ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่ พืชไร่นา

สาขา **ภาควิชา**

เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วง

Breeding for Purple Opaque-2 Tein Corn

นามผู้วิจัย นางสาวศานนท์ สุขสถาน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ชูศักดิ์ จอมพุก, Dr.sc.nat.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์วิทิตร ใจอารีย์, Dr.rer.agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์พีรนุช จอมพุก, Ph.D.

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชเนษฎ์ ม้าลำพอง, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วง

Breeding for Purple Opaque-2 Tein Corn

โดย

นางสาวศานนท์ สุขสถาน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศานนท์ สุขสถาน 2557: การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชูศักดิ์ จอมพุก, Dr.sc.nat. 68 หน้า

การถ่ายทอดยีนโอเปกทู (o_2o_2) ให้กับข้าวโพดเทียนทำให้ข้าวโพดเทียนมีปริมาณทริปโตแฟนในเมล็ดสูงขึ้น และถ้าเมล็ดข้าวโพดเทียนโอเปกทูมีปริมาณสารแอนโทไซยานินสูงขึ้น จะเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารของข้าวโพดเทียนให้แก่ผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น ดังนั้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนทริปโตแฟนและสารแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวโพดเทียน และใช้ phi057 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (MAS) ยีนโอเปกทู โดยเริ่มผสมพันธุ์ระหว่างข้าวโพดเทียนโอเปกทู (*o_2o_2Pr_cc*) เป็นต้นแม่ กับข้าวโพดแฟนซีสีม่วง 111 (Fancy Purple 111, *O_2O_2Pr_C_*) นำลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ไปปลูกแล้วผสมตัวเองเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) ปลูกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 แล้วใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ *phi057* ช่วยคัดเลือกยีนโอเปกทูชนิด homozygous recessive (o_2o_2) และคัดเลือกฝักที่เป็นสีม่วง จากนั้นปลูกและผสมตัวเองจนถึงชั่วที่ 4 (S_4) แล้วสร้างลูกผสม Topcross จากสายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูชั่วที่ 4 ที่มีฝักสีม่วงไว้ 10 สายพันธุ์ และฝักสีขาว 3 สายพันธุ์ โดยใช้สายพันธุ์สีม่วงเป็นสายพันธุ์ตรวจสอบ (tester) ผลการทดลองพบว่า ทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้มีปริมาณทริปโตแฟนในส่วนของเอนโดสเปิร์มสูงขึ้น (0.52-0.80%) ในขณะที่ปริมาณสารแอนโทไซยานินของสายพันธุ์สีม่วงระหว่าง 75-251 mg/100g ส่วนพันธุ์สีขาวมีค่าระหว่าง 5-9.5 mg/100g ขณะที่พันธุ์แฟนซีสีม่วง(พันธุ์ตรวจสอบ) มีปริมาณทริปโตแฟน0.28% และมีสารแอนโทไซยานิน 190 mg/100g ของน้ำหนักแห้ง ในส่วนของลูกผสมพบว่าปริมาณทริปโตแฟนสูงเช่นเดียวกับพันธุ์พ่อแม่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.49-0.77% มีปริมาณสารแอนโทไซยานินอยู่ระหว่าง 35.9-216.6 mg/100 ทั้งนี้ขึ้นอยู่จำนวนฝักสีม่วงที่มีในแต่ละคู่ผสม ผลผลิตฝักสดของลูกผสมมีค่าอยู่ระหว่าง 853-1,763 กก.ต่อไร่ โดยคู่ผสม POTH3 x POTH10 ให้ผลผลิตสูงสุด

_____ _____ ___/___/___

ลายมือชื่อนิสิต **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sanon Suksatan 2014: Breeding for Purple Opaque-2 Tein Corn. Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Associate Professor Choosak Jompuk, Dr.sc.nat. 68 pages.

To transfer the opaque-2 gene into tein corn, the tryptophan content in its kernel was increased. Moreover, if an anthocyanin was added into the kernel of this corn, it would be more benefit for consumer. So, the objective of this study were to increase the tryptophan content in an endosperm and adding anthocyanin in pericarp of kernel and use phi057 as marker- assisted selection (MAS) for opaque-2 gene in segregating population. Cross was made between tein opaque-2 corn ($o_2o_2Pr_cc$) as female parent and waxy purple corn (Fancy Purple 111, $O_2O_2Pr_C_$) as male parent. The F_1 hybrid was grown and self-pollinated to obtain S_1 line. In the segregating population of S_1 plant, DNA marker (phi057) was applied as marker-assisted selection (MAS) for the opaque-2 gene or homozygous recessive of opaque-2 (o_2o_2) and purple kernel of selected plant was harvested. Then, selected plants were self-pollinated until S_4 generation. Topcross was made from ten purple opaque-2 tein lines and three white opaque-2 tein lines by using the purple kernel as tester. The results showed that all selected lines (S_4) had high tryptophan content in endosperm (0.58-0.80%). Moreover, an anthocyanin of these purple kernel lines ranged from 75-251 mg/100 of dry weight while an anthocyanin of white kernel lines ranged from 5-9.5 mg/100. On the other hand, tryptophan content and anthocyanin of Purple Fancy 111 (check variety) was about 0.28% and 190 mg/100 of dry weight, respectively. For F_1 hybrid, the result showed that trypthophan content was high as their parents ranging from 0.49-0.77% and anthocyanin ranged from 35.9-216.6 mg/100 depending on the number of purple ear in each cross. The green ear weight of F_1 ranged from 853-1,763 kg per rai and the superior hybrid was the cross of POTH3 x POTH10.

_____ _____ ___ / ___ / ___

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 และการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชเนษฎ์ ม้าลำพอง ประธานกรรมการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และ รองศาสตราจารย์ ดร.กิตติ บุญเลิศนิรันดร์ ผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2557 ภายใต้โครงการการปรับปรุงข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง

ขอขอบพระคุณ ดร.สรรเสริญ และ ดร.ชบา จำปาทอง ที่ให้คำปรึกษา ความรู้ อบรมสั่งสอนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และช่วยเหลือด้านการทำงานเสมอมา ตลอดจนบุคลากรในศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการปลูกข้าวโพด และขอขอบคุณศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบคุณ นางสาววรรษมน มงคล นางสาวอังคณา เพาะนิยม ที่คอยช่วยเหลือด้านเทคนิคทางโมเลกุล และเป็นกำลังใจจนงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสมใจ คุณแม่เรณู สุขสถาน และคนในครอบครัวทุกคน ที่ให้ความรักและเสียสละในการสนับสนุน ช่วยเหลือทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ที่ทำให้ข้าพเจ้าได้ศึกษาจนถึงระดับปริญญาโท จนกระทั่งสำเร็จวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ประโยชน์และความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแด่คุณพ่อและคุณแม่ และอยู่เบื้องหลังความสำเร็จทั้งหมด ตลอดจนครู อาจารย์ ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา ความรู้และอบรมสั่งสอนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ศานนท์ สุขสถาน

พฤศจิกายน 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	14
อุปกรณ์	14
วิธีการ	18
ผลการทดลองและวิจารณ์	37
สรุปและข้อเสนอแนะ	56
สรุป	56
ข้อเสนอแนะ	56
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	57
ภาคผนวก	64
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	68

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1	ลำดับเบส SSR primer ของ *phi057*	26
2	องค์ประกอบในการทำพีซีอาร์	27
3	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำพีซีอาร์	28
4	แสดงค่า standard curve ของ pelargonidin chloride 1% TFA	35
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCBD)	36
6	แสดงจำนวนต้นข้าวโพดสายพันธุ์ ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) ที่จำแนกยีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ *phi057* และตรวจสอบการกระจายตัวโดยใช้ไคสแควร์	38
7	แสดงลักษณะสีเมล็ดของสายพันธุ์ ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) เมื่อผสมตัวเองเป็น S_2 แล้วเก็บฝักมาแยกสีเมล็ดเป็นฝักสีขาวและฝักสีม่วง	39
8	ค่าเฉลี่ยผลผลิต และลักษณะทางการเกษตรของคู่ผสมจำนวน 12 คู่ผสม พันธุ์ตรวจสอบ big white และแฟนซีสีม่วง 111	43
9	องค์ประกอบทางเคมีของสายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วงในชั่วที่ 4 (S_4) และพันธุ์ตรวจสอบแฟนซีสีม่วง 111	45
10	คุณภาพทางเคมีของสายพันธุ์อินเบรดของข้าวโพดเทียนสีขาวในรุ่น S_4 และพันธุ์ตรวจสอบ big white	46
11	ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะต่างๆ ในรุ่นลูกของคู่ผสมจำนวน 12 คู่ผสม พันธุ์ตรวจสอบ big white และแฟนซีสีม่วง111	50
12	ค่าเฉลี่ยผลผลิต และลักษณะทางการเกษตรของคู่ผสมจำนวน 12 คู่ผสม พันธุ์ตรวจสอบ big white และแฟนซีสีม่วง 111	51
13	คุณภาพทางชีวเคมี รุ่นลูกของคู่ผสมจำนวน 12 คู่ผสม พันธุ์ตรวจสอบ big white และแฟนซีสีม่วง 111	53

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1	แผนผังการดำเนินงานการปรับปรุงพันธุ์ของข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วง	19
2	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ตัวอย่างที่ 1, 5-15 คือ ข้าวโพดที่มียีนโอเปกทู *(o_2o_2)* และ ตัวอย่างที่ 2-4 คือ *non-opaque-2 (O_2O_2)*	39
3	ลักษณะสีเมล็ดที่เป็นสีเดียวกันทั้งฝักคือ ฝักขาวและฝักสีม่วง	39

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วง

Breeding for Purple Opaque-2 Tein Corn

คำนำ

ข้าวโพดเทียน (tein corn) เป็นข้าวโพดรับประทานฝักสดที่จัดอยู่ในกลุ่มข้าวโพดข้าวเหนียวซึ่งมีฝักขนาดเล็กและเรียวยาว เนื่องจากยีนที่ควบคุมลักษณะของแป้งเป็นยีนตัวเดียวกันคือ waxy gene (*wx*) มีแป้งแอมิโลเพคติน (amylopectin) เป็นองค์ประกอบมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เนื้อเหนียวนิ่มเมื่อสุก สีของเมล็ดสด มีตั้งแต่สีขาว เหลือง ม่วง และหลากสีในฝักเดียวกัน ข้าวโพดสีม่วงเกิดจากการสะสมสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ในเยื่อหุ้มเมล็ด (aleurone layer) เนื่องจากยีนสีม่วง (Pr) ทำงานร่วมกับยีนที่ก่อให้เกิดสี (C) ข้าวโพดจะแสดงออกเป็นสีม่วง ต้องมียีโนไทป์เป็น Pr_CC หรือ Pr_Cc แต่ถ้ายีน C อยู่ในสภาพ homozygous recessive (cc) ข้าวโพดจะไม่แสดงออกเป็นสีม่วง (Sharma *et al*., 2011) แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุธรรมชาติในกลุ่มฟลาโวนอยด์ พันธุกรรมข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนที่มีสีม่วงจนถึงสีดำมีแอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่สำคัญ ในปัจจุบันมีการค้นพบแอนโทไซยานินมากกว่า 300 ชนิด จากสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบแล้วมากกว่า 7,000 ชนิด โดยในข้าวโพดมีรายงานอยู่หลายชนิด ซึ่งกลุ่มของ cyanidin, peonidin และ pelargonidin เป็นกลุ่มที่ พบว่ามีในปริมาณมากในข้าวโพด (Zilic *et al.,* 2012) แม้ว่าข้าวโพดจะเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ดีแต่ในส่วนของกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) ในข้าวโพดจะมีไลซีน (lysine) และทริปโตแฟน (tryptophan) ในปริมาณต่ำมาก (FAO, 1992) จนได้ค้นพบยีนโอเปกทู (*opaque-2*) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 7 (Mertz *et al*., 1964) ยีนดังกล่าวมีผล ทำให้ปริมาณไลซีนและทริปโตแฟนสูงขึ้นเป็นเกือบสองเท่าของข้าวโพดปกติ การตรวจสอบยีนโอเปกทูในข้าวโพดทำได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะ คือ *phi057* (Chin *et al*., 1996) ด้วยเทคนิค simple sequence repeat (SSR) ซึ่ง *phi057* เป็น co-dominant marker สามารถตรวจสอบยีโนไทป์ได้ทั้ง 3 แบบ (AA, Aa และ aa) ทำให้สามารถคัดเลือกข้าวโพดในรุ่นลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพและช่วยลดขั้นตอนในการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วง (purple opaque-2 tein corn) จะเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารแก่ผู้บริโภคทั้งในส่วนของปริมาณทริปโตแฟนและสารต้านทานอนุมูลอิสระแอนโทไซยานิน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเพิ่มปริมาณสารแอนโทไซยานินในสายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทู

2. ใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ช่วยในการคัดเลือกยีนโอเปกทู (*opaque-2*) ในรุ่นลูกชั่วต่างๆ เพื่อเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนของสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วงที่คัดเลือกไว้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ลักษณะพันธุ์ข้าวโพดเทียน

ข้าวโพดเทียน (tein corn) เป็นข้าวโพดในกลุ่มเดียวกับข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn) แต่มีขนาดฝักเล็กกว่า ความยาวฝัก 10-15 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางฝัก 2-3 เซนติเมตร มีจำนวนแถวของเมล็ด 8-12 แถว ขณะที่ข้าวโพดข้าวเหนียวมีตั้งแต่ 12 แถวขึ้นไป (ราเชนทร์, 2539) ข้าวโพดข้าวเหนียว (*Zea mays* L. *caratina*) เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *Wx* ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 9 โดยเปลี่ยนจากยีนข่ม *Wx* ไปเป็นยีนแฝง *wx* (Fergason, 1994) การค้นพบยีน *wx* (waxy gene) มีการกล่าวถึงโดย Collin เป็นครั้งแรกในปี 1909 โดย *wx* เป็นยีนที่ทำให้เกิดการสะสมแป้ง ที่แตกต่างไปจากข้าวโพดธรรมดา และต่อมาค้นพบว่าเป็นแป้งพวกแอมิโลเปคติน (amylopectin) สำหรับประเทศไทยรู้จักกันดีในนามของข้าวโพดเทียน หรือข้าวโพดข้าวเหนียว (ทวีศักดิ์, 2540) ทั้งนี้เนื่องจากแป้งของข้าวโพดข้าวเหนียว ประกอบด้วยแอมิโลเปคตินเกือบทั้งหมด โมเลกุลของแป้งจับกันเป็น branched-chain molecular structure มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (โอวาท, 2513) ลักษณะพิเศษของแอมิโลเปคติน ที่ทำให้ข้าวโพดข้าวเหนียวไม่เหมือนข้าวโพดชนิดอื่น คือ เมื่อย้อมเอนโดสเปิร์ม หรือละอองเกสรด้วยสารละลายไอโอดีนในโพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) จะให้สีน้ำตาลแดง ขณะที่ข้าวโพดชนิดอื่นซึ่งมีปริมาณแอมิโลสสูง จะให้สีน้ำเงินเข้มถึงดำ (Weatherwax, 1922) เมล็ดข้าวโพดเทียนมีความอ่อนนุ่ม หวานเล็กน้อย รสชาติดี จึงเป็นข้าวโพดฝักสดที่ได้รับความนิยมบริโภคชนิดหนึ่ง สีของเมล็ดมีได้หลายสี คือ สีขาว สีเหลือง และสีม่วง ซึ่งอาจมีสีเข้มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งเป็นสีดำ ผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมข้าวโพดเทียนที่มีเมล็ดสีเหลืองและสีขาว สีเมล็ดเกิดจากการสะสมของแอนโทไซยานิน และสารสีอื่นๆ ในชั้นของเปลือกหุ้มเมล็ด (pericarp) เยื่อหุ้มเมล็ด (aleurone layer) และ เอนโดสเปิร์ม (กรมวิชาการเกษตร, 2539)

ข้าวโพดเทียนมีการปลูกอยู่ทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย พันธุ์ที่ใช้ในแต่ละท้องถิ่นมีประวัติความเป็นมาแตกต่างกัน เกษตรกรเป็นผู้คัดเลือกพันธุ์เพื่อใช้ปลูกเอง และใช้ปลูกต่อเนื่องกันมาเป็นเวลานาน ทำให้มีลักษณะเป็นพันธุ์พื้นเมืองในแต่ละท้องถิ่น มีความแตกต่างกัน แต่ละพันธุ์มีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ (narrow genetic base) และจะมีความเสื่อมถอยทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากการผสมชิด (inbreeding depression) (กรมวิชาการเกษตร, 2539) พันธุ์ข้าวโพดเทียนที่นิยมปลูกมีอยู่หลายแหล่งด้วยกัน โดยนิยมเรียกชื่อพันธุ์ตามแหล่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จำหน่าย แหล่งปลูกและสีเมล็ด เช่น พันธุ์เทียนอยุธยา เทียนเหลืองสุโขทัย เทียนขาวสุโขทัย เทียนบ้านเกาะ และเทียนหวานพิษณุโลก เป็นต้น (คมสัน, 2544)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเทียนและข้าวโพดข้าวเหนียวในประเทศไทย

สุรณี และคณะ (2548) ได้ปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมเดี่ยวข้าวโพดข้าวเหนียวแปดแถว พันธุ์ Kwpsx 7436 ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่าง สายพันธุ์แท้ Kwpi# 74-20-4 กับ Kwpi# 36-9-4 พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวแปดแถวลูกผสมเดี่ยวพันธุ์ Kwpsx 7436 เป็นพันธุ์ที่มีรสชาติอร่อย นุ่มเหนียว ใกล้เคียงกับข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมที่เป็นพันธุ์เปรียบเทียบทั้ง 2 พันธุ์ (พันธุ์ Kwsx 107 และ พันธุ์ Kwsx 91) และอร่อยกว่าพันธุ์ wax 22 เล็กน้อย ผลผลิต และลักษณะทางการเกษตรค่อนข้างดี เปลือกหุ้มฝักมิดชิด มีระบบรากและลำต้นแข็งแรง ต้านทานโรคราสนิมได้ดี

กมล และสราวุฒิ (2537) ใช้เชื้อพันธุกรรมจากข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมือง ข้าวโพดหวานพันธุ์ TSSC 1 DMR และข้าวโพดหวานจากต่างประเทศพันธุ์ Silver Queen สร้างข้าวโพดพันธุ์ข้าวเหนียวหวานขอนแก่น และพันธุ์ขอนแก่นหวานสลับสี มีลักษณะเด่นที่เมล็ดสดมีสีเหลืองสลับกับสีขาว เนื้อนุ่ม มีรสหวาน และรสชาติปนกันระหว่างข้าวโพดหวานพิเศษ (super sweet corn) กับข้าวโพดข้าวเหนียว มีกลิ่นหอมเมื่อนึ่งสุกใหม่ๆ

ดนุพล (2553) พัฒนาข้าวโพดเทียนให้มีลักษณะฝักดก พบว่าการคัดเลือกพันธุ์แบบประยุกต์ จำนวน 4 รอบสามารถเพิ่มลักษณะฝักดกได้ โดยทำให้จำนวนฝักต่อต้นเพิ่มขึ้นจาก 1.56 เป็น 1.78 ฝักต่อต้น ในประชากรเริ่มต้น และประชากรที่ผ่านการคัดเลือกรอบที่ 4 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยต่อรอบการคัดเลือกของลักษณะจำนวนฝักต่อต้น คือ 0.06 ฝักต่อต้นต่อรอบ ส่วนการตอบสนองร่วมในลักษณะอื่นๆ ที่คัดเลือกโดยอ้อม พบว่า มีการเพิ่มจำนวนฝักดีทั้งหมดจาก 31,243 เป็น 35,182 ฝักต่อไร่ ซึ่งมีการตอบสนองต่อการคัดเลือกพันธุ์ คือ 1,107 ฝักต่อไร่ต่อรอบ รวมทั้งมีน้ำหนักฝักก่อนปอกเปลือกและน้ำหนักฝักหลังปอกเปลือกสูงขึ้น เมื่อรอบการคัดเลือกเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ จำนวนฝักต่อต้น ยังมีสหสัมพันธ์ทางบวก กับจำนวนฝักดีทั้งหมด (0.99**) และความยาวเปลือกฝัก (0.74*)

คมสัน และคณะ (2541) สร้างลูกผสมโดยการผสมระหว่างประชากรของข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมือง 7 พันธุ์ คือ สุโขทัย1, สุโขทัย2, อยุธยา, บางพระ, พิษณุโลก, ขาวนครศรี และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขาวสุโขทัย แบบพบกันหมด นำลูกผสมที่ได้มาปลูกศึกษา พบว่า ลักษณะทางการเกษตรทุกลักษณะที่ศึกษามีความแตกต่างกันระหว่างลูกผสมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ นอกจากนี้พบว่าลักษณะที่สำคัญ เกือบทุกลักษณะของลูกผสมที่ได้ดีกว่าพันธุ์พ่อแม่ในระดับที่สูง พันธุ์พื้นเมืองบางพันธุ์แสดงสมรรถนะการผสมทั่วไป (GCA) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) ในบางลักษณะได้เป็นอย่างดี แสดงว่า สามารถใช้ประชากรผสมเปิดข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมืองเป็นพ่อแม่ในการผลิตลูกผสมระหว่างพันธุ์ได้เป็นอย่างดี

ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ (2534) พัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว “SSR TW 8801” โดยการนำข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ “เทียนหัวรอ” ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองในเขตจังหวัดอยุธยามาปรับปรุงโดยวิธี S_1 selection ทำ 1 รอบการคัดเลือก จนได้ข้าวโพดข้าวเหนียว ที่มีลักษณะทางการเกษตรและคุณภาพในการบริโภคดีขึ้น คือ มีลำต้นแข็งแรง สม่ำเสมอ ให้ผลผลิตสูง โดยเฉลี่ยต้นละ 3 ฝัก ขนาดฝักสม่ำเสมอ ให้ผลผลิตสูง การเรียงแถวของเมล็ดตรง มีรสหวาน หอม มีความเหนียวนุ่ม ไม่ติดฟัน เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร

ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (Quality Protein Maize; QPM)

ข้าวโพดโอเปกทู (*opaque-2* corn) มีระดับโปรตีนใกล้เคียงกับข้าวโพดทั่วไป คือ มีโปรตีนประมาณ 9 – 10 เปอร์เซ็นต์ แต่มีคุณภาพโปรตีนสูงกว่าข้าวโพดทั่วไป ซึ่งคุณภาพโปรตีนนี้วัดได้โดยใช้ระดับของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด คือไลซีน และทริปโตแฟนในโปรตีน โดยในข้าวโพดทั่วไปมีไลซีนประมาณ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนข้าวโพดโอเปกทูมีประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ และข้าวโพดทั่วไปจะมีทริปโตแฟน ประมาณ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ข้าวโพดโอเปกทู มีประมาณ 1.3 เปอร์เซ็นต์ (Mertz *et al.*, 1964) ข้าวโพดที่มียีนโอเปกทู จะมีแป้งอ่อนและทึบแสงเป็นองค์ประกอบหลักในเอนโดสเปิร์ม มีน้ำหนักเมล็ดเบา ทำให้ง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อราและแมลง (ราเชนทร์, 2539) ข้าวโพดที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรม ซึ่งมีปริมาณทริปโตแฟนสูงกว่าปกติถูกค้นพบโดย Mertz *et al.* (1964) ได้ค้นพบยีนโอเปกทู (*opaque-2*) บนโครโมโซมคู่ที่ 7 เป็น recessive gene โดยยีนโอเปกทู จะมีปริมาณไลซีน และทริปโตแฟนสูงกว่าข้าวโพดปกติ ทำให้มีคุณค่าทางอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์สูงด้วย ข้าวโพดที่มียีนโอเปกทูถูกเรียกว่าข้าวโพดโอเปก หรือข้าวโพดคุณภาพโปรตีน โดยปกติแล้วโปรตีนที่สะสมในเมล็ดข้าวโพดเป็นโปรตีนประเภทละลายได้ในแอลกอฮอล์ หรือเรียกได้ว่า prolamines (zein) ซึ่งจะมีปริมาณไลซีนและทริปโตแฟนในปริมาณต่ำ งานพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดโอเปกทู มีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะงานทางด้านการปรับปรุงพันธุ์มาตรฐาน (conventional breeding) แต่ในระยะต่อมาจึงได้เริ่มมีการศึกษาลงไปถึงระดับโมเลกุล ดังรายงานของ

Prasanna *et al.* (2001) ได้มีความพยายามที่จะพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน โดยใช้เทคโนโลยีทางด้านโมเลกุลเครื่องหมายเข้ามาช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อ พัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดให้คุณภาพโปรตีนสูง

Bressani (1966) รายงานการทดลองใช้ข้าวโพดโอเปกทูเป็นอาหารกับเด็กจำนวน 6 คน ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 24-75 เดือน น้ำหนัก 10.82-19.05 กิโลกรัม พบว่า เด็กเหล่านี้บริโภคโปรตีน 1.8 – 1.5 กรัมต่อน้ำหนักเด็ก 1 กิโลกรัมต่อวัน มีปริมาณไนโตรเจนโดยเฉลี่ยวัดเป็นเปอร์เซ็นต์ของนมที่บริโภคเท่ากับ 26.4 และ 30.8 เปอร์เซ็นต์ แต่ข้าวโพดโอเปกทูจะเท่ากับ 28.1 และ 26.1 เปอร์เซ็นต์ ค่าดัชนีของสภาพสมดุลของไนโตรเจน (nitrogen balance index) สำหรับนมเท่ากับ 0.8 ข้าวโพดโอเปกทู เท่ากับ 0.72 และข้าวโพดทั่วไปเท่ากับ 0.31 แสดงให้เห็นว่าข้าวโพดโอเปกทูมีคุณภาพโปรตีนเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ของนมเด็ก ในประเทศโคลัมเบีย ที่เป็นโรคขาดสารอาหาร สามารถมีสุขภาพเป็นปกติได้เมื่อใช้ข้าวโพดโอเปกทู เป็นแหล่งของโปรตีน

Sinkangam *et al*. (2011) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวกับข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (QPM) และได้คัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีขาว พบว่ามีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนสูงประมาณขึ้นระหว่าง 0.72 ถึง 1.71 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ข้าวโพดข้าวเหนียวมี 0.51 เปอร์เซ็นต์

ความหวาน และน้ำตาลข้าวโพด

น้ำตาลเป็นสารให้รสหวานกับประสาทสัมผัส ความหวานเป็นลักษณะคุณภาพที่มีความสำคัญมากโดยใช้เป็นตัวชี้ถึงลักษณะรสชาติข้าวโพด ความหวานขึ้นอยู่กับน้ำตาลในเมล็ด ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส และมอลโทส โดยส่วนใหญ่จะเป็นซูโครส มีความสำคัญต่อความหวานในเมล็ดข้าวโพด โดยเฉพาะน้ำตาลฟรุกโตส ที่พบว่าเป็นน้ำตาลที่ให้ความหวานมากที่สุดโดยเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุกโตสให้ความหวานถึง 1.7 เท่า ในขณะที่กลูโคสให้ความหวานเพียง 0.75 เท่า (นิธิยา, 2549) ในข้าวโพดหวาน (sugary 1) น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และซูโครส มีปริมาณสูงในเมล็ด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ช่วงแรกๆ หลังการผสมเกสร โดยพบว่ามีปริมาณสูงสุดในวันที่ 10 หลังจากผสมเกสร และลดลงอย่างรวดเร็วหลังจาก 15 วันหลังผสมเกสร (Doehlert *et al.*,1993) เช่นเดียวกันกับ wheat grain พบว่าน้ำตาลรีดิวซิ่ง (reducing sugar) ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่หลังผสมเกสรโดยมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 14 หลังการผสมเกสร และลดลงต่ำสุดในวันที่ 28 หลังการผสมเกสร (Kumar and Singh, 1981) น้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลชนิดนอนรีดิวซิ่ง (non-reducing sugar) ซึ่งน้ำตาลชนิดนี้จะไม่เกิดปฏิกิริยากับสารอื่นๆ เนื่องจากไม่มีกลุ่มของ ketone และ aldehyde ที่สามารถสร้างพันธะกับสารอื่นขณะเคลื่อนย้ายภายในลำต้นได้ ต่างจากน้ำตาลรีดิวซิ่ง (reducing sugar) ที่มีกลุ่ม ketone และ aldehyde ที่พร้อมทำงาน และจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นขณะเคลื่อนย้ายได้ตลอดเวลา ดังนั้นท่อลำเลียงอาหารในพืชจึงมีน้ำตาล non-reducing เป็นส่วนใหญ่ (พูนพิภพ, 2552)

ลักษณะสีเมล็ด

ทิพย์ (2529) รวบรวมพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวภายในประเทศไทย พบว่า เมล็ดของข้าวโพดข้าวเหนียวมีหลายสี ตั้งแต่สีขาวจนกระทั่งเป็นสีดำ และสีเหลืองสลับขาว แต่ผู้บริโภคฝักสดส่วนมากนิยมสีเหลืองและสีขาว ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับแต่ละท้องถิ่น เช่น ในแถบจังหวัดนครสรรค์ มีข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์คราบงู ซึ่งในฝักประกอบด้วยเมล็ดสีต่างๆ ทั้งสีขาว ม่วงอ่อน และม่วงเข้ม สลับกัน สลับกันดูคล้ายคราบงู หรือที่จังหวัดอุบลราชธานี มีข้าวโพดข้าวเหนียวชื่อ เทียนสำลี เมล็ดมีสีม่วงเข้ม ม่วงอ่อน และสีขาวคละกันภายในฝัก เป็นต้น

ราเชนทร์ (2539) กล่าวว่า สีเมล็ดข้าวโพดเกิดจากการสะสมสารแอนโทไซยานินและสารสีอื่นๆ ในชั้นของเปลือกหุ้มเมล็ด (pericarp) เยื่อหุ้มเมล็ด (aleurone) และเอนโดสเปิร์ม นักวิทยาศาสตร์พบว่า ลักษณะสีแดงที่ปรากฏบนเปลือกหุ้มเมล็ด และแกนฝัก (cob) ถูกควบคุมด้วยยีน *ys* ในโครโมโซมที่ 7 ตำแหน่งที่ 44 และยีนที่ควบคุมลักษณะสีขาวของเอนโดสเปิร์ม คือ ยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 9 ตำแหน่งที่ 26 ซึ่งลักษณะต่างๆ เหล่านี้ สามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปสู่ลูกหลานได้ โดยมีปฏิกิริยาของยีนทั้งในแบบข่มและผลบวก (dominant and additive gene action)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุตามธรรมชาติที่ละลายน้ำ (water soluble pigment) สะสมภายใน vacuoles ในเซลล์พืช สีแอนโทไซยานินตามธรรมชาติมีทั้งสีชมพู สีแดง สีน้ำเงินและสีม่วง สีเหล่านี้ขึ้นอยู่กับสภาพความเป็นกรดและด่างของสารละลาย โดยในสารละลายด่างจะออกสีน้ำเงินเข้ม แต่ในสารละลายที่เป็นกรดจะมีสีชมพูจนถึงสีแดงเข้ม แอนโทไซยานินเป็นสารธรรมชาติที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากกว่าที่มาจากการสังเคราะห์ เป็นสารกลุ่ม glucosides (เกิดจากสาร aglycones เกาะกับน้ำตาล) ส่วนแอนโทไซยาดิน (anthocyadins) เป็น aglycones ที่มีโครงสร้างคล้ายกัน (Dey and Harborne, 1993) แอนโทไซยานินเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งสารฟลาโวนอยด์เป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ที่พบในพืชทั่วไป ปกติฟลาโวนอยด์มีสูตรโครงสร้างเป็นฟลาแวน (flavan) หรือ 2-phenylbenzopyran ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมเรียงกันเป็นระบบ C6-C3-C6 (Haborne, 1973) ถ้ามีการแยกเอาหมู่น้ำตาลออกจากโมเลกุลของแอนโทไซยานินจะได้สารประกอบที่เรียกว่า แอนโทไซยาดินเป็นสารประกอบที่คงตัวและไม่ละลายน้ำ ทำให้ธรรมชาติไม่ค่อยพบแอนโทไซยาดินรูปอิสระ แต่พบว่าจับตัวกับน้ำตาลจำนวนหนึ่งหมู่หรือมากกว่าเกิดเป็นแอนโทไซยานินเสมอ (Shrikhande,1976)

การที่มีโครงสร้างอื่นมาเกาะโครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิน จะส่งผลต่อการแสดงออกของสีได้ เช่น ถ้ามีหมู่น้ำตาลมาเกาะจะทำให้เกิดสีน้ำเงินจนถึงสีม่วง ซึ่งหมู่น้ำตาลที่มาเกาะได้แก่ กลูโครส, กาแล็กโตส, แลมโนส และ เจนไทโอไบโอส หรือ ถ้าหมู่เมททิลมาเกาะทำให้เกิดสีแดงสด (reddish color) (Deepesh, 2000) คุณสมบัติบางประการของแอนโทไซยานินในพืชระยะแรกๆ เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการป้องกันรังสีอุลตร้าไวโอเลต จากแสงที่มีความเข้มข้นมากเพื่อไม่ให้เซลล์ของพืชถูกทำลาย การป้องกันพืชจากสภาวะเครียด (nutrient stress) และการป้องกันโรค (pathogen) ในพืช

แอนโทไซยานินมีคุณสมบัติเป็นทั้งกรดและด่าง (amphoteric nature) ทำให้แอนโทไซยานินเหมาะแก่การเป็นตัวช่วยบอกค่า pH ได้ เนื่องจากสารละลายแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนสีไปตามค่า pH ของสภาพแวดล้อม กล่าวคือ ถ้า pH น้อยกว่า 3 จะให้สีแดง แต่ถ้า pH อยู่ระหว่าง 7-8 จะให้สีม่วง และถ้า pH มากกว่า 11 จะให้สีน้ำเงิน (Counsell, 1981) นอกจากนี้แอนโทไซยานินมีลักษณะเป็น resonance structure ซึ่งมีผลต่อการแสดงระดับของสี คือในที่ที่มีความเป็นกรดสูงแอนโทไซยานินมักพบในรูปเกลือโอโซเนียม (oxonium) ตัวอย่างเช่น cyaniding-3-galactosides

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Cy-3-Ga) จะมีสีแดงสด เมื่อค่าความเป็นเบสเพิ่มขึ้นแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็น quinodal ทำให้มีสีม่วง แต่ถ้าแอนโทไซยานินมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) เพิ่มมากขึ้นที่ aglycone จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม (Fuleki, 1967)

แอนโทไซยานินมีคุณสมบัติที่ทนต่อความร้อนได้ดี และเพียงพอสำหรับกระบวนการผลิตที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง เช่นการผลิตผลไม้กระป๋องการเกิด acylation ของแอนโทไซยานินกับโมเลกุลน้ำตาลเป็นผลให้แอนโทไซยานินสามารถทนความร้อนและแสงได้เพิ่มขึ้น หรือผลิตภัณฑ์ที่มีแอนโทไซยานินมีความคงตัวดีกว่าในอุณหภูมิต่ำ ดังนั้นขบวนการ HTST (high temperature short time) จะทำให้สีของแอนโทไซยานินคงตัวได้สูงสุด (Hendry and Houghton, 1996)

บทบาทที่สำคัญของแอนโทไซยานิน

ปัจจุบันแอนโทไซยานินจัดเป็นสารธรรมชาติ ที่นำมาใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ โดย Cao and Prior (1999) กล่าวว่าตามปกติมนุษย์จะได้รับแอนโทไซยานินประมาณ 180-215 มิลลิกรัมต่อวันจากผักและผลไม้ที่รับประทานเข้าไปในร่างกาย และจากการที่โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ขาดอิเลคตรอนที่ C_3 unit ทำให้มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงไปนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การนำไปใช้เป็นสารสีธรรมชาติ การใช้เป็นสารแอนติออกซิแดนท์ เป็นต้น ในปี 2004 Aoki และคณะ แสดงให้เห็นว่าสารแอนโทไซยานินในข้าวโพดสีม่วงสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย แอนโทไซยานินมีโครงสร้างที่สามารถเกาะกับอนุมูลอิสระได้ดี โดยเฉพาะอนุมูลที่เกิดจากขบวนการออกซิเดชั่นของไขมัน ซึ่งมีการทดสอบคุณสมบัติ antioxidant ของผักและผลไม้จำนวน 50 ชนิด พบว่า Blueberries มีค่า ORAC (oxygen radicle absorbance capacity) สูงกว่าผักผลไม้ชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ และเสนอว่า เนื่องจากมีแอนโทไซยานินในระดับที่สูง (Mazza and Oomah 2000)

ข้าวโพดสีม่วง (Purple corn)

ข้าวโพดสีม่วง โดยทั่วไปจะพบเพียงบางเมล็ดในฝักของข้าวโพดข้าวเหนียว ปัจจุบัน พันธุ์การค้าบางพันธุ์มีเมล็ดสีม่วงทั้งฝัก สารสีม่วงในเมล็ดข้าวโพดนี้จัดเป็นแอนโทไซยานินชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับที่พบในผัก ผลไม้ และพืชบางชนิด การศึกษาข้าวโพดสีม่วงส่วนใหญ่จะเกี่ยวกับสารแอนโทไซยานินที่พบบริเวณลำต้น ใบ หรือเยื่อหุ้มเอนโดสเปิร์ม นักวิจัยจากประเทศญี่ปุ่นทำการศึกษาการใช้ประโยชน์จากข้าวโพดสีม่วงทั้งฝักตั้งแต่ปี ค.ศ. 1973 โดยใช้ข้าวโพดพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Morado สีแดง และพันธุ์ Kulli ที่นำเข้าจากประเทศเปรูมาสกัดแอนโทไซยานิน และนำมาใช้ประโยชน์ทางการค้าด้านเป็นแหล่งสารสีธรรมชาติในลูกกวาดและน้ำเชื่อมไซรัป ซึ่ง Sugiyama Chemical Institute of Tokyo ได้จดสิทธิบัตรทางการค้าแล้ว (Miniati and Mazza, 1993)

เมล็ดข้าวโพดทั่วไปประกอบด้วยชั้นเยื่อหุ้มเอนโดสเปิร์มที่เรียกว่า aleurone layer เยื่อหุ้มนี้มีหลายสี เช่น สีขาว สีเหลือง สีม่วง โดยสีม่วงเกิดจากรงควัตถุแอนโทไซยานิน จากอิทธิพลของยีนเด่น *Pr* กับยีน *C/R* ถ้าอยู่ในอิทธิพลของยีนสภาพ *pr/pr* ร่วมกับ ยีนตระกูล *C/R* จะทำให้เป็นสีแดง (Blinkley, 2005)

อรุณทิพย์ และคณะ (2556) ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดข้าวเหนียว 3 พันธุ์ คือ KKU-WX111031, KKU OP Variety และ Check Variety ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีสีม่วงเข้ม ในระยะรับประทานฝักสด และระยะเมล็ดพันธุ์ พบว่า ชนิดของแอนโทไซยานินที่พบมากที่สุดในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดข้าวเหนียว คือ cyanidin-3-glucoside รองลงมาคือ ชนิด pelargonidin-3-glucoside และ peonidin-3-glucoside

Becraft and Asuncion-Crabb (2000) รายงานว่ายีนที่ควบคุมสีเยื่อ aleurone ในข้าวโพดปกติคือ C1-I แต่ถ้าทำให้โครโมโซมที่ยีนนี้อยู่แตกหักไปพบว่ายีน C1 สามารถแสดงออกได้และทำให้เยื่อ aleurone มีสีม่วง ยีนนี้ไม่มีผลต่อส่วนประกอบของเอนโดสเปิร์ม

ปกติสารสีม่วงหรือแอนโทไซยานินจะพบในหลายๆ ส่วนของลำต้น เช่น ก้านชูเกสรตัวผู้ (filament) เปลือกหุ้มฝัก, เกสรตัวผู้ และ coleoptile หน้าที่ส่วนใหญ่เกี่ยวกับการป้องกันอันตรายแก่เซลล์พืชจากรังสีอุลตร้าไวโอเลต ข้าวโพดสีม่วงจะพบแอนโทไซยานินที่บริเวณเยื่อหุ้มเอนโดสเปิร์ม การผ่าเหล่า (mutation) ทำให้บริเวณนี้เดิมเป็นรงควัตถุสีเหลืองเปลี่ยนไปเป็นรงควัตถุสีม่วงแทน นักวิจัยจากภาควิชาพืชสวน Taxas A&M University ได้ประเมินค่าเฉลี่ยของแอนโทไซยานินในข้าวโพดสีม่วงพันธุกรรมจากประเทศเปรู พบว่ามีประมาณ 16.4 มิลลิกรัมต่อกรัมโดยน้ำหนักสด (fresh purple corn) และ 17.7 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (dry weight) (Jones, 2005)

Harakotr *et al* (2014) ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานิน และสาร anti-oxidant ในเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวดูจาก 2 ระยะ คือ ระยะน้ำนม และระยะสุกแก่ ด้วยวิธีการทำ HPLC-DAD-ESI

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชนิดของแอนโทไซยานินที่พบมากที่สุด ได้แก่ Cyanidin-3-glucoside และอนุพันธุ์ (derivatives) ปริมาณอะซิเลตเทต แอนโทไซยานิน (acylated anthocyanin) ที่พบของข้าวโพด 2 ที่พบในระยะน้ำนม 67.1-88.2 เปอร์เซ็นต์ และในระยะสุกแก่มีประมาณ 46.2-83.6 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเมล็ดข้าวโพดพันธุ์ KKU-WX111031 มี antioxidant activity สูงที่สุด และมีระดับแอนโทไซยานินสูงที่สุด ทั้งระยะน้ำนม และระยะสุกแก่

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน

ถึงแม้ว่าคุณค่าทางอาหารของข้าวโพดโอเปกทู เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง แต่ปัญหาเกี่ยวกับข้าวโพดชนิดนี้ยังมีอีกมาก สุทัศน์ (2514 และ 2515) เมื่อมีการถ่ายทอดยีนโอเปกทูเข้าไปยังข้าวโพดทั่วไปจะทำให้คุณภาพโปรตีนเพิ่มขึ้น ปัญหาที่สำคัญ คือ เมล็ดมีลักษณะแป้งอ่อน (soft endosperm) สีเหลืองซีดหรือขาวขุ่น ลักษณะแป้งอ่อนในเอนโดสเปิร์ม ทำให้แมลงเจาะเข้าทำลายได้ง่าย ก่อให้เกิดปัญหาเรื่องการเก็บรักษาเมล็ดไว้นานๆ คุณภาพของแป้งข้าวโพดลดลง น้ำหนักเมล็ดเบากว่าข้าวโพดทั่วไปทำให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำไม่เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร

ดังนั้นนักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงพยายามแก้ไขปรับปรุงลักษณะด้อยต่างๆ Paez *et al*. (1969) พบว่า สายพันธุ์พ่อแม่บางสายพันธุ์ที่เป็น homozygous *opaque-2* จะให้ลูกที่มีลักษณะเป็นเมล็ดสองชนิด คือ ลักษณะเมล็ด opaque ทั้งเมล็ด (แป้งอ่อน, สีซีด, ทึบแสง) และลักษณะ modified opaque (ครึ่งเมล็ดเป็นแป้งอ่อนและครึ่งเมล็ดเป็นแป้งแข็ง) จากการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า ลักษณะเมล็ดที่เป็น modified opaque มีปริมาณไลซีน และทริปโตแฟนสูงพอๆ กับเมล็ดที่เป็น opaque แท้ๆในฝักเดียวกัน โดยผลที่ได้เป็นผลจาก modified genes complex ซึ่งทำให้ยีน *opaque-2* แสดงออกแตกต่างจากเดิมในลักษณะของเอนโดสเปิร์ม ขณะที่ Vasal (1994) พบว่าลักษณะเมล็ด modified opaque จะผันแปรตามสัดส่วนของ translucent ต่อ opaque นอกจากนี้ยังได้ให้ข้อสังเกตว่าอิทธิพลดังกล่าวมีความแตกต่างเมื่อทำการผสมแบบผสมสลับ (reciprocal cross) ซึ่งเป็นผลมาจากอิทธิพลทางแม่ (maternal effect) และแสดงออกทางลักษณะของเมล็ดที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกข้าวโพดโปรตีนคุณภาพ

การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐาน (conventional breeding) เพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการจากพ่อแม่ที่แตกต่างกันรวมอยู่ในต้นเดียวกันนั้น ถ้าเป็นลักษณะที่คัดเลือกได้ยากหรือมีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมต่ำ และหรือมียีนหลายตำแหน่งมาเกี่ยวข้อง และยีนแต่ละตำแหน่งมีอิทธิพลต่อการแสดงออกน้อย ทั้งยังมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมาเกี่ยวข้องด้วย เช่น ลักษณะทางปริมาณต่าง ๆ จำเป็นจะต้องใช้ความชำนาญ และคัดเลือกหลายๆ รอบ ทำให้โครงการปรับปรุงพันธุ์มีความก้าวหน้าช้า ปัจจุบันมีเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ เช่น เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection; MAS) สำหรับคัดเลือกลักษณะที่คัดเลือกได้ยาก และสามารถคัดเลือกได้ครั้งละหลายลักษณะพร้อม ๆ กันได้ โดยปราศจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ทำให้การคัดเลือกลักษณะต่างๆ ทำได้ง่าย และใช้เวลาน้อยกว่าการคัดเลือกแบบมาตรฐานที่ต้องใช้รอบของการคัดเลือกจำนวนมากจึงจะสำเร็จ การนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) เข้ามาใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของพืช ทำให้สามารถศึกษาพันธุกรรมที่มีผลต่อการควบคุมลักษณะต่างๆ ได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น สามารถนำมาใช้ในการศึกษาในแง่ต่างๆ เช่น การตรวจสอบสายพันธุ์ การคัดเลือกพันธุ์ การทำแผนที่ยีน และการปรับปรุงพันธุ์ เป็นต้น การเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมในระบบการปรับปรุงพันธุ์จะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้สูงขึ้น และประสบผลสำเร็จเร็วขึ้น

Simple sequence repeats (SSR) หรือ microsatellite เป็นวิธีที่วัดความแตกต่างจากจำนวนซ้ำ (repeat units) ของนิวคลีโอไทด์ (Litt and Luty, 1989; Jacob *et al.,* 1991) จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR ด้วยการใช้ไพรเมอร์ที่ครอบคลุมส่วน repeat units ทำให้เกิดการสร้างความแตกต่างได้มาก และแน่นอนตรงตำแหน่งที่ตรวจสอบนั้น การแสดงออกจะเป็นแบบ co-dominant แต่มีข้อจำกัดคือ ไพรเมอร์ที่มีในพืชยังมีน้อยอยู่เมื่อเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุลแบบอื่นๆ ประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก เมื่อเปรียบเทียบกับการคัดเลือกแบบปกตินั้น ยังขึ้นอยู่กับต้นทุนการทดสอบโมเลกุลเครื่องหมาย ต้นทุนในการวัดลักษณะ ขนาดของประชากรที่ใช้ จำนวนซ้ำและค่า heritability ของลักษณะ การใช้ MAS จะมีประสิทธิภาพและคุ้มค่ามากเมื่อลักษณะที่จะนำมาคัดเลือกมีค่า heritability ต่ำมีค่าใช้จ่ายในการวัดลักษณะสูงและมีจำนวนตัวอย่างในการวัดมาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่องหมายโมเลกุล *phi112, umc1066* และ *phi057* เป็น SSR marker ที่มีความจำเพาะกับยีนโอเปกทู (www.maizegdb.go.th) โดย *phi057* และ *umc1066* เป็น co-dominant marker ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ ส่วน *phi112* เป็น dominant marker ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ แต่สามารถใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ได้ (Babu *et al.,* 2005) และจากการศึกษาJompuk (2007) และ Sinkangam *et al*. (2011) พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* มีความจำเพาะกับยีนโอเปกทู และสามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ของจีโนไทป์ได้ดี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์ข้าวโพด

1.1 เชื้อพันธุกรรมข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง

1.1.1 สายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทู (Hunta//(Kwi/Q53)-S4-2-8-1-2)-S1-96) จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวคุณภาพโปรตีนสูง (งบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2554) เป็นพันธุ์แม่

1.1.2 พันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวแฟนซีสีม่วง 111 (Fancy purple 111) จากบริษัทแปซิฟิกเมล็ดพันธุ์จำกัด เป็นแหล่งพันธุกรรมสีม่วง (*O_2O_2wxwxPrPrCc*) เป็นพันธุ์พ่อ

1.2 ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าบิ๊กไวท์ (Big white 852) เป็นพันธุ์ตรวจสอบ

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1.1 liquid nitrogen
2.1.2 CTAB (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide)
2.1.3 EDTA (Ethylenediamine tetraacetate)
2.1.4 Sodium chloride
2.1.5 Tris-base
2.1.6 2-Mercaptoethanol
2.1.7 Chloroform
2.1.8 Isoamyl alcohol
2.1.9 Iso-propanol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.10 70% Ethanol

2.1.11 washing buffer

2.1.12 RNase A

2.1.13 Sodium acetate

2.1.14 linear polyacrylamide

2.1.15 TE buffer pH 7.5

2.2 สารเคมีที่ใช้ทำพีซีอาร์

2.2.1 ddH_2O

2.2.2 Primer *phi057*

2.2.3 taq Green Master Mix(2x)

2.3 สารเคมีที่ใช้ทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และการย้อมแถบดีเอ็นเอ

2.3.1 Bind silane

2.3.2 Repel silane

2.3.3 95% Ethanol

2.3.4 Glacia lacetic acid

2.3.5 Acrylamide

2.3.6 Bis-acrylamide

2.3.7 Urea

2.3.8 TBE buffer

2.3.9 Ammonia

2.3.10 Sliver nitrate

2.3.11 3M Sodium hydroxide

2.3.12 Sodium carbonate

2.3.13 40% Formaldehyde

2.3.14 Ammonium persulphate(APS)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3.15 TEMED (N,N,N',N'-tetrametehylethylenediamide)

2.3.16 Molecular weight standard (100bp)

2.4 สารเคมีที่ใช้ทำ agarose gel electrophoresis และการย้อมแถบดีเอ็นเอ

2.4.1 Agarose

2.4.2 TBE buffer

2.4.3 Ethidium bromide

2.4.4 Molecular weight standard (100bp)

2.5 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ Total sugar และ Non-reducing sugar

2.5.1 D-glucose anhydrous

2.5.2 0.1 N Hydrochloric acid

2.5.3 0.1 N Sodium hydroxide

2.5.4 Alkalic copper reagent

2.5.5 Arsenomolybdic reagent

2.6 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลเพคติน

2.6.1 95% Ethyl alcohol

2.6.2 1 N Sodium hydroxide

2.6.3 Potato amylose, 100% purity

2.6.4 Glacial acetic acid

2.6.5 สารละลายไอโอดีน

2.7 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.7.1 Hexane

2.7.2 98% Sulfuric acid, standard 0.05018 N Sulfuric acid

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.7.3 Catalyst (Na_2SO_4 100g: Se 1g)

2.7.4 10 N Sodium hydroxide, 0.1 N Sodium hydroxide

2.7.5 Boric acid indicator solution

2.7.6 95% Ethyl alcohol

2.8 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟน

2.8.1 Haxane

2.8.2 0.165 M Sodium acetate (pH 7)

2.8.3 Papain

2.8.4 30 N Sulfuric acid, 7 N Sulfuric acid

2.8.5 0.1 M Glyoxilic acid

2.8.6 1.8 M Ferric chloride

2.8.7 DL-Tryptophan

2.9 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์แอนโทไซยานิน

2.9.1 80% Methanol absolute

2.9.2 1% TFA (Trifluoroacetic acid in 80% methanol)

2.9.3 Pelargonidin chloride stock solution (100 µg/ml)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.1 โกร่งบดตัวอย่าง

3.2 หลอดเซนตริฟิวจ์

3.3 water bath

3.4 เครื่องเซนติฟิวจ์

3.5 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้

3.6 ปิเปต

3.7 หลอดไมโครเซนติฟิวจ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.8 incubator

3.9 Spectrophotometer

3.10 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)

3.11 ชุด sequencing gels

3.12 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

3.13 เครื่องฉายแสง ultraviolet และเครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ

3.14 Cyclone mill

3.15 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.16 เครื่องสกัดไขมัน (SER148 extraction unit by solvent)

3.17 หลอดทดลอง

3.18 เครื่องแก้ว

3.19 (pH meter)

3.20 เครื่องเขย่า (Shaker), Vortex-Genie2

วิธีการ

การผสมพันธุ์ใช้สายพันธุ์ ข้าวโพดเทียนโอเปกทู (*opaque-2)* จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวคุณภาพโปรตีนสูง (งบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2554) เป็นสายพันธุ์แม่ ใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนโอเปกทู (*opaque-2)* ซึ่งมีปริมาณทริปโตแฟนสูง ผสมกับข้าวโพดข้าวเหนียวแฟนซีสีม่วง 111 (Fancy purple 111) จากบริษัทแปซิฟิกเมล็ดพันธุ์ เป็นพันธุ์พ่อ มีลักษณะเมล็ดสีม่วงและมีปริมาณสารแอนโทไซยานินสูง ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 hybrid) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. ฤดูปลูกที่ 1 ปลูกสายพันธุ์พ่อแม่เพื่อผสมพันธุ์

สายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทู *($o_2o_2wxwxprprcc$)* เป็นพันธุ์แม่ ผสมข้าวโพดข้าวเหนียวแฟนซีสีม่วง 111 (*$O_2O_2wxwxPrprCc$*) เป็นพันธุ์พ่อ ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1)

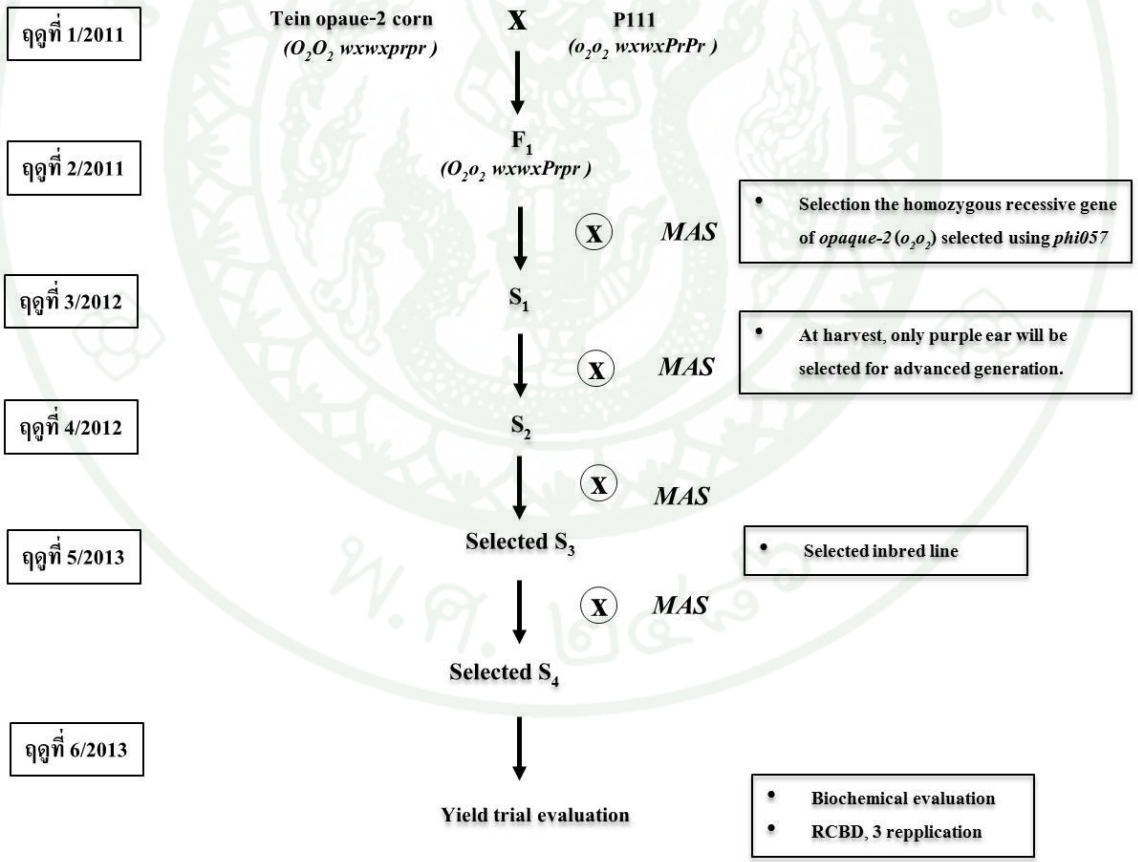
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. **ฤดูปลูกที่ 2 ปลูกลูกผสมชั่วที่ 1**

เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ที่ได้ไปปลูก แล้วผสมตัวเอง (self) ได้ลูกผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) คัดเลือกฝักที่มีเมล็ดสีม่วง

3. **ฤดูปลูกที่ 3 คัดเลือกข้าวโพดเทียนที่มียีนโอเปกทูโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล**

สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) จำนวน 100 ต้น ขณะที่ข้าวโพดอายุ ประมาณ 14 วัน จึงสุ่มเลือกต้นแล้วตัดใบมาสกัดดีเอ็นเอ และใช้เครื่องหมายโมเลกุล phi 057 คัดเลือกต้นที่มีจีโนไทป์เป็น recessive gene (o_2o_2) แล้วผสมตัวเองได้สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 (S_2) และคัดเลือกเฉพาะฝักที่มีเมล็ดสีม่วงไปปลูกในรุ่นต่อไป



ภาพที่ 1 แผนผังการดำเนินงานการปรับปรุงพันธุ์ของข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ฤดูปลูกที่ 4

นำฝักที่มีเมล็ดสีม่วงมาปลูกแล้วตัดใบต้นข้าวโพดมาสกัดดีเอ็นเอ และใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* คัดเลือกยีนโอเปกทู (o_2o_2) อีกครั้งหนึ่ง เพื่อยืนยันผลการคัดเลือก) ของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) คัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี และ มียีนโอเปกทู (o_2o_2) แล้วผสมตัวเองได้สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3) เพื่อเพิ่มความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygosity) แล้วนำเมล็ดจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ไป ทดสอบปริมาณทริปโตแฟน และโปรตีน

5. ฤดูปลูกที่ 5

เลือกสายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วง จำนวน 13 สายพันธุ์ มาปลูกเพื่อผสมพันธุ์แบบ Topcross โดยใช้สายพันธุ์จำนวน 12 สายพันธุ์ และตัวทดสอบจำนวน 1 สายพันธุ์ เลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี จากนั้นผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ที่คัดเลือกกับตัวทดสอบได้คู่ผสมทั้งหมด จำนวน 12 คู่ผสม บันทึกลักษณะทางการเกษตรต่างๆ และวิเคราะห์หาปริมาณแอมิโลเพคติน ปริมาณโปรตีน ปริมาณทริปโตแฟน และปริมาณสารแอนโทไซยานินในเมล็ด

6. ฤดูปลูกที่ 6 ทดสอบผลผลิต

ทดสอบผลผลิต (yield trail) ของลูกผสม วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCB) จำนวน 3 ซ้ำ ขนาดแปลงย่อย (plot size) แถวยาว 5 เมตร จำนวน 2 แถว ระยะปลูก 0.75 × 0.25 เมตร บันทึกลักษณะทางการเกษตร และวิเคราะห์หา total sugar และ Non-reducing sugar วิเคราะห์หาปริมาณแอมิโลเพคติน ปริมาณโปรตีน ปริมาณทริปโตแฟน และปริมาณสารแอนโทไซยานิน ในเมล็ด

7. การบันทึกข้อมูล

1. ผลผลิตฝักสดทั้งเปลือก ชั่งน้ำหนักฝักสดทั้งเปลือกลังจากการเก็บเกี่ยว ของแต่ละแปลงย่อย เทียบค่าเป็นกิโลกรัมต่อไร่แล้วเทียบค่าเป็นกิโลกรัมต่อเฮกตาร์ โดยคิดจากสูตร

$$\text{ผลผลิต (กก./ไร่)} = \frac{\text{น้ำหนักฝักสดทั้งเปลือก} \times 1{,}600}{\text{พื้นที่เก็บเกี่ยว (ม.}^2\text{)}}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หมายเหตุ: พื้นที่เก็บเกี่ยว = ระยะระหว่างแถว × (ความยาวของแถว + ระยะระหว่างหลุม) × จำนวนแถวที่เก็บเกี่ยว

ผลผลิตฝักสดป อกเปลือก (yellow ear weight) ชั่งน้ำหนักฝักสดที่ผ่านการปลอกเปลือกแล้วของแต่ละแปลงย่อย เทียบค่าเป็นกิโลกรัมต่อเฮกตาร์ โดยคิดจากสูตร

$$\text{ผลผลิต (กก./เฮกตาร์)} = \left[\frac{\text{น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก} \times 1{,}600}{\text{พื้นที่เก็บเกี่ยว (ม.}^2\text{)}}\right] \times 6.25$$

2. อัตราแลกฝัก (% cutting)

$$\text{อัตราแลกฝัก (\%)} = \left[\frac{\text{น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก}}{\text{น้ำหนักฝักสดทั้งเปลือก}}\right] \times 100$$

3. วันออกไหม นับจำนวนวันจากวันให้น้ำถึงวันที่จำนวนต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทั้งหมดในแปลงย่อยออกไหมยาว 2-3 เซนติเมตร

4. วันออกดอกตัวผู้ นับจำนวนวันให้น้ำถึงวันที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทั้งหมดในแปลงย่อยออกดอกครึ่งหนึ่งของช่อดอก

5. โรคทางใบ ให้คะแนนต้นที่เป็นโรคทางใบในช่วงก่อนถึงวันเก็บเกี่ยวผลผลิตฝักสดประมาณ 7-14 วัน หรือไหมแห้ง หรือช่อดอกตัวผู้แห้ง โรคที่ตรวจสอบได้แก่ โรคใบไหม้ โรคใบจุด โรคราสนิม และโรคราน้ำค้าง ให้คะแนนการเป็นโรค 1-5 โดยการนับจำนวนต้นที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่เป็นโรคในแต่ละแปลงย่อย และเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

1 = เป็นโรคน้อยมาก มีจำนวนต้นอ่อนแอไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์
2 = เป็นโรคน้อย มีจำนวนต้นอ่อนแอ อยู่ในช่วง 6-20 เปอร์เซ็นต์
3 = เป็นโรคปานกลาง แข็งแรงปานกลาง มีจำนวนต้นอ่อนอยู่ในช่วง 21-35%
4 = เป็นโรคมาก ต้นอ่อนแอ มีจำนวนต้อนอ่อนแอ อยู่ในช่วง 36-49 เปอร์เซ็นต์
5 = เป็นโรคทางใบมากที่สุด มีจำนวนต้นเป็นโรคมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. จำนวนต้น (plant number) นับจำนวนต้นครั้งแรกเมื่อถอนแยกโดยถอนแยกให้เหลือ 21 ต้น ต่อแถวยาว 5 เมตร และนับอีกครั้งที่ระยะเก็บเกี่ยวต่อแปลงย่อย

7. จำนวนฝัก (ear number) นับจำนวนฝักในแต่ละแปลงย่อยที่ระยะเก็บเกี่ยว

8. ความสูงต้น (plant high) วัดจากพื้นดินถึงข้อของใบบนสุด วัดพร้อมกับความสูงต้น เป็นเซนติเมตรจำนวน 10 ต้น ต่อแปลงย่อย

9. ความสูงฝัก วัดจากพื้นดินถึงข้อของฝักบนสุด วัดพร้อมกับความสูงงต้น เป็นเซนติเมตรจำนวน 10 ต้น ต่อแปลงย่อย

10. ลักษณะต้น (plant aspect) สังเกต และบันทึกความสม่ำเสมอของทรงต้นต่อแถวในแต่ละแปลงย่อย เช่น ลักษณะลำต้นตั้งตรง ความแข็งแรงของต้นและระบบราก ความสูงของต้นและฝัก การต้านทานโรคและแมลง ให้คะแนน 1-5 โดยเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

1 = มีความสม่ำเสมอมากที่สุด (เป็นที่ต้องการ) มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์
2 = มีความสม่ำเสมอมาก อยู่ในช่วง 80-90 เปอร์เซ็นต์
3 = มีความสม่ำเสมอปานกลาง อยู่ในช่วง 70-80 เปอร์เซ็นต์
4 = มีความสม่ำเสมอน้อย อยู่ในช่วง 60-70 เปอร์เซ็นต์
5 = มีความสม่ำเสมอน้อยที่สุด (ไม่เป็นที่ต้องการ) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

11. ลักษณะฝักสดปอกเปลือก (ear aspect) พิจารณาจากความสม่ำเสมอของรูปทรงฝัก ขนาดฝัก การติดเมล็ด สีของเมล็ด จำนวนแถวของเมล็ด และการมีแมลงเข้าทำลายฝัก โดยสังเกตจากทุกฝักที่เก็บมาจากแปลงย่อยเดียวกัน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากจำนวนฝักทั้งหมด ให้คะแนน 1-5 ดังนี้

1 = มีความสม่ำเสมอมากที่สุด (เป็นที่ต้องการ) มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์
2 = มีความสม่ำเสมอมาก อยู่ในช่วง 80-90 เปอร์เซ็นต์
3 = มีความสม่ำเสมอปานกลาง อยู่ในช่วง 70-80 เปอร์เซ็นต์
4 = มีความสม่ำเสมอน้อย อยู่ในช่วง 60-70 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5 = มีความสม่ำเสมอน้อยที่สุด (ไม่เป็นที่ต้องการ) น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

12. เปลือกหุ้มฝัก (husk cover aspect) ให้คะแนน 1-5 ตามความสม่ำเสมอของเปลือกหุ้มฝัก ดังนี้

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

13. ลักษณะการติดเมล็ดเต็มถึงปลายฝัก (tip full) พิจารณาความสม่ำเสมอของการมีเมล็ดติดเต็มปลายฝัก สังเกตจากจำนวนฝักทั้งหมด ให้คะแนนดังนี้

1 = มีเมล็ดติดเต็มฝักสม่ำเสมอมากที่สุด มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์
2 = มีเมล็ดติดเต็มฝักความสม่ำเสมอมาก อยู่ในช่วง 80 – 90 เปอร์เซ็นต์
3 = มีเมล็ดติดเต็มฝักความสม่ำเสมอปานกลาง อยู่ในช่วง 70 – 80 เปอร์เซ็นต์
4 = มีเมล็ดติดเต็มฝักความสม่ำเสมอน้อย อยู่ในช่วง 60 – 70 เปอร์เซ็นต์
5 = มีเมล็ดติดเต็มฝักความสม่ำเสมอน้อยที่สุด น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

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

14.1 ความยาวทั้งฝัก วัดจากส่วนท้ายฝักถึงปลายฝักที่ยาวที่สุด
14.2 ความยาวติดเมล็ด วัดจากส่วนท้ายฝักถึงส่วนปลายฝักที่มีเมล็ดติดสุด
14.3 ความยาวของส่วนปลายฝักที่ไม่ติดเมล็ดหาได้จากความยาวฝัก – ความยาวติดเมล็ด

15. เส้นผ่านศูนย์กลางฝัก (ear diameter) ทำการวัดไปพร้อมกับการวัดความยาวฝักใช้ฝักเดียวกับที่สุ่มมา ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

15.1 ความกว้างฝัก วัดโดยการหักฝักข้าวโพดบริเวณกลางฝักทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางฝัก

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอนเอ (DNA) จากใบข้าวโพดใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Agrawal *et al*., 1992 มีขั้นตอนการทำดังนี้

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

2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง ทุกๆ 10 นาที

3. นำหลอดมาไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 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. ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ จากนั้นเติม linear polyacrylamide ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เพื่อช่วยในการตกตะกอนดีเอ็นเอ และเติม iso-propanol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ได้สายดีเอ็นเอ

6. เกี่ยวดีเอ็นเอไปแช่ใน 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 rpm นาน 1 นาที เพื่อให้ตะกอนนอนก้น

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

9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 rpm นาน 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอนอนก้น

10. เทส่วนน้ำทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษ ซับให้แห้ง หรือนำไปใส่ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

11. เติม RNase buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอให้หมด

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

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

14. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500 rpm นาน 10 นาที

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

16. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12500 rpm นาน 10 นาที

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

18. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 RPM นาน 5 นาที

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

20. เทส่วนน้ำทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษ ซับให้แห้ง หรือปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วละลายตะกอน ดีเอ็นเอใน TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ต่อไป

การตรวจสอบยีนโอเปกทู (*opaque-2*) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR (Simple sequence repeat)

การตรวจสอบยีนโอเปกทูด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย *phi057* (ตารางที่ 1) ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ของทั้งสองสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี โดยเครื่องหมายโมเลกุล SSR มีขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 140-160 bp. ลำดับเบสของไพรเมอร์เหล่านี้สามารถหาได้จากฐานข้อมูลของข้าวโพด (Maize Genome Database) (http://www.maizegdb.org)

ตารางที่ 1 ลำดับเบส SSR primer ของ *phi057*

Marker	Trait	Primer sequence	
		Forward	Reward
Phi057	*Opaque-2*	CTCATCAGTGCCGT GTCCATT	CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC

การวิเคราะห์และวัดปริมาณดีเอ็นเอ

วิธีวัดการดูดกลืนแสงอัลตาไวโอเล็ตโดยใช้ spectrophotometer เป็นวิธีการตรวจสอบคุณภาพ ความบริสุทธิ์และวัดปริมาณดีเอ็นเอจากการวัดค่า optical density (OD) ซึ่งเป็นค่าดูดแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร หรือ OD_{260} โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางแล้ววัดค่า OD_{260} โดยหาความเข้มข้นดีเอ็นเอได้จาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความเข้มข้นจองสารละลายดีเอ็นเอ (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)

การแยกขนาดดีเอ็นเอ

เครื่องหมายโมเลกุล phi057 จะแยกโดยใช้วิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ 6% polyacrylamide gel (19:1) ที่มี 7.5 M Urea และใช้กระแสไฟฟ้า 300-500 โวลต์ ประมาณ 90-120 นาที แล้วย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

ตารางที่ 2 องค์ประกอบในการทำพีซีอาร์ (1 reaction: total volume 20 µl)

สารเคมี	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
ddH_2O	-
Primer, Forword + Reverse (1.0 µM each)	0.25 µM each
Taq Buffer (10X; Mg-free)	1X
$MgCl_2$ (50 mM)	2.5 mM
Glycerol (100%) (Optional)	10%
dNTP Mix (2.5 mM each)	150 µM each
Taq DNA polymerase (5 U/µl)	1 U
DNA (10 ng/µl)	50 ng

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

ตารางที่ 3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

1 Cycle:	30 Cycles:	1 Cycle:
94ºC for 1 min	94ºC for 30 sec 65ºC for 1 min 72ºC for 1 min	72ºC for 5 min

การวิเคราะห์ Total sugar และ Non-reducing sugar

วิเคราะห์ปริมาณ Total Sugar และ Reducing Sugar ทำตามวิธีการของ Nelson (1944) มีขั้นตอนการทำดังนี้

การเตรียมตัวอย่างข้าวโพด

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

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

การวิเคราะห์ Total Sugar

1. ดูดสารละลายจากข้อ 6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 0.1 N HCl 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 °ซ 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 อุณหภูมิ100 °ซ 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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลเพคติน (amylopectin)

วิเคราะห์ปริมาณแอมิไมโลเพคตินจากวิธีการวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสตามวิธีการของ Juliano (1971) มีขั้นตอนการทำดังนี้ (แสดงวิธีการเตรียมสารเคมีใน ภาคผนวกที่ 2)

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

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยชั่งแอมิโลส (amylose) 0.04 กรัม ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม 95% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เติม 1 N NaOH ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนสังเกตการเกิดเจลาติไนเซชั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากันดี

3. การเตรียมตัวอย่างทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม แทนการใส่แอมิโลส

4. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยดูดสารละลายจากข้อ 3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1 N acetic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายไอโอดีนปริมาตร 2 มิลลิลิตร (potassium iodide 2 g: iodine 0.2 g) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทำเช่นเดียวกันอีกแต่ไม่ใส่ตัวอย่างเพื่อใช้เป็น 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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

7. เปลี่ยนค่าดูดกลืนแสงเป็นปริมาณแอมิโลส โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ปริมาณตัวอย่าง 0.1 กรัมของแต่ละตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานแล้วอ่านค่าเป็นร้อยละแอมิโลส ต่อแป้ง 100 กรัม

ปริมาณแอมิโลเปกติน = 100 – ปริมาณแอมิโลส

การเตรียมตัวอย่างการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และปริมาณทริปโตแฟน

มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้

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

2. นำแป้งที่ได้ไปสกัดไขมันด้วยเครื่องสกัดไขมัน (Extraction Unit B-811 BUCHI) ประมาณ 2 ชั่วโมง โดยใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย ทิ้งไว้ให้แห้งเพื่อนำไปใช้วิเคราะห์โปรตีนและวิเคราะห์ทริปโตแฟน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ด้วยวิธี Micro-kjeldahl (Bailey, 1967) แล้วนำมาคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนในเมล็ด (N × 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)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

3. การกลั่น ทำโดยใส่สารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเครื่องกลั่น

4. วาง flask ที่บรรจุสารละลาย H_3BO_3-indicator solution (ภาคผนวกที่ 3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใต้ตัวควบแน่น (condenser) โดยให้ปลายท่อจุ่มลงไปในสารละลายภายใน flask

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

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

7. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนทั้งหมดได้จากสูตร

$$\%\text{Total nitrogen} = \frac{(\text{ml std. } H_2So_4 \text{ samples} - \text{ml std. } H_2So_4 \text{ blank}) \times 0.05018 \times 0.014 \times 50 \times 10^6}{\text{weight (g)} \times 10 \times 10{,}000}$$

การวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟน

วิเคราะห์หาปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนจากการวิเคราะห์หาปริมาณทริปโตแฟนตามวิธีการของ Nurit *et al.* (2009) มีขั้นตอนดังนี้ (แสดงวิธีการเตรียมสารเคมีใน ภาคผนวกที่ 4)

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 แล้วต้องนำไปผสมด้วยเครื่อง (vortex) เพื่อให้แป้งกระจายตัวสัมผัสกับสารละลาย papain อย่างทั่วถึง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. นำตัวอย่างไปบ่ม (incubate) ในตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 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 C ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง (vortex) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

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

$$\% \text{ try} = \frac{OD_{560}}{\text{standard curve slope}} X \frac{\text{hydrolysis volumn}}{\text{sample weight}} X\ 100\%$$

การวิเคราะห์แอนโทไซยานิน

วิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินตามวิธีของ CIMMYT มีดังนี้

1. สุ่มตัวอย่างเมล็ด 20-30 เมล็ด นำไปบดละเอียดจนเป็นผงแป้ง และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 64-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 20 mg ใส่ใน microtube เติม 1% TFA ปริมาณ 1.3 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) และวางหลอดในแนวนอนในน้ำแข็ง เขย่าตัวอย่างเป็นเวลา 90 นาที ที่ 150 รอบต่อนาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14.000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที อ่านค่า absorbances ที่ 520 นาโนเมตร (สกัดครั้งแรก)

3. นำไปสกัดใหม่อีกครั้ง ด้วย 1% TFA ปริมาณ 1.3 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า และวางหลอดในแนวนอนในน้ำแข็ง เขย่าตัวอย่างเป็นเวลา 90 นาที ที่ 150 รอบต่อนาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14.000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นวางไว้บนน้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง อ่านค่า absorbance ที่ 520 นาโนเมตร (สกัดครั้งที่2)

4. การอ่านค่าของ spectrophotometer โดยดูดส่วนใส 200 µl ใส่ใน microplate ควรมีตัวอย่างblank ประกอบด้วย 1% TFA และตัวอย่าง control ได้จากตัวอย่างที่ทราบค่า เขย่าที่ 800 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที อ่านค่า absorbance 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และประเมินค่า total anthocyanin

Standard curve

เตรียม stock solution 100 µl/ml pelargonidin chloride 1% TFA โดยเตรียมความเข้มข้นที่ 0, 1, 3, 5, 10 และ 15 µl/ml เจือจางด้วย 1%TFA ใส่หลอดแก้วขนาด 5 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากันก่อนวัดค่า

การคำนวณค่า Calibration curve

การทำ calibration curve ใช้ pelargonidin ระหว่าง 0-15 µg ระบุค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรและคำนวณค่าความชันของ standard curve โดยใช้หน่วย OD/ µg คำนวณเปอร์เซ็นต์ของ pelargonidin

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\% \text{ Pel} = \frac{OD_{520}}{\text{standard curve slope}} \times \frac{\text{hydrolysis volumn}}{\text{sample weight}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Pel} = \text{OD 520nm corrected x Factor}$$

เมื่อ $OD_{520nm\ corrected} = OD_{520nm\ sample} = OD_{520nm\ average\ of\ methanol\ blanks}$

$$\text{Factor} = \frac{0.0065}{\text{slope}}$$

ตารางที่ 4 แสดงค่า standard curve ของ pelargonidin chloride 1% TFA

No.	Volume of stock pelargonidin chloride100 µl/ml (µl)	1% TFA	Total volume (ml)	Concentration µg pelargonidin chloride / ml
1	0.0	2,500	2.5	0.0
2	25	2,475	2.5	1.0
3	75	2,425	2.5	3.0
4	125	2,375	2.5	5.0
5	250	2,250	2.5	10.0
6	375	2,125	2.5	15.0

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (statistical analysis)

นำข้อมูลผลผลิตทั้งหมดของลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์กับตัวทดสอบมาวิเคราะห์ผลทางสถิติตามแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (randomized complete block design; RCBD) ตามวิธีการของ สุรพล (2536) ซึ่งมีตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ดังตารางที่ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (RCBD)

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

r = จำนวนซ้ำ

t = จำนวนของสิ่งทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

1. ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
2. ศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
3. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาในการทดการทดลอง

เริ่มการทดลองเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2554 – 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบยีนโอเปกทู (o_2o_2) ของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1)

หลังจากผสมพันธุ์ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ *phi057* ตรวจสอบยีนโอเปกทู พบว่าลูกผสมชั่วที่ 1 มียีนโอเปกทูเป็นเป็น heterozygous *(O_2o_2)* ทั้งนี้เนื่องจาก ยีนโอเปกทูจากฝ่ายแม่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) และได้ยีน *non-opaque-2* (O_2O_2) มาจากฝ่ายพ่อ (แฟนซีสีม่วง 111) เมื่อถึงระยะออกดอกได้ผสมตัวเองเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) เก็บเกี่ยวฝักผสมตัวเอง พบว่าฝักมีเมล็ดสีม่วงทั้งฝัก จากนั้นปลูกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) จำนวน 100 ต้น เมื่อต้นข้าวโพดมีใบประมาณ 4 ใบ เก็บใบข้าวโพดมาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกยีนโอเปกทู (o_2o_2) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ *phi057* ผลการทดลอง พบว่า ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ผสมตัวเองในชั่วที่ 1 (S_1) มีลักษณะยีโนไทป์ที่ได้ทั้ง 3 ชนิด คือ homozygous dominant (O_2O_2), heterozygous (O_2o_2) และ homozygous recessive (o_2o_2) จำนวน 22, 60 และ 18 สายพันธุ์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6) เมื่อตรวจสอบการกระจายตัวของสายพันธุ์ผสมตัวเองด้วยไคสแควร์ พบว่ามีการกระจายตัวของยีนโอเปกทูเป็น *1O_2O_2: 2O_2o_2: 1 o_2o_2* ซึ่งไปตามกฎของเมนเดล ถ้าลักษณะของลูกผสมชั่วที่ 1 ควบคุมด้วยยีน 1 คู่ เมื่อผสมตัวเอง 1 ครั้ง ประชากรในชั่วที่ 2 จะมียีโนไทป์กระจายตัวเป็น 1: 2: 1

การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ซึ่งเป็น co-dominant marker แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในยีนโอเปกทู (Chin *et al.,* 1996) พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอ 3 ชนิด (ภาพที่ 1) คือ homozygous dominant (O_2O_2), heterozygous (O_2o_2) และ homozygous recessive (o_2o_2) โดยข้าวโพดปกติที่ไม่มียีนโอเปกทู (o_2o_2) เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 160 bp ส่วนข้าวโพดที่มียีนโอเปกทู ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 170 bp และพบ heterozygous ซึ่งให้ขนาดของแถบดีเอ็นของทั้งสองขนาดสอดคล้องกับการทดลองของ พัชรา (2551), Babu *et al*. (2005) และ Jompuk (2007) ที่รายงานไว้ว่า เมื่อใช้ *phi057* ตรวจสอบในข้าวโพดปกติจะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 160 bp และในข้าวโพด QPM จะให้ขนาดแถบดีเอ็นเอขนาด 170 bp นอกจากนี้ยังสามารถแยก homozygous dominant (O_2O_2), heterozygous (O_2o_2) และ homozygous recessive (o_2o_2) ออกจากกันได้ ทำให้สามารถคัดเลือกแถบดีเอ็นที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) ได้โดยไม่ต้องทดสอบในรุ่นลูก (progeny test) ซึ่งต้องเก็บเมล็ดมาวิเคราะห์หาปริมาณทริปโตแฟนก่อนทดสอบในรุ่นต่อๆ ไป และผลของเครื่องหมายโมเลกุลทำให้สามารถเลือกต้นที่มียีน *opaque-2* ได้ นอกจากนี้แล้ว การคัดเลือกเฉพาะต้นที่เป็นโอเปกทู

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(recessive gene,o_2o_2) สามารถทำได้ก่อนถึงช่วงการผสมพันธุ์ ทำให้สามารถลดขนาดประชากรที่ต้องผสมพันธุ์ ลดค่าใช้จ่าย และย่นระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเพื่อเพิ่มคุณภาพโปรตีนจากยีนโอเปกทู (Ribaut and Hisington, 1998)

ข้าวโพดข้าวเหนียวต้นที่สกัดดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ เมื่อถึงระยะออกดอก และเมื่อถึงระยะสุกแก่ได้เก็บเกี่ยวฝักแล้วแยกตามสีเมล็ดเป็นฝักที่มีเมล็ดสีม่วงและฝักที่มีเมล็ดสีขาว ในฝักเดียวกันจะมีเมล็ดเป็นสีเดียวกันเท่านั้น คือเมล็ดสีขาวหรือสีม่วง (ภาพที่ 2) สายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมเป็นยีนโอเปกทูเหมือนกันจะมีทั้งฝักสีขาวและสีม่วง กล่าวคือ homozygous dominant (O_2O_2) มีฝักสีขาว 21 ฝัก และสีม่วง 1 ฝัก ขณะที่ heterozygous (O_2o_2) มีฝักสีขาว 57 ฝัก และฝักสีม่วง 3 ฝัก และข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (o_2o_2) มีฝักสีขาว 16 ฝัก และฝักที่ม่วง 2 ฝัก ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ในพันธุกรรมเดียวกันจะมีฝักสีขาวมากกว่าฝักสีม่วง และได้ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วงจำนวน 2 สายพันธุ์ (ตารางที่ 6) และได้คัดเลือก 1 สายพันธุ์ เพื่อไปปลูกต่อ แบบฝักต่อแถว (ear to row) จากนั้นปลูกเมล็ด S_2 เพื่อคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรที่ดี ผสมตัวเองจนกระทั่งได้เมล็ดผสมตัวเองชั่วที่ 3 (S_3-seed) ในฤดูถัดมาได้ปลูกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 3 จำนวน 13 สายพันธุ์ และใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ตรวจสอบยีนโอเปกทูอีกครั้งหนึ่งเพื่อเป็นการยืนยันว่าในการผสมตัวเองอีก 2 ครั้งไม่มีการปนเปื้อนของละอองเกสรที่ไม่ใช่ข้าวโพดโอเปกทู ซึ่งพบว่าทั้ง 13 สายพันธุ์ยังคงมียีนโอเปกทูเป็น recessive gene จึง ปลูกและผสมตัวเองอีกหนึ่งครั้งเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) สายพันธุ์เหล่านี้จะนำไปผสมพันธุ์เพื่อสร้างลูกผสม topcross และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ด

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนต้นข้าวโพดสายพันธุ์ ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) ที่จำแนกยีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ *phi057* และตรวจสอบการกระจายตัวโดยใช้ไคสแควร์

คู่ผสม		จำนวนต้น			ไคสแควร์
		O_2O_2	O_2o_2	o_2o_2	$1O_2O_2$: $2O_2o_2$: $1\ o_2o_2$
OTH[1/] X P111[2/]	100	22	60	18	4.32^{ns}

[1/] OTH คู่ผสม Hantra//(Kwi/Q53)-S4-2-8-1-2)-S1-96 , [2/]P111 = ข้าวโพดข้าวเหนียวแฟนซีสีม่วง 111

[ns] Non-significant difference ($p>0.05$)

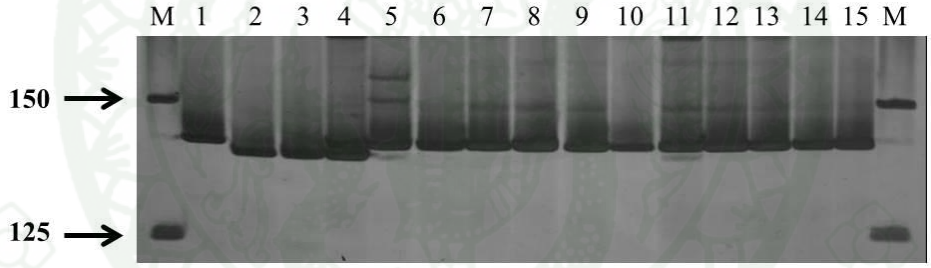
ค่า ไคสแควร์ (chi-square) จากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ df = 2 คือ 5.99

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 แสดงลักษณะสีเมล็ดของสายพันธุ์ ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) เมื่อผสมตัวเองเป็น S_2 แล้วเก็บฝักมาแยกสีเมล็ดเป็นฝักสีขาวและฝักสีม่วง

คู่ผสม	จำนวนต้นที่มียีนโอเปกทูกและสีเมล็ด (ขาวและม่วง)		
	O_2O_2 (ขาว, ม่วง)	O_2o_2 (ขาว, ม่วง)	o_2o_2 (ขาว, ม่วง)
OTH × P111	22 (21, 1)	60 (57, 3)	18 (16, 2)

รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบได้โดยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* การเกิดแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 157 ถึง 165 bp ซึ่งสามารถเห็นได้อย่างชัดเจน ระหว่างแถบดีเอ็นเอที่มียีนโอเปกทู และ non-*opaque-2* แถบดีเอ็นเอในช่องหมายเลข 1, 5-15 แสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่เป็นโอเปกทูส่วนในช่องหมายเลข 2-4 เป็นแถบดีเอ็นเอของข้าวโพดที่เป็น *non-opaque-2* (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ตัวอย่างที่ 1, 5-15 คือข้าวโพดที่มียีนโอเปกทู *(o_2o_2)* และ ตัวอย่างที่ 2-4 คือ *non-opaque-2 (O_2O_2)*

ภาพที่ 3 ลักษณะสีเมล็ดที่เป็นสีเดียวกันทั้งฝักคือ ฝักขาวและฝักสีม่วง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรและคุณภาพทางเคมี

เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจสอบด้วย *phi057* แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของการเกิดแถบดีเอ็นของยีนโอเปกทู ในสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) ซึ่งคัดเลือกสายพันธุ์ที่มียีนเป็น *homozygous recessive* (o_2o_2) ได้ทั้งหมด 13 สายพันธุ์ เมื่อคัดเลือกได้ลักษณะสายพันธุ์ที่มียีนโอเปกทู จากนั้นคัดเลือกโดยดูจากลักษณะสีเมล็ดที่มีสีม่วงได้จำนวน 10 สายพันธุ์ และเมล็ดสีขาวจำนวน 3 สายพันธุ์ การคัดเลือกลักษณะทางการเกษตร (ตารางที่ 8) และการทดสอบคุณภาพทางเคมีดังแสดงในตารางที่ 9 และ 10

จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกยีนโอเปกทูร่วมกับการใช้ลักษณะทางคุณภาพทางเคมีนั้น พบว่าได้ทั้งหมด 13 สายพันธุ์ โดยเฉพาะการหาปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์ม การวิเคราะห์ลักษณะคุณภาพทางเคมี ฝักสดที่นำมาใช้ในการทดลอง มีอายุ 21 วันหลังการผสมเป็นช่วงอายุที่เหมาะแก่การบริโภค ซึ่งแน่นอนว่าสายพันธุ์ที่มียีนโอเปกทูมีปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์มมากกว่าอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับพันธุ์ตรวจสอบทั้งสองพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่ได้มียีนโอเปกทูร่วมอยู่ด้วย พันธุ์พ่อแม่เฉลี่ยอยู่ประมาณ 0.67 เปอร์เซ็นต์ ในฝักสด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนมากกว่าพันธุ์ตรวจสอบ นอกจากนี้แล้วยังมีไลซีน (lysine) เป็นองค์ประกอบเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ปกติ ทั้งนี้เนื่องจากไลซีนและทริปโตแฟนนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากในเอนโดสเปร์มข้าวโพดโอเปกทู โดยถ้าปริมาณของทริปโตแฟนในโปรตีนมีค่าสูงจะพบว่าปริมาณไลซีนก็สูงด้วยเช่นเดียวกัน โดยสัดส่วนประมาณ 1:4 ของ ทริปโตแฟน: ไลซีน (Hernandez and Bates, 1969; Prasanna *et al.,* 2001)

ข้าวโพดเมื่อเทียบกับธัญพืชชนิดอื่นๆ แล้ว มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงกว่า โดยทั่วไปมีประมาณ 7 ถึง 18 เปอร์เซ็นต์ (Bressani and Conde, 1958) ปริมาณโปรตีนในข้าวโพดมีความแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน ในธัญพืชส่วนใหญ่มีระดับโปรตีนค่อนข้างสูงมักมีกรด glutamic และ leucine แต่ในข้าวโพดมีกรดอะมิโน ทริปโตแฟน และไลซีน (Lawton and Wilson, 2003) ปริมาณโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดปกติและข้าวโพด *opaque-2* มีปริมาณใกล้เคียงกัน ตามรายงานของ Vasal (1994) และ Jompuk *et al.,* (2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วงเป็นข้าวโพดที่มีปริมาณน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นอาจนำไปใช้รับประทานฝักสด หรือใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารอื่นๆ ได้ กล่าวคือน้ำตาลทั้งหมดประกอบด้วย monosaccharide ส่วนน้ำตาล non-reducing ประกอบด้วย polysaccharide ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเพิ่มความหวาน (Nelson, 1980) อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลของสายพันธุ์ทั้งหมดที่ได้ โดยเปรียบเทียบพันธุ์ตรวจสอบทั้งสองพันธุ์ และแยกวิเคราะห์เป็นสีขาว และสีม่วงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วัดได้ อยู่ระหว่าง 17 ถึง 70 มิลลิกรัมต่อกรัมในขณะเดียวกันปริมาณน้ำตาล non-reducing ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ซึ่งกับกับ 12 ถึง 31 มิลลิกรัมต่อกรัม ของข้าวโพดสีม่วง ส่วนสีขาวประมาณ 40 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อกรัม

ลักษณะทางการเกษตรของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4

สายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทู ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) ที่คัดเลือกไว้ คือ มีฝักสีม่วงจำนวน 10 สายพันธุ์ (POTH1-10) และฝักสีขาวจำนวน 3 สายพันธุ์ (WOTH11-13) มีลักษณะทางการเกษตร ดังแสดงในตารางที่ 7 จำนวนวันออกดอก และออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ ของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 อยู่ในช่วง 57 ถึง 75 วัน และ 59 ถึง 77 วัน ตามลำดับ ความสูงต้น อยู่ระหว่าง 104 ถึง 160 ซม. และความสูงฝักอยู่ระหว่าง 57 ถึง 89 ซม. ลักษณะที่เกี่ยวเนื่องกับผลผลิต ยกตัวอย่างเช่น น้ำหนักทั้งเปลือกมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 308 ถึง 569 กิโลกรัมต่อไร่ น้ำหนักปอกเปลือกอยู่ในช่วง 203 ถึง 467 กิโลกรัมต่อไร่ เปอร์เซ็นต์กะเทาะตั้งแต่ 63.2 ถึง 97.6 เปอร์เซ็นต์ นอกเหนือจากนี้มีความยาวฝัก อยู่ระหว่าง 8.2 ถึง 14.5 ซม. ความกว้างอยู่ระหว่าง 1.7 ถึง 3.5 ซม.

ระยะเวลาในการปลูกลูกผสมในปี 2013 ได้ปลูกลูกผสมเพื่อเก็บข้อมูลลักษณะทางการเกษตรโดยมีพันธุ์ตรวจสอบจำนวน 2 พันธุ์ คือ แปซิฟิกแฟนซีสีม่วง 111 และพันธุ์บิ๊กไวท์ ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์อินเบรด ผลกระทบในการปลูกในฤดูนี้คือมีการเข้าทำลายของเชื้อโรคตามธรรมชาติ เชื้อที่พบส่วนใหญ่คือ ราสนิม (Southern rust) การเข้าทำลายอยู่ในเกณฑ์ปานกลาง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลทางเคมีในสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 จำนวน 13 สายพันธุ์ และพันธุ์ตรวจสอบ

การวิเคราะห์ทางเคมีของข้าวโพดโอเปกทูสีม่วง (ตารางที่ 9) ของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 ของฝักสดที่อายุประมาณ 21 วันหลังการผสมเกสร มีปริมาณโปรตีนในเอนโดสเปิร์ม มีค่าระหว่าง 9.5 ถึง 15.2 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่พันธุ์ตรวจสอบแฟนซีสีม่วง111 มีค่าเท่ากับ 10.0 เปอร์เซ็นต์ การวิเคราะห์ทริปโตแฟนในโปรตีน จากสายพันธุ์โอเปกทูสีม่วงที่คัดเลือก เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 0.58 ถึง 0.80 พันธุ์ตรวจสอบ มีค่าทริปโตแฟนในโปรตีน 0.28 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลของการวิเคราะห์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีขาวพบว่ามีเปอร์เซ็นต์โปรตีน อยู่ระหว่าง 9.5 ถึง 15.2% และ มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีน อยู่ระหว่าง 0.52 ถึง 0.70% โดยมีค่าเฉลี่ย 0.62 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่พันธุ์ big white มีค่า 0.38 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Jompuk *et al*. (2011) ที่รายงานไว้ว่า ข้าวโพดโอเปกทูมีปริมาณทริปโตแฟนสูงขึ้นเกือบสองเท่าของข้าวโพดปกติ เช่นเดียวกับรายงานของ Sinkangam *et al.* (2011) ที่รายงานในข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีขาว มีปริมาณทริปโตแฟนสูงกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวปกติเกือบสองเท่า ขณะที่มีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน

ผลของแอนโทไซยานินทั้ง 13 สายพันธุ์ พบว่าข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วงจำนวน 10 สายพันธุ์ (POTH1-10) และสีขาวจำนวน 3 สายพันธุ์ (WOTH11-13) ค่าแอนโทไซยานินในข้าวโพดโอเปกทูสีม่วงที่วัดได้เท่ากับ 80.0 ถึง 251.2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (mg/100g) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 138.5 mg/100g ในขณะที่ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีขาว มีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่ระหว่าง 4.9 ถึง 9.5 mg/100g โดยมีค่าเฉลี่ย 7.2 mg/100g จากการทดลองจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า ปริมาณสารแอนโทไซยานินในข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วงมีสูงกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีขาว แสดงให้เห็นถึงคุณค่าทางอาหารที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดเทียนพันธุ์ปกติ โดยข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีขาวจะมีปริมาณทริปโตแฟนที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วงมีทั้งปริมาณทริปโตแฟนและปริมาณสารแอนโทไซยานินที่เพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การรวมลักษณะที่ดีของยีนโอเปกทู และยีนควบคุมสีม่วง ในข้าวโพดเทียนสามารถทำได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยผลผลิต และลักษณะทางการเกษตรของคู่ผสมจำนวน 12 คู่ผสม พันธุ์ตรวจสอบ big white และแฟนซีสีม่วง 111

ลูกผสม	ผลผลิตฝักสด (กก./ไร่)		อัตราแลก	ความสูง (ซ.ม.)		50% วันออกดอก		คะแนน (1-5)		ลักษณะฝัก		จำนวนแถว	สีเมล็ด
	ทั้งเปลือก	ปอกเปลือก	เนื้อ(%)	ต้น	ฝัก	ตัวผู้	ไหม	โรคทางใบ	ลักษณะต้น	ยาว	กว้าง		
POTH1 X POTH10	1593	1195	75.0	156	73	49	52	2.67	2.7	13.74	3.5	13.2	P
POTH2 X POTH10	1479	1252	84.6	169	85	49	51	3.17	2.8	14.40	3.8	14.3	P
POTH3 X POTH10	1763	1422	80.6	158	71	49	53	2.17	2.7	15.63	4.0	13.5	P
POTH4 X POTH10	1479	1252	84.6	145	66	49	52	1.83	2.5	14.59	3.7	13.7	P
POTH5 X POTH10	1536	1081	70.4	153	70	49	52	2.67	3.2	13.61	3.7	13.6	P
POTH6 X POTH10	1138	910	80.0	134	62	49	53	3.00	3.3	13.66	3.7	13.2	P
POTH7 X POTH10	1138	967	85.0	153	62	48	52	3.00	3.0	14.36	3.3	13.1	P
POTH8 X POTH10	1024	853	83.3	145	68	49	53	3.33	3.2	14.42	3.7	12.0	P
POTH9 X POTH10	1138	967	85.0	158	61	49	52	1.83	2.7	12.83	3.5	11.6	P
POTH11 X POTH10	1138	910	80.0	158	69	50	53	2.67	2.8	15.28	3.5	12.1	P/W
POTH12 X POTH10	1308	1024	78.3	162	74	49	52	3.17	3.2	15.16	3.1	12.4	P/W
POTH13 X POTH10	1081	910	84.2	161	80	48	53	2.50	2.8	13.37	3.4	12.4	P/W
ค่าเฉลี่ย	1318	1062	80.9	154	70	49	52	2.67	2.9	14.25	3.6	12.9	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ลูกผสม	ผลผลิตฝักสด (กก./ไร่)		อัตราแลก	ความสูง (ซ.ม.)		50% วันออกดอก		คะแนน (1-5)		ลักษณะฝัก		จำนวนแถว	สีเมล็ด
	ทั้งเปลือก	ปอกเปลือก	เนื้อ(%)	ต้น	ฝัก	ตัวผู้	ไหม	โรคทางใบ	ลักษณะต้น	ยาว	กว้าง		
P111	1652	1224	74.1	169	89	61	63	1.83	2.5	15.30	4.2	12.4	P
Big white	1707	1365	80.0	171	82	48	53	2.50	2.5	15.72	4.1	13.2	W
CV (%)	14.5	15.7	9.1	5.6	9.2	1.9	1.3	17.94	17.6	11.03	7.2	4.5	-
F-test	**	**	ns	**	**	*	*	ns	*	ns	**	**	-
LSD (0.05)	326.4	284.6	-	14.7	10.9	1.6	1.1	-	0.9	-	0.4	1.0	-

ns, * และ ** คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ , มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ตามลำดับ, P111 = ข้าวโพดข้าวเหนียวแฟนซีสีม่วง 111

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 องค์ประกอบทางเคมีของสายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วงในชั่วที่ 4 (S_4) และพันธุ์ตรวจสอบแฟนซีสีม่วง 111

สายพันธุ์	ทริปโตแฟนในโปรตีน (%)	โปรตีน (%)	แอนโทไซยานิน (mg/100g)		น้ำตาล (mg/g)		แอมิโลเพคติน (%)	สีเมล็ด
	ฝักสด	ฝักสด	ฝักสด	ทั้งหมด	รีดิวซ์	นอนรีดิวซ์	ฝักสด	
POTH1	0.64	9.5	124.9	30.7	9.2	21.5	98.5	P
POTH 2	0.75	11.7	144.7	22.0	6.6	15.4	98.5	P
POTH 3	0.59	11.5	103.1	38.9	11.7	27.3	98.3	P
POTH 4	0.72	12.1	210.0	63.0	18.9	44.1	98.7	P
POTH 5	0.54	10.6	158.4	16.8	5.0	11.8	98.6	P
POTH 6	0.58	10.1	251.2	56.0	16.8	39.2	99.2	P
POTH 7	0.79	10.1	74.9	23.9	7.2	16.7	98.0	P
POTH 8	0.80	15.2	80.0	35.8	10.7	25.1	98.8	P
POTH 9	0.58	10.6	98.5	25.6	7.7	17.9	98.2	P
POTH 10	0.70	11.2	139.7	20.8	6.2	14.6	98.7	P
ค่าเฉลี่ย	0.67	11.3	138.5	33.4	10.0	23.4	98.6	
P111	0.28	10.0	190.0	69.7	38.4	31.3	97.3	P
CV (%)	7.9	4.3	18.5	38.2	32.0	41.6	0.5	-
F-test	**	**	*	*	**	ns	*	-
LSD (0.05)	0.1	1.1	65.0	35.9	10.8	-	0.8	-

ns, * และ ** คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ , มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ตามลำดับ, P111 = ข้าวโพดข้าวเหนียวแฟนซีสีม่วง 111

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 คุณภาพทางเคมีของสายพันธุ์อินเบรดของข้าวโพดเทียนสีขาวในรุ่น S_4 และพันธุ์ตรวจสอบ big white

สายพันธุ์	ทริปโตแฟนในโปรตีน (%)	โปรตีน (%)	แอนโทไซยานิน (mg/g)	น้ำตาล (mg/g)			อะไมโลเพคติน (%)		สีเมล็ด
	ฝักสด	ฝักสด	ฝักสด	ทั้งหมด	รีดิวซ์	นอนรีดิวซ์	ฝักแห้ง	ฝักสด	
WOTH11	0.52	11.0	7.1	57.1	17.1	40.0	98.4	98.7	W
WOTH12	0.64	11.7	4.9	58.3	17.5	40.8	98.8	98.7	W
WOTH13	0.70	9.5	9.5	72.0	21.6	50.4	98.5	98.3	W
ค่าเฉลี่ย	0.62	10.7	7.2	62.5	18.7	43.7	98.6	98.6	
Big white	0.38	11.1	8.0	70.8	41.9	28.9	95.8	96.9	W
CV (%)	3.3	9.5	25.5	54.7	43.0	61.9	0.2	0.2	-
F-test	**	ns	*	ns	ns	ns	*	*	-
LSD (0.05)	0.1	-	0.04	-	-	-	0.5	0.7	-

ns, * และ ** คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ตามลำดับ, P111 = ข้าวโพดข้าวเหนียวแฟนซีสีม่วง 111

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะทางการเกษตรและการทดสอบผลผลิตลูกผสม

1. การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน จากแผนการทดลองสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (RCB) ของลักษณะที่ศึกษาทั้งหมด 7 ลักษณะ คือ ลักษณะน้ำหนักฝัดสดทั้งเปลือก น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก อัตราแลกเนื้อ ความสูงฝัก ความสูงต้น อายุวันออกดอกตัวผู้ และอายุวันออกดอกตัวเมีย ดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่า ลักษณะน้ำหนักฝัดสดทั้งเปลือก น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก อัตราแลกเนื้อ ความสูงต้นความสูงฝัก อายุวันออกดอกตัวผู้ อายุวันออกดอกตัวเมียของสิ่งทดลองทั้งหมดแสดงนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะเหล่านี้ มีความแตกต่างกัน

สายพันธุ์พ่อแม่จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนจากลักษณะทั้งหมด พบว่า ทุกลักษณะมีความแตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นเพียง 2 ลักษณะคือ น้ำหนักฝักสดทั้งเปลือก และน้ำหนักฝักสดหลังปอกเปลือก ทำให้ทราบว่าสายพันธุ์พ่อแม่มีน้ำหนักผลผลิตที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อพิจารณาลูกผสม พบว่า ลักษณะน้ำหนักฝัดสดทั้งเปลือก น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก ความสูงต้น ความสูงฝัก ของสิ่งทดลองทั้งหมดแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะเหล่านี้ มีความแตกต่างกัน สำหรับอัตราแลกเนื้อ อายุวันออกดอกตัวผู้ อายุวันออกดอกตัวเมีย พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่ากลุ่มพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีลักษณะดังกล่าวใกล้เคียงกันมาก

2. ลักษณะทางการเกษตร

สายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วงมีจำนวนวันออกดอก และออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ ของอยู่ในช่วง 48 ถึง 50 วัน และ 51 ถึง 53 วัน ตามลำดับ ความสูงต้น และความสูงฝักแตกต่างกันไปแต่ละสายพันธุ์เมื่อพิจารณาจากคู่ผสม ได้แก่ คู่ POTH2 X POTH3 มีทั้งความสูงต้น (169 ซม.) และความสูงฝัก (85 ซม.) สูงที่สุด ในขณะที่ พันธุ์ตรวจสอบทั้งสองพันธุ์คือ พันธุ์บิ๊กไวท์ และ แฟนซีสีม่วง111 มีความสูงต้น และความสูงฝักที่สูงกว่าลูกผสมทั้งหมด ในการให้คะแนนความเป็นโรคทางใบที่เข้าทำลายตามธรรมชาติ ซึ่งโรคที่เกิดส่วนใหญ่ คือโรคราสนิม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Southern Rust) ลูกผสมทั้งหมดและพันธุ์ตรวจสอบทั้งสองพันธุ์มีความต้านทานโรคอยู่ในเกณฑ์ปานกลาง (1.83-3.33)

ลักษณะต้นจากคู่ผสมทั้ง 12 คู่ผสม ลักษณะต้นเป็นไปในแนวทางเดียวกับพันธุ์ตรวจสอบทั้งสองพันธุ์ ลักษณะฝัก ได้แก่ ความยาวฝัก ความกว้างฝัก และจำนวนแถว อยู่ในช่วง 12.8 ถึง 15.3 , 9.8 ถึง 12.3 ซม. และจำนวนแถว 11.6 ถึง 14.3 แถว ในคู่ผสม POTH2 X POTH3 แสดงให้เห็นว่ามีจำนวนแถวสูงที่สุด ส่วน คู่ผสม POTH10 X POTH3 มีจำนวนแถวน้อยสุดเมื่อเทียบกันภายในคู่ผสม (ตารางที่ 12)

3. ผลผลิต

POTH4 X POTH3 ให้ผลผลิตฝักสดทั้งเปลือก และปอกเปลือกสูงที่สุดเท่ากับ 1,763 และ 1,422 กิโลกรัมต่อไร่ ในทางตรงกันข้ามคู่ผสม POTH9 X POTH3 ให้ผลผลิตน้อยที่สุดคือ 1,024 กิโลกรัมต่อไร่ของน้ำหนักฝักสดทั้งเปือก และ 853 กิโลกรัมต่อไร่ของน้ำหนักฝักปอกเปลือก นอกจากนี้แล้ว เปอร์เซ็นต์กะเทาะที่ดีที่สุด 2 คู่ผสม ที่มีเปอร์เซ็นต์กะเทาะเท่ากัน คือ 85 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ คู่ผสม POTH8 X POTH3 และ POTH10 X POTH3 เมื่อเทียบกับพันธุ์ตรวจสอบทั้งสองพันธุ์เปอร์เซ็นต์ กระเทาะของลูกผสมที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่สูงกว่า

การวิเคราะห์ผลทางเคมีของลูกผสม

ปริมาณโปรตีนในเอนโดสเปิร์ม ของลูกผสม มีค่าระหว่าง มีค่าระหว่าง 7.8 ถึง 11.6 เปอร์เซ็นต์ การวิเคราะห์ทริปโตแฟนในโปรตีน จากคู่ผสมที่ได้ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนเท่ากับ 0.49 ถึง 0.77 ในขณะที่พันธุ์ตรวจสอบทั้งสองพันธุ์ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ฝักสด (0.38) ในพันธุ์บิ๊กไวท์ และพันธุ์ P111 ฝักสด (0.28) ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

การวิเคราะห์ผลแอนโธไซยานินในลูกผสมทั้ง 12 คู่ผสม จากอินเบรด 13 สายพันธุ์ มีปริมาณแอนโธไซยานินที่วัดได้เท่ากับ 35.9 ถึง 253.1 มิลลิกรัมต่อกรัม ปริมาณแอนโทไซยานินที่แตกต่างกันมากเป็นผลมาจากในบางคู่ผสมยังมีการกระจายตัวของสีฝัก เช่นคู่ผสม WOTH11 X POTH10, WOTH12 X POTH10 และคู่ผสม WOTH13 X POTH10 (ตารางที่ 13)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลนอนรีดิวซ์ คู่ผสมที่ได้มากที่สุดคือ POTH5 X POTH10 (97.86 และ 68.50 มิลลิกรัมต่อกรัม) ในทางกลับกันคู่ผสมที่วัดค่าของน้ำตาลได้น้อยที่สุดคือ POTH12 x POTH10 (40.66 และ 28.46 มิลลิกรัมต่อกรัม) ดังตารางที่ 13 ปริมาณอะไมโลเพคตินทั้งในฝักแห้ง และฝักสด ปริมาณที่มากที่สุด เท่ากับ 99.2 และ 99.1 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณที่น้อยที่สุดเท่ากับ 98.4 ถึง 97.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลของน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลนอนรีดิวซ์ สายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วง POTH5 เป็นสายพันธุ์ที่มีค่าของน้ำตาลน้อยที่สุด ปริมาณที่วัดได้อยู่ที่ 16.8, 5.0 และ 11.8 สายพันธุ์ที่มีค่ามากสุดคือ POTH4 ปริมาณที่วัดได้ คือ 63.0, 18.9 และ 44.1 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลของขาวโพดสีม่วง (ตารางที่ 9) และสีขาว (ตารางที่ 10) สายพันธุ์ที่วัดค่าของน้ำตาลได้มากที่สุดคือ POTH11 ซึ่งเป็นข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีขาว ปริมาณที่ได้เท่ากับ 72, 21.6 และ 50.4 (ตารางที่ 10) ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลเปคตินในข้าวโพดสีม่วง มีประมาณ 98.2 ถึง 99.1 เปอร์เซ็นต์ ในฝักแห้ง และฝักสด ในข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีขาว มีประมาณ 98.4-98.8 เปอร์เซ็นต์

การหาเปอร์เซ็นต์ของแอโลเปกติน ในข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วง และสีขาว มีค่าใกล้เคียงกับพันธุ์ตรวจสอบทั้งสองพันธุ์ อยู่ระหว่าง 97-99 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าข้าวโพดสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มียีน waxy ปรากฏให้เห็น ที่เป็นเช่นนี้น่าจะเนื่องมาจากข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วงมีฐานพันธุกรรมมาจากข้าวโพดปกติ ยีน waxy นี้ทำให้การสะสมแป้งแอโลเปกติน มีมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ พบในปี ค.ศ. 1943 โดย E. G. Anderson (ทวีศักดิ์, 2540) การเกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ รงควัตถุที่เยื่อหุ้มเอนโดสเปิร์ม aleurone โดย Becraft and Asuncion-Crabb (2000) รายงานว่ายีนที่ควบคุมสีของเยื่อ aleurone ในข้าวโพดปกติคือ CI-I แต่ถ้าทำให้ยีนในโครโมโซมนี้แตกหัก พบว่ายีน CI สามารถแสดงออกได้ ทำให้เยื่อ aleurone มีสีม่วง และยีนนี้ไม่มีผลต่อเอนโดสเปิร์ม การวิเคราะห์ผลแอนโธไซยานินในลูกผสมทั้ง 12 คู่ผสมและจาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะต่างๆ ในรุ่นลูกของคู่ผสมจำนวน 12 คู่ผสม พันธุ์ตรวจสอบ big white และแฟนซีสีม่วง111

Source of variation	DF	Mean squares						
		นน.ทั้งเปลือก (กก./ไร่)	นน.ปอกเปลือก (กก./ไร่)	แลกเนื้อ (%)	ความสูงต้น (ซม.)	ความสูงฝัก (ซม.)	อายุวันออกดอกตัวผู้	อายุวันออกดอกตัวเมีย
Replications	2	4232	35050	53.80	92.3	13.813	2.0	1.2
Treatments	24	705577***	471160***	85.11*	538.7***	189.958***	194.7***	159.6***
Parents	12	17774ns	20882ns	94.54*	439.4***	208.756***	43.8***	44.8***
Parents vs.Crosses	1	15040545***	10136487***	368.61**	4957.6***	182.688*	4136.7***	3281.2***
Crosses	11	152730***	83706***	49.06ns	245.4**	170.111***	1.0ns	1.0ns
Error	48	19125	16692	39.79	69.2	38.924	2.7	2.7
Total	74							
CV (%)		15.88207	18.63147	8.0304	5.65561	8.74907	2.9114	2.78188
LSD 0.05		227.0326	227.0326	10.35558	13.65654	10.24227	2.69755	2.69755

ns, * และ ** คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยผลผลิต และลักษณะทางการเกษตรของคู่ผสมจำนวน 12 คู่ผสม พันธุ์ตรวจสอบ big white และแฟนซีสีม่วง 111

ลูกผสม	ผลผลิตฝักสด (กก./ไร่)		อัตราแลกเนื้อ(%)	ความสูง (ซ.ม.)		50% วันออกดอก		คะแนน (1-5)		ลักษณะฝัก		จำนวนแถว	สีเมล็ด
	ทั้งเปลือก	ปอกเปลือก		ต้น	ฝัก	ตัวผู้	ไหม	โรคทางใบ	ลักษณะต้น	ยาว	กว้าง		
POTH1 X POTH10	1593	1195	75.0	156	73	49	52	2.67	2.7	13.74	3.5	13.2	P
POTH2 X POTH10	1479	1252	84.6	169	85	49	51	3.17	2.8	14.40	3.8	14.3	P
POTH3 X POTH10	1763	1422	80.6	158	71	49	53	2.17	2.7	15.63	4.0	13.5	P
POTH4 X POTH10	1479	1252	84.6	145	66	49	52	1.83	2.5	14.59	3.7	13.7	P
POTH5 X POTH10	1536	1081	70.4	153	70	49	52	2.67	3.2	13.61	3.7	13.6	P
POTH6 X POTH10	1138	910	80.0	134	62	49	53	3.00	3.3	13.66	3.7	13.2	P
POTH7 X POTH10	1138	967	85.0	153	62	48	52	3.00	3.0	14.36	3.3	13.1	P
POTH8 X POTH10	1024	853	83.3	145	68	49	53	3.33	3.2	14.42	3.7	12.0	P
POTH9 X POTH10	1138	967	85.0	158	61	49	52	1.83	2.7	12.83	3.5	11.6	P
WOTH11 X POTH10	1138	910	80.0	158	69	50	53	2.67	2.8	15.28	3.5	12.1	P/W
WOTH12 X POTH10	1308	1024	78.3	162	74	49	52	3.17	3.2	15.16	3.1	12.4	P/W
WOTH13 X POTH10	1081	910	84.2	161	80	48	53	2.50	2.8	13.37	3.4	12.4	P/W
ค่าเฉลี่ย	1318	1062	80.9	154	70	49	52	2.67	2.9	14.25	3.6	12.9	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลูกผสม	ผลผลิตฝักสด (กก./ไร่)		อัตราแลกเนื้อ(%)	ความสูง (ซ.ม.)		50% วันออกดอก		คะแนน (1-5)		ลักษณะฝัก		จำนวนแถว	สีเมล็ด
	ทั้งเปลือก	ปอกเปลือก		ต้น	ฝัก	ตัวผู้	ไหม	โรคทางใบ	ลักษณะต้น	ยาว	กว้าง		
P111	1652	1224	74.1	169	89	61	63	1.83	2.5	15.30	4.2	12.4	P
Big white	1707	1365	80.0	171	82	48	53	2.50	2.5	15.72	4.1	13.2	W
CV (%)	14.5	15.7	9.1	5.6	9.2	1.9	1.3	17.94	17.6	11.03	7.2	4.5	-
F-test	**	**	ns	**	**	*	*	ns	*	ns	**	**	-
LSD (0.05)	326.4	284.6	-	14.7	10.9	1.6	1.1	-	0.9	-	0.4	1.0	-

ns, * และ ** คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 คุณภาพทางชีวเคมี รุ่นลูกของคู่ผสมจำนวน 12 คู่ผสม พันธุ์ตรวจสอบ big white และแฟนซีสีม่วง 111

สายพันธุ์	%ทริปโตแฟน	%โปรตีน	แอนโทไซยานิน (mg/100g)	น้ำตาล (mg/g)		แอไมโลเพคติน(%)	
	ฝักสด	ฝักสด	ฝักสด	Total	Non-Reducing	ฝักแห้ง	ฝักสด
POTH1 X POTH10	0.54	9.0	216.6	95.61	66.93	98.4	98.1
POTH2 X POTH10	0.57	11.6	155.0	80.75	56.53	98.4	98.5
POTH3 X POTH10	0.63	9.7	150.2	59.67	41.77	99.0	98.8
POTH4 X POTH10	0.62	10.6	177.2	82.65	57.86	98.5	98.6
POTH5 X POTH10	0.69	11.6	142.0	97.86	68.50	98.4	98.2
POTH6 X POTH10	0.77	11.6	178.9	57.77	40.44	99.2	98.7
POTH7 X POTH10	0.70	9.9	100.1	43.77	30.64	98.9	97.9
POTH8 X POTH10	0.62	10.9	58.0	58.46	40.92	99.2	98.7
POTH9 X POTH10	0.49	9.2	35.9	54.83	38.38	98.8	98.6
POTH11 X POTH10	0.55	10.0	151.1	77.64	54.35	98.4	98.1
POTH12 X POTH10	0.58	7.8	170.7	65.20	45.64	98.4	99.1
POTH13 X POTH10	0.51	11.0	106.5	40.66	28.46	98.4	98.2
ค่าเฉลี่ย	0.61	10.2	136.9	67.91	47.54	98.7	98.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 (ต่อ)

สายพันธุ์	%ทริปโตแฟน	%โปรตีน	แอนโทไซยานิน (mg/100g)	น้ำตาล (mg/g)		แอไมโลเพคติน(%)	
	ฝักสด	ฝักสด	ฝักสด	Total	Non-Reducing	ฝักแห้ง	ฝักสด
P111	0.28	10.0	190	73.43	35.92	96.2	98.6
Big white	0.30	8.3	8.0	53.97	37.78	98.4	98.4
CV (%)	20.5	14.6	62.7	51.9	51.9	0.6	96.2
F-test	*	ns	**	ns	ns	**	ns
LSD (0.05)	0.3	-	0.1	-	-	1.0	-

ns, * และ ** คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อินเบรด 13 สายพันธุ์ มีปริมาณแอนโธไซยานินที่วัดได้เท่ากับ 35.9 ถึง 253.1 มิลลิกรัมต่อกรัม ของฝักสด และสายพันธุ์อินเบรด 80.0 ถึง 251.2 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยข้าวโพดที่มีส่วนประกอบแตกต่างไปจากข้าวโพดปกติ มักเรียกข้าวโพดเหล่านี้ว่า special corn (Harllauer, 1994)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วง ในประชากรที่เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทู *(o_2o_2wxwx)* ผสมข้าวโพดข้าวเหนียวแฟนซีสีม่วง 111 สามารถสรุปได้ดังนี้

1. สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูที่มีแอนโทไซยานินสูง จำนวน 10 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดสีขาว จำนวน 3 สายพันธุ์ จะเห็นว่าปริมาณที่ได้แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ผลแอนโธไซยานินในลูกผสมทั้ง 12 คู่ผสมและจากอินเบรด 13 สายพันธุ์ มีปริมาณแอนโธไซยานินที่วัดได้เท่ากับ 35.9 ถึง 253.1 มิลลิกรัมต่อกรัม ของฝักสด และสายพันธุ์อินเบรด 80.0 ถึง 251.2 มิลลิกรัมต่อกรัม

2. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ช่วยในการคัดเลือกยีน *opaque-2* และสามารถคัดเลือกยีน *opaque-2* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถแยกจีโนไทป์ที่ต่างกันทั้งสามชนิดได้อย่างชัดเจนลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เป็น opaque-2 *(o_2o_2)* ของ homozygous และ heterozygous และ recessive ได้ สายพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทูสีม่วงที่คัดเลือกไว้ได้มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนอยู่ระหว่าง 0.58 ถึง 0.79 เปอร์เซ็นต์ และของลูกผสมอยู่ระหว่าง 0.49 ถึง 0.77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ตรวจสอบบิ๊กไวท์ (0.38 เปอร์เซ็นต์) และ แฟนซีสีม่วง 111 (0.28 เปอร์เซ็นต์)

ข้อเสนอแนะ

ถึงแม้จะประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนและสารแอนโทไซยานินในข้าวโพดข้าวเหนียว และเรียกว่าข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูสีม่วง แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยยังจะต้องดำเนินการต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งเรื่องคุณภาพการบริโภค ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต่างๆ ของแป้ง เช่น ความเหนียวนุ่ม ความหนาของเพอริคาบ (pericarp thickness) และความหอม เป็นต้น ซึ่งจะเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับผู้บริโภคจะยอมรับพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กมล เลิศรัตน์ และ สราวุฒิ นุศรากุล. 2537. ข้าวโพดซุปเปอร์สวีทพันธุ์ใหม่: พันธุ์ขอนแก่นหวานสลับสี, น. (10-1)-(10-6), *ใน* **รายงานการสัมมนาเรื่อข้าวโพดหวาน ครั้งที่** 2. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

กรมวิชาการเกษตรม. 2539. **พันธุ์พืชไร่**. โรงพิมพ์คุรุสภา, กรุงเทพฯ.

คมสันต์ อำนวยสิทธิ์, ประเทือง สง่าจิตร และ นาลอน สีมูลละ. 2541. ศักยภาพของลูกระหว่างพันธุ์ผสมเปิดของข้าวโพดเทียนพันธุ์พื้นเมือง. น. 57-63 *ใน* **เอกสารการประชุมสัมมนาทางวิชาการ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่** 16. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตพิษณุโลก. พิษณุโลก.

_____. 2544. ข้าวโพดหวานฝักเล็กพันธุ์ “เทียนหวานพิษณุโลก”. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า** 9: 56-57.

ดนุพล เกษไธสง. 2553. **การตอบสนองโดยตรงและตอบสนองรวมต่อการคัดเลือกพันธุ์แบบหมู่ประยุกต์เพื่อเพิ่มลักษณะฝักดกในประชากรข้าวโพดเทียนขอนแก่นคอมโพสิต**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ทวีศักดิ์ ภู่หลำ. 2540. **ข้าวโพดหวาน การปรับปรุงพันธุ์และการปลูกเพื่อการค้า**. โอเอสพริ้นติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ.

ทิพย์ เลขะกุล. 2529. ข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน. **ชาวเกษตร** 67: 4-17.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549. **เคมีอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 2 โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ

พูนพิภพ เกษมทรัพย์. 2552. **ชีววิทยา 2**. พิมพ์ครั้งที่ 3 โครงการตำราวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์มูลนิธิส่งเสริมโอลิมปิกวิชาการและพัฒนามาตรฐานวิทยาศาสตร์ศึกษา, กรุงเทพฯ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ราเชนทร์ ถิราพร. 2539. **ข้าวโพด: การผลิต การใช้ประโยชน์ การวิเคราะห์ปัญหาและการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่เกษตรกร**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่. 2534. ข้าวโพดข้าวเหนียว พันธุ์ SSR TW 8801. *ใน* **สรุปรายงานวิจัยพืชไร่สถาบันวิจัยพืชไร่**, เชียงใหม่.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2514. การปรับปรุงคุณภาพของโปรตีนในข้าวโพด. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร** 4 (1): 59-64.

_____. 2515. อนาคตข้าวโพด opaque-2. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร** 5 (พิเศษ): 193-196.

สุรณี ทองเหลือง ยุพาพรรณ จุฑาทอง สำราญ ศรีชมพร และธำรงศิลป โพธิสูง. 2548. ข้าวโพดข้าวเหนียวแปดแถวลูกผสมเดี่ยว พันธุ์ Kwpsx 7436. น. 585-590 ใน **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43**. สาขาพืช, กรุงเทพฯ.

สุรพล อุปดิสกุล. 2526. **สถิติการวางแผนการทดลอง เล่ม 1**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. พิมพ์ครั้งที่ 1 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรุณทิพย์ เหมะธุลิน, สกุลกานต์ สิมลา, สุรศักดิ์ บุญแต่ง และ สุดาทิพย์ อินทร์ชื่น. 2556. การประเมินชนิดของแอนโธไซยานินในเมล็ดเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง. **แก่นเกษตร41** 1: 592-596.

โอวาท จุฑานนท์. 2513. **ข้าวโพด พืชไร่**. ภาควิชาพืชศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Aoki, H., K. Wada, N. Kuzo, Y. Ogawa and T. Koda. 2004. Inhibitory effect of anthocyanin Colors on mutagenicityinduced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP). **Foods & Food Ingredients Journal of Japan** 209: 240-246.

Babu, R., S.K. Nair, A. Kumar, S. Venkatesh, J.C. Sekhar, N.N. Singh, G Srinivasan and H.S. Gupta. 2005. Two-generation marker-aided backcrossing for rapid conversasion of normal maize lines to quality protein maize (QPM). **Theor Appl Genet** 111: 888-897.

Bailey,J.L. 1967. **Techniques in protein chemistry**. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, New York.

Becraftl, B.W. and Y. Asuncion-Crabb. 2000. Positional cues specify and maintain aleurone cell fate in maize endosperm development. **Development** 127: 4039-4048.

Blinkley, S.W. 2005. **Corn ears for genetics**. Available Source: http://www.carolina.com/biotech/corn_genetics.asp**,** September 17, 2013.

Bressani, R.1966. Protein quality of opaque-2 maize in children, pp. 34-39. *In* E.T.Mertz and O.E. Nelson, eds. **Proceeding of the High Lysine Corn Conference**. Corn Refineries Association Inc. Washington, DC.

Bressani, R. and R. Conde. 1958. Studies on corn protein. IV. Protein and amino content of different corn varieties. **Cereal Chem** 38:35-227.

Cao, G. and Prior, R.L. 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods Enzymol** 299: 51-62

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Counsell, J.N. 1981. **Natural colours for food and other uses. Applied Science Publishers Ltd.**. London. 167 p.

Deepesh, N. De. 2000. **Plant cell vacuoles. CSIRO publishing Collingwood VIC3066**, Australia. 288p.

Doehlert, D.C., T.M. Kuo, J.A. Juvik., E.P. Beers and S.H. Duke. 1993. Characteristic of Carbohydrate Metabolism in Sweet corn (*sugary-1)* Endosperm. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 118: 661-666.

Dey, P.M. and J.B. Harborne. 1993. **Methods in plant biochemistry**, p. 99-131. *In* Flavonoid enzymology. Academic Press. Available Source: http://scripts.cac.psu.edu/courses/plphy/plphy597_hef1/conclude.html

FAO. 1992. **Maize in human nutrition**. FAO food and nutrition series, No. 25. Rome, Italy.

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

Fuleki, T. 1967. **Development of quantitative methods for individual anthocyanin in Cranberry and cranberry products**. Ph.D. thesis Department of Food Science and Technology. Graduate Faculty, University of Massachusetts, 36 Anherst, Massachusetts.

Harakotr, B., B. Suriharn, R. Tangwongchai, M.P. Scott and K. Lurtrat. 2014. Anthocyanin and antioxidant activity in coloured waxy corn at different maturation stages. **Journal of functional food** 9: 109-118

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Harborne, J. B. 1973. **Flavonoids**, pp. 344-345. *In* Miller, L.P. (ed.) 1973. Phytochemistry Vol II: Organic metabolism. Van Nostrand Reinhold Company, New York.

Haullauer, A. R. 1994. **Special corn.** Publish by CRC, Inc USA. 410p.

Hendry, G.A.F. and J.D. Houghton. 1996. **Anthocyanin and betatanins**, Natural Food Colorants Blackie, Glassgow.

Hernandez, H.H. and L.S. Bates. 1969. A modified method for ripid tryptophan analysis in maize. **CIMMYT Research Bull** 13: 35-38.

Jacob, H. J., K. Lindpaintner, S. E. Lincoln, K. Kusumi, R. K. Bunker, Y. P. Mao, D. Ganten, V. J. Dzau and E. S. Lander. 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell** 67: 213-224.

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

Jompuk, P., W. Wongyai, S. Apisitvanich and C. Jampatong. 2007. Combining ability of inbred lines derived from quality protein maize populations. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 41: 433-441

Jompuk, C., P. Cheuchart, P. Jompuk and S. Sirisansaneeyakul. 2011. Improved Tryptophan Content In Maize With Opaque-2 Gene Using Marker Assisted Selection (MAS) In Backcross And Selfing Generations. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 45: 666-674

Kumar, R. and R. singh. 1981. Free Sugar and Their Relationship with Size and Starch Content in Developing Wheat Grains. **J. Sci. Fod. Agr.** 32: 229-234.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lawton, J. W. and C.M. Wilson. 2003. Protein of the kernel, pp. 313-354. *In* **The Chemistry of Cereal Proteins. 2nd ed.** CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Litt, M. and J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet** 44: 397-401.

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

Mazza, G. and Oomah, B.D. 2000. Functional food products from selected canadian crops. Available Source: http://www.agr.gc.ca/food/nff/ cancrops.html. September 17, 2013.

Miniati, E. and G Mazza. 1993. **Anthocyanin in fruits, vegetables and grains**. CRC press, Inc. Florida. p.32

Nelson, O.E. 1980. Opaque-2, floury-2 and high protein maize, pp 156-186. *In* E.T. Mertz and O.E. Nelson, eds. **Proceeding of the High Lysine Corn Conference**. Corn Industries Research Foundation, Washington, D.C.

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

Nurit, E., A. Tiessen, K.V. Pixley and N. Palacios-Rojas. 2009. Reliable and inexpensive colormetric method for determining protein-bound tryptophan in maize kernels. **J. Agric. Food Chem**. 57: 233-7238.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Peaz, A.V., J.L. Helm and M.S. Zuber. 1969. Lysine content of opaque-2 maize kernels having different phenotype. **Crop Sci.** 9: 251-252.

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

Ribaut, J. M. and D. A. Hoisington. 1998. Marker-assisted selection: new tool and strategics. **Trens \in plant Sci.** 3(6): 236-239.

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, L., M.C. 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** 188: 69-79.

Shrikhande, A.J. 1976. Anthocyanins in foods. Crit.Rev.**Food Sci.Nutr**. 7: 193-218

Sinkangam, B. 2012. Marker-assisted selection for quality protein in waxy corn (Zea maysvar ceratina). **Ph.D. Thesis**. 80 p.

Vasal, S.K. 1994. High quality protein corn, pp.80-121. *In* A.R. Hellauer (ed.). 2001. **Specialty Corns**. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A.

Weatherwax, P. 1922. A rare carbohydrate in waxy maize. **Genetics** 7: 568–572.

Zilic, S., A. Serpen, G. Akillioglu, V. Gokmen and J. Vancetovic. 2012. Phenolic compounds, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (Zea mayL.) kernels. **J. Agric. Food Chem** 60: 1224-1231.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีเตรียมสารเคมี

ภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ Total Sugar และ Reducing Sugar

เมล็ดที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ใช้อายุฝัก 21 วันหลังผสมเกสร โดยนำมาบดแล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง จากนั้นดูดใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.7 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที กรองส่วนใสด้านบนด้วยกระดาษกรอง หลังจากนั้นดูดส่วนใสที่ได้ 0.05 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร เมื่อเจือจางแล้วดูดสารละลายที่ได้ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดใหม่ เติม 0.1 N HCL ปริมาตร 0.5 ml ต้มในน้ำเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที รอจนเย็น วัดค่าที่ได้ตามวิธีของ Nelson's reducing-sugar (Nelson, 1980) ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

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)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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)

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

ภาคผนวกที่ 2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์แป้ง (starch analysis)

1. NaOH 1 N solution: ละลาย NaOH 40.0 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. Glacial acetic acid 1 N solution: ละลาย CH_3COOH 60 ml ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และปรับปริมตรเป็น 1 ลิตร

ภาคผนวกที่ 3 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 0.1 N NaOH จำนวน 3 หยด จะได้สารละลายสีม่วงแดง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวกที่ 4 การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ทริปโตแฟน

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

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

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

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวศานนท์ สุขสถาน
เกิดวันที่	7 กรกฎาคม 2529
สถานที่เกิด	อำเภอบางซ้าย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตศึกษา จากสำนักคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์