวด้านในมีสีขาวอมเหลืองหรือสีครีมหรือสีม่วงอ่อน ใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกัน รูปกลมแกมไข่ ปลายใบมน ใบหนาขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย มีรูปร่างคล้ายใบฤษีผสม มีขนปกคลุมทั้งสองด้าน เมื่อเด็ดดมจะมีกลิ่นหอม ก้านใบยาว 2-3 ซม. ใบกว้าง 4.5-6.5 ซม. ยาว 5-7 ซม. ดอกออกเป็นช่อที่ปลายยอดลำต้น คล้ายช่อดอกโหระพา ก้านช่อดอกยาวประมาณ 5-20 ซม. มีดอกย่อยจำนวนมาก กลีบดอกสีม่วง ไม่ค่อยติดเมล็ด มันขี้หนูเป็นพืชหัวท้องถิ่นที่อยู่คู่กับวิถีวัฒนธรรมการผลิตทางการเกษตรและการบริโภคของชาวใต้มานานแล้ว ใช้สำหรับประกอบอาหารทั้งอาหารคาวและอาหารหวาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งโดยใช้ใส่ในแกงส้ม แกงกะทิ แกงไตปลาหรือต้มจิ้มเกลือก็ได้ในอินโดนีเซียนิยมนำหัวแก่มาบดละเอียดปรุงอาหารแทนมันฝรั่ง เป็นการปลูกที่สอดแทรกอยู่ในระบบการปลูกพืชหลักทั้งยางพารา ปาล์มน้ำมันและไม้ยืนต้นอื่นๆ โดยมีการปลูกเพื่อบริโภคในครัวเรือนและเพื่อการจำหน่ายเป็นรายได้เสริม สามารถทำรายได้ให้กับเกษตรกร 25,000-35,000 บาท/ไร่/ฤดูปลูก (6-8 เดือน) หากไม่คิดค่าแรงงาน นอกจากนี้มันขี้หนูมีคุณสมบัติพิเศษ คือต้มนานก็ไม่เปื่อยยุ่ยเหมือนในมันเทศและมันฝรั่ง เนื่องจากแป้งมีลักษณะเหนียว ความหนืดของแป้งสูง ด้วยลักษณะแป้งที่มีความหนืดสูง จึงมีความน่าสนใจในการนำมาทำผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูงขึ้น มันขี้หนูเป็นพืชที่ตลาดมีความต้องการสูง แต่ยังขาดงานวิจัยรองรับ โดยเฉพาะด้านพันธุ์และวิธีการเขตกรรมที่เหมาะสม พันธุ์ที่เกษตรกรใช้ปลูกเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่เรียกกันตามแหล่งปลูกต่างๆ ไม่มีการจำแนกความแตกต่างอย่างชัดเจนสามารถแยกความแตกต่างของมันขี้หนูด้วยการอาศัยลักษณะของส่วนลำต้นและใบได้ จึงยังไม่มีการระบุเป็นมันขี้หนูพันธุ์ต่างๆ กัน แต่จากลักษณะรูปทรงของหัวทำให้แยกมันขี้หนูออกได้เป็น 3 ลักษณะ คือ หัวลักษณะค่อนข้างกลม หัวลักษณะทรงกระบอก หัวลักษณะทรงกระสวย (จิระ, 2535) ในปัจจุบันสายพันธุ์ที่ได้จากการรวบรวมและผ่านการทดสอบการให้ผลผลิตมาระยะหนึ่งแล้วว่าเป็นพันธุ์ที่มีลักษณะดีและให้ผลผลิตสูงคือ สายพันธุ์ควนเนียง 1 และพัทลุง 3 เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันทั่วไปเป็นลักษณะพันธุ์คละที่ปลูกต่อๆกันมา ซึ่งยังไม่ได้เป็นพันธุ์ที่รับรองโดยกรมวิชาการเกษตรงานวิจัยที่ผ่านมามีการรวบรวมพันธุ์มันขี้หนูจากแหล่งปลูกต่างๆ พร้อมบันทึกลักษณะทางสัณฐานและมีการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างพันธุ์เนื่องจากจำนวน primer ที่น้อยเกินไป ซึ่งพันธุกรรมเหล่านี้มีบางตัวอย่างพันธุ์มีลักษณะที่บ่งบอกว่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มีผลผลิตสูง เช่น จำนวนหัว/หลุมมากและขนาดหัวใหญ่พันธุกรรมดังกล่าวทางศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลาได้จัดเก็บไว้เป็นอย่างดี แต่ยังขาดข้อมูลการบ่งชี้ในความแตกต่างของพันธุ์ที่ชัดเจน หากได้ข้อมูลที่บ่งชี้ได้ว่ามีความแตกต่างกันของพันธุกรรม ก็สามารถทำการคัดเลือกและนำพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงแนะนำแก่

เกษตรกรต่อไป การจัดจำแนกและการใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ยังไม่ค่อยแน่นอนที่พบเห็นได้บ่อยคือ *Coleus tuberosus* (Blume) Benth หรือ *Coleus parviflorus* Benth. หรือ *Coleus rotundifolius* Poiret) A. Chev., *Coleus parvifolius* (Enyiukwu *et al*., 2014) ส่วนชื่อสามัญที่ใช้กันมากได้แก่ Hausa potato, country potato, Chinese potato และ Madagascar potato

การจำแนกพันธุ์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการจัดการแหล่งพันธุกรรมให้เกิดประสิทธิภาพและสำคัญอย่างยิ่งต่อการนำพันธุกรรมนั้นมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืช การจำแนกชนิดพืชโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางพืชมีข้อจำกัดมาก ลักษณะบางอย่างสังเกตได้ยาก บางลักษณะไม่ปรากฏออกมาในขณะที่ทำการสังเกต การหาวิธีการที่มีความแม่นยำในการจำแนกจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะพืชที่มีพันธุกรรมสัมพันธ์กับพันธุ์ป่า ในปัจจุบันเทคนิคการใช้ molecular marker โดยเฉพาะ DNA marker ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการจำแนกพันธุกรรมพืช เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่มีผลต่อความแปรปรวนของ DNA ปัจจุบันมีการสืบหาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ด้วยคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA; cpDNA) ได้ถูกใช้เป็นแหล่งของเครื่องหมายทางดีเอ็นเอที่มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิวัฒนาการและพันธุศาสตร์ประชากร เนื่องจากคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอวงกลมที่มีความคงที่สูงในเรื่องขนาดและโครงสร้าง ลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ถือเป็นแหล่งแรกของข้อมูลสำหรับการศึกษาทางด้านการจัดจำแนกพืชโดยใช้สารชีวโมเลกุล เนื่องจากมีขนาดและการจัดเรียงตัวของยีนแตกต่างกันมาก การเรียงตัวของยีนในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอได้นำไปสู่การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้กันทั่วไป (universal chloroplast primers) ซึ่งเป็นการอำนวยความสะดวกให้กับการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการของพืชและพันธุศาสตร์ประชากร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจัดจำแนกมันขี้หนู โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพื่อให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

6. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ 1) พันธุ์มันขี้หนู 12 พันธุ์

2) สารละลายที่ใช้ (Solution required)

1. สารละลายที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ (extraction buffer) ประกอบด้วย 2 % CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2 % polyvinyl pyrrolidone (PVP), 0.2 % β-mercaptoethanol (v/v)
2. Chloroform : Octanol ; 24 : 1 (v/v)
3. 5 M NaCl
4. Isopropanol
5. 70 % ethanol
6. RNase A (Sigma) : 10 mg/ml
7. TE buffer

วิธีดำเนินการ

1. การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบมันขี้หนูไปสกัดดีเอ็นเอ โดยนำมาล้างใบด้วยน้ำเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ซับน้ำให้แห้ง ตัดใบ ให้เป็นชิ้นเล็กๆ (50 มิลลิกรัม) ใส่ลงในโกร่งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ที่มีสารละลาย CTAB ซึ่งอุ่น 65°C ก่อนใช้จำนวน 2 มิลลิลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียด ดูดสารละลายที่มีเนื้อเยื่อถั่วเขียวโดยใช้ไมโครทิปตัดปลาย 700 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มตัวอย่างไว้ที่ 65°C เป็นเวลา 30 นาที, เขย่าตัวอย่างไปมาทุกๆ 10 นาที เติมสารละลาย chloroform: isoamyl (24:1) 700 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่น เขย่าอย่างแรงประมาณ 2-3 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที, ดูดส่วนใส (ด้านบน) ใส่หลอดทดลองใหม่เติม isopropanol 700 ไมโครลิตร ลงในส่วนใส เขย่าเบาๆ ประมาณ 30 วินาที ปั่นตกตะกอน 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที, เทสารละลายทิ้ง (ดีเอ็นเอจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด) ตากตะกอนดีเอ็นเอไว้ให้แห้งเติมสารละลาย 80% ethanol 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกจากก้นหลอด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนให้แห้งประมาณ 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE buffer 500 ไมโครลิตร, รอจนดีเอ็นเอละลายหมด เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4°C หรือ -20°C เมื่อต้องการเก็บรักษาไว้นาน

2. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงตึงผิว (nanodrop) ที่ใช้ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง/ครั้ง โดยทำการวัดค่าการดูดซับแสง (Absorbance) ที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) ซึ่งหน่วยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้คือ นาโนกรัม/ไมโครลิตร ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะดูจากสัดส่วนการดูดซับแสงของตัวอย่างที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโนเมตร (A280) ซึ่งหากดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง ควรมีค่าเท่ากับ 1.8 (A260/A280=1.8) หากค่าสัดส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนจากโปรตีน หรือสารเคมีอื่นๆ

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้างต้นมาเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกไพรเมอร์บริเวณ chloroplast genes โดยปฏิกิริยา PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป OnePCRTM (GeneDirex, Taiwan) เติมดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4 ng/µl และไพรเมอร์ 0.5 µM ในน้ำยาสำเร็จรูป Master Mix ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ที่มีองค์ประกอบของ Taq DNA polymerase, PCR Buffer, dNTP, gel loading dyes, and fluorescence dye นำส่วนผสมที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมการเพิ่มปริมาณ (PCR Profile) ที่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

4. การตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิส

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสโดยใช้ 0.8 % Agarose ใน 1X TBE buffer ที่ 80 Volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสีย้อม ดูแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular weight Marker) จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท macrogen ประเทศเกาหลีใต้ต่อไป

การบันทึกผล

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบความถูกต้องด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปแกรม BLAST

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละบริเวณมาวิเคราะห์ด้วยการจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) ให้ถูกต้องตรงกันทุกชนิด โดยใช้โปรแกรม ClastalX2 หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

สถานที่ดำเนินการ : ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชสงขลา ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

ระยะเวลาดำเนินงาน: ตุลาคม 2560-กันยายน 2561

7. ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างใบมันขี้หนูจำนวน 12 พันธุ์/สายพันธุ์ ดังแสดงภาพที่ 1 เพื่อนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอจากทั้งหมดภายในเซลล์ (genomic DNA) ทั้งดีเอ็นเอในนิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรียจากใบ พบว่าได้ดีเอ็นเอในปริมาณต่างๆกัน และดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์สามารถนำไปใช้เพิ่มขยายต่อไปดังแสดงในตารางที่ 1 ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของมันขี้หนูจากฐานข้อมูลของ NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่าชื่อวิทยาศาสตร์ที่ใกล้เคียงที่สุดคือ *Plectranthus barbatus* และนำมาออกแบบไพรเมอร์บริเวณ chloroplast genes ซึ่งสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั่วไป (universal molecular markers) ในการจำแนกได้และเหมาะสมสำหรับการศึกษาทางด้านการจำแนกพันธุกรรมสำหรับพืชที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาต่ำ (lower taxonomic ranks) เนื่องจากปัจจุบัน CBOL (Consortium for the Barcode of Life) เสนอว่าชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะ (specific site) เหมาะสมสำหรับการระบุพันธุ์พืช โดยตำแหน่งนั้นต้องประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) แบบลำดับอนุรักษ์ (conserved sequence) สำหรับเป็นที่จับของไพรเมอร์สากล (universal primer) และส่วนที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงเพื่อให้จำเพาะกับพืชแต่ละพันธุ์ทั้งนี้ CBOL เสนอตำแหน่งที่เหมาะสม คือ ชิ้นดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ได้แก่ยีน *mat*K, *rpo*B, *rpo*C1, *rpo*C2, *acc*D, *ndh*A, *ndh*J, *ndh*K, YCF5, YCF9 และ *rbc*L และได้เสนอตำแหน่งมาตรฐาน 2 ยีน คือ ยีน *mat*K และ *rbc*L (CBOL, 2009) โดยยีน muturase K (matK) เป็นยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์แมทัวเรส (maturase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการตัดแต่งอาร์เอ็นเอ (RNA splicing) (Reimo *et al*., 2006) ส่วนยีน ribulose bisphosphate carboxylase (*rbc*L) เป็นยีนกำหนดการสร้างโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์ RuBis CO (ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในการกระบวนสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) ดังนั้นจึงนิยมใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ สำหรับศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการในพืชหลายชนิด (Schuettpelz *et al*., 2006) การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชสามารถเลือกใช้ชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆ ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในแต่ละชนิด (หรือพันธุ์) เดียวกัน แต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด (หรือพันธุ์) สูง ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะนี้จึงให้ความแม่นยำสูง สะดวก และรวดเร็ว ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้บริเวณดังกล่าวในการออกแบบไพรเมอร์ ได้แก่ *rpo*B, *mat*K, *rpo*C1, *rbc*L และ *trn*L มาออกแบบไพรเมอร์ดังแสดงใดตารางที่ 2

เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณบริเวณยีน rpoB พบมีขนาด 220 คู่เบส, ยีน matK มีขนาด 100 คู่เบส, ยีน rpoC1 มีขนาด 217 คู่เบส, ยีน rbcL1 มีขนาด 230 คู่เบส และ ยีน trnL มีขนาด 180 คู่เบส จากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มโดยใช้ 5 ยีนได้แก่ *rpo*B, *mat*K, *rpo*C1, *rbc*L1 และ *trn*L พบว่าสามารถ

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ทุกตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันขี้หนูเพื่อจัดจำแนกพันธุ์ในระดับโมเลกุล พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ไม่สามารถแยกความแตกต่างของมันขี้หนูทั้ง 12 พันธุ์ได้ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนยีน *rpo*B พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของมันขี้หนูได้ทั้งหมด มีเพียงบางพันธุ์เท่านั้นที่แยกได้ คือ สายพันธุ์ 4-2 และ 19-1 ออกจากพันธุ์อื่นๆ พบตำแหน่งที่แตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง ณ ตำแหน่งที่ 10 เกิดการเปลี่ยนแปลงจากไทมีน (T) เป็นอะลานีน (A) และตำแหน่ง 217 ซึ่งอาจมีผลทำให้พอลิเพปไทด์และอาจมีผลต่อการทำงานของโปรตีน (ธีระชัย, 2553)

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *trn*L พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของมันขี้หนูได้ทั้งหมด มีเพียงบางพันธุ์เท่านั้นที่แยกได้ คือ สายพันธุ์ 2-3 ออกจากพันธุ์อื่นๆ โดยพบตำแหน่งที่แตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง ณ ตำแหน่งที่ 9 เกิดการเปลี่ยนแปลงจากไซโตซีน (C) เป็นอะดีนีน (A) และเมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 12 พบว่าแยกพันธุ์มันขี้หนูได้ 2 กลุ่มคือสายพันธุ์ 19-1, 4-2, 5-1, 10-10, 11-4, 2-3 และ 3-1 ตำแหน่งที่ 12 เกิดการขาดหายไปของเบสอะดีนีน (A) ส่วนกลุ่มที่ 2 คือพันธุ์ ควนเนียง, 17-1, พัทลุง, 9-3, 25-5 ตำแหน่งที่ 12 มีเบสอะดีนีน (A) อย่างไรก็ตามการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงบางตำแหน่งซึ่งมีขนาดเล็กมากเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดจีโนมของพืชทั้งหมด

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มขยายของยีน *rbc*L1 ในมันขี้หนูทั้ง 12 สายพันธุ์/พันธุ์ พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ได้ทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามสามารถแยกพันธุ์พัทลุงออกจากพันธุ์อื่นๆ เนื่องจากตำแหน่งที่ 154 เกิดการขาดหายไปของเบสไซโตซีน (C) และตำแหน่งที่ 155 เกิดการขาดหายไปของเบสอะดีนีน (A) จึงทำให้แยกพันธุ์ 5-1, 2-3 ออกจากพันธุ์อื่นๆได้ สอดคล้องกับรายงานของ Schuettpelz และคณะ 2006 รายงานว่ายีน *rbc*L นิยมนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืช ซึ่งประสบความสำเร็จในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่ายีนอื่นๆ ที่คัดเลือกมา เช่น ยีน matK (maturase K) (Parveen *et al*., 2012)

8. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

1. จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันขี้หนูโดยใช้ยีนในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ได้แก่ *rpo*B, *mat*K, *rpo*C1, *rbc*L1 และ *trn*L พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ไม่สามารถแยกความแตกต่างของมันขี้หนูทั้ง 12 พันธุ์ได้ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนยีน *rpo*B พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของมันขี้หนูได้ทั้งหมด มีเพียงบางพันธุ์เท่านั้นที่แยกได้ คือ สายพันธุ์ 4-2 และ 19-1 ออกจากพันธุ์อื่นๆ พบตำแหน่งที่แตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง ณ ตำแหน่งที่ 10 เกิดการเปลี่ยนแปลงจากไทมีน (T) เป็นอะลานีน (A) และตำแหน่ง 217 สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *trn*L พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของมันขี้หนูได้ทั้งหมด มีเพียงบางพันธุ์เท่านั้นที่แยกได้ คือ สายพันธุ์ 2-3 ออกจากพันธุ์อื่นๆพบตำแหน่งที่แตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง ณ ตำแหน่งที่ 9 เกิดการเปลี่ยนแปลงจากไซโตซีน (C) เป็นอะดีนีน (A) และเมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 12 พบว่าแยกพันธุ์มันขี้หนูได้ 2 กลุ่มคือ 19-1, 4-2, 5-1, 10-10, 11-4, 2-3 และ 3-1 ตำแหน่งที่ 12 เกิดการขาดหายไปของเบสอะดีนีน (A) ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ ควนเนียง, 17-1, พัทลุง, 9-3, 25-5 ตำแหน่งที่ 12 มีเบสอะดีนีน สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ได้ทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามสามารถแยกพันธุ์พัทลุงออกจากพันธุ์อื่นๆ เนื่องจากตำแหน่งที่ 154 เกิดการขาดหายไปของเบสไซโตซีน (C) ขณะที่ตำแหน่งที่ 155 เกิดการขาดหายไปของเบสอะดีนีน (A) จึงทำให้แยกพันธุ์ 5-1, 2-3 ออกจากพันธุ์อื่นๆได้

2. การจำแนกพันธุ์มันขี้หนูโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ที่นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานมีขนาดสั้น (ประมาณ 200-250 คู่เบส) ทำให้มีความผันแปรเพียงเล็กน้อยในพืช ควรวิเคราะห์ตำแหน่งจำเพาะร่วมกันหลายบริเวณ จะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อวิเคราะห์ตำแหน่งจำเพาะร่วมกันหลายบริเวณ

9. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

1. สามารถนำไปประกอบการจดทะเบียนพันธุ์พืชได้ในอนาคต ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลเพื่อปกป้องพันธุ์มันขี้หนูได้

2. สามารถใช้วางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์

10. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลกที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลาที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์มันขี้หนูสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

11. เอกสารอ้างอิง

จิระ สุวรรณประเสริฐ, สมรรถ จันทะโร และอดิศักดิ์ คำนวณศิลป์. 2535. การเปรียบเทียบมาตรฐานพันธุ์มันขี้หนู, น. 16. ใน รายงานประจำปี 2535. สถานีทดลองพืชไร่สงขลา, สงขลา

ธีระชัย ธนานันต์, 2553. พันธุศาสตร์โมเลกุล, พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัท แดเน็กซ์ อินเตอร์คอร์ ปอเรชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

Chase, M.W., R. S. Cowan, P. M. Hollingsworth and C. van den Berg. 2007. A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56: 295-299.

CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 106: 12794-12797.

Enyiukwu, D. N., A. N. Awurum and J. A. Nwaneri. 2014. Potentials of Hausa Potato (*Solenostemon rotundifolius* (Poir.) J. K. Morton and Management of its Tuber Rot in Nigeria. *Greener J. Agronomy, Forestry and Horticulture*. 2 : 27-37.

Muazu, J., A. Giobo, A. Usman and G. Mohammed. 2012. Preliminary studies on Hausa potato starch I: The disintegrant properties. *J. Pharm. Sci. Tech.* 4 : 883-891.

Parveen, I., H. K. Singh, S. Raghuvanshi, U. C. Pradhan and S. B. Babbar. 2012. DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species. *Mol Ecol Resour.* 12: 82-90.

Reimo, Z., O. Oren, B. Thomas, B. Christian and L. Schmitz. 2006. Analysis of the regulation of *mat*K gene expression Endocytobiosis. *Cell Res*. 19: 127-135.

Schuettpelz, E., P. Korall, and K.M. Pryer. 2006. Plastid at data provide improved support for deep relationships among ferns. *Taxon*. 55: 897-906.

13. ภาคผนวก

สายพันธุ์ 2-3

สายพันธุ์ 3-1

สายพันธุ์ 4-2

สายพันธ์ 5-1

สายพันธุ์ 9-3

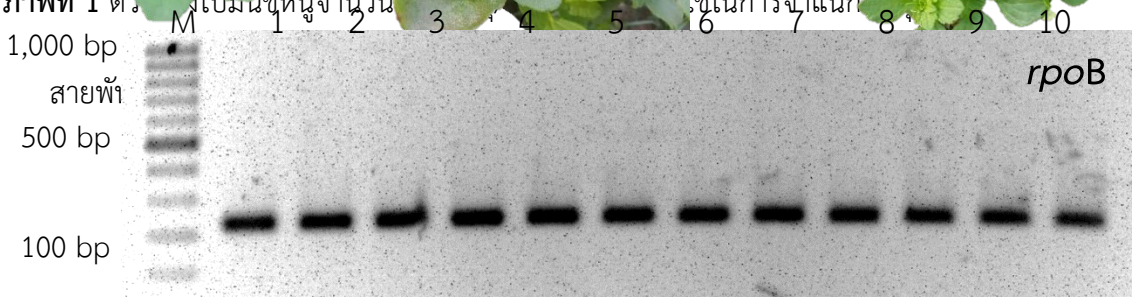
สายพันธุ์ 11-4

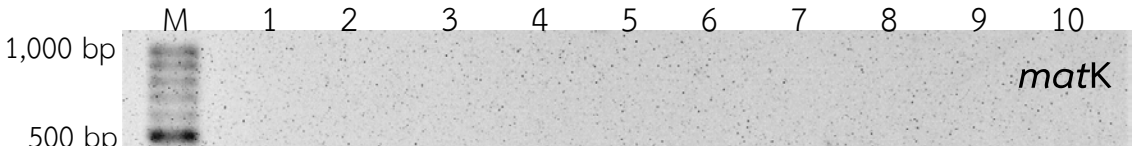
สายพันธุ์ 10-10

สายพันธุ์ 17-10

สายพันธุ์ 19-1

ภาพที่ 1 ตัว[illegible]งเบ็มนขี้หนูจำนวน[illegible]ช้ในการจำแนก[illegible]





ภาพที่ 1 ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบริเวณยีน *rpo*B มีขนาด 220 คู่เบส, ยีน *mat*K มีขนาด 100 คู่เบส, ยีน *rpo*C1 มีขนาด 217 คู่เบส, ยีน *rbc*L1 มีขนาด 230 คู่เบส และ ยีน *trn*L มีขนาด 180 คู่เบส ในมันขี้หนูสายพันธุ์ 2-3 Lane1, สายพันธุ์ 3-1 Lane2, สายพันธุ์ 4-2 Lane3, สายพันธุ์ 5-1 Lane4 , สายพันธุ์ 9-3 Lane5, สายพันธุ์ 10-10 Lane6, สายพันธุ์ 14-8 Lane7, สายพันธุ์ 17-10 Lane8, สายพันธุ์ 19-1 Lane9, สายพันธุ์ 25-5 Lane10, พันธุ์พัทลุง Lane11 และ พันธุ์ควนเนียง Lane12

```
                                  10        20        30        40        50        60        70        80
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
5-1                       ------AAATGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
2-3                       TCCGAGAAATGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
9-3                       -------AATGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
Khuneng                   -------AATGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
3-1                       -------AATGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
Phatalung                 -------AATGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
11-4                      TCCGAGAAATGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
17-10                     TCCGAGAAATGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
10-10                     TCCGAGAAATGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
25-5                      TCCGAGAAATGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
19-1                      TCCGAGAAATGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
4-2                       --------AAGCATTGTTGGAACTGGGTTGGAACGGCAAGCAGCTCTAGATTCGGGAGCTCTTGCTATAGCTGAACGCGGGGG
Clustal Consensus                 * ***********************************************************************

                                  110       120       130       140       150       160       170       180
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
5-1                       ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
2-3                       ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
9-3                       ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
Khuneng                   ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
3-1                       ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
Phatalung                 ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
11-4                      ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
17-10                     ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
10-10                     ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
25-5                      ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
19-1                      ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
4-2                       ATACTGACAAAATCCTTTTCTCGGGGAATGGAGATACTCTAAGCATTTCATTAGTTATGTATCAACGTTCCAACAAAAATACT
Clustal Consensus         ***********************************************************************************

                                  210       220       230
                          ....|....|....|....|....|....|
5-1                       CCAGGTTCGGCGGGG---------------
2-3                       CCAGGTTCGGCGGGGAAAATGCATTAAAAA
9-3                       CCAGGTTCGGCGGG----------------
Khuneng                   CCAGGTTCGGCGGG----------------
3-1                       CCAGGTTCGGCGGG----------------
Phatalung                 CCAGGTTCGGCGGG----------------
11-4                      CCAGGTTCGGCGGG----------------
17-10                     CCAGGTTCGGCGGG----------------
10-10                     CCAGGTTCGGCGGG----------------
25-5                      CCAGGTTCGGCGGG----------------
19-1                      CCAGGTTCGGCGGGGTA-------------
4-2                       CCAGGTTCGGCGGG----------------
Clustal Consensus         **************
```

ภาพที่ 2 ผลการเทียบเคียง consensus sequence ของยีน *rpo*B จากมันขี้หนูทั้ง 12 สายพันธุ์

```
                                  10        20        30        40        50        60        70        80
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
19-1                      --CTGAGCCAA-TCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
4-2                       --CTGAGCCAA-TCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
5-1                       ---TGAGCCAA-TCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
Khoneng                   TCCTGAGCCAAATCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
17-10                     --CTGAGCCAAATCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
10-10                     ---TGAGCCAA-TCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
11-4                      --CTGAGCCAA-TCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
2-3                       ---TGAGCAAA-TCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
Phatalung                 -CCTGAGCCAAATCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
3-1                       --CTGAGCCAA-TCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
9-3                       --CTGAGCCAAATCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
25-5                      ---TGAGCCAAATCCTGTTTTCTCAAAACAAAGATTCACAAAACGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
Clustal Consensus           ***** ** ***********************************************************************

                                  110       120
                          ....|....|....|....|
19-1                      GCGCTGGTAGAGGAATCTAA
4-2                       GCGCTGGTAGAGGAATCTAA
5-1                       GCGCTGGTAGAGGAAT----
Khoneng                   GCGCTGGTAGAGGA------
17-10                     GCGCTGGTAGAGGAAT----
10-10                     GCGCTGGTAGAGGAAT----
11-4                      GCGCTGGTAGAGGA------
2-3                       GCGCTGGTAGAGGA------
Phatalung                 GCGCTGGTAGAGGAAT----
3-1                       GCGCTGGTAGAGGA------
9-3                       GCGCTGGTAGAGGAAT----
25-5                      GCGCTGGTAGAGGAAT----
Clustal Consensus         **************
```

ภาพที่ 3 ผลการเทียบเคียง consensus sequence ของยีน *trn*L จากมันขี้หนูทั้ง 12 สายพันธุ์

```
                                  10        20        30        40        50        60        70        80
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
5-1                       --------TTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
2-3                       AGAGATAATTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
4-2                       ------AATTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
Khouneng                  --------TTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
14-8                      --------TTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
19-1                      --------TTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
9-3                       --------TTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
17-10                     --------TTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
10-10                     --------TTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
25-5                      --------TTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
3-1                       --------TTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
Phatalung                 --------TTGAACAAGTACGGTCGTCCTCTGCTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCTGCTAAAAACTATGGT
Clustal Consensus                 ***************************************************************************

                                  110       120       130       140       150       160
                          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
5-1                       TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGCC-TTTATGCGTTGA
2-3                       TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGCC-TTTATGCGTTGA
4-2                       TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGCCATTTATGCGTTGA
Khouneng                  TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGCCATTTATGCGTTGA
14-8                      TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGCCATTTATGCGTTGA
19-1                      TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGCCATTTATGCGTTGA
9-3                       TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGCCATTTATGCGTTGA
17-10                     TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGCCATTTATGCGTTGA
10-10                     TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGCCATTTATGCGTTGA
25-5                      TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGCCATTTATGCGTTGA
3-1                       TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGCCATTTATGCGTTGA
Phatalung                 TCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGATGAGAACGTGAACTCCCAGC-ATTTATGCGTTGA
Clustal Consensus         ****************************************************  *************
```

ภาพที่ 4 ผลการเทียบเคียง consensus sequence ของยีน *rbc*L1 จากมันขี้หนูทั้ง 12 สายพันธุ์

ตารางที่ 1 พันธุ์/สายพันธุ์มันขี้หนูที่รวบรวมได้และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

พันธุ์/สายพันธุ์มันขี้หนู	ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	OD260/280
2-3	59.6	1.76
3-1	91.2	1.60
4-2	60.7	1.77
5-1	62.7	1.77
9-3	53.6	1.82
10-10	61.6	1.77
14-8	60	1.73
17-10	50.8	1.78
19-1	58.2	1.80
25-5	78.7	1.77
พัทลุง	45.7	1.77
ควนเนียง	44.4	1.80

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์	**ลำดับเบส**
DXS2	F: TCC GAC GAG TCA AGC TTC TT R: AAG GCT TCT CTC CCG TGA AA
DXS1	F: ATT CTC TGG GAT GTT GGG CA R: GCC ACC ACG TTG TTC TTT CT
CPR	F: CTG AGC TTG TCC TTG CGT TT R: AAT GGT GTG AAG AGT CCG GT
psbA	F: GGA GCA ATA AAC CCT CTA GAA CA R: GCT ACA TCC GCC CCT TTA CT
atpF	F: CCA GTA GCC CAA AGA AAC GA R: ACA ACA ATC AAG CGG CAG TT
matK	F: CGA GGA ACC TTG CAT GCA TT R: GGG AAT GCT TGG AAA ATG GGT
trnL	F: AAA TTC AGA GAA ACC CCG GC R: AAG ATT CCT CTA CCA GCG CA
CMK	F: CAC CCG TAC CTC TTG ACC TT R: GCG ACG GAA CCA CTT CAA AT

ACT8	F: GTG CAA TAC GAT CGC CAT GT R: AAT GCA ACG GGT TTC TGG AC
ACT7	F: TTC TTC TTC ACC GCC CTG AT R: TTC GGT TCC AAG ATG TCG GA
CYP76AH17	F: GGC CAA GTG TTT TCA GGG AG R: AGG AAG CCT CAC GAA TGT CA
rbcL1	F: GCG GGT ACA TGC GAA GAA AT R: ATG ATC TCC ACC GGA CAG AC
rbcL2	F: TAA AAC TTT CCA AGG CCC GC R: CAA CGC ATA AAT GGC TGG GA
rbcL3	F: CTT CGC GGT GGA CTT GAT TT R: ATT TCT TCG CAT GTA CCC GC
rbcL4	F: TAC AAA GGG CGA TGC TAC CA R: GCA CGT AGG GCT TTG AAT CC
rbcL5	F: GGT GTT ATT CCC GTG GCT TC R: CCT TCA GCA GCA AGA TCA CG
rpoC1	F: TGT CGT AGG CCC TTC ACT TT R: GGA ATG CCT GTA TGC CCA AT
rpoB	F: CGG TCC GAG AAA TGC ATT GT R: TTA ATG CAT TTA CCC CGC CG
rbcL-CC	F: TAA AAC TTT CCA AGG CCC GC R: CAA CGC ATA AAT GGC TGG GA
Rbcl1	F: TAC AAA GGG CGA TGC TAC CA R: GCA CGT AGG GCT TTG AAT CC
Rbcl2	F: TGT GTG GAC CGA TGG ACT TA R: AAG CAA CAG GAA TTC GCA GA
trnL-trnF	F: TGC GCT GGT AGA GGA ATC TT R: TCG GAC TAT GGA GCG AAT GA
rpoC1	F: TGT CGT AGG CCC TTC ACT TT R: GGA ATG CCT GTA TGC CCA AT
rpoC2	F: GTT CCG TCA TTG TCG TAG GC R: TGC CCA ATT TAT GCA GAG TGG
rpoC1	F: TGC TTC GAA CAT AGG AGT TGC R: CAC GCC CCT CCA CTA AAA TG
rpl32	F: TCG CCA TCA ATT CAC GCA AA

	R: ACT TGA ACT CTT GTA AAA CCC GA