การพัฒนาเทคนิค Tetra-primer ARMS-PCR เพื่อคัดเลือกลักษณะอะไมโลสสูง ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

Development of Tetra-primer ARMS-PCR Technique for High Amylose Selection in Cassava Breeding

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ[1/*] สุวลักษณ์ ศันสนีย์[2/] จีราพร แก่นทรัพย์[1/] วิภาวี ชั้นโรจน์[1/]
กฤตยา เพชรผึ้ง[3/] ศิริวัลย์ สร้อยกล่อม[3/]
Adcharapun Chaicharoen[1/*] Suwaluk Sansanee[2/] Jeeraporn Kansup[1/] Vipavee Chanroj[1/]
Krittaya Petchpoung[3/] Siriwan Soiklom[3/]

Received 11 Apr. 2025/Revised 18 Mar. 2026/Accepted 18 Mar. 2026

ABSTRACT

Amylose starch in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) can be widely used in many industries. Rapid selection of cassava varieties with high amylose starch content can be done using advanced techniques. This study aimed to develop molecular markers associated with high amylose content by designing primers for single nucleotide polymorphism (SNP) markers. The results revealed that the SNP marker S2_25293441 on chromosome 2 was significantly associated with high amylose content. Optimal conditions for tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (tetra-primer ARMS-PCR) were achieved at an annealing temperature of 60°C. In heterozygous (CT) genotypes, DNA bands of 339, 229, and 166 bp were observed, while homozygous (CC) genotypes produced bands of 339 and 229 bp. Genotypes exhibiting the CT genotype demonstrated phenotypes with high amylose content. In testing with cassava varieties containing amylose content exceeding 18%, the developed SNP marker achieved an accuracy rate of 75.90% in selecting high amylose varieties. The use of this molecular marker reduced the number of plants required for field selection, enabled screening with fairly high accuracy, and shortened the time for selecting cassava varieties with high amylose content.

Keywords: amylose content; molecular marker; SNP; tetra-primer ARMS-PCR; plant breeding

[1/] กองวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[1/] Biotechnology Research and Development Division, Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

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

[2/] Rayong Field Crops Research Center, Huai Pong, Mueang, Rayong 21150, Thailand

[3/] สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ถ.งามวงศ์วาน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[3/] Kasetsart University Research and Development Institute, Ngamwongwan Rd., Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*** Corresponding author: adcharapun1826@gmail.com**

บทคัดย่อ

แป้งอะไมโลสในหัวมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) สามารถนำไปใช้ประโยชน์อุตสาหกรรมได้หลากหลาย จึงมีการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้งอะไมโลสสูงโดยใช้เทคนิคสมัยใหม่เพื่อความรวดเร็ว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะปริมาณอะไมโลสสูง โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปและเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR ผลการทดลองพบว่า เครื่องหมายสนิป S2_25293441 บนโครโมโซมที่ 2 สัมพันธ์กับลักษณะปริมาณอะไมโลสสูง และสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจด้วยวิธี tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (tetra-primer ARMS-PCR) คือใช้ annealing temperature ที่ 60°ซ. ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดเฮเทอโรไซกัส CT จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 339 229 และ 166 คู่เบส จีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส CC เกิดแถบดีเอ็นขนาด 339 และ 229 คู่เบส พันธุ์ที่มีจีโนไทป์ CT จะแสดงฟีโนไทป์ที่มีปริมาณอะไมโลสสูง และเมื่อทดสอบกับพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณอะไมโลสสูงกว่า 18% พบว่า สามารถให้ค่าความถูกต้องในการคัดเลือก 75.90% การใช้เครื่องหมายโมเลกุลนี้ทำให้ลดจำนวนต้นที่ปลูกเพื่อคัดเลือก มีความแม่นยำค่อนข้างสูง และลดระยะ เวลาการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณอะไมโลสสูง

คำสำคัญ: ปริมาณอะไมโลส; เครื่องหมายโมเลกุล; สนิป; เตตระไพรเมอร์เออาร์เอ็มเอสพีซีอาร์; การปรับปรุงพันธุ์พืช

บทนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ให้ผลผลิตแป้งซึ่งสะสมในรากสูง ความสามารถในการสร้างและสะสมแป้งในหัวมันสำปะหลังมีความแตกต่างกันเนื่องมาจากพันธุ์ อายุเก็บเกี่ยว ปริมาณน้ำฝนในช่วงก่อนการเก็บเกี่ยว และปัจจัยอื่น ๆ (Janket et al., 2020; Mohidin et al., 2023) ในหัวมันสำปะหลังมีแป้งถึง 70-80% (Gomez, 1979) มีคุณสมบัติเด่นด้านการดูดซับน้ำ มีความหนืดสูง และมีความคงตัวภายใต้ความร้อน จึงนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม (Grand View Research, 2023) กระดาษ กาว ผ้าใยสังเคราะห์ (Das et al., 2024) และเชื้อเพลิงชีวภาพ (Silveira et al., 2025) ในการปรับปรุงมันสำปะหลังจึงมุ่งเน้นไปที่การคัดเลือกพันธุ์ที่มีแป้งสูง

มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยเป็นอย่างมาก สามารถลดจำนวนพืชที่จะปลูก และคัดเลือกได้หลายลักษณะพร้อมกันโดยมีความแม่นยำค่อนข้างสูง ทำให้ลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ ได้พันธุ์ที่มีผลผลิตสูงเป็นไปตามความต้องการของตลาด (Sinha et al., 2023) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป (single nucleotide polymorphisms; SNPs) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เบสเดี่ยวในลำดับจีโนม ซึ่งบริเวณดีเอ็นเอที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์นี้สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิป เพื่อการตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ได้ เนื่องจากบางเครื่องหมายสนิปมีความสัมพันธ์กับยีนควบคุมลักษณะทางการเกษตร จึงสามารถใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์พืชทั้งลักษณะทางปริมาณและคุณภาพได้อย่างถูกต้องแม่นยำ (Kumar et al., 2024) เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่นำมาใช้คัดเลือกต้องมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตำแหน่งบนโครโมโซมหรือยีนที่ควบคุมลักษณะนั้น ๆ ตัวอย่างเช่น Santos et al. (2022) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติการเกิดเพสต์ของแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch paste properties, CSPP) เพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่มีแป้งคุณภาพสูง

ใช้วิธีการ genome-wide association study (GWAS) เพื่อระบุตำแหน่งในจีโนมที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของแป้งโดยใช้ข้อมูลจากสนิป 23,078 ตำแหน่ง พบ SNPs 13 ตำแหน่ง ที่มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติแป้งบนโครโมโซม 3 8 17 และ 18 นอกจากนี้ Codjia et al. (2023) ได้ใช้เทคนิค kompetitive allele-specific PCR (KASP) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแคโรทีนอยด์และสีของรากมันสำปะหลัง โดยใช้เครื่องหมาย S1_24155522 ที่เชื่อมโยงกับยีน *phytoene synthase* ในการคัดเลือกพันธุ์ที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่า 10 ไมโครกรัม/ก.

ในประเทศไทย Chaicharoen et al. (2023) ได้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสนิป S16_640082 และ S16_735381 ในการตรวจคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะไซยาไนด์ต่ำกว่า 250 มก.HCN/กก. น้ำหนักสด ที่มีความถูกต้อง 73.33 และ 76.64% ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค tetra-primer ARMS-PCR การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสนิปที่เชื่อมโยงกับลักษณะคุณภาพแป้งของมันสำปะหลัง เช่น ลักษณะ waxy starch และปริมาณ dry matter โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลสนิปที่เกี่ยวข้องกับยีนในเส้นทางการสังเคราะห์แป้ง เช่น GBSSI สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ (do Carmo et al., 2020; Ige et al., 2022) อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุลสนิปดังกล่าวนี้ส่วนใหญ่พัฒนาจากเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังในแอฟริกาและอเมริกาใต้ และใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่แตกต่างจาก tetra-primer ARMS-PCR จึงอาจมีข้อจำกัดในการนำมาใช้โดยตรงกับเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังของประเทศไทย อีกทั้งการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสนิปและเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR ในการคัดเลือกลักษณะคุณภาพแป้งของมันสำปะหลังในประเทศยังมีค่อนข้างน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสนิปที่สัมพันธ์กับลักษณะปริมาณอะไมโลส ในมันสำปะหลัง โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปและเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR เพื่อคัดเลือกประชากรพันธุ์มันสำปะหลังของประเทศไทย ซึ่งจะทำให้การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้มีปริมาณแป้งสูงมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นและใช้ระยะเวลาลดลง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคโนโลยี genotyping-by-sequencing (GBS)

คัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังจากแปลงรวบรวมเชื้อพันธุกรรมของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง 100 เชื้อพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งในช่วง 3.25–28.35% (จิณณจาร์และคณะ, 2559) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีการถ่วงน้ำหนัก (specific gravity method) เก็บตัวอย่างใบอ่อนของมันสำปะหลังเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method ตามวิธีของ Devi et al. (2013) ดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคโนโลยี GBS (NovogeneAIT Genomics, Singapore) ซึ่งเป็นเทคนิคการหาลำดับเบสดีเอ็นเอเฉพาะบางบริเวณของจีโนมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นตรวจหาความแปรผันของลำดับเบสชนิด SNP ในจีโนม ข้อมูลสนิปที่ได้นำมาคัดกรองคุณภาพ (SNP filtering) ก่อนนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม โดยกำหนดเกณฑ์ minimum allele frequency (MAF) ≥ 0.05 และอัตราข้อมูลที่หายไป (missing rate) ≤ 20% เพื่อให้ได้ตำแหน่ง SNP ที่มีความน่าเชื่อถือสำหรับการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งสนิปกับลักษณะปริมาณอะไมโลสด้วยวิธี GWAS

เก็บตัวอย่างหัวมันสำปะหลังจากแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยขุดที่อายุประมาณ 13 เดือน

ในเดือน ก.ค. 2562 จำนวน 3 ต้น/สายพันธุ์ ๆ ละ 1 หัว ตัดหัวมันบริเวณกลางให้เป็นแว่นขนาดประมาณ 1–1.5 ซม. นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°ซ. จนแห้ง แล้วบดให้ละเอียดเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสตามวิธีของ Juliano (1971)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งสนิปบนจีโนมกับลักษณะปริมาณอะไมโลส โดยใช้การวิเคราะห์-GWAS ด้วยโปรแกรม TASSEL 5.0 วิเคราะห์โครงสร้างประชากรด้วยวิธี principal component analysis (PCA) และความสัมพันธ์ทางเครือญาติระหว่างตัวอย่างคำนวณเป็น kinship matrix (K matrix) โดยใช้แบบจำลอง mixed linear model (MLM) ซึ่งรวมตัวแปรโครงสร้างประชากร (Q หรือ PCA) และ kinship matrix เพื่อควบคุมผลของโครงสร้างประชากร

3. ออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปด้วยวิธี tetra-primer ARMS-PCR

ตำแหน่งสนิปที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณอะไมโลส คัดเลือกจากผลการวิเคราะห์ GWAS ที่ได้จากการวิเคราะห์ร่วมกันระหว่างข้อมูลจีโนไทป์จากเทคโนโลยี GBS และข้อมูลฟีโนไทป์ด้านปริมาณอะไมโลส จากนั้นนำตำแหน่งสนิปที่มีนัยสำคัญทางสถิติไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Primer1 (http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html) ด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 4 เส้น ได้แก่ forward outer primer (FO), reverse outer primer (RO), forward inner primer (FI) และ reverse inner primer (RI) โดยไพรเมอร์ outer ทำหน้าที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่ครอบคลุมตำแหน่งสนิปเป็นแถบควบคุม ขณะที่ไพรเมอร์ inner ได้รับการออกแบบให้จำเพาะต่ออัลลีลที่แตกต่างกันของตำแหน่งสนิป เพื่อใช้ในการจำแนกจีโนไทป์ของตัวอย่าง จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการแยกบนเจลอะกาโรส รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้นำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับจำแนกจีโนไทป์ของตัวอย่างที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณอะไมโลส

4. สภาวะที่เหมาะสมของการตรวจหาลักษณะปริมาณอะไมโลสสูง

นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปที่ออกแบบได้มาทดสอบกับดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลัง ซึ่งผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GBS และคัดเลือกตามจีโนไทป์ CT และ CC โดยใช้เป็นตัวอย่างทดสอบในการปรับสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR การทำปฏิกิริยาใช้ 1X GoTaq® colorless master mix (Promega, USA) และดำเนินการด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA) สภาวะการทำปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยการแยกสายดีเอ็นเอ (denature) ที่อุณหภูมิ 95°ซ. เป็นเวลา 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยการแยกสายดีเอ็นเอที่ 95°ซ. เป็นเวลา 40 วินาที การจับคู่ของไพรเมอร์ (annealing) ที่อุณหภูมิ 50 55 และ 60°ซ. (40 วินาที) เพื่อทดสอบหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการจับคู่ของไพรเมอร์กับสายดีเอ็นเอเป้าหมาย และการขยายชิ้นดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายสนิป เพื่อประเมินความจำเพาะและประสิทธิภาพของชุดไพรเมอร์

5. ทดสอบความถูกต้องของเครื่องหมายสนิป

นำชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปที่พัฒนาขึ้นไปทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง 83 พันธุ์ ที่มีดีเอ็นเอพร้อมใช้งาน เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำโดยปฏิกิริยา PCR ด้วย

GoTaq® Master Mix (Promega, USA) โดยใช้ annealing temperature ที่ 60°ซ และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 3% ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นบันทึกภาพแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Doc UV transilluminator (Bio-Rad Laboratories, USA) เพื่อใช้จำแนกรูปแบบจีโนไทป์ของตัวอย่าง วิเคราะห์ความถูกต้องของเครื่องหมายสนิป โดยใช้สมการที่ 1 (Ige et al., 2021)

$$\text{ความถูกต้อง (accuracy)} = (TP + TN) / (TP + FN + FP + TN) \quad (1)$$

โดย TP = true positive คือ จำนวนตัวอย่างที่มีฟีโนไทป์อะไมโลสสูงและจำแนกถูกต้อง
TN = true negative คือ จำนวนตัวอย่างที่มีฟีโนไทป์อะไมโลสต่ำและจำแนกถูกต้อง
FP = false positive คือ จำนวนตัวอย่างที่มีฟีโนไทป์อะไมโลสต่ำแต่จำแนกเป็นอะไมโลสสูง
FN = false negative คือ จำนวนตัวอย่างที่มีฟีโนไทป์อะไมโลสสูงแต่จำแนกเป็นอะไมโลสต่ำ

6. ทดสอบการใช้งาน

นำชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องแล้วไปทดสอบการคัดเลือกลูกผสมมันสำปะหลัง 36 พันธุ์ จากแปลงรวบรวมของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ซึ่งเป็นประชากรลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์พ่อแม่ที่มีความแตกต่างของอัลลีลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณอะไมโลสและมีข้อมูลจีโนไทป์และฟีโนไทป์ครบถ้วน โดยนำดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง 40 นาโนกรัม และชุดไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิป 0.2 ไมโครโมล ไปใช้ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 1X GoTaq® colorless master mix (Promega, USA) ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติในการทำ PCR ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95°ซ. 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95°ซ. 40 วินาที (denature) อุณหภูมิ 60°ซ. 40 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72°ซ. 30 วินาที (extension) ตรวจวิเคราะห์ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 3% ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc UV transilluminator (Bio-Rad laboratories, USA)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์จีโนไทป์และความสัมพันธ์ของเครื่องหมายสนิปกับปริมาณอะไมโลสด้วยเทคโนโลยี GBS และ GWAS

จากการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคโนโลยี GBS ตรวจพบเครื่องหมายโมเลกุลสนิป 1,048,576 ตำแหน่ง หลังจากคัดกรองคุณภาพของข้อมูลโดยกำหนดค่า missing data < 20%, minimum minor allele frequency (MAF) ≥ 0.05 และ minimum read depth ≥ 20X ทำให้เหลือสนิปที่มีคุณภาพสำหรับการวิเคราะห์ 5,144 ตำแหน่ง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง 100 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูล 5,144 SNPs พบว่าค่า polymorphic information content (PIC) ของสนิปอยู่ระหว่าง 0.000–0.712 ผลการวิเคราะห์ GWAS เพื่อตรวจหาตำแหน่งสนิปที่สัมพันธ์กับลักษณะปริมาณแป้งในหัวมันสำปะหลัง พบว่าเครื่องหมายสนิปที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะดังกล่าวกระจายอยู่บนโครโมโซมที่ 1 และ 14 ของจีโนมมันสำปะหลัง เมื่อพิจารณาจากค่า $-\log10(P) \geq 4$ พบตำแหน่งสนิปที่มีนัยสำคัญ 26 ตำแหน่ง

ผลการวิเคราะห์ GWAS ตรวจพบตำแหน่งสนิปที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณแป้งบนโครโมโซมที่ 1 และ 14 อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบระหว่างฟีโนไทป์กับจีโนไทป์ของเครื่องหมาย S2_25293441 บนโครโมโซมที่ 2 พบว่าจำแนกลักษณะปริมาณอะไมโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้ว่าเครื่องหมาย S2_25293441 มีค่า –log10(P) มากกว่า 2 แต่ไม่ถึง 4 ซึ่งไม่อยู่ในช่วงที่มีนัยสำคัญสูงจากการวิเคราะห์ GWAS ก็ตาม ทั้งนี้ประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลในการนำไปใช้จริงไม่ได้ขึ้นอยู่กับระดับนัยสำคัญทางสถิติเพียงอย่างเดียว แต่ขึ้นอยู่กับความเสถียรของความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในประชากรที่ทดสอบด้วย ดังนั้น เครื่องหมายที่มีค่าความมีนัยสำคัญสูงจากการวิเคราะห์ GWAS อาจไม่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกในทางปฏิบัติเสมอไป ในขณะที่เครื่องหมายอื่นอาจแสดงความสัมพันธ์ที่สม่ำเสมอและเชื่อถือได้มากกว่าเมื่อประเมินในชุดตัวอย่างเพิ่มเติม ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากอิทธิพลของโครงสร้างประชากร ขนาดตัวอย่าง และปัจจัยทางพันธุกรรมอื่น ๆ ที่มีผลต่อการแสดงลักษณะ (Flint-Garcia et al., 2003; Yu et al., 2006) ซึ่งสภาพแวดล้อมมีผลต่อลักษณะปริมาณแป้งและปริมาณอะไมโลสด้วย

2. การออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิปและสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจด้วยวิธี tetra-primer ARMS–PCR

จากการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจตำแหน่งสนิป S2_25293441 (Table 1) พบว่า annealing temperature ที่เหมาะสม ได้แก่ 60°ซ. โดยผลการทำปฏิกิริยา PCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ดังนี้ แถบดีเอ็นเอขนาด 339 คู่เบสซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอควบคุม แถบดีเอ็นเอขนาด 229 คู่เบสที่แสดงสนิปอัลลีล C และ แถบดีเอ็นเอขนาด 166 คู่เบสที่แสดงสนิปอัลลีล T ส่วน annealing 50 และ 55°ซ. ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ตรงตามขนาดของแต่ละอัลลีลได้ครบถ้วน (Figure 1) เนื่องจากอุณหภูมิในการจับคู่ของไพรเมอร์มีผลโดยตรงต่อความจำเพาะของการเกิดพันธะระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบ หากอุณหภูมิต่ำเกินไป เช่น 50–55°ซ. จะทำให้ไพรเมอร์เกิดการจับแบบไม่จำเพาะ (nonspecific binding) (Rychlik et al., 1990) ส่งผลให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ถูกต้องตามขนาดของแต่ละอัลลีล ในขณะที่อุณหภูมิ 60°ซ. ปรากฏแถบดีเอ็นเอครบทั้งสามแถบอย่างชัดเจน จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรวจตำแหน่งสนิป S2_25293441 ด้วยเทคนิค Tetra-primer ARMS–PCR ซึ่งให้ผลการแยกอัลลีลได้ชัดเจนและจำเพาะเจาะจงสูงต่อดีเอ็นเอเป้าหมาย

Table 1 Primers used in the tetra-primer ARMS-PCR for amylose content detection in cassava

SNP position		Primer set and sequences	Product size
S2_25293441	FO	5’- CTTCGAAAATCCCTCTATGTCTTGAAAC -3’	Control fragment: 339 bp
	RO	5’- AAAGCTAACTCAATGAGGAGTGCCTATG -3’	
	FI	5’- ACAGGAAGTGACGTTGCTGGCATAAT -3’	T allele: 166 bp
	RI	5’- ACTGTGTTTTAAGAAATTCTTTTAGAGCTG -3’	C allele: 229 bp

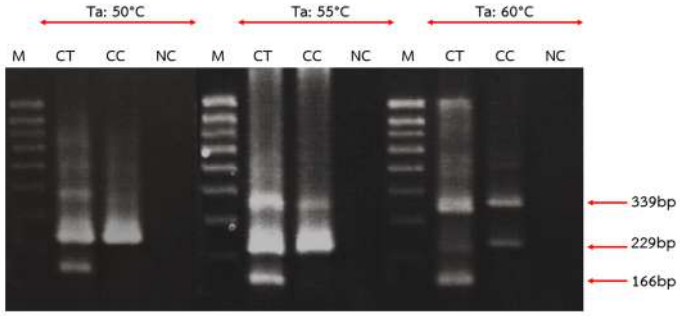


Figure 1 Tetra-primer ARMS–PCR optimization for S2_25293441 detection with different annealing temperatures. The optimum PCR condition using outer and inner primer at the ratio of 1:1 and annealing temperature of 60°C. DNA fragments generated by S2_25293441 include control fragment (339 bp), specific fragment of C allele (229 bp) and T allele (166 bp) (M: DNA ladder 100 bp, Ta: annealing temperature, NC: negative control (water)

ตำแหน่งสนิป S2_25293441 เครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับปริมาณอะไมโลสสูง อยู่ในส่วนอินทรอน (intron) ของยีน *Mitochondrial ABC transporter ATM* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารในไมโทคอนเดรีย ยีนนี้ผลิตโปรตีนที่เป็นส่วนหนึ่งของ ATP-binding cassette (ABC) transporter ซึ่งใช้พลังงานจาก ATP เพื่อขนส่งโมเลกุลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์หรือเยื่ออินทรีย์ภายในเซลล์ (Schaedler et al., 2015) แม้ว่ายีน *Mitochondrial ABC transporter ATM* ไม่มีบทบาทโดยตรงในการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง แต่ยีนนี้มีความสำคัญโดยเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานและขนส่งสารตั้งต้นที่จำเป็นสำหรับเมแทบอลิซึมต่าง ๆ รวมถึงการตอบสนองต่อความเครียดในสภาพแวดล้อม ซึ่งล้วนมีผลต่อการสะสมแป้งในหัวมันสำปะหลัง (Jacoby et al., 2012) นอกจากนี้ ตำแหน่งสนิป S2_25293441 จากงานวิจัยนี้ เป็นตำแหน่งสนิปใหม่ที่ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับปริมาณอะไมโลสสูง ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 ซึ่งจะแตกต่างจากรายงานของ Santos et al. (2022) ที่ระบุตำแหน่งสนิปในจีโนมของมันสำปะหลังที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของแป้งพบตำแหน่งสนิปจำนวน 13 ตำแหน่ง ที่มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติแป้ง โดยตั้งอยู่บนโครโมโซม 3 8 17 และ 18 อาจสรุปได้ว่า ตำแหน่งสนิป S2_25293441 ซึ่งอยู่ในบริเวณ intron ของยีน *Mitochondrial ABC transporter ATM* ทำหน้าที่เป็นเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับกระบวนการเมแทบอลิซึมและส่งผลต่อการสะสมอะไมโลสในมันสำปะหลังได้

3. ทดสอบความถูกต้องของเครื่องหมายสนิป

การทดสอบความถูกต้องของเครื่องหมายโมเลกุล SNP S2_25293441 ด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS–PCR ในตัวอย่างมันสำปะหลัง 83 พันธุ์ โดยเปรียบเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอ (Figure 2) กับปริมาณอะไมโลสของตัวอย่างที่เก็บเกี่ยวจากพื้นที่ปลูกเดียวกันในปี 2564 (ปริมาณอะไมโลสอยู่ในช่วง 3.25–28.35%) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ ได้กำหนดจุดตัด (threshold) ที่ปริมาณอะไมโลส 18% ซึ่งคำนวณจากค่าเฉลี่ยของการกระจายตัวของข้อมูล เพื่อแบ่งกลุ่มพันธุ์เป็น อะไมโลสสูง (≥18%) และอะไมโลสต่ำ (<18%) (Gawłowska et al., 2022) พบว่า เครื่องหมายมีความถูกต้อง 75.90% ในการคัดเลือกพันธุ์กลุ่มอะไมโลสสูง ซึ่งแสดงว่ามีประสิทธิภาพ

ในระดับปานกลางสำหรับการคัดกรองตามเกณฑ์ที่กำหนด

การแบ่งระดับประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการคัดเลือกแบบใช้เครื่องหมาย (marker-assisted selection; MAS) มักอ้างอิงค่า accuracy โดยค่ามากกว่า 80% จัดอยู่ในระดับสูง 70–80% จัดอยู่ในระดับปานกลาง และต่ำกว่า 70% จัดอยู่ในระดับต่ำ (Hasan et al., 2015) เครื่องหมายที่มีความถูกต้องในระดับปานกลางสามารถนำไปใช้ร่วมกับข้อมูลฟีโนไทป์ในการคัดกรองเบื้องต้น

เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาจากการวิเคราะห์ GWAS หรือ QTL mapping สำหรับลักษณะเชิงปริมาณในพืชมักมีค่าความถูกต้องอยู่ในช่วงประมาณ 70–90% ขึ้นอยู่กับชนิดของลักษณะ โครงสร้างประชากร และอิทธิพลของสภาพแวดล้อม (Xu and Crouch, 2008; Kumar et al., 2012) ดังนั้น ความถูกต้องของเครื่องหมาย S2_25293441 ที่ 75.90% จึงอยู่ในช่วงที่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า และมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง โดยเฉพาะในขั้นตอนการคัดกรองเบื้องต้น

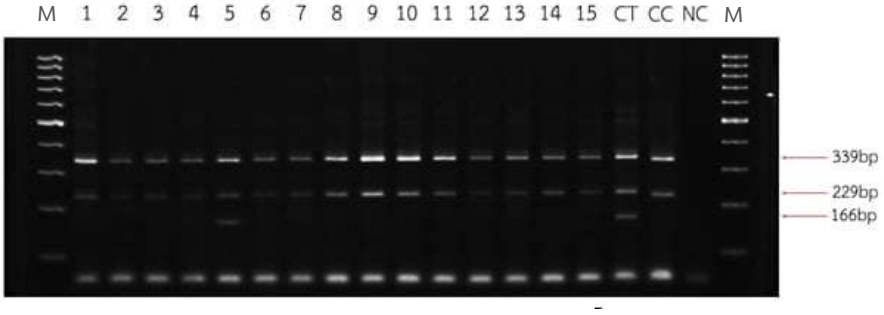


Figure 2 Agarose gel electrophoresis of 15 cassava varieties genotyped by tetra-primer ARMS-PCR using the primer set of S2_25293441 (M: DNA ladder 100 bp)

4. ทดสอบการใช้งาน

ผลการตรวจสอบกับลูกผสมมันสำปะหลัง พบว่า รูปแบบของแถบดีเอ็นเอกับปริมาณอะไมโลสมีความถูกต้องถึง 75% (Figure 3) ซึ่งจัดอยู่ในระดับปานกลางตามเกณฑ์การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล (Hasan et al., 2015) ถือว่าเพียงพอสำหรับการนำไปใช้ในการคัดกรองเบื้องต้นในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะลักษณะเชิงปริมาณ

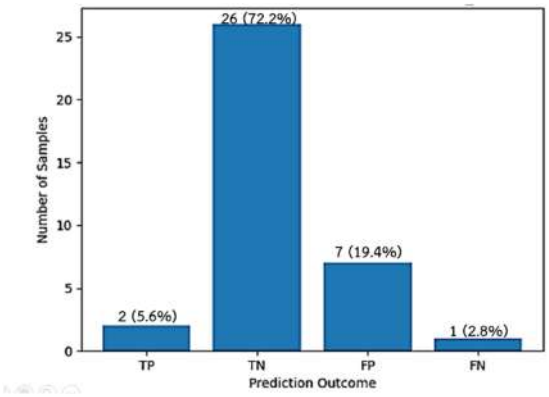


Figure 3 Distribution of prediction outcomes (true positive, true negative, false positive, and false negative) for the SNP marker S2_25293441 in 36 cassava hybrids. The results indicated that most samples were correctly classified as true negatives, while a smaller proportion showed misclassification

ที่ควบคุมโดยหลายยีนและได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อม (Xu and Crouch, 2008) ช่วยลดจำนวนต้นและพื้นที่ปลูกในการคัดเลือกพันธุ์ เนื่องจากสามารถคัดเลือกเฉพาะต้นกล้าที่มีจีโนไทป์ที่ต้องการเข้าสู่การทดสอบภาคสนาม (Hasan et al., 2021) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเครื่องหมายในอนาคต ควรพัฒนาเพิ่มเติมโดยการใช้เครื่องหมายหลายตำแหน่งร่วมกันในรูปแบบ haplotype หรือ marker combination การทดสอบในประชากรที่มีความหลากหลายมากขึ้นเพื่อประเมินความเสถียรของเครื่องหมาย และการบูรณาการข้อมูลจีโนไทป์ร่วมกับฟีโนไทป์หรือการประยุกต์ใช้ genomic selection เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือก (Xu and Crouch, 2008)

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบเครื่องหมายสนิป S2_25293441 ด้วยใช้เทคนิค tetra-primer ARMS-PCR ในมันสำปะหลังเพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะปริมาณอะไมโลสสูง พบว่า เครื่องหมายสนิป S2_25293441 มีความถูกต้อง 75.90% ในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณอะไมโลสสูงกว่า 18% สภาวะที่เหมาะสมของการตรวจด้วยวิธี tetra-primer ARMS-PCR คือใช้ annealing ที่ 60°ซ. ในปฏิกิริยา PCR พันธุ์ที่มีจีโนไทป์ชนิดเฮเทอโรไซกัส CT เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 339 229 และ 166 คู่เบส จีโนไทป์ชนิดโฮโมไซกัส CC เกิดแถบดีเอ็นขนาด 339 และ 229 คู่เบส พันธุ์ที่มีจีโนไทป์ CT แสดงฟีโนไทป์ที่มีปริมาณอะไมโลสสูง การใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายสนิป S2_25293441 และเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR ทำให้การคัดเลือกประชากรพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้งสูงทำได้รวดเร็วขึ้น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

เอกสารอ้างอิง

จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข ประพิศ วองเทียม อุมาพร รักษาพราหมณ์ จิตติลักษณ์ พลพวก จารุวรรณ บางแวก และจินดา จิตจักร. 2559. การจำแนกและประเมินลักษณะทางคุณภาพของหัวคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งและคุณภาพของท่อนพันธุ์ในเชื้อพันธุ์มันสำปะหลัง. รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุดโครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลัง, ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. 163 หน้า.

Chaicharoen, A., S. Amawan, J. Kansup, A. Sawwa and K. Petchpoung. 2023. Novel SNP markers and their application in low-cyanide cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding program. Trends in Sciences. 20(4): 6456.

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): 15115.

Das, S., M.K. Das, T. Jamatia, B. Bhattacharya, R. Mazumder, P.K. Yadav, N.R. Ghose Bishwas, T. Deka, D. Roy, B. Sinha, B. Das, I. Daule, K. Paul, A. Roy, A. Choudhury, P. Sadhukhan, D. Sarmah, D. Bhargab, B.K. Jana, D. Tayeng, N. Guha, B. Kalita and S. Mandal. 2024. Advances of cassava starch-based composites in novel and conventional drug delivery systems: a state-of-the-art review. RSC Pharmaceutics. 1(2): 182-203.

Devi, K.D., K. Punyarani, N.S. Singh and H.S. Devi. 2013. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order *Zingiberales*-suitable for diverse PCR based downstream applications. SpringerPlus. 2(1): 669.

do Carmo, C.D., M.B.E. Sousa, P.P. dos Santos Silva, G.A.F. Oliveira, H. Ceballos and E.J. de Oliveira. 2020. Identification and validation of mutation points associated with waxy phenotype in cassava. BMC Plant Biology. 20(1): 164.

Flint-Garcia, S.A., J.M. Thornsberry and E.S. Buckler. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. Annual Review of Plant Biology. 54(1): 357–374.

Gawłowska, M., L. Lahuta, L. Boros, A. Sawikowska, P. Kumar, M. Knopkiewicz, Z. Kaczmarek and W. Święcicki. 2022. Validation of molecular markers significant for flowering time, plant lodging, stem geometry properties, and raffinose family Oligosaccharides in pea (*Pisum sativum* L.). Agriculture. 12(8): 1125.

Gomez, G.G. 1979. Use of cassava products in pig feeding. Available at: https://www.fao.org/4/ t0554e/ t0554e11.htm. Accessed: October 14, 2025.

Grand View Research. 2023. Cassava starch market size and share: applications as thickening, binding, stabilizing agent in processed foods. Available at: https://www.grandviewresearch.com/ industry-analysis/cassava-starch-market-report. Accessed: October 14, 2025.

Hasan, M.M., M.Y. Rafii, M.R. Ismail, M. Mahmood, H.A. Rahim, M.A. Alam, S. Ashkani, M.A. Malek and M.A. Latif. 2015. Marker-assisted backcrossing: a useful method for rice improvement. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 29(2): 237–254.

Hasan, N., S. Choudhary, N. Naaz, N. Sharma and R.A. Laskar. 2021. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 19(1): 128.

Ige, A.D., B. Olasanmi, E.G.N. Mbanjo, I.S. Kayondo, E.Y. Parkes, P. Kulakow, C. Egesi, G.J. Bauchet, E. Ng, L.A.B. Lopez-Lavalle, H. Ceballos and I.Y. Rabbi. 2021. Conversion and validation of uniplex SNP markers for selection of resistance to cassava mosaic disease in cassava breeding programs. Agronomy. 11(3): 420.

Ige, A.D., B. Olasanmi, G.J. Bauchet, I.S. Kayondo, E.G.N. Mbanjo, R. Uwugiaren, S. Motomura-Wages, J. Norton, C. Egesi, E.Y. Parkes, P. Kulakow, H. Ceballos, I. Dieng and I.Y. Rabbi. 2022. Validation of KASP-SNP markers in cassava germplasm for marker-assisted selection of increased carotenoid content and dry matter content. Frontiers in Plant Science. 13: 1016170.

Jacoby, R.P., L. Li, S. Huang, C.P. Lee, A.H. Millar and N.L. Taylor. 2012. Mitochondrial composition, function and stress response in plants. Journal of Integrative Plant Biology. 54(11): 887-906.

Janket, A., N. Vorasoot, B. Toomsan, W. Kaewpradit, S. Jogloy, P. Theerakulpisut, C.C. Holbrook, C.K. Kvien and P. Banterng. 2020. Starch accumulation and granule size distribution of cassava cv. Rayong9 grown under irrigated and rainfed conditions using different growing seasons. Agronomy. 10(3): 412.

Juliano, B.O. 1971. A simplified assay for milled-rice amylose. Cereal Science Today. 16(11): 334-340.

Kumar, S., T.W. Banks and S. Cloutier. 2012. SNP discovery through next-generation sequencing and its applications. International Journal of Plant Genomics. 2012: 831460.

Kumar, R., S.P. Das, B.U. Choudhury, A. Kumar, N.R. Prakash, R. Verma, M. Chakraborti, A.G. Devi, B. Bhattacharjee, R. Das, B. Das, H.L. Devi, B. Das, S. Rawat and V.K. Mishra. 2024. Advances in genomic tools for plant breeding: harnessing DNA molecular markers, genomic selection, and genome editing. Biological Research. 57(1): 80.

Mohidin, S.R.N.S.P., S. Moshawih, A. Hermansyah, M.I. Asmuni, N. Shafqat and L.C. Ming. 2023. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): a systematic review

for the pharmacological activities, traditional uses, nutritional values, and phytochemistry. Journal of Evidence-Based Integrative Medicine. 28: 2515690X231206227.

Rychlik, W., W.J. Spencer and R.E. Rhoads. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nucleic Acids Research. 18(21): 6409.

Santos, C.S.D., M.B. Sousa, A.C. Brito, L.A. de Oliveira, C.W.P. Carvalho and E.J. de Oliveira. 2022. Genome-wide association study of cassava starch paste properties. PLoS ONE. 17(1): e0262888.

Schaedler, T.A., B. Faust, C.A. Shintre, E.P. Carpenter, V. Srinivasan, H.W. van Veen and J. Balk. 2015. Structures and functions of mitochondrial ABC transporters. Biochemical Society Transactions. 43(5): 943-951.

Silveira, Y.D., A.S. Franca and L.S. Oliveira. 2025. Cassava waste starch as a source of bioplastics: development of a polymeric film with antimicrobial properties. Foods. 14(1): 113.

Sinha, D., A.K. Maurya, G. Abdi, M. Majeed, R. Agarwal, R. Mukherjee, S. Ganguly, R. Aziz, M. Bhatia, A. Majgaonkar, S. Seal, M. Das, S. Banerjee, S. Chowdhury, S.B. Adeyemi and J.T. Chen. 2023. Integrated genomic selection for accelerating breeding programs of climate-smart cereals. Genes. 14(7): 1484.

Xu, Y. and J.H. Crouch. 2008. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. Crop Science. 48(2): 391–407.

Yu, J., G. Pressoir, W.H. Briggs, I. Vroh Bi, M. Yamasaki, J.F. Doebley, M.D. McMullen, B.S. Gaut, D.M. Nielsen, J.B. Holland, S. Kresovich and E.S. Buckler. 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nature Genetics. 38(2): 203–208.