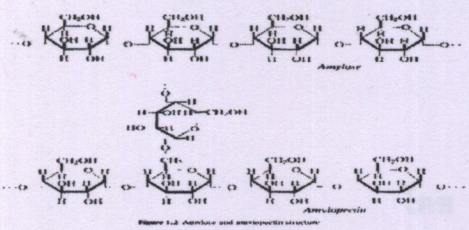
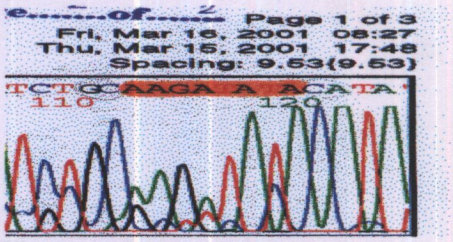
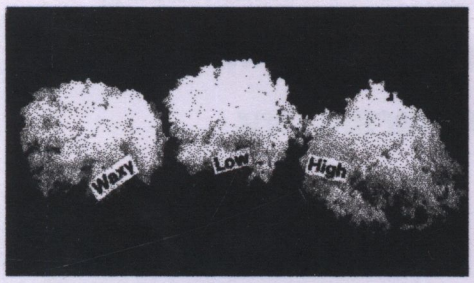
29 ก.ย. 2545

รายงานฉบับสมบูรณ์
โครงการ

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของ *Waxy* gene กับปริมาณแป้งอะมัยโลสในข้าวไทย







โดย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ประเทพา
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

25 กรกฎาคม 2545

BRT R_144006

รายงานฉบับสมบูรณ์
โครงการ

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของ *Waxy* gene กับปริมาณแป้งอะมัยโลสในข้าวไทย

โดย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ประเทพา
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สนับสนุนโดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบาย
การจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของ *Waxy* gene กับปริมาณแป้งอะมัยโลสในข้าวไทย" ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ภายใต้รหัสโครงการ BRT R_144006 มีระยะเวลาของการวิจัย 1 ปี ด้วยความตระหนักถึงความสำคัญของข้าวระหว่างนักวิจัยและแหล่งทุนที่เป็นผู้ให้การสนับสนุนการวิจัยนี้ จึงดำเนินการได้ ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบคุณโครงการ BRT ไว้ ณ ที่นี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสำนักงานเลขานุการของโครงการ BRT ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและประสานงานต่างๆ จนโครงการวิจัยนี้ดำเนินการจนสำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย

บทคัดย่อ

Waxy gene เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ granule-bound strach synthase (GBSS) รับผิดชอบในกระบวนการสร้างแป้งชนิดอะไมโลสในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว ซึ่งปริมาณของอะมัยโลสในเมล็ดข้าวนั้นมีความสัมพันธ์กับคุณภาพการหุงต้ม ข้าวที่มีอะมัยโลสสูงเมื่อหุงแล้วจะร่วนถึงร่วนแข็ง ส่วนข้าวเจ้าที่มีอะมัยโลสต่ำเมื่อหุงแล้วจะนุ่มน่ารับประทาน ข้าวไทยมีความหลากหลายของพันธุ์ทั้งที่เป็นพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ส่งเสริม นับได้ว่ามีฐานพันธุกรรมค่อนข้างกว้าง การศึกษา *Waxy* gene กับปริมาณอะมัยโลสในเชื้อพันธุ์ข้าวเหล่านี้นับเป็นความจำเป็นเพื่อที่จะใช้ในการระบุสายพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย และการสร้างฐานข้อมูลของเชื้อพันธุ์ข้าวเจ้าโดยการใช้ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *Waxy* gene ที่ปรากฏความหลากหลายกับเชื้อพันธุ์ข้าวแต่ละสายพันธุ์ที่มีปริมาณอะไมโลสเฉพาะตัวนั้นนำไปสู่การจัดการเชื้อพันธุ์ในด้านการนำมาใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณอะไมโลสตามที่ต้องการได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ 3 ประการคือ 1) ศึกษาความหลากหลายของอัลลีลที่ระบุโดยจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์แบบ CT และอัลลีลที่ระบุโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณรอยต่อระหว่างเอ็กซอน1-อินทรอน1 2) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีลส์ของยีนนี้กับปริมาณอะมัยโลสในเมล็ดข้าวสายพันธุ์ต่างๆ และ 3) ศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ในระดับโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และระดับ mRNA โดยใช้เทคนิค RT-PCR ผลการศึกษาที่ได้รับเป็นดังนี้

1) ข้าวที่ศึกษาความหลากหลายของอัลลีลที่ระบุโดยจำนวนซ้ำ CT ในข้าวจำนวน 63 สายพันธุ์พบว่ามีอัลลีลจำนวน 10 อัลลีลส์ คือ n=4,8,9,10,11,12,14,17,18 และ 19
2) ข้าวที่ศึกษาจำนวน 78 สายพันธุ์พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงรอยต่อระหว่างเอ็กซอน1กับอินทรอน1 มีอยู่ 3 แบบ คือ GGTATA (Wx^a), GTTATA(Wx^b) และ GATATA (Wx^c)
3) อัลลีลที่เป็นลักษณะเฉพาะของข้าวเหนียวและข้าวอะมัยโลสต่ำคือ อัลลีล $(CT)_{18}$ และอัลลีลที่พบเฉพาะในข้าวสายพันธุ์ที่มีปริมาณอะมัยโลสปานกลางและปริมาณสูงคืออัลลีล $(CT)_{11}$
4) ข้าวสายพันธุ์ที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำทุกสายพันธุ์มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบ GTTATA หรือ GATATA ขณะที่ข้าวสายพันธุ์ที่มีปริมาณอะมัยโลสปานกลางและปริมาณสูงมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบ GGTATA และข้าวสายพันธุ์ที่มีปริมาณอะมัยโลสปานกลางและสูงสามารถระบุได้จากการใช้เอนไซม์ *AccI* ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่
5) อัลลีล Wx^c เป็นอัลลีลใหม่ที่ไม่มีรายงานมาก่อนซึ่งพบเฉพาะในข้าวสายพันธุ์ที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำของไทยเท่านั้นและผลจากการศึกษาการแสดงออกของอัลลีลนี้พบว่ามีการแสดงออกทั้งในระดับโปรตีนและ ระดับ mRNA

Abstract

The rice *Waxy* gene encodes a granule-bound starch synthase (GBSS) for synthesis of amylose in endosperm tissue. In Thailand, there has been a lot of rice varieties with variation in apparent amylose content. Amylose content is a key determinant of the cooking and processing quality of rice (*Oryza sativa)*. Low amylose levels are usually associated with tender, cohesive, glossy cooked rice, while higher amylose levels tend to cook dry, be fluffy and separated. The objectives of this work are as follows:

1. To determine and accumulate of microsatellite classes located in *Waxy* gene, and the nucleotide sequence at the junction between exon1-intron1 of the *wx* locus. These allelic differences are further analyzed to determine the correlation with amylose content in their endosperm of rice strain used in this study.

2. To examine gene expression at the *wx* locus both *Waxy* gene product (Waxy protein) and mRNA levels by using SDS-PAGE and RT-PCR techniques, respectively.

The results obtained are as follows:

1. Among 63 strains examined, ten classes of microsatellites (or $(CT)_n$ repeats) were detected (n=4,8,9,10,11,12,14,17,18 and 19). One predominant class of $(CT)_{17}$ repeats was observed in the sample.
2. An unique microsatellite allele, $(CT)_{18,}$ was detected in glutinous cultivars and the cultivars with low amylose content. In additional, the microsatellite allele, $(CT)_{11}$, was also detected only in all the cultivars with intermediate and high amylose content.
3. Rice strains with low amylose content had the sequence GTTATA (allele Wx^b) or GATATA (allele Wx^c) at the putative leader intron 5' splice site, while all rice strains with intermediate and high amylose had GGTATA (allele Wx^a). Furthermore, rice strains with intermediate and high amylose could be detected by using a restriction enzyme, *AccI* to cleave the PCR products.
4. Based on the molecular evidence, the allele Wx^c in the *wx* locus was responsible for amylose synthesis as well as the other alleles.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ตั้งอยู่บนพื้นที่หลักของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หลักฐานทางโบราณคดีชี้ให้เห็นว่าประเทศไทยมีวัฒนธรรมการปลูกข้าวมาแล้วไม่น้อยกว่า 4,000 ปี ดังนั้นพื้นที่แห่งนี้นักวิชาการเชื่อว่าเป็นศูนย์กลางของความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าว (หรือ center of diversity) หลักฐานที่บ่งชี้ถึงสิ่งที่นักวิชาการเชื่อถือคือจำนวนสายพันธุ์ข้าวปลูกที่เป็นพันธุ์พื้นเมืองคาดว่ามีไม่น้อยกว่า 50,000 สายพันธุ์ การศึกษาวิจัยพื้นฐานด้านพันธุกรรมข้าวนับว่ามีความจำเป็นเพื่อความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของข้าวและนำไปสู่การนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการเกษตรเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ที่สำคัญคือข้อมูลที่แสดงถึงการเกิดวิวัฒนาการของข้าวปลูกจากอดีตถึงปัจจุบันโดยใช้การวิเคราะห์สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลต่างๆ นอกจากนี้การเกิดวิวัฒนาการของข้าวในบริบททางชีววิทยานั้นอาจเชื่อมโยงกับวิวัฒนาการของวัฒนธรรมข้าวในชุมชนจากยุคโบราณและมีวิวัฒนาการมาจนถึงปัจจุบัน

ข้อค้นพบใหม่จากการวิจัยนี้ที่น่าสนใจคือ การที่พบว่าสายพันธุ์ข้าวพื้นบ้านที่ปลูกในประเทศไทยทั้งชุมชนเมืองและชน กลุ่มน้อยทางภาคเหนือทั้งในประเทศไทยและชนกลุ่มน้อยในประเทศเพื่อนบ้านในแถบลุ่มน้ำโขงมีเอกลักษณ์ของทางพันธุกรรมของยีนแวคซีที่พบเฉพาะแถบลุ่มน้ำโขงเท่านั้นไม่พบในข้าวสายพันธุ์ที่ปลูกในภูมิภาคอื่นๆ ซึ่งผลจากการศึกษานี้สะท้อนให้เห็นถึงความเป็นเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมในข้าวในพื้นที่ลุ่มน้ำโขง ที่อาจจะมีวิวัฒนาการของสายพันธุ์ข้าวปลูกของตนเองแตกต่างไปจากสายวิวัฒนาการของข้าวปลูกในจีนหรือญี่ปุ่น ข้อสังเกตุนี้น่าจะได้รับการสนับสนุนให้มีการวิจัยต่อไปอีกในวงกว้างที่ครอบคลุมพื้นที่ในแถบลุ่มน้ำโขงเพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ในแวดวงวิชาการด้านข้าวที่เกิดขึ้นจากนักวิทยาศาสตร์ไทย

Executive Summary

Thailand is a country located in a main land of Southeast Asia, and it has been well recognized as a center of rice diversity, biological findings and historical records supports this view. The ancient sample of rice hulls were also found in some areas in Thailand and date back 4,000 years. Previously, Thai scholar indicated that there are around 50,000 (or more) traditional rice strains in Thailand. Thus, genetic information existing in these rice strains are important in context of rice evolution, breeding and ,as a result, correlation and association to cultural context of people in this region.

Granule-bound starch synthase (GBSS), a product of the *Waxy* gene in rice (*Oryza sativa* L.), is necessary for the synthesis of amylose in the endosperm. Amylose content is a major determinants of eating quality of rice. New finding resulting from this study is that rice strains in main land of Southeast Asia carried the new functional allele. Previously, two alleles Wx^a and Wx^b have been reported by rice researchers. The new allele, Wx^c, was found in the first time and reported to science. Moreover, this allele is prominent in traditional cultivar in Southeast Asia but not found in another region. This means that the Mekong strain has a different pathway in genetic evolution compared to strains of another regions. With respect to this finding, a basic research in terms of DNA analysis should be further made in large scale of samples and deeper DNA examined of these strains are necessary to investigate for a new knowledge in context of rice in Southeast Asia.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
การศึกษา *Waxy* gene ในข้าวจากอดีตถึงปัจจุบัน	1
แนวคิดและการศึกษา *Waxy* gene ในข้าวไทย	3
วิธีการศึกษาข้อมูลต่างๆที่บรรจุอยู่ใน *Waxy* gene	3
-การศึกษาไมโครแซทเทลไลท์และบริเวณนิวคลีโอไทด์จำเพาะ	3
-การวิเคราะห์ปริมาณอะมัยโลสในข้าวป่าและข้าวปลูก	3
-การศึกษาการแสดงออกของ *Waxy* gene โดยเทคนิค SDS-PAGE และ RT-PCR	7
ผลการศึกษา	5
-ผลลัพธ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่ของการศึกษา *Waxy* gene	5
-จำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์แบบ CT	6
-ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 5' splice site junction	6
-ปริมาณอะมัยโลสในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ	6
-การศึกษา Waxy protein และ mRNA ของ *Waxy* gene	6
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	10
เอกสารอ้างอิง	11
ภาคผนวก	12

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาและคุณสมบัติต่าง ๆที่ได้ศึกษา ภาคผนวก

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1	ภาพถ่ายเจลที่ได้จากการศึกษา *Waxy* gene โดยใช้เทคนิค PCR	5
ภาพที่ 2	แสดงจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์แบบ CT ใน *Waxy* gene	6
ภาพที่ 3	แสดงนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 5' splice site ของอินทรอนที่ 1	6
ภาพที่ 4	ภาพภ่ายเจลแสดงผลการตัด PCR products ของ *Waxy* gene โดยใช้เอนไซม์ *AccI*	7
ภาพที่ 5	ภาพถ่ายเจล SDS-PAGE แสดง Waxy protein ซึ่งมีขนาด 60 กิโลดาลตัน	8
ภาพที่ 6	ภาพถ่ายเจลแสดงผลของ RT-PCR ในข้าวขาวดอกมะลิ 105	9

การศึกษา Waxy gene ในข้าวจากอดีตถึงปัจจุบัน

Waxy gene ในข้าวซึ่งจะควบคุมการสังเคราะห์ waxy protein ที่เรียกว่า granule-bound starch synthase (GBSS) นั้น มีการศึกษา ดังนี้

- Khush *et al.* (1984) ได้รายงานว่า waxy locus อยู่บนโครโมโซมที่ 3 จะควบคุมการสร้าง amylose ใน endosperm ของเมล็ดข้าว
- Sano (1984) พบว่ามีโปรตีนขนาด 60 kdal ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน waxy ในข้าว ซึ่งโปรตีนนี้เรียกว่า waxy protein ที่มีรายงานในข้าวโพดเอาไว้แล้วและมีขนาดโมเลกุลเท่ากัน
- Sano *et al.* (1986) ได้รายงานว่า waxy gene มี 2 อัลลีลส์ คือ Wx^a และ Wx^b ใช้ผลการศึกษาจาก two-dimensional electrophoresis และการแสดงออกของอัลลีล Wx^a จะมีมากกว่าอัลลีล Wx^b ซึ่งวัดจากความเข้มข้นหรือปริมาณโปรตีน (วัดการแสดงออกของยีนระดับ protein level) จากการใช้เทคนิค SDS-PAGE
- Taira *et al.* (1991) ได้รายงานผลของการศึกษาโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ว่า waxy protein ในเอ็นโอสเปิร์มข้าวเจ้า (nonglutinous rice) ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบและมีขนาดโมเลกุล 60 กิโลดาลตัน (kd) ขณะที่ในข้าวเหนียว (glutinous rice) ไม่พบโปรตีนดังกล่าว และยังพบว่าแป้งอะไมโลสที่มีอยู่ในใบข้าวนั้นถูกควบคุมโดยยีนอื่นที่ไม่ใช่ยีน Waxy ที่ควบคุมการสร้างแป้งอะไมโลสในเอ็นโดสเปิร์ม
- ในปี ค.ศ. 1991 R. J. Okayaki [Dep of Vegetable Crops, University of Florida, USA) ได้submitted ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของ waxy gene ของข้าวปลูก (O. sativa) ไปลงทะเบียนที่ NCBI ระบุว่าเป็นยีน ไม่ได้ระบุ exon และ intron (GenBank database Acc. X62134 S39554)
- ต่อมา ในปี ค.ศ. 1992 ได้มีกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ของจีนคือ Wang และคณะ ได้ submitted ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ waxy gene ในข้าวปลูกไปลงทะเบียนที่ NCBI (GenBank database Acc. X65183)และได้ระบุส่วนที่เป็น exon จำนวน 13 exons และ intron จำนวน 12 introns ในอินทรอนที่ 1 พบว่าเริ่มต้นด้วย GT
- ในปี ค.ศ. 1995 ได้มีกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ของจีนกลุ่มเดิมนำโดย Wang และคณะ ที่ทำงานที่ Institute of Plant Physiology, Academic Sinica, Shanghai, People's Republic of China) ได้รายงานว่า ปริมาณ amylose ที่มีอยู่ใน endosperm นั้นมีความสัมพันธ์กับการควบคุมการแสดงออกของยีนหลังจากที่มีการถอดรหัสแล้ว (post-transcriptional regulation) โดยพบว่า
    - ข้าวในกลุ่มที่มีปริมาณ amylose สูง จะพบ waxy protein ปริมาณมาก และจะพบเฉพาะ mature 2.3kb Wx mRNA เท่านั้น
    - ข้าวในกลุ่มที่มีปริมาณ amylose ปานกลาง (intermediate amylose) จะพบว่ามีปริมาณ waxy protein ปานกลาง และพบ mature 2.3kb Wx mRNA และ 3.3kb Wx pre-mRNA (ซึ่งมี intron 1 ที่มีขนาดประมาณ 1 kb อยู่ด้วย)
    - ข้าวในกลุ่มที่มีปริมาณ amylose ต่ำ (0-2%) หรือ ข้าวเหนียว (glutinous rice) จะไม่พบ waxy protein เลย และไม่พบ mature 2.3 kb mRNA แต่จะพบ 3.3 kb Wx pre-mRNA เท่านั้น

  ผลการศึกษานี้สรุปว่า ถ้ามีการตัดเอา DNA ส่วนที่เป็น intron 1 ออกไป ทำให้กระบวนการ สร้าง mature Wx mRNA ได้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ทำให้ได้ปริมาณอะไมโลสในปริมาณมาก เพราะว่ายีนสามารถสร้าง waxy protein (GBBS) ที่จะไปใช้ในปฏิกิริยาสร้าง amylose ในเม็ดแป้ง (starch granule) ได้ในปริมาณปกติ

- ต่อมา Cai *et al.* (1998) ซึ่งเป็นนักวิจัยในกลุ่มของ Wang ได้รายงานผลการศึกษาต่อมาเพื่อยืนยันว่าในกระบวนการตัดต่อ exon ใน waxy pre-mRNA นั้น ถ้ามีความผิดปกติเกิดขึ้นคือ ยังคงมี DNA ส่วนที่เป็น intron1 ติดอยู่ที่ด้านปลาย 5' ของ 2.3 kb mRNA ซึ่งเรียกบริเวณ DNA ที่ติดอยู่นี้ว่า heterogeneous 5' untranslated region หรือ 5'-UTR สาเหตุที่ทำให้การตัด DNA ส่วนนี้เกิดความผิดปกติเนื่องจากว่าผลการวิเคราะห์ cDNA ของ intron 1 พบว่ามีตำแหน่งที่เรียกว่า splice donor site จำนวน 4 แห่ง และ splice acceptor site อีก 3 แห่ง ทำให้เกิดการตัดต่อเกิดขึ้นได้จำนวน 6 รูปแบบ (การตัดต่อแบบปกติจะมี 1 splice donor site และ 1 splice acceptor site) อาจจะได้ 2.3kb Wx mRNA ที่สมบูรณ์ หรือเกิด 3.3kb Wx pre-

mRNA ก็ได้ และยังพบว่าเมื่อมีการตัดต่อเป็นแบบผิดปกติทำให้เกิดนิวคลีโอไทด์ที่อยู่รอยต่อระหว่าง Exon1 และ Exon2 ขาดหายไป 4-5 นิวคลีโอไทด์ หรือเพิ่มขึ้นมา 7 และ 13 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ intron1 ในข้าวกลุ่มที่มี amylose สูง และกลุ่มที่มี amylose ปานกลาง พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกันจำนวน 16 นิวคลีโอไทด์ จากหลักฐานตรงนี้ทำให้นักวิจัยกลุ่มนี้สรุปว่า น่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การตัด intron1 ออกไปจึงไม่เกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ในกระบวนการตัดต่อ exon

- ในปี ค.ศ. 1997 ศาสตราจารย์ Park และทีมวิจัย จากมหาวิทยาลัย Texas A&M (Texas A&M University) ได้พบว่าใน waxy gene นั้น ในพันธุ์ข้าวของอเมริกาที่มีปริมาณ amylose น้อยกว่า หรือเท่ากับ18% บริเวณด้าน 5' splice site ของ Wx leader intron (คือ intron1) มีลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นเป็นดังนี้ AGTTATA ส่วนพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณ amylose สูงกว่า 18% จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวเป็นดังนี้ AGGTATA ทีมวิจัยทีมนี้ได้สรุปว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เพียง 1 นิวคลีโอไทด์ (G->T) นั้นมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณ amylose ใน endosperm ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในข้าวเหนียวที่ศึกษานั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นของ intron 1 เป็น AGTTATA และที่น่าสนใจคือ การเปลี่ยนแปลงของ นิวคลีโอไทด์เพียงตัวเดียวนี้สามารถตรวจสอบได้โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Acc*I ตัดชิ้น DNA ที่เพิ่มปริมาณขึ้นจากการใช้เทคนิค PCR
- ต่อมา ในปี ค.ศ. 1998 ได้มีทีมวิจัยจากญี่ปุ่นได้ คือ ศาสตราจารย์ Sano และคณะ ได้ระบุว่าอัลลีล Wx^a นั้นมีความแตกต่างกับอัลลีล Wx^b เพียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นจุดเริ่มต้นของ intron1 คือ อัลลีล Wx^a มีนิวคลีโอไทด์เป็น GG ส่วนอัลลีล Wx^b มีนิวคลีโอไทด์เป็น GT โดยอัลลีล Wx^a มีการแสดงออกในระดับสูงกว่าอัลลีล Wx^b สอดคล้องกับที่ทีมวิจัยนี้ได้รายงานไปแล้วในปี 1986
- และในปี ค.ศ. 1998 ได้มีทีมวิจัยจากญี่ปุ่นนำโดย K. Shimamoto จาก Laboratory of Plant Molecular Genetics, Nara Institute of Science and Technology, Takayama ได้รายงานผลที่สอดคล้องกับทีมของ Sano ว่า การเกิดมิวเทชันบริเวณที่เริ่มต้นของ intron 1จากนิวคลีโอไทด์ G (Wx^a) ไปเป็น T (Wx^b)นั้นเกิดได้โดยธรรมชาติ และส่งผลทำให้การแสดงออกของยีนรายงานผลคือ GUS gene แสดงออกได้น้อยกว่า เรียกการเกิดมิวเทชันแบบนี้ว่า a single base mutation ที่ปลาย 5' splice site ของ intron1 ดังนั้นการเกิดเหตุการณ์อย่างนี้ได้เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ คือ เดิมอัลลีล Wx^aที่เป็นต้นกำเนิดของอัลลีล Wx^b นั้น จะพบเฉพาะในข้าวป่าเท่านั้น ไม่พบอัลลีล Wx^b เลย เมื่อเกิดมิวเทชันแล้วจะได้ข้าวพันธุ์ที่มีปริมาณ amylose ต่ำและมีการเก็บรักษานิวคลีโอไทด์แบบ GT ใน intron1 มาตลอดระยะเวลาของประวัติการปลูกข้าวพันธุ์นั้นๆ
- ในปี ค.ศ. 1999 ศาสตราจารย์ W.D. Park ได้รายงานว่าพันธุ์ข้าวที่มีนิวคลีโอไทด์แบบ GTTATA จะมีการสะสมของ mature GBSS transcripts (หมายถึง mature Wx mRNA) ได้มากอย่างเห็นได้ชัดที่อุณหภูมิ 18° C เมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 25° C และ 32° C ส่งผลทำให้ข้าวที่ปลูกในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าจะมีมีปริมาณอะมัยโลสสูงกว่า
- และจากปี ค.ศ. 1999 ถึงปัจจุบัน ได้มีการรายงานผลการศึกษาใน waxy gene ข้าวพันธุ์ปลูก ออกมาเป็นระยะๆ ผลจากการประมวลข้อสรุปของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนข้อสังเกตที่ได้จากการวิเคราะห์ มีดังนี้

  1. ยีนนี้มีขนาดประมาณ 5,016 bp (5 kb) ประกอบด้วย 14 exon และ 13 intron
  2. บริเวณ exon1 จะพบ microsatellite แบบ $(CT)_n$ ที่มีจำนวนซ้ำ (n)ที่แตกต่างกันแล้วแต่พันธุ์ข้าว
  3. บริเวณเริ่มต้นของ intron 1 จะเริ่มต้นด้วย GG หรือ GT เท่านั้น ถ้าเริ่มต้นด้วย GG เรียกว่าอัลลีล Wx^a ส่วนที่เริ่มต้นด้วย GT เรียกว่าอัลลีล Wx^b
  4. บริเวณถัดจากไมโครแซทเทลไลท์ CT ขึ้นไปทางด้าน 5' จะพบว่ามีลำดับเบสจำนวน 48 เบส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ข้าวต่างๆพบว่าเป็นบริเวณที่มีลำดับเบสเหมือนกัน
  5. intron1 มีขนาดประมาณ 1 kb ในกระบวนการตัดต่อ exon หรือ DNA splicing นั้น ถ้า Wx mRNA ยังคงมี intron 1 อยู่ด้วยจะ และมีผลต่อการสร้างปริมาณแป้ง amylose ใน endosperm ที่มีปริมาณน้อยกว่าระดับปกติ

แนวคิดและการศึกษา Waxy gene ในข้าวไทย

จากการค้นคว้าเอกสารรายงานเกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณแป้งอะมัยโลสในข้าวไทยพบว่า ข้าวไทยมีความหลากหลายทางด้านปริมาณแป้งอะมัยโลส ซึ่งสามารถใช้ในการจัดกลุ่มสายพันธุ์ข้าวตามปริมาณแป้งอะมัยโลสเป็น กลุ่มข้าวเหนียว ข้าวเจ้าที่มีแป้งอะมัยโลสต่ำ (<19%) ข้าวเจ้าที่มีแป้งอะมัยโลสปานกลาง (20-25%) และข้าวเจ้าที่มีแป้งอะมัยโลสสูง (>25%) ข้อมูลทางด้านโมเลกุลของยีนที่ควบคุมการสร้างแป้งอะมัยโลสยังไม่พบรายงาน ในขณะที่พบว่ามีผลการศึกษายีนนี้ในวารสารวิชาการที่เป็นผลงานของนักวิจัยในต่างประเทศที่ได้ศึกษาวิจัยตัวอย่างข้าวของต่างประเทศที่เก็บเป็นเชื้อพันธุ์ดังที่ได้นำเสนอไปแล้วในเบื้องต้น

ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาวิจัยข้อมูลระดับโมเลกุลของ Waxy gene ในข้าวของไทย โดยใช้ตัวอย่างข้าวทั่วประเทศที่สามารถเก็บรวบรวมได้ในระยะเวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดโครงการวิจัยนี้

วิธีการศึกษาข้อมูลต่าง ๆที่บรรจุอยู่ใน Waxy gene

1) การศึกษาไมโครแซทเทลไลท์และบริเวณนิวคลีโอไทด์จำเพาะ

- การออกแบบไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการศึกษานั้นจะใช้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่เป็นของยีนแวคซี ที่มีอยู่ใน GenBank ที่มีรหัส (accession number) AF031162 (http://www.ncbi.nlm.gov:80/) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงจาก 5' → 3' ดังนี้

1 ACCATTCCTT CAGTTCTTTG TCTATCTCAA GACACAAATA ACTGCAGTCT CTCTCTCTCT
61 CTCTCTCTCT CTCTCTCTCT CTCTCTCTGC TTCACTTCTC TGCTTGTGTT GTTCTGTTGT
121 TCATCAGGAA GAACATCTGC **AAGGTATA**CA TATATGTTTA TAATTCTTTG TTTCCCCTCT
181 TATTCAGATC GATCACATGC ATCTTTCATT GCTCGTTTTT CCTTACAAGT AGTCTCATAC
241 ATGCTAATTT CTGTAAGGTG TTGGGCTGGA AATTAATTAA TTAATTAATT GACTTGCCAA
301 GATCCATATA TATGTCCTGA TATTAAATCT TCGTTCGTTA TGTTTGGTTA GGCTGATCAA
361 TGTTATTCTA GAGTCTAGAG AAACACACCC AGGGGTTTTC CAACTAGCTC CACAAGATGG
421 TGGGCTAGCT GACCTAGATT TGAAGTCTCA CTCCTTATAA TTATTTTATA TTAGATCATT
481 TTCTAATATT CGTGTCTTTT TTTATTCTAG AGTCTAGATC TTGTGTTCAA CTCTCGTTAA

ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบคือไพรเมอร์ F ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-ACCATTCCTTCAGTT CTTTGTCT-3' และไพรเมอร์ R ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'TAG CAT GTA TGA GAC TAC TTG TAA 3' ไพรเมอร์ทั้งสองมีเบสที่เป็น G และ C คิดเป็น 39.1% และ 33.3% ตามลำดับ โดยทั่วไปค่านี้จะอยู่ระหว่าง 40-60% เป็นค่าที่เหมาะสม น้อยกว่าได้แต่ต้องไม่เกิน 60% การออกแบบไพรเมอร์ต้องคำนึงถึงค่านี้ด้วยถ้าจะทำให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถนำไปใช้ได้ผล

- การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว ใช้วิธีการของ Doyle and Doyle (1987)
- องค์ประกอบในปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

ในปฏิกิริยาลูกโซ่ที่มีการปรับแต่งแล้วและทำการทดลองได้ผล มีองค์ประกอบดังนี้ ปริมาตรที่ใช้ทำปฏิกิริยาคือ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ F และ R อย่างละ 10 พิโคโมล, ความเข้มข้นของ Mg^{2+} 1.5 มิลลิโมลาร์, ความเข้มข้นของ dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์ และใช้เอนไซม์ *Taq* polymerase 0.5 หน่วย

- ปฏิกิริยาลูกโซ่

ปฏิกิริยาลูกโซ่ประกอบด้วยขั้นตอน denature ที่ 94 องศา 1 นาที annealing ที่ 60 องศา 1 นาที และ extension ที่ 72 องศา 1 นาที 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และอีก 1 รอบสำหรับ extension ที่ 72 องศา นาน 5 นาที ปฏิกิริยาลูกโซ่ใช้เครื่อง Hybaid thermocycler (Biorad)

- การตรวจสอบผลลัพธ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่

ตรวจสอบโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเลคโทรฟอริซิส ใช้เจลเข้มข้น 2% สารละลายบัฟเฟอร์ TBE เข้มข้น 0.5X ใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 75 โวลต์ และย้อมเจลด้วยสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ และส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transiluminator)

- การทำ direct DNA sequencing

เมื่อพบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลลัพธ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่แล้ว จะตัดเจลที่มีดีเอ็นเอนั้นออกมา และทำให้ดีเอ็นเอแยกออกจากเจลและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ชุดสารละลายสำหรับใช้ทำให้แยกดีเอ็นเอออกมาจากเจลคือชุด QIAquick Gel extraction kit (Qiagen).

การทำ direct sequencing นั้นจะใช้เฉพาะไพรเมอร์ F สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่ จะใช้ชุดทดลองที่เรียกว่า Taq Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem) ก่อนที่จะนำไปวิเคราะหลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (ABI Model 377 automatic sequencer)

2) การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสในตัวอย่างข้าวป่าและข้าวปลูก การศึกษาจำนวนซ้ำนิวคลีโอไทด์แบบ CT ของยีนแวคซี และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่เรียกว่า the 5' leader intron splice site

ก) ตัวอย่างเมล็ดข้าวป่าและข้าวปลูกที่ใช้ในการศึกษานี้จะวิเคราะห์ปริมาณแป้งอะไมโลส จากเมล็ดที่ตัดแบ่งครึ่ง ส่วนครึ่งหลังที่เป็นส่วนคัพภะจะนำไปเพาะให้เป็นต้นข้าวเพื่อสกัดดีเอ็นเอ ภายหลังจากที่สกัดดีเอ็นเอแล้วได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย และได้จัดกลุ่มของตัวอย่างข้าวตามปริมาณแป้งอะไมโลส คือต่ำ (< 20%) ปานกลาง (20-25%) และสูง (>25%) ตามเกณฑ์ของสถาบันวิจัยข้าว หลังจากนั้นข้าวปลูกพันธุ์ต่างๆได้นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อศึกษาจำนวนซ้ำ CT และเพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณอินทรอน1 ว่าเป็นแบบใดใน 3 แบบ (GGTATA หรือ GTTATA หรือ GATATA)

ข) ตัวอย่าง PCR products ของข้าวทุกพันธุ์ได้ถูกนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AccI* เพื่อศึกษาว่าตัวอย่างข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสที่ระดับต่างๆ นั้นเอนไซม์ดังกล่าวสามารถตัด PCR products ของพันธุ์ข้าวนั้นๆได้หรือไม่

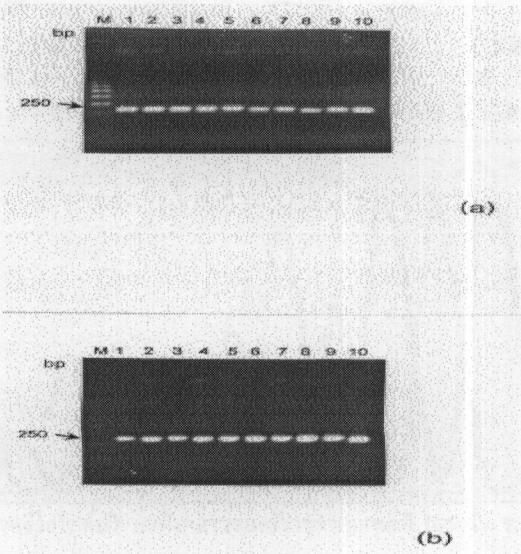
3) การศึกษาการแสดงออกของยีนแวคซี

การแสดงออกของยีนแวคซีได้มีการศึกษา 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน (protein level) และระดับ mRNA โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ตามลำดับ

กระบวนการศึกษาโปรตีนแวคซี (Waxy protein) อันเป็นผลผลิตของการแสดงออกของยีนแวคซี นั้นจะใช้วิธีการของ Sano (1984) และ Echt and Schwartz (1981) ส่วนการศึกษา mRNA ของยีนนี้จะสกัด mRNA จากเมล็ดข้าวที่ยังไม่สุกแก่ โดยมีอายุเมล็ดหลังจากออกดอกประมาณ 18 วัน กระบวนการสกัดแยก mRNA จะใช้ TRIZOL reagent (Life Technologies,BRL) และกระบวนการสังเคราะห์ cDNA และ RT-PCR จะใช้ชุดทดลอง SUPERSCRIPT™ One-Step RT-PCR with PLATINUM® *Taq* (Life Technologies,BRL) ที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนนี้ที่ออกแบบโดย Bligh *et al.* (1998)

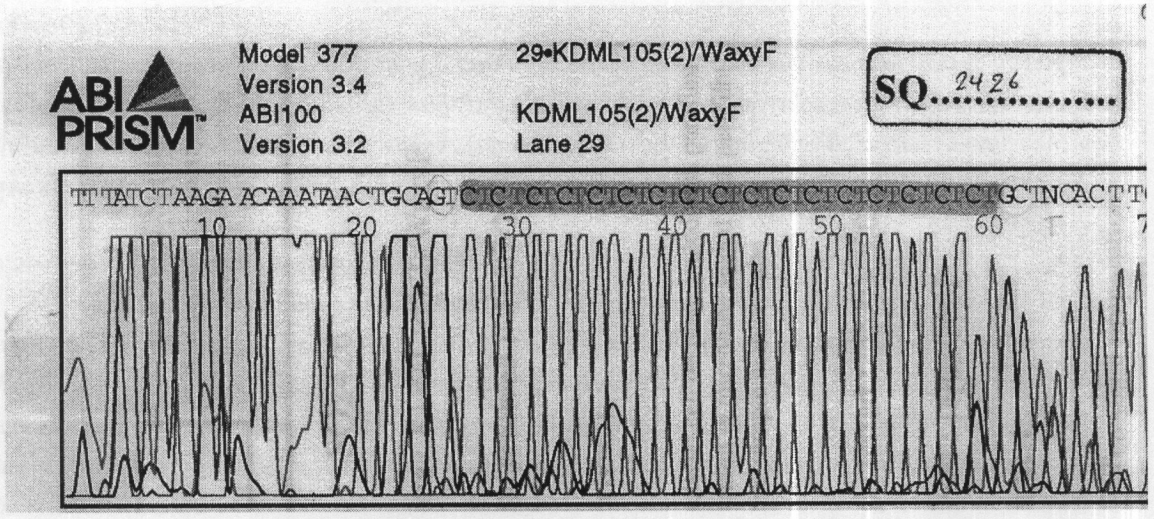
ผลการศึกษา

1) ผลลัพธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้น พบว่ามีขนาดของแถบดีเอ็นที่ได้จากปฏิกิกริยาประมาณ 250 คู่เบส แสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ภาพถ่ายเจลที่แสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่เป็น PCR products ของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ใช้เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอบางส่วนของยีนแวคซี โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ

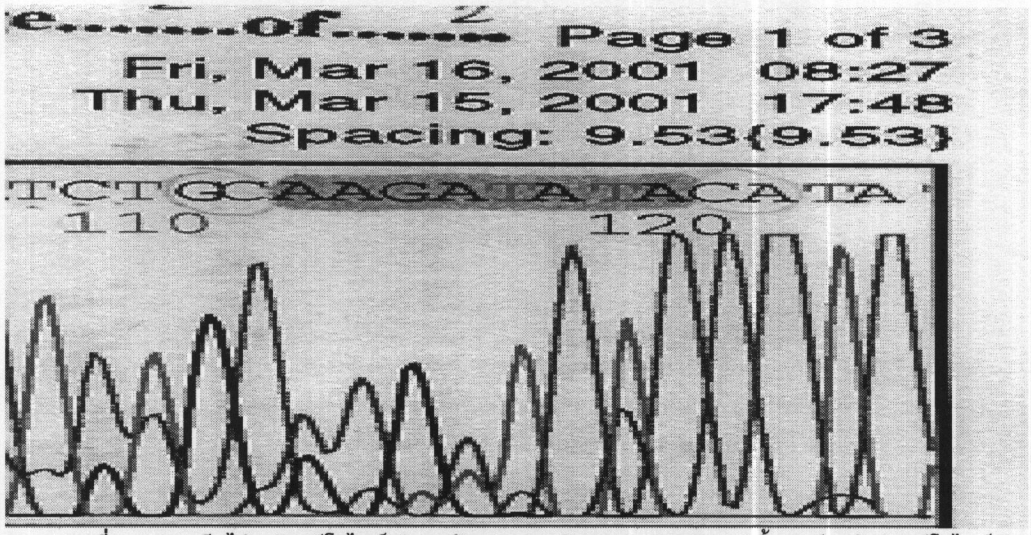
2) หลังจากที่นำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ที่อยู่บนยีนแวคซีและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณด้าน 5' ของอินทรอนที่ 1 ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงไมโครแซทเทลไลท์แบบ CT ที่ซ้ำๆกันอยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแวคซีในข้าว ตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่ใช้คือ ขาวดอกมะลิ 105 จากอำเภอนาหว้า จังหวัดนครพนม ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จะมีจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ 17 ซ้ำ เขียนย่อๆคือ $(CT)_{17}$

3) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณด้าน 5' ของอินทรอน 1

ในขณะเดียวกันลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณด้าน 5' ของอินทรอน 1 ของยีนนี้จะได้จากการทดลองนี้เช่นกัน ซึ่งได้ผลดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงเห็นได้ว่านิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวของข้าวขาวดอกมะลิ 105 นั้น จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบ GATATA

4) ผลการศึกษาปริมาณอะมัยโลสในข้าวพันธุ์ต่างๆแสดงในตารางที่ 1 สรุปได้ว่าตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่นำมาศึกษานั้น แบ่งออกเป็น

4.1 ข้าวเหนียว ซึ่งถ้าบดเอ็นโดสเปิร์มแล้วย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน จะเห็นเป็นสีน้ำตาลแดง ปริมาณแป้งอะมัยโลสที่มีอยู่จะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 3-8%

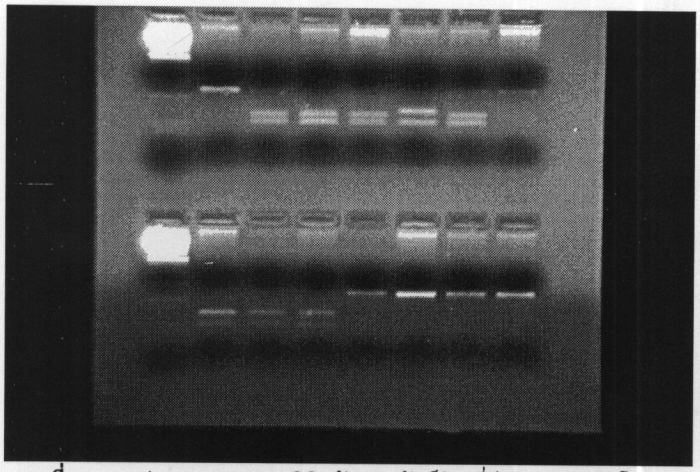
4.2 ข้าวเจ้า ถ้าปริมาณอะมัยโลสมากกว่านี้คือเริ่มจาก 9% ขึ้นไปเมื่อย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนแล้วจะปรากฏเป็นสีน้ำเงิน พันธุ์ข้าวเจ้าที่ศึกษาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอะมัยโลสต่ำ (<20%) ปานกลาง (20-25%) และสูง (>25%) เมื่อย้อมสีแล้วจะเห็นเป็นสีน้ำเงิน

5) การวินิจฉัยระหว่างสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำกับสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสปานกลางและสูง นั้นจะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *ACCI* ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ดังแสดงในภาพที่ 1 ผลการตัดแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำเอนไซม์ชนิดนี้ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอได้ แตกต่างไปจากสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสปานกลางและสูงเอนไซม์นี้สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอชิ้นนี้ได้

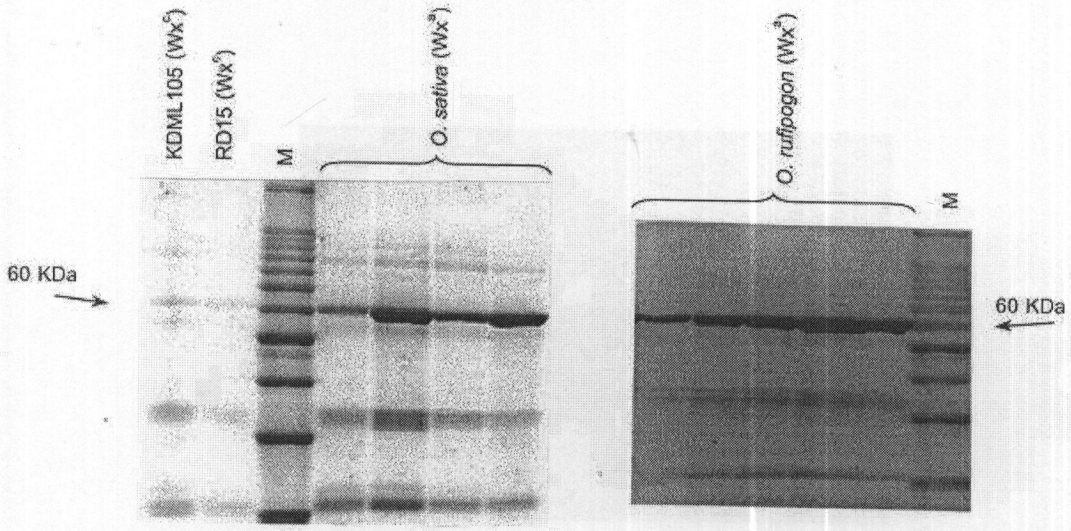
6) ผลการศึกษาโปรตีนแวคซีและmRNA ของยีนแวคซี

โปรตีนแวคซีของข้าวที่ศึกษา แบ่งออกเป็นข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำ จำนวน 2 พันธุ์ คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และกข15 และข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสปานกลางและสูงทั้งข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวป่า ผลการศึกษาแสดงในภาพที่ 5 โปรตีนแวคซีที่ศึกษามีขนาดเท่ากับโปรตีนแวคซีของข้าวพันธุ์อื่นๆที่มีรายงานมาก่อนแล้ว โปรตีนแวคซีมีขนาดโมเลกุล 60 กิโลดาลตัน ระดับการแสดงออกของยีนนี้แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำกับพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสปานกลางและสูง ระดับของโปรตีนแวคซีในพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะลัยโลสปานกลางและสูงจะมีปริมาณมากกว่าในพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำ (ภาพที่ 6)

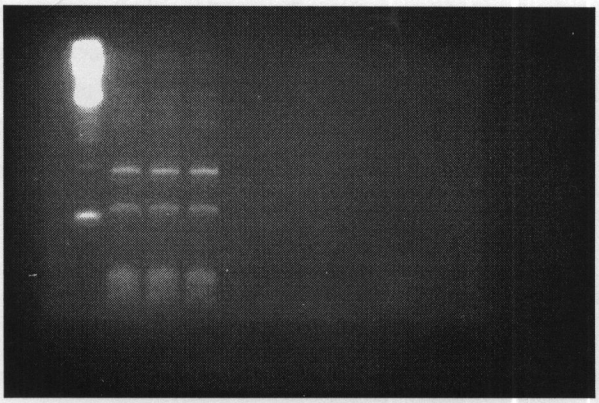
ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ในพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำนั้นได้ผลเช่นเดียวกันกับผลการศึกษาในพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำดังเช่นผลการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์คนอื่นๆ (Larkin and Park, 1999; Wang *et al.*,1995) คือ แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ 2 แถบที่มีขนาด 120 คู่เบส และ 210 คู่เบส



ภาพที่ 4 ภาพถ่ายเจลแสดงการวินิจฉัยสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสปานกลางและสูง ซึ่งเอนไซม์ *AccI* ตัดชิ้นดีเอ็นได้เป็น 2 ชิ้น และสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำซึ่งเอนไซม์ *AccI* ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ได้ (ช่องที่ 1 = DNA marker)



ภาพที่ 5 ภาพถ่ายเจล(SDS-PAGE) แสดง starch-granule-Wx protein ของเมล็ดข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆซึ่งมีขนาดโมเลกุล 60 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 6 ภาพถ่ายเจลแสดงผลของ RT-PCR ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำ

(ดีเอ็นเอแถบบนมีขนาด 210 คู่เบสและแถบล่างมีขนาด 120 คู่เบส)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ความหลากหลายของยีนแวคซี

ความหลากหลายของยีนแวคซีนั้นสามารถระบุได้จากความแตกต่างของจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์แบบ CT (ให้สัญลักษณ์เป็น n) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นจุดเริ่มต้นของอินทรอนที่ 1 (the putative leader intron 5' splice site) จากการศึกษาในข้าวจำนวน 86 สายพันธุ์(strain) ไมโครแซทเทลไลท์แบบ CT ที่สามารถระบุจำนวนซ้ำ(n) ได้ชัดเจนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ในสายพันธุ์ข้าวจำนวน 63 สายพันธุ์ พบว่ามีจำนวนอัลลีลส์ 10 อัลลีลส์ หมายถึงสายพันธุ์ข้าวที่ศึกษามีจำนวนซ้ำของ CT ทั้งหมด 10 แบบเป็นดังนี้คือ n= 4, 8, 9, 10,11,12,14,17, 18 และ 19 และเมื่อจัดกลุ่มของอัลลีลส์ตามปริมาณแป้งอะมัยโลสในเมล็ดที่แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มสรุปได้ดังนี้

กลุ่มพันธุ์ข้าวที่มีอะมัยโลสต่ำ (<20%)	กลุ่มพันธุ์ข้าวที่มีอะมัยโลสปานกลาง (20-25%)	กลุ่มพันธุ์ข้าวที่มีอะมัยโลสสูง (>25%)
n=17 (29 สายพันธุ์)	n=9(4 สายพันธุ์)	**n=11(8 สายพันธุ์)***
n=18 (6 สายพันธุ์)*	n=10(3 สายพันธุ์)	n=17(32 สายพันธุ์)
n=8(1 สายพันธุ์) n=14(1 สายพันธุ์)	n=12(4 สายพันธุ์)	n=19(3 สายพันธุ์) n=4 (1 สายพันธุ์)
หมายเหตุ * สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ayres *et al.* (1997) ที่ศึกษาในยีนพูลของเชื้อพันธุ์ข้าวของสหรัฐอเมริกา		

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนซ้ำ(n)ของ CT กับกลุ่มพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสที่แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มนั้น จะพบว่า **ข้าวสายพันธุ์ที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำที่เป็นข้าวเหนียวพื้นเมืองจะมีจำนวนซ้ำของ CT เท่ากับ 18 (n=18)** ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ayres *et al.*(1997) ที่ศึกษาในเชื้อพันธุ์ข้าวของสหรัฐอเมริกา ที่พบว่า n=18 มีความสัมพันธ์กับปริมาณอะมัยโลสต่ำ และพบว่าข้าวเหนียวที่มีต้นกำเนิดที่ญี่ปุ่นคือ พันธุ์ Panda, Toro-2 และ Nato มี n=18 เช่นเดียวกันกับข้าวเหนียวพื้นบ้านที่ปลูกในภาคอีสาน ในขณะ**ที่สายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสสูงจะมี n=11 ทั้งหมดที่เป็นตัวอย่างใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ พันธุ์เจ็กเชย เหลืองประทิว ข้าวเจ้าแดง มะลิทองและพิษณุโลก60-2** ส่วนพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสปานกลาง จะมีจำนวนซ้ำของ CT เป็นดังนี้ n=9, 10, 12 **ในยีนพูลของข้าวไทยนั้นจำนวนซ้ำของ CT จำนวน 17 ซ้ำ (n=17) จะพบมากที่สุดกล่าวคือมีความถี่สูงสุด** (32/63=50.8%) ซึ่งอัลลีลนี้พบทั้งในข้าวเหนียวพื้นบ้านจากภาคอีสานและข้าวเหนียวและข้าวเจ้าพื้นบ้านที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำจากภาคเหนือ (เจ้าฮ่อ, ขาวโป่งไคร้) จากภาคกลาง (อั้งเจิงจาน, ขาวหอม,เจ้าดำ, มะลิแดง, มะลิหอม เป็นต้น) รวมทั้งพบในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ กข15 อย่างไรก็ตามอัลลีลนี้ (n=17) พบในข้าวเจ้าพื้นบ้านจากจังหวัดสุรินทร์ที่มีปริมาณอะมัยโลสสูง (เนียงเมาและบองกษัตริย์)

จากตารางที่ 1 จะเห็นว่าข้าวในกลุ่มที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเริ่มต้นของอินทรอน1 เป็น AAGTTATA หรือ AAGATATA ทั้งหมด แต่มีความถี่ของลำดับนิวคลีโอไทด์อันหลังนี้มากกว่า ซึ่งผู้วิจัยสรุปว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน เดิมมีรายงานว่ายีนนี้มีเพียง 2 functional alleles คือ Wx^a (AAGGTATA) และ Wx^b (AAGTTATA) **ในการศึกษานี้พบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบใหม่คือ Wx^c (AAGATATA) ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ อัลลีลนี้โดยใช้การศึกษาโปรตีนแวคซีด้วยเทคนิค SDS-PAGE และศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ในระดับ mRNA และพบว่ามีการแสดงออกของอัลลีลนี้ดังเช่นอัลลีลส์อื่นที่ได้มีรายงานผลการศึกษาไปแล้ว** ส่วนพันธุ์ข้าวที่ปริมาณอะมัยโลสปานกลางและสูงจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบ AAGGTATA ทุกสายพันธุ์ ผลจากการค้นพบนี้ได้เสนอผลการวิจัยลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติแล้ว

วิธีการทางโมเลกุลที่ศึกษาดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่เป็นยีนนี้ทำให้สามารถใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอแยกระหว่างสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำกับสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสปานกลางและสูง โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *ACCI* ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของยีนแวคซีของข้าวสายพันธุ์ที่มีปริมาณอะมัยโลสปานกลางและสูง แต่ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของยีนนี้ของสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำ ดังนั้นในกระบวนการวินิจฉัยสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะมัยโลสต่ำกับปานกลางและสูงนั้นสามารถนำเทคนิคนี้ไปใช้ได้ในการจำแนกสายพันธุ์ข้าวในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีคุณสมบัติด้านการหุงต้มตามที่ต้องการได้

เอกสารอ้างอิง

Ayres, N.M., A.M. McClung, P.D. Larkin, H.F.J. Bligh, C.A. Jones and W.D. Park. 1997. Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. *Theor. Appl. Genet.* 94,773-781.

Bligh, H.F.J., R.I. Till and C.A. Jones. 1995. A microsatellite sequence closely linked to the Waxy gene of *Oryza sativa*. *Euphytica* 86,83-5.

Bligh, H.F.J, P.D. Larkin, P.S. Roach, C.A. Jones, H. Fu and P.D. Park. 1998. Use of alternate splice sites in granule-bound starch synthase mRNA from low-amylose rice varieties. *Plant Mol. Biol.* 38,407-15.

Cai, X.L., Z. Y. Wang, Y.Y. Xing, J. L. Zhang and M.M. Hong. 1998. Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of waxy gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *Plant J.* 14, 459-65.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull.* 19, 11-5.

Echt, C.S. and D. Schwartz. 1981. Evidence for the inclusion of controlling elements within the structural gene at the waxy locus in maize. *Genetics* 99, 275-84.

Isshiki, M., K. Morino, M. Nakajima, R.J. Okagaki, S.R. Wessler, T. Izawa and K. Shimamoto. 1998. A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. *Plant J.* 15, 133-138.

Hirano, H.Y., M. Eiguchi and Y. Sano. 1998. A single base change altered the regulation of the Waxy gene at the posttranscriptional level during the domestication of rice. *Mol. Biol. Evol.* 15, 978-87.

Juliano, B.O. 1971. A simplified assay for milled rice amylose. *Cereal Sci. Today* 16, 334-40.

Khush, G.S., R.J. Singh, S.C. Sur and A. L. Librojo 1984. Primary trisomics of rice: origin, morphology, cytology and use in linkage mapping. *Genetics* 107, 141-63.

Larkin, P.D. and W.D. Park 1999. Transcript accumulation and utilization of alternate and non-consensus splice sites in rice granule-bound starch synthase are temperature-sensitive and controlled by a single-nucleotide polymorphism. *Plant Mol. Biol.* 40, 719-27.

Okagaki, R.J. and S.R. Wessler. 1988. Comparison of non-mutant and mutant waxy genes in rice and maize. *Genetics* 120, 1137-1143

Sano, Y. 1984. Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 68, 467-73

Sano, Y., M. Katsumata and K. Okuno. 1986. Genetic studies of speciation in cultivated rice. 5. Inter- and intra-specific differentiation in the waxy gene expression in rice. *Euphytica* 35, 1-9.

Taira, T., M. Uematsu, Y Nakano and T. Morikawa. 1991. Molecular identification and comparison of the starch synthase bound to starch granules between endosperm and leaf blades in rice plants. *Bichem. Genet.* 29, 301-11.

Wang, Z.Y., F.Q. Zheng, G.Z. Shen, J.P. Gao, D.P. Snustad, M.G. Li, J.L. Zhang and M.M. Hong. 1995. The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the waxy gene. *Plant J.* 7, 613-22.

ภาคผนวก

Table 1 Market class, amylose content, the 5' leader intron splice site and number of microsatellite CT repeats in 5'-untranslated region of the varieties tested.

พันธุ์ข้าว	แหล่งของตัวอย่าง	CT repeats	G/T/A	Amylose(%)	*AccI*
ชัยนาท60	ศูนย์วิจัยข้าว ปทุมธานี	8	A	17.21	N
กข15	ศูนย์วิจัยข้าว ปทุมธานี	17	A	16.48	N
มะลิชุด10	สุพรรณบุรี	17	A	15.63	N
มะลิหอม	มูลนิธิข้าวขวัญ สุพรรณบุรี	17	A	17.04	N
มะลิแดง	กาฬสินธุ์	17	A	15.35	N
ข้าวเจ้าแดง	ร้อยเอ็ด	11	G	28.19	Y
ข้าวเจ้าดำ1/2	มูลนิธิข้าวขวัญ สุพรรณบุรี	17	A	16.19	N
ข้าวเจ้าดำ1/4	มูลนิธิข้าวขวัญ สุพรรณบุรี	17	A	14.45	N
เหลืองประทิว	เพชรบุรี	11	G	30.33	Y
เจ๊กเชย	เพชรบุรี	11	G	27.51	Y
ขาวกอ	อ. เสาไห้ สระบุรี	19	G	26.22	Y
เหลืองเลาขวัญ	อ. เลาขวัญ กาญจนบุรี	19	G	28.36	Y
เจ้าฮ่อ	เชียงราย	17	A	17.5	N
ขาวโป่งไคร้(เจ้าปน)	เชียงราย	17	A	14.67	N
ขาวโป่งไคร้(เหนียว)	เชียงราย	17	A	4.31	N
พิษณุโลก60-1	พิษณุโลก	17	A	17.8	N
พิษณุโลก60-2	พิษณุโลก	11	G	30.78	Y
เนียงเมา	สุรินทร์	17	G	25.93	Y
บองกษัตริย์	สุรินทร์	17	G	26.16	Y

Amylose class in Thailand (Rice Research Institue)

Low=< 20%

Intermediate=20-25%

High=>25%

US market class (Webb,1985)

Low=14-19%

Intermediate=20-23%

High>23%

อั้งเจิงจาน	เพชรบุรี	17	A	15.57	N
ขาวหอม	สุพรรณบุรี	17	A	13.38	N
ข้าวดำ1/2	สุพรรณบุรี	17	A	14.17	N
ข้าวดำ90%	สุพรรณบุรี	17	A	17.21	N
ข้าวเจ้า(ข้าวหนัก)	บุรีรัมย์	19	G	22.05	Y
มะลิทอง	ศูนย์วิจัยข้าว	11	G	28.75	Y
O. nivara No.1	อ. ธาตุพนม	17	A	12.98	N
O. nivara No.2	อ. ธาตุพนม	17	A	13.72	N
O. nivara No.1	อ. เมือง, มุกดาหาร	17	A	10.45	N
O. nivara No.2	อ. เมือง, มุกดาหาร	12	G	25.03	Y
O. nivara No.3	อ. เมือง, มุกดาหาร	12	G	22.27	Y
O. nivara No.1	อ. คำม่วง	10	G	22.11	Y
O. nivara No. 2	อ. คำม่วง	10	G	24.84	Y
O. nivara (ต้นลูก)	บ้านลาดค้อ, สกลฯ	9	G	21.94	Y
O. rufipogon	หนองหาน, สกลฯ	18(gt)TGT	G	22.89	Y
ข้าวไร่เกษตร	บ. ร่มเกล้า, มุกดาหาร	17	A	9.77	N
ฮ้าวแก่นดู่ (ข้าวไร่)	บ. ร่มเกล้า, มุกดาหาร	17	A	8.65	N
O. nivara(ข้าวเหนียว)	บ. ทุ่งนาเรา, มหาสารคาม	18	A	3.62	N
อุคำ	บ.หนองนกเขียน	18	T	6.51	N
O. nivara(ข้าวเจ้า)	อ. สมเด็จ,กาฬสินธุ์	10	G	22.5	Y
ป้องแอ้ว	มุกดาหาร	18	A	8.7	N

O. nivara(ข้าวเจ้า) ต้นพ่อ	บ.ลาดค้อ,สกลนคร	9	G	23.4	Y
O. nivara(ข้าวเจ้า)	อ.เมือง มุกดาหาร	11	G	เก็บใบ	Y
กข6	อ.เมือง มหาสารคาม	11	A	5.95	N
O. rufipogon	หนองหาน site2	CT=8+GT=2	G	เก็บใบ	Y
O. rufipogon	บ.ท่ากลาง อ. ธาตุพนม	CT=10+GT=1	G	เก็บใบ	Y
O. nivara(ข้าวเหนียว)	อ. สมเด็จ,กาฬสินธุ์	18	A	เก็บใบ	N
ก่ำใน	อ.คำม่วง,กาฬสินธุ์	17	A	เก็บใบ	N
ก่ำปูน	มุกดาหาร	17	A	9.44	N
ไก่ง้อ	บ.เชิงชุม สกลนคร	17	A	2.82	N
เจ้าดำ	อ. พยัคภูมิพิสัย		G	28.5	Y
ก่ำ	มุกดาหาร	17	T	9.21	N
ก่ำ	อ.เมือง ร้อยเอ็ด	17	A	9.44	N
อีโพน	บ.ภู มุกดาหาร	17	A	4.65	N
ขาวดอกมะลิ105	อ.กุดชุม ยโสธร	17	A	13.72	N
ขาวดอกมะลิ105	อ. สุวรรณภูมิ ร้อยเอ็ด	17	A	14.11	N
ขาวดอกมะลิ105	อ.เมืองม มหาสารคาม	17	A	14.11	N
ขี้ตม	อ.กันทรวิชัย มหาสารคาม	18	A	8.48	N
มะยม	อ.ดอนตาล มุกดาหาร	18	A	3.96	N
ขาวดอกมะลิ105	อ.นาหว้า นครพนม	17	A	12.98	N
แบลเกาซือ	เผ่าม้ง เชียงราย	CT13+GT	A	13.99	N
แบลล้ามี	เผ่าม้ง เชียงราย	17	A	15.13	N

แบลซาเปลา	เผ่าม้ง เชียงราย	CT16+GT	A	3.39	N
เบี้ยวกู๋(เบ้ากู๋)	เผ่าเมี่ยน เชียงราย	9	A	3.62	N
เบี้ยวไมยั่นไร	เผ่าเมี่ยน เชียงราย	CT16+GT	A	16.51	N
เบี้ยวบุด(เบ้าบุด)	เผ่าเมี่ยน เชียงราย		A	3.62	N
ขะจ้าว	เผ่าขมุ เชียงราย	AT+CT12+GT	A	11.03	N
ยิม	เผ่าขมุ เชียงราย	11	A	3.74	N
ปั้นเนิ้รกลอก	เผ่าขมุ เชียงราย			9.89	N
ชิว	เผ่าขมุ เชียงราย			3.62	N
แบ้เด๋าเดอก	เผ่าม้ง ตาก			3.96	N
เจ้าหนี้	เผ่ากะเหรี่ยง ตาก	9		16.49	N
เบ้เหล่าด๊า	เผ่าม้ง ตาก			2.48	N
เบ้จา	เผ่าม้ง ตาก		T	2.14	N
เผือกน้ำ43	ปัตตานี		G	30.5	Y
นางพญา132	นครศรีธรรมราช		G	28.34	Y
เฉี้ยงพัทลุง	พัทลุง		G	28.91	Y
หัวนา	ภาคใต้	CT16+GT	G	24.92	Y
ดำเมไหร	ภาคใต้	4	A	27.65	Y
สังข์หยด	ภาคใต้			16.4	N
เล็บนกปัตตานี	ปัตตานี	CT16+GT	G	23.78	Y
ช่อลุง	ภาคใต้	12	G	23.67	Y
ไข่มดริ้น	ภาคใต้		G	23.33	Y
น้ำปะ	สปป. ลาว		A	5.33	N

ดอกคำ	สปป. ลาว	12	T	4.42	N
ข้าวเหนียวพื้นบ้าน	ผาตั้ง สปป. ลาว	14	A	4.19	N
ข้าวเหนียวพื้นบ้าน	บ้านกาสี สปป. ลาว		A	5.1	N