การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1 และ non-coding ดีเอ็นเอ ในไมโทคอนเดรียของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz)

ยุรนันท์ ทรวงทองหลาง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ยุรนันท์ ทรวงทองหลาง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดารัตน์ ถนนแก้ว)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ)

..... กรรมการ
(ดร.สลิล ชั้นโรจน์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 8 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคล และหน่วยงานต่าง ๆ โดยเฉพาะท่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำปรึกษา เอื้อเฟื้อครุภัณฑ์ และวัสดุอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์เพื่อใช้ในการทำวิจัย และสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำแนะนำแก้ไขข้อบกพร่องให้ความรู้ต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนด้วยดีเสมอมาจนทำให้งานวิจัยนี้สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุดารัตน์ ถนนแก้ว ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ และดร. สลิล ชั้นโรจน์ คณะกรรมการพิจารณาวิทยานิพนธ์ที่สละเวลาร่วมพิจารณา และให้การแก้ไขรายงานให้ถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ กรรมการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้และคำแนะนำรวมทั้งข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการค้นคว้า และพัฒนางานวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.ธีรยุทธ เกิดไทย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ นางชุติมณฑ์ ภัทรวรานนท์ ครูโรงเรียนสุรนารีวิทยา ที่เอื้อเฟื้อให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และจำแนกชนิดมันสำปะหลังในเบื้องต้นเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ นางสาวหยาดเพชร โอเจริญ นางสาวจิรนันท์ ธรรมณวโสพัส นางสาวนิจรดา ย๊ะหมื่น นางสาวอาทิตยา คำแก้ว นายสันติ สวนลา นางสาวปิยนาฏ ลิ่มหลัก และนางสาวน้ำอ้อย ใจแสน ที่ได้ให้คำแนะนำและฝึกเทคนิคต่าง ๆ จนทำให้ผู้วิจัยทำงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ยุรนันท์ ทรวงทองหลาง

56990012: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)
คำสำคัญ: ดีเอ็นเอ/ มันสำปะหลัง/ ITS1/ NON-CODING DNA/ พีซีอาร์

ยุรนันท์ ทรวงทองหลาง: การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1 และ non-coding ดีเอ็นเอ ในไมโทคอนเดรียของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) (ANALYSIS OF ITS1 AND NON-CODING MITOCHONDRIAL DNA OF CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz)) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชูตา บุญภักดี, Ph.D. 60 หน้า. ปี พ.ศ. 2560.

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal Transcribed Spacers 1 (ITS1) และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของไมโทคอนเดรียเพื่อพิจารณาใช้เป็นเครื่องหมายชีวโมเลกุลในระดับสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง โดยศึกษาจำนวน 18 สายพันธุ์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 Mes_R และ ITS1 Mes_L ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดเท่ากับ 514 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าบริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลังทุกตัวอย่างมีขนาดเท่ากับ 225 คู่เบส ลำดับเบสแตกต่างกัน 8 ตำแหน่ง ส่วนบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ trn-Phe และ trn-F ได้ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาด 368 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าทุกตัวอย่างมีขนาด 268 คู่เบส เท่ากัน ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1 และ non-coding ดีเอ็นเอ ในไมโทคอนเดรียของมันสำปะหลังมีความแปรปรวนต่ำ ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเครื่องหมายชีวโมเลกุลในระดับสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง

56990012: MAJOR: BIOLOGICAL EDUCATION; M.Sc. (BIOLOGICAL EDUCATION)
KEYWORDS: DNA/ CASSAVA/ ITS1/ NON-CODING DNA/ PCR

YURANUN THUANGTONGLANG: ANALYSIS OF ITS1 AND NON-CODING MITOCHONDRIAL DNA OF CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz). ADVISORY COMMITTEE: CHUTA BOONPHAKDEE, Ph.D. 60 P. 2017.

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important economic crop of Thailand. The purpose of this study was to investigate the nucleotide sequences of Internal Transcribed Spacers1 (ITS1) and non-coding mitochondrial DNA of cassava to use as the molecular marker. In this study, 18 cassava cultivars were used to obtain the 514-bp segment using ITS1 Mes_R and ITS1 Mes_L primers in the polymerase chain reaction. The ITS1 region of all samples was 225 -base pairs comparison between nucleotide sequences among samples revealed 8 positions difference. The amplified 368-bp non-codind DNA segment using trn-Phe and trn-F primers was investigated. The non-coding DNA of all samples was 268 -bp, with no nucleotide difference. Therefore, the nucleotide sequences of ITS1 and non-coding mitochondrial DNA of cassava are not suitable for cassava identification at the cultivar level.

สารบัญ

บทที่ หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ที่มาของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

สมมติฐานงานวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 2

ขอบเขตของการวิจัย..... 2

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

ต้นกำเนิดและการกระจายพันธุ์ของมันสำปะหลัง..... 4

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง..... 5

ประโยชน์ของมันสำปะหลัง..... 12

การใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมพืช..... 14

หลักการทำพีซีอาร์..... 16

จีโนมพืช..... 17

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 18

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 22

เครื่องมือและอุปกรณ์..... 22

สารเคมี..... 22

การเตรียมตัวอย่าง..... 23

วิธีการทดลอง..... 23

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

4 ผลการทดลอง..... 26

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์..... 26

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1..... 27

การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมบริเวณ ITS1..... 30

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์..... 33

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ..... 34

การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ..... 35

การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมบริเวณ ITS1เปรียบเทียบกับบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ..... 36

5 อภิปรายและสรุปผล..... 38

สรุปผลการทดลอง..... 41

ข้อเสนอแนะ..... 39

บรรณานุกรม..... 42

ภาคผนวก..... 50

ประวัติย่อของผู้วิจัย..... 60

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ตำแหน่งของเบสบริเวณ ITS1 ที่แตกต่างกันของมันสำปะหลัง 17 สายพันธุ์ เทียบเคียงกับมันสำปะหลังสายพันธุ์ PIROON..... 27

4-2 ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ระหว่างสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง..... 30

4-3 ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลังกับพืชในวงศ์เดียวกัน และพืชต่างวงศ์คือ Vitaceae และ Fabaceae 31

4-4 ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลังและพืชในวงศ์เดียวกัน (Euphorbiaceae) และต่างวงศ์ คือ Vitaceae และ Fabaceae..... 35

4-5 ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ non-coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลัง กับพืชในวงศ์เดียวกัน (Euphorbiaceae) และต่างวงศ์ คือ Vitaceae และ Fabaceae..... 36

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 บริเวณ Internal transcribed spacer 1 (ITS1) ของพืช..... 20

4-1 บริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลัง..... 26

4-2 ผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ ITS1ของมันสำปะหลัง..... 26

4-3 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ที่เทียบเคียงกันระหว่างตัวอย่างมันสำปะหลัง 17 สายพันธุ์ 28

4-4 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) บริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลังทั้งหมด และของตัวอย่างนอกกลุ่ม..... 32

4-5 บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลัง..... 33

4-6 ผลผลิตพีซีอาร์ของ non-coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลัง 33

4-7 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ที่เทียบเคียงกันระหว่างตัวอย่างมันสำปะหลัง 18 สายพันธุ์..... 34

4-8 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลังทั้งหมด และของตัวอย่างพืชนอกกลุ่ม..... 37

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นแหล่งอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของมนุษย์ที่มีราคาถูกกว่าพืชผลิตแป้งชนิดอื่น ๆ (Lebot, 2009) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดหวาน (sweet type) ใช้เพื่อการบริโภค มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิคต่ำ สามารถใช้หัวสดมาทำอาหารได้โดยตรง เช่น นำไปปิ้ง นึ่ง เชื่อม หรือ ทอด ได้แก่ พันธุ์ห้านาที พันธุ์ระยอง 2 พันธุ์ญวน และพันธุ์สวน และมันสำปะหลังชนิดขม (bitter type) มีรสขม มีแป้งมาก ปลูกอยู่ตามไร่ทั่วไปเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรมสำหรับใช้ทำแป้งและสาคู หรือนำไปแปรรูปเป็นมันอัดเม็ดหรือมันเส้นเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์ไม่เหมาะสำหรับการบริโภคของมนุษย์หรือนำเอาหัวสดมาใช้เลี้ยงโดยตรง เนื่องจากมีกรดไฮโดรไซยานิคสูงเกินกว่า 50-60 มิลลิกรัมมาบริโภคจะทำให้เป็นพิษต่อผู้บริโภคได้ มันสำปะหลังในกลุ่มนี้ ได้แก่ สายพันธุ์ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 60 ระยอง 90 และเกษตรศาสตร์ 50 เป็นต้น (โสภณ สินธุประมา, 2526) การผลิตมันสำปะหลังจะได้ผลผลิตสูงหรือต่ำมีคุณภาพของผลผลิตดีหรือไม่อย่างไรนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และสภาพแวดล้อมที่ปลูกการใช้สายพันธุ์ดีถือว่าเป็นเทคโนโลยีที่สะดวก และง่ายสำหรับเกษตรกรในการเพิ่มผลผลิตหรือปรับปรุงคุณภาพของมันสำปะหลัง แทนที่จะเปลี่ยนวิธีการเขตกรรมหรือวิธีการปฏิบัติต่อมันสำปะหลัง อย่างไรก็ตามหากมีการใช้พันธุ์ดีร่วมกับเทคโนโลยีที่เหมาะสม ผลผลิตที่ได้ก็จะสูงขึ้น (สกล ฉายศรี และคณะ, 2550) การจำแนกสายพันธุ์มีประโยชน์ในการคัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตรงตามความต้องการ เช่น ผลผลิตสูง ผลผลิตมีคุณภาพ ต้านทานต่อโรค และแมลง เป็นต้น สำหรับการจำแนกมันสำปะหลังนั้น ศานิต สวัสดิกาญจ์ (2557) ได้รวบรวมข้อมูลการจำแนกมันสำปะหลังโดยใช้หลายลักษณะด้วยกัน เช่น จำแนกตามการนำไปใช้ประโยชน์ใช้สอย จำแนกตามปริมาณของกรดไฮโดรไซยานิค จำแนกทรงสัณฐานวิทยาจากลักษณะภายนอก ได้แก่ พุ่ม สีของยอดอ่อน สีของก้านใบ สีของเปลือกหัว สีของลำต้น เป็นต้น การจำแนกดังกล่าวเป็นเพียงการจัดกลุ่มเบื้องต้นลักษณะที่ปรากฏต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการจัดจำแนก

ปัจจุบันนี้มีการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมาศึกษาข้อมูลพันธุกรรมพืชใช้ในการระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตมากขึ้น ซึ่งให้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำกว่าการจำแนกแบบดั้งเดิมที่ใช้แต่เพียงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกสามารถจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ต่าง ๆ ออกจากกันพร้อมทั้งบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ได้อย่างชัดเจน (Archak, 2000) ดังนั้นการนำเทคนิคทาง

ชีวโมเลกุลมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacers1 (ITS1) ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของไมโทคอนเดรีย จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยการจัดจำแนกสายพันธุ์ ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังซึ่งเป็นการต่อยอดภูมิปัญญาการจำแนกแบบดั้งเดิมทำให้เกิดองค์ความรู้ในระดับพันธุกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณ ITS1 ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ในไมโทคอนเดรียของมันสำปะหลังโดยใช้เทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุล

สมมติฐานการวิจัย

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ในไมโทคอนเดรียของมันสำปะหลังแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ในไมโทคอนเดรียของมันสำปะหลังจำนวน 18 สายพันธุ์

2. ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณ ITS1 ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ในไมโทคอนเดรียของสายพันธุ์ต่าง ๆ ของมันสำปะหลังที่มีการปลูกในประเทศไทย

3. เพื่อสร้างองค์ความรู้พื้นฐานทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังเพื่อนำไปใช้ในการวิจัยขั้นสูงต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

นำใบอ่อนของมันสำปะหลังที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 18 สายพันธุ์ มาสกัดเป็นจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของบริเวณ ITS1 และบริเวณ

non-coding ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในมันสำปะหลังแต่ละสายพันธุ์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ต้นกำเนิดและการกระจายพันธุ์ของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังมีการแพร่กระจายในยุคสมัยที่มีการล่าอาณานิคมในคริสต์ศตวรรษที่ 15 โดยพวกนักค้าทาสได้นำมันสำปะหลังจากประเทศบราซิลซึ่งอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ไปปลูกในทวีปแอฟริกา ต่อมาในปี ค.ศ.1739 (พ.ศ. 2282) มีชาวโปรตุเกสได้นำมันสำปะหลังไปปลูกที่เกาะรียูเนียน (Reunion) และในเวลาต่อมาได้แพร่กระจายไปยังเกาะมาดากัสการ์ จากนั้นชาวสเปนได้นำมันสำปะหลังจากเม็กซิโกมาปลูกที่ฟิลิปปินส์เป็นแห่งแรกในทวีปเอเชียในคริสต์ศตวรรษที่ 17 และในเวลาต่อมาก็มีการปลูกที่อินโดนีเซีย นอกจากนี้มีหลักฐานว่าเมื่อราวปี พ.ศ. 2337 ได้มีการนำมันสำปะหลังจากทวีปแอฟริกามาปลูกที่อินเดียเพื่อใช้ในการทดลอง สำหรับไทยนั้นยังไม่มีหลักฐานข้อมูลที่แน่ชัดว่ามีการนำมันสำปะหลังเข้ามาปลูกเมื่อใด แต่คาดว่าน่าจะมีการนำเข้ามาจากมาเลเซียในระยะเดียวกันกับการนำเข้าสู่ศรีลังกา และฟิลิปปินส์ ในช่วงประมาณปี พ.ศ. 2329-2383 มันสำปะหลังในภาษามาเลเซีย และภาษาอินโดนีเซียนั้นเรียกว่า Ubikayu แปลว่าพืชที่มีรากขยายใหญ่คล้ายกับภาษาชวาตะวันตกว่า “ส้มเปอ” (Sampeu) ในประเทศไทยเดิมเรียกกันว่า “มันสำโรง มันไม้” ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียกว่า “มันต้นเตี้ย” ทางภาคใต้เรียก “มันเทศ (แต่เรียกมันเทศว่ามันหลา)” คำว่า “สำปะหลัง” ที่คนส่วนใหญ่นิยมเรียกกันในปัจจุบันอาจมาจากคำว่า “ส้มเปอ (Sampeu)” ของชวาตะวันตกซึ่งมีความหมายเหมือนคำ “ยุนิคายู” ในภาษามาเลย์ ซึ่งแปลว่าพืชที่มีรากขยายใหญ่ (จรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา, 2537) ประเทศไทยมีการปลูกมันสำปะหลังเป็นการค้าครั้งแรกในภาคใต้เมื่อประมาณ 70 ปี มาแล้วโดยมีการปลูกระหว่างแถวต้นยางพาราขนาดเล็ก แล้วส่งผลิตผลที่ได้ไปจำหน่ายยังโรงงานทำแป้ง และโรงงานทำสาคู โดยเฉพาะที่จังหวัดสงขลามีอุตสาหกรรมทำแป้ง และสาคู สำหรับส่งจำหน่ายไปยังเกาะปีนัง และประเทศสิงคโปร์ แต่การปลูกมันสำปะหลังเพื่อการค้าในภาคใต้นั้นค่อย ๆ หมดไปเนื่องจากการปลูกกันในระหว่างแถวยางพารา และพืชยืนต้นอื่น ๆ เมื่อปลูกได้ 4-5 ปี ต้นยางพาราจะเจริญเติบโตคลุมพื้นที่หมดจนไม่สามารถปลูกมันสำปะหลังได้อีกต่อไป ในขณะที่สภาพภูมิประเทศริมฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย คือ จังหวัดชลบุรี ระยอง และจังหวัดใกล้เคียงนั้น มีลักษณะเป็นเนินเขาลาดเอียงดินเป็นดินทราย ไม่มีแม่น้ำใหญ่ที่จะทำการชลประทานได้ซึ่งลักษณะพื้นที่ดังกล่าวไม่เหมาะแก่การทำนา และปลูกพืชไร่ชนิดอื่นชาวบ้านจึง

เริ่มเพาะปลูกมันสำปะหลัง ปรากฏว่าการปลูกมันสำปะหลังได้รับผลดีจนกลายเป็นอาชีพที่แพร่หลายอย่างรวดเร็ว (จรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา, 2537)

ประเทศไทยเริ่มมีการปลูกมันสำปะหลังเพื่อการค้าอย่างแพร่หลายหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 เมื่อประมาณปี พ.ศ. 2491 เนื่องจากในระยะนั้นประเทศญี่ปุ่นขาดแคลนวัตถุดิบ และได้เริ่มสั่งซื้อแป้งมันสำปะหลังจากประเทศไทย นอกจากญี่ปุ่นเป็นประเทศคู่ค้าที่สำคัญแล้ว ในเวลาต่อมาสหรัฐอเมริกา และประเทศเพื่อนบ้านของไทย ก็ได้สั่งแป้งมันสำปะหลังจากไทยเพิ่มขึ้น จึงทำให้มีโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่ทันสมัยเพิ่มขึ้นมากมาย เนื่องจากตลาดมีความต้องการใช้ผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลังในการเลี้ยงสัตว์ และอุตสาหกรรมเพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการขยายพื้นที่ปลูกเดิมจากภาคตะวันออกไปยังจังหวัดอื่น ๆ โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการส่งผลให้ปัจจุบันภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังมากที่สุดในประเทศไทย (จรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา, 2547) นอกจากนี้ราคารับซื้อมันสำปะหลังที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการขยายพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังเพิ่มขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) จึงกล่าวได้ว่าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง เป็นต้นเหตุให้มีการปลูกมันสำปะหลังเป็นการค้าในระยะแรก แต่อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังเพื่อส่งออกมิได้มีการเปลี่ยนแปลงมากมายไม่เหมือนกับการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังสำหรับใช้เลี้ยงสัตว์ ซึ่งปัจจุบันมีการค้าอย่างแพร่หลายในตลาดโลก (จรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา, 2547)

ลักษณะพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง (เจริญศักดิ์โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, 2546)

1. การจำแนกทางอนุกรมวิธาน

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลังมีชื่อทั่วไป (common name) ภาษาอังกฤษเรียกว่า แคสซาวา (cassava) หรือภาษาสเปนเรียกว่า ทาพิโอกา (tapioca) โดยประเทศแถบอเมริกาใต้ และอเมริกากลางเรียกว่า ยูก้า (yuca) ภาษาโปตุเกสในประเทศบราซิลเรียกว่า แมนดิโอก้า (mandioca) ภาษาฝรั่งเศสในประเทศทวีปแอฟริกาเรียกว่า แมนดิออค (mandioc) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Manihot esculenta* Crantz มันสำปะหลังได้รับการจัดหมวดหมู่ทางพฤกษศาสตร์อยู่ในคลาส (Class) Dicotyledonae วงศ์ (Family) Euphorbiaceae เช่นเดียวกับ ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และละหุ่ง (*Ricinus communis*) สมัยก่อนแบ่งมันสำปะหลังเป็นชนิดหวาน คือ *M. esulenta* และชนิดขม คือ *M. palmata* หรือ *M. dulcis* แต่ปัจจุบันมีจัดเป็นชนิดเดียวกัน คือ *M. esulenta*

1.1 ราก (Root)

มันสำปะหลังมีระบบรากเป็นแบบ adventitious root system ซึ่งรากที่งอกจากท่อนพันธุ์ (cutting) สามารถงอกได้จาก 3 ส่วนคือ รากจากส่วนเนื้อเยื่อ cambium รากจากส่วนตา และรากจากส่วนรอยหลุดร่วงของใบ (leaf scar) ส่วนรากในส่วน parenchyma cell ของมันสำปะหลัง คือ ที่ขยายใหญ่เพื่อสะสมอาหารแป้ง เรียกว่า หัว (tuber) แต่ละต้นมีจำนวนหัว 5–15 หัว ขนาดความยาว 15-10 ซม เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-15 ซม. ขนาดของรากขึ้นอยู่กับพันธุ์ อายุ สภาพภูมิอากาศ และดิน เมื่อตัดตามขวางของส่วนหัว หรือรากสะสมอาหาร

1.2 ลำต้น (Stem)

มันสำปะหลังมีลำต้นเป็น woody stem มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 ซม. เจริญเติบโตเป็นแบบไม้พุ่มมีขนาดเล็ก ลำต้นมีสีแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ส่วนที่อยู่ใกล้ยอดมีสีเขียวส่วนแก่ที่ต่ำลงมาอาจมีสีน้ำเงิน เหลือง หรือน้ำตาล ต้นมีความสูง 2-4 เมตร ทั้งนี้มีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกับการแตกกิ่ง สายพันธุ์ที่ไม่แตกกิ่ง (unbranched) ลำต้นจะสูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่มีการแตกกิ่ง การแตกกิ่งของมันสำปะหลังจะแตกออกเป็น 2 กิ่ง (dichotomous branching) หรือ 3 กิ่ง (trichotomous branching) กิ่งที่แตกออกจากลำต้นเรียกว่า primary branch ส่วนกิ่งที่แตกออกจาก primary branch เรียกว่า secondary branch บนลำต้นหรือกิ่งของมันสำปะหลังจะมีรอยหลุดร่วงของใบแก่เรียกว่า leaf scar ซึ่งเป็นรอยต่อระหว่างก้านใบกับลำต้นหรือกิ่ง ระยะระหว่างรอยหลุดร่วงของใบมี 2 รอยต่อกันเรียกว่า storey length ด้านบนเหนือรอยหลุดร่วงของใบจะมีตา (bud) ซึ่งจะงอกเป็นต้นใหม่เมื่อนำท่อนพันธุ์ไปปลูก

1.3 ใบ (Leaf)

มันสำปะหลังมีใบเป็นแบบใบเดี่ยว (simple leaf) การเกิดของใบจะหมุนเวียนรอบลำต้น (spiral) มีค่า phyllotaxy ค่อนข้างคงที่แน่นอนคือ 2/5 ก้านใบ (petiole) ต่อระหว่างลำต้นหรือกิ่งกับตัวแผ่นใบ ตัวใบหรือแผ่นใบ (lamina) จะเว้าเป็นหยักลึกเป็นแบบ palmately lobe ก้านใบอาจมีสีเขียวหรือสีแดง จำนวนหยักมีตั้งแต่ 3-9 หยัก ใบที่อยู่ใกล้ช่อดอก และยอดมักจะมีขนาดเล็กกว่า และมีจำนวนหยักน้อยกว่าใบด้านล่าง

1.4 ช่อดอก (Inflorescences)

มันสำปะหลังมีช่อดอกเป็นแบบ panicle มีดอกตัวผู้ และดอกตัวเมียอยู่คนละดอกในช่อเดียวกัน (monoecious plant) ช่อดอกจะเกิดตรงปลายยอดของลำต้นหรือกิ่ง หรืออาจเกิดตรงรอยต่อที่เกิดการแตกกิ่งดอกตัวผู้ (staminate flower) มักเกิดบริเวณส่วนปลายหรือยอดของช่อดอก ไม่มีกลีบดอก (petal) มีกลีบรองดอก (sepal) 5 กลีบมีเกสรตัวผู้ (stamen) 10 อัน แบ่งเป็น

2 วง วงละ 5 อัน เกสรตัวผู้วงในมีก้านชูเกสรตัวผู้ (filament) สั้นกว่าวงนอก ดอกตัวเมีย (pistillate flower) มีขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้มักเกิดอยู่บริเวณส่วนโคนของช่อดอกไม่มีกลีบดอกแต่มีกลีบรองดอก 5 กลีบ เช่นเดียวกับดอกตัวผู้ตรงกลางจะเป็นเกสรตัวเมีย (pistil) รังไข่ (ovary) มี 3 carpel ภายในแต่ละ carpel มีไข่ (ovule) อยู่ 1 ใบ ในช่อดอกเดียวกันดอกตัวเมียจะบานก่อนดอกตัวผู้ 7-1 วัน การบานของดอกตัวผู้ และดอกตัวเมียจะบานในเวลา 11.30-12.30 น.

1.5 ผล (Fruits)

หลังการผสมเกสรแล้ว รังไข่จะเจริญเติบโตขยายใหญ่กลายเป็นผลแบบ capsule มีเส้นผ่าศูนย์กลางเมื่อโตเต็มที่ขนาดประมาณ 1 ซม. ยาว 1-1.5 ซม. ภายในผลมี 3 ช่องแต่ละช่องมีจำนวน 1 เมล็ด หลังจากการผสมเกสรได้ประมาณ 3 เดือนผลจะแก่เต็มที่แล้วแตกดีดเมล็ดกระเด็นออกไป (dehiscent)

1.6 เมล็ด (Seed)

เมล็ดมีสีน้ำตาล และมีลายดำ รูปร่างยาวรี ขนาดกว้าง 3/4 ซม. หนา 1/2 ซม. และยาว 1 ซม.ตอนปลายของเมล็ดที่ติดกับผนังรังไข่ จะมีส่วน caruncle หรือมีตาอย่างน้อย 3 ตา

2. หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงสายพันธุ์มันสำปะหลัง

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์ (2546) ได้รายงานข้อมูลว่ามีหน่วยงานสำคัญของไทยที่เกี่ยวข้องการปรับปรุงสายพันธุ์มันสำปะหลัง ได้แก่

2.1 สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร มีศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ตั้งอยู่ที่ตำบลห้วยโป่ง อำเภอเมือง จังหวัดระยอง เป็นศูนย์วิจัยหลักในการสร้างสายพันธุ์มันสำปะหลังซึ่งสายพันธุ์ที่ได้มาจะใช้ชื่อสายพันธุ์ “ระยอง” หมายเลขต่าง ๆ

2.2 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้การประสานงานโดยภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มีสายพันธุ์ที่แนะนำออกมาคือ สายพันธุ์ศรีราชา 1 เกษตรศาสตร์ 50 และห้วยบง 60

2.3 ศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT) ตั้งอยู่ที่เมืองคาลี ประเทศโคลัมเบีย เป็นศูนย์วิจัยมันสำปะหลังนานาชาติมีชื่อย่อว่า “เซียท (CIAT)” เช่นเดียวกันกับศูนย์วิจัยข้าวนานาชาติประเทศฟิลิปปินส์ CIAT ได้ร่วมมือในการปรับปรุงมันสำปะหลังกับประเทศไทย โดยส่งพันธุ์ และเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังให้โครงการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังไทยจำนวนมาก และใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการสร้างพันธุ์ใหม่ ๆ

2.4 มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย ก่อตั้งเมื่อปี พ.ศ. 2536 ด้วยจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาการผลิต และการค้ามันสำปะหลังทางมูลนิธิฯ ให้การสนับสนุนการวิจัยพัฒนาสายพันธุ์มันสำปะหลังตลอดจนขยาย และแจกจ่ายพันธุ์มันสำปะหลังสู่เกษตรกร

3. สายพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ในประเทศไทย

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์ (2546) ได้รายงานข้อมูลว่ามีสายพันธุ์มันสำปะหลังบางสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ในประเทศไทย ตัวอย่างเช่น

3.1 สายพันธุ์ระยอง 1 (RAYONG 1)

สายพันธุ์ระยอง 1 เคยเป็นสายพันธุ์มันสำปะหลังที่สำคัญที่สุดของประเทศไทย และสำคัญที่สุดในโลก เคยเป็นสายพันธุ์เดียวที่ปลูกกันทั่วประเทศจำนวน 8-10 ล้านไร่ และผลผลิตของสายพันธุ์นี้ถูกแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อส่งออกเป็นมูลค่าถึงปีละสองหมื่นล้านบาท ให้ผลผลิตสูง ปานกลาง มีการปรับตัวได้กว้างขวาลำต้นสูงใหญ่ และตั้งตรงมีสีเงินงอกได้ดีทั้งในฤดูแล้ง และฤดูฝน หัวมีสีขาวเป็นกระจุกถอนง่ายยอดอ่อนมีสีม่วงมีขนใบแตกกิ่งน้อยก้านใบมีสีเขียวเหลือบแดง เปลือกหัวมีสีน้ำตาลอ่อน เนื้อหัวมีสีขาวนวล มีรสขม มีกรดไฮโดรไซยานิคในหัวสูง ไม่เหมาะที่ใช้เป็นอาหารมนุษย์โดยตรงเหมาะสำหรับเป็นพันธุ์เพื่อแปรรูปในโรงงานมันเส้นหรือแป้ง

3.2 สายพันธุ์ระยอง 3 (RAYONG 3)

เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ M.Mex 55 กับสายพันธุ์ M.Ven 307 ที่ CIAT ประเทศโคลัมเบียนำเมล็ดมาปลูกเพื่อคัดเลือกในประเทศไทยมีลักษณะเด่น คือ ผลผลิตหัวสดใกล้เคียงกับสายพันธุ์ระยอง 1 ยอดอ่อนมีสีเขียวอ่อน ก้านใบมีสีเขียวอ่อนปนแดง ลำต้น และเปลือกมีสีน้ำตาลอ่อนสีของเนื้อมีสีขาว แต่เกษตรกรไม่นิยมปลูกเนื่องจากมีลักษณะต้นเตี้ยขนาดต้นเล็กปกคลุมวัชพืชได้ไม่ดี ต้นขยายพันธุ์ได้น้อย

3.3 สายพันธุ์ระยอง 60 (RAYONG 60)

เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ MCol 1684 กับสายพันธุ์ระยอง 1 มีลักษณะเด่น คือผลผลิตหัวสูงกว่าสายพันธุ์ระยอง 1 ปริมาณแป้งในหัวไม่สูงนักแต่สูงกว่าสายพันธุ์ระยอง 1 เล็กน้อยท่อนพันธุ์งอกดี แตกกิ่งน้อย ลำต้นสูง ทรงต้นสวย ยอดอ่อนมีสีเขียวอมน้ำตาล ก้านใบมีสีเขียวปนม่วงลำต้น และเปลือกมีสีน้ำตาลอ่อน เนื้อหัวมีสีขาวครีม

3.4 สายพันธุ์ระยอง 5 (RAYONG 5)

สายพันธุ์นี้เป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ 27-77-10 กับสายพันธุ์ระยอง 3 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง และมีปริมาณแป้งในหัวสูง ท่อนพันธุ์งอกดีปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี หัวอ้วนสั้นเก็บเกี่ยวได้ง่ายยอดอ่อนมีสีม่วงอ่อนก้านใบมีสีแดงเข้มลำต้นมีสีน้ำตาลอ่อนอมเขียว เปลือกหัวมีสีน้ำตาลอ่อน เนื้อหัวมีสีขาว

3.5 สายพันธุ์ระยอง 90 (RAYONG 90)

เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ CMC 76 กับสายพันธุ์ V 43 มีลักษณะเด่น คือ ผลผลิตสูง และปริมาณแป้งในหัวสูงซึ่งเป็นที่ต้องการของโรงงานแป้งมันสำปะหลัง จุดอ่อนคือท่อนพันธุ์หลังจากการเก็บเกี่ยวควรรีบนำไปปลูกให้เร็วที่สุดหากเก็บไว้เกิน 3 สัปดาห์จะเสียความงอกอย่างรวดเร็วซึ่งพันธุ์ดีพันธุ์อื่นท่อนพันธุ์ไม่เสียความงอกเร็วเท่านี้ ลักษณะทั่วไปมีสียอดอ่อนสีเขียวก้านใบมีสีเขียวอ่อนลำต้นมีสีน้ำตาลอมส้มเปลือกหัวมีสีน้ำตาลเข้มเนื้อหัวมีสีขาว

3.6 สายพันธุ์ระยอง 72 (RAYONG 72)

สายพันธุ์นี้เป็นพันธุ์ใหม่ล่าสุดของกรมวิชาการเกษตร เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์ระยอง 1 ผสมกับสายพันธุ์ระยอง 5 ลักษณะเด่น คือให้ผลผลิตหัวสดค่อนข้างสูงคือหัวสดสูงกว่าสายพันธุ์ระยอง 1 ระยอง 5 และระยอง 90 นอกจากนั้นลักษณะของท่อนพันธุ์งอกดีลำต้นตรงสูงใหญ่ทรงต้นสวยท่อนพันธุ์งอกดีเจริญเติบโตเร็วข้อจำกัด คือมีปริมาณแป้งในหัวไม่สูงมาก นักลักษณะทั่วไปคือมีสียอดอ่อนสีม่วงก้านใบมีสีแดงเข้มลำต้นมีสีเขียวเงินเปลือกหัวมีสีน้ำตาลอ่อนและเนื้อหัวมีสีขาว

3.7 สายพันธุ์ศรีราชา 1 (SRIRACHA 1)

สายพันธุ์ศรีราชาเป็นสายพันธุ์ที่พัฒนามาจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์ MKU2-162 กับสายพันธุ์ระยอง 1 ซึ่งพันธุ์นี้ยังคงรักษาคุณสมบัติของสายพันธุ์ระยอง 1 ไว้ คือท่อนพันธุ์งอกดีทรงต้นสูงใหญ่แตกกิ่งน้อยคุมวัชพืชได้ดีผลผลิตหัวสดใกล้เคียงกับพันธุ์ระยอง 1 แต่มีปริมาณแป้งสูงกว่าลักษณะทั่วไปคือยอดอ่อน ก้านใบมีสีเขียวปนม่วงลำต้นมีสีเขียวเงินแตกลายเปลือกหัวมีสีขาวนวล และเนื้อหัวมีสีครีม

3.8 สายพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU 50)

สายพันธุ์นี้เป็นผลงานวิจัยร่วมกันของ 3 หน่วยงานคือ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรมวิชาการเกษตร และศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT) เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ระยอง 1 ผสมกับสายพันธุ์ระยอง 90 และเนื่องในวาระครบรอบ 50 ปีในปี 2535 ของการก่อตั้งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์จึงตั้งชื่อสายพันธุ์นี้ว่า “เกษตรศาสตร์ 50” มีลักษณะเด่น คือ ผลผลิตสูงปริมาณแป้งในหัวสูง และยังคงลักษณะเด่นของสายพันธุ์ระยอง 1 ไว้ คือ ท่อนพันธุ์งอกดีลำต้นสูงใหญ่คุมวัชพืชได้ดีหัวเป็นกลุ่มขุดเก็บเกี่ยวสะดวกพันธุ์นี้เป็นพันธุ์ที่ได้รับการส่งเสริม และเป็นที่ต้องการของเกษตรกรและปลูกมากที่สุดใน

ประเทศลักษณะทั่วไปคือ ยอดอ่อนมีสีม่วงไม่มีขนอ่อน ก้านใบมีสีเขียว ลำต้นมีสีเขียวเงิน เปลือกหัวมีสีน้ำตาลอ่อน และเนื้อหัวมีสีขาว

3.9 สายพันธุ์ห้วยบง 60

สายพันธุ์ห้วยบง 60 เป็นมันสำปะหลังสายพันธุ์ที่พัฒนาโดยความร่วมมือของนักวิชาการจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย สายพันธุ์นี้เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ระยอง 5 กับสายพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ลักษณะเด่นของสายพันธุ์ห้วยบง 60 คือ ให้ผลผลิตหัวสดสูงกว่าพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 อยู่ 7 เปอร์เซ็นต์ และมีแป้งในหัวสูงกว่าสายพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 เล็กน้อย สามารถปลูกได้ทั่วไป และนำมาสกัดแป้งจากหัวสดได้มากแป้งมีสีขาวและมีความหนืดสูงเหมาะสมกับอุตสาหกรรมแป้ง และอุตสาหกรรมต่อเนื่อง นอกจากนั้นสายพันธุ์นี้ยังมีคุณสมบัติที่ท่อนพันธุ์งอกดี ลำต้นสูงใหญ่ สามารถคลุมวัชพืชได้ดี ลักษณะทั่วไปคือ ยอดอ่อนมีสีม่วงอ่อนไม่มีขน ก้านใบมีสีเขียว ลำต้นมีสีเขียวเงิน เปลือกหัวมีสีน้ำตาลอ่อนและเนื้อหัวมีสีขาว

4. พันธุศาสตร์มันสำปะหลัง

มันสำปะหลังมีโครโมโซม 2n=36 จัดเป็นพวก allotetraploid และเป็นพืชที่มี heterozygosity สูงมากซึ่งสามารถรักษาลักษณะนี้ได้โดยการขยายพันธุ์ด้วยท่อนพันธุ์โดยธรรมชาติมันสำปะหลังมีทั้งการผสมข้ามและการผสมตัวเอง (self-pollination) ซึ่งการผสมข้าม (crosspollination) ของมันสำปะหลังจะทำให้เมล็ดที่ได้จากการผสมแต่ละเมล็ดมี genotype ที่แตกต่างกันทำให้เกิดการกระจายตัวทางพันธุกรรมในลักษณะต่าง ๆ ทั้งทางด้านรูปทรง ลักษณะต้น ผลผลิต และดัชนีการเก็บเกี่ยว แต่ลูกที่ได้จากการผสมตัวเองนั้นอิทธิพลของ inbreeding depression ทำให้ลูกที่ได้นั้นอ่อนแอผลผลิตต่ำ และลักษณะต่าง ๆ เช่น ความสูง ความแข็งแรงลดลงอย่างมาก ต้นที่ได้จาก F1 จึงไม่สามารถนำไปปลูกเป็นการค้าได้ (จรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา, 2537)

5. การจำแนกมันสำปะหลัง

แบ่งมันสำปะหลังตามปริมาณกรดไฮโดรไซยานิคได้เป็น 2 ชนิด (จรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา, 2547) คือ

5.1 ชนิดหวาน (sweet cassava) เป็นมันสำปะหลังที่มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิคต่ำไม่มีรสขม ใช้เพื่อบริโภคของมนุษย์ มีทั้งชนิดเนื้อร่วน ยุ่ย และชนิดเนื้อแน่นเหนียว ในประเทศไทยไม่มีการปลูกเป็นพื้นที่ใหญ่ ๆ เนื่องจากมีตลาดจำกัด ส่วนใหญ่จะปลูกรอบ ๆ บ้าน หรือตามร่องสวนเพื่อบริโภคเอง ในครัวเรือนหรือเพื่อจำหน่ายตามตลาดสดในท้องถิ่นในปริมาณไม่มาก ราคากิโลกรัมละ 4-8 บาท และสายพันธุ์มันสำปะหลังชนิดหวาน ที่นิยมปลูก

เช่น ระยอง 2 และห้านาที ในระยะหลังมีการปรับปรุงสายพันธุ์ขึ้นมาแล้วไม่มีการศึกษาจริงจังทำให้ไม่มีสายพันธุ์มันสำปะหลังชนิดนี้ใหม่ ๆ ออกมา สายพันธุ์ห้านาทีเป็นสายพันธุ์พื้นเมืองที่มีปลูกมานานในประเทศไทย (คาดว่ามาจากทางภาคใต้ผ่านมาทางประเทศมาเลเซีย) โดยไม่ทราบเวลานำเข้ามาที่แน่นอน มีการปลูกจำนวนเล็กน้อยเพื่อใช้รับประทาน ลักษณะเด่น เนื้อหัวร่วน เหมาะสำหรับทำขนม เช่น เชื่อม ย่าง ผลผลิตค่อนข้างต่ำประมาณ 1,500-2,000 กิโลกรัมต่อไร่ ปลูกในสภาพสวนจะมีคุณภาพของหัวดีกว่าปลูกในสภาพไร่มีกรดไฮโดรไซยานิคในหัวค่อนข้างต่ำ ต้านทานโรคปานกลาง ลำต้นตรง สูง แตกกิ่ง ก้านใบสีแดงใบกว้าง ยอดอ่อนสีเขียว ลำต้นสีน้ำตาลเข้ม สีเปลือกหัวน้ำตาลเข้ม เนื้อสีขาว เปลือกในสีม่วง รูปร่างหัวเรียวยาว เปลือกปอกง่าย การเก็บเกี่ยว ในสภาพไร่ ไม่ควรเก็บเกี่ยวอายุเกิน 10 เดือน เพราะจะมีเส้นใยมาก ในสภาพสวนเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 8 เดือน

5.2 ชนิดขม (bitter cassava) เป็นมันสำปะหลังที่มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิคสูงเป็นพิษ และมีรสขม เช่น ระยอง 1 ระยอง 2 ระยอง 60 ระยอง 90 ระยอง 5 ระยอง 72 เกษตรศาสตร์ 50 และห้วยบง 60 ไม่เหมาะสำหรับการบริโภคของมนุษย์ หรือใช้หัวสดเลี้ยงสัตว์โดยตรง แต่ใช้สำหรับอุตสาหกรรมแปรรูปต่าง ๆ เช่น แป้งมัน มันอัดเม็ด แอลกอฮอล์ เนื่องจากมีปริมาณแป้งสูงราคากิโลกรัมละ 0.80-1.25 บาท ประเทศไทยจึงนิยมปลูกมันสำปะหลังชนิดนี้มากที่สุด สารไซยาไนด์ในมันสำปะหลังจะอยู่ในรูปของกรดไฮโดรไซยานิค (HCN) ซึ่งเกิดจากสารไซยาโนเจนิค ไกลโคไซด์ซึ่งมีอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของมันสำปะหลัง เมื่อเซลล์ถูกทำลาย เช่น ถูกบด ถูกสับ จะทำให้เอนไซม์เข้ามาทำปฏิกิริยากับสารไซยาโนเจนิค ไกลโคไซด์ ได้กรดไฮโดรไซยานิคออกมา สารไซยาโนเจนิคไกลโคไซด์มีอยู่หลายชนิดแต่ที่พบในมันสำปะหลังมีอยู่ 2 ชนิดคือ ไลนามาริน (linamarin) และ โลทอสตราลิน (lotaustralin) นักวิทยาศาสตร์พบว่าสารไซยาโนเจนิคไกลโคไซด์นั้น สร้างขึ้นในส่วนของใบมันสำปะหลัง แล้วลำเลียงไปเก็บยังส่วนต่าง ๆ ของมันสำปะหลัง เช่น ที่ราก หรือ หัว เป็นต้น (Bediako, Tapper, & Pritchard, 1981) พบว่ากรดไฮโดรไซยานิคในบริเวณเปลือกของหัวจะพบมากที่สุด ประมาณ 150-1,110 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ ใบประมาณ 83-878 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด และในเนื้อหัวมีประมาณ 5-490 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด

BruiJn (1971) ได้จัดลำดับความเป็นพิษของกรดไฮโดรไซยานิคได้ ดังนี้

1) ระดับไม่เป็นพิษ มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิคน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด

2) ระดับเป็นพิษปานกลาง มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิค 50-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด

3) ระดับเป็นพิษมาก (อันตราย) มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิคมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด

ประโยชน์ของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศในเขตร้อนโดยเฉพาะประเทศต่าง ๆ ในทวีปแอฟริกา และอเมริกาใต้ ในเอเชีย ประเทศอินโดนีเซีย และอินเดียมีการบริโภคมันสำปะหลังกันเป็นจำนวนมาก (จรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา, 2547) เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตของคนในประเทศเขตร้อนที่สำคัญอันดับ 4 ของโลกรองจากข้าว น้ำตาล และข้าวโพด ผลผลิตทั่วโลก 166 ล้านตันต่อปี พื้นที่ปลูก 16.6 ล้านเฮกตาร์ (ha) ผลผลิตเฉลี่ย 9.9 ตันต่อเฮกตาร์ โดยใช้เป็นอาหารของมนุษย์ 57 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารสัตว์ 32 เปอร์เซ็นต์ ใช้ในอุตสาหกรรม 11 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตประมาณ 51.3 เปอร์เซ็นต์ ผลิตในทวีปแอฟริการองลงมา คือ ทวีปเอเชีย ผลิตประมาณ 29.4 เปอร์เซ็นต์ และอเมริกาใต้ 19.3 เปอร์เซ็นต์ (Bellotti, Smith, & Lapointe, 1999) ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังออกมากที่สุดในโลก ทั้งนี้เพราะประเทศที่ผลิตมันสำปะหลังได้มาก เช่น ไนจีเรีย บราซิล คองโก กานา และประเทศอื่น ๆ นำผลผลิตที่ได้ใช้เป็นอาหารของพลเมืองภายในประเทศ ในขณะที่ประเทศไทยใช้มันสำปะหลังเพื่อบริโภคน้อยมาก ประเทศที่ไทยส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในรูปของมันอัดเม็ดไปขายมากที่สุด คือ ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป เกาหลีใต้ และญี่ปุ่น ส่วนการส่งออกในรูปแป้งมันสำปะหลัง ประเทศที่สั่งซื้อมากที่สุด คือ ญี่ปุ่น รองลงมา คือ ฮ่องกง สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงค์โปร์ และไต้หวัน (จรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา, 2547) มีหลายประเทศในโลกบริโภคมันสำปะหลังเป็นอาหารหลัก เช่น ประเทศในแถบทวีปอเมริกาใต้ ทวีปแอฟริกา ตลอดจนบางประเทศในทวีปเอเชีย เช่น อินโดนีเซีย และมีหลายประเทศที่บริโภคมันสำปะหลังเป็นอาหารสำคัญรองจากธัญพืชแต่เนื่องจากหัวมันสำปะหลังสดไม่สามารถเก็บรักษาให้คงสภาพเดิมไว้ได้นานวันมักจะเกิดการเน่าเสียจึงมักจะมีการแปรสภาพก่อนเก็บรักษาเพื่อให้สามารถเก็บไว้บริโภคนานวัน ส่วนมากมักจะนำไปหมักก่อนนำไปปรุงอาหาร เช่น นำไปนึ่ง ทอด ย่าง นอกนั้นการนำหัวสดไปบดใส่ถุงทับให้แห้งทิ้งไว้ 4 วัน ระหว่างนั้นจะเกิดการ

หมัก จากนั้นจึงนำไปทอด ชาวไนจีเรียเรียกอาหารชนิดนี้ว่า Gari ส่วนของชาวมาดากัสกา เรียกว่า Bononoka นั้นการหมักโดยนำไปแช่ในน้ำที่ไหลหลาย ๆ วัน แล้วนำไปนึ่งเพื่อเป็นอาหาร นอกจากนั้นยังนิยมนำมารับประทานได้หลายรูปแบบ เช่น ทำเป็นแป้งมันเพื่อนำไปปรับเป็นอาหารอื่นต่อไป หัวสดยังนำมาทำเป็นมันทอดได้โดยปอกเปลือกฝานเป็นแผ่นบาง ๆ นำมาทอด ใช้เป็นอาหารว่างได้ (Adewui & Akindahunsi, 1994)

การใช้ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังเพื่อการเลี้ยงสัตว์เริ่มประมาณปี พ.ศ. 2499 สมัยนั้นมีชาวเยอรมันทดลองนำเอาขี้แป้งซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากการทำแป้งมันสำปะหลังไปใช้เลี้ยงสัตว์ได้ผลเป็นที่พอใจคุ้มกับราคา แต่ขี้แป้งมีไม่มากพอกับความต้องการของตลาดยุโรปจึงมีผู้ริเริ่มเอาหัวมันสำปะหลังสดมาหั่นเป็นชิ้น ๆ นำมาตากแห้งและบดด้วยหินบดข้าวเป็นมันป่น ปรากฏว่ามันป่นที่ได้จากการบดหัวมันสำปะหลังนี้เป็นที่นิยมของโรงงานอาหารสัตว์ในทวีปยุโรป ต่อมาในราวปี พ.ศ. 2503-2504 ได้มีผู้นำเอากากมันสำปะหลังเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังมาผสมปนรวมกันเป็น กากมันป่น (waste meal) ปรากฏว่ากลายเป็นสินค้าที่ขายดี แต่ภายหลังมีผู้ปลอมปนกากมันป่นมากขึ้น โดยนำดิน ทราย แกลบ ขี้เลื่อยมาบดผสมปนลงไป ผู้ซื้อในยุโรปจึงหันมาซื้อมันเส้นแทน ซึ่งการผลิตมันเส้นทำได้โดยนำหัวมันสำปะหลังสดมาฝาน หรือตัด เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วตากแดดให้แห้ง ระยะนั้นชาวชลบุรีได้คิดเครื่องทำมันเส้นขึ้นแล้ว การส่งมันเส้นออกไปจำหน่ายในยุโรปดำเนินเรื่อยมาจนกระทั่งปี พ.ศ. 2510-2511 ได้มีบริษัทสั่งซื้อเครื่องอัดเม็ดมาจากต่างประเทศเพื่อทำมันสำปะหลังอัดเม็ด โดยนำมันเส้นเข้าเครื่องอัดออกมาเป็นแท่งเหมือนแท่งชอล์กซึ่งมีน้ำหนักเบา เพื่อใช้ส่งออกขายแทนมันเส้นที่เปลืองเนื้อที่บรรทุกในระวางเรือมากทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการขนส่งสูง ต่อมาวิศวกรไทยได้สร้างเครื่องอัดเม็ดเลียนแบบของต่างประเทศเป็นผลสำเร็จ และใช้ได้ดีทั้งราคาถูกว่าสั่งจากต่างประเทศ แต่ปัจจุบันเครื่องอัดเม็ดในโรงงานมันสำปะหลังอัดเม็ดส่วนใหญ่เป็นเครื่องอัดเม็ดที่ผลิตขึ้นในประเทศไทย (จรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา, 2547)

กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (2546) รายงานว่าผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลังของประเทศไทยสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้ ดังนี้.

1) มันสำปะหลังเส้น (cassava chips หรือ shredded) คือ ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังที่ได้จากการนำหัวมันสำปะหลังสดมาหั่น หรือฝาน ให้เป็นแผ่นบาง ๆ แล้วนำไปตากแดดให้แห้ง ซึ่งใช้เวลาตากประมาณ 2-3 วัน หัวมันสำปะหลังสด 1 กิโลกรัม ผลิตเป็นมันสำปะหลังเส้นได้ประมาณ 0.40 กิโลกรัม

2) มันสำปะหลังอัดเม็ด (cassava pellets) คือ ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังที่ได้มาจากการนำหัวมันสำปะหลังสด หรือมันสำปะหลังเส้นนำไปบด แล้วอัดด้วยเครื่องจักรให้มีรูปร่างเป็นแท่งทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4-0.7 ซม. แล้วทำให้แห้งเพื่อลดอุณหภูมิ และลดความชื้นให้เหลือ 14 เปอร์เซ็นต์ มันสำปะหลังเส้นหนัก 1 กิโลกรัม ผลิตเป็นมันสำปะหลังอัดเม็ดได้ประมาณ 0.89-0.93 กิโลกรัม

3) แป้งมันสำปะหลัง (cassava flour หรือ tapioca flour) คือ ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังที่ได้จากการนำหัวมันสำปะหลังสดไปล้างทำความสะอาดแยกเอาดิน หรือสิ่งสกปรกออกแล้วนำไปขูดเปลือกออกพร้อมกับสับให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นนำไปบดย่อยพร้อมทั้งแยกเอากากมันสำปะหลัง และน้ำแป้งออกจากกัน ส่วนกากมันสำปะหลัง (cassava meal หรือ cassava waste) จะถูกแยกออกไปตากให้แห้ง เพื่อนำไปจำหน่ายเป็นกากมันสำปะหลังหรือนำไปใช้ผสมกับมันเส้นเพื่ออัดเป็นมันเม็ดอีกครั้งหนึ่ง น้ำแป้งที่ถูกแยกออกมาจะถูกส่งไปฟอกด้วยไอกำมะถัน เพื่อขจัดยาง และฟอกสีให้ขาวสะอาดขึ้น จากนั้นจะถูกส่งต่อไปทำให้แห้งเพื่อได้แป้งมันสำปะหลังออกมา การทำให้แห้งมีทั้งการใช้วิธีการสลัด (centrifuge) และการอบด้วยความร้อน หัวมันสำปะหลังสดน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ผลิตเป็นแป้งมันสำปะหลังได้ 0.20 กิโลกรัม และได้กากมันสำปะหลังประมาณ 0.04-0.09 กิโลกรัม จากแป้งมันสำปะหลัง สามารถนำไปผลิตเป็นแป้งแปรรูป (modified starch) ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีความสำคัญทางอุตสาหกรรมอาหาร ยา ตลอดจนสิ่งพิมพ์ หรือกาว และคาดว่าแป้งแปรรูปจากมันสำปะหลังจะมีบทบาทต่ออุตสาหกรรมมันสำปะหลังเพิ่มมากขึ้นในอนาคต

4) แอลกอฮอล์จากมันสำปะหลัง (alcohol) กรรมวิธีในการผลิตแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลัง เริ่มต้นด้วยการนำหัวมันสำปะหลังสดไปล้างให้สะอาดแล้วบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปย่อยแป้งให้มีโมเลกุลเล็กลง (saccharification) ด้วยการใช้กรด (hydrolysis) หรือใช้จุลินทรีย์ (biological process) แล้วจึงนำสารละลายแป้งที่ย่อยได้ไปหมัก (fermentation) ด้วยยีสต์ ซึ่งจะได้น้ำไวน์ (wine) เมื่อนำไปกรองและกลั่น ก็จะได้แอลกอฮอล์และกาก (stillage)

การใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช

การจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทำโดยการศึกษาอนุกรมวิธาน การเปรียบเทียบทางกายวิภาค สัณฐานวิทยา การศึกษาเอมบริโอ และสรีรวิทยา (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) การใช้ลักษณะดังกล่าวเพื่อบอกถึงสายพันธุ์พืชนั้น บางครั้งยังไม่เพียงพอต่อการแยกความแตกต่างให้ชัดเจน และแม่นยำได้ เนื่องจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่พืชนั้นขึ้นอยู่การแยกความแตกต่างของสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะที่พืชแสดงออก หรือลักษณะทางฟีโนไทป์ ของพืชนั้น อาจได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการทางด้านโมเลกุล มาช่วยแยกความแตกต่างของพืชแต่ละสายพันธุ์ ในระดับโมเลกุล ซึ่งปัจจุบันเป็นที่นิยม ดังนั้นที่ผ่านมาจึงได้มีการพัฒนาวิธีการในการตรวจสอบสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตโดยการใช้อิเล็กโทรโฟริซีสของไอโซไซม์ในระดับโปรตีนมาใช้ในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทางจีโนไทป์ (genotype) ได้ (สมิต บุญเสริมสุข และประวิทย์ จิตต์จำนงค์, 2532; Bassiri, 1976; Stegemann, 1984)

เทคนิคทางโมเลกุลมีความสำคัญในการวิจัยความหลากหลาย และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ หรือที่เรียกว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นการศึกษาเครื่องหมายพันธุศาสตร์ที่สำคัญอีกทั้งเป็นตัวบ่งชี้ส่วนการทำงานของยีน ซึ่งเป็นบริเวณของดีเอ็นเอที่ส่งผลการแสดงออกในสิ่งมีชีวิตรุ่นต่าง ๆ ดังนั้นในปัจจุบันนี้นวัตกรรมทางเครื่องหมายทางพันธุกรรมจึงมีความสำคัญมาก (Wagner, 1992) การวิเคราะห์ความหลายหลายทางพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลการศึกษา ในระดับ ดีเอ็นเอ เช่น ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชมีส่วนได้เปรียบกว่าการศึกษาทางสัณฐานวิทยา เพราะข้อมูลพันธุกรรมในสายดีเอ็นเอของพืชจะมีความคงตัว และไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อม สามารถตรวจสอบได้ทุกระยะของการเจริญเติบโตจากการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ เกิดจากการกลายพันธุ์ของเบสในสายนิวคลีโอไทด์ จึงทำให้เกิดลักษณะที่มีความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จึงนิยมนำมาใช้ในการศึกษาความแปรปรวน หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช โดยทั่วไปการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชชนิดต่าง ๆ ซึ่งพืชหลายชนิดมีลักษณะทางกายภาพคล้ายคลึงกันมาก จึงมีการประยุกต์โดยอาศัยเทคนิควิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่งของยีน หรือดีเอ็นเอ เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ใช้ตัวอย่างพืชปริมาณน้อยและมีความถูกต้องแม่นยำสูง (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) ซึ่งปัจจุบันเป็นที่นิยมได้มีการพัฒนาวิธีการในการตรวจสอบสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต โดยการใช้อิเล็กโตรโฟรีซีสของไอโซไซม์มาใช้ในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทาง

จีโนไทป์ได้ (สมิต บุญเสริมสุข และประวิทย์ จิตต์จำนง, 2532; Bassiri, 1976; Stegemann, 1984) ปัจจุบันมีการนำเอาวิธีการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ที่มีการแสดงความแตกต่าง หรือพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ในระดับโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอ โดยเครื่องหมายโมเลกุลมีส่วนช่วยในการจำแนกหรือตรวจสอบพันธุ์สัตว์และพันธุ์พืช โดยสามารถตรวจสอบได้จากทั้งต้นกล้าหรือต้นที่โตแล้ว (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) และยังสามารถนำไปศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งการใช้เทคนิคทางโมเลกุล เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นวิธีการที่นำมาใช้ในการจำแนก หรือตรวจสอบสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ และยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการ ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือด และพิสูจน์บุคคล (Weising, Atkinson, & Gardner, 1995)

หลักการทำพีซีอาร์ (polymerase chain reaction)

พีซีอาร์ หรือเรียกอีกชื่อว่า in vitro enzymatic gene amplification เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษาให้มีปริมาณสูงกว่าเดิมหลายล้านเท่า โดยใช้วิธีการในหลอดทดลองเทคนิคนี้ถูกค้นพบโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ.1983 (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536) หลักการทำพีซีอาร์คือ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ซึ่งในปฏิกิริยาพีซีอาร์ต้องมีองค์ประกอบเหล่านี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด ไพรเมอร์ เอนไซม์ Tag DNA polymerase และบัฟเฟอร์ (buffer) แล้วนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใส่เครื่อง Thermal Cycle ซึ่งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะทำเป็นรอบ ๆ โดยแต่ละรอบจะมี 3 ขั้นตอน คือ Denaturation เกิดขึ้น ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส Annealing ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับเบสที่เป็นคู่ผสมของเบสแต่ละตัวบนดีเอ็นเอของแม่พิมพ์ที่เป็นสายเดี่ยวเกิดขึ้นที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส Extension เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ต่อเนื่องจากจุดที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ที่ 72 องศาเซลเซียส เทคนิคการทำพีซีอาร์นั้น เป็นวิธีที่ต้องการปริมาณดีเอ็นเอน้อยและไม่จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์มากนัก (เอกดนัย กอกิมพงษ์, 2548) วิธีการสกัดดีเอ็นเอเพื่อการประยุกต์สำหรับ PCR นั้นมีรายงานในพืชหลายชนิด Kasajima, Ide, Ohkama-Ohtsu, and Hayashi (2004) ได้ดัดแปลงวิธี ของ Edwards, Johnstone, and Thompson (1991) ซึ่งใช้ 0.5 เปอร์เซ็นต์ SDS เป็นสารประกอบสำคัญในสารสกัด โดยลดปริมาณความเข้มข้นของ SDS ลงสิบเท่า เพื่อไม่ให้สารดังกล่าวมีผลรบกวนต่อการนำดีเอ็นเอไปใช้ และได้ลดขั้นตอนการสกัดให้เหลือเพียงขั้นตอนเดียว

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีดัดแปลงดังกล่าวสามารถนำไปใช้สำหรับพีซีอาร์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จีโนมพืช

จีโนม (genome) คือ สารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ) ทั้งหมดที่มีอยู่ภายในเซลล์ มีอยู่ทั้งในนิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย ในเซลล์มีจีโนม 1 ชุด หรือ หมายถึง 1 ชุดของดีเอ็นเอ หรือ 1 ชุดของโครโมโซม มีสารพันธุกรรมของจีโนมร้อยละ 99 อยู่ในนิวเคลียสเรียกว่า นิวเคลียร์ดีเอ็นเอซึ่งได้รับจากพ่อครึ่งหนึ่ง และแม่ครึ่งหนึ่งเป็นตัวควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมของลูก นอกจากนี้ยังมีดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน ซึ่งพบเป็นส่วนใหญ่ในจีโนมประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ และยังไม่ทราบบทบาทที่ชัดเจน (สุชาดา สุขหร่อง, 2552)

1) นิวเคลียร์จีโนม เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสของพืช มีลักษณะเป็นเส้นเรียงตัวกันอยู่บนโครโมโซม เป็นองค์ประกอบที่ใหญ่ที่สุดของจีโนมได้รับการถ่ายมาจากพ่อและแม่คนละครึ่ง ขนาดของจีโนมในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแตกต่างกัน ขนาดของนิวเคลียร์จีโนมผันแปรมากในสิ่งมีชีวิต (Hawkins, Grover, & Wendel, 2008) สำหรับดีเอ็นเอที่นิยมในการใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชนั้นสามารถใช้ดีเอ็นเอในนิวเคลียสซึ่งส่วนที่นิยมใช้ คือ ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) เนื่องจากเป็นบริเวณนี้มีจำนวนชุดของยีนเดียวกันบนโครโมโซมสูงทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือโคลนได้ง่าย

2) จีโนมที่อยู่นอกนิวเคลียส เป็นสารพันธุกรรมที่บรรจุอยู่ในไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ โดยที่ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียของสิ่งมีชีวิตจะมีตำแหน่งของดีเอ็นเอจำนวนมาก โดยแต่ละตำแหน่งนั้นจะมีโมเลกุลของดีเอ็นเออยู่หลายชุด จีโนมในไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์จะประกอบด้วยยีนที่เป็นส่วนอาร์อาร์เอ็นเอ (rRNA) ของไรโบโซมของออร์แกแนลนี้ สำหรับทีอาร์เอ็นเอ (tRNA) จำนวนมากใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน มีโปรตีนจำนวนหนึ่งที่ยังคงอยู่และแสดงหน้าที่จำเพาะต่อออร์แกแนลนี้ ส่วนโปรตีนอื่น ๆ จะอยู่ภายในนิวเคลียส สังเคราะห์บนไซโทพลาสมิกไรโบโซมแล้วจึงส่งมายังออร์แกแนลต่าง ๆ มีการค้นพบว่ารหัสพันธุกรรมที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตบางชนิดมีผลเนื่องจากยีนที่มาจากไมโทคอนเดรียนั่นเอง ด้วยเหตุนี้การวิเคราะห์ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย จึงถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่น่าจะมีลักษณะอันสืบทอดมาจากแม่เพียงฝ่ายเดียว ลักษณะพันธุกรรมที่ถูกควบคุม และถ่ายทอดมาสู่รุ่นลูกซึ่งเป็นผลมาจากยีนในไมโทคอนเดรียนั้น แตกต่างจากลักษณะพันธุกรรมที่ควบคุมจากสารพันธุกรรมในนิวเคลียส เนื่องจากไม่มีการกระจายอันเนื่องจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส เป็นลักษณะจาก

แม่เพียงฝ่ายเดียว ถูกกำหนดให้แสดงออกอย่างเฉพาะเจาะจง ไม่สามารถทำแผนที่ยีนเชื่อมต่อกับกลุ่มลิงเกจในนิวเคลียสได้ และลักษณะทางฟีโนไทป์ที่เป็นผลจากการกลายของสารพันธุกรรมภายนอกนิวเคลียสนั้นจะแสดงออกภายหลังการแลกเปลี่ยนโครโมโซมในนิวเคลียส (สุชาดา สุขหร่อง, 2552)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจำแนกมันสำปะหลังโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับด้านสรีระวิทยาของมันสำปะหลัง เช่น การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในแปลงรวบรวมพันธุ์ (Ex situ) และสภาพถิ่นเดิม (In situ) ซึ่งเก็บรวบรวมข้อมูล 277 สายพันธุ์ ในแต่ละลักษณะใช้เกณฑ์ และการตรวจสอบลักษณะพันธุ์ตามหลักสากล โดยใช้ทรงต้น มุมของการแตกกิ่ง จำนวนระดับการแตกกิ่ง จำนวนลำต่อต้น ความสูงของต้น ความสูงของการแตกกิ่งชั้นที่ 1 ความนูนของรอยแผลใบ สีของลำต้น การเจริญเติบโตทางลำต้น สีของยอดอ่อน ขนที่ยอดอ่อน รูปร่างแผ่นใบกลาง สีของแผ่นกลางใบ ความยาวก้านใบ มุมของก้านใบที่ทำกับลำต้น จำนวนแฉกบนแผ่นใบ ความยาวแผ่นใบกลาง ความกว้างแผ่นใบกลาง สีก้านใบ รูปทรงของหัว การมีขั้วของหัว ลักษณะผิวของหัว สีผิวเปลือกชั้นนอกของหัว สีเปลือกชั้นในของหัว การหลุดล่อนของผิวชั้นนอก ความยากง่ายในการลอกเปลือกมันชั้นใน ลักษณะการลงหัว รอยคอดที่หัว สีเนื้อของหัว จำนวนหัวต่อต้น และเปอร์เซ็นต์แป้งของหัว สามารถนำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยามาใช้ในการจำแนกเบื้องต้น และนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์ได้ (ประพิศ วองเทียม, 2555) แต่การศึกษาดังกล่าวใช้ระยะเวลายาวนานถึง 5 ปี การวิจัยและพัฒนาสายพันธุ์มันสำปะหลังต้องดำเนินงานอย่างต่อเนื่องจำเป็นต้องมีแผนการดำเนินงานและการทำงานเป็นทีมจึงจะประสบผลสำเร็จ การได้พันธุ์มันสำปะหลังที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูง มีลักษณะต่าง ๆ ที่ดี ปรับตัวได้ดีในเขตพื้นที่ปลูก ต้านทานต่อโรค และแมลงที่สำคัญ (สกล ฉายศรี และคณะ, 2550)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS มีความแปรผันสูงเพียงพอที่จะใช้แยก และระบุชนิดพืชได้ดี โดยพบว่ามีความแปรผันสูงกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ 3-4 เท่า เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีรายงานการใช้พิสูจน์ความแตกต่างระหว่างพืชหลายชนิด (Kress & Erickson, 2008) บริเวณ ITS1 ในพืชทั่วไปรายงานว่ามีขนาด 107-681 คู่เบส (Wang et al., 2015) ซึ่งนักวิจัยเลือกใช้ในการศึกษาทางอนุกรมวิธาน และสายสัมพันธ์วิวัฒนาการของพืชอย่างกว้างขวาง ทำให้มีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้มีมากกว่า 50,000 ข้อมูลจากพืชหลากหลายชนิดที่

ถูกบันทึกเก็บไว้ในฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์สากล หรือ GenBank ทำให้ง่ายต่อการนำมาพัฒนาสร้างไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Hajibabaei, Singer, Hebert, & Hickey, 2007) รายงานการวิจัยที่ใช้บริเวณ ITS1 ในการแยกความแตกต่างของพืชในระดับสกุล ได้แก่ Booy, Hendriks, Smulders, Groenendael, and Vosman (2000) รายงานศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของพืชสกุล *Tulipa* (Liliaceae) โดยเทคนิค PCR-RFLP ที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I และ *Hin*fI พบว่าบริเวณ ITS1 มีความแปรปรวนสามารถจำแนกชนิดของพืชสกุล *Tulipa* ออกจากกันได้ Qiao et al., (2009) รายงานข้อมูลบริเวณ ITS1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาด 175~179 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างเครื่องยาที่ได้จาก *Amomum villosum* กับพืชอีก 10 ชนิด จากสกุล *Alpinia* พบว่าแยกพืชสกุล *Amomum* และ *Alpinia* ออกจากกันได้ นอกจากนี้ ประสบอร รินทอง, ภัทรพล เพียรชนะ และวนิดา ไทรชมภู. (2556) ศึกษาแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของสมุนไพรเร่วใหญ่ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) บริเวณ ITS1 ของตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษากับพืชที่อ้างอิง 4 ชนิด ได้แก่ *Amomum xanthioides, Amomum villosum, Alpinia mutica* และ *Alpinia nigra* พบว่าบริเวณ ITS1 ของเร่วใหญ่ลักษณะของทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษาตรงกับ *A. mutica* ที่เกิดการผสมข้ามสายพันธุ์บ่งชี้ได้ว่าเร่วใหญ่ที่ใช้เป็นยาในปัจจุบันมีแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์จากพืช *A. mutica* ในส่วนของ Dhivya et al., (2012) ได้ศึกษาพืชสมุนไพรพื้นเมืองของอินเดียที่ใช้เป็นยา คือ *Boerhavia diffusa* ร่วมกับพืชในวงศ์เดียวกันที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกันจำนวน 15 ตัวอย่างโดยศึกษาบริเวณ nuclear ribosomal DNA ประกอบด้วย ITS, ITS1, ITS2 และยีนจากคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ คือ *psb*A-*trn*H วิเคราะห์โดยสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่ามีความแตกต่างกัน 26, 30, 16 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าบริเวณ ITS และ ITS1 มีความเหมาะสมในการแยกความแตกต่างระดับชนิดในสกุลของ *Boerhavia* ในส่วนของงานการวิจัยที่ใช้บริเวณ ITS1 ศึกษาความแตกต่างของพืชในระดับสายพันธุ์จนสามารถพัฒนาไปเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ เช่น ประสบอร รินทอง และคณะ (2556) ตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาเร่วน้อย *(Amomum uliginosum*) จำนวน 7 ตัวอย่าง มีเครื่องหมายดีเอ็นเอตรงกับ *A. uliginosum* โดยใช้บริเวณ ITS1 พบว่าเครื่องยาเร่วน้อยทุกตัวอย่างมีขนาดเท่ากับ 180 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันของเครื่องหมายดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 แสดงให้เห็นว่าเครื่องยาเร่วน้อยต่างชนิดกัน สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบเอกลักษณ์เครื่องยาเร่วน้อยได้ นอกจากนี้ Drabkova, Kirschner, and Vlcek (2002) ใช้บริเวณ ITS1 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสายพันธุ์ของ

Haberlea rhodopensis จากตัวอย่างที่เก็บได้จากสถานที่แตกต่างกัน 4 แห่ง พบว่าบริเวณดังกล่าวมีความแปรปรวนเพียงพอที่จะใช้จำแนกในระดับสายพันธุ์ได้

ภาพที่ 2-1 บริเวณ Internal transcribed spacer1 (ITS1) ของพืชที่อยู่ระหว่างยีน 18S *rRNA* และ 5.8S *rRNA* (ประสบอร รินทอง และคณะ, 2556)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของไมโทคอนเดรีย

พืชส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างของไมโทคอนเดรียลจีโนมที่มีลักษณะเป็นวงแหวนเกลียวคู่ (double stranded circular DNA) ถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมทางด้านแม่ (maternal inheritance) ไมโทคอนเดรียลจีโนมของพืชมีขนาดต่างกันมากประมาณ 180-2500 กิโลเบส อัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียของพืชช้ากว่าในสัตว์ 40-100 เท่า ช้ากว่าในนิวเคลียร์จีโนม และคลอโรพลาสต์จีโนม 12 และ 3-4 เท่า ตามลำดับ (สุชาดา สุขหร่อง, 2552) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าไมโทคอนเดรียมีหน้าที่ในการผลิตพลังงานให้กับเซลล์สิ่งมีชีวิตผลลัพธ์บางอย่างที่ได้ในกระบวนการนี้ ได้แก่ อนุมูลอิสระของออกซิเจน ทำให้เกิดความเสียหายกับสารพันธุกรรม ซึ่งหลายทฤษฎีสนับสนุนว่าความเสียหายนี้สามารถทำให้เกิดการแก่ของเซลล์ได้ นอกจากนี้การที่ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสของไมโทคอนเดรียนั้นมีประสิทธิภาพการซ่อมแซมตัวเองต่ำ จึงเป็นผลให้เมื่อเกิดความผิดพลาดในกระบวนการจำลองตัวเองจากดีเอ็นเอต้นแบบจึงส่งผลให้เกิดการส่งต่อรูปแบบสารพันธุกรรมที่ผิดพลาดไปยังเซลล์อื่น ๆ ที่เกิดจากการแบ่งตัว หรืออาจเกิดการส่งทอดพันธุกรรมไปสู่ลูกหลานได้ (สุทัศน์ ดวงจิตร, 2554) ทำให้สามารถใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับที่สูงกว่าระดับชนิด (species) หรือวงศ์ (family) เช่น ในระดับซับคลาส(subclass) หรือไฟลัม (phylum) ได้ดี (สุชาดา สุขหร่อง, 2552) ยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีบริเวณถอดรหัสสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน สังเคราะห์ tRNA และ rRNA นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่ไม่มีการถอดรหัส เรียกว่า non-coding ดีเอ็นเอ ที่ยังไม่มีรายงานการศึกษาการทำงานของบริเวณนี้แน่ชัด ส่วนสาเหตุของการแปรผันของลำดับเบสในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมาจากข้อสันนิษฐานหลายประการ คือ สายดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียนั้นไม่ได้รับการป้องกันจากโปรตีน เช่น ฮีสโตน เหมือนกันกับนิวเคลียร์ดีเอ็นเอจึงทำให้มีการแลกเปลี่ยนหรือสัมผัสกับสิ่งที่จะที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ได้ง่าย และอาจเกิดจากการที่

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีโอกาสถูกทำให้เสียหายจากอนุมูลอิสระได้ง่าย โดยเฉพาะ reactive oxygen species ซึ่งเป็นผลต่อเนื่องจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ที่เกิดขึ้นภายในออแกเนลล์ บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ คาดว่าเป็นบริเวณไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนมากนัก จึงน่าจะทำให้เกิดหลากหลายของลำดับเบสในระดับย่อยกว่าชนิด เช่น ระดับย่อยในประชากรได้ง่ายกว่าบริเวณอื่น ด้วยเหตุนี้อัตราการกลายพันธุ์ในไมโทคอนเดรีย จึงสูงกว่าในนิวเคลียสนิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ในระดับวงศ์ สกุล ชนิด หรือแม้แต่สายพันธุ์ (LeDoux et al., 1992) สำหรับในพืช และมันสำปะหลังยังไม่มีรายงานการใช้ บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ศึกษาความแตกต่างระดับ สกุล ชนิด หรือสายพันธุ์

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ปิเปตอัตโนมัติ (Auto pipette) ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
2. ทิป และทริปกรอง ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
3. หลอดทดลองขนาด 0.2, 0.6, 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
4. ชุดอุปกรณ์ gel documentation (Ingenius, Syngene, United Kingdom)
5. เครื่องเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra, Germany)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) (Sigma, Germany)
7. ชุดเครื่องสกัดดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า (Bio-Active Ltd., Jappan)
8. เครื่องถ่ายภาพเจล
9. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Memment GmbH)
10. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Tanita, Japan)
11. NanoDrop 200/2000 C spectrophotometer (Themo Scientific, USA)
12. เครื่องแก้ว
13. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ
14. เครื่องไมโครเวฟ

3.2 สารเคมี

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ Plant DNA Kit (OMEGA, USA)
2. Agarose (Seakem, USA)
3. Ethidium bromide (Vivantis Technologies Bhb, Malaysia)
4. 6X Loading dry
5. Absolute ethanol (Merck, Germany)
6. 2X GoTaq™ Green MasterMix
7. 100 bp DNA Ladder
8. LB broth (Hardy dianostics)
9. ไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ ITS1 และ non-coding ดีเอ็นเอ

10. 0.5X SB buffer

11. ชุดทำบริสุทธิ์สำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Genenaid International, Taiwan)

3.3 การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของมันสำปะหลัง 18 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ RAYONG 72, MENTEGA, PIROON, KRABURI, V13, WILD 2, HANATEE, LOAS, WILD 1, RAYONG 5, SRIRACHA 1, NEP, RAYONG 1, YOLK, RAYONG 9, KU50 และ RAYONG 90 จากแปลงทดลองของสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ใส่ถุงแช่ลงในน้ำแข็ง ขนส่งมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล (BS3109) อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของมันสำปะหลังด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Plant DNA Kit ทำตามวิธีแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (OMEGA, USA) มีขั้นตอนดังนี้ ตัดตัวอย่างใบสดให้มีขนาดเล็กที่สุด รวบรวมน้ำหนักให้ได้ประมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร บดตัวอย่างด้วยแท่งบดให้ละเอียดเติม P1 buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ระหว่างการบ่มให้กลับหลอดขึ้นลงเป็นระยะหลังจากนั้นเติม P2 buffer 140 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่ในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 100% Isopronol ปริมาตร 210 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 g เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนที่ใสทิ้ง เติมน้ำปราศจาก Nuclease ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ RNAseA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากันทันทีเติม P3 buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ 100% ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากันทันที ย้ายตัวอย่างลงใน Hibind DNA Mini ที่ประกอบด้วย Collection tube ขนาด 2 มิลลิกรัมแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทสารใน Collection tube ทิ้งและประกอบเข้ากับ HiBind DNA Mini column เหมือนเดิม แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g ใช้เวลา 2 นาที หลังจากนั้นย้าย HiBind DNA Mini column ประกอบเข้ากับหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้น เติมน้ำปราศจาก Nuclease ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้น

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นวัดปริมาตรดีเอ็นเอและคุณภาพดีเอ็นเอด้วย NanoDrop 200/2000 C spectrophotometer (Themo Scientific, USA) เก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1) บริเวณ ITS1

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X GoTaq™ Green MasterMix 10 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบของมันสำปะหลังแต่ละตัวอย่าง 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ที่จำเพาะในบริเวณ ITS1 ปริมาตร10 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรรวมด้วยน้ำปราศจาก Nuclease ให้เป็น 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยมีขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที
Annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 Final Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้โดยปิเปตแต่ละตัวอย่างที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ด้วย 1% Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.5X SB buffer ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 60 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA marker จำนวน 400 นาโนกรัม จากนั้นทำการตรวจสอบดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยชุดถ่ายภาพเจล และโปรแกรมวิเคราะห์ (Gel documentation for fluorescence) (Syngene international Ltd., England)

2) บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร เช่นเดียวกับบริเวณ ITS1 แต่เปลี่ยนไพรเมอร์เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะในบริเวณยีน *trn-Phe* และ *trn-F* ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพารา (GenBank accession no. AP014526) และเปลี่ยนอุณหภูมิ Annealing เป็นที่ 54 องศาเซลเซียส

3.4.3 การทำผลผลิตพีซีอาร์ให้มีความบริสุทธิ์

ทำผลผลิตพีซีอาร์ที่ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์สำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Genenaid International, Taiwan) โดยเติม DF buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลองที่มีผลผลิตพีซีอาร์ผสมให้เข้ากันกับการ vortex เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นดูดถ่ายสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน DF column ที่อยู่บน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งหลอด collection tube ที่มีสารละลายไหลลงมาทิ้งไป นำหลอด collection tube หลอดใหม่มาสวมแทนหลังจากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,500 g เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายที่ไหลลงมาทิ้งไปจากนั้นนำหลอด collection tube สวมกลับตามเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,500 g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นย้าย DF column ไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจาก Nuclease อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที โดยเปิดฝาทั้ง DF column และ หลอดทดลอง จากนั้นผลผลิตพีซีอาร์จะตกลงมาที่หลอดทดลอง

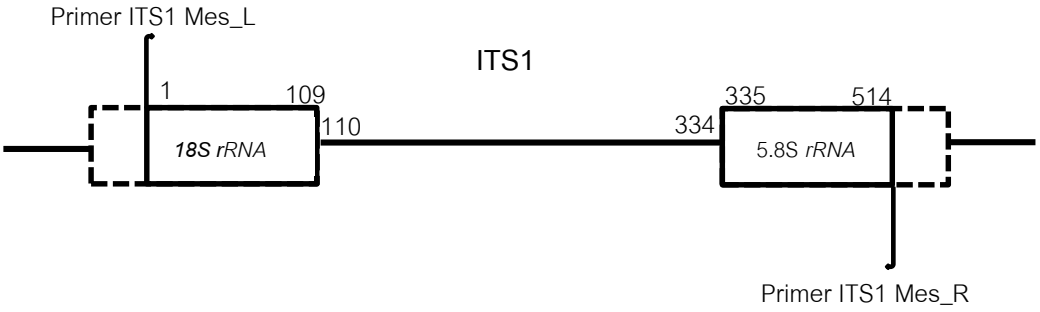
3.4.4 การอ่านลำดับเบส

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในข้างต้นส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท 1st BASE Laboratories SdnBhd (Malaysia) จากนั้นศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่สนใจด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.0 (Hall,1999) เปรียบเทียบความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านระบบเครือข่ายอินเตอร์เนต (www.ncbi.nlm.nih.gov/) และวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ระหว่างยีน *trn-Phe* และ *trn-F* ของไมโทคอนเดรียด้วยโปรแกรม Clustal X (Thomson, Gibson, Plewniak, Jeanmougin, & Higgins, 1997) หาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7

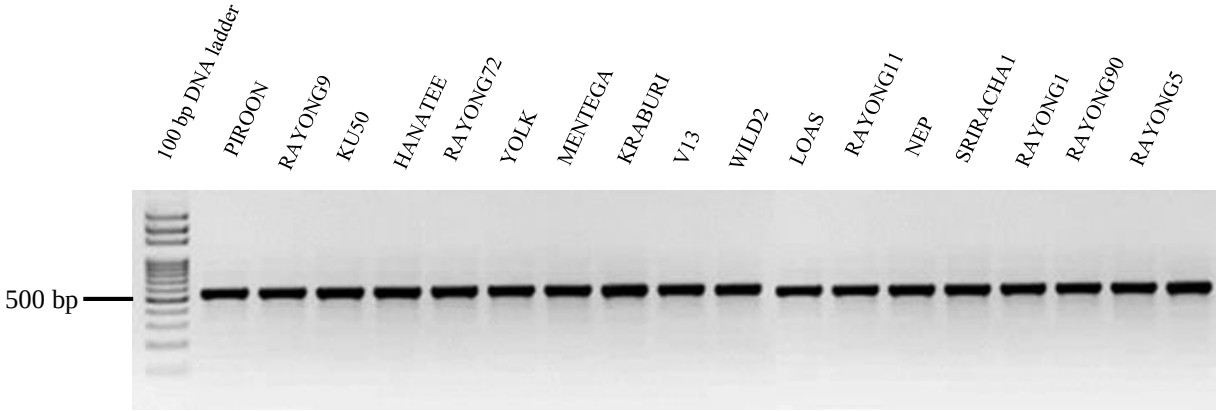
บทที่ 4
ผลการทดลอง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลังจำนวน 17 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 Mes_R และ ITS1 Mes_L ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Plukenetia loretensis* จากฐานข้อมูล GenBank (accession no. KP794453) ตำแหน่งที่ 110 และตำแหน่งที่ 334 ตามลำดับ (ภาพที่ 4-1) พบผลผลิตพีซีอาร์ของมันสำปะหลังมีขนาดเท่ากันทุกสายพันธุ์ ภายหลังอ่านลำดับเบสพบว่าผลผลิตที่ได้มีขนาดเท่ากับ 514 คู่เบส (ภาพที่ 4-2)



ภาพที่ 4-1 บริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลังที่เพิ่มจำนวนได้จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 Mes_R และ ITS1 Mes_L



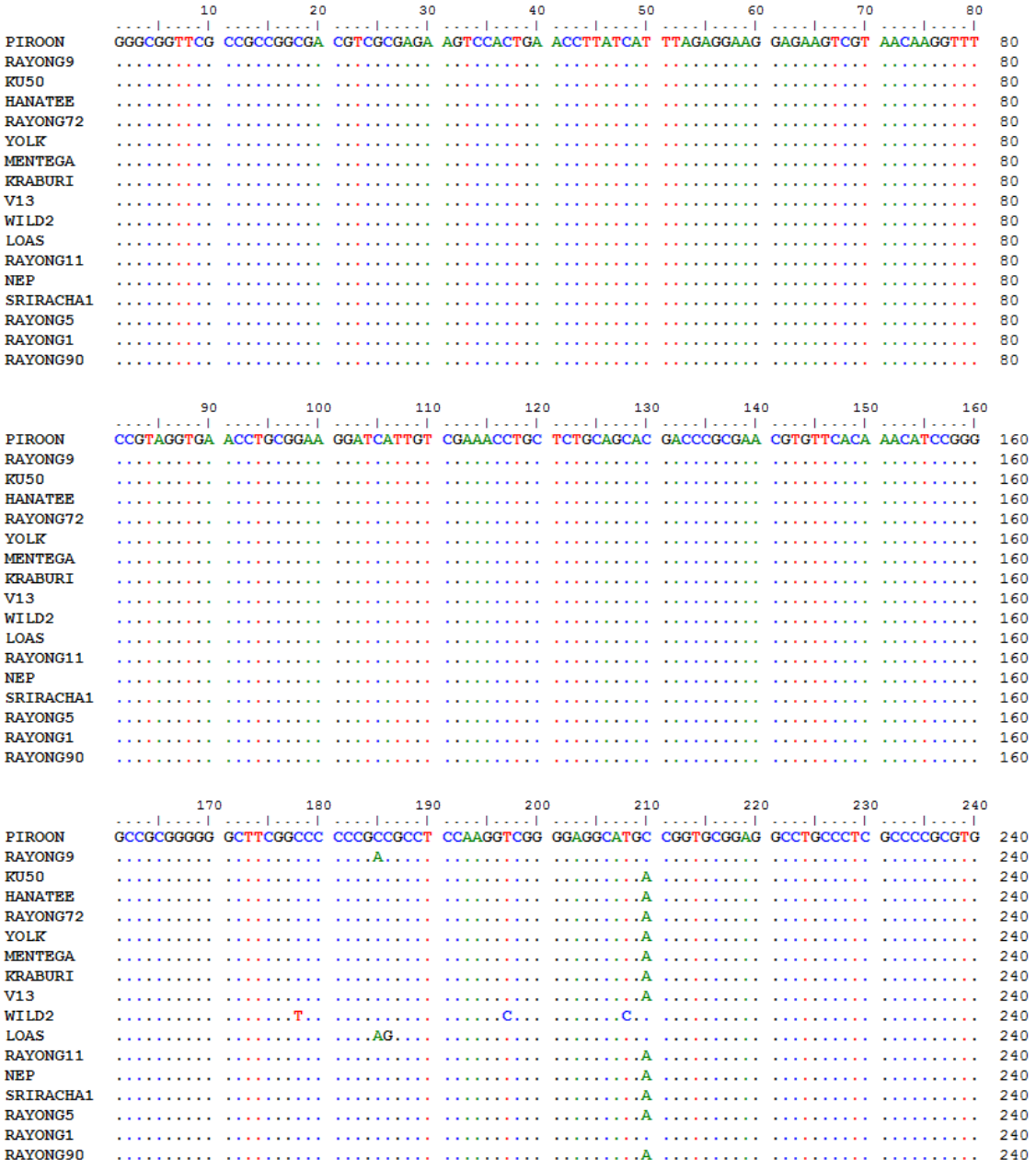
ภาพที่ 4-2 ผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลัง ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 SB buffer ที่ความต่างศักย์ 60 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1

เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ ดังภาพที่ 4-2 ของมันสำปะหลังส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาตรวจสอบผลด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0 (Hall, 1999) และเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลังทั้ง 17 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์มีจำนวน 225 คู่เบส (ภาพที่ 4-3 และภาพที่ 4-4) พบความแตกต่างของลำดับเบส 8 ตำแหน่งคือตำแหน่งที่ 178, 185, 186, 197, 208, 210, 244 และ 236 มีการแทนที่ของเบสแต่ละสายพันธุ์ ดังตารางที่ 4-1 มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.016 (ตารางที่ 4-2)

ตารางที่ 4-1 ตำแหน่งของเบสบริเวณ ITS1 ที่แตกต่างกันของมันสำปะหลัง 17 สายพันธุ์ เทียบเคียงกับมันสำปะหลังสายพันธุ์ PIROON

ตำแหน่งเบสถูกแทนที่	สายพันธุ์	ชนิดเบสที่เทียบเคียง	ชนิดเบสที่ถูกแทนที่
178	WILD 2	C	T
185	LOAS, RAYONG 9	C	A
186	LOAS	C	G
197	WILD 2	T	C
208	WILD 2	T	C
210	KU 50, HANATEE, RAYONG 72, YOLK, MENTEEGA, KRABURI, V 13, RAYONG 11, NEP, SRIRACHA 1, RAYONG 5, RAYONG 1, RAYONG 90	C	A
244	WILD 2	G	A
326	KU 50, HANATEE, RAYONG 72, YOLK, MENTEEGA, KRABURI, V 13, WILD 2, RAYONG 11, NEP, SRIRACHA 1, RAYONG 90	C	T



ภาพที่ 4-3 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ที่เทียบเคียงกันระหว่างตัวอย่างมันสำปะหลัง 17 สายพันธุ์ โดยตำแหน่ง และสัญลักษณ์จุด (.) คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกัน

250 260 270 280 290 300 310 320
PIROON CTCGCCGCGG CCGCAACAAC CAACCCCGGC GCGAGAAGCG CCAAGGAACA TGAAACGAAG AGAGGGCGCT CCCGTTCGGG 320
RAYONG9 320
KU50 320
HANATEE 320
RAYONG72 320
YOLK 320
MENTEGA 320
KRABURI 320
V13 320
WILD2 ...A..... 320
LOAS 320
RAYONG11 320
NEP 320
SRIRACHA1 320
RAYONG5 320
RAYONG1 320
RAYONG90 320
330 340 350 360 370 380 390 400
PIROON ACGCGCCGTC CTCTTTCGAG AACCAAAACG ACTCTCGGCA ACGGATATCT CGGCTCTCGC ATCGATGAAG AACGCAGCAA 400
RAYONG9 400
KU50 .....T..... 400
HANATEE .....T..... 400
RAYONG72 .....T..... 400
YOLK .....T..... 400
MENTEGA .....T..... 400
KRABURI .....T..... 400
V13 .....T..... 400
WILD2 .....T..... 400
LOAS 400
RAYONG11 .....T..... 400
NEP .....T..... 400
SRIRACHA1 .....T..... 400
RAYONG5 400
RAYONG1 400
RAYONG90 .....T..... 400

ภาพที่ 4-3 (ต่อ)

การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมบริเวณ ITS1

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลังทั้ง 18 สายพันธุ์ มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.016 (ตารางที่ 4-1) เมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลัง สายพันธุ์ระยอง 1 เป็นตัวแทนเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และละหุ่ง (*Ricinus communis*) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกันกับมันสำปะหลังพบว่าบริเวณ ITS1 มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมต่ำเท่ากับ 0.048 และ 0.134 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-1) และเมื่อเปรียบเทียบกับพืชต่างวงศ์คือถั่วเขียว *(V. radiate*) และองุ่นแดง *(V. vinifera*) มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.234 และ 0.272 ตามลำดับ แสดงว่าบริเวณ ITS1 ของพืชมีความแปรปรวนต่ำ

ตารางที่ 4-2 ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ระหว่างสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง

Cultivar of *M. esculenta*	WILD 2	RAYONG 9	LOAS	PIROON, RAYONG 1	RAYONG 5	K 50, H, Y, M, K, V, R 11 ,N, R 90, R 72, S
WILD 2	0.000					
RAYONG 9	0.013	0.000				
LOAS	0.016	0.002	0.000			
PIROON, RAYONG 1	0.011	0.002	0.004	0.000		
RAYONG 5	0.013	0.004	0.007	0.002	0.000	
K 50, H, Y, M, K, V, R 11 ,N, R 90, R 72, S	0.011	0.007	0.009	0.004	0.002	0.000

หมายเหตุ วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยโมเดลของ Tamura 3-parameter

H = HANATEE K 50 = KU 50 K = KRABURI

M = MENTEGA N = NEP R 11 = RAYONG 11

R 72 = RAYONG 72 R 90 = RAYONG 90 S = SRIRACHA 1

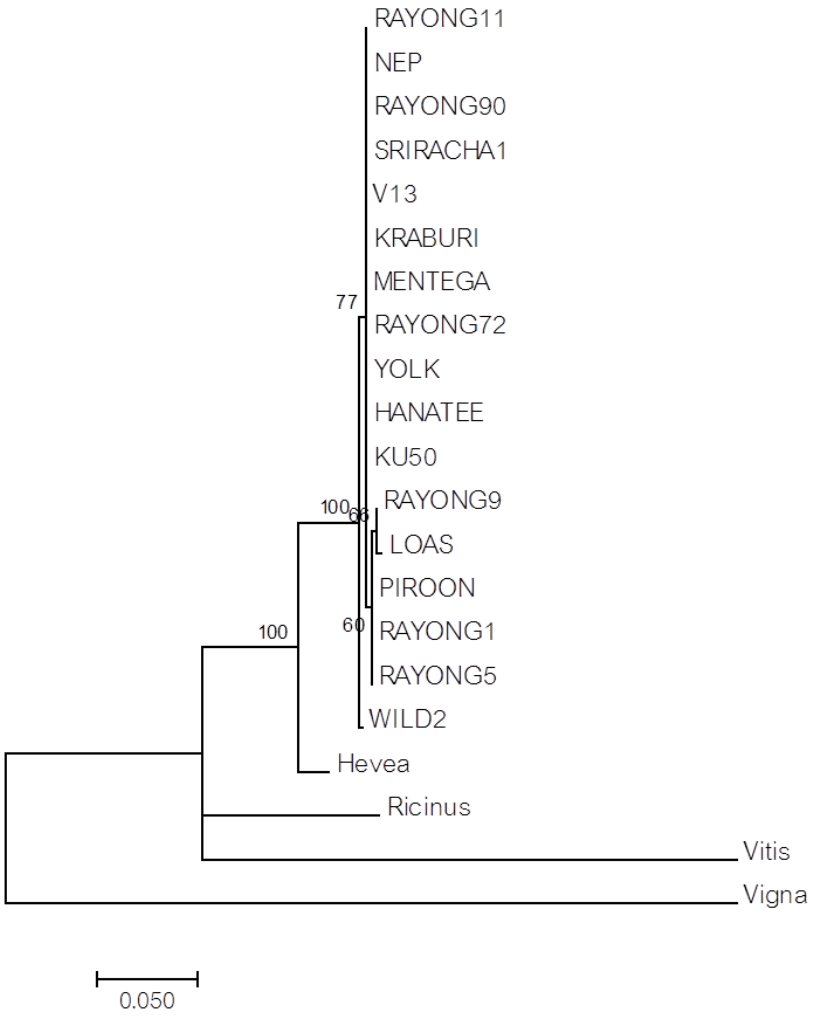
Y = YOLK V = V 13

ตารางที่ 4-3 ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลังกับพืชในวงศ์เดียวกัน (Euphorbiaceae) และต่างวงศ์ คือ Vitaceae และ Fabaceae

Species	*M. esculenta*	*H. brasiliensis*	*R. communis*	*V. radiata*	*V. vinifera*
M. esculenta	0.000				
H. brasiliensis	0.048	0.000			
R. communis	0.134	0.125	0.000		
V. radiata	0.234	0.218	0.234	0.000	
V. vinifera	0.272	0.286	0.307	0.345	0.000

หมายเหตุ วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยโมเดลของ Tamura 3-parameter

เมื่อนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่ามันสำปะหลังทุกสายพันธุ์อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งแยกจากตัวอย่างนอกกลุ่ม คือ พืชในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกันกับมันสำปะหลัง ได้แก่ ยางพารา (*H. brasiliensis*) และละหุ่ง (*R. communis*) กับพืชต่างวงศ์ คือ ถั่วเขียว *(V. radiate*) และองุ่นแดง *(V. vinifera*) อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4-5)

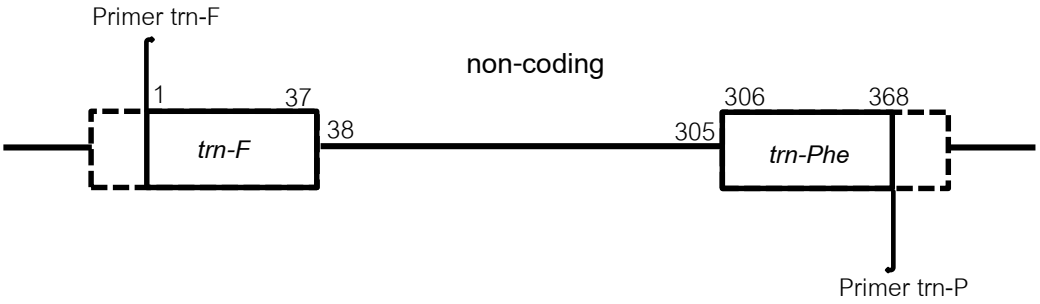


ภาพที่ 4-4 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) บริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลังทั้งหมด และของตัวอย่างพืชนอกกลุ่มจากฐานข้อมูล GenBank คือ พืชวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกันกับมันสำปะหลัง ได้แก่ ยางพารา (*H. brasiliensis*) และละหุ่ง (*R. communis*) กับพืชต่างวงศ์ คือ ถั่วเขียว *(V. radiate*) และองุ่นแดง *(V. vinifera)* โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยโมเดลของ Tamura 3-parameter สับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

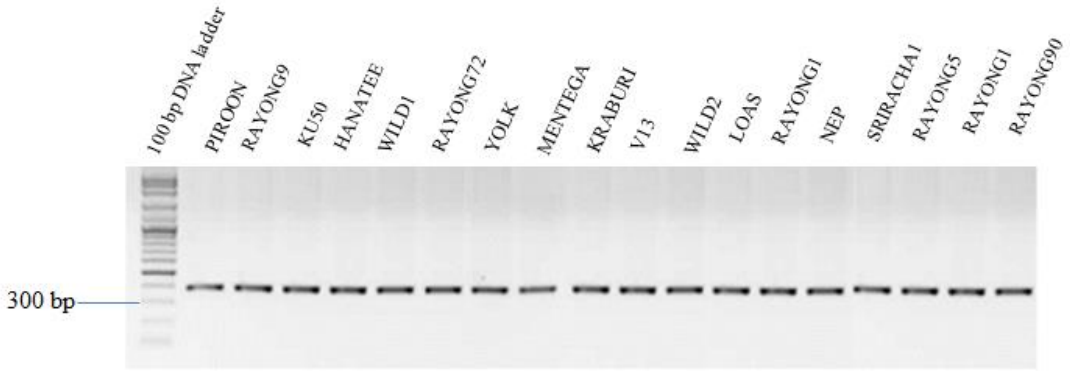
<u>หมายเหตุ</u> ตัวเลข 0.050 = ค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง และตัวเลขบนกิ่ง (%) = ค่าความเชื่อมั่นที่เกิดจากการสับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลัง จำนวนทั้ง 18 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ trn-Phe และ trn-F ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพารา (GenBank acession no. AP014526) (ภาพที่ 4-5) พบว่าผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดเท่ากันทุกสายพันธุ์เท่ากับ 368 คู่เบส (ภาพที่ 4-6)



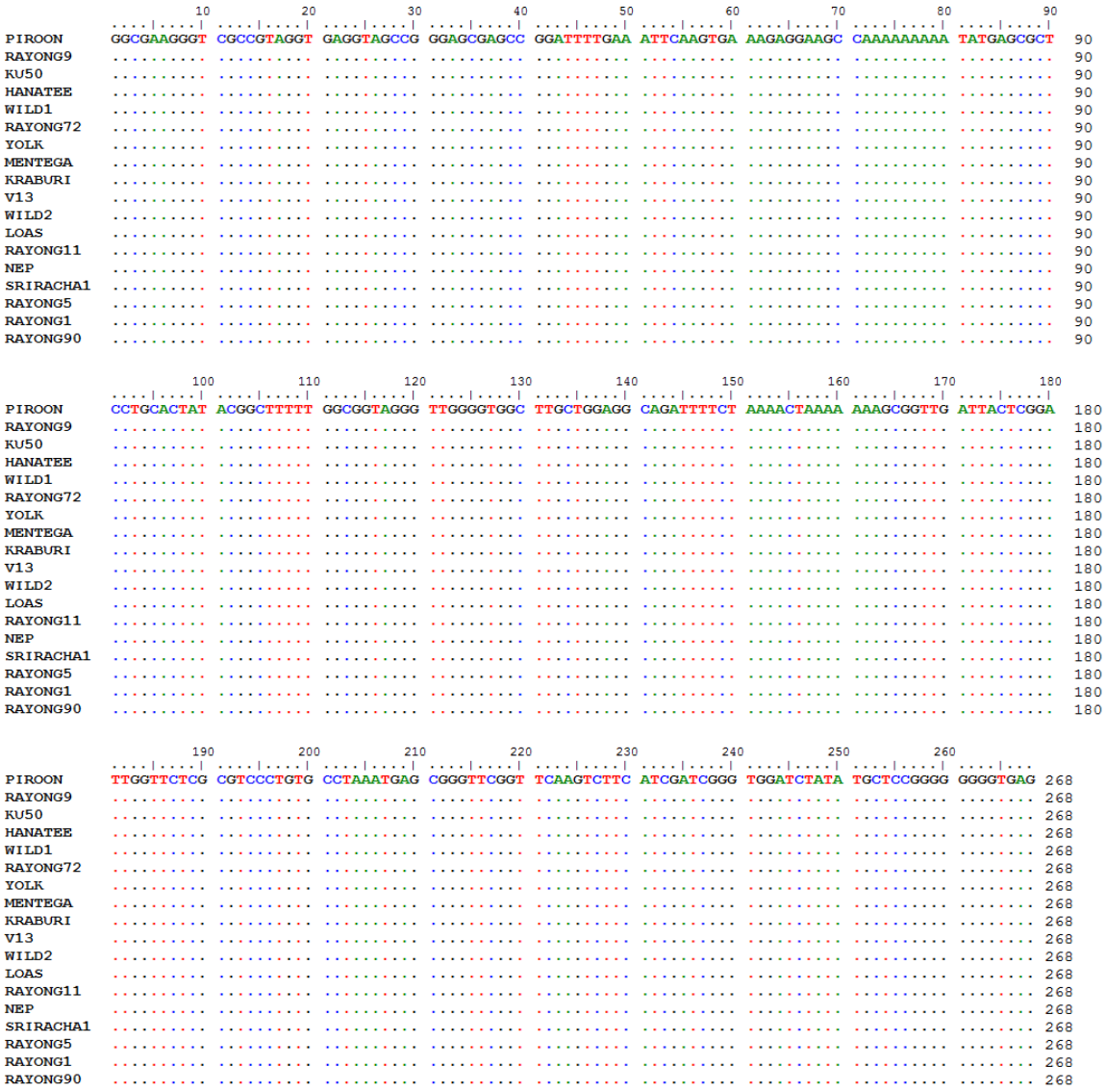
ภาพที่ 4-5 บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลังที่เพิ่มจำนวนได้จากคู่ไพรเมอร์ trn-F และ trn-P



ภาพที่ 4-6 ผลผลิต PCR ของบริเวณ non-coding ของมันสำปะหลัง ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 SB buffer ที่ความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ

เมื่อนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์ในภาพ 4-6 มาวิเคราะห์ และเทียบเคียงแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลังมีขนาดเท่ากับ 268 คู่เบส ทุกสายพันธุ์ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังภาพที่ 4-5



ภาพที่ 4-7 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ที่เทียบเคียงกันระหว่างตัวอย่างมันสำปะหลัง 18 สายพันธุ์ โดยตำแหน่ง และสัญลักษณ์จุด (.) คือลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกัน

การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RAYONG 1 เป็นตัวแทนของมันสำปะหลังมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพารา (*H. brasiliensis*) และละหุ่ง (*R. communis*) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกันกับมันสำปะหลัง พบว่า non-coding ดีเอ็นเอ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.063 และ 0.158 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-3) เมื่อเปรียบเทียบกับพืชต่างวงศ์คือ ถั่วเขียว (*V. radiate*) และองุ่นแดง (*V. vinifera*) มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.092 และ 0.186 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-4 ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลังและพืชในวงศ์เดียวกัน (Euphorbiaceae) และต่างวงศ์ คือ Vitaceae และ Fabaceae

Species	*M. esculenta*	*H. brasiliensis*	*R. communis*	*V. radiata*	*.V. vinifera*
M. esculenta	0.000				
H. brasiliensis	0.063	0.000			
R. communis	0.158	0.102	0.000		
V. radiata	0.092	0.059	0.148	0.000	
V. vinifera	0.186	0.132	0.214	0.137	0.000

หมายเหตุ วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non coding ดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยโมเดลของ Jukes-Cantor

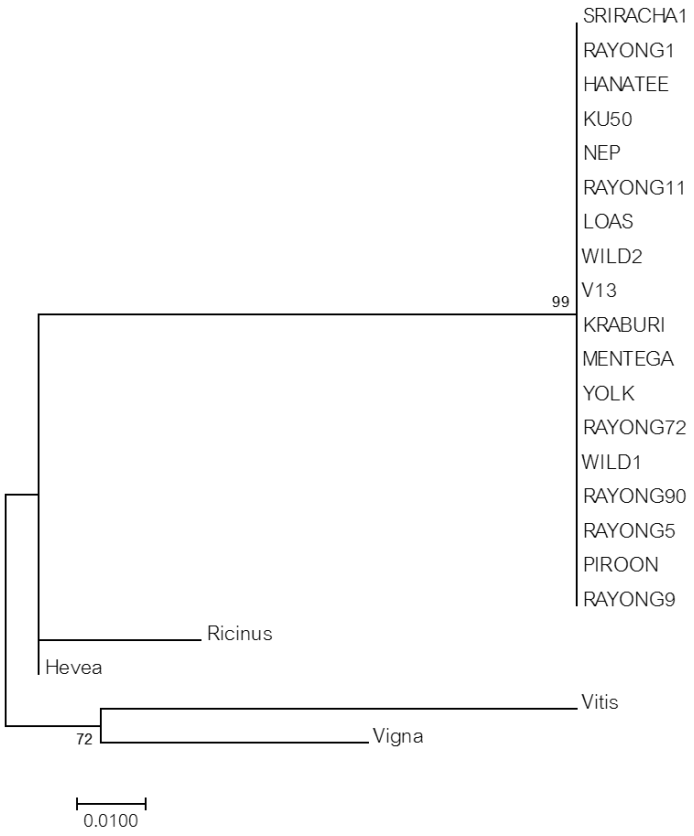
การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 เปรียบเทียบกับบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ

เมื่อนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมบริเวณ ITS1 เปรียบเทียบกับ non-coding ดีเอ็นเอ พบว่าบริเวณ ITS1 มีความแปรปรวนในระดับสายพันธุ์มากกว่า non-coding ดีเอ็นเอ โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระเท่ากับ 0.000-0.016 ส่วนบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับศูนย์ เมื่อเปรียบเทียบค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดในพืชในวงศ์เดียวกัน (Euphorbiaceae) พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมบริเวณ ITS1 กับ non-coding ดีเอ็นเอ ใกล้เคียงกันคือ 0.048-0.134 และ 0.063-0.158 ตามลำดับ ส่วนระหว่างวงศ์พบว่าบริเวณ ITS1 มีความแปรปรวนมากกว่าบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.234-0.272 และบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ มีค่าเท่ากับ 0.092-0.186

ตารางที่ 4-5 ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ non coding ดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง กับพืชในวงศ์เดียวกัน (Euphorbiaceae) และต่างวงศ์คือ Vitaceae และ Fabaceae

cultivar	ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม	
	ITS	non-coding
ระหว่างสายพันธุ์	0.000-0.016	0.000
ระหว่างชนิดในวงศ์เดียวกัน	0.048-0.134	0.063-0.158
ระหว่างวงศ์	0.234-0.272	0.092-0.186

เมื่อนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลังไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่ามันสำปะหลังทุกสายพันธุ์อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งแยกจากตัวอย่างนอกกลุ่ม คือ พืชในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกันกับมันสำปะหลัง ได้แก่ ยางพารา (*H. brasiliensis*) และละหุ่ง (*R. communis*) กับพืชต่างวงศ์ คือ ถั่วเขียว *(V. radiate*) และองุ่นแดง (*V. vinifera*) อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4-9)



ภาพที่ 4-8 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลังทั้งหมด และของตัวอย่างพืชนอกกลุ่มจากฐานข้อมูล GenBank คือ พืชในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกันกับมันสำปะหลัง ได้แก่ ยางพารา (*H. brasiliensis*) และละหุ่ง (*R. communis*) กับพืชต่างวงศ์ คือ ถั่วเขียว *(V. radiate*) และองุ่นแดง (*V. vinifera*) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 ด้วยโมเดลของ Jukes-Cantor สับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

<u>หมายเหตุ</u> ตัวเลข 0.0100 = ค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่ง และตัวเลขบนกิ่ง (%) = ค่าความเชื่อมั่นที่เกิดจากการสับเปลี่ยนข้อมูล 1,000 ครั้ง

บทที่ 5
อภิปราย และสรุปผล

การศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาบริเวณ ITS1 ที่อยู่ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอเพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลในการบ่งบอกถึงความเป็นเอกลักษณ์ที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบระดับสายพันธุ์ของมันสำปะหลังที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceous โดยเริ่มต้นจากการใช้ไพรเมอร์ ITS1 Mes_R และ ITS1 Mes_L ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลัง GenBank accession no. JQ743203 ในตำแหน่งของยีน 18S *rRNA* และ 5.8S *rRNA* ตามลำดับ ผลผลิตพีซีอาร์ของมันสำปะหลังทั้งหมดมีขนาด 514 คู่เบส เท่ากันทุกสายพันธุ์เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank มีความเหมือนมากที่สุดกับ ITS1 ของมันสำปะหลังดังที่คาดการณ์ไว้ เมื่อวิเคราะห์ขนาดของบริเวณ ITS1 มีขนาดเท่ากับ 225 คู่เบส เท่ากันทุกสายพันธุ์ สอดคล้องกับบริเวณ ITS1 ในพืชทั่วไปที่มีขนาดระหว่าง 107-681 คู่เบส (Wang et al., 2015) เช่น ในวงศ์กะทกรก (Passifloraceae) สกุลย่อย (Subgenus) ของ *Passiflora* ได้แก่ *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* และ *Passiflora* ซึ่งบริเวณ ITS1 มีขนาดเท่ากับ 291, 291, 301 และ 292 คู่เบส ตามลำดับ (Giovanna, Geraldo, & Loreta, 2015) พืชวงศ์ตับเต่า (Boletaceae) ใน Genus *Mimulus* พบว่า *M. platycalyx, M. nasutus*, *M. laciniatus, M. guttatus, M. tilingii* และ *M. glaucescens* มีขนาดเท่ากับ 189, 213, 214, 214, 214 และ 214 คู่เบส ตามลำดับ (Carol, Kermit, & Neil, 1993) และในพืชวงศ์ขนุน (Moraceae) เช่น มะเดื่อ (*F. carica* L.) จำนวน 10 สายพันธุ์ มีขนาดระหว่าง 200-279 คู่เบส (Ghada et al., 2009) ส่วนพืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ได้แก่ เร่วน้อย (*Amomum villosum*) ที่มีขนาดเท่ากับ 178 คู่เบส (Qiao et al., 2009) เครื่องยาเร่วน้อย (*A. uliginosum*) มีขนาดเท่ากับ 180 คู่เบส (ประสบอร รินทอง และคณะ, 2556) และเร่วใหญ่ (*A. mutica*) มีขนาด 184 คู่เบส (ประสบอร รินทอง และคณะ, 2556) และในวงศ์ถั่ว (Fabaceae) เช่น สกุลย่อยของราชพฤกษ์ (*Chamaecrista*) มีขนาด 315 คู่เบส (Mishra, Kumar, Rodrigues, Shukla, & Sundaesan, 2016) เป็นต้น

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าบริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลังทั้ง 18 สายพันธุ์มีลำดับเบสแตกต่างกันเพียง 8 ตำแหน่ง (1.76 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่าบริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลังมีความแปรปรวนต่ำมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม 0.000 - 0.016 สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ ลักษณา ชัยประสิทธิ์ และชูตา บุญภักดี (2556) ที่ศึกษาบางส่วนของบริเวณ ITS1 ขนาดประมาณ

60 คู่เบส ไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 5.8S และบางส่วนของบริเวณ ITS2 (ระหว่าง 5.8S และ 28S) ของยางพารา ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 382 คู่เบส พบความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณดังกล่าว 2 คู่เบส (ระยะห่างทางพันธุกรรม 0.000-0.005) ซึ่งไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ แต่รายงานวิจัยของ Ertuğrul et al. (2014) ที่พบว่าบริเวณ ITS1 ใช้จำแนกความแตกต่างระดับสายพันธุ์ของ *Barbarea integrifolia* DC. วงศ์ผักกาด (Brassicaceae) ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นที่ใกล้จะสูญพันธุ์ของประเทศตุรกี จำนวน 27 ตัวอย่างได้ เช่นเดียวกับ Ghada et al. (2009) จำแนกสายพันธุ์ในมะเดื่อ (*F. carica* L.) จำนวน 11 สายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ ประสบอร รินทอง และคณะ (2556) นำมาใช้ตรวจเอกลักษณ์ระดับสายพันธุ์ของเครื่องยาเร่วน้อย *(A. uliginosum*) ได้จำนวน 7 ตัวอย่าง

อนึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถนำพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกันกับมันสำปะหลังมาทำการทดลองได้ อีกทั้งไม่พบข้อมูลใน GenBank จึงใช้พืชชนิดอื่นซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกันกับมันสำปะหลังอีก 2 ชนิด ร่วมในการศึกษา คือ ยางพารา (*H. brasiliensis*) และละหุ่ง (*R. communis*) มีความแตกต่างจำนวน 28 (6.29 เปอร์เซ็นต์) และ 93 (20.57 เปอร์เซ็นต์) คู่เบสตามลำดับ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม 0.048-0.134 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับพืชต่างวงศ์อีก 2 ชนิด คือ ถั่วเขียว *(V. radiata* (L.)) และองุ่นแดง (*V. vinifera*) พบความแตกต่างจำนวน 105 คู่เบส มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม 0.234-0.272 เมื่อนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระดับสายพันธุ์ และระดับสกุลมาวิเคราะห์ร่วมกันพบว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระดับชนิดน่าจะอยู่ระหว่าง 0.016-0.048 แสดงว่าบริเวณ ITS1 มีความแปรปรวนเหมาะสำหรับใช้ในการแยกความแตกต่างระดับชนิดได้ซึ่งมีการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดแล้วในพืชหลายชนิด เช่น พืชในวงศ์ถั่ว (Fabaceae) ได้แก่ สกุล *Cassia*, *Senna* และ *Chamaecrista* (Mishra et al., 2016) พืชในวงศ์กระเพรา (Lamiaceae) ได้แก่ มิ้น *(Mentha*) (Hribova et al., 2011) เป็นต้น

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding ของมันสำปะหลังทั้งหมดด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ในบริเวณยีน *trn-Phe* และ *trn-F* ที่ขนาบข้างของบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของยางพารา (*H. brasiliensis*) (GenBank accession no. AP014526) ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดเท่ากับ 368 คู่เบส เท่ากันทุกสายพันธุ์ และพบว่าขนาดของ non-coding ดีเอ็นเอเท่ากับ 268 คู่เบส เท่ากันหมดและไม่พบความแตกต่างของลำดับเบส สอดคล้องกับรายงานว่าส่วนใหญ่ที่ไมโทคอนเดรียในพืชมีวิวัฒนาการช้ามากเมื่อเทียบกับไมโทคอนเดรียของสัตว์ สาเหตุที่ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของพืชมีการกลายพันธุ์น้อยมากอาจเนื่องมาจากมีระบบการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพที่ช่วยในการตรวจสอบข้อมูลได้ถูกต้อง การใช้ไมโทคอนเดรียลจีโนมเป็นดีเอ็นเอ

บาร์โค้ดในพืชจึงมีข้อจำกัด (Kress et al., 2008; Mustapha et al., 2015; Asaf et al., 2016) สอดคล้องกับ ณัฐกร เพชรชา, ดวงกมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข (2554) ศึกษาความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลจีโนมพบว่าไม่เพียงพอที่จะใช้จำแนกพืชในระดับสายพันธุ์ได้ จึงเลือกศึกษายีนในคลอโรพลาสต์ คือ *rpo*B และ *rpo*C1 และใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดระดับชนิดสำหรับศึกษาในพืชสกุล *Alpinia*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ ของมันสำปะหลังไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชในวงศ์เดียวกันแต่ต่างสกุลจากมันสำปะหลัง คือ ยางพารา และละหุ่ง มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.063-0.158 และพืชต่างวงศ์ คือ ถั่วเขียว และองุ่นแดง มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.234-0.272 ไม่สามารถแยกความแตกต่างระดับสายพันธุ์ แต่บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ น่าจะนำมาใช้ระบุเอกลักษณ์ตั้งแต่ระดับสกุลขึ้นไปได้

เมื่อเปรียบเทียบความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างบริเวณ ITS1 และ non-coding ดีเอ็นเอ พบว่าบริเวณ ITS1 มีความแปรปรวนมากกว่าโดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรม 0.000-0.016 ส่วนบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ มีค่าเท่ากับ 0 ที่เป็นดังนี้เพราะนิวเคลียร์จีโนมได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมมาจากพ่อ และแม่คนละครึ่ง (Hawkins et al., 2008) ส่วน non-coding ดีเอ็นเอ ของไมโทคอนเดรียลจีโนมน่าจะสืบทอดมาจากแม่เพียงฝ่ายเดียว (สุชาดา สุขหร่อง, 2552) ทั้งนี้ลำดับเบสบริเวณ ITS1 ที่มีความแปรปรวนต่ำ และไม่พบความแปรปรวนบริเวณ non-coding ดีเอ็นเอ อาจเนื่องมาจากตัวอย่างมันสำปะหลังทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาน่าจะมีบรรพบุรุษร่วมกันทำให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนหรือซ้ำกันในแต่ละชุดของจีโนม (Baldwin et al., 1995) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาของมันสำปะหลังพบว่ามีข้อมูลของการแลกเปลี่ยนและปรับปรุงพันธุ์มาอย่างต่อเนื่องจึงคาดว่ามันสำปะหลังปัจจุบันจะมีแหล่งกำเนิดเดียวกัน คือมาจากประเทศบราซิลเนื่องจากพบการกระจายตัว และความแปรปรวนของสายพันธุ์มากมายในประเทศดังกล่าว (ประพิศ วองเทียม, 2555)

สรุปผลการทดลอง

บริเวณ ITS1 ของมันสำปะหลังทั้ง 18 สายพันธุ์มีขนาดเท่ากันคือ 225 คู่เบส มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 8 ตำแหน่ง (1.76 เปอร์เซ็นต์) บริเวณ non-coding ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังทั้งหมด มีขนาดเท่ากันคือ 268 คู่เบส ไม่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ แสดงว่าบริเวณ ITS1 และบริเวณ non-coding ของมันสำปะหลังมีความแปรปรวนต่ำ ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุเอกลักษณ์ในระดับสายพันธุ์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเพิ่มเติมบริเวณอื่นของนิวเคลียร์จีโนม หรือคลอโรพลาสต์จีโนมเพื่อใช้แยกความแตกต่างระดับสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง

2. ควรศึกษาพืชกลุ่มที่มีความแตกต่างจากมันสำปะหลังในระดับชนิด และสกุล เพื่อพิจารณาใช้บริเวณ ITS1 และ non-coding ดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในลำดับขั้นที่เหมาะสมทางอนุกรมวิธาน (taxonomic categories) ต่อไปได้

บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2546). *เทคโนโลยีของแป้ง* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรมวิชาการเกษตร. (2545). เกษตรดีที่เหมาะสมสำหรับมันสำปะหลัง.ใน กรมวิชาการเกษตร (บรรณาธิการ), *เอกสารกรมวิชาการเกษตรลำดับที่ 13*, (หน้า 22) กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

จรุงสิทธิ์ ลิ่มศาลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา. (2537). ประวัติการแพร่กระจายความสำคัญและดินฟ้าอากาศที่เหมาะสมในมันสำปะหลัง. ใน กรมวิชาการเกษตร (บรรณาธิการ), *เอกสารวิชาการศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง*, กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

จรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา. (2537). ชนิดและพันธุ์มันสำปะหลัง. ใน กรมวิชาการเกษตร (บรรณาธิการ), เอกสารวิชาการศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง, กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

จรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา และอัจฉรา ลิ่มศิลา. (2547). ประวัติและความสำคัญของมันสำปะหลัง. ใน กรมวิชาการเกษตร (บรรณาธิการ), *เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง*. (หน้า 1-7) กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. (2546). องค์ประกอบทางเคมีของมันสำปะหลัง. ใน มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย (บรรณาธิการ), เ*อกสารประกอบการฝึกอบรมโครงการพัฒนาศักยภาพการผลิตและการตลาดมันสำปะหลัง*. (หน้า 1-17). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ้มภัย และธีระชัย ธนานันต์. (2558). การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, *23*(6), 994-1005.

ณัฐกร เพชรชา, ดวงกมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข. (2554). การประเมินดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ *rpo*C1 และ *rpo*B ในการใช้เป็น DNA barcode และกรณีศึกษาในพืชสกุล *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae) Assessment of *rpo*B and *rpo*C1 Plastid DNA Regions for Their Suitability as DNA Barcodes for Identification of Plants in the Genus *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประพิศ วองเทียม. (2555). การศึกษาจำแนกลักษณะพันธุกรรมโดยสัณฐานวิทยาของพืชไร่ (มันสำปะหลัง) ในแปลงรวบรวมพันธุ์ (Ex situ) และสภาพถิ่นเดิม (In situ) = Utilization of the research was to characterize the genetic morphology and physiology of cassava in the region. ผลงานฉบับเต็มขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ. ระยอง: กลุ่มวิจัย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร.

ประสบอร รินทอง, ภัทรพล เพียรชนะ และวนิดา ไทรชมภู. (2556). การศึกษาแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเร่วใหญ่โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacer 1. *วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ, 8*(3), 93-97.

พวงเพชร นรินทราพร. (2547). การแปรรูป และการใช้ประโยชน์มันสำปะหลัง. เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 91-110.

ลักษณา ชัยประสิทธิ์ และชูตา บุญภักดี. (2556). ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacer1 (ITS) ของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). ใน *รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 6*. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์. (2554). การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ และการระบุเพศของสละหม้อจากจังหวัดจันทบุรี. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา, วิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ. (2536). *ทฤษฎี การประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR. Technology*, (หน้า 208) กรุงเทพฯ: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, ประพิศ วองเทียม, ศุภชัย สารกาญจน์, และเพียงเพ็ญ ศรวัต. (2551). การจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลังที่รวบรวมไว้โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย. *รายงานผลงานวิจัยและพัฒนาด้านพืชและเทคโนโลยีการเกษตร*, 175-176.

ศานิต สวัสดิกาญจน์. (2557). *พืชอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ, โอเดียนสโตร์.

สกล ฉายศรี, โอภาษ บุญเส็ง, พชรดา ฉายศรี, ประภาส ช่างเหล็ก, กิ่งกานท์ พานิชนอก, สุปราณี งามประสิทธิ, นิตยา ดนตรี และนิกร ตูมสันเทียะ. (2550). *รายงานผลการดำเนินงาน โครงการประเมินเชื้อ พันธุกรรมมันสำปะหลังสำหรับจัดทำฐานข้อมูลด้านการปรับปรุงพันธุ์.* โครงการวิจัยสถาบันวิจัย และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2549-2550.

สุชาดา สุขหร่อง. (2552). *ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุทัศน์ ดวงจิตร. (2554). ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและการประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์. *วารสารนิติเวชศาสตร์, 4*(1), 53-65.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). *จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โสภณ สินธุประมา. (2526). ประวัติความสำคัญและดินฟ้าอากาศที่เหมาะสมในมันสำปะหลัง. ใน กรมวิชาการเกษตร (บรรณาธิการ), *เอกสารวิชาการมันสำปะหลังศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง*, (หน้า 41-62). กรุงเทพฯ. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง.

สมิต บุญเสริมสุข และประวิทย์ จิตต์จำนง. (2532). การศึกษา isozyme กับพรรณไม้ป่า. ในที่ประชุมฝ่ายวนวัฒวิจัยกองบำรุงกรมป่าไม้ (หน้า 5). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2557). *สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญ และแนวโน้มปี 2558.* เข้าถึงได้จาก https://www.oae.go.th/ download/ document tendency/ journalofecon2558.pdf.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และทัศนารถ กระจ่างวุฒิ. (2556). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Passiflora*. *Thai Journal of Genetics, 5*(1), 214-217.

เอกดนัย กอกิมพงษ์. (2548). *Thermal Cycler เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR*., เข้าถึง ได้จาก http://www.thaiscience.com/lab_vol/p22/Thermal_Cycler.asp.

อัจฉรา ลิ่มศิลา และจรุงสิทธิ์ ลิ่มศิลา. (2547). *พันธุ์มันสำปะหลัง*. เอกสารวิชาการ มันสำปะหลัง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 8-14.

Adewui, S. R., & Akindahunsi, A. A. (1994). Cassava processing, consumption and cyanide toxicity. *Toxicol Environ Health, 43*(1), 13-23.

Anand, P., Samit, Ray., & Amit, R. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-A review. *Phylogenetics and Evolutionary Biology, 2,* 1-9.

Archak, S. (2000). *Plant DNA* fingerprinting: an overview. *Agricultural Biotechnology*, *2,* 1-6.

Asaf, S., Khan, A. L., Khan, A. R., Waqas, M., Kang, S-M., Khan, M. A., Shahzad, R., Seo, C. W., Shin, J. H., & Lee, I. J. (2016). Mitochondrial genome analysis of wild rice (*Oryza minuta*) and its comparison with other related species. *Public Library of Science* ONE, *11*(4), 1-14.

Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J., Mwojciechowski, M. F., Cambell, C. S., & Donoghe, M. J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of Missouri Botanical Garden, 82,* 247-277.

Baraket, G., Saddoud, O., Chatti, K., Mars, M., Marrakchi, M., Trifi, M., & Salhi-Hannachi, A. (2011). Sequence analysis of the Internal Transcribed Spacers (ITSs) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in fig cultivars (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae, 120*, 34-40.

Bassiri, A. (1976). Baeley cultivar identification by use of isozyme: electrophoretic pattern. *Canadian Journal of Plant Science. 56,* 1-6.

Bediako, M. K. B., Tapper, B. A., & Pritchard, G. G. (1981). Metabolism, synthetic site, and translocation of cyanogenic glycosides in cassava, *Tropical Root Crop: Reserch strategies for the 1980s,* 143-148.

Booy, G., Hendriks, R. J. J., Smulders, M. J. M., Van Groenendael, J. M., & Vosman, B. (2000). Genetic diversity and the survival of populations. *Plant Biology, 2,* 379–395.

Bellotti, A. C., Smith, L., & Lapointe, S. L. (1999). Recent advances in cassava pest management. *Annual Review of Entomology, 44*, 343-370.

Bruijn, G. W. D. (1971). Etude du character cyanogenetique du manioc *(Manihot esculenta* Crantz). *Mededelingen landbouwhogeschool*, *71*(13), 1-140.

Carol, E. R., Kermit, R., & Neil, A.(1993). Straus variation in the ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS1 and ITS2) among eight taxa of the *Mimulus guttatus* Species. *Molecular* Biology *and Evolution, 10*(6), 1213-1288.

Carlos, C., Alejandro, H., Luis, A., & Dora, F. (2015). DNA Barcodes in Fig Cultivars (*Ficus carica* L.) Using ITS regions of ribosomal DNA, the *psb*A-*trn*H spacer and the *mat*K coding sequence. *American Journal of Plant Sciences, 6,* 95-102.

Camille, M. B., Stephen, R. K., Park. I., Daniel B. S., & Douglas, R. T. (2007). Variation in mutation rate & polymorphism among mitochondrial genes of *silene vulgaris*. *Society for Molecular Biology and Evolution, 24*(8), 1783-1791.

Choi, B. H., & Kim, J. H. (1997). ITS sequence and speciation on Far Eastern Indigofera (Leguminosae). *Journal of Plant Research, 110,* 339-346.

Christensen, A. C. (2014). Plant mitochondrial genome evolution can be explained by DNA repair mechanisms. *Genome Biology and Evolution*, *5*(6), 1079-1086.

Dhivya, S., Dhivya, S., Rajeev, K., Jijo, C. J., Ramachandran, V. S., & Sathishkumar, R. (2012) . DNA barcode ITS effectively distinguishes the medicinal plant *Boerhavia diffusa* from Its adulterants. *Genomics Proteomics Bioinformatics Dec*, *10*(6), 364-367.

Drabkova, L., Kirschner, J., & Vlcek, C. (2002) . Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*, *20,* 161-75.

Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of genomic plant DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, *19*, 1349.

Ertuğrul, F., Etem, O., Ali, K., Hüseyin, T., Güzin, T., Seda, B., & Mehtap, A. (2014). Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationships of endangered endemic plant *Barbarea integrifolia* DC. (Brassicaceae) in Turkey. *Turkish Journal of Botan*y, *38,* 1169-1181.

Giovanna, C. G., Geraldo, M., & Loreta, B. F. (2015). Efficiency of ITS sequences for DNA barcoding in *Passiflora* (Passifloraceae). *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(4), 7289-7303.

Ghada, B., Olfa, S., Khaled, C., Messaoud, M., Mohamed, M., Mokhtar, T., & Amel, S. H. (2009). Sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in fig cultivars (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae*, *120*, 34-40.

Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. N., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetic and population genetics. *Trends in Genetics*, *23*, 167-172.

Hall, T. A. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium, 41*, 95-98.

Hawkins, J. S., Grover, C. E., & Wendel, J. F. (2008). Repeated big bangs and the expanding universe: Directionality in plant genome size evolution. *Plant Science, 174*, 557-562.

Hershkovitz, M. A., & Lewis, L. A. (1996). Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Molecular Biology and Evolution*, *13*, 1276-1295.

Hribova, E., Cizkova, J., Christelova, P., Taudien, S., Langheand, E., & Dolezel, J. (2011). The ITS1–5.8S-ITS2 sequence region in the Musaceae: structure, diversity and use in molecular phylogeny. *Public Library of Science*, *6,* 17863.

Jeffrey, D. P., & Laura, A. H. (1988). Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. *Journal of Molecular Evolution, 28*, 87-97.

Kasajima, I., Ide, Y., Ohkama-Ohtsu, N., & Hayashi, H. (2004). A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Molecular Biology, 22,* 49-52.

Kong, P., Hong, C. X., Tooley, P. W., Ivors, K., Garbelotto, M., & Richardson, P. A. (2004).Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis Of ribosomal DNA ITS-1. *The Journal of Applied Microbiology*, *81*(4), 792-799.

Kress, J. W., & Erickson, D. L. (2008). DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 105*, 2761-2762.

Lebot, V. (2009). The tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids. *The Centre for Agriculture and Bioscience International*, *17*, 143.

LeDoux, S. P., Wilson, G. L., Beecham, E. J., Stevnsner, T., Wassermann, K., & Bohr, V. A. (1992). Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, *13*, 1967-1973.

Liepelt, S., Bialozyt, R., & Ziegenhagen, B. (2002). Wind-dispersed pollen mediates postglacial gene flow among refugia. *Proceedings of the Natlional Academy of Sciences*, *99*, 14590-14594.

Mishra, P., Kumar, A., Rodrigues, V., Shukla, A. K., & Sundaesan, V. (2016). Feasibility of nuclear ribosomal region ITS1 over ITS2 in barcoding taxonomically challenging genera of subtribe *Cassiinae* (Fabaceae), *Open access peer-reviewed scientific mega, 4,* 2638.

Mustapha, S.B., Tamarzizt, H. B., Baraket, G., Abdallah, D., & Hannachi, A. S. (2015). Genetic diversity and differentiation in *Prunus* species (Rosaceae) using chloroplast and mitochondrial DNA CAPS markers. *Genetic and Molecular Research*, *14*(2), 4177-4188.

Palmer, J. D. (1985). Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. *Plenum,* 131-240.

Petit, R. J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., & Vendramin, G. G. (2005). Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, *14*, 689-701.

Pring, D. R., & Lonsdale, D. M. (1985). Molecular biology of higher plant mitochondrial DNA. *International Review of Cytology*, *97*, 1-46.

Qiao, C. F., Han, Q. B., Zhao, Z. L., Wang, Z. T., Xu, L. S., & Xu, H .X. (2009). Sequence analysis based on ITS1 region of nuclear ribosomal DNA of *Amomum villosum* and ten species of Alpinia. *Journal of Food and Drug Analysis*, *17,* 142-145.

Stegemann, H. (1984) . Retrospect on 25 years of cultivar identification by protein patterns and prospects for the future. *Seed Science Techno. 15*, 20-31.

Thomson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The Clustal X interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research, 25*(24), 487-4882.

Wagner, D. B. (1992). Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. *New Forests*, *6,* 373-390.

Wang, X. C., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J. H., Cai, D., & Li, J. Q. (2015) . ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? . *Molecular Ecology Resources*, *15*, 573-586.

Ward, B. L., Anderson, R. S., & Bendich, A. J. (1981). The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (cucurbitaceae). *Cell, 25*, 793-803.

Weising, K., Atkinson, R. G., & Gardner, R. C. (1995). Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Meth Applications, 4,* 249-255.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมี และวิธีการเตรียม

ภาคผนวก ก
สารเคมี และวิธีการเตรียม

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA plus)

เตรียมปริมาณ 50 µg 100 reaction

Stock 100 bp DNA ladder plus (0.5 µg)	50	µl
TE buffer	200	µl
6X Orange DNA loading dye	20	µl
6X DNA loading dye	20	µl

2. 1X SB buffer (เตรียมสารละลายปริมาตร 100 ml)

NaOH	8	g
Boric acid	45	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

ภาคผนวก ข

งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ไม่มีความแปรปรวน

No Nucleotide Sequence Variation at Non-Coding Mitochondrial DNA of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

ยุรนันท์ ทรวงทองหลาง และ ชูตา บุญภักดี*

Yuranun Thuangtonglang and Chuta Boonphakdee*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทยในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อพิจารณาใช้เป็นเครื่องหมายชีวโมเลกุลของมันสำปะหลัง โดยศึกษากับมันสำปะหลังจำนวน 18 สายพันธุ์ เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 368 คู่เบส ด้วยคู่ไพรเมอร์ trn-Phe และ trn-F ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์พบว่าบริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลังทุกตัวอย่างมีขนาดเท่ากับ 268 คู่เบส ไม่มีลำดับเบสที่แตกต่างกันและผลการศึกษาร่วมกับพืชในวงศ์ Euphorbiaceous เดียวกันอีก 2 ชนิด คือ ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และละหุ่ง (*Ricinus communis*) พบความแตกต่างจำนวน 10 และ 33 คู่เบส ตามลำดับ และพืชต่างวงศ์อีก 1 ชนิด คือถั่วเขียว *(Vigna radiata* (L.)) พบความแตกต่างจำนวน 32 คู่เบส ดังนั้นบริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเครื่องหมายชีวโมเลกุลในระดับสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอ/ มันสำปะหลัง/ ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ/ พีซีอาร์

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important economic crop of Thailand. The purpose of this study is to investigate the non-coding mitochondrial DNA region of cassava for use as a molecular marker. In this study, 18 cassava cultivars were used to obtain the 368-bp segment using trn-Phe and trn-F primers in the polymerase chain reaction. The non-coding mitochondrial DNA region of all samples were 268 base pairs, with no nucleotide difference. Comparison between sequences of other members within Euphorbiaceous (same family as cassava), Para rubber (*Hevea brasiliensis*) and castor bean (*Ricinus communis*), revealed 10 and 33 base pairs being different, respectively. Moreover, when compared to mung bean (*Vigna radiata* (L.)), out of Euphorbiaceous family, found 32 base pairs different. Therefore, the non-coding mitochondrial DNA region is not suitable for cassava identification at the cultivar level.

Keywords: DNA/ Cassava/ Mitochondrial DNA/ PCR

*Corresponding author: chuta@buu.ac.th

1. บทนำ

มันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของมนุษย์ที่มีราคาถูกกว่าพืชผลิตแป้งชนิดอื่นๆ (Lebot, 2009) การจำแนกสายพันธุ์ของมันสำปะหลังมีประโยชน์ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตรงตามความต้องการ เช่น ผลผลิตสูง มีคุณภาพ ต้านทานต่อโรคและแมลง เป็นต้น (วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์, 2554) ปัจจุบันนี้การนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาศึกษาข้อมูลพันธุกรรมพืช เพื่อใช้ระบุชนิดหรือสายพันธุ์ได้รับความนิยมมากขึ้น ซึ่งให้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำกว่าการจำแนกแบบดั้งเดิมที่ใช้แต่เพียงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก และสามารถจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ต่างๆ ออกจากกันพร้อมทั้งบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้อย่างชัดเจน (Archak, 2000) ดังนั้นการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจึงเป็นอีกแนวทางที่ภายหลังทราบลำดับเบสแล้วจะสามารถนำมาใช้บ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ หรือความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ ได้ ซึ่งจะเป็นการต่อยอดภูมิปัญญาทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในพืชจะมีโครงสร้างของจีโนมเป็นลักษณะวงแหวนเกลียวคู่ มีขนาดต่างกันมากประมาณ 200-2,400 กิโลเบส (Ward et al.,1981; Palmer 1985; Pring and Lonsdale 1985) ยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีบริเวณถอดรหัสสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน tRNA และ rRNA และมีบริเวณที่ไม่มีการถอดรหัส เรียกว่า non-coding DNA หรือ non-functional DNA ในพืชเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างยีน *trn-Phe* และ *trn-F* คือ ส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนส่วนใหญ่ ซึ่งมีลำดับเบสเหมือนหรือคล้ายกันได้หลายซ้ำ เรียกว่า repeated sequence ทำหน้าที่สร้างเสถียรภาพให้กับ coding DNA ปัจจุบันถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอพาหะ และเป็นเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) บริเวณนี้จึงน่าจะพบความแปรปรวนของลำดับเบสในระดับชนิดหรือย่อยกว่าระดับชนิดในพืชได้ (Anand et al., 2014) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ non-coding ของมันสำปะหลังในฐานข้อมูล GenBank ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเริ่มต้นด้วยการออกแบบไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายพันธุ์ต่างๆ ของมันสำปะหลัง ที่อาจใช้เป็นข้อมูลบ่งบอกความเป็นเอกลักษณ์ในระดับสายพันธุ์ของพืชชนิดนี้ได้

2. วิธีการการวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลัง

ทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อนของมันสำปะหลัง จากสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 18 สายพันธุ์ นำมาสกัดเป็นจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จ SP Plant DNA Kit (Omega bio-tek, USA) จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่อง NanaDrop™ 2000/2000C spectrophotometer และเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X GoTaq™ Green MasterMix 10 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังแต่ละตัวอย่าง (แยกหลอด) 200 นาโนกรัม ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะในบริเวณยีน *trn-Phe* และ *trn-F* ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพารา (GenBank accession no. AP014526) ข้างละ 0.2 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปราศจาก Nuclease ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยมีขั้นตอน Pre-denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที ขั้นตอน Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา

30 วินาที จำนวนทั้งหมด 30 รอบ ขั้นตอน Final Extention 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วย 1.0 % Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.5 SB buffer ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 60 โวลต์ นาน 60 นาที แล้วทำการตรวจสอบดูแถบดีเอ็นเอภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตด้วยชุด gel documentation (Syngene international Ltd., England)

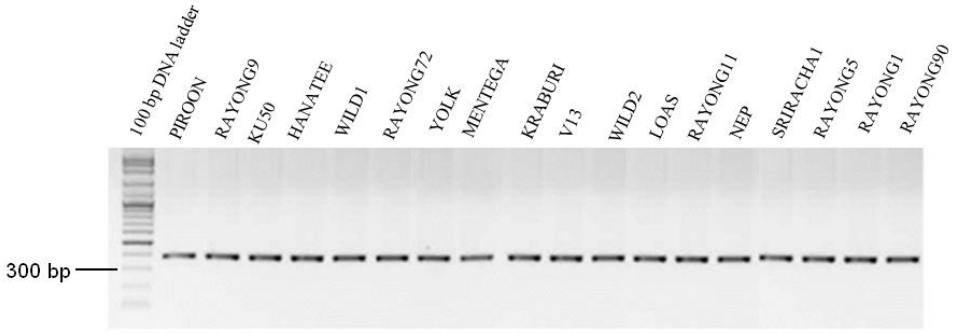
2.3 การอ่านลำดับเบส

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์สำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Genenaid International, Taiwan) ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีอ่านโดยตรง จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องด้วยตาโดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.0 และนำข้อมูลไปเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายพันธุ์ของมันสำปะหลังและที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านระบบเครือข่ายอินเตอร์เนต (www.ncbi.nlm.nih.gov/) ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสายพันธุ์ด้วยการทำ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal X

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

เมื่อเพิ่มปริมาณบริเวณ non-coding ของมันสำปะหลัง จำนวน 18 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ trn-Phe และ trn-F พบว่าได้ผลผลิตที่มีขนาด 368 คู่เบส เท่ากันทุกสายพันธุ์ (ภาพที่ 1) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding พบว่ามีขนาดเท่ากับ 268 คู่เบส ที่มีลำดับเบสเหมือนกันทั้งหมด (ภาพที่ 2) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และละหุ่ง (*Ricinus communis*) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกันกับมันสำปะหลัง พบจำนวนลำดับเบสในบริเวณ non-coding มีความแตกต่างกัน 10 และ 33 คู่เบส ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงผล) โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.063 และ 0.158 ตามลำดับ (ตารางที่1) และกับพืชต่างวงศ์ คือ ถั่วเขียว *Vigna radiata* (L.) มีลำดับเบสต่างกันจำนวน 32 คู่เบส (ไม่ได้แสดงผล) ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.092 แสดงว่าบริเวณ non-coding ของพืชมีความแปรปรวนน้อยผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Jeffrey et al. (1988) ที่พบว่าในไมโทคอนเดรียลจีโนมของพืชสกุล *Brassica* และ *Raphanus* มีความแปรปรวนต่ำมาก เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Kress et al. (2005) ที่ระบุว่าการใช้ไมโทคอนเดรียลจีโนมเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชนั้นมีข้อจำกัดเนื่องจากวิวัฒนาการของจีโนมพืชจะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงที่ต่ำกว่าในสัตว์ สอดคล้องกับ ณัฐกร เพชรชา และคณะ (2554) ที่ศึกษาความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลจีโนมพบว่าไม่เพียงพอที่จะใช้จำแนกพืชในระดับสายพันธุ์ได้

มันสำปะหลังสายพันธุ์ต่างๆ ที่ปลูกในประเทศไทยคาดว่ามีแหล่งกำเนิดเดียวกัน คือประเทศบราซิลเนื่องจากพบการกระจายตัวและความแปรปรวนของสายพันธุ์มากมายในบริเวณดังกล่าว (ประพิศ วองเทียม, 2555) มันสำปะหลัง 18 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ทราบข้อมูลแหล่งที่มาของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์น้อยมากเมื่อพิจารณาร่วมกับการศึกษาของ ประพิศ วองเทียม (2555) สามารถแบ่งมันสำปะหลังออกเป็นเป็น 3 กลุ่มใหญ่ตามแหล่งที่มา คือ 1) สายพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ HANATEE RAYONG1 WILD1 WILD2 2) สายพันธุ์จากต่างประเทศ ได้แก่ YOLK MENTEGA 3) สายพันธุ์ที่ได้รับปรับปรุงพันธุ์โดยผสมข้ามสายพันธุ์ ได้แก่ PIROON KU50 RAYONG5 RAYONG11 RAYONG9 RAYONG72 RAYONG90 SRIRACHA1 4)สายพันธุ์ที่ไม่ทราบข้อมูลแหล่งที่มา ได้แก่ NEP V13 LOAS ซึ่งพบว่าทุกสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาจีโนมของไมโทคอนเดรียในพืชมีวิวัฒนาการน้อยมากเนื่องจากกลไกการซ่อมแซมตัวเองของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพสูงกว่าไมโทคอนเดียลดีเอ็นเอของสัตว์ กล่าวคือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงหรือแทนที่ของลำดับเบสบริเวณ non-coding บริเวณดังกล่าวจะมีความสามารถซ่อมแซมตัวเองในการจัดเรียงของลำดับเบสให้เป็นแบบเดิมได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ (Christensen, 2014) แต่อย่างไรก็ตาม ถ้ามีรายงานการศึกษาในพืชชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมมากขึ้นเป็นลำดับต่อไปและภายในพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ ไม่พบความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือมีความแปรปรวนต่ำ บริเวณ non-coding นี้อาจพิจารณานำไปใช้เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับชนิดของพืชได้



ภาพที่ 1 ผลผลิต PCR ของ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจำนวน 18 สายพันธุ์ ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 SB buffer ที่ความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PIROON          GGCGAAGGGT CGCCGTAGGT GAGGTAGCCG GGAGCGAGCC GGATTTTGAA ATTCAAGTGA AAGAGGAAGC CAAAAAAAAA TATGAGCGCT  90
RAYONG9         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
KU50            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
HANATEE         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
WILD1           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
RAYONG72        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
YOLK            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
MENTEGA         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
KRABURI         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
V13             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
WILD2           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
LOAS            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
RAYONG11        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
NEP             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
SRIRACHA1       .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
RAYONG5         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
RAYONG1         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90
RAYONG90        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  90

                100       110       120       130       140       150       160       170       180
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PIROON          CCTGCACTAT ACGGCTTTTT GGCGGTAGGG TTGGGGTGGC TTGCTGGAGG CAGATTTTCT AAAACTAAAA AAAGCGGTTG ATTACTCGGA 180
RAYONG9         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
KU50            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
HANATEE         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
WILD1           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
RAYONG72        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
YOLK            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
MENTEGA         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
KRABURI         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
V13             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
WILD2           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
LOAS            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
RAYONG11        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
NEP             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
SRIRACHA1       .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
RAYONG5         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
RAYONG1         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180
RAYONG90        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 180

                190       200       210       220       230       240       250       260
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|...
PIROON          TTGGTTCTCG CGTCCCTGTG CCTAAATGAG CGGGTTCGGT TCAAGTCTTC ATCGATCGGG TGGATCTATA TGCTCCGGGG GGGGTGAG 268
RAYONG9         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
KU50            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
HANATEE         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
WILD1           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
RAYONG72        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
YOLK            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
MENTEGA         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
KRABURI         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
V13             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
WILD2           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
LOAS            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
RAYONG11        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
NEP             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
SRIRACHA1       .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
RAYONG5         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
RAYONG1         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
RAYONG90        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ........ 268
```

ภาพที่ 2 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 268 คู่เบส ของมันสำปะหลังจำนวน 18 สายพันธุ์ สัญลักษณ์จุด (.) คือลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกัน

ตารางที่ 1 ระยะห่างทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ non-coding ของมันสำปะหลังกับพืชในวงศ์ Euphorbiaceae และต่างวงศ์คือ Vitaceae และ Fabaceae

Species	*M. esculenta*	*H. brasiliensis*	*R. communis*	*V. radiata*	*V. vinifera*
M. esculenta	0.000				
H. brasiliensis	0.063	0.000			
R. communis	0.158	0.102	0.000		
V. radiata	0.092	0.059	0.148	0.000	
V. vinifera	0.186	0.132	0.214	0.137	0.000

4. สรุป

บริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ที่อยู่ระหว่างยีน *trn-Phe* และ *trn-F* ทุกสายพันธุ์มีขนาดเท่ากับ 268 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์มีลักษณะอนุรักษ์ไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของมันสำปะหลังที่นำมาทดสอบทั้ง 18 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับยางพาราและละหุ่งที่จัดอยู่ในวงศ์เดียวกัน พบลำดับเบสแตกต่างกัน 10 และ 33 คู่เบส ตามลำดับ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.063 และ 0.158 ตามลำดับ ดังนั้นบริเวณ non-coding ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของมันสำปะหลังไม่เหมาะสมที่จะใช้ระบุเอกลักษณ์ในระดับสายพันธุ์

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี สำหรับสถานที่ทำการทดลอง ขอขอบคุณสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างใบอ่อนของมันสำปะหลัง

6. เอกสารอ้างอิง

ณัฐกร เพชรชา, ดวงกมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข. (2554). การประเมินดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ rpoC1 และ rpoB ในการใช้เป็น DNA barcode และกรณีศึกษาในพืชสกุล *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae) Assessment of rpoB and rpoC1 Plastid DNA Regions for Their Suitability as DNA Barcodes for Identification of Plants in the Genus *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์. (2554). การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจและการระบุเพศของสละหม้อจากจังหวัดจันทบุรี. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา, วิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

Archak, S. (2000). Plant DNA Fingerprinting: an Overview. *AgBiotechNet*, *2*, 1-6.

Anand, P., Samit, Ray., and Amit, R. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Phylogenetics and Evolutionary Biology, 2,* 1-9.

Christensen, A.C. (2014). Plant Mitochondrial Genome Evolution can be Explained by DNA repair Mechanisms. *Genome Biology and Evolution*, *5(6),* 1079-1086.

Jeffrey, D.P. and Laura, A.H. (1988). Plant Mitochondrial DNA Evolves Rapidly in Structure, but Slowly in Sequence. *Journal of Molecular Evolution, 28*, 87-97.

Kress, J.W. and Erickson, D.L. (2008). DNA Barcodes: Genes, Genomics, and Bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 105*, 2761-2762.

Lebot, V. (2009). The Tropical Root and Tuber Crops: Cassava, SweetPotato, Yams and Aroids. *The Centre for Agriculture and Bioscience International*, *17*, 143.

Palmer, J.D. (1985). Evolution of Chloroplast and Mitochondrial DNA in Plants and Algae. *Plenum,*131-240.

Pring, D.R., and Lonsdale, D.M. (1985). Moleccular biology of Higher Plant Mitochondrial DNA. *International Review of Cytology*, *97*, 1-46.

Ward, B.L., Anderson, R.S. and Bendich, A.J. (1981). The Mitochondrial Genome is Large and Variable in a Family of Plants (cucurbitaceae). *Cell, 25*, 793-803.