



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่

สาขา

พืชไร่นา

ภาควิชา

เรื่อง การประเมินความบริสุทธิ์และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วย
เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Assessment of Genetic Purity and Variation of Waxy Corn (*Zea mays* L. *ceratina*) using
DNA Markers

นามผู้วิจัย นางสาวนิศากร กาญจนเกษร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จุฑามาศ ร่มแก้ว, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์อัญมณี อวูษานนท์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ชูศักดิ์ จอมพุท, Dr.sc.nat.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์นวรรตน์ อุดมประเสริฐ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประเมินความบริสุทธิ์และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว
ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

Assessment of Genetic Purity and Variation of Waxy Corn (*Zea mays* L. *ceratina*)
using DNA Markers

โดย

นางสาวนิศากร กาญจนเกษร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

พ.ศ. 2556

นิตสาร กาญจนเกษร 2556: การประเมินความบริสุทธิ์และความแปรปรวนทางพันธุกรรม
ของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปริญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)
สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
จุฑามาศ ร่มแก้ว, Ph.D. 82 หน้า

การศึกษาการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ ได้แก่
แม่ข้าววัน บิ๊กไวท์-852 ไช้มุก-49 ทับทิมสยาม รัชตะ 1 และเหนียวสวรรค์ ด้วยเครื่องหมาย SSR
จำนวน 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ bnlg 1012 bnlg 1017 bnlg 1055 bnlg 1118 bnlg 1188 และ umc 1086
พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ 6 ชนิด แสดงแถบดีเอ็นเอที่
เหมือนกันภายในแต่ละพันธุ์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 22 แถบ และมีขนาดดีเอ็นเอตั้งแต่
100-500 คู่เบส โดยไพรเมอร์ bnlg 1188 สามารถแยกพันธุ์แม่ข้าววันออกจากข้าวโพดข้าวเหนียว
พันธุ์อื่น ๆ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ โดยใช้ลักษณะทางสถิติ
วิทยาด้วยวิธี Principal Component Analysis พบว่า PC1 และ PC2 อธิบายผลความสัมพันธ์ได้
ทั้งหมด 88.38 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว
ด้วยเครื่องหมาย AFLP โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ได้แก่ E-AGG:M-CAC E-AGC:M-CAG และ
E-AGG:M-CAG พบว่า ทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 31 แถบ จากจำนวน
แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 74 แถบ คิดเป็น 41.89 เปอร์เซ็นต์ และจากการประเมินความสัมพันธ์ของ
ข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมาย SSR และ AFLP พบว่า มีค่า Dice similarity coefficient
อยู่ระหว่าง 0.51 ถึง 0.71 และเมื่อนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with
Arithmetic mean (UPGMA) พบว่า สามารถจัดกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ ได้เป็น 2 กลุ่ม
ได้แก่ พันธุ์รัชตะ 1 และ ไช้มุก-49 ในขณะที่พันธุ์ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ แม่ข้าววัน และบิ๊กไวท์-
852 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

Nisakorn Kanjanakesorn 2013: Assessment of Genetic Purity and Variation of Waxy Corn (*Zea mays* L. *ceratina*) using DNA Markers. Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Assistant Professor Jutamas Romkaew, Ph.D. 82 pages.

Assessment of genetic purity of 6 waxy corn varieties; Maxone, Bigwhite-852, Kaimook-49, Tabtim Siam, Ratchata 1 and Neawsawan were studied using SSR markers with bnlg 1012, bnlg 1017, bnlg 1055, bnlg 1118, bnlg 1188 and umc 1086. All of 6 primers exhibited similar banding pattern in each waxy corn variety. It showed 22 total DNA bands and band size 100-500 base pair. The primer bnlg 1188 had a potential to separate Maxone from other waxy corn varieties. The principal component analysis (PCA) based on morphology data gave 88.38 percent explained by PC1 and PC2. AFLP marker with 3 pairs of primers; E-AGG:M-CAC, E-AGC:M-CAG and E-AGG:M-CAG were used to evaluate genetic variation of waxy corn. Three primers amplified 31 polymorphic bands from 74 total DNA representing 41.89 percent. The relationship of 6 waxy corn varieties was analyzed using SSR and AFLP markers. It was found that Dice's similarity coefficient ranged from 0.51 to 0.71. All 6 waxy corn varieties were clustered into 2 groups based on Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) clustering method. The result revealed that waxy corn varieties as Ratchata 1 were clustered together with Kaimook-49 while, Tabtim Siam, Neawsawan, Maxone and Bigwhite-852 were clustered in the same group.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุฑามาศ ร่มแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร. อัญมณี อวูษานนท์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ชุติศักดิ์ จอมพุก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการวางแผนการทดลอง รวมทั้งการเรียบเรียงตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ทศพล พรพรหม ประธานในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และ รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา บุญเลิศนิรันดร์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นาทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ และคำแนะนำในด้านการศึกษาดูแลมา ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ นิสิตภาควิชาพืชไร่นา และห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืชและเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพืชสวน ทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศข้าวโพด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาพืชไร่นา และภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่สำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณพ่อประมวล คุณแม่สมศรี กาญจนเกษร และขอขอบคุณญาติพี่น้องทุกท่านที่เป็นกำลังใจในการศึกษาดูแลมา ประโยชน์อันใดเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ และคณาจารย์ที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้ข้าพเจ้าตลอดมา

นิศากร กาญจนเกษร

กุมภาพันธ์ 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	38
สรุปผลการทดลอง	64
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	65
ภาคผนวก	75
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	82

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าจำนวน 6 พันธุ์	21
2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ 6 ชนิด ที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย SSR	27
3 ชนิดและปริมาณของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเครื่องหมาย SSR	28
4 อุณหภูมิและเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	28
5 ชนิดและปริมาณสารสำหรับปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด	30
6 ชนิดและปริมาณสารสำหรับปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter	31
7 ชนิดและปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา pre-selective amplification	32
8 ชนิดและปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา selective amplification	33
9 ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างคู่ไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ AFLP	34
10 ชนิดและปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมอะคริลามิคเจล 6 เปอร์เซ็นต์	34
11 ลักษณะทางการเกษตรของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์	40
12 ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์	43
13 การประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	45
14 ค่า Eigenvalue และ Eigenvector ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ	47
15 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน	51
16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย AFLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน	59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ และ วันออกใหม่ 50 เปอร์เซ็นต์ของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์	76
2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูงต้น และความสูงฝักของ ข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์	76
3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวฝัก ความกว้างฝัก และจำนวน แถวของเมล็ดของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์	77
4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักฝัก น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก และ เปอร์เซ็นต์กะเทาะของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์	77
5 ลำดับเบสของไพรเมอร์ จำนวน 15 ชนิด ที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย SSR	78
6 ข้อมูลที่แปลงเป็นระบบไบนารีในการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม ของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวน 6 ไพรเมอร์	79
7 ข้อมูลที่แปลงเป็นระบบไบนารีในการตรวจสอบความแปรปรวนทาง พันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย AFLP จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์	80

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้าวโพดข้าวเหนียว จำนวน 6 พันธุ์ ด้วยวิธี principal component analysis	47
2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ bnlg 1012	52
3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ bnlg 1017	53
4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ bnlg 1055	54
5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ bnlg 1118	55
6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ bnlg 1188	56
7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ umc 1086	57
8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว พันธุ์ไวโอเล็ตไวท์-926 และตำลึงอีสาน ด้วยเครื่องหมาย SSR ไพรเมอร์ bnlg 1188 โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์	58
9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว พันธุ์ไวโอเล็ตไวท์-926 และตำลึงอีสาน ด้วยเครื่องหมาย SSR ไพรเมอร์ umc 1086 โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์	58
10 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SSR และ AFLP และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA	63

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	Amplified fragment length polymorphism
APS	=	Ammonium persulphate
dNTP	=	Deoxynucleotide triphosphate
EDTA	=	Ethylene diamine tetra acetic acid
GOT	=	Grow out test
ISTA	=	International seed testing association
MgCl ₂	=	Magnesium chloride
mM	=	Millimolar
PCR	=	Polymerase chain reaction
RCBD	=	Randomized complete block design
SSR	=	Simple sequence repeat
TBE	=	Tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution
TEMED	=	N N N'N'-Tetramethylethylenediamine
UPGMA	=	Unweighted pair group method with arithmetic mean

การประเมินความบริสุทธิ์และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

Assessment of Genetic Purity and Variation of Waxy Corn (*Zea mays* L. *ceratina*) Using DNA Markers

คำนำ

ข้าวโพดข้าวเหนียว (*Zea mays* L. *ceratina*) นอกจากจะเป็นที่นิยมนำมาบริโภคในรูปฝักสดแล้วยังนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแป้ง เนื่องจากมีปริมาณอะไมโลเพคตินสูง 95-98 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนผสมที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ สำหรับในประเทศไทยนิยมนำมาบริโภคในรูปของฝักสดกันมากขึ้น เนื่องจากรสชาติของข้าวโพดข้าวเหนียวมีความอ่อนนุ่ม มีความหวาน และขนาดฝักพอเหมาะ อย่างไรก็ตามการผลิตข้าวโพด ข้าวเหนียวในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดไร่และข้าวโพดหวาน ปัญหาที่สำคัญในการปลูกข้าวโพดข้าวเหนียว คือ เมล็ดพันธุ์ที่เกษตรกรใช้อยู่เป็นพันธุ์พื้นเมือง ที่ให้ผลผลิตและคุณภาพต่ำ เมล็ดพันธุ์คุณภาพดีมีไม่เพียงพอความต้องการของเกษตรกร (แสงแข และคณะ, 2554) ดังนั้นบริษัทเมล็ดพันธุ์และหน่วยงานราชการได้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมเพิ่มขึ้น เพื่อให้เกษตรกรได้ใช้พันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ให้ผลผลิตและคุณภาพสูง

ปัจจุบันการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวส่วนใหญ่จะเป็นพันธุ์ลูกผสม (F_1) ในการผลิตเมล็ดพันธุ์นั้นคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เป็นสิ่งสำคัญที่สุดที่จะต้องพิจารณา โดยเฉพาะอย่างยิ่งความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (genetic purity) ซึ่งก่อนการจำหน่ายเมล็ดพันธุ์สู่ตลาดจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ เพื่อสร้างความมั่นใจให้แก่เกษตรกร การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดโดยทั่วไปจะพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) สรีรวิทยา (physiology) และเซลล์วิทยา (cytology) เป็นต้น วิธีการดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลานาน (สุรินทร์, 2545)

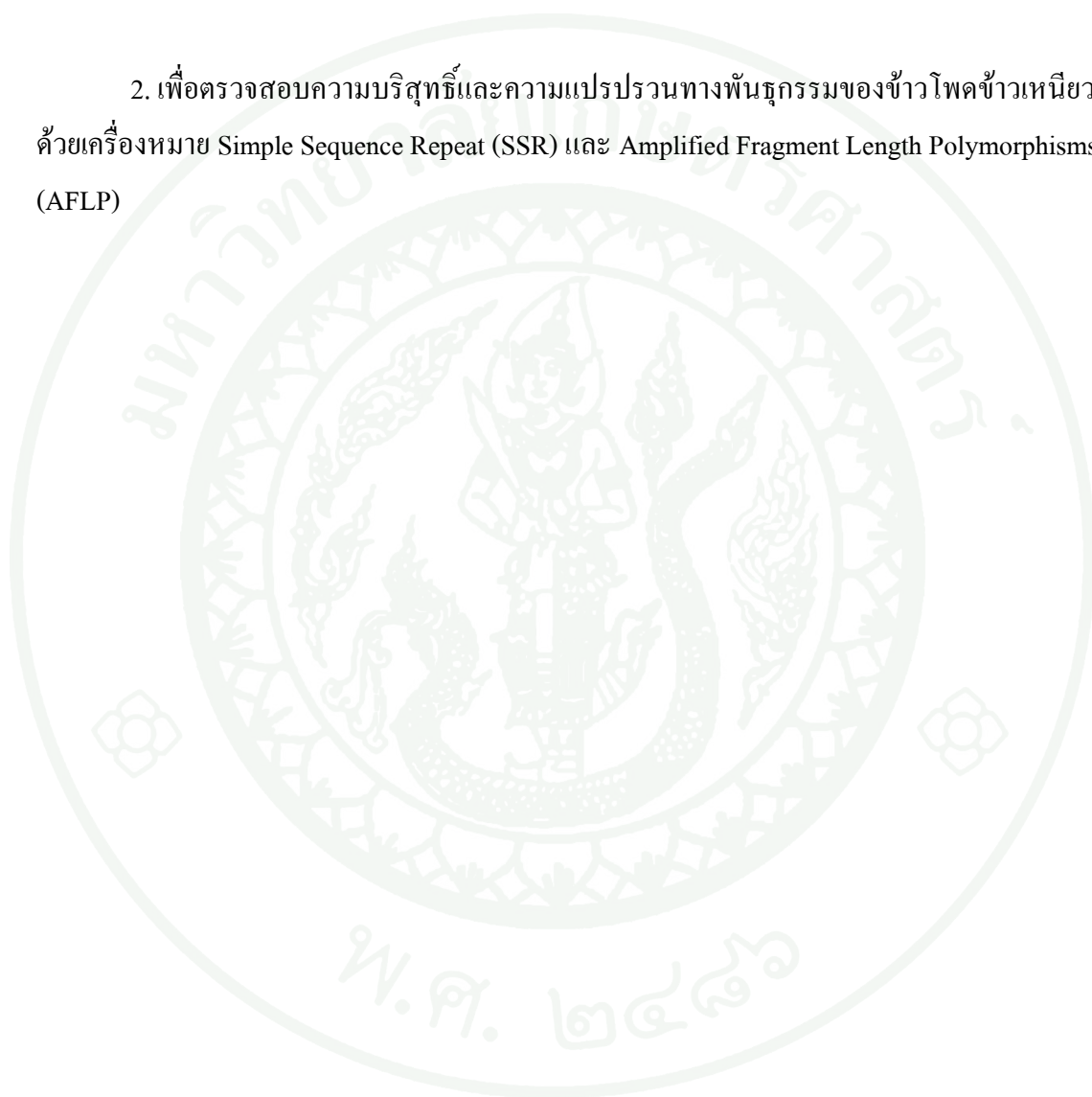
การตรวจสอบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวโพดที่นิยมใช้กันคือ grow out test (GOT) แต่มีข้อจำกัด ได้แก่ ใช้เวลาในการตรวจสอบนาน จำนวนแรงงานที่ใช้มาก ต้องอาศัย

ผู้เชี่ยวชาญและมีประสบการณ์มากในการจำแนกพันธุ์ เป็นวิธีการที่ประเมินยาก เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีผลกระทบต่อการแสดงออกทางฟีโนไทป์ (Noli *et al.*, 1999) วิธีการที่เป็นทางเลือกในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมอีกวิธีการหนึ่ง คือ isozyme เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ แต่มีข้อจำกัดในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพืช (Walter *et al.*, 1989) ดังนั้นจึงต้องการวิธีการที่สามารถประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมที่แม่นยำ และรวดเร็ว

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ในการจำแนกและตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ได้เป็นอย่างดี สามารถตรวจสอบได้โดยไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมภายนอก เครื่องหมายที่นิยมใช้ คือ Simple Sequence Repeat (SSR) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสามารถในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้สูงกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น มีความเสถียรสูง (stability) ทำซ้ำได้ (reproducibility) และสามารถให้ข้อมูลเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมได้ง่ายสะดวกและรวดเร็ว (Powell *et al.*, 1996) จึงมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้มาใช้ศึกษาในทางพันธุกรรมกันอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมในประเทศไทยเป็นสิ่งสำคัญ จึงได้นำเครื่องหมาย Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสายพันธุ์พืชได้ดี มาใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
2. เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย Simple Sequence Repeat (SSR) และ Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP)



การตรวจเอกสาร

1. ข้าวโพดข้าวเหนียว

ข้าวโพดข้าวเหนียว (*Zea mays* L. *ceratina*) เป็นข้าวโพดรับประทานฝักสดที่ได้รับความนิยมบริโภคในหลายประเทศของภาคพื้นเอเชีย มีความแตกต่างในลักษณะต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับความนิยมในแต่ละท้องถิ่น เช่น ความเหนียว ความนุ่ม (Neuff *et.al.*, 1968) เมล็ดมีสีต่าง ๆ กัน เช่น เหลือง ขาวส้ม ม่วง หรือมีหลายสีในฝักเดียวกัน และลักษณะฝักที่มีความหลากหลาย เนื้อแป้งจะมีลักษณะเฉพาะ คือ เหนียวและนุ่ม เนื่องจากองค์ประกอบของแป้งส่วนใหญ่เป็นพอลิอะไมโลเปคติน (amylopectin) สัดส่วนของอะไมโลเปคตินกับอะไมโลส (amylose) มีร้อยละ 73 : 27 (ชูศักดิ์, 2542) ลักษณะนี้เกิดจากการกลายของยีนแว็กซ์ (waxy gene) บนโครโมโซมคู่ที่ 9 ตำแหน่งที่ 56 โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงจากยีน Wx ไปเป็นยีนแฝง wx มีผลทำให้ปริมาณอะไมโลเปคตินซึ่งเป็นแป้งที่มีโมเลกุลใหญ่และมีกิ่งก้านสาขาของโมเลกุลมาก เกิดแทนที่อะไมโลสในเอนโดสเปิร์ม (endosperm) และละอองเกสร นอกจากแป้งในเมล็ดแล้วยังมีน้ำตาลโมเลกุลใหญ่พวก water soluble polysaccharides เช่น เด็กซ์ตริน (dextrin) ที่ทำให้เหนียวและหวานเล็กน้อย ทำให้ข้าวโพดข้าวเหนียวเหนียวนุ่มน่ารับประทาน (ประภา และคณะ, 2535) คาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในเมล็ด เป็นปัจจัยสำคัญต่อคุณภาพการบริโภค รวมทั้งน้ำตาลในรูปของซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ไฟโตไกลโคเจน และแป้ง (Creech, 1965) ซึ่งความหวานของข้าวโพดข้าวเหนียวขึ้นอยู่กับน้ำตาล ในขณะที่ไกลโคเจนบ่งบอกความนุ่ม และแป้งในรูปของอะไมโลเปคตินเป็นตัวประเมินรสชาติ (Azanza *et al.*, 1996) จากการศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ ที่อายุเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน พบว่า เมื่ออายุสุกแก่เพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นและหลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลลดลง ในขณะที่อะไมโลเปคติน และไฟโตไกลโคเจนเพิ่มขึ้น เมื่ออายุเก็บเกี่ยวเพิ่มขึ้น และสูงสุดเมื่อเมล็ดสุกแก่เต็มที่ (Simla *et al.*, 2010)

ข้าวโพดข้าวเหนียวแตกต่างจากข้าวโพดชนิดอื่นเนื่องจากมีปริมาณอะไมโลเปคตินที่สูงกว่าอะไมโลส ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยการย่อยละอองเกสรด้วยสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์จะมีสีน้ำตาลแดง ขณะที่ข้าวโพดชนิดอื่นซึ่งมีปริมาณอะไมโลสสูง จะมีสีน้ำเงินเข้มถึงดำ (Weatherwax, 1992) ดังนั้นการตรวจสอบยีน wx โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์สามารถแยกพันธุ์กรรม WxWx Wxwx และ wxwx ได้อย่างชัดเจน เมื่อย่อยละอองเกสรของพวก WxWx จะมีสีน้ำเงินเข้มถึงดำ ส่วน wxwx จะมีสีน้ำตาลแดง และ Wxwx จะมีทั้งสีน้ำตาลแดงและน้ำเงินเข้มถึง

คำปนกัน เนื่องจากละอองเกสรเป็นแฮพลอยด์ (haploid) Fergason (1994) พบว่า การย้อมสีที่ละอองเกสรช่วยให้ง่ายต่อการคัดเลือกยีน wx ที่ต้องการก่อนที่จะผสมเกสร ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการผสมเกสร เพื่อถ่ายทอดยีน wx หรือเพื่อตรวจสอบสายพันธุ์อินเบรคในการผลิตข้าวโพดข้าวเหนียว แต่เมื่อย้อมสีที่เมล็ดจะแยกได้เพียง 2 กลุ่ม คือ สีน้ำเงิน (WxWx และ Wxwx) และให้สีน้ำตาลแดง wxwx (กฤษฎา, 2546)

ข้าวโพดเป็นพืชในเผ่า (tribe) Maydeae ซึ่งลักษณะสำคัญของพืชในเผ่านี้คือ มี ดอกตัวผู้ (tassel) และดอกตัวเมีย (ear) อยู่บนต้นเดียวกันแต่แยกคนละตำแหน่ง (monoecious plant) ข้าวโพดซึ่งเป็นพืชปลูกเพียงชนิดเดียวในเผ่านี้ จะมีช่อดอกตัวผู้ทางปลายยอด และมีช่อดอกตัวเมียอยู่บนแกน ซึ่งแตกต่างด้านข้างของลำต้น ข้าวโพดเป็นพืชที่ดอกตัวผู้สลับเกสรก่อนที่ดอกตัวเมียพร้อมที่จะผสมเล็กน้อย ดังนั้น จึงเป็นพืชที่ผสมข้ามพันธุ์ตามธรรมชาติ โดยมีการผสมตัวเองเพียงเล็กน้อย ละอองเกสรของข้าวโพดจะปลิวตามกระแสลม หรือตามแรงดึงดูดของโลก เมื่อไหมได้รับละอองเกสรโดยส่งท่อ (tube) ไปตามเส้นไหมจนถึงรังไข่ ซึ่งอยู่ปลายสุดของเส้นไหมเพื่อทำการผสม การผสมระหว่างเกสรกับไข่โดยปกติจะใช้เวลา 12-28 ชั่วโมง นับตั้งแต่ละอองเกสรเริ่มสัมผัสกับเส้นไหมภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ละอองเกสรอาจจะมีชีวิตอยู่ได้นาน 18-24 ชั่วโมง แต่อาจจะตายในเวลา 2-3 ชั่วโมง ด้วยความร้อนหรือความแห้ง ความร้อนหรือลมที่แห้งแล้ง เป็นอันตรายต่อดอกตัวผู้ ดังนั้น จึงไม่มีการสลัดละอองเกสร การลดความชื้นที่ไหมทำให้เกสรตัวผู้ไม่สามารถงอกเข้าไปผสมเกสรได้ หลังจากผสมเกสรแล้วประมาณ 20-40 วัน รังไข่จะเจริญเติบโตเป็นเมล็ดที่แก่จัด (ชูศักดิ์, 2542)

2. แหล่งพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) และความหลากหลายทางพันธุกรรมในการจำแนกพืชที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน เป็นสิ่งสำคัญในการประเมินและการใช้เป็นแหล่งพันธุกรรม ซึ่งจะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวในอนาคต การผลิตข้าวโพดข้าวเหนียวในประเทศไทยนั้น เกษตรกรนิยมเก็บเมล็ดของข้าวโพดข้าวเหนียวเพื่อใช้ปลูกในฤดูถัดไป การเก็บเมล็ดใช้ต่อ ๆ กันไปหลายรุ่นจะทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนไป ดังนั้นพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวพื้นเมืองจะปรับตัวไปตามสภาพแวดล้อมที่ปลูกและการปฏิบัติของเกษตรกร และเป็นแหล่งที่สำคัญของความแปรปรวนทางพันธุกรรม ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมืองที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ 1) เทียนบ้านเกาะ เป็นพันธุ์พื้นเมืองที่พบในเขตภาคกลางของประเทศไทย

โดยเฉพาะจังหวัดพระนครศรีอยุธยา เป็นพันธุ์ที่มีฝักเล็ก เมล็ดสีเหลือง และมีความหวานเล็กน้อย

2) เทียนดักหงาย เป็นพันธุ์พื้นเมืองของจังหวัดเลย มีลักษณะเด่น คือ เมล็ดมีสีเหลือง กลิ่นหอม เหนียวนุ่ม และเขียวไม่ติดฟัน ปัจจุบันข้าวโพดดักหงาย ถูกปนเปื้อนกลายพันธุ์ เพราะเกิดการผสมข้ามกับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และข้าวโพดเทียนพันธุ์อื่น ๆ และเกษตรกรได้เก็บพันธุ์ไว้ปลูกเองโดยไม่มีการคัดเลือกพันธุ์ ทำให้ลักษณะเด่นของข้าวโพดดักหงายเปลี่ยนไป เช่น เมล็ดมีสีขาวและแข็งขึ้น รสชาติและความหอมเปลี่ยนไป ปริมาณและคุณภาพการรับประทานลดลง

3) ข้าวโพดข้าวเหนียวแปดแถว เป็นพันธุ์พื้นเมืองของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัดปราจีนบุรี เป็นพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มี 8 แถว มีคุณภาพการรับประทานดี เมล็ดมีสีขาว มีความนุ่มและมีความหวานเล็กน้อย

4) ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์เจ้าหลือ เป็นพันธุ์พื้นเมืองของจังหวัดนครสวรรค์

5) ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์อุบล เป็นพันธุ์พื้นเมืองของจังหวัดอุบลราชธานี ลักษณะเด่น คือ มีฝักเป็นแบบ taper-shape เมล็ดสีขาว เมื่อรับประทานจะมีความเหนียวนุ่มและหวาน เป็นต้น และยังมีพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมืองอีกหลายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย (Simla *et al.*, 2010)

จากการเก็บรวบรวมข้าวโพดข้าวเหนียว 34 พันธุ์ จากแหล่งปลูกที่แตกต่างกัน พบว่าข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 34 พันธุ์ มีความแตกต่างกันทางด้านฟีโนไทป์ สีเมล็ดมีทั้งสีขาว เหลืองและม่วง มีการจำแนกขนาดฝักเป็นฝักเล็กและฝักใหญ่ ความกว้างและความยาวฝักเฉลี่ยของกลุ่มที่มีฝักขนาดเล็กประมาณ 2.5 และ 10.5 เซนติเมตร ขณะที่กลุ่มที่มีฝักขนาดใหญ่มีความกว้างและความยาวฝักเฉลี่ยประมาณ 4.5 และ 18.0 เซนติเมตร (Wilaiwan *et al.*, 2006) แม้ว่าพันธุ์ท้องถิ่นมีลักษณะทางการเกษตรที่ไม่เป็นที่ต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์ แต่มีลักษณะบางอย่างที่สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เช่น ทนแล้งและทนกรด (Beck *et al.*, 1997) จากการทดสอบพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวภายใต้สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน โดยปลูกข้าวโพดข้าวเหนียว 21 พันธุ์ ใน 13 สถานที่ พบว่า ผลผลิต องค์ประกอบผลผลิต ลักษณะฝักและลักษณะทางการเกษตร แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว สถานที่ และปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์กับสถานที่ พันธุ์ wx 005 มีศักยภาพและเสถียรภาพของผลผลิตสูงสุดดีกว่าพันธุ์การค้า wx 004 Bigwhite-852 Sweet white 25 TS1 และ CP fancy1 (พลึง และกมล, 2550)

3. การประเมินความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ (seed purity test)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ในการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์นั้น ประกอบด้วย การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางกายภาพ (physical purity test) และความบริสุทธิ์ทาง

พันธุ์กรรม (วันชัย, 2542) การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางกายภาพ (physical purity test) เป็นการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกเพื่อเป็นตัวแทนของ seed lot โดยการคัดแยกและจำแนกเมล็ดออกเป็น เมล็ดพันธุ์บริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน โดยรายงานผลการทดสอบเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ตามกฎของ ISTA (2010) ในขณะที่การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรมสามารถตรวจสอบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological character) การใช้เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical marker) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ซึ่งการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรมมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งเพราะเป็นสิ่งที่ยืนยันว่าเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้นั้นมีความตรงตามพันธุ์

3.1 การประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรมด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา

วิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรมที่นิยมใช้คือ การประเมินจากลักษณะสัณฐานวิทยาหรือการแสดงออกทางสรีรวิทยาของเมล็ดพันธุ์ ต้นกล้าและต้นพืชที่เจริญเต็มที่ โดยการตรวจสอบลักษณะของต้นกล้าในแปลงปลูก ซึ่งบ่อยครั้งจะให้ผลการตรวจสอบที่ไม่ค่อยถูกต้องและแม่นยำ เนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการพัฒนาการของต้นพืชมีผลทำให้การแสดงออกของลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาเปลี่ยนแปลงไป และนอกจากนั้นวิธีการนี้ใช้ระยะเวลาในการปลูกนานและใช้แรงงานมาก แต่บริษัทเมล็ดพันธุ์ต่าง ๆ ยังคงใช้วิธีการนี้ เนื่องจากเสียค่าใช้จ่ายในการลงทุนต่ำ เพราะไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการสร้างห้องปฏิบัติการและการจ้างผู้เชี่ยวชาญประจำห้องปฏิบัติการ (McDonald, 1995)

3.2 การประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรมโดยชีวเคมี

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรมของเมล็ดพันธุ์ด้วยการใช้ isozyme เป็นวิธีการที่อาศัยหลักการตรวจสอบโปรตีนในเมล็ดพันธุ์และในเนื้อเยื่อพืชซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ได้จากการแสดงออกของยีน isozyme เป็นเครื่องหมายทางชีวเคมีชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรมและ isozyme ได้ถูกนำมาใช้เป็นมาตรฐานหรือเกณฑ์ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรมของ ISTA (2010) การใช้เครื่องหมายทางชีวเคมี เช่น isozyme สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์พืชได้หลายชนิด ซึ่งในข้าวโพดได้ใช้ isozyme มานานกว่า 20 ปี แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วย isozyme มีข้อจำกัด เนื่องจากโปรตีนเป็นผลจากการแสดงออกของยีน ดังนั้นสภาพแวดล้อมและสภาพในเนื้อเยื่อของพืชมีผลต่อการแสดงออกทำให้ผลการตรวจสอบมี

ความผิดพลาดได้บ้าง นอกจากนั้น isozyme สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพืชได้ต่ำ เนื่องจากมีข้อจำกัดทางด้านของความหลากหลายของโปรตีน (Walter *et al.*, 1989) ในประเทศบราซิล บริษัทเมล็ดพันธุ์ได้นำวิธีการ isozyme มาใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่เทคนิคนี้มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พืชบางชนิดได้ โดยเฉพาะพืชผักและไม่ดอกพบที่มีความแตกต่างของ isozyme หรือโปรตีนระหว่างพ่อแม่น้อยมาก (Della Vecchia *et al.*, 1998)

3.3 การประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่าง (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน

เครื่องหมายดีเอ็นเอปัจจุบันถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมายในการศึกษาระดับจีโนมและในทางการเกษตร เช่น การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตและศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต การสร้างตัวตรวจสอบ (probe) เพื่อใช้ในการตรวจสอบโรคหรือหาสิ่งที่ต้องการ การสร้างแผนที่โครโมโซม การหาตำแหน่งยีนที่ต้องการบนโครโมโซม และการแยกสกัดยีนโดยอาศัยแผนที่ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อช่วยคัดเลือกลักษณะที่สำคัญและคัดเลือกลาย โดยที่สภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืชไม่มีผลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายชนิดนี้ ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ในการจำแนก และตรวจสอบความตรงต่อสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ทุกส่วนของต้นพืชและสามารถตรวจสอบได้ตลอดเวลา โดยสภาพแวดล้อมไม่มีผลกระทบต่อผลการตรวจสอบ

4. เครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)

ในการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลนั้นสามารถใช้ในการหาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ ซึ่งเป็นการจำแนกความแตกต่างใน

ระหว่างและภายในสปีชีส์ (between and within species) หรือระหว่างและภายในประชากร (between individuals and between population) เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างมี 2 ประเภท (สุรินทร์, 2545) คือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphology marker) เป็นเครื่องหมายที่สามารถมองเห็นได้ คือ ลักษณะที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะสีกลีบของดอกกุหลาบ ลักษณะสีตา เป็นต้น ข้อดีของเครื่องหมายชนิดนี้คือ ไม่ซับซ้อน สามารถมองเห็นได้ด้วยตา แต่มีข้อจำกัดคือ จำนวนน้อย และที่สำคัญคือ การแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยามักได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อม เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของดินหรือปุ๋ย เป็นต้น (อรรค์, 2548)

2. เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) มี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน และดีเอ็นเอ

2.1 เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เป็นการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟลิซิส แล้วแยกแถบของโปรตีนจำเพาะ มีข้อจำกัดคือ การแสดงออกของโปรตีนหรือเอนไซม์ได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อม และระยะการเจริญเติบโต อีกทั้งยังมีความจำเพาะเจาะจงต่ำ

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เกิดความแปรปรวนของนิวคลีโอไทป์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอหรือเกิดความแตกต่าง (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอนั้นเอง (สุริพร, 2546)

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ โดยใช้ “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA Fingerprinting) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น หมายถึง แบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิตหรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้ ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น เครื่องหมาย RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) มีลักษณะเด่น คือ สามารถแยกความแตกต่างที่ดีเอ็นเอโดยตรง ดังนั้นจึงไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง การตรวจสอบจะเจาะจงที่ยีนหรือตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม (locus specific marker) ผลที่ได้จึงมีความแม่นยำและ

สามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม (reproducibility) นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุล RFLP ยังแสดงการข่มร่วมกัน (codominant marker) ซึ่งจะช่วยให้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตระหว่างกลุ่มที่เป็น homozygous และ heterozygous ได้ (Tanksley *et al.*, 1989; McCouch and Tanksley, 1991; USDA, 1994) ถึงแม้เครื่องหมาย RFLP จะมีข้อดีมากมายแต่พบว่า ข้อจำกัดที่สำคัญคือ ขั้นตอนยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้เวลานาน ตลอดจนใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูง ดีเอ็นเอที่ใช้ต้องมีปริมาณมากและต้องทำให้บริสุทธิ์ ไม่เช่นนั้นจะไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นอกจากนั้น วิธีการตรวจสอบต้องผ่านขั้นตอน Southern hybridization และดีเอ็นเอโพรบที่ใช้นั้น ต้องผ่านการโคลนหรือทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งเสียก่อน และถ้าติดฉลากดีเอ็นเอโพรบด้วยสารกัมมันตรังสีอาจมีอันตราย ดังนั้นจึงต้องทำด้วยความระมัดระวังในพื้นที่ที่ควบคุม (สุรินทร์, 2545)

เครื่องหมาย Simple Sequence Repeat (SSR) เอกลักษณะและคุณสมบัติเด่นเฉพาะตัวที่ทำให้เครื่องหมาย SSR กลายเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ดีที่สุดตัวหนึ่งในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ 1) ลักษณะที่มีหลายอัลลีลในโลกัส (multi-allelic nature) ทำให้ตรวจสอบความแตกต่างได้มากกว่า (Morgante and Olivieri, 1993; Brown *et al.*, 1996; Paterson, 1996; Powell *et al.*, 1996) 2) มีการถ่ายทอดลักษณะที่เป็นแบบข่มไม่สมบูรณ์ (co-dominant transmission) 3) สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ และต้องการดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (small amount of starting DNA) 4) พบได้มากมายและครอบคลุมทั้งจีโนม (highly abundant with uniform genome coverage) โดยจะพบภายในยีน หรือระหว่างยีน 5) ไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นสำหรับพีซีอาร์นั้น มีความจำเพาะเจาะจงและสามารถแลกเปลี่ยนข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ระหว่างห้องปฏิบัติการที่ร่วมวิจัยได้สะดวก (electronically exchangeable primer sequences) จากจุดเด่นดังกล่าว ทำให้มีผู้นิยมเครื่องหมาย SSR ในการจำแนกสายพันธุ์พืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะพืชที่มีฐานพันธุกรรมแคบ จากการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่า เครื่องหมาย SSR สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphisms) ของสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่าการใช้เทคนิคอื่น ๆ ทั้งนี้ เนื่องมาจากจำนวนและความถี่ของอัลลีลที่ตรวจพบในตำแหน่ง (locus) หนึ่ง ๆ นั่นเอง ถึงแม้เครื่องหมาย SSR จะเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ข้อมูลทางพันธุกรรมได้มากมาย แต่พบว่ามีข้อจำกัดที่สำคัญคือ การพัฒนาหรือสร้างไพรเมอร์นั้น มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงมาก นอกจากนี้แล้ว ปัญหาทางด้านเทคนิคที่พบบ่อย ๆ คือ การวิเคราะห์ผลค่อนข้างยาก โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการรู้ขนาดอัลลีลที่แน่นอน ทั้งนี้ เนื่องมาจากการเกิด “stutter band” ทำให้การอ่านแถบดีเอ็นเอผิดพลาดได้ (สุริพร, 2546)

เครื่องหมาย Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) ปัจจุบันได้รับความนิยมนำมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) การบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสายพันธุ์พืช (varietal identification) การสร้างแผนที่ยีนในพืชหลายชนิด และเป็นข้อมูลสำคัญในการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืช (Paterson, 1996; Mohan *et al.*, 1997; Ridout and Donini, 1999; Kate-ngam, 2002) อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ที่ต้องคำนึงถึงคือ ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการทำพีซีอาร์ทั่วไป และการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิด ตลอดจนการกำหนดจำนวนและชนิดของเบสคัดเลือกของ AFLP โพรเมอร์นั้นพบว่า จะมีผลต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเลือกให้มีการเพิ่มปริมาณ ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลเพียงพอโดยไม่ต้องทำการทดลองหลายครั้งจะต้องคำนึงถึงขนาดของจีโนมของพืชที่จะทำการศึกษาด้วย

ดังนั้นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรมากกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานานได้ และ ดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชทุกส่วนของระยะการเจริญเติบโตหรือทางสรีรวิทยาใดก็ได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อมและสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ (สุรินทร์, 2545)

5. เครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR, Simple Sequence Repeat หรือ microsatellite)

เครื่องหมาย SSR เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อาศัยหลักการซ้ำกันของชุดเบส (repetitive sequence) ที่เรียงต่อกันในทิศทางเดียวกันตลอด (tandemly repeat) ส่วนมากประกอบด้วยดีเอ็นเอที่มีขนาดของชุดซ้ำสั้นมากประมาณ 1-6 คู่เบส ส่วนใหญ่จะเป็นชุดซ้ำ 2 คู่เบส (dinucleotide) แต่บางครั้งก็อาจพบชุดซ้ำที่เป็น 3-4 คู่เบสก็ได้ ซึ่งพบได้น้อยกว่า เครื่องหมาย SSR นั้นมีประโยชน์หลายประการ เช่น การแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถให้ข้อมูลเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมได้ง่าย การสร้างแผนที่จีโนม เป็นต้น ทั้งนี้เพราะ SSR มีอยู่เป็นจำนวนมากกระจายทั่วไปในจีโนมและมีความแปรปรวนมาก อีกทั้งจำนวนซ้ำของ SSR มีความแตกต่างกันในพืชหรือสัตว์ต่างสายพันธุ์ในชนิดเดียวกัน จึงสามารถใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายได้เป็นอย่างดีในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สาเหตุที่เกิดความแปรปรวนของจำนวนซ้ำใน SSR มาจากการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) และบริเวณ slippage ทำให้จำนวนซ้ำของหน่วยดีเอ็นเอที่ได้ภายหลังการจำลองตัวเองมีมากขึ้นหรือน้อยลง (addition or deletion) SSR จัดว่า

เป็น semispecific primer ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายมากขึ้น ผลที่ได้จากการใช้ SSR จะเห็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มีหลายแถบเช่นเดียวกับ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) แต่สามารถบอกความแตกต่างของ heterozygous และ homozygous ได้ นอกจากนี้ยังสามารถทำซ้ำได้ดีอีกด้วย

เครื่องหมาย SSR สามารถบอกถึงความเป็น co-dominant ของอัลลีล หลายอัลลีลในสิ่งมีชีวิต (Gianfranceschi *et al.*, 1998) เครื่องหมาย SSR มีข้อเด่นที่ใช้ในการตรวจสอบ คือ มีความไวต่อการตรวจสอบ กล่าวได้ว่า ใช้ปริมาณดีเอ็นเอไม่มากแต่สามารถตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ การวิเคราะห์ผลทำได้ง่าย เนื่องจากการสังเกตแถบดีเอ็นเอซึ่งมีจำนวนมากพอและใช้ score ได้ดี และพบอัลลีลที่มีความจำเพาะในชนิดหรือสกุล มีความเสถียรภาพสูงและสามารถทำซ้ำได้ เครื่องหมาย SSR จึงมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตระหว่างชนิดหรือแม้กระทั่งระหว่างสกุลของสิ่งมีชีวิตได้ สามารถปรับใช้ในการทำแผนที่ยีนโดยใช้ได้ทั้ง genetic linkage map และ physical map บนโครโมโซมได้ (Brown *et al.*, 1996) และพบว่าการใช้เครื่องหมาย SSR สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ของพันธุ์ได้ดีกว่าการใช้เครื่องหมาย RFLP (Restriction fragment length polymorphism) AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism) และ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ในข้าวบาร์เลย์ (Karakousis *et al.*, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับ Struss and Plieske (1998) พบว่า เครื่องหมาย SSR สามารถจำแนกความแตกต่างระดับจีโนมไทป์ของข้าวบาร์เลย์ได้ดี จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 15 ตำแหน่ง จำแนกข้าวบาร์เลย์ในประเทศเยอรมันจำนวน 163 จีโนมไทป์ ซึ่งมีค่า polymorphism information content (PIC) ระหว่าง 0.30-0.86 จำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 5-15 อัลลีลต่อตำแหน่ง เช่นเดียวกับ Karakousis *et al.* (2003) ได้ใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 130 ตำแหน่ง จำแนกข้าวบาร์เลย์ในประเทศออสเตรเลีย 2 ชุด จำนวน 58 จีโนมไทป์ ซึ่งสามารถใช้จำแนกได้ดีและพบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 36 ตำแหน่งที่มีค่า PIC สูงสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมได้

สำหรับการศึกษาการใช้เครื่องหมาย SSR ในข้าวนั้นได้มีการศึกษาการกลายพันธุ์และหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนความหอมในข้าว จากการใช้เครื่องหมาย ISSR ในข้าวหอมมะลิ 105 ต้นปกติ และข้าวหอมมะลิ 105 ต้นที่กลายพันธุ์ โดยใช้ 25 SSR markers สามารถแยกข้าว 3 สายพันธุ์จากข้าวทั้งหมด 6 สายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน (สุกัญญา และปรียา, 2547) นอกจากนี้ Yashitola *et al.* (2002) ได้ใช้เครื่องหมาย ISSR และ SSR ตรวจสอบความเป็นลูกผสมและความบริสุทธิ์ทาง

พันธุกรรมในข้าว โดยได้นำดีเอ็นเอจากต้นกล้าข้าวอายุ 6 วัน มาทำการตรวจสอบ พบว่าเครื่องหมาย SSR เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในข้าวลูกผสม

สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก เมื่อคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ได้แล้วนำไปใช้เป็นไพรเมอร์สำหรับทำ PCR เพื่อตรวจหาเครื่องหมาย SSR ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 ที่เป็นพันธุ์รับ และ Taichung 65 ที่เป็นพันธุ์ให้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์นี้ ผลของการทดลอง พบว่า มีเครื่องหมาย SSR จำนวน 2 ตำแหน่งที่สามารถใช้เป็น target marker ได้แก่ RM8225 (54.1 cM) และ RM8226 (54.1 cM) ส่วนเครื่องหมาย SSR ที่ใช้เป็น flanking marker 1 คือ RM5963 (53.5 cM) ซึ่งห่างจากยีน *Hd1/hd1* (54.1 cM) เท่ากับ 0.6 cM และ flanking marker 2 คือ RM8250 (61.6 cM) ซึ่งห่างจากยีน *Hd1/hd1* เท่ากับ 7.5 cM ส่วน SSR marker ที่ใช้เป็น background marker มีจำนวน 160 ตำแหน่ง และ marker แต่ละตำแหน่งมีระยะห่างกันประมาณ 11.25 cM (วรารณ และคณะ, 2550)

จากการใช้เครื่องหมาย SSR วิเคราะห์ตำแหน่งยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Bph3* จากพันธุ์ข้าว Rathu Heenati โดยการพัฒนาประชากรข้าวผสมกลับ BC3F2 จากกลุ่มผสม Rathu Heenati×ข้าวดอกมะลิ 105 เพื่อใช้ทดสอบความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและสร้างแผนที่พันธุกรรม คัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ จำนวน 36 ไพรเมอร์ บนโครโมโซม 4 6 และ 10 วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอจำนวนกลุ่มละ 15 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียงเครื่องหมาย RM190 ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานและอ่อนแอ คัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายเพิ่มเติมที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกับ RM190 เพื่อวิเคราะห์ตำแหน่งยีนต้านทานที่แน่นอนบน โครโมโซม จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์และจีโนไทป์ของประชากรผสมกลับ BC3F2 จำนวน 333 สายพันธุ์ พบว่ายีนต้านทาน *Bph3* มีตำแหน่งอยู่ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย RM588 และ RM589 บนโครโมโซม 6 นำโมเลกุลเครื่องหมายที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีนต้านทานไปใช้พัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและมีคุณภาพเมล็ดดี สามารถแยก linkage drag ระหว่างอัลลีล *Bph3* และ *Wxa* ออกจากกัน โดยการคัดเลือกฟีโนไทป์และการใช้เครื่องหมายโมเลกุลร่วมกัน (จิรพงศ์ และคณะ, 2551)

การใช้เครื่องหมาย SSR ในการประเมินความบริสุทธิ์และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้จำนวน 22 สายพันธุ์ พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียว 4 สายพันธุ์ ให้

แถบดีเอ็นเอที่มี heterozygous น้อยกว่า 7 เปอร์เซนต์ และ 5 สายพันธุ์ ที่มี heterozygous มากกว่า 20 เปอร์เซนต์ โดยมีค่า PIC 0.46 เมื่อจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.38 และสามารถแบ่งกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 22 สายพันธุ์ ได้เป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มี 1 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 10 กลุ่มที่ 2 มี 1 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 16 กลุ่มที่ 3 มี 8 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 3 waxy 5 waxy 22 waxy 21 waxy 8 waxy 9 waxy 12 และ waxy 18 กลุ่มที่ 4 มี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 2 waxy 15 waxy waxy 20 และ waxy 17 กลุ่มที่ 5 มี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 4 waxy 6 waxy 7 และ waxy 11 และกลุ่มที่ 6 มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 1 waxy 14 และ waxy 19 (Hung *et al.*, 2012)

สำหรับในข้าวโพดพันธุ์ลูกผสมได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้ 7 SSR markers พบว่ามี 6 markers ที่ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่หลากหลาย และมีค่า Polymorphism Information Content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.66 - 1.00 แบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ SSWI114 Ki4 Ki43 และ Ksei24014 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ Ksei14004 Ki47 และ Ksei24012 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ Ki21 Ki45 Ki14 และ Ki11 กลุ่มที่ 4 ได้แก่ Ksei0102 และ Ki20 กลุ่มที่ 5 ได้แก่ Ksei306 และ Ki28cms (นฤมล และคณะ, 2547) นอกจากนี้ได้มีการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของข้าวโพด 26 พันธุ์ เพื่อสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย SSR พบว่า ไพรมเมอร์ 36 คู่ ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งแตกต่างกัน จำนวน 139 ตำแหน่ง แต่ละไพรมเมอร์มี โอกาสที่จะพบความหลากหลาย polymorphism information content (PIC) ตั้งแต่ 0.14-0.80 และได้ ไพรมเมอร์ 25 คู่ ที่สามารถบอกความเป็นลูกผสมของข้าวโพดทนแล้ง (ประสาน และคณะ, 2554)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดสายพันธุ์แท้และพันธุ์การค้า จำนวน 5 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย SSR 6 ไพรมเมอร์ ได้แก่ phi072 phi109642 phi123 pi423796 phi96100 และ umc1136 พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล SSR สามารถประเมินความบริสุทธิ์และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดสายพันธุ์แท้และพันธุ์การค้าของประเทศในจีเรีย โดยมีค่า average genetic diversity และ PIC 0.592 และ 0.512 ตามลำดับ โดยไพรมเมอร์ phi96100 ให้ค่า genetic diversity และ PIC สูงที่สุด คือ 0.673 และ 0.613 ตามลำดับ ในขณะที่ไพรมเมอร์ phi123 ให้ค่า genetic diversity และ PIC ต่ำที่สุด คือ 0.484 และ 0.367 ตามลำดับ (Daniel *et al.*, 2012) ซึ่ง สอดคล้องกับ Legesse *et al.* (2007) พบว่า การใช้เครื่องหมาย AFLP ในข้าวโพดสายพันธุ์แท้ จำนวน 56 สายพันธุ์ ให้ค่า PIC ที่ใกล้เคียงกับงานทดลองของ Daniel *et al.* (2012) คือ 0.58 ในขณะที่ Banisetli *et al.* (2012) ศึกษาการใช้เครื่องหมาย SSR ในการจำแนกยีนที่ควบคุมการสร้าง lysine และ tryptophan ในข้าวโพดจำนวน 22 สายพันธุ์ ให้ค่า PIC เท่ากับ 0.4 นอกจากนี้ Choukan and

Warburton (2005) ใช้เครื่องหมาย SSR ในการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างข้าวโพดสายพันธุ์แท้ของประเทศอิหร่าน พบว่า มีค่า PIC เท่ากับ 0.58 จากการศึกษาดังกล่าว พบว่า การใช้เครื่องหมาย SSR และ AFLP สามารถประเมินความแปรปรวนและความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดได้

จากการจำแนกข้าวโพดลูกผสม Nongda 108 (178 x Huang C) และ Zhengdan 958 (Chang 7.2 x Zhengdan 58) โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ umc1165 umc1294 nc030 bnlgl161 umc1165 phi001 phi034 phi057 phi080 และ phi119 พบว่า มี 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ phi080 nc030 phi057 และ phi034 ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ของข้าวโพดลูกผสมทั้ง 2 พันธุ์ ซึ่งสามารถใช้ประเมินความบริสุทธิ์ของข้าวโพดลูกผสมได้ ดังนั้น เครื่องหมาย SSR สามารถใช้ในการประเมินความบริสุทธิ์ของข้าวโพดลูกผสมได้ แต่ในปัจจุบัน เครื่องหมาย SSR มีไพรเมอร์ประมาณ 2300 ชนิด ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลข้าวโพด (<http://www.maizegdb.org>) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจำแนกความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดลูกผสม (Wu *et al.*, 2012)

การใช้เครื่องหมาย RAPD ISSR และ SSR ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในฝ้ายลูกผสมได้ ซึ่งใช้ระยะเวลาสั้นและมีความน่าเชื่อถือ (Ashok and Parkhi, 2005) และ Selvakumar *et al.* (2010) ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย SSR ร่วมกับการปลูกทดสอบในแปลงของฝ้ายลูกผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ TCHB4510 TCHB2310 และ TCHB213 โดยไพรเมอร์ SSR ที่ถูกใช้ในการตรวจสอบมี 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ BNL686 BNL1679 BNL3971 BNL3955 CIR407 และ CIR413 พบว่า พันธุ์ TCHB2310 มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมต่ำที่สุด 62.5 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยพันธุ์ TCHB4510 78.2 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์ TCHB213 95.2 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเครื่องหมาย SSR สามารถใช้ในการประเมินความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ฝ้ายลูกผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 70 ตำแหน่ง จำแนกพันธุ์มันฝรั่ง จำนวน 73 accessions ที่ได้คัดเลือกมาจากศูนย์วิจัยมันฝรั่งนานาชาติ (International Potato Center, CIP) พบว่า สามารถจำแนกความแตกต่างระดับจีโนไทป์ได้ ซึ่งการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SSR สามารถช่วยในการจำแนกพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ลดปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถจำแนกลักษณะทางฟีโนไทป์ได้ ช่วยในระบบการจัดรวบรวมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Ghislain *et al.*, 1999) สำหรับในมันสำปะหลัง วีระเดช และกนกพร (2548) ได้ศึกษารูปแบบพันธุกรรมที่จำเพาะต่อปริมาณแป้งในมันสำปะหลัง 10 สายพันธุ์ โดยใช้ 60 SSR markers พบว่า markers SSRY161 และ

SSRY164 มีความสอดคล้องกับปริมาณแป้งของมันสำปะหลัง และนำไปทดสอบในประชากรลูกผสมของมันสำปะหลังเพื่อใช้ตรวจสอบตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณแป้ง

ในเมลอนได้มีการพัฒนาเครื่องหมาย SSR ด้วยวิธีการ enrichment genomic library เพื่อใช้ศึกษาพันธุกรรมของเมลอน พบว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 65 ตำแหน่งแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์เมลอนและสามารถใช้ศึกษาพันธุกรรมในเมลอน เช่น ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic distance) ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม (identity test) และสามารถชี้แจงความแตกต่างระดับจีโนมไทป์ในแตงกวาแตงโม และฟักทอง (Patricia *et al.*, 2004) จากการศึกษาของนุชจรี (2550) ที่ใช้เครื่องหมาย SSR ในแตงกวาโดยใช้วิธี enriched genomic library พบว่าไพรเมอร์ 57 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณได้ และไพรเมอร์จำนวน 45 คู่ สามารถแยกความแตกต่างในแตงกวา 16 สายพันธุ์ได้ โดยมีจำนวนอัลลีลต่อโลคัสเฉลี่ย 3.64 มีค่า PIC สูงสุดเท่ากับ 0.78 และเฉลี่ยเท่ากับ 0.47 นอกจากนี้เครื่องหมาย SSR สามารถใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์และสามารถใช้ตรวจสอบข้ามสายพันธุ์ในพืชวงศ์แตงได้

สำหรับการพัฒนาเครื่องหมาย SSR ในเรพสิด พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ 62 ตำแหน่งแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์เรพสิด 95 สายพันธุ์ ที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาวและสีดำ ความสัมพันธ์ระหว่างสีเชื้อหุ้มเมล็ด ปริมาณแอนโทไซยานิน ปริมาณฟีนอล ปริมาณเมลานิน และปริมาณฟลาโวนอยด์ ในเชื้อหุ้มเมล็ดมีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกับปริมาณน้ำมัน และมีความสัมพันธ์ในทางเดียวกันกับเชื้อหุ้มเมล็ด จากการทดลองชี้ให้เห็นว่า เครื่องหมาย SSR สามารถประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสายพันธุ์แท้ของเรพสิด และสีเชื้อหุ้มเมล็ด ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่มีต่อการปรับปรุงพันธุ์เรพสิด (Qu *et al.*, 2012)

6. เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphisms)

AFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเออีกแบบหนึ่งที่ใช้หลักการของพีซีอาร์ (PCR-based marker) มีการพัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos นักวิจัยของ ประเทศเนเธอร์แลนด์ และได้จดสิทธิบัตร ในปี ค.ศ. 1993 (สุรินทร์, 2545) AFLP เป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว หรือปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้น AFLP จึงรวมจุดเด่นหรือความน่าเชื่อถือของ RFLP และประสิทธิภาพของ

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ เข้าด้วยกัน สารพันธุกรรมจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีตำแหน่งจดจำแตกต่างกัน ซีนดีเอ็นเอที่ได้จะถูกต่อเข้ากับซีนดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ทราบรหัส (adapter) สองชนิด จากนั้นหากมีการเข้าคู่ที่เฉพาะเจาะจงระหว่างซีนดีเอ็นเอรหัสเริ่มต้นจำลองตัว (primer) กับซีนดีเอ็นเอสังเคราะห์ทราบรหัส (adapter) และเบสคัดลอก (N) ในซีนดีเอ็นเอเป้าหมาย จะทำให้ดีเอ็นเอเหล่านั้น มีการเพิ่มปริมาณขึ้นโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เรียกขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะนี้ว่า “selective amplification” (Vos *et al.*, 1995) ต่อจากนั้น จึงนำซีนดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มปริมาณนั้นมาแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสใน “denaturing polyacrylamide gel electrophoresis” แบบเดียวกับที่ใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (sequencing gel) (Vos *et al.*, 1995) แถบดีเอ็นเอ (DNA profile) ที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ AFLP ไพร์เมอร์ คู่หนึ่ง ๆ นี้เรียกว่า “ลายพิมพ์ AFLP” ดังนั้น AFLP จึงเป็นวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเออีกวิธีหนึ่ง แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างพีซีที่ตรวจสอบ จะบ่งบอกถึงความแตกต่างของซีนดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนั้นจึงใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้

เครื่องหมาย AFLP จัดเป็น “high throughput markers” ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาแต่ละครั้งสามารถให้เครื่องหมายโมเลกุลได้จำนวนมาก นอกจากนี้ ยังมีลักษณะดีเด่นหลายประการ คือ จำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่มีอย่างมากมาย และครอบคลุมทั้งจีโนม ในปฏิกิริยาหนึ่ง ๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multilocus) พร้อม ๆ กัน (relatively high effective multiplex ratio) ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาจำนวนน้อย และเมื่อทำการตรวจสอบซ้ำจะให้ผลเหมือนเดิม นอกจากนี้ยังไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำ AFLP มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม ความแตกต่างหรือ โพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นระหว่างพีซีที่ตรวจสอบ เกิดจากการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะข่ม (dominance) ต่อการไม่มีแถบดีเอ็นเอ ดังนั้น AFLP จึงจัดเป็น “dominant marker” อย่างไรก็ตามมีผู้รายงานว่า AFLP สามารถแสดงลักษณะข่มร่วมกัน (co-dominant marker) โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจะมีความเข้มของแถบไม่เท่ากัน สามารถตรวจสอบได้โดยใช้ซอฟต์แวร์ที่มีความเฉพาะ (สุริพร, 2546)

เครื่องหมาย AFLP ถูกนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Vigna* อย่างกว้างขวาง ทั้งที่เป็นลักษณะเชิงคุณภาพและลักษณะเชิงปริมาณ โดยเครื่องหมายทางโมเลกุลที่ได้จากการสำรวจในรุ่นพ่อแม่สามารถนำไปใช้ในประชากรได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการใช้เครื่องหมาย AFLP ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ azuki bean โดยใช้ 25 ไพร์เมอร์ ใน

68 ตัวอย่าง เมื่อนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์โดย UPGMA dendrogram พบว่า ถั่วอะซูกิที่นำมาศึกษามีการกระจายตัวทางพันธุกรรมสูงกว่าพันธุ์ป่าและพันธุ์พืชที่มาจากพื้นที่และภูมิอากาศเดียวกัน (Tara *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2000)

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย AFLP ของถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) จำนวน 117 accessions ที่มีถิ่นกำเนิดที่แตกต่างกัน พบว่า ถั่วพุ่มพันธุ์ป่า (*V. unguiculata* var. *spontanea*) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าถั่วพุ่มพันธุ์ทดสอบ (*V. unguiculata* var. *unguiculata*) และถั่วพุ่มพันธุ์ป่าในแอฟริกาตะวันออกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าพันธุ์ปลูกในแอฟริกาตะวันออก จึงกล่าวได้ว่า แอฟริกาตะวันออกเป็นแหล่งกำเนิดของ ถั่วพุ่มพันธุ์ป่า นอกจากนี้ Yoon *et al.* (2002) ใช้ AFLP ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *V. angularis* (Wild.) Ohwi & Ohashi และถั่วที่ใกล้เคียงกันจากประเทศเกาหลี พบว่า มี 142 แถบที่เหมือนกันระหว่าง *V. angularis* กับ *V. nakashima* และ 166 แถบที่เหมือนกันระหว่าง *V. angularis* กับ *V. umbellata* ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ dendrogram หาความสัมพันธ์สามารถแยกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ *V. angularis*, *V. nakashima* และ *V. umbellata* ซึ่ง *V. angularis* มีความใกล้ชิดกับ *V. umbellata* มากกว่า *V. nakashima* โดยมีค่า PIC ระหว่าง *V. angularis* กับ *V. nakashima* เป็น 0.502 และระหว่าง *V. angularis* กับ *V. umbellata* เป็น 0.467 จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการ ตลอดจนฐานข้อมูลพันธุกรรมของพืชในสกุล *Vigna* ได้ดียิ่งขึ้น (Coulibaly *et al.*, 2002)

จากการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวัน สายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับเครื่องหมาย AFLP พบว่า สามารถจัดกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ 2 กลุ่มใหญ่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.00-0.20 โดยใช้วิธี UPGMA คือ กลุ่มเมล็ดไม่มีลายแถบ และกลุ่มเมล็ดที่มีลายแถบ ซึ่งกลุ่มเมล็ดที่มีลายแถบ แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ ทานตะวันชนิดน้ำมัน (oil seed) และชนิดบริโภคเมล็ด (non-oilseed) ส่วนการศึกษาโดยใช้เครื่องหมาย AFLP จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 23 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน (polymorphic bands) เมื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1,963 แถบ (เฉลี่ย 85.35 แถบ/ไพรเมอร์) แต่เป็นแถบของดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 1,278 แถบ คิดเป็น 64.87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.56-1.00 ซึ่งสามารถจัดกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ ทานตะวันกลุ่ม restorer (R) line และทานตะวันกลุ่ม maintainer (B) line ซึ่งประกอบด้วย 3 กลุ่ม

ย่อย คือ ทานตะวันชนิดน้ำมันสูง ชนิดน้ำมันปานกลาง และชนิดบริโภคมะลิ (ลลิตา และคณะ, 2553)

7. ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) หรือ ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity)

ความแปรปรวนทางพันธุกรรม หมายถึง ความหลากหลายของยีน (gene) ที่มีในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมีถิ่นแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ความแตกต่างทางพันธุกรรมมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งอาจเกิดในระดับยีนหรือโครโมโซมในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ กลไกการ crossing over ทำให้ยีนเกิดการสลับที่หรือรวมตัวกันใหม่แล้วถูกถ่ายทอดไปสู่รุ่นต่อ ๆ ไปในประชากร อย่างไรก็ตามประชากรของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งจะรวมตัวเป็นกลุ่มและผสมพันธุ์กันภายในกลุ่มเผ่าพันธุ์ของตนทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนเกิดขึ้นเฉพาะภายในประชากรของสปีชีส์เดียวกัน กลุ่มยีนของประชากรสิ่งมีชีวิตเดียวกัน เรียกว่า gene pool การถ่ายทอดยีนแต่ละรุ่นต้องพบกับสภาพเครียด เช่น การคัดเลือกโดยธรรมชาติ การอพยพ ความผันแปรทางพันธุกรรม เป็นต้น ทำให้โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรในแต่ละรุ่นเปลี่ยนแปลงไปก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรต่าง ๆ ของสปีชีส์ ประชากรของสปีชีส์อาจจะมีลักษณะจำเพาะ (speciation) ในแต่ละพื้นที่ที่มีสาเหตุจากการโดดเดี่ยวทางภูมิศาสตร์ (geographic isolation) อันเกิดจากแยกกลุ่มประชากร (splitting) ของสิ่งมีชีวิตโดยสภาพทางภูมิศาสตร์มีสภาพภูมิศาสตร์เป็นตัวกีดกัน (barrier) ทำให้สิ่งมีชีวิตมีพัฒนาการที่เฉพาะตัวขึ้นมาเป็นสปีชีส์ใหม่ โดยการผสมข้ามพันธุ์หรือผสมกันเองภายใต้ข้อจำกัดทางภูมิศาสตร์ทำให้มีความหลากหลายของพันธุกรรมขึ้น (Marsh and Grossa, 1996)

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวที่ส่งเสริมในภาคใต้จำนวน 8 สายพันธุ์ และข้าวเหนียวดำพื้นเมืองจำนวน 1 สายพันธุ์ เป็นพันธุ์เปรียบเทียบโดยใช้ 8 SSR markers พบว่าแถบดีเอ็นเอมีขนาด 100–1,500 bp จำนวน 45 แถบ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PHYLIP และสร้าง phylogenetic tree พบว่าไม่สามารถจำแนกพันธุ์ข้าวที่ส่งเสริมในภาคใต้ออกเป็นกลุ่มได้ (ศิริบุญา, 2549) เช่นเดียวกับ วันชัย และคณะ (2554) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดสายพันธุ์แท้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 69 ตำแหน่ง กระเจียวอยู่ทุกโครโมโซม พบว่า ทุกเครื่องหมายโมเลกุลแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ โดยมีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.64 จำนวนอัลลีลที่พบมีตั้งแต่ 2 ถึง 14 อัลลีลต่อตำแหน่ง ค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่ง

เท่ากับ 5.79 ความหลากหลายทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.68 เมื่อทำการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งส่วนใหญ่มีความสอดคล้องกับข้อมูลประวัติพันธุ์

Li *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Triticum turgidum* L. จำนวน 48 accessions โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 16 loci พบว่าแต่ละ locus ให้จำนวน allele อยู่ในช่วง 2-14 alleles โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.1 มีค่า genetic similarity (GS) อยู่ในช่วง 0.20-0.92 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.59 และจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *T. turgidum* L. ssp. *turgidum* 39 accessions กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *T. turgidum* L. ssp. *carthlicum* 2 accessions และ *T. turgidum* L. ssp. *paleocolchicum* 3 accessions กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *T. turgidum* L. ssp. *turgidum* 3 accessions และ *T. turgidum* L. ssp. *durum* 1 accession

การศึกษความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองไทย 13 พันธุ์ และเกาหลี่ 18 พันธุ์ โดยใช้ 20 SSR markers ที่ติดฉลากด้วยสาร fluorescence พบว่า มีค่า genetic variation อยู่ระหว่าง 0.54-0.82 ค่า genetic similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.022-0.857 เมื่อนำมาจัดกลุ่มด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.20 สามารถแบ่งกลุ่มถั่วเหลืองได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ส่วนใหญ่เป็นถั่วเหลืองพันธุ์ไทย กลุ่มที่ 2 กลุ่มพันธุ์ถั่วเหลืองของเกาหลี่ แต่มีถั่วเหลืองพันธุ์ไทย 4 พันธุ์เข้าไปรวมด้วย กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย IT 161471 กับ IT 182307 และกลุ่มที่ 4 คือ IT 184222 โดยกลุ่มที่ 3 และ 4 เป็นถั่วเหลืองพันธุ์ป่า (พัชรินทร์ และคณะ, 2544)

การศึกษความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันในประเทศอินโดนีเซียจำนวน 48 คู่ผสม ซึ่งเป็นตัวแทนของประชากร 4 กลุ่ม คือ Cameroon, Deli, Ivory Coast และ Zaire ในโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์ของ Indonesian Oil Palm Research Institute (IOPRI) โดยใช้เครื่องหมาย AFLP พบว่ามีค่า simple-matching similarity อยู่ในช่วง 0.042-0.406 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการศึกษามีความแตกต่างทางพันธุกรรม (Purba *et al.*, 2000) และ Billotte *et al.* (2001) พัฒนา microsatellite markers ซึ่งจำเพาะกับปาล์มน้ำมันได้ทั้งหมด 21 ตำแหน่ง โดยศึกษาในประชากร *Elaeis guineensis* จำนวน 18 accessions ส่วน *E. oleifera* จำนวน 21 accessions นำมาใช้ในการศึกษความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันและพบว่า SSR marker มีความสามารถสูงในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Elaeis* เนื่องจากมีจำนวน polymorphic allele เฉลี่ย 8 อัลลีลต่อโลคัส เหมาะที่จะใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชตระกูลปาล์ม

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าจำนวน 6 พันธุ์

ตารางที่ 1 ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าจำนวน 6 พันธุ์

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	แหล่งที่มา	สีของเมล็ดพันธุ์	หมายเหตุ
1	ทับทิมสยาม	บริษัท วิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชไทย จำกัด	ขาว ม่วง เหลือง	พันธุ์ลูกผสม
2	เม็กช้วน	บริษัท แปซิฟิค เมล็ดพันธุ์ จำกัด	เหลือง	พันธุ์ลูกผสม
3	เหนียวสวรรค์	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ขาว	พันธุ์ลูกผสม
4	ปักไวท์-852	บริษัท ฮอทิเจนเนติกส์ รีเสิร์ช เอส อี เอเชีย จำกัด	ขาว	พันธุ์ลูกผสม
5	ไข่มุก-49	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ขาว	พันธุ์ลูกผสม
6	รัชตะ 1	ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ	ขาว	พันธุ์ผสมเปิด

2. สารเคมีควบคุมวัชพืชราก่อนงอก อลาคลอร์

3. ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 และ สูตร 46-0-0

4. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง ได้แก่

4.1 ป้ายชื่อพันธุ์

4.2 ไม้ปักแปลง

4.3 เทปวัดแปลง

4.4 ไม้เมตร/ไม้บรรทัด

4.5 ถังกระจายและถุงไนลอน

4.6 สมุดบันทึกข้อมูล

5. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

- 5.1 PCR tube
- 5.2 Pipette tips
- 5.3 Microtubes
- 5.4 Racks
- 5.5 Electrophoresis (รุ่น DSG-200 ของบริษัท C.B.S. Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 5.6 PCR Thermal cycle (รุ่น T1 Thermocycler 96 บริษัท Biometra ประเทศเยอรมนี)
- 5.7 Gel documentation (รุ่น InGenius บริษัท Syngene ประเทศอังกฤษ)
- 5.8 Centrifuge
- 5.9 Water bath
- 5.10 Glove
- 5.11 Pipettes (p1000 p200 และ p20)

6. สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

- 6.1 Liquid nitrogen
- 6.2 CTAB buffer (100 mM TrisHCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% PVP, 2% CTAB และ 2% 2-mercaptoethanol)
- 6.3 Potassium acetate
- 6.4 Chloroform/isoamyl (24:1)
- 6.5 Absolute ethanol
- 6.6 70 % ethanol
- 6.7 TE buffer
- 6.8 TBE buffer
- 6.9 Ethidium bromide
- 6.10 Sequencing dye
- 6.11 DNA ladder (1 KB)
- 6.12 dNTP
- 6.13 *Taq* polymerase (Fermentus)
- 6.14 Agarose agar
- 6.15 Polyacrylamide solution

วิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้ลักษณะทางลักษณะทางพันธุกรรม

ปลูกข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ลูกผสม (hybrid) และพันธุ์ผสมเปิด (open-pollinated variety) ที่ได้จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และบริษัทเมล็ดพันธุ์ จำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ ทับทิมสยาม แม็กซ์วัน เหนียวสวรรค์ บิ๊กไวท์-852 ไช่มุก-49 และรัชตะ 1 วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ ณ แปลงทดลองภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม–สิงหาคม 2554 โดยปลูกพันธุ์ละ 100 ต้น ระยะห่างระหว่างต้น 25 เซนติเมตร และระยะห่างระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ปลูกหลุมละ 2 เมล็ด ก่อนปลูกใส่ปุ๋ยรองพื้นด้วยปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ หลังให้น้ำครั้งแรกพ่นสารควบคุมวัชพืชก่อนงอกด้วยไอโซซาฟลูโทล 75 WG อัตรา 3-4 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร จากนั้นถอนแยกหลังปลูก 2 สัปดาห์ ให้เหลือ 1 ต้นต่อหลุม เมื่อข้าวโพดข้าวเหนียวอายุ 3 สัปดาห์หลังปลูก ใส่ปุ๋ยแต่งหน้าด้วยปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ บันทึกข้อมูลต่าง ๆ ดังนี้

1.1 ลักษณะทางการเกษตร ได้แก่

1.1.1 วันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ นับจำนวนวันตั้งแต่ปลูกจนถึงวันที่ช่อดอกตัวผู้เริ่มโปรยละอองเกสร โดยพิจารณาจากจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ของต้นทั้งหมด

1.1.2 วันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ นับจำนวนวันตั้งแต่ปลูกจนถึงไหมโผล่พ้นกาบหุ้มฝัก โดยพิจารณาจากจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ของต้นทั้งหมด

1.1.3 ความสูงต้น (เซนติเมตร) วัดความสูงจากพื้นดินถึงข้อสุดท้ายของใบธง ที่ระยะเก็บเกี่ยว จำนวน 100 ต้น

1.1.4 ความสูงฝัก (เซนติเมตร) วัดความสูงจากพื้นดินถึงข้อที่ติดฝักแต่ละฝัก ที่ระยะเก็บเกี่ยว จำนวน 100 ต้น

1.2 ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต ได้แก่

1.2.1 ความยาวฝัก (เซนติเมตร) นำฝักข้าวโพดข้าวเหนียวทั้งหมดจาก 100 ต้น วัดความยาวจากโคนฝักถึงปลายฝักที่ติดเมล็ดหลังปอกเปลือก

1.2.2 ความกว้างฝัก (เซนติเมตร) นำฝักข้าวโพดข้าวเหนียวทั้งหมดจาก 100 ต้น วัดบริเวณกึ่งกลางฝักหลังปอกเปลือก

1.2.3 จำนวนแถวของเมล็ด นำฝักข้าวโพดข้าวเหนียวทั้งหมดจาก 100 ต้น ปอกเปลือก นับจำนวนแถวของเมล็ดทั้งหมดในแต่ละฝัก

1.2.4 น้ำหนักฝัก (กรัม) ชั่งน้ำหนักของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้งฝักหลังปอกเปลือกในแต่ละฝักจาก 100 ต้น

1.2.5 น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก (กรัม) ชั่งน้ำหนักเมล็ดต่อฝักของข้าวโพดข้าวเหนียวหลังจากแกะเอาแต่ละฝักจาก 100 ต้น

1.2.6 เปอร์เซ็นต์กะเทาะ กะเทาะเมล็ดและชั่งน้ำหนักเมล็ดของข้าวโพดข้าวเหนียวในแต่ละฝัก จำนวน 100 ต้น แล้วคำนวณจากสูตร = $\frac{\text{น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก} \times 100}{\text{น้ำหนักฝัก}}$

1.3 ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวโพดข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์ บันทึกจำนวนต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากลักษณะของข้าวโพดข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์ คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม

1.4 ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางการเกษตรและองค์ประกอบผลผลิตด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (correlation) ของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ ด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก

(principal component analysis) โดยใช้ค่าเฉลี่ยแต่ละพันธุ์บนพื้นฐานความสัมพันธ์ระหว่าง ความกว้างฝัก จำนวนแถวของเมล็ด น้ำหนักฝัก น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก เปอร์เซ็นต์กะเทาะ วันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ และวันออกใหม่ 50 เปอร์เซ็นต์ การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis, PCA) เป็นวิธีการสถิติวิธีหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร มีวัตถุประสงค์เพื่อลดมิติของข้อมูลที่มีหลายมิติหรือหลายตัวแปร โดยการลดมิติของข้อมูลช่วยให้สามารถอธิบายผลการทดลองได้โดยใช้จำนวนมิติน้อยลง แต่การลดมิตินั้นต้องสามารถคงรายละเอียดของข้อมูลส่วนใหญ่ไว้ ดังนั้น PCA จึงมีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายการกระจายของข้อมูล และโครงสร้างความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร โดยใช้องค์ประกอบที่อยู่ในรูป linear combination ของตัวแปรเดิม หากจำนวนแกนองค์ประกอบหลักที่คำนวณได้มีน้อยกว่าตัวแปรเดิมแต่สามารถอธิบายความผันแปรของข้อมูลส่วนใหญ่ไว้ได้ก็อาจใช้องค์ประกอบหลักจำนวนน้อยแทนตัวแปรเดิมได้ โดยจำนวนมิติของข้อมูลจะลดลงเหลือเท่ากับจำนวนแกนองค์ประกอบหลักนั้น ๆ โดยแกนองค์ประกอบหลักที่ 1 (PCA1) จะครอบคลุมความผันแปรโดยส่วนใหญ่ไว้ ในขณะที่แกนองค์ประกอบหลักที่ 2, 3,... จะมีความผันแปรได้รองลงมาตามลำดับ นอกจากนี้ PCA ยังช่วยให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรได้ดีขึ้น

การทดลองที่ 2 การประเมินความบริสุทธิ์และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพด ข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR และ AFLP

2.1 การประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR

2.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Agrawal *et al.* (1992) โดยบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ภายในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด โดยในแต่ละหลอดใส่สารละลาย 2% CTAB buffer [2% hexadecyltrimethyl ammoniumbromide, 2.8 M NaCl, 40 mM EDTA (pH 8.0), 200 mM Tris-HCl (pH 8.0)] ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เขย่าหลอดกลับขึ้นมาทุก 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำคลอโรฟอร์ม : isoamylalcohol ที่อัตราส่วน 24:1 (v:v) ปริมาตร 700 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ จากนั้น

นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย ส่วนใสให้หมดใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 5 M NaCl ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ isopropanol ในปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่ผสมให้เข้ากันเบา ๆ บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม 70 % ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายเกลือ เติ สารละลายทิ้งอย่างระมัดระวัง แล้วปล่อยให้ตะกอนแห้ง โดยนำไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1.0 mM EDTA (pH 8.0)] ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.1.2 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอและปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง

ตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer อาศัยหลักการที่ว่า กรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ส่วนโปรตีนดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วิธีการคือ นำสารละลายดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ใน TE buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เจือจางในน้ำกลั่นหนึ่งเท่าเพื่อปริมาตร 98 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นดีเอ็นเอ } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times (100 \mu\text{l} / 2 \mu\text{l})$$

คุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอตรวจสอบได้จากอัตราของค่า $A_{260} : A_{280}$ ถ้ามีค่า 1.8–2.0 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่นำมาตรวจสอบนั้นมีดีเอ็นเอที่สะอาดและมีปริมาณที่เพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณในการทำปฏิกิริยา PCR (อรรถรัตน์, 2548) หลังจากทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอแล้วปรับความเข้มข้นเป็น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งเท่าเพื่อเก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นแล้วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.1.3 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย

SSR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะใช้ดีเอ็นเอต้นแบบด้วยการรวมดีเอ็นเอจากข้าวโพดข้าวเหนียว 10 ต้น ในหลอดเดียวกันเป็น 1 ตัวอย่าง ดังนั้น ข้าวโพดข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์จะมีดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ตัวอย่างต่อ 1 ปฏิกิริยา จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสซ้ำ (ตารางที่ 2) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือปฏิกิริยา PCR โดยเตรียมสารต่าง ๆ ในปฏิกิริยาดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ 6 ชนิด ที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย SSR

ไพรเมอร์	Forward sequence	Reverse sequence
bnlg 1012	5'-GAGTGAGCGTGCGGAGTC-3'	5'-AACAGGCCAACTCCTCCTC-3'
bnlg 1017	5'-ATTGGAAGGATCTGCGTGAC-3'	5'-CAGCTGGTGGACTGCATCTA-3'
bnlg 1055	5'-GCTGGATGGCAGGTACAGAG-3'	5'-TGCAATGGAGAAGCAACAAG-3'
bnlg 1118	5'-CAGAGTTGATGAACTGAAAAAGG-3'	5'-CTCTTGCTTCCCCCTAATC-3'
bnlg 1188	5'-ATTAAGTAAATGACTATCTAGTGTTCG-3'	5'-AATAGCAAGGCATCAGCCAT-3'
umc 1086	5'-CATGAAAGTTTCCTGTGCAGATT-3'	5'-GGGCAACTTAGAGGTCGATTTATT-3'

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเครื่องหมาย SSR

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1. ดีเอ็นเอ (50 ng/μl)	5	100 ng/25μl
2. 10X Taq buffer	2	1 เท่า
3. MgCl ₂ (25 mM)	2	2.5 mM
4. dNTP (2 mM)	2	200 μM
5. ไพรมเมอร์	2	0.2 μM
6. Taq Enzyme (5u/μl)	0.2	1 unit/25 μl
7. น้ำกลั่น	6.8	-
ปริมาตรรวม	20	

ผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Denaturation	94	3	1
2. Denaturation	94	1	
Annealing	55-60	1	35
Extension	72	2	
3. Final extention	72	5	1
4. Storage	4	99.99	1

2.1.4 การตรวจสอบผลเครื่องหมายโมเลกุล SSR ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสในอะกาโรสเจล

เตรียมอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 3% เดิม 1X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นหลอมอะกาโรสโดยอุ่นให้ร้อน เขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสละลายจนหมด ตั้งไว้ให้เย็นจนมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที คัดสารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตรผสมกับ 6X loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol ละลายในน้ำ) 1 ไมโครลิตร และน้ำ 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องเจลที่เตรียมไว้ ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟริซิส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที นำเจลที่แช่เอธิเดียมโบรไมด์ มาแช่น้ำ 10 นาที นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพด้วยกล้องโพลาไรซ์

2.2 การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย AFLP

เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ ทับทิมสยาม แม็กซ์วัน เหนียวสวรรค์ บิ๊กไวท์-852 ไข่มุก-49 และรัชตะ 1 จำนวน 10 เมล็ด นำไปอ่อนของข้าวโพดข้าวเหนียวที่อายุ 1 สัปดาห์ มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Agrawal *et al.* (1992)

2.2.1 ตัด DNA ด้วย restriction enzyme คือ *EcoRI* และ *MseI*

2.2.2 ทำปฏิกิริยาในหลอด microtube ขนาด 1.5 ml ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณสารสำหรับปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
สารละลาย DNA (100 ng/μl)	2.50
5x reaction buffer*	5.00
<i>Eco</i> RI (10 U/μl)	0.25
<i>Mse</i> I (5 U/μl)	0.50
น้ำกลั่น	16.75
ปริมาตรรวม	25.00

หมายเหตุ * = 1x reaction buffer ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate และ 50 mM potassium acetate

2.2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.2.4 เชื่อมต่อ DNA กับ adapter โดยนำ DNA ที่ตัดด้วย restriction enzyme แล้วมาเติมสารต่าง ๆ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ชนิดและปริมาณสารสำหรับปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA ที่ตัดด้วย restriction enzyme	25.0
EcoRI adapter (5 pmole/ μ l)	1.0
MseI adapter (25 pmole/ μ l)	2.0
5x T4 ligase buffer*	10.0
T4 DNA ligase (1 U/ μ l)	1.0
น้ำกลั่น	11.0
ปริมาตรรวม	50.0

หมายเหตุ * = 1x T4 ligase buffer ประกอบด้วย 1mM ATP, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, 5 mM DTT และ 50 ng/ μ l BSA

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส อีก 2 ชั่วโมง

2.2.5 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี PCR

2.2.5.1 Pre-selective amplification เป็นขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการ โดยนำดีเอ็นเอที่ต่อกับ adapter แล้วมาทำปฏิกิริยากับ EcoRI ไพรมเมอร์ และ MseI ที่ต่ออยู่กับเบสคัดเลือก 1 เบส จำนวน 3 คู่ไพรมเมอร์ เพื่อเพิ่มเข้าไปด้านปลายสุดทางด้านปลาย 3' ไพรมเมอร์ประกอบด้วย ลำดับเบส 3 ส่วน คือ 1) เบสหลัก 2) ลำดับเบสที่เป็นรหัสของเอนไซม์ และ 3) เบสคัดเลือกที่ต่ออยู่ด้านปลายสุดด้านปลาย 3' ไพรมเมอร์ที่ใช้มีดังนี้

EcoRI primer + 0 (E-A) 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' และ

MseI primer + 1 (M-C) 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'

โดยใช้ปริมาตรของสารในการทำปฏิกิริยาขั้น pre-selective amplification ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ชนิดและปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา pre-selective amplification

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA ที่ได้จากข้อ 3	2.0
<i>Eco</i> RI primer+0 (E-A) (5 pmole/ μ l)	1.0
<i>Mse</i> I primer+1 (M-C) (5 pmole/ μ l)	1.0
dNTP mix (2 mM)	2.50
MgCl ₂ (50 mM)	0.75
<i>Taq</i> polymerase (5 U/ μ l)	0.10
น้ำกลั่น	15.15
ปริมาตรรวม	25.0

นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้สภาวะดังนี้

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	}	ทำปฏิกิริยา 20 รอบ
56 องศาเซลเซียส 60 วินาที		
72 องศาเซลเซียส 60 วินาที		

แบ่งสารละลายมาทำ electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.5.2 Selective amplification โดย set reaction ดังนี้

ผลผลิตที่ได้จาก pre-selective amplification นำมาทำปฏิกิริยา โดยในขั้นตอนนี้เติมคู่ไพรเมอร์ *Eco*RI และ *Mse*I ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ชนิดและปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา selective amplification

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNAจากข้อ1ที่เจือจาง 20 เท่าด้วย TE buffer	5.0
primer E-ANN	1.0
primer M-CNN	1.0
2 mM dNTP mix	2.0
10x PCR buffer	2.0
50 mM MgCl ₂	0.6
Taq polymerase (5 U/μl)	0.1
น้ำกลั่น	8.3
ปริมาตรรวม	20.0

ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้สภาวะดังนี้

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	}	ทำปฏิกิริยา 1 รอบ
65 องศาเซลเซียส 30 วินาที		
72 องศาเซลเซียส 60 วินาที		

โดยลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส ทุกรอบ จำนวน 12 รอบ จนถึงอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส และทำปฏิกิริยาต่อ ดังนี้

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	}	ทำปฏิกิริยา 23 รอบ
56 องศาเซลเซียส 30 วินาที		
72 องศาเซลเซียส 60 วินาที		

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR แล้ว นำมาเติม AFLP loading beffer (98% formamide, 10mM EDTA, 0.1% bromophenol blue และ 0.1% xylene cyanol) 20 μl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อเตรียมสำหรับการทำ electrophoresis

ตารางที่ 9 ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างคู่ไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ AFLP

ไพรเมอร์ที่ใช้กับ		ไพรเมอร์ที่ใช้กับ	
Preselective amplification		Selective amplification	
EcoRI	MseI	EcoRI	MseI
A	C	E-AGG	M-CAC
		E-AGG	M-CAG
		E-AGC	M-CAG
รวม	1	3	3

2.2.6 การเตรียมเจลโพลีอะครีลาไมด์

2.2.6.1 เช็ดกระจกแผ่นที่เป็นหุกระต่ายด้วย repel siline และเช็ดกระจกสี่เหลี่ยมด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 498.5 ไมโครลิตร glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และ bind saline 1 ไมโครลิตร

2.2.6.2 เตรียมอะครีลาไมด์เจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (acrylamide:bisacrylamide 19:1 M urea) ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ชนิดและปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมอะครีลาไมด์เจล 6 เปอร์เซ็นต์

สารที่ใช้	ปริมาณสารที่ใช้
30% อะครีลาไมด์ (19 : 1)	4.5 มิลลิลิตร
5X TBE	6 มิลลิลิตร
Urea	13.5 กรัม
น้ำกลั่น	8.5 มิลลิลิตร
10% APS (ammonium persulfate)	400 ไมโครลิตร
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	20 ไมโครลิตร

ผสม acrylamide TBE น้ำกลั่น และ urea เขย่าเบา ๆ ใน water bath อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ให้อยู่ระยะลายหมด รอให้อุณหภูมิลดลงเท่าอุณหภูมิห้องจึงเติม 10% APS และ TEMED ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็วระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ใส่หัวด้านบน ปลอ่ยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง ดึงหัวออกแล้วนำมาทำ electrophoresis

2.2.6.3 ทำ Pre-run ด้วยการต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง electrophoresis แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้วิ่งผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวก ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 200 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

2.2.6.4 ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรกับ loading buffer 3 ไมโครลิตร (loading buffer : 10 ml formamide, 10 mg xylene cyanol, 10 mg bromphenol blue และ 200 μ l 0.5 M EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากัน แล้วค่อย ๆ หยดลงในช่องหัวด้วยไมโครปิเปตและปล่อยให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 250 โวลต์

2.2.7 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอในเจลโพลีอะครีลาไมด์ด้วยซิลเวอร์ไนเตรด

2.2.7.1 นำกระจกที่มีเจลไปล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 3-5 นาที แล้วแช่ใน 0.1% CTAB เป็นเวลา 30 นาที และบ่มเจลด้วยแอมโมเนีย 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที

2.2.7.2 เทสารละลายแอมโมเนียทิ้ง จากนั้นเทสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดที่เตรียมโดยละลายซิลเวอร์ไนเตรด 0.4 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ NaOH 1 มิลลิลิตร สารละลายจะเกิดตะกอนขุ่น เติมน้ำแอมโมเนีย 1,500 ไมโครลิตร จนกระทั่งกลายเป็นสารละลายที่ไม่มีสีแล้วเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 20 นาที

2.2.7.3 ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 20-30 นาที

2.2.7.4 วางเจลลงในถาดที่มีสารละลาย developer (โซเดียมคาร์บอเนต 5 กรัม และ formaldehyde 50 ไมโครลิตร) โดยละลายโซเดียมคาร์บอเนตในน้ำ 250 มิลลิลิตรก่อนแล้วจึงเติม formaldehyde โดย developer ก่อนใช้ควรแช่ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 15 นาที หรือจนกระทั่งเห็นแถบดีเอ็นเอ และหยุดปฏิกิริยาโดยใช้น้ำ เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างให้แห้ง

2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

2.3.1 ประเมินขนาดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง โดยเปรียบเทียบกับขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb DNA ladder บริษัท SibEnzyme ประเทศ Russia)

2.3.2 ประเมินความบริสุทธิ์และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวแปลงข้อมูลให้เป็นแบบไบนารี (binary) โดยในตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอกำหนดให้มีค่าเป็น “1” และที่ตำแหน่งเดียวกันของตัวอย่างอื่นที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอกำหนดให้มีค่าเป็น “0”

$$\text{percentage of polymorphism} = \frac{\text{จำนวนของยีนหรือแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม} \times 100}{\text{จำนวนของยีนหรือแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

2.3.3 วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ศึกษาด้วยการคำนวณค่า Dice's similarity coefficient (1945) และจัดกลุ่มสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยวิธี UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01 (Rohlf, 1997)

สถานที่ทำการวิจัย

1. แปลงทดลองภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
2. ห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืชและเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร
กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาในการวิจัย

พฤษภาคม พ.ศ. 2554 – มีนาคม พ.ศ. 2555

ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา

1.1 ลักษณะทางการเกษตร

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะทางการเกษตรของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ ได้แก่ ทับทิมสยาม แม็กซ์วัน เหนียวสวรรค์ บิ๊กไวท์-852 ไช้มุก-49 และรัชตะ 1 มีลักษณะทางการเกษตร ได้แก่ วันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ วันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ และความสูงต้นมีความแตกต่างทางสถิติ ยกเว้นความสูงฝักแรกของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ที่ไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 11 และตารางผนวกที่ 1)

เมื่อพิจารณาวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์แม็กซ์วัน และบิ๊กไวท์-852 มีอายุวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างทางสถิติ โดยมีอายุวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ ซ้ำกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์อื่น ๆ ที่ 50.83 ± 2.21 และ 49.68 ± 2.80 วัน ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์ทับทิมสยามมีวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์เร็วที่สุด คือ 44.37 ± 2.60 วัน ส่วนพันธุ์รัชตะ 1 เหนียวสวรรค์ และไช้มุก-49 มีวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 46.50 ± 3.33 46.12 ± 1.22 และ 45.96 ± 2.71 วัน ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 11)

สำหรับวันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ ของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ พบว่า พันธุ์แม็กซ์วัน และบิ๊กไวท์-852 มีอายุวันออกดอกไหมไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ 52.40 ± 2.69 และ 51.67 ± 3.77 วัน ตามลำดับ ทั้ง 2 พันธุ์ มีอายุวันออกไหมซ้ำกว่าพันธุ์รัชตะ 1 ไช้มุก-49 และเหนียวสวรรค์ ที่มีวันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ 49.60 ± 3.98 48.89 ± 2.50 และ 47.98 ± 3.50 วัน ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์ทับทิมสยามมีวันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ 46.59 ± 2.44 วัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับพันธุ์เหนียวสวรรค์ที่มีวันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ 47.98 ± 3.50 วัน (ตารางที่ 11)

ความสูงของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ พบว่า พันธุ์เหนียวสวรรค์ ไช้มุก-49 และทับทิมสยาม มีความสูงต้นไม่แตกต่างทางสถิติ โดยมีความสูงต้น 182.66 ± 7.44 182.58 ± 4.36 และ 180.48 ± 5.89 เซนติเมตร ตามลำดับ พันธุ์เหนียวสวรรค์ และไช้มุก-49 มีความสูงต้นแตกต่างทาง

สถิติกับพันธุ์รัชตะ 1 บิ๊กไวท์-852 และแม็กซ์วันที่มีความสูงต้น 179.21 ± 5.79 179.13 ± 3.38 และ 176.75 ± 7.68 เซนติเมตร ตามลำดับ

ข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ มีความสูงฝักไม่แตกต่างทางสถิติ โดยมีความสูงฝักตั้งแต่ 92.64 ± 3.88 - 95.65 ± 3.44 เซนติเมตร (ตารางที่ 11)

พันธุ์พืชแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน จึงมีผลทำให้ข้าวโพดข้าวเหนียวมีความสูงต้น ความสูงฝัก วันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ และวันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกัน เมื่อปลูกในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน จะเห็นได้จากการศึกษาเสถียรภาพผลผลิตของข้าวโพดข้าวเหนียว 12 พันธุ์ พบว่า พันธุ์เหนียวสวรรค์มีความสูงต้น 196.5 เซนติเมตร ความสูงฝัก 99.3 เซนติเมตร วันออกดอกตัวผู้ 43 วัน และ วันออกไหม 44 วัน ในขณะที่พันธุ์บิ๊กไวท์-852 มีความสูงต้น 169.0 เซนติเมตร ความสูงฝัก 88.2 เซนติเมตร วันออกดอกตัวผู้ 44 วัน และวันออกไหม 47 วัน (กิตติ และคณะ, 2554) ในขณะที่สำราญ และคณะ (2553) พบว่า พันธุ์บิ๊กไวท์-852 แม็กซ์วัน รัชตะ 1 และไข่มุก-49 มีวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ 45 49 46 และ 45 วัน มีวันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ 46 48 47 และ 45 วัน ตามลำดับ มีความสูงต้น 176 224 185 และ 172 เซนติเมตร และมีความสูงฝัก 92 123 95 และ 98 เซนติเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 11 ลักษณะทางการเกษตรของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์

พันธุ์	ลักษณะทางการเกษตร			
	วันออกดอกตัวผู้	วันออกไหม	ความสูงต้น	ความสูงฝัก
	50 %	50 %	(ซม.)	(ซม.)
ทับทิมสยาม	44.37±2.60 c	46.59±2.44 d	180.48±5.89 ab	94.65±2.94
แม่ข้าววัน	50.83±2.21 a	52.40±2.69 a	176.75±7.68 c	92.64±3.88
เหนียวสวรรค์	46.12±1.22 b	47.98±3.50 cd	182.66±7.44 a	94.49±6.59
บิ๊กไวท์-852	49.68±2.80 a	51.67±3.77 a	179.13±3.38 bc	95.65±3.44
ไข่มุก-49	45.96±2.71 b	48.89±2.50 bc	182.58±4.36 a	93.26±3.79
รัชตะ 1	46.50±3.33 b	49.60±3.98 b	179.21±5.79 bc	94.14±4.41
เฉลี่ย	47.24	49.52	180.14	94.14
F-test	**	**	**	ns
C.V. (%)	1.72	2.03	0.91	2.23

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.01$)

1.2 ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตในข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ มีความกว้างฝัก จำนวนแถวของเมล็ด น้ำหนักฝัก น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ความยาวฝัก และเปอร์เซ็นต์กะเทาะไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 12 และตารางผนวกที่ 4) โดยข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ มีความยาวฝักไม่แตกต่างทางสถิติ โดยมีความยาวฝักตั้งแต่ 12.73 ± 0.76 - 16.34 ± 1.19 เซนติเมตร

ข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ มีความกว้างฝักแตกต่างกันทางสถิติโดย พันธุ์แม่กษัตริย์ มีความกว้างฝักมากที่สุด คือ 4.92 ± 0.21 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์รัชตะ 1 เหนียวสวรรค์ ไช้มุก-49 และทับทิมสยาม ที่มีความกว้างฝัก 4.65 ± 0.32 4.63 ± 0.27 4.47 ± 0.28 และ 4.43 ± 0.37 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์บิ๊กไวท์-852 มีความกว้างฝัก 4.27 ± 0.32 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์ทับทิมสยามที่มีความกว้างฝัก 4.43 ± 0.37 เซนติเมตร จากการที่ข้าวโพดข้าวเหนียว พันธุ์แม่กษัตริย์ มีความกว้างฝักสูงที่สุด ทำให้มีจำนวนแถวของเมล็ดสูงที่สุด คือ 16.70 ± 1.59 แถว มีความแตกต่างทางสถิติกับพันธุ์เหนียวสวรรค์ ทับทิมสยาม รัชตะ 1 และไช้มุก-49 ที่มีจำนวนแถวของเมล็ด 114.42 ± 0.75 13.83 ± 1.05 13.37 ± 1.33 และ 13.32 ± 0.83 แถว ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์บิ๊กไวท์-852 มีจำนวนแถวของเมล็ด 12.51 ± 0.89 แถว ไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์ไช้มุก-49 และรัชตะ 1 ที่มีจำนวนแถวของเมล็ด 13.32 ± 0.83 และ 13.37 ± 1.33 แถว ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ มีน้ำหนักฝักแตกต่างกันทางสถิติ โดยพันธุ์แม่กษัตริย์มีน้ำหนักฝัก 128.87 ± 6.09 กรัม ไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์รัชตะ 1 ที่มีน้ำหนักฝัก 125.46 ± 7.46 กรัม แต่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์เหนียวสวรรค์ ทับทิมสยาม บิ๊กไวท์-852 และไช้มุก-49 ที่มีน้ำหนักฝัก 120.33 ± 6.84 115.37 ± 7.01 111.96 ± 5.41 และ 106.21 ± 5.41 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

จากการศึกษาน้ำหนักเมล็ดต่อฝักของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ พบว่า พันธุ์แม่กษัตริย์ มีน้ำหนักเมล็ดต่อฝัก 115.07 ± 6.40 กรัม ไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์รัชตะ 1 ที่มีน้ำหนักเมล็ดต่อฝัก 112.97 ± 7.48 กรัม และพันธุ์รัชตะ 1 ไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์เหนียวสวรรค์ที่มีน้ำหนักเมล็ดต่อฝัก 108.77 ± 7.49 กรัม แต่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์ทับทิมสยาม บิ๊กไวท์-852 และไช้มุก-49 มีน้ำหนักเมล็ดต่อฝัก 100.97 ± 9.47 99.93 ± 5.34 และ 94.89 ± 5.71 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

เปอร์เซ็นต์กะเทาะของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์กะเทาะระหว่าง $87.46 \pm 0.61 - 90.41 \pm 5.64$ เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ ที่มีความยาวฝักและความกว้างฝักที่แตกต่างกัน จะมีผลต่อน้ำหนักเมล็ดต่อฝัก ซึ่งจะเห็นได้จากพันธุ์แม่ช้วน ที่มีความยาวฝักและความกว้างฝัก สูงกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์อื่น จะมีน้ำหนักเมล็ดต่อฝักสูง ในขณะที่พันธุ์ทับทิมสยาม มีความยาวฝักน้อย จึงมีน้ำหนักเมล็ดต่อฝักสูง ในขณะที่พันธุ์ทับทิมสยามมีความยาวฝัก และความกว้างฝักน้อย จึงมีน้ำหนักเมล็ดต่อฝักน้อย ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ปลูกในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน จะให้ผลผลิต และขนาดฝักที่แตกต่างกัน จากการศึกษาเสถียรภาพผลผลิตของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ พบว่า พันธุ์เหนียวสวรรค์ และบิ๊กไวท์-852 เป็นพันธุ์ลูกผสมเดี่ยวที่มีฝักขนาดใหญ่ และให้ผลผลิตสูง เมื่อปลูกในสภาพแวดล้อมที่ดี พันธุ์เหนียวสวรรค์ มีความยาวฝัก และความกว้างฝัก 15.3 และ 4.28 เซนติเมตร ในขณะที่พันธุ์บิ๊กไวท์-852 มีความยาวฝัก และความกว้างฝัก 14.7 และ 4.26 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาในครั้งนี้ พันธุ์เหนียวสวรรค์ มีความยาวฝัก และความกว้างฝัก 13.19 และ 4.6 เซนติเมตร ในขณะที่พันธุ์บิ๊กไวท์-852 มีความยาวฝักและความกว้างฝัก 14.12 และ 4.27 เซนติเมตร ในขณะที่ สำราญ และคณะ (2553) พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียว พันธุ์แม่ช้วน เป็นพันธุ์ที่มีศักยภาพในด้านผลผลิตสูง โดยให้ผลผลิตฝักปอกเปลือก 1,799 กิโลกรัมต่อไร่ บิ๊กไวท์-852 และรัชตะ 1 ให้ผลผลิตฝักปอกเปลือก 1,188 และ 874 กิโลกรัมต่อไร่

ตารางที่ 12 ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์

พันธุ์	ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต					
	ความยาวฝัก (ซม.)	ความกว้าง ฝัก (ซม.)	จำนวนแถว ของเมล็ด	น้ำหนักฝัก (กรัม)	น้ำหนักเมล็ด ต่อฝัก (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ กะเทาะ
ทับทิมสยาม	12.73±0.76	4.43±0.37 de	13.83±1.05 b	115.37±7.01c	100.97±9.47c	90.41±5.64
เม็กขวัญ	16.34±1.19	4.92±0.21 a	16.70±1.59 a	128.87±6.09a	115.07±6.40a	89.34±2.47
เหนียวสวรรค์	13.19±0.61	4.63±0.27 bc	14.42±0.75 b	120.33±6.84b	108.77±7.49b	89.30±2.06
บักไวท์-852	14.12±0.86	4.27±0.32 e	12.51±0.89 c	111.96±5.41c	99.93±5.34c	87.46±0.61
ไข่มุก-49	14.16±0.46	4.47±0.28 cd	13.32±0.83bc	106.21±5.41d	94.89±5.71d	89.29±1.20
รัชตะ 1	14.85±0.75	4.65±0.32 b	13.37±1.33bc	125.46±7.46a	112.97±7.48ab	90.04±0.74
เฉลี่ย	14.23	4.56	14.23	118.03	105.43	89.31
F-test	ns	**	**	**	**	ns
C.V. (%)	16.4	2.31	5.58	2.25	2.92	1.79

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์
($P < 0.01$)

1.3 การประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการปลูกข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ พันธุ์ละ 100 ต้น ประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวโพดข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์ พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์แม่แก้ววัน เหนียวสวรรค์ บิ๊กไวท์-852 มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ทับทิมสยาม ไชยมุก-49 และรัชตะ 1 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน โดยลักษณะประจำพันธุ์ของพันธุ์ทับทิมสยาม มีสีดอกตัวผู้และสีไหมเป็นสีม่วง แต่พบว่า มีสีดอกตัวผู้สีขาว 2 เปอร์เซ็นต์ และสีไหมสีขาว 3 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น พันธุ์ทับทิมสยามมีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ไชยมุก-49 มีสีดอกตัวผู้เป็นสีเหลือง และไหมสีขาว แต่พบว่า มีลักษณะไหมสีม่วง จำนวน 24 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น พันธุ์ไชยมุก-49 จึงมีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม คิดเป็น 76 เปอร์เซ็นต์ และข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์รัชตะ 1 มีสีดอกตัวผู้สีเหลือง และไหมสีขาว แต่พบลักษณะไหมสีม่วง จำนวน 6 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น พันธุ์รัชตะ 1 มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม คิดเป็น 94 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13) เมื่อมีการนำข้าวโพดข้าวเหนียวมาปลูกทดสอบจะเห็นได้ว่าข้าวโพดข้าวเหนียวที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมแตกต่างกัน ลักษณะที่แตกต่างที่แสดงออก อาจจะเนื่องมาจากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวมีความไม่บริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในขั้นตอนของการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม สำหรับการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดลูกผสมในประเทศไทย ส่วนใหญ่ยังใช้วิธีการปลูกทดสอบในแปลงปลูกที่เรียกว่า grow out test ซึ่งตรวจสอบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวโพด นอกจากการประเมินในข้าวโพดแล้ว ยังมีการศึกษาการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี grow out test ในฝ้าย พบว่า ฝ้ายลูกผสมพันธุ์ TCHB231 มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมสูงที่สุด ประมาณ 95.2 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่พันธุ์ TCHB4510 และ TCHB2310 มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม 78.2 และ 62.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลักษณะที่นำมาใช้ในการพิจารณา ได้แก่ สีกลีบดอก สีอับละอองเกสร รูปร่างของสมอ สีของใบ และโครงสร้างของใบ เป็นต้น อย่างไรก็ตามการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้น มีข้อจำกัดในการใช้พื้นที่มาก และระยะเวลาในการทดสอบนาน (Selvakumar *et al.*, 2010)

ตารางที่ 13 การประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้ลักษณะทาง
สัณฐานวิทยา

พันธุ์	สีดอกตัวผู้		สีไหม		ต้นปนพันธุ์ (%)		ความบริสุทธิ์ ทางพันธุกรรม (%)
	ต้นปกติ	ต้นปน พันธุ์	ต้นปกติ	ต้นปน พันธุ์	สีดอกตัวผู้	สีไหม	
ทับทิมสยาม	ม่วง	ขาว	ม่วง	ขาว	2	3	95
แม่แก้ว	เหลือง	-	ขาว	-	0	0	100
เหนียวสวรรค์	เหลือง	-	ม่วง	-	0	0	100
บักไวท์-852	เหลือง	-	ขาว	-	0	0	100
ไข่มุก-49	เหลือง	-	ขาว	ม่วง	0	24	76
รัชตะ 1	เหลือง	-	ขาว	ม่วง	0	6	94

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ความกว้างฝัก จำนวนแถวของเมล็ด น้ำหนักฝัก น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก เปอร์เซ็นต์กะเทาะ วันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ วันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ และความสูงต้น มาทดสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมเพื่อยืนยันผลการทดลอง โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี principal component analysis พบว่า principal component 1 (PC1) และ principal component 2 (PC2) สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ได้ทั้งหมด 88.38 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14) ลักษณะที่นำมาเป็นตัวแปรในการวิเคราะห์เป็นลักษณะที่บอกคุณลักษณะของข้าวโพดข้าวเหนียวที่นำมาทดสอบ โดย PC1 อธิบายด้วยความกว้างฝัก จำนวนแถวของเมล็ด น้ำหนักฝัก น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก เปอร์เซ็นต์กะเทาะ วันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ วันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกับความสูงต้น ส่วน PC2 อธิบายด้วย ความกว้างฝัก จำนวนแถวของเมล็ด น้ำหนักฝัก น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก เปอร์เซ็นต์กะเทาะ ความสูงต้น ที่มีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกับ วันออกดอกตัวผู้และวันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1) โดยข้าวโพดข้าวเหนียวในการทดลองครั้งนี้ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันไป ข้าวโพดข้าวเหนียว 3 พันธุ์ คือ ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ และรัชตะ 1 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันโดยเฉพาะมีอายุวันออกดอกตัวผู้และอายุการออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ เร็ว ส่วนข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์แม่กษัตริย์ บิ๊กไวท์-852 และไข่มุก-49 มีลักษณะเฉพาะและไม่สามารถบ่งบอกว่ามี ความใกล้เคียงกับข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์อื่น ๆ เนื่องจากข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์แม่กษัตริย์ มีความกว้างฝัก จำนวนแถวของเมล็ด น้ำหนักฝัก น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก และเปอร์เซ็นต์กะเทาะสูง ซึ่งต่างจากพันธุ์ไข่มุก-49 ที่มีความกว้างฝัก น้ำหนักฝัก น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก และเปอร์เซ็นต์กะเทาะต่ำ ส่วนพันธุ์บิ๊กไวท์-852 มี วันออกดอกตัวผู้และวันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ ช้ากว่าพันธุ์อื่น

ตารางที่ 14 ค่า Eigenvalue และ Eigenvector ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ

Estimate	Eigenvalue		Eigenvector							
	Eigenvalue	Proportion	ความกว้าง ปีก	จำนวนแถว ของเมล็ด	น้ำหนัก ปีก	น้ำหนักเมล็ด ต่อปีก	เปอร์เซ็นต์ กะเทาะ	วันออกดอก ตัวผู้ 50%	วันออก ไหม 50%	ความสูง ต้น
PC1	5.342	66.772	0.3713	0.3473	0.4014	0.3979	0.399	0.2843	0.2632	-0.3359
PC2	1.729	21.613	0.2635	0.1774	0.2255	0.219	0.2127	-0.5504	-0.5845	0.3323



ภาพที่ 1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้าวโพดข้าวเหนียว จำนวน 6 พันธุ์ ด้วยวิธี principal component analysis

การทดลองที่ 2 การประเมินความบริสุทธิ์และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพด ข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR และ AFLP

2.1 การประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR

การประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว จำนวน 6 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 15 ไพรเมอร์ (ตารางผนวกที่ 5) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอข้าวโพดข้าวเหนียว พบว่า ไพรเมอร์ที่สามารถใช้ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวมี 6 ไพรเมอร์ จาก 15 ไพรเมอร์ ได้แก่ bnlg 1012 bnlg 1017 bnlg 1055 bnlg 1118 bnlg 1188 และ umc 1086

เมื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิด พบว่า แลบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว เมื่อนำมาแยกโดยใช้อะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ จะพบแลบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากไพรเมอร์ทั้ง 6 ไพรเมอร์ ที่มีขนาดต่างกัน ตั้งแต่ 100-500 คู่เบส โดยพบว่าแลบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดมี 22 แลบดีเอ็นเอที่ให้จำนวนแลบดีเอ็นเอจำนวนมากที่สุด ได้แก่ ไพรเมอร์ bnlg 1017 คือ ให้แลบดีเอ็นเอ 7 แลบดีเอ็นเอ ขนาด 100-250 คู่เบส ไพรเมอร์ bnlg 1055 และ bnlg 1118 ให้แลบดีเอ็นเอ 4 แลบดีเอ็นเอ มีขนาด 100-250 คู่เบส ไพรเมอร์ bnlg 1012 ให้แลบดีเอ็นเอ 3 แลบดีเอ็นเอ มีขนาด 100-250 คู่เบส ไพรเมอร์ bnlg 1188 และ umc 1086 ให้แลบดีเอ็นเอ 2 แลบดีเอ็นเอ มีขนาด 250-500 และ 100-500 คู่เบส (ตารางที่ 15)

เมื่อประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR โดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด คือ ได้แก่ bnlg 1012 bnlg 1017 bnlg 1055 bnlg 1118 bnlg 1188 และ umc 1086 ดีเอ็นเอข้าวโพดข้าวเหนียวที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะใช้ดีเอ็นเอต้นแบบด้วยการรวมดีเอ็นเอจากข้าวโพดข้าวเหนียว 10 ต้น ในหลอดเดียวกันเป็น 1 ตัวอย่าง ดังนั้น ข้าวโพดข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์จะมีดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ตัวอย่าง ที่นำมาประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม โดยตัวอย่างที่ 1-10 พันธุ์ทับทิมสยาม ตัวอย่างที่ 11-20 พันธุ์เหนียวสวรรค์ ตัวอย่างที่ 21-30 พันธุ์รัชตะ 1 ตัวอย่างที่ 31-40 พันธุ์แม่แก้ว ตัวอย่างที่ 41-50 พันธุ์บีบีไวท์-852 ตัวอย่างที่ 51-60 พันธุ์ไข่มุก-49 จากการทดลอง การใช้ไพรเมอร์ bnlg 1012 bnlg 1017 และ bnlg 1055 ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์

แสดงแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในแต่ละไพรเมอร์ และมีขนาดดีเอ็นเอ 100-250 คู่เบส 100-500 คู่เบส และ 100-250 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จากการตรวจสอบด้วย เครื่องหมาย SSR ด้วยไพรเมอร์ bnlg 1012 bnlg 1017 และ bnlg 1055 จะเห็นได้ว่าข้าวโพด ข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ เมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ 6 ชนิด แสดงแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันภายใน แต่ละพันธุ์ แสดงว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ รัชตะ 1 แม็กชวัน บิ๊ก ไวท์-852 และไข่มุก-49 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (ภาพที่ 2 3 และ 4)

การใช้ไพรเมอร์ bnlg 1118 ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์แม็กชวัน บิ๊กไวท์-852 และไข่มุก-49 พบว่า ทั้ง 3 พันธุ์ แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ และมีขนาดดีเอ็นเอต่ำกว่า 250 คู่เบส ในขณะที่พันธุ์ทับทิมสยาม และรัชตะ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ มีขนาดดีเอ็นเอ ต่ำกว่า 250 คู่เบส และพันธุ์เหนียวสวรรค์ แสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่แตกต่างจากข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ อื่น ๆ (ภาพที่ 5)

การใช้ไพรเมอร์ bnlg 1188 ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ รัชตะ 1 บิ๊กไวท์-852 และไข่มุก-49 พบว่า ทั้ง 5 พันธุ์ แสดงแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 250 คู่เบส ในขณะที่พันธุ์ แม็กชวัน แสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่แตกต่างจากข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์อื่น ๆ ดังนั้น ไพรเมอร์ bnlg 1188 สามารถแยกข้าวโพด ข้าวเหนียวพันธุ์แม็กชวันออกจากข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 5 พันธุ์ ได้ (ภาพที่ 6)

การใช้ไพรเมอร์ umc 1086 ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ รัชตะ 1 แม็กชวัน บิ๊กไวท์-852 และไข่มุก-49 พบว่า ไพรเมอร์ umc 1086 แสดงแถบ ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ในข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ รัชตะ 1 และบิ๊กไวท์- 852 โดยมีขนาดดีเอ็นเอต่ำกว่า 250 คู่เบส ในขณะที่พันธุ์แม็กชวัน และไข่มุก-49 แสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่แตกต่างจากข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 4 พันธุ์ จากการทดลองจะเห็นได้ว่า ข้าวโพดข้าวเหนียว แต่ละพันธุ์เมื่อประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ umc 1086 พบว่า ข้าวโพด ข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ พันธุ์ละ 10 ตัวอย่าง จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันภายในแต่ละพันธุ์ แสดงว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ รัชตะ 1 แม็กชวัน บิ๊กไวท์-852 และ ไข่มุก-49 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม เมื่อพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอที่ ปรากฏ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SSR ด้วยไพรเมอร์ umc 1086 (ภาพที่ 7) จากการ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ bnlg 1012 bnlg 1017

bnlg 1055 และ bnlg 1118 ในการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว ทั้ง 6 พันธุ์ จะเห็นว่า ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันภายในแต่ละพันธุ์ ในขณะที่การทดสอบด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นสามารถเห็นความแตกต่าง แสดงให้เห็นว่า เครื่องหมาย SSR ที่ นำมาใช้ไม่เกี่ยวข้องกับสีดอกและสีไหมในข้าวโพดข้าวเหนียวที่นำมาศึกษาในครั้งนี้

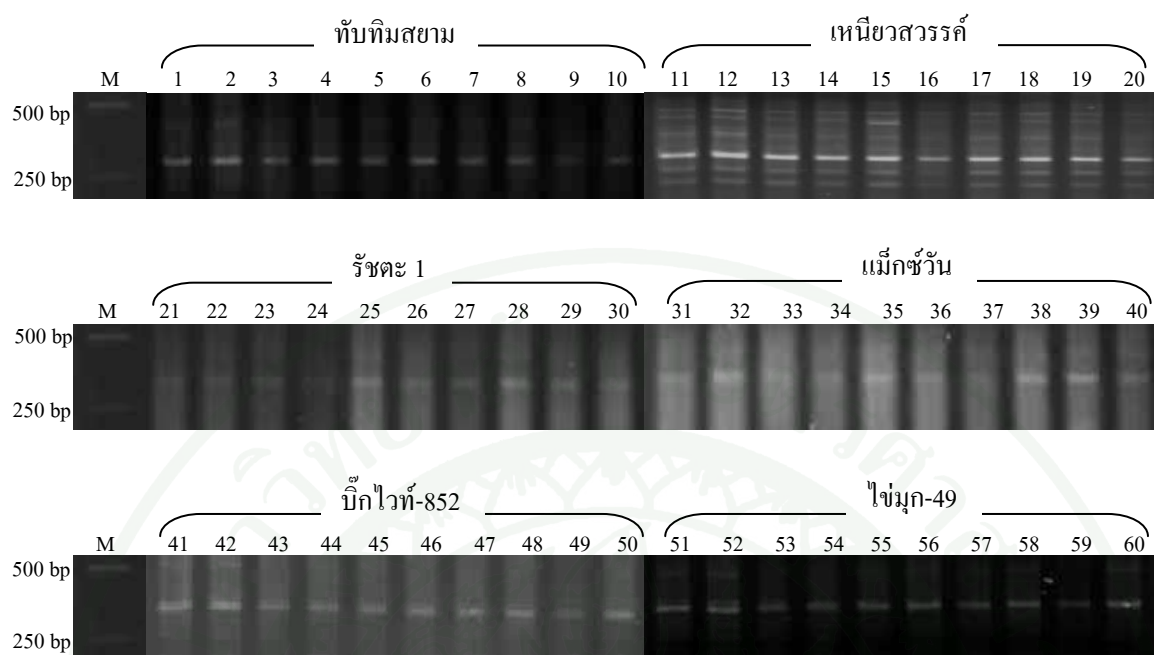
จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเมื่อใช้ไพรเมอร์ bnlg 1188 พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ แม็กชวัน จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์อื่น ๆ โดยจะแสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ในขณะที่พันธุ์ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ รัชตะ 1 บิ๊กไวท์-852 และไข่มุก-49 มีแถบ ดีเอ็นเอ 2 แถบ เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพันธุ์แม็กชวัน พบว่า มีลักษณะทาง สัณฐานวิทยาแตกต่างจากข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์อื่น ๆ โดยมีวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ และ วันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ ช้ำกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์อื่น ๆ (ตารางที่ 11) และมีความยาวฝัก ความกว้างฝัก จำนวนแถวของเมล็ด น้ำหนักฝัก และน้ำหนักเมล็ดต่อฝัก สูงกว่าข้าวโพดข้าวเหนียว พันธุ์อื่น ๆ (ตารางที่ 12) แสดงว่า ไพรเมอร์ bnlg 1188 สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความ แตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์แม็กชวันจากข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์อื่น ๆ ได้

จากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ จะเห็นว่า เครื่องหมาย SSR สามารถนำมาใช้ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว ภายในแต่ละพันธุ์จำนวน 6 พันธุ์ และแยกความแตกต่างของข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์แม็กชวันออก จากข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์อื่น ๆ ได้ ดังนั้น จึงได้นำข้าวโพดข้าวเหนียว 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ ไวโอ เล็ตไวท์ จากบริษัท สอทิเจนเนติกส์ รีเสิร์ช เอส อี เอเชีย จำกัด และพันธุ์สำลีอีสาน จากคณะ เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มาตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 6 ไพรเมอร์ คือ bnlg 1012 bnlg 1017 bnlg 1055 bnlg 1118 bnlg 1188 และ umc 1086 มาทดสอบความบริสุทธิ์ทาง พันธุกรรม โดยเฉพาะเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 2 พันธุ์ ในงานเพาะ สกัดดีเอ็นเอด้วยโซเดียม ไฮดรอกไซด์ (NaOH) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว (He *et al.*, 2009) การสกัดดีเอ็นเอด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกในการสกัดดีเอ็นเอได้อย่างรวดเร็ว เชื่อถือได้ และมีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB โดยนำไปอ่อนของข้าวโพด ข้าวเหนียวที่อายุ 2 สัปดาห์ ขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร วางลงในหลอด microtube ที่มี 0.5 M NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำปลายปิเปตบดให้ละเอียด บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลโดยใช้ เครื่องหมาย SSR ในอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 6 ไพรเมอร์

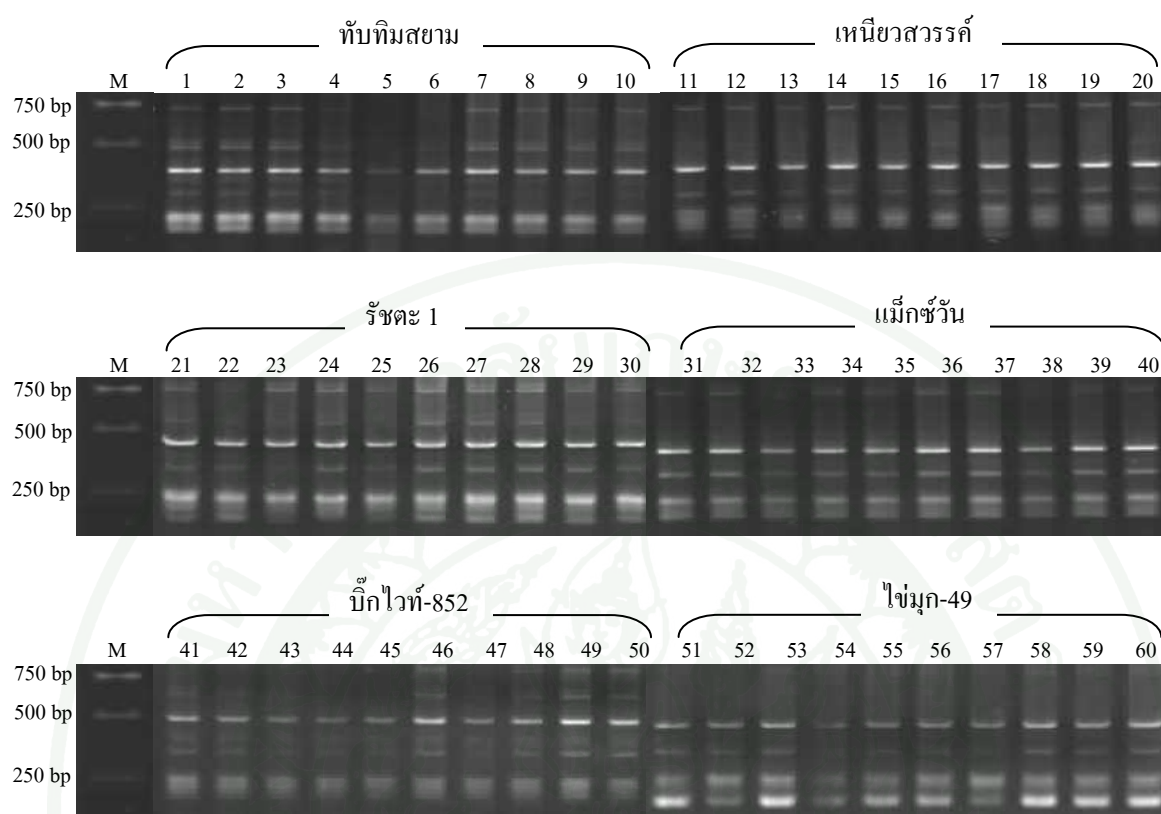
สามารถประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 2 พันธุ์ที่นำมาทดสอบ และมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับการทดสอบในข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ (ภาพที่ 8 และ 9)

ตารางที่ 15 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์แตกต่างกัน

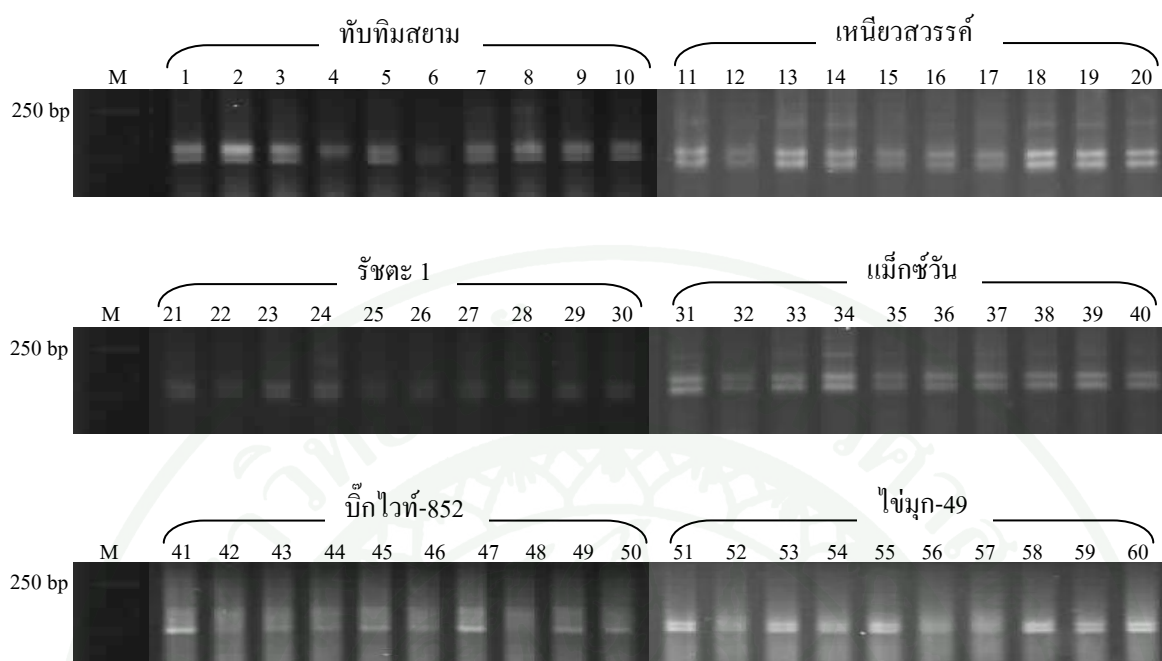
ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ	Band size (bp)
bnlg 1012	3	100-250
bnlg 1017	7	100-500
bnlg 1055	4	100-250
bnlg 1118	4	100-250
bnlg 1188	2	250-500
umc 1086	2	100-250



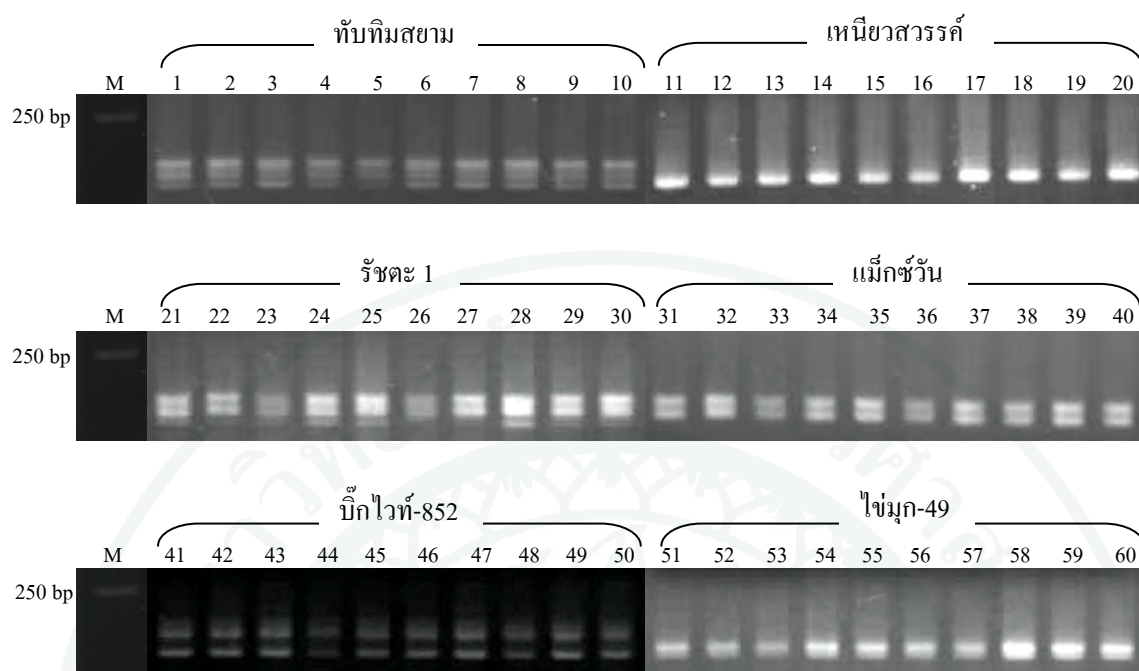
ภาพที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ bnlg 1012 เมื่อ M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐานที่มีหน่วยเป็นคู่เบส (bp) พันธุ์ทับทิมสยาม (1-10) เหนียวสวรรค์ (11-20) รัชตะ 1 (21-30) แม่กษัณห์ (31-40) บักไวท์-852 (41-50) และไข่มุก-49 (51-60)



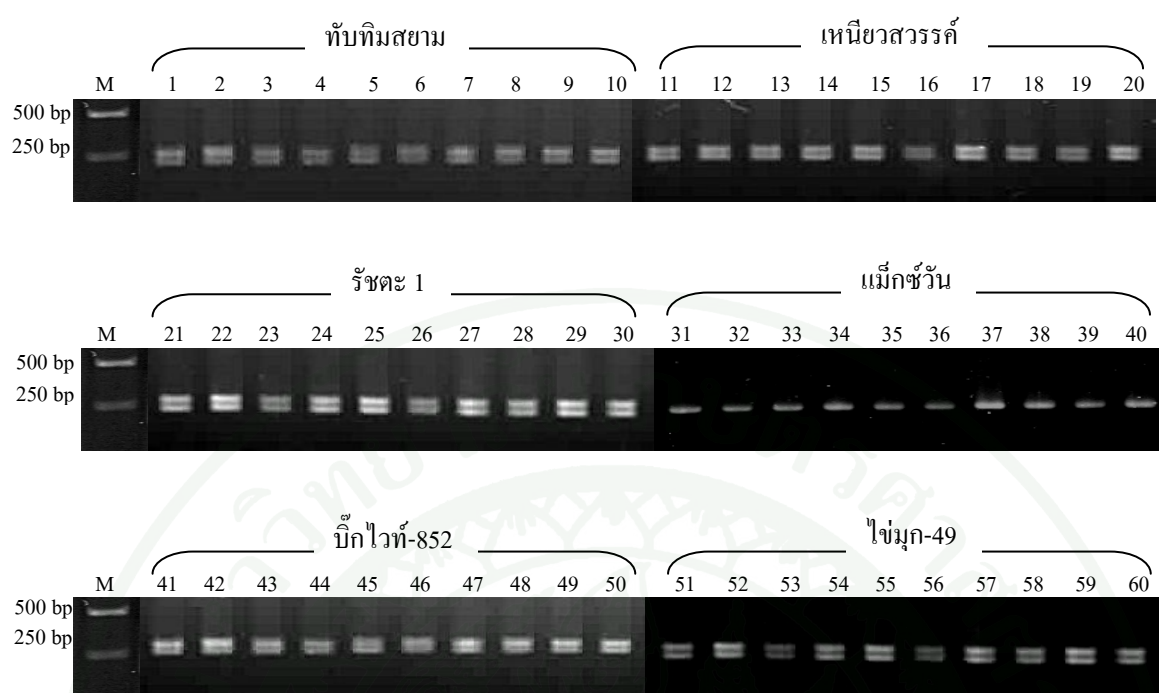
ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ bnlg 1017 เมื่อ M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐานที่มีหน่วยเป็นคู่เบส (bp) พันธุ์ทับทิมสยาม (1-10) เหนียวสวรรค์ (11-20) รัชตะ 1 (21-30) แม่กษัณ (31-40) บักไวท์-852 (41-50) และไข่มุก-49 (51-60)



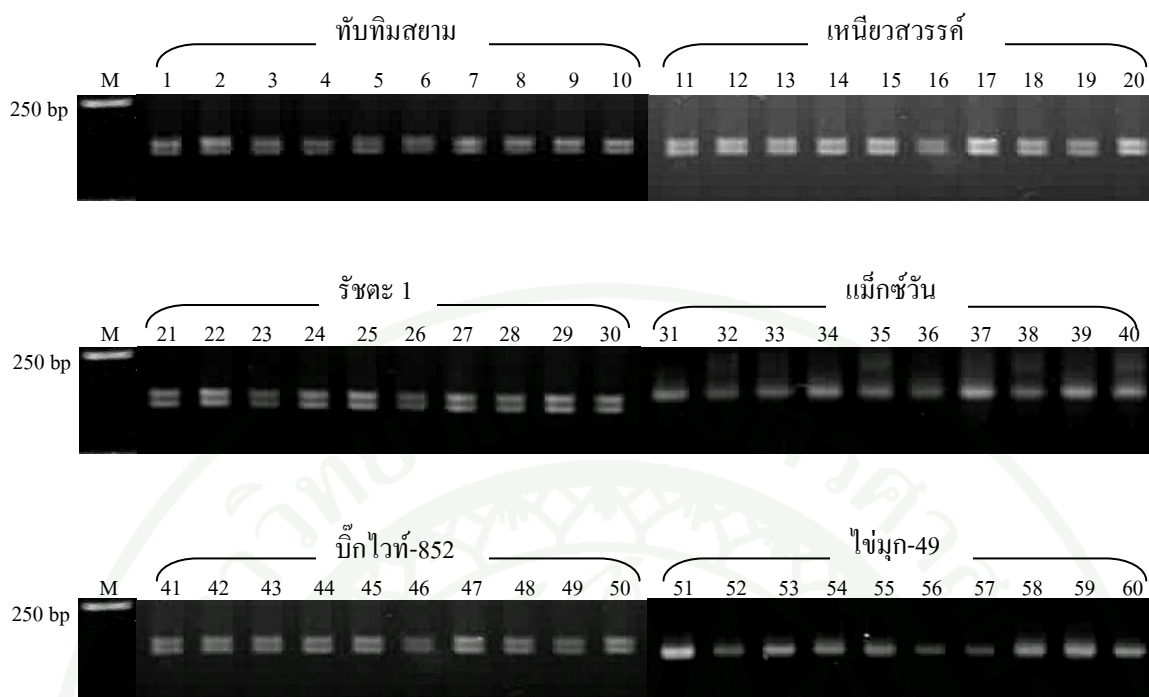
ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ bnlg 1055 เมื่อ M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐานที่มีหน่วยเป็นคู่เบส (bp) พันธุ์ทับทิมสยาม (1-10) เหนียวสวรรค์ (11-20) รัชตะ 1 (21-30) แม่กษัณน์ (31-40) ปักไต้หวัน-852 (41-50) และไข่มุก-49 (51-60)



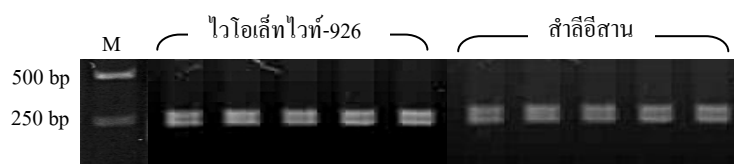
ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ bnlg 1118 เมื่อ M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐานที่มีหน่วยเป็นคู่เบส (bp) พันธุ์ทับทิมสยาม (1-10) เหนียวสวรรค์ (11-20) รัชตะ 1 (21-30) แม่กษัณ (31-40) บักไวท์-852 (41-50) และไข่มุก-49 (51-60)



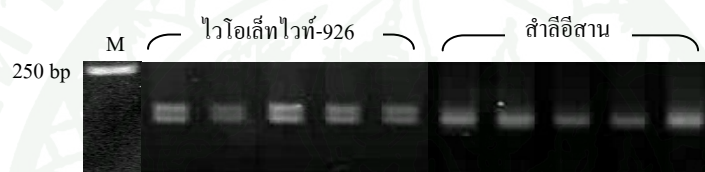
ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ bnlg 1188 เมื่อ M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐานที่มีหน่วยเป็นคู่เบส (bp) พันธุ์ทับทิมสยาม (1-10) เหนียวสวรรค์ (11-20) รัชตะ 1 (21-30) แม่กษัณน์ (31-40) บักไวท์-852 (41-50) และไข่มุก-49 (51-60)



ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ umc 1086 เมื่อ M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐานที่มีหน่วยเป็นคู่เบส (bp) พันธุ์ทับทิมสยาม (1-10) เหนียวสวรรค์ (11-20) รัชตะ 1 (21-30) แม่กษัณ (31-40) บักไวท์-852 (41-50) และไข่มุก-49 (51-60)



ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ไวโอเล็ตไวท์-926 และลำลืออีสาน ด้วยเครื่องหมาย SSR ไพรมเมอร์ bnlg 1188 โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เมื่อ M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐานที่มีหน่วยเป็นคู่เบส (bp)



ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ไวโอเล็ตไวท์-926 และลำลืออีสาน ด้วยเครื่องหมาย SSR ไพรมเมอร์ umc 1086 โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เมื่อ M คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐานที่มีหน่วยเป็นคู่เบส (bp)

2.2 การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย AFLP

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย AFLP แล้วนำข้อมูลที่คำนวณหาค่าดัชนีความเหมือนด้วยโปรแกรม NTSYS pc version 2.01e และแสดงผลออกมาในรูปของ dendrogram โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ คือ E-AGG:M-CAC, E-AGC:M-CAG และ E-AGG:M-CAG พบว่า สามารถสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน จากการทดลองพบข้อมูลแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 74 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 31 แถบ คิดเป็น 41.89 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ ดังนี้ ไพรเมอร์ E-AGG:M-CAC จำนวน 26 แถบ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 8 แถบ คิดเป็น 10.81 เปอร์เซ็นต์ คู่ไพรเมอร์ E-AGC:M-CAG จำนวน 21 แถบ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 12 แถบ คิดเป็น 16.22 เปอร์เซ็นต์ และคู่ไพรเมอร์ E-AGG:M-CAG จำนวน 27 แถบ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 11 แถบ คิดเป็น 14.86 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย AFLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน

EcoRI	MseI	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอเกิดความแตกต่าง	% polymorphism
E-AGG	M-CAC	26	8	10.81
E-AGC	M-CAG	21	12	16.22
E-AGG	M-CAG	27	11	14.86
รวม		74	31	41.89

2.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR และ AFLP

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้าวโพดข้าวเหนียว จำนวน 6 พันธุ์ เมื่อนำข้อมูลของขนาด และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากเครื่องหมาย SSR พบแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจาก ไพรเมอร์ทั้ง 6 ไพรเมอร์ ที่เกิดขึ้นทั้งหมดมี 22 แถบ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จาก เครื่องหมาย AFLP ที่ปรากฏในคู่ไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ มีทั้งหมด 74 แถบ เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมา วิเคราะห์และจัดกลุ่มโดยใช้ NTSYS-pc version 2.01 เพื่อคำนวณหาค่าความเหมือนและความ แตกต่างของข้าวโพดข้าวเหนียวจนครบทั้ง 6 พันธุ์ แล้วนำมาสร้างเป็นตารางดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลใน การสร้าง dendrogram ที่เหมาะสมเพื่อแสดงความสัมพันธ์ของ ข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ (ภาพที่ 10)

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficients) 0.51 ถึง 0.71 กลุ่มสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวมีความแปรปรวนทาง พันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอปานกลาง และสามารถจำแนกข้าวโพดข้าวเหนียวได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์รัชตะ 1 และไข่มุก-49 กลุ่มที่ 2 จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ แม่กษัณ และบักไวท์-852 ซึ่งเมื่อพิจารณาตามลักษณะทางสัณฐาน วิทยาประกอบ พบว่า

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์รัชตะ และไข่มุก-49 โดยมีค่าความเหมือน อยู่ที่ 0.66 ซึ่งในกลุ่มนี้จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน ได้แก่ วันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ วันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนแถวของเมล็ด

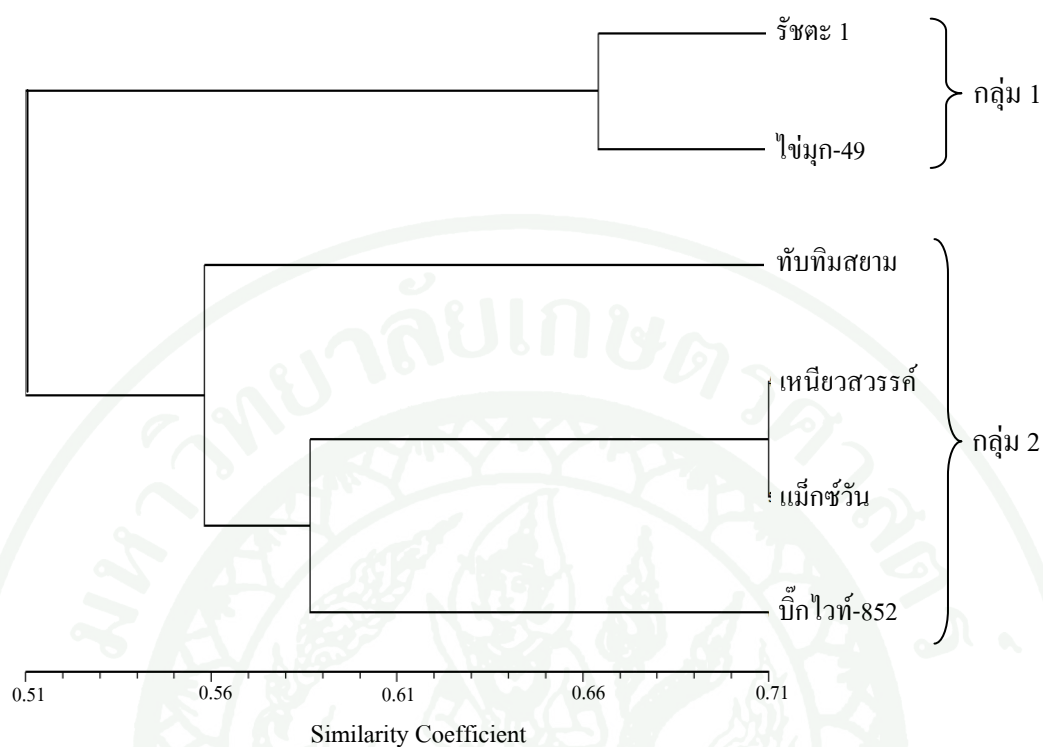
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ แม่กษัณ และบักไวท์-852 โดยข้าวโพดข้าวเหนียว 3 พันธุ์ คือ เหนียวสวรรค์ แม่กษัณ และบักไวท์-852 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง โดยเฉพาะพันธุ์เหนียวสวรรค์ และแม่กษัณ มีความใกล้ชิดทาง พันธุกรรมถึง 71 เปอร์เซ็นต์ และข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 2 พันธุ์ ยังมีความใกล้ชิดกับพันธุ์บักไวท์-852 ด้วย ในขณะที่พันธุ์ทับทิมสยามถึงแม้ว่าจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้แต่ก็ยังพบว่า มีความแตกต่างทาง

พันธุกรรม ซึ่งเมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า พันธุ์ทับทิมสยามมีวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ และวันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เร็วกว่าพันธุ์อื่น ๆ

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ และเครื่องหมาย AFLP โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ จากการวิเคราะห์โดยวิธี UPGMA จากข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 2 ชนิด สามารถจัดกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวได้เป็น 2 กลุ่ม ทั้งนี้การใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ ช่วยให้จัดกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะดีเด่น เพื่อใช้ประกอบการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ และยังใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พืช ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว (Dong *et al.*, 2007)

ผลของการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยากับเครื่องหมาย SSR และ AFLP จะเห็นได้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจจะแยกได้ไม่ชัดเจน เท่ากับการใช้เครื่องหมายโมเลกุล เนื่องจากสภาพแวดล้อมอาจจะมีผลกระทบต่อลักษณะสัณฐานวิทยาบางลักษณะ ดังนั้น ควรจะมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการจัดกลุ่ม เพื่อให้เกิดความแม่นยำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chowdhury *et al.* (2001) พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ไม่สามารถแยกกลุ่มถั่วเหลือง 47 สายพันธุ์ ได้ชัดเจนเท่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD การใช้เครื่องหมาย AFLP เป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดและพันธุ์ได้ (Rogowsky *et al.*, 1993) ซึ่งพบว่า ประสบความสำเร็จในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วพุ่ม (Coulibaly *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2002) ถั่วอะซูกิ (Xu *et al.*, 2000) และทานตะวัน (ลลิตา และคณะ, 2553) เป็นต้น สอดคล้องกับ Hung *et al.* (2012) พบว่า เครื่องหมาย SSR สามารถนำมาใช้ประเมินความบริสุทธิ์ของข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ จำนวน 22 สายพันธุ์ โดยมีค่า PIC 0.46 เมื่อจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.38 และสามารถแบ่งกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 22 สายพันธุ์ ได้เป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มี 1 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 10 กลุ่มที่ 2 มี 1 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 16 กลุ่มที่ 3 มี 8 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 3 waxy 5 waxy 22 waxy 21 waxy 8 waxy 9 waxy 12 และ waxy 18 กลุ่มที่ 4 มี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 2 waxy 15 waxy 20 และ waxy 17 กลุ่มที่ 5 มี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 4 waxy 6 waxy 7 และ waxy 11 และกลุ่มที่ 6 มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ waxy 1 waxy 14 และ waxy 19

ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากจะสามารถหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวได้แล้ว และในการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ สามารถจัดกลุ่มของข้าวโพดข้าวเหนียวได้ โดยพบว่า พันธุ์รัชตะ 1 และ ไช่มุก-49 ถึงแม้จะมีลักษณะทางการเกษตรที่คล้ายคลึงกัน แต่พบว่า พันธุ์รัชตะ 1 มีความสามารถในการให้ผลผลิตสูงกว่า พันธุ์ไช่มุก-49 ในขณะที่ พันธุ์ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ และเม็กช้วน มีความสามารถในการให้ผลผลิตสูงกว่า บิ๊กไวท์-852 ถึงแม้จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นในการนำข้าวโพดข้าวเหนียวมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ หากพันธุกรรมที่มาจากกลุ่มที่ต่างกัน แต่มีความใกล้ชิดกันระหว่างกลุ่มมาก จึงจะมีโอกาสประสบความสำเร็จ จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เครื่องหมาย SSR และ AFLP สามารถแบ่งกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามเนื่องจากจำนวนไพรเมอร์และพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ใช้ในการศึกษายังมีน้อย ดังนั้นการเพิ่มจำนวนไพรเมอร์และจำนวนพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวให้มากขึ้น จะสามารถทำให้แยกความแตกต่างของข้าวโพดข้าวเหนียวได้ดีขึ้น



ภาพที่ 10 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SSR และ AFLP และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA

สรุปผลการทดลอง

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ ได้แก่ วันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ วันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ ความกว้างฝัก จำนวนแถวของเมล็ด น้ำหนักฝัก น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยพันธุ์แม่ช้วนมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเด่นกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 5 พันธุ์ และจากการประเมินลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี principle component analysis พบว่า PC1 และ PC2 สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ ได้ 88.38 เปอร์เซ็นต์

2. จากการศึกษาความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวน 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ bnlg 1012 bnlg 1017 bnlg 1055 bnlg 1118 bnlg 1188 และ umc 1086 สามารถประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ ได้ โดยพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันภายในข้าวโพดข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์ และไพรเมอร์ bnlg 1188 สามารถแยกข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์แม่ช้วนออกจากข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 5 พันธุ์

3. การใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ bnlg 1012 bnlg 1017 bnlg 1055 bnlg 1118 bnlg 1188 และ umc 1086 และเครื่องหมาย AFLP จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ E-AGG:M-CAC E-AGC:M-CAG และ E-AGG:M-CAG ในการประเมินความสัมพันธ์ของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์ มีค่า Dice's similarity coefficients ระหว่าง 0.51 ถึง 0.71 และเมื่อนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวทั้ง 6 พันธุ์ ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ พันธุ์รัชตะ 1 และไข่มุก-49 ในขณะที่พันธุ์ทับทิมสยาม เหนียวสวรรค์ แม่ช้วน และบี๊ไวท์-852 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิตติ บุญเลิศนิรันดร์, ระวีวรรณ สุวรรณศรี และ สุชาดา บุญเลิศนิรันดร์. 2554. เสถียรภาพผลผลิตของข้าวโพดข้าวเหนียว 12 พันธุ์. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี 14(2): 7-12.

กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2554. **ปรับปรุงพันธุ์ : ความหลากหลายของแนวคิด**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จิรพงศ์ ไกรรินทร์, วราภรณ์ วงศ์บุญ, กิจติพงษ์ เพ็งรัตน, สงวน เทียงดีฤทธิ์, พิภูล ลีลาภู และ กัลยา สานเสน. 2551. การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและมีคุณภาพเมล็ดเหมือนข้าวดอกมะลิ 105 โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย, น. 187-207. ใน **การประชุมข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2552 ณ โรงแรม ชีบริท จอมเทียน พัทยา, ชลบุรี**.

ชูศักดิ์ จอมพุท. 2542. ข้าวโพด, น. 30-49. ใน **พืชเศรษฐกิจ**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นฤมล เข้มกลัดเงิน, โชคชัย เอกพัฒน์วรรณ และ วิภา หงส์ตระกูล. 2547. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการตรวจสอบการปลอมปนของเมล็ดข้าวโพดลูกผสม. โครงการงานอุตสาหกรรมสำหรับปริญญาตรี. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นุชจรี วัชรวงษ์ไพบูลย์. 2550. การพัฒนาและจำแนกลักษณะดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด **Microsatellite** ในแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) และการวิเคราะห์เปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประสาน สืบสุข, ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, กุหลาบ คงทอง, กิ่งกาญจน์ พิษณุกุล และ พิเชษฐ์ กรุดลอยมา. 2554. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพดทนแล้ง, น. 454-459. ใน รายงานการประชุมวิชาการข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35. วันที่ 24-27 พฤษภาคม 2554 ณ โรงแรมมารวยการ์เด็น, กรุงเทพฯ.

ประภา กันธสากุล, สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์ และ จินดา จันทร์อ่อน. 2535. ส่วนประกอบบางอย่างของข้าวโพดฝักสด, น. 1-3. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาข้าวโพดหวาน. ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, เชียงใหม่.

พัชรินทร์ ตัญญา, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, ชีรยุทธ ผู้จินดา และ อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2544. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์ไทยและเกาหลีโดยเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR), น. 100-104. ใน รายงานการประชุมวิชาการ พันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พลัง สุริหาร และ กมล เลิศรัตน์. 2550. การทดสอบพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวหลายสภาพแวดล้อมในประเทศไทย. แก่นเกษตร 35(4): 469-476.

ลลิตา อาจสูงเนิน, สนธิชัย จันทร์เปรม และ บุษพา คงสมัย. 2553. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล AFLP. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41(2): 175-182.

วรารณ แสงทอง, ศุภางค์ ทิพย์พิทักษ์, วัฒวรรณ ศิริพูนวิวัฒน์, ประทีป พินตานนท์, สมเกียรติ วัฒนกิจรานต์ และ นลินี รุ่งเรืองศรี. 2550. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 26: 96-110.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2542. เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืชไร่. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วันชัย เย็นเพชร, ธาณี ศรีวงศ์ชัย, มณฑิกานันท์ สงบจิต, ศานนท์ สุขสถาน, สรรเสริญ จำปาทอง และ ชบา จำปาทอง. 2554. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดสายพันธุ์แท้ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR, น. 70-76. ใน รายงานการประชุมวิชาการข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35. วันที่ 24-27 พฤษภาคม 2554 ณ โรงแรมมารวยการ์เด็น, กรุงเทพฯ.

วีระเดช โชนสันเทียะ และ กนกพร ไตรวิทยากร. 2548. การหารูปแบบพันธุกรรมที่จำเพาะต่อปริมาณแป้งในมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ศิริกัญญา ม่วงสอน. 2549. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ส่งเสริมภาคใต้โดยใช้เทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR). วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุกัญญา พรเสนา และ ปรียา พวงสำลี. 2547. การศึกษาเบื้องต้นการกลายพันธุ์และการหาเครื่องหมายโมเลกุลของยีนความหอมในข้าว. โครงการวิจัยสำหรับปริญญาตรี RPUS 1 ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5(2): 37-59.

แสงแข น้าวานิช, ชฎาภาส จิตต์เลขา และ วิบูลย์ จงรัตนเมธิกุล. 2554. การประเมินเบื้องต้นของความเสียหายจากหนอนเจาะลำต้นข้าวโพดและหนอนเจาะฝักข้าวโพดในข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้, น. 276-281. ใน รายงานการประชุมวิชาการข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35. วันที่ 24-27 พฤษภาคม 2554 ณ โรงแรมมารวยการ์เด็น, กรุงเทพฯ.

ลำราญ ศรีชมพร, ชำรงศิลป์ โพธิ์สูง และ ชฎามาศ จิตต์เลขา. 2553. ศักยภาพการให้ผลผลิตและคุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวเพื่อการค้าในประเทศไทย, น. 500-507. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48. วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2553 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรรถัน มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Cheorospondias asillaris* leaves. **Biotech. Biodiv. Lett.** 2: 19-24.

Ashok, D. and P. Vilas. 2005. Identification of cotton hybrid through the combination of PCR based RAPD, ISSR and microsatellite markers. **J. Plant Biochem. Biot.** 14: 53-55.

Azanza, F., B.P. Klein and J.A. Juvik. 1996. Sensory characterization of sweet corn lines differing in physical and chemical composition. **Food Sci.** 61: 253-257.

Banisetti, K. 2012. Identification of candidate gene-based SSR markers for lysine and tryptophan metabolic pathways in maize (*Zea mays*). **Plant Breeding** 131(1): 20–27.

Beck, D.F., J. Betran, M. Banziger, M. Wilcox and G.O. Edmeades. 1997. From landraces to hybrids: Strategies for the use of source populations and lines in the development of drought tolerant cultivars, pp. 369-382. In G.O. Edmeades. (eds). **Developing drought tolerant and low N tolerant maize.** CIMMYT/UNDP, Mexico D.F.

Billotte, N., A.M. Risterucci, E. Barcelos, J.L. Noyer, P. Amblard and F.C. Baurens. 2001. Development, characterization and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis quineensis* Jacq.) microsatellite markers. **Genome** 44: 413-425.

- Brown, S.M., A.K. Szew-McFadden and S. Kresovich. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis, pp. 147-156. *In* P.P. Jauhar (ed.). **Method of Genome Analysis in Plant**. Department of Agriculture : Agricultural Research Service, Northern Crop Science Laboratory, North Dakota State University, Fargo, North Dakota.
- Choukan, R. and M.I. Warburton. 2005. Use of SSR data to determine relationships among early maturing Iranian maize inbred lines. **Maydica** 50: 163-170.
- Coulbaly, S., R.S. Pasquet, R. Papa and P. Gepts. 2002. AFLP analysis of the phonetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. **Theor. Appl. Genet.** 104: 358-366.
- Creech, R.G. 1965. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. **Genetics** 52: 1175-1186.
- Della Vecchia, P.T., C.A. R. Dasilva and P. Terenciano-Sobrinho. 1998. Use of molecular marker technique in seed testing by Brazilian seed company. **Sci. Agri.** 55: 79-82.
- Deniel, I.O., J.A. Adetumbi, O.O. Oyelakin, S.A. Olakojo, M.O. Ajala and S.O. Onagbesan. 2012. Application of SSR markers for genetic purity analysis of parental inbred lines and some commercial hybrid maize (*Zea mays* L.). **Am. J. Exp. Agr.** 2(4): 597-606.
- Dong, G.J., G.S. Liu and K.F. Li. 2007. Studying genetic diversity in the germplasm of confectionary sunflower (*Helianthus annuus* L.) in China based on AFLP and morphological analysis. **Russ. J. Genet.** 43(6): 627-635.
- Ferguson, V. 1994. High amylase and waxy corn, pp. 56-77. *In* **Specialty Corns**. A. R. Hallauer (ed.). CRC. Press.Inc. Florida, USA.

- Gianfranceschi, L., N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc and C. Gessler. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theor. Appl. Genet.** 96: 1069-1076.
- Hung, N.T., N.T. Huyen, N.V. Loc and B.M. Cuong. 2002. The application of SSR molecular indicator to assess the purity and genetic diversity of waxy corn inbred lines. **J. ISSAAS.** 18(2): 45-54.
- ISTA. 2010. **International Rules for Seed Testing.** Bassersdorf, Switzerland.
- Karakousis, A., A. R. Barr, K. J. Chalmers, G. A. Ablett, T. A. Holton, R. J. Henry, P. Lim and P. Langridge. 2003. Potential of SSR markers of plant breeding and variety identification in Australian barley germplasm. **Aust. J. Agr. Res.** 54: 1197-1210.
- Kate-ngam, S., J.M. Crane and S.J. Knapp. 2002. The development of genetic map for meadowfoam comprised of amplified fragment length polymorphisms. **Theor. Appl. Genet.** 104: 92-96.
- Legesse, B.W. 2007. Genetic diversity of maize inbred lines revealed by AFLP markers. **Afr. Crop Sci.** 8: 649-653.
- Li, W., D.F. Zhang, Y.M. Wei, Z.H. Yan and Y.L. Zheng. 2006. Genetic diversity of *Triticum turgidum* L. based on microsatellite markers. **Russ. J. Genet.** 42(3): 311–316.
- Marsh, W.M. and J.M. Jr. Grossa. 1996. **Environmental Geography Science, Land Use and Earth Systems.** John Wiley and Sons Inc., Canada.
- McCouch, S. and S.D. Tanksley. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphisms in rice breeding and genetic, pp. 109-133. *In* **Rice biotechnology.** Khush, G.S. and Toenniessen, G.H. (eds.) CAB International. Wallingford. Oxon, UK.

McDonald, M.B. 1995. Genetic purity: from protein electrophoresis to RAPDs, pp. 256-271.

In The fiftieth annual corn & sorghum industry research conference, USA.

Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia and T. Sasaki. 1997.

Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants.

Mol. Breed. 3: 87-103.

Morgante, M. and A.M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant J.** 3: 175-182.

Neuffer, M.G., L. Jones and M.S. Zuber. 1968. **The mutants of maize.** The Crop Science Society of America, USA.

Noli, E., S. Conti, M. Maccaferri and M.C. Sanguineti. 1999. Molecular characterization of tomato cultivars. **Seed Sci. & Technol.** 27: 1-10

Paterson, A.H. 1996. **Genome Mapping in Plants.** Academic Press, Inc., San Diego, California, USA.

Patricia, S. R., C. L. L. Tuli, L. T. Rodrigo, S. C. B. Gláucia, A. B. José and E. Márcio. 2004.

Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). Available Source:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/9>, July 14, 2004.

Powell, W., G.C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Sci.** 1: 215-222.

- Purba, A.R., J.L. Noyer, L. Baudouin, X. Perrier, S. Hamon and P.J.L. Lagoda. 2000. A new aspect of genetic diversity of Indonesian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isoenzyme and AFLP markers and its consequences for breeding. **Theor. Appl. Genet.** 101: 956–961.
- Qu, C., F. Fu, L. Liu, K. Lu, J. Huang, X. Liu, J. Xie, L. Chen, R. Wang, Z. Tang and J. Li. 2012. Simple sequence repeat (SSR) markers analysis of genetic diversity among *Brassica napus* inbred lines based on correlation between seed quality traits and seed pigments content. **Afr. J. Biot.** 11(33): 8202-8211.
- Ridout, J. and P. Donini. 1999. Use of AFLP in cereals research. **Trends Plant Sci.** 4(2): 76-79.
- Rogowsky, P.M., M.E. Sorrels, K.W. Shepherd and P. Langride. 1993. Characterization of wheat-rye recombinants with RFLP and PCR probes. **Theor. Appl. Genet.** 85: 1023-1028.
- Rohlf, F.I. 1997. **NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.00.** Exeter Software, Setauket, N.Y.
- Selvakumar, P., R. Ravikesavan, A. Gopikrishnan, K. Thiyaagu, S. Preetha and N. M. Boopathi. 2010. Genetic purity analysis of cotton (*Gossypium* spp.) hybrids using SSR markers. **Seed Sci. & Technol.** 38: 358-366.
- Simla, S., K.Lertrat and B. Suruharn. 2010. Carbohydrate characters of six vegetable waxy corn varieties as affected by harvest time and storage duration. **Asian J. Plant Sci.** 9(8): 463-470.
- Smith, J. S. C. and J. C. Register. 1998. Genetic purity and testing technology for seed quality: a company perspective. **Seed Sci. Res.** 8: 285-293.

- Struss, D. and J. Plieske. 1998. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. **Theor. Appl. Genet.** 97: 308-315.
- Tanksley, S.D., N.D. Young, A.H. Paterson and M.W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. **Biotechnology** 7: 257-264.
- Tara, T. V., J. Peng and S. K. St. Martin. 1997. Using AFLP markers to determine the genomic contribution of parents to populations. **Crop Sci.** 37: 1370-1373.
- USDA. 1994. **The USDA-ARS Plant Genome Research Programs.** United States Department of Agriculture, Washington D.C, USA.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijmans, T.V. Lee, M. Hormes, A. Frijters, T. Plot , J. Peleman, M. Kuiper and M. Zebeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414.
- Walter, T.W., U. Posluszny and P. G. Kevan. 1989. Isoenzyme analysis of the grape (*Vitis*). I.A practical solution. **Can. J. Bot.** 67: 2894-2899.
- Weathewax, F. 1992. A rare carbohydrate in waxy maize. **Genetics** 7: 568.
- Wilaiwan, P., S. Wayupab, P. Sorawat, T. Manutheerapan and B. Poosri. 2006. Genetic base for characteristic record of local and introduced waxy corn varieties, pp. 30-37. *In* **Proceeding of 31st National Corn and Sorghum Meeting.** May 11-15, 2006, Rose garden A-pirm resort, Nakhon Pathom.
- Winter, P., T. Pfaff, S. M. Udupa, B. Huttel, P. C. Sharma, S. Sahi, R. Arreguin-Espinoza, F. Weigand, F. J. Muehlbauer and G. Kahl. 1999. Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. **Mol. Gen. Genet.** 262: 90-101.

- Wu, M. 2010. Rapid and reliable purity identification of F1 hybrids of maize (*Zea mays* L.) using SSR markers. **Plant Breeding** 4(3): 381-384.
- Xu, R.Q., N. Tomooka and D.A. Vaughan. 2000. AFLP markers for characterizing the azuki bean complex. **Crop Sci.** 40: 808-815.
- Yashitola, J., T. Thirumurugan, R. M. Sundaram, M. K. Naseerullah, M. S. Ramesha, N. P. Sarma and R. V. Sonti. 2002. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. **Crop Sci.** 42: 1369-1373.
- Yoon, M. S., J. Lee, H. J. Back, E. G. Cho and C. Y. Kim. 2002. **Relationship of *Vigna angularis* (Wild.) Ohwi & Ohishi and its relative from Korea based on AFLP markers.** Available Source: <http://www.botany2002.org/section12/abstracts/40.html>, June 10, 2002.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ และ
วันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์

Source of variation	df	Mean Squares	
		วันออกดอกตัวผู้ 50 %	วันออกไหม 50 %
Replications	3	0.41	0.48
Treatments	5	24.42**	19.47**
Error	15	0.66	1.01
Total	23		
C.V. (%)		1.72	2.03

หมายเหตุ ** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์
($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูงต้น และความสูงฝักของข้าวโพด
ข้าวเหนียว 6 พันธุ์

Source of variation	df	Mean Squares	
		ความสูงต้น	ความสูงฝัก
Replications	3	1.04	1.82
Treatments	5	20.64**	4.57 ^{ns}
Error	15	2.70	4.43
Total	23		
C.V. (%)		0.91	2.23

หมายเหตุ ^{ns} = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์
($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวฝัก ความกว้างฝัก และจำนวนแถวของเมล็ดของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์

Source of variation	df	Mean Squares		
		ความยาวฝัก	ความกว้างฝัก	จำนวนแถวของเมล็ด
Replications	3	5.79	0.03	0.35
Treatments	5	6.55 ^{ns}	0.20**	8.46**
Error	15	81.77	0.01	0.61
Total	23			
C.V. (%)		16.40	2.31	5.58

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักฝัก น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก และเปอร์เซ็นต์กะเทาะของข้าวโพดข้าวเหนียว 6 พันธุ์

Source of variation	df	Mean Squares		
		น้ำหนักฝัก	น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก	เปอร์เซ็นต์กะเทาะ
Replications	3	3.78	1.86	1.41
Treatments	5	289.38**	257.77**	4.02 ^{ns}
Error	15	7.05	9.49	2.55
Total	23			
C.V. (%)		2.25	2.92	1.79

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ($P < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 5 ลำดับเบสของไพรเมอร์ จำนวน 15 ชนิด ที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย SSR

ลำดับที่	ไพรเมอร์	Forward sequence	Reverse sequence
1	bnlg 1007	5'-GATGCAATAAAGGTTGCCGT-3'	5'-ATGTGCTGTGCCTGCCTC-3'
2	bnlg 1012	5'-GAGTGAGCGTGCGGAGTC-3'	5'-AACAGGCCAAACTCCTCCTC-3'
3	bnlg 1017	5'-ATTGGAAGGATCTGCGTGAC-3'	5'-CAGCTGGTGGACTGCATCTA-3'
4	bnlg 1019	5'-ACCATAGTTGGACGGACCAC-3'	5'-ACCACAACACAGACGAGCAC-3'
5	bnlg 1022	5'-GTGTTGTCGATCCACTCCCT-3'	5'-GCAAAGATCTGTGAGGGGAC-3'
6	bnlg 1028	5'-AGGAAACGAACACAGCAGCT-3'	5'-TGCATAGACAAAACCGACGT-3'
7	bnlg 1055	5'-GCTGGATGGCAGGTACAGAG-3'	5'-TGCAATGGAGAAGCAACAAG-3'
8	bnlg 1118	5'-CAGAGTTGATGAACTGAAAAAGG-3'	5'-CTCTTGCTTCCCCCTAATC-3'
9	bnlg 1188	5'-ATTAAGTAAATGACTATCTAGTGTTCG-3'	5'-AATAGCAAGGCATCAGCCAT-3'
10	bnlg 1325	5'-CTAAATGCGCAGCAGTAGCA-3'	5'-TGCTCTGCAACAACCTTGAGG-3'
11	bnlg 1347	5'-TTGCAATCACACAGGTGGTT-3'	5'-GTGGTCACGACGAAATCCTT-3'
12	bnlg 1372	5'-AGCGGTGCTCAAATAGGAG-3'	5'-CGCCGGCTTCCCTCAC-3'
13	umc 1005	5'-TTTGATCACAGACTTATCCCTGTT-3'	5'-CTAATGACGAACCCCTAAAAGGT-3'
14	umc 1014	5'-GAAAGTCGATCGAGAGACCTG-3'	5'-CCCTCTCTTCAACCCCTCCTT-3'
15	umc 1086	5'-CATGAAAGTTTCCTGTGCAGATT-3'	5'-GGGCAACTTTAGAGGTCGATTATT-3'

ที่มา: <http://www.maizegdb.org>

ตารางผนวกที่ 6 ข้อมูลที่แปลงเป็นระบบไบนารีในการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยเครื่องหมาย SSR จำนวน 6 ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ทับทิม สยาม	รัชตะ 1	แม่กษัณ	เหนียว สวรรค์	ไข่มุก-49	บิกไวท์-852
bnlg 1012	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	0	0
	1	0	0	1	0	0
bnlg 1017	0	1	0	1	1	0
	1	0	1	0	0	1
	1	1	1	0	0	1
	0	0	0	1	0	0
	1	1	1	1	1	0
	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	1	1	0
bnlg 1055	1	1	1	0	0	0
	0	0	0	1	1	1
	1	0	1	1	1	0
	1	1	0	0	0	1
	1	1	0	0	0	1
bnlg 1118	1	1	0	0	0	1
	1	1	1	1	1	0
	1	1	1	0	1	1
	0	0	0	0	0	1
bnlg 1188	1	1	1	1	1	1
	1	1	0	1	1	1
umc 1086	1	1	1	1	1	1
	1	1	0	1	0	1

หมายเหตุ 1 = ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

0 = ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ตารางผนวกที่ 7 ข้อมูลที่แปลงเป็นระบบไบนารีในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม
ของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยเครื่องหมาย AFLP จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์

คู่ไพรเมอร์	อัลลีล	ทับทิม	รัชตะ 1	แม่กษัณ	เหนียว	ไข่มุก-49	บี๊ไวท์-852
		สยาม			สวรรค์		
E-AGG:	a1	1	0	0	0	1	1
M-CAC	a2	1	1	1	1	0	1
	a3	1	1	1	1	1	0
	a4	1	0	1	1	1	1
	a5	1	0	1	1	1	1
	a6	1	1	0	1	1	1
	a7	0	0	1	1	0	1
	a8	0	1	0	1	1	0
E-AGC:	a1	0	1	1	1	0	0
M-CAG	a2	1	1	1	0	1	1
	a3	0	0	1	1	0	1
	a4	1	1	0	0	1	0
	a5	1	0	1	1	1	1
	a6	0	1	1	0	0	0
	a7	0	0	0	0	1	1
	a8	0	1	0	0	1	0
	a9	0	1	1	1	1	1
	a10	1	0	0	0	0	0
	a11	0	1	0	1	1	0
	a12	0	0	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ 7 (ต่อ)

คู่มือเมอร์	อัลลีล	ทับทิม	รัชตะ 1	แม่กษัตริย์	เหนียว	ไข่มุก-49	บิกไวท์-852
		สยาม			สวรรค์		
E-AGG:	a1	1	1	0	0	1	0
M-CAG	a2	1	0	1	0	0	1
	a3	0	1	1	0	0	0
	a4	1	0	0	0	1	0
	a5	0	1	0	0	1	0
	a6	0	1	1	1	1	1
	a7	1	0	0	0	0	0
	a8	0	1	0	1	1	0
	a9	1	0	1	1	0	1
	a10	0	1	0	0	0	0
	a11	1	0	1	1	1	1

หมายเหตุ 1 = ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

0 = ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวนิศากร กาญจนเกษร
เกิดวันที่	4 สิงหาคม พ.ศ. 2530
สถานที่เกิด	อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-