ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่ พืชไร่นา

สาขา **ภาควิชา**

เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มสารแอนโธไซยานินในข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู

Breeding for Increasing of Anthocyanin in *Opaque-2* Waxy Corn

นามผู้วิจัย นางสาวปวรวรรณ จีนรัตน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์ชูศักดิ์ จอมพุก, Dr.sc.nat.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์วิทิตร ใจอารีย์, Dr.rer.agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์พีรนุช จอมพุก, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชเนษฎ์ ม้าลำพอง, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มสารแอนโธไซยานินในข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู

Breeding for Increasing of Anthocyanin in *Opaque-2* Waxy Corn

โดย

นางสาวปวรวรรณ จีนรัตน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปวรวรรณ จีนรัตน์ 2557: การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มแอนโธไซยานินในข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีนโอเปกทู ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชูศักดิ์ จอมพุก, Dr.sc.nat. 68 หน้า

ข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระแอนโธไซยานิน ขณะที่ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูมีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนสูง ข้าวโพดข้าวเหนียวทั้งสองพันธุกรรมจะเป็นประโยชน์มากยิ่งขึ้นถ้านำมารวมไว้ในข้าวโพดพันธุ์เดียวกันได้ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มสารแอนโธไซยานินในข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ในรุ่นลูก โดยนำสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (*$o_2o_2prprcc$*) เมล็ดสีขาว ซึ่งมีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนสูง 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นพันธุ์แม่ จำนวน 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ Agwo1 และ Agwo2 ผสมกับข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง พันธุ์แฟนซีสีม่วง 111 *($O_2O_2Pr_C_$)* ที่มีสารแอนโธไซยานินสูง ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จำนวน 2 คู่ผสม จากนั้น ใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* เพื่อคัดเลือกยีนโอเปกทูในสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) และคัดเลือกฝักที่มีสีม่วง ปลูกและผสมตัวเองจนถึงชั่วที่ 4 (S_4) แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง ไว้จำนวน 5 สายพันธุ์ (Agwop2, Agwop3, Agwop4, Agwop5 และ Agwop6) และสีขาวจำนวน 1 สายพันธุ์ (Agwow1) ผสมพันธุ์แบบ Line x Tester จำนวน 4 สายพันธุ์ และ 2 ตัวทดสอบ ผลการทดลอง พบว่า สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงชั่วที่ 4 (S_4) มีทริปโตแฟนในโปรตีนอยู่ระหว่าง 0.57-0.79% แอนโธไซยานินอยู่ระหว่าง 190-250 mg/100g ขณะที่สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีขาวมีทริปโตแฟนในโปรตีน 0.62% และแอนโธไซยานิน 20 mg/100g จากการผสมแบบ Line × Tester พบว่า ลูกผสมชั่วที่ 1 มีผลผลิตน้ำหนักฝักสดอยู่ระหว่าง 1,195-1,934 กก./ไร่ มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.50-0.79% และมีแอนโธไซยานิน 160-320 mg/100g ขณะที่พันธุ์สวีทไวท์ 853 และพันธุ์แฟนซีสีม่วง 111 มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีน 0.26% เท่ากัน แต่มีปริมาณแอนโธไซยานิน 10 mg/100g และ 180 mg/100g ตามลำดับ และทุกสายพันธุ์และพันธุ์ลูกผสมมีปริมาณอะไมโลเปกตินสูงกว่า 95 % ดังนั้นการรวมลักษณะที่ดีของ 3 ลักษณะ คือ ปริมาณแป้งอะไมโลเปกตินสูง ปริมาณทริปโตแฟนสูง และมีสารแอนโธไซยานินสูง ประสบความสำเร็จ ได้ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง สายพันธุ์ใหม่

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pawonwan Jeenrat 2014: Breeding for Increasing of Anthocyanin in *Opaque-2* Waxy Corn. Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Associate Professor Choosak Jompuk, Dr.sc.nat. 68 pages.

The kernel of purple waxy corn is rich in antioxidants (anthocyanin) while the kernel of *opaque-2* waxy corn contains proteins with a high percentage of tryptophan content. It would benefit consumers if both of these qualities could be combined in one corn variety. So, the objective of this study was to increase the anthocyanin content in the kernel of *opaque-2* waxy corn by using marker-assisted selection (MAS) to detect the opaque-2 gene in the segregating progenies. Crosses were made between two *opaque-2* waxy corn varieties (Agwo1 and Agwo2) with white kernels and high (about 0.8%) percentage of tryptophan content in protein as the female parent and a purple waxy corn variety (Fancy Purple 111) having high anthocyanin in the kernel as the male parent. In the S_1 progenies the simple sequence repeat (SSR) marker *phi057* was applied to detect the *opaque-2* gene in the young plants, and the purple ears of *opaque-2* plants were selected at harvest. The advanced generation was made by selfing the selected plants until S_4. Five purple *opaque-2* waxy lines (Agwop2, Agwop3, Agwop4, Agwop5 and Agwop6) and one white *opaque-2* waxy line (Agwow1) were achieved. Four lines and two testers were used for the Line × Tester design to obtain eight crosses. In S_4 lines results showed that the percentage of tryptophan content in protein of purple *opaque-2* waxy lines ranged from 0.57-0.97% and anthocyanin content ranged from 0.19-0.25 mg/100g, while the white *opaque-2* waxy line had about 0.62% of tryptophan and 0.02 mg/100g of anthocyanin. For the eight F_1 hybrids, green ear weight ranged from 1,195-1,934 kg/1,600 m^2, percentage of tryptophan content in protein ranged from 0.50-0.79% and anthocyanin content was 0.16-0.32 mg/100g. In the check varieties, Sweet White 853 and Purple Fancy 111 had the same percentage of tryptophan content in protein (0.26%) but the anthocyanin content of Purple Fancy 111 was about 0.18 mg/100g, higher than 0.01 mg/100g in Sweet White 853. Moreover, the amylopectin content of S_4 lines, F_1 hybrid and check varieties was more than 95%. In summary, the combination of these 3 traits (high amylopectin, tryptophan and anthocyanin) in a new genotype of purple opaque-2 waxy corn was achieved.

_____ / / _____

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชูศักดิ์ จอมพุก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร. วิทิตร ใจอารีย์ และรองศาสตราจารย์ ดร. พีรนุช จอมพุก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำในการเรียน การทำงานวิจัย และการตรวจแก้ไขวิทยาพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชเนษฎ์ ม้าลำพอง ประธานกรรมการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และ รองศาสตราจารย์ ดร.กิตติ บุญเลิศนิรันดร์ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการปลูกข้าวโพด การจัดการภายในแปลง ตั้งแต่เริ่มงานวิจัยจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนบุคลากรในศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และขอขอบคุณศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์สำหรับการวิเคราะห์ทางด้านดีเอนเอ

ขอขอบคุณ นางสาววรรษมน มงคล และนางสาวอังคณา เพาะนิยม ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลืองานด้านการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ในช่วงเริ่มต้นของการทำวิทยานิพนธ์ และเป็นกำลังใจจนงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่สุวภัทร สุพลจิตร พี่สาวและน้องสาว ที่ให้ความรักและเสียสละในการสนับสนุน ช่วยเหลือทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ที่ทำให้ข้าพเจ้าได้ศึกษาจนถึงระดับปริญญาโท ประโยชน์และความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแด่คุณพ่อและคุณแม่ และผู้อยู่เบื้องหลังความสำเร็จทั้งหมด ตลอดจนครู อาจารย์ ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา ความรู้และอบรมสั่งสอนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ปวรวรรณ จีนรัตน์

กรกฎาคม 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
อุปกรณ์	14
วิธีการ	17
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	55
สรุป	55
ข้อเสนอแนะ	55
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	57
ภาคผนวก	64
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	68

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนเมื่อแยกแหล่งความแปรปรวนของพ่อแม่ (parents) คู่ผสม (crosses) พ่อแม่กับคู่ผสม และสายพันธุ์กับตัวทดสอบ	32
2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแผนการทดลองแบบสุ่มภายในบลอคสมบูรณ์	33
3	แสดงจำนวนต้นข้าวโพดข้าวเหนียว opaque-2 ผสมตัวเองชั่วที่ 1 ที่จำแนกจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ *phi057* และตรวจสอบการกระจายตัวของยีนโดยไคสแควร์	35
4	แสดงลักษณะ สีของเมล็ดของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1)	36
5	แสดงการกระจายตัวของสีฝักของต้นข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (o_2o_2) ที่คัดเลือกไว้ของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3)	37
6	ค่าเฉลี่ยของลักษณะคุณภาพสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงที่คัดเลือกได้ จำนวน 6 สายพันธุ์และสายพันธุ์เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์	41
7	ค่าเฉลี่ยของลักษณะคุณภาพสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงที่คัดเลือกได้ จำนวน 6 สายพันธุ์และสายพันธุ์เปรียบเทียบ 1 สายพันธุ์	42
8	ค่าเฉลี่ยลักษณะทางการเกษตรของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงจำนวน 8 คู่ผสม และสายพันธุ์เปรียบเทียบ 1 สายพันธุ์	43
9	ค่าเฉลี่ยของลักษณะคุณภาพลูกผสมของข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง จำนวน 8 คู่ผสมและพันธุ์เปรียบเทียบ 1 พันธุ์	44
10	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะผลผลิตฝักสดทั้งเปลือกและปอกเปลือกของลูกผสม จำนวน 8 คู่ผสม โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนตามวิธีการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์กับสายพันธุ์ทดสอบ	47
11	สมรรถนะในการผสมทั่วไป (GCA) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) ของลักษณะฝักสดทั้งเปลือกของสายพันธุ์ 4 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ทดสอบ 2 สายพันธุ์	48
12	สมรรถนะในการผสมทั่วไป (GCA) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) ของลักษณะฝักสดปอกเปลือกของสายพันธุ์ 4 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ทดสอบ 2 สายพันธุ์	49

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

13 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางชีวเคมีและคุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวฝักแก่ที่มียีน *opaque-2* จำนวน 8 คู่ผสม 50

14 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางชีวเคมีและคุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวฝักสดที่มียีน *opaque-2* จำนวน 8 คู่ผสม 50

15 ผลลิตฝักสดและลักษณะเกษตรที่สำคัญของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* สีม่วง จำนวน 6 สายพันธุ์ 53

16 ผลลิตฝักสดและลักษณะเกษตรของพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มียีน *opaque-2* สีม่วงจำนวน 8 คู่ผสม และพันธุ์เปรียบเทียบ 54

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วิถีการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน (Anthocyanin)	7
2	วิถีการสังเคราะห์แอนโธไซยานินในชั้น aleurone ในเมล็ดข้าวโพด	10
3	การแสดงออกของยีน *red aleurone locus*	11
4	แผนผังการวางแผนการทดลอง	19
5	ลักษณะการกระจายตัวของสีเมล็ดสีต่างๆ ของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีนโอเปกทู รุ่นผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S3)	38
6	ลักษณะการติดเมล็ดบนเกสรตัวผู้ รุ่นผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S3)	38

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CV	coefficient of variation
ddH_2O	double-distilled water
DNA	deoxyribose nucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
GCA	general combining ability
LSD	least significant difference
MAS	marker assisted selection
mM	millimolar
ng	nanogram
PCR	polymerase chain reaction
RCBD	randomezed completely block design
SCA	specific combining ability
U	unit(s) of enzyme
µM	micromolar

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มสารแอนโธไซยานินในข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (*opaque-2*)

Breeding for Increasing of Anthocyanin in Waxy *Opaque-2* Corn

คำนำ

ข้าวโพดข้าวเหนียวเป็นข้าวโพดรับประทานฝักสด มีแป้งชนิด อะไมโลเปกติน (amylopectin) มากกว่า 90% ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการทำงานของระบบย่อยอาหาร คือย่อยง่ายกว่าแป้งชนิด อะไมโลส (amylose) ที่มีอยู่ในข้าวโพดข้าวเหนียวน้อยกว่า 10% อีกทั้งแป้งของข้าวโพดข้าวเหนียวเมื่อสุกแล้วมีลักษณะเหมือนขี้ผึ้ง มีความอ่อนนุ่ม รสหวานเล็กน้อย จึงมีศักยภาพที่จะได้รับความนิยมจากกลุ่มผู้บริโภคที่รักสุขภาพ และ ข้าวโพดข้าวเหนียวจะมีศักยภาพทางด้านสุขภาพมากขึ้นไปอีก ถ้ามีสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น สารแอนโธไซยานิน (anthocyanin) ที่เป็นรงควัตถุชนิดหนึ่งในพืช มีสีแดง สีน้ำเงิน ไปจนถึงสีม่วง จัดเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Harborne, 1988) และสารแอนโธไซยานินนี้พบอยู่ใน epidermal cell ของพืชที่มีสีม่วง สีน้ำเงิน และสีแดง ข้าวโพดสีม่วง (purple corn) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้ ประชากรในแถบนี้ได้นำ ข้าวโพดสีม่วงนี้มาใช้ในการบำรุงรักษาสุขภาพ เช่น ตัวอย่างในประเทศเปรู มีการนำข้าวโพดสีม่วงมาใช้ในอาหารท้องถิ่นที่เรียกว่า “chicha morada” เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร (Cevallos-Casals and Cisneros-Zevallos, 2003)

สำหรับการเพิ่มคุณค่าทางอาหารในข้าวโพดข้าวเหนียวนอกจากสารแอนโธไซยานินแล้ว การเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น ได้แก่ ทริปโตแฟนและไลซีน ก็ได้มีการศึกษาเช่นกัน จากการค้นพบของนักวิทยาศาสตร์จากมหาวิทยาลัย Purdue ได้ค้นพบยีนโอเปกทู (*opaque-2, o_2o_2*) ในข้าวโพดกลายพันธุ์ (mutant) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 โดยยีนโอเปกทูนี้ส่งผลให้เอนโดเสปิร์มของข้าวโพดมีปริมาณกรดอะมิโนทริปโตแฟนและไลซีนสูงขึ้นเกือบเป็นสองเท่าของข้าวโพดปกติที่ไม่มียีนชนิดนี้อยู่ (Villegas, 1994) เมื่อปี 2553 โครงการวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวให้มียีนโอเปกทู ทำให้มีสายพันธุ์ข้าวโพดที่มียีนโอเปกทูสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่จะตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่รักสุขภาพได้ (Sinkangam *et al.*, 2012) แต่ยีนโอเปกทูในข้าวโพดข้าวเหนียวเป็น recessive gene การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีปกติ (conventional breeding) จะต้องเสียเวลาในการผสมตัวเอง (selfing) เพื่อให้ยีนโอเปกทูอยู่ในรูป homozygous recessive ก่อนจึงจะสามารถ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโอเปกทูได้ โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารทริปโตแฟนในเมล็ด ซึ่งทำให้ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ต้องเสียเวลามาก แต่ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ การใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ที่จำเพาะกับยีนนี้ สามารถช่วยตรวจสอบ และคัดเลือกต้นข้าวโพดที่มีจีโนไทป์ (genotype) ที่ต้องการ ได้รวดเร็วขึ้น โดยใช้เทคนิค simple sequence repeat (SSR) และใช้ primer ที่เป็น co-dominant marker คือ *phi057* (Chin *et al.,* 1996) ตรวจสอบยีนโอเปกทู ในประชากรข้าวโพดข้าวเหนียวในชั่วต่างๆ ของการคัดเลือกสายพันธุ์ และเนื่องจากสารแอนโธไซยานิน เป็นสารสีม่วงและแสดงออกที่เมล็ด จึงทำให้การคัดเลือกทำได้ง่าย โดยการทดสอบรุ่นลูก แต่ถ้าต้องการทราบปริมาณสารแอนโธไซยานิน จำเป็นต้องวิเคราะห์ทางเคมีดังนั้น การคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงสามารถทำได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) ยีนโอเปกทู และคัดเลือกสารแอนโธไซยานินได้โดยการคัดเลือกสีม่วงของเมล็ด ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนในการปรับปรุงพันธุ์ และการคัดเลือกรุ่นลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเพิ่มปริมาณสารแอนโธไซยานิน (anthocyanin) ในสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (*opaque-2*)

2. คัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ในรุ่นลูกชั่วต่างๆ

3. ตรวจสอบปริมาณสารแอนโธไซยานินและปริมาณทริปโตแฟน (tryptophan) ของสายพันธุ์ผสมตัวเองและลูกผสมของข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ความสำคัญของข้าวโพดข้าวเหนียว

ข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn) เป็นข้าวโพดที่ได้มาจากการกลายพันธุ์ ของยีน waxy ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 9 ตำแหน่งที่ 59 โดยการเปลี่ยนแปลงจากยีน Wx (dominance gene) ไปเป็นยีน wx (recessive gene) ทำให้ปริมาณแป้งอะไมโลเพคติน (amylopectin) ซึ่งเป็นแป้งโมเลกุลใหญ่ มีกิ่งก้านสูงมีปริมาณสูงขึ้นแทนที่แป้งอะไมโลส (amylose) ในเอนโดสเปิร์มและละอองเกสร (Coe and Neuffer, 1988) ข้าวโพดข้าวเหนียวถูกค้นพบที่ประเทศจีนในปี ค.ศ. 1909 และเป็นข้าวโพดที่มีการปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยและอีกหลายประเทศในเอเชีย (Lertrat and Thongnarin, 2008) สาเหตุสำคัญที่ทำให้ข้าวโพดข้าวเหนียวได้รับความนิยมบริโภคมากขึ้น เนื่องจากลักษณะสำคัญทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว ที่มีปริมาณแป้งอะไมโลเพคติน ต่อแป้งอะไมโลส ในอัตราส่วน 73: 27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแป้งอะไมโลเพคติน เมื่อสุกจะมีลักษณะเหนียวนุ่ม และมีเนื้อสัมผัสที่ดี จากการแสดงออกของคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอนโดสเปิร์ม ทำให้เมล็ดมีลักษณะขุ่น ทึบแสง (Fergason, 1994) อย่างไรก็ตามในประเทศไทย ข้าวโพดข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์จากแต่ละพื้นที่มีปริมาณแป้งอะไมโลเพคตินที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้รสชาติแตกต่างกัน (Lertrat and Thongnarin, 2008) สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวในประเทศไทยนั้น มีนักปรับปรุงพันธุ์ให้ความสนใจก่อนหน้านี้ไม่มากเท่าที่ควร จากอดีตถึงปัจจุบันการใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ผ่านมา เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ผสมเปิด (open pollinated variety) แต่หลังจากที่ความนิยมในการบริโภคข้าวโพดฝักสดมีมากขึ้นจึงได้มีการพัฒนาพันธุ์เป็นพันธุ์ลูกผสมเดี่ยว (single cross variety) มากขึ้น ส่งผลให้คุณภาพในการบริโภค (eating quality) ดีขึ้น ทำให้มีผู้บริโภคมากขึ้น นอกจากนี้ลักษณะทางการเกษตรต่างๆ ที่ดีขึ้น และผลผลิตต่อไร่สูงขึ้น จึงทำให้การปลูกข้าวโพดข้าวเหนียวเป็นการค้าได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น

ความสำคัญของข้าวโพดโอเปกทู (*opaque-2*)

Mertz *et al.* (1964) และ Nelson *et al.* (1965) ได้ค้นพบยีนโอเปกทู (recessive gene) บนโครโมโซมคู่ที่ 7 และยีน floury-2 (semi-dominant gene) บนโครโมโซมคู่ที่ 4 ในข้าวโพดกลายพันธุ์ โดยที่ยีนโอเปกทู จะทำให้เอนโดสเปิร์ม (endosperm) ของข้าวโพดมีปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรดอะมิโนไลซีน (lysine) และทริปโตแฟน (tryptophan) สูงกว่าข้าวโพดปกติ ซึ่งข้าวโพดที่มียีนโอเปกทู จะถูกเรียกว่า "ข้าวโพดโอเปก" หรือ " ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (quality protein maize, QPM)" สำหรับงานพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดที่มียีนโอเปกทู นั้นได้เริ่มจากการพบว่ายีนโอเปกทู นอกจากจะทำให้ปริมาณกรดอะมิโน 2 ชนิด ดังกล่าวสูงขึ้นแล้ว ยังทำให้เกิดลักษณะแป้งอ่อนในเอนโดเสิร์มซึ่งทำให้เกิดปัญหาตามมาคือ เกิดโรคฝักเน่าได้ง่าย ข้าวโพดโอเปกจึงไม่เป็นที่นิยมของเกษตรกรมากนัก (Villegas, 1994) จากปัญหาข้างต้นจึงมีการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวโพดที่มียีนโอเปกทู ให้เป็นที่ยอมรับของเกษตรกรมากขึ้น โดยเริ่มจากการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีมาตรฐาน (conventional breeding) โดยใช้การวิธีผสมกลับ (backcross) เพื่อเพิ่มลักษณะทางการเกษตรอื่นๆ ที่ดีให้กับข้าวโพดโอเปก

ในระยะต่อมาจึงได้เริ่มมีการศึกษาลงไปถึงระดับโมเลกุล ดังรายงานของ Prasanna *et al.* (2001) ได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดโอเปก โดยใช้เทคโนโลยีทางด้านโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) เข้ามาช่วยการคัดเลือกข้าวโพดที่มียีนโอเปกทู ทำได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล simple sequence repeat (SSR) ที่มีความจำเพาะ กับยีนตำแหน่งนี้ ซึ่งเป็นmarker ชนิด co-dominant ทำให้จำแนกต้นข้าวโพดที่มียีนเป็น heterozygous ได้ด้วย โดยไม่ต้องรอการทดสอบรุ่นลูก (progeny test) (Ribaut and Hoisington, 1998) ทำให้การคัดเลือกเร็วขึ้น ไม่ต้องรอจนกระทั่งถึงระยะเก็บเกี่ยวแล้วนำเมล็ดไปวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทริปโตแฟน ซึ่งจะช่วยประหยัดระยะเวลาและงบประมาณในการคัดเลือกในรุ่นแรกๆ ของโครงการปรับปรุงพันธุ์ (Sinkangam *et al*., 2011)

คุณภาพของข้าวโพดโอเปกทู

ข้าวโพดโอเปกทู จะมีคุณภาพของโปรตีนที่ดีกว่าข้าวโพดไร่ปกติ กล่าวคือ มีระดับกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด คือไลซีนและทริปโตแฟนในโปรตีนสูงกว่า ข้าวโพดทั่วไป โดยในเมล็ดข้าวโพดทั่วไปจะมีปริมาณกรดอะมิโนไลซีนและทริปโตแฟนในโปรตีน ประมาณ 2.6 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ข้าวโพดโอเปก จะมีปริมาณกรดอะมิโนไลซีน และทริปโตแฟนในโปรตีนประมาณ 4 และ 1.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Mertz *et al.,* 1964) Bressani (1966) รายงานการทดลองถึงปริมาณข้าวโพดที่เพียงพอต่อความต้องการเพื่อให้เกิดสภาพสมดุลของไนโตรเจน พบว่า ต้องการข้าวโพดปกติ 23.6 g/kg ของน้ำหนักตัว (bodyweight, BW) ในขณะที่ข้าวโพดที่มียีนโอเปกทู ปริมาณเพียง 8.2 g/ kg ของน้ำหนักตัวก็เพียงพอสำหรับสภาพสมดุลไนโตรเจน หรือถ้าเป็นเด็กที่มีน้ำหนัก 15 กิโลกรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อที่จะรักษาสมดุลของโปรตีน จะมีความต้องการข้าวโพดที่มียีนโอเปกทู ปริมาณ 120 กรัมต่อวัน ซึ่งจะให้พลังงาน 440 kcal มากกว่าข้าวโพดปกติ 3 เท่า ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (quality protein maize, QPM) เปรียบเสมือนไข่และนมซึ่งทั้งสองอย่างมี ไนอะซีนต่ำ แต่มีปริมาณทริปโตแฟนสูง เมื่อเทียบกับนมพร่องมันเนยคุณค่าทางโภชนาการของข้าวโพด QPM คือประมาณ 90% ซึ่งเพียงพอต่อความต้องการโปรตีนของเด็กวัยก่อนปฐมวัย

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาในสัตว์หลายชนิด เช่น ไก่ ซึ่งต้องการโปรตีนและกรดอะมิโนเมไทโอนีน (methionine) ในการเจริญเติบโต ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ข้าวโพดที่มียีนโอเปกทู เป็นส่วนผสมของอาหารไก่ ทำให้ไก่มีการเจริญเติบโตได้เร็วกว่าการใช้ข้าวโพดไร่ปกติเป็นส่วนประกอบในอาหาร และมีกำไรมากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ข้าวโพดไร่ปกติ (Cromwell *et al*., 1983)

สารแอนโธไซยานิน

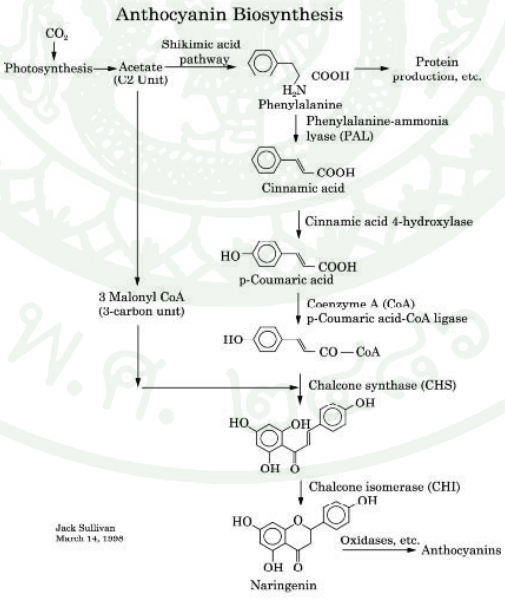
แอนโธไซยานิน เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่เป็นรงควัตถุชนิดหนึ่ง สามารถพบได้ในแวคคิวโอล มีสีแดง สีน้ำเงิน ไปจนถึงสีม่วง ละลายน้ำได้ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ไม่มีหมู่ไฮดรอกไซด์ เช่น อีเทอร์ อะซีโตน คลอโรฟอร์ม และเบนซีน เป็นต้น (Harborne, 1988) แอนโธไซยานินมีสูตรโครงสร้างหลักคือ $C_6C_3C_6$ และเป็นอนุพันธ์ polyhydroxyl และ polymethoxyl ของสารฟลาวิเลียม (flavylium) หรือ 2-phenylbenzopyrylium โมเลกุลของแอนโธไซยานินประกอบด้วยแอนโธไซยานิดิน หรือที่เรียกว่า aglycone ซึ่งจับตัวกับน้ำตาลด้วยพันธะ β - glycosidic และมักจับที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของโครงสร้างแอนโธไซยานิดิน น้ำตาลที่จับกับแอนโธไซยานิดินอาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ได้แก่ กลูโคส แรมโนส กาแล็คโตส ไซโลส และอะราบิโนส น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) หรือ trisaccharide โดยโมเลกุลของน้ำตาลจะทำปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น p-coumaric, caffeic และ ferulic ในคาร์บอนตำแหน่งที่สาม ซึ่งจะช่วยให้แอนโธไซยานินมีเสถียรภาพดีขึ้น แอนโธไซยานินที่สำคัญมี 17 ชนิด เรียกชื่อแตกต่างกันขึ้นกับตำแหน่งของหมู่ ไฮดรอกซิล (hydroxyl) และเมทธอกซิล (metoxyl) (Francisco and Paredes-Lopez,2003) แอนโธไซยานินที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่มี 6 ชนิด คือ pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin และ malvidin (Gray and Lan, 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสังเคราะห์แอนโธไซยานินในพืช

แอนโธไซยานินมีวิถีการสังเคราะห์โดยเริ่มจาก acetate (C2 unit) ที่ได้จากการสังเคราะห์แสงเข้าสู่ shikimic acid pathway แล้วเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้น คือ กรดอะมิโน phenylalanine จากนั้น phenylalanine จะถูกเปลี่ยนเป็น cinnamic acid โดยมีเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) เร่งปฏิกิริยา cinnamic acid จะถูกเปลี่ยนเป็น p-coumaric acid จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น pcoumaryl co-A แล้วเปลี่ยนเป็น chalcone (C15 unit) โดยมีเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) เร่งปฏิกิริยา จากนั้น chalcone จะถูกเปลี่ยนเป็น nariginine โดยมีเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) เร่งปฏิกิริยา แล้ว nariginine จะถูกเปลี่ยนเป็นแอนโธไซยานินต่อไป

การสังเคราะห์แอนโธไซยานินอีกวิถีหนึ่งมาจาก การเปลี่ยน Acetate (C2 unit) ที่ได้จากการสังเคราะห์แสงไปเป็น malonylCo-A (C3 unit) 3 โมเลกุลแล้วเข้าร่วมกับ p-coumaryl Co-A เพื่อเปลี่ยนเป็น chalcone โดยมีเอนไซม์ CHS เร่งปฏิกิริยา จากนั้น chalcone จะถูกเปลี่ยนเป็น nariginine โดยมีเอนไซม์ CHI เร่งปฏิกิริยา แล้ว nariginine จะถูกเปลี่ยนเป็นแอนโธไซยานินต่อไป (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 วิถีการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน

ที่มา: Sullivan (1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประโยชน์จากแอนโธไซยานิน

แอนโธไซยานินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีโครงสร้างที่สามารถจับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว ทำให้ไม่สามารถที่จะไปก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และหยุดการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ จึงลดอัตราการเกิดโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุ

ในสมัยก่อนชาวกรีกได้นำผลไม้ที่มีสีม่วงมาพอกหน้า พอกตัว เพราะเชื่อว่าจะทำให้ผิวพรรณดูอ่อนกว่าวัย (Sullivan, 1998) ในขณะเดียวกัน Lila (2004) อ้างว่าการรับประทาน Bilberries *(Vaccinium myrtillus)* ทำให้มีการมองเห็นในที่มืดได้ดีขึ้น การดื่มไวน์แดง (redwine) ที่มี polyphenolic ต่างๆ รวมทั้งแอนโธไซยานิน สามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (Blando *et al.*, 2004) การรับประทานผักและผลไม้ที่มีแอนโธไซยานินสามารถยับยั้งการลุกลามของเนื้องอก ป้องกันการเกิดโรคมะเร็งและลดระดับไขมันในเลือดได้ (Wrolstad, 2001)

การนำแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากผลเชอร์รี่ไปทดลองกับเซลล์ตับอ่อนของหนูทดลองในหลอดทดลอง พบว่า แอนโธไซยานินสามารถกระตุ้นให้เซลล์ตับอ่อนสร้างอินซูลิน (insulin) เพิ่มขึ้น ซึ่งอินซูลินทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือด ซึ่งจะสามารถยับยั้งการเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงในโรคเบาหวานได้ด้วย (Nair, 2004) อีกทั้งแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากเปลือกของลิ้นจี่ (*Lichi chinenesis* Sonn.) สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ linoleic acid ในหลอดทดลองได้ (Duan *et al.,* 2007)

Rottmann *et al.,* 2002 รายงานว่า แอนโธไซยานินในน้ำสกัดของผล ach (*Aristotelia chilensis*) ผล blackberry (*Rubus* spp.) ผล cranberry (*Vaccinium macrocapon*) ผล blueberry (*Vaccinium corymbosum*) และผล raspberry (*Rubus idaeus*) สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein oxidation; LDL oxidation) ในหลอดทดลองได้ (LDL ได้จากการสกัดจากเลือดของหนูทดลอง) ซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกัน และรักษาภาวะไขมันอุดตันในเส้นเลือด และโรคหลอดเลือดหัวใจที่เกิดจากปฏิกิริยาออกเดชันของ LDL ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารแอนโธไซยานินในข้าวโพดสีม่วง

ข้าวโพดสีม่วง (purple corn) เป็นพืชที่ปลูกในแถบอเมริกาใต้ ส่วนใหญ่ปลูกในประเทศเปรู และโบลิเวีย ในเมล็ดข้าวโพดสีม่วงประกอบด้วยสารแอนโธไซยานิน นิยมใช้ทำขนมและเครื่องดื่ม (Cevallos-Casals and Cisneros-Zevallos, 2003)

แอนโธไซยานินเป็นเม็ดสีที่อยู่ในเซลล์อีพิเดอร์มิส (epidermis cell) ทำให้เกิดสีม่วงในข้าวโพดโดยทำหน้าที่ป้องกันรังสี UVB ในใบ (Stepletoh and Walbot, 1994) แอนโธไซยานินที่พบในข้าวโพดมี 2 ชนิด คือ Cyanidin-3-glucoside และ pelargonidin glucoside (Grotewold *et al.*, 1998) แอนโธไซยานินที่สำคัญที่พบในเมล็ดข้าวโพดสีม่วงคือ Cyanidin-3-glucoside แต่ pelargonidin glucosides มักจะพบในข้าวโพดทั่วไป (Styles and Ceska, 1972) ปริมาณของแอนโธไซยานินที่พบในข้าวโพดสีม่วงมีประมาณ 1640 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสด ซึ่งมีปริมาณที่สูงกว่าผลบลูเบอรี่สด (Jones, 2005)

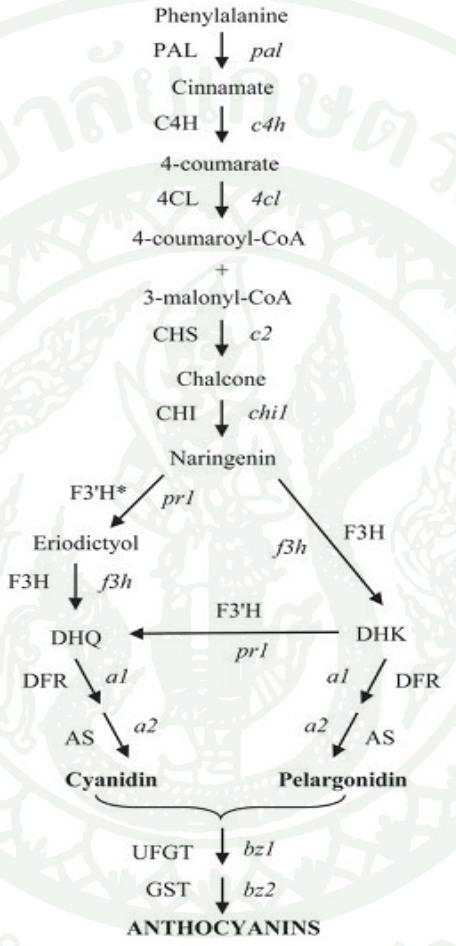
Mazza, and Oomah (2000) กล่าวว่า แอนโธไซยานินในข้าวโพดสีม่วงมีผลต่อจำนวนเชื้อรา ระดับของสารพิษอะฟลาทอกซิน และยังมีผลในการช่วยลดสารพิษของเชื้อราบางชนิด นอกจากนี้แอนโธไซยานินในข้าวโพดสีม่วงยังมีคุณสมบัติบางประการที่เทียบเคียงกับสารเคมีสังเคราะห์บางชนิด เช่น เป็นสารกันหืนตามธรรมชาติโดยทำหน้าที่เป็นตัวจับอนุมูลอิสระที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในไขมัน

เมื่อปี ค.ศ. 1973 ประเทศญี่ปุ่นได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากข้าวโพดสีม่วงทั้งฝัก โดยใช้ข้าวโพดพันธุ์ Morado สีแดงและพันธุ์ Kulli จากประเทศเปรู มาสกัดสารแอนโธไซยานินพบว่าสารแอนโธไซยานินที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นสารสีสำหรับผสมในอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ของมนุษย์ได้ เช่นใช้เป็นแหล่งสารสีในลูกกวาดและน้ำเชื่อมไซรัป (Miniati and Mazza, 1993) นอกจากนำมาใช้เป็นแหล่งสารสีในการผสมอาหารและผลิตภัณฑ์แล้วแอนโธไซยานินในข้าวโพดสีม่วงยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพ ช่วยลดความดันโลหิตช่วยป้องกันไม่ให้เกิดโรคอ้วนและเบาหวานในหนูทดลอง (Toyoshi and Kohda, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวโพดสีม่วงสามารถยับยั้งการกลายพันธุ์ของเซลล์และลดการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักได้อีกด้วย (Tsuda *et al*., 2003)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมแอนโธไซยานินในข้าวโพด

สารฟลาโวนอยด์นั้นได้จากการวิถีการสังเคราะห์ Phenypropanoid pathway ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมในต้นพืช (ภาพที่ 2) (Sharma *et al*., 2011)



ภาพที่ 2 วิถีการสังเคราะห์แอนโธไซยานินในชั้น aleurone ในเมล็ดข้าวโพด

ที่มา: Sharma *et al*. (2011)

การสะสมของแอนโธไซยานินในชั้น aleurone ของข้าวโพด ต้องการการแสดงออกของยีน R1 และ C1 ในขณะที่การสร้างแอนโธไซยานินในส่วนของลำต้นนั้น จะต้องการการแสดงออกของยีน B1 และ PL1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสร้างแอนโธไซยานินในเมล็ดที่ชั้น aleurone ต้องการการทำงานของเอมไซม์ Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) โดยที่ต้องอาศัยการแสดงออกของ *red aleurone1* locus หรือที่เรียกกันว่า *purple aleurone1* (*pr1*) ในข้าวโพดโดยที่ยีน *pr1* จะสร้างเม็ดสีแดง (pelargonidin) เนื่องมาจากการผิดปกติของ hydroxylase ในวงแหวน B ในโครงสร้างของ dihrdrokaemoferol (DHK) และการสร้างเม็ดสีม่วง, (cyanidin) จะแสดงออกเนื่องจากยีน *Pr1* ที่ไม่มีความผิดปกติของ hydroxylase (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 3 การแสดงออกของยีน *red aleurone1* locus

ที่มา: Sharma *et al*. (2003)

Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) คือเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสารตั้งต้นในการสร้างสาร flavonols, flavones and flavanones ซึ่งสารทั้งสามจะเป็นสารตัวกลางที่จะใช้ในวิถีสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์

ในต้นศตวรรษที่ 20 ยีนตำแหน่ง *pr1* นี้ถูกใช้ให้เป็นเครื่องหมายสำหรับการจำแนกลักษณะพันธุกรรมของข้าวโพด ต่อมาในกลางศตวรรษที่ 20 มีการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างสีแดงและสีม่วงในชั้น aleurone ที่ต่างกันโดยมีอิทธิพลมาจากการแสดงออกของยีน *Pr1* และการไม่แสดงออกของยีน *pr1* ต่อ hydroxyl group ในเม็ดสี

การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดโอเปกทู

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถช่วยจำแนกจีโนไทป์ของพืชได้เป็นอย่างดี สามารถตรวจสอบได้โดยที่ไม่มีอิทธิพลของความแปรปรวนจากสิ่งแวดล้อม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภายนอกมาเกี่ยวข้อง เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ คือ Simple Sequence Repeat (SSR) ซึ่งมีความสามารถในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่าเครื่องหมายชนิดอื่นๆ

การเผยแพร่ไพรเมอร์ (primer) 3 ตัวซึ่งเป็น SSR marker คือ *phi112, umc1066* และ *phi057* ที่มีความจำเพาะกับยีนโอเปกทู ใน www.agron.missouri.edu ทำให้ง่ายต่อการศึกษาและการใช้ประโยชน์ของยีนโอเปกทู ได้เป็นอย่างมาก โดย *phi112* อยู่ระหว่าง G box และ 3 upstream open reading frames (uORFs) ส่วน umc1066 และ *phi057* จะอยู่บน exon 1 และ exon 6 ตามลำดับ แต่โพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของทั้ง 3 ไพรเมอร์ มีความแตกต่างกัน คือ *phi112* เป็น dominant marker ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการแยกจีโนไทป์ของยีนโอเปกทู ออกเป็น 3 จีโนไทป์ จึงเป็นประโยชน์ด้านการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์มากกว่า สำหรับ *phi057* และ *umc1066* เป็น co-dominant marker ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของ homozygous กับ heterozygous ได้เป็นอย่างดี จึงช่วยลดประชากรของข้าวโพดที่ต้องปลูกเพื่อคัดแยก (Babu et al., 2005)

Bentte and Prasanna (2003) ศึกษาเกี่ยวกับ SSR marker 5 ไพรเมอร์ ดังนี้ *bnlg439*, *phi057*, *blng125*, *dupssr34* และ *bnlg105* ผลการศึกษาพบว่า ทั้ง 5 ไพรเมอร์ที่เป็นเครื่องหมายโมเลกุลนั้นให้ความแตกต่างของโพลิมอร์ฟิซึมของข้าวโพดที่มีพันธุกรรมเป็นข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (QPM) ได้ดี สอดคล้องกับรายงานของ Chin *et al*. (1996) ที่พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* และ *umc1066* เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างของยีโนไทป์ของโอเปกทู ได้เช่นกัน

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) ใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยลดระยะเวลาในการดำเนินการ และประหยัดงบประมาณสามารถทดแทนการทดสอบในสภาพจริงซึ่งทำได้ยากในบางข้อมูล การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection, MAS) นั้น จะมีประสิทธิภาพและคุ้มค่ามากเมื่อใช้กับลักษณะที่ต้องมีค่าใช้จ่ายสูงในการวัดและมีจำนวนตัวอย่างจำนวนมากในการคัดเลือก

สมรรถนะการผสมของสายพันธุ์ (Combining ability)

การทดสอบสมรรถนะการผสม ควรกระทำเสมอเมื่อมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาให้ได้ลูกผสมและใช้ประโยชน์จากความดีเด่นของลูกผสม (heterosis) สมรรถนะการผสมของสายพันธุ์ (combining ability) หมายถึงความสามารถของแต่ละสายพันธุ์ในการให้ลูกผสมที่ดี แบ่งออกเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2 รูปแบบคือ 1) สมรรถนะการผสมทั่วไป (general combining ability, GCA) ความสามารถของสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งที่ผสมพันธุ์กับพันธุ์อื่นๆ หลายพันธุ์แล้วให้ค่าเฉลี่ยของลูกผสมทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ดี และ 2) สมรรถนะการผสมเฉพาะ (specific combining ability, SCA) การที่พันธุ์หนึ่งผสมกับอีกพันธุ์หนึ่งแล้วให้ค่าเฉลี่ยของลูกผสมที่ดีเป็นขีดความสามารถเฉพาะกับคู่ผสมนั้นๆ โดยทั่วไปแล้วสมรรถนะการผสมทั่วไป (GCA) จะแสดงปฏิกิริยาของยีนส่วนใหญ่เป็นแบบผลบวก (additive gene action) ถ้ามีค่าสูงพันธุ์ดังกล่าวจะเหมาะสำหรับใช้เป็นพันธุ์ทดสอบสำหรับการประเมินสมรรถนะการผสมในครั้งต่อไป และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) จะแสดงปฏิกิริยาของยีนส่วนใหญ่เป็นแบบไม่เป็นผลบวก (non-additive gene action) กล่าวคือถ้ามีค่า SCA สูงแล้วจะเหมาะอย่างยิ่งในการใช้พันธ์พ่อแม่คู่นั้นๆ ในการสร้างลูกผสม

หลักการสร้างลูกผสมที่ดี คือ การสร้างสายพันธุ์แท้ และหาลูกผสมที่ดีจากสายพันธุ์แท้ที่สร้างขึ้น (พีระศักดิ์ และเจริญศักดิ์, 2529) ในการทดสอบสมรรถนะในการผสม วิธีที่นิยมมากวิธีหนึ่งคือ การทดสอบคู่ผสมแบบพบกันหมด (diallel cross) เป็นวิธีที่ตรงไปตรงมา แต่จะขาดประสิทธิภาพ ถ้ามีสายพันธุ์จำนวนมาก วิธีนี้จึงเหมาะในการใช้กับสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วเป็นอย่างดี และไม่ควรใช้เกิน 10 สายพันธุ์ (กฤษฎา, 2551)

Spraque and Tatum (1942) กล่าวว่าสมรรถนะการผสมของสายพันธุ์แท้ เป็นปัจจัยสุดท้ายของการใช้ประโยชน์ของสายพันธุ์แท้ และยังมีความสำคัญต่อการประเมินสายพันธุ์ และการปรับปรุงประชากรในข้าวโพด โดยสมรรถนะการผสมทั่วไป เป็นค่าการแสดงออกของลูกผสมโดยเฉลี่ยที่เกิดจากการรวมตัวของสายพันธุ์แท้ ส่วนสมรรถนะการผสมเฉพาะเป็นค่าการแสดงออกของลูกผสมที่ดีหรือเลวกว่าค่าเฉลี่ยของสายพันธุ์ที่เป็นพ่อแม่

การผสมระหว่างสายพันธุ์และสายพันธุ์ทดสอบ (Line x Tester)

การใช้ทดสอบสายพันธุ์ทำได้โดยผสมสายพันธุ์ (Line) กับสายพันธุ์ทดสอบ (Tester) เพื่อประเมินสมรรถนะการผสมในรุ่นลูก เหมาะที่จะใช้เมื่อมีสายพันธุ์จำนวนมาก โดยนำทุกสายพันธุ์มาผสมกับพันธุ์ทดสอบ สามารถประเมินสมรรถนะการผสมทั่วไป (GCA) ของทั้งสายพันธุ์และสายพันธุ์ทดสอบ และ สมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) ของคู่ผสมได้ และยังสามารถวิเคราะห์อิทธิพลของยีนได้หลายชนิดอีกด้วย (Kempthrone, 1957)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์ข้าวโพด

1.1 สายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (*opaque-2*) จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ NS (เหนียวสวรรค์ // (Kwi1 / Q53)-BC_1S_4-1-6-2-3-2)-S_1-712) และ D3 (บิ๊กไวท์ // (Kwi1 / Q53)-BC_1S_4-1-6-2-3-2)-S_1-110)

1.2 พันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวแฟนซีสีม่วง 111 (Fancy purple 111) จากบริษัทแปซิฟิกเมล็ดพันธุ์จำกัด

1.3 ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ สวีทไวท์ 853 จากบริษัท อีสต์ เวสต์ ซีดส จำกัด ใช้เป็นพันธุ์ร่วมทดสอบในการปลูกทดสอบผลผลิต

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1.1 ไนโตรเจนเหลว
2.1.2 2X CTAB
2.1.3 2-Mercaptoethanol
2.1.4 Chloroform
2.1.5 Isoamyl alcohol
2.1.6 Iso-propanol
2.1.7 70% Ethanol
2.1.8 washing buffer
2.1.9 RNase buffer
2.1.10 RNase A

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.11 Phenol

2.1.12 3 M Sodium acetate

2.1.13 linear polyacrylamide

2.1.14 TE buffer

2.2 สารเคมีที่ใช้ทำพีซีอาร์

2.2.1 ddH_2O

2.2.2 Primer *phi057*

forward; 5'-CTCATCAGTGCCGTCGTCCAT-3'

reverse; 5'-CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC-3'

2.2.3 $MgCl_2$

2.2.4 *Taq* Buffer (10X; Mg-free)

2.2.5 dNTP

2.2.6 glycerol

2.2.7 *Taq* DNA polymerase

2.3 สารเคมีที่ทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และการย้อมแถบดีเอ็นเอ

2.3.1 Bind silane

2.3.2 Repel silane

2.3.3 95% Ethanol

2.3.4 Glacial acetic acid

2.3.5 Acrylamide

2.3.6 Bis-acrylamide

2.3.7 Urea

2.3.8 5X TBE, 1X TBE

2.3.9 AFLP loading dry

2.3.10 Ammonia

2.3.11 Silver nitrate

2.3.12 3M Sodium hydroxide

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3.13 Sodium carbonate

2.3.14 40% Formaldehyde

2.3.15 Molecular weight standard (100bp)

2.4 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบแอนโธไซยานิน

2.4.1 80% Methanol

2.4.2 1% TFA (Trifluoroacetic acid) in 80% methanol

2.4.3 Pelargonidin chloride stock solution

3. อุปกรณ์

3.1 โกร่งบดตัวอย่าง

3.2 หลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge tube)

3.3 water bath

3.4 เครื่องเซนตริฟิวจ์

3.5 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้

3.6 ปิเปต

3.7 หลอดไมโครเซนตรฟิวจ์ (Microcentrifuge tube)

3.8 incubator

3.9 Spectrophotometer

3.10 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดีเอ็นเอ (PCR)

3.11 เครื่อง Gel Electrophoresis สำหรับ acrylamide gels

3.12 ชุด sequencing gels

3.13 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

3.14 เครื่องฉายแสง ultraviolet และเครื่องถ่ายภาพเจล

3.15 เครื่องบดตัวอย่างพืช (Cyclone mill)

3.16 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.17 เครื่องสกัดไขมัน (SER148 extraction unit by solvent)

3.18 หลอดทดลอง

3.19 เครื่องแก้ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.20 pH meter

3.21 Shaker, Vortex-mixer

3.22 กระดาษกรอง

วิธีการ

1. การดำเนินงานในภาคสนาม

1.1 ปลูกข้าวโพดสายพันธุ์พ่อแม่เพื่อผสมพันธุ์

สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีขาว (*$o_2o_2Pr_cc$*) ซึ่งมีปริมาณทริปโตแฟนสูงประมาณ 0.8 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ NS (เหนียวสวรรค์ // (Kwi1 / Q53)-BC_1S_4-1-6-2-3-2)-S_1-712) และ D3 (บิ๊กไวท์ // (Kwi1 / Q53)-BC_1S_4-1-6-2-3-2)-S_1-110) ผสมกับพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์แฟนซีสีม่วง (*$O_2O_2Pr_CC$*) ที่มีสารแอนโธไซยานินสูงแต่มีปริมาณทริปโตแฟนปกติ (0.4%) ได้ทั้งหมด 2 คู่ผสมได้แก่

(1) เหนียวสวรรค์ // (Kwi1 / Q53)-BC1S4-1-6-2-3-2)-S1-712 x purple 111

(2) บิ๊กไวท์ // (Kwi1 / Q53)-BC1S4-1-6-2-3-2)-S1- 110 x purple 111

1.2 ปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1)

เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ทั้ง 2 คู่ผสมนำไปปลูก แล้วผสมตัวเอง (self) เป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1)

1.3 คัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวยีนโอเปกทู

การคัดเลือกต้นที่มียีนโอเปกทูที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) โดยนำเมล็ดสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 มาปลูก คู่ผสมละประมาณ 200 ต้น เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* คัดเลือกต้นข้าวโพดที่มียีโนไทป์เป็นข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (*$wxwxo_2o_2$*) ทั้งนี้เนื่องจากในลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ยีนในตำแหน่งโอเปกทูเป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygous, *O_2o_2*) เมื่อผสมตัวเองเป็น S_1 ยีนใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่งดังกล่าวจะมีการกระจายตัว ปลูกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 จำนวน 100 ต้นต่อคู่ผสม เพื่อคัดเลือกต้นที่มียีนโอเปกทูที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) ระยะออกดอกผสมตัวเองของทุกต้นที่คัดเลือกไว้ได้สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 (S_2) ในระยะเก็บเกี่ยวคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูที่มีเมล็ดสีม่วง

1.4 การเพิ่มระดับความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygosity)

นำเมล็ดของสายพันธุ์ข้าวโพดที่มียีนโอเปกทูเมล็ดสีม่วง และลักษณะทางการเกษตรที่ดีมาปลูกเพื่อผสมตัวเองเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3) เพื่อเพิ่มความคงตัวทางพันธุกรรม ลูกในชั่วนี้อาจมีการกระจายตัวของสายพันธุ์ที่มีเมล็ดเป็นสีต่างๆ ได้ อย่างไรก็ตาม จะคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีเมล็ดสีม่วงมาวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินและปริมาณทริปโตแฟน

1.5 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง

คัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงโดยคัดเลือกจากฝักที่มีปริมาณทริปโตแฟนสูงที่เมล็ดมีสีม่วง และลักษณะทางการเกษตรที่ดีจำนวน 6 สายพันธุ์ มาปลูกเพื่อผสมพันธุ์แบบ Line x Tester โดยใช้สายพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์ และตัวทดสอบจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้คู่ผสมทั้งหมด จำนวน 8 คู่ผสม

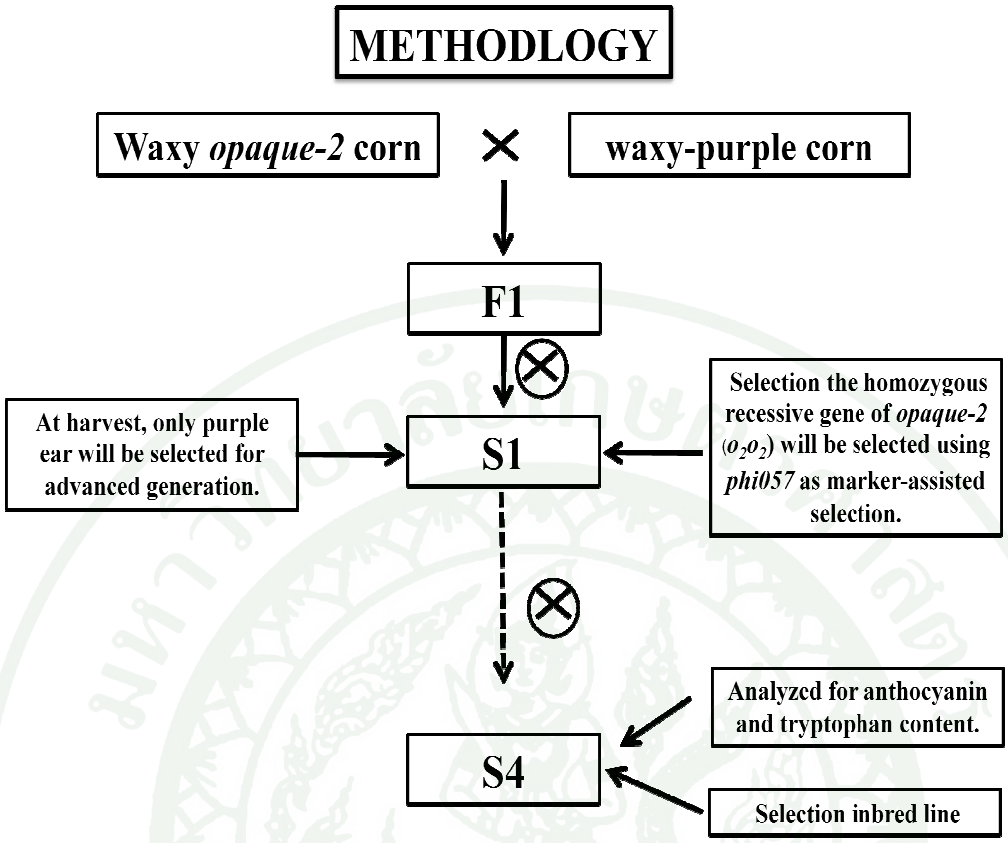
1.6 การทดสอบผลผลิต

นำลูกผสม F_1ทั้ง 8 คู่ผสม มาปลูกทดสอบผลผลิต โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCB) จำนวน 4 ซ้ำ ระยะปลูก 75 x 25 ซม. ปลูกจำนวน 4 แถว แถวยาว 5 เมตร เก็บข้อมูล 2 แถวกลาง มีพันธุ์ร่วมทดสอบ (check) จำนวน 1 พันธุ์ ได้แก่ Sweet white 853

1.7 การวิเคราะห์สมรรถนะการผสม

นำข้อมูลผลผลิตมาวิเคราะห์สมรรถนะการผสมทั่วไป (general combining ability, GCA) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (specific combining ability, SCA) ตามวิธี Line x Tester โดยใช้โปรแกรม R (R, 2013)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 แผนผังการวางแผนการทดลอง

2. การดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอนเอ (DNA) จากใบข้าวโพดใช้วิธีการของ Agrawal *et al.*, 1992 โดยมีการดัดแปลงขั้นตอนดังนี้

1. นำใบข้าวโพดประมาณ 0.2 กรัม (อายุประมาณ 21 วัน) ใส่ลงในโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลว และบดให้ละเอียด ถ่ายผงใบลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตรที่มี 2X CTAB ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. นำหลอดมาบ่มไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งทุกๆ 10 นาที

3. ทิ้งไว้ให้หลอดมาไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เพื่อให้อุณหภูมิลดลง เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นาน 10 นาที

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500 rpm นาน 15 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำ และ Chloroform ออกจากกัน

5. ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ จากนั้นเติม linear polyacrylamide ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เพื่อช่วยในการตกตะกอนดีเอ็นเอ และเติม iso-propanol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ได้สายดีเอ็นเอ

6. เกี่ยวดีเอ็นเอไปใส่ใน 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 rpm นาน 1 นาที เพื่อให้ตกตะกอน

8. เท 70% ethanol ทิ้งแล้วเติม washing buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เคาะข้างหลอดเบาๆ เพื่อละลายเกลือออกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ

9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 rpm นาน 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอนอนก้น

10. เทส่วนน้ำทิ้ง ปล่อยให้แห้ง หรือนำไปใส่ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

11. เติม RNase buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

12. เติมเอนไซม์ RNase A (10 mg/ml) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หรือเติม 7 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

13. เติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เพื่อสกัดเอาเอนไซม์ RNase A และโปรตีนที่อาจหลงเหลืออยู่ออกไป ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมา

14. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12500 rpm นาน 10 นาที

15. ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ สกัดซ้ำด้วย chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมา

16. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12500 rpm นาน 10 นาที

17. ดูดสารละลายใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ เติม linear polyacrylamide ปริมาตร 6 ไมโครลิตร 3 M Sodium acetate ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ absolute ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอซ้ำ

18. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 RPM นาน 5 นาที

19. เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 rpm นาน 2 นาที

20. เทส่วนน้ำทิ้ง ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วละลายตะกอน ดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ต่อไป

2.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

วิธีวัดการดูดกลืนแสงอัลตาไวโอเล็ตโดยใช้ spectrophotometer เป็นวิธีการตรวจสอบคุณภาพ และวัดปริมาณดีเอ็นเอจากการวัดค่า optical density (OD) เนื่องจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ซึ่งสารละลายดีเอ็นเอ เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดูดแสงได้ค่า absorbance ที่ 260 นาโนเมตร (OD_{260}) นำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมไว้มาทำให้เจือจางลงตามปริมาตรที่ต้องการแล้ววัดค่า OD_{260} และนำไปหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้จาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (µg/ml) = OD_{260} X 50 µg/ml X dilution factor การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) จะใช้เพื่อคำนวณหาอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (โปรตีนจะดูดแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร โดยถ้าค่า OD_{260}/ OD_{280} อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 แสดงว่า DNA ที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์ แต่ถ้าอัตราส่วนสูงกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่ และถ้าอัตราส่วนต่ำกว่า 1.7 แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของโปรตีน หรือฟีนอล (สุรินทร์, 2552)

2.3 การวิเคราะห์ Total sugar และ Non-reducing sugar

ปริมาณ Total Sugar และ Non-reducing Sugar วิเคราะห์ด้วยวิธีการของ Nelson (1944) ตามขั้นตอนดังนี้

1. เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่มีอายุประมาณ 18–20 วัน นับจากวันที่ทำการผสม (days after)

2. ฝานตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 20–25 กรัม

3. บดเมล็ดข้าวโพดโดยใช้ blender ให้ละเอียดที่สุด พร้อมกับเติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากับน้ำหนักของตัวอย่างที่ชั่ง ตัวอย่างที่บดนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อต้องการสารแขวนลอยนำไปใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ (ขนาดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเครื่อง centrifuge)

4. ทำการ balancing ตัวอย่างก่อนปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 10,000 rpm นาน 20 นาที

5. กรองด้วยกระดาษกรองใส่หลอดทดลอง

6. เตรียมสารละลายเพื่อวัด Total Sugar และ Reducing Sugar โดยการดูดสารละลาย 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 7.45 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ Total Sugar

1. ดูดสารละลายจากข้อ 6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 0.1 N HCl 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำหลอดทดลองมาแช่น้ำเย็น หรือทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. เติม 0.1 N NaOH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร นำไปหาน้ำตาลตามวิธีการของ Nelson's reducing sugar

การวิเคราะห์ Reducing Sugar

ดูดสารละลายที่สกัดเจือจาง 1 มิลลิลิตร นำไปหาน้ำตาลตามวิธีของ Nelson's reducing sugar

Nelson's reducing sugar

1. ดูดสารละลายตัวอย่าง เติม alkalic copper reagent 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 1) นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำหลอดทดลองมาแช่น้ำเย็นหรือทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. เติม arsenomolybdic reagent 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ 1) เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 12.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ค่า absorbance ที่ได้เปรียบเทียบกับสารละลายมาตราฐาน (standard solution) D-glucose ที่ความเข้มข้น 0.01–0.04% ผลการวิเคราะห์มีหน่วยเป็น mg D-glucose/ml. หรือกรัมน้ำหนักแห้ง

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส

ปริมาณอะไมโลเพคตินวิเคราะห์ตามวิธีการของ (Juliano, 1971) มีขั้นตอนการทำดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. สุ่มตัวอย่างเมล็ดประมาณ 20-30 เมล็ด แช่น้ำกลั่นประมาณ 10 นาที จากนั้นลอกเพอริคาร์พ (pericarp) และแกะส่วนของเอมบริโอ (embryo) ออก ผึ่งลมให้แห้ง บดเมล็ดด้วยเครื่อง cyclone mill ให้มีขนาด 0.08 มิลลิเมตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยชั่ง amylose 0.1 กรัม ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม 95% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เติม 1 N NaOH ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากันดี

3. การเตรียมตัวอย่างทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยชั่งตัวอย่าง 0.02 กรัม เติม 95% ethanol ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติม 1 N NaOH ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร

4. ดูดสารละลายจากข้อ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1 M acetic acid ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ Lugol's solution ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (potassium iodide 2 g: iodine 0.2 g) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วป้องกันไม่ให้โดนแสง 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและทำเช่นเดียวกันอีกแต่ไม่ใส่ตัวอย่างเพื่อใช้เป็น blank

5. เตรียม standard graph โดยดูดสารละลายมาตรฐานจากข้อ 2 ปริมาตร 1, 2, 3, 4, และ 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1 N acetic acid ปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วที่มีสารละลายมาตรฐานตามลำดับ และดูดสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

6. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และเขียนกราฟระหว่างอะไมโลส (g/แป้ง 100 g หรือคิดเป็นร้อยละ 8, 16, 24, 32 และ 40) กับค่าการดูดกลืนแสง

7. เปลี่ยนค่าดูดกลืนแสงเป็นปริมาณอะไมโลส โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ปริมาณตัวอย่าง 0.1 กรัมของแต่ละตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานแล้วอ่านค่าเป็นร้อยละของอะไมโลสต่อแป้ง 100 กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5 การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และปริมาณทริปโตแฟน

1. สุ่มตัวอย่างเมล็ดประมาณ 20-30 เมล็ด แช่น้ำกลั่นประมาณ 10 นาที จากนั้นลอกเพอริคาพ (pericarp) และแกะส่วนของเอมบริโอ (embryo) ออก ผึ่งลมให้แห้งบดเมล็ดด้วยเครื่อง cyclone mill ให้มีขนาด 0.08 มิลลิเมตร

2. นำตัวอย่างที่ได้ไปสกัดไขมันด้วยเครื่องสกัดไขมัน (Extraction Unit B-811 BUCHI) ประมาณ 2 ชั่วโมง โดยใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย ทิ้งไว้ให้แห้งเพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และทริปโตแฟน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ด้วยวิธี Micro-kjeldahl (Bailey, 1967) แล้วนำมาคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนในเมล็ด (N x 6.25) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม ใส่ในหลอดสำหรับ digest จากนั้นเติมผง catalyst 1 กรัม และ 98% H_2SO_4 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (สำหรับ blank ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง)

2. นำไปย่อย (digest) ที่อุณภูมิ 350 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสารละลายตัวอย่างใส ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเจือจางสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่มีฝาปิด

3. การกลั่น ทำโดยใส่สารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเครื่องกลั่น

4. วาง flask ที่บรรจุสารละลาย 4% boric acid ปริมาตร 5 ml + indicator 2-3 หยด (ภาคผนวกที่ 2) ใต้ตัวควบแน่น (condenser) โดยให้ปลายท่อจุ่มลงไปในสารละลายภายใน flask

5. เติม 10 N NaOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กลั่นจนได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. นำสารละลายที่กลั่นได้ไปไตเตรทด้วย standard 0.05018 N H_2SO_4 จนกระทั่งสีของสารละลายใน flask เปลี่ยนเป็นสีเริ่มต้น (สีม่วงแดง) บันทึกปริมาตรของ 0.05018 N H_2SO_4 ที่ใช้

7. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนทั้งหมดได้จากสูตร

$$\%\text{Total nitrogen} = \frac{\left(\text{ml std. } H_2SO_4 \text{ samples} - \text{ml std. } H_2SO_4 \text{ blank}\right) \times 0.05018 \times 0.014 \times 50 \times 10^5}{\text{weight(g)} \times 10 \times 10000}$$

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟน

การตรวจสอบปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนจากการวิเคราะห์หาปริมาณทริปโตแฟนตามวิธีการของ Nurit *et al.* (2009) มีขั้นตอนดังนี้ (แสดงวิธีการเตรียมสารเคมีใน ภาคผนวกที่ 3)

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมัน ปริมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วไฮโดรไลส์ (hydrolyzed) ด้วยสารละลาย papain (Merck, Germany) ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml) ปริมาตร 1.125 มิลลิลิตร สำหรับ blank เติมสารละลาย papain เพียงอย่างเดียว หลังจากเติม papain แล้วต้องนำไปผสมด้วยเครื่องvortex เพื่อให้แป้งกระจายตัวสัมผัสกับสารละลาย papain อย่างทั่วถึง

2. นำตัวอย่างไปบ่ม (incubate) ในตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา16 ชั่วโมง เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแรก นำตัวอย่างมาเขย่าอีกครั้งหนึ่งแล้วนำกลับไปบ่มจนครบ 16 ชั่วโมง

3. เมื่อไฮโดรไลส์ครบ 16 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมาเขย่าอีกหนึ่งครั้ง แล้วปล่อยให้อุณหภูมิเย็นลงตามอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 2500 rpm นาน 5 นาที

4. ดูดส่วนใสด้านบน ปริมาตร 666 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร เติม reagent D ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องvortex นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. นำตัวอย่างออกจากตู้บ่มแล้วปล่อยให้เย็นลงประมาณอุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (nm)

6. สร้างกราฟมาตรฐานจากการเตรียม DL-tryptophan (Merck, Germany) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0, 10, 15, 20, 25 และ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml)

7. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟน (%Try) ได้จากค่าสมการดังนี้

$$\%\text{Try} = \frac{\text{OD}_{560}}{\text{std.curve slope}} \times \frac{\text{hydrolysis volume}}{\text{sample weight}} \times 100\%$$

2.7 การวิเคราะห์แอนโธไซยานิน

1. สุ่มตัวอย่างเมล็ดประมาณ 20-30 เมล็ด บดเมล็ดด้วยเครื่อง cyclone mill ให้มีขนาด 0.08 มิลลิเมตรชั่งตัวอย่างใส่หลอด enpendrof 0.02 g เติม 1%TFA แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นนำไปวางในแนวนอนและนำไปบ่มในน้ำแข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. เขย่าตัวอย่าง 90 นาที ด้วยความเร็ว150 รอบต่อนาที หลังจากบ่มในน้ำแข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดน้ำด้านบนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

3. แล้วนำมาสกัดใหม่ซ้ำอีกครั้งตามวิธีการข้อที่ 2 จากนั้นและเขย่าตัวอย่าง 60 นาที ด้วยความเร็ว150 รอบต่อนาที หลังจากบ่มในน้ำแข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดน้ำด้านบนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 520 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานจากการเตรียม Pelargonidin chloride in 1% TFA ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0, 1, 3, 5, 10 และ 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ แอนโธไซยานิน ได้จากค่าสมการดังนี้

$$\%\ \text{Pel} = \frac{\text{OD}_{520}}{\text{std.curve slope}} \times \frac{\text{hydrolysis volume}}{\text{sample weight}} \times 100\%$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การบันทึกข้อมูล

1. ผลผลิตฝักสดทั้งเปลือก ชั่งน้ำหนักฝักสดทั้งเปลือกในแต่ละแปลงย่อยของแต่ละคู่ผสม เทียบค่าเป็นกิโลกรัมต่อไร่โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{ผลผลิตต่อไร่ (กก./ไร่)} = \frac{\text{น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก} \times 1600}{\text{พื้นที่เก็บเกี่ยว (ม.}^2\text{)}}$$

2. ผลผลิตฝักสดปอกเปลือก ชั่งน้ำหนักฝักสดปอกเปลือกในแต่ละแปลงย่อยเทียบค่าเป็นกิโลกรัมต่อไร่โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{ผลผลิตต่อไร่ (กก./ไร่)} = \frac{\text{น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก} \times 1600}{\text{พื้นที่เก็บเกี่ยว (ม.}^2\text{)}}$$

3. อัตราแลกฝัก (% shelling)

$$\text{อัตราแลกฝัก (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก} \times 100}{\text{น้ำหนักฝักสดทั้งเปลือก}}$$

4. ความแข็งแรงของต้น (plant vigor) ให้คะแนน 1 – 5 โดยนับจำนวนต้นที่อ่อนแอเปรียบเทียบกับต้นที่แข็งแรงในแต่ละแปลงย่อยแล้วเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

1 = ต้นแข็งแรงดี 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีต้นอ่อนแอ และเป็นโรคทางใบ ต้นโตปกติ
2 = ต้นแข็งแรงดี มีจำนวนต้นอ่อนแอไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์
3 = ต้นแข็งแรงปานกลาง มีจำนวนต้นอ่อนแอในช่วง 21 – 35 เปอร์เซ็นต์
4 = ต้นอ่อนแอ มีจำนวนต้นอ่อนแอในช่วง 36 – 49 เปอร์เซ็นต์
5 = ต้นอ่อนแอมาก มีจำนวนต้นอ่อนแอมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

5. วันออกไหม (silking) นับจำนวนวันจากวันให้น้ำจนถึงวันที่จำนวนต้น 50 เปอร์เซ็นต์ของต้นทั้งหมดในแปลงย่อยออกไหมยาว 2 – 3 เซนติเมตร

6. วันที่ช่อดอกตัวผู้บาน (tasseling) นับจำนวนวันจากวันที่ให้น้ำถึงวันที่จำนวนต้น 50 เปอร์เซ็นต์ของต้นทั้งหมดในแปลงย่อยออกดอกครึ่งหนึ่งของช่อดอก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. โรคทางใบ ให้คะแนนต้นที่เป็นโรคทางใบในช่วงก่อนถึงวันเก็บเกี่ยวผลผลิตฝักสด ประมาณ 7 – 14 วัน หรือ ตอนไหมแห้ง และ/หรือ ช่อดอกตัวผู้แห้ง โรคที่ตรวจสอบ ได้แก่ โรคใบไหม้ (leaf blight) โรคใบจุด (leaf spot) โรคราสนิม (rust) และ โรคราน้ำค้าง (downey mildew) ให้คะแนนการเป็นโรค 1 – 5 โดยการนับจำนวนต้นที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่เป็นโรคในแต่ละแปลงย่อยแล้วเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

1 = เป็นโรคน้อยมาก มีจำนวนต้นอ่อนแอไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์
2 = เป็นโรคน้อย มีจำนวนต้นอ่อนแออยู่ในช่วง 6 – 20 เปอร์เซ็นต์
3 = เป็นโรคปานกลาง มีจำนวนต้นอ่อนแออยู่ในช่วง 21 – 35 เปอร์เซ็นต์
4 = เป็นโรคมาก ต้นอ่อนแอ มีจำนวนต้นอ่อนแออยู่ในช่วง 36 – 49 เปอร์เซ็นต์
5 = เป็นโรคมากที่สุด ต้นอ่อนแอมาก มีจำนวนต้นเป็นโรคมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

8. จำนวนต้น นับจำนวนต้นครั้งแรกเมื่อถอนแยก โดยถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น (ระยะปลูก 0.75 X 0.25 เมตร) และนับจำนวนต้นอีกครั้งก่อนเก็บเกี่ยวผลผลิตฝักสดในแต่ละแปลงย่อย

9. จำนวนฝัก นับจำนวนฝักในแต่ละแปลงย่อยที่ระยะเก็บเกี่ยว

10. ความสูงต้น วัดจากพื้นดินถึงโคนใบธง (ข้อใบบนสุดของลำต้น) วัดเมื่อดอกตัวผู้แห้งมีหน่วยเป็นเซนติเมตร

11. ความสูงฝัก วัดจากพื้นดินถึงข้อของฝักบนสุดวัดพร้อมกับความสูงต้นมีหน่วยเป็นเซนติเมตร

12. ลักษณะต้น (plant aspect) สังเกตและบันทึกความสม่ำเสมอของทรงต้น เช่น ลักษณะลำต้นตั้งตรง ความแข็งแรงของต้น ระบบราก ความสูงฝักและต้น การต้านทานโรคและแมลง ให้คะแนน 1 – 5 โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ดังนี้

1 = มีความสม่ำเสมอมากที่สุด มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์
2 = มีความสม่ำเสมอมาก อยู่ในช่วง 80 – 90 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3 = มีความสม่ำเสมอปานกลาง อยู่ในช่วง 70 – 80 เปอร์เซ็นต์
4 = มีความสม่ำเสมอน้อย อยู่ในช่วง 60 – 70 เปอร์เซ็นต์
5 = มีความสม่ำเสมอน้อยที่สุด น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

13. ลักษณะฝักสดปอกเปลือก (ear aspect) พิจารณาจากความสม่ำเสมอของรูปทรงฝัก ขนาดฝัก การติดเมล็ด จำนวนแถวของเมล็ด และการมีแมลงเข้าทำลายฝัก โดยสังเกตจากทุกฝักที่เก็บคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากจำนวนฝักทั้งหมด ให้คะแนน 1 – 5 ดังนี้

1 = มีความสม่ำเสมอมากที่สุด มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์
2 = มีความสม่ำเสมอมาก อยู่ในช่วง 80 – 90 เปอร์เซ็นต์
3 = มีความสม่ำเสมอปานกลาง อยู่ในช่วง 70 – 80 เปอร์เซ็นต์
4 = มีความสม่ำเสมอน้อย อยู่ในช่วง 60 – 70 เปอร์เซ็นต์
5 = มีความสม่ำเสมอน้อยที่สุด น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

14. ลักษณะเปลือกหุ้มฝัก (husk cover aspect) ให้คะแนน 1 – 5 ตามความสม่ำเสมอของเปลือกหุ้มฝัก ดังนี้

1 = เปลือกหุ้มฝักยาว แน่น หุ้มฝักไว้ได้มิด
2 = เปลือกหุ้มฝักค่อนข้างมิด
3 = เปลือกหุ้มฝักมิดชิดปานกลาง
4 = เปลือกหุ้มฝักมิดชิดเล็กน้อย
5 = เปลือกหุ้มฝักไม่ดี ปลายฝักโผล่พ้นเปลือกหุ้มฝัก

15. ลักษณะการติดเมล็ดเต็มถึงปลายฝัก (tip fill) พิจารณาจากความสม่ำเสมอของการมีเมล็ดติดเต็มถึงปลายฝัก สังเกตจากจำนวนฝักทั้งหมด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับจำนวนฝักทั้งหมด ให้คะแนน 1 – 5 คะแนน ดังนี้

1 = มีเมล็ดติดเต็มฝักสม่ำเสมอมากที่สุด มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์
2 = มีเมล็ดติดเต็มฝักความสม่ำเสมอมาก อยู่ในช่วง 80 – 90 เปอร์เซ็นต์
3 = มีเมล็ดติดเต็มฝักความสม่ำเสมอปานกลาง อยู่ในช่วง 70 – 80 เปอร์เซ็นต์
4 = มีเมล็ดติดเต็มฝักความสม่ำเสมอน้อย อยู่ในช่วง 60 – 70 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5 = มีเมล็ดติดเต็มฝักความสม่ำเสมอน้อยที่สุด น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

16. ความยาวฝัก (ear length) วัดจากการสุ่มฝักจำนวน 5 ฝัก มีหน่วยเป็นเซนติเมตร ดังนี้

16.1 ความยาวทั้งฝัก วัดจากส่วนท้ายฝักถึงปลายฝักที่ยาวที่สุด

16.2 ความยาวติดเมล็ด วัดจากส่วนท้ายฝักถึงส่วนปลายฝักที่มีเมล็ดติดสุด

16.3 ความยาวของส่วนปลายฝักที่ไม่ติดเมล็ดหาได้จาก ความยาวฝัก – ความยาวติดเมล็ด

17. เส้นผ่านศูนย์กลางฝัก (ear diameter) และความลึกเมล็ด (kernel length) ทำการวัดไปพร้อมกับการวัดความยาวฝักใช้ฝักเดียวกับที่สุ่มมา ดังนี้

17.1 ความกว้างฝัก วัดโดยการหักฝักข้าวโพดบริเวณกลางฝักทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางฝัก

17.2 ความลึกเมล็ด โดยวัดจากบริเวณของด้านนอกสุดของเมล็ดเข้ามาด้านในบริเวณที่ติดกับซังข้าวโพด

18. การทดสอบการกัดชิม (bite test) โดยใช้ผู้ทดสอบ 3 คนทดสอบการกัดชิมข้าวโพดที่สุ่มเพื่อบอกคุณภาพในการบริโภค แบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

18.1 ความนุ่มเหนียวของเนื้อ

18.2 รสชาติ (รวมทั้งรสและกลิ่น)

18.3 ความหนาบางของเปลือกหุ้มเมล็ด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยให้คะแนน 1 – 5 คะแนน ดังนี้

1 = มีความนุ่มเหนียวมากที่สุดรสชาติดีเยี่ยมและเปลือกเมล็ดบางมากไม่ติดฟันเป็นที่ยอมรับ
2 = มีความนุ่มเหนียมมาก รสชาติดี และเปลือกเมล็ดบางไม่ติดฟัน
3 = มีความนุ่มเหนียวปานกลาง รสชาติดีพอใช้เปลือกเมล็ดค่อนข้างบางค่อนข้างติดฟัน
4 = มีความเหนียวนุ่มเล็กน้อย รสชาติไม่ดี เปลือกเมล็ดหนา ติดฟันมาก
5 = ไม่มีความเหนียวนุ่ม รสชาติแย่มาก และเปลือกเมล็ดหนามากไม่เป็นที่ต้องการ

การวิเคราะห์สมรรถนะการผสม (combining ability)

ประเมินสมรรถนะการผสมทั่วไป (general combining ability, GCA) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (specific combining ability, SCA) ตามวิธีการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์กับตัวทดสอบ (Lines x Tester Analysis) (Singh and Chaudhary, 1979) มีตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ดังนี้

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเมื่อแยกแหล่งความแปรปรวนของพ่อแม่ (parents) คู่ผสม (crosses) พ่อแม่กับคู่ผสม และสายพันธุ์กับตัวทดสอบ

Source of Variations	**Degree of freedom**	**Mean sum square**
Replication	(r-1)	
Treatment	(Lt+L+t)-1	
Parents (P)	(L+t)-1	
P vs C	1	
Crosses (C)	Lt-1	
Lines (L)	L-1	M_L
Testers (T)	T-1	M_T
L x T	(L-1)(T-1)	M_{LT}
Error	r(Lt+L+t)-(Lt+L+t)-(r-1)	M_E
Total	**r(Lt+L+t)**	

r = จำนวนซ้ำ t = จำนวนของสิ่งทดลอง
L = จำนวนสายพันธุ์ T = จำนวนตัวทดสอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (statistical analysis)

นำข้อมูลผลผลิตทั้งหมดของลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์กับตัวทดสอบมาวิเคราะห์ผลทางสถิติตามแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (randomized complete block design; RCBD) ตามวิธีการของ สุรพล (2536) และชูศักดิ์ (2554) ซึ่งมีตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ดังนี้

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์

Source of Variations	**Degree of freedom**
Replication	r-1
Treatments	t-1
Error	(r-1)(t-1)
Total	**tr-1**

r = จำนวนซ้ำ

t = จำนวนของสิ่งทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การสร้างคู่ผสม

จากการผสมสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู ($o_2o_2prprcc$) 2 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) เหนียวสวรรค์ // (Kwi1 / Q53)-BC_1S_4-1-6-2-3-2)-S_1-712 และ 2) บิ๊กไวท์ // (Kwi1 / Q53)-BC_1S_4-1-6-2-3-2)-S_1-110 ผสมกับข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงคือ พันธุ์แฟนซีสีม่วง ($O_2O_2Pr_CC$) ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จำนวน 2 คู่ผสม เนื่องจากในรุ่นลูกผสมชั่วที่ 1 นี้ยีนโอเปกทูจะอยู่มีจีโนไทป์เป็น เฮทเทอไซกัส (heterozygous) จึง ปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ทั้ง 2 คู่ผสม เมื่อถึงระยะออกดอกได้ผสมตัวเอง (self) ได้สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) ซึ่งยีนโอเปกทูมีรูปแบบการกระจายตัวของยีนเป็น homozygous dominant (O_2O_2), heterozygous (O_2o_2) และ homozygous recessive (o_2o_2) ในทั้ง 2 คู่ผสม

2. การตรวจสอบยีน *Opaque-2* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อพัฒนาสายพันธุ์อินเบรด

ผลการคัดเลือกยีนโอเปกทูจากสายพันธุ์ข้าวโพดผสมตัวเองชั่วที่ 1 พบว่า ในคู่ผสมที่ 1 พบต้นข้าวโพด homozygous dominant จำนวน 28 ต้น heterozygous จำนวน 50 ต้น และ homozygous recessive จำนวน 22 ต้น ส่วนในคู่ผสมที่ 2 พบ homozygous dominant จำนวน 30 ต้น heterozygous จำนวน 47 ต้น และ homozygous recessive จำนวน 23 ต้น (ตารางที่ 3) พบว่าการกระจายตัวของยีนโอเปกทูในคู่ผสมที่ 1 เป็นอัตราส่วน $0.28O_2O_2 : 0.50O_2o_2 : 0.22o_2o_2$ ส่วนในคู่ผสมที่ 2 เป็น $0.30O_2O_2 : 0.47O_2o_2 : 0.23o_2o_2$ เมื่อตรวจสอบการกระจายตัวของยีนโอเปกทูด้วยไคสแควร์ (chisquare test) ในทั้ง 2 คู่ผสม พบว่าเป็นไปตามกฎของเมนเดล (Mendel's Law) โดยมีอัตราส่วนของยีนโอเปกทูเป็น $1O_2O_2 : 2O_2o_2 : 1\ o_2o_2$ ทั้ง 2 คู่ผสม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนต้นข้าวโพดข้าวเหนียว opaque-2 ผสมตัวเองชั่วที่ 1 ที่จำแนกจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ *phi057* และตรวจสอบการกระจายตัวของยีนโดยไคสแควร์

คู่ผสม[1/]	จำนวนต้นข้าวโพดที่จำแนกจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057			รวม	ตรวจสอบการกระจายตัวของยีนโอเปกทูด้วยไคสแควร์	
	O_2O_2	O_2o_2	o_2o_2		$1O_2O_2$: $2O_2o_2$:1 o_2o_2[2/]	$3O_2_$:1 o_2o_2[3/]
(1)	28	50	22	100	0.72^{ns}	0.48^{ns}
(2)	30	47	23	100	1.34^{ns}	0.21^{ns}

[1/]คู่ผสม

(1) เหนียวสวรรค์ // (Kwi1 / Q53)-BC1S4-1-6-2-3-2)-S1-712 x purple 111

(2) บิ๊กไวท์ // (Kwi1 / Q53)-BC1S4-1-6-2-3-2)-S1- 110 x purple 111

[2/] df=2 และ [3/] df=1, [ns]Non-significant difference (P> 0.05)

ค่าไคสแควร์จากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่ df =1 คือ 3.84 และ df=2 คือ 5.99 ตามลำดับ

จากนั้นเมื่อถึงระยะออกดอกได้ผสมพันธุ์แบบผสมตัวเอง (self) ของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 ทั้ง 100 ต้นที่เก็บใบมาสกัดดีเอ็นเอ และเมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวได้เก็บฝักข้าวโพดจากทั้ง 100 ต้น แล้วแยกสีของเมล็ดเป็นฝักที่มีเมล็ดสีม่วงและฝักที่มีเมล็ดสีขาว จากการทดลองพบว่า ในฝักเดียวกันจะมีเมล็ดสีเดียวกันเท่านั้น คือ สีขาวหรือสีม่วง ในคู่ผสมที่ 1 ได้ต้นที่มีฝักสีขาว จำนวน 89 ต้น และต้นที่มีฝักสีม่วง จำนวน 11 ต้น ส่วนในคู่ผสมที่ 2 ได้ต้นที่มีฝักสีขาว จำนวน 90 ต้น และต้นที่มีฝักสีม่วง จำนวน 10 ต้น (ตารางที่ 4) จากนั้นนำผลของการตรวจสอบดีเอ็นเอมาพิจารณาร่วมกับสีของฝัก พบว่า ในคู่ผสมที่ 1 ต้นที่แสดงจีโนไทป์เป็น homozygous dominant มีฝักสีขาว 26 ต้น ฝักสีม่วง 2 ต้น heterozygous มีฝักสีขาว 45 ต้น ฝักสีม่วง 5 ต้น และ homozygous recessive มีฝักสีขาว 18 ต้น ฝักสีม่วง 4 ต้น ในคู่ผสมที่ 2 ต้นที่แสดงจีโนไทป์เป็น homozygous dominant มีฝักสีขาว 26 ต้น ฝักสีม่วง 4 ต้น heterozygous มีฝักสีขาว 43 ต้น ฝักสีม่วง 4 ต้น และ homozygous recessive มีฝักสีขาว 21 ต้น ฝักสีม่วง 2 ต้น ดัง (ตารางที่ 4)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะสีของเมล็ดของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1)

คู่ผสม[1/]	จำนวนต้นข้าวโพดที่จำแนกจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 และสีของเมล็ดในระยะเก็บเกี่ยว			รวม	
	O_2O_2 (ขาว, ม่วง)	O_2o_2 (ขาว, ม่วง)	o_2o_2 (ขาว, ม่วง)	ขาว	ม่วง
(1)	28 (26,2)	50 (45,5)	22 (18,4)	89	11
(2)	30 (26,4)	47 (43,4)	23 (21,2)	90	10

[1/]คู่ผสม

(1) เหนียวสวรรค์ // (Kwi1 / Q53)-BC1S4-1-6-2-3-2)-S1-712 x purple 111

(2) บิ๊กไวท์ // (Kwi1 / Q53)-BC1S4-1-6-2-3-2)-S1- 110 x purple 111

ระยะสุกแก่ได้สายพันธุ์ข้าวโพดโอเปกทูสีม่วง (homozygous recessive) จาก 2 คู่ผสม คือ 4 และ 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ

ในฤดูต่อมาได้ปลูกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 (S_2) ที่มียีนโอเปกทูเป็น homozygous recessive และมีฝักสีม่วงของทั้ง 6 สายพันธุ์ แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี มีความแข็งแรง โดยคัดเลือกจากคู่ผสมที่ 1 มาจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ NS-S_2-71-1, NS-S_2-71-8, NS-S_2-190-2, NS-S_2-190-45 และจากคู่ผสมที่ 2 มาจำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ และ BW-S_2-4-3 ดังนั้น จึงคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อพัฒนาเป็นสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงไว้ จำนวน 5 สายพันธุ์ แล้วผสมตัวเองเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3)

นำเมล็ดผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3) มาปลูกสายพันธุ์ละประมาณ 30-35 ต้น และใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ตรวจสอบอีกครั้งหนึ่ง โดยนำใบข้าวโพดที่ต้นข้าวโพดอายุประมาณ 14 วัน จากสายพันธุ์ NS-S_2-71-1 คัดเลือกต้นข้าวโพดทีมีจีโนไทป์เป็น homozygous recessive ไว้ จำนวน 6 ต้น จากสายพันธุ์ NS-S_2-71-8 คัดเลือกไว้ จำนวน 18 ต้น สายพันธุ์ NS-S_2-190-2 คัดเลือกไว้ จำนวน 21 ต้น จากสายพันธุ์ NS-S_2-190-45 คัดเลือกไว้ จำนวน 25 ต้น และสายพันธุ์ที่ 5 (BW-S_2-4-3) คัดเลือกไว้ จำนวน 5 ต้น รวมแล้วในรุ่นผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3) คัดเลือกต้นข้าวโพดที่มียีนโอเปกทูเป็น homozygous recessive (o_2o_2) จากการตรวจสอบดีเอ็นเอ ไว้จำนวน 75 ต้น จากทั้ง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต้นข้าวโพดที่คัดเลือกจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกต้นมียีนโอเปกทูและลักษณะทางการเกษตรที่ดี เมื่อถึงระยะออกดอกผสมตัวเองไว้ และเมื่อถึงระยะสุกแก่คัดแยกฝักโดยใช้สีของเมล็ด พบว่า คัดเลือกข้าวโพดโอเปกทูสีม่วงได้ 57 ฝัก โดยได้จากสายพันธุ์ที่ 1 ถึง 5 จำนวน 2, 16, 16, 18 และ 5 ฝัก ตามลำดับ คิดเป็น 33.3, 88.8, 76.1, 72.0, และ 100 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นข้าวโพดที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous recessive (o_2o_2) ตามลำดับ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงการกระจายตัวของสีฝักของต้นข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (o_2o_2) ที่คัดเลือกไว้ของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3)

สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 (S_2)	**จำนวนต้นคัดเลือก**	**สีเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู ชั่วที่ 3 (S_3)**		**เปอร์เซ็นต์ข้าวโพดโอเปกทูสีม่วง**
		ม่วง	**ขาว**	
1) NS-S_2-71-1	6	2	4	33.3
2) NS-S_2-71-8	18	16	2	88.8
3) NS-S_2-190-2	21	16	5	76.1
4) NS-S_2-190-45	25	18	7	72.0
5) BW-S_2-4-3	5	5	0	100
รวม	**75**	**57**	**18**	**เฉลี่ย =74.04**

จากนั้น นำเมล็ดทั้ง 57 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาปลูกแบบ ear-to-row และผสมตัวเองเพื่อเพิ่มความคงตัวทางพันธุกรรมพร้อมกับคัดเลือกลักษณะที่ดีทางการเกษตรและคัดเลือกฝักที่มีสีม่วงมาปลูกเท่านั้น

การพัฒนาสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง

นำสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงชั่วที่ 3 (S_3) ที่ได้จากการคัดเลือก จำนวน 57 สายพันธุ์ ปลูกและผสมตัวเองเป็น S_4 ปลูกและทำการคัดเลือกแบบ ear-to-row พบว่าข้าวโพดในรุ่นผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3) ทั้ง 57 สายพันธุ์ มีการกระจายตัวของฝักสีต่างๆ ซึ่งเกิดจากยีนที่ควบคุมการเกิดสีของเมล็ด ดังภาพที่ 4 ในการเกิดสีเมล็ด ที่แตกต่างกันนั้น เป็นผลมาจากยีน ซึ่ง Sharma *et al*. (2011)หรือ2011 รายงานว่ายีน *purple aleurone1* (*pr1*) จะสร้างสารสีแดง (pelargonidin)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฝักสีแดง (*prprC_*) เนื่องมาจากการผิดปกติของ hydroxylase ในวงแหวน B ในโครงสร้างของ dihydrokaemoferol (DHK) และสารสีม่วง (cyanidin) ฝักสีม่วง (*Pr_C_*) เนื่องจากสร้าง hydroxylase ได้ตามปกติ

ภาพที่ 5 ลักษณะการกระจายตัวของเมล็ดสีต่างๆ ของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีนโอเปกทู รุ่นผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3)

เพื่อเพิ่มระดับความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygosity) ของยีนตำแหน่งที่ควบคุมการเกิดสีม่วง จึงคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ฝักสีม่วง (Pr_C_) ไว้ นอกจากนี้ยังพบต้นข้าวโพดเกิดลักษณะอินบรีดดิง (inbreeding) กล่าวคือมีลักษณะติดเมล็ดบนเกสรตัวผู้ (tassel-seeds) ดังภาพที่ 5

ภาพที่ 6 ลักษณะการติดเมล็ดบนเกสรตัวผู้ รุ่นผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3)

จากนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี จึงได้สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงรุ่นผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3) จำนวน 6 สายพันธุ์คือ 1) NS-S_2-71-1, 2) NS-S_2-71-8, 3) NS-S_2-190-2, 4) NS-S_2-190-45, 5) และ 6) BW-S_2-4-3 หรือ กำหนดให้เป็น Agwow1,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Agwop2, Agwop3, Agwop4 Agwop5 และ Agwop6 จากการตรวจสอบปริมาณทริปโตแฟนของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู *(o_2o_2)* สีม่วงที่คัดเลือกได้กับพันธุ์เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์สวีทไวท์ 853 และพันธุ์แฟนซีสีม่วง 111 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ไม่มียีนโอเปกทู พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู สีม่วงที่คัดเลือกได้มีปริมาณทริปโตแฟนในเมล็ดอยู่ระหว่าง 0.57-0.79 เปอร์เซ็นต์ สำหรับฝักสด (freshed) และ 0.40-0.56 สำหรับฝักแก่ (dried) ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบทั้งสองพันธุ์ ในส่วนของปริมาณแอนโธไซยานิน (mg/100g) พบว่าสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู สีม่วงที่คัดเลือกได้มีปริมาณแอนโธไซยานินอยู่ระหว่าง 190-250 mg/100g ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบสวีทไวท์ 853 ที่เป็นสีขาว ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาล non-reducing (mg/g) อยู่ระหว่าง 84-130 mg/g และ 42-92 mg/g ตามลำดับ โดยที่ลักษณะทางคุณภาพอื่น ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%) และ ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (%) มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยที่ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู สีม่วง มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ระหว่าง 1.5-2.8% ในฝักสด (freshed) และ 1.6-2.3% ในฝักแก่ (dried) และปริมาณโปรตีนทั้งหมดอยู่ระหว่าง 9.3-17.5% ในฝักสด (freshed) และ 10.2-14.3 % ในฝักแก่ (dried) ขณะที่พันธุ์สวีทไวท์ 853 มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.9% ในฝักสด (freshed) และ 1.6 % ในฝักแก่ (dried) และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 11.6 % (freshed) และ 10.2 % (dried) ตามลำดับ ส่วนพันธุ์แฟนซีสีม่วง 111 มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.7 % เท่ากันทั้งฝักสดและฝักแก่ และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 10.4 % เท่ากันทั้งฝักสดและฝักแก่ ส่วนปริมาณอะไมโลเปกติน (%) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 6)

ทั้งนี้ไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณไลซีนเนื่องจากไลซีน และทริปโตแฟน มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากโดยในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดโอเปกทู ถ้าค่าปริมาณของทริปโตแฟนในโปรตีนมีค่าสูงจะพบว่าค่าปริมาณของไลซีนสูงเช่นเดียวกัน โดยมีสัดส่วนประมาณ 1:4 ของทริปโตแฟน: ไลซีน (Hernandez and Bates, 1969; Prasanna *et al*., 2001)

การทดสอบลักษณะที่ดีทางการเกษตรจากสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู สีม่วงที่คัดเลือกได้ พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เปรียบเทียบ โดยมีผลผลิตทั้งเปลือกอยู่ระหว่าง 423-544 กิโลกรัมต่อไร่ ผลผลิตปอกเปลือกอยู่ระหว่าง 226-294 กิโลกรัมต่อไร่ และ อัตราแลกฝัก (%) มีค่าระหว่าง 44.8-55.6 % ส่วนพันธุ์เปรียบเทียบ สวีทไวท์ 853 มีผลผลิตทั้งเปลือก 1854.5 กิโลกรัมต่อไร่ ผลผลิตปอกเปลือก1535.9 กิโลกรัมต่อไร่ และ อัตราแลกฝัก (%) มีค่าเท่ากับ 82.8 % (ตารางที่ 7)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนลักษณะทางการเกษตรของสายพันธุ์ที่แสดงในตารางที่ 7 พบว่า วันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 49-51 วัน ส่วนวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 51-53 วัน ขณะที่พันธุ์เปรียบเทียบ วันออกไหมและ วันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 49-50 วัน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาพบว่า มีวันออกไหมสายพันธุ์อินเบรดออกดอกใกล้เคียงพันธุ์เปรียบเทียบ และวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ เร็วกว่าพันธุ์เปรียบเทียบ ประมาณ 1-2 วัน อย่างไรก็ตาม วันออกไหม และวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกันหรือต่างกัน 1 วัน ซึ่งเหมาะแก่การนำไปใช้ผลิตลูกผสมทางการค้าต่อไป ส่วนความสูงต้น อยู่ระหว่าง 109-145 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์สวีทไวท์ 853 มีความสูง 156 เซนติเมตร ซึ่งเตี้ย ส่วนความสูงฝัก อยู่ระหว่าง 40-79 เซนติเมตร และพันธุ์เปรียบเทียบ มีความสูงฝักอยู่ระหว่าง 62 เซนติเมตร (ตารางที่ 7)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยลักษณะคุณภาพของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงที่คัดเลือกได้ จำนวน 6 สายพันธุ์และสายพันธุ์เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ทริปโตแฟน (%)		แอนโธไซยานิน (mg/100g)		อะไมโลเปกติน (%)		ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%)		โปรตีน (%)		น้ำตาล (mg/g)	
	ฝักสด	ฝักแก่	ฝักสด	ฝักแก่	ฝักสด	ฝักแก่	ฝักสด	ฝักแก่	ฝักสด	ฝักแก่	TS[/1]	non-RS[/2]
Agwow1	0.62	0.55	20	20	94.7	97.8	2.1	1.8	13.1	11.5	130.	92
Agwop2	0.65	0.49	250	150	95.8	96.5	1.5	1.7	9.3	10.4	84	51.
Agwop3	0.57	0.46	190	210	96.9	97.6	1.7	2.0	10.4	12.6	79	44
Agwop4	0.78	0.42	190	160	95.3	97.8	2.8	2.3	17.5	14.2	94	61
Agwop5	0.65	0.41	200	60	97.1	96.8	1.6	1.6	10.2	10.2	79	42
Agwop6	0.66	0.39	230	270	96.8	97.2	1.5	1.8	9.3	11.5	114	87
Sweet white 853	0.26	0.15	7	2	96.9	97.3	1.9	1.6	11.6	10.2	190.	142
Fancy 111	0.26	0.24	180	30	95.1	97.0	1.7	1.7	10.4	10.4	188	139
F-test	**	**	**	**	ns	ns	**	**	**	**	*	*
LSD.05	0.08	0.04	0.08	0.005	-	-	0.14	0.14	0.89	0.88	66.07	3.89
%CV	7.66	7.03	28.79	2.44	0.73	0.66	3.52	0.14	3.51	31.99	22.9	26.5

[1/]TS = total sugar, [2/] non-RS = non-reducing sugar, ns = non significant differences, *, ** = significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยลักษณะทางการเกษตรของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง จำนวน 6 สายพันธุ์และสายพันธุ์เปรียบเทียบ 1 สายพันธุ์

สายพันธุ์	วันออกดอก(50%)		ความสูง(cm.)		น้ำหนักทั้งเปลือก	น้ำหนักปอกเปลือก	อัตราแลกฝัก
	ดอกตัวผู้	ไหม	ต้น	ฝัก	(กก./ไร่)	(กก./ไร่)	(%)
Agwow1	52	49	109.7	46.7	498.6	226.3	45.5
Agwop2	51	49	144.3	60.7	525.4	294.1	55.6
Agwop3	52	50	135.3	45.3	498.6	266.9	54.1
Agwop4	53	51	145.0	51.7	423.2	236.5	55.5
Agwop5	51	49	144.3	79.7	544.2	278.9	51.2
Agwop6	51	49	127.0	40.7	526.1	236.9	44.8
เฉลี่ย	**51.4**	**49.4**	**137.4**	**55.3**	**502.2**	**256.6**	**51.2**
Sweet white 853	**50**	**49**	**156.0**	**62.0**	**1854.5**	**1535.9**	**82.8**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยของลักษณะคุณภาพลูกผสมของข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง จำนวน 8 คู่ผสมและพันธุ์เปรียบเทียบ 1 พันธุ์

สายพันธุ์	ทริปโตแฟน(%)		แอนโธไซยานิน (mg/100g)		อะไมโลเปกติน(%)		ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด(%)		โปรตีน(%)		น้ำตาล(mg/g)	
	ฝักสด	ฝักแก่	ฝักสด	ฝักแก่	ฝักสด	ฝักแก่	ฝักสด	ฝักแก่	ฝักสด	ฝักแก่	TS[/1]	non-RS[/2]
Agwow1xAgwop5	0.70	0.48	210	370	97.5	97.5	1.7	2.2	10.4	13.9	345	9
Agwop2xAgwop5	0.57	0.46	280	280	97.8	97.3	1.8	1.7	11.7	10.4	47	25
Agwop3xAgwop5	0.58	0.68	220	330	97.2	97.5	1.7	1.4	10.4	8.6	119	93
Agwop4xAgwop5	0.61	0.61	260	320	96.9	97.4	1.8	1.4	11.7	8.6	90	59
Agwow1xAgwop6	0.60	0.48	220	210	97./	97.6	1.2	1.7	7.7	10.4	72	51
Agwop2xAgwop6	0.79	0.52	160	210	97.5	97.3	1.4	1.8	8.6	11.7	103	74
Agwop3xAgwop6	0.61	0.51	80	190	97.1	97.4	1.8	1.5	11.7	9.3	131	107
Agwop4xAgwop6	0.55	0.39	220	60	97.3	97.2	1.5	1.6	9.3	10.1	60	41
Sweet white 853	0.26	0.24	7	2	96.9	97.3	1.7	1.7	10.4	10.4	188	139
F-test	**	***	*	***	ns	ns	**	**	**	**	**	*
LSD.05	0.22	0.13	0.11	0.11	-	-	0.11	0.13	0.61	0.75	62.98	72.61
%CV	21.77	18.95	33.75	32.15	0.73	0.66	3.49	3.93	3.15	3.50	29.05	47.09

[1/]TS = total sugar, [2/] non-RS = non-reducing sugar, ns = non significant differences, *, ** = significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยลักษณะทางการเกษตรของข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง จำนวน 8 คู่ผสมและพันธุ์เปรียบเทียบ 1 พันธุ์

สายพันธุ์	วันออกดอก (50%)		ความสูง (cm.)		น้ำหนักทั้งเปลือก	น้ำหนักปอกเปลือก	อัตราแลกฝัก	อัตราฝาน
	ดอกตัวผู้	ไหม	ต้น	ฝัก	(กก./ไร่)	(กก./ไร่)	(%)	(%)
Agwow1xAgwop5	50	48	174	85	1820.4	1592.8	67.62	47.44
Agwop2xAgwop5	50	48	179	88	1820.4	1535.9	79.41	47.63
Agwop3xAgwop5	50	48	165	68	1649.7	1479.1	72.70	61.28
Agwop4xAgwop5	49	47	162	76	1763.5	1479.1	66.71	55.53
Agwow1xAgwop6	51	49	178	76	1934.1	1706.6	70.12	55.21
Agwop2xAgwop6	49	47	173	73	1649.7	1479.1	70.22	57.14
Agwop3xAgwop6	50	48	150	64	1592.8	1422.2	71.31	51.39
Agwop4xAgwop6	50	48	141	56	1194.6	1137.7	74.83	48.44
Sweet white 853	52	49	156	71	1649.7	1085.00	70.30	36.28
F-test	**	**	ns	ns	**	**	ns	**
LSD.05	1.24	1.95	-	-	414.21	326.18	-	9.70
%CV	1.54	2.39	13.86	14.23	15.93	17.59	12.29	13.52

ns =nonsignificant differences, *, ** = significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะคุณภาพของสายพันธุ์ลูกผสม

จากการผสมแบบ line x tester ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ 4 สายพันธุ์ 2 ตัวทดสอบ ได้ลูกผสม 8 คู่ผสม เมื่อนำมาปลูกประเมินสายพันธุ์ พบว่า ปริมาณทริปโตแฟน (%) ในเมล็ดสด (freshed) และเมล็ดแห้ง (dried) มีความแตกต่างทางสถิติ โดยสายพันธุ์ลูกผสมให้ค่าสูงกว่าสายพันธุ์ สวีทไวท์ 853 และพันธุ์แฟนซีสีม่วง 111 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่มียีนโอเปกทู (o_2o_2) โดยที่สายพันธุ์ลูกผสมมีปริมาณทริปโตแฟนในเมล็ดสดและเมล็ดแก่อยู่ระหว่าง 0.50-0.79% และ 0.40-0.78% ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ สวีทไวท์ 853 และพันธุ์แฟนซีสีม่วง 111 มีปริมาณทริปโตแฟนในเมล็ดสดอยู่ 0.26 และ 0.27 % ตามลำดับ ในเมล็ดแก่พันธุ์ สวีทไวท์ 853 และพันธุ์แฟนซีสีม่วง 111 มีปริมาณทริปโตแฟนอยู่ 0.15 และ 0.24% ตามลำดับ ส่วนปริมาณแอนโธไซยานิน (mg/100g) ในเมล็ดของสายพันธุ์ลูกผสมมีปริมาณอยู่ระหว่าง 80-280 mg/100g ในฝักสด (freshed) และ 60-370 mg/100g (dried) ซึ่งมากกว่าพันธุ์ สวีทไวท์ 853 ที่เป็นสีขาว ซึ่งมีปริมาณแอนโธไซยานิน 7 mg/100g (freshed) และไม่พบแอนโธไซยานินในฝักแก่ ส่วนปริมาณ Amylopectin (%) ในตัวอย่างเมล็ดสด (freshed) และ ตัวอย่างเมล็ดแก่ (dried) พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยสายพันธุ์ลูกผสมมีปริมาณ Amylopectin ประมาณ 97% ทั้งฝักสดและฝักแก่ เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เปรียบเทียบ 2 พันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ลูกผสมมีค่าใกล้เคียงกับพันธุ์เปรียบเทียบ โดยมีปริมาณ Amylopectin อยู่ช่วง 95-96% ฝักสด (freshed) และ 97% ฝักแก่ (dried) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Boyer and Hannah (2001) กล่าวว่ายีน *waxy* ในข้าวโพดข้าวเหนียวจะสะสมแป้ง amylopectin เกือบ 100% ส่วนปริมาณน้ำตาล (mg/g) มีความแตกต่างทางสถิติ พบว่าปริมาณน้ำตาล (mg/g) ในพันธุ์เปรียบเทียบ 2 พันธุ์ให้ค่าสูงกว่าสายพันธุ์ลูกผสมที่ทำการทดสอบทั้งใน total sugar และ non-reducing sugar ในขณะที่ปริมาณโปรตีนของสายพันธุ์ลูกผสมมีค่าอยู่ระหว่าง 7.7-11.7% (freshed) และ 8.6-113.9% (dried) และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ระหว่าง 1.2-1.8% (freshed) และ 1.4-2.2% (dried) (ตารางที่ 8)

ลักษณะทางการเกษตรของสายพันธุ์ลูกผสม

ผลผลิตทั้งเปลือก พบว่า คู่ผสม Agwow1xAgwop6 ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 1,934 กก./ไร่ ซึ่งสอดคล้องกับผลผลิตปอกเปลือก ที่ให้ค่าสูงที่สุดเช่นกันเท่ากับ 1,706 กก./ไร่ ขณะที่อัตราแลกฝัก(%) พบว่าคู่ผสม Agwow4xAgwop6 ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 74.83% (ตารางที่ 9)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนลักษณะทางการเกษตรของลูกผสมที่แสดงใน ตารางที่ 9 วันออกไหมอยู่ในช่วง 47-49 วัน และวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 49-52 วัน ขณะที่พันธุ์เปรียบเทียบ มีวันออกไหมและวันออกดอกตัวผู้ อยู่ในช่วง 49-50 วัน เมื่อพิจารณาพบว่า มีวันออกดอก และวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์เร็วกว่าพันธุ์เปรียบเทียบ ประมาณ 2-3 วัน ส่วนความสูงต้น อยู่ระหว่าง 141-179 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์สวีทไวท์ 853 ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมเดี่ยวทางการค้า มีความสูง 156 เซนติเมตร ส่วนความสูงฝัก อยู่ระหว่าง 56-88 เซนติเมตร ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ปกติ และพันธุ์เปรียบเทียบ มีความสูงฝักอยู่อยู่ระหว่าง 71 เซนติเมตร จัดว่าอยู่ในเกณฑ์ปกติเช่นกัน

สมรรถนะการผสมของลักษณะผลผลิต (Combining ability analysis)

จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ 4 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์ทดสอบ 2 สายพันธุ์ ได้ลูกผสมชั่วแรก 8 คู่ผสม เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนตามวิธีการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์กับสายพันธุ์ทดสอบในลักษณะผลผลิตทั้งเปลือก พบว่า ลูกผสมมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนสายพันธุ์และสายพันธุ์ทดสอบไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 10)

อิทธิพลของสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (GCA) และสมรรถนะการรวมตัวเฉพาะ (SCA) โดยอิทธิพลของสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (GCA) มีความสำคัญมากกว่าสมรรถนะการรวมตัวเฉพาะ (SCA) สายพันธุ์ที่มีสมรรถนะการผสมทั่วไปดีที่สุด (GCA) คือ Agwow1 นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์อินเบรดที่ให้ค่าสมรรถนะการผสมทั่วไปเป็นบวกอีก คือ Agwop2และAgwop5 คู่ผสมที่ให้สมรรถนะการผสมเฉพาะสูงที่สุด ได้แก่ Agwop4xAgwop5 และยังมีอีก 3 คู่ผสมที่ให้ค่าสมรรถนะการผสมเฉพาะเป็นบวกอีก คือ Agwow1xAgwop6, Agwop3xAgwop6, Agwop1xAgwop5 (ตารางที่ 11)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะผลผลิตฝักสดทั้งเปลือก และปอกเปลือกของลูกผสม จำนวน 8 คู่ผสม โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนตามวิธีการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์กับสายพันธุ์ทดสอบ

Source of Variations	Degree of freedom	Mean square	
		ผลผลิตฝักสดทั้งเปลือก	ผลผลิตฝักสดปอกเปลือก
Replication	2	108185.76^{ns}	33973.77^{ns}
Treatment	13	726573.64**	694078.75**
Parents (P)	5	110350.77*	126865.00*
P vs C	1	7825827.00**	7825627.63**
Crosses (C)	7	152553.79**	80438.72^{ns}
Lines (L)	3	171515.58^{ns}	119742.26^{ns}
Testers (T)	1	174728.53^{ns}	43673.6^{ns}
L x T	3	126200.42*	53390.22^{ns}
Error	26	40221.34	33978.15^{ns}
Total	**41**	**-**	**-**

ns = non significant differences, * and ** = significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 สมรรถนะในการผสมทั่วไป (GCA) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) ของลักษณะฝักสดทั้งเปลือกของสายพันธุ์ 4 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ทดสอบ 2 สายพันธุ์

สายพันธุ์(Line)	สายพันธุ์ทดสอบ (Tester)		GCA
	Agwop5	Agwop6	
Agwow1	-142.225	142.225	199.108
Agwop2	0.008	-0.008	56.875
Agwop3	-56.875	56.875	-56.875
Agwop4	199.092	-199.092	-199.108
GCA	**85.325**	**-85.325**	

หมายเหตุ

ค่า Standard Error (S.E.) ของ GCA สำหรับสายพันธุ์ (Line) = 81.87

ค่า Standard Error (S.E.) ของ GCA สำหรับสายพันธุ์ทดสอบ (tester) = 57.89

ค่า Standard Error (S.E.) ของ SCA effect = 115.78

สำหรับการวิเคราะห์ความแปรปรวนของสายพันธุ์กับสายพันธุ์ทดสอบในลักษณะผลผลิตปอกเปลือก พบว่า ลูกผสม สายพันธุ์และสายพันธุ์ทดสอบไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 10)

ส่วนการวิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัวในลักษณะผลผลิตปอกเปลือก ในตารางที่ 12 พบว่า สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ให้สมรรถนะการผสมทั่วไปดี (GCA) คือ Agwow1 นอกจากนี้ ยังมีสายพันธุ์ที่ให้ค่าสมรรถนะการผสมทั่วไปเป็นบวกอีก คือ Agwop2, Agwop5 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัวทั่วไปในลักษณะผลผลิตทั้งเปลือก ส่วนสมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) ของผลผลิตปอกเปลือกดีที่สุด คือ Agwow3xAgwop5 และ ยังมีอีก 4 คู่ผสมที่ให้ค่าสมรรถนะการผสมเฉพาะเป็นบวกอีก คือ Agwow4xAgwop6, Agwop1xAgwop6 และ Agwop2xAgwop6 เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัวทั่วไปในลักษณะผลผลิตทั้งเปลือก (ตารางที่ 11)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 สมรรถนะในการผสมทั่วไป (GCA) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) ของลักษณะฝักสดปอกเปลือกของ สายพันธุ์ 4 สายพันธุ์และสายพันธุ์ทดสอบ 2 สายพันธุ์

สายพันธุ์(Line)	สายพันธุ์ทดสอบ (Tester)		GCA
	Agwop5	Agwop6	
Agwow1	-14.22	14.22	170.65
Agwop2	-14.22	14.22	28.42
Agwop3	127.99	-127.99	-28.42
Agwop4	-99.54	99.54	-170.65
GCA	**42.65**	**-42.65**	

หมายเหตุ

ค่า Standard Error (S.E.) ของ GCA สำหรับสายพันธุ์ (Line) = 75.25

ค่า Standard Error (S.E.) ของ GCA สำหรับสายพันธุ์ทดสอบ (tester) = 53.21

ค่า Standard Error (S.E.) ของ SCA effect = 106.42

การประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะคุณภาพของฝักแก่

จากตารางที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางคุณภาพ (biochemical traits) ฝักแก่ของลูกผสม 4 ลักษณะ ได้แก่ ปริมาณอะไมโลเปกติน, แอนโธไซยานิน ทริปโตแฟน และโปรตีน พบว่าให้ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ไม่มีความสัมพันธ์กันในระดับที่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่13) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลักษณะต่างๆ มีความเป็นอิสระในการแสดงออก ดังนั้นข้าวโพดโอเปกทูซึ่งมีปริมาณอะไมโลเปกตินสูง ก็สามารถที่จะเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนสูงได้ และนอกจากนี้ ยังสามารถเพิ่มปริมาณแอนโธไซยานินให้สูงขึ้นได้เช่นเดียวกัน ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่าข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง เป็นข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีคุณค่าทางอาหารสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางชีวเคมีและคุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวฝักแก่ที่มียีน *opaque-2* จำนวน 8 คู่ผสม

Traits	Amylopectin	Tryptophan	Anthocyanin	Protein
Amylopectin	-	-0.006^{ns}	0.28^{ns}	0.32^{ns}
Tryptophan		-	0.55^{ns}	-0.55^{ns}
Anthocyanin			-	0.01^{ns}
Protein				-

ns = non significant differences

การประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะคุณภาพของฝักสด

จากตารางที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ลักษณะที่เกี่ยวข้องของคู่ผสมลักษณะทางคุณภาพ (biochemical traits) ของข้าวโพดลูกผสมฝักสด พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งมีความสัมพันธ์อย่างมากกับปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (non-reducing sugar) ส่วนลักษณะคุณภาพอื่นๆ ไม่มีความสัมพันธ์กัน

ตารางที่ 14 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางชีวเคมีและคุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวฝักสดที่มียีน *opaque-2* จำนวน 8 คู่ผสม

Fresh	Amylopectin	Tryptophan	Anthocyanin	TS[1/]	NRS[2/]	Protein
Amylopectin	-	0.52^{ns}	-0.35^{ns}	-0.26^{ns}	-0.20^{ns}	0.39^{ns}
Tryptophan		-	-0.68^{ns}	-0.19^{ns}	-0.21^{ns}	0.06^{ns}
Anthocyanin			-	0.41^{ns}	0.39^{ns}	0.23^{ns}
TS				-	0.99**	-0.08^{ns}
NRS					-	-0.08^{ns}
Protein						-

[1/]TS = total sugar, [2/] non-RS = non-reducing sugar

ns = non significant differences, ** = significant difference 0.01

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะทางพืชไร่ของสายพันธุ์อินเบรด

สายพันธุ์อินเบรดที่สกัดได้มีลักษณะที่ค่อนข้างดีและสม่ำเสมอกันมีลักษณะแตกต่างกันทางสถิติ โดยที่สายพันธุ์ Agwop5 ที่ใช้เป็นตัวทดสอบนั้นมีลักษณะทรงต้นที่ดีที่สุดในสายพันธุ์อินเบรดที่คัดเลือกได้ ส่วนลักษณะความแข็งแรงของลำต้นและการต้านทานโรคทางใบนั้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จะเห็นได้ว่าสายพันธุ์ Agwop3 นั้นมีความแข็งแรงของลำต้นมากที่สุด ส่วนสายพันธุ์ Agwop4 จะต้านทานโรคทางใบมากที่สุด

สำหรับลักษณะฝักสดของสายพันธุ์อินเบรดแสดงในตารางที่ 15 เมื่อพิจารณาภาพรวม คือ ลักษณะการติดเมล็ดไม่เต็มฝัก โดยความยาวทั้งฝักอยู่ในช่วง 13.08-14.66 เซนติเมตร ความยาวติดเมล็ดอยู่ในช่วง 11.72-13.64 เซนติเมตร และความยาวส่วนปลายของฝักอยู่ในช่วง 0.37-1.77 เซนติเมตร และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เปรียบเทียบ สวีทไวท์ 853 พบว่า มีความยาวทั้งฝัก 17.6 เซนติเมตร ความยาวติดเมล็ด14.43 เซนติเมตร และความยาวส่วนปลายของฝัก 3.16 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับสายพันธุ์อินเบรดที่สกัดได้

ส่วนความกว้างของฝักของสายพันธุ์อินเบรด พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยความกว้างฝักของสายพันธุ์อินเบรดอยู่ในช่วง 3.68-3.80 เซนติเมตร ส่วนสายพันธุ์เปรียบเทียบมีความกว้างของฝัก 4.40 เซนติเมตร ส่วนจำนวนแถวสายพันธุ์อินเบรดอยู่ในช่วง 12-14 แถว ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ส่วนคุณภาพการรับประทานของสายพันธุ์อินเบรดในส่วนของความหนาของเพอริคาร์พมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยที่สายพันธุ์ Agwow1, Agwop3 และ Agwop5 มีความหนาของเพอริคาร์พน้อยที่สุด ส่วนความนุ่มและความเหนียวนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ลักษณะทางพืชไร่ของลูกผสมเดี่ยว

เมื่อพิจารณาความแข็งแรงของต้น พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติกับพันธุ์สวีทไวท์ 853 โดยที่ คู่ผสม Agwow1xAgwop5 และ Agwop2xAgwop5 มีความแข็งแรงที่สุด ในกลุ่มลูกผสมที่ผลิตได้ ด้านความต้านทานโรคทางใบ พบว่าสายพันธุ์คู่ผสม Agwow1xAgwop5, Agwop2xAgwop5, Agwop4xAgwop5 และ Agwop2xAgwop6 มีความต้านทานโรคทางใบได้ดีที่สุดและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของพันธุ์เปรียบเทียบ ส่วนลักษณะทรงต้นนั้นลูกผสมที่ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีทรงต้นที่ดีและสม่ำเสมอกันทั้ง 8 คู่ผสมซึ่งทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.66-3.66 คะแนน ซึ่งใกล้เคียงกับพันธุ์เปรียบเทียบ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ส่วนคะแนนคุณภาพในการรับประทานของทั้ง 8 คู่ผสมมีความแตกต่างทางสถิติกันที่ความหนาของเพอริคาร์พ โดยพันธุ์ที่มีความหนาของเพอริคาร์พ มากที่สุดคือ Agwop4xAgwop6 ส่วนลักษณะอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติส่วนของคุณภาพในการรับประทานที่ดีที่สุด คือ มีความเหนียวนุ่ม คือคู่ผสม Agwop4xAgwop5, Agwow1xAgwop6 และ มีคะแนน เมื่อเปรียบเทียบพันธุ์เปรียบเทียบกับพันธุ์สวีทไวท์ 25 ซึ่งเป็นพันธุ์การค้าที่มีคะแนนคุณภาพในการรับประทานดีที่สุด

สำหรับลักษณะฝักสดของทั้ง 8 คู่ผสม เมื่อพิจารณาภาพรวม คือ ลักษณะการติดเมล็ดไม่เต็มฝัก มีความยาวทั้งฝักและความยาวติดเมล็ดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยมีความยาวทั้งฝักอยู่ในช่วง 15.00-19.44 เซนติเมตร โดยที่คู่ผสม Agwop2xAgwop5 มีความยาวฝักมาก และความยาวฝักติดเมล็ดอยู่ในช่วง 12.25-16.28 เซนติเมตร โดยที่คู่ผสม Agwop2xAgwop5 มีความยาวติดเมล็ดมากที่สุด ส่วนความกว้างของฝักและจำนวนแถวของคู่ผสมทั้งหมดนี้ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยคู่ผสม Agwow1xAgwop6 มีความกว้างของฝักคือ 4.24 เซนติเมตร ส่วนลักษณะของจำนวนแถวมีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่พันธุ์ที่มีจำนวนแถวมากที่สุดคือ Agwow1xAgwop6 มี 16 แถว เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์สวีทไวท์ 25 มีความกว้างของฝักและจำนวนแถวน้อยกว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 15 ผลผลิตฝักสดและลักษณะเกษตรที่สำคัญของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* สีม่วง จำนวน 6 สายพันธุ์

สายพันธุ์	คะแนน[1/] (1-5)					ความยาวฝัก(ซม.)					
	ความแข็งแรง	ต้านทานโรคทางใบ	ลักษณะทรงต้น	ความนุ่ม	ความเหนียว	ความหนาของเพอริคาร์พ	ความยาวทั้งฝัก	ความยาวติดเมล็ด	ความยาวส่วนปลาย	ความกว้างฝัก	จำนวนแถวต่อฝัก
Agwow1	3	2	2	3	2	2	14.34	13.21	1.13	3.74	14.00
Agwop2	1.5	1.5	3	2.5	2.5	3	14.47	12.70	1.77	3.72	13.33
Agwop3	1	1.5	2.5	2	2.5	2	14.66	13.64	1.02	3.70	12.00
Agwop4	1.5	1	3	2.5	2	3	13.89	13.52	0.37	3.70	13.33
Agwop5	2	2	3.5	2.5	2	2	13.4	11.72	1.68	3.68	12.66
Agwop6	1.5	2.5	2.5	2.5	2	2.5	13.08	12.41	0.67	3.80	13.33
Sweet white 853	1	1	4	2.5	3	2	17.6	14.43	3.16	4.40	13.33
F-test	ns	ns	*	ns	ns	*	**	**	**	**	ns
LSD.05	-	-	0.92	-	-	0.65	1.23	1.24	1.09	0.15	-
%CV	46.01	29.70	12.90	25.44	17.86	11.33	4.77	5.35	43.66	2.26	8.01

[1/]คะแนน 1-5; 1 = ยอมรับ และ 5 ไม่เป็นที่ยอมรับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 16 ผลิตฝักสดและลักษณะเกษตรของพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มียีน *opaque-2* สีม่วงจำนวน 8 คู่ผสม และพันธุ์เปรียบเทียบ

สายพันธุ์	คะแนน[1/] (1-5)						ความยาวฝัก(ซม.)			ความกว้างฝัก	จำนวนแถวต่อฝัก
	ความแข็งแรง	ต้านทานโรคทางใบ	ลักษณะทรงต้น	ความนุ่ม	ความเหนียว	ความหนาของเพอริคาร์พ	ความยาวทั้งฝัก	ความยาวติดเมล็ด	ความยาวส่วนปลาย		
Agwow1xAgwop5	3.00	2.33	3.66	3.00	2.50	2.50	18.28	15.08	3.20	4.40	14.00
Agwop2xAgwop5	3.00	3.00	3.66	3.00	3.00	2.00	19.44	16.28	3.16	4.00	14.00
Agwop3xAgwop5	2.66	3.00	3.00	3.00	3.50	2.00	17.00	14.27	3.64	4.24	14.00
Agwop4xAgwop5	2.66	3.00	3.66	3.00	4.00	2.00	16.24	12.60	2.96	4.08	15.33
Agwow1xAgwop6	2.33	3.00	3.33	3.50	3.50	2.00	18.52	14.38	3.16	4.35	16.00
Agwop2xAgwop6	2.66	2.66	3.66	2.00	2.50	2.00	17.72	14.56	3.16	4.16	13.33
Agwop3xAgwop6	2.33	2.66	3.33	2.50	3.00	2.00	15.00	12.25	2.74	4.10	14.66
Agwop4xAgwop6	2.33	4.00	2.66	4.00	3.00	3.50	16.12	12.46	3.66	3.90	13.33
Sweet white 853	1.00	1.00	4	2.50	3.00	2.00	17.60	14.43	3.16	4.40	13.33
F-test	*	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*
LSD.05	0.88	-	-	-	-	0.71	-	-	-	-	1.71
%CV	19.84	27.55	21.91	22.28	15.15	14.03	11.91	14,78	37.63	9.22	6.41

[1/]คะแนน 1-5; 1 = ยอมรับ และ 5 ไม่เป็นที่ยอมรับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุป และข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การเพิ่มปริมาณแอนโธไซยานินในข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (*opaque-2*) โดยการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูกับข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง (Fancy Purple 111) ซึ่งมีปริมาณสารแอนโธไซยานินสูง ประสบความสำเร็จ สามารถคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงในรุ่นลูกได้สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4)

2. เครื่องดีเอนเอ *phi057* สามารถแยกความแตกต่างของยีนโอเปกทูในรุ่นลูกได้อย่างชัดเจน ทั้ง 3 ชนิด กล่าวคือ homozygous dominant (O_2O_2), heterozygous (O_2o_2) และ homozygous recessive (o_2o_2) ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ของการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการในรุ่นลูกชั่วต่างๆ

3. สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) ที่คัดเลือกไว้ มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนอยู่ระหว่าง 0.57-0.78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าสายพันธุ์การค้าสวีทไวท์ 853 (0.26%) และแฟนซี 111 (0.26%) และมีปริมาณสารแอนโธไซยานินในเมล็ดระหว่าง 190-250 mg/100g ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์สวีทไวท์ 853 (7%) และไม่น้อยกว่าพันธุ์แฟนซีสีม่วง (180%) เมื่อนำสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3) มาสร้างเป็นลูกผสมแบบ line × tester จำนวน 8 คู่ผสม พบว่าได้ลูกผสมฝักสีม่วงและมีปริมาณทริปโตแฟนและสารแอนโธไซยานินในปริมาณสูงเช่นเดียวกันพันธุ์พ่อแม่ และมีผลผลิตฝักสดของลูกผสมอยู่ระหว่าง 1,195-1,934 กก./ไร่

ข้อเสนอแนะ

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูให้มีปริมาณแอนโธไซยานินสูงขึ้นโดยการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูกับข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงและใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกยีนโอเปกทูและคัดเลือกฝักสีม่วงในชั่วลูกนั้นประสบความสำเร็จ ได้สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงที่มีคุณค่าอาหารสูง มีปริมาณทริปโตแฟนสูงเช่นเดียวกับพันธุ์แม่และมีสารแอนโธไซยานินสูงขึ้นเช่นเดียวกับพันธุ์พ่อ การนำสายพันธุ์ผสมตัวเองของข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูชั่วที่ 4 (S_4) ไปสร้างลูกผสมประสบความสำเร็จในเรื่องของปริมาณทริปโตแฟนและสารแอนโธไซยานิน อย่างไรก็ตาม การปลูกข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง จะต้องคำนึงถึงระยะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปลอดละอองเกสรของข้าวโพดชนิดอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากยีนโอเปกทูเป็น homozygous recesive (o_2o_2) ถ้ามีละอองเกสรข้าวโพดข้าวเหนียวมาผสมก็จะทำให้ลักษณะโอเปกทูหายไปทันที ซึ่งเป็นผลของ xenia effect นอกจากนี้ สารแอนโธไซยานินเป็นสารที่ละลายในน้ำ ดังนั้นการทำให้สุกด้วยความร้อนชื้นจะต้องระวังการสูญเสียปริมาณสารแอนโธไซยานินด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2546. **ปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐานและแนวความคิด**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2546. **ปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐานและแนวความคิด**. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชูศักดิ์ จอมพุก. 2555. **สถิติ: การวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยด้านพืชด้วย "R".** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 335 หน้า.

พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และ เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2529. **การปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจในประเทศไทย**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรพล อุปดิสสกุล. 2536. **สถิติการวางแผนการทดลอง เล่ม 1**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

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

Anderson, O.M. and K.R. Markham. 2006. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.** Boca Raton, Fla.: CRC Press / Taylor & Francis, p. 472-478, 508-515.

Bentte, K. and B.M. Prasanna. 2003. Simple sequence repeat polymorphism in Quality ProteinMaize (QPM) lines. **Euphytica** 129(3): 337-344.

Blando, F., C. Gerardi and I. Nicoletti. 2004. Sour cherry (*Prunus cerasus* L.) anthocyanin as ingredients for functional food. **Journal of biomedicine and biotechnology** 5: 235-238.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Boyer, C.D. and L.C. Hannah. 2001. Kernel mutants of corn, pp. 1-31. *In* A.R. Hallauar, ed. **Specialty Corns.** 2 nd ed. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.

Bressani, R. 1966. Protein quality of opaque-2 maize in children. **Proc. High Lysine Corn Conf. Corn Industries Research Foundation**, Washington, D.C.

Cevallos-Casals, B.A and L. Cisneros-Zevallos. 2003. Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweet potato. **J Agric Food Chem.** 51:3313-3319.

Chin, E.C.L, M.L. Senior, H. Shu and J.S.C. Smith. 1996. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allelic variation. **Genome** 39: 866-873.

Clark, H.E., D.V. Glover, J.L. Betz and L.B. Bailey. 1977. Nitrogen retention of young men who consumed isonitrogenous diets containing normal, opaque-2 or sugary-2 opaque-2 corn. **J. Nutr.** 107: 404.

Coe, E.H., M.G. Neuffer and D.A. Hoisington. 1988. The genetics of corn, pp. 81-258. *In* G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.), Corn and Corn Improvement. 3rd ed. **Am. Soc. Agron**, Madison, WI.

Cromwell, G.L., M.J. Bitzer. T.S. Stahly and T.H. Johnson. 1983. Effects of soil nitrogen fertility on the protein and lysine content and nutritional value of normal and opaque-2 corn. **Animal Sci. J.** 57: 1345-1351.

Duan, X., Y. Jaing, X. Su, Z. Zhang and J. Shi. 2007. Antioxidant properties of anhocyanin extracted from lichi (*Lichi chinenesis* Sonn.) fruit pericarp tissue in relation to their role in pericarp browning. **Food Chemistry**. 101: 1365-1371.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Emerson, R.A. 1921. The genetic relations of plant colors in maize. Cornell Univ. **Agric. Exp**. Stn.Mem. 39.

Escribano-Bailon, T., C. Santos-Buelga and J.C. Rivas-Gonzalo. 1994. Anthocyanins in cereals. **J. Chromatogr.** 1054: 133-134.

Fergason, V. 1994. **High amylose and waxy corn**, pp. 56-77. *In* A.R. Hallauer (ed.). 2001. Specialty Corns. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A.

Francisco, D.V. and O. Paredes-Lopez. 2003. **Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses.** CRC Press, Boca Raton, New York.

Grotewold, E., M. Chamberlin, M. Snook, B.,Siam, L. Butler, J Swenson, S.St. Maddock, G. Clair and B. Bowen. 1998. Engineering secondary metabolism in maize cell by ectopic expression of transcription factors. **Plant cell** 10: 721-740.

Gary, T. and L. Dao. 2002. Anthocyanins. *In* W. Jeffrey Hurst (ed.). **Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals**. CRC Press , Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. pp. 219-220.

Harborne, J.B. 1988. The favonnoids: recent advancesLn T.W. Goodwin (ed.). **Plant Pigments.** 300-343. Academic Press, London.

Hernandez, H.H. and L.S. Bates. 1969. **A modified method for rapid tryptophan analysis of maize**. CIMMYT Res. Bull. 13. CIMMYT, Mexico City, Mexico.

Jones, K. 2005. The potential health benefits of purple corn. **HerbalGram** 65:46-49

Juliano, B.O.A. 1971. Simplified assay for milled-rice amylose. **Cereal Science Today**. 16: 334 -340.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Knabe, D.A., J.S. Sullivan and K.G. Burgoon. 1992. **Quality protein maize (QPM) as a swine feed**, pp. 225-238. *In* Quality Protein Maize. E.T. Mertz (ed.) American Assoc. of Cereal Chem., St. Paul, MN.

Konczak, I. and W. Zhang. 2004. Anthocyanins-more than nature´s colours. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** 2004 (5), 239–240.

Lertrat, K. and N. Thongnarin. 2008. Novel approach to eating quality improvement in local waxy corn: Improvement of sweet taste in local waxy corn variety with mixed kernels from super sweet corn. **Acta Hort** 769:145-150.

Lila, M.A. 2004. Anthocyanins and human health: An in vitro investigative approach. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** 5: 306-313.

Lopez-Pereira, M.A. 1992. The economics of quality protein maize as an animal feed, case studies of Brazil and El Salvador, **CIMMYT economics working paper 92-06**, ElBatan, Mexico.

Maner, H.J. 1975. **Quality protein maize in swine nutrition**, pp. 58-82. In L.F. Buaman et al. (eds.). High quality protein maize. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., Stroudsburg, Pennsylvania.

Maniati, E. and G. Mazza. 1993. **Anthocyanin in fruits, vegetables and grains**. Boca Raton, FL: CRC Press. 362 p.

Mazza, G. and B.D. Oomah. 2002. **Functional Food Products from selected Canadian Crops** (Online). http://www.agr.gc.ca/food/nff/cancrops.html. March 20, 2012.

Mertz, E.T. 1994. **Proceedings of the international symposium on quality protein maize**. EMBRAPA/CNPMS.Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mertz, E.T., L.S. Bates and O.E. Nelson. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. **Science** 145:279-280.

Nair, M. 2004. **Chemicals Found In Cherries May Help Fight Diabetes** (Online). http://www.sciencedaily.com/releases/2004/12/041220122203.htm. March 17, 2013.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biochem** 153: 375-380

Nelson, O.E., E.T. Mertz and L.S. Bates. 1965. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm protein. **Science** 150: 1469-1470.

Nurit, E., T. Axel, P.V. Kevin and R.P. Natalia. 2009. Reliable and inexpensive colorimetric method for determining protein-bound tryptophan in maize kernels. **J. Agric. Food Chem** 57: 7233-7238.

Lertrat, K. and N. Thongnarin. 2008. Novel approach to eating quality improvement in local waxy corn: Improvement of sweet taste in local waxy corn variety with mixed kernels from super sweet corn. **Acta Horticulture**, 769: 145–150.

Lila, M.A. 2004. Anthocyanins and human health: An in vitro investigative approach. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** 5: 306-313.

Prasanna. B.M., S.K. Vasal, B. Ksssahun and N.N. Singh. 2001. Quality protein maize. **Curr.Sci** 81: 1308-1319.

Ribaut, J.M. and D.A. Hoisington. 1998. Marker-assisted selection: new tool and strategies. **Trends in Plant Sci** 3 (6): 236-239.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rottmann, S.M., A. Augusto, D. Druso, L.F. Alvado and F. Leighton. 2002. Juice and phenolic fractions of the berry inhibit LDL oxidation in vitro and protect human endothelial cells against oxidative stress. **Food Chem** 70(2): 2-3.

Singh, R.K. and B.D. Chaudhary. 1979. **Biometriccal methods in quatitative genetic analysis**. Kalyani, India.

Senior, M.L., J.P. Murphy, M.M. Goodman and C.W. Stuber. 1998. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Sci** 38:1088-1098.

Sharma, M., M. Cortes-Cruz,K. R. Ahern, M. McMullen, T.P. Brutnell and S. Chopra. 2011. identification of the Pr1 gene product completes the anthocyanin biosynthesis pathway of maize. **Genetics Society of America** 188: 69-79.

Sinkangam, B., P.Stamp, P. Srinives, P. Jompuk, W. Mongkol, A. Porniyom, N.C. Dang and C. Jompuk. 2011. Integration of quality protein in waxy maize by means of sequence repeat markers. **Crop Sci** 51: 2499-2504.

Sprague G.F. and L.A. Tatum.1942. General vs. specific combining ability in single crosses of corn. **J. Amer. Soc. agron** 34: 923-932.

Stapleton, A.E. and V. Walbot. 1994. Anthocyanins in cereals. **Plant Physiol** 105: 881.

Styles, E. D. and O. Ceska. 1972. Flavonoid pigments in genetic strains of maize. **Phytochem** 11: 3019-3021.

Sullivan, J. 1998. **Anthocyanin** (Online). http://www.carnivorousplants.org/cpn/samples/Science273anthocyanin.htm, June 18, 2012.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Toyoshi T. and T. Kohda. 2004. Antihypertensive activity of purple corn color in spontaneously hypertensive rats. **Foods Food Ingredients Japan** 209: 676–679.

Tsuda T., F. Horio, K. Uchida, H. Aoki and T. Osawa. 2003. Dietary Cyanidin 3-O- beta -D-Glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **J. Nutr** 133(7): 2125-2130.

Vasal, S.K. 1994. **High quality protein corn**, pp. 79-121. *In* Specialty Corns. A.R. Hallauer (ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida.

Villegas, E. 1994. **Factors limiting quality protein maize (QPM) development and utilization**, pp. 79-88 *In* Quality protein maize: 1964-1994. B A. Larkins and E.T.

Wrolstad, R.E. 2001. **The possible health benefits of anthocyanin pigments and polyphenolics** (Online). http://lpi.oregonstate.edu/ss01/anthocyanin.htm. July 3, 2012.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีเตรียมสารเคมี

ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ Total Sugar และ Reducing Sugar

การเตรียมสารละลายมาตราฐาน (standard solution) D-glucose

1. เตรียมสารเคมี D-glucose anhydrous ที่ 50, 100, 150, 200, 250, 300 ppm

การเตรียมสารละลาย alkalic copper reagent

1. ละลาย anhydrous sodium carbonate จำนวน 25 กรัม ในน้ำ 250 มิลลิลิตร และเติม potassium sodiumtartrate 12 กรัม

2. เติมสารละลาย 10% copper sulfate 40 มิลลิลิตร (ใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 4 กรัม ละลายน้ำจนครบ 40 มิลลิลิตร) เติม sodium bicarbonate จำนวน 16 กรัม (solution I)

3. ละลาย anhydrous sodium sulfate จำนวน 180 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร (solution II)

4. ผสม solution I และ solution II แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 สัปดาห์ กรองเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 – 37 องศาเซลเซียส (ทุกครั้งที่มีการใช้ต้องทำการกรองทุกครั้ง)

การเตรียมสารละลาย arsenomolybdic reagent

1. ละลาย ammonium molybdate จำนวน 50 กรัม ในน้ำ 900 มิลลิลิตร เติม sulfuric acid 42 มิลลิลิตร (solution III)

2. ละลาย disodium hydrogen arsenate จำนวน 6 กรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร (solution IV)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. เติมสารละลาย IV ในสารละลายที่ III และII แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 – 37 องศาเซลเซียส (เก็บไว้ 24 ชั่วโมงจึงสามารถนำมาใช้ได้)

ภาคผนวกที่ 2 การเตรียม Boric acid indicator solution

1. การเตรียม indicator โดยชั่ง Bromocresol green 0.066 กรัม และ Methyl red 0.033 กรัม ละลายใน 95% ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. การเตรียม Boric acid indicator solution โดยชั่ง Boric acid จำนวน 20 กรัม ละลายในน้ำร้อน 400 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายเย็นเติม indicator 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 ลิตร และหยด 0.1N NaOH จำนวน 3 หยด จะได้สารละลายสีม่วงแดง

ภาคผนวกที่ 3 การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ทริปโตแฟน

Papain solution (1 mg/ml): ชั่ง Papain 40 มิลลิกรัม ละลายใน 0.165 M Sodium acetate (pH 7) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ที่อุณภูมิห้อง

DL-Tryptophan stock solution (100 µg/ml): ชั่ง DL-Tryptophan 10 มิลลิกรัม ละลายใน 0.165 M Sodium acetate (pH 7) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณภูมิห้อง

Reagent A: (0.1 M glyoxylic acid) ชั่ง glyoxylic acid (Merck, Germany) จำนวน 0.9205 กรัม แล้วละลายใน 7 N sulfuric acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

Reagent B: (1.8 mM $FeCl_3$-$6H_2O$) ใช้ $FeCl_3$-$6H_2O$ (Ajax Finechem, Australia) ปริมาณ 0.05 กรัม แล้วละลายใน Reagent A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

Reagent C: (30 N sulfuric acid) ใช้ sulfuric acid 96% (Merck, Germany) ปริมาตร 833.3 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 166.7 มิลลิลิตร วางขวดผสมบนน้ำแข็ง ใน volumetric flask ที่แช่ในน้ำแข็งและใช้ magnetic ในการผสมให้เข้ากัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Reagent D: เตรียมประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนใช้ โดยผสมระหว่าง Reagent A และ Reagent B เข้าด้วยกันในขวดสีน้ำตาล (brown glass) เพื่อป้องกันแสง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวปวรวรรณ จีนรัตน์
เกิดวันที่	18 กรกฎาคม 2532
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดพิจิตร
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์