

การประเมินเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือกมันสำปะหลัง  
ที่มีค่าอุณหภูมิที่ทำให้แป้งเกิดความหนืดต่ำ

Validation of Molecular Markers Used for Assisting Selection of Cassava  
(*Manihot esculenta* Crantz) with Low Starch Pasting Temperature

ชญัญวิช ธัญสิริวรรณ<sup>1\*</sup> ศุภจิต สระเพชร<sup>2</sup> และกนกพร ไตรวิทยาการ<sup>2</sup>

Thanwanit Thanyasiriwat<sup>1\*</sup>, Supajit Sraphet<sup>2</sup> and Kanokporn Triwitayakorn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>หน่วยวิจัยเทคโนโลยีจีโนมพืช ภาควิชาเกษตรและทรัพยากร คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร 47000

<sup>2</sup>สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

<sup>1</sup>Plant Genome Technology Research Unit, Department of Agriculture and Resources, Faculty of Natural Resources and  
Agro-Industry, Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus, Mueang, Sakon Nakhon 47000, Thailand

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya, Phuttamonthon, Nakhon Pathom 73170, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: thanwanit.t@ku.th

(Received: Apr 5, 2020; Revised: Apr 17, 2020; Accepted: Jun 5, 2020)

#### บทคัดย่อ

การใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกลักษณะความหนืดของแป้งเป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนาสายพันธุ์มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เพื่อตอบสนองต่อภาคอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะความหนืดของแป้ง (Starch pasting viscosity) ในประชากรลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 ที่ได้จากคู่ผสมจำนวน 13 คู่ จากการศึกษาจีโนมไทป์ในมันสำปะหลังลูกผสมจำนวน 54 สายพันธุ์พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล MeES959 MeES1019 SSR13 และ EME81 ให้จำนวนอัลลีล 4 7 8 และ 2 อัลลีล ตามลำดับ ส่วนค่าความหนืดของแป้งในมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) โดยมีค่าเฉลี่ยของความหนืดสูงสุด (Peak viscosity, PV) ความหนืดต่ำสุด (Holding strength, HS) ความหนืดสุดท้าย (Final viscosity, FV) อุณหภูมิที่เกิดความหนืด (Pasting temperature, PT) เวลาที่ทำให้เกิดความหนืด (Pasting time, PTi) ค่าการแตกตัวของแป้งสุก (Breakdown, BD) และค่าคืนตัวกลับ (Setback, SB) เท่ากับ 200.9 cP 56.0 cP 104.6 cP 68.6°C 210.6 วินาที 145.0 cP และ 48.6 cP ตามลำดับ ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์หรีเกรสชั่นแบบเส้นตรงเชิงเดี่ยวและวิเคราะห์ความแปรปรวน พบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนมไทป์และค่าความหนืดของแป้ง โดยที่เครื่องหมาย EME81 มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกลูกผสมที่มีคุณสมบัติด้านความหนืดของแป้งสูงหรือต่ำ โดยอัลลีล 1 เป็นอัลลีลที่ให้ลักษณะ PT ต่ำ และสามารถจัดกลุ่มมันสำปะหลังเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะของจีโนมไทป์ (1/1 1/2 และ 2/2) ได้

**คำสำคัญ :** การคัดเลือก เครื่องหมายโมเลกุล ความหนืดของแป้ง มันสำปะหลัง

#### Abstract

Marker assisted selection (MAS) technology used for assisting selection of starch pasting viscosity traits is an important goal for breeding of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) to support the tapioca starch industry. This research aimed to evaluate the molecular markers linked to starch pasting viscosity in  $F_1$  population derived from 13 crosses. The genotyping results showed that the band pattern of 54  $F_1$  lines revealed 4, 7, 8 and 2 alleles for MeES959, MeES1019, SSR13 and EME81 markers, respectively. Starch pasting viscosity values showed statistically significant difference ( $p < 0.01$ ) among  $F_1$  lines. The average phenotypic values of PV, HS, FV, PT, PTi, BD and SB were 200.9 cP, 56.0 cP, 104.6 cP,



68.6°C, 210.6 seconds, 145.0 cP and 48.6 cP, respectively. The marker-trait efficiency was validated in F<sub>1</sub> population using simple linear regression and ANOVA test. It was found the relationship between genotypic class and starch pasting viscosity. Among four markers, EME81 was the most effective marker for selecting the F<sub>1</sub> lines consisted of low- and high-pasting viscosity. The allele 1 contributed to the lower PT. The PT was classified into 3 classes depending on the genotypic class (1/1, 1/2 and 2/2).

**Keywords:** Selection, Molecular marker, Starch pasting viscosity, Cassava

## บทนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชที่ให้แหล่งอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญสำหรับการบริโภค ใช้เป็นอาหารสัตว์ และใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ โดยมีแหล่งปลูกในประเทศแถบเอเชีย แอฟริกา และลาตินอเมริกา (Udoh *et al.*, 2017, pp. 123-134) แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งวัตถุดิบแป้งที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เป็นผงละเอียด และมีความบริสุทธิ์สูง (Toae *et al.*, 2019, pp. 447-460) ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมอาหารและอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ ยา กระดาษ เครื่องสำอาง และเคมีภัณฑ์ รวมถึงอุตสาหกรรมต่อเนื่องคุณสมบัติด้านกายภาพและเคมีเชิงฟิสิกส์ของแป้งเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (Nuwamanya *et al.*, 2010, pp. 8-15) ความหนืดเป็นคุณสมบัติที่สำคัญและเป็นประโยชน์มากที่สุดของแป้ง ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของแป้งเมื่อได้รับความร้อน ทำให้เม็ดแป้งเกิดการพองตัวและมีความหนืดมากขึ้น ค่าอุณหภูมิที่เกิดความหนืด (Pasting temperature, PT) เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ความหนืดของแป้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยแป้งที่มีค่า PT ต่ำสามารถเกิดเป็นแป้งเปียกได้ง่ายกว่าแป้งที่มีค่า PT สูง ซึ่งทำให้ประหยัดพลังงานในกระบวนการแปรรูปแป้งในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ เช่น อุตสาหกรรมอาหารต้องการแป้งที่มีค่าความหนืดเมื่อแป้งคืนตัว (Setback) ต่ำ ความหนืดเมื่อแป้งเย็นตัว (Final viscosity) สูง และอุณหภูมิกับเวลาทำให้แป้งเกิดความหนืดต่ำ เป็นต้น (Mufumbo *et al.*, 2011, pp. 195-202) ซึ่งพฤติกรรมความหนืดเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวและแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง ดังนั้นการพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังให้มีลักษณะ PT ต่ำจึงเป็นเป้าหมายสำคัญในโครงการปรับปรุงพันธุ์ระดับโมเลกุลเพื่อให้ได้มันสำปะหลังที่มีคุณสมบัติของแป้งที่ต้องการ เช่น งานวิจัยของ Thanyasirawat *et al.* (2014, pp. 197-207) พบตำแหน่งยีน (QTL) ที่ควบคุมความหนืดของแป้งมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 จำนวน 15 ตำแหน่ง ซึ่งกระจายตัวอยู่บนโครโมโซมทั้ง 19 Linkage groups (LG) โดยที่ QTL ที่ควบคุมลักษณะ PT มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรม (Genotype) มากที่สุด และวางตัวอยู่ใกล้กับเครื่องหมายโมเลกุล MeES959 MeES1019 SSR13 และ EME81 บน LG ที่ 1 จากผลการวิจัยนี้พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะ PT มีแนวโน้มในการเป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก

นอกจากนี้ Srisawad *et al.* (2018, pp. 493-510) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ และสร้างแผนที่ทางกายภาพ (Physical map) ให้ครอบคลุมบริเวณที่พบ QTL ที่สัมพันธ์กับลักษณะ PT ที่ค้นพบโดย Thanyasirawat *et al.* (2014, pp. 197-207) เมื่อทำการวิเคราะห์ตำแหน่ง QTL ในประชากรมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล EME81 มีความสัมพันธ์กับค่า PT มากที่สุด และเสนอแนะว่าเครื่องหมายโมเลกุล EME81 สามารถใช้เป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือกได้ ในขณะที่ Pootakham *et al.* (2014, p. e116028) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SNP ในมันสำปะหลัง 16 สายพันธุ์ โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในอาร์เอ็นเอ และใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสร้างแผนที่พันธุกรรม และหาตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะความหนืดของแป้ง พบว่าตำแหน่ง QTL อยู่ที่เดียวกับที่ Thanyasirawat *et al.* (2014, pp. 197-207) เคยรายงานไว้ ถึงแม้จะมีรายงานว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะ PT สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้เร็วขึ้นด้วยเทคนิค Marker assisted selection (MAS) ได้ แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับการประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายดังกล่าวสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือกลักษณะคุณภาพแป้งในมันสำปะหลัง

ยังมีงานวิจัยที่ใช้เทคนิค MAS เพื่อการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรค Cassava mosaic disease (CMD) (Okogbenin *et al.*, 2012, pp. 2576-2586) คัดเลือกพันธุ์ไซยาไนต์ต่ำ การเพิ่มน้ำหนักแห้ง และการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เช่น ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ (Udoh *et al.*, 2017, pp. 123-134.) เป็นต้น การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกเป็นวิธีการคัดเลือกลักษณะที่สนใจจากจีโนมไทป์ที่สัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวโดยตรง ทำให้มี

ประสิทธิภาพและความเที่ยงตรงในการคัดเลือกมากยิ่งขึ้น (Oliveira *et al.*, 2018, pp. 3853-3869) เนื่องจากสามารถคัดเลือกลักษณะที่สนใจได้ตั้งแต่ที่ขอยู่ในระยะต้นกล้าโดยติดตามเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะนั้น ๆ โดยต้นพืชที่ไม่มียีนหรือลักษณะเป้าหมายจะถูกคัดออกจากประชากรเพื่อลดจำนวนตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หลัง ทำให้ประหยัดเวลาและค่าแรงงานสำหรับการประเมินลักษณะในแปลงทดลอง (Orazaly *et al.*, 2018, pp. 71-89) ซึ่งก่อนที่จะนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เพื่อเป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือก จำเป็นต้องทำการประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลนั้น ๆ ที่สัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจก่อน โดยใช้ประชากรอื่น ๆ ที่มีฐานพันธุกรรมแตกต่างไปจากเดิม (Li *et al.*, 2013, pp. 1039-1052) เช่น งานวิจัยของ Tembo *et al.* (2017, pp. 1061-1068) ประเมินเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซเทลไลท์เพื่อเป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือกข้าวสาลีต้านทานโรค *Bipolaris sorokiniana* โดยใช้ประชากรลูกผสมชั่วรุ่นที่ 2 และ Li *et al.* (2013, pp. 1039-1052) ได้ทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนในวิธีการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตในประชากรมันฝรั่งลูกผสมเตตราพลอยด์เพื่อคัดเลือกลักษณะคุณภาพของหัวมันฝรั่ง เป็นต้น นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุลนั้นจะต้องสามารถแยกลักษณะที่สนใจออกเป็นกลุ่มตามลักษณะของจีโนไทป์ของประชากรที่ใช้ศึกษา

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล MeES959 MeES1019 SSR13 และ EME81 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความเหนียวของแป้ง สำหรับเป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกสายพันธุ์มันสำปะหลังที่ค่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดความเหนียวต่ำ

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. แหล่งพันธุกรรมมันสำปะหลัง

ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 ที่พัฒนาโดย ดร.โอภาส บุญเส็ง สำหรับประเมินเครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 54 สายพันธุ์ ที่เกิดจากคู่ผสมจำนวน 13 คู่ ได้แก่ (1) HN x MVEN200 (2) HN x มันม่วง (PC) (3) B126 x MCOL1684 (4) R60 x MBRA77 (5) R60 x MBRA337 (6) R90 x MBRA279 (7) R90 x MBRA18 (8) R90 x MBRA887 (9) HB60 x MCOL1684 (10) HB60 x MCOL1466 (11) HB60 x MVEN200 (12) HB60 x MCOL585 และ (13) HB60 x MPAL103

#### 2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลัง

สกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 ระยะเพสลาด (ตำแหน่งใบที่ 1 นับจากยอด) ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) โดยดำเนินการตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเข้มข้น 0.8% และวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้เครื่อง Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

#### 3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์จีโนไทป์

วิเคราะห์จีโนไทป์ในมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยไพรเมอร์ 4 คู่ ได้แก่ MeES959 (Forward: 5'-GATTGTGTGATCATGGCTGG-3' Reverse: 5'-GAATCCATCGCGTGATTTG-3') MeES1019 (Forward: 5'-AGAATGGATGCAGGAGTGCT-3' Reverse: 5'-AAGTTGGATGCTTGATGGAA-3') SSR13 (Forward: 5'-AGCATAGGAACCTGCGTCTC-3' Reverse: 5'-TCCAGCTGTAGCTGTTGTGG-3') และ EME81 (Forward: 5'-GTGATGGAGACAGCTGAGG-3' Reverse: 5'-CACATAATGCCAAAACCTAACC-3') โดยเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบเข้มข้น 50 นาโนกรัม บัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์เข้มข้น 1 เท่า (1X PCR buffer) dNTPs เข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ (Vivantis, Malaysia) MgCl<sub>2</sub> เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ชนิด Forward และ Reverse เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 2 ยูนิต/ไมโครลิตร (Vivantis, Malaysia) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเครื่อง PCR (PCRmax Alpha Cycler, UK) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ดังนี้ (1) Pre-denaturation ด้วยอุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที (2) ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนย่อย ได้แก่ Denaturation ด้วยอุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ด้วยอุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 45 วินาที และ Extension ด้วยอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที และ (3) ขั้นตอน Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกขนาดด้วยเทคนิคโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น

5% แล้วย้อมแถบตีเอ็นเอด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต นำลายพิมพ์ตีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ผล โดยพิจารณาตามขนาดของแถบตีเอ็นเอ และกำหนดให้แถบตีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีรหัสเป็น 1 หรืออัลลีล 1 ตามลำดับไปจนถึงแถบตีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กที่สุด

#### 4. การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านความหนืดของแป้ง

**4.1 เตรียมตัวอย่างแป้งมันสำปะหลัง** สุ่มชุดหัวมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 อายุ 12 เดือน สายพันธุ์ละ 3 ต้น และชั่งหัวมันให้ได้น้ำหนัก 5 กิโลกรัม แล้วปอกเปลือกและบดหยาบโดยใช้เครื่องโม่ จากนั้นบดละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น (Waring Lab Blenders รุ่น E8000) ด้วยความเร็ว 16000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองน้ำแป้งด้วยผ้าขาวบาง จำนวน 2 ครั้ง แยกเส้นใยออกจากแป้งโดยใช้ตะแกรงร่อนขนาดความถี่ของตา 90 ไมโครเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้แป้งตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างตะกอนแป้งด้วยน้ำและตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนต่ออีก 4 ชั่วโมง เทน้ำทิ้งแล้วอบแป้งที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการบดตัวอย่างแป้งให้ละเอียดโดยใช้โม่ แล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาดความถี่ของตา 90 ไมโครเมตร และหาความชื้นของแป้ง ก่อนนำไปใช้วิเคราะห์คุณสมบัติด้านความหนืดต่อไป โดยเตรียมตามวิธีการของ Toae *et al.* (2019, pp. 447-460)

**4.2 วิเคราะห์ความชื้นแป้ง** เริ่มต้นจากอบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้ทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง จากนั้นชั่งตัวอย่างแป้งให้น้ำหนัก 2.00x กรัม ใส่ลงในภาชนะที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้ทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่าง ดำเนินการตามวิธีการของ Chukwu & Abdullahi (2015, pp. 753-763) แล้วคำนวณหาปริมาณความชื้น ตามสูตร (1)

$$\text{ปริมาณความชื้น(\%)} = [\text{ผลต่างของน้ำหนักแป้งก่อนอบและหลังอบ (กรัม)}/\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}] \times 100 \quad (1)$$

**4.3 วิเคราะห์คุณสมบัติด้านความหนืดของแป้ง** ชั่งตัวอย่างแป้งให้น้ำหนัก 2.3000 กรัม ด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ลงในถ้วยแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้น้ำหนักรวมเท่ากับ 25 กรัม จากนั้นนำเข้าเครื่อง Rheometer (Physica MCR51, Anton Paar, Austria) เพื่อวิเคราะห์ความหนืดโดยใช้โปรแกรม ReoPlus ด้วยวิธีการ “Starch STD1” ดังนี้ เริ่มต้นให้ความร้อนแก่น้ำแป้งด้วยอุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิในอัตราเร็ว 12°C/นาที จนถึงอุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที และให้อุณหภูมิคงที่ต่ออีก 3.4 นาที แล้วลดอุณหภูมิลงเป็น 50°C เป็นเวลา 4.2 นาที และคงที่ต่อเนื่องอีก 2 นาที กำหนดความเร็วในการกวนน้ำแป้ง 960 rpm เป็นเวลา 10 วินาที และเพิ่มเป็น 160 rpm จนเสร็จกระบวนการ บันทึกค่าพารามิเตอร์ ดังนี้ (1) ความหนืดสูงสุด (Peak viscosity, PV) (2) ความหนืดต่ำสุด (Holding strength, HS) (3) ความหนืดสุดท้าย (Final viscosity, FV) (4) อุณหภูมิที่เกิดความหนืด (Pasting temperature, PT) (5) เวลาที่ทำให้เกิดความหนืด (Pasting time, PTi) (6) ค่าการแตกตัวของแป้งสุก (Breakdown, BD) และ (7) ค่าคืนตัวกลับ (Setback, SB) เนื่องจากความชื้นแป้งมันสำปะหลังไม่เท่ากับ 14% จึงคำนวณหาน้ำหนักแป้งตามความชื้นจริงจากสูตร (2)

$$S = (86 \times A)/(100 - M) \quad (2)$$

โดยที่ S = น้ำหนักแป้งตามความชื้นจริง A = น้ำหนักแป้งที่ความชื้น 14% (สำหรับแป้งมันสำปะหลัง = 2.5 กรัม) และ M = ความชื้นจริงจากแป้ง

**4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ** วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ของข้อมูลลักษณะความหนืดของแป้ง และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ( $p < 0.01$ )

#### 5. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลในการเป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือก

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ของความหนืดแป้งและข้อมูลจีโนไทป์ของมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 ด้วยวิธีการวิเคราะห์รีเกรสชันแบบเส้นตรงเชิงเดียว (Simple Linear Regression Analysis) ด้วยวิธี Single marker analysis (SMA) และทดสอบความแปรปรวน (ANOVA)

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. ลักษณะจีโนไทป์ของมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1

วิเคราะห์จีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล MeES959 MeES1019 SSRY13 และ EME81 แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ (อัลลีล) ในลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 จำนวน 54 สายพันธุ์ พบจำนวนอัลลีลรวมจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 เครื่องหมาย เท่ากับ 4 7 8 และ 2 อัลลีล ตามลำดับ และพบว่าจำนวนอัลลีลมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนอัลลีลที่ได้จากการทดลองของ Thanyasiriwat *et al.* (2014, pp. 197-207) เครื่องหมายโมเลกุล EME81 แสดงรูปแบบของจีโนไทป์ 3 แบบ ได้แก่ 1/1 1/2 และ 2/2 (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าจำนวนอัลลีลที่เพิ่มขึ้นในประชากรลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับอัลลีลที่ได้จากประชากรของกลุ่มระหว่าง HB60 และ HN (ตารางที่ 1) อาจเกิดเนื่องมาจากความถี่ในการเกิดรีคอมบิเนชันของอัลลีลในประชากรแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกัน (Chhabra *et al.*, 2019, pp. 258-265) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าเครื่องหมาย EME81 ให้จำนวนอัลลีลเท่ากับ 2 อัลลีล แต่แสดงรูปแบบของจีโนไทป์ 3 แบบ โดยพบจีโนไทป์แบบ 2/2 เพิ่มขึ้นมาจากลูกผสมของประชากรเดิมซึ่งมีจีโนไทป์เป็น ll (1/1) และ lm (1/2) จากงานวิจัยของ Thanyasiriwat *et al.* (2014, pp. 197-207) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากจีโนไทป์ของกลุ่ม R90 x MPER279 R90 x MBRA18 และ R90 x MBRA887 แสดงจีโนไทป์เป็นแบบ 2/2 ในมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 90 (R90) และแบบ 1/2 ในมันสำปะหลังสายพันธุ์ MPER279 MBRA18 และ MBRA887 ทำให้ได้ลูกผสมที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ 1/2 และ 2/2 ส่วนกลุ่ม HB60 x MVEN200 แสดงจีโนไทป์แบบ Heterozygous (1/2) ทั้งคู่ ทำให้ลูกผสมที่เกิดขึ้นมีจีโนไทป์แบบ 2/2 ซึ่งถ่ายทอดมาจากทั้งฝ่ายพ่อและแม่

ตารางที่ 1 จำนวนอัลลีล และรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 ที่ได้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล MeES959 MeES1019 SSRY13 และ EME81

Molecular marker	In this study		Thanyasiriwat <i>et al.</i> (2014, pp. 197-207)	
	Detected alleles	DNA pattern of F <sub>1</sub> <sup>1</sup> (13 crosses)	Detected alleles	Genotype of F <sub>1</sub> <sup>2</sup> (HB60 x HN)
MeES959	4 (Designated as 1, 2, 3 and 4)	1/1 1/2 1/3 1/4 2/2 2/4 3/3	2 (l and m)	ll, lm (1/1 and 1/2)
MeES1019	7 (Designated as 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7)	1/1 1/2 1/3 1/4 1/5 1/7 2/2 2/5 3/7 4/4 4/5 4/7 5/5 5/6 5/7 7/7	4 (a, b, c and d)	ac, ad, bc, bd (1/3 1/4 2/3 and 2/4)
SSRY13	8 (Designated as 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8)	1/3 1/7 1/8 2/3 2/5 2/6 2/7 2/8 3/3 3/4 3/5 3/7 3/8 4/3 4/4 4/5 4/7 4/8 5/8 7/8 8/8	4 (a, b, c and d)	ac, ad, bc, bd (1/3 1/4 2/3 and 2/4)
EME81	2 (Designated as 1 and 2)	1/1 1/2 2/2	2 (l and m)	ll, lm (1/1 and 1/2)

<sup>1</sup> ตัวเลข 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 แทนอัลลีลที่พบและประกอบกันเป็นรูปแบบจีโนไทป์ของลูก F<sub>1</sub> เช่น 1/1 1/2 หรือ 2/2

<sup>2</sup> ชนิดของจีโนไทป์ที่เกิดจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยใช้รหัส CP (CP codes) ได้แก่ <abxcd> และ <lmxll> (Thanyasiriwat *et al.*, (2014, pp. 197-207)

2. คุณสมบัติด้านความหนืดของแป้ง

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านความหนืดของแป้งมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 จำนวน 54 สายพันธุ์ พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีค่าความหนืด PV HS FV BD SB PTi และ PT แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) โดยที่มันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 ต้นที่ 40 จากกลุ่ม HB60 x MVEN200 มีค่าเฉลี่ยของความหนืด PV HS FV และ BD สูงที่สุด ส่วนลูกผสมต้นที่ 35 ที่เกิดจากกลุ่ม R90 x MBRA887 มีค่าเฉลี่ยของความหนืด HS FV และ SB ต่ำที่สุด และลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 ต้นที่ 10 ที่ได้จากกลุ่ม R60 x MBRA77 มีค่า PT ต่ำที่สุด (53.6°C) (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่าลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 มีการกระจายตัวของคุณสมบัติด้านความหนืดของแป้งเป็นแบบต่อเนื่อง (ไม่แสดงข้อมูล) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tembo *et al.* (2017, pp. 1061-1068) ที่รายงานว่าประชากรที่เหมาะสมสำหรับใช้ประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลในการเป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือกลักษณะควรเป็นประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และจากผลการทดลองแสดง



ให้เห็นว่าค่าความหนืดของแป้งในมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 มีความหลากหลายเช่นกัน อาจเนื่องมาจากประชากรลูกผสมมีพันธุกรรมแตกต่างกัน นอกจากนี้ลักษณะความหนืดของแป้งมีการกระจายตัวแบบต่อเนื่องบ่งชี้ว่าลักษณะความหนืดของแป้งมียีนควบคุมหลายคู่ (Polygenes) โดยที่แต่ละอัลลีลที่ควบคุมลักษณะได้รับการถ่ายทอดมาจากพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ (Thanyasiriwat *et al.*, 2014, pp. 197-207)

**ตารางที่ 2** ค่าเฉลี่ยความหนืดแป้งมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 ที่เกิดจากคู่ผสมของมันสำปะหลัง 13 คู่

Parents (n) <sup>1</sup>	F <sub>1</sub> lines	Starch pasting viscosity						
		PV (cP)	HS (cP)	FV (cP)	BD (cP)	SB (cP)	PTi (s)	PT (°C)
HN x MVEN200 (1)	1	248.1 <sup>de</sup>	81.3 <sup>cd</sup>	178.4 <sup>b</sup>	166.7 <sup>cde</sup>	97.1 <sup>b</sup>	221.0 <sup>b-e</sup>	70.7 <sup>abc</sup>
HN x PC (3)	2	191.3 <sup>k-p</sup>	52.6 <sup>n-q</sup>	95.3 <sup>n-q</sup>	138.7 <sup>j-s</sup>	42.7 <sup>p-t</sup>	213.9 <sup>d-j</sup>	69.5 <sup>a-d</sup>
	3	203.2 <sup>f-m</sup>	53.8 <sup>m-p</sup>	93.3 <sup>p-s</sup>	149.4 <sup>f-m</sup>	39.5 <sup>s-v</sup>	211.8 <sup>f-m</sup>	63.1 <sup>a-d</sup>
	4	193.3 <sup>i-o</sup>	64.6 <sup>ghi</sup>	111.6 <sup>hij</sup>	128.7 <sup>p-u</sup>	47.0 <sup>m-q</sup>	220.8 <sup>b-e</sup>	71.1 <sup>abc</sup>
B126 x MCOL1684 (2)	5	178.5 <sup>o-r</sup>	50.1 <sup>p-t</sup>	93.8 <sup>p-s</sup>	128.4 <sup>q-u</sup>	43.7 <sup>o-t</sup>	207.3 <sup>i-r</sup>	66.1 <sup>a-d</sup>
	6	198.9 <sup>h-n</sup>	74.9 <sup>e</sup>	145.6 <sup>d</sup>	123.9 <sup>s-v</sup>	70.7 <sup>e</sup>	219.0 <sup>b-g</sup>	69.7 <sup>a-d</sup>
R60 x MBRA77 (7)	7	174.8 <sup>o-r</sup>	40.1 <sup>vw</sup>	73.7 <sup>v</sup>	134.8 <sup>l-t</sup>	33.7 <sup>v-y</sup>	199.0 <sup>r-u</sup>	69.2 <sup>a-d</sup>
	8	199.1 <sup>h-n</sup>	66.0 <sup>ghi</sup>	117.9 <sup>gh</sup>	133.2 <sup>m-t</sup>	52.0 <sup>i-n</sup>	212.2 <sup>f-l</sup>	72.5 <sup>ab</sup>
	9	275.4 <sup>b</sup>	89.4 <sup>ab</sup>	176.1 <sup>b</sup>	186.0 <sup>b</sup>	86.8 <sup>c</sup>	209.8 <sup>h-o</sup>	64.9 <sup>a-d</sup>
	10	215.4 <sup>fgh</sup>	62.4 <sup>hij</sup>	116.0 <sup>ghi</sup>	153.0 <sup>e-j</sup>	53.6 <sup>kl</sup>	200.1 <sup>q-u</sup>	53.6 <sup>d</sup>
	11	204.6 <sup>f-m</sup>	59.2 <sup>kl</sup>	104.9 <sup>j-m</sup>	145.3 <sup>s-p</sup>	45.7 <sup>o-r</sup>	212.1 <sup>f-l</sup>	57.3 <sup>bcd</sup>
	12	211.9 <sup>f-i</sup>	56.3 <sup>k-o</sup>	98.5 <sup>l-p</sup>	155.6 <sup>d-i</sup>	42.3 <sup>p-t</sup>	209.2 <sup>h-p</sup>	61.7 <sup>a-d</sup>
	13	218.0 <sup>fg</sup>	68.5 <sup>fg</sup>	131.5 <sup>e</sup>	149.5 <sup>f-m</sup>	63.0 <sup>fg</sup>	203.2 <sup>m-t</sup>	61.2 <sup>a-d</sup>
R60 x MBRA337 (10)	14	212.5 <sup>fgh</sup>	73.7 <sup>ef</sup>	129.2 <sup>ef</sup>	138.8 <sup>i-s</sup>	55.5 <sup>ijk</sup>	200.6 <sup>p-u</sup>	55.0 <sup>cd</sup>
	15	205.8 <sup>f-m</sup>	51.2 <sup>o-r</sup>	92.2 <sup>p-t</sup>	154.6 <sup>d-j</sup>	41.0 <sup>q-u</sup>	196.7 <sup>st-u</sup>	63.5 <sup>a-d</sup>
	16	176.5 <sup>o-r</sup>	27.5 <sup>zA</sup>	51.8 <sup>zA</sup>	149.1 <sup>f-n</sup>	24.3 <sup>ABC</sup>	192.4 <sup>u</sup>	65.2 <sup>a-d</sup>
	17	205.4 <sup>f-m</sup>	34.0 <sup>xy</sup>	62.1 <sup>wxy</sup>	171.4 <sup>bcd</sup>	28.1 <sup>yzAB</sup>	194.9 <sup>tu</sup>	68.4 <sup>a-d</sup>
	18	216.0 <sup>fgh</sup>	66.7 <sup>gh</sup>	120.2 <sup>gh</sup>	149.3 <sup>f-n</sup>	53.5 <sup>kl</sup>	199.8 <sup>q-u</sup>	69.7 <sup>a-d</sup>
	19	244.8 <sup>e</sup>	73.5 <sup>ef</sup>	141.5 <sup>d</sup>	171.3 <sup>bcd</sup>	68.0 <sup>ef</sup>	198.1 <sup>stu</sup>	67.4 <sup>a-d</sup>
	20	221.2 <sup>f</sup>	59.2 <sup>kl</sup>	103.6 <sup>j-n</sup>	162.0 <sup>c-g</sup>	44.4 <sup>o-t</sup>	194.9 <sup>tu</sup>	69.8 <sup>a-d</sup>
	21	153.0 <sup>t-w</sup>	24.6 <sup>AB</sup>	46.5 <sup>AB</sup>	128.5 <sup>q-u</sup>	22.0 <sup>BC</sup>	201.5 <sup>o-t</sup>	69.4 <sup>a-d</sup>
	22	206.2 <sup>f-l</sup>	61.5 <sup>ijk</sup>	106.8 <sup>ijkl</sup>	144.8 <sup>h-q</sup>	45.4 <sup>o-s</sup>	201.9 <sup>o-t</sup>	68.5 <sup>a-d</sup>
23	207.1 <sup>f-l</sup>	56.0 <sup>l-o</sup>	98.6 <sup>l-p</sup>	151.1 <sup>e-l</sup>	42.5 <sup>p-t</sup>	203.8 <sup>l-s</sup>	70.4 <sup>a-d</sup>	
R90 x MBRA279 (4)	24	155.1 <sup>s-v</sup>	27.3 <sup>zA</sup>	54.1 <sup>yzA</sup>	127.9 <sup>r-u</sup>	26.8 <sup>zABC</sup>	204.4 <sup>k-s</sup>	66.1 <sup>a-d</sup>
	25	179.2 <sup>o-r</sup>	46.7 <sup>st</sup>	85.3 <sup>stu</sup>	132.5 <sup>n-t</sup>	38.6 <sup>t-w</sup>	220.1 <sup>b-f</sup>	67.5 <sup>a-d</sup>
	26	205.9 <sup>f-m</sup>	59.0 <sup>kl</sup>	106.9 <sup>ijkl</sup>	146.9 <sup>f-o</sup>	47.9 <sup>l-p</sup>	215.4 <sup>d-j</sup>	70.7 <sup>abc</sup>
	27	264.4 <sup>bcd</sup>	86.3 <sup>abc</sup>	191.4 <sup>a</sup>	178.1 <sup>bc</sup>	105.0 <sup>a</sup>	229.8 <sup>a</sup>	72.7 <sup>ab</sup>
R90 x MBRA18 (3)	28	270.5 <sup>bc</sup>	85.3 <sup>bc</sup>	163.5 <sup>c</sup>	185.2 <sup>b</sup>	78.3 <sup>d</sup>	225.1 <sup>ab</sup>	70.0 <sup>a-d</sup>
	29	173.2 <sup>p-s</sup>	32.5 <sup>xyz</sup>	62.9 <sup>wx</sup>	140.7 <sup>h-r</sup>	30.4 <sup>xyzA</sup>	209.6 <sup>h-o</sup>	72.7 <sup>ab</sup>
	30	136.5 <sup>vw</sup>	27.6 <sup>zA</sup>	53.2 <sup>zA</sup>	108.9 <sup>v</sup>	25.6 <sup>ABC</sup>	209.2 <sup>h-p</sup>	73.0 <sup>ab</sup>
R90 x MBRA887 (5)	31	171.5 <sup>q-t</sup>	37.0 <sup>wx</sup>	69.7 <sup>vw</sup>	134.4 <sup>l-t</sup>	32.6 <sup>w-z</sup>	210.7 <sup>g-n</sup>	70.1 <sup>a-d</sup>
	32	190.5 <sup>l-p</sup>	45.1 <sup>tuv</sup>	84.4 <sup>tu</sup>	145.4 <sup>s-p</sup>	39.4 <sup>s-v</sup>	208.2 <sup>j-q</sup>	69.7 <sup>a-d</sup>
	33	187.4 <sup>m-q</sup>	41.2 <sup>uvw</sup>	76.8 <sup>uv</sup>	146.2 <sup>g-o</sup>	35.6 <sup>u-x</sup>	217.0 <sup>b-i</sup>	73.1 <sup>ab</sup>
	34	134.8 <sup>w</sup>	25.4 <sup>AB</sup>	51.2 <sup>zAB</sup>	109.4 <sup>v</sup>	25.8 <sup>ABC</sup>	208.1 <sup>j-q</sup>	67.6 <sup>a-d</sup>
	35	144.3 <sup>uvw</sup>	21.4 <sup>B</sup>	42.9 <sup>B</sup>	122.9 <sup>s-v</sup>	21.5 <sup>C</sup>	207.2 <sup>i-r</sup>	66.6 <sup>a-d</sup>
HB60 x MCOL1684 (1)	36	220.0 <sup>f</sup>	56.7 <sup>k-n</sup>	102.9 <sup>k-o</sup>	163.3 <sup>c-f</sup>	46.2 <sup>n-r</sup>	203.1 <sup>n-t</sup>	57.2 <sup>bcd</sup>
HB60 x MCOL1466 (2)	37	253.4 <sup>cde</sup>	86.0 <sup>bc</sup>	164.4 <sup>c</sup>	167.4 <sup>cde</sup>	78.5 <sup>d</sup>	214.1 <sup>d-j</sup>	69.1 <sup>a-d</sup>
	38	211.7 <sup>f-i</sup>	72.7 <sup>ef</sup>	132.6 <sup>e</sup>	139.0 <sup>j-s</sup>	59.9 <sup>ghi</sup>	215.6 <sup>c-j</sup>	69.2 <sup>a-d</sup>
HB60 x MVEN200 (3)	39	209.9 <sup>f-k</sup>	52.5 <sup>n-q</sup>	96.3 <sup>m-q</sup>	157.4 <sup>d-h</sup>	43.8 <sup>o-t</sup>	212.2 <sup>f-l</sup>	71.9 <sup>abc</sup>
	40	296.0 <sup>a</sup>	91.3 <sup>a</sup>	193.8 <sup>a</sup>	204.7 <sup>a</sup>	102.5 <sup>ab</sup>	217.1 <sup>b-i</sup>	70.7 <sup>abc</sup>

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Parents (n) <sup>1</sup>	F <sub>1</sub> lines	Starch pasting viscosity						
		PV (cP)	HS (cP)	FV (cP)	BD (cP)	SB (cP)	PTi (s)	PT (°C)
HB60 x MCOL585 (8)	41	155.2 <sup>s-v</sup>	31.7 <sup>yz</sup>	58.8 <sup>xyz</sup>	123.4 <sup>s-v</sup>	27.1 <sup>zABC</sup>	208.8 <sup>t-p</sup>	71.5 <sup>abc</sup>
	42	209.1 <sup>f-l</sup>	76.2 <sup>de</sup>	132.7 <sup>e</sup>	132.9 <sup>m-t</sup>	56.6 <sup>hij</sup>	224.1 <sup>abc</sup>	74.1 <sup>ab</sup>
	43	183.6 <sup>n-q</sup>	48.4 <sup>t</sup>	89.2 <sup>q-t</sup>	135.2 <sup>k-t</sup>	40.8 <sup>r-u</sup>	214.5 <sup>d-j</sup>	73.3 <sup>ab</sup>
	44	210.4 <sup>f-j</sup>	62.5 <sup>hij</sup>	112.2 <sup>g-j</sup>	147.9 <sup>f-n</sup>	49.6 <sup>k-o</sup>	216.8 <sup>b-i</sup>	72.5 <sup>ab</sup>
	45	212.3 <sup>fgh</sup>	50.4 <sup>p-s</sup>	91.4	161.9 <sup>c-g</sup>	41.0 <sup>q-u</sup>	207.7 <sup>j-q</sup>	67.8 <sup>a-d</sup>
	46	179.9 <sup>opq</sup>	49.3 <sup>p-t</sup>	90.7 <sup>p-t</sup>	130.6 <sup>o-u</sup>	41.4 <sup>q-u</sup>	215.7 <sup>c-j</sup>	74.2 <sup>ab</sup>
	47	214.9 <sup>fgh</sup>	67.4 <sup>gh</sup>	120.8 <sup>g</sup>	147.5 <sup>f-n</sup>	53.4 <sup>kl</sup>	214.4 <sup>d-j</sup>	71.1 <sup>abc</sup>
	48	199.9 <sup>g-n</sup>	58.9 <sup>j-m</sup>	108.2 <sup>jk</sup>	141.0 <sup>h-r</sup>	49.3 <sup>k-o</sup>	213.2 <sup>d-j</sup>	71.7 <sup>abc</sup>
	49	205.4 <sup>f-m</sup>	53.8 <sup>m-p</sup>	98.7 <sup>l-p</sup>	151.6 <sup>e-k</sup>	45.0 <sup>o-s</sup>	212.9 <sup>e-k</sup>	73.9 <sup>ab</sup>
HB60 x MPAL103 (5)	50	214.2 <sup>fgh</sup>	69.2 <sup>fg</sup>	131.6 <sup>e</sup>	145.0 <sup>h-q</sup>	62.4 <sup>fgh</sup>	215.2 <sup>d-j</sup>	70.1 <sup>a-d</sup>
	51	170.9 <sup>q-t</sup>	52.5 <sup>n-q</sup>	94.6 <sup>o-r</sup>	118.4 <sup>tu</sup>	42.1 <sup>p-t</sup>	221.5 <sup>a-d</sup>	73.0 <sup>ab</sup>
	52	175.2 <sup>o-r</sup>	48.9 <sup>p-t</sup>	90.8 <sup>p-t</sup>	126.3 <sup>r-u</sup>	41.9 <sup>p-t</sup>	219.3 <sup>b-g</sup>	75.1 <sup>a</sup>
	53	193.0 <sup>j-o</sup>	66.2 <sup>shi</sup>	119.2 <sup>sh</sup>	126.8 <sup>r-u</sup>	53.1 <sup>j-m</sup>	217.4 <sup>b-h</sup>	70.0 <sup>a-d</sup>
	54	160.5 <sup>r-u</sup>	45.7 <sup>stu</sup>	86.1 <sup>rst</sup>	114.8 <sup>uv</sup>	40.4 <sup>r-u</sup>	220.8 <sup>b-e</sup>	72.0 <sup>abc</sup>
	Grand mean	200.9	56.0	104.6	145.0	48.6	210.6	68.6
±S.D.	±33.3	±17.7	±36.1	±19.4	±19.0	±8.4	±4.8	
P-value (p<0.01)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

<sup>1</sup> จำนวนสายพันธุ์ของมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.01 และตัวอักษร a b c แยกต่างจากตัวอักษร A B C)

### 3. การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล

จากการวิเคราะห์รีเกรสชันแบบเส้นตรงเชิงเดี่ยวและทดสอบความแปรปรวน พบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลและค่าความหนืดของแป้ง โดยที่เครื่องหมายโมเลกุล MeES959 มีความสัมพันธ์กับลักษณะ PTi และ PT ซึ่งมีค่า R<sup>2</sup> เท่ากับ 2.61 และ 2.43% ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุล MeES1019 สัมพันธ์กับลักษณะ PT และมีค่า R<sup>2</sup> เท่ากับ 4.63% สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล SSR13 มีความสัมพันธ์กับลักษณะ PTi และ PT มีค่า R<sup>2</sup> เท่ากับ 9.58 และ 2.89% ตามลำดับ และเครื่องหมายโมเลกุล EME81 มีความสัมพันธ์กับลักษณะ HS FV SB และ PT ด้วยค่า R<sup>2</sup> เท่ากับ 6.84 5.60 4.17 และ 3.17% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกกลุ่มของลักษณะความหนืดของแป้ง พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล EME81 สามารถจัดแบ่งกลุ่มค่าเฉลี่ยของลักษณะความหนืดแป้งตามกลุ่มของจีโนไทป์ (Genotypic class) ได้ โดยที่จีโนไทป์แบบ 1/1 และ 1/2 มีค่า PV HPV CPV และ SB สูงกว่ากลุ่มที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ 2/2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (อัลลีล 1 เป็นอัลลีลที่ให้ลักษณะ PV HPV CPV และ SB สูง) ส่วนกลุ่มที่มีค่า PT และ PTi ต่ำ มีจีโนไทป์เป็นแบบ 1/1 และ 1/2 (อัลลีล 1 เป็นอัลลีลที่ให้ลักษณะ PT และ PTi ต่ำ) (ภาพที่ 1) สำหรับเครื่องหมาย MeES959 MeES1019 และ SSR13 ไม่สามารถแยกกลุ่มความหนืดของแป้งตามลักษณะจีโนไทป์ได้ จากการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล พบว่าเครื่องหมาย MeES959 MeES1019 และ SSR13 ให้จำนวนอัลลีล 4 7 และ 8 อัลลีล ตามลำดับ ทำให้ไม่เหมาะสมในการเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกเนื่องจากอัลลีลแต่ละแบบไม่สามารถแยกกลุ่มของจีโนไทป์ได้ ซึ่งแตกต่างจากเครื่องหมาย EME81 ที่ให้จำนวนอัลลีลเท่ากับ 2 อัลลีล และมีจีโนไทป์ 3 แบบ สามารถแยกกลุ่มของลักษณะความหนืดแป้งตามกลุ่มของจีโนไทป์ได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัลลีล 1 ที่ปรากฏในรุ่นลูกเป็นอัลลีลที่กำหนดลักษณะความหนืดของแป้งสูงหรือต่ำ เช่น เมื่อต้องการคัดเลือกมันสำปะหลังลูกผสมที่มีค่า PT ต่ำ ควรเลือกต้นที่ปรากฏอัลลีล 1 เสมอ (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Srisawad *et al.* (2018, pp. 493-510) ที่ได้ยืนยันผลการวิเคราะห์ QTL ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะ PT ในมันสำปะหลังชั่วรุ่นที่ 1 ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ท้านาที่ โดยพบเครื่องหมาย EME81 มีความสัมพันธ์กับค่า PT อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.0001) โดยจีโนไทป์ nn และ np ให้ลักษณะ PT ต่ำ และ PT สูง ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์รีเกรสชันแบบเส้นตรงเชิงเดี่ยวด้วยวิธี SMA ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลและค่าความหนืดของแป้ง พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้



นี้มีความสัมพันธ์กับลักษณะ HS FV SB PTi และ PT อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แต่มีค่า  $R^2$  ค่อนข้างต่ำ (2.40-9.58%) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากประชากรลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 แต่ละคู่ผสมมีจำนวนน้อย (54 ต้น) ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Udoh *et al.* (2017, pp. 123-134) ที่ใช้ประชากรมันสำปะหลังจำนวน 650 สายพันธุ์สำหรับประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมาย SNP ที่สัมพันธ์กับปริมาณแคโรทีนอยด์ นอกจากนี้ลักษณะความหนืดของแป้งมันสำปะหลังมีค่าอัตราพันธุกรรม (Heritability) ต่ำ (Thanyasirawat *et al.*, 2014, pp. 197-207) จึงทำให้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวอธิบายความแปรปรวนของลักษณะความหนืดของแป้งได้น้อย อย่างไรก็ตาม ถึงแม้เครื่องหมาย EME81 จะให้ค่า  $R^2$  ต่ำ แต่ยังคงมีศักยภาพในการเป็นเครื่องหมายช่วยคัดเลือกลักษณะความหนืดของแป้งได้

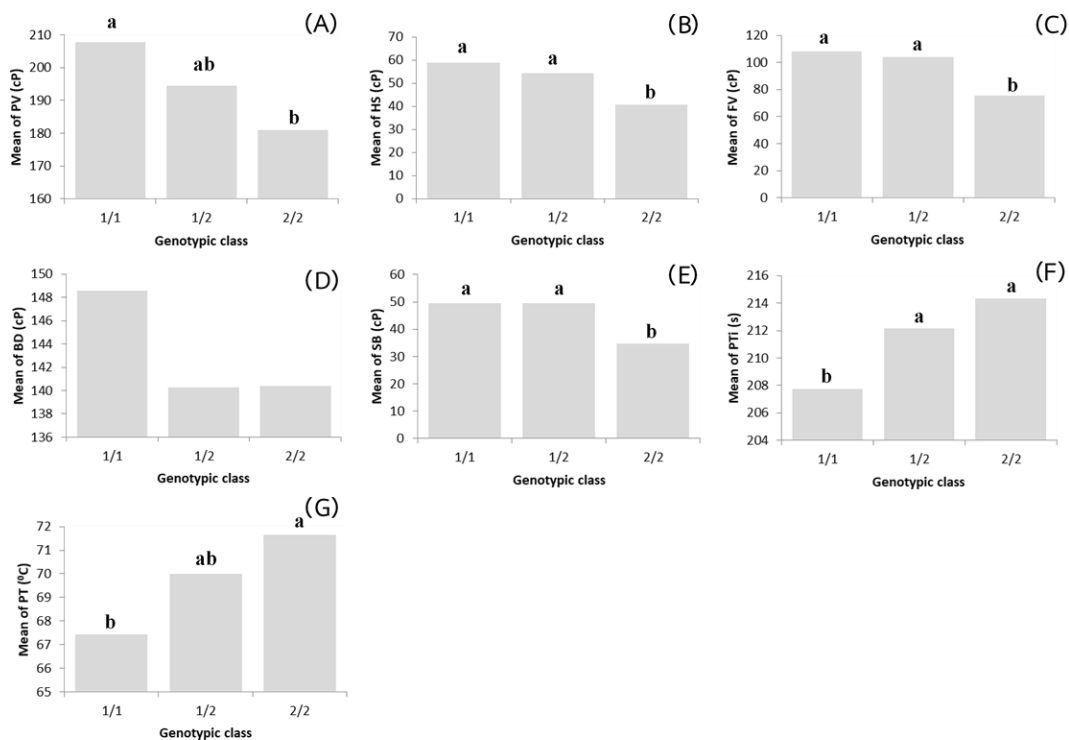
**ตารางที่ 3** การวิเคราะห์รีเกรสชันแบบเส้นตรงเชิงเดี่ยวระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลและค่าความหนืดของแป้ง

Molecular marker	Trait	P-value	$R^2$ (%)	Significant (p<0.05)
MeES959	PV	0.272	0.75	ns
	HS	0.394	0.45	ns
	FV	0.162	1.21	ns
	BD	0.271	0.76	ns
	SB	0.064	2.13	ns
	PTi	0.039	2.61	*
	PT	0.049	2.40	*
MeES1019	PV	0.933	0.00	ns
	HS	0.874	0.02	ns
	FV	0.641	0.14	ns
	BD	0.996	0.00	ns
	SB	0.462	0.34	ns
	PTi	0.121	1.49	ns
	PT	0.005	4.63	*
SSRY13	PV	0.535	0.24	ns
	HS	0.174	1.15	ns
	FV	0.160	1.23	ns
	BD	0.864	0.02	ns
	SB	0.164	1.21	ns
	PTi	0.000	9.58	*
	PT	0.031	2.89	*
EME81	PV	0.095	4.13	ns
	HS	0.001	6.84	*
	FV	0.002	5.60	*
	BD	0.165	1.20	ns
	SB	0.009	4.17	*
	PTi	0.115	1.54	ns
	PT	0.023	3.17	*

ns: เครื่องหมายโมเลกุลและลักษณะความหนืดของแป้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)

\* เครื่องหมายโมเลกุลและลักษณะความหนืดของแป้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)





ภาพที่ 1 การจัดแบ่งกลุ่มค่าเฉลี่ยของลักษณะความหนืดแป้ง ได้แก่ ค่า PV (A) ค่า HS (B) ค่า FV (C) ค่า BD (D) ค่า SB (E) PTi (F) และค่า PT (G) ตามกลุ่มของจีโนไทป์ (Genotypic class) 1/1 1/2 และ 2/2 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล EME81 (ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a ab และ b ที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  โดย DMRT)

### สรุปผลการวิจัย

จากการประเมินเครื่องหมายโมเลกุล MeES959 MeES1019 SSR13 และ EME81 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะ PT ของมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 ที่ได้จากคู่ผสม 13 คู่ จำนวน 54 สายพันธุ์ โดยวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ พบว่ามันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 มีจำนวนอัลลีล 2-8 อัลลีล ซึ่งอัลลีลที่เพิ่มขึ้นถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่ที่ใช้เป็นคู่ผสม (อัลลีลที่เพิ่มขึ้นแตกต่างจากอัลลีลของพันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ห่านาที่ใช้เป็นคู่ผสมเพื่อสร้างลูกผสมในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 เครื่องหมาย) ส่วนคุณสมบัติด้านความหนืดของแป้งในมันสำปะหลังลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแสดงลักษณะการกระจายตัวแบบต่อเนื่อง นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุล EME81 มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกลูกผสมที่มีคุณสมบัติด้านความหนืดของแป้งสูงหรือต่ำ เนื่องจากมีอัลลีลเพียง 2 แบบ โดยอัลลีล 1 เป็นอัลลีลที่ให้ลักษณะ PT ต่ำ และสามารถจัดกลุ่มมันสำปะหลังเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะของจีโนไทป์ (1/1 1/2 และ 2/2) ได้

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนงบประมาณทุนอุดหนุนวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (รหัสโครงการวิจัย ร-ม 28.58)

### เอกสารอ้างอิง

Chhabra, R., Hossain, F., Muthusamy, V., Baveja, A., Mehta, B. & Zunjare, R.U. (2019). Mapping and Validation of *Anthocyanin1* Pigmentation Gene for Its Effectiveness in Early Selection of *shrunken2* Gene Governing Kernel Sweetness in Maize. *Journal of Cereal Science*, 87, 258-265.



- Chukwu, O. & Abdullahi, H. (2015). Effects of Moisture Content and Storage Period on Proximate Composition, Microbial Counts and Total Carotenoids of Cassava Flour. *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, 2(11), 753-763.
- Li, L., Tacke, E., Hofferbert, H. R., Lübeck, J., Strahwald, J., Draffehn, A. M., et al. (2013). Validation of Candidate Gene Markers for Marker-Assisted Selection of Potato Cultivars with Improved Tuber Quality. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(4), 1039-1052.
- Mufumbo, R., Baguma, Y., Kashub, S., Nuwamanya, E., Rubaihayo, P., Mukasa, S., et al. (2011). Amylopectin Molecular Structure and Functional Properties of Starch from Three Ugandan Cassava Varieties. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 3(9), 195-202.
- Nuwamanya, E., Baguma, Y., Emmambux, N. & Rubaihayo, P. (2010). Crystalline and Pasting Properties of Cassava Starch Are Influenced by Its Molecular Properties. *African Journal of Food Science*, 4(1), 8-15.
- Okogbenin, E., Egesi, C.N., Olasanmi, B., Ogundapo, O., Kahya, S., Hurtado, P., et al. (2012). Molecular Marker Analysis and Validation of Resistance to Cassava Mosaic Disease in Elite Cassava Genotypes in Nigeria. *Crop Science*, 52, 2576-2586.
- Oliveira, P.H.G.A.D., Barbosa, A.C.O., Diniz, R.P., Oliveira, E.J.D. & Ferreira, C.F. (2018). Molecular Marker Assisted Selection for Increasing Inbreeding in S1 Populations of Cassava. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 90(4), 3853-3869.
- Orazaly, M., Chen, P., Zhang, B., Florez-Palacios, L. & Zeng, A. (2018). Confirmation of SSR Markers and QTL for Seed Calcium Content and Hardness of Soybean. *Journal of Crop Improvement*, 32(1), 71-89.
- Pootakham, W., Shearman, J.R., Ruang-Areerate, P., Sonthirod, C., Sangsrakru, D., Jomchai, N., et al. (2014). Large-scale SNP Discovery Through RNA Sequencing and SNP Genotyping by Targeted Enrichment Sequencing in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *PLoS One*, 9(12), e116028.
- Srisawad, N., Worrakitrunsi, W., Sraphet, S., Boonseng, O., Smith, D.R. & Triwitayakorn, K. (2018). Dissection of Gene Loci Underlying Pasting Temperature in Cassava. *Journal of Crop Improvement*, 32(4), 493-510.
- Tembo, B., Sibiya, J., Tongoona, P. & Tembo, L. (2017). Validation of Microsatellite Molecular Markers Linked with Resistance to *Bipolaris sorokiniana* in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *The Journal of Agricultural Science*, 155(7), 1061-1068.
- Thanyasiriwat, T., Sraphet, S., Whankaew, S., Boonseng, O., Bao, J., Lightfoot, D.A., et al. (2014). Quantitative Trait Loci and Candidate Genes Associated with Starch Pasting Viscosity Characteristics in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Biology*, 16, 197-207.
- Toae, R., Sriroth, K., Rojanaridpiched, C., Vichukit, V., Chotineeranat, S., Wansuksri, R., et al. (2019). Outstanding Characteristics of Thai Non-GM Bred Waxy Cassava Starches Compared with Normal Cassava Starch, Waxy Cereal Starches and Stabilized Cassava Starches. *Plants*, 8, 447-460.
- Udoh, L.I., Gedil, M., Parkes, E.Y., Kulakow, P., Adesoye, A., Nwuba, C. et al. (2017). Candidate Gene Sequencing and Validation of SNP Markers Linked to Carotenoid Content in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Molecular Breeding*, 37, 123-134.