บทความวิจัย

การระบุพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังไทยโดยใช้ SCAR marker และ multiplex PCR

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

ได้รับบทความ: 25 เมษายน 2562
ได้รับบทความแก้ไข: 9 กรกฎาคม 2562
ยอมรับตีพิมพ์: 9 กรกฎาคม 2562

บทคัดย่อ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ และมีการคัดเลือกพันธุ์ปลูกที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูงเพื่ออุตสาหกรรม แต่พันธุ์ปลูกที่ได้รับการพัฒนาอาจมีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ดังนั้นการจำแนกพันธุ์ปลูกจึงต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังไทยจำนวน 16 พันธุ์ปลูกที่ได้จากแหล่งเชื้อพันธุกรรมในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยนำแถบดีเอ็นเอซึ่งมีความแตกต่างกันในพันธุ์ปลูกต่างๆ ที่ได้จากการทำ HAT-RAPD มาโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับ SCAR ที่มีความจำเพาะจำนวน 4 คู่ โดย SCAR marker ที่ได้สามารถใช้จำแนกพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังได้ ดังนี้ (1) 308-bp marker และ 850-bp marker ใช้ระบุอัตลักษณ์ของพันธุ์ปลูกระยอง 60 และห้านาที ตามลำดับ (2) 414-bp marker ใช้ระบุกลุ่มพันธุ์ปลูกระยอง 1 ระยอง 11 ระยอง 90 ระยอง 86-13 ห้วยบง 60 และเกษตรศาสตร์ 50 (3) 273-bp marker ใช้ระบุกลุ่มพันธุ์ปลูกระยอง 3 ระยอง 9 และระยอง 72 และ (4) 414-bp marker และ 273-bp marker ใช้ระบุกลุ่มพันธุ์ปลูกระยอง 5 และห้วยบง 80 นอกจากนี้ ยังได้มีการพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ที่เหมาะสมกับการใช้ไพรเมอร์สำหรับ SCAR พร้อมกันทั้ง 4 คู่ในหนึ่งปฏิกิริยา เพื่อให้การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายมีความรวดเร็วและประหยัดยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: มันสำปะหลัง การจำแนกพันธุ์ปลูก เทคนิค multiplex PCR เทคนิค SCAR

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

Identification of Thai cassava cultivars using SCAR markers and multiplex PCR

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

Received: 25 April 2019
Revised: 9 July 2019
Accepted: 9 July 2019

ABSTRACT

Cassava is an important economic crop which has been artificially selected to improve cultivars with high industrial yield of starch. Based on their morphoagronomic descriptors however, several improved cultivars are similar. Hence, accurate identification of each cultivar requires well-trained personnel. This study aimed to establish molecular markers for the identification of 16 Thai cassava cultivars from the germplasm collection in Rayong Field Crops Research Center. HAT-RAPD amplicons which were distinctive among the cultivars were employed for molecular cloning. Based on nucleotide sequences obtained four SCAR primer pairs were designed. SCAR markers were generated and used to differentiate the cultivars as follows: (1) 308-bp marker and 850-bp marker for Rayong 60 and Hanatee, respectively; (2) 414-bp marker for Rayong 1, Rayong 11, Rayong 90, Rayong 86-13, Huay Bong 60 and Kasetsart 50; (3) 273-bp marker for Rayong 3, Rayong 9 and Rayong 72; and (4) 414-bp and 273-bp markers for Rayong 5 and Huay Bong 80. For the procedure to be less time-consuming and more cost-effective, efficient multiplex PCR with optimal conditions was developed to incorporate all four pairs of SCAR primers in a single PCR reaction.

Keywords: Cassava, cultivar identification, multiplex PCR, SCAR

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

บทนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของโลก และเป็นพืชอาหารหลักของประเทศต่างๆ ในทวีปแอฟริกาและอเมริกาใต้ ในปี พ.ศ. 2560 ประเทศไทยสามารถผลิตมันสำปะหลังได้มากเป็นอันดับ 3 รองจากประเทศไนจีเรีย และคองโก (http://www.fao.org/faostat/) มันสำปะหลังที่ใช้ในอุตสาหกรรมได้รับการปรับปรุงพันธุ์เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากในหลายประเทศ เพื่อให้ได้พันธุ์ปลูก (cultivar) ที่ให้ผลผลิตสูง ต้านทานโรคและแมลง และเหมาะสมกับสภาพพื้นที่เพาะปลูก สำหรับประเทศไทยมีหน่วยงานที่รับผิดชอบด้านการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง 2 หน่วยงานหลัก คือ กรมวิชาการเกษตร และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งปัจจุบันได้ปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังและมีการรับรองพันธุ์แล้ว 19 พันธุ์ปลูก โดยเป็นของกรมวิชาการเกษตร 11 พันธุ์ปลูก (ระยอง 1 ระยอง 2 ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 7 ระยอง 9 ระยอง 11 ระยอง 60 ระยอง 72 ระยอง 90 และระยอง 86-13) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 6 พันธุ์ปลูก (ศรีราชา 1 เกษตรศาสตร์ 50 เกษตรศาสตร์ 72 ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 และห้วยบง 90) และกรมวิชาการเกษตรร่วมกับสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยมหิดล 2 พันธุ์ปลูก (พิรุณ 1 และพิรุณ 2) นอกจากนี้ยังมีมันสำปะหลังพันธุ์ปลูกพื้นเมืองที่ใช้เพื่อการบริโภคในครัวเรือน ได้แก่ พันธุ์ปลูกห้านาที โดยแต่ละพันธุ์ปลูกมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน [1]

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตมันสำปะหลังที่มีศักยภาพสูง แต่ปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่ประสบปัญหาต้นทุนการผลิตที่ขยับตัวสูงขึ้นโดยเฉพาะค่าปุ๋ยเคมี ค่าสารเคมีกำจัดวัชพืช และเนื่องจากการขยายพันธุ์มันสำปะหลังนิยมใช้ท่อนพันธุ์ [2] เกษตรกรยังประสบปัญหาการหลอกขายท่อนพันธุ์ที่มีราคาสูง ซึ่งอาจเป็นพันธุ์ปลูกที่ได้รับการรับรองพันธุ์แล้วแต่มีการตั้งชื่อทางการค้าใหม่ ดังนั้นก่อนการเพาะปลูกหากสามารถจำแนกพันธุ์ปลูกได้จากท่อนพันธุ์จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซื้อท่อนพันธุ์ราคาสูง ในการระบุพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังจะใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาหลายประการประกอบกัน ซึ่งต้องอาศัยความรู้จากบุคลากรที่มีความชำนาญ โดยลักษณะต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกอาจขึ้นอยู่กับอายุของมันสำปะหลัง รวมทั้งความแปรผันที่เกิดขึ้นจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมอาจทำให้มันสำปะหลังพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในต่างพื้นที่มีลักษณะแตกต่างกัน การสังเกตลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวจึงอาจจะไม่สามารถจำแนกพันธุ์ปลูกได้อย่างแม่นยำ [3] ดังนั้นในการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันภาคการเกษตร ประเทศไทยควรมีแนวทางในการลดต้นทุนของวัตถุดิบทางการเกษตรซึ่งรวมถึงการเพิ่มมาตรฐานการควบคุมการผลิตท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง และเพื่อให้เกษตรกรได้รับท่อนพันธุ์ที่ถูกต้อง จึงควรมีการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกท่อนพันธุ์มันสำปะหลังได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่อาศัยดีเอ็นเอและเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และการจำแนกชนิดและพันธุ์ของพืช [4-9] เทคนิค sequence characterized amplified region (SCAR) ประยุกต์มาจากเทคนิคที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มหลายตำแหน่ง เช่น RAPD โดยการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SCAR marker เกี่ยวข้องกับการโคลน (molecular cloning) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง เพื่อออกแบบไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแถบดังกล่าวด้วยเทคนิค PCR ดังนั้นผลที่ได้จึงมีความแม่นยำ พร้อมทั้งมีความคงที่สม่ำเสมอ สามารถตรวจสอบได้เมื่อทำการทดลองซ้ำ (reproducible) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค SCAR ในการจำแนกชนิดและพันธุ์พืชในกลุ่มต่างๆ

[10-14] ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการใช้เทคนิค SCAR ในการจัดจำแนกพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังทั้งในต่างประเทศและในประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายหลายตำแหน่งด้วยการใช้ไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในหนึ่งปฏิกิริยา โดยไพรเมอร์แต่ละคู่ที่นำมาใช้จะมีความจำเพาะและให้ PCR product ที่มีขนาดต่างกัน การทำ multiplex PCR ต้องมีการปรับสภาวะรวมทั้งส่วนประกอบของปฏิกิริยาให้เหมาะสม เพื่อให้ไพรเมอร์ทุกคู่สามารถเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ มีรายงานการใช้เทคนิค multiplex PCR ในการจำแนกพืชหลายชนิด [14-16]

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหา SCAR marker ที่มีความจำเพาะในการระบุพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังจากแหล่งเชื้อพันธุกรรมในประเทศไทย และการประยุกต์ใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อลดขั้นตอนและเวลาในการตรวจสอบ ทำให้ได้ผลที่แม่นยำและรวดเร็วยิ่งขึ้น

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างใบมันสำปะหลัง

เก็บรวบรวมตัวอย่างใบมันสำปะหลังจำนวน 16 พันธุ์ปลูกจากแหล่งเชื้อพันธุกรรมในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยแบ่งเป็นพันธุ์ปลูกที่ได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรจำนวน 15 พันธุ์ปลูก และพันธุ์ปลูกพื้นเมืองจำนวน 1 พันธุ์ปลูก ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 16 พันธุ์ปลูก

พันธุ์ปลูกที่ได้รับการรับรองพันธุ์ (ชื่อย่อ)	
1. ระยอง 1 (R1)	9. ระยอง 72 (R72)
2. ระยอง 2 (R2)	10. ระยอง 90 (R90)
3. ระยอง 3 (R3)	11. ระยอง 86-13 (R86-13)
4. ระยอง 5 (R5)	12. ห้วยบง 60 (HB60)
5. ระยอง 7 (R7)	13. ห้วยบง 80 (HB80)
6. ระยอง 9 (R9)	14. เกษตรศาสตร์ 50 (KU50)
7. ระยอง 11 (R11)	15. พิรุณ 1 (P1)
8. ระยอง 60 (R60)	
พันธุ์ปลูกพื้นเมือง (ชื่อย่อ)	
16. ห้านาที (HA)	

2. การสกัดดีเอ็นเอ

ทำความสะอาดใบมันสำปะหลังด้วยสารละลาย 1% sodium hypochlorite จากนั้นสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากใบของมันสำปะหลัง 16 พันธุ์ปลูก พันธุ์ปลูกละ 3 ใบจากต่างต้นกัน (ทั้งหมด 48 ตัวอย่าง) โดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) ตามวิธีการในคู่มือ ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu) และเจือจางให้ได้

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นในแต่ละตัวอย่างเท่ากัน คือ 100 ng/μL เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD และคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลัง

เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เพื่อเป็นตัวแทนของแต่ละพันธุ์ปลูกโดยการรวมดีเอ็นเอจาก 3 ตัวอย่างให้เป็น 1 ตัวอย่าง (bulked DNA) เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลังทั้ง 16 พันธุ์ปลูกด้วยเทคนิค high annealing temperature-RAPD (HAT-RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 50 สาย (NAPS Unit, University of British Columbia Biotechnology Laboratory) ด้วยเครื่อง thermal cycler (Eppendorf Mastercycler Gradient 5331) โดยแต่ละปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยสารต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 7 ng/μL DNA template 150 μM dNTP แต่ละชนิด 2 mM $MgCl_2$, 0.6 μM primer และ 0.4 U TopTaq DNA polymerase (QIAGEN) กำหนดขั้นตอนและอุณหภูมิในการทำ PCR ดังนี้ initial heating ที่ 94° เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 35 รอบของขั้น denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่ 48°C เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72°C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยขั้น final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 7 นาที ในการทำ HAT-RAPD นี้ มีการเพิ่มอุณหภูมิในขั้น annealing เพื่อลดการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ จากนั้นตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis (1.5% w/v) คัดเลือกแถบดีเอ็นเอ (PCR product) ที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูก เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอของแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ตามวิธีการในคู่มือ

4. การโคลน การสกัดพลาสมิด และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ

นำชิ้น PCR product (insert) ที่ทำให้บริสุทธิ์เชื่อมต่อกับพลาสมิด (plasmid: pGEM-T Easy Vector, Promega) โดยใช้เอนไซม์ T_4 DNA ligase เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (HIT-JM109 competent cell, RBC Bioscience) โดยวิธี heat shock จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยวิธี blue-white selection เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวนใน LB broth (เติม 100 μg/mL ampicillin) สกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis ซึ่งขั้นตอนและวิธีการต่างๆ ดัดแปลงจาก Green และ Sambrook [17] ตรวจสอบขนาดของชิ้น insert โดยการตัดด้วย *Eco*RI restriction enzyme ทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์ด้วย QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN) ตามวิธีการในคู่มือ นำพลาสมิดที่ได้ส่งเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ T7 และ SP6 (universal primer)

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับ SCAR

ตรวจสอบความถูกต้องและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากชิ้น insert (แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูก) โดยใช้โปรแกรม Chromas (http://www.technelysium.com.au/chromas.html) เทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) จากนั้นออกแบบคู่ไพรเมอร์สำหรับ SCAR (SCAR primer) โดยใช้โปรแกรม Primer3 [18]

6. การทดสอบไพรเมอร์สำหรับ SCAR กับตัวอย่างมันสำปะหลังที่ทราบพันธุ์ปลูก

ทดสอบไพรเมอร์สำหรับ SCAR ที่ได้กับตัวอย่างดีเอ็นเอของมันสำปะหลังทั้ง 16 พันธุ์ปลูก

ที่มาจากต้นอื่นๆ อีกพันธุ์ปลูกละ 5 ต้น เพื่อยืนยันความแม่นยำของไพรเมอร์สำหรับ SCAR แต่ละคู่ด้วย uniplex PCR โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วยสารที่มีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 4 ng/μL DNA template, 0.2 mM dNTP แต่ละชนิด, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.66 μM ของคู่ไพรเมอร์สำหรับ SCAR (forward และ reverse primer) และ 1.25 U HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN) กำหนดขั้นตอนและอุณหภูมิในการทำ PCR ดังนี้ initial heating ที่ 95°C เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 30 รอบของขั้น denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่ 56°C เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ตามด้วยขั้น final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 2 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis (1.5% w/v)

7. การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อตรวจสอบพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลัง

การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เริ่มจากการทดสอบสภาวะ (PCR condition) รวมทั้งส่วนประกอบ (PCR component) ที่เหมาะสมในการใช้ไพรเมอร์สำหรับ SCAR ที่ได้จำนวนหลายคู่พร้อมกันในหนึ่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มความรวดเร็วในการตรวจสอบพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังโดยส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยสารที่มีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 4 ng/μL DNA template, 0.2 mM dNTP แต่ละชนิด, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.8 μg/μL bovine serum albumin (BSA), ไพรเมอร์สำหรับ SCAR จำนวนหลายคู่ (forward และ reverse primer ที่ความเข้มข้น 0.66 μM สำหรับ PCR product ขนาดใหญ่ และ 0.22 μM สำหรับ PCR product ขนาดเล็ก) และ 1.25 U HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN) กำหนดขั้นตอนและอุณหภูมิในการทำ PCR ดังนี้ initial heating ที่ 95°C เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 30 รอบของขั้น denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่ 55°C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และ extension ที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ตามด้วยขั้น final extension ที่ 68°C เป็นเวลา 15 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis (1.5% w/v)

ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังที่ได้จากเทคนิค HAT-RAPD

การตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 16 พันธุ์ปลูกที่ได้จากเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 50 สาย พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 4 สายที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลัง ได้แก่ NAPS115, NAPS116, NAPS153 และ NAPS157 โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 459, 867, 450 และ 378 คู่เบส (bp) ตามลำดับ และมีเพียง NAPS116 และ NAPS157 เท่านั้นที่ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับมันสำปะหลังเพียง 1 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์ห้านาที และระยอง 60 ตามลำดับ จากตัวอย่างมันสำปะหลังทั้งหมด 16 พันธุ์ปลูก มีเพียง 3 พันธุ์ปลูก (ระยอง 2 ระยอง 7 และพิรุณ 1) ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 สายนี้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์แบบสุ่มที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลัง

RAPD primer	Sequence (5' -----> 3')	Actual length of amplicon (bp)	Presence of RAPD marker
NAPS115	TTCCGCGGGC	459	R3, R5, R9, R72, HB80
NAPS116	TACGATGACG	867	HA
NAPS153	GAGTCACGAG	450	R1, R5, R11, R90, R86-13, HB60, HB80, KU50, HA
NAPS157	CGTGGGCAGG	378	R60

2. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ SCAR

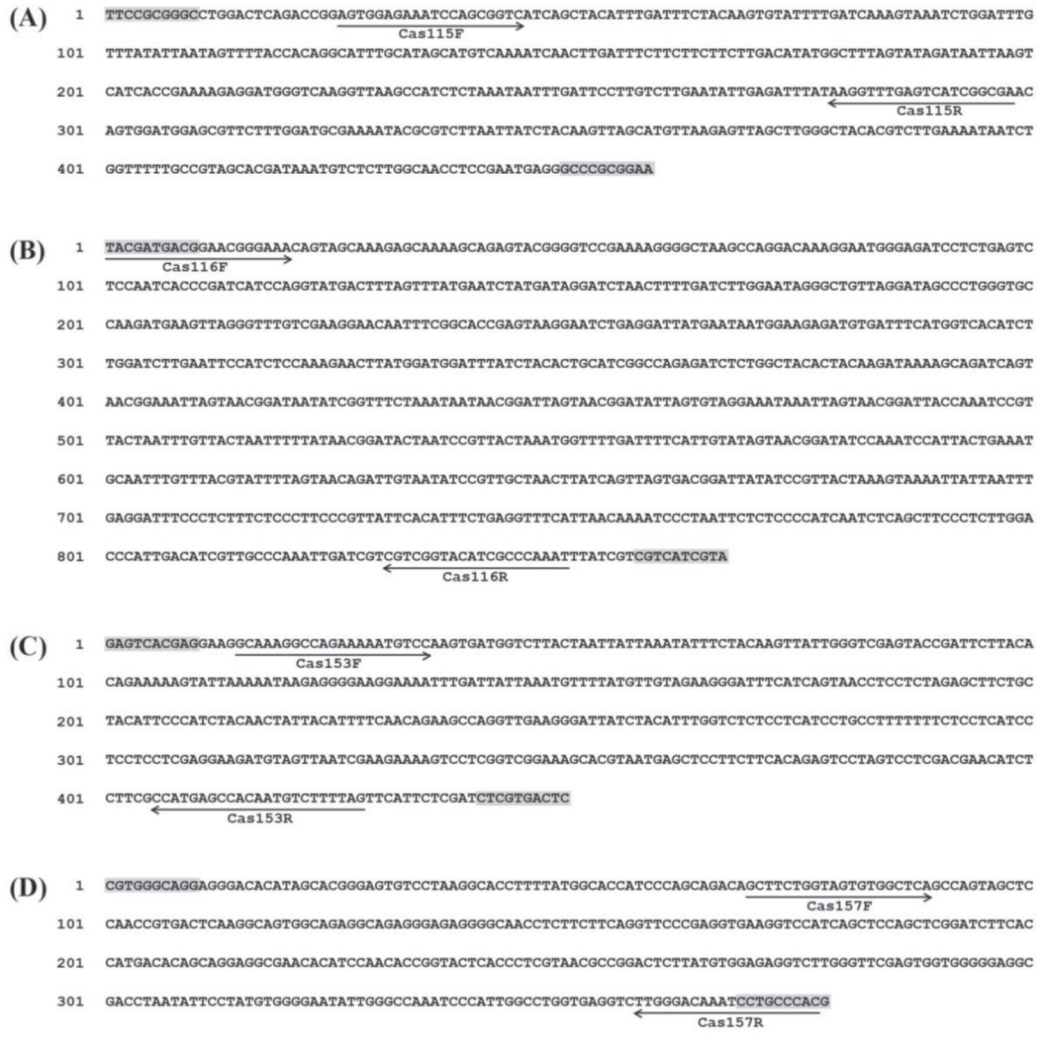
เมื่อเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น insert (แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูก) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีความเหมือน 89-94% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบในจีโนมของมันสำปะหลัง จากแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูกทั้ง 4 แถบ สามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับ SCAR ได้ทั้งหมด 4 คู่ ได้แก่ Cas115F-Cas115R, Cas116F-Cas116R, Cas153F-Cas153R และ Cas157F-Cas157R โดยตำแหน่งของไพรเมอร์แต่ละคู่แสดงในรูปที่ 1

3. การทดสอบไพรเมอร์สำหรับ SCAR กับตัวอย่างมันสำปะหลังที่ทราบพันธุ์ปลูก

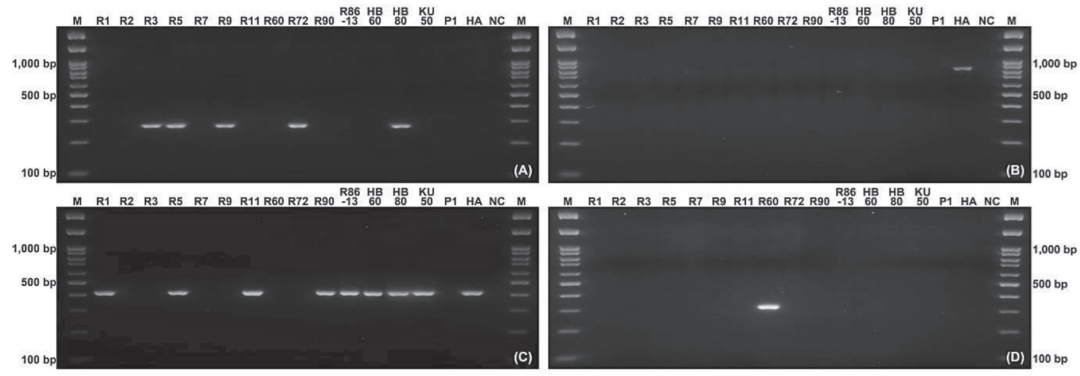
ทดสอบไพรเมอร์สำหรับ SCAR แต่ละคู่กับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่ทราบพันธุ์ปลูกทั้งหมด 80 ตัวอย่าง ด้วย uniplex PCR เพื่อวิเคราะห์ความแม่นยำของ SCAR marker โดยผลการทดลองพบว่าคู่ไพรเมอร์ Cas115F-Cas115R ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 273 คู่เบสในมันสำปะหลังพันธุ์ปลูกระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 9 ระยอง 72 และห้วยบง 80 คู่ไพรเมอร์ Cas116F-Cas116R ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 850 คู่เบสในมันสำปะหลังพันธุ์ปลูกห้านาทีเท่านั้น คู่ไพรเมอร์ Cas153F-Cas153R ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 414 คู่เบสในมันสำปะหลังพันธุ์ปลูกระยอง 1 ระยอง 5 ระยอง 11 ระยอง 90 ระยอง 86-13 ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 เกษตรศาสตร์ 50 และห้านาที และคู่ไพรเมอร์ Cas157F-Cas157R ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 308 คู่เบสในมันสำปะหลังพันธุ์ปลูกระยอง 60 เท่านั้น (รูปที่ 2) รายละเอียดลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ SCAR ขนาดของ SCAR marker และพันธุ์ปลูกที่สามารถตรวจสอบได้จาก SCAR marker แสดงในตารางที่ 3

4. การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อการตรวจสอบพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลัง

หลังจากทดสอบสภาวะและส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับการทำ multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ SCAR จำนวน 4 คู่พร้อมกันในหนึ่งปฏิกิริยา เพื่อเพิ่มความรวดเร็วในการตรวจสอบพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลัง พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เป็น SCAR marker สามารถใช้จำแนกพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังได้ ดังนี้ (1) ระบุอัตลักษณ์ของพันธุ์ปลูกระยอง 60 และห้านาที (2) ระบุกลุ่มที่พบเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาด 414 คู่เบส (ระยอง 1 ระยอง 11 ระยอง 90 ระยอง 86-13 ห้วยบง 60 และเกษตรศาสตร์ 50) (3) ระบุกลุ่มที่พบเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาด 273 คู่เบส (ระยอง 3 ระยอง 9 และระยอง 72) และ (4) ระบุกลุ่มที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 414 และ 273 คู่เบส (ระยอง 5 และห้วยบง 80) นอกจากนี้ยังพบกลุ่มที่ไม่มีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่เป็น SCAR marker (ระยอง 2 ระยอง 7 และพิรุณ 1) (รูปที่ 3)



รูปที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลัง แถบสีเทาแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แบบสุ่ม และลูกศรแสดงตำแหน่งและทิศทางของคู่ไพรเมอร์สำหรับ SCAR: (A) Cas115F-Cas115R, (B) Cas116F-Cas116R, (C) Cas153F-Cas153R, (D) Cas157F-Cas157R



รูปที่ 2 ตัวอย่างภาพเจลแสดงผลการทดสอบไพรเมอร์สำหรับ SCAR กับตัวอย่างมันสำปะหลังที่ทราบพันธุ์ปลูกด้วย uniplex PCR: (A) Cas115F-Cas115R, (B) Cas116F-Cas116R, (C) Cas153F-Cas153R, (D) Cas157F-Cas157R

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์สำหรับ SCAR และขนาดของ SCAR marker ที่พบในพันธุ์ปลูกต่างๆ ของมันสำปะหลัง

RAPD primer	SCAR primer	Sequence (5′------> 3′)	SCAR marker (bp)	Existence of SCAR marker
NAPS115	Cas115F	AGTGGAGAAATCCAGCGGTC	Cas115 (273)	R3, R5, R9, R72, HB80
	Cas115R	TCGCCGATGACTCAAACCTT		
NAPS116	Cas116F	TACGATGACGGAACGGGAAA	Cas116 (850)	HA
	Cas116R	ATTTGGGCGATGTACCGACG		
NAPS153	Cas153F	GCAAAGGCCAGAAAAATGTCC	Cas153 (414)	R1, R5, R11, R90, R86-13,
	Cas153R	CTAAAAGACATTGTGGCTCATGG		HB60, HB80, KU50, HA
NAPS157	Cas157F	GCTTCTGGTAGTGTGGCTCA	Cas157 (308)	R60
	Cas157R	GTGGGCAGGATTTGTCCCAA		

รูปที่ 3 การตรวจสอบพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังโดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ SCAR จำนวน 4 คู่พร้อมกันใน multiplex PCR

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันหลายหน่วยงานในประเทศไทยได้ปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้มีลักษณะตรงตามความต้องการของทั้งภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม เช่น มีความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช สามารถปรับตัวได้ดีกับทุกพื้นที่เพาะปลูก และให้เปอร์เซ็นต์แป้งในหัวมันสดสูง ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานหลักในการจัดตั้งธนาคารเชื้อพันธุ์มันสำปะหลัง โดยได้รวบรวมเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังจาก International Center for Tropical Agriculture (CIAT) ประเทศโคลัมเบีย และจากแหล่งอื่นๆ ตลอดจนรวบรวมพันธุ์ลูกผสมที่เกิดขึ้นในประเทศไทย การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์เหล่านี้มีประโยชน์สำหรับใช้เป็นแหล่งพ่อแม่พันธุ์เพื่อการพัฒนามันสำปะหลังพันธุ์ปลูกใหม่ๆ [19]

การจำแนกพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังจำเป็นต้องอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น สีและขนของยอดอ่อน สีของใบอ่อน สีของก้านใบ สีของลำต้น และลักษณะของหัว ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้อาจพบได้ในบางช่วงอายุของพืช และอาจมีความแปรปรวนเนื่องจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม [3] นอกจากนี้ยังอาจพบพันธุ์ปลูกประเภทเดียวกันแต่มีการตั้งชื่อแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ หรือการปรับเปลี่ยนชื่อพันธุ์ปลูกเพื่อการค้าทำให้ราคาท่อนพันธุ์สูงขึ้น ดังนั้นการจำแนกพันธุ์ปลูกจากลักษณะสัณฐานวิทยาจึงอาจมีความสับสน ต้องอาศัยทักษะและประสบการณ์ของผู้เชี่ยวชาญ ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมวิชาการเกษตร ร่วมกับสถาบันวิจัยพืชไร่ และศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จึงได้รวบรวมลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลังที่ได้รับการรับรองพันธุ์และนิยมปลูกในประเทศไทยจำนวน 12 พันธุ์ปลูก เพื่อจัดทำระบบในการช่วยจำแนกพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังผ่านทางเว็บไซต์ http://at.doa.go.th/cassvar/ [20]

การจำแนกพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังด้วยวิธีดั้งเดิมจากลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวนั้นอาจไม่เหมาะกับการใช้ในแหล่งเชื้อพันธุกรรมขนาดใหญ่ที่มีตัวอย่างจำนวนมาก การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อจำแนกพันธุ์ปลูกจะช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่าย อีกทั้งยังมีความสม่ำเสมอ ไม่แปรปรวนจากปัจจัยของสิ่งแวดล้อม และสามารถตรวจสอบได้จากทุกส่วนและทุกระยะการเจริญของพืชอีกด้วย [21-22] ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังไทยที่ได้จากแหล่งเชื้อพันธุกรรมในศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยได้ SCAR marker ที่มีความจำเพาะในการจำแนกพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลัง ดังนี้

SCAR marker Cas157 (308-bp marker) ใช้ระบุอัตลักษณ์ของพันธุ์ปลูกระยอง 60 ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง Mcol1684 และพันธุ์ปลูกระยอง 1 ข้อดีของพันธุ์ปลูกระยอง 60 คืออายุการเก็บเกี่ยวสั้น ให้ผลผลิตสูง แต่มีข้อด้อยคือ เปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ ในปี พ.ศ. 2561 มีรายงานพื้นที่ปลูกในประเทศไทยประมาณ 2 แสนไร่ นับเป็นอันดับ 5 รองจากพันธุ์ปลูกเกษตรศาสตร์ 50 ระยอง 5 ระยอง 90 และระยอง 72 (http:// www.oae.go.th/)

SCAR marker Cas116 (850-bp marker) ใช้ระบุอัตลักษณ์ของพันธุ์ปลูกห้านาที ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกพื้นเมืองที่พบมานานในประเทศไทย มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกต่ำ รสชาติดี เนื้อร่วนซุย เหมาะสำหรับการบริโภค นอกจากนี้ยังนิยมใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ให้แก่มันสำปะหลังพันธุ์หวานอีกด้วย ในปีงบประมาณ 2559 กระทรวงพาณิชย์ได้ริเริ่มโครงการแปรรูปมันสำปะหลังพันธุ์หวานสู่อุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับรายได้เกษตรกรชุมชน โดยมีเป้าหมายเพื่อผลักดันให้เกษตรกรเพิ่มการเพาะปลูกมันสำปะหลังพันธุ์หวาน เช่น ห้านาที พิรุณ 1 และพิรุณ 2 โดยในปัจจุบันพบผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากมันสำปะหลังพันธุ์ปลูกห้านาทีมากขึ้น (http://www.moc.go.th)

SCAR marker Cas153 ร่วมกับ Cas115 (414-bp marker และ 273-bp marker) ใช้ระบุกลุ่มพันธุ์ปลูกระยอง 5 และห้วยบง 80 โดยพันธุ์ปลูกระยอง 5 เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ 22-77-10 กับพันธุ์ปลูกระยอง 3 มีข้อดีคือให้ผลผลิตและเปอร์เซ็นต์แป้งสูง ปรับตัวได้ดีกับสภาพแวดล้อม แต่มีข้อด้อยคือค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคใบไหม้และเพลี้ยแป้ง ในปี พ.ศ. 2561 มีรายงานพื้นที่ปลูกในประเทศไทยจำนวน 2.8 ล้านไร่ และเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ถึง 4.97 ล้านตัน นับเป็นอันดับ 2 รองจากพันธุ์ปลูกเกษตรศาสตร์ 50 ส่วนพันธุ์ปลูกห้วยบง 80 ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับห้วยบง 60 เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ปลูกระยอง 5 และเกษตรศาสตร์ 50 มีเปอร์เซ็นต์แป้งสูงกว่าพันธุ์ปลูกเกษตรศาสตร์ 50 และห้วยบง 60 ผลผลิตหัวสดเหมาะสมในการใช้แปรรูปเป็นมันเส้น แป้งมันสำปะหลัง และใช้ผลิตเอทานอล [1]

ในการศึกษานี้ยังได้มีการพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อเพิ่มความรวดเร็วและลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ เมื่อทำการทดสอบสภาวะและส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับการทำ multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับ SCAR จำนวน 4 คู่พร้อมกันในหนึ่งปฏิกิริยา พบว่า SCAR marker Cas116 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ (850 bp) ที่มีความเข้มน้อยกว่าแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กอื่นๆ จึงทำการปรับส่วนประกอบของปฏิกิริยาโดยเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์ Cas116F และ Cas116R และลดความเข้มข้นของไพรเมอร์สำหรับ SCAR คู่อื่นๆ ส่งผลให้การเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบมีประสิทธิภาพมากขึ้น [23-24] นอกจากนี้ยังมีการเติม BSA เพื่อให้เข้าจับกับตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR (PCR inhibitor) ทำให้เอนไซม์ DNA polymerase ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ [25-26] และทำการปรับสภาวะของ multiplex PCR โดยการลดอุณหภูมิในขั้น final extension จาก 72°C เหลือ 68°C และเพิ่มเวลาจาก 2 นาที เป็น 15 นาที เพื่อให้การต่อสายนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น [23]

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาต่อยอดมาจากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD ของมันสำปะหลังไทยจำนวน 19 พันธุ์ปลูก ประกอบด้วยพันธุ์ปลูกที่ได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตร พันธุ์ปลูกพื้นเมือง และพันธุ์ปลูกเศรษฐกิจที่นิยมโดยเกษตรกร โดยพบว่ามันสำปะหลังเหล่านี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง [27] เมื่อเปรียบเทียบกับมันสำปะหลังจากแหล่งเชื้อพันธุกรรมของต่างประเทศ [28-31] ถึงแม้ว่าการจำแนกพันธุ์ปลูกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCAR marker ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพันธุ์ปลูกซึ่งอยู่ภายใต้ชนิดเดียวกัน *(M. esculenta)* การศึกษาครั้งนี้สามารถจำแนกมันสำปะหลังบางพันธุ์ปลูกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิค SCAR เพื่อให้สามารถระบุพันธุ์ปลูกของมันสำปะหลังที่รับรองพันธุ์แล้วได้อย่างครบถ้วนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2561 และขอขอบคุณนางจิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข อดีตผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สำหรับตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Thai Tapioca Development Institute. (2017). Wonders of tapioca. Bangkok. Amarin Printing and Publishing Public Co., Ltd. p. 203.
2. Zayed, E. M., Shams, A. S., & Kamel, A. S. (2013). Genetic diversity in introduced cassava using inter simple sequence repeat markers (ISSRs). *Geneconserve, 12*(47), 23-33.
3. Fukuda, W. M. G, Guevara, C. L., Kawuki, R., & Ferguson, M. E. (2010). Selected morphological and agronomic descriptors for the characterization of cassava. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria. p. 19.
4. Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports, 27,* 617-631.
5. Li, X. Q., Haroon, M., Coleman, S. E., Sullivan, A., Singh, M., Ward, L., De Boer, S. H., Zhang, T., & Donnelly, D. J. (2008). A simplified procedure for verifying and identifying potato cultivars using multiplex PCR. *Canadian Journal of Plant Science, 88,* 583-592.
6. Moon, B. C., Choo, B. K., Cheon, M. S., Yoon, T., Ji, Y., Kim, B. B., Lee, A. Y., & Kim, H. K. (2010). Rapid molecular authentication of three medicinal plant species, *Cynanchum wilfordii, Cynanchum auriculatum,* and *Polygonum multiflorum* (*Fallopia multiflorum*), by the development of RAPD-derived SCAR markers and multiplex-PCR. *Plant Biotechnology Reports, 4*(1), 1-7.
7. Wu, X., Li, H., Zhao, W., Fu, L., Peng, H., He, L., Cheng, J., Wei, H., & Wu, Q. (2010). SCAR makers and multiplex PCR-based rapid molecular typing of *Lentinula edodes* strains. *Current Microbiology, 61*(5), 381-389.
8. Korir, N. K., Han, J., Shangguan, L. F., Wang, C., Kayesh, E., Zhang, Y. Y., & Fang, J. G. (2012). Plant variety and cultivar identification: Advances and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology, 33,* 111-125.
9. Moon, B. C., Ji, Y., Lee, Y. M., Kang, Y. M., & Kim, H. K. (2015). Authentication of *Akebia quinata* Dencnc. from its common adulterant medicinal plant species based on the RAPD-derived SCAR markers and multiplex-PCR. *Genes & Genomics, 37*(1), 23-32.
10. Lee, J. W., Kim, Y. C., Jo, I. H., Seo, A. Y., Lee, J. H., Kim, O. T., Hyun, D. Y., Cha, S. W., Bang, K. H., & Cho, J. H. (2011). Development of an ISSR-derived SCAR marker in Korean ginseng cultivars (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Journal of Ginseng Research, 35*(1), 52-59.
11. Riaz, S., Sadia, B., Awan, F. S., Khan, I. A., Sadaqat, H. A., & Khan, I. A. (2012). Development of a species-specific sequence-characterized amplified region marker for roses. *Genetics and Molecular Research, 11*(1), 440-447.

12. Chaudhary, A. A., Yadav, D., Hemant, Jamil, S. S. & Asif, M. (2012). Real time sequence characterized amplified region (RT-SCAR) marker: Development and its application for authentication and quantification of *Catharanthus roseus* L. Don. *Journal of Medicinal Plants Research, 6*(32), 4748-4754.
13. Cheng, J., Long, Y., Khan, Md. A., Wei, C., Fu, S., & Fu, J. (2015). Development and significance of RAPD-SCAR markers for the identification of *Litchi chinensis* Sonn. by improved RAPD amplification and molecular cloning. *Electronic Journal of Biotechnology, 18*(1), 35-39.
14. Rangsiruji, A., Binchai, S., & Pringsulaka, O. (2018). Species identification of economic bamboos in the genus *Dendrocalamus* using SCAR and multiplex PCR. Songklanakarin *Journal of Science and Technology, 40*(3), 640-647.
15. Wallinger, C., Juen, A., Staudacher, K., Schallhart, N., Mitterrutzner, E., Steiner, E.-M., Thalinger, B., & Traugott, M. (2012). Rapid plant identification using species- and group-specific primers targeting chloroplast DNA. *PLoS ONE, 7*(1), e29473.
16. Koh, J. C. O., Barbulescu, D. M., Norton, S., Redden, B., Salisbury, P. A., Kaur, S., Cogan, N., & Slater, A. T. (2017). A multiplex PCR for rapid identification of *Brassica* species in the triangle of U. *Plant Methods, 13,* 49.
17. Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). Molecular cloning: A laboratory manual, 4th ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
18. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research, 40*(15), e115.
19. Narangajavana, J. (2010). Biotechnology for cassava genetic improvement. *Thai Journal of Genetics, 3*(2), 95-105. (in Thai)
20. Sasiprapa, W., Pothong, N., Werawut, T., & Hansethasuk, J. (2010). Cassava cultivar identification information system. *Thai Agricultural Research Journal, 28*(2), 201-214. (in Thai)
21. Cooke, R. J. (1999). New approaches to potato variety identification. *Potato Research, 42,* 529-539.
22. Nováková, A., Šimáčková, K., Bárta, J., & Čurn, V. (2009). Potato variety identification by molecular markers based on retrotransposon analyses. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 45*(1), 1-10.
23. Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques, 23*(3), 504-511.

24. Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: Balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution, 3,* 898-905.
25. Farell, E. M., & Alexandre, G. (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Research Notes, 5,* 257.
26. Zhang, Y., Li, X., Zou, R., Xue, Y., Lou, X., & He, M. (2014). Bovine thrombin enhances the efficiency and specificity of polymerase chain reaction. *BioTechniques, 57*(6), 289-294.
27. Rangsiruji, A., Pringsulaka, O., & Binchai, S. (2019). HAT-RAPD fingerprinting analysis of Thai cassava germplasm and economic cultivars of farmers' preferences. *Srinakharinwirot Science Journal, 35*(1), 59-74. (in Thai)
28. 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 Crop Science Journal, 5*(3), 219-228.
29. 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.
30. Colombo, C., Second, G., & Charrier, A. (2000). Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology, 23*(1), 189-199.
31. Asante, I. K., & Offei, S. K. (2003). RAPD-based genetic diversity study of fifty cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes. *Euphytica, 131,* 113-119.