สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

แบบสรุปผู้บริหาร
(Executive Summary)

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

โครงการวิจัยเรื่อง การเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยยีนโอเปกทู

An Increase in Tryptophan Content in Endosperm of Waxy Corn by Opaque2 Gene

1.2 คณะผู้วิจัย

1.2.1 **หัวหน้าโครงการ**

ดร. ชูศักดิ์ จอมพุก **ตำแหน่ง** รองศาสตราจารย์

Dr. Choosak Jompuk

หน่วยงาน ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

โทรศัพท์ 034-351887, 086-9818658 **โทรสาร** 034-281266

Email: agrcsj@ku.ac.th

1.2.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

ดร. สุจินต์ เจนวีรวัฒน์ **ตำแหน่ง** อาจารย์

Dr. Sujin Jenweerawat

หน่วยงาน ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ 0-2579-3130 ext. 115, 08-1571-7225 **โทรสาร** 0-2579-8580

Email: agrsjj@ku.ac.th, sjenweerawat@yahoo.com

ดร. บุญฤทธิ์ สินค้างาม **ตำแหน่ง** อาจารย์

Dr. Bunyarit Sinkangam

หน่วยงาน สำนักวิชาเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 65000

โทรศัพท์ 054-466666 ต่อ 3156 **โทรสาร** 054-466663

Email: sin_bunyarit@hotmail.com

ดร. พีรนุช จอมพุก **ตำแหน่ง** รองศาสตราจารย์
Dr. Peeranuch Jompuk
หน่วยงาน ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 02 9428481 **โทรสาร** 025795530
Email: fsciprk@ku.ac.th

นายกิตติ บุญเลิศนิรันดร์ **ตำแหน่ง** ผู้ช่วยศาสตราจารย์
Mr. Kitti Boonlertnirun
หน่วยงาน สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัย
เทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ พระนครศรีอยุธยา
โทรศัพท์ 0-3532-3621 **โทรสาร** 0-3532-3621
Email: kittihuntra@hotmail.com

นายสกล ฉายศรี **ตำแหน่ง** นักวิจัย
Mr. Sakol Chaisri
หน่วยงาน สถานีวิจัยลพบุรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ
โทรศัพท์ 0-3665-1187 **โทรสาร** 0-9801-57370
Email: rdiskc@ku.ac.th, sakol_north@hotmail.com

นายสุรพล เช้าฉ้อง **ตำแหน่ง** นักวิชาการเกษตร
Mr. Surapol Chowchong
หน่วยงาน ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ 298 หมู่ 1 ต.กลางดง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
โทรศัพท์ 0-4436-1770-4 **โทรสาร** 0-4436-1108
Email: raisuwan@csloxinfo.com

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำการวิจัย

ได้รับงลประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 งบประมาณที่ได้รับ 1,000,000 บาท (หนึ่งล้านบาทถ้วน) ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ กรกฎาคม 2554 ถึง 30 มิถุนายน 2555

2. สรุปโครงการวิจัย

ปกติแล้วโปรตีนในข้าวโพดจะมีคุณภาพต่ำ เนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโนทริปโตแฟน (tryptophan) และไลซีน (lysine) ต่ำ ส่วนกรดอะมิโนตัวอื่นๆ มีอยู่ในปริมาณปกติ ในช่วงทศวรรษ 1960 ได้ค้นพบยีนโอเปกทู (opaque-2) ในข้าวโพดกลายพันธุ์ (mutant) ซึ่งทำให้เอนโดสเปิร์ม (endosperm) ข้าวโพดมีปริมาณกรดอะมิโนทริปโตแฟนและไลซีนสูงขึ้นประมาณสองเท่าของข้าวโพดปกติ แต่การนำยีนโอเปกทูมาใช้ประโยชน์ในข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนยังมีน้อยมาก ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน เพื่อเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนและไลซีนในเอนโดสเปิร์มด้วยยีนโอเปกทู จะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อผู้บริโภคข้าวโพดฝักสด การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) เพิ่มปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนด้วยยีน *opaque-2* และ 2) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาช่วยในการคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy) และข้าวโพดเทียนที่มียีน opaque-2 ในรุ่นลูกชั่วต่างๆ

วิธีการวิจัยเริ่มจากใช้สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) จากโครงการวิจัยเดิม มาตรวจสอบยีนโอเปกทูและยีน waxy ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 และ phi022 ตามลำดับ ตรวจสอบปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีน และแป้งอมิโลเปกติน (amylopectin) นอกจากนี้ ใช้สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูผสมตัวเองชั่วที่ 4 ที่คัดเลือกไว้บางสายพันธุ์ ไปผสมข้ามพันธุ์กับข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน เพื่อสร้างสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวเทียนสายพันธุ์ใหม่ที่มียีนโอเปกทู ในรุ่นลูก สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) และ สายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) คัดเลือกยีนโอเปกทูด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057

ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) ที่ผสมตัวเอง 2 ครั้ง ได้สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูผสมตัวเองชั่วที่ 6 (S_6) ไว้จำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่า มียีนโอเปกทูและยีน waxy เป็น double homozygous recessive (*wxwxo$_2$o$_2$*) มีเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟนในโปรตีนอยู่ระหว่าง 0.66-1.21% มีค่าเฉลี่ย 0.94% มีสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 6 ที่คัดเลือกไว้ จำนวน 8 สายพันธุ์ ที่มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนมากกว่า 0.8 เปอร์เซ็นต์ และมีอมิโลเปกตินอยู่ระหว่าง 91.8-93.76 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ย 92.69 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้า มีเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟนในโปรตีนเฉลี่ย 0.47% สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 6 (S_6) ทั้ง 10 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ ได้นำไปผสมพันธุ์แบบพบกันหมดได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1-hybrid) จำนวน 45 คู่ผสม ซึ่งจะปลูกทดสอบสมรรถนะการผสมด้านผลผลิตในโครงการปีที่ 2 ต่อไป

ส่วนการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูจากการผสมพันธุ์ใหม่ของทั้ง 5 คู่ผสม พบว่า สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) เมื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 คัดเลือก ได้สายพันธุ์ที่มียีนโอเปกทูเป็น homozygous recessive (*o$_2$o$_2$*) ได้ทั้งหมด 166 สายพันธุ์ จากต้นที่ทำการคัดเลือกทั้งหมด 889 ต้น และสายพันธุ์เหล่านี้ได้ผสมตัวเองเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 (S_2) สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีปริมาณทริปโตแฟนสูงต่อไปในการวิจัยปีที่ 2

ในส่วนของการผสมกลับ (backcross) เพื่อเพิ่มระดับพันธุกรรมของพันธุ์รับ (recurrent parent) ได้สายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ที่มียีนโอเปกทูเป็นเฮเทอโรไซกัส (*O$_2$o$_2$*) จากทั้ง 5 คู่ผสมจำนวน 37 สายพันธุ์ และผสมตัวเอง 1 ครั้ง ได้เมล็ด BC_1S_1 ทุกสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์สามารถปลูกเป็นต้น BC_1S_1 มากกว่า 100 ต้น/สายพันธุ์ สำหรับคัดเลือกยีนโอเปกทูที่เป็น homozygous recessive (*o$_2$o$_2$*) ในโครงการปีที่ 2 ต่อไป

ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า การเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนในข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยยีนโอเปกทูสามารถทำได้ เช่นเดียวกับงานทดลองที่ประสบความสำเร็จแล้วในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (field corn) แต่ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูจะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อผู้บริโภคข้าวโพดฝักสด อย่างไรก็ตาม การทดสอบสมรรถนะการผสมเพื่อ

คัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตลูกผสมยังเป็นงานที่จะต้องดำเนินงานต่อ และนอกจากนี้ การพัฒนาพันธุกรรมใหม่ๆ เพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมอื่นๆ ก็เป็นงานที่จะต้องดำเนินงานต่อเช่นเดียวกัน เนื่องจากพันธุ์ข้าวโพดที่มีคุณภาพทางด้านอาหารที่ดีแล้ว ยังจะต้องมีผลผลิตอยู่ในเกณฑ์ที่ดี และมีความต้านทานโรคและแมลงที่เป็นศัตรูที่สำคัญๆ ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์อินเบรดชั่วที่ 2 (S_2) ที่ได้จากการผสมพันธุ์ใหม่ของทั้ง 5 คู่ผสม ที่มียีน *opaque-2* อยู่ในสภาพ homozygous recessive (o_2o_2) ทั้ง 166 สายพันธุ์ สามารถปลูกและคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรที่ดี ทดสอบความต้านทานโรคข้าวโพดที่สำคัญ เช่น โรครานำ้ค้าง โรคราสนิม และโรคใบไหม้แผลใหญ่ เป็นต้น และจะต้องทดสอบสมรรถนะการผสม เพื่อจะคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีสำหรับสร้างลูกผสมที่ให้ผลผลิตดี คุณภาพดี และมีคุณค่าทางอาหารสูง

บทคัดย่อ

ชูศักดิ์ จอมพุก[1] สุจินต์ เจนวีรวัฒน์[2] นายบุญฤทธิ์ สินค้างาม[3] พีรนุช จอมพุก[4]
กิตติ บุญเลิศนิรันดร์[5] สกล ฉายศรี[6] และสุรพล เช้าฉ้อง[7]

ข้าวโพดข้าวเหนียวเป็นข้าวโพดรับประทานฝักสดของประชากร ที่อาศัยอยู่ในเขตเอเชียตะวันตกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออก แต่ข้าวโพดข้าวเหนียวจะมีคุณภาพโปรตีนต่ำ เนื่องจากมีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนต่ำ อย่างไรก็ตาม ถ้าข้าวโพดข้าวเหนียวมียีนโอเปกทู (*opaque-2*) ในสภาพ homozygous recessive (o_2o_2) จะทำให้คุณภาพโปรตีนดีขึ้น เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟนในโปรตีนเพิ่มขึ้นกว่าเดิมเกือบ 2 เท่า การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดข้าวเหนียว และข้าวโพดเทียนด้วยยีนโอเปกทูและใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาช่วยในการคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนที่มียีนโอเปกทูในรุ่นลูกชั่วต่างๆ วิธีการทดลองใช้สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์ร่วมกับการใช้โมเลกุลเครื่องหมายในการคัดเลือก ซึ่งตรวจสอบยีน *waxy* และ ยีน *opaque-2* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล phi022 และ phi057 ตามลำดับ เป็นพันธุกรรมพื้นฐานสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ และใช้เป็นสายพันธุ์พ่อสำหรับสร้างลูกผสมใหม่ โดยใช้ข้าวโพดข้าวเหนียว 3 พันธุ์ และข้าวโพดเทียน 2 พันธุ์ เป็นพันธุ์แม่ ในการคัดเลือกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) และสายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) จะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 ตรวจสอบยีนโอเปกทู ส่วนสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4), 5 (S_5) และ 6 (S_6) ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ทริฟโตแฟนในโปรตีน และเปอร์เซ็นต์อมิโลเปกตินในเอนโดสเปิร์ม แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 6 ที่แข็งแรงและมีลักษณะการเกษตรที่ดีจำนวน 10 สายพันธุ์ไปผสมพันธุ์แบบพบกันหมด (diallel cross) ตามวิธี Griffing's method 4 ได้ลูกผสมแบบพบกันหมดจำนวน 45 คู่ผสม สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูผสมตัวเองชั่วที่ 6 ที่คัดเลือกไว้ 10 สายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟนในโปรตีนอยู่ระหว่าง 0.66-1.21% มีค่าเฉลี่ย 0.94% มีเปอร์เซ็นต์อมิโลเปกตินเฉลี่ย 92.69% ขณะที่ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้ามีเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟนในโปรตีนเฉลี่ย 0.47% สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูจากการผสมพันธุ์ใหม่ของทั้ง 5 คู่ผสม พบว่าสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) ของทั้ง 5 คู่ผสม เมื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 คัดเลือก ได้ต้นที่มียีนโอเปกทูเป็น homozygous recessive (o_2o_2) ทั้งหมด 166 สายพันธุ์ และสายพันธุ์เหล่านี้ได้ผสมตัวเองเป็น S_2 สำหรับการคัดเลือกต่อไป ในส่วนของการผสมกลับ (backcross) เพื่อเพิ่มระดับพันธุกรรมของพันธุ์รับ (recurrent parent) ได้สายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ที่มียีนโอเปกทูเป็นเฮเทอโรไซกัส (O_2o_2) จากทั้ง 5 คู่ผสม จำนวน 37 สายพันธุ์ และผสมตัวเองได้เมล็ด BC_1S_1 ทุกสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์สามารถปลูกเป็นต้น BC_1S_1 มากกว่า 100 ต้น/สายพันธุ์ สำหรับคัดเลือกยีนโอเปกทูที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) ต่อไป

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
[2] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900
[3] สำนักวิชาเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 65000
[4] ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์
[5] สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ พระนครศรีอยุธยา
[6] สถานีวิจัยลพบุรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ
[7] ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

Abstract

Choosak Jompuk[1] Sujin Jenweerawat[2] Bunyarit Sinkangam[3] Peeranuch Jompuk[4]
Kitti Boonlertnirun[5] Sakol Chaisri[6] Surapol Chowchong[7]

Waxy corn is an important food and vegetable in Southeast and East Asia. It has low quality protein which is low tryptophan content in protein. However, its insufficient protein quality could be remedied by the *opaque-2* gene (o_2o_2) increasing 2 time of normal waxy corn. The objectives of this study were to increase the tryptophan content in endosperm of waxy and tein corns by *opaque-2* gene and to apply DNA marker as marker-assisted selection for *opaque-2* gene in progeny. The S_4 of *waxy-opaque-2* lines from the Improvement of quality protein of waxy corn (*Zea mays ceratina*) by mutation techniques and marker-assisted selection project were used as genetic source for *waxy* and *opaque-2* genes. These genes were detected by DNA-markers, phi022 and phi057, respectively. The selection of *waxy-opaque-2* inbred lines was directly obtained from the S_4 plants or progeny of new cross. Five crosses between normal waxy (3 waxy and 2 tein corns) and S_4 of waxy-opaque-2 lines were made. In S_1 and BC_1F_1 progenies, DNA from leaf of each plant was tested by phi057 as marker-assisted selection to detect the *opaque-2* gene. Moreover, the percentage of tryptophan content in protein and amylopectin content from endosperm were analysed in S_4, S_5 and S_6 generations. Ten waxy-opaque-2 lines (S_6) with healthy and good agronomic characters were selected to make a diallel cross by Griffing's method 4 obtaining forty-five single cross hybrids. The percentage of tryptophan in protein from the endosperm of ten S_6 lines ranged from 0.66 to 1.21% with an average about 0.94%. The average percentage of amylopectin was about 92.69% in selected S_6 inbred lines. But, an average percentage of tryptophan in protein of normal waxy corn was about 0.47%. For selection of waxy-opaque-2 plant from new five crosses, one hundred and sixty-six lines with homozygous recessive (o_2o_2) genes were obtained by marker phi057. Then, these selected plants were self-pollinated to get S_2 line for the next cycle of selection. On the other hand, backcross method was used to increase the genetic background of recurrent parent. In BC_1F_1 plant from 5 crosses, the heterozygous of *opaque-2* gene were obtained about 37 lines. Then, the selected lines were self-pollinated to get BC_1S_1 seed. The seed in each cross can be grown over 100 plants for selecting homozygous recessive plant in the next generation.

[1] Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhonpathom 73140
[2] Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 10900
[3] Dept. of Agriculture, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao
[4] Dept. of Applied Radiation and Isotopes, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900
[5] Dept. plant science, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Pranakornsri Ayuttaya
[6] Lopbuir research station, Kasetsart University, Lopburi
[7] National Corn and Sorghum Research Center, Kasetsart University, Nakonracha Srima