การพัฒนามันสำปะหลังอะมิโลสสูงโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล *GBSSI* ในการคัดเลือกพ่อแม่และลูกผสม

Development High Amylose Cassava by Using Molecular Marker *GBSSI* for Parents Selection and Hybrid Breeding

รุ่งรวี บุญทั่ง[1] สุวลักษณ์ ศันสนีย์[1] ภานุวัฒน์ มูลจันทะ[1] ศิริลักษณ์ ล้านแก้ว[1] นราชัย โพธิ์สาร[1] และธนาวดี ค้ำชู[1]

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

บทนำ

อะมิโลสเป็นองค์ประกอบหนึ่งของแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมแป้งดัดแปร (modified starch) การพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังให้มีปริมาณอะมิโลสสูงจะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของแป้งมันสำปะหลัง มีรายงานว่า แป้งที่มีอะมิโลสสูงสามารถทนต่อการย่อยได้ดี หรือที่เรียกว่าแป้งต้านทานการย่อย (resistant starch) ซึ่งทนต่อการย่อยของเอนไซม์ไฮโดรไลซิส (enzymatic hydrolysis) (Birt *et al*., 2013) ดังนั้น แป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณอะมิโลสสูงจึงเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมอาหารที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพ (Zhang *et al*., 2017) ซึ่งยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์อะมิโลส ได้แก่ Granule Bound Starch Synthase (*GBSS*), (Zhou *et al*., 2019) จึงสามารถใช้ *GBSS* มาช่วยในการคัดเลือกมันสำปะหลังที่มีปริมาณอะมิโลสสูงได้

วัตถุประสงค์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกพ่อแม่และลูกผสมมันสำปะหลังที่มีปริมาณอะมิโลสสูง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล *GBSSI* มาช่วยตัดสินใจและเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือก

ระเบียบวิธีวิจัย

<u>การตรวจสอบจีโนไทป์ที่ตำแหน่งยีน *GBSSI* และการประเมินปริมาณอะมิโลสในพ่อแม่มันสำปะหลัง</u>

1) ปลูกมันสำปะหลังจำนวน 55 พันธุ์/สายพันธุ์ จากธนาคารเชื้อพันธุกรรมของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง เก็บตัวอย่างใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามกรรมวิธีของ Doyle and Doyle (1987)

2) ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย SNAP พัฒนาโดย Aiemnaka *et al*. (2012) (Table 1) สำหรับตรวจสอบยีน *GBSSI* โดยมีพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU50) และ ห้วยบง 80 (HB80) เป็นชุดควบคุมผลลบสำหรับการตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ของการสร้างอะมิโลส

3) วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสในแป้งของพ่อแม่มันสำปะหลังที่อายุประมาณ 12 เดือนด้วยการย้อมสีด้วยไอโอดีน และตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแป้งมันสำปะหลัง เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อประเมินปริมาณอะมิโลส โดยใชสเปกโตรโฟโตมิเตอรที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรตามกรรมวิธีของ Juliano (1971) และ Tappiban *et al*. (2020)

<u>การตรวจสอบจีโนไทป์ที่ตำแหน่งยีน *GBSSI* ในลูกผสมอะมิโลสสูง</u>

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของลูกผสมเมื่อมีอายุได้ประมาณ 3 เดือน เพื่อสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB และใช้เครื่องหมาย SNAP เพื่อตรวจสอบยีน *GBSSI* แบบเดียวกับขั้นตอนการตรวจสอบจีโนไทป์ในพ่อแม่มันสำปะหลัง

<u>การวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

- วิเคราะห์ความถี่ของจีโนไทป์ (genotype frequency) อ้างอิงตามทฤษฎีของ Hardy-Weinberg จากสมการ

ความถี่จีโนไทป์ = จำนวนจีโนไทป์ที่ต้องการที่มีอยู่ในประชากรนั้น/จำนวนประชากรทั้งหมด

<u>สถานที่ดำเนินการทดลอง</u>

ดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองปี 2565/2566

Table 1 F2-RN and F4-RN primer pairs specific to the C/G single nucleotide polymorphism of the granule-bound starch synthase I (*GBSSI*) gene.

Allele	Forward Primer	Nucleotides no. (bp)	Product size (bp)
C	F2: [GC]ATGTTGAAGTAAGTAAAGATGC	24	474
	RN: TGCTCAAGGCGTGGGAACGT	20	
G	F4: [GC]ATGTTGAAGTAAGTAAAGATGG	24	474
	RN: TGCTCAAGGCGTGGGAACGT	20	

Table 2 DNA purity (Optical Density; OD) and concentration (ng/µl) of cassava parents and high amylose hybrids.

Parents		Hybrids	
OD 260/280	DNA concentration (ng/ml)	OD 260/280	DNA concentration (ng/µl)
1.9-2.1	698.5-6,162.8	1.2-2.3	8.1-2,690.0

Table 3 Genotypic analysis for amylose trait of parents and hybrids.

Parents				Hybrids			
Geno type	Plant No.	Genotype frequency	Allele frequency	Geno type	Plant No.	Genotype frequency	Allele frequency
WxWx	51	0.93	0.95	*WxWx*	103	0.46	0.72
Wxwx	3	0.05		*Wxwx*	116	0.52	
wxwx	1	0.02	0.05	*wxwx*	5	0.02	0.28
Total	55	1	1	Total	224	1	1

ผลการวิจัย

<u>ลักษณะทางจีโนไทป์ที่ตำแหน่งยีน *GBSSI* ของพ่อแม่มันสำปะหลัง</u>

ผลการวิจัยพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าอัตราส่วน OD 260/280 ระหว่าง 1.9-2.1 มีความเข้มข้นระหว่าง 698.5-6,162.8 ng/µl (Table 2) วิเคราะห์ลักษณะการสร้างอะมิโลสที่ตำแหน่งของยีน *GBSSI* พบว่า พ่อแม่มันสำปะหลังจำนวน 55 พันธุ์/สายพันธุ์ สามารถแบ่งได้เป็นต้นที่มีจีโนไทป์ *WxWx* จำนวน 51 ตัวอย่าง *Wxwx* จำนวน 3 ตัวอย่าง และ *wxwx* จำนวน 1 ตัวอย่าง (Table 3) เมื่อพิจารณาความถี่ของจีโนไทป์ *WxWx Wxwx* และ *wxwx* พบว่า มีความถี่ 0.93 0.05 และ 0.02 ตามลำดับ (Table 3) วิเคราะห์ความถี่ของอัลลีล พบว่า อัลลีน *Wx* มีความถี่ 0.95 และอัลลีล *wx* มีความถี่ 0.05 (Table 3) จึงคัดเลือกพ่อแม่มันสำปะหลังที่มีจีโนไทป์ *WxWx* และ *Wxwx* จำนวน 54 พันธุ์/สายพันธุ์ นำมาผสมดอกและได้ลูกผสมอะมิโลสสูงที่ย้ายลงแปลงทดลองได้จำนวน 224 ต้น สำหรับปริมาณอะมิโลสของพ่อแม่มันสำปะหลัง พบว่า มีปริมาณอะมิโลสระหว่าง 24.1%-31.0% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 28.0% โดยพันธุ์ SM1541-32 มีปริมาณอะมิโลสในหัวสดสูงสุดเท่ากับ 31.0% มีจีโนไทป์แบบ *WxWx* (Figure 1)

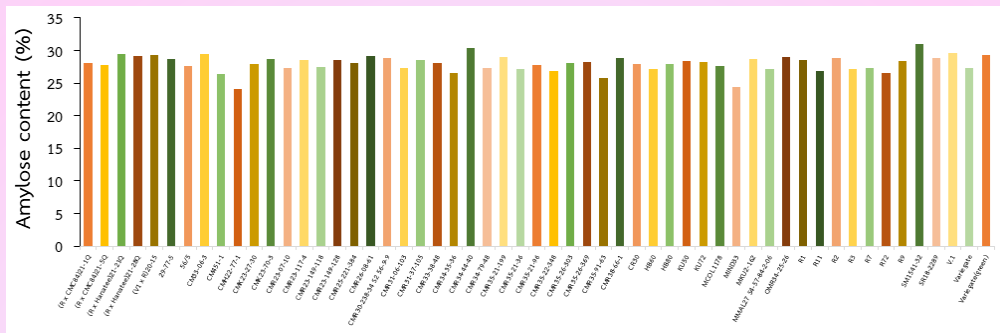

Figure 1 Amylose content (%) at 12 months of cassava parents.

<u>ลักษณะทางจีโนไทป์ที่ตำแหน่งยีน *GBSSI* ของลูกผสมที่มีอะมิโลสสูง</u>

ดีเอ็นเอของลูกผสมจำนวน 224 ต้นมีค่าอัตราส่วน OD 260/280 ระหว่าง 1.2-2.3 มีความเข้มข้นระหว่าง 8.1-2,690.0 ng/µl (Table 2) พิจารณาลักษณะจีโนไทป์ของการสร้างอะมิโลส พบว่า ลูกผสมมีจีโนไทป์ *WxWx* จำนวน 103 ต้น จีโนไทป์ *Wxwx* จำนวน 116 ต้น และจีโนไทป์ *wxwx* จำนวน 5 ต้น (Table 3) วิเคราะห์ความถี่ของจีโนไทป์ พบว่า *WxWx Wxwx* และ *wxwx* มีความถี่ของจีโนไทป์ 0.46 0.52 และ 0.02 ตามลำดับ (Table 3) อัลลีล *Wx* มีความถี่ 0.72 และอัลลีล *wx* มีความถี่ 0.28 (Table 3) จึงได้คัดเลือกลูกผสมจำนวนทั้งหมด 59 สายพันธุ์ โดยการพิจารณาจากลักษณะทางฟีโนไทป์ คือ ลำต้นแข็งแรง ไม่พบโรคและแมลงเข้าทำลาย ให้ผลผลิตต่อต้นดีและหัวไม่ฉ่ำน้ำ ร่วมกับการพิจารณาลักษณะทางจีโนไทป์ โดยลูกผสมที่คัดเลือกมีจีโนไทป์แบบ *WxWx* จำนวน 29 สายพันธุ์ และ *Wxwx* จำนวน 30 สายพันธุ์ (Figure 2) ซึ่งลูกผสมอะมิโลสสูงจำนวน 59 สายพันธุ์นี้ จะนำมาประเมินสายพันธุ์ตามขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังต่อไป

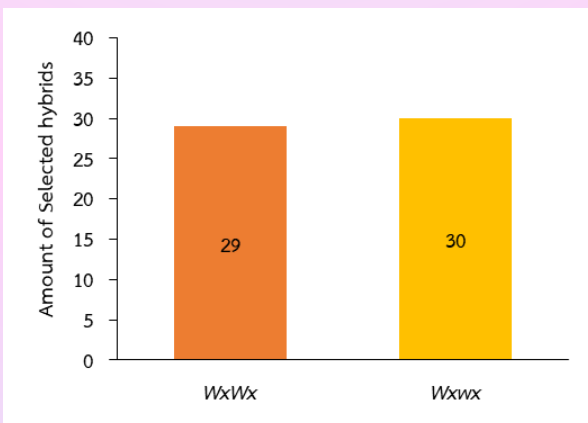

Figure 2 Genotype for amylose trait of selected high amylose cassava hybrids.

Reference

Aiemnaka, P., A. Wongkaew, J. Chanthaworn, S.K. Nagashima, S. Boonma, J. Authapun, S. Jenweerawat, P. Kongsila, P. Kittipadakul, S.Nakasathien, and T. Sreewongchai. 2012. Molecular characterization of a spontaneous waxy starch mutation in cassava. Crop Science. 52(5): 2121-2130.

Birt, D.F., T. Boylston, S. Hendrich, J. Jane, J. Hollis, L. Li, J. McClelland, S. Moore, G.J. Phillips, and M. Rowling. 2013. Resistant starch: Promise for improving human health. Advances in Nutrition. 4: 587-601.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. Phytochemical Bulletin. 19: 11-15.

Juliano, B. O. 1971. A simplified assay for milled-rice amylose. Cereal Science Today. 12: 334-360.

Tappiban, P., S. Sraphet, N. Srisawad , P. Wu, H. Han, D. Smith, J. Bao, and K. Triwitayakorn. 2020. Effects of cassava variety and growth location on starch fine structure and physicochemical properties. Food Hydrocolloids. 108: 106074.

Zhang, P., Q. Ma, M. Naconsie, X. Wu, W. Zhou, and J. Yang. 2017. Advances in genetic modification of cassava. pp. 1-20. *In* C. Hershey. ed. Achieving Sustainable Cultivation of Cassava Volume 2, Genetics, Breeding, Pests and Diseases. Burleigh Dodds Science Publishing. Cambridge. UK. 322 p.

Zhou, W., S. Zhao, S. He, Q. Ma, X. Lu, X. Hao, H. Wang, J. Yang, and P. Zhang. 2019. Production of very-high-amylose cassava by post-transcriptional silencing of branching enzyme genes. Journal of Integrative Plant Biology. 62: 832-846.