

และคุณสมบัติด้านความเหนียว เป็นต้น ซึ่งทั้งหมดล้วนมีอิทธิพลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสที่มีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค แม้ว่ากรรมพันธุ์เนื้อสัมผัสแบบทางอ้อมหรือการวัดด้วยประสาทสัมผัส โดยวิธีการชิมจะเป็นที่นิยมใช้กันแพร่หลาย ทั้งจากผู้บริโภคทั่วไป หรือผู้ที่มีความชำนาญ เป็นผู้ให้คะแนนการชิม ซึ่งอาจเกิดความลำเอียง ทำให้ผลการชิมจึงมีความแปรปรวนในการทดสอบได้ และไม่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของความเหนียวนุ่มได้อย่างชัดเจน ปัจจุบันมีการนำเครื่องมือใช้เครื่องมือวัดความเหนียวแบบรวดเร็ว (Rapid Visco Analysis: RVA) เป็นเครื่องมือติดตามการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมความเหนียวของตัวอย่างตลอดช่วงการให้ความร้อนและความเย็น รวมทั้งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ การควบคุมองค์ประกอบของแป้งและการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้วยความเหนียวของข้าวโพดข้าวเหนียวเป็นผลจากอิทธิพลของยีน ได้แก่ *amylose extender (ae1)* *brittle endosperm2 (bt2)* *shrunk1 (sh1)* *shrunk2 (sh2)* *sugary (su1)* และ *waxy1 (wx1)* (Wilson et al., 2004) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection; MAS) เพื่อเลือกต้นที่มีจีโนไทป์ที่ต้องการ สามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนเป้าหมาย (indirect MAS; iMAS) และ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน (direct MAS; dMAS หรือ functional marker assisted selection; fMAS) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด fMAS นั้นจะมีความแม่นยำในการคัดเลือกมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด iMAS เนื่องจากเป็นการพัฒนามาจากส่วนยีนที่ทำหน้าที่กำหนดรหัสพันธุกรรมที่ควบคุมการทำงานของลักษณะเป้าหมายที่ต้องการมาเป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก การศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับกรดอะมิโนของยีนจะทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีกายภาพและคุณภาพความเหนียว เพื่อการนำมาสู่การออกแบบเครื่องมือในการคัดเลือก ที่แม่นยำ และช่วยร่นระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์ (Collard et al., 2005) ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อาจมีตำแหน่งแตกต่างกันเพียงตำแหน่งเดียว แต่มีผลต่อฟีโนไทป์ หรือ สนิป (single nucleotide polymorphism, SNP) ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป ร่วมกับการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ค่าการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ (high-resolution melting analysis; HRM) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ตรวจสอบหาความผิดปกติของยีนได้ ค่าการคลายเกลียวสายดีเอ็นเอหมายถึง ค่าที่วัดจากการค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิให้ผลผลิตพีซีอาร์ จาก 56-95°C และวัดสัญญาณ fluorescence ที่ลดลงตลอดเวลา เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่เดิมเป็นเกลียวคู่ แยกตัวออกจากกันมากขึ้น ทั้งนี้ดีเอ็นเอสายคู่จากผลผลิตพีซีอาร์ของสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันจะมีค่าการคลายเกลียวที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธีนี้ในการแยกชนิดหรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นการทดลองนี้มุ่งเน้นศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพบางประการของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว แปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์และการทำงานของยีนที่ควบคุมความเหนียวนุ่มของข้าวโพดข้าวเหนียว สำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีประสิทธิภาพ ให้ได้คุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวตามต้องการอย่างแม่นยำ

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว จำนวน 30 พันธุ์
2. ชุดสกัดดีเอ็นเอและสารเคมีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
3. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์
4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม
5. เครื่องตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

วิธีการ

1. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของข้าวโพดข้าวเหนียว

1.1 วิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส อะไมโลเพคติน

1.1.1 การปลูกและการปฏิบัติดูแลรักษา

ปลูกข้าวโพดข้าวเหนียวที่คัดเลือกได้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล เตรียมดิน ใส่ปุ๋ยเคมี 15-15-15 รองพื้น อัตรา 67 กิโลกรัมต่อไร่ โดยปลูกจำนวน 3-4 แถวต่อสายพันธุ์ แถวยาว 5 เมตร ใช้ระยะปลูก 75x25 เซนติเมตร เมื่อข้าวโพดข้าวเหนียวอายุ 14 วัน ถอนแยกให้เหลือ 1 ต้นต่อหลุม เมื่อข้าวโพดมีอายุได้ 20-25 วัน ใส่ปุ๋ยเคมี 46-0-0 อัตรา 22 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อมีอายุ 35-40 วัน ใส่ปุ๋ยเคมี 46-0-0 อัตรา 22 กิโลกรัมต่อไร่ ฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดโรคและแมลงตามความจำเป็น เมื่อถึงระยะออกดอกและออกไหม ทำการผสมตัวเอง เก็บเกี่ยวฝักสดหลังผสม 20 วัน จากนั้นนำไปอบให้แห้ง เพื่อนำไปประเมินองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว

1.2 ขั้นตอนการเตรียมแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว

แยกเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวออกจากฝัก นำไปตากแดดจนแห้ง นำเมล็ดมาบดหรือบั่นหรือโม่จนได้เป็นผงละเอียด แล้วนำมาร่อนด้วยตะแกรงไนลอนที่มีขนาดของรู 100 mesh

1.2.1 การเตรียมน้ำแป้ง

ชั่งแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว ที่มีขนาด 100 mesh หนักอย่างละ 10 mg ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 85% methanol 5 ml นำไปต้มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที (เขย่า) แล้วให้นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ 12,000 รอบ นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ 0.4 M NaOH จำนวน 2 ml. ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจำนวน 4 ml เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองและนำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 95°C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้นำมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

1.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่ง potato amylose และ amylopectin หนักอย่างละ 50 ml. ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำ 0.4 M NaOH จำนวน 8.3 ml เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้เป็น 25 ml ด้วยน้ำกลั่น นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80°C นาน 30 นาที แล้วให้นำมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ใช้เป็น stock solution (100%) โดยให้เจือจาง potato amylose และ amylopectin เป็นดังนี้ 20 40 60 80 และ 100% โดยใช้ 0.13 NaOH นอกจากนี้ให้รวมสารละลายมาตรฐาน

โดยให้ความเข้มข้นของอัตราส่วน potato amylose : amylopectin ดังนี้ 100 : 0, 80 : 20, 60 : 40, 40 : 60, 20 : 80 และ 0 : 100 ตามลำดับ

1.2.3 การวัดปริมาณ amylose และ amylopectin ในตัวอย่างน้ำแป้งและสารละลายมาตรฐาน potato amylose และ amylopectin ด้วยวิธี dual- wavelength colorimetric (DWC) procedure

ปิเปต 0.5% Trichloroacetic acid (TCA) จำนวน 5 ml ลงในหลอดทดลอง เติมตัวอย่างน้ำแป้งหรือสารละลายมาตรฐาน potato amylose และ amylopectin จำนวน 300 μ l ลงในหลอดทดลอง แล้งตามด้วย Iodine solution จำนวน 300 μ l เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยเลือกความยาวคลื่น 620 และ 440 nm สำหรับการวัด amylose และ เลือกความยาวคลื่น 560 และ 728 nm สำหรับการวัด amylopectin

1.2 วิเคราะห์คุณสมบัติด้านความหนืดของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว

วัดความหนืดของแป้งด้วยเครื่อง RVA (Rapid visco analysis 4500) โดยดำเนินการตามวิธีการ Newport Scientific method, 1997 ชั่งแป้งแต่ละชนิด 3 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ลงใน RVA canister และเติมน้ำกลั่นลงไปให้มีน้ำหนักรวมเป็น 28 กรัม จากนั้นผสมให้เข้ากัน ใช้โปรแกรมมาตรฐาน กำหนดสถานะของเครื่องความ RVA โดยใช้ใบพัดกวนแป้งที่หมุนด้วยความเร็วดังนี้ วินาทีที่ 0-10 หมุนด้วยความเร็ว 960 รอบต่อนาที หลังจากนั้นหมุนด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที จนเสร็จการปฏิบัติและกำหนดอุณหภูมิในการปฏิบัติดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้น 50°C นาน 1 นาที เพิ่มอุณหภูมิจาก 50°C เป็น 95°C ภายในเวลา 3.8 นาที คงอุณหภูมิที่ 95°C นาน 2.5 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงจาก 95°C เป็น 50°C ภายในเวลา 3.8 นาที และคงอุณหภูมิต่ำสุดที่ 50°C นาน 2 นาที ทำการบันทึกค่าต่างๆ ดังนี้ อุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืด (pasting Temperature, °C) ความหนืดสูงสุด (Peak viscosity, RVU) ความหนืดต่ำสุด (trough, RVU) ความหนืดสุดท้าย (final viscosity, RVU) ผลต่างระหว่างค่าความหนืดสูงสุดและความหนืดต่ำสุด (breakdown = peak viscosity – trough, RVU) ผลต่างของความหนืดสุดท้ายกับความหนืดต่ำสุด (setback from trough = final viscosity – trough, RVU) และผลต่างของความหนืดสุดท้ายกับความหนืดสูงสุด (setback from peak = final viscosity – peak viscosity, RVU)

2. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความเหนียวนุ่มของข้าวโพดข้าวเหนียวและการออกแบบไพรมอร์

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบข้าวโพดข้าวเหนียวมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในโถงที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผง สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของชุดสกัดดีเอ็นเอ Plant DNA Extraction (Vivantis, Taiwan) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 280 μ l และ proteinase K ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที ดูดส่วนใสลงหลอดทดลองขนาด 1.5 ml เติม RNase A 2 μ l บ่มที่ 37°C นาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PB 600 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที นำไปแช่เย็น 10 นาที นำออกมาเติม absolute

ethanol 200 µl พลิกไปพลิกมาเบา ๆ ให้เข้ากัน ดูดสารละลาย 650 µl ใส่ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติม wash buffer 600 µl ลงบนแผ่นกรองในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และตามด้วย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เติม Elution buffer 40 µl จากนั้นให้นำไปวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A_{260}/A_{280} เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอในช่องแช่แข็งจนกว่าจะนำมาใช้

2.2. การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นำดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่จำเพาะด้วยเทคนิคปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ปริมาตร 15 µl ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, USA); สารต้นแบบดีเอ็นเอ (100 ng/µl) ปริมาตร 3 µl และ 0.5 µM โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะบริเวณยีน *GBSSI* และ *SSSIII* โปรแกรมที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้ Pre-denaturing 94 °C นาน 5 นาที, denaturing 94°C นาน 1 นาที, annealing 60°C นาน 30 วินาที, extension 72°C นาน 45 วินาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 30 รอบ) และ final extension 72°C นาน 7 นาที

2.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้แยกให้บริสุทธิ์ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป (AmbiClean kit, Malaysia) แล้วส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามกรรมวิธีของบริษัท 1st bast ประเทศมาเลเซีย

2.3 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาตรวจสอบความถูกต้องโดยเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ของฐานข้อมูลสากล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

2.4 การออกแบบไพรเมอร์และการทดสอบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

2.4.1 การออกแบบไพรเมอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากแต่ละสายพันธุ์มาจัดเรียงเทียบกัน หาดำแหน่งที่มีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เรียกว่า Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมตำแหน่ง SNP โดยมีข้อกำหนด ดังนี้

- ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ ไม่เกิน 100 bp
- ความยาวของลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของแต่ละสาย Forward และ Reverse ประมาณ 18-23 mers
- ค่า T_m ของแต่ละไพรเมอร์ ประมาณ 50-62 องศาเซลเซียส โดยผลต่างค่า T_m ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ไม่เกิน 1-2 องศาเซลเซียส
- ต้องไม่มี primer dimer และ hairpin loop

2.4.2 การทดสอบปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอร์และตรวจสอบค่าการคลายเกลียว (melting temperature)

2.4.3 ทดสอบส่วนผสมที่เหมาะสมของปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอร์ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของ $MgCl_2$

2.4.4 ทดสอบขั้นตอนการทำปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอร์ ได้แก่ อุณหภูมิช่วง annealing ระยะเวลาที่ใช้ในช่วง degeneration, annealing และ extension จำนวนรอบที่เหมาะสม

2.4.5 ตรวจสอบค่าการคลายเกลียว (melting temperature)

- เวลาและสถานที่ เริ่มต้น 2560-สิ้นสุด 2562
สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส อะไมโลเพคติน และคุณสมบัติด้านความหนืดของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว

จากการศึกษาคุณภาพทางเคมีของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn flour) 35 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณอะไมโลสร้อยละ 0-6.0152 ปริมาณอะไมโลเพคตินร้อยละ 57.429-126.5 ปริมาณแป้งทั้งหมดร้อยละ 47.44-76.56 ดัง Table 1

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านความหนืดของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว ความหนืดเป็นสมบัติที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของแป้ง เมื่อได้รับความร้อน เม็ดแป้งจะดูดซับน้ำและเกิดการพองตัวเนื่องจากพันธะไฮโดรเจนของโมเลกุลถูกทำลาย ซึ่งการพองตัวของเม็ดแป้ง ทำให้น้ำบริเวณรอบ ๆ เม็ดแป้งเหลือน้อยลง เม็ดแป้งจึงเคลื่อนไหวได้ยาก มีผลให้เกิดความหนืดขึ้น (Zobel and Stephen, 1995) การทดสอบการเปลี่ยนแปลงความหนืดของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว Rapid Visco Analysis (RVA) ดัง Table 1 เมื่อพิจารณาค่าความหนืดสูงสุด (Peak viscosity) ซึ่งเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับยังสำหรับใช้เป็นเกณฑ์สำคัญตัวหนึ่งในการประเมินสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวในระหว่างการปรับปรุงพันธุ์และมีความสัมพันธ์กับคุณภาพการบริโภค (Ketthaisong *et al.*, 2014) จากการทดลอง พบว่าแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวมีค่าความหนืดสูงสุดอยู่ในช่วงระหว่าง 14-181 RVU โดยมีข้าวโพดข้าวเหนียวที่ให้ค่าความหนืดสูงสุดสูงที่สุดและต่ำสุดคือ WEWS003 (180.46 RVU) และ PWHB01 (14.125 RVU) และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อพิจารณาค่าความหนืดต่ำสุด (Trough) ซึ่งเป็นค่าที่เกิดจากการให้ความร้อน และแรงกวนที่ใช้ในการกวน พบว่าที่อุณหภูมิและแรงกวนที่เท่ากัน แป้งข้าวโพดข้าวเหนียวค่าความหนืดต่ำสุดสูงที่สุดและต่ำที่สุดคือ CNW (96.458 RVU) และ PWHB01 (13.625 RVU) เมื่อพิจารณาค่าความแตกต่างระหว่างค่าความหนืดสูงสุดและความหนืดต่ำสุด (Breakdown) ซึ่งบอกลถึงความสามารถในการคงทนต่อการแตกหักของเม็ดแป้งหลังการต้มด้วยอุณหภูมิ และการกวน พบว่ามีค่า Breakdown อยู่ในช่วง 0.375-98 RVU ซึ่งแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวที่ให้ค่า Breakdown สูงที่สุดคือ WEWS003 (97.667 RVU) นั่นคือ แป้งข้าวโพดข้าวเหนียวนี้ มีความคงทนต่อกระบวนการหุงต้มน้อยที่สุดในขณะที่ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ให้ค่า Breakdown ต่ำที่สุดคือ WKNN016 WKNN004

และ PWHB01 (0.375 RVU) เมื่อพิจารณาถึงค่าความหนืดสุดท้าย (final viscosity) ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ในการบอกถึงคุณภาพแป้ง และเป็นตัวบ่งชี้ถึงลักษณะของแป้งว่ามีลักษณะเป็นแป้งเปียกหรือเจลเมื่อผ่านการให้ความร้อน และทำให้เย็น พบว่าทั้ง 35 ตัวอย่างมีค่าความหนืดสุดท้ายมากกว่าค่าความหนืดต่ำสุด นั่นคือเมื่อผ่านการให้ความร้อน และทำให้เย็นจะมีลักษณะเป็นเจล โดยแป้งที่มีลักษณะเป็นเจลแข็งมากที่สุดและแข็งน้อยที่สุดคือ UT1122 (147.04 RVU) และ PWHB01 (19.917 RVU) เมื่อพิจารณาค่าการคืนตัว (Setback viscosity) จากผลต่างระหว่างความความสุดท้ายกับความหนืดต่ำสุด ซึ่งค่าการคืนตัวนี้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส แป้งที่มีค่าการคืนตัวน้อยกว่าจะทำให้เนื้อสัมผัสมีลักษณะนุ่มกว่า แป้งที่มีการคืนตัวมากกว่าลักษณะจะมีความแข็งกระด้างหลังจากต้มแล้วปล่อยให้เย็น หรือทำให้มีลักษณะแห้งและร่วน (ภัทรภณ, 2552) จากผลการทดลองพบว่าระดับการคืนตัวของแป้งที่มากที่สุดคือ UT1122 (60.708 RVU) และการคืนตัวน้อยที่สุดคือ PWHB01 (6.2917 RVU) เมื่อพิจารณาเวลาที่เกิดความหนืดสูงสุด พบว่าแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวให้ค่าสูงสุดคือ WKNN016, YNB01 (6.6334, 6.5567 นาที) และต่ำสุดคือ WEWS003 (4.0667 นาที) การพิจารณาอุณหภูมิเริ่มเปลี่ยนแปลงความหนืด (Pasting temperature) พบว่าอุณหภูมิเริ่มเปลี่ยนแปลงความหนืดสูงสุดคือ PWHB01 (81.55 องศาเซลเซียส) และต่ำสุดคือ WSJ003 (77.125 องศาเซลเซียส) ดัง Table 1

ในการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การแจกแจงความถี่ เพื่อจัดหมวดหมู่เรียงจากน้อยไปมาก จากการทดลองการแจกแจงความถี่ของข้อมูลความหนืดสูงสุด (Peak viscosity) ข้อมูลค่าแตกต่างระหว่างค่าความหนืดสูงสุดและความหนืดต่ำสุด (Breakdown) และข้อมูลค่าการคืนตัว (Setback viscosity) สามารถกำหนดจำนวนชั้นจากสูตร $K = 1 + 3.3 \log N$ ได้ 6 ชั้น และมีค่าอันตรภาคชั้นหรือความกว้างของแต่ละชั้น ดังนี้ 28 16 และ 9 ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถกำหนดเกณฑ์ของระดับของแต่ละค่า

การวิเคราะห์ข้อมูลความหนืดสูงสุดของตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียวที่ศึกษาในการทดลองนี้ ค่าความหนืดสูงสุดเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับยิ่งสำหรับใช้เป็นเกณฑ์สำคัญตัวหนึ่งในการประเมินสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวในระหว่างการปรับปรุงพันธุ์และมีความสัมพันธ์กับคุณภาพการบริโภค ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในระดับชั้นที่สูงจะมีลักษณะเหนียวมากกว่าชั้นที่อยู่ต่ำกว่าตามลำดับ เมื่อพิจารณาข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าที่ผู้บริโภคนิยม ได้แก่ violet violetwhite sweetviolet sweetwax254 และ fancy พบว่ามีค่าเฉลี่ยความหนืดอยู่ในระดับชั้นที่ 2 และ 3 ยกเว้น fancy อยู่ในชั้นที่ 5 พันธุ์ลูกผสมข้าวโพดข้าวเหนียวที่อยู่ในขั้นตอนการทดสอบพันธุ์ ได้แก่ CNW1537 CNW1602 CNW1643 CNW1504 CNW1614 และ CHATNAT84-1 ซึ่งอยู่ในระดับชั้น 2-5 ดัง Table 2 ซึ่งเป็นระดับระหว่างชั้นของข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าที่ผู้บริโภคยอมรับ

การวิเคราะห์ข้อมูลค่าแตกต่างระหว่างค่าความหนืดสูงสุดและความหนืดต่ำสุด (Breakdown) เป็นค่าที่บอกถึงความสามารถในการคงทนต่อการแตกหักของเม็ดแป้งหลังการต้มด้วยอุณหภูมิ และการกวน แป้งข้าวโพดข้าวเหนียวที่ให้ค่า Breakdown สูงที่สุด คือ แป้งที่มีความคงทนต่อกระบวนการหุงต้มน้อยที่สุด เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยตามระดับชั้นของข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้า อยู่ระหว่างระดับชั้น 1-4 ซึ่งมีพันธุ์ลูกผสมข้าวโพดข้าวเหนียวอยู่ด้วย ดัง Table 3

การวิเคราะห์ข้อมูลค่าการคืนตัว (Setback viscosity) จากผลต่างระหว่างความความสุดท้ายกับความหนืดต่ำสุด ซึ่งค่าการคืนตัวนี้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส แป้งที่มีค่าการคืนตัวน้อยกว่าจะทำให้เนื้อสัมผัสมีลักษณะนุ่มกว่า แป้งที่มีการคืนตัวมากกว่าลักษณะจะมีความแข็งกระด้างหลังจากต้มแล้วปล่อยให้เย็น หรือทำให้มีลักษณะแห้งและร่วน จากผลการวิเคราะห์ พบว่าค่าเฉลี่ยส่วนใหญ่ อยู่ที่ระดับชั้น 1 ซึ่งเป็นระดับชั้นที่มีค่าเฉลี่ยต่ำสุด คือ มีแป้งที่เนื้อสัมผัสมีลักษณะนุ่มกว่าชั้นอื่นๆ ลูกผสมและพันธุ์การค้าที่นำมาทดสอบจึงมีคุณภาพอยู่ในระดับเดียวกัน ดัง Table 4

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องและการออกแบบไพรเมอร์

ทางด้านลักษณะคุณภาพของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว ได้แก่ องค์ประกอบของแป้ง และการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้านความหนืดของข้าวโพดข้าวเหนียวเป็นผลจากอิทธิพลที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายชนิด ได้แก่ *amylose extender (ae1)*, *brittle endosperm2 (bt2)*, *shrunk1 (sh1)*, *shrunk2 (sh2)*, *sugary (su1)*, *dull (du)* และ *waxy1 (wx1)* (Cao *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2004) มีอย่างน้อย 6 ไอโซฟอร์มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้งได้แก่ GBSSI, GBSSII, SSI, SSII, SSIII และ SSIV และชนิดของเอนไซม์อีกมากมาย ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Smith *et al.*, 1997; Hirose and Terao, 2004) บริเวณ GBSSI มีหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แป้งในส่วนของการสะสมแป้ง ในขณะที่ GBSSII ทำหน้าที่การสังเคราะห์อะไมโลสในใบ บทบาทของ SSI ยังไม่ความชัดเจนไม่มากนัก ในขณะที่ SSII และ SSIII เกี่ยวข้องกับการเชื่อมต่อสายโซ่ของอะไมโลเพคติน (Smith *et al.*, 1997) การทดลองนี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ต้นแบบมาจากฐานข้อมูลสากล GENBANK ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ GBSSI และ SSIII ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ 15 และ 6 คู่ไพรเมอร์ ตามลำดับ หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายดีเอ็นเอของตัวอย่างที่มีความหนืดต่ำ ได้แก่ WEWS003 CNW1614 และ ตัวอย่างที่มีความหนืดสูง ได้แก่ WKA005 CNW1537 เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว พบตำแหน่งที่มีความแปรปรวนบริเวณตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งของอาร์เอ็นเอที่จัดกลุ่มได้ระหว่างความหนืดต่ำและสูง ซึ่งตำแหน่งนี้จะถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ SNP markers ที่จะใช้ในการตรวจสอบตำแหน่งเหล่านี้ในตัวอย่างอื่นด้วยด้วยเทคนิค High-resolution melting (HRM) real-time PCR ตำแหน่งเหล่านี้ ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GBSSI มี 2 ตำแหน่ง ได้แก่ C1350G, C1944A และ SSII มี 3 ตำแหน่ง ได้แก่ G551A, T914C, A1112G ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้นี้ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้มีค่าการคลายเกลียว ดังนี้ คู่ไพรเมอร์ที่ได้ ได้แก่ GbF3/R3, Du01F1/R1, และ Du02F2/R2 มีค่าการคลายเกลียวที่ 73.1-74.4, 77.7-78.5, 80.8-82.1 °C ตามลำดับ (Figure 1) ซึ่งไพรเมอร์เหล่านี้จะถูกนำไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการทดลองต่อไป

Table 1 The pasting properties of waxy corn flours.

Sample name	Peak viscosity	Trough1	Breakdown	Final Visc	Set back	Peak tie	Pasting Temp	total starch(%)	amylose	amylopectin
CHAINAT84-1	140 c	74.37 d	66.45 b	97.66 d	23.29 d	4.33 op	77.85 klm	72.03 b	0 e	88.04 j-m
CNW1537	61.04 lm	49.95 lm	11.08 p	64.16 mn	14.20 i-m	4.80 c-f	79.55 b-f	63.77 i-m	0 e	92.47 ghi
CNW1602	69.08 kl	46.62 m-o	22.45 j-l	59.66 nop	13.04 m-p	4.70 f-i	79.92 bcd	67.67 def	0 e	95.41 f
CNW1614	146.29 c	96.45 a	49.83 d	115.00 c	18.54 f	4.63 gj	78.30 i-l	64.46 g-k	0 e	89.78 i-l
CNW1643	103 fg	69.12 ef	34.20 h	81.50 hi	12.37 m-q	4.70 f-i	79.87 b-e	58.87 op	0 e	86.58 m
F4305	98.45 gh	62.45 g	35.50 gh	77.52 ij	15.06 h-k	4.55 ijk	79.42 c-g	60.59 nop	0 e	86.11 m
F4305/WSL002	73.29 lk	45.25 no	28.04 i	58.58 op	13.33 k-o	4.60 h-k	79.10 e-h	65.21 f-j	0 e	59.14r s
KKCW02	74.37 lk	52.58 kl	21.79 j-l	64.54 mn	11.95 n-r	4.63 ghj	79.52 c-f	58.18 p	0 e	76.73 o
M80	82.29 i	43.31 o	38.97 fg	57.02 p	13.70 j-n	4.31 oq	78.10 jkl	66.00 e-i	0 e	92.43 ghi
POP	124. d	73.54 d	51.25 d	87.58 fg	14.04 i-m	4.30 oq	77.97 jkl	62.88 j-n	0 e	63.30 pq
PWHB01	64.29 lm	49l mn	15.04 o	62.29 no	13.04 m-p	4.63 g-j	79.25 c-g	62.26 k-n	0 e	81.38 n
UT1120	69.04 kl	53.91 jk	15.12 o	69.83 kl	15.91 g-i	4.93 c	79.85 b-f	61.23 mno	0 e	99.63 e
UT1122	114 e	90.91 b	23.70 jk	147 a	56.12 b	5.70 b	79.87 b-e	66.57 d-h	2.19 b	107 c
UTI11	94.00 h	73.95 d	20.04 k-m	106 d	32.50 c	5.56 b	80.32 b	64.67 g-k	0 e	113 b
UTI201	47.08 o	37.62 p	9.45 p	51.25 q	13.62 j-m	4.90 cd	79.42 c-g	64.25 h-l	0e	111 b

Remark: Mean followed by the same letter are not significant at p=0.05 by DMRT.

Table 1 Continued.

Sample name	Peak viscosity	Trough1	Breakdown	Final Visc	Set back	Peak tie	Pasting Temp	total starch(%)	amylose	amylopectin
UTI221	72.91 lk	61.70 gh	11.20 p	122 b	60.70 a	5.66 b	81.42 a	62.86 j-n	6.01 a	126 a
WEWS003	180.46 a	83.29 c	97.66 a	104 d	21.08 e	4.06 s	78.35 h-k	72.80 b	0 e	93.76 f-h
WEWS003/F4305	110.33 e	67.79 f	42.54 ef	83.33 gh	15.54 hij	4.76 d-g	80.00 bc	67.62 d-f	0.19 e	91.88 ghi
WKNN016/F4305	99.77 gh	58.02 hi	41.75 ef	74.20 jk	16.18 gh	4.38 m-p	78.10 jkl	63.62 i-m	0 e	87.47 lm
WPK008/F4305	112.94 e	72.10 de	40.83 ef	89.87 d	17.77 fg	4.51 j-n	78.22 jkl	65.44 f-j	1.44 cd	88.41 j-m
WPK018/F4305	99.87 gh	56.83 ij	43.04 e	69.87 kl	13.04 m-p	4.56 ijk	78.30 i-l	69.12 cd	0 e	90.73 ijk
WPK034/F4305	98.72 gh	56.08ijk	41.85 ef	70.47 kl	14.22 i-m	4.45 k-o	78.13 jkl	71.32 bc	0 e	82.87 n
WSJ003	55.00 n	22.37 s	32.62 h	30.50 t	8.125 uv	4.10 s	77.12 m	68.56 de	0 e	91.92 ghi
WSJ003/F4305 (CNW1504)	109.04 ef	52.33 kl	56.70 c	67.79 lm	15.45 hij	4.13 rs	77.52 lm	76.56 a	1.76 c	94.50 fg
WTNGHB3003	75.87 u	56.62 ij	19.20 lmn	71.87 kl	15.25 h-k	4.80 c-f	79.07 f-i	63.24 j-n	0 e	80.82 n
FANCY111	153 b	95.62 a	57.91 c	117.96 bc	22.33 de	4.53 j-m	79.10 e-h	72.78 b	0 e	100.17 e
SWEETVIOLET	58.95 lm	33.16 q	23.12 jk	44.33 r	11.16 p-s	4.40 l-p	79.52 c-f	63.64 i-m	1.26 d	57.42 s
SWEETWAX254	98.12 gh	47.08 m-o	51.04 d	60.33 nop	13.25 l-o	4.16 qrs	78.25 jkl	72.74 b	0 e	86.73 m
VIOLET	43.79 op	27.41 r	16.50 mno	37.91 s	10.62 q-t	4.36 nop	79.17 d-g	67.69 def	0.22 e	61.26 qr
VIOLETWHITE	56.29 n	31.25 qr	25.04 ij	42.12 rs	10.37 rst	4.26 pqr	79.50 b-f	67.01 d-g	1.49 cd	65.23 p

Remark: Mean followed by the same letter are not significant at p=0.05 by DMRT.

Table 2 Frequency distribution of peak viscosity mean data

class	Class limit	Class boundary	Frequency	Sample names						
1	13-41	12.5-41.5	5	PWHB011	WKNN016	YNB01	WKNN004	WKA005		
2	42-70	41.5-70.5	9	VIOLET	UTI201	WSJ003	VIOLETWHITE	CNW1537	SWEETVIOLET	
				PWHB011	CNW1602	UT1120				
3	71-99	70.5-99.5	9	F4305/ WSL002	UTI221	KKCW02	WTNGHB3003	M80	UT111	
				WKNN016/F4305	SWEETWAX254	WPK034/F4305				
4	100-128	99.5-128.5	8	WPK018/ F4305	F4305	CNW1643	CNW1504	WEWS003/F4305	UT1122	
				WPK008/ F4305	POP					
5	129-157	128.5-157.5	3	CHAINAT84-1	CNW1614	FANCY111				
6	158-186	157.5-186.5	1	WEWS003						

Table 3 Frequency distribution of breakdown mean data

class	Class limit	Class boundary	Frequency	Sample names					
1	0-16	0.5-16.5	11	YNB01	WKNN016	WKNN004	CNW1537	PWHB01	VIOLET
2	17-33	16.5-33.5	10	WTNGHB3003	UT111	KKCW02	UT1122	F4305/ WSL002	CNW1643
3	34-50	33.5-50.5	8	F4305	WKNN01/ F4305	WPK018/ F4305	M80	CNW1614	
4	51-66	50.5-66.5	5	POP	SWEET WAX254	CNW1504			
5	67-82	66.5-82-5	0						
6	83-99	82.5-99.5	1	WEWS003					

Table 4 Frequency distribution of setback viscosity mean data

class	Class limit	Class boundary	Frequency	Sample names					
1	6-15	6.5-15.5	22	PWHB01	WSJ003	WKA005	WKNN016	WKNN004	VIOLETWHITE
				KKCW02	CNW1602	PWHB01	SWEETWAX 254	F4305/ WSL002	WPK018/ F4305
				VIOLET	SWEETVIOLET	YNB01	CNW1643	UTI201	POP
				CNW1537	WPK034/ F4305	F4305	WTNGHB3003		
2	16-25	15.5-25.5	10	CNW1504	M80	WEWS003/F4305	UT1120	WKNN016/F4305	WPK008/ F4305
				CNW1614	WEWS003	FANCY111	CHAINAT 84-1		
3	26-35	25.5-35.5	1	UTI11					
4	36-45	35.5-45.5							
5	46-55	45.5-55.5							

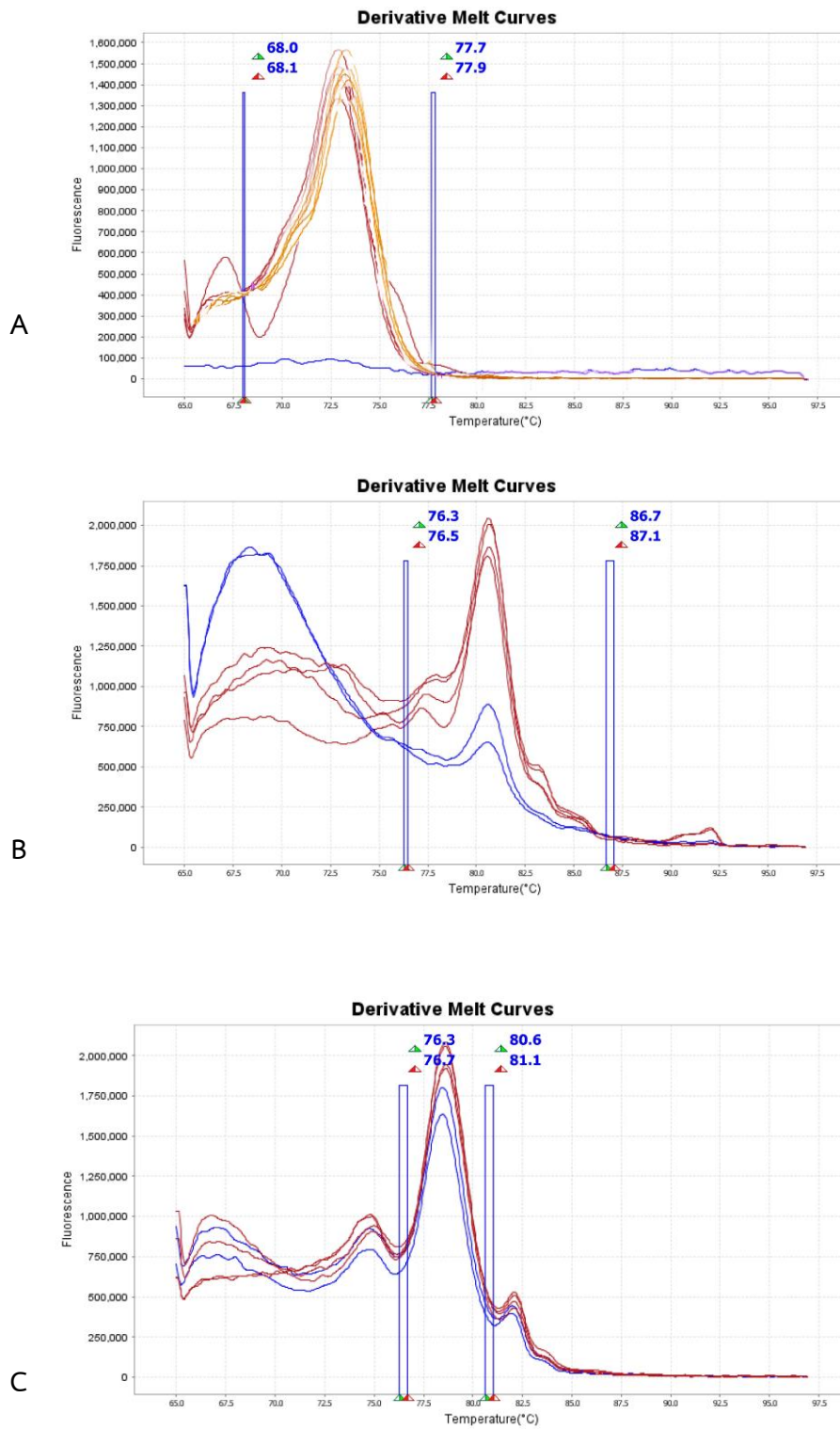


Figure 1 High-resolution DNA melting temperature analysis results for amplicon one SNP in primer set of GbF3/R3 (A), Du01F1/R1 (B) and Du02F2/R2 (C).

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ค่าวิเคราะห์ที่สามารถนำไปใช้เป็นเกณฑ์สำคัญในการประเมินข้าวโพดข้าวเหนียวให้มีความสัมพันธ์กับคุณภาพการบริโภค ได้แก่ ค่าความหนืดสูงสุด (Peak viscosity) ค่าแตกต่างระหว่างค่าความหนืดสูงสุดและความหนืดต่ำสุด (Breakdown) และค่าการคืนตัว (Setback viscosity) ตัวอย่างของลูกผสมข้าวโพดข้าวเหนียวที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท ค่าทั้งสามนี้ที่สามารถประเมินได้อยู่ในระดับชั้นเดียวกับพันธุ์การค้า นั่นคือมีลักษณะคุณภาพการบริโภคใกล้เคียงกัน

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GBSSI และ SSIII บริเวณที่เป็น exon จากตัวอย่างที่มีความหนืดต่ำ ได้แก่ WEWS003 CNW1614 และ ตัวอย่างที่มีความหนืดสูง ได้แก่ WKA005 CNW1537 พบว่า มีตำแหน่งที่มีความแปรปรวน GBSSI มี 2 ตำแหน่ง ได้แก่ C1350G C1944A และ SSIII มี 3 ตำแหน่ง ได้แก่ G551A T914C A1112G แต่สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์สำเร็จได้เพียง 3 คู่ไพรเมอร์ ดังนี้ GbF3/R3, Du01F1/R1, และ Du02F2/R2 มีค่าการคลายเกลียวที่ 73.1-74.4 77.7-78.5 80.8-82.1°C ตามลำดับ ซึ่งไพรเมอร์เหล่านี้จะถูกนำไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการทดลองต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อในการทดลองการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะเหนียวนุ่มได้ ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความกระชับมากขึ้น

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) -

12. เอกสารอ้างอิง

กฤษณา สุตทะสาร และ รานี เคนเหล็ยม. 2555. การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติความหนืดของแป้งและคุณภาพการหุงต้มระหว่างการศึกษาของสายพันธุ์ข้าวนาสวนน่าน้ำฝนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.

คลังข้อมูลดิจิทัลระบบศูนย์กลางข้อมูลการวิจัยการเกษตร.

ภัทร์ภณ ภูเพชร, สุนทรี สุวรรณสิขินน์ และ บุศราภา ลิมานนท์. 2552. สมบัติทางเคมีและกายภาพของแป้งข้าวสาลีและคุณภาพของขนมปังที่ใช้แป้งข้าวสาลีทดแทนแป้งสาลีบางส่วน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

Cao, H., J. Imparl-Radosevich, H. Guan, P.L. Keeling, M.G. James and A.M. Myers. 1999.

Identification of the soluble starch synthase activities of maize endosperm. Plant physiology. 120: 205-216.

Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer and E.C.K. Pang. 2005. An introduction to markers quantitative trait loci (QTL) mapping and maker-assist selection for crop important : The basic concepts. Euphytica 142: 169-196.

Ketthaisong, D., B. Suriham, R. Tangwongchai and K. Lertrat. 2014. Combining ability analysis in complete diallel cross of waxy corn (*Zea mays* var. ceratina) for starch pasting viscosity characteristics. Scientia Horticulturae 175: 229-235.

Wilson L.M., S.R. Whitt, A.M. Ibanez, T.R. Rocheford, M.M. Goodman and E.S. Buckler. 2004. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. *Plant cell* 16(10): 19-33.

Zobel, H.F. and A.M. Stephen. 1995. Starch: Structure, analysis, and application. In Stephen, A.M., Ed. *Food Polysaccharide and their Applications*. Marcel Dekker. Inc., New York.

13. ภาคผนวก -