

การพัฒนาเครื่องหมายสปีส์จากยีน *Dull* เพื่อจำแนกข้าวโพดข้าวเหนียว ที่มีลักษณะความเหนียวนุ่มอย่างแม่นยำ

SNPs Marker Development from *Dull* Gene for Accuracy of Identification Sticky Characteristic in Waxy Corns

ธีรวุฒิ วงศ์รัตน์¹ วรชมน มงคล² ฉลอง เกิดศรี² ภาคภูมิ ถิ่นคำ¹ มณีรัตน์ รุจิณรงค์³ ยิงยศ พาลูกา¹
Theerawut Wongwarat¹ Wassamon Mongkol² Chalong Kerdsri² Parkpoom Thinkum¹
Maneerat Rujinarong³ Yingyod Paluka¹

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายสปีส์สำหรับการจำแนกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะเหนียวนุ่ม โดยดำเนินงานวิจัยที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ปี พ.ศ. 2560-2564 การประเมินลักษณะความเหนียวนุ่มของข้าวโพดข้าวเหนียวที่ได้จากผู้ทดสอบชิมนั้นมีความแปรปรวนสูงไม่สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวได้ จึงได้พัฒนาเครื่องหมายสปีส์จากยีน *Dull* มาเป็นเครื่องมือช่วยในการจำแนกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะความเหนียวนุ่มเปรียบเทียบกับข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้า จากการศึกษาข้าวโพดข้าวเหนียว จำนวน 30 พันธุ์/สายพันธุ์ พบว่า ค่าความหนืดสูงสุด ค่าการแตกตัวของเม็ดแป้ง และค่าการคั้นตัว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมกับสมบัติทางด้านความหนืด พบว่าตำแหน่งที่ N130 ยีน *Dull* มีความสัมพันธ์กับค่าความหนืดสูงสุดและการแตกตัวของเม็ดแป้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จึงนำไปใช้ในการออกแบบเครื่องหมายสปีส์ Du-1F/1R และตรวจสอบด้วยเทคนิค high resolution melting (HRM) พบว่า สามารถจำแนกจีโนไทป์ได้ 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบ GG GT และ TT ซึ่งรูปแบบจีโนไทป์ GG มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ทางบวกกับความหนืดสูงสุดและค่าการแตกตัวของแป้งในข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้า ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ และข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสม ขณะที่รูปแบบจีโนไทป์ TT มีความสัมพันธ์ทางลบกับความหนืดสูงสุดและการแตกตัวของเม็ดแป้งในข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้เท่านั้น นอกจากนี้เครื่องหมายสปีส์ Du-1F/1R สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในข้าวโพดข้าวเหนียว 108 พันธุ์ ได้ผลสำเร็จร้อยละ 100 และสามารถตรวจสอบรูปแบบของสปีส์ได้ทุกตัวอย่าง จากการสุ่ม

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น อำเภอเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40000

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

² ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท อำเภอสรรพยา จังหวัดชัยนาท 171503

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

³ กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

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

ตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีรูปแบบจีโนไทป์ที่ต่างกันจำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค HRM พบว่าการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง N130 มีความถูกต้องตรงกันร้อยละ 100 แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย สนิปส์ Du-1F/1R มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องแม่นยำ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะเหนียวนุ่มได้

คำสำคัญ: ข้าวโพดข้าวเหนียว ลักษณะความเหนียวนุ่ม เครื่องหมายสนิปส์

ABSTRACT

The objective of this research was to develop molecular markers for identifying diverse stickiness levels of waxy corn. This research was conducted at Khon Kaen Field Crops Research Center during 2017-2021. SNPs (single nucleotide polymorphisms) marker was developed to identify stickiness character of waxy corn that gave similarly as commercial waxy corn hybrid, comparative variety. The pasting properties: peak viscosity, breakdown and setback of thirty waxy corn flour were also performed. The results revealed that statistically difference with 95% confidence interval levels. SNPs position at N130 of *Dull* genes found significantly related to peak viscosity and breakdown ($p \leq 0.05$). In this study, N130 SNPs markers; Du-1F/1R was designed. Also, high-resolution melting analysis (HRM) was developed to detect SNPs genotypes. The results showed that three SNPs genotypes were achieved, including GG, GT and TT. The genotype GG was positively correlated with the peak viscosity and breakdown. While, the genotype TT showed a negative correlation with the peak viscosity, and breakdown. Evaluation of SNPs markers in 108 waxy corns were used as a template for amplification by Du-1F/1R SNPs marker. The results showed the success rate of amplification were 100% and found three SNPs genotypes. Then 30 random samples were analyzed by DNA sequencing. The results showed all genotype samples matched DNA sequencing and HRM analysis accuracy for N130 genotyping was 100%. This study demonstrates that Du-1F/1R SNPs marker was an efficiency and accuracy. This can be used for identifying stickiness characteristic of waxy corns.

Key words: waxy corns, sticky characteristics, SNPs marker

คำนำ

ข้าวโพดข้าวเหนียว (*Zea mays* subsp. *mays*) เป็นข้าวโพดรับประทานฝักสด มีการผลิตและจำหน่ายในตลาดท้องถิ่นตลอดทั้งปี ในปี พ.ศ. 2564 มีเนื้อที่ปลูกข้าวโพดข้าวเหนียว 22,860 ไร่ ได้ผลผลิต 22,852 ตัน คิดเป็นผลผลิตต่อไร่ 1,302 กิโลกรัม ทำรายได้ให้แก่เกษตรกร 10,000-20,000

บาทต่อไร่ต่อปี คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1,000 ล้านบาทต่อปี (สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน, 2564) ความต้องการบริโภคข้าวโพดฝักสดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ผู้บริโภคให้ความสนใจอาหารสุขภาพมากขึ้น เนื่องจากข้าวโพดข้าวเหนียวมีคุณค่าทางโภชนาการที่ดี เมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวมีความเหนียวนุ่มเป็นคุณลักษณะพิเศษเฉพาะตัว จึงเป็นเป้าหมายสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว การใช้ประสาทสัมผัสโดยเฉพาะด้านการชิม นั้น อาจเกิดความลำเอียงได้ ไม่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของลักษณะเหนียวนุ่มได้อย่างชัดเจน ปัจจุบันมีการนำเครื่องวัดความหนืดแบบยิ่งยวด (rapid visco analyzer; RVA) มาใช้ในการคัดเลือกลักษณะความเหนียวนุ่ม เมื่อน้ำแป้งได้รับความร้อนพันธะไฮโดรเจนภายในเม็ดแป้งจะถูกทำลาย เม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำและพองตัวขยายใหญ่ขึ้น ขณะเดียวกันน้ำที่เหลืออยู่รอบๆ จะมีปริมาณน้อยลง ทำให้เกิดความหนืดเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่มีความหนืดสูงสุด (peak viscosity) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและมีการกวนอย่างต่อเนื่องต่อไปอีก จะทำให้โครงสร้างภายในเม็ดแป้งแตกตัว (breakdown) และเมื่อลดอุณหภูมิลง ทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้นอีก ซึ่งเป็นความหนืดที่เกิดจากการเรียงตัวกันใหม่ของโมเลกุลอะไมโลสที่หลุดออกจากเม็ดแป้งหรือการคืนตัวของแป้ง (setback) มีงานวิจัยที่ใช้เครื่องวัดความหนืดแบบยิ่งยวดนี้ ในการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ข้าวโพดข้าวเหนียวสามารถคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีค่าความสามารถในการรวมตัวทั่วไป (general combining ability; GCA) ในลักษณะความหนืดสูงได้ (دنกุล และ กมล, 2558) อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวต้องใช้เวลาวิเคราะห์ พื้นที่ปลูก แรงงานมาก และยังแปรปรวนจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อมอีกด้วย

การนำเทคโนโลยีชีวโมเลกุลมาประยุกต์ในการออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเครื่องหมายสเนปส์ (SNPs marker) ซึ่งเป็นการตรวจสอบตำแหน่งที่มีความผันแปรของพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความเหนียวนุ่มของข้าวโพดข้าวเหนียว มีรายงานการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 9 ยีนว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ starch branching enzyme interaction protein (SIP-1) starch branching enzyme IIb (aeIIb) ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit (shrunken2; sh2) และ waxy สามารถแยกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีความเหนียวที่ต่างกันได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit (Brittle-2; Bt2) starch synthase isoform zSSII-2 (zSSIIb) starch branching enzyme 2a (IIa) starch branching enzyme III (SBE3) และ *Dull* ไม่สามารถแยกข้าวโพดข้าวเหนียวที่ต่างกันได้ (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2565) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าหากเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *Dull* ในข้าวโพด จะส่งผลให้ไม่มีการทำงานของเอนไซม์ SSIIIa และการทำงานของเอนไซม์ SBEIIa และ SSII จะลดลง ส่งผลต่อการลดลงของความยาวและจำนวนการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งก้านของอะไมโลเพคติน ดังนั้นจึงมีผลต่อโครงสร้างของอะไมโลเพคติน และสมบัติทางด้านความหนืด (Cao *et al.*, 2000) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายสเนปส์สำหรับการจำแนกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะเหนียวนุ่มที่มีความแม่นยำ ช่วยลดเวลา พื้นที่ปลูก และแรงงาน เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือกในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาสมบัติทางความหนืด

แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ฟลาวร์ (flour) และ สตาร์ช (starch) ฟลาวร์เป็นผลิตภัณฑ์แห่งที่ผลิตจากเมล็ดบดละเอียดเป็นผงและร่อนผ่านตะแกรง ดังนั้นส่วนประกอบของฟลาวร์จึงประกอบด้วยสารอาหารต่างๆที่มีอยู่ในวัตถุดิบดั้งเดิม คือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เส้นใยแร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น ในขณะที่สตาร์ช คือ ส่วนของฟลาวร์ที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและไขมันออก (อุทัยวรรณ, 2553) จึงเลือกใช้ฟลาวร์เนื่องจากใกล้เคียงกับสภาพของการบริโภคมากกว่า

1.1 การเตรียมฟลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียว

ข้าวโพดข้าวเหนียว จำนวน 30 พันธุ์/สายพันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้จำนวน 14 สายพันธุ์ ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมจำนวน 10 คู่ผสม และข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้าใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบจำนวน 6 พันธุ์ เก็บเกี่ยวอายุ 20 วัน หลังออกไหม แยกเมล็ดออกจากฝักอบที่อุณหภูมิ 50°C นาน 12 ชั่วโมง โดยใช้ตู้อบลมร้อน นำออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็น บดด้วยเครื่องบดจนได้เป็นผงละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงไนลอนที่มีขนาดรู 100 เมช (mesh)

1.2 วิเคราะห์ลักษณะความหนืดของฟลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียว

วัดความหนืดด้วยเครื่อง rapid visco analysis รุ่น 4500 (RVA) ตามกรรมวิธีการ Newport Scientific method (Newport Scientific, 1997) มีหน่วยเป็น RVU (rapid visco units) เป็นหน่วยการวัดความหนืดและความเหนียวโดยการวัดการแข็งตัวและการหยุดตัวของสตาร์ช เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางความหนืดและความเหนียวของสตาร์ช

2. ค้นหาชนิดของยีน *Dull*

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

คัดเลือกเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวที่สมบูรณ์ทั้ง 30 พันธุ์/สายพันธุ์ตัวอย่างละ 20 เมล็ด นำมาเพาะให้งอกเป็นต้นกล้า ตัดใบอ่อนเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในโถงที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผงแล้วสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA extraction GF-1, Vivantis) จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวัดค่าการดูดกลืนแสงให้มีค่าระหว่าง 1.65-1.85 จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Du6F (5'-TGATTGGTGGTTTGCAGATG-3') / Du8R (5'-TCCGAGAAAACGAAGTCCA-3') (ออกแบบใช้สำหรับงานวิจัยนี้) ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีอะการโรสเจลอิเล็กโตโฟลิซิส จากนั้นทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง IlluminaHiSeq (illumine) ด้วยเทคนิค BT-Sequencing (barcode tagged sequencing base on next generation sequencing) ตามกรรมวิธีของบริษัท Celomics ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

3. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโน

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกับกันโดยใช้โปรแกรม ClustalW2 ให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องตรงกันทุกตัวอย่าง แล้วนำไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากล GenBank และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาถอดรหัสกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ExPASy

4. ตรวจหาสนิปส์ด้วยเทคนิค high resolution melting (HRM)

4.1 ออกแบบเครื่องหมายสนิปส์

ออกแบบเครื่องหมายสนิปส์โดยใช้โปรแกรม NCBI Primer-BLAST โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอนที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมชนิดสนิปส์ ที่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน

4.2 การตรวจหารูปแบบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค HRM

เจือจางสารสกัดดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายสนิปส์ที่ออกแบบจาก 4.1 ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (LightCycle® 480 real-time PCR, Roche, Switzerland) วิเคราะห์ค่าการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ (melting temperature; T_m) ที่ติดตั้งอยู่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง

5. ตรวจสอบความถูกต้องและแม่นยำของเครื่องหมายสนิปส์

5.1 การสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบตำแหน่งเครื่องหมายสนิปส์ด้วยเทคนิค HRM

เมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว จำนวน 108 พันธุ์/สายพันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสม พันธุ์การค้าจำนวน 7 พันธุ์ ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้จำนวน 55 สายพันธุ์ และข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมจำนวน 46 คู่ผสม คัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ ตัวอย่างละ 20 เมล็ด นำมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบตำแหน่งเครื่องหมายสนิปส์ด้วยเทคนิค HRM เช่นเดียวกับ 4.2

5.2 ตรวจสอบตำแหน่งเครื่องหมายสนิปส์ด้วยเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

สุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอจาก 5.1 ที่มีรูปแบบจีโนไทป์ GG GT และ TT รูปแบบละ 8 12 และ 10 ตัวอย่าง ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่นเดียวกับ 2.1

6. วิเคราะห์สถิติ

- วิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลสมบัติทางด้านความหนืด ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

- วิเคราะห์ไคสแควร์ (chi-square) ทดสอบความเป็นอิสระ (test for independence) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางพันธุกรรมกับสมบัติทางด้านความหนืด

- วิเคราะห์ค่าความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) จากสมการ

$$\text{ความถี่จีโนไทป์} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ที่กำหนด}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

- วิเคราะห์ค่าความถี่อัลลีล (allele frequency) จากสมการ

$$\text{ความถี่อัลลีล} = [\text{จำนวนอัลลีลแบบโฮโมไซโกตที่กำหนด} + \frac{1}{2} \text{ จำนวนอัลลีลแบบเฮเทอโรไซโกต}] / \text{จำนวนอัลลีลทั้งหมด}$$

- วิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient) แบ่งระดับความสัมพันธ์ตามเกณฑ์ของ Zady (2000) คือ ค่า $r = 0.90-1.00$ แสดงว่ามีระดับความสัมพันธ์สูงมาก $0.70-0.89$ มีระดับความสัมพันธ์สูง $0.50-0.69$ มีระดับความสัมพันธ์ปานกลาง และ $0.30-0.49$ มีระดับความสัมพันธ์ต่ำ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สมบัติทางด้านความหนืดของฟลาวัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียว

ค่าความหนืดสูงสุด พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าความหนืดสูงสุดสูงที่สุดและต่ำที่สุดของฟลาวัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้า คือ พันธุ์ Fancy 111 (153.54 RVU) และพันธุ์ Violet white 926 (56.29 RVU) จึงใช้ค่าความหนืดสูงสุดของพันธุ์ Violet white 926 เป็นเกณฑ์ในการเปรียบเทียบ พบว่า พันธุ์/สายพันธุ์ ที่มีค่าความหนืดสูงสุดมากกว่าหรือใกล้เคียงพันธุ์ Violet white 926 ได้แก่ สายพันธุ์แท้ F4305 (98.45 RVU) KKCW02 (74.37 RVU) M80 (82.29) PWHB01 (64.29 RVU) UT111 (94.00 RVU) UT122 (72.91 RVU) WEWS003 (180.46 RVU) WSJ003 (55.10 RVU) และ WTNGHB003 (75.87 RVU) และ ลูกผสม CNW142430505 (110.33 RVU) CNW142430519 (99.52 RVU) CNW1504 (109.04 RVU) CNW1515 (112.93 RVU) CNW1537 (61.04 RVU) CNW1602 (69.08 RVU) CNW1608 (99.52 RVU) CNW1614 (99.77 RVU) UT1120 (67.84 RVU) และ UT1122 (114.65 RVU) (Table 1) ค่าความหนืดสูงสุดเป็นค่าที่อธิบายความสามารถในการพองตัวของแป้งเมื่อต้มสุก และมีความสัมพันธ์กับความเหนียวนุ่มของเนื้อเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว (Ketthaisong *et al.*, 2014) ถ้าค่าความหนืดสูงสุดของข้าวโพดข้าวเหนียวมีค่ามากกว่าหรือใกล้เคียงกับข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้า แสดงว่าเนื้อเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวมีความเหนียวนุ่มมากกว่าหรือใกล้เคียงกับข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้า

ค่าการแตกตัวของเม็ดแป้ง พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ลูกผสมพันธุ์การค้าที่มีค่าการแตกตัวของเม็ดแป้งมากที่สุดและน้อยที่สุด คือ พันธุ์ Chai Nat 84-1 (66.45 RVU) และพันธุ์ Sweet violet (23.12 RVU) ตามลำดับ พันธุ์/สายพันธุ์ที่มีค่าการแตกตัวของเม็ดแป้งสูงกว่าหรือใกล้เคียงกับพันธุ์ Sweet violet ได้แก่ สายพันธุ์ F4305 (35.50 RVU) M80 (38.97 RVU) WEWS003 (97.66 RVU) WSJ003 (32.62 RVU) ลูกผสม CNW142430505 (42.54 RVU) CNW142430519 (42.49 RVU) CNW1504 (56.70 RVU) CNW1515 (40.83 RVU) CNW1608 (41.85 RVU) CNW1614 (41.75 RVU) CNW1627 (28.04 RVU) CNW1643 (34.20 RVU) และ UT1122 (23.70 RVU) (Table 1) ค่าการแตกตัวของเม็ดแป้ง

เป็นค่าที่ใช้อธิบายความแตกต่างของเม็ดแป้งในช่วงการให้ความร้อนหรือหุงต้ม หากการแตกตัวของเม็ดแป้งมีค่าต่ำ แสดงว่าแป้งนั้นทนความร้อนได้มากเมื่อให้ความร้อน จะได้เจลที่มีลักษณะแข็งหรือแข็งกระด้าง อาจต้องใช้เวลาในการทำให้เกิดเจลนานขึ้น (วิจิตร และวชิรญา, 2563) ดังนั้นค่าการแตกตัวของเม็ดแป้งควรมีค่าสูงหรือใกล้เคียงกับฟลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้า

ค่าการคินตัวแป้ง พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ฟลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้าที่มีค่าการคินตัวมากที่สุดและน้อยที่สุดคือ พันธุ์ Chai Nat 84-1 (23.29 RVU) และพันธุ์ Violet White 926 (10.37 RVU) ตามลำดับ ฟลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีค่าการคินตัวใกล้เคียงหรือต่ำกว่าพันธุ์ Chai Nat 84-1 ได้แก่ สายพันธุ์แท้ F4305 (15.06 RVU) KKCW02 (11.95 RVU) M80 (13.70 RVU) PWHB01 (13.04 RVU) WEWS003 (21.08 RVU) WKA005 (8.79 RVU) WPK018 (6.29 RVU) WKNN016 (9.66 RVU) WSJ003 (8.12 RVU) WTNHGB003 (15.25 RVU) และ YNB01 (11.54 RVU) ลูกผสม CNW142430505 (15.54 RVU) CNW142430519 (13.60 RVU) CNW1504 (15.45 RVU) CNW1537 (14.20 RVU) CNW1602 (13.04 RVU) CNW1608 (13.66 RVU) CNW1614 (16.18 RVU) CNW1627 (13.33 RVU) CNW1643 (12.37 RVU) และ UT1120 (15.91 RVU) ค่าการคินตัวเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเนื้อสัมผัส เมื่อให้ความร้อนแก่แป้งแล้วปล่อยให้เย็นลง แป้งที่มีค่าการคินตัวต่ำเนื้อสัมผัสของแป้งยังคงเหนียวนุ่ม การคินตัวทำให้เกิดการรวมตัวกันของโมเลกุลอะไมโลสและอะไมโลเพคตินได้โครงสร้างโมเลกุลใหม่หลังการทำให้เย็นตัวลง (Hagenimana *et al.*, 2006) ดังนั้นฟลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีค่าการคินตัวที่ใกล้เคียงหรือต่ำกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้า

ดังนั้น ลักษณะความเหนียวนุ่มของเนื้อเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวที่ใกล้เคียงหรือดีกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้า ต้องมีสมบัติทางด้านความหนืด คือ ความหนืดสูงสุดมีค่าสูง การแตกตัวของเม็ดแป้งมีค่าสูง แต่การคินตัวของเม็ดแป้งมีค่าต่ำ

Table 1 Pasting properties of various waxy corn flour and SNPs position of 20 lines/varieties from Chai Nat Field Crops Research Center.

Samples	Type of waxy corns	Peak viscosity (RVU)	Breakdown (RVU)	Set back (RVU)	SNPs position						
					28	34	55	130	213	403	483
F4305	Inbred	98.45 gh	35.50 gh	15.06 h-k	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
KKCW02	Inbred	74.37 lk	21.79 j-l	11.95 n-r	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
M80	Inbred	82.29 i	38.97 fg	13.70 j-n	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
PWHB01	Inbred	64.29 mn	15.04 ln	13.04 i-k	AA	CC	AA	GG	GG	AA	CT
UTI11	Inbred	94.00 h	20.04 km	32.50 c	GA	CT	AG	GT	GG	AC	TT
UTI20	Inbred	57.08 n	9.45 no	13.62 j-m	GA	CT	AG	GT	GA	AC	CT
UTI22	Inbred	2.91 lk	11.20 mn	60.70 a	AA	CC	GG	GT	GG	AA	TT
WEWS003	Inbred	180.46 a	97.66 a	21.08 e	AA	CC	GG	GG	GG	AA	TT
WKA005	Inbred	38.12 oq	0.37 p	8.79 tu	GG	TT	AA	TT	AA	CC	CC

Samples	Type of waxy corns	Peak viscosity (RVU)	Breakdown (RVU)	Set back (RVU)	SNPs position						
					28	34	55	130	213	403	483
WPK018	Inbred	14.12 s	0.37 p	6.29 q	GG	TT	AA	TT	AA	CC	CC
WKNN016	Inbred	34.12 q	0.37 p	9.66 s-u	GG	TT	AA	TT	AA	CC	CC
WSJ003	Inbred	55.00 n	32.62 h	8.12 uv	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
WTNGHB3003	Inbred	75.87 u	19.25 l-n	15.25 h-k	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
YNB01	Inbred	33.91q	0.37 p	11.54 o-s	GG	TT	GG	TT	AA	CC	CC
CNW142430505	Hybrid	110.33 e	42.54 ef	15.54 h-j	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
CNW142430519	Hybrid	99.87 gh	43.04 e	13.04 m-p	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
CNW1504	Hybrid	109.04 ef	56.70 c	15.45 h-j	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
CNW1537	Hybrid	61.04 lm	11.08 mn	14.20 i-m	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
CNW1602	Hybrid	69.08 kl	22.45 j-l	13.04 m-p	GA	CT	AG	GT	GA	AC	CT
CNW1608	Hybrid	98.72 gh	41.85 ef	14.22 i-m	GA	CT	AG	GG	GA	AC	TT
CNW1614	Hybrid	99.77 gh	41.75 ef	16.18 gh	GA	CT	AG	GT	GG	AC	CT
CNW1643	Hybrid	103.33 fg	34.20 h	12.37 m-q	GA	CT	AG	GT	GA	AC	CT
UT1120	Hybrid	9.04 kl	15.12 ln	15.91 g-i	GA	CT	AG	GT	GA	AC	CT
UT1122	Hybrid	114.63 e	23.70 jk	56.12 b	GA	CT	AG	GG	GA	AC	CT
Chai Nat 2	Com. hyb	112.94 e	40.83 ef	17.77 fg	GA	CT	AG	GT	GA	AC	CT
Chai Nat 84-1	Com. hyb	140.83 c	66.45 b	23.29 d	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
Fancy 111	Com. hyb	153.54 b	57.91 c	22.33 de	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
Sweet violet	Com. hyb	58.95 lm	23.12 jk	11.16 p-s	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
Sweet wax 254	Com. hyb	98.12 gh	51.04 d	13.25 l-o	GA	CT	AG	GT	GA	AC	CT
Violet white 926	Com. hyb	56.29 n	25.04 ij	10.37 r-t	AA	CC	AA	GG	GG	AA	TT
CV (%)		2.8	4.2	4.0							

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

Com. hyb. = Commercial hybrid.

2. ความผันแปรทางพันธุกรรมลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Dull*

ผลการวิเคราะห์ขั้นต้นเอ็นเอจำนวน 30 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ผ่านการประเมินสมบัติทางด้านความหนืดแล้ว พบว่าขั้นต้นเอ็นเอที่ได้มีขนาด 1,808-1,812 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลสากล GenBank พบว่า มีความน่าเชื่อถือและมีความถูกต้องจริง โดยมีความใกล้เคียงร้อยละ ร้อยละ 98.02-98.23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Dull* ที่ได้ ประกอบด้วย 3 อินทรอน (อินทรอนที่ 3-5) และ 2 เอ็กซอน (เอ็กซอนที่ 4-5)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอนมาเทียบกัน พบว่า มีความผันแปรทางพันธุกรรมบริเวณเอ็กซอนชนิดสโนปส์ (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 7 ตำแหน่ง (Table 1) ได้แก่ ตำแหน่งที่ N28 มีรูปแบบจีโนไทป์ AA>GG>AG ตำแหน่งที่ N34 มีรูปแบบจีโนไทป์ CC>TT>CT N55 มีรูปแบบจีโนไทป์ AA>GG>AG N130 มีรูปแบบจีโนไทป์ GG>TT>GT ตำแหน่งที่ N153 มีรูปแบบจีโนไทป์ GG>AA>GA ตำแหน่งที่ N403 มีรูปแบบจีโนไทป์ AA>CC>AC ตำแหน่งที่ N483 มีรูปแบบจีโนไทป์ CC>TT>CT เห็นได้ว่าพบที่ตำแหน่ง N28 N34 N55 N130 N403 และ N483 ของ

ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีสมบัติทางด้านความหนืดใกล้เคียงกับลูกผสมพันธุ์การค้ามีรูปแบบจีโนไทป์ AA/AG CC/CT AA/AG GG/TT GG/GA AA/AC และ CC/CT ตามลำดับ ในขณะที่ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีสมบัติทางด้านความหนืดต่ำกว่าลูกผสมพันธุ์การค้า มีรูปแบบจีโนไทป์ GG TT GG TT AA CC และ TT ตามลำดับ

เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของยีน *Dull* ของแต่ละตำแหน่งกับสมบัติทางความหนืดด้วยไค-สแควร์ พบว่า จีโนไทป์ทุกตำแหน่งมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) กับความหนืดสูงสุดและการแตกตัวของเม็ดแป้ง (Table 2)

Table 2 Correlation analysis between genotypes and peak viscosity, breakdown and setback using the Pearson chi-square test

Nucleotide Position	Genetic variation	Genotypes	p-value for Pearson chi-square		
			Peak viscosity	Breakdown	Setback
N28	SNPs	AA > GG > AG	0.000	0.000	0.424
N34	SNPs	CC > TT > CT	0.000	0.000	0.424
N55	SNPs	AA > GG > AG	0.000	0.000	0.323
N130	SNPs	GG > TT > GT	0.000	0.000	0.066
N213	SNPs	GG > AA > GA	0.000	0.000	0.332
N403	SNPs	AA > CC > AC	0.000	0.000	0.424
N483	SNPs	CC > TT > CT	0.000	0.000	0.511

P value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอนมาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ได้กรดอะมิโน 170 ชนิด เมื่อนำมาเรียงเทียบกัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนจำนวน 6 ตำแหน่ง (Table 3) ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ A9 เป็นกรดอะมิโนชนิดวาเลีน (valine) หรือกรดอะมิโนที่ไม่ทราบชนิดหรือเป็นกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง (unknown or any amino acid; X) (valine>X) ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ A18 เป็นกรดอะมิโนโพรลีน (proline) หรือกรดอะมิโนที่ไม่ทราบชนิดหรือเป็นกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง (unknown or any amino acid; X) (proline>X) ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ A43 เป็นกรดอะมิโนชนิดกลูตามิก (glutamic) หรือกรดแอสปาทิก (aspartic acid) หรือกรดอะมิโนที่ไม่ทราบชนิดหรือเป็นกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง (unknown or any amino acid; X) (glutamic>aspartic acid>X) ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ A71 เป็นกรดอะมิโนชนิดอาร์จินีน (arginine) หรือไลซีน (lysine) หรือกรดอะมิโนที่ไม่ทราบชนิด หรือเป็นกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง (unknown or any amino acid; X) (arginine>lysine>X) ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ A134 เป็นกรดอะมิโนชนิดซีรีน (serine) หรือกรดอะมิโนที่ไม่ทราบชนิด หรือเป็นกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง (unknown or any amino acid; X) (serine>X) ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ A161 เป็นกรดอะมิโนชนิดวาเลีน หรืออะลานีน (alanine) หรือกรดอะมิโนที่ไม่ทราบชนิด หรือเป็นกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง (unknown or any amino acid; X) (alanine>X) ความผันแปรทางพันธุกรรมรูปแบบสปีส์ 7 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง N28 N34 N55 N130 N213

N403 และ N483 เมื่อถูกถอดรหัสและถูกแปลรหัสทางพันธุกรรมแล้ว มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนทั้งหมด 6 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง A9 A18 A43 A71 A134 และ A161 ตามลำดับ ยกเว้น สนิปส์ตำแหน่งที่ N28 ไม่มีเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรด อะมิโน

เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงกับสมบัติทางความหนืด พบว่า กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปในตำแหน่งที่ A43 A71 และ A161 มีความสัมพันธ์กับความหนืดสูงสุด และการแตกตัวของเม็ดแป้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ A43 A71 และ A161 เกิดจากการแปลรหัสของจีโนไทป์ในตำแหน่ง N130 N213 และ 483 ตามลำดับ (Table 3)

Table 3 Correlation analysis between amino acid variation and peak viscosity, breakdown and setback using the Pearson chi-square test

Amino acid positions	Amino acid variation*	p-value for Pearson chi-square		
		Peak viscosity	Breakdown	Setback
A9	Val > X	0.488	0.114	0.114
A18	Pro > X	0.147	0.147	0.152
A43	Glu > Asp > X	0.001	0.001	0.424
A71	Arg > Lys > X	0.000	0.000	0.234
A134	Serine > X	0.114	0.114	0.215
A161	Val > Ala > X	0.000	0.000	0.424

* Val: Valine, Pro: Proline, Glu: Glutamine, Asp: Aspartic acid, Arg: Arginine, Lys: Lysine, Ser: Serine, Ala: Alanine and X: Unknown or any amino acid.

P value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. การตรวจสอบสนิปส์ของยีน *Dull* ด้วยเทคนิค HRM

สารสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากข้าวโพดข้าวเหนียว 30 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ผ่านประเมินสมบัติทางด้านความหนืดและศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมแล้วถูกนำมาใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ Du-1F/1R ถูกออกแบบจากตำแหน่งสนิปส์ที่ N130 มีลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ Du-1F (5'-CCAGGGAGTGCAAGGAATT A-3') และ Du-1R (5'-CTCCTCTCTTGTTGAAG CCT-3') จากการทดสอบความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR พบว่าไพรเมอร์นี้ให้ผลความสำเร็จร้อยละ 100 แสดงให้เห็นว่าถึงความไว (sensitivity) ในการทำปฏิกิริยา ส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาและสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีความเหมาะสม เมื่อวิเคราะห์จีโนไทป์ของสนิปส์ *Dull* ตำแหน่งสนิปส์ที่ N130 พบว่า สามารถจำแนกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีจีโนไทป์รูปแบบ homozygous: GG, heterozygous: GT และ homozygous: TT ได้ตรงกับข้อมูลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ และแต่ละรูปแบบจีโนไทป์มีช่วงอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่คลายเกลียวแยกออกจากกัน เท่ากับ 78.21-78.66°C, 77.22-78.45°C และ 78.10-78.19°C ตามลำดับ (Figure 1) ซึ่งจีโนไทป์รูปแบบ GG และ GT เป็นรูปแบบจีโนไทป์ที่พบว่าข้าวโพดข้าวเหนียวที่ใกล้เคียงกับลูกผสมพันธุ์การค้า

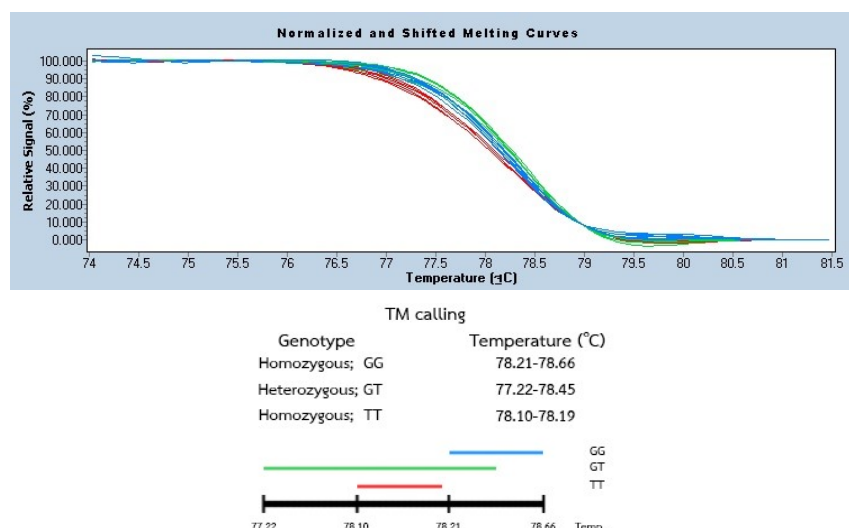


Figure 1 Genotyping of SNPs N130 Dull. The three groups were well distinguished: homozygous; GG (blue) heterozygous: GT (green) and homozygous; TT (red) in thirty waxy corns.

การวิเคราะห์ความถี่อัลลีลของยีน *Dull* เฉพาะตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ N130 พบ 2 รูปแบบ ได้แก่ อัลลีล G (0.700) และ T (0.300) ซึ่งอัลลีลที่มีความถี่สูงหรืออัลลีลที่พบบ่อย (common allele) คือ อัลลีล G ลูกผสมพันธุ์การค้า พบมีอัลลีล G (0.900) มากกว่า T (0.100) อย่างชัดเจน ความถี่ของอัลลีลของสายพันธุ์แท้ และลูกผสมพบอัลลีล G (0.607) และ (0.727) ตามลำดับ สูงกว่าอัลลีล T 0.393 และ 0.273 ตามลำดับ (Table 4) ความถี่ของยีนในแต่ละประชากรอาจมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอัลลีลพื้นฐานของแต่ละประชากรที่ส่งผลต่อความถี่อัลลีลได้

เมื่อพิจารณาความถี่จีโนไทป์รูปแบบ GG GT และ TT ของยีน *Dull* พบว่าสายพันธุ์แท้และลูกผสมพันธุ์การค้ามีความถี่จีโนไทป์รูปแบบ GG 0.500 และ 0.800 ตามลำดับ สูงกว่า GT 0.214 และ 0.200 ตามลำดับ ในขณะที่ลูกผสมมีความถี่จีโนไทป์ GT (0.546) สูงกว่า GG (0.455) ตรวจพบความถี่จีโนไทป์รูปแบบ TT (0.286) เฉพาะในข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้เท่านั้น (Table 4)

Table 4 The genotype and allele frequencies of *Dull* gene in waxy corns

Types	Genotype frequency			Allele frequency	
	GG	GT	TT	G	T
Waxy corn Inbreds	0.500 (7)	0.214 (3)	0.286 (4)	0.607	0.393
Waxy corn hybrids	0.455 (5)	0.545 (6)	0	0.727	0.273
Commercial waxy corn hybrid	0.800 (4)	0.200 (1)	0	0.9	0.1
Total	0.533 (16)	0.333 (10)	0.133 (4)	0.7	0.3

(n) = Number of random sampling waxy corn.

เมื่อวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์รูปแบบ GG GT และ TT กับค่าความหนืดสูงสุด การแตกตัวของเม็ดแป้ง และการคั่นตัวของแป้ง พบว่า มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ดังนั้น จีโนไทป์รูปแบบ GG ซึ่งพบในข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีสมบัติทางด้านความหนืดใกล้เคียงกับลูกผสมพันธุ์การค้า มีความสัมพันธ์ในทางบวกระดับต่ำกับความหนืดสูงสุด ($r = 0.426^{**}$) และการแตกตัวของเม็ดแป้ง ($r = 0.426^{**}$) แม้ว่าจะมีความสัมพันธ์ในระดับต่ำ แต่ก็สามารถใช้เป็นปัจจัยหรือตัวบ่งชี้ที่มีความสำคัญในการคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวได้ ซึ่งมีรายงานผลการศึกษาคัดเลือกประเภทของข้าวตามระดับการย่อยด้วยเอนไซม์โดยใช้ตัวแปรหรือปัจจัยของสมบัติทางด้านเคมีกายภาพและอื่นๆ พบว่า ข้าวในกลุ่มย่อยด้วยเอนไซม์ได้ช้า (slowly digestible starch; SDS) มีเพียงความคงตัวของแป้งสุกเท่านั้นที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยมีความสัมพันธ์ทางบวกระดับต่ำ ($r = 0.459^*$) (Patindol *et al.*, 2010) ในขณะที่จีโนไทป์รูปแบบ TT ซึ่งพบในข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีสมบัติทางด้านความหนืดต่ำกว่าลูกผสมพันธุ์การค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกับความหนืดสูงสุด และการแตกตัวของเม็ดแป้ง ($r = -1.000$) ส่วน GT ไม่มีความสัมพันธ์กับความหนืดสูงสุด และการแตกตัวของเม็ดแป้ง และจีโนไทป์ทั้ง 3 รูปแบบไม่มีความสัมพันธ์กับการคั่นตัวของเม็ดแป้ง (Table 5) สอดคล้องกับวิจิตรและวชิรา (2563) ที่รายงานว่าค่าความหนืดสูงสุดและค่าการแตกตัวของเม็ดแป้งเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับความเหนียวนุ่มของข้าวโพดข้าวเหนียว

แสดงให้เห็นว่าจีโนไทป์รูปแบบ GG มีแนวโน้มที่จะผลต่อลักษณะความเหนียวนุ่มที่ดีของข้าวโพดข้าวเหนียวในทิศทางที่ทำให้ลักษณะคุณภาพการบริโภคที่ดี ขณะที่จีโนไทป์รูปแบบ TT มีผลต่อลักษณะความเหนียวนุ่มของข้าวโพดข้าวเหนียวในทิศทางที่ทำให้ลักษณะคุณภาพการบริโภคที่ไม่ดีพอดังนั้นในการคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวเพื่อใช้เป็นพันธุ์พ่อและแม่ในการสร้างลูกผสมนั้น ควรคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีจีโนไทป์รูปแบบ GG ที่ตำแหน่ง N130 ของยีน *Dull* เพื่อเพิ่มความถี่ของจีโนไทป์และทำให้สามารถสร้างลูกผสมที่มีลักษณะเหนียวนุ่มใกล้เคียงหรือดีกว่าพันธุ์การค้า

Table 5 Bivariate correlations using Pearson correlation coefficient among peak viscosity, breakdown and setback in genotype position at N130

Genotype	Peak viscosity	Breakdown	Setback
GG	0.426**	0.426**	0.12
GT	0.310	0.310	-0.243
TT	-1.000**	-1.000**	0.154

** Correlation is significant at the $p \leq 0.01$ level.

4. การตรวจสอบความถูกต้องและแม่นยำของเครื่องหมายสปีส์

4.1 การตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค HRM

พบว่าสามารถจำแนกรูปแบบจีโนไทป์ได้ 3 จีโนไทป์ และช่วงอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่คลายเกลียวแยกออกจากกันของจีโนไทป์ ดังนี้ รูปแบบจีโนไทป์ homozygous: GG (78.26-78.85°C) รูปแบบจีโนไทป์ heterozygous: GT (77.54-78.78°C) และรูปแบบจีโนไทป์ homozygous: TT (78.11-78.21°C) (Figure 2) แสดงให้เห็นได้ว่าเครื่องหมายสปีส์ Du-1F/1R นั้นสามารถจำแนกรูปแบบจีโนไทป์ได้ 3 รูปแบบ

และช่วงของอุณหภูมิที่ทำให้เอ็นเอคลายเกลียวแยกออกจากกันมีค่าใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์ในข้าวโพดข้าวเหนียวจากก่อนหน้านี้ จึงเป็นการยืนยันได้ว่าเครื่องหมายสนิปส์ Du-1F/1R มีแม่นยำในจำแนกจีโนไทป์ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 130 ของยีน *Dull*

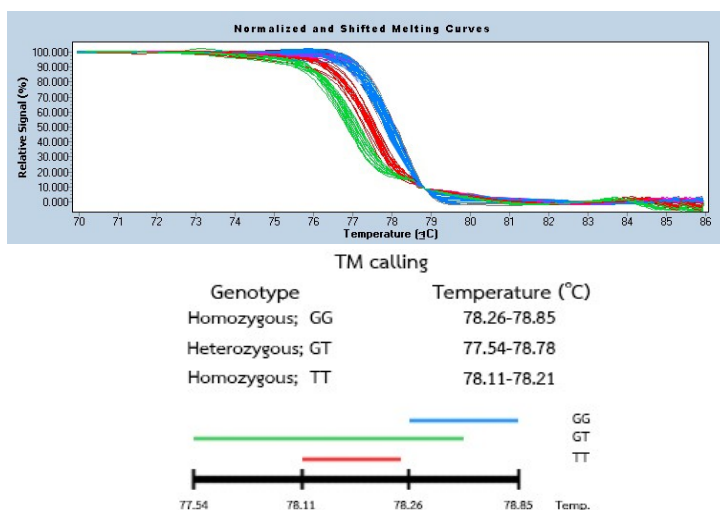


Figure 2 Genotyping of SNPs N130 Dull. The three groups were well distinguished: homozygous; GG (blue) heterozygous: GT (green) and homozygous; TT (red) in 108 waxy corns.

4.2 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเทคนิค HRM กับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรูปแบบจีโนไทป์ GG GT และ TT พบว่า ทั้งสองเทคนิคมีรูปแบบจีโนไทป์ตำแหน่งที่ N130 เหมือนกันร้อยละ 100 (Table 6) แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายสนิปส์ ส่วนผสมและขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ สำหรับการตรวจหาสนิปส์มีความถูกต้องและแม่นยำ จากผลการวิจัยนี้เห็นได้ชัดเจนว่าเครื่องหมายสนิปส์ Du-1F/1R สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมที่มีลักษณะเหนียวนุ่ม ควรใช้จีโนไทป์ GG ในการคัดเลือกเพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีค่าความเหนียวสูงสุดใกล้เคียงหรือสูงกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้าได้

Table 6 Comparison of accuracy between the genotype position at N130 using HRM technique and DNA sequencing

Genotype position at N130	Number of samples	HRM (%)	DNA sequencing, (%)
Homozygous; GG	8	26.67	26.67
Heterozygous, GT	12	40.00	40.00
Homozygous; TT	10	33.33	33.33
Total	30	100	100

สรุปผลการทดลอง

เครื่องหมายสนิปส์ Du-1F/1R เป็นเครื่องหมายสนิปส์ที่มีความแม่นยำในการตรวจสอบจีโนไทป์ของข้าวโพดข้าวเหนียวที่ตำแหน่ง N130 ของยีน *Dull* ซึ่งจีโนไทป์รูปแบบ GG สัมพันธ์กับลักษณะความเหนียวนุ่มของเนื้อเมล็ดในข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ และข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมที่มีความใกล้เคียงกับข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้าซึ่งเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ในขณะที่รูปแบบจีโนไทป์ TT ตรวจพบได้ในข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้เท่านั้น และมีลักษณะความเหนียวนุ่มของเนื้อเมล็ดต่ำกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้า การใช้เครื่องหมายสนิปส์ Du-1F/1R ในการตรวจสอบยีน *Dull* ในข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ และข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมตำแหน่งที่ N130 ควรใช้รูปแบบจีโนไทป์ GG เพื่อให้ได้เนื้อเมล็ดที่มีลักษณะเหนียวนุ่มใกล้เคียงกับข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้า

การนำไปใช้ประโยชน์

- 1) เป็นเครื่องมือในการประเมินสายพันธุ์แท้ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีความเหมาะสมเพื่อนำมาเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ของคู่ผสม เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือกในโครงการการปรับปรุงพันธุ์
- 2) สามารถใช้คัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะเหนียวนุ่มได้ตั้งแต่รุ่นชั่วแรกๆ ของการคัดเลือก ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ที่มีสายพันธุ์จำนวนมาก ช่วยลดระยะเวลา พื้นที่ปลูก และแรงงาน
- 3) ใช้ติดตามตำแหน่งจีโนไทป์ได้ในทุกชั่วรุ่นของข้าวโพดข้าวเหนียว ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวของกรมวิชาการเกษตร

คำขอบคุณ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบวิจัยจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.)

เอกสารอ้างอิง

- คุณุพล เกษไชยสง และ กมล เลิศรัตน์. 2558. การประยุกต์ใช้เครื่องวัดความหนืดแบบอิงยวดในการประเมินสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมเดี่ยว. *แก่นเกษตร*. 43(ฉบับพิเศษ 1): 888-893.
- วิจิตรา เหลียวตระกูล และวชิรญา เหลียวตระกูล. 2563. ผลของวิธีการดัดแปรแป้งด้วยกรดและฟรีเจลาติโนเซชันต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งกระจับ. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม*. 15(2): 82-95.
- ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล กิตติภาพ วายุภาพ อีรุฒิ วงศ์วรรัตน์ วรขมน มงคล สุบิน ศรีวิชัย และ ปาริฉัตร หงส์ประภาส. 2565. การคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล. รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด. แหล่งข้อมูล: [doa.go.th/plan/wp-content/uploads/2021/04/341.7.การคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล.pdf](https://doi.org/10.24645/2021.04.341.7). สืบค้น: วันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2565.
- สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน. 2564. สถานการณ์พืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญ. หน้า 26-30. ใน: เอกสารการประชุมติดตามและแถลงผลงานวิจัย สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ประจำปี 2565. วันที่ 7-8 กันยายน 2565. ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี.
- อุทัยวรรณ ทองทั้งวงศ์. 2553. การทดแทนแป้งสาลีด้วยแป้งข้าวสาลีในผลิตภัณฑ์เค้ก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 732 หน้า.
- Cao, H. M.G. James and A.M. Myers. 2000. Purification and characterization of solution starch synthases from maize endosperm. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373: 135-146.
- Hagenimana, A., X. Ding and T. Fang. 2006. Evaluation of rice flour modified by extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*. 43(1): 38-46.
- Ketthaisong, D., B. Suriarn, 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.
- Newport Scientific. 1997. Operation manual for the series 4 rapid visco analyzer. New South Wales: Newport Scientific Pty, Ltd. 26 p.
- Patindol, J., H. Guraya, E. champagne, M-H. Chen and A. McClung. 2010. Relationship of cooked-rice nutritionally important starch fractions with other physicochemical properties. *Starch/starke*. 62: 246-256.
- Zady, M.F. 2000. Correlation and simple least squares regression. Available at: <https://www.westgard.com/lesson42.htm>. Accessed: August 21, 2022.