

ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มเฮเทอโรติกข้าวโพดข้าวเหนียว
สายพันธุ์แท้ ด้วยเครื่องหมาย Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP)

Genetic Diversity and Heterotic Grouping of Waxy Corn Inbred Lines Based on
Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) Markers

สิริธร สุพลแสง¹ วิชญารัตน์ ชอบทำกิจ² กิติยา อังกุล³ อรรอุมา ตนะดุลย์³
ชฎามาศ จิตต์เลขา⁴ และกุลารบ เหล่าสาธิต^{3*}

Sireethorn Suponsang¹, Wichayarat Chobthamkit², Kitiya Amkul³, Orn-u-ma Tanadul³,
Chadamas Jitlaka⁴ and Kularb Laosatit^{3*}

Received: April 21, 2023

Revised: June 21, 2023

Accepted: June 23, 2023

Abstract: The success of the development of hybrid maize depends on the genetic differences of the inbred lines used as the parents. Therefore, the objective of this study was to assess the genetic diversity and heterotic grouping of 75 waxy corn samples including 62 waxy corn inbreds from National Corn and Sorghum Research Center (NCSRC), 8 commercial varieties and 5 waxy corn samples from China with 16 SRAP markers. SRAP analysis revealed that the markers detected 199 alleles, of which 176 were polymorphic (88.44%). An average number of alleles per marker was 12.44. The average *PIC* value was 0.26 and gene diversity was 0.26. Neighbor-joining analysis and STRUCTURE analysis showed that all waxy corn samples were clustered into three heterotic groups. The first and second groups contained waxy corn inbreds from the NCSRC, while the third group had waxy corn inbreds from the NCSRC, commercial varieties and waxy corn from China. The findings in this study can be used for parental selection in order to breeding a new waxy corn hybrid.

Keywords: genetic diversity, heterotic, DNA marker, waxy corn

¹ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

¹ Agricultural Biotechnology Program, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

² ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

² Department of Soil Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

³ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

³ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

⁴ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครราชสีมา 30320

⁴ National Corn and Sorghum Research Center, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Nakhonrachasima 30320

*Corresponding author, e-mail: fagrkal@ku.ac.th

บทคัดย่อ: ความสำเร็จของการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์แท้ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มเฮเทอโรติกข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 75 ตัวอย่าง ประกอบด้วยข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติจำนวน 62 ตัวอย่าง ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าจำนวน 8 ตัวอย่าง และข้าวโพดข้าวเหนียวจากประเทศจีนจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SRAP จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ ตรวจพบแถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 199 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 176 แถบ คิดเป็น 88.44% โดยมีแถบดีเอ็นเอต่อเครื่องหมายเฉลี่ย 12.44 แถบต่อเครื่องหมาย มีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.26 และมีค่าความหลากหลายของยีนเฉลี่ยเท่ากับ 0.26 และจากการจัดกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยวิธี Neighbor-joining analysis และ STRUCTURE ให้ผลสอดคล้องกัน คือ สามารถจัดกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ทั้งหมด ขณะที่กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ พันธุ์การค้า และพันธุ์จากประเทศจีน ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำข้อมูลการจัดกลุ่มที่ได้ไปใช้คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์สำหรับใช้สร้างข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์ใหม่ต่อไป

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม เฮเทอโรติก เครื่องหมายดีเอ็นเอ ข้าวโพดข้าวเหนียว

คำนำ

ข้าวโพดข้าวเหนียวหรือบางท้องถิ่นเรียกว่า ข้าวโพดเทียนหรือข้าวโพดสาลิ เป็นข้าวโพดรับประทานฝักสด ปลูกได้ตลอดทั้งปีทั้งในพื้นที่ไร่และในเขตชลประทาน ความต้องการใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวของเกษตรกรในประเทศไทยต่อปีคิดเป็น 45% ของตลาดเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดฝักสด มีมูลค่ารวมกว่า 270 ล้านบาท (ธาวิตา, 2561) ปัจจุบันปัญหาการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ (climate change) มีแนวโน้มความรุนแรงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั่วโลกต้องเผชิญกับภัยธรรมชาติมากมาย (Chapman *et al.*, 2012) เกษตรกรผู้ปลูกข้าวโพดข้าวเหนียวของไทยก็เริ่มได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดสภาพแล้งที่ยาวนานมากขึ้น น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติมีปริมาณน้อยลง ทำให้มีน้ำไม่เพียงพอต่อการเพาะปลูกข้าวโพด เกษตรกรต้องปล่อยพื้นที่ว่าง ส่งผลให้เกษตรกรขาดรายได้ กระทั่งต่อคุณภาพชีวิตและความเป็นอยู่ของเกษตรกร แนวทางการแก้ปัญหาทางหนึ่ง คือ การพัฒนาข้าวโพดพันธุ์ใหม่เพื่อรองรับการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ

ข้าวโพดข้าวเหนียวที่เกษตรกรนิยมปลูกในปัจจุบันทั้งในและต่างประเทศส่วนใหญ่เป็นข้าวโพด

ลูกผสมเดี่ยว (single cross hybrid) เนื่องจากให้ผลผลิตสูงกว่าและมีความสม่ำเสมอของลักษณะต่างๆ ดีกว่าพันธุ์ข้าวโพดชนิดอื่น ๆ (Troyer, 1999; Meena *et al.*, 2017) โดยเฉพาะพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อแม่สายพันธุ์แท้ (inbred lines) ที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันมาก ลูกผสมจะแสดงลักษณะดีเด่นเหนือกว่าสายพันธุ์พ่อแม่และแม่ (heterosis หรือ hybrid vigor) มากกว่าลูกผสมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อแม่สายพันธุ์แท้ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (Carena and Hallauer, 2001; Reif *et al.*, 2005a; 2005b; Barata and Carena, 2006; Kashiani *et al.*, 2012; Meena *et al.*, 2017) ดังนั้น ความสำเร็จของการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมจึงขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์แท้ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ (Meena *et al.*, 2017)

การจัดกลุ่มข้าวโพดสายพันธุ์แท้หรือที่เรียกว่า การจัดกลุ่มเฮเทอโรติก คือ การจัดกลุ่มสายพันธุ์แท้ที่เหมือนกันหรือมีพันธุกรรมใกล้เคียงกันไว้กลุ่มเดียวกัน ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้ข้อมูลประวัติพันธุ์ (pedigree) (Reid *et al.*, 2011) การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Kashiani *et al.*, 2014) การผสมแบบพบกันหมด (diallel cross) หรือการผสมกับสายพันธุ์ทดสอบ (testcross) แล้วประเมิน

ความดีเด่นของลูกผสมที่ได้ (Fan *et al.*, 2003; Barata and Carena, 2006; Aguiar *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2009; Kulka *et al.*, 2018) และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (Prasanna and Hoisington, 2003; Li *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2008; Kashiani *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2018; Mahato *et al.*, 2018) อย่างไรก็ตาม วิธีเหล่านี้มีทั้งข้อดีและข้อเสีย กล่าวคือ การใช้ข้อมูลประวัติพันธุ์ในการจัดกลุ่มสามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์แท้ได้ครั้งละหลายสายพันธุ์ แต่ข้อมูลที่ใช้จำเป็นต้องเป็นข้อมูลที่ถูกต้องแท้จริง มิเช่นนั้นอาจทำให้ข้อมูลการจัดกลุ่มไม่ถูกต้อง (Sa *et al.*, 2010) เช่นเดียวกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดกลุ่ม วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย สามารถแยกความแตกต่างของแต่ละกลุ่มได้ชัดเจน แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นลักษณะที่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องสูง (Sa *et al.*, 2018) ทำให้การจัดกลุ่มผิดพลาดได้ง่าย ในขณะที่วิธีการผสมแบบพบกันหมดและวิธีผสมกับสายพันธุ์ทดสอบแล้วประเมินความดีเด่นของลูกผสมที่ได้ เป็นการทดสอบในสภาพแปลง ทำให้สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์แท้ได้จำนวนจำกัดเนื่องจากข้อจำกัดเรื่องพื้นที่ปลูก แรงงาน ระยะเวลาทดสอบ ตลอดจนการดูแลจัดการแปลง ส่วนการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการจัดกลุ่มเฮเทอโรติกนั้นสามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์แท้ได้ครั้งละจำนวนมาก ข้อมูลที่ได้ไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมีความชัดเจนและถูกต้อง ทำให้มีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มเฮเทอโรติกในข้าวโพดเป็นจำนวนมาก (Gethi *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003; Barata and Carena, 2006; Reid *et al.*, 2011; Kashiani *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2018; Mahato *et al.*, 2018; Sa *et al.*, 2018)

เครื่องหมาย Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR) โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ส่วนใหญ่มักเป็นบริเวณ open reading frame (ORF) ทำให้สามารถนำเครื่องหมายชนิดนี้มาประยุกต์ใช้ได้โดยไม่จำเป็นต้องทราบ

ข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามาก่อน สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน ทำได้ง่าย รวดเร็ว ทำซ้ำแล้วได้ผลคงเดิม อีกทั้งค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก (Li and Quiros, 2001) ทำให้เครื่องหมาย SRAP ถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิดรวมทั้งข้าวโพด (Fareghi *et al.*, 2019; Ahmed *et al.*, 2020; Dabral *et al.*, 2020) ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มเฮเทอโรติกข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ โดยใช้เครื่องหมาย SRAP เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้เชื้อพันธุกรรมให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียว

ข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 75 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (NCSRC) จำนวน 62 ตัวอย่าง ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าจำนวน 8 ตัวอย่าง และข้าวโพดข้าวเหนียวจากประเทศจีนจำนวน 5 ตัวอย่าง (Table 1) ปลูกข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 75 ตัวอย่าง ที่แปลงทดลองภาควิชาพืชไร่ภาคเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนของข้าวโพดข้าวเหนียวแต่ละตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Lodhi *et al.* (1994) จากนั้น ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ NanoDrop 8000 (Nanodrop Technologies, DE, USA) และเจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SRAP

สุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้จาก NCSRC จำนวน 2 ตัวอย่าง

ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าและข้าวโพดข้าวเหนียวจากประเทศจีนอย่างละ 1 ตัวอย่าง รวม 4 ตัวอย่าง เพื่อนำมาค้นหาเครื่องหมาย SRAP ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวได้ โดยนำดีเอ็นเอทั้ง 4 ตัวอย่าง มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย SRAP จำนวน 64 คู่ไพรเมอร์ (Table 2) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 10 นาโนกรัม 1X Taq buffer, 2 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$, 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTPs, 0.5 ไมโครโมลาร์ ฟอว์เวิร์ดไพรเมอร์และรีเวิร์สไพรเมอร์ (forward and reverse primers) และ 0.1 ยูนิต เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, US) จากนั้นนำไปทำ PCR โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ GeneAmp PCR9700 System (Applied Biosystems) กำหนดโปรแกรมการทำงานดังนี้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 35 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 5 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 50 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรส ความเข้มข้น 2% ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วตรวจสอบภายใต้แสง UV บันทึกขนาดของแถบดีเอ็นเอหรืออัลลิล โดยการเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, US) จากนั้น คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 4 ตัวอย่างได้อย่างชัดเจนมาตรวจ

สอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 75 ตัวอย่าง ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกข้อมูลการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละตำแหน่ง โดยกำหนดให้ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 0 นับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดของแต่ละคู่ไพรเมอร์และ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (polymorphic bands) จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (percentage of polymorphism) ค่า Polymorphic information content (PIC) ตามวิธีของ Anderson *et al.* (1993) และค่าความหลากหลายของยีน (gene diversity) ด้วยโปรแกรม Pop gen (Yeh *et al.*, 1999)

นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย SRAP ไปวิเคราะห์โครงสร้างของประชากรด้วย Bayesian algorithm โดยใช้โปรแกรม STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2007) ทำ simulation run โดยกำหนดค่าประชากรย่อย (K) ระหว่าง 1 ถึง 10 ค่า burn-in เท่ากับ 10,000 และค่า Markov Chain Monte Carlo เท่ากับ 50,000 จากนั้นวิเคราะห์หา ค่า K ที่เหมาะสมตามวิธีของ Evanno *et al.* (2005) แล้วจัดกลุ่มประชากรย่อยตามค่า K ที่วิเคราะห์ได้ โดยใช้ค่า burn-in และค่า Markov Chain Monte Carlo เท่ากับ 100,000 และ 500,000 ตามลำดับ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Jaccard's coefficient) ตามวิธีของ Jaccard (1901) โดยใช้โปรแกรม R (R Development Core Team, 2013) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามวิธี Neighbor-joining analysis ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013)

Table 1 Waxy corn samples used in this study.

No.	Code	Source	No.	Code	Source
1	203-1	NCSRC	39	4011	NCSRC
2	203-2	NCSRC	40	4012	NCSRC
3	203-3	NCSRC	41	4013	NCSRC
4	203-4	NCSRC	42	4014	NCSRC
5	203-5	NCSRC	43	7001	NCSRC
6	203-6	NCSRC	44	7006	NCSRC
7	204-1	NCSRC	45	11001	NCSRC
8	204-3	NCSRC	46	11002	NCSRC
9	204-4	NCSRC	47	11004	NCSRC
10	204-5	NCSRC	48	11005	NCSRC
11	204-7	NCSRC	49	12001	NCSRC
12	204-11	NCSRC	50	12002	NCSRC
13	204-12	NCSRC	51	12003	NCSRC
14	204-13	NCSRC	52	12004	NCSRC
15	204-14	NCSRC	53	12005	NCSRC
16	204-15	NCSRC	54	17001	NCSRC
17	701	NCSRC	55	17002	NCSRC
18	705	NCSRC	56	17008	NCSRC
19	708	NCSRC	57	17012	NCSRC
20	710	NCSRC	58	17014	NCSRC
21	711	NCSRC	59	17004	NCSRC
22	CR01	NCSRC	60	17004	NCSRC
23	CR02	NCSRC	61	709	NCSRC
24	CR03	NCSRC	62	712	NCSRC
25	3001	NCSRC	63	china3	China
26	3003	NCSRC	64	china4	China
27	3005	NCSRC	65	china5	China
28	3006	NCSRC	66	china6	China
29	3007	NCSRC	67	china7	China
30	3009	NCSRC	68	C1	Field corn
31	3010	NCSRC	69	C2	White-purple Phu Khao Thong
32	3011	NCSRC	70	C3	Bigwhite 852 F1 Sorndaeng
33	4001	NCSRC	71	C4	Pink Flash
34	4003	NCSRC	72	C5	Tian Leung M.T. 85 Phu Khao Thong
35	4006	NCSRC	73	C6	Tian Rom Phu Khao Thong
36	4007	NCSRC	74	C7	Tian Rom Nam Nan Triple A
37	4008	NCSRC	75	C8	Neow Thabthim F1 Sorndaeng
38	4009	NCSRC			

Table 2 The sequences of SRAP primer that used for constructed 64 primer combinations.

Name	Primer Sequence (5'-3')	Name	Primer Sequence (5'-3')
Forward primer			
Me 2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Me 8	TGAGTCCAAACCGGAAA
Me 11	TGAGTCCAAACCGGAAG	Me 13	TGAGTCCAAACCGGTTG
Reverse primer			
Em 1	GACTGCGTACGAATTCAA	Em 2	GACTGCGTACGAATTCTG
Em 3	GACTGCGTACGAATTGAC	Em 4	GACTGCGTACGAATTTGA
Em 5	GACTGCGTACGAATTAAC	Em 6	GACTGCGTACGAATTGCA
Em 7	GACTGCGTACGAATTGAG	Em 8	GACTGCGTACGAATTGCC
Em 9	GACTGCGTACGAATTTCA	Em 10	GACTGCGTACGAATTCAT
Em 11	GACTGCGTACGAATTAAT	Em 12	GACTGCGTACGAATTTGC
Em 13	GACTGCGTACGAATTCGA	Em 14	GACTGCGTACGAATTATG
Em 15	GACTGCGTACGAATTAGC	Em 16	GACTGCGTACGAATTACG

ผลการทดลอง

1. ความแตกต่างของเครื่องหมาย SRAP

จากการค้นหาคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 4 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย SRAP จำนวน 64 คู่ไพรเมอร์ (Table 2) พบคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณและให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดจำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ (Table 3) จากนั้น จึงนำคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียว ทั้ง 75 ตัวอย่าง พบแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้

ทั้งหมด 199 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 176 แถบ คิดเป็น 88.44% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด โดยมีแถบดีเอ็นเอต่อเครื่องหมายระหว่าง 6 (Me13/Em11) ถึง 16 แถบ (Me2/Em4 และ Me13/Em12) เฉลี่ย 12.44 แถบต่อเครื่องหมาย มีค่า *PIC* ระหว่าง 0.18 (Me13/Em7) ถึง 0.33 (Me2/Em4 และ Me2/Em15) เฉลี่ย 0.26 และมีค่า *gene diversity* ระหว่าง 0.18 (Me13/Em7) ถึง 0.33 (Me2/Em4 และ Me2/Em15) เฉลี่ย 0.26 (Table 3)

Table 3 Number of total bands, number of polymorphic bands, percentage of polymorphism, polymorphic information content (*PIC*) and *gene diversity* value of 16 polymorphic SRAP primer combinations amplified in 75 waxy corn samples.

Primers	Total bands	Polymorphic bands	Percentage of polymorphism	<i>PIC</i>	<i>Gene diversity</i>
Me2/Em1	15	15	100.00	0.28	0.27
Me2/Em4	16	14	87.50	0.33	0.33
Me2/Em5	13	13	100.00	0.22	0.22
Me2/Em9	10	9	90.00	0.26	0.26
Me2/Em12	9	6	66.67	0.22	0.22
Me2/Em15	15	12	80.00	0.33	0.33
Me2/Em16	13	11	84.62	0.24	0.24
Me13/Em1	13	11	84.62	0.27	0.27
Me13/Em2	14	13	92.86	0.21	0.21

Table 3 (continued).

Primers	Total bands	Polymorphic bands	Percentage of polymorphism	PIC	Gene diversity
Me13/Em4	13	12	92.31	0.21	0.21
Me13/Em5	10	8	80.00	0.31	0.31
Me13/Em6	11	9	81.82	0.22	0.22
Me13/Em7	12	11	91.67	0.18	0.18
Me13/Em8	13	12	92.31	0.32	0.29
Me13/Em11	6	5	83.33	0.25	0.25
Me13/Em12	16	15	93.75	0.25	0.25
Total	199	176	88.44	-	-
Average	12.44	11	87.59	0.26	0.26

2. โครงสร้างประชากรและการจัดกลุ่ม

การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 75 สายพันธุ์ โดยใช้โปรแกรม STRUCTURE และคำนวณจำนวนประชากรย่อยตามวิธีของ Evanno *et al.* (2005) พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวทั้งหมดประกอบด้วย 3 ประชากรย่อย ($K = 3$) (Figure 1 และ 2B) โดยประชากรย่อยที่ 1 ประกอบด้วยข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ทั้งหมดจำนวน 18 สายพันธุ์ ประชากรย่อยที่ 2 ประกอบด้วยข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้จำนวน 25 สายพันธุ์ พันธุ์การค้าทั้ง 8 พันธุ์ และพันธุ์จากประเทศจีนทั้ง 5 พันธุ์ ขณะที่ประชากรย่อยที่ 3 ประกอบด้วย ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ทั้งหมดจำนวน 19 สายพันธุ์

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Neighbor-joining analysis พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวทั้งหมดแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มหลัก (cluster) (Figure 2) โดยกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย

ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ทั้งหมด ขณะที่กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ พันธุ์การค้า และพันธุ์จากประเทศจีน โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 3A 3B และ 3C (Figure 2A) และพบว่า ข้าวโพดพันธุ์การค้าทั้งหมดยกเว้นพันธุ์เทียนเหลือง M.T. 85 ภูเขาทอง ถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 3A ทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าส่วนใหญ่ของประเทศไทยพัฒนามาจากแหล่งพันธุกรรมที่มีเชื้อพันธุกรรมใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับการวิเคราะห์โครงสร้างประชากร พบว่า ประชากรย่อยที่ 1 ทั้งหมด ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ขณะที่ประชากรย่อยที่ 2 ส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 3 กลุ่มย่อย 3A และ 3B ส่วนประชากรย่อยที่ 3 ส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 3 กลุ่มย่อย 3C (Figure 2B) แสดงให้เห็นว่าการจัดกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียว ทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน

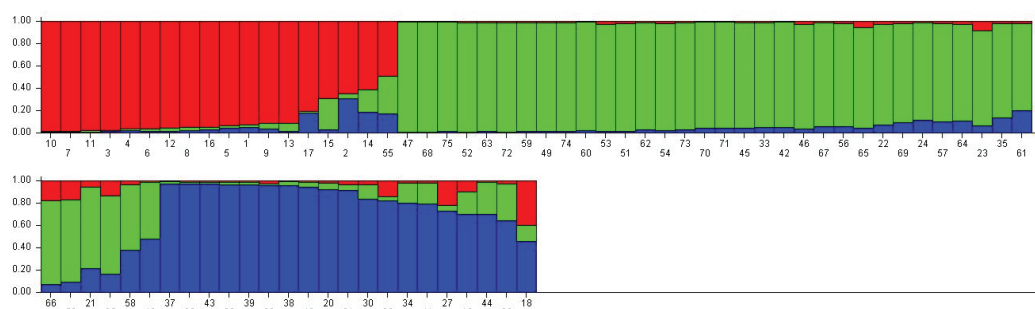


Figure 1 Bar plots showing population structure of 75 waxy corn samples determined by STRUCTURE analysis based on SRAP alleles detected by 16 SRAP combination primers. Number under each bar indicates code name of each waxy corn sample (see Table 1).

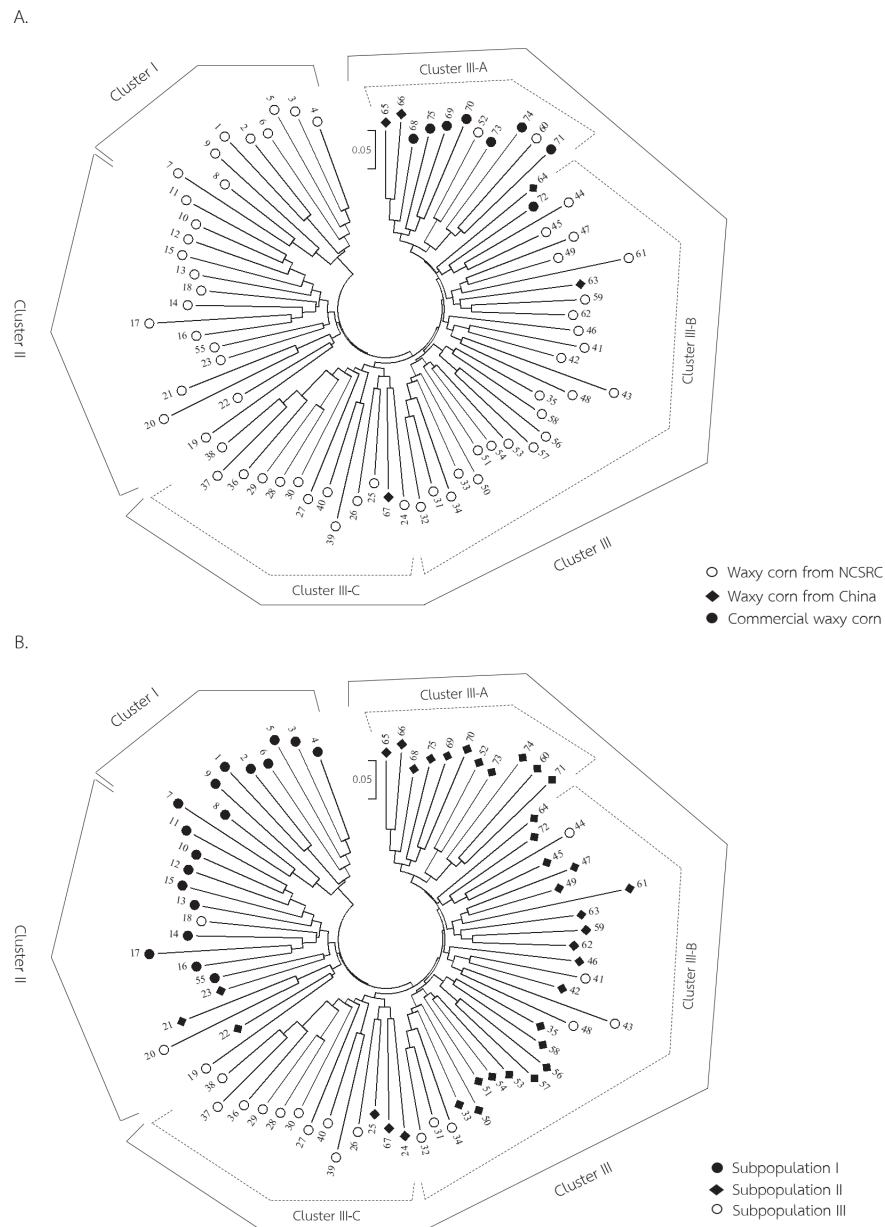


Figure 2 Neighbor-joining tree depicting genetic relationship among the 75 waxy corn samples based on allelic data of 16 SRAP combination primers. (A) Individuals are shown based on their sources of origin. (B) Individuals are shown based on subpopulations they belong to as determined by STRUCTURE analysis.

วิจารณ์

จากการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 75 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย SRAP จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 199 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจำนวน 176 แถบ คิดเป็น 88.44% ซึ่งมากกว่ารายงานของกิตติยา (2554) ที่ศึกษาความ

หลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนพันธุ์การค้าของไทยจำนวน 18 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย SRAP จำนวน 25 คู่ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง 52.77% โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อไพรเมอร์ 4.38 แถบ ขณะที่ในการศึกษาครั้งนี้พบจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อไพรเมอร์ 12.44 แถบ ขณะที่ Fareghi *et al.* (2019)

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดสายพันธุ์แท้จำนวน 13 สายพันธุ์และข้าวโพดลูกผสมเดี่ยวจำนวน 52 สายพันธุ์ด้วยเครื่องหมาย SRAP จำนวน 25 คู่ไพรเมอร์ พบ แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 205 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจำนวน 135 แถบ คิดเป็น 65.75% แสดงให้เห็นว่า เครื่องหมาย SRAP เป็นเครื่องหมายหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอและสามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ นอกจากนี้ การศึกษาในครั้งนี้ พบค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.18-0.3344 เฉลี่ย 0.26 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ahmed *et al.* (2020) ที่ใช้เครื่องหมาย SRAP ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดลูกผสมพันธุ์การค้าของอียิปต์และพบค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.09-0.31 จากการจัดกลุ่มและวิเคราะห์โครงสร้างประชากรของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 75 ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวถูกจัดออกได้เป็น 3 กลุ่ม (Figure 2) ซึ่งสามารถนำข้อมูลการจัดกลุ่มดังกล่าวไปใช้เป็นพื้นฐานในการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่สำหรับสร้างลูกผสมพันธุ์ใหม่ โดยคัดเลือกสายพันธุ์พ่อและแม่ที่อยู่ต่างกลุ่มกันมาผสมพันธุ์กัน จะทำให้มีโอกาสได้ลูกผสมที่มีลักษณะดีเด่นมากกว่าลูกผสมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อและแม่ที่อยู่ภายในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้ ยังพบว่าข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติและข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าของไทยมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับตัวอย่างข้าวโพดข้าวเหนียวจากประเทศจีน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าข้าวโพดสายพันธุ์ดังกล่าวอาจได้รับเชื้อพันธุกรรมบางส่วนมาจากข้าวโพดข้าวเหนียวของจีนในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sa *et al.* (2010) ที่พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวของประเทศเกาหลีและข้าวโพดข้าวเหนียวจากประเทศจีนมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกัน แสดงให้เห็นถึงการกระจายพันธุ์ของข้าวโพดข้าวเหนียวจากประเทศจีน ซึ่งเป็นประเทศต้นกำเนิดของข้าวโพดข้าวเหนียวไปยังประเทศอื่นๆ อย่างไรก็ตาม จากค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.26 แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายของข้าวโพดข้าวเหนียวในการ

ศึกษานี้ขึ้นอยู่กับระดับต่ำ ฉะนั้นในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวจึงควรรวบรวม นำเข้า หรือเพิ่มความแปรปรวนเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดข้าวเหนียวเพิ่มมากขึ้น

สรุป

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มเฮเทอโรติกข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 75 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย SRAP จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวได้เป็น 3 กลุ่ม สามารถนำข้อมูลการจัดกลุ่มดังกล่าวมาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่สำหรับสร้างลูกผสมพันธุ์ใหม่ อย่างไรก็ตาม ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวในการศึกษานี้ยังมีค่าต่ำ ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวจึงควรรวบรวม นำเข้า หรือเพิ่มความแปรปรวนเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดข้าวเหนียวเพิ่มมากขึ้น เพื่อเพิ่มโอกาสและความสำเร็จในการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ใหม่ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กิตติยา โปบำรุง. 2554. การศึกษาข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน 18 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SRAP จำนวน 25 คู่ไพรเมอร์. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 20 หน้า.
- ธาวิดา ศิริสัมพันธ์. 2561. เทคโนโลยีชาวบ้าน. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: https://www.technologychaoban.com/agricultural-technology/article_65761. (5 มีนาคม 2566).
- Anderson, J.A., G.A. Churchill, J.E. Autrique, S.D. Tanksley and M.E. Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36(1): 181-186.
- Ahmed, Y.K.Y., M.A.H. Elmaged, R.A.I. Abdulllah, A.A.F. Ali, H.E.M. Ali, G.A.R. El-Sherbeny, A.Y.M. Ahmed,

- H.S.A. Abdelaziz and A.G.A. Khaled. 2020. Comparative analysis of genetic diversity among Egyptian commercial maize hybrids obtained by SRAP markers. *Journal of King Abdulaziz University-Meteorology, Environment and Arid Land Agriculture Sciences* 29(1): 79-86, doi: 10.4197/Met. 29-1.7
- Aguiar, C.G., I. Schuster, A.T.A. Junior, C.A. Scapim and E.S.N. Vieira. 2008. Heterotic groups in tropical maize germplasm by test crosses and simple sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research* 7: 1233-1244.
- Barata, C. and M.J. Carena. 2006. Classification of North Dakota maize inbred lines into heterotic groups based on molecular and testcross data. *Euphytica* 151: 339-349.
- Carena, M.J. and A.R. Hallauer. 2001. Expression of heterosis in leaming and midland corn belt dent population. *Journal of the Iowa Academy of Science* 108: 73-78.
- Chapman, S.C., S. Chakraborty, M.F. Dreccer and C.S.M. Howden. 2012. Plant adaptation to climate change opportunities and priorities in breeding. *Crop and Pasture Science* 63: 251-268.
- Dabral, H., D.C. Baskheti, R.K. Singh and V.P. Kumar. 2020. Molecular diversity assessment using sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers in maize. *African Journal of Biotechnology* 2020: 12392, doi: 10.5897/AJB.
- Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Fan, X.M., J. Tan, H.M. Chen and J. Y. Yang. 2003. Heterotic grouping for tropical and temperate maize inbreds by analyzing combining ability and SSR markers. *Maydica* 48: 251-257.
- Fan, X.M., Y.M. Zhang, W.H. Yao, H.M. Chen, J. Tan, C.X. Xu, X.L. Han, L.M. Luo and M.S. Kang. 2009. Classifying maize inbred lines into heterotic groups using a factorial mating design. *Agronomy Journal* 101: 106-12.
- Fareghi, S., A.F. Mirlohi, G. Saeidi and H. Khamisabadi. 2019. Evaluation of SRAP marker efficiency in identifying the relationship between genetic diversities of corn inbred lines with seed quantity and quality in derived hybrids. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand)* 65(4): 6-14.
- Ferreira, F., C.A. Scapim, C. Maldonado and F. Mora. 2018. SSR-based genetic analysis of sweet corn inbred lines using artificial neural networks. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 18: 309-313.
- Gethi, J.G., J.A. Labate, K.R. Lamkey, M.E. Smith and S. Kresovich. 2002. SSR variation in important US maize inbred lines. *Crop Science* 42: 951-7.
- Jaccard, P. 1901. Eetude comparative de la distribution florale dans une portion des alpes et des jura. *Bulletin de la SocieteVaudoise des Sciences Naturelles* 37: 547-579, doi.org10.5169/seals-266450.
- Kashiani, P., G. Saleh, J.M. Panandam, N.A.P. Abdullah and A. Selamat. 2012. Molecular characterization of tropical sweet corn inbred lines using microsatellite markers. *Maydica* 57: 154-163.

- Kashiani, P., G. Saleh, N.A.P. Abdullah and M.A. Sin. 2014. Evaluation of genetic variation and relationships among tropical sweet corn inbred lines using agronomic traits. *Maydica* 59: 275-282.
- Kulka, V.P., T.A. Silva, R.I. Contreras-Soto, C. Maldonado, F. Mora and C.A. Scapim. 2018. Diallel analysis and genetic differentiation of tropical and temperate maize inbred lines. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 18: 31-38.
- 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 the *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* 130: 445-461.
- Li, Y., Y. Shi, Y. Song, J. Du, R. Tuberosa and T. Wang. 2004. Analysis of genetic diversity in maize inbred lines base on AFLP markers. *Maydica* 49: 89-95.
- Lodhi, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden and B.I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 6-13.
- Mahato, A., J.P. Shahi, P.K. Singh and M. Kumar. 2018. Genetic diversity of sweet corn inbreds using agro-morphological traits and microsatellite markers. *3 Biotech* 8: 332.
- Meena, A.K., D. Gurjar, S.S. Patil and B.L. Kumhar. 2017. Concept of heterotic group and its exploitation in hybrid breeding. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6: 61-73.
- Nelson, P.T., N.D. Coles, J.B. Holland, D.M. Bubeck, S. Smith and M.M. Goodman. 2008. Molecular characterization of maize inbreds with expired U.S. plant variety protection. *Crop Science* 48: 1673-1685.
- Prasanna, B.M. and D. Hoisington. 2003. Molecular breeding for maize improvement: An overview. *Indian Journal of Biotechnology* 2: 85-98.
- Pritchard, J.K., X. Wen and D. Falush. 2007. Documentation for Structure Software Version 2.2., Available from <http://pritchbsd.uchicago.edu/software/structure22/readme.pdf>.
- R Development Core Team. 2013. R: A Language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reid, L.M., K. Xiang, X. Zhu, B.R. Baum and S.J. Molnar. 2011. Genetic diversity analysis of 119 Canadian maize inbred lines based on pedigree and simple sequence repeat markers. *Canadian Journal of Plant Science* 91: 651-661.
- Reif, J.C., A.R. Hallauer and A. E. Melchinger. 2005a. Heterosis and heterotic pattern in maize. *Maydica* 50: 215-223.
- Reif, J.C., S. Hamrit, M. Heckenberger, W. Schipprack, H.P. Maurer, M. Bohn and A.E. Melchinger. 2005b. Trends in genetic diversity among European maize cultivars and their parental components during the past 50 years. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 838-845.

- Sa, K.J., J.Y. Park, K.J. Park and J.K. Lee. 2010. Analysis of genetic diversity and relationships among waxy maize inbred lines in Korea using SSR markers. *Genes Genome* 32: 375-384.
- Sa, K.J., T.K. Hong and J.K. Lee. 2018. Genetic diversity and association analyses of Canadian maize inbred lines with agronomic traits and simple sequence repeat markers. *Plant Breeding and Biotechnology* 6: 159-169.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Journal of Molecular Evolution* 30: 2725-2729.
- Troyer, A.F. 1999. Background of U.S. hybrid corn. *Crop Science* 39: 601-626.
- Yeh, F.C., R.C. Yang, T. Boyle, Z.H. Ye and J.X. Mao. 1999. POPGENE VERSION 1.32: the user friendly software for population genetic analysis. <https://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Popgene-Population-Genetic-Analysis.shtml>.