



## บทความวิจัย

การศึกษาสมบัติทางด้านความหนืดแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวและค้นหาสนิปส์ของยีน  
Waxy และ Dull-1 ในข้าวโพดข้าวเหนียวธีรวุฒิ วงศ์วรรณ์<sup>1\*</sup> วรชมล มงคล<sup>2</sup> ฉลอง เกิดศรี<sup>2</sup> มณีรัตน์ รุจิณรงค์<sup>3</sup> และ ยິงยศ พาลูกา<sup>1</sup><sup>1</sup>ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40000<sup>2</sup>ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท อำเภอสรรพยา จังหวัดชัยนาท 17150<sup>3</sup>กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10900

ข้อมูลบทความ	บทคัดย่อ
Article history	การประเมินสมบัติทางด้านความหนืดของฟลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว (Rapid Visco Analyzer หรือ RVA) จากฟลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียว 30 พันธุ์/สายพันธุ์/ลูกผสม ประกอบด้วย ข้าวโพดข้าวเหนียว สายพันธุ์แท้ (Inbred lines) ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสม (Hybrids) และข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้า (Commercial hybrids) ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ พบว่าฟลาวร์ที่ได้จากข้าวโพดข้าวเหนียว สายพันธุ์แท้ WKA005 WKNN016 YNB01 และ WPK018 มีค่าความหนืดสูงสุด การแตกตัวของเม็ดแป้ง และค่าการคืนตัวน้อยกว่าพันธุ์เปรียบเทียบ ในขณะที่ฟลาวร์ที่ได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสม UT1122 UT111 และ UT122 มีค่าการคืนตัวสูงกว่าพันธุ์เปรียบเทียบ เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Waxy และ Dull ซึ่งแปลงข้อมูลเป็นแอนไอโซม GBSSI เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อะไมโลส และแอนไอโซม SSIII ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมหลักการต่อสายอะไมโลเพคตินในเม็ดแป้ง จากผลงานวิจัยนี้สามารถตรวจพบความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Waxy 20 ตำแหน่ง แต่ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนมไทป์กับลักษณะความหนืด ในขณะที่การวิเคราะห์ความผันแปรลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เป็น เอ็กซอนของยีน Dull มีตำแหน่งความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสนิปส์จำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ A28G C34T A55G G130T G213A A430C และ T480C เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอน มาถอดรหัสกรดอะมิโน พบว่ามีตำแหน่งความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสนิปส์ยีน Dull ตำแหน่งที่ G130T G213A และ T480C ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 3 ตำแหน่ง และมีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนืด ดังนั้น ยีน Dull สามารถนำไปสร้างเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับนำไปใช้ในการช่วยคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะคุณภาพด้านการบริโภคดีดี
รับ: 25 ตุลาคม 2564	
แก้ไข: 6 เมษายน 2565	
ตอบรับการตีพิมพ์: 8 เมษายน 2565	
ตีพิมพ์ออนไลน์: 22 มิถุนายน 2565	
คำสำคัญ	
ข้าวโพดข้าวเหนียว	
สมบัติทางด้านความหนืด	
สนิปส์	

## บทนำ

ข้าวโพดข้าวเหนียวมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่เหนียวนุ่มซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะจึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ดังนั้นในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์นอกจากจะเน้นการเพิ่มผลผลิตแล้ว คุณภาพด้านการบริโภคจึงเป็นเกณฑ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งด้วย การคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดีนั้นสามารถทำได้โดยการวัดด้วยประสาทสัมผัส โดยวิธีการชิมซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันแพร่หลาย ผู้ชิมทั้งจากผู้บริโภคทั่วไป หรือผู้ที่มีความชำนาญ เป็นผู้ให้คะแนนการชิมค่า

ความเหนียวนุ่ม ซึ่งอาจเกิดความลำเอียงจากทักษะการประเมินและความชอบส่วนบุคคล ทำให้ผลการชิมมีความแปรปรวนในการทดสอบได้ จึงไม่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของความเหนียวนุ่มได้อย่างชัดเจน ปัจจุบันมีการนำเครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว (Rapid Visco Analysis, RVA) มาใช้ประเมินคุณภาพด้านการบริโภคเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ ในการประเมินคุณภาพสำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานของลักษณะประจำพันธุ์ของสายพันธุ์ข้าวด้วยเครื่อง RVA พบว่าสายพันธุ์ข้าวที่พบค่าความหนืดสูงสุด (peak

\*Corresponding author

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

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

viscosity) และค่าการแตกตัวของเม็ดแป้ง (breakdown) ที่น้อยกว่า มีผลทำให้ความเหนียวน้อยกว่า และสายพันธุ์ข้าวที่มีค่าการคืนตัวของแป้ง (setback) มากกว่า หลังการหุงต้มทำให้ข้าวสุกมากกว่า และต้องใช้เวลาในการหุงต้มมากขึ้น (Sudtasarn & Kenlueam, 2013) การควบคุมองค์ประกอบของแป้งและการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้วยความหนืดของข้าวโพด ข้าวเหนียวเป็นผลจากอิทธิพลของยีน ได้แก่ amylose extender (ae1) brittle endosperm2 (bt2) shrunken1 (sh1) shrunken2 (sh2) sugary (su1) และ GBSSI (wx1) (Wilson et al., 2004) การกลายพันธุ์ของยีน Waxy ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เม็ดแป้งในข้าวโพดข้าวเหนียวส่งผลให้การสังเคราะห์อะไมโลสลดลง ในเม็ดแป้งจึงประกอบด้วยอะไมโลเพคตินร้อยละ 99 ทำให้ข้าวโพดข้าวเหนียวมีลักษณะเหนียวนุ่ม (Klosgen et al., 1986) การกลายพันธุ์ของยีน Dull มีผลทำให้โครงสร้างอะไมโลเพคตินเปลี่ยนแปลง (Fujita et al., 2007) โมเลกุลของอะไมโลเพคตินมีผลต่อการคืนตัวของแป้งของข้าวและเพิ่มการทนต่อการย่อย (Lapkhoksung, 2012) งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหาความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเดียว (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน และส่งผลถึงการแสดงออกของยีนและการทำงานของโปรตีนที่มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับสมบัติทางด้านความหนืด เพื่อการนำมาสู่การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิปส์สำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการช่วยคัดเลือกที่แม่นยำ และช่วยร่นระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาสมบัติทางด้านความหนืดของฟลัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวและความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Waxy และ Dull สำหรับนำไปใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีประสิทธิภาพ ให้ได้คุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวตามต้องการอย่างแม่นยำ

## อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### 1. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของฟลัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียว

#### 1.1 การเตรียมฟลัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียว

บดเมล็ดแห้งของข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 30 พันธุ์/สายพันธุ์/ลูกผสม ประกอบด้วย ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ (Inbred lines) ลูกผสม (Hybrids) และลูกผสมพันธุ์การค้า (Commercial hybrids) จำนวน 14 สายพันธุ์ 11 ลูกผสม และ 5 พันธุ์ ตามลำดับ แล้วร่อนผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 100 เมช (mesh)

#### 1.2 วิเคราะห์คุณสมบัติด้านความหนืดของฟลัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียว

วัดความหนืดของแป้งด้วยเครื่อง RVA (Rapid Visco Analysis 4500) โดยดำเนินการตามวิธีการ Newport Scientific method (Newport Scientific, 1997) ทำการบันทึกค่าต่าง ๆ ดังนี้ ค่าความ

หนืดสูงสุด (peak viscosity) ค่าแตกตัวของเม็ดแป้ง (breakdown) ค่าการคืนตัวของแป้ง (setback) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 2. คันทาสนิปส์ของยีน GBSSI และ Dull ในข้าวโพดข้าวเหนียว

#### 2.1 การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

เมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียว 30 พันธุ์/สายพันธุ์/ลูกผสม จากนั้นทำการคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ตัวอย่างละ 20 เมล็ด นำมาเพาะให้งอกเป็นต้นกล้า ตัดใบอ่อนมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในโถงที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผงแล้วใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA extraction GF-1, Vivantis) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้การวัดการดูดกลืนแสง นำสารสกัดดีเอ็นเอมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/ $\mu$ l) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ด้วยไพรเมอร์ S3F (5'-GTTGACCACCCACTGTTCT-3') / S5R (5'-AGACAAGCAAGCAGCTACA-3') (Bao et al., 2012) และไพรเมอร์ Du6F (5'-TGATTGGTGGTTTGAGATG-3') / Du8R (5'-TCCGAGAAAACGAAGTCCA-3') (ออกแบบสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้) ซึ่งจำเพาะกับดีเอ็นเอของยีน GBSSI และ Dull ตามลำดับ ตรวจสอบผลผลิตโดยใช้เจลอะกาโรส หลังจากนั้นทำซันดิเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq (illumine) ด้วยเทคนิค BT-Sequencing (barcode tagged sequencing base on next generation sequencing) ตามกรรมวิธีของบริษัท Celemics ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี

#### 2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

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

## ผลการวิจัย

### 1. สมบัติทางด้านความหนืดของฟลัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียว

ปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์ในการจัดแบ่งลักษณะความเหนียวนุ่มของข้าวโพดข้าวเหนียว งานวิจัยนี้จึงใช้ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ลูกผสมเพื่อการค้า ซึ่งเป็นที่ยอมรับและนิยมบริโภคมาเป็นตัวเปรียบเทียบ เมื่อนำฟลัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 30 พันธุ์/สายพันธุ์/ลูกผสม มาศึกษาสมบัติทางด้านความหนืดด้วยเครื่อง

Rapid Visco Analyser (RVA) พบว่าค่าความหนืดสูงสุด (peak viscosity) ค่าแตกตัวของเม็ดแป้ง (breakdown) ค่าการคืนตัวของแป้ง (setback) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Table 1) เมื่อพิจารณาค่าความหนืดสูงสุด ซึ่งเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับคุณภาพด้านการบริโภค พบว่าพลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวมีค่าความหนืดสูงสุดระหว่าง 14.12 – 180.46 อาร์วียู (RVU) โดยพลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้ามีความหนืดสูงสุดและน้อยที่สุดเป็นพลาวร์ที่ได้มาจากพันธุ์แฟนซี 111 (Fancy 111) (153.54 RVU) และพันธุ์ไวโอเล็ตไวท์ 926 (Violet white 926) (56.29 RVU) ตามลำดับ พลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีค่าความหนืดสูงสุดต่ำกว่าพลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวจากพันธุ์ไวโอเล็ตไวท์ 926 ได้แก่ พลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ได้มาจากสายพันธุ์แท้ WKA005 WKNN016 YNB01 และ WPK018 นั่นคือสายพันธุ์แท้ดังกล่าวมีลักษณะความเหนียวน้อยกว่าพันธุ์เปรียบเทียบเมื่อพิจารณาการแตกตัวของเม็ดแป้ง (breakdown) เป็นค่าความแตกต่างระหว่างความหนืดสูงสุดและความหนืดต่ำสุด บ่งบอกถึงความสามารถในการคงทนต่ออุณหภูมิ และการถนอม

พบว่าพลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวมีค่าความหนืดสูงสุดระหว่าง 0.37–97.66 RVU พลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้าที่มีค่าการแตกตัวของแป้งมากที่สุด คือ พลาวร์ที่ได้มาจากพันธุ์ชยันนาท 84–1 (Chai Nat 84–1) (66.45 RVU) และพันธุ์สวีทไวโอเล็ต (Sweet Violet) (23.12 RVU) พลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีค่าการแตกตัวของแป้งต่ำกว่าพลาวร์จากพันธุ์ สวีทไวโอเล็ต ได้แก่ พลาวร์ที่ได้มาจากข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ KKCW02 PWHB01 UT11 UT120 UT122 WKA005 WPA018 WKNN016 WTNGHB003 YNB01 และข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสม CNW1602 CNW 1537 CNW1602 และ UT112 แต่มีเพียงค่าการแตกตัวของแป้งที่ได้มาจากสายพันธุ์แท้ WKA005, WPK018, WKNN016 และ YNB01 เท่านั้นที่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 นั่นคือ สายพันธุ์แท้ดังกล่าวนี้มีคุณภาพด้านความเหนียวน้อยกว่าตัวเปรียบเทียบ

เมื่อพิจารณาค่าการคืนตัว (setback) หาได้จากผลต่างระหว่างความหนืดสุดท้ายกับความหนืดต่ำสุด ซึ่งค่าการคืนตัวจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะเนื้อสัมผัส โดยแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวมีค่าการคืนตัวต่ำแสดงให้เห็นว่า เมื่อนำข้าวโพดข้าวเหนียวมาต้มสุกแล้วปล่อยให้เย็นลง แต่เนื้อสัมผัสยังคงเหนียวนุ่ม งานวิจัยนี้มีค่าการคืนตัวของพลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวอยู่ระหว่าง 6.29 – 60.70 RVU พลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้าที่มีค่าการคืนตัวมากที่สุดและน้อยที่สุด คือ พลาวร์ที่ได้มาจากพันธุ์ชยันนาท 84–1 (23.29 RVU) และพันธุ์ไวโอเล็ตไวท์ 926 (10.37 RVU) พลาวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีค่าการคืนตัวสูงกว่าตัวเปรียบเทียบ ได้แก่ พลาวร์ ที่ได้มาจากสายพันธุ์แท้ UT1122 UT111 และ UT122

## 2. คันทาสนิปส์ของยีน Waxy และ Dull ในข้าวโพดข้าวเหนียว

### 2.1 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน Waxy

งานวิจัยนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียว 30 พันธุ์/สายพันธุ์/ลูกผสม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ GBSS ซึ่งถูกออกแบบมาให้จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายคือยีน Waxy พบว่าไพรเมอร์ GBSS สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 16 พันธุ์/สายพันธุ์/ลูกผสม (ผลสำเร็จร้อยละ 53.34) ขึ้นดีเอ็นเอมีขนาด 2,485 – 2,506 คู่เบส เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการเทียบกับฐานข้อมูลสากล GenBank พบว่ามีความใกล้เคียงร้อยละ 97.54 – 98.80 กับข้าวโพดข้าวเหนียว (Zea mays) แสดงให้เห็นว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความน่าเชื่อถือและความถูกต้องจริงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Waxy จากข้าวโพดข้าวเหนียวที่ได้ ประกอบด้วย 11 อินทรอน (บริเวณอินทรอนที่ 4 – 14) และ 11 เอ็กซอน (บริเวณเอ็กซอนที่ 4 – 14) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากทุกตัวอย่างมาเทียบกัน พบว่ามีความผันแปรในรูปแบบการขาดหายไป (deletion) และการเพิ่มเติม (insertion) การเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ มักเรียกว่า INDEL (insertion and deletion) ซึ่งสามารถตรวจพบในทุกบริเวณอินทรอน ยกเว้น อินทรอนที่ 5 และ ส่วนบริเวณเอ็กซอน พบความผันแปรรูปแบบ INDEL พบว่าบริเวณเอ็กซอนที่ 7 และเอ็กซอนที่ 10 เท่านั้น จำนวน 5 และ 15 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ เมื่อทำการถอดรหัสกรดอะมิโนจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้ พบว่าได้กรดอะมิโน 438 – 443 ชนิด เมื่อนำกรดอะมิโนมาเรียงเทียบกัน พบความผันแปรของลำดับกรดอะมิโนบริเวณเอ็กซอนที่ 7 และ 10 จำนวน 1 และ 5 ชนิด ตามลำดับ

### 2.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน Dull

งานวิจัยนี้ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียว 30 พันธุ์/สายพันธุ์/ลูกผสม ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Du ซึ่งถูกออกแบบมาให้จำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายคือยีน Dull พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 28 พันธุ์/สายพันธุ์/ลูกผสม (ผลสำเร็จร้อยละ 93.34) ขึ้นดีเอ็นเอมีขนาด 1,808 – 1,812 คู่เบส เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากล GenBank พบว่ามีความใกล้เคียงร้อยละ 98.02 – 98.23 กับข้าวโพดข้าวเหนียว (Zea mays) เห็นได้ว่าเป็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความน่าเชื่อถือและความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Dull จากข้าวโพดข้าวเหนียวที่ได้ ประกอบด้วย 3 อินทรอน (บริเวณอินทรอนที่ 3 – 5) และ 2 เอ็กซอน (บริเวณเอ็กซอนที่ 4 – 5) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอนมาเทียบกัน พบว่ามีความผันแปรกระจายอยู่ในบริเวณเอ็กซอนทั้งสองในรูปแบบการสลับ (Single Nucleotide Polymorphisms,

SNPs) 7 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ A28G C34T A55G G130T G213A A430C T480C เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอนมาถอดรหัสกรดอะมิโน พบว่าได้กรดอะมิโน 170 ชนิด เมื่อนำกรดอะมิโนมาเรียงเทียบกัน พบว่าตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ ตำแหน่งที่ G130T G213A และ T480C ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง 3 ตำแหน่ง ดังนี้ ตำแหน่งที่ 43 71 และ 161 เมื่อนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวโพดข้าวเหนียวจำนวน 28 พันธุ์/สายพันธุ์/ลูกผสม มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (Figure 2) ดังนี้

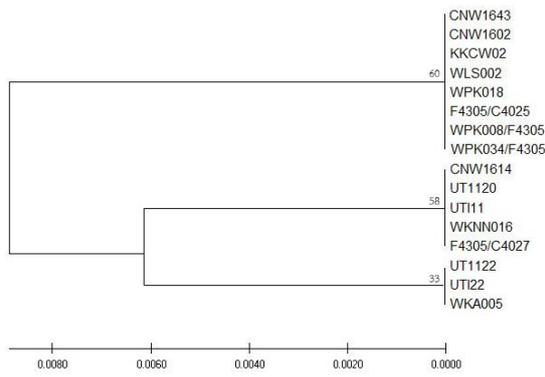
กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ 10 สายพันธุ์ ลูกผสม 9 ลูกผสม และลูกผสมพันธุ์การค้า 5 พันธุ์ มีลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 43 71 และ 161 เป็นกรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) ไลซีน (lysine) และอะลานีน (alanine) ตามลำดับ

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ WKA005 WKNN016 YNB01 และ WPK018 ซึ่งมีการกรดอะมิโนในตำแหน่ง ที่ 43 71 และ 161 เป็นกรดกลูตามิก (Glutamic acid) อาร์จินีน (Arginine) และวาลีน (Valine) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาาร่วมกับสมบัติทางด้านความหนืด พบว่ากลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีค่าหนืดสูงสุด และค่าการแตกตัวของแป้งน้อยกว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้าซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ

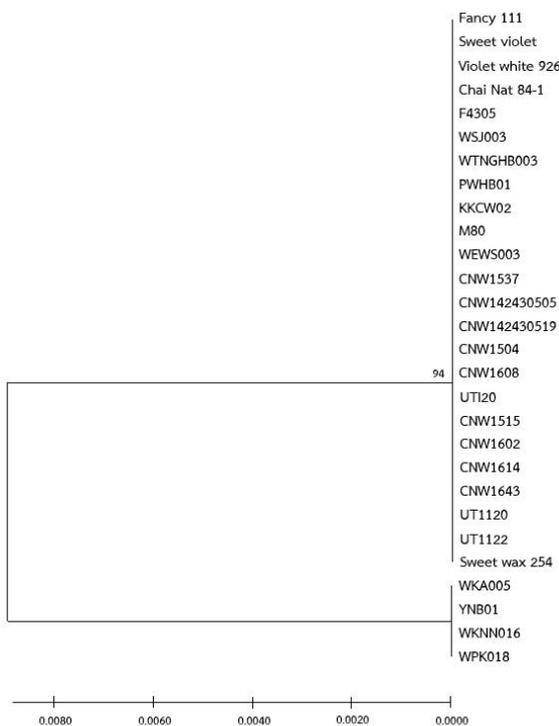
**Table 1** Pasting properties of various waxy corn flour and genotype for SNPs in *Dull-I* gene

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

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



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



**Figure 2** Phylogenetic relationships based on amino acid sequence encoded in the *Dull-1* gene of waxy corns, constructed using Neighbor-Joining method. Number on branches is bootstrap values obtained for 1000 replicates

**วิจารณ์ผลการวิจัย**

สมบัติทางด้านความหนืดของฟลาวัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียว เป็นลักษณะที่ใช้บ่งชี้ความเหนียวนุ่ม และการแข็งตัวของเมล็ดข้าง ภายหลังจากการต้มสุกของข้าวโพดข้าวเหนียวได้ดี (Simla & Hemathulin, 2012) การคัดเลือกสายพันธุ์แท้ข้าวโพดข้าวเหนียว เพื่อสร้างลูกผสมที่มีคุณภาพด้านการบริโภคน้ำตาลที่ดี สามารถพิจารณาจาก ค่าความหนืดสูงสุด (Ketthaisong & Lertrat, 2015) และค่าความ หนืดสูงสุดมีความสัมพันธ์กับการคืนตัวของแป้ง (Jane et al., 1999) ค่าความหนืดสูงสุด ค่าการแตกตัว และค่าการคืนตัวของแป้งข้าวโพด

ข้าวเหนียว สามารถใช้บ่งชี้คุณภาพด้านการบริโภคน้ำตาลของข้าวโพดข้าว เหนียวได้ค่าความหนืดสูงสุด และค่าการแตกตัวของ เม็ดแป้ง เป็นค่าที่บ่งชี้คุณภาพของแป้งในทิศทางเดียวกัน จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าฟลาวัวร์ที่ได้มาจากข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ ได้แก่ WKA005 WKNN016 YNB01 และ WPK018 มีค่าความหนืดสูงสุด และค่าการแตกตัวของแป้งน้อยกว่าฟลาวัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ เปรียบเทียบ แสดงให้เห็นว่าข้าวโพดข้าวเหนียวดังกล่าวมีคุณภาพ ด้านการบริโภคน้ำตาลไม่เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการสร้างลูกผสมใน ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งตรงข้ามกับค่าการคืนตัว ถ้าหากแป้ง ข้าวโพดข้าวเหนียวมีค่าการคืนตัวสูง จะบ่งชี้ว่าข้าวโพดข้าวเหนียว จะลักษณะเนื้อสัมผัสแข็งกระด้างเมื่อต้มสุกแล้วปล่อยให้เย็นตัวลง จากผลการทดลองนี้เห็นได้ว่าฟลาวัวร์ที่ได้มาจากข้าวโพดข้าวเหนียว ลูกผสมจาก UT1122 UT111 และ UT122 มีค่าการคืนตัวสูงกว่าพันธุ์ เปรียบเทียบ นั่นคือมีแนวโน้มว่าเมื่อต้มสุกแล้วปล่อยให้เย็นจะมี ลักษณะเนื้อสัมผัสแข็ง

ยีน *Waxy* มีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 4,339 คู่เบส (หมายเลขจำเพาะนิวคลีโอไทด์ EU041691) ประกอบด้วยบริเวณ อินทรอน (ส่วนที่ไม่ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน) 13 อินทรอน และ บริเวณเอ็กซอน exon (ส่วนที่ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน) 14 เอ็กซอน (Klosgen et al., 1986; Zheng et al., 2013) เมื่อถูกถอดรหัสจะได้ เป็นโปรตีน GBSSI มีบทบาทหน้าที่ในการสังเคราะห์อะไมโลสการ กลายพันธุ์ของยีน GBSSI ส่งผลให้มีการสังเคราะห์โปรตีน GBSSI ลดลงจึงส่งผลกระทบโดยตรงต่อปริมาณอะไมโลส งานวิจัยนี้ตรวจพบ ความผันแปรรูปแบบ INDEL พบว่าบริเวณเอ็กซอนที่ 7 และเอ็กซอน ที่ 10 เท่านั้น จำนวน 5 และ 15 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ สอดคล้อง กับรายงานวิจัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Waxy*

จากข้าวโพดข้าวเหนียว 55 หมายเลขพันธุ์ พบว่าบริเวณ รอยต่อระหว่างอินทรอนและเอ็กซอนที่ 7 (wx - D7) และเอ็กซอน ที่ 10 (wx - D10) มีการกลายพันธุ์ในรูปแบบการขาดหายไป 30 และ 15 คู่เบส ตามลำดับ (Fan et al., 2008) เมื่อทำการ ถอดรหัสกรดอะมิโนจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้พบว่า ความผันแปรของ ลำดับกรดอะมิโนบริเวณเอ็กซอนที่ 7 และ 10 จำนวน 1 และ 5 ชนิด ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ wx - D7 พบการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์พบได้ในรอยต่อ ระหว่าง เอ็กซอนและอินทรอน (exon - intron) ที่ 7 มีผลทำให้เกิด รหัสหยุด เป็นผลให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน GBSSI (Bao et al., 2012) การขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ 15 คู่เบสของบริเวณ wx - D10 ทำให้ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการถอดรหัสพันธุกรรม หายไป 5 ชนิด มีผลทำให้รูปแบบโดเมนของ glucosyl transferase domain 1 (GTD1) ของโปรตีน GBSSI เปลี่ยนไป (Fan et al., 2008) จากรายงานวิจัยการศึกษาปริมาณอะไมโลสในข้าวโพด ข้าวเหนียว พบว่าฟลาวัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ได้จากแต่ละตัวอย่าง มีปริมาณ

อะไมโลสน้อยและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Ketthaisong & Lertrat, 2015) ปริมาณอะไมโลสในแป้งที่ลดลง มีผลทำให้ลักษณะความหนืดสูงสุดเป็นไปในทิศทางที่สูงขึ้น (Valle et al., 1996) จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากข้อมูลลำดับกรดอะมิโน พบว่าการจัดกลุ่มไม่สัมพันธ์กับข้อมูลลักษณะ ค่าความหนืด ดังนั้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการตรวจหาความเหนียวนุ่มในข้าวโพดข้าวเหนียว อย่างไรก็ตามมีการใช้ตำแหน่งกลายพันธุ์ wx - D7 และ wx - D10 เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวพื้นเมืองและข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดข้าวเหนียวจีน (Fan et al., 2008; Bao et al., 2012)

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

### สรุปผลการวิจัย

สมบัติทางด้านความหนืดของฟลาวัวร์ข้าวโพดข้าวเหนียว ได้แก่ ค่าความหนืดสูงสุด ค่าการแตกตัวของเม็ดแป้ง และค่าการคืนตัว เป็นเกณฑ์สำคัญที่ใช้ในการช่วยคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวในระหว่างการปรับปรุงพันธุ์ งานวิจัยนี้พบว่า ฟลาวัวร์ที่ได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ WKA005 WKNN016 YNB01 และ WPK018 มีค่าความหนืดสูงสุดและค่าการแตกตัวน้อยกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้าที่ใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีคุณภาพด้านการบริโภคที่ไม่ดีพอ ในขณะที่ฟลาวัวร์ที่ได้จากข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสม ได้แก่ UT1122 UTI11 และ UTI22 มีค่าการคืนตัวสูงกว่าพันธุ์เปรียบเทียบ นั่นคือเมื่อนำข้าวโพดข้าวเหนียวมาต้มจนสุกและปล่อยให้เย็นพบว่า ลักษณะเนื้อสัมผัสแข็งกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์การค้าซึ่งใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ผลของการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Waxy และ Dull พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเอ็กซอนของยีน Dull มีความความผันแปรทางพันธุกรรมรูปแบบสไนป์ส ที่มีผลเปลี่ยนแปลงการเรียงตัวของกรดอะมิโน และมีบทบาทหน้าที่สำคัญต่อลักษณะความเหนียวซึ่งเป็นลักษณะคุณภาพด้านการบริโภคที่สำคัญของข้าวโพดข้าวเหนียว การตรวจพบลำดับ

นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมนี้สามารถนำมาออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอสไนป์สเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีคุณภาพด้านการบริโภคที่ดีได้ต่อไป

### References

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

- T. A. (2012). Functional interactions between starch synthase III and isoamylase-type starch-debranching enzyme in maize endosperm. *Plant Physiology*, 158(2), 679–692.
- Newport Scientific. (1997). Operation Manual for the Series 4 Rapid Visco Analyzer. Newport Scientific Pty, Ltd., Australia. 93 p.
- Simla, S., & Hemathulin, A. (2012). Physiochemical properties of flour waxy corn. *Khon Kaen Agricultural Journal*, 40(supplement 1), 455–459. (In Thai).
- Sudtasam, G., & Kenlueam, R. (2013). Changes during storage in starch viscosity and quality of Northeastern rainfed lowland rice lines. *Proceeding of the 30<sup>th</sup> rice and temperate cereal crops annual conference* (pp. 314–315). Bangkok: Bureau of rice reserch and development. (in Thai).
- Valle, G. D., Colonna, P., & Patria, A. (1996). Influence of amylose content on the viscous behavior of low hydrated molten starches. *Journal of Rheology*, 40, 347–362.
- Wilson, L. M., Whitt, S. R., Ibanez, A. M., Rocheford, T. R., Goodman, M. M., & Buckler, E. S. (2004). Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. *The Plant Cell*, 16(10), 2719–2733.
- Zheng, H., Wang, H., Yang, H., Wu, J., Shi, B., Cai, R., Xu, Y., Wu, A., & Luo, L. (2013). Genetic diversity and molecular evolution of Chinese waxy maize germplasm. *PLoS One*, 8(6): e66606.

---

**Research article**

---

# Study on Pasting Properties of Waxy Corn Flour and Identification of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of Waxy and Dull Gene in Waxy Corn

Theerawut Wongwarat<sup>1\*</sup> Wassamon Momkol<sup>2</sup> Chalong Kerdsri<sup>2</sup>  
Maneerat Rujinarong<sup>3</sup> and Yingyod Paluka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Khon Kaen Field Crops Research Center, Mueang Khon Kaen, Khon Kaen 40000*

<sup>2</sup>*Chai Nat Crops Research Center, Supphaya, Chai Nat 17150*

<sup>3</sup>*Planning and Technical Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900*

---

**ARTICLE INFO****Article history**

Received: 25 October 2021

Revised: 6 April 2022

Accepted: 8 April 2022

Online published: 22 June 2022

**Keyword**

*Waxy corn*

*Pasting properties*

*Single nucleotide polymorphisms (SNPs)*

**ABSTRACT**

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

---

\*Corresponding author

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

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