# ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้า 18 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP

## Genetic Diversity of the 18 Commercial Waxy Corn Cultivars Based on SRAP Markers

**บุบผา คงสมัย[1] เปรมจิต เลี้ยงอำนวย[2] ปณาลี ภู่วรกุลชัย[3] และอัญมณี อาวุชานนท์[3*]**

Buppa Kongsamai[1] Premjit Leangumnuay[1] Panalee Pooworakulchai[3] and Anyamanee Auvuchanon[3*]

**Abstract:** This study was to evaluate genetic diversity of 18 varieties of waxy corn, including 2 hybrid varieties, 13 open-pollinated varieties and 3 exotic varieties compared to 2 varieties of sweet corn by using SRAP markers (Sequence-Related Amplified Polymorphism). It was found that 12 primers provided 61 polymorphics of DNA band. Analysis of genetic relationship and cluster by using Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) showed that the waxy corn and the sweet corn could be grouped according to Dice's similarity coefficient (0.35-0.76) into 4 groups. Group 1 included 2 varieties of hybrid waxy corn 'Violet white-926' and an exotic variety 'Chinawax-23'. Group 2 included commercially hybrid sweet corn (Supersweet-3A and Supergold) and F1 hybrid variety of waxy corn (Bigwhite#854), open-pollinated varieties (White Hawk, Hueplee-20, Snowwhite-seedlines, Pum-pui-Singto and Khaw-niuw-wan-14) and two exotic varieties (Chinawax-2 and Chinawax-2000). The open-pollinated varieties of waxy corn, which were consisted of Kai-mook-Pum-pui, Nakhon Pathom, Eight-row and Snowwhite) were grouped into the third group. Group 4 had only 2 varieties of open-pollinated waxy corn with a small ear type; Khao-kawniuw and Num-Nan. But there were 2 cultivars with small ear type in out group that were Numyom and Numwang. The result of the study indicates that there is genetic variation among the waxy corn varieties evaluated, which is able to select the parental lines for developing a breeding population.

**Keywords:** DNA markers, Genetic diversity, Waxy corn, Sweet corn

**บทคัดย่อ**: เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 18 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ลูกผสมการค้า 2 พันธุ์ พันธุ์ผสมเปิด 13 พันธุ์ พันธุ์จากต่างประเทศ 3 พันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวโพดหวาน 2 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) พบว่า ไพรเมอร์ 12 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 61 แถบ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มโดยใช้วิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) พบว่า ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Dice's similarity coefficient) ระหว่าง 0.35-0.76 สามารถจัดกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวานออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 มี 2 พันธุ์ คือ ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ลูกผสม (Violet white-926) และข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ต่างประเทศ (Chinawax-23) กลุ่มที่ 2 ข้าวโพดหวาน (Supergold และ Supersweet-3A) และข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสม

[1]ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[1]Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University

[2]สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[2]Agricultural Biotechnology Program, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University

[3]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[3]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University

*Corresponding author: agrana@ku.ac.th

(Bigwhite#854) พันธุ์ผสมเปิด (White Hawk หัวปลี-20 สโนไวท์-ซีดไลน์ ปุ้มปุ้ย-สิงโต และข้าวเหนียวหวาน-14) และพันธุ์ต่างประเทศ (Chinawax-2และ Chinawax-2000) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนกลุ่มที่ 3 เป็นข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ผสมเปิด 4 พันธุ์ คือพันธุ์ไข่มุกปุ้มปุ้ย ข้าวเหนียวนครปฐม ข้าวโพด 8 แถว และสโนไวท์ และกลุ่มที่ 4 เป็นข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ผสมเปิด ซึ่งเป็นกลุ่มของข้าวโพดเทียนฝักเล็ก 2 พันธุ์คือ พันธุ์ขาวข้าวเหนียว และพันธุ์น้ำน่าน ส่วนข้าวโพด 2 พันธุ์ที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้คือ พันธุ์น้ำยม และพันธุ์น้ำวัง ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า กลุ่มพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่นำมาทดสอบมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์สำหรับใช้เป็นพ่อแม่เพื่อสร้างประชากรปรับปรุงพันธุ์ได้

**คำสำคัญ**: เครื่องหมายดีเอ็นเอ ความหลากหลายทางพันธุกรรม ข้าวโพดข้าวเหนียว ข้าวโพดหวาน

## คำนำ

ข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn, *Zea mays ceratina*) เป็นข้าวโพดรับประทานสดที่เนื้อแป้งในเมล็ดเป็นแป้งอ่อน (soft starch) มีความเหนียวนุ่มและหวาน เนื่องจากมีปริมาณแอมิโลเปกตินสูง เมล็ดจึงมีสีขุ่น ทึบแสง (Fergason, 2001) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน waxy โดยเปลี่ยนแปลงจากยีนข่ม *Wx* ไปเป็นยีนแฝง *wx* โดยที่ยีนแฝง *wx* นี้มีผลทำให้ปริมาณแอมิโลเปกตินเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยีน *wx* ยังมีผลทำให้ปริมาณ reducing sugar เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดธรรมดา (*Wx*) ทั้งนี้ข้าวโพดข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์มีปริมาณแอมิโลเปกตินแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้รสชาติต่างกัน (ประภา และคณะ, 2535)

ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ปลูกในประเทศไทยมีหลากหลายในลักษณะฝักและสีเมล็ดตั้งแต่สีขาว สีครีม สีม่วง และสีม่วงหรือสีเหลืองสลับขาว แต่ผู้บริโภคฝักสดส่วนมากนิยมสีเหลืองและสีขาวแตกต่างไปตามท้องถิ่น เช่น พื้นที่จังหวัดนครสวรรค์มีข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์คราบงู หรืออุบลราชธานีมีข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์เทียนลำลี ซึ่งมีสีเหลืองและฝักเล็ก จังหวัดเชียงใหม่มีข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์เทียนอุ้มหรือเทียนโอ้ม ซึ่งมีฝักเล็ก เมล็ดมีสีม่วงเข้มม่วงอ่อน และมีสีขาวคละกันในหนึ่งฝัก ทิพย์ (2529) และองค์การตลาดเพื่อเกษตรกร (2552) ได้รายงานว่า มหาวิทยาลัยขอนแก่นได้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวคือ พันธุ์ข้าวเหนียวสลับสี เป็นพันธุ์ลูกผสมชั่วแรก (F1-hybrid) ที่มีเมล็ดสองสีคือ สีขาวและสีเหลืองสลับกันอยู่ในฝักเดียวกัน โดยผสมข้ามระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดซุปเปอร์เพื่อรวมยีน waxy gene และ shrunken-2 gene เข้าด้วยกัน ทำให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีรสชาติหวานและเหนียวนุ่มในฝักเดียวกัน โดยที่เมล็ดส่วนใหญ่เป็นเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว

อย่างไรก็ตามจากผลของการคัดเลือกพันธุ์โดยเกษตรกรหรือจากการปรับปรุงพันธุ์พืช ส่งผลทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมแคบลงในพืชหลายชนิด จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ โดยคาดว่าการสำรวจความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ปลูกของพื้นที่เขตภาคตะวันตกของประเทศไทย จะเป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวได้ โดยทั่วไปการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชนอกจากการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาแล้ว ยังสามารถใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของพืชจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลได้อีกด้วย (Sanchez and Goodman, 1992; Pineda-Hidalgo *et al*., 2013) ซึ่ง Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) markers เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่นิยมใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ที่โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ชนิด forward มีขนาด 17 เบส ที่ประกอบด้วยลำดับเบสแกน (core sequence) ที่เหมือนกันยาว 14 เบสและเป็นส่วนของลำดับเบสเรียกว่า filler ยาว 10 เบสต่อด้วยเบส CCGG เพื่อให้จับได้กับส่วนเอ็กซอน (exon) หรือ open reading frame (ORF) ซึ่งมักเป็นบริเวณที่มีเบส GC สูง(GC rich) และส่วนตรงปลาย 3’ ของไพรเมอร์เป็นเบสคัดเลือก (selective base) อีก 3 เบสที่เปลี่ยนแปลงได้ โดยอาศัยหลักการเดียวกับไพรเมอร์ของเครื่องหมายเอเอฟแอลพีส่วน reverse มีขนาด 18 เบสประกอบด้วย

ลำดับเบสแกนที่เหมือนกันยาว 15 เบสและส่วนของ filler ยาว 11 เบสต่อด้วยเบส AATT เพื่อให้จับได้กับดีเอ็นเอในจีโนมบริเวณAT สูงซึ่งมักพบในส่วนอินทรอน (intron) และโพรโมเตอร์ของยีนตรงปลาย 3' ของไพรเมอร์เป็นเบสคัดเลือกที่เปลี่ยนแปลงได้อีก 3 เบส (Li and Quiros, 2001; Pan *et al*., 2010)

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR จะใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำที่ 35 องศาเซลเซียส 5 รอบเพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดีแล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นตามปกติอีก 30-35 รอบเพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มาจาก 5 รอบแรกเท่านั้นทำให้ผลที่ได้มีความคงที่ หลังจากนั้นตรวจสอบผลด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ผลที่ได้จะพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกันโดยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552) ซึ่ง กิตติยา (2554) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน 18 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP ทั้งหมด 25 คู่ไพรเมอร์ พบว่า 13 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 57 แถบ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มโดยใช้วิธี UPGMA ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 0.61-0.89 และสามารถจัดข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน ได้ 4 กลุ่ม และ out group 5 ตัวอย่าง จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนมีพันธุกรรมใกล้ชิดกันมาก ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ SRAP markers ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวเปรียบเทียบกับข้าวโพดหวาน เนื่องจากข้าวโพดข้าวเหนียวหลายพันธุ์ได้รับการปรับปรุงลักษณะคุณภาพการบริโภคโดยถ่ายทอด shunken gene จากข้าวโพดหวานเข้าสู่ข้าวโพดข้าวเหนียวให้มีความหวานเพิ่มขึ้น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### พืชทดลอง

ข้าวโพดข้าวเหนียว 18 พันธุ์ ได้แก่ กลุ่มพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสม F1 คือพันธุ์ Violet white-926 และ Bigwhite#854 กลุ่มพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวผสมเปิดของไทย คือพันธุ์ White Hawk หัวปลี 20 ไข่มุกปุ้มปุ้ย ข้าวเหนียวนครปฐม ข้าวโพด 8 แถว สโนไวท์ สโนไวท์-ซีดไลน์, ข้าวโพดขาวข้าวเหนียว ปุ้มปุ้ย-สิงโต ข้าวเหนียวหวาน-14 กลุ่มพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวฝักเล็กหรือข้าวโพดเทียน คือ พันธุ์น้ำวัง น้ำน่าน น้ำยม พันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวจากประเทศจีน คือ Chinawax-2 Chinawax-23 และ Chinawax-2000 และกลุ่มพันธุ์ข้าวโพดหวาน 2 พันธุ์ คือ Supergold และ Supersweet-3A

### การสกัดดีเอ็นเอ

ตัดใบอ่อนให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่โกร่งเติมไนโตรเจนเหลวบดตัวอย่างให้ละเอียด ย้ายตัวอย่างใส่หลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีสารละลาย 2X CTAB buffer (2%CTAB, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Polyvinylpyrollidone) 600 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethanol 5 ไมโครลิตร นำไป บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เขย่าทุก 10 นาที เมื่อครบเวลา เติม Chlorofrom:Isoamylalcohol (24:1) 600 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูสารละลายใสส่วนบน 450 ไมโครลิตร ใส่หลอด microtube หลอดใหม่ที่มี 5 M NaCl 5 ไมโครลิตร เติม Isopropanol 450 ไมโครลิตร ตกตะกอนที่ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายใสทิ้ง บ่มตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนแห้ง เติม TE buffer 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งานต่อไป

### การทำปฏิกิริยา PCR ด้วย SRAP primer

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วย SRAP primer combination จำนวน 25 คู่ (Table 1) ประกอบด้วย DNA template (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ทำปฏิกิริยาด้วยสารประกอบต่อไปนี้ $dH_2O$ 12.6 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 1.2 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTP 2 ไมโครลิตร, Primer F (5mM) 1 ไมโครลิตร, Primer R (5mM) 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (5U/µl) 0.2 ไมโครลิตร ปฏิกิริยา PCR เริ่มจากpre-denaturing 94 °C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 37 รอบ

Agricultural Science and Management J. 2 (2) : 114-120 (2019)

ประกอบด้วย denaturing 94 °C เป็นเวลา 1 นาที annealing 47 °C เป็นเวลา 1 นาที extension 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และ final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จำนวน 5 ไมโครลิตรใส่หลอดที่มี sequencing dye 3 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที นำผลผลิตที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจสอบด้วย 6% denaturing gel electrophoresis และย้อมแถบสีดีเอ็นเอด้วย silver nitrate โดยล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่แผ่นกระจกเจลในสารละลาย 0.1% CTAB เป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่แผ่นกระจกเจลใส่ในสารละลาย 0.3% Ammonia นาน 15 นาที นำแผ่นกระจกเจลแช่ในสารละลาย silver nitrate (silver nitrate 0.4 กรัม, $dH_2O$ 250 มิลลิลิตร, 1 M NaOH 1 มิลลิลิตร, Ammonia 750 ไมโครลิตร) นาน 20 นาที ย้ายแผ่นกระจกเจลใส่ในสารละลาย Developer (2% $Na2CO_3$ 5 กรัม $dH_2O$ 250 มิลลิลิตร, 0.02% formaldehyde 50 ไมโครลิตร) เมื่อเห็นแถบดีเอ็นเอ ให้ย้ายแผ่นกระจกเจลแช่ในบนน้ำกลั่น เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำกระจกขึ้นผึ่งให้แห้ง

**Table 1** SRAP primer sequences for 25 primer combination screening

| Forward primer | Sequence | Reverse primer | Sequence |
|---|---|---|---|
| ME1 | TGAGTCCAAACCGGATA | EM1 | GACTGCGTACGAATTAAT |
| ME2 | TGAGTCCAAACCGGAGC | EM2 | GACTGCGTACGAATTTGC |
| ME3 | TGAGTCCAAACCGGAAT | EM3 | GACTGCGTACGAATTGAC |
| ME4 | TGAGTCCAAACCGGACC | EM4 | GACTGCGTACGAATTTGA |
| ME5 | TGAGTCCAAACCGGAAG | EM5 | GACTGCGTACGAATTAAC |

การวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอ ด้วยการบันทึกแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic band โดยใช้ค่าการปรากฏของแถบดีเอ็นเอมีค่าเป็น 1 และไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอมีค่าเป็น 0 และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.20e โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของ Dice's similarity coefficient และจัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวานรวม 20 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP จำนวน 25 คู่ที่เกิดจาก forward primer ME 1-5 และ reverse primer EM 1-5 combination พบว่า มีไพรเมอร์ 12 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ polymorphic band ได้ทั้งหมด 61 แถบ เมื่อวิเคราะห์หาจำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะที่ปรากฏในแต่ละคู่ไพรเมอร์ พบว่าคู่ไพรเมอร์ที่ปราฏแถบดีเอ็นเอจำเพาะมากที่สุดได้แก่คู่ไพรเมอร์ ME1/ EM1, ME3/ EM3 และ ME3/ EM4 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะคู่ละ 7 แถบ (Table 2) จากข้อมูลดังกล่าวเมื่อนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.20e พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวาน 20 ตัวอย่าง ค่าระหว่าง 0.35-0.76 และจากการ จัดกลุ่มโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเฉลี่ยที่ 0.55 สามารถแบ่งกลุ่มข้าวโพดได้ 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1มี 2 พันธุ์คือข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ลูกผสม (Violet white-926) และข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ต่างประเทศ (Chinawax-23) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสม พันธุ์ผสมเปิดและพันธุ์ต่างประเทศถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ White Hawk หัวปลี-20 Supergold Chinawax-2000 Bigwhite#854 Supersweet (3A) สโนไวท์ซีดไลน์ Chinawax-2 ปุ้มปุ้ยสิงโต และข้าวเหนียวหวาน-14 ส่วนข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ผสมเปิด

ไข่มุกปุ้มปุ้ย ข้าวเหนียวนครปฐม ข้าวโพด 8 แถว และสโนไวท์ จัดอยู่ในกลุ่มที่ 3 ขณะที่กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของข้าวโพดข้าวเหนียวที่เป็นข้าวโพดเทียนฝักเล็ก คือ พันธุ์ขาวข้าวเหนียว และพันธุ์น้ำน่าน ส่วนข้าวโพดที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ (outgroup) คือ พันธุ์น้ำยม และพันธุ์น้ำวัง จากการศึกษาครั้งนี้สามารถแยกจากกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวานได้ชัดเจน (Figure 1)

**Table 2** Polymorphic primer, number of polymorphic band and polymorphic information content (PIC)

| Code | Forward/Reverse primer | Polymorphic | PIC |
|---|---|---|---|
| S1 | ME1/EM1 | 7 | 0.817 |
| S2 | ME1/EM2 | 4 | 0.567 |
| S3 | ME2/EM1 | 5 | 0.783 |
| S12 | ME4/EM1 | 1 | 0.698 |
| S14 | ME3/EM2 | 6 | 0.825 |
| S15 | ME4/EM2 | 6 | 0.806 |
| S16 | ME5/EM2 | 5 | 0.786 |
| S17 | ME3/EM3 | 7 | 0.842 |
| S18 | ME3/EM4 | 7 | 0.845 |
| S22 | ME4/EM5 | 3 | 0.453 |
| S23 | ME5/EM3 | 5 | 0.753 |
| S24 | ME5/EM4 | 5 | 0.798 |
| | | 5.08 | 0.748 |

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุล SRAP จำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ มีค่า PIC เฉลี่ย 0.748 ซึ่งบ่งบอกถึงเครื่องหมายโมเลกุล SRAP ที่นำมาใช้ในครั้งนี้มีประสิทธิภาพสูง และให้จำนวน polymorphic band เฉลี่ย 5.08 อัลลีลต่อไพรเมอร์ เพื่อจัดกลุ่มและแยกความแตกต่างของฝัก สีเมล็ด และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว จากผลทดลองจะเห็นได้ว่าสามารถแบ่งกลุ่มข้าวโพดเทียนฝักเล็กพันธุ์น้ำยม พันธุ์ขาวข้าวเหนียว พันธุ์น้ำน่านและพันธุ์น้ำวังซึ่งจัดเป็นกลุ่มพันธุ์ผสมเปิดทั้งหมดออกจากกลุ่มข้าวโพดเทียนฝักใหญ่ได้ และ กลุ่มพันธุ์ ข้าวโพดข้าวเหนียวผสมเปิดที่มีเมล็ดสีขาวได้แก่ พันธุ์ไข่มุกปุ้มปุ้ย ข้าวเหนียวนครปฐม ข้าวโพด 8 แถว และสโนไวท์ ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ผลในทำนองเดียวกันนี้รายงานไว้โดย กิตติยา (2554) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน 18 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเดียวกันคือ SRAP markers พบว่า ข้าวโพดพันธุ์ Bigwhite#854 ถูกจัดกลุ่มร่วมกับข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าที่มีลักษณะฝักใหญ่ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า Bigwhite#854 ถูกจัดกลุ่มอยู่กับข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าอื่นๆ ที่มีลักษณะฝักใหญ่ และมีข้าวโพดหวาน 2 พันธุ์คือ Supergold และ ซุปเปอร์สวีท ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวโพดข้าวเหนียว ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิดเช่น เชื้อพันธุกรรม Tectona grandis ที่มีค่า PIC ระหว่าง0.37 - 0.48 (Me5/Em2) มีค่าเฉลี่ย 0.40 (Thakor *et al.*, 2019) และ Jingade et al. (2019) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมกาแฟ ใช้ค่า PIC บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของแต่ละไพรเมอร์ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.28 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP ได้ใช้ศึกษาความหลากหลายทาง

พันธุกรรมของ Brassica 65 accessions ประกอบด้วย B. rapa 54 accessions และ Brassica สปีชีร์ อื่นๆ 11 accessions ได้ดี โดยพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.34–0.83 (Zhang *et al*., 2017)

ข้าวโพดพันธุ์ Bigwhite#854 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่ที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งมีทั้งพันธุ์ลูกผสม พันธุ์ต่างประเทศ และพันธุ์ผสมเปิดบางพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าข้าวโพดในกลุ่มนี้มีฐานพันธุกรรมใกล้เคียงกัน อาจเนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวให้มีลักษณะเหนียวนุ่ม และหวานเพิ่มขึ้น โดยการนำลักษณะความหวานซึ่งเป็นลักษณะเด่นของข้าวโพดหวาน และความเหนียวนุ่มซึ่งเป็นลักษณะเด่นในข้าวโพดข้าวเหนียวมาผสมผสานกันให้ได้คุณภาพที่ดีที่สุดโดยมีการใช้ประโยชน์ร่วมกันจากยีนควบคุมความหวานคือ shrunken-2 (sh2) ยีนควบคุมความนุ่มคือ sugary gene (*su*) และยีนควบคุมความเหนียวคือ waxy (*wx*) (ทวีศักดิ์, 2540) นอกจากคุณภาพแล้ว ยังมุ่งเน้นให้มีขนาดฝักและสีเมล็ดสดที่มีความหลากหลายให้ผู้บริโภคและเกษตรกรผู้ปลูกได้เลือกหลากหลาย และอาจมีแหล่งพันธุกรรมพ่อแม่พันธุ์ที่เหมือนกันบางส่วน จึงเป็นสาเหตุของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวกับข้าวโพดหวานในกลุ่มนี้

หากพิจารณาโดยรวมกลุ่มของข้าวโพดข้าวเหนียวกับข้าวโพดหวานมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมปานกลาง ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับใช้ในการพัฒนาข้าวโพดข้าวเหนียวได้ต่อไป โดยการพัฒนาพันธุ์ลูกผสมของข้าวโพดข้าวเหนียวนั้นจำเป็นต้องเลือกใช้เชื้อพันธุกรรมที่แตกต่างทางพันธุกรรมจากแหล่งอื่นๆ เพื่อขยายฐานพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวในอนาคต

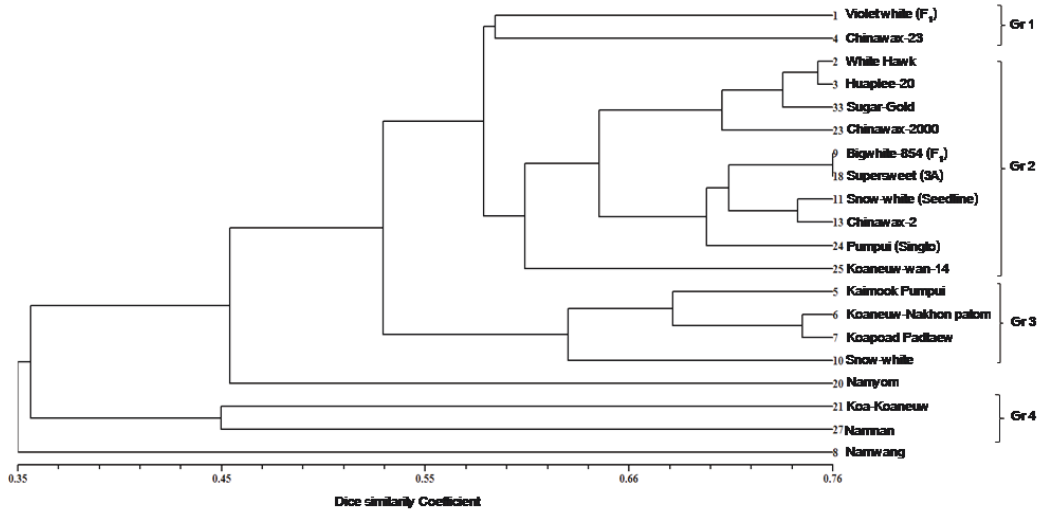


Figure 1 Cluster analysis of 18 waxy and 2 sweet corn cultivars based on Dice's similarity coefficient

## สรุป

จากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวานจำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) โดยใช้ไพรเมอร์ 12 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 61 แถบ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 0.35-0.76 และสามารถจัดกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวาน ออกเป็น 4 กลุ่ม เมื่อกำหนดค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.55 แสดงให้เห็นถึงพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันของข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวาน ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากแหล่งพันธุกรรมของพ่อแม่ที่มีความคล้ายคลึงกันหรืออาจมาจากแหล่งเดียวกันได้ การเก็บรักษาพันธุ์หรือเพิ่มปริมาณเมล็ดที่แตกต่างกันรวมถึงการเก็บรวบรวมพันธุ์จากแหล่งต่างๆ เพื่อนำมาปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการ และข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวานมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมปานกลาง และผลการศึกษานี้แสดงให้

เห็นว่าเทคนิค SRAP markers สามารถศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดหวานได้ และยังสามารถจัดกลุ่มได้ชัดเจน รวมถึงแยกลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของฝักได้

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนุบสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

กิตติยา โพบำรุง. 2554. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทวีศักดิ์ ภู่หลำ. 2540. ข้าวโพดหวาน การปรับปรุงพันธุ์และการปลูกเพื่อการค้า. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 143 หน้า.

ทิพย์ เลขะกุล. 2529. ข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน. ชาวเกษตร 67:4-17.

ประภา กัณฐศากุล, สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์ และจินดา จันทร์อ่อน. 2535. ส่วนประกอบบางอย่างของข้าวโพดฝักสด, น. 1-3. ในเอกสารประกอบการสัมนาข้าวโพดหวาน, ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, เชียงใหม่.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 269 หน้า.

องค์การตลาดเพื่อเกษตรกร. 2552. คู่มือการถ่ายทอดเทคโนโลยี โครงการส่งเสริมการผลิตสินค้าเกษตรที่ได้มาตรฐานและปลอดภัย. กรุงเทพ ฯ. 10 หน้า.

Fergason, V.L. 2001. High amylose and waxy corns, pp. 63-84. In A.R. Hallauer, ed. Specialty corns. CRC Press, USA.

Jingade, P., A. K. Huded, B. Kosaraju, and M. K. Mishra. 2019. Diversity genotyping of Indian coffee (*Coffea arabica* L.) germplasm accessions by using SRAP markers. J. Crop Improve. 33(3): 327–345.

Li, G. and C.F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. Theor. Appl. Genet. 103: 455-461.

Pan, D., W. Yu-Ming, C.Guo-Yue, L. Wei, W. Ji-Rui, N. Eviatar and Z. You-Liang. 2010. Sequence-related amplified poly morphism (SRAP) of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) in Israel and its ecological association. Biochem. Syst. Ecol. 38: 1–11.

Pineda-Hidalgo, K.V., K.P. Méndez-Marroquin, E.V. Alvarez, J.Chávez-Ontiveros, P. Sánchez-Peña, J.A. Garzón-Tiznado, M.O. Vega-Garcia and J.A. López-Valenzuela. 2013. Microsaltellite-based genetic diversity among accessions of maize landraces from Sinaloa in Mexico. Hereditas 150 (4-6): 53-59.

Sanchez, G.J.J. and M.M. Goodman. 1992. Relationships among the Mexican races of maize. Econ. Bot. 46(1):72-85

Thakor . M. C., R. S. Fougat, S. Kumar and A. A. Sakure. 2019. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) analysis of teak (*Tectona grandis* L.) germplasm. Ecol. Genet. Genom. 12: article 100041.

Zhang, X., H. Chen, S. A. Channa, Y. Zhang, Y. Guo, M. Klima, F. Yu. and S. Hu. 2017. Genetic diversity in Chinese and exotic *Brassica rapa* L. accessions revealed by SSR and SRAP markers. Braz. J. Bot. 40 (4): 973–982.