การค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายสนิปส์ใหม่เพื่อร่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีไซยาไนด์ต่ำ ต้านทานโรครากปมและโรคใบด่างมันสำปะหลัง

Detection and development of novel SNPs markers to shorten the time of cassava breeding for low cyanide, resistance to root knot and cassava mosaic disease

มัลลิกา แก้ววิเศษ[1*] อัจฉราพรรณ ใจเจริญ[1*] จีราพร แก่นทรัพย์[1*] สุวลักษณ์ อะมะวัลย์[2] สุภาวดี ง้อเหรียญ[1]
วิภาวี ชั้นโรจน์[1] วานิช คำพานิช[3] กฤตยา เพชรผึ้ง[4] ประพิศ วองเทียม[5] และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1]
Mallika Kaewwises[1*] Adcharapun Chaicharoen[1*] Jeeraporn Kansup[1*] Suwaluk Amawan[2]
Suphawadee Ngorian[1] Vipavee Chanroj[1] Wanich Kampanich[3] Krittaya Petchpoung[4]
Prapit Wongtiem[5] and Piyarat Thammakijjawat[1]

บทคัดย่อ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) เป็นพืชอาหารที่สำคัญอันดับ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว มันฝรั่ง และเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งเป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังรายใหญ่ที่สุดของโลก ปัจจุบันเกิดปัญหาการระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังทำให้สูญเสียผลผลิตปริมาณมาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะปริมาณไซยาไนด์ต่ำ ความต้านทานโรครากปม โรคใบด่างมันสำปะหลัง และนำมาใช้ในคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลัง ดำเนินการปี 2560-2564 ที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมด้วย Genotyping By Sequencing (GBS) ศึกษารูปแบบความเชื่อมโยงจีโนมด้วย Genome-Wide Association Study (GWAS) พบเครื่องหมายโมเลกุล ชนิดสนิปส์ (Single nucleotide polymorphisms; SNPs) ที่สัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์ต่ำ ต้านทานโรครากปม และต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง ทำการออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปส์แต่ละตำแหน่งใหม่ด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR พบว่าเครื่องหมายสนิปส์ S16_735381 บนโครโมโซมที่ 16 สัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์ต่ำ เครื่องหมาย S2_5300154 บนโครโมโซมที่ 2 สัมพันธ์กับความต้านทานโรครากปม และเครื่องหมาย S12_7926132 บนโครโมโซมที่ 12 สัมพันธ์กับความต้านทานโรคใบด่าง โดยเครื่องหมายสนิปส์ใหม่

---

* ผู้มีส่วนร่วมในผลงานเท่าเทียมกัน (Equal contribution)

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110 (Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, A.Thanyaburi, Pathumthani, 12110)

[2] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรม.วิชาการเกษตร อ.เมืองระยอง จ.ระยอง21150 (Rayong Field Crops Research Center, Department of Agriculture, A.Muang Rayong, Rayong, 21150)

[3] สำนักพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 (Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok, 10900)

[4] ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถ.งามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ (Scientific Equipment and Research Division, Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI) 50 Ngam Wong Wan Rd, Lat Yao Chatuchak Bangkok, Thailand)

[5] กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 (Planning and Technical Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok, 10900)

มีความถูกต้องในการตรวจคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะไซยาไนด์ต่ำ ต้านทานโรครากปม และต้านทานโรคใบด่าง ร้อยละ 76.64, 70.42 และ 77 ตามลำดับ นำเครื่องหมายสนิปส์มาใช้ตรวจคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังจำนวน 250 พันธุ์ พบพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมสัมพันธ์กับความต้านทานโรคใบด่างและปริมาณไซยาไนด์ต่ำ จำนวน 9 พันธุ์ ได้แก่ C33, พิรุณ 1, พิรุณ 2, ห้านาที, เกษตรลพบุรี, MMAL63, CR79, MPER325 และ OMRE 62-03-27 และพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมสัมพันธ์กับความต้านทานโรคใบด่างและโรครากปม จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ TMS-972205, TMS-980505, TMS-980581 และ TME B419 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตร มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากลดจำนวนพืชที่จะปลูกเพื่อคัดเลือก สามารถตรวจคัดเลือกได้หลายลักษณะพร้อมกันโดยมีความแม่นยำในการคัดเลือก ลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ และ ได้พันธุ์ที่มีคุณลักษณะทางพันธุกรรมตรงตามที่ต้องการ

คำสำคัญ เครื่องหมายโมเลกุล, การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง, ไซยาไนด์ต่ำ, ต้านทานโรครากปม, ต้านทานโรคใบด่าง

ABSTACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) is the fifth most important food crop in the world after wheat, maize, rice and potato, as well as one of the important economic crops of Thailand, which is the world's largest exporter of cassava products. Currently, there is an outbreak of cassava mosaic disease (CMD) causing severe yield loss. The objectives of this research were to develop molecular markers associated with low cyanide, root knot and CMD resistance, and to use these markers in the selection of cassava varieties. This research was conducted in 2017-2021 at the Biotechnology Research and Development Office, using Genotyping By Sequencing (GBS) technique and Genome-Wide Association Study (GWAS). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) markers associated with low cyanide, resistance to root knot and CMD were found. The novel primers of each SNPs marker were designed using tetra-primer ARMS-PCR technique. It was found that SNPs S16_735381 on chromosome 16 was associated with cyanide content, S2_5300154 on chromosome 2 was associated with root knot disease resistance and S12_7926132 on chromosome 12 was associated with CMD resistance. The novel SNPs markers were accurate in the selection of cassava varieties with the traits of low cyanide, resistance to root knot disease and CMD at 76.64, 70.42 and 77 percent, respectively. The three SNPs markers were used for screening of 250 cassava varieties and found that 9 varieties were genetically related to CMD resistance and low cyanide, namely C33 Pirun1, Pirun2, HANATEE, Kaset-Lopburi, MMAL63, CR79, MPER325 and OMRE 62-03-27. And 4 varieties genetically related to both CMD and

root knot disease resistance were TMS-972205, TMS-980505, TMS-980581 and TME B419. The use of molecular markers related to agricultural traits is particularly useful in plant breeding. It can reduce the number of plants planted for phenotype selection, select multiple traits at the same time with accuracy, reduce the breeding time and provide plant varieties having desired genetic characteristics.
Key words Molecular marker, Cassava breeding, Low cyanide, Root knot disease resistance, Cassava mosaic disease resistance

คำนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) เป็นพืชอาหารที่สำคัญอันดับ 5 ของโลก และเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย ซึ่งเป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง (มันเส้น มันอัดเม็ด และแป้งมัน) รายใหญ่ที่สุดของโลก (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2563) มูลค่าการส่งออกมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์ปี 2563 เป็นเงิน 82,312 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) มันสำปะหลังที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นชนิดขม ที่มีสารไซยาโนเจนิคกลูโคไซด์ที่สะสมในรูปกรดไฮโดรไซยานิกและสะสมอยู่ในรากของมันสำปะหลัง เมื่อรับประทานเข้าไปแล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นไซยาไนด์ที่เป็นสารพิษร้ายแรงได้ สารพิษชนิดนี้จะทำให้เกิดอาการผิดปกติทางระบบประสาทโดยมีอาการชา ความรู้สึกผิดปกติ ตาพร่ามัว สูญเสียการมองเห็น เสียการทรงตัว หูหนวก และอาการอัมพาต องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ และองค์การอนามัยโลกได้กำหนดระดับมาตรฐานความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ให้มีปริมาณไซยาไนด์อยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง (FAO/WHO, 1991)

ปัญหาการลดลงของผลผลิตมันสำปะหลังมีสาเหตุสำคัญมาจากโรคพืช เช่น โรคใบด่างมันสำปะหลังและโรครากปม โรคใบด่างมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อไวรัส *Cassava mosaic virus* (CMV) มีแมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะนำโรค ปัจจุบันนี้ปัญหาการแพร่ระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังเกิดขึ้นในหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย มันสำปะหลังที่เป็นโรคนี้จะแสดงอาการคือใบด่างจนถึงเหลือง ใบเสียรูปทรง ต้นเตี้ย ลำต้นแคระแกร็นและทำให้ผลผลิตลดลงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับโรครากปมของมันสำปะหลังเกิดจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* จากการสำรวจและประเมินความเสียหายในปี พ.ศ. 2554 ที่ จ.ชัยภูมิ พบว่าไส้เดือนฝอยเข้าทำลายมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 80 ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (อุดมศักดิ์ และบัญชา, 2555) และในปี พ.ศ. 2557 พบการระบาดใน จ.กาญจนบุรี กาฬสินธุ์ กำแพงเพชร นครสวรรค์ นครราชสีมา และระยอง ทำให้ผลผลิตเสียหายได้ตั้งแต่ 20-100 เปอร์เซ็นต์ (nettathai.org) มันสำปะหลังที่เป็นโรครากปมจะไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ บนส่วนเหนือดิน ที่จะทำให้ทราบว่ามันสำปะหลังถูกไส้เดือนฝอยทำลาย ดังนั้นเกษตรกรจึงไม่ทราบว่าผลผลิตหัวมันสำปะหลังมีปริมาณและคุณภาพเป็นอย่างไร หลังจากที่ต้องใช้เวลาในการปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวนาน 10-12 เดือน

ปัจจุบันเทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามามีบทบาทด้านการเกษตรเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในงานปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะที่ดี ตรงตามความต้องการ ได้แก่ เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) ที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ และมีประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์ นอกจากนี้บางเครื่องหมายโมเลกุลยังมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตร เช่น ผลผลิตสูง ไซยาไนด์ต่ำ และความต้านทานโรค การนำเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะปริมาณไซยาไนด์ต่ำ ความต้านทานโรครากปม ความต้านทานต่อโรคใบด่างมันสำปะหลัง และนำมาใช้ในคัดเลือกมันสำปะหลังเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะดังกล่าว เป็นการเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกร่นระยะเวลาในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ อีกทั้งการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานโรคเป็นการส่งเสริมความมั่นคงทางอาหารอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การพัฒนาเครื่องหมายสนิปส์ที่สัมพันธ์กับลักษณะไซยาไนด์ต่ำ ความต้านทานโรครากปมและโรคใบด่างมันสำปะหลัง

1.1 การศึกษาจีโนไทป์ด้วยเทคโนโลยี GBS

เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอสำหรับวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS โดยคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณไซยาไนด์ที่ระดับต่างๆ ตามรายงานของ จิณณจาร์ และคณะ (2558) สำหรับลักษณะต้านทานโรครากปม คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีความต้านทานระดับต่างๆ ตามรายงานของ นุชนารถ และคณะ (2558) จากนั้นสกัดดีเอ็นมันสำปะหลังด้วยวิธี CTAB และวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS สำหรับลักษณะความต้านทานต่อโรคใบด่างมันสำปะหลังมีการศึกษารูปแบบความเชื่อมโยงจีโนม (GWAS) เพื่อค้นหาเครื่องหมายสนิปส์ที่สัมพันธ์กับลักษณะดังกล่าวแล้ว (Rabbi *et al.,* 2020)

1.2 การศึกษาฟีโนไทป์ของลักษณะไซยาไนด์ต่ำ และความต้านทานโรครากปม

วิเคราะห์ปริมาณไซยาไนด์ด้วยวิธี picrate paper ดัดแปลงจาก Haque และ Bradbury (1999) โดยชั่ง picric acid 1.4 กรัม ละลายใน 100 มิลลิลิตร 2.5% (w/v) sodium carbonate จากนั้นจุ่มกระดาษ Whatman #1 ลงในสารละลาย picric acid ปล่อยให้แห้ง ตัด picric acid paper ขนาด 1 x 3 ซม^2. ติดบนฝาของหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส นำมันสำปะหลัง 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติม 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บดให้ละเอียด ปิดฝาที่มี picric acid paper บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง นำ picric acid paper จุ่มในน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เทียบกับค่ามาตราฐานของปริมาณไซยาไนด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ สำหรับฟีโนไทป์ของลักษณะต้านทานโรครากปมใช้ข้อมูลจากรายงานของ นุชนารถ และคณะ (2558)

1.3 การศึกษารูปแบบความเชื่อมโยงจีโนมเพื่อค้นหาเครื่องหมายสนิปส์

นำข้อมูลจีโนไทป์จากการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยี GBS มาคัดกรองคุณภาพ (Filter) ที่ call rate > 0.8 และ Polymorphic Information Content (PIC) > 0.1 จากนั้นนำสนิปส์ที่ผ่านการคัดกรองคุณภาพ ไปวิเคราะห์รูปแบบความเชื่อมโยงจีโนม (GWAS) โดยค้นหาตำแหน่งสนิปส์ที่เกี่ยวข้องกับแต่ละลักษณะของฟีโนไทป์ (ปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลัง และความต้านทานโรครากปม) โดยวิเคราะห์แบบ Mixed linear model (MLM) (Kang *et al*., 2008) ด้วยโปรแกรม TASSEL 5.0 (Bradbury *et al*., 2007)

2. การออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปส์ ด้วยวิธี tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (tetra-primer ARMS-PCR)

นำข้อมูลสนิปส์ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณไซยาไนด์ ความต้านทานโรครากปมและโรคใบด่างมันสำปะหลัง ไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปส์แต่ละตำแหน่ง โดยใช้ซอฟต์แวร์ Primer1 (http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html) เทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR ณ 1 ตำแหน่งของเครื่องหมายสนิปส์จะใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 เส้นในการตรวจสอบ ประกอบด้วย Forward inner primer (FI) Reverse inner primer (RI) Forward outer primer (FO) และ Reverse outer primer (RO) จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสม (condition) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ GoTaq® Master Mix (Promega, USA) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปส์แต่ละลักษณะ แสดงรายละเอียดใน Table 1 บันทึกข้อมูลรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปส์

Table 1 Sequence of primers of SNPs markers associated with low cyanide, root knot disease resistance and CMD resistance used in Tetra-Primer ARMS–PCR technique

SNPs position	Trait	Sequence	Annealing temperature (°C)	Expected allele size (bp)
S16_735381	Low cyanide	FI :GTGGACTCACAGAATCACAAGTCATTGTAC RI: GAAGGGGAGGAATTATTTCTCACCCA FO: CTTGGCAAATTCTGAGGCTTATTTATGG RO: TGGTGGTTCTTGAAATCATAGGAACAAA	60	T allele: 246 C allele: 207
S2_5300154	Root knot disease resistance	FI : GAGCAAGCCGAGCCGATGTTC RI: CAACTGCTGCACCACCGCACTA FO: TGCCGATGCTGGTCATGCTACTACT RO: TGCAAAACAGGGACCAAATGAACCT	58	T allele: 276 C allele: 188
S12_7926132	CMD resistance	FI :XXXTTTCCATGTTTCXXXXXXXXXXXXX RI: XXXGTACAAGAATCTTGXXXXXXXXXXXXX FO: XXXAGTTTTATGGACXXXXXXXXXXXXX RO: XXXATGGACTAAAATXXXXXXXXXXXXX	58	T allele: 204 G allele: 145

3. การทดสอบความถูกต้องของเครื่องหมายสนิปส์ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลัง

นำชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปส์ที่ออกแบบได้ ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจากแปลงรวบรวมของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร จำนวน 71 และ 137 พันธุ์ สำหรับลักษณะต้านทานโรครากปมและปริมาณไซยาไนด์ ตามลำดับ โดยทำปฏิกิริยา PCR ด้วย GoTaq® Master Mix (Promega, USA) และใช้อุณหภูมิในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตาม Table 1 ตรวจวิเคราะห์ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 2.5 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc UV Transilluminator (Bio-Rad Laboratories, USA) บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายสนิปส์แต่ละลักษณะ

วิธีวิเคราะห์ความถูกต้องของเครื่องหมายสนิปส์ โดยใช้สมการจากรายงานของ Ige *et al*. (2021) ดังนี้

$$\text{ความถูกต้อง} = (TP + TN) / (TP + FN + FP + TN)$$

TP = true positive, จีโนไทป์และฟีโนไทป์สอดคล้องกันในลักษณะที่ต้องการทางบวก (เช่น ความต้านทาน)

TN = true negative, จีโนไทป์และฟีโนไทป์สอดคล้องกันในลักษณะที่ต้องการทางลบ (เช่น ความอ่อนแอ)

FP = false positive, จีโนไทป์และฟีโนไทป์ไม่สอดคล้องกันในลักษณะที่ต้องการทางบวก

FN = false negative, จีโนไทป์และฟีโนไทป์ไม่สอดคล้องกันในลักษณะที่ต้องการทางลบ

บันทึกข้อมูลความถูกต้องของเครื่องหมายสนิปส์แต่ละลักษณะ

4. การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายสนิปส์ 3 ลักษณะ

นำชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปส์ทั้ง 3 ลักษณะ ประกอบด้วย S16_735381 S2_5300154 และ S12_7926132 ไปคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังจากแปลงรวบรวมของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร จำนวน 250 พันธุ์ โดยใช้ S12_7926132 เครื่องหมายสนิปส์ต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง คัดเลือกพันธุ์ในลำดับแรก จากนั้นทำการคัดเลือกลักษณะไซยาไนด์ต่ำและต้านทานโรครากปม ด้วยเครื่องหมายสนิปส์ S16_735381 และ S2_5300154 ตามลำดับ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ที่สัมพันธ์กับลักษณะไซยาไนด์ต่ำ ความต้านทานโรครากปมและโรคใบด่างมันสำปะหลัง

ลักษณะปริมาณไซยาไนด์ มันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองจำนวน 100 พันธุ์ มีปริมาณไซยาไนด์ ระหว่าง 8.26 - 815 mg Hydrogen cyanide (HCN)/kg น้ำหนักสด ทำการศึกษาจีโนไทป์ของเครื่องหมายสนิปส์ในจีโนมด้วยเทคโนโลยี GBS จากนั้นวิเคราะห์ GWAS พบเครื่องหมายสนิปส์จำนวน 40 ตำแหน่ง ที่สัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์อย่างมีนัยสำคัญ โดยพิจารณาจากค่า logarithm of significant level [$-\log_{10}(P)$] ไม่น้อยกว่า 5 ซึ่งพบอยู่บนโครโมโซมที่ 13 และ 16 (Figure 1)

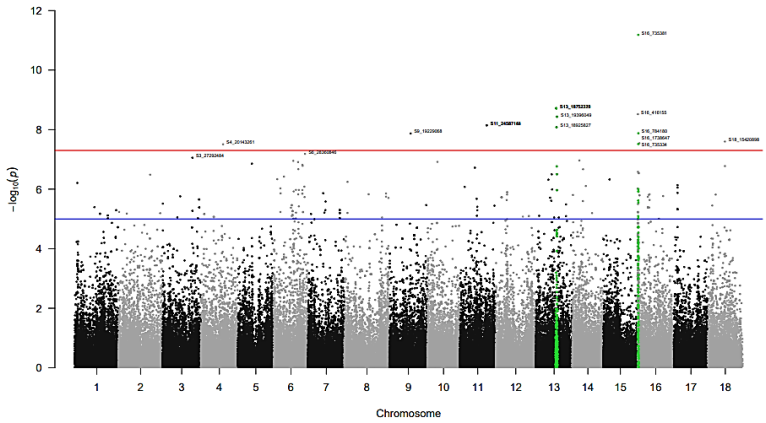

Figure 1 The Manhattan plot for GWAS of HCN in cassava 100 varieties. X-axis shows chromosomal positions. Y-axis shows –log 10 (P-value).

ลักษณะต้านทานโรครากปม มันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองจำนวน 71 พันธุ์ ที่มีข้อมูลดัชนีการเกิดปมที่แสดงถึงความต้านทานโรครากปม ผลการวิเคราะห์ GWAS พบเครื่องหมายสนิปส์จำนวน 6 ตำแหน่ง ที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรครากปมอย่างมีนัยสำคัญโดย ค่า -$\log_{10}$ (P) ไม่น้อยกว่า 5 ซึ่งพบอยู่บนโครโมโซมที่ 2 และ 14 (Figure 2)

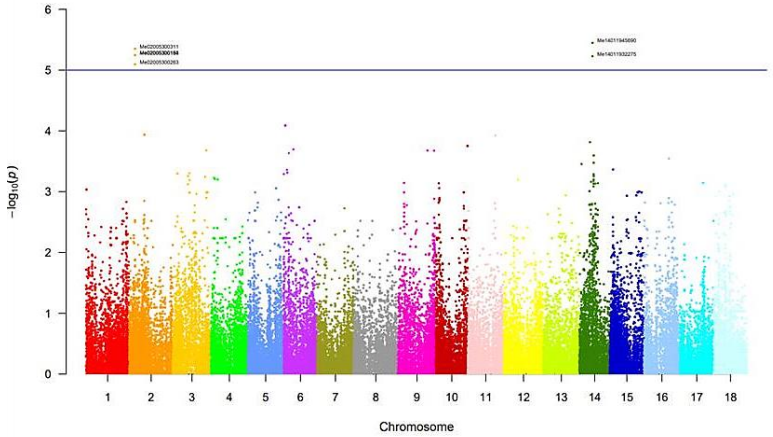

Figure 2 The Manhattan plot for GWAS of root knot disease resistance in cassava 71 varieties. X-axis shows chromosomal positions. Y-axis shows –log 10 (P-value).

ลักษณะต้านทานโรคใบด่าง Rabbi *et al*. (2020) ทำการศึกษา GWAS โดยใช้กลุ่มประชากรมันสำปะหลังจำนวน 5,130 โคลนที่พัฒนาขึ้นที่สถาบัน International Institute of Tropical Agriculture (IITA) ประเทศไนจีเรีย ข้อมูลจีโนไทป์ของประชากรมันสำปะหลังศึกษาโดยเทคโนโลยี GBS พบเครื่องหมายสนิปส์ที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง ณ ตำแหน่ง S12_7926132 มีค่า -$\log_{10}$ (P) เท่ากับ 112 จึงนำตำแหน่งสนิปส์ดังกล่าวไปออกแบบชุดไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมเกี่ยวกับความต้านทานต่อโรคใบด่างมันสำปะหลัง

2. การออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปส์ ด้วยวิธี tetra-primer ARMS-PCR

นำข้อมูลตำแหน่งเครื่องหมายสนิปส์ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง รวมถึงข้อมูลลำดับของจีโนมบริเวณใกล้เคียง ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณไซยาไนด์ ความต้านทานต่อโรครากปมและโรคใบด่างมันสำปะหลัง ไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer1 จากผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตำแหน่งสนิปส์ จำนวน 40 และ 6 ตำแหน่ง ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณไซยาไนด์และความต้านทานต่อโรครากปม ตามลำดับ พบชุดไพรเมอร์ลักษณะละ 1 ชุด ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะและเสถียร ได้แก่ S16_735381 (โครโมโซมที่ 16 ตำแหน่ง 735381) สำหรับลักษณะปริมาณไซยาไนด์ S2_5300154 สำหรับลักษณะความต้านทานต่อโรครากปม และ S12_7926132 สำหรับลักษณะต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง (Table 1 และ Figure 3)

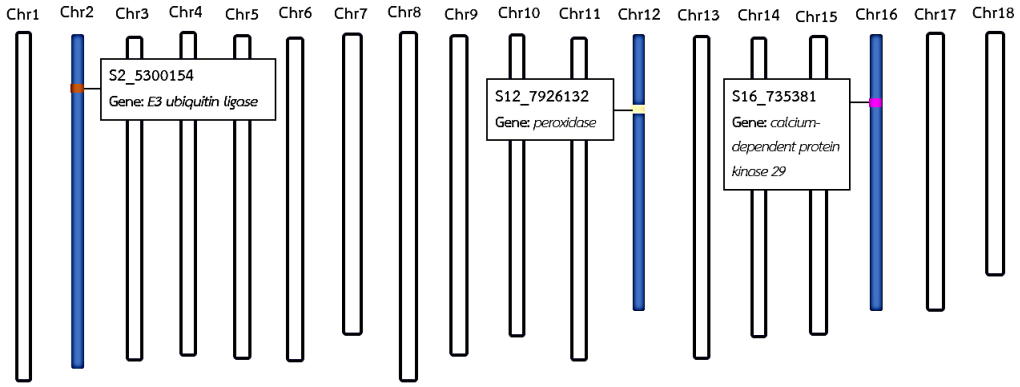

Figure 3 Position of SNPs markers associated with cyanide content, resistance to root knot disease and CMD. Related genes are described in boxes.

ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง พบว่า **ลักษณะปริมาณไซยาไนด์** สามารถแยกจีโนไทป์ของแต่ละอัลลีลของมันสำปะหลังได้ชัดเจน โดยพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) CT จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 397 246 และ 207 คู่เบสโดยแถบดีเอ็นเอ 397 คู่เบสเป็นชุดดีเอ็นเอควบคุม จีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส (homozygous) TT เกิดแถบดีเอ็นขนาด 397 และ 246 คู่เบส ส่วนจีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส CC จะเกิดแถบดีเอ็นขนาด 397 และ 207 คู่เบส (Figure 4A) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ GWAS พบว่า ณ ตำแหน่ง S16_735381 พันธุ์ที่มีจีโนไทป์ CC จะแสดงฟีโนไทป์ที่มีปริมาณไซยาไนด์ต่ำ

ลักษณะต้านทานโรครากปม ตำแหน่งสนิปส์ S2_5300154 จีโนไทป์ TT จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 421 และ 276 คู่เบส ในขณะที่จีโนไทป์เฮเทอโรไซกัส CT จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 421 276 และ 188 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอ 421 คู่เบสเป็นชุดดีเอ็นเอควบคุม (Figure 4B) พันธุ์ที่มีจีโนไทป์ TT จะแสดงฟีโนไทป์ที่มีความต้านทานต่อโรครากปม

ลักษณะต้านทานโรคใบด่าง ตำแหน่งสนิปส์ S12_7926132 จีโนไทป์ TT จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 291 240 และ 204 คู่เบส จีโนไทป์เฮเทอโรไซกัส TG จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 291 240 204 และ 145 คู่เบส และจีโนไทป์ GG แถบดีเอ็นเอขนาด 291 240 และ 145 คู่เบส โดยมีแถบดีเอ็นเอ 291 และ 240 คู่เบสเป็นชุดดีเอ็นเอควบคุม (Figure 4C) พันธุ์ที่มีจีโนไทป์ TT และ TG จะแสดงฟีโนไทป์ที่มีความต้านทานต่อโรคใบด่างมันสำปะหลัง

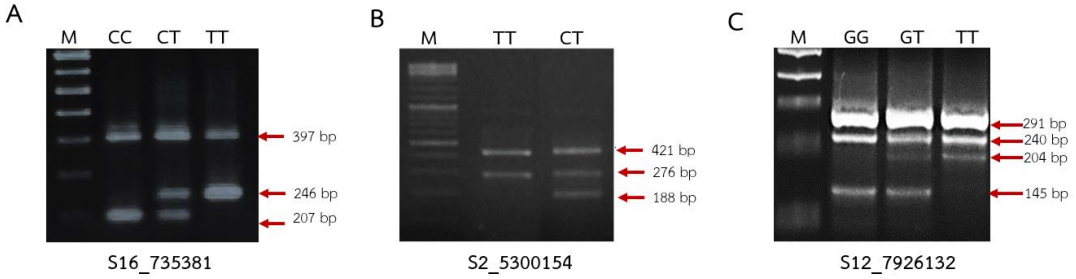

Figure 4 DNA amplification with primers of SNPs markers using Tetra-Primer ARMS–PCR technique in cassava. SNPs S16_735381(A), SNPs S2_5300154 (B) and SNPs S12_7926132 (C) were associated to cyanide content, root knot disease resistance and CMD resistance, respectively. The genotype of nucleotide allele is described above each lane. Arrows show the size of DNA bands. Lane M = Marker/DNA ladder.

ตำแหน่งสนิปส์ S16_735381 เครื่องหมายโมเลกุลไซยาไนด์ต่ำ อยู่ในส่วนอินทรอน (intron) ของยีน *manes.16G007500* ซึ่งเป็นยีน *calcium-dependent protein kinase 29* โดยมีความสอดคล้องกับรายงานของ Maduh *et al.* (1995) ซึ่งระบุว่า *potent protein kinase* C (PKC) เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของไซยาไนด์ และ Zhang (2012) รายงานว่า MAP kinase กระตุ้นไซยาไนด์ที่เป็นองค์ประกอบในกระบวนการผลิตอนุมูลว่องไวปฏิกิริยาออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) และการตายอย่างเฉียบพลันของเซลล์พืช (hypersensitive cell death)

ตำแหน่งสนิปส์ S2_5300154 เครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรครากปม อยู่ในส่วนเอกซอน (exon) ของยีน *manes.02G059900* ซึ่งเป็นยีน *E3 ubiquitin ligase* มีบทบาทสำคัญในการส่งสัญญาณของเซลล์ที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ ได้แก่ การย่อยสลายโปรตีนและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยการเติมโปรตีนยูบิควิติน (ubiquitination) ให้แก่โมเลกุลเป้าหมาย หน้าที่หลักของยูบิควิตินคือการกำหนดเป้าหมายโปรตีนเพื่อการทำลาย นอกจากนี้ทำให้การจับตัวกันระหว่างโปรตีนทำได้สะดวกขึ้นในกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ กระตุ้นให้พืชตอบสนองในการป้องกันตนเอง เช่น การหลั่งฮอร์โมน การตายของเซลล์เพื่อหยุดยั้งเชื้อโรค และการขนส่งสารภายในเซลล์ (Duplan and Rivas, 2014)

ตำแหน่งสนิปส์ S12_7926132 เครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง อยู่ระหว่างยีน *manes.12G076200 และ manes.12G076300* (Rabbi *et al.* 2020) โดยทั้งสองยีนนี้เป็นยีน *peroxidase* ทำหน้าที่ในระบบป้องกันของพืช (plant defense) และเมตาบอลิซึมต่างๆ เช่น การก่อตัวของลิกนินและซับเบริน

(lignin and suberin formation) การเชื่อมขวางของส่วนประกอบผนังเซลล์ (cross-linking of cell wall components) การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เมตาบอลีซึมของออกซินและ ROS (Almagro *et al.* 2009)

3. การทดสอบความถูกต้องของเครื่องหมายสนิปส์ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลัง

ลักษณะปริมาณไซยาไนด์ นำชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปส์ S16_735381 ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 137 พันธุ์ เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องหมายโมเลกุล โดยเปรียบเทียบระหว่างรูปแบบของแถบดีเอ็นเอกับปริมาณไซยาไนด์ที่วิเคราะห์จากมันสำปะหลังที่เก็บเกี่ยวจากพื้นที่ปลูกเดียวกันในปี 2564 ที่มีปริมาณไซยาไนด์ที่อยู่ในช่วง 87.40 - 911.60 mg HCN/kg น้ำหนักสด พบว่าเครื่องหมายสนิปส์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ความถูกต้องในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 mg HCN/kg น้ำหนักสด ร้อยละ 76.64

ลักษณะต้านทานโรครากปมนำชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปส์ S2_5300154 ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 71 พันธุ์ ซึ่งมีข้อมูลฟีโนไทป์ความต้านทานโรครากปม ตามรายงานของ นุชนารถและคณะ (2558) พบว่าเครื่องหมายสนิปส์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ให้ความถูกต้องในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีความต้านทานโรครากปม ร้อยละ 70.42

ลักษณะต้านทานโรคใบด่าง จากรายงานของ Ige *et al.* (2021) และ Codjia *et al.* (2022) พบว่าเครื่องหมายสนิปส์ S12_7926132 ให้ความถูกต้องในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง ร้อยละ 77-80

4. การคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายสนิปส์ 3 ลักษณะ

ผลการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังจำนวน 250 พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายสนิปส์ต้านทานโรคใบด่าง S12_7926132 คัดเลือกได้พันธุ์ที่มีแถบดีเอ็นต้านทานโรคใบด่าง จำนวน 17 พันธุ์ จากนั้นนำมาคัดเลือกเพิ่มเติมด้วยเครื่องหมายสนิปส์อีก 2 ลักษณะ ได้แก่ S16_735381 (ปริมาณไซยาไนด์ต่ำ) และ S2_5300154 (ความต้านทานต่อโรครากปม) พบว่า กลุ่มพันธุ์ที่มีแถบดีเอ็นเอความต้านทานโรคใบด่างและปริมาณไซยาไนด์ต่ำ มีจำนวน 9 พันธุ์ ได้แก่ C33, พิรุณ1, พิรุณ2, ห้านาที, เกษตรลพบุรี, MMAL63, CR79, MPER325 และ OMRE 62-03-27 (Figure 5 และ Table 2) สำหรับกลุ่มพันธุ์ที่มีแถบดีเอ็นเอความต้านทานทั้งโรคใบด่างและโรครากปม มีจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ TMS-972205, TMS-980505, TMS-980581 และ TME B419 (Figure 5 และ Table 2) โดยพันธุ์ C33 TMS-972205, TMS-980505, TMS-980581 และ TME B419 เป็นพันธุ์ต้านทานที่ได้รับมาจาก IITA (International Institute of Tropical Agriculture) และ CIAT (International Center for Tropical Agriculture)

ผลการคัดเลือกดังกล่าว ทำให้ได้พันธุ์ที่มีแนวโน้มที่จะมีลักษณะทางการเกษตรที่ดีรวมกันหรือเรียกว่าพีระมิดยีน (gene pyramiding) การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์อย่างมาก เนื่องจากช่วยลดจำนวนพืชที่จะปลูกเพื่อคัดเลือก โดยนักปรับปรุงพันธุ์สามารถเลือกเฉพาะต้นที่มีแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะที่ต้องการไว้ ทำให้สามารถลดพื้นที่ปลูก แรงงาน และค่าใช้จ่ายได้ (Table 3) และเป็นการเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรที่ต้องการอีกด้วย

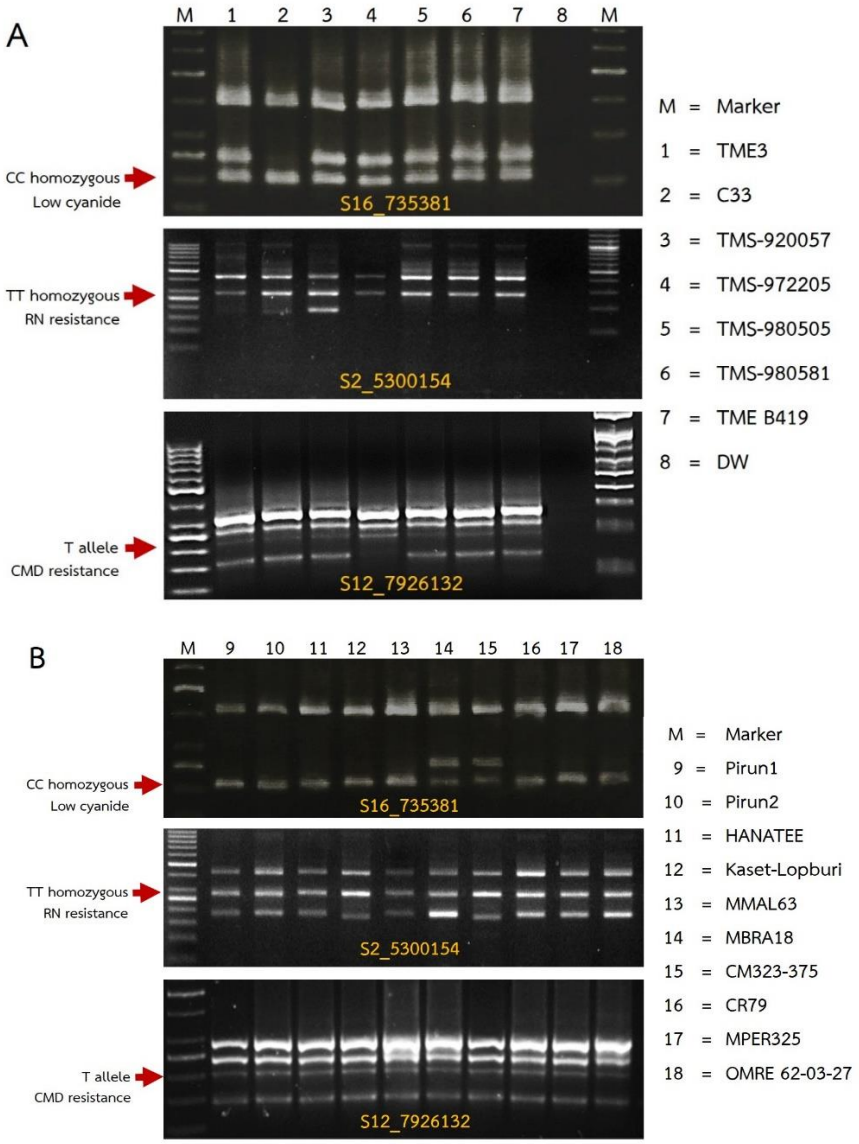

Figure 5 Marker-assisted selection using SNPs markers associated to cyanide content (S16_735381), root knot (RN) disease resistance (S2_5300154) and CMD resistance (S12_7926132) in cassava varieties from foreign country (A) and from Rayong Field Crops Research Center (B).

Table 2 Summary of genotype of cassava varieties examined with SNPs markers associated to cyanide content, root knot disease resistance and CMD resistance

Variety	S16_735381	S2_5300154	S12_7926132
	Low cyanide	Root knot disease resistance	CMD resistance
TME3	×	×	√
C33	√	×	√
TMS-920057	×	×	√
TMS-972205	×	√	√
TMS-980505	×	√	√
TMS-980581	×	√	√
TME B419	×	√	√
Pirun1	√	×	√
Pirun2	√	×	√
HANATEE	√	×	√
Kaset-Lopburi	√	×	√
MMAL63	√	×	√
MBRA18	×	×	√
CM323-375	×	×	√
CR79	√	×	√
MPER325	√	×	√
OMRE 62-03-27	√	×	√

√: favorable genotype, which are low cyanide, root knot and CMD resistance

×: unfavorable genotype, which are high cyanide, root knot and CMD susceptibility

Table 3 Comparison of conventional selection and marker-assisted selection for cassava breeding.

Trait	Breeding of cassava				Remark
	Conventional selection			Marker-assisted selection	
	Low cyanide	Root knot resistance	CMD resistance	3 traits (Low cyanide, Root knot resistance, CMD resistance)	
Number of F1	1,000	1,000	1,000	1,000	=
Cost of genotyping	-	-	-	160,000 Baht	↑
Area	1000 m^2	1000 m^2	1000 m^2	100 m^2 (100 plants from selection)	↓
Cost of planting/season	62,500 Baht	62,500 Baht	62,500 Baht	6,250 Baht	↓
Cost of Phenotyping	100,000 Baht	100,000 Baht	300,000 Baht	50,000 Baht	↓
Duration	10-12 months	10-12 months	10-12 months	10-12 months	=
Duration for pyramiding of 3 traits	10-12 months				↓
		10-12 months			↓
Area	2000 m^2				↓
Cost of planting/season	125,000 Baht				↓
Cost of Phenotyping	100,000 Baht	100,000 Baht	300,000 Baht		↓

สรุปผลการทดลอง

1. ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคโนโลยี GBS และการศึกษารูปแบบความเชื่อมโยงจีโนม (GWAS) ได้ค้นพบเครื่องหมายสนิปส์ใหม่ จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ สนิปส์ S16_735381 สัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์ และ สนิปส์ S2_5300154 สัมพันธ์กับความต้านทานโรครากปม

2. พัฒนาไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบเครื่องหมายสนิปส์ด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR จำนวน 3 ชุดไพรเมอร์ สำหรับ 3 ลักษณะ ได้แก่ ปริมาณไซยาไนด์ต่ำ ความต้านทานโรครากปมและความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง

3. ความถูกต้องของเครื่องหมายสนิปส์ในการคัดเลือกพันธุ์ S16_735381 (ปริมาณไซยาไนด์ต่ำ) S2_5300154 (ความต้านทานโรครากปม) และ S12_7926132 (ความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง) มีความถูกต้อง ร้อยละ 76.64 70.42 และ 77 ตามลำดับ

4. ผลการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังจำนวน 250 พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายสนิปส์ทั้ง 3 ลักษณะ คัดเลือกได้กลุ่มพันธุ์ที่มีแนวโน้มต้านทานโรคใบด่างและไซยาไนด์ต่ำ จำนวน 9 พันธุ์ และกลุ่มพันธุ์ที่มีแนวโน้มต้านทานทั้งโรคใบด่างและโรครากปม จำนวน 4 พันธุ์

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำเครื่องหมายสนิปส์ทั้ง 3 ชุดไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้ มาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการ ประกอบด้วย ปริมาณไซยาไนด์ต่ำ ต้านทานโรครากปมและต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง เครื่องหมายทั้งสามนี้มีความถูกต้องมากกว่า ร้อยละ 70 ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพสูง

2. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์ช่วยลดจำนวนประชากรของพืชที่จะทำการปลูกคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ ทำให้ลดขนาดพื้นที่ จำนวนแรงงาน ค่าใช้จ่าย และระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ การคัดเลือกลักษณะทางฟีโนไทป์บางลักษณะมีความยากในการตรวจสอบ มีค่าใช้จ่ายสูง และได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบฟีโนไทป์และมีความแม่นยำในการคัดเลือกมากกว่าวิธีคัดเลือกจากฟีโนไทป์ อีกทั้งเป็นการช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อโรคจากการตรวจสอบฟีโนไทป์กับเชื้อโรคจริง

3. เครื่องหมายสนิปส์ด้วยเทคนิค Tetra-Primer ARMS–PCR นี้ มีความสะดวก ใช้งานได้ง่าย ไม่ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญเฉพาะด้าน สามารถดำเนินการในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลที่มีเครื่องมือพื้นฐานได้ เช่น เครื่องพีซีอาร์ เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอ และยังมีต้นทุนการตรวจสอบเพียง 10 บาทต่อการตรวจสอบสนิปส์ 1 ตำแหน่ง เมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นๆ ซึ่งมีราคาประมาณ 100 บาทต่อตำแหน่งสำหรับเทคนิค real time PCR และ 310 บาทต่อตำแหน่งสำหรับเทคนิค Pyrosequencing

4. หน่วยงานต่างๆ สามารถนำเครื่องหมายสนิปส์ทั้ง 3 ชุดไพรเมอร์ ไปใช้คัดเลือกพันธุ์ได้ทันที

5. เครื่องหมายสนิปส์ของลักษณะปริมาณไซยาไนด์ต่ำ S16_735381 ขอจดอนุสิทธิบัตรในนามของกรมวิชาการเกษตร ชื่อการประดิษฐ์ เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ที่สัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลังของยีน *manes.16G007500* เลขที่คำขอ 2203000058 วันที่ยื่นคำขอและรับคำขอ 10 มกราคม 2565

6. เครื่องหมายสนิปส์ของลักษณะความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง S12_7926132 นำไปใช้ต่อยอดในงานวิจัย เรื่อง การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง ดำเนินงานปี 2565-2567

เอกสารอ้างอิง

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

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

โรคในมันสำปะหลังและการป้องกันกำจัด. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. (1-67_1.1 (nettathai.org) Accessed May 2022.

สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศ ปี 2563. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 164 หน้า.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2563. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2564. สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 240 หน้า.

อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช และบัญชา ชิณศรี. 2555. การสำรวจและประเมินความเสียหายจากโรคราก่ปมของมันสำปะหลัง หน้า 391-395 ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50 สาขาพืช

Almagro, L., L.V. Gómez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barceló and M.A. Pedreño. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions, J. Exp. Bot. 60(2): 377–390.

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

Codjia, E. D. , B. Olasanmi, P.A. Agre, R. Uwugiaren, A.D. Ige, I.Y. Rabbi. 2022. Selection for resistance to cassava mosaic disease in African cassava germplasm using single nucleotide polymorphism markers. Afr. J. Sci. 118.

Duplan, V. and S. Rivas. 2014. *E3 ubiquitin-ligases* and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. Front Plant Sci. 5:42.

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

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

Ige, A.D., B. Olasanmi, E.G.N. Mbanjo, I.S. Kayondo, E.Y. Parkes, P. Kulakow, C. Egesi, G.J. Bauchet, E. Ng, L.A.B. Lopez-Lavalle, H. Ceballos and I.Y. Rabbi. 2021. Conversion and validation of uniplex SNP markers for selection of resistance to cassava mosaic disease in cassava breeding programs. Agronomy,11: 420.

Kang, H.M, N.A. Zaitlen, C.M. Wade, A. Kirby, D. Heckerman, M.J. Daly and E. Eskin. 2008. Efficient control of population structure in model organism association mapping, Genetics, 178(3): 1709–1723.

Maduh, E.U., E.W. Nealley, H. Song, P.C. Wang and S.I. Baskin. 1995. A protein kinase C inhibitor attenuates cyanide toxicity in vivo. Toxicology. 100(1-3): 129-137.

Rabbi, I. Y., K.S. Ismail, B. Guillaume, Y. Muyideen, A.C. Idhigu, O. Kayode, U. Ruth, S.I. Andrew, P. Prasad, A. Afolabi, P. Elizabeth, L.Ezenwaka, W.Marnin, J. Jean-Luc, E.Chiedozie and K. Peter. 2020. Genome-wide association analysis reveals new insights into the genetic architecture of defensive, agro-morphological and quality-related traits in cassava. Plant Mol. Biol. doi:10.1007/s11103-020-01038-3

Zhang, S. 2012. Activation of plant stress-responsive MAP kinases induces cyanide- its role in reactive oxygen species generation and hypersensitive Cell Death. https://grantome.com/grant/NSF/IOS-0743957. Accessed in May 2022.