การพัฒนาเครื่องหมายสนิปส์ของยีน Lycopene Beta-Cyclase (*lcyB*) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารเบต้าแคโรทีนในมันสำปะหลัง

SNPs Marker Development for Lycopene Beta-Cyclase (*lcyB*) Gene Related to Beta-Carotene Biosynthesis in Cassava

ธนาวดี ค้ำชู[1/*] อัจฉราพรรณ ใจเจริญ[2/] สุวลักษณ์ ศันสนีย์[1/] กฤตยา เพชรผึ้ง[3/]

Tanavadee Kumchoo[1/*] Adcharapun Chaicharoen[2/] Suwaluk Sansanee[1/]

Krittaya Petchpoung[3/]

Received 22 Apr. 2024/Revised 15 Mar. 2025/Accepted 15 Mar. 2025

ABSTRACT

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) molecular markers can be effectively applied to select various traits in plant breeding. The objectives of this study were to develop SNPs markers for the lycopene beta-cyclase (*lcyB*) gene, which is related to beta-carotene biosynthesis in cassava, to examine the genetic variation of SNPs by using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique, and to analyze beta-carotene content in the fresh root. Twenty cassava cultivars/lines (10 cultivars/lines of yellow fresh root and 10 cultivars/lines of white fresh root) were used in the experiments. The results showed that the yellow fresh root group had beta-carotene content ranging from <40.00-172.93 µg/100g, with the MPER297 variety exhibiting the highest beta-carotene content. In contrast, the white fresh root group contained beta-carotene levels below 40.00 µg/100g. A total of 44 SNPs in the *lcyB* gene were identified, along with 12 restriction enzymes capable of cutting nucleotides at the SNPs positions. Among these 12 SNPs markers of *lcyB*, 8 SNPs showed polymorphism while 4 SNPs were monomorphism. The polymorphic information contents for these SNPs ranged from 0-0.50, with SNP *lcyB* g.1673969 having the highest. The accuracy of these markers varied from 0-75%, with SNP *lcyB* g.1674619 demonstrating an accuracy of 75%. This marker can be used for selecting cassava varieties with high beta-carotene content.

Keywords: SNPs markers; lycopene beta-cyclase gene; beta-carotene biosynthesis; cassava

[1/] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ต.ห้วยโป่ง อ.เมือง จ.ระยอง 21150

[1/] Rayong Field Crops Research Center, Mueang, Rayong 21150, Thailand

[2/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[2/] Biotechnology Research and Development Office, Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

[3/] ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[3/] Scientific Equipment and Research Division, Kasetsart University Research and Development Institute, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*** Corresponding author: tanavadeekumchoo@gmail.com**

บทคัดย่อ

เครื่องหมายโมเลกุล single nucleotide polymorphisms (SNPs) สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกลักษณะต่าง ๆ ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงพัฒนาเครื่องหมาย SNPs ของยีน lycopene beta-cyclase (*lcyB*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารเบต้าแคโรทีนในมันสำปะหลัง ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของตำแหน่ง SNPs โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism และวิเคราะห์ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนในหัวสดมันสำปะหลัง 20 พันธุ์/สายพันธุ์ (กลุ่มสีเนื้อหัวสดสีเหลือง 10 พันธุ์/สายพันธุ์ และกลุ่มสีเนื้อหัวสดสีขาว 10 พันธุ์/สายพันธุ์) พบว่า กลุ่มสีเนื้อหัวสดสีเหลืองมีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนในหัวสด <40.00-172.93 ไมโครกรัม/100 ก. ซึ่งพันธุ์ MPER297 มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนสูงสุด และกลุ่มสีเนื้อหัวสดสีขาวปริมาณสารเบต้าแคโรทีนในหัวสด <40.00 ไมโครกรัม/100 ก. สำหรับความผันแปรทางพันธุกรรมของตำแหน่ง SNPs ของยีน *lcyB* พบทั้งหมด 44 ตำแหน่ง และค้นหาเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อใช้ตัดนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNPs ได้ทั้งหมด 12 SNPs เมื่อตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมตำแหน่ง SNPs พบว่า มี 8 ตำแหน่ง แสดงลักษณะ polymorphism และมี 4 ตำแหน่ง แสดงลักษณะ monomorphism ซึ่งมีค่า polymorphic information contents 0-0.5 โดย SNP *lcyB* g.1673969 มีค่าสูงสุด ส่วนความแม่นยำมีค่า 0-75% ซึ่ง SNP *lcyB* g.1674619 มีค่าสูงสุด 75% เครื่องหมายนี้สามารถนำมาใช้ตรวจคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนในหัวสดได้

คำสำคัญ: เครื่องหมายสนิปส์; ยีน lycopene beta-cyclase; การสังเคราะห์สารเบต้าแคโรทีน; มันสำปะหลัง

บทนำ

พันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยเป็นพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์อย่างต่อเนื่องให้มีผลผลิตสูง เปอร์เซ็นต์แป้งสูง และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่ละพันธุ์/สายพันธุ์มักมีลักษณะที่หลากหลายแตกต่างกัน เช่น ลักษณะลำต้น ใบ ดอก และหัวสะสมอาหาร มันสำปะหลังมีลักษณะสีของเนื้อและองค์ประกอบแตกต่างกัน จิณณจาร์และคณะ (2559) ได้จำแนกและประเมินลักษณะทางคุณภาพของหัวและคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งมันสำปะหลัง 252 พันธุ์ พบว่า พันธุ์ที่มีลักษณะสีของเนื้อหัวทั้งสีขาว สีครีม สีเหลืองอ่อน และสีเหลือง และมีปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญในหัวสดปริมาณสูง เช่น ธาตุเหล็ก สังกะสี แมงกานีส และมีองค์ประกอบต่าง ๆ ที่เหมาะสำหรับการบริโภคและการแปรรูป เช่น ปริมาณไซยาไนด์ในเนื้อมันสดต่ำ เนื้อสุกร่วนซุยหรือเหนียว แป้งสูง ปริมาณกากใยสูง 70 พันธุ์ และพันธุ์ที่มีเนื้อสีเหลือง 22 พันธุ์

ในหัวมันสำปะหลังมีองค์ประกอบที่สำคัญชนิดหนึ่งคือ สารเบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Munzuroglu et al., 2003) มีหลายงานวิจัยศึกษาปริมาณสารเบต้าแคโรทีน และสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ในหัวสดมันสำปะหลังที่มีลักษณะสีเนื้อหัวสดต่างกัน เช่น สีขาว สีครีม สีเหลือง และสีส้ม (Maziya-Dixon and Dixon, 2015; Belalcazar et al., 2016; Carvalho et al., 2016) พบว่ามันสำปะหลังหัวสดสีส้มมีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนและแคโรทีนอยด์สูงกว่าหัวสดสีเหลือง สีครีม และสีขาว ตามลำดับ

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสะสมแคโรทีนอยด์ในหัวมันสำปะหลัง 23 พันธุ์ โดยแบ่งตามสีเนื้อหัวสดเป็น 5 กลุ่ม โดยใช้เทคนิค microarray และ qRT-PCR พบว่า ปริมาณแคโรทีนอยด์ในกลุ่มสีเนื้อหัวสดกลุ่มต่าง ๆ มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตขั้นที่ 2 (secondary growth) สีเนื้อหัวสด และขั้นตอนการแบ่งเซลล์ (Carvalho et al., 2016) นอกจากนั้น Udoh et al. (2017) ได้ศึกษายีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในมันสำปะหลัง 4 ยีน (*crtRB PSY2 lcyE* และ *lcyB*) ในมันสำปะหลัง 167 accessions จาก IITA (International Institute of Tropical Agriculture) โดยวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน พบว่า มี 37 SNPs (single nucleotide polymorphisms) ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกตัวอย่างมันสำปะหลังได้ ซึ่งยีน *lcyB* จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนจากสารไลโคปีน (lycopene) ไปเป็นสารเบต้าแคโรทีนในกระบวนการสังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ในมันสำปะหลัง (Carvalho et al., 2016)

De Albuquerque et al. (2018) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง 1,580 accessions สำหรับเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมในมันสำปะหลัง และเปรียบเทียบความผันแปรทางพันธุกรรมของ SNPs แต่ละตำแหน่งในจีโนม ซึ่งสามารถนำข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNPs มาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบและจัดจำแนกกลุ่มมันสำปะหลังที่มีสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่แตกต่างกันสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ (Esuma et al., 2016; Luo et al., 2018) การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยให้มีสารเบต้าแคโรทีนสูงยังไม่มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก เนื่องจากข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ที่มีสารเบต้าแคโรทีนสูงมีค่อนข้างจำกัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีน lycopene beta-cyclase (*lcyB*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารเบต้าแคโรทีนในมันสำปะหลัง ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรม บริเวณตำแหน่ง SNPs และวิเคราะห์ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนในหัวสดมันสำปะหลัง 20 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยมีเป้าหมายเพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล SNPs ในการคัดเลือกพ่อ-แม่พันธุ์สำหรับสร้างลูกผสมมันสำปะหลังที่มีสารเบต้าแคโรทีนสูง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์มันสำปะหลัง

ใช้พันธุ์มันสำปะหลังจากแปลงรวบรวมเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง 20 พันธุ์ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีสีเนื้อหัวสดสีเหลือง 10 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ระยอง2 Yolk Yellow root Mentega MPER297 MKU2-151 01-77-1 MBRA311 Golden yellow และ MMAL66 และกลุ่มที่มีสีเนื้อหัวสดสีขาว 10 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ห้านาที พิรุณ2 พิรุณ4 ปุยฝ้าย Nep Batang MPER179 MPER283 CM3306-4 และ MCOL1468

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารเบต้าแคโรทีน

เก็บตัวอย่างหัวสดมันสำปะหลังที่อายุ 8 เดือน นำมาปอกเปลือกและหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่องบด และบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ทึบทั้ง 2 ด้าน และส่งตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนในหัวสด โดยใช้วิธี In-house method WI-TMC-11 (Munzuroglu et al., 2003) ที่ห้องปฏิบัติการ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทาง

วิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนมันสำปะหลังมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Tiangen, China) และนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density : OD) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร (nm)

4. การค้นหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทป์

ค้นหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทป์ และความผันแปรทางพันธุกรรมบริเวณตำแหน่งสนิปส์ของยีน *lcyB* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารเบต้าแคโรทีนในมันสำปะหลัง จากเว็บไซต์ https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html (Manes.09G008200) (Phytozome, 2019) ซึ่ง Manes.09G008200 คือ accession number ของยีน lycopene beta-cyclase (*lcyB*) มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 9 ของมันสำปะหลัง และจากรายงานของ Carvalho et al. (2016) และ Udoh et al. (2017) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNPs ที่แตกต่างกัน ทั้งเส้น forward primer และ reverse primer โดยออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลาย 5’ ไปยัง 3’ โดยใช้โปรแกรม Primer3 (Primer3, 2019) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ มาค้นหาเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) ที่มีลำดับเบสจำเพาะ เพื่อใช้ตัดนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง SNP แต่ละตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรม NEBcutter 2.0 (NEBcutter, 2019) จากนั้นสังเคราะห์ไพรเมอร์ โดยกรรมวิธี high affinity purification (HAP) (Bio Basic Inc., 2019)

5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของคู่ไพรเมอร์ และตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรม

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของคู่ไพรเมอร์ของยีน *lcyB* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR: polymerase chain reaction) ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย green PCR master mix (2x) 10 ไมโครลิตร UltraPure distilled water 5 ไมโครลิตร forward primer (10 pmol/µL) 1 ไมโครลิตร reverse primer (10 pmol/µL) 1 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ (50-100 ng/µL) 3 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยเริ่มที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 3 นาที (denaturation) ทำซ้ำขั้นตอน denaturation 94°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที annealing 52 54 และ 58°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที และ extension 72°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที 40 รอบ และ final extension 72°ซ. เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยคัดเลือกจากอุณหภูมิของ annealing ที่เหมาะสม ซึ่งให้ปริมาณดีเอ็นเอดีที่สุดและเฉพาะเจาะจงกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ บน 6% polyacrylamide gel electrophoresis ด้วยกระแสไฟฟ้า 120 V เป็นเวลานาน 30 นาที และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี RedSafe nucleic acid staining และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วย 2.5 U ของเอนไซม์ตัดจำเพาะตำแหน่ง SNP บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism: PCR-RFLP) ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบน 8% polyacrylamide gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer จากนั้นตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้

โดยการส่องภายใต้แสงรังสีอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (UPV PhotoDoc-It™ Imaging System, Analytik Jena)

6. การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรม

นำข้อมูลความผันแปรทางพันธุกรรมของตำแหน่ง SNPs และขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละพันธุ์ของคู่ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง ประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล SNPs จากค่า polymorphic information contents (PIC) (Anderson et al., 1993) ซึ่งใช้บอกความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของ SNP แต่ละตำแหน่ง และความแม่นยำของแต่ละตำแหน่งโดยเปรียบเทียบกับลักษณะทางฟีโนไทป์ของสีเนื้อหัวสดมันสำปะหลัง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนในหัวสดมันสำปะหลัง

การวิเคราะห์ในหัวสดมันสำปะหลัง 2 กลุ่ม พบว่า กลุ่มเนื้อหัวสดสีเหลือง มีสารเบต้าแคโรทีนระหว่าง <40-172.93 ไมโครกรัม/100 ก. โดยพันธุ์ MPER297 มีสารเบต้าแคโรทีนสูงสุด 172.93 ไมโครกรัม/100 ก. รองลงมา คือ Mentega และ 01-77-1 ในขณะที่พันธุ์ MMAL66 และ Golden yellow มีสารเบต้าแคโรทีนต่ำสุด สำหรับกลุ่มที่มีสีเนื้อหัวสดสีขาว พบว่า มีสารเบต้าแคโรทีนในหัวสดน้อยกว่า 40 ไมโครกรัม/100 ก. ทั้งหมด (Table 1) สอดคล้องกับรายงานของ Welsch et al. (2010) ที่พบว่าปริมาณสารแคโรทีนอยด์ในมันสำปะหลังกลุ่มหัวสดสีเหลืองมีสารแคโรทีนอยด์สูง 6.0-11.5 ไมโครกรัม/ก. ของน้ำหนักสด ส่วนกลุ่มหัวสดสีขาวมีสารแคโรทีนอยด์ต่ำ 0.5-1.5 ไมโครกรัม/ก. นอกจากนี้ Codjia et al. (2023) ยังพบว่าปริมาณสารแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (total carotenoid content: TCC) มีความสัมพันธ์กันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับสีเนื้อหัวสดในมันสำปะหลัง (r=0.88; p<0.0001)

Table 1 Beta-carotene content in twenty cassava cultivars/lines

No.	Cassava cultivars/lines (yellow storage root)	Beta-carotene content[1/] (µg/100g)	No.	Cassava cultivars/lines (white storage root)	Beta-carotene content[1/] (µg/100g)
1	Rayong2	68.44	11	Hanatee	<40
2	MPER297	172.93	12	Pirun2	<40
3	Yolk	91.55	13	Pirun4	<40
4	MMAL66	<40	14	Puifai	<40
5	Yellow root	113.55	15	Nep	<40
6	Mentega	162.93	16	Batang	<40
7	Golden yellow	<40	17	MPER179	<40
8	MKU2-151	71.21	18	MPER283	<40
9	01-77-1	118.50	19	CM3306-4	<40
10	MBRA311	104.52	20	MCOL1468	<40

[1/] LOQ = 40.00 µg/100g; LOQ = limit of quantitation, which means the analyzed sample has a minimum measurable laboratory test value of less than 40.00 µg/100g according to the analytical method with high accuracy and precision of the test method

2. ความผันแปรทางพันธุกรรมตำแหน่ง SNPs ของยีน *lcyB*

ผลการค้นหาข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเบต้าแคโรทีนในมันสำปะหลัง และจากรายงานของ Carvalho et al. (2016) และ Udoh et al. (2017) พบความผันแปรทางพันธุกรรมของ SNPs ทั้งหมด 44 SNPs (ตำแหน่ง) คัดเลือกและนำมาค้นหาเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ทั้งหมด 12 SNPs จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณตำแหน่ง SNPs ได้ทั้งหมด 4 คู่ ไพรเมอร์ (Table 2)

Table 2 Primer, sequence, position, PCR product size and restriction enzyme of SNPs *lcyB* gene in cassava

Primer	Sequence (5' ⟶ 3')	Position	PCR product size (bp)	Restriction enzyme
lcyBexon2-1up/dw	F: AACACATAATAAGCTTGAGTTC	g.1674884	247	*Msp*I
	R: AACCACAAGGCCTTTTGATG	g.1674907		*Bts*I*Mut*I
		g.1675021		*Hpy188*I
lcyBexon2-2up/dw	F: ACCTGGTCTGGTGCTGTTG	g.1674340	325	*Bfa*I
	R: GGTGCTCTTCTACCTCTGC	g.1674449		*Hpy99*I
		g.1674542		*HpyCH4*V
		g.1674619		*HpyCH4*IV
lcyBexon2-3up/dw	F: TTCAGATAGAATATTTCTTGAAG	g.1673969	281	*Nla*III
	R: CTATGGAATTGGCAACTATTG	g.1673999		*Aci*I
		g.1674161		*Hha*I
lcyBexon2-4up/dw	F: TATACAGAGAAGGAGACAAAG	g.1673757	241	*Fnu4H*I
	R: CAAAGGAAGAGTACCCTTTG	g.1673758		*Mse*I

Note: F = forward primer, R = reverse primer

3. สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมคู่ไพรเมอร์ของยีน *lcyB*

ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมคู่ไพรเมอร์ของยีน *lcyB* ที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์บริเวณที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม 4 คู่ไพรเมอร์ โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 52 54 และ 58°ซ. พบว่า ที่อุณหภูมิ 52°ซ. ไพรเมอร์ lcyBexon2-1up/dw สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะลง และที่อุณหภูมิ 54°ซ. ไพรเมอร์ lcyBexon2-3up/dw และ lcyBexon2-4up/dw สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง ในขณะที่อุณหภูมิ 58°ซ. ไพรเมอร์ lcyBexon2-2up/dw สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมกับตัวอย่างมันสำปะหลัง 20 พันธุ์/สายพันธุ์ ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์

4. ความผันแปรทางพันธุกรรมของ SNPs

SNPs ของยีน *lcyB* ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง พบว่า มี 8 ตำแหน่ง แสดงลักษณะ polymorphism

Table 3 Genetic variation of twelve SNPs *lcyB* markers in twenty cassava cultivars/lines by using PCR-RFLP technique

SNP marker	Variation	PCR product size (bp)	Restriction enzyme	Genotype	PCR fragment size (bp)
lcyB g.1674884	A/G	247	*Msp*I	AA	247
				AG	247, 179, 68
				GG	179, 68
lcyB g.1674907	A/G	247	*BtsI*Mut*I*	AA	247
				AG	247, 160, 87
				GG	160, 87
lcyB g.1675021	C/T	247	*Hpy188*I	CC	142, 105
				CT	142, 105, 59, 46
				TT	142, 59, 46
lcyB g.1674340	T/C	325	*Bfa*I	TT	223
				TC	223, 62, 21, 19
				CC	62, 21, 19
lcyB g.1674449	T/G	325	*Hpy99*I	TT	325
				TG	325, 196, 129
				GG	196, 129
lcyB g.1674542	A/G	325	*HpyCH4*V	AA	110, 96, 78, 41
				AG	110, 102, 96, 78, 41, 8
				GG	102, 96, 78, 41, 8
lcyB g.1674619	A/G	325	*HpyCH4*IV	AA	325
				AG	325, 302, 23
				GG	302, 23
lcyB g.1673969	T/C	281	*Nla*III	TT	153, 74, 54
				TC	153, 74, 54, 50, 24
				CC	153, 54, 50, 24
lcyB g.1673999	A/C	281	*Aci*I	AA	281
				AC	281, 201, 80
				CC	201, 80
lcyB g.1674161	T/G	281	*Hha*I	TT	281
				TG	281, 241, 40
				GG	241, 40
lcyB g.1673757	A/C	241	*Fnu4H*I	AA	241
				AC	241, 151, 90
				CC	151, 90
lcyB g.1673758	G/A	241	*Mse*I	GG	241
				GA	241, 154, 87
				AA	154, 87

คือ พบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ SNPs g.1674884 g.1675021 g.1674340 g.1674449 g.1674619 g.1673969 g.1673999 และ g.1674161 ในขณะที่มี 4 ตำแหน่ง แสดงลักษณะ monomorphism คือ ไม่พบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ SNPs g.1674907 g.1674542 g.1673757 และ g.1673758 และแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล SNPs แต่ละตำแหน่ง ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน (Table 3) ซึ่งตำแหน่ง SNPs ที่เกิดความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสีเนื้อหัวสดที่แตกต่างกันได้ โดยกลุ่มที่มีสีเนื้อหัวสดสีเดียวกันควรจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพ พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล SNPs มีค่า PIC 0-0.50 โดย SNP *lcyB* g.1673969 มีค่าสูงสุด 0.50 รองลงมา คือ ตำแหน่ง SNP g.1674340 และ g.1675021 (Table 4) ซึ่งเครื่องหมาย SNP เป็นเครื่องหมายแบบข่มร่วมมี 2 อัลลีล โดยแสดงลักษณะโฮโมไซกัสและเฮทเทอโรไซกัส ทำให้มีค่า PIC สูงสุดไม่เกิน 0.50 (Kawuki et al., 2009) ซึ่งค่า PIC เครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีน *lcyB* ที่ศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับเครื่องหมาย SNPs ของยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในมันสำปะหลัง คือ ยีน phytoene synthase (*PSY2*) 2 ตำแหน่ง และยีน lycopene epsilon cyclase (*lcyE*) 4 ตำแหน่ง โดยพบว่า ยีน *PSY2* มีค่า PIC 0.26 และ 0.30 สำหรับยีน *lcyE* มีค่า PIC 0.04-0.32 (Udoh et al., 2017) และสอดคล้องกับเครื่องหมาย SNPs ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรวิตามินเอ 4 เครื่องหมาย โดยพบว่ามีค่า PIC 0.22-0.49 (Codjia et al., 2023) ซึ่งเครื่องหมายที่ค่า PIC สูง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังได้

สำหรับการวิเคราะห์ความแม่นยำ พบว่า การจำแนกลักษณะสีเนื้อหัวสดสีขาวออกจากสีเหลืองครีมมีความแม่นยำ 0-75% โดย SNPs *lcyB* g.1674619 มีความแม่นยำสูงสุด 75% รองลงมา คือ ตำแหน่ง SNP g.1674340 และ g.1673969 (Table 4) ดังนั้น เครื่องหมาย SNPs *lcyB* g.1674619 จึงสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการจัดกลุ่มมันสำปะหลังที่มีสีเนื้อหัวสดสีขาวและสีเหลืองออกจากกันได้ แม่นยำ รวดเร็ว และสะดวกกว่าวิธีแบบมาตรฐานซึ่งการจำแนกสีจากหัวสดมันสำปะหลังต้องมีอายุมากกว่า 6 เดือนขึ้นไป อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้มีเพียง SNP g.1674619 ตำแหน่งเดียวที่มีค่าความแม่นยำมากกว่า 75% แต่ไม่มีเครื่องหมาย SNP ที่มีความแม่นยำ 100% จึงควรมีการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lcyB* ของพันธุ์/สายพันธุ์มันสำปะหลังที่มีสีเนื้อหัวสดสีขาวกับสีเหลืองที่แตกต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบความผันแปรทางพันธุกรรมของ SNPs และออกแบบไพรเมอร์เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SNPs และนำมาทดสอบประสิทธิภาพและความแม่นยำของเครื่องหมาย SNPs สำหรับใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มมันสำปะหลังที่มีลักษณะปริมาณสารเบต้าแคโรทีนสูง สำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังในอนาคตเพิ่มเติมทั้งจำนวนตำแหน่ง SNPs และจำนวนตัวอย่างมันสำปะหลังที่ทำการทดสอบ เพื่อเพิ่มความแม่นยำของเครื่องหมาย SNPs ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีหัวสดสีเหลืองเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ที่มีสารเบต้าแคโรทีนสูงในอนาคต

Table 4 SNP marker, polymorphic information content (PIC) and percent accuracy of twelve SNPs lcyB markers in twenty cassava cultivars/lines

SNP marker	PIC	Percent accuracy
lcyB g.1674884	0.07	62.00
lcyB g.1674907	0.00	0.00
lcyB g.1675021	0.43	62.00
lcyB g.1674340	0.47	69.00
lcyB g.1674449	0.12	56.00
lcyB g.1674542	0.00	0.00
lcyB g.1674619	0.34	75.00
lcyB g.1673969	0.50	63.00
lcyB g.1673999	0.12	53.00
lcyB g.1674161	0.12	53.00
lcyB g.1673757	0.00	0.00
lcyB g.1673758	0.10	55.00

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาสามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ของยีน *lcyB* ได้ 4 คู่ไพรเมอร์ซึ่งครอบคลุม SNPs 12 ตำแหน่ง เมื่อนำมาทดสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของนิวคลีโอไทด์โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่า มี 8 SNPs ที่เกิดความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ ซึ่ง SNP *lcyB* g.1673969 มีค่า PIC ซึ่งใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างของตัวอย่างในกลุ่มประชากรที่มีหัวสดมันสำปะหลังสีขาวกับสีเหลืองทั้ง 20 พันธุ์/สายพันธุ์ สูงสุด 0.50 และ SNPs *lcyB* g.1674619 มีค่าความแม่นยำสูงสุด 75% ในการแบ่งกลุ่มตัวอย่างหัวสดสีขาวกับสีเหลืองออกจากกัน จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกตัวอย่างมันสำปะหลังที่มีสารเบต้าแคโรทีนสูงได้โดยไม่ต้องรอเก็บผลผลิตหัวสดมันสำปะหลัง กลุ่มมันสำปะหลังที่มีหัวสดสีขาวมีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนในหัวสดน้อยกว่า 40.00 ไมโครกรัม/100 ก. ทุกสายพันธุ์/พันธุ์ ในขณะที่กลุ่มที่มีหัวสดสีเหลือง 8 พันธุ์/สายพันธุ์ มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีน ระหว่าง 68.44-172.93 ไมโครกรัม/100 ก. พันธุ์ MPER297 มีปริมาณสารเบต้าแคโรทีนสูงสุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้ทุนวิจัยในปีงบประมาณ 2565-2566 และขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร ที่ให้การอนุเคราะห์ด้านสถานที่และวัสดุอุปกรณ์ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข ประพิศ วองเทียม อุมาพร รักษาพราหมณ์ จิตติลักษณ์ พลพวก จารุวรรณ บางแวก และจินดา จิตจักร. 2559. การจำแนกและประเมินลักษณะทางคุณภาพของหัวคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งและคุณภาพของท่อนพันธุ์ในเชื้อพันธุ์มันสำปะหลัง. ใน: รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุดโครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร. 163 หน้า.

Anderson, J.A., G.A. Churchill, J.E. Autrique, S.D. Tanksley and M.E. Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome. 36(1): 181-186.

Belalcazar, J., D. Dufour, M.S. Andersson, M. Pizarro, J. Luna, L. Londoño, N. Morante, A.M. Jaramillo, L. Pino, L.A.B. LÓpez-Lavalle, F. Davrieux, E.F. Talsma and H. Ceballos. 2016. High-throughput phenotyping and improvements in breeding cassava for increased carotenoids in the roots. Crop Science. 56(6): 2916-2925.

Bio Basic Inc. 2019. What is “HAP?”. Available at: https://biobasic-asia.com/sevices/oligo-synthesis2/oligo-synthesis-overview/. Accessed: January 18, 2019.

Carvalho, L.J., M.A. Agustini, J.V. Anderson, E.A Vieira, C.R. de Souza, S. Chen, B.A. Schaal and J.P. Silva. 2016. Natural variation in expression of genes associated with carotenoid biosynthesis and accumulation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage root. BMC Plant Biology. 16: 133.

Codjia, E.D., B. Olasanmi, C.E. Ugoji and I.Y. Rabbi. 2023. SNP-based marker-assisted selection for high provitamin A content in African cassava genetic background. South African Journal of Science. 119: 11-12.

de Albuquerque, H.Y.G, C.D. Carmo, A.C. Brito and E.J. Oliveira. 2018. Genetic diversity of *Manihot esculenta* Crantz. germplasm based on single-nucleotide polymorphism markers. Annals of Applied Biology. 173(3): 271-284.

Esuma, W., L. Herselman, M.T. Labuschagne, P. Ramu, F. Lun, Y. Baguma, E.S. Buckler and R.S. Kawuki. 2016. Genome-wide association mapping of provitamin A carotenoid content in cassava. Euphytica. 212(1): 97-110.

Kawuki, R.S., M. Ferguson, M. Labuschagne, L. Herselman and D.J. Kim. 2009. Identification, characterisation and application of single nucleotide polymorphisms for diversity assessment in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Molecular Breeding. 23(4): 669-684.

Luo, X., K.I. Tomlins, L.J.C.B. Carvalho, K. Li and S. Chen. 2018. The analysis of candidate genes and loci involved with carotenoid metabolism in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) using SLAF-seq. Acta Physiologiae Plantarum. 40(4): 66.

Maziya-Dixon, B.B. and A.G.O. Dixon. 2015. Carotenoids content of yellow-fleshed cassava genotypes grown in four agroecological zones in Nigeria and their retinol activity equivalents (RAE). Journal of Food, Agriculture & Environment. 13(2): 63-69.

Munzuroglu, O., F. Karatas and H. Geckil, 2003. The vitamin and selenium contents of apricot fruit of different varieties cultivated in different geographical regions. Food Chemistry. 83(2): 205-212.

NEBcutter. 2019. NEBcutter V2.0. Available at: https://nc2.neb.com/NEBcutter2/.Accessed: January 18, 2019.

Phytozome. 2019. Gene Manes.09G008200. Available at: https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html. Accessed: January 18, 2019.

Primer3. 2019. Primer3. Available at: https://primer3.org. Accessed: January 18, 2019.

Udoh, L., M. Gedil, E.Y. Parkes, P. Kulakow, A. Adesoye, C. Nwuba and I.Y. Rabbi. 2017. Candidate gene sequencing and validation of SNP markers linked to carotenoid content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Molecular Breeding. 37(10): 123.

Welsch, R., J. Arango, C. Bär, B. Salazar, S. Al-Babili, J. Beltrán, P. Chavarriaga, H. Ceballos, J. Tohme and P. Beyer. 2010. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. The Plant Cell. 22(10): 3348-3356.