บทความวิจัย

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD ของมันสำปะหลังจากแหล่งเชื้อพันธุกรรมของไทย และพันธุ์ปลูกเศรษฐกิจที่นิยมโดยเกษตรกร

อัจฉริยา รังษิรุจิ[1*] อรอนงค์ พริ้งศุลกะ[2] และ สุธีวรรณ บินชัย[1]

ได้รับบทความ: 10 สิงหาคม 2561
ได้รับบทความแก้ไข: 20 พฤศจิกายน 2561
ยอมรับตีพิมพ์: 27 พฤศจิกายน 2561

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) จำนวน 19 พันธุ์ปลูก โดยใช้เทคนิค high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) ประกอบด้วยพันธุ์ปลูกที่ได้จากแหล่งเชื้อพันธุกรรมของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง 16 พันธุ์ปลูก และพันธุ์ปลูกซึ่งเป็นที่นิยมของเกษตรกร 3 พันธุ์ปลูกจากจังหวัดนครราชสีมา ในการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มทั้งหมด 28 ไพรเมอร์ พบว่า 21 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง เมื่อวิเคราะห์ความต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์ปลูกแต่ละคู่ โดยใช้ Nei's genetic distance พบว่ามีความแตกต่างตั้งแต่ 3 ถึง 82% นอกจากนี้เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังที่ศึกษาด้วย unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) จากแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจำนวน 61 แถบ สามารถจัดกลุ่มทั้ง 19 พันธุ์ปลูก เป็น 5 กลุ่ม โดยแบ่งเป็นตัวอย่างของพันธุ์ขมจำนวน 4 กลุ่ม และพันธุ์หวานจำนวน 1 กลุ่ม ภายในกลุ่มของพันธุ์ขมพบ 3 พันธุ์ปลูกเศรษฐกิจที่นิยมโดยเกษตรกร ได้แก่ พันธุ์เกล็ดมังกร (มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์ระยอง 72) พันธุ์ไจแอนท์ (จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับพันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ห้วยบง 80) และพันธุ์นาคขาว (จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับพันธุ์ระยอง 3 และพันธุ์ระยอง 5)

คำสำคัญ: มันสำปะหลัง แหล่งเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลัง เทคนิค HAT-RAPD วิธี UPGMA

---

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: achariya@g.swu.ac.th

HAT-RAPD Fingerprinting Analysis of Thai Cassava Germplasm and Economic Cultivars of Farmers' Preferences

Achariya Rangsiruji[1*], Onanong Pringsulaka[2] and Sutheewan Binchai[1]

Received: 10 August 2018
Revised: 20 November 2018
Accepted: 27 November 2018

ABSTRACT

Sixteen cultivars of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) were obtained from the germplasm collection in Rayong Field Crops Research Center, and three other economic cultivars of farmers' preferences from a well-established cassava plantation in Nakhon Ratchasima. Genetic diversity of these nineteen cultivars was assessed by high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique. Out of 28 random primers used, 21 generated polymorphic bands. Pairwise distances between taxa calculated using Nei's genetic distance varied from 3 to 82%. An unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram constructed based on 61 RAPD characters classified all 19 cultivars into five clusters, four of which containing bitter-type accessions and one accommodating sweet-type accessions. The bitter-type clusters possessed three cultivars of farmers' preferences, including Gled Mangorn (closely related to Rayong 72), Giant (placed with Huay Bong 60 and Huay Bong 80), and Nak Khao (placed with Rayong 3 and Rayong 5).

Keywords: *Manihot esculenta* Crantz, cassava germplasm, HAT-RAPD technique, UPGMA method

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University
[2]Department of Microbiology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University
*Corresponding author, e-mail: achariya@g.swu.ac.th

บทนำ

พืชในสกุล *Manihot* (วงศ์ Euphorbiaceae) มีทั้งหมด 98 ชนิด โดยมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นเพียงชนิดเดียวที่พบการเพาะปลูกเพื่ออุตสาหกรรม และเป็นพืชเศรษฐกิจที่ใช้เป็น แหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ โดยเฉพาะในทวีปแอฟริกา ลาตินอเมริกา และเอเชียบางประเทศ เช่น อินโดนีเซีย และอินเดีย ซึ่งปลูกมันสำปะหลังเพื่อการบริโภคโดยตรง [1] มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่สำคัญจัดอยู่ในอันดับที่ 6 รองมาจากอ้อย ข้าวโพด ข้าว ข้าวสาลี และมันฝรั่ง [2]

จากรายงานขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) พ.ศ. 2559 ทั่วโลกผลิตมันสำปะหลังได้ 281.89 ล้านตัน และประเทศไทยผลิตได้มากที่สุดเป็นอันดับสองรองจากประเทศไนจีเรีย [3] โดยในปี พ.ศ. 2560 ประเทศไทยมีเนื้อที่เพาะปลูกมันสำปะหลัง 8.92 ล้านไร่ และได้ผลผลิตถึง 30.5 ล้านตัน [4] และนับเป็นประเทศที่มีการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในรูปของมันเส้นและมันอัดเม็ดเป็นอันดับหนึ่งไปยังประชาคมยุโรป (มากกว่า 60%) ส่วนที่เหลือส่งออกในรูปแป้งมันสำปะหลังไปยังประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา ไต้หวัน จีน และเกาหลีใต้ รวมมูลค่าของการส่งออกทั้งหมดมากกว่า 80,000 ล้านบาทต่อปี [5] นอกจากนี้มันสำปะหลังยังใช้สำหรับผลิตเอทานอลเพื่อเป็นแหล่งพลังงานทดแทนอีกด้วย [6]

แหล่งเชื้อพันธุกรรม (germplasm bank) ของมันสำปะหลังแห่งแรกจัดตั้งที่ Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ในประเทศโคลัมเบีย ซึ่งปัจจุบันได้รวบรวมพันธุ์มันสำปะหลังไว้ถึง 6,643 ตัวอย่าง [7] นอกจากนี้ยังมีที่ International Institute for Tropical Agriculture (IITA) ในประเทศไนจีเรียอีก 2,580 ตัวอย่าง [8] สำหรับประเทศไทยได้รวบรวมเชื้อพันธุ์มันสำปะหลังจาก CIAT จำนวน 649 ตัวอย่าง และจากแหล่งอื่นๆ ตลอดจนพันธุ์ลูกผสมที่เกิดในไทยอีกทั้งหมด 218 ตัวอย่าง รวมเป็น 867 ตัวอย่าง จัดตั้งเป็นแหล่งเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง เพื่ออนุรักษ์เชื้อพันธุ์และใช้เป็นแหล่งพ่อแม่พันธุ์ให้กับนักปรับปรุงพันธุ์ได้ใช้ประโยชน์ในความหลากหลายของพันธุกรรมเพื่อพัฒนามันสำปะหลังพันธุ์ใหม่ๆ ที่สอดคล้องกับความต้องการในภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม [9]

การปลูกมันสำปะหลังนิยมปลูกแบบไม่อาศัยเพศโดยใช้ท่อนพันธุ์ ในสมัยก่อนเกษตรกรปลูก เฉพาะพันธุ์ดั้งเดิมที่มีผู้นำเข้ามาในประเทศไทย ต่อมากรมวิชาการเกษตรได้คัดเลือกพันธุ์จากแหล่งปลูกอื่นๆ และพบว่าพันธุ์ที่ปลูกในจังหวัดระยองให้ผลผลิตดีที่สุด จึงตั้งชื่อว่าพันธุ์ระยอง 1 [10] ในปัจจุบันกรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และมหาวิทยาลัยมหิดล ได้ปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังและมีการรับรองพันธุ์แล้ว 18 พันธุ์ปลูก [11] โดยส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ขมซึ่งให้ปริมาณแป้งสูงกว่าพันธุ์หวาน จึงนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการแปรรูปต่างๆ นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ปลูกอื่นๆ ซึ่งเป็นที่นิยมของเกษตรกร แต่ไม่ได้มีการรับรองพันธุ์ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาและรวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของพันธุ์ปลูกเหล่านี้

ปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ซึ่งอาศัยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เช่น amplified fragment length polymorphism (AFLP), microsatellite marker (หรือ simple sequence repeat, SSR) และ inter-simple sequence repeat (ISSR) เพื่อใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของพืช (อ้างจาก [12]) สำหรับการศึกษาความหลากหลาย ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังในต่างประเทศมีการใช้เทคนิค AFLP ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างมันสำปะหลังที่ปลูกเพื่อการค้ากับชนิดอื่นๆ ในสกุลเดียวกัน [13] และการระบุพันธุ์ของมันสำปะหลัง [14] นอกจากนี้ยังมีการใช้ microsatellite marker ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจากแหล่งต่างๆ [15-16] รวมทั้งการตรวจสอบความซ้ำซ้อนของตัวอย่างมันสำปะหลังในแหล่งเชื้อพันธุกรรมด้วย [17] และยังมีการนำ

เทคนิค ISSR มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลัง [18] และศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกด้วย [19]

นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้เป็นแบบสุ่ม (arbitrary primer) มีความยาวประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ สามารถเพิ่มโอกาสในการเกิด PCR product ขนาดต่างๆ จึงสามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้โดยพบการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งในพื้นที่เพาะปลูกและในแหล่งเชื้อพันธุกรรม [20-21] และเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิค RAPD จึงมีการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างจำเพาะมากยิ่งขึ้น เทคนิคดังกล่าวนี้เรียกว่า high annealing temperature-RAPD (HAT-RAPD) ซึ่งมีตัวอย่างการใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยหลายชนิด ได้แก่ ลิ้นจี่ ลำไย กวาวเครือ กล้วย และมะเดื่อฝรั่ง [22-24]

ในประเทศไทยมีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังบางพันธุ์ปลูกโดยเทคนิค ISSR [25] SSR [26] และ RAPD [27] แต่ทั้งหมดนั้นยังไม่ครอบคลุมมันสำปะหลังทั้ง 18 พันธุ์ที่ได้รับการรับรองจากกรมวิชาการเกษตร และพันธุ์ปลูกอื่น ๆ ซึ่งเป็นที่นิยมของเกษตรกร ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังไทยโดยใช้เทคนิค HAT-RAPD เพื่อให้ได้ข้อมูลอ้างอิงในระดับโมเลกุลที่มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นสำหรับใช้ในการจัดกลุ่มและจำแนกพันธุ์มันสำปะหลังและเป็นฐานข้อมูลพันธุกรรมสำหรับงานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังต่อไป

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลัง

เก็บรวบรวมตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่ได้รับการรับรองพันธุ์ และพันธุ์ปลูกพื้นเมือง จำนวน 16 พันธุ์ปลูก จากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง และตัวอย่างใบของพันธุ์ปลูกเศรษฐกิจที่นิยมโดยเกษตรกร จำนวน 3 พันธุ์ปลูก จากไร่มันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมา ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 19 พันธุ์ปลูก ประกอบด้วยพันธุ์ปลูกที่ได้รับการรับรองพันธุ์ พันธุ์ปลูกพื้นเมือง และพันธุ์ปลูกเศรษฐกิจที่นิยมโดยเกษตรกร

พันธุ์ปลูกที่ได้รับการรับรองพันธุ์	
1. พันธุ์ระยอง 1	9. พันธุ์ระยอง 72
2. พันธุ์ระยอง 2	10. พันธุ์ระยอง 90
3. พันธุ์ระยอง 3	11. พันธุ์ระยอง 86-13
4. พันธุ์ระยอง 5	12. พันธุ์ห้วยบง 60
5. พันธุ์ระยอง 7	13. พันธุ์ห้วยบง 80
6. พันธุ์ระยอง 9	14. พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50
7. พันธุ์ระยอง 11	15. พันธุ์พิรุณ 1
8. พันธุ์ระยอง 60	
พันธุ์ปลูกพื้นเมือง	**พันธุ์ปลูกเศรษฐกิจที่นิยมโดยเกษตรกร**
16. พันธุ์ห้านาที	17. พันธุ์นาคขาว
	18. พันธุ์ไจแอนท์
	19. พันธุ์เกล็ดมังกร

2. การสกัดดีเอ็นเอ

ทำความสะอาดใบของมันสำปะหลังทั้ง 19 พันธุ์ปลูก พันธุ์ปลูกละ 5 ใบที่ได้มาจากต่างต้นกันด้วยสารละลาย 1% sodium hypochlorite ตัดแต่ละใบเป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ 1×1 cm^2 จำนวน 5 ชิ้น สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากตัวอย่างใบทั้งหมด 95 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CTAB ซึ่งประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [28] โดยรายละเอียดของแต่ละขั้นตอนพบในงานวิจัยก่อนหน้านี้ [29]

จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด 95 ตัวอย่าง ตรวจวัดความเข้มข้น (DNA concentration) และความบริสุทธิ์ (DNA purity) ของแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-1700 PharmaSpec, Shimadzu) และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นในแต่ละตัวอย่างเท่ากัน คือ 100 ng/μL จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอจาก 5 ตัวอย่างของแต่ละพันธุ์มารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีจำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษาทั้งหมด 19 ตัวอย่าง

3. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD

เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจาก genomic DNA ของตัวอย่างมันสำปะหลังทั้งหมด 19 ตัวอย่างด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 28 สาย (จาก NAPS Unit, University of British Columbia Biotechnology Laboratory) เตรียม PCR reaction ที่มีปริมาตรรวม 15 μL ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้: 6.7 ng/μL DNA template, 150 μM dNTP แต่ละชนิด, 2 mM $MgCl_2$, 0.6 μM primer และ 0.03 U/μL TopTaq DNA Polymerase (QIAGEN) นำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง thermal cycler (Eppendorf Mastercycler Gradient 5331) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลา

ดังต่อไปนี้ ขั้นแรก initial heating ที่ 94 °C 2 นาที ตามด้วยขั้น denaturation ที่ 94 °C 1 นาที ขั้น annealing ที่ 48 °C for 1 นาที และขั้น extension ที่ 72 °C 2 นาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ ตามด้วยขั้น final extension ที่ 72 °C 2 นาที และเพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากขึ้น จึงมีการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจาก genomic DNA ของตัวอย่างมันสำปะหลังทั้งหมด 19 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์จำนวน 28 สาย ซ้ำสองครั้ง

4. การวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ และการสร้างเดนโดรแกรม

สำหรับแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ ตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis ซึ่งย้อมสีด้วย SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen) บันทึกผลของแถบดีเอ็นเอแต่ละขนาดเป็น binary coded character (0, 1) โดยกำหนดให้ “0” หมายถึง การไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และ “1” หมายถึง การปรากฏของแถบดีเอ็นเอ สร้างตาราง binary data matrix ที่ประกอบด้วยข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (informative character) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ Nei’s genetic distance (1972) และสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) โดยใช้ unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม POPGENE version 1.31 [30]

ผลการทดลอง

ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลังทั้งหมด 19 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค HAT-RAPD (รูปที่ 1) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 28 สาย พบว่าได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 113 แถบซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 240 ถึง 2,000 คู่เบส และพบว่ามีไพรเมอร์ 21 สายที่ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งมีความแตกต่าง 61 แถบ (53.98% polymorphism) รายละเอียดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอ และขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายได้ แสดงในตารางที่ 2

การวิเคราะห์ Nei’s genetic distance ของมันสำปะหลังทั้ง 19 พันธุ์ปลูก พบว่ามันสำปะหลังคู่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ พันธุ์ระยอง 72 และพันธุ์เกล็ดมังกร (0.03) ในขณะที่พันธุ์ไจแอนท์และพันธุ์ห้านาที มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.82) (ตารางที่ 3)

เมื่อสร้างเดนโดรแกรมโดยใช้ UPGMA จากการวิเคราะห์ Nei’s genetic distance (%) ด้วยโปรแกรม POPGENE version 1.31 พบว่าสามารถจัดกลุ่มมันสำปะหลังทั้ง 19 พันธุ์ปลูก เป็น 5 กลุ่ม (cluster A - cluster E, รูปที่ 2) โดยแบ่งเป็นตัวอย่างของพันธุ์ขมและพันธุ์หวาน ดังนี้ ภายในกลุ่มของพันธุ์ ขม จำนวน 4 กลุ่ม จำแนกเป็น (1) cluster A ประกอบด้วย 4 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์ระยอง 1 พันธุ์ระยอง 60 พันธุ์ระยอง 72 และพันธุ์เกล็ดมังกร ซึ่งมีระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 3-37% (2) cluster B ประกอบด้วย 3 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์ระยอง 3 พันธุ์ระยอง 5 และพันธุ์นาคขาว ซึ่งมีระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 24-40% (3) cluster C ประกอบด้วย 3 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์ห้วยบง 60 พันธุ์ห้วยบง 80 และพันธุ์ไจแอนท์ ซึ่งมีระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 16-35% และ (4) cluster D ประกอบด้วย 6 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์ระยอง 7 พันธุ์ระยอง 9 พันธุ์ระยอง 11 พันธุ์ระยอง 86-13 พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และพันธุ์ระยอง 90 ซึ่งมีระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 18-37% และภายในกลุ่มของพันธุ์หวาน จำนวน 1 กลุ่ม คือ cluster E ประกอบด้วย 3 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์ระยอง 2 พันธุ์ห้านาที และพันธุ์พิรุณ 1 ซึ่งมีระยะห่าง ทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 35-47%

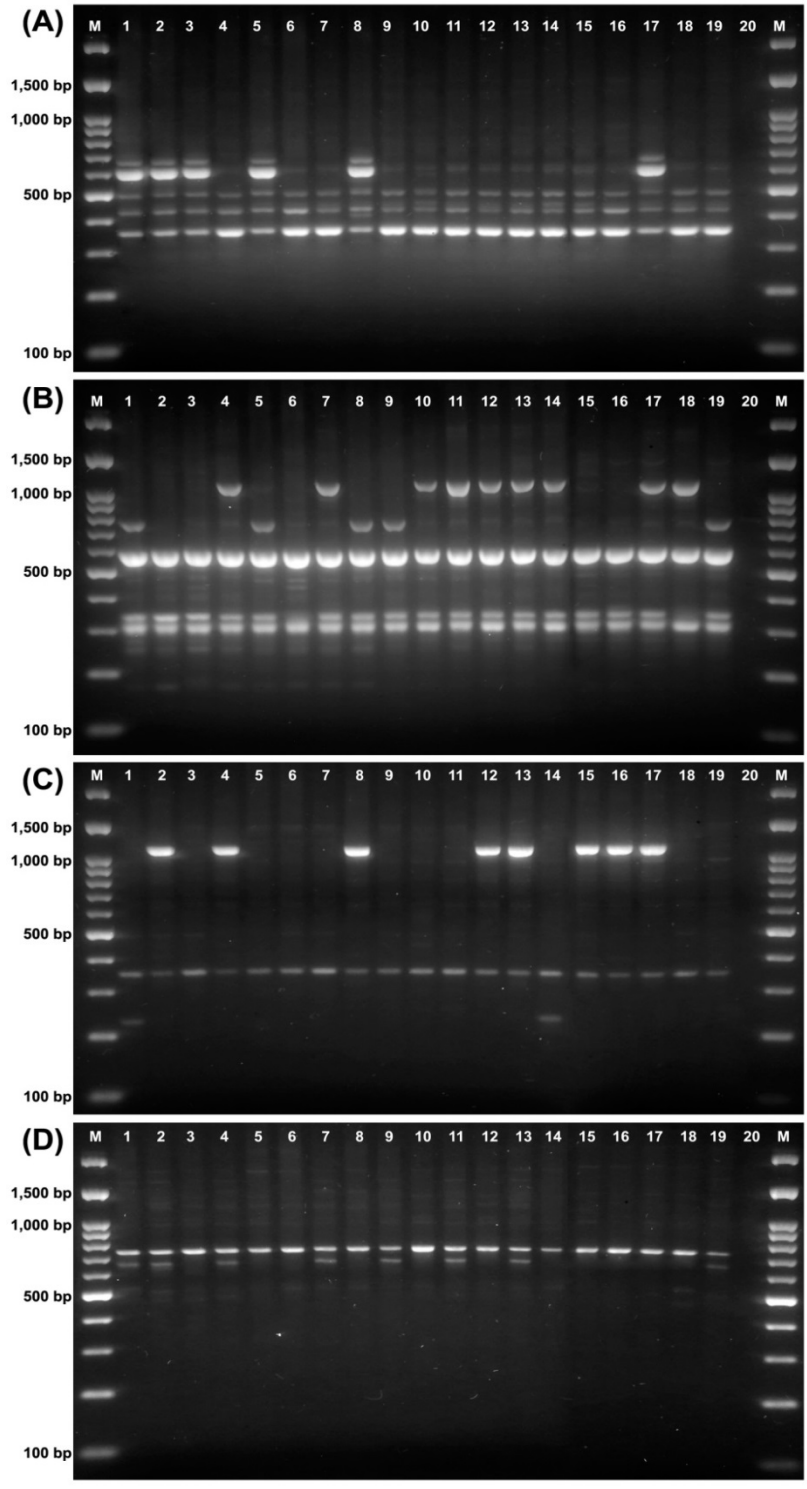
ตารางที่ 2 รายละเอียดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอ และขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง 19 พันธุ์ปลูก

No.	Primer	Sequence (5'-3')	No. of amplified band	No. of monomorphic band	No. of polymorphic band	Polymorphism (%)	Fragment size (bp)
1	NAPS101	GCGGCTGGAG	5	3	2	40	350, 480, 500, 800, 850
2	NAPS102	GGTGGGGACT	5	3	2	40	380, 450, 500, 600, 680
3	NAPS103	GTGACGCCGC	4	3	1	25	280, 300, 450, 700
4	NAPS104	GGGCAATGAT	8	3	5	62.5	400, 410, 490, 500, 750, 850, 900, 1000
5	NAPS105	CTCGGGTGGG	4	3	1	25	500, 700, 1000, 1100
6	NAPS106	CGTCTGCCCG	8	4	4	50	280, 320, 400, 420, 450, 500, 700, 750
7	NAPS108	GTATTGCCCT	2	2	0	0	450, 500
8	NAPS110	TAGCCCGCTT	6	2	4	66.67	300, 350, 450, 600, 750, 1200
9	NAPS111	AGTAGACGGG	11	1	10	90.91	400, 600, 690, 800, 850, 900, 950, 1300, 1350, 1400, 2000
10	NAPS114	TGACCGAGAC	5	2	3	60	400, 450, 800, 1000, 1400
11	NAPS115	TTCCGCGGGC	3	1	2	66.67	420, 450, 520
12	NAPS119	ATTGGGCGAT	1	1	0	0	750
13	NAPS120	GAATTTCCCC	3	0	3	100	600, 700, 750
14	NAPS122	GTAGACGAGC	7	1	6	85.71	240, 280, 350, 400, 550, 600, 650
15	NAPS123	GTCTTTCAGG	1	0	1	100	380
16	NAPS125	GCGGTTGAGG	7	4	3	42.86	300, 330, 350, 400, 550, 600, 650
17	NAPS127	ATCTGGCAGC	2	2	0	0	700, 1000
18	NAPS128	GCATATTCCG	2	0	2	100	450, 900
19	NAPS131	GAAACAGCGT	2	2	0	0	320, 400
20	NAPS132	AGGGATCTCC	2	0	2	100	650, 900
21	NAPS134	AACACACGAG	3	1	2	66.67	250, 350, 1500
22	NAPS135	AAGCTGCGAG	3	2	1	33.33	300, 500, 550
23	NAPS136	TACGTCTTGC	3	3	0	0	550, 800, 900
24	NAPS137	GGTCTCTCCC	3	2	1	33.33	320, 450, 790
25	NAPS138	GCTTCCCCTT	2	2	0	0	400, 1000
26	NAPS140	GTCGCATTTC	2	1	1	50	650, 750
27	NAPS142	ATCTGTTCGG	2	2	0	0	500, 650
28	NAPS143	TCGCAGAACG	7	2	5	71.43	300, 430, 450, 550, 650, 700, 750
		Total	**113**	**52**	**61**	**53.98**	

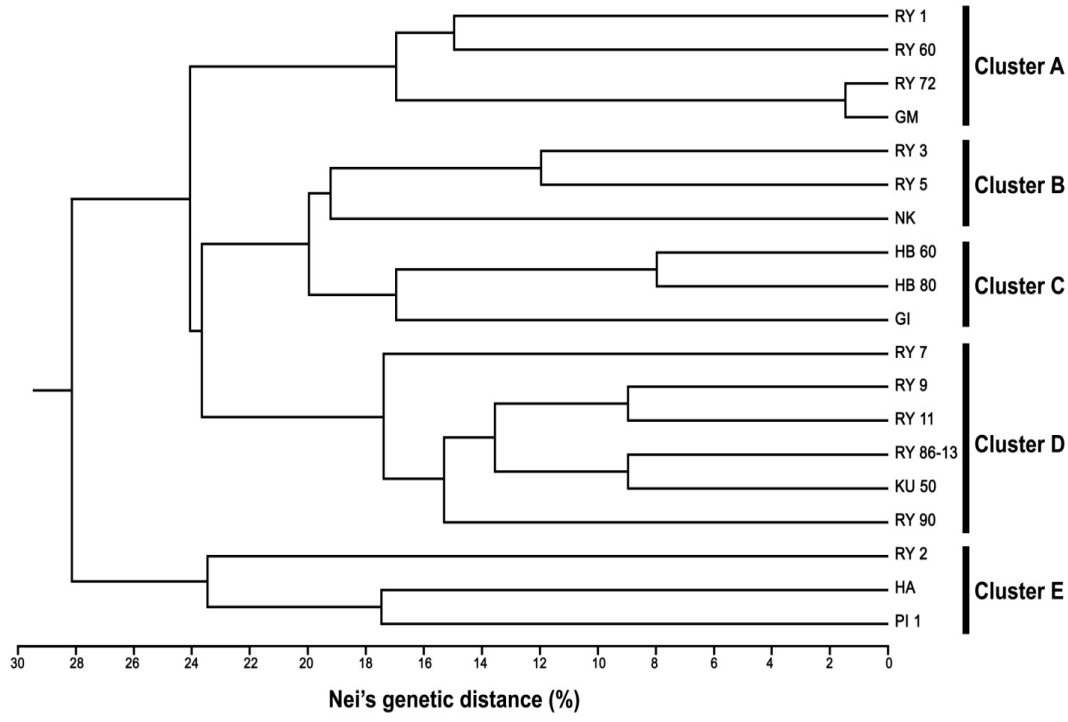
ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ Nei's genetic distance เพื่อแสดงความต่างทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังพันธุ์ปลูกแต่ละคู่

Cultivar	RY 1	RY 2	RY 3	RY 5	RY 7	RY 9	RY 11	RY 60	RY 72	RY 90	RY 86-13	HB 60	HB 80	KU 50	PI 1	HA	NK	GI	GM
RY 1	-																		
RY 2	0.65	-																	
RY 3	0.58	0.5	-																
RY 5	0.61	0.53	0.24	-															
RY 7	0.33	0.5	0.5	0.58	-														
RY 9	0.45	0.65	0.58	0.56	0.37	-													
RY 11	0.35	0.47	0.53	0.35	0.37	0.18	-												
RY 60	0.3	0.53	0.47	0.5	0.53	0.68	0.61	-											
RY 72	0.33	0.61	0.5	0.33	0.5	0.53	0.42	0.33	-										
RY 90	0.71	0.68	0.61	0.53	0.35	0.33	0.33	0.65	0.61	-									
RY 86-13	0.35	0.65	0.47	0.35	0.37	0.26	0.18	0.56	0.42	0.24	-								
HB 60	0.5	0.58	0.47	0.35	0.53	0.45	0.35	0.4	0.37	0.37	0.3	-							
HB 80	0.47	0.56	0.4	0.24	0.56	0.37	0.28	0.47	0.35	0.45	0.28	0.16	-						
KU 50	0.26	0.71	0.58	0.5	0.28	0.35	0.3	0.56	0.42	0.33	0.18	0.3	0.37	-					
PI 1	0.68	0.47	0.58	0.61	0.58	0.5	0.5	0.61	0.58	0.37	0.5	0.3	0.42	0.61	-				
HA	0.68	0.47	0.53	0.45	0.47	0.56	0.5	0.68	0.65	0.42	0.5	0.5	0.65	0.56	0.35	-			
NK	0.61	0.58	0.37	0.4	0.58	0.56	0.4	0.5	0.71	0.47	0.45	0.45	0.42	0.68	0.35	0.61	-		
GI	0.56	0.71	0.42	0.45	0.71	0.45	0.4	0.56	0.47	0.65	0.5	0.35	0.33	0.45	0.5	0.82	0.4	-	
GM	0.33	0.61	0.5	0.33	0.45	0.47	0.37	0.37	0.03	0.61	0.37	0.37	0.3	0.37	0.58	0.65	0.65	0.42	-

หมายเหตุ: GI = ไจแอนท์, GM = เกล็ดมังกร, HA = ห้านาที, HB = ห้วยบง, KU = เกษตรศาสตร์, NK = นาคขาว, PI = พิรุณ, RY= ระยอง



รูปที่ 1 ตัวอย่างรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจากมันสำปะหลัง 19 พันธุ์ปลูก (เรียงลำดับตามตารางที่ 1) ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ (A) NAPS102, (B) NAPS110, (C) NAPS134, (D) NAPS140



รูปที่ 2UPGMA dendrogram ของมันสำปะหลัง 19 พันธุ์ปลูกจากการวิเคราะห์ Nei's genetic distance (%)

ภายในกลุ่มของพันธุ์ขมพบ 3 พันธุ์ปลูกเศรษฐกิจที่นิยมโดยเกษตรกร ได้แก่ พันธุ์เกล็ดมังกร พันธุ์นาคขาว และพันธุ์ไจแอนท์ โดยพันธุ์เกล็ดมังกรมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์ระยอง 72 มากที่สุด (ต่างกันเพียง 3%) ตามด้วยพันธุ์ไจแอนท์ ซึ่งต่างจากพันธุ์ห้วยบง 80 ประมาณ 33% และพันธุ์นาคขาว ซึ่งต่างจากพันธุ์ระยอง 3 ประมาณ 37% ส่วนในกลุ่มของพันธุ์หวานพบว่าพันธุ์ห้านาที ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกพื้นเมืองมีความแตกต่างจากพันธุ์พิรุณ 1 ประมาณ 35% และเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มของพันธุ์ปลูกที่ได้รับการรับรองพันธุ์ พบว่าพันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ห้วยบง 80 มีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ 16% ส่วน พันธุ์ระยอง 1 และพันธุ์ระยอง 90 มีระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ 71%

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค HAT-RAPD ซึ่งพัฒนามาจากเทคนิค RAPD โดยการเพิ่มอุณหภูมิในขั้น annealing ให้สูงขึ้นเป็น 48 °C (โดยทั่วไปในขั้น annealing ของเทคนิค RAPD ใช้อุณหภูมิประมาณ 37 °C) เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างจำเพาะมากยิ่งขึ้น ดังนั้นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจึงมีความน่าเชื่อถือมากขึ้นด้วย การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังจากแหล่งเชื้อพันธุกรรมของไทย และพันธุ์ปลูกเศรษฐกิจที่นิยมโดยเกษตรกรในการศึกษานี้ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 28 สาย ซึ่งพบว่ามี 21 สายที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างถึง 61 แถบ ซึ่งสอดคล้องกับ Colombo และคณะ [31] ที่อภิปรายว่าเพื่อให้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ปลูกต่างๆ ของพืชในชนิดเดียวกันด้วยเทคนิค RAPD มีความแม่นยำและน่าเชื่อถือนั้น ควรมีการใช้ไพรเมอร์ประมาณ 10-30 สาย เพื่อให้ได้ผลของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างประมาณ

50-100 แถบ และจาก 19 พันธุ์ปลูกที่ศึกษาพบว่าได้ผลแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างคิดเป็น 53.98% ซึ่งบ่งชี้ว่ามันสำปะหลังเหล่านี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ของมันสำปะหลังจากแหล่งเชื้อพันธุกรรมของต่างประเทศ ซึ่งพบทั้งกลุ่มที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ได้แก่ สหรัฐอเมริกา (> 80%) [20] และกาน่า (97.5%) [21] และกลุ่มที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ เช่น บราซิล (37.6%) [31] และสาธารณรัฐเบนิน (32%) [32]

ในการวิเคราะห์ความต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์ปลูกแต่ละคู่โดยใช้ Nei's genetic distance พบว่าพันธุ์เกล็ดมังกรมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์ระยอง 72 มากที่สุด โดยมีความต่างทางพันธุกรรมเพียง 3% พันธุ์เกล็ดมังกรเป็นพันธุ์ปลูกเศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมจากเกษตรกร เนื่องจากมีเกษตรกรส่วนหนึ่งอ้างว่าได้ผลผลิตของหัวมันสำปะหลังสูงถึง 10-30 ตันต่อไร่ แต่จำเป็นต้องใช้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับพืช และการวางระบบน้ำหยดที่มีประสิทธิภาพ สำหรับพันธุ์นาคขาว และพันธุ์ไจแอนท์นั้น ไม่พบข้อมูลเชิงวิชาการที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเป็นการรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพันธุ์นาคขาวกับพันธุ์ระยอง 3 พันธุ์ไจแอนท์กับพันธุ์ห้วยบง 80 และพันธุ์เกล็ดมังกรกับพันธุ์ระยอง 72 โดยผลที่ได้จากการศึกษาสามารถใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์แหล่งที่มาของพ่อแม่พันธุ์ของมันสำปะหลังพันธุ์ปลูกเศรษฐกิจเหล่านี้ได้

เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังที่ศึกษาด้วยวิธี UPGMA จากแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจำนวน 61 แถบ สามารถจัดกลุ่มทั้ง 19 พันธุ์ปลูก เป็น 5 กลุ่ม โดยแบ่งเป็นตัวอย่างของพันธุ์ขมจำนวน 4 กลุ่ม และพันธุ์หวานจำนวน 1 กลุ่ม มันสำปะหลังมีสารประกอบไซยาโนเจนิกกลูโคไซด์ (cyanogenic glucoside) ซึ่งเมื่อเกิดการแตกตัวจะให้สารพิษในรูปของกรดไฮโดรไซยานิก (hydrocyanic acid) [33] ในปริมาณสูงเกินกว่าที่องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) และองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้กำหนดไว้ในปี ค.ศ. 1991 โดยถ้าหัวมันสำปะหลังสดมีกรดไฮโดรไซยานิก อยู่ในช่วง 50-100 ส่วนในล้านส่วน จะบ่งชี้ว่ามีพิษปานกลาง แต่ถ้ามีกรดไฮโดรไซยานิกสูงกว่า 100 ส่วนในล้านส่วน จะบ่งชี้ว่ามีพิษรุนแรง [34] ซึ่งมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 1 ที่ปลูกในประเทศไทยเพื่อผลิตมันเส้น มันอัดเม็ด และแป้งมัน จัดอยู่ในประเภทที่มีพิษรุนแรง ดังนั้นขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการแปรรูป ซึ่งเริ่มต้นจากการปอกเปลือกของหัวมันสำปะหลัง การล้างน้ำและแช่น้ำ การหั่นหรือบดเป็นชิ้นเล็กๆ และตากแดดให้แห้ง รวมทั้งการให้ความร้อนด้วยวิธีต่างๆ จึงช่วยลดความเป็นพิษของกรดไฮโดรไซยานิกได้ [35] ส่วนหัวสดของมันสำปะหลังพันธุ์หวานมีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกต่ำกว่า 100 ส่วนในล้านส่วน ดังนั้นประชากรในประเทศแถบแอฟริกาจึงนิยมบริโภคมันสำปะหลังพันธุ์หวานโดยไม่ผ่านการแปรรูป [36]

อย่างไรก็ดี เกษตรกรในหลายประเทศยังนิยมปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ขมมากกว่าพันธุ์หวาน เนื่องจากพบว่าหัวของมันสำปะหลังพันธุ์ขมให้เปอร์เซ็นต์แป้งสูงกว่า โดยพบว่าจากปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่พบในหัวสดของมันสำปะหลังพันธุ์ขมทั้งหมดประมาณ 32-35% นั้น จะพบแป้ง 80% [37] และพันธุ์ขมส่วนใหญ่ยังมีความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืชได้ดีกว่าพันธุ์หวาน [38] ในปี พ.ศ. 2551 ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์แป้งในหัวของมันสำปะหลังพันธุ์ขมบางพันธุ์ปลูกในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์ระยอง 1 พันธุ์ระยอง 5 พันธุ์ระยอง 7 พันธุ์ระยอง 9 พันธุ์ระยอง 72 พันธุ์ระยอง 90 พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และพันธุ์ห้วยบง 60 พบว่าพันธุ์ระยอง 7 ให้เปอร์เซ็นต์แป้งในหัวของมันสำปะหลังสูงที่สุด (> 27% ทั้งในฤดูฝน และฤดูแล้ง) [39] แต่ปัจจุบันพบว่าพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 มีการเพาะปลูกมากที่สุด และให้ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ถึง 3.5 ตันต่อไร่ [4] ส่วนพันธุ์ปลูก

เศรษฐกิจที่นิยมโดยเกษตรกรทั้ง 3 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์เกล็ดมังกร พันธุ์ไจแอนท์ และพันธุ์นาคขาว ยังไม่พบการรายงานเปอร์เซ็นต์แป้งในหัวของมันสำปะหลัง รวมทั้งข้อมูลเนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว และผลผลิตต่อไร่

เกษตรกรในประเทศเขตร้อนนิยมปลูกมันสำปะหลังเนื่องจากเป็นพืชที่สามารถทนทานต่อความ แห้งแล้งได้ดี และปลูกได้แม้ในดินที่เสื่อมสภาพ โดยเกษตรกรสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตหัวมันสำปะหลังได้ ตั้งแต่ 1-3 ปี หลังการเพาะปลูก ดังนั้นจึงเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประชากรกว่า 800 ล้านคน ทั่วโลก [40] หลายประเทศจึงได้ศึกษาแหล่งเชื้อพันธุกรรมของมันสำปะหลัง และรวบรวมข้อมูลเพื่อใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้แก่พันธุ์ปลูกต่างๆ ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะตรงตามความต้องการของตลาดมากขึ้น โดยในอนาคตการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุเอกลักษณ์ของพันธุ์ปลูกต่างๆ จะเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการจำแนกพันธุ์ปลูกสำหรับอุตสาหกรรม พันธุ์ปลูกที่ได้รับการขึ้นทะเบียนรับรองพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตรและเพื่อลดปัญหาการถูกละเมิดทรัพย์สินทางปัญญา

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2561 ขอขอบคุณนางจิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข อดีตผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง และนายธวัช เรี้ยนสุวงษ์ เจ้าของไร่มันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมา สำหรับตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Nassar N. M., Hashimoto D. Y., & Fernandes, S. D. (2008). Wild *Manihot* species: Botanical aspects, geographic distribution and economic value. *Genetics and Molecular Research*, *7*(1), 16-28.
2. FAOSTAT. *Food and agricultural commodities production*. Available from URL: http://faostat.fao.org/. 5 July 2018.
3. Food and agriculture organization of the United Nations. (2016). *Production quantities of cassava by country*. Available from URL: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. 6 July 2018.
4. Office of agricultural economics. (2017). Agricultural economic information (cassava). Available from URL: http://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/production/fieldcrop/casava/2560/cassava2560.pdf. 10 July 2018. (in Thai)
5. Treesilvattanakul, K. (2016). *Deterministic factors of Thai cassava prices: multi uses of cassava from food, feed, and fuel affecting on Thai cassava price volatility*. Proceedings of the international conference on agro-industry (ICoA) 2015. 7-9 November 2015. Matsuyama. Japan. p. 12-16.
6. Wichitchan, C., & Skolpap, W. (2014). Optimum cost for ethanol production from cassava roots and cassava chips. *Energy Procedia*, *52*, 190-203.

7. International center for tropical agriculture (CIAT). (2017). *CIAT today: An overview*. October 2017. Cali, CO. 8 p.
8. International institute of tropical agriculture (IITA). (2017). *Cassava collection*. Available from URL: http://my.iita.org/accession2/collection.jspx;jsessionid=58CA6CCC459D93C7504F4B2076463FF8?id=9. 10 July 2018.
9. Narangajavana, J. (2010). Biomolecular technology for improving cassava cultivars. *Thai Journal of Genetics*, *3*(2), 95-105. (in Thai)
10. Ratanawaraha, C., Senanarong, N., & P. Suriyapan. (2000). *Status of cassava in Thailand: Implications for future research and development*. In: A review of cassava in Asia with country case studies on Thailand and Viet Nam. Volume 3. Proceedings of the validation forum on the global cassava development strategy. 26-28 April 2000. Rome. Italy. p.63-102.
11. Rayong field crops research center. Department of agriculture. (2019). *Cassava cultivars*. Available from URL:http://www.doa.go.th/fcrc/rayong/index.php/r-d/2-variety. 12 July 2018. (in Thai)
12. Nybom, H., Weising, K., & Rotter, B. (2014). DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investigative Genetics*, *5*(1), 1-35.
13. Roa, A. C., Maya, M. M., Duque, M. C., Tohme, J., Allem, A. C., & Bonierbale, M. W. (1997). AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theoretical and Applied Genetics*, *95*(5-6), 741-750.
14. Wong, H. L., Yeoh, H. H., & Lim, S. H. (1999). Customisation of AFLP analysis for cassava varietal identification. *Phytochemistry*, *50*(6), 919-924.
15. Kabeya, M. J., Kabeya, U. C., Bekele, B. D., & Ingelbrecht, I. L. (2012). Genetic Analysis of selected cassava (*Manihot esculenta*) genetic pool in africa assessed with simple sequence repeats. *World Journal of Agricultural Sciences*, *8*(6), 637-641.
16. Beovides, Y., Fregene, M., Gutiérrez, J. P., Milián, M. D., Coto, O., Buitrago, C., Cruz, J. A., Ruiz, E., Basail, M., Rayas A., Rodríguez, D., Santos, A., López, J., & Medero, V. (2015). Molecular diversity of cuban cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars assessed by simple sequences repeats (SSR). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, *19*(4), 364-377.
17. Moura, E. F., de Farias Neto, J. T., Sampaio, J. E., da Silva, D. T., & Ramalho, G. F. (2013). Identification of Duplicates of cassava accessions sampled on the north region of Brazil using microsatellite markers. *Acta Amazonica*, *43*(4), 461-468.
18. Tiago, A. V., Rossi, A. A. B., Tiago, P. V., Carpejani, A. A., Silva, B. M., Hoogerheide, E. S. S., & Yamashita, O. M. (2016). Genetic diversity in cassava landraces grown on farms in Alta Floresta-MT, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, *15*(3), 1-10.

19. Vidal, Á. M., Vieira, L. J., Ferreira, C. F., Souza, F. V. D., Souza, A. S., & 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.
20. Colombo, C., Second, G., & Charrier, A. (2000). Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, *23*(1), 189-199.
21. Asante, I. K., & Offei, S. K. (2003). RAPD-based genetic diversity study of fifty cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Genotypes. *Euphytica*, *131*, 113-119.
22. Wangspa, R., Cutler, R. W., Sitthiprom, S., Chundet, R., Dumampai, N., & Anuntalabhochai, S. (2005). DNA fingerprint database of some economically important Thai plants: *Litchi chinensis* Sonn, *Dimocarpus longan* Lour, and *Peuraria* spp. *Science Asia*, *31*, 145-149.
23. Ruangsuttapha, S., Eimert, K., SchrÖder, M.-B., Silayoi, B., Denduangboripant, J., & Kanchanapoom, K. (2007). Molecular phylogeny of banana cultivars from Thailand based on HAT-RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *54*, 1565-1572.
24. Anuntalabhochai, S., Phromthep, W., Sitthiphrom, S., Chundet, R., & Cutler, R. W. (2008). Phylogenetic diversity of *Ficus* species using HAT-RAPD markers as a measure of genomic polymorphism. *The Open Agriculture Journal*, *2*, 62-67.
25. Sanguanrungsirikul, S. (2008). Classification of collected cassava varieties by using molecular markers. Department of agriculture. (in Thai)
26. Ruttawat, B., Wangsomnuk, P. P., & Wangsomnuk, P. (2011). Genetic studies of selected Thai cassava by SSR markers. The 12th Khon Kaen University graduate research conference. 28 January 2011. Khon Kaen University. p. 564-571. (in Thai)
27. Thanananta, N., Charoenchai, M., & Charoenchai, T. Study on the genetic relationship in cassava using RAPD technique. *Thai Journal of Science and Technology*, *1*(2), 127-133. (in Thai)
28. Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, *19*, 11-15.
29. Niyompanich, S., Binchai, S., Pringsulaka, O., & Rangsiruji, A. (2017). Clustering and genetic diversity assessment of economic cultivars of Mmelons (*Cucumis melo* L.) using molecular techniques. *Srinakharinwirot Science Jourmal*, *33*(2), 71-87. (In Thai)
30. Yeh, F. C., Yang, R. C., & Boyle, T. (1999). POPGENE. Microsoft windows based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. University of Alberta, Edmonton.
31. Colombo, C., Second, G., Valle, T. L., & Charrier, A. (1998). Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I) RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, *21*(1), 105-113.

32. Tonukari, N. J., Thottappilly, G., Ng, N. Q., & Mignouna, H. D. (1997). Genetic Polymorphism of cassava within the Republic of Benin detected with RAPD markers. *African Journal of Crop Science*, *5*(93), 219-228.
33. Chiwona-Karltun, L., Brimer, L., Saka, J. D. K., Mhone, A. R., Mkumbira, J., Johansson, L., Bokanga, M., Mahungu, N. M., & Rosling, H. (2004). Bitter taste in cassava roots correlates with cyanogenic glucoside levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*, 581-590.
34. FAO/WHO. (1991). Joint FAO/WHO food standards programme. In: Codex alimentarius commission XII (suppl. 4). Rome. Italy.
35. Kasetsart University research and development institute. (2015). Cassava: Utilization of cassava production. Available from URL: https://www3.rdi.ku.ac.th/?p=17866. 23 July 2018. (in Thai)
36. Balagopalan, C. (2002). Cassava Utilization in Food, Feed and Industry. In Hillocks, R. J., Thresh, J. M., Bellotti, A. C., (Eds.), *Cassava: Biology, production and utilization.* (pp. 301-318). CABI Publishing. Oxon, UK.
37. Montagnac, J. A., Davis, C. R., & Tanumihardjo, S. A. (2009). Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, *8*, 181-194.
38. Wilson, W. M., & Dufour, D. L. (2002). Why “bitter” cassava? Productivity of “bitter” and “sweet” cassava in a Tukanoan Indian settlement in the northwest Amazon. *Economic Botany*, *56*(1), 49-57.
39. Klakhang, K. (2008). Cassava: Agricultural extension academic handbook. Department of agricultural extension. Bureau of agricultural commodities promotion and management. Bangkok. p. 32. (in Thai)
40. Burns, A., Gleadow, R., Cliff, J., Zacarias, A., & Cavagnaro, T. (2010). Cassava: The drought, war and famine crop in a changing world. *Sustainability*, *2*(11), 3572-3607.