การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม ของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

A PRELIMINARY STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz) USING ISSR MOLECULAR MARKERS

นางสาวฉัตรเงิน กาศมณี

นางสาวพีรยา พงษ์เส็ง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปีการศึกษา 2565

A PRELIMINARY STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz) USING ISSR MOLECULAR MARKERS

CHATNGERN KADMANEE

PEERAYA PONGSENG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR A Preliminary study on genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using ISSR molecular markers
ชื่อนักศึกษา	นางสาวฉัตรเงิน กาศมณี รหัสนักศึกษา 62050478 นางสาวพีรยา พงษ์เส็ง รหัสนักศึกษา 62050527
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ กรรมการ	
รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR A Preliminary study on genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using ISSR molecular markers
ชื่อนักศึกษา	นางสาวฉัตรเงิน กาศมณี รหัสนักศึกษา 62050478 นางสาวพีรยา พงษ์เส็ง รหัสนักศึกษา 62050527
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

มันสำปะหลัง (Cassava) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Manihot esculenta* Crantz เป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศในเขตร้อน และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย ได้มีการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง และพัฒนาสายพันธุ์ที่ให้ความทนทานต่อโรคพืชและแมลงศัตรูพืช จึงทำให้มันสำปะหลังมีความหลากหลายทางพันธุกรรม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.73-0.94 และที่ค่าเฉลี่ยความเหมือนที่ 0.73 สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างจำนวน 22 ตัวอย่าง ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มันสำปะหลังชนิดที่นำมาใช้สำหรับบริโภคโดยตรงและสำหรับใช้เป็นไม้ประดับ ประกอบด้วยระยอง 2, มันห้านาที และมันใบด่าง และกลุ่มที่ 2 มันสำปะหลังสำหรับอุตสาหกรรม ประกอบด้วยระยอง 1, ระยอง 3, ระยอง 5, ระยอง 7, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 15, ระยอง 60, ระยอง 72, ระยอง 86-13, ระยอง 90, เกษตรศาสตร์ 50, เกษตรศาสตร์ 72, ห้วยบง 60, ห้วยบง 80, ห้วยบง 90, พิรุณ 1, พิรุณ 2 และมันห้านาที (PC2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : มันสำปะหลัง ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

Title	A Preliminary study on genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using ISSR molecular markers
Students	Miss Chatngern Kadmanee Student ID 62050478
	Miss Peeraya Pongsang Student ID 62050527
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2022
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim

Abstract

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a major agricultural product in tropical countries and Thailand's most important economic crop. Breeding of Cassava has been developed to increase agricultural productivity and develop resistant varieties against pests and diseases. As a result, breeding can create new genetic variations. In this study, our aim was to analyze a set of 22 varieties of cassava for genetic diversity using inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. Genetic similarity was constructed from the Jaccard's similarity coefficients matrix using the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA). The genetic similarity coefficient ranged from 0.73 to 0.94. The similarity coefficient at 0.73, cluster analysis clustered 22 cassava varieties into two major groups. The first group is cassava, which is used for home cooking and decoration, consisting of Rayong 2, Ha-na-tee and variegated leaf. Another group, cassava for industry, consists of Rayong 1, Rayong 3, Rayong 5, Rayong 7, Rayong 9, Rayong 11, Rayong 15, Rayong 60, Rayong 72, Rayong 86-13, Rayong 90, Kasetsart 50, Kasetsart 72, Huay Bong 60, Huay Bong 80, Huay Bong 90, Pirun 1, Pirun 2 and Ha-na-tee (PC2).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords: Cassava, Genetic diversity, ISSR

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาและจัดทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้ผู้จัดทำขอขอบคุณ รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการที่ให้ความอนุเคราะห์ ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและช่วยแนะนำแนวทางการแก้ไขปัญหาจนประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ รศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ และดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ กรรมการ คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้เกียรติในการเป็นคณะกรรมการในการสอบวิชาโครงงานพิเศษนี้ รวมถึงให้คำแนะนำข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 20 ตัวอย่าง และชาวบ้านที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 2 ตัวอย่าง

ขอขอบคุณชาวบ้านที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างมันสำปะหลังเพิ่มอีก 2 ตัวอย่าง

ขอขอบคุณผู้ปกครองที่คอยสนับสนุนผู้จัดทำในทุก ๆ ด้าน และเป็นกำลังใจให้เสมอกับทุกเรื่องราวและทุกปัญหา

ขอขอบคุณพี่นักวิทย์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์

ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ที่คอยให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และให้กำลังใจมาโดยตลอดจนสำเร็จโครงงานพิเศษ

นอกจากนี้ขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา และคณาจารย์ทุกท่านที่คอยมอบวิชาความรู้ให้แก่ผู้จัดทำ

ฉัตรเงิน กาศมณี

พีรยา พงษ์เส็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข
กิตติกรรมประกาศ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
2.1 มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz)..... 3
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง..... 3
2.1.2 การจำแนกมันสำปะหลัง..... 4
2.1.3 การป้องกันกำจัดโรคและแมลง..... 10
2.2 เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker) 11
2.3 เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR (Inter-simple sequence repeats)..... 12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 15
3.1 พืชตัวอย่าง 15
3.2 สารเคมีและสารละลาย..... 15
3.3 อุปกรณ์..... 16
3.4 วิธีการทดลอง..... 17
3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ..... 17
3.4.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ..... 18
3.4.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยชุด GF-1 AmbiClean kit (Vivantis)..... 18
3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย
เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 22

4.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ 22

4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR 23

4.2.1 ผลการคัดเลือกไพรเมอร์ และการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR 23

4.2.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR 25

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 31

เอกสารอ้างอิง 32

ภาคผนวก 35

ภาคผนวก ก 36

ภาคผนวก ข 39

ภาคผนวก ค 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สายพันธุ์ พ่อแม่พันธุ์ ปริมาณแป้ง (%) ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ และลักษณะประจำพันธุ์..... 5
3.1 ชนิดของไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR 20
3.2 ส่วนประกอบสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา..... 21
3.3 แสดงขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR 21
4.1 ค่าความเข้มข้นและการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตรของ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง โดยเครื่องรุ่น BioPhotometer™..... 22
4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ด้วยเครื่องหมาย โมเลกุลชนิด ISSR 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.1	ตัวอย่างการคัดเลือกไพรเมอร์จาก 39 ไพรเมอร์.....	24
4.2	แสดงแผนภาพความสัมพันธ์ของสายพันธุ์มันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่างที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR จากไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ ด้วยวิธี UPGMA.....	28
4.3	แผนภูมิการกระจายของสายพันธุ์มันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่างที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR จากไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ ด้วยวิธี UPGMA.....	29
4.4	แสดงแผนภาพความสัมพันธ์ของสายพันธุ์มันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่างที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR จากไพรเมอร์จำนวน 2 ไพรเมอร์ด้วยวิธี UPGMA.....	30
4.5	แผนภูมิการกระจายของสายพันธุ์มันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่างที่ศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR จากไพรเมอร์จำนวน 2 ไพรเมอร์ ด้วยวิธี UPGMA.....	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
DNA	Deoxy ribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ISSR	Inter-simple sequence repeats
PCR	Polymerase chain reaction
RAPD	Random amplification of polymorphism DNA
SSR	Simple sequence repeat
TBE buffer	Tris-borate EDTA buffer
TE buffer	Tris-EDTA buffer
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) หรือ Cassava, Tapioca และ Manioc อยู่ในพืชวงศ์ Euphorbiaceae เป็นพืชหัวชนิดหนึ่ง มันสำปะหลังถือเป็นพืชอาหารที่สำคัญของผู้คนนับล้านในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เนื่องจากมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงในส่วนหัว จึงถือเป็นพืชอาหารที่สำคัญรองจากธัญพืช นอกจากนี้มันสำปะหลังเป็นสินค้าพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของโลกด้วยเช่นกัน เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน ตั้งแต่ยอดใบจนถึงรากที่เป็นหัวมัน เพื่อการบริโภคเป็นอาหารมนุษย์และสัตว์ และการอุปโภคจากการแปรรูปในอุตสาหกรรมเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ทั้งสิ่งทอ พลาสติกที่สลายได้ทางชีวภาพ และเอทานอล (พูนสุข, 2558) มันสำปะหลังมีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้และแอฟริกาแถบที่ลุ่มเขตร้อนต่อมาได้ขยายไปสู่แหล่งอื่น ๆ ทั่วโลกหนึ่งในนั้น คือ ประเทศไทย

ในปี 2542 ตามพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช มันสำปะหลังถือเป็นพืชต้องห้ามที่อนุญาตให้นำเข้าเฉพาะแค่หัวสด ไม่สามารถนำเข้าใบหรือเมล็ดพันธุ์ และถูกควบคุม จึงต้องได้รับการอนุญาตก่อนจึงจะสามารถนำพืชมาวิจัยได้ (ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง, 2525) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลังมีลักษณะเป็นไม้พุ่มหรือไม้ต้นขนาดเล็ก สูง 1.3–5 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางต้น 10–15 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 4–7 กิโลกรัม ใบเป็นแฉกลึก 3–7 แฉก ใต้ใบมีขนเล็กน้อย (James, 1983) การปลูกมันสำปะหลังจะใช้ส่วนของลำต้นตัดเป็นท่อนปักลงดิน บริเวณรอยตัดที่ปักอยู่ในดินจะแตกเป็นรากฝอยแบบสะสมอาหาร (Tuberous root) ใช้เวลาประมาณ 2 เดือนรากจะสะสมแป้งและมีขนาดใหญ่ขึ้น เรียกว่า หัวมันสำปะหลัง ภายหลังจากนั้นอีก 6 เดือนจึงจะสามารถเก็บเกี่ยวหัวมันสำปะหลังเพื่อการบริโภค (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, 2543)

ปัจจุบันมันสำปะหลังทั่วโลกมีทั้งหมดประมาณ 600 สายพันธุ์ โดยทั่วไปจะมีการจำแนกความแตกต่างสายพันธุ์ของมันสำปะหลังโดยการสังเกตจากลักษณะภายนอก เช่น สีก้านใบ สีลำต้น และลักษณะทรงต้น เป็นต้น แต่ในโครงงานพิเศษฉบับนี้มุ่งเน้นศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ตามวัตถุประสงค์ของการนำมันสำปะหลังไปใช้ โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ มันสำปะหลังบริโภค และมันสำปะหลังอุตสาหกรรม (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2565) โดยมันสำปะหลังสำหรับการบริโภค หมายถึง มันสำปะหลังที่นำหัวมาเพื่อการบริโภคได้โดยตรง มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกต่ำ รสไม่ขม นิยมนำหัวมันมาเชื่อม ปิ้ง เผา ในประเทศไทยนิยมปลูกสายพันธุ์ห้านาที และสายพันธุ์ระยอง 2 และมันสำปะหลังสำหรับอุตสาหกรรม คือ มันสำปะหลังที่ต้องนำไปแปรรูปและผ่านกรรมวิธีทางอุตสาหกรรมก่อน เนื่องจากมีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกสูง ดังนั้นจึงควรนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มันสำปะหลังอุตสาหกรรมไปแปรรูปผ่านความร้อน ดัดแปลง เพื่อลดความเป็นพิษก่อนนำผลผลิตจากมันสำปะหลังมาใช้ประกอบอาหารได้ อีกทั้งการแปรรูปมันสำปะหลังเพื่อให้เก็บรักษาได้เป็นเวลานานในรูปแบบของมันเส้น สาคู และแป้งมันสำปะหลัง (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2565)

ดังนั้นในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเพื่อให้ทราบถึงความแตกต่างทางพันธุกรรม และการนำข้อมูลที่ได้ศึกษาไปใช้ประโยชน์ต่อไป ในปัจจุบันได้มีการนำเครื่องหมายทางโมเลกุลมาใช้ในการจำแนก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช ซึ่งในงานวิจัยฉบับนี้ได้เลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) โดยได้รับความอนุเคราะห์มันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และได้รับความอนุเคราะห์จากชาวบ้าน รวมเป็นจำนวน 22 ตัวอย่าง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเบื้องต้นของมันสำปะหลังด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

1.2.2 การศึกษาเพื่อหาจำนวนไพรเมอร์ที่น้อยที่สุดของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เพื่อแบ่งกลุ่มมันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับ และมันสำปะหลังอุตสาหกรรม

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR โดยศึกษากับตัวอย่างใบของต้นมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง ได้แก่ ระยอง 1, ระยอง 2, ระยอง 3, ระยอง 5, ระยอง 7, ระยอง 9, ระยอง 11, ระยอง 15, ระยอง 86-13, ระยอง 60, ระยอง 72, ระยอง 90, เกษตรศาสตร์ 50, เกษตรศาสตร์ 72, ห้วยบง 60, ห้วยบง 80, ห้วยบง 90, พิรุณ 1, พิรุณ 2 และมันห้านาที จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยมันใบด่าง และมันห้านาที (PC2) ได้รับความอนุเคราะห์จากชาวบ้าน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ใช้ความรู้ที่ได้จากการศึกษาเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน และเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ

1.4.2 ได้ศึกษาความละเอียดวิธีการทำและการวิเคราะห์ของวิธีการเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เพื่อทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง

1.4.3 สามารถแบ่งกลุ่มสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ง่ายยิ่งขึ้น ลดต้นทุนและระยะเวลาในการทดลองระหว่างการปรับปรุงพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz)

มันสำปะหลัง (Cassava) หรือชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Manihot esculenta* Crantz ได้รับการจัดหมวดหมู่ทางพฤษศาสตร์ดังนี้ ชั้น (Class) Dicotyledonae วงศ์ (Family) Euphorciacea สกุล (Genus) *Manihot* สปีชีส์ (Species) *M.esculenta* มันสำปะหลังมีชื่อทั่วไปในภาษาอังกฤษว่า แคสซาวา (Cassava) หรือภาษาสเปนเรียกว่า ทาพิโอกา (Tapioca) ในประเทศแถบอเมริกาใต้ และอเมริกากลางเรียกว่า ยูก้า (Yuca) ประเทศบราซิลเรียกว่า แมนดิโอก้า (Mandioca) และทวีปแอฟริกาเรียกว่า แมนดิออค (Mandioc) (สุพัตรา, 2549) มันสำปะหลังถือว่าเป็นพืชหลักสำหรับอาหารที่สำคัญอย่างนึงกับผู้คน 800 ล้านคนในพื้นที่เขตร้อนและพื้นที่ใกล้เขตร้อน (Asha และคณะ, 2019) มันสำปะหลังมีแหล่งที่มาเริ่มจากอเมริกาใต้ และแพร่กระจายไปทั่วโลกโดยนาวิกโยธินชาวโปรตุเกสในศตวรรษที่ 16 (Salim และคณะ, 2017) แหล่งผลิตมันสำปะหลังที่สำคัญอยู่ในทวีปอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย เช่น ไนจีเรีย บราซิล ซาอีร์ ไทย และอินโดนีเซีย ส่วนมากนิยมบริโภคเป็นอาหารภายในประเทศ ยกเว้นประเทศไทยที่บริโภคเพียงเล็กน้อย ส่วนมากเป็นวัตถุดิบทางด้านอุตสาหกรรม (สุพัตรา, 2549) มันสำปะหลังเป็นแหล่งผลิตคาร์โบไฮเดรตที่ดี และยังสามารถปลูกโดยมีข้อจำกัดเพียงเล็กน้อย อย่างเช่น ปริมาณน้ำฝนที่ไม่แน่นอน และดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ เป็นต้น (Asha และคณะ, 2019)

มันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของประชากรในทวีปแอฟริกาและอเมริกาใต้ และยังเป็นแหล่งวัตถุดิบประเภทแป้งที่มีราคาถูกกว่าแป้งชนิดอื่น ๆ นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ยา และเคมีภัณฑ์ เนื่องจากไม่มีกลิ่น ไม่มีสี และไม่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ โดยในประเทศไทยนั้นนิยมไปแปรรูปเพื่อส่งออกผลิตภัณฑ์ของมันสำปะหลังเพราะไม่นิยมบริโภคเป็นอาหารหลักไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมมันเส้น มันอัด แป้ง รวมถึงอาหารสัตว์ที่เป็นสินค้าทางการเกษตร จึงถือได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างนึง (นฤมล, 2555) ผลผลิตของแป้งมันสำปะหลังที่ประเทศไทยผลิตเป็นอันดับ 3 ของโลกและส่งออกเป็นอันดับ 1 ของโลกจากประเทศผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังมากกว่า 100 ประเทศทั่วโลกโดยการผลิตแป้งมันสำปะหลังนั้นแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แป้งมันสำปะหลังดิบ (Raw material) และแป้งมันสำปะหลังดัดแปลง (Modified starch) และยังมีการใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังที่เหลืออุตสาหกรรมแป้งมาผลิตน้ำตาล เป็นการสร้างคุณค่าให้มันสำปะหลังอย่างถึงที่สุด ลดปัญหาสิ่งแวดล้อม และลดปัญหาภาวะโลกร้อนจากการนำของเหลือมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด (สวลี และคณะ, 2555)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง

ลำต้น (Stem) มีลักษณะแตกต่างตามสายพันธุ์ ในบางสายพพันธุ์ลำต้นเดียวไม่แตกกิ่ง หรือแตกกิ่งมาก และแตกกิ่งหลายระดับ สายพันธุ์ที่มีการแตกกิ่งมากต้นเตี้ย แตกกิ่งน้อยต้นสูง สีของลำต้นก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เช่น สีเหลือง สีเงิน และสีน้ำตาล เป็นต้น ที่ลำต้นมีก้านใบติดอยู่เมื่อใบร่วงทำให้เหลือเฉพาะส่วนบน

ของลำต้น และที่เหนือบริเวณที่เกิดก้านใบมีตาอยู่หนึ่งตา ซึ่งเมื่อตัดลำต้นไปปลูกตาเหล่านี้จะเป็นส่วนที่เจริญเป็นต้นใหม่

ใบ (Leaf) เป็นใบเดี่ยว แผ่นใบมีเว้าเป็นแฉก ๆ รูปร่าง และจำนวนแฉกแตกต่างกันตามสายพันธุ์ ในหนึ่งใบจะมี 3-9 แฉก โดยมีรูปร่างแฉกแตกต่างกันไป เช่น เรียวยาว และป้อมสั้น เป็นต้น โดยใบอ่อนที่ยังไม่คลี่มีสีแตกต่างกัน เช่น เขียวเข้ม แดง หรือ ม่วง เป็นต้น บางสายพันธุ์มีขนอ่อน ใบจะติดก้านใบที่มีสีต่างกัน เช่น เขียว แดง เขียวเหลือบแดง เป็นต้น

รากและหัว (Root) เป็นระบบรากฝอย รากสามารถงอกตามส่วนต่าง ๆ ของท่อนพันธุ์ได้อีกเช่น รอยแผลก้านใบ และตา เป็นต้น ซึ่งมีหน้าที่ดูดน้ำและแร่ธาตุไปเลี้ยงลำต้น และเมื่ออายุได้ 1.5-2 เดือนจะมีการลำเลียงแป้งไปสะสมที่รากบางราก โดยรากที่สะสมแป้งจะโตขึ้นตามอายุ และเฉพาะรากที่สะสมแป้งเท่านั้นที่จะโตขึ้นเป็นหัวโดยทั่วไปต้นหนึ่งจะมีหัวน้อยกว่า 10 หัว รากส่วนใหญ่ที่ไม่ได้สะสมแป้งก็ยังคงเป็นรากธรรมดา ส่วนรากที่เป็นหัวก็จะสะสมแป้งและมีขนาดใหญ่ขึ้นตามอายุ แต่จำนวนหัวจะคงที่ ส่วนหัวมันสำปะหลังจะเป็นที่สะสมแป้งเท่านั้น ไม่มีตาจึงไม่สามารถใช้หัวขยายพันธุ์ได้

ดอก ผล และเมล็ด (Flower, fruit and seed) ช่อดอกเป็นแบบแพนนิเคิล (Panicle) เกิดตรงจุกที่มีการแตกกิ่ง มันสำปะหลังเป็นพืชพวก monoecious plant คือ มีดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน ซึ่งอยู่คนละดอกแต่อยู่ในช่อดอกเดียวกัน ช่อดอกเกิดที่ปลายของ apical branch หรือตรงรอยต่อที่แตก branch ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่แตกกิ่งจึงไม่มีช่อดอก ดอกตัวผู้มีขนาดเล็กอยู่บนส่วนของช่อดอก ดอกตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าอยู่ส่วนล่างภายในช่อดอกเดียวกัน ดอกตัวมีจะบานและพร้อมผสมก่อนดอกตัวผู้ประมาณ 7-10 วัน ถึงแม้ดอกตัวผู้และตัวเมียจะอยู่ช่อดอกเดียวกันแต่ถูกจัดเป็นพืชผสมข้าม (Cross pollination)

หลังผสมรังไข่จะเจริญเป็นผลโตเต็มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร ภายในมีเมล็ดอยู่ 3 เมล็ด เมล็ดมีสีน้ำตาล ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร กว้างและหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร เมื่อใช้เมล็ดมันสำปะหลังปลูกจะงอกขึ้นมาเป็นต้นเช่นเดียวกับต้นมันสำปะหลังที่ปลูกโดยใช้ท่อนพันธุ์แต่ต้นที่ปลูกจากเมล็ดจะมีระบบรากแก้ว และรากแก้วจะเจริญเป็นหัว การใช้เมล็ดปลูกไม่เหมาะกับทำการค้า เพราะบางสายพันธุ์มีทั้งมีดอกมีมากหรือน้อยตามสายพันธุ์ และไม่มีดอก เมื่อผลแก่จะแตกดีดออกจากเมล็ดให้ห่างจากต้น ทำให้เก็บเมล็ดได้ลำบาก นอกจากนั้นเมล็ดมีระยะพักตัว และเมล็ดแต่ละเมล็ดความแตกต่างทางพันธุกรรมจึงไม่มีความสม่ำเสมอ ต่างจากปลูกแบบท่อนพันธุ์จะมีพันธุกรรมเหมือนกันหมด เมื่อปลูกจึงมีความสม่ำเสมอ ดังนั้นการปลูกมันสำปะหลังจากเมล็ดจะทำเฉพาะเพื่อสร้างสายพันธุ์ใหม่ในการปรับปรุงพันธุ์เท่านั้น (สุพัตรา, 2549)

2.1.2 การจำแนกมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังบริโภค หรือพันธุ์หวานเป็นมันสำปะหลังที่มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกต่ำ ใช้เพื่อการบริโภค มีทั้งชนิดเนื้อร่วนนุ่ม และชนิดเนื้อแน่นเหนียว ราคาจึงสูงกว่าชนิดขม แต่ในประเทศไทยมีการปลูกไม่มากเนื่องจากการจำกัดความต้องการของตลาด เช่น ระยอง 2 และมันห้านาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มันสำปะหลังอุตสาหกรรม หรือพันธุ์ขมเป็นสายพันธุ์มันสำปะหลังที่มีกรดไฮโดรไซยานิกสูง เนื่องจากมีพิษและมีรสขมไม่เหมาะแก่การบริโภค หรือนำหัวมันสำปะหลังสดใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์โดยตรง จึงเหมาะแก่การนำไปแปรรูปต่าง ๆ ในอุตสาหกรรม เช่น แป้งมัน มันอัดเม็ด เป็นต้น (สุพัตรา, 2549)

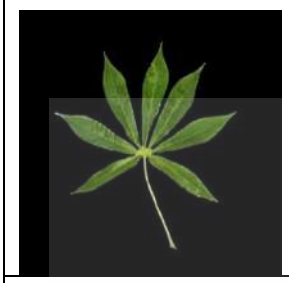
มันสำปะหลังในประเทศไทยมีหลากหลายทางสายพันธุ์สำหรับบริโภคได้โดยตรง และสำหรับอุตสาหกรรมจึงมีการตั้งชื่อของแต่ละสายพันธุ์ ระบุบรรพบุรุษ ปริมาณแป้ง การรับรองสายพันธุ์ และลักษณะประจำพันธุ์ไว้เป็นข้อมูลเพื่อใช้ในจำแนกสายพันธุ์อย่างง่ายสำหรับเกษตรกรหรือผู้ที่สนใจ และการปรับปรุงสายพันธุ์ได้รับข้อมูลจากสมลักษณ์ (2551) และศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ พ่อแม่พันธุ์ ปริมาณแป้ง (%) ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ และลักษณะประจำพันธุ์

สายพันธุ์	พ่อแม่พันธุ์	ปริมาณแป้ง (%)	ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ (พ.ศ.)	ลักษณะประจำพันธุ์
ระยอง 1 (R1)	พันธุ์พื้นเมือง	18	2518	ผลผลิตสูง ให้แป้งต่ำ เกษตรกรไม่นิยมปลูก
ระยอง 2 (R2)	ลูกผสมระหว่าง Mcol 113 และ Mcol 22	แป้งต่ำและไซยาไนด์ต่ำ	2527	สายพันธุ์บริโภค เนื้อเหลือง ให้แป้งต่ำ เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสำหรับการทอด
ระยอง 3 (R3)	ลูกผสมระหว่าง Mmex 55 และ Mven 307	23	2526	ผลผลิตสูง ให้แป้งสูง ในดินดี เกษตรกรปลูกน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ พ่อแม่พันธุ์ ปริมาณแป้ง (%) ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ และลักษณะประจำพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์	พ่อแม่พันธุ์	ปริมาณแป้ง (%)	ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ (พ.ศ.)	ลักษณะประจำพันธุ์
ระยอง 5 (R5) 	ลูกผสมระหว่าง MR 27-77-10 และระยอง 3	22	2537	ผลผลิตสูง ให้แป้งสูง เกษตรนิยมปลูกมากโดยทั่วไป
ระยอง 7 (R7)	ลูกผสมระหว่าง CMR 30-71-25 และ OMR 29-20-118	27.3	2548	ผลผลิตสูง ให้แป้งสูง เหมาะสำหรับปลูกปลายฝนเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงในดินที่มีความสมบูรณ์สูง
ระยอง 9 (R9)	ลูกผสมระหว่าง CMR 31-19-23 และ OMR 29-20-118	24.4	2548	ผลผลิตสูง ให้แป้งสูง เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูง
ระยอง 11 (R11)	ลูกผสมระหว่าง ระยอง 5 และ OMR29-20-118	26.1	2553	ผลผลิตสูง ให้แป้งสูง ปลูกได้ในดินอุดมสมบูรณ์ปานกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ พ่อแม่พันธุ์ ปริมาณแป้ง (%) ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ และลักษณะประจำพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์	พ่อแม่พันธุ์	ปริมาณแป้ง (%)	ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ (พ.ศ.)	ลักษณะประจำพันธุ์
ระยอง 15 (R15)	การผสมเปิดของพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50	29.2	2562	ผลผลิตสูง ให้แป้งมาก อายุการเก็บเกี่ยวผลผลิตสั้นเมื่ออายุ 8 เดือน
ระยอง 60 (R60)	ลูกผสมระหว่าง Mcol 22 และระยอง 1	20	2530	ผลผลิตสูง อายุเก็บเกี่ยวสั้น 6-8 เดือน เกษตรกรปลูกน้อย เนื่องจากสีเนื้อแป้งเหลืองนวล โรงงานแป้งไม่ค่อยยอมรับ
ระยอง 72 (R72)	ลูกผสมระหว่างระยอง 1 และระยอง 5	20	2542	ผลผลิตสูง ให้แป้งต่ำ เมื่อเก็บเกี่ยวในสภาพฝนชุก เกษตรกรนิยมปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
ระยอง 86-13 (R86-13)	ลูกผสมระหว่างระยอง 11 และเกษตรศาสตร์ 50	26.3	2556	ผลผลิตสูง ให้แป้งสูง ไม่เหมาะกับการเก็บเกี่ยวที่อายุน้อยกว่า 12 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ พ่อแม่พันธุ์ ปริมาณแป้ง (%) ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ และลักษณะประจำพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์	พ่อแม่พันธุ์	ปริมาณแป้ง (%)	ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ (พ.ศ.)	ลักษณะประจำพันธุ์
ระยอง 90 (R90)	ลูกผสมระหว่าง CMC 76 และ V 43	24	2534	ผลผลิตสูง ให้แป้งสูง เกษตรกรนิยมปลูกมากเนื่องจากให้ผลผลิตและแป้งได้สูงในทุกสภาพการปลูก แต่อายุของการเก็บรักษาท่อนพันธุ์ต่ำ ไม่เกิน 30 วัน
เกษตรศาสตร์ 50 (KU50)	ลูกผสมระหว่าง ระยอง 1 และ ระยอง 90	สูง	2534	ผลผลิตสูง ให้แป้งสูง เกษตรกรนิยมปลูกมากเนื่องจากเจริญเติบโตได้ดีในดินที่ความสมบูรณ์ต่ำ แต่ก็ยังให้ผลผลิตและแป้งที่สูง
เกษตรศาสตร์ 72 (KU72)	ลูกผสมระหว่าง ระยอง 5 และ OMR-29-20-118	26.9	2550-2557	ผลิตสูง ให้แป้งสูง ทนแล้ง ไม่ทิ้งก้านใบ เจริญเติบโตเร็ว
ห้วยบง 60 (HB 60)	ลูกผสมระหว่าง ระยอง 5 และ เกษตรศาสตร์ 50	สูง	2546	ผลผลิตสูง ทนแล้ง เกษตรกรนิยมปลูกไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

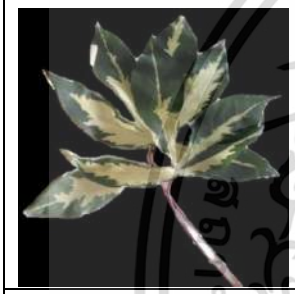
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ พ่อแม่พันธุ์ ปริมาณแป้ง (%) ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ และลักษณะประจำพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์	พ่อแม่พันธุ์	ปริมาณแป้ง (%)	ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ (พ.ศ.)	ลักษณะประจำพันธุ์
ห้วยบง 80 (HB 80)	ลูกผสมระหว่างระยอง 5 และเกษตรศาสตร์ 50	27.3	2542	ผลผลิตสูง ให้แป้งสูง เหมาะกับแปรรูปมันเส้น แป้ง และเอทานอล
ห้วยบง 90 (HB 90)	ลูกผสมระหว่าง CMC 76 และ V 43	30	2559	ผลผลิตสูง ให้แป้งสูง ไม่มีการแตกกิ่ง
พิรุณ 1 (PR 1)	ลูกผสมระหว่างห้วยบง 60 และมันห้านาที	28.7	2559	ผลผลิตสูง ให้แป้งสูง เหมาะกับอุตสาหกรรมแป้ง ต้านทานโรคและแมลง
พิรุณ 2 (PR 2)	ลูกผสมระหว่างห้วยบง 60 และมันห้านาที	24.7	2559	ผลผลิตสูง เหมาะที่จะปลูกในดินเหนียวสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ พ่อแม่พันธุ์ ปริมาณแป้ง (%) ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ และลักษณะประจำพันธุ์ (ต่อ)

สายพันธุ์	พ่อแม่พันธุ์	ปริมาณแป้ง (%)	ปีที่มีการรับรองสายพันธุ์ (พ.ศ.)	ลักษณะประจำพันธุ์
มันห้านาที (M5)	พันธุ์พื้นเมือง	แป้งต่ำและไซยาไนด์ต่ำ	ไม่แน่ชัด	สายพันธุ์บริโภค เมื่อให้ความร้อนสุดได้เร็ว ให้แป้งต่ำ เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสำหรับการต้ม นึ่ง เชื่อม
มันใบด่าง (D1) 	ได้รับตัวอย่างมาจากชาวบ้าน มีข้อมูลที่ไม่แน่ชัด			
มันห้านาที (PC2)	ได้รับตัวอย่างมาจากชาวบ้าน มีข้อมูลที่ไม่แน่ชัด			

2.1.3 การป้องกันกำจัดโรคและแมลง (Diseases and pest control)

มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงน้อยมากเมื่อเทียบกับพืชอื่น เนื่องจากสภาวะโลกร้อน อาจจะเป็นสาเหตุสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นต้นเหตุของการเกิดโรคที่สำคัญในมันสำปะหลัง เช่น โรคใบไหม้ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (*Xanthomonas campestris* pv. manihotis) การแพร่ระบาดจะรุนแรงในช่วงฤดูฝน โรคใบจุดน้ำตาล เกิดจากเชื้อ *Cercosporidium henningsii* จะเกิดเมื่ออุณหภูมิสูง การแพร่ระบาดและความรุนแรงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ด้วย โรคใบจุดไหม้ เกิดจากเชื้อ *Cercospora vicosae* เกิดจุดที่เกิดโรคใบจุดน้ำตาลมาก่อนแต่ลักษณะของแผลจะต่างกัน โรคแอนแทรกโนส เกิดจากเชื้อ *Collectotrichum* spp. ระบาดหลังจากฝนตกติดต่อกันเป็นเวลานาน และโรคหัวเน่า เกิดจากเชื้อราในดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลาย ๆ ชนิดเข้าสู่หัวแล้วทำลายถึงเนื้อด้านใน พบมากในฤดูฝน เป็นต้น นอกจากนั้นอาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของแมลงที่เป็นศัตรูพืชของของมันสำปะหลัง ได้แก่ แมลงพวกปากดูด เช่น ไรแดง เพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง แมลงหวี่ขาว เป็นต้น แมลงพวกปากกัดกิน เช่น ปลวก หนอนเจาะลำต้น แมลงนูนหลวง และด้วง เป็นต้น แมลงจะระบาดในช่วงที่มีอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์สูง (สุพัตรา, 2549) มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาโรคต่าง ๆ ของมันสำปะหลัง เช่น พรปวีณ์ และคณะ (2561) ได้ทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการก่อให้เกิดโรคเน่าแห้ง-เน่าดำมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Neoscytalidium hyalinum* มัลลิกา แก้ววิเศษ และคณะ (2564) ค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายสนิปส์ใหม่ (Single nucleotide polymorphisms; SNPs) เพื่อร่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีไซยาไนด์ต่ำ ต้านทานโรครากปมและโรคใบด่างของมันสำปะหลัง และจีราพร และคณะ (2019) ศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง (Cassava Mosaic Disease)

2.2 เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker)

การจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทำโดยการศึกษาอนุกรมวิธาน การเปรียบเทียบทางกายวิภาค (Anatomy) สัณฐานวิทยา (Morphology) การศึกษาเอมบริโอ (Embryo) และสรีรวิทยา (Physiology) ใช้เพื่อบอกถึงสายพันธุ์ต่าง ๆ แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อการแยกความแตกต่าง และแม่นยำได้ (สุพัตรา, 2549) เนื่องจากความผิดพลาดที่ผันแปรตามสภาพแวดล้อมหรือสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันมากจะแยกได้ยากจึงมีการพัฒนาเครื่องหมายให้จำแนกความแตกต่างได้ (สุรีพร, 2546) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีเทคนิคทางด้านโมเลกุลมาเพื่อช่วยแยกความแตกต่างของพืชแต่ละสายพันธุ์ (สุพัตรา, 2549) ในปัจจุบันได้มีบทบาทสำคัญในงานด้านพันธุศาสตร์การปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เพราะการจัดกลุ่มด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาทำได้ยาก เครื่องหมายโมเลกุลจึงช่วยจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความแม่นยำมากขึ้นและช่วยเป็นข้อมูลสำคัญในการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืช (Plant patent) นอกจากนี้ยังได้รับความนิยมอย่างมากในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (Genetic diversity) (จุฑาพร, 2555)

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) ที่แสดงความแตกต่างหรือพอลิมอร์ฟิซึม (Polymorphism) ในระดับโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอ มีส่วนช่วยในการจำแนกหรือตรวจสอบพันธุ์สัตว์และพันธุ์พืชจากต้นกล้าหรือต้นที่โตแล้ว นำไปศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การปรับปรุงพืชอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น และยังสามารถศึกษาต่อในด้านวิวัฒนาการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดและพิสูจน์บุคคล (สุพัตรา, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR (Inter-simple sequence repeats)

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการใช้ลำดับไมโครแซทเทิลไลท์เป็นไพรเมอร์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อสร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR นั้นเป็นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็วซึ่งรวมข้อดีของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (Simple sequence repeat) เครื่องหมายโมเลกุลชนิด AFLP (Amplified fragment length polymorphism) และเครื่องหมายหมายโมเลกุลชนิด RAPD (Random amplification of polymorphism DNA) และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ยังมีความแม่นยำสูงกว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD (Asha และคณะ, 2019) ความแตกต่าง (Polymorphism) ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เกิดขึ้นจากความแปรปรวน (Variation) ของลำดับเบสภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เช่น การกลายพันธุ์ ของบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าจับทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่างเทคนิคนี้มีความคล้ายกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD ในส่วนของการสุ่มตำแหน่งต่าง ๆ ของจีโนม แต่เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR มีความจำเพาะมากกว่าเนื่องจากลำดับเบสของไพรเมอร์มีความจำเพาะมากกว่าไม่ได้มีลำดับเบสสุ่มเหมือนกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD จึงเป็นเทคนิคที่ทำซ้ำและได้ผลออกมาคงเดิม (สุทวัฒน์, 2557)

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR สามารถตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณระหว่างไมโครแซลเทิลไลท์ 2 ตำแหน่งซึ่งทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ไพรเมอร์จะมีลำดับเบสซ้ำ ๆ แบบไมโครแซลเทิลไลท์ ส่วนมากจะมีความยาวประมาณ 16-20 นิวคลีโอไทด์ มี 2 แบบ คือ แบบ unanchored เป็นไพรเมอร์ที่มีเฉพาะชุดลำดับเบสซ้ำ ๆ และแบบ anchored เป็นไพรเมอร์ที่ถูกเติมด้วยเบส 1-4 นิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3’ ของไพรเมอร์ เรียกว่า 3’-anchored ซึ่งจะทำให้แถบดีเอ็นเกิดมีความคมชัดขึ้นหรือที่ปลาย 5’ ของไพรเมอร์ เรียกว่า 5’-anchored จะทำให้เกิดจำนวนแถบดีเอ็นเอมากขึ้นและเกิดความแตกต่างมากขึ้นอีกด้วย (สมบัติ, 2560)

ข้อดีของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เมื่อทำการวิเคราะห์ผลที่ทำซ้ำยังคงได้ผลคงเดิม เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ที่ยาว 16-25 คู่เบส (Lakshmanan et al., 2017) และไม่ต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ขนาบข้างบริเวณที่ซ้ำ แต่ก็มีข้อจำกัด คือ เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เป็น dominant marker ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกต (Reddy et al., 2002)

Vidal และคณะ, (2015) ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลว่ามีประสิทธิภาพสำหรับการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของพืชหลังจากการเพาะเลี้ยง ในงานวิจัยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR กับมันสำปะหลัง 22 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์จำนวน 27 ไพรเมอร์ ซึ่ง 24 ไพรเมอร์พบแถบแบนทั้งหมด 175 แถบ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphism bands) 100 แถบ และนำไปใช้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมต่อไป จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนสามารถจัดกลุ่มมันสำปะหลังได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย BGM 212 และ BGM 1282 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย BGM 264, BGM 340, BGM 337, BGM 640, BGM 316, BGM 561, BGM 563 และ BGM 1723 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย BGM 638 กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย BGM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1123, BGM 1348, BGM 1027, BGM 1324, BGM 1345, BGM 1245, BGM 1271 และ BGM 116 กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย BGM 1811 กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย BGM 668 และกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย BGM 1840

Afonso และคณะ, (2019) ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจากประเทศแองโกลาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เพื่อระบุความแปรผันทางพันธุกรรมและการพัฒนามันสำปะหลังให้มีหลากหลายมากขึ้นในประเทศแองโกลา วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมจากของมันสำปะหลังจำนวน 40 ตัวอย่าง จากสามพื้นที่ในประเทศแองโกลา ได้แก่ Cuanza norte, Uige และ Malanje ไพรเมอร์ที่ใช้จำนวน 32 ไพรเมอร์ ซึ่ง 18 ไพรเมอร์ พบแถบแบนทั้งหมด 116 แถบ และค่าเฉลี่ยของแถบแบนต่อไพรเมอร์คือ 6.4 ค่า Polymorphism Information Content (PIC) เป็นค่าความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์แต่ละชนิดของเมือง Uige อยู่ที่ 48.15 เปอร์เซ็นต์ เมือง Cuanza norte อยู่ที่ 61.11 เปอร์เซ็นต์ และเมือง Malanje อยู่ที่ 92.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สุภาวดี และคณะ (2562) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุ์กรรมของพันธุ์มันสำปะหลังจำนวน 18 ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร จังหวัดระยอง และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR สำหรับการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ 55 คู่ จาก 60 คู่ไพรเมอร์ มีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างกันจำนวน 236 อัลลีล จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) กับโปรแกรม NTSYS version 2.10 มีการจัดกลุ่มได้ดี และแสดงความแตกต่างอย่างชัดเจน

เบญจวรรณ (2554) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง 8 ตัวอย่างด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้คัดเลือกลำดับเบสแบบซ้ำจำนวน 17 คู่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังได้ทั้ง 8 ตัวอย่างพบแถบแบนทั้งหมด 96 แถบซึ่งมีขนาดประมาณ 100-380 คู่เบสแถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่าง (polymorphic DNA) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.36 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ที่ระหว่าง 0.54-0.83 และค่า PIC เป็นค่าความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์แต่ละชนิด (Polymorphism Information Content) อยู่ระหว่าง 0.66-0.90 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนสามารถจัดกลุ่มมันสำปะหลังได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพันธุ์ หรือที่เรียกว่ามันอุตสาหกรรม คือ ห้วยบง 60 และเกษตรศาสตร์ 50 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย มันห้านาทีก้านเหลือง มันห้านาทีก้านแดง และระยอง 2 ซึ่งหวานมีปริมาณกรดไซยานิกต่ำ และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ระยอง 5 ระยอง 7 และระยอง 9 ซึ่งมาจากการผสมข้ามสายพันธุ์ที่มีแม่เป็นพันธุกรรมเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Colombo และคณะ, (2000) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมันสำปะหลัง *Manihot esculenta* Crantz กับ *M. flabellifolia* และ *M. peruviana* ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติซึ่งมีการสันนิษฐานว่ามีความเกี่ยวข้องทางวิวัฒนาการกับมันสำปะหลังพันธุ์ปลูกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด AFLP กับมันสำปะหลังพันธุ์ปลูกจำนวน 33 ตัวอย่าง และมันสำปะหลังพันธุ์ที่พบตามธรรมชาติทั้งสองชนิดจำนวน 15 ตัวอย่าง เมื่อนำมาศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic band) 92 แถบ และในเครื่องหมายโมเลกุลชนิด AFLP พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic band) 73 แถบ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองชนิดไม่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่พบตามธรรมชาติทั้งสองชนิดได้ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของมันสำปะหลังพันธุ์ปลูกกับมันสำปะหลังพันธุ์ที่พบตามธรรมชาติทั้งสองชนิดเฉลี่ยอยู่ที่ 0.59 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่า *M. flabellifolia* และ *M. peruviana* เป็นบรรพบุรุษของมันสำปะหลังพันธุ์ปลูก

Asante และ Offei (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD กับมันสำปะหลัง 50 โคลน โดยใช้ไพรเมอร์ OPK-01, OPR-02, OPR-09 และ OPJ-14 พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic band) 41 แถบ ในการวิเคราะห์ค่า genetic distance พบว่ามันสำปะหลังที่มาจาก Nkoranza และสายพันธุ์ปรับปรุงมีความแตกต่างทางพันธุกรรม 20.3 เปอร์เซ็นต์ และมันสำปะหลังที่มาจาก Asonafo และ Dormaa มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด

นฤมล (2555) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ไพรเมอร์ พบว่าชนิดไพรเมอร์ 55 ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และเมื่อทำการคัดเลือกไพรเมอร์ 25 ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังพันธุ์ปลูก 9 ตัวอย่าง และพันธุ์ป่า 1 ตัวอย่าง และพบว่ามีไพรเมอร์ชนิดเดียวจำนวน 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ B27 (GCC GGT TAT GAA), C22 (GGT CAC CGA TCC), C31 (TCT GCT GAC CGG), D21 (GGC GAT TCT GCA), E26 (CTG CCT GTA CCA) และ E32 (CAG GAA CAG CAA) สามารถแยกตัวอย่างออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นมันสำปะหลังพันธุ์ปลูก ประกอบด้วย ระยอง1, ระยอง2, ระยอง5, ระยอง60, ระยอง 90, มันห้านาที, ศรีราชา 1, Virgin Island 18 และ Virgin Island 22 และ กลุ่มที่ 2 เป็นมันสำปะหลังพันธุ์ป่า โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ที่ 0.56-0.85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 พืชตัวอย่าง

ตัวอย่างใบมันสำปะหลัง 22 ตัวอย่าง จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ตำบลห้วยโป่ง อำเภอเมือง จังหวัดระยอง เก็บในช่วงเดือนตุลาคม 2565 ประกอบด้วย ระยอง 1 (R1) ระยอง 2 (R2) ระยอง 3 (R3) ระยอง 5 (R5) ระยอง 7 (R7) ระยอง 9 (R9) ระยอง 11 (R11) ระยอง 15 (R15) ระยอง 60 (R60) ระยอง 72 (R72) ระยอง 86-13 (R86-13) ระยอง 90 (R90) เกษตรศาสตร์ 50 (KU50) เกษตรศาสตร์ 72 (KU72) ห้วยบง 60 (HB60) ห้วยบง 80 (HB80) ห้วยบง 90 (HB90) พิรุณ 1 (PR1) พิรุณ 2 (PR2) และ ห้านาที (M5) และใบด่าง (D1) ห้านาที (PC2) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากชาวบ้าน และจัดเก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลังในถุงซิปล็อค แล้วนำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 สารเคมีและสารละลาย

3.2.1 ไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen)

3.2.2 2X CTAB

3.2.3 β-mercaptomethanol

3.2.4 Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)

3.2.5 RNase A

3.2.6 Proteinase K

3.2.7 10% CTAB

3.2.8 70% Ethanol

3.2.9 Absolute ethanol

3.2.10 TE buffer

3.2.11 Isopropanol

3.2.12 Deionized water (DI water)

3.2.13 ISSR Primer ชนิดแบบ unanchored

3.2.14 6X loading dye (Vivantis)

3.2.15 VC 100 bp DNA ladder (Vivantis)

3.2.16 1kb DNA ladder (Vivantis)

3.2.17 Ethidium bromide

3.2.18 PCR buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.19 *Taq* DNA polymerase (Vivantis)

3.2.20 $MgCl_2$

3.2.21 dNTPs

3.2.22 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 กรรไกรตัดกิ่ง (Pruning shears)

3.3.2 ถุงซิปล็อค (Ziplock)

3.3.3 โกร่ง (Mortar) และ ที่บด (Pestle)

3.3.4 ปากคีบ (Forceps)

3.3.5 กรรไกร (Scissor)

3.3.6 ช้อนตักสาร (Specular)

3.3.7 พาราฟิล์ม (Parafilm)

3.3.8 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

3.3.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.10 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.3.11 ตู้แช่แข็ง (Freezer)

3.3.12 ไมโครปิเปต (Micropipettes) และ ทิป (Micropipettes tips)

3.3.13 กระบอกไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen container)

3.3.14 หลอดทดลอง (Micro centrifuge tube) ขนาด 0.2, 1.5 และ 2 มิลลิลิตร

3.3.15 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

3.3.16 ไมโครเวฟ (Microwave)

3.3.17 Thermocycler รุ่น Biometra TAdvanced

3.3.18 ชุดอะกาโรสเจลอิเอ็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis system)

3.3.19 ถาดเจล (Gel tray)

3.3.20 หวี (Combs)

3.3.21 ถุงมือยาง (Rubber glove)

3.3.22 คอมพิวเตอร์ (Computer)

3.3.23 ชุดถ่ายภาพเจลล (Gel document system) รุ่น SYSGENE InGenius bio imaging

3.3.24 กระดาษทิชชู (Tissue paper)

3.3.25 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น Eppendorf BioPhotometer™

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.26 คิวเวตควอตซ์ (Quartz semi-cuvette)

3.3.27 เครื่องผสมสาร (Vortex)

3.3.28 Spin down

3.3.29 ชุด GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR) (Vivantis)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบมันสำปะหลังมาสกัดด้วยวิธี CTAB (Doyle และ Doyle, 1987) โดยทำความสะอาดและตัดใบให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำมาบดกับไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติม 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปใส่หลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร เติม β-mercaptomethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พลิกหลอดทดลองกลับด้านไปมาเบา ๆ ทุก ๆ 15 นาที เมื่อครบเวลา 3 ชั่วโมง เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วจึงพลิกหลอดทดลองกลับด้านไปมาเบา ๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน นำหลอดทดลองเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายส่วนใสใสในหลอดทดลองใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเติม 10% CTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร พลิกหลอดทดลองกลับด้านไปมาเบา ๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน นำหลอดทดลองเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol ที่แช่เย็นไว้ปริมาตร 1:1 (v/v) ของสารละลายส่วนใส กลับหลอดทดลองไปมาแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นนำหลอดทดลองเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ คว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชูเพื่อซับสารละลายที่เหลือออกให้หมด เติม 70% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองและนำหลอดทดลองเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ คว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชูเพื่อซับสารละลายที่เหลือออกให้หมด จากนั้นเติม Absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และนำหลอดทดลองเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้งเก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ เมื่อเทสารละลายออกหมดนำไปตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปิดฝาไว้ให้ Absolute ethanol ระเหยออกหมด เมื่อตะกอนแห้งแล้วเติม TE buffer ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 ถึง 60 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นนำหลอดทดลองบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนตะกอนดีเอ็นเอมีลักษณะละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับ TE buffer และนำดี

เอ็นเอไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพ และวัดปริมาณของดีเอ็นเอ ดังวิธีการในข้อ 3.4.2

3.4.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจลตามความเข้มข้นที่ต้องการ เช่น เตรียมอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วทำการละลายด้วยไมโครเวฟจนสารละลายมีลักษณะเหลวใส รอให้อุณหภูมิลดลง จึงเทสารละลายลงถาดเจลที่มีหวี เพื่อทำให้เกิดหลุมเตรียมไว้สำหรับหยอดดีเอ็นเอ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เมื่อเจลแข็งตัวแล้วนำเจลใส่ลงใน chamber ที่ภายในมีสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วต่อระบบตัวจ่ายกระแสไฟฟ้า ทำการผสมสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับสีย้อมความเข้มข้น 3X ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เทียบกับ 1kb DNA ladder ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เปิดเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสตั้งกระแสไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์ เวลาประมาณ 30-35 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลาย Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงล้าง Ethidium bromide ออกด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงส่องแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และถ่ายภาพโดยชุดถ่ายภาพเจล SYSGENE InGenius Bio Imaging และการวัดปริมาณดีเอ็นเอทำได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง มีการคำนวณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ทำได้การนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 5 ไมโครลิตร เจือจางน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 495 ไมโครลิตร (ค่า Dilution factor เท่ากับ 100) ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายตัวอย่างดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วใส่คิวเวตต์ วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงรุ่น BioPhotometer™ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร การคำนวณความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจะคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร หรือไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังสมการที่ 3.1

สมการที่ 3.1

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = OD260 x 50 ng/ml x dilution factor

3.4.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยชุด GF-1 AmbiClean kit ของบริษัท Vivantis

นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ปรับปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยทำในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ DB (Buffer DB) ปริมาตร 1:1 โดยปริมาตรที่ผ่านการบ่ม ณ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และเติมเอทานอล (Ethanol) ปริมาตร 1:1 โดยปริมาตรแล้วผสมสารให้เข้ากันโดยพลิกหลอดทดลองกลับไปมา จากนั้นดูดสารละลายใส่ลงในคอลัมน์ แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาแล้วเทสารละลายด้านล่างคอลัมน์ทิ้ง และเติม Wash buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาเทสารละลายด้านล่างคอลัมน์ทิ้ง และนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัดเอทานอล (Ethanol) ที่หลงเหลือภายในคอลัมน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นย้ายคอลัมน์ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม Elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในแผ่นเมมเบรนโดยตรงจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที สารละลายดีเอ็นเอจะตกลงสู่ด้านล่างคอลัมน์ ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็เอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงวิธีการในข้อ 3.4.2

3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เริ่มต้นจากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง โดยไพรเมอร์ที่ศึกษาเป็นไพรเมอร์ unanchored เป็นไพรเมอร์ที่มีเฉพาะชุดลำดับเบสซ้ำ ๆ อ้างอิงจาก Innark และคณะ, (2014) โดยมีจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ 39 ไพรเมอร์ ซึ่งแสดงรหัส และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แต่ละเส้น ดังตารางที่ 3.1 ในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมนั้นใช้วิธีการสุ่มมันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับ กับมันสำปะหลังอุตสาหกรรมที่ผ่านการสกัดดีเอ็นเอ และทำให้บริสุทธิ์นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำนวน 39 ไพรเมอร์ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ใช้ส่วนประกอบสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา ที่ดัดแปลงมาจาก Mouhamady และคณะ, (2020) ดังตารางที่ 3.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) ด้วยเครื่อง Biometra TAdvanced ที่ใช้ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 3.3 หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมสีย้อม 3X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้ความเข้มข้นของเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ ระยะเวลา 30-35 นาที เทียบกับ VC 100 bp DNA ladder จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 39 ไพรเมอร์มาวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์การแปลผลแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์โดยการให้คะแนนแถบแบนแบบ binary data matrix โดยให้คะแนนเป็น 1 เมื่อปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างนำมาคำนวณค่า polymorphism information content (PIC) เป็นค่าที่ใช้บอกความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์แต่ละชนิดมีสูตรการคำนวณ ดังสมการที่ 3.2 และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี วิ ธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) แสดงผลในรูปแบบ dendrogram โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.1

สมการที่ 3.2

$$PIC = 1-\sum_{i=1}^{n} Pi^2$$

โดย Pi = ความถี่ของอัลลีล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ชนิดของไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

ลำดับ	ISSR primer	Sequence (5’-3’)	ลำดับ	ISSR primer	Sequence (5’-3’)
1	UBC801	ATATATATATATATATT	21	UBC834	GAGGAGAGAGAGAGAG(CT)T
2	UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	22	UBC835	GAGGAGAGAGAGAGAG(CT)C
3	UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	23	UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGCA
4	UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	24	UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
5	UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	25	UBC844	CTCTCTCTCTCTCTCTGC
6	UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	26	UBC847	CACACACACACACACARC
7	UBC813	CTCTCTCTCTCTCTCTT	27	UBC849	GTGTGTGTGTGTGTGTYC
8	UBC814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	28	UBC855	ACACACACACACACAC(CT)T
9	UBC815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	29	UBC856	ACACACACACACACACYA
10	UBC817	CACACACACACACACAA	30	UBC857	ACACACACACACACACTG
11	UBC818	CACACACACACACACAG	31	UBC861	ACCACCACCACCACCACC
12	UBC819	GTGTGTGTGTGTGTGTA	32	UBC862	AGCAGCAGCAGCAGCAGCT
13	UBC820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	33	UBC863	AGTAGTAGTAGTAGTAGT
14	UBC821	GTGTGTGTGTGTGTGTT	34	UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC
15	UBC822	TCTCTCTCTCTCTCTCA	35	UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
16	UBC824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	36	UBC870	TGCTGCTGCTGCTGCTGC
17	UBC825	ACACACACACACACACT	37	UBC873	GACAGACAGACAGACA
18	UBC826	ACACACACACACACACC	38	UBC880	TCTCTCTCTCTCTCTCAA
19	UBC827	ACACACACACACACACG	39	UBC881	GGGTGGGGTGGGGTG
20	UBC828	GTGTGTGTGTGTGTGTA			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบสารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา

สารเคมี	**ความเข้มข้นเริ่มต้น**	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
PCR buffer	5X	2	1X
$MgCl_2$	25 mM	1.6	2 mM
dNTP	10 mM	3.2	0.2 mM
Primer	10 pmol	1	0.5 pmol
Taq DNA polymerase	5000 U/ml	0.2	1 U
DNA template	50 ng/µl	2	100 ng
DI water		10	
ปริมาตรรวม		20	

ตารางที่ 3.3 แสดงขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

ขั้นตอน	**อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)**	**เวลา (นาที)**	**จำนวน (รอบ)**
Initiation denaturation	94	5	1
Denaturation	94	45s	
Annealing	49-55	50s	35
Extension	72	1	
Final extension	72	7	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ของ Doyle และ Doyle (1987) จากตัวอย่างใบมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง มาจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง 20 ตัวอย่าง ได้แก่ ระยอง 1 (R1) ระยอง 2 (R2) ระยอง 3 (R3) ระยอง 5 (R5) ระยอง 7 (R7) ระยอง 9 (R9) ระยอง 11 (R11) ระยอง 15 (R15) ระยอง 60 (R60) ระยอง 72 (R72) ระยอง 86-13 (R86-13) ระยอง 90 (R90) เกษตรศาสตร์ 50 (KU50) เกษตรศาสตร์ 72 (KU72) ห้วยบง 60 (HB60) ห้วยบง 80 (HB80) ห้วยบง 90 (HB90) พิรุณ 1 (PR1) พิรุณ 2 (PR2) และมันห้านาที (M5) และตัวอย่างใบมันสำปะหลังจากชาวบ้านจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ มันใบด่าง (D1) และมันห้านาที (PC2) นำดีเอ็นเอที่ได้ (จากวิธีการข้อ 3.4.3) มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยวิธีการอิเล็กโทรโฟรีซิส และตรวจหาค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น BioPhotometer™ ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และ 260 นาโนเมตร แสดงดังตารางที่ 4.1 ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 85.39 ถึง 364.88 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าอัตราการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าอยู่ในช่วง 1.22 ถึง 7.14 โดยดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของโปรตีน เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมนั้นควรอยู่ในช่วง 1.7 ถึง 2.0 บ่งบอกถึงดีเอ็นเอที่สกัดมีการปนเปื้อนโปรตีนต่ำและมีความบริสุทธิ์เพียงพอต่อการนำไปใช้ (Maniatis และคณะ, 1982) จึงได้ทำการนำดีเอ็นเอทำให้บริสุทธิ์โดยชุด GF-1 AmbiClean kit ของบริษัท Vivantis และตรวจสอบโดยวิธีการอิเล็กโทรโฟรีซิสอีกครั้งก่อนนำไปศึกษาในลำดับต่อไป

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นและการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง โดยเครื่องรุ่น BioPhotometer™

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	อัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 (A_{260}/A_{280})
R1	94.02	3.20
R2	344.70	1.93
R3	120.21	2.43
R5	162.61	3.95
R7	199.24	1.84
R9	85.39	2.65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นและการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง โดยเครื่องรุ่น BioPhotometer™ (ต่อ)

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	อัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 (A_{260}/A_{280})
R11	116.23	7.14
R15	163.06	1.67
R60	123.40	2.67
R72	110.76	6.80
R86-13	120.11	2.42
R90	121.30	2.49
KU50	147.62	1.75
KU72	284.82	1.89
HB60	218.81	1.62
HB80	192.44	1.60
HB90	226.92	1.42
PR1	184.69	1.22
PR2	190.44	1.45
M5	111.25	1.49
D1	364.88	1.45
PC2	100.74	3.05

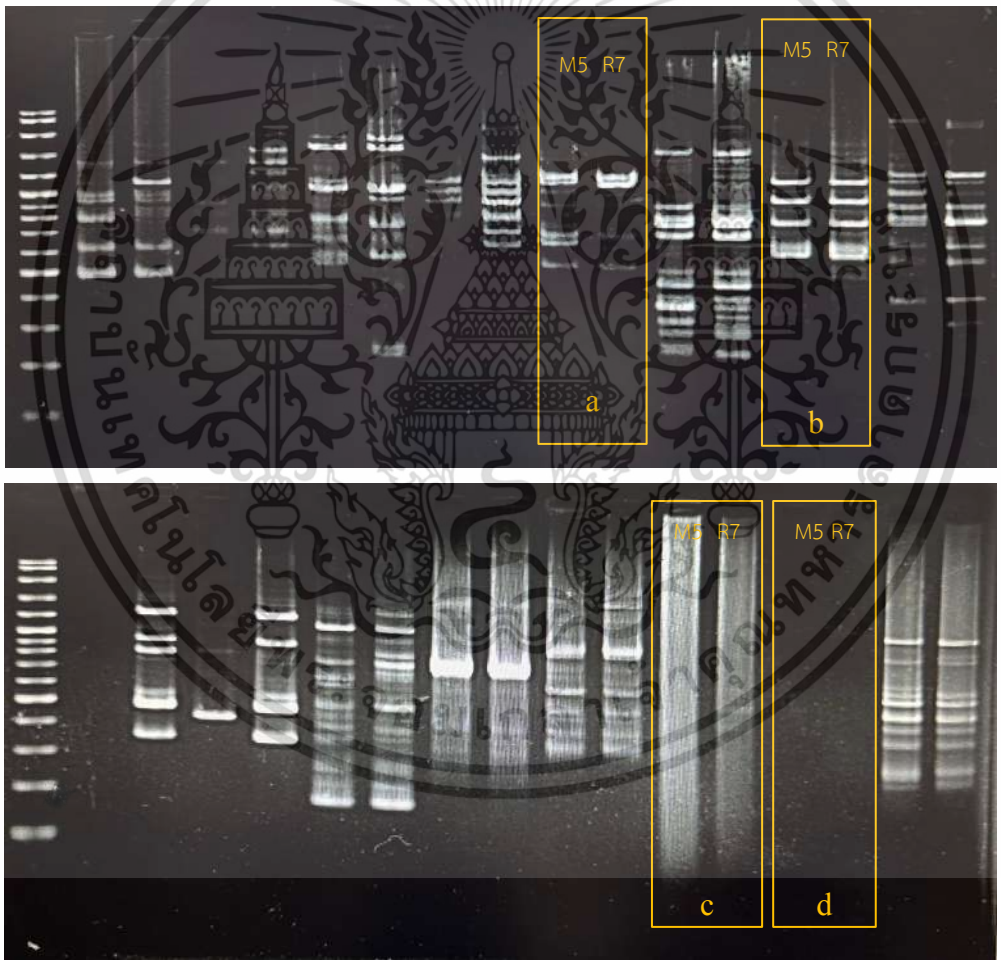
4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

4.2.1 ผลการคัดเลือกไพรเมอร์ และการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

การศึกษาเบื้องต้นในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR โดยไพรเมอร์จำนวน 39 ไพรเมอร์ แสดงดังตารางที่ 3.1 ใช้ทดลองกับมันสำปะหลังจำนวน 2 ตัวอย่าง ในการคัดเลือกไพรเมอร์สุ่มตัวอย่างมันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับ 1 ตัวอย่าง คือ มันห้านาที (M5) และมันสำปะหลังอุตสาหกรรม 1 ตัวอย่าง คือ ระยอง 7 (R7) จากผลการทดลองการคัดเลือกไพรเมอร์ แสดงดังรูปที่ 4.2 ทั้งสองภาพเป็นเพียงภาพบางส่วนจากการคัดเลือกไพรเมอร์ โดยใช้หลักในการคัดเลือกพิจารณาเฉพาะไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอและมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่มากจนเกินไปและน้อยจนเกินไป มีความแตกต่างแถบแบนที่ตำแหน่งเดียวกันในแต่ละตัวอย่าง โดยแถบดีเอ็นเอที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดความแตกต่างของแถบแบนในตำแหน่งเดียวกัน (Polymorphic bands) และแถบดีเอ็นเอที่มีความเหมือนหรือไม่แตกต่างกันของแถบแบนในตำแหน่งเดียวกัน (Monomorphic bands) ดังนั้นจึงเลือกไพรเมอร์ที่มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอและมีความคมชัดของแถบแบน แสดงดังรูปที่ 4.1 โดย (a) มีการแยกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในตำแหน่งเดียวกัน (Polymorphic bands) ของมันห้านาที (M5) และระยอง 7 (R7) แถบแบนในตำแหน่งเดียวกัน (b) แถบดีเอ็นเอที่มีความเหมือนหรือไม่แตกต่างกันระหว่างแถบแบนในตำแหน่งเดียวกัน (Monomorphic bands) (c) เกิดแถบแบนที่ไม่ชัดเจน และ (d) ไม่เกิดแถบแบน และพบว่าไพรเมอร์ที่เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในตำแหน่งเดียวกัน (Polymorphic bands) สามารถให้คะแนนแถบแบนได้มี 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC814, UBC822, UBC808, UBC844, UBC835 และ UBC856 จึงสรุปได้ว่าทั้ง 6 ไพรเมอร์ดังกล่าวมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างการคัดเลือกไพรเมอร์จาก 39 ไพรเมอร์กับมันสำปะหลังที่สุ่มจำนวน 2 ตัวอย่าง (a) แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในตำแหน่งเดียวกัน (Polymorphic bands) (b) แถบดีเอ็นเอเหมือนกันในตำแหน่งเดียวกัน (Monomorphic bands) (c) เกิดแถบแบนที่ไม่ชัดเจน (d) ไม่เกิดแถบแบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

แถบดีเอ็นเอจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ของมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง กับไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ คือ UBC814, UBC822, UBC808, UBC844, UBC835 และUBC856 (ภาคผนวก ข) นำเข้าโปรแกรม Microsoft excel เพื่อให้คะแนนแถบแบนแบบ binary data matrix พบว่ามีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 98 แถบ มีขนาดของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 250-2250 คู่เบส โดยมีแถบดีเอ็นเอที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic bands) เป็นจำนวน 61 แถบ ค่าเฉลี่ย 10.17 มีค่า Polymorphism Information Content (PIC) อยู่ในช่วง 0.17-0.75 โดยแสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ในเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ดังตารางที่ 4.1 จากงานวิจัยของ Vidal และคณะ, (2015) ศึกษาความแม่นยำทางพันธุกรรมและความแปรปรวนจากการขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเนื้อเยื่อของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR จากเนื้อเยื่อมันสำปะหลังทั้ง 3 ตัวอย่าง ซึ่งมีแหล่งที่มาจาก Embrapa Cassava & Fruits Germplasm Bank เทศบาลครูซ ดาส อัลมาส (Cruz das Almas) รัฐบาเอีย (Bahia) ประเทศบราซิล ถูกเพาะเลี้ยงในหลอดแก้วเพื่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์จำนวน 27 ไพรเมอร์ ซึ่ง 24 ไพรเมอร์ สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้จำนวน 175 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic bands) จำนวน 100 แถบ ซึ่งถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างการขยายพันธุ์ของมันสำปะหลังที่ถูกเพาะเลี้ยงในหลอดแก้วตามการวัดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์หรือระหว่างประชากรภายในสายพันธุ์ โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Jaccard similarity coefficient) แบ่งกลุ่มโดยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) ค่าของแถบแบนต่อไพรเมอร์ คือ 2 ถึง 13 โดยมีค่าเฉลี่ย 7.3 แถบ โดยโครงงานพิเศษนี้มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 98 แถบ ค่าของแถบแบนต่อไพรเมอร์ คือ 11 ถึง 20 โดยมีค่าเฉลี่ย 16.33 และงานวิจัยของ Asha และคณะ, (2019) การจัดกลุ่มระดับโมเลกุลของเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังที่คัดเลือก (*Manihot esculenta* Crantz) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR และ SSR โดยใช้มันสำปะหลังจำนวน 14 สายพันธุ์ ใช้ ISSR ไพรเมอร์ 6 ไพรเมอร์ และ SSR ไพรเมอร์ 9 ไพรเมอร์ และเมื่อทำการวิเคราะห์ ISSR แถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด 80 แบน โดยแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic bands) 67 แถบ (83.75%) เปอร์เซ็นต์ของความหลากหลายมีตั้งแต่สูงสุด UBC836 (94.11%) และต่ำสุด UBC807 และ UBC811 (66.66%) การวิเคราะห์ SSR มีแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด 29 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic bands) 21 แถบ (72.41%) ทั้งนี้จากโครงงานพิเศษใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ไพรเมอร์ที่มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างสูงสุด คือ UBC856 จำนวน 17 แถบ และต่ำสุด UBC835 จำนวน 7 แถบ

เมื่อนำมาสร้าง Dendrogram ด้วยโปรแกรม NTYSYSpc version 2.1 โดยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.73 (ภาคผนวก ค) ดังรูปที่ 4.3 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ มันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับจำนวน 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วย มันห้านาที (M5) ระยอง 2 (R2) และมันใบด่าง (D1) และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ มันสำปะหลัง 19 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ระยอง 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(R1), ระยอง 3 (R3) ระยอง 5 (R5) ระยอง 7 (R7) ระยอง 9 (R9) ระยอง 11 (R11) ระยอง 15 (R15) ระยอง 60 (R60) ระยอง 72 (R72) ระยอง 86-13 (R86-13) ระยอง 90 (R90) เกษตรศาสตร์ 50 (KU50) เกษตรศาสตร์ 72 (KU72) ห้วยบง 60 (HB60) ห้วยบง 80 (HB80) ห้วยบง 90 (HB90) พิรุณ 1 (PR1) พิรุณ 2 (PR2) และมันห้านาที (PC2) เมื่อพิจารณาลักษณะทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของมันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับ และมันสำปะหลังอุตสาหกรรม สอดคล้องกับงานวิจัยของเบญจวรรณ (2554) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจำนวน 8 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.54 ถึง 0.83 สามารถจัดมันสำปะหลังออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ พันธุ์ขม หรือที่เรียกว่ามันอุตสาหกรรมประกอบด้วย ห้วยบง 60 และเกษตรศาสตร์ 50 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย มันห้านาทีก้านเหลือง มันห้านาทีก้านแดง และระยอง 2 ซึ่งเป็นพันธุ์หวาน หรือที่เรียกว่ามันสำปะหลังบริโภค มีกรดไฮโดรไซยานิกต่ำ กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ระยอง 5 ระยอง 7 และระยอง 9 ซึ่งมาจากการผสมข้ามพันธุ์ที่มีแม่พันธุ์เดียวกัน จากงานวิจัยข้างต้นเห็นได้ว่ามีการแบ่งกลุ่มระหว่างมันพันธุ์ขม หรือที่เรียกว่ามันอุตสาหกรรม และพันธุ์หวาน หรือมันสำปะหลังบริโภคเนื่องจากมากรดไฮโดรไซยานิกต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มของโครงงานพิเศษนี้ และนอกจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ยังมีเครื่องหมายโมเลกุลที่ถูกนำมาศึกษาที่พันธุกรรมของมันสำปะหลังในประเทศไทย และงานวิจัย นฤมล และคณะ (2012) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD และคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 25 ไพรเมอร์ นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังพันธุ์ปลูก 9 สายพันธุ์ และพันธุ์ป่า 1 สายพันธุ์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของมันสำปะหลังได้ และนอกจากนั้นยังพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกมันสำปะหลังจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์สามารถจำแนกมันสำปะหลังได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ มันสำปะหลังพันธ์ปลูก ประกอบด้วย ระยอง 1 ระยอง 2 ระยอง 5 ระยอง 60 ระยอง 90 มันห้านาที ศรีราชา 1 Virgin Island 18 และ Virgin Island 22 และ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ มันสำปะหลังพันธุ์ป่า ประกอบด้วย Wild type โดยทั้ง 2 กลุ่ม มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.65 ถึง 0.85 เฉลี่ย 0.71 แม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างในสายพันธุ์ได้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการคัดเลือกมันสำปะหลังสายพันธุ์อื่น ๆ นำมาเปรียบเทียบ และยืนยันความแตกต่างระหว่างมันสำปะหลังบริโภค และมันสำปะหลังอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวน polymorphic bands	เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands	Polymorphism Information Content (PIC)
UBC814	320-2250	14	8	57.14	0.60
UBC822	450-2500	11	8	72.73	0.75
UBC808	320-2250	20	9	45	0.17
UBC844	250-1400	18	12	66.67	0.33
UBC835	250-1500	17	7	41.18	0.40
UBC856	300-1500	18	17	94.44	0.33
รวม		98	61	377.16	2.58
เฉลี่ย		16.33	10.17	62.87	0.43

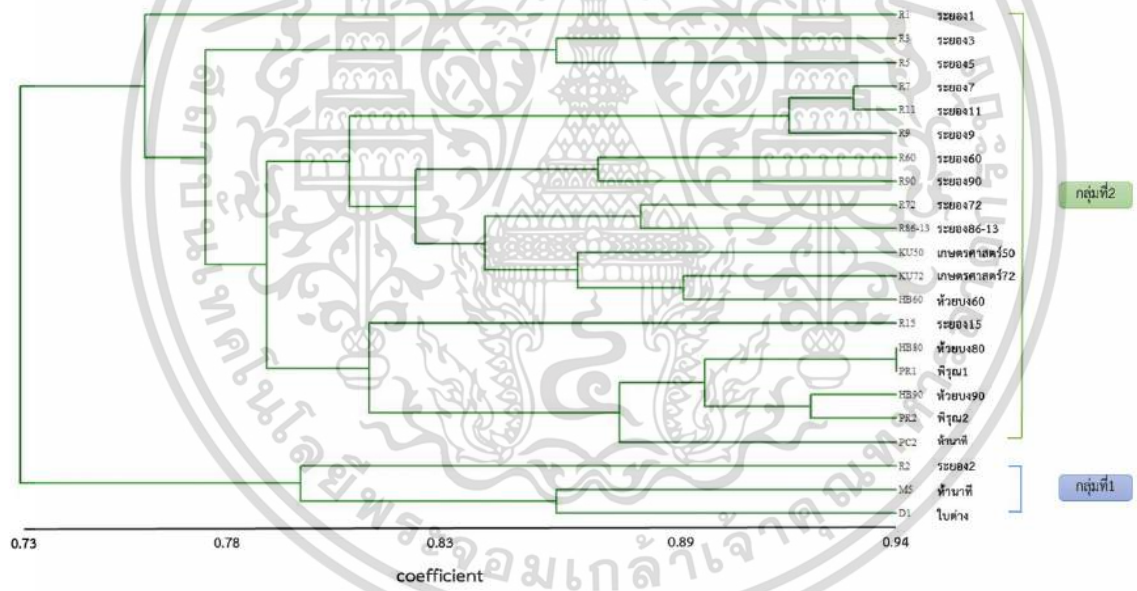
ผลการวิเคราะห์จาก Dendrogram สังเกตได้ว่าตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 จัดอยู่ในประเภทมันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับ และตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 จัดอยู่ในประเภทมันสำปะหลังอุตสาหกรรม โดยมันสำปะหลัง 22 ตัวอย่าง ดังแสดงรูปที่ 4.2 เมื่อพิจารณา กลุ่มที่ 1 มันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับจำนวน 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ระยอง 2 ที่มีพ่อแม่พันธุ์จากการคัดเลือก Mcol 113 และ Mcol 22 มันห้านาทีเป็นพันธุ์พื้นเมือง และมันใบด่าง พ่อแม่พันธุ์ไม่ทราบที่มาชัดเจน และเมื่อพิจารณา กลุ่มที่ 2 มันสำปะหลังอุตสาหกรรมจำนวน 19 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ระยอง 1 เป็นสายพันธุ์พื้นเมือง, ระยอง 3 และระยอง 5 มีความใกล้ชิดกันเนื่องจาก ระยอง 5 ใช้พ่อพันธุ์ คือระยอง 3 ร่วมกัน, ระยอง 7, ระยอง 11 และระยอง 9 ใช้พ่อพันธุ์เดียวกัน คือ OMR 29-20-118, ระยอง 60, ระยอง 90, ระยอง 72, ระยอง 86-13, เกษตรศาสตร์ 50, เกษตรศาสตร์ 72 และ ห้วยบง 60 มีความใกล้ชิดกันแต่ไม่ได้มีสายพันธุ์พ่อแม่ร่วมกัน, ระยอง 15 เป็นการผสมแบบเปิดกับเกษตรศาสตร์ 50, สังเกตความใกล้ชิดของห้วยบง 60 และพิรุณ 1 ซึ่งทั้งสองไม่มีพ่อแม่สายพันธุ์ร่วมกัน และห้วยบง 90, พิรุณ 2 และมันห้านาที (PC2) ไม่มีสายพันธุ์พ่อแม่ร่วมกัน จาก Dendrogram พบว่ามันห้านาที (PC2) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มมันสำปะหลังอุตสาหกรรม เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์จากชาวบ้านอาจเกิดความสับสนของผู้อนุเคราะห์เข้าว่าตัวอย่างดังกล่าว คือ มันห้านาที (PC2) ตามการเรียกขานในท้องถิ่น

จากผลแสดงให้เห็นว่าการแบ่งกลุ่มของตัวอย่างมันสำปะหลังทั้ง 2 กลุ่ม ไม่ได้เกิดจากการแบ่งตามสายพันธุ์พ่อแม่แต่อย่างใด สอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นของเบญจวรรณ (2554) และจากงานวิจัย Joseph และคณะ, (2020) ศึกษาการประเมินความหลากหลายและขอบเขตของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างการขยายพันธุ์ของมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ใช้ไพรเมอร์จำนวน 35 ไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

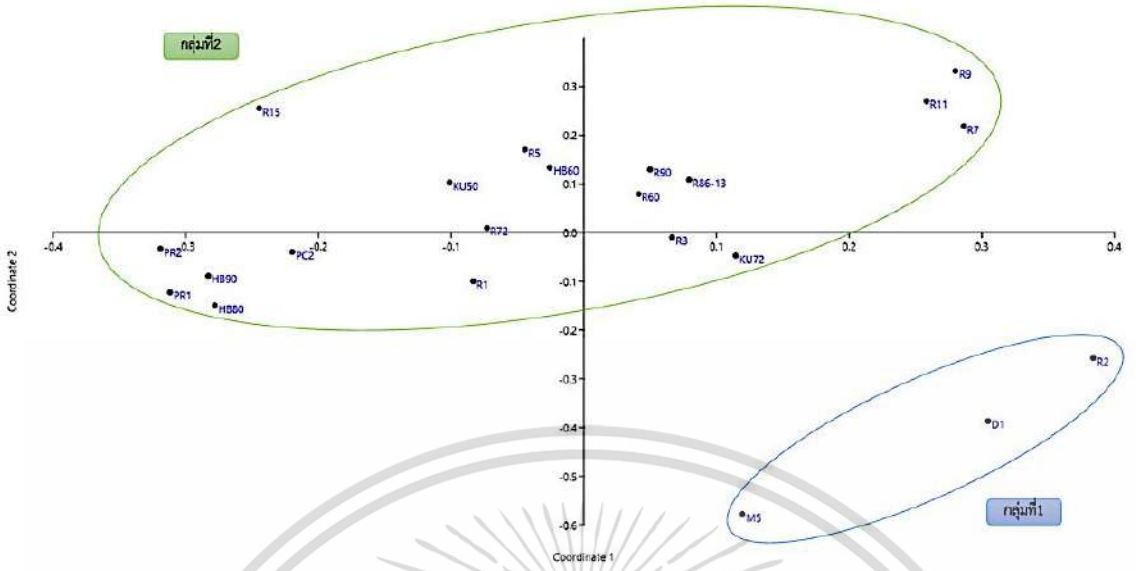
กับกลุ่มตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 89 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจากประเทศกานาหนึ่งในประเทศแห่งทวีปแอฟริกาตะวันตก และแหล่งที่มาอื่น ๆ ผลการศึกษาในปัจจุบันเผยให้เห็นความหลากหลายในระดับปานกลางถึงสูงในมันสำปะหลัง 89 รายการที่วิเคราะห์ เช่นเดียวกับที่พบในสกุล *Manihot* การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรระบุประชากรย่อย และส่วนประกอบจำนวนมากที่ยืนยันลักษณะที่แตกต่างกันของมันสำปะหลังที่นำมาใช้ จำนวนเฉลี่ยของไพรเมอร์ที่จำเป็นในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชตระกูลหัวนั้นจะแตกต่างกันและขึ้นอยู่กับระดับของการผสมข้ามสายพันธุ์ สายพันธุ์พืชตระกูลหัวที่มีการผสมพันธุ์สูงจึงต้องการไพรเมอร์จำนวนมากกว่าพืชที่ต่างกันตามธรรมชาติ

การวิเคราะห์การกระจายของตัวอย่างมันสำปะหลัง โดยใช้โปรแกรม Past version 3.1 ได้แผนภูมิการกระจายของตัวอย่างของมันสำปะหลัง ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มของ Dendrogram โดยผลจากแผนภูมิสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ มันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับ และมันสำปะหลังอุตสาหกรรม



รูปที่ 4.2 Dendrogram ของมันสำปะหลัง จำนวน 22 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR โดยวิธี UPGMA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

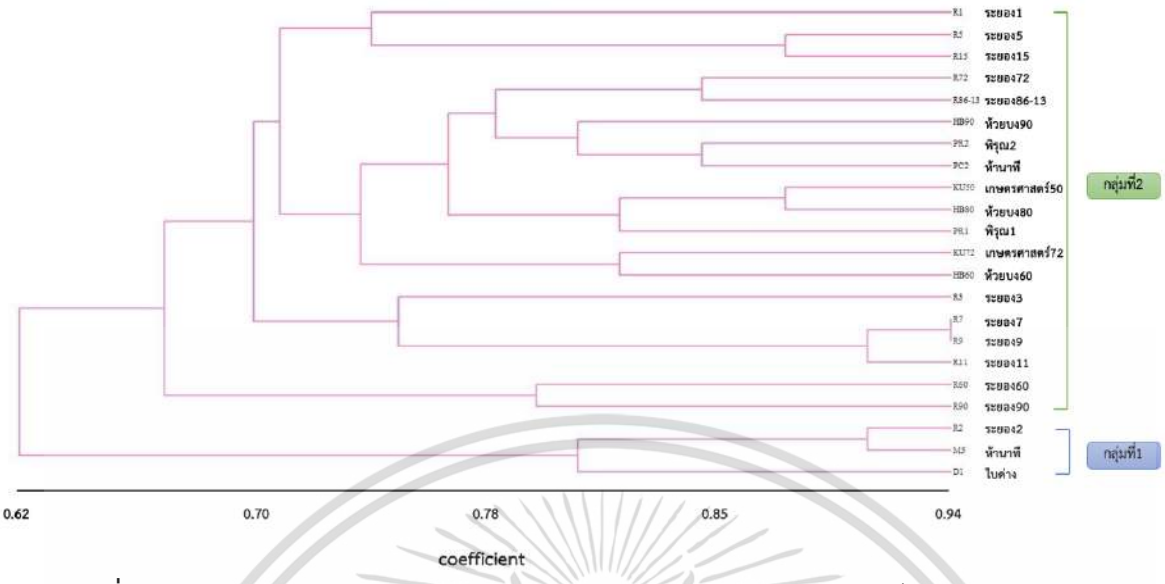


รูปที่ 4.3 แผนภูมิการกระจายของมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่างด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

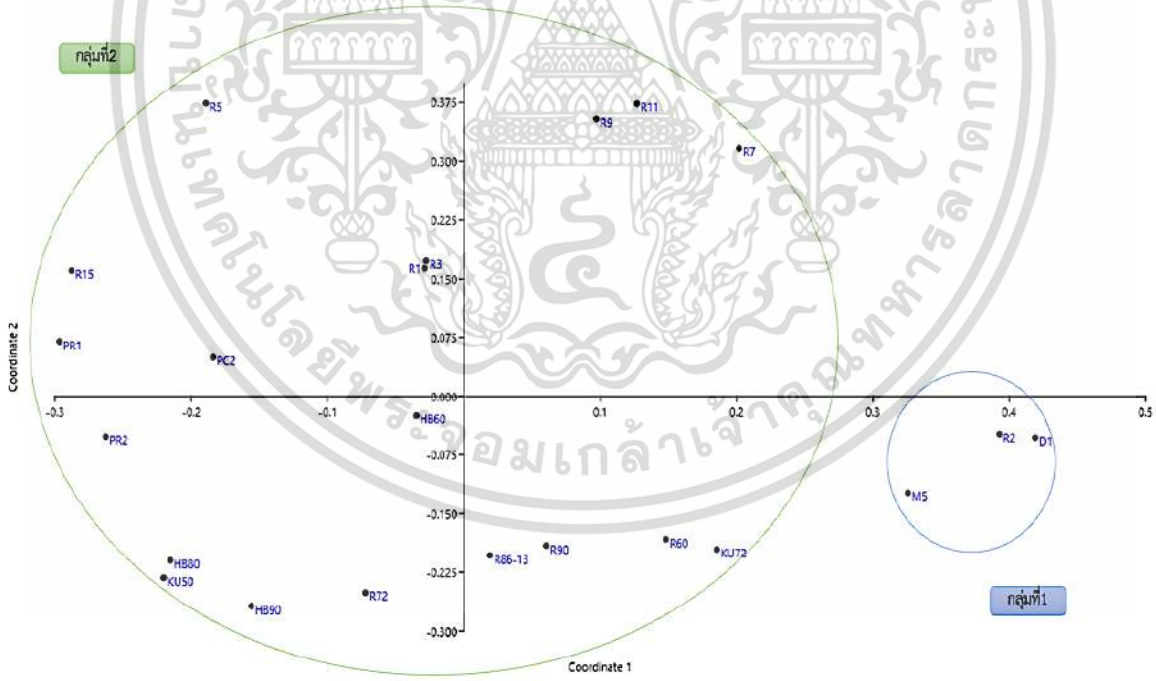
นอกจากนี้จากการทดลองพบว่าไพรเมอร์ UBC835 และ UBC856 หากใช้ไพร์เมอร์ดังกล่าวเพียงสองชนิดก็สามารถแยกความแตกต่างของมันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับ และมันสำปะหลังอุตสาหกรรมได้เช่นเดียวกัน โดยหลักการในการจับคู่แสดงผลร่วมกันของไพรเมอร์ นำค่าการให้คะแนนแถบแบนของแต่ละไพรเมอร์มาจับคู่ และแสดงผลร่วมกัน เมื่อนำผลของไพรเมอร์ทั้งสองมาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่าผลการสร้าง Dendrogram ของ 2 ไพรเมอร์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.62 ถึง 0.94 เมื่อพิจารณาจาก Dendrogram ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.62 ดังแสดงรูปที่ 4.4 สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ระยอง 2 มันห้านาที และมันใบด่าง ด่าง เมื่อนำมาวิเคราะห์ 2 ไพรเมอร์ ให้ผลสอดคล้องกับการใช้ 6 ไพรเมอร์ และ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ระยอง 1 ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 7 ระยอง 9 ระยอง 11 ระยอง 15 ระยอง 60 ระยอง 72 ระยอง 86-13 ระยอง 90 เกษตรศาสตร์ 50 เกษตรศาสตร์ 72 ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 ห้วยบง 90 พิรุณ 1 พิรุณ 2 และมันห้านาที (PC2) เมื่อนำ 2 ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ให้ผลสอดคล้องกับการใช้ 6 ไพรเมอร์แสดงถึงผลของการแบ่งกลุ่มเช่นเดียวกัน และค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมันใบด่าง และระยอง 15 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.62 แสดงถึงความต่างมันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับกับมันสำปะหลังอุตสาหกรรม และพิรุณ 1 และห้วยบง 80 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.94 เนื่องจากพิรุณ 1 แม่พันธุ์ คือห้วยบง 60 ซึ่งทั้งห้วยบง 60 และห้วยบง 80 ต่างมีพ่อแม่พันธุ์เหมือนกัน คือ เกษตรศาสตร์ 50 และระยอง 5 ดังนั้น พิรุณ 1 และห้วยบง 80 จึงมีความใกล้เคียงกัน

จากแผนภูมิการกระจายของมันสำปะหลัง พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ มันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับ และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ มันสำปะหลังอุตสาหกรรม ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ผลที่ได้จาก 2 ไพรเมอร์มีความคล้ายคลึงกับผลการแบ่งกลุ่มโดยใช้ 6 ไพรเมอร์อย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 Dendrogram ของมันสำปะหลังจำนวนจำนวน 22 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ UBC835 และ UBC856 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR วิเคราะห์โดยวิธี UPGMA



รูปที่ 4.5 แผนภูมิการกระจายของมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ UBC835 และ UBC856 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ระยอง 1 ระยอง 2 ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 7 ระยอง 9 ระยอง 11 ระยอง 15 ระยอง 60 ระยอง 72 ระยอง 86-13 ระยอง 90 เกษตรศาสตร์ 50 เกษตรศาสตร์ 72 ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 ห้วยบง 90 พิรุณ 1 พิรุณ 2 มันห้านาที มันใบด่าง และมันห้านาที (PC2) โดยการนำใบไปสกัดดีเอ็นเอของพืชด้วยวิธี CTAB แล้วศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์จาก 39 ไพรเมอร์ เพื่อได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic bands) ที่ชัดเจน และสามารถให้คะแนนได้ จึงได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการนำมาศึกษา 6 ไพรเมอร์ ประกอบด้วย UBC814, UBC822, UBC808, UBC844, UBC835 และUBC856

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังโดยการสร้าง Dendrogram ด้วยโปรแกรม NTSYSpc โดยวิธี UPGMA พบว่าสามารถแบ่งสายพันธุ์มันสำปะหลังได้ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มมันสำปะหลังบริโภคและไม้ประดับ ประกอบด้วย ระยอง 2 มันห้านาที และมันใบด่าง และกลุ่มมันสำปะหลังอุตสาหกรรม ประกอบด้วย ระยอง 1 ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 7 ระยอง 9 ระยอง 11 ระยอง 15 ระยอง 60 ระยอง 72 ระยอง 86-13 ระยอง 90 เกษตรศาสตร์ 50 เกษตรศาสตร์ 72 ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 ห้วยบง 90 พิรุณ 1 พิรุณ 2 และมันห้านาที (PC2)

5.2 ข้อเสนอแนะ

คณะผู้จัดทำจะสามารถแยกกลุ่มของมันสำปะหลังออกได้ 2 กลุ่ม อย่างไรก็ตามด้วยความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังยังคงมีสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ไม่ได้นำมาทำการวิเคราะห์ซึ่งหากมีตัวอย่างมากขึ้นอาจเพิ่มประสิทธิภาพในการแบ่งกลุ่มของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR ให้ชัดเจนยิ่งขึ้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเทคนิคทางโมเลกุลชนิดอื่น ๆ เพื่อให้ค้นหาเทคนิคที่สามารถเหมาะสมต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังในอนาคตต่อไป และจากการศึกษาสามารถใช้ไพรเมอร์จากงานวิจัยอ้างอิงเบื้องต้น เพื่อประหยัดเวลาในขั้นตอนการคัดเลือกไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จีราพร แก่นทรัพย์, สุวลักษณ์ อะมะวัลย์, ประพิศ วองเทียม, อรุโณทัย ซาววา, สุภาวดี ง้อเหรียญ, ดนัย นาค-ประเสริฐ และจิณณาจาร์ หาญเศรษฐสุข. 2563. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง (Cassava Manihot Disease). วารสารวิชาการเกษตร. 1: 68-79

จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ข้าว. แก่นเกษตร. 40: 299-308.

นฤมล ธนานันต์. 2555. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี. Thai Journal of Science and Technology. 1(2): 128-133.

เบญจวรรณ รัตวัตร์, ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก และพินิจ หวังสมนึก. 2554. การศึกษาพันธุกรรมของมันสำปะหลังบางพันธุ์ในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย SSR. The 12th Khon Kaen University 2011 Graduate Research Conference. 564-571.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์. 2558. การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือทางอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพฯ. โอเดียนสโตร์.

พรปวีณ์ ธิวัฒน์วรานิกุล, ภาณุวัฒน์ มูลจันทะ, วรรณวิไล อินทนู และจินตนา อันอาตม์งาม. 2561. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการก่อให้เกิดโรคเน่าแห้ง-เน่าดำมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Neoscytalidium hyalinum*. Agricultural Science and Management J. 1(2): 22-34.

มัลลิกา แก้ววิเศษ, อัจฉราพรรณ ใจเจริญ, จีราพร แก่นทรัพย์, สุวลักษณ์ อะมะวัลย์, สุภาวดี ง้อเหรียญ, วิภาวี ชั้นโรจน์, วานิช คำพานิช, กฤตยา เพชรผึ้ง, ประพิศ วองเทียม และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2564. การค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายสนิปส์ใหม่เพื่อร่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง ให้มีไซยาไนด์ต่ำ ต้านทานโรครากปมและโรคใบด่างมันสำปะหลัง. [Online]. เข้าถึงได้จาก. https://www.doa.go.th/research/showthread.php?tid=2812&pid=3249.

มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย. 2543. พันธุ์มันสำปะหลัง. [Online]. เข้าถึงได้จาก. https://tapiocathai.org/K1.html.

ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. 2525. พันธุ์มันสำปะหลัง. [Online]. เข้าถึงได้จาก. https://www.doa.go.th/fc/rayong/?page_id=12.

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2558. มันสำปะหลัง: ลักษณะทางพฤษศาสตร์. [Online]. เข้าถึงได้จาก. https://www3.rdi.ku.ac.th/?p=17856.

สมบัติ แก้วผ่องอำไพ. 2560. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะปราง. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สมลักษณ์ จูฑังคะ. 2551. เอกสารวิชาการ เทคโนโลยีการผลิตมันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สวลี ดีประเสริฐ, ศุภชัย บุญนำมา, วิทยา บุตรทองมูล, บุฝผา ชินเชิดวงศ์ และวีระ โลหะ. 2555. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเป็นน้ำตาล. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 15(3): 41-46.

สุทวัฒน์ สินธีรโรจน์. 2557. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกมะละกอพันธุ์ขอนแก่น 80. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

สุภาวดี ง้อเหรียญ, จีราพร แก่นทรัพย์, บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ, วิภาวี ชั้นโรจน์, สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ และประพิศ วองเทียม. 2562. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR. วารสาวิชาเกษตร. 37(2): 2-13.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5(2): 37-59.

สุพัตรา คงสมมาตย์. 2549. การใช้เทคนิค RAPD และ AFLP ในการจัดจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลัง. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Asante, I.K. and Offei, S.K. 2003. RAPD-based genetic diversity study of fifty cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genetypes. Euphytica. 131: 113-119.

Asha, K.I., Varghese, A.M., Radhika Krishna, N., Koundinya, A.V.V. and Krishnan Prakash, B.S. 2019. Molecular Profiling of Selected Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Germplasm Using ISSR and SSR Markers. Journal of Root Crops. 45(2): 24-32.

Colombo, C., Second, G. and Charrier, A. 2000. Genetic relatedness between cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *M. flabellifolia* and *M. Peruviana* based on both RAPD and AFLP markers. Genetics and Molecular Biology. 23(2): 417-423.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 19(1): 11-15.

Joseph, A-D., Joseph, A.M-A., Isaac, K.A., Richard, Y.A., Vernon, G. and Samuel, K.F. 2020. Genetic diversity and population structure analysis of Ghanaian and exotic cassava accessions using simple sequence repeat (SSR) markers. Heliyou. 6: 1-9.

Duke, J.A. 1983. *Manihot esculenta* Crantz. [Online]. https://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Manihot_esculenta.html.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor New York. 76-85.

Mouhamady, A.B.A.E., Kordy, M.A.A. and Elewa, T.A.F. 2021. Elucidation of genetic diversity among some accessions of sugar beet (*Beta Vulgaris* L.) using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. Bulletin of the National Research Centre. 45: 166-193.

Salim, T.M., Baiea, H.S., Bekhit, M.M.M., Abdel-Sabour, M.S. and Elnagar, M. 2017. Genetic Diversity in some Introduced Cassava Genotypes via Simple Sequence Repeat Markers (SSR). Benha Journal of Applied Sciences. 2: 11-18.

Afonso, S.D.J., Moreira, R.F.C., Ledo, C.A.D.S., Ferriera, C.F., Santos, V.D.S. and Muondo, P.A. 2019. Genetic structure of cassava populations (*Manihot esculenta* Crantz) from Angola assessed through (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology. 18: 144-154.

Vidal, A.M., Vieira, L.J., Ferreira, C.F., Souza, F.V.D., Souza, A.S. and Ledo, C.A.S. 2015. Genetic fidelity and variability of micropropagated cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) evaluated using ISSR markers. Genetics and Molecular Research. 14(3): 7759-7770.

Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E.A. 2002. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plan breeding. Euphytica: International Journal of Plant Breeding. 128: 9-17.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม 2X CTAB

เตรียม 2X CTAB ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยมีสารเคมีที่ใช้ดังต่อไปนี้

1.1 สารเคมี

1.1.1 CTAB 6 กรัม

1.1.2 5 M NaCl 84 มิลลิลิตร

1.1.3 0.5 M EDTA pH8 12 มิลลิลิตร

1.1.4 Polyvinylpyrrolidone 3 กรัม

1.2 ขั้นตอนการเตรียม

1.2.1 เตรียมสารละลาย 5 M NaCl และ 0.5 EDTA pH8 แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่อง Autoclave

1.2.2 ชั่ง CTAB 6 กรัม และ PVP 3 กรัม แล้วละลายด้วย 5 M NaCl ปริมาตร 84 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้ Magnetic bar และเติม 0.5 M EDTA pH8 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร

1.2.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 300 มิลลิลิตร บรรจุในขวดดูแลนปลอดเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียม 10% CTAB buffer

เตรียม 10% CTAB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีสารเคมีที่ใช้ดังต่อไปนี้

2.1 สารเคมี

2.1.1 CTAB 10 กรัม

2.1.2 0.7 M NaCl 100 มิลลิลิตร

2.2 ขั้นตอนการเตรียม

2.2.1 ชั่งสาร CTAB 10 กรัม ละลายด้วย 0.7 M NaCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.2.2 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม 1.25 mM dNTPs

เตรียม 1.25 mM dNTPs ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร โดยมีสารเคมีที่ใช้ดังต่อไปนี้

3.1 สารเคมี

3.1.1 dATP 100 mM 12.5 ไมโครลิตร

3.1.2 dTTP 100 mM 12.5 ไมโครลิตร

3.1.3 dCTP 100 mM 12.5 ไมโครลิตร

3.1.4 dGTP 100 mM 12.5 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5 DI water 950 ไมโครลิตร

3.2 ขั้นตอนการเตรียม

ปิเปต DI water 950 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วปิเปต 100mM dATP dTTP dCTP และ dGTP สารละ 12.5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากับ DI water โดยใช้เครื่องผสมสารและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การเตรียม TE buffer

เตรียม TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีสารเคมีที่ใช้ดังต่อไปนี้

4.1 สารเคมี

4.1.1 TrisHCL pH8 1 M 1000 ไมโครลิตร

4.1.2 EDTA pH8 0.5 M 200 ไมโครลิตร

4.2 ขั้นตอนการเตรียม

ทำการปิเปต 1 M TrisHCL pH8 ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.5 EDTA pH 8 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นหลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. การเตรียมไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

เตรียมไพรเมอร์สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR โดยแต่ละไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 pmol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

5.1 สารเคมี

5.1.1 ไพรเมอร์ 100 pmol 2 ไมโครลิตร

5.1.2 DI water 18 ไมโครลิตร

5.2 ขั้นตอนการเตรียม

ปิเปต DI water ปริมาตร 18 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วปิเปตไพรเมอร์ความเข้มข้น 100 pmol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วผสมให้เข้ากับ DI water แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. การเตรียม Ethidium bromide

เตรียมสารละลาย Ethidium bromide 10 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เตรียมดังนี้

6.1 สารเคมี

6.1.1 10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร Ethidium bromide 0.5 มิลลิลิตร

6.1.2 น้ำกลั่น

6.2 ขั้นตอนการเตรียม

เตรียมถาดพร้อมฝาที่ห่อฟรอยด์สำหรับใส่ Ethidium bromide แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป ปริมาตร 495.5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปต 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Ethidium bromide 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น เขย่าถาดไปมาเล็กน้อยให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่มิดชิดไม่ให้แสงเข้าถึง ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การเตรียม Tris-borate EDTA buffer

เตรียม TE buffer ปริมาตร 1 ลิตร เตรียมดังนี้

7.1 สารเคมี

7.1.1 Tris-Base 108 กรัม

7.1.2 0.5 M EDTA pH8 40 มิลลิลิตร

7.1.3 Boric acid 54 กรัม

7.1.4 น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

7.2 ขั้นตอนการเตรียม

7.2.1 ชั่ง Tris-Base, EDTA, Boric acid จากนั้นค่อยละลายด้วยน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน

7.2.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดย Autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. การเตรียม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)

เตรียม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

8.1 สารเคมี

8.1.1 Chloroform 48 มิลลิลิตร

8.1.2 Isoamyl alcohol 2 มิลลิลิตร

8.2 ขั้นตอนการเตรียม

8.2.1 เตรียม Chloroform ปริมาตร 48 มิลลิลิตร

8.2.2 ปิเปต Isoamyl alcohol 2 มิลลิลิตร ผสมกับ Chloroform ปริมาตร 48 มิลลิลิตรใส่ขวด แล้วเก็บไม่ให้โดนแสงที่อุณหภูมิห้อง

9. การเตรียม Agarose gel 1%

9.1 สารเคมี

เจลขนาดเล็ก

Agarose 0.2 กรัม

1X TBE buffer 20 มิลลิลิตร

เจลขนาดใหญ่

Agarose 0.4 กรัม

1X TBE buffer 40 มิลลิลิตร

9.2 ขั้นตอนการเตรียม

9.2.1 ชั่งอะกาโรสเจล และตวง 1X TBE ตามปริมาตร

9.2.2 นำอะกาโรสเจลและ 1X TBE เทรวมกันลงในฟลากส์

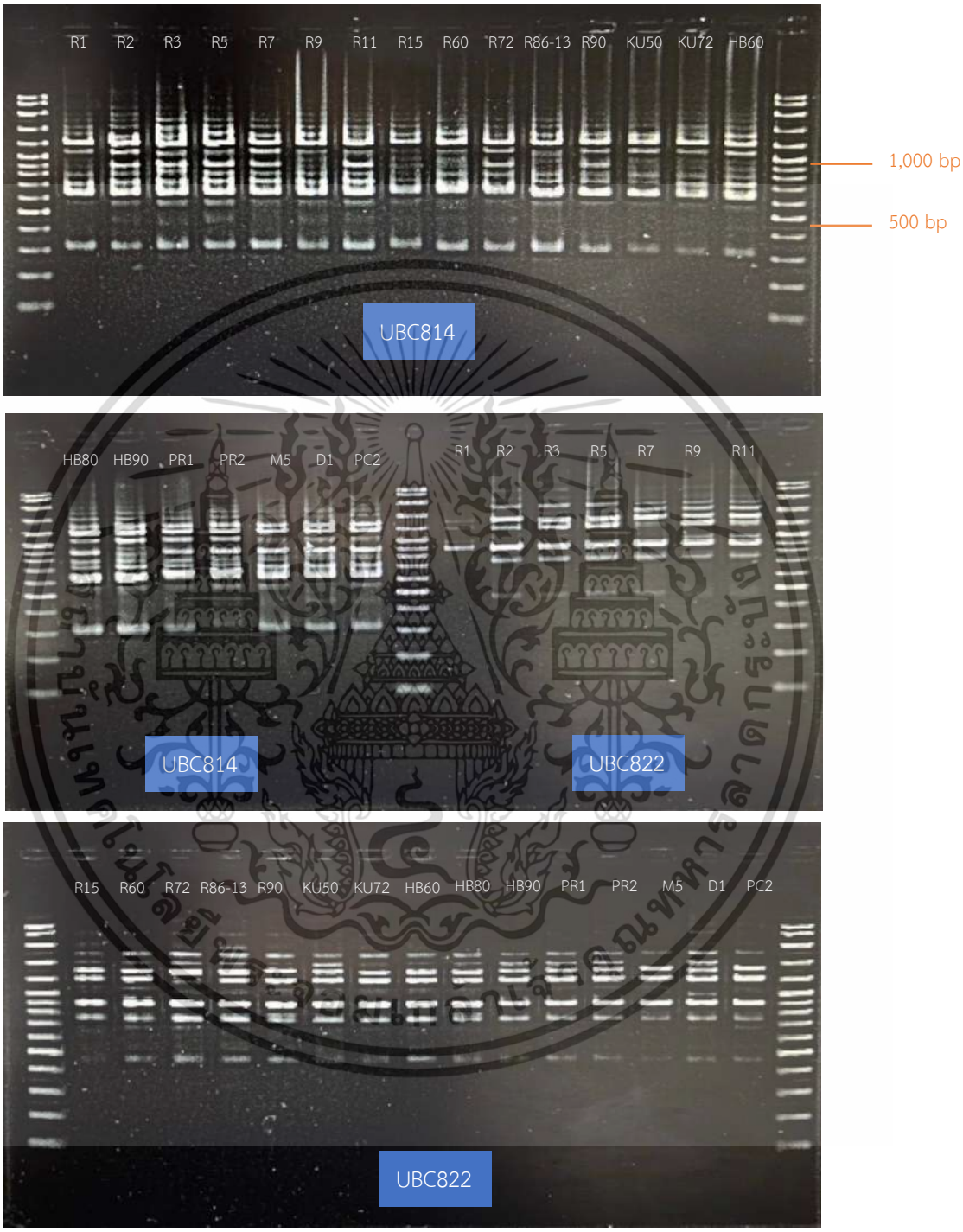
9.2.3 ปิดปากขวดด้วยแรป เจาะรู แล้วนำไปให้ความร้อนเพื่อละลาย

9.2.4 เทใส่ถาดที่มีหวี ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องให้เจลแข็งตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

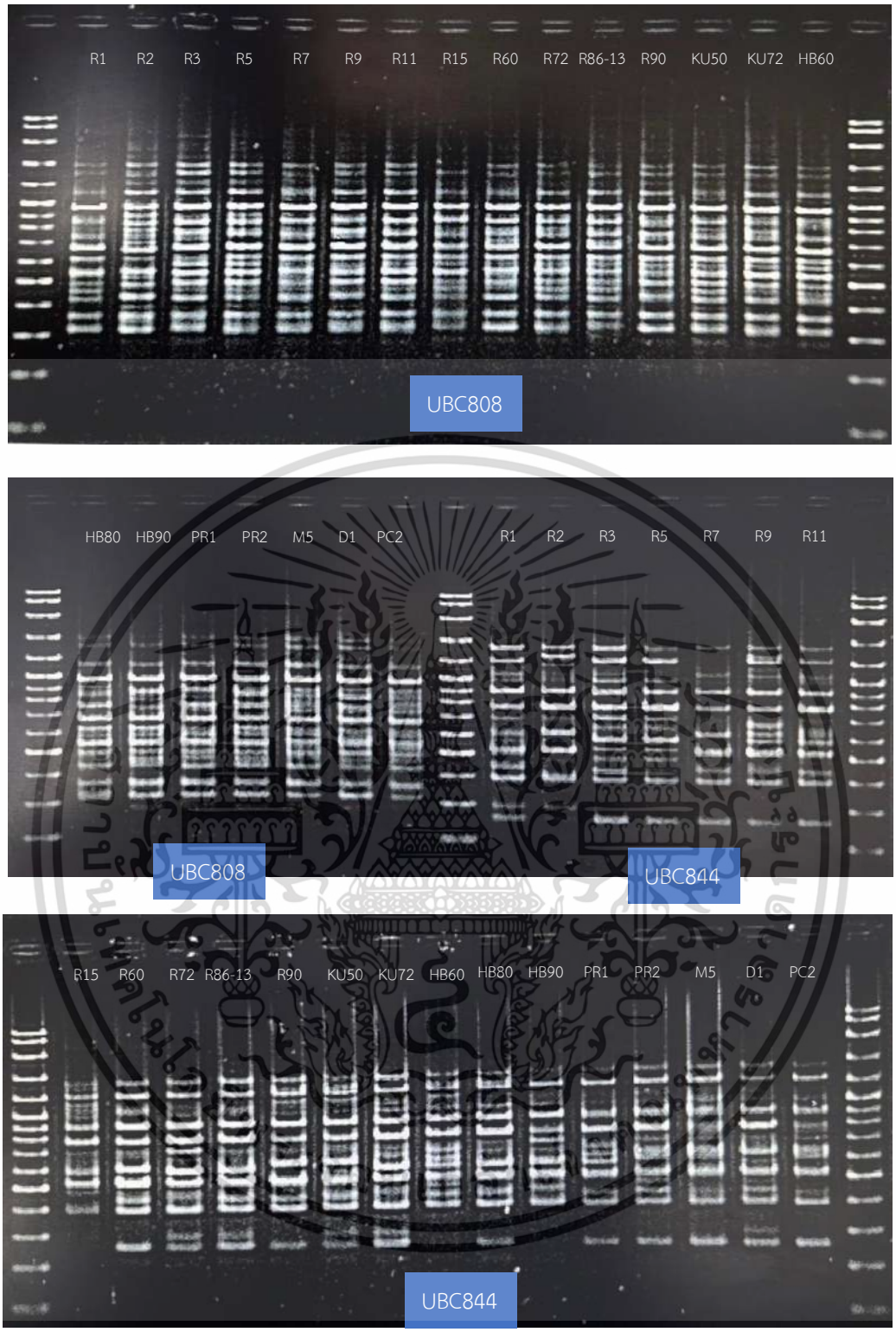
ภาคผนวก ค

ตารางค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient)



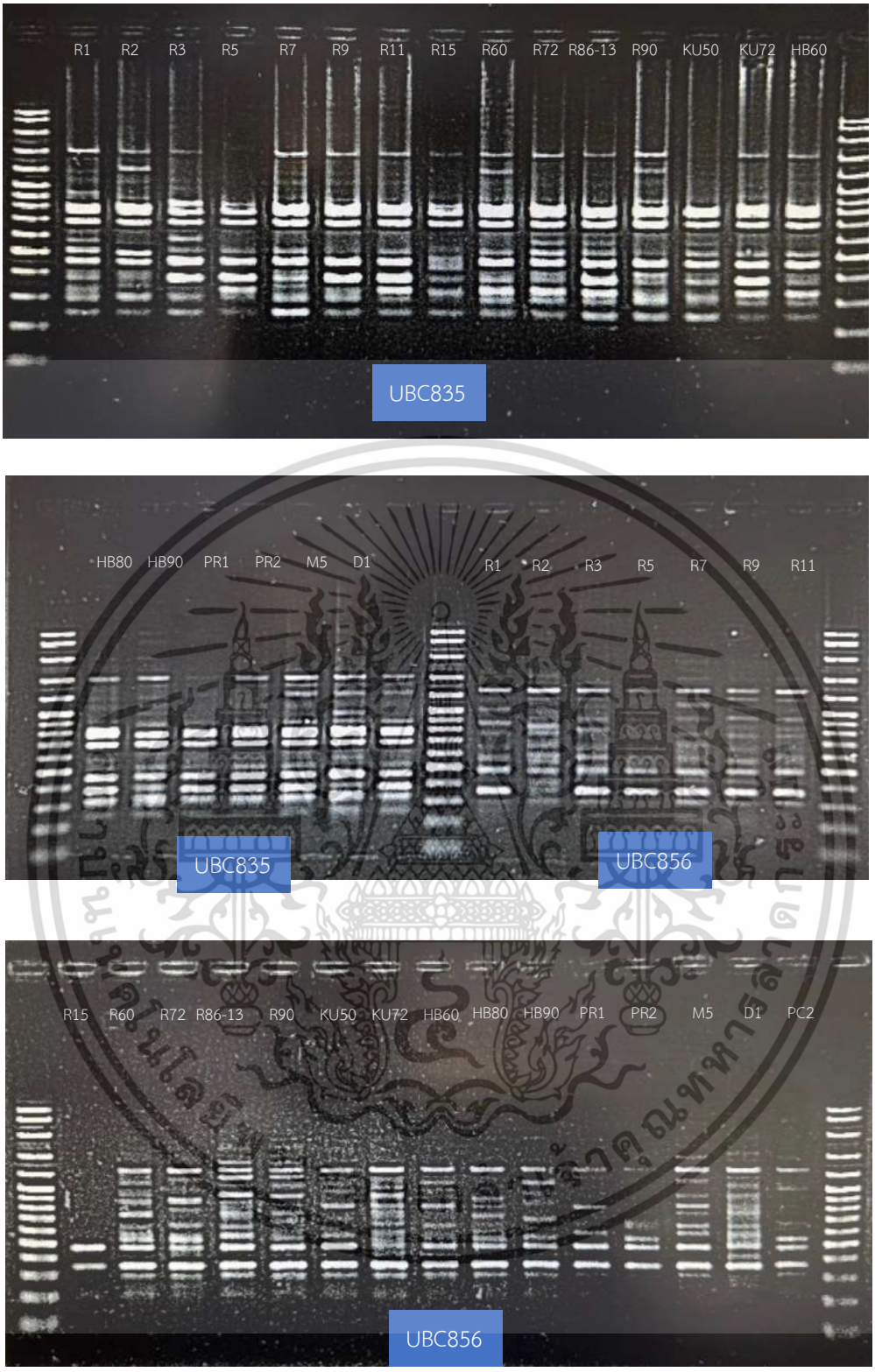
รูปภาคผนวกที่ 1 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic band) ของมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ UBC814 และ UBC822 เปรียบเทียบกับ VC 100 bp DNA ladder โดยเรียงตัวอย่าง R1, R2, R3, R5, R7, R9, R11, R15, R60, R72, R86-13, R90, KU50, KU72, HB60, HB80, HB90, PR1, PR2, M5, D1, PC2 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 2 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic band) ของมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ UBC808 และ UBC814 เปรียบเทียบกับ VC 100 bp DNA ladder โดยเรียงตัวอย่าง R1, R2, R3, R5, R7, R9, R11, R15, R60, R72, R86-13, R90, KU50, KU72, HB60, HB80, HB90, PR1, PR2, M5, D1, PC2 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 3 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic band) ของมันสำปะหลังจำนวน 22 ตัวอย่าง จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ UBC835 และ UBC856 เปรียบเทียบกับ VC 100 bp DNA ladder โดยเรียงตัวอย่าง R1, R2, R3, R5, R7, R9, R11, R15, R60, R72, R86-13, R90, KU50, KU72, HB60, HB80, HB90, PR1, PR2, M5, D1, PC2 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient)

ตารางที่ 1 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของมันสำปะหลัง 22 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

ตัวอย่าง	R1	R2	R3	R5	R7	R9	R11	R15	R60	R72	R86-13	R90	KU50	KU72	HB60	HB80	HB90	PR1	PR2	M5	D1	PC2
R1	1.00																					
R2	0.71	1.00																				
R3	0.71	0.71	1.00																			
R5	0.73	0.69	0.86	1.00																		
R7	0.76	0.82	0.80	0.80	1.00																	
R9	0.71	0.76	0.78	0.80	0.92	1.00																
R11	0.74	0.77	0.83	0.83	0.93	0.91	1.00															
R15	0.78	0.65	0.71	0.82	0.76	0.73	0.74	1.00														
R60	0.76	0.69	0.69	0.69	0.80	0.78	0.81	0.76	1.00													
R72	0.74	0.70	0.77	0.77	0.81	0.77	0.80	0.77	0.83	1.00												
R86-13	0.74	0.72	0.79	0.74	0.83	0.81	0.84	0.74	0.85	0.88	1.00											
R90	0.77	0.74	0.70	0.74	0.83	0.81	0.82	0.79	0.87	0.80	0.80	1.00										
KU50	0.79	0.70	0.77	0.77	0.79	0.77	0.80	0.81	0.79	0.84	0.86	0.86	1.00									
KU72	0.78	0.76	0.76	0.73	0.82	0.82	0.81	0.73	0.82	0.85	0.83	0.87	0.87	1.00								
HB60	0.72	0.74	0.79	0.81	0.85	0.83	0.84	0.85	0.79	0.86	0.82	0.86	0.86	0.89	1.00							
HB80	0.80	0.69	0.78	0.78	0.76	0.73	0.77	0.80	0.80	0.85	0.83	0.79	0.87	0.80	0.83	1.00						
HB90	0.78	0.67	0.78	0.78	0.76	0.71	0.74	0.82	0.80	0.85	0.79	0.83	0.81	0.82	0.87	0.90	1.00					
PR1	0.82	0.67	0.80	0.82	0.76	0.73	0.74	0.82	0.73	0.81	0.77	0.77	0.85	0.80	0.83	0.94	0.88	1.00				
PR2	0.78	0.65	0.80	0.82	0.76	0.73	0.77	0.82	0.78	0.85	0.79	0.79	0.81	0.78	0.85	0.90	0.92	0.90	1.00			
M5	0.74	0.83	0.74	0.70	0.74	0.68	0.71	0.64	0.72	0.76	0.71	0.73	0.71	0.79	0.76	0.81	0.77	0.79	0.77	1.00		
D1	0.68	0.77	0.77	0.70	0.77	0.72	0.78	0.62	0.74	0.76	0.78	0.73	0.71	0.83	0.76	0.72	0.72	0.70	0.68	0.86	1.00	
PC2	0.76	0.67	0.76	0.80	0.78	0.76	0.79	0.82	0.82	0.85	0.79	0.81	0.81	0.78	0.83	0.88	0.86	0.88	0.88	0.79	0.72	1.00

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 19 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาว ฉัตรเงิน กาศมณี รหัสประจำตัว 62050478

นางสาว พีรยา พงษ์เส็ง รหัสประจำตัว 62050527

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง *(Manihot esculenta* Crantz*)* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR

A Preliminary study on genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using ISSR molecular markers ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อน เรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.99 %

ลงชื่อ.....ฉัตรเงิน กาศมณี.....

(ฉัตรเงิน กาศมณี)

นักศึกษา

ลงชื่อ.....พีรยา พงษ์เส็ง.....

(พีรยา พงษ์เส็ง)

นักศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้