ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่	พืชไร่นา
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวให้มีคุณภาพโปรตีนสูงโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกยีน *opaque-2* และ *waxy*

Waxy Corn Improvement for High Quality Protein Using Marker-Assisted Selection of *Opaque-2* and *Waxy* Genes

นามผู้วิจัย นางสาวอังคณา เพาะนิยม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชูศักดิ์ จอมพุก, Dr.sc.nat.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์วิทิตร ใจอารีย์, Dr.rer.agr.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวให้มีคุณภาพโปรตีนสูงโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกยีน *opaque-2* และ *waxy*

Waxy Corn Improvement for High Quality Protein Using Marker-Assisted Selection of *Opaque-2* and *Waxy* Genes

โดย

นางสาวอังคณา เพาะนิยม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อังคณา เพาะนิยม 2554: การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวให้มีคุณภาพโปรตีนสูงโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกยีน *opaque-2* และ *waxy* ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชูศักดิ์ จอมพุก, Dr.sc.nat. 71 หน้า

ข้าวโพดข้าวเหนียวมีคุณภาพโปรตีนต่ำเช่นเดียวกับข้าวโพดทั่วไป เนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโน คือ ไลซีนและทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์มต่ำ อย่างไรก็ตาม ปัญหานี้สามารถแก้ด้วยการใช้ยีน *opaque-2* ซึ่งทำให้มีกรดอะมิโนดังกล่าวเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 2 เท่า การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อถ่ายยีน *opaque-2* จากสายพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (QPM) มายังสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยวิธีการผสมพันธุ์ โดยใช้สายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดข้าวเหนียว 2 สายพันธุ์ คือ Kwi1 และ Kwi9 เป็นพันธุ์แม่ และสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดคุณภาพโปรตีน คือ Q53 (PopII#53) เป็นพันธุ์พ่อ แล้วใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Simple Sequence Repeat (SSR) ในการตรวจสอบยีน *opaque-2* และยีน *waxy* ในประชากรรุ่นต่างๆ (BC_1F_1, BC_1S_1, BC_1S_2 และ BC_1S_3) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* และ *phi022* ในการตรวจสอบยีน *opaque-2* และยีน *waxy* ตามลำดับ โดยในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) มีการกระจายตัวเป็น O_2O_2 และ O_2o_2 ของยีน *opaque-2* ซึ่งในขั้นตอนนี้จะใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* คัดเลือกพืชที่เป็นเฮเทอโรไซกัสของยีน *opaque-2* (O_2o_2) เพื่อผสมตัวเองได้ลูก (BC_1S_1) ปลูกลูกในชั่วนี้เพื่อคัดเลือกต้นที่เป็นโฮโมไซกัสของทั้งสองยีน (o_2o_2wxwx) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล (*phi057* และ *phi022*) แล้วผสมตัวเองจนถึงชั่วที่ BC_1S_3 และคัดเลือกได้ทั้งหมดจำนวน 5 สายพันธุ์ เก็บฝักข้าวโพดที่มีอายุ 21 วันหลังจากการผสมมาตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี พบว่ามีปริมาณอะมิโลเปคตินในเอนโดสเปิร์ม อยู่ระหว่าง 95.55-97.54% และปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนอยู่ระหว่าง 0.82-1.31%. นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนรวมอยู่ระหว่าง 7.98-10.41% ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่มียีน *waxy-opaque- 2* นี้มีปริมาณทริปโตแฟนสูงเช่นเดียวกับ ข้าวโพด *opaque-2* และมีปริมาณอะมิโลเปคตินสูงเช่นเดียวกับข้าวโพดข้าวเหนียว ในทำนองเดียวกัน ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ของการผสมพันธุ์แบบพบกันหมด (diallel cross) ของสายพันธุ์ BC_1S_3 มีปริมาณอะมิโลเปคตินและปริมาณทริปโตแฟนสูงด้วยเช่นกัน สายพันธุ์ A1 มีสมรรถนะในการผสมทั่วไปที่ดีที่สุด คู่ผสม A1 x A3 ให้ผลผลิตทั้งเปลือก (2,251 กก./ไร่) และปอกเปลือก (1,702 กก./ไร่) สูงที่สุด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยีน *waxy* และยีน *opaque-2* ทำหน้าที่อิสระจากกัน เมื่ออยู่ร่วมกันในข้าวโพดข้าวเหนียวจะมีปริมาณทริปโตแฟนและอะมิโลเปคตินสูง

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Angkana Poniyom 2011: Waxy Corn Improvement for High Quality Protein Using Marker-Assisted Selection of *Opaque-2* and *Waxy* Genes. Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Assistant Professor Choosak Jompuk, Dr.sc.nat. 71 pages.

The waxy corn has in a low quality protein which is deficient in essential amino acids, lysine and tryptophan as compared to that of normal corn. However, this problem can be solved by incorperating the *opaque-2* mutant gene causing higher lysine and tryptophan in the endosperm about two times. The purpose of this study was to transfer the *opaque-2* gene from the quality protein maize (QPM) inbred line to the waxy inbred lines by crossing. The waxy lines, Kwi1 and Kwi9 was used as a female and QPM line, Q53 (PopII#53) was used as male. Moreover, simple sequence repeat markers (SSR markers) was applied to detect the *opaque-2* and *waxy* genes in the segregating population (BC_1F_1, BC_1S_1, BC_1S_2 and BC_1S_3) where the *phi057* and *phi022* detected the *opaque-2* and *waxy* genes, respectively. In the BC_1F_1 generation, plants segregated into homozygous dominance and heterozygous of these two genes. Only heterozygous plant of these genes was used to make backcross to its recurrent parent. In BC_1F_1 plant, *phi057* was applied to detect the heterozygous of *opaque-2* plants (O_2o_2) and these plants were self-pollinated to achieve the BC_1S_1. Then, advanced generations were done by selfing the selected plants into BC_1S_3. In this generation five homozygous recessive of both *opaque 2* and *waxy* genes ($wxwxo_2o_2$) were detected by *phi057* and *phi022*, respectively. At 21 after pollination, amylopectin in endosperm of these lines ranged from 95.55-97.54% while tryptophan content in protein ranged from 0.82-1.31%. Moreover, protein content ranged from 7.98 to 10.41%. These results indicated that *waxy-opaque-2* inbred lines gave high tryptophan content as *opaque-2* corn and high amylopectin as waxy corn. Likewise, ten F_1 hybrids from the diallel cross of BC_1S_3 inbred lines showed not only high amylopectin but also high tryptophan content in endosperm. For combining ability, A1 line had the best general combining ability (GCA). The cross of A1 x A3 gave the highest green ear weight (2,251 kg/rai) and white ear weight (1,702 kg/rai). These results indicated that *waxy* and *opaque-2* genes can be combined in a plant whereas tryptophan content and amylopectin can be expressed as a normal function of those genes separately.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูศักดิ์ จอมพุก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร.วิฑิตร ใจอารีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำในการเรียน การทำงานวิจัย และการตรวจแก้ไขวิทยาพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประภา ศรีพิจิตต์ ประธานการสอบสัมภาษณ์ขั้นสุดท้าย และ ศาสตราจารย์ ดร.สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ใน การสอบสัมภาษณ์ขั้นสุดท้ายให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์สุรพล เช้าฉ้อง ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและอำนวยความ สะดวกในการปลูกข้าวโพดในงานวิจัยจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนบุคลากรในศูนย์วิจัย ข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรนุช จอมพุก หัวหน้าศูนย์บริการฉายรังสีแกมมา และวิจัยนิวเคลียร์ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ต่างๆเกี่ยวกับการใช้เครื่องหมาย โมเลกุลในการคัดเลือกพืชและสถานที่ในการวิจัยจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณศูนย์ ความเป็นเลิศทางด้านวิชาการด้านข้าวโพด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนการจัดทำ วิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ นายบุญฤทธิ์ สินค้างาม และ นางสาววรรษมน มงคล ที่ให้คำปรึกษาและ ช่วยเหลืองานด้านวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคน ที่คอยช่วยเหลือและ เป็นกำลังใจจนงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อณรงค์ เพาะนิยม และคุณแม่วันเพ็ญ เพาะนิยม พี่ชายและ พี่สาว ที่ให้ความรักและเสียสละในการสนับสนุน ช่วยเหลือทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ที่ทำให้ข้าพเจ้าได้ศึกษาจนถึงระดับปริญญาโท จนกระทั่งสำเร็จวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ประโยชน์และ ความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแด่คุณพ่อและคุณแม่ ผู้ให้ชีวิตและ อยู่เบื้องหลังความสำเร็จทั้งหมด ตลอดจนครู อาจารย์ ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา ความรู้และอบรมสั่ง สอนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

อังคณา เพาะนิยม

ธันวาคม 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
อุปกรณ์	14
วิธีการ	18
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	52
สรุป	52
ข้อเสนอแนะ	53
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	54
ภาคผนวก	61
ภาคผนวก ก วิธีเตรียมสารเคมี	62
ภาคผนวก ข ตารางการประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะคุณภาพ	66
ภาคผนวก ค ภาพฝักข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2*	69
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	71

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงแหล่งความแปรปรวนของแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์	32
2	แสดงแหล่งความแปรปรวนของแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูณ์	32
3	แสดงแหล่งความแปรปรวนของการวิเคราะห์สมรรถนะการผสมโดยวิธีของ Griffing's method IV ด้วย R-progam	33
4	ยีโนไทป์ของข้าวโพดที่มียีน *opaque-2* ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057*	36
5	ยีโนไทป์ของข้าวโพดที่มียีน *opaque-2* ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1S_1 เมื่อตรวจสอบด้วย เครื่องหมายโมเลกุล *phi057*	37
6	ยีโนไทป์ของข้าวโพดที่มียีน *waxy* ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1S_1 เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi022*	38
7	ค่าเฉลี่ยของลักษณะคุณภาพของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* จำนวน 5 สายพันธุ์ และสายพันธุ์เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์	41
8	ค่าเฉลี่ยของลักษณะทางการเกษตรของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* จำนวน5 สายพันธุ์ และสายพันธุ์เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์	42
9	ค่าเฉลี่ยของลักษณะคุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* จำนวน10 คู่ผสม และพันธุ์เปรียบเทียบ	43
10	ค่าเฉลี่ยของลักษณะทางการเกษตรของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* จำนวน 10 คู่ผสม และพันธุ์เปรียบเทียบ	44
11	ค่าผลผลิตเฉลี่ยทั้งเปลือกเป็นกิโลกรัมต่อไร่ของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* ลูกผสม 10 คู่ผสม (ใต้เส้นทแยงมุม) ค่าประมาณสมรรถนะในการผสมทั่วไป (แนวเส้นทแยงมุม) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (เหนือเส้นทแยงมุม)	45

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

12 ค่าผลผลิตเฉลี่ยปอกเปลือกเป็นกิโลกรัมต่อไร่ของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* ลูกผสม 10 คู่ผสม (ใต้เส้นทแยงมุม) ค่าประมาณสมรรถนะในการผสมทั่วไป (แนวเส้นทแยงมุม) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (เหนือเส้นทแยงมุม) 46

13 ผลผลิตฝักสดและลักษณะเกษตรที่สำคัญของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* จำนวน 5 สายพันธุ์ และสายพันธุ์เปรียบเทียบ 49

14 ผลผลิตฝักสดและลักษณะเกษตรที่สำคัญของพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 hybrid) ที่มียีน *opaque-2* จำนวน10 คู่ผสม และพันธุ์เปรียบเทียบ 50

ตารางผนวกที่

ข1 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางชีวเคมีและคุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวฝักแห้งที่มียีน *opaque-2* จำนวน 10 คู่ผสม 67

ข2 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางชีวเคมีและคุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวฝักสดที่มียีน *opaque-2* จำนวน 10 คู่ผสม 68

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1	ลักษณะเมล็ดของข้าวโพดข้าวเหนียวได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1)	34
2	ลักษณะละอองเกสร ที่ย้อมด้วยสารละลาย I_2KI ข้าวโพดข้าวเหนียว (Kwi1) ข้าวโพดข้าวเหนียว (Kwi9) ข้าวโพด QPM (Q53) และ ข้าวโพดข้าวเหนียวผสมกับข้าวโพด QPM (F_1)	35
3	ผลการตรวจสอบข้าวโพด QPM (Q53) และสายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* เพื่อตรวจสอบยีน *opaque-2* ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1S_1)	36
4	ผลการตรวจสอบข้าวโพด QPM (Q53) และสายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi022* เพื่อตรวจสอบยีน *waxy* ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1S_1)	38
5	แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* รุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1S_2) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* เพื่อตรวจสอบยีน *opaque-2*	39
6	แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* รุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1S_2) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi022* เพื่อตรวจสอบยีน *waxy*	39

ภาพผนวกที่

ค1	แสดงรูปฝักข้าวโพดข้าวเหนียวสายพันธุ์ A1 ที่มีสมรรถนะการผสมทั่วไป (GCA) ดีที่สุด	70
ค2	แสดงรูปฝักข้าวโพดข้าวเหนียวของคู่ผสม A1 x A3 ที่ให้น้ำหนักผลผลิตดีที่สุด	70

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CIMMYT	Centro Internacional de Mejorameinto de Maize y Trigo (The International Maize and Wheat Improvement Center)
CV	coefficient of variation
ddH_2O	double-distilled water
DNA	deoxyribose nucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
GCA	general combining ability
LSD	least significant difference
MAS	marker assisted selection
mM	millimolar
ng	nanogram
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
QPM	quality Protein Maize
RCBD	randomezed completely block design
SCA	specific combining ability
SSR	simple sequence repeat
U	unit(s) of enzyme
µM	micromolar
ºC	degree Celsius

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวให้มีคุณภาพโปรตีนสูงโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกยีน *opaque-2* และ *waxy*

Waxy Corn Improvement for High Quality Protein Using Marker-Assisted Selection of *Opaque-2* and *Waxy* Genes

คำนำ

ข้าวโพดเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกชนิดหนึ่ง ทั้งการบริโภคฝักสดและด้านอุตสาหกรรม ข้าวโพดที่ใช้ในการบริโภคฝักสดนั้นได้แก่ ข้าวโพดข้าวเหนียว ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดฝักอ่อน เป็นต้น ในส่วนของข้าวโพดข้าวเหนียวนั้น ในปัจจุบันมีความนิยมนำมารับประทานกันมากขึ้นเป็นลำดับ เนื่องจากมีรสชาติดีและมีความเหนียวนุ่มเหมือนข้าวเหนียว ลักษณะแป้งในเมล็ดจัดเป็นแป้งอ่อน (soft starch) มีเนื้อแป้งนิ่ม เหนียวนุ่ม เนื่องจากแป้งส่วนใหญ่มีปริมาณของอะมิโลเปคตินสูง ลักษณะดังกล่าวนี้ควบคุมด้วยยีน *waxy* ซึ่งเป็น recessive gene (*wxwx*) และสามารถตรวจสอบยีน *waxy* ได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (*phi022*) ด้วยเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) (Coe and Neuffer, 1988) อย่างไรก็ตาม ข้าวโพดข้าวเหนียวก็ยังมีคุณภาพโปรตีนต่ำ เหมือนข้าวโพดไร่ทั่วไป เนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโน คือ ไลซีน (lysine) และทริปโตแฟน (tryptophan) ในโปรตีนปริมาณต่ำ (FAO, 1992) แต่ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้เมื่อนักวิจัยจากมหาวิทยาลัย Purdue ค้นพบยีน *opaque-2* (o_2o_2) ในข้าวโพดซึ่งเป็นยีนที่เกิดจากการกลายพันธุ์ (mutant gene) ส่งผลให้ปริมาณไลซีนและทริปโตแฟนสูงขึ้นประมาณ 2 เท่าของข้าวโพดทั่วไป ในขณะเดียวกันก็พบว่ายีนนี้มีผลทำให้เกิดแป้งอ่อน (soft chalky dull) ในเมล็ด และเกิดโรคฝักเน่า (ear rot)ได้ง่าย ซึ่งก่อให้เกิดปัญหากับผลผลิต จึงทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร (Villegas, 1994) การพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดเพื่อเพิ่มปริมาณไลซีนและทริปโตแฟน จึงเริ่มขึ้นตั้งแต่ ค.ศ.1994 เป็นต้นมา แต่จะทำในข้าวโพดไร่เป็นส่วนใหญ่ และต่อมาประสบความสำเร็จเมื่อศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวสาลีนานาชาติ (CIMMYT) ค้นพบ modifying genes ที่มีผลทำให้ข้าวโพดที่มียีน *opaque-2* มีเมล็ดใส (vitreusness) และแข็ง (kernel hardness) เหมือนข้าวโพดปกติ (Vasal, 1994; Lopes and Lawkin, 1994) และที่สำคัญมีผลผลิตไม่น้อยกว่าข้าวโพดที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน เรียกข้าวโพดชนิดนี้ว่า ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (Quality Protein Maize, QPM) (CIMMYT, 1999) ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน ควบคุมด้วยยีน *opaque-2* ซึ่งเป็น recessive gene (o_2o_2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และสามารถตรวจสอบ ยีน *opaque-2* ได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (*phi057*) ด้วยเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) (Chin *et al*., 1996)

จากลักษณะที่กล่าวมาจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนในข้าวโพดข้าวเหนียว ซึ่งสามารถนำลักษณะของยีน *opaque-2* ในข้าวโพดไร่มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวให้มีปริมาณทริปโตแฟนให้สูงขึ้น ซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะเพิ่มคุณภาพโปรตีนให้แก่ข้าวโพด และจะเป็นประโยชน์แก่ผู้บริโภคข้าวโพดข้าวเหนียว ในการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (DNA marker) ซึ่งสามารถแยกข้าวโพดที่เป็นเฮเทอโรไซโกท (heterozygote) และโฮโมไซโกท (homozygote) ของยีนทั้ง *waxy* และ *opaque-2* โดยไม่ต้องรอการทดสอบรุ่นลูก (progeny test) จะช่วยทำให้การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดลดระยะเวลาของการคัดเลือกให้รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากกว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีปกติเพียงอย่างเดียว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวให้มีคุณภาพโปรตีนสูงเนื่องจากยีน *opaque-2*

2. ใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* และ *phi022* ในการคัดเลือกยีน *opaque-2* และยีน*waxy* ในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (backcross) และลูกผสมตัวเองในชั่วต่างๆ

3. ทดสอบผลผลิตและประเมินสมรรถนะการผสมของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ความสำคัญของข้าวโพดข้าวเหนียว

ข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays ceratina* เป็นข้าวโพดบริโภคฝักสดที่ได้รับความนิยมบริโภคมากชนิดหนึ่ง ลักษณะที่สำคัญทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวนั้นเป็นข้าวโพดที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *waxy* ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 9 ตำแหน่งที่ 59 โดยการเปลี่ยนแปลงจากยีน *Wx* (dominance gene) ไปเป็นยีน *wx* (recessive gene) ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณอะมิโลเปคติน ซึ่งเป็นแป้งโมเลกุลที่ใหญ่ และมีกิ่งก้านของโมเลกุลสูงแทนที่อะมิโลส ในเอนโดสเปิร์มและละอองเกสร (Coe and Neuffer, 1988) ในอัตราส่วน 73 : 27 เปอร์เซ็นต์ การแสดงออกของคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของเอนโดสเปิร์ม ทำให้เมล็ดมีลักษณะขุ่น และทึบแสง (Fergason, 1994) แป้งในเมล็ดข้าวโพดข้าวเหนียวจัดเป็นแป้งอ่อน (soft starch) มีเนื้อแป้งเหนียวนุ่มเหมือนข้าวเหนียว เนื่องจากมีปริมาณอะมิโลเปคตินสูง อย่างไรก็ตามข้าวโพดข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์มีปริมาณอะมิโลเปคตินแตกต่างกันออกไปซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้รสชาติแตกต่างกัน (ประภา และคณะ, 2535) สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวในประเทศไทยนั้น มีนักปรับปรุงพันธุ์ให้ความสนใจก่อนหน้านี้ไม่มากเท่าที่ควร จากอดีตถึงปัจจุบันการใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ผ่านมา เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ผสมเปิด (open pollinated variety) แต่หลังจากที่ความนิยมในการบริโภคข้าวโพดฝักสดมีมากขึ้นจึงได้มีการพัฒนาพันธุ์เป็นพันธุ์ลูกผสมเดี่ยว (single cross variety) มากขึ้นส่งผลต่อคุณภาพในการบริโภคที่ดีขึ้น ลักษณะทางการเกษตรต่างๆดีขึ้น และผลผลิตต่อไร่สูงขึ้น มีผู้บริโภคมากขึ้นทำให้การปลูกข้าวโพดข้าวเหนียวได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น พร้อมๆกับการพัฒนาสายพันธุ์ออกมาอย่างต่อเนื่องทั้งจากหน่วยงานราชการและเอกชน อย่างไรก็ตามการพัฒนาอุตสาหกรรมข้าวโพดข้าวเหนียวก็ยังมีขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวโพดฝักอ่อนและข้าวโพดหวาน

ลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียว

ลักษณะพิเศษของอะมิโลเปคตินที่ทำให้ข้าวโพดข้าวเหนียวไม่เหมือนข้าวโพดชนิดอื่น คือ เมื่อย้อมเอนโดสเปิร์มหรือละอองเกสรด้วยสารละลายไอโอดีนในสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (I_2KI) จะให้สีน้ำตาลแดง ขณะที่ข้าวโพดชนิดอื่นซึ่งมีปริมาณอะมิโลสสูงจะให้สีน้ำเงินเข้มถึงดำ (Weatherwax, 1922) ทำให้การตรวจสอบยีน *wx* โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์สามารถแยกพันธุกรรม *Wx*/*Wx*, *Wx*/*wx* และ *wx*/*wx* ออกได้อย่างชัดเจน โดยละอองเกสร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของพวก *Wx*/*Wx* จะให้สีน้ำเงินเข้มถึงดำ ส่วน *wx*/*wx* จะให้สีน้ำตาลแดง และ *Wx*/*wx* จะให้ทั้ง 2 สี คละกัน เนื่องจากละอองเกสรมีลักษณะเป็นแฮพลอยด์ (haploid) ถ้าหากย้อมสีที่เมล็ดจะแยกได้เพียง 2 กลุ่ม คือ ให้สีน้ำเงิน (*Wx*/*Wx* และ *Wx*/*wx*) และ สีน้ำตาลแดง (*wx*/*wx*) (กฤษฎา, 2546) นอกจากนี้ Fergason (1994) ยังกล่าวว่า การย้อมสีที่ละอองเกสรช่วยให้สะดวกในการคัดเลือกยีน *wx* ที่ต้องการก่อนที่จะทำการผสมเกสร ซึ่งเป็นเทคนิคพิเศษที่สามารถนำมาใช้ในการผสมเกสรเพื่อการถ่ายทอดยีน *wx* หรือ เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์อินเบรดในโครงการผลิตสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดข้าวเหนียว

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว

คมสัน และคณะ (2541) ได้ศึกษาถึงการสร้างลูกผสมระหว่างประชากร(varietal crosses) ของข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมือง 7 พันธุ์ คือ สุโขทัย1 สุโขทัย2 อยุธยา บางพระ พิษณุโลก ขาวนครศรี และขาวสุโขทัย ผสมแบบพบกันหมด (diallel crossing) แล้วนำลูกผสมที่ได้มาปลูกทดสอบ พบว่าลักษณะทางการเกษตรทุกลักษณะที่ศึกษามีความแตกต่างกันระหว่างลูกผสมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ยังพบว่าลักษณะที่สำคัญๆในหลายลักษณะของลูกผสมที่ได้ดีกว่าพ่อแม่พันธุ์ในระดับที่สูงกว่าพันธุ์พื้นเมืองบางพันธุ์ แสดงสมรรถนะในการผสมทั่วไป (GCA) และสมรรถนะในการผสมเฉพาะ (SCA) แสดงว่าสามารถใช้ประชากรผสมเปิดข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์พื้นเมืองเป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตลูกผสมระหว่างพันธุ์ได้

ในขณะเดียวกันลักษณะทางการเกษตรของข้าวโพดข้าวเหนียว ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ต่างๆก็เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งที่จะต้องให้ความสำคัญควบคู่กันไป จากรายงานของศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ (2534) ได้พัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว SSR TW 8801 โดยการนำข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์เทียนหัวรอ ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองในแถบจังหวัดอยุธยามาปรับปรุงพันธุ์โดยวิธี S_1 selection จำนวน 1 รอบการคัดเลือก หลังจากนั้นคัดเลือกแบบ modified mass selection อีก 1 รอบการคัดเลือก จนได้ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีลักษณะทางการเกษตรและคุณภาพในการบริโภคที่ดีขึ้น คือ มีลำต้นที่แข็งแรง สม่ำเสมอ ให้ผลผลิตสูง จำนวนฝักเฉลี่ย 3 ฝักต่อต้น ขนาดฝักสม่ำเสมอ การเรียงแถวเมล็ดตรง มีรสหวาน หอม มีความเหนียวนุ่ม ไม่ติดฟันและเป็นที่ยอมรับของเกษตรกร

นอกจากนี้ ยังมีการนำสายพันธุ์จากต่างประเทศ (exotic varieties) มาเป็นแหล่งเชื้อพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว เนื่องจากสายพันธุ์จากต่างประเทศมักจะมีลักษณะทางการเกษตรที่ดีอยู่มากโดยเฉพาะผลผลิตสูง แต่สิ่งหนึ่งที่เป็นจุดด้อยเมื่อนำสายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เหล่านี้เข้ามาพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดในประเทศไทย คือ การปรับตัวไม่ค่อยดีนัก ทั้งช่วงแสง การง่ายต่อการเข้าทำลายของโรคและแมลง ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ในปัจจุบันจึงพยายามที่จะแก้ปัญหาเหล่านี้ โดยนำเชื้อพันธุกรรมจากต่างประเทศมาผสมกับข้าวโพดในประเทศไทยซึ่งมีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมดีอยู่แล้ว ดังรายงานของ โชคชัยและคณะ (2544) ได้พัฒนาพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวจากต่างประเทศให้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้ดีขึ้นและเพิ่มลักษณะทางการเกษตรที่ดี โดยใช้เชื้อพันธุกรรมจากข้าวโพดไร่ โดยการนำข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ผสมเปิดเมล็ดสีขาวจากประเทศฟิลิปปินส์ จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ IRRI และ PHILIPPINE GLUTINOUS SYN # 20 ผสมกับข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 3 แล้วสกัดสายพันธุ์อินเบรดจากทั้งสองประชากร คือ กลุ่ม A (SUWAN 3/ PHILIPPINE GLUTINOUS SYN # 20)–F_4–S_4 จำนวน 6 สายพันธุ์ และ กลุ่ม B (SUWAN 3/IRRI)–F_4–S_4 จำนวน 4 สายพันธุ์ โดยการนำสายพันธุ์อินเบรดจากทั้งสองประชากรมาผสมแบบพบกันหมดระหว่างกลุ่ม (factorial cross) ได้ลูกผสม จำนวน 24 ลูกผสม ปลูกทดสอบผลผลิต พบว่า สายพันธุ์ A–182–4–6 และ สายพันธุ์ B–143–3–2 ให้น้ำหนักฝักสดทั้งเปลือก น้ำหนักสดปอกเปลือก และจำนวนฝักสดปอกเปลือกที่ดีอีกทั้งยังให้คะแนนรสชาติสูงเป็นอันดับหนึ่ง และสองตามลำดับ ลูกผสมที่ได้จากสายพันธุ์ดังกล่าว (A–182–4–6/B–143–3–2) ให้น้ำหนักฝักสดทั้งเปลือก น้ำหนักฝักสดปอกเปลือกรวม น้ำหนักฝักสดปอกเปลือกที่ดีที่สุด คือ 2,783, 1,727 และ 1,585 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ และให้จำนวนฝัก/ไร่สูงสุด 11,784 ฝัก/ไร่ รวมทั้งมีคุณภาพในการรับประทานดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีลักษณะทางพืชไร่บางอย่างที่ดี ได้แก่ ต้านทานโรคทางใบและมีเปลือกหุ้มฝักมิด

อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงประชากรข้าวโพดข้าวเหนียวที่ผสมด้วยพันธุ์ข้าวโพดไร่ และการพัฒนาสายพันธุ์จากประชากรดังกล่าว รวมทั้งการทดสอบผลผลิตลูกผสมที่ได้ต้องระมัดระวังและให้ความสำคัญในการคัดเลือกด้านคุณภาพ ได้แก่ รสชาติ ความนุ่ม กลิ่น และสี เพราะข้าวโพดไร่มีคุณภาพเหล่านี้ด้อยกว่าข้าวโพดข้าวเหนียว

ความสำคัญของข้าวโพด *opaque-2*

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (field corn) นับได้ว่าเป็นแหล่งอาหารคาร์โบไฮเดรตที่ดีแต่เป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพต่ำ เพราะมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น คือ ไลซีน (lysine) และทริปโตแฟน (tryptophan) ปริมาณต่ำ จนกระทั่งมีการค้นพบข้าวโพดที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมซึ่งมีปริมาณทริปโตแฟนสูงกว่าปกติ โดย Mertz *et al.* (1964) และ Nelson *et al.* (1965) ได้ค้นพบยีน *opaque-2* บนโครโมโซมคู่ที่ 7 ซึ่งเป็น recessive gene และพบยีน *floury-2* บนโครโมโซมคู่ที่ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยยีน *opaque-2* จะมีปริมาณไลซีนและทริปโตแฟนสูงกว่าข้าวโพดปกติ ทำให้มีคุณค่าทางอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์สูงด้วย ข้าวโพดที่มียีน *opaque-2* ถูกเรียกว่าข้าวโพดโอเปกหรือข้าวโพดคุณภาพโปรตีน โดยปกติแล้วโปรตีนที่สะสมในเมล็ดข้าวโพดเป็นโปรตีนประเภท alcohol-soluble protein หรือเรียกได้ว่า prolamines (zein) ซึ่งจะมีปริมาณไลซีนและทริปโตแฟนในปริมาณต่ำ งานพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดสำหรับยีน *opaque-2* และ *floury-2* มีการทดลองอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะงานทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ปกติ (conventional breeding) ในระยะต่อมาจึงได้เริ่มมีการศึกษาลงไปถึงระดับโมเลกุล ดังรายงานของ Prasanna *et al.* (2001) ได้มีความพยายามที่จะพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนโดยใช้เทคโนโลยีทางด้านโมเลกุลเครื่องหมายเข้ามาช่วยในการเข้าใจถึงพันธุกรรม พื้นฐานระดับโมเลกุล พื้นฐานทางชีวเคมี พร้อมๆ กับการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดให้คุณภาพโปรตีนสูงตามไปด้วย

คุณภาพของข้าวโพด *opaque-2*

ข้าวโพด *opaque-2* มีระดับโปรตีนใกล้เคียงกับข้าวโพดทั่วไป คือ มีโปรตีนประมาณ 9–10 เปอร์เซ็นต์ และยังมีคุณภาพโปรตีนสูงกว่าข้าวโพดทั่วไป ซึ่งคุณภาพโปรตีนนี้วัดได้โดยใช้ระดับของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด คือไลซีนและทริปโตแฟนในโปรตีน โดยในข้าวโพดทั่วไปมีไลซีนประมาณ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนข้าวโพด *opaque-2* มีประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ และข้าวโพดทั่วไปจะมีทริปโตแฟน ประมาณ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ข้าวโพด *opaque-2* มีประมาณ 1.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Mertz *et al.,* 1964)

Bressani (1966) รายงานการทดลองใช้ข้าวโพด *opaque-2* เป็นอาหารกับเด็กจำนวน 6 คน ซึ่งมีอายุตั้งแต่ 24-75 เดือน น้ำหนัก 10.82-19.05 กิโลกรัม พบว่า เด็กเหล่านี้บริโภคโปรตีน 1.8–15 กรัมต่อน้ำหนักเด็ก 1 กิโลกรัมต่อวัน มีปริมาณไนโตรเจนโดยเฉลี่ยวัดเป็นเปอร์เซ็นต์ของนมที่บริโภคเท่ากับ 26.4 และ 30.8 เปอร์เซ็นต์ แต่ข้าวโพด *opaque-2* จะเท่ากับ 28.1 และ 26.1 เปอร์เซ็นต์ ค่าดัชนีของสภาพสมดุลของไนโตรเจน (nitrogen balance index) สำหรับนมเท่ากับ 0.8 ข้าวโพด *opaque-2* เท่ากับ 0.72 และข้าวโพดทั่วไปเท่ากับ 0.31 แสดงให้เห็นว่าข้าวโพด *opaque-2* มีคุณภาพโปรตีนเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ของนม เด็กๆ ในประเทศโคลัมเบีย ที่เป็นโรคขาดสารอาหารสามารถมีสุขภาพเป็นปกติได้เมื่อใช้ข้าวโพด *opaque-2* เป็นแหล่งของโปรตีน (Clark *et al*., 1977) Bressani and Elias (1979) รายงานการใช้ข้าวโพดธรรมดา ข้าวโพด *opaque-2* และนม ในอายุเด็ก 4-5 เดือน จากสมการรีเกรสชั่นเส้นตรง (linear regression) ของ nitrogen absorbed กับ nitrogen balance พบว่าคุณค่าทางอาหารของข้าวโพด *opaque-2* เท่ากับนมซึ่งมากกว่าข้าวโพดปกติสองเท่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lopez-Pereira (1992) ศึกษาบทบาทของการใช้ข้าวโพด QPM เป็นส่วนผสมของอาหารสุกรในประเทศบราซิลและเอลสวาดอร์ พบว่าราคาอาหารสุกรจะลดลง เมื่อใช้ข้าวโพด QPM เป็นส่วนผสม การนำข้าวโพด *opaque-2* ไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงไก่จะทำให้ไก่เจริญเติบโตเร็วและใช้ปริมาณอาหารต่อหน่วยน้อยกว่าข้าวโพดธรรมดา

Bantte and Prasanna (2003) ได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดอินเบรดโปรตีนสูงที่ได้มาจาก 2 แหล่ง คือ อินเดีย และ CIMMYT โดยทำการเปรียบเทียบกับข้าวโพดทั่วไป (normal maize) พบว่า ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณทริปโตแฟนยังมีค่าสูงกว่าข้าวโพดทั่วไปอีกด้วย

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีนสูง

ถึงแม้ว่าคุณค่าทางอาหารของข้าวโพด *opaque-2* เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง แต่ปัญหาเกี่ยวกับข้าวโพดชนิดนี้ยังมีอีกมาก สุทัศน์ (2514 และ 2515) เมื่อมีการถ่ายทอดยีน *opaque-2* เข้าไปยังข้าวโพดทั่วไปจะทำให้คุณภาพโปรตีนเพิ่มขึ้น ปัญหาที่สำคัญ คือ เมล็ดมีลักษณะแป้งอ่อน (soft endosperm) สีเหลืองซีดหรือขาวขุ่น ลักษณะแป้งอ่อนในเอนโดสเปิร์ม ทำให้แมลงเจาะเข้าทำลายได้ง่าย ก่อให้เกิดปัญหาเรื่องการเก็บรักษาเมล็ดไว้นานๆ คุณภาพของแป้งข้าวโพดใช้เป็นอาหารมนุษย์ลดลง น้ำหนักเมล็ดเบากว่าข้าวโพดทั่วไปทำให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำไม่เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lodha *et al*. (1976) ศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ modified endosperm และ vitreous endosperm ของข้าวโพด *opaque-2* พบว่าเอนโดสเปิร์มของข้าวโพด *opaque-2* จะมีค่าเฉลี่ยโปรตีน 8.08 เปอร์เซนต์ และปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีน 0.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเอนโดสเปิร์มของข้าวโพด modified opaque-2 มีค่าเฉลี่ยโปรตีนประมาณ 9.36 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีน 0.84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเพิ่มลักษณะเมล็ดข้าวโพด *opaque-2* ให้โปร่งใสขึ้นใกล้เคียงกับข้าวโพดทั่วไป จะทำให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 9.4 เปอร์เซ็นต์ ถึง 12.6 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณไลซีนจะลดลงจาก 3.6 เปอร์เซ็นต์ เป็น 1.6 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณทริปโตแฟนจะลดลงจาก 0.96 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.34 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองนี้ขัดแย้งกับการรายงานของ Vasal (1994) ที่ปรับปรุงข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (QPM) โดยใช้ยีน *opaque-2* ร่วมกับ modifying gene ที่ทำให้เมล็ดแข็งและใส (vitreousness) ในขณะเดียวกันปริมาณโปรตีนมีปริมาณปกติแต่ปริมาณทริปโตแฟนและไลซีนสูงขึ้นเป็นสองเท่าของข้าวโพดทั่วไป

Navarro and Domingo (1977) รายงานว่า สภาพแวดล้อมของสถานที่ มีอิทธิพลอย่างมากต่อ modified kernel ทั้ง น้ำหนักเมล็ด ปริมาตรเมล็ด และปริมาณไลซีน มีค่าสูงกว่าในสภาพสถานที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ สำหรับการคัดเลือกปริมาณไลซีนสูงให้มีประสิทธิภาพ จะต้องคำนึงถึงการผสมข้ามกันอย่างอิสระ (random mating) ในการคัดเลือกปริมาณ modification สูงขึ้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์ modification kernel เพิ่มขึ้นแต่ปริมาตรเมล็ดลดลง การเพิ่มปริมาณโปรตีน และน้ำหนักเมล็ดลดลงขึ้นอยู่กับการคัดเลือกปริมาณไลซีนในโปรตีน แต่ผลจะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิ และนอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองนำลักษณะ *opaque-2* รวมกับยีน *sugary-2* เป็นแบบ double recessive พบว่า ยีนทั้งสองอัลลีล ให้ผลบวกทาง additive คือ ทำให้ปริมาณไลซีน สูงกว่าข้าวโพด *opaque-2* ธรรมดา ในขณะที่ลักษณะแป้ง, เปลือกหุ้มเมล็ด และผลผลิตสูงกว่าข้าวโพดลูกผสม *opaque-2* และข้าวโพดลูกผสมทั่วไป

การปรับปรุงข้าวโพดคุณภาพโปรตีนด้วยวิธีปกติ (conventional breeding)

การปรับปรุงคุณภาพโปรตีนในข้าวโพดด้วยวิธีปกติมีข้อจำกัดในเรื่องของการตรวจสอบปริมาณของไลซีนและทริปโตแฟนในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของข้าวโพด นักปรับปรุงพันธุ์จะไม่สามารถบอกได้ว่าต้นใดที่มีอัลลีลของยีน *opaque-2* ที่จะส่งผลให้ได้ผลผลิตที่มีปริมาณของไลซีนและทริปโตแฟนสูงจนกว่าจะสิ้นสุดฤดูกาล ทำให้การผสมพันธุ์ต้องทำทั้งประชากร การจำแนกข้าวโพด QPM ที่น่าเชื่อถือจะต้องส่งตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ โดยในขั้นตอนแรกจะวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนเพื่อนำไปหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด และวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณทริปโตแฟนที่มีในส่วนของเอนโดสเปิร์ม และขั้นตอนที่สองเป็นการหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน EF-1A ซึ่งมีความสัมพันธ์สูงกับปริมาณของ lysine ในเอนโดสเปิร์ม (Habben *et al*., 1995) ข้าวโพด QPM โดยทั่วไปจะมีอัตราส่วนของปริมาณ lysine:tryptophan ในสัดส่วน 4:1 ดังนั้นการวิเคราะห์กรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งจะสามารถบอกลักษณะของยีน *opaque-2* ที่ควบคุมอยู่ในพืชต้นนั้นๆ ได้ นอกจากนี้ข้อจำกัดของยีน *opaque-2* ซึ่งเป็น recessive gene ทำให้ข้าวโพดที่มี genotype เป็น heterozygous (O_2o_2) แสดงออกเหมือนกับ homozygous dominant (O_2O_2) ทำให้การจำแนกความแตกต่างของทั้งสองยีโนไทป์นี้ต้องทำการผสมตัวเองก่อนแล้วนำเมล็ดที่ได้ไปปลูกในฤดูถัดไปเพื่อพิจารณาเฉพาะต้นที่มีการแสดงออกเป็นข้าวโพด QPM และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในเอนโดสเปิร์ม วิธีการดังกล่าวนี้ทำให้ค่อนข้างเสียเวลาค่อนข้างมาก (Dreher *et al*., 2002)

การปรับปรุงโดยวิธีการผสมกลับ

การผสมกลับ (backcrossing) คือ การนำเอาลูกผสมที่ได้ผสมกลับไปยังพ่อหรือแม่ เพื่อเสริมลักษณะใดลักษณะหนึ่งเพียงไม่กี่ลักษณะเข้าไปยังพันธุ์พืชที่เห็นว่าดีอยู่แล้ว แต่ขาดลักษณะที่ต้องการบางลักษณะ ซึ่งเป็นการถ่ายทอดยีนจากสายพันธุ์หนึ่งไปยังสายพันธุ์หนึ่ง (Allard, 1960)

การผสมกลับ ประกอบด้วย สายพันธุ์ให้ยีน (donor parent) คือสายพันธุ์ที่มียีนที่ต้องการบางยีนถ่ายไปยังสายพันธุ์รับ (recipient parent) และสายพันธุ์รับยีน คือ สายพันธุ์ดีที่จะต้องนำลูกผสมที่เกิดขึ้นผสมกลับไปหาอย่างต่อเนื่อง จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า recurrent parent ลูกผสมที่เกิดขึ้นจึงเป็นลูกผสมกลับ (backcross hybrid) ถ้าผสมกลับครั้งที่ 1 เรียกว่าลูกผสมกลับครั้งที่ 1 (BC_1) วิธีการผสมกลับเป็นวิธีการมีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดลักษณะคุณภาพ การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมกลับอาจทำได้อย่างตรงไปตรงมาตามขั้นตอนมาตรฐาน หรืออาจซับซ้อนขึ้นอยู่กับความยากง่ายในการถ่ายทอดลักษณะ และปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ที่ใช้ (กฤษฎา, 2546)

การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด

ในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) เข้ามามีส่วนช่วยเร่งกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพด คือ การใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือกพันธุ์อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการถ่ายยีนที่สำคัญทางเศรษฐกิจจากพันธุ์หนึ่งไปสู่อีกพันธุ์หนึ่งโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้ หรือ อยู่บนยีนที่ต้องการถ่ายทอดนั้น สามารถเข้ามามีบทบาทที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำคัญในการเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือก ลดระยะเวลาในการดำเนินการ ในการเลือกใช้โมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) โมเลกุลเครื่องหมายที่อยู่ใกล้ยีนมากที่สุดสามารถนำมาใช้ช่วยในการคัดเลือกนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการดังนี้ 1) ความถูกต้องแม่นยำในการวางตำแหน่งยีน โดยการใช้หลักการวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะปริมาณ 2) ระยะห่างระหว่างโมเลกุลเครื่องหมายและยีนที่ทำการถ่ายทอด และ 3) พื้นฐานทางพันธุกรรมของพันธุ์ที่จะได้รับการถ่ายทอดยีน

ประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection, MAS) เมื่อเปรียบเทียบกับการคัดเลือกแบบปกตินั้น ยังขึ้นอยู่กับต้นทุนการทดสอบโมเลกุลเครื่องหมาย ต้นทุนในการวัดลักษณะขนาดของประชากรที่ใช้ จำนวนซ้ำและค่า heritability ของลักษณะ การใช้ MAS จะมีประสิทธิภาพ และคุ้มค่ามากเมื่อลักษณะที่จะตรวจสอบมีค่า heritability ต่ำมีค่าใช้จ่ายในการวัดลักษณะสูงและมีจำนวนตัวอย่างในการวัดมาก

Bentte and Prasanna (2003) ศึกษา SSR marker ดังนี้ *bnlg439*, *phi057*, *blng125*, *dupssr34* และ *bnlg105* ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างของ polymorphism สูงในการคัดเลือกข้าวโพดที่มีพันธุกรรมเป็น QPM อย่างไรก็ตาม จากรายงานของ Chin *et al*. (1996) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างของยีโนไทป์ของยีน *opaque-2* ได้เช่นกัน

นอกจากนี้ เครื่องหมายโมเลกุล *phi022* สามารถแยกความแตกต่างของยีโนไทป์ของยีน *waxy* ได้ (Senior *et al*., 1996) แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวโดยใช้ยีน *opaque-2* ผ่านวิธีการผสมพันธุ์และใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2*

สมรรถนะการผสม (Combining ability)

หลักการสร้างลูกผสมที่ดี คือ การสร้างสายพันธุ์แท้ และหาลูกผสมที่ดีจากสายพันธุ์แท้ที่สร้างขึ้น (พีระศักดิ์ และเจริญศักดิ์, 2529) โดยสิ่งที่ควรพิจารณาในการทำลูกผสม คือ สมรรถนะการผสมของพ่อแม่ เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของพืชที่จะให้ลูกผสมที่ดีหรือเลว แบ่งได้ 2 พวก คือ สมรรถนะการผสมทั่วไป (general combining ability, GCA) การที่พืชพันธุ์พืชหนึ่งสามารถผสมพันธุ์กับพันธุ์อื่นๆ หลายพันธุ์แล้วให้ค่าเฉลี่ยของลูกผสมทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ดี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมรรถนะการผสมเฉพาะ (specific combining ability, SCA) การที่พันธุ์หนึ่งผสมกับอีกพันธุ์หนึ่งแล้วให้ค่าเฉลี่ยของลูกผสมที่ดีเท่านั้น (รังสฤษดิ์, 2539) ในการทดสอบสมรรถนะในการผสม วิธีที่นิยมมากวิธีหนึ่งคือ การทดสอบคู่ผสมแบบพบกันหมด (diallel cross) เป็นวิธีที่ตรงไปตรงมา แต่จะขาดประสิทธิภาพ ถ้ามีสายพันธุ์จำนวนมาก วิธีนี้จึงเหมาะในการใช้กับสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วเป็นอย่างดี และไม่ควรใช้เกิน 10 สายพันธุ์ (กฤษฎา, 2551) ซึ่งรายงานเกี่ยวกับทฤษฎีและวิธีวิเคราะห์ การผสมแบบพบกันหมดได้หลายวิธี เช่น Hayman (1954 a, b; 1957; 1960), Griffing (1956) และ Gardner and Eberhart (1966)

Bjarnason and Klein (1976) ศึกษาการผสมแบบพบกันหมดในข้าวโพด *opaque-2* ข้าวโพดธรรมดา จากการวิเคราะห์สมรรถนะการผสมในลักษณะเมล็ด พบว่าอัตราส่วนของความแปรปรวน GCA ต่อ SCA มีค่าเท่ากับ 17 ต่อ 1 สายพันธุ์ข้าวโพด *opaque-2* จะมีค่า GCA สูงที่สุด Bjarnasan *et al*., (1977) ทำการศึกษาการผสมแบบพบกันหมดของข้าวโพดสายพันธุ์อินเบรด *opaque-2* ข้าวโพดที่เป็น hard endosperm ข้าวโพดลูกผสมสลับ และข้าวโพดธรรมดา พบว่า จากการวิเคราะห์ ไลซีนจากฝักที่มีการกระจายตัวของลูกผสมที่ผสมตัวเองจากข้าวโพดธรรมดา 2.6 เปอร์เซ็นต์ แต่ฝัก modified *opaque-2* และฝัก *opaque-2* จะมีปริมาณไลซีนอยู่ระหว่าง 3.6-3.9 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ modifying gene จะมีอิทธิพลอย่างมากกับลักษณะของเอนโดสเปิร์ม แต่จะมีเพียงเล็กน้อยในเรื่องของปริมาณโปรตีน

ลักษณะคุณภาพสำหรับการบริโภค

กลิ่นรส (flavor) ความหวานเป็นองค์ประกอบหลักของคุณภาพการบริโภคข้าวโพดฝักสดนั่น หมายถึง กลิ่นหอมและรสชาติดี ซึ่งกลิ่นของข้าวโพดเป็นความหอมเฉพาะตัวที่เกิดขึ้นเมื่อนำข้าวโพดมาทำให้สุก (Flora and Wiley, 1974) สำหรับรสชาติหมายถึงความนุ่ม และส่วนประกอบของเนื้อข้าวโพด ทั้งรสชาติและกลิ่น สามารถคัดเลือกโดยทดสอบด้วยการกัดชิมระหว่างการปรับปรุงพันธุ์

ความนุ่ม (tenderness) หมายถึง ลักษณะเมล็ดข้าวโพดและความหนาของเปลือกหุ้มเมล็ด คุณภาพความนุ่มของเมล็ดข้าวโพดมีความสัมพันธ์ตรงกันข้ามกับความหนาของเปลือกหุ้มเมล็ด ถ้าเปลือกหุ้มเมล็ดหนาความนุ่มจะมีน้อย เปลือกหุ้มเมล็ดได้มาจากเนื้อเยื่อต้นแม่ ความหนาของเปลือกหุ้มเมล็ดจึงเป็นผลมาจากชนิดเอนโดสเปิร์ม ซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งพันธุกรรมที่ใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์อินเบรด (Tracy, 2001)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์ม

การวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนและทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดจากแปลงทดสอบผลผลิตลูกผสม จากการผสมแบบพบกันหมด และประชากรพ่อแม่ ตามวิธีของ Villegas และ Mertz (1971) ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมเมล็ด ดังนี้ 1) สุ่มตัวอย่างเมล็ดประมาณ 20-30 เมล็ด แช่น้ำกลั่นประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นลอกเอา pericarp และแกะส่วนของ germ ออก ผึ่งลมให้แห้ง 2) บดเอนโดสเปิร์มให้มีขนาด 0.08 มิลลิเมตรด้วย cyclone mill ห่อด้วยกระดาษกรอง และ 3)สกัดไขมันด้วยเครื่องสกัดไขมัน โดยใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์โปรตีนในเมล็ด ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ nitrogen content และนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์โปรตีนในเมล็ด โดยการคูณด้วยค่าคงที่ 6.25 ตามวิธี Micro-kjedahl method

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟนในเมล็ดนั้น จากการศึกษาของ Hernandez and Bates (1969) พบว่ากรดอะมิโนที่จำเป็น ไลซีนและทริปโตแฟนนั้น มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากใน endosperm ของข้าวโพด *opaque-2* โดยถ้าค่าปริมาณของทริปโตแฟนในโปรตีนมีค่าสูงจะพบว่าค่าปริมาณไลซีนในโปรตีนจะมีค่าสูงด้วย (ประมาณ 1:4) ดังนั้นการวิเคราะห์กรดอะมิโนทริปโตแฟนเพียงอย่างเดียวก็สามารถประเมินปริมาณไลซีนได้

การวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์มข้าวโพดตามวิธีของ Villegas และ Mertz (1971) ต้องคำนึงถึงคุณภาพของกรดซัลฟุลริก (H_2SO_4) เพราะมีผลถึงปริมาณทริปโตแฟนที่วัดได้ จากข้อจำกัดของวิธีดังกล่าวนี้ Nurit *et al*. (2009) ได้ใช้กรดไกลออกซาลิก (glyoxaric acid) เพิ่มเติมขึ้นมาจากวิธีของ Villegas และ Mertz ทำให้การวิเคราะห์ผลได้แม่นยำยิ่งขึ้น และให้ผลเหมือนกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์ข้าวโพด

1.1 สายพันธุ์ อินเบรด ข้าวโพดข้าวเหนียว (inbred line) จากโครงการปรับปรุง พันธุ์ข้าวโพดของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คือ

1.1.1 Kwi1

1.1.2 Kwi9

1.2 สายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดไร่คุณภาพโปรตีน (quality protein maize; QPM) คือ Q53 ซึ่งได้มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยสายพันธุ์ดังกล่าวมาจากประชากรคุณภาพโปรตีนของ CIMMYT (PopII#53)

1.3 ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ผ สมเปิด (open-pollinated variety) คือ พันธุ์รัชตะ และข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมเดี่ยว (single cross hybrid) พันธุ์บิ๊กไวท์ โดยสองพันธุ์นี้ใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ (check variety)

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1.1 ไนโตรเจนเหลว

2.1.2 2X CTAB (Cethyl trimethyl ammonium bromide)

2.1.3 TE buffer

2.1.4 Linear polyacrylamide

2.1.5 Washing buffer

2.1.6 2-Mercaptoethanol

2.1.7 Chloroform

2.1.8 Isoamyl alcohol

2.1.9 70% Ethanol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.10 Phenol

2.1.11 RNase buffer

2.1.12 Iso-propanol

2.1.13 3M Sodium acetate

2.1.14 RNase A

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำ PCR

2.2.1 Ultra pure water (ddH_2O)

2.2.2 $Mgcl_2$

2.2.3 dNTP

2.2.4 *Taq* DNA polymerase

2.2.5 glyceraol

2.2.6 *Tag* buffer (10x; Mg-free)

2.2.7 Primer phi057

forward; 5'- CTCATCAGTGCCGTCGTTCCAT – 3'

reverse; 5'- CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC – 3'

2.2.8 Primer phi022

forward; 5'-TGCGCACCAGCGACTGACC-3'

reverse; 5'-GCGGGCGACGCTTCCAAAC-3'

2.3 สารเคมีใช้ในการทำ polyacrylamide gel electrophoresis และการย้อมแถบดีเอ็นเอ

2.3.1 Bind silane

2.3.2 Repel silane

2.3.3 Glacial acetic acid

2.3.4 Acrylamide

2.3.5 Bis-acrylamide

2.3.6 95% Ethanol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3.7 Urea

2.3.8 5X TBE, 1X TBE

2.3.9 AFLP loading dry

2.3.10 Ammonia

2.3.11 Sliver nitrate

2.3.12 3M Sodium hydroxide

2.3.13 Sodium carbonate

2.3.14 40% Formaldehyde

2.3.15 Molecular weight standard (100bp)

2.4 สารเคมีที่ใช้ทำ agarose gel electrophoresis และการย้อมแถบดีเอ็นเอ

2.4.1 Agarose

2.4.2 1X TBE

2.4.3 AFLP loading dry

2.4.4 Ethidium bromide

2.4.5 Molecular weight standard (1 kb)

2.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมละอองเกสร

2.5.1 0.3% Iodine

2.5.2 1.0% Potassium iodide

2.6 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟน

2.6.1 Haxane

2.6.2 0.165 M Sodium acetate (pH 7)

2.6.3 Papain

2.6.4 30 N Sulfuric acid, 7 N Sulfuric acid

2.6.5 0.1 M Glyoxilic acid

2.6.6 1.8 M Ferric chloride

2.6.7 DL-Tryptophan

2.7 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลส

2.7.1 1 N NaOH

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.7.2 Potato amylase, 100% purity

2.7.3 95%Ethyl alcohol

2.7.4 Glacial acetic acid

2.7.5 Iodine

2.8 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ Total sugar และ Reducing sugar

2.8.1 0.1 N NaOH

2.8.2 0.1 N HCl

2.8.3 D-glucose anhydrous

2.8.4 Alkalic copper reagent

2.8.5 Arsenomolybdic reagent

2.9 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.9.1 Hexane

2.9.2 98% Sulfuric acid, 0.05018 N Sulfuric acid

2.9.3 Catalyst (Na_2SO_4 100g: Se 1g)

2.9.4 10N Sodium hydroxide, 0.1 N Sodium hydroxide

2.9.5 Boric acid

2.9.6 95% Ethyl alcohol

3. อุปกรณ์

3.1 โกร่งบดตัวอย่าง

3.2 หลอดทดลอง

3.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

3.4 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.5 เครื่องเซนติฟิวจ์

3.6 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้

3.7 ชุด sequencing gels

3.8 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

3.9 เครื่องฉายแสง ultraviolet

3.10 เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ

3.11 เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.12 Spectrophotometer

3.13 เครื่อง eletroporesis สำหรับ acrylamide gels

3.14 เครื่องบดเมล็ด (Extraction Unit 13-811)

3.15 เครื่องแก้ว

3.16 pH meter

3.17 Shaker, Vortex-Genie2

3.18 เครื่องสกัดไขมัน (SER 148 extraction unit by solvent)

3.19 กระดาษกรอง

3.20 Incubator

3.21 Cyclone mill

3.22 หลอดไมโครเซนติฟิวจ์

วิธีการ

นำสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดข้าวเหนียว (*O_2O_2wxwx*) จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ Kwi1 และ Kwi9 ผสมกับข้าวโพดไร่ QPM ที่มียีน *opaque-2* (*o_2o_2WxWx*) คือ Q53 จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดคุณภาพโปรตีน (ศ.4.48) ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งสกัดมาจากข้าวโพดพันธุ์ผสมเปิด ของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวสาลีนานาชาติ (CIMMYT) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีคุณภาพโปรตีนสูง ได้ลูกผสมชั่วแรก (F_1) สองคู่ผสมคือ Kwi1 x Q53 และ Kwi9 x Q53 เพื่อเพิ่มลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวให้มากขึ้นจึงใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ (backcross) ไปยังสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 จะคัดเลือกยีโนไทป์ของยีนตำแหน่ง *waxy* (*wxwx*) ด้วยการย้อมละอองเกสร และคัดเลือกยีน *opaque-2* (*o_2o_2*) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ซึ่งเป็น simple sequence repeat (SSR) (Chin *et al.,* 1996) ต่อมาในรุ่น BC_1S_1 ตรวจสอบยีน *opaque-2* (*o_2o_2*) และยีน *waxy* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* และ *phi022* (SSR) ตามลำดับ เลือกเฉพาะต้นที่มียีโนไทป์เป็น double homozygous recessive (*o_2o_2wxwx*) ของทั้งสองยีนผสมตัวเองอีกสองครั้งเพื่อเพิ่มความคงตัวทางพันธุกรรม เป็นลูกรุ่น BC_1S_3 แล้วตรวจสอบยีน *opaque-2* (*o_2o_2*) และยีน *waxy* อีกครั้งในลูกชั่วนี้ในฤดูถัดไปปลูกเพื่อผสมแบบพบกันหมด และปลูกทดสอบผลผลิตของลูกผสมเดี่ยวในฤดูต่อมา โดยมีรายละเอียดดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kwi1, Kwi9 (*O_2O_2wxwx*) **x** Q53 (*o_2o_2WxWx*)

ฤดูปลูกที่ 1 Kwi1, Kwi9 (*O_2O_2wxwx*) x F_1 (*O_2o_2Wxwx*)

ฤดูปลูกที่ 2 BC_1F_1 (*O_2O_2Wxwx* : *O_2o_2Wxwx* : *O_2O_2wxwx* : *O_2o_2wxwx*)

phi057

I_2KI

ฤดูปลูกที่ 3 BC_1S_1 (3 *O_2_wxwx*: 1 *$o_2o_2$wxwx*)

phi057 และ *phi022*

I_2KI

ฤดูปลูกที่ 4 BC_1S_2 (*$o_2o_2$wxwx*)

phi057 และ *phi022*

I_2KI

ฤดูปลูกที่ 5 BC_1S_3 (*$o_2o_2$wxwx*) การผสมแบบพบกันหมด (diallel cross)

phi057 และ *phi022*

I_2KI

ฤดูปลูกที่ 6 ทดสอบผลผลิต (yield trial)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฤดูปลูกที่ 1 (พฤษภาคม 2550 – สิงหาคม 2550)

ปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ทั้งสองคู่ผสม และสายพันธุ์แม่ที่เป็นข้าวโพดข้าวเหนียว จากนั้นผสมกลับไปยังสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียว (recurrent parent) ได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1)

ฤดูปลูกที่ 2 (ธันวาคม 2550 – มีนาคม 2551)

ปลูกลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ขณะที่ข้าวโพดยังมีขนาดเล็กอยู่ เก็บใบมาเพื่อสกัดดีเอ็นเอ (DNA) แล้วใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ช่วยคัดเลือกต้นที่มียีน *opaque-2* ส่วนยีน *waxy* ในชั่วนี้จะตรวจสอบละอองเกสรด้วยสารละลายโพแตสเซียมไอโอไดล์ (KI) เพื่อช่วยลดงานสำหรับการใช้เครื่องหมายโมเลกุล *phi022* ในขั้นตอนแรกก่อน เมื่อสิ้นสุดการคัดเลือกในชั่วนี้จะได้ข้าวโพดที่มีพันธุกรรมในตำแหน่งที่สนใจเป็น $wxwxO_2o_2$ แล้วผสมตัวเองเป็น BC_1S_1

ฤดูปลูกที่ 3 (มิถุนายน 2551 – กันยายน 2551)

ปลูกลูกผสมกลับที่ผสมตัวเองหนึ่งครั้ง (BC_1S_1) ตรวจสอบละอองเกสรด้วยสารละลายโพแตสเซียมไอโอไดด์ เก็บใบข้าวโพดเมื่อข้าวโพดอายุประมาณ 30 วัน เพื่อสกัดดีเอ็นเอ และใช้เครื่องหมายโมเลกุลเลือกข้าวโพดที่มีพันธุกรรมของยีนทั้งสองเป็น double homozygous recessive ($wxwxo_2o_2$) แล้วผสมตัวเองเป็น BC_1S_2

ฤดูปลูกที่ 4 (ธันวาคม 2551 – มีนาคม 2552)

ปลูกลูกผสมกลับที่ผสมตัวเองหนึ่งครั้ง (BC_1S_2) ตรวจสอบละอองเกสรด้วยสารละลายโพแตสเซียมไอโอไดด์ เก็บใบข้าวโพดเมื่อข้าวโพดอายุประมาณ 30 วัน เพื่อสกัดดีเอ็นเอ แล้วใช้เครื่องหมายโมเลกุลเลือกข้าวโพดที่มีพันธุกรรมของยีนทั้งสองเป็น double homozygous recessive ($wxwxo_2o_2$) แล้วผสมตัวเองเป็น BC_1S_3

ฤดูปลูกที่ 5 (เมษายน 2552 – กรกฎาคม 2552)

ปลูกลูกผสมกลับที่ผสมตัวเองหนึ่งครั้ง (BC_1S_3) ตรวจสอบละอองเกสรด้วยสารละลายโพแตสเซียมไอโอไดด์แล้วเก็บใบข้าวโพดเมื่อข้าวโพดอายุประมาณ 30 วัน แล้วใช้เครื่องหมาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โมเลกุลเลือกข้าวโพดที่มีพันธุกรรมของยีนทั้งสองเป็น double homozygous recessive ปลูกสายพันธุ์อินเบรดที่เป็น double homozygous recessive ของทั้งสองยีนทั้งหมด 5 สายพันธุ์ คือ

1) A1; kwi_1/Q53//BC_1-2-3-1-3

2) A2; kwi_1/Q53//BC_1-6-2-3-2

3) A3; kwi_1/Q53//BC_1-7-3-1-2

4) A4; kwi_1/Q53//BC_1-8-3-2-1

5) A5; kwi_9Q53//BC_1-5-2-2-2

เพื่อผสมแบบพบกันหมด (diallel cross) ตามวิธีการของ Griffing (Griffing, 1956) ได้ลูกผสมจำนวน 10 คู่ผสม และขณะเดียวกันก็ผสมตัวเองของสายพันธุ์อินเบรดชั่วที่ BC_1S_3 เป็น BC_1S_4 เพื่อเพิ่มความคงตัวทางพันธุกรรมของยีนในตำแหน่งอื่นๆ

ฤดูปลูกที่ 6 (ตุลาคม 2552 – มกราคม 2553)

ปลูกทดสอบผลผลิตลูกผสม 10 คู่ผสม วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบอลคสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ ขนาดแปลงย่อย (plot size) แถวยาว 5 เมตร จำนวน 4 แถว ระยะปลูก 0.75×0.25 เมตร

การบันทึกข้อมูล

1. ผลผลิตฝักสดทั้งปลือก (green weight) ชั่งน้ำหนักฝักสดทั้งเปลือกหลังจากเก็บเกี่ยวของแต่ละแปลงย่อยเทียบค่าเป็นกิโลกรัมต่อไร่ โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{ผลผลิตต่อไร่ (กก./ไร่)} = \frac{\text{น้ำหนักฝักสดทั้งเปลือก x 1,600}}{\text{พื้นที่เก็บเกี่ยว (ตร.ม.)}}$$

2. ผลผลิตฝักสดปอกปลือก (white weight) ชั่งน้ำหนักฝักสดที่ผ่านการปอกเปลือก แล้วของแต่ละแปลงย่อยเทียบค่าเป็นกิโลกรัมต่อไร่ โดยคำนวณจากสูตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\text{ผลผลิตต่อไร่ (กก./ไร่)} = \frac{\text{น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก x 1,600}}{\text{พื้นที่เก็บเกี่ยว (ตร.ม.)}}$$

3. อัตราแลกฝัก โดยการคัดเลือกฝักสดทั้งเปลือกที่ดี ชั่งน้ำหนักบันทึกคำนวณเปอร์เซ็นต์แลกฝักดังนี้

$$\text{อัตราแลกฝัก (\% shelling)} = \frac{\text{น้ำหนักฝักสดทั้งเปลือก x 100}}{\text{น้ำหนักสดปอกเปลือก}}$$

4. อัตราฝาน โดยการคัดเลือกฝักสดปอกเปลือกที่ดี ชั่งน้ำหนักบันทึกแล้วฝานเอาแต่เนื้อเมล็ด ชั่งน้ำหนักเมล็ดที่ฝานได้ คำนวณเปอร์เซนต์ฝานดังนี้

$$\text{อัตราฝาน (\% cutting)} = \frac{\text{น้ำหนักเมล็ดที่ฝานได้ x 100}}{\text{น้ำหนักสดปอกเปลือก}}$$

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

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

5. วันออกไหม (day to 50% silking) นับจำนวนวันจากวันให้น้ำถึงวันที่จำนวนต้น 50 เปอร์เซ็นต์ของต้นทั้งหมดในแปลงย่อยออกไหมยาว 2–3 เซ็นติเมตร

6. วันออกดอกตัวผู้ (day to 50% tasseling) นับจำนวนวัน จากวันที่ให้น้ำถึงวันที่ 50 เปอร์เซ็นต์ของต้นทั้งหมดในแปลงย่อยออกดอกครึ่งหนึ่งของช่อดอก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. โรคทางใบ (foliar diseases) ให้คะแนนต้นที่เป็นโรคทางใบในช่วงก่อนถึงวันเก็บเกี่ยวผลผลิตฝักสดประมาณ 7–14 วัน หรือ ตอนไหมแห้ง หรือช่อดอกตัวผู้แห้ง โรคที่ตรวจสอบ ได้แก่ โรคใบไหม้ (leaf blight) โรคใบจุด (leaf spot) โรคราสนิม (rust) และโรคราน้ำค้าง (downey mildew) ให้คะแนนการเป็นโรค 1–5 โดยการนับจำนวนต้นที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่เป็นโรคในแต่ละแปลงย่อย แล้วเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

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

8. จำนวนต้น (plant number) นับจำนวนต้นครั้งแรกเมื่อถอนแยก โดยถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น (ระยะปลูก 25x75 เซ็นติเมตร)

9. จำนวนฝัก (ear number) นับจำนวนฝักในแต่ละแปลงย่อยที่ระยะเก็บเกี่ยว

10. ความสูงต้น (plant height) วัดจากพื้นดินถึงโคนใบธง (ข้อใบบนสุดของลำต้น) วัดเมื่อดอกตัวผู้แห้งมีหน่วยเป็นเซ็นติเมตร

11. ความสูงฝัก (ear height) วัดจากพื้นดินถึงข้อของฝักบนสุด วัดพร้อมกับความสูงต้นมีหน่วยเป็นเซ็นติเมตร

12. ลักษณะต้น (plant aspect) สังเกตและบันทึกความสม่ำเสมอของทรงต้น เช่นลักษณะลำต้นตั้งตรง ความแข็งแรงของต้น ระบบราก ความสูงฝักและต้น การต้านทานโรคและแมลงให้คะแนน 1–5 โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ดังนี้

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5 = มีความสม่ำเสมอน้อยที่สุด น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

13. ความยาวฝัก (ear length) สุ่มวัดจากต้นสุ่มมีหน่วยเป็นเซ็นติเมตร ดังนี้

13.1 ความยาวทั้งฝัก วัดจากส่วนท้ายฝักถึงปลายฝักที่ยาวที่สุด

13.2 ความยาวติดเมล็ด วัดจากส่วนท้ายฝักถึงส่วนปลายฝักที่มีเมล็ดติดสุด

13.3 ความยาวของส่วนปลายฝักที่ไม่ติดเมล็ด

14. เส้นผ่านศูนย์กลางฝัก (ear diameter) และ ความลึกเมล็ด (kernel length) ทำการวัดไปพร้อมกับการวัดความยาวฝักใช้ฝักเดียวกับที่สุ่มมา ดังนี้

14.1 ความกว้างฝัก วัดโดยการหักฝักข้าวโพดบริเวณกลางฝักทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางฝัก

14.2 ความลึกเมล็ด โดยวัดจากบริเวณของด้านนอกสุดของเมล็ดเข้ามาด้านในบริเวณที่ติดกับซังข้าวโพด

15. การทดสอบการกัดชิม (bite test) โดยใช้ผู้ทดสอบ 3 คนทดสอบการกัดชิมข้าวโพดที่สุ่ม เพื่อบอกคุณภาพในการบริโภค แบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ 1) ความนุ่มเหนียวของเนื้อ 2) รสชาติ (รวมทั้งรสและกลิ่น) 3) ความหนาบางเปลือกหุ้มเมล็ด โดยให้คะแนน 1–5 คะแนน ดังนี้

1 = มีความนุ่มเหนียวมากที่สุดรสชาติดีเยี่ยมและเปลือกเมล็ดบางมากไม่ติดฟัน

2 = มีความนุ่มเหนียมมาก รสชาติดี และเปลือกเมล็ดบางไม่ติดฟัน

3 = มีความนุ่มเหนียวปานกลางรสชาติดีพอใช้เปลือกเมล็ดค่อนข้างบางและติดฟัน

4 = มีความเหนียวนุ่มเล็กน้อย รสชาติไม่ดี เปลือกเมล็ดหนา ติดฟันมาก

5 =ไม่มีความเหนียวนุ่ม รสชาติแย่มาก และเปลือกเมล็ดหนามาก ไม่เป็นที่ต้องการ

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโพดใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Agrawal *et al*. (1992) มีขั้นตอนดังนี้

1. นำใบข้าวโพดประมาณ 0.2 กรัม (ใช้ใบอ่อนที่โตพอสมควร) ใส่ลงในโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วม และบดให้ละเอียด แล้วจึงถ่ายผงใบลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มิลลิลิตรที่มี 2X CTAB 6 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol 15 ไมโครลิตร ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 60 ºC

2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 ºC เป็นเวลา 60 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งทุกๆ 10 นาที

3. นำหลอดมาไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เพื่อให้อุณหภูมิลดลง เติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 :1) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500 rpm นาน 15 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำ และคลอโรฟอร์มออกจากกัน

5. ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม linear polyacrylamide 60 ไมโครลิตร เพื่อช่วยในการตกตะกอนดีเอ็นเอ และเติมไอโซโพรพานอล 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ

6. เกี่ยว DNA ไปแช่ใน แอลกอฮอล์ 70% 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ใน Eppendorf ขนาด 1.5 ml

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 rpm นาน 1 นาที เพื่อให้ตะกอนนอนก้น

8. เทแอลกอฮอล์ทิ้ง แล้วเติม washing buffer 1 มิลลิลิตร เคาะข้างหลอดเบาๆ เพื่อละลายเกลือออกจากโมเลกุลของ DNA

9. นำปั่นเหวี่ยงที่ 2800 rpm นาน 1 นาที เพื่อให้ DNA นอนก้น

10. เทส่วนน้ำทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษซับให้แห้งในอากาศ หรือนำไปใส่ใน incubator ที่ 37 ºC

11. เติม RNase buffer 500 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA ให้หมด

12. เติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC ข้ามคืน

13. สกัดเอนไซม์ RNase A และโปรตีนที่อาจหลงเหลืออยู่ออกไปด้วย ฟีนอล: คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) 400 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยกลับหลอดไปมา

14. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12500 rpm นาน 10 นาที

15 ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ สกัดซ้ำด้วย คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมา

16. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12500 rpm นาน 10 นาที

17. ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม linear polyacrylamide 6 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตรทเข้มข้น 3 โมลาร์ 30 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอน DNA ซ้ำ

18 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2800 rpm นาน 5 นาที

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

20. เทส่วนน้ำทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษซับให้แห้งหรือปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วละลายตะกอน DNAใน TE buffer 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ºC จนกว่าจะใช้ต่อไป

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

1. วิธีวัดการดูดกลืนแสงโดย spectrophotometer เป็นวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ และวัดปริมาณ DNA จากการวัดค่า optical density (OD) ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) โดยนำสารละลาย DNA ที่เตรียมไว้มาทำให้เจือจางลงตามปริมาตรที่ต้องการแล้ววัดค่า OD_{260} และนำไปหาค่าความเข้มข้นของ DNA ได้จาก

ความเข้มข้นองสารละลาย DNA (ng/ml) = OD_{260} x 50 ng/ml x dilution factor

สำหรับการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) จะใช้เพื่อคำนวณหาอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของ DNA โดยถ้าค่า OD_{260}/ OD_{280} อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 แสดงว่า DNA ที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์ แต่ถ้าอัตราส่วนสูงกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมี RNA ปนเปื้อนอยู่ และถ้าอัตราส่วนต่ำกว่า 1.7 แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของโปรตีน หรือฟีนอล

2. วิธีวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์ที่จับตัวกับดีเอ็นเอหลังจากขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีการอิเล็กโทรโฟรีซีส ทำโดยหยอดดีเอ็นเอที่เตรียมได้ปริมาตรที่แน่นอนลงในแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดและปริมาณหลายๆความเข้มข้น เมื่อสิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้ว จึงย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำส่องผ่านด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและเปรียบเทียบการเรืองแสงของดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยความเข้มแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอและปริมาณที่ตรวจสอบได้เป็นระดับนาโนกรัม นอกจากนี้ยังสามารถบอกคุณภาพดีเอ็นเอได้ด้วยว่ามีการปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอ ซึ่งจะเห็นเป็นปื้นเคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

องค์ประกอบในการทำ PCR (1 reaction; total volume 20 µl)

สารเคมี	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
ddH_2O	-
Primer, F+R (1.0 µM each)	0.25 µM each
Taq Buffer (10X; Mg-free)	1X
$MgCl_2$ (50 mM)	2.5 mM
Glycerol (100%) (optinal)	10%
dNTP mix (2.5 mM each)	150 µM each
Taq Enzyme (5U/µl)	1 U
DNA (10 ng/µl)	50 ng

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

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

การแยกขนาดดีเอ็นเอ

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

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล *phi022* จะใช้ agarose gel electrophoresis ในการแยกดีเอ็นเอ โดยใช้ 4% agarose gel ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 135โวลล์ ประมาณ 40-45 นาที และย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟนและโปรตีนในเอนโดสเปิร์ม

วิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนและทริปโตแฟนในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดของสายพันธุ์อินเบรดที่คัดเลือกไว้ ตามวิธีการของ Nurit *et al*. (2009) โดยมีขั้นตอนการเตรียมเมล็ด ดังนี้

1. สุ่มตัวอย่างเมล็ดประมาณ 20-30 เมล็ด แช่น้ำกลั่นประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นลอกเอาเพอริคาบ (pericarp) และแกะส่วนของเอมบริโอ (embryo) ออก ผึ่งลมให้แห้ง

2. บดเอนโดสเปิร์ม (embryo) ที่ 0.08 มิลลิเมตรด้วยเครื่อง Cyclone mill

3. สกัดไขมันด้วยเครื่องสกัดไขมันด้วยเครื่อง Extraction Unit 13-811 โดยใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย ทิ้งไว้ให้แห้ง เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์โปรตีนและวิเคราะห์ทริปโตแฟนต่อไป

การวิเคราะห์โปรตีนในเมล็ด เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ด้วยวิธี Micro-kjedahl (Bailey, 1967) แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์โปรตีนในเมล็ด (N x 6.25) โดยมีขั้นตอนดังนี้ (แสดงวิธีการเตรียมสารเคมีในภาคผนวกที่ ก1)

1. ชั่งตัวอย่าง 20 มิลลิกรัมใส่ในหลอดสำหรับ digest เติมผง catalyst 1 กรัม และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร

2. นำไปย่อย (digest) ประมาณ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 350 °C ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเจือจางสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่มีฝาปิด

3. ใส่สารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในเครื่องกลั่น

4. วาง flask ที่บรรจุสารละลาย boric acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตรผสมกับ indicator 2-3 หยด ใต้ตัวควบแน่น (condenser) โดยให้ปลายท่อจุ่มลงไปในสารละลายภายใน flask

5. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กลั่นจนได้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

6. ไตเตรทด้วย H_2SO_4 จนกระทั่งสีของสารละลายใน flask เปลี่ยนเป็นสีเริ่มต้น บันทึกปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้

7. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนได้จาก

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ทริปโตแฟนทำตามวิธีการของ Nurit *et al*.(2009) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (แสดงขั้นตอนการเตรียมสารเคมีในภาคผนวกที่ ก2)

1. ชั่งตัวอย่าง 30 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอด Eppendorf เติมสารละลาย papain ปริมาตร 1.125 มิลลิลิตร (สำหรับ blank เติมสารละลาย papain เพียงอย่างเดียว)

2. บ่มตัวอย่างไว้ข้ามคืน (16 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแรก นำตัวอย่างมาเขย่า

3. เมื่อบ่มตัวอย่างครบ 16 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมาเขย่าอีกครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 3600 rpm 5 นาที

4. ดูดส่วนใสด้านบน ปริมาตร 666 ไมโครลิตรใส่หลอดทดลองใหม่ เติม reagent D ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

5. นำตัวอย่างที่เย็นแล้ว ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร

6. กราฟมาตรฐานเตรียมได้จาก DL-tryptophan ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0, 10, 15, 20, 25 และ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

7. คำนวณหาเปอร์เซนต์ทริปโตแฟนได้จาก

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

การวิเคราะห์ปริมาณของอะมิโลเปคติน

การตรวจสอบปริมาณแป้งในแต่ละประชากรประกอบด้วย อะมิโลสและอะมิโลเปคติน ตามวิธีของ Juliano (1971) โดยมีขั้นตอน ดังนี้ (แสดงขั้นตอนการเตรียมสารเคมีในภาคผนวกที่ ก3)

1.ตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดลอก pericarp ออก จากนั้นทำการบดเมล็ดโดยใช้โกร่งบดให้ละเอียดจนได้ตัวอย่างอย่างน้อย 0.1 กรัม

2. เตรียมสารละลายมาตราฐานอะมิโลส 0.04 กรัม ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 95% 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1N 9 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืน สังเกตการเกิดเจลาติไนเซชั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากันดี

3.การเตรียมตัวอย่างทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตราฐานโดยชั่งตัวอย่าง 0.1กรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การวิเคราะห์ตัวอย่าง ดูดสารละลายจากข้อ 3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น70 มิลลิลิตร ดูดสารละลายกรดอะซิติก 1N 1 มิลลิลิตร และดูดสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทำเช่นเดียวกันอีกแต่ไม่ใส่ตัวอย่างเพื่อใช้เป็น blank

5. การเตรียม standard graph ดูดสารละลายมาตราฐานจากข้อ 2 ปริมาตร 1, 2, 3, 4, และ 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตร ดูดสารละลายกรดอะซิติก 1N ปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วที่มีสารละลายมาตราฐานตามลำดับ และดูดสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

6. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตราฐานที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และเขียนกราฟระหว่าง อะมิโลส (กรัม/แป้ง 100 กรัม หรือคิดเป็นร้อยละ 8, 16, 24, 32 และ 40) กับค่าการดูดกลืนแสง

7. การเปลี่ยนค่าดูดกลืนแสงเป็นปริมาณอะมิโลส นำค่าการดูดกลืนแสงที่ปริมาณตัวอย่าง 0.1 กรัม ของแต่ละตัวอย่าง เทียบกับกราฟมาตราฐานแล้วอ่านค่าเป็นร้อยละของอะมิโลสต่อแป้ง 100 กรัม

การวิเคราะห์ Total Sugar and Reducing Sugar

โดยการตรวจสอบคุณภาพในแต่ละประชากรประกอบด้วยปริมาณน้ำตาล ได้แก่ reducing sugar, non-reducing sugar และ total sugar ตามวิธีของ Nelson (1944) มีขั้นตอนดังนี้ (แสดงขั้นตอนการเตรียมสารเคมีในภาคผนวกที่ ก4)

1. เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่มีอายุประมาณ 18–20 วัน นับจากวันที่ทำการผสมเกสร
2. ฝานตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 20–25 กรัม
3. ทำการบดเมล็ดข้าวโพดโดยใช้ blender ให้ละเอียดที่สุด พร้อมกับเติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากับน้ำหนักของตัวอย่างที่ชั่ง นำตัวอย่างที่บดกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อต้องการสารแขวนลอยนำไปใส่ centrifuge tube (ขนาดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเครื่อง centrifuge)
4. ทำการ balancing ตัวอย่างก่อนปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 10000 rpm. เวลา 20 นาที
5. เมื่อปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของสารแขวนลอยเรียบร้อยแล้ว กรองด้วยกระดาษกรองใส่หลอดทดลองจนได้สารละลายในที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. เตรียมสารละลายเพื่อทำการวัด Total Sugar และ Reducing Sugar โดยการดูดสารละลาย 100 µl และเติมน้ำกลั่น 7.45 ml. ใส่ในหลอดทดลองใหม่

การวิเคราะห์ Total Sugar

1. ดูดสารละลายที่สกัดเจือจาง 1 มิลลิลิตร เติม 0.1N HCl 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำหลอดทดลองมาแช่น้ำเย็นหรือทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

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

การวิเคราะห์ Reducing Sugar

1. ดูดสารละลายที่สกัดเจือจาง 1 มิลลิลิตร นำไปหาน้ำตาลตามวิธีของ Nelson's reducing sugar

Nelson's reducing sugar

1. ดูดสารละลายตัวอย่างเติม alkalic copper reagent 1 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ100 °C 15 นาที แล้วนำหลอดทดลองมาแช่น้ำเย็นหรือทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. เติม arsenomolybdic reagent 1 มิลลิลิตร (Nelson's reagent) เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 12.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์โดยการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 500 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์สัดส่วนของยีโนไทป์ที่ได้จากการตรวจสอบต้นข้าวโพดด้วยดีเอ็นเอในแต่ละชั่วโดยใช้ R-program ด้วยวิธีการวิเคราะห์ Chi-square ส่วนการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อดูความแตกต่างของแป้ง โปรตีน และปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีน วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (complete block design, CRD) (ตารางที่ 1) ทำจำนวน 2 ซ้ำในแต่และยีโนไทป์ที่ทดสอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งความแปรปรวนของแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์

Source of variation	Degree of freedom
Treatments	t–1
Error	t(r-1)
Total	tr-1

หมายเหตุ r = จำนวนซ้ำ, t = จำนวนสิ่งทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูลผลผลิตทั้งหมดของลูกผสมที่เกิดจากการผสมแบบพบกันหมด (diallel cross) ของสายพันธุ์อินเบรดของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* (o_2o_2wxwx) ตามวิธีการของ Griffing's Method IV (Griffing, 1956) ปลูกทดสอบผลผลิต วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCBD) (ตารางที่ 2) จำนวน 4 ซ้ำ ขนาดแปลงย่อย (plot size) แถวยาว 5 เมตร จำนวน 4 แถว ระยะปลูก 0.75 x 0.25 เมตร วิเคราะห์สมรรถนะการผสมทั่วไป (GCA) และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) โดยใช้ R-program (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 แสดงแหล่งความแปรปรวนของแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์

Source of variation	Degree of freedom
Replications	r – 1
Treatments	t – 1
Error	(r – 1)(t – 1)
Total	tr - 1

หมายเหตุ r = จำนวนซ้ำ, t = จำนวนสิ่งทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 แสดงแหล่งความแปรปรวนของการวิเคราะห์สมรรถนะการผสมโดยวิธีของ Griffing's method IV ด้วย R-program

Source of variation	d.f.	MS
Replication	r-1	
Treatment	t-1	MS_t
GCA	p-1	MS_g
SCA	p(p-3)/2	MS_s
Error	(r-1)(t-1)	Ms_e
Total	rt-1	

หมายเหตุ r = จำนวนซ้ำ, t = จำนวนขอสิ่งทดลอง, p = จำนวนสายพันธุ์พ่อแม่

สถานที่ทำการทดลอง

1. ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
2. ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
3. ภาควิชาพืชไร่นา วิทยาเขตกำแพงแสนและบางเขน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2550 สิ้นสุดการทดลองเดือนมกราคม 2553

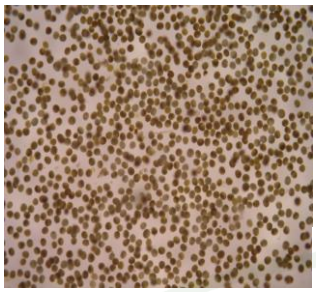
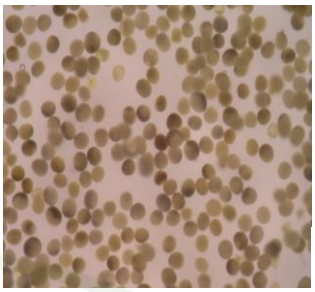
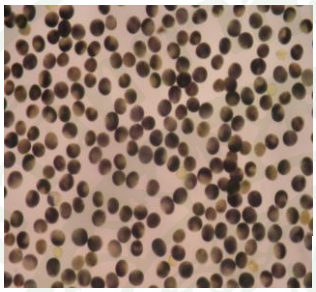
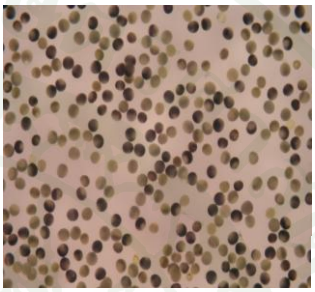
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

หลังจากนำสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดข้าวเหนียว (O_2O_2wxwx) ผสมกับข้าวโพดไร่ QPM ที่มียีน *opaque-2* (o_2o_2WxWx) ได้ลูกผสมชั่วแรก (F_1) แล้วเพื่อเพิ่มลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวให้มากขึ้นจึงใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ (backcross) ไปยังพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) พบว่า เมล็ดมีลักษณะคล้ายข้าวโพดไร่และข้าวโพดข้าวเหนียวปนกันอยู่ในฝักเดียวกัน (ภาพที่ 1) เนื่องจาก xenia effect คือ เมื่อไข่และละอองเกสรที่เป็น *waxy* ผสมกันจะแสดงลักษณะเป็นข้าวโพดข้าวเหนียวส่วนที่เหลือเป็นข้าวโพดไร่ (กฤษฎา, 2544) เมื่อนำเอาละอองเกสรไปตรวจสอบด้วยสารละลาย I_2KI พบว่า ข้าวโพดไร่ *opaque-2* (Q53) ละอองเกสรติดสีน้ำเงิน ส่วนข้าวโพดข้าวเหนียวละอองเกสรติดสีน้ำตาลแดง ขณะที่ในรุ่นลูก กล่าวคือ ถ้าเป็นต้นที่มียีโนไทป์เป็น *Wxwx* จะให้ละอองเกสรทั้งสองประเภท แต่ถ้ามียีโนไทป์เป็น *wxwx* ก็จะให้ละอองเกสรสีน้ำตาลแดงทั้งหมด (ภาพที่ 2) ดังนั้นการตรวจสอบละอองเกสรด้วย I_2KI ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *waxy* ซึ่งปกติจะแสดงออกทั้งที่ละอองเกสรและเมล็ด (Brink and MacGillivray, 1924)

ภาพที่ 1 ลักษณะเมล็ดของข้าวโพดข้าวเหนียวได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์


(a)

(b)

(c)

(d)

ภาพที่ 2 ลักษณะละอองเกสร ในสารละลาย I_2KI (a) ข้าวโพดข้าวเหนียว (Kwi1), (b) ข้าวโพดข้าวเหนียว (Kwi9), (c) ข้าวโพด QPM (Q53) และ (d) ข้าวโพดข้าวเหนียวผสมกับข้าวโพด QPM (F_1)

การตรวจสอบยีนด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

การตรวจสอบยีน *opaque-2* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* ในลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) พบว่ายีนที่ตำแหน่ง *opaque-2* เป็นเฮเทอโรไซโกท (O_2o_2) แสดงว่าลูกชั่วแรกเกิดจากการผสมข้ามระหว่างข้าวโพดข้าวเหนียวซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์แม่ กับข้าวโพดไร่ QPM อย่างถูกต้อง จากนั้นนำลูกผสมชั่วที่ 1 นี้ผสมกลับไปยังสายพันธุ์แม่พันธุ์เดิมของแต่ละคู่ผสม และเมื่อนำลูกมาปลูก ซึ่งเรียกว่าลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ในคู่ผสม Kwi1 x Q53 (BC_1F_1) ตรวจสอบข้าวโพดจำนวน 37 ต้น ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* พบว่าเกิดโพลิมอร์ฟิซึมแบบ homozygous dominant (O_2O_2) จำนวน 15 ต้น และ heterozygote (O_2o_2) จำนวน 22 ต้น ส่วนคู่ผสม Kwi9 x Q53 (BC_1F_1) ตรวจสอบข้าวโพดจำนวน 56 ต้น ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเดียวกัน พบว่าเกิดโพลิมอร์ฟิซึมแบบ homozygous dominant (O_2O_2) จำนวน 25 ต้น และ heterozygote (O_2o_2) จำนวน 31 ต้น (ตารางที่ 4) จากการวิเคราะห์ไคสแควร์ (chi-square) พบว่าอัตราส่วนระหว่าง O_2O_2: O_2o_2 ของลูกผสมกลับ

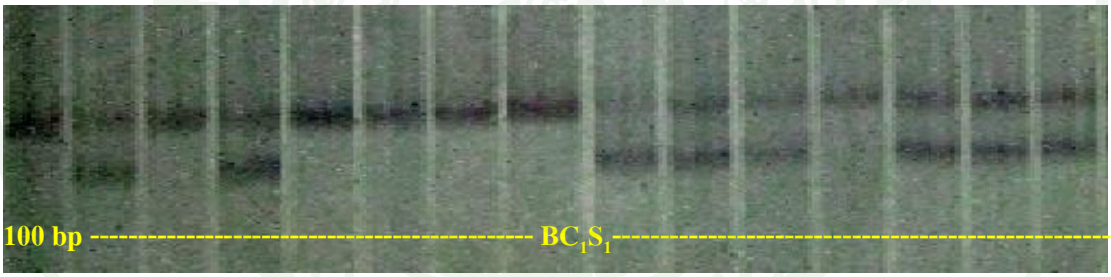
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ของทั้งสองคู่ผสมเป็นอัตราส่วน 1 : 1 ซึ่งเป็นไปตามหลักการทางพันธุศาสตร์ของการผสมกลับสำหรับยีนหนึ่งตำแหน่ง (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 4 ยีโนไทป์ของข้าวโพดที่มียีน *opaque-2* ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057*

คู่ผสม	จำนวนต้น	Homozygous dominant (O_2O_2)	Heterozygous (O_2o_2)	Chi- square test ($1O_2O_2 : 1O_2o_2$)
Kwi1xQ53	37	15 (40.5%)	22 (59.5%)	ns
Kwi9xQ53	56	25 (46.4%)	31 (55.4%)	ns

หมายเหตุ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 3 ผลการตรวจสอบข้าวโพด QPM (Q53) และสายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* เพื่อตรวจสอบยีน *opaque-2* ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1S_1)

จากนั้นคัดเลือกต้นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) เฉพาะต้นที่เป็น heterozygous (O_2o_2) แล้วนำมาผสมตัวเองได้รุ่นลูกเรียกว่า BC_1S_1 ในทางทฤษฎีแล้ว ลูกในชั่วนี้จะมีการกระจายตัวของยีนที่ตำแหน่งของยีน *opaque-2* เป็น $1O_2O_2 : 2O_2o_2 : 1o_2o_2$ ดังนั้น ในฤดูปลูกถัดมาปลูก BC_1S_1 สุ่มต้นข้าวโพดและตัดใบมาสกัดดีเอ็นเอแล้วคัดเลือกต้นข้าวโพดด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* โดยคู่ผสม Kwi1 x Q53 (BC_1S_1) สุ่มเลือกต้นข้าวโพดที่มาลักษณะค่อนมาทางข้าวโพดข้าวเหนียว มาจำนวน 36 ต้น ผลการทดลองพบว่า ต้นที่เป็น homozygous dominant จำนวน 16 ต้น ที่เป็น heterozygous จำนวน 15 ต้น และต้นที่เป็น homozygous recessive จำนวน 5 ต้น (ตารางที่ 5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนในคู่ผสม Kwi9 x Q53 สุ่มเลือกมาจำนวน 74 ต้น พบว่า ต้นที่เป็น homozygous dominant จำนวน 31 ต้น ที่เป็น heterozygous จำนวน 36 ต้น และต้นที่เป็น homozygous recessive จำนวน 7 ต้น เมื่อนำมาทดสอบไคสแควร์ พบว่าการกระจายตัวของยีโนไทป์ที่ทดสอบแตกต่างกันออกไปจากสัดส่วนที่กล่าวไว้ในทฤษฎี กล่าวคือ $1O_2O_2 : 2O_2o_2 : 1o_2o_2$ (ตารางที่ 5) สัดส่วนที่ได้ไม่เป็นไปตามทฤษฎี ทั้งนี้อาจมาจากตัวอย่างที่เก็บมา เกิดจากการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะค่อนไปทางข้าวโพดข้าวเหนียว ซึ่งไม่ได้มาจากการสุ่มที่แท้จริง ทั้งนี้เนื่องจากต้องการข้าวโพดที่มีลักษณะของข้าวโพดข้าวเหนียวและมียีน *opaque-2* จึงคัดเลือกลักษณะฟีโนไทป์ก่อน จากทั้งสองคู่ผสมได้ข้าวโพดที่เป็น homozygous recessive ทั้ง 12 ต้น แล้วผสมตัวเอง (self) จากนั้นจะต้องนำไปตรวจสอบว่าข้าวโพดข้าวเหนียวที่ควบคุมด้วยยีน *wxwx* อีกครั้งหนึ่ง เพื่อหาต้นที่เป็นที่เป็น homozygous recessive ของทั้งสองยีน

ตารางที่ 5 ยีโนไทป์ของข้าวโพดที่มียีน *opaque-2* ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1S_1 เมื่อตรวจสอบด้วย เครื่องหมายโมเลกุล *phi057*

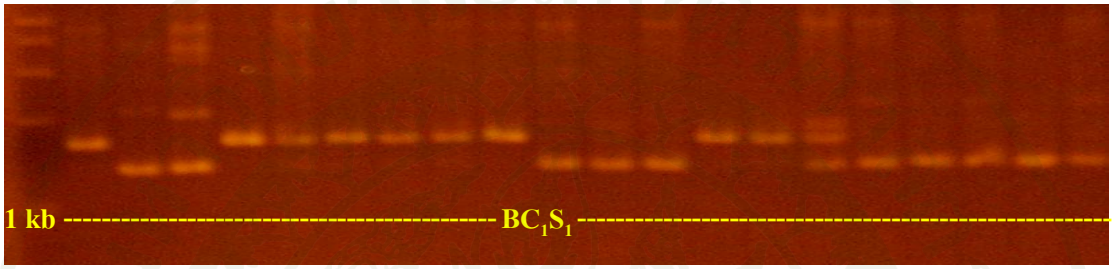
คู่ผสม	จำนวนต้น	Homozygous Dominant (O_2O_2)	Heterozygous (O_2o_2)	Homozygous recessive (o_2o_2)	Chi-square test $1O_2O_2:2O_2o_2:1o_2o_2$
Kwi1xQ53	36	16 (44.4%)	15 (41.7%)	5 (13.9%)	*
Kwi9xQ53	74	31 (41.9%)	36 (48.6%)	7 (9.5%)	**
Total	110	47 (42.7%)	51 (46.4%)	12 (10.9%)	**

หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

เมื่อนำลูกที่เป็น homozygous recessive ของยีน *opaque-2* ในชั่ว BC_1S_1 มาตรวจสอบยีน *waxy* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi022* (ภาพที่4) พบว่ามีการกระจายตัวของยีโนไทป์ดังแสดงในตารางที่ 6 เมื่อตรวจสอบการกระจายตัวของยีนพบว่า การกระจายของยีน *waxy* ไม่ปืนไปตามทฤษฎี ทั้งนี้เนื่องจากได้มีการคัดเลือกพืชที่มีเฉพาะยีน *opaque-2* ก่อน และประชากรมีขนาดเล็ก ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหลักทำให้การกระจายตัวของยีนต่างไปจากทฤษฎี อย่างไรก็ตาม การวิจัยนี้ต้องการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้าวโพดที่มียีนทั้ง *opaque-2* และ *waxy* ในต้นเดียวกันที่เป็น recessive gene ทั้งคู่ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ได้ต้นที่เป็น homozygous recessive ของยีนทั้งสองจำนวน 4 และ 1 ต้น ในคู่ผสม Kwi1 x Q53 และ Kwi9 x Q53 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) แล้วพันธุ์แบบผสมตัวเองเพื่อเพิ่มความคงตังทางพันธุกรรม ในฤดูปลูกถัดมานำลูกที่เป็น homozygous recessive ของยีน *opaque-2* ในชั่ว BC_1S_2 มาตรวจสอบยีน *opaque-2* และ *waxy* อีกครั้งหนึ่งด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* และ *phi022* ตามลำดับ จากคู่ผสม Kwi1 x Q53 จำนวน 4 ต้น และ Kwi9 x Q53 จำนวน 1 ต้น (ภาพที่ 5 และ 6)



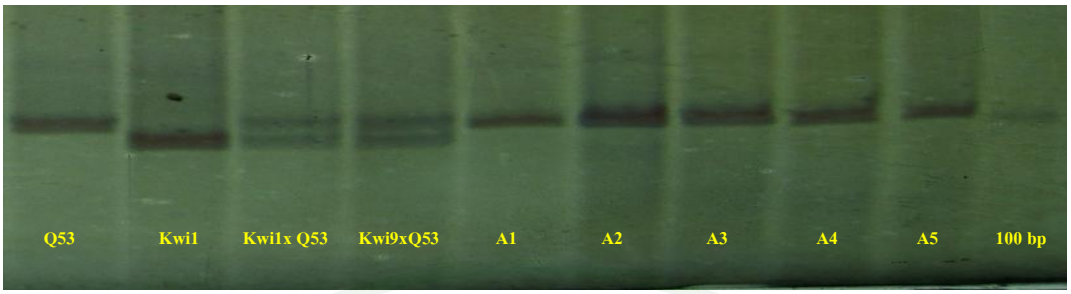
ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบข้าวโพด QPM (Q53) และสายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi022* เพื่อตรวจสอบยีน *waxy* ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1S_1)

ตารางที่ 6 ยีโนไทป์ของข้าวโพดที่มียีน *waxy* ในรุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1S_1 เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi022*

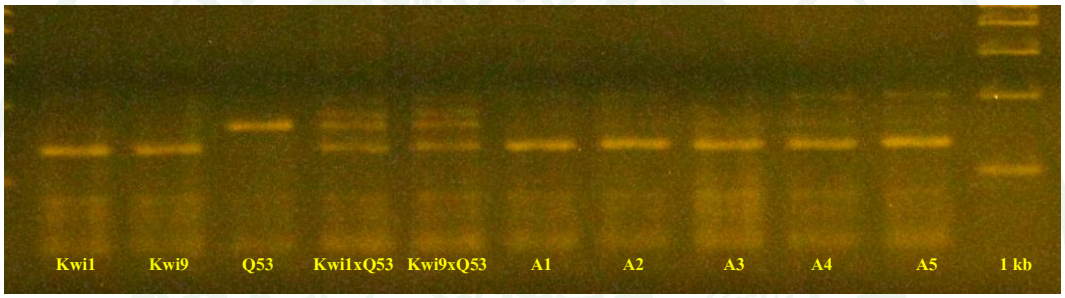
คู่ผสม	จำนวนต้น	Homozygous doinant (*WxWx*)	Heterozygous (*Wxwx*)	Homozygous recessive (*wxwx*)	Chi-square test (1*WxWx*:2*Wxwx*:1 *wxwx*)
Kwi1×Q53	4	-	-	4 (100%)	**
Kwi9×Q53	7	4 (57.1%)	2 (28.6%)	1 (14.3%)	**
Total	11	4 (36.4%)	2 (18.2%)	5 (45.5%)	**

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* รุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1S_2) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi057* เพื่อตรวจสอบยีน *opaque-2*



ภาพที่ 6 แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* รุ่นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1S_2) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *phi022* เพื่อตรวจสอบยีน *waxy*

การพัฒนาสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีปริมาณทริปโตแฟนสูง

ข้าวโพดในรุ่นลูกผสมกลับ (BC_1F_1) คัดเลือกเฉพาะต้นที่ให้โพลีมอร์ฟิซึมเป็น heterozygous (O_2o_2) ด้วย *phi057* ซึ่งเป็น co-dominant marker แยกความแตกต่างของข้าวโพดที่เป็น homozygous dominant (O_2O_2), heterozygous (O_2o_2)และ homozygous recessive (o_2o_2) ที่ตำแหน่ง 140-160 bp (Chin *et al*., 1996) เครื่องหมายโมเลกุล *phi057* จะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 160 bp สำหรับอัลลีล O_2 และ 170 bp สำหรับอัลลีล o_2 (Babu *et al*., 2005) จากลักษณะดังกล่าวจึงได้มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกอัลลีล o_2 (Ribaut and Hoisington, 1998) เช่นเดียวกับในการทดลองของ Jompuk *et al*., (2006 and 2007) จากนั้นผสมตัวเองอีก 1 ครั้ง ได้ลูกผสมกลับ (BC_1S_1) และ ผสมตัวเองจนกระทั่ง (BC_1S_2) คัดเลือกเฉพาะต้นที่เป็น double homozygous recessive ด้วย *phi057* (o_2o_2) และ *phi022* (*wxwx*) โดยที่ *phi022* ซึ่งเป็น co-dominant marker แยกความแตกต่างของข้าวโพดที่เป็น *WxWx*, *Wxwx* และ *wxwx* ที่ตำแหน่ง 124-148 bp (Yuan *et al*., 2002) จากนั้นผสมตัวเองเพื่อพัฒนาสายพันธุ์พร้อมกับคัดเลือกลักษณะทางคุณภาพ จำนวน 5 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ตารางที่ 7) พบว่า ลักษณะทางคุณภาพ (biochemical traits) ได้แก่ ทริปโตแฟน (%) อะมิโลเปคติน (%) โปรตีน (%) และ น้ำตาล (mg/g) มีความแตกต่างทางสถิติ และขณะที่ปริมาณทริปโตแฟน (%) ทั้ง 5 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ Kwi1 และ Kwi9 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่มียีน o_2o_2 พบว่า สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่มียีน o_2o_2 มีปริมาณทริปโตแฟนในโปรตีนในเมล็ดสดระหว่าง 0.82-1.31% และในเมล็ดแห้ง 0.87-1.10% ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบทั้งสองพันธุ์ และยังแสดงให้เห็นว่าการเก็บข้าวโพดฝักสดที่อายุ 21 วันหลังจากการผสม ปริมาณของทริปโตแฟนได้สะสมเต็มที่แล้ว เช่นเดียวกับเมล็ดที่สุกแก่เต็มที่ ในการวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์ทริปโตแฟนเพียงอย่างอย่างเดียว ไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณไลซีนทั้งนี้เนื่องจากไลซีน และทริปโตแฟน มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากโดยในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพด *opaque-2* ถ้าค่าปริมาณของ ทริปโตแฟนในโปรตีนมีค่าสูงจะพบว่าค่าปริมาณของไลซีนสูงเช่นเดียวกัน โดยมีสัดส่วนประมาณ 1:4 ของทริปโตแฟน : ไลซีน (Hernandez and Bates, 1969; Prasanna *et al*., 2001)

สำหรับปริมาณโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของสายพันธุ์อินเบรดเมล็ดสดมีค่าระหว่าง 7.98-10.41% ในขณะที่สายพันธุ์ Kwi1 และ Kwi9 มีค่า 8.49 และ 10.88 ตามลำดับ และสายพันธุ์อินเบรดเมล็ดแห้งมีค่าระหว่าง 8.09-11.50% ในขณะที่สายพันธุ์ Kwi1 และ Kwi9 มีค่า 7.65 และ 11.08 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พบว่า ปริมาณโปรตีนของสายพันธุ์ข้าวโพดทั้งหมดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 7) จากผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Vasal (1994) และ Jompuk *et al*. (2007) ที่พบว่าปริมาณโปรตีนในเอนโดสเปิร์มของข้าวโพดปกติและข้าวโพด *opaque-2* มีปริมาณใกล้เคียงกัน

ลักษณะทางการเกษตรของสายพันธุ์อินเบรดที่แสดงในตารางที่ 8 พบว่า วันออกไหม 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 50-54 วัน ส่วนวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 51-54 วัน ขณะที่พันธุ์เปรียบเทียบ วันออกไหมและ วันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซนต์ อยู่ในช่วง 56-57 วันและ อยู่ที่ 56 วัน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาพบว่า มีวันออกไหมสายพันธุ์อินเบรดออกดอกเร็วกว่าพันธุ์เปรียบเทียบ 2-6 วัน และวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ เร็วกว่าพันธุ์เปรียบเทียบ ประมาณ 2-5 วัน อย่างไรก็ตาม วันออกไหม และวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกันหรือต่างกัน 1 วัน จึงเหมาะแก่การนำไปใช้ผลิตลูกผสมทางการค้า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของลักษณะคุณภาพของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* จำนวน 5 สายพันธุ์และสายพันธุ์เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์

สายพันธุ์	%ทริปโตแฟน		% อะมิโลเปกติน		% โปรตีน		น้ำตาล (mg/g)	
	เมล็ดสด	เมล็ดแห้ง	เมล็ดสด	เมล็ดแห้ง	เมล็ดสด	เมล็ดแห้ง	TS[/1]	non-RS[/2]
A1	0.82	0.87	95.60	96.15	8.78	9.50	76.34	40.13
A2	1.09	1.10	97.54	97.10	9.75	9.04	82.73	41.25
A3	1.31	0.96	95.56	97.60	7.98	11.50	49.19	13.10
A4	0.98	0.92	95.86	95.38	9.91	8.60	108.48	61.92
A5	0.94	0.89	95.55	94.97	10.41	8.09	51.32	14.14
Kwi1	0.62	0.53	95.94	95.80	8.49	7.65	43.87	12.59
Kwi9	0.71	0.52	95.72	96.06	10.88	11.08	70.76	33.78
F-test	**	**	**	*	ns	ns	**	**
LSD.05	0.25	0.27	1.02	1.50	-	-	21.86	14.58
%CV	17.13	13.56	0.73	0.66	14.26	13.90	21.56	31.99

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

ความสูงต้นเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 99-132 เซนติเมตร โดยที่พันธุ์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ Kwi1 และ Kwi9 มีความสูง 90 และ 104 เซนติเมตร ตามลำดับความสูงฝักเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 54-71 เซนติเมตร ซึ่งสูงเท่าค่าเฉลี่ยของพันธุ์เปรียบเทียบซึ่งอยู่ระหว่าง 48-58 เซนติเมตร

น้ำหนักผลผลิตทั้งเปลือกและปอกเปลือกมีความแตกต่างทางสถิติ โดยที่สายพันธุ์ A1 ให้ผลผลิตสูงที่สุด โดยมีผลผลิต 1,383 กิโลกรัมต่อไร่ และ 892 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ ส่วน Shelling (%) และ Cutting (%) พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน โดยที่ Kw1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบให้ค่าสูงที่สุด โดย Shelling (%) เท่ากับ 76.90% ส่วนสายพันธุ์ A3 ให้ Shelling (%) และ Cutting (%) สูงที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยของลักษณะทางการเกษตรของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* จำนวน 5 สายพันธุ์และสายพันธุ์เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์

สายพันธุ์	วันออกดอก(50%)		ความสูง(cm.)		น้ำหนักทั้งเปลือก	น้ำหนักปอกเปลือก	Shelling	Cutting
	ดอก	ไหม	ต้น	ฝัก	(กก./ไร่)	(กก./ไร่)	(%)	(%)
A1	54.00	50.00	107.5	56.25	1383.36	891.6	32.25	39.13
A2	53.00	53.00	115.83	58.33	818.56	396.97	48.36	52.07
A3	51.00	52.00	99.38	54.38	969.32	600.41	62.11	53.97
A4	54.00	54.00	131.88	70.63	1027.06	543.77	53.03	46.31
A5	54.00	54.00	116.88	63.13	778.16	251.26	34.97	29.00
Kwi1	56.00	57.00	90.00	48.13	1152.49	768.25	76.90	48.74
Kwi9	56.00	59.00	104.38	57.5	755.96	429.34	55.58	40.96
F-test	**	**	**	*	**	**	**	*
LSD.05	3.03	3.89	18.10	13.41	329.93	228.77	12.98	11.19
%CV	3.16	4.03	10.07	13.94	19.27	26.14	15.53	17.00

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

ลักษณะคุณภาพและลักษณะทางการเกษตรสายพันธุ์ลูกผสม

จากการผสมแบบพบกันหมดของสายพันธุ์ผสมกลับ 5 สายพันธุ์ ได้ลูกผสม 10 คู่ผสม เมื่อนำมาปลูกประเมินสายพันธุ์ (yield trial) (ตารางที่ 9) พบว่าลักษณะคุณภาพ (biochemical traits) มีความแตกต่างทางสถิติโดยเฉพาะ ปริมาณทริปโตแฟน (%) ในตัวอย่างเมล็ดสด (freshed) ให้ค่าสูงกว่าสายพันธุ์ บิ๊กไวท์ (BW) และรัชตะ (RAT) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่มียีน o_2o_2 เช่นเดียวกับตัวอย่างเมล็ดแห้ง (dried) ส่วนปริมาณอะมิโลเปคติน (%) ในตัวอย่างเมล็ดสด (freshed) และ ตัวอย่างเมล็ดแห้ง (dried) พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยสายพันธุ์ลูกผสมมีปริมาณอะมิโลเปคติน อยู่ในช่วงระหว่าง 95-99% เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เปรียบเทียบ 2 พันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ลูกผสมมีค่าใกล้เคียงกับพันธุ์เปรียบเทียบ โดยมีปริมาณอะมิโลเปคติน อยู่ในช่วงระหว่าง 95-96% ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Boyer and Hannah (2001) กล่าวว่ายีน *waxy* ในข้าวโพดข้าวเหนียวจะสะสมแป้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อะมิโลเปคตินเกือบ 100% ส่วนปริมาณน้ำตาล (mg/g) มีความแตกต่างทางสถิติ พบว่าปริมาณน้ำตาล (mg/g) ในพันธุ์เปรียบเทียบ 2 พันธุ์ให้ค่าสูงกว่าสายพันธุ์ลูกผสมที่ทำการทดสอบทั้งใน total sugar และ non-reducing sugar

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยของลักษณะคุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* จำนวน10 คู่ผสม และพันธุ์เปรียบเทียบ

สายพันธุ์	%ทริปโตแฟน		% อะมิโลเปกติน		น้ำตาล (mg/g)	
	เมล็ดสด	เมล็ดแห้ง	เมล็ดสด	เมล็ดแห้ง	TS[/1]	non-RS[/2]
A1 x A4	1.12	1.25	95.62	97.67	76.87	36.57
A2 x A4	0.83	0.91	96.22	96.46	67.02	19.14
A3 x A4	0.99	0.99	95.88	95.38	53.36	24.77
A5 x A4	0.62	0.95	95.00	93.97	46.81	19.86
A1 x A3	0.94	0.83	95.58	97.19	60.85	27.49
A2 x A3	0.95	0.79	95.83	98.10	38.26	13.42
A5 x A3	1.03	1.00	96.46	96.07	43.18	11.64
A2 x A1	0.82	1.02	95.87	99.41	31.15	12.28
A5 x A1	1.29	0.53	95.21	95.94	45.21	10.45
A5 x A2	1.16	0.79	95.41	97.88	39.00	11.69
BW	0.53	0.50	95.22	96.36	85.91	39.95
RAT	0.50	0.56	95.92	94.82	81.13	24.17
F-test	**	**	ns	ns	**	**
LSD.05	0.34	0.32	-	-	16.64	10.83
%CV	26.10	17.26	0.66	1.42	20.82	36.02

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

ลักษณะทางการเกษตรของลูกผสมที่แสดงใน ตารางที่ 10 วันออกไหม และวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 55-59 วัน ขณะที่พันธุ์เปรียบเทียบ มีวันออกไหมและวันออกดอกตัวผู้ 50 เปอร์เซนต์ อยู่ในช่วง 50-51 วัน เมื่อพิจารณาพบว่า มีวันออกไหม และวันออกดอกตัวผู้ 50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์ ช้ากว่าพันธุ์เปรียบเทียบ ประมาณ 5-8 วัน ส่วนความสูงต้น อยู่ระหว่าง 139-174 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์บิ๊กไวท์ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมเดี่ยวทางการค้า มีความสูง 131 เซนติเมตร และเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์รัชตะ ซึ่งเป็นพันธุ์ผสมเปิด มีความสูง 166 เซนติเมตร ส่วนความสูงฝัก อยู่ระหว่าง 79-98 เซนติเมตร และพันธุ์เปรียบเทียบ มีความสูงฝักอยู่อยู่ระหว่าง 69-93 เซนติเมตร

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยของลักษณะทางการกษตรของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* จำนวน10 คู่ผสมและพันธุ์เปรียบเทียบ

สายพันธุ์	วันออกดอก(50%)		ความสูง(cm.)		น้ำหนักทั้งเปลือก	น้ำหนักปอกเปลือก	Shelling	Cutting
	ดอกตัวผู้	ไหม	ต้น	ฝัก	(กก./ไร่)	(กก./ไร่)	(%)	(%)
A1 x A4	56.00	56.00	155.00	87.00	1721.00	1155.00	67.62	47.44
A2 x A4	57.00	55.00	166.00	92.00	1927.00	1524.00	79.41	47.63
A3 x A4	55.00	56.00	173.00	98.00	2128.00	1545.00	72.70	61.28
A5 x A4	56.00	58.00	168.00	93.00	1907.00	1268.00	66.71	55.53
A1 x A3	55.00	55.00	165.00	92.00	2251.00	1702.00	75.10	47.28
A2 x A3	56.00	58.00	167.00	96.00	1660.00	1162.00	70.12	55.21
A5 x A3	56.00	59.00	148.00	81.00	1467.00	1025.00	70.22	57.14
A2 x A1	56.00	58.00	174.00	98.00	1895.00	1362.00	71.31	51.39
A5 x A1	57.00	56.00	139.00	79.00	2048.00	1479.00	74.83	48.44
A5 x A2	57.00	59.00	170.00	95.00	1383.00	953.00	71.21	48.42
BW	50.00	51.00	131.00	69.00	1543.00	1085.00	70.30	36.28
RAT	50.00	51.00	166.00	93.00	1759.00	1210.00	68.82	39.54
F-test	**	**	ns	ns	**	**	ns	**
LSD.05	1.24	1.95	-	-	414.21	326.18	-	9.70
%CV	1.54	2.39	13.86	14.23	15.93	17.59	12.29	13.52

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลผลิตทั้งเปลือก (กิโลกรัม/ไร่) พบว่า คู่ผสม A1 x A3 ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 2,251 กิโลกรัม/ไร่ ซึ่งสอดคล้องกับผลผลิตปอกเปลือก (กก./ไร่) ที่ให้ค่าสูงที่สุดเช่นกันเท่ากับ 1,702 กิโลกรัม/ไร่ ขณะที่ Shelling (%) พบว่าคู่ผสม A2 x A4 ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 79.41% สำหรับ Cutting (%) พบว่าคู่ผสม A3 x A4 ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 61.28%

การวิเคราะห์สมรรถนะการผสม (combining ability analysis)

จากการผสมแบบพบกันหมดของสายพันธุ์อินเบรดทั้ง 5 สายพันธุ์ ตามวิธีของ Griffing's method IV จะได้ลูกผสมชั่วแรก 10 คู่ผสม เมื่อวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* อิทธิพลของสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (GCA) และสมรรถนะการรวมตัวเฉพาะ (SCA) ซึ่งมีรายงานว่าทั้ง GCA และ SCA นั้นมีความสำคัญในทุกลักษณะที่ศึกษา โดยอิทธิพลของสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (GCA) มีความสำคัญมากกว่าอิทธิพลสมรรถนะการรวมตัวเฉพาะ (SCA) (Vasal, 1994) จากการทดลองพบว่าลักษณะของผลผลิตทั้งเปลือก (ตารางที่ 11) สายพันธุ์อินเบรดที่ให้ผลผลิตดีเมื่อนำไปผสมกับสายพันธุ์อื่น (GCA) คือ สายพันธุ์ A1 นอกจากนี้ ยังมีสายพันธุ์อินเบรดที่ให้ค่าสมรรถนะการผสมทั่วไปเป็นบวกอีก คือ A4 และ A3 คู่ผสมที่ให้สมรรถนะการผสมเฉพาะสูงที่สุด คือ A5 x A1 นอกจากนี้ยังมีอีก 4 คู่ผสมที่ให้ค่าสมรรถนะการผสมเฉพาะเป็นบวกอีก คือ A2 x A1, A1 x A3, A5 x A4 และ A2 x A4

ตารางที่ 11 ค่าผลผลิตเฉลี่ยทั้งเปลือกเป็นกิโลกรัมต่อไร่ของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* ลูกผสม 10 คู่ผสม (ใต้เส้นทแยงมุม), ค่าประมาณสมรรถนะในการผสมทั่วไป (แนวเส้นทแยงมุม), และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (เหนือเส้นทแยงมุม)

ประชากรพันธุ์แม่	ประชากรพันธุ์พ่อ				
	A5	A2	A1	A3	A4
A5	**-183.28**	-109.18	206.18	-239.44	142.44
A2	1382.75	**-163.13**	32.68	-65.54	142.04
A1	2048.00	1894.75	**186.61**	175.30	-414.16
A3	1466.50	1660.25	2250.50	**50.37**	129.68
A4	1907.00	1926.75	1720.50	2128.00	**109.44**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนการวิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัวในลักษณะผลผลิตปอกเปลือก (white weight) ในตารางที่ 12 พบว่า สายพันธุ์อินเบรดที่ให้ผลผลิตดีเมื่อนำไปผสมกับสายพันธุ์อื่น (GCA) คือ สายพันธุ์ A1 นอกจากนี้ ยังมีสายพันธุ์อินเบรดที่ให้ค่าสมรรถนะการผสมทั่วไปเป็นบวกอีก คือ A4 และ A3 ส่วนสายพันธุ์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัวทั่วไปในลักษณะผลผลิตทั้งเปลือก ส่วนสมรรถนะการผสมเฉพาะ (SCA) ของผลผลิตปอกเปลือกดีที่สุด คือ คู่ผสมระหว่าง A2 x A4 นอกจากนี้ยังมีอีก 3 คู่ผสมที่ให้ค่าสมรรถนะการผสมเฉพาะเป็นบวกอีก คือ A5 x A1, A1 x A3 และ A5 x A4

ตารางที่ 12 ค่าผลผลิตเฉลี่ยปอกเปลือกเป็นกิโลกรัมต่อไร่ของข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* ลูกผสม10 คู่ผสม (ใต้เส้นทแยงมุม), ค่าประมาณสมรรถนะในการผสมทั่วไป (แนวเส้นทแยงมุม), และสมรรถนะการผสมเฉพาะ (เหนือเส้นทแยงมุม)

ประชากรพันธุ์แม่	ประชากรพันธุ์พ่อ				
	A5	A2	A1	A3	A4
A5	**-181.48**	-93.45	200.56	-165.46	58.35
A2	952.74	**-89.83**	-8.65	-120.13	222.23
A1	1479.32	1361.77	**142.75**	187.13	-379.03
A3	1025.15	1162.13	1701.97	**54.59**	98.46
A4	1268.34	1523.86	1155.18	1544.51	**73.97**

ลักษณะทางพืชไร่ของสายพันธุ์อินเบรด

สายพันธุ์อินเบรดที่สกัดได้มีอายุการเก็บเกี่ยวฝักสดอยู่ในช่วง 79-82 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เปรียบเทียบพบว่าสายพันธุ์ Kwi1 มีอายุการเก็บเกี่ยวฝักสดที่ 76 วันซึ่งมีอายุการเก็บเกี่ยวฝักสดที่สั้นกว่า ส่วนสายพันธุ์ Kwi9 มีอายุการเก็บเกี่ยวฝักสดที่ 79 วัน ซึ่งอยู่ในช่วงวันใกล้เคียงกับสายพันธุ์อินเบรดที่สกัดได้ใหม่ เมื่อพิจารณาความแข็งแรงของต้นและความต้านทานโรคทางใบ พบว่าสายพันธุ์อินเบรดที่สกัดใหม่ได้ มีความแข็งแรงกว่าสายพันธุ์อินเบรดเริ่มต้นที่นำมาใช้เป็นแม่พันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของโชคชัยและคณะ (2544) ที่พบว่า การนำข้าวโพดไร่ผสมกับข้าวโพดข้าวเหนียว สายพันธุ์อินเบรดที่ได้จากการคัดเลือกจะมีผลผลิตสูงขึ้น ความแข็งแรงและความต้านทานโรคทางใบเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะทรงต้นของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ มีทรงต้นที่ค่อนข้างดีอยู่ในเกณฑ์เดียวกับสายพันธุ์เปรียบเทียบ ซึ่งทั้งหมดอยู่ในช่วง 2-3 คะแนน จัดว่าสายพันธุ์อินเบรดเหล่านี้มีความสม่ำเสมอของทรงต้นค่อนข้างสม่ำเสมอ ส่วนคะแนนการกัดชิมของสายพันธุ์อินเบรด พบว่า สายพันธุ์ A2 มีคะแนนการกัดชิมดีที่สุด คือ ความเหนียวนุ่มและความชอบดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

ลักษณะฝักสดของสายพันธุ์อินเบรดแสดงในตารางที่ 10 เมื่อพิจารณาภาพรวม คือ ลักษณะการติดเมล็ดค่อนข้างเต็มฝัก โดยความยาวทั้งฝักอยู่ในช่วง 11.31-12.90 เซนติเมตร ความยาวติดเมล็ดอยู่ในช่วง 8.93-11.25 เซนติเมตร และความยาวส่วนปลายของฝักอยู่ในช่วง 1.57-2.47 เซนติเมตร และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เปรียบเทียบ Kwi1 และ Kwi9 พบว่า ความยาวทั้งฝักอยู่ในช่วง 11.96-12.57 เซนติเมตร ความยาวติดเมล็ดอยู่ในช่วง 10.63-11.07 เซนติเมตร และความยาวส่วนปลายของฝักอยู่ในช่วง 0.89-1.93 เซนติเมตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ความกว้างและความลึกของเมล็ดของสายพันธุ์อินเบรด พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน โดยความกว้างฝักของสายพันธุ์อินเบรดอยู่ในช่วง 2.70-2.99 เซนติเมตร ส่วนสายพันธุ์เปรียบเทียบมีความกว้างของฝักอยู่ในช่วง 3.12-3.22 เซนติเมตร และความลึกฝักของสายพันธุ์อินเบรดอยู่ในช่วง 0.56-0.69 เซนติเมตร ส่วนสายพันธุ์เปรียบเทียบมีความลึกของฝัก 0.63 เซนติเมตร ทั้งสองสายพันธุ์

น้ำหนัก 100 เมล็ดมีความแตกต่างทางสถิติ โดยอินเบรดสายพันธุ์ A4 ให้น้ำหนักเมล็ดสูงสุด คือ 20.58 กรัม และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ Kwi1 มีน้ำหนักเมล็ดสูงสุด คือ 23.16 กรัม

ลักษณะทางพืชไร่ของลูกผสมเดี่ยว

เมื่อพิจารณาอายุวันเก็บเกี่ยวฝักสดพบว่า สายพันธุ์เปรียบเทียบกับพันธุ์บิ๊กไวท์ (BW) และรัชตะ (RAT) มีอายุวันเก็บเกี่ยวฝักสด 71 วัน ซึ่งมีอายุการเก็บเกี่ยวฝักสดสั้นกว่าลูกผสม 10 คู่ผสมที่มีอายุการเก็บเกี่ยวฝักสดอยู่ในช่วง 75-79 วัน เมื่อพิจารณาความแข็งแรงของต้น พบว่าคู่ผสมระหว่าง A1 x A4, A3 x A4 และ A1 x A3 มีความแข็งแรงที่สุดซึ่งใกล้เคียงกับพันธุ์รัชตะที่เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ และความต้านทานโรคทางใบ พบว่าสายพันธุ์คู่ผสม A3 x A4, A5 x A4, A2 x A3, A2 x A1 และ A5 x A1 มีความต้านทานโรคทางใบได้ดีที่สุดซึ่งใกล้เคียงกับพันธุ์บิ๊กไวท์ ส่วนลักษณะทรงต้นมีทรงต้นที่ค่อนข้างดีและสม่ำเสมอกันทั้ง 10 คู่ผสม ซึ่งทั้งหมดอยู่ในช่วง 2-3 คะแนน เช่นเดียวกับพันธุ์เปรียบเทียบรัชตะ มีลักษณะทรงต้นค่อนข้างดีและสม่ำเสมอ ส่วนคะแนน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การกัดชิมของทั้ง 10 คู่ผสมมีความแตกต่างทางสถิติ พบว่า คู่ผสม A3 x A4, A5 x A4, A1 x A3 และ A2 x A1 มีคะแนนกัดชิมที่ดีที่สุด คือ มีความเหนียวนุ่ม ความชอบ เมื่อเปรียบเทียบพันธุ์เปรียบเทียบกับพันธุ์รัชตะ ซึ่งมีคะแนนการกัดชิมเท่ากัน แต่คู่ผสมที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดบางที่สุด คือ คู่ผสม A1 x A3 ดังนั้นคู่ผสม A1xA3 เป็นคู่ผสมที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองนี้

สำหรับลักษณะฝักสดของทั้ง 10 คู่ผสม จากตารางที่ 14 พิจารณาภาพรวม คือ ลักษณะการติดเมล็ดค่อนข้างเต็มฝัก มีความยาวทั้งฝักและความยาวติดเมล็ดมีความแตกต่างทางสถิติ คู่ผสม A2 x A1 มีความยาวทั้งฝักยาวมากที่สุด แต่คู่ผสมที่ความยาวฝักติดเมล็ดมากที่สุดคือคู่ผสม A5 x A1 แสดงว่าคู่ผสมนี้มีลักษณะการติดเมล็ดค่อนข้างเต็มฝักมากที่สุด เมื่อพิจารณาควบคู่กับ ความยาวฝักส่วนปลายที่สั้นที่สุดเพียง 0.82 เซนติเมตร ส่วนความกว้างของฝักของคู่ผสมทั้งหมดนี้ พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ คือ คู่ผสม A2 x A1 และ A5 x A1 โดยความกว้างฝัก 3.73 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เปรียบเทียบมีความกว้างของฝักน้อยกว่าและอยู่ในช่วง 2.90-2.98 เซนติเมตร และความลึกฝักของคู่ผสมทั้งหมดนี้อยู่ในช่วง 0.73-0.81 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เปรียบเทียบมีความลึกของฝัก 0.74 และ 0.77 เซนติเมตร ในพันธุ์บิ๊กไวท์และพันธุ์รัชตะ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 ผลผลิตฝักสดและลักษณะเกษตรที่สำคัญของสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2* จำนวน 5 สายพันธุ์

สายพันธุ์	อายุเก็บเกี่ยวฝักสด	คะแนน[1/] (1-5)						ความยาวฝัก(ซม.)			เส้นผ่านศูนย์กลางฝัก		จำนวนแถวต่อฝัก	น้ำหนัก 100 เมล็ด
		ความแข็งแรง	โรคทางใบ	ความกว้าง (ซม.)	ความนุ่มเหนียว	ความชอบ	เพอริคาร์บ[2/]	ความยาวทั้งฝัก	ความยาวติดเมล็ด	ความยาวส่วนปลาย	ความกว้าง (ซม.)	ความลึก (ซม.)		
A1	79	1	1	3	3	3	2	11.41	8.93	2.47	2.80	0.58	8	19.72
A2	82	1	2	3	2	2	2	12.68	10.57	1.57	2.90	0.56	11	17.44
A3	82	2	1	3	3	3	2	12.90	11.25	2.12	2.86	0.62	13	15.34
A4	80	1	1	4	3	3	2	11.31	8.95	1.65	2.70	0.69	12	20.58
A5	82	2	2	3	4	3	2	11.97	10.40	2.36	2.99	0.66	12	13.18
Kwi1	77	2	2	3	2	3	2	11.96	11.07	0.89	3.22	0.63	13	23.16
Kwi9	79	2	2	5	3	3	2	12.57	10.63	1.93	3.12	0.63	13	18.71
F-test	**	ns	*	**	**	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	**
LSD.05	1.69	-	0.55	0.71	0.55	0.54	-	-	-	-	-	-	1.25	4.70
%CV	1.32	25.11	26.37	14.32	13.21	12.99	9.62	9.06	6.65	28.27	8.61	11.96	6.42	13.14

หมายเหตุ [1/]คะแนน 1-5; 1 = ยอมรับ และ 5 ไม่เป็นที่ยอมรับ, [2/]1= เพอริคาร์บบาง และ 5 เพอริคาร์บหนา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 ผลลิตฝักสดและลักษณะเกษตรของพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 hybrid) ที่มียีน *opaque-2* จำนวน10 คู่ผสม และพันธุ์เปรียบเทียบ

สายพันธุ์	อายุเก็บเกี่ยวฝักสด	คะแนน[1/] (1-5)						ความยาวฝัก(ซม.)			เส้นผ่านศูนย์กลางฝัก		จำนวนแถวต่อฝัก
		ความแข็งแรง	โรคทางใบ	ความกว้าง (ซม.)	ความนุ่มเหนียว	ความชอบ	เพอริคาร์ป[2/]	ความยาวทั้งฝัก	ความยาวติดเมล็ด	ความยาวส่วนปลาย	ความกว้าง (ซม.)	ความลึก (ซม.)	
A1 x A4	76	1	2	3	3	2	2	15.10	14.13	0.98	3.83	0.74	14
A2 x A4	75	2	2	2	3	3	2	15.95	14.68	1.28	3.68	0.76	13
A3 x A4	76	1	1	2	2	2	2	15.84	15.22	0.62	3.67	0.81	14
A5 x A4	78	3	1	3	2	2	2	15.60	13.90	1.70	3.52	0.73	13
A1 x A3	75	1	2	2	2	2	1	16.40	15.15	1.25	3.35	0.76	14
A2 x A3	78	3	1	2	3	2	2	15.77	14.24	1.53	3.57	131.78	13
A5 x A3	79	3	2	3	2	3	2	14.77	13.53	1.24	3.65	0.70	13
A2 x A1	78	3	1	2	2	2	2	16.88	14.53	2.35	3.73	0.80	14
A5 x A1	76	2	1	2	3	3	2	15.70	14.88	0.82	3.73	0.73	14
A5 x A2	79	3	2	3	3	3	2	14.34	12.44	1.90	3.50	0.75	12
BW	71	2	1	4	2	3	2	13.95	12.60	1.35	2.98	0.74	11
RAT	71	1	2	2	2	2	1	14.10	12.45	1.65	2.90	0.77	13

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สายพันธุ์	อายุเก็บเกี่ยวฝักสด	คะแนน[1/] (1-5)						ความยาวฝัก(ซม.)			เส้นผ่านศูนย์กลางฝัก		จำนวนแถวต่อฝัก
		ความแข็งแรง	โรคทางใบ	ความกว้าง (ซม.)	ความนุ่มเหนียว	ความชอบ	เพอริคาร์ป[2/]	ความยาวทั้งฝัก	ความยาวติดเมล็ด	ความยาวส่วนปลาย	ความกว้าง (ซม.)	ความลึก (ซม.)	
F-test	**	**	**	**	*	**	**	**	**	ns	*	ns	**
LSD.05	1.95	0.72	0.64	0.52	0.94	0.51	0.40	1.08	1.34	-	0.53	-	1.04
%CV	1.76	25.42	29.64	15.20	27.34	14.63	15.44	9.06	6.65	55.74	8.61	9.59	5.51

หมายเหตุ [1/]คะแนน 1-5; 1 = ยอมรับ และ 5 ไม่เป็นที่ยอมรับ, [2/]1= เพอริคาร์บบาง และ 5 เพอริคาร์บหนา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวให้มียีน *opaque-2* ร่วมอยู่ด้วยนี้ สำหรับยีนควบคุมข้าวโพดข้าวเหนียว (*waxy* gene, *wxwx*) การดูลักษณะขุ่นและใสของแป้งในเมล็ดในรุ่นลูกอาจช่วยลดงานทางด้านเครื่องหมายโมเลกุลได้บ้าง นอกจากนี้ลักษณะ xenia effect ของ *waxy* gene ก็ยังเป็นประโยชน์อย่างมากในการคัดเลือกยีน *waxy* เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุลของทั้งยีน *opaque-2* (*phi057*) และยีน *waxy* (*phi022*) สามารถยืนยันยีโนไทป์ของรุ่นลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถแยกยีโนไทป์ที่แตกต่างกันทั้งสามชนิดได้อย่างชัดเจน ในขั้นตอนการผสมกลับก็สามารถเลือกพืชที่เป็น heterozygous ของยีโนไทป์ *opaque-2* ไปผสมกลับได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้เมื่อผสมตัวเองของต้นที่เป็นที่เป็น heterozygous ก็สามารถคัดเลือกต้นที่เป็น double homozygous recessive ได้เช่นเดียวกัน ลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) มีการการจายตัวของยีน *opaque-2* ในอัตราส่วน $1O_2O_2:1O_2o_2$ แต่เมื่อนำลูกผสมตัวเองของ heterozygous (BC_1S_1) มาปลูกและคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลพบว่า การกระจายตัวของยีนในอัตราส่วน $1O_2O_2 : 2\ O_2o_2 : 1\ o_2o_2$ ไม่เป็นไปตามทฤษฎี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีการคัดเลือกโดยดูลักษณะค่อนมาทางข้าวโพดข้าวเหนียว ก่อนที่จะนำว่าวิเคราะห์ยีน *opaque-2* และส่วนในยีน *waxy* มีการกระจายในอัตราส่วน $1WxWx:2Wxwx:1wxwx$ ซึ่งไม่ไปตามทฤษฎีเช่นกันทั้งนี้อาจเนื่องมาจากได้มีการคัดเลือกพืชที่มีเฉพาะยีน *opaque-2* ก่อน และประชากรมีขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามในที่สุดสามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์ที่ประกอบด้วยสองยีนที่ต้องการ double homozygous recessive (o_2o_2wxwx) ประกอบด้วยกลุ่มผสมกลับจำนวน 5 สายพันธุ์ มีปริมาณทริปโตแฟน (%) ในโปรตีนสูงกว่าข้าวโพดสายพันธุ์เปรียบเทียบซึ่งไม่มียีน *opaque-2* (o_2o_2) และทั้ง 5 สายพันธุ์นี้ยังมีปริมาณอะมิโลเปคติน (%) ที่สูงเช่นเดียวกับสายพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวที่แท้จริง ทั้งขณะที่ใช้รับประทานฝักสดและเมื่อสุกแก่ พบว่า สายพันธุ์อินเบรด A4 ให้น้ำหนัก 100 เมล็ดสูงที่สุดเท่ากับ 20.58 กรัม จากการพิจารณาลักษณะของคุณภาพในการกัดชิม พบว่า สายพันธุ์อินเบรด A2 ให้ค่าคะแนนสูงที่สุด และเมื่อนำทั้ง 5 สายพันธุ์ มาผสมแบบพบกันหมดแล้วทดสอบผลผลิต พบว่า ผลผลิตทั้งเปลือก (กก./ไร่) คู่ผสม A1 x A3 ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 2250.50 กก./ไร่ และผลผลิตปอกเปลือก (กก./ไร่) คู่ผสม A3 × A1 ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 1701.97 กก./ไร่ นอกจากนี้สายพันธุ์ A1 ให้สมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (GCA) ดีซึ่งเหมาะที่จะพัฒนาต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

ในการคัดเลือกยีน *opaque-2* สามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกได้ แต่สิ่งหนึ่งที่มีความสำคัญเช่นกันคือ modifying gene ซึ่งมีส่วนสำคัญที่ทำให้เมล็ดข้าวโพดใสและแข็ง ดังนั้นในการคัดเลือกควรที่จะนำส่วนนี้เข้าไปพิจารณาในการคัดเลือกสายพันธุ์อินเบรดของข้าวโพดข้าวเหนียวด้วย เนื่องจากเมื่อพันธุกรรมพื้นฐานต่างกัน modifying gene จะแสดงออกแตกต่างกัน โดยสังเกตได้จากเมล็ดจากต่างคู่ผสมกันจะมีความใสและแข็งของเมล็ดแตกต่างกันด้วย

ส่วนในการคัดเลือกยีน *waxy* โดยการดูลักษณะขุ่นและใสของแป้งในเมล็ดในรุ่นลูกอาจช่วยลดงานทางด้านเครื่องหมายโมเลกุลได้บ้าง และนอกจากนี้ลักษณะ xenia effect ของยีน *waxy* ก็ยังเป็นประโยชน์อย่างมากในการคัดเลือกยีน *waxy* โดยการใช้สารละลาย I_2KI ตรวจสอบละอองเกสรไปตรวจสอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2544. **ปรับปรุงพันธุ์พืช: ความหลากหลายของแนวคิด**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2546. **ปรับปรุงพันธุ์ : ความหลากหลายของแนวคิด**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2551**. การปรับปรุงพันธุ์: พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

คมสัน อำนวยสิทธิ์, ประเทือง สง่าจิตร และ นาลอน สีมูลละ. 2541. **ศักยภาพลูกผสมระหว่างพันธุ์ผสมเปิดของข้าวโพดเทียนพันธุ์พื้นเมือง.** วารสารวิจัย มทร. ธัญบุรี ปีที่ 2 ฉบับที่ 1. แหล่งที่มา: http://www.ird.rmutt.ac.th/research_journal/V2No1/5V2No1.pdf, 5 ตุลาคม 2553.

โชคชัย เอกทัศนวรรณ, ชไมพร เอกทัศนวรรณ, นพพงศ์ จุลจอหอ และ ฉัตรพงศ์ บาลลา. 2544. ศักยภาพของเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสม. หน้า 1 – 9**.** *ใน* **สัมนาข้าวโพดหวานอุตสาหกรรมครั้งที่ 7 เรื่อง ข้าวโพดอุตสาหกรรมกับการพัฒนาเศรษฐกิจไทย**. กลุ่มงานเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร. สำนักงานคระกรรมการการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ประภา กัณฐศากุล, สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์ และ จินดา จันทร์อ่อน. 2535. ส่วนประกอบบางอย่างของข้าวโพดฝักสด, น. 1-3. *ใน* **เอกสารประกอบการประชุมสัมนาข้าวโพดหวาน.** ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่**,** เชียงใหม่.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

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

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

ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่. 2534. ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ SSR TW 8801. **สรุปรายงานวิจัยพืชไร่ สถาบันวิจัยพืชไร่**. เชียงใหม่.

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.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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.

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

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

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

Brink, R.A. and J.H. MacGillivray. 1924. Segregation for the waxy character in maize pollen and differential development of the male gametophyte. **American. J. Bot.** 11: 465-469.

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

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.

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

Coe, E.H., JR. and M.G. Neuffer. 1988. The genetics of corn, pp. 111-223. *In* G.F. Sprague, ed. **Corn and Corn Improvement: Number 18 in the Series Agronomy.** American Society of Agronomy Inc., USA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dreher, K., M. Morris, M. Khairallah, J.M. Ribaut, S. Pandey and G. Srinivasan. 2002. Is marker assisted selection cost-effective compared to conventional plant breeding methods?: the case of quality protein maize, pp. 203-236. *In* R.E. Evenson, V. Santaniello and D. Zilberman, eds. **Economic and Social Issues in Agricultural Biotechnology.** CAB International, UK.

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

Fergason, V. L. 1994. High amylose and waxy corn, pp. 56-77. *In* A.R. Hallauer, ed. **Specialty Corns.** CRC. Press. Boca Raton, Florida.

Flora, L.F. and R.C. Wiley. 1974. Sweet corn aroma, chemical components and relative importance in the overall flavor response. **J. Food Sci.** 39: 770-773.

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.

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

Hayman, B.I. 1954 a. The analysism of variance of dialles table. **Biometric** 10: 235-244.

_____. 1954 b. The theory and analysis of diallel cross. **Genetics** 39: 789-809.

_____. B.I. 1957. Interaction haterosis and diallel cross. **Genetics** 42: 336-355.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hayman, B.I. 1960. The theory and analysis of diallel cross. **Genetics** 45: 155-172.

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

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

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

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

Lodha, M., H.O. Gupta, P.C. Ram and J. Singh. 1976. Some biochemical characteristics of modified phenotype strains of opaque-2 (*Zea may* L.). **Current Sci**. 45: 285-286.

Lopes, M.A. and B.A. Larkins. 1994. Genetic analysis of endosperm modification in quality protein maize, pp. 149-173. *In* B.A. Larkins and E.T. Mertz, eds. **Quality Protein Maize: 1964-1994: Proceedings of the International Symposium on Quality Protein Maize, December 1-3.** 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.

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 (3629): 279-280.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Navarro, R. C. and A. A. Domingo. 1977. Genetic and environment stability of modified opaque-2 population. **Annual report on inheritance and improvement of protein quality and content in maize**. 84 p.

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

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

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

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

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

Prasanna, B.M., S.K. Vasel., B. Kassahun and N.N. Singh. 2001. Quality protein maize. **Current Science.** 81(10): 1308 – 1319.

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

Senior, M.L., E.C.L. Chin, M. Lee. J.S.C. Smith and C.W. Stuber. 1996. Simple sequence repeatmarker developed from maize sequence found in the GENBANK Database: map construction . **Crop Sci.** 36: 1676-1683.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tracy, W. F. 2001. Sweet corn, pp. 147-187. *In* A.R. Hallauer, ed. **Specialty Corns.** 2nd ed. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.

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

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

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

Weatherwax, F. 1922. A rare carbohydrate in waxy maize. **Genetic** 7: 568.

Yuan, L., S. Zhang, M. Warburton, X. Li, J. Fu and M. Li. 2002. Assessment of genetic similarities among maize inbred lines using SSR markers, pp. 50-57. *In* G. Srinivasan, P.H. Zaidi, B.M. Prasanna, F. Gonzalez and K. Lesrlick, eds. **Proceedings of the 8th Asian Regional Maize Workshop: New Technologies for the New Millennium.** Bangkok, Thailand. Mexico, D.F.: CIMMYT.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

วิธีเตรียมสารเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวกที่ ก1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1. Hexane

2. 98% Sulfuric acid, 0.05018 N Sulfuric acid

3. Catalyst

4. การเตรียม 10N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ชั่ง NaOH 400 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตร 1 ลิตร

5. การเตรียม indicator ชั่ง methyl red 0.033 กรัม และ bromoresol green 0.066 กรัม ละลายในเอทานอล 100 มิลลิลิตร

6. การเตรียมสารละลาย Boric acid ชั่ง Boric acid 20 กรัม ละลายในน้ำร้อน 400 มิลลิลิตร ปล่อยให้เย็นแล้วปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร หยด 0.1N โซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 หยด

ภาคผนวกที่ ก2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณทริปโตแฟน

1. การเตรียม 0.165 M Sodium acetate (pH 7) ละลาย Sodium acetate 13.6 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร ปรับให้ได้ pH 7 ด้วย sodium hydroxide หรือ acetic acid เก็บไว้ที่อุณภูมิ 4 ºC

2. การเตรียม Papain solution (1 mg/ml) ละลาย Papain 40 มิลลิกรัม ใน 0.165 M Sodium acetate (pH 7) 40 มิลลิลิตร ที่อุณภูมิห้อง (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์)

3. การเตรียม Tryptophan strock solution (100 µg/ml) ละลาย DL-Tryptophan 10 มิลลิกรัม ใน 0.165 M Sodium acetate (pH 7) 100 มิลลิลิตร ที่อุณภูมิห้อง และเก็บไว้ที่อุณภูมิ 4 ºC (เขย่าก่อนใช้)

4. การเตรียม 30 N Sulfuric acid (Reagent C) โดยเติม 98% Sulfuric acid ปริมาตร 833.3 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 166.7 มิลลิลิตร (วางภาชนะที่ใส่น้ำกลั่นบนน้ำแข็งก่อนใส่ Sulfuric acid และ steror ตลอดเวลา)

5. การเตรียม 7 N Sulfuric acid โดยผสม 30 N Sulfuric acid ปริมาตร 35 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 115 มิลลิลิตร วิธีการทำเช่นเดียวกับข้อ 4

6. การเตรียม 0.1 M Glyoxilic acid (Reagent A) ละลาย Glyoxilic acid 0.9205 กรัม ใน 7 N Sulfuric acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ จนกว่า Glyoxilic acid ละลายแล้วปรับปริมาตรด้วย 7 N Sulfuric acid เป็น 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์)

7. การเตรียม 1.8 M Ferric chloride (Reagent B) ละลาย Ferric chloride 0.050 กรัม ใน Reagent A ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การเตรียม colorimetric reagent (Reagent D) โดยผสมระหว่าง Reagent C ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงใน Reagent B ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดสีชา ปิดฝาให้สนิท และ steror ตลอด (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์ 1 ชั่วโมง)

ภาคผนวกที่ ก3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลเปคติน

1. สารละสาย 1N NaOH ชั่ง NaOH 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

2. สารละลาย Glacial acetic acid: 1N CH3COOH ละลาย Glacial acetic acid 60 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

3. สารละลาย Iodine ชั่ง Iodine 0.2 กรัม และ Potassium Iodine 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาขนาด 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนหรือจน Iodine ละลายจนหมดแล้ว ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวกที่ ก4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ Total Sugarand Reducing Sugar

การเตรียมสารละลาย alkalic copper reagent

1. ละลาย anhydrous sodium carbonate (Na_2CO_3) 25 กรัม ในน้ำ 250 มิลลิลิตร เติม potassium sodiumtartrate ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) 12 กรัม

2. เติมสารละลาย 10% copper sulfate 40 มิลลิลิตร (ใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 4 กรัม ละลายน้ำจนครบ 40 มิลลิลิตร) เติม sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) 16 กรัม (solution I)

3. ละลาย anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_3) 180 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร (solution II)

4. ผสม solution I และ solution II แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 สัปดาห์ กรองเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 – 37 °C (ทุกครั้งที่มีการใช้ต้องทำการกรองทุกครั้ง)

การเตรียมสารละลาย arsenomolybdic reagent

1. ละลาย ammonium molybdate $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำ 900 มิลลิลิตร เติม sulfuric acid (H_2SO_4) 42 มิลลิลิตร (solution III)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ละลาย disodium hydrogen arsenate ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) 6 กรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร (solution IV)

3. ค่อยเติมสารละลาย IV ในสารละลายที่ III II แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 – 37 ˚C (เก็บไว้ 24 ชั่วโมงจึงสามารถนำมาใช้ได้)

ค่า absorbance ที่ได้เปรียบเทียบกับสารละลายมาตราฐาน (standard solution) D-glucose (ที่ความเข้มข้น 0.01 – 0.04%) ผลการวิเคราะห์มีหน่วยเป็น mg.D-glucose/มิลลิลิตร หรือกรัมน้ำหนักแห้ง

การเตรียมสารละลายมาตราฐาน(standard solution) D-glucose

1. เตรียมสารเคมี D-glucose anhydrous ที่ 50, 100, 150, 200, 250, 300 ppm. โดยดูดสารตั้งต้น (D-glucose anhydrous 1000 ppm) ปริมาตร 1.25, 2.5, 3.75, 5, 6.25 และ 7.5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 25 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

ตารางการประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะคุณภาพ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะคุณภาพของฝักแห้ง

จากตารางผนวกที่ ข1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ลักษณะที่เกี่ยวข้องของคู่ผสม โดยเฉพาะลักษณะทางคุณภาพ (biochemical traits) 9 ลักษณะ ได้แก่ ปริมาณอะมิโลส อะมิโลเปคติน ทริปโตแฟน โปรตีน น้ำตาลทั้งหมด ปริมาณ Non-Reducing Sugar ความชอบ ความเหนียวนุ่ม และความหนาของเพอริคาบ พบว่าให้ค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ของแต่ละคู่ค่อนข้างแตกต่างกันอย่างมาก ส่วนลักษณะที่มีความสัมพันธ์กันได้แก่ ปริมาณอะมิโลส และอะมิโลเปกติน และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กับปริมาณ Non-Reducing Sugar ส่วนลักษณะอื่นๆ นั้นไม่มีความสัมพันธ์กันในระดับที่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ข1 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางชีวเคมีและคุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวฝักแห้งที่มียีน *opaque-2* จำนวน 10 คู่ผสม

Dried	Amylose	Amylopectin	Tryptophan	Protein	TS[1/]	NRS[2/]	Flavor	Terderness
Amylopectin	-1**							
Tryptophan	-0.10	0.10						
Protein	0.12	-0.12	-0.15					
TS	0.03	-0.03	0.39	0.23				
NRS	0.12	-0.12	0.19	0.18	0.91**			
Flavor	-0.49	0.49	-0.14	-0.03	-0.17	-0.06		
Terderness	-0.33	0.33	0.04	-0.12	0.02	-0.02	0.49	
Pericarp	0.68	-0.68	0.27	0.05	0.24	0.28	-0.24	-0.02

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

การประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะคุณภาพของฝักสด

จากตารางผนวกที่ ข2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ลักษณะที่เกี่ยวข้องของคู่ผสมลักษณะทางคุณภาพ (biochemical traits) พบว่า ปริมาณอะมิโลเปคตินมีความสัมพันธ์ทางบวกกับความเหนียวนุ่ม (tenderness) และกลิ่น (flavor) แต่สอบลักษณะดังกล่าวนี้จะมีความสัมพันธ์ทางลบกับปริมาณอะมิโลส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้าวโพดข้าวเหนียวที่ดีนั้นจะต้องมีปริมาณอะมิโลเปคตินสูง นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กับปริมาณ Non-Reducing Sugar ก็มีความสัมพันธ์ในทางบวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางชีวเคมีและคุณภาพของข้าวโพดข้าวเหนียวฝักสดที่มียีน *opaque-2* จำนวน 10 คู่ผสม

Fresh	Amylose	Amylopectin	Tryptophan	Protein	TS[1/]	NRS[2/]	Flavor	Terderness
Amylopectin	-1**							
Tryptophan	-0.15	0.28						
Protein	0.26	0.15	-0.16					
TS	-0.15	0.15	0.13	0.38*				
NRS	-0.15	0.15	-0.08	0.23	0.91**			
Flavor	-0.56*	0.56*	0.14	-0.20	-0.17	-0.06		
Terderness	-0.41*	0.41*	-0.08	-0.30	0.02	-0.02	0.49	
Pericarp	0.12	-0.12	0.32	0.01	0.24	0.28	-0.24	-0.02

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

ภาพฝักข้าวโพดข้าวเหนียวที่มียีน *opaque-2*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ ค1 แสดงรูปฝักของสายพันธุ์ A1 ที่มีสมรรถนะการผสมทั่วไป (GCA) ดีที่สุด

ภาพผนวกที่ ค2 แสดงรูปฝักของคู่ผสม A1 x A3 ที่ให้น้ำหนักผลผลิตดีที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวอังคณา เพาะนิยม

เกิดวันที่ 31 กรกฎาคม 2527

สถานที่เกิด อ.เมือง จ.ตราด

ประวัติการศึกษา วท.บ.(เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตำแหน่งปัจจุบัน -

สถานที่ทำงานปัจจุบัน -

ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -

ทุนการศึกษาที่ได้รับ -

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์