ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่ | พืชไร่นา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเพื่อเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์ม

Maize Breeding for Increasing Tryptophan Content in Endosperm

นามผู้วิจัย นายอธิวัฒน์ ทรงพินิจ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชูศักดิ์ จอมพุก, Dr.sc.nat.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์วิทิตร ใจอารีย์, Dr.rer.agr.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเพื่อเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์ม

Maize Breeding for Increasing Tryptophan Content in Endosperm

โดย

นายอธิวัฒน์ ทรงพินิจ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อธิวัฒน์ ทรงพินิจ 2554: การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเพื่อเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์ม ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชูศักดิ์ จอมพุก, Dr.sc.nat. 66 หน้า

คุณภาพโปรตีนของข้าวโพดสามารถปรับปรุงโดยใช้ยีน *opaque-2* ที่เป็นยีนด้อยมาแทนที่เมล็ดที่มี o_2o_2 จะมีปริมาณทริปโตแฟน (tryptophan) และไลซีน (lysine) ที่มากขึ้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) พัฒนาสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดไร่ (O_2O_2) ให้เป็นสายพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (o_2o_2) ด้วยวิธีการผสมกลับ (backcross) ร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกยีน *opaque-2* (o_2o_2) การทดลองใช้สายพันธุ์แท้ข้าวโพดพันธุ์ปกติเป็นต้นแม่และใช้สายพันธุ์แท้ข้าวโพด QPM เป็นต้นพ่อ แล้วผสมกลับ (backcross) ไปยังพันธุ์แม่ 2 ครั้ง และผสมตัวเองอีก 3 ครั้งได้ต้น BC_2S_3 ที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) ได้ 2 สายพันธุ์ในคู่ผสม Agron20 x Pop65 C_6-46 และอีก 2 สายพันธุ์ ในคู่ผสม Agron29 x Pop65 C_6-55 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ช่วยในการคัดเลือกยีน *opaque-2* จากการตรวจสอบปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนพบว่า Agron20-1, Agron20-2, Agron29-1และ Agron29-2 มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีน 1.17, 0.88, 1.84 และ 1.46 ตามลำดับ แล้วผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ได้ลูกผสมจำนวน 8 คู่ผสม จากการปลูกทดสอบผลผลิต พบว่าสายพันธ์ลูกผสมให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณทริปโตแฟนในโปตีนอยู่ระหว่าง 1.04 – 1.41 % ซึ่งมากกว่าพันธุ์ SW4452 ที่ไม่มียีน *opaque-2* (0.67 %) ลูกผสมที่ให้ผลผลิตดีที่สุดคือ QPM 1 (1,172 กก./ไร่) ซึ่งไม่แตกต่างกับพันธุ์ SW4452 (1,171 กก./ไร่)

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Athiwat Songpinich 2011: Maize Breeding for Increasing Tryptophan Content in Endosperm. Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Assistant Professor Choosak Jompuk, Dr.sc.nat. 66 pages.

The protein quality of maize (*Zea mays* L.) can be improved by replacing normal *opaque-2* alleles with recessive alleles (o_2o_2). The tryptophan and lysine contents of *opaque-2* kernels (o_2o_2) are increased. The objectives of this study were; 1) to improve the normal inbred lines to QPM inbred lines by backcross method and marker-assisted selection (MAS). The crosses were made between field corn inbred lines and quality protein maize as female and male, respectively. Then, two times of backcross to recurrent parent and following three times of selfing were made to obtain BC_2S_3. In BC_2S_3 by marker assisted selection, *phi057*, two lines of homozygous recessive (o_2o_2) of *opaque-2* gene were obtained from the cross of Agron20 x Pop65 C_6-46 and two lines were obtained from the cross of Agron29 x Pop65 C_6-55. These lines were Agron20-1, Agron20-2, Agron29-1 and Agron29-2 and they had tryptophan content in endosperm about 1.17, 0.88, 1.84 and 1.46%, respectively. Then, eight hybrids were crosed among these lines. The yield trial results showed that tryptophan in protein content in endosperm of QPM hybrid was higher and its range from 1.04 – 1.41 % while variety without *opaque-2* gene was about 0.67%. The best yield of QPM hybrid was QPM 1 (1,172 kg/rai) and was not different from SW4452 (1,171 kg/rai).

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูศักดิ์ จอมพุก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ดร.วิทิตร ใจอารีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำในการศึกษา การทำงานวิจัยตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชเนษฎ์ ม้าลำพอง ประธานการสอบสัมภาษณ์ขั้นสุดท้าย และรองศาสตราจารย์ ดร.งามชื่น รัตนดิลก ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่กรุณาแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ในการสอบสัมภาษณ์ขั้นสุดท้ายให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย ขอขอบพระคุณอาจารย์สุรพล เช้าฉ้อง บุคลากรทุกท่านตลอดจนผู้ใช้แรงงานทุกคนที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือในการงานวิจัยอย่างดียิ่ง และขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรนุช จอมพุก หัวหน้าศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือสำหรับงานวิจัยด้าน marker assisted selection จนงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ตลอดจนบุคคลที่แวดล้อมทั้งหลายที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนและเป็นกำลังใจในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุวรรณ คุณแม่บังอร ทรงพินิจ และพี่อัจฉรา ที่อุปการะและส่งเสริมทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ที่ทำให้ข้าพเจ้าได้ศึกษาจนถึงระดับปริญญาโท ประโยชน์และความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแด่ คุณพ่อคุณแม่ผู้ให้ชีวิตและอยู่เบื้องหลังความสำเร็จทั้งหมดตลอดจนครูอาจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และอบรมสั่งสอนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

อธิวัฒน์ ทรงพินิจ

พฤษภาคม 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	16
อุปกรณ์	16
วิธีการ	20
ผลและวิจารณ์	35
สรุปและข้อเสนอแนะ	51
สรุป	51
ข้อเสนอแนะ	52
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	53
ภาคผนวก	61
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	66

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงองค์ประกอบในการทำพีซีอาร์ (1 reaction; total volume 20 μ)	27
2	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำพีซีอาร์	27
3	แสดงส่วนผสมและปริมาณสารที่ใช้ในการตรียมโพลีอะครีลาไมด์	28
4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์	33
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหลายฤดูปลูก ของแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์	33
6	แสดงจีโนไทป์ของข้าวโพดคุณภาพโปรตีนในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 2 (BC_2F_1) เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ในการตรวจสอบ	35
7	แสดงจีโนไทป์ของข้าวโพดคุณภาพโปรตีนในรุ่นลูกผสมตัวเอง (BC_2S_3) เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi112* และ *phi057* ในการตรวจสอบ	36
8	แสดงการผสมระหว่างสายพันธุ์ที่เป็น o_2o_2 ในรุ่น BC_2S_3 และลูกผสม QPM ที่ได้ทั้ง 8 คู่ผสม	37
9	ค่าเฉลี่ยของผลผลิต อายุวันออกไหม ความสูงต้นความสูงฝัก จำนวนฝักต่อ 100 ต้นเปอร์เซ็นต์ความชื้น และเปอร์เซ็นต์กะเทาะของข้าวโพดลูกผสม QPM และพันธุ์ตรวจสอบ (SW4452) ในฤดูปลูกที่ 1	39
10	ค่าเฉลี่ยของผลผลิต อายุวันออกไหม ความสูงต้นความสูงฝัก จำนวนฝักต่อ 100 ต้นเปอร์เซ็นต์ความชื้นและเปอร์เซ็นต์กะเทาะของข้าวโพดลูกผสม QPM และพันธุ์ตรวจสอบ (SW4452) ในฤดูกาลที่ 2	42
11	ค่าเฉลี่ยของผลผลิต อายุวันออกไหม ความสูงต้นความสูงฝัก จำนวนฝักต่อ 100 ต้นเปอร์เซ็นต์ความชื้นและเปอร์เซ็นต์กะเทาะของข้าวโพดลูกผสม QPM และพันธุ์ตรวจสอบ (SW4452) ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวม 2 ฤดูปลูก	45
12	ค่าเฉลี่ยของความยาวฝัก ความยาวติดเมล็ด จำนวนแถว ความกว้างฝัก ความกว้างซัง ความกว้างแกนซังและลักษณะเมล็ดของข้าวโพดลูกผสม QPM และพันธุ์ตรวจสอบ (SW4452) ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวม 2 ฤดูปลูก	47

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

13 แสดงค่าเฉลี่ยของ ปริมาณโปรตีน ปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนของสายพันธุ์พ่อแม่และ *opaqu -2* 48

14 แสดงค่าเฉลี่ยของผลผลิต ปริมาณโปรตีน ปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนของข้าวโพดลูกผสม QPM กับพันธุ์ตรวจสอบ 50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงแผนผังการผสมร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก	22
2	แสดงยีน *opaque-2* ในสายพันธุ์ที่ใช้เป็นแม่และพ่อ (Agron และ Pop 65) และข้าวโพด *opaque-2* เปรียบเทียบกับข้าวโพดที่คัดเลือก (Agron20-1, Agron20-2, Agron29-1 และ Agron29-2) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057*	35

ภาพผนวกที่

1	แสดงรูปฝักข้าวโพดที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่	62
2	แสดงรูปฝักข้าวโพดพันธุ์ SW4452 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ	62
3	แสดงรูปฝักข้าวโพลูกผสม QPM 1 – QPM 8	63

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CIMMYT	=	The International Maize and Wheat Improvement Center
CV	=	coefficient of variation
ddH_2O	=	double-distilled water
DNA	=	deoxyribose nucleic acid
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
GCA	=	general combining ability
LSD	=	least significant difference
MAS	=	marker assisted selection
min	=	minute(s)
mM	=	millimolar
ng	=	nanogram
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	=	polymerase chain reaction
QPM	=	quality protein maize
QTL	=	quantitative trait loci
RCBD	=	randomezed completely block design
SCA	=	specific combining ability
sec	=	second(s)
SSR	=	simple sequence repeat
U	=	unit(s) of enzyme
μM	=	micromolar
°C	=	degree Celsius

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเพื่อเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์ม

Maize Breeding for Increasing Tryptophan Content in Endosperm

คำนำ

ข้าวโพดเป็นธัญพืชที่ใช้ประโยชน์เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์ หลายๆ ประเทศที่กำลังพัฒนา ดังเช่น อินเดีย ปากีสถาน ตลอดจนประเทศต่างๆ ในแถบลาตินอเมริกา ประชากรส่วนใหญ่จะประสบปัญหาการขาดโปรตีนในสารอาหาร นอกจากนี้ข้าวโพดยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแป้ง น้ำมัน น้ำตาลและผลิตภัณฑ์อื่นๆ อีกด้วย โปรตีนในพันธุ์ข้าวโพดทั่วไป (normal maize) จะขาดกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต คือทริปโตแฟน (tryptophan) และ ไลซีน (lysine) และในการผลิตอาหารสัตว์ได้มีการเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่สัตว์ไม่สามารถสร้างได้เอง กรดอะมิโนที่เติมในอาหารสัตว์ เป็นกรดอะมิโนสังเคราะห์มีราคาแพง จึงทำให้อาหารสัตว์ราคาสูง ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเพื่อเพิ่มคุณภาพโปรตีนจึงเป็นงานที่น่าสนใจ ในช่วงทศวรรษ 1960 นักวิทยาศาสตร์จากมหาวิทยาลัย Purdue ได้ค้นพบยีน *opaque-2* ในข้าวโพดกลายพันธุ์ (mutant gene) อยู่บนโครโมโซมที่ 7 ซึ่งทำให้เมล็ดข้าวโพดมีปริมาณทริปโตแฟนและไลซีนสูงขึ้น ในขณะเดียวกันก็พบว่ายีนนี้มีผลทำให้เกิดแป้งอ่อน (soft chalky dull) ในเมล็ด และเกิดโรคฝักเน่า (ear rot) ได้ง่าย ก่อให้เกิดปัญหากับผลผลิตข้าวโพด ทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร (Villegas, 1994) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด *opaque-2* เพิ่มมากขึ้นจนกระทั่งได้มีการค้นพบ modifying genes ที่มีผลทำให้ข้าวโพดที่มียีน *opaque-2* มีเมล็ดใส (vitreousness) และแข็ง (kernel hardness) เหมือนข้าวโพดปกติ (Vasal, 1994; Lopes and Larkins, 1994) จนในที่สุด พันธุ์ข้าวโพด *opaque-2* หรือปัจจุบันเรียกว่า quality protein maize (QPM) เป็นที่ยอมรับของหลายๆ ประเทศทั่วโลก และที่สำคัญคือ ข้าวโพด QPM มีผลผลิตไม่น้อยกว่าข้าวโพดที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน (CIMMYT, 1999) สำหรับประเทศไทย ได้เคยมีการนำข้าวโพดคุณภาพโปรตีนสูง (QPM) ที่ปรับปรุงโดยศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวสาลีนานาชาติ (International Wheat and Maize Improvement Center, CIMMYT) มาปลูกทดสอบในประเทศไทยแล้ว แต่พบว่าข้าวโพด QPM ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศยังไม่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้ดีเท่าที่ควร แต่พันธุ์หรือสายพันธุ์เหล่านั้นสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงข้าวโพดคุณภาพโปรตีนในประเทศไทยได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดไร่ *(O_2O_2)* ให้เป็นข้าวโพดคุณภาพโปรตีน *(o_2o_2)* โดยวิธีการผสมกลับ (backcross) ร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกยีน *opaque-2 (o_2o_2)*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

แหล่งอาหารโปรตีนที่สิ่งมีชีวิตได้รับคือ โปรตีนจากพืชและสัตว์ โปรตีนจากเนื้อสัตว์มีราคาแพงกว่า และการผลิตเนื้อสัตว์ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงกว่าการผลิตโปรตีนจากพืช ดังนั้นโปรตีนจากพืชจึงเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญมากสำหรับประเทศที่กำลังพัฒนา แต่โปรตีนของพืชมักขาดสมดุลของสัดส่วนกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) ที่มนุษย์ต้องการ ในขณะที่โปรตีนจากสัตว์มีสมดุลของสัดส่วนกรดอะมิโนที่จำเป็นดีกว่าพืช Sauberlich *et al.* (1953) และ Macgregor *et al.* (1961) ได้วิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโนในเมล็ดข้าวโพดพบว่ามี 20 ชนิด โดยจำแนกออกเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นและกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น คือ กรดอะมิโนที่สัตว์สามารถสร้างขึ้นได้เอง ได้แก่ glutamic acid, glutamine, proline, alanine, aspartic acid, asparagine, tyrosine, serine, glysine และ cysteine และกรดอะมิโนที่จำเป็น คือ กรดอะมิโนที่สัตว์ไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ ได้แก่ threonine, valine, arginine, isoleucine, leucine, histidine, lysine, methionine, phenyl alanine และ tryptophan

ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (Quality protein maize)

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของทั้งมนุษย์และสัตว์โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา ดังเช่น อินเดีย ปากีสถาน ตลอดจนประเทศต่างๆ ในแถบลาตินอเมริกา ประชากรส่วนใหญ่จะประสบปัญหาการขาดสารอาหารประเภทโปรตีน นอกจากนี้ข้าวโพดยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแป้ง น้ำมัน น้ำตาลและผลิตภัณฑ์อื่นๆ อีกด้วย ข้าวโพดเป็นแหล่งอาหารคาร์โบไฮเดรตที่ดี แต่เป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่มีคุณภาพต่ำ เนื่องจากภายในเอนโดสเปิร์มข้าวโพดมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต (essential amino acid) และสิ่งมีชีวิตไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ คือไลซีนและทริปโตแฟนอยู่ในปริมาณที่ต่ำ (Food and Agriculture Organization [FAO], 1992) จนกระทั่ง Mertz *et al.* (1964) และ Nelson *et al.* (1965) ได้ค้นพบยีน *opaque-2* ซึ่งเป็นยีนด้อย (recessive gene) อยู่บนโครโมโซมที่ 7 และยีน *floury-2* (semi-dorminant gene) ในข้าวโพดกลายพันธุ์ ซึ่งยีนทั้ง 2 นี้ ส่งผลให้เอนโดสเปิร์มข้าวโพดมีปริมาณของไลซีนและทริปโตแฟนสูงกว่าข้าวโพดทั่วไป จึงทำให้ข้าวโพดมีคุณภาพโปรตีนและคุณค่าทางอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์เพิ่มมากขึ้น

อย่างไรก็ตาม ยังพบปัญหาของข้าวโพดชนิดนี้ คือ ภายในเมล็ดประกอบด้วยแป้งอ่อน (soft endosperm) จำนวนมากซึ่งจะทำให้แมลงเข้าทำลายได้ง่ายโดยเฉพาะในช่วงของการเก็บรักษา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้ยังอ่อนแอต่อโรคฝักเน่า (ear rot) โดยจะส่งผลให้ผลผลิตลดลงกว่า 10-15% จากข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้ในระยะแรกข้าวโพด *opaque-2* ไม่เป็นที่ต้องการของตลาดและเกษตรกร (Villegas, 1994) แต่ปัจจุบันผลผลิตของข้าวโพดเหล่านี้ไม่แตกต่างไปจากข้าวโพดที่ปลูกกันทั่วๆ ไป (CIMMYT, 1999) เนื่องจากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวสาลีนานาชาติได้พบ modifying genes ที่มีผลทำให้เมล็ดข้าวโพดมีลักษณะแข็งใส (vitreousness) เหมือนกับข้าวโพดไร่ทั่วไป (Vasal, 1994; Lopes and Larkins, 1994) ซึ่งข้าวโพดพันธุ์ดังกล่าวนี้รู้จักกันในชื่อ Quality Protein Maize (QPM) สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด QPM ด้วยวิธีดั้งเดิมนั้น นักปรับปรุงพันธุ์จะมุ่งเน้นการถ่ายยีน *opaque-2* และ modifying genes ไปสู่พันธุ์ที่ดีต่างๆ ที่ยังขาดลักษณะที่ต้องการ โดยจะใช้การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการผสมกลับ (backcross) เป็นหลัก

คุณภาพของข้าวโพดโปรตีน

คุณค่าทางอาหารของข้าวโพด *opaque-2* จะมีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกับข้าวโพดไร่ทั่วไป คือ 9-10 เปอร์เซ็นต์ แต่จะมีคุณภาพโปรตีนที่สูงกว่าข้าวโพดไร่ทั่วไป ซึ่งคุณภาพโปรตีนในข้าวโพดจะวัดปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด คือไลซีนและทริปโตแฟน โดยในข้าวโพดทั่วไปจะมีปริมาณของไลซีน ประมาณ 2.6 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณทริปโตแฟน ประมาณ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในข้าวโพด *opaque-2* มีปริมาณของไลซีน และทริปโตแฟน ประมาณ 4 และ 1.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Mertz *et al.*, 1964) นอกจากนี้การศึกษาของ Prasana *et al.* (2001) เกี่ยวกับปริมาณโปรตีนในข้าวโพด QPM พบว่า ปริมาณของทริปโตแฟนและปริมาณไลซีนข้าวโพด QPM มากกว่าข้าวโพดปกติเท่ากับ 55% และ 30% ตามลำดับ

Prasanna *et al*. (2001) ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณโปรตีนในข้าวโพด QPM พบว่า ปริมาณของไลซีนและทริปโตแฟนในข้าวโพด QPM มีมากกว่าข้าวโพดปกติถึง 30 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Bentte and Prasana (2003) ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดสายพันธุ์แท้ที่มีคุณภาพโปรตีนสูงจากอินเดีย และ CIMMYT เปรียบเทียบกับข้าวโพดปกติ (normal maize) พบว่า ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) มีความแตกต่างกันทางสถิติ และมีปริมาณของทริปโตแฟนสูงกว่าข้าวโพดปกติ

Bressani (1966) รายงานการทดลองใช้ข้าวโพด *opaque-2* เป็นอาหารกับเด็ก จำนวน 6 คน ที่มีอายุตั้งแต่ 24-75 เดือน และน้ำหนัก 10.82–19.05 กิโลกรัม พบว่าเด็กเหล่านี้บริโภคโปรตีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.8-15 กรัม ต่อน้ำหนักเด็ก 1 กิโลกรัมต่อวัน ปริมาณไนโตรเจนโดยเฉลี่ยวัดเป็นเปอร์เซ็นต์ของนม ที่บริโภคเท่ากับ 26.4 และ 30.8 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าใช้ข้าวโพด *opaque-2* จะเท่ากับ 28.1 และ 26.0 เปอร์เซ็นต์ ค่าดัชนีของสภาพสมดุลของไนโตรเจน (nitrogen balance index) สำหรับนมเท่ากับ 0.80 ข้าวโพด *opaque-2* เท่ากับ 0.72 และข้าวโพดธรรมดาเท่ากับ 0.31 แสดงให้เห็นว่า ข้าวโพด *opaque-2* มีคุณค่าของโปรตีนเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของนม เด็กในประเทศโคลัมเบีย (Colombia) ที่เป็นโรคขาดสารอาหารสามารถมีสุขภาพเป็นปกติได้เมื่อใช้ข้าวโพด *opaque-2* เป็นแหล่งของโปรตีน (Clark *et al.*, 1977) Bressani and Elias (1979) รายงานการทดลองใช้ข้าวโพดธรรมดา ข้าวโพด *opaque-2* และนม ในเด็กอายุ 4-5 เดือน จากสมการรีเกสชั่นเส้นตรง (linear regression) ของ nitrogen absorbed กับ nitrogen balance พบว่าคุณค่าทางอาหารของข้าวโพด *opaque-2* เท่ากับนม ซึ่งมากกว่าข้าวโพดปกติเกือบสองเท่า

Clark (1966) รายงานว่า ในผู้ใหญ่การบริโภคข้าวโพด *opaque-2* ปริมาณ 300 กรัมต่อวัน จะให้โปรตีนที่ร่างกายต้องการ 93 เปอร์เซ็นต์ และให้พลังงาน 40 เปอร์เซ็นต์ ในทางตรงกันข้าม การบริโภคข้าวโพดปกติปริมาณ 500-600 กรัมต่อวัน จะให้พลังงานอย่างน้อยที่สุด 80 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้โปรตีนเพียง 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Bressani (1966) รายงานว่า ข้าวโพดปกติมีคุณภาพของโปรตีนเป็น 39 เปอร์เซ็นต์ของนม (skim milk) แต่ในข้าวโพด *opaque-2* มีคุณภาพของโปรตีนเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ของนม (skim milk)

ยังมีการทดลองอีกหลายการทดลองที่นำข้าวโพด *opaque-2* ไปใช้กับสัตว์ เช่น สุกร เช่น Maner (1975) ใช้ข้าวโพด opaque-2 เลี้ยงสุกร ผลการทดลองพบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 3.6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดธรรมดา สุกรที่เลี้ยงด้วยข้าวโพดธรรมดาร่วมกับกากถั่วเหลือง จะมีอัตราการเจริญเติบโตพอๆ กับสุกรที่เลี้ยงด้วยข้าวโพด *opaque-2* และการใช้ข้าวโพด *opaque-2* เลี้ยงสุกรตลอดช่วงการเจริญเติบโตไม่ทำให้สมรรถภาพการเจริญเติบโตของสุกรลดลงไปจากเดิม แต่ถ้ามีการเสริมด้วยโปรตีนบางชนิดควบคู่กับข้าวโพด *opaque-2* จะทำให้สมรรถภาพการเจริญเติบโตสูงขึ้น ดังเช่นการทดลองของ Knabe *et al.* (1992) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของสุกรที่เลี้ยงด้วยข้าวโพด QPM จะสูงกว่าการเลี้ยงด้วยข้าวโพดธรรมดา แต่เมื่อเทียบกับการเลี้ยงด้วยข้าวโพดที่มี isolysinic เป็นองค์ประกอบจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ Lopez-Pereira (1992) ศึกษาถึงบทบาทของการใช้ข้าวโพด QPM เป็นส่วนผสมของอาหารสุกรในประเทศบราซิลและเอลซัลวาดอร์ พบว่าราคาอาหารของสุกร จะลดลง เมื่อใช้ข้าวโพด QPM เป็นส่วนผสม การนำข้าวโพด *opaque-2* ไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงไก่ จะทำให้ไก่เจริญเติบโตเร็วและใช้ปริมาณอาหาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่อหน่วยน้อยกว่าข้าวโพดธรรมดา ซึ่งมีผลแตกต่างทางสถิติ (Cromwell *et al.*, 1983) นอกจากนี้ยังมีการใช้ข้าวโพด QPM กับสัตว์อื่นๆ เช่น หนู (Mertz *et al.*, 1965; Bressani *et al.*, 1969)

พันธุกรรมของข้าวโพดคุณภาพโปรตีน

นอกจากการค้นพบยีน *opaque-2* (o_2o_2) (Mertz *et al.*, 1964) และ ยีน *floury-2* (fl_2) (Nelson *et al.*, 1965) ในข้าวโพดกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาคุณภาพโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวโพด คือไลซีนและทริปโตแฟนแล้ว ยังได้มีการค้นพบยีนอื่นๆ อีกอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวกับการปรับปรุงคุณภาพโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวโพด เช่น *opaque-7* (o_7), *opaque-6* (o_6) และ *floury-3* (fl_3) (Mertz, 1994) ตำแหน่งของยีน *opaque-2* จะอยู่บนโครโมโซมที่ 7 ยีน *floury-2* อยู่บนโครโมโซมที่ 4 ยีน *opaque-7* อยู่บนโครโมโซมที่ 10 และยีน *floury-3* อยู่บนโครโมโซมที่ 8 โดยยีน O_2 , O_6 และ O_7 จะแสดงลักษณะทางชีวเคมีที่เป็นผลมาจากการสังเคราะห์ zein เมื่อยีนอยู่ในสภาพที่เป็น homozygous recessive เท่านั้น ส่วนยีน fl_2 และ fl_3 ซึ่งเป็นยีนชนิด semi-dominant จะแสดงออกในลักษณะของการทึบแสงของเมล็ด (kernel) และคุณภาพของโปรตีน

จากการศึกษาของ Habben *et al.* (1995) พบว่า elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) มีสหสัมพันธ์กับปริมาณของไลซีนภายในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวโพด ไปในทางบวก (positive correlation) เช่นเดียวกับในข้าวฟ่างและข้าวบาร์เลย์ แสดงว่าการคัดเลือกจีโนไทป์ที่ให้ค่า EF-1 alpha สูงก็ย่อมได้คุณภาพโปรตีนที่ดีเช่นเดียวกัน Xuelu and Brian (2001) กล่าวถึงสาเหตุการเพิ่มขึ้นของปริมาณไลซีนที่เป็นผลมาจากยีน *opaque-2* เกิดจาก 1) การสังเคราะห์โปรตีนภายใน zein ลดลงและภายใน zein ไม่มีไลซีนเป็นองค์ประกอบ 2) การสังเคราะห์โปรตีนใน non-zein เพิ่มขึ้นและ non-zein มีไลซีนเป็นองค์ประกอบ 3) มีการเพิ่มขึ้นของ free amino acid (FAA) ซึ่งรวมถึงไลซีนด้วย Henry *et al.* (2005) รายงานว่า ยีน *opaque-2* ในข้าวโพด ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในช่วงของการพัฒนาเมล็ด โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะทำหน้าที่เก็บโปรตีนภายในเอนโดสเปิร์ม ซึ่งในพืช teosinte จะมีเมล็ดขนาดใหญ่และจำนวนมาก ซึ่งเป็นการเพิ่มอัตราส่วนของแป้งและการเก็บสะสมโปรตีนด้วย

เป็นที่ทราบกันดีว่า การรวมตัวของยีน (gene combinations) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการผสมพันธุ์ในพืชแต่ละชนิดมักจะมีลักษณะที่ไม่ต้องการติดมาด้วย ยีนที่ได้มาจากการกลาย คือ high lysine หรือ low prolamine mutants นอกจากมีผลต่อการสังเคราะห์ของ zein ที่ลดลงและการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของไลซีนและทริปโตแฟนแล้ว ยังมีผลให้ลักษณะทางชีวเคมีอื่นๆ เปลี่ยนไปด้วย การเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางชีวเคมี คือไลซีนเป็นไปในทิศทางบวก แต่ขณะเดียวกันลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญรวมทั้งลักษณะของเมล็ดกลับเป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม โดยได้มีการรายงานถึงลักษณะที่ไม่ต้องการของข้าวโพด QPM เนื่องมาจากยีน o_2 ในเรื่องการสะสมน้ำหนักแห้ง (dry matter) ทำให้ผลผลิตตกต่ำ ขนาดของเอนโดสเปิร์มลดลง ลักษณะของเมล็ดเป็นแป้งอ่อน ทึบแสง (soft chalky dull) ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของเกษตรกร การเกิดโรค ฝักเน่า ที่เป็นผลมาจากเมล็ดแห้งช้า เพอริคาบ (pericarp) หนา ส่วนของเอ็มบริโอมีขนาดใหญ่น้ำหนักฝักลดลง สีของเมล็ดไม่เหลือง และน้ำหนักของเมล็ดลดลง ทั้งนี้ความแตกต่างของลักษณะต่างๆ ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมพื้นฐาน (genetic backgrounds) ของแต่ละคู่ผสม (Vasal, 1994)

Modifying genes เป็นกลุ่มยีนที่ไม่ทราบบทบาทที่แน่นอน โดยจะมีผลไปเพิ่มหรือลดการแสดงออกของยีนหลัก สำหรับคุณภาพโปรตีนในข้าวโพด modifying genes จะไปส่งเสริมให้เมล็ดที่มียีนหลัก คือ *opaque-2* ซึ่งมีลักษณะทึบแสงและเป็นแป้งอ่อนนั้น มีบทบาทในการเกิดแป้งแข็งบางส่วนทำให้เมล็ดมีลักษณะแข็งและใสเหมือนกับข้าวโพดปกติ จากลักษณะดังกล่าวทำให้ modifying ของยีน *opaque-2* เป็นที่สนใจและเริ่มมีการศึกษากันมากขึ้น โดยรูปแบบของ kernel modification มี 2 ชนิด คือ irregular patterns เป็นส่วนที่แสดงลักษณะการโปร่งแสง (translucent) อาจมีหลายแบบ เช่น เป็นจุดกระจายทั่วเมล็ด เป็นแถบ หรือใสทั้งเมล็ด ส่วน regular patterns เป็นส่วนของ modified ที่แสดงความก้าวหน้าของลักษณะของเมล็ดตั้งแต่ดีที่สุดไปถึงเลวที่สุด (Vasal, 1994) ซึ่ง regular patterns เป็นรูปแบบที่นักปรับปรุงพันธุ์ให้ความสำคัญมากที่สุดในการคัดเลือกลักษณะเมล็ด

Paez *et al.* (1969 a) พบว่าสายพันธุ์บางสายพันธุ์จากพ่อแม่ที่เป็น *homozygous opaque-2* จะให้ลูกที่มีลักษณะเมล็ด 2 ชนิด คือ ลักษณะเมล็ด opaque ทั้งเมล็ด (แป้งอ่อน ทึบแสง) และลักษณะ modifying opaque (ครึ่งเมล็ดมีแป้งอ่อนและอีกครึ่งเมล็ดมีแป้งแข็ง) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า ลักษณะเมล็ดที่เป็น modifying opaque มีปริมาณไลซีนและทริปโตแฟน สูงใกล้เคียงกับเมล็ดที่เป็น opaque ภายในฝักเดียวกัน โดยลักษณะดังกล่าวเป็นผลจาก modified genes complex ซึ่งทำให้ *gene opaque-2* แสดงออกต่างไปจากเดิมในลักษณะของเอนโดสเปิร์ม Vasal (1975) พบว่าลักษณะเมล็ดของ modifying opaque จะผันแปรตามสัดส่วนของ translucent ต่อ *opaque*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vasal *et al.* (1979) ได้เสนอผลการคัดเลือกเพื่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางชีวเคมีของลักษณะเมล็ด modified opaque-2 ว่า ปริมาณโปรตีนในเมล็ดโดยทั่วไปจะเพิ่มขึ้น ส่วนระดับของไลซีนและทริปโตแฟน โดยทั่วไปในเอนโดสเปิร์มจะลดลง แต่ไม่มีผลกระทบกระเทือนต่อคุณภาพโปรตีน ลักษณะการถ่ายทอดของกลุ่มยีน modifying genes เป็นแบบข่มสมบูรณ์ และลักษณะ kernel vitreosity จะพบว่ามีอิทธิพล additive gene มากกว่า dominance gene มีผลงานสนับสนุนอื่นๆ ที่แสดงว่า ลักษณะแป้งอ่อน (soft opaque) และลักษณะแป้งแข็ง (modified opaque) ไม่ส่งผลต่อคุณภาพของโปรตีนในเอนโดสเปิร์ม อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของคุณภาพโปรตีนและ kernel modification หรือความโปร่งแสง พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน (Vasal *et al.*, 1980)

Sriwatanapongse *et al.* (1974) ศึกษาถึงปฏิกิริยาของกลุ่ม modifying gene จากการวิเคราะห์ข้อมูลของการผสมพันธุ์แบบพบกันหมด (diallel) พบว่าการถ่ายทอดลักษณะของ modifier จะซับซ้อน และมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย และจากการวิเคราะห์สมรรถนะการผสม (combing ability) ในลักษณะเมล็ดแข็งใส (kernel vitreosity) พบว่าอิทธิพลของ additive genetic variance จะมีอิทธิพลมากกว่า dominance genetic variance การถ่ายทอดลักษณะเมล็ดในระหว่างลูกผสมที่เกิดจากพ่อแม่ opaque และ modified opaque จะพบอิทธิพลทางแม่ (maternal effect) เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ผลการทดลองนี้สนับสนุนการทดลองของ Vasal *et al.* (1980) ซึ่งรายงานว่าการสะสมของพันธุกรรมที่เป็น modifiers (genetic modifiers) จะเปลี่ยนแปลงลักษณะของเมล็ด ให้มีลักษณะโปร่งแสง ซึ่งอาจจะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นเมล็ด (kernel density) และน้ำหนักหรือไม่ก็ได้ ส่วนการแสดงออกของ modifiers ในลักษณะเมล็ด อาจได้รับอิทธิพลมาจากฝ่ายแม่ (maternal effect) นอกจากนี้บางรายงานสนับสนุนอิทธิพลของ additive gene effect เช่น การศึกษาของ Glover and Mertz (1987) และ Bjarnason and Vasal (1992) พบว่าบทบาทที่สำคัญต่อการแสดงออกของลักษณะเอนโดสเปิร์ม (modified endosperm) ซึ่งเกิดจากหลายยีน (polygenic) นั้น เป็นผลมาจาก additive gene effect

การคัดเลือกลักษณะเมล็ดให้มีลักษณะแข็งใสเหมือนกับข้าวโพดไร่ทั่วไปนั้น ได้มีรายงานของ Vasal *et al.* (1993) ว่าเนื่องจาก *opaque-2* เป็น recessive และลักษณะของ modifier เป็น polygenic ซึ่งไม่สามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ในการบ่งบอกลักษณะ modifier ได้ ในการคัดลักษณะของเมล็ดให้มีประสิทธิภาพนั้น ต้องส่องผ่านแสงไฟ และคัดเลือกเมล็ดที่เป็น *opaque* น้อยกว่า 25%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แหล่งพันธุกรรมข้าวโพดคุณภาพโปรตีน

ปัจจุบันแหล่งพันธุกรรมของ *opaque-2* ที่ได้มาจาก CIMMYT มีแป้งอ่อนประกอบอยู่เพียงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจาก CIMMYT ได้ให้ความสำคัญกับการพัฒนาข้าวโพด *opaque-2* ที่มีเอนโดสเปิร์มเป็นแป้งแข็งมาโดยตลอด ตัวอย่างประชากรข้าวโพด *opaque-2* ที่เป็นแป้งอ่อนที่น่า สนใจ เช่น Tuxpeno *opaque-2* (Population 37), CIMMYT *opaque-2* composite, Composite1 (ปรับตัวได้ในเขต highland), Composite K (ปรับตัวได้ในเขต tropical) และ Puebla *opaque-2* composite (Vasal, 1994) มหาวิทยาลัย Illinois ได้พัฒนาพันธุ์สังเคราะห์ด้วยวิธีการคัดเลือกแบบวงจร (recurrent selection) เช่น SSSS-o_2 (Super Stiff Stalk Synthetic-*opaque-2*), disease oil synthetic (DO-o_2), Syn. A-o_2 และ Syn. B-o_2 (Dudley *et al.*, 1975) มหาวิทยาลัย Purdue พัฒนา Temp. HA-o_2, Temp. HB-o_2 และ Colus synthetic ในปี ค.ศ. 1971 ประเทศอินเดียได้มีการปรับปรุงพันธุ์และนำออกมาเผยแพร่ 3 ประชากร คือ Shakti, Rattan และ Proteina สำหรับในประเทศไทย ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ มีแหล่งพันธุกรรม *opaque-2* คือ Thai *opaque-2* composite ต่อมามีการปรับปรุงพันธุ์ที่เน้นให้มีลักษณะแป้งแข็งและต้านทานโรคราน้ำค้างร่วมด้วย จนได้เป็น Thai *opaque-2* composite # 3 (Sriwatanapongse *et al.*, 1974) นอกจากนี้ที่ CIMMYT ได้มีการเก็บรักษาพันธุ์ข้าวโพด modified *opaque-2* ไว้มาก ซึ่งส่วนใหญ่พันธุ์ข้าวโพดที่เก็บไว้ได้มาจากการพัฒนาและปรับปรุงมามากกว่า 20 ปี โดยประชากรเหล่านั้นจะมีความแตกต่างกัน ทั้งเรื่องการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อม ระยะการสุกแก่ สีของเมล็ดและลักษณะของเอนโดสปิร์ม (Vasal, 1994)

การพัฒนาแหล่งพันธุกรรมข้าวโพดคุณภาพโปรตีนสูง (QPM)

การรวมกันของยีน o_2 และ modifying genes ทำให้ข้อบกพร่องของข้าวโพด *opaque-2* ถูกกำจัดไปและพัฒนาสู่ลักษณะทางการเกษตรที่ดีของข้าวโพด QPM โดยเฉพาะลักษณะของเอนโดสเปิร์มที่เป็นแบบ modified หรือ hard endosperm โดยเริ่มจากแหล่งพันธุกรรมที่ CIMMYT คัดเลือกฝักที่เป็น modified *opaque-2* ออกจากฝักที่เป็น *opaque-2* เพื่อเลือกลักษณะของ modified kernels ที่ดีที่สุดจากแต่ละฝักและนำไปปลูกแบบฝักต่อแถว (ear to row) เลือกต้นที่ดีที่สุดเพื่อผสมตัวเองเก็บฝักที่มีลักษณะ modified ที่ดีเพื่อเก็บไว้ในการพัฒนา การคัดเลือกทั้งระหว่างและภายในฝักจะนำไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อสร้างแหล่งพันธุกรรมของข้าวโพด QPM อย่างไรก็ตามความพยายามดังกล่าว นอกจากเป็นเรื่องที่ยากแล้ว ยังมีความน่าเบื่อและมักจะไม่ประสบความสำเร็จ(Vasal, 1994)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนสูง

ถึงแม้ว่าคุณค่าทางอาหารของข้าวโพด *opaque-2* จะเป็นที่ยอมรับของนักวิชาการโดยทั่วไป แต่ก็ยังพบข้อจำกัดที่เกี่ยวกับข้าวโพดชนิดนี้อีกมาก สุทัศน์ (2514 และ 2515) พบว่าเมื่อมีการถ่ายทอดยีน *opaque-2* เข้าไปในข้าวโพดธรรมดา แม้จะทำให้คุณภาพโปรตีนเพิ่มมากขึ้น แต่ปัญหาที่พบก็คือ การที่เมล็ดมีลักษณะแป้งอ่อน (soft endosperm) สีเหลืองซีดหรือสีขาวขุ่น ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะก่อให้เกิดปัญหาในช่วงของการเก็บรักษาเมล็ดไว้เป็นระยะเวลานาน เนื่องจากมีการเข้าทำลายของแมลง คุณภาพแป้งข้าวโพดที่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ลดลง น้ำหนักเมล็ดเบากว่าข้าวโพดธรรมดา และเกิดโรคฝักเน่าได้ง่าย ส่งผลให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำกว่าข้าวโพดทั่วไป จึงทำให้ข้าวโพด *opaque-2* ไม่เป็นที่ยอมรับของเกษตรกรและตลาด Lambert *et al.* (1969) พบว่า ข้าวโพด opaque-2 อ่อนแอต่อโรคฝักเน่าอย่างมาก ในขณะที่ Goodsell (1968); Paez *et al.* (1969 b) ได้กล่าวถึงปัญหาในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด *opaque-2* ว่ามีลักษณะทางการเกษตรไม่ดีพอ กล่าวคือ มีน้ำหนักเมล็ดเบา ทำให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำกว่าข้าวโพดปกติ

เทคนิคที่ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวโพด *opaque-2* และการแก้ไขข้อบกพร่องในลักษณะที่ไม่ต้องการนั้น นักปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการผสมกลับ (backcross) คือ การนำเอาลูกผสมที่ได้ผสมกลับไปยังพ่อหรือแม่ เพื่อเสริมลักษณะใดลักษณะหนึ่งเพียงไม่กี่ลักษณะเข้าไปยังพันธุ์พืชที่เห็นว่าดีอยู่แล้ว แต่ขาดลักษณะที่ต้องการบางลักษณะ ซึ่งเป็นการถ่ายทอดยีนจากสายพันธุ์หนึ่งไปยังอีกสายพันธุ์หนึ่ง (Allard, 1960) นอกจากนี้ Martin *et al.* (1982) เสนอว่า การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด *opaque-2* ขึ้นอยู่กับลักษณะต่างๆ ทางการเกษตร และลักษณะคุณภาพในการคัดเลือก การศึกษาพันธุกรรมในข้าวโพด *opaque-2* โดยใช้วิธีการคัดเลือกแบบวงจร (recurrent selection) ผลผลิตจะเป็นเพียงลักษณะเดียวที่เป็นตัวชี้คุณค่าทางเศรษฐกิจ ลักษณะสำคัญที่ได้รับความสำเร็จในการคัดเลือก คือ ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความชื้น ลักษณะความแข็งของเมล็ด (kernel hardness) ปริมาณไลซีน น้ำหนักเมล็ด และระดับความโปร่งแสงของเมล็ด (degree of light transmission) ประสิทธิภาพของการปรับปรุงรวมลักษณะต่างๆ นั้น โดยใช้วิธีการคัดเลือกแบบวงจร ทำการทดสอบในรุ่นลูกทั้งแบบ S_2 และแบบ full sib เป็นการทดสอบที่มีประสิทธิภาพสูง

Vasal (1994) กล่าวถึงลักษณะเด่นของการใช้วิธีการผสมกลับ (backcross method) ร่วมกับการคัดเลือกแบบวงจร (recurrent selection) โดยมีวิธีการดำเนินการ คือ 1) ใช้วิธีการคัดเลือกแบบวงจรในสายพันธุ์พ่อแม่ในทุกรอบการคัดเลือก 2) ประเมินคุณภาพของ kernel modified หลังจากทำการผสมกลับ 3) วิธีการคัดเลือกนี้สนับสนุนการสร้างสายพันธุ์อินเบรดของ *opaque-2* และ 4)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ป้องกันการลดการสะสมของ modifiers ประชากรของข้าวโพด QPM ของ CIMMYT ได้มาจากการใช้สองวิธีดังกล่าวร่วมกัน

การปรับปรุงข้าวโพดคุณภาพโปรตีนด้วยวิธีดั้งเดิม (Conventional breeding)

การปรับปรุงคุณภาพโปรตีนในข้าวโพดด้วยวิธีดั้งเดิมจะมีข้อจำกัดในเรื่องการตรวจสอบปริมาณไลซีนและทริปโตแฟน กล่าวคือ ในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของข้าวโพด นักปรับปรุงพันธุ์ไม่สามารถบอกได้ว่าข้าวโพดต้นใดมีปริมาณของไลซีนและทริปโตแฟน สูง จนกว่าจะสิ้นสุดฤดูกาล ซึ่งจะทำให้การผสมพันธุ์ต้องทำทั้งประชากร เนื่องจากบอกไม่ได้ว่าต้นใดที่มีอัลลีล (allele) ของยีน *opaque-2* อยู่ สำหรับการจำแนกข้าวโพด QPM ที่น่าเชื่อถือจะต้องส่งตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ ในขั้นตอนแรกจะวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (เพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด) และปริมาณทริปโตแฟนที่มีอยู่ในส่วนของเอนโดสเปิร์ม ขั้นตอนที่สองเป็นการหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน EF1A ซึ่งมีความสัมพันธ์สูงกับปริมาณของไลซีนในเอนโดสเปิร์ม นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนของไลซีนต่อทริปโตแฟนจะเท่ากับ 4: 1 ในข้าวโพด QPM ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งก็จะสามารถบอกลักษณะของยีนที่ควบคุมอยู่ในพืชต้นนั้นๆ นอกจากนี้ข้อจำกัดของยีน *opaque-2* ซึ่งเป็น recessive ทำให้ต้นข้าวโพดที่มียีนเป็น heterozygous คือมีจีโนไทป์เป็น O_2o_2 แสดงออกเหมือนกับ homozygous dominant (O_2O_2) ซึ่งในการจำแนกความแตกต่างของจีโนไทป์ 2 ชนิดนี้ทำโดยผสมตัวเองของข้าวโพดทุกต้น แล้วนำเมล็ดที่ได้ไปปลูกในฤดูถัดไปเพื่อพิจารณาเฉพาะต้นที่มีการแสดงออกเป็น QPM โดยการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในเอนโดสเปิร์ม ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้ ค่อนข้างสิ้นเปลืองแรงงาน ค่าใช้จ่าย และเสียเวลาค่อนข้างมาก (Dreher *et al.*, 2000)

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนสูง

ในปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) เข้ามามีส่วนช่วยเร่งกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ให้เร็วขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในกระบวนการคัดเลือกพันธุ์พืช อย่างไรก็ตาม ก่อนที่จะได้มาซึ่งเครื่องหมายโมเลกุล จะต้องมีการศึกษาตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะที่ศึกษาก่อน ซึ่งอาจเป็นการศึกษาของลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci ; QTL) หรือลักษณะคุณภาพ (qualitative trait) โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้ยีนมากที่สุดสามารถเข้ามามีบทบาทที่สำคัญในการเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือก ลดระยะเวลาในการดำเนินการ ประหยัดงบประมาณ โดยสามารถทดแทนการทดสอบในสภาพจริงในบาง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขั้นตอน ซึ่งกระทำได้ยากในบางลักษณะ ดังนั้นประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกจึงขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น 1) ความถูกต้องแม่นยำในการวางตำแหน่งยีน โดยการใช้หลักการวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะปริมาณ 2) ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลและยีนที่ทำการถ่ายทอด และ 3) พื้นฐานทางพันธุกรรมของพันธุ์ที่จะได้รับการถ่ายทอดยีน

ความไม่ต่อเนื่องในการพัฒนาไปสู่สายพันธุ์อินเบรดที่ดี สำหรับยีน *opaque-2* ร่วมกับ modifying genes นั้น เป็นผลมาจาก 3 สาเหตุ คือ 1) การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับแบบดั้งเดิมในแต่ละรุ่นต้องผสมตัวเองเพื่อแยก *opaque-2* และต้องผสมกลับอย่างน้อย 6 ชั่ว เพื่อให้ระดับของการถ่ายทอดลักษณะต่างๆ เป็นที่น่าพอใจ 2) การรักษา homozygous *opaque-2* และ multiple modifier ต้องมีการคัดเลือก และ 3) กระบวนการทางชีวเคมี ในการตรวจสอบปริมาณไลซีนและทริปโตแฟนที่ทำในแต่ละชั่ว ต้องใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์จำนวนมาก รวมทั้งแรงงานและเวลาด้วย การปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมจนกระทั่งได้เป็นพันธุ์การค้านอกจากใช้เวลานานแล้ว การตรวจสอบลักษณะที่ต้องการต่างๆ ก็ทำได้โดยการพิจารณาถึงลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) ซึ่งไม่สามารถบอกจีโนไทป์ (genotype) ที่แท้จริงของพืชต้นนั้นได้ แต่การใช้เทคนิคทางเครื่องหมายโมเลกุล หรือ marker assisted selection (MAS) สามารถตรวจสอบได้ว่าพืชต้นนั้นมีอัลลีลที่ต้องการอยู่หรือไม่โดยไม่ต้องรอประเมินจากลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) ข้อแตกต่างที่ชัดเจนของวิธีการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลกับวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมในยีน *opaque-2* คือ 1) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกยีน *opaque-2* ซึ่งเป็น receesive gene จะใช้เพียงใบบางส่วนของต้นที่มีขนาดเล็ก ไปสกัดดีเอ็นเอ ทำให้สามารถวิเคราะห์ลักษณะของพืชต้นนั้นได้ตั้งแต่ช่วงแรกของการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์จะคัดเลือกต้นที่ไม่มียีน *opaque-2* ออกก่อนทำการผสมพันธุ์ นั่นหมายถึงขนาดของประชากรที่จะต้องผสมพันธุ์จะลดลง เป็นการประหยัดทั้งเวลาและแรงงาน 2) เครื่องหมายโมเลกุลสามารถแยกพืชต้นที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous recessive (o_2o_2) และ heterozygous ที่มีอัลลีลของ o_2 เพียงอัลลีลเดียวออกจากันได้ (Ribaut and Hoisington, 1998)

Hamada *et al.* (1982) กล่าวว่าดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำขนาดสั้นๆ เพียง 1-4 คู่เบส แต่ไม่เกิน 10 คู่เบส ที่พบอยู่ภายในดีเอ็นเอของยูคาริโอท มีชื่อเรียกว่า simple sequence repeat (SSR) หรือ microsatellite DNA โดยได้มีการนำไปใช้ในการศึกษาแผนที่จีโนม การแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการประเมินระดับของการกระจายตัวของพันธุกรรม (Yang *et* al., 1994; Choukan and Warburton, 2005) SSR สามารถบอกได้ว่ามียีนที่ต้องการอยู่ในพืชต้นนั้นหรือไม่ โดยการสังเคราะห์ primer ขึ้นมาซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ SSR ของยีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

opaque-2 มาเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) (Saiki *et al.*, 1988) แล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีส (eletrophoresis) เพื่อแยก amplified DNA บนเจลชนิดต่างๆ จะทราบได้ว่า พืชต้นนั้นมีอัลลีลของ *opaque-2* ทั้ง 2 alleles หรือมีเพียงอย่างละ 1 allele (Jompuk, 2007) SSR ยังพบอยู่ในจีโนมของพืชหลายๆ ชนิด เช่น ข้าวโพด (Senior and Heun, 1993) ข้าว (*Oryza sativa* L.) (Wu and Tanksley, 1993) ถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) เป็นต้น Saghai Maroof *et al.* (1994) และ Rongwen *et al.* (1995) รายงานการเกิด polymorphism ของ SSR จะดีกว่าใน RFLPs สำหรับพืชหลายๆ ชนิด เช่น ถั่วเหลือง เป็นต้น

การนำเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามามีส่วนร่วมในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบันช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์พืชทำได้เร็วขึ้น โดยเฉพาะการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกพันธุ์พืช (Marker-Assisted Selection; MAS) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้ยีนมากที่สุดจะสามารถเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกพืชได้ สามารถตรวจสอบอัลลีลที่ต้องการโดยไม่ต้องรอประเมินจากลักษณะของฟีโนไทป์ทำให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพ และช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ลงได้

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือ SSR marker (simple sequence repeat) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) ลำดับเบสมีลักษณะซ้ำเรียงต่อเนื่องกัน แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยเบส 1-6 เบส ลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลท์มักเป็นลำดับเบสจำเพาะมีเพียงชุดเดียวในจีโนม (unique sequence) สามารถนำมาออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์ (primer) ที่มีลำดับเบสเหมือนหรือเป็นคู่สมกับลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเพียงเล็กน้อย จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเฉพาะเพียงตำแหน่งเดียว ผลการตรวจจึงมีความแม่นยำ นอกจากนี้ SSR marker ยังเป็นเครื่องหมายที่มีพอลิมอฟีซึม (polymorphism) สูง และส่วนใหญ่เป็น co-dominance marker สามารถแยกจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสออกจากกันได้ (สุรินทร์, 2552) สำหรับการคัดเลือกยีน *opaque-2* การใช้ SSR marker ทำให้สามารถแยกต้นที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous recessive (o_2o_2) และ heterozygous (O_2o_2) ที่มีอัลลีลของ o_2 เพียงอัลลีลเดียวออกจากกันได้ (Ribaut and Hoisington, 1998) ทำให้ช่วยลดประชากรที่ไม่ต้องการในช่วงก่อนการผสมพันธุ์ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในปี 2001 ได้มีการเผยแพร่ primer 3 ตัวซึ่งเป็น SSR marker คือ *phi112*, *umc1066* และ *phi057* ที่มีความจำเพาะกับยีน *opaque-2* ใน www.agron.missouri.edu ซึ่งเป็นการง่ายต่อการศึกษาและการใช้ประโยชน์อย่างมาก โดย *phi112* อยู่ระหว่าง G box และ 3 upstream open reading frames (uORFs) ส่วน *umc1066* และ *phi057* จะอยู่บน exon 1 และ exon 6 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม polymorphism ของ primer ทั้ง 3 มีความแตกต่างกัน คือ *phi112* เป็น dominant marker ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการแยกจีโนไทป์ของ *opaque-2* ออกเป็น 3 จีโนไทป์ แต่เป็นประโยชน์ด้านการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ในช่วงรักษา (maintain) สายพันธุ์อินเบรด QPM สำหรับ *phi057* และ *umc1066* เป็น co-dominant marker ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous กับ heterozygous ได้ การแยก heterozygous ในช่วงก่อนผสมพันธุ์จะเป็นการลดประชากรที่ไม่ต้องการเป็นการประหยัดแรงงานและเวลาลงได้มาก (Babu *et al.*, 2005)

Bentte and Prasanna (2003) ได้ศึกษา SSR marker ดังนี้ *bnlg439*, *phi057*, *blng125*, *dupssr34* และ *bnlg105* ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างของ polymorphism สูงในการคัดเลือกข้าวโพดที่มีพันธุกรรมเป็น QPM พบว่า marker ที่จำเพาะกับยีน *opaque-2* คือ *phi057* ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างของจีโนไทป์ของ *opaque-2* ได้ดี

พัชรา (2551) พบว่า การใช้เครื่องหมายเลกุล *phi057* ช่วยในการคัดเลือกยีน *opaque-2* สามารถคัดเลือกข้าวโพดที่มียีน *opaque-2* จากประชากรข้าวโพดได้อย่างมีประสิทธิภาพและข้าวโพดที่คัดเลือกได้มีปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์มสูงเช่นเดียวกับข้าวโพด *opaque-2*

อินบรีดดิง (Inbreeding)

อินบรีดดิงเป็นการผสมใดๆ ก็ตามที่ทำให้อัตราส่วนของความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygosity) เพิ่มขึ้น เช่น การผสมตัวเอง การผสมระหว่างพี่น้อง การผสมระหว่างพวกที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน เป็นต้น เป็นการเปิดโอกาสให้ยีนที่เหมือนกันมาเข้าคู่กัน โดยการผสมตัวเองเป็นการเพิ่มอัตราของโฮโมไซโกซิตีได้เร็วที่สุด รองลงไป คือ การผสมระหว่างพี่น้องร่วมพ่อแม่ และการผสมแบบอื่นๆ ก็ให้อัตราส่วนของพันธุ์แท้ช้าลงแล้วแต่ความห่างไกลของความสัมพันธ์ระหว่างพืชที่ผสมกัน (ไพศาล, 2526) โดยในแต่ละครั้งของการผสมตัวเองพืชแต่ละต้นจะเข้าสู่สภาพความคงตัวทางพันธุกรรม 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากผสมตัวเองมากกว่า 6 ครั้งขึ้นไป พืชจะแสดงความแตกต่างกันในลักษณะโดยทั่วๆ ไปน้อยมาก จึงถือว่าพืชมีความคงตัวทางพันธุกรรม (กฤษฎา, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการผสมตัวเอง (self pollination) เป็นวิธีมาตรฐานที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชเลือกใช้เพื่อพัฒนาสายพันธุ์แท้สำหรับผลิตลูกผสม (Hallauer, 1990) เป็นการใช้ประโยชน์จากอินบรีดดิง (inbreeding) ที่ทำให้ได้สายพันธุ์แท้เร็วที่สุด โดยทั่วไปจะทำการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในแต่ละชั่วควบคู่ไปด้วย เช่น ความแข็งแรงของต้น ลักษณะทรงต้น การต้านทานโรค เป็นต้น เมื่อผ่านไป 3-4 ชั่ว สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้จะเริ่มมีความคงตัวทางพันธุกรรม (uniform) ภายในสายพันธุ์ และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน (Sprague and Eberhart, 1977)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์ข้าวโพด

1.1 พันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนสูง (Quality Protein Maize; QPM) ที่พัฒนาโดยศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวสาลีนานาชาติ (CIMMYT) คือ Pop65C_6 QPM ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดเขตร้อน มีอายุเก็บเกี่ยวปานกลาง ลักษณะเมล็ดสีเหลืองหัวแข็ง (Tropical Maize Late Flowering Yellow Flint; TLYF) มีปริมาณโปรตีนในเอนโดสเปิร์มทั้งหมด 7.30 % และปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีน 0.665 % (Jompuk, 2006)

1.1.1 Pop65C_6-46

1.1.2 Pop65C_6-55

1.2 สายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดไร่ ที่ได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดไร่ของภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้แก่

1.2.1 Agron20 (origin Cargill 919)

1.2.2 Agron29 (origin Uni-H 9728)

1.3 ข้าวโพดไร่ลูกผสมเดี่ยว (single cross hybrid) พันธุ์สุวรรณ 4452 (SW4452) ซึ่งเป็นพันธุ์การค้าของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อายุเก็บเกี่ยว 100-120 วัน ผลผลิตสูง ปรับตัวได้กว้างใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1.1 ไนโตรเจนเหลว

2.1.2 CTAB (Cethyl trimethyl ammonium bromide)

2.1.3 Sodium chloride

2.1.4 EDTA (Ethylenediamine tetraacetate)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.5 Tris-HCL

2.1.6 2- Mercaptoethanol

2.1.7 Chloroform

2.1.8 Isoamyl alcohol

2.1.9 Ethanol

2.1.10 Ammonium acetate

2.1.11 RNase

2.1.12 Iso-propanol

2.1.13 Sodium acetate

2.1.14 RNase A

2.1.15 Phenol

2.1.16 Ammonium persulphate (APS)

2.1.17 TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamide)

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำ SSR

2.2.1 Ultra pure water

2.2.2 $MgCl_2$

2.2.3 dNTP

2.2.4 Taq DNA polymerase

2.2.5 Primer

phi057

forward; 5'- CTCATCAGTGCCGTCGTCCAT-3'

reverse; 5'-CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC-3'

phi112

forward 5'- TGCCCTGCAGGTTCACATTGAGT-3'

reverse 5'- AGGAGTACGCTTGGATGCTCTTC-3'

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ denaturing polyacrylamind gel electrophoresis และการย้อมแถบดีเอ็นเอ

2.3.1 Bind silane

2.3.2 Repel silane

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3.3 Glacial acetic acid

2.3.4 Acrylamide

2.3.5 Bisacrylamide

2.3.6 Tris-borate

2.3.7 Tris-base

2.3.8 Formamide

2.3.9 Bromphenol blue

2.3.10 Xylene cyanol

2.3.11 Boric acid

2.3.12 Agarose

2.3.13 Glycerol

2.3.14 Ethidium bromide

2.3.15 Ammonia

2.3.16 Sliver nitrate

2.3.17 Sodium hydroxide

2.3.18 Formaldehyde

2.3.19 Sodium carbonate

2.3.20 Molecular weight standard

2.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.4.1 Hexane

2.4.2 98% Sulfuric acid, standard 0.05018 N Sulfuric acid

2.4.3 Catalyst (Na_2SO_4 100g: Se 1g)

2.4.4 10 N Sodium hydroxide, 0.1 N Sodium hydroxide

2.4.5 Boric acid indicator solution

2.4.6 95% Ethyl alcohol

2.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ tryptophan

2.4.1 Haxane

2.4.2 Sodium acetate anhydrous

2.4.3 Ferric chloride hexahydrate

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.4.4 Acetic Anhydride

2.4.5 DL-Tryptophan

2.4.6 Papain Enzyme

2.4.7 Hydrochloric acid

2.4.8 Sodium triosulfate

2.4.9 Metyl red

2.4.10 Bromocresol green

3. อุปกรณ์

3.1 โกร่งบดตัวอย่าง

3.2 หลอดทดลอง

3.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

3.4 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.5 เครื่องเซนตริฟิวจ์

3.6 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้

3.7 ชุด sequencing gels

3.8 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

3.9 เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

3.10 Spectophotometer

3.11 เครื่อง electrophoresis สำหรับ acrylamide gels

3.12 Cyclone mill

3.13 เครื่องแก้ว

3.14 pH meter

3.15 Shaker, Vortex-Genie2

3.16 เครื่องสกัดไขมัน (SER 148 extraction unit by solvent)

3.17 กระดาษกรอง

3.18 ปิเปต

3.19 Incubater

3.20 หลอดเซนตริฟิวจ์

3.21 เครื่องฉายแสงอุลตร้าไวโอเล็ตและเครื่องฉายภาพดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. ผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดปกติเป็นต้นแม่ (recurrent parent) กับสายพันธุ์อินเบรด QPM ที่ปรับตัวได้ดีกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยเป็นต้นพ่อ (donor parent) ได้ลูกผสมจำนวน 2 คู่ผสมคือ Agron20 x Pop65C_6-46 และ Agron29 x Pop65C_6-55 แล้วใช้วิธีการผสมกลับ (backcross) ไปหาสายพันธุ์อินเบรดที่ใช้เป็นต้นแม่ (recurrent parent) โดยทำต่อมาจากวิทยานิพนธ์พัชรา (2551) จากรุ่น BC_1F_1 ผสมกลับไปหาสายพันธุ์อินเบรดที่ใช้เป็นต้นแม่ (recurrent parent) อีก 1 ครั้ง

2. ได้สายพันธุ์ BC_2F_1 จากนั้นใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* (SSR marker) ซึ่งอยู่ใกล้กับยีน *opaque-2* ช่วยในการคัดเลือกต้นที่เป็น heterozygous (O_2o_2) แล้วผสมตัวเอง (self) ไว้เพื่อให้เกิดการกระจายตัวเป็น 3 แบบ คือ homozygous dominant (O_2O_2), heterozygous (O_2o_2) และ homozygous recessive (o_2o_2) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* คัดเลือกต้นที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) จากนั้นผสมตัวเองเพื่อเพิ่มระดับความคงตัวทางพันธุกรรมจนถึงรุ่น BC_2S_3

3. นำต้นที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) ในรุ่น BC_2S_3 ผสมข้ามกันระหว่างคู่ผสม Agron20 x Pop65C_6-46 และ Agron29 x Pop65C_6-55 แล้วนำลูกผสมที่ได้ไปทดสอบผลผลิตโดยแสดงรายละเอียดด้านล่าง (ภาพที่ 1)

ฤดูปลูกที่ 1

ปลูกสายพันธุ์อินเบรด (Agron20 และ Agron29) เป็น recurrent parent และข้าวโพดคุณภาพโปรตีนที่ตรวจสอบว่ามียีน *opaque-2* ใช้เป็น donor parent ได้เป็นลูก F_1 จำนวน 2 คู่ผสม คือ Agron20 x Pop65C_6-46 และ Agron29 x Pop65C_6-55

ฤดูปลูกที่ 2

ปลูกต้น F_1 ของทั้ง 2 คู่ผสม คู่ผสม ซึ่งประชากรชั่วนี้ จะมีต้นที่มียีนที่เป็น heterozygous (O_2o_2) เลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรต่างๆ ที่ดี แล้วนำไปผสมกลับไปยังพันธุ์รับ (recurrent parent) ได้ลูกเป็น BC_1F_1 ในฤดูที่ 1 และฤดูที่ 2 ได้มาจากวิทยานิพนธ์ พัชรา (2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฤดูปลูกที่ 3

ปลูก BC_1F_1 จำนวน 200 ต้นต่อ คู่ผสม ซึ่งประชากรชั่วนี้ จะมีต้นที่มียีนที่เป็น heterozygous dominant (O_2O_2) และ heterozygous (O_2o_2) สุ่มเลือกต้น 100 ต้นต่อคู่ผสม เพื่อตัดใบสกัดดีเอ็นเอ ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* เลือกต้นที่เป็น heterozygous (O_2o_2) แล้วผสมกลับไปหา recurrent parent ลูกที่ได้เป็น BC_2F_1

ฤดูปลูกที่ 4

ปลูกต้นที่เป็น BC_2F_1 โดยประชากรชั่วนี้ จะมีต้นที่เป็น homozygous dominant (O_2O_2) และ heterozygous (O_2o_2) ตัดใบสกัดดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* เลือกต้นที่เป็น heterozygous (O_2o_2) แล้วผสมตัวเอง (self) ของต้นที่เป็น heterozygous ไว้ ได้ลูก BC_2S_1

ฤดูปลูกที่ 5

นำเมล็ด BC_2S_1 ที่ทำการผสมตัวเองไว้ในฤดูที่ผ่านมา มาปลูกและผสมตัวเองต่อ โดยไม่ได้มีการคัดเลือกต้นที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) เนื่องจากเกิดปัญหาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แต่ได้มีการเลือกต้นให้มีลักษณะที่สม่ำเสมอมากขึ้น

ฤดูปลูกที่ 6

ผสมตัวเองในรุ่น BC_2S_2 เพื่อเลือกต้นให้มีลักษณะที่ดีและสม่ำเสมอมากขึ้น โดยไม่ได้มีการคัดเลือกต้นที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) เนื่องจากเกิดปัญหาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เช่นเดียวกับฤดูที่ 5

ฤดูปลูกที่ 7

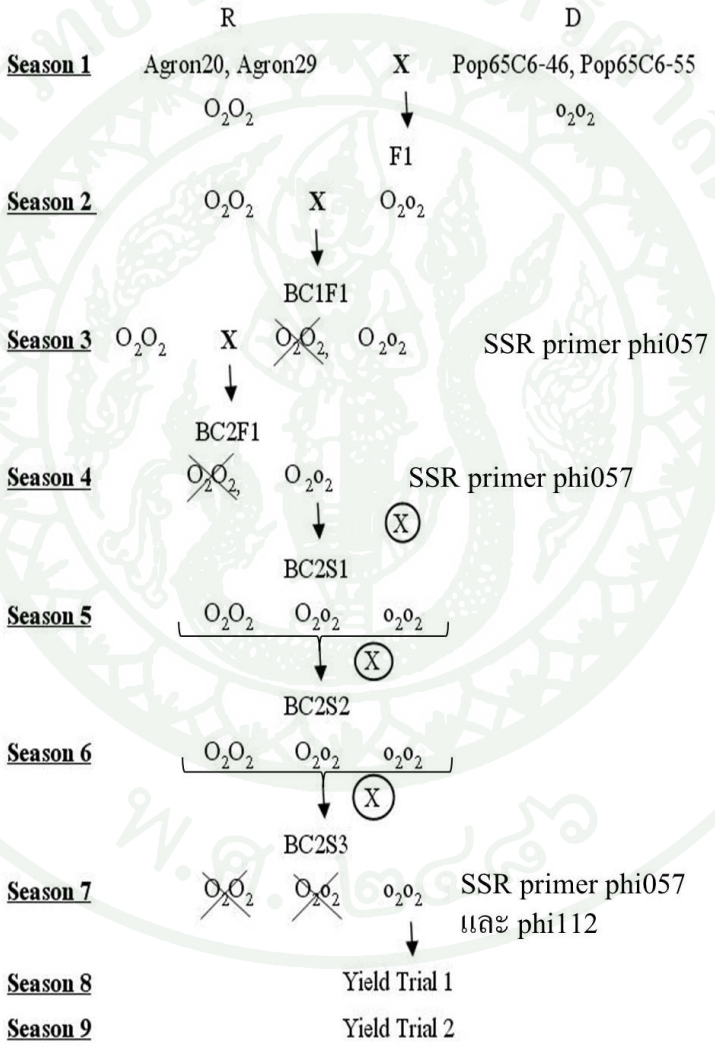
ผสมตัวเองในรุ่น BC_2S_3 โดยประชากรชั่วนี้ จะมีต้นที่เป็น homozygous dominant (O_2O_2), heterozygous (O_2o_2) และ homozygous recessive (o_2o_2) สุ่มตัดใบและทำติดฉลากไว้ที่ต้น นำไปตรวจสอบยีน *opaque-2* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi112* เพื่อจะเลือกต้นที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) และการทดสอบต้นที่เป็น o_2o_2 ซ้ำด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi 057* เพื่อยืนยันต้นที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็น o_2o_2 หลังจากนั้นทำการผสมข้ามต้นที่เป็น o_2o_2 ระหว่างคู่ผสม Agron20 x Pop65C_6-46 และ Agron29 x Pop65C_6-55

ฤดูปลูกที่ 8

นำลูกผสมเดี่ยวที่ได้ไปปลูกทดสอบผลผลิต



ภาพที่ 1 แสดงแผนผังการผสมร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปลูกทดสอบผลผลิต (Yield trial)

ปลูกทดสอบผลผลิตระหว่างคู่ผสมร่วมกับพันธุ์ตรวจสอบ คือ SW4452 วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ ขนาดแปลงย่อยแถวยาว 5 เมตร จำนวน 4 แถว ระยะปลูก 0.75 x 0.25 เมตร และตรวจสอบปริมาณโปรตีน ปริมาณทริปโตแฟนในปริมาณโปรตีน และวิเคราะห์ผลผลิต

การดูแลแปลงทดลองในทุกฤดูปลูกปฏิบัติตามคำแนะนำของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ดังนี้ ปลูก 2 เมล็ดต่อหลุม หลังจากปลูกใช้สารควบคุมวัชพืชประเภท pre-emergence คือ อาทราซีน (atrazine) อัตรา 640 กรัมต่อไร่ สต๊อม (stomp) 640 ซีซีต่อไร่ เมื่อข้าวโพดอายุได้ประมาณ 2 สัปดาห์ถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น ใส่ปุ๋ยรองพื้นสูตร 16-20-0 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ และใส่ปุ๋ยด้านข้างต้น (side dressing) สูตร 46-0-0 ครั้งละ 40 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวโพดอายุ 4 สัปดาห์ มีการให้น้ำแบบ sprinkler ในช่วงอายุ 1-4 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะให้น้ำแบบปล่อยตามร่อง (furrow) 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ประมาณ 7-8 ครั้ง ปริมาณน้ำที่ให้ในแต่ละครั้งประมาณ 40 มิลลิเมตร

การบันทึกข้อมูล

1. ผลผลิต (yield) ชั่งน้ำหนักฝักทั้งหมดในแต่ละแปลงย่อยของแต่ละคู่ผสม เทียบค่าเป็นกิโลกรัมต่อไร่ โดยปรับค่าที่ความชื้นของเมล็ด 15 เปอร์เซ็นต์

$$\text{ผลผลิตที่ความชื้น 15 \%} = \frac{\text{น้ำหนักฝักสด x (100 - \% ความชื้น) x \% กะเทาะ}}{(100 - 15)} \times \frac{1{,}600}{\text{พื้นที่เก็บเกี่ยว}}$$

2. เปอร์เซ็นต์กะเทาะ (threshing percentage) คำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์กะเทาะ} = \frac{\text{น้ำหนักเมล็ด (กก.) x 100}}{\text{น้ำหนักฝัก (กก.)}}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ความสูงต้นและฝัก (plant and ear height) ความสูงต้นวัดจากระดับพื้นดินถึงข้อใบธง และความสูงของตำแหน่งฝักวัดจากระดับพื้นดินถึงข้อของฝักบนสุด วัดเมื่อดอกตัวผู้แห้ง สุ่มวัดแปลงย่อยละ 10 ต้น แล้วหาค่าเฉลี่ยของความสูง หน่วยเป็นเซนติเมตร

4. เปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ด (seed moisture content) วัดหลังจากกะเทาะเมล็ด โดยสุ่มเมล็ดของแต่ละแปลงย่อย ชั่งให้ได้น้ำหนัก 250 กรัมแล้ว นำไปวัดด้วยเครื่อง moisture tester

5. วันออกไหมและวันช่อดอกตัวผู้บาน (day to silking and tasselling) นับตั้งแต่วันที่ได้รับ น้ำครั้งแรกจนถึงวันที่ข้าวโพดออกไหม 50 % ของจำนวนต้นทั้งหมด ส่วนวันที่ช่อดอกตัวผู้บานนับจากวันที่ได้รับน้ำครั้งแรกจนถึงวันที่ช่อดอกตัวผู้บานครึ่งช่อ 50 % ของจำนวนต้นทั้งหมด

6. จำนวนต้นทั้งหมด (plant stand) จะนับหลังจากถอนแยกและใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 แล้ว

7. คะแนนการเกิดโรคทางใบ (foliar diseases) ให้คะแนนการเกิดโรคทางใบในช่วงอายุประมาณ 100 วัน ในช่วงนี้ต้นข้าวโพดยังมีใบสีเขียวอยู่ แต่ฝักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแล้ว การให้คะแนนจะให้ตั้งแต่ 1 – 5 ต้นที่ไม่เป็นโรคจะได้ 1 และต้นที่เป็นโรคทั้งต้นจะได้ 5

8. จำนวนต้นหักล้ม (root and stalk lodging) นับก่อนเก็บผลผลิตเพื่อดูความแข็งแรงของต้นและราก

9. จำนวนฝักดีฝักเสีย (ear count) นับหลังจากเก็บผลผลิตแล้วโดยนับจำนวนฝักทั้งหมดและจำนวนฝักเสีย

10. จำนวนฝักต่อ 100 ต้น (ear 100 per plant) นำจำนวนฝักที่ได้มาคำนวณกับจำนวนต้น

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ (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 ครั้งทุกๆ 10 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

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 12500 rpm นาน 10 นาที

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

16. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12500 rpm นาน 10 นาที

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

18. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 rpm นาน 5 นาที

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

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

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (μg/ml) = OD_{260} x 50 μg/ml x dilution factor

การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) จะใช้เพื่อคำนวณหาอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (โปรตีนจะดูดแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร) โดยถ้าค่า OD_{260} / OD_{280} อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์ แต่ถ้าอัตราส่วนสูงกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่ และถ้าอัตราส่วนต่ำกว่า 1.7 แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของโปรตีน หรือฟีนอล (สุรินทร์, 2552)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

องค์ประกอบในการทำพีซีอาร์ (1 reaction; total volume 20 μ)

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบในการทำพีซีอาร์ (1 reaction; total volume 20 μ)

สารเคมี	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
ddH_2O	-
Primer, F+R (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 polyerase (5 U/μ)	1 U
DNA (10 ng/μ)	50 ng

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

ตารางที่ 2 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

1 Cycle:	30 Cycles:	1 Cycle:
94°C for 1 min	94°C for 30 sec X°C for 1 min (X ranges between 50-68°C) 72°C for 1 min	72°C for 5 min

การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

1. นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น

2. เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วยสารละลาย bind silence (bind silence 1 μ; acetic acid 2.5 μ และเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 μ) เพื่อให้เจลเกาะติดกระจก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. เช็ดกระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่ายให้ทั่วด้วยสารละลาย repel silence เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที

4. นำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silence และ repel silence เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่ สำหรับกระจกแผ่นขนาด 15 x 17 เซนติเมตรให้ใช้เทปกาวติดกระจก 3 ด้านเพื่อกันไม่ให้เจลรั่วซึมออกมา ก่อนใช้คลิปหนีบอีกครั้งหนึ่ง ถ้าเป็นกระจกขนาด 20 x 40 เซนติเมตรไม่ต้องติดเทป spacer จะใช้ขนาด 0.35 – 0.4 มิลลิเมตร

การเตรียมโพลีอะครีลาไมด์

ใช้เจลเข้มข้น 5 หรือ 6 เปอร์เซ็นต์ (acrylamide : bisacrylamide = 19:1, 7.5 M urea) โดยมีส่วนผสมตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงส่วนผสมและปริมาณสารที่ใช้ในการตรียมโพลีอะครีลาไมด์

สารที่ใช้		ปริมาณที่ใช้สำหรับเตรียมเจลเข้มข้น 6%	
		ปริมาตรรวม 10 มล.	ปริมาตรรวม 40 มล.
30% acrylamide (19:1)		2.0 มิลลิลิตร	8.0 มิลลิลิตร
5x TBE		2.0 มิลลิลิตร	8.0 มิลลิลิตร
ยูเรีย		4.5 กรัม	18.0 กรัม
น้ำกลั่น		2.5 มิลลิลิตร	10.0 มิลลิลิตร
10% APS	เติม	100.0 µ	400.0 µ
TEMED	ภายหลัง	10.0 µ	20.0 µ

TBE = 89 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA

APS = ammonium persulfate

TEMED = N,N,N’,N’-tetramethylethylenediamine

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การแยกดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* จะใช้ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ในการแยกดีเอ็นเอ โดยใช้ 6% polyacrylamide (19:1) ที่มียูเรียเข้มข้น 7.5 โมลาร์ ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ใช้กระแสไฟฟ้า 300 - 350 โวลต์ ประมาณ 90-120 นาที และย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหวีออก ถ้าติดเทปไว้ตอนเตรียมเจลให้แกะเทปออก และประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เติมบัฟเฟอร์ TBE ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้กระจก

2. ต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง ทำ pre – run 20 -30 นาที เจลขนาด 15 x 17 เซนติเมตรให้ใช้ความต่างศักย์คงที่ 200 โวลต์ ส่วนเจลขนาด 20 x 40 เซนติเมตรให้ใช้ความต่างศักย์ 1,500-2,000 โวลต์ หรือใช้กำลังไฟฟ้าคงที่ 35-40 วัตต์

3. ปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจล และล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหวีแต่ละช่องให้หมด

4. หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ผสมกับสี 3-5 ไมโครลิตรลงในแต่ละช่อง

5. เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์เท่าเดิมเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จนกว่าสี xylene cyanol (สีที่อยู่ด้านบน) จะเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล

6. ปิดเครื่อง ดูดบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจากกัน เจลจะเกาะติดอยู่กับกระจกแผ่นหลังที่เป็นสีเหลี่ยมตรง นำเจลไปย้อมต่อไป

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีปลอดรังสี

มีขั้นตอนดังนี้

1. นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่ในน้ำกลั่นนาน 8 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า

2. แช่แผ่นเจลในสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที วางบนเครื่องเขย่าตลอดเวลา

2. นำแผ่นเจลใส่ในสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้น 0.3% นาน 15 นาที โดยวางบน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่องเขย่าตลอดเวลา

4. นำแผ่นเจลมาย้อมในสารละลายซิลเวอร์ที่เตรียมใหม่ๆ เป็นเวลา 20 นาที โดยวางบนเครื่องเขย่าตลอดเวลา

5. นำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว ไม่เกิน 5 วินาที เพราะถ้าล้างนานซิลเวอร์จะหลุดหมด ต้องย้อมใหม่

6. ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ $10^{o}C$ วางบนเครื่องเขย่า จนกว่าจะเห็นแถบดีเอนเอชัดเจน (developer = 2% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde)

7. นำแผ่นเจลมาจุ่มน้ำอย่างรวดเร็ว

8. หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ในสารละลายกลีเซอรอล 15-30 เปอร์เซ็นต์แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

การเตรียมตัวอย่างการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณทริปโตแฟน

มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้

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

2. นำแป้งที่ได้ไปสกัดไขมันด้วยเครื่องสกัดไขมัน SER 148 extraction unit by solvent ประมาณ 2 ชั่วโมง โดยใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย ทิ้งไว้ให้แห้งเพื่อนำไปใช้วิเคราะห์โปรตีน และวิเคราะห์ทริปโตแฟน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

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

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

3. การกลั่น ทำโดยใส่สารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในเครื่องกลั่น

4. วาง flask ที่บรรจุสารละลาย H_3BO_3-indicator solution (ภาคผนวกที่ 1) 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

$$\%\text{Total nitrogen} = \frac{(\text{ml std. } H_2SO_4 \text{ samples} - \text{ml std. } H_2SO_4 \text{ blank}) \times 0.05018 \times 0.014 \times 50 \times 10^6}{\text{weight (g)} \times 10 \times 10000}$$

การวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟน

วิเคราะห์หาปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนจากการวิเคราะห์หาปริมาณทริปโตแฟนตามวิธีการของ Nurit *et al.* (2009) มีขั้นตอนดังนี้ (แสดงวิธีการเตรียมสารเคมีในภาคผนวกที่ 2)

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

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. เมื่อไฮโดรไลส์ครบ 16 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมาเขย่าอีกหนึ่งครั้ง แล้วปล่อยให้อุณหภูมิเย็นลงตามอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 2,500 RPM นาน 5 นาที

4. ดูดส่วนใสด้านบน ปริมาตร 666 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร เติม reagent D 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

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

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (statistical analysis)

นำข้อมูลผลผลิตทั้งหมดของลูกผสมที่เกิดจากการผสมของสายพันธุ์ที่เป็น o_2o_2 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติตามแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (randomized complete block design; RCBD) ตามวิธีการของสุรพล (2536) ซึ่งมีตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ดังนี้ (ตารางที่ 4)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์

Source of Variations	Degree of Freedom (d.f.)
Replications	r-1
Treatments	t-1
Error	(r-1)(t-1)
Total	tr-1

r = จำนวนซ้ำ

t = จำนวนสิ่งทดลอง

นำข้อมูลจากการวิเคราะห์ความแปรวนจาก 2 ฤดู มาการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวมตามวิธีการของชูศักดิ์ (2552) ซึ่งมีตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนรวม ดังนี้ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของหลายฤดูปลูกของแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์

Source of Variations	Degree of Freedom (d.f.)
Environments (E)	e-1
Replication / Environments	e(r-1)
Genotypes (G)	g-1
E X G	(e-1)(r-1)
Pooled error	e(r-1)(g-1)
Total	egr-1

e = จำนวนสภาพแวดล้อมหรือฤดูปลูก

g = จำนวนพันธุ์ที่ปลูก

r = จำนวนซ้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่ทำการทดลอง

1. ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร
3. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน จ. นครปฐม

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่เดือนเมษายน 2549 สิ้นสุดการทดลองเดือนเมษายน 2552

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

การตรวจสอบยีน *opaque-2* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลในลูกผสม F_1 ระหว่างคู่ผสม ของยีน *opaque-2* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* พบว่าให้โพลิมอร์ฟิซึมเป็น O_2o_2 ทั้งสองคู่ผสม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลูกผสมชั่วที่ 1 นี้มียีน *opaque-2* รวมอยู่ด้วย ต่อมาเมื่อนำลูกผสมชั่วที่ 1 ผสมกลับ ไปยังพันธุ์แม่ ได้ลูกผสม BC_1F_1 ของทั้งสองคู่ผสม ลูกในชั่วนี้จะเลือกเฉพาะต้นที่เป็นเฮเตอโรไซกัสของยีนในตำแหน่ง *opaque-2* เท่านั้น นำไปผสมกลับได้ลูกผสมกลับครั้งที่ 2 (BC_2F_1) เมื่อนำลูกผสมกลับ BC_2F_1 ของคู่ผสม Agron20 x Pop65C_6-46 และในคู่ผสม Agron29 x Pop65C_6-55 มาตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* พบว่า เกิดโพลิมอร์ฟิซึม 2 ชนิดคือ O_2O_2 และ O_2o_2 เมื่อนำตัวเลขไปวิเคราะห์ไคสแควร์ (chi-square) เพื่อดูการกระจายตัวของยีน พบว่าอัตราส่วนระหว่าง O_2O_2 : O_2o_2 ของลูกผสมกลับชั่วที่ 2 (BC_2F_1) มีสัดส่วนเป็น 1 ต่อ 1 ในคู่ผสม Agron20 x Pop65 C_6-46 (BC_2F_1) ส่วนคู่ผสม Agron29 x Pop65 C_6-55 (BC_2F_1) ที่มียีน *opaque-2* เป็น homozygous dominant มากว่า heterozygous (ตารางที่ 6) ซึ่งไม่เป็นไปตามทฤษฎี สาเหตุมาจากมีการเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีแล้วจึงตัดใบไปตรวจสอบหายีน o_2o_2 ไม่ได้เป็นการสุ่มตัวอย่าง

ตารางที่ 6 แสดงจีโนไทป์ของข้าวโพดคุณภาพโปรตีนในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 2 (BC_2F_1) เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล phi057 ในการตรวจสอบ

คู่ผสม	จน. ต้น	O_2O_2	O_2o_2	ไคสแควร์
Agron20 x Pop65 C_6-46 (BC_2F_1)	46	21	25	ns
Agron29 x Pop65 C_6-55 (BC_2F_1)	55	37	18	**

ns = non significant differences

** = highly significant differences

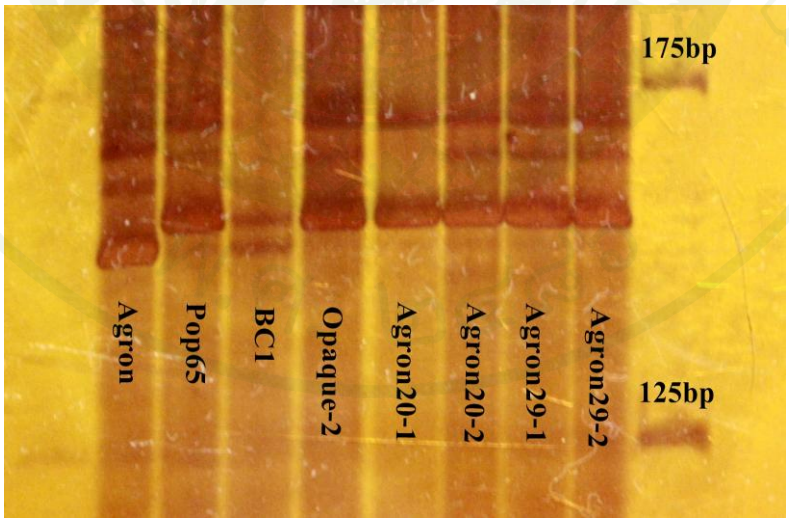
จากการคัดเลือกต้นในรุ่น BC_2F_1 ที่เป็น O_2o_2 ได้ทำการผสมตัวเองจำนวน 3 ครั้งเพื่อเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีและมีความสม่ำเสมอในสายพันธุ์ก่อน แต่ไม่ได้เลือกต้นที่เป็น o_2o_2 ออกมาตั้งแต่ในรุ่น BC_2S_1 และ BC_2S_2 เพราะไม่สามารการตรวจสอบยีน o_2o_2 ด้วยเครื่องหมาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โมเลกุลได้จนกระทั่งได้รุ่น BC_2S_3 จึงนำมาทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi112* เพื่อแยกต้นที่เป็น o_2o_2 ออกมาแล้วตรวจสอบซ้ำอีกครั้งด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* เพื่อยืนยันต้นที่เป็น o_2o_2 อีกครั้งหนึ่งผลการทดลองพบว่า ได้ต้นที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) คู่ผสมละ 2 ต้น (ตารางที่ 7) จำนวนสายพันธุ์ที่เป็น homozygous recessive ที่ได้มีจำนวนน้อย เนื่องจากผสมตัวเองต่อเนื่องจำนวน 3 ครั้ง ทำให้การตรวจสอบสายพันธุ์ค่อนข้างยากเนื่องจากจำนวนสายพันธุ์มากขึ้น และไม่ทราบแน่ชัดว่าในชั่วก่อนหน้านั้นมียีน o_2 เป็นแบบใด ดังนั้นถ้าจะคัดเลือกให้มีประสิทธิภาพดี ควรจะตรวจสอบยีน *opaque-2* ในชั่ว BC_2S_1 ให้ชัดเจนเสียก่อน แล้วค่อยผสมตัวเองเพื่อเพิ่มความคงตัวทางพันธุกรรม จะทำให้ได้สายพันธุ์ *opaque-2* จำนวนมากขึ้น เช่นงานทดลองของ พัชรา (2551)

ตารางที่ 7 แสดงจีโนไทป์ของข้าวโพดคุณภาพโปรตีนในรุ่นลูกผสมตัวเอง (BC_2S_3) เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi112* และ *phi057* ในการตรวจสอบ

คู่ผสม	No. of plant	O_2O_2 และ O_2o_2	o_2o_2
Agron20 x Pop65 C_6-46 (BC_2S_3)	72	70	2
Agron29 x Pop65 C_6-55 (BC_2S_3)	107	105	2



ภาพที่ 2 แสดงยีน *opaque-2* ในสายพันธุ์ที่ใช้เป็นแม่และพ่อ (Agron และ Pop 65) และข้าวโพด *opaque-2* เปรียบเทียบกับข้าวโพดที่คัดเลือก (Agron20-1, Agron20-2, Agron29-1 และ Agron29-2) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดสอบผลผลิต

จากข้าวโพดที่เป็น o_2o_2 ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 2 และผสมตัวเอง 3 ครั้ง (BC_2S_3) คู่ผสมละ 2 ต้น ผสมข้ามระหว่างคู่และสลับพ่อแม่ ได้ลูกผสมชั่วแรก 8 คู่ผสม นำคู่ผสมที่ได้ไปปลูกทดสอบผลผลิตใน 2 ฤดูปลูก ซึ่งคู่ผสมที่ได้จะเรียกว่า ลูกผสม QPM (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 แสดงการผสมระหว่างสายพันธุ์ที่เป็น o_2o_2 ในรุ่น BC_2S_3 และลูกผสม QPM ที่ได้ทั้ง 8 คู่ผสม

คู่ผสมที่	สายพันธุ์	ลูกผสม
1	Agron20-1 x Agron29-1	QPM 1
2	Agron20-1 x Agron29-2	QPM 2
3	Agron20-2 x Agron29-1	QPM 3
4	Agron20-2 x Agron29-2	QPM 4
5	Agron29-1 x Agron20-1	QPM 5
6	Agron29-1 x Agron20-2	QPM 6
7	Agron29-2 x Agron20-1	QPM 7
8	Agron29-2 x Agron20-2	QPM 8

ฤดูที่ 1

ผลผลิตเฉลี่ยของลูกผสมมีค่าเท่ากับ 1,135 กิโลกรัมต่อไร่ โดยมีผลผลิตอยู่ระหว่าง 891-1,309 กิโลกรัมต่อไร่ ส่วนพันธุ์ตรวจสอบ (SW 4452) มีผลผลิตเฉลี่ย 1,181 กิโลกรัมต่อไร่ (ตารางที่ 9) คู่ผสมที่ให้ผลผลิตสูงที่สุด คือ QPM 5 ได้ผลผลิตเฉลี่ย 1,309 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างลูกผสม QPM กับ SW 4452 จะไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ แต่จะมี QPM 8 (891 กิโลกรัมต่อไร่) เพียงพันธุ์เดียวที่มีผลผลิตเฉลี่ยต่ำกว่า SW 4452

อายุวันออกไหมในฤดูที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 74 วัน วันออกดอกของลูกผสมทั้งหมดมีจำนวนวันตั้งแต่ 73 – 74 วัน (ตารางที่ 9) สาเหตุที่ข้าวโพดออกไหมช้าเป็นผลมาจากช่วงแรกในการเจริญมีสภาพอากาศที่เย็นจัด ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิต่ำสุดในแต่ละวัน 17.0 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดในเดือนแรก 13.2 องศาเซลเซียส จึงมีผลทำให้วันออกไหมเลื่อนออกไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความสูงต้นและความสูงฝัก จากการวิเคราะห์ข้อมูล พบว่ามีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งสองลักษณะ โดยพันธุ์ SW 4452 มีความสูงต้นมากที่สุดคือ 223.25เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับลูกผสม QPM ลูกผสม QPM ที่มีความสูงต้นมากที่สุดคือ QPM 5 (202.50 เซนติเมตร) QPM ที่มีความสูงต้นน้อยที่สุดคือ QPM 4 (186.25 เซนติเมตร)(ตารางที่ 9) ความสูงฝักก็เป็นไปเช่นเดียวกันคือ SW 4452 มีความสูงฝักมากที่สุดคือ 126.50 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับลูกผสม QPM ลูกผสม QPM ที่มีความสูงฝักมากที่สุดคือ QPM 6 (99 เซนติเมตร) QPM ที่มีความสูงฝักน้อยที่สุดคือ QPM 4 (85 เซนติเมตร) จากค่าเฉลี่ยของความสูงต้นและความสูงฝัก ลูกผสม QPM มีต้นที่ไม่สูงและตำแหน่งฝักที่ไม่สูง ซึ่งน่าจะส่งผลไปถึงการทนทานต่อการหักล้มที่ดีได้

จำนวนฝักต่อ 100 ต้น จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่ามีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ค่าเฉลี่ยของจำนวนฝักต่อ 100 ต้นอยู่ที่ 96 ฝัก QPM 1 มีจำค่าเฉลี่ยมากที่สุดคือ 103 ฝักต่อ 100 ต้น แต่ลูกผสมทุกพันธุ์ก็มีค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันกับ SW 4452 (101 ฝักต่อ 100 ต้น) (ตารางที่ 9) จากค่าเฉลี่ยของจำนวนฝักต่อ 100 ต้นจะเห็นได้ว่า SW 4452 มีจำนวนฝักที่สม่ำเสมอกว่าลูกผสม QPM

เปอร์เซ็นต์ความชื้นข้าวโพดที่เก็บได้มีความชื้นอยู่ระหว่าง 16.20 –17.68 เปอร์เซ็นต์โดยมีค่าเฉลี่ย 16.89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบกับพันธุ์ SW4452 (17.18) ให้ค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 9) อย่างไรก็ตามค่าความชื้นในขณะเก็บเกี่ยวก็ไม่ได้สูงมากนัก ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลูกผสมเหล่านี้ไม่มีปัญหาเรื่องความชื้นสูงในขณะเก็บเกี่ยว

เปอร์เซ็นต์กะเทาะที่ได้จากการสีข้าวโพดพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 81.45 - 85.76 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ย 83.36 เปอร์เซ็นต์ คู่ผสมที่ให้เปอร์เซ็นต์กะเทาะมากที่สุดคือ QPM 1 (85.76 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่คู่ผสม QPM 8 มีค่าเปอร์เซ็นต์กะเทาะต่ำสุด (81.45 เปอร์เซ็นต์) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติภายในกลุ่มพันธุ์ทดสอบพบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ SW4452 ซึ่งให้ค่าเฉลี่ย (81.87 เปอร์เซ็นต์) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ QPM 8 ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์กะเทาะต่ำสุด (81.45 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 9)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยของผลผลิต อายุวันออกไหม ความสูงต้นความสูงฝัก จำนวนฝักต่อ 100 ต้นเปอร์เซ็นต์ความชื้น และเปอร์เซ็นต์กะเทาะของข้าวโพดลูกผสม QPM และพันธุ์ตรวจสอบ (SW4452) ในฤดูปลูกที่ 1

สายพันธุ์	ผลผลิตเมล็ดที่ความชื้น 15%	อายุวันออกไหม	ความสูง		จำนวนฝัก	ความชื้น	เปอร์เซ็นต์กะเทาะ
			ต้น	ฝัก	ฝัก/ 100 ต้น		
	(กก/ไร่)	(วัน)	(ซม.)	(ซม.)	(ฝัก)	(%)	(%)
QPM 1	1,286.34	74	201.50	97.50	104	16.33	85.76
QPM 2	1,194.56	74	187.33	74.00	97	16.20	83.65
QPM 3	963.12	73	190.50	98.00	95	17.68	83.10
QPM 4	985.17	74	186.25	85.00	90	17.20	83.14
QPM 5	1,309.30	73	202.50	96.00	103	16.37	85.39
QPM 6	1,208.59	73	196.25	99.00	103	17.58	82.52
QPM 7	1,198.52	73	196.25	86.25	90	16.38	83.38
QPM 8	891.59	74	197.50	94.75	84	17.18	81.45
SW 4452	1,181.12	74	223.25	126.50	101	17.13	81.87
MEAN	1,135.37	74	197.93	95.22	96	16.89	83.36
CV	17.26	0.76	4.02	7.03	12.98	2.95	2.25
F-test	**	*	**	**	*	**	**
LSD 0.01	387.50	-	15.72	13.24	-	0.98	3.70
LSD 0.05	285.94	0.81	11.60	9.77	18.22	0.73	2.73

* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน 99%, - = ไม่ได้วิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฤดูปลูกที่ 2

ผลผลิตเฉลี่ยของลูกผสมอยู่ระหว่าง 684.81 – 1,162.82 กิโลกรัมต่อไร่ พันธุ์ที่ให้ผลผลิตที่สูงที่สุดคือ SW 4452 มีผลผลิตเฉลี่ย 1,162.82 กิโลกรัมต่อไร่ (ตารางที่ 10) แต่ไม่พบความแตกต่างกับ QPM 7 (1,139.20), QPM 5 (1,113.75), QPM 1 (1,057.72), QPM 6 (907.00) และ QPM (844.15) แต่ลูกผสม QPM 2, 3 และ 8 มีผลผลิตที่ต่ำกว่าพันธุ์ SW 4452 จะเห็นได้ว่าลูกผสม QPM ที่มีผลผลิตสูงบางพันธุ์เช่น QPM 7 และ QPM 5 ให้ผลผลิตสูงเช่นเดี่ยวกับพันธุ์ตรวจสอบ
(SW 4452)

อายุวันออกไหมในฤดูที่ 2 มีค่าเฉลี่ย 64 วัน วันออกดอกของลูกผสมทั้งหมดมีจำนวนวันตั้งแต่ 64 – 65 วัน (ตารางที่ 10) แตกต่างกันอยู่ 1 คู่ คือ QPM 6 (65 วัน) กับ QPM 8 (64 วัน) ซึ่งต่างกันอยู่แค่ 1 วัน

ความสูงต้นและความสูงฝัก จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่ามีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทั้งสองลักษณะ โดยพันธุ์ SW 4452 มีความสูงต้นมากที่สุดคือ 223.75 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับลูกผสม QPM ลูกผสม QPM ที่มีความสูงต้นมากที่สุดคือ QPM 1 (197.00 เซนติเมตร) QPM ที่มีความสูงต้นน้อยที่สุดคือ QPM 3 (176.50 เซนติเมตร)(ตารางที่ 10) ความสูงฝักก็เป็นไปทำนองเดียวกันคือ SW 4452 มีความสูงฝักมากที่สุดคือ 136.50 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับลูกผสม QPM ลูกผสม QPM ที่มีความสูงฝักมากที่สุดคือ QPM 1 (105.25 เซนติเมตร) QPM ที่มีความสูงฝักน้อยที่สุดคือ QPM 2 (86.33 เซนติเมตร)

จำนวนฝักต่อ 100 ต้น จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแล้ว พบว่ามีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ค่าเฉลี่ยของจำนวนฝักต่อ 100 ต้นเฉลี่ย 107 ฝัก QPM 3 มีค่าเฉลี่ยมากที่สุดคือ 145 ฝักต่อ 100 ต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญสำคัญกับ SW 4452 (97 ฝักต่อ 100 ต้น) (ตารางที่ 10) จากค่าเฉลี่ยของจำนวนฝักต่อ 100 ต้นในฤดูที่ 2 นี้ ข้าวโพด QPM จะมีฝักขนาดเล็กกว่า SW 4452 นอกจากนี้ SW 4452 มีฝักที่สม่ำเสมอมากกว่าลูกผสม QPM

เปอร์เซ็นต์ความชื้นข้าวโพดที่เก็บได้มีความชื้นอยู่ระหว่าง 18.08 – 21.15 เปอร์เซ็นต์โดยมีค่าเฉลี่ย 19.51 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ SW4452 (20.95) (ตารางที่ 10) ในฤดูที่ 2 ค่าความชื้นในขณะเก็บเกี่ยวค่อนข้างสูง แต่ก็ไม่ได้สูงมากนัก ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลูกผสมเหล่านี้ไม่มีปัญหาเรื่องความชื้นสูงในขณะเก็บเกี่ยว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์กะเทาะที่ได้จากการสีข้าวโพดพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 81.13 - 85.40 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ย 82.74 เปอร์เซ็นต์ คู่ผสมที่ให้เปอร์เซ็นต์กะเทาะมากที่สุดคือ QPM 1 (85.40 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ SW4452 มีค่าเปอร์เซ็นต์กะเทาะต่ำสุด (81.13 เปอร์เซ็นต์)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยของผลผลิต อายุวันออกไหม ความสูงต้นความสูงฝัก จำนวนฝักต่อ 100 ต้นเปอร์เซ็นต์ความชื้นและเปอร์เซ็นต์กะเทาะของข้าวโพดลูกผสม QPM และพันธุ์ตรวจสอบ (SW4452) ในฤดูกาลที่ 2

สายพันธุ์	ผลผลิตเมล็ดที่ความชื้น 15% (กก/ไร่)	อายุวันออกไหม (วัน)	ความสูง ต้น (ซม.)	ความสูง ฝัก (ซม.)	จำนวนฝักต่อ 100 ต้น (ฝัก)	ความชื้น (%)	เปอร์เซ็นต์กะเทาะ (%)
QPM 1	1,057.72	64	197.00	105.25	113	18.08	85.40
QPM 2	741.96	64	177.33	86.33	68	19.03	83.44
QPM 3	689.16	64	176.50	92.75	145	20.15	80.66
QPM 4	844.15	64	184.75	92.75	126	19.20	81.95
QPM 5	1,113.80	64	193.50	103.75	107	18.85	83.61
QPM 6	906.99	65	179.00	94.25	98	21.15	83.63
QPM 7	1,139.21	65	191.00	97.00	106	18.55	83.44
QPM 8	684.81	64	189.25	94.00	103	19.60	81.42
SW 4452	1,162.82	64	223.75	136.50	97	20.95	81.13
MEAN	926.73	64	190.23	100.29	107	19.51	82.74
CV	24.56	0.76	6.97	11.10	25.75	2.86	2.62
F-test	**	**	**	**	**	**	**
LSD 0.01	450.26	0.97	26.21	22.02	54.50	1.10	4.29
LSD 0.05	332.26	0.71	19.34	16.25	40.22	0.81	3.17

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน 99%, - = ไม่ได้วิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ความแปรปรวนรวม 2 ฤดูปลูก

ผลผลิตของข้าวโพดอยู่ระหว่าง 788.20 – 1,211.55 กิโลกรัมต่อไร่ ค่าเฉลี่ยของการทดลองอยู่ที่ 1,031.05 กิโลกรัมต่อไร่ พันธุ์ที่ให้ผลผลิตมากที่สุดคือ QPM 5 (1,211.55 กิโลกรัมต่อไร่), QPM 1 (1,172.03 กิโลกรัมต่อไร่), QPM 7 (1,168.86 กิโลกรัมต่อไร่), QPM 6 (1,057.80 กิโลกรัมต่อไร่) และ QPM 2 (968.27 กิโลกรัมต่อไร่) ให้ผลผลิตเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันกับ SW 4452 (1,171.97 กิโลกรัมต่อไร่) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) แสดงให้เห็นว่าศักยภาพของผลผลิตข้าวโพดที่มียีน *opaque-2* ร่วมอยู่ด้วยให้ผลผลิตไม่แตกต่างจากพันธุ์การค้าในขณะที่มีคุณภาพโปรตีนดีกว่า เช่นเดียวกับรายงานของ CIMMYT (1999) พันธุ์ที่ให้ผลผลิตมากที่สุดคือ QPM 5 ลำดับต่อมาคือ QPM 1 ทั้งสองพันธุ์นี้มาจากคู่ผสมเดียวกันแต่สลับพ่อแม่ จึงเป็นคู่ผสมที่น่าสนใจ และยังแสดงให้เห็นว่า การผสมสลับพ่อแม่ไม่มีผลต่อผลผลิต

จำนวนวันออกดอกของลูกผสมประมาณ 69 วัน แต่จำนวนวันที่มากเป็นเพราะฤดูที่ 1 ได้รับอุณหภูมิต่ำในช่วงกำลังงอก แต่ในฤดูที่ 2 อายุวันออกดอกก็ปกติ

ความสูงต้นระหว่างลูกผสม QPM และพันธุ์ตรวจสอบพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยลูกผสม QPM มีค่าความสูงต้นอยู่ระหว่าง 182.33 – 199.25 เซนติเมตร (ตารางที่ 11) โดยลูกผสมที่ให้ค่าความสูงต้นสูงสุดคือ QPM 1 (199.25 เซนติเมตร) และลูกผสมที่ให้ค่าต่ำสุดคือ QPM 2 (182.33 เซนติเมตร) ในขณะที่พันธุ์ SW4452 ให้ค่าเฉลี่ย 223.50 เซนติเมตร และความสูงฝักก็มีความแตกต่างกันทางสถิติระหวางลูกผสม QPM กับ SW4452 โดยลูกผสม QPM มีค่าความสูงฝักอยู่ระหว่าง 80.17 – 101.38 เซนติเมตร โดยลูกผสม QPM ที่ให้ค่าความสูงฝักสูงสุดคือ QPM 1 (101.38 เซนติเมตร) และลูกผสมที่ให้ค่าต่ำสุดคือ QPM 2 (80.17 เซนติเมตร) ในขณะที่พันธุ์ SW4452 ให้ค่าเฉลี่ย 131.50 เซนติเมตร

จำนวนฝักต่อ 100 ต้นเมื่อนำข้อมูลทั้ง 2 ฤดูมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแล้ว พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ค่าเฉลี่ยของจำนวนฝักต่อ 100 ต้นอยู่ที่ 83 – 120 ฝัก จำนวนฝักที่ไม่แตกต่างกันในทางสถิติที่พบเนื่องจากค่า cv ของจำนวนฝักต่อ 100 ต้น ค่อนข้างสูง QPM 3 มีจำค่าเฉลี่ยมากที่สุดคือ 120 ฝักต่อ 100 ต้น พันธุ์ SW 4452 ได้ 99 ฝักต่อ 100 ต้น (ตารางที่ 11) จากค่าเฉลี่ยของจำนวนฝักต่อ 100 ต้นใน 2 ฤดูนี้จะเห็นได้ว่า SW 4452 มีจำนวนฝักกับจำนวนต้นที่สม่ำเสมอกว่าลูกผสม QPM

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์ความชื้นข้าวโพดที่เก็บได้มีความชื้นอยู่ระหว่าง 17.20 – 19.36 เปอร์เซ็นต์โดยมีค่าเฉลี่ย 18.20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบกับพันธุ์ SW4452 (19.04) ให้ค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามค่าความชื้นในขณะเก็บเกี่ยวก็ไม่ได้สูงมากนัก ซึ่งมีทั้งที่ใกล้เคียงและต่ำกว่าพันธุ์ SW4452 (ตารางที่ 11) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลูกผสม QPM เหล่านี้ไม่มีปัญหาเรื่องความชื้นสูงในขณะเก็บเกี่ยว

เปอร์เซ็นต์กะเทาะที่ได้จากการสีข้าวโพดพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 81.43 – 85.58 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ย 83.05 เปอร์เซ็นต์ ลูกผสมที่ให้เปอร์เซ็นต์กะเทาะมากที่สุดคือ QPM 1 (85.58 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่าลูกผสมที่ได้มีน้ำหนักเมล็ดมากหรือเมล็ดมีขนาดใหญ่เมล็ดลึกและมีซังขนาดเล็กหรือน้ำหนักเบาและเป็นพันธุ์ที่มีความชื้นต่ำที่สุดในช่วงเก็บเกี่ยว เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติภายในกลุ่มพันธุ์ทดสอบพบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ SW4452 ซึ่งให้ค่าเฉลี่ย (81.50 เปอร์เซ็นต์) มีค่าต่ำกว่าลูกผสม QPM เป็นเพราะ SW4452 มีลักษณะของแกนซังใหญ่ เมล็ดตื้นแต่จะมีจุดเด่นที่เมล็ดสีส้มกึ่งหัวแข็ง แต่ ลูกผสม QPM เมล็ดจะมีสีเหลืองหัวบุบ (ตารางที่ 11 และรูปภาพในภาพผนวกที่ 1 และ 2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยของผลผลิต อายุวันออกไหม ความสูงต้นความสูงฝัก จำนวนฝักต่อ 100 ต้นเปอร์เซ็นต์ความชื้นและเปอร์เซ็นต์กะเทาะของข้าวโพดลูกผสม QPM และพันธุ์ตรวจสอบ (SW4452) ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวม 2 ฤดูปลูก

สายพันธุ์	ผลผลิตเมล็ดที่ความชื้น 15%	อายุวันออกไหม	ความสูง		จำนวนฝักต่อ 100 ต้น	ความชื้น	เปอร์เซ็นต์กะเทาะ
			ต้น	ฝัก			
	(กก/ไร่)	(วัน)	(ซม.)	(ซม.)	(ฝัก)	(%)	(%)
QPM 1	1,172.03	69	199.25	101.38	108	17.2	85.58
QPM 2	968.26	69	182.33	80.17	83	17.62	83.55
QPM 3	826.14	69	183.5	95.38	120	18.91	81.88
QPM 4	914.66	69	185.5	88.88	108	18.2	82.54
QPM 5	1,211.55	69	198	99.88	105	17.61	84.5
QPM 6	1,057.79	69	187.63	96.63	101	19.36	83.07
QPM 7	1,168.86	69	193.63	91.63	98	17.46	83.41
QPM 8	788.2	69	193.38	94.38	94	18.39	81.43
SW 4452	1,171.97	69	223.5	131.5	99	19.04	81.5
MEAN	1,031.05	69	194.08	97.75	102	18.2	83.05
CV	17.89	1.26	4.15	9.81	32.28	5.37	1.81
F-test	**	ns	**	**	ns	**	**
LSD 0.01	309.48	-	13.53	16.08	-	1.64	2.52
LSD 0.05	212.69	-	9.3	11.05	-	1.13	1.73

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน 99%, - = ไม่ได้วิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความยาวฝักของลูกผสม QPM และ SW 4452 อยู่ระหว่าง 16.16 – 21.10 เซนติเมตร พันธุ์ SW 4452 มีความยาวมากที่สุดและลูกผสม QPM 4 มีความยาวฝักน้อยที่สุด (ตารางที่ 12 และรูปภาพในภาพผนวกที่1 และ 2) ค่าเฉลี่ยของความยาวฝักอยู่ที่ 17.69 เซนติเมตร เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า SW 4452 มีความยาวฝักที่แตกต่างกับลูกผสม QPM

ความยาวติดเมล็ดมีค่าอยู่ระหว่าง 16.02 – 20.10 เซนติเมตร พันธุ์ SW 4452 มีความยาวมากที่สุดและลูกผสม QPM 4 มีความยาวติดเมล็ดน้อยที่สุด ค่าเฉลี่ยของความยาวติดเมล็ดอยู่ที่ 17.18 เซนติเมตร (ตารางที่ 12 และรูปภาพในภาพผนวกที่1 และ 2) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า SW 4452 มีความยาวฝักที่แตกต่างกับลูกผสม QPM

จำนวนแถวของเมล็ดโดยเฉลี่ยแล้วมีประมาณ 16 แถว ทั้งลูกผสม QPM และ SW 4452 จะมี จำนวนแถวของเมล็ดทั้ง 16 และ 18 แถว แต่ส่วนใหญ่จะเป็น 16 แถว

ความกว้างฝัก มีค่าอยู่ระหว่าง 4.52 – 5.11 เซนติเมตร พันธุ์ที่มีความกว้างฝักมากที่สุดคือลูกผสม QPM 7 พันธุ์ที่มีความกว้างฝักน้อยที่สุดคือลูกผสม QPM 8 พันธุ์ SW 4452 มีความกว้างฝัก 5.06 เซนติเมตร (ตารางที่ 12 และรูปภาพในภาพผนวกที่ 1 และ 2) เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าค่าความกว้างฝักถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กว้างมากกว่า 4.94 เซนติเมตรและน้อยกว่า 4.67 เซนติเมตร

ลักษณะสีเมล็ดมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างลูกผสม QPM กับ SW 4452 โดยลูกผสม QPM จะมีเมล็ดสีเหลืองหัวบุบเป็นส่วนใหญ่ มีเพียงลูกผสม QPM 4 กับลูกผสม QPM 8 ที่มีลักษณะของเมล็ดแบบกึ่งหัวบุบ ส่วน SW 4452 (ตารางที่ 12 และรูปภาพในภาพผนวกที่ 1 และ 2) มีเมล็ดสีส้มเหลืองเมล็ดเป็นแบบกึ่งหัวแข็ง ซึ่งเป็นลักษณะที่เกษตรกรในประเทศชอบมากกว่าส่วนข้าวโพด QPM มีลักษณะเมล็ดสีเหลืองหัวบุบจะได้เปรียบที่เมล็ดยาวกว่าและจะมีจำนวนแถวมากกว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยของความยาวฝัก ความยาวติดเมล็ด จำนวนแถว ความกว้างฝัก ความกว้างซัง ความกว้างแกนซังและลักษณะเมล็ดของข้าวโพดลูกผสม QPM และพันธุ์ตรวจสอบ (SW4452) ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวม 2 ฤดูปลูก

สายพันธุ์	ความยาวฝัก	ความยาวติดเมล็ด	จำนวนแถว	เส้นผ่านศูนย์กลางฝัก	เส้นผ่านศูนย์กลางซัง	เส้นผ่านศูนย์กลางแกนซัง	ลักษณะเมล็ด
QPM 1	18.26	17.72	16	5.08	2.86	1.87	OYD
QPM 2	17.54	16.56	16	4.94	2.75	1.71	OYD
QPM 3	17.17	16.89	16	4.60	2.46	1.51	OYD
QPM 4	16.15	16.02	16	4.59	2.47	1.44	OYSD
QPM 5	18.57	17.85	16	5.10	2.88	1.79	OYD
QPM 6	17.00	16.72	16	4.67	2.55	1.51	OYD
QPM 7	17.15	16.65	16	5.11	2.84	1.75	OYD
QPM 8	16.35	16.13	16	4.52	2.56	1.42	OYSD
SW 4452	21.08	20.10	16	5.06	2.88	1.83	OYSF
MEAN	17.69	17.18	16	4.85	2.69	1.65	
CV	4.30	4.58	-	3.31	3.70	4.96	
F-test	**	**	-	**	**	**	
LSD 0.01	1.28	1.32	-	0.27	0.17	0.14	
LSD 0.05	0.88	0.91	-	0.18	0.11	0.09	

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ทริปโตแฟน

ปริมาณโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ (Agron 20-1, Agron 20-2, Agron 29-1, Agron 29-2) มีค่าระหว่าง 7.24 – 7.87 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ย 7.60 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่พันธุ์ *opaque-2* มีค่า 7.76 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13)

จากการวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟนของสายพันธุ์ที่คัดเลือก (Agron 20-1, Agron 20-2, Agron 29-1, Agron 29-2) มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนอยู่ระหว่าง 0.88 – 1.84 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ย 1.28 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ *opaque-2* ผลการวิเคราะห์มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีน 1.03 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ยังมีความผันแปร แต่ถ้าพิจารณาตามเกณฑ์ของ CIMMYT กล่าวคือพันธุ์ใดก็ตามถ้ามีปริมาณทริปโตแฟนตั้งแต่ 0.70 เปอร์เซ็นต์ ให้เรียกว่าข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (QPM) (Nurit *et al.,* 2009)

ตารางที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยของ ปริมาณโปรตีน ปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนของสายพันธุ์พ่อแม่และ *opaqu -2*

สายพันธุ์	ปริมาณ	
	โปรตีนทั้งหมด (%)	ทริปโตแฟนในโปรตีน (%)
Agron20-1	7.87	1.17
Agron20-2	7.80	0.88
Agron29-1	7.50	1.84
Agron29-2	7.24	1.46
opaque-2	7.76	1.03
ค่าเฉลี่ย	7.63	1.28

ปริมาณโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของลูกผสม QPM มีค่าระหว่าง 5.79 – 8.63 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ย 7.05 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่พันธุ์ SW4452 มีค่า 6.82 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14) อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างพันธุ์ SW4452 กับลูกผสม QPM สอดคล้องกับการทดลองของ Vasal (1994) และ Jompuk (2007) ที่พบว่าปริมาณโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดปกติและข้าวโพด *opaque-2* มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟนของลูกผสม QPM เปรียบเทียบกับพันธุ์ SW4452 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีและไม่มียีน *opaque-2* ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์พบว่า ลูกผสม QPM มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนอยู่ระหว่าง 1.04 – 1.41 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ย 1.20 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่พันธุ์ SW4452 มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีน 0.67 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าลูกผสม QPM มีปริมาณทริปโตแฟนสูงกว่าพันธุ์ข้าวโพดปกติ (SW4452) ตารางที่ 14 ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับรายงานของ Vasal (1994)

ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนนอกจากมีทริปโตแฟนที่สูงแล้ว ยังมีไลซีนเป็นองค์ประกอบที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดปกติ ในการทดลองนี้ไม่ได้วิเคราะห์ไลซีน เนื่องจากวิธีวิเคราะห์ยุ่งยากและค่อนข้างแพงแต่มีรายงานกล่าวว่า ข้าวโพดที่ควบคุมด้วยยีน *opaque-2* ปริมาณไลซีนและทริปโตแฟนนั้น มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก โดยถ้าค่าปริมาณของทริปโตแฟนในโปรตีนมีค่าสูงจะพบว่าปริมาณไลซีนสูงเช่นเดียวกัน มีสัดส่วนประมาณ 1 : 4 ของทริปโตแฟน : ไลซีน (Hernandez and Bates, 1969; Prasanna *et al*., 2001)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยของผลผลิต ปริมาณโปรตีน ปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนของข้าวโพดลูกผสม QPM กับพันธุ์ตรวจสอบ

สายพันธุ์	ปริมาณ	
	โปรตีน (%)	ทริปโตแฟนในโปรตีน (%)
QPM 1	6.59	1.16
QPM 2	6.27	1.30
QPM 3	7.57	1.13
QPM 4	8.63	1.41
QPM 5	7.61	1.08
QPM 6	5.79	1.21
QPM 7	7.30	1.04
QPM 8	6.60	1.29
SW 4452	6.82	0.67
MEAN	7.02	1.14
CV	12.70	18.64
F-test	**	**
LSD 0.01	2.13	0.51
LSD 0.05	1.54	0.37

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การพัฒนาสายพันธุ์อินเบรดจากข้าวโพดไร่ปกติให้มีปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์มสูงขึ้น โดยการผสมพันธุ์กันระหว่างสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดไร่ ได้แก่ Agron20 และ Agron29 กับพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนสูง คือ Pop65C_6-46 QPM และ Pop65C_6-55 QPM ได้ 2 คู่ผสม แล้วผสมกลับมาหาข้าวโพดไร่อีก 2 ครั้ง คัดเลือกสายพันธุ์ที่เป็น *opaque-2* ได้คู่ละ 2 ต้น ผสมข้ามระหว่างคู่และสลับพ่อแม่ ได้ลูกผสมชั่วแรก 8 คู่ผสม นำลูกผสมที่ได้ไปปลูกทดสอบผลผลิต พบว่าลูกผสมส่วนใหญ่ให้ผลผลิตที่ไม่ต่างจาก SW 4452 แต่จะมีลักษณะที่ดีกว่าคือ ต้นไม่สูง ตำแหน่งฝักไม่สูง เปอร์เซ็นต์กะเทาะดีกว่า แต่อย่างไรก็ตามยังมีลักษณะที่ต้องปรับปรุงคือ สีและลักษณะของเมล็ดที่เป็นสีเหลืองหัวบุบที่เกษตรกรยังไม่นิยมปลูก ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของข้าวโพดทุกสายพันธุ์ที่ตรวจสอบให้ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์พ่อแม่มีค่าปริมาณโปรตีนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 7.24 – 7.87 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ SW4452 มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 6.82 เปอร์เซ็นต์ ลูกผสม QPM มีค่าปริมาณโปรตีนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5.79 – 8.63 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนของสายพันธุ์พ่อแม่มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.88 – 1.81 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ SW4452 มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีน 0.67 เปอร์เซ็นต์ ลูกผสม QPM มีค่าปริมาณทริปโตแฟนในโปตีนอยู่ระหว่าง 1.04 – 1.41 เปอร์เซ็นต์ จากผลของการทดสอบในลูกผสมชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์พ่อแม่ Agron20-1, Agron20-2, Agron29-1และ Agron29-2 มีความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นสายพันธุ์แท้ opaque-2 ที่ดีในอนาคตได้ ส่วนคู่ผสมที่น่าสนใจที่จะนำไปพัฒนาเป็นลูกผสม QPM คือ Agron20-1 กับ Agron29-1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

ในการคัดเลือกยีน *opaque-2* สามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุล phi112 ในการคัดเลือก o_2o_2 บนแผ่นอะกาโรสเจลได้ แต่จะให้ได้ผลจัดเจนนั้นจะต้องใช้ phi057 บน polyacrylamide gel แต่สิ่งหนึ่งที่มีความสำคัญเช่นกัน คือ modifying gene ซึ่งมีส่วนสำคัญที่ทำให้เมล็ดข้าวโพดใสและแข็ง ดังนั้นในการคัดเลือกควรที่จะนำส่วนนี้เข้าไปพิจารณาในการคัดเลือกสายพันธุ์อินเบรด QPM ด้วย ทั้งนี้เนื่องจาก เมื่อพันธุกรรมพื้นฐานต่างกัน modifying gene จะแสดงออกแตกต่างกัน โดยสังเกตุได้จากเมล็ดจากต่างคู่ผสมกันจะมีความใสและแข็งของเมล็ดแตกต่างกันด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2551. **ปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด.** พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 465 น.

ชูศักดิ์ จอมพุก. 2552. **สถิติ: การวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยด้านพืชด้วย " R".** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พัชรา เชื้อชาติ. 2551. **การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดทริพโตเฟนสูงด้วยวิธีการผสมกลับและคัดเลือกโดยเครื่องหมายโมเลกุล**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2526. **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช.** พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 303 น.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2539. **การปรับปรุงพันธุ์พืชขั้นสูง**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

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

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

_____. 2553. **การปรับปรุงพันธุ์พืช**. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

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

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Allard, R.W. 1960. **Principles of Plant Breeding**. John Wiley and Sons, Inc., New York.

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 conversion 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.

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

Bjarnason and S.K. Vasal. 1992. Breeding quality protein maize (QPM), pp. 181-216. *In* **Plant Breeding Reviews** vol. 9. John Wiley & Sons, Inc., New York.

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

_____ and L.G. Ellias. 1979. The world protein and nutritional situation, pp. 3-23. *In* **Seed Protein improvement in cereal and grain legumes**. IAEA 11: 3-23.

_____, _____ and R.A. Gomez-Brenes. 1969. Protein quality of opaque-2 corn, evaluation in rats. **J. Nutr.** 97: 173.

Chin, E.C.L., M.L. Senior, H. Shu and J.S.C. Smith. 1966. Maize simple repetitive DNA sequence: abundance and allelic variation. **Genome** 39: 866-873.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Choukan, R. and M.L. Warburton. 2005. Use of SSR data to determine relationships among early maturing Iranian maize inbred lines. **Maydica** 50 (2): 163-170.

Clark, H.E. 1966. Opaque-2 corn as a source of protein for adult human subjects, pp. 40-44. *In* E.T. Mertz and O.E. Nelson, eds. **Proceeding of the High Lysine Corn Conference.** Corn Refineries Association Inc., Washington., DC

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

CIMMYT. 1999. Quality protein maize: food of the poor becomes inexpensive, accessible protein source, pp. 38-39. *In* **CIMMYT annual report** 1998-99: science to sustain people and the environment. Mexico.

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

Dreher, K., M. Morris, M. Khairallah, J.M. Ribaut, S. Pandey and G. Srinivasan. 2000. Is marker-assisted selection cost-effective compared to conventional plant breeding methods? : the case of quality protein maize.

Dudley, J.W., D.E. Alexander and R.J. Lambert. 1975. Genetic improvement of modified protein maize, pp. 120-135. *In* **High-quality protein maize**, Hutchinson Ross, Publishing, Stroudsburg.

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

Gardner, C.O. and S.A. Eberhart. 1966. Analysis and interpretation of the variety cross diallel and relation. **Biometrics** 22: 139-193.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Glover, D.V. and E.T. Mertz. 1987. Corn, pp. 183-236. *In* **Nutrition quality of cereal grains: genetic and agronomic improvement**, Am. Soc. Agronomy, Madison, WI.

Goodsell, S.F. 1968. Potassium in mature kernels of normal and opaque-2 maize. **Crop Sci.** 8: 281-282.

Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. **Aust. J. Biol. Sci.** 9: 463-493.

Habben, J.E., G.L. Morro, B.G. Hunter, B.R. Hamaker and B.A. Larkins. 1995. Elongation factor-1 alpha concentration is highly correlated with the lysine content of maize endosperm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92: 8640-8644.

Hallauer, A.R.1990. Methods used in developing maize inbreds. **Maydica** 35: 1-16.

Hamada, H., M.G. Petrino and T. Kakunaga. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79: 6465-6469.

Henry, A.M., D. Manicacci., M. Falque and C. Damerval. 2005. Molecular evolution of the Opaque-2 gene in *Zea mays* L. **Journal of Molecular Evolution** 61 (4): 551-558.

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

Jompuk, P. 2007**. Improvement of Quality Protein Maize using Marker-Assisted Selection (MAS)**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.

_____, W. Wongyai, C. Jampatong and S. Apisitvanich. 2006. Detection of quality protein maize (QPM) using simple sequence repeat (SSR) markers and analysis of tryptophan content. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 768-774.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Lambert, R.J., D.E. Alexander and J.W. Dudley. 1969. Relative performance of normal and modified protein (opaque-2) maize hybrids. **Crop Sci.** 9: 242-243.

Lopes, M.A. and B.A. Larkins. 1994. Genetic analysis of endosperm modification in quality protein maize, pp. 149-174. *In* **Quality protein maize**: 1964-1994. B.A. Larkins and E.T. Mertz (eds.) Proceedings of the international symposium on quality protein maize. December 1-3, 1994, EMBRAPA/CNPMS. Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil.

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

Macgregor, J.M., L.T. Taskovitch and W.T. Martin. 1961. Effect of nitrogen fertilizer and soil type on the amino acid content of corn grain. **Agron. J**. 53: 211-214.

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

Martin, S.K., P.J. Loesch, J.T. Demopulos- Rodriguez and W.J. Wiser. 1982. Selection indices for the improvement of opaque-2 maize. **Crop Sci.** 22: 478-485.

Mertz, E.T. 1994. Thirty year of opaque-2 maize, pp. 79-88. *In* **Quality protein maize**: 1964-1994. B.A. Larkins and E.T. Mertz (eds.) Proceedings of the international symposium on quality protein maize. December 1-3, 1994, EMBRAPA/CNPMS. Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

_____, O.A. Vernon, S. Bates and O.E. Nelson. 1965. Growth of rats fed on opaque-2 maize. **Science** 148: 1741.

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

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

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

_____. 1969 b. Kernels opacity during development and moisture content within ears segregating for opaque-2 and floury-2. **Agron. J.** 61: 443-445.

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

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

Rongwen, J., M.S. Akkaya, A.A. Bhagwat, U. Lavi and P.W. Cregan. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theor. Appl. Genet.** 90: 43-48.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Saghai-Maroof, M.A., R.M. Biyashev, G.P. Yang, Q. Zhuang and R.W. Allard. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations and population dynamics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 5466-5470.

Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239: 487-491.

Sauberlich, H.E. , W. Chang and W.D. Salmon. 1953. The amino acid and protein content of corn as related to variety and nitrogen fertilization. **Nutrition J.** : 241-250

Senior, M.L. and M. Heun. 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. **Genome** 36: 884-889.

Sprague, G.F. and Eberhart, S.A. 1977. Corn Breeding: Development of inbred lines. In Sprague, G. F. ed. **Corn and Corn Improvement**. The Amer. Soc. of Agron., Madison, Wisconsin, USA. 305-362.

Sriwatanapongse, S.E., E.C. Johnson, S.K. Vasal and E. Villegas. 1974. Inheritance of kernel vitreosity in opaque-2 maize. **SABRAO J.** 6: 1-6.

Vasal, S.K. 1975. Use of genetics modifiers to obtain normal-type kernels with the opaque-2 gene, pp. 197-216. *In* L.F. Bauman et al. (eds.). **High Quality Protein Maize**. Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., Stroudsburg, Pennsylvania.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____, E. Villegas and R. Bauman. 1979. Present status of breeding quality protein maize, pp. 127-150. *In* **International symposium on seed protein improvement in cereals and grain legumes.** IAEA 11.

_____, G. Srinivasan, C.F. Gonazalez, D.L. Beck and J. Crossa. 1993. Heterosis and combining ability of CIMMYT's QPM maize germplasm. II. Subtropical. **Crop Sci.** 33: 51.

_____, M. Bjarnason, B. Gelau and P. Goertz. 1980. Genetic modifiers and breeding strategies in developing hard endosperm opaque-2 materials, pp. 37-73. *In* **Improvement of quality traits of maize for grain and silage use.** W.G. Pollmer and R.H. Phillips (eds.) Martinus Nijhoff. London, UK.

Villegas, E. 1994. Factors limiting quality protein maize (QPM) development and utilization, pp.79-88 *In* **Quality protein maize**: 1964-1994. B A. Larkins and E.T. Mertz (eds.) Proceedings of the international symposium on quality protein maize. December 1-3, 1994, EMBRAPA/CNPMS. Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil.

_____ and E.T. Mertz. 1971. Chemical screening methods for maize protein quality at CIMMYT. **CIMMYT Res. Bull.** 20. CIMMYT, Mexico City, Mexico.

Wu, K-S. and S.D. Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsattellites in rice. **Molec. Gen. Genet.** 241: 225-235.

Yang, G.P., M.A. Saghai-Maroof, C.G. Xu, Q. Zhang and R.M. Biyashev. 1994. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. **Molec. Gen. Genet.** 245: 187-194.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวกที่ 1 การเตรียม Boric acid indicator solution

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

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

ภาคผนวกที่ 2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟน

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

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

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

Reagent B: (1.8 mM $FeCl_3$-$6H_2O$) ใช้ $FeCl_3$-$6H_2O$ (Ajax Finechem, Australia) ปริมาตร 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

Agron 20-1 **Agron 20-2**

Agron 29-1 **Agron 29-2**

ภาพผนวกที่ 1 แสดงรูปฝักข้าวโพดที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่

SW4452

ภาพผนวกที่ 2 แสดงรูปฝักข้าวโพดพันธุ์ SW4452 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

QPM 1

QPM 2

QPM 3

QPM4

QPM1

ภาพผนวกที่ 3 แสดงรูปฝักข้าวโพลูกผสม QPM 1 – QPM 8

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

QPM 5

QPM 6

QPM 7

QPM 8

ภาพผนวกที่ 3 แสดงรูปฝักข้าวโพลูกผสม QPM 1 – QPM 8 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ นายอธิวัฒน์ ทรงพินิจ

เกิดวันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2527

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี

ประวัติการศึกษา วท.บ.(เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่งปัจจุบัน เจ้าหน้าที่วิจัย

สถานที่ทำงานปัจจุบัน ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์