การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

The Study of Genetic Diversity of Cassava (*Manihot esculenta*) Using SSR Markers

สุภาวดี ง้อเหรียญ [1/] จีราพร แก่นทรัพย์ [1/] บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ [1/]
วิภาวี ชั้นโรจน์ [1/] สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ [2/] ประพิศ วองเทียม [3/]
Suphawadee Ngorian [1/] Jeeraporn Kansup [1/] Boonruanrat Ruangwised [1/]
Vipavee Chanroj [1/] Suwaluk Amawan [2/] Prapit Wongtiem [3/]

Received 16 Nov 2018/Revised 25 Jan 2019/Accepted 02 Feb 2019

ABSTRACT

Genetic research and development of cassava in Thailand have been limited due to insufficient information on genetic diversity of cassava varieties. This research aimed to investigate the genetic diversity and to analyze cluster of 18 cassava varieties collected at Rayong Field Crops Research Center, Department of Agriculture using SSR markers. It was conducted during October 2017 – September 2018. Results showed that 54 of 60 SSR markers used in this study were able to amplify DNA fragments from all varieties and generated polymorphic allele in total of 265 alleles varying from 1 – 8 allele per locus, with an average of 4.82 alleles per locus of which 263 alleles showed the polymorphic bands, with the percentage of 97.27%. Sizes of DNA fragments ranged from 85 – 597 base pairs. The Polymorphism Information Content (PIC) value ranged from 0.00 – 0.36, with an average of 0.24. Cluster analysis based on UPGMA and genetic relationships using NTSYSpc version 2.10 program showed similarity coefficient value ranging from 0.119 – 0.615, revealed two distinct groups, with cophenetic correlation (r) of 0.87, suggesting clear clustering. Therefore, SSR markers in this study were appropriate to identify the genetic differences and to select cassava varieties for breeding.

Key words : *Manihot esculenta*, SSR marker, Genetic diversity

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110
[2/] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง อ.เมือง จ.ระยอง 21150
[3/] สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพ 10900
[1/] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanyaburi District, Pathumthani Province 12110
[2/] Rayong Field Crops Research Center, Muang District, Rayong Province 21150
[3/] Expert Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900
[*] Corresponding author : finger__1234@yohoo.com

บทคัดย่อ

การวิจัยและพัฒนาด้านพันธุกรรมของมันสำปะหลังในประเทศไทยยังมีข้อจำกัด เนื่องจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังมีข้อมูลไม่ครบถ้วนเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอและการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง 18 ตัวอย่างพันธุ์ ที่ปลูกรวบรวมไว้ ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR โดยดำเนินการวิจัยระหว่างเดือนตุลาคม 2560 – กันยายน 2561 พบว่ามีไพรเมอร์ 55 คู่ จาก 60 คู่ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยวิธี PCR และจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี โดยพบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด 265 อัลลีล มีอัลลีลต่อตำแหน่ง 1 – 8 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 4.82 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกัน (polymorphic) จำนวน 263 อัลลีล คิดเป็น 97.27% ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 85 – 597 คู่เบส มีค่า Polymorphism Information Content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.00 – 0.36 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.24 เมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.10 พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.119 – 0.615 สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังได้เป็น 2 กลุ่ม โดยมีค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.87 ซึ่งแสดงว่ามีการจัดกลุ่มได้ดี และแสดงความแตกต่างอย่างชัดเจน เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่คัดเลือกได้ในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมและคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : มันสำปะหลัง, เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR, ความหลากหลายทางพันธุกรรม

บทนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) เป็นพืชอาหารที่สำคัญของโลก และเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในประเทศไทย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ตั้งแต่ส่วนยอดจนถึงรากสะสมอาหาร แป้งมันสำปะหลังสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและทางการแพทย์ นอกจากนี้ยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และพลังงานทดแทน จากรายงานการรวบรวมพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยที่ผ่านมาได้มีการนำเข้าพันธุ์มันสำปะหลังจากประเทศต่าง ๆ ได้แก่ มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และหมู่เกาะเวอร์จินไอร์แลนด์ และมีความร่วมมือกันในด้านการวิจัยและพัฒนาเพื่อการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังระหว่างหน่วยงานภาครัฐกับศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (International Center for Tropical Agriculture: CIAT) ขึ้นในปี พ.ศ. 2526 โดยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมจาก CIAT และมีการวิจัยปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังโดยการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์พื้นเมืองกับพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ได้มันสำปะหลังพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงแนะนำสู่เกษตรกร ปัจจุบันพันธุ์มันสำปะหลังมีเก็บรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวนมาก ได้แก่ พันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ป่าที่มีอยู่ในประเทศ พันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศเดิม พันธุ์ที่ได้จากปรับปรุงพันธุ์ในประเทศ จำนวน

260 พันธุ์ และพันธุ์ที่ได้จากศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (CIAT) จำนวน 540 พันธุ์ ซึ่งมีการนำเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังที่มีอยู่มาใช้ประโยชน์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีตามต้องการ เช่น ผลผลิตสูง ปริมาณแป้งสูง ไซยาไนด์ต่ำ โปรตีนสูง และต้านทานต่อโรคและแมลง เป็นต้น

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังโดยทั่วไปอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ในการจำแนกพันธุ์ ซึ่งอาจทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดของพันธุ์มันสำปะหลังออกจากกันได้อย่างชัดเจน ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ โดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง ซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้อย่างชัดเจน รวดเร็ว มีความแม่นยำและประสิทธิภาพสูง โดยเทคนิคที่มีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการตรวจสอบพันธุ์ เช่น RAPD (Randomly Amplied Polymorphic DNA) (Pillai *et al*., 2004), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Fregene *et al*., 1997; Jorge *et al*., 2000), SSR (Simple Sequence Repeat) (Fregene *et al*., 1997), AFLP (Amplied Fragment Length Polymophisms) (Elais *et al*., 2000), SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) (Vsquez and Lpez, 2014) และ SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) (Lpez *et al*., 2005) เป็นต้น เทคนิคต่าง ๆ เหล่านี้ ทำให้เกิดความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ (polymorphism) สามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้และจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ มีทั้งข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน สำหรับเทคนิคการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (Simple Sequence Repeat) หรือ microsatellites เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างแบบข่มร่วม (co-dominant) โดยแยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็น homozygous และ heterozygous ออกจากกันได้ จึงนำมาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของมันสำปะหลังได้เป็นอย่างดี (Hokanson *et al*., 1998) อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชได้อย่างชัดเจน แม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง ปัจจุบันการวิจัยและพัฒนาด้านพันธุกรรมของมันสำปะหลังในประเทศไทยยังมีข้อจำกัด เนื่องจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังยังมีข้อมูลไม่ครบถ้วนเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR เข้ามาช่วยในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 18 ตัวอย่างพันธุ์ ที่เก็บรวบรวมไว้ ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร จ.ระยอง และเพื่อคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่เหมาะสมสำหรับใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ และกลุ่มพันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีต่อไป ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ เพื่อการบ่งชี้ลักษณะประจำพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลัง

นำท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จำนวน

18 ตัวอย่างพันธุ์ ได้แก่ Rayong 1 (R1), Rayong 2 (R2), Rayong 3 (R3), Rayong 5 (R5), Rayong 7 (R7), Rayong 9 (R9), Rayong 11 (R11), Rayong 60 (R60), Rayong 90 (R90), Huai Bong 60 (HB60), Kasetsart 50 (KU50), Sriracha 1, Hanatee, H.P.1, H.P.8 (VIC), Java 2, Yellow Root และ Wild 1 มาปลูกในกระถางพลาสติกที่ใส่วัสดุปลูก ขนาด 18 นิ้ว และติดป้ายชื่อระบุพันธุ์มันสำปะหลัง หลังจากแตกใบอ่อนใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กก./ไร่ เมื่ออายุ 1 เดือน นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Plant Genomic DNA Purication (Tiangen Biotech Co, China) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวัดค่าความเข้มข้น (Optical Density:O.D.) ของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ต่อไป

2. การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิค SSR

ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสไพรเมอร์ชนิด SSR ของมันสำปะหลังจากรายงานวิจัยของ Mba *et al*., (2001) และ Raghu *et al*., (2007) โดยค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล NCBI (le://H:\Manihot\MapViewer.htm) และสังเคราะห์ไพรเมอร์ จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ (Table 1) ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 18 ตัวอย่างพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ชนิด SSR โดยใช้ชุด GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 60-100 นาโนกรัม, 1X GoTaq® Green Master Mix, 0.4 M upstream primer, 0.4 M downstream primer ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 95°ซ. 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°ซ. 30 วินาที, Annealing 55-64°ซ. 45 วินาที, Extension 70°ซ. 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension 72°ซ. 10 นาที อีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp DNA ladder marker (Fermentas, USA) พร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA

3. การวิเคราะห์ PCR Product ด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced

คัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR และสภาวะของปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสม ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลังทั้ง 18 ตัวอย่างพันธุ์ และให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่เหลือจากข้อ 2 ไปเข้าเครื่องวิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ผลภาพ (QIAxcel Advanced System) โดยใช้ชุดน้ำยาที่มีความละเอียดสูง QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen, USA) ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ในระดับความห่างไม่น้อยกว่า 3 – 5 คู่เบส โดยจะแสดงผลในรูปแบบของกราฟ (eletropherograms) และแบบภาพขนาดของแถบดีเอ็นเอ เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลัง

Table 1 List of 60 SSR primers used in the study of genetic diversity of 18 cassava varieties

Primer name	Sequence	Annealing tempera-ture(°C)	Primer name	Sequence	Annealing tempera-ture(°C)
SSRY4	F: ATAGAGCAGAAGTGCAGGCG	62	SSRY148	F: GGCTTCATCATGGAAAAACC	62
	R: CTAACGCACACGACTACGGA			R: CAATGCTTTACGGAAGAGCC	
SSRY9	F: ACAATTCATCATGAGTCATCAACT	62	SSRY149	F: AGCAGAGCATTTACAGCAAGG	62
	R: CCGTTATTGTTCCTGGTCCT			R: TGTGGAGTTAAAGGTGTGAATG	
SSRY12	F: AACTGTCAAACCATTCTACTTGC	65	SSRY151	F: AGTGGAAATAAGCCATGTGATG	64
	R: GCCAGCAAGGTTTGCTACAT			R: CCCATAATTGATGCCAGGTT	
SSRY19	F: TGTAAGGCATTCCAAGAATTATCA	63	SSRY154	F: ACAATGTCCCAATTGGAGGA	55
	R: TCTCCTGTGAAAAGTGCATGA			R: ACCATGGATAGAGCTCACCG	
SSRY20	F: CATTGGACTTCCTACAAATATGAAT	60	SSRY155	F: CGTTGATAAAGTGGAAAGAGCA	62
	R: TGATGGAAAGTGGTTATGTCCTT			R: ACTCCACTCCCGATGCTCGC	
SSRY21	R: CAACAATTGGACTAAGCAGCA	60	SSRY160	F: CTGGCTCTTCCAGACACCTT	62
	F: CCTGCCACAATATTGAAATGG			R: GGCAAGAGAAGCCATAAAGC	
SSRY32	F: CAAATTTGCAACAATAGAGAACA	60	SSRY161	F: AAGGAACACCTCTCCTAGAATCA	60
	R: TCCACAAAGTCGTCCATTACA			R: CCAGCTGTATGTTGAGTGAGC	
SSRY34	F: TTCCAGACCTGTTCCACCAT	60	SSRY164	F: TCAAACAAGAATTAGCAGAACTGG	60
	R: ATTGCAGGGATTATTGCTCG			R: TGAGATTTCGTAATATTCATTTCACTT	
SSRY38	F: GGCTGTTCGTGATCCTTATTAAC	60	SSRY169	F: ACAGCTCTAAAAACTGCAGCC	57
	R: GTAGTTGAGAAAACTTTGCATGAG			R: AACGTAGGCCCTAACTAACCC	
SSRY49	F: TGAAAATCTCACTGGCATTATTT	60	SSRY171	F: ACTGTGCCAAAATAGCCAAATAGT	64
	R: TGCAACCATAGTGCCAAGC			R: TCATGAGTGTGGGATGTTTTTATG	
SSRY51	F: AGGTTGGATGCTTGAAGGAA	60	SSRY172	F: TCCAACTGGCTTAACTTGAGG	55
	R: GGATGCAGGAGTGCTCAACT			R: TTTAGTTTTTGAAACAATGATGAAA	
SSRY59	F: GCAATGCAGTGAACCATCTTT	63	SSRY177	F: ACCACAAACATAGGCACGAG	63
	R: CGTTTGTCCTTTCTGATGTTC			R: CACCCAATTCACCAATTACCA	
SSRY62	F: CATTCTCCAGGAAAGTCATTTTG	55	SSRY179	F: CAGGCTCAGGTGAAGTAAAGG	64
	R: AGCTCATGCCATACAAGCAA			R: GCGAAAGTAAGTCTACAACTTTTCTAA	
SSRY63	F: TCAGAATCATCTACCTTGGCA	55	SSRY180	F: CCTTGGCAGAGATGAATTAGAG	64
	R: AAGACAATCATTTTGTGCTCCA			R: GGGGCATTCTACATGATCAATAA	
SSRY64	F: GACAAGTCGTATATGTAGTATTCACGC	64	SSRY181	F: GGTAGATCTGGATCGAGGAGG	66
	R: GCAGAGGTGGCTAACGAGAC			R: CAATCGAAACCGACGATACA	
SSRY69	F: CGATCTCAGTCGATACCCAAG	64	SSRY269	F: AATAGTTTCAGGCAAGGGTGA	63
	R: CACTCCGTTGCAGGCATTA			R: TCAATCACAAGCCAGACACA	
SSRY77	F: CAGGAGGTGGCAGATTTTGT	60	SSRY280	F: TGTGCATGGAGAGATTGACAG	55
	R: GCATGTTCCACCTGCATAAG			R: AAGTCGTTTATTGCCGATGC	
SSRY82	F: TGTGACAATTTTCAGATAGCTTCA	60	NS77	F: GGACGCACAGTATTCTCCAC	55
	R: CACCATCGGCATTAAACTTTG			R: GATAATGGCAAGACCGGA	
SSRY100	F: ATCCTTGCCTGACATTTTGC	63	NS78	F: AGCAATGCCTTGATCTTGAG	64
	R: TTCGCAGAGTCCAATTGTTG			R: AAGATGGCAATTCAAGCAAG	
SSRY102	F: TTGGCTGCTTTCACTAATGC	55	NS169	F: GTGCGAAATGGAAATCAATG	65
	R: TTGAACACGTTGAACAACCA			R: GCCTTCTCAGCATATGGAGC	
SSRY103	F: TGAGAAGGAAACTGCTTGCAC	58	NS189	F: TGGGCTGTTCGTGATCCTTA	55
	R: CAGCAAGACCATCACCAGTTT			R: CATGAGTTTAAAAATTATCACATCCG	
SSRY105	F: CAAACATCTGCACTTTTGGC	64	NS890	F: TAAATTGGGGGTTCTTGCTC	63
	R: TCGAGTGGCTTCTGGTCTTC			R: TGCTTACTCTTTGATTCCACG	
SSRY106	F: GGAAACTGCTTGCACAAAGA	60	NS911	F: TGTTGTTCAGACGATGTCCAA	55
	R: CAGCAAGACCATCACCAGTTT			R: TTGAAGCAGTTATGAACCGT	
SSRY108	F: ACGCTATGATGTCCAAAGGC	62	NS912	F: GAGAACTCAACCCCATACC	55
	R: CATGCCACATAGTTCGTGCT			R: AAGGGACACGACTTGGTCAC	
SSRY109	F: TGCTAATTGCAGGAAATAGGAT	62	NS928	F: GATACCCACAAGCCCAAAGA	55
	R: GCAGCTTTTTAGCATAACAATCAA			R: GACCCACCCATCCACTAGAA	
SSRY110	F: TTGAGTGGTGAATGCGAAAG	55	NS945	F: GCAAGGCTCCATTAAAAGTCC	65
	R: AGTGCCACCTTGAAAGAGCA			R: TGTTTGAAATAGTGTTGCTTCTTGA	
SSRY132	F: CTTTTTGCCAGTCTTCCTGC	55	NS1010	F: TAGCGATTGCATTTTACCCC	55
	R: TGTCCAATGTCTTCCTTTCCTT			R: ACTGCAAAGCCCTTGAGAGA	
SSRY135	F: CCAGAAACTGAAATGCATCG	60	NS1012	F: TGTTGATACAATCTAAATGTAGCCTTC	60
	R: AACATGTGCGACAGTGATTG			R: TGTTGAATCCCACATTGGTG	
SSRY141	F: TCCAAAATCTTGGTCATTTTGA	60	NS1016	F: CTGAAAGGGAATTTCATGCC	60
	R: TGCTGTGATTAAGGAACCAACTT			R: TGGACTTCGTAATTTTCTGCAC	
SSRY147	F: GTACATCACCACCAACGGGC	55	NS1018	F: GTGCCATGGCTTTGCTATCT	45
	R: AGAGCGGTGGGGCGAAGAGC			R: AGAACATTTCCAGCACACCC	

4. การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 บันทึกข้อมูลขนาดแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่ โดยให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ มีค่าเท่ากับ 0

4.2 วิเคราะห์หาค่า Polymorphic Information Content (PIC) จากข้อมูล genotype เป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่แสดงความหลากหลายของอัลลีลที่ได้จากแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้สูตรในการคำนวณ คือ

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 - 2\left[\sum_{i=1}^{n-1}\sum_{j=i+1}^{n} p_i^2 p_j^2\right]$$

กำหนดให้ค่า pi, pj เป็นความถี่ของอัลลีล i และ j ตามลำดับ และ n เป็นจำนวนอัลลีล (Botstein *et al.*, 1980)

4.3 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (cluster analysis) ด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) ของมันสำปะหลัง จำนวน 18 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-pc) version 2.10 (Rohlf, 2000)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิค SSR

ไพรเมอร์ชนิด SSR ที่คัดเลือกมาจำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ (Table 1) เพื่อใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 18 ตัวอย่างพันธุ์ พบว่า มีไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ หรือคิดเป็น 92% ของเครื่องหมายสามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี PCR และมีไพรเมอร์ที่ไม่สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 5 คู่ไพรเมอร์ คือ SSRY62, SSRY172, NS77, NS912 และ NS1018 ซึ่งการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่า การจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังยังไม่ชัดเจน เนื่องจากมันสำปะหลังบางพันธุ์มีขนาดของดีเอ็นเอต่างกันเพียงเล็กน้อย (Figure 1) จึงได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยวิธี PCR และจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ดี จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ นำมาวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอของมันสำปะหลังทั้ง 18 ตัวอย่างพันธุ์ ด้วยเครื่อง QIAxcel Advance พบว่า ไพรเมอร์ชนิด SSR ทุกคู่ไพรเมอร์ สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ในระดับที่แตกต่างกันเพียง 3 – 5 เบส ซึ่งผลที่ได้มีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ (Figure 2)

การวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จำนวน 18 ตัวอย่างพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ชนิด SSR ทุกคู่ไพรเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ดี โดยพบอัลลีลที่เกิดขึ้นทั้งหมด จำนวน 265 อัลลีล มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งตั้งแต่ 1–8 อัลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.82 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกัน (polymorphic) จำนวน 263 อัลลีล คิดเป็น 97.27% โดยไพรเมอร์ที่พบอัลลีลมากที่สุด จำนวน 8 อัลลีล คือ SSRY100 SSRY151 SSRY177 และ NS78 ส่วนไพรเมอร์ที่พบอัลลีลน้อยที่สุด จำนวน 1 อัลลีล คือ SSRY102 ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 85 – 597 คู่เบส การวิเคราะห์ค่า Polymorphism Information Content (PIC) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PowerMarker 3.25 พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.00–0.36 โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.24 โดยไพรเมอร์ที่มีค่า PIC สูงสุด คือ SSRY103 และไพรเมอร์ที่มีค่า PIC ต่ำสุด คือ SSRY102 (Table 2)

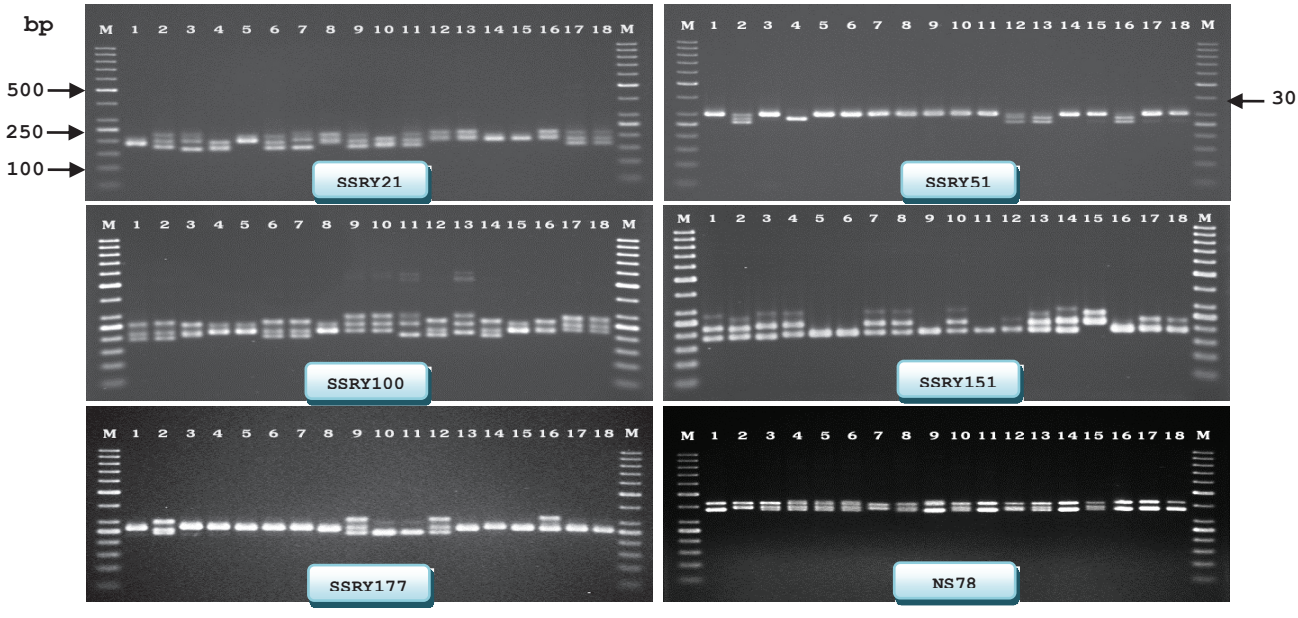

Figure 1 PCR amplication proles of 18 cassava varieties with SSRY21, SSRY51, SSRY100, SSRY151, SSRY177 and NS78, Lane M = 50 bp DNA Ladder, Lane 1 = Rayong 1, Lane 2 = Rayong 2, Lane 3 = Rayong 3, Lane 4 = Rayong 5, Lane 5 = Rayong 7, Lane 6 = Rayong 9, Lane 7 = Rayong 11, Lane 8 = Rayong 60, Lane 9 = Rayong 90, Lane 10 = Huai Bong 60, Lane 11 = Kasetsart 50, Lane 12 = Sriracha 1, Lane 13 = Hanatee, Lane 14 = H.P.1, Lane 15 = H.P.8 (VIC), Lane 16 = Java 2, Lane 17 = Yellow Root, Lane 18 = Wild 1

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในประชากรมันสำปะหลัง จำนวน 18 ตัวอย่างพันธุ์ ที่ประเมินโดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.119 – 0.615 โดยพันธุ์ที่มีค่า similarity coefficient สูงสุด คือ R5 กับ HB60 มีค่าดัชนีความเหมือนสูงสุด คือ 0.615 (พันธุ์ HB60 ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง R5 X KU50) รองลงมา คือ R5 และ R3 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.612 (พันธุ์ R5 ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง 27-77-10 X R3) และพันธุ์ที่มีค่า similarity coefficient ต่ำสุด คือ Sriracha 1 กับ Wild 1 (Table 3) เมื่อนำค่า similarity matrix ที่ได้มาทำการวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังทั้ง 18 ตัวอย่างพันธุ์ ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย Rayong 1 (R1), Sriracha 1 และ Hanatee และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย Rayong 2 (R2), Rayong 3 (R3), Rayong 5 (R5), Huai Bong 60 (HB60), Rayong 7 (R7), Rayong 60 (R60), Rayong 90 (R90), H.P.8 (VIC), JAVA 2, Kasetsart 50 (KU50), H.P.1, Rayong 9 (R9), Rayong 11 (R11), Yellow Root และ Wild 1 (Figure 3) และเมื่อวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) พบว่า ค่า r มีค่าเท่ากับ 0.86 แสดงถึงความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่มมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นค่าบวก หมายความว่า ค่า correlation coefficient

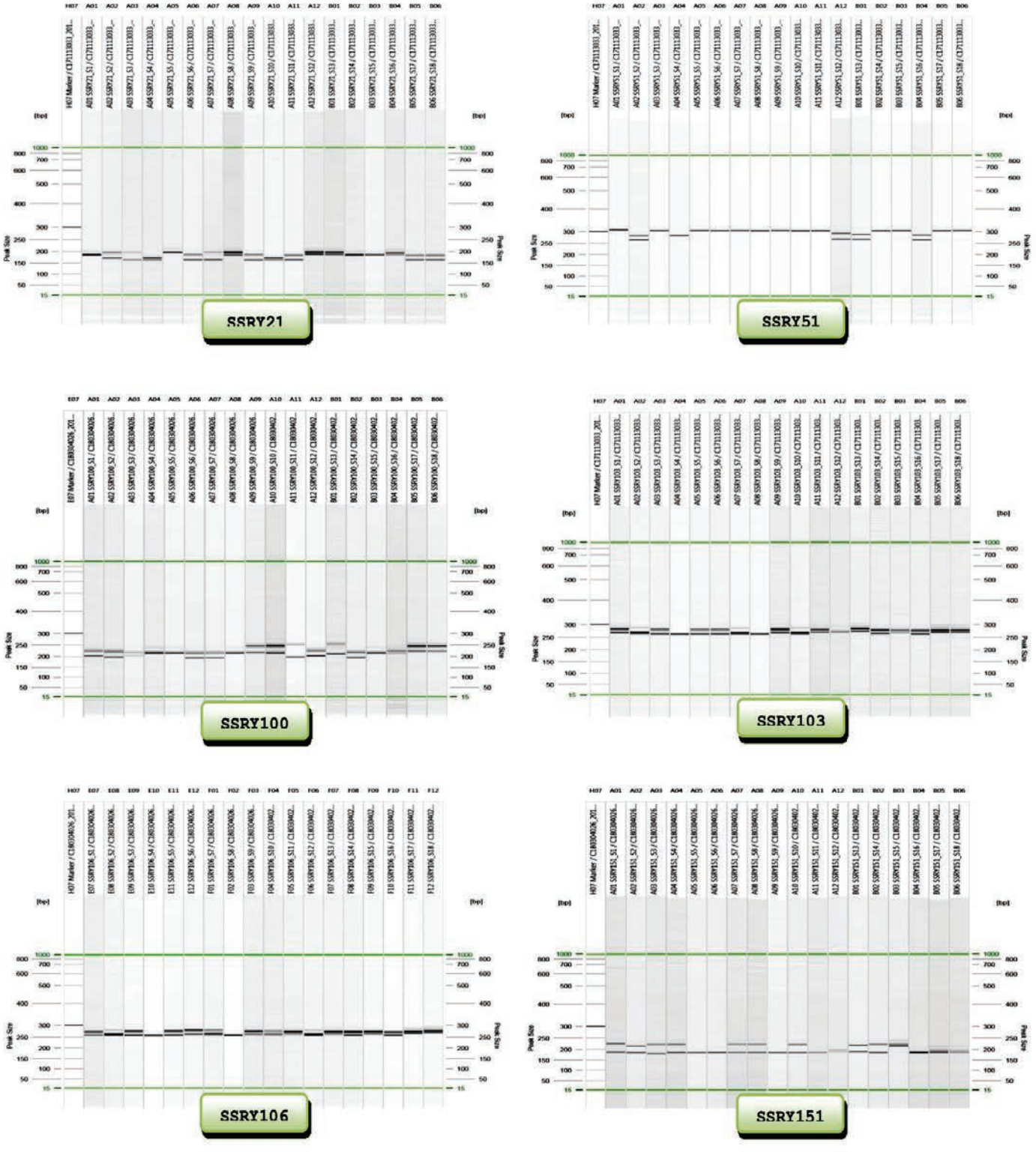

Figure 2 PCR amplication proles of 18 cassava varieties with SSRY21, SSRY51, SSRY100, SSRY103, SSRY106 and SSRY151 marker using QIAxcel Advanced System

Table 2 The number of alleles per locus (primer), size of alleles (bp), % polymorphic and polymorphism information content (PIC) of 18 cassava varieties using 55 SSR markers

Primer name	Number of Alleles	Number of Polymorphic	% Polymorphic	Size of alleles (bp)	Mean of alleles (bp)	Polymorphism Information Contents (PIC)
SSRY4	7	7	100	264-319	282	0.2114
SSRY9	7	7	100	253-292	272	0.2676
SSRY12	3	3	100	259-292	266	0.2870
SSRY19	7	7	100	206-236	219	0.2753
SSRY20	4	4	100	128-161	150	0.2374
SSRY21	4	4	100	163-197	181	0.3298
SSRY32	3	3	100	289-309	305	0.1732
SSRY34	5	5	100	274-310	288	0.2543
SSRY38	2	1	50	107-125	111	0.1430
SSRY49	7	7	100	269-315	296	0.1693
SSRY51	5	5	100	264-307	293	0.2101
SSRY59	3	3	100	146-164	155	0.3008
SSRY63	4	4	100	284-300	290	0.2918
SSRY64	5	5	100	194-213	201	0.2582
SSRY69	4	4	100	222-257	241	0.2868
SSRY77	4	4	100	269-302	280	0.1335
SSRY82	7	7	100	185-222	208	0.2433
SSRY100	8	8	100	193-256	220	0.2954
SSRY102	1	0	0	179-183	180	0.0000
SSRY103	4	4	100	263-284	272	0.3630
SSRY105	6	6	100	196-237	225	0.2666
SSRY106	6	6	100	256-280	266	0.3029
SSRY108	4	4	100	174-211	190	0.3046
SSRY109	3	3	100	120-148	125	0.2164
SSRY110	5	5	100	248-269	257	0.1711
SSRY132	2	2	100	200-207	202	0.2392
SSRY135	5	5	100	243-267	256	0.2853
SSRY141	4	4	100	248-262	255	0.2695
SSRY147	4	4	100	104-121	109	0.2560
SSRY148	4	4	100	107-122	115	0.2590
SSRY149	4	4	100	161-186	176	0.3212
SSRY151	8	8	100	180-224	198	0.1983
SSRY154	6	6	100	309-339	320	0.2309
SSRY155	4	4	100	152-167	160	0.2622
SSRY160	6	6	100	113-161	138	0.2068
SSRY161	6	6	100	180-245	206	0.2444
SSRY164	6	6	100	157-192	170	0.2135
SSRY169	4	4	100	85-109	103	0.1810
SSRY171	3	3	100	278-302	295	0.2082
SSRY177	8	8	100	242-281	263	0.2048
SSRY179	7	7	100	188-239	213	0.2353
SSRY180	6	6	100	164-196	171	0.1843
SSRY181	4	4	100	191-208	198	0.2804
SSRY269	6	6	100	161-196	177	0.2561
SSRY280	2	2	100	178-187	180	0.2392
NS78	8	8	100	364-427	392	0.2843
NS169	7	7	100	300-342	315	0.2654
NS189	3	3	100	94-110	98	0.2548
NS890	3	3	100	320-331	327	0.1926
NS911	4	4	100	115-137	122	0.2821
NS928	6	6	100	270-298	280	0.2346
NS945	6	6	100	384-415	394	0.2906
NS1010	5	5	100	571-597	580	0.2416
NS1012	2	2	100	356-369	359	0.2392
NS1016	4	4	100	342-396	367	0.2356
Mean	4.82		97.27		235	0.2416

Table 3 Genetic similarity coefficient of 18 cassava varieties using 55 SSR markers

CASE	R1	R2	R3	R5	R7	R9	R11	R60	R90	HB60	KU50	SRI RACHA1	HANATEE	H.P.1	H.P.8 (VIC)	JAVA2	YELLOW ROOT	WILD1
R1	1.000																	
R2	0.216	1.000																
R3	0.278	0.318	1.000															
R5	0.256	0.307	0.612	1.000														
R7	0.281	0.312	0.458	0.505	1.000													
R9	0.151	0.243	0.309	0.331	0.360	1.000												
R11	0.157	0.23	0.304	0.383	0.353	0.514	1.000											
R60	0.298	0.371	0.514	0.549	0.560	0.342	0.325	1.000										
R90	0.268	0.364	0.414	0.404	0.541	0.393	0.306	0.389	1.000									
HB60	0.244	0.265	0.486	0.615	0.485	0.328	0.391	0.472	0.525	1.000								
KU50	0.333	0.352	0.331	0.319	0.435	0.260	0.266	0.331	0.486	0.398	1.000							
SRIRACHA1	0.477	0.321	0.269	0.248	0.205	0.131	0.145	0.260	0.221	0.200	0.252	1.000						
HANATEE	0.353	0.223	0.209	0.188	0.182	0.134	0.148	0.209	0.198	0.205	0.278	0.299	1.000					
H.P.1	0.432	0.344	0.441	0.393	0.413	0.262	0.258	0.495	0.348	0.342	0.486	0.254	0.176	1.000				
H.P.8(VIC)	0.208	0.307	0.362	0.375	0.369	0.287	0.233	0.436	0.391	0.360	0.377	0.211	0.225	0.357	1.000			
JAVA2	0.281	0.321	0.375	0.464	0.395	0.242	0.267	0.460	0.368	0.397	0.333	0.235	0.279	0.381	0.425	1.000		
YELLOW ROOT	0.231	0.328	0.350	0.361	0.368	0.289	0.305	0.431	0.376	0.381	0.352	0.199	0.212	0.355	0.339	0.408	1.000	
WILD1	0.138	0.243	0.258	0.246	0.240	0.364	0.403	0.287	0.278	0.264	0.231	0.119	0.122	0.242	0.237	0.320	0.604	1.00

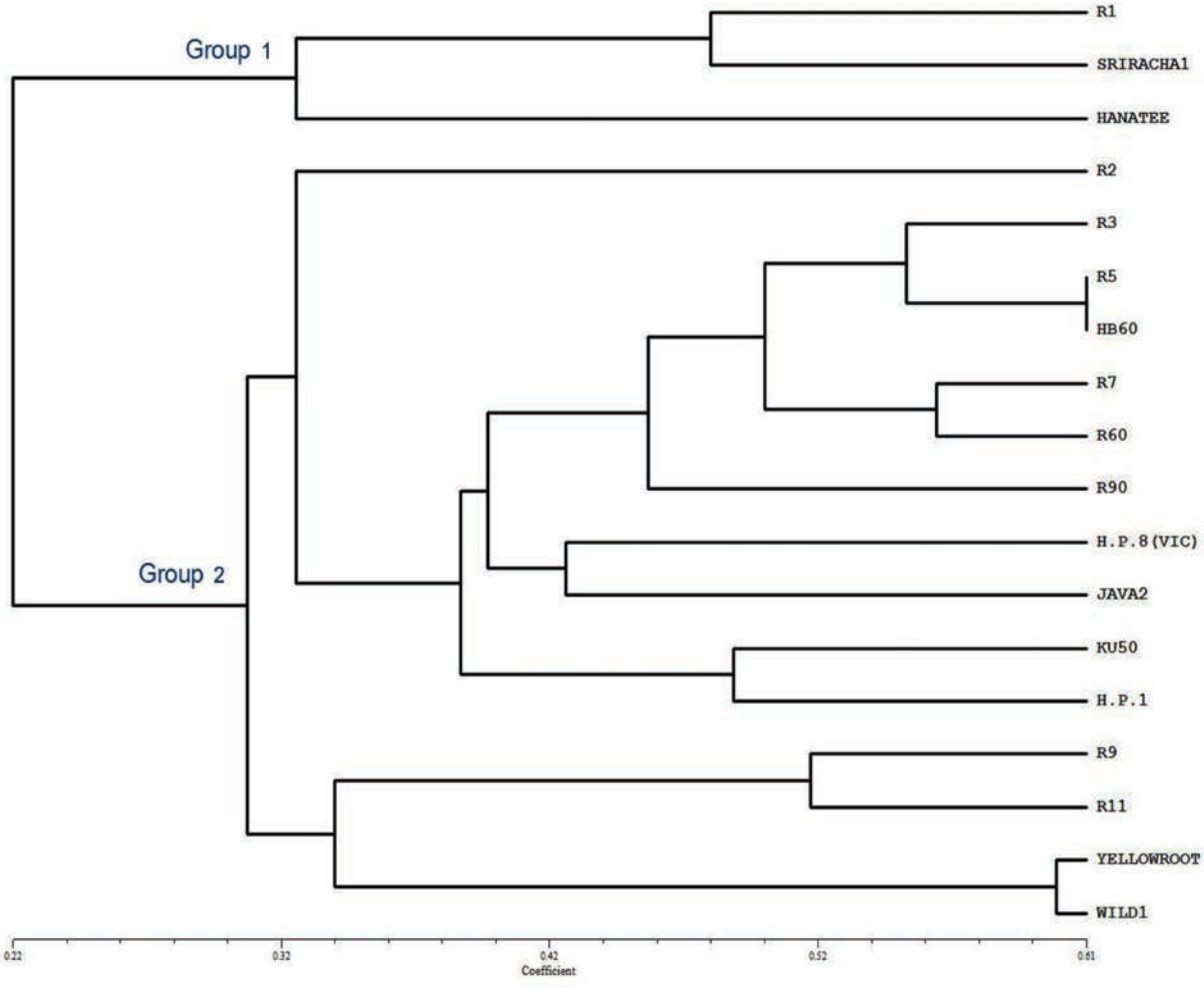

Figure 3 Dendrogram of 18 cassava varieties generated by UPGMA clustering using 55 SSR markers

และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ ค่า cophenetic correlation (r) เป็นค่าที่บอกถึงประสิทธิภาพในการจัดกลุ่ม โดยค่า cophenetic correlation ที่ต่ำกว่าหรืออยู่ระหว่าง 0.7 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ไม่น่าเชื่อถือ ถ้าค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มได้น่าเชื่อถือปานกลาง และถ้าค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มได้น่าเชื่อถือ และค่าอยู่ระหว่าง 0.9–1.0 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มได้น่าเชื่อถือ ดีมาก (Sirithunya *et al*., 2001) สามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความเหมาะสมเหล่านี้สำหรับนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในมันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์และกลุ่มที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดชนิด SSR พบว่า เป็นวิธีการที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้ดีมีความแม่นยำสูง สามารถทำซ้ำและได้ผลที่เหมือนเดิม ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลังได้ นอกจากนี้ ยังสามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในมันสำปะหลังกลุ่มพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีต่อไป สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการบ่งชี้ลักษณะประจำพันธุ์และสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง อีกทั้งยังสามารถนำไปเป็นแนวทางในการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังของไทยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการทรัพยากรเชื้อพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างใบและท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง สำหรับใช้ในการทดลองวิจัย ขอขอบคุณ คุณวีรยา คำแก้ว และคุณวัชรินทร์ ศรีประยูร ผู้ช่วยนักวิจัย สำหรับความช่วยเหลืองานวิจัยด้านต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

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

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

Fregene, M.; F. Angel; R. Gomez; F. Rodrignez; P. Chavarriaga; W.M. Roca; J. Tohme and M.W. Bonierbale. 1997. A molecular genetic map for cassava (*Manihiot*

esculenta Crantz). *Theor Appl Genet*. 95: 431 – 441.

Hokanson, S.C.; A.K. Szewc-McFadden; W.F. Lamboy and J.R. McFerson. 1998. Microsatellite (SRR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationship in a Malus x domestica Borkh. core subset collection. *Theor Appl Genet*. 97: 671–683.

Jorge, V.; M.A. Fregene; M.C. Durque; M.W. Bonierbale; J. Tohme and V. Verdier. 2000. Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet*. 101: 865 – 872.

Lpez, C.; B. Piegu; R. Cooke; M. Delseny; J. Tohme and V. Verdier. 2005. Using cDNA and genomic sequences as tools to develop SNP strategies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet*. 110: 425 – 431.

Mba, R.E.C.; P. Stephenson; K. Edwards; S. Mezer; J. Nkumbira.; U. Gulberg.; K. Apel.; M. Gale; J. Tohme and M.A. Fregene. 2001. Simple sequence repeat (SSR) marker survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: toward a SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theor Appl Genet*. 102: 21 – 31.

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

Raghu, D.; N. Senthil; T. Saraswathi; M. Raveendran; R. Gnanam; R. Venkatachalam; P. Shanmugasundaram and C. Mohan. 2007. Morphological and Simple Sequence Repeats (SSR) based nger printing of south indian Cassava germplasm. *IJIB*. 1(2): 141 – 149.

Rohlf, F.J. 2000. *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1.* Exeter Publishing Setauket, New York.

Sirithunya, P.; E. Roumen; S. Mongkolsomrit; S. Sriprakhon; P. Hutamekalin and T. Sreewongchai. 2001. *Instruction manual work shop on molecular genetic analysis on diversity of blast pathogen in Thailand*. Yothee laboratory Unit Bangkok, Thailand.

Vsquez A. and C. Lpez. 2014. In Silico Genome Comparison and Distribution Analysis of Simple Sequences Repeats in Cassava. *Int J Genomics*. Vol. 2014, Article ID 471461. 9 p.