



บทความวิจัย

การศึกษาสมบัติทางด้านความหนืดแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวและค้นหาสนิปส์ของยีน *Waxy* และ *Dull-I* ในข้าวโพดข้าวเหนียว

ธีรวิมล วงศ์วรรณ์^{1*} วรชมล มงคล² ฉลอง เกิดศรี² มณีรัตน์ รุจิณรงค์³ และ ยິงยศ พาลูกา¹

¹ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40000

²ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทอำเภอสรรพยาจังหวัดชัยนาท 17150

³กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตรเขตจตุจักรจังหวัดกรุงเทพมหานคร 10900

ข้อมูลบทความ	บทคัดย่อ
<p>Article history</p> <p>รับ: 25 ตุลาคม 2564</p> <p>แก้ไข: 6 เมษายน 2565</p> <p>ตอบรับการตีพิมพ์: 8 เมษายน 2565</p> <p>ตีพิมพ์ออนไลน์: 22 มิถุนายน 2565</p>	<p>การประเมินสมบัติทางด้านความหนืดของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว (Rapid Visco Analyzer หรือ RVA) จากแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว 30 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ (Inbred) ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสม (Hybrids) และข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสมเพื่อการค้า (Commercial hybrids) ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ พบว่าแป้งที่ได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ WKA005 WKNN016 YNB01 และ WPK018 มีค่าความหนืดสูงสุด การแตกตัวของแป้ง และการคาร์บอเนชันน้อยกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบ ในขณะที่แป้งที่ได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสม UT1122 UT111 และ UT122 มีค่าคาร์บอเนชันสูงกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบ เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Waxy</i> และ <i>Dull-I</i> ซึ่งแปลงข้อมูลเป็นเอนไซม์ GBSSI เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อะไมโลส และเอนไซม์ SSIII ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมหลักการต่อสายอะไมโลเพคตินในเม็ดแป้ง จากผลงานวิจัยนี้พบว่าความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>Waxy</i> 20 ตำแหน่ง แต่ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนมกับลักษณะความหนืด ในขณะที่การวิเคราะห์ความผันแปร นิวคลีโอไทด์ส่วนที่เป็นเอ็กซอนของยีน <i>Dull-I</i> มีตำแหน่งความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสนิปส์จำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ A28G C34T A55G G130T G213A A430C และ T480C เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอน มาถอดรหัสกรดอะมิโน นอกจากนั้นมีตำแหน่งความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสนิปส์ในตำแหน่งของยีน <i>Dull-I</i> ที่ G130T G213A และ T480C ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 3 ตำแหน่ง ซึ่งสัมพันธ์กับแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีค่าลักษณะทางด้านความหนืดต่ำ ดังนั้น ยีน <i>Dull-I</i> สามารถนำไปสร้างเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับนำไปใช้ในการช่วยคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะคุณภาพด้านการบริโภคที่ดี</p>
<p>คำสำคัญ</p> <p>ข้าวโพดข้าวเหนียว</p> <p>สมบัติทางด้านความหนืด</p> <p>สนิปส์</p>	

บทนำ

ข้าวโพดข้าวเหนียวมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่เหนียวนุ่มซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะจึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ดังนั้นในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์นอกจากจะเน้นการเพิ่มผลผลิตแล้ว คุณภาพด้านการบริโภคจึงเป็นเกณฑ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งด้วย การคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดีนั้นสามารถทำได้โดยการวัดด้วยประสาทสัมผัส โดยวิธีการชิมซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันแพร่หลาย

ผู้ชิมทั้งจากผู้บริโภคทั่วไป หรือผู้ที่มีความชำนาญ เป็นผู้ให้คะแนนการชิมค่าความเหนียวนุ่ม ซึ่งอาจเกิดความลำเอียงจากทักษะการประเมินและความชอบส่วนบุคคล ทำให้ผลการชิมมีความแปรปรวนในการทดสอบได้ จึงไม่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของความเหนียวนุ่มได้อย่างชัดเจน ปัจจุบันมีการนำเครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว (Rapid Visco Analysis, RVA) มาใช้ประเมินคุณภาพด้านการบริโภคเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ ในการประเมิน

*Corresponding author

E-mail address: theerawut6949@gmail.com @hotmail.com (T. Wongwarat)

Online print: 22 June 2022 Copyright © 2022. This is an open access article, production and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2022.5>

คุณภาพสำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานของลักษณะประจำพันธุ์ของสายพันธุ์ข้าวด้วยเครื่อง RVA พบว่าสายพันธุ์ข้าวที่พบค่าความหนืดสูงสุด (Peak viscosity) และ ค่าการแตกตัวของแป้ง (Breakdown viscosity) ที่น้อยกว่า มีผลทำให้ความเหนียวน้อยกว่า และสายพันธุ์ข้าวที่มีค่าการคืนตัวของแป้ง (Setback viscosity) มากกว่า หลังการหุงต้มทำให้ข้าวแฉิมมากกว่า และต้องใช้เวลาในการหุงต้มนานขึ้น (Sudtasam & Kenlueam, 2013) การควบคุมองค์ประกอบของแป้งและการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้วยความหนืดของข้าวโพดข้าวเหนียวเป็นผลจากอิทธิพลของยีน ได้แก่ *amylose extender (ae1)* *brittle endosperm2 (bt2)* *shrunk1 (sh1)* *shrunk2 (sh2)* *sugary (su1)* และ *GBSSI (wx1)* (Wilson et al., 2004) การกลายพันธุ์ของยีน *GBSS* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เม็ดแป้งในข้าวโพดข้าวเหนียว ส่งผลให้การสังเคราะห์อะไมโลสลดลง เม็ดแป้งจึงประกอบด้วยอะไมโลเพคตินร้อยละ 99 ทำให้ข้าวโพดข้าวเหนียวมีลักษณะเหนียวนุ่ม (Klosgen et al., 1986) การกลายพันธุ์ของยีน *Dull-I* มีผลทำให้โครงสร้างอะไมโลเพคตินเปลี่ยนแปลง (Fujita et al., 2007) โมเลกุลของอะไมโลเพคตินมีผลต่อการคืนตัวของแป้งของข้าวและเพิ่มการทนต่อการย่อย (Lapkhoksung, 2012) งานวิจัยนี้ใช้ได้ทำการตรวจหาลักษณะความผันแปรทางพันธุกรรมระดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเดียว (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) การเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน ที่อาจส่งผลถึงการแสดงออกของยีนและการทำงานของโปรตีนที่มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับสมบัติทางด้านความหนืด เพื่อการนำมาสู่การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปส์สำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการช่วยคัดเลือกที่แม่นยำ และช่วยร่นระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาสมบัติทางด้านความหนืดของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวและความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Waxy* และ *Dull-I* สำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีประสิทธิภาพ ให้ได้คุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวตามต้องการอย่างแม่นยำ

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว

1.1 การเตรียมแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว

ข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 30 สายพันธุ์ ประกอบด้วยข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์แท้ (Inbreds) พันธุ์ลูกผสม (Hybrids) และพันธุ์ลูกผสมเพื่อการค้า (Commercial hybrids) จำนวน 14 11 และ 5 สายพันธุ์ ตามลำดับ

1.2 วิเคราะห์คุณสมบัติด้านความหนืดของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว

วัดความหนืดของแป้งด้วยเครื่อง RVA (Rapid Visco Analysis

4500) โดยดำเนินการตามวิธีการ Newport Scientific method (Newport Scientific, 1997) ทำการบันทึกค่าต่าง ๆ ดังนี้ ค่าความหนืดสูงสุด ค่าแตกตัวของแป้ง ค่าการคืนตัวของแป้ง วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2. ค้นหาสนิปส์ของยีน *GBSSI* และ *Dull-I* ในข้าวโพดข้าวเหนียว

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

เมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว 30 สายพันธุ์ จากนั้นทำการคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ตัวอย่างละ 20 เมล็ด นำมาเพาะให้งอกเป็นต้นกล้าตัดใบอ่อนมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในโถงที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผงแล้วใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA extraction GF-1, Vivantis) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้การวัดค่าการดูดกลืนแสงนำสารสกัดดีเอ็นเอมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/μl) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ S3F (5'-GTTGACCACCCACTGTTCT-3') / S5R (5'-AGCACAAGCAAGCAGCTACA-3') (Bao et al., 2012) และไพรเมอร์ Du6F (5'-TGATTGGTGGTTGCAGATG-3') / Du8R (5'-TCCGAGAAAACGAAGTCCA-3') (ออกแบบสำหรับใช้ใน งานวิจัยนี้) ซึ่งจำเพาะกับดีเอ็นเอของยีน *GBSSI* และ *Dull-I* ตามลำดับ ตรวจสอบผลผลิตโดยใช้เจลอะกาโรส หลังจากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq (illumine) ด้วยเทคนิค BT-Sequencing (barcode tagged sequencing base on next generation sequencing) ตามกรรมวิธีของบริษัท Celemics ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม ClustalW2 ด้วยวิธี Multiple alignment ให้ถูกต้องตรงกันทุกตัวอย่าง แล้วนำไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาถอดรหัสกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ExPASy แล้วนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA-X ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 ซ้ำ

ผลการวิจัย

1. สมบัติทางด้านความหนืดของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว

ปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์ในการจัดแบ่งลักษณะความเหนียวนุ่มของข้าวโพดข้าวเหนียว งานวิจัยนี้จึงใช้ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสมเพื่อการค้า ซึ่งเป็นที่ยอมรับและนิยมบริโภคมาเป็นตัว

เปรียบเทียบ เมื่อนำแบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 30 สายพันธุ์ โดยนำมาศึกษาสมบัติทางด้านความหนืดด้วยเครื่อง RVA พบว่าค่าความหนืดสูงสุด ค่าแตกตัวของแป้ง ค่าการคินตัวของแป้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Table 1) เมื่อพิจารณาค่าความหนืดสูงสุดซึ่งเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับคุณภาพด้านการบริโภค พบว่าแบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวมีค่าความหนืดสูงสุดระหว่าง 14.12 – 180.46 อาร์วียู (RVU) โดยแบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสมเพื่อการค้ามีความหนืดสูงสุดและน้อยที่สุดเป็นแบ่งที่ได้มาจากสายพันธุ์แฟนซี 111 (Fancy 111) (153.54 RVU) และสายพันธุ์ไวโอเล็ตไวท์ 926 (Violet white 926) (56.29 RVU) ตามลำดับ แบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีค่าความหนืดสูงสุดต่ำกว่าแบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวจากสายพันธุ์ Violet white ได้แก่ แบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวที่ได้มาจากสายพันธุ์แท้ WKA005 WKNN016 YNB01 และ WPK018 นั่นคือแบ่งที่ได้มาจากสายพันธุ์ดังกล่าวมีลักษณะความเหนียวน้อยกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบ

เมื่อพิจารณาการแตกตัวของแป้ง ซึ่งเป็นค่าความแตกต่างระหว่างความหนืดสูงสุดและความหนืดต่ำสุด บ่งบอกถึงความสามารถในการคงทนต่ออุณหภูมิ และการกวน พบว่าแบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวมีค่าความหนืดสูงสุดระหว่าง 0.37–97.66 RVU คือ แบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสมเพื่อการค้า (Commercial hybrids) ที่มีค่าการแตกตัวของแป้งมากที่สุด คือ แบ่งที่ได้มาจากสายพันธุ์ชัยนาท 84–1 (Chai Nat 84–1) (66.45 RVU) และสายพันธุ์สวีทไวโอเล็ต (Sweet Violet) (23.12 RVU) แบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีค่าการแตกตัวของแป้งต่ำกว่าแบ่งจากสายพันธุ์สวีทไวโอเล็ต ได้แก่ แบ่งที่ได้มาจากสายพันธุ์ CNW1602 KKCW02 PWHB01 UTI11 UTI20 UTI22 WKA005 WPA018 WKNN016 WTNGHB003 YNB01 CNW 1537 CNW1602 และ UT1120 แต่มีเพียงค่าการแตกตัวของแป้งที่ได้มาจากสายพันธุ์ WKA005, WPK018, WKNN016 และ YNB01 เท่านั้นที่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 นั่นคือ สายพันธุ์แท้ดังกล่าวมีคุณภาพด้านความเหนียวน้อยกว่าตัวเปรียบเทียบ

เมื่อพิจารณาค่าการคินตัว หาได้จากผลต่างระหว่างความหนืดสุดท้ายกับความหนืดต่ำสุด ซึ่งค่าการคินตัวจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะเนื้อสัมผัส โดยแบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวมีค่าการคินตัวต่ำแสดงให้เห็นว่า เมื่อนำข้าวโพดข้าวเหนียวมาต้มสุกแม้ปล่อยให้เย็นลงแต่เนื้อสัมผัสยังคงเหนียวนุ่ม งานวิจัยนี้มีค่าการคินตัวของแบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวอยู่ระหว่าง 6.29 – 60.70 RVU แบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสมเพื่อการค้าที่มีค่าการคินตัวมากที่สุดและน้อยที่สุด คือ แบ่งที่ได้มาจากสายพันธุ์ชัยนาท 84–1 (23.29 RVU) และไวโอเล็ตไวท์ 926 (10.37 RVU) แบ่งข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีค่าการคินตัวสูงกว่าตัวเปรียบเทียบ ได้แก่ แบ่งที่ได้มาจากสายพันธุ์

UT1122 UTI11 และ UTI22

2. คันทาสนิปส์ของยีน *Waxy* และ *Dull-I* ในข้าวโพดข้าวเหนียว

2.1 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *Waxy*

งานวิจัยนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียว 30 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ GBSS ซึ่งถูกออกแบบมาให้จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายคือยีน *Waxy* พบว่าไพรเมอร์ GBSS สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 16 สายพันธุ์ (ผลสำเร็จร้อยละ 53.34) ขึ้นดีเอ็นเอมีขนาด 2,485 – 2,506 คู่เบส เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความใกล้เคียง ร้อยละ 97.54 – 98.80 กับข้าวโพดข้าวเหนียว (*Zea mays*) แสดงให้เห็นว่า ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือและความถูกต้องจริง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Waxy* จากข้าวโพดข้าวเหนียวที่ได้ ประกอบด้วย 11 อินทรอน (บริเวณอินทรอนที่ 4 – 14) และ 11 เอ็กซอน (บริเวณเอ็กซอนที่ 4 – 14) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากทุกตัวอย่างมาเทียบกัน พบว่ามีความผันแปรในรูปแบบการขาดหายไป (Deletion) และการเพิ่มเติม (Insertion) ซึ่งการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ มักเรียกว่า INDEL (Insertion and deletion) ซึ่งตรวจพบในทุกบริเวณอินทรอน ยกเว้นอินทรอนที่ 5 และส่วนบริเวณเอ็กซอน พบความผันแปรรูปแบบ INDEL พบว่าบริเวณเอ็กซอน ที่ 7 และเอ็กซอนที่ 10 เท่านั้น จำนวน 5 และ 15 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ เมื่อทำการถอดรหัสกรดอะมิโนจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้ พบว่าได้กรดอะมิโน 438 – 443 ชนิด เมื่อนำกรดอะมิโนมาเรียงเทียบกัน พบความผันแปรของลำดับกรดอะมิโนบริเวณเอ็กซอนที่ 7 และ 10 จำนวน 1 และ 5 ชนิด ตามลำดับ

2.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *Dull-I*

งานวิจัยนี้ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียว 30 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Du ซึ่งถูกออกแบบมาให้จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายคือยีน *Dull-I* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 28 สายพันธุ์ (ผลสำเร็จร้อยละ 93.34) ขึ้นดีเอ็นเอมีขนาด 1,808 – 1,812 คู่เบส เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความใกล้เคียงร้อยละ 98.02 – 98.23 กับข้าวโพดข้าวเหนียว (*Zea mays*) เห็นได้ว่าเป็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความน่าเชื่อถือและความถูกต้อง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Dull-I* จากข้าวโพดข้าวเหนียวที่ได้ ประกอบด้วย 3 อินทรอน (บริเวณอินทรอนที่ 3 – 5) และ 2 เอ็กซอน (บริเวณเอ็กซอนที่ 4 – 5) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอนมาเทียบกัน พบว่ามีความผันแปรกระจายอยู่ในบริเวณเอ็กซอนทั้งสองในรูปแบบการสนิปส์ (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) 7 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่

A28G C34T A55G G130T G213A A430C และ T480C เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอนมาถอดรหัสกรดอะมิโน พบว่าได้กรดอะมิโน 170 ชนิด เมื่อนำกรดอะมิโนมาเรียงเทียบกัน พบว่าตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ ตำแหน่งที่ G130T G213A และ T480C ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 3 ตำแหน่ง ดังนี้ ตำแหน่งที่ 43 71 และ 161 เมื่อนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 28 สายพันธุ์ มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (Figure 2) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ 10 สายพันธุ์ สายพันธุ์ลูกผสม 9 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ลูกผสมเพื่อ

การค้า 5 สายพันธุ์ ลำดับของกรดอะมิโนจากข้าวโพดข้าวเหนียวดังกล่าวนี้มีกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 43 71 และ 161 เป็น กรดแอสปาร์ติก (Aspartic acid) ไลซีน (Lysine) และอะลานีน (Alanine) ตามลำดับ

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ WKA005 WKNN016 YNB01 และ WPK018 ซึ่งมีกรดอะมิโนในตำแหน่ง ที่ 43 71 และ 161 เป็น กรดกลูตามิก (Glutamic acid) อาร์จินีน (Arginine) และวาเลีน (Valine) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาพร้อมกับสมบัติทางด้านความเหนียว พบว่ากลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีค่าเหนียวสูงสุด และค่าการแตกตัวของแป้งน้อยกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสมเพื่อการค้าซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ

Table 1 Pasting properties of various waxy corn flour and genotype for SNPs in *Dull-1* gene

cultivars	Type	Peak viscosity (RVU)	Breakdown (RVU)	Set back (RVU)	SNPs position		
					130	213	480
F4305	Inbred	98.45 gh	35.50 gh	15.06 h-k	GG	GG	TT
KKCW02	Inbred	74.37 lk	21.79 j-l	11.95 n-r	GG	GG	TT
M80	Inbred	82.29 i	38.97 fg	13.70 j-n	GG	GG	TT
PWHB01	Inbred	64.29 mn	15.04 ln	13.04 i-k	GG	GG	CT
UTI11	Inbred	94.00 h	20.04 km	32.50 c	GT	GG	TT
UTI20	Inbred	57.08 n	9.45 no	13.62 j-m	GT	GA	CT
UTI22	Inbred	72.91 lk	11.20 mn	60.70 a	GT	GG	TT
WEWS003	Inbred	180.46 a	97.66 a	21.08 e	GG	GG	TT
WKA005	Inbred	38.12 oq	0.37 p	8.79 tu	TT	AA	CC
WPK018	Inbred	14.12 s	0.37 p	6.29 q	TT	AA	CC
WKNN016	Inbred	34.12 q	0.37 p	9.66 s-u	TT	AA	CC
WSJ003	Inbred	55.00 n	32.62 h	8.12 uv	GG	GG	TT
WTNGHB3003	Inbred	75.87 u	19.25 l-n	15.25 h-k	GG	GG	TT
YNB01	Inbred	33.91q	0.37 p	11.54 o-s	TT	AA	CC
CNW142430505	Hybrid	110.33 e	42.54 ef	15.54 h-j	GG	GG	TT
CNW142430519	Hybrid	99.87 gh	43.04 e	13.04 m-p	GG	GG	TT
CNW1504	Hybrid	109.04 ef	56.70 c	15.45 h-j	GG	GG	TT
CNW1515	Hybrid	112.94 e	40.83 ef	17.77 fg	GT	GA	CT
CNW1537	Hybrid	61.04 lm	11.08 mn	14.20 i-m	GG	GG	TT
CNW1602	Hybrid	69.08 kl	22.45 j-l	13.04 m-p	GT	GA	CT
CNW1608	Hybrid	98.72 gh	41.85 ef	14.22 i-m	GG	GG	TT
CNW1614	Hybrid	99.77 gh	41.75 ef	16.18 gh	GT	GA	CT
CNW1643	Hybrid	103.33 fg	34.20 h	12.37 m-q	GT	GG	CT
UT1120	Hybrid	69.04 kl	15.12 ln	15.91 g-i	GT	GA	CT
UT1122	Hybrid	114.63 e	23.70 jk	56.12 b	GT	GA	CT
Chai Nat 84-1	Commercial hybrid	140.83 c	66.45 b	23.29 d	GG	GG	TT
Fancy 111	Commercial hybrid	153.54 b	57.91 c	22.33 de	GG	GG	TT
Sweet violet	Commercial hybrid	58.95 lm	23.12 jk	11.16 p-s	GG	GG	TT
Sweet wax 254	Commercial hybrid	98.12 gh	51.04 d	13.25 l-o	GT	GA	CT
Violet white 926	Commercial hybrid	56.29 n	25.04 ij	10.37 r-t	GG	GG	TT

Means within the same column with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

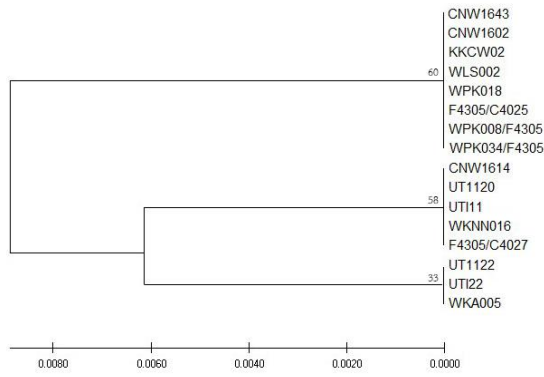


Figure 1 Phylogenetic relationships based on amino acid sequence encoded in the *Waxy* gene of waxy corns, constructed using Neighbor-Joining method. Number on branches is bootstrap values obtained for 1000 replicates.

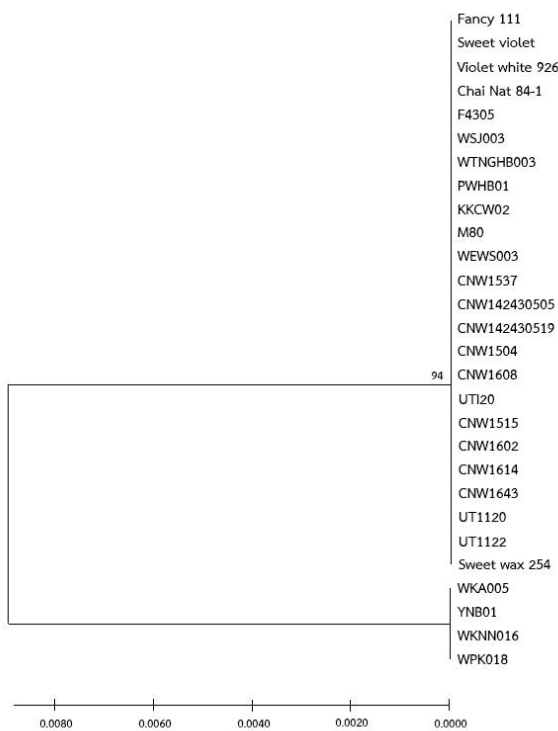


Figure 2 Phylogenetic relationships based on amino acid sequence encoded in the *Dull-I* gene of waxy corns, constructed using Neighbor-Joining method. Number on branches is bootstrap values obtained for 1000 replicates.

วิจารณ์ผลการวิจัย

สมบัติทางด้านความเหนียวของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว เป็นลักษณะที่ใช้บ่งชี้ความเหนียวนุ่ม และการแข็งตัวของเมล็ดข้าลง ภายหลังจากการต้มสุกของข้าวโพดข้าวเหนียวได้ดี (Simla & Hemathulin, 2012) การคัดเลือกสายพันธุ์แท้ข้าวโพด ข้าวเหนียว เพื่อสร้างลูกผสมที่มีคุณภาพด้านการบริโภคที่ดี สามารถพิจารณาจากค่าความเหนียวสูงสุด (Ketthaisong & Lertrat, 2015) และค่าความเหนียวสูงสุดมีความสัมพันธ์กับการคั่วตัวของแป้ง (Jane et al., 1999) ค่าความเหนียวสูงสุด ค่าการแตกตัว และค่าการคั่วตัวของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว สามารถใช้บ่งชี้คุณภาพด้านการบริโภคของ

ข้าวโพดข้าวเหนียวได้ค่าความเหนียวสูงสุด และค่าการแตกตัวซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้คุณภาพของแป้งในทางเดียวกัน จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแป้งที่ได้มาจากข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ ได้แก่ WKA005 WKNN016 YNB01 และ WPK018 มีค่าความเหนียวสูงสุด และค่าการแตกตัวของแป้งน้อยกว่าแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์เปรียบเทียบ แสดงให้เห็นว่าข้าวโพดข้าวเหนียวดังกล่าวมีคุณภาพด้านการบริโภคไม่เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการสร้างลูกผสมในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งตรงข้ามกับค่าการคั่วตัว ถ้าหากแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวมีค่าการคั่วตัวสูง จะบ่งชี้ว่าข้าวโพดข้าวเหนียวจะลักษณะเนื้อสัมผัสแข็งกระด้างเมื่อต้มสุกแล้วปล่อยให้เย็นตัวลง จากผลการทดลองนี้เห็นได้ว่าแป้งที่ได้มาจากข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสมจาก UT1122 UTI11 และ UTI22 มีค่าการคั่วตัวสูงกว่าพันธุ์เปรียบเทียบ นั่นคือมีแนวโน้มว่าเมื่อต้มสุกแล้วปล่อยให้เย็นจะมีลักษณะเนื้อสัมผัสแข็ง

ยีน *Waxy* มีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 4,339 คู่เบส (หมายเลขจำเพาะนิวคลีโอไทด์ EU041691) ประกอบด้วยบริเวณอินทรอน (ส่วนที่ไม่ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน) 13 อินทรอน และบริเวณเอ็กซอน exon (ส่วนที่ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน) 14 เอ็กซอน (Klosgen et al., 1986; Zheng et al., 2013) เมื่อถูกถอดรหัสจะได้เป็นโปรตีน GBSSI มีบทบาทหน้าที่ในการสังเคราะห์อะไมโลส การกลายพันธุ์ของยีน GBSSI ส่งผลให้มีการสังเคราะห์โปรตีน GBSSI ลดลงจึงส่งผลกระทบต่อปริมาณอะไมโลส งานวิจัยนี้ตรวจพบความผันแปรรูปแบบ INDEL พบว่าบริเวณเอ็กซอน ที่ 7 และเอ็กซอนที่ 10 เท่านั้น จำนวน 5 และ 15 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานวิจัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Waxy* จากข้าวโพดข้าวเหนียว 55 หมายเลขพันธุ์ พบว่าบริเวณรอยต่อระหว่างอินทรอนและเอ็กซอนที่ 7 ($wx - D7$) และเอ็กซอนที่ 10 ($wx - D10$) มีการกลายพันธุ์ในรูปแบบการขาดหายไป 30 และ 15 คู่เบส ตามลำดับ (Fan et al., 2008) เมื่อทำการถอดรหัสกรดอะมิโนจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้พบว่า ความผันแปรของลำดับกรดอะมิโนบริเวณเอ็กซอนที่ 7 และ 10 จำนวน 1 และ 5 ชนิด ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ $wx - D7$ พบการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์พบได้ในรอยต่อระหว่างเอ็กซอนและอินทรอน (exon - Intron) ที่ 7 มีผลทำให้เกิดรหัสหยุดเป็นผลให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน GBSSI (Bao et al., 2012) การขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ 15 คู่เบสของบริเวณ $wx - D10$ ทำให้ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการถอดรหัสพันธุ์กรรมหายไป 5 ชนิด มีผลทำให้รูปแบบโดเมนของ glucosyl transferase domain 1 (GTD1) ของโปรตีน GBSSI เปลี่ยนไป (Fan et al., 2008) จากรายงานวิจัยการศึกษาปริมาณอะไมโลสในข้าวโพดข้าวเหนียวพบว่าแป้งข้าวโพดข้าวโพดที่ได้จากแต่ละตัวอย่างมีปริมาณอะไมโลส น้อยและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Ketthaisong & Lertrat, 2015)

ปริมาณอะไมโลสในแป้งที่ลดลงมีผลทำให้ลักษณะความหนืดสูงสุดเป็นไปในทิศทางที่สูงขึ้น (Valle et al., 1996) จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากข้อมูลลำดับกรดอะมิโน พบว่าการจัดกลุ่มไม่สัมพันธ์กับข้อมูลลักษณะค่าความหนืด ดังนั้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้จึงไม่เหมาะสำหรับการนำมาใช้ออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการตรวจหาความเหนียวนุ่มในข้าวโพดข้าวเหนียว อย่างไรก็ตามมีการใช้ตำแหน่งกลายพันธุ์ wx - D7 และที่ 10 wx - D10 เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวพื้นเมืองและข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดข้าวเหนียวจีน (Fan et al., 2008; Bao et al., 2012)

ยีน *Dull* มีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 11,617 คู่เบส (หมายเลขจำเพาะนิวคลีโอไทด์ JF273457) ประกอบด้วยบริเวณอินทรอน 16 อินทรอน และบริเวณเอ็กซอน 17 เอ็กซอน (Lin et al., 2012) เมื่อถูกถอดรหัสจะได้เป็นโปรตีน SSIII มีบทบาทหน้าที่ในการต่อสายแขนงพอลิเมอร์ของอะไมโลเพคตินให้ยาวขึ้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนมีผลต่อการทำงานของโปรตีน SSIII ทำให้โครงสร้าง อะไมโลเพคตินเปลี่ยนแปลงด้วย ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งดังกล่าวสามารถนำไปพัฒนาต่อให้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปส์เพื่อเป็นเครื่องมือช่วยคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะคุณภาพการบริโภคที่ดี

สรุปผลการวิจัย

สมบัติทางด้านความหนืดของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว ได้แก่ ค่าความหนืดสูงสุด ค่าการแตกตัวของแป้ง และ ค่าการคืนตัว เป็นเกณฑ์สำคัญที่ใช้ในการช่วยคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว ในระหว่างการปรับปรุงพันธุ์ งานวิจัยนี้พบว่า แป้งที่ได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ WKA005 WKNN016 YNB01 และ WPK018 มีค่าความหนืดสูงสุดและค่าการแตกตัวน้อยกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสมเพื่อการค้าที่ใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีคุณภาพด้านการบริโภคที่ไม่ดีพอ ในขณะที่แป้งที่ได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ UT1122 UT11 และ UT122 มีค่าการคืนตัวสูงกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบ นั่นคือเมื่อนำข้าวโพดข้าวเหนียวมาต้มจนสุกและปล่อยให้เย็นพบว่า ลักษณะเนื้อสัมผัสแข็งกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสมเพื่อการค้าซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ผลของการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Waxy* และ *Dull-I* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอนของยีน *Dull-I* มีความความผันแปรทางพันธุกรรมรูปแบบสนิปส์ ที่มีผลเปลี่ยนแปลงการเรียงตัวของกรดอะมิโน และมีบทบาทหน้าที่สำคัญต่อลักษณะความเหนียวซึ่งเป็นลักษณะคุณภาพด้านการบริโภคที่สำคัญของข้าวโพดข้าวเหนียว การตรวจพบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมนี้สามารถนำมาออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปส์

เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีคุณภาพด้านการบริโภคที่ดีต่อไป

References

- Bao, J. D., Yao, J. Q., Zhu, J. Q., Hu, W. M., Cai, D. G., Li, Y., Shu, Q. Y. & Fan, L. J. (2012). Identification of glutinous maize landraces and inbred lines with altered transcription of *waxy* gene. *Molecular Breeding*, 30, 1707–1714.
- Fan, L., Quan, L., Leng, X., Guo, X., Hu, W., Ruan, S., Ma, H., & Zeng, M. (2008). Molecular evidence for post-domestication selection in the *waxy* gene of Chinese *waxy* maize. *Molecular Breeding*, 22, 329–338.
- Fujita, N., Yoshida, M., Kondo, T., Saito, K., Utsumi, Y., Tokunaga, T., Nishi, A., Satoh, H., Park, J. H., Jane, J. L., Miyao, A., Hirochika H., & Nakamura, Y. (2007). Characterization of SSIIIa-deficient mutants of rice: the function of SSIIIa and pleiotropic effects by SSIIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiology*, 144(4), 2009–2023.
- Jane, J., Chen, Y. Y., Lee, L. F., McPherson, A. E., Wong, K. S., Radosavljevic, M., & Kasemsuwan, T. (1999). Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chemistry*, 76(5), 629–637.
- Ketthaisong, D., & Lertrat, K. (2015). Application of a rapid visco analyzer in inbred line evaluation for producing single cross *waxy* corn hybrid variety. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 43(supplement 1), 888–893. (in Thai)
- Klosgen, R. B., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z., & Saedler, H. (1986). Molecular analysis of the *waxy* locus of *Zea mays*. *Molecular and general Genetics*, 203, 237–244.
- Lapkoksung, A. (2012). *Effects of amylose content and amylopectin structure of different starch varieties on resistant starch type III formation*. (Master's thesis). Nakhon Ratchasima. Suranee University of Technology. (in Thai)
- Lin, Q., Huang, B., Zhang, M., Zhang, X., Rivenbark, J., Lappe, R. L., James, M. G., Myers, A. M., & Hennen-Bierwagen, T. A. (2012). Functional interactions between starch

- synthase III and isoamylase-type starch-debranching enzyme in maize endosperm. *Plant Physiology*, 158(2), 679–692.
- Newport Scientific. (1997). *Operation manual for the series 4 rapid visco analyzer*. New South Wales: Newport Scientific Pty, Ltd.
- Simla, S., & Hemathulin, A. (2012). Physiochemical properties of flour waxy corn. *Khon Kaen Agricultural Journal*, 40(supplement 1), 455–459. (in Thai)
- Sudtasarn, G., & Kenlueam, R. (2013). Changes during storage in starch viscosity and quality of Northeastern rainfed lowland rice lines. *Proceeding of the 30th rice and temperate cereal crops annual conference* (pp. 314–315). Bangkok: Bureau of rice reserch and development. (in Thai)
- Valle, G. D., Colonna, P., & Patria, A. (1996). Influence of amylose content on the viscous behavior of low hydrated molten starches. *Journal of Rheology*, 40, 347–362.
- Wilson, L. M., Whitt, S. R., Ibanez, A. M., Rocheford, T. R., Goodman, M. M., & Buckler, E. S. (2004). Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. *The Plant Cell*, 16(10), 2719–2733.
- Zheng, H., Wang, H., Yang, H., Wu, J., Shi, B., Cai, R., Xu, Y., Wu, A., & Luo, L. (2013). Genetic diversity and molecular evolution of Chinese waxy maize germplasm. *PLoS One*, 8(6): e66606.

Research article

Study on pasting properties of waxy corn flour and identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *Waxy* and *Dull-I* gene in waxy corn

Theerawut Wongwarat^{1*} Wassamon Momkol² Chalong Kerdsri²
Maneerat Rujinarong³ and Yingyod Paluka¹

¹*Khon Kaen Field Crops Research Center, Mueang Khon Kaen, Khon Kaen, 40000*

²*Chai Nat Crops Research Center, Supphaya, Chai Nat, 171503*

³*Planning and Technical Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok, 10900*

ARTICLE INFO**Article history**

Received: 25 October 2021

Revised: 6 April 2022

Accepted: 8 April 2022

Online published: 22 June 2022

Keyword

Waxy corn

Pasting properties

Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

ABSTRACT

The pasting properties of waxy corn flours were investigated for evaluation of thirty waxy corn cultivars including fourteen inbreds, eleven hybrids and five commercial hybrids as checks using Rapid Visco Analyzer (RVA). The result of WKA005 WKNN016 YNB01 and WPK018 waxy corn flours showed that the peak viscosity and their breakdown viscosities were found in lower values when compared to the control cultivars while the setback viscosities of UT1122 UT111 and UT122 waxy corn flours were found in higher values when compared to the control cultivars. The nucleotide sequences of the *Waxy* gene and the *Dull-I* gene respectively encoding the enzyme GBSSI responsible for amylose synthesis and the enzyme SSIII responsible for the main control of the elongation of amylopectin chains in flour were determined. Sequence analysis revealed twenty nucleotide differences in the *Waxy* gene but it was not found the relationship between genotype and pasting viscosity. While exon nucleotide variation analysis of the *Dull-I* gene was detected seven SNPs; A28G, C34T, A55G, G130T, G213A, A430C and T480C. Only three SNPs; G130T G213A and T480C, within a coding changed the three amino acid sequences associating with low pasting viscosity of waxy corn flour. The result suggested that SNPs in the *Dull-I* position could be potentially developed as DNA marker for consumption quality of waxy corn.

*Corresponding author

E-mail address: theerawut6949@gmail.com (T. Wongwarat)

Online print: 22 June 2022 Copyright © 2022. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2022.5>