บทความวิจัย (Research Article)

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa* ที่สัมพันธ์กับอุณหภูมิแป้งสุกในข้าวไทย

DNA Marker Development to Detect SNP of *SSIIa* Gene in Relation to Starch Gelatinization Temperature in Thai Rice

ยุพเยาว์ คบพิมาย*, ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ และวราภรณ์ แสงทอง

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

ศรัณย์ จีนะเจริญ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50300

Yuppayao Kophimai*, Chotipa Sakulsingharoj and Varaporn Sangtong

Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University,

Nonghan, Sansai, Chiang Mai 50290

Saran Cheenacharoen

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University,

Changphuak, Mueang, Chiang Mai 50300

บทคัดย่อ

อุณหภูมิแป้งสุกเป็นตัวกำหนดระยะเวลาในการหุงต้ม โดยข้าวที่มีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำใช้ระยะเวลาในการหุงต้มน้อยกว่าข้าวที่มีอุณหภูมิแป้งสุกสูง นอกจากนี้ยังมีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวสุกด้วย ยีน *SSIIa* ควบคุมลักษณะอุณหภูมิแป้งสุกของข้าว โดยการแทนที่เบสที่ตำแหน่ง 4,198 (G/A) และ 4,329-4,330 (GC/TT) ในเอกซอน 8 มีผลมากต่ออุณหภูมิแป้งสุก ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบสนิปส์ที่ตำแหน่ง 4,198 โดยวิธีเตตระไพรเมอร์ เออาร์เอ็มเอส พีซีอาร์ พบว่าไพรเมอร์ที่เปลี่ยนแปลงเบสที่ 3 จากปลาย 3′ ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจน เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่นี้ตรวจสอบสนิปส์ในตำแหน่ง 4,198 และไพรเมอร์ที่มีรายงานมาก่อนตรวจสอบสนิปส์ตำแหน่ง 4,329-4,330 ในข้าวไทย 69 พันธุ์ และข้าวญี่ปุ่น 3 พันธุ์ พบว่าสนิปส์ตำแหน่ง 4,198 ในข้าวไทยเป็น G เท่านั้น และในข้าวญี่ปุ่น 2 พันธุ์ เป็น A ส่วนสนิปส์ตำแหน่ง 4,329-4,330 พบทั้ง GC และ TT และให้ผลการทดลองเหมือนกับการหาลำดับเบส รูปแบบสนิปส์ GC/TT มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิแป้งสุกของข้าวไทยที่ปลูกทั้งในฤดูนาปีและนาปรัง โดยข้าวที่มีสนิปส์ GC มีอุณหภูมิแป้งสุกสูงกว่าข้าวที่มีสนิปส์ TT อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงสามารถใช้ไพรเมอร์ในงานวิจัยนี้คัดเลือกข้าวไทยที่มีอุณหภูมิแป้งสุกที่เหมาะสมได้

คำสำคัญ: ข้าว; เครื่องหมายสนิปส์; เตตระไพรเมอร์ เออาร์เอ็มเอส พีซีอาร์; ยีน *SSIIa*; อุณหภูมิแป้งสุก

**Corresponding author: kophimai@yahoo.com*

DOI: 10.14456/tjst.2018.19

Abstract

Gelatinization temperature determines the time required for cooking rice. Low gelatinization temperature rice needs less cooking time than the high gelatinization temperature ones. Furthermore, gelatinization temperature affects cooked rice texture. *SSIIa* gene controls gelatinization temperature in rice. Base substitutions in *SSIIa* gene at positions 4,198 (G/A) and 4,329-4,330 (GC/TT) of 8th exon have been found to be responsible for gelatinization temperature. In this research, primers for SNP detection at position 4,198 using tetra-primer ARMS-PCR method were developed. The results showed that primers with change in third base from 3' end could be used to clearly identify SNP at position 4,198. When the newly developed primers for detecting SNP at position 4,198 and the formerly reported primers to detect SNP at position 4,329-4,330 were used in 69 Thai and 3 Japanese rice, G allele at position 4,198 was detected in all Thai rice tested, while A allele was found in two Japanese rice. At position 4,329-4,330, GC and TT alleles were found. The SNPs detection by tetra-primer ARMS-PCR method were confirmed and found to be consistent with sequencing analysis results. Correlations between GC/TT SNP and gelatinization temperature were found in Thai rice grown in season and off season. Rice with GC SNP had significantly higher gelatinization temperature than those with TT SNP. Therefore, the SNP markers used in this research would be applied in marker-assisted selection for Thai rice with proper gelatinization temperature.

Keyword: rice; SNPs; tetra-primer ARMS-PCR; *SSIIa* gene; gelatinization temperature

1. คำนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และมีผลผลิตประมาณปีละ 25 ล้านตัน (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2560) ข้าวยังเป็นพืชอาหารที่สำคัญของโลก โดยพลังงานจากข้าวคิดเป็น 21 % ของปริมาณพลังงานที่ได้จากการบริโภคอาหารของคนทั้งโลก และคิดเป็น 76 % ของชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้นในแต่ละวันจึงมีการใช้พลังงานในการหุงข้าวปริมาณมาก สิ่งที่มีผลต่อระยะเวลาในการหุงข้าว คืออุณหภูมิแป้งสุกของข้าว ซึ่งอยู่ระหว่าง 55-85 องศาเซลเซียส (Fitzgerald *et al*., 2009) ระยะเวลาการต้มเมล็ดข้าวให้สุก คือ ประมาณ 12-24 นาที หรือมากกว่า (งามชื่น, 2547) ข้าวที่มีอุณหภูมิแป้งสุกสูงจะใช้ระยะเวลานานในการต้มให้สุก ส่วนข้าวที่มีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำจะใช้ระยะเวลาน้อยกว่าในการทำให้สุก การลดอุณหภูมิแป้งสุกให้ต่ำลงจะช่วยประหยัดเวลาในการหุงต้มเฉลี่ยประมาณ 4 นาที ซึ่งช่วยลดการใช้พลังงานได้เป็นอย่างมาก เมื่อคำนึงถึงการหุงข้าวของหลายล้านครัวเรือนทั่วโลก (Fitzgerald *et al*., 2009) นอกจากนี้อุณหภูมิแป้งสุกยังมีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวสุก โดยข้าวที่ใช้เวลาในการหุงต้มนานจะดูดน้ำมากและทำให้ความแน่นเนื้อ (firmness) ของข้าวต่ำด้วย ข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำจึงควรมีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ ซึ่งจะไม่ทำให้ข้าวแฉะ (งามชื่น, 2547)

อุณหภูมิแป้งสุกของข้าวถูกควบคุมด้วยยีน *Starch synthase IIa (SSIIa)* ซึ่งประกอบด้วย 8 เอกซอน 7 อินทรอน มีความยาวทั้งสิ้น 4,422 คู่เบส (Bao *et al*., 2006) ซึ่งมีผลต่ออุณหภูมิแป้งสุกทั้งใน

ข้าวจาโปนิกาและอินดิกา (Shu *et al*., 2006) รวมทั้งข้าวเหนียวด้วย (Xu *et al*., 2013) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิแป้งสุกกับความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งต่าง ๆ ของยีน *SSIIa* พบว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจาก A เป็น G ในตำแหน่ง 4,198 และ GC เป็น TT ในตำแหน่ง 4,329-4,330 (เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์หมายเลข AY423717 ในฐานข้อมูล GenBank) ในเอกซอน 8 มีผลต่ออุณหภูมิแป้งสุกของข้าวมากที่สุด (Bao *et al*., 2006)

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจาก G เป็น A ในตำแหน่ง 4,198 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากวาลีนเป็นเมทไธโอนีน ส่วนการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในตำแหน่ง 4,329 ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน แต่การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในตำแหน่ง 4,330 จาก C เป็น T ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากลิวซีนเป็นฟีนิลอะลานีน โปรตีน SSIIa ทำหน้าที่ในการต่อสายแขนงพอลิเมอร์ของอะไมโลเพคตินให้ยาวขึ้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนมีผลต่อการทำงานของโปรตีน SSIIa จึงมีผลต่อโครงสร้างของอะไมโลเพคตินและอุณหภูมิแป้งสุกของข้าว โดยถ้าในตำแหน่ง 4,198 เป็น A ไม่ว่าในตำแหน่ง 4,329-4,330 จะเป็นเบสใดก็ตาม ข้าวจะมีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ แต่ถ้าในตำแหน่ง 4,198 เป็น G อุณหภูมิแป้งสุกจะขึ้นอยู่กับเบสตำแหน่ง 4,329-4,330 ถ้าเป็น GC จะมีอุณหภูมิแป้งสุกปานกลางถึงสูง แต่หากเป็น TT จะมีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ (Nakamura *et al*., 2005; Bao *et al*., 2006) การทดสอบอุณหภูมิแป้งสุกของข้าวสามารถวัดโดยทางอ้อมจากระดับการสลายตัวในด่าง (1.7 % KOH) ถ้าเมล็ดข้าวสลายตัวได้ดีแสดงว่ามีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ แต่ถ้าสลายตัวน้อยหรือไม่สลายตัวแสดงว่ามีอุณหภูมิแป้งสุกสูง (Juliano and Villareal, 1993)

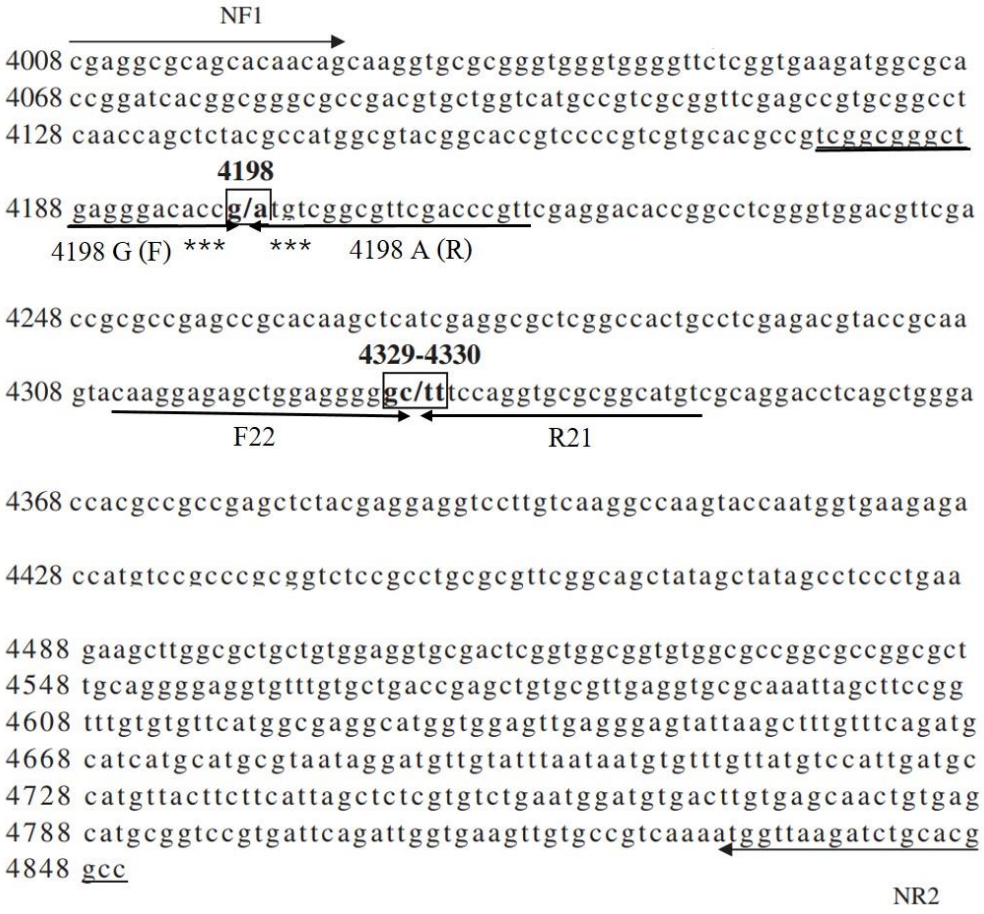
การค้นพบสนิปส์ ซึ่งมีผลต่ออุณหภูมิแป้งสุกของข้าวทำให้มีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ข้าวที่มีอุณหภูมิแป้งสุกที่ต้องการ โดยมีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบสนิปส์ตำแหน่ง 4,329-4,330 เพียงอย่างเดียว (Jin *et al*., 2010) และไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกทั้งตำแหน่ง 4,198 และ 4,329-4,330 (Lu *et al*., 2010) อย่างไรก็ตาม สำหรับการคัดเลือกตำแหน่ง 4,198 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบ CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) ซึ่งต้องใช้การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ จึงมีค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานาน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa* ในตำแหน่ง 4,198 ให้สะดวกขึ้นโดยใช้วิธี tetra - primer ARMS - PCR (tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction) ซึ่งไม่ต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ รวมถึงการตรวจสอบสนิปส์ของยีนทั้งตำแหน่ง 4,198 และ 4,329-4,330 ในข้าวไทยพันธุ์ต่าง ๆ และการทดสอบความสัมพันธ์ของรูปแบบสนิปส์ต่าง ๆ กับอุณหภูมิแป้งสุกในข้าวไทย เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกข้าวเพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีอุณหภูมิแป้งสุกที่เหมาะสมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa* โดยวิธี tetra-primer ARMS-PCR

การตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa* ในแต่ละตำแหน่งใช้วิธี tetra-primer ARMS-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ คู่นอกและคู่ใน โดยไพรเมอร์คู่ในต้องมีความจำเพาะกับสนิปส์แต่ละรูปแบบ ดังรูปที่ 1 การตรวจสอบสนิปส์ในตำแหน่ง 4,329-4,330 ใช้ไพรเมอร์คู่นอกและคู่ใน ซึ่งได้จากการรายงานของ Lu *et al*. (2010) ส่วนไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบ

สนิปส์ตำแหน่ง 4,198 ใช้ไพรเมอร์คู่นอกเหมือนกับการตรวจสอบในตำแหน่ง 4,329-4,330 แต่ได้ออกแบบไพรเมอร์คู่ในทั้งหมด 4 แบบ ได้แก่ แบบที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเบส แบบที่เปลี่ยนแปลงเบสตำแหน่งที่ 2 (*2) ตำแหน่งที่ 3 (*3) และตำแหน่งที่ 3 และ 4 (*3, *4) นับจากปลาย 3′ ดังตารางที่ 1



รูปที่ 1 ตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa* ไพรเมอร์คู่นอก ได้แก่ NF1 และ NR2 ไพรเมอร์คู่ในสำหรับตรวจสอบตำแหน่ง 4,329-4,330 ได้แก่ F22 และ R21 ไพรเมอร์คู่ในสำหรับตรวจสอบตำแหน่ง 4,198 ได้แก่ 4,198 G (F) และ 4,198 A (R) * หมายถึง ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงเบส (ดัดแปลงจาก Lu *et al*., 2010)

2.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ทดสอบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบสนิปส์ตำแหน่ง 4,198

การตรวจเอกสารพบว่าข้าวส่วนใหญ่มีสนิปส์ตำแหน่ง 4,198 เป็น G แต่มีข้าวญี่ปุ่นบางพันธุ์ เช่น Nipponbare มีสนิปส์เป็น A ดังนั้นจึงทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ กับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ Nipponbare โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอประมาณ 20 นาโนกรัม ไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์ ความเข้มข้นไพรเมอร์ละ 0.5 ไมโครโมลาร์ และสารสะลาย 1 เท่าของ 2X MyTaq HS Red mix (Bioline, United Kingdom)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa*

ตำแหน่งไพรเมอร์	ชนิดสนิปส์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (จาก 5′ ไป 3′)	T_a	ขนาดดีเอ็นเอ	ที่มา
คู่นอก (ตรวจสนิปส์และหาลำดับเบส)	-	NF1	CGAGGCGCAGCACAACAG	60	843	Lu *et al.*, 2010
	-	NR2	GGCCGTGCAGATCTTAACCAT			
คู่ใน (ตรวจสนิปส์ตำแหน่ง 4,329-4,330)	GC	F22	CAAGGAGAGCTGGAGGGGGC	65	540, 843	Lu *et al.*, 2010
	TT	R21	ACATGCCGCGCACCTGGAAA		341, 843	
คู่ใน (ตรวจสนิปส์ตำแหน่ง 4,198)	G	4,198 (F)	TCGGCGGGCTGAGGGACACCG	60	683, 843	งานวิจัยนี้
	A	4,198 (R)	AACGGGTCGAACGCCGACAT		210, 843	
	G	4,198 (F)*2	TCGGCGGGCTGAGGGACAC**A**G	60	683, 843	งานวิจัยนี้
	A	4,198 (R)*2	AACGGGTCGAACGCCGAC**C**T		210, 843	
	G	4,198 (F)*3	TCGGCGGGCTGAGGGACA**A**CG	60	683, 843	งานวิจัยนี้
	A	4,198 (R)*3	AACGGGTCGAACGCCGA**A**AT		210, 843	
	G	4,198 (F)*3, *4	TCGGCGGGCTGAGGGAC**TA**CG	60	683, 843	งานวิจัยนี้
	A	4,198 (R)*3, *4	AACGGGTCGAACGCCG**TA**AT		210, 843	

หมายเหตุ : เบสที่ถูกเปลี่ยนแปลง คือ เบสที่เป็นตัวหนาและขีดเส้นใต้

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย (1) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 15 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 วินาที ในขั้นตอนที่ 2 ทำ 30 รอบ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

ตรวจสอบขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรฟอรีซิส โดยใช้เจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ และบัฟเฟอร์ 0.5X TBE

2.1.2 พันธุ์ข้าวที่ใช้ตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa*

ตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa* ทั้งตำแหน่ง 4,198 และ 4,329-4,330 ในข้าวไทยจำนวน 69 พันธุ์ และข้าวญี่ปุ่นจำนวน 3 พันธุ์ ดังตารางที่ 3 โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เช่นเดียวกับในข้อ 2.1.1 แต่จะเปลี่ยนอุณหภูมิให้เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์คู่ในแต่ละคู่

2.2 การตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa* โดยการหาลำดับเบส

เพื่อยืนยันว่าแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันมีสนิปส์ที่แตกต่างกันจริงหรือไม่ จึงตรวจสอบลำดับเบสของยีน *SSIIa* ในข้าวที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยตรวจสอบในข้าวไทยจำนวน 46 พันธุ์ และข้าวญี่ปุ่นจำนวน 2 พันธุ์ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอประมาณ 80 นาโนกรัม ไพรเมอร์ NF1 และ NR2 อย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ และสารสะลาย 1 เท่า ของ 2X Thermo Sciencetific Phusion High Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย (1) บ่มที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 10 วินาที อุณหภูมิ 58 องศา

เซลเซียส 10 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที ในขั้นตอนที่ 2 ทำ 30 รอบ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จากนั้นส่งผลผลิตพีซีอาร์ไปหาลำดับเบสที่บริษัท 1st Base (Malaysia)

2.3 การศึกษาอุณหภูมิแป้งสุกในข้าวไทย

วิธีศึกษาอุณหภูมิแป้งสุกในข้าวดัดแปลงจากวิธีของมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่องข้าวหอมไทย (มกอช 4000-2546) โดยศึกษาในข้าวไทยที่ปลูกในฤดูนาปี (มิถุนายน 2559 - ธันวาคม 2559) จำนวน 39 พันธุ์ และฤดูนาปรัง (ธันวาคม 2558 - เมษายน 2559) จำนวน 40 พันธุ์ มีขั้นตอนดังนี้ สุ่มเมล็ดข้าวสารพันธุ์ละ 18 เมล็ด แบ่งใส่ในจานพลาสติกใส จำนวน 3 จาน จานละ 6 เมล็ด เติมสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 1.7 % ลงในจานพลาสติก จานละ 25 มิลลิลิตร ให้เมล็ดข้าวทุกเมล็ดจมอยู่ในสารละลายและให้แต่ละเมล็ดอยู่ห่างกันพอสมควร ปิดฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ขยับภาชนะ เป็นเวลา 23 ชั่วโมง ตรวจระดับการสลายของเมล็ดข้าวในด่าง โดยแบ่งเป็น 7 ระดับ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ระดับการสลายของเมล็ดข้าวในด่าง (งามชื่น, 2547)

ระดับการสลายของเมล็ดข้าว	ลักษณะการสลายของเมล็ดข้าวในด่าง	อุณหภูมิแป้งสุก	ระยะเวลาหุงต้ม
1	ลักษณะของเมล็ดข้าวไม่เปลี่ยนแปลง	สูง (>75 °ซ)	>24 นาที
2	เมล็ดข้าวพองตัว		
3	เมล็ดข้าวพองตัวและมีแป้งกระจายออกมาจากบางส่วนของเมล็ดข้าว		
4	เมล็ดข้าวพองตัวและมีแป้งกระจายออกมารอบเมล็ดข้าวเป็นบริเวณกว้าง	ปานกลาง (70-74 °ซ)	17-24 นาที
5	ผิวของเมล็ดข้าวปริทางขวางหรือทางยาวและมีแป้งกระจายออกมารอบเมล็ดเป็นบริเวณกว้าง		
6	เมล็ดข้าวสลายตัวตลอดทั้งเมล็ด มีลักษณะเป็นเมือกขุ่นขาว	ต่ำ (< 69 °ซ)	12-17 นาที
7	เมล็ดข้าวสลายตัวตลอดทั้งเมล็ดและมีลักษณะเป็นแป้งเปียกใส		

2.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบสนิปส์ของยีน *SSIIa* กับอุณหภูมิแป้งสุกของข้าวไทย

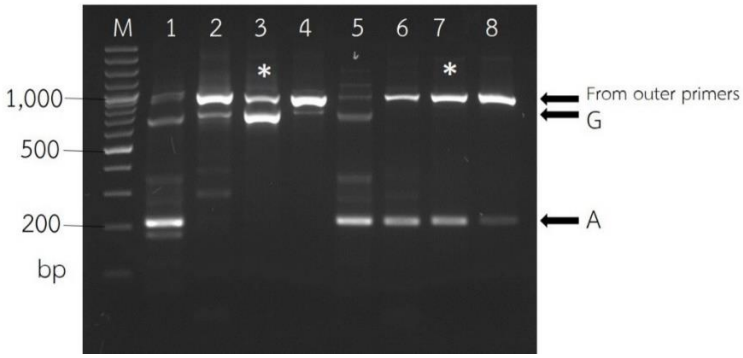
เปรียบเทียบระดับการสลายตัวในด่างของเมล็ดข้าวระหว่างข้าวที่มีสนิปส์ของยีน *SSIIa* แตกต่างกัน ด้วยวิธี Wilcoxon test โดยใช้โปรแกรม R (R core team, 2013) ทั้งในข้าวนาปีและนาปรัง

3. ผลการวิจัย

3.1 การทดสอบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบสนิปส์ตำแหน่ง 4,198

การทดสอบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบสนิปส์ในตำแหน่ง 4,198 ในข้าวไทยพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งมี สนิปส์ G และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Nipponbare ซึ่งมีสนิปส์ A พบว่าไพรเมอร์ที่ให้ผลการตรวจสอบสนิปส์ที่ถูกต้องและชัดเจนที่สุด ได้แก่

ไพรเมอร์ 4,198 (F,R)*3 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเบสตำแหน่งที่ 3 นับจากปลาย 3′ โดยในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส และข้าว Nipponbare ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 คู่เบส ซึ่งแสดงถึงการมีสนิปส์ G และ A ตามลำดับ (รูปที่ 2) ดังนั้นไพรเมอร์ 4,198 (F)*3 และ 4,198 (R)*3 จึงเหมาะสมในการใช้เป็นไพรเมอร์คู่ในเพื่อตรวจสอบสนิปส์ตำแหน่ง 4,198 ของยีน *SSIIa* ในข้าว



รูปที่ 2 ผลการทดสอบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบสนิปส์ตำแหน่ง 4,198 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, Thermo Sciencetific, USA), 1-4 คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สนิปส์ G), 5-8 คือ ข้าวญี่ปุ่น Nipponbare (สนิปส์ A) ในข้าวแต่ละพันธุ์ใช้ไพรเมอร์คู่นอก ได้แก่ NF1 และ NR2 และไพรเมอร์คู่ในได้แก่ 4,198 (F,R) คือ หมายเลข 1 และ 5; 4,198*2 (F,R) คือ หมายเลข 2 และ 6; 4,198*3 (F,R) คือหมายเลข 3 และ 7; 4,198*3,*4 (F,R) คือหมายเลข 4 และ 8 ตามลำดับ, * หมายถึงช่องดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการตรวจสอบสนิปส์แต่ละรูปแบบ]

3.2 การตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa* ในข้าว

การตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa* ในข้าวไทย จำนวน 69 พันธุ์ และข้าวญี่ปุ่น จำนวน 3 พันธุ์ พบว่าในตำแหน่ง 4,198 สนิปส์ A พบเฉพาะในข้าวญี่ปุ่นเท่านั้น โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 210 คู่เบส ส่วนสนิปส์ G พบทั้งในข้าวญี่ปุ่นและข้าวไทยโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 683 คู่เบส สำหรับตำแหน่ง 4,329-4,330 พบสนิปส์ GC ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 540 คู่เบส และ TT ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 341 คู่เบส ทั้งในข้าวไทยและข้าวญี่ปุ่น ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 3 ซึ่งผลจากการตรวจสอบด้วยวิธี tetra-primer ARMS-PCR สอดคล้องกับผลที่ได้จากการหาลำดับเบส

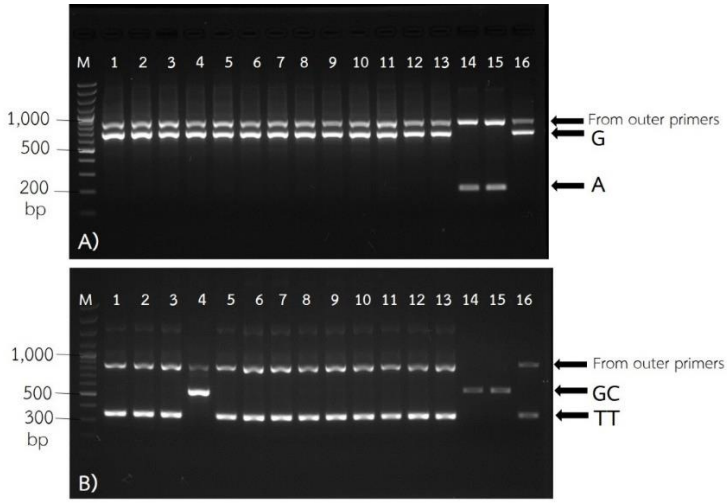
3.3 การศึกษาอุณหภูมิแป้งสุกในข้าวไทยและความสัมพันธ์กับสนิปส์ของยีน *SSIIa* ตำแหน่ง 4,329-4,330

การศึกษาระดับการสลายตัวในด่างของเมล็ดข้าวไทยที่ปลูกในฤดูนาปี จำนวน 39 พันธุ์ และนาปรัง จำนวน 40 พันธุ์ พบว่าในข้าวที่มีสนิปส์ GC มีค่าระดับการสลายตัวในด่างในช่วง 4-6 โดยส่วนใหญ่มีค่า 5 ส่วนข้าวที่มีสนิปส์ TT มีค่าระดับการสลายตัวในด่าง 6-7 โดยส่วนใหญ่มีค่า 7 เมื่อเปรียบเทียบค่าระดับการสลายตัวในด่างระหว่างข้าวที่มีรูปแบบสนิปส์ของยีน *SSIIa* ที่ตำแหน่ง 4,329-4,330 แตกต่างกัน พบว่าข้าวที่มีสนิปส์ TT มีระดับการสลายตัวในด่างสูงกว่าข้าวที่มีสนิปส์ GC อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในข้าวนาปีและนาปรัง (รูปที่ 4)

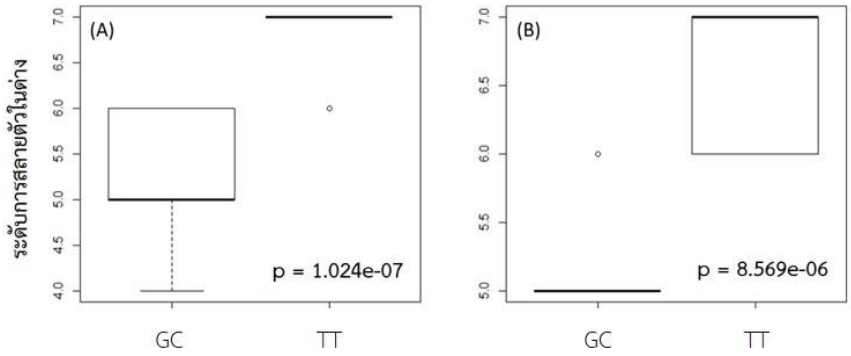
ตารางที่ 3 รูปแบบสนิปส์ของยีน *SSIIa* ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

ตำแหน่ง 4,198	ตำแหน่ง 4,329-4,330	รายชื่อพันธุ์ข้าว
A	GC	Nipponbare, Taichung 65
G	TT	Kitaake, ขาวดอกมะลิ 105, กข 15, กู้เมืองหลวง, กข 51, นางมลเอส 4, กข 6, สินเหล็ก, หอมมะลิแดง, แก่นจันทร์, เข็มทองพัทลุง, เหลือง No.1, ลืมผัว, หางยี 71, เหนียวเขี้ยวงู, ซิวแม่จัน, กข 16, เหมยนอง 62 เอ็ม, ปทุมธานี 1, พิษณุโลก 2, กข 39, กข 43, กข 21, กข 49, หอมสุพรรณ, กข 33, กข 14, กข 47, หอมนิล, ไรซ์เบอรี่, สันป่าตอง 1, กข 10, กข 41, ขาวใหญ่, กุหลาบแดง, ปลาแข็ง, ม้ามืด, เหรียญทอง, สุพรรณบุรี 90, สาวอุดร, สุพรรณบุรี 60, กข 35, หอมใบเตย, นางนวล, ขาวเมล็ดใหญ่, เหนียวตม, ดอหอม, ซัมบาย, เหนียวหอม, สาวหนองคาย, ขี้ตมแดง, กาบซาง, อีค่าง
	GC	เล็บมือนาง 111, ขาวตาแห้ง 17, ปราจีนบุรี 2, ปิ่นแก้ว 56, เสาไห้, ดอกพะยอม, หันตรา 60, ตะเภาแก้ว 161, กข 19, นางฉลอง, สุพรรณบุรี 1, ปทุมธานี 80, ชัยนาท 1, กข 7, กข 57
	GC และ TT	ชัยนาท 80, กอเดียว

หมายเหตุ : พันธุ์ข้าวที่มีการหาลำดับเบสยืนยันแสดงด้วยอักษรตัวหนา



รูปที่ 3 ผลการตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa* ด้วยวิธี tetra-primer ARMS-PCR: (A) การตรวจสอบสนิปส์ในตำแหน่ง 4,198 และ (B) ตำแหน่ง 4,329-4,330 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, Thermo Sciencetific, USA), 1-16 คือ ข้าวพันธุ์ (1) กข 43, (2) กข 49, (3) กข 21, (4) ปทุมธานี 80, (5) หอมสุพรรณ, (6) กข 33, (7) กข 14, (8) กข 47, (9) หอมนิล, (10) ไรซ์เบอรี่, (11) สันป่าตอง 1, (12) กข 10, (13) กข 41, (14) Nipponbare, (15) Taichung 65 และ (16) Kitaake



รูปที่ 4 เปรียบเทียบค่าระดับการสลายตัวในด่างระหว่างข้าวที่มีสนิปส์ GC และ TT : (A) ข้าวนาปี และ (B) ข้าวนาปรัง

4. วิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบสนิปส์ตำแหน่ง 4,198

การทดสอบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบสนิปส์ตำแหน่ง 4,198 โดยใช้ไพรเมอร์คู่ในทั้ง 4 คู่ พบว่าไพรเมอร์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเบสตำแหน่งที่ 3 นับจากปลาย 3′ มีความจำเพาะกับสนิปส์แต่ละแบบ และให้ผลการตรวจสอบชัดเจน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Ye และคณะ (2001) ซึ่งรายงานว่าตำแหน่งของเบสในไพรเมอร์ที่ควรจะเปลี่ยนแปลงเพื่อให้มีความจำเพาะกับสนิปส์แต่ละแบบ คือ ตำแหน่งที่ 3 นับจากปลาย 3′ และการเปลี่ยนแปลงเบสก็มีความเหมาะสมนั่นคือ บริเวณปลาย 3′ ของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับสนิปส์แต่ละแบบทำให้เกิด mismatch แบบ weak (C/A และ G/T) ดังนั้นจึงต้องเปลี่ยนเบสตำแหน่งที่ 3 ให้มี mismatch แบบ strong (A/G หรือ C/T) เพื่อให้ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับสนิปส์แต่ละแบบ ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้สามารถใช้ตรวจสอบสนิปส์ของข้าวได้อย่างแม่นยำ ทำได้ง่าย ให้ผลชัดเจน รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายถูกกว่าวิธี CAPS และการหาลำดับเบส จึงสามารถนำไปใช้ศึกษาประชากรที่มีขนาดใหญ่ หรือตัวอย่างจำนวนมากได้

4.2 สนิปส์ของยีน *SSIIa* และความสัมพันธ์กับอุณหภูมิแป้งสุกในข้าวไทย

การตรวจสอบสนิปส์ทั้ง 2 ตำแหน่ง ในข้าวไทยโดยใช้วิธี tetra-primer ARMS-PCR พบว่ามีความแม่นยำ เนื่องจากให้ผลการตรวจสอบเหมือนกับการตรวจสอบด้วยการหาลำดับเบส โดยการตรวจสอบสนิปส์ตำแหน่ง 4,198 ในข้าวไทยพบสนิปส์ G เท่านั้น ส่วนสนิปส์ A พบในข้าวญี่ปุ่นบางพันธุ์ สอดคล้องกับการรายงานของ Caffagni และคณะ (2013) ซึ่งสำรวจข้าวเจ้า 292 พันธุ์ พบว่าข้าวส่วนใหญ่มีสนิปส์ตำแหน่ง 4,198 เป็น G ส่วน A พบได้น้อย โดยเฉพาะในข้าวอินดิกาพบสนิปส์ A เพียง 4 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบสนิปส์ในตำแหน่ง 4,198 มีความสำคัญเนื่องจากถ้าสนิปส์ในตำแหน่ง 4,198 เป็น A อุณหภูมิแป้งสุกจะต่ำ ไม่ว่าในตำแหน่ง 4,329-4,330 จะเป็นสนิปส์แบบใดก็ตาม (Nakamura *et al*., 2005) แต่ถ้าเป็นสนิปส์ G อุณหภูมิแป้งสุกจะขึ้นอยู่กับสนิปส์ในตำแหน่ง 4,329-4,330 ซึ่งมี 2 รูปแบบ คือ GC และ TT ถ้าเป็น GC ข้าวจะมีอุณหภูมิแป้งสุกปานกลางถึงสูง แต่ถ้าเป็น TT ข้าวจะมีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ

(Bao *et al*., 2006) ซึ่งจากการทดลองในข้าวไทยที่มีสนิปส์ GC มีระดับการสลายตัวในด่างต่ำกว่าข้าวที่มีสนิปส์ TT อย่างมีนัยสำคัญ นั่นแสดงว่าข้าวที่มีสนิปส์ GC มีอุณหภูมิแป้งสุกสูงกว่าข้าวที่มีสนิปส์ TT ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานดังกล่าว ดังนั้นจึงสามารถใช้ไพรเมอร์ในการทดลองนี้คัดเลือกข้าวไทยที่มีอุณหภูมิแป้งสุกที่ต้องการได้

การทดลองพบว่าข้าวไทยมีสนิปส์ตำแหน่ง 4,329-4,330 เป็นแบบ TT มากถึง 52 พันธุ์ ในขณะที่สนิปส์ GC พบเพียง 15 พันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ วราภรณ์ และคณะ (2558) ซึ่งทดสอบอุณหภูมิแป้งสุกในข้าวพื้นเมืองในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแม่ฮ่องสอน พบว่าข้าวส่วนใหญ่ (ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์) มีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ

5. สรุป

การตรวจสอบสนิปส์ของยีน *SSIIa* โดยใช้ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ ร่วมกับไพรเมอร์ที่ได้จากการรายงานของ Lu และคณะ (2010) พบว่าสามารถตรวจสอบสนิปส์ได้อย่างแม่นยำ ชัดเจน รวดเร็ว และราคาถูก โดยให้ผลเช่นเดียวกับการหาลำดับเบส ในข้าวไทยสนิปส์ตำแหน่ง 4,198 พบเฉพาะ G เท่านั้น ส่วนสนิปส์ A พบในข้าวญี่ปุ่นบางพันธุ์ ในตำแหน่ง 4,329-4,330 พบสนิปส์ 2 แบบ คือ GC และ TT ซึ่งข้าวที่มีสนิปส์ GC มีอุณหภูมิแป้งสุกสูงกว่าข้าวที่มีสนิปส์ TT อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงสามารถใช้ไพรเมอร์ในการทดลองนี้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกข้าวเพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ ซึ่งจะช่วยลดพลังงานในการหุงต้มได้

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2559 ขอขอบคุณ ผศ.ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต ที่ช่วยให้คำแนะนำในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล และขอบคุณ ผศ.ดร.กฤษณะ ลาน้ำเที่ยง ที่ช่วยให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

7. รายการอ้างอิง

งามชื่น คงเสรี, 2547, คุณภาพข้าวสวย, น. 41-62, ใน คุณภาพและการตรวจสอบข้าวหอมมะลิไทย, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

วราภรณ์ กันทะวงค์, ศันสนีย์ จำจด, นริศ ยิ้มแย้ม และชนากานต์ เทโบลต์ พรมอุทัย, 2558, ความแปรปรวนของคุณภาพการหุงต้มในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแม่ฮ่องสอน, แก่นเกษตร 43(4): 687-698.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, ผลผลิตข้าว, แหล่งที่มา : http://www.thairiceexporters.or.th/production.htm, 14 สิงหาคม 2560.

Bao, J.S., Corke, H. and Sun, M., 2006, Nucleotide diversity in starch synthase IIa and validation of single nucleotide polymorphism in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.), Theor. Appl. Genet. 113: 1171-1183.

Caffagni, A., Albertazzi, G., Gavina, G., Ravaglia, S., Gianinetti, A., Pecchioni, N. and Milc, J., 2013, Characterization of an Italian rice germplasm collection with genetic markers useful for breeding to improve eating and cooking quality, Euphytica 194: 383-399.

Fitzgerald, M.A., McCouch, S.R. and Hall, R.D., 2009, Not just a grain of rice: The quest

for quality, Trends Plant Sci. 14: 133-139.

Jin, L., Lu, Y., Shao, Y., Zhang, G., Xiao, P., Shen, S. and Corke, H., 2010, Molecular marker assisted selection for improvement of the eating, cooking and sensory quality of rice (*Oryza sativa* L.), J. Cereal Sci. 51: 159-164.

Juliano, B.O. and Villareal, C.P., 1993, Grain Quality Evaluation of World Rices, International Rice Research Institute, Manila, 218 p.

Lu, Y., Xiao, P., Shao, Y., Zhang, G., Thanyasiriwat, T. and Bao, J., 2010, Development of new markers to genotype the functional SNPs of *SSIIa*, a gene responsible for gelatinization temperature of rice starch, J. Cereal Sci. 52: 438-443.

Nakamura, Y., Francisco, Jr.P.B., Hosaka, Y., Sato, A., Sawada, T., Kubo, A. and Fujita, N., 2005, Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between *japonica* and *indica* rice varieties, Plant Mol. Biol. 58: 213-227.

R Core Team, R: A language and environment for statistical computing, version 3.0.2. Vienna: R foundation for statistical computing, Available Source: http://www.r-project.org, September 25, 2013.

Shu, X.L., Shen, S.Q., Bao, J.S., Wu, D.X., Nakamura, Y. and Shu, Q.Y., 2006, Molecular and biochemical of the gelatinization temperature characteristics of rice (*Oryza satva* L.) starch granules, J. Cereal Sci. 44: 40-48.

Xu, F., Zhang, G., Tong, C., Sun, X., Corke, H., Sun, M. and Bao, J., 2013, Association mapping of starch physicochemical properties with starch biosynthesizing genes in waxy rice (*Oryza sativa L.)*, J. Agric. Food Chem. 61: 10110-10117.

Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R. and Day, I.N., 2001, An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymer-phisms, Nucl. Acids Res. 29(17): e88-8.