



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยประจำปี 2554 จำนวนเงิน 1,000,000 บาท (หนึ่งล้านบาทถ้วน)

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ กรกฎาคม 2554 ถึง 30 มิถุนายน 2555

รายนามคณะผู้วิจัย

1.1 หัวหน้าโครงการ

ดร. ชูศักดิ์ จอมพุก

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์

Dr. Choosak Jompuk

หน่วยงาน ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
จ.นครปฐม 73140

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

Email : agrcsj@ku.ac.th

1.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1.2.1 ดร. สุจินต์ เจนวีร์วัฒน์

ตำแหน่ง อาจารย์

Dr. Sujin Jenweerawat

หน่วยงาน ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ 0-2579-3130 ext. 115, 08-1571-7225 **โทรสาร** 02-579-8580

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

1.2.2 ดร. บุญฤทธิ์ สิ้นค้างาม

ตำแหน่ง อาจารย์

Dr. Bunyarit Sinkangam

หน่วยงาน สำนักวิชาเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อำเภอเมือง จังหวัด
พะเยา 65000

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

Email : sin_bunyarit@hotmail.com

1.2.3 ดร. พีรนุช จอมพุก ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์

Dr. Peeranuch Jompuk

หน่วยงาน ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์

โทรศัพท์ 02 9428481 โทรสาร 025795530

Email : fsciprk@ku.ac.th

1.2.4 นายกิตติ บุญเลิศนรินทร์ ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

Mr. Kitti Boonlertnirun

หน่วยงาน สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัย

เทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ พระนครศรีอยุธยา

โทรศัพท์ 0-3532-3621 โทรสาร 0-3532-3621

Email : kittihuntra@hotmail.com

1.2.5 นายสกล ฉายศรี ตำแหน่ง นักวิจัย ระดับ 7

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

1.2.6 นายสุรพล เข้าฉ่อง ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร ระดับ 8 (ชำนาญการ)

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

บทคัดย่อ

ชูศักดิ์ จอมพุก¹ สุจินต์ เจนวีร์วัฒน์² นายบุญฤทธิ์ สิ้นค้างาม³ พิรณัฐ จอมพุก⁴
กิตติ บุญเลิศนิรันดร์⁵ สกล ฉายศรี⁶ และสุรพล เข้าฉ่อง⁷

ข้าวโพดข้าวเหนียวเป็นข้าวโพดรับประทานฝักสดของประชากร ที่อาศัยอยู่ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเชียตะวันออก แต่ข้าวโพดข้าวเหนียวจะมีคุณภาพโปรตีนต่ำ เนื่องจากมีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนต่ำ อย่างไรก็ตาม ถ้าข้าวโพดข้าวเหนียวมียืนโอเปกทู (*opaque-2*) ในสภาพ homozygous recessive (o_2o_2) จะทำให้คุณภาพโปรตีนดีขึ้น เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟนในโปรตีนเพิ่มขึ้นกว่าเดิมเกือบ 2 เท่า การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดข้าวเหนียว และข้าวโพดเทียนด้วยยืนโอเปกทูและใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาช่วยในการคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนที่มียืนโอเปกทูในรุ่นลูกข้าวต่างๆ วิธีการทดลองใช้สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์ร่วมกับการใช้โมเลกุลเครื่องหมายในการคัดเลือก ซึ่งตรวจสอบยืน *waxy* และ ยืน *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 ตรวจสอบยืนโอเปกทู ส่วนสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4), 5 (S_5) และ 6 (S_6) ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟนในโปรตีน และเปอร์เซ็นต์มิโลเปกตินในเอนโดสเปิร์ม 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% มีเปอร์เซ็นต์มิโลเปกตินเฉลี่ย 92.69% ขณะที่ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้ามีเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟนในโปรตีนเฉลี่ย 0.47% สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูจากการผสมพันธุ์ใหม่ของทั้ง 5 คู่ผสม พบว่าสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) ของทั้ง 5 คู่ผสม เมื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 คัดเลือก ได้ต้นที่มียืนโอเปกทูเป็น homozygous recessive (o_2o_2) ทั้งหมด 166 สายพันธุ์ และสายพันธุ์เหล่านี้ได้ผสมตัวเองเป็น S_2 สำหรับการคัดเลือกต่อไป ในส่วนของการผสมกลับ (backcross) เพื่อเพิ่มระดับพันธุกรรมของพันธุ์รับ (recurrent parent) ได้สายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ที่มียืนโอเปกทูเป็นเฮเทอโรไซกัส (O_2o_2) จากทั้ง 5 คู่ผสม จำนวน 37 สายพันธุ์ และผสมตัวเองได้เมล็ด BC_1S_1 ทุกสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์สามารถปลูกเป็นต้น BC_1S_1 มากกว่า 100 ต้น/สายพันธุ์ สำหรับคัดเลือกยืนโอเปกทูที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) ต่อไป

¹ ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

² ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900

³ สำนักวิชาเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 65000

⁴ ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์

⁵ สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ
พระนครศรีอยุธยา

⁶ สถาบันวิจัยลพบุรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

⁷ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

Abstract

Choosak Jompuk¹ Sujin Jenweerawat² Bunyarit Sinkangam³ Peeranuch Jompuk⁴
Kitti Boonlertnirun⁵ Sakol Chaisri⁶ Surapol Chowchong⁷

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 (o_2o_2) plant in the next generation.

¹ Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhonpathom

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

⁶ Lopbuir research station, Kasetsart University, Lopburi

⁷ National Corn and Sorghum Research Center, Kasetsart University, Nakonracha Srirama

บทนำ

ข้าวโพดเป็นธัญพืชที่ใช้ประโยชน์เป็นอาหารมนุษย์และสัตว์ ผลผลิตประมาณครึ่งหนึ่งใช้เป็นอาหารมนุษย์ อีกส่วนหนึ่งเป็นอาหารสัตว์ ประเทศไทยมีการปลูกข้าวโพดหลายชนิดเพื่อการค้า ได้แก่ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวโพดหวาน ข้าวโพดฝักอ่อน และข้าวโพดข้าวเหนียว เป็นต้น ซึ่งสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรมากกว่าสามแสนครอบครัว ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นข้าวโพดส่วนใหญ่ที่เกษตรกรปลูกและใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ภายในประเทศ นอกจากนี้ ข้าวโพดยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแป้ง น้ำมัน น้ำตาล และผลิตภัณฑ์อื่นๆ อีกด้วย ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารจึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจ ปกติแล้วโปรตีนในข้าวโพดจะมีคุณภาพต่ำ เนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตต่ำ ได้แก่ ทริปโตเฟน (tryptophan) และไลซีน (lysine) ส่วนกรดอะมิโนตัวอื่นๆ มีอยู่ในปริมาณปกติ อย่างไรก็ตาม ในช่วงทศวรรษ 1960 นักวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยเพอร์ดู (Purdue University) ได้ค้นพบยีนโอเพกทู (*opaque-2*) ในข้าวโพดกลายพันธุ์ (*mutant*) ซึ่งทำให้เมล็ดข้าวโพดมีปริมาณกรดอะมิโนทริปโตเฟนและไลซีนสูงขึ้นประมาณสองเท่าจากข้าวโพดปกติ (*normal maize*) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดโอเพกทู ปัจจุบันพันธุ์ข้าวโพดโอเพกทู หรือเป็นที่รู้จักกันในชื่อ *quality protein maize (QPM)* ที่ปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวสาลีนานาชาติ (CIMMYT) เป็นพันธุ์ข้าวโพดที่เป็นที่ยอมรับของหลายๆ ประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มประเทศที่ใช้ข้าวโพดเป็นอาหารมนุษย์โดยตรง ข้าวโพดชนิดนี้จะปลูกร่วมกับข้าวโพดชนิดอื่นๆ ไม่ได้ เนื่องจากยีนที่ควบคุมลักษณะนี้เป็น *recessive gene* ถ้าได้รับละอองเกสรจากข้าวโพดปกติทุกๆ ไปมาผสมพันธุ์ ข้าวโพดจะแสดงออกเป็นข้าวโพดปกติ เนื่องจากอิทธิพลของฝ่ายพ่อ (*Xenia effect*) นอกจากนี้การรับซื้อข้าวโพดไร่ (ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์) ในประเทศไทยยังใช้เกณฑ์ด้านปริมาณเป็นหลัก ดังนั้นประเทศไทยจึงยังไม่มีมีการปลูกข้าวโพดชนิดนี้เป็นการค้า

อย่างไรก็ตาม สำหรับข้าวโพดชนิดอื่นๆ ซึ่งต้องปลูกแยกตามชนิดของข้าวโพดเพื่อป้องกันการผสมข้ามของละอองเกสรข้ามชนิดพันธุ์ จึงมีความเป็นไปได้ในการปลูกเป็นการค้า เช่น ข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน (*waxy corn*) ซึ่งเป็นข้าวโพดที่ปลูกและบริโภคฝักสดกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย และเป็นสินค้าที่กำลังเป็นที่ต้องการสูงทั้งในประเทศและต่างประเทศในแถบเอเชีย เช่น จีน เวียดนาม ใต้หวัน และเกาหลีใต้ คาดว่ามีชาวเอเชียบริโภคข้าวโพดทั้งสองชนิดนี้ไม่ต่ำกว่าปีละ 300-600 ล้านคน ดังนั้น บริษัทผู้ค้าเมล็ดพันธุ์นานาชาติ ไม่ว่าจะในประเทศจีน เวียดนาม อินเดีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย รวมทั้งไทย สนใจเร่งพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวกันอย่างเต็มที่ โดยปัจจุบันไทยมียอดส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวไม่ต่ำกว่าปีละ 70-80 ล้านบาท

ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน เพื่อเพิ่มปริมาณทริปโตเฟนและไลซีนในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดด้วยยีน *opaque-2* จะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อผู้บริโภคข้าวโพดฝักสด เป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารจากพืชโดยตรง ปัจจุบัน งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณทริปโตเฟนในข้าวโพดฝักสดยังมีน้อยมาก เพราะนักวิจัยส่วนใหญ่ยังให้ความสำคัญเกี่ยวกับคุณภาพการบริโภคด้านอื่นๆ เช่น ความนุ่ม ความเหนียว กลิ่น และผลผลิต แต่คุณค่าทางโภชนาการยังให้ความสำคัญน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้ จะเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยจะนำยีนโอเพกทู ซึ่งเป็นยีน *recessive (o₂o₂)* จำนวน 1 ยีนที่ปกติมีอยู่ในข้าวโพดไร่คุณภาพโปรตีน (QPM) มาใส่ในข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนโดยการผสมข้ามพันธุ์ แล้วคัดเลือกข้าวโพดที่มีปริมาณทริปโตเฟนสูงและยังคงลักษณะข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนดั้งเดิม โดยในช่วงแรกของการคัดเลือกยีนโอเพกทูจะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาช่วยในการคัดเลือก เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือกพืชที่มียีนชนิดนี้ในรุ่นลูกชั้วต่างๆ ซึ่งปกติแล้วจะต้องรอจนเก็บ

เกี่ยวผลผลิตแล้วนำมาเมล็ดไปวิเคราะห์ทางเคมีจึงจะรู้ว่าต้นใดควบคุมด้วยยีนโอเปกทู แต่ถ้ายีนโอเปกทูอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส ก็จะต้องผสมตัวเองแล้วคัดเลือกรุ่นลูก ซึ่งทำให้เสียเวลาและจะต้องวิเคราะห์ตัวอย่างทางเคมีจำนวนมาก ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอ จะช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถเลือกพืชในระดับยีนที่ต้องการได้ หลังจากคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนที่มียีนดังกล่าวได้แล้ว จึงใช้การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีปกติ

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

ข้าวโพดข้าวเหนียวผลิตแป้งอมิโลเปกตินที่เป็นองค์ประกอบในเอนโดสเปิร์มมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ มียีนควบคุมเป็น recessive 1 คู่ ($wxwx$) อยู่บนโครโมโซมที่ 9 อย่างไรก็ตาม เมื่อวัดปริมาณเปอร์เซ็นต์ทริบิตแฟนในโปรตีนพบว่ามีความต่ำประมาณ 0.45 เปอร์เซ็นต์ ส่วนข้าวโพดโอเปกทู ($opaque-2$ corn) มียีน $opaque-2$ (o_2o_2) ควบคุมเป็น recessive 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมที่ 7 มีผลทำให้ปริมาณทริบิตแฟนในโปรตีนมีประมาณ 0.86 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผสมพันธุ์ข้ามระหว่างข้าวโพดทั้งสองชนิด (พันธุ์) จะทำให้ยีนทั้งสองตำแหน่ง (loci) เป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygous; $WxwxO_2o_2$) ลูกในชั่วนี้จะมีปริมาณอมิโลเปกตินและทริบิตแฟนต่ำ แต่ทั้งสองลักษณะนี้จะสูงขึ้นเมื่อยีนทั้งสองตำแหน่งนี้อยู่ในสภาพ homozygous recessive ($wxwxo_2o_2$) การทดลองนี้มีสมมติฐานว่า ถ้ายีน $waxy$ และ $opaque-2$ มาอยู่รวมกันจะทำให้ข้าวโพดมีความเหนียวนุ่มเนื่องจากมีปริมาณอมิโลเปกตินไม่น้อยกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณทริบิตแฟนในโปรตีนไม่น้อยกว่า 0.80 เปอร์เซ็นต์ ของฝักที่เก็บมาต้มสำหรับรับประทานฝักสด (อายุประมาณ 20-23 วันหลังการผสมเกสร) ปกติผลของยีน $waxy$ และ $opaque-2$ จะแสดงออกที่เมล็ด โดยตรวจสอบจากปริมาณแป้งอมิโลเปกตินและทริบิตแฟนในเอนโดสเปิร์ม ตามลำดับ ถ้าพ่อและแม่มียีนในแต่ละตำแหน่งเป็นเฮเทอโรไซกัส ($WxwxO_2o_2$) ลูกในชั่วที่ 2 (F_2) หรือสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) จะมีจีโนไทป์เป็น 9:3:3:1 ถ้าการกระจายตัวเป็นไปตามทฤษฎี ข้าวโพดชั่วที่ 2 จำนวน 16 ต้น จะมีเพียง 1 ต้นเท่านั้นที่มียีนที่ต้องการ ($wxwxo_2o_2$) ถ้าปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีปกติจะต้องรอจนข้าวโพดติดเมล็ดและสุกแก่ แล้วเก็บเมล็ดนำไปวิเคราะห์ปริมาณอมิโลเปกตินและทริบิตแฟน ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ ต้องใช้เวลา แรงงาน และการวิเคราะห์ตัวอย่างทางเคมีเป็นจำนวนมาก ถึงจะทราบว่าพืชต้นใดมีจีโนไทป์ในลักษณะที่ต้องการ แต่ด้วยเทคโนโลยีเครื่องหมายดีเอ็นเอ จะสามารถทำให้เลือกข้าวโพดที่มียีน $waxy$ และ $opaque-2$ ได้โดยตรงตั้งแต่ข้าวโพดยังเป็นต้นเล็กๆ โดยสกัดดีเอ็นเอ (DNA) แล้วใช้เครื่องหมายโมเลกุล $phi057$ (สำหรับยีน $opaque-2$) (Jompuk *et al.*, 2006 and 2007) และ $phi022$ (สำหรับ ยีน $waxy$) (วรรณชน และคณะ, 2553) ช่วยในการคัดเลือกรุ่นลูกที่มีการกระจายตัวของยีนทั้งสองนี้ ทำให้สามารถคัดเลือกต้นพืชที่มียีนที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ต้องรอจนเก็บเกี่ยวเมล็ด แล้วจึงคัดเลือกพืชที่มียีนที่ต้องการ เมื่อได้พืชที่มียีนที่ต้องการแล้วจึงใช้การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีปกติ (conventional breeding) โดยผสมตัวเอง (selfing) แล้วคัดเลือกลักษณะทางเกษตรที่ดี หรือมีสมรรถนะการผสมที่ดี ในการผสมพันธุ์ อาจต้องใช้วิธีการผสมกลับ (backcross) เข้ามาใช้ในวิธีการปรับปรุงพันธุ์ด้วย เพื่อช่วยเพิ่มพันธุกรรมพื้นฐานของข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์แม่ (recurrent parent) โดยคัดเลือกต้นที่ดีผสมกลับไปยังข้าวโพดข้าวเหนียวอีก 1-2 ครั้ง ปัจจุบันการวิเคราะห์ปริมาณทริบิตแฟนตามวิธีการของ Nurit *et al.* (2009) ทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ และราคาถูกลงกว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และมีความน่าเชื่อถือไม่แตกต่างจากการวิเคราะห์ทริบิตแฟนด้วยเครื่อง HPLC สายพันธุ์ผสมตัวเองที่ได้คัดเลือกไว้สามารถนำไปสร้างเป็นข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมคุณภาพโปรตีนสูง หรือสร้างเป็นพันธุ์สังเคราะห์เพื่อให้เกษตรกรสามารถเก็บเมล็ดไว้ปลูกต่อไปได้ ส่วนงานวิจัยในข้าวโพดเทียนจะทำในรูปแบบเดียวกัน จะคัดเลือก

ข้าวโพดเทียนที่มีจำนวนแถวประมาณ 8 แถว เหมือนกับพันธุ์แม่ที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ อย่างไรก็ตาม พันธุ์กรรมข้าวโพดเทียนยังต้องปรับปรุงอีกมาก ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเทียนจะทำทั้งการปรับปรุงเพื่อเพิ่มคุณภาพโปรตีน และยังมีอีกหนึ่งโครงการวิจัยที่ปรับปรุงพันธุ์กรรมข้าวโพดเทียนเพื่อสร้างพันธุ์สังเคราะห์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นพันธุ์โดยตรง หรือใช้เป็นแหล่งพันธุ์กรรมสำหรับปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเทียนโอเปกทู ในอนาคตต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม

ข้าวโพด (*Zea mays* L.) เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของทั้งมนุษย์และสัตว์ โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา แต่ข้าวโพดเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่มีคุณภาพต่ำ เนื่องจากภายในเอนโดสเปิร์มข้าวโพดมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต (essential amino acid) และสิ่งมีชีวิตไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ คือ ไลซีน (lysine) และ ทริปโตแฟน (tryptophan) อยู่ในปริมาณที่ต่ำ (Food and Agriculture Organization [FAO], 1992) จนกระทั่ง Mertz *et al.* (1964) และ Nelson *et al.* (1965) ได้ค้นพบยีนโอเปกทู (*opaque-2*) ซึ่งเป็น recessive gene และยีน *floury-2* (semi-dominant gene) ในข้าวโพดกลายพันธุ์ ซึ่งยีนทั้ง 2 นี้ ส่งผลให้เอนโดสเปิร์มข้าวโพดมีปริมาณของไลซีน และทริปโตแฟน สูงกว่าข้าวโพดทั่วไป ทำให้ข้าวโพดมีคุณภาพโปรตีนและคุณค่าทางโภชนาการ สำหรับมนุษย์และสัตว์เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ยังพบปัญหาของข้าวโพดชนิดนี้ คือ ภายในเมล็ดประกอบด้วยแป้งอ่อน (soft endosperm) จำนวนมาก ซึ่งจะช่วยให้แมลงเข้าทำลายได้ง่าย โดยเฉพาะในช่วงของการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังอ่อนแอต่อโรคฝักเน่า (ear rot) โดยจะส่งผลให้ผลผลิตลดลงกว่า 10-15% จากข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้ในระยะแรกข้าวโพดโอเปกทู ไม่เป็นที่ต้องการของตลาดและเกษตรกร (Villegas, 1994) แต่ปัจจุบัน ผลผลิตของข้าวโพดเหล่านี้ไม่แตกต่างไปจากข้าวโพดที่ปลูกกันทั่วไป (CIMMYT, 1999) เนื่องจากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวสาลีนานาชาติ (CIMMYT) ได้พบ modifying genes ที่มีผลทำให้เมล็ดข้าวโพดมีลักษณะแข็งใส (vitreousness) เหมือนกับข้าวโพดไร่ทั่วไป (Vasal, 1994; Lopes and Larkins, 1994) ซึ่งข้าวโพดพันธุ์ดังกล่าวนี้จะรู้จักกันในชื่อ Quality Protein Maize (QPM) สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด QPM ด้วยวิธีดั้งเดิมนั้น นักปรับปรุงพันธุ์จะมุ่งเน้นการถ่ายยีน *opaque-2* และ modifying genes ไปสู่พันธุ์ที่ดีต่างๆ โดยจะใช้การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการผสมกลับ (backcross)

กรดอะมิโนที่ร่างกายต้องการ

ความต้องการกรดอะมิโนของมนุษย์แบ่งได้ 2 ประเภทคือ กรดอะมิโนชนิดจำเป็น (essential amino acid) เป็นกรดอะมิโนที่ร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นได้ จึงจำเป็นต้องได้รับจากอาหารให้เพียงพอ ส่วนกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น (non-essential amino acid) เป็นกรดอะมิโนที่ร่างกายสร้างขึ้นเองได้ ทั้งกรดอะมิโนจำเป็นและกรดอะมิโนไม่จำเป็น มีความสำคัญต่อร่างกายเช่นเดียวกัน หากเกิดภาวะขาดกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง จะทำให้เกิดสภาวะที่ก่อให้เกิดโรค กรดอะมิโนที่จำเป็นมี 9 ชนิดได้แก่ ฮิสติดีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมไทโอนีน ทรีโอนีน ฟีนิลอะลานีน ทริปโตแฟน และวาลีน โดยทริปโตแฟน มีบทบาทสำคัญ ช่วยในการสร้างวิตามินบี 3 สร้างสารสื่อประสาท และต่อต้านอาการซึมเศร้า ถ้าร่างกายขาดจะทำให้หอนไม่หลับ และมีอาการซึมเศร้า ส่วนไลซีน ช่วยสร้างสายใยคอลลาเจน ซึ่งป้องกันการเกิดริ้วรอยก่อนวัย ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ ถ้าขาดจะทำให้ร่างกายอ่อนเพลีย ขาดสมาธิในการทำงาน เกิดโรคโลหิตจาง ความต้องการกรดอะมิโนของมนุษย์แสดงใน ตารางที่ 2-1 (FAO, 2002)

ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (Quality Protein Maize)

คุณค่าทางอาหารของข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (ควบคุมด้วยยีน *opaque-2*) จะมีปริมาณโปรตีนรวม (total protein) ที่ใกล้เคียงกับข้าวโพดไร่ทั่วไป คือ 9-10 เปอร์เซ็นต์ แต่จะมีคุณภาพโปรตีนที่สูงกว่าข้าวโพดไร่ สำหรับคุณภาพโปรตีนในข้าวโพด จะพิจารณาจากปริมาณของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด คือไลซีนและทริปโตแฟน โดยในข้าวโพดปกติจะมีปริมาณของไลซีน ประมาณ 2.6 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณของทริปโตแฟน ประมาณ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในข้าวโพดโอเปกทู (*opaque-2* corn) มีปริมาณของไลซีนและ ทริปโตแฟน ประมาณ 4 และ 1.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Mertz *et al.*, 1964)

ตารางที่ 2-1 ความต้องการกรดอะมิโนในมนุษย์

กรดอะมิโน	mg/kg per day	mg/g protein
Histidine	10	15
Isoleucine	20	30
Leucine	39	59
Lysine	30	45
Methionine	10	16
Cystine	4	6
Methionine + cysteine	15	22
Phenylalanine + tyrosine	25	30
Threonine	15	23
Tryptophan	4	6
Valine 26	26	39

ที่มา: FAO/WHO/UNU (2002)

ส่วนการศึกษาของ Prasana *et al.* (2001) เกี่ยวกับปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในข้าวโพดคุณภาพโปรตีน พบว่า ปริมาณทริปโตแฟนและไลซีนสูงกว่าข้าวโพดปกติประมาณ 55% และ 30% ตามลำดับ นอกจากนี้ Bressani (1966) รายงานการทดลองการใช้ข้าวโพดโอเปกทูเป็นอาหารกับเด็ก จำนวน 6 คน ที่มีอายุตั้งแต่ 24-75 เดือน และมีน้ำหนักตัว 10.82-19.05 กิโลกรัม พบว่าเด็กเหล่านี้บริโภคโปรตีน 1.8-15 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ค่าดัชนีของสภาพสมดุลของไนโตรเจน (nitrogen balance index) สำหรับนมเท่ากับ 0.80 ข้าวโพดโอเปกทูเท่ากับ 0.72 และข้าวโพดปกติเท่ากับ 0.31 แสดงให้เห็นว่า ข้าวโพดโอเปกทูมีคุณค่าของโปรตีนเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของนม เด็กในประเทศโคลัมเบีย (Colombia) ที่เป็นโรคขาดสารอาหาร สามารถมีสุขภาพเป็นปกติได้เมื่อใช้ข้าวโพดโอเปกทูเป็นแหล่งของโปรตีน (Clark *et al.*, 1977) ส่วน Bressani and Elias (1979) รายงานการทดลองใช้ข้าวโพดปกติ ข้าวโพดโอเปกทู และนม ในเด็กอายุ 4-5 เดือน จากสมการรีเกรสชันเส้นตรง (linear regression) ของ nitrogen absorbed กับ nitrogen balance พบว่า คุณค่าทางอาหารของข้าวโพดโอเปกทู เท่ากับนม ซึ่งมากกว่าข้าวโพดปกติสองเท่า นอกจากนี้ มีการทดลองที่นำข้าวโพดโอเปกทูไปใช้เลี้ยงสัตว์ ได้แก่ สุกร โดย Maner (1975) ใช้ข้าวโพดโอเปกทูเลี้ยงสุกร ผลการทดลอง พบว่า มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 3.6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ข้าวโพดปกติ สุกรที่เลี้ยงด้วยข้าวโพดปกติร่วมกับกากถั่วเหลือง จะมีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากสุกรที่เลี้ยงด้วยข้าวโพด

โอเปกทู ส่วนการทดลองของ Knabe *et al.* (1992) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของสุกรที่เลี้ยงด้วยข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (QPM) จะสูงกว่าการเลี้ยงด้วยข้าวโพดปกติ นอกจากนี้ Lopez-Pereira (1992) ได้ศึกษาการใช้ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนเป็นส่วนผสมของอาหารสุกรในประเทศบราซิลและเอลซาวาดอร์ พบว่าราคาอาหารของสุกรจะลดลง เมื่อใช้ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน เป็นส่วนผสม การนำข้าวโพดโอเปกทูไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงไก่ ทำให้ไก่เจริญเติบโตเร็วและใช้ปริมาณอาหารต่อหน่วยน้อยกว่าข้าวโพดปกติ (Cromwell *et al.*, 1983)

พันธุกรรม

นอกจากการค้นพบยีน *opaque-2* (o_2o_2) (Mertz *et al.*, 1964) และ ยีน *floury-2* (fl_2) (Nelson *et al.*, 1965) ในข้าวโพดกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาคุณภาพโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวโพด คือ ไลซีน และทริปโตเฟน ยังได้มีการค้นพบยีนอื่นๆ อีกอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงคุณภาพโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวโพด 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

ปัจจุบันแหล่งพันธุกรรมของยีน *opaque-2* ที่ได้มาจาก CIMMYT มีแบ่งอ่อนประกอบอยู่เพียงเล็กน้อย เนื่องจาก CIMMYT ได้ให้ความสำคัญกับการพัฒนาข้าวโพดโอเปกทูที่มีเอนโดสเปิร์มเป็นแป้งแข็งมาโดยตลอด ตัวอย่างประชากรข้าวโพดโอเปกทู ที่เป็นแป้งอ่อนที่น่าสนใจ เช่น Tuxpeno *opaque-2* (Population 37), CIMMYT *opaque-2* composite, Composite1 (ปรับตัวได้ในเขต highland), Composite K (ปรับตัวได้ในเขต tropical) และ Puebla *opaque-2* composite (Vasal, 1994) มหาวิทยาลัยอิลลินอยส์ (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 ในประเทศอินเดียได้มีการปรับปรุงพันธุ์และนำออกมาเผยแพร่ 3 ประชากร คือ Shakti, Rattan และ Proteina ในปี 1971 สำหรับในประเทศไทย ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ มีแหล่งพันธุกรรมยีน *opaque-2* คือ Thai *opaque-2* composite ต่อมามีการปรับปรุงพันธุ์ที่เน้นให้มีลักษณะแป้งแข็งและต้านทานโรคราน้ำค้างร่วมด้วย จนได้เป็น Thai *opaque-2* composite # 3 (Sriwatanapongse *et al.*, 1974) นอกจากนี้ ที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวสาลีนานาชาติ (CIMMYT) ได้มีการเก็บรักษาพันธุ์ข้าวโพด modified *opaque-2* ไว้มาก ซึ่งส่วนใหญ่พันธุ์ข้าวโพดที่เก็บไว้ ได้มาจากการพัฒนาและปรับปรุงมามากกว่า 20 ปี โดยประชากรเหล่านี้ จะมีความแตกต่างกัน ทั้งเรื่องการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อม ระยะเวลาสุกแก่ สีของเมล็ดและลักษณะของเอนโดสเปิร์ม (Vasal, 1994)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนสูง

ถึงแม้ว่าคุณค่าทางอาหารของข้าวโพดโอเปกทูจะเป็นที่ยอมรับของนักวิชาการโดยทั่วไป แต่ก็ยังพบข้อจำกัดที่เกี่ยวกับข้าวโพดชนิดนี้อีกมาก สุทัศน์ (2514 และ 2515) พบว่า เมื่อมีการถ่ายทอดยีน *opaque-2* เข้าไปในข้าวโพดปกติ แม้จะทำให้คุณภาพโปรตีนเพิ่มมากขึ้น แต่ปัญหาที่พบก็คือ เมล็ดมีลักษณะแป้งอ่อน

(soft endosperm) สีเหลืองซีดหรือสีขาวขุ่น ซึ่งลักษณะดังกล่าว จะก่อให้เกิดปัญหาในช่วงของการเก็บรักษา เมล็ดไว้เป็นระยะเวลานาน เนื่องจากมีการเข้าทำลายของแมลง คุณภาพแป้งข้าวโพดที่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ ลดลง น้ำหนักเมล็ดเบากว่าข้าวโพดธรรมดา และเกิดโรคฝักเน่าได้ง่าย ส่งผลให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำกว่าข้าวโพดทั่วไป จึงทำให้ข้าวโพดโอเพกทู ไม่เป็นที่ยอมรับของเกษตรกรและตลาด

เทคนิคที่ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวโพดโอเพกทู และการแก้ไขข้อบกพร่องในลักษณะที่ไม่ต้องการ นั้น นักปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการผสมกลับ (backcross) คือ การนำเอาลูกผสมที่ได้ผสมกลับไปยังพ่อหรือแม่ เพื่อเสริมลักษณะใดลักษณะหนึ่งเพียงไม่กี่ลักษณะเข้าไปยังพันธุ์พืชที่เห็นว่าดีอยู่แล้ว แต่ขาดลักษณะที่ต้องการบางลักษณะ ซึ่งเป็นการถ่ายทอดยีนจากสายพันธุ์หนึ่งไปยังอีกสายพันธุ์หนึ่ง (Allard, 1960) นอกจากนี้ Martin *et al.* (1982) เสนอว่า การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดโอเพกทู ขึ้นอยู่กับลักษณะต่างๆ ทาง การเกษตร และลักษณะคุณภาพในการคัดเลือก การศึกษาพันธุกรรมในข้าวโพดโอเพกทู โดยใช้วิธีการคัดเลือกแบบวงจร (recurrent selection) ผลผลิตจะเป็นเพียงลักษณะเดียวที่เป็นตัวชี้คุณค่าทางเศรษฐกิจ ลักษณะสำคัญที่ได้รับความสำเร็จในการคัดเลือก คือ ผลผลิต เเปอร์เซ็นต์ความชื้น ลักษณะความแข็งของเมล็ด (kernel hardness) ปริมาณไลซีน น้ำหนักเมล็ด และระดับความโปร่งแสงของเมล็ด (degree of light transmission) ประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์เพื่อรวมลักษณะต่างๆ โดยใช้วิธีการคัดเลือกแบบวงจร และทำการทดสอบในรุ่นลูกทั้งแบบ 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) ป้องกันการลดการสะสมของ modifiers ซึ่งประชากรข้าวโพด QPM ของ CIMMYT ได้มาจากการใช้สองวิธีดังกล่าวร่วมกัน

การปรับปรุงข้าวโพดคุณภาพโปรตีนด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding)

การปรับปรุงคุณภาพโปรตีนในข้าวโพดด้วยวิธีดั้งเดิมจะมีข้อจำกัดในเรื่องการตรวจสอบปริมาณ ไลซีน และทริปโตเฟน กล่าวคือ ในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของข้าวโพด นักปรับปรุงพันธุ์ไม่สามารถบอกได้ว่า ข้าวโพดต้นใด จะให้ผลผลิตที่มีปริมาณของไลซีนและทริปโตเฟนสูง จนกว่าจะสิ้นสุดฤดูกาล ซึ่งจะทำให้การผสมพันธุ์ต้องทำทั้งประชากร เนื่องจากบอกไม่ได้ว่าต้นใดที่มีอัลลีล (allele) ของยีนโอเพกทู (*opaque-2*) อยู่ สำหรับการจำแนกข้าวโพด QPM ที่น่าเชื่อถือจะต้องส่งตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ ในขั้นตอนแรกจะวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน เพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด และปริมาณทริปโตเฟน ที่มีอยู่ในส่วนของเอนโดสเปิร์มในเมล็ด ขั้นตอนที่สองเป็นการหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน EF1A ซึ่งมีความสัมพันธ์สูงกับปริมาณของไลซีนในเอนโดสเปิร์มภายในเมล็ด นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนของ ไลซีน : ทริปโตเฟน จะเท่ากับ 4: 1 ในข้าวโพดคุณภาพโปรตีน ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งก็จะสามารถบอกลักษณะของยีนที่ควบคุมอยู่ในพืชต้นนั้นๆ นอกจากนี้ ยังมีข้อจำกัดของยีนโอเพกทู ซึ่งเป็น recessive ทำให้ต้นข้าวโพดที่มียีนเป็น heterozygous คือมีจีโนไทป์เป็น O_2O_2 แสดงออกเหมือนกับ homozygous dominant (O_2O_2) ซึ่งในการจำแนกความแตกต่างของจีโนไทป์ 2 ชนิดนี้ ทำโดยผสมตัวเองของข้าวโพดทุกต้น แล้วนำเมล็ดที่ได้ไปปลูกในฤดูถัดไป เพื่อพิจารณาเฉพาะต้นที่มีการแสดงออกเป็น 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) โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้ยีนมากที่สุด สามารถเข้ามามีบทบาทที่สำคัญในการเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือก ลดระยะเวลาในการดำเนินการ ประหยัดงบประมาณ โดยสามารถทดแทนการทดสอบในสภาพจริงในบางขั้นตอน ซึ่งกระทำได้ยากในบางลักษณะ ดังนั้นประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกจึงขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น 1) ความถูกต้องแม่นยำในการวางตำแหน่งยีน โดยการใช้หลักการวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะปริมาณ 2) ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลและยีนที่ทำการถ่ายทอด และ 3) พื้นฐานทางพันธุกรรมของพันธุ์ที่จะได้รับการถ่ายทอดยีน ความไม่ต่อเนื่องในการพัฒนาไปสู่สายพันธุ์แท้ที่ดี สำหรับยีน *opaque-2* ร่วมกับ modifying genes นั้นเป็นผลมาจาก 3 สาเหตุ คือ 1) การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับแบบดั้งเดิมในแต่ละรุ่นต้องผสมตัวเองเพื่อแยกยีนโอเปกทู และต้องผสมกลับอย่างน้อย 6 ครั้ง เพื่อให้ระดับของการถ่ายทอดลักษณะต่างๆ เป็นที่น่าพอใจ 2) การรักษายีน *homozygous opaque-2* และ multiple modifier ต้องมีการคัดเลือก และ 3) กระบวนการทางชีวเคมี ในการตรวจสอบปริมาณไลซีน และทริปโตแฟนที่ทำในแต่ละชั่ว เป็นการใช้อย่างมากในการวิเคราะห์ รวมทั้งแรงงานและเวลาดำเนินการ การปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมจนกระทั่งได้เป็นพันธุ์การค้านอกจากใช้เวลานานแล้ว การตรวจสอบลักษณะที่ต้องการต่างๆ ก็ทำได้โดยการพิจารณาถึงลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) ซึ่งไม่สามารถบอกจีโนไทป์ (genotype) ที่แท้จริงของพืชต้นนั้นได้ แต่การใช้เทคนิคทางเครื่องหมายโมเลกุล หรือ DNA marker-assisted selection (MAS) สามารถตรวจสอบได้ว่าพืชต้นนั้นมีอัลลีลที่ต้องการอยู่หรือไม่โดยไม่ต้องรอประเมินจากลักษณะฟีโนไทป์ ข้อแตกต่างที่ชัดเจนของวิธีการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลกับวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมในยีนโอเปกทู คือ 1) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกยีนโอเปกทู ซึ่งเป็น recessive gene จะใช้เพียงใบบางส่วนของต้นที่มีขนาดเล็ก ไปสกัดดีเอ็นเอ ทำให้สามารถวิเคราะห์ลักษณะของพืชต้นนั้นได้ตั้งแต่ช่วงแรกของการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์จะคัดเลือกต้นที่ไม่มียีนโอเปกทูออกก่อนทำการผสมพันธุ์ นั้นหมายถึงขนาดของประชากรที่จะต้องผสมพันธุ์จะลดลง เป็นการประหยัดทั้งเวลาและแรงงาน 2) เครื่องหมายโมเลกุลสามารถแยกพืชต้นที่มีจีโนไทป์เป็น *homozygous recessive (o₂o₂)* และ *heterozygous* ที่มีอัลลีลของ *o₂* เพียงอัลลีลเดียวออกจากกันได้ (Ribaut and Hoisington, 1998; Jompuk *et al.*, 2006; Jompuk *et al.*, 2009)

Hamada *et al.* (1982) กล่าวว่าดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำขนาดสั้นๆ เพียง 1-4 คู่เบส แต่ไม่เกิน 10 คู่เบส ที่พบอยู่ภายในดีเอ็นเอของยูคาริโอท มีชื่อเรียกว่า simple sequence repeat (SSR) หรือ microsatellite DNA โดยได้มีการนำไปใช้ในการศึกษาแผนที่จีโนม การแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการประเมินระดับของการกระจายตัวของพันธุกรรม (Yang *et al.*, 1994; Choukan and Warburton, 2005) SSR สามารถบอกได้ว่ามียีนที่ต้องการอยู่ในพืชต้นนั้นหรือไม่ โดยการสังเคราะห์ primer ขึ้นมาซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ SSR ของยีน *opaque-2* มาเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่

(polymerase chain reaction, PCR) (Saiki *et al.*, 1988) แล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เพื่อแยก amplified DNA บนเจลชนิดต่างๆ จะทราบได้ว่า พีชต้นนั้นมีอัลลีลของ opaque-2 ทั้ง 2 alleles หรือมีเพียงอย่างละ 1 allele (Jompuk *et al.*, 2006 and 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-Marooof *et al.* (1994) และ Rongwen *et al.* (1995) รายงานการเกิด polymorphism ของ SSR จะดีกว่าใน RFLPs สำหรับพืชหลายๆ ชนิด เช่น ถั่วเหลือง เป็นต้น

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; Jompuk *et al.*, 2006; Jompuk *et al.*, 2009)

Bentte and Prasanna (2003) ได้ศึกษา SSR marker ดังนี้ bnlg439, phi057, blng125, dupssr34 และ bnlg105 ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างของ polymorphism สูงในการคัดเลือกข้าวโพดที่มีพันธุกรรมเป็น QPM พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนโอเปกทู คือ phi057 ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างของยีนโอเปกทูได้ดี ในประชากรที่ใช้ศึกษา

ข้าวโพดข้าวเหนียว

ข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn) เป็นข้าวโพดที่ค้นพบในประเทศจีน ตั้งแต่ช่วงต้นๆ ของปี ค.ศ. 1900s โดยลักษณะของเอนโดสเปิร์มจะขุ่น (dull) และเป็น waxy-like appearance ซึ่งเป็นผลมาจาก recessive gene 1 คู่ ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 9 หรือกำหนดสัญลักษณ์ของยีนตำแหน่งนี้เป็น waxy (wxwx) ข้าวโพดที่เป็น homozygous ของยีน waxy (wxwx) จะผลิตแป้งที่เป็นอมิโลเปกติน (amylopectin) เท่านั้น เมื่อแป้งชนิดนี้ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน (dilute solution of iodine) จะสร้างสารประกอบ iodine-starch complex ซึ่งจะทำให้ได้สีน้ำตาลแดง (reddish-brown stain) (Weatherwax, 1922) ข้าวโพดชนิดนี้ นิยมปลูกและรับประทานฝักสด ดังนั้นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารจะเป็นประโยชน์แก่ผู้บริโภคโดยตรง การใช้ยีนโอเปกทู (o_2o_2) ซึ่งเป็นยีนที่เกิดจากการกลายพันธุ์ (mutant gene) อยู่บนโครโมโซมที่ 7 มีผลทำให้เอนโดสเปิร์มของข้าวโพด มีปริมาณทริโบแทนและไลซีนเพิ่มขึ้น (Mertz *et al.*, 1964) ซึ่งปัจจุบันใช้กันอย่างแพร่หลายในข้าวโพดไร่โดยเฉพาะในเขตที่ปลูกข้าวโพดไร่เป็นอาหารมนุษย์โดยตรง (CIMMYT, 1999) แต่การนำยีนดังกล่าวมาไว้ในข้าวโพดข้าวเหนียวซึ่งเป็นข้าวโพดที่ใช้บริโภคฝักสดในประเทศไทยยังมี

น้อย (วรรณมน และคณะ 2553; Sinkangam *et al.*, 2011) และยังไม่มีการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าที่มีปริมาณทริบโตแพนสูงกว่าพันธุ์ปกติเนื่องจากยีนโอเปกทู

แหล่งพันธุกรรมของยีนโอเปกทูมีทั้งส่วนที่เป็นประชากร (population) และสายพันธุ์อินเบรด (inbred) ที่ปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวสาลีนานาชาติ (CIMMYT) (Vasal, 1994) อย่างไรก็ตามการนำยีนโอเปกทูมาใส่ไว้ในข้าวโพดข้าวเหนียว จะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อผู้บริโภคเมื่อคำนึงถึงคุณภาพของโปรตีนที่จะได้รับ เนื่องจากพันธุ์ข้าวโพดโอเปกทูควบคุมด้วย recessive gene และมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของทริบโตแพนในเมล็ดข้าวโพด ดังนั้นการนำประชากรของข้าวโพดเหล่านี้มาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรม จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถทำได้ การตรวจสอบยีนโอเปกทูสามารถทำได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker, phi057, umc1066 และ phi112) ซึ่งมีความจำเพาะกับยีนโอเปกทู (Chin *et al.*, 1996) โดยใช้เทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) ซึ่งทำให้การตรวจสอบข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีนกลาย หรือยีนโอเปกทูทำได้ง่ายขึ้น โดยไม่ต้องรอจนถึงระยะเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนของการผสมกลับเพื่อเพิ่มคุณภาพของการรับประทานของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีทริบโตแพนสูง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพิ่มปริมาณทริบโตแพนในแอนโดสเปิร์มของข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนด้วยยีนโอเปกทู (*opaque-2*)
2. ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาช่วยในการคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียว (*waxy*) และข้าวโพดเทียนที่มียีนโอเปกทูในรุ่นลูกชั่วต่างๆ

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวชั่วที่ 4 ที่มียีน *waxy* และ *opaque-2* ($wxwxo_2o_2$)

ฤดูปลูกที่ 1

ปลูกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (*waxy-opaque-2*) สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) ที่มีแหล่งพันธุกรรมของยีน *waxy* และยีน *opaque-2* ($wxwxo_2o_2$) ที่ได้จากโครงการวิจัย ‘การปรับปรุงคุณภาพโปรตีนของข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์ร่วมกับการใช้โมเลกุลเครื่องหมายในการคัดเลือก’ โครงการวิจัยปีงบประมาณ 2550-2552 จำนวน 15 สายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบยีน *waxy* ($wxwx$) และ *opaque-2* (o_2o_2) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล phi022 และ phi057 ตามลำดับ เนื่องจากยีนทั้ง 2 เป็น recessive ถึงจะแสดงออกเป็นข้าวโพดข้าวเหนียวและมีปริมาณทริปโตแฟนสูง แต่ถ้ามีละอองเกสรจากข้าวโพดชนิดอื่นๆ มาปนในช่วงการผสมเกสรจะทำให้ลักษณะ *waxy* และ *opaque-2* เสียไป ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจสอบสายพันธุ์เพื่อความแน่ใจในพันธุกรรมที่จะนำมาใช้ผสมพันธุ์สำหรับถ่ายทอดพันธุกรรมให้แก่ข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนพันธุ์อื่นๆ เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุล phi022 และ phi057 เป็น simple sequence repeat marker (SSR-marker) และเป็น co-dominant marker ซึ่งสามารถแยกยีนโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส และโฮโมไซกัสทั้ง dominant และ recessive ได้

เมื่อถึงระยะเก็บฝักสดที่อายุ 21 วันหลังการผสมเกสร เก็บเมล็ดมาตรวจสอบปริมาณอมิโนเปกติน โปรตีน ความหวาน และทริปโตแฟน เพื่อเป็นการยืนยันผลของเครื่องหมายดีเอ็นเอ กับลักษณะทางคุณภาพของยีนที่ควบคุม โดยที่ระยะออกดอกจะผสมตัวเองเพิ่มระดับความคงตัวของพันธุกรรม แล้ววิเคราะห์เมล็ดอีกครั้งหนึ่งในเมล็ดที่อายุสุกแก่ (อายุประมาณ 35 วันหลังการผสมเกสร) เพื่อดูปริมาณสารต่างๆ ที่วิเคราะห์ที่อายุ 21 วัน และที่ 35 วันหลังการผสมเกสร มีความสัมพันธ์ (correlation) กันอย่างไร

ในช่วงของการออกดอก ได้คัดเลือกบางสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี และแข็งแรง จำนวน 10 สายพันธุ์ แล้วผสมตัวเองได้เมล็ดผสมตัวเองชั่วที่ 5 (S_5) โดยผสมตัวเองไว้ประมาณ 10 ฝัก/สายพันธุ์

ฤดูปลูกที่ 2

ปลูกข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (*waxy-opaque-2*) สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 5 (S_5) จำนวน 70 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกมาจากฤดูปลูกที่ 1 โดยนำเมล็ดบางส่วนของแต่ละสายพันธุ์ไปวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟน โปรตีนและอมิโนส เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี และมีปริมาณทริปโตแฟนสูง แล้วเพิ่มระดับของความคงตัวของพันธุกรรมโดยการผสมตัวเองได้สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 6 (S_6)

ฤดูปลูกที่ 3

ปลูกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 6 (S_6) ที่คัดเลือกแล้วว่ามีปริมาณทริปโตแฟนสูง จำนวน 10 สายพันธุ์ เพื่อผสมพันธุ์แบบพบกันหมด (diallel cross) โดยใช้ Griffing's method 4 เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 -hybrid) จำนวน 45 คู่ผสม

2. การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวเพื่อเพิ่มปริมาณทริปโตแฟนด้วยยีนโอเปกทู *opaque-2* (o_2o_2)

ฤดูปลูกที่ 1

ปลูกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีคุณภาพรับประทานฝักสดที่ดีเป็นพันธุ์แม่ จำนวน 3 พันธุ์ คือ พันธุ์รัชตะ (จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) เหนียวสวรรค์ และพันธุ์บิ๊กไวท์ (Big white) จากบริษัทเอกชน และข้าวโพด

เทียน 2 พันธุ์ คือ เทียนพันตรา จ. อยุธยา (พันธุ์พื้นบ้าน) และเทียนสุโขทัย และใช้สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) เป็นพันธุ์พ่อ จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่

1. (Kwi1 x Q53)- S_4 -2-8-1-2
2. (Kwi9 x Q53)- S_4 -13-73-4-1
3. (Kwi1 x Q53)- BC_1S_4 -1-2-2-5-1
4. (Kwi1 x Q53)- BC_1S_4 -1-6-2-3-2
5. (Kwi1 x Q53)- S_4 -4-3-2-6

สร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จำนวน 8 คู่ผสม ในการผสมข้ามพันธุ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อถ่ายทอดยีนโอเปกทู (*opaque-2*) จากพันธุ์พ่อ มาไว้ในลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ทำให้ยีนในตำแหน่งโอเปกทูของลูกผสมชั่วที่ 1 อยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) (O_2o_2) ส่วนยีนในตำแหน่ง waxy จะเป็น homozygous recessive (wxwx) เนื่องจากผสมข้ามระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยกัน ดังนั้น ลูกชั่วที่ 1 (F_1) จะแสดงลักษณะเป็นข้าวโพดข้าวเหนียว แต่มีปริมาณทริบิโตแพนต่ำเนื่องจากยีนโอเปกทู ยังไม่แสดงลักษณะเพราะถูกข่มอยู่ (O_2o_2)

ฤดูปลูกที่ 2

ปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน กับข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู ของทั้ง 8 คู่ผสมจากฤดูปลูกที่ 1 จากนั้นเลือกคู่ผสมที่มีลักษณะเกษตรดี มีความแข็งแรงเพื่อใช้ปรับปรุงพันธุ์ต่อ จำนวน 5 คู่ผสม คู่ผสมเหล่านี้ เมื่อถึงระยะออกดอก จะแยกดำเนินการเป็น 2 ส่วนคือ

1. ผสมตัวเอง (self) ได้สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) หรือบางครั้งเรียกลูกชั่วที่ 2 (F_2) ของทั้ง 5 คู่ผสม
2. ผสมกลับ (backcross) ไปยังข้าวโพดพันธุ์แม่ (recurrent parent) ของแต่ละคู่ผสมได้สายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ของทั้ง 5 คู่ผสม

ฤดูปลูกที่ 3

1. สายพันธุ์ผสมตัวเอง

1.1 ปลูกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) จำนวนคู่ผสมละ 100-200 ต้น เพื่อคัดเลือกต้นที่มียีนโอเปกทูในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous recessive, o_2o_2) ของแต่ละคู่ผสม โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (ϕ 057) เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือก โดยเครื่องหมายโมเลกุลนี้ สามารถจำแนกข้าวโพดได้ทั้ง 3 ยีนไทป์ กล่าวคือ homozygous dominant (O_2O_2), heterozygous (O_2o_2) และ homozygous recessive (o_2o_2)

1.2 ต้นข้าวโพดที่เป็น homozygous recessive (o_2o_2) ของยีนโอเปกทู จะดูแลต่อไปจนถึงระยะออกดอก จึงผสมตัวเองเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 (S_2) ทุกต้น จากนั้นรอนจนแก่จึงเก็บเกี่ยวแล้วคัดเลือกฝักที่ดี เพื่อปลูกในฤดูต่อไป ขั้นตอนการผสมพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์แสดงดังภาพที่ 2-1

2. สายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC₁F₁)

ปลูกสายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC₁F₁) คู่ผสมละประมาณ 10- 30 ต้น เพื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (phi057) ช่วยในการคัดเลือกต้นที่เป็นเฮเทอโรไซกัสของยีนโอเปกทู (*O₂O₂*) ทั้งนี้เนื่องจาก ข้าวโพดสายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 มียีนไทป์ของยีนโอเปกทูอยู่ 2 ประเภท คือ *O₂O₂* และ *O₂o₂* ดังนั้นจะเลือกเฉพาะต้นที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (*O₂O₂*) เท่านั้น ผสมตัวเองเป็น BC₁S₁ สำหรับใช้ปลูกและคัดเลือกสายพันธุ์ผสมกลับที่มียีนโอเปกทูอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส เช่นเดียวกับการคัดเลือกในสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S₁) โดยจะดำเนินงานในโครงการปีต่อไป

ปีที่ 1

ฤดูที่ 1

ตรวจสอบ *waxy* และ *opaque-2* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

phi022 และ phi057

Waxy x corn

(*wxwxO₂O₂*)

สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูชั่วที่ S₄
ที่มียีน *waxy* และ *opaque-2* (*wxwxo₂o₂*)

S₄ (Waxy-
Opaque-2)
(*wxwxo₂o₂*)

ผสมตัวเอง

ฤดูที่ 2

Waxy corn
(*O₂O₂*)

F₁
(*O₂o₂*)

S₅ วิเคราะห์โปรตีน
ทริปโตเฟน และ
อะมิโลเปกติน

ฤดูที่ 3

BC₁F₁

S₁

S₆

1*O₂O₂* : 1 *O₂o₂*

(1*O₂O₂* : 2 *O₂o₂* : 1*o₂o₂*)

Diallel cross

Phi057 เลื่อน *O₂o₂* แล้ว self

ได้เมล็ด BC₁S₁

ใช้เครื่องหมายโมเดลล์ phi057

S₂ ช่วยคัดเลือกเฉพาะ *o₂o₂*

(*o₂o₂*)

ภาพที่ 2-1 แผนการดำเนินการผสมและคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวเพื่อเพิ่มปริมาณทริปโตเฟนด้วยยีนโอเปกทู

3 การวิเคราะห์ทางเคมีและดีเอ็นเอ

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง (amylopectin)

บดตัวอย่างเมล็ดจนได้ผงแป้งละเอียด จากนั้นชั่งผงแป้ง 0.1 กรัม ใส่หลอดทดลองพร้อมกับเติมเอธิลแอลกอฮอล์ (95% ethyl alcohol) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย 5 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาณอะมิโลส (amylose) ตามวิธีการของจูลิโน (Juliano, 1971) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายมาตรฐานอะมิโลส แล้วแปลงค่าเป็นอะมิโลเปกติน โดยคำนวณจาก 100 - อะมิโลส ก็จะได้ปริมาณอะมิโลเปกติน

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์ม

การวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟนใช้วิธีของ Nurit *et al.* (2009) ซึ่งการวิเคราะห์ดัดแปลงมาจากวิธีของ Villegas and Mertz (1971)

การเตรียมตัวอย่าง

เก็บเมล็ดสายพันธุ์ตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟน ตามวิธีของ Nurit *et al.* (2009) โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดประมาณ 20-30 เมล็ด แช่น้ำกลั่นประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นลอกเพอริคาร์ป (pericarp) และแกะส่วนของเอ็มบริโอ (embryo) ออก ผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำเอนโดสเปิร์มไปบดด้วยเครื่อง cyclone mill ให้มีขนาด 0.08 มิลลิเมตร นำแป้งที่ได้ไปสกัดไขมันด้วยเครื่องสกัดไขมัน โดยใช้เฮกเซน (hexane) เป็นตัวทำละลาย นานประมาณ 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์ทริปโตแฟน ดังนี้

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

2. นำตัวอย่างไปบ่ม (incubate) ในตู้บ่มอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแรก นำตัวอย่างมาเขย่าอีกครั้งหนึ่งแล้วนำกลับไปบ่มจนครบ 16 ชั่วโมง

3. เมื่อไฮโดรไลส์ครบ 16 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมาเขย่าอีกครั้ง แล้วปล่อยให้เย็นลงในสภาพอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง (centrifuge) ที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที (rpm) นาน 5 นาที

4. ดูดส่วนใสด้านบน ปริมาตร 666 ไมโครลิตร (μL) ใส่หลอดทดลองแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร (ml) เติม reagent D ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง (vortex) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

5. นำตัวอย่างออกจากตู้บ่มแล้วปล่อยให้เย็นลงประมาณอุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (nm)

6. สร้างกราฟมาตรฐานจากการเตรียม DL-tryptophan (Merck, Germany) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0 10, 15, 20, 25 และ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$)

7. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟน (%try) ได้จากค่าสมการดังนี้

$$\% \text{ try} = \frac{\text{OD}_{560}}{\text{slope of standard curve}} \times \frac{\text{hydrolysis volume}}{\text{sample weight}} \times 100 \%$$

การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ทริปโตแฟน

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

Reagent B: (1.8 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ใช้ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Ajax Finechem, Australia) ปริมาณ 0.05 กรัม แล้วละลายใน Reagent A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

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

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

3.3 การวิเคราะห์โปรตีน

การวิเคราะห์โปรตีนใช้การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen, N) ด้วยวิธี Micro-kjeldahl (Bailey, 1967) แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์โปรตีนในเมล็ด ($N \times 6.25$)

3.4 การวิเคราะห์ Total sugar

วิเคราะห์ปริมาณ Total Sugar ทำตามวิธีการของ Nelson (1944) มีขั้นตอนการทำดังนี้

การเตรียมตัวอย่างข้าวโพด

1. เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่มีอายุประมาณ 18–20 วัน นับจากวันที่ทำการผสม (days after crossing)
2. ผานตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 20–25 กรัม
3. บดเมล็ดข้าวโพดโดยใช้ blender ให้ละเอียดที่สุด พร้อมกับเติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากับน้ำหนักของตัวอย่างที่ชั่ง ตัวอย่างที่บดนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อต้องการสารแขวนลอยนำไปใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ (ขนาดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเครื่อง centrifuge)
4. ทำการ balancing ตัวอย่างก่อนปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 10,000 rpm นาน 20 นาที
5. กรองด้วยกระดาษกรองใส่หลอดทดลอง
6. เตรียมสารละลายเพื่อวัด Total Sugar โดยการดูดสารละลาย 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 7.45 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่

การวิเคราะห์ Total Sugar

1. ดูดสารละลายจากข้อ 6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม 0.1 N HCl 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำหลอดทดลองมาแช่น้ำเย็น หรือทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
2. เติม 0.1 N NaOH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร นำไปหาน้ำตาลตามวิธีการของ Nelson's reducing sugar (Nelson, 1944)

3.5 การวิเคราะห์หายีน *opaque-2* และยีน *waxy* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโพดสด (young leaf) ตามวิธีการของ Agrawal *et al.* (1992) จำนวน 150-250 มิลลิกรัม (mg) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล phi057 (Chin *et al.*, 1996) ซึ่งเป็น simple sequence repeat (SSR) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการคัดเลือกต้นข้าวโพดที่มียีน o_2o_2 และใช้เครื่องหมายโมเลกุล phi022 (Senior *et al.*, 1998) คัดเลือกต้นที่มียีน *waxy* (*wxwx*) จากปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 1X reaction ประกอบด้วย: 10% glycerol, $MgCl_2$ 2.5 mM, mixed dNTP 150 μ l, primer 0.3

μM , Taq DNA polymerase 1 U และ DNA 50 ng การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง thermal cycler (MJ Research) มีรอบการทำงาน ดังนี้ 1) first denaturation ที่ 94°C นาน 1 นาที 2) denaturation ที่ 94°C นาน 30 นาที 3) annealing ที่ $58-60^{\circ}\text{C}$ นาน 1 นาที 4) extension ที่ 72°C นาน 1 นาที และ 5) final extension 72°C นาน 5 นาที ตรวจสอบผลดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องอิเล็กโตโฟเรซิส โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 แยกด้วย 6% ของ polyacrylamide denaturing gel และย้อมด้วย silver-stained ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ phi022 ใช้ 3% ของ agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide

ผลการวิจัย

1. การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวข้าวที่ 4 ที่มียีน waxy และ opaque-2 (waxy₂o₂)

ฤดูปลูกที่ 1

จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย phi057 และ phi022 พบว่า สายพันธุ์ข้าวที่ 4 จากโครงการเดิมให้ ยีนไทป์ที่เป็นข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีนโอเปกทูเป็น recessive ทั้ง 15 สายพันธุ์ (กลุ่มสายพันธุ์) โดย เปอร์เซ็นต์ทรูปโตแฟนในโปรตีนของเมล็ดที่อายุ 21 วันหลังผสมเกสร มีค่าอยู่ระหว่าง 0.61-1.24% ส่วนพันธุ์ ที่มียีนโอเปกทูเป็น dominant คือพันธุ์ Kwi1 และ บิ๊กไวท์ มีเปอร์เซ็นต์ทรูปโตแฟนในโปรตีน 0.45% และ 0.49% ตามลำดับ ขณะที่พันธุ์ข้าวโพดไรโอเปก (AgQ53) มีเปอร์เซ็นต์ทรูปโตแฟนในโปรตีน 0.87% (ตารางที่ 2-2) ส่วนเปอร์เซ็นต์ทรูปโตแฟนในโปรตีนของเมล็ดที่อายุ 35 วันหลังผสมเกสร มีค่าอยู่ระหว่าง 0.60-1.18% เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (correlation) ของข้อมูลโดยรวม จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์ทรูปโตแฟนที่อายุ 21 และ 35 วันหลังผสมเกสร มีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และมีค่าสหสัมพันธ์กันสูง ($r=0.88^{**}$) ดังนั้น การวิเคราะห์ ปริมาณทรูปโตแฟนสามารถวิเคราะห์ที่อายุ 21 วัน หรือ ที่ 35 วันหลังการผสมเกสรก็ได้ แต่ในทางปฏิบัติการ วิเคราะห์ทรูปโตแฟนที่อายุ 35 วันหลังการผสมเกสร สามารถทำได้ค่อนข้างสะดวกกว่า และจากการทดลองนี้ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (C.V.) ของการวิเคราะห์ทรูปโตแฟนที่อายุ 35 วัน ต่ำกว่าการวิเคราะห์ที่ อายุ 21 วันหลังผสมเกสร

เปอร์เซ็นต์อไมโลเปกติน ข้าวโพดที่มีจีโนไทป์เป็นข้าวโพดข้าวเหนียวมีค่าอยู่ระหว่าง 96.2-98.0% ส่วนข้าวโพดไรโอเปกมีค่าประมาณ 70% โดยที่เมล็ดข้าวโพดอายุ 21 และ 35 วัน มีปริมาณใกล้เคียงกัน และมี สหสัมพันธ์ปานกลาง ($r=0.67^{**}$)

ความหวาน ซึ่งวัดเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำตาลรวมในเมล็ดที่เก็บที่อายุ 21 วันหลังผสมเกสร พบว่า ข้าวโพด ข้าวเหนียวมีน้ำตาลรวมค่อนข้างแปรปรวนในแต่ละสายพันธุ์ โดยมีค่าระหว่าง 58-88% อย่างไรก็ตามข้าวโพด ข้าวเหนียวเหล่านี้มีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลรวมมากกว่าข้าวโพดไร่ ซึ่งมี 32%

ในช่วงของการออกดอก ได้คัดเลือกบางสายพันธุ์ที่มีลักษณะเกษตรที่ดีและแข็งแรง จำนวน 5 สายพันธุ์ ต่อกลุ่มสายพันธุ์ แล้วผสมตัวเองได้เมล็ดข้าวที่ 5 (S₅) จำนวน 75 สายพันธุ์ (15 สายพันธุ์ x 5 ฝัก/สายพันธุ์)

ฤดูปลูกที่ 2

ปลูกข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (waxy-opaque2) ข้าวที่ 5 (S₅) จำนวน 75 สายพันธุ์ จาก 15 กลุ่ม สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาจากฤดูปลูกที่ 1 จากการประเมินด้วยสายตาได้คัดเลือกกลุ่มสายพันธุ์ที่มีความแข็งแรง และมีลักษณะเกษตรที่ดีไว้ 10 กลุ่มสายพันธุ์ โดยแต่ละสายพันธุ์จะยังคงเลือกและผสมตัวเองไว้ 5 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 50 สายพันธุ์ หลังการเก็บเกี่ยวได้นำเมล็ดบางส่วน (จำนวน 4 สายพันธุ์/กลุ่มสายพันธุ์) ของแต่ละ สายพันธุ์ไปวิเคราะห์ปริมาณทรูปโตแฟนในโปรตีน และอไมโลเปกติน ที่อายุ 35 วันหลังการผสมเกสร (ตารางที่ 2-3) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะเกษตรที่ดี และมีปริมาณทรูปโตแฟนสูง ไว้จำนวน 10 สายพันธุ์ (โดย เลือก 1 สายพันธุ์ ที่มีทรูปโตแฟนสูงที่สุดจากแต่ละกลุ่มสายพันธุ์) แล้วนำเมล็ด S₅ ไปปลูกเพื่อเพิ่มระดับของ ความคงตัวทางพันธุกรรมโดยการผสมตัวเองได้ลูกผสมตัวเองข้าวที่ 6 (S₆) ลูกในขั้นนี้ ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 2-2 แสดงยีนไทป์ของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูในชั่ว S₄ ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ เปอร์เซ็นต์อมิโลเปกติน เปอร์เซ็นต์ของทริโบโตแฟนในโปรตีน และเปอร์เซ็นต์น้ำตาล ในเมล็ดที่อายุ 21 และ 35 วันหลังการผสมเกสร

Lines	Pedigree	Genotypes		Tryptophan in protein (%)		amylopectin (%)		Total sugar (%)
		waxy	opaque	21 d	35 d	21 d	25 d	fresh
Ab-1	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-8-3-2-1	wxwx	O ₂ O ₂	1.24	1.03	96.7	96.4	59.00
Ab-2	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-2-2-5-1	wxwx	O ₂ O ₂	1.18	1.10	97.6	97.1	85.27
Ab-3	(Kwi9 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-5-2-2-2	wxwx	O ₂ O ₂	1.06	1.02	98.0	97.4	71.23
Ab-4	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-7-3-1-2	wxwx	O ₂ O ₂	1.02	1.12	97.0	97.2	77.36
Ab-5	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-3-2-1-1	wxwx	O ₂ O ₂	1.11	1.18	96.0	97.6	88.33
Ab-6	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-6-2-3-2	wxwx	O ₂ O ₂	0.61	0.60	96.7	96.1	65.36
As-7	(Kwi1 x Q53)-S ₄ -2-8-1-1	wxwx	O ₂ O ₂	0.72	0.77	96.9	97.1	58.33
As-8	(Kwi1 x Q53)-S ₄ -2-8-1-1	wxwx	O ₂ O ₂	0.98	0.92	96.3	97.6	76.05
As-9	(Kwi1 x Q53)-S ₄ -2-8-1-2	wxwx	O ₂ O ₂	0.93	0.89	97.7	97.1	68.50
As-10	(Kwi1 x Q53)-S ₄ -2-9-1-1	wxwx	O ₂ O ₂	0.78	1.09	96.3	97.2	69.10
As-11	(Kwi1 x Q53)-S ₄ -5-2-1-1	wxwx	O ₂ O ₂	1.12	1.02	96.6	97.1	71.10
As-12	(Kwi1 x Q53)-S ₄ -4-3-2-6	wxwx	O ₂ O ₂	1.01	1.10	96.2	96.1	76.2
As-13	(Kwi1 x Q53)-S ₄ -4-3-2-7	wxwx	O ₂ O ₂	0.98	0.96	94.3	65.2	77.4
As-14	(Kwi9 x Q53)-S ₄ -13-73-4-1	wxwx	O ₂ O ₂	0.87	0.85	96.1	96.4	80.2
As-15	(Kwi9 x Q53)-S ₄ -13-73-4-2	wxwx	O ₂ O ₂	0.88	0.87	95.4	95.7	79.6
Kwi1		wxwx	O ₂ O ₂	0.45	0.55	97.6	97.5	68.10
Big-white		wxwx	O ₂ O ₂	0.49	0.50	96.2	96.8	73.49
AgQ53		WxWx	O ₂ O ₂	0.87	0.86	70.1	71.2	32.0
F-test				**	**	**	**	**
LSD _{0.05}				0.39	0.28	1.15	0.60	23.98
CV (%)				22.14	14.39	7.0	2.9	15.67
correlation (r) ^{1/}				0.88**		0.67**		

** = significant at the 0.01 level, 21 d = 21 days after pollination, 35 d = 35 days after pollination

^{1/} = correlation (r) between 21 d and 35 d samples

ปริมาณโปรตีน ทริปโตแฟนในโปรตีน ปริมาณอมิโลเปกติน และเก็บข้อมูลพื้นฐานทางด้านเกษตร ดังแสดง
ในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-3 แสดงเปอร์เซ็นต์ของทริปโตแฟนในโปรตีน และเปอร์เซ็นต์อมิโลเปกติน สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว
โอเปกทูชั่วที่ 5 (S₅) ที่อายุ 35 วันหลังผสมเกสร

Lines	Original	Tryptophan in protein (%)	Amylopectin (%)
R1	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-8-3-2-1-1	0.815	92.83
R2	(Kwi1 x Q53)-BC₁S₅-1-8-3-2-1-2	1.113	93.39
R3	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-8-3-2-1-3	0.887	92.55
R5	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-8-3-2-1-4	0.917	93.84
R6	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-2-2-5-1-1	0.917	93.84
R7	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-2-2-5-1-2	0.890	93.17
R8	(Kwi1 x Q53)-BC₁S₅-1-2-2-5-1-3	0.950	93.73
R9	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-2-2-5-1-4	0.918	93.68
R9	(Kwi9 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-5-2-2-2-1	0.929	93.10
R10	(Kwi9 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-5-2-2-2-2	0.933	93.51
R11	(Kwi9 x Q53)-BC₁S₅-1-5-2-2-2-3	0.986	93.43
R12	(Kwi9 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-5-2-2-2-4	0.831	92.87
R13	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-7-3-1-2-1	0.711	93.40
R14	(Kwi1 x Q53)-BC₁S₅-1-7-3-1-2-2	1.036	94.18
R15	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-7-3-1-2-3	0.972	92.49
R16	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-7-3-1-2-4	0.955	93.76
R26	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-3-2-1-1-1	1.012	93.24
R27	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-3-2-1-1-2	1.055	92.27
R29	(Kwi1 x Q53)-BC₁S₅-1-3-2-1-1-3	1.124	92.11
R30	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-3-2-1-1-4	0.968	93.31
R31	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-6-2-3-2-1	0.750	93.71
R32	(Kwi1 x Q53)-BC₁S₅-1-6-2-3-2-2	1.209	91.80
R34	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-6-2-3-2-3	0.828	93.09
R35	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₅ -1-6-2-3-2-4	0.729	91.99
R36	(Kwi1 x Q53)-S ₅ -2-8-1-2-1	0.760	92.87
R37	(Kwi1 x Q53)-S ₅ -2-8-1-2-2	0.852	92.47
R38	(Kwi1 x Q53)-S₅-2-8-1-2-3	0.937	92.42
R40	(Kwi1 x Q53)-S ₅ -2-8-1-2-4	0.716	91.86
R41	(Kwi1 x Q53)-S ₅ -5-2-1-1-1	1.068	93.03
R43	(Kwi1 x Q53)-S ₅ -5-2-1-1-2	0.778	93.57
R45	(Kwi1 x Q53)-S ₅ -5-2-1-1-3	0.661	92.77
R46	(Kwi1 x Q53)-S₅-5-2-1-1-4	1.131	92.74

ตารางที่ 2-3 (ต่อ)

Lines	Original	Tryptophan in protein (%)	Amylopectin (%)
R47	(Kwi1 x Q53)-S ₅ -4-3-2-6-1	0.722	92.38
R48	(Kwi1 x Q53)-S ₅ -4-3-2-6-2	0.791	94.24
R49	(Kwi1 x Q53)-S₅-4-3-2-6-3	0.908	94.33
R50	(Kwi1 x Q53)-S ₅ -4-3-2-6-4	0.672	95.14
R54	(Kwi9 x Q53)-S ₅ -13-73-4-1-1	0.715	93.42
R55	(Kwi9 x Q53)-S ₅ -13-73-4-1-2	0.622	93.19
R56	(Kwi9 x Q53)-S ₅ -13-73-4-1-3	0.674	93.82
R57	(Kwi9 x Q53)-S₅-13-73-4-1-4	0.981	92.77
AgQ53		0.871	64.48
Big-white		0.423	93.45
F-test		**	**
LSD _{0.05}		0.32	1.08
CV (%)		17.97	0.55

** = significant at the 0.01 level

ฤดูปลูกที่ 3

ปลูกสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู ผสมตัวเองชั่วที่ 6 (S₆) จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกจากฤดูปลูกที่ 2 (ภาพที่ 2-2) ผสมพันธุ์ข้ามระหว่างสายพันธุ์แบบพบกันหมด ตาม Griffing's method 4 ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งหมด 45 คู่ผสม ลูกผสมเหล่านี้ จะปลูกทดสอบสมรรถนะการผสมทั่วไป (General combining ability, GCA) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (Specific combining ability, SCA) ของลักษณะผลผลิต ในปีต่อไป จากการตรวจสอบยีนโอเปกทูด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ พบว่าทั้ง 10 สายพันธุ์มียีนโอเปกทูอยู่ในสภาพ homozygous recessive (o₂o₂) ทุกสายพันธุ์ (ภาพที่ 2-3) กล่าวคือ หลายเลข 1-10 เป็นพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ทั้ง 10 สายพันธุ์ มีโพลิมอร์ฟิซึมอยู่ในแนวเดียวกันกับข้าวโพดโอเปกทู (AgQ53) ในขณะที่ข้าวโพดเทียนหันตรา (TH) ข้าวโพดเทียนสุโขทัย (TS) และข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์บิ๊กไวท์ (BW) มีโพลิมอร์ฟิซึมที่เป็น homozygous dominant (O₂O₂) และโพลิมอร์ฟิซึมจะอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า homozygous recessive (o₂o₂)

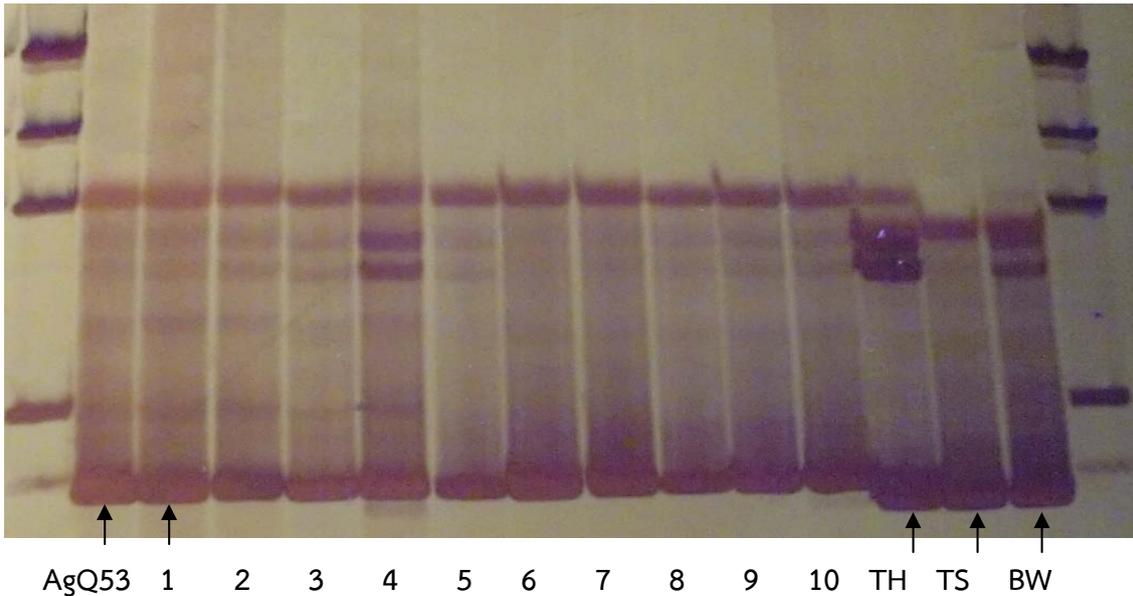
ตารางที่ 2-4 แสดงปริมาณโปรตีน (Total protein) เปอร์เซ็นต์ทริปโตเฟนในโปรตีน (%Tryp. in protein) เปอร์เซ็นต์อามิโลเปกติน (%AP) และลักษณะเกษตรต่างๆ ของสายพันธุ์อินเบรดข้าวที่ 6 (S₆) ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู ที่คัดเลือกไว้สำหรับผสมพันธุ์แบบพบกันหมด

Code	Pedigree	Total pro.	%Tryp. in protein	%AP	Height (cm)		Flowering (d)		No. of rows	Ear length (cm)	Kernel ear length (cm)	Ear width (cm)
					ear	plant	Male	Female				
AgWB 1	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₆ -1-8-3-2-1-2-1	8.71	0.97	92.85	87	147	54	54	10	8.6	8.0	3.1
AgWB 2	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₆ -1-2-2-5-1-3-1	10.43	0.95	93.76	85	130	51	53	12	13.4	11.2	3.7
AgWB 3	(Kwi9 x Q53)-BC ₁ S ₆ -1-5-2-2-2-3-1	8.78	1.21	91.80	85	137	54	53	12	11.0	9.9	2.9
AgWS 4	(Kwi1 x Q53)-S ₆ -2-8-1-2-3-1	7.13	0.98	92.77	53	115	54	55	12	10.5	9.8	3.0
AgWS 5	(Kwi1 x Q53)-S ₆ -5-2-1-1-4-1	8.78	0.72	92.38	52	123	52	55	12	9.2	8.5	3.0
AgWS 6	(Kwi1 x Q53)-S ₆ -4-3-2-6-3-1	9.33	1.07	93.03	42	102	52	54	12	8.3	7.4	3.4
AgWB 7	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₆ -1-7-3-1-2-2-1	6.59	1.01	93.24	58	118	54	55	10	9.9	9.0	2.9
AgWS 8	(Kwi9 x Q53)-S ₆ -13-73-4-1-4-1	9.60	0.66	92.77	67	142	53	53	12	10.6	9.8	3.4
AgWB 9	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₆ -1-3-2-1-1-3-1	6.86	0.90	93.48	50	105	50	49	12	10.5	10.5	3.3
AgWB 10	(Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₆ -1-6-2-3-2-2-1	10.15	0.90	93.51	70	123	52	54	12	11.0	9.2	3.3
Mean		8.64	0.94	92.96	64.9	124	53	54	12.6	10.3	9.33	3.2

เมื่อ Total pro. = Total protein, %Tryp. in protein = percentage of tryptophan in protein, %AP = percentage of amylopectin

(Kwi1 x Q53)-BC₁S₆-1-8-3-2-1-2-1(Kwi1 x Q53)-BC₁S₆-1-2-2-5-1-3-1(Kwi9 x Q53)-BC₁S₆-1-5-2-2-2-3-1(Kwi1 x Q53)-S₆-2-8-1-2-3-1(Kwi1 x Q53)-S₆-5-2-1-1-4-1(Kwi1 x Q53)-S₆-4-3-2-6-3-1(Kwi1 x Q53)-BC₁S₆-1-7-3-1-2-2-1(Kwi9 x Q53)-S₆-13-73-4-1-4-1(Kwi1 x Q53)-BC₁S₆-1-3-2-1-1-3-1(Kwi1 x Q53)-BC₁S₆-1-6-2-3-2-2-1

ภาพที่ 2-2 แสดงฝักของสายพันธุ์อินเบรดชั่วที่ 6 (S₆) ที่คัดเลือกไว้และใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ของการผสมพันธุ์แบบพบกันหมด

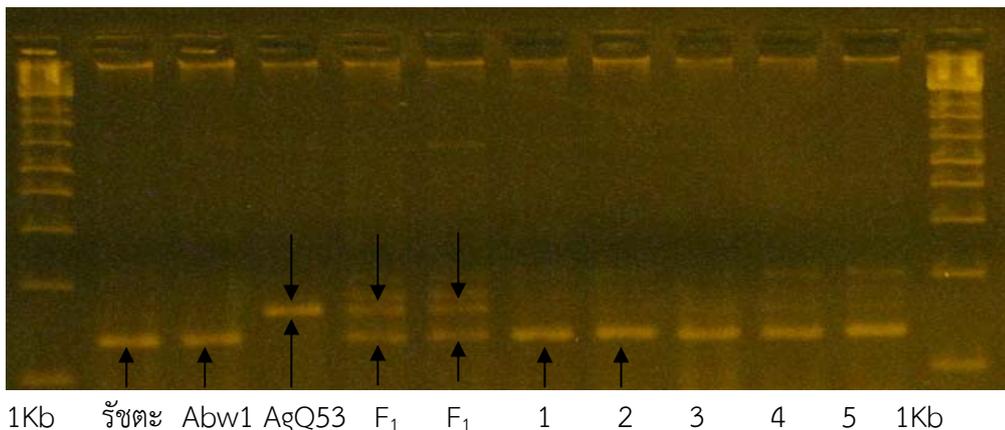


ภาพที่ 2-3 แสดงโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของสายพันธุ์อินเบรดซ์ที่ 6 (S_6) ทั้ง 10 สายพันธุ์ (1-10) ที่เหมือนกับข้าวโพด AgQ53 ซึ่งมียีน opaque-2 เป็น homozygous recessive (o_2o_2), ในขณะที่ TH=ข้าวโพดเทียนหันตรา, TS=ข้าวโพดเทียนสุโขทัย และ BW=ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์บักไวท์ ซึ่งมียีน opaque-2 เป็น homozygous dominant (O_2O_2)

2. การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวเพื่อเพิ่มปริมาณทริบโตเฟนด้วยยีนโอเปกทู opaque-2 (o_2o_2)

ฤดูปลูกที่ 1

จากการตรวจสอบยีน *waxy* ของข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (*waxy-opaque-2*) สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่ว 4 (S_4) ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อ ทั้ง 5 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล phi022 พบว่ามียีน *waxy* ในทุกสายพันธุ์ (ภาพที่ 2-4) แล้วผสมพันธุ์ระหว่างข้าวโพดเทียน (เทียนหันตรา (TH) และเทียนสุโขทัย (TS)) กับข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูได้จำนวน 5 คู่ผสม นอกจากนี้ ได้ผสมข้ามระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์การค้าอีก 3 พันธุ์ ได้แก่ เหนียวสวรรค (NS) บักไวท์ (BW) และรัชตะ (RT) กับข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูได้จำนวน 3 คู่ผสม (ตารางที่ 2-5) เก็บเมล็ดชั่วที่ 1 ไปปลูก เพื่อผสมตัวเอง และผสมกลับไปยังพันธุ์แม่ในฤดูปลูกที่ 2



ภาพที่ 2-4 แสดงโพลิมอร์ฟิซึมของยีน *waxy* เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล phi022 เมื่อข้าวโพดข้าวเหนียวรัชตะ ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (Abw1) และสายพันธุ์พ่อ (1-5) มีโพลิมอร์ฟิซึมอยู่ด้านล่าง ขณะที่พันธุ์ข้าวโพดไร่โอเปก (AgQ53) มีโพลิมอร์ฟิซึมอยู่ด้านบน และลูกผสมชั่วแรก (F_1) Abw1 x AgQ53 เป็น heterozygous

ตารางที่ 2-5 แสดงกลุ่มผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียว ข้าวโพดเทียน ซึ่งใช้เป็นต้นแม่ ผสมกับข้าวโพดข้าวเหนียวโอเพกทู

แม่ (waxy)	พ่อ (waxy-opaque-2)
1. เทียนหันตรา (TH)	x (Kwi1 x Q53)-S ₄ -2-8-1-2
2. เทียนหันตรา (TH)	x (Kwi9 x Q53)-S ₄ -13-73-4-1
3. เทียนหันตรา (TH)	x (Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-2-2-5-1
4. เทียนสุโขทัย (TS)	x (Kwi1 x Q53)-S ₄ -2-8-1-2
5. เทียนสุโขทัย (TS)	x (Kwi9 x Q53)-S ₄ -13-73-4-1
6. เหนียวสวรรค์ (NS)	x (Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-6-2-3-2
7. บิ๊กไวท์ (BW)	x (Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-6-2-3-2
8. รัชตะ (RT)	x (Kwi1 x Q53)-S ₄ -4-3-2-6

ฤดูปลูกที่ 2

ปลูกกลุ่มผสมชั่วที่ 1 (F₁) ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน กับข้าวโพดข้าวเหนียวโอเพกทู ของทั้ง 8 กลุ่มผสม จากนั้นเลือกกลุ่มผสมที่มีลักษณะทางการเกษตรดี มีความแข็งแรงไว้ จำนวน 5 กลุ่มผสม (ตารางที่ 2-6) กล่าวคือ ข้าวโพดเทียน จำนวน 2 กลุ่มผสม ได้แก่ เทียนหันตรา x (Kwi1 x Q53)-S₄-2-8-1-2 และ เทียนสุโขทัย x (Kwi1 x Q53)-S₄-2-8-1-2 ส่วนข้าวโพดข้าวเหนียว จำนวน 3 กลุ่มผสม ได้แก่ เหนียวสวรรค์ x (Kwi1 x Q53)-BC₁S₄-1-6-2-3-2, บิ๊กไวท์ x (Kwi1 x Q53)-BC₁S₄-1-6-2-3-2 และ รัชตะ x (Kwi1 x Q53)-BC₁S₄-1-6-2-3-2 กลุ่มผสมเหล่านี้ เมื่อถึงระยะออกดอก จะแยกดำเนินงานเป็น 2 ส่วน คือ ผสมตัวเอง (selfing) และผสมกลับ (backcrossing)

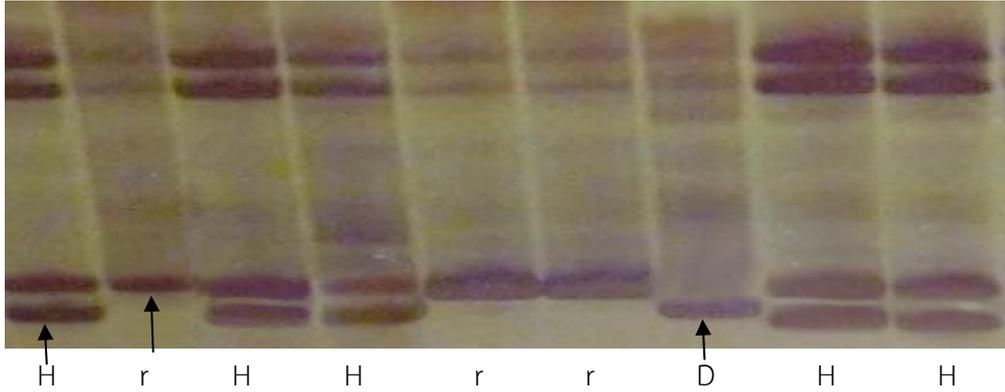
ตารางที่ 2-6 แสดงกลุ่มผสมที่คัดเลือกไว้สำหรับผสมตัวเอง (self) และผสมกลับ (backcross)

Crosses	No. of plants	
	selfing (S ₁)	backcrossing (BC ₁ F ₁)
1. เทียนหันตรา x (Kwi1 x Q53)-S ₄ -2-8-1-2	10	4
2. เทียนสุโขทัย x (Kwi1 x Q53)-S ₄ -2-8-1-2	10	4
3. เหนียวสวรรค์ x (Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-6-2-3-2	10	5
4. บิ๊กไวท์ x (Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-6-2-3-2	10	5
5. รัชตะ x (Kwi1 x Q53)-S ₄ -4-3-2-6	10	3

ฤดูปลูกที่ 3

1. สายพันธุ์ผสมตัวเอง

ปลูกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S₁) จำนวนกลุ่มผสมละ 100-200 ต้น เพื่อคัดเลือกต้นที่มียีนโอเพกทู (opaque-2) ในสภาพ homozygous recessive (o₂o₂) ของแต่ละกลุ่มผสม โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือก โดยแต่ละกลุ่มผสมจะมีการกระจายตัวของยีนโอเพกทูทั้ง 3 แบบ กล่าวคือ 1) homozygous dominant (O₂O₂) 2) heterozygous และ 3) homozygous recessive (o₂o₂) (ภาพที่ 2-5)



ภาพที่ 2-5 แสดงโพลิมอร์ฟิซึมของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) ที่มีการกระจายตัว ยีนโอบีทั้ง 3 แบบ 1) D = homozygous dominant (O_2O_2), 2) H = heterozygote และ 3) r = homozygous recessive (o_2o_2)

ในคู่ผสมเทียมหันตรา การปลูกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) จะเลือกเฉพาะเมล็ดสีเหลืองปลูก (ในฝักเดียวกันมีทั้งเมล็ดสีเหลืองและเมล็ดสีขาว) จำนวน 191 ต้น เมื่อใช้เครื่องหลายดีเอ็นเอ phi057 คัดเลือก ได้ต้นที่เป็น homozygous dominance (O_2O_2) จำนวน 56 ต้น เฮเทอโรไซกัส (heterozygous) จำนวน 73 ต้น และ homozygous recessive จำนวน 17 ต้น (ตารางที่ 2-7) และคู่ผสมอื่นๆ อีก 4 คู่ผสม จะสุ่มเมล็ดมาปลูก เนื่องจากทั้ง 4 คู่ผสมนี้เป็นข้าวโพดสีขาวทั้งหมด จะสังเกตได้ว่าการกระจายตัวของยีนโอบีทุก มีอัตราส่วน $1O_2O_2 : 2O_2o_2 : 1o_2o_2$ ยกเว้นคู่ผสม บิ๊กไวท์ x (Kwi1 x Q53)-BC₁S₄-1-6-2-3-2 ซึ่งมีจำนวนต้น homozygous recessive ต่ำกว่า homozygous dominant และ คู่ผสมเทียมหันตราที่คัดเลือกเฉพาะเมล็ดสีเหลืองมาปลูกเท่านั้น ทำให้การกระจายตัวแตกต่างจากอีก 3 คู่ผสมที่เหลือ จากทั้ง 5 คู่ผสม ข้าวโพดที่นำมาสกัดดีเอ็นเอจำนวน 889 ต้นสามารถคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีนโอบีทุกในสภาพ homozygous recessive ได้ทั้งหมด 166 ต้น ข้าวโพดที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดนี้ เมื่อถึงระยะออกดอกได้ผสมตัวเองเป็น S_2 เพื่อนำเมล็ดไปปลูกในฤดูต่อไป

ตารางที่ 2-7 แสดงยีนโอบีของยีนโอบีทุก (*opaque-2*) ในสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) ของ 5 คู่ผสม ที่คัดเลือกไว้

Crosses	No. of plants			χ^2	Total
	Homozygous Dominance	Heterozygote	Homozygous recessive		
1. เทียนหันตรา x (Kwi1 x Q53)-S ₄ -2-8-1-2	56	73	17	**	191
2. เทียนสุโขทัย x (Kwi1 x Q53)-S ₄ -2-8-1-2	54	97	50	ns	201
3. เหนียวสวรรค์ x (Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-6-2-3-2	52	100	50	ns	202
4. บิ๊กไวท์ x (Kwi1 x Q53)-BC ₁ S ₄ -1-6-2-3-2	52	103	31	*	185
5. รัชตะ x (Kwi1 x Q53)-S ₄ -4-3-2-6	30	62	18	ns	110
Total	244	435	166		889

ns = non-significant different ($P > 0.05$) , * = significant different ($P < 0.05$), ** = highly significant different ($P < 0.01$)

ข้าวโพดที่คัดเลือกไว้เมื่อผสมตัวเองเป็น S_2 เมล็ดมีสีขาว 4 คู่ผสม คือ คู่ผสม เทียนสุโขทัย x (Kwi1 x Q53)- S_4 -2-8-1-2, เหนียวสวรรค์ x (Kwi1 x Q53)- BC_1S_4 -1-6-2-3-2, บิ๊กไวท์ x (Kwi1 x Q53)- BC_1S_4 -1-6-2-3-2 และ รัชตะ x (Kwi1 x Q53)- S_4 -4-3-2-6 ส่วนคู่ผสมเทียนหันทรา x (Kwi1 x Q53)- S_4 -2-8-1-2 เมล็ดจะมีทั้งสีขาวและสีเหลือง (ภาพที่ 2-6)



ก

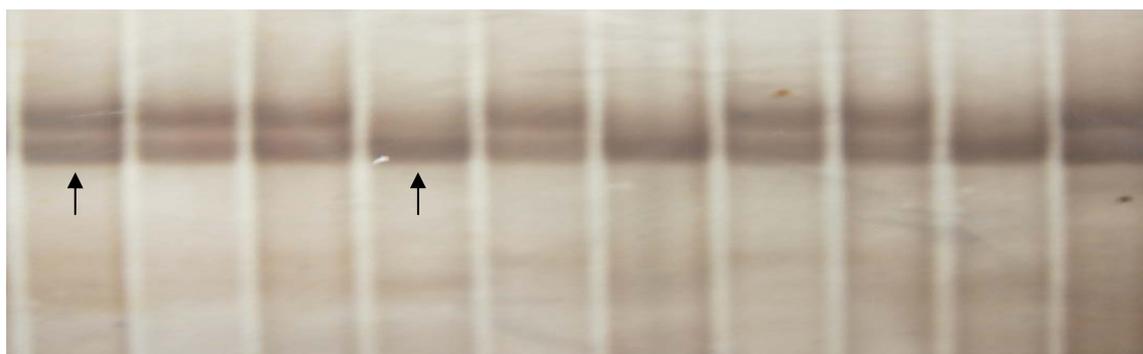


ข

ภาพที่ 2-6 แสดงฝักของคู่ผสม เทียนหันทรา x (Kwi1 x Q53)- S_4 -2-8-1-2 ซึ่งปลูกจากเมล็ดสีเหลืองในชั่ว S_1 เมื่อผสมตัวเองเป็นเมล็ด S_2 ได้ฝักเป็น 2 แบบ คือ ก) เมล็ดในฝักยังมีการกระจายตัวของสีเมล็ดมีทั้งสีเหลืองและสีขาว และ ข) เมล็ดทั้งฝักเป็นสีขาว

2. สายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1)

ปลูกสายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 ปลูก 1 ฝักต่อคู่ผสม เพื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 ช่วยในการคัดเลือกต้นที่เป็นเฮเทอโรไซกัสของยีนโอเปก (O_2O_2) ทั้งนี้เนื่องจาก ข้าวโพดสายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 มียีนไทป์ของยีนโอเปกอยู่ 2 ประเภท คือ O_2O_2 และ O_2o_2 (ภาพที่ 2-7) จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 ช่วยในการคัดเลือกได้ต้นที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) จำนวน 6, 2, 18, 6 และ 5 ต้น ในคู่ผสม เทียนหันทรา x (Kwi1 x Q53)- S_4 -2-8-1-2, เทียนสุโขทัย x (Kwi1 x Q53)- S_4 -2-8-1-2, เหนียวสวรรค์ x (Kwi1 x Q53)- BC_1S_4 -1-6-2-3-2, บิ๊กไวท์ x (Kwi1 x Q53)- BC_1S_4 -1-6-2-3-2 และ รัชตะ x (Kwi1 x Q53)- S_4 -4-3-2-6 ตามลำดับ (ตารางที่ 2-8) รวมแล้วได้ต้น heterozygous ทั้งหมดจำนวน 37 ต้น เมื่อถึงระยะออกดอกได้ผสมตัวเองเฉพาะต้นที่เป็น heterozygous เป็น BC_1S_1 จำนวน 37 สายพันธุ์ และปลูก BC_1S_1 ได้ต้นข้าวโพดข้าวเหนียวคู่ผสมละประมาณ 80 ต้น สำหรับคัดเลือกลูกผสมกลับที่มียีนโอเปกอยู่ในสภาพ homozygous recessive ในปีต่อไป



H H H D H D H H D H

ภาพที่ 2-7 แสดงการกระจายตัวของยีนไทป์โอเพกทูเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 ในสายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ของคู่ผสม เหนียวสวรรค์ x (Kwi1 x Q53)- BC_1S_4 -1-6-2-3-2 เมื่อ 1) D = homozygous dominant (O_2O_2) และ 2) H = heterozygous (O_2o_2)

ตารางที่ 2-8 แสดงยีนไทป์ของยีนโอเพกทู (*opaque2*) ในสายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ของทั้ง 5 คู่ผสม

Crosses	No. of plants (BC_1F_1)		χ^2	Total
	Homozygous dominance (O_2O_2)	Heterozygote (O_2o_2)		
1. เทียนหันตรา x (Kwi1 x Q53)- S_4 -2-8-1-2	4	6	ns	10
2. เทียนสุโขทัย x (Kwi1 x Q53)- S_4 -2-8-1-2	4	2	ns	6
3. เหนียวสวรรค์ x (Kwi1 x Q53)- BC_1S_4 -1-6-2-3-2	16	18	ns	34
4. บิ๊กไวท์ x (Kwi1 x Q53)- BC_1S_4 -1-6-2-3-2	4	6	ns	10
5. รัชตะ x (Kwi1 x Q53)- S_4 -4-3-2-6	5	5	ns	10
Total	33	37		70

ns = non-significant different ($P > 0.05$) , * = significant different ($P < 0.05$)

** = highly significant different ($P < 0.01$)

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) ที่มียีน *waxy* และ *opaque-2* ($wxwxo_2o_2$)

ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (*waxy-opaque-2*, $wxwxo_2o_2$) ซึ่งมียีน *waxy* และยีน *opaque-2* อยู่ในสภาพ homozygous recessive ที่ได้จากการทดลองมีปริมาณอะมิโลเพกติน (amylopectin) สูงมากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ทริโบโตแฟนในโปรตีนอยู่ระหว่าง 0.61-1.24% ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Sinkangam *et al.* (2011) นอกจากนี้ ยังได้รายงานการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์ทริโบโตแฟนในโปรตีนด้วยยีนโอเปกทูมีผลทำให้ปริมาณกรดอะมิโนไลซีน (lysine) เพิ่มขึ้นด้วยเช่นเดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณไลซีน ทั้งนี้เนื่องจากอัตราส่วนระหว่างปริมาณไลซีนและทริโบโตแฟนในเอนโดสเปิร์มข้าวโพดจะเท่ากับ 4:1 (Hernandez and Bates, 1969) การตรวจสอบยีน *waxy* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล phi022 อาจใช้การตรวจสอบละอองเกสรด้วยสายละลาย I_2 -KI แทนได้ แต่วิธีดังกล่าวนี้ จะต้องรอกกว่าข้าวโพดที่ต้องการทดสอบยีน *waxy* ออกดอก โดยผลการทดสอบจะสอดคล้องกับผลของการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล phi022 (Sinkangam *et al.*, 2011) นอกจากนี้ เปอร์เซ็นต์ทริโบโตแฟนในโปรตีนของเมล็ดที่อายุ 21 และ 35 วัน หลังการผสมเกสรมีความสอดคล้องกัน ดังนั้นจะวิเคราะห์ที่อายุใดก็ได้ (Sinkangam, 2012) แต่จากการทดลองนี้ การวิเคราะห์เมล็ดที่อายุ 35 วันจะมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (C.V.) ต่ำกว่าการวิเคราะห์ที่อายุ 21 วัน หลังการผสมเกสร อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูที่คัดเลือกไว้ยังต้องการประเมินสมรรถนะการผสม จากกลุ่มผสมแบบพบกันหมด จำนวน 45 คู่ผสม ในฤดูต่อไป นอกจากนี้แล้ว สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 6 (S_6) ที่คัดเลือกไว้ยังมีผลผลิตค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนาสายพันธุ์อินเบรตให้มีผลผลิตสูงขึ้น ซึ่งสามารถทำได้โดยการคัดเลือกกลุ่มผสมเดี่ยวที่ให้ผลผลิตสูง แล้วผสมตัวเองเพื่อคัดเลือกอินเบรตใหม่ ซึ่งจะทำให้อินเบรตใหม่ที่คัดเลือกมีผลผลิตที่ดีกว่าเดิมได้

2. การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวเพื่อเพิ่มปริมาณทริโบโตแฟนด้วยยีนโอเปกทูโอเปกทู (o_2o_2)

การผสมพันธุ์ระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียน ($wxwxO_2O_2$) กับข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู ($wxwxo_2o_2$) ลูกผสมชั่วแรก (F_1) จะมียีนโอบีเป็น $wxwxO_2o_2$ ยีนในตำแหน่ง *waxy* จะเป็น homozygous recessive ($wxwx$) ดังนั้นข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 1 จึงเป็นข้าวโพดข้าวเหนียว (เหมือนข้าวโพดข้าวเหนียวปกติทั่วไป) ยีนโอเปกทูจะอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส ดังนั้นปริมาณทริโบโตแฟนจึงต่ำเหมือนข้าวโพดพันธุ์ปกติทั่วไป (Jompuk *et al.*, 2012) แต่เมื่อผสมตัวเอง 1 ครั้ง ได้สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) เมื่อนำเมล็ด S_1 ไปปลูกและตรวจสอบยีนโอเปกทูด้วยเครื่องหมายโมเลกุล phi057 โดยทางทฤษฎีแล้ว การกระจายตัวของยีนโอบีในรุ่นลูกจะเป็น $1O_2O_2 : 2O_2o_2 : 1o_2o_2$ ซึ่งในกลุ่มผสมจากงานทดลองมีการกระจายตัวเป็นไปตามทฤษฎี 3 กลุ่มผสม ยกเว้นกลุ่มผสมเทียนหันตรา x (Kwi1 x Q53)- S_4 -2-8-1-2 ทั้งนี้เนื่องจากได้มีการคัดเลือกเมล็ดที่มีสีเหลืองเท่านั้นมาปลูก (ไม่เลือกเมล็ดสีขาว) ดังนั้นในรุ่นลูกจึงเปรียบเสมือนไม่ใช้การสุ่ม (randomization) ลูกที่ได้จึงมีการกระจายตัวที่แตกต่างไปจากทฤษฎี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วรชมน และคณะ (2553) นอกจากนี้กลุ่มผสม บิ๊กไวท์ x (Kwi1 x Q53)-BC S_4 -1-6-2-3-2 ก็แตกต่างจากสัดส่วนที่ควรจะเป็น เนื่องจากในช่วงปลูกมีเมล็ดไม่ออกสูงถึง 55 สายพันธุ์ จากการปลูกทั้งหมด 240 สายพันธุ์ งดจำนวน 185 สายพันธุ์ ส่วนอีก 3 กลุ่มผสม การงอกดีมาก อย่างไรก็ตาม ในการคัดเลือกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) นี้ ในแต่ละกลุ่มผสมมีลูกที่เป็นข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูตั้งแต่ 17 – 50 สายพันธุ์ เมื่อรวมกันแล้วได้จำนวน 166 สายพันธุ์ ซึ่งมากพอที่จะคัดเลือกความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อที่จะใช้เป็นสายพันธุ์อินเบรตที่ดีสำหรับการสร้างลูกผสมต่อไป สายพันธุ์ S_2 ที่คัดเลือกไว้จะเป็นสีขาว ทั้งนี้

เนื่องจากทั้งพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่เป็นสีขาว ยกเว้นเฉพาะคู่ผสมเทียมพันธุ์ที่เมล็ดเป็นสีเหลือง สำหรับในคู่ผสมดังกล่าวนี้ จะเลือกเมล็ดสีเหลืองเป็นหลักซึ่งมีสารพวกแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการอีกวิธีหนึ่ง

ในสายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ข้าวโพดข้าวเหนียวจะมีอีโนไทป์เป็น $wxwxO_2O_2$ และ $wxwxO_2o_2$ สายพันธุ์ในชั่วนี้ ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 ช่วยในการคัดเลือกอีโนไทป์เพกทู ซึ่งในทางทฤษฎีแล้วจะมีสัดส่วนเป็น 1:1 ซึ่งผลจากการทดลองนี้ สอดคล้องกับทฤษฎี ซึ่งแตกต่างจากงานทดลองของ อังคณา และคณะ (2553) ที่พบว่า มีบางคู่ผสมของสายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ 1 มีสัดส่วนของอีโนไทป์แตกต่างจากทฤษฎี จากนั้นจึงเลือกเฉพาะต้นที่เป็นเฮเทอโรไซกัสเท่านั้นผสมตัวเองเป็น BC_1S_1 ซึ่งจะมีเปอร์เซ็นต์ของพันธุ์ recurrent parent เพิ่มขึ้นเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ การคัดเลือกต่อจากนี้ จะทำเช่นเดียวกันกับการคัดเลือกในสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) และจะคัดเลือกต้นที่มีลักษณะคล้ายพันธุ์ recurrent parent ให้มากที่สุด

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลงานวิจัย

1. การคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู (waxy-opaque-2) จากสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ phi057 สำหรับยีนโอเปกทู (opaque-2) และ phi022 สำหรับยีน waxy พบว่า สายพันธุ์เหล่านี้มีเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟนในโปรตีนระหว่าง 0.61-1.24% ในขณะที่ข้าวโพดที่ไม่มียีนโอเปกทูมีเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟนในโปรตีนระหว่าง 0.45-0.49% ขณะที่พันธุ์ข้าวโพดโรโอเปกทู (AgQ53) มีเปอร์เซ็นต์ทริปโตแฟนในโปรตีน 0.87%

2. การคัดเลือกข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 6 (S_6) ที่มีความแข็งแรงและลักษณะเกษตรต่างๆ ดี ไว้จำนวน 10 สายพันธุ์ มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนอยู่ระหว่าง 0.66-1.21% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.94% มีเปอร์เซ็นต์อามิโลเปกตินเฉลี่ย 92.96% และได้ผสมพันธุ์ระหว่าง 10 สายพันธุ์แบบพบกันหมดได้เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จำนวน 45 คู่ผสม สำหรับปลูกทดสอบผลผลิตและหาสมรรถนะการผสมทั่วไป (GCA) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) ในปีต่อไป

3. การผสมข้ามระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวและข้าวโพดเทียนกับข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูได้ลูกผสมใหม่ที่ดี 5 คู่ผสม เป็นคู่ผสมข้าวโพดเทียน 2 คู่ผสม คือ เทียนห้าตรา \times (Kwi1 \times Q53)- S_4 -2-8-1-2 และ เทียนสุขทัย \times (Kwi1 \times Q53)- S_4 -2-8-1-2 และเป็นคู่ผสมข้าวโพดข้าวเหนียว 3 คู่ผสม ได้แก่ เหนียวสวรรค์ \times (Kwi1 \times Q53)-BC $_1$ S $_4$ -1-6-2-3-2, บิ๊กไวท์ \times (Kwi1 \times Q53)-BC $_1$ S $_4$ -1-6-2-3-2 และ รัชตะ \times (Kwi1 \times Q53)-BC $_1$ S $_4$ -1-6-2-3-2 ลูกผสมเหล่านี้ผสมตัวเองเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 (S_1) และได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล phi057 คัดเลือกยีนโอเปกทูของสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1 ที่อยู่ในสภาพ homozygous recessive (o_2o_2) ได้รวม 166 สายพันธุ์

4. ในการผสมกลับครั้งที่ 1 (BC $_1$ F $_1$) ไปยัง recurrent parent ของทั้ง 5 คู่ผสม ได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล phi057 คัดเลือกต้นที่เป็นเฮเทอโรไซกัสของยีนโอเปกทูไว้รวม 37 ต้น (สายพันธุ์) แล้วผสมตัวเองเป็น BC $_1$ S $_1$ ทุกต้น ซึ่งสามารถปลูกต้น BC $_1$ S $_1$ ได้อย่างน้อยสายพันธุ์ละ 100 ต้น เพื่อคัดเลือกรุ่นที่มียีนโอเปกทูในสภาพ homozygous recessive ต่อไป เช่นเดียวกับการคัดเลือกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 1

ข้อเสนอแนะ

1. ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทู สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 6 (S_6) ที่คัดเลือกไว้ 10 สายพันธุ์ และได้นำไปผสมพันธุ์แบบพบกันหมดได้ 45 คู่ผสม จะต้องมีการทดสอบสมรรถนะการผสม (combining ability) เพื่อต้องการหาสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโอเปกทูไปพัฒนาเป็นพันธุ์ลูกผสมต่อไป แต่ในบางกรณีที่สายพันธุ์ S_6 ให้ลูกผสมที่ดี แต่ผลผลิตของตัวเองไม่ดี (สายพันธุ์อินเบรตมีผลผลิตค่อนข้างต่ำ) ซึ่งจะมีผลต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม ก็สามารถนำไปปรับปรุงผลผลิตของสายพันธุ์อินเบรตใหม่ได้ ตามวิธีการสกัดสายพันธุ์อินเบรตตามวิธีปกติ โดยการผสมตัวเองของลูกผสมเดี่ยวที่ให้ผลผลิตสูง คุณภาพการรับประทานดี และมีปริมาณทริปโตแฟนสูง คัดเลือกสายพันธุ์อินเบรตปกติ

2. สายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 2 (S_2) ที่ได้จากการผสมพันธุ์ใหม่ของทั้ง 5 คู่ผสม ที่มียีนโอเปกทูอยู่ในสภาพ homozygous recessive (o_2o_2) ทั้ง 166 สายพันธุ์ จะต้องปลูกและคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรที่ดี และต้องทดสอบสมรรถนะการผสม เพื่อจะคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีต่อไป

บรรณานุกรม

- สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2514. การปรับปรุงคุณภาพของโปรตีนในข้าวโพด. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 4 (1): 59-64.
- สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2515. อนาคตของข้าวโพด opaque-2. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 5 (พิเศษ): 193-196.
- วรรณมน มงคล ชูศักดิ์จอมพุก รังสฤษดิ์ กาวีตะ บัญญัติ สิ้นค้างาม และอังคณา เพาะนิยม. 2553. การเพิ่มทริปโตแฟนในข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้ยีน opaque-2 และใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. ใน การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 48 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2553.
- อังคณา เพาะนิยม ชูศักดิ์ จอมพุก วิจิตร ใจอารีย์ บัญญัติ สิ้นค้างาม และ วรรณมน มงคล. 2553. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกยีน *Waxy* และ *Opaque-2* ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว ใน การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 48 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2553.
- Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* 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, M. and D. Klein. 1976. Inheritance of modified endosperm structure and lysine content in opaque-2 maize. I. Modified endosperm structure. *Cereal Res. Commun.* 4: 401-410.
- Bjarnason, M. and D. Klein. 1977. Inheritance of modified endosperm structure and lysine content in opaque-2 maize. II. Lysine content. *Cereal Res. Commun.* 5: 49-58.
- Bjarnason, M., D. Klein 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.
- Bressani, R 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.
- Chin, E.C.L., M.L. Senior, H. Shu and J.S.C. Smith. 1996. Maize simple repetitive DNA sequence: abundance and allelic variation. *Genome* 39: 866-873.
- 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., 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.
- FAO/WHO/UNU. 2002. Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. : report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva, Switzerland. 265 p.
- 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.
- Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. **Aust. J. Biol. Sci.** 9: 463-493.
- 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.
- Hayman, B.I. 1954 a. The analysis of variance of dialles table. **Biometrics** 10: 235-244.
- Hayman, B.I. 1954 b. The theory and analysis of diallel cross. **Genetics** 39: 789-809.
- Hayman, B.I. 1957. Interaction heterosis and diallel cross. **Genetics** 42: 336-355.
- 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 C., P. Cheuchart, P. Jompuk and S. Apisitwanich. 2012. Improved tryptophan content in maize with *opaque-2* gene using marker assisted selection (MAS) in backcross and selfing generations. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 45: 666 – 674.
- Jompuk, C., P. Cheuchart, S. Apisitwanich, P. Jompuk and S. Chowchong. 2009. Improved tryptophan content in maize by opaque-2 gene and using marker assisted selection. p. 14-15, *In the first international on corn and sorghum research and the 34th national corn and sorghum research conference*. April 8-10, 2009. Thailand.
- Jompuk, P. 2007. **Improvement of Quality Protein Maize using Marker-Assisted Selection (MAS)**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- Jompuk, P., W. Wongyai, C. Jampatong and S. Apisitwanich. 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.

- Jompuk, P., W. Wongyai, C. Jampatong and S. Apisitvanich. 2007. Combining Ability of Inbred Lines Derived from Quality Protein Maize Populations. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 43: 433-441.
- Juliano, B.O.A. 1971. Simplified assay for milled-rice amylose. **Cereal Science Today**. 16: 334 – 340.
- 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.
- 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.
- 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. Demopoulos- Rodriguez and W.J. Wiser. 1982. Selection indices for the improvement of opaque-2 maize. **Crop Sci.** 22: 478-485.
- Mertz, E.T., L.S. Bates and O.E. Nelson. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. **Science** 145: 279-280.
- Mertz, E.T., 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.
- Prasanna. B.M., S.K. Vasal, B. Kssahun 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.
- Saghai-Marouf, 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.
- 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.
- Sinkangam, B., P. Stamp, P. Srinives, P. Jompuk, W. Mongkol, A. Porniyom, N.C. Dang and C. Jompuk. 2011. Integration of quality protein in waxy maize by means of sequence repeat markers. **Crop Sci.** 51: 2499-2504.
- Sinkangam, B. 2012. Marker-assisted selection for quality protein in waxy corn (*Zea mays* var. *ceratina*). **Ph.D. Thesis.** 80 p.
- Sriwatanapongse, S., 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., 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.
- 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.
- Villegas, E. and E.T. Mertz. 1971. Chemical screening methods for maize protein quality at CIMMYT. **CIMMYT Res. Bull.** 20. CIMMYT, Mexico City, Mexico.
- Weatherwax, F. 1922. A rare carbohydrate in waxy maize. **Genetics.** 7: 568.
- 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-Marooof, 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.