

## รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : ชุดโครงการวิจัยและพัฒนาข้าวโพดฝักสด
2. โครงการวิจัย : 34. โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต
- กิจกรรม : 1. การพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว/ข้าวโพดเทียน
- กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : ระบุชื่อกิจกรรมย่อยตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : 1.7 การคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Selection of waxy corn by molecular markers

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางสาวศุภิรัตน์ สวงนรังศิริกุล<sup>1</sup>

ผู้ร่วมงาน นายกิตติภพ วายุภาพ<sup>2</sup>

นายธีรวุฒิ วงศ์วัฒน์<sup>1</sup>

นางสาววรรณมน มงคล

นายสุบิน ศรีวิชัย<sup>3</sup>

นางสาวปาริฉัตร หงส์ประภาส<sup>3</sup>

## 5. บทคัดย่อ

การสร้างแป้ง อะไมโลสและอะไมโลเพคตินในพืชเกิดได้จากการทำงานของเอ็นไซม์ 4 กลุ่ม ได้แก่ ADPglucose pyrophosphorylases (AGPase), starch synthases (SS), starch branching enzymes (SBE) และ starch debranching enzymes (SDBE) ความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ดังกล่าว รวมทั้งโปรตีนที่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์เหล่านี้ จะมีผลต่อคุณภาพแป้งภายในเมล็ด แต่เนื่องจากการตรวจคุณภาพข้าวโพดข้าวเหนียวที่ใช้กันใช้วิธีการชิมซึ่งมีความผิดพลาดสูง การพัฒนาวิธีการตรวจจำแนกความแตกต่างของคุณภาพความเหนียวของแป้ง ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล จะทำให้การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ผลการศึกษาลำดับเบสของยีนทั้ง 8 ยีนในตัวอย่าง 18 พันธุ์ ดังกล่าวข้างต้นพบว่าทุกยีนในมีความแตกต่างกันภายในกลุ่มตัวอย่าง โดยยีนที่สามารถแยกตัวอย่างอ้างอิงที่มีความเหนียวมากที่สุดและน้อยที่สุดจากกันได้มีจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *SIP-1*, *aeIIb* (SBEIIb), *Sh2-1* (AGPase) และ *Wx* (GBSS) ส่วนยีนอื่น ได้แก่ *Bt3*, *SSIIb*, *zSSIIa*, *SBE3* และ *Dull* ไม่สามารถแยกตัวอย่างอ้างอิงได้ ส่วนยีน *Isoamylase* หรือ *starch debranching enzyme* (*SU1*) และ *Isoamylase-type starch debranching enzyme* (*iso2*) ไม่พบความแปรปรวน

ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ตรวจสอบ การศึกษาดำเนินการแปรปรวน (SNPs) ทำการศึกษาใน 3 ยีน ได้แก่ *SIP-1*, *Sh2-1* และ GBSS พบว่า HRM profile ของยีน *SIP-1* แยกกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่ม มีค่า Tm เท่ากับ 81.76°C, 81.48°C และ 81.70°C คู่กับ 81.11°C ตามลำดับ ภายในกลุ่มที่ 2 มีตัวอย่างอ้างอิงที่มีความเหนียวมากที่สุดรวมอยู่ด้วย และกลุ่มที่ 3 มีตัวอย่างอ้างอิงที่มีความเหนียวน้อยรวมอยู่ด้วย HRM profile ของยีน *Sh-2* แบ่งกลุ่มได้ไม่ชัดเจน ส่วน HRM profile ของยีน **GBSS** แม้จะแบ่งกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม แต่กลุ่มที่ 2 และ 3 ซึ่งมีตัวอย่างอ้างอิงรวมอยู่ด้วยนั้น มีกราฟซ้อนทับกันอยู่ ทำให้แยกได้ไม่ชัดเจน การนำมาใช้ประโยชน์อาจต้องใช้ทั้ง *SIP-1* และ **GBSS** ในการคัดเลือก จากการทดลองนี้พบว่า การสำรวจตำแหน่ง SNPs ในยีนเป้าหมายและการพัฒนาเทคนิค HRM ในการตรวจตำแหน่ง SNPs ของยีนนั้น มีศักยภาพในการนำมาใช้คัดเลือกคุณภาพด้านความเหนียวของแป้งในข้าวโพดข้าวเหนียวได้ แต่ในการทดลองนี้ขาดข้อมูลด้านคุณภาพของแป้งในตัวอย่างที่ทดสอบ ทำให้การพัฒนาเทคนิค HRM ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร

#### ABSTRACT

The biosynthesis of starch, amylose and amylopectin in plant involve 4 enzymes including ADPglucose pyrophosphorylases (AGPase), starch synthases (SS), starch branching enzymes (SBE) and starch debranching enzymes (SDBE). Abnormality of the encoding genes and relevant proteins affect starch quantity. To date, the best practical qualitative determination of starch quantity of waxy maize is based on tasting which prone to erroneous cause by personal preference. The development of new and accurate quantitation technique for waxy starch stickiness based on molecular technique will enhance waxy maize breeding program.

Partial gene sequencing studies of the 8 genes from 18 accessions revealed distinctiveness in all samples tested. The genes that separated reference samples with highest and lowest starch stickiness, determined by physical approaches, were including *SIP-1*, *aeIIb* (SBEIIb), *Sh2-1* (AGPase) and *Wx* (GBSS). Reference samples were not separable by *Bt3*, *SSIIb*, *zSSIIa*, *SBE3* and *Dull*. However, no variation was found in the sequences of *Isoamylase* or *starch de-branching enzyme (SU1)* and *Isoamylase-type starch debranching enzyme (iso2)*. High resolution melting (HRM) profile studied by single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the 3 genes including *SIP-1*, *Sh2-1* and GBSS revealed 3 sample groupings generated by *SIP-1* profile with Tm values at 81.76°C; 81.48°C; and 81.70°C coupled with 81.11°C, respectively. Reference samples with highest and lowest starch stickiness laid in second and third groups. HRM profile of *Sh-2* showed ambiguous grouping. The GBSS profile though showing 3 groupings but melting curves of group 2 and 3 with reference samples were not clearly separated. The application of these SNP markers for starch quantitation may involve both *SIP-1* and **GBSS**. In conclusion, the study on SNPs

of the target genes and the application of HRM technique exposed their utilization potentials on starch quantity differentiation in waxy maize. However, the physical starch quantity was not sufficient in this study that cause imprecise results on the development of the new markers.

---

<sup>1</sup>ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น <sup>2</sup>ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท <sup>3</sup>คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## 6. คำนำ

ข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn) เป็นข้าวโพดฝักสดพื้นบ้านของประเทศไทย ที่ได้รับความนิยมบริโภคมากชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีความเหนียวนุ่ม และมีรสหวานเล็กน้อย ขนาดฝักพอเหมาะ จัดเป็นพืชที่มีศักยภาพสูง เพราะปลูกง่าย ใช้ระยะเวลาการผลิตสั้น มีความเสี่ยงต่ำ ใช้สารเคมีน้อย เหมาะสมสำหรับเกษตรกรในชนบท โดยเฉพาะในเขตที่มีน้ำ ในพื้นที่ไร่และในเขตชลประทานเหมาะสมสำหรับเป็นพืชเสริมรายได้ มีอายุเก็บเกี่ยวสั้น (55-70 วัน) และปลูกได้ตลอดทั้งปี ข้าวโพดข้าวเหนียวส่วนใหญ่ปลูกเพื่อการบริโภคฝักสดภายในประเทศเท่านั้น มีปลูกทั่วไปทุกภาคของประเทศ ทำรายได้ให้แก่เกษตรกร 10,000 – 20,000 บาทต่อไร่ต่อปี คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1,000 ล้านบาทต่อปี ทั้งนี้การผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด พันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวในอดีต ตัวอย่างเช่น พันธุ์แปดแถว พันธุ์ข้าวเหนียวสาธิตเจี๊หลี่ ข้าวเหนียวสาธิตอีสาน พันธุ์ดักหงาย-ท่าลี่ ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่ได้มาจากผสมเปิดที่เกษตรกรมักเก็บพันธุ์ไว้ปลูกเองหรือซื้อมาจากพ่อค้าในท้องถิ่น ปัจจุบันพบว่ามีพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวเกิดขึ้นในตลาดเมล็ดพันธุ์มากมายมีทั้งพันธุ์ผสมเปิด เช่น พันธุ์รัชตะ สาธิตเจี๊หลี่ ข้าวเหนียวแปดแถว และพันธุ์ลูกผสมของบริษัทเอกชน เช่น พันธุ์เวกซ์ 22 หรือ พันธุ์ Dr. Pek และบิ๊กไวท์ 852 เป็นต้น ปัจจุบันเกษตรกรนิยมปลูกพันธุ์ลูกผสม เนื่องจากให้ผลผลิตฝักสดสูง มีขนาดฝักสม่ำเสมอ รสชาติดี มีความเหนียวนุ่ม ซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาดมากกว่า แต่เมล็ดพันธุ์ลูกผสมเหล่านี้มักมีราคาแพง ประมาณ 450-600 บาทต่อกิโลกรัม ขึ้นอยู่กับความต้องการของเกษตรกร (กิตติภพ, 2548) อย่างไรก็ตามพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่เกษตรกรใช้อยู่ นั้น บางพันธุ์ให้ผลผลิตต่ำและคุณภาพไม่เป็นไปตามความต้องการของตลาดหรือโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ขนาดของฝักไม่ได้มาตรฐาน และฝักไม่สม่ำเสมอ ขนาดพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและคุณภาพสูง ดังนั้นยังต้องมีการพัฒนาพันธุ์ลูกผสมใหม่ๆ ที่มีคุณภาพที่ดีกว่าพันธุ์ที่มีอยู่ในปัจจุบันเพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ปลูกเป็นการค้าได้ ในราคาที่ถูกลง การคัดเลือกลูกผสมนับเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในงานปรับปรุงพันธุ์พืชที่ต้องใช้แรงงาน พื้นที่ ระยะเวลา และงบประมาณในการทดสอบ วิธีการคัดเลือกที่ดีควรมีมาตรฐาน มีวิธีการที่ให้ผลแม่นยำ ทำซ้ำได้ สามารถเปรียบเทียบและแลกเปลี่ยนข้อมูลระหว่างกันได้ หากเป็นวิธีการที่สามารถทดสอบหลายตัวอย่างได้ในเวลาเดียวกัน จะทำให้ดำเนินการได้รวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้หากเป็นวิธีการที่สามารถคัดเลือกได้ในขณะที่พืชยังเป็นต้นอ่อนอยู่นั้น จะทำให้งานปรับปรุงพันธุ์นั้นๆ มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว ขั้นตอนการคัดเลือกลูกผสมนับเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีปัญหาดังกล่าว การคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวเน้นที่คุณภาพการบริโภค ซึ่งมีความ

แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ขึ้นกับ องค์ประกอบที่สำคัญ คือ ระดับความเหนียวนุ่มของแป้งและปริมาณ น้ำตาลที่สะสมในเอนโดสเปิร์ม และความนุ่มและความเหนียวของเปลือกหุ้มเมล็ด ที่มีความบางของ เปลือกหุ้มเมล็ดเป็นส่วนสำคัญซึ่งเป็นชั้นเนื้อเยื่อที่อยู่ชั้นนอกสุดของเมล็ดข้าวโพด (Culpepper and Magoon, 1927; วิเชียร, 2538) การคัดเลือกลูกผสมนี้ในปัจจุบันยังคงใช้วิธีการชิม ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความ ผิดพลาดได้ง่าย และไม่เป็นมาตรฐาน เพราะขึ้นอยู่กับความชำนาญและความชอบของผู้ทดสอบซึ่งแตกต่างกันไป จึงทำให้ผลที่ได้มีความแปรปรวนสูง ส่งผลต่อคุณภาพของพันธุ์ที่คัดเลือกได้ และความสม่ำเสมอ นอกจากนี้การคัดเลือกด้วยวิธีการนี้ยังมีความจำกัดเนื่องจากผู้ชิมสามารถทดสอบได้เพียง 20-30 ตัวอย่างต่อ วันเท่านั้น ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ได้มาตรฐาน สามารถนำมาใช้คัดเลือกพันธุ์ในปริมาณมากได้ อย่างแม่นยำ จึงเป็นสิ่งจำเป็นซึ่งจะทำให้การพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ข้าวโพดข้าวเหนียวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays ceratina* เมล็ดมีลักษณะเหมือนขี้ผึ้ง แป้งของ ข้าวโพดชนิดนี้จะเป็นแป้งชนิดอะไมโลเพคตินทั้งหมด ในขณะที่แป้งข้าวโพดชนิดอื่นจะมีอะไมโลเพคติน ประมาณ 72-78% และมีอะไมโลสประมาณ 22-28% ความเหนียวของแป้งในเมล็ดของข้าวโพดข้าวเหนียว เกิดจากการกลายของยีนแว็กซ์ (waxy gene) ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 9 ตำแหน่งที่ 56 โดยเกิดการ เปลี่ยนแปลงจากยีน *wx* ไปเป็นยีนแฝง *wx* มีผลทำให้มีปริมาณอะไมโลเพคติน (amylopectin) ซึ่งเป็น แป้งที่มีโมเลกุลใหญ่และมีกิ่งก้านของโมเลกุลมาก เกิดแทนที่อะไมโลส (amylose) ในเอนโดสเปิร์ม (endosperm) และละอองเกสร (Coe et al., 1988) โดยมีสัดส่วนปริมาณอะไมโลเพคตินต่อปริมาณอะไมโลส โดยประมาณเท่ากับร้อยละ 10 ระดับความเหนียวของแป้งนั้นมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับพันธุ์ ตัวอย่างเช่น พันธุ์สำลีซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองมีความเหนียวมากกว่าพันธุ์ข้าวเหนียวฟิลิปปินส์ (Philippines glutinous corn) ซึ่งเป็นพันธุ์นำเข้าที่มีความร่วนมากกว่า แต่มีความต้านทานโรคสูง ดังนั้นระดับความเหนียว (มาก-น้อย) จึง น่าจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติและโครงสร้างของอะไมโลเพคตินในเมล็ด เช่น จำนวนกิ่งก้านสาขา การจัดเรียง ตัว และความยาวของสาขาในอะไมโลเพคติน มากกว่าปริมาณของอะไมโลเพคติน เนื่องจากคุณสมบัติ ดังกล่าวถูกควบคุมด้วยการทำงานของยีนที่ควบคุมขบวนการสร้างแป้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนของ starch branching enzyme (Denyer et al. 1995, Craig, et al., 1998, Yao, et al., 2004) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจ ว่าการทำงานของยีนในกลุ่มนี้จะสัมพันธ์กับระดับความเหนียวในข้าวโพดข้าวเหนียวหรือไม่ และสามารถ นำมาพัฒนาเป็นเป็นวิธีการในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีความมาตรฐาน แม่นยำ ได้หรือไม่

จากการศึกษาของ สุจริตน์ (2552) ได้มีการนำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) มาใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ สร้างแป้ง ได้แก่ ยีน *ADPGase* *GBSS* และ *SBE* และการสร้างไซยาไนด์ ได้แก่ *CYP79D1* *CYP79D2* และ *Linamarase* ในมันสำปะหลัง ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน *ADPGase* ในใบอ่อนของต้นอายุ 1-2 เดือน และ *GBSS* และ *SBE* ในใบอ่อนของต้นอายุ 2 เดือน มีความสัมพันธ์กับปริมาณแป้งในหัวมัน สำปะหลังในต้นอายุ 12 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ( $R^2 = 0.827-0.680$ ) และการแสดงออกของยีน *CYP79D1* ใน ใบอ่อนของต้นอายุ 1 เดือน มีความสัมพันธ์กับปริมาณไซยาไนด์ในหัวมันสำปะหลังในต้นอายุ 12 เดือน

อย่างมีนัยสำคัญ ( $R^2 = 0.873$ ) สามารถนำมาใช้เป็นวิธีการในการคัดเลือกต้นอ่อนมันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้งและโปรตีนสูงหรือต่ำได้โดยไม่ต้องคัดกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการอย่างง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากซับซ้อน ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่สามารถจะนำมาใช้ในการศึกษาการศึกษาในที่ควบคุมคุณภาพความเหนียวของแป้งในข้าวโพดข้าวเหนียวสำหรับงานวิจัยที่นำเสนอนี้ได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับเบสของยีนและพัฒนาวิธีการตรวจความแตกต่างความเหนียวของพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเทคนิค High Resolution Melting (HRM) สำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาวิธีการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีความแม่นยำ และมีมาตรฐานในงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว

## 7. วิธีดำเนินการ

พืชที่ใช้ในการทดลอง :

ชุดที่ 1 ข้าวโพดข้าวเหนียว 27 สายพันธุ์ ๆ ละ 5 ต้น ปลูกที่ สวร.ชก. ในปี 2554 ดังนี้

- |                                     |                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. ลำลึทบัทกฤษ (ต้นเขียว) -14-4-9-B | 2. ลำลึทบัทกฤษ (ต้นเขียว)-16-1-11-B |
| 3. ลำลึทบัทกฤษ (ต้นเขียว)-17-2-12-1 | 4. ลำลึทบัทกฤษ (ต้นเขียว)-20-2-15-B |
| 5. ลำลึทบัทกฤษ (ต้นเขียว)-12-3-7-1  | 6. ลำลึทบัทกฤษ (ต้นเขียว)-4-1-50-B  |
| 7. ลำลึทบัทกฤษ (ต้นเขียว)-10-2-5-B  | 8. ลำลึทบัทกฤษ (ต้นเขียว)-11-1-6-1  |
| 9. ลำลึทบัทกฤษ (ต้นเขียว)-11-2-6-2  | 10. ลำลึทบัทกฤษ (ต้นเขียว)-12-1-7-B |
| 11. ตาโก้+แปดแฉว (S)-1-38-B         | 12. ตาโก้+แปดแฉว (S)-B-50-1         |
| 13. ตาโก้+แปดแฉว (S)-B-50-B         | 14. ตาโก้+แปดแฉว (S)-B              |
| 15. ตาโก้+แปดแฉว -B                 | 16. ข้าวเหนียวจีน -1-19             |
| 17. ข้าวเหนียวจีน -2-21             | 18. ข้าวเหนียวจีน -1-22             |
| 19. ข้าวเหนียวจีน -4-23             | 20. ข้าวเหนียวจีน -3-24             |
| 21. ข้าวเหนียวจีน -2-25             | 22. ข้าวเหนียวจีน -3-26             |
| 23. ข้าวเหนียวจีน -1-27             | 24. ข้าวเหนียวจีน -1-31             |
| 25. ข้าวเหนียวจีน -4-32             | 26. M80                             |
| 27. F4305                           |                                     |

ชุดที่ 2 ประกอบด้วย เมล็ดลูกผสมระหว่าง F4305 และ M80 รุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 2 รับจาก สวร. ชัยนาท

ชุดที่ 3 ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทได้มีการปลูกข้าวโพดข้าวเหนียวเพื่อผลิตฝักสำหรับการวิเคราะห์คุณภาพแป้งในระหว่างเดือน ธันวาคม 2555 ถึง กุมภาพันธ์ 2556 และมีการส่งเมล็ดพันธุ์มายังศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ประกอบด้วยเมล็ด 29 สายพันธุ์ ดังนี้

1. สำลึท้บถฤษ-8-1-B-22-1-B-B-B
2. สำลึท้บถฤษ-36-1-B-2-111-1-48-B-1-B
3. สำลึท้บถฤษ-2-B-2-42-B-B-B
4. สำลึท้บถฤษ (ตั้นเจ็ยว)-16-1-11-B-B
5. สำลึท้บถฤษ (ตั้นเจ็ยว)-17-2-12-1-B-B
6. สำลึท้บถฤษ (ตั้นเจ็ยว)-4-1-50-B-1-B
7. สำลึท้บถฤษ (ตั้นเจ็ยว)-10-2-5-B-B-B
8. สำลึท้บถฤษ (ตั้นเจ็ยว)-11-1-6-1-B-B
9. สำลึท้บถฤษ (ตั้นเจ็ยว)-11-2-6-1-B-B
10. CNK-61-3-B-B-9-B-B-B
11. CNK-53-3-B-28-B-B-B
12. CNK-26-3-1-3-B-B-B
13. CNK-61-3-B-B-9-B-1-B
14. CNW09-17-B-B-B
15. CNW09-21-B-B-B
16. CNW09-16-B-B-B
17. M80-1
18. LB50
19. F4305
20. WALB-2-B-B-B
21. WALB-2-8-B-B-B
22. LBWX 09-50-1-B-B-B
23. LBWX 09-50-1-B-3-1-B
24. EWS 4780-6-B-B-B
25. WPB-80-5-1-1-53-B-1-B
26. ตาโก้ 8 แถว-B-50-1-B-B
27. ตาโก้ 8 แถว-1-38-B-B-B
28. KP-34-B-1-B-B
29. นางลาย-B

ได้ทำการปลูกเมล็ดพันธุ์ชุดที่ 3 ในถาดหลุม พันธุ์ละ 5 ต้น และเมื่อต้นอายุได้ 1 เดือน ทำการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อรอการวิเคราะห์ลำดับเบส

#### การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแป้ง

##### 1. การตรวจหายีนและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแป้ง

ในการศึกษาลำดับเบสของยีนที่ควบคุมคุณภาพในแป้งข้าวโพด คือ starch branching enzyme interaction protein-1 (SIP-1), starch branching enzyme IIb (aeIIb), ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit (Brittle-2; Bt2), ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit (shrunken2; SH2), starch synthase isoform zSSII-2 (zSSIIb), starch branching enzyme 2a (IIa), starch branching enzyme III (SBE3), granule-bound starch synthase (GBSS) โดยทำการศึกษาใน 18 พันธุ์ ได้แก่

- |                            |                           |                       |
|----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1. M80-1                   | 2. F4305                  | 3. LB50               |
| 4. CNW09-17-B-B            | 5. ST-8-1-B-22-B-B        | 6. ST(g) 4-1-50-B-1-B |
| 7. CNK(S) 61-3-B-B-9-B-B-B | 8. WALB) 2-B-B-B          | 9. LBWX09)-50-1-B-B-B |
| 10. EWS4780-6-B-B-B        | 11. WPB)80-5-1-1-53-B-1-B | 12. KP8)-1-38-B-B     |
| 13. KP8)-1-38-B-B          | 14. NGL)-B                | 15. KP)34-B-1-B       |
| 16. ชัยนาท84-1             | 17. ST(g)-16-1-11-B-B     | 18. TK8)-B-50-1-B-B   |

มีรหัสชื่อพันธุ์ดังนี้

No.	Pedigree		
1	ST)-8-1-B-22-1-B-B-B	ลำลึที่บักถุช)-8-1-B-22-1-B-B-B	12D-17H
2	ST)-36-1-B-2-111-1-48-B-1-B	ลำลึที่บักถุช)-36-1-B-2-111-1-48-B-1-B	12D-17H
3	ST)-2-B-2-42-B-B-B	ลำลึที่บักถุช)-2-B-2-42-B-B-B	12D-17H
4	ST(g))-16-1-11-B-B	ลำลึที่บักถุช(ตึ้นเชียว))-16-1-11-B-B	B1-12D-17I-45
5	ST(g))-17-2-12-1-B-B	ลำลึที่บักถุช(ตึ้นเชียว))-17-2-12-1-B-B	B1-12D-17I-18
6	ST(g))-4-1-50-B-1-B	ลำลึที่บักถุช(ตึ้นเชียว))-4-1-50-B-1-B	B1-12D-17I-7
7	ST(g))-10-2-5-B-B-B	ลำลึที่บักถุช(ตึ้นเชียว))-10-2-5-B-B-B	B1-12D-17I-13
8	ST(g))-11-1-6-1-B-B	ลำลึที่บักถุช(ตึ้นเชียว))-11-1-6-1-B-B	B1-12D-17I-14
9	ST(g))-11-2-6-1-B-B	ลำลึที่บักถุช(ตึ้นเชียว))-11-2-6-1-B-B	B1-12D-17I-15
10	CNK)-61-3-B-B-9-B-B-B	CNK)-61-3-B-B-9-B-B-B	12D-17H
11	CNK)-53-3-B-28-B-B-B	CNK)-53-3-B-28-B-B-B	12D-17H
12	CNK)-26-3-1-3-B-B-B	CNK)-26-3-1-3-B-B-B	12D-17H
13	CNK)-61-3-B-B-9-B-1-B	CNK)-61-3-B-B-9-B-1-B	12D-17H
14	CNW09)-17-B-B-B	CNW09)-17-B-B-B	12D-17H
15	CNW09)-21-B-B-B	CNW09)-21-B-B-B	12D-17H
16	CNW09)-16-B-B-B	CNW09)-16-B-B-B	12D-17H
17	M80)-1	M80)-1	12D-17H
18	LB50	LB50	12D-17H
19	F4305	F4305	12D-17H
20	WALB)-2-B-B-B	WALB)-2-B-B-B	12D-17H
21	WALB)-2-8-B-B-B	WALB)-2-8-B-B-B	12D-17H
22	LBWX09)-50-1-B-B-B	LBWX09)-50-1-B-B-B	12D-17H
23	LBWX09)-50-1-B-3-1-B	LBWX09)-50-1-B-3-1-B	12D-17H
24	EWS4780)-6-B-B-B	EWS4780)-6-B-B-B	12D-17H
25	WPB)-80-5-1-1-53-B-1-B	WPB)-80-5-1-1-53-B-1-B	12D-17H
26	TK8)-B-50-1-B-B	ตาโก้ 8 แถว)-B-50-1-B-B	B1-12D-17I-43
27	TK8)-1-38-B-B-B	ตาโก้ 8 แถว)-1-38-B-B-B	B4-12D-17I-44
28	KP)-34-B-1-B-B	KP)-34-B-1-B-B	12D-17H
29	NGL)-B	นางลาย)-B	12D-17H

2. การสกัดดีเอ็นเอ : สกัดดีเอ็นเอจากใบอ้อยโดยดัดแปลงวิธีของ Li and Midmore (1999) เริ่มด้วยบดตัวอย่างใบ 0.2 กรัมใน extraction buffer 800 ul ในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 มล. นำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที พลิกหลอดไปมาทุก 10 นาที นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 10 นาที คือด่วนใส่ใส่หลอดใหม่แล้วเติม Chloroform : Isoamyl (24 : 1) 500 ul ผสมให้เข้ากัน นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 10 นาที คือด่วนใส่ใส่หลอดใหม่แล้วเติม Isopropanol 500 ul พลิกไปมาเบาๆ จนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอ นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วยการเติม 95% ethanol 500 ul คีดีให้ตะกอนลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที เติม 95% ethanol 500 ul อีกครั้งหนึ่ง ตากตะกอนให้แห้ง เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 180 ul รอให้ตะกอนละลาย เติม 5M NaCl 20 ul และ 95% ethanol 200 ul พลิกไปมาจนกระทั่งเห็นสายตะกอนดีเอ็นเอ นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม 70% ethanol 500 ul คีดีตะกอนให้ลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที ทำซ้ำ ตากตะกอนจนแห้ง เติม TE buffer ที่มี RNase A 40 ul

**3. การตรวจยีน :** ทำปฏิกิริยา PCR โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ดังนี้ 1x PCR buffer (Fermentas), 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 uM forward และ reverse primers, DNA template 20ng, Taq polymerase 1 unit และ น้ำกลั่น มีสถานะการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR profile แบบ gradient temperature ดังนี้

94 °C	5 นาที	1 รอบ
94 °C	1 นาที	} 35 รอบ
50/52/55/60/62/65 °C	2 นาที	
72 °C	2 นาที	
72 °C	7 นาที	1 รอบ
25 °C		

ตรวจผลด้วย Electrophoresis วิธี electrophoresis โดยใช้ DNA 20 µl ผสม loading dye 4 µl ไปวิเคราะห์ใน 1.5% agarose gel ที่ 100 v. นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที ย้อมด้วยสารเรืองแสง (SYBR green)

**4. การตรวจการแสดงออกของยีน :** เก็บตัวอย่างใบข้าวโพดที่ระยะเวลา 45 60 และ 75 วันมาทำการสกัด RNA ด้วยชุดสกัด SV Total RNA Isolation System (Promega) นำ RNA ที่สกัดได้มาเตรียม cDNA โดยใช้ชุดน้ำยาเอนไซม์ Revert transcriptase PCR (RevertAid™ Reverse Transcriptase) นำ cDNA ที่ได้มาทำ PCR ตามสถานะที่ทดสอบมาแล้วในขั้นต้น โดยใช้ primer 26 คู่ และยีน GAPDH เป็นยีนตรวจสอบทดสอบปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ MgCl<sub>2</sub> (mM) เป็น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 mM

**5. การศึกษาลำดับเบสและการจัดกลุ่ม :** เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ สกัดชิ้นดีเอ็นเอจากเจลโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป (RBC Bioscience, Taiwan) ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส (Firstbase, Malaysia) เทียบผลกับฐานข้อมูลใน NCBI จัดเรียงข้อมูลด้วยโปรแกรม Clustal X v 2.0.11 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic) ด้วยโปรแกรม MEGA v 5.0 และจัดกลุ่มด้วยวิธี Neighbor Joining.



6. การออกแบบเครื่องหมาย SNPs: ออกแบบไพรเมอร์จาก granule-bound starch synthesis I (GBSSI) นำมาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 20  $\mu$ l มีองค์ประกอบดังนี้ น้ำกลั่น, 1X PCR buffer, Syto9 0.9  $\mu$ l, 1 mM dNTP, 0.5  $\mu$ M Primer 1, 0.5  $\mu$ M Primer 2, DNA template 100 ng, Taq DNA polymerase 1.5 unit ใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 95 °C 4 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 °C / 20 วินาที และ 72°C / 30 วินาที จำนวน 55 รอบ ตามด้วย 95 °C / 1 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 40 °C เพื่อรอวิเคราะห์ต่อจากนั้น ผลผลิต PCR ถูกนำไปให้ร้อนจาก 70-90 °C ด้วยอัตราการเพิ่ม 1°C ต่อวินาที พร้อมกับการตรวจวัดโดย fluorescence จากนั้นวิเคราะห์ผล melting curve ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ตรวจสอบความแตกต่างของยีนโดยวิธี HRM (High resolution melting analysis conditions) ซึ่งเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของยีนที่ความต่างกันเพียง 1 คู่เบสได้ โดยดูจากจำนวนรอบและอุณหภูมิ ของการเพิ่มจำนวนสาย DNA ของเครื่อง Real-time PCR แสดงผลเป็นกราฟ

### 7. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และการวิเคราะห์ HRM

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แต่ละปฏิกิริยามีปริมาตรสุทธิ 15  $\mu$ l มีความเข้มข้นสุดท้ายของส่วนผสมดังนี้ 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, USA), 0.34  $\mu$ M Primer และ 20 ng/ $\mu$ l สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ และ 3.34  $\mu$ M Syto9 dye แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Perkin Elmer PE 9700 Thermo Cycler, USA) มีขั้นตอนดังนี้ Pre-denaturing 94 °C นาน 5 นาที, denaturing 94 °C นาน 40 วินาที, annealing 52 °C นาน 40 วินาที, extension 72 °C นาน 1 นาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 35 รอบ) และ final extension 72 °C นาน 7 นาที นำผลผลิต PCR มาตรวจสอบมาวิเคราะห์ค่า melting temperature; T<sub>m</sub> ที่ติดตั้งอยู่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-time PCR, Roche, Germany) มีขั้นตอนดังนี้ initial-denaturing 94 °C นาน 5 นาที, denaturing 94 °C นาน 30 วินาที, annealing 64 °C นาน 30 วินาที, extension 72 °C นาน 40 วินาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 40 รอบ) จากนั้นทำการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 65 °C ถึง 95 °C โดยเพิ่ม 0.03 °C/ วินาที เมื่อสิ้นสุดให้ลดอุณหภูมิลงที่ 40 °C นาน 30 วินาที วิเคราะห์ melting peak ด้วยโปรแกรม T<sub>m</sub> calling และสร้าง Normalized melting curves โดยโปรแกรม Gene Scanning 1.5.0 (Roche Diagnostics, Germany)

**Table 1 :** Primers used to amplify starch synthesis genes and their sequences.

Name	Sequences	gene
SbeII-For	AGG CAT GCC GGT CCT TTG CC	starch branching enzyme III (SBE3)
SbeII-Rev	CAG GTG CGG GGC GGA GAA AG	
Ila2-For	TGC CCA AAG CGA CTA GAG TT	starch branching enzyme 2a (Ila)
Ila2-Rev	GGC TGG TTA TGC AAG GAA AA	
SIP12-For	GGA GCA GAA CTC GAA GAT GG	starch branching enzyme interaction protein-1 (SIP-1)

SIP12-Rev	GAG CTA CGT ATC GCA CAC GA		
zSSIIb1-For	GAT GGA GCG GCG TCG GTA CG	starch synthase isoform zSSII-2 (zSSIIb)	
zSSIIb1-Rev	CGC CGC ATC TGT AGC CGG AG		
aeII-for	TTT CAT GGC CCT CGA TAG AC	starch branching enzyme IIb (aeIIb)	
aeII-rev	GGA TCC TGC TAA ATC CAC CA		
Sh21-for	CAA GGG AAA TTT ACT GTA TTT T	ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit (shrunken2; Sh2-1)	
Sh21-rev	GAT ATC GTA GCA ATG ATT TGT G		
Bt23-for	ACG CGT TGC TCA TCT TGA TG	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit (Brittle-2; Bt2)	
Bt23-rev	ACC CAC AAC TAC AAC ACT GAC ACC		
ISA1-For	CCC TGA GCG CGG ACA GTA CTA	starch de-branching enzyme (SU1)	
ISA1-Rev	GGT CAA GCT TTG ACA CAG CAC C		
ISA2-For	CCG CTT CCG AAC CGA CGA C	Isoamylase-type starch debranching enzyme (iso2)	
ISA2-Rev	GTG TGT CCG TA TCT CCG CTC CC		
GBSS1-f01	TCT AGG ATT GTC ACA CGC CTT G	granule-bound starch synthase (GBSS)	
GBSS1-r01	GCC TCG GTA TTT CTA GCG CG		
GBSS1-f02	AGA CGA CAA GCC AAG GCG AG		
GBSS1-r02	GGA CGA AAC TCA AGG ACA GGA TC		
GBSS1-f03	GCC AGT GAA GGG GGA GAA GTG		
GBSS1-r03	CGA AGA AGA CGC GAT CCA ACG		
GBSS1-f04	CAT GAA CGT CGT CTT CGT CG		
GBSS1-r04	GCA GCT GGT TGT CCC TGT AGT C		
GBSS1-f05	CCA CCC CAT TGT AAG CAG TTA C		
GBSS1-r05	CCT GGT AGG AGA TGT TGT GG AT		
GBSS1-f06	GCC GTC TTC GTT CTC CAT GC		
GBSS1-r06	CTT CAC GGC GAT GTA CTT GTC C		
GBSS1-f07	CGA TGG ATA ATG CTG CAG GG		
GBSS1-r07	GTG TGG TCG GTC GAT CGA TC		
GBSS1-f08	GAG GAG ATG GTG AGG AAC TGC		
GBSS1-r08	CAC AAA CGT AGG ATT CAG AGA GAG		
Du01-f	GAT AGC AGC AGA CAC CGT GA		Du endosperm (Du)
Du01-r	TGT TCA TGC AAT CCA GTG GT		
Du02-f	CCA ACC GGT GGT AGA TTA CG		
Du02-r	TCC ATC ATG AGT CCC AAC AG		
Du03-f	TCC ATA GAT GGT TTC CCT AAA CA		
Du03-r	AAG TCC ATT CTG TAT GCC TGC T		

Du04-f	TAT CAGC TGT GGC CAA TGA G	
Du04-r	CAT ACC ATC TGC AAA CCA CC	

**Table 2 : Primer sequences for SNPs detection in 3 genes involved in starch biosynthesis using HRM.**

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	ยีน	ตำแหน่งแปรปรวน
SIP-for	CTG TTC CCC GTG CTG CAG C	starch branching enzyme interaction protein-1 (SIP-1)	450
SIP-rev	GGG CTG TGG GAA TAT GCA TGC		
Sh2-F	GTG GTT TCA CTG CGT TCA GG	ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit (shrunken2; Sh2-1)	152 และ 178
Sh2-R	GAC CTT AGA GTT GCT GCA TGA TT		
GBSS-F2	CCG GAA CAT CCC GCT GGT	granule-bound starch synthase (GBSS)	445-446
GBSS-R2	<b>AGC TCA TGG AGA TGG TGG AGG A</b>		

เวลาและสถานที่ : เริ่มต้น 2557 สิ้นสุด 2558 สถานที่ดำเนินการทดลอง : ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

### การตรวจหาฮีนและการแสดงออกของฮีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแป้ง

การสร้างแป้ง อะไมโลสและอะไมโลเพคตินในพืชเกิดได้จากการทำงานของเอ็นไซม์ 4 กลุ่ม ได้แก่ ADPglucose pyrophosphorylases (AGPase), starch synthases (SS), starch branching enzymes (SBE) และ starch debranching enzymes (SDBE) โดยมีการทำงานดังนี้

1. AGPglucose pyrophosphorylases (AGPase) เป็นเอ็นไซม์สำคัญในขั้นตอนแรกที่ควบคุมการสร้างแป้ง เมื่อเกิดความผิดปกติของเอ็นไซม์นี้พบว่าปริมาณแป้งในเมล็ดจะต่ำลง ยีนที่มีรายงานเกี่ยวข้องกัเอ็นไซม์นี้ได้แก่ *shrunken2 (sh2)* และ *brittle2 (bt2)* สร้าง adenylate translocator AGPase ทั้ง large และ small subunits

2. Starch synthase enzymes (SS) มีหน้าที่ต่อสาย  $\alpha$ -glucan ให้ยาวขึ้นในพืชพบจำนวน 5 subfamilies ได้แก่ granule-bound starch synthase (GBSS), starch synthase I, II, III และ IV สำหรับ GBSS มีความสำคัญต่อการสร้างอะไมโลส ส่วน SSI-IV ทำหน้าที่ในการต่อสายอะไมโลเพคติน ยีนที่เกี่ยวข้องกัเอ็นไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ *waxy gene (wx)* และ *dull1 (du1)*

3. Starch-branching enzymes (SBEs) มีหน้าที่ตัดสาย  $\alpha$  (1-4) glycoside bond และนำไปเชื่อมที่ตำแหน่ง  $\alpha$  (1-6) glycoside bond ซึ่งมีผลต่อโครงสร้างอะไมโลเพคติน และเม็ดแป้ง ในข้าวโพดมี 2 isoforms ได้แก่ SBEI และ II โดย SBEI มีความสามารถในการจับกับอะไมโลส ส่วน SBEII นั้นมีสามารถ

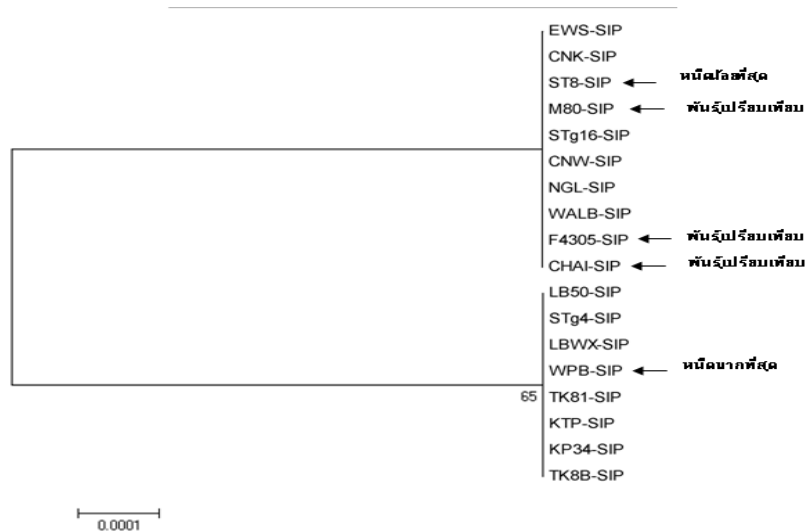
จับกับอะไมโลเพคตินทั้งการสร้างและการจัดเรียงตัวของโครงสร้างอะไมโลเพคติน SBEII พบได้ 2 forms คือ SBEIIa และ SBEIIb การทำงานของเอ็นไซม์นี้ถูกควบคุมโดย regulatory protein กลุ่ม Phosphoprotein ยีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ amylose extender (ae) ที่สร้าง SBEIIb และ *du1* ที่ควบคุมทั้ง SS และ SBEIIa ส่วนโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ starch branching enzyme interaction protein-1 (SIP-1)

4. starch debranching enzymes (SDBE) ทำหน้าที่ทำหน้าที่สลายแป้งโดยตัดกิ่งตำแหน่ง  $\alpha$ -1,6 มีการจำแนกออกเป็น 2 class คือ pullulanase-type DBE (หรือ R-enzyme หรือ limit-dextrinase) และ isoamylase-type DBE ซึ่งมีอยู่อย่างน้อย 3 isoform ในข้าวโพด ยีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Zpu1* ควบคุมการสร้าง R-enzyme และ *sugary1 (su1)* สร้าง SDBE SU1 กลุ่ม isoamylase type

ความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ดังกล่าว รวมทั้งโปรตีนที่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์เหล่านี้ จะมีผลต่อคุณภาพแป้งภายในเมล็ด

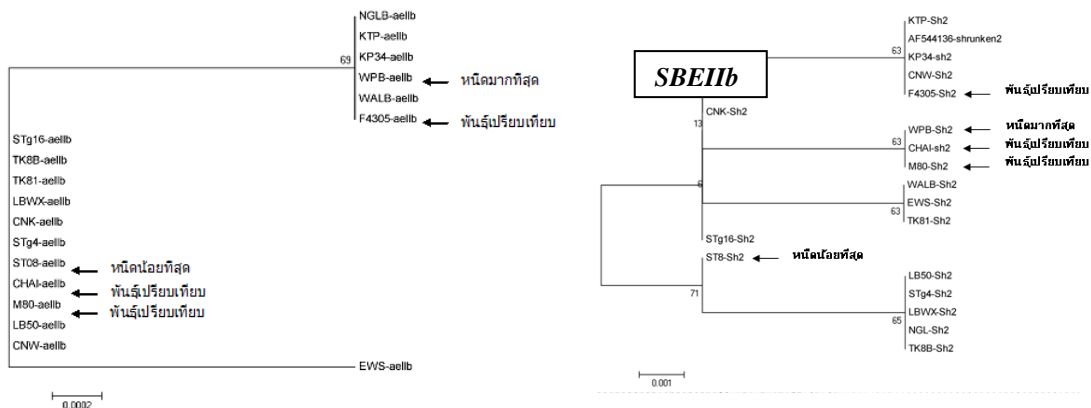
เนื่องจากการตรวจคุณภาพข้าวโพดข้าวเหนียวที่ใช้กันใช้วิธีการชิมซึ่งมีความผิดพลาดสูง ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีศึกษาการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมทางความหนืดของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว ด้วยเครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว (Rapid Visco Analyzer: RVA) (ดำเนินการที่คณะอุตสาหกรรม การเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) โดยคัดเลือกตัวแทนจากกลุ่มพันธุ์ ได้แก่ สำลีทับกฤช, สำลีทับกฤช (ต้นเขียว), CNW09, WPB, และ ตาโก 8 แถว ซึ่งพบว่าพันธุ์ WPB-80-5-1-1-53-B-1-B มีค่าความหนืดดีที่สุดในขณะที่พันธุ์ที่มีความหนืดต่ำ ได้แก่ สำลีทับกฤช-8-1-B-22-1-B-B-B และ CNW09-21-B-B-B ดังนั้นจึงใช้พันธุ์เหล่านี้เป็นตัวเปรียบเทียบในการศึกษายีน

ผลการศึกษาลำดับเบสของยีนทั้ง 8 ยีนในตัวอย่าง 18 พันธุ์ ดังกล่าวข้างต้นพบว่าทุกยีนในมีความแตกต่างกันภายในกลุ่มตัวอย่าง โดยยีนที่สามารถแยกกลุ่มสองตัวอย่างนี้จากกันได้จำนวน 4 ยีน ได้แก่ *SIP-1*, *aeIIb* (SBEIIb), *Sh2-1* (AGPase) และ *Wx* (GBSS) โดยยีนแต่ละยีนมีตำแหน่ง SNPs จำนวนต่างๆ กัน สำหรับ *SIP-1* ขนาดของชิ้นยีนที่ศึกษา 757-770 bp สามารถแยกตัวอย่างที่ทดสอบได้เป็น 2 กลุ่มโดยมีตัวอย่างควบคุมอยู่แยกกลุ่มกันชัดเจน (ภาพที่ 1) และมีตำแหน่งที่มีความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์จำนวน 14 ตำแหน่ง จึงเหมาะสมที่จะนำมาทดสอบการแยกกลุ่มด้วยเทคนิค HRM



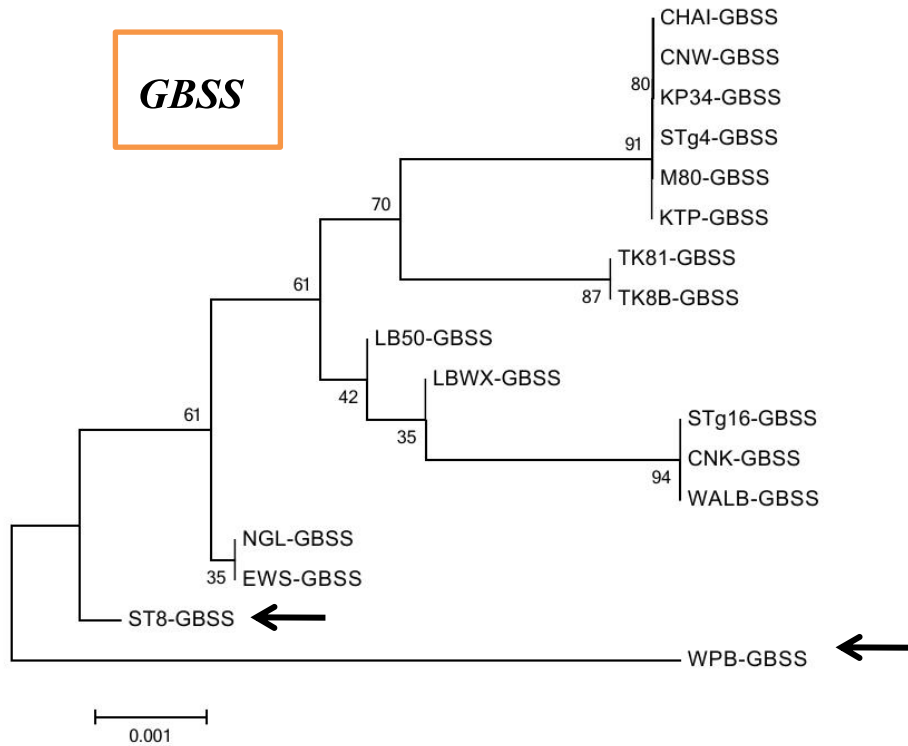
**Figure 1.** Clustering of starch branching enzyme interaction protein-1 (SIP-1) gene (770 bp) based on sequence differentiation of 18 waxy maize accessions. Arrow : reference samples with highest and lowest starch stickiness properties.

ส่วน *aeIIb* (SBEIIb) และ *Sh2-1* (AGPase) นั้นมีการแยกเป็นกลุ่มย่อยอีก ทำให้หาจุดสำหรับ SNP ได้ยาก แต่พันธุ์ WPB ที่มีความเหนียวมากที่สุด แยกกลุ่มกับ ST8 ที่เหนียวน้อยที่สุด (ภาพที่ 2)



**Figure 2.** Clustering of *SBEIIb* and *Sh2-1* genes based on sequence difference of 18 waxy maize accessions. Arrow : reference samples with highest and lowest starch stickiness.

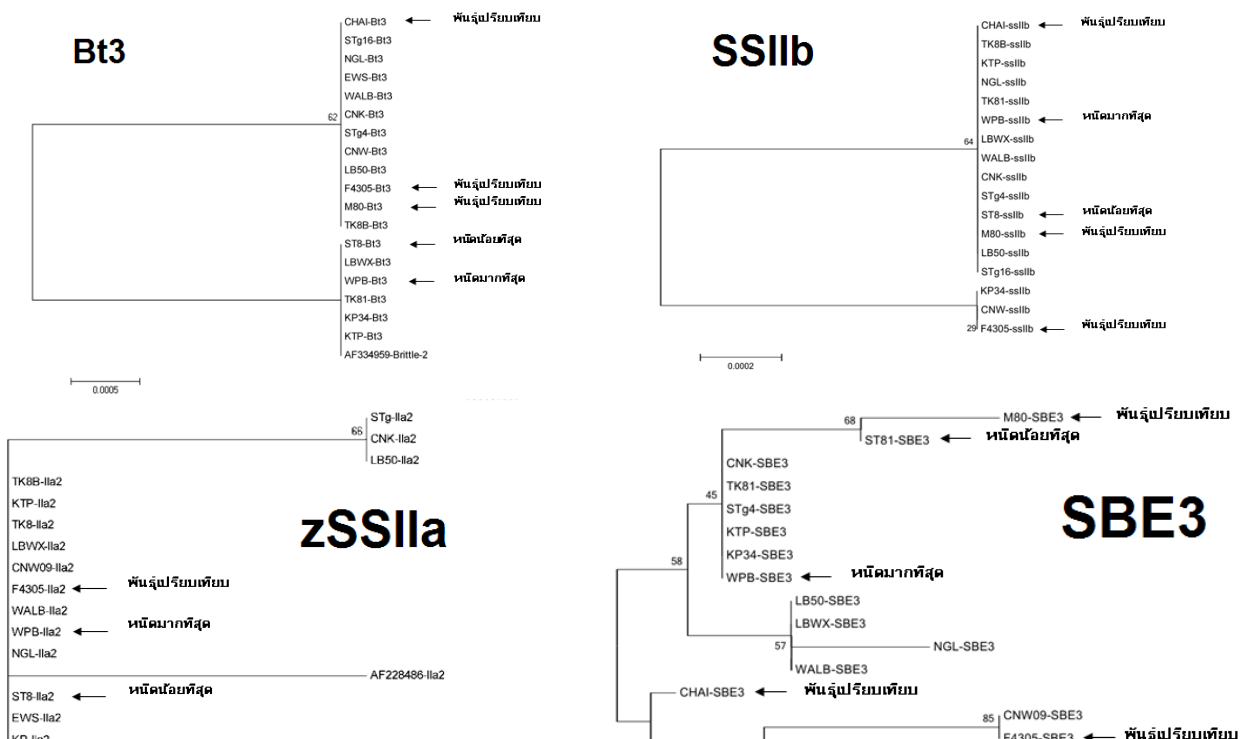
การจัดกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Wx* (GBSS) นั้นพบว่าพันธุ์ควบคุม WPB ที่มีความเหนียวมากที่สุดนั้นมีการแยกเดี่ยวออกจากกลุ่ม จึงอาจเป็นอีกหนึ่งยีนที่จะทำการทดสอบการหาตำแหน่งตรวจจับ SNP (ภาพที่ 3)

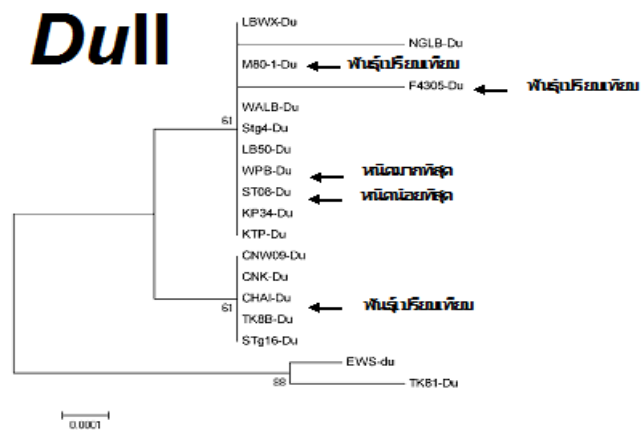


**Figure 3.** Clustering of Wx (GBSS) based on sequence differentiation of 17 waxy maize accessions.

Arrow: reference samples with highest and lowest starch stickiness.

ส่วนอื่นอื่น ได้แก่ *Bt3*, *SSIIb*, *zSSIIa*, *SBE3* และ *Dull* ไม่แยกกันส่วน ยีน *Isoamylase* หรือ *starch de-branching enzyme (SU1)* และ *Isoamylase-type starch debranching enzyme (iso2)* ไม่มีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ตรวจสอบ (ภาพที่ 4)





**Figure 4.** Clustering of *Bt3*, *SSIIb*, *zSSIIa*, *SBE3* and *Dull* based on sequence differentiation of 18 waxy maize accessions. Arrow : reference samples with highest and lowest starch stickiness.

#### การพัฒนาเทคนิค HRM

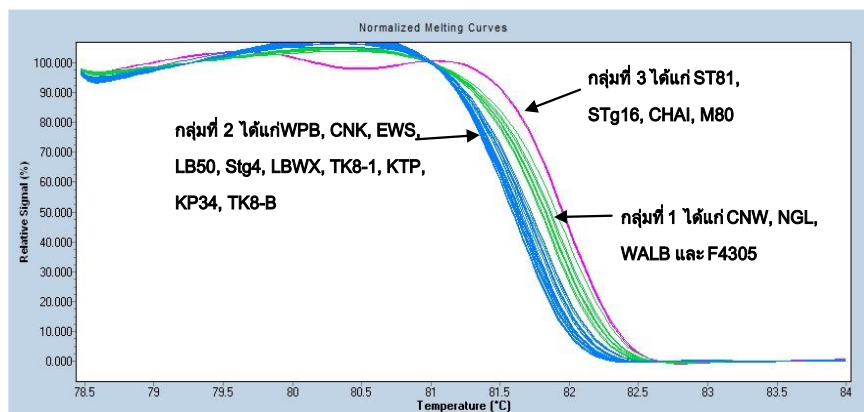
ผลการออกไพรเมอร์สำหรับยีน *SIP-1* เพื่อใช้ศึกษา HRM ให้ได้ PCR product ไม่เกิน 100 bp ครอบคลุมบริเวณที่เป็น SNP ของยีน *SIP-1* โดยครอบคลุม SNPs จำนวน 8 เบสที่อยู่ติดกัน และทำการทดสอบเพิ่มปริมาณยีนนี้กับตัวอย่าง 18 ตัวอย่าง พบว่าได้ HRM profile โดยการทำการ Gene scanning ที่แยกกลุ่มกันอย่างชัดเจนเป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 3) ได้แก่

1) กลุ่มที่มีค่า  $T_m$  เฉลี่ยเท่ากับ  $81.76^{\circ}\text{C}$  ได้แก่ตัวอย่างจำนวน 4 ตัวอย่างคือ **CNW09-17-B-B**, NGL-B, WALB 2-B-B-B, **F4305** ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีเบส 8 เบสแทรกในลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นกลุ่มที่มีตัวอย่างที่มีความเหนียวน้อยรวมอยู่ด้วย

2) กลุ่มที่มีค่า  $T_m$  เฉลี่ยเท่ากับ  $81.48^{\circ}\text{C}$  ได้แก่ตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่างคือ **WPB-80-5-1-1-53-B-1-B**, CNK(S) 61-3-B-B-9-B-B-B, EWS4780-6-B-B-B, LB50, ST(g) 4-1-50-B-1-B, LBWX-09-50-1-B-B-B, TK8-B-50-1-B-B, KTP(S)34-B-1-B, KP34-B-1-B และ TK8-B-50-1-B-B ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ไม่มีเบสแทรกในลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นกลุ่มที่มีตัวอย่างที่มีความเหนียวมากรวมอยู่ด้วย

3) กลุ่มที่มีค่า Tm 2 ค่า คือ 81.70°C และ 81.11°C ได้แก่ตัวอย่างจำนวน 4 ตัวอย่างคือ **ST-8-1-B-22-B-B**, ST(g)-16-1-11-B-B, ชัยนาท84-1, M80-1 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีเบส 8 เบสแทรกในลำดับนิวคลีโอไทด์ ยกเว้น M80-1 เป็นกลุ่มที่มีตัวอย่างที่มีความเหนียวน้อยรวมอยู่ด้วย

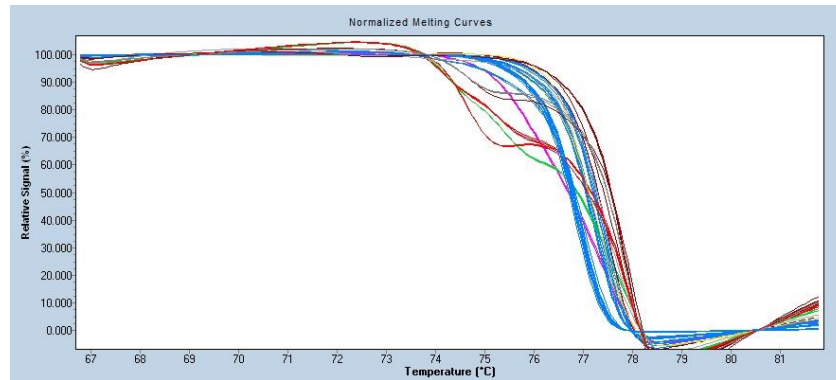
พันธุ์ควบคุมคือ WPB เป็นตัวอย่างที่ไม่มีเบสแทรกในลำดับนิวคลีโอไทด์ และ ST81 เป็นตัวอย่างที่มีเบส 8 เบสแทรกในลำดับนิวคลีโอไทด์



**Figure 5. HRM profile of *SIP-1* gene that was used to differentiate 8 adjacent SNP bases of 18 waxy maize accessions including :** CNW09)-17-B-B; NGL)-B; WALB) 2-B-B-B; F4305 ; WPB)80-5-1-1-53-B-1-B; CNK(S) 61-3-B-B-9-B-B-B; EWS4780-6-B-B-B; LB50; ST(g)) 4-1-50-B-1-B; LBWX09)-50-1-B-B-B; TK8)-B-50-1-B-B; KTP(S)34-B-1-B; KP)34-B-1-B; TK8)-B-50-1-B-B; ST)-8-1-B-22-B-B; ST(g))-16-1-11-B-B; ชัยนาท84-1 (CHAI); M80-1

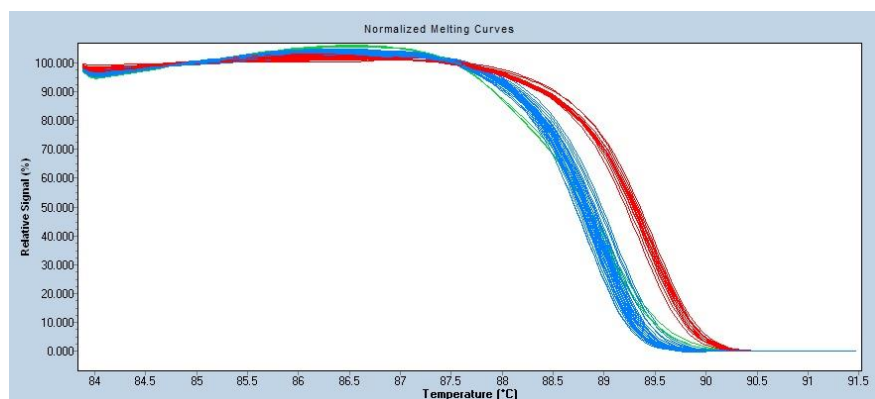
ผลการออกไพรเมอร์สำหรับยีน *Sh-2* พบว่าแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สีฟ้า ได้แก่ ST)-8-1-B-22-B-B, KP)34-B-1-B, มีตัวอย่างที่มีความเหนียวน้อยที่สุดรวมอยู่ด้วย กลุ่มที่ 2 สีชมพู ได้แก่ M80-1, WPB)80-5-1-1-53-B-1-B มีตัวอย่างที่มีความเหนียวมากที่สุดรวมอยู่ด้วย กลุ่มที่ 3 สีเขียว ได้แก่ CNW09)-17-B-B, ชัยนาท84-1 (CHAI) กลุ่มที่ 4 สีส้ม ได้แก่ CNK(S) 61-3-B-B-9-B-B-B, ST(g))-16-1-11-B-B, WALB) 2-B-B-B, EWS4780-6-B-B-B, KTP(S)34-B-1-B, TK8)-1-38-B-B-B, F4305 กลุ่มที่ 5 สีม่วง ได้แก่ NGL)-B, LB50, ST(g)) 4-1-50-B-1-B, LBWX09)-50-1-B-B-B, TK8)-B-50-1-B-B แต่พบว่า HRM profile ของยีน *Sh-2* แบ่งกลุ่มได้ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 6)





**Figure 6.** HRM profile of *Sh2* gene that was used to differentiate 8 adjacent SNP bases of 18 waxy maize accessions including CNW09)-17-B-B; NGL)-B; WALB) 2-B-B-B; F4305 ; WPB)80-5-1-1-53-B-1-B; CNK(S) 61-3-B-B-9-B-B-B; EWS4780-6-B-B-B; LB50; ST(g) 4-1-50-B-1-B; LBWX09)-50-1-B-B-B; TK8)-B-50-1-B-B; KTP(S)34-B-1-B; KP)34-B-1-B; TK8)-B-50-1-B-B; ST)-8-1-B-22-B-B; ST(g))-16-1-11-B-B; ชัยนาท84-1 (CHAI); M80-1

ผลการออกไพรเมอร์สำหรับยีน *GBSS* พบว่าตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 18 พันธุ์ ถูกแบ่งเป็นได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 (เส้นสีแดง) ได้แก่ M80-1, ST(g) 4-1-50-B-1-B, KP)34-B-1-B, ชัยนาท84-1 (CHAI), CNW09)-17-B-B, KTP(S)34-B-1-B กลุ่มที่ 2 (เส้นสีน้ำเงิน) ได้แก่ NGL)-B, WALB) 2-B-B-B, F4305, CNK(S) 61-3-B-B-9-B-B-B, EWS4780-6-B-B-B, LB50, LBWX09)-50-1-B-B-B, TK8)-B-50-1-B-B, TK8)-B-50-1-B-B, ST)-8-1-B-22-B-B, ST(g))-16-1-11-B-B เป็นกลุ่มที่มีตัวอย่างอ้างอิงที่มีความเหนียวน้อยรวมอยู่ด้วย กลุ่มที่ 3 (เส้นสีเขียว) ได้แก่ WPB)80-5-1-1-53-B-1-B เป็นตัวอย่างอ้างอิงที่มีความเหนียวมากที่สุด จาก HRM profile ของยีน *GBSS* แม้จะแบ่งกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม แต่กลุ่มที่ 2 และ 3 ซึ่งมีตัวอย่างอ้างอิงรวมอยู่ด้วยนั้น มีกราฟซ้อนทับกันอยู่ ทำให้สังเกตความแตกต่างได้ค่อนข้างยาก (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 HRM profile of **GBSS** that was used to differentiate 8 adjacent SNP bases of 18 waxy maize accessions including CNW09)-17-B-B; NGL)-B; WALB) 2-B-B-B; F4305 ; WPB)80-5-1-1-53-B-1-B; CNK(S) 61-3-B-B-9-B-B-B; EWS4780-6-B-B-B; LB50; ST(g) 4-1-50-B-1-B; LBWX09)-50-1-B-B-B; TK8)-B-50-1-B-B; KTP(S)34-B-1-B; KP)34-B-1-B; TK8)-B-50-1-B-B; ST)-8-1-B-22-B-B; ST(g)-16-1-11-B-B; ชัยนาท84-1 (CHAI); M80-1

## 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองนี้พบว่า การสำรวจตำแหน่ง SNPs ในยีนเป้าหมายและการพัฒนาเทคนิค HRM ในการตรวจตำแหน่ง SNPs ของยีนนั้น มีศักยภาพในการนำมาใช้คัดเลือกคุณภาพด้านความเหนียวของแป้งในข้าวโพดข้าวเหนียวได้ การนำผลการทดลองมาใช้ประโยชน์ อาจต้องใช้ในการตรวจ SNPs ของทั้ง 2 ยีน ได้แก่ *SIP-1* และ *GBSS* ตำแหน่งนี้ในการคัดเลือก เพื่อให้มีความแม่นยำมากขึ้น อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ขาดข้อมูลด้านคุณภาพของแป้งในตัวอย่างที่ทดสอบของทุกตัวอย่าง รวมทั้งตัวอย่างที่ได้รับมาแต่ละชุดไม่ซ้ำชุดเดิม ทำให้เป็นอุปสรรคในการตรวจยืนยันผล จึงทำให้การพัฒนาเทคนิค HRM ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 นำผลการวิจัยไปพัฒนาต่อ ในโครงการวิจัย ปี 2559-2564

10.2 นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมแสดงผลงานวิจัยประจำปีของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และกรมวิชาการเกษตร

## 11. คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยทั้งที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท ที่ช่วยปฏิบัติงานทำให้สามารถดำเนินงานทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ และได้ผลตามเป้าหมาย

## 12. เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2546. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 3 สำนักพิมพ์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 303 หน้า.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล เพียงเพ็ญ สรวัด ธีรวุฒิ วงศ์วรรณ์ พิเชษฐศักดิ์ ศรีวงศ์ วีระเดช โชนสันเทียะ ตรีตราภรณ์ จันทร์เทศ. 2552. การแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะแป้งสูงและไซยาไนด์ต่ำในมันสำปะหลัง. การประชุมวิชาการพืชไร่ประจำปี 2552 เรื่อง ผลงานวิชาการด้านพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน. สุราษฎร์ธานี. 7-9 กันยายน.

- Coe EH, M.G. Neuffer and D.A. Hoisington. 1988. The genetics of corn In: Sprague GF and Dudley JW, eds., Corn and corn improvement. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 81–258.
- Craig, J., J. R. Lloyd, K. Tomlinson, L. Barber, A. Edwards, T.L. Wang, C. Martin, C. L. Hedley and A.M. Smith. 1998. Mutations in the Gene Encoding Starch Synthase II Profoundly Alter Amylopectin Structure in Pea Embryos. *Plant Cell*, Vol. 10, 413-426.
- Denyer, K., C.M. Hylton, C.F. Jenner, A.M. Smith. 1995. Identification of multiple isoforms of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm, *Planta (Heidelb.)* 196, 256–265.
- French, D. (1984). Organization of starch granules. In *Starch: Chemistry and Technology*, R.L. Whistler, J.N. BeMiller, and E.F. Paschall, eds (Orlando, FL: Academic Press), pp. 183–247.
- Gidley, M. (1992). Structural order in starch granules and its loss during gelatinisation. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 6*, G.O. Phillips, P.A. Williams, and D.J. Wedlock, eds (Oxford, UK: IRL), pp. 87–92.