



การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *Waxy* และ *SSIIa*
ที่สัมพันธ์กับคุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทย

ANALYSIS OF SNPs OF *Waxy* AND *SSIIa* GENES IN RELATED TO STARCH
DIGESTIBLE PROPERTIES OF THAI RICE (*Oryza sativa* L.)

อังคณา ศรีहर

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *Waxy* และ *SSIIa*
ที่สัมพันธ์กับคุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทย
ANALYSIS OF SNPs OF *Waxy* AND *SSIIa* GENES IN RELATED TO STARCH
DIGESTIBLE PROPERTIES OF THAI RICE (*Oryza sativa* L.)

อังคัรวรา ศรีहरา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2558

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *Waxy* และ *SSIIa*
ที่สัมพันธ์กับคุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทย

ANALYSIS OF SNPs OF *Waxy* AND *SSIIa* GENES IN RELATED TO STARCH
DIGESTIBLE PROPERTIES OF THAI RICE (*Oryza sativa* L.)

อังคณา ศรีเหรา

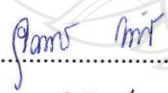
วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

2558

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(ดร. สมฤดี นิลทอง)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ดร. สยาม ภพลือชัย)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. จุฑามาศ นิวัฒน์)


.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังคณา อินตา)

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดีผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.สยาม ภพลือชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้ ให้คำปรึกษาในการศึกษาวิจัย ตลอดจนเสียสละเวลาในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.จุฑามาศ นิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร.สมฤดี นิลทอง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.อังคณา อินตา ที่กรุณาเสียสละเวลามาเป็นกรรมการสอบทั้งคอยให้คำแนะนำแนวความคิดในสิ่งที่เป็ประโยชน์ รวมถึงตรวจสอบเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวชื่อมา ณ ที่นี้ที่ให้ความรู้ในด้านวิชาการตลอดระยะเวลาที่ศึกษา

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยข้าว-ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าว จ.เชียงราย พะเยา พิษณุโลก ปทุมธานี พัทลุง ปราจีนบุรี นครศรีธรรมราช และเกษตรกรจาก จ.เชียงราย และ จ.น่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพันธุ์ข้าว ขอขอบพระคุณ นพ.ก้องเกียรติ เกษเพ็ชร และบริษัทสุขสาธารณะ จำกัด ที่ให้ทุนสนับสนุนทั้งทางด้านการศึกษา และการวิจัยในการศึกษาวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณแม่และทุกคนในครอบครัวของผู้เขียนสำหรับกำลังใจที่ยิ่งใหญ่ ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านอีกทั้งยังส่งเสริม และสนับสนุนทางด้านการศึกษาเป็นอย่างดีจึงทำให้ประสบผลสำเร็จในชีวิตตลอดมา รวมทั้งเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ที่ร่วมเรียนปริญญาโท น้อง ๆ ที่เรียนปริญญาตรี ตลอดจนมิตรสหายที่ได้เอยนามถึงในที่นี่เป็นจำนวนมากที่เป็นกำลังใจซึ่งกันและกันตลอดมา และมีส่วนช่วยในการศึกษาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ท้ายสุดนี้หวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และผู้ที่สนใจทั่วไป หากมีสิ่งผิดพลาดหรือข้อบกพร่องประการใด ขอน้อมรับ และขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

อังคิรา ศรีเหรา

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *Waxy* และ *SSIIa* ที่สัมพันธ์กับคุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทย

ชื่อผู้เขียน

อังคิรา ศรีहरา

หลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร. สยาม ภพลือชัย

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร. จุฑามาศ นิวัฒน์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *Waxy* ยีน *SSIIa* ค่าปริมาณกลูโคสที่ย่อยออกมาแบบเร็ว (RAG) และค่าปริมาณกลูโคสที่ย่อยออกมาแบบช้า (SAG) ในข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับปริมาณแอมิโลส การทดสอบพบว่าข้าวจำนวน 16 สายพันธุ์ที่มีปริมาณแอมิโลสสูงมีรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* เป็นแบบ G-A-T และ G-C-T ข้าวจำนวน 4 สายพันธุ์ที่มีปริมาณแอมิโลสปานกลางเป็นแบบ G-C-C ข้าวจำนวน 19 สายพันธุ์ที่มีปริมาณแอมิโลสดำเป็นแบบ T-A-T, T-A-C, T-C-T และ T-C-C ข้าวจำนวน 16 สายพันธุ์มียีน *SSIIa* ที่มีความแปรปรวนแบบ GC และแบบ TT จำนวน 23 สายพันธุ์ พบข้าวพันธุ์เล็บนกเล็ก และไข่มดรีน 3 ซึ่งมี haplotype ของยีน *Waxy* เป็น G-A-T มีค่า RAG ต่ำที่สุด และค่า SAG สูงสุด คือ 10.42 และ 16.56 กรัม/100 กรัมข้าวสุกตามลำดับ การจำแนกกลุ่มข้อมูลโดยวิธีวิเคราะห์กลุ่ม (Cluster analysis) ร่วมกับวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis) สามารถแบ่งกลุ่มข้าวไทยได้ออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะของ *WxIn1G* และ *WxIn1T* โดยพบว่าที่ตำแหน่งดังกล่าวมีค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลส และค่า SAG แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิตินอกจากนี้ค่าปริมาณแอมิโลสมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่า SAG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ค่า $r = 0.474$; $p < 0.01$ แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอมิโลสสะท้อนค่า SAG สอดคล้องกับความสัมพันธ์เกี่ยวกับอาหารที่มีปริมาณ SAG

หรือ SDS มากซึ่งส่งผลต่อค่าดัชนีน้ำตาลต่ำโดยถูกกำหนดให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพ การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ใช้บ่งชี้คุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทยได้บางส่วนแต่ควรพิจารณาปัจจัยอื่นร่วมด้วย

คำสำคัญ: ข้าวไทย/รูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy*/แอมิโลส/ปริมาณกลูโคสที่ย่อยออกมาแบบช้า



Thesis Title	Analysis of SNPs of <i>Waxy</i> and <i>SSIIa</i> genes in related to starch digestible properties of Thai rice (<i>Oryza sativa</i> L.)
Author	Angwara Sriheara
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Advisor	Siam Popluechai, Ph. D.
Co-Advisor	Chutamat Niwat, Ph. D.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the relationship between *Waxy*, *SSIIa* genes, rapidly available glucose (RAG) and slowly available glucose (SAG) of 39 Thai rice varieties in related to amylose content (AC). The study revealed that 16 varieties contained high AC harboring G-C-T and G-A-T haplotype, whereas 4 varieties contained intermediate AC harboring G-C-C haplotype and low AC harboring T-A-T, T-A-C, T-C-T and T-C-C haplotype were presented in 19 varieties. The SNPs of *SSIIa* gene was founded in 16 varieties harboring GC and 23 varieties harboring TT. The results showed that, Leb Nok Lek and Khai Mod Rin3 harboring G-A-T haplotype exhibited lowest RAG value and displayed the highest SAG value of 10.42 and 16.56 g/100g, respectively. Starch digestive properties were analyzed by cluster analysis and principal component analysis in related to SNP of *Waxy* and *SSIIa* genes. Results demonstrated that, Thai rice can be divided into two groups including *WxIn1G* and *WxIn1T* based on the average of AC and SAG values. SAG values were also positively correlated to AC (Pearson's correlation coefficients $r = 0.474$; $p < 0.01$). This relationship reflects the amount of SAG or SDS content in food with low glycemic index, which might confer health advantages. This study

suggested that *Waxy* haplotype can be used to predict the digestive properties of rice. However, other factors should be taken into consideration.

Keywords: Thai rice/ *Waxy* haplotype/ Amylose/ Slowly available glucose



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(3)
บทคัดย่อภาษาไทย	(4)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(6)
สารบัญตาราง	(11)
สารบัญภาพ	(12)
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตการศึกษา	3
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 แหล่งกำเนิดของข้าว	4
2.2 การจำแนกข้าวตามชนิด และปริมาณของแป้งในเมล็ด	5
2.3 ข้าวกับโรคเบาหวาน	6
2.4 โครงสร้าง และส่วนประกอบของข้าว	7
2.5 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแป้ง	8
2.6 โครงสร้าง และการรวมตัวกันเป็นเมล็ดแป้ง	11
2.7 ยีนในข้าวที่ควบคุมการสร้างแป้ง	11
2.8 ความแปรปรวนแบบเบสเดียว (Single nucleotide polymorphisms: SNPs)	12
2.9 คุณสมบัติการย่อยของแป้ง	16
2.10 การศึกษาวิธีการย่อยของแป้งในหลอดทดลอง	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่	
2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยของแป้ง และดัชนีน้ำตาล	23
2.12 การวิเคราะห์ข้อมูล ประเภทของการจัดกลุ่มหรือแบ่งกลุ่มข้อมูลของตัวอย่าง	26
3 ระเบียบวิธีวิจัย	30
3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย	30
3.2 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ	32
3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction: PCR)	35
3.4 การเตรียมตัวอย่างข้าว	42
3.5 การวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส	43
3.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติการย่อยของแป้งในหลอดทดลอง	44
3.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	47
4 ผลการศึกษา	49
4.1 การศึกษาใน <i>Waxy</i>	49
4.2 การศึกษาใน <i>SSIa</i>	51
4.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส	53
4.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติการย่อยของแป้งในหลอดทดลอง	53
4.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	57
5 อภิปรายผล และสรุป	69
5.1 การศึกษาใน <i>Waxy</i>	69
5.2 การศึกษาใน <i>SSIa</i>	73
5.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส	74

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่	
5.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติการย่อยของแป้งในหลอดทดลอง	76
5.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	78
5.6 สรุป	82
รายการอ้างอิง	83
ภาคผนวก	98
ภาคผนวก ก ตารางแสดงผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	99
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	127
ภาคผนวก ค การนำเสนอ และตีพิมพ์ผลงานวิจัยบางส่วนในงานประชุมวิชาการ	132
ประวัติผู้เขียน	139

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 การแบ่งประเภทข้าวตามปริมาณแอมิโลส	6
2.2 ตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน <i>Waxy</i> ในตำแหน่งของ Intron1 Exon6 และ Exon10 และยีน <i>SSIHa</i>	15
2.3 ค่าดัชนีน้ำตาล (GI) ระดับต่าง ๆ	17
2.4 ค่าดัชนีน้ำตาลในข้าวจากการศึกษาในคน (<i>In vivo</i> test)	18
2.5 ค่า RAG และค่า SAG ในข้าวจากงานวิจัยอื่น ๆ	22
2.6 รายละเอียดปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยของแป้ง และดัชนีน้ำตาล	24
3.1 รายชื่อพันธุ์ข้าวกล้องจำนวน 39 สายพันธุ์	30
3.2 ไพโรมอร์ที่ใช้ในการศึกษายีน <i>Waxy</i> และยีน <i>SSIHa</i>	35
3.3 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาฟิซีอาร์ที่ตำแหน่ง Intron1	36
3.4 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่ง Intron1	37
3.5 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาฟิซีอาร์ที่ตำแหน่ง Exon6	38
3.6 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาฟิซีอาร์ที่ตำแหน่ง Exon10	39
3.7 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่ง Exon10	40
3.8 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาฟิซีอาร์ของยีน <i>SSIHa</i>	41
4.1 ยีน <i>Waxy</i> ที่ตำแหน่ง Intron1 Exon6 Exon10 และยีน <i>SSIHa</i> ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์	51
4.2 ปริมาณแอมิโลส ค่า RAG ค่า SAG ค่า RDS และค่า SDS ในข้าวไทยหุงสุก จำนวน 39 สายพันธุ์	54

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 โครงสร้างเมล็ดข้าว	8
2.2 กระบวนการสังเคราะห์แป้งในข้าว	9
2.3 (a) โครงสร้างแอมิโลส และ (b) โครงสร้างแอมิโลเพคติน	10
2.4 แผนภาพแสดงตัวอย่าง SNPs จำนวน 3 ตำแหน่ง	12
2.5 ตำแหน่งความหลากหลายของ SNPs ที่เกิดขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง Intron1 มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างเบส G/T ตำแหน่ง Exon6 มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างเบส A/C และตำแหน่ง Exon10 มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างเบส T/C	14
2.6 วิธีการวิเคราะห์หาดัชนีน้ำตาลในข้าวสุกในหลอดทดลองที่เรียกว่า “Rapidly available glucose (RAG) และ Slowly available glucose (SAG)” ตามวิธีของ Englyst and Hudson (1996) และ Goni, Garcia-Alonso and Saura-Calixto (1997)	21
2.7 ตัวอย่าง Dendrogram จากการวิเคราะห์กลุ่มข้อมูลด้วยเทคนิค Cluster analysis	27
2.8 ตัวอย่าง Scree plot จากการวิเคราะห์องค์ประกอบ PCA	29
4.1 การแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดียวของ ยีน <i>Waxy</i> ที่ตำแหน่ง Intron1 (a) ปริมาณแอมิโลส (b) ค่า RAG (c) ค่า SAG	58
4.2 การแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดียวของ ยีน <i>Waxy</i> ที่ตำแหน่ง Exon6 (d) ปริมาณแอมิโลส (e) ค่า RAG (f) ค่า SAG	59
4.3 การแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดียวของ ยีน <i>Waxy</i> ที่ตำแหน่ง Exon10 (g) ปริมาณแอมิโลส (h) ค่า RAG (i) ค่า SAG	60
4.4 การแบ่งกลุ่มตามรูปแบบ haplotype ของยีน <i>Waxy</i> ที่ตำแหน่ง Intron1 และ Exon6 (In1-EX6) (j) ปริมาณแอมิโลส (k) ค่า RAG (l) ค่า SAG	61
4.5 การแบ่งกลุ่มตามรูปแบบ haplotype ของยีน <i>Waxy</i> ที่ตำแหน่ง Intron1 Exon6 และ Exon10 (In1-EX6-Ex10) (m) ปริมาณแอมิโลส (n) ค่า RAG (o) ค่า SAG	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
4.6 การแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน <i>SSIIa</i> (p) ปริมาณแอมิโลส (q) ค่า RAG (r) ค่า SAG	63
4.7 การจัดกลุ่มของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ โดยใช้ Cluster analysis	65
4.8 การกระจายตัวของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ ตามลักษณะความแปรปรวนแบบเบสเดียวของ (a) ยีน <i>Waxy</i> ในตำแหน่ง Intron1 (b) ยีน <i>SSIIa</i>	66
4.9 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation) ระหว่าง ปริมาณแอมิโลส ค่า RAG ค่า SAG ค่า RDS และ ค่า SDS (a) ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ (b) เฉพาะตัวอย่างข้าวเจ้าจำนวน 27 สายพันธุ์ (c) เฉพาะตัวอย่างข้าวเหนียวจำนวน 12 สายพันธุ์	68

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญ

ปัจจุบันมีจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานในกลุ่มผู้บริโภครชาวไทยเพิ่มขึ้น เนื่องจากการบริโภคอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตโดยเฉพาะแป้งในปริมาณที่เกินความต้องการ ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก คือ แป้งมากกว่าถึงร้อยละ 80 ขององค์ประกอบทั้งหมด (Wani et al., 2012) ดังนั้นข้าวจึงมีบทบาทสำคัญทั้งในการทำให้เกิดหรือลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเบาหวาน มีรายงานพบว่าการกินข้าวทำให้มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นในการเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ยิ่งรับประทานข้าวขาวมากก็จะยิ่งเพิ่มความเสี่ยงสูง ซึ่งชาวเอเชียมีความเสี่ยงมากกว่าชาวตะวันตก เนื่องจากชาวเอเชียมีแนวโน้มการกินข้าวขาวมากกว่าชาวตะวันตก โดยนักวิจัยพบว่าการรับประทานข้าวขาวมีความสัมพันธ์ในการเพิ่มความเสี่ยงของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ (Hu, Pan, Malik & Sun, 2012) การเปลี่ยนแปลงการบริโภคข้าวขาว และหันมาบริโภคข้าวกล้องแทนสามารถลดโอกาสการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ (Barclay et al., 2008) แป้งในข้าวประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือแอมิโลส และแอมิโลเพกทิน (Champagne, 1996) มีรายงานพบว่ามีปริมาณแอมิโลสเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการย่อยแป้ง และดัชนีน้ำตาล (Glycemic index: GI) (Kharabian-Masouleh, Waters, Reinke, Ward & Henry, 2012) ปริมาณแอมิโลสถูกควบคุมด้วยยีน *Waxy* ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีน Granule-bound starch synthase (GBSS) (Chen, Bergman, Pinson & Fjellstrom, 2008b) ยีน *Waxy* มี 2 อัลลีล คือ Wx^a และ Wx^b ซึ่ง Wx^a จะสังเคราะห์โปรตีน GBSS ได้มากกว่า Wx^b เป็นผลให้เมล็ดมีปริมาณแอมิโลสมากขึ้น (Sano, Katsumata & Amano, 1985) มีรายงานวิจัยพบว่าความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *Waxy* นำมาใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่าง Wx^a และ Wx^b โดยพบว่ารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 Exon6 และ Exon10 มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณแอมิโลสในข้าว (Chen et al., 2008b; Cai, Wang, Xing, Zhang & Hong, 1998; Larkin & Park, 2003; Kharabian-Masouleh et al., 2012) และจากรายงานที่มีการศึกษามาก่อน พบว่าปริมาณแอมิโลสสามารถเป็นตัวบ่งชี้ในการหุงต้ม

และคุณภาพของข้าวปรุงสุกใหม่ (Juliano, 1998) มีรายงานว่าคุณสมบัติการหุงต้ม และคุณสมบัติของแป้งถูกควบคุมด้วยยีน *Starch synthase IIa (SSIIa)* จากการศึกษาพบว่าความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *SSIIa* มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณแอมิโลสซึ่งความแปรปรวนที่เป็นแบบ GC บ่งชี้ว่าเป็นข้าวที่มีลักษณะแอมิโลสสูง และแบบ TT บ่งชี้ว่าเป็นข้าวที่มีลักษณะแอมิโลสต่ำ (Umemoto et al., 2004; Nakamura et al., 2005; Bao, Corke & Sun, 2006)

อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตเมื่อถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลจะเข้าสู่กระแสเลือด ประเมินได้จากค่า GI ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากรับประทานอาหาร อย่างไรก็ตามพบว่าหลายปัจจัยที่มีผลต่อค่า GI อีกทั้งการทดลองในคนนั้นมีความยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง Englyst, Veenstra and Hudson (1996) ได้พัฒนาวิธีการวัดอัตราการย่อยแป้งหรืออาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลในหลอดทดลองที่เรียกว่า ปริมาณกลูโคสที่ย่อยออกมาแบบเร็ว (Rapidly available glucose: RAG) และปริมาณกลูโคสที่ย่อยออกมาแบบช้า (Slowly available glucose: SAG) ซึ่งวิธีนี้ถูกออกแบบมาเพื่อสะท้อนให้เห็นถึงอัตราปริมาณน้ำตาลกลูโคสซึ่งถูกปล่อยออกมาจากส่วนที่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก มีรายงานว่าค่า RAG สามารถนำมาใช้ทำนายค่าดัชนีน้ำตาลในข้าวได้ (Englyst, Englyst, Hudson, Cole & Cummings, 1999) โดยข้าวที่มีค่า RAG ต่ำก็จะมีค่า GI ต่ำเช่นกัน (Englyst et al., 1996) มีรายงานพบว่า *Waxy* haplotype ที่เป็น In1G-Ex6C-Ex10T มีความสัมพันธ์กับค่า GI ที่ต่ำ (Larkin & Park, 2003) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอาหารที่มีค่า GI ต่ำ และอุดมไปด้วยเส้นใยอาหารพบว่ามีประสิทธิภาพในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคเบาหวาน นอกจากนี้อาหารประเภทแป้งที่มีปริมาณแอมิโลสสูงหรือมีปริมาณแป้งทนย่อยสูงมีอัตราการย่อย และการดูดซึมของน้ำตาลช้าลง (Erlingen & Declour, 1995; Salmeron et al., 1997a; 1997b) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับยีน *Waxy* และยีน *SSIIa* ที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทย ดังนั้นหากมีการศึกษารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* และความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *SSIIa* และนำไปสัมพันธ์กับการย่อยของแป้งในข้าวไทย โดยเป็นค่าที่ได้จากการทดสอบในหลอดทดลองซึ่งส่งผลต่อค่าดัชนีน้ำตาลในร่างกาย ทำให้พบสายพันธุ์ข้าวที่มีค่าดัชนีน้ำตาลต่ำซึ่งจะเป็นประโยชน์ และเป็นทางเลือกในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดรวมถึงผู้ป่วยโรคเบาหวาน

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* และความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *SSIIa* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแป้งในข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

1.2.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *Waxy* ยีน *SSIIa* และคุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์โดยศึกษาจากปริมาณแอมิโลสเป็นเกณฑ์

1.3 ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* และความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *SSIIa* โดยศึกษาอัลลีลที่มีความแตกต่างกันในแต่ละตำแหน่งที่เกิดขึ้น โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้งในข้าวไทยโดยวิธีพีซีอาร์ จากนั้นตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส สำหรับคุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทยทดสอบทางด้านชีวเคมีซึ่งเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางเคมีกายภาพนำข้อมูลดังกล่าวมาหาความสัมพันธ์ด้วยวิธีทางสถิติ

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* และความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *SSIIa* รวมถึงคุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

1.4.2 ข้อมูลของความสัมพันธ์ระหว่างการศึกษารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *SSIIa* และคุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ นำไปใช้สำหรับค้นหาสายพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด รวมถึงผู้ป่วยโรคเบาหวาน และใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวไทยต่อไป

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 แหล่งกำเนิดของข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocotyledon) ซึ่งอยู่ในวงศ์หญ้ามีลักษณะภายนอกคล้ายต้นหญ้า เช่น ใบ ลำต้น และราก มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (Diploid, $n=12$ หรือ $2n=24$) (นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์, 2546) ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลกโดยเฉพาะในแถบภูมิภาคเอเชียนิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่น ๆ ของโลก (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2552) ดังนั้นการผลิตข้าวส่วนใหญ่จึงอยู่ในทวีปเอเชียมากกว่าร้อยละ 90 ของการผลิตทั้งหมด รองลงมาคือทวีปอเมริกา ทวีปแอฟริกา และทวีปยุโรป สายพันธุ์ของข้าวที่มีอยู่บนโลกนี้มีมากถึง 120,000 สายพันธุ์ แต่พันธุ์ที่รู้จักและนำมาปลูกเพื่อการบริโภคเป็นอาหารแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ *Oryza glaberrima* ซึ่งจะมีปลูกเฉพาะในทวีปแอฟริกาเท่านั้น และ *Oryza sativa* นิยมปลูกในทวีปเอเชีย ข้าวที่ปลูก และมีการซื้อขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวที่มาจากทวีปเอเชียซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยตามภูมิประเทศ และภูมิอากาศที่แตกต่างกัน (Juliano, 1985) คือ ข้าวอินดิกา (Indica) ปลูกมากในเขตร้อน ลักษณะเมล็ดยาวรีเป็นข้าวที่ปลูกในทวีปเอเชียเขตร้อนตั้งแต่ จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย อินเดีย และศรีลังกา ข้าวพันธุ์นี้ค้นพบครั้งแรกในอินเดีย และต่อมาได้พัฒนาไปปลูกที่ทวีปอเมริกา เป็นข้าวใช้ปริมาณน้ำมากในการหุงสุก เมื่อหุงสุกจะได้ข้าวสวยที่มีลักษณะแข็งเนื่องจากปริมาณการร่อนน้ำน้อย (อรรถพ วงศ์ศิริโรจน์, 2537) ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวที่ปลูกมากในเขตอบอุ่น เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี ลักษณะเมล็ดป้อมสั้นกลมรี ใช้ปริมาณน้ำน้อยกว่าข้าวอินดิกาในการหุงสุก และข้าวที่หุงสุกแล้วจะได้ข้าวที่มีลักษณะนุ่ม (อรรถพ วงศ์ศิริโรจน์, 2537) ข้าวจาวานิกา (Javanica) สันนิษฐานว่าเป็นข้าวพันธุ์ผสมระหว่างข้าวอินดิกา และข้าวจาปอนิกา ปลูกในอินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ เมล็ดป้อมใหญ่ (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547) อย่างไรก็ตามข้าวจาวานิกาไม่ได้รับความนิยมเพราะให้ผลผลิตต่ำซึ่งประเทศต่าง ๆ ในโลกต่างก็มีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวใหม่ เพิ่มพื้นที่การเพาะปลูก และวิธีการปลูกข้าวให้ได้ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น

2.2 การจำแนกข้าวตามชนิด และปริมาณของแป้งในเมล็ด

ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นข้าวอินดิกาโดยแบ่งออกเป็นข้าวเจ้า และข้าวเหนียวดังนี้

2.2.1 ข้าวเหนียว (Glutinous rice, Sticky rice, Waxy rice)

ลักษณะของเนื้อเมล็ดเป็นสีขาวขุ่น เมื่อนำไปหุงต้มจะมีลักษณะเหนียว เมล็ดเกาะตัวกันดี มาก แป้งในเมล็ดส่วนใหญ่เป็นแอมิโลเพคติน และมีแอมิโลสเป็นส่วนน้อยหรืออาจไม่มีเลย ในเมล็ดจะประกอบด้วยแอมิโลเพคตินร้อยละ 92-100 และแอมิโลสร้อยละ 0-8 ของน้ำหนักเมล็ด ข้าวเหนียวเมื่อนำไปนึ่งจะมีความนุ่มของแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันโดยส่วนใหญ่สายพันธุ์ที่มีความนุ่มน้อยกว่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณแอมิโลสอยู่สูงกว่า นอกจากนี้อาจมีสาเหตุมาจากปริมาณโปรตีนในเมล็ด อายุการเก็บรักษา และสภาพที่เก็บรักษา (วาสนา ผลารักษ์, 2523)

2.2.2 ข้าวเจ้า (Non-glutinous rice, Non-sticky rice, Non-waxy rice)

มีส่วนของเมล็ดน้อยกว่าข้าวเหนียว เมื่อนำไปหุงต้มจะมีลักษณะไม่ค่อยเกาะตัว จะร่วนซุย ไม่เหนียวติดกัน ในการหุงต้องใช้ปริมาณน้ำที่มากกว่าข้าวเหนียว แป้งในเมล็ดส่วนใหญ่จะเป็นแอมิโลเพคตินร้อยละ 64-92 และมีปริมาณของแอมิโลสร้อยละ 8-36 ของน้ำหนักเมล็ดซึ่งปริมาณแอมิโลสในข้าวเจ้าจะสูงกว่าข้าวเหนียว ข้าวเจ้าสายบางพันธุ์เมื่อหุงต้มแล้วจะพบว่ามีความนุ่ม และเกาะตัวดีใกล้เคียงกับข้าวเหนียวความนุ่มของข้าวเจ้าขึ้นอยู่กับสายพันธุ์นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับปริมาณแอมิโลสในเมล็ด ปริมาณโปรตีน อายุการเก็บรักษา ปริมาณน้ำในการหุงต้มเป็นต้น (วาสนา ผลารักษ์, 2523)

ปริมาณแอมิโลสในข้าวเจ้ามีผลทำให้ข้าวเมื่อสุกแล้วมีลักษณะอ่อนนุ่มหรือแข็งกระด้าง ต่างกันไป เรียกว่ามีคุณภาพการหุงต้ม (Cooking quality) ต่างกัน กล่าวคือข้าวสายพันธุ์ที่มีปริมาณแอมิโลสมากจะยังมีเนื้อสัมผัสของข้าวสุกที่แข็งมาก (ชาญ มงคล, 2536) ในข้าวเจ้าจะมีปริมาณแอมิโลสแตกต่างกันไป ได้หลายระดับขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ข้าว ซึ่งจะแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ สายพันธุ์ข้าวที่มีแอมิโลสต่ำ ปานกลาง และสูง ปริมาณของแอมิโลสที่ต่างกันจะส่งผลโดยตรงกับคุณสมบัติทางกายภาพ และทางเคมี อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของแอมิโลส แอมิโลเพคตินเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ข้าวสุกมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูงจะดูดน้ำ และขยายตามปริมาตรในระหว่างการหุงต้มได้มากกว่าข้าวปริมาณแอมิโลสต่ำหรือที่เรียกว่าหุงขึ้นหม้อ ส่วนข้าวเหนียวที่ประกอบด้วยแอมิโลเพคตินเป็นส่วนใหญ่ดูดน้ำ และขยายตัวได้น้อยกว่าข้าวเจ้า ข้าวสุกที่ได้จะเหนียว และนุ่มกว่า (งามชื่น คงเสรี, 2531) โดยข้าวสามารถแบ่งประเภทตามปริมาณแอมิโลสแสดงในตารางที่ 2.1 ดังนี้

ตารางที่ 2.1 การแบ่งประเภทข้าวตามปริมาณแอมิโลส

ประเภทข้าว	ปริมาณแอมิโลส (ร้อยละ)	ลักษณะข้าวสุก
ข้าวเหนียว	0-2	ข้าวสุกมีลักษณะเหนียวมาก เมล็ดข้าวสุกเกาะติดกัน
ข้าวเจ้าแอมิโลสต่ำ	2-20	ข้าวสุกมีลักษณะนุ่ม เมล็ดข้าวสุกจับตัวกันเล็กน้อย
ข้าวเจ้าแอมิโลสปานกลาง	20-25	ข้าวสุกมีลักษณะนุ่มเล็กน้อย เมล็ดข้าวสุกค่อนข้างร่วน
ข้าวเจ้าแอมิโลสสูง	มากกว่า 25	ข้าวสุกมีลักษณะร่วนค่อนข้างแข็ง เมล็ดข้าวสุกร่วนไม่จับตัวกัน

ที่มา Juliano (1985)

2.3 ข้าวกับโรคเบาหวาน

ข้าวเป็นอาหารหลักที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศในแถบเอเชีย กลุ่มอาหารหลักที่ให้พลังงานสำหรับคนไทย คือ กลุ่มคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ ข้าว ผลิตภัณฑ์จากข้าว และ แป้งต่าง ๆ โดยข้าวให้พลังงานมากกว่าร้อยละ 60 ของพลังงานทั้งหมดที่ได้รับจากอาหาร หากคาร์โบไฮเดรตนั้นถูกย่อยเร็วก็จะได้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยอย่างรวดเร็ว ซึ่งการที่เซลล์จะนำน้ำตาลไปใช้เป็นพลังงานได้นั้นจำเป็นที่จะต้องอาศัยฮอร์โมนอินซูลินซึ่งผลิตจากตับอ่อน ดังนั้นถ้าในเลือดมีน้ำตาลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตับอ่อนก็ต้องผลิตอินซูลินได้เร็ว ส่งผลให้หากในเลือดมีน้ำตาลมากขึ้นก็ต้องใช้อินซูลินจำนวนมากขึ้นจึงทำให้ตับอ่อนต้องทำงานหนักขึ้น ดังนั้นการที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงอยู่เสมอจึงเป็นสิ่งที่ควรหลีกเลี่ยงโดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน เนื่องจากตับทำงานได้ไม่ดีเท่าที่ควร และที่สำคัญอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหารสูงขึ้น ดังนั้นการเลือกชนิด และปริมาณของคาร์โบไฮเดรตจึงมีความสำคัญทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสมดุล และควบคุมโรคเบาหวานให้ดีขึ้น (ดวงจันทร์ เสงส์ศักดิ์, 2557) Hu et al. (2012) ได้รวบรวมรายงานการศึกษาเพื่อสรุปความสัมพันธ์ระหว่างการบริโภคข้าวขัดขาว และความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยวิเคราะห์ใน

ชาวเอเชีย และชาวตะวันตกพบว่าชาวเอเชียที่มีแนวโน้มบริโภคข้าวขัดขาวมากกว่าชาวตะวันตก คือ 3-4 มื้อต่อวันเทียบกับ 1-2 มื้อต่อสัปดาห์ตามลำดับ ทำให้มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นที่จะเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และพบว่าการบริโภคข้าวขัดขาวมีความสัมพันธ์ในการเพิ่มความเสี่ยงโรคเบาหวานชนิดที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญโดยเฉพาะในกลุ่มประชากรชาวเอเชีย ซึ่งความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากการบริโภคข้าวขัดขาวที่มีค่าดัชนีน้ำตาลสูงซึ่งมีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด โดยวัดจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดภายหลังการรับประทาน สำหรับอาหารที่มีค่าดัชนีน้ำตาลต่ำ เช่น ข้าวกล้องจะย่อยช้าทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดมีค่าคงที่มากกว่า ซึ่งมีงานวิจัยได้รวบรวมรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์กับโรคเรื้อรังต่าง ๆ ที่มีการติดตามผลต่อเนื่องตั้งแต่ 4 ถึง 20 ปี ทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่รับประทานอาหารที่มีค่าดัชนีน้ำตาลสูงสุด และต่ำสุด พบว่าการรับประทานอาหารที่มีค่าดัชนีน้ำตาลต่ำจะส่งผลทำให้ลดความเสี่ยงโรคเรื้อรังบางอย่าง เช่น โรคเบาหวาน และโรคหัวใจได้ (Barclay et al., 2008)

2.4 โครงสร้าง และส่วนประกอบของข้าว

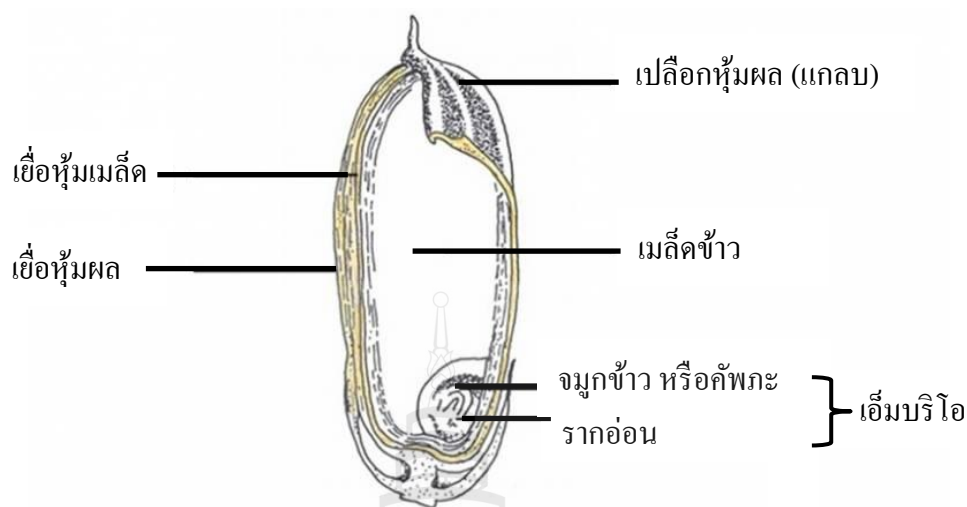
ภาพที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของเมล็ดข้าวประกอบด้วยสองส่วนหลัก คือ ส่วนที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าวหรือผล เรียกว่า แกลบ (Hull หรือ Husk) และส่วนเนื้อผลหรือผลแท้ (True fruit หรือ Caryopsis grain) หรือข้าวกล้อง (Brown rice) เป็นส่วนที่ใช้บริโภคแบ่งออกเป็นชั้นต่าง ๆ ประกอบด้วย

2.4.1 เยื่อหุ้มผล (Caryopsis coat) มีสารสีอยู่ทำให้ข้าวกล้องมีสีต่าง ๆ เช่น ขาว แดง น้ำตาล เข้ม น้ำตาลเทา และม่วงหรือเกือบดำ

2.4.2 เยื่อหุ้มเนื้อเมล็ด (Aleurone layer) เป็นเนื้อเยื่อชนิดเดียวกับเนื้อเมล็ด (Endosperm) เซลล์ของเยื่อหุ้มเนื้อเมล็ดประกอบด้วยโปรตีน และไขมัน

2.4.3 ส่วนเอนโดสเปิร์ม (Endosperm) หรือข้าวขาว ห่อหุ้มด้วยชั้นรำข้าว (Rice bran) มีองค์ประกอบส่วนใหญ่ คือ คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) ที่เป็นสตาร์ช (Starch) ซึ่งมี Amylose และ Amylopectin เป็นส่วนประกอบหลักรวมเป็นเม็ดสตาร์ช (Starch granule)

2.4.4 จมูกข้าวหรือคัพพะ (Germ หรือ Embryo) เป็นส่วนที่อยู่ติดกับเอนโดสเปิร์มทางด้าน Lemma เป็นส่วนที่จะเจริญเป็นต้นต่อไปประกอบด้วย ต้นอ่อน (Plumule) รากอ่อน (Radicle) เยื่อหุ้มต้นอ่อน (Coleoptile) เยื่อหุ้มรากอ่อน (Coleorhiza) ท่อน้ำท่ออาหาร (Epiplast) และใบเลี้ยง (Scutellum) คัพพะเป็นแหล่งสะสมอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของต้นอ่อนจึงอุดมไปด้วย โปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุสูง (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2532)



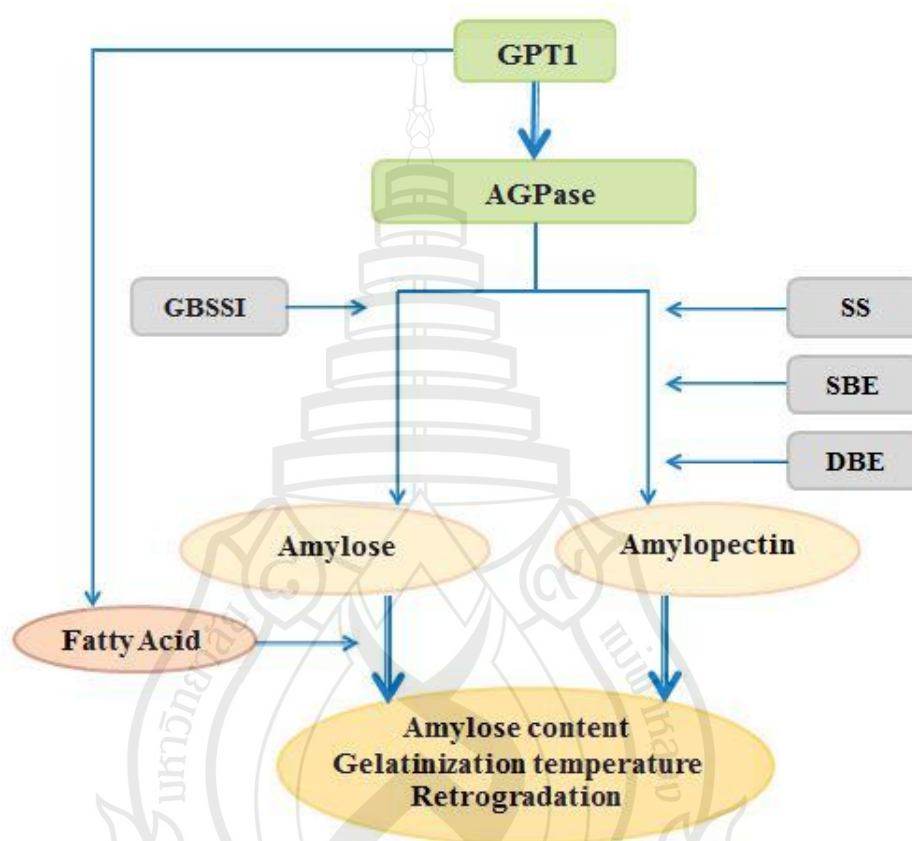
ที่มา สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2544)

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างเมล็ดข้าว

2.5 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแป้ง

องค์ประกอบหลักทางเคมีในข้าว คือ คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 90 ซึ่งเป็นสตาร์ชเกือบทั้งหมด นอกจากนี้ยังประกอบด้วย โปรตีนร้อยละ 7 ไขมันร้อยละ 1.5 วิตามิน เกลือแร่ และสารอาหารอื่นๆ อีกร้อยละ 1.5 (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2540) แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรต โดยปกติแป้งจะมีอยู่ในเมล็ด ราก และลำต้นของพืช ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยมีสูตรเคมีทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส โครงสร้างทางเคมีของแป้งจะประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 ซึ่งน้ำตาลซูโครสที่ได้ มาจากการสังเคราะห์แสงซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการสะสมแป้งในเอนโดสเปิร์มของเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ใช่การสังเคราะห์แสง โดยกระบวนการสังเคราะห์แป้งทั้งในอะมิโลพลาสต์ และคลอโรพลาสต์มีความเกี่ยวข้องกับยีนที่สร้างแป้งอยู่หลายยีน โดย Glucose 6-phosphate translocator (GPT1) เป็นเอนไซม์หลักมีหน้าที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์แป้งในพืช โดยทำหน้าที่เปลี่ยน glucose-1-phosphate ไปเป็น ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase) ซึ่งจะถูกสังเคราะห์เป็นแอมิโลสต่อไป โดยเอนไซม์ Granule bound starch synthase (GBSSI) สำหรับแอมิโลเพคตินถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์ Starch synthase (SS) Starch branching enzyme (BE) และ Starch debranching enzyme (DBE) ภายในเมล็ดแป้งจะประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส

สองชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (แอมิโลส) พอลิเมอร์กิ่ง (แอมิโลเพกติน) ซึ่งโมเลกุลทั้งสองจะจัดเรียงตัวกันแน่นจนเป็นเม็ดสตาร์ช (Starch granul) (Champagne, 1996; กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546) (ภาพที่ 2.2)



ที่มา Kharabian-Masouleh et al. (2012)

ภาพที่ 2.2 กระบวนการสังเคราะห์แป้งในข้าว

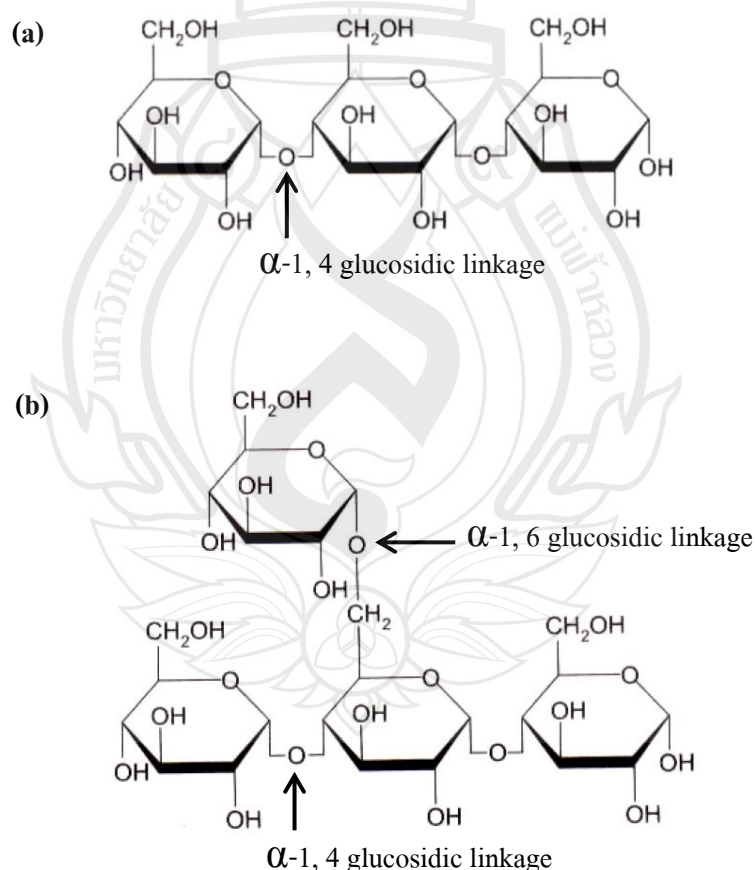
2.5.1 แอมิโลส (Amylose)

แอมิโลสเป็นโพลิเมอร์ที่เป็นสายตรงประกอบด้วยโมเลกุลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกที่ตำแหน่ง α -1, 4 ของแต่ละหน่วยกลูโคส (ภาพที่ 2.3a) และอาจพบลักษณะโพลิเมอร์ที่เป็นสายกิ่งในโมเลกุลของแอมิโลสได้บ้าง แต่ในปริมาณเล็กน้อย (Hizukuri, 1985) มีการศึกษาพบว่าในธรรมชาติแอมิโลสมีกิ่งก้านอยู่บ้างแต่ไม่มาก (กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546) เนื่องจากแอมิโลสมีสายโมเลกุลที่ยาว ดังนั้นเมื่ออยู่ในสารละลายแอมิโลสจะอยู่ในรูปแบบ

เกลียว (สลิคซ์) ที่สามารถจับกับไอโอดีน โดยที่ไอโอดีนอยู่ในรูปโพลิไอไอด์ (I_3 หรือ I_5) ไอโอดีนจะเกิดแรงยึดเกาะกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ และจะเข้าไปอยู่ภายในเกลียวจึงทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแอมิโลสกับไอโอดีนจากนั้นจะทำปฏิกิริยาเกิดเป็นสีน้ำเงิน การที่แอมิโลสสามารถจับไอโอดีนแล้วทำให้เกิดสี ทำให้มีการนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอมิโลสจากแป้งได้ (Bao & Bergman, 2004)

2.3.2 แอมิโลเพคติน (Amylopectin)

แอมิโลเพคตินเป็นโพลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกที่ตำแหน่ง α -1, 4 ส่วนที่เป็นกิ่งสาขาสายสั้นเชื่อมต่อกับส่วนที่เป็นสายตรงด้วยพันธะ α -1, 6 ทำให้แอมิโลเพคตินมีโครงสร้างของโมเลกุลที่แยกออกเป็นกิ่ง (Jane, 1995) (ภาพที่ 2.3b)



ที่มา Visser (1996)

ภาพที่ 2.3 (a) โครงสร้างแอมิโลส และ (b) โครงสร้างแอมิโลเพคติน

2.6 โครงสร้าง และการรวมตัวกันเป็นเมล็ดแป้ง

แป้งที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูปเมล็ดสตาร์ช (Granule) ขนาดเล็ก โดยจะมีขนาด รูปร่าง และลักษณะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งของแป้งนั้น ๆ เมล็ดสตาร์ชมีโครงสร้างเป็นแบบกึ่งผลึก (Semi-crystalline) โดยโมเลกุลที่เป็นสายยาวของแอมิโลสเกาะเกี่ยวกับโมเลกุลที่เป็นกิ่งก้านสาขาของแอมิโลเพกตินด้วยพันธะไฮโดรเจน การเกาะกันนี้ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่เป็นชั้น ๆ ของส่วนโครงสร้างผลึก (Crystalline) และส่วนอสัณฐาน (Amorphous) สลับกันไปมาอย่างเป็นระเบียบ ส่วนอสัณฐานของเมล็ดสตาร์ชจะประกอบด้วยโมเลกุลของแอมิโลส และสายโซ่ยาวของแอมิโลเพกติน (Jacobs & Delcour, 1998) แอมิโลส และแอมิโลเพกตินจะจัดเรียงตัวกันแน่นจนเป็นเมล็ดสตาร์ช อัตราส่วนระหว่างแอมิโลส แอมิโลเพกติน และลักษณะรายละเอียดของพอลิเมอร์ทั้งสองที่แตกต่างกัน เช่น ความเป็นกิ่งของแอมิโลเพกติน ความยาวของสายแอมิโลสทำให้คุณสมบัติของสตาร์ชข้าวแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน (Juliano, 1998) ที่สำคัญโปรตีนที่พบในสตาร์ชคือ กลุ่มโปรตีน Integral ซึ่งเกิดจากยีน *Waxy* เรียกว่า *Waxy* (*Wx*) protein โดย *Waxy* protein คือ Granule-bound starch synthase (GBSS) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างแอมิโลส (Han & Hamaker, 2002)

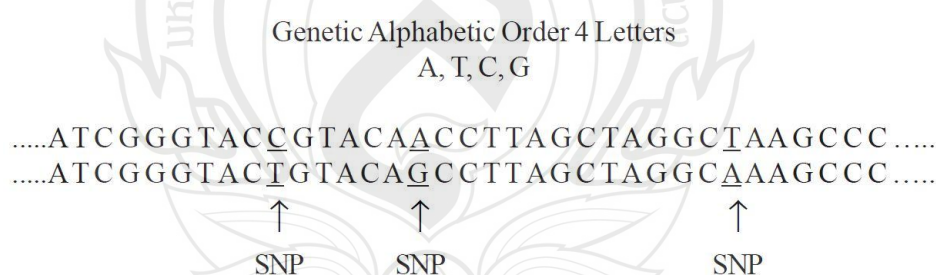
2.7 ยีนในข้าวที่ควบคุมการสร้างแป้ง

จากการศึกษาด้านพันธุกรรมพบว่าการสังเคราะห์แป้งเกิดขึ้นโดยเอนไซม์สตาร์ทซินเทส (Starch synthase) ในอะมิโลพลาสต์ แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ Granule bound starch synthase (GBSS) และ Soluble starch synthase (SSS) เอนไซม์ทั้งสองชนิด ทำหน้าที่เชื่อมหน่วยกลูโคสกับสายแอมิโลส และแอมิโลเพกติน การสังเคราะห์แอมิโลสในข้าวถูกควบคุมด้วยยีน *Waxy* บนโครโมโซม 6 (Cheng, Ismail, Osman & Hashim, 2012) ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีน GBSS (Sano, 1984; Smith, Denyer & Martin, 1997) ซึ่งสะสมตามปริมาณแอมิโลสที่เพิ่มขึ้นระหว่างการเจริญของเมล็ดข้าว (Sano, 1984) โดยจะสังเคราะห์ได้เฉพาะแอมิโลส ส่วนโปรตีน SSS สามารถสังเคราะห์ได้ทั้งแอมิโลส และแอมิโลเพกติน ดังนั้นเอนไซม์ต่างชนิดกันมีผลต่อการสังเคราะห์แป้งที่มีอัตราส่วนของแอมิโลส และแอมิโลเพกตินที่แตกต่างกัน เช่น ข้าวเหนียวไม่มีเอนไซม์ GBSS จึงมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแอมิโลเพกติน (Visser, 1996) ยีน *Waxy* มี 2 อัลลีล คือ Wx^a และ Wx^b ซึ่ง Wx^a จะสังเคราะห์โปรตีน GBSS ได้มากกว่า Wx^b จึงส่งผลให้ในเมล็ดมีปริมาณแอมิโลสมากกว่า

(Sano et al., 1985) โดยพบว่าอัลลีล Wx^a สัมพันธ์กับปริมาณข้าวที่มีแอมิโลสปานกลาง และสูง ส่วน Wx^b สัมพันธ์กับปริมาณข้าวที่มีแอมิโลสต่ำ (Sano, 1984; Sano et al., 1985) ปริมาณแอมิโลสในแป้งยังสามารถใช้บ่งชี้คุณสมบัติการหุงสุกของแป้ง และอุณหภูมิในการเกิดเจล โดยอุณหภูมิในการเกิดเจลถูกควบคุมโดยยีน *SSIIa* มีรายงานว่ายีน *SSIIa* มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สายแอมิโลเพคตินรวมถึงความแตกต่างของความยาวโซ่ของสายแอมิโลเพคตินที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของเมล็ดแป้ง (Umemoto, Yano, Satoh, Shomura & Nakamura, 2002)

2.8 ความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยว (Single nucleotide polymorphisms: SNPs)

ความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยว คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอที่เกิดจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เบสเพียง 1 ตำแหน่ง ณ ตำแหน่งเดียวกันของยีนบนโครโมโซม (สมาพันธ์ศาสตร์แห่งประเทศไทย และสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2548) (ภาพที่ 2.4) แต่อาจมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพที่แสดงออกของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในลำดับเบสเพียง 1 ตำแหน่งอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนตลอดจนปริมาณ และการทำงานของโปรตีน (กนกวรรณ จารุกัจฉ และวรัญญา จตุพรประเสริฐ, 2550)



ที่มา Stripichai and Fucharoen (2007)

ภาพที่ 2.4 แผนภาพแสดงตัวอย่าง SNPs จำนวน 3 ตำแหน่ง

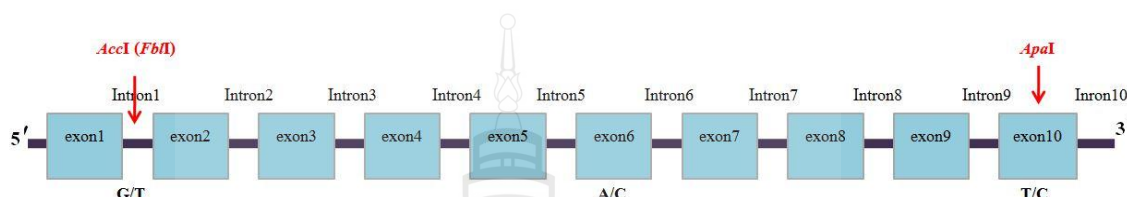
จากการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนแปลงเพียงรหัสเดียวของยีนกลุ่ม *Waxy* นำมาใช้ในการแยกอัลลีล Wx^a และ Wx^b โดยอัลลีล Wx^b เกิดจากการที่ SNP บริเวณ 5' Splice site ที่ Intron1 ไม่มีการ Splice ออกเนื่องจากลำดับเบสที่เปลี่ยนจาก Guanine (G) เป็นเบส Thymine (T) (Hirano & Sano, 1991)

จึงทำให้แบ่งข้าวออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มข้าวแอมิโลสสูง Wx^a และข้าวแอมิโลสต่ำ Wx^b Ayres, McClung, Larkin and Park (1997) พบว่าความแปรปรวนแบบเบสเดียว (G/T) ที่เกิดบริเวณ Intron1 สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมิโลสในตัวอย่างข้าวของประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 89 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ พบว่าร้อยละ 80 ของสายพันธุ์ที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำมีลำดับเบสเป็น AGTTATA ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีปริมาณแอมิโลสปานกลาง และสูง จะมีลำดับเบสเป็น AGGTATA แต่ยังไม่สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสปานกลาง และข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูงได้ จึงชี้ให้เห็นว่าการใช้ยีน *Waxy* เพียงตำแหน่งเดียวไม่เพียงพอต่อการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการบ่งบอกคุณสมบัติในการย่อย

Wanchana, Toojinda, Tragoonrungs and Vanavichit (2003) ได้ศึกษาการเพิ่มลำดับของยีน (Duplication coding sequence) ใน *Waxy* อัลลีลของข้าวเหนียวเขตร้อน โดยที่ตำแหน่ง 5' ของสายดีเอ็นเอของข้าวแอมิโลสต่ำ และข้าวเหนียวมีอัลลีล Wx^b เกิดการแทนที่กันระหว่างเบส G/T ทำให้สายดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป และพบว่ามีอินจำนวน 23 bp เพิ่มขึ้นเฉพาะในข้าวเหนียวเท่านั้น ซึ่งสามารถที่จะใช้วิธี PCR-base markers ในการแบ่งประเภทของข้าวโดยใช้ปริมาณแอมิโลสเป็นตัวกำหนด Ayres et al., (1997) ระบุว่าในตำแหน่ง Intron1 หากเป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำจะมีลำดับเบสเป็น T แต่ถ้าเป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูงจะมีลำดับเบสเป็น G แต่อย่างไรก็ตามจากที่กล่าวข้างต้นที่ตำแหน่ง Intron1 (G/T SNP) เพียงอย่างเดียวยังไม่เพียงพอที่จะอธิบายเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมิโลสทางพันธุกรรมที่พบในพันธุ์ข้าว โดยเฉพาะกลุ่มข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูง และปานกลาง (Cheng et al., 2012)

Larkin and Park (2003) ได้ศึกษา SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon6 Exon9 และ Exon10 ในข้าวจำนวน 28 สายพันธุ์ พบว่าที่ตำแหน่ง Exon6 และ Exon10 มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณแอมิโลสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าข้าวที่มีแอมิโลสสูงที่ตำแหน่ง Exon6 และ Exon10 (Ex6-Ex10) จะมีลำดับเบสเป็น A-C หรือ A-T ส่วนข้าวที่มีแอมิโลสปานกลางจะมีลำดับเบสเป็น C-C จากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่ง Exon6 (A/C SNP) พบว่ามีความสัมพันธ์กับข้าวที่มีแอมิโลสปานกลาง ซึ่งมีลำดับเบสเป็น Cytosine (C) แต่ถ้ามีลำดับเบสเป็น Adenine (A) บอกถึงสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูง จึงสามารถนำมาใช้ในการคัดแยกข้าวแอมิโลสปานกลางออกจากข้าวแอมิโลสสูงได้ และที่ตำแหน่ง Exon10 (C/T SNP) (ภาพที่ 2.5) จากการศึกษาของ Bergman, Delgado, McClung and Fjellstrom (2001) ระบุว่ามีความสัมพันธ์กับข้าวที่มีแอมิโลสสูง แต่อย่างไรก็ตามที่ตำแหน่ง Exon10 ไม่ได้มีผลต่อปริมาณแอมิโลสโดยตรงแต่มีความสัมพันธ์กับค่าคืนตัวของแป้งสุกซึ่งนำไปทำนายค่าแป้งทนย่อยได้ (Tran et al., 2011) โดยพบว่าที่ตำแหน่ง Exon10 ถ้ามีลำดับเบสเป็น C จะพบได้ในสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะแอมิโลสสูง

ปานกลาง และต่ำ หากมีลำดับเบสเป็น T จะพบได้ในสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะแอมิโลสสูง (ตารางที่ 2.2) จึงทำให้สามารถใช้ตำแหน่ง *WxEx6-WxEx10* ดังกล่าวมาใช้ในการแยกข้าวปริมาณแอมิโลสสูง และปานกลางออกจากกันรวมถึงแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูงออกจากกลุ่มอื่น (Chen et al., 2008b)



ที่มา Dobo Macaire (2006)

ภาพที่ 2.5 ตำแหน่งความหลากหลายของ SNPs ที่เกิดขึ้นที่บริเวณตำแหน่ง Intron1 มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างเบส G/T ตำแหน่ง Exon6 มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างเบส A/C และตำแหน่ง Exon10 มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างเบส T/C

การศึกษา SNPs ของยีน *SSIIa* ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณแอมิโลส พบว่าความแตกต่างของยีน *SSIIa* ในตำแหน่งที่ 4329-4330 bp มีความแตกต่างของอัลลีลระหว่าง GC/TT สามารถแยกได้จากข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูง หรือปานกลาง จะมีอัลลีลเป็นแบบ GC ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำจะมีอัลลีลเป็นแบบ TT (ตารางที่ 2.2) (Bao et al., 2006) อีกทั้งยังมีการศึกษาพบว่ายีน *SSIIa* มีความเกี่ยวข้องในการควบคุมการสังเคราะห์แอมิโลเพคตินรวมถึงความยาวของสายแอมิโลเพคติน และการเกิดเจลของแป้ง (Umemoto et al., 2004; Nakamura et al., 2005; Bao et al., 2006)

Chen, Bergman, Pinson and Fjellstrom (2008a) ได้จัดจำแนกยีน *Waxy* ออกเป็น haplotype ตามปริมาณแอมิโลสในตัวอย่างข้าวเหนียว และข้าวเจ้าจำนวน 146 สายพันธุ์ โดยพิจารณา SNPs จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ Intron1 Exon6 และ Exon10 (In1-Ex6-Ex10) สามารถแบ่งได้ 4 กลุ่ม คือ G-A-T บอกลึงสายพันธุ์ข้าวที่มีแอมิโลสสูงมาก G-A-C บอกลึงสายพันธุ์ข้าวที่มีแอมิโลสสูง G-C-C บอกลึงสายพันธุ์ข้าวที่มีแอมิโลสปานกลาง และ T-A-C บอกลึงสายพันธุ์ข้าวที่มีแอมิโลสต่ำ แสดงให้เห็นว่า SNPs ที่ตำแหน่ง In1-Ex6-Ex10 ของยีน *Waxy* มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญมากที่สุด ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณแอมิโลสในข้าว (Kharabian-Masouleh et al., 2012)

มีรายงานโดย Fitzgerald et al. (2011) พบว่าปริมาณแอมิโลส รูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* และคุณภาพการย่อยของข้าวมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ในการทำนายค่าดัชนีน้ำตาลของข้าว ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานได้อีกด้วย Patindol, Guraya, Champagne, Chen and McClung (2010) ได้ศึกษา รูปแบบความสัมพันธ์แต่เป็นลักษณะนำความหลากหลายของอัลลีลที่ระบุโดยจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ แบบ CT นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับปริมาณแอมิโลส และคุณสมบัติการย่อยของแป้ง สำหรับในประเทศไทยพบว่ามีเพียงงานวิจัยของ Prathepha and Baimai (2004) ได้รายงานลักษณะของยีน *Waxy* ในข้าวจำนวน 82 สายพันธุ์ โดยพบว่าที่บริเวณ 5' Splice site ที่บริเวณรอยต่อระหว่างตำแหน่ง Exon1 และ Intron1 มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอมิโลสในข้าว แต่จากรายงานดังกล่าวไม่ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง haplotype ของยีน *Waxy* และคุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าว ซึ่งถ้ามีการศึกษาอาจพบข้อมูลความสัมพันธ์ที่เป็นประโยชน์ในการใช้เป็นดัชนีเบื้องต้นสำหรับการพิจารณาเลือกสายพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมให้กับผู้บริโภค

ตารางที่ 2.2 ตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน *Waxy* ในตำแหน่งของ Intron1 Exon6 Exon10 และยีน *SSIIa*

ยีน (ตำแหน่ง)	PCR product (bp.)	เอนไซม์ ตัดจำเพาะ	ความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยว ที่สัมพันธ์กับปริมาณแอมิโลส			เอกสารอ้างอิง
			สูง	ปานกลาง	ต่ำ	
Intron1	182-144	<i>AccI</i>	“ G ” 137, 116 bp.	-	“ T ” 253 bp.	Ayres et al. (1997)
Exon 6	292-2389	-	“ A ” 292, 202 bp.	“ C ” 292 bp.	-	Larkin and Park (2003)
Exon10	745-3381	<i>ApaI</i>	“ T ” 745 bp.	-	“ C ” 424, 321 bp.	Tran et al. (2011)
<i>SSIIa</i>	540, 4329-4323	-	“ GC ” 540 bp.	-	“ TT ” 341 bp.	Jin et al. (2010)

2.9 คุณสมบัติการย่อยของแป้ง

แป้งเมื่อผ่านกระบวนการทำให้สุก และผ่านระบบการย่อยอาหารของมนุษย์จะถูกไฮโดรไลซ์ให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงโดยเอนไซม์ Englyst and Hudson (1996) ได้แบ่งประเภทแป้งตามอัตรา และระยะเวลาของการย่อยในหลอดทดลองดังนี้

2.9.1. แป้งที่ย่อยเร็ว (Rapidly digestible starch: RDS) เป็นแป้งที่ถูกย่อยไปเป็นน้ำตาลกลูโคสภายใน 20 นาที โดยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก เมื่อบริโภคอาหารประเภทแป้งที่มีสัดส่วนของ RDS ในปริมาณมากจะส่งผลให้ร่างกายมีระดับน้ำตาลกลูโคส และระดับฮอร์โมนอินซูลินในกระแสเลือดสูง (Englyst et al., 1999) โดยคำนวณได้จากปริมาณกลูโคสที่ถูกย่อยออกมาแบบเร็วภายใน 20 นาที (Rapidly available glucose: RAG)

2.9.2. แป้งที่ย่อยช้า (Slowly digestible starch: SDS) จะมีลักษณะคล้ายกับ RDS แต่จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้ช้ากว่าซึ่งจะถูกย่อยในช่วงระหว่าง 21-120 นาที และคาดว่าจะถูกย่อยสลายได้สมบูรณ์ในลำไส้เล็ก เนื่องจาก SDS ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างช้า ๆ เมื่อบริโภคอาหารที่มีสัดส่วนของ SDS มากจะส่งผลให้ร่างกายมีระดับน้ำตาลกลูโคส และระดับฮอร์โมนอินซูลินในกระแสเลือดปานกลาง (Zhang, Sofyan and Hamaker, 2008) ดังนั้นจึงส่งผลให้มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ซึ่งจะลดโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคอ้วน โรคเบาหวาน โดยคำนวณได้จากปริมาณกลูโคสที่ถูกย่อยออกมาภายใน 20-120 นาที (Slowly available glucose: SAG)

2.9.3. แป้งที่ทนย่อย (Resistant starch: RS) เป็นแป้งที่มีคุณสมบัติเทียบเท่ากับเส้นใยอาหาร (Yue & Waring, 1998) ที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ 120 นาทีในลำไส้เล็ก (Englyst, Kingman & Cummings, 1992) ดังนั้นจึงผ่านเข้าสู่ลำไส้ใหญ่ และถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ กลายเป็นกรดไขมันสายสั้น (Short-chain fatty acid; SCFA) อาทิ เช่น แอซิเตท โพรพิโอเนท บิวทิเรท สามารถดูดซึมภายในลำไส้ใหญ่ และขนส่งไปถึงตับได้ ซึ่งจะมีผลดีกับลำไส้ใหญ่ เช่น ปรับสภาวะตอนปลายของลำไส้ใหญ่ เพิ่มปริมาณของของเหลว และปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ภายในลำไส้ใหญ่ให้ต่ำลง (กล้านรงค์ ศรีวรรต และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546) ซึ่งสามารถช่วยในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Shamai, Bianco-Peled & Shimoni, 2003) นอกจากนี้สามารถบ่งชี้ได้ด้วยค่าที่ทดสอบในคน (*In vivo test*) ได้แก่ ค่าดัชนีน้ำตาล (GI) ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต เมื่อคนเรารับประทานอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยโดยน้ำย่อยในทางเดินอาหารจนได้เป็นกลูโคสซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตขนาดเล็กสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด เมื่อนำ

อาหารแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบกับกันโดยให้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเท่ากันพบว่าอาหารแต่ละชนิดจะถูกย่อย และถูกดูดซึมเข้าร่างกายในอัตราที่แตกต่างกันทำให้ระดับน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างกันต่อมาได้มีการศึกษาวิธีการหาค่าดัชนีน้ำตาลซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต 50 กรัม แล้ววัดระดับน้ำตาลที่มีการเปลี่ยนแปลงไปใน 2-3 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นหลังจากรับประทานอาหารมาตรฐานที่มีค่า GI (น้ำตาลกลูโคสหรือขนมปังขาว) เท่ากับ 100 ซึ่งเป็นตัวเลขบอกปริมาณน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้นหลังจากรับประทานอาหารแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับรับประทานน้ำตาลกลูโคสหรือขนมปังขาวในจำนวนคาร์โบไฮเดรตที่เท่ากันโดยค่า GI ของอาหาร (Wolever, Jenkins, Jenkins & Josse, 1991) แบ่งได้ 3 ระดับแสดงในตารางที่ 2.3 ดังนี้

ตารางที่ 2.3 ค่าดัชนีน้ำตาล (GI) ระดับต่างๆ

ระดับดัชนีน้ำตาลในอาหาร	ค่าดัชนีน้ำตาล
อาหารที่มีค่าดัชนีน้ำตาลระดับต่ำ	0-55
อาหารที่มีค่าดัชนีน้ำตาลระดับปานกลาง	56-69
อาหารที่มีค่าดัชนีน้ำตาลระดับสูง	มีค่า >70

ที่มา Brand-Miller, Wolever and Colagiuri (1999)

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ได้จากการย่อยแป้งได้เร็วหรือช้านั้น พบว่าอาหารชนิดที่ย่อยเร็วจะมีค่า GI สูง แต่ถ้าอาหารชนิดนั้นมีการย่อยที่ช้าจะมีค่า GI ต่ำ (Brand-Miller et al., 1999) ข้าวประกอบด้วยแป้งมากกว่าร้อยละ 80 ดังนั้นข้าวจึงเป็นอาหารหลักสำคัญที่ส่งผลต่อค่าดัชนีน้ำตาลในเลือด มีรายงานวิจัยได้ศึกษาค่า GI ในตัวอย่างข้าวแต่ละสายพันธุ์ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทดสอบในคน (*In vivo test*) พบว่าค่า GI ของข้าวโดยทั่วไปมีค่า GI อยู่ในช่วงกว้าง คือ ตั้งแต่ 47-109 แสดงในตารางที่ 2.4 ดังนี้

มีรายงานพบว่าคนที่ข้าวมีดัชนีน้ำตาล และคาร์โบไฮเดรตสูงทำให้ผู้ที่ควบคุมหรือจำกัดอาหารต้องระวังการบริโภคมากขึ้น (Jenkins, Wolever, Jenkins, Josse & Wong, 1984) ในขณะที่ Miller, Pang and Bramall (1992) รายงานว่าการบริโภคอาหาร GI ต่ำ หรืออาหาร GI ปานกลางสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้

ตารางที่ 2.4 ค่าดัชนีน้ำตาลในข้าวจากการศึกษาในคน (*In vivo* test)

เอกสารอ้างอิง	ประเทศ	สายพันธุ์	ประเภท	ชนิด	อาหารอ้างอิง	ดัชนีน้ำตาล
Jenkins et al. (1981)	แคนาดา	ไม่ระบุสายพันธุ์	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Japonica	กลูโคส	72
Brand, Nicholson, Thorburn and Truswell (1985)	ออสเตรเลีย	Mahatma (Long grain)	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Japonica	กลูโคส	50
Miller et al. (1992)	ออสเตรเลีย	ไม่ระบุสายพันธุ์	ข้าวขัดขาว (ข้าวเหนียว)	Japonica	ขนมปังขาว	88
		Calrese (Medium grain)	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Japonica	ขนมปังขาว	83
		Pelde	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Japonica	ขนมปังขาว	93
		Doongara (สายพันธุ์พื้นเมือง)	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าแอมิโลสสูง)	Japonica	ขนมปังขาว	64
Chan et al. (2001)	ออสเตรเลีย	ไม่ระบุสายพันธุ์	ข้าวขัดขาว (ข้าวเหนียว)	Indica	กลูโคส	94
		ข้าวหอมมะลิ	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	109
Ito et al. (2005)	ญี่ปุ่น	ไม่ระบุสายพันธุ์ (Short grain)	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Japonica	กลูโคส	80
Panlasigui and Thompson (2006)	แคนาดา	IR43	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	ขนมปังขาว	94
Yang et al. (2006)	จีน	ไม่ระบุสายพันธุ์	ข้าวขัดขาว (ข้าวเหนียว)	Indica	กลูโคส	87
		ไม่ระบุสายพันธุ์	ข้าวขัดขาว (ข้าวเหนียว)	Indica	กลูโคส	88
		ไม่ระบุสายพันธุ์	ข้าวขัดขาว (ข้าวเหนียวแอมิโลสสูง)	Indica	กลูโคส	50
		ไม่ระบุสายพันธุ์	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	83
Ranawana et al. (2009)	อังกฤษ	ไม่ระบุสายพันธุ์ (Long grain)	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	47
	อังกฤษ	ไม่ระบุสายพันธุ์ (ข้าวเหนียวไทย)	ข้าวขัดขาว (ข้าวเหนียว)	Indica	กลูโคส	92
	อังกฤษ	ไม่ระบุสายพันธุ์ (Thai red rice)	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	76

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

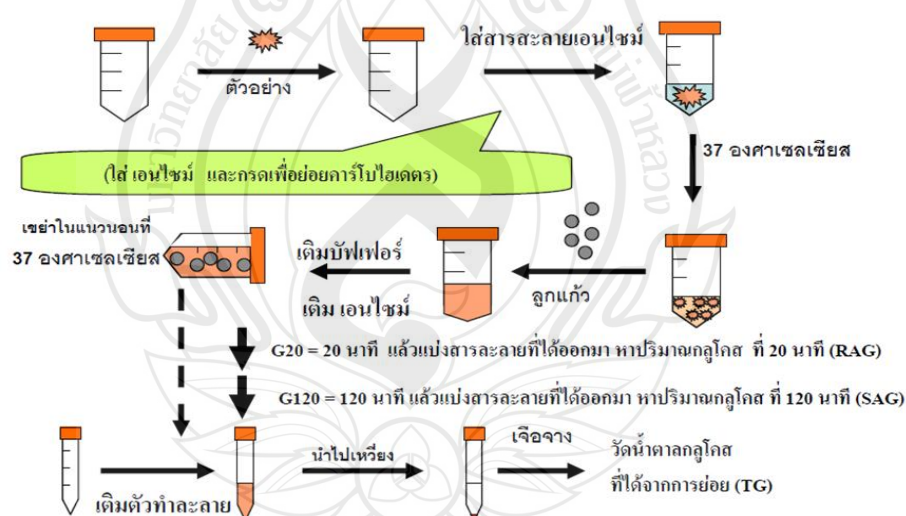
เอกสารอ้างอิง	ประเทศ	สายพันธุ์	ประเภท	ชนิด	อาหารอ้างอิง	ดัชนีน้ำตาล
Pathiraje, Madhujith, Chandrasekara and Nissanka (2010)	ศรีลังกา	Bg 300	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	61
		Bg 352	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	67
		Bg 358	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	67
		Bg 406	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	73
		LD 356	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	70
		Wedaheenati (สายพันธุ์พื้นเมือง)	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	57
		Rathkaral (สายพันธุ์พื้นเมือง)	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	60
		Heendikwel (สายพันธุ์พื้นเมือง)	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	62
Sri Widowati, Susila Santosa, Made Astawan and Akhyar (2010)	อินโดนีเซีย	Sintanur	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าเอมิโลสต่ำ)	Indica	กลูโคส	91
		Gilirang	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าเอมิโลสต่ำ)	Indica	กลูโคส	97
		Ciherang	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าเอมิโลสปานกลาง)	Indica	กลูโคส	54
		IR64	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าเอมิโลสปานกลาง)	Indica	กลูโคส	70
		Mekongga	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าเอมิโลสปานกลาง)	Indica	กลูโคส	79
		IR42	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าเอมิโลสสูง)	Indica	กลูโคส	69
		Batang Lembang	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าเอมิโลสสูง)	Indica	กลูโคส	64
Trinidad et al. (2013)	ฟิลิปปินส์	IMS 2	ข้าวขัดขาว (ข้าวเหนียว)	Indica	กลูโคส	63
		Sinandomeng	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าเอมิโลสต่ำ)	Indica	กลูโคส	75
		NSIC Rc160	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าเอมิโลสต่ำ)	Indica	กลูโคส	70

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

เอกสารอ้างอิง	ประเทศ	สายพันธุ์	ประเภท	ชนิด	อาหารอ้างอิง	ดัชนีน้ำตาล
Trinidad et al. (2013)	ฟิลิปปินส์	PSB Rc18	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าแอมิโลสปานกลาง)	Indica	กลูโคส	59
		IR64	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าแอมิโลสปานกลาง)	Indica	กลูโคส	57
		PSB Rc12	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าแอมิโลสปานกลาง)	Indica	กลูโคส	63
		PSC rc10	ข้าวขัดขาว (ข้าวเจ้าแอมิโลสสูง)	Indica	กลูโคส	50
Jenkins et al. (1981)	แคนาดา	ไม่ระบุสายพันธุ์	ข้าวกล้อง (ข้าวเจ้า)	Japonica	กลูโคส	66
Miller et al. (1992)	ออสเตรเลีย	Calrese (Medium grain)	ข้าวกล้อง (ข้าวเจ้า)	Japonica	ขนมปังขาว	87
		Pelde	ข้าวกล้อง (ข้าวเจ้า)	Japonica	ขนมปังขาว	76
		Doongara (สายพันธุ์พื้นเมือง)	ข้าวกล้อง (แอมิโลสสูง)	Japonica	ขนมปังขาว	66
Ito et al. (2005)	ญี่ปุ่น	ไม่ระบุสายพันธุ์ (Short grain)	ข้าวกล้อง (ข้าวเจ้า)	Japonica	กลูโคส	62
Panlasigui and Thompson (2006)	แคนาดา	IR42	ข้าวกล้อง (แอมิโลสสูง)	Indica	ขนมปังขาว	83
Yang et al. (2006)	จีน	ไม่ระบุสายพันธุ์	ข้าวกล้อง (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	87
Lin (2010)	จีน	variety, Tai Ken #9	ข้าวกล้อง (ข้าวเจ้า)	Japonica	ขนมปังขาว	82
Trinidad et al. (2013)	ฟิลิปปินส์	Sinandomeng	ข้าวกล้อง (แอมิโลสต่ำ)	Indica	กลูโคส	55
		IR64	ข้าวกล้อง (แอมิโลสปานกลาง)	Indica	กลูโคส	51
ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์ (2553)	ไทย	สินเหล็ก	ข้าวกล้อง (ข้าวเจ้า)	Indica	กลูโคส	58
Ito et al. (2005)	ญี่ปุ่น	ไม่ระบุสายพันธุ์ (Short grain)	ข้าวกล้องนอก (ข้าวเจ้า)	Japonica	กลูโคส	57

Jenkins et al. (2002) ระบุว่าอาหารที่มีค่า GI ต่ำจะช่วยลดความเสี่ยงของโรคเบาหวาน และโรคหลอดเลือดหัวใจ โดยข้าวที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน คือ ข้าวที่มีค่า GI ต่ำหรือปานกลาง และยังมีรายงานพบว่าค่า GI ของข้าวแต่ละสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของแป้งในแต่ละสายพันธุ์นั้น ๆ (Fitzgerald et al., 2011) งานวิจัยที่มีมาก่อนหน้าพบว่าข้าวไทยหลายสายพันธุ์ที่มีศักยภาพเชิงโภชนาการสูงเพื่อใช้ควบคุมปริมาณน้ำตาล เช่น ข้าวหอมมะลิแดงเมื่อหุงสุกแล้วนำไปบริโภค จะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับของน้ำตาลกลูโคสต่ำกว่าข้าวเจ้าทั่วไปจึงมีศักยภาพในการป้องกันและบรรเทาโรคเบาหวาน (แผนงานฐานทรัพยากรอาหาร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ [สสส.], 2555) สำหรับการศึกษาดัชนีน้ำตาลในข้าวไทยมีรายงานพบเพียงไม่กี่สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียวไทยมีค่าดัชนีน้ำตาล 92 ข้าวสีแดงมีค่าดัชนีน้ำตาล 76 (Ranawana, Henry, Lightowler & Wang, 2009) และข้าวสินเหล็กมีค่าดัชนีน้ำตาล 58 (ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์, 2553) (ตารางที่ 2.4)

2.10 การศึกษาวิธีการย่อยของแป้งในหลอดทดลอง



ที่มา รัชณี คงคาอุยยา และวิญญู เจริญศิริ (2555)

ภาพที่ 2.6 แสดงวิธีการวิเคราะห์หาดัชนีน้ำตาลในข้าวสุกในหลอดทดลองที่เรียกว่า “Rapidly available glucose (RAG) และ Slowly available glucose (SAG)” ตามวิธีของ Englyst and Hudson (1996) และ Goni, Garcia-Alonso and Saura-Calixto (1997)

สำหรับค่า GI อาจวัดได้จากวิธีการย่อยของแป้งในหลอดทดลองโดย Englyst et al.(1992) ได้พัฒนาวิธีการวัดอัตราการย่อยของแป้งหรือคาร์โบไฮเดรตของอาหารให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ กลุ่มแอลฟา-แอมิเลส และแอมิโลกลูโคซิเดสในหลอดทดลองที่เรียกว่า Rapidly available glucose (RAG) คือ ปริมาณที่ใช่วงบอกระดับน้ำตาลกลูโคสที่เข้าสู่กระแสเลือดในช่วงเวลา 20 นาที และ Slowly available glucose (SAG) คือ ปริมาณที่ใช่วงบอกปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เข้าสู่กระแสเลือดในช่วงเวลา 21-120 นาทีถัดมา ดังแสดงในภาพที่ 2.6 ซึ่งวิธีนี้ถูกออกแบบมาเพื่อสะท้อนให้เห็นถึงอัตราที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสถูกปล่อยออกมาจากส่วนที่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในมนุษย์โดยเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่างค่า RAG และค่า GI (Englyst & Hudson, 1996)

และจากการศึกษาของ Englyst and Hudson (1996) พบว่าค่า RAG สามารถนำมาใช้ในการจำแนกอาหารจำพวกแป้ง โดยใช้ในการทำนายระดับดัชนีน้ำตาลในอาหารได้

ตารางที่ 2.5 ค่า RAG และค่า SAG ในข้าวจากงานวิจัยอื่น ๆ

เอกสารอ้างอิง	ตัวอย่าง	กรัม/100 กรัมข้าวสุก	
		RAG	SAG
Englyst et al. (1996)	ข้าวเมล็ดยาว (ขัดขาว)	19.30	6.20
	ข้าวเมล็ดยาว (กล้อง)	16.30	10.20
Rashmi and Urooj (2003)	ข้าวขัดขาว	12.80-21.00	14.20-30.60
Aarathi, Urooj, Puttaraj and Science (2003)	ข้าวขัดขาว	26.60	-
Englyst, Liu and Englyst (2007)	ข้าวเมล็ดยาว (กล้อง)	17.20	12.50
Hettiaratchi, Ekanayake and Welihinda (2009)	ข้าวสีแดง	18.80	10.50
วิญญู เจริญศิริ, รัชณี คงกาญจนาย และนฤมล รัตนกรพันธ์ (2551)	ข้าวเหนียว และข้าวเจ้า (ขัดขาว)	6.05-20.89	6.13-22.18
รัชณี คงกาญจนาย และวิญญู เจริญศิริ (2555)	ข้าวเหนียว และข้าวเจ้า (ข้าวกล้อง)	0.62-14.66	0.44-11.97
	ข้าวมะลิแดง	10.60	8.59

โดยระบุว่าผลของปริมาณ RAG ที่วัดได้จากข้าวในระดับปานกลางหรือต่ำอาจให้ค่าดัชนีน้ำตาลและระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดอยู่ในระดับปานกลาง ต่อมาการศึกษาพบว่าค่า RAG และ RDS จากการทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในมนุษย์ โดยเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่างค่า RAG และค่า GI มีความสัมพันธ์กันมากถึงร้อยละ 99 (Englyst et al. 1999) และงานวิจัยของ Araya, Contreras, Alvina, Vera and Pak (2002) ได้แสดงให้เห็นว่าค่า RAG ที่ได้จาก การทดสอบในหลอดทดลองมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อระดับน้ำตาลในเลือดในการศึกษาของมนุษย์ และยังพบว่าอาหารที่มีปริมาณของค่า SAG สูงอาจจะนำไปเป็นอาหาร GI ต่ำซึ่งน่าจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพ (Englyst & Englyst, 2003)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาการศึกษาอัตราการย่อยของแป้งในหลอดทดลองในข้าวมีการศึกษาก่อนข้างน้อย (ตารางที่ 2.5) สำหรับในข้าวไทยมีเพียงรายงานการศึกษาของริญ เจริญศิริ และคณะ (2551) ในข้าวที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และข้าวที่ได้จากท้องตลาดจำนวน 71 สายพันธุ์ พบว่าค่า RAG ในข้าวกล้องมีแนวโน้มต่ำกว่าข้าวขาวซึ่งใยอาหารในข้าวกล้องมากกว่าข้าวขาวเป็นผลให้ค่า RAG ในข้าวกล้องต่ำกว่าข้าวขาว ดังนั้นค่า RAG และค่า SAG สามารถใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการตรวจสอบอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการย่อยของแป้ง และการตอบสนองระดับน้ำตาลในเลือดในร่างกาย

2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยของแป้ง และดัชนีน้ำตาล

ในอดีตที่ผ่านมาพบว่าปริมาณแอมิโลสเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อค่า GI มีคุณสมบัติย่อยได้ช้ากว่าแอมิโลเพคติน ซึ่งแอมิโลสประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายโซ่ตรง และแอมิโลเพคตินประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายกิ่ง ดังนั้นอาหารที่มีแอมิโลสสูงจึงมีค่าการตอบสนองระดับน้ำตาลต่ำ มีรายงานวิจัยพบว่าปริมาณแอมิโลสมีความสัมพันธ์ในทางตรงข้ามกับค่าดัชนีน้ำตาลของข้าว คือ หากข้าวมีปริมาณแอมิโลสสูงจะมีค่าดัชนีน้ำตาลต่ำหรือมีอัตราการย่อยของแป้งช้า ในทางกลับกันหากข้าวมีปริมาณแอมิโลสต่ำจะมีค่าดัชนีน้ำตาลสูงหรือมีอัตราการย่อยของแป้งเร็วซึ่งข้าวในกลุ่มหลังไม่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Behall, Scholfield & Canary, 1988; Frei, Siddhuraju & Becker, 2003; Hu et al., 2004) ดังนั้นข้าวเหนียวเป็นข้าวในกลุ่มที่มีปริมาณแอมิโลสที่ต่ำมากจึงมีอัตราการย่อยของแป้งหรือค่าดัชนีน้ำตาลสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวกลุ่มอื่น (Denardin, Walter, Silva, Souto & Fagundes, 2007; Jaisut, Prachayawarakorn, Varayanond, Tungtrakul & Soponronnarit, 2008) จากการศึกษาของ Frei et al. (2003) พบว่าข้าว/แป้งที่มีปริมาณแอมิโลสสูงจะมีค่า GI ต่ำซึ่งจะส่ง

ผลดีต่อผู้ป่วยเบาหวานเพราะคาร์โบไฮเดรตในข้าวจะถูกย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคส และร่างกายสามารถดูดซึมอย่างช้า ๆ ดังนั้นจึงช่วยในการรักษาระดับน้ำตาลในผู้ป่วยเบาหวานแต่จากรายงานวิจัยของ Perez, Thompson and Yiu (1991); Miller et al. (1992); ริญ เจริญศิริ และคณะ (2551) ระบุว่าปริมาณแอมิโลสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้ในการบ่งชี้อัตราการย่อยของแป้ง และการตอบสนองระดับน้ำตาลได้ โดยสายพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูงเหมือนกันอาจมีองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ต้องนำมาพิจารณา เช่น คุณสมบัติทางเคมีหรือกายภาพที่แตกต่างกันซึ่งมีผลต่อการย่อยของแป้ง และปริมาณน้ำตาลในเลือดอย่างไรก็ตามยังมีอีกหลากหลายปัจจัยที่สำคัญซึ่งเป็นตัวกำหนดอัตราการย่อยของแป้ง และดัชนีน้ำตาลดังนี้ (ตารางที่ 2.6)

ตารางที่ 2.6 รายละเอียดปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยของแป้ง และดัชนีน้ำตาล

ปัจจัยที่มีผล	รายละเอียด	เอกสารอ้างอิง
ปริมาณแอมิโลส	1. มีความสัมพันธ์ตรงข้ามกับค่าดัชนีน้ำตาล 2. ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำมีอัตราการย่อยของแป้งเร็ว และมีค่าดัชนีน้ำตาลสูงซึ่งไม่เหมาะกับผู้ป่วยโรคเบาหวาน	Behall et al. (1988) Frei et al. (2003) Hu, Zhao, Duan, Linlin and Wu (2004) Denardin et al. (2007) Jaisut et al. (2008)
อัตราส่วนระหว่างแอมิโลสและแอมิโลเพคติน	1. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีสัดส่วนของแอมิโลส/แอมิโลเพคตินในข้าวเพิ่มขึ้นช่วยให้ค่าดัชนีน้ำตาลในข้าวต่ำลง 2. ช่วยในการลดระดับการดูดซึมของน้ำตาลในเลือดได้	Goddard, Young and Marcus (1984) Miller et al. (1992) Kennedy and Burlingame (2003) Ranawana et al. (2009)
การขัดสี	1. ข้าวกล้องส่วนที่เป็นเนื้อหรือเมล็ดข้าวสารยังมีส่วนที่เป็นจมูกข้าว และเยื่อหุ้มเมล็ด (รำ) อยู่เป็นส่วนที่มีเส้นใยอาหารสูง 2. ข้าวกล้องมีแนวโน้ม ค่า RAG ต่ำกว่าข้าวขาวซึ่งมีผลทำให้ค่าดัชนีน้ำตาลน้อยกว่า สำหรับการบ่งชี้ค่า GI ได้อีกด้วย	Ito et al. (2005) ริญ เจริญศิริ และคณะ (2551)

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

ปัจจัยที่มีผล	รายละเอียด	เอกสารอ้างอิง
วิธีการหุงต้ม	- ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสใกล้เคียงกันมีความแตกต่างทางด้านการหุงต้มเนื่องจากความแตกต่างของความยาวของสายกิ่งของแอมิโลเพคตินแตกต่างกัน - ระยะเวลาในการหุงต้มขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ แป้งสุกหากอุณหภูมิแป้งสูงมีค่าต่ำจะใช้เวลาในการหุงต้มเร็วกว่า - ความร้อนที่ใช้ในการหุงต้มมีผลต่อโครงสร้างโมเลกุลของเมล็ดแป้ง และมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของข้าว - ข้าวหุงสุกที่ผ่านวิธีการทำให้ข้าวสุกด้วยวิธีที่ต่างกันมีผลต่อการย่อย และค่า GI	Indudhara Swamy, Sowbhagya and Bhattacharya (1978) Juliano (1985) Jane, Wong and McPkerson (1997) Kumari et al. (2007) Mahadevammn and Tharanathan (2007) Vidal et al. (2007) Ranawana et al. (2009) ณัชชา คาวมุกดา (2554) ละมุล วิเศษ (2555)
การเก็บรักษา	การเก็บรักษา และนำมาให้ความร้อนซ้ำพบว่าปริมาณแป้งทนย่อยเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบข้าวหุงสุกแล้วนำมาวิเคราะห์ทันที	Hu et al. (2004)
ปริมาณแป้งทนย่อย	- ปริมาณแป้งทนย่อยจะไม่ถูกย่อยในลำไส้เล็ก แต่จะถูกหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่เป็นกรดไขมันสายสั้น - ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ - ส่งผลให้อัตราการย่อยในลำไส้เล็กลดลง - ช่วยลดการตอบสนองต่อระดับน้ำตาลในเลือดในคนปกติ และในผู้ป่วยโรคเบาหวาน (ชนิดที่ 2) - เพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินในคนปกติ	Shamai et al. (2003) Cummings, Edmond and Magee (2004) Englyst and Englyst (2003) Robertson, Bickerton, Dennis, Vidal and Frayn (2005) วิญญู เจริญศิริ และคณะ (2551)

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

ปัจจัยที่มีผล	รายละเอียด	เอกสารอ้างอิง
ปริมาณใยอาหาร	1. หากเมล็ดข้าวมีปริมาณเส้นใยอาหารมาก	Salmerom et al. (1997a)
	อัตราการย่อยจะต่ำ	Salmerom et al. (1997b)
	2. อาหารที่อุดมไปด้วยเส้นใยอาหารมี	Kumari, Urooj and Prasad
	ประสิทธิภาพในการลดความเสี่ยงของ	(2007)
การเจลาติไนเซชัน (Gelatinization)	โรคเบาหวาน	Ranawana et al. (2009)
	1. ความสามารถในการเจลาติไนเซชันมีผล	Perez et al. (1991)
	ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแป้งข้าว	Ranawana et al. (2009)
	2. แป้ง/ข้าวที่ใช้เวลาในการเจลาติไนเซชัน	
	เป็นเวลานาน มีสตาร์ชที่ถูกย่อยเป็นน้ำตาล	
	ง่ายส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูง	

2.12 การวิเคราะห์ข้อมูล ประเภทของการจัดกลุ่มหรือแบ่งกลุ่มข้อมูลของตัวอย่าง

เทคนิคการจัดกลุ่มข้อมูลมีหลากหลายเทคนิคซึ่งเทคนิคการจัดกลุ่มสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

2.12.1 การวิเคราะห์กลุ่มข้อมูล (Cluster analysis) (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2553)

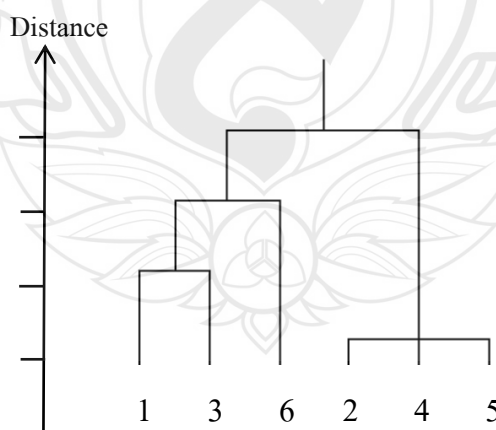
เป็นเทคนิคที่ใช้จำแนกหรือแบ่ง Case คือ คน สัตว์ สิ่งของ ฯลฯ หรือแบ่งตัวแปรออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป Case ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันจะมีลักษณะที่เหมือนกันหรือคล้ายกัน ส่วน Case ที่อยู่ต่างกลุ่มกันจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน ประเภทของเทคนิค Cluster Analysis แบ่งเป็นหลายประเภท โดยเทคนิคที่ใช้กันมากมี 2 เทคนิค คือ

2.12.1.1 การวิเคราะห์กลุ่มแบบขั้นตอน (Hierarchical Cluster analysis)

2.12.1.2 การวิเคราะห์กลุ่มแบบไม่เป็นขั้นตอน (K-Means Cluster analysis)

สำหรับเทคนิคการวิเคราะห์กลุ่มแบบขั้นตอนเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากในการจัดกลุ่ม Case หรือจัดกลุ่มตัวแปรซึ่งเงื่อนไขที่ใช้ในการแบ่ง Case นั้น จำนวน Case ควรต่ำกว่า 200 ถ้าจำนวน Case ตั้งแต่ 200 ขึ้นไป ใช้เทคนิคการวิเคราะห์กลุ่มแบบไม่เป็นขั้นตอน และจำนวนตัวแปรต้องไม่มากเกินไป อีกทั้งไม่จำเป็นต้องทราบจำนวนกลุ่มมาก่อน และไม่จำเป็นต้องทราบว่าตัวแปรใดหรือ

Case ใดอยู่กลุ่มใดก่อน สำหรับการจัดกลุ่ม Case นั้น กัลยา วาณิชย์บัญชา (2552) ระบุว่าขั้นตอนของเทคนิคการวิเคราะห์กลุ่มแบบขั้นตอน มีรายละเอียดดังนี้ คือ 1. เลือกตัวแปรหรือปัจจัยที่คาดว่า มีอิทธิพลที่ทำให้ Case ต่างกันทำให้สามารถจัดกลุ่ม Case ได้ชัดเจนจากนั้นเลือกวิธีการวัดระยะห่างระหว่าง Case แต่ละคู่ หรือวิธีการคำนวณเพื่อวัดค่าความคล้ายของ Case แต่ละคู่ และเลือกหลักเกณฑ์ในการรวมกลุ่มหรือรวม Cluster 2. การวัดความคล้าย (Similarity Measure) จะมีการวัดความคล้ายกันของ Case ที่ละคู่ในกรณีที่เป็นการจัดกลุ่ม Case ส่วนการจัดกลุ่มตัวแปรการวัดความคล้ายจะเป็นการวัดความคล้ายของตัวแปรแต่ละคู่ สำหรับการวัดความคล้ายของ Case แต่ละคู่ อาจจะวัดด้วยระยะห่าง (Distance) หรือวัดด้วยค่าความคล้าย (Similarity) แต่การวัดความสัมพันธ์ของตัวแปรจะวัดด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation) สำหรับวิธีการคำนวณระยะห่าง หรือค่าความคล้ายของ Case แต่ละคู่จะแตกต่างกันเมื่อชนิดของข้อมูลต่างกัน (ภาพที่ 2.7) อย่างไรก็ตามผลของเทคนิค Cluster ไม่ได้ให้ค่าสถิติ หรือผลการทดสอบสมมติฐาน เพื่อตัดสินใจหาจำนวนกลุ่มที่เหมาะสม ดังนั้นผู้วิเคราะห์จะต้องพิจารณาจำนวนกลุ่มที่มีความเหมาะสมเองโดยอาจใช้ระยะห่างหรือความคล้าย โดยสามารถพิจารณาจำนวนกลุ่มจาก Dendrogram โดยการกำหนดตัวเลขระหว่างหรือความคล้ายเป็นเกณฑ์ในการตัดสินใจเทคนิคข้างต้นมีหลักการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน สำหรับเทคนิคการวิเคราะห์กลุ่มนั้นสามารถใช้ในการจัดกลุ่มข้อมูล คน สัตว์ สิ่งของ ฯลฯ หรือใช้ในการจัดกลุ่มตัวแปรก็ได้ แต่ส่วนใหญ่จะนิยมใช้ในการจัดกลุ่มข้อมูลมากกว่าตัวแปร โดยการจัดกลุ่มตัวแปรนิยมใช้เทคนิคการวิเคราะห์ปัจจัย



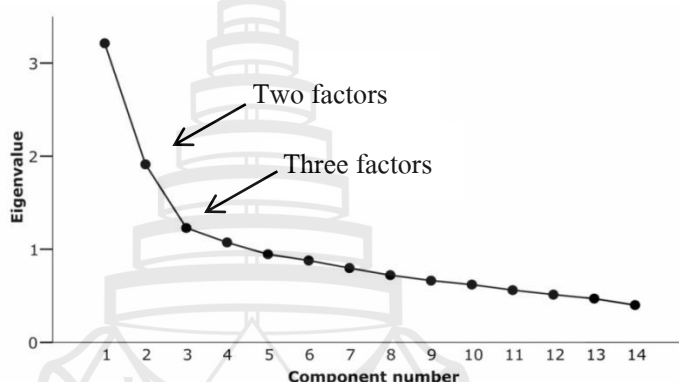
ที่มา Lohninger (1999)

ภาพที่ 2.7 ตัวอย่าง Dendrogram จากการวิเคราะห์กลุ่มข้อมูลด้วยเทคนิค Cluster analysis

2.12.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบ (Principal component analysis: PCA)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการลดจำนวนตัวแปร โดยการศึกษาถึงโครงสร้างความสัมพันธ์ของตัวแปร และสร้างตัวแปรใหม่ เรียกว่า องค์ประกอบ โดยองค์ประกอบที่สร้างขึ้นจะเป็นการนำตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันสูงมารวมกันเป็นองค์ประกอบเดียวกัน ซึ่งความสัมพันธ์เป็นไปได้ทั้งทิศทางบวก (ไปในทางเดียวกัน) และทิศทางลบ (ไปในทางตรงข้ามกัน) ส่วนตัวแปรที่อยู่คนละองค์ประกอบมีความสัมพันธ์กันน้อยหรือไม่มีความสัมพันธ์กันเลย (กัลยา วาณิชยปัญญา, 2551) การวิเคราะห์องค์ประกอบโดยการสกัดองค์ประกอบเป็นการรวมลักษณะตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันเข้าเป็นตัวแปรใหม่ที่มีจำนวนน้อยกว่าตัวแปรเดิม และองค์ประกอบหลักที่สกัดได้ยังคงความแปรปรวนของตัวแปรเดิมไว้ การวิเคราะห์องค์ประกอบข้อมูลที่น่ามาวิเคราะห์จะถูกใช้เป็นพารามิเตอร์เพื่อหาความสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่าง โดยเป็นการอธิบายโครงสร้างของข้อมูลในรูปแบบความสัมพันธ์ของตัวอย่าง ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงความคล้ายหรือความแตกต่างของตัวอย่างสำหรับวิธีการสกัดปัจจัยโดยวิธี Principal component analysis (PCA) เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นวิธีการที่นำรายละเอียดของตัวแปรที่มีจำนวนตัวแปรมาก ๆ มาไว้ในปัจจัยที่มีเพียงไม่กี่ปัจจัยโดยจะพิจารณาจากรายละเอียดทั้งหมด จากแต่ละตัวแปรเมื่อสกัดปัจจัยแล้วจะต้องมีการจัดตัวแปรแต่ละตัวว่าควรอยู่ในปัจจัยใดโดยพิจารณาได้จากค่าน้ำหนักองค์ประกอบ (Factor loading) ซึ่งเป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรกับองค์ประกอบซึ่งในแต่ละตัวแปรถูกจัดกลุ่มตามน้ำหนักองค์ประกอบของตัวแปร การพิจารณาน้ำหนักองค์ประกอบควรมีค่ามากกว่า 0.3 ตัวแปรใดมีน้ำหนักในองค์ประกอบใดมากจะถูกจัดให้ตัวแปรดังกล่าวอยู่ในองค์ประกอบนั้น ๆ ซึ่งมาจากค่าคะแนนปัจจัย (Factor score) ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะมีค่าคะแนนในแต่ละองค์ประกอบซึ่งค่าคะแนนเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงตำแหน่งของตัวอย่างตามแกนองค์ประกอบ โดยตัวอย่างที่มีคะแนนใกล้เคียงกันในแกนองค์ประกอบเดียวกันจะมีความคล้ายคลึงกัน แต่ในทางตรงกันข้ามตัวอย่างที่มีคะแนนต่างกันในแต่ละองค์ประกอบเดียวกันจะมีค่าคะแนนของตัวแปรนั้นแตกต่างกัน เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบจะพบค่าความผันแปรของตัวแปรทั้งหมดในแต่ละองค์ประกอบซึ่งเรียกว่าค่าไอเกน (Eigen value) โดยค่าไอเกนเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสามารถขององค์ประกอบว่าจะใช้อธิบายความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่างได้มากหรือน้อย สามารถพิจารณาได้จาก Scree plot (ภาพที่ 2.8) ซึ่งเป็นกราฟที่นำค่าไอเกนของแต่ละองค์ประกอบมาพล็อตโดยเรียงจากค่ามากไปยังค่าน้อยสำหรับการใช้ในการพิจารณาว่ามีกี่ปัจจัย โดยพิจารณาจากค่าไอเกนที่ลดลงอย่างรวดเร็วเพื่อใช้ประกอบการพิจารณาว่าควรมีกี่องค์ประกอบ อย่างไรก็ตามโดยปกติแล้วถ้าหากองค์ประกอบนั้น ๆ มาใช้ในการพิจารณาจะต้องมีค่าไอเกนมากกว่าหนึ่ง (กัลยา วาณิชยปัญญา, 2551) ในทางปฏิบัติเมื่อใช้ข้อมูลที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์จะพบว่ามียังปัจจัยที่มีค่าไอเกนใกล้ 1 ทำให้ผู้วิเคราะห์ต้อง

ตัดสินใจว่าควรมีกี่ปัจจัยในการวิเคราะห์ เมื่อตัดสินใจเลือกจำนวนปัจจัยที่จะนำมาใช้พิจารณาได้แล้วทำให้เห็นโครงสร้างความสัมพันธ์ของตัวแปรที่นำมาใช้ศึกษาซึ่งเทคนิคนี้จะหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation) ของตัวแปรทีละคู่แล้วรวมตัวแปรที่สัมพันธ์กันมากไว้ในปัจจัยเดียวกัน จึงทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงโครงสร้างที่แสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรต่าง ๆ ที่อยู่ในปัจจัยเดียวกัน รวมถึงสามารถอธิบายความหมายของแต่ละปัจจัยได้ตามความหมายของตัวแปรต่าง ๆ ที่อยู่ในปัจจัยนั้น



ทิมา กัลยา วานิชย์บัญชา (2553)

ภาพที่ 2.8 ตัวอย่าง Scree plot จากการวิเคราะห์องค์ประกอบ PCA

อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวยังขาดข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างแป้งซึ่งพบว่าถูกกำหนดด้วยยีน *Waxy* รวมถึงยีน *SSIIa* และสำหรับการทดสอบคุณสมบัติการย่อยสามารถทำการทดสอบได้ในหลอดทดลอง (*In vitro*) โดยพิจารณาจากปริมาณกลูโคสที่ย่อยออกมาแบบเร็ว ซึ่งจากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ค่าดัชนีน้ำตาลในคนได้ ดังนั้นหากมีการศึกษารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* และความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *SSIIa* ในข้าวไทยอย่างละเอียดแล้วนำมาหาความสัมพันธ์โดยการจัดกลุ่มตัวแปร และจำแนกกลุ่มข้าวด้วยหลักการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ร่วมกับเทคนิค Cluster analysis เพื่อหาความสัมพันธ์ของคุณสมบัติด้านการย่อยของแป้งทำให้พบสายพันธุ์ข้าวที่มีค่า GI ต่ำซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดรวมถึงผู้ป่วยโรคเบาหวานในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่เหมาะสม และเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาดัชนีน้ำตาลในคนต่อไป

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างข้าวกล้อง (*Oryza sativa* L.) จำนวน 39 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท สุขธารณะจำกัด ศูนย์วิจัยข้าว (จังหวัดเชียงราย พิษณุโลก ปทุมธานี พัทลุง ปราจีนบุรี และ นครศรีธรรมราช) ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพะเยา เกษตรกร (จังหวัดเชียงราย และน่าน) (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 รายชื่อพันธุ์ข้าวกล้องจำนวน 39 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ประเภท	ชนิด	กลุ่มแอมิโลส*	แหล่งที่มา
FR13A	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
IR20	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
กข29	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	สูง	ศูนย์วิจัยข้าวนครศรีธรรมราช
กข31	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	สูง	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
กข35	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	สูง	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
กข41	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	สูง	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
กข45	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	ต่ำ	ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี
ขาวก้นจุด	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	เกษตรกร จ.เชียงราย
ขาวตาโง้ว	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	เกษตรกร จ.เชียงราย
ไข่มดรีน3	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	ปานกลาง	ศูนย์วิจัยข้าวนครศรีธรรมราช
เจ้าขาวเชียงใหม่	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	ต่ำ	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
เจ้าไร่ขาว	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	เกษตรกร จ.เชียงราย
เจ้าลีซอ	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	ต่ำ	เกษตรกร จ.เชียงราย
ดอกพะยอม	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	ปานกลาง	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

สายพันธุ์	ประเภท	ชนิด	กลุ่มเอมิโลส*	แหล่งที่มา
บาหนี่	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	เกษตรกร จ.เชียงราย
เบิ้ลเกลือ	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	เกษตรกร จ.เชียงราย
ปราจีนบุรี1	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	สูง	ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี
ปราจีนบุรี2	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	สูง	ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี
พลาขามปราจีนบุรี	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	สูง	ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี
พิษณุโลก2	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	สูง	ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก
มันปู	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	เกษตรกร จ.เชียงราย
เล็บนกเล็ก	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	บ.สุทธาธารณะ จำกัด
เล็บนกใหญ่	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	บ.สุทธาธารณะ จำกัด
เล็บมือนาง	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	สูง	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
สุพรรณบุรี60	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	ปานกลาง	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
หน่วยเชื้อ	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	บ.สุทธาธารณะ จำกัด
อยุธยา1	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	สูง	ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี
ก่ำดอยสะเก็ด	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	ต่ำ	เกษตรกร จ.เชียงราย
ก่ำพะเยา	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	ต่ำ	ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพะเยา
ชีวขาว	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	ไม่มีรายงาน	เกษตรกร จ.เชียงราย
เล็บช้าง	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	ไม่มีรายงาน	เกษตรกร จ.เชียงราย
สันป่าดอง1	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	ต่ำ	เกษตรกร จ.เชียงราย
หวัน1	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	ต่ำ	เกษตรกร อ. ภูเพียง จ.น่าน
หวัน2	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	ต่ำ	เกษตรกร อ. ภูเพียง จ.น่าน
หอมทุ่ง	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	ต่ำ	เกษตรกร อ. ภูเพียง จ.น่าน
หางปลาไหล	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	ต่ำ	เกษตรกร จ.เชียงราย
เหนียวข่อไม้ไผ่	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	ต่ำ	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี
เหนียวชีวแดง	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	ต่ำ	เกษตรกร จ.เชียงราย
เหนียวคำชุมแพ	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	ต่ำ	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี

ที่มา *สุรนันทน์ วงศ์ปิยชน และคณะ (2549)

3.2 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเมล็ดข้าวจากนั้นลงปลูกในดินสำโรงรูปในกระบะพลาสติกที่เตรียมไว้สำหรับเพาะข้าวประมาณ 14 วัน จากนั้นนำไปอ่อนของตัวอย่างข้าวทั้งหมด 39 สายพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอใช้วิธี CTAB (Doyle, 1991) นำตัวอย่างใบข้าวประมาณ 2 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโถงที่มีไนโตรเจนเหลวจากนั้นบดให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง นำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วประมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 1% CTAB buffer (10% CTAB, 700 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 0.5 มิลลิตร (CTAB buffer ควรอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้เนื่องจากมีความหนืด) ผสมให้เข้ากันบ่มหลอดตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งทุก ๆ 10 นาที จากนั้นเติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ นาน 5 นาทีเพื่อกำจัดโปรตีนและโพลีแซกคาไรด์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยกชั้นระหว่างน้ำ และ Chloroform ออกจากกัน ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนสารละลายที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดใหม่จากนั้นเติม Isopropanol (ที่แช่เย็น) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกักตะกอนดีเอ็นเอ เติสารละลายในหลอดทิ้งระวังอย่างให้ตะกอนสีขาว (ดีเอ็นเอ) หลุดออกมาล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% (แช่เย็น) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง (ล้างตะกอนจำนวน 2 ครั้ง) คว่ำหลอดลงบนกระดาษชำระซับให้แห้งหรือปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หรือตามความเหมาะสมกับปริมาณของตะกอน จากนั้นเติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

3.2.2 การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอ

3.2.2.1 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส

ซึ่งผงเจลอะกาโรส 0.8 กรัม ละลายในสารละลาย 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA (pH 8.0)) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% ให้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เทเจลลงในถาดเตรียมเจลให้มีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นจึงเสียบหัวที่บริเวณด้านบนบนของแผ่นเจล ปลอ่ยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ดึงหัวที่เสียบเจลไว้ออกจะได้ช่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ นำเจลออกจากถาดนำไปวางลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟริซิสให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างหันไปทางขั้วลบ เติม 1X TAE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล นำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมไว้มาผสมกับ 6X loading dye buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วน 5: 1 จากนั้นค่อย ๆ หยอดสารละลายผสมลงในแต่ละช่องสำหรับหยอดตัวอย่างด้วยไมโครปิเปต และหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับการทดลองนี้ใช้ 1 kb Plus DNA ladder marker [Invitrogen] เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบขนาด และปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่าง จากนั้นปิดฝาเครื่องเปิดกระแสไฟฟ้าให้วิ่งผ่านจากขั้วลบไปยังขั้วบวกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ปิดเครื่องเมื่อสังเกตได้จากการเคลื่อนสีของ 6X loading dye buffer โดยสีล่างห่างจากขอบล่างของเจลประมาณ 2-3 เซนติเมตร ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที จากนั้นค่อย ๆ นำแผ่นเจลออกจากตัวเครื่อง นำไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (50 mg/ml) ประมาณ 5 นาที นำแผ่นเจลล้างด้วยน้ำประปาประมาณ 10 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้เครื่อง Gel-Documentation เปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอตัวอย่าง และแถบดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งจะทำให้สามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างได้ โดยสังเกตจากปริมาณความเข้มของแสงซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงระหว่างปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน สำหรับวิธีการนี้ยังสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงในกรณีที่ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และสามารถใช่วิธีดังกล่าวบอกคุณภาพดีเอ็นเอได้ว่าการปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอหรือไม่ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

3.2.2.2 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นดี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer

วิธีการนี้ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ และปริมาณของดีเอ็นเอได้ค่อนข้างแม่นยำในกรณีที่สารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ ไม่มีการเจือปนของอาร์เอ็นเอ และโพลิโกนิวคลีโอไทด์ โดยนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่า Optical density (OD) เป็นค่าที่มีหน่วยเป็นไมโครกรัม ซึ่งเป็นค่าการดูดแสงที่มีช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หรือ OD₂₆₀ สามารถหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้ดังนี้ คือ

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Dilution factor}$$

$$\text{OD}_{260} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอช่วง 260 นาโนเมตร}$$

$$50 \mu\text{g/ml} = \text{ค่าความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ OD}_{260} \text{ มีค่าเท่ากับ 1}$$

$$\text{Dilution factor} = \text{อัตราส่วนที่ใช้ในการเจือจาง}$$

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอจะวัดความยาวในช่วง 280 นาโนเมตร (OD₂₈₀) สำหรับนำมาใช้คำนวณอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ซึ่งถ้าตัวอย่างดีเอ็นเอมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงระหว่าง 1.7-1.8 (OD₂₆₀/ OD₂₈₀) แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ แต่ถ้าอัตราส่วนดังกล่าวที่ได้สูงกว่า 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีอาร์เอ็นเอเจือปน และถ้าอัตราส่วนดังกล่าวที่ได้ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดมีโปรตีนหรือ Phenol ปนเปื้อน (Simth & Sniyh, 1992)

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction: PCR)

3.3.1 การศึกษาความแปรปรวนแบบเบสเดียว (Single nucleotide polymorphisms: SNPs)

ศึกษาความแปรปรวนแบบเบสเดียวด้วยวิธีการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการศึกษามาก่อนของยีน *Waxy* ซึ่งอยู่บริเวณตำแหน่ง Intron 1 Exon6 Exon10 และยีน *SSIa* ดังนี้ (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษายีน *Waxy* และยีน *SSIa*

Primer	Sequence (5′→3′)	Tm (°C)	References
<i>Waxy</i> gene			
<i>Waxy</i> (In1)-190F	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	47.8	Ayres et al. (1997)
<i>Waxy</i> (In1)-W2R	TTTCCAGCCCAACACCTTAC	55.3	
<i>Waxy</i> (Ex6)-Wxa1F	CCCATACTTCAAAGGAACATA	48.5	Fitzgerald et al. (2011)
<i>Waxy</i> (Ex6)-Wxa2R	GGTTGGAAGCATCACGAGTT	51.8	
<i>Waxy</i> (Ex6)-Wxa3R	TCTTCAGGTAGCTCGCCAGT	53.8	
<i>WxEx10-WxEx10F</i>	GCATCACCGGCATCGTC	51.9	Tran et al. (2011)
<i>WxEx10-WxEx10R</i>	GCTCCGGCCATGATGAGATG	55.9	
<i>SSIa</i> gene			
NF1	CGAGGCGCAGCACAAACAG	54.9	Jin et al. (2010)
NR1	GGCCGTGCAGATCTTAACCAT	60.0	
F22	CAAGGAGAGCTGGAGGGGGC	54.4	
R21	ACATGCCGCGCACCTGGAAA	55.9	

3.3.1.1 ศึกษาความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1

ตารางที่ 3.3 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ตำแหน่ง Intron1

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
DNA sample (50 ng/ml)	2.00
10X PCR buffer	2.00
MgCl ₂ (50 mM)	1.00
dNTP mix (10 mM)	1.00
Taq polymerase (5 U/μl)	0.50
Primer <i>Waxy</i> (In1)-190F (10 mM/μl)	0.50
Primer <i>Waxy</i> (In1)-W2R (10 mM/μl)	0.50
น้ำกลั่น	12.50
ปริมาตรรวม	20.00

ผสมสารละลายที่เตรียมได้ตามตารางที่ 3.3 ให้เข้ากันจากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาซึ่งได้จากการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มีรายละเอียดในการทำปฏิกิริยาดังนี้ :

Initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำ 1 รอบ	
Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	} ทำซ้ำ 35 รอบ
Annealing อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที	
Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำ 1 รอบ	

ตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์ โดยแบ่ง PCR product มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใช้เจลอะกาโรส เข้มข้น 2.0% จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะพบรอยขาวหรือแถบสีเอ็นเอในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส นำสารละลายดีเอ็นเอที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Ayres et al., 1997)

นำสารละลายดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการศึกษาที่ตำแหน่ง Intron1 ใช้เอนไซม์ *AccI* โดยใส่ดีเอ็นเอ และสารละลายแต่ละชนิดในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีรายละเอียดตามตารางที่ 3.4 จากนั้นบ่มสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอมาตรวจสอบผลทำอิล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 2.0% ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตจะพบรอยขาวหรือแถบดีเอ็นเอในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส

ตารางที่ 3.4 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่ง Intron1

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
PCR product	10.00
<i>AccI/XmiI</i>	0.50
10X Buffer B	1.00
น้ำกลั่น	8.50
ปริมาตรรวม	20.00

จากนั้นวิเคราะห์ผลหากชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 116 และ 137 เบส แสดงว่าข้าวสายพันธุ์นั้นมีความแปรปรวนเป็นเบส G หากชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 253 เบสแสดงว่าข้าวสายพันธุ์นั้นมีความแปรปรวนเป็นเบส T

3.3.1.2 ศึกษาความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon 6

ตารางที่ 3.5 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ตำแหน่ง Exon6

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
DNA sample (50 ng/ml)	2.00
10X PCR buffer	2.00
MgCl ₂ (50 mM)	1.00
dNTP mix (10 mM)	1.00
Taq polymerase (5 U/μl)	0.50
Primer <i>Waxy</i> (Ex6)-Wxa1F (10 mM/μl)	0.50
Primer <i>Waxy</i> (Ex6)-Wxa2R (10 mM/μl)	0.50
Primer <i>Waxy</i> (Ex6)-Wxa3R (10 mM/μl)	0.50
น้ำกลั่น	12.00
ปริมาตรรวม	20.00

ผสมสารละลายที่เตรียมได้ตามตารางที่ 3.5 ให้เข้ากันจากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้ (Fitzgerald et al., 2011)

Initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำ 1 รอบ	
Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	} ทำซ้ำ 35 รอบ
Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที	
Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำ 1 รอบ	

ตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์ โดยแบ่ง PCR product มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใช้เจลอะกาโรส เข้มข้น 2.0% จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะพบรอยขาวหรือแถบสีเอ็นเอในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส วิเคราะห์ผลหากชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 292 และ 202 เบส แสดงว่าข้าวสายพันธุ์นั้นจะมีความแปรปรวนเป็นเบส A หากชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 292 เบส แบบเดียวเพียงแสดงว่าข้าวสายพันธุ์นั้นจะมีความแปรปรวนเป็นเบส C

3.3.1.3 ศึกษาความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon 10

ตารางที่ 3.6 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ตำแหน่ง Exon10

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
DNA sample (50 ng/ml)	2.00
10X PCR buffer	2.00
MgCl ₂ (50 mM)	1.00
dNTP mix (10 mM)	1.00
Taq polymerase (5 U/μl)	0.50
Primer <i>WxEx10-WxEx10F</i> (10 mM/μl)	0.50
Primer <i>WxEx10-WxEx10R</i> (10 mM/μl)	0.50
น้ำกลั่น	12.50
ปริมาตรรวม	20.00

ผสมสารละลายที่เตรียมได้ตามตารางที่ 3.6 ให้เข้ากันจากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้ (Tran et al., 2011)

Initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำ 1 รอบ	
Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} ทำซ้ำ 35 รอบ
Annealing อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที	
Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที	
Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำ 1 รอบ	

ตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์ โดยแบ่ง PCR product มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใช้เจลอะกาโรส เข้มข้น 2.0% จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะพบรอยขาวหรือแถบสีเอ็นเอในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส นำสารละลายดีเอ็นเอที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Tran et al., 2011)

นำสารละลายดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับการศึกษาที่ตำแหน่ง Exon10 ใช้เอนไซม์ *ApaI* โดยใส่ดีเอ็นเอ และสารละลายแต่ละชนิดในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีรายละเอียดตามตารางที่ 3.7 จากนั้นบ่มสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอมาตรวจสอบผลทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส เข้มข้น 2.0% ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตจะพบรอยยาวหรือแถบดีเอ็นเอในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส

ตารางที่ 3.7 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่ง Exon10

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
PCR product	10.00
<i>ApaI</i>	0.50
10X Buffer B	1.00
น้ำกลั่น	8.50
ปริมาตรรวม	20.00

จากนั้นวิเคราะห์ผลหากชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 745 เบส เพียงแบนเดียวแสดงว่าข้าวสายพันธุ์นั้นมีความแปรปรวนเป็นเบส T หากชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 424 และ 321 แสดงว่าข้าวสายพันธุ์นั้นจะมีความแปรปรวนเป็นเบส C

3.3.1.4 ศึกษาความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *SSIIa*

ตารางที่ 3.8 สาร และปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *SSIIa*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
DNA sample (50 ng/ml)	2.00
10X PCR buffer	2.00
MgCl ₂ (50 mM)	1.00
dNTP mix (10 mM)	1.00
Taq polymerase (5 U/μl)	0.50
Primer NF1 (10 mM/μl)	0.50
Primer NR1 (10 mM/μl)	0.50
Primer F22 (10 mM/μl)	0.50
Primer R21 (10 mM/μl)	0.50
น้ำกลั่น	11.50
ปริมาตรรวม	20.00

ผสมสารละลายที่เตรียมได้ตามตารางที่ 3.8 ให้เข้ากันจากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้ (Jin et al., 2010)

Initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำ 1 รอบ	
Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	} ทำซ้ำ 35 รอบ
Annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที	
Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำ 1 รอบ	

ตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์ โดยแบ่ง PCR product มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใช้เจลอะกาโรส เข้มข้น 2.0% จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะพบรอยขาวหรือแถบดีเอ็นเอในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส วิเคราะห์ผลหากพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด

540 เบส แสดงว่าข้าวสายพันธุ์นั้นมีความแปรปรวนเป็นแบบ GC และหากพบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 341 เบส แสดงว่าข้าวสายพันธุ์นั้นมีความแปรปรวนเป็นแบบ TT

3.4 การเตรียมตัวอย่างข้าว

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวดิบ

นำตัวอย่างข้าวกล้องทั้ง 39 สายพันธุ์ มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า (PHILIPS HR2001; 220-240V, 350W) บดตัวอย่างเป็นเวลา 5 นาที สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส ทำตามวิธี Colorimetric ของ Juliano (1985) ตัวอย่างที่เหลือนำมาบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีนปิดสนิทเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเตรียมตัวอย่างข้าวหุง

นำตัวอย่างข้าวกล้องส่วนที่เหลือมาหุง โดยชั่งตัวอย่างข้าว 5.0 มิลลิกรัมใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงกันกลมขนาด 50 มิลลิลิตร สำหรับปริมาณน้ำที่ใช้ และระยะเวลาในการหุงได้จากการศึกษาหาปริมาณน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างข้าวหุงสุกมีรายละเอียดดังนี้คือ

ตัวอย่างที่เป็นข้าวเจ้าล้างตัวอย่างข้าวด้วยน้ำสะอาดหนึ่งครั้ง จากนั้นเทน้ำทิ้งเติมน้ำลงไปใหม่ 15 มิลลิลิตรวางทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ตัวอย่างที่เป็นข้าวเหนียวใส่น้ำสะอาดแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 19 ชั่วโมง จากนั้นเทน้ำทิ้งเติมน้ำลงไปใหม่ 15 มิลลิลิตร ให้อัตราส่วนข้าวต่อน้ำเท่ากับ (1:3 w/v) (ทิมรักบ้านเกิด, 2559) นำตัวอย่างข้าวทั้งหมดให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert ที่อุณหภูมิ 95 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยให้เย็นเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทน้ำที่อยู่ในหลอดทิ้งให้ข้าวพอสะเด็ดน้ำ นำเมล็ดข้าวที่หุงสุกบางส่วนมาตรวจสอบการสุกโดยการนำเมล็ดข้าววางลงบนแผ่นกระจกใส แล้วใช้แผ่นกระจกใสอีกแผ่นมาวางทับเมล็ดข้าว และกดให้แบนเพื่อตรวจดูภายในของเมล็ดข้าว ลักษณะเมล็ดข้าวต้องไม่ปรากฏจุดขาวขุ่นของแป้งดิบบริเวณกลางเมล็ด หากเมล็ดข้าวยังเป็นไตจะมีลักษณะเป็นจุดขุ่นขาวของแป้งดิบปรากฏ ให้ถือว่าเป็นข้าวที่ยังไม่สุกสมบูรณ์ (งามชื่น คงเสรี และคณะ, 2547) จากนั้นบดตัวอย่างข้าวที่เหลือโดยใช้ช้อนบดตัวอย่างนับจำนวนครั้งในการบด 40 ครั้งต่อตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์หาค่าปริมาณกลูโคสที่ปล่อยออกมาแบบเร็ว (Rapidly available glucose: RAG) ปริมาณกลูโคสที่ปล่อยออกมาแบบช้า (Slowly available glucose: SAG) และปริมาณกลูโคสอิสระ (Free glucose: FG) คัดแปลงจากวิธีของ Englyst et al. (1999)

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส

วิเคราะห์ตามวิธีของ Juliano (1985) โดยชั่งตัวอย่างข้าวกล้องที่บดละเอียดหนัก 0.1000 กรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรที่แห้งสนิท เติมน้ำกลั่นความเข้มข้น 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ เพื่อให้แป้งกระจายตัว จากนั้นเติมน้ำกลั่นความเข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert ที่อุณหภูมิ 95 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายน้ำแป้งที่เตรียมได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ในขวดใหม่ที่มีย่าน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นความเข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายไอโอดีน (ซึ่งมีส่วนผสมของโพแทสเซียมไอโอไดด์ และไอโอดีน) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที เตรียม Blank โดยเติมน้ำกลั่นและสารละลายกรดเกลือและไอโอดีน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายไอโอดีน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าความเข้มข้นของสารละลายด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยปรับเครื่องด้วย Blank ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0 (ศูนย์)

3.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมิโลส

ชั่ง Potato amylose บริสุทธิ์ 0.0400 กรัม ใส่ในขวดแก้วปริมาตรขนาดความจุ 100 มิลลิลิตร ที่แห้งสนิทเตรียมเป็นสารละลายแป้งเช่นเดียวกับตัวอย่างจะได้สารละลายมาตรฐาน เตรียมขวดแก้วปริมาตรขนาดความจุ 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวดเติมน้ำกลั่นขวดละ 70 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นกรดเกลือและไอโอดีน ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ในขวดที่ 1 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ในขวดที่ 2 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ในขวดที่ 3 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร ในขวดที่ 4 และปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ในขวดที่ 5 ตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำกลั่นและไอโอดีนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวด ดูดสารละลายมาตรฐานปริมาตร 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดที่ 1-5 ตามลำดับ ซึ่งเทียบเท่าปริมาณแอมิโลสร้อยละ 8 16 24 32 และ 40 ตามลำดับ ใส่ในขวดที่เตรียมไว้ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร และวัดค่า Absorbance ที่ 620 นาโนเมตร หลังปรับเครื่องด้วย Blank ให้ได้ค่า Absorbance เท่ากับ 0 (ศูนย์) จากนั้นเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของแอมิโลสกับค่าการดูดกลืน

แสงคำนวณปริมาณแอมิโลสจากการเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐาน และแสดงค่าเป็นร้อยละของแอมิโลส/แป้งข้าว 100 กรัม

3.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติการย่อยของแป้งในหลอดทดลอง

3.6.1 เอนไซม์ และสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติการย่อยของแป้งในหลอดทดลอง

3.6.1.1 เอนไซม์เปปซิน (Pepsin from porcine stomach mucosa) from Sigma Chemical Co. St. Louis. Mo 63178 USA

3.6.1.2 เอนไซม์แพนครีเอติน (Pancreatin from porcine pancreas) from Sigma Chemical Co. St. Louis. Mo 63178 USA

3.6.1.3 เอนไซม์อะมิโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase: AMG from *Aspergillus niger* 300U/ml) from Sigma Chemical Co. St. Louis. Mo 63178 USA

3.6.1.4 เอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase from Baker yeast) from Sigma Chemical Co. St. Louis. Mo 63178 USA

3.6.1.5 กวักัม (Guar Gum) from Sigma Chemical Co. St. Louis. Mo 63178 USA

3.6.1.6 สารละลาย GOPOD (GOPOD reagent) from Megazyme International Ireland Ltd, Ireland

3.6.1.7 สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (D-glucose: glucose standard 1mg/ml) from Megazyme International Ireland Ltd, Ireland

3.6.2 การหาค่าปริมาณกลูโคสที่ปล่อยออกมาแบบเร็ว (Rapidly available glucose: RAG) และค่าปริมาณกลูโคสที่ปล่อยออกมาแบบช้า (Slowly available glucose: SAG)

ซึ่งตัวอย่างข้าวกล้องหุงสุกที่บดแล้วหนัก 0.25 มิลลิกรัม ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงกันกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเปปซินซึ่งมีส่วนผสมของเอนไซม์เปปซิน ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ 41,250 ยูนิต และกวักัม ที่ละลายในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตรท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 5.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 5 ลูก เติมสารละลายเอนไซม์ผสมซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์แพนครีเอติน (ที่ประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (Protease) ไลเปส (Lipase) และแอลฟา-อะมิเลส

(α -amylase)) ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ 37,500 ยูนิต และเอนไซม์อะมิโลกลูโคซิเดสซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ 28 ยูนิต ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างโดยใช้ไมโครปิเปต คูดสารละลายที่อยู่ในหลอด ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เมื่อบ่มครบเวลา 20 และ 120 นาที ลงในหลอดทดลองชุดใหม่ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเติมเอทานอลเข้มข้น 66% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที คูดส่วนที่เป็นสารละลายใสด้วยไมโครปิเปต ลงในหลอดทดลองชุดใหม่ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยเติมสารละลาย GOPOD ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) และเปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) จากนั้นบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบไมโครเพลท (Microplate spectrophotometer) ซึ่งจะเรียกว่า RAG และ SAG ตามลำดับ ดัดแปลงจากวิธีของ Englyst et al. (1999)

3.6.3 การหาค่าปริมาณกลูโคสอิสระ (Free glucose: FG)

ซึ่งตัวอย่างข้าวกล้องหุงสุกที่บดแล้วหนัก 0.25 มิลลิกรัม ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงกันกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตรบัพเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 5.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นลงโดยนำมาบ่มต่อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์อินเวอร์เทสซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ 25 ยูนิต ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง จากนั้นบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างโดยใช้ไมโครปิเปต คูดสารละลายที่อยู่ในหลอด ลงในหลอดทดลองชุดใหม่ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเติมเอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที คูดส่วนที่เป็นสารละลายใสด้วยไมโครปิเปต ใส่ในหลอดทดลองชุดใหม่ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน คูดส่วนที่เป็นสารละลายใสด้วยไมโครปิเปต ลงในหลอดทดลองชุดใหม่ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส โดยเติมสารละลาย GOPOD ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) และเปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ที่ 510 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบไมโครเพลท คัดแปลงจากวิธีของ Englyst et al. (1999)

3.6.4 การคำนวณหาค่า RAG SAG และ FG

คำนวณหา ค่า RAG ค่า SAG และค่า FG ตามวิธีการของ Narumol Ratanakonpun (2007)

$$\% \text{ glucose} = \frac{A_t \times V_t \times C \times D \times 100}{A_s \times W_t}$$

A_t	=	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้
V_t	=	ปริมาตรรวมของสารละลายทั้งหมดที่มีในหลอดทดลอง (มิลลิลิตร)
C	=	ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
A_s	=	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน
W_t	=	น้ำหนัก (มิลลิกรัม) ของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์
D	=	อัตราส่วนที่ใช้ในการเจือจาง

คำนวณหาปริมาณแป้งที่ย่อยเร็ว (Rapidly digestible starch: RDS) และแป้งที่ย่อยช้า (Slowly digestible starch: SDS) จากสูตรโดยคำนวณร้อยละของไฮโดรไลซ์สตาร์ช โดยการคูณปริมาณกลูโคสด้วยค่าแฟกเตอร์เท่ากับ 0.9 ดังนี้

RAG	=	ค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่คำนวณได้หลังจากการย่อย 20 นาที
SAG	=	ค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่คำนวณได้หลังจากการย่อย 120 นาที
FG	=	ค่าปริมาณกลูโคสอิสระที่คำนวณได้
RDS	=	$(RAG - FG) \times 0.9$
SDS	=	$SAG \times 0.9$

โดยปริมาณ RDS และ SDS รายงานผลเป็น % โดยน้ำหนักของตัวอย่างแห้ง

3.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3.7.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

วิเคราะห์หาความแตกต่างของปริมาณแอมิโลส ค่า RAG ค่า SAG ค่า RDS และค่า SDS ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ IBM SPSS statistics software program เวอร์ชัน 21.0 (Purchase order: 10-58878)

3.7.2 วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีการสร้างกราฟแบบ Box Plot

เปรียบเทียบการกระจายตัวของข้อมูลปริมาณแอมิโลส ค่า RAG ค่า SAG ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ ตามความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *Waxy* ยีน *SSIIa* รวมถึงรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ซึ่งพิจารณาในตำแหน่ง (In1-Ex6) และ (In1-Ex6-Ex10) โดยวิเคราะห์การวัดการกระจายสัมพัทธ์ (Relative Variation) ในการเปรียบเทียบการกระจายของข้อมูลระหว่างกลุ่มโดยหาสัมประสิทธิ์ของส่วนเบี่ยงเบนควอร์ไทล์ (Coefficient of quartile deviation) จากนั้นนำเสนอข้อมูลผลการวิเคราะห์เป็นกราฟโดยวิธี Box and whisker plots โดยใช้โปรแกรมเครื่องมือการสร้างกราฟ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบออนไลน์ Plotly (อ้างอิงจาก <https://plot.ly>)

3.7.3 วิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิค Principal component analysis (PCA)

วิเคราะห์ข้อมูลปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ปัจจัย (Factor analysis) เพื่อลดจำนวนปัจจัยให้เหลือเฉพาะปัจจัยที่ใช้อธิบายซึ่งมีความเป็นอิสระต่อกันด้วยวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบ (Principal component analysis: PCA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ PAST-Paleontological statistics software program เวอร์ชัน 3.06 (Current version: October 2015) (อ้างอิงจาก <http://folk.uio.no/ohammer/past>) (Hammer, Harper & Ryan, 2001)

3.7.4 วิเคราะห์ข้อมูล ด้วยเทคนิค Cluster analysis

วิเคราะห์การจำแนกกลุ่มตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์กลุ่ม (Cluster analysis) เพื่อแบ่งกลุ่มข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ โดยวิเคราะห์กลุ่มแบบขั้นตอนในการตีความความคล้ายคลึงกันระหว่างกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ IBM SPSS statistics software program เวอร์ชัน 21.0 (Purchase order: 10-58878)

3.7.5 วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอมิโลส ค่า RAG ค่า SAG ค่า RDS และค่า SDS โดยหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันด้วยวิธี Pearson correlation ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ IBM SPSS statistics software program เวอร์ชัน 21.0 (Purchase order: 10-58878)



บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 การศึกษายีน *Waxy*

จากผลการศึกษายีน *Waxy* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างปริมาณแอมิโลสในตัวอย่างข้าวไทย จำนวน 39 สายพันธุ์พบว่า

4.4.1 การศึกษาความแปรปรวนแบบเบสเดียว (SNPs) ของยีน *Waxy*

4.4.1.1 SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1

จากตารางที่ 4.1 พบว่าข้าวขง29 ข้าวขง31 ข้าวไข่มดร้อน3 ข้าวปราชญ์บุรี2 ข้าวพลาขงมปราชญ์บุรี ข้าวพิษณุโลก2 ข้าวเล็บนกเล็ก ข้าวอยุธยา1 ข้าวFR13A ข้าวIR20 ข้าวขง35 ข้าวขง41 ข้าวขาวตาโง้ว ข้าวปราชญ์บุรี1 ข้าวเล็บมือนาง ข้าวสุพรรณบุรี60 ข้าวขาวกันจูด ข้าวบาหนี่ ข้าวเล็บนกใหญ่ และข้าวหน่วยเชื้อ มี SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 เป็นเบส Guanine (G) ในขณะที่ข้าวขง45 ข้าวท่าคอยสะแก ข้าวท่าพะเยา ข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ ข้าวเหนียวคำชุมแพ ข้าวดอกพะยอม ข้าวหวัน1 ข้าวหวัน2 ข้าวหอมทุ่ง ข้าวหางปลาไหล ข้าวเจ้าไร่ขาว ข้าวเจ้าลิซอ ข้าวเหนียวชีวแดง ข้าวเจ้าขาวเชียงใหม่ ข้าวเบิ้ลเกลือ ข้าวมันปู ข้าวชีวขาว ข้าวเล็บช้าง และข้าวสันป่าตอง1 มี SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 เป็นเบส Thymine (T)

4.4.1.2 SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon6

พบที่ข้าวขง29 ข้าวขง31 ข้าวไข่มดร้อน3 ข้าวปราชญ์บุรี2 ข้าวพลาขงมปราชญ์บุรี ข้าวพิษณุโลก2 ข้าวเล็บนกเล็ก ข้าวอยุธยา1 ข้าวขง45 ข้าวท่าคอยสะแก ข้าวท่าพะเยา ข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ ข้าวเหนียวคำชุมแพ ข้าวดอกพะยอม ข้าวหวัน1 ข้าวหวัน2 ข้าวหอมทุ่ง และข้าวหางปลาไหล มี SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon6 เป็นเบส Adenine (A) ในขณะที่ข้าวFR13A ข้าวIR20 ข้าวขง35 ข้าวขง41 ข้าวขาวตาโง้ว ข้าวปราชญ์บุรี1 ข้าวเล็บมือนาง ข้าวสุพรรณบุรี60 ข้าวขาวกันจูด ข้าวบาหนี่ ข้าวเล็บนกใหญ่ ข้าวหน่วยเชื้อ ข้าวเจ้าไร่ขาว ข้าวเจ้าลิซอ ข้าวเหนียวชีวแดง ข้าวเจ้าขาวเชียงใหม่ ข้าวเบิ้ลเกลือ ข้าวมันปู ข้าวชีวขาว ข้าวเล็บช้าง และข้าวสันป่าตอง1 มี SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon6 เป็นเบส Cytosine (C) ดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.1.1.3 SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon10

พบว่าข้าวกข29 ข้าวกข31 ข้าวไข่มดรีน3 ข้าวปราชญ์บุรี2 ข้าวพลาขามปราชญ์บุรี ข้าวพิษณุโลก2 ข้าวเล็บนกเล็ก ข้าวอยุธยา1 ข้าวFR13A ข้าวIR20 ข้าวกข35 ข้าวกข41 ข้าวขาวตาโง้ว ข้าวปราชญ์บุรี1 ข้าวเล็บมือนาง ข้าวสุพรรณบุรี60 ข้าวกข45 ข้าวกำคอยสะเก็ด ข้าวกำพะเยา ข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ ข้าวเหนียวคำชุมแพ ข้าวเจ้าไร่ขาว ข้าวเจ้าลิซอ และข้าวเหนียวชีวแดง มี SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon10 เป็นเบส Thymine (T) ในขณะที่ข้าวขาวกันจูด ข้าวบาหนี่ ข้าวเล็บนกใหญ่ ข้าวหน่วยเชื้อ ข้าวดอกพะยอม ข้าวหวัน1 ข้าวหวัน2 ข้าวหอมทุ่ง ข้าวหางปลาไหล ข้าวเจ้าขาวเชียงใหม่ ข้าวเบิ้ลเกลือ ข้าวมันปู ข้าวชีวขาว ข้าวเล็บช้าง และข้าวสันป่าตอง1 มี SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon10 เป็นเบส Cytosine (C) (ตารางที่ 4.1)

4.1.2 การศึกษารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy*

4.1.2.1 การศึกษารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ในตำแหน่ง Intron1 และ Exon6 (In1-Ex6)

จากผลการศึกษายีน *Waxy* ในตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ พบว่ามีรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ทั้งหมด 4 แบบดังนี้ แบบ G-A (8 สายพันธุ์) ได้แก่ ข้าวกข29 ข้าวกข31 ข้าวไข่มดรีน3 ข้าวปราชญ์บุรี2 ข้าวพลาขามปราชญ์บุรี ข้าวพิษณุโลก2 ข้าวเล็บนกเล็ก และข้าวอยุธยา1 แบบ G-C (12 สายพันธุ์) ได้แก่ ข้าวFR13A ข้าวIR20 ข้าวกข35 ข้าวกข41 ข้าวขาวตาโง้ว ข้าวปราชญ์บุรี1 ข้าวเล็บมือนาง ข้าวสุพรรณบุรี60 ข้าวขาวกันจูด ข้าวบาหนี่ ข้าวเล็บนกใหญ่ และข้าวหน่วยเชื้อ แบบ T-A (10 สายพันธุ์) ได้แก่ ข้าวกข45 ข้าวกำคอยสะเก็ด ข้าวกำพะเยา ข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ ข้าวเหนียวคำชุมแพ ข้าวดอกพะยอม ข้าวหวัน1 ข้าวหวัน2 ข้าวหอมทุ่ง และข้าวหางปลาไหล และแบบ T-C (9 สายพันธุ์) ได้แก่ ข้าวเจ้าไร่ขาว ข้าวเจ้าลิซอ ข้าวเหนียวชีวแดง ข้าวเจ้าขาวเชียงใหม่ ข้าวเบิ้ลเกลือ ข้าวมันปู ข้าวชีวขาว ข้าวเล็บช้าง และข้าวสันป่าตอง1

4.1.2.2 การศึกษารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ในตำแหน่ง Intron1 Exon6 และ Exon10 (In1-Ex6-Ex10)

จากผลการศึกษายีน *Waxy* ในตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ พบว่ามีรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ทั้งหมด 7 แบบดังนี้ แบบ G-A-T (8 สายพันธุ์) ได้แก่ ข้าวกข29 ข้าวกข31 ข้าวไข่มดรีน3 ข้าวปราชญ์บุรี2 ข้าวพลาขามปราชญ์บุรี ข้าวพิษณุโลก2 ข้าวเล็บนกเล็ก และข้าวอยุธยา1 แบบ G-C-T (8 สายพันธุ์) ได้แก่ ข้าวFR13A ข้าวIR20 ข้าวกข35 ข้าวกข41 ข้าวขาวตาโง้ว ข้าวปราชญ์บุรี1 ข้าวเล็บมือนาง และข้าวสุพรรณบุรี60 แบบ G-C-C (4 สายพันธุ์) ได้แก่ ข้าวขาวกันจูด ข้าวบาหนี่ ข้าวเล็บนกใหญ่ และข้าวหน่วยเชื้อ แบบ T-A-T (5 สายพันธุ์) ได้แก่ ข้าวกข45 ข้าวกำคอยสะเก็ด ข้าวกำพะเยา ข้าวเหนียวช่อไม้ไผ่ และข้าวเหนียวคำชุมแพ แบบ T-A-C (5 สายพันธุ์)

ได้แก่ ข้าวดอกพะยอม ข้าวหวัน1 ข้าวหวัน2 ข้าวหอมทุ่ง และข้าวหางปลาไหล แบบ T-C-T (3 สายพันธุ์) ได้แก่ ข้าวเจ้าไร่ขาว ข้าวเจ้าลิซอ และข้าวเหนียวผิวแดง และแบบ T-C-C (6 สายพันธุ์) ได้แก่ ข้าวเจ้าขาวเชียงใหม่ ข้าวเบิ้ลเกลื่อ ข้าวมันปู ข้าวชีวกาว ข้าวเล็บช้าง และข้าวสันป่าตอง1 (ตารางที่ 4.1)

4.2 การศึกษายีน *SSIIa*

จากตารางที่ 4.1 ความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *SSIIa* ในตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ พบว่ามีความแปรปรวนแบบเบสเดียวเป็นแบบ Thymine (T) ซ้ำกัน (TT) ได้แก่ ข้าวกข29 ข้าวกข31 ข้าวปราจีนบุรี2 ข้าวเล็บนกเล็ก ข้าวFR13A ข้าวกข35 ข้าวขาวตาโง้ว ข้าวบาหนี่ ข้าวเล็บนกใหญ่ ข้าวกข45 ข้าวท่าคอยสะแก ข้าวท่าพะยา ข้าวเหนียวข่อไม้ไผ่ ข้าวเหนียวคำชุมแพ ข้าวหวัน1 ข้าวหวัน2 ข้าวหอมทุ่ง ข้าวเจ้าไร่ขาว ข้าวเจ้าลิซอ ข้าวเหนียวผิวแดง ข้าวมันปู ข้าวชีวกาว และข้าวสันป่าตอง1 และพบว่าข้าวไข่มดดิน3 ข้าวพลาขามปราจีนบุรี ข้าวพิษณุโลก2 ข้าวอยุธยา1 ข้าวIR20 ข้าวกข41 ข้าวปราจีนบุรี1 ข้าวเล็บมือนาง ข้าวสุพรรณบุรี60 ข้าวขาวกันจูด ข้าวหน่วยเชื้อ ข้าวดอกพะยอม ข้าวหางปลาไหล ข้าวเจ้าขาวเชียงใหม่ ข้าวเบิ้ลเกลื่อ และข้าวเล็บช้างเป็นแบบ Guanine (G) และ Cytosine (C) (GC) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 Exon6 Exon10 และยีน *SSIIa* ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ประเภท	ชนิด	รูปแบบ haplotype ของยีน <i>Waxy</i>			ยีน <i>SSIIa</i>
			Intron1	Exon6	Exon10	
กข29	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	A	T	TT
กข31	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	A	T	TT
ไข่มดดิน3	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	A	T	GC
ปราจีนบุรี2	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	A	T	TT
พลาขามปราจีนบุรี	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	A	T	GC
พิษณุโลก2	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	A	T	GC
เล็บนกเล็ก	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	A	T	TT

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

สายพันธุ์	ประเภท	ชนิด	รูปแบบ haplotype ของยีน <i>Waxy</i>			ยีน <i>SSIa</i>
			Intron1	Exon6	Exon10	
อยุธยา1	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	A	T	GC
FR13A	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	C	T	TT
IR20	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	C	T	GC
กข35	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	C	T	TT
กข41	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	C	T	GC
ขาวตาโง้ว	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	G	C	T	TT
ปราจีนบุรี1	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	C	T	GC
เล็บมือนาง	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	C	T	GC
สุพรรณบุรี60	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	C	T	GC
ขาวก้นจูด	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	G	C	C	GC
บาหนี่	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	G	C	C	TT
เล็บนกใหญ่	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	C	C	TT
หน่วยเชื้อ	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	G	C	C	GC
กข45	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	T	A	T	TT
ก่ำดอยสะเก็ด	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	T	A	T	TT
ก่ำพะเยา	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	T	A	T	TT
เหนียวช่อไม้ไผ่	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	T	A	T	TT
เหนียวคำชุมแพ	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	T	A	T	TT
ดอกพะยอม	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	T	A	C	GC
หวัน1	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	T	A	C	TT
หวัน2	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	T	A	C	TT
หอมทุ่ง	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	T	A	C	TT
หางปลาไหล	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	T	A	C	GC
เจ้าไร่ขาว	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	T	C	T	TT
เจ้าสีซอ	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	T	C	T	TT
เหนียวชีวแดง	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	T	C	T	TT

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

สายพันธุ์	ประเภท	ชนิด	รูปแบบ haplotype ของยีน <i>Waxy</i>			ยีน <i>SSIIa</i>
			Intron1	Exon6	Exon10	
เจ้าขาวเชียงใหม่	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	T	C	C	GC
เบิ้ลเกลือ	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	T	C	C	GC
มันปู	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	T	C	C	TT
จิหวา	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	T	C	C	TT
เล็บช้าง	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	T	C	C	GC
สันป่าตอง1	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	T	C	C	TT

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส

ปริมาณแอมิโลสของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ วิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาให้เกิดสีน้ำเงินกับไอโอดีนพบว่าอยู่ในช่วงระหว่าง 3.70-39.05 กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4.2)

4.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติการย่อยของแป้งในหลอดทดลอง

จากผลการวิเคราะห์พบว่าค่าปริมาณกลูโคสที่ปล่อยออกมาแบบเร็ว (RAG) ในตัวอย่างข้าวไทยแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน คือ มีค่าระหว่าง 10.42-24.55 กรัม/100 กรัมข้าวสุก และค่าปริมาณกลูโคสที่ปล่อยออกมาแบบช้า (SAG) มีค่าระหว่าง 0.32-16.56 กรัม/100 กรัมข้าวสุก สำหรับค่าปริมาณแป้งที่ย่อยเร็ว (RDS) และค่าปริมาณแป้งที่ย่อยช้า (SDS) พบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกับค่า RAG และ SAG โดยปริมาณ RDS ในตัวอย่างข้าวไทยแต่ละสายพันธุ์พบมีความแตกต่างกัน คือ มีค่าระหว่าง 6.88-21.44 กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง และปริมาณ SDS มีค่าระหว่าง 6.88-21.44 กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแอมิโนส ค่า RAG ค่า SAG ค่า RDS และค่า SDS ในข้าวไทยหุงสุกจำนวน 39 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ประเภท	ชนิด	¹แอมิโนส (ร้อยละ)	กรัม/100 กรัมข้าวสุก		กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง	
				RAG20	SAG120	RDS	SDS
กข29	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	39.05	17.89±1.40 ^{f-m}	8.60±1.14 ^{j-l}	15.30±1.26 ^{g-o}	7.74±1.02 ^{j-l}
กข31	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	34.29	15.94±2.27 ^{d-j}	5.76±1.22 ^{c-j}	12.86±2.04 ^{e-h}	5.18±1.10 ^{c-j}
ไข่มดรีน3	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	33.77	15.44±2.41 ^{c-i}	16.56±2.77 ⁿ	13.26±2.17 ^{e-k}	14.90±2.49 ⁿ
ปราจีนบุรี2	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	37.41	22.31±0.48 ^{o-p}	13.76±0.66 ^{m-n}	19.72±0.43 ^{p-q}	12.38±0.59 ^{m-n}
พลาขามปราจีนบุรี	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	37.36	18.36±0.91 ^{g-n}	10.96±0.91 ^{l-m}	15.97±0.82 ^{h-o}	9.86±0.82 ^{l-m}
พิษณุโลก2	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	26.15	13.03±1.55 ^{a-e}	3.61±2.26 ^{a-f}	9.29±1.39 ^{a-c}	3.25±2.04 ^{a-f}
เล็บนกเล็ก	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	32.46	10.42±0.62 ^a	6.99±0.62 ^{f-k}	7.41±0.56 ^a	6.29±0.56 ^{f-k}
อยุธยา1	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	35.08	19.76±0.23 ^{l-o}	10.55±0.44 ^l	13.57±1.07 ^{c-l}	9.50±0.40 ^l
FR13A	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	32.04	12.18±1.95 ^{a-c}	6.26±1.11 ^{d-k}	9.89±1.75 ^{a-d}	5.64±1.00 ^{d-k}
IR20	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	28.91	16.14±0.75 ^{e-k}	6.27±2.88 ^{d-k}	13.64±0.68 ^{e-l}	5.64±2.59 ^{d-k}
กข35	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	33.29	18.80±3.82 ^{h-n}	8.94±3.20 ^{j-l}	16.11±3.44 ^{i-o}	8.05±2.88 ^{j-l}

หมายเหตุ ¹ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์สามครั้ง กรัม/100กรัมน้ำหนักแห้ง

^{abc}เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานวิเคราะห์ โดยวิธี Duncan's multiple range test

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

สายพันธุ์	ประเภท	ชนิด	¹แอมิโลส (ร้อยละ)	กรัม/100 กรัมข้าวสุก		กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง	
				RAG20	SAG 120	RDS	SDS
กข41	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	27.95	19.57±0.99 ^{k-o}	5.28±1.19 ^{c-j}	14.92±0.89 ^{f-n}	4.75±1.07 ^{c-j}
ขาวตาโง้ว	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	30.83	15.10±2.05 ^{c-g}	3.86±2.67 ^{a-g}	13.22±1.84 ^{c-j}	3.47±2.40 ^{a-g}
ปราจีนบุรี1	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	36.22	16.41±0.89 ^{c-l}	15.73±1.69 ⁿ	14.07±0.80 ^{c-m}	14.16±1.52 ⁿ
เล็บมือนาง	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	37.62	15.40±0.22 ^{c-h}	6.91±0.94 ^{f-k}	12.94±0.20 ^{e-i}	6.22±0.85 ^{f-k}
สุพรรณบุรี60	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	29.07	21.75±0.35 ^{n-p}	5.53±1.03 ^{c-j}	17.08±0.32 ^{l-p}	4.98±0.93 ^{c-j}
ขาวกันจุด	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	18.54	11.02±0.28 ^a	0.32±0.02 ^a	7.20±0.25 ^a	0.14±0.16 ^a
บาหนี่	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	18.89	20.57±2.39 ^{m-o}	8.25±2.38 ^{i-l}	16.43±2.15 ^{k-o}	7.43±2.15 ^{i-l}
เล็บนกใหญ่	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	29.74	16.59±1.53 ^{f-l}	4.67±1.08 ^{b-i}	12.56±1.38 ^{d-g}	4.20±0.97 ^{b-i}
หน่วยเชื้อ	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	28.87	16.44±1.25 ^{e-l}	1.51±0.85 ^{a-b}	8.87±1.13 ^{a-b}	1.36±0.77 ^{a-b}
กข45	ข้าวนา	ข้าวเจ้า	23.8	24.55±0.71 ^p	9.58±2.80 ^{k-l}	21.44±0.64 ^q	8.62±2.52 ^{k-l}
กำดอยสะเก็ด	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	5.45	18.77±1.87 ^{h-n}	7.49±2.19 ^{g-l}	14.05±1.68 ^{c-m}	6.74±1.98 ^{g-l}
กำพะเยา	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	5.95	17.26±2.38 ^{f-m}	6.38±0.69 ^{e-k}	14.04±2.14 ^{c-m}	5.74±0.62 ^{e-k}
เหนียวช่อไม้ไผ่	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	5.16	18.79±1.59 ^{h-n}	3.37±1.37 ^{a-f}	15.89±1.43 ^{h-o}	3.03±1.23 ^{a-f}
เหนียวคำชุมแพ	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	6.16	16.37±0.69 ^{c-l}	7.65±1.01 ^{h-l}	14.06±0.62 ^{c-m}	6.89±0.90 ^{h-l}

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

สายพันธุ์	ประเภท	ชนิด	1แอมิโลส (ร้อยละ)	กรัม/100 กรัมข้าวสุก		กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง	
				RAG 20	SAG 120	RDS	SDS
ดอกพะยอม	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	15.11	16.14±1.17 ^{e-k}	2.26±0.69 ^{a-c}	12.13±1.05 ^{c-f}	2.04±0.62 ^{a-c}
หวัน1	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	4.46	20.34±5.37 ^{m-o}	6.03±4.31 ^{d-k}	15.79±4.83 ^{h-o}	5.42±3.88 ^{d-k}
หวัน2	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	5.56	15.13±2.30 ^{c-g}	4.01±2.46 ^{b-h}	11.42±2.07 ^{b-e}	3.61±2.21 ^{b-h}
หอมทุ่ง	ข้าวนา	ข้าวเหนียว	3.94	16.87±2.71 ^{f-l}	6.73±2.08 ^{f-k}	14.37±2.44 ^{e-n}	6.05±1.87 ^{f-k}
หางปลาไหล	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	4.65	14.72±2.77 ^{b-f}	4.12±3.52 ^{b-h}	11.51±2.50 ^{b-e}	3.71±3.17 ^{b-h}
เจ้าไร่ขาว	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	14.47	21.45±1.59 ^{n-p}	3.34±2.49 ^{a-f}	17.23±1.43 ^{n-p}	3.01±2.24 ^{a-f}
เจ้าสีขอ	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	14.45	19.38±3.22 ^{j-o}	4.57±1.43 ^{b-i}	17.32±2.90 ^{n-p}	4.11±1.28 ^{b-i}
เหนียวชีวแดง	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	16.16	18.95±0.59 ^{i-c}	6.67±1.25 ^{f-k}	16.32±0.53 ^{j-o}	6.01±1.12 ^{f-k}
เจ้าขาวเชียงใหม่	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	18.47	19.04±2.59 ^{j-o}	5.95±3.98 ^{c-k}	16.53±2.33 ^{l-o}	5.35±3.58 ^{c-k}
เบ็ดเกลือ	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	11.46	12.61±1.28 ^{a-d}	2.75±2.31 ^{a-e}	9.51±1.15 ^{a-c}	2.48±2.08 ^{a-e}
มันปู	ข้าวไร่	ข้าวเจ้า	17.79	12.26±1.72 ^{a-c}	2.59±0.22 ^{a-d}	9.17±1.55 ^{a-c}	1.16±1.35 ^{a-d}
ชีวขาว	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	9.40	11.67±1.97 ^{a-b}	1.50±0.63 ^{a-b}	8.68±1.77 ^{ab}	1.02±0.82 ^{ab}
เล็บช้าง	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	3.70	12.49±1.36 ^{a-c}	4.59±1.56 ^{b-i}	6.88±1.22 ^a	4.13±1.41 ^{b-i}
สันป่าตอง1	ข้าวไร่	ข้าวเหนียว	8.21	21.38±1.63 ^{n-p}	6.31±2.54 ^{d-k}	18.33±1.46 ^{o-p}	5.68±2.28 ^{d-k}

4.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

4.5.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีการสร้างกราฟแบบ Box Plot และนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

นำข้อมูลปริมาณเอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG มาจัดกลุ่มตามรูปแบบความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *Waxy* ในตำแหน่ง Intron1 Exon6 Exon10 และ ยีน *SSIIa* เพื่อเปรียบเทียบกลุ่มข้อมูลซึ่งมีความแตกต่างดังนี้

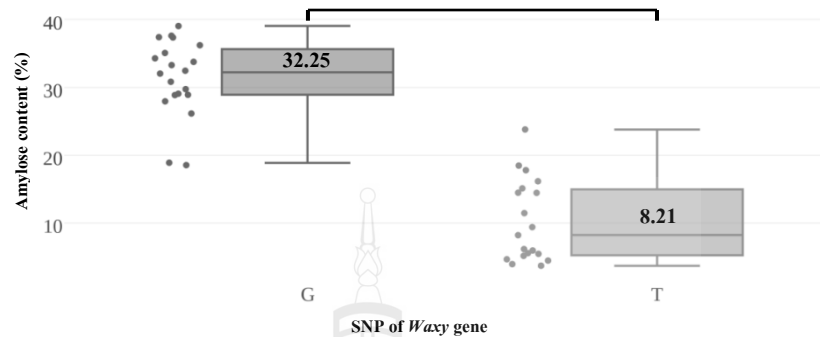
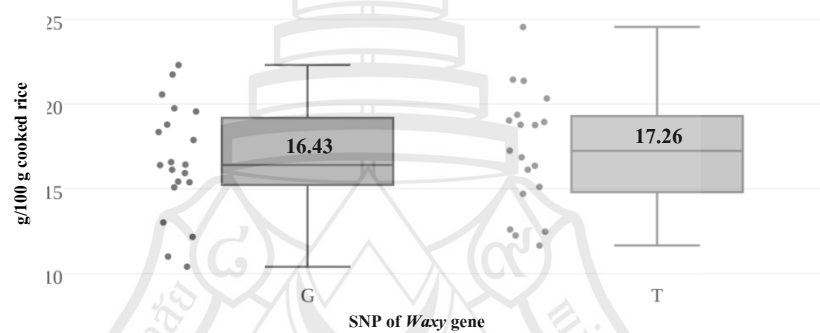
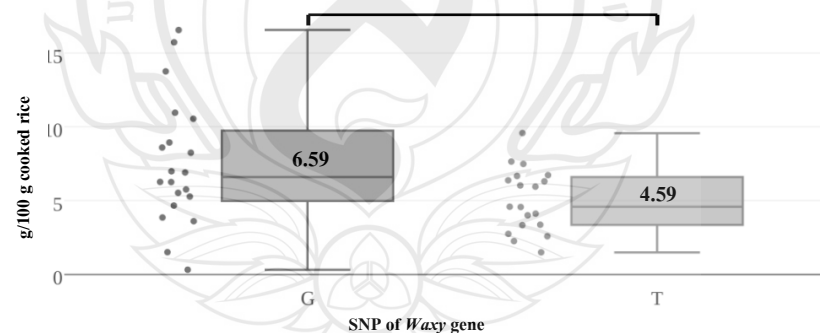
4.5.1.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยว ของยีน *Waxy*

เปรียบเทียบกลุ่มข้อมูลตามความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *Waxy* ในตำแหน่ง Intron1 พบว่าปริมาณเอมิโลส และค่า SAG มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.000; $p < 0.05$ และ 0.030; $p < 0.05$ ตามลำดับ สำหรับค่า RAG ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.1) ในตำแหน่ง Exon6 ปริมาณเอมิโลส ค่า RAG และ ค่า SAG พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.2) และในตำแหน่ง Exon10 พบว่าปริมาณเอมิโลส และค่า SAG มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.000; $p < 0.05$ และ 0.002; $p < 0.05$ ตามลำดับ สำหรับค่า RAG ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.3)

4.5.1.2 การวิเคราะห์รูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy*

พิจารณารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ในตำแหน่ง Intron1 และ Exon6 ตามปริมาณเอมิโลส พบว่าทั้ง 4 รูปแบบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณารูปแบบตามค่า SAG พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้น รูปแบบ G-C กับ T-A และ T-A กับ T-C หากพิจารณารูปแบบตาม ค่า RAG พบว่าทุกรูปแบบมีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.4)

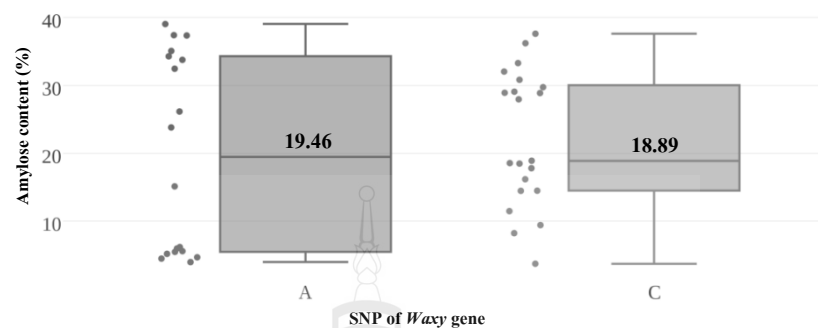
พิจารณารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ในตำแหน่ง Intron1 Exon6 และ Exon10 ตามปริมาณเอมิโลส พบว่าทั้ง 7 รูปแบบ โดยส่วนใหญ่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นรูปแบบ GAT กับ GCT, TAT กับ TCT, TAT กับ TCC และ TCC กับ TCT พิจารณารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ตามค่า RAG พบว่ามีเพียงรูปแบบ GAT กับ TAT, GAT กับ TCT, GCT กับ TAT, GCT กับ TCT, GCC กับ TCT, TAC กับ TAT, TAC กับ TCT, TAT กับ TCC และ TCT กับ TCC มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพิจารณารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ตามค่า SAG พบว่าโดยส่วนใหญ่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นรูปแบบ GCT กับ TAT, GCC กับ TAC, GCC กับ TCT, GCC กับ TCC, TAT กับ TAC, TAT กับ TCT, TAC กับ TCT, TAC กับ TCC และ TCT กับ TCC (ภาพที่ 4.5)

(a) Amylose content depend on SNP of *Waxy* gene at Intron1(b) Rapidly available glucose depend on SNP of *Waxy* gene at Intron1(c) Slowly available glucose depend on SNP of *Waxy* gene at Intron1

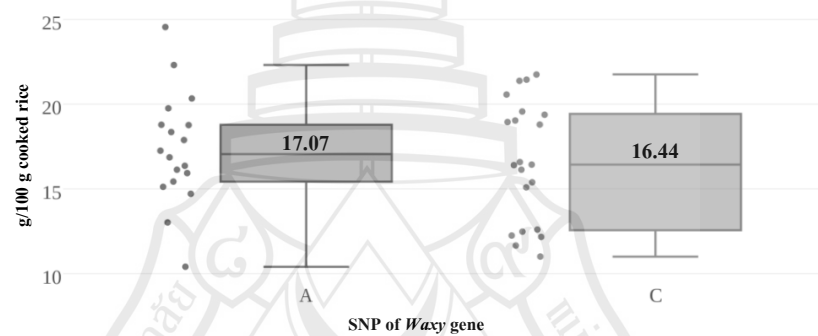
Significantly different between the group at $p < 0.05$

ภาพที่ 4.1 การแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดียวของ ยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 (a) ปริมาณแอมิโลส (b) ค่า RAG (c) ค่า SAG

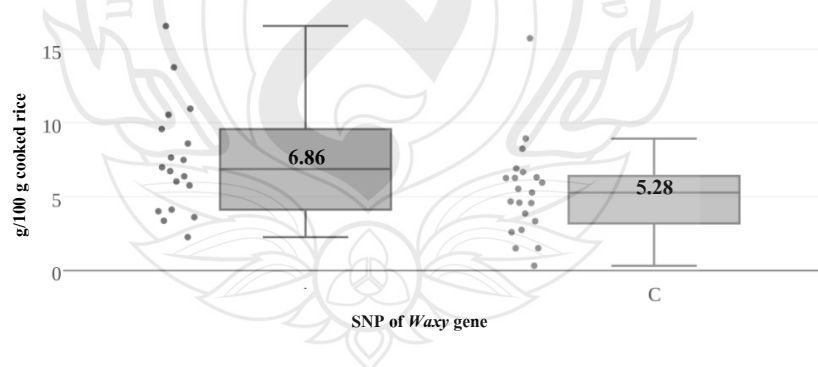
(d) Amylose content depend on SNP of *Waxy* gene at Exon6



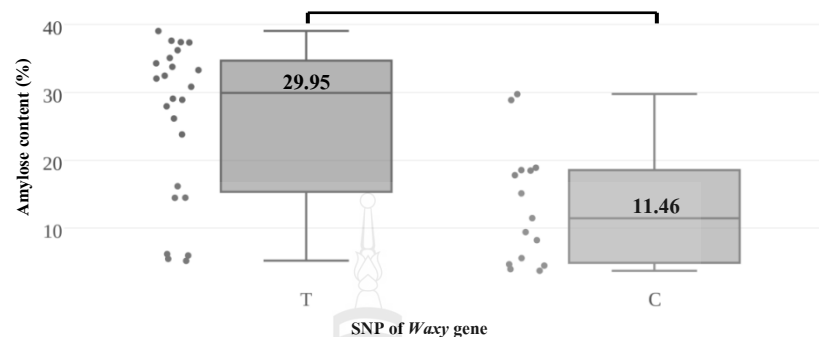
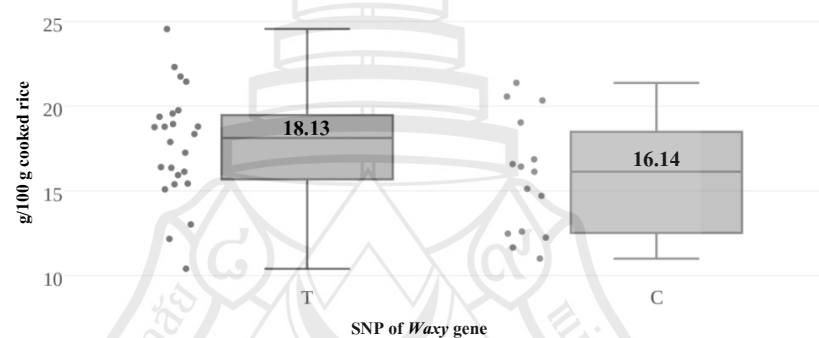
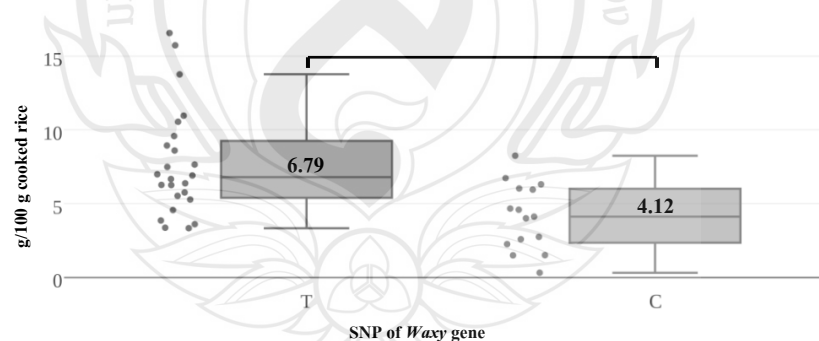
(e) Rapidly available glucose depend on SNP of *Waxy* gene at Exon6



(f) Slowly available glucose depend on SNP of *Waxy* gene at Exon6

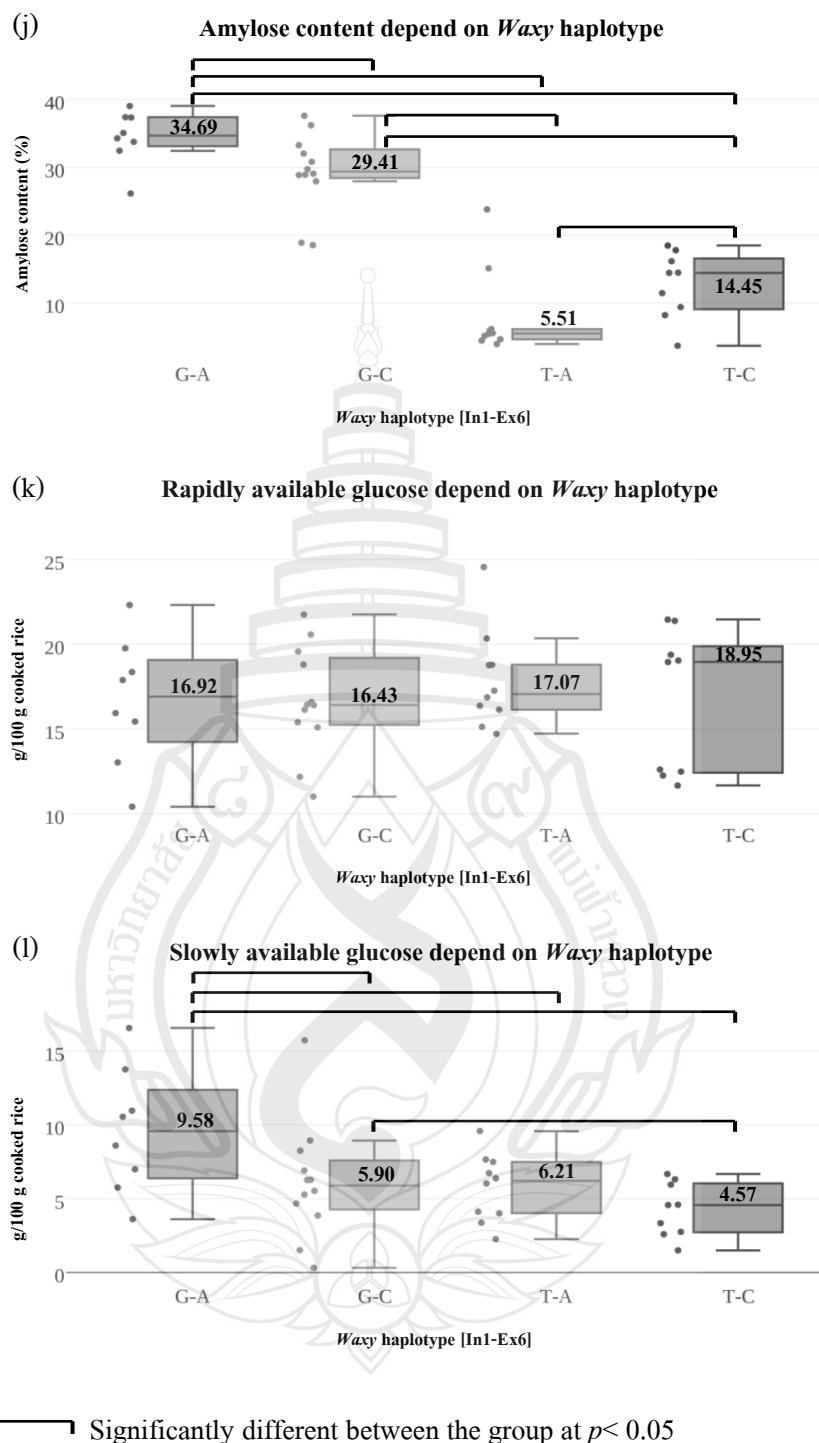


ภาพที่ 4.2 การแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดียวของ ยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon6 (d) ปริมาณเอมิโลส (e) ค่า RAG (f) ค่า SAG

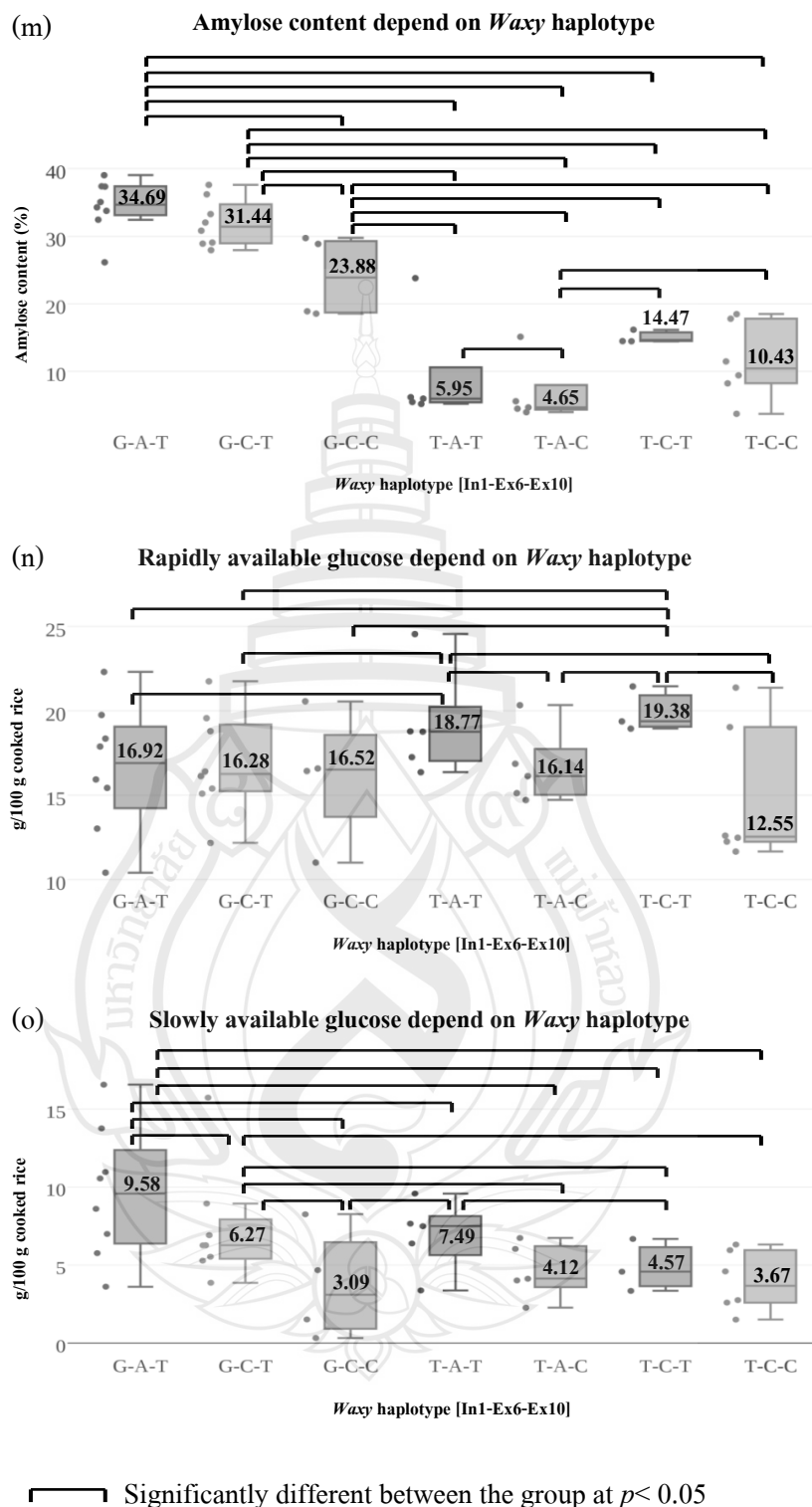
(g) Amylose content depend on SNP of *Waxy* gene at Exon10(h) Rapidly available glucose depend on SNP of *Waxy* gene at Exon10(i) Slowly available glucose depend on SNP of *Waxy* gene at Exon10

Significantly different between the group at $p < 0.05$

ภาพที่ 4.3 การแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของ ยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon10 (g) ปริมาณแอมิโลส (h) ค่า RAG (i) ค่า SAG



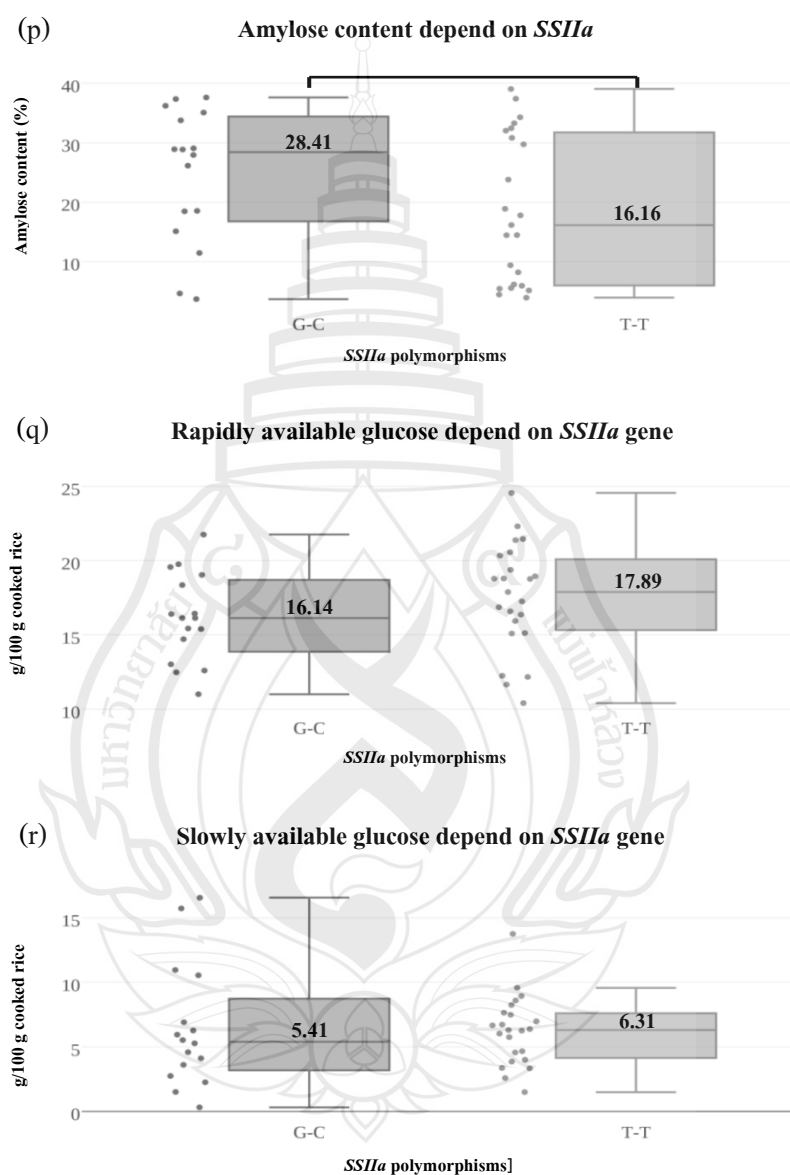
ภาพที่ 4.4 การแบ่งกลุ่มตามรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 และ Exon6 (In1-EX6) (j) ปริมาณแอมิโลส (k) ค่า RAG (l) ค่า SAG



ภาพที่ 4.5 การแบ่งกลุ่มตามรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 Exon6 และ Exon10 (In1-EX6-Ex10) (m) ปริมาณแอมิโลส (n) ค่า RAG (o) ค่า SAG

4.5.1.3 ความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *SSIIa*

เปรียบเทียบกลุ่มข้อมูลตามความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *SSIIa* ซึ่งพิจารณาตามปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.6)



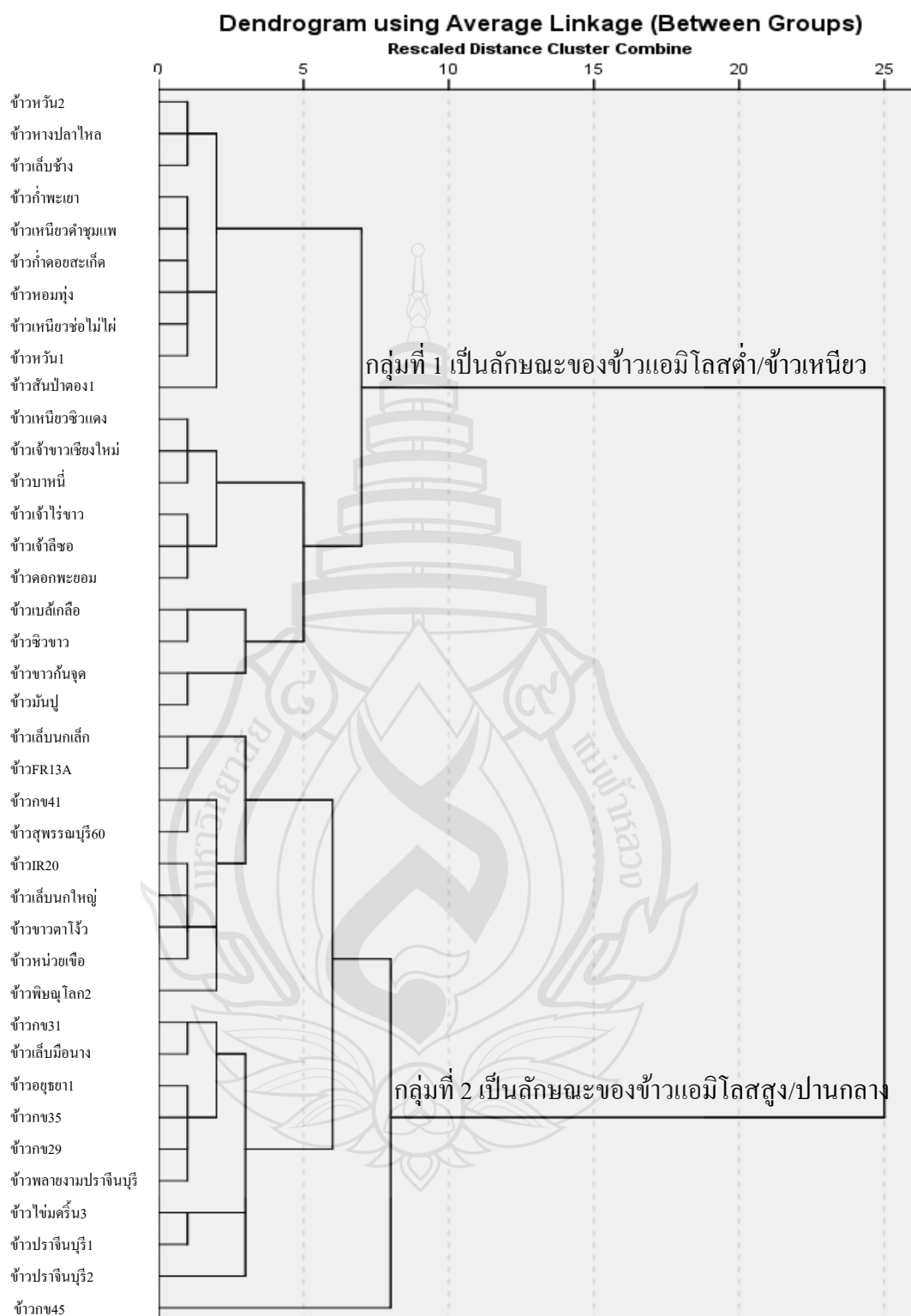
ภาพที่ 4.6 การแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *SSIIa* (p) ปริมาณแอมิโลส (q) ค่า RAG (r) ค่า SAG

4.5.2 การวิเคราะห์ข้อมูล ด้วยเทคนิค Cluster analysis

ข้อมูลปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ นำมาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ได้ 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ข้าวหวัน2 ข้าวหางปลาไหล ข้าวเล็บช้าง ข้าวกำพะเยา ข้าวเหนียวคำชุมแพ ข้าวกำดอยสะเก็ด ข้าวหอมทุ่ง ข้าวเหนียวหอไม้ไฟ ข้าวหวัน1 ข้าวสันป่าตอง1 ข้าวเหนียวชีวแดง ข้าวเจ้าขาวเชียงใหม่ ข้าวบาหนี่ ข้าวเจ้าไร่ขาว ข้าวเจ้าลีซอ ข้าวดอกพะยอม ข้าวเบิ้ลเกลือ ข้าวชีวขาว ข้าวขาวกันจูด และข้าวมันปู พบว่าสายพันธุ์ข้าวไทยส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 เป็นเบส G เป็นลักษณะของข้าวแอมิโลสสูง และปานกลาง กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ข้าวเล็บนกเล็ก ข้าวFR13A ข้าวกข41 ข้าวสุพรรณบุรี60 ข้าวIR20 ข้าวเล็บนกใหญ่ ข้าวขาวตาโง้ว ข้าวหน่วยเชื้อ ข้าวพิษณุโลก2 ข้าวกข31 ข้าวเล็บมือนาง ข้าวอยุธยา1 ข้าวกข35 ข้าวกข29 ข้าวพลาขามปราจีนบุรี ข้าวไข่มดร้อน3 ข้าวปราจีนบุรี1 ข้าวปราจีนบุรี2 และข้าวกข45 พบว่าสายพันธุ์ข้าวไทยส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 เป็นเบส T เป็นลักษณะของข้าวแอมิโลสต่ำ และกลุ่มข้าวเหนียว (ภาพที่ 4.7)

4.5.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิค Principal component analysis (PCA)

เมื่อนำข้อมูลปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบ พบว่าเมื่อพิจารณาการกระจายตัวตามลักษณะความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 สามารถจำแนกข้าวไทยแต่ละสายพันธุ์ที่มีอัลลีลแบบ G และอัลลีลแบบ T ที่ตำแหน่ง Intron1 ของยีน *Waxy* ออกจากกันได้อย่างชัดเจน เมื่อพิจารณาการกระจายตัวตามลักษณะความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *SSIIa* พบว่าการกระจายตัวตามลักษณะความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *SSIIa* ของข้าวไทยแต่ละสายพันธุ์ที่มีอัลลีลแบบ GC และ อัลลีลแบบ TT ยังไม่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างข้าวไทยได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.8) พิจารณาจากภาพที่ 4.8 พบว่าเวกเตอร์ของปริมาณแอมิโลส (AC) ซึ่งมาจากค่าน้ำหนักองค์ประกอบแต่ละตัวแปรที่สัมพันธ์กับองค์ประกอบ คือ ไอเกนเวกเตอร์ (Eigenvector) พบว่ามีความยาวจากจุดกึ่งกลางมากที่สุด และไกลที่สุดแสดงให้เห็นว่าไอเกนเวกเตอร์ของปริมาณแอมิโลสเป็นตัวแปรที่มีผลกระทบมากที่สุดสำหรับใช้จำแนกกลุ่มตัวอย่าง



ภาพที่ 4.7 การจัดกลุ่มของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ โดยใช้ Cluster analysis

(a)

PCA plot showing the first two principal components (Component 1: 87.58% Explained variance, Component 2: 8.74% Explained variance) for 20 Thai rice varieties. The plot is divided into four quadrants by the principal components, with labels RAG, SAG, AC, and IR indicating different groups. The varieties are labeled with their names and corresponding numbers (e.g., กข45, กข35, กข29, กข31, กข41, IR20, AC, FR13A, เสืบนกเล็ก, เสืบนกใหญ่, เสืบนก, เสืบนกเล็ก, เสืบนกใหญ่, เสืบนกเล็ก, เสืบนกใหญ่, เสืบนกเล็ก, เสืบนกใหญ่, เสืบนกเล็ก, เสืบนกใหญ่, เสืบนกเล็ก, เสืบนกใหญ่, เสืบนกเล็ก).

4.5.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอมิโลส ค่า RAG ค่า SAG ค่า RDS และค่า SDS ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

วิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation) ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเชิงบวกระหว่างปริมาณแอมิโลส กับค่า SAG ด้วยค่า $r = 0.474$; $p < 0.01$ และค่า SDS ด้วยค่า $r = 0.442$; $p < 0.01$ อีกทั้งพบว่ามีสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างปริมาณแอมิโลส กับค่า RAG ด้วยค่า $r = 0.043$ และค่า RDS ด้วยค่า $r = 0.118$ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สันพบความสัมพันธ์ในเชิงบวกสูงระหว่างค่า RAG และค่า RDS ด้วยค่า $r = 0.743$; $p < 0.01$ รวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่า SAG และค่า SDS ด้วยค่า $r = 0.943$; $p < 0.01$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างค่า RAG กับค่า SAG และความสัมพันธ์ระหว่างค่า RDS กับค่า SDS พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเชิงบวกด้วยค่า $r = 0.374$; $p < 0.05$ และค่า $r = 0.455$; $p < 0.05$ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.9a)

จากนั้นนำข้อมูลของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์นำมาแยกเฉพาะข้อมูลตัวอย่างที่เป็นข้าวเจ้า และข้าวเหนียวออกจากกันวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน สำหรับตัวอย่างข้าวเจ้าพบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ในกลุ่มตัวอย่างเฉพาะข้าวเจ้ามีแนวโน้มความสัมพันธ์เหมือนกับการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ ยกเว้นความสัมพันธ์ระหว่างค่า RAG กับค่า SAG พบว่าไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.9b) อย่างไรก็ตามค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ในกลุ่มตัวอย่างเฉพาะข้าวเหนียวนั้นมีแนวโน้มความสัมพันธ์เหมือนกับการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์เช่นกัน พบว่ามีความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างปริมาณแอมิโลสกับค่า RAG ค่า SAG ค่า RDS และค่า SDS แต่ความสัมพันธ์ดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างค่า RAG กับค่า SAG พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเชิงบวกด้วยค่า $r = 0.605$; $p < 0.05$ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างค่า RDS กับค่า SDS ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.9)

(a)	AC	RAG	SAG	RDS	SDS
AC	(a)				
RAG	0.043	1			
SAG	0.474 ^{**}	0.374 [*]	1		
RDS	0.118	0.743 ^{**}	0.334 [*]	1	
SDS	0.442 ^{**}	0.283	0.943 ^{**}	0.455 ^{**}	1

(b)	AC	RAG	SAG	RDS	SDS
AC	1				
RAG	0.043	1			
SAG	0.620 ^{**}	0.351	1		
RDS	0.089	0.936 ^{**}	0.471 [*]	1	
SDS	0.626 ^{**}	0.364	0.998 ^{**}	0.481 [*]	1

(c)	AC	RAG	SAG	RDS	SDS
AC	1				
RAG	0.167	1			
SAG	0.042	0.605 [*]	1		
RDS	0.277	0.953 ^{**}	0.564	1	
SDS	0.028	0.613 [*]	0.999 ^{**}	0.568	1

^{**} มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 (2-tailed)

^{*} มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 (2-tailed)

ภาพที่ 4.9 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation) ระหว่างปริมาณแอมิโลส ค่า RAG ค่า SAG ค่า RDS และ ค่า SDS (a) ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ (b) เฉพาะตัวอย่างข้าวเจ้าจำนวน 27 สายพันธุ์ (c) เฉพาะตัวอย่างข้าวเหนียวจำนวน 12 สายพันธุ์

บทที่ 5

การอภิปรายผล และสรุป

5.1 การศึกษา ยีน *Waxy*

การศึกษาความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยว (SNPs) ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ในตำแหน่ง Intron1 และ Exon6 พบว่าลักษณะ SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 ที่มีลำดับเบสเป็น Guanine (G) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสสูงกว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสที่มีลำดับเบสเป็น Thymine (T) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.1a) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในข้าวไทยของ Prathepha and Baimai (2004) และงานวิจัยของ Ayres et al. (1997) ระบุว่า SNPs ที่ตำแหน่งดังกล่าวสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมิโลสในข้าวได้เกือบร้อยละ 80 สำหรับตำแหน่ง Exon6 พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสที่มีลำดับเบสเป็น Adenine (A) และ Cytosine (C) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.2d) อย่างไรก็ตามเป็นที่สังเกตว่าตัวอย่างข้าวไทยที่มีปริมาณแอมิโลสสูงมีรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 และ Exon6 เป็นแบบ (In1G-Ex6A) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen et al. (2008a) และ Larkin and Park (2003) โดยถูกจำแนกให้เป็นข้าวที่อยู่ในกลุ่มแอมิโลสสูงหากเป็นแบบ (In1G-Ex6C) ถูกจำแนกให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสปานกลาง และหากเป็นแบบ (In1T-Ex6A) หรือ (In1T-Ex6C) ถูกจำแนกให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสต่ำ จากงานวิจัยของ Chen et al. (2008a) ระบุว่าข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสปานกลางมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 14.8-21.0 สำหรับงานวิจัยนี้รูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ (In1G-Ex6C) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสร้อยละ 29.41 ซึ่งมีค่ามากกว่าแต่อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลส ดังกล่าวมีค่าน้อยกว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสที่เป็นแบบ (In1G-Ex6A) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.4j) แสดงให้เห็นว่าที่ตำแหน่ง Exon6 ที่มีลำดับเบสเป็น A/C เมื่อนำมาพิจารณาร่วมกับตำแหน่ง Intron1 สามารถอธิบายความแตกต่างของปริมาณแอมิโลส และระบุกลุ่มแอมิโลสได้ ที่ตำแหน่ง Exon10 มีรายงานการศึกษาของ Tran et al. (2011) ระบุว่าที่ตำแหน่ง Exon10 ไม่ได้มีผลต่อปริมาณแอมิโลสโดยตรง แต่มีความสัมพันธ์กับค่าคืนตัวของแป้งสุก หากข้าวสายพันธุ์ใดมีลำดับเบสเป็น Thymine (T) มีผลให้ข้าวสายพันธุ์นั้น ๆ มีปริมาณ

แอมิโลสสูงกว่าที่มีลำดับเบสเป็น Cytosine (C) งานวิจัยนี้พบว่าสายพันธุ์ข้าวที่มีลำดับเบสเป็น T มีค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสสูงกว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสที่มีลำดับเบสเป็น C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.3g) จากนั้นพิจารณาแบบ haplotype ของยีน *Waxy* สามตำแหน่ง คือ กลุ่มข้าวแอมิโลสสูงมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 34.69 และ 31.44 มีรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* เป็นแบบ G-A-T และ G-C-T ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Larkin and Park (2003) โดยศึกษาแบบ ความหลากหลายของอัลลีลที่ระบุโดยจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์แบบ CT พบว่ารูปแบบดังกล่าวมีจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์เป็น CT11 เหมือนกันจึงถูกจำแนกให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสสูง แต่จากการศึกษาของ Chen et al. (2008a) ได้ระบุว่ารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ G-A-T ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสสูงมาก ส่วนรูปแบบ G-C-T ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสสูงโดยใช้ตำแหน่ง Exon10 มาใช้ในการพิจารณาเพิ่ม อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ค่าเฉลี่ยปริมาณแอมิโลสที่เป็นแบบ G-A-T มีปริมาณแอมิโลสใกล้เคียงแบบ G-C-T ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กลุ่มข้าวแอมิโลสปานกลางมีรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* เป็นแบบ G-C-C สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen et al. (2008a) และ Larkin and Park (2003) โดย Chen et al. (2008a) ระบุว่าตัวอย่างข้าวที่นำมาทดสอบที่มีแอมิโลสปานกลางมีค่าเฉลี่ยระหว่างร้อยละ 14.8-21.0 ซึ่งงานวิจัยนี้มีปริมาณแอมิโลสอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 18.54-29.74 อย่างไรก็ตามปริมาณแอมิโลสของตัวอย่างข้าวไทยบางสายพันธุ์ที่เป็นแบบ G-C-C มีปริมาณใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Chen et al. (2008a) แต่ยังพบว่าข้าวไทยบางสายพันธุ์ คือ ข้าวไข่มดรีน3 และข้าวสุพรรณบุรี60 มีปริมาณแอมิโลสเกินช่วงที่กำหนด โดยข้อมูลจากกรมการข้าวได้ระบุให้ข้าวสองสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นข้าวที่อยู่ในกลุ่มแอมิโลสปานกลาง แต่หลังจากการศึกษาพบว่าข้าวไข่มดรีน3 และข้าวสุพรรณบุรี60 มีรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ G-A-T และ G-C-T ตามลำดับซึ่งทั้งสองรูปแบบนี้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสสูง (Chen et al., 2008a; Larkin & Park, 2003) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Chen et al. (2008a) ใช้ตำแหน่ง Exon10 ในการแยกกลุ่มข้าวแอมิโลสสูงมาก (G-A-T) และกลุ่มข้าวแอมิโลสสูง (G-A-C) ออกจากกันโดยระบุว่าตำแหน่ง Exon10 หากมีลำดับเบสเป็น T จะพบเฉพาะกลุ่มข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูงมาก หากมีลำดับเบสเป็น C จะพบในกลุ่มข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูง ปานกลาง และต่ำ สำหรับการศึกษาของ Larkin and Park (2003) ได้ศึกษายีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon6 Exon9 และ Exon10 โดยใช้ตำแหน่งดังกล่าวในการแยกกลุ่มระหว่างกลุ่มข้าวแอมิโลสสูง (G-C-T) และกลุ่มข้าวแอมิโลสปานกลาง (G-C-C) ออกจากกัน ผลการศึกษาพบว่ามีเพียงตำแหน่ง Exon6 และ Exon10 ที่มีผลต่อปริมาณแอมิโลสโดยข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูงจะพบ SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon6 และ Exon10 เป็นแบบ A-T และ A-C สำหรับข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสปานกลางจะพบแบบ C-C แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงที่

ตำแหน่ง Exon10 ถูกนำมาใช้ในการพิจารณาปริมาณข้าวแอมิโลสสูงหรือข้าวแอมิโลสสูงมากออกจากกลุ่มอื่น ๆ รวมถึงแสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง Exon10 สามารถอธิบายองค์ประกอบที่สำคัญของความแตกต่างเกี่ยวกับความคงตัวของแป้งสุกอีกทั้งเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของข้าวปรุงสุกใหม่ และอาจจะมีศักยภาพในการเกิดรีโทรเกรดเดชั่นสูงของข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูง (Tran et al., 2011) กลุ่มข้าวแอมิโลสต่ำมีค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสระหว่างร้อยละ 3.70-23.8 พบว่ามีรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* เป็นแบบ T-A-C สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen et al. (2008a) และ Larkin and Park (2003) ซึ่งที่ตำแหน่ง Intron1 ถ้ามีลำดับเบสเป็นเบส T จะสามารถระบุได้ทันทีว่าเป็นข้าวที่จัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสต่ำอีกทั้งงานวิจัยนี้ยังพบรูปแบบ T-C-C ทั้งในตัวอย่างข้าวเจ้า และข้าวเหนียวซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Larkin and Park (2003) โดยพบว่ารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ T-A-C พบในตัวอย่างข้าวเจ้าแอมิโลสต่ำ และข้าวเหนียวรวมถึงพบรูปแบบ T-C-C ในตัวอย่างข้าวเจ้าแอมิโลสต่ำซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen et al. (2008a) ระบุว่าพบรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* เป็นแบบ T-A-C ในกลุ่มข้าวเจ้าแอมิโลสต่ำ และแบบ T-C-C ในกลุ่มข้าวเหนียวซึ่งงานวิจัยนี้พบว่ากลุ่มข้าวแอมิโลสต่ำ และกลุ่มข้าวเหนียวมีรูปแบบ T-A-C, T-A-T และ T-C-T ซึ่งที่ผ่านมายังไม่มีรายงานพบรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ดังกล่าวแต่เนื่องจากตัวอย่างข้าวที่ Chen et al. (2008a) ศึกษาส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างข้าวที่มาจากทวีปออสเตรเลีย ทวีปยุโรป และทวีปอเมริกาซึ่งไม่ใช่ตัวอย่างข้าวไทยจึงเป็นไปได้ที่จะพบรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่แตกต่างกัน ต่อมาในปี 2010 งานวิจัยของ Chen, Fjellstrom, Christensen and Bergman (2010) ได้ระบุว่าพบรูปแบบ T-A-C และ T-C-C ในกลุ่มตัวอย่างข้าวเหนียวซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าในตัวอย่างข้าวเหนียวมีรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นทั้งแบบ T-A-C และ T-C-C เช่นกัน อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการนำรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ T-A-T, T-A-C, T-C-T และ T-C-C มาใช้ในการจำแนกกลุ่มตัวอย่างข้าว เช่น จำแนกให้เป็นกลุ่มข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำ ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำปานกลางหรือข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำมากเป็นต้น ซึ่งรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ทั้ง 4 แบบเป็นข้าวที่จัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสต่ำโดยมีทั้งข้าวเจ้าแอมิโลสต่ำ และข้าวเหนียว อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Larkin and Park (2003) พบรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ T-A-C และ T-C-C มีจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ที่เหมือนกัน และการศึกษาของ Chen et al. (2008a) พบรูปแบบดังกล่าวทั้งในตัวอย่างข้าวเจ้าแอมิโลสต่ำ และข้าวเหนียวจึงสันนิษฐานได้ว่ารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ทั้ง 4 แบบไม่สามารถใช้ในการแยกข้าวที่อยู่ในกลุ่มแอมิโลสต่ำว่ามีปริมาณแอมิโลสต่ำมากหรือน้อยได้อย่างชัดเจน จากนั้นจัดกลุ่มสายพันธุ์ข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ตามรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* พิจารณาตามปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG นำเสนอเป็นกราฟ

โดยวิธี Box and whisker plots (ภาพที่ 4.1-4.5) เมื่อพิจารณารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* สองตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง Intron1 และ Exon6 พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.4j) พิจารณารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* สามตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง Intron1 Exon6 และ Exon10 พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสที่เป็นแบบ G-A-T มีค่าเฉลี่ยสูงสุดสอดคล้องกับการศึกษาของ Chen et al. (2008a) ที่ระบุว่ารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ G-A-T จะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสสูงมาก และพบว่ารูปแบบ G-C-T, G-C-C, T-A-T และ T-A-T มีค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสที่ลดหลั่นลงมา ตามกลุ่มข้าวแอมิโลสสูงปานกลาง และต่ำตามลำดับ แต่จากภาพที่ 4.5m พบว่ารูปแบบ T-C-T และ T-C-C มีค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสที่มากกว่ารูปแบบ T-A-T และ T-A-C อาจสันนิษฐานได้จากในกลุ่มข้าวไทยที่เป็นแบบ T-C-T และ T-C-C เป็นตัวอย่างข้าวเจ้าแอมิโลสต่ำ และข้าวเหนียวละกันซึ่งส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างข้าวเจ้าแอมิโลสต่ำจึงทำให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสที่สูงกว่าในกลุ่มที่เป็นแบบ T-A-T และ T-A-C ซึ่งพบว่ามีข้าวเจ้าแอมิโลสต่ำเพียงหนึ่งสายพันธุ์จึงส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสที่ต่ำกว่า (ภาพที่ 4.5m) สำหรับค่า RAG พบว่าเมื่อพิจารณา SNPs ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ ในตำแหน่ง Intron1 Exon6 Exon10 รวมถึงรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* แบบสองตำแหน่งพบว่าค่าเฉลี่ยของค่า RAG ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.1b, 4.2e, 4.3h และ 4.4k) และพบว่าค่าเฉลี่ยของค่า RAG ที่เป็นแบบ G-A-T และ G-C-T ไม่สอดคล้องกับข้าวที่มีลักษณะแอมิโลสสูงซึ่งควรจะมีค่า RAG ที่ต่ำ แต่กลับพบว่ารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ T-C-C มีค่าเฉลี่ยที่ต่ำที่สุดซึ่งเป็นกลุ่มข้าวแอมิโลสต่ำ และข้าวเหนียว อย่างไรก็ตามพบว่ารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ G-A-T และ G-C-T ซึ่งถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสสูงพบว่าในกลุ่มดังกล่าวมีบางสายพันธุ์ที่มีค่า RAG ต่ำกว่าเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่า RAG ที่เป็นแบบ T-A-T, T-A-C, T-C-T และ T-C-C แต่หากพิจารณาจากกลุ่มข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่าการกระจายตัวของข้อมูลส่วนใหญ่มีการกระจายตัวของข้อมูลอยู่ในช่วงกว้าง และมีความผันแปรมาก สำหรับค่า SAG เมื่อแบ่งกลุ่มข้อมูลตามรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* พิจารณาในตำแหน่ง Intron1 และ Exon10 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.1c, 4.2f และ 4.3i) จากนั้นพิจารณารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* แบบสองตำแหน่งพบว่าค่าเฉลี่ยของค่า SAG มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นความแตกต่างระหว่างรูปแบบ T-A และ T-C สันนิษฐานได้จากรูปแบบดังกล่าวมี SNPs ที่ตำแหน่ง Intron1 เป็นเบส T แสดงถึงปริมาณแอมิโลสต่ำจึงส่งผลให้ค่าเฉลี่ยของค่า SAG ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4.4l) พิจารณารูปแบบของยีน *Waxy* แบบสามตำแหน่งพบว่ารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ G-A-T และ G-C-T ซึ่งเป็นลักษณะของข้าวแอมิโลสสูงมีค่าเฉลี่ยของค่า SAG สูงที่สุด โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Englyst and

Englyst (2003) ที่ระบุว่าอาหารที่มีปริมาณค่า SAG สูงอาจระบุว่าเป็นอาหาร GI ต่ำน่าจะจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพซึ่งจากรายงานการศึกษาของ Frei et al. (2003) พบว่าข้าว/แป้งที่มีปริมาณแอมิโลสสูงจะมีค่า GI ต่ำ ดังนั้นความสัมพันธ์ของค่า SAG และปริมาณแอมิโลสจึงมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกัน และสอดคล้องกันอย่างไรก็ตามพบว่ารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ G-C-C ซึ่งเป็นลักษณะของข้าวแอมิโลสปานกลางกลับมีค่าเฉลี่ยของค่า SAG ที่น้อยกว่ารูปแบบอื่น และยังพบว่ารูปแบบ T-A-T ซึ่งถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสต่ำมีค่าเฉลี่ยของค่า SAG มากกว่ารูปแบบ G-C-T ซึ่งถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสสูง แต่หากพิจารณาจากกลุ่มข้อมูลจะเห็นว่าการกระจายตัวของข้อมูลอยู่ในช่วงกว้าง และมีความผันแปรมาก (ภาพที่ 4.5o) ความผันแปรของค่า RAG และค่า SAG อาจสันนิษฐานได้จากตัวอย่างเมล็ดข้าวแต่ละสายพันธุ์มาจากหลายพื้นที่ในการปลูก รวมถึงระยะเวลาการเก็บรักษาก่อนที่จะได้รับตัวอย่างมาวิเคราะห์ส่งผลให้องค์ประกอบภายในเมล็ดข้าวมีความแตกต่างกัน ข้อเสนอแนะหากมีการทำการทดลองซ้ำตัวอย่างเมล็ดข้าวที่ได้รับสำหรับนำมาใช้ในการศึกษาควรมีการนำมาปลูกใหม่ในพื้นที่ และระยะเวลาเดียวกันเพื่อควบคุมปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อเมล็ดข้าวรวมถึงองค์ประกอบภายในเมล็ดข้าว

5.2 การศึกษายีน *SSIIa*

การศึกษา SNPs ของยีน *SSIIa* ในตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ พบว่าเป็นแบบ TT 23 สายพันธุ์ และแบบ GC 16 สายพันธุ์ โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Bao et al. (2006) ที่ระบุว่าสายพันธุ์ข้าวที่เป็นแบบ TT จะมีลักษณะข้าวหุงสุกที่นุ่มกว่าข้าวที่เป็นแบบ GC ซึ่งสายพันธุ์ข้าวที่เป็นแบบ TT เป็นลักษณะของข้าวแอมิโลสต่ำ และแบบ GC เป็นลักษณะของข้าวแอมิโลสสูง จากนั้นแบ่งกลุ่มสายพันธุ์ข้าวตามลักษณะ SNPs ของยีน *SSIIa* ทั้งสองแบบพิจารณาตามปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.6p) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณา SNPs ของยีน *SSIIa* พบว่าทั้งแบบ GC และ TT มีลักษณะของข้าวแอมิโลสสูง ปานกลาง ต่ำ และข้าวเหนียวปะปนกันในแต่ละกลุ่ม สำหรับค่า RAG พบว่าสายพันธุ์ข้าวที่เป็นแบบ GC มีค่าเฉลี่ยของค่า RAG น้อยกว่าแบบ TT สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น คือ สายพันธุ์ข้าวที่เป็นแบบ GC เป็นลักษณะของข้าวแอมิโลสสูงดังนั้นควรจะมีค่าการย่อยที่ต่ำกว่าแบบ TT (ภาพที่ 4.6q) สำหรับค่า SAG สายพันธุ์ข้าวที่เป็นแบบ GC มีค่าเฉลี่ยของค่า SAG ที่น้อยกว่าแบบ TT (ภาพที่ 4.6r) เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของค่า RAG และค่า SAG ตาม SNPs ของยีน *SSIIa* ที่เป็นแบบ GC และ TT พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างไรก็ตามไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจนว่าข้าวไทยบางสายพันธุ์ที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำถึงมีความ

แปรปรวนเป็นแบบ GC (ลักษณะข้าวที่มีแอมิโลสสูงหรือปานกลาง) และข้าวไทยบางสายพันธุ์ที่มีปริมาณแอมิโลสสูงถึงมีความแปรปรวนเป็นแบบ TT (ลักษณะข้าวที่มีแอมิโลสดำหรือข้าวเหนียว) (ตารางที่ 4.2) สันนิษฐานได้จากความแตกต่างที่เกิดขึ้นน่าจะมีสาเหตุมาจากในข้าวเหนียวมีอัลลีลที่เกิดการแทนที่กันระหว่างเบส G/T ที่ตำแหน่ง 5' ของสายดีเอ็นเอ และพบว่ามีการเพิ่มลำดับของอินจำนวน 23 bp ที่บริเวณตำแหน่ง Intron1 ส่งผลให้สายดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป (Wanchana et al., 2003) อีกทั้งสายพันธุ์ข้าวประเภทข้าวนาที่ได้รับจากกรรมกรข้าวเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์มีผลทำให้พันธุ์กรรมมีความหลากหลายน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์กรรมของสายพันธุ์ข้าวประเภทข้าวไร่ซึ่งมีความหลากหลายมากกว่าไม่ว่าจะเป็นปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม และพื้นที่การเพาะปลูก เมื่อนำตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์มาจัดกลุ่มโดยแยกตัวอย่างข้าวเจ้า และข้าวเหนียนามาวิเคราะห์ข้อมูลตามรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* และ SNPs ของยีน *SSIIa* พบว่าสามารถเห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG (ภาพที่ ก11-ก13) อย่างไรก็ตามข้อมูลตัวอย่างข้าวไทยบางรูปแบบมีจำนวนสายพันธุ์น้อยอีกทั้งบางรูปแบบพบเพียงสายพันธุ์เดียวจึงไม่สามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบได้ แสดงให้เห็นว่าเมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มข้อมูลดังกล่าวไม่สามารถพิจารณารูปแบบที่พบในข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ได้ ทำให้ได้ข้อมูลไม่สมบูรณ์อาจส่งผลให้มีการพิจารณาผลคลาดเคลื่อน ข้อเสนอแนะหากมีการศึกษาเพิ่มเติมการเพิ่มจำนวนสายพันธุ์ข้าวในการศึกษาให้มากขึ้นเพื่อให้ได้ข้อมูลความสัมพันธ์ของรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* และ SNPs ของยีน *SSIIa* ต่อลักษณะที่แตกต่างกัน

5.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ นำมาเปรียบเทียบกับช่วงค่ามาตรฐานของปริมาณแอมิโลสในข้าวไทยแต่ละกลุ่ม ตามวิธีของ Julianio (1988) สามารถแบ่งได้ 4 กลุ่มดังนี้ กลุ่มข้าวเจ้าที่มีปริมาณแอมิโลสสูงมีค่าระหว่างร้อยละ 26.15-39.05 กลุ่มข้าวเจ้าที่มีปริมาณแอมิโลสปานกลางมีค่าระหว่างร้อยละ 20-25 ซึ่งงานวิจัยนี้มีเพียงสายพันธุ์เดียวที่สอดคล้องกับปริมาณแอมิโลสกลุ่มดังกล่าว คือ มีค่าร้อยละ 23.80 กลุ่มข้าวเจ้าที่มีปริมาณแอมิโลสดำมีค่าระหว่างร้อยละ 11.46-18.89 และกลุ่มข้าวเหนียวมีค่าระหว่างร้อยละ 3.70-16.16 (ตารางที่ 4.2) ปริมาณแอมิโลสในกลุ่มตัวอย่างข้าวเหนียวเมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานพบว่า i) ตัวอย่างข้าวไทยที่มีปริมาณแอมิโลสสูงเกินมาตรฐานอาจเป็นผลจากสายแอมิโลเพคตินมีความยาวของโซ่กิ่งที่ค่อนข้างยาวอาจทำให้เกิดสารเชิงซ้อนกับไอโอดีนเป็นผลให้การวิเคราะห์ปริมาณ

แอมิโลสสูงกว่าความเป็นจริง (Chung, Liu, Lee & Wei, 2011) ii) นอกจากนี้พบว่าข้าวไทยสองสายพันธุ์ คือ ข้าวขาวก้นจุด และข้าวบาหนี่ ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสปานกลางโดยพิจารณาจาก SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง In1-EX6-Ex10 ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาของ Chen et al. (2008a) พบว่ามีปริมาณแอมิโลสอยู่ในเกณฑ์ของกลุ่มแอมิโลสต่ำอาจเกิดจากไขมันที่เกิดสารเชิงซ้อนกับปริมาณแอมิโลสอยู่เดิมเป็นผลทำให้แอมิโลสโมเลกุลนั้น ๆ ไม่สามารถจับกับไอโอดีนส่งผลให้ค่าที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง (Chung et al., 2011) iii) นอกจากนี้การศึกษาของ Chen et al. (2008a) ระบุว่า การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอมิโลสอาจได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมหลายสาเหตุ เช่น สายพันธุ์ของข้าว สภาพแวดล้อมในการเพาะปลูก และฤดูกาล เป็นต้น อีกทั้งได้วิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสหลังจากตกตะกอนแอมิโลเพคตินด้วยวิธีตรวจสอบ Concanavalin-A หรือ ConA วิเคราะห์โดยใช้ชุดทดสอบ Amylose/Amylopectin assay kit (Megazyme, International Ireland Ltd.) เพื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณแอมิโลสที่วิเคราะห์จากวิธีของ Juliano (1985) ว่ามีความสอดคล้องกันหรือไม่ โดยพบว่า การวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสจากชุดทดสอบมีแนวโน้มเป็นไปตามกลุ่มข้าวตามปริมาณแอมิโลส จากนั้นเปรียบเทียบการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีกับปริมาณแอมิโลสที่มีการรายงานจากกรมการข้าว (ตารางที่ ก1) พบว่าปริมาณแอมิโลสที่วิเคราะห์ด้วยวิธีของ Juliano (1985) มีความใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์จากรายงานของกรมการข้าว ทั้งนี้เนื่องจากวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ทางกรมการข้าวใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสในข้าวเช่นกัน โดยหลักการวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวเกิดจากโมเลกุลของสายแอมิโลสมีความสามารถในการทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารละลายไอโอดีนเกิดแรงยึดเกาะกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ และจะเข้าไปอยู่ภายในเกลียวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเกิดเป็นสีน้ำเงิน (Bao & Berhman, 2004) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีการตกตะกอนแอมิโลเพคตินอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของขนาดโมเลกุลระหว่างแอมิโลสและแอมิโลเพคตินซึ่งโมเลกุลของแอมิโลเพคตินจะมีขนาดใหญ่กว่าจึงสามารถตกตะกอนโมเลกุลของแอมิโลเพคตินแยกออกจากโมเลกุลของแอมิโลส จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสที่เหลืออยู่ในสารละลายด้วยวิธีทางเอนไซม์ จากผลการทดลองการวิเคราะห์ตามวิธีของ Juliano (1985) ให้ค่าที่สูงกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี ConA (ตารางที่ ก1) อาจสันนิษฐานได้จากสายแอมิโลเพคตินที่มีความยาวของโซ่กิ่งบางส่วนที่ยาวอาจทำให้เกิดสารเชิงซ้อนกับไอโอดีน (Chung et al., 2011) อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์จากวิธีของ Juliano (1985) เมื่อพิจารณาประกอบกับการจัดจำแนกยีน *Waxy* ออกเป็น haplotype ตามปริมาณแอมิโลสโดยอ้างอิงจากการศึกษาของ Chen et al. (2008a) พบว่ามีความสอดคล้องกันอย่างชัดเจนโดยรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* แต่ละรูปแบบมีค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.1a, 4.3g, 4.4j และ 4.5m)

5.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติการย่อยของแป้งในหลอดทดลอง

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของค่า RAG และค่า SAG ในตัวอย่างข้าวไทย โดยใช้วิธี Duncan's multiple range test พบว่าแต่ละสายพันธุ์มีความหลากหลายมาก อีกทั้งจากการศึกษาที่มีมาก่อนหน้าไม่ได้มีการระบุหลักเกณฑ์อย่างชัดเจนเกี่ยวกับระดับของค่า RAG และค่า SAG ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังจากถูกย่อยจากอาหารประเภทแป้งหรือคาร์โบไฮเดรต ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงใช้ควอร์ไทล์ดิวิเอชัน (Quartile Deviation: Q.D.) ซึ่งอ้างอิงจากงานวิจัยของ ริญ เจริญศิริ และคณะ (2551) ในการแบ่งระดับของข้อมูลค่า RAG และค่า SAG ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ซึ่งเป็นการวัดการกระจายของข้อมูลเพื่ออธิบายว่าข้อมูลแต่ละค่ามีค่าที่ห่างกันมากน้อยเพียงใด โดยแบ่งจำนวนข้อมูลที่มีการกระจายออกเป็น 4 ส่วนซึ่งแต่ละส่วนมีค่าเท่า ๆ กัน จากนั้นแบ่งช่วงระดับข้อมูลได้เป็น 3 ระดับดังนี้ ค่า RAG ระดับต่ำมีค่าน้อยกว่า 15.12 กรัม/100กรัมข้าวสุก ค่า RAG ระดับปานกลางมีค่าอยู่ในช่วง 15.12-19.21 กรัม/100กรัมข้าวสุก และค่า RAG ระดับสูงมีค่ามากกว่า 19.21 กรัม/100กรัมข้าวสุก (รูปที่ ก3) ค่า SAG ระดับต่ำมีค่าน้อยกว่า 3.93 กรัม/100กรัมข้าวสุก ค่า SAG ระดับปานกลางมีค่าอยู่ในช่วง 3.93-7.57 กรัม/100กรัมข้าวสุก และค่า SAG ระดับสูงมีค่ามากกว่า 7.57 กรัม/100กรัมข้าวสุก (ภาพที่ ก4) งานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ ริญ เจริญศิริ และคณะ (2551) ระบุว่าข้าวที่มีค่า RAG อยู่ในช่วงที่ต่ำจะส่งผลทำให้ปริมาณน้ำตาล และค่า GI อยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง โดยข้าวเล็บนกเล็กถูกจำแนกให้อยู่ในกลุ่มข้าวแอมิโลสสูงซึ่งมีค่า RAG ต่ำที่สุด สำหรับค่า SAG มีการศึกษาพบว่าปริมาณน้ำตาลกลุ่มนี้จะช่วยควบคุมปริมาณน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับที่ไม่สูงจนเกินไป โดยพบว่าข้าวที่มีค่า SAG ที่สูงที่สุดคือข้าวไข่มดดิน3 ถูกจำแนกให้อยู่ในกลุ่มข้าวแอมิโลสสูง (ตารางที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอมิโลสมีผลต่อคุณสมบัติการย่อยของแป้ง อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Perez & Thompson, (1991); Miller et al. (1992); ริญ เจริญศิริ และคณะ (2551) ระบุว่าปริมาณแอมิโลสไม่ใช่ปัจจัยเดียวในการวัดอัตราการตอบสนองน้ำตาลในเลือดยังมีปัจจัยอื่นซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่แตกต่างกัน โดยข้าวแต่ละสายพันธุ์ที่มีปริมาณแอมิโลสใกล้เคียงกันอาจมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่แตกต่างกัน จากงานวิจัยของ ริญ เจริญศิริ และคณะ (2551) ระบุว่าข้าวเหนียวจะมีค่า RAG สูงกว่าข้าวเจ้า แต่จากงานวิจัยนี้พบว่าข้าวสายพันธุ์กข45 มีค่า RAG สูงที่สุด คือ 24.55 กรัม/100กรัมข้าวสุก ซึ่งถูกจำแนกให้เป็นข้าวแอมิโลสต่ำ แต่ยังคงพบว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์หวัน1 และสายพันธุ์สันป่าตอง1 มีค่า RAG คือ 20.34 และ 21.38 กรัม/100กรัมข้าวสุก ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังพบว่าข้าวปราชญ์บุรี2 ถูกจำแนกให้เป็นข้าวแอมิโลสสูงกลับมีค่า RAG คือ 22.31 กรัม/100กรัมข้าวสุก (ตารางที่ 4.2) และ

พบว่าข้าวที่ถูกระบุว่ามีปริมาณแอมิโลสสูงบางสายพันธุ์มีค่า RAG ที่ต่ำอีกทั้งข้าวแอมิโลสต่ำ และข้าวเหนียวมีค่า RAG ที่อยู่ในช่วงปานกลาง และต่ำเช่นกัน งานวิจัยของ ริญู เจริญศิริ และคณะ (2551) ยังระบุว่าข้าวกล้องมีแวนโนมีค่า RAG ที่ต่ำกว่าข้าวขาว โดยพบว่าในข้าวกล้องมีแวนโนมีของปริมาณแป้งทนย่อย และปริมาณใยอาหารสูงกว่าข้าวขัดขาวซึ่งปริมาณแป้งทนย่อยเป็นแป้งที่มีคุณสมบัติเทียบเท่ากับเส้นใยอาหาร (Yue & Waring, 1998) ที่ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ จึงส่งผลให้ข้าวกล้องมีค่า RAG ต่ำกว่าข้าวขาวสอดคล้องกับงานวิจัยนี้เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างข้าวกล้อง ส่วนที่เหลือเป็นเนื้อหรือเมล็ดข้าวสารยังมีส่วนที่เป็นจมูกข้าว และเยื่อหุ้มเมล็ด (รำ) อยู่ โดยส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มเมล็ดมีเส้นใยอาหารที่สูงจึงเป็นไปได้ว่าในการทดลองครั้งนี้ตัวอย่างข้าวเหนียวบางสายพันธุ์จึงมีค่า RAG ที่ต่ำกว่าข้าวเจ้า อีกทั้งการศึกษาดังกล่าวยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ito et al. (2005) ได้ศึกษาค่าดัชนีน้ำตาลในข้าวกล้องงอกญี่ปุ่นพบว่ามีค่าดัชนีน้ำตาลน้อยกว่าข้าวกล้องญี่ปุ่นธรรมดา และข้าวญี่ปุ่นขัดขาวตามลำดับ และอาจเป็นผลจากองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ใช่สตาร์ช เช่น โปรตีน ไขมัน ปริมาณกากใยอาหารโดยส่วนประกอบต่าง ๆ เหล่านี้อาจเกิดการรวมตัวกันส่งผลให้เกิดโครงสร้างที่ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ และอาจสันนิษฐานได้จากกระบวนการหุงต้มซึ่งวิธีการหุงสุกของตัวอย่างข้าวในการศึกษาของริญู เจริญศิริ และคณะ (2551) ให้ความร้อนโดยวิธีหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Auto-clave) ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ที่ให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ระบุว่าวิธีการหุงต้มที่แตกต่างกันส่งผลให้มีอัตราการย่อยที่แตกต่างกัน หากเป็นข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสใกล้เคียงกัน ความแตกต่างในการหุงต้มอาจมีผลมาจากความยาวของสายกิ่งของแอมิโลเพคตินรวมถึงความร้อนที่ใช้ในการหุงต้มมีผลต่อโครงสร้างโมเลกุลของเมล็ดแป้ง ซึ่งส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของข้าว อีกทั้งพบว่าระยะเวลาในการหุงต้มขึ้นอยู่กับอุณหภูมิแป้งสุกหากอุณหภูมิแป้งสุกมีค่าต่ำจะใช้เวลาในการหุงต้มเร็วกว่า (Indudhara et al., 1978; Juliano, 1985; Jane et al., 1997; Kumari et al., 2007; Mahadevammm and Tharanathan, 2007; Vidal et al., 2007; Ranawana et al., 2009; ณัฏฐา ดาวมุกดา, 2554 และละมุล วิเศษ, 2555) เมื่อพิจารณาภาพที่ 4.4k และภาพที่ 4.5n พบว่าค่าเฉลี่ยของค่า RAG ที่มีรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่เป็นแบบ G-A-T และ G-C-T เป็นลักษณะของข้าวแอมิโลสสูงควรจะมีค่า RAG ที่ต่ำ แต่กลับมีค่า RAG ก่อนข้างสูงอีกทั้งยังมากกว่ารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ซึ่งถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสต่ำ อย่างไรก็ตามตัวอย่างข้าวไทยที่นำมาทำการวิเคราะห์ได้แก่ ข้าวกข29 ข้าวไข่มดรีน3 ข้าวปราจีนบุรี2 ข้าวพลาขามปราจีนบุรี ข้าวอยุธยา1 และข้าวปราจีนบุรี1 เป็นตัวอย่างที่ทางศูนย์วิจัยข้าวระบุว่าเป็นตัวอย่างที่เก็บไว้ซึ่งผลิตในปี 2557 (ปีที่ได้รับตัวอย่างปี 2558) ซึ่งพบว่าตัวอย่างข้าวดังกล่าวมีค่า RAG สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างข้าวที่ผลิตแล้วนำมาวิเคราะห์ทันที อีกทั้งข้าวสายพันธุ์ดังกล่าวยังถูกระบุให้เป็นข้าว

แอมิโลสสูงสันนิษฐานได้จากระยะเวลา และอุณหภูมิในการเก็บรักษาอาจมีผลต่อค่า RAG และค่า SAG มีการศึกษาของรัชณี คงกาญจนาย และวิญญู เจริญศิริ (2555) ได้ทดสอบความแปรปรวนของค่าดัชนีน้ำตาลโดยใช้ค่า RAG เป็นตัวบ่งชี้ในข้าวมะลิแดงพบว่าปริมาณดัชนีน้ำตาลมีค่าไม่มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง โดยพบว่าข้าวมะลิแดงที่เก็บไว้ซึ่งผลิตในปี 2552 มีค่า RAG สูงกว่าข้าวมะลิแดงที่ผลิตในปี 2553 ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากวิธีการเก็บรักษาข้าวโดยเฉพาะอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บข้าวอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าดัชนีน้ำตาล นอกจากนี้ รัชณี คงกาญจนาย และวิญญู เจริญศิริ (2555) ได้ทำการศึกษพบว่า การเก็บรักษาข้าวเจ้าหอมนิลไว้ในตู้เย็นสามารถรักษาคุณสมบัติของสารอาหารต่าง ๆ ไว้ได้ดีกว่าการเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง โดยเฉพาะค่าดัชนีน้ำตาลพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากวันแรก (day 0) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเป็นข้าวเก่าจะช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับสภาพการเก็บรักษา หากเก็บในที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ข้าวกลายเป็นข้าวเก่าเร็วขึ้นส่งผลให้การวิเคราะห์ค่า RAG และค่า SAG แตกต่างกัน และอาจเกิดจากสาเหตุอื่น อาทิเช่น ลักษณะทางเคมีกายภาพภายในเมล็ดข้าวเป็นต้น ข้อเสนอแนะหากจะมีการทำการทดลองเพิ่มเติมจำเป็นต้องมีการเก็บข้อมูลรายละเอียดทั้งหมดของตัวอย่างข้าว เช่น แหล่งเพาะปลูก ช่วงเวลาเก็บเกี่ยว อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาหรือควรนำตัวอย่างเมล็ดข้าวที่ได้รับมาปลูกใหม่ในพื้นที่ และระยะเวลาเดียวกันเพื่อควบคุมปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อองค์ประกอบภายในของเมล็ดข้าว แต่จากภาพที่ 4.41 และภาพที่ 4.56 พบว่าค่า SAG เมื่อพิจารณาตามรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติชี้ให้เห็นว่าค่า SAG มีความสอดคล้องกับปริมาณแอมิโลสในข้าวไทย อย่างไรก็ตามปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG ยังไม่สามารถใช้ในการบ่งชี้คุณสมบัติการย่อยของแป้งได้อย่างชัดเจนจึงควรมีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของข้าวเพิ่มเติมไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน ปริมาณกากใยอาหาร ปริมาณแป้งทนย่อยเพื่อนำมาประกอบการพิจารณาพร้อมกับข้อมูลการย่อยของแป้งในข้าว

5.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

5.5.1 การวิเคราะห์กลุ่มข้อมูลปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค Cluster analysis

นำข้อมูลปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ วิเคราะห์กลุ่มข้อมูลแบบใช้ข้อมูลทั้งหมด วิเคราะห์เฉพาะตัวอย่างที่เป็นข้าวเจ้า (27 สายพันธุ์) และข้าวเหนียว (12 สายพันธุ์) จากนั้นพิจารณาการวิเคราะห์ดังนี้ i) วิเคราะห์ข้อมูลแบบหนึ่งกลุ่ม คือ

วิเคราะห์แยกเฉพาะปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG ii) วิเคราะห์ข้อมูลแบบสองกลุ่ม คือ วิเคราะห์ข้อมูลแบบเป็นคู่ ได้แก่ ปริมาณแอมิโลสกับค่า RAG ปริมาณแอมิโลสกับค่า SAG และค่า RAG กับค่า SAG iii) วิเคราะห์ข้อมูลแบบสามกลุ่ม คือ นำข้อมูลปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG มาวิเคราะห์รวมกัน พบว่าการวิเคราะห์กลุ่มข้อมูลแบบสามกลุ่มเมื่อพิจารณาจากระยะห่างระหว่างกลุ่มที่ 25 หน่วย สามารถแบ่งกลุ่มข้าวไทยออกเป็น 2 กลุ่มซึ่งมีความแตกต่างอย่างชัดเจน โดยพิจารณาจากสายพันธุ์ข้าวที่มี SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 เป็นเบส G/T โดยพบว่ามีอิทธิพลสำหรับนำมาใช้ในการจำแนกกลุ่มข้อมูล สายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันจะมีความสัมพันธ์กันมากกว่าสายพันธุ์ที่ต่างกลุ่มกัน สายพันธุ์ที่อยู่ต่างกลุ่มกันจะมีความสัมพันธ์กันน้อยหรือไม่มีความสัมพันธ์เลย (ภาพที่ 4.7) กลุ่มที่ 1 พิจารณาจากสายพันธุ์ข้าวที่มีรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* เป็นแบบ T-A-T, T-A-C, T-C-C และ T-C-C ซึ่งรูปแบบของยีน *Waxy* ทั้ง 4 แบบนี้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มข้าวแอมิโลสดำ และกลุ่มข้าวเหนียว แต่ยังพบว่าเมื่ออยู่ 2 สายพันธุ์ที่เป็นแบบ G-C-C ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแอมิโลสปานกลาง คือ ข้าวขาวก้นจุด และข้าวบาหนี่รวมอยู่ในกลุ่มดังกล่าวเมื่อพิจารณาความแตกต่างของข้าว 2 สายพันธุ์ พบว่าข้าวสองสายพันธุ์ดังกล่าวมีปริมาณแอมิโลสอยู่ในเกณฑ์ข้าวแอมิโลสดำ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นสาเหตุให้อยู่ในกลุ่มดังกล่าว กลุ่มที่ 2 พิจารณาจากสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* เป็นแบบ G-A-T, G-C-T และ G-C-G ซึ่งรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ทั้ง 3 แบบนี้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มข้าวแอมิโลสสูง และกลุ่มข้าวแอมิโลสปานกลาง อย่างไรก็ตามพบว่าข้าวข45 เป็นหนึ่งสายพันธุ์ที่เป็นแบบ T-A-T เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณแอมิโลสของข้าวข45 มีปริมาณสูงถึง 23.8กรัม/100 กรัม (ตารางที่ 4.2) หากพิจารณาตามเกณฑ์จะถือว่าอยู่ในช่วงปริมาณแอมิโลสปานกลางจึงน่าจะเป็นสาเหตุให้ข้าวข45 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มดังกล่าว แสดงให้เห็นว่ายีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 สามารถบ่งชี้ปริมาณแอมิโลสได้อย่างชัดเจนมีผลอย่างมากในการจัดกลุ่มข้อมูลของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

5.5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของข้อมูลปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค Principal component analysis (PCA)

การจำแนกกลุ่มข้อมูลของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค Cluster analysis สามารถจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม จากนั้นนำผลที่ได้มาพิจารณาร่วมกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของข้อมูลด้วยเทคนิค PCA พบว่าเมื่อพิจารณาจากกลุ่มสายพันธุ์ที่มี SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 การกระจายตัวของข้อมูลบริเวณทางด้านขวามือของกราฟเป็นสายพันธุ์ข้าวที่มี SNPs ที่ตำแหน่ง Intron1 เป็นเบส G มีเพียงหนึ่งสายพันธุ์ที่เป็นเบส T คือข้าวข45 สำหรับการกระจายตัวอยู่บริเวณทางด้านซ้ายมือของกราฟเป็นสายพันธุ์ข้าวที่มี SNPs ตำแหน่ง Intron1 เป็นเบส T และ

พบว่ามิข้าว 2 สายพันธุ์ที่เป็นเบส G รวมอยู่ด้วย คือ ข้าวบาหนี่ และข้าวขาวกันจูด (ภาพที่ 4.8a) เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบหลักพบว่าครอบคลุมความแปรปรวนทั้งหมด 100% โดยองค์ประกอบหลักที่ 1 (PC1) สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 87.58 ซึ่งองค์ประกอบหลักนี้ คือ ลักษณะของปริมาณแอมิโลส องค์ประกอบหลักที่ 2 (PC2) และองค์ประกอบหลักที่ 3 (PC3) อธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 8.74 และ 3.69 คือ ลักษณะของค่า RAG และค่า SAG ตามลำดับ (ตารางที่ ก2) การวิเคราะห์แกนองค์ประกอบโดยเลือกพิจารณาเฉพาะองค์ประกอบหลักที่ 1 และ 2 สามารถอธิบายความแปรปรวนรวมได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 96.32 ซึ่งหากเลือกพิจารณาองค์ประกอบหลักที่ 1 กับ 3 และองค์ประกอบหลักที่ 2 กับ 3 พบว่าสามารถอธิบายความแปรปรวนรวมได้น้อยกว่า รวมถึงถึงลักษณะการกระจายตัวของข้อมูลกระจายไม่เป็นระเบียบ อีกทั้งการพิจารณาจากลักษณะ SNPs ของยีน *SSIIa* ที่เป็นเป็นแบบ GC และ TT พบว่าข้อมูลทั้งสองแบบดังกล่าวมีการกระจายตัวทั้งทางด้านซ้าย และด้านขวาของกราฟ (ภาพที่ 4.8b) ซึ่งไม่สามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่มของข้อมูลได้อย่างชัดเจน การพิจารณาข้อมูลเฉพาะข้าวเจ้า (27 สายพันธุ์) สามารถแบ่งกลุ่มข้าวไทยได้ 2 กลุ่มซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับการวิเคราะห์แบบใช้ข้อมูลทั้งหมด (ภาพที่ ก22) สำหรับข้อมูลเฉพาะข้าวเหนียว (12 สายพันธุ์) พบว่าไม่สามารถพิจารณากลุ่มของข้อมูลได้เนื่องจากกลุ่มข้าวเหนียวมีลักษณะ SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 เป็นเบส T เหมือนกันทุกสายพันธุ์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Wanchana et al. (2003) พบว่าในตัวอย่างข้าวเหนียวที่ตำแหน่ง 5' เกิดการแทนที่กันระหว่างเบส G/T ทำให้สายดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป โดยมีอินจำนวน 23 bp เพิ่มขึ้น และไปแทรกที่บริเวณตำแหน่ง Intron 1 ส่งผลให้การสังเคราะห์ปริมาณแอมิโลสในข้าวมีการเปลี่ยนแปลงไป เมื่อพิจารณาตามปริมาณแอมิโลสทำให้ลักษณะการกระจายตัวของข้อมูลไม่สามารถแบ่งกลุ่มข้อมูลได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ ก24) อย่างไรก็ตามความสอดคล้องของการจัดกลุ่มด้วยวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบหลักขึ้นอยู่กับความแปรปรวนรวมของลักษณะที่ถูกสกัดไว้ในองค์ประกอบหลัก ดังนั้นความแปรปรวนอาจมีความแตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับความแปรปรวนของลักษณะต่าง ๆ ของสายพันธุ์ข้าว และลักษณะในองค์ประกอบหลักอาจเปลี่ยนแปลงได้หากลักษณะหรือตัวแปรที่เรานำมาศึกษามีความแตกต่างกัน การจัดกลุ่มด้วยวิธีการวิเคราะห์กลุ่มทำให้เห็นโครงสร้างของกลุ่มได้อย่างชัดเจนเป็นการพิจารณาลักษณะต่าง ๆ ในภาพรวมจึงไม่สามารถทราบตัวแปรที่ต่างกันของข้าวแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่ม ในขณะที่การจัดกลุ่มด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักสามารถจำแนกกลุ่มของตัวอย่างสายพันธุ์ข้าวได้เช่นกัน โดยพิจารณารูปแบบการกระจายตัวของข้อมูลบนกราฟจากแกนองค์ประกอบหลักซึ่งทำให้เห็นความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวได้จากองค์ประกอบหลักที่ 1 ซึ่งเป็นตัวแทนของปริมาณแอมิโลส หลักการของการวิเคราะห์องค์ประกอบ

หลักทำให้สามารถอธิบายลักษณะกลุ่มสายพันธุ์ได้ง่ายขึ้นเป็นประโยชน์ในการพิจารณาตัดสินใจเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะตรงกับความต้องการในเบื้องต้น

5.5.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอมิโลส ค่า RAG ค่า SAG ค่า RDS และค่า SDS ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

ผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สันพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอมิโลสกับค่า RAG และความสัมพันธ์ระหว่างค่า RAG และค่า SAG ไม่สอดคล้องในแนวทางเดียวกับงานวิจัยของ ริญ เจริญศิริ และคณะ (2551) สันนิษฐานได้จากจำนวนตัวอย่าง สายพันธุ์ข้าวระดับการจัดสี กระบวนการหุงต้ม และความเข้มข้นของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้พบว่าค่า SAG มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณแอมิโลสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Englyst and Englyst (2003) ที่ระบุว่าปริมาณน้ำตาลกลุ่มนี้จะช่วยควบคุมปริมาณน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับที่ไม่สูงจนเกินไป และอาหารที่มีปริมาณของค่า SAG ที่สูงอาจเป็นอาหาร GI ต่ำ ดังนั้นน่าจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพอีกทั้งยังสอดคล้องกับงานวิจัยที่ระบุว่าหากบริโภคอาหารที่มีสัดส่วนของ SDS ในปริมาณมากส่งผลให้มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ลดโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคต่าง ๆ เช่น โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคหัวใจหลอดเลือด รวมถึงลดคอเลสเตอรอลได้ (Jenkins et al., 2002; Zhang et al., 2008; Ells, Seal, Kettlitz, Bal & Mathers , 2005) ซึ่งการตอบสนองดังกล่าวสามารถนำไปสู่การป้องกัน และการรักษาของโรคเรื้อรังต่าง ๆ ความสัมพันธ์ระหว่างค่า SAG และค่า SDS ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีความสัมพันธ์กันสูงในเชิงบวกแสดงในภาพที่ 4.9 จากนั้นพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของกลุ่มตัวอย่างเฉพาะข้าวเจ้า และข้าวเหนียวพบว่าความสัมพันธ์มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอมิโลสสะท้อน ค่า SAG ซึ่งค่า SAG สัมพันธ์กับค่า SDS มีหลายการศึกษาพบว่าการศึกษาอัตราการย่อยของแป้งในหลอดทดลองตามวิธีของ Englyst et al. (1999) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมีความสัมพันธ์ต่อการบริโภคของปริมาณ RDS และ SDS ในอาสาสมัครสุขภาพดี และผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่าแป้งที่มีการย่อยแบบเร็ว และแบบช้านั้นแสดงให้เห็นรูปแบบระบบการเผาผลาญอาหารที่แตกต่างกัน (Ells et al., 2005; Seal et al., 2003) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่า GI สำหรับใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบอาหารในการตอบสนองระดับน้ำตาล (Englyst & Englyst, 2003) จึงเป็นสาเหตุที่จะเชื่อว่า SDS นั้นถูกย่อยอย่างช้า ๆ ดังนั้นปริมาณน้ำตาลที่ได้หลังจากการย่อยจะค่อย ๆ เข้าสู่กระแสเลือดส่งผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดให้มีระดับปานกลางอีกทั้งยังพบว่าการศึกษาเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมถูกนำมาใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ โดยมีการศึกษาขึ้นที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างแป้งในการควบคุมปัจจัยทางพันธุกรรมที่มี

ผลต่อชนิด และโครงสร้างของแป้งรวมถึงปริมาณแอมิโลส (Kong et al., 2015) มีการศึกษาพบว่า ปริมาณ และความยาวของสายแอมิโลแพคตินมีผลต่อปริมาณ SDS ในการนำมาปรับปรุงสายพันธุ์ หรือการเพิ่มปริมาณ SDS (Guraya, James & Champagne et al., 2001b) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย ของ Benmoussa, Moldenhauer and Hammaker. (2007) ที่ระบุว่า การเกิดขึ้นของปริมาณ SDS มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับลักษณะของสายโซ่ของแอมิโลแพคตินสายยาว และสายปานกลาง และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับสายโซ่ของแอมิโลแพคตินสายสั้น ดังนั้นการศึกษาเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมจึงมีศักยภาพในการผลิตแป้งที่มีปริมาณ SDS สูง แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอมิโลส ค่า SAG หรือปริมาณ SDS มีความสัมพันธ์ที่เป็นประโยชน์ส่งผลให้หลายการศึกษาพยายามที่จะศึกษาโครงสร้างหรือการผลิตเพื่อให้ได้มาซึ่งการผลิตตัวอย่างแป้งที่มีปริมาณ SDS มากสำหรับนำไปผลิตเป็นอาหารในการพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพหรือสายพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมกับความต้องการ

5.6 สรุป

5.6.1 การศึกษารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* พบรูปแบบ haplotype ที่เป็นแบบ G-A-T จัดเป็นข้าวกลุ่มแอมิโลสสูงมาก แบบ G-C-T จัดเป็นข้าวกลุ่มแอมิโลสสูง แบบ G-C-C จัดเป็นข้าวกลุ่มแอมิโลสปานกลาง และข้าวกลุ่มแอมิโลสต่ำรวมถึงข้าวเหนียวพบรูปแบบ haplotype จำนวน 4 แบบ ได้แก่ แบบ T-A-T, T-A-C, T-C-T และแบบ T-C-C

5.6.2 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค Cluster analysis และวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิค PCA พบว่า SNPs ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 สามารถบ่งชี้ปริมาณแอมิโลสได้อย่างชัดเจนโดยพบว่ามีผลอย่างมากสำหรับนำมาใช้ในการจำแนกกลุ่มข้อมูลของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

5.6.3 การศึกษารูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ปริมาณแอมิโลส ค่า RAG และค่า SAG สามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้คุณสมบัติการย่อยของแป้งในข้าวไทยได้ แต่ยังไม่สามารถใช้ในการบ่งชี้คุณสมบัติการย่อยของแป้งได้อย่างชัดเจน ควรพิจารณาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลเกี่ยวข้องกับการย่อยของแป้งในข้าว เช่น โปรตีน ไขมัน ปริมาณแป้งทนย่อย รวมถึงกาบใยอาหารประกอบการพิจารณา

5.6.4 ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างปริมาณแอมิโลส และค่า SAG แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอมิโลสสะท้อนค่า SAG ซึ่งสอดคล้องกับหลายการศึกษาที่ระบุความสัมพันธ์เกี่ยวกับอาหารที่มีปริมาณ SAG หรือ SDS มากส่งผลต่อค่า GI ต่ำ โดยถูกกำหนดให้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพ



รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิง

- กนกวรรณ จารุกัจฉ และวรัญญา จตุพรประเสริฐ. (2550). SNP: Basic Knowledge to Applications. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 2(2), 166-174.
- กัลยา วานิชย์บัญชา. (2551). การวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- กัลยา วานิชย์บัญชา. (2552). สถิติสำหรับงานวิจัย (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- กัลยา วานิชย์บัญชา. (2553). การวิเคราะห์สถิติขั้นสูงด้วย SPSS for Windows (พิมพ์ครั้งที่ 8). กรุงเทพฯ: ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2546). เทคโนโลยีของแป้ง (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- งามชื่น คงเสรี. (2531). คุณภาพการหุงต้มและรับประทานและปัจจัยที่เกี่ยวข้อง. ใน *การปรับปรุงคุณภาพข้าวสำหรับผู้ดำเนินธุรกิจโรงสี*. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร.
- งามชื่น คงเสรี จารุวรรณ บางแวก กัญญา เชื้อพันธุ์ สุนันทา วงศ์ปิยชน วัชร สุขวิวัฒน์ พลุศรี สว่างจิต และศิริวรรณ ตั้งวิสุทธิจิต. (2547). *คุณภาพและการตรวจสอบข้าวหอมมะลิไทย*. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.
- ชาญ มงคล. (2536). ข้าว. ตำรา-เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 63 ภาคพัฒนาตำราและเอกสารวิชาการ หน่วยการศึกษานิเทศ กรมวิชาการฝึกหัดครู. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์การศาสนา.
- ณัชชา ดามุกดา. (2554). ผลของวิธีการหุงข้าวกล้องต่อความสามารถในการย่อยได้ของแป้งและดัชนีไกลซีมิก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.
- ดวงจันทร์ เสงส์สวัสดิ์. (2557). ข้าวต้านเบาหวาน อาหารที่คุณเลือกได้. *วารสารอาหาร*, 44(2), 15-18.

ทีมรักบ้านเกิด. (2559). *วิธีการหุงข้าวกล้องให้นุ่มน่ารับประทาน*. สืบค้นเมื่อ 15 กุมภาพันธ์ 2557, จาก <http://www.rakbankerd.com/agriculture/page.php?id=0935&s=tblrice>

นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. (2546). *เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

แผนงานฐานทรัพยากรอาหาร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.). (2555). มหัศจรรย์ พันธุ์ข้าวพื้นบ้าน “คุณค่าทางโภชนาการของสายพันธุ์ข้าวท้องถิ่น”. ใน *งานมหกรรมสมุนไพรแห่งชาติครั้งที่ 5 เรื่อง “ข้าวไทย ชีวิตไทย ชีวิตโลก”*. กรุงเทพฯ: อิมแพค เมืองทองธานี.

รัชณี คงกาญจนาย และริญ เจริญศิริ. (2555). *รายงานฉบับสมบูรณ์ “ศึกษาคุณค่าโภชนาการของข้าวพื้นเมืองในเขตปฏิรูปที่ดิน อำเภอกุดชุม จังหวัดยโสธร”* สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ: สำนักงานการปฏิรูปที่ดินเพื่อการเกษตรกรรม (ส.ป.ก.).

ริญ เจริญศิริ รัชณี คงกาญจนาย และณฤมล รัตนกรพันธ์. (2551). การคัดเลือกดัชนีน้ำตาลของข้าวสายพันธุ์ต่างจากการปรับปรุงพันธุ์และจากแหล่งต่างในกรุงเทพมหานคร โดยใช้การทดสอบ “*In vitro* rapid available glucose”. *วารสารโภชนาการ*, 43(3), 16-27.

ละมุล วิเศษ. (2555). ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพด้านการหุงต้มของข้าว. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 17(1), 172-180.

วาสนา ผลารักษ์. (2523). *ข้าว*. ขอนแก่น: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบุญ. (2553). คุณรู้จักข้าวดีแค่ไหน: โภชนาการของข้าว. *วารสารโภชนาการ*, 21(2), 39-50.

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.). (2544). *หนังสือเรียนสาระการเรียนรู้พื้นฐานและเพิ่มเติมชีววิทยา เล่ม 4* (พิมพ์ครั้งที่ 5). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ สกสค.ลาดพร้าว.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. (2552). *ประวัติศาสตร์ข้าวโลก*. สืบค้นเมื่อ 18 กุมภาพันธ์ 2557, จาก <http://www.riceexporters.or.th>

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

(2548). *สารานุกรมพันธุศาสตร์*. กรุงเทพฯ: เท็กซ์ แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น.

สุนันทา วงศ์ปิยชน กัญญา เชื้อพันธุ์ วชิร สุขวิวัฒน์ สุวณี กิตติลาภานนท์ ละม้ายมาศ ยังสุข และ
รุจิรา ปรีชา. (2549). *คุณภาพเมล็ดทางกายภาพ เคมี และโภชนาการของข้าวสายพันธุ์ดี*.
กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. (2545) *จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดี และเอเอฟแอล*
พี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรรณพ วงศ์ศิริโรจน์. (2537). ขนมห้าจากข้าว. ใน *การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*
ครั้งที่ 32 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร เรื่อง ศักยภาพข้าวไทย...ทิศทางใหม่สู่ อุตสาหกรรม
(หน้า 81-93). กรุงเทพฯ: คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรอนงค์ นัยวิกุล. (2532). *เคมีทางธัญญาหาร*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะ
อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรอนงค์ นัยวิกุล. (2540). เทคโนโลยีการผลิตและการพัฒนาผลิตภัณฑ์กล้วยเด็ยสด และอบแห้ง.
วารสารอุตสาหกรรมเกษตร, 8(3), 74-78.

อรอนงค์ นัยวิกุล. (2547). *ข้าว : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Aarathi, A., Urooj, A., Puttaraj, S., & Science, F. (2003). *In vitro* starch digestibility and
nutritionally important starch fractions in cereals and their mixtures. *Research Paper*.
55: 94-99.

Araya, H., Contreras, P., Alvina, M., Vera, G., & Pak, N. (2002). A comparison between an *in*
vitro method to determine carbohydrate digestion rate and the glycemic response in
young men. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(8), 735-739.

- Ayres, N. M., McClung, A. M., Larkin, P. D., & Park, W. D. (1997). Microsatellites and single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 773-781.
- Bao, J., & Bergman, C. J. (2004). The functionality of rice starch. In A.-C. Eliasson (Ed.), *Starch in food: Structure, function and applications* (pp. 258-294). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Bao, J. S., Corke, H., & Sun, M. (2006). Nucleotide diversity in starch synthase *Ila* and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 113(7), 1171-1183.
- Barclay, A. W., Petocz, P., Mcmillan-price, J., Flood, V. M., Prvan, T., Mitchell, P., & Brand-miller, J. C. (2008). Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk-a meta-analysis of observational studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(3), 627-637.
- Behall, K. M., Scholfield, D. J., & Canary, J. (1988). Effect of starch structure on glucose and insulin responses in adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 47: 428-432.
- Benmoussa, M., Moldenhauer, K. A. K., & Hamaker, B. R. (2007). Rice amylopectin fine structure variability affects starch digestion properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1475-1479.
- Bergman, C. J., Delgado, J. T., McClung, A. M., & Fjellstrom R. G. (2001). An improved method for using a microsatellite in the rice *waxy* gene to determine amylose class. *Cereal Chemistry*, 78: 257-260.
- Brand, J. C., Nicholson, P. L., Thorburn, A. W., & Truswell, A. S. (1985). Food processing and the glycemic index. *American Journal of Clinical Nutrition*, 42: 1192-1196.
- Brand-Miller, J., Wolever, T. M. S., & Colagiuri, S. (1999). *The Glucose Revolution*. Marlowe & Company Editor, New York.

- Cai, X. L., Wang, Z. Y., Xing, Y. Y., Zhang, J. L., & Hong, M. M. (1998). Aberrant splicing of intron1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of *waxy* gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *Plant Journal*, 14: 459-465.
- Champagne, E. T. (1996). Rice starch: composition and characteristics. *Cereal Food World*, 41(1), 833-838.
- Chan, H. M. S., Brand-miller, J. C., Holt, S. H. A., Wilson, D., Rozman, M., & Petocz, P. (2001). Original communication the glycaemic index values of vietnamese foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55: 1076-1083.
- Cheng, A., Ismail, I., Osman, M., & Hashim, H. (2012). Simple and rapid molecular techniques for identification of amylose levels in rice varieties. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 6156-6166.
- Chen, M.-H., Bergman, C. J., Pinson, S. R. M., & Fjellstrom, R. G. (2008a). *Waxy* gene haplotypes: associations with pasting properties in an international rice germplasm collection. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 781-788.
- Chen, M.-H., Bergman, C., Pinson, S., & Fjellstrom, R. (2008b). *Waxy* gene haplotypes: associations with apparent amylose content and the effect by the environment in an international rice germplasm collection. *Journal of Cereal Science*, 47(3), 536-545.
- Chen, M.-H., Fjellstrom, R. G., Christensen, E. F., & Bergman, C. J. (2010). Development of three allele-specific codominant rice *waxy* gene PCR markers suitable for marker-assisted selection of amylose content and paste viscosity. *Molecular Breeding*, 26(3), 513-523.
- Chung, H., Liu, Q., Lee, L., & Wei, D. (2011). Relationship between the structure, physicochemical properties and *in vitro* digestibility of rice starches with different amylose contents. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 968-975.
- Cummings, J. H., Edmond, L. M., & Magee, E. A. (2004). Dietary carbohydrates and health: Do we still need the fibre concept?. *Clinical Nutrition supplements*, 1: 5-17.

- Denardin, C. C., Walter, M., Silva, L. P., Souto, G. D., & Fagundes, C. A. A. (2007). Effect of amylose content of rice varieties on glycemic metabolism and biological responses in rats. *Food Chemistry*, 105: 1474-1479.
- Dobo Macaire. (2006). *Role of GBSS allelic diversity in rice grain quality*. Doctor's Thesis of Molecular and Environmental Plant Sciences. Texas A&M University, Texas.
- Doyle, J. J. (1991). DNA protocols for plants. pp. 283-293 in: G. Hewitt, A. W. B. Johnson, & J. P. W. Young (eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATOASI Series H, *Cell Biology*, Vol. 57.
- Eerlingen, R. C., & Delcour, J. A. (1995). Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. *Journal of Cereal Science*, 22(2), 129-138.
- Ells, L. J., Seal, C. J., Kettlitz, B., Bal, W., & Mathers, J. C. (2005). Postprandial glycaemic, lipaemic and haemostatic responses to ingestion of rapidly and slowly digested starches in healthy young women. *British Journal of Nutrition*, 94: 948-955.
- Englyst, H. N., & Hudson, G. J. (1996). The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chemistry*, 57(1), 15-21.
- Englyst, H. N., Kingman, S.M., & Cummings, J.H. (1992) Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46(2), 33-50.
- Englyst, H. N., Veenstra, J., & Hudson, G. J. (1996). Measurement of rapidly available glucose (RAG) in plant foods: a potential *in vitro* predictor of the glycaemic response. *The British Journal of Nutrition*, 75(3), 327-337.
- Englyst, K. N., Englyst, H. N., Hudson, G. J., Cole, T. J., & Cummings, J. H. (1999). Rapidly available glucose in foods: an *in vitro* measurement that reflects the glycemic response. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 448-454.

- Englyst, K. N., & Englyst, H. N. (2003). Carbohydrate bioavailability. *British Journal of Nutrition*. 94: 1-11.
- Englyst, K. N., Liu, S., & Englyst, H. N. (2007). Nutritional characterization and measurement of dietary carbohydrates. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61 (Suppl 1), 19-39.
- Fitzgerald, M. A., Rahman, S., Resurreccion, A. P., Concepcion, J., Daygon, V. D., Dipti, S. S., Kabir, K. A., Klingner, B., Morell, M. K., & Bird, A. R. (2011). Identification of a major genetic determinant of glycaemic index in rice. *Rice*, 4(2), 66-74.
- Frei, M., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Studies on the *in vitro* starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. *Food Chemistry*, 83(3), 395-402.
- Goddard, M. S., Young, G., & Marcus, R. (1984). The effect of amylose content on insulin and glucose responses to ingested rice. *American Journal of Clinical Nutrition*. 39: 388-392.
- Goni, I., Garcia-Alonso, A., Saura-Calixto, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*. 17: 427-437.
- Guraya, H. S., James, C. & Champagne, E. T. (2001b). Effect of enzyme concentration and storage temperature on the formation of slowly digestible starch from cooked debranched rice starch. *Starch/Starke*. 53:131-139.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4(1), 9pp.
- Han, X. Z., & Hamaker, B. R. (2002). Location of starch granule-associated proteins revealed by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Cereal Science*, 35(1), 109-116.
- Hettiaratchi, U. P. K., Ekanayake, S., & Welihinda, J. (2009). Do different fractions of digestible carbohydrates in foods influence the glycaemic responses?. *Journal of Food and Agriculture*, 2(2), 28-35.

- Hirano, H.Y., & Sano, Y. (1991). Molecular characterization of the waxy locus of rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Physiol.* 32: 989-997.
- Hizukuri, S. (1985). Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and crystalline structure of starch granule. *Carbohydrate Research.* 141: 295-306.
- Hu, E. A., Pan, A., Malik, V., & Sun, Q. (2012). White rice consumption and risk of type 2 diabetes: meta-analysis and systematic review. *British Medical Journal*, 344(3), 961-969.
- Hu, P., Zhao, H., Duan, Z., Linlin, Z., & Wu, D. (2004). Starch digestibility and the estimated glycemic score of different types of rice differing in amylose contents. *Journal of Cereal Science*, 40(3), 231-237.
- Indudhara Swamy, Y. M., Sowbhagya, C., & Bhattacharya, K. (1978). Changes in the physicochemical properties of rice with aging. *The Journal of the Science of Food and Agriculture.* 29: 627-639.
- Ito, Y., Mizukuchi, A., Kise, M., Aoto, H., Yamamoto, S., Yoshihara, R., & Yokoyama, J. (2005). Postprandial blood glucose and insulin responses to pre-germinated brown rice in healthy subjects. *Journal of Investigative Medicine*, Aug; 52(3-4), 159-164.
- Jacobs, H., & Delcour, J. A. (1998). Hydrothermal modification of granular starch, with retention of the granular structure: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46: 2895-2905.
- Jaisut, D., Prachayawarakorn, S., Varanyanond, W., Tungtrakul, P., & Soponronnarit, S. (2008). Effects of drying temperature and tempering time on starch digestibility of brown fragrant rice. *Journal of Food Engineering.* 86: 251-258.
- Jane, J. (1995). Starch properties, modification. *Journal of Macromolecular Science Part A Pure and Applied Chemistry.* 32: 751-757.

- Jane, J.-L., Wong, K.-S., & McPkerson, A. E. (1997). Branch-structure difference in starch of A and B-type X-ray patterns revealed by their naegeli dextrins. *Carbohydrate Research*. 300: 219-227.
- Jenkins, D. J. A, Kendall, C. W. C., Augustin, L. S. A, Franceschi, S., Hamidi, M., Marchie, A., Jenkins, A. L., & Axelsen, M. (2002). Glycemic index: overview of implications in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(1), 266-273.
- Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Jenkins, A. L., Josse, R. G., & Wong, G. S. (1984). The glycaemic response to carbohydrate foods. *The Lancet*. 18: 388-391.
- Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Taylor, R. H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J. M., Bowling, A. C., Newman, H. C., Jenkins, A. L., & Goff, D. V. (1981). Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *American Journal of Clinical Nutrition*. 34: 362-366.
- Jin, L., Lu, Y., Shao, Y., Zhang, G., Xiao, P., Shen, S., Corke, H., & Bao, J. (2010). Molecular marker assisted selection for improvement of the eating, cooking and sensory quality of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 51(1), 159-164.
- Juliano, B.O. (1985). Criteria and test for rice grain quality. In: B.O. Juliano (ed), *Rice chemistry and technology*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, pp 443-513.
- Juliano, B.O. (1998). Varietal impact on rice quality. *Cereal food world*, 43(4), 207-222.
- Kennedy, G., & Burlingame, B. (2003). Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. *Food Chemistry*. 80: 589-596.
- Kharabian-Masouleh, A., Waters, D. L. E., Reinke, R. F., Ward, R., & Henry, R. J. (2012). SNP in starch biosynthesis genes associated with nutritional and functional properties of rice. *Scientific Reports*, 2, 557.

- Kong, X., Chen, Y., Zhu, P., Sui, Z., Corke, H., & Bao, J. (2015). Relationships among genetic, structural, and functional properties of rice starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(27), 6241-6248.
- Kumari, M., Urooj, A., & Prasad, N. N. (2007). Effect of storage on resistant starch and amylase content of cerealpulse based ready to eat commercial products. *Food Chemistry*, 102: 1425-1430.
- Larkin, P. D., & Park, W. D. (2003). Association of *waxy* gene single nucleotide polymorphisms with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*, 12(4), 335-339.
- Lin, M.-H. A. (2010). Glycemic index, glycemic load and insulinemic index of Chinese starchy foods. *World Journal of Gastroenterology*, 16(39), 4973-4979.
- Lohninger, H. (1999). Teach/Me Data Analysis. Springer-Verlag, Berlin-New York-Tokyo. ISBN 3-540-14743-8.
- Mahadevamma, S., & Tharanathan, R. N. (2007). "Processed rice starch characteristics and morphology". *European Food Research and Technology*, 225: 603-612.
- Miller, J. B., Pang, E., & Bramall, L. (1992). Rice: a high or low glycemic index food?. *American Journal of Clinical Nutrition*, 56: 1034-1036.
- Nakamura, Y., Francisco, Jr. P. B., Hosaka, Y., Sato, A., Sawada, T., Kubo, A., & Fujita, N. (2005). Essential amino acid of starch synthase *Ila* differentiate amylopectin structure and starch quality between *japonica* and *indica* rice varieties. *Plant Molecular Biology*, 58: 2130-227.
- Narumol Ratanakonpun. (2007). *In Vitro* "Rapidly available glucose (RAG)" value use as an indicator for glucose response after digestion of Thai rice and rice products. Master's Thesis of Science (Nutrition). Mahidol University, Bangkok.

- Panlasigui, L. N., & Thompson, L. U. (2006). Blood glucose lowering effects of brown rice in normal and diabetic subjects. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57: 151-158.
- Pathiraje, P. M. H. D., Madhujith, W. M. T., Chandrasekara, A., & Nissanka, S. P. (2010). The effect of rice variety and parboiling on *in vivo* glycemic response. *Tropical Agricultural Research*, 22(1), 26-33.
- Patindol, J., Guraya, H., Champagne, E., Chen, M.-H., & McClung, A. (2010). Relationship of cooked-rice nutritionally important starch fractions with other physicochemical properties. *Starch/Starke*, 62(5), 246-256.
- Perez, M., Thompson, U., & Yiu, H. (1991). Rice varieties with similar amylose digestibility and glycemic response content differ in starch in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54: 871-877.
- Prathepha, P., & Baimai, V. (2004). Variation of *Wx* microsatellite allele, *waxy* allele distribution and differentiation of chloroplast DNA in a collection of Thai rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 140(3), 231-237.
- Ranawana, D. V, Henry, C. J. K., Lightowler, H. J., & Wang, D. (2009). Glycaemic index of some commercially available rice and rice products in Great Britain. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(4), 99-110.
- Rashmi, S., & Urooj, A. (2003). Effect of processing on nutritionally important starch fractions in rice varieties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 54(1), 27-36.
- Robertson, M. D., Bickerton, A. S., Dennis, A. L., Vidal, H., & Frayn, K. N. (2005). Insulin sensitizing effects of dietary resistant starch and effects on skeletal muscle and adipose tissue metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(3), 559-567.
- Salmeron, J., Ascherio, A., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Spiegelman, D., Jenkins, D. J., Stampfer, M. J., Wing, A. L., & Willett, W. C. (1997a). Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes care*, 20(4), 545-50.

- Salmeron, J., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Wing, A. L., & Willett, W. C. (1997b). Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *JAMA*, 277: 472-7.
- Sano, Y. (1984). Differential regulation of *waxy* gene expression in rice endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*, 64: 467-473.
- Sano, Y., Katsumata, M., & Amano, E. (1985). Correlations between the amounts of amylose and *Wx* protein in rice endosperm. *Sabao Journal*, 17(2), 121-127.
- Seal, C. J., Daly, M. E., Thomas, L. C., Bal, W., Birkett, A. M., Jeffcoat, R., & Mathers, J. C. (2003). Postprandial carbohydrate metabolism in healthy subjects and those with type 2 diabetes fed starches with slow and rapid hydrolysis rates determined in vitro. *British Journal of Nutrition*, 90: 853-864.
- Shamai, K., Bianco-Peled, H., & Shimoni, E. (2003). Polymorphism of resistant starch type III. *Carbohydrate Polymers*, 54: 363-369.
- Simth, F. S. C., & Sniyh, O. S. (1992). Fingelprinting crop varieties. *Advances in Agronomy*, 47: 85-140.
- Smith, A. M., Denyer, K., & Martin, C. (1997). The synthesis of the starch granule. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 67-87.
- Sripichai, O., & Fucharoen, S. (2007). Genetic polymorphisms and implications for human diseases. *Journal of The Medical Association of Thailand*, 90(2), 394-8.
- Sri Widowati, B.A., Susila Santosa, Made Astawan, & Akhyar. (2010). Reducing glycemic index of some rice varieties using parboiling process. *Indonesian Journal of Agriculture*, 3(2), 104-111.

- Tran, N. A., Daygon, V. D., Resurreccion, A. P., Cuevas, R. P., Corpuz, H. M., & Fitzgerald, M. A. (2011). A single nucleotide polymorphism in the *Waxy* gene explains a significant component of gel consistency. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 123(4), 519-525.
- Trinidad, T. P., Mallillin, A. C., Encabo, R. R., Sagum, R. S., Felix, A. D., & Juliano, B. O. (2013). The effect of apparent amylose content and dietary fiber on the glycemic response of different varieties of cooked milled and brown rice. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(1), 89-93.
- Umemoto, T., Aoki, N., Lin, H. X., Nakamura, Y., Inouchi, N., Sato, Y., Yano, M., Hirabayashi, H., & Maruyama, S. (2004). Natural variation in rice starch synthase *Ila* affects enzyme and starch properties. *Functional Plant Biology*. 31: 671-684.
- Umemoto, T., Yano, M., Satoh, H., Shomura, A., & Nakamura, Y. (2002). Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between *japonica*-type and *indica*-type rice varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 104: 1-8.
- Vidal, V., Pons, B., Brunnschweiler, J., Handschin, S., Rouau, X., & Mestres, C. (2007). Cooking behavior of rice in relation to kernel physicochemical and structural properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 336-346.
- Visser, R. G. F. (1996). Comparison of starches from different botanical sources. In *Advanced Post Academic Course on Tapioca Starch Technology*. AIT Center, Bangkok 22-26 January and 19-23 February 1996.
- Wanchana, S., Toojinda, T., Tragoonrung, S., & Vanavichit, A. (2003). Duplicated coding sequence in *waxy* allele of tropical glutinous rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*. 165: 1193-1199.

- Wani, A. A., Singh, P., Shah, M. A., Schweiggert-Weisz, U., Gul, K., & Wani, I. A. (2012). Rice starch diversity: effects on structural, morphological, thermal, and physicochemical properties-A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(5), 417-436.
- Wolever, T. M., Jenkins, D. J., Jenkins, A. L., & Josse, R. G. (1991). The glycemic index: methodology and clinical implications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54(5), 846-854.
- Yang, Y.-xin., Wang, H.-wei., Cui, H.-mei., Wang, Y., Yu, L.-da., Xiang, S.-xue., & Zhou, S.-ying. (2006). Glycemic index of cereals and tubers produced in China. *World Journal of Gastroenterology*, 12(21), 3430-3433.
- Yue, P., & Waring, S. (1998). Functionality of resistant starch in food applications. *Food Australia*, 50(12), 615-621.
- Zhang, G., Sofyan, M., & Hamaker, B. (2008). Slowly digestible state of starch: mechanism of slowly digestion property of gelatinized maize starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 4695-4702.



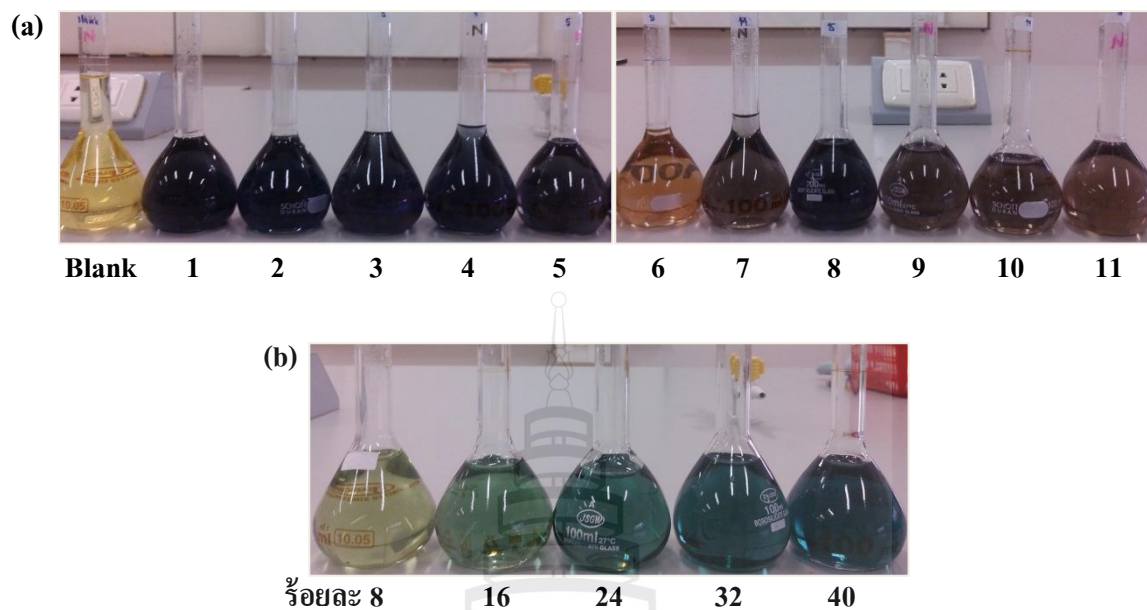
ภาคผนวก ก

ตารางแสดงผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ก1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสของตัวอย่างข้าวไทยบางสายพันธุ์โดยวิธีวิเคราะห์ของ Juliano (1985) และใช้ชุดทดสอบ AMYLOSE/AMYLOPECTIN Assay จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลปริมาณแอมิโลสจากกรมการข้าว

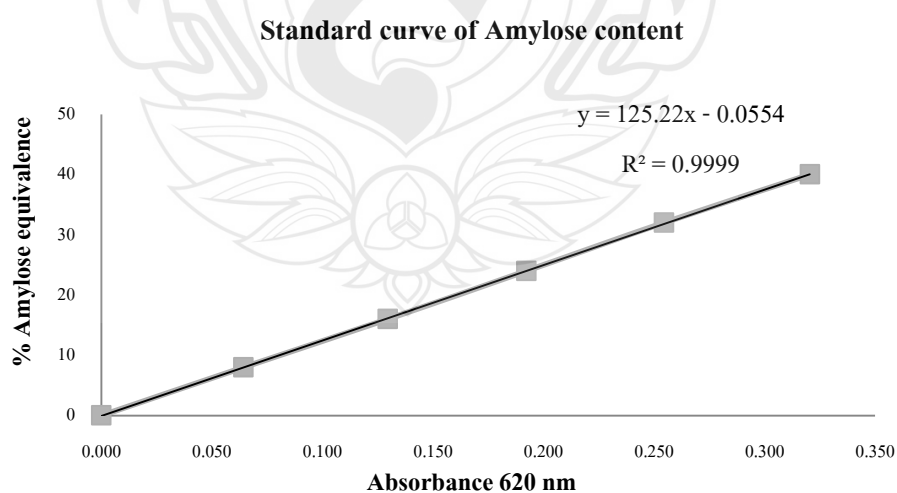
สายพันธุ์	ชนิด	ปริมาณแอมิโลส		
		Juliano (1985) ¹	ชุดทดสอบ (Kit) ¹	อ้างอิงจากกรมข้าว ¹
กข29	ข้าวเจ้า	39.05	10.55	26.6-29.4
กข31	ข้าวเจ้า	34.29	12.35	27
ไข่มดรีน3	ข้าวเจ้า	33.77	9.50	21.8
พิษณุโลก2	ข้าวเจ้า	26.15	15.57	28.6
อยุธยา1	ข้าวเจ้า	35.08	10.13	28.4
กข35	ข้าวเจ้า	33.29	14.78	26.1-29.3
สุพรรณบุรี60	ข้าวเจ้า	29.07	8.75	20-25
ดอกพะยอม	ข้าวเจ้า	15.11	9.41	24
สันป่าตอง1	ข้าวเหนียว	8.21	8.34	5-6

หมายเหตุ ¹ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์สามครั้ง กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง

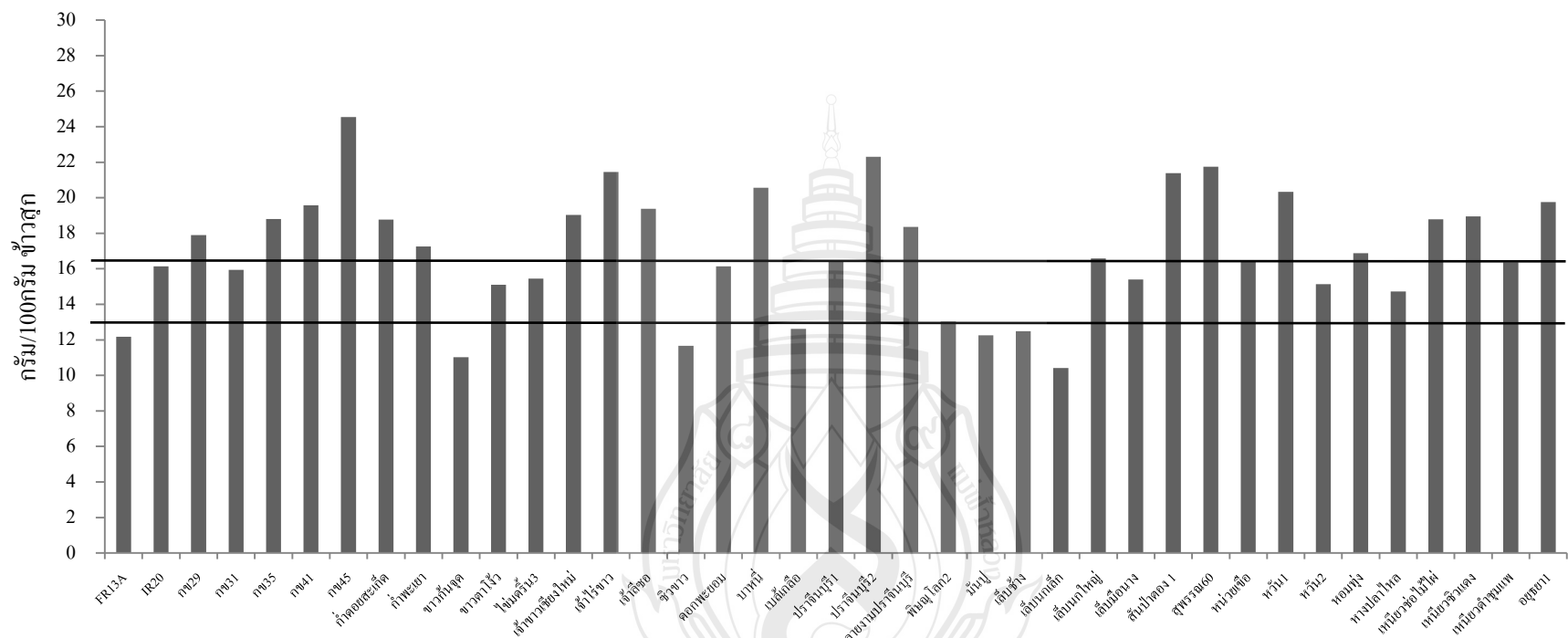


หมายเหตุ ข้าวสายพันธุ์ (1) เล็บนกเล็ก (2) กข31 (3) สุพรรณบุรี60 (4) กข35 (5) กข41
(6) ก่ำดอยสะเก็ด (7) เหนียวชีวงแดง (8) ขาวตาโง้ว (9) บาห์นี (10) เจ้าขาวเชียงใหม่
(11) เจ้าไร่ขาว

ภาพที่ ก1 (a) สารละลายเอมิโลสของตัวอย่างข้าวไทยบางสายพันธุ์ (b) สารละลายมาตรฐาน
เอมิโลสที่มีความเข้มข้นในการสร้างกราฟมาตรฐาน

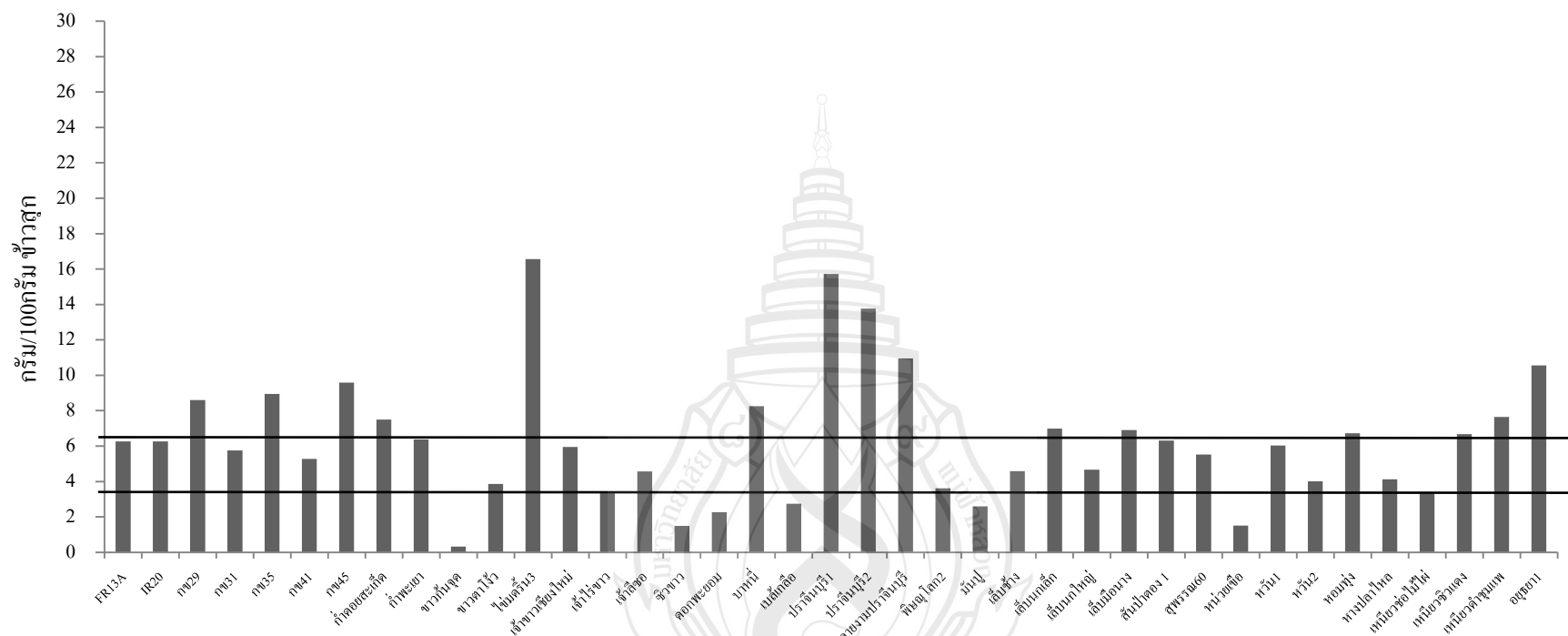


ภาพที่ ก2 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณเอมิโลส และค่าดูดกลืนแสง (A620)



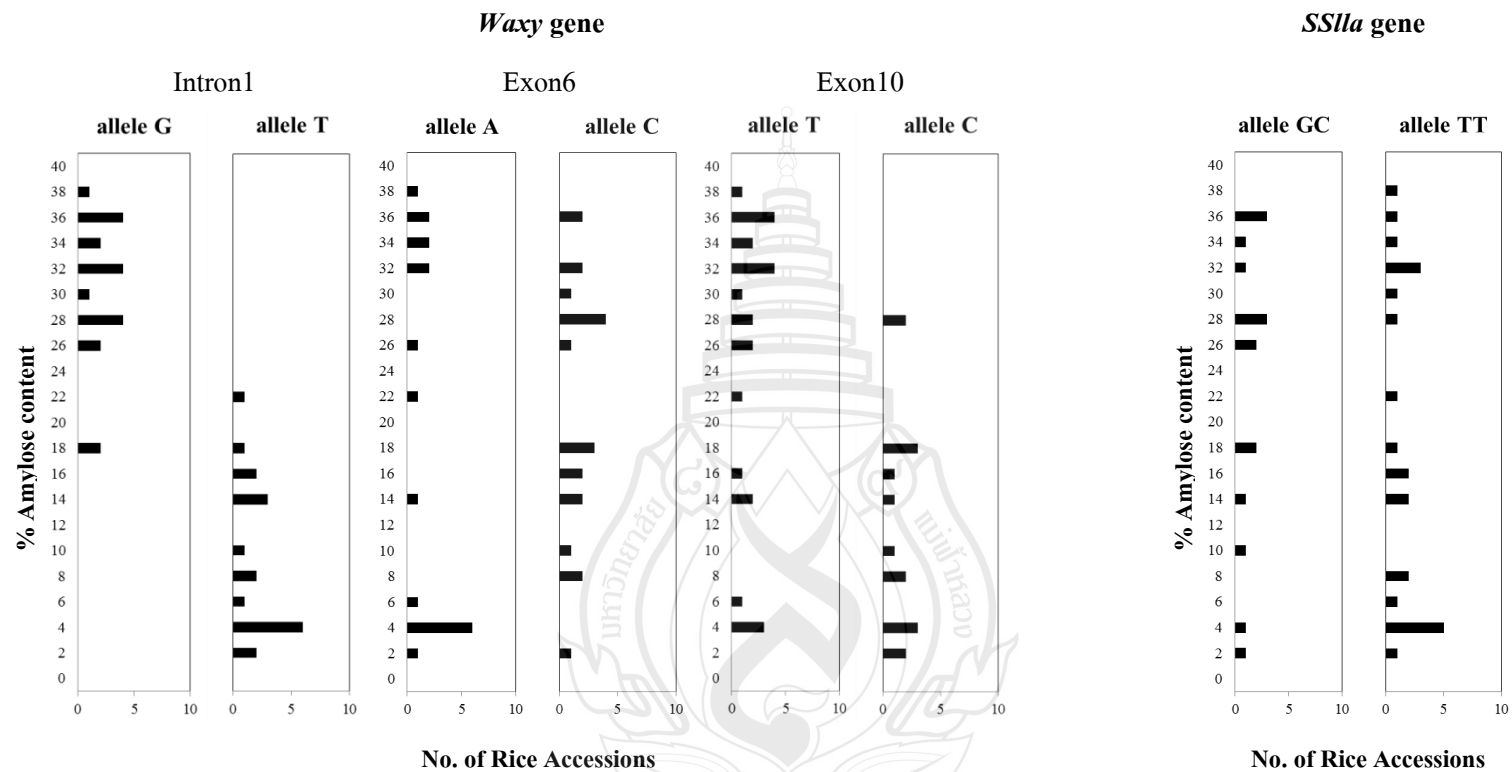
— หมายถึง ข้าวที่มีระดับต่ำกว่าหรือเท่ากับเส้นสีแดงเป็นข้าวที่คาดว่ามีความชื้นน้ำตาลต่ำ-ปานกลาง โดยใช้ควอร์ทเดวเอน์ในการแบ่งค่า RAG ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

ภาพที่ ก3 ค่า RAG ในข้าวกล้องจำนวน 39 สายพันธุ์



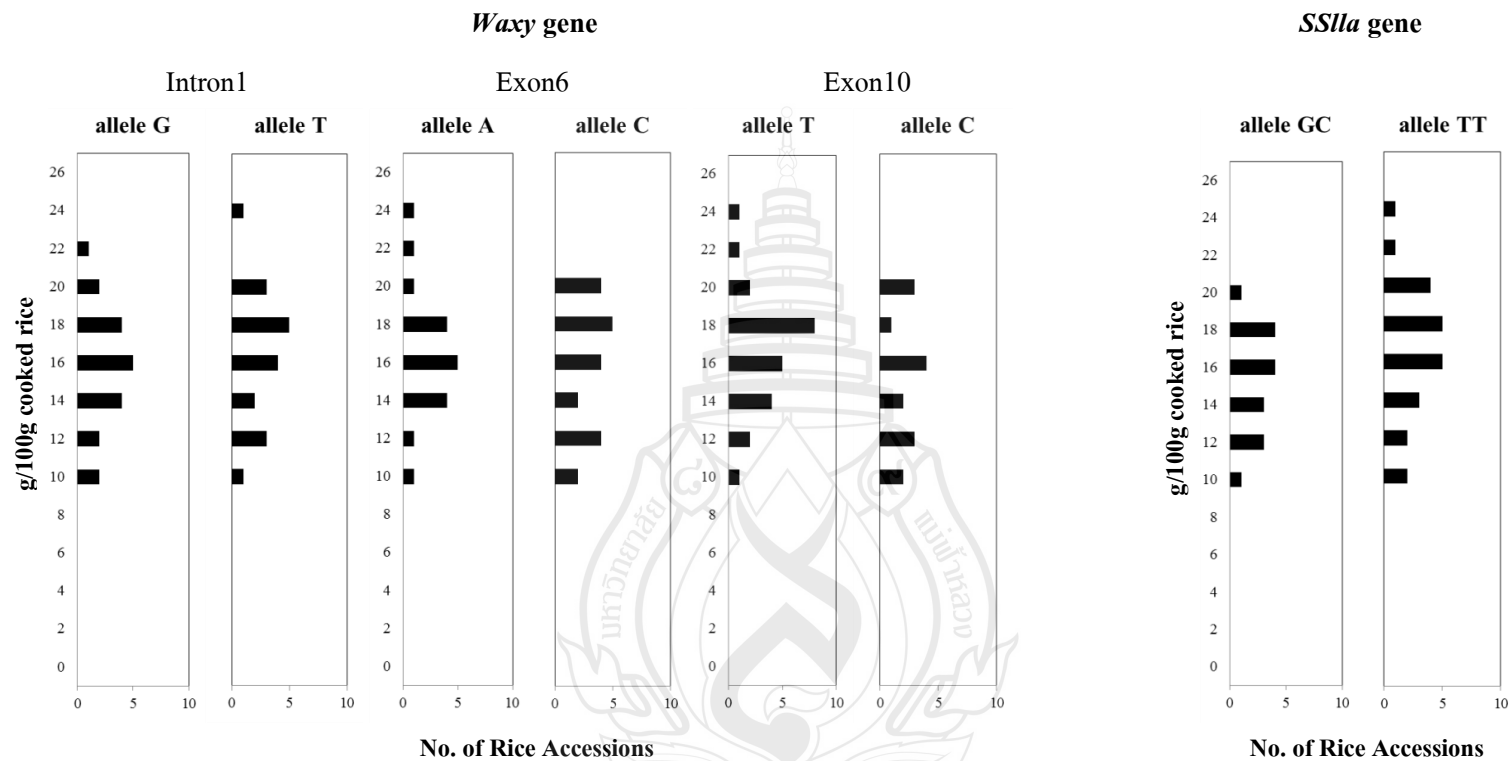
— หมายถึง ข้าวที่มีระดับสูงกว่าหรือเท่ากับเส้นสีแดงเป็นข้าวที่คาดว่าจะมีดัชนีน้ำตาลต่ำ-ปานกลาง โดยใช้ควอร์ไทล์เอชในการแบ่งค่า SAG ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

ภาพที่ 4 ค่า SAG ในข้าวกล้องจำนวน 39 สายพันธุ์



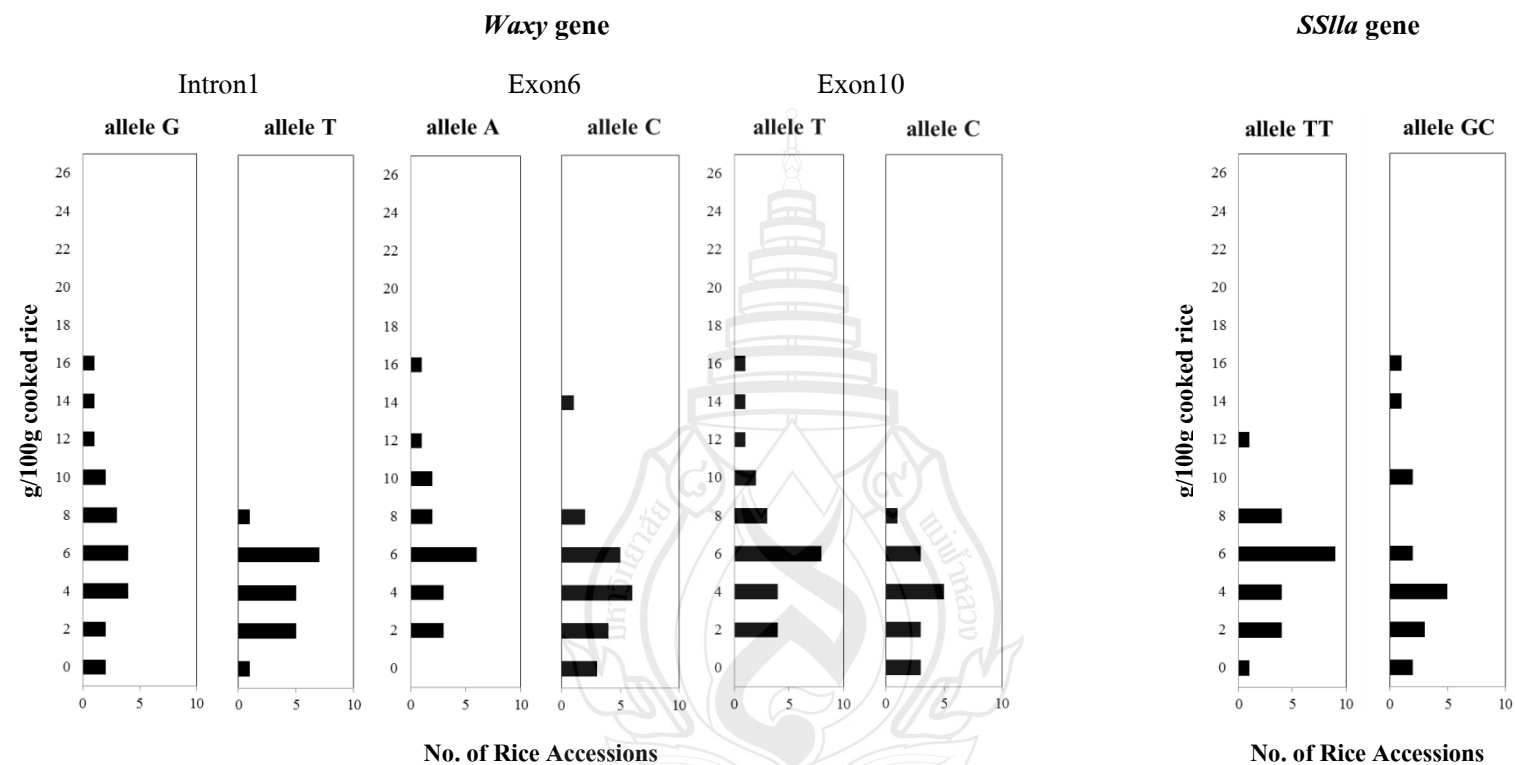
ที่มา Chen et al. (2008a)

ภาพที่ ๓5 การแจกแจงความถี่ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ตามปริมาณแอมิโลสที่สัมพันธ์กับยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 (G/T) Exon6 (A/C) Exon10 (T/G) และยีน *SSIa* (GC/TT)



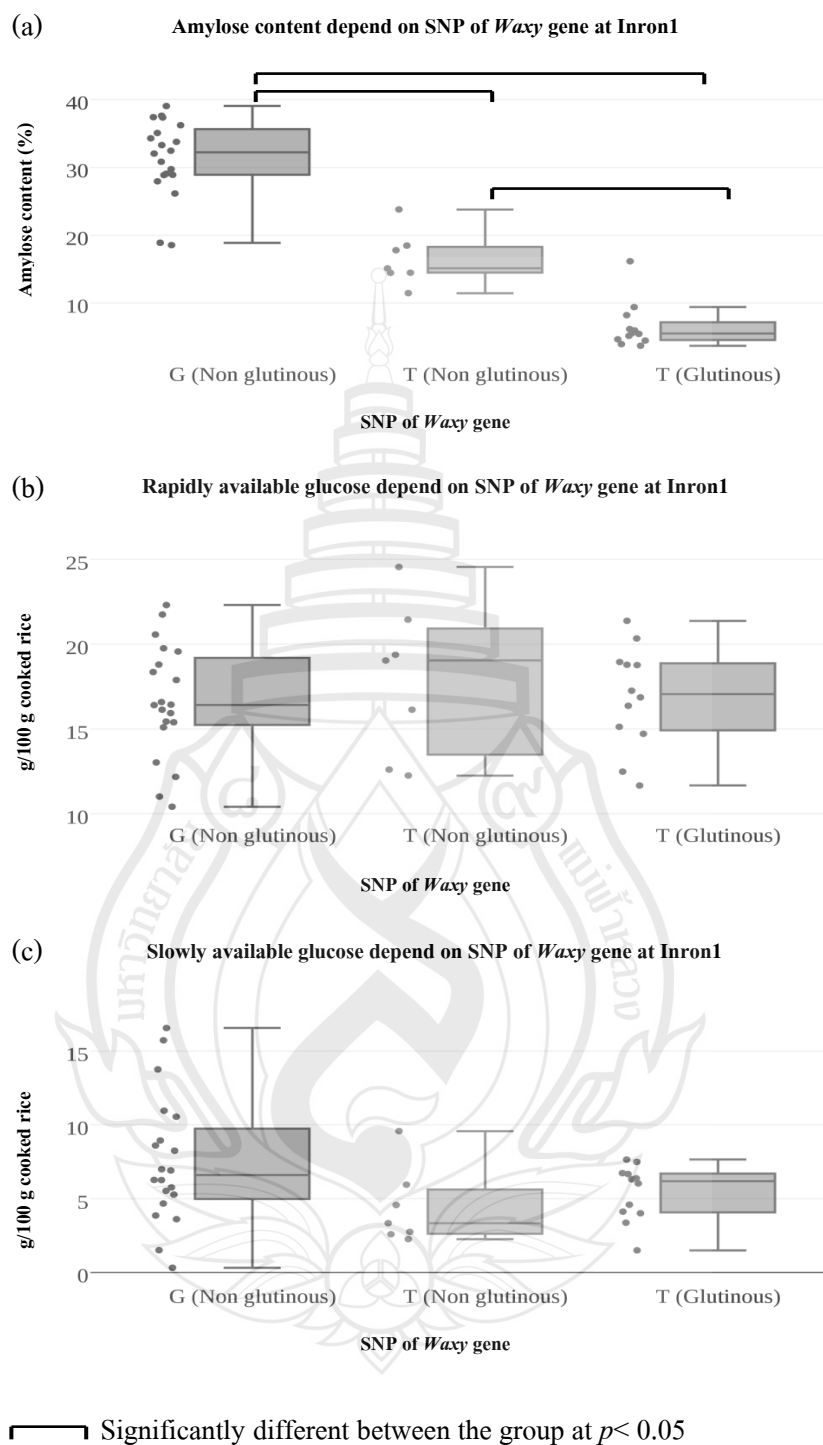
ที่มา Chen et al. (2008a)

ภาพที่ 6 การแจกแจงความถี่ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ตามค่า RAG ที่สัมพันธ์กับยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 (G/T) Exon6 (A/C) Exon10 (T/G) และยีน *SSI1a* (GC/TT)

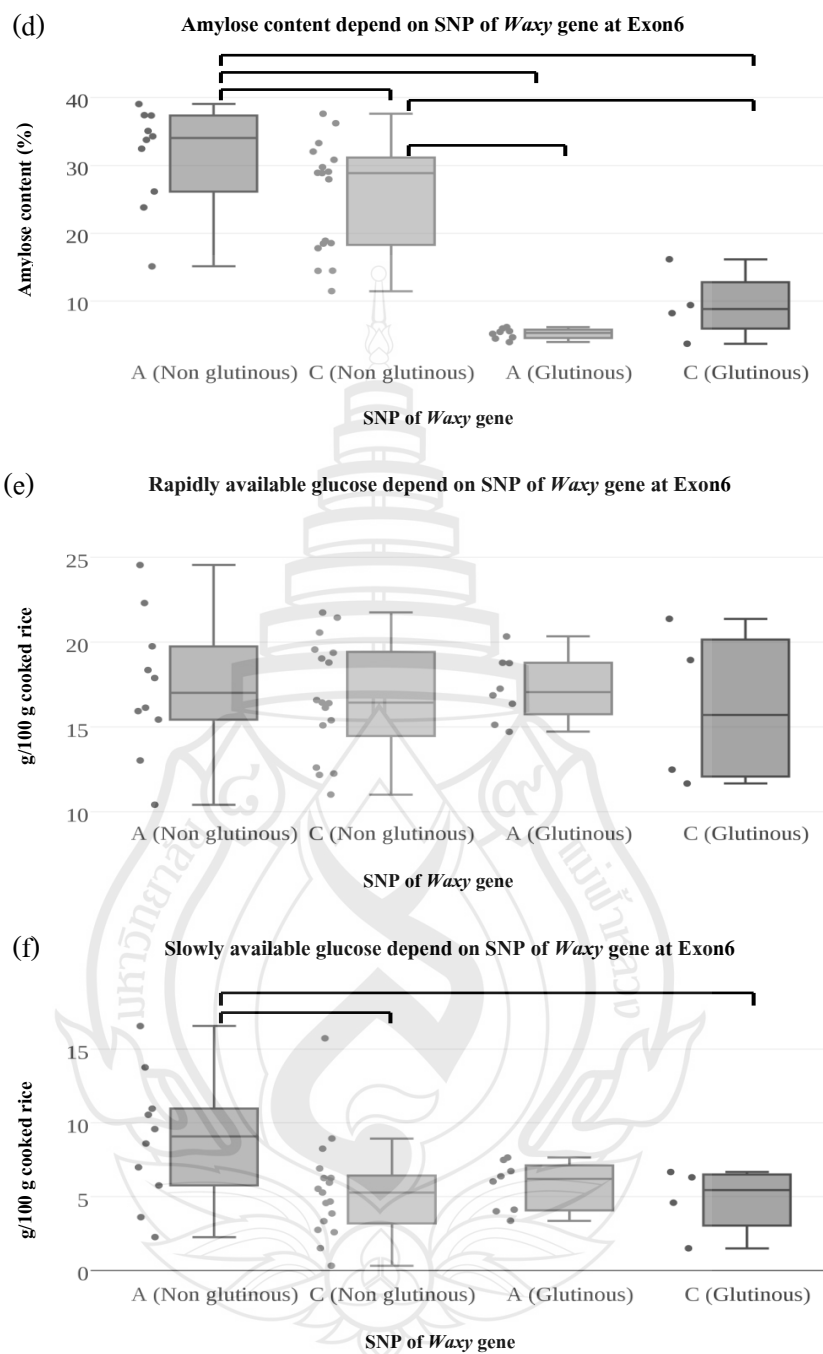


ที่มา Chen et al. (2008a)

ภาพที่ ๗ การแจกแจงความถี่ของข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ตามค่า SAG ที่สัมพันธ์กับยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 (G/T) Exon6 (A/C) Exon10 (T/G) และยีน *SSIa* (GC/TT)

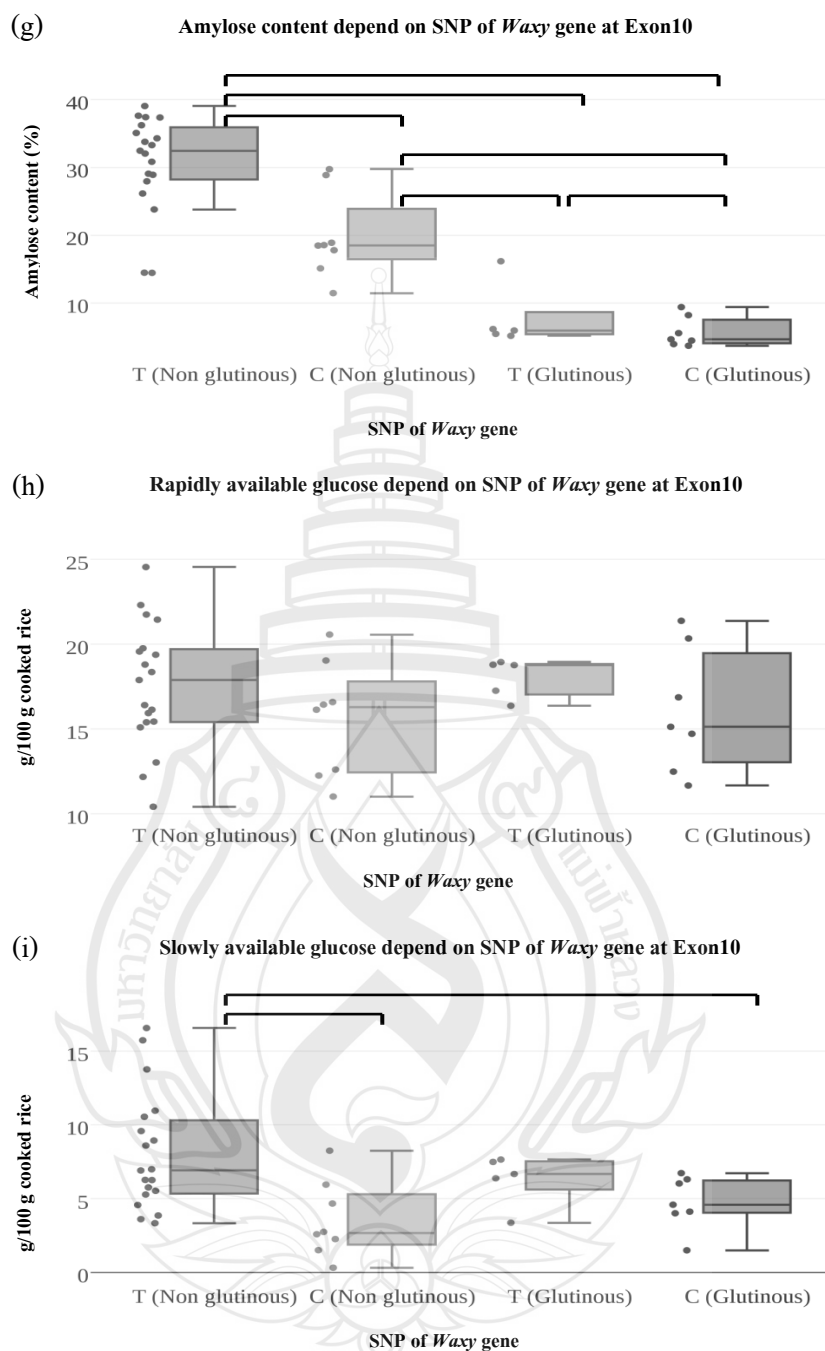


ภาพที่ ๓๘ การแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 (แยกตัวอย่างข้าวเจ้า และข้าวเหนียว) (a) ปริมาณแอมิโลส (b) ค่า RAG (c) ค่า SAG



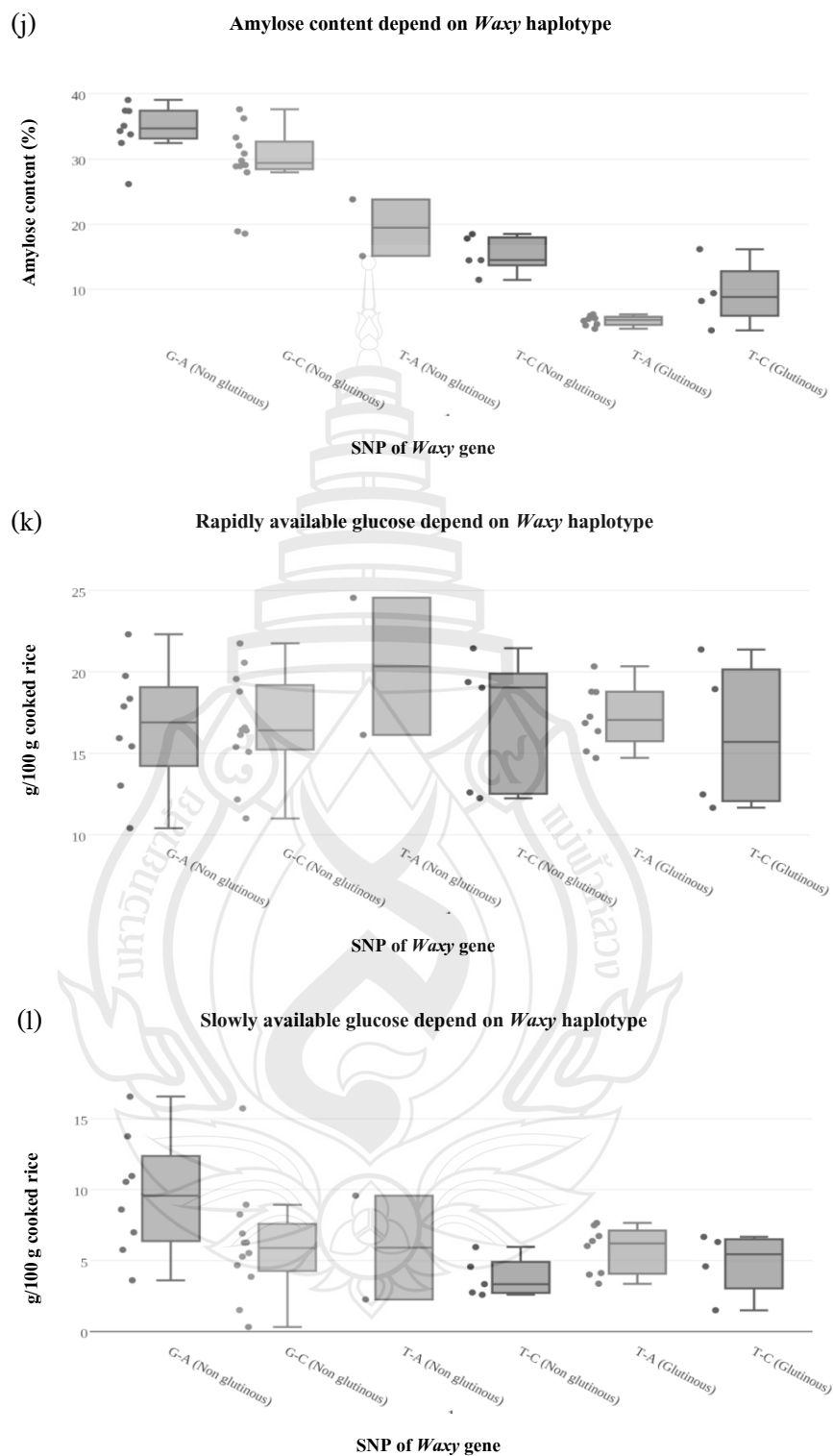
— Significantly different between the group at $p < 0.05$

ภาพที่ ๓๑ การแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดียวของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon6 (แยกตัวอย่างข้าวเจ้า และข้าวเหนียว) (d) ปริมาณแอมิโลส (e) ค่า RAG (f) ค่า SAG

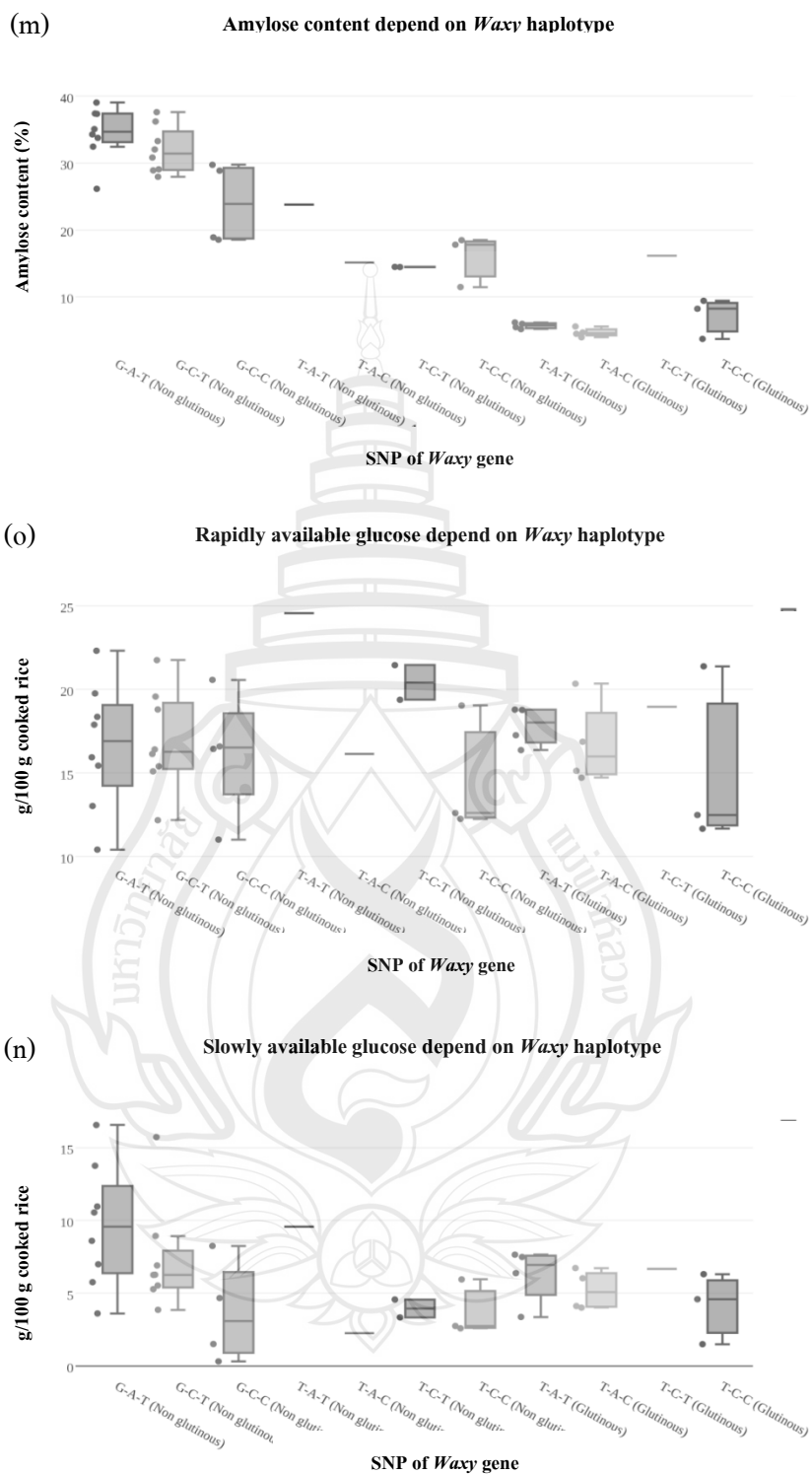


Significantly different between the group at $p < 0.05$

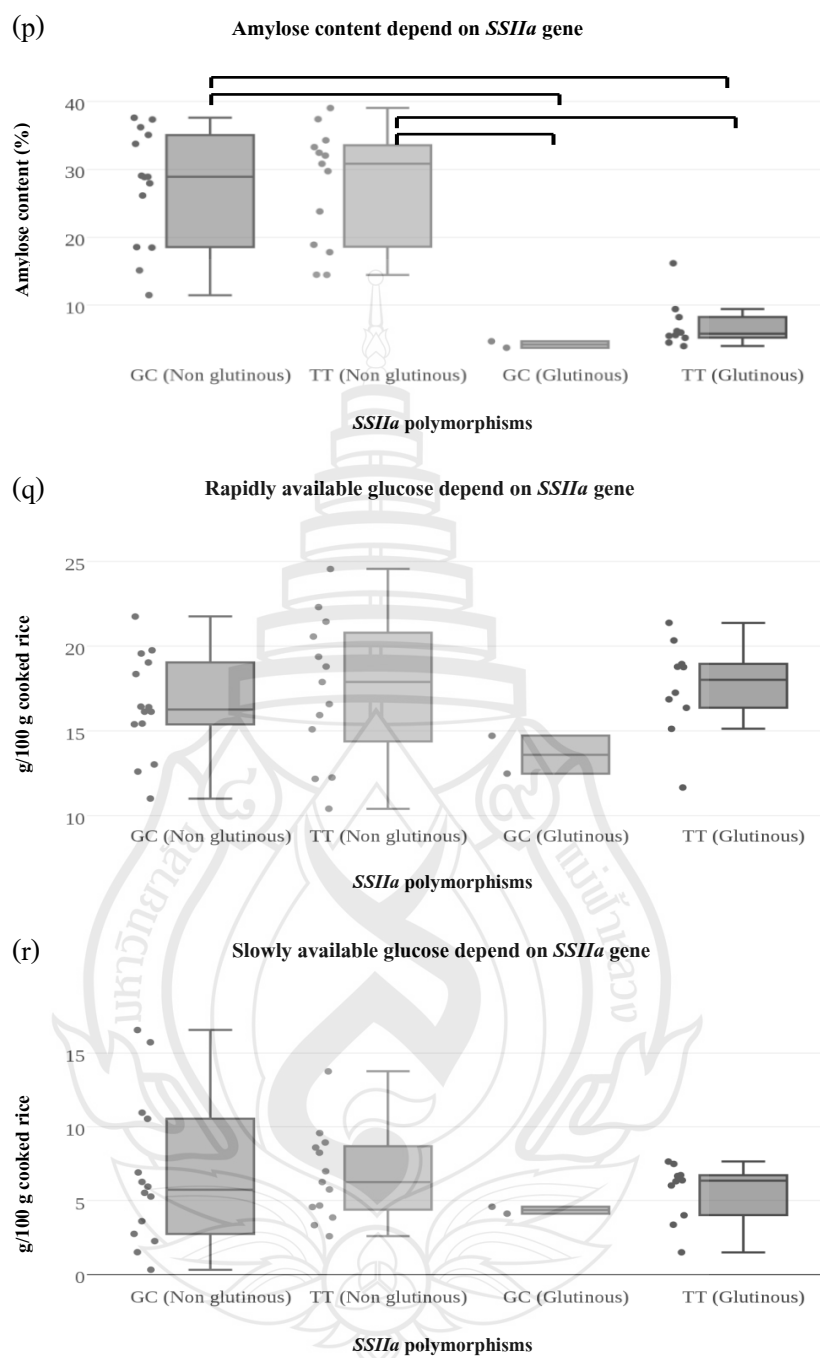
ภาพที่ ๑๑๐ การแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Exon10 (แยกตัวอย่างข้าวเจ้า และข้าวเหนียว) (g) ปริมาณแอมิโลส (h) ค่า RAG (i) ค่า SAG



ภาพที่ 11 การแบ่งกลุ่มตามรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 และ Exon6 (แยกตัวอย่างข้าวเจ้า และข้าวเหนียว) (j) ปริมาณแอมิโลส (k) ค่า RAG (l) ค่า SAG

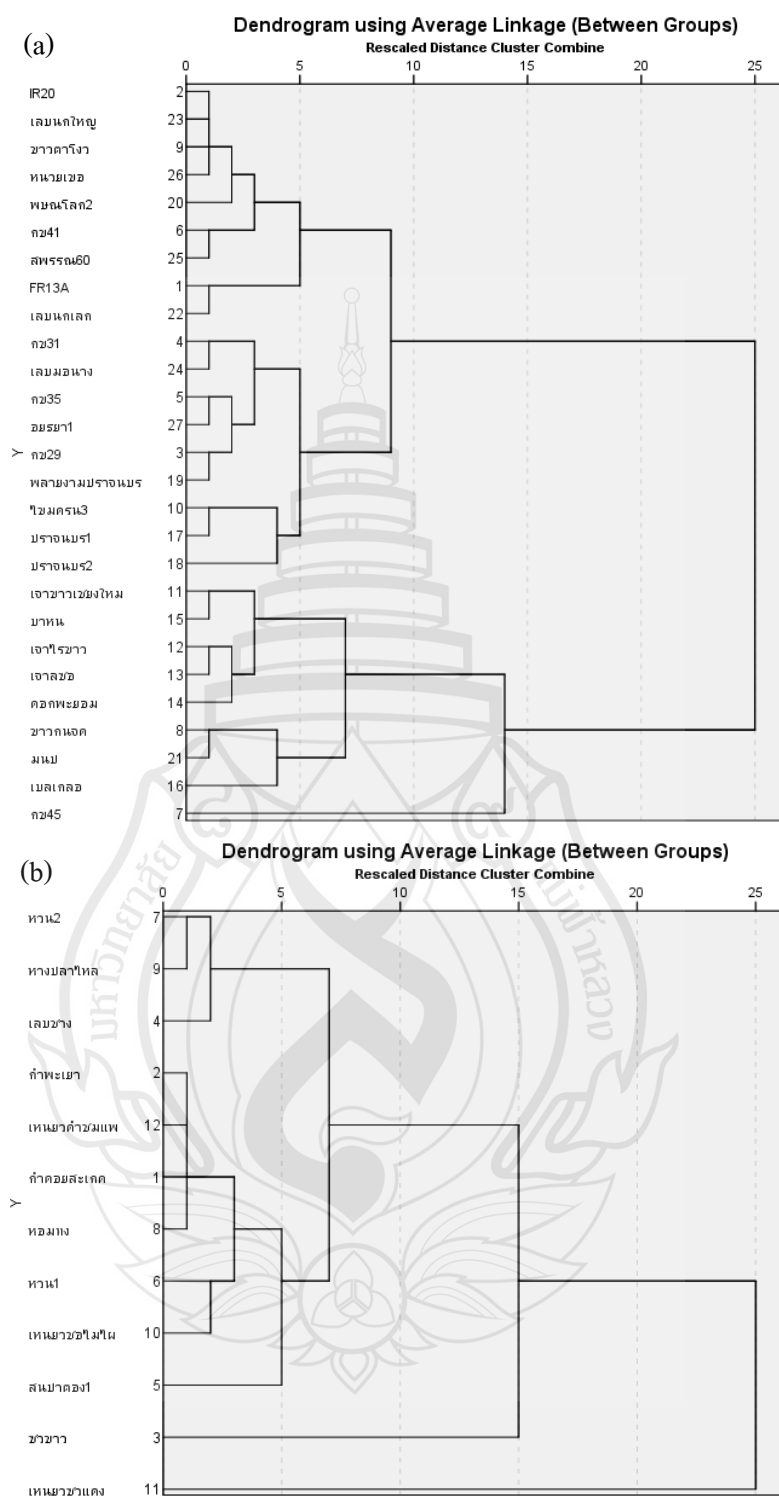


ภาพที่ ก12 การแบ่งกลุ่มตามรูปแบบ haplotype ของยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 Exon6 และ Exon10 (แยกตัวอย่างข้าวเจ้า และข้าวเหนียว) (m) ปริมาณแอมิโลส (o) ค่า RAG (n) ค่า SAG

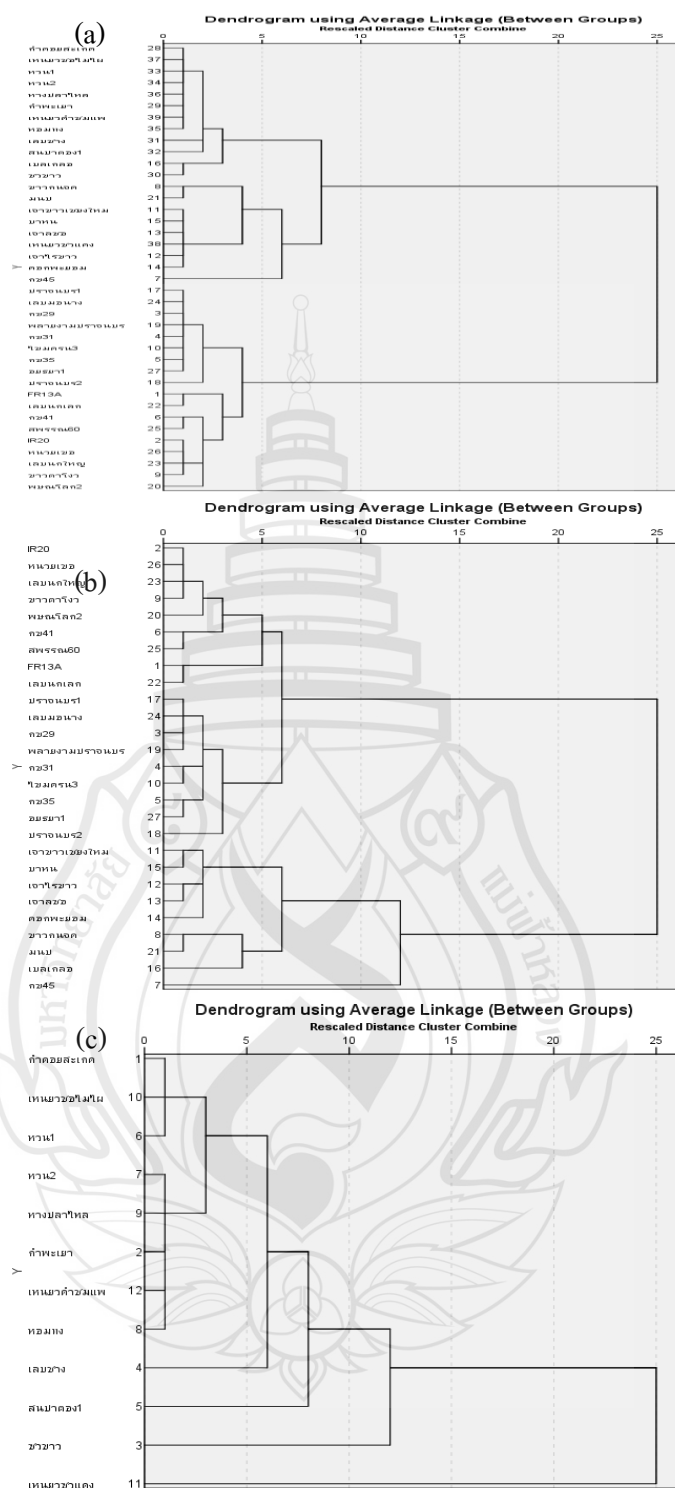


Significantly different between the group at $p < 0.05$

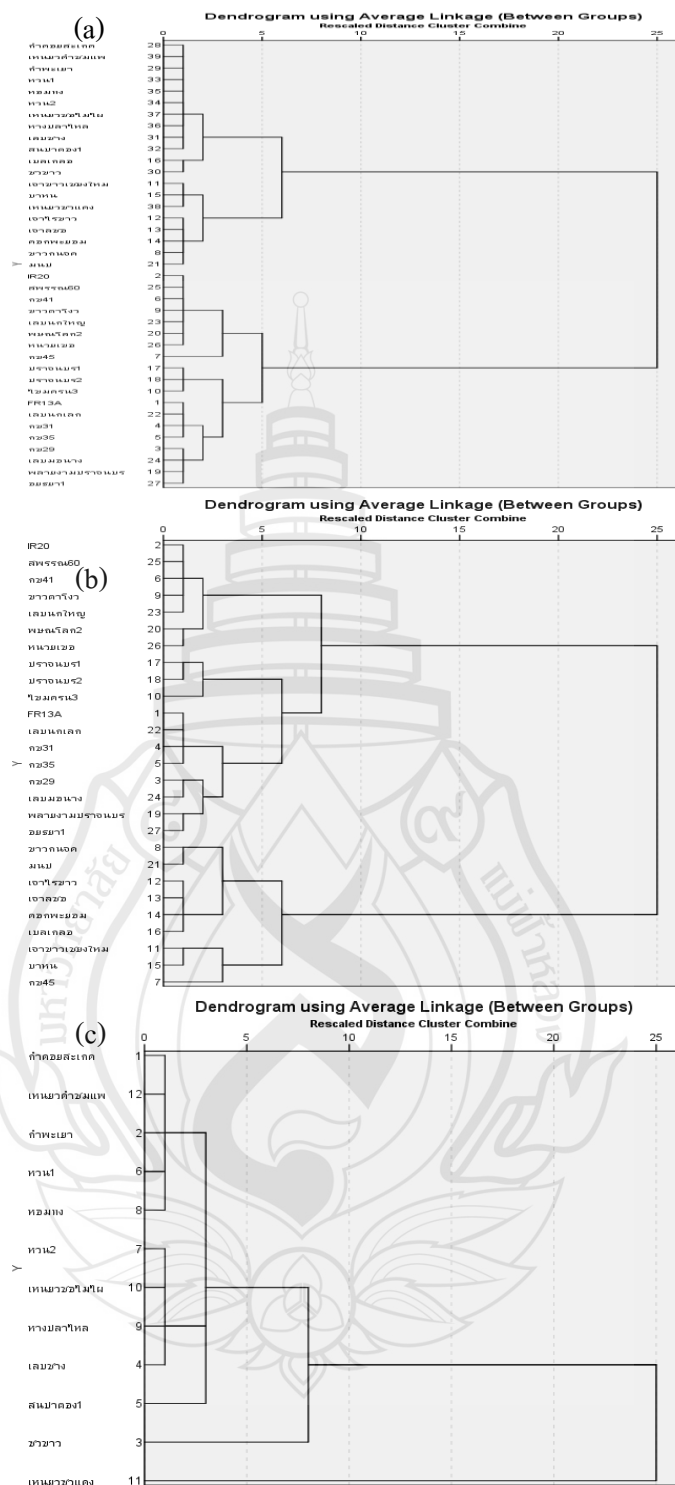
ภาพที่ ๓13 แบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนแบบเบสเดี่ยวของยีน *SSIIa* (แยกตัวอย่างข้าวเจ้า และ ข้าวเหนียว) (p) ปริมาณแอมิโลส (q) ค่า RAG (r) ค่า SAG



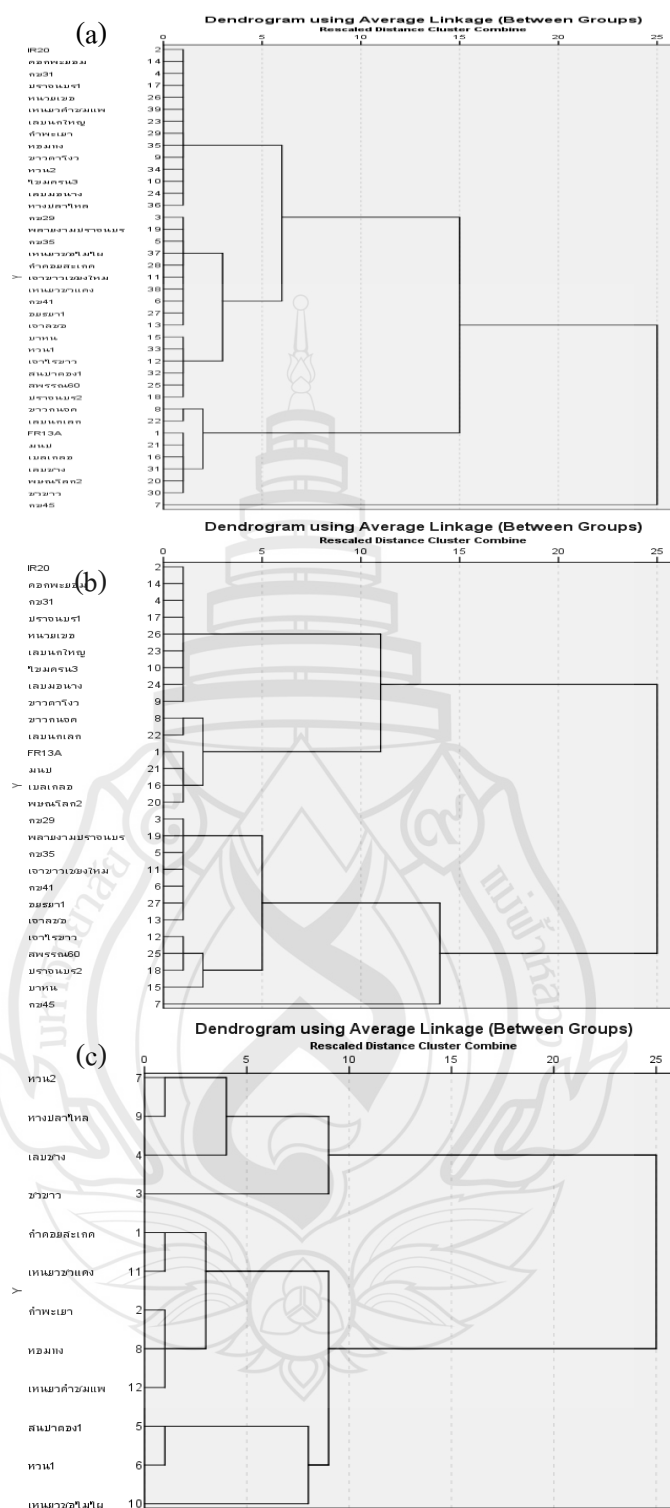
ภาพที่ 14 การจัดกลุ่มตามปริมาณเอมิโดส ค่า RAG และค่า SAG ของตัวอย่างข้าวไทย (a) เฉพาะข้าวเจ้า (27 สายพันธุ์) (b) เฉพาะข้าวเหนียว (12 สายพันธุ์) โดยใช้ Cluster analysis



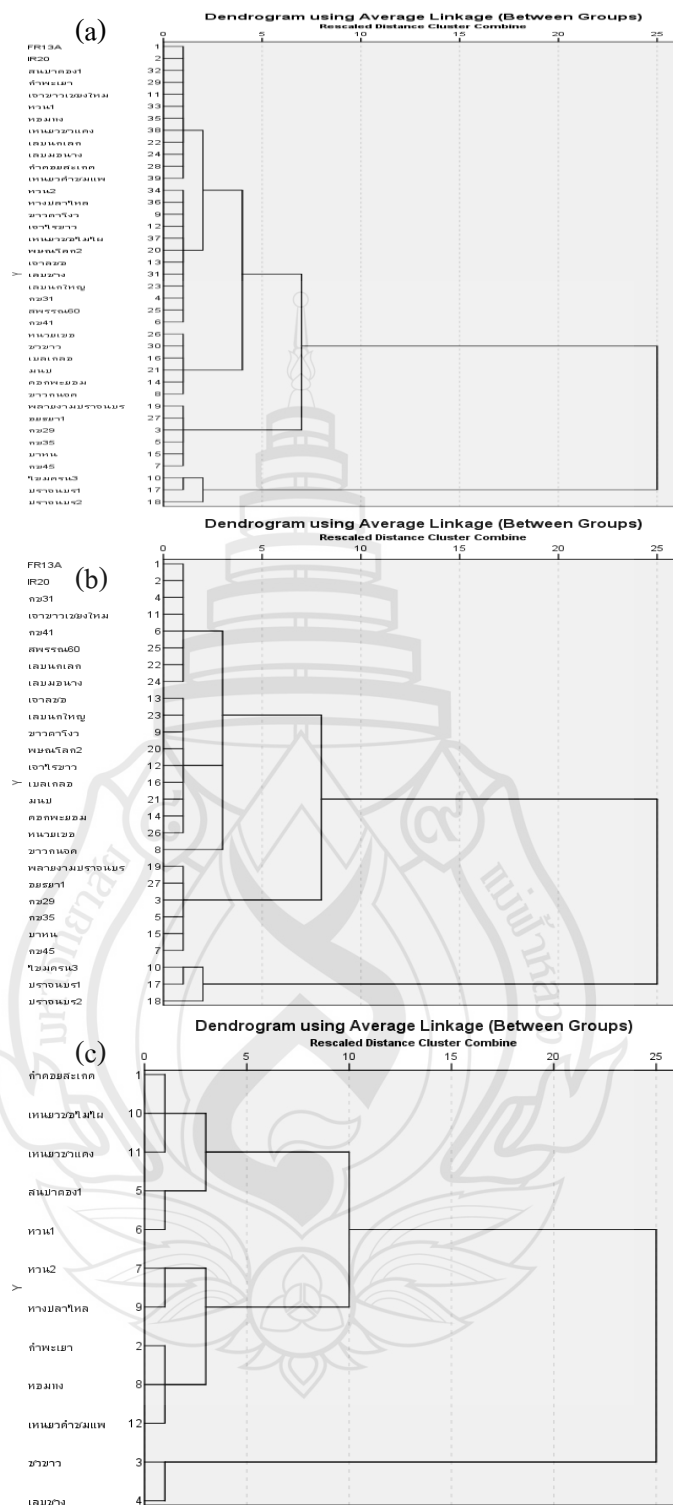
ภาพที่ 16 การจัดกลุ่มตามปริมาณเอมิโลส และค่า RAG (a) ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ (b) เฉพาะข้าวเจ้า (27 สายพันธุ์) (c) เฉพาะข้าวเหนียว (12 สายพันธุ์) โดยใช้ Cluster analysis



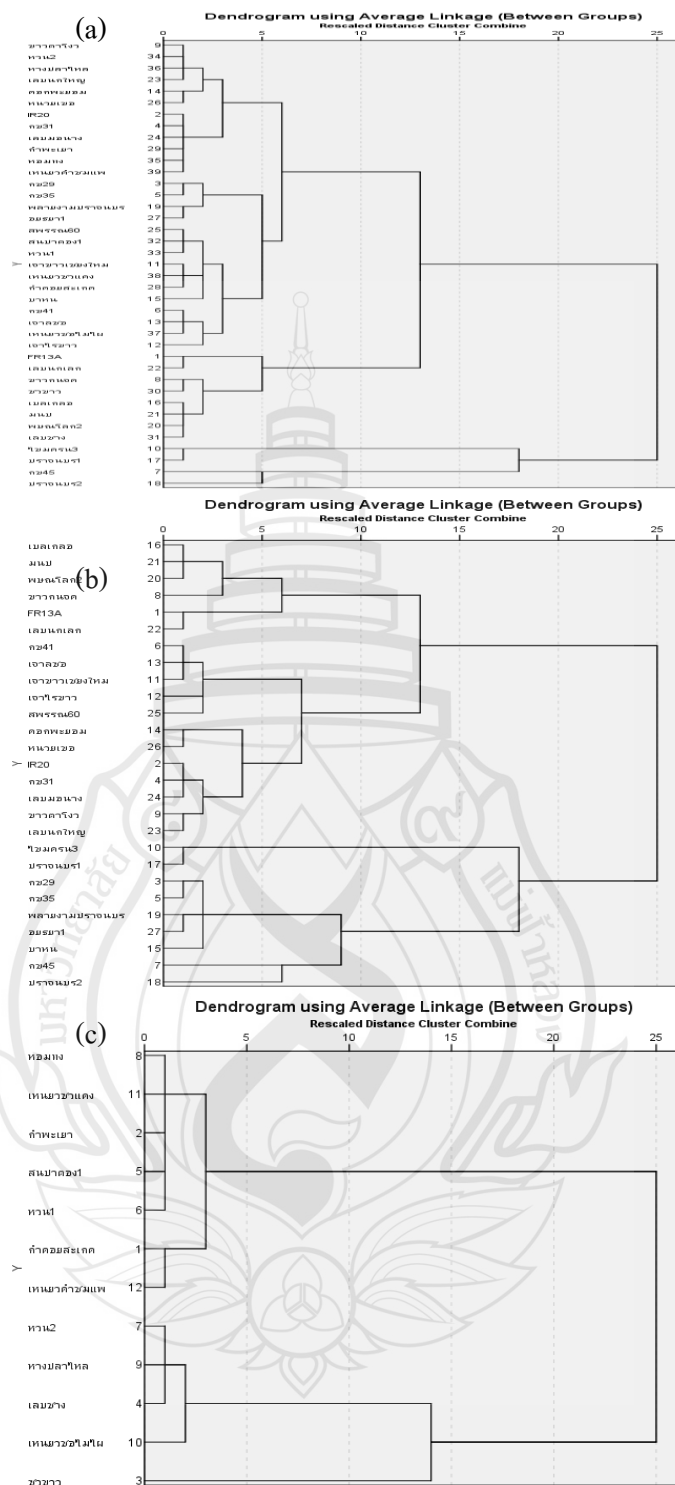
ภาพที่ 17 การจัดกลุ่มตามปริมาณเอมิโลส และค่า SAG (a) ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ (b) เฉพาะข้าวเจ้า (27 สายพันธุ์) (c) เฉพาะข้าวเหนียว (12 สายพันธุ์) โดยใช้ Cluster analysis



ภาพที่ 18 การจัดกลุ่มตามค่า RAG (a) ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ (b) เฉพาะข้าวเจ้า (27 สายพันธุ์) (c) เฉพาะข้าวเหนียว (12 สายพันธุ์) โดยใช้ Cluster analysis



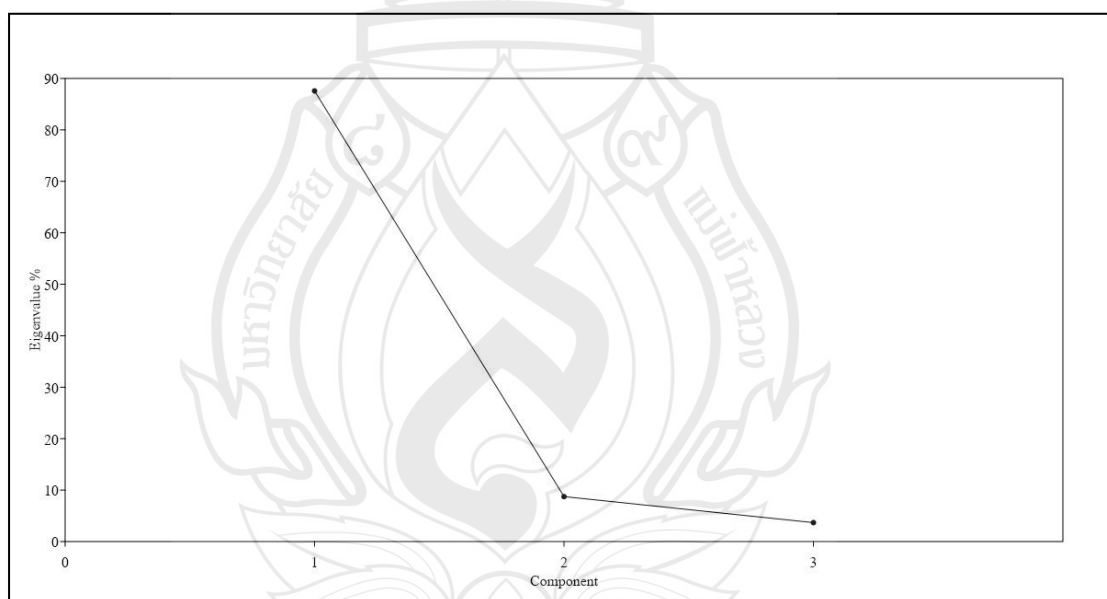
ภาพที่ 19 การจัดกลุ่มตามค่า SAG (a) ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ (b) เฉพาะข้าวเจ้า (27 สายพันธุ์) (c) เฉพาะข้าวเหนียว (12 สายพันธุ์) โดยใช้ Cluster analysis



ภาพที่ ก20 การจัดกลุ่มตามค่า RAG และค่า SAG (a) ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์ (b) เฉพาะข้าวเจ้า (27 สายพันธุ์) (c) เฉพาะข้าวเหนียว (12 สายพันธุ์) โดยใช้ Cluster analysis

ตารางที่ ก2 ค่าน้ำหนักองค์ประกอบแต่ละตัวแปรของปัจจัยของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

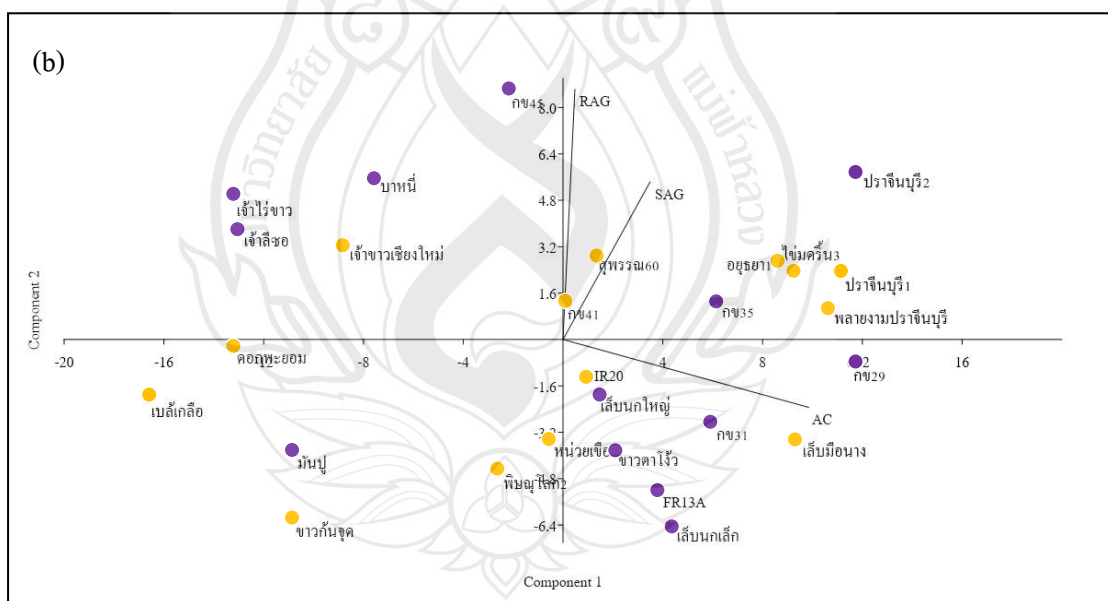
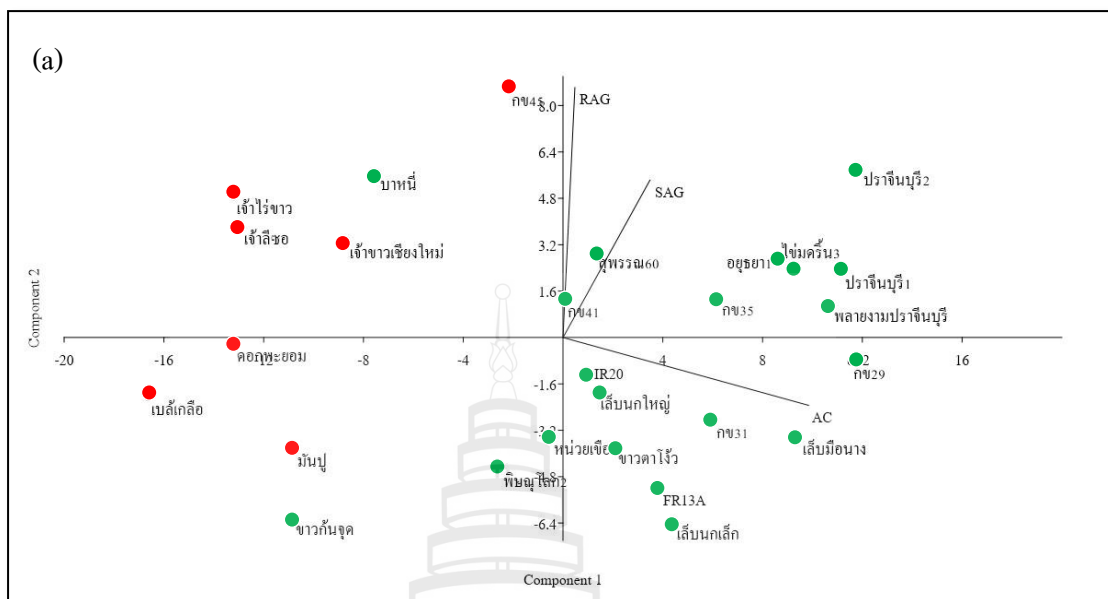
ตัวแปร	องค์ประกอบ		
	1	2	3
ปริมาณแอมิโลส	0.99	-0.11	-0.10
ค่า RAG	0.02	0.77	-0.64
ค่า SAG	0.15	0.63	0.76
Eigenvalue	151.28	15.09	6.37
% Variance	87.58	8.74	3.69



ภาพที่ ก21 กราฟ Scree plot ซึ่งพล็อตค่า Eigenvalues ของแต่ละองค์ประกอบโดยเรียงจากมากไปน้อยของข้อมูลตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

ตารางที่ 33 ค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรในปัจจัยที่สกัดออกมาได้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบเมื่อมีการหมุนแกนปัจจัยโดยใช้วิธี Varimax ของตัวอย่างข้าวไทยจำนวน 39 สายพันธุ์

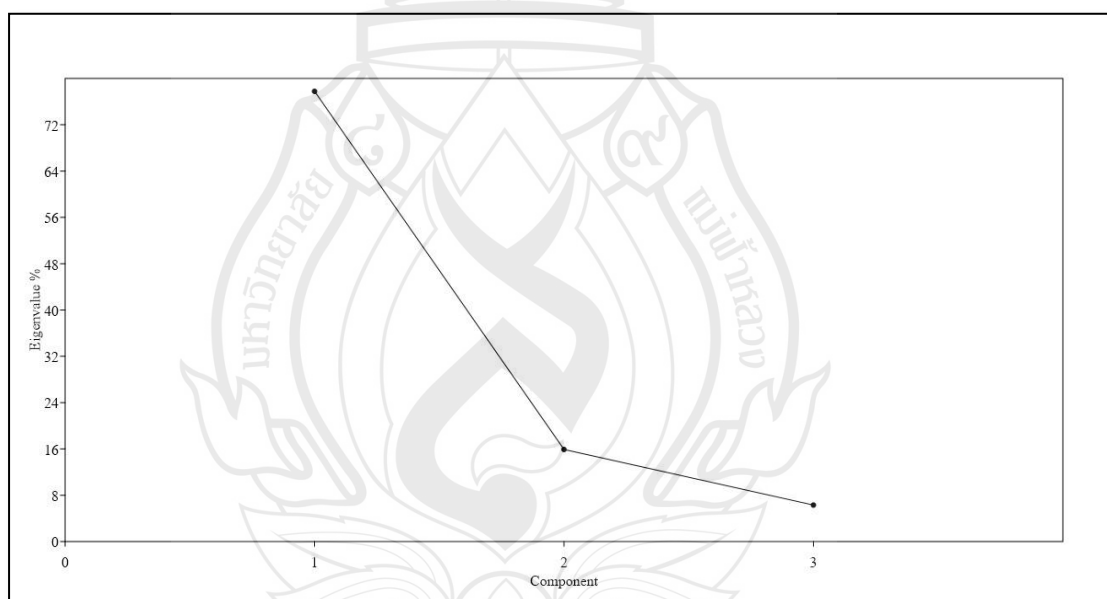
ลำดับ	สายพันธุ์	องค์ประกอบ			ลำดับ	สายพันธุ์	องค์ประกอบ		
		1	2	3			1	2	3
1	FR13A	10.75	-4.91	1.86	25	สุพรรณบุรี60	7.87	2.33	-4.49
2	IR20	7.73	-1.51	-0.33	26	หน่วยเชื้อ	6.98	-4.27	-4.15
3	กข29	18.13	0.2	-0.73	27	อยุธยา1	14.53	3.29	-0.01
4	กข31	12.96	-2.57	-1.15	28	กำแพงเพชรเก็ด	-15.24	3.84	1.37
5	กข35	12.5	1.74	-0.44	29	กำแพงเขา	-14.94	1.93	1.44
6	กข41	6.69	0.61	-3.17	30	ชีวาขาว	-12.36	-5.82	0.91
7	กข45	3.32	7.6	-2.63	31	เล็บช้าง	-17.51	-2.63	3.34
8	ขาวกันจุด	-3.51	-8.06	-0.53	32	สันป่าตอง1	-12.64	4.81	-1.48
9	ขาวตาโง้ว	9.24	-4.03	-1.71	33	หวัน1	-16.41	4.24	-0.64
10	ไข่มดรีน3	14.06	3.89	7.46	34	หวัน2	-15.71	-1.16	1.02
11	เจ้าขาวเขียงใหม่	-2.59	1.66	-1.33	35	หอมทุ่ง	-16.88	2.06	2.16
12	เจ้าไร่ขาว	-6.89	2.31	-4.45	36	หางปลาไหล	-16.6	-1.31	1.46
13	เจ้าลีซอ	-6.77	1.49	-2.18	37	เหนียวช่อไม้ไฟ	-16.14	1.3	-1.76
14	ดอกพะยอม	-6.52	-2.53	-1.95	38	เหนียวขาวแดง	-4.77	2.3	-0.49
15	บาหนี่	-1.8	4.24	-0.6	39	เหนียวดำชุมแพ	-14.55	2.01	2.95
16	เบิ้ลเกลื่อ	-10.12	-4.54	1.05					
17	ปราจีนบุรี1	16.37	3.84	5.96					
18	ปราจีนบุรี2	17.36	7.02	0.57					
19	พลาขงามปราจีนบุรี	16.82	2.23	0.95					
20	พิษณุโลก2	4.54	-5.28	-0.09					
21	มันปู	-3.89	-5.6	0.49					
22	เล็บนกเล็ก	11.24	-5.85	3.5					
23	เล็บนกใหญ่	8.31	-2.26	-1.93					
24	เล็บมือนาง	16.42	-2.63	-0.28					



ภาพที่ ก22 การกระจายตัวของตัวอย่างข้าวไทยเฉพาะข้าวเจ้า (27 สายพันธุ์) ตามลักษณะความแปรปรวนแบบเบสเดียวของ (a) ยีน *Waxy* ในตำแหน่ง Intron1 (b) ยีน *SSIIa*

ตารางที่ ก4 ค่าน้ำหนักองค์ประกอบแต่ละตัวแปรของปัจจัยของตัวอย่างข้าวไทยเฉพาะตัวอย่างข้าว
เจ้าจำนวน 27 สายพันธุ์

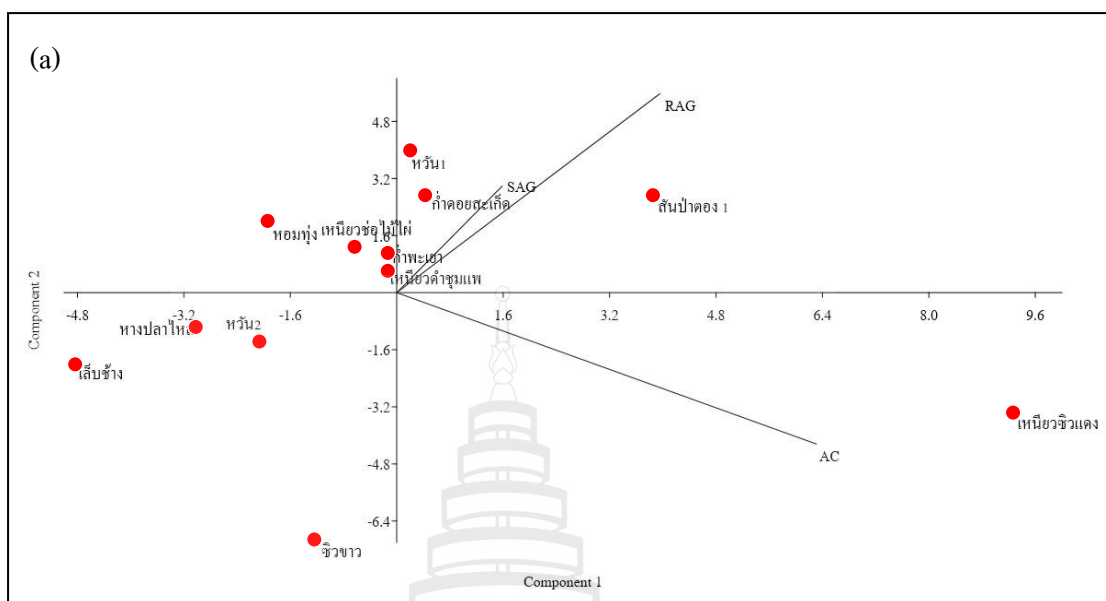
ตัวแปร	องค์ประกอบ		
	1	2	3
ปริมาณแอมิโลส	0.94	-0.22	0.25
ค่า RAG	0.05	0.82	0.56
ค่า SAG	0.33	0.52	-0.79
Eigenvalue	78.79	16.12	6.39
% Variance	77.78	15.91	6.31



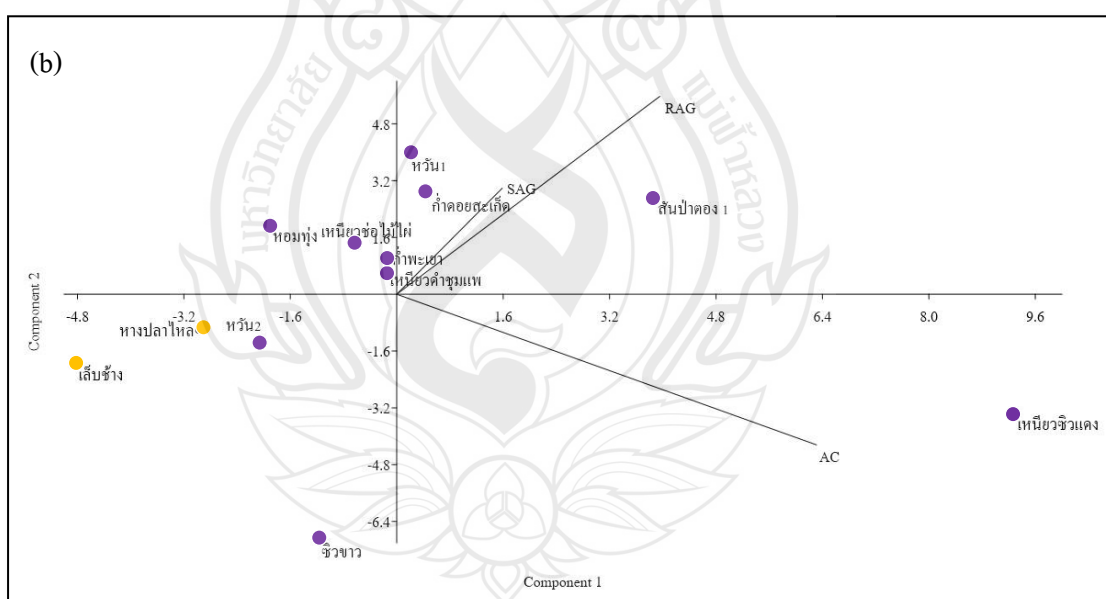
ภาพที่ ก23 กราฟ Scree plot ซึ่งพล็อตค่า Eigenvalues ของแต่ละองค์ประกอบ โดยเรียงจากมากไป
น้อยของข้อมูลเฉพาะตัวอย่างข้าวเจ้าจำนวน 27 สายพันธุ์

ตารางที่ ก5 ค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรในปัจจัยที่สกัดออกมาได้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบเมื่อมี
การหมุนแกนปัจจัยโดยใช้วิธี Varimax ของตัวอย่างข้าวไทยเฉพาะตัวอย่างข้าวเจ้า
จำนวน 27 สายพันธุ์

ลำดับ	สายพันธุ์	องค์ประกอบ			ลำดับ	สายพันธุ์	องค์ประกอบ		
		1	2	3			1	2	3
1	FR13A	3.88	-5.21	-1.21	25	สุพรรณบุรี60	1.28	2.97	4.01
2	IR20	1.12	-1.24	0.23	26	หน่วยเจ้า	-0.49	-3.45	4.13
3	กข29	11.53	-0.85	1.93	27	อยุธยา1	8.52	2.59	0.45
4	กข31	6.01	-2.87	1.87					
5	กข35	6.26	1.36	0.72					
6	กข41	0.04	1.29	2.7					
7	กข45	-2.21	8.56	1.08					
8	ขาวกันจุด	-10.86	-6.23	-0.59					
9	ขาวตาไว้ว	2.08	-3.78	2.02					
10	ไข่มดรีน3	9.09	2.44	-7.04					
11	เจ้าขาวเขียงใหม่	-8.69	3.32	-0.51					
12	เจ้าไร่ขาว	-13.21	4.85	1.9					
13	เจ้าลิซอ	-12.92	3.79	-0.24					
14	ดอกพะยอม	-13.21	-0.23	-0.09					
15	บาหนี่	-7.45	5.69	-1.35					
16	เบสเกสือ	-16.65	-2.07	-3.38					
17	ปราจีนบุรี1	11.17	2.26	-5.23					
18	ปราจีนบุรี2	11.9	5.84	-0.05					
19	พลาขามปราจีนบุรี	10.74	1.14	-0.09					
20	พิษณุโลก2	-2.51	-4.57	-0.13					
21	มันปู	-10.76	-3.86	-1.86					
22	เล็บนกเล็ก	4.44	-6.38	-2.67					
23	เล็บนกใหญ่	1.39	-1.88	1.95					
24	เล็บมือนาง	9.5	-3.47	1.49					



- สายพันธุ์ข้าวไทยที่มีความเกี่ยวข้องกับยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 เป็นเบส G
- สายพันธุ์ข้าวไทยที่มีความเกี่ยวข้องกับยีน *Waxy* ที่ตำแหน่ง Intron1 เป็นเบส T

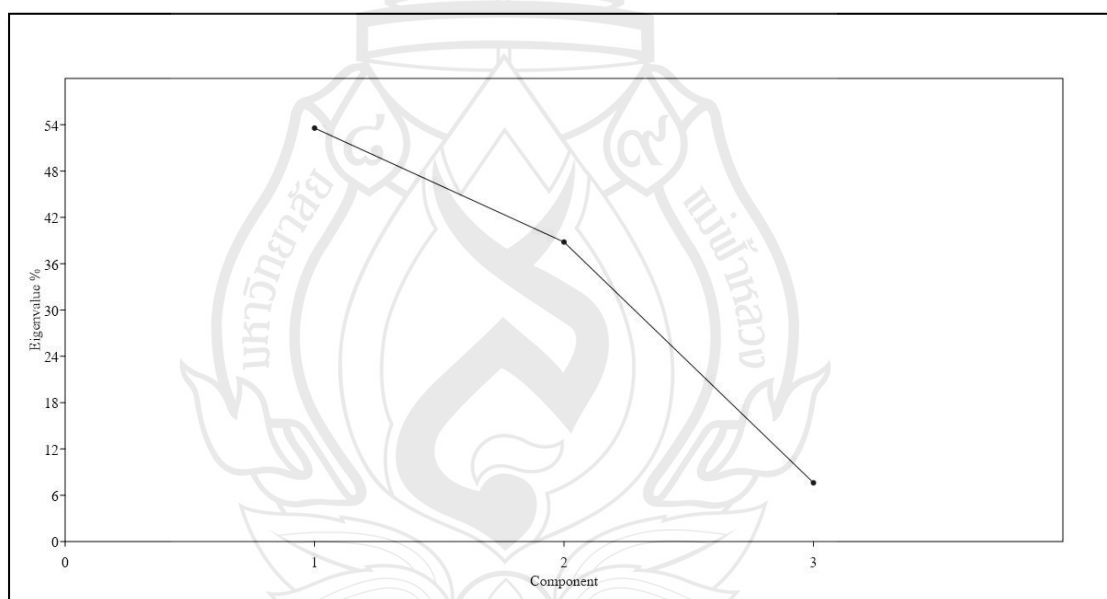


- สายพันธุ์ข้าวไทยที่มีความเกี่ยวข้องกับยีน *SSIIa* ที่มีความแปรปรวนเป็นแบบ GC
- สายพันธุ์ข้าวไทยที่มีความเกี่ยวข้องกับยีน *SSIIa* ที่มีความแปรปรวนเป็นแบบ TT

ภาพที่ ก24 การกระจายตัวของตัวอย่างข้าวไทยเฉพาะข้าวเหนียว (12 สายพันธุ์) ตามลักษณะความแปรปรวนแบบเบสเดียวของ (a) ยีน *Waxy* ในตำแหน่ง Intron1 (b) ยีน *SSIIa*

ตารางที่ 6 ค่าน้ำหนักองค์ประกอบแต่ละตัวแปรของปัจจัยของตัวอย่างข้าวไทยเฉพาะตัวอย่างข้าวเหนียวจำนวน 12 สายพันธุ์

ตัวแปร	องค์ประกอบ		
	1	2	3
ปริมาณแอมิโลส	0.83	-0.56	0.05
ค่า RAG	0.52	0.73	-0.44
ค่า SAG	0.21	0.39	0.90
Eigenvalue	13.03	9.44	1.85
% Variance	53.57	38.81	7.62



ภาพที่ 25 แสดงกราฟ Scree plot ซึ่งพล็อตค่า Eigenvalues ของแต่ละองค์ประกอบโดยเรียงจากมากไปน้อยของข้อมูลตัวอย่างเฉพาะตัวอย่างข้าวเหนียวจำนวน 12 สายพันธุ์

ตารางที่ ก7 ค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรในปัจจัยที่สกัดออกมาได้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบเมื่อมีการหมุนแกนปัจจัยโดยใช้วิธี Varimax ของตัวอย่างข้าวไทยเฉพาะตัวอย่างข้าวเหนียวจำนวน 12 สายพันธุ์

ลำดับ	สายพันธุ์	องค์ประกอบ		
		1	2	3
1	กำดอยสะเก็ด	0.48	2.81	0.98
2	กำพะเยา	-0.12	0.99	0.68
3	ชีวขาว	-1.18	-6.93	-1.05
4	เล็บช้าง	-4.83	-1.95	1.07
5	สันป่าตอง1	3.88	2.72	-1.08
6	หวัน1	0.17	3.94	-1.07
7	หวัน2	-2.04	-1.28	-0.52
8	หอมทุ่ง	-1.91	1.97	1.06
9	หางปลาไหล	-2.99	-1.03	-0.29
10	เหนียวข่อยไม้ไผ่	-0.61	1.37	-2.73
11	เหนียวชีวแดง	9.28	-3.34	0.72
12	เหนียวคำชุมแพ	-0.14	0.72	2.22

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. NaCl เข้มข้น 1 โมลาร์ (Mw = 58.44 g/Mole)

เตรียมในปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ชั่ง	NaCl	29.22	กรัม
------	------	-------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. 10% CTAB

เตรียมในปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่ง	CTAB	5.0	กรัม
	1M NaCl	35.0	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. 70% Ethanol

เตรียมในปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ตวง	95% Ethanol	368.42	มิลลิลิตร
-----	-------------	--------	-----------

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์: pH 8.0 (Mw = 121.14 g/Mole)

เตรียมในปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ชั่ง	Tris-HCl	30.285	กรัม
------	----------	--------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (เพราะจะเริ่มละลายได้ดีใน pH 8.0) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์: pH 8.0 (Mw = 292.24 g/Mole)

เตรียมในปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ชั่ง	EDTA	73.06	กรัม
------	------	-------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. 1% CTAB

เตรียมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตวงสาร	10 % CTAB	10.0	มิลลิลิตร
	700 Mm NaCl	70.0	มิลลิลิตร
	10 Mm Tris- HCl pH 8.0	2.0	มิลลิลิตร
	50 Mm EDTA pH 8.0	10.0	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1)

เตรียมในปริมาตร 400 มิลลิลิตร

ตวงสาร	Chloroform	384.0	มิลลิลิตร
	Isoamyl alcohol	16.0	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในภาชนะที่ผ่านการนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. TE buffer

เตรียมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตวง	10 mM Tris-HCl pH 8.0	2.0	มิลลิลิตร
	10 mM EDTA pH 8.0	2.0	มิลลิลิตร
	น้ำ DI	96.0	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. 50X TAE buffer (Tris-Acetate EDTA buffer)

เตรียมในปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ชั่ง	Tris-acetate (MW 242.289)	121.14	กรัม
เติม	0.5 M EDTA pH 8.0	50.00	มิลลิลิตร
	กรดกลูเซออะซิติก	28.65	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Ethidium bromide ความเข้มข้น 50 µg/ml

เตรียมในปริมาตร 200 มิลลิลิตร

ตวงสาร	Ethidium bromide (10 mg/ml)	100.0	ไมโครลิตร
--------	-----------------------------	-------	-----------

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บไว้ในภาชนะที่ทึบแสงหรือภาชนะที่หุ้มด้วยแผ่นฟอยล์อะลูมิเนียมที่อุณหภูมิห้อง

11. 6X loading buffer

เตรียมในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งสาร	Bromophenol blue	0.025	กรัม
	Xylene cyanol	0.025	กรัม
เติม	Glycerol	3.000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมด เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12. Sodium hydroxide (NaOH) เข้มข้น 2 โมลาร์

เตรียมในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง	NaOH	80.0	กรัม
------	------	------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

13. Glacial acetic acid (CH₃COOH) เข้มข้น 2 โมลาร์

เตรียมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลาย	กรดกลูเซออะซิติก	6.0	มิลลิลิตร
-------	------------------	-----	-----------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

14. Iodine solution

เตรียมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งสาร Iodine	0.20	กรัม
Potassium iodide	2.00	กรัม

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 80 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนหรือจนกว่าไอโอดีนจะละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

15. Calcium chloride

เตรียมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Calcium chloride	14.698	กรัม
-----------------------	--------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

16. Acetic acid เข้มข้น 1 โมลาร์

เตรียมในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตวง กรดกลูเซอซีติก	0.575	มิลลิลิตร
--------------------	-------	-----------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

17. Sodium acetate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์: pH 5.2

เตรียมในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง Benzoic acid	0.725	กรัม
-------------------	-------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร (จะได้สารละลาย Benzoic acid) จากนั้น

ชั่ง Sodium acetate trihydrate	13.6	กรัม
--------------------------------	------	------

นำมาละลายในสารละลาย Benzoic acid ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่า pH เป็น 5.2 ด้วย acetic acid ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นเติมสารละลาย Calcium chloride ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน

18. HCl เข้มข้น 0.05 โมลาร์

เตรียมในปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ตวงสาร 37% HCl	1.042	มิลลิลิตร
----------------	-------	-----------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

19. Pepsin solution

เตรียมในปริมาตร 50 มิลลิลิตร สำหรับ 5 ตัวอย่าง

วิธีการเตรียม สารละลาย Pepsin (ต้องเตรียมใหม่ก่อนทำการทดลองทุกครั้ง)

ซังสาร	Pepsin	0.25	กรัม
	Guar gum	0.25	กรัม
	0.05 M HCl	50.00	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในภาชนะ

20. Enzyme mixer

เตรียมในปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ต้องเตรียมใหม่ก่อนทำการทดลองทุกครั้ง)

ซัง	Pancreatin	1.5	กรัม
-----	------------	-----	------

ผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร ให้เข้ากันในหลอดปั่นเหวี่ยงกันกลมขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวใส่ลงในหลอดใหม่ จากนั้น

เติม	Amyloglucosidase; (AMG)	0.933	มิลลิลิตร
------	-------------------------	-------	-----------

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในภาชนะ

21. 66% Ethanol

เตรียมในปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ดูด	95% เอทานอล	347.4	มิลลิลิตร
-----	-------------	-------	-----------

จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

22. Invertase เข้มข้น 0.1 mg/ml

เตรียมในปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ซัง	Invertase	0.005	กรัม
-----	-----------	-------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ภาคผนวก ค

การนำเสนอ และตีพิมพ์ผลงานวิจัยบางส่วนในงานประชุมวิชาการ

ผลงานการนำเสนอ Poster presentation จากการเข้าร่วมประชุมวิชาการ ในงานการประชุมวิชาการนานาชาติ ครั้งที่ ๒๖ (The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference “3Bs: Biodiversity, Biotechnology and Bioeconomy”) มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง เชียงราย ระหว่างวันที่ 26-29 พฤศจิกายน พ.ศ. 2557





Rapidly Available Glucose (RAG) and Waxy Haplotype as Indicators for Glycemic Index in Some Lowland and Upland Thai Rice Varieties (*Oryza sativa* L.)

Angwara Sriheara,¹ Nittaya Laosat,¹ Suraphichaya Kitiraj,¹ Rungarun Sasanatayart,² Kongkiat Kespechara,³ Siam Popluechai^{1,*}

¹School of Science, Mae Fah Luang University, Tasud, Chiang Rai 57100, Thailand

²School of Agro-industry, Mae Fah Luang University, Tasud, Chiang Rai 57100, Thailand

³Sooksatharana (Social Enterprise) Co., Ltd, 88/9 Moo 2, Muang, Phuket 83000, Thailand

*e-mail: siam@mfu.ac.th

Abstract

Glycemic index (GI) is generally used as an indicator for the response of blood sugar levels after food consumption. It was found that amylose content (AC) is a key factor that affects the rate of starch digestion and GI values. Previous studies indicated that amylose content in rice can be determined by Waxy haplotype at intron1 (In1G/T) and exon6 (Ex6 A/C). The rapidly available glucose (RAG) has also been reported to be used as an indicator of the GI, low RAG indicates a lower GI. However, Waxy haplotype and starch digestive properties in Thai rice have rarely been studied. The objective of this study was to rapidly evaluate available glucose and Waxy haplotype for GI indicators in Thai rice varieties. The results showed that four varieties of Thai rice contain high AC harboring G-A haplotype, nine varieties contain intermediate AC harboring G-C haplotype and thirteen varieties contain low AC harboring T-A or T-C haplotype. Furthermore, G-A exhibited significantly low RAG value (at $p < 0.05$) compared to G-C haplotype, T-A haplotype and T-C haplotype. The study suggested that RAG, Waxy haplotype and AC can be used as an indicator of GI in Thai rice germplasm.

Keywords: Thai rice, rapidly available glucose, Waxy haplotype, amylose

Introduction

The prevalence of diabetes and chronic diseases in Thai people is increasing because over food consumption. Rice is the main staple containing 80% of starch (Wani et al., 2012). It has been reported that eating rice could increase the risk of type 2 Diabetes (Courage, 2010). Therefore, rice might play an important role in lowering the risk of getting this disease. Carbohydrate in rice composed of the two glucose polymers, amylose and amylopectin, respectively (Champagne, 1996). Amylose is controlled by Waxy gene, which codes for granule bound starch synthase (GBSS) (Chen et al., 2008). In rice, amylose content (AC) is a key factor that affects the rate of starch digestion and Glycemic index (GI) (Kharabian-Masouleh et al., 2012). Previous studies found that Waxy haplotype at intron1 (In1G/T) and exon6 (Ex6 A/C) can be used for determining of AC in rice (Chan et al., 2008; Larkin et al., 2003; Kharabian-Masouleh et al., 2012). At intron1, the Guanine (G) to Thymine (T) mutation at the 5'-leader intron splice site (Hirano et al., 1998) can be used to distinguish low AC (harboring T) from high AC (harboring G). However, Waxy haplotype at intron1 is insufficient to explain the genetic variations of AC in rice (Cheng et al., 2012). Larkin and Park (2003) reported that a change at exon 6 (A/C SNP) could be used to distinguish the intermediate AC (harboring C) from high AC (harboring A). AC in rice was successfully classified (Chen et al., 2008) which composed of 4 haplotypes; including (In1T- Ex6A), (In1G- Ex6C), (In1G- Ex6A) and (In1G- Ex6A). Fitzgerald et al., (2011) found that the amount of AC, Waxy haplotype and digestibility of rice are significantly correlated.



Accordingly, this can be used for indicating of the quality of the rice, which helps to select appropriate varieties for diabetes. Moreover, Jenkins et al., (2002) found that food with low

GI could reduce the risk of diabetes and also coronary heart disease. The rice/flour with high AC tend to have low GI which has a benefit for people with diabetes since carbohydrates in rice are slowly digested and absorbed (Frei et al., 2003). GI is generally used as an indicator for the responses of blood sugar levels after eating, which can be measured by rapidly available glucose (RAG). It has been reported that the RAG can be use as an indicator of the GI (99%) (Englyst et al., 1999). However, the study of Waxy haplotype and starch digestive property in Thai rice is still limited nevertheless there is a study of Charoensiri et al., (2008) which RAG values were determined in 49 varieties of Thai rice. Consequently, Waxy haplotype, RAG and SAG might be use as biomarkers for healthy carbohydrate investigation (Healthy food) and rice variety selection with low GI, for an alternative approach to prevent and reduce diabetes problems. The objective of this study was to rapidly evaluate available glucose and Waxy haplotype for GI indicators in Thai rice varieties.

Methodology

Rice sample

Glutinous and non-glutinous rice (*Oryza sativa* L.) including twenty-six Thai rice varieties obtained from Sooksatharana Company Ltd. and four Rice Research Centers including (Chiang rai, Pathumthani, Phitsanulok and Phatthalung)

Single Nucleotide Polymorphism of Waxy gene

Rice grains were germinated and genomic DNA extracted from leaves using the CTAB method (Doyle, 1991). The PCR amplification of the Waxy were performed using the G/T polymorphism at intron1 of the Waxy (In1 G/T SNP) as previously described by (Ayes et al., 1997), the A/C polymorphism at exon6 of the Waxy (Ex6 A/C SNP) previously described by (Fitzgerald et al., 2011) and PCR product quality analysis by gel electrophoresis on 2.0 % agarose gel. The sequences of primers showed in Table 1.

Table 1: List of Primers

Primer name	Sequence (5'→3')	Tm(°C)	Restriction enzyme	References
Waxy(In1)190F	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	47.8	AccI	(Ayes et al., 1997)
Waxy(In1)W2R	TTTCCAGCCCCAACACCTTAC	55.3		
Waxy(Ex6)-F	CCCATACTTCAAAGGAACATA	48.5	-	(Fitzgerald et al., 2011).
Waxy(Ex6)-R	GGTTGGAAGCATCACGAGTT	51.8		
Waxy(Ex6)-R	T CTTCAGG TAGCTCGCCAGT	53.8		

Amylose content (AC) analysis

Rice grains were ground in an electric coffee grinder (PHILIPS HR 2001) 220-240V., 350W. Amylose content was determined using iodine spectrophotometer method previously described by Juliano (1985).

In vitro rapidly available glucose (RAG) and slowly available glucose (SAG)

Cooked rice, rice and distilled water were prepared in ratio of 1:3 using boiling water bath (Memmert) at 95±5°C for 30 minutes. After that, the cooked rice was ground for RAG and SAG analysis and determined by using method modified from Englyst et al., (1999).



Statistical analysis

All statistical analyses were performed using IBM SPSS statistics software program version 21.0 (Purchase Order: 10-58878) for analysis of variance (ANOVA) means were compared using the Duncan's multiple comparison tests. Correlation of RAG, SAG and their AC of Thai rice were analyzed by Pearson's correlation was used to measure the linear correlation between parameters at 95% confident interval, significance level $P \leq 0.05$.

Results

The results show four varieties harboring G-A include Chainat1, Leb Nok Lek, Phitsanulok2, and RD31. Nine varieties harboring G-C include Ba Nie, Basmati, FR13A, Khao Ta Kong, Leb Nok Yai, Nui Khuea, RD35, RD41, and Suphan Buri60, respectively.

Table 2: Waxy haplotype, AC, RAG and SAG of twenty-six Thai rice varieties

Varieties	Waxy (In1-Ex6)		g/100g cooked rice		AC%
			RAG	SAG	
Chainat1	G	A	15.72±1.50 ^{bcdefg}	11.43±2.14 ^g	23.46
Leb Nok Lek	G	A	10.42±0.62 ^a	6.99±0.62 ^{cdef}	32.46
Phitsanulok2	G ^c	A	13.03±1.55 ^{abc}	3.61±2.26 ^{abc}	26.15 ^c
RD31	G	A	15.94±2.27 ^{cdefg}	5.76±1.22 ^{bcdef}	34.29
Ba Nie	G	C	20.57±2.39 ^{ij}	8.25±2.38 ^{efg}	18.89
Basmati	G	C	16.36±2.57 ^{cdefg}	2.76±1.63 ^{ab}	25.13
FR13A	G	C	12.18±1.95 ^{ab}	6.26±1.11 ^{bcdef}	32.04
Khao Ta Kong	G	C	15.10±2.05 ^{bcde}	3.86±2.67 ^{abcd}	30.83
Leb Nok Yai	G	C	16.59±1.53 ^{cdefgh}	4.67±1.08 ^{abcde}	29.74
Nui Khuea	G	C	16.44±1.25 ^{cdefg}	1.51±0.85 ^a	28.87
RD35	G	C	18.80±3.82 ^{efghij}	8.94±3.20 ^{fg}	33.29
RD41	G	C	19.57±0.99 ^{ghij}	5.28±1.19 ^{abcdef}	27.95
Suphan Buri 60	G	C	21.75±0.35 ^j	5.53±1.03 ^{bcdef}	29.07
Hang Pla Lai ^a	T	A	14.72±2.77 ^{bcd}	4.12±3.52 ^{abcd}	4.65
Hawm Thung ^a	T ^c	A	16.87±2.71 ^{cdefghi}	6.73±2.08 ^{cdef}	3.94 ^c
Homnin Surin	T	A ^b	15.33±0.63 ^{bcdef}	2.76±0.92 ^{ab}	15.53
Kam Doi Saket ^a	T	A	18.77±1.87 ^{efghij}	7.49±2.19 ^{def}	5.45
Kam Phayao ^a	T	A	17.26±2.38 ^{defghi}	6.38±0.69 ^{bcdef}	5.95
Niaw Cham Mai Pai ^a	T	A	18.79±1.59 ^{efghij}	3.37±1.37 ^{abc}	5.16
Niaw Dam Chum Phae ^a	T	A	16.37±0.69 ^{cdefg}	7.65±1.01 ^{def}	6.16
Pathum Thani1	T	A	17.61±0.85 ^{defghi}	5.26±0.11 ^{abcdef}	17.51
Whan1 ^a	T ^c	A	20.34±5.37 ^{hij}	6.03±4.31 ^{bcdef}	4.46 ^c
Whan2 ^a	T ^c	A	15.13±2.30 ^{bcde}	4.01±2.46 ^{abcd}	5.56 ^c
Jow Khao Chiangmai	T	C	19.04±2.59 ^{fghij}	5.95±3.98 ^{bcdef}	18.47
Jow Lisaw	T	C	19.38±3.22 ^{ghij}	4.57±1.43 ^{abcde}	14.45
Jow Rai Khao	T	C	21.45±1.59 ⁱ	3.34±2.49 ^{abc}	14.47

^a Glutinous rice

^b Previous studies by Popluechai et al., 2012

^c Previous studies by Popluechai et al., 2013

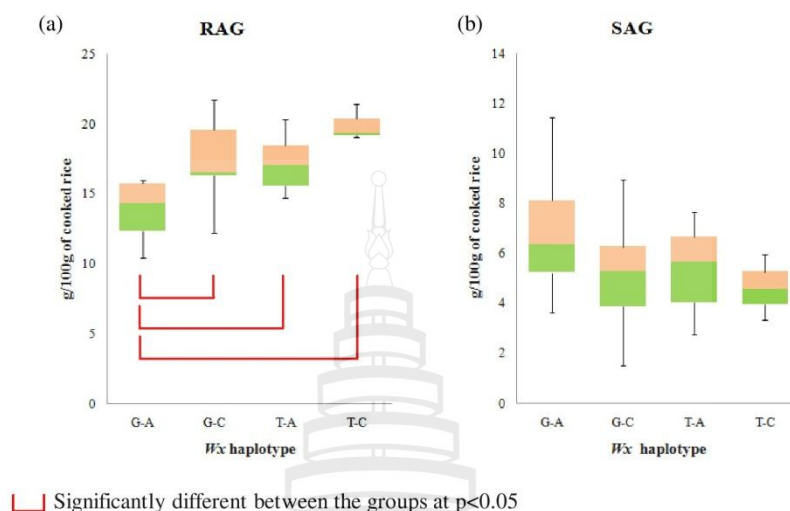


Figure 1: Digestible properties of twenty-six rice sample base on Waxy haplotype; (a) RAG, (b) SAG

Ten varieties harboring T-A include Hang Pla Lai, Hawm Thung, Homnin Surin, Kam Doi Saket, Kam Phayao, Niaw Dam Chum Phae, Niaw Cham Mai Pai, Pathum Thani1, Whan1, and Whan2, and three varieties harboring T-C include Jow Khao Chiangmai, Jow Lisaw, and Jow Rai Khao. The Amylose contents of twenty-six Thai rice varieties ranging from 3.94–34.29% (Table 2). RAG value ranging from 10.42–21.75 g/100g, and SAG value ranging from 1.51–11.43 g/100g (Figure 1). Twenty-six Thai rice varieties were classified using the Analysis of Variances (One-Way ANOVA). There were 4 haplotypes harboring G-A, G-C, T-A, and T-C, which each variety of Thai rice was classified according to the haplotype. It was found that AC (Sig=0.000) and RAG (Sig=0.018) were significantly different at $p < 0.05$, while SAG was not significantly different at $p < 0.05$. From Pearson's correlation coefficient of AC, RAG and SAG showed that there was no significant difference at $p < 0.05$.

Discussion

From the results Waxy haplotype of twenty-six Thai rice varieties can be used to classify AC in rice (Chen et al., 2008) found harboring G-A haplotype exhibit high AC whereas harboring G-C haplotype exhibit intermediate AC which the results are consistent with Larkin and Park (2003) and Chen et al., (2008). However, in this study, AC of these two groups were not significantly different at $p < 0.05$. Chen et al., (2008) have previously found a haplotype harboring T-A haplotype in non-glutinous rice samples and also found harboring T-C haplotype only in glutinous rice samples. In addition, the study found that harboring T-A haplotype exhibit low AC in non-glutinous rice samples while harboring T-C haplotype exhibit low AC in non-glutinous rice samples, which are consistent with Larkin and Park (2003) and Chen et al., (2008). Subsequently, a haplotype harboring T-C and T-A were found in glutinous rice samples (Chen et al., 2010) (Table 2).

**Table 3:** The correlation of AC, RAG and SAG of twenty-six Thai rice varieties

	AC	RAG	SAG
AC	1		
RAG	-0.264	1	
SAG	0.017	0.058	1

*Correlation is significant at the 0.05 level.

From the results revealed that AC in glutinous group were higher than previous report by Thai Rice Department. This might due to the long chains of amylopectin, which could form a complex compound with iodine (Chung et al., 2011). Furthermore, the study by Chen et al. (2008) found that variation of AC values might be affected by environment factors.

The amount of RAG and SAG were reported as glucose releases in gram per 100g of cooked rice from (Table 2). There was no difference of RAG values among twenty-six Thai rice varieties. From the data showed that Leb Nok Lek harboring G-A haplotype exhibited the lowest RAG value whereas Suphan Buri 60 harboring G-C haplotype exhibited the highest RAG value. However, there were significant differences (at $p < 0.05$) between the groups of harboring G-A haplotype compared to harboring G-C haplotype (0.016), harboring T-A haplotype (0.027) and harboring T-C haplotype (0.003). Larkin and Park (2003) have described that rice variety harboring G-C haplotype (high AC) containing low RAG value can be used for GI prediction. We also found that a haplotype harboring G-A contain low RAG value can be grouped into high AC group according to Chen et al., (2008). For the SAG values, each group of Waxy haplotype were not significantly different at $p < 0.05$. From the results obtained from Pearson's correlation coefficient found that, there were a negative correlation between AC and RAG ($r = -0.264$) and also a positive correlation between AC and SAG ($r = 0.017$), which consistent with Charoensiri et al., (2008), nevertheless, there was no significant difference at $p < 0.05$ (Table 3).

Conclusion

Waxy haplotype and RAG can be used to predict starch digestible properties such as indicators of the GI in twenty-six Thai rice varieties. But there are other factors that related to starch digestion in rice, such as resistant starch and crude fiber which will be taken into consideration as well.

Acknowledgements

The authors are Thankful to Sooksatharana Company Ltd for funded. We would like to thank Rice Research Centers for providing seed samples.

References

- Ayres N. M., McClung A. M., Larkin P. D., Park W. D. (1997). Microsatellites and single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 773-781.
- Champagne E. T. (1996). Rice starch composition and characteristics. *Cereal Foods World*, 41, 833-838.
- Chen M.-H., Bergman C. J., Pinson S. R. M., Fjellstrom, R. G. (2008). Waxy gene haplotypes: Associations with pasting properties in an international rice germplasm collection. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 781-788.



- Chen M.-H., Fjellstrom R. G., Christensen E. F., Bergman C. J. (2010). Development of three allele-specific codominant rice Waxy gene PCR markers suitable for marker-assisted selection of amylose content and paste viscosity. *Molecular Breeding*, 26(3), 513–523.
- Cheng A., Ismail I., Osman M., Hashim H. (2012). Simple and rapid molecular techniques for identification of amylose levels in rice varieties. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 6156–6166.
- Chung H.-J., Liu Q., Lee L., Wei D. (2011). Relationship between the structure, physicochemical properties and in vitro digestibility of rice starches with different amylose contents. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 968–975.
- Courage H. K. (2010). White rice raises risk of type 2 diabetes. *Observations Scientific American, Blog Network*, 14 June.
- Doyle J. J. (1991). DNA protocols for plants. In G. Hewitt, A. W. B. Johnson, and J. P. W. Young (eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy* (pp. 283–293). NATO.
- Englyst K. N., Englyst H. N., Hudson G. J., Cole T. J., Cummings J. H. (1999). Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycemic response. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 448–54.
- Fitzgerald M. A., Rahman S., Resurreccion A. P., Concepcion J., Daygon V. D., Dipti S. S., Kabir, K. A., Klingner, B., Morell, M. K., Bird, A. R. (2011). Identification of a Major Genetic Determinant of Glycaemic Index in Rice. *Rice*, 4(2), 66–74.
- Frei M., Siddhuraju P., Becker K. (2003). Studies on the in vitro starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. *Food Chemistry*, 83(3), 395–402.
- Hirano H. Y., and Sano Y. (1991). Molecular characterization of the waxy locus of rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Physiol* 32, 989–997.
- Jenkins D. J. A., Kendall C. W. C., Augustin L. S. A., Franceschi S., Hamidi M., Marchie A., Jenkins A.L., Axelsen M. (2002). Glycemic index: overview of implications in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(1), 266–273.
- Juliano B. O. (1985). Criteria and tests for rice grain qualities. In Juliano B.O. editor. *Rice Chemistry and Technology*, 2nd edition. American Association of Cereal Chemists (pp. 443–513). St. Paul, MN.
- Kharabian-Masouleh A., Waters D. L. E., Reinke R. F., Ward R., Henry R. J. (2012). SNP in starch biosynthesis genes associated with nutritional and functional properties of rice. *Scientific Reports*, 2, 557.
- Larkin P. D., and Park W. D. (2003). Association of waxy gene single nucleotide polymorphisms with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*, 12(4), 335–339.
- Charoensiri R., Kongkachuichai R., Ratanakonpun N. (2008). Screening of Glycemic index of various rice varieties from breeding line and local market in Bangkok evaluated by In vitro rapid available glucose. *Journal of Nutrition Association of Thailand*, 43(3), 16–27.
- Popluechai S., Laosat N., Sasanatayart R., Kespechara K. (2012). Appear amylose content and single nucleotide polymorphisms of Wx gene in some Thai rice (*Oryza sativa* L. var indica). Paper presented at 1st Mae Fah Luang University International Conference 2012, Mae Fah Luang University, Chiang Rai Thailand, 29 November - 1 December.
- Popluechai S., Laosat N., Kitaraj S., Sasanatayart R., Kespechara K. (2013). The combination of GBBSI-GPT1 haplotype of some Thai rice in related to retrograded resistant starch property. Paper presented at Starch Update 2013: The 7th International Conference on Starch Technology, Miracle Grand Convention Hotel Bangkok, Thailand, 21–22 November.
- Wani A. A., Singh P., Shah M. A., Schweiggert-Weisz U., Gul K., Wani I. A. (2012). Rice Starch Diversity: Effects on Structural, Morphological, Thermal, and Physicochemical Properties-A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(5), 417–436.



ประวัติผู้เขียน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ

นางสาวอังกวรา ศรีहरา

วัน เดือน ปีเกิด

12 พฤศจิกายน 2530

สถานที่อยู่ปัจจุบัน

เลขที่ 604 หมู่ที่ 24 ซอยคอยเขาควาย 1

ตำบลรอบเวียง อำเภอเมือง

จังหวัดเชียงราย 57000

ประวัติการศึกษา

2553

ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (จุลชีววิทยาประยุกต์)

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

