

รูปแบบการทำงานของยีนที่ควบคุมลักษณะการทนแล้งในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์
โดยใช้แผนการผสมแบบ North Carolina Mating Design II



ณัสนา ตระหมาน

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชไร่

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2568

รูปแบบการทำงานของยีนที่ควบคุมลักษณะการทนแล้งในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์
โดยการใช้แผนการผสมแบบ North Carolina Mating Design II



ณัฏฐา ตระหมาน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชไร่

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2568

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

รูปแบบการทำงานของยีนที่ควบคุมลักษณะการทนแล้งในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์
โดยใช้แผนการผสมแบบ North Carolina Mating Design II

ณัฏฐา ดลระฆัง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชไร่

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัทมา หาญนอก)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดิ์น้ำ)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.สุเทพ วัชรเวชศฤงคาร)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชณี พุทธา)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยศ สัมฤทธิ์สกุล)

รองอธิการบดี

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	รูปแบบการทำงานของยีนที่ควบคุมลักษณะการทนแล้งในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ โดยใช้แผนการผสมแบบ North Carolina Mating Design II
ชื่อผู้เขียน	นางสาวณัฏฐา ดลระฆาณ
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัทมา หาญนอก

บทคัดย่อ

การพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมเดี่ยวที่ให้ผลผลิตสูงและมีความทนทานต่อสภาพแล้งได้ เป็นหนึ่งวิธีในการบรรเทาความเสียหายของผลผลิตข้าวโพดให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกข้าวโพดได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมสำหรับลักษณะส่งเสริมการทนแล้งของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ภายใต้สภาวะเครียดน้ำ และการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนโปรตีนไคเนสและลักษณะฟีโนไทป์ที่เกี่ยวข้องกับความทนทานต่อสภาพเครียดน้ำ การทดลองเริ่มจากพัฒนาลูกผสมทั้งหมด 12 คู่ผสม ผ่านการใช้แผนการผสมแบบ North Carolina II และนำมาทดสอบในสภาพการทดลองที่ควบคุมการให้น้ำ ผ่านการใช้แผนการทดลองชนิด 2×12 Factorial in randomized complete block design จำนวน 2 ซ้ำ รวมทั้งหมด 48 หน่วยทดลอง ปัจจัยที่ 1 คือ ลูกผสม จำนวน 12 คู่ผสม ส่วนปัจจัยที่ 2 คือ รูปแบบการให้น้ำ ได้แก่ การให้น้ำแบบสม่ำเสมอ และการจำกัดการให้น้ำในบางช่วง จากนั้นเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตทางลำต้น ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบผลผลิต คำนวนค่าดัชนีความทนแล้ง จากผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่า คู่ผสม Ki48xNei542010 และ Nei452004xNei542010 ให้องค์ประกอบผลผลิตเฉลี่ยจากสภาพเครียดน้ำและสภาพให้น้ำปกติที่ดี รวมถึงยังให้ค่าดัชนีการทนทานต่อสภาพเครียดน้ำที่สูงอีกด้วย นอกจากนี้ ยังพบอีกด้วยว่า ลักษณะดัชนีความทนแล้งในลักษณะน้ำหนักฝักสดไม่เปลือกมีค่าอัตราการพันธุกรรมแบบแคบที่สูง ขณะที่ผลทดสอบการมีอยู่ของยีนโปรตีนไคเนสในรุ่นลูก F_1 จาก InDel primers พบว่า คู่ผสม Ki48xNei542010 ที่ให้ลักษณะฟีโนไทป์ที่ดีนั้นให้ค่าความถี่ของการเกิดแถบดีเอ็นเอสูงที่สุดเช่นกัน

คำสำคัญ : ความสามารถในการผสม, ดัชนีความทนทานต่อสภาพเครียด, ไพรเมอร์ชนิดอินเดล, ยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนไคเนส

Title	GENE ACTIONS CONTROLLING DROUGHT TOLERANT TRAITS IN FIELD CORN USING NORTH CAROLINA MATING DESIGN II
Author	Miss nasma donlaman
Degree	Master of Science in Agronomy
Advisory Committee Chairperson	Dr. Pattama Hannok

ABSTRACT

The development of high-yield and drought-tolerant F₁ hybrid maize is one of the effective strategies to mitigate yield losses in maize production for maize growers. This study aimed to evaluate genetic parameters related to drought tolerance traits in hybrid maize under water-stressed conditions and to assess the correlation between protein kinase gene expression and phenotypic traits associated with drought tolerance. Twelve hybrid combinations were generated using the North Carolina II mating design and tested under controlled watering conditions using a 2 × 12 Factorial experiment in a randomized complete block design with two replications, totaling 48 experimental units. The first factor was 12 hybrid combinations, and the second factor was two water regimes: well-watered and water-restricted conditions. Data on vegetative growth, yield components, and drought tolerance indices were collected. Analysis of variance and mean comparisons revealed that hybrids Ki48 × Nei542010 and Nei452004 × Nei542010 exhibited superior performance in yield components under both water-stressed and non-stressed conditions, along with high drought tolerance indices. Moreover, the drought tolerance index for fresh ear weight with husk exhibited a high narrow-sense heritability. In addition, protein kinase gene presence was detected using InDel primers in F₁ hybrids, with hybrid Ki48 × Nei542010 showing the highest frequency of DNA band occurrence, consistent with its favorable phenotypic expression under drought stress.

Keywords : Combining ability, Stress tolerance index, InDel primer, Protein kinase-related genes

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัย โดยมอบทุน“ทุนศิษย์กัณฐิ” ประจำปีการศึกษา 2663 ให้แก่ผู้วิจัย มา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปัทมา หาญนอก อาจารย์ที่ปรึกษางานหลัก คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้คำปรึกษา ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในงานวิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยแก้ไขข้อบกพร่องจนงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้

และขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรพินธุ์ สุธษดีนำ และ อาจารย์ ดร. สุเทพ วัชรเวช ศฤงคาร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ช่วยชี้แนะ และให้คำปรึกษาในงานวิจัยฉบับนี้ กราบขอบพระคุณ ณ โอกาสนี้

ณัฏฐา ดลระฆมาน



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	3
ปัญหาภัยแล้ง.....	3
ผลกระทบของภัยแล้งต่อผลผลิตของข้าวโพด.....	4
การวิเคราะห์ความสามารถในการรวมตัวและอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรม	6
โปรตีนไคเนสที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียดในยูคาริโอต	11
วิถีไมโทเจนแอกทีเวเตดโปรตีนไคเนส (Mitogen-activated protein kinases).....	13
MAPK ที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้ง.....	15
เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) และความสำคัญของ InDel marker.....	16
บทที่ 3 วิธีการศึกษา	18
การทดลองที่ 1: การประเมินค่าทางพันธุกรรมของข้าวโพดสายพันธุ์แท้	18
การวางแผนการทดลอง.....	18
การบันทึกลักษณะฟีโนไทป์ในแต่ละระยะ.....	21
การคำนวณค่าความต่าง (Difference; Diff) และดัชนีทนแล้ง (Stress tolerance index; STI).....	26

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	29
การทดลองที่ 2: การออกแบบและทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด InDel DNA markers ใน Pathway ของโปรตีนไคเนสที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้ง	30
การออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ชนิด InDel.....	30
เรียบเรียงข้อมูลไพรเมอร์ เมื่อออกแบบข้อมูล.....	31
การตรวจสอบการทำงานของ InDel DNA markers	38
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล.....	40
ผลการทดลองที่ 1: การประเมินค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมสำหรับลักษณะการทนแล้งของ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ภายใต้สภาวะเครียดน้ำ	40
การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอิทธิพลหลัก	40
ค่าดัชนีความทนทานต่อสภาพเครียด.....	55
การประเมินความสามารถในการผสม (combining ability) ของลักษณะรอง (secondary traits) ซึ่งเกี่ยวข้องกับผลผลิต	58
ความสามารถในการรวมตัวแบบทั่วไป (general combining ability).....	62
ความสามารถในการรวมตัวแบบเฉพาะ (Specific Combining Ability).....	66
ความสามารถในการผสมของลักษณะผลผลิตและดัชนีการทนแล้ง	70
ผลการทดลองที่ 2: การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนโปรตีนไคเนสและ ลักษณะฟีโนไทป์ที่เกี่ยวข้องกับความทนทานต่อสภาพเครียดน้ำ	74
ผลการออกแบบไพรเมอร์	74
การรวมกลุ่มไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา Multiplex PCR	76
ผลการทดสอบไพรเมอร์ในข้าวโพดคู่ผสม	77
สรุปผลการทดลอง.....	81
บรรณานุกรม.....	82
ประวัติผู้วิจัย.....	90

สารบัญตาราง

	หน้า
Table 1. Pedigree and source of eight inbred lines.....	19
Table 2. Twelve F ₁ progenies from North Carolina Mating Design II.....	20
Table 3. secondary Traits, yield components, and data collection methods for various traits.....	22
Table 4. Twenty-seven designed InDel primers	35
Table 5. Conditions for testing annealing temperatures in the PCR reactions of each primer.....	39
Table 6. Analysis of variance (ANOVA) for vegetative traits of 12 F ₁ progenies.....	42
Table 7. Analysis of Variance (ANOVA) for adaptive traits (differences in SPAD and Leaf Rolling) of 12 F ₁ Progenies.....	48
Table 8. Analysis of variance (ANOVA) for reproductive traits of 12 F ₁ progenies	50
Table 9. Analysis of variance (ANOVA) for yield components of 12 F ₁ progenies	53
Table 10. Analysis of variance (ANOVA) for Stress tolerance index (STI) of Fresh weight (unhusked) in 12 F ₁ progenies under different watering regime (water stress and well-watered conditions)	55
Table 11. Mean squares from combined analyses of variance for combining ability based on PHv8, ASI, differences in SPAD and LR of 12 F ₁ progenies crosses under two watering regimes	60
Table 12. General combining ability of PHv8, ASI, differences of SPAD and LR in 12 F ₁ progeny crosses under two conditions	64
Table 13. Specific combining ability of PHv8, ASI, differences of SPAD and LR in 12 F ₁ progeny crosses under two conditions	68

Table 14. Estimates of general combining ability (GCA) under well-watered (WW) water stressed (WS) and Stress tolerance index of 8 parental lines	72
Table 15. Estimates of specific combining ability (SCA) for the Stress tolerance index of 12 F ₁ crosses	73
Table 16. Twelve newly designed InDel primers targeting the MAPK pathway	75
Table 17. Frequency of DNA band occurrence based on gel electrophoresis analysis	79



สารบัญภาพ

หน้า

Figure 1. Impact of Drought on US Corn Yield (1994–2022) a) US Drought Monitor b) Record Corn Yields Despite Drought	4
Figure 2. North Carolina Mating Design II	7
Figure 3. Stress tolerance factors produced in adaptive responses of a plant	11
Figure 4. Classification of plant protein kinases	12
Figure 5. A signal transduction of MAPK cascade.....	14
Figure 6. Experimental management by day after planting (DAP)	21
Figure 7. Data collection of secondary traits a) Plant height b) Vegetative stage c) SPAD (chlorophyll content) d) Leaf rolling e) Tassel size f) Spikelet density	28
Figure 8. Primer design steps a) Identification of drought tolerance-related genes in the MAPK pathway b) Retrieval of gene information in maize using MaizeGDB c) Extraction of the maize gene model and sequence d) Detection of insertions and deletions using the ClustalX2 program.....	32
Figure 9. Importing maize gene sequence data into the ClustalX2 program a) Load the gene sequence from a .txt file and assign a file name b) Identify insertions and deletions (InDels) c) Determine the positions of forward and reverse primers	33
Figure 10. Steps for searching designed primer pairs a) Use NCBI Primer-BLAST b) Enter the designed sequence information for each primer pair c) View the results provided by NCBI for each primer pair	34
Figure 11. Plant height from V1 to V20 stages of 12 F ₁ crosses under well-watered and water deficit conditions under well-watered (Green lines) and water deficit conditions (Orange lines).....	41

Figure 12. LSD test for plant height at v8 – v11 stages of 12 F ₁ crosses under well-watered (Green bar) and water deficit conditions (Orange bar) a–e represent plant height (cm) at V8, V9, V10, and V11, respectively	43
Figure 13. Differences among 12 F ₁ progenies in a) SPAD values and b) leaf rolling between 35 and 42 days after planting (DAP) under well-watered (Green lines) and water deficit conditions (Orange lines).....	47
Figure 14. LSD test showing differences among 12 F ₁ progenies in a) SPAD values and b) Leaf rolling measured at 37, 39, and 40 days after planting (DAP).....	49
Figure 15. LSD test for anthesis-silking interval (ASI) of 12 F ₁ progenies under well-watered (Green bar) and water deficit conditions (Orange bar)	51
Figure 16. LSD test for yield components of 12 F ₁ crosses under well-watered (Green bar) and water deficit conditions (Orange bar) a) Fresh Weight Unhusked b) Total Dry Weight c) Kernel Dry Weight e) 100 Kernel Dry Weight f) Number of Kernels, respectively.....	54
Figure 17. Mean comparison among 12 F ₁ progenies using the Least Significant Difference (LSD) test at the 0.01 significance level a) Ear characteristics and ear weight (g per plot) under water stress and well-watered conditions b) Stress Tolerance Index (STI) of 12 F ₁ crosses.....	57
Figure 18. Testing 12 insertion/deletion (InDel) primers in Nei542010 and Ki48 at 50 °C annealing temperature.....	76
Figure 19. Multiplex PCR using 12 InDel primers across 8 inbred lines and 12 F ₁ progenies	80

บทที่ 1

บทนำ

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ เป็นพืชเศรษฐกิจที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ทั่วโลกมีความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง คิดเป็นร้อยละ 3.26 ปริมาณการส่งออกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ทั่วโลกในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2562 - 2566) อยู่ระหว่าง 123.29 – 158.60 ล้านตัน ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกในปี พ.ศ. 2567 ประมาณ 6.929 ล้าน ผลิตเฉลี่ย 735 กิโลกรัมต่อไร่ (กระทรวงพาณิชย์, 2566) Messina et al. (2022) รายงานว่า ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เมื่อได้รับน้ำปกติจะมีขนาดของฝักที่ใหญ่และมีจำนวนเมล็ดได้มากถึง 6,000 เมล็ดต่อพื้นที่ปลูก 1 ตารางเมตร แต่เมื่อเผชิญสภาวะการขาดน้ำระหว่างการออกดอก จะมีผลกระทบต่อการยึดตัวของฝักและไหมที่ลดลง และส่งผลให้ไม่ได้รับการปฏิสนธิ ข้าวโพดอาจไม่ติดเมล็ดได้ นอกจากการขาดน้ำในระยะออกดอก หากข้าวโพดขาดน้ำในช่วงหลังออกไหม ระยะติดเมล็ด หรือ แม้แต่ระยะสะสมน้ำหนักเมล็ด การติดเมล็ดและขนาดของฝักจะลดลง ดังนั้น การใช้พันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่มีความทนทานต่อสภาพแล้ง จึงน่าจะมีประโยชน์ต่อการรักษาปริมาณผลผลิตต่อไร่ ได้

สำหรับการปรับปรุงพันธุ์นั้น นอกจากประเมินผลผลิตเป็นเกณฑ์หลักแล้ว ลักษณะรอง (secondary traits) ทางด้านสรีรวิทยา (physiological trait) จัดเป็นเป็นดัชนีที่สำคัญที่ควรนำมาพิจารณาร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือก เนื่องจากลักษณะดังกล่าวสามารถแสดงการถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้สูงกว่าลักษณะผลผลิต ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางสรีรวิทยา (physiological trait) ที่เกี่ยวข้องกับความทนทานแล้งในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ จึงมีความสำคัญในการใช้อธิบายกลไกความทนทานแล้งของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ได้ นอกจากนี้ ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช การทราบรูปแบบการทำงานของยีน (gene action) ที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการกำหนดทิศทางของงานปรับปรุงพันธุ์พืช (Sprague and Tatum, 1942) การประเมินความสามารถในการรวมตัวของสายพันธุ์แท้ (combining abilities) จากลูกรุ่น F_1 ที่ได้รับจากการผสมระหว่างคู่พ่อแม่ตามแผนการผสม มักถูกนำมาใช้ในการศึกษานี้

เมื่อพิจารณาในระดับโมเลกุลจะพบว่า เมื่อพืชเผชิญกับสภาวะแห้งแล้ง โปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณทางเคมี (signal transduction) ภายในเซลล์พืช จะทำหน้าที่ส่งสัญญาณเพื่อควบคุมการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อสภาพเครียด โปรตีนไคเนสเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ดังกล่าว โดยทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัว เช่น ยีนที่ควบคุมการปิดปากใบ การสร้างสารออสโมไลต์ และการพัฒนาระบบราก การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มี

ความจำเพาะต่อยีนที่ควบคุมโปรตีนไคเนส จึงอาจมีประโยชน์ในการนำมาใช้คัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่มีประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อสภาวะแห้งแล้งได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์โปรตีนไคเนส ควบคู่ไปกับการประเมินค่าทางพันธุกรรมของลักษณะที่ส่งเสริมการทนแล้งในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์



บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ปัญหาภัยแล้ง

ภัยแล้ง คือ ช่วงที่สภาพอากาศแห้งผิดปกติอย่างต่อเนื่องนานพอที่จะทำให้เกิดปัญหาร้ายแรง เช่น ผลผลิตเสียหาย ความแห้งแล้งเกิดจากการที่ฝนทิ้งช่วงเป็นเวลานาน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ อุณหภูมิของมหาสมุทร การเปลี่ยนแปลงของกระแสน้ำ และการเปลี่ยนแปลงภูมิทัศน์ในท้องถิ่น (Martins et al., 2024) ภาวะเอลนีโญ เป็นส่วนหนึ่งของการเกิดภัยแล้ง อุณหภูมิอากาศสูงขึ้น เกิดคลื่นความร้อนรุนแรงขึ้นอันเป็นผลมาจากน้ำอุ่นในมหาสมุทรแปซิฟิก โดยเฉพาะในแถบเส้นศูนย์สูตรมีอุณหภูมิสูงขึ้น และไหลไปทางตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก (ฝั่งทวีปอเมริกาใต้) ทำให้ลมพัดอากาศร้อนและแห้งไปยังแถบตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิก (ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้) มากขึ้น เหตุการณ์นี้จึงส่งผลกระทบอย่างมากต่อความเป็นอยู่ของประชากรทั้งทางด้านเศรษฐกิจ อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม (Varotsos, 2024) ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการก่อตั้งทีมในการตรวจสอบภัยแล้ง (U.S. Drought Monitor; USDM) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999 ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างศูนย์บรรเทาภัยแล้งแห่งชาติ (NDMC) สำนักบริหารมหาสมุทรและบรรยากาศแห่งชาติ (NOAA) และกระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา (USDA) จากรายงานพบว่า พื้นที่บางส่วนของสหรัฐอเมริกาประสบภัยแล้งอย่างต่อเนื่อง (Figure 1a) นอกจากนี้ ภาพ Figure 1b แสดงให้เห็นถึง ผลกระทบของภัยแล้งที่มีต่อความเสียหายในการผลิตข้าวโพดในช่วงปีที่เกิดภัยแล้ง ได้แก่ ปี ค.ศ. 2002 และ 2012 แม้ว่าผลผลิตข้าวโพดเฉลี่ยต่อเอเคอร์ (Bushels per acre) ของสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ. 1994 ถึง 2022 แสดงแนวโน้มผลผลิตที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ในช่วงปีดังกล่าว พบผลผลิตลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงใน Figure 1a (ปี ค.ศ. 2012) จากข้อมูลนี้เห็นได้ชัดว่า ภัยแล้งเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตข้าวโพด แม้ว่าจะมีเทคโนโลยีและการจัดการที่ดี แต่การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศอาจทำให้สถานการณ์รุนแรงขึ้นได้ในอนาคต ดังนั้น การศึกษาและการพัฒนามาตรการในการรับมือกับภัยแล้งจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง (Cunningham, 2024) เช่นเดียวกันกับประเทศไทยที่มักเผชิญกับปัญหาภัยแล้งอย่างต่อเนื่อง โดยข้อมูลในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2557 - 2567) พบว่า ในปี พ.ศ. 2557 - 2558 ประเทศไทยประสบภัยแล้งรุนแรงทั่วประเทศ ซึ่งเป็นผลกระทบจากปรากฏการณ์เอลนีโญ ปริมาณฝนน้อยกว่าค่าเฉลี่ย และหลายจังหวัดขาดแคลนน้ำอย่างหนัก ต่อมาในปี พ.ศ. 2559 ภัยแล้งยังคงต่อเนื่องจากปี พ.ศ. 2558 หลายพื้นที่ยังคงขาดแคลนน้ำ และส่งผลกระทบต่อการเพาะปลูกพืชอาหารสัตว์ที่สำคัญของประเทศ และในปี พ.ศ. 2562 -

2563 ประเทศไทยเผชิญกับภัยแล้งรุนแรงที่สุดในรอบ 40 ปี ปริมาณน้ำในเขื่อนสำคัญหลายแห่ง ลดลงต่ำสุดเป็นประวัติการณ์ ส่งผลกระทบต่อภาคเกษตรกรรม ภาคอุตสาหกรรม (PBS, 2023)

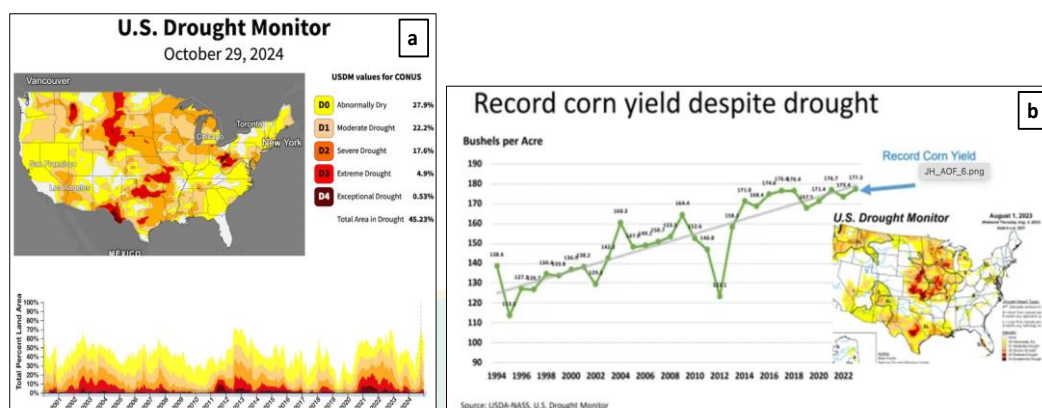


Figure 1. Impact of Drought on US Corn Yield (1994–2022) a) US Drought Monitor b) Record Corn Yields Despite Drought

ที่มาภาพ: Cunningham. (2024)

ผลกระทบของภัยแล้งต่อผลผลิตของข้าวโพด

ปัจจัยที่เป็นปัญหาสำคัญสำหรับการเกษตร คือ แหล่งน้ำที่มีอยู่อย่างจำกัด โดยพบว่า 97% ของน้ำที่มีอยู่บนโลกเป็นน้ำเค็ม และมีอยู่เพียง 1% เท่านั้นที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ และยังพบว่า ปริมาณการใช้น้ำในพื้นที่ทำเกษตรกรรมคาดว่าจะเพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ปี นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศจนนำไปสู่การเกิดปัญหาภัยแล้ง ส่งผลให้เกิดการสูญเสียผลผลิตจำนวนมาก (Gong, 2022) ปัญหาความแห้งแล้งทำความเสียหาย 3 - 22% ของพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย ส่งผลให้ผลผลิตลดลง 858,000 ตัน รวมเป็นมูลค่า 2.4 พันล้านบาท (กระทรวงพาณิชย์, 2566) ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มีความจำเป็นในการใช้น้ำตลอดวงจรชีวิตอยู่ที่ 350-450 มิลลิเมตร น้ำแต่ละ มิลลิเมตรเพิ่มน้ำหนักเมล็ดได้ถึง 15 กิโลกรัม ซึ่งข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หนึ่งตันจำเป็นต้องได้รับน้ำ ประมาณ 250 ลิตร เพื่อใช้ในการเจริญและเติบโตและการพัฒนา (Du Plessis, 2003) จากรายงาน ของ Denmead and Shaw (1960) กล่าวว่า สภาพความแห้งแล้งมีผลต่อการให้ผลผลิตของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ลดลง จากการศึกษพบว่า หากข้าวโพดเผชิญกับสภาวะแล้งในช่วงระยะก่อนออกดอก ระหว่างออกดอก และหลังออกดอก จะส่งผลให้ผลผลิตลดลงประมาณ 25% 50% และ 21% ตามลำดับ นอกจากนี้ การขาดน้ำยังส่งผลกระทบต่อผลผลิตละอองเรณูและช่วงเวลาในการปล่อยละอองเรณูของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์อีกด้วย ในสภาพแล้งข้าวโพดผลิตละอองเรณูลดลง 3 - 8 % ต่อวัน และ เวลาในการปล่อยละอองเรณูสั้นลงหรือในบางสายพันธุ์อาจไม่มีการปล่อยละอองเรณู ส่งผลให้โอกาส

ในการเกิดการผสมพันธุ์ลดลง (Burris, 2001) นอกจากนี้ น้ำยังมีความสำคัญมากต่อการสะสมน้ำหนักรวมเมล็ด ในสภาพขาดน้ำพบการสะสมสารชีวมวลภายในเมล็ดลดลง เอนโดสเปิร์มที่เป็นแหล่งเก็บสะสมอาหารสำหรับเอ็มบริโอมีการยืดตัวและแบ่งตัวของเซลล์ลดลง (Olsen et al., 1999) จากงานวิจัยของ Ngugi (2013) พบว่า ผลของการขาดน้ำในข้าวโพดส่งผลให้มีช่วงห่างระหว่างวันออกดอกออกไหม (anthesis and silking interval; ASI) ที่เพิ่มขึ้น จากงานวิจัยข้าวโพดสายพันธุ์จากสถาบัน CIMMYT มีการสุกแก่ที่ช้ากว่าสายพันธุ์ของเคนยา แต่มีช่วง ASI ที่ค่อนข้างแคบกว่าอยู่ที่ 2 – 4 วัน และยังมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับน้ำหนักของเมล็ดเมื่ออยู่ในสภาพขาดน้ำอีกด้วย สอดคล้องกับรายงานของ (Basseti and Westgate, 1993) ที่พบว่า เมื่อข้าวโพดขาดน้ำ ส่งผลให้เกิดการยืดตัวของไหมช้าลงถึง 6 - 9 วัน เมื่อเทียบกับสภาพที่ได้รับน้ำปกติ แต่ในทางกลับกันช่อดอกตัวผู้โผล่ออกมาและโปรยละอองเรณูเร็วกว่าปกติ ส่งผลทำให้ค่า ASI กว้างมากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการผสมและติดเมล็ด ด้วยเหตุนี้ ค่า ASI จึงเป็นหนึ่งในดัชนีที่สำคัญ ที่สามารถบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพในการผสมได้ การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดโดยพิจารณาจากค่า ASI ที่แคบ ทำให้มีผลผลิตเมล็ดที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ได้รับผลผลิตสูงถึง 900 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ภายใต้ความเครียดจากการขาดน้ำ (Edmeades, 1999) จากการศึกษาของ (Haupt-Herting, 2002) ยังพบอีกว่า การขาดน้ำยังส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลงเนื่องจากในช่วงที่พืชขาดน้ำ ส่งผลให้เกิดการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยเป็นผลมาจากการสลายตัวของคลอโรพลาสต์และองค์ประกอบต่าง ๆ เนื่องมาจากสภาวะออกซิเดทีฟ และการเพิ่มของฮอร์โมนไซโตไคนิน และกรดแอบไซซิกที่มากขึ้น มีการเคลื่อนย้ายมาที่ใบมากเป็นพิเศษ โดยควบคุมให้ใบเข้าสู่กระบวนการแก่ (leaf senescence) และมีการสลายคลอโรฟิลล์เร็วกว่าปกติ ทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงลดลง อีกหนึ่งกลไกในการปรับตัวของข้าวโพดเมื่อเผชิญความเครียดจากภัยแล้ง คือ การม้วนใบ (leave rolling; LR) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการลดพื้นที่ใบเพื่อลดการสัมผัสรังสีจากแสงอาทิตย์ และลดการคายน้ำผ่านการปิดปากใบ อย่างไรก็ตาม การลดการคายน้ำผ่านการปิดปากใบจะส่งผลต่ออุณหภูมิใบที่เพิ่มขึ้น และในหลายการศึกษาชี้ให้เห็นว่า การม้วนใบของข้าวโพดมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับผลผลิต (Zia et al., 2011) ทั้งนี้การที่ข้าวโพดประสบปัญหาการม้วนของใบเร็วกว่าปกติ บ่งชี้ให้เห็นว่า ข้าวโพดสายพันธุ์นั้นมีความไวต่อความเครียดจากภัยแล้งมากกว่าสายพันธุ์ที่ม้วนใบช้ากว่า (Saglam et al., 2014)

การวิเคราะห์ความสามารถในการรวมตัวและอัตราการผลิตทางพันธุกรรม

ข้าวโพดแต่ละสายพันธุ์ สามารถให้ผลผลิตรุ่นลูกที่มีความดีเด่น (heterosis หรือ hybrid vigor) ไม่เท่ากัน คู่ผสมที่มีความดีเด่นสูงมักมาจากการผสมพันธุ์พ่อแม่ที่มีความสามารถในการรวมตัว (Combining ability) ที่ดี ดังนั้น ในกระบวนการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดเพื่อให้ได้ลูกผสมที่ดีที่สุด จึงมักประเมินความสามารถในการผสม ซึ่งมี 2 ชนิด ได้แก่ 1) การประเมินค่าความสามารถในการรวมตัวแบบทั่วไป (General Combining Ability; GCA) ของสายพันธุ์พ่อแม่ใด ๆ และ 2) การประเมินค่าความสามารถในการรวมตัวแบบเฉพาะ (Specific Combining Ability; SCA) ระหว่างลูกผสมแต่ละคู่

ในส่วนของการประเมินค่า GCA สามารถทำได้โดยการคำนวณจากค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ยประชากร F_1 ที่ได้จากสายพันธุ์แท้เดียวกัน ความแตกต่างของค่า GCA ในแต่ละสายพันธุ์เกิดจากผลของยีนแบบบวก (additive effect) และปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างผลของยีนแบบบวก (additive x additive interaction) ขณะที่ค่า SCA คำนวณจากค่าเบี่ยงเบนจากผลรวมของ GCA ของพ่อและแม่ของลูกผสมคู่นั้น (Acquaah, 2009; Falconer et al., 1996) และเป็นผลมาจากยีนที่ไม่ใช่ยีนแบบบวก (non-additive effect) การแสดงออกทางฟีโนไทป์ของรุ่นลูกถูกอธิบายด้วยสมการด้านล่างนี้ Huidong (1982)

$$Y_{ij} = Y + G_i + G_j + S_{ij}$$

โดยค่า Y_{ij} คือ ค่าฟีโนไทป์ของรุ่นลูกที่ได้จาก พ่อ (i) และแม่ (j), Y คือ ค่าเฉลี่ยฟีโนไทป์ของลูกทั้งหมด G_i และ G_j คือ ค่า GCA ของพ่อ (i) และของแม่ (j) และในส่วนของ S_{ij} คือ ค่า SCA ที่ได้จากรุ่นลูกของพ่อแม่แต่ละคู่

แผนการผสมแบบ North Carolina design II (NCII) เป็นหนึ่งในแผนการผสมที่นำมาใช้ศึกษาความสามารถในการผสม ถูกพัฒนาขึ้นโดย Comstock และ Robinson ในปี ค.ศ. 1952 โดยแผนแบบ NCII แบ่งคู่ผสมออกเป็น 2 ชุด ได้แก่ สายพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อ และสายพันธุ์ที่ใช้เป็นแม่ ซึ่งสายพันธุ์พ่อทุกตัวจะต้องมีการนำมาผสมข้ามกับสายพันธุ์แม่ชุดเดิม (Figure 2) (Comstock and Robinson, 1952)

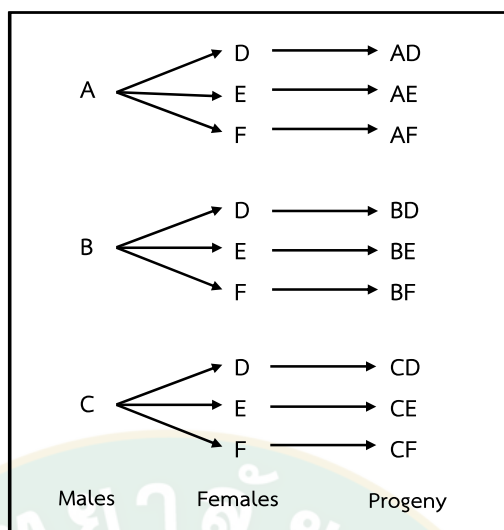


Figure 2. North Carolina Mating Design II

ที่มาภาพ: Comstock and Robinson (1952)

มีรายงานการศึกษาความสามารถในการผสมของสายพันธุ์พืชเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างเช่น Chiuta and Mutengwa (2020) ศึกษาพันธุ์กรรมของสายพันธุ์ข้าวโพดที่ทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งและความร้อนร่วมกัน (Combined Drought and Heat Stress; CDHS) ในพื้นที่แถบแอฟริกาใต้สะฮารา (Sub-Saharan Africa) โดยสร้างลูกผสมเดี่ยว 24 คู่ (Single Cross Hybrids; SCHs) จากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ โดยใช้แผนการผสมพันธุ์ North Carolina Design II ที่ใช้สายพันธุ์แม่จำนวน 4 ผสมกับสายพันธุ์พ่อจำนวน 6 สายพันธุ์ ทำการเก็บข้อมูลลักษณะรองที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต ผลพบว่า ลักษณะส่วนใหญ่ถูกควบคุมโดยยีนที่ส่งผลแบบบวกสะสม (additive) ยกเว้นผลผลิตเมล็ดที่ถูกควบคุมโดยยีนที่ส่งผลแบบไม่บวกสะสม (non-additive) พบ 5 สายพันธุ์แท้ที่มี GCA สูงสำหรับลักษณะผลผลิตภายใต้สภาวะแห้งแล้งและความร้อนร่วมกัน และพบลูกผสมจำนวน 3 คู่ผสม ที่ให้ค่าความสามารถในการผสมพันธุ์เฉพาะ (SCA) สูงสำหรับผลผลิตภายใต้สภาวะแห้งแล้งและความร้อนร่วมกัน นอกจากนี้ Ngaboyisonga et al. (2019) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการผสมพันธุ์ของสายพันธุ์ข้าวโพดในประเทศรวันดา เพื่อพัฒนาพันธุ์ลูกผสมและพันธุ์สังเคราะห์ที่มีผลผลิตสูงและออกไหมเร็ว เนื่องจากต้องการค้นหาสายพันธุ์ที่ออกไหมเร็วเพื่อลดช่วงห่างระหว่างวันออกดอกออกไหม (Anthesis and silking interval; ASI) โดยใช้สายพันธุ์แท้จำนวน 17 สายพันธุ์ เป็นกลุ่มพ่อและแม่ และผสมพันธุ์โดยใช้แผนการผสมแบบ North Carolina Design II ผลการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ RML0006, RML0014, RML0015, RML0018, RM0017 และ RML0010 มีค่า GCA สูงสำหรับผลผลิตเมล็ด แต่ค่า GCA สำหรับการออกไหม (ออก

ไหมเร็ว) มีค่าต่ำ ส่วนลูกผสม 10 คู่ มีค่า SCA สำหรับผลผลิตเมล็ด โดยให้ปริมาณผลผลิตเมล็ดสูงกว่า 1.5 ต้นต่อเฮกตาร์ ในขณะที่ค่า SCA สำหรับการออกไหม (ออกไหมเร็ว) มีค่าต่ำ สายพันธุ์เหล่านี้จึงถูกนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมที่มีผลผลิตสูงและออกไหมเร็ว

อีกหนึ่งปัจจัยหลักที่มีผลกระทบอย่างมากและอาจนำไปสู่ความคลาดเคลื่อนของการประเมินศักยภาพของพันธุ์ได้นั้น คือ อิทธิพลของสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่อาจส่งผลกระทบต่อลักษณะฟีโนไทป์ที่วัดได้ ดังนั้น ในวิเคราะห์ผลของการปรับปรุงพันธุ์พืชจึงมักมีการแยกอิทธิพลของสภาพแวดล้อมออกมา เพื่อให้เห็นอิทธิพลของพันธุ์เทียบกับอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ค่าดังกล่าวคือ อัตราพันธุกรรม (heritability) ซึ่งนำมาใช้ในการประเมินลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะที่สนใจได้ หากอัตราทางพันธุกรรมมีค่าสูง หมายความว่า อิทธิพลของสภาพแวดล้อมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะน้อยมาก อัตราพันธุกรรมจำแนกได้ 2 ชนิด ได้แก่ อัตราพันธุกรรมแบบกว้าง (broad sense heritability; H^2) และ อัตราพันธุกรรมแบบแคบ (narrow sense heritability; h^2)

อัตราพันธุกรรมแบบกว้าง เป็นอัตราส่วนระหว่างความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งหมด ต่อความแปรปรวนที่สังเกตได้ทั้งหมด ดังสมการดังนี้

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_E^2}$$

โดยที่ σ_G^2 คือ Genetic variance หมายถึง ค่าความแปรปรวน (Variance) ของลักษณะที่เกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรนั้น ๆ และ σ_E^2 คือ Environment variance หมายถึง ค่าความแปรปรวนของลักษณะที่เกิดจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อม

ส่วนอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (narrow sense heritability; h^2) สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2}$$

โดยที่ σ_A^2 คือ Additive variance หมายถึง ค่าความแปรปรวนของลักษณะที่เกิดจากอิทธิพลของยีนที่ส่งต่อจากพ่อแม่สู่ลูกโดยตรง หรือ เกิดจากการสะสมของยีนที่มีอิทธิพลต่อลักษณะนั้น ๆ และ σ_P^2 คือ ค่าความแปรปรวนของลักษณะที่ศึกษา เกิดจากผลรวมของความแปรปรวนทาง

พันธุกรรม (Genotypic Variance; σ_G^2) และความแปรปรวนทางสภาพแวดล้อม (Environmental Variance; σ_E^2) มีสมการคือ

$$\sigma_P^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2$$

ในส่วนของ σ_G^2 สามารถแบ่งออกเป็น σ_A^2 , σ_D^2 และ σ_I^2 ซึ่ง σ_D^2 หมายถึง ความแปรปรวนของการข่มกันของยีน (Dominance Genetic Variance) และ σ_I^2 หมายถึง ความแปรปรวนของการปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน (Interaction Genetic Variance หรือ Epistatic Variance)

ในหลายงานวิจัยพบว่า h^2 ให้ประโยชน์มากกว่า H^2 เนื่องจาก σ_D^2 และ σ_I^2 เป็นองค์ประกอบของ genotype สามารถเปลี่ยนแปลงได้ในตอนแบ่งเซลล์แบบ Miosis ดังนั้นในรุ่นลูกที่ได้จึงมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ค่า σ_G^2 ก็เปลี่ยนแปลงตามไปด้วย (Singh et al., 1993)

การศึกษาในระดับโมเลกุล

สภาวะแห้งแล้งกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา ชีวเคมี รวมถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลที่ซับซ้อนในพืช การศึกษาในระดับโมเลกุล เช่น การวิเคราะห์จีโนม (genome), ทรานสคริปโตม (transcriptome), โปรตีโอม (proteome) และเมแทโบโลม (metabolome) ช่วยให้เข้าใจถึงเครือข่ายการทำงานของยีน โปรตีน และสารเมแทบอลิไทต์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการรับรู้สัญญาณ การส่งสัญญาณ และการตอบสนองต่อความเครียดจากภาวะขาดน้ำได้อย่างละเอียด (Kiegle et al., 2000) การระบุองค์ประกอบและวิถีทางโมเลกุลเหล่านี้เป็นพื้นฐานสำคัญในการพัฒนาแนวทางการปรับปรุงพันธุ์

ลักษณะความทนทานต่อสภาพแล้งเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait) ที่ถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง (Quantitative Trait Loci หรือ QTL) และได้รับอิทธิพลจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนและสภาพแวดล้อม ทำให้การปรับปรุงพันธุ์โดยอาศัยลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวเป็นไปได้ยากและใช้เวลานาน การศึกษาในระดับโมเลกุลช่วยในการค้นหายีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมลักษณะความทนทานต่อความแห้งแล้ง การระบุยีนเหล่านี้นำไปสู่การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) ที่มีความจำเพาะและแม่นยำ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พืชทนแล้งในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว วิธีการ

ดังกล่าวไม่จำเป็นต้องรอให้พืชแสดงลักษณะภายใต้สภาวะแห้งแล้งในแปลงทดลอง (Aslam et al., 2015)

การศึกษาในระดับโมเลกุลได้ให้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองของพืชต่อความเครียดจากความแห้งแล้ง โดยระบุยีนและวิถีการทำงานของยีน (gene pathways) ที่เกี่ยวข้องกับการทนทานต่อสภาวะดังกล่าว ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาโปรตีนไคเนส (protein kinases) เช่น MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) พบว่า มีบทบาทสำคัญในการส่งสัญญาณภายใต้ความเครียดจากความแห้งแล้ง และควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัว การระบุยีนเหล่านี้และกำหนดบริเวณ DNA ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความทนทานต่อแล้ง (QTLs) เป็นพื้นฐานสำคัญในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) (Lin et al., 2021)

บทบาทของโปรตีนไคเนสในการตอบสนองของพืชต่อความเครียดที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต

ยีน 2 กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในระดับโมเลกุลเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม คือ ยีนในกลุ่ม functional protein และ ยีนในกลุ่ม regulatory protein

ยีนในกลุ่ม functional protein เป็นกลุ่มที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองโดยตรง ได้แก่ water channels dehydrins (LEA proteins), antifreeze proteins, chaperones, detoxification enzyme, INA proteins, proline transporters, sugar และเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารออสโมไลต์

ยีนในกลุ่ม regulatory protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ signal transduction เป็นตัวส่งสัญญาณทางเคมีเพื่อไปควบคุมการทำงานของยีนตัวอื่นให้ตอบสนองต่อสภาวะเครียด โปรตีนในกลุ่มนี้ ได้แก่ 1) กลุ่มของเอนไซม์ใน phospholipids metabolism และ signaling molecules เช่น calmodulin-binding protein 2) กลุ่มของ transcription factors ต่าง ๆ เช่น MYB, MYC, CBF (1 2 และ 3) กลุ่มของ protein kinases ชนิดต่าง ๆ เช่น calcium dependent protein kinase (CDPK), SNF1, ribosomal s6 kinase และ MAP kinases (Figure 3) (Randy, 1995; Beck et al., 2007; de Zelicourt et al., 2016)

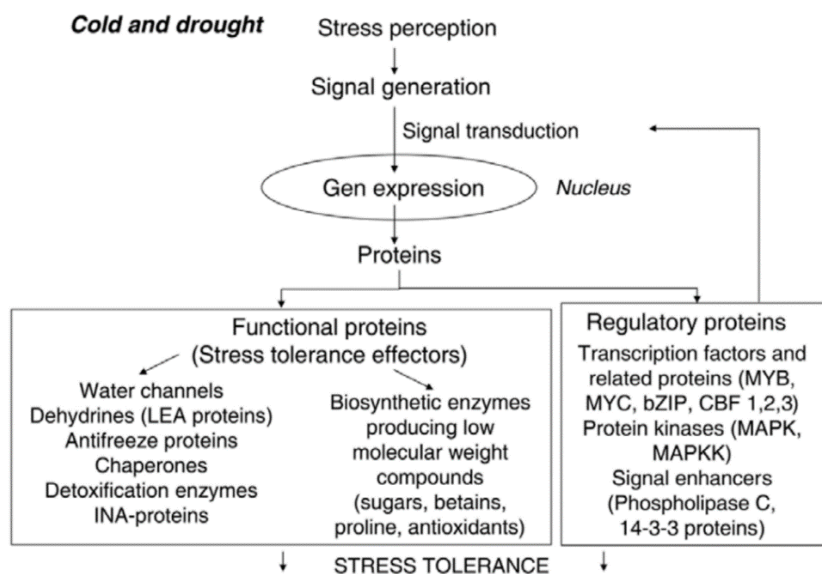


Figure 3. Stress tolerance factors produced in adaptive responses of a plant

ที่มาภาพ : Randy (1995)

โปรตีนไคเนสที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียดในยูคาริโอต

โปรตีนไคเนส (protein kinase) เป็นหนึ่งในตระกูลยีนที่ใหญ่ที่สุดในจีโนมพืช เอนไซม์เหล่านี้จะเร่งปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) ของกรดอะมิโนจำเพาะ ได้แก่ ซีรีน ธรีโอนีน และไทโรซีน (Serine; Ser, Threonine; Thr และ Tyrosine; Tyr) เพื่อควบคุมการทำงานของโปรตีนเป้าหมาย โดยโปรตีนไคเนส เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมกิจกรรมทางชีวภาพของโปรตีน โดยการเร่งปฏิกิริยาการถ่ายโอน γ -phosphate จาก adenosine triphosphate (ATP) ไปยังกรดอะมิโน (Ser Thr และ Tyr) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมการทำงานของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป (Stone and Walker, 1995)

Hanks and Hunter (1995) ได้ทำการจัดกลุ่มของโปรตีนไคเนสไว้ทั้งหมด 5 กลุ่ม ได้แก่ **กลุ่ม A** หรือที่เรียกว่า AGC group ได้แก่ PKC family, cyclic nucleotide-dependent family (PKA และ PKG) และ ribosomal S6 kinase family โดยเอนไซม์ AGC kinases จะทำหน้าที่เป็นสื่อกลางในการส่งสัญญาณออกซิน ด้วยเหตุนี้เอนไซม์ AGC kinases จึงมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการเจริญเติบโตและการสร้างรูปร่าง การเจริญเติบโตของเซลล์ เมแทบอลิซึม การแบ่งตัว และการอยู่รอดของพืช **กลุ่ม B** หรือ CaMK group ประกอบด้วย SNF1 /AMP activated protein kinase และ calcium/calmodulin-dependent kinases ซึ่งกลุ่มนี้จะเป็นตัวส่งสัญญาณเพื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์ให้สูงขึ้น ทำให้เกิดการจับตัวกับโปรตีนเป้าหมายตัวถัดไปภายใน

เซลล์เพื่อให้พืชตอบสนองต่อสภาวะเครียดที่เกิดขึ้น **กลุ่ม C** หรือ CMGC group ได้แก่ CKII families, GSK-3, CDK และ mitogen-activated protein kinase (MAPK) โดย CMGC group จะทำงานตรงกันข้ามกับ AGC และ CaMK group ซึ่งจะเป็นตัวควบคุมตัวรับสัญญาณที่เรียกว่า second messenger โดยจะไปควบคุมกระบวนการ phosphorylation ที่ตำแหน่ง subdomains VII and VIII ซึ่งเป็นบริเวณที่เรียกว่า activation loop **กลุ่ม D** หรือ conventional PTK group ในกลุ่ม PTK เป็นโปรตีนไคเนสที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา phosphorylation ของกรดอะมิโน serine (Ser) threonine (Thr) และ tyrosine (Tyr) จากโปรตีนเป้าหมายที่ตกค้าง โดยการถ่ายโอน **Y**-phosphate จาก ATP และ **กลุ่ม E** ซึ่งเป็นกลุ่มอื่น ๆ นอกเหนือจากที่ได้กล่าวมาข้างต้น เช่น RLKs ซึ่งคาดการณ์ว่า RLKs จะมีหน้าที่คล้ายกับ RTKs (Figure 4) ซึ่งเป็นโปรตีนเมมเบรน (transmembrane proteins) ที่รับรู้สัญญาณจากภายนอกเซลล์ได้จาก polypeptide ligand จากนั้น Ligand-binding จะทำให้เกิดกระบวนการ phosphorylation ในโดเมน cytoplasmic kinase การจัดหมวดหมู่ของโปรตีนไคเนสเหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากในพืชหลายชนิดมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน อีกทั้งยังมีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกันอีกด้วย (Kiegle et al., 2000)

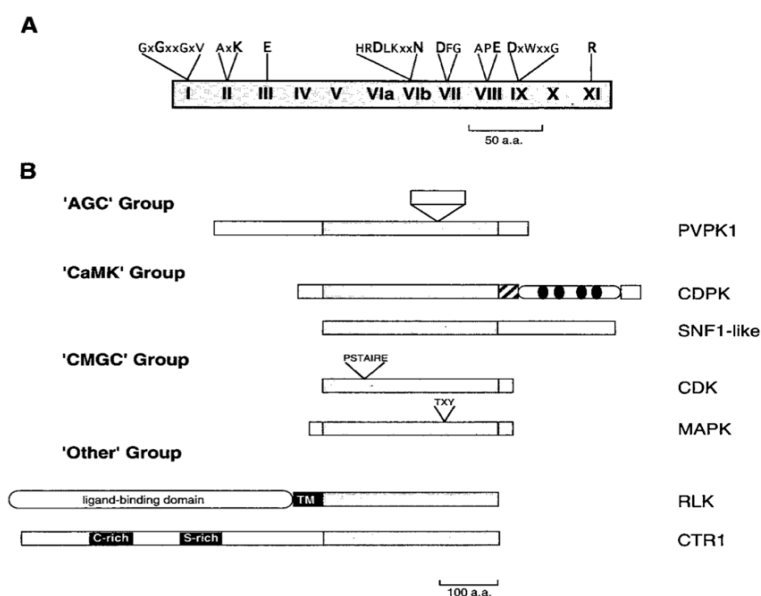


Figure 4. Classification of plant protein kinases

ที่มาภาพ : Hanks and Hunter (1995)

วิถีไมโทเจนแอกทิเวเตดโปรตีนไคเนส (Mitogen-activated protein kinases)

วิถีไมโทเจนแอกทิเวเตดโปรตีนไคเนส (Mitogen-activated protein kinases; MAPK) หรือ แมพไคเนส (MAPK) เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณหลากหลายอย่าง ซึ่งแต่ละลำดับของไคเนส (kinase cascades) จะทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการภายในเซลล์ที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ และสิ่งกระตุ้น (Jiang et al., 2022) MAPK เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ มีหน้าที่หลัก คือ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการตายของเซลล์ เอนไซม์กลุ่มนี้มีกระบวนการที่เรียกว่า phosphorylation โดยมีการเติมหมู่ฟอสเฟตไปยังโปรตีนเป้าหมาย เป็นการกระตุ้นให้โปรตีนเป้าหมายทำงานเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อสถานะเครียดที่พืชได้รับ ทั้งสถานะเครียดที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic stresses) และที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตอีกด้วย (biotic stresses) (Lin et al., 2021) MAPK ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Sturgill and Ray (1986) ซึ่งโปรตีนไคเนสถูกสกัดได้จากเซลล์ 3T3-L1 ที่ได้รับการทดสอบด้วยอินซูลิน ทีมนักวิจัยพบว่า โปรตีนไคเนสมีบทบาทในการจับและเรียงตัวของ microtubule phosphorylation ที่เกี่ยวข้องกับการจับตัวกับโปรตีน (MAP-2) ทั้งในซีรีนและทรีโอนีน โดย MAP-2 kinase ได้มีการจับตัวกับ receptor tyrosine kinases (RTKs) ซึ่งมีบทบาทต่อวิธีส่งสัญญาณภายในเซลล์ในแง่ของการเป็นตัวรับสัญญาณการกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้นต่าง ๆ และทำหน้าที่ถ่ายทอดสัญญาณต่อไปยังโปรตีนอื่น ๆ ทำให้เกิดการตอบสนองต่อ mitogens ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการส่งเสริมการแบ่งเซลล์ จากนั้นต่อมาได้เปลี่ยนชื่อ MAP-2 kinase เป็น p42 MAP kinase จากการศึกษาก่อนหน้านี้ทำให้ทราบว่า โปรตีนไคเนส p42 MAP นั้นขึ้นอยู่กับฟอสโฟรีเลชันของทั้งทรีโอนีนและไทโรซีน (Anderson et al., 1990)

เอนไซม์ Mitogen-activated protein kinase (MAPK หรือ MPK) เป็น Family ที่มีกลุ่มใหญ่ที่สุดในยูคาริโอต วิถี MAPK cascade pathway ประกอบด้วยไคเนส 3 ชนิด ได้แก่ 1) MAP kinase kinases kinases (MAPKKKs, MKKKs, MAP3Ks, หรือ MEKKs) 2) MAP kinase kinases (MAPKKs, MKKs, หรือ MAP2Ks) และ 3) MAP kinases (MAPKs หรือ MPKs) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสัญญาณจากภายนอกเซลล์จะมากระตุ้น MAP3K ส่งผลให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง serine (S) and threonine (T) ของ MAPKKs และเมื่อ MAPKKs ถูกกระตุ้นก็เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง T and tyrosine (Y) ของ MAPKs ส่งผลให้ MAPKs ถูกกระตุ้นและส่งสัญญาณต่อไปยังไซโตพลาสซึม หรือนิวเคลียส (Figure 5) (Jagodzick et al., 2018) นอกจากตำแหน่ง TDY (Thr-Asp-Tyr) และ TEY (Thr-Glu-Tyr) กระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ยังสามารถเกิดขึ้นที่ตำแหน่งอื่นได้ เช่น TEM (Thr-Glu-Met), TEC (Thr-Glu-Cys), MEY (Met-Glu-Tyr), TSY (Thr-

Ser-Tyr), TVY(Thr-Val-Tyr), TQY (Thr-Gln-Tyr) และ TRM (Thr-Arg-Met) (Jiang et al., 2022) มีรายงานพบว่า จีโนมของ *Arabidopsis* สามารถสังเคราะห์ MAPKs ได้มากถึง 20 ตัว, MAPKKs 10 ตัว และ MAPKKKs 80 ตัว ขณะที่จีโนมของข้าวสังเคราะห์ MAPKs ได้ 17 ตัว MAPKKs 8 ตัว และ MAPKKKs 75 ตัว ส่วนจีโนมของข้าวโพดพบ MAPKs 19 ตัว MAPKKs 9 ตัว และ MAPKKKs 74 ตัว ที่พืชใช้การตอบสนองต่อสภาวะแล้ง (Jagodzic et al., 2018)

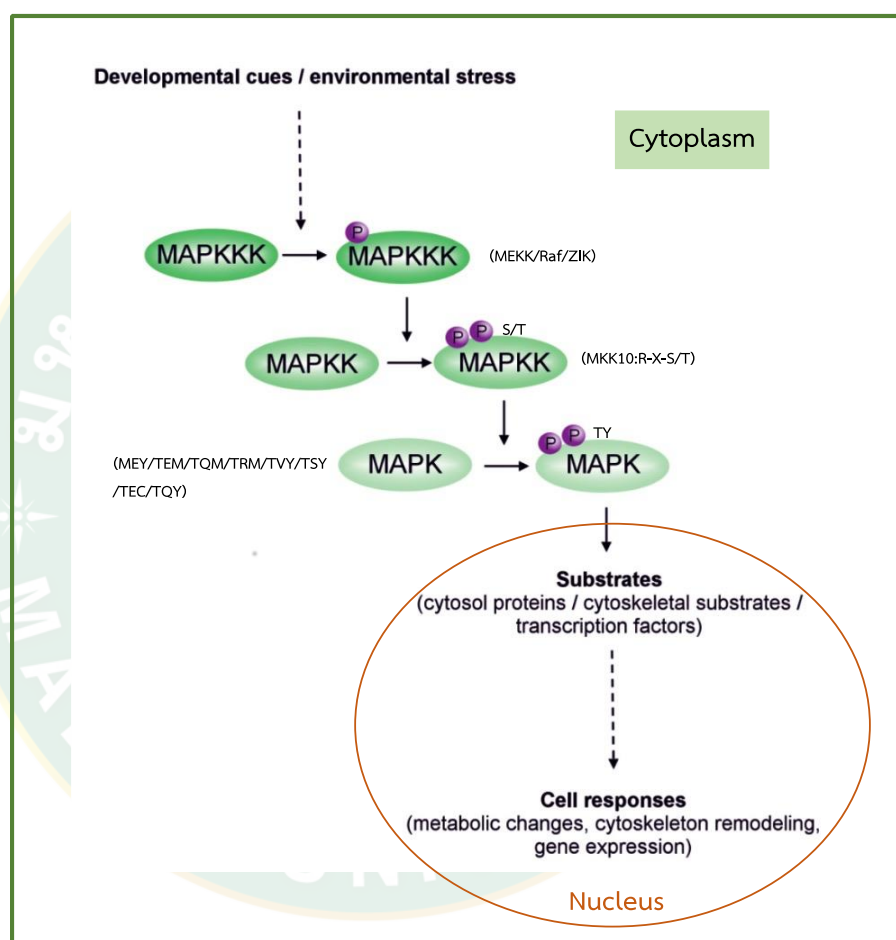


Figure 5. A signal transduction of MAPK cascade

ที่มาภาพ: Jiang et al. (2022)

MAPK ที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้ง

MAPK มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อความเครียดจากภัยแล้ง โดยตอบสนองต่อฮอร์โมน Absciscic acid (ABA) และควบคุมการผลิต ROS จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยการหาลำดับเบสของ RNA (RNA Sequencing; RNA Seq) พบว่า ในข้าว พบ OsMKK4, OsMKK1, OsMPK8, OsMPK7, OsMPK5 และ OsMPK4 แสดงออกมากขึ้นเมื่อข้าวเผชิญกับความเครียดจากภัยแล้ง (Agrawal et al., 2008) นอกจากนี้ ในการทดสอบในฝ้ายภายใต้สภาพเครียดออสโมติก (ชักนำด้วยการให้สาร PEG 6000) พบว่า ยีน GhMPK6, GhMPK9, GhMPK10, GhMPK12, GhMPK13, GhMPK19 และ GhMPK24 มีการแสดงออกมากขึ้น และช่วยให้ฝ้ายมีการตอบสนองต่อการขาดน้ำได้ดี (Zhang et al., 2014) (Moustafa et al., 2014) ได้ศึกษา MAPK Families ของ *Arabidopsis thaliana* ภายใต้สภาวะขาดน้ำ ความเครียดจากเกลือ (Salt stress) หรือสภาวะที่พืชได้รับผลกระทบจากความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่สูงทั้งในดิน น้ำ หรือสารละลายที่ใช้ปลูก งานวิจัยนี้สรุปได้ว่ายีน MPK2, MPK3, MPK4, MPK5, MPK12 และ MAPKKK4 ใน *Arabidopsis* มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพเครียดจากการขาดน้ำ ส่งผลให้พืชสามารถดำรงอยู่ในสภาวะขาดน้ำได้ ในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ภายใต้สภาพแห้งแล้ง พบการแสดงออกของยีน ZmMAPKKK56, ZmMAPKKK19, ZmMAPKKK18, ZmMKK10-2, ZmMPK3 และ ZmMPK15 ซึ่งการค้นพบนี้เน้นย้ำให้เห็นถึงความสำคัญของ MAPK ภายใต้สภาพแห้งแล้ง (Wang et al., 2010) จากการศึกษา MAPK 10.2 ที่ส่งเสริมความต้านทานโรคที่เกิดจาก *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* (Xoc) และทนทานต่อสภาพแล้งในข้าว พบว่า ต้นข้าวสายพันธุ์ Zhonghua 11 ที่มีการแสดงออกของยีน MAPK 10.2 มาก (overexpression) มีอัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าสูงกว่าพันธุ์ควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (wild type) ภายใต้สภาพแล้ง เมื่อต้นข้าวที่มียีนดังกล่าวถูก knock down พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่ายีน MAPK 10.2 มีส่วนช่วยให้ข้าวรอดชีวิตเมื่ออยู่ในสภาวะแล้งได้ (Ma et al., 2017) จากการศึกษาของ Ye et al. (2017) ที่ได้ศึกษาบทบาทของ MeMAPKKK (MEK MAPKKK) ในการตอบสนองต่อความแห้งแล้งของต้นกล้าน้ำมันสำปะหลัง ทั้ง 3 พันธุ์ ที่งอกมาเป็นเวลา 12 วัน เมื่อเก็บตัวอย่างใบและรากเพื่อทำการวิเคราะห์ RNA-seq พบว่า ในพันธุ์ Arg7 ยีน MeMAPKKK 7/56 และ 14/56 ถูกกระตุ้นหลังจากความเครียดจากความแห้งแล้งในรากและใบ ตามลำดับ โดยมียีนสองยีน ซึ่งได้แก่ MeMAPKKK32 และ MeMAPKKK40 มีแสดงการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในรากและใบ ในมันสำปะหลังพันธุ์ SC124 การแสดงออกของยีน MeMAPKKK 3/56 และ 9/56 เพิ่มขึ้นหลังจากความเครียดจาก

ความแห้งแล้งในรากและใบ ตามลำดับ โดย MeMAPKKK40 แสดงการเพิ่มขึ้นในทั้งรากและใบ และในกลุ่มย่อย W14 ยีน MeMAPKKK 4/56 และ 5/56 แสดงการกระตุ้นหลังจากความเครียดจากความแห้งแล้งในรากและใบ ตามลำดับ ซึ่งให้เห็นว่า จำนวน MeMAPKKK ที่เพิ่มขึ้นจากความแห้งแล้งนั้น Arg7 และ SC124 มากกว่าใน W14 จากงานวิจัย ซึ่งให้เห็นว่า MAPKKK มีการตอบสนองต่อความแห้งแล้งอาจแตกต่างกันระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ป่าและพันธุ์ที่ปลูก

จากการศึกษาของ Wang et al. (2022) ที่ได้ทำการศึกษาหากลุ่มยีน MAPK ในต้นบัควีททาร์ทาร์ (*Fagopyrum tataricum*) โดยใช้ข้อมูลลำดับจีโนมทั้งหมด จัดแผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) การวิเคราะห์รูปแบบซ้ำ ๆ ในโปรตีน (motif) และการวิเคราะห์ตำแหน่งโครโมโซม เพื่อจัดกลุ่มยีน MAPK ทั้งหมด 65 ยีนที่พบในต้นบัควีททาร์ทาร์ ซึ่งกระจายอยู่บนโครโมโซม 5 แห่ง ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ MAPK (8 ยีน) MAPKK (1 ยีน) และ MAPKKK (56 ยีน) พบว่า ยีน FtMAPK5, FtMAPKK1, FtMAPKKK8, FtMAPKKK10 และ FtMAPKKK24 ในต้นกลับบัควีททาร์ทาร์มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อพืชอยู่ภายใต้ความเครียดจากสภาวะแวดล้อม 3 ประเภท ได้แก่ ความแห้งแล้ง ความเค็ม และอุณหภูมิสูง

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) และความสำคัญของ InDel marker

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) สามารถใช้จำแนกความแตกต่างในระดับ DNA ได้ ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช มีความพยายามในการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการคัดเลือก ซึ่งเรียกว่า Marker Assisted Breeding (MAB) หรือ Marker Assisted Selection (MAS) นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุลสามารถนำมาจัดทำแผนที่พันธุกรรม หาความหลากหลายทางพันธุกรรม และการจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของพืชได้ด้วย ตัวอย่างเช่น เครื่องหมาย Simple Sequence Repeats (SSR) หรือ microsatellites ที่เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีลักษณะการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงสั้น ๆ ประมาณ 2-6 คู่เบส ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่าย มีความจำเพาะสูง และมีความหลากหลายในจีโนม (Litt et al., 1997) เครื่องหมาย Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ซึ่งเป็นความต่างเพียงตำแหน่งเดียวใน DNA ซึ่งค่อนข้างจะมีความจำเพาะ และแม่นยำสูงมาก (Broeckx et al., 2017) หรือเครื่องหมาย Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มมีข้อดีในการตรวจสอบได้ง่ายรวดเร็ว แต่มีความจำเพาะต่ำ (Vos et al. 1995) เครื่องหมาย Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เทคนิคการตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของขนาด DNA ซึ่ง

จะมีความแม่นยำสูง แต่ข้อเสีย คือ ต้องใช้ปริมาณ DNA มาก และมีกระบวนการที่ค่อนข้างซับซ้อน (Botstein et al., 1980)

Insertion/Deletion Polymorphisms (InDels) เป็นเครื่องหมายพอลิมอร์ฟิซึมที่ถูกสร้างขึ้นจากการค้นหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่เกิดการเพิ่มเข้ามา หรือการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดเล็ก โดยปกติอยู่ที่ 1-50 คู่เบส ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่าย มีความจำเพาะสูง และมีความหลากหลายในจีโนม นอกจากนี้ InDel marker สามารถจำแนก homozygous (อัลลีลชุดเดียวกัน) และ heterozygous (อัลลีลที่ต่างชุด) กันได้ นอกจากนี้ ยังสามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส มีการศึกษาพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของภาคใต้ ประเทศไทย โดยใช้ InDel marker ที่เกี่ยวข้องกับความเครียดต่อสภาพแล้ง ทั้งหมด 16 คู่ ผลพบว่า พบรูปแบบที่แตกต่างกันของยีน 36 อัลลีลที่แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวที่ศึกษา โดยแสดงถึงเป็นสองกลุ่มหลัก ส่วนใหญ่เป็นความแตกต่างระหว่างข้าวที่ปลูกในนาดอนและที่ลุ่ม เครื่องหมาย InDel ที่พบในงานวิจัยนี้ ได้แก่ Indel1922, -2543, -6746, -7447 และ -8538 ซึ่งอยู่ในยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนทานต่อความเครียด (Whankaew et al., 2020) นอกจากนี้ มีการใช้เครื่องหมาย InDel ที่เกี่ยวข้องกับความแห้งแล้งมาทดสอบในทุเรียน (*Durio zibethinus*) จำนวน 24 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นพันธุ์ท้องถิ่นในประเทศไทย ผลพบว่า ค่าความหลากหลาย (polymorphic information content; PIC) ของเครื่องหมาย INDEL จำนวน 9 คู่ มีค่าอยู่ในช่วง 0.1103 ถึง 0.5808 ซึ่งผลประเมินระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 24 จีโนไทป์ อยู่ในช่วง 0.222 ถึง 0.889 ผลการจัดกลุ่มลำดับวงศ์ตระกูล (phylogeny) สามารถแบ่งตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่ม ผลนี้ชี้ให้เห็นว่า เครื่องหมาย InDel ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ตอบสนองต่อความแห้งแล้งนี้มีประโยชน์สำหรับการศึกษาทางพันธุกรรม (Sathapondecha et al., 2024) จากการศึกษายีนที่เข้ารหัส NAC ชื่อว่า ZmNAC080308 ได้ถูกโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายพันธุ์ข้าวโพด 199 สายพันธุ์ และจากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า ยีน ZmNAC080308 อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับยีน NAC อื่น ๆ ที่เป็นที่รู้จักกันดีว่าตอบสนองต่อการปรับปรุงความทนทานของพืชต่อความแห้งแล้ง โดยพบ SNPs 86 ตำแหน่งและ InDels 47 ตำแหน่งในบริเวณทั่วไปของ ZmNAC080308 ซึ่ง 19 ตำแหน่งยีนนั้นเกี่ยวข้องกับผลผลิตเมล็ด ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจควบคุมการแสดงออกของยีนและมีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อการปรับปรุงผลผลิต ภายใต้สภาวะความแห้งแล้ง (Wang et al., 2021)

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1: การประเมินค่าทางพันธุกรรมของข้าวโพดสายพันธุ์แท้

การวางแผนการทดลอง

นำข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สายพันธุ์แท้ที่ถูกจัดว่ามีความทนและไม่ทนต่อสภาพแล้งจาก Hannok et al. (2023) จำนวนทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ดังแสดงใน Table 1 โดยกลุ่มที่มีความทนต่อสภาพแล้งประกอบด้วย Nei9202 Ki48 Nei492006 และ Nei452004 และกลุ่มที่ไม่ทนต่อสภาพแล้งประกอบด้วย Nei542010 Ki53 Ki59 และ Kei1421 สำหรับการทดสอบนี้ กำหนดใช้สายพันธุ์ Nei542010 และ Nei9202 เป็นพันธุ์พ่อ ขณะที่สายพันธุ์ Ki48 Ki53 Ki59 Kei1421 Nei452004 และ Nei492006 ใช้เป็นพันธุ์แม่ สร้างลูกผสมโดยใช้แผนการผสมพันธุ์แบบ North Carolina Design II ในปี พ.ศ. 2564 ณ โรงเรือน อาคารกำจรบุญแปลง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ทำการปลูกและผสมเกสรระหว่างสายพันธุ์แม่และสายพันธุ์พ่อ เพื่อผลิตเมล็ดลูกผสม F_1 จำนวน 12 คู่ผสม (Table 2)

ในปี พ.ศ. 2566 ปลูกทดสอบเมล็ดลูกผสมทั้ง 12 คู่ผสมในโรงเรือนระบบปิด ของสาขาวิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ มีการควบคุมการให้น้ำ โดยใช้ระบบน้ำหยด ปลูกข้าวโพดในถุงปลูก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 44.5 เซนติเมตร บรรจุวัสดุปลูกที่เตรียมจากดินปลูกและปุ๋ยหมักที่อัตราส่วน 2:1 วางแผนการทดลองแบบ 2×12 Factorial in Randomized complete block design จำนวน 2 ซ้ำ โดย 1 หน่วยทดลอง ประกอบด้วยข้าวโพด 5 ต้น จำนวนหน่วยทดลองทั้งหมด เท่ากับ 48 หน่วยทดลอง กำหนดให้ปัจจัยที่ 1 คือ ลูกผสมทั้ง 12 คู่ผสม ส่วนปัจจัยที่ 2 คือ รูปแบบการให้น้ำ ได้แก่ 1) การให้น้ำแบบสม่ำเสมอ (WW) ซึ่งให้น้ำในตอนเช้า จำนวน 1 ครั้งต่อวัน อัตราการให้น้ำเฉลี่ย 29.20 มล.ต่อนาที่ วันละ 30 นาที่ และ 2) การจำกัดการให้น้ำ (WS) เพื่อเหนี่ยวนำสภาพเครียดจากการขาดน้ำ กระทำโดยงดน้ำเป็นเวลา 7 วันเมื่อข้าวโพดมีอายุได้ 33 วันหลังปลูก ไปจนถึง 39 หลังปลูก (รวม 7 วัน)

สำหรับการดูแลข้าวโพดทั้งหมด กำหนดการให้ปุ๋ยเคมี จำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ให้ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 โดยให้รองพื้นก่อนปลูก ที่อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ (เฉลี่ยต้นละ 5.80 กรัมต่อต้น ครั้งที่ 2 ให้ปุ๋ยเคมี สูตร 46-0-0 ที่อัตรา 44 กิโลกรัมต่อไร่ (เฉลี่ยต้นละ 5.16 กรัมต่อต้น) เมื่อข้าวโพดอายุได้ประมาณ 35 วันหลังปลูก

Table 1. Pedigree and source of eight inbred lines

Order no.	Inbred line	Pedigree	Drought tolerance ¹	Parent
1	Ki48	Pioneer3013-S8-57-2	tolerant	Female
2	Ki53	KS27(S)C1-S8-39-1-1(Kei0703)	susceptible	Female
3	Ki59	(Agron35xKi45)-S8-6-1-2-1-3(Kei1024)	susceptible	Female
4	Kei1421	(Ki49xKei9806)-F2-S7-4-1-1-BxKei0703}-F2-S8-9-1-1-1-1-1	susceptible	Female
5	Nei452004	KS23(S)C2-190-1-2-1-BBBBBB(LT)	tolerant	Female
6	Nei9202	Pop.28(HS)C6-S9-5-2-1-B	tolerant	Male
7	Nei492006	XPT9774-BBBBBB-1	tolerant	Female
8	Nei542010	[(KS23(S)C2-190-1-2-1-BBBBBxPIONEER3006-4-1-3-1-BBB)-40-3-BBBBBxNei452008]-F2-B-B-B-10-1-B-B-B	susceptible	Male

Remark: ¹ drought tolerance of each line based on cluster analysis of Hannok et al. (2023)

Table 2. Twelve F₁ progenies from North Carolina Mating Design II

	Males parent	
	Females parent	
Ki48	Ki48 x Nei9202	Nei9202
Ki53	Ki53 x Nei9202	Nei542010
Ki59	Ki59 x Nei9202	
Kei1421	Kei1421 x Nei9202	
Nei452004	Nei452004 x Nei9202	
Nei492006	Nei492006 x Nei9202	

การบันทึกลักษณะฟีโนไทป์ในแต่ละระยะ

ทำการเก็บลักษณะทางฟีโนไทป์ ทั้งหมด 46 ลักษณะ โดยแต่ละลักษณะมีวิธีการเก็บข้อมูลดังตารางข้างล่างนี้ โดย 20 ลักษณะแรกถูกเก็บข้อมูลในช่วงระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative stage) จากนั้นเมื่อข้าวโพดอยู่ที่ระยะ v6 เริ่มทำการเก็บลักษณะที่ใช้ในการปรับตัวเมื่ออยู่ในสภาพแล้ง (Adaptative traits) ทั้งหมด 14 ลักษณะ ประกอบด้วย ค่าความเขียวใบ (SPAD) 7 ลักษณะ และอีก 7 ลักษณะได้จาก ค่าการม้วนใบ (Leave rolling; LR) และเมื่อข้าวโพดเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ (reproductive stage) เก็บลักษณะฟีโนไทป์ทั้งหมด 6 ลักษณะ ได้แก่ วันออกดอกตัวผู้ (Anthesis date; AD) วันที่ออกดอกตัวเมีย (Silking date; SD) ช่วงห่างระหว่างวันออกดอกและออกไหม (Anthesis and silking interval; ASI) ขนาดช่อดอกตัวผู้ (Tassel size; TS) และความหนาแน่นของช่อดอก (Spikelet density; SPD) และ ข้าวโพดเข้าสู่ระยะการเก็บเกี่ยว (Harvest) เก็บบันทึกข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะองค์ประกอบผลผลิต 6 ลักษณะ ได้แก่ น้ำหนักสด (Flesh weight; FW) น้ำหนักสดหลังปอกเปลือก (Flesh weight unhusked; FWunhusked) น้ำหนักแห้ง (Total dry weight; TDW) น้ำหนักแห้งของเมล็ด (Kernel dry weight; KDW) น้ำหนักแห้ง 100 เมล็ด (Kernel dry weight; 100 KDW) และจำนวนเมล็ด (Number of kernel; NK) และวิธีการในการเก็บบันทึกทั้ง 46 ลักษณะถูกแสดงใน Table 3 ซึ่งช่วงเวลาในการเก็บข้อมูลถูกแสดงใน Figure 6

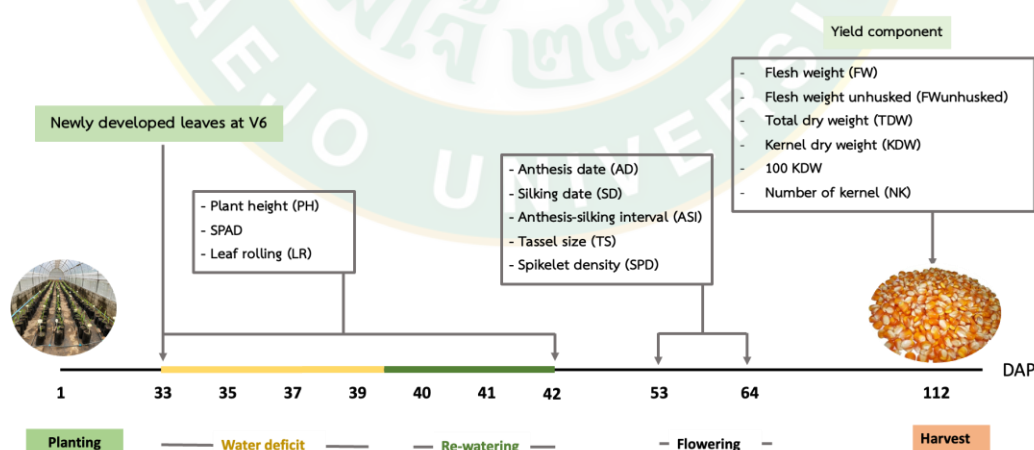


Figure 6. Experimental management by day after planting (DAP)

Table 3. secondary Traits, yield components, and data collection methods for various traits

ลำดับที่	ระยะการเจริญเติบโต	ลักษณะ	วิธีการเก็บบันทึกลักษณะต่าง ๆ
1	การเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative stage)	ความสูงที่ระยะ V (Plant height at V; PHv)	ทำการวัดความสูงของข้าวโพด จากพื้นดินจนถึงจุดโค้งของใบ (จุด Arc) ที่เจริญเต็มที่แล้ว (Figure 7a) ควบคู่กับการวัดระยะ V ซึ่งจะเริ่มทำการวัดจากใบที่มีการกาง collar สมบูรณ์แล้ว โดยจะทำการเก็บลักษณะความสูงและระยะ V ควบคู่กันไปจนถึงระยะ VT (Figure 7b)
2	การปรับตัว ในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น (Adaptive traits at vegetative stage)	ค่าความเขียวใบ (SPAD)	เมื่อข้าวโพดเข้าสู่ระยะ v6 จะทำการเก็บค่าความเขียวใบ ด้วยเครื่อง SPAD (KONICA MINOLTA รุ่น 502 ประเทศญี่ปุ่น) วัดข้อมูลลงในใบข้าวโพดทั้งหมด 8 จุด (Figure 7c) โดยทำการเก็บข้อมูลทั้งก่อนงอต้น และระหว่างงอต้น และช่วงที่กลับมาให้ใหม่อีกครั้ง
		ค่าการม้วนใบ (Leaf rolling; LR)	เมื่อข้าวโพดเข้าสู่ระยะ v6 ใช้สายวัดพันบริเวณโดยรอบของจุดกึ่งกลางใบข้าวโพด โดยเก็บข้อมูลทั้งก่อนงอต้น ระหว่างงอต้น และช่วงที่กลับมาให้ใหม่อีกครั้ง (Figure 7d)

Table 3. secondary Traits, yield components, and data collection methods for various traits (table continue)

ลำดับที่	ระยะการเจริญเติบโต	ลักษณะ	วิธีการเก็บบันทึกลักษณะต่าง ๆ
3	ระยะการเจริญพันธุ์ (reproductive stage)	วันออกดอกตัวผู้ (Anthesis date; AD)	เก็บข้อมูลจากวันที่ต้นข้าวโพดมีการออกดอกแล้ว ที่ 50% ของแปลงย่อยนั้น ๆ
		วันที่ออกดอกตัวเมีย (Silking date; SD)	เก็บข้อมูลจากวันที่เส้นไหมของต้นข้าวโพดเริ่มโผล่ออกมาจากฝัก ที่ 50% ของแปลงย่อยนั้น ๆ
		ช่วงห่างระหว่างวันออกดอกและออกไหม (Anthesis and silking interval; ASI)	นำจำนวนวันออกไหม ลบกับจำนวนวันออกดอก (SD - AD)

Table 3. secondary Traits, yield components, and data collection methods for various traits (table continue)

ลำดับที่	ระยะการเจริญเติบโต	ลักษณะ	วิธีการเก็บบันทึกลักษณะต่าง ๆ
	ขนาดช่อดอกตัวผู้ (Tassel size; TS)		เก็บข้อมูลขนาดช่อดอก ด้วยการประเมินด้วยสายตา (visual score) ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการให้คะแนนถูกนำมาจากประชากรข้าวโพดที่ได้ทำการปลูกทดสอบในไร่เรือน โดยเกณฑ์ให้คะแนนจะอยู่ที่ 1 ถึง 5 คะแนน ดังนี้ 1 คะแนน คือ ขนาดช่อดอกเล็กที่สุด 3 คะแนน คือ ขนาดช่อดอกปานกลาง ไปจนถึง 5 คะแนน คือ มีขนาดช่อดอกใหญ่ที่สุด ซึ่งเก็บข้อมูลทั้ง 5 ต้น ในพลอตนั้น ๆ (Figure 7e)
	ความหนาแน่นของช่อดอก (Spikelet density; SPD)		การเก็บข้อมูลความหนาแน่นของช่อดอก โดยใช้ตัวอย่างจริงจากประชากรข้าวโพดที่ใช้ปลูกทดสอบและประเมินด้วยสายตา (visual score) มีเกณฑ์การให้คะแนน ตั้งแต่ 1 ถึง 5 คะแนน โดย 1 คะแนน คือ มีความหนาแน่นของช่อดอกน้อยมาก 3 คะแนน คือ มีความหนาแน่นของช่อดอกในระดับปานกลาง ไปจนถึง 5 คะแนน คือมีความหนาแน่นของช่อดอกมาก ซึ่งเก็บข้อมูลทั้ง 5 ต้นในพลอตนั้น ๆ (Figure 7f)

Table 3. secondary Traits, yield components, and data collection methods for various traits (table continue)

ลำดับที่	ระยะการเจริญเติบโต	ลักษณะ	วิธีการเก็บบันทึกลักษณะต่าง ๆ
4	ระยะการเก็บเกี่ยวเกี่ยว (Harvest)	น้ำหนักสด (Flesh weight; FW)	สำหรับการเก็บเกี่ยวข้อมูลแต่ละลักษณะองค์ประกอบผลผลิตทั้งหมด จะถูกเก็บข้อมูลรวมทั้ง 5 ฝักต่อหน่วยทดลอง โดย FW จะเป็นการนำฝักข้าวโพดทั้งเปลือก ไปทำการชั่งน้ำหนัก
		น้ำหนักสดหลังเปลือกเปลือก (Fresh weight unhusked; FWunhusked)	นำข้าวโพด 5 ฝัก เปลือกเปลือกจากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก
		น้ำหนักแห้ง (Total dry weight; TDW)	นำข้าวโพดที่เปลือกเปลือกแล้ว นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 70°C 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก
		น้ำหนักแห้งของเมล็ด (Kernel dry weight; KDW)	นำฝักข้าวโพดที่อบแห้งแล้ว กะเทาะเพื่อนำเมล็ดออกมา จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก
		น้ำหนักแห้ง 100 เมล็ด (Kernel dry weight; 100 KDW)	นำเมล็ดที่กะเทาะแล้วจาก 5 ฝักมาผสมรวมกัน จากนั้นคัดแยกออกมา 100 เมล็ดแล้วไปชั่งน้ำหนัก
		จำนวนเมล็ด(Number of kernel; NK)	นำจำนวนเมล็ดที่ได้จากทั้ง 5 ฝักรวมกัน

การคำนวณค่าความต่าง (Difference; Diff) และดัชนีทนแล้ง (Stress tolerance index; STI)

เนื่องจากความเขียวใบ และขนาดของใบ ของข้าวโพดแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ดังนั้น จึงคำนวณหาค่าความต่างของค่า SPAD และ LR ก่อนนำข้อมูลไปวิเคราะห์ในลำดับถัดไป โดยใช้สัญลักษณ์ Diff ในการแทนค่าความแตกต่างของค่า SPAD และ LR

ค่าความต่างที่ใช้ในการศึกษานี้ถูกแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรก หมายถึง ช่วงระหว่างการงนน้ำที่ 3 5 และ 7 วัน (35 37 หรือ 39 วันหลังปลูก) และ ช่วงที่ 2 คือ หลังกลับมาให้น้ำ ที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง (40 41 และ 42 วันหลังปลูก)

ในส่วนของค่าความต่างในระหว่างการงนน้ำ สามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{Diff} = Y_w - Y_s$$

โดยที่ Y_w = ค่า SPAD หรือ LR ก่อนงนน้ำของแต่ละสายพันธุ์ และ Y_s = ค่า SPAD และ LR ในระหว่างการงนน้ำของแต่ละสายพันธุ์ กล่าวคือ

นำค่า SPAD หรือ LR หลังจากงนน้ำที่ 3 วัน ลบด้วย ค่าก่อนงนน้ำ จะได้ค่าความต่างของความเขียวใบ และค่าความต่างของการม้วนใบ ที่งนน้ำ 3 หรือ Diff_{SPAD35} DAP และ Diff_{LR35} DAP

นำค่า SPAD หรือ LR หลังจากงนน้ำที่ 5 วัน ลบด้วย ค่าก่อนงนน้ำ จะได้ค่าความต่างของความเขียวใบ และค่าความต่างของการม้วนใบ ที่งนน้ำ 5 หรือ Diff_{SPAD37} DAP และ Diff_{LR37} DAP

และเมื่อนำค่า SPAD หรือ LR หลังจากงนน้ำที่ 7 วัน ลบด้วย ค่าก่อนงนน้ำ จะได้ค่าความต่างของความเขียวใบ และค่าความต่างของการม้วนใบ ที่งนน้ำ 7 หรือ Diff_{SPAD39} DAP และ Diff_{LR39} DAP

ค่าความต่างในช่วงที่กลับมาให้น้ำ สามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{Diff} = Y_r - Y_s$$

โดยที่ Y_r = ค่าหลังจากกลับมาให้น้ำ (rewatering) และ Y_s ค่าการงนน้ำวันสุดท้ายที่ 7 วัน หลังงนน้ำของแต่ละสายพันธุ์ กล่าวคือ

นำค่า SPAD หรือ LR ที่บันทึกหลังจากกลับมาให้น้ำที่ 24 ชั่วโมง ลบด้วย ค่าที่บันทึกได้หลังจากการงดน้ำวันสุดท้ายที่ 7 วัน จะได้ค่าความต่างของความเขียวใบ และค่าความต่างของการม้วนใบหลังจากกลับมาให้น้ำภายใน 24 ชั่วโมง หรือ Diff_SPAD40 DAP และ Diff_LR40 DAP

นำค่า SPAD หรือ LR ที่บันทึกหลังจากกลับมาให้น้ำที่ 48 ชั่วโมง ลบด้วย ค่าค่าการงดน้ำวันสุดท้ายที่ 7 วัน จะได้ค่าความต่างของความเขียวใบ และค่าความต่างของการม้วนใบหลังจากกลับมาให้น้ำที่ 48 ชั่วโมง หรือ Diff_SPAD41 DAP และ Diff_LR41 DAP

และเมื่อนำค่า SPAD หรือ LR ที่บันทึกหลังจากกลับมาให้น้ำที่ 72 ชั่วโมง ลบด้วย ค่าที่บันทึกหลังจากการงดน้ำวันสุดท้ายที่ 7 วัน จะได้ค่าความต่างของความเขียวใบ และค่าความต่างของการม้วนใบหลังจากกลับมาให้น้ำ ที่ 72 ชั่วโมง หรือ Diff_SPAD42 DAP และ Diff_LR42 DAP

ดัชนีทนแล้ง (Stress tolerance index; STI)

ลักษณะองค์ประกอบผลผลิต โดยเฉพาะ น้ำหนักสดหลังปอกเปลือก (Fresh weight unhusked; FWunhusked) จะถูกนำมาคำนวณค่าดัชนีความทนทานต่อสภาพเครียด โดยใช้สมการของ (Zhu, 2021) โดยใช้สมการดังนี้

$$\text{STI} = \frac{Y_s * Y_p}{\bar{Y}_p^2}$$

โดยที่ Y_s = ผลผลิตของพืชที่ขาดน้ำ Y_p = ผลผลิตของพืชที่ให้น้ำปกติ และ $\bar{Y}_p^2$ = ค่ายกกำลังสองของค่าเฉลี่ยของผลผลิตจากทุกจีโนไทป์ที่ได้รับน้ำปกติ

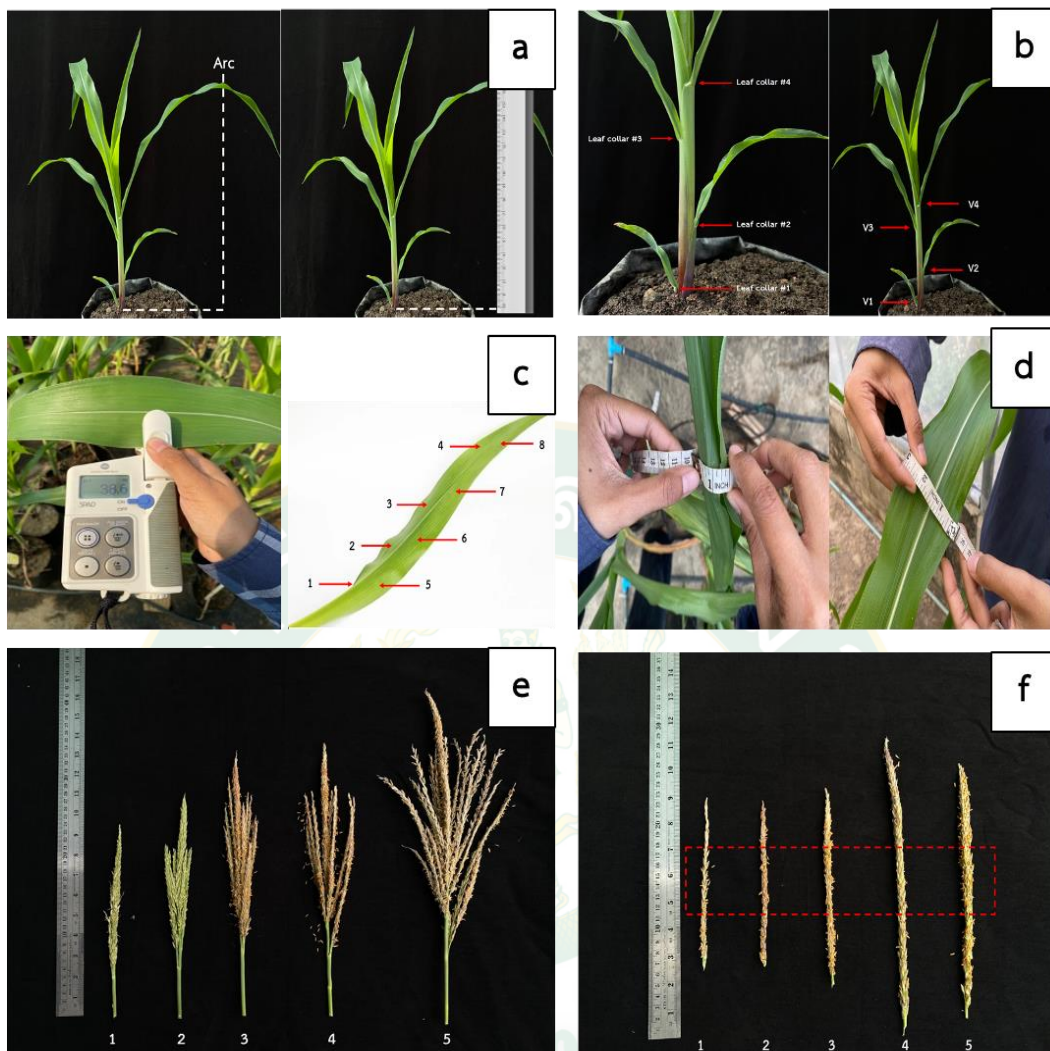


Figure 7. Data collection of secondary traits a) Plant height b) Vegetative stage c) SPAD (chlorophyll content) d) Leaf rolling e) Tassel size f) Spikelet density

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอิทธิพลหลัก

นำข้อมูลทั้ง 46 ลักษณะ มาวิเคราะห์สถิติพรรณนา เพื่อตรวจสอบลักษณะของข้อมูล โดยทั่วไป จากนั้นนำข้อมูลที่มีการกระจายตัวปกติมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนชนิด 2 ทาง (Two-way ANOVA) ที่ระดับแอลฟา 0.05 0.01 และ 0.001 ด้วยโปรแกรม R v4.4.1 (R Core Team, 2024) จากนั้นคัดเลือกข้อมูลที่มีความสำคัญ และนำไปวิเคราะห์ผลในลำดับถัดไป

การวิเคราะห์ค่าความสามารถในการรวมตัว

สำหรับการประเมินค่าความสามารถในการรวมตัวแบบทั่วไป (general combining ability; GCA) ของข้าวโพดสายพันธุ์พ่อแม่ และค่าความสามารถในการรวมตัวแบบเฉพาะ (specific combining ability; SCA) ระหว่างคู่ผสม ทำในโปรแกรม R v4.4.1 (R Core Team, 2024) โดยใช้แพ็คเกจ gpbStat (Patil and Lackshmi, 2020) ซึ่งจะถูกวิเคราะห์ในลักษณะความสูงที่ระยะ v8 (plant height at v8; PHv8) ช่วงห่างระหว่างวันออกดอกออกไหม (anthesis and silking date interval; ASI) ค่าความต่างของความเขียวใบ (Difference of SPAD; $\text{Diff}_{\text{SPAD}}$) และความต่างของการม้วนใบ (Difference of SPAD; Diff_{LR}) โดยค่า $\text{Diff}_{\text{SPAD}}$ และ Diff_{LR} ถูกวิเคราะห์ในช่วง 39 และ 40 วันหลังปลูก ($\text{Diff}_{\text{SPAD}}$ 39 และ 40 DAP) หรือช่วงงดน้ำ 7 วัน และ กลับและมาให้น้ำภายใน 24 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรม และ วิเคราะห์อัตราพันธุกรรมอย่างแคบ (narrow-sense heritability; h^2) ด้วยโปรแกรม PB Tools Version 2.0 (PBTools. 2014) จะถูกวิเคราะห์ในลักษณะน้ำหนักสดหลังปอกเปลือก (Fresh weight unhusked; FWunhusked)

การทดลองที่ 2: การออกแบบและทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด InDel DNA markers ใน Pathway ของโปรตีนไคเนสที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้ง

การออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ชนิด InDel

สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ชนิด InDel ใน pathway ของ MAPK มีขั้นตอน ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนการค้นหายีน และรวบรวมลำดับเบสของยีน

ทำการศึกษาและค้นหายีนใน protein kinase pathway ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อ Abiotic stresses ที่มีรายงานในพืชต่าง ๆ จากเว็บไซต์ www.ncbi.nlm.nih.gov จากนั้นทำการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล ชนิด InDel DNA markers ด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

ตรวจสอบเอกสารเพื่อค้นหายีนที่อยู่ใน Pathway ของ MAPK โดยเจาะจงไปที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้ง (Figure 8a) เริ่มต้นทำการค้นหาข้อมูลของยีนแต่ละยีนใน maizeGDB โดยไปที่ PAN-GENE ป้อนชื่อยีน ID ของยีน หรือคำสำคัญที่เกี่ยวข้องกับยีนที่คุณต้องการค้นหา เพื่อดูว่าได้ศึกษาในข้าวโพดสายพันธุ์ใดบ้าง และคัดเลือกข้อมูลของสายพันธุ์ข้าวโพดในเขตร้อน (tropical) เนื่องจากเชื้อพันธุกรรมของข้าวโพดในงานวิจัยเป็นของเขตร้อนทั้งหมด จากนั้นกดไปที่ gene model ของข้าวโพดที่ต้องการ (Figure 8b) จากนั้นกดไปที่ gene model ของพันธุ์ B73 เลือก Sequence => และคัดลอกข้อมูลในช่อง cDNA (Figure 8c) แล้วนำไปบันทึกใส่ไฟล์ txt* แล้ว Save ไฟล์ให้อยู่ folder เดียวกันเพื่อนำมาใช้หา InDel ในภายหลัง (Figure 8d) เมื่อได้ Sequence ของยีนที่ต้องการในข้าวโพดแต่ละสายพันธุ์ นำข้อมูลไปค้นหา InDel ในลำดับต่อไป โดยใช้โปรแกรม ClustalX2 (Figure 8e)

ขั้นตอนการค้นหาดำแหน่ง Insertion และ Deletion ของยีนในโปรแกรม ClustalX2

เริ่มต้นการค้นหาดำแหน่ง Insertion และ Deletion ของยีน โดยการใช้โปรแกรม ClustalX2 เริ่มโหลดไฟล์ .txt ของยีนทั้งหมดที่ได้บันทึกไว้ ลงในโปรแกรม ClustalX2 โดยเพิ่มไฟล์ข้อมูลแรกลงในช่อง file => Load sequence => เลือกไฟล์แรกที่ต้องการ และไฟล์ที่ 2 และ 3 ไปเรื่อย ๆ ให้กดเพิ่มที่ช่อง Append sequence จากนั้นไปที่ Alignment => Do Complete Alignment จากนั้นให้เปลี่ยนชื่อทั้งข้างบนและข้างล่างตามยีนที่สนใจ เช่น PH_ZmMPK3 (Figure 9a) เมื่อทำการ Alignment เริ่มต้นหาจุด InDel โดยต้องมีความยาวไม่สั้นเกินไป เนื่องจากเมื่อตรวจสอบ PCR product ผ่านเทคนิค Electrophoresis Gel อาจสังเกตได้ยาก ความยาวเริ่มต้น

มากกว่า 50 nucleotide ขึ้นไป และเมื่อพบจุด InDel ที่ต้องการ ให้เลือกक्रमตรงช่องว่างเพื่อนำไป design marker ทั้งข้างหน้าและหลัง InDel (Figure 9b) เมื่อได้ตำแหน่ง Forward และ reverse ที่ต้องการ กลับไปยังไฟล์ .txt อีกครั้ง เพื่อค้นหาตำแหน่งที่ต้องการ และบันทึกข้อมูล sequence แยกไว้ในไฟล์ Excel เพื่อให้สะดวกต่อการใช้งานในลำดับถัดไป (Figure 9c)

การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของลำดับเบสบนฐานข้อมูลของ NCBI

สำหรับการระบุชนิดของยีนหรือสิ่งมีชีวิต กระทำในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> เริ่มเลือก BLAST link (Figure 10a) นำข้อมูล sequence ไป Blast ใน NCBI primer blast ทั้ง forward และ reverse ใส่ลงในช่อง ดังแสดงใน Figure 10b เมื่อโปรแกรมประมวลผล จะแสดง primer pair ออกมาโดย ซึ่งประกอบด้วย ค่าของ %GC อุณหภูมิ melting (TM) และขนาดของ PCR product สำหรับพิจารณาและคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม (Figure 10c)

เรียบเรียงข้อมูลไพรเมอร์ เมื่อออกแบบข้อมูล

เมื่อออกแบบไพรเมอร์ตามขั้นตอนเรียบร้อยแล้ว จากนั้นทำการจัดบันทึกข้อมูลไพรเมอร์ทั้งหมด เพื่อนำข้อมูลส่งส่งเคราะห์ต่อไป โดยประกอบด้วย ชื่อยีน หรือ ชื่อไพรเมอร์ที่ออกแบบ (gene name) ลำดับเบสทั้ง Forward และ Reverse (DNA sequence of forward primer (5'→3') และ DNA sequence of reverse primer (5'→3')) จำนวนเบสทั้ง Forward และ Reverse (Base (F/R)) ลำดับโครโมโซม (Chr) ชนิดของไพรเมอร์ที่มาจาก Insertion หรือ Deletion (Type of InDel) และ product size (Table 4) จากนั้นเมื่อได้คู่ไพรเมอร์ที่ต้องการ จึงส่งส่งเคราะห์ไพรเมอร์ต่อไป

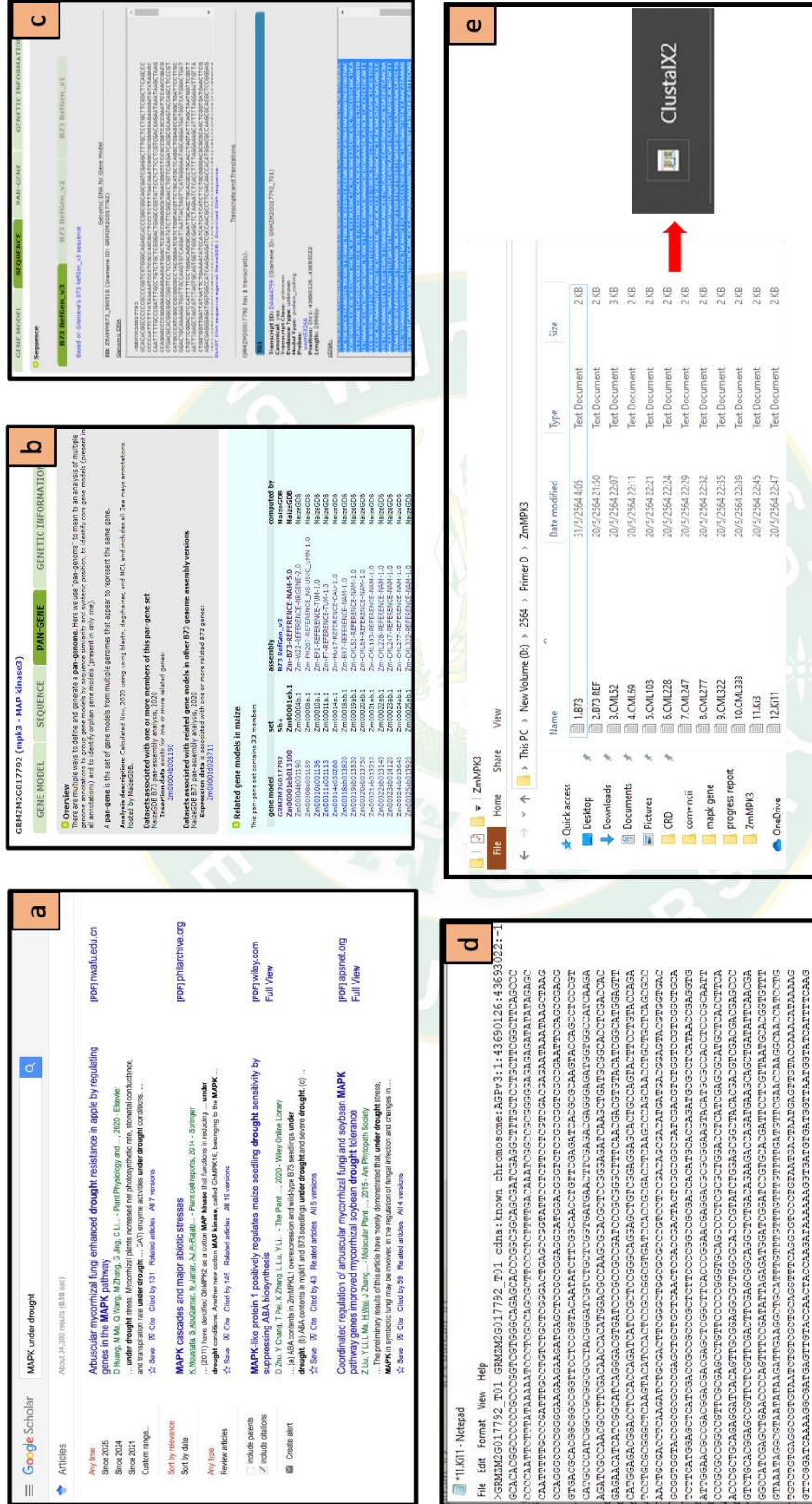


Figure 8. Primer design steps a) Identification of drought tolerance-related genes in the MAPK pathway b) Retrieval of gene information in maize using MaizeGDB c) Extraction of the maize gene model and sequence d) Detection of insertions and deletions using the ClustalX2 program

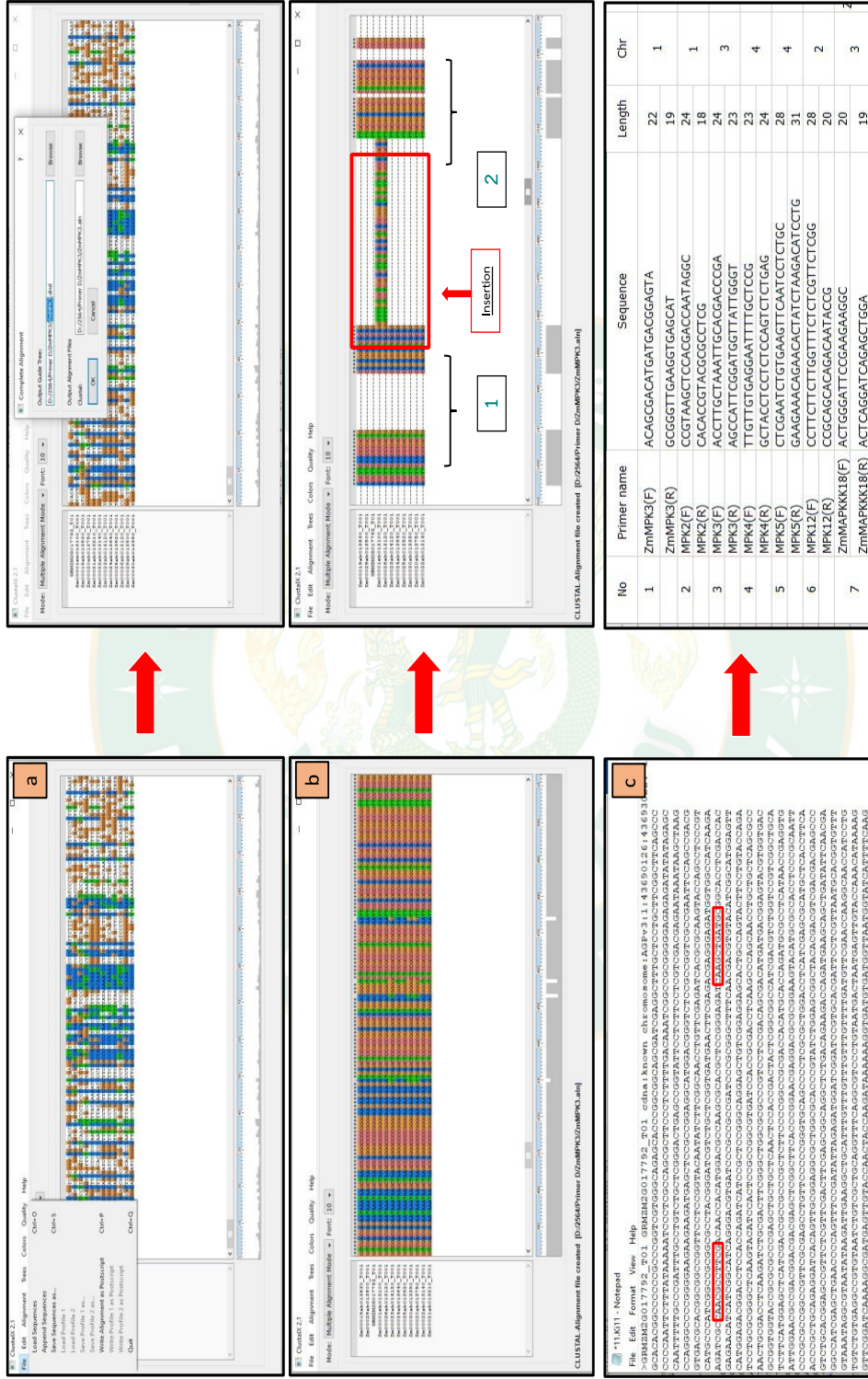


Figure 9. Importing maize gene sequence data into the ClustalX2 program a) Load the gene sequence from a .txt file and assign a file name b) Identify insertions and deletions (InDels) c) Determine the positions of forward and reverse primers

a

Web BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Standard BLAST services and databases

- blastx Translated nucleotide → protein
- tblastn protein → translated nucleotide
- Nucleotide BLAST nucleotide → nucleotide
- Protein BLAST protein → protein

Specialized searches

- SmartBLAST Find proteins highly similar to your query
- Primer-BLAST Design primers specific to your PCR template
- CD-search Find conserved domains in your sequence

Primer-BLAST www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast

Primer designer and specificity checker

b

U.S. National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primer-BLAST: Retrieving recent results Publication Tips for finding specific primers

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)

Or, upload FASTA file No file chosen

Primer Parameters

Use my own forward primer

Use my own reverse primer

Use my own reverse primer (5' → 3' on minus strand)

PCR product size

Min 70 1000

Max 60.0 65.0

of primers to return 3

Primer melting temperatures (T_m)

Min 57.0 60.0

Max 63.0 65.0

Range From To

Forward primer

Reverse primer

c

Detailed primer reports

Primer pair 1

Sequence (5'→3')	Length	T _m	GCL	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	21	63.25	57.14	3.00	2.00
Reverse primer	20	60.81	55.00	6.00	2.00

Products on target templates

NC_011565.2 Zeb mays uncultured LOC10272953 (LOC10272953) mRNA

Product	Length	Start	End	Strand
Forward primer	184	1189	1209	+
Reverse primer	1189	1209	1227	-

NC_011565.2 Zeb mays uncultured LOC10272953 (LOC10272953) mRNA, complete cds

Product	Length	Start	End	Strand
Forward primer	184	1189	1209	+
Reverse primer	1189	1209	1227	-

NC_011565.2 Zeb mays uncultured LOC10272953 (LOC10272953) mRNA, complete cds

Product	Length	Start	End	Strand
Forward primer	184	1189	1209	+
Reverse primer	1189	1209	1227	-

NC_011565.2 Zeb mays uncultured LOC10272953 (LOC10272953) mRNA, complete cds

Figure 10. Steps for searching designed primer pairs a) Use NCBI Primer-BLAST b) Enter the designed sequence information for each primer pair c) View the results provided by NCBI for each primer pair

Table 4. Twenty-seven designed InDel primers

No.	Gene name	Base (F/R)	DNA sequence of forward primer (5'→3')	DNA sequence of reverse primer (5'→3')	Chrom.	Type of InDel	product size (bp)
1	PH_ZmMPK1	17/17	GATTCGTCAAAAGAGGA	TGCTTCAGCAGTTCAGC	9	-	495
2	PH_ZmMPK2.1	20/20	TTCATCCAGTACAACATCTT	CTTGGCATCGATCTTGTTGT	9	+	180
3	PH_ZmMPK2.2	20/21	TTGAAGTATATACATTCAGC	GTGACAACATATTCAGTCATA	9	-	149
4	PH_ZmMPK3.1	22/22	TTACAAACACCGTGCATTAACG	GATGAAGCAGCTGATATTCAAC	1	+	108
5	PH_ZmMPK4	18/17	ATATATATGTTTCATCACA	GAATCATGAAAAATGTGA	10	-	175
6	PH_ZmMPK5	19/18	TGATACAGTAGTGTTTCG	TATAAGCCAAAGTACACT	5	+	309
7	PH_ZmMPK6	20/21	TTACTGTATATTGAGGTGC	GATTCAAAAGATTTATTGTGA	10	+	425
8	PH_ZmMPK7	19/20	TAGTAGTTAATTAATGTAC	GCAACGCTTGATAATGCAA	6	-	848
9	PH_ZmMPK8	21/20	CATCAGAGTAGGCAACAATTG	ATTCATTGACATCATAATGT	8	+	336
10	PH_ZmMPK11.1	21/21	TTGTTGCGTTGTATAGGGATT	TTGAACAGGAAGTCAGGAAGA	8	+	118

Table 4. Twenty-seven designed InDel primers (table continue)

No.	Gene name	Base (F/R)	DNA sequence of forward primer (5'->3')	DNA sequence of reverse primer (5'->3')	Chrom.	Type of InDel	product size (bp)
11	PH_ZmMPK11.2	17/17	CCTACTCTGTGTATCCT	GAGTGAGTAATACATAC	8	+	439
12	PH_ZmMPK12	17/17	AGTTCTTCTGTACCAG	AATATTCCTGGGCTTAA	6	-	357
13	PH_ZmMPK13.1	20/19	AGTTCAGCAGGTTGTTTGT	TGAATCAATCTGATTGATA	6	+	361
14	PH_ZmMPK13.2	18/20	TTACAGTGACAAAAGGAC	TAGTTTCTCTCCATATTAAG	6	-	111
15	PH_ZmMPK14.1	21/20	TGTTAAGCTGCACAAAGCATG	ACCTAAACAACCTCAGCTACA	5	-	310
16	PH_ZmMPK14.2	20/19	TAAATAATAATACCCAGGGTTG	ATAGTCTCTTTTGAGCTCAA	5	+	112
17	PH_ZmMPK17	18/18	ATCCAACCAAAATAGTGGC	TTGCTACATGTAGTGAAG	4	+	1294
18	PH_ZmMPK18	17/16	ATTATGTCACAGCCAGG	AGGGTAGGTGTAGTGT	3	+	231
19	PH_ZmMPK19	18/20	TGTACTTGGATTTCAGTT	TCTTTTGGCACACGCACGAA	8	+	898
20	PH_ZmMKK2	18/18	AATATTCGACAACGGAGG	CGGACGACAAATATTCGA	9	+	324
21	PH_ZmMPKKK1	18/20	ATGGAACCTTGGAAATATG	TAGAGCATGATAGAAGATAT	4	+	104

Table 4. Twenty-seven designed InDel primers (table continue)

No.	Gene name	Base (F/R)	DNA sequence of forward primer (5'→3')	DNA sequence of reverse primer (5'→3')	Chrom.	Type of InDel	product size (bp)
22	PH_ZmMPKKK16	17/20	TGATGACACCAATAAGTA	TAGCCATATTATAACTATGT	2	+	142
23	PH_ZmMPKKK51	17/17	TGAAGCATACCTGTGTA	AATTGCGCACACAGACCA	1	+	911
24	PH_ZmMPK3.2	22/19	ACAGCGACATGATGACGGAGTA	GCGGGTTGAAGGTGAGCAT	1	+	184
25	PH_AtMPK2	24/18	CCGTAAGCTCCACGACCAATAGGC	CACACCCGTACGCGCCTCG	9	+	167
26	PH_AtMPK4	23/24	AGCCATTCGGATGGTTATTGGGT	TTGTTGTAGGAATTTTGCTCCG	10	+	186
27	PH_AtMPK12	22/20	CCTTCTTCTTGGTTTCTCTCGT	CCGCAGCACAGACAAATACCG	6	+	357

Remark: Chrom. indicates the chromosome number. The "+" and "-" signs represent insertion and deletion events.

การตรวจสอบการทำงานของ InDel DNA markers

การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโพด

สำหรับการสกัด DNA กระทำโดยใช้ชุดสกัด DNAsecure plant kit (Tiangen Cat. No. 4992707/4992708) เริ่มจากนำใบข้าวโพด อายุ 1 สัปดาห์หนัก 100 มิลลิกรัม บดในโกร่งที่เติมนิโตรเจนเหลวให้ละเอียด จากนั้นเติม LP1 buffer และ RNase A ปริมาตร 6 ไมโครลิตร นำตัวอย่างใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติม LP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสไปใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม LP3 buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า นาน 15 วินาที จากนั้นดูดสารทั้งหมดย้ายไปยังหลอด spin column ที่ถูกใส่ไว้ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เติม PW buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารที่อยู่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดกลับมาใส่ที่เดิม ปั่นเหวี่ยง 2 นาที แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยดสารละลาย TE buffer ลงตรงกลาง spin column แล้วปั่นเหวี่ยงนาน 2 นาที

ปฏิกิริยา Polymerase Chain reaction (PCR)

สำหรับปฏิกิริยา Polymerase Chain reaction (PCR) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม RNase-free water ปริมาตร 18.875 ไมโครลิตร 10 mM dNTP ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10X PCR buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร 10 uM Forward primer ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เติม 10 uM Reverse primer ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Tag DNA polymerase (5 units/ul) ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ PCR profile ที่มีความเหมาะสมและเฉพาะเจาะจงต่อแต่ละคู่ไพรเมอร์ จากนั้นตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วน PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ใน 1X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 35 นาที เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ ทำการบันทึกภาพ และอ่านผลข้อมูลในลำดับถัดไป

การทดสอบอุณหภูมิการจับ (annealing temperature)

สำหรับการทดสอบอุณหภูมิการจับ (annealing temperature) ในปฏิกิริยา PCR ของไพรเมอร์แต่ละคู่ มีเป้าหมายหลัก คือ การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งจะให้ผลผลิต DNA เป้าหมายมากที่สุด และจากการทดลองทำให้ได้เงื่อนไขสำหรับการทดสอบอุณหภูมิการจับ (annealing temperature) ดังแสดงใน Table 5

Table 5. Conditions for testing annealing temperatures in the PCR reactions of each primer

Each PCR step	Time duration and temperature (°C)
Pre-denature	5 mins at 94 °C
Denaturing	40s at 94 °C
Annealing	40s at 50-58 °C
Extension	2 mins 72 °C
Final Extension	5 mins at 72 °C
Cycle number	30

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการทดลองที่ 1: การประเมินค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมสำหรับลักษณะการทนแล้งของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ภายใต้สภาวะเครียดน้ำ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอิทธิพลหลัก

ลักษณะความสูงที่ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น (Plant height at vegetative stage)

เมื่อนำข้อมูลลักษณะความสูงทั้ง 20 ลักษณะ ได้แก่ ความสูงที่ระยะ V1 ไปจนถึง V20 (PHv1 – PHv20) มาสร้างเป็นภาพกราฟ (Figure 11) เพื่อเปรียบเทียบพัฒนาการด้านความสูงต้นระหว่างข้าวโพดกลุ่มที่ได้รับน้ำปกติ (WW) และกลุ่มที่ได้รับสภาพเครียดจากการขาดน้ำ (WS) สิ่งที่พบเห็นได้ใน Figure 11 คือ ความสูงของข้าวโพด 2 กลุ่ม (WW และ WS) มีการเจริญเติบโตทางความสูงใกล้เคียงกันมาก สังเกตจากเส้นสีเขียวและสีดำมีการเกาะกลุ่มกันตั้งแต่ระยะ V1-V7 จนกระทั่งระยะ V8 เริ่มสังเกตพบความแตกต่างของความสูงของข้าวโพดระหว่าง 2 กลุ่ม ซึ่งเป็นผลมาจากการงดให้น้ำ 5 วัน ข้าวโพดในกลุ่ม WS เริ่มแสดงออกทางความสูงที่แตกต่างไป

นอกจากนี้ เมื่อประเมินอิทธิพลหลักของลักษณะการให้น้ำ (watering) ที่มีต่อลักษณะความสูงที่ระยะ V8 ดังแสดงผลใน Table 6 พบข้อมูลที่สอดคล้องกับ Figure 11 กล่าวคือ อิทธิพลของลักษณะการให้น้ำมีผลต่อความสูงที่ระยะ V8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ผลนี้ชี้ให้เห็นว่าการปลูกข้าวโพดในถุงปลูกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 44.5 เซนติเมตร ในเดือนพฤษภาคม ต้องอาศัยการงดน้ำข้าวโพดนาน 5 วัน จึงเริ่มส่งผลให้เห็นการตอบสนองของข้าวโพดได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาอิทธิพลหลักของกลุ่มผสม (cross) และปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างปัจจัย (cross x watering) ที่มีต่อความสูงที่ระยะ V8 (Table 6) ก็พบว่า มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อลักษณะดังกล่าว ($P < 0.001$)

เมื่อพิจารณาผลการเปรียบเทียบความสูงที่ระยะ V8 ของกลุ่มผสมทั้งหมด 12 คู่ ดังแสดงใน Figure 12b พบว่า กลุ่มผสม Kei1421xNei9202 ให้ความสูงภายใต้สภาพ WS ดีที่สุด (90.95 ซม) รองลงมา คือ Ki59xNei9202 (87.50 ซม) อย่างไรก็ตาม กลุ่มผสม 2 คู่นี้ให้ความสูงที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ที่น่าสนใจ คือ กลุ่มผสม 2 คู่นี้แสดงความดีเด่นทางด้านความสูงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผสมอื่นตลอดระยะการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น (Figure 12) จากรายงานของ Anjum et al. (2011)

ที่พบว่า เมื่อพืชได้รับน้ำลดลง เซลล์พืชจะสูญเสียความเต่งในระยะแรก ส่งผลให้ขนาดและการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง และอาจส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการขัดขวางกระบวนการเผาผลาญภายในต้น และส่งผลให้พืชตายในที่สุดได้หากขาดน้ำเป็นระยะเวลานาน ดังนั้น การค้นหาสายพันธุ์ที่ยังคงสามารถเจริญเติบโตทางลำต้นในระยะเริ่มแรกภายใต้สภาพการขาดน้ำจึงเป็นอีกหนึ่งตัวชี้วัดที่สำคัญในการคัดเลือก และจากการทดลองของ Aslam et al. (2015) ที่แสดงให้เห็นว่า คู่ผสมที่ได้รับความชื้น (FC) ที่ 100% พืชแสดงถึงความสูงมากที่สุด เมื่อเทียบกับความชื้นที่ 75% และ 50% ซึ่งอาจเป็นผลมา้อัตราการปิดปากใบ และอัตราการคายน้ำที่ต่ำ

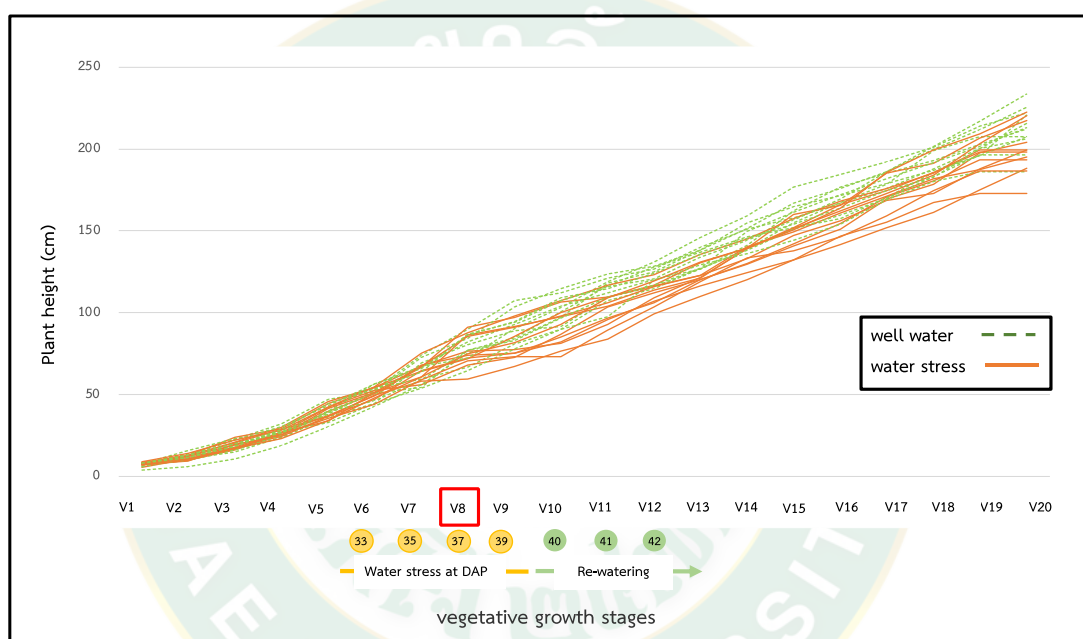


Figure 11. Plant height from V1 to V20 stages of 12 F₁ crosses under well-watered and water deficit conditions under well-watered (Green lines) and water deficit conditions (Orange lines)

Table 6. Analysis of variance (ANOVA) for vegetative traits of 12 F₁ progenies

SOV	df	MS			
		PHv8	PHv9	PHv10	PHv11
Block	1	0.52	1.5	0.62	2
Cross	11	277.12***	358.5***	362.9***	246***
Watering	1	52.5**	780***	1372.8***	1824.1***
Cross x Watering	11	22.81**	14	42.5***	42.4***
Residuals	23	5.52	7.8	7.5	8.5

Remark: PHv8–PHv11 refers to plant height measured at V8, V9, V10, and V11 growth stages

Significance levels: *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001

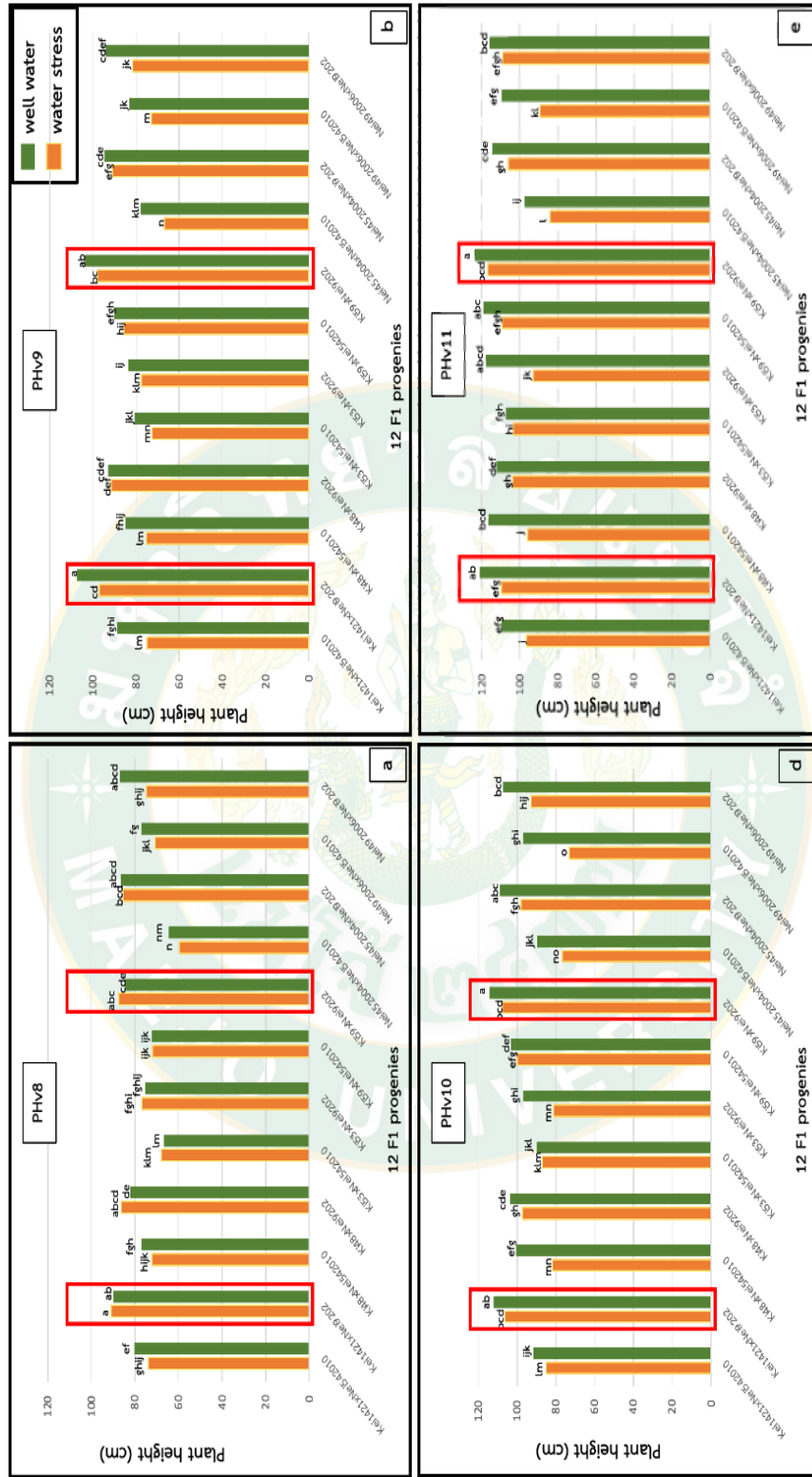


Figure 12. LSD test for plant height at v8 – v11 stages of 12 F₁ crosses under well-watered (Green bar) and water deficit conditions (Orange bar) a–e represent plant height (cm) at v8, v9, v10, and v11, respectively

ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวเพื่อการอยู่รอด (Adaptative traits)

เมื่อนำข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัว ได้แก่ ค่าความต่างของความเขียวใบ ($\text{Diff}_{\text{SPAD}}$) และค่าความต่างของการม้วนใบ (Diff_{LR}) ของข้าวโพดภายใต้สองสภาวะ ได้แก่ การให้น้ำปกติ (WW) และการขาดน้ำ (WS) โดยเก็บข้อมูลหลังจากงดน้ำเป็นระยะเวลา 3 5 และ 7 วัน (ที่ 35 37 และ 39 วัน หลังปลูก หรือ DAP) และอีกช่วงหนึ่งหลังจากกลับมาให้น้ำใหม่ที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง (40 41 และ 42 DAP) รวมทั้งหมด 12 ลักษณะสำหรับแต่ละตัวแปร เมื่อนำข้อมูลทั้งสองชุดมาสร้างเป็นกราฟใน Figure 13 ผลการวิเคราะห์พบว่า ช่วงแรกของการงดน้ำ (3 วัน) ข้าวโพดทั้งสองกลุ่มมีค่าการเปลี่ยนแปลงของ SPAD และการม้วนใบใกล้เคียงกัน เส้นกราฟของทั้งสองกลุ่มยังเกาะกลุ่มกันอยู่ แต่เมื่อเข้าสู่วันที่ 5 หลังงดน้ำ (37 วันหลังปลูก) ค่าทั้งสองเริ่มแสดงความแตกต่างอย่างชัดเจน โดยกลุ่ม WS (ขาดน้ำ) มีค่าความเขียวใบลดลง ($\text{Diff}_{\text{SPAD}}$ เพิ่มขึ้น) และใบเริ่มม้วนมากขึ้น (Diff_{LR} สูงขึ้น) สะท้อนให้เห็นถึงความเครียดจากการขาดน้ำ ซึ่งผลนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับที่พบจากลักษณะความสูงของต้นในช่วง V8 ก่อนหน้านี้

เมื่อพิจารณาผลวิเคราะห์เพิ่มเติมดังแสดงใน Table 7 ก็ยืนยันข้อมูลจากกราฟ โดยพบว่าการให้น้ำ (watering) มีผลต่อลักษณะ $\text{Diff}_{\text{SPAD}}$ และ Diff_{LR} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 37 วันหลังปลูก ที่ $P < 0.001$ และ $P < 0.05$ ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่า การขาดน้ำนาน 5 วันเริ่มส่งผลต่อสรีรวิทยาของพืชให้เห็นได้ชัดในช่วงนี้ นอกจากนี้ ยังพบว่า อิทธิพลหลักของคู่ผสม (cross) ของข้าวโพดแต่ละคู่ผสมก็มีอิทธิพลต่อลักษณะ $\text{Diff}_{\text{SPAD}}$ ที่ 37 วันหลังปลูก อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) แต่ไม่มีผลต่อ Diff_{LR} อย่างชัดเจนในช่วงเวลาเดียวกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อดูการทำงานร่วมกันระหว่างพันธุ์กับสภาวะน้ำ (cross $\times$ watering) พบว่า ทั้งสองลักษณะได้รับผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$ และ $P < 0.05$) จากผลทั้งหมดนี้ สรุปได้ว่า การงดน้ำเป็นเวลา 5 วันเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญซึ่งข้าวโพดเริ่มแสดงสัญญาณความเครียดอย่างเห็นได้ชัด ทั้งในแง่ของการลดลงของความเขียวใบ และการม้วนใบ ซึ่งสามารถใช้เป็นดัชนีในการประเมินความทนแล้งของข้าวโพดในระยะเริ่มต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ค่าความต่างของความเขียวใบ (Difference of SPAD; $\text{Diff}_{\text{SPAD}}$)

จากผลการเปรียบเทียบค่าความต่างของความเขียวใบ ($\text{Diff}_{\text{SPAD}}$) วันที่ 37 หลังปลูก หรือหลังจากงดน้ำนาน 5 วัน ของคู่ผสมทั้งหมด 12 คู่ ซึ่งแสดงใน Figure 14a พบว่า คู่ผสม

Ki48xNei9202 แสดงการตอบสนองได้ดีที่สุดภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยมีค่าความต่างของความเขียวใบต่ำที่สุด คือ 3.50 ซึ่งหมายความว่า ความเขียวของใบลดลงน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับคู่ผสมอื่น ๆ แสดงถึงศักยภาพในการรักษาความเขียวของใบภายใต้สภาวะเครียดจากการขาดน้ำได้ดี รองลงมาได้แก่คู่ผสม Kei1421xNei542010 และ Ki48xNei542010 ซึ่งมีค่า $\text{Diff}_{\text{SPAD}}$ อยู่ที่ 4.80 และ 4.85 ตามลำดับ ถึงแม้จะมีค่ามากกว่าคู่แรกเล็กน้อย แต่ยังถือว่าอยู่ในระดับที่ต่ำและมีความสามารถในการทนแล้งได้ดี อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ค่าความต่างของความเขียวใบของทั้ง 3 คู่ผสมนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แสดงว่า ทั้งสามคู่ผสมอาจมีศักยภาพใกล้เคียงกันในการคงความเขียวของใบภายใต้สภาพขาดน้ำ ที่น่าสนใจคือ เมื่อประเมินค่าความต่างของความเขียวใบในวันที่ 39 หลังปลูก (หรือหลังให้น้ำนาน 7 วัน) ซึ่งแสดงใน Figure 14a พบว่า ทั้ง 3 คู่ผสมข้างต้นยังคงแสดงผลการตอบสนองที่ดี โดยมีค่า $\text{Diff}_{\text{SPAD}}$ ที่ต่ำกว่าคู่ผสมอื่น ๆ เช่นเดิม แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการรักษาความเขียวของใบได้ต่อเนื่อง แม้เวลาที่ขาดน้ำนานขึ้น แต่ในขณะเดียวกันเมื่อกลับมาให้น้ำทันทีที่ 24 ชั่วโมง และสังเกตค่าความต่างของความเขียวใบ ($\text{Diff}_{\text{SPAD}}$) ที่ 40 วันหลังปลูก พบว่า คู่ผสม Nei492006xNei9202 แสดงการตอบสนองได้ดีรวดเร็วที่สุดเมื่อกลับมาให้น้ำ โดยมีค่าความต่างของความเขียวใบสูงที่สุด คือ 3.78 ซึ่งหมายความว่า ความเขียวของใบเพิ่มขึ้นสูงที่สุดเมื่อเทียบกับคู่ผสมอื่น ๆ รองลงมาได้แก่ คู่ผสม Ki53xNei542010 และ Nei452004xNei542010 ซึ่งมีค่า $\text{Diff}_{\text{SPAD}}$ อยู่ที่ 3.67 และ 2.75 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ค่าความต่างของความเขียวใบของทั้งสามคู่ผสมนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ซึ่งบ่งชี้ว่า ทั้ง 3 คู่ผสมอาจมีศักยภาพที่ดีในการฟื้นตัวจากสภาพขาดน้ำภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังได้รับน้ำอีกครั้ง

จากการศึกษาของ Li et al. (2024) ในสภาพขาดน้ำ พบว่า การรักษาความชื้นในดินที่ 50% และ 110% ส่งผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ถูกวัดได้จาก SPAD meter แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และความชื้น ที่ 50% กับ 110% ยังส่งผลให้ข้าวโพด ผลิต malondialdehyde (MDA) สูงขึ้น และผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) และ proline (Pro) เพิ่มขึ้นตามไปด้วย ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการตอบสนองต่อการขาดน้ำและได้รับน้ำมากเกินไปเกินความต้องการ นอกจากนี้ Li et al. (2024) และ Jangpromma et al. (2010) ยังชี้ให้เห็นถึงความเชื่อมโยงของข้อมูล SPAD กับปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลงเมื่อข้าวโพดขาดน้ำ และ Ghimire et al. (2015) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์ (SPAD) และผลผลิตของข้าวโพด

ค่าความต่างของการม้วนใบ (Difference of leaf rolling; Diff_{LR})

สำหรับค่าความต่างของการม้วนใบ (Diff_{LR}) ทั้งในวันที่ 37 หลังปลูก มีความสอดคล้องกับช่วงดำนานาน 5 ซึ่งแสดงใน Figure 14b ผลการวิเคราะห์พบว่า คู่ผสม $\text{Ki48} \times \text{Nei542010}$ มีค่าการม้วนใบที่ลดลงน้อยที่สุด อยู่ที่ 0.25 เซนติเมตร แสดงให้เห็นว่า ข้าวโพดมีการม้วนใบเพียงเล็กน้อย จึงถือว่าการตอบสนองต่อความเครียดจากการขาดน้ำได้ดี รองลงมาคือ คู่ผสม $\text{Nei452004} \times \text{Nei9202}$ และ $\text{Ki48} \times \text{Nei9202}$ ซึ่งมีค่า Diff_{LR} เท่ากับ 0.75 และ 1.15 เซนติเมตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการคงสภาพใบให้ไม่ม้วนมากนักภายใต้สภาวะขาดน้ำ ทั้งนี้คู่ผสม $\text{Ki48} \times \text{Nei542010}$ และ $\text{Ki48} \times \text{Nei9202}$ ยังคงมีการม้วนใบน้อยที่สุดเมื่อรดน้ำที่ 7 วัน ($\text{Diff}_{\text{LR}}_{39 \text{ DAP}}$) ซึ่งสะท้อนถึงความสามารถในการทนทานต่อความเครียดจากสภาพแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่เมื่อกลับมาให้น้ำทันทีที่ 24 ชั่วโมง และสังเกตค่าความต่างของการม้วนใบ (Diff_{LR}) ที่ 40 วันหลังปลูก พบว่า คู่ผสม $\text{Ki59} \times \text{Nei542010}$ $\text{Nei452004} \times \text{Nei9202}$ และ $\text{Nei452004} \times \text{Nei542010}$ แสดงการตอบสนองได้ดีรวดเร็วที่สุดเมื่อกลับมาให้น้ำ โดยมีค่าความต่างของการม้วนใบ สูงที่สุด คือ 7.05 6.00 และ 4.90 ตามลำดับ

จากผลทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่า คู่ผสม $\text{Ki48} \times \text{Nei9202}$ และ $\text{Ki48} \times \text{Nei542010}$ เป็นคู่ผสมที่โดดเด่นที่สุดภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยให้ค่าความต่างของความเขียวใบและการม้วนใบต่ำที่สุด สะท้อนถึงศักยภาพในการทนแล้งได้ดีเยี่ยม และยังพบว่า $\text{Nei492006} \times \text{Nei9202}$ อยู่ในลำดับต้น ๆ ของคู่ผสมที่มีความสามารถในการฟื้นตัวจากความเครียดได้ดีที่สุดภายใน 24 ชั่วโมง หลังกลับมาให้น้ำ โดยมีค่าความต่างของความเขียวใบและการม้วนใบเพิ่มขึ้นมากที่สุด ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญในการประเมินและคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่ทนต่อสภาวะแห้งแล้งในช่วงต้นของการเจริญเติบโต สภาพการขาดน้ำที่รุนแรงนำไปสู่กลไกการม้วนใบของพืช เพื่อลดอัตราการคายน้ำได้ แต่นำไปสู่การลดพื้นที่ในการสังเคราะห์แสง และการลดลงของผลผลิตในภายหลัง ดังนั้นการค้นหายีนพันธุ์ที่มีอัตราการม้วนใบต่ำเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการต้านทานความแห้งแล้งของพืชได้ (Zhang et al., 2024) สอดคล้องกับการศึกษาของ Saglam et al. (2014) ที่ได้ทำการศึกษากการตอบสนองต่อความแห้งแล้งต่างกันในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สายพันธุ์ทนแล้งและไม่ทนแล้ง และรายงานว่ายีนพันธุ์ทนแล้งม้วนใบช้ากว่าและค่าศักย์น้ำในใบ (Ψ_{leaf}) ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ไม่ทนแล้ง พันธุ์ทนแล้งมักแสดงอาการม้วนใบได้ช้ากว่าพันธุ์ที่ไม่ทนแล้ง และแม้ว่าการม้วนใบเป็นกลไกสำคัญที่ช่วยปกป้องการสังเคราะห์แสง และลดการสูญเสียผลผลิตภายใต้สภาวะแห้งแล้ง แต่ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงก็สำคัญเช่นกัน จากการศึกษาของ Effendi et al. (2019) ที่แสดงให้เห็นถึง

ความสัมพันธ์ระหว่างการม้วนใบของข้าวโพดและปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของใบ การรักษาปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของใบให้อยู่ระดับสูงในสภาวะความเครียดจากภัยแล้ง บ่งชี้ถึงความสามารถของต้นข้าวโพดในการดูดซับน้ำในดินเพียงพอผ่านรากที่ลึก และระงับการสูญเสียน้ำผ่านการคายน้ำได้

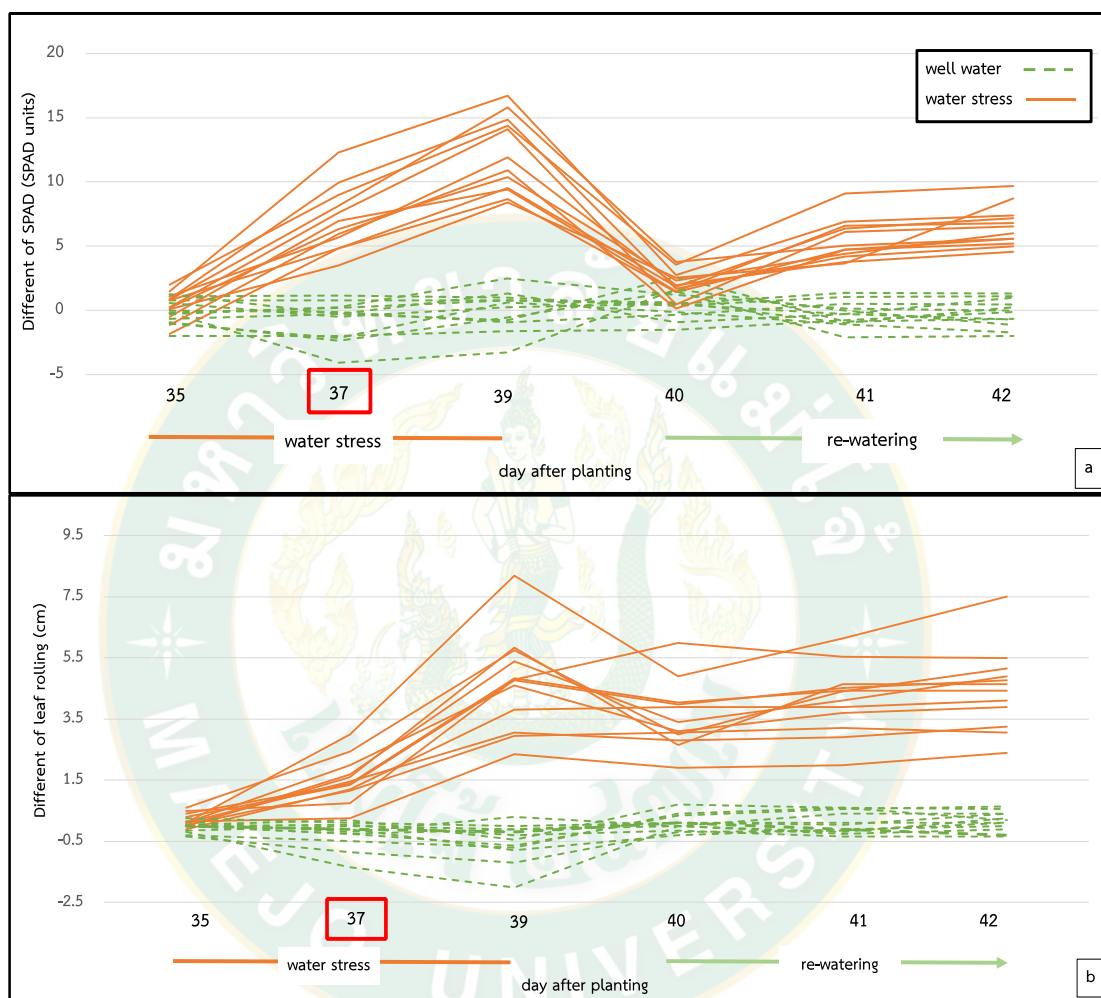


Figure 13. Differences among 12 F₁ progenies in a) SPAD values and b) leaf rolling between 35 and 42 days after planting (DAP) under well-watered (Green lines) and water deficit conditions (Orange lines)

Table 7. Analysis of Variance (ANOVA) for adaptive traits (differences in SPAD and Leaf Rolling) of 12 F₁ Progenies

		MS									
SOV	df	Diff_SPAD 37 DAP	Diff_SPAD 39 DAP	Diff_SPAD 40 DAP	Diff_SPAD 41 DAP	Diff_LR 37 DAP	Diff_LR 39 DAP	Diff_LR 40 DAP	Diff_LR 41 DAP		
Block	1	3.2	0.2	1.047	3.4	0.2	2.3*	0.81	0.19		
Cross	11	9.1***	13.5***	2.159	4.5**	0.61	3.6***	2.02***	2.15***		
Watering	1	741.8***	1748.9***	27.165***	397.2***	38.75***	326.1***	176.41***	222.74***		
Cross x watering	11	7.8***	8.5***	2.827*	2.5	0.84*	2.1***	2.31***	3.11***		
Residuals	23	1.6	0.6	1.003	1.1	0.38	0.4	0.31	0.2		

Remark: Diff_SPAD and LR at 37, 39, and 40 DAP refer to differences in SPAD values and leaf rolling observed during water stress at 5 and 7 days, and after rewetting at 24 and 48 hours Significance levels: *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001



Figure 14. LSD test showing differences among 12 F₁ progenies in a) SPAD values and b) Leaf rolling measured at 37, 39, and 40 days after planting (DAP)

ลักษณะขนาดช่อดอก ความหนาแน่นของช่อดอก และช่วงห่างระหว่างวันออกดอก ออกใหม่

จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบ Two-way ANOVA โดยใช้ข้อมูลลักษณะขนาดช่อดอก (Tassel size; TS) ความหนาแน่นของช่อดอก (Spikelet density; SPD) และช่วงห่างระหว่างวันออกดอกและออกใหม่ (Anthesis and silking date interval; ASI) เพื่อประเมินอิทธิพลหลักของกลุ่มผสม (cross) ลักษณะการให้น้ำ (watering) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (cross × watering) พบว่า ลักษณะการให้น้ำ (watering) ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนอย่างมีนัยสำคัญต่อลักษณะ ASI และ TS ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การงดน้ำ (water stress; WS) มีผลกระทบต่อกระบวนการออกดอกและออกใหม่ของข้าวโพด ในทางกลับกัน พบว่า บล็อก กลุ่มผสม ลักษณะการให้น้ำ และปฏิสัมพันธ์ร่วมกันของปัจจัยเหล่านี้ไม่มีผลต่อความแปรปรวนของลักษณะ SPD (Table 8) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำลักษณะ ASI มาพิจารณาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Least Significant Difference (LSD) พบว่า กลุ่มผสม Nei492006×Nei542010 (1.5 วัน), Nei492006×Nei9202 (1.5 วัน) และ Ki59×Nei542010 (2 วัน) มีค่า ASI ต่ำที่สุด (Figure 15) ซึ่งแสดงถึงความสามารถของกลุ่มผสมเหล่านี้ในการรักษาช่วงเวลาระหว่างการออกดอกและการออกใหม่ให้อยู่ในช่วงที่สั้นที่สุด แม้จะอยู่ภายใต้สภาวะความเครียดจากการขาดน้ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Martins-da-Silva et al. (2022) ที่พบว่า เมื่อข้าวโพดเผชิญกับภัยแล้ง ส่งผลให้ ASI กว้างขึ้น และพบว่า ASI ที่มากขึ้นนั้นมีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญกับผลผลิตเมล็ดพืช ($r = -0.76$; $p = 0.047$) ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อพันธุ์กรรมที่มี ASI ที่แคบเป็นส่วนหนึ่งของการปรับปรุงผลผลิตที่เพิ่มขึ้นได้

Table 8. Analysis of variance (ANOVA) for reproductive traits of 12 F₁ progenies

SOV	df	Mean square		
		ASI	TS	SPD
Block	1	0	0.301	0.701
Cross	11	4.136***	0.294	1.05
Watering	1	12***	7.207*	5.201
Cross x Watering	11	4.773***	0.848	0.963
Residuals	23	0.391	1.017	1.264

Remark: ASI, TS, and SPD refer to anthesis-silking interval, tassel size, and spikelet density, respectively

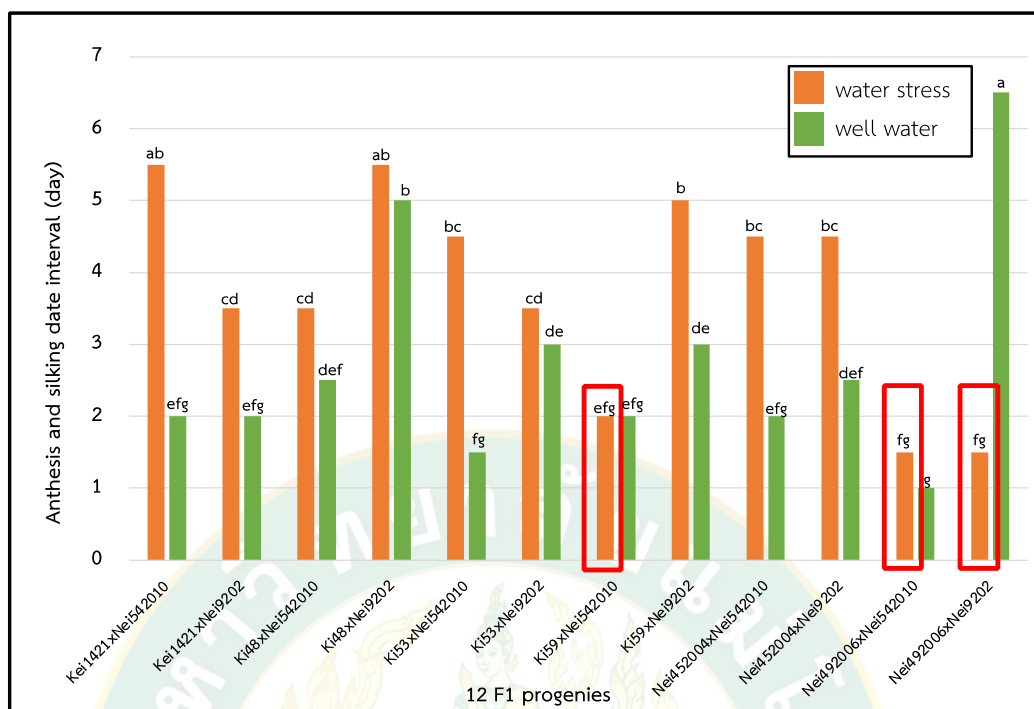


Figure 15. LSD test for anthesis-silking interval (ASI) of 12 F₁ progenies under well-watered (Green bar) and water deficit conditions (Orange bar)

ลักษณะองค์ประกอบผลผลิต (yield components)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของข้าวโพด จำนวน 6 ลักษณะ ได้แก่ น้ำหนักสด (Fresh Weight; FW), น้ำหนักสดหลังปอกเปลือก (Fresh Weight Unhusked; FWunhusked), น้ำหนักแห้งรวม (Total Dry Weight; TDW), น้ำหนักแห้งของเมล็ด (Kernel Dry Weight; KDW), น้ำหนักแห้งของเมล็ด 100 เมล็ด (100 Kernel Dry Weight; 100 KDW) และ จำนวนเมล็ด (Number of Kernels; NK) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-way ANOVA) เพื่อประเมินอิทธิพลของพันธุ์ลูกผสม (cross) วิธีการให้น้ำ (watering) และ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (cross × watering) พบว่า วิธีการให้น้ำ (watering) ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อลักษณะองค์ประกอบผลผลิตทั้ง 6 ลักษณะ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาวะขาดน้ำ (water stress; WS) มีผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของต้นข้าวโพด จนถึงกระบวนการติดเมล็ด (Table 9)

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ภายใต้สภาพขาดน้ำ (WS) พบว่า คู่ผสม Ki48xNei542010 และ Nei452004xNei542010 มีค่าลักษณะองค์ประกอบ

ผลผลิตในระดับสูง ได้แก่ FW (103 และ 84 กรัม) (Figure 16a), FWunhusked (94.99 และ 74.66 กรัม) (Figure 16b), TDW (66.48 และ 59.14 กรัม) (Figure 16c), KDW (54.24 และ 48.89 กรัม) (Figure 16d) และ NK (170.37 และ 174.20 เมล็ด) (Figure 16f) ตามลำดับ ซึ่งน่าสนใจว่า แม้ปลูกในสภาพน้ำปกติ (WW) ทั้งสองคู่ผสมนี้ยังคงให้ค่าผลผลิตที่สูงเช่นกัน (แสดงด้วยแท่งสีเขียวใน Figure 16) เมื่อพิจารณาลักษณะรกร่วมด้วย พบว่า คู่ผสม Ki48xNei542010 ยังมีลักษณะการปรับตัวการปรับตัวที่ดีเด่นเมื่ออยู่ในสภาพขาดน้ำ (WS) เช่นกัน ไม่ว่าจะเป็นในลักษณะของค่าความต่างของความเขียวใบ ($\text{Diff}_{\text{SPAD}}$) และค่าความต่างของการมันใบ (Diff_{LR}) และทั้งนี้ยังพบว่า คู่ผสมคู่นี้ ยังมีช่วงห่างระหว่างวันออกดอก ออกใหม่ที่แคบ อยู่ในลำดับที่ 4 จากทั้งหมด 12 คู่ผสม สะท้อนให้เห็นถึงศักยภาพของทั้งสองคู่ผสมในการให้ผลผลิตสูงและมีความสามารถในการปรับตัวภายใต้สภาพขาดน้ำ โดยเฉพาะในช่วงก่อนการผสมพันธุ์ที่เป็นช่วงวิกฤตของข้าวโพด เนื่องจากความเครียดจากการขาดน้ำในช่วงนี้ส่งผลโดยตรงต่ออัตราการแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และกระบวนการเติมเมล็ดในฝัก ซึ่งอาจทำให้ระยะเวลาการพัฒนาใหม่ยืดออก ส่งผลต่อการลดลงของผลผลิตและน้ำหนักเมล็ด โดยมีรายงานว่า มากถึง 75% ของการสูญเสียผลผลิตเป็นผลมาจากการยืดตัวของใหม่ที่ช้าลง (Bolonos and Edmeades, 1996) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kamara et al. (2003) ที่พบว่า ลูกผสมบางคู่มีความสามารถในการปรับตัวและยังคงให้ผลผลิตสูงภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย

Table 9. Analysis of variance (ANOVA) for yield components of 12 F₁ progenies

SOV	df	Mean square					
		FW	FWunhusked	TDW	KDW	100KDW	NK
Block	1	6	1	8	14	0.41	81
Cross	11	1088***	1094***	877***	649***	33.02***	6323***
Watering	1	18272***	16272***	12459***	8903***	268.43***	104857***
CrossxWatering	11	232**	293***	195***	158***	3.96	1971***
Residuals	23	53	35	31	30	1.88	346

Remark: FW = fresh weight, FWunhusked = fresh weight unhusked, TDW = total dry weight, KDW = kernel dry weight, 100KDW = 100 kernel dry weight, NK = number of kernel
Significance levels: **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001

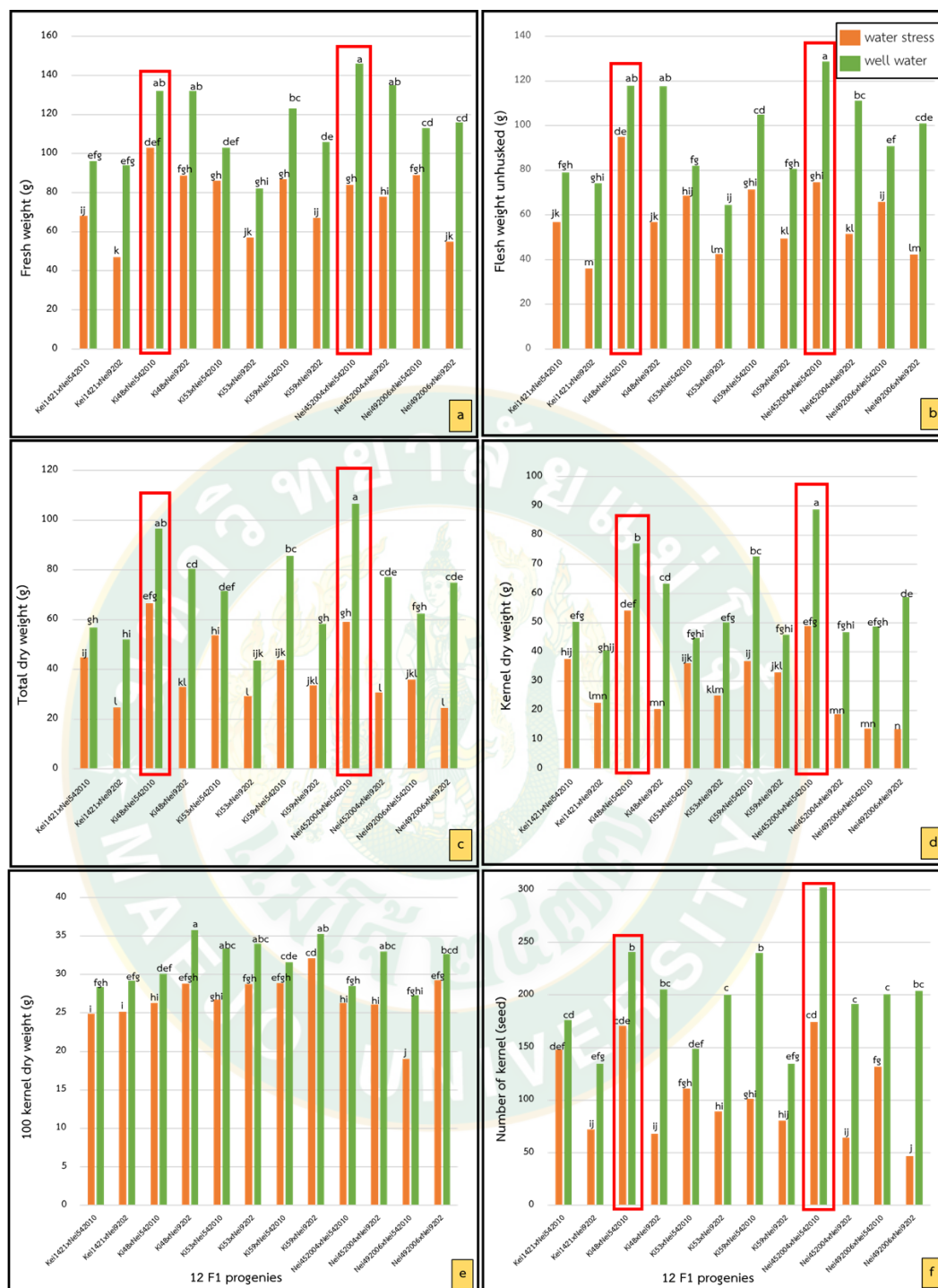


Figure 16. LSD test for yield components of 12 F₁ crosses under well-watered (Green bar) and water deficit conditions (Orange bar) a) Fresh Weight Unhusked b) Total Dry Weight c) Kernel Dry Weight e) 100 Kernel Dry Weight f) Number of Kernels, respectively

ค่าดัชนีความทนทานต่อสภาพเครียด

เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความทนทานต่อสภาพเครียดของลักษณะน้ำหนักฝัก ($STI_{Fwunhusked}$) โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบ One-way ANOVA ผลพบว่า คู่ผสมมีผลทางสถิติต่อดัชนีความทนทานต่อสภาพเครียด ($P \leq 0.01$) ดังแสดงใน Table 10 ในขณะที่บล็อกไม่มีอิทธิพลทางสถิติต่อดัชนีความทนทานต่อสภาพเครียด

Table 10. Analysis of variance (ANOVA) for Stress tolerance index (STI) of Fresh weight (unhusked) in 12 F_1 progenies under different watering regime (water stress and well-watered conditions)

SOV	df	SS	MS	F-value	Pr(>F)
Block	1	0.002	0.002	0.285	0.604
Cross	11	1.727	0.157	24.387	3.89×10^{-06} **
Residuals	11	0.071	0.006		

Remark: ** $P \leq 0.01$

จากผลการเปรียบเทียบค่าดัชนีความทนทานต่อสภาพเครียดของลักษณะน้ำหนักฝัก ($STI_{Fwunhusked}$) พบว่า คู่ผสม Ki48xNei542010 (1.215) Nei452004xNei542010 (1.040) Ki59xNei542010 (0.810) และ Ki48xNei9202 (0.725) มีดัชนีความทนทานต่อสภาพเครียดสูงตามลำดับ (กรอบสีแดงที่ใน Figure 17) และเมื่อพิจารณาร่วมกับองค์ประกอบผลผลิต ยังพบอีกว่า ทั้ง คู่ผสม Ki48xNei542010 Nei452004xNei542010 และมีค่าลักษณะองค์ประกอบผลผลิตในระดับสูงในทุกลักษณะ (Figure 16) ได้แก่ ลักษณะ FW, Fwunhusked, TDW, KDW และ NK

งานวิจัยอื่นมีการใช้ค่าดัชนีความทนทานต่อสภาพเครียดในการคัดเลือกลูกผสม เช่น Dorina. (2020) คัดเลือกลูกผสมที่ให้ผลผลิต และค่า STI ที่สูง สำหรับพัฒนาเป็นข้าวโพดทนแล้ง ส่วน Shojaei et al. (2022) ใช้ดัชนีชี้วัดการทนแล้งหลายชนิด ได้แก่ ค่าดัชนีความทนต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม (Tolerance Index; TOL) ผลผลิตเฉลี่ยภายใต้ทั้งสภาพปกติ (ไม่เครียด) และสภาพเครียด (Mean Productivity; MP) ค่าเฉลี่ยฮาร์โมนิกของผลผลิตในสองสภาพแวดล้อม (Harmonic Mean; HARM) ผลคูณเฉลี่ยเรขาคณิตของผลผลิตในสภาพปกติและเครียด (Geometric Mean Productivity; GMP) ดัชนีความอ่อนไหวต่อความเครียด (Stress Susceptibility Index; SSI)

สำหรับดัชนีความทนต่อความเครียด ที่คำนึงถึงผลผลิตทั้งภายใต้ความเครียดและไม่เครียด คือ ดัชนี STI จึงสามารถระบุพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงในทั้งสภาพปกติและสภาพเครียดได้ ทั้งยังส่งเสริมการคัดเลือกพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง โดยไม่ลดทอนศักยภาพในสภาพปกติเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ที่มีความทนแล้งจริง และ ให้ผลผลิตคงที่ในหลากหลายสภาพแวดล้อม และใช้ได้ดีในการปรับปรุงพันธุ์เชิงปฏิบัติ เนื่องจากไม่เน้นแค่ผลผลิตสูงหรือต่ำเพียงด้านเดียว แต่พิจารณา ความสามารถในการรักษาผลผลิตภายใต้ความเครียด ร่วมกับศักยภาพพื้นฐานอีกด้วย



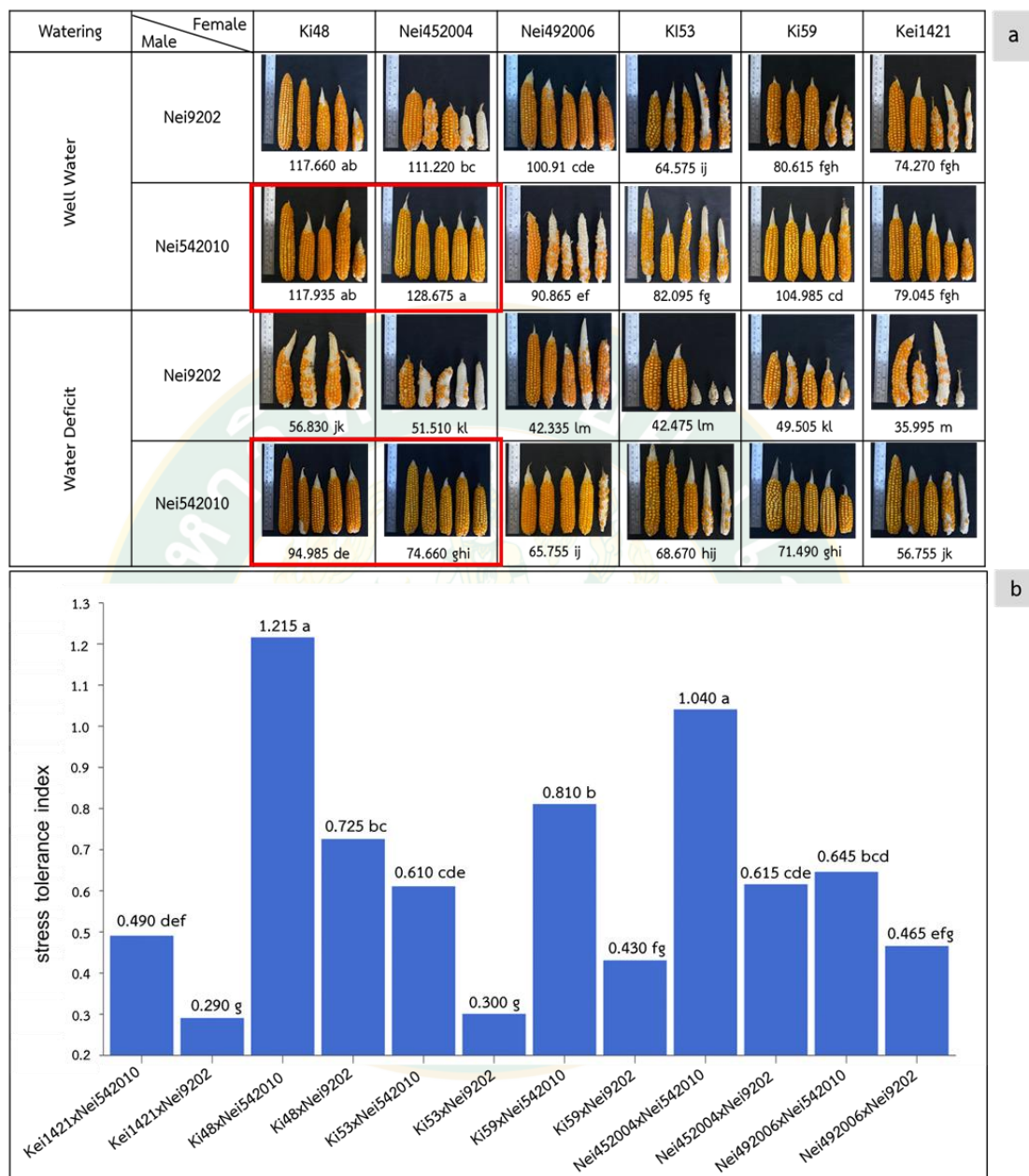


Figure 17. Mean comparison among 12 F_1 progenies using the Least Significant Difference (LSD) test at the 0.01 significance level a) Ear characteristics and ear weight (g per plot) under water stress and well-watered conditions b) Stress Tolerance Index (STI) of 12 F_1 crosses

การประเมินความสามารถในการผสม (combining ability) ของลักษณะรอง (secondary traits) ซึ่งเกี่ยวข้องกับผลผลิต

จากผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนความสามารถในการผสม (combining Ability) ของลักษณะความสูงที่ระยะ v8 (plant height at v8; PHv8) ที่ระยะ V8 ที่ถูกวิเคราะห์แล้วว่า พบความแตกต่างของความสูงของข้าวโพดระหว่าง 2 กลุ่ม ซึ่งเป็นผลมาจากการงดนน้ำได้นาน 5 วัน ข้าวโพดในกลุ่ม WS จึงเริ่มแสดงออกทางด้านความสูงที่แตกต่างไป นอกจากนี้ยังมีลักษณะช่วงห่างระหว่างวันออกดอกออกไหม (anthesis and silking date interval; ASI) ค่าความต่างของความเขียวใบ (Difference of SPAD; Diff_{SPAD}) และความต่างของการม้วนใบ (Difference of SPAD; Diff_{LR}) ของข้าวโพดลูกผสม 12 คู่ ภายใต้ สองสภาวะน้ำ ได้แก่ สภาพให้น้ำปกติ (well water; WW) สภาพขาดน้ำ (water stress; WS) ซึ่งทั้งลักษณะ Diff_{SPAD} และ Diff_{LR} ถูกวิเคราะห์แล้วว่า มีความต่างของการให้น้ำทั้ง 2 รูปแบบอย่างชัดเจนจากการวิเคราะห์ก่อนหน้านี้

เมื่อประเมินอิทธิพลหลักของคู่ผสม (crosses) ที่มีต่อลักษณะความสูงของต้นข้าวโพดในระยะ V8 (PHv8) ทั้งในสภาวะปกติ (WW) และสภาวะขาดน้ำ (WS) ดังแสดงผลใน Table 11 ก็พบว่า มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ต่อความสูงต้นในทั้งสองสภาวะ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์อิทธิพลจากสายพันธุ์แม่ (GCA_f), สายพันธุ์พ่อ (GCA_m) และคู่ผสม (SCA) ที่แสดงค่าความแปรปรวนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เช่นกัน โดยเฉพาะอิทธิพลจากฝั่งพ่อ (GCA_m) ซึ่งมีค่า mean square สูงสุดในทั้ง 2 สภาวะ ได้แก่ 759.375 (WW) และ 1209.840 (WS) แสดงให้เห็นว่า พันธุ์พ่อบีบทบาทสำคัญต่อการกำหนดความสูงของต้นอย่างเด่นชัดในทั้งสองสภาพแวดล้อม

สำหรับลักษณะช่วงห่างระหว่างวันออกดอกและออกไหม (ASI) พบว่า ลักษณะการให้น้ำ (watering) มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ต่อ ASI ทั้งในสภาวะปกติและขาดน้ำ ซึ่งการขาดน้ำส่งผลให้ความล่าช้าระหว่างช่วงการออกดอกและออกไหมเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาอิทธิพลของสายพันธุ์พ่อ (GCA_m) ภายใต้สภาพขาดน้ำ พบว่า ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งแสดงว่า สายพันธุ์พ่อก็มีผลต่อ ASI ลดลงภายใต้สภาวะเครียดจากการขาดน้ำ

ในส่วน of ค่าความต่างความเขียวของใบ (Diff_{SPAD}) ที่ 39 หลังปลูก (39 DAP) หรือ งดนน้ำที่ 7 วัน และ 40 หลังปลูก (40 DAP) หรือกลับมาให้น้ำภายใน 24 ชั่วโมง พบว่า ทั้งคู่ผสม (crosses) และอิทธิพลจาก GCA_f, GCA_m และ SCA มีผลต่อความเขียวใบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทั้งสองสภาวะ โดยเฉพาะในช่วง 39 วันหลังปลูก ซึ่งเป็นช่วงงดนน้ำที่ 7 วัน พบว่า GCA_f และ SCA มีผล

ชัดเจนต่อการคงความเขียวของใบ แสดงให้เห็นถึงบทบาทของพันธุกรรมในการทนต่อสภาวะขาดน้ำ ขณะที่ค่าความแปรปรวนในช่วง 40 วันหลังปลูก ซึ่งเป็นช่วงหลังกลับมาให้น้ำ พบว่า อิทธิพลจากสายพันธุ์พ่อ (GCA_m) ไม่มีนัยสำคัญในสภาพขาดน้ำ ($P>0.05$) แสดงให้เห็นว่าฝั่งพ่ามีอิทธิพลลดลงหลังข้าวโพดเริ่มฟื้นตัวจากความเครียด

และในส่วนของค่าความต่างการม้วนใบ (Leaf Rolling; LR) ที่ 39 และ 40 วันหลังปลูก พบว่า ลักษณะการให้น้ำ (watering) คู่ผสม (cross) และ GCA_f , GCA_m และ SCA ล้วนมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$ ถึง $P<0.001$) ต่อการม้วนใบในทั้งสองสภาวะ โดยเฉพาะในวันที่ 39 หลังปลูก ซึ่งเป็นช่วงที่ข้าวโพดขาดน้ำสูงสุด 7 วัน พบว่า GCA_f มีอิทธิพลสูงที่สุดต่อการม้วนใบในทั้งสองสภาวะ ($MS = 1.272$ และ 7.907 ตามลำดับ) ขณะที่อิทธิพลจาก GCA_m ในวันที่ 40 หลังปลูก ภายใต้สภาวะขาดน้ำ ($MS = 0.058$) ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สะท้อนให้เห็นว่า อิทธิพลจากพันธุ์พ่อลดลงหลังการให้น้ำ และข้าวโพดเริ่มมีการฟื้นตัวจากความเครียด



Table 11. Mean squares from combined analyses of variance for combining ability based on PHv8, ASI, differences in SPAD and LR of 12 F₁ progenies crosses under two watering regimes

SOV	df	Mean Square							
		well-watered							
		PHv8	ASI	Diff_SPAD 39	Diff_SPAD 40	Diff_LR 39	Diff_LR 40	DAP	DAP
Replication	1	0.882	0.15	0.202	0.851	2.667**	1.042		
Cross	11	128.530***	4.773***	4.633**	2.599	0.769**	0.155		
GCA _f	5	97.303***	2.500***	3.829**	3.359	1.272*	0.239		
GCA _m	1	759.375***	20.167***	10.402**	4.507	0.06	0.327		
SCA	5	33.589***	3.967***	4.283**	1.457	0.409	0.038		
Error	11	6.744	0.182	0.685	1.417	0.16	0.275		

Table 11. Mean squares from combined analyses of variance for combining ability based on PHv8, ASI, differences in SPAD and LR of 12 F₁ progenies crosses under two watering regimes (table continue)

SOV	df	Mean Square							
		water deficit							
		PHv8	ASI	Diff_SPAD 39	Diff_SPAD 40	Diff_LR 39	Diff_LR 40	DAP	DAP
Replication	1	3.84*	0.32	0.39	0.275	0.265	0.062		
Cross	11	171.399***	4.136**	17.403***	2.388*	4.968***	4.178***		
GCA _f	5	79.861***	5.500***	23.365***	2.849*	7.907***	6.320***		
GCA _m	1	1209.840***	0.667	2.509**	0.134	3.745***	0.058		
SCA	5	55.250***	3.467**	14.420***	2.377*	2.274**	2.860***		
Error	11	4.415	0.636	0.511	0.673	0.557	0.349		

Remark: PHv8 = Plant height at v8, ASI = anthesis and silking date interval, Diff_SPAD and LR at 39 and 40 DAP = Differences in SPAD values and leaf rolling observed during water stress at 7 days, with rewatering at 24 hours

ความสามารถในการรวมตัวแบบทั่วไป (general combining ability)

จากการประเมินอิทธิพลหลักของความสามารถในการรวมตัวแบบทั่วไป (General Combining Ability; GCA) ภายใต้สภาวะขาดน้ำ (water stress) และการให้น้ำตามปกติ (well water) ดังแสดงใน Table 12 ของลักษณะความสูงที่ระยะ v8 (plant height at v8; PHv8) ช่วงห่างระหว่างวันออกดอกออกไหม (anthesis and silking date interval; ASI) ค่าความต่างของความเขียวใบ (Difference of SPAD; Diff_{SPAD}) และความต่างของการม้วนใบ (Difference of SPAD; Diff_{LR}) ของข้าวโพดลูกผสม 12 คู่ ภายใต้ 2 สภาวะน้ำ ได้แก่ สภาพให้น้ำปกติ (well water; WW) สภาพขาดน้ำ (water stress; WS) พบว่า

ความสูงต้นในระยะ V8 (PHv8) ภายใต้สภาพให้น้ำปกติ สายพันธุ์แม่ Kei1421 (6.475), Nei492006 (3.4) และสายพันธุ์พ่อ Nei9202 (5.625) แสดงค่า GCA ของความสูงต้นดีที่สุด เช่นเดียวกับภายใต้สภาพขาดน้ำที่สายพันธุ์แม่ Kei1421 (5.892) และสายพันธุ์พ่อ Nei9202 (7.1) ยังคงมีค่า GCA สูงที่สุด ทั้งนี้ยังพบว่า Ki48 (2.742) และ Ki59 (3.242) แสดงผลดีที่สุดเช่นกัน

ในส่วนในช่วงห่างระหว่างวันออกดอกและออกไหม (ASI) ซึ่งเป็นลักษณะเดียวที่ต้องการค่า GCA เป็นลบ และมีความแตกต่างทางสถิติ โดยผลการวิเคราะห์พบว่า ภายใต้สภาพให้น้ำปกติ สายพันธุ์แม่ Nei492006 (1), Ki48 (1), Kei1421 (-0.75) และสายพันธุ์พ่อ Nei9202 (0.917) ให้ค่า ASI แคบที่สุด เช่นเดียวกับภายใต้สภาพขาดน้ำ พบว่าสายพันธุ์แม่ Nei492006 (-2.25) เป็นสายพันธุ์เดียวที่มี GCA แคบที่สุดและมีความแตกต่างทางสถิติ

ค่าความต่างของความเขียวใบที่ 39 และ 40 วันหลังปลูก (Diff_{SPAD} 39 และ 40 DAP) หรือช่วงงอก 7 วัน และ กลับและมาให้น้ำภายใน 24 ชั่วโมง โดยพบว่า ภายใต้สภาพให้น้ำปกติ สายพันธุ์แม่ Nei492006 (1.539), Nei452004 (0.197) และสายพันธุ์พ่อ Nei9202 (0.658) มีค่าความต่างของความเขียวใบสูงที่สุด ส่วนภายใต้สภาพขาดน้ำ สายพันธุ์แม่ Kei1421 (3.006), Ki59 (1.926) และ Ki48 (0.816) ยังคงมีค่า GCA เป็นบวกและมีความแตกต่างทางสถิติ แสดงการรักษาความเขียวใบเมื่อเผชิญกับสภาพขาดน้ำได้ดีที่สุด

ค่าความต่างของการม้วนใบ ที่ 39 และ 40 วันหลังปลูก (Diff_{SPAD} 39 และ 40 DAP) พบว่า ภายใต้สภาพให้น้ำปกติ สายพันธุ์แม่ Nei452004 (0.567) และ Nei492006 (0.008) แสดงการม้วนใบน้อย ขณะที่ภายใต้สภาพขาดน้ำ สายพันธุ์แม่ Ki59 (1.587), Nei452004 (1.524), Ki48 (2.047) ยังคงมีค่า GCA เป็นบวกและมีความแตกต่างทางสถิติ

จากผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่า สายพันธุ์แม่ Kei1421 Ki48 Ki59 และ Nei492006 รวมถึงสายพันธุ์พ่อ Nei9202 เป็นสายพันธุ์ที่ดีที่สุดในภาพรวม เพราะแสดงค่า GCA ที่สูง (เช่น GCA ของ ASI เป็นค่าลบ) ในหลายลักษณะสำคัญทั้งในสภาพปกติและสภาพขาดน้ำ



Table 12. General combining ability of PHv8, ASI, differences of SPAD and LR in 12 F₁ progeny crosses under two conditions

watering	Line	PHv8	ASI	Diff_SPAD 39 DAP	Diff_SPAD 40 DAP	Diff_LR 39 DAP	Diff_LR 40 DAP
Water deficit	<u>Males</u>						
	Nei542010	-7.1***	-0.167	-0.323	0.075	-0.395	0.049
	Nei9202	7.1***	0.167	0.323	-0.075	0.395	-0.049
	<u>Females</u>						
	Kei1421	5.892***	0.75	3.006***	-0.37	1.272**	-0.576
	Ki48	2.742*	0.75	0.816*	-0.493	2.047***	-1.451***
	Ki53	-4.133**	0.25	-1.052*	0.757	-0.303	-0.676*
	Ki59	3.242**	-0.25	1.926***	-1.193*	-0.616	1.587***
	Nei452004	-4.008**	0.75	-3.702***	0.237	-1.803**	1.524***
	Nei492006	-3.733**	-2.25***	-0.994*	1.062*	-0.596	-0.408

Table 12. General combining ability of PHv8, ASI, differences of SPAD and LR in 12 F₁ progeny crosses under two conditions (table continue)

watering	Line	PHv8	ASI	Diff_SPAD 39	Diff_SPAD 40	Diff_LR 39	Diff_LR 40
				DAP	DAP	DAP	DAP
Well-watered	<u>Males</u>						
	Nei542010	-5.625***	-0.917	-0.658*	0.433	-0.05	0.117
	Nei9202	5.625***	0.917	0.658*	-0.433	0.05	-0.117
	<u>Females</u>						
	Kei1421	6.475***	-0.75**	-0.026	1.124	-0.408*	-0.017
	Ki48	1.075	1***	0.109	0.467	-0.058	0.458
	Ki53	-7.55***	-0.5*	-0.313	-1.071	-0.883***	-0.242
	Ki59	-0.25	-0.25	-1.506	0.564	0.567*	-0.042
	Nei452004	-3.15**	-0.5*	0.197*	-1.118	0.467*	0.008
	Nei492006	3.4**	1***	1.539	0.034	0.317	-0.167

Remark: PHv8 = Plant height at v8, ASI = anthesis and silking date interval, Diff_SPAD and LR at 39 and 40 DAP = Difference in SPAD values and leaf rolling during water stress at 7 days, and after 24 hours of rewatering

ความสามารถในการรวมตัวแบบเฉพาะ (Specific Combining Ability)

จากการประเมินอิทธิพลหลักของความสามารถในการรวมตัวแบบเฉพาะ (Specific Combining Ability; SCA) ภายใต้สภาวะขาดน้ำ (water stress) และการให้น้ำตามปกติ (well water) ดังแสดงใน Table 13 ของลักษณะความสูงที่ระยะ v8 (plant height at v8; PHv8) ช่วงห่างระหว่างวันออกดอกออกไหม (anthesis and silking date interval; ASI) ค่าความต่างของความเขียวใบ (Difference of SPAD; $\text{Diff}_{\text{SPAD}}$) และความต่างของการม้วนใบ (Difference of SPAD; Diff_{LR}) ของข้าวโพดลูกผสม 12 คู่ ภายใต้ สองสภาวะน้ำ ได้แก่ สภาพให้น้ำปกติ (well water; WW) สภาพขาดน้ำ (water stress; WS) พบว่า

สำหรับความสูงต้นในระยะ V8 (PHv8) ภายใต้สภาพขาดน้ำ คู่ผสมที่มีค่า SCA เป็นบวกและมีความแตกต่างทางสถิติ ได้แก่ คู่ผสม Nei492006 $\times$ Nei542010 (5.05) และ คู่ผสม Nei452004 $\times$ Nei9202 (5.775) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงสมรรถนะการผสมเฉพาะที่ดีเยี่ยมในด้านความสูงต้นเมื่อเผชิญกับภาวะขาดน้ำ

และในส่วนในช่วงห่างระหว่างวันออกดอกและออกไหม (ASI) ซึ่งเป็นลักษณะเดียวที่ต้องการค่า SCA เป็นลบ และมีความแตกต่างทางสถิติ พบว่า คู่ผสม Ki59 $\times$ Nei542010 (-1.333) และ Kei1421 $\times$ Nei9202 (-1.167) เป็นคู่ผสมที่ให้ค่า ASI แคบที่สุด แสดงถึงความสามารถในการผสมเกสรภายใต้สภาวะเครียดจากการขาดน้ำได้ดี

ค่าความต่างของความเขียวใบ ที่ 39 และ 40 วันหลังปลูก ($\text{Diff}_{\text{SPAD}}$ 39 และ 40 DAP) ซึ่งสะท้อนถึงความสามารถในการรักษาความเขียวของใบในช่วงต้นน้ำ 7 วัน (39 DAP) และหลังกลับมาให้น้ำภายใน 24 ชั่วโมง (40 DAP) พบว่าคู่ผสม Nei492006 $\times$ Nei542010 (3.043) และ Ki59 $\times$ Nei542010 (1.088) แสดงความแตกต่างเป็นบวกและมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 39 วันหลังปลูก แสดงถึงความสามารถในการรักษาความเขียวของใบระหว่างการขาดน้ำ

ค่าความต่างของการม้วนใบ ที่ 39 และ 40 วันหลังปลูก (Diff_{LR} 39 และ 40 DAP) พบว่า คู่ผสมที่มีค่า SCA เป็นบวกและมีความแตกต่างทางสถิติ ได้แก่ Nei452004 $\times$ Nei9202 (1.305) และ Ki59 $\times$ Nei542010 (1.488) ที่ 40 วันหลังปลูก ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการฟื้นตัวของใบหลังจากได้รับน้ำอีกครั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากผลการวิเคราะห์ จึงสรุปได้ว่า ภายใต้สภาพขาดน้ำ คู่ผสม Nei492006 × Nei542010 และ Ki59 × Nei542010 แสดงสมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) ที่โดดเด่น โดย Nei492006 × Nei542010 ให้ค่า SCA สูงสุดในลักษณะความสูงต้น (5.05) และความเขียวใบช่วงขาดน้ำ ($\text{Diff}_{\text{SPAD}}$ 39 DAP = 3.043), ส่วน คู่ผสม Ki59 × Nei542010 แสดงค่า SCA เป็นลบในลักษณะ ASI (-1.333) ซึ่งเป็นทิศทางที่ต้องการ พร้อมทั้งมีค่า SCA สูงในลักษณะค่าความต่างของความเขียวใบช่วงขาดน้ำ (1.088) และการฟื้นตัวของใบหลังกลับมาได้น้ำ (Diff_{LR} 40 DAP = 1.488) แสดงถึงศักยภาพในการเจริญเติบโต การผสมเกสร และการฟื้นตัวจากความเครียดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Table 13)



Table 13. Specific combining ability of PHv8, ASI, differences of SPAD and LR in 12 F₁ progeny crosses under two conditions

Watering regimes	Crosses	PHv8	ASI	Diff_SPAD 39		Diff_SPAD 40		Diff_LR 39		Diff_LR 40	
				DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP
Water deficit	Kei1421xNei542010	-1.475	1.167*	-0.102	0.125	0.02	0.501				
	Ki48xNei542010	0.125	-0.833	-2.532***	-1.102	0.695	-0.624				
	Ki53xNei542010	2.75	0.667	-0.884	0.743	0.795	-0.199				
	Ki59xNei542010	-0.675	-1.333*	1.088*	0.588	-0.142	1.488**				
	Nei452004xNei542010	-5.775	0.167	-0.614	0.448	-1.305*	-0.599				
	Nei492006xNei542010	5.05**	0.167	3.043***	-0.802	-0.062	-0.567				
	Kei1421xNei9202	1.475	-1.167*	0.102	-0.125	-0.02	-0.501				
	Ki48xNei9202	-0.125	0.833	2.532***	1.102	-0.695	0.624				
	Ki53xNei9202	-2.75	-0.667	0.884	-0.743	-0.795	0.199				
	Ki59xNei9202	0.675	1.333*	-1.088*	-0.588	0.143	-1.488**				
	Nei452004xNei9202	5.775**	-0.167	0.614	-0.448	1.305*	0.599				
	Nei492006xNei9202	-5.05	-0.167	-3.043	0.802	0.063	0.567				

Table 13. Specific combining ability of PHv8, ASI, differences of SPAD and LR in 12 F₁ progeny crosses under two conditions (table continue)

Watering regimes	Crosses	PHv8	ASI	Diff_SPAD 39		Diff_SPAD 40		Diff_LR 39		Diff_LR 40	
				DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP
Well-watered	Kei1421xNei542010	0.775	0.917**	-0.119		0.562		0.325		0.158	
	Ki48xNei542010	3.025	-0.333	-0.009		0.074		0.175		0.033	
	Ki53xNei542010	1.3	0.167	1.958**		0.492		-0.55		0.033	
	Ki59xNei542010	-0.45	0.417	-1.104		0.132		-0.2		-0.067	
	Nei452004xNei542010	-5.45	0.667*	-0.467		-0.156		0.1		-0.117	
	Nei492006xNei542010	0.8	-1.833***	-0.259		-1.103		0.15		-0.042	
	Kei1421xNei9202	-0.775	-0.917**	0.119		-0.562		-0.325		-0.158	
	Ki48xNei9202	-3.025	0.333	0.009		-0.074		-0.175		-0.033	
	Ki53xNei9202	-1.3	-0.167	-1.958**		-0.492		0.55		-0.033	
	Ki59xNei9202	0.45	-0.417	1.104		-0.132		0.2		0.067	
	Nei452004xNei9202	5.45*	-0.667*	0.467		0.156		-0.1		0.117	
	Nei492006xNei9202	-0.8	1.833***	0.259		1.103		-0.15		0.042	

Remark: PHv8 = Plant height at v8, ASI = anthesis and silking date interval, Diff_SPAD and LR at 39 and 40 DAP = Difference in SPAD values and leaf rolling during water stress at 7 days, and after 24 hours of rewatering

ความสามารถในการผสมของลักษณะผลผลิตและดัชนีการทนแล้ง

เมื่อนำลักษณะดัชนีการทนทานต่อความเครียด (STlunhusked_FW) และน้ำหนักสดหลังปอกเปลือก (FWunhusked) ที่แยกตามสภาพการให้น้ำ ได้แก่ FWunhusked_WW และ FWunhusked_WS มาประเมินความสามารถในการรวมตัวทั่วไป (GCA) และแสดงผลใน Table 14 ผลพบว่า ในลักษณะ FWunhusked_WS สายพันธุ์พ่อ Nei542010 (10.354) และสายพันธุ์แม่ Ki48 (20.062) มีค่า GCA เป็นบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในลักษณะ FWunhusked_WW พบว่าสายพันธุ์แม่ Ki48 (17.167) และ Nei452004 (25.667) มีค่า GCA เป็นบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิตินอกจากนี้ ยังพบสิ่งที่น่าสนใจคือ ในลักษณะ STlunhusked_FW นั้น พบว่า สายพันธุ์พ่อ Nei542010 (12.805) สายพันธุ์แม่ Ki48 (16.66) และ Nei452004 (3.838) มีค่า GCA เป็นบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสายพันธุ์แท้ที่ให้ค่า GCA เป็นบวกและสูงทั้งในด้านผลผลิต และลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต สามารถนำมาพัฒนาต่อให้เป็นสายพันธุ์สังเคราะห์ได้ (synthetic varieties) เมื่อประเมินความสามารถในการรวมตัวเฉพาะ (SCA) ของดัชนีการทนทานต่อความเครียด (STlunhusked_FW) พบว่า คู่ผสม Ki48xNei542010 (6.272) มีค่า SCA เป็นบวกสูงสุดเพียงคู่เดียว ($P < 0.05$) คล้ายกันกับการศึกษาของ ul Malook et al. (2016) ที่พบว่า มีคู่ผสมที่ให้ผลผลิตต่อต้นสูงที่สุด และให้ค่า SCA เป็นบวก ซึ่งเป็นผลจากยีนแบบข่ม (non-additive gene effect) ชี้ให้เห็นว่า คู่ผสมที่สามารถให้ผลผลิตสูงในสภาพขาดน้ำเหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาเป็นคู่ผสมที่ให้ผลผลิตสูงต่อไป เนื่องจากสามารถปรับตัวได้ดีเมื่ออยู่ในสภาพแล้ง

นอกจากนี้ Table 15 ยังแสดงผลการวิเคราะห์ค่าทางพันธุกรรมต่าง ๆ ได้แก่ ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Genotypic Variance; σ^2_G) ความแปรปรวนของลักษณะที่ปรากฏ (Phenotypic Variance; σ^2_P) ความแปรปรวนของยีนแบบบวกสะสม (Additive variance; σ^2_A) ความแปรปรวนแบบข่ม (dominant variance; σ^2_D) ค่าความสามารถในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบแคบ (Narrow sense heritability; h^2) และอัตราส่วนของยีนแบบข่ม (Dominance Ratio) จากผลดังกล่าว เห็นได้ว่า หากพิจารณาค่าความแปรปรวนทั้งจากฟีโนไทป์ (σ^2_P) และจีโนไทป์ (σ^2_G) ของทั้ง 3 ลักษณะ (FWunhusked_WW, FWunhusked_WS และ STlunhusked_FW) จะพบว่า ค่า σ^2_P มีค่าสูงกว่า VG เพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงชี้ให้เห็นว่า ค่าความแปรปรวนที่เกิดจากสภาพแวดล้อม (σ^2_E) มีค่าต่ำมาก เนื่องจาก σ^2_E สามารถคำนวณได้จากความแตกต่างระหว่าง σ^2_P และ σ^2_G นั่นเอง ผลนี้สะท้อนให้เห็นอย่างชัดเจนว่า การทดลองนี้ที่ทำในโรงเรือนระบบปิด ลักษณะ

ผลผลิตและดัชนีความทนทานของข้าวโพดทดสอบได้รับผลจากสภาพแวดล้อมภายในโรงเรือนที่น้อยมาก ลักษณะฟีโนไทป์ของข้าวโพดที่แสดงออกมาจากสัดส่วนของจีโนไทป์เป็นหลัก ดังนั้น การคัดเลือกลักษณะจีโนไทป์โดยพิจารณาจากลักษณะฟีโนไทป์จึงค่อนข้าง

นอกจากนี้ จากข้อมูลที่แสดงใน Table 15 ยังพบอีกว่า อัตราพันธุกรรมแบบแคบ (h^2) ของลักษณะ STI_FWunhusked มีค่าสูงถึง 0.9025 ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ลักษณะความทนทานต่อสภาพสภาพเครียดจากการขาดน้ำถูกถ่ายทอดทางพันธุกรรมให้รุ่นลูกได้เป็นสัดส่วนที่สูง และเมื่อพิจารณารูปแบบการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะดัชนีการทนทานต่อสภาพเครียดจากการขาดน้ำ พบว่า ลักษณะดัชนีการทนทานต่อสภาพเครียดจากการขาดน้ำ เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนแบบบวก (additive) เนื่องจากค่า dominance ratio มีค่าต่ำกว่า 1 ดังแสดงใน Table 15 เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบการทำงานของยีนที่ได้จากรายงานของ Erdal et al. (2015) ที่ได้วิเคราะห์รูปแบบการทำงานของยีนในลักษณะอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ภายใต้สภาพขาดน้ำ และรายงานว่า วันออกดอกตัวผู้ ช่วงห่างระหว่างวันออกดอกตัวผู้และวันออกใหม่ (ASI) และจำนวนฝักต่อต้น ถูกควบคุมด้วยยีนแบบบวก แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่า ความสูง น้ำหนักหนึ่งพันเมล็ด และผลผลิต ถูกควบคุมด้วยยีนแบบข่ม (dominant) อย่างไรก็ตาม Falconer et al. (1996) แนะนำว่า ค่าอัตราพันธุกรรมขึ้นอยู่กับชนิดของประชากร และสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการทดสอบ ดังนั้น ค่าที่สังเกตได้จะมีความแตกต่างออกไปตามประชากร สภาพแวดล้อม และลักษณะเฉพาะของการประมาณค่าพันธุกรรม

จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ในการพัฒนาข้าวโพดลูกผสมเดี่ยวให้มีความทนทานต่อสภาพเครียดจากการขาดน้ำ จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องให้ความสำคัญในการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อและแม่ ที่มียีนเป็น homozygous ในตำแหน่งของอัลลีลที่ควบคุมลักษณะทนแล้ง เพื่อให้ลูกผสมได้รับยีนดังกล่าว และแสดงออกได้อย่างเต็มที่อันเป็นผลมาจากการทำงานของยีนแบบบวกสะสม ซึ่งในทางกลับกันจากรายงานของ Singh et al. (1993) พบว่า ปัจจัยที่สำคัญที่สุดในความแตกต่างของผลผลิตน้ำหนักสดจำนวนเมล็ดต่อฝัก เกิดจาก อัลลีลแบบ dominant (Aa) ซึ่งหากต้องการลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ ๆ ในสภาพ heterozygous จะมีประสิทธิภาพมากกว่า homozygous ที่มีอัลลีลเป็น AA และ aa

Table 14. Estimates of general combining ability (GCA) under well-watered (WW) water stressed (WS) and Stress tolerance index of 8 parental lines

lines	FWunhusked_WW	FWunhusked_WS	STlunhusked_FW
Males			
Nei542010	4	10.354***	12.805**
Nei9202	-4	-10.354***	-12.805**
Females			
Kei1421	-19.833***	-18.312***	-12.872**
Ki48	17.167***	20.062***	16.66**
Ki53	-22.333***	-4.312	-3.675*
Ki59	-0.333	1.188	1.25
Nei452004	25.667***	5.188	3.838*
Nei492006	-0.333	-3.812	-5.202*

Remark: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$

Table 15. Estimates of specific combining ability (SCA) for the Stress tolerance index of 12 F₁ crosses

F ₁ crosses	FWunhusked	FWunhusked_	STlunhusked
	_WW	WS	_FW
Kei1421xNei542010	-3	0.146	-2.425
Kei1421xNei9202	-4	-3.229	2.425
Ki48xNei542010	6.5	4.146	6.272*
Ki48xNei9202	4.5	-0.354	-6.272
Ki53xNei542010	1.5	-7.354	0.292
Ki53xNei9202	-5.5	6.646	-0.292
Ki59xNei542010	3	-0.146	-1.813
Ki59xNei9202	4	3.229	1.813
Nei452004xNei542010	-6.5	-4.146	-1.23
Nei452004xNei9202	-4.5	0.354	1.23
Nei492006xNei542010	-1.5	7.354	-1.095
Nei492006xNei9202	5.5	-6.646	1.095
Genotypic Variance (σ^2_G)	391.73	248.505	0.078
Phenotypic Variance (σ^2_P)	410.518	292.828	0.084
Additive variance (σ^2_A)	749.124	1.25	0.1
dominant variance (σ^2_D)	297.218	4.833	0.005
Narrow sense heritability (h^2)	0.703	0.187	0.903
Dominance Ratio	0.891	2.781	0.307

Remark: *P ≤ 0.05

ผลการทดลองที่ 2: การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนโปรตีนไคเนสและลักษณะฟีโนไทป์ที่เกี่ยวข้องกับความทนทานต่อสภาพเครียดน้ำ

ผลการออกแบบไพรเมอร์

ผลจากการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล ชนิด InDel จากฐานข้อมูล NCBI สามารถออกแบบไพรเมอร์จากกลุ่มของยีนที่เข้ารหัสโปรตีน MAPK รวมได้ทั้งหมด 27 คู่ ดังแสดงใน Table 4 ในบทอุปกรณ์และวิธีการ อย่างไรก็ตาม เมื่อนำไพรเมอร์ทั้งหมดนี้มาทดสอบในเทคนิค PCR โดยใช้ตัวอย่างใบจากข้าวโพด 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Nei542010 และ Ki48 และใช้ annealing temperature ที่ 50°C มีเพียงไพรเมอร์จำนวน 12 จาก 27 คู่ ที่สามารถให้ชิ้น PCR product ตามที่ต้องการได้ ซึ่งแสดงใน Table 16 โดยคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวมีความยาวของลำดับเบสอยู่ในช่วง 17 - 22 และให้ขนาดของ PCR product อยู่ในช่วง 108 – 898 bp

ไพรเมอร์ทั้ง 12 คู่นี้เกี่ยวข้องกับยีน MAPK 2 MAPK3 MAPK4 MAPK8 MAPK11 MAPK12 MAPK19 MAPKKK1 และ MAPKKK16 ซึ่งยีนเหล่านี้ส่วนใหญ่ทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อความเครียดจากความแห้งแล้งในพืช โดยทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณที่เชื่อมโยงการรับรู้ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมกับการตอบสนองทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช ไม่ว่าจะเป็นการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดและการพัฒนา การส่งสัญญาณการเจริญเติบโตของเซลล์ การแบ่งตัว การควบคุมการแสดงออกของยีนและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ และการกระตุ้นเส้นทาง p38 MAPK เพื่อตอบสนองความเครียดต่อการขาดน้ำ เป็นต้น (Orton et al., 2005)

Table 16. Twelve newly designed InDel primers targeting the MAPK pathway

No.	Name	base (F/R)	DNA sequence of forward primer (5'→3')	DNA sequence of reverse primer (5'→3')	Chrom.	type of	product size (bp)
1	PH_ZmMPK8	21/20	CATCAGAGTAGGCAACAATTG	ATTCATTGACATCATAATGT	8	+	336
2	PH_ZmMPK11.1	21/21	TTGTTCCGTTGTATAGGGATT	TTGAACAGGAAGTCAGGAAGA	8	+	118
3	PH_ZmMPK19	18/20	TGTACTTGGAATTCAGTT	TCTTTTGGCACACGCACGAA	8	+	898
4	PH_ZmMPK4	18/17	ATATATATGTTTCATCACA	GAATCATGAAAAATGTGA	1	-	175
5	PH_ZmMPK11	18/18	ATGGAACCTTGGAAATATG	TAGAGCATGATAGAAGATAT	4	+	104
6	PH_AtMPK12	22/20	CCTTCTTCTTGTTTCTCTCGT	CCGCAGCACAGACAATAACCG	6	+	357
7	PH_ZmMPK16	17/20	TGATGACACCAATAAGTA	TAGCCATATTATAACTATGT	2	+	142
8	PH_ZmMPK12	17/17	AGTTCTTCTGTACCAG	AATATTCTTGGGCTTAA	6	-	285
9	PH_ZmMPK2.2	20/21	TTGAAGTATATACATTACGC	GTGACAACATATTCAGTCATA	9	-	149
10	PH_ZmMPK3	22/22	TTACAAACACCCGTGCATTAACG	GATGAAGCAGCTGATATTC AAC	1	+	108
11	PH_ZmMPK6	20/21	TTACTGTATATTGAGGTGC	GATTCAAAGATTATTGTGTA	10	+	425
12	PH_ZmMPK7	19/20	TAGTAGTTAAATTAATGTAC	GCAACGCTTGTATAATGCAA	6	-	848

Remark: minus sign (-) = Deletion, plus sign (+) = Insertion and Chrom. = Chromosomes

การรวมกลุ่มไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา Multiplex PCR

เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 12 คู่นี้ มาทดสอบร่วมกันในปฏิกิริยา Multiplex PCR ทำการจับคู่ไพรเมอร์ ที่มีขนาดที่แตกต่างกัน และสามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน จากผลที่ได้สามารถจัดกลุ่มไพรเมอร์ออกเป็น 3 กลุ่ม (Figure 18) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ PH_ZmMPK19 (898 bp) PH_ZmMPK4 (175 bp) PH_ZmMPK11.1 (118 bp) และ PH_ZmMPK8 (336 bp) ดังแสดงใน Figure 18 ช่องที่ 1 สีเขียว และ เหลือง

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ PH_ZmMPK16 (142 bp) PH_ZmMPK11 (104 bp) PH_ZmMPK12 (285 bp) และ PH_AtMPK12 (357 bp) ดังแสดงใน Figure 18 ช่องที่ 2 สีเขียว และ เหลือง

กลุ่มที่ 3 คือ คือคู่ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถนำไปทำปฏิกิริยาใน Multiplex PCR ได้ มีจำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ประกอบด้วย PH_ZmMPK3 (108 bp) PH_ZmMPK2.2 (149 bp) PH_ZmMPK6 (425 bp) PH_ZmMPK7 (848 bp) ดังแสดงใน Figure 18 (ช่องที่ 3 สีเขียว และ เหลือง) จึงนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ไพรเมอร์เดี่ยว

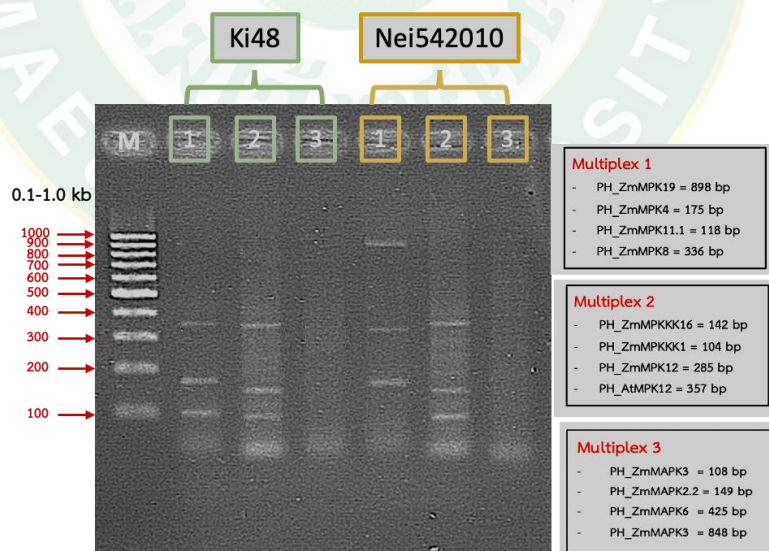


Figure 18. Testing 12 insertion/deletion (InDel) primers in Nei542010 and Ki48 at 50 °C annealing temperature

ผลการทดสอบไพรเมอร์ในข้าวโพดคู่ผสม

นำไพรเมอร์ทั้งหมด 12 คู่ มาใช้ในปฏิกิริยา Multiplex PCR และ PCR เพื่อทดสอบกับตัวอย่างข้าวโพดของสายพันธุ์พ่อและแม่ที่ให้ค่า GCA ของลักษณะ STI_FWunhusked เชิงบวกและลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวม 8 ตัวอย่าง ดังแสดงไว้ก่อนหน้านี้ใน Table 14 ซึ่งได้แก่ Nei542010 (12.805, $P < 0.01$), Ki48 (16.66, $P < 0.01$), Nei 452004 (3.838, $P < 0.05$), Nei9202 (-12.805, $P < 0.01$), Kei1421 (-12.872, $P < 0.01$), Ki53 (-3.675, $P < 0.01$) Nei492006 (-5.202, $P < 0.05$) และ Ki59 (1.25, ns) จากการทดสอบในครั้งนี้ ให้ผลของสายพันธุ์แท้ Nei542010 และ Nei9202 ตรงข้ามรายงานของ Hannok et al., (2023) ที่ได้จัดกลุ่มลักษณะความทนแล้งของสายพันธุ์แท้เหล่านี้ไว้ รายงานดังกล่าวระบุว่า Nei452004, Ki48, Nei9202 จัดเป็นสายพันธุ์แท้ที่ให้ลักษณะทนแล้ง ส่วน Nei542010, Ki53 และ Kei1421 ถูกระบุว่าเป็นสายพันธุ์อ่อนแอต่อสภาพแล้ง

ผลจากการวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ของข้าวโพด 8 สายพันธุ์ แสดงใน Figure 19 ผลการทดสอบพบว่า ไพรเมอร์เหล่านี้จัดเป็น dominant marker เนื่องจากในแต่ละตัวอย่างพืชแสดงการเกิดแถบดีเอ็นเอ เป็นแบบปรากฏและไม่ปรากฏแถบ จากการสังเกตการเกิดแถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์แท้ที่ให้ค่า GCA ของลักษณะ STI_FWunhusked เป็นเชิงบวกนั้น ให้ค่าความถี่ในการเกิดแถบดีเอ็นเอ 7-9 แถบจากทั้งหมด 12 แถบ โดยสายพันธุ์ Nei542010 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอของ 12 คู่ไพรเมอร์มากที่สุด (9 จาก 12 แถบ) ขณะที่กลุ่มของสายพันธุ์แท้ที่ให้ค่า GCA ของลักษณะ STI_FWunhusked เป็นเชิงลบ ให้ค่าความถี่ในการเกิดแถบดีเอ็นเอในช่วง 4-6 แถบเพียงเท่านั้น เมื่อพิจารณาไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันภายในระหว่างสายพันธุ์ที่ให้ค่า GCA สูงนั้น พบว่า ไพรเมอร์ PH_ZmMPK19 (898 bp), PH_AtMPK12 (357 bp), PH_ZmMPK6 (425 bp) มีความน่าสนใจ กล่าวคือ สายพันธุ์ Nei542010 และ Nei452004 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 898 bp เหมือนกัน ซึ่งเกิดจากการใช้ไพรเมอร์ PH_ZmMPK19 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นอกจากนี้ สายพันธุ์ Nei542010 และ Ki48 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 357 bp เหมือนกัน ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ PH_AtMPK12 ส่วนสายพันธุ์ Nei542010, Nei452004 และ Ki48 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 425 bp เหมือนกันทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ PH_AtMPK6 อย่างไรก็ตาม มีสายพันธุ์จำนวน 1 สายพันธุ์ ที่แสดงค่า GCA เป็นค่าลบ ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 425 bp เช่นกัน สายพันธุ์นั้นคือ Ki53 (Figure 19 และ Table 17)

เมื่อย้อนกลับไปดูผล SCA ของคู่ผสม F_1 จำนวน 12 คู่ผสม จาก Table 15 และเลือกเพียงคู่ผสมที่ให้ค่า SCA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมาพิจารณาเชื่อมโยงกับผลดีเอ็นเอ คู่ผสม Ki48xNei542010 (SCA=6.272, $P<0.05$) ผลพบว่า ค่าความถี่ของการเกิดแถบดีเอ็นเอสูงเท่ากับ 8 จาก 12 แถบ และให้แถบขนาด 357 bp และ 425 bp เช่นเดียวกับสายพันธุ์พ่อแม่ ผลนี้ชี้ให้เห็นว่าไพรเมอร์ PH_AtMPK12 และ PH_AtMPK6 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 357 และ 425 bp มีความน่าสนใจในการนำไปทดสอบในระดับที่สูงขึ้น (Table 17)

ไพรเมอร์ PH_AtMPK12 และ PH_AtMPK6 มีความจำเพาะต่อยีน MPK12 และ MPK6 ตามลำดับ มีรายงานที่เกี่ยวกับการทำงานของยีนดังกล่าว จากงานวิจัยของ Tsugama et al. 2012 ที่ได้ทำการศึกษาบทบาทของ Mitogen-activated protein kinase 6 (MPK6) ในพืช *Arabidopsis thaliana* ต่อการตอบสนองต่อสภาวะแห้งแล้งและการได้รับน้ำกลับคืน (rehydration) พบว่าภายใต้สภาวะแห้งแล้ง พบระดับ ROS ที่สูงขึ้น ส่งผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ MPK6 ทำให้ระดับ ROS ต่ำลงและทำให้พืชสามารถปรับตัวต่อสภาพแล้งได้ แต่เมื่อพืชได้รับน้ำกลับคืนมา พบว่า MPK6 จะหยุดการทำงานดังกล่าว และนอกจากนี้ยังพบว่า MAPK12 ช่วยในการควบคุมการปิดปากใบเมื่อพืชเจอความเครียด โปรตีนเหล่านี้ทำงานอยู่ปลายทางของ ROS และต้นทางของช่องไอออนในเซลล์คุมปากใบ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการปิดปากใบ ซึ่งการทำงานของโปรตีนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการควบคุมการคายน้ำของพืช (Jammes et al., 2009) และเมื่อพืชเผชิญกับปัญหาการขาดน้ำ MAPK จะเป็นเอนไซม์หลักที่ช่วยควบคุมการทำงานของเซลล์ ไม่ว่าจะเป็น MAPK MAPKK หรือ MAPKKK จะเป็นตัวช่วยในการตอบสนองต่อสภาวะเครียดที่พืชได้รับอย่างรวดเร็ว (Lin et al., 2021) ไม่ว่าจะเป็นการทำงานของ MAPK2 ที่มีส่งผลให้มีการสะสมของสารโพรลีน (Proline content) เพิ่มขึ้นในช่วงที่พืชขาดน้ำ และการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งได้แก่ SOD, CAT and POD และการลดการสะสมของ MDA ที่เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของ MAPK2 MAPK6 MAPK7 และ MAPK 11 เป็นต้น (Zhu et al. 2020; Tsugama et al. 2016)

Table 17. Frequency of DNA band occurrence based on gel electrophoresis analysis

band_size (bp)	Nei9202	Ki53	Kei1421	Nei542010	Ki48	Nei452004	Ki48xNei542010	band_size (bp)
899	b	b	b	a	b	a	b	899
336	a	a	a	a	a	a	a	336
175	a	a	a	a	a	a	a	175
118	b	b	b	b	a	b	b	118
357	b	b	b	a	a	b	a	357
285	b	b	b	b	b	a	b	285
142	a	a	b	a	a	a	a	142
104	a	b	b	a	b	b	a	104
108	a	a	a	a	a	b	a	108
149	a	a	a	a	a	b	a	149
425	b	a	b	a	a	a	a	425
848	b	b	b	b	b	a	b	848
GCA	-12.805	-3.675	-12.872	12.805	16.66	3.838	6.272	SCA
(STI_FWunhusked)								(STI_FWunhusked)
Freq (a)	6	6	4	9	8	7	8	Freq (a)
Freq (b)	6	6	8	3	4	5	4	Freq (b)

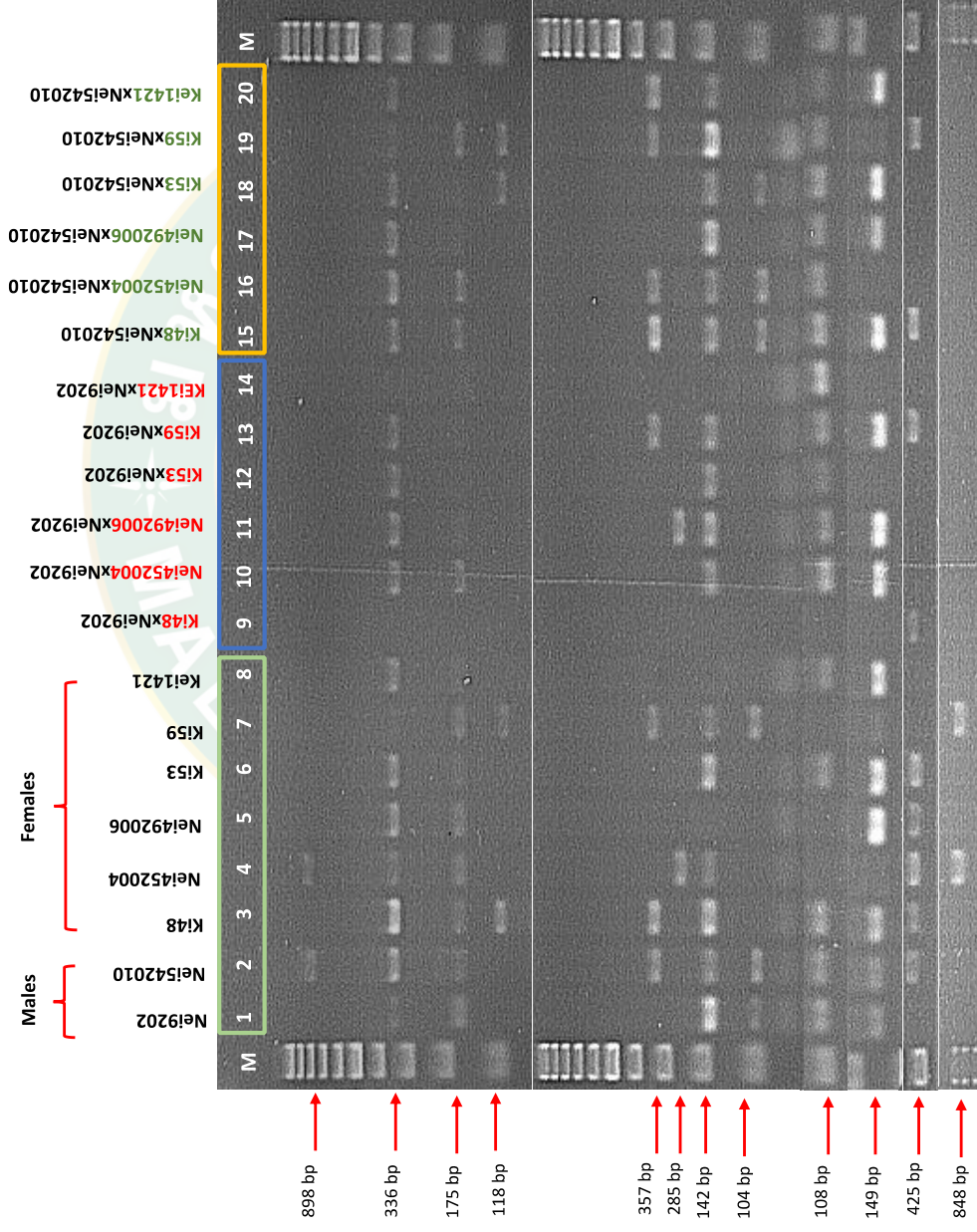


Figure 19. Multiplex PCR using 12 InDel primers across 8 inbred lines and 12 F₁ progenies

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบลูกผสมทั้ง 12 คู่ผสมที่ได้จากแผนการผสมแบบ North Carolina design II ของสายพันธุ์พ่อแม่ จำนวน 8 สายพันธุ์ พบว่า คู่ผสมที่ดีที่สุดภายใต้สภาวะขาดน้ำ คือ คู่ผสม Ki48 x Nei542010 เนื่องจาก ให้ผลผลิตสูงสุด มีดัชนีความทนทานต่อความเครียดสูงสุด และ แสดงคุณสมบัติด้านสรีรวิทยาที่บ่งชี้ถึงการทนแล้งได้ดีเยี่ยม นอกจากนี้ ยังพบอีกว่า คู่ผสม Nei452004xNei542010 และ Ki48xNei9202 เป็นตัวเลือกสำรองที่ดี โดยขึ้นกับเป้าหมายการใช้ หากเน้นการฟื้นตัวจากความเครียดหรือเสถียรภาพของผลผลิต และทั้งนี้ยังพบว่า คู่ผสม Ki48xNei542010 และ Ki59xNei542010 ให้ผลผลิตสูงทั้งในแบบทดสอบภายใต้สภาพการให้น้ำแบบปกติและสภาพเครียดน้ำในโรงเรือนระบบปิด และให้ค่า STI ที่สูง โดยลักษณะการทนทานต่อสภาพเครียดน้ำของข้าวโพดคู่ผสมเกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนแบบบวก ดังนั้น การเลือกพันธุ์พ่อแม่ที่มียีนควบคุมลักษณะดังกล่าวเป็น homozygous ณ ตำแหน่งอัลลีลที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว จะช่วยส่งผลให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะความทนทานต่อสภาพแล้งได้ดี นอกจากนี้ พบว่า ความทนทานต่อสภาพแล้งมีอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (h^2) ที่สูง ดังนั้น การให้ความสำคัญกับการเลือกพันธุ์พ่อแม่ที่มีลักษณะทนทานต่อสภาพเครียดน้ำที่ดี จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการบรรเทาความเสียหายของผลผลิตข้าวโพดลูกผสมที่ต้องเผชิญสภาพฝนทิ้งช่วงได้ดี สอดคล้องกับผลการทดสอบไพร์เมอร์ทั้ง 12 คู่ ที่พบว่า คู่ผสม Ki48xNei542010 แสดงค่าความถี่ของการเกิดแถบดีเอ็นเอสูง

บรรณานุกรม

- Acquaah, G. 2009. **Principles of plant genetics and breeding**. John Wiley & Sons.
- Agrawal G.K., R. R. a. I. H. 2002. Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, OsMSRMK2, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. **Biochem. Biochemical and Biophysical Research Communications** 294(5), pp.1009-1016.
- Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K., and Sturgill, T. W. . 1990. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. . **Nature**, 343(6259), 651-653.
- Anjum, S. A., Xie, X.Y., Wang, L.C., Saleem, M.F., Man, C., Lei, W. . 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. . **Res. 6:2026–2032**.
- Aslam, M., Zamir, M.S.I., Anjum, S.A., Khan, I. and Tanveer, M. 2015. An investigation into morphological and physiological approaches to screen maize (*Zea mays* L.) hybrids for drought tolerance. **Cereal research communications**., 43(1), 41-51.
- Bassetti, P. & Westgate, M. E. 1993. Water deficit affects receptivity of maize silks. **Crop Science**, 33(2), 279-282.
- Beck E H, F. S., Knake C, Hartig K and Bhattarai T. 2007. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. **J. Biosci.** , 32 501–510.
- Bolaños, J. a. E., G.O., . 1996. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. **Field crops research**., 48(1), pp.65-80.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. . 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. . **American journal of human genetics**, 32(3), 314.
- Broeckx, B. J., Derrien, T., Mottier, S., Wucher, V., Cadieu, E., Hédan, B., Le Béguec, C., Botherel, N., Lindblad-Toh, K. & Saunders, J. H. 2017. An exome sequencing based approach for genome-wide association studies in the dog. **Scientific reports**, 7(1), 15680.

- Burris, J. 2001. **Proc. 56th Annual Corn and Sorghum Research Conference.**
- Comstock, R. & Robinson, H. 1952. Estimation of average dominance of genes. **Heterosis**, 2, 494-516.
- Cunningham, J. 2024. monitoring drought resistance of corn in IOWA from 2000-2023.
- De Zélicourt, A., Colcombet, J., and Hirt, H. . 2016. The role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling. **Trends in plant science**, 21(8), 677-685.
- Denmead, O. & Shaw, R. H. 1960. The Effects of Soil Moisture Stress at Different Stages of Growth on the Development and Yield of Corn 1. **Agronomy journal**, 52(5), 272-274.
- Dorina, B. 2020. Screening for drought tolerance in maize hybrids using new indices based on resilience and production capacity. . **Economic Engineering in Agriculture and Rural Developme.**, 2285-3952.
- Du Plessis, J. 2003. **Maize production (pp. 1-38). Pretoria, South Africa: Department of Agriculture.**
- Edmeades, G. O., Bolaños, J., Chapman, S.C., Lafitte, H.R. and Bänziger, M.,. 1999. Selection improves drought tolerance in tropical maize populations: I. Gains in biomass, grain yield, and harvest index. . **Crop science.**, 39(5), 1306-1315.
- Effendi, R., Priyanto, S., Aqil, M. & Azrai, M. 2019. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.** IOP Publishing.
- Erdal, S., Pamukcu, M., Ozturk, A., Aydinsakir, K. & Soylu, S. 2015. Combining abilities of grain yield and yield related traits in relation to drought tolerance in temperate maize breeding. **Turkish Journal of Field Crops**, 20(2), 203-212.
- Falconer, D. S., Mackay, T. F. & Frankham, R. 1996. Introduction to quantitative genetics (4th edn). **Trends in Genetics**, 12(7), 280.
- Ghimire, B., Timsina, D. and Nepal, J. . 2015. Analysis of chlorophyll content and its correlation with yield attributing traits on early varieties of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Maize Research and Development.**, 1(1), 134-145.
- Gong, Z., Zhu, J., Li, T., Huang, D., Chen, X., and Zhang, Q. . 2022. The features of regional flash droughts in four typical areas over China and the possible mechanisms. **Science of the Total Environment**, 827, 154217.

- Hanks, S. K., and Hunter, T. 1995. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification 1. **The FASEB journal.**, 9(8), 576-596.
- Haupt-Herting, S., H. P. Fock. 2002. Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water-stressed leaves during photosynthesis. **Annals of Bot.**, 89, 851–859.
- Huidong, M. 1982. The analysis of combining ability in $p \times q$ mating pattern. **Academic Journal of JiangSu Agriculture Colloge**, 3(3): 51–57.
- Jagodzki, P. T., , Małgorzata, C., Agata, M., Małgorzata and & L, Agnieszka. 2018. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. **Frontiers in plant science.**, 9.
- Jammes, F., Song, C., Shin, D., Munemasa, S., Takeda, K., Gu, D., Cho, D., Lee, S., Giordo, R. & Sritubtim, S. 2009. MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. **Proceedings of the National Academy of sciences**, 106(48), 20520-20525.
- Jangpromma, N., P. Songsri, S. Thammasirirak and P. Jaisil. . 2010. . Rapid assessment of chlorophyll content in sugarcane using a SPAD chlorophyll meter across different water stress conditions. . **Asian Journal of Plant Science.** , 368-374.
- Jiang, M., Zhang, Y., Li, P., Jian, J., Zhao, C. & Wen, G. 2022. Mitogen-activated protein kinase and substrate identification in plant growth and development. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(5), 2744.
- Kamara, A. Y., A. Menkir, Baffour Badu-Apraku, and O. Ibikunle. . 2003. The influence of drought stress on growth, yield and yield components of selected maize genotypes. **The journal of agricultural science.**, 141(1), 43-50.
- Kiegle, E., Moore, C. A., Haseloff, J., Tester, M. A., and Knight, M. R. . 2000. Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the Arabidopsis root. **Plant J.**, 23: 267-278.
- Li, X. F., Y.; Sun, X.; Liu, W.; Yang, W.; Ge, X.; Jia, Y. . 2024. Effects of Various Levels of Water Stress on Morpho-Physiological Traits and Spectral Reflectance of Maize at Seedling Growth Stage. **Agronomy.** , 14, 2173. .

- Lin, L., Wu, J., Jiang, M. & Wang, Y. 2021. Plant mitogen-activated protein kinase cascades in environmental stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(4), 1543.
- Litt, M., and Luty, J. A. . 1997. A hypervariable microsatellite locus in a gene for human von Willebrand factor. . **American journal of human genetics.**, 44(3), 397.
- Martins, L., Sobierajski, G. & Blain, G. 2024. A scientific-based protocol for the calculation of two standardized drought indices using NASA POWER data. **Journal of Earth System Science**, 133(4), 240.
- Messina, C., Ciampitti, I. A., Berning, D., Bubeck, D., Hammer, G. & Cooper, M. 2022. Sustained improvement in tolerance to water deficit accompanies maize yield increase in temperate environments. **Crop Science**, 62(6), 2138-2150.
- Mills, R., L., Christopher. T., Christine, B., Adam, T., Circe P., Stephen, D., Scott. 2006. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. **Plant Molecular Biology**, , 9: 1182-1190.
- Moustafa, K., AbuQamar, S., Jarrar, M., Al-Rajab, A. J. & Trémouillaux-Guiller, J. 2014. MAPK cascades and major abiotic stresses. **Plant cell reports**, 33, 1217-1225.
- Ngaboyisonga, C., Nizeyimana, F., Gafishi, M. K., Ndayishimiye, T., Mbarushimana, J. D., Nyirabashyitsi, J., ... & Nyombayire, A. (2019). Combining ability for grain yield and silking of maize inbred lines derived from three open pollinated varieties released for mid altitudes of Rwanda: Comparison of diallel and North Carolina design II. *African Crop Science Journal*, 27(1), 59-75. 2019. Combining ability for grain yield and silking of maize inbred lines derived from three open pollinated varieties released for mid altitudes of Rwanda: Comparison of diallel and North Carolina design II. **African Crop Science Journal**, , 27(1): 59-75.
- Ngugi, K., Cheserek, J., Muchira, C. and Chemining'wa, G. . 2013. Anthesis to silking interval usefulness in developing drought tolerant maize. . **Journal of renewable agriculture.**, 1(5), 84-90.
- Oktem, A., Simsek, M., and Oktem, A. G. (2003). Deficit irrigation effects on sweet corn (*Zea mays saccharata* Sturt) with drip irrigation system in a semi-arid region: I. Water-yield relationship. *Agricultural water management*, 61(1), 63-74. 2003.

- Deficit irrigation effects on sweet corn (*Zea mays saccharata* Sturt) with drip irrigation system in a semi-arid region: I. Water-yield relationship. *Agricultural water management*,. **61(1): 63-74.**
- Olsen, O.-A., Linnestad, C. & Nichols, S. E. 1999. Developmental biology of the cereal endosperm. **Trends in plant science**, 4(7), 253-257.
- Orton, R. J., Sturm, O.E., Vyshemirsky, V., Calder, M., Gilbert, D.R. and Kolch, W. . 2005. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. **Biochemical Journal**., 392(2), pp.249-261.
- PBS, T. 2023. สถิติ 10 ปีย้อนหลัง ปี 2553-2563 24 จังหวัดประสบภัยแล้ง ระดับสูง "ภัยแล้ง" (Publication. [<https://www.thaipbs.or.th/news/infographic/1108>],
- R.D., R. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. **Plant Physiol.**, 107, 1049–1054.
- Saglam A, K. A., Demiralay M and Terzi R. . 2014. Leaf rolling reduces photosynthetic loss in maize under severe drought *Acta Botanica Croatica* 73 315. **Acta Botanica Croatica**., 73(2), 315-323.
- Sathapondecha, P., Suksri, P., Nuanpirom, J., Nakkanong, K., Nualsri, C. and Whankaew, S. . 2024. Development of Gene-Based InDel Markers on Putative Drought Stress-Responsive Genes and Genetic Diversity of Durian (*Durio zibethinus*). . **Biochemical Genetics**, 62(6), 4396-4407.
- Shojaei, S. H., Mostafavi, K., Omrani, A., Illés, Á., Bojtor, C., Omrani, S., Mousavi, S.M.N. and Nagy, J. . 2022. Comparison of maize genotypes using drought-tolerance indices and graphical analysis under normal and humidity stress conditions. . **Plants**., 11(7), 942.
- Singh, M., Ceccarelli, S. & Hamblin, J. 1993. Estimation of heritability from varietal trials data. **Theoretical and applied genetics**, 86, 437-441.
- Sprague, G. F. & Tatum, L. A. 1942. General vs. specific combining ability in single crosses of corn.
- Stone, J. M., and Walker, J. C. . 1995. Plant protein kinase families and signal transduction. **Plant physiology**., 108(2), 451-457.

- Sturgill, T. W., and Ray, L. B. . 1986. Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. . **Biochemical and biophysical research communications.**, 134(2), 565-571.
- Tsugama, D., Liu, S. and Takano, T. . 2021. Drought-induced activation and rehydration-induced inactivation of MPK6 in Arabidopsis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 426(4), pp.626-629.
- Varotsos, C., Sarlis, N. V., Mazei, Y., Saldaev, D., and Efstathiou, M. . 2024. A Composite Tool for Forecasting El Niño: The Case of the 2023–2024 Event. *Forecasting*, **6(1): 187-203**.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., and Kuiper, M. . 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. . **Nucleic acids research.**, 23(21), 4407-4414.
- Wang, N., Cheng, M., Chen, Y., Liu, B., Wang, X., Li, G., Zhou, Y., Luo, P., Xi, Z., Yong, H. and Zhang, D. . 2021. Natural variations in the non-coding region of ZmNAC080308 contributes maintaining grain yield under drought stress in maize. . **BMC Plant Biology.**, 21(1), 305.
- Wang, Z., Yan, S., Ren, W., Liu, Y., Sun, W., Liu, M., Lu, J., Mi, Y. and Ma, W. . 2022. Genome-wide identification of MAPK, MAPKK, and MAPKKK gene families in *Fagopyrum tataricum* and analysis of their expression patterns under abiotic stress. **Frontiers in Genetics.**, 13, 894048. .
- Whankaew, S., Kaewmanee, S., Ruttajorn, K. and Phongdara, A. . 2020. Indel marker analysis of putative stress-related genes reveals genetic diversity and differentiation of rice landraces in peninsular Thailand. . **Physiology and Molecular Biology of Plants.**, 26, 1237-1247.
- Ye, J., Yang, H., Shi, H., Wei, Y., Tie, W., Ding, Z., Yan, Y., Luo, Y., Xia, Z., Wang, W. and Peng, M. . 2017. The MAPKKK gene family in cassava: Genome-wide identification and expression analysis against drought stress. **Scientific Reports.**, 7(1), 14939.
- Zhu, X., Zhang, N., Liu, X., Li, S., Yang, J., Hong, X and Si, H. (2021). Mitogen-activated protein kinase 11 (MAPK11) maintains growth and photosynthesis of potato plant under drought condition. *Plant Cell Reports*, 40, 491-506. 2021. Mitogen-

activated protein kinase 11 (MAPK11) maintains growth and photosynthesis of potato plant under drought condition. . **Plant Cell Reports**,, 40: 491-506.

Zia S, S. K., Wenyong D, Spreer W, Romano G, and Xiongkui H. . 2011. Monitoring physiological responses to water stress in two maize varieties by infrared thermography. **Int J. Agric. & Biol.**, Eng. 4.

กระทรวงพาณิชย์. 2566. กองส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร 1 กรมการค้าภายใน กระทรวงพาณิชย์. (ระบบออนไลน์). . [Online].



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ณัฏฐา ดลระหมาน
เกิดเมื่อ	17 มีนาคม 2541
ประวัติการศึกษา	2559 โรงเรียนดาราลมาอาเรฟมุลนธิ จ.สตูล 2563 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สาขาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร จ.เชียงใหม่
ประวัติการทำงาน	-

