

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีนในข้าวไทย



ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2565

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีนในข้าวไทย



ดุษฎีนิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์

สำนักบริหารและพัฒนาระบบราชการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การพัฒนาเครื่องหมายอิเล็กทรอนิกส์ที่สัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีนในข้าวไทย

กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ

ดุษฎีนิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุลงสิงหาโรจน์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภารัตน์ ลิ้นชอุดม)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุพเยาว์ คบพิมาย)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รองอธิการบดี

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีนในข้าวไทย
ชื่อผู้เขียน	นางสาวกนกวรรณ จันทร์เพ็ญ
ชื่อปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต

บทคัดย่อ

ลูทีนเป็นสารที่ได้จากวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์พบมากในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีนที่สัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีน จากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีนในวิถีและที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสจากผลการอ่านลำดับเบสอาร์เอ็นเอทั้งหมดกับการอ่านลำดับเบสจีโนมของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว คือ พันธุ์ปทุมธานี 1 กข-แม่โจ้ 2 และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ คือ พันธุ์ก้าน้อย ก้าใหญ่ โดยสามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน จำนวน 18 ยีน เป็นยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ จำนวน 11 ยีน ได้แก่ *PSY1*, *PDS*, *ZISO*, *ZDS*, *CrtISO*, *LYCe*, *LYCb*, *CYP97A*, *CYP97C*, *CYP97B2* และ *HYD3* กับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ จำนวน 7 ยีน ได้แก่ ยีน *SDG8*, *OsLCD*, *OsNCED2*, *OsMADS26*, *OsWD40*, *OsB2_Kala4* และ *OsB1* เมื่อนำไปทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณสารลูทีน ด้วยวิธี simple regression ในประชากร F_2 ที่ได้จากคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 กับก้าน้อย ไม่พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายจำเพาะกับยีนในวิถีสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ แต่พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน *OsB2_Kala4* และยีน *OsB1* ซึ่งเป็นยีนสร้างโปรตีนควบคุมการถอดรหัส (transcription factor) ที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับสีของเยื่อหุ้มเมล็ด โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 17.13 และ 16.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สีของเยื่อหุ้มเมล็ดพบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีนปานกลาง ดังนั้น ยีน *OsB2_Kala4* และยีน *OsB1* อาจจะควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสีเยื่อหุ้มเมล็ดและการสังเคราะห์ลูทีน แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB2_Kala4* และยีน *OsB1* สามารถนำไปใช้ในการช่วยคัดเลือกข้าวที่มีปริมาณสารลูทีนสูง

คำสำคัญ : ข้าว, สารลูทีน, เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีน, การอ่านลำดับเบสอาร์เอ็นเอทั้งหมด, การอ่านลำดับเบสจีโนม

Title	DEVELOPMENT OF LUTEIN CONTENT RELATED DNA MARKERS IN THAI RICE
Author	Miss Kanokwan Janphen
Degree	Doctor of Philosophy in Genetics
Advisory Committee Chairperson	Associate Professor Dr. Saengtong Pongjaroenkit

ABSTRACT

Lutein is a product from carotenoid biosynthetic pathway which is highly found in pericarp of black rice. The purpose of this study was to develop gene-specific markers that were related to lutein content from sequence variations in carotenoid biosynthetic pathway and related genes resulting of Thai rice varieties with white (Pathum Thani 1 and RD-Maejo 2) and black (Kum Noi and Kum Yai) pericarp transcriptome and genome sequencing analyses. Eighteen gene-specific markers were developed which were 11 genes in carotenoid biosynthesis pathway (*PSY1*, *PDS*, *ZISO*, *ZDS*, *CrtISO*, *LYCe*, *LYCb*, *CYP97A*, *CYP97C*, *CYP97B2* and *HYD3*) and 7 related genes (*SDG8*, *OsLCD*, *OsNCED2*, *OsMADS26*, *OsWD40*, *OsB2_Kala4* and *OsB1*). The relationship between these markers and lutein content were investigated by simple regression method in F₂ plant population of a cross between Pathum Thani 1 and Kum Noi. None of carotenoid biosynthetic gene markers was related to lutein content. Only *OsB2_Kala4* and *OsB1* markers were related to lutein content which had R² equivalent to 17.13 and 16.99%, respectively. These genes are transcription factor genes that have been reported as key genes in pericarp color. The moderate relationship between pericarp color and lutein content was found. Therefore, *OsB2_Kala4* and *OsB1* genes might be involved in expression of pericarp color and lutein biosynthetic genes. Moreover, *OsB2_Kala4* and *OsB1* gene-specific markers could be used for high lutein content selection in rice.

Keywords : Rice, Lutein, Gene-specific marker, Transcriptome sequencing, Whole

genome sequencing



กิตติกรรมประกาศ

ดุชฎินิพนธ์นี้เป็นผลงานที่ผู้วิจัยได้ทุ่มเทสติปัญญา ความตั้งใจ ความมุ่งมั่นและกำลังกาย จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือและความเมตตาจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก คือ รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต ในการให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจ คอยช่วยเหลือ และร่วม แก้ปัญหาที่เกิดขึ้นตลอดงานวิจัย รวมถึงอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง ที่ให้คำแนะนำในการปลูกและการผสมพันธุ์ข้าว และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุลงสิงหาโรจน์ ที่ความให้ความช่วยเหลือในเรื่องพื้นที่สำหรับปลูกข้าวทดสอบ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภรัตน์ ลีธน์ชอุตม ที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องงานวิจัยและคำแนะนำที่ดีเสมอมา งานวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างยิ่ง

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ บัณฑิตย์ ที่ได้กรุณารับเป็นประธาน กรรมการในการสอบดุชฎินิพนธ์ครั้งนี้ และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุพเยาว์ คบพิมาย ที่ได้กรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบดุชฎินิพนธ์ รวมถึงผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ไพศาลสุทธิชล ที่ให้ความอนุเคราะห์เกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณสาร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณะ ลาน้ำเที่ยง ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไป ด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและ นวัตกรรม (สกอ.) ผ่านมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2562 - 2563 ข้าพเจ้าจึงใคร่ ขอขอบพระคุณที่ช่วยสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัยนี้ให้ประสบผลสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ บิดาและมารดา ที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน ให้คำปรึกษาและคอย เป็นกำลังใจที่ดี คอยสนับสนุนทั้งในด้านการเรียนและการดำรงชีวิต รวมไปถึงคณาจารย์และบุคลากรใน สาขาวิชาพันธุศาสตร์ และนักศึกษาในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล ที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือ ตลอดการทำวิจัยนี้

กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจสอบเอกสาร.....	4
ข้าวเพื่อสุขภาพตลาดและแนวโน้มการบริโภค.....	4
คุณค่าทางโภชนาการของข้าว.....	6
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว.....	7
ความสำคัญของสารลูทีน	10
ความสำคัญและสภาวะขาดสารลูทีน.....	10
วิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และการสร้างสารลูทีนในพืช.....	11
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	13
การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว.....	15
การอ่านลำดับเบสของจีโนม (Whole genome sequencing; WGS)	18
การอ่านลำดับเบสของอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Transcriptome Sequencing).....	20

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	24
การศึกษาปริมาณสารลูทีนในข้าว	24
การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณสารในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	25
การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	26
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย	27
พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา	27
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	27
วิธีการวิจัย	30
1. การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total-RNA) ด้วยวิธี TRIzol® reagent	30
2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) จากใบข้าว	31
3. การสร้างประชากรลูกรุ่นที่ 2 (F ₂).....	33
4. การคัดเลือกเครื่องหมาย RM ที่خابข้างยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	35
5. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค Transcriptome Sequencing (RNA-Seq).....	38
6. การพัฒนาเครื่องหมายจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค WGS	45
7. การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอกับข้าวพันธุ์รับ พันธุ์ให้ ลูกผสมรุ่นที่ 1 และ ประชากรลูกรุ่นที่ 2.....	48
8. การวิเคราะห์ปริมาณของสารลูทีนและซีแซนทีนด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	49
9. การศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณสารลูทีน	50
10. การศึกษาความสัมพันธ์ของสีของเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนและซีแซนทีน	50
สถานที่ในการทดลอง	52
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	53
1. การศึกษาเครื่องหมาย RM ที่خابข้างยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	53
1.1 การค้นหาเครื่องหมาย RM ที่خابข้างยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	53

1.2 การทดสอบเครื่องหมาย RM ที่ขึ้นาข่างยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	59
2. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค Transcriptome Sequencing (RNA-Seq)	65
2.1 การค้นหายีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	65
2.2 การค้นหาบริเวณ InDel และ SNP	69
2.3 การออกแบบไพรเมอร์ T-ARMS	74
2.4 การทดสอบเครื่องหมายที่พัฒนาได้	76
3. การพัฒนาเครื่องหมายจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค WGS	79
3.1 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	79
3.2 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	82
3.3 การออกแบบไพรเมอร์	85
3.4 การทดสอบเครื่องหมาย	92
4. เครื่องหมายที่ใช้ทดสอบกับประชากร F ₂ จำนวน 300 ต้น	97
5. การตรวจสอบจีโนมไทป์ประชากร F ₂ ด้วยเครื่องหมายที่พัฒนาได้	100
5.1 การศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในประชากร F ₂	101
5.2 การศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในประชากร F ₂	105
6. การวิเคราะห์ปริมาณของสารลูทีนและซีแซนทีนด้วยเทคนิค HPLC	108
6.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curves)	108
6.2 การวิเคราะห์ปริมาณของสารลูทีนในประชากร F ₂	110
6.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณของสารซีแซนทีนในประชากร F ₂	111
7. การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารลูทีนกับเครื่องหมายที่พัฒนาในประชากร F ₂	112
7.1 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารลูทีนกับเครื่องหมายที่พัฒนาในประชากร F ₂	112

7.2 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารลูทีนกับเครื่องหมายที่พัฒนาในประชากร F_2	117
8. สีของเยื่อหุ้มเมล็ดและปริมาณสารลูทีนและซีแซนทีนในประชากร F_2	119
8.1 การศึกษาการกระจายตัวของพีโนไทป์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ด.....	120
8.2 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของการแบ่งกลุ่มของพีโนไทป์ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนในประชากร F_2	122
8.3 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของการแบ่งกลุ่มของพีโนไทป์ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารซีแซนทีนในประชากร F_2	124
8.4 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างสีของเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนหรือซีแซนทีนในประชากร F_2	127
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	130
บรรณานุกรม.....	132
ภาคผนวก.....	138
ภาคผนวก ก การค้นหาบริเวณ SNP และ InDel ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบส Transcriptome Sequencing.....	139
ภาคผนวก ข การค้นหาบริเวณ SNP และ InDel ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบส Whole Genome Sequencing.....	144
ภาคผนวก ค ปริมาณสารลูทีนและซีแซนทีนกับจีโนไทป์ของ 18 เครื่องหมาย ในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น.....	156
ประวัติผู้วิจัย.....	164

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวปลูก <i>O. sativa</i>	9
ตารางที่ 2 เครื่องหมาย/ไพรเมอร์ RM ที่ขนาดข้างยีน จำนวน 7 ยีน ที่คัดเลือก	57
ตารางที่ 3 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ RM ที่ขนาดข้างยีนทั้ง 7 ยีน ที่อุณหภูมิแอนนีลิ่ง 55 องศาเซลเซียส.....	60
ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค Transcriptome ของยีนใน วิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จาก 27 cluster ของ 12 ยีน	72
ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ T-ARMS จากผล Transcriptome จำนวน 5 ยีน 12 ชุดไพรเมอร์.....	74
ตารางที่ 6 สรุปผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค WGS ของยีนในวิธีการ สังเคราะห์แคโรทีนอยด์	81
ตารางที่ 7 สรุปผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค WGS ของยีนที่เกี่ยวข้อง กับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	84
ตารางที่ 8 ไพรเมอร์ T-ARMS ที่ออกแบบจากผล WGS	87
ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ InDel ที่ออกแบบจากผล WGS.....	91
ตารางที่ 10 เครื่องหมายจำนวน 19 เครื่องหมายที่ใช้ในการทดสอบกับประชากร F_2 สำหรับยีน จำนวน 300 ต้น จำนวน 18 ยีน	99
ตารางที่ 11 ผลการทดสอบโคสแควร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ในประชากร F_2	104
ตารางที่ 12 การทดสอบโคสแควร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แค โรทีนอยด์ในประชากร F_2	107
ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์ แคโรทีนอยด์ในประชากร F_2 กับปริมาณสารลูทีน	113
ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการ สังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในประชากร F_2 กับปริมาณสารลูทีน	116

ตารางที่ 15 ค่าสหสัมพันธ์ (R-sq หรือ R^2) ระหว่างเครื่องหมายจำเพาะกับยีนกับปริมาณสารลูทีน
โดยวิธี simple regression 118

ตารางที่ 16 การทดสอบไคสแควร์การกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดแบ่งเป็น 2 กลุ่มในประชากร F_2
..... 120

ตารางที่ 17 การทดสอบไคสแควร์การกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดแบ่งเป็น 3 กลุ่มในประชากร F_2
..... 121

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนในประชากร F_2 124

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารซีแซนทีนในประชากร F_2
..... 127

ตารางที่ 20 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างสีของเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนหรือซีแซนทีนในประชากร
 F_2 128



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ส่วนแบ่งทางการตลาดข้าวในตลาดโลก ปี 2020/21.....	5
ภาพที่ 2 วิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในข้าว	12
ภาพที่ 3 วิธีการสังเคราะห์อะโปกแคโรทีนอยด์ (apocarotenoid Biosynthesis) ในพืช.....	15
ภาพที่ 4 ขั้นตอนการจัดการข้อมูล การวิเคราะห์หาตำแหน่ง SNP และ InDel จากเทคนิค WGS ...	20
ภาพที่ 5 ขั้นตอนการจัดการข้อมูล การสร้าง Cluster และการวิเคราะห์หาที่ยีนและหน้าที่การทำงานของยีนจากเทคนิค Transcriptome sequencing.....	23
ภาพที่ 6 การสร้างประชากรลูกรุ่นที่ 2 (F ₂) จากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ให้คือ กำน้อย และพันธุ์รับคือ ปทุมธานี 1	34
ภาพที่ 7 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว แดง และดำ ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR.....	35
ภาพที่ 8 การค้นหาเครื่องหมาย RM ที่ขนานข้างยีน.....	37
ภาพที่ 9 การค้นหายีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จากเทคนิค transcriptome sequencing	39
ภาพที่ 10 หลักการออกแบบไพรเมอร์ชนิด T-ARMS ตำแหน่ง SNP ที่แสดงด้วยอักษรสีแดง	43
ภาพที่ 11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยชุดไพรเมอร์ T-ARMS	44
ภาพที่ 12 ตัวอย่างผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS	46
ภาพที่ 13 บริเวณลำดับเบสที่ขนานข้างตำแหน่ง InDel ที่แสดงด้วยอักษรสีแดง โดย Flanking sequence ด้านละ 400 เบส ในฐานข้อมูล Gramene	47
ภาพที่ 14 การกำหนดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในประชากร F ₂ แต่ละแบบ	48
ภาพที่ 15 ภาพตำแหน่งเครื่องหมาย RM ที่ขนานข้างยีนจากตาราง Supplementary Table 18 ของยีน (ก.) OsPDS, (ข.) OsZISO, (ค.) OsCRTISO, (ง.) OsZDS, (จ.) OsCYP97A4, (ฉ.) OsCYP97C2, และ (ช.) OsZEP.....	56
ภาพที่ 16 การเกิดแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ RM	60
ภาพที่ 17 ตำแหน่งของไพรเมอร์ RM27970 ในยีน OsZISO (ก.) และผลการเพิ่มจำนวน (ข.).....	64

ภาพที่ 18 Cluster ที่เกี่ยวข้องกับ Carotenoid biosynthesis (Ko00906) จำนวน 111 cluster.	65
ภาพที่ 19 จำนวน cluster ที่แบ่งตามจำนวนยีนทั้ง 23 ยีน รวมเป็น 61 cluster	66
ภาพที่ 20 การทำแผนที่ใน Carotenoid biosynthesis (Ko00906) จากฐานข้อมูล KEGG PATHWAY Database ของทั้ง 18 ยีน	67
ภาพที่ 21 จำนวน Cluster ในแต่ละยีนของ 10 ยีน ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลูทีน	68
ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบค่าการแสดงออก (FPKM) ของ 24 cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลูทีน 10 ยีนของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ คือ กข-แม่โจ้ 2 (RD-MJU2) ปทุมธานี 1 (PTT1) ก้าน้อย (KN) และกำใหญ่ (KY)	68
ภาพที่ 23 ค่าการแสดงออก (FPKM) ของ 24 cluster ใน 10 ยีน ในวิธีการสังเคราะห์ลูทีน	69
ภาพที่ 24 ตัวอย่างผลการค้นหาบริเวณ InDel ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-seq	70
ภาพที่ 25 ตัวอย่างผลการค้นหาบริเวณ SNP ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-seq	71
ภาพที่ 26 ผลการทดสอบไพรเมอร์ T-ARMS ที่อุณหภูมิแอนนिलลิง 55 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner เท่ากับ 1 : 0.5	77
ภาพที่ 27 ผลการทดสอบไพรเมอร์ T-ARMS ของยีน ZEP	78
ภาพที่ 28 ผลการทดสอบไพรเมอร์ T-ARMS และ InDel ที่ออกแบบจากข้อมูล WGS อุณหภูมิ แอนนिलลิง 55 องศาเซลเซียส	94
ภาพที่ 29 ผลการปรับสภาวะของไพรเมอร์ T-ARMS ที่ออกแบบจากข้อมูล WGS	96
ภาพที่ 30 ตำแหน่งของยีนทั้ง 18 ยีนที่ทำการทดสอบบนโครโมโซมทั้ง 12 แห่งในข้าว	98
ภาพที่ 31 เครื่องหมายที่ออกแบบจากยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	100
ภาพที่ 32 กราฟมาตรฐานสารลูทีน (lutein) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	108
ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานสารซีแซนทีน (zeaxanthin) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	109
ภาพที่ 34 ฮีลโทแกรมปริมาณสารลูทีนในประชากร F ₂ จำนวน 300 ต้น	110
ภาพที่ 35 ฮีลโทแกรมปริมาณสารซีแซนทีนในประชากร F ₂ จำนวน 300 ต้น	111

ภาพที่ 36 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณสารลูทีนในประชากร F_2 ตามกลุ่มมีสีและไม่มีสีของเยื่อหุ้ม
เมล็ด..... 122

ภาพที่ 37 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณสารลูทีนในประชากร F_2 ตามกลุ่มสีของเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว สี
น้ำตาล และสีดำ..... 123

ภาพที่ 38 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณสารซีแซนทีนในประชากร F_2 ตามกลุ่มมีสีและไม่มีสีของเยื่อ
หุ้มเมล็ด 125

ภาพที่ 39 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณสารซีแซนทีนในประชากร F_2 ตามกลุ่มสีของเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว
สีน้ำตาล และสีดำ..... 126



บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันเทคโนโลยีการอ่านลำดับเบสจีโนม (Genome sequencing) ของพืชและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้รับความนิยอย่างแพร่หลาย จึงได้มีการนำความรู้ทางด้านการวิเคราะห์ลำดับเบสจีโนมมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและการหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่ต้องการเพิ่มมากขึ้น โดยพืชที่ได้รับความนิยมในการอ่านลำดับเบสและศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสแต่สายพันธุ์เป็นจำนวนมากคือ ข้าว เนื่องจากข้าวจัดว่าเป็นพืชอาหารหลักของประชากรโลก และมีการเพาะปลูกเป็นจำนวนมากในหลายๆ ทวีป จึงทำให้มีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมข้ามสายพันธุ์เพื่อให้มีลักษณะตรงตามความต้องการของแต่ละพื้นที่นั้นจำนวนมาก ซึ่งมีงานวิจัยที่ทำการศึกษถึงความแตกต่างของ ลำดับเบสของจีโนมข้าวที่ทำการผสมข้ามระหว่างข้าวเอเชีย (WAB56-104) กับข้าวแอฟริกา (CG14) โดยการอ่านลำดับเบสของประชากรที่เกิดจากการผสม ที่แบ่งเป็นสองกลุ่มโดยใช้ลักษณะวันออกดอก การแตกกอ และน้ำหนักข้าว 1,000 กรัมข้าวเปลือก ในการจัดพีโนไทป์พบบริเวณ SNP (single nucleotide polymorphism) จำนวน 5,152 ตำแหน่ง ที่แตกต่างกันในประชากรข้าวสองกลุ่มที่ได้ทำการศึกษา ซึ่งมี 6 ตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับยีนของลักษณะที่สนใจคือ ลักษณะวันออกดอก การแตกกอ และน้ำหนักข้าว 1,000 กรัมข้าวเปลือก ที่อาจจะเป็นบริเวณ SNP ที่สำคัญ (Badro et al., 2020) เช่นเดียวกับการศึกษาของ (Ren et al., 2020) ที่ได้มีการใช้เทคนิค Transcriptome sequencing (RNA-seq) ร่วมกับ Whole Genome Sequencing (WGS) ของข้าวลูกผสมสายพันธุ์ Chuanyou 6203 เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนที่ส่งผลให้เกิดลักษณะดีเด่นกว่าพันธุ์ของพ่อแม่ (Heterosis) ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้พัฒนาพันธุ์ข้าวให้ได้ผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดสูงต่อไป

นอกจากลักษณะทางการเกษตรต่างๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้น อีกหนึ่งลักษณะที่ได้มีการศึกษาและมีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวคือ การเพิ่มสารอาหารที่ได้จากวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ เพื่อให้ข้าวสร้างสารปริมาณที่สูงขึ้น เนื่องจากสารในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ได้แก่ แอลฟา-แคโรทีน (alpha-carotene), บีตา-แคโรทีน (beta-carotene), บีตา-คริปโตแซนทิน (beta-cryptoxanthin), ไลโคพีน (lycopene), ลูทีน (lutein), ซีแซนทิน (zeaxanthin) มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานในระบบสายตาและการมองเห็น นอกจากนี้ยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและ

ยับยั้งมะเร็งบางประเภท จึงได้มีการศึกษากระบวนการในการสังเคราะห์และสะสมของสารแคโรทีนอยด์ในพืชหลายชนิด (Watkins and Pogson, 2020) ด้วยประโยชน์ของสารที่เกิดจากกระบวนการดังกล่าว จึงทำให้มีการศึกษาปริมาณของสารจากวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในข้าวพบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจะมีปริมาณสารลูทีนสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว (Kim et al., 2010) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาเกี่ยวกับตำแหน่ง QTLs ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (Ashokkumar et al., 2020) ที่ไม่พบตำแหน่ง QTLs ไตสัมพันธ์กับปริมาณแคโรทีนอยด์และการศึกษาการแสดงออกของยีนระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำที่มีปริมาณสารในวิถีแคโรทีนอยด์สูงเปรียบเทียบกับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวที่มีปริมาณสารในวิถีแคโรทีนอยด์ต่ำจากการศึกษาด้วยเทคนิคทรานสคริปโทมพบว่า ยีน *PSY1*, *PDS*, *LCYb* และ *LCYe* มีการแสดงออกสูงในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและยีนมีการทำงานร่วมกันของแต่ละยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (Cazzonelli and Pogson, 2010; Chettry and Chrungoo, 2020; Chettry et al., 2019) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้สร้างข้าวตัดแปลงพันธุกรรมให้มีการสร้างสารในวิถีแคโรทีนอยด์สูงหรือการสร้างข้าวสีทอง (Golden Rice) ที่มีสาร Provitamin A ซึ่งเป็นสารที่ได้จากวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ที่ได้จากการแทรกยีนหลายชุดยีน เพื่อให้มีการทำงานร่วมกันของหลายยีนที่แทรกเข้าไปในจีโนมข้าว (Al-Babili and Beyer, 2005; Bai et al., 2016) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานเกี่ยวกับการทำงานของกระบวนการสังเคราะห์สารในวิถีแคโรทีนอยด์ที่มีการแสดงออกของยีนจำนวนมาก แต่ยังไม่พบยีนใดที่เป็นยีนหลักในการควบคุม แต่เป็นการทำงานร่วมกันของหลายยีนที่เกี่ยวข้อง (Stanley and Yuan, 2019)

โดยงานวิจัยนี้จะศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสของยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และยีนที่เกี่ยวข้องในข้าวไทยที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวเปรียบเทียบกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำที่มีปริมาณสารลูทีนแตกต่างกันที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Transcriptome sequencing (RNA-seq) ร่วมกับ Whole Genome Sequencing (WGS) ซึ่งเป็นวิธีการที่ทันสมัยและมีความถูกต้องแม่นยำสูง เพื่อนำบริเวณที่พบความแตกต่างของยีนมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีนเพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงข้าวไทยต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลูทีนของข้าวไทย
2. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลูทีนในข้าวไทย
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาได้กับปริมาณสารลูทีน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลูทีนที่ได้จากการศึกษา แสดงให้เห็นถึงบริเวณลำดับเบสที่ต่างกัน และสามารถนำไปใช้ในการแยกความแตกต่างของยีนในข้าวที่มีปริมาณสารลูทีนต่างกันได้
2. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีนที่คาดว่าจะสามารถนำไปใช้คัดเลือกในประชากร BC_nF_1 เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีปริมาณสารลูทีนสูงต่อไป

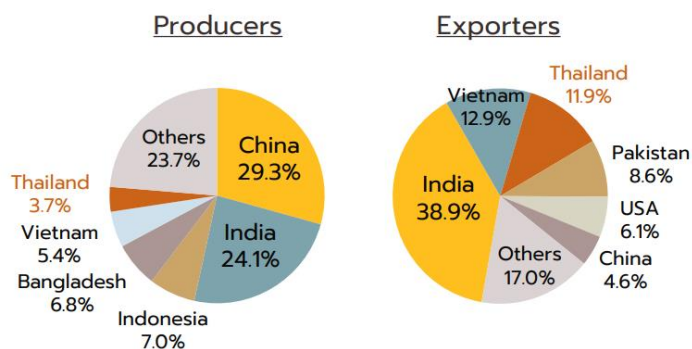
บทที่ 2

ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

คนไทยนิยมบริโภค “ข้าว” เป็นอาหารหลัก ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการต่อร่างกาย ได้มีการศึกษาพฤติกรรมการบริโภคข้าวของคนไทยในระยะเวลาที่ผ่านมา พบว่า การบริโภคข้าวของคนไทยเฉลี่ยต่อคนลดลงจากเดิมประมาณ 190 กิโลกรัมเพียง 106 กิโลกรัมต่อปี สืบเนื่องมาจากคนไทยหันมาใส่ใจในเรื่องสุขภาพที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการเลือกบริโภคอาหารปลอดภัยและมีสารอาหารที่ดีมีประโยชน์ต่อร่างกาย ประกอบกับการขยายตัวของสังคมเมืองและการเปลี่ยนแปลงช่วงวัยเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ โดยจะเน้นอาหารที่มีคุณค่าเพื่อลดอัตราการเสี่ยงต่อการเกิดโรคชนิดต่างๆ เช่น โรคมะเร็งหัวใจ เบาหวาน เป็นต้น จึงทำให้มีความสนใจข้าวทางเลือกเพื่อสุขภาพมากขึ้น (มุกกริน และ จิรวุฒิ, 2564) สอดคล้องกับตลาดและแนวโน้มการบริโภคของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ ประจำเดือนเมษายน 2564 ได้กล่าวถึงอีกปัจจัยสำคัญที่ทำให้มูลค่าการนำเข้าข้าวโดยเฉพาะตลาดพรีเมียมเพิ่มสูงในอนาคต คือพฤติกรรมผู้บริโภคเกี่ยวกับการใส่ใจสุขภาพ จึงทำให้ประเทศไทยมีการเจาะตลาดข้าวคุณภาพดีรวมถึงข้าวสีและข้าวเพื่อสุขภาพ เช่น ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวหอมนิล ข้าวหอมมะลิแดง (จันทนา, 2564) โดยข้าวเพื่อสุขภาพส่วนใหญ่จะเป็นข้าวที่เป็นพันธุ์พื้นเมือง มีเมล็ดสีค่อนข้างเข้ม มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว ซึ่งจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีปริมาณใยอาหารสูง และมีสารต้านอนุมูลอิสระ

ข้าวเพื่อสุขภาพตลาดและแนวโน้มการบริโภค

หากเปรียบเทียบปริมาณการส่งออกข้าวของประเทศไทยในปี 2563 จะมีความใกล้เคียงกับการบริโภคในประเทศ ประเทศไทยจัดเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกที่สำคัญของโลก โดยปี 2563/2564 มีผลผลิตข้าวสูงเป็นอันดับที่ 6 ของโลก คิดเป็น 3.7 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตข้าวทั่วโลก และเป็นผู้ส่งออกอันดับที่ 3 ของโลก มีส่วนแบ่งทางการตลาด 11.9 เปอร์เซ็นต์ รองจากอินเดียและเวียดนาม (ภาพที่ 1) ซึ่งการส่งออกจะมีความผันผวนตามปริมาณผลผลิตของประเทศผู้ส่งออกและการบริโภคของประเทศผู้นำเข้า โดยตลาดนำเข้าข้าวส่วนใหญ่เป็นประเทศในภูมิภาคแอฟริกา ตะวันออกกลาง และเอเชีย (ชัยวัช, 2565)



Source: U.S. Department of Agriculture (USDA)

ภาพที่ 1 ส่วนแบ่งทางการตลาดข้าวในตลาดโลก ปี 2020/21

ที่มา; ชัยวิษ (2565: หน้า 5)

สำหรับปริมาณการส่งออกข้าวของไทยในปี 2563 พบว่า ใกล้เคียงกับการบริโภคในประเทศ โดยข้าวไทยยังคงได้รับการยอมรับด้านคุณภาพและเป็นที่ต้องการของตลาดโลก มีตลาดส่งออกสำคัญ คือ แอฟริกาใต้ สหรัฐฯ เบนินอาเซียน จีน แองโกลา และตะวันออกกลาง ทั้งนี้ประเภทข้าวที่ไทยส่งออกเป็นปริมาณมาก คือ ข้าวหอมมะลิ (Jasmine Rice) ข้าวเหนียว (Parboiled Rice) ข้าวหัก (Broken Rice) ข้าวเหนียว (Glutinous Rice) และข้าวกล้อง (Brown Rice) ตามลำดับ ข้าวกล้อง และข้าวอื่นๆ มีปริมาณการส่งออกของประเทศไทยอยู่ที่ 1.2 แสนตันข้าวสาร คิดเป็นสัดส่วน 2.0 เปอร์เซ็นต์ มีตลาดส่งออกหลัก คือ เกาหลีใต้ (สัดส่วน 25.7 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณส่งออกข้าวกล้อง และข้าวอื่น ๆ ทั้งหมดของประเทศไทย) รองลงมาเป็นแองโกลา (21.4 เปอร์เซ็นต์) สหรัฐฯ (10.1 เปอร์เซ็นต์) และเนเธอร์แลนด์ (7.8 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ชัยวิษ, 2565)

แนวโน้มอุตสาหกรรมข้าวกล้องและข้าวอื่นๆ (ชัยวิษ, 2565): ช่วง 9 เดือนแรกปี 2564 มีปริมาณส่งออกอยู่ที่ 0.06 ล้านตัน ขยายตัว 18.4 เปอร์เซ็นต์ ที่มีปัจจัยสนับสนุนหลักมาจากตลาดในกลุ่มประเทศพัฒนาแล้วนิยมบริโภคอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงรวมทั้งข้าวกล้องเพิ่มขึ้นตามกระแสการใส่ใจสุขภาพ โดยเฉพาะภูมิภาคอเมริกาและยุโรป ประกอบกับราคาวัตถุดิบข้าวเปลือกลดลง ทำให้ราคาส่งออกข้าวกล้องลดลงอยู่ที่ 958.5 ดอลลาร์สหรัฐฯ/ตัน (-10.1 เปอร์เซ็นต์) เทียบกับ 1,066.2 ดอลลาร์สหรัฐฯ/ตันในปี 2563 (1.8 เปอร์เซ็นต์) ส่งผลให้มูลค่าส่งออกอยู่ที่ 50.9 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ หดตัว 10.1 เปอร์เซ็นต์ โดยตลาดหลัก ได้แก่ เกาหลีใต้ (27.9 เปอร์เซ็นต์ ของตลาดส่งออกข้าวกล้องและข้าวอื่นๆ ของประเทศไทย) รองลงมา คือ สหรัฐฯ (14.8 เปอร์เซ็นต์) สิงคโปร์ (10.1 เปอร์เซ็นต์) อิตาลี (5.8 เปอร์เซ็นต์) และฮ่องกง (5.7 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ทั้งนี้ คาดว่าปริมาณส่งออกข้าวกล้องและข้าวอื่นๆ ทั้งปี 2564 จะอยู่ที่ระดับ 0.13 ล้านตัน ขยายตัว 15.8 เปอร์เซ็นต์

คุณค่าทางโภชนาการของข้าว

ข้าวจัดว่าเป็นอาหารที่สำคัญของคนมานานตั้งแต่โบราณ โดยเฉพาะคนในทวีปเอเชีย รับประทานข้าวกันทั่วไปเรียกได้ว่าเป็นอาหารหลัก ข้าวในโลกนี้มีหลายพันธุ์แตกต่างกันมากมาย ข้าว ประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ มากมายที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (ชัชวาลย์, 2548) เช่น

คาร์โบไฮเดรต ข้าวทุกชนิดมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบร้อยละ 70-80 ซึ่งเป็นแป้งเกือบทั้งหมด มีน้ำตาลซูโครส (sucrose) และน้ำตาลเดกซ์ทริน (dextrin) เล็กน้อย

โปรตีน มีโปรตีนไม่มาก อยู่ระหว่างร้อยละ 7-8 ในข้าวเจ้า และร้อยละ 11-12 ในข้าวสาลี

ไขมัน ในข้าวกล้องมีปริมาณไขมันสูงกว่าข้าวชนิดอื่น เพราะข้าวกล้องยังมีส่วนของรำข้าวอยู่ แต่เมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่น ๆ แล้ว ข้าวไม่ใช่แหล่งที่อุดมด้วยสารอาหารจำพวกไขมัน

ใยอาหาร ข้าวกล้องให้ใยอาหารสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว โดยทั่วไปข้าวกล้องจะมีสีน้ำตาลอ่อน คนไทยสมัยก่อนใช้วิธีซ้อมหรือตำด้วยมือ จึงเรียกว่า “ข้าวซ้อมมือ” เป็นข้าวกล้องอย่างหนึ่ง มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง มีใยอาหาร ไขมันและวิตามินบี 1 มากกว่าข้าวชนิดอื่น

วิตามินและแร่ธาตุ ในข้าวกล้องจะมีวิตามินและแร่ธาตุสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ที่เห็นได้ชัดคือ ธาตุฟอสฟอรัส ธาตุแมกนีเซียม ไนอาซิน และวิตามินบี 1

คุณค่าของข้าวกล้อง ข้าวกล้องมีสารอาหารครบทุกชนิด องค์ประกอบหลัก คือ คาร์โบไฮเดรต เช่นเดียวกับข้าวชนิดอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบข้าวกล้องกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว พบว่า ข้าวกล้องมีใยอาหารสูงกว่าถึง 3 เท่า ส่วนข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวนั้นมีการสูญเสียสารอาหารที่มีประโยชน์คือโปรตีน ไขมัน ใยอาหารไประหว่างการขัดสี เหลือแต่คาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนใหญ่ การขัดสียังทำให้สูญเสียวิตามินและเกลือแร่อีกด้วย

ข้าวโภชนาการสูง (High nutritious rice)

คือ ข้าวที่มีคุณค่าทางอาหาร ในปริมาณสูงกว่าข้าวทั่วไป มีสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย อาทิเช่น สารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยชะลอการเสื่อมของเซลล์ ลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็ง ได้แก่ แอนโทไซยานิน, แกมมา-ออร์ซานอล, วิตามินอี ในกลุ่มโทโคฟีรอล, ฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก เป็นต้น นอกจากนี้ ธาตุเหล็ก, ธาตุสังกะสี, วิตามิน B1, B2 และ B3, โอเมก้า 3, 6 และ 9 และสาร ASGs (Acylated steryl glucosides) ช่วยการทำงานของอินซูลิน และควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ข้าวโภชนาการสูง ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มข้าวสีประเภท ข้าวกล้องที่มีสีแดง ม่วงเข้ม และสีดำ โดยสารที่มีคุณค่าทางอาหารจะพบที่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว

- **กลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง** ได้แก่ ข้าวเหนียวดำลิ้มผิว ข้าวกำ ข้าวเหนียวดำช่อไม้ไผ่ ข้าวหอมนิล ข้าวมะลิชนิดสุรินทร์ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ จัดเป็นข้าวโภชนาการสูง มีรงควัตถุ แกมมา-ไทโคไตรอีนอล แกมมา-ออริซานอล ที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในน้ำมัน และสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในน้ำ ได้แก่ แอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิน ประโยชน์ของสารเหล่านี้ ช่วยลดไขมันอุดตันในเส้นเลือด บำรุงสายตา ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม ปอด กระเพาะอาหาร และเม็ดเลือดขาว และเป็นยาบำรุงโลหิต

- **กลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง** ได้แก่ ข้าวทับทิมชุมแพ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวทับทิมโกเมน ข้าวหอมกุหลาบแดง ข้าวหอมกระดังงา จัดเป็นข้าวโภชนาการสูง ลักษณะเด่นมีสารต้านอนุมูลอิสระ แอนโทไซยานินในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารโพลีฟีนอล ประโยชน์ของกลุ่มข้าวสีแดง ช่วยในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ต้านอนุมูลอิสระ ชะลอการเสื่อมของเซลล์ ช่วยการหมุนเวียนของกระแสโลหิต ลดอัตราเสี่ยงของการเป็นมะเร็ง ป้องกันโรคหัวใจ มี GABA สูง มีประโยชน์ต่อระบบประสาทและสมอง ป้องกันโรคอัลไซเมอร์ มีกากใยอาหารสูง มีโปรตีนชะลอความแก่ มีธาตุเหล็ก และฟอสฟอรัส ช่วยบำรุงโลหิต ป้องกันโรคความจำเสื่อม

- **กลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีครีม / น้ำตาล** ได้แก่ ข้าวกล้องสีเหลือง ข้าวฮาง จัดเป็นข้าวโภชนาการสูง ลักษณะเด่น มีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายสูง เช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ไนอาซิน วิตามินอี แร่ธาตุ ฟอสฟอรัส แคลเซียม เหล็ก ทองแดง สังกะสี เป็นต้น ประโยชน์ของกลุ่มข้าวสีครีม / น้ำตาล มีสารขัดขวางการดูดซึมธาตุเหล็กน้อย มีน้ำตาลต่ำ ลดภาวะการดื้อของอินซูลิน เพิ่มขบวนการทำงานของตับอ่อน และเพิ่มปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

ข้าว (rice : *Oryza sativa* L.) โดยทั่วไปข้าวพันธุ์ปลูกมีจำนวนโครโมโซม $2n = 24$ อยู่ในกลุ่มของธัญพืชให้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากข้าวเป็นพืชที่สามารถทำการปลูกได้ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลถึงระดับความสูง 2,000 เมตร (เรวัต, 2541) มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ดังนี้

- ราก

ระบบรากเป็นแบบรากฝอย (fibrous root system) การเจริญของรากมี 2 ส่วน คือ เจริญมาจากส่วนของคัพภะ (embryo) และเจริญมาจากส่วนข้อของลำต้น ซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวิธีการปลูก รวมไปถึงสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันก็ส่งผลให้การเจริญของรากอาจแตกต่างกัน

- ลำต้น (haulm หรือ culm)

ลำต้นประกอบด้วยข้อ (node) และปล้อง (internode) โดยลำต้นจะมีความสูงอยู่ที่ประมาณ 30-40 เซนติเมตร ในพันธุ์เตี้ย และสูงมากกว่า 7 เมตร ในข้าวพันธุ์ขึ้นน้ำ สำหรับพันธุ์ข้าวที่ปลูกเป็นการค้าจะมีความสูงประมาณ 1-2 เมตร มีการแตกกอมาก จำนวนของหน่อที่เกิดขึ้นอยู่กับพันธุ์ ระยะปลูก การให้ปุ๋ย และสภาพแวดล้อม จะมีจำนวนอยู่ที่ประมาณ 4-80 หน่อ

- ใบ

ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ กาบใบ (leaf sheath) และแผ่นใบ (leaf blade) ความยาวของกาบใบข้าวจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งของข้อบนลำต้น และความกว้างของแผ่นใบนั้นก็มีความแตกต่างกันของแต่ละพันธุ์ข้าว

- ช่อดอกและดอก

ช่อดอกเป็นแบบช่อดอกแยกแขนง (panicle) ที่มีการเจริญมาจากตายอด (terminal bud) โดยมีปล้องสุดท้ายของลำต้น (uppermost internode) เป็นก้านช่อดอก (peduncle) แกนกลางช่อดอกเรียกว่า rachis หรือ panicle axis มีการแตกกิ่งก้านจากส่วนของแกนกลางช่อดอก (rachis) โดยกิ่งก้านที่แตกจากแกนกลางช่อดอก (rachis) เรียกว่า ก้านช่อดอกปฐมภูมิ (primary branch) และกิ่งก้านที่แตกจากส่วนของก้านช่อดอกปฐมภูมิ (primary branch) เรียกว่า ก้านช่อดอกทุติยภูมิ (secondary branch)

ดอกข้าวเกิดเป็นกลุ่มเรียกว่า กลุ่มดอกย่อย (spikelet) มีส่วนประกอบดังนี้ กลีบดอกที่หุ้ม กลุ่มดอกย่อยมี 2 กลีบ ได้แก่ กลีบด้านนอก (outer glume) และกลีบด้านใน (inner glume) อยู่ตรงปลายสุดของก้านดอก (pedicel) ภายในดอกประกอบด้วยดอกย่อย (floret) จำนวน 3 ดอก แต่มีดอกย่อยเพียงดอกเดียวที่มีการเจริญ เรียกว่า flowering glume ส่วนดอกย่อยที่ไม่เจริญ 2 ดอกนั้นเหลือเฉพาะส่วนกลีบดอกนอก (lemma) ที่เรียกว่า sterile lemma หรือ non-flowering glume หรือ empty glume จำนวน 2 กลีบ ที่มีความยาวไม่เกิน 1 ใน 3 ของดอกย่อยที่มีการเจริญ (flowering glume) กลีบทั้งสองนี้ยังคงปรากฏให้เห็นอยู่ที่ฐานของเมล็ด เมื่อเมล็ดแก่แล้ว

ดอกย่อยที่มีการเจริญประกอบด้วยกลีบดอกย่อยด้านนอก (lemma) ที่มีเส้นตามความยาว 5 เส้น และกลีบดอกย่อยด้านใน (palea) ที่มีเส้นตามความยาว 3 เส้น ภายในดอกย่อยประกอบด้วย เกสรเพศผู้ (stamen) 6 อัน เกสรเพศเมีย (pistil) ประกอบด้วยรังไข่ (ovary) ที่มี 1 ออวูล (ovule) มีก้านชูเกสรเพศเมีย (style) สั้น และยอดเกสรเพศเมีย (stigma) แยกเป็น 2 แฉก มีลักษณะคล้ายขนนกเรียกว่า plumose stigma เยื่อรองรังไข่ (lodicule) มี 2 อัน ขนาดเล็ก ใส อยู่ที่ส่วนฐานของรังไข่

- ผลหรือเมล็ด

ผลเป็นผลแห้งเมล็ดติดหรือผลแบบธัญพืช (caryopsis) ประกอบด้วยเยื่อหุ้มผล (pericarp) ติดอยู่กับส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat หรือ testa) มีเปลือกหุ้มเรียกว่า hull ซึ่งประกอบด้วยส่วนของกลีบดอกย่อยด้านนอกและกลีบดอกย่อยด้านใน โดยในส่วนของเยื่อหุ้มผลและเยื่อหุ้มเมล็ดในข้าวแต่ละสายพันธุ์ ที่มีการปลูกในปัจจุบันจะมีสีและลักษณะที่แตกต่างทำให้ข้าวแต่ละพันธุ์จะให้คุณค่าทางสารอาหารที่แตกต่างกันออกไป

การจำแนกชนิดของข้าว (เรวัต, 2541)

ข้าวเป็นพืชจัดอยู่ในสกุล *Oryza* ซึ่งมีลักษณะเด่นของพืชในสกุลนี้ คือ ดอกเกิดเป็นกลุ่ม แต่มีดอกย่อยเพียง 1 ดอกเท่านั้นที่มีการพัฒนา ในแต่ละกลุ่มดอกของข้าวจึงมีดอกที่ติดเมล็ดเพียง 1 ดอก จึงอาจเรียกกลุ่มดอกของข้าวว่าเป็นดอกหรือดอกย่อยก็ได้ ดอกมีลักษณะแบน ที่ฐานของดอกมีส่วนของกลีบดอกย่อยที่ไม่สมบูรณ์ติดอยู่ 2 อัน และมีเกสรตัวผู้ 6 อัน

พืชในสกุล *Oryza* ประกอบด้วยพืชหลายชนิด แต่เท่าที่ยอมรับมีอยู่ 23 ชนิด ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 พวกได้แก่

1. ข้าวปลูก (cultivated rice) ประกอบด้วย *Oryza sativa* (*O. sativa*) ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก และ *Oryza glaberrima* (*O. glaberrima*) ซึ่งเป็นข้าวที่มีการปลูกเฉพาะในแถบตะวันตกของทวีปแอฟริกาเท่านั้น ทั้งสองชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ ช่อดอกของ *O. glaberrima* ไม่มีก้านแขนงที่สอง มีลิ้นใบสั้น และไม่มีขนที่กลีบดอกนอก และกลีบดอกย่อยด้านใน ข้าวปลูกกลุ่ม *O. sativa* แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดย่อย ได้แก่ *indica*, *japonica* และ *javanica* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวปลูก *O. sativa*

ลักษณะ	<i>indica</i>	<i>japonica</i>	<i>javanica</i>
ใบ	กว้างและสีเขียวอ่อน	แคบและสีเขียวแก่	กว้างและสีเขียวอ่อน
เมล็ด	ยาวและค่อนข้างแบน	สั้นและกลม	กว้างและหนา
การแตกกอ	มาก	ปานกลาง	น้อย
ต้น	สูงและอ่อน	เตี้ยและแข็ง	สูงและแข็ง
หางของเมล็ด	สั้นมาก	สั้นมากและยาว	สั้นมากและยาว
ขนของข้าวเปลือก	สั้น	มากและยาว	ยาว
การร่วงของเมล็ด	ง่าย	ยาก	ยาก

ที่มา: เรวัต (2541: หน้า 10)

2. ข้าวป่า (wild rice) มีลักษณะเป็นวัชพืช เมล็ดมีขนาดเล็ก ร่วงง่าย และมีหาง ในประเทศไทยพบอยู่ 5 ชนิด ได้แก่ *O. perennis*, *O. fatua*, *O. officinalis*, *O. granulata* และ *O. ridleyi*

ความสำคัญของสารลูทีน

ความสำคัญและสถานะขาดสารลูทีน

การมองเห็นถือเป็นหนึ่งในประสาทสัมผัสที่มีความสำคัญ กลไกในการมองเห็นคือ เมื่อมีแสงตกกระทบกับวัตถุ แสงจะสะท้อนเข้าสู่ดวงตาผ่านกระจกตา รูม่านตา แก้วตา และไปตกที่จอรับภาพ ในลักษณะของภาพหัวกลับแล้วจึงถูกส่งไปแปลเป็นภาพที่มองเห็นจริงในระบบประสาทส่วนท้ายทอย โดยสารอาหารจำเป็นสำหรับดวงตามีอยู่หลายชนิดด้วยกัน คือ วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี รวมถึงสารอาหารที่มีงานวิจัยอย่างกว้างขวางว่ามีประโยชน์กับดวงตาโดยตรงก็คือ สารลูทีน และซีแซนทีน (ศูนย์เลนส์, มปป) สารลูทีนเป็นสารธรรมชาติที่มีในนมมารดา และในพืชผักผลไม้หลายชนิด เป็นสารในตระกูลของสารแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ที่ในธรรมชาติมีประมาณ 600 ชนิด แต่ที่พบมากมี 6 ชนิด คือ แอลฟา-แคโรทีน (alpha-carotene), บีตา-แคโรทีน (beta-carotene), บีตา-คริปโตแซนทีน (beta-cryptoxanthin), ไลโคปีน (lycopene), ลูทีน (lutein) และซีแซนทีน (zeaxanthin) (ดิสไทย, มปป)

สารลูทีน (lutein) และซีแซนทีน (zeaxanthin) ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันเซลล์รับแสง (photoreceptor cells) จากอันตรายจากอนุมูลอิสระที่เซลล์สร้างขึ้น เนื่องจากมีปริมาณออกซิเจนสูง (oxygen tension) และจากแสง นอกจากนี้สารประกอบทั้งสองมีหน้าที่ในการกรองแสงสีฟ้าที่เป็นคลื่นแสงที่มีพลังงานสูง โดยประมาณว่าจะสามารถกรองแสงสีฟ้าลงได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ก่อนที่แสงจะตกถึงแมคูลา ดังนั้นจะสามารถลดสถานะความเครียดออกซิเดชันต่อจอประสาทตาได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยสารทั้งสองเป็นสารประกอบที่จัดอยู่ในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ที่ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ (non-provitamin A carotenoids) หรือเรียกอีกอย่างว่าเป็นกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสร้างสารประกอบทั้งสองนี้ได้ จำเป็นต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น แหล่งอาหารที่ให้สารลูทีนสูง คือ ผักใบเขียว ตัวอย่างเช่น ผักคะน้ามีลูทีนในปริมาณ 4.8 – 13.4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผักสด 100 กรัม และผักปวยเล้งมีลูทีน 6.5 – 13.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผักสด 100 กรัม (วิมล, 2556)

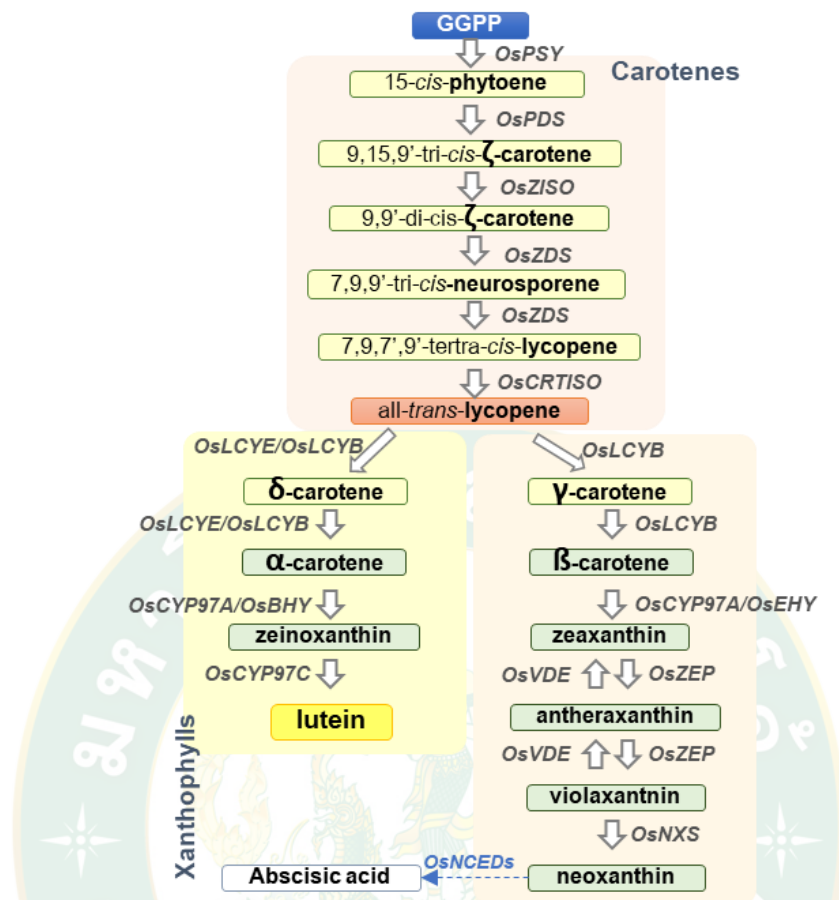
สารลูทีนในเซลล์รับภาพของจอประสาทตาทำหน้าที่สำคัญ คือ กรองแสงสีฟ้าซึ่งเป็นอันตรายต่อจอประสาทตา และเป็นแสงที่หลีกเลี่ยงได้ยาก ได้แก่ แสงจากดวงอาทิตย์ แสงจากโทรทัศน์ แสง

จากจอคอมพิวเตอร์ และแสงจากหลอดไฟ เป็นต้น สารลูทีนสามารถลด ป้องกัน หรือชะลอการเกิด ต้อกระจกได้ โดยจะลดกลไกการเกิดความเสื่อมของโรคต้อกระจกโดยตรง มีการวิจัยในกลุ่มผู้สูงอายุ พบว่ากลุ่มที่มีระดับของสารลูทีนในกระแสเลือดสูงจะมีความชุ่นของเลนส์ตาน้อยกว่า ดังนั้นสารลูทีน น่าจะลดการเกิดความเสื่อมของเลนส์ตาในผู้สูงอายุได้ และยังมี การวิจัยว่าการรับประทานสารลูทีนใน ปริมาณสูงเพิ่มความสามารถในการมองเห็นของผู้ป่วยที่เป็นต้อกระจกได้ นอกจากนี้สารลูทีนจะช่วยลด ความเสี่ยงในการเกิดโรคต้อกระจกแล้ว ยังพบว่า มีประโยชน์ในโรคจุดรับภาพเสื่อม โดยพบว่าถ้า ปริมาณสารลูทีนในดวงตาลดน้อยลง จะพบความเสี่ยงมากขึ้นในการเป็นโรคจุดรับภาพเสื่อม และ ความเสี่ยงในการเป็นโรคจุดรับภาพเสื่อมจะลดลง หากมีปริมาณสารลูทีนในเลือดสูงขึ้น แสดงให้เห็น ว่า การบริโภคอาหารที่มีสารลูทีนสามารถช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับดวงตาได้ (ดิสไทย, มปป)

วิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และการสร้างสารลูทีนในพืช

กระบวนการสร้างสารลูทีนนั้นจะเกี่ยวข้องกับวิธีการสร้าง methylerythritol 4-phosphate (MEP) โดยเกิดจากสาร 2 โมเลกุล คือ isopentenyl diphosphate (IDP) และ dimethylallyl diphosphate (DMADP) ทำให้ได้ออกมาเป็น C₂₀ GGPP เพื่อเข้าสู่กระบวนการ สังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ โดยกระบวนการหลังจากได้สารไลโคพีน (lycopene) จะเกิดการแยก ออกเป็น 2 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะได้รับการกระตุ้นจากสารที่แตกต่างกัน ผลผลิตที่ได้จะแบ่งเป็น แอลฟา-แคโรทีน (α -carotenes) กับบีต้า-แคโรทีน (β -carotenes) จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนสร้างแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) โดยสารแอลฟา-แคโรทีนจะเปลี่ยนเป็นสารลูทีน (lutein) สำหรับสารบีต้า-แคโรทีนจะเปลี่ยนเป็นสารซีแซนทีน (zeaxanthin) (Nisar et al., 2015) ดังแสดงในภาพที่ 2

โดยกลุ่มแคโรทีนเป็นสารสีแดงหรือส้ม ส่วนกลุ่มแซนโทฟิลล์เป็นสารสีเหลืองหรือสีน้ำตาล การสร้างสารที่อยู่ในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์บริเวณต่างกันั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 ช่วง คือ ยีนที่ควบคุมส่วนต้นของการสังเคราะห์แคโรทีน (carotenes) จำนวน 7 ยีน ได้แก่ ยีน *OsPSY*, *OsPDS*, *OsZISO*, *OsZDS*, *OsCrtISO*, *OsLCYE* และ *OsLCYB* และยีนที่ควบคุมส่วนที่สังเคราะห์ แซนโทฟิลล์ จำนวน 5 ยีน ได้แก่ ยีนที่ควบคุมการสร้างสารลูทีน คือ *OsCYP97A*, *OsCYP97C*, *OsEHY* และ *OsBHY* ยีนที่ควบคุมการสร้างสารซีแซนทีน และไวโอลาแซนทีน (violaxanthin) คือ *OsCYP97A*, *OsBHY* และ *OsZEP* (Nisar et al., 2015; Sun et al., 2018) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 วิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในข้าว
ที่มา; (Nisar et al., 2015)

วิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์มีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ที่สำคัญ คือ เอนไซม์ PSY ซึ่งการแสดงออกของยีน *PSY* เป็นแบบจำเพาะกับเนื้อเยื่อ (tissue specific) ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแวดล้อม เช่น ฮอโมน แสง และอุณหภูมิ ยีน *PSY* มีหลายอัลลีลที่สามารถเกิด alternative splicing ได้เอนไซม์ทำหน้าที่แตกต่างกัน (Cazzonelli and Pogson, 2010)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

เนื่องจากแคโรทีนอยด์มีความสำคัญอย่างมากในด้านสรีรวิทยา การพัฒนาและวิวัฒนาการของพืช จึงได้มีการศึกษาถึงกระบวนการเผาผลาญและหน้าที่อย่างแพร่หลาย โดยวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์นั้นค่อนข้างจะมีความคล้ายกันในพืชหลายชนิด (Stanley and Yuan, 2019) และได้มีการศึกษาถึงการควบคุมอีพีเจเนติกส์ (epigenetic) ของการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ โดยพบว่าการถอดรหัสของยีน *CRTISO* นั้นเกี่ยวข้องกับการทำงานของโปรตีน SET DOMAIN GROUP 8 (SDG8) ที่เป็นเอนไซม์ฮิสโตนเมทิลทรานส์เฟอเรส (histone methyltransferase) ที่เมทิลเลสฮิสโตน 3 ตำแหน่งไลซีน (K) ที่ 4 และ/หรือ 36 (H3K4 และ H3K36) โดยมีการทดสอบการกลายพันธุ์ของ *carotenoid chloroplast regulatory1 (CCR1)* ที่เป็นรหัสของโปรตีน SDG8 พบว่า ส่งผลให้เกิดการลดลงของ tri-methyl H3K4 ของโครมาตินที่บริเวณจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสของยีน *CRTISO* ทำให้การแสดงออกของยีนลดลง มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยการทำงานระหว่าง *SDG8* กับการสะสมแคโรทีนอยด์ยังไม่ทราบรายละเอียดที่ชัดเจน (Chettry and Chrungoo, 2020)

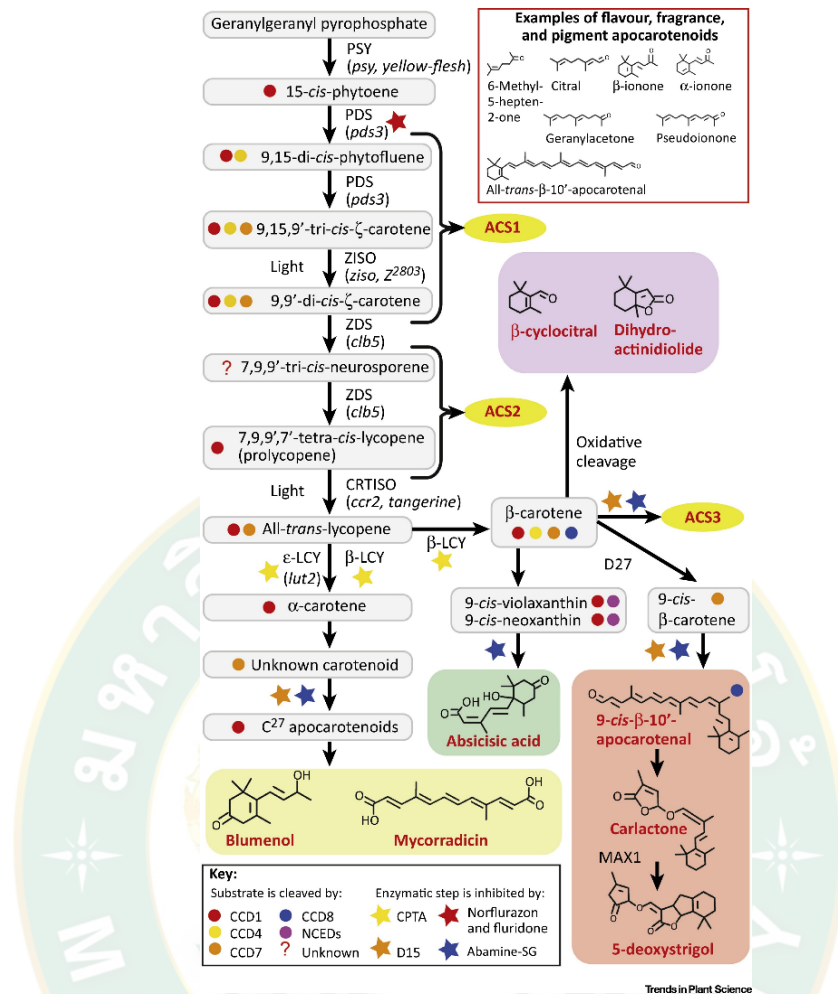
จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์กับ transcription factors (TFs) ที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสในข้าวที่มีสีของเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว, น้ำตาล และม่วง ด้วยเทคนิค transcriptome sequencing พบว่า ยีน *OsMAD26* และ *R2R3MYB* ที่เป็นยีนกลุ่ม TF มีการแสดงออกสูงเหมือนกันยีน *PSY1* ในระยะเมล็ดแก่ของข้าว แสดงให้เห็นว่า *OsMAD26* และ *R2R3MYB* น่าจะมีส่วนในการควบคุมการแสดงออกของยีนในวิถีสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (Chettry and Chrungoo, 2020)

ในช่วงผ่านมามีความสนใจเกี่ยวกับเรื่อง การถอดรหัส กระบวนการหลังการถอดรหัส การแปลรหัส กระบวนการหลังการแปลรหัส การสะสมหรือการสลาย และการควบคุมผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ เช่น สิ่งเหล่านี้จึงนำไปสู่การค้นพบกลไกการควบคุมการสังเคราะห์ แคโรทีนอยด์ การควบคุมกระบวนการหลังการแปลรหัสของยีน phytoene synthase (*PSY*) โดยยีน orange (*Or*) ด้วยการสร้างยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการแสดงออกของยีน *Or* เพิ่มขึ้น พบว่ายีน *PSY* แสดงออกไม่แตกต่างกับต้นยาสูบปกติ แต่กลับพบว่าโปรตีน *PSY* มีปริมาณมากขึ้นในต้นปกติ (Zhou et al., 2015) ด้วยกระบวนการตัดสารในวิถีแคโรทีนอยด์ที่มีขนาดใหญ่ให้มีขนาด เล็ก โดย เอนไซม์ carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs) และ 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases (NCEDs) ของอะโปกแคโรทีนอยด์ (apocarotenoids) (Stanley and Yuan, 2019)

การสังเคราะห์อะโปแคโรทีนอยด์ (Apocarotenoid Biosynthesis)

ในพืชแคโรทีนอยด์เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการ เพื่อให้ได้สารต่าง ๆ ในวิถีการสังเคราะห์ ซึ่งแคโรทีนอยด์มีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์แสงและการป้องกันแสง แต่แคโรทีนอยด์ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของวิถีการสังเคราะห์ ยังมีในส่วนของอะโปแคโรทีนอยด์ (apocarotenoids) ที่เป็นตัวช่วยในการปรับเปลี่ยนการพัฒนาพืชและการตอบสนองต่อสิ่งเร้าจากสิ่งแวดล้อม โดยอะโปแคโรทีนอยด์เป็นผลผลิตจากเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการตัดแคโรทีนอยด์ (carotenoid cleavage dioxygenases: CCDs) หรือกระบวนการที่ไม่ได้เกิดจากเอนไซม์ (non-enzymatic processes) สารในวิถีการสังเคราะห์อะโปแคโรทีนอยด์จะสลายตัวได้ง่ายกว่าสารที่ได้จากวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ เนื่องจากเกิดการเร่งการตัดตัวของสารตั้งต้น (Hou et al., 2016; Sun et al., 2020) (ภาพที่ 3)

สัญญาณอะโปแคโรทีนอยด์ (apocarotenoid signals: ACSs) มีบทบาทในการควบคุมการสังเคราะห์สารที่เกิดขึ้นหลังจากผลผลิตสุดท้ายของวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ที่ได้เป็นกรดแอบไซซิก (abscisic acid: ABA) และสตริกโกลแลกโตน (strigolactone: SL) โดยในอะราบิดอปซิสพบ CCDs ถึง 9 ชนิดและได้มีการตั้งชื่อตามประเภทและความจำเพาะของเอนไซม์ ได้แก่ CCD1, CCD4, CCD7 และ CCD8 ซึ่งมีการศึกษาพบว่า CCD8 อาจจะมีเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ SL นอกจากนี้มี 5 CCDs อยู่ในกลุ่ม nine-cisepoxy carotenoid dioxygenase (NCED2, NCED3, NCED5, NCED6, และ NCED9) ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ ABA โดยในสิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์ก็จะมี การตั้งชื่อที่แตกต่างกันออกไป



ภาพที่ 3 วิธีการสังเคราะห์ห่อไซโทแคโรทีนอยด์ (apocarotenoid Biosynthesis) ในพืช โดย จุดสีต่าง ๆ จะแสดงการเข้าทำงานของ carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs) ในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ของการเกิดไซโทแคโรทีนอยด์ ที่มา: (Hou et al., 2016)

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

จุดประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีหลายประการ เช่น ด้านทนต่อโรคและแมลง เพิ่มผลผลิต คุณภาพการหุงต้ม และเพิ่มคุณค่าทางอาหาร เป็นต้น จึงได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้คัดเลือก (marker assisted selection; MAS) ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือก เพิ่มความแม่นยำ และย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อคัดเลือกพันธุ์ข้าวหรือต้นข้าวที่มีจีโนไทป์ตรงตามต้องการ MAS ที่นำมาใช้ในการคัดเลือก มี 2 แบบ คือ เครื่องหมายที่บริเวณยีน (functional marker assisted selection; fMAS หรือ direct MAS; dMAS) และเครื่องหมายที่ขนานข้างยีน (flanking

marker assisted selection หรือ indirect MAS; iMAS) การคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายที่บริเวณ ยีนจะมีความแม่นยำมากกว่าเครื่องหมายที่ขนานข้างยีน เนื่องจากเครื่องหมายที่ได้ถูกพัฒนามาจาก บริเวณยีนของลักษณะที่สนใจ (จันทร์จิรา และคณะ., 2557)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) มีความสำคัญต่องานทางด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์อย่างมาก เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการ จำแนกสิ่งมีชีวิตด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์หรือสัณฐานวิทยานั้นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญและค่อนข้างยาก โดยเฉพาะในพืชซึ่งมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมและความคล้ายคลึงกันสูง ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอ จึงช่วยทำให้การจัดแบ่งกลุ่มของสายพันธุ์มีความแม่นยำและความถูกต้องมากขึ้น ปัจจุบันได้มีการนำ เครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการหาจัดกลุ่มและศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลาย (จุฑาทพร, 2555)

เครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายประเภท เช่น RFLP, RAPD, AFLP, SSR และ SNP เป็นต้น การ เลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละ ประเภท (จุฑาทพร, 2555)

อาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphisms; RFLP) เริ่มด้วยการตัด จีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ตามด้วยแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นทำไฮบริดเซชันด้วยโพรบที่เป็นยีนที่สนใจ เทคนิคนี้เป็น เทคนิคแรกๆ ที่ได้รับความนิยมสูงในอดีตแต่มีขั้นตอนซับซ้อน และเสียเวลา จึงไม่ได้รับความนิยมใน เวลาต่อมา

อาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบ ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา โดยอาศัย หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (arbitrary primer) ขนาด 8-12 เบส หากไพรเมอร์มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอของพืชที่นำมาตรวจสอบจะเกิดการเพิ่ม จำนวนของดีเอ็นเอ ไพรเมอร์เหล่านี้จึงสามารถเข้าคู่กับลำดับเบสในจีโนมของพืชได้หลายตำแหน่ง โดยหากสายพันธุ์พืชที่นำมาตรวจสอบเป็นคนละชนิด การเพิ่มจำนวนจะได้แถบดีเอ็นเอรูปแบบ แตกต่างกัน

เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphisms; AFLP) เป็นการวิเคราะห์ ความแตกต่างของจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะร่วมกับความแตกต่างของตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ที่มี

ลำดับเบสแบบสุ่มสามารถตรวจสอบหลายตำแหน่งในคราวเดียวกัน เครื่องหมายนี้มีความจำเพาะและสม่ำเสมอในการทำซ้ำสูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี เนื่องจากการทำซ้ำหนึ่งอาจได้แถบดีเอ็นเอที่มีโพลิมอร์ฟิซึมจำนวนมากเมื่อเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา แถบดีเอ็นเอค่อนข้างชัดเจน จึงนิยมนำเทคนิคนี้มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การสร้างแผนที่พันธุกรรม การค้นและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับยีนที่สนใจ

เอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat; SSR) เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จับกับดีเอ็นเอที่ขนาดข้างบริเวณไมโครแซทเทลไลท์ ทำให้การออกแบบไพรเมอร์ชนิดนี้ต้องทราบลำดับเบสบริเวณขนาดข้างส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ ผลการศึกษาพืชต่างสายพันธุ์กันพบว่ามีความซ้ำไม่เท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบความแตกต่างของขนาดแถบดีเอ็นเอได้จากผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เทคนิคนี้มีชื่อเรียกต่าง ๆ กันได้แก่ Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) หรือ Sequence Tagged Microsatellite (STM) หรือ Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) หรือ Sequence Tagged SSR

สนิปส์ (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) จากเทคนิค ARMS-PCR

การตรวจโดยใช้เทคนิค PCR ที่นิยมใช้คือ Amplification Refractory Mutation System-PCR (ARMS-PCR) ซึ่งเทคนิคนี้นิยมใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ point mutation และการตรวจหา Single Nucleotide Polymorphism (SNP) หลักการของเทคนิค ARMS-PCR คือ การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยาแรกไพรเมอร์ที่ใช้จะจำเพาะกับอัลลีลที่ 1 และในอีกปฏิกิริยาไพรเมอร์ที่ใช้จะจำเพาะกับอัลลีลที่ 2 ในปัจจุบันนอกจากเทคนิค ARMS-PCR ยังมีเทคนิค Tetra-Primer Amplification Refractory Mutation System PCR (Tetra-Primer ARMS-PCR) ซึ่งสามารถตรวจสอบอัลลีลที่ปกติและอัลลีลที่เกิดการเปลี่ยนแปลงได้โดยการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว

หลักการของเทคนิค Tetra-Primer ARMS-PCR จะประกอบด้วยไพรเมอร์ 4 สาย คือ ไพรเมอร์ outer forward และไพรเมอร์ outer reverse ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอในบริเวณก่อนและหลังบริเวณ SNP ไพรเมอร์ outer forward และ outer reverse จะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจแต่ไม่จำเพาะกับอัลลีลใด ๆ นอกจากนี้ไพรเมอร์ outer 2 สายนี้แล้วยังมีไพรเมอร์ inner forward และ inner reverse เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอัลลีลที่ 1 และ 2 ตามลำดับ โดยบริเวณ

ปลายด้าน 3' ของไพรเมอร์ inner ทั้งสองจะมีนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับแต่ละอัลลีลนั้น (Pongjaroenkit et al., 2017)

การอ่านลำดับเบสของจีโนม (Whole genome sequencing; WGS)

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในจีโนม แบบเป็น *De novo* sequencing เป็นการหาลำดับเบสของจีโนมของสิ่งมีชีวิต โดยไม่มีข้อมูลลำดับเบสอ้างอิง และ whole genome resequencing เป็นการหาลำดับเบสของจีโนมของสิ่งมีชีวิต โดยมีข้อมูลลำดับเบสอ้างอิง (แสงทอง, 2561)

ในการอ่านลำดับเบสของจีโนมนั้นจะเกี่ยวข้องกับ 3 ส่วน ดังนี้

Sequencing เริ่มต้นการหาลำดับเบสจะอาศัยหลักการ dideoxynucleotide chain-termination โดยใช้เทคนิคแซงเกอร์ (sanger chemistry) ซึ่งจะเป็นการนำนิวคลีโอไทด์มาติดฉลากด้วยสารเรืองแสงหรือรังสีโดยทั้งสี่เบสจะติดฉลากสีต่างกัน จากนั้นจะการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากเส้นสายเดิม ความยาวของการอ่านลำดับเบสที่ได้ประมาณ 1,000 ถึง 1,200 คู่เบส ต่อมาได้มีการหาลำดับเบสจากชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กนำมาต่อกันเป็นดีเอ็นเอสายยาว วิธีการใหม่ที่พัฒนาเรียกว่า shotgun sequencing และในปัจจุบันนี้ได้มีการใช้เทคโนโลยีแบบ high throughput ที่เรียกว่า next generation sequencing (NGS) ที่สามารถหาลำดับได้จำนวนมากในเวลาเดียวกัน ทำให้การหาลำดับเบสมีความรวดเร็ว และราคาถูกลง

Assembly ใช้ในการประกอบลำดับเบสใหม่โดยอาศัยหลักการ การจัดกลุ่มของชิ้นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ เป็น contiguous sequence (contig) จาก contig รวมกันเป็น ลำดับเบสที่ยาวขึ้น เรียกว่า scaffold การจัดการกับปริมาณของ reads ที่มีจำนวนมาก ความยาว reads จากเทคโนโลยีเอ็นจีเอสที่ได้ค่อนข้างสั้นอยู่ที่ 35 ถึง 400 คู่เบส จนถึงยาวเป็น 10 กิโลเบส ขนาดและจำนวนของ reads ส่งผลต่อการประกอบลำดับเบสเป็นสายยาวระดับจีโนม

Annotation เป็นการระบุตำแหน่งของยีน (annotation) เมื่อทราบการเรียงลำดับของดีเอ็นเอทั้งหมดแล้ว จึงค้นหาตำแหน่งของยีน ซึ่งมีอยู่เพียงประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ในข้อมูลจีโนมทั้งหมด ทั้งนี้อาจทำได้โดยการค้นหาบริเวณรหัส บริเวณโปรโมเตอร์ บริเวณเทมิเนเตอร์ของยีน หรือโดยการเปรียบเทียบกับยีนที่มีการรายงานแล้ว

ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเทคโนโลยีการอ่านลำดับเบสของจีโนมมาใช้อย่างแพร่หลาย จึงมีบริษัททางด้านวิทยาศาสตร์หลายบริษัทให้บริการอ่านลำดับเบส ทั้งในรูปแบบที่รับตัวอย่างเนื้อเยื่อ

และในรูปแบบของ genomic DNA เพื่อทำการอ่านและวิเคราะห์ผลการอ่านลำดับเบส โดยจะยกตัวอย่างการส่งตัวอย่าง genomic DNA ไปอ่านและวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS ที่บริษัท NovogeneAIT, China แบบ resequencing ถึงการจัดการข้อมูล และการวิเคราะห์หาตำแหน่ง SNP และ InDel บนโครโมโซมด้วยการนำไปเทียบกับตำแหน่งบนฐานข้อมูล (ภาพที่ 4) ดังนี้

- เมื่อบริษัทได้รับตัวอย่างจะตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ส่งไปอ่านลำดับเบส โดย agarose gel electrophoresis และ NanoDrop® 2000 spectrophotometer ซึ่ง DNA จะต้องให้ค่า OD260/OD280 อยู่ในช่วง 1.8 - 2.0 ปริมาณขั้นต่ำไม่น้อยกว่า 1 ไมโครกรัม ต่อการทำ library

- อ่านลำดับเบส (Read) ด้วยเครื่อง Illumina® high-throughput sequencing โดยผลที่ได้ออกมาจากเครื่องจะมีรูปแบบของไฟล์ FASTQ ที่มีความยาวประมาณ 150 เบส

- ตรวจสอบคุณภาพไฟล์ FASTQ ที่อ่านได้จากแต่ละตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม Casava version 1.8 ซึ่งจะได้ค่า error rate, correct rate และ q-score (Q10 Q20, Q30 และ Q40)

- filter เพื่อเป็นการตัดตัวปนเปื้อนต่าง ๆ ออก ได้แก่ adapter contamination, Read ที่พบเบส N มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และ read ที่มีคุณภาพน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการ filter ครั้งที่ 1 จะทำการจัดกลุ่มโดยตัดตัวที่มีคุณภาพต่ำออกให้เหลือเฉพาะที่ Q-score ที่ Q30 และ Q40

- ทำการ mapping ผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม Burrows-Wheeler transform software (BWA) จากนั้นตัดข้อมูลซ้ำด้วยเครื่องมือ SAMTOOLS สำหรับ reference genome ที่ใช้คือ: ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-46/plants/fasta/oryza_sativa/dna/Oryza_sativa.IRGSP-1.0.dna.toplevel.fa.gz

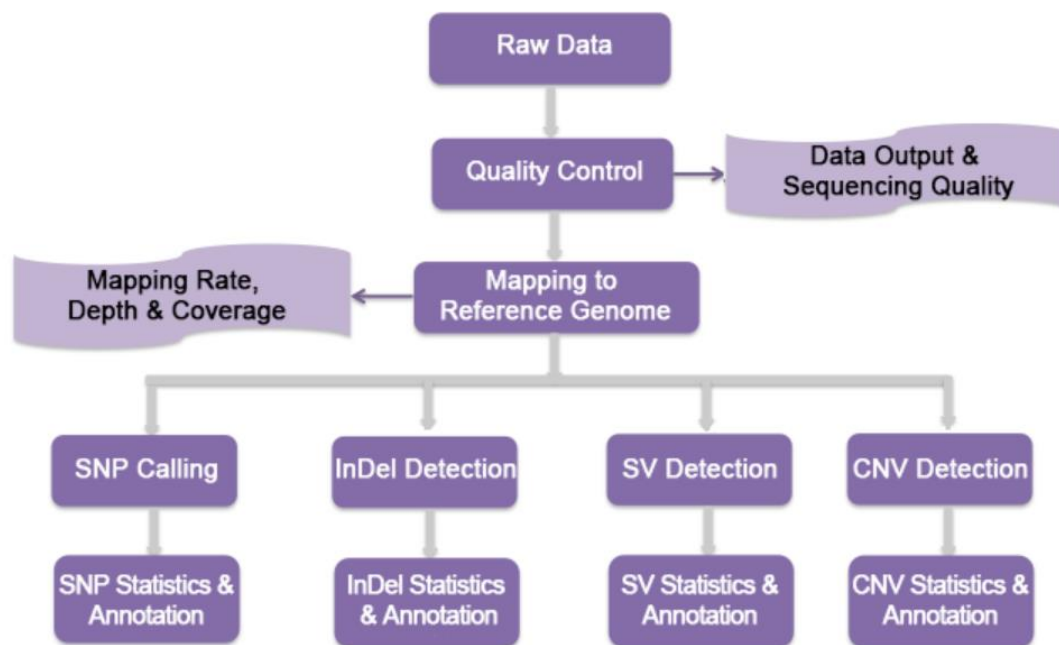
- ตรวจสอบ single nucleotide polymorphism (SNP) โดยโปรแกรม GATK สำหรับการหา annotation ของ Novogene จะใช้โปรแกรม ANNOVAR

- สำหรับการตรวจสอบ InDel (insertion or deletion) จะเป็นการ call ตำแหน่งที่มีขนาดต่างกันน้อยกว่า 50 คู่เบส โดยโปรแกรม GATK สำหรับการหา annotation ของ Novogene จะใช้โปรแกรม ANNOVAR

- สำหรับการตรวจสอบ structural variants (SVs) เป็นการเปรียบเทียบบริเวณที่พบความแตกต่างที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 50 คู่เบส โดยโปรแกรม BreakDancer สำหรับการหา annotation จะใช้โปรแกรม ANNOVAR

- สำหรับการตรวจสอบ Copy-number variation (CNV) จะเป็นการแสดงจำนวนซ้ำที่พบตำแหน่งนั้นเทียบกับ Reference genome จะแสดงผลเป็นจำนวนตัวเลข โดยโปรแกรม CNVnator สำหรับการหา annotation จะใช้โปรแกรม ANNOVAR

- จากนั้นทำการรวบรวมข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งหมดลงในตาราง Excel โดยมี 2 ไฟล์หลัก คือ SNP และ InDel ซึ่งในหนึ่งไฟล์จะแสดงทุกตำแหน่งที่พบความแตกต่างในจีโนมของตัวอย่างเทียบกับ Reference genome โดยจะเรียงจากตำแหน่งที่พบในโครโมโซมแท่งที่ 1 ถึง 12 ของข้าว ตามด้วยตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลงบนจีโนม mitochondria และ chloroplast เพื่อเป็นการสรุปรวมข้อมูลทั้งหมดสำหรับการวิเคราะห์ผลต่อไป



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการจัดการข้อมูล การวิเคราะห์หาตำแหน่ง SNP และ InDel จากเทคนิค WGS ที่มา; Novogene

การอ่านลำดับเบสของอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Transcriptome Sequencing)

การอ่านลำดับเบสอาร์เอ็นเอที่ได้จากการแสดงออกของยีน (transcriptome sequencing; RNA-Seq) เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอทั้งหมด เป็นการตรวจสอบหรือค้นหาชุดของ RNA transcript, mRNA และ non-coding RNA ในสิ่งมีชีวิตเดี่ยวหรือกลุ่มประชากรของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยการนำเอาเทคโนโลยีเอ็นจีเอสมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาส่วนของบริเวณรหัสการแสดงออกของยีนระดับเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ และการเกิดโรคในสิ่งมีชีวิตได้มากขึ้นด้วย

เทคโนโลยีทรานสคริปโตมมีส่วนช่วยในการเชื่อมช่องว่างในการอ่านลำดับเบสของจีโนม ตัวอย่างจากผลการศึกษาเซลล์สมองในสัตว์จำพวกต่อ (*Polistes metricus*) ด้วยเครื่อง 454/Roche genome sequencer พบว่าสามารถสร้าง expressed sequence tag (EST) เท่ากับ 391,157 reads จากนั้นทำการจัดเรียงลำดับเบสและทำการเปรียบเทียบกับจีโนมของผึ้ง (*Apis mellifera*) พบว่า EST ของตัวต่อมีความคล้ายกับลำดับเบสในส่วนที่เป็นรหัส 39 เปอร์เซ็นต์ (Toth et al., 2007) นอกจากนี้ยังได้มีการนำเทคนิคทรานสคริปโตมมาใช้ในงานทางการแพทย์ในการตรวจหา gene fusion ของเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง (Wilantho et al., 2012)

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีบริษัททางด้านวิทยาศาสตร์หลายบริษัทที่ให้บริการอ่านลำดับเบส อาร์เอ็นเอทั้งหมด มีการรับตัวอย่างทั้งในรูปแบบเนื้อเยื่อและในรูปแบบอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) เพื่อทำการอ่านและวิเคราะห์ผลการอ่านลำดับเบส โดยจะยกตัวอย่างการส่งตัวอย่างไปอ่าน และวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Novogene (NovogeneAIT, Singapore) แบบ *De novo* ถึงการจัดการข้อมูล การสร้าง cluster และการวิเคราะห์หาชื่อยีนและหน้าที่การทำงานของยีน (ภาพที่ 5) ดังนี้

- เมื่อบริษัทได้รับตัวอย่าง จะทำการตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่าง total RNA ที่ส่งไป วิเคราะห์ลำดับเบสโดย agarose gel electrophoresis และ NanoDrop ซึ่ง total RNA จะต้องให้ ค่า $A_{260}/A_{280} = 2.0$, $A_{260}/A_{230} \geq 2.0$ และ $RIN \geq 6.3$ ปริมาณขั้นต่ำไม่น้อยกว่า 0.4 ไมโครกรัม ต่อการทำ library

- อ่านลำดับเบส (Read) ด้วยเครื่อง Illumina โดยผลที่ได้ออกมาจากเครื่องจะมีรูปแบบของไฟล์ FASTQ ที่มีความยาวประมาณ 30-400 คู่เบส

- ตรวจสอบคุณภาพของ read ที่อ่านได้จากแต่ละตัวอย่าง ได้แก่ clean bases, error, Q20, Q30 และ GC โดยหลังจากการ filter ในครั้งที่ 1 แล้วนั้นจะทำการนำ clean reads ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีในฐานข้อมูลโดยเลือกการ map กลับไปหา reference genome โดยใช้โปรแกรม RSEM (RNA-Seq by Expectation Maximization) จากนั้นทำการ filter ครั้งที่ 2 เพื่อเป็นการตัดตัวปนเปื้อนต่าง ๆ ออก ได้แก่ adapter contamination, read ที่พบเบส N มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และ read ที่มีคุณภาพน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

- หลังจากการตรวจสอบความถูกต้องและคุณภาพของ read เรียบร้อยแล้วนั้นจะเป็นขั้นตอนในการประกอบ read ขนาดสั้น ๆ ทั้งหมดที่พบว่าเป็นยีนเดียวกันให้มีขนาดยาวครอบคลุมทั้ง ยีน โดยใช้โปรแกรม Trinity ในการสร้าง assembled transcriptome (Cluster) และทำการให้

ลำดับแต่ละ cluster โดยใช้โปรแกรม Corset ซึ่งในการให้ลำดับของ cluster นั้น หากตรวจพบยีนที่มีลำดับเบสเหมือนกันโปรแกรมจะทำการตั้งชื่อให้เป็น cluster เดียวกัน

- จาก cluster ทั้งหมดที่ได้ทำการสร้างขึ้นในขั้นตอนต่อไปจะเป็นการนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลต่าง ๆ เพื่อบ่งบอกถึงชื่อยีน ชื่อโปรตีน หน้าที่ และการทำงานของยีนในส่วนต่าง ๆ ในข้าว โดยขั้นตอนนี้จะเป็นการทำงานร่วมกันของหลาย ๆ ฐานข้อมูล (NovogeneAIT, Singapore) ดังนี้

- NT: NCBI blast 2.2.28+, the evaluate threshold is $1e-5$ (Each unigene shows top10 alignment results).

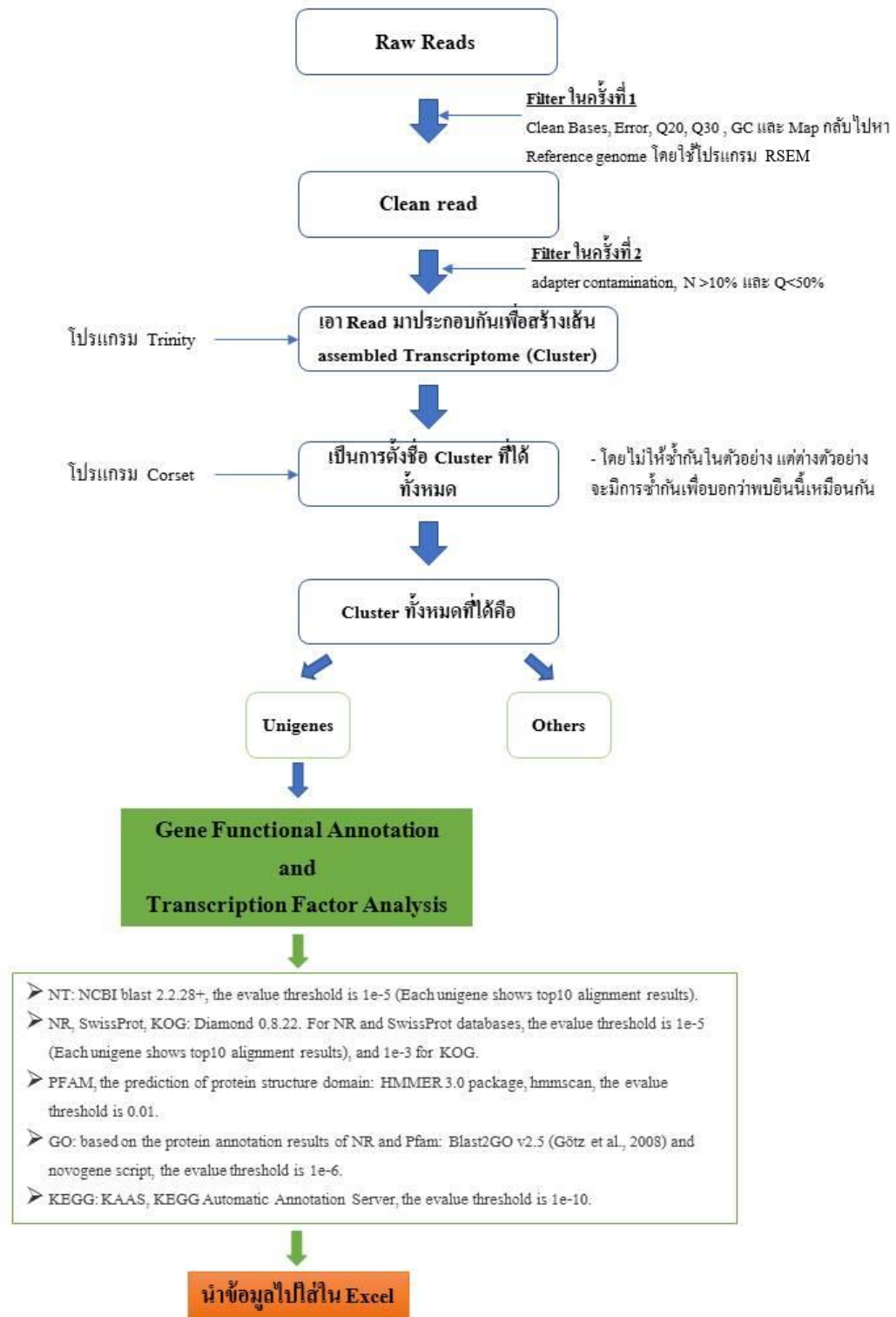
- NR, SwissProt, KOG: Diamond 0.8.22. For NR and SwissProt databases, the evaluate threshold is $1e-5$ (Each unigene shows top10 alignment results), and $1e-3$ for KOG.

- PFAM, the prediction of protein structure domain: HMMER 3.0 package, hmmscan, the evaluate threshold is 0.01.

- GO: based on the protein annotation results of NR and Pfam: Blast2GO v2.5 (Götz et al., 2008) and novogene script, the evaluate threshold is $1e-6$.

- KEGG: KAAS, KEGG Automatic Annotation Server, the evaluate threshold is $1e-10$.

- ในส่วนของการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนนั้น ในขั้นต้นจะทำการตัดข้อมูลที่ให้ค่า FPKM (fragments per kilobase of exon model per million reads mapped) ในทั้ง 4 ตัวอย่างน้อยกว่า 0 ออก เพื่อเป็นการ clean ข้อมูลทั้งหมดและตัด cluster ออกอีกครั้งหนึ่งก่อนการนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลหาบริเวณ SNP และ InDel จากนั้นจะทำการรวบรวมข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูลทั้งหมดลงในตาราง excel เพื่อเป็นการสรุปรวมข้อมูลทั้งหมดสำหรับการวิเคราะห์ผลต่อไป



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการจัดการข้อมูล การสร้าง Cluster และการวิเคราะห์หาชื่อยีนและหน้าที่การทำงานของยีนจากเทคนิค Transcriptome sequencing

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาปริมาณสารลูทีนในข้าว

สำหรับในชาวนั้นได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณของสารแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ จากข้าวในประเทศเกาหลีจำนวน 8 พันธุ์ ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีต่างกัน คือ สีดำ สีแดง และสีขาว พบว่า ข้าวในกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจะพบปริมาณของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ ที่สูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและขาว (Kim et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ รัชณี และ ริญญ (2555) ที่ได้ทำการศึกษาคคุณค่าโภชนาการของข้าวพื้นเมือง ในเขตปฏิรูปที่ดิน อำเภอภูคุดชุม จังหวัดยโสธร พบว่าข้าวเหนียวก่ำใหญ่และข้าวเหนียวก่ำน้อย ที่เป็นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำนั้นมีปริมาณสารลูทีนสูงที่สุด (115.15 และ 132.24 ไมโครกรัม/100 กรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีอื่นๆ ที่ได้้นำมาทำการศึกษา และได้มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จากข้าวไทยพันธุ์ก่ำน้อย ทับทิมชุมแพ และปทุมธานี 1 ซึ่งมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ สีแดงและสีขาว ตามลำดับ พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจะมีปริมาณสารลูทีนสูงกว่าข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและขาว (Janphen et al., 2019)

การค้นหายีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในข้าว

การศึกษาของ Kim et al. (2010); Pereira-Caro et al. (2013) ที่ทำการทดสอบข้าวที่มีสีของเยื่อหุ้มเมล็ดต่างกันพบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีปริมาณของสารที่ได้จากการสังเคราะห์ในวิถีแคโรทีนอยด์สูงกว่าที่ได้จากข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีอื่น ซึ่งผลที่ได้นี้เกิดจากการทำงานของยีน *OsPSY* ที่เป็นยีนสำคัญในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (Sun et al., 2018) โดยจะทำงานร่วมกับยีน *OsLCYE* และ *OsLCYB* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ระหว่างทางแยกเพื่อกำหนดการสังเคราะห์สารลูทีน หรือซีแซนทีนต่อไป ซึ่งจะพบการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ยีน สูงในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (Chettry et al., 2019)

การค้นคว้าข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ของ Shumskaya และ Wurtzel (2013) ทำให้ทราบเกี่ยวกับความสัมพันธ์กับกระบวนการสังเคราะห์แสง การป้องกันอันตรายที่เกิดจากแสง การเจริญเติบโต การตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากฮอร์โมน และสัญญาณต่าง ๆ โดยในข้าว (*O. sativa*) พบว่า มีการศึกษาโปรตีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีน คือ โปรตีน PSY1-P₂₅₇, PSY2 และ PSY3 จะพบอยู่ในขั้นตอน Carotenoid precursors สำหรับโปรตีน CYP97A และ CYP97C พบในขั้นตอน Carotenoid biosynthesis

จากการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของโปรตีน CYP97A4 ที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างสารลูทีนในข้าว โดยใช้เทคนิคการยับยั้งการทำงาน (Knock-out) ของยีนดังกล่าว พบว่าในข้าวที่

ได้ทำการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CYP97A4 มีการสร้างสารลูทีนลดลง เมื่อทำการเปรียบเทียบกับข้าวปกติ แต่ในส่วนของแอลฟา-แคโรทีน ซึ่งเป็นตั้งต้นในการสร้างสารลูทีนนั้นมีปริมาณมากขึ้น และข้าวที่ทำการยับยั้งการทำงานของโปรตีน CYP97A4 นั้นจะมีความไวต่อการถูกกระตุ้นด้วยแสงมากกว่าข้าวปกติ จากการศึกษาครั้งนี้คาดว่าโปรตีน CYP97A4 น่าจะเป็นโปรตีนที่สำคัญในการสังเคราะห์สารลูทีน (Lv et al., 2012)

จากศึกษาของ Lu et al. (2018) เป็นการศึกษาจีโนมบีแนนท์โปรตีน *CsMADS6* ที่เป็น transcription factor พบว่า โปรตีนดังกล่าวสามารถจับที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *PSY* และ *PDS* แล้วทำให้การแสดงออกของทั้ง 2 ยีนเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษา Chetty และ Chrungoo (2020); Chetty et al.(2019) ที่พบการแสดงออกของยีน *PSY1*, *PDS* และ *LCYb* สูงในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำที่มีการสะสมของสารในวิถีแคโรทีนอยด์สูง รวมถึงการทำงานร่วมกันของยีนในวิถีแคโรทีนอยด์กับยีน *MADS26* และ *R2R3MYB* ซึ่งเป็นยีนกลุ่ม transcription factor (Stanley and Yuan, 2019) เช่นเดียวกับยีน *ZISO* ที่เป็นยีนสำคัญในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ซึ่งพบว่าในข้าวโพดและอะราบิดอพซิสหากเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจะส่งผลทำให้ปริมาณของสาร 15-cis-phytoene ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารไลโคพีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ลดลง (Chen et al., 2010; Wurtzel, 2019)

เนื่องจากข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีปริมาณของสารที่ได้จากการสังเคราะห์ในวิถีแคโรทีนอยด์สูง โดยมีงานวิจัยเกี่ยวกับการเกิดสีของเยื่อหุ้มเมล็ดพบว่ามียีนที่สำคัญคือ *OsDFR* (*OsPp*) และ *OsB1* (*OsPb*) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน (Rahman et al., 2013) สอดคล้องกับการศึกษาของ อนงค์นาฏ และคณะ (2564) ที่ได้สร้างประชากร F_2 ระหว่างข้าวพันธุ์แม่ปทุมธานี 1 (เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว) กับข้าวพันธุ์พ่อก้าน้อย (เยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินกับเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* และ *OsB1* พบว่า ยีน *OsB1* ให้ค่า R^2 เท่ากับ 31.9 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า ต้องมีอัลลีลเด่นของยีน *OsB1* อย่างน้อย 1 อัลลีล จึงจะทำให้การเกิดสีเยื่อหุ้มเมล็ดดำและปริมาณแอนโทไซยานินสูง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณสารในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการสร้างข้าวดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการสังเคราะห์สาร Provitamin A ซึ่งเป็นสารที่ได้จากวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในส่วนเอนโดสเปิร์ม ข้าวพันธุ์ golden rice 1 โดยการแทรกชุดยีน *PSY* จากดอกแดฟโฟดิล และชุดยีน phytoene desaturase (*CRTI*) จากแบคทีเรีย และข้าวพันธุ์ golden rice 2 โดยแทรกชุดยีน *PSY* จากข้าวโพด และชุดยีน *CRTI* จากแบคทีเรีย และมีการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารตั้งต้นในวิถีการสังเคราะห์แคโรที

นอยด์โดยแทรกยีน *ZmPSY1* จากข้าวโพด, ยีน *PaCRTI* จากแบคทีเรีย และยีน 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (*AtDXS*) กับยีน *orange (AtOR)* จากอะราบิโดพซิส เพื่อให้มีการทำงานร่วมกันของยีนมากยิ่งขึ้น พบว่ามีการสร้างสารเบต้าแคโรทีนสูงกว่าข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Al-Babili and Beyer, 2005; Bai et al., 2016)

นอกจากนี้ยังมีการวิจัยที่ได้นำเทคนิค CRISPR/Cas9 มาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารเบต้าแคโรทีน (provitamin A) ในข้าว โดยการเลียนแบบกระบวนการแก้ไขยีน *orange (Or)* ที่ได้มีการทดสอบในดอกกะหล่ำว่าสามารถทำให้ดอกกะหล่ำมีการสะสมของสารเบต้าแคโรทีนได้ เมื่อทำการแก้ไขยีน *Osor* ในแคลลัสของข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปกติ จะพบการสะสมของเบต้าแคโรทีนในปริมาณสูงจนทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของแคลลัสจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีส้ม ซึ่งผลการวิจัยแสดงให้เห็นถึงการพยายามนำเทคโนโลยีแก้ไขจีโนม CRISPR/Cas9 มาเป็นแนวทางเลือกในการเพิ่มการสะสมเบต้าแคโรทีนในพืช (Endo et al., 2019)

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

Colasuonno et al. (2017) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีเหลืองในเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวสาลี (wheat) เพื่อใช้ในการแยกสีของเมล็ดสีขาวและสีเหลืองออกจากกัน โดยจากการศึกษานี้รายงานยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างแคโรทีนอยด์ จำนวน 24 ยีน และพบความแตกต่างรูปแบบ single nucleotide polymorphisms (SNP) จาก 19 ยีน ที่ตั้งกระจายตัวในแต่ละโครโมโซมของข้าวสาลี และได้ทำการสร้าง quantitative trait loci (QTLs) พบว่า มียีน 10 ยีน ที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดสีในข้าวสาลี คือ ยีน *CRTISO*, *VDE*, *LCYE*, *PSY2*, *CYP97A3*, *PSY1*, *NCED9*, *ABA2*, *AAO3* และ *YPC* โดยตำแหน่งที่พบความแตกต่างสามารถทำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดสีเหลืองในเมล็ดเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาระบุตำแหน่ง QTLs ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และโฟเลตในข้าว พบตำแหน่ง QTLs ที่สัมพันธ์กับปริมาณโฟเลต จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ qQTF-3-1, qQTF-3-2 และ qQTF-3-3 ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 3 แต่ไม่พบตำแหน่ง QTL ที่สัมพันธ์กับปริมาณแคโรทีนอยด์ (Ashokkumar et al., 2020)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

จากการตรวจเอกสารเพื่อเลือกพันธุ์ข้าวไทยที่มีปริมาณสารลูทีนสูง พบข้าวที่มีสารลูทีนสูงคือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ เช่น พันธุ์ก้าน้อย (KN) หรือก้าใหญ่ (KY) มีปริมาณลูทีน 132.24 และ 115.15 ไมโครกรัม/100 กรัม ตามลำดับ (รัชนี้ และ ริญ, 2555) ในงานวิจัยนี้จึงเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำคือ พันธุ์ก้าน้อย และก้าใหญ่ จากเขตปฏิรูปที่ดิน สำนักงานการปฏิรูปที่ดินเพื่อเกษตรกรรม ต.กำเม็ด อ.กุดชุม จ.ยโสธร ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวคือ พันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 (RD-MJU2) หรือ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (PTT1) จากศูนย์หน่วยความเป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ข้าว มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เพื่อใช้ในการศึกษาลำดับเบสของจีโนมด้วยการอ่านลำดับเบสของจีโนม (Whole genome sequencing; WGS) และการศึกษาลำดับเบสของยีนที่แสดงออกทั้งหมดด้วยการอ่านลำดับเบสของอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Transcriptome Sequencing; RNA-Seq)

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบเครื่องหมายที่พัฒนาจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว 2 พันธุ์ คือ ปทุมธานี 1 และกข-แม่โจ้ 2 ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ 3 พันธุ์ คือ ก้าน้อย, ก้าใหญ่ และหอมมะลิดำ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง 1 พันธุ์ คือ หอมมะลิแดง

สำหรับพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการสร้างประชากรลูกรุ่นที่ 2 (F_2) คือ พันธุ์ก้าน้อย เป็นพันธุ์ให้ ผสมกับพันธุ์รับ คือ พันธุ์ปทุมธานี 1

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมี

1. CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) (Merck, Germany)
2. สาร TRIzol[®] reagent (Invitrogen, USA)
3. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Scientific, Germany)
4. ไพรเมอร์ (primer)
5. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป MyTaq[™] HS Red Mix (BioLine, UK)
6. อะกาโรส (agarose)
7. บัฟเฟอร์ TBE

8. เอทานอล (Ethanol)
9. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
10. Isopropyl alcohol
11. สีย้อมดีเอ็นเอ RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (20,000X) (intron Biotechnology, Korea)
12. ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) และ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)
13. มินเนอรัล ออย (Mineral oil)

อุปกรณ์

1. เครื่องเพิ่มปริมาณซันตีเอ็นเอ T100™ Thermal Cycler และ C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-rad, Singapore)
2. อุปกรณ์สำหรับการทำ electrophoresis
3. เครื่อง UV transilluminator (Major Science®, Taiwan)
4. ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
6. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง
8. ตู้บ่ม
9. เต้าไมโครเวฟ
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
11. เครื่องผสมสาร (Magnetic Sterrier)
12. ไมโครปิเปต แบบ single channel และ multi channel
13. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
14. เครื่อง homogenizer
15. เครื่องปั่นเหวี่ยง Mini plate spinner

วัสดุสิ้นเปลือง

1. เพลท 96 หลุม ขนาด 500 ไมโครลิตร (Deep well plate) สำหรับבודตัวอย่างด้วยเม็ดปัด
2. เพลท 96 หลุม ขนาด 300 ไมโครลิตร (V-Shape microplate) สำหรับตกตะกอนดีเอ็นเอ
3. เพลทพีซีอาร์ 96 หลุม ขนาด 200 ไมโครลิตร (96 well PCR plate non skirted)
4. หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และหลอดพีซีอาร์ ขนาด 200 ไมโครลิตร
5. ทิป ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร



วิธีการวิจัย

1. การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total-RNA) ด้วยวิธี TRIzol® reagent

อาร์เอ็นเอทั้งหมดที่ส่งไปอ่านลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-seq (transcriptome sequencing) (NovogeneAIT, Singapore) แบบ *De novo* sequencing สกัดจากใบข้าวจำนวน 4 พันธุ์ คือ ปทุมธานี 1, กข-แม่โจ้ 2, กำน้อย และกำใหญ่ เริ่มจากการศึกษาการแสดงออกของยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จากเนื้อเยื่อที่ระยะต่าง ๆ ของข้าวจากฐานข้อมูล Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) ในส่วนของ Plant: *Oryza sativa* เลือกเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของเนื้อเยื่อจากศึกษาของ (Davidson et al., 2012) จำนวน 9 เนื้อเยื่อ เพื่อเลือกเนื้อเยื่อที่จะใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด พบการแสดงออกของยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เกือบทุกยีนสูงในเนื้อเยื่อส่วนใบและช่อดอก จึงได้เลือกใช้เนื้อเยื่อในส่วนใบตรงที่ระยะ 7 วันก่อนและหลังออกดอก จากต้นข้าวจำนวน 4 ต้นต่อพันธุ์ ที่ปลูกในโรงเรือนพร้อมกัน สกัด Total-RNA ด้วยวิธี TRIzol® reagent (Invitrogen, USA) โดยขั้นตอนในการสกัดดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักใบข้าว 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำแข็งปัดจำนวน 5 เม็ด แช่หลอดตัวอย่างในไนโตรเจนเหลวจากนั้นทำการตีตัวอย่างโดยเครื่อง homogenizer
2. เติม Trizol® reagent 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครทิวบ์ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
3. เติมคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตร พลิกกลับหลอด เป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที
4. ปั่นเหยียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
5. ดูดส่วนใสชั้นบน ใส่หลอดใหม่ประมาณ 500 ไมโครลิตร
6. เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
7. บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
8. ปั่นเหยียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
9. ดูดส่วนใสทิ้งจนหมด
10. เติมเอทานอล ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
11. ปั่นเหยียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
12. ดูดส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 10-12 ซ้ำอีกครั้ง
13. ตากตะกอนให้แห้ง เป็นเวลาประมาณ 25-30 นาที
14. ละลายตะกอนด้วย TE buffer, pH 7.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

จากนั้นทำการกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Scientific, Germany) ด้วยวิธีการของชุดสำเร็จรูป เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอส่งตัวอย่างไปอ่านลำดับเบสและวิเคราะห์บริเวณที่แสดงความแตกต่างของลำดับเบสของยีนที่แสดงออกทั้งหมดในข้าวทั้ง 4 พันธุ์

2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) จากใบข้าว

ตัวอย่างที่นำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอแบ่งเป็น 3 การทดลอง คือ 1.) ตัวอย่างที่ส่งไปอ่านลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS (NovogeneAIT, China) แบบ resequencing โดยได้รับความอนุเคราะห์ข้อมูล WGS จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุลงสิงหาโรจน์ จำนวน 4 พันธุ์ คือ ปทุมธานี 1, กข-แม่โจ้ 2, กำน้อย และกำใหญ่ 2.) ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้น และ 3.) ตัวอย่างประชากรลูก F₂ จำนวน 300 ต้น เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณลูทีน โดยในทั้ง 3 การทดลองจะเก็บตัวอย่างใบหลังจากทำการปลูกประมาณ 1 เดือน จากนั้นสกัด Genomic DNA ด้วยวิธี mCTAB (Li et al., 2013) ในการทดลองที่ 1 และ 2 ใช้การสกัดในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แต่การทดลองที่ 3 จะทำการสกัดในเพลท 96 หลุมขนาด 500 ไมโครลิตร (Deep well plate) สำหรับสกัดดีเอ็นเอมีขั้นตอนในการสกัดดังนี้

- การสกัดดีเอ็นเอในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

1. ตัดใบขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 10-15 ชิ้น ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งได้ใส่เม็ดบีดสำหรับการบดตัวอย่างลงไปหลอดประมาณ 5 เม็ด

2. เติมนสารละลาย CTAB ดัดแปลง (modified Cetyl Trimethyl ammonium Bromide buffer) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ (V/V) ของ 2-mercaptoethanol ลงในหลอดที่มีตัวอย่างของใบข้าวอยู่

3. บดตัวอย่างโดยใช้เครื่องตีตัวอย่าง homogenizer โดยตีตัวอย่างจนกว่าใบข้าวแตกละเอียด

4. บ่มตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ผสมโดยการกลับหลอดทุก ๆ 10 นาที

5. เติมนคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 500 มิลลิลิตร หรือเติมเท่ากับปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง ทำการกลับหลอดไปมาเพื่อผสมตัวอย่าง

6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที
7. ย้ายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ประมาณ 300 - 400 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ RNaseA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1/300 เท่าของสารละลาย ประมาณ 1 ไมโครลิตร
8. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
9. เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือเติมเท่ากับปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง ทำการกลับหลอดไปมาเพื่อผสมตัวอย่าง
10. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที
11. ย้ายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ประมาณ 300 - 400 ไมโครลิตร เติม 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลเย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย จากนั้นผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
12. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที
13. ดูด 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลทิ้ง เติมเอทานอลเย็น ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ
14. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอลเย็น ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง
15. ตากตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ให้แห้ง แล้วละลายตะกอนกลับด้วย 10 ไมโครโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร
16. เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

- การสกัดดีเอ็นเอในเพลท 96 หลุม ขนาด 500 ไมโครลิตร (Deep well plate)

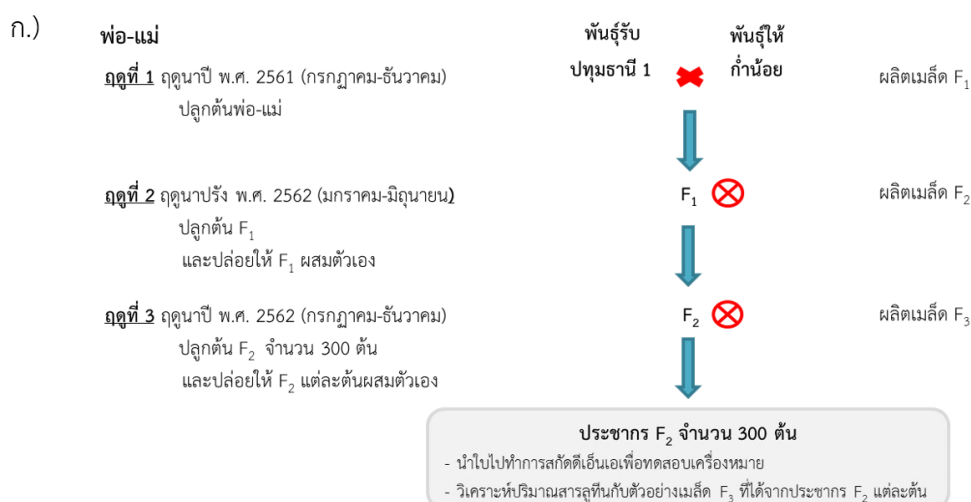
1. ใส่เม็ดบีดสำหรับการบดตัวอย่างลงไปในเพลท 96 หลุม ขนาด 500 ไมโครลิตร (Deep well plate) 3 เม็ดต่อหลุม ใส่ใบข้าวที่ได้ทำการตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น
2. เติมสารละลาย CTAB ดัดแปลง (modified Cetyl Trimethyl ammonium Bromide buffer) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ (V/V) ของ 2-mercaptoethanol ในแต่ละหลุม ปิดเพลทด้วยติดสติ๊กเกอร์
3. ตีตัวอย่างโดยใช้เครื่องตีตัวอย่าง homogenizer ครั้งละ 1.30 นาที ประมาณ 2 ครั้ง โดยจะทำการตีตัวอย่างจนกว่าใบข้าวแตกละเอียด แล้วเติมสารละลาย CTAB ดัดแปลง ปริมาตร 150 ไมโครลิตร

4. บ่มตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
 5. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที
 6. ย้ายส่วนใสด้านบนประมาณ 150 ไมโครลิตร ใส่เพลท 96 หลุมใหม่ (Deep well plate) และเติมเอนไซม์ RNaseA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1/300 เท่าของสารละลาย หรือประมาณ 0.5 ไมโครลิตร
 7. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
 8. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
 9. ย้ายส่วนใสด้านบนประมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่เพลท 96 หลุม ขนาด 300 ไมโครลิตร (V-Shape microplate) สำหรับตกตะกอนดีเอ็นเอ เติม 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลเย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย ประมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน
 10. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
 11. ดูด 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลทิ้ง ตะกอนดีเอ็นเอจะปรากฏเป็นสีขาวใสอยู่ก้นเพลท
 12. เติมเอทานอลเย็น ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ
 13. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอลเย็น ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง
 14. ตากตะกอนดีเอ็นเอที่ใต้ให้แห้ง แล้วละลายตะกอนกลับด้วย 10 ไมโครโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร
 15. เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- ทำการวิเคราะห์ผลการสกัดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ agarose ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที

3. การสร้างประชากรลูกรุ่นที่ 2 (F₂)

จากการตรวจสอบเอกสารเพื่อเลือกพันธุ์ข้าวไทยที่มีปริมาณสารลูทีนสูงมาเป็นพันธุ์ให้ พบข้าวที่มีสารลูทีนสูง คือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ คือ พันธุ์กำน้อย (Janphen et al., 2019; รัชณี และ ริญ, 2555) และพันธุ์รับคือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว คือ พันธุ์ปทุมธานี 1 ได้ทำการปลูกและผสมข้าม

พันธุ์รับและพันธุ์ให้ในฤดูนาปี พ.ศ. 2561 (กรกฎาคม-ธันวาคม) เพื่อผลิตเมล็ดลูกผสมรุ่นที่ 1 (F_1) จากนั้นนำเมล็ด F_1 ที่ได้มาปลูกในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2562 (มกราคม-มิถุนายน) แล้วปล่อยให้ต้น F_1 ผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ดรุ่นที่ 2 (F_2) และในฤดูนาปี พ.ศ. 2562 (กรกฎาคม-ธันวาคม) ได้ปลูกต้นประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น เพื่อใช้ในการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอและนำเมล็ดที่ได้จากต้น F_2 มาวิเคราะห์หาปริมาณสารลูทีน ซีแซนทีนและเก็บพีโนไทป์สีของเยื่อหุ้มเมล็ดเพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณสารลูทีนต่อไป (ภาพที่ 6)



ข.)

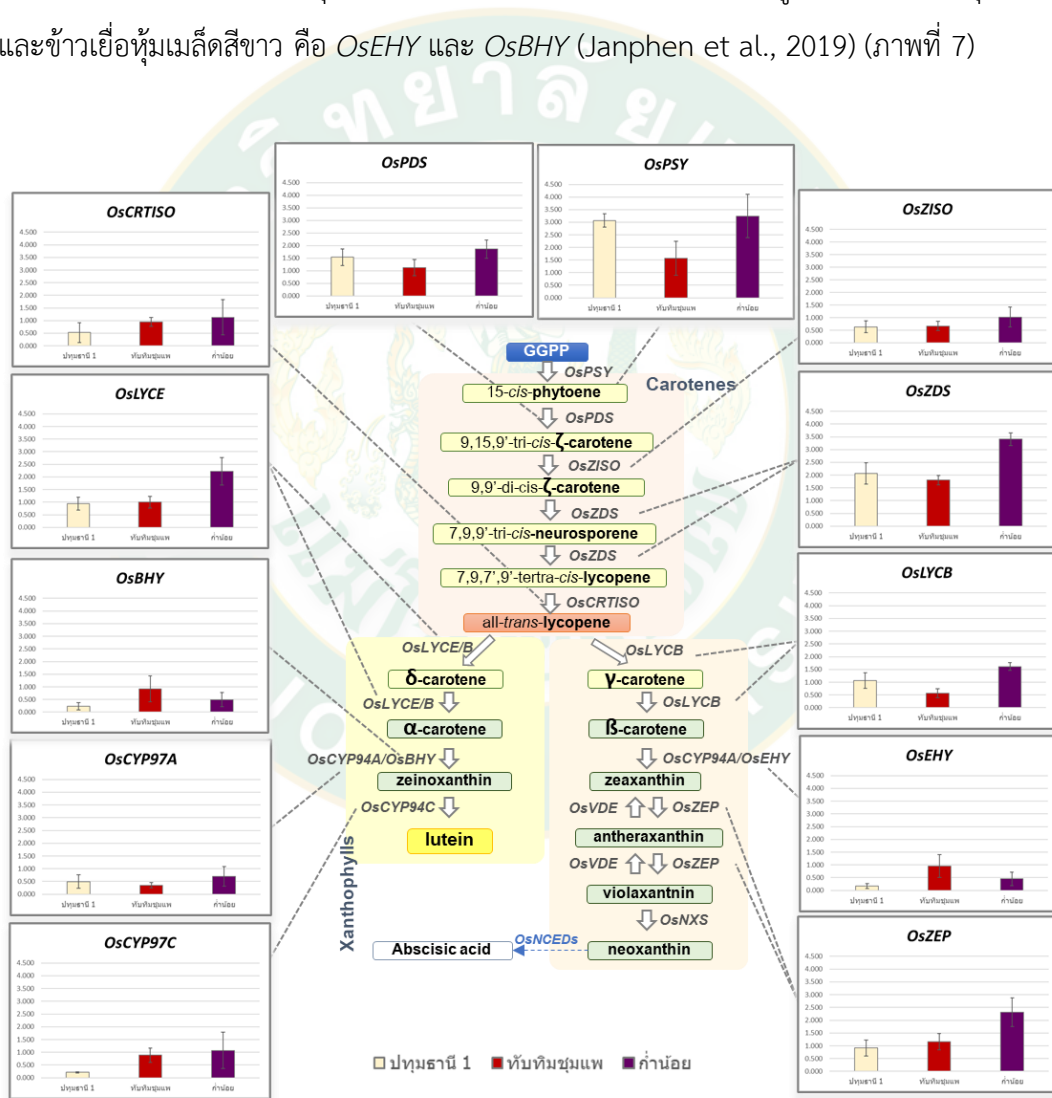


ภาพที่ 6 การสร้างประชากรลูกรุ่นที่ 2 (F_2) จากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ให้คือ ก้าน้อย และพันธุ์รับคือ ปทุมธานี 1

โดย ก.) แผนผังแสดงขั้นตอนการผลิตประชากร F_2 ข.) เมล็ดบนต้นประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น

4. การคัดเลือกเครื่องหมาย RM ที่ขนานข้างยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จำนวน 12 ยีน จากตัวอย่างใบธงที่ระยะ 7 วัน ก่อนและหลังออกดอก ของข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว สีแดง และสีดำ ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่า ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีการแสดงออกของยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์สูงกว่าข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว จำนวน 10 ยีน ได้แก่ *OsPSY*, *OsPDS*, *OsZISO*, *OsZDS*, *OsCrtISO*, *OsLCYE*, *OsLCYB*, *OsCYP97A*, *OsCYP97C* และ *OsZEP* และในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงพบ 2 ยีน ที่มีการแสดงออกสูงกว่าในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว คือ *OsEHY* และ *OsBHY* (Janphen et al., 2019) (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว แดง และดำ ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR
ที่มา: (Janphen et al., 2019)

การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการเลือกยีนที่อยู่ส่วนต้นของการสังเคราะห์แคโรทีน (carotenes) จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *OsPDS*, *OsZISO*, *OsZDS*, และ *OsCrtISO* ยีนส่วนวิถีสังเคราะห์แซนโทฟิลล์ (xanthophylls) จำนวน 3 ยีน ที่แยกเป็นยีนสังเคราะห์สารลูทีน (lutein) คือ *OsCYP97A* และ *OsCYP97C* และยีนสังเคราะห์แซนทีน (zeaxanthin) และไวโอลาแซนทีน (violaxanthin) คือ *OsZEP* รวมเป็น 7 ยีน เพื่อค้นหาเครื่องหมาย RM ขนาบข้างยีน ซึ่งขั้นตอนในการค้นหาไพรเมอร์ RM ขนาบข้างยีนมี ดังนี้

4.1 ค้นหาลำดับเบสของยีนที่รายงานในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) และ The Rice Annotation Project (RAP) (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>) เพื่อระบุตำแหน่งของยีนที่อยู่บนโครโมโซมของข้าว โดยจะเลือกตำแหน่งที่ตั้งของยีนที่แสดงในข้าวพันธุ์ Nipponbare (*Oryza sativa* L. Japonica) เป็น reference genome เนื่องจากตารางเครื่องหมาย RM ของฐานข้อมูล Gramene (McCouch et al., 2002) (<https://archive.gramene.org/>) และ Ricebase (<https://ricebase.org/>) ใช้ข้าวพันธุ์ดังกล่าวเป็น reference genome เช่นเดียวกัน

4.2 ค้นหาเครื่องหมาย RM ที่เป็นเครื่องหมายประเภท SSR ตำแหน่งที่มีไพรเมอร์จากฐานข้อมูล Gramene (McCouch et al., 2002) มีขั้นตอน ดังนี้

- จากตารางเครื่องหมาย RM Supplementary Table 18 จะมีการเรียงลำดับเครื่องหมายตามโครโมโซมและตำแหน่ง นำตำแหน่งของยีนที่สนใจมาหาเครื่องหมาย RM ในตาราง โดยเลือกเครื่องหมายที่มีตำแหน่งก่อนถึงยีนจำนวน 10 คู่ และหลังยีนจำนวน 10 คู่ รวมจำนวนไพรเมอร์ที่เลือกใน 1 ยีน คือ 20 คู่ (ภาพที่ 8ก)

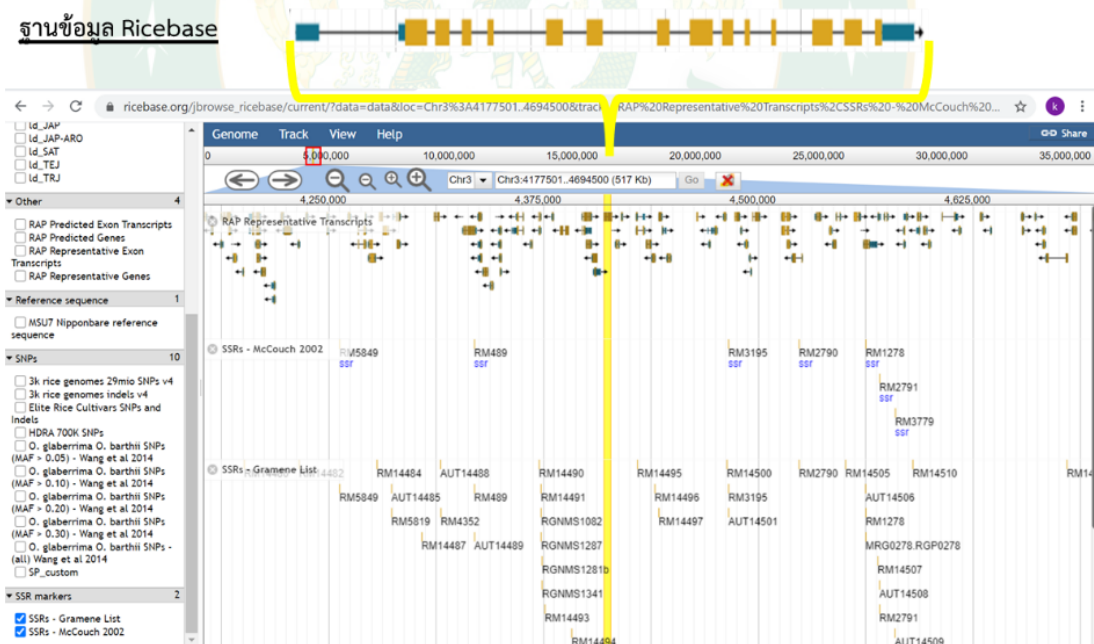
- นำเครื่องหมาย RM ที่ได้มาตรวจสอบระยะห่างกับตำแหน่งของยีนที่สนใจ โปรแกรม Ricebase (<https://ricebase.org/>) ดังภาพที่ 8ข จากนั้นเลือกเครื่องหมายที่ห่างจากตำแหน่งที่ตั้งของยีนไม่เกิน 100 กิโลเบส เพื่อให้ได้เครื่องหมายที่ใกล้ชิดกับยีน ซึ่งจะเลือกด้านละ 3 เครื่องหมาย ทำให้ 1 ยีน จะเลือกเครื่องหมาย 6 เครื่องหมาย จากนั้นสังเคราะห์ไพรเมอร์ของแต่ละเครื่องหมายเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

ก.)

Supplementary Table 18

McCouch Locus ID	Motif	Number of Repeats	Chromosome	Order(S-L)	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end	
RM14484	AC	11	3	252	AUT14484	CTACTTCTCTCTGTCATAATCATCG	CGTCTCATTCTTGATCTCTACCG	97	4,259,739	4,259,760
RM5819	RM14485	ACT	3	253	AUT14485	TACGCGCTAACGCGCTAAAGTACC	AATCACTCCAGAACCCAGTAGTACG	171	4,268,274	4,268,309
RM14487	AT	39	3	255	AUT14487	TGCACACTCTGCTCAAAATTTGC	CGAGAGTGTCTGTCTAGATTTCCAGG	392	4,285,925	4,286,002
RM4352	RM14488	AT	3	256	AUT14488	AATGCAATGGCAACCAACAGC	GATTGAOCCACAACTGAAACG	436	4,296,987	4,297,020
RM489	RM14489	AAT	3	257	AUT14489	GAACAGGACACAATGATGAGG	GACGATGGACACCTAATTACAGC	220	4,316,616	4,316,639
RM14490	COG	7	3	258	AUT14490	GGAGACGACGGCTAGAGCCTAGAA	GCCGACCAAGTACAAOCCACTTCAACG	192	4,354,269	4,354,289
RM14491	AC	10	3	259	AUT14491	TAAAGAAATCGCGCGAAAGAGG	CTCCACGACCCATCTCTCTCC	272	4,355,489	4,355,508
RM14493	AT	14	3	261	AUT14493	AACTTGACCTGCTCACTTTCTCG	AATAGGGCCTAATTGCTTTCG	198	4,357,550	4,357,577
RM14494	AGGG	5	3	262	AUT14494	CCATCACAAGGACCACTGAAACC	TCCTCCAGTACTCTGAACCTTTGAAACG	362	4,373,095	4,373,114
Phytoene desaturase (PDS) Os03g0184000 chr03:4410090..4414779 (+ strand)										
RM14495	COG	7	3	263	AUT14495	ACCTCTCCCGGAGTGGATCG	GAGGTGCATGAGCCGACAGG	398	4,411,543	4,411,563
RM14496	AGG	8	3	264	AUT14496	CTCCATCTTGGCGCTTGTCTCC	CCTCGCTTAAACCTTCTCTCC	176	4,421,563	4,421,586
RM14497	COG	7	3	265	AUT14497	CTAATCGGCGCATGAGGATCG	COGTGATGAAGTGGAGGGATCG	298	4,423,936	4,423,966
RM14498	AT	38	3	266	-	NA	NA	NA	4,458,753	4,458,828
RM14499	AT	30	3	267	-	NA	NA	NA	4,459,223	4,459,282
RM14500	AT	12	3	268	AUT14500	TCACCACAAGCATGTTTACC	GGTGCTCATTAGTTCGCATGG	365	4,463,817	4,463,840
RM3195	RM14501	AG	3	269	AUT14501	ACCGGAAAGAAAGCCCATCACG	COGATAGGCTGAGCTGTTGG	199	4,464,494	4,464,517
RM2790	RM14502	AT	3	270	AUT14502	AGTTGCTAGTACTGTTGAC	GACTTCCAAATGATCTCTCTGC	593	4,505,458	4,505,491
RM14503	AT	25	3	271	-	NA	NA	NA	4,519,673	4,519,722
RM14504	AT	17	3	272	-	NA	NA	NA	4,520,086	4,520,119
RM14505	COG	8	3	273	AUT14505	CTCTTGGCGTCTTCGACTCTCC	GCCTTATGATTGCCGCAAGG	343	4,532,699	4,532,722

ข.)



ภาพที่ 8 การค้นหาเครื่องหมาย RM ที่ขนานข้างยีน

โดย ก.) ตารางเครื่องหมาย RM จาก supplementary table 18 และ ข.) ฐานข้อมูล Ricebase

4.3 ทดสอบการเพิ่มจำนวนด้วยเครื่องหมาย RM ที่ขนาบข้างยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) ซึ่งมีส่วนประกอบของ 1xMyTaq™ HS Red Mix (BioLine, UK) ไพรมเมอร์ของแต่ละเครื่องหมาย RM ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 μ M และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 10 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา สภาวะที่ใช้คือ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลการเพิ่มจำนวนด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ นาน 70 นาที

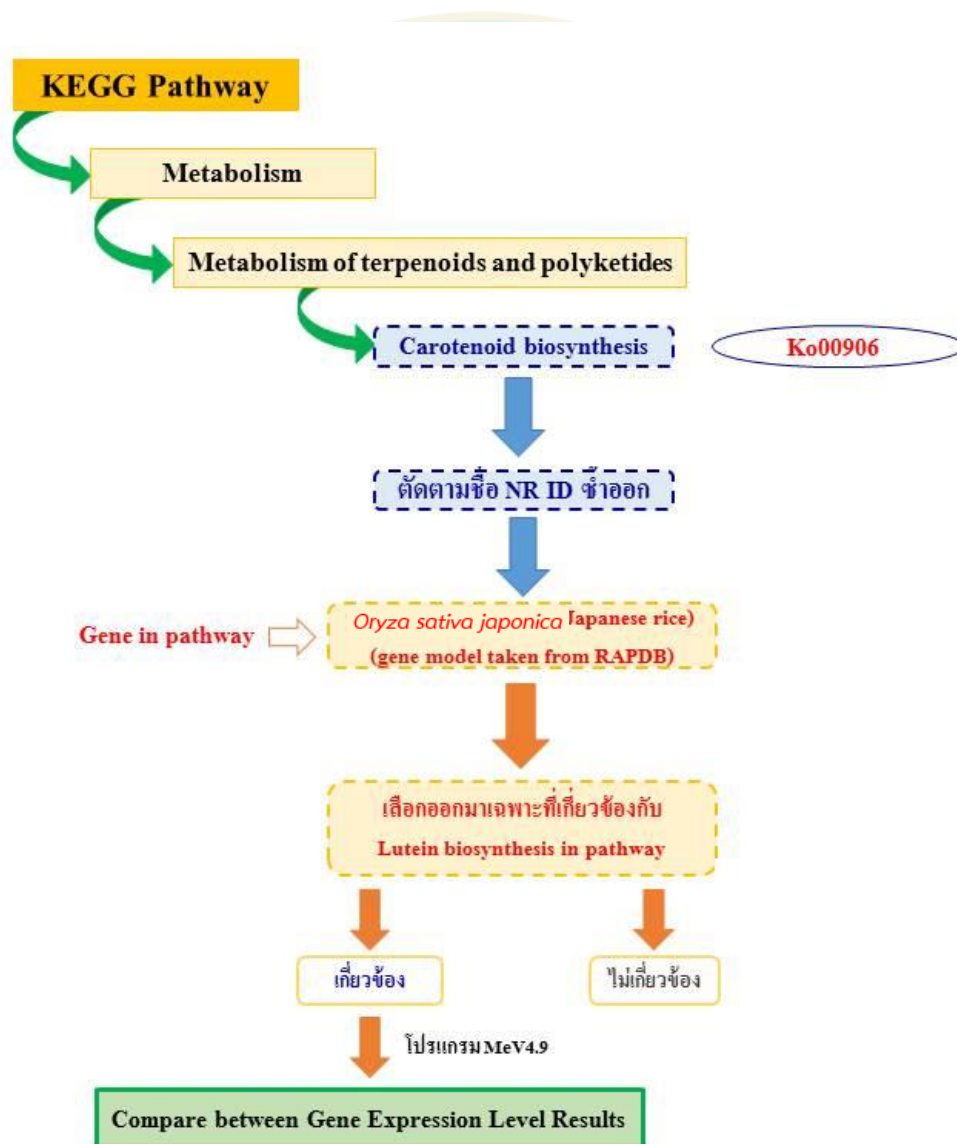
5. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค Transcriptome Sequencing (RNA-Seq)

จากการส่งตัวอย่างอาร์เอ็นเอทั้งหมดเพื่อทำการอ่านและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค transcriptome sequencing (NovogeneAIT, Singapore) แบบ *De novo* ซึ่งจะได้ผลการอ่านเป็นลำดับเบสของ cluster และ ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่แตกต่างในแต่ละ cluster การศึกษานี้จึงเป็นการค้นหายีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ จากผลของการทำ cluster ทั้งหมด มีขั้นตอนดังนี้ (ภาพที่ 9)

เริ่มจากการค้นหายีนจากการทำหน้าที่ต่าง ๆ จึงเลือกข้อมูลจากการวิเคราะห์ส่วน KEGG Pathway แล้วจึงเลือกเฉพาะยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ Carotenoid biosynthesis (Ko00906) ออกมาจากข้อมูลทั้งหมด ในขั้นต้นข้อมูล Cluster ที่ได้จะมียีนวิถีอื่น ๆ ที่ทำหน้าที่หรือเป็นตัวตั้งต้นที่มีความเชื่อมโยงกันทั้งหมดใน Metabolism of terpenoids and polyketides (09109) จึงต้องตรวจสอบเพื่อคัดเฉพาะ Cluster ของยีนที่อยู่ใน Carotenoid biosynthesis (Ko00906) ออกมาโดยตรวจสอบตามลำดับ คือ Biosynthesis of secondary metabolites (ko01110) > Metabolic pathways (ko01100) > Carotenoid biosynthesis (ko00906) > Lutein biosynthesis in pathway เมื่อได้ชื่อยีนและ Cluster ที่ต้องการแล้ว ต่อไปจะเป็นการตัด Cluster ที่มี NR ID ซ้ำกันออกและเลือกเฉพาะ Cluster ที่มีลำดับเบสยาวมากที่สุด เพื่อใช้เป็นตัวแทนของแต่ละยีน ซึ่งเป็นการเลือกเฉพาะในส่วนของ Carotenoid biosynthesis (Ko00906) ที่แสดงยีนใน *Oryza sativa japonica* (Japanese rice) เปรียบเทียบค่าการแสดงออกของยีน (FPKM) โดยใช้โปรแกรม Multi Experiment Viewer (MeV v4.9) (Howe et al., 2010) เพื่อ

ค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว โดยคาดว่า จะพัฒนาเครื่องหมายจากยีนที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างข้าวทั้งสองกลุ่ม

ค้นหาการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสทั้งแบบ single nucleotide polymorphism (SNP) และ insertion-deletion mutation (InDel) ของ cluster ที่เลือกได้จากผลการวิเคราะห์ SNP และ InDel จากบริษัทที่สามารถแยกข้าวกลุ่มที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวออกจากข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ เพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ



ภาพที่ 9 การค้นหายีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จากเทคนิค transcriptome sequencing

5.1 การค้นหาลำดับเบสเปลี่ยนแปลงของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

บริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบ SNP (single nucleotide polymorphisms) จะรายงานผลอยู่ในไฟล์ชื่อ: SNPs สำหรับบริเวณที่มีการเพิ่มขึ้น (insertion) หรือการลดลง (deletion) จะรายงานผลอยู่ในไฟล์ชื่อ: InDels ซึ่งจะเป็นรายงานการเปรียบเทียบในส่วนของบริเวณที่พบการเปลี่ยนแปลงในข้าวทั้ง 4 พันธุ์ ซึ่งรายงานทุกการเปลี่ยนแปลงที่พบ ดังนั้น ในการเลือกบริเวณที่เกิด SNP หรือ InDel จาก cluster ในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ที่ได้นั้นจะต้องเป็นบริเวณที่สามารถแยกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำที่ใช้ในการศึกษา ตามด้วย download ลำดับเบสของ cluster ที่สนใจจาก raw data โดยลำดับเบสที่ได้นั้นจะเป็นลำดับเบสที่เป็นตัวแทนของยีนจากข้าวทั้ง 4 พันธุ์ นำลำดับเบสของ cluster ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสกับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) และ The Rice Annotation Project (RAP) เพื่อค้นหาชื่อ ID และโครงสร้างของยีนของแต่ละ cluster ที่ทำการศึกษา

5.2 การออกแบบไพรเมอร์ชนิด T-ARMS ที่จำเพาะกับตำแหน่ง SNP

เนื่องจากตำแหน่งของการเกิด InDel ในแต่ละยีนที่ได้กล่าวมานั้น มีการเพิ่มหรือลดของลำดับเบสจำนวนสั้น ๆ ที่ไม่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis จึงไม่ศึกษาบริเวณดังกล่าว ดังนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ T-ARMS ที่เป็นเครื่องหมายที่จำเพาะกับการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบ SNPs ในขั้นตอนคัดเลือกลำดับเบสจากสาย transcript (cluster) ที่ทราบชื่อและโครงสร้างของยีนจากผลการเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล NCBI และลำดับเบสที่แสดงความแตกต่างในรูปแบบ SNP ในพันธุ์ข้าวทั้ง 4 พันธุ์ ซึ่งเป็น SNP ที่แยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวออกจากข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำได้

ตามด้วยค้นหาตำแหน่งของการเกิด SNP ดังกล่าวในข้าวพันธุ์ Nipponbare จากนั้นนำตำแหน่งของ SNP ที่ได้ไปค้นหาลำดับเบสบริเวณที่ขนาน SNP ทั้งสองข้าง (flanking sequence) จากลำดับเบสในจีโนม (*Oryza sativa Japonica* Group: IRGSP-1.0) ที่รายงานในฐานข้อมูล Gramene (แหล่งที่มา; <http://www.gramene.org/>) ซึ่งจะแสดงลำดับเบสที่ขนานข้างตำแหน่ง SNP ด้านละ 400 เบส แล้วนำลำดับเบสดังกล่าวมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (ภาพที่ 10ก)

การออกแบบไพรเมอร์ชนิด T-ARMS เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสแต่ละชนิด (allele specific primer) ที่จะมีจำนวน 4 สาย ได้แก่ outer forward และ outer reverse เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนและ inner forward และ inner reverse เป็นไพรเมอร์ที่ใช้ในการแยกความแตกต่าง

ของ SNP หรือ allele ที่ต่างกัน ด้วยโปรแกรม PRIMER1: primer design for tetra-primer ARMS-PCR (แหล่งที่มา; <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) โดยผลที่ได้จากการค้นหา ลำดับเบสที่ขนาบข้างตำแหน่ง SNP มีความยาวของลำดับเบสเท่ากับ 801 เบส และกำหนดให้ SNP ที่ต้องการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะอยู่ที่ตำแหน่ง 401 จากนั้นเลือกอัลลีลที่ต้องการออกแบบ เช่น inner forward (อัลลีล C) และ inner reverse (อัลลีล T) เป็นต้น สำหรับบริเวณ SNP ที่พบใน ตำแหน่งอื่นให้แสดงบริเวณดังกล่าวเป็นลำดับเบสในระบบ IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Johnson, 2010) และในส่วนของความยาวของขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่ม จำนวนและข้อกำหนดอื่นทำตามวิธีการของโปรแกรม PRIMER1 ซึ่งมีดังนี้ 1.) ลำดับเบสที่ใส่ใน โปรแกรมต้องมีขนาดไม่เกิน 1,000 เบส 2.) กำหนดตำแหน่งที่ต้องการออกแบบบนลำดับเบสและอัล ลีลทั้ง 2 ชนิด 3.) ความยาวของไพรเมอร์ซึ่งโปรแกรมจะกำหนดที่ 28 เบส 4.) ขนาดของแถบดีเอ็นเอ ที่เกิดจากไพรเมอร์ Inner โปรแกรมจะกำหนดที่ 100 - 300 คู่เบส 5.) ความแตกต่างของขนาดแถบดี เอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ Inner ทั้ง 2 แถบต่างกัน 1.1 - 1.5 เท่า และ 6.) กำหนด Tm ที่ 65 องศา เซลเซียส และ %GC ที่ 20 - 80 โดยค่าต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้น สามารถทำการปรับเปลี่ยนได้ตาม ความเหมาะสม ซึ่งผลจากการออกแบบจะให้ชุดไพรเมอร์จำนวน 7 ชุดไพรเมอร์ จากนั้นจะเลือกมา เพียง 1 ชุดไพรเมอร์ (Collins and Ke, 2012; Medrano and de Oliveira, 2014) ดังนั้น ไพรเมอร์ ที่ออกแบบจาก SNP 1 ตำแหน่งจะได้เป็น 1 ชุดไพรเมอร์ที่ประกอบด้วย 4 สาย ดังที่กล่าวมาก่อน หน้า (ภาพที่ 10ข)

ก.)

ฐานข้อมูล Gramene

Position of SNP = 401
R = G to A

```

TATGGATAGAACCAAGGAGACCAATTCTTGAACCCCTGGATTTTGCTGGCTGAAC
AACTGATTTGGGATTAAGTAGTAGTGTGCTTGTGATGAGCTGACCATGTG
TATGCTAGTCTTCTTTCTAGCAITGAGTAGCTTCTACAGGATACCTGAAT
ATGCTGCTGTGAAGGCTGAAGCAATGATCGGATCTTTCCGCTGTGG
CAGCTCAAGGATTTCTCCCGGAGCCGGACATACAGGGGCGCAAGCTGAAG
TGCCATCATAGGGGGCCCTCCCGCATGTCCACCGGCTGGAGCTTGGAACAGG
CCATGAGGTTCTCAATTCATTCCTGCAATGATGCTGCTCTCTCCAGGA
AAGACAGTATTTTGGTACAAATTTGGGTGATCTCTCTTTGAGGATGATC
TGTGAGTCCGGGCTTATCGGGCAAGCTCGTCTTTTGGGATGGAAGGGA
ACCAATCCGAGATGGGGCTGACGTGCTTCCGGGTGACACCAATCTTTCCGCTTA
TGAAAGGTAATTTCTATGCTTTTCAGATGGTGGAGATGCTACTTTGAGTAT
TTGTTAATCTAGACTGCACTAGTAGAATAGGAGCTGATGATGCTCTTCCATCA
TGAAAGTTAGAAAGTGCATCTGTTGCACTACTAGATGATGGAATCTGATCTCC
GATATGTTGAGGAGAAC
    
```

ข.)

โปรแกรม PRIMER1: primer design for tetra-primer ARMS-PCR

PRIMER1: primer design for tetra-primer ARMS-PCR

Source sequence (up to 1,000 bases)

Position of SNP from start of sequence

Allele 1: G

Allele 2: A

Optimum primer size: 25

Maximum primer size: 30

Minimum primer size: 20

Output 1:

```

Forward inner primer (A allele):           Melting temperature
381 CATTGCCTGCAATGATGATACA 401           60

Reverse inner primer (G allele):
421 TTCCCTGGAAGAGCAGAAAC 401           60

Forward outer primer (5' - 3'):
152 TCAGTAGCTTCTACAGGATTACCTGA 178     60

Reverse outer primer (5' - 3'):
618 AGAAAATTACCTTCTCATAAGGCG 594     60

Product size for A allele: 239
Product size for G allele: 270
Product size of two outer primers: 467
    
```

ตำแหน่ง 401 กำหนดเพียง 1 อัลลีล

*****OUTPUT 1*****

```

Forward inner primer (A allele):           Melting temperature
381 CATTGCCTGCAATGATGATACA 401           60

Reverse inner primer (G allele):
421 TTCCCTGGAAGAGCAGAAAC 401           60

Forward outer primer (5' - 3'):
152 TCAGTAGCTTCTACAGGATTACCTGA 178     60

Reverse outer primer (5' - 3'):
618 AGAAAATTACCTTCTCATAAGGCG 594     60

Product size for A allele: 239
Product size for G allele: 270
Product size of two outer primers: 467
    
```

ภาพที่ 10 หลักการออกแบบไพรเมอร์ชนิด T-ARMS ตำแหน่ง SNP ที่แสดงด้วยอักษรสีแดง โดย ก.) การค้นหาลำดับเบสบริเวณที่ขนาบ SNP ทั้งสองข้าง (flanking sequence) จากฐานข้อมูล Gramene ข.) โปรแกรม PRIMER1: primer design for tetra-primer ARMS-PCR

จากนั้นทดสอบชุดไพรเมอร์ที่ได้ด้วยเทคนิค PCR โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้จะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกตัวอย่าง 1 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ที่สุดที่ได้จากการเพิ่มจำนวนระหว่างไพรเมอร์ outer forward กับ outer reverse และจะมีแถบดีเอ็นเอ 1 แถบที่ขนาดต่างกันซึ่งจะเป็นแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับแต่ละ SNP หรือ allele ที่จะได้จากการเพิ่มจำนวนจากไพรเมอร์ inner forward กับ outer reverse หรือไพรเมอร์ outer forward กับ inner reverse ตัวอย่างการเพิ่มจำนวนจากไพรเมอร์ T-ARMS ดังภาพที่ 11 โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 470 คู่เบส จากไพรเมอร์ outer forward กับ outer reverse แถบดีเอ็นเอขนาด 290 คู่เบส ที่เป็นแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับอัลลีล T จากไพรเมอร์ outer forward กับ inner reverse และแถบดีเอ็นเอขนาด 240 คู่เบส ที่เป็นแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับอัลลีล C จากไพรเมอร์ inner forward กับ outer reverse โดยใช้ตัวอย่างของดีเอ็นเอ 10 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ซึ่งมีส่วนประกอบของ 1XMyTaq™ HS Red Mix (BioLine, UK) ไพรเมอร์จะมีการศึกษาอัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer : inner เท่ากับ 1 : 0.5 และ 0.5 : 1 ตามลำดับเพื่อหาปริมาณของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ



ภาพที่ 11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยชุดไพรเมอร์ T-ARMS

สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนคือ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ก่อนจึงจะเริ่มเข้าสู่ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 45 รอบ จากนั้นสิ้นสุดปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ในขั้นตอนการทดสอบนี้ใช้ข้าวจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ พันธุ์ปทุมธานี 1, พันธุ์ก้าน้อย และข้าวลูกผสมรุ่นที่ 1 (ปทุมธานี 1 x ก้าน้อย) ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนด้วย agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5xTBE Buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ นาน 45 นาที

6. การพัฒนาเครื่องหมายจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค WGS

การหาบริเวณที่เปลี่ยนแปลงของลำดับเบสระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีชาวกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำนด้วยเทคนิค WGS จะเป็นการค้นหาตำแหน่งของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ เริ่มด้วยการในการหาตำแหน่งของยีนที่สนใจบนโครโมโซมจากฐานข้อมูล Ricebase และ NCBI นำตำแหน่งของยีนที่สนใจที่ได้ไปค้นหาบริเวณ SNP และ InDel จากผลที่ได้จากการอ่านและวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS ซึ่งจะค้นหาบริเวณของยีน รวมถึงบริเวณด้านหน้า (upstream) และด้านหลัง (downstream) ที่อยู่ห่างจากยีนไม่เกิน 50 กิโลเบส จากนั้นจะทำการรวบรวมบริเวณ SNP และ InDel ทั้งหมดที่พบในบริเวณดังกล่าวเพื่อคัดเลือกบริเวณที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีชาวกับกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ

นำบริเวณความแตกต่างที่เลือกได้ไปหาตำแหน่งของบริเวณดังกล่าว โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการค้นหาตำแหน่งในฐานข้อมูล Gramene และ Ricebase เพื่อแสดงระยะห่างระหว่างตำแหน่งกับยีนที่อยู่ในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ที่ได้ทำการศึกษา

หลักการในการค้นหาตำแหน่ง SNP และ InDel เหมือนกับที่ได้กล่าวไปใน ข้อ 5.1 นอกจากยีนที่มีรายงานในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ จำนวน 12 ยีน ที่ได้แสดงในภาพที่ 2 แล้ว ยังได้ค้นหาความแตกต่างของยีน cytochrome P450 type B (*CYP97B*) ซึ่งพบว่าเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารในวิถีแคโรทีนอยด์ เนื่องจากโครงสร้างของยีนนี้คล้ายคลึงกับลำดับเบสของยีน *CYP97A* (Niu et al. 2020 และ Villa-Rivera et al. 2020) ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 เหมือนกันแต่ตำแหน่งของยีนต่างกัน และยีน *PSY* ที่ได้มีการรายงานก่อนหน้านี้พบว่ายีน *PSY* ในข้าวมีทั้งหมด 3 ยีน คือ *PSY1*, *PSY2* และ *PSY3* โดยยีน *PSY1* และ *PSY2* นั้นจะถูกควบคุมการแสดงออกด้วยแสงและทำงานเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ สำหรับยีน *PSY3* นั้นถูกควบคุมด้วยกระบวนการ ABA (Welsch et al., 2008) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จะค้นหาตำแหน่ง SNP และ InDel จากยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทั้งสิ้น 14 ยีน

เนื่องจากได้ออกแบบไพรเมอร์จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค transcriptome ไปแล้ว 5 ยีน คือ ยีน *ZDS*, *CYP97B2*, *ZISO*, *CYP97A* และ *ZEP* ดังนั้น ในการพัฒนาเครื่องหมายจากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค WGS จะเป็นการออกแบบเครื่องหมายกับยีนที่ยังไม่ได้ออกแบบจากเทคนิค transcriptome จำนวน 9 ยีน และยีนที่คาดว่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ได้แก่ กลุ่มของ transcription factor คือ ยีนในกลุ่ม MBW (MYB-bHLH-

WDR) protein complexes (Xu et al., 2015) จำนวน 5 ยีน และยีน MADS-box transcription factor จำนวน 1 ยีน, ยีน DnaJ จำนวน 2 ยีน, ยีน SET DOMAIN (Chetry et al., 2019) จำนวน 1 ยีน, ยีน cleavage ที่เกี่ยวข้องกับ carotenoid biosynthesis pathway (Sun et al., 2020) จำนวน 3 ยีน และยีน orange (*Or*) (Endo et al., 2019) ดังนั้น ยีนทั้งหมดที่จะทำการออกแบบเครื่องหมายมีจำนวน 22 ยีน

การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่ง InDel

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS นั้นจะได้ข้อมูลจำนวนมาก พบบริเวณที่แสดงความแตกต่างของลำดับเบสที่สามารถนำมาออกแบบเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง มีทั้งตำแหน่งที่เป็น SNP และตำแหน่งที่เป็น insertion หรือ deletion ซึ่งการรายงานผลการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสนั้นจะแสดงในรูปแบบของไฟล์ excel โดยตำแหน่งที่แสดงในไฟล์จะเป็นตำแหน่งของข้าวพันธุ์ Nipponbare (*Oryza sativa* L. Japonica) เป็น reference genome โดยบอกตำแหน่งของลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงบนโครโมโซมแต่ละแห่งของข้าว และแสดงลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ที่ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส การออกแบบเครื่องหมายที่จำเพาะกับตำแหน่ง SNP จะใช้หลักการเดียวกับที่ได้กล่าวในหัวข้อ “การออกแบบไพรเมอร์ชนิด T-ARMS ที่จำเพาะกับตำแหน่ง SNP” จากเทคนิค transcriptome ในส่วนนี้จึงอธิบายการออกแบบไพรเมอร์สำหรับบริเวณ InDel มีหลักการออกแบบดังนี้

- ค้นหาตำแหน่ง insertion หรือ deletion ที่แยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวจากข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำได้จากผลการเปรียบเทียบ จากนั้นนำบริเวณที่ต้องการออกแบบไปค้นหาตำแหน่งของการเกิด InDel ดังกล่าวในข้าวพันธุ์ Nipponbare ตัวอย่างดังแสดงในภาพที่ 12

โครโมโซม ตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลงพบโครโมโซม

ตัวอย่างที่ส่งไปวิเคราะห์ Whole genome sequencing (WGS)

#CHROM	POS	REF	ALT	KNO	KY_1	MJU2_1	PTT1
6	5,311,849	G	A	GG	GG	AA	AA
6	5,321,614	T	C	TT	TT	CC	CC
6	5,316,058	TACTGGAACAG	T	TACTGGAACAG TACTGGAACAG	TACTGGAACAG TACTGGAACAG	TT	TT

Nipponbare การเปลี่ยนแปลงพบในตัวอย่างที่ส่งไปวิเคราะห์

ภาพที่ 12 ตัวอย่างผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS

โดย KNO, KY_1, MJU2_1 และ PTT1 คือ ตัวอย่างข้าวพันธุ์ก้าน้อย, ก้านใหญ่, กข-แม่โจ้ 2 และ ปทุมธานี 1 ตามลำดับ

- ค้นหาบริเวณที่ขนาบ InDel ทั้งสองข้าง (flanking sequence) จาก ลำดับเบสในจีโนม (*Oryza sativa Japonica* Group: IRGSP-1.0) ที่รายงานในฐานข้อมูล Gramene ซึ่งจะแสดงลำดับเบสที่ขนาบข้างตำแหน่ง InDel ด้านละ 400 เบส แล้วนำลำดับเบส ดังกล่าวมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (ภาพที่ 13)

vcZ2IQ5Q INDEL

Most severe consequence | downstream gene variant | [See all predicted consequences](#)

Alleles | [CCGATGTTGAGAGGA/CA/CAGATGTTGAGAGGA/CAGGATGATGTTACA...](#) | [Click the plus to show all of the alleles](#) | Highest population MAF: 0.32

Location | [Chromosome 12:14232718-14232732](#) (forward strand) | VCF: 12 14232718 vcZ2IQ5Q CCGATGTTGAGAGG C, CAGATGTTGAGAGG, CAGGATGATGTTAC, CCGAGTTGAGAGG, CCGATGTTGAGAGG, CCGATGTTGAGAGG

HGVSN names | This variant has 16 HGVSN names - [Show](#) [x](#)

Original source | [The European Variation Archive \(EVA\) is an open-access database of all types of genetic variation data from all species](#)

About this variant | This variant overlaps 2 transcripts and has 31 sample phenotypes

Variants: 3 prime UTR Downstream Focus variant Missense

Markup: loaded

```

AAAAAAAAAATTCCTTTTAAAGAGAGAAAYGGAGAGGAGTTATSTAMATRCGTAYRCACRGGAAAGARRGGAYCCCTCTTTRTAMRAAATAGAA
AAATYAATCTAATCCAAGTTCCTCAAYGGYTTTGAGGATGGGCCCTATTARTTTTAGTGAAATYAAAGGCTRGGTTTTTTTTCTYAGATT
TTTDCATAATTTATGGAGYGCACGTKRYATTATAGGAGCATTATATAARCRTCATGTGAHAGCTTAGAAGCATTATATAAWWWTTTTY
RYRGACTTTTACTATATAATAGATAGATTGGATATCATCGATATAAATTTAGCRAAACATAWYTGTTAGAATTATTTAAGGTGMCRTMYAA
TATGCYAAAYGGAGATGAGAGGRRRSGTACAGGTGGTGGGA [CCGATGTTGAGAGGA/CA/CAGATGTTGAGAGGA/CAGGATGAT
GTTACA/CCGAAGTTGAGAGGA/CCGATGTTGAGAGGA/CCGATGTTGAGAGGA/CCGATGTTGAGAGGA/CCGATGTTGAGAGGA/CC
GATGTTGAGAGGA/CCGATGTTGAGAGGA/CCGATGTTGAGAGGA/CCGATGTTGATAGGA/CCGATGTTGAGAGGA/CCGATGTTTAG
AGGA/CCGATTTTGGAGAGGA/CCGATGTTGAGAGGA]GGATTTTATTTATTTTATTTGATYWAATGGTTAAAAEFTTTGGACCCACCAA
TTTAAAKRAAAATCAACGGTTAGATTTTTTAGRYTGSACTTGGCRCTCTTAGGAGYGTSTWGGAGAACA YGTGGMGGCCTTRGRAGCRT
TYRTAGRAARTTTTAATRMBWTWTAGWAKWTWAWARWAGATAKATAGATAGATGTGAAATGACAACCAGACTATAATACTTCTCTTATG
ACCATMTAAATCAAATGCTGGAAAGTACATTTGTAGCAGATMTCGCTTATGAAGTTATGAAGTATTTATCTTTATACGTAGAGTAGTGG
GTAAGGTTTTTCACAAACATCTTATTGTTGTGCGAGAAGTTCCGGCTGTTTGGACAAAAATACCATGAAAGCCATAGGRGA

```

ภาพที่ 13 บริเวณลำดับเบสที่ขนาบข้างตำแหน่ง InDel ที่แสดงด้วยอักษรสีแดง โดย Flanking sequence ด้านละ 400 เบส ในฐานข้อมูล Gramene

บริเวณขีดเส้นใต้ คือ ลำดับเบสที่มีลำดับเบสแตกต่างกันในซ้ำ 3,000 สายพันธุ์ ในระบบ IUPAC

- นำลำดับเบสที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3Plus: pick primers from a DNA sequence (แหล่งที่มา; <https://www.primer3plus.com/>) เพื่อออกแบบไพรเมอร์คล่อมบริเวณที่เกิด InDel โดยขนาดของไพรเมอร์ประมาณ 20 – 25 เบส ส่วนขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนจะกำหนดให้มีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 100 – 500 คู่เบส ที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างซ้ำพันธุที่นำมาศึกษา

- ทดสอบไพรเมอร์ InDel ที่ออกแบบด้วยเทคนิค PCR ซึ่งมีส่วนประกอบของ 1xMyTaq™ HS Red Mix (BioLine, UK) ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 μ M และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 10 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา สภาวะที่ใช้คือ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้น 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนด้วย agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5xTBE Buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ นาน 45 นาที

7. การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอกับข้าวพันธุ์รับ พันธุ์ให้ ลูกผสมรุ่นที่ 1 และ ประชากรลูกรุ่นที่ 2

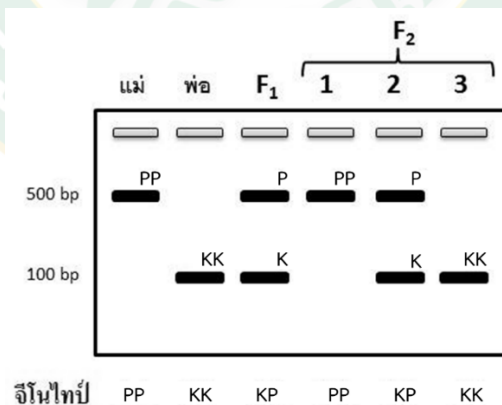
ตรวจสอบจีโนไทป์ของตัวอย่างข้าวพันธุ์รับ พันธุ์ให้ ลูกผสมรุ่นที่ 1 และประชากรลูก F_2 จำนวน 300 ต้น ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาได้จำนวน 18 ยีน เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณลูทีนต่อไป โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอของใบข้าวกับไพรเมอร์ที่ออกแบบ แล้วบันทึกข้อมูลจีโนไทป์ของต้น F_2 แต่ละต้น โดยกำหนดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในประชากร F_2 แต่ละแบบ (ภาพที่ 14) ดังนี้

- ตัวอย่างแสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์รับ (ปทุมธานี 1) ให้จีโนไทป์แบบ homozygous ให้สัญลักษณ์เป็น PP หรือ Female (F) ให้คะแนนเป็น 0

- ตัวอย่างแสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์รับ (ปทุมธานี 1) และพันธุ์ให้ (ก้าน้อย) ให้จีโนไทป์แบบ heterozygous ให้สัญลักษณ์เป็น KP หรือ H ให้คะแนนเป็น 1

- ตัวอย่างแสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์ให้ (ก้าน้อย) ให้จีโนไทป์แบบ homozygous ให้สัญลักษณ์เป็น KK หรือ Male (M) ให้คะแนนเป็น 2

บันทึกผลการทดสอบของทั้ง 18 เครื่องหมายที่ได้ทดสอบลงในตารางเพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



ภาพที่ 14 การกำหนดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในประชากร F_2 แต่ละแบบ

ต้นแม่ คือ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ต้นพ่อ คือ ข้าวพันธุ์ก้าน้อย F_1 คือ ลูกผสมของกลุ่มผสมปทุมธานี 1 กับ ก้าน้อย 1-3 คือ ลูก F_2 ต้นที่ 1-3 ตามลำดับ

8. การวิเคราะห์ปริมาณของสารลูทีนและซีแซนทีนด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เก็บตัวอย่างเมล็ดที่ได้จากข้าวพันธุ์รับ พันธุ์ให้ และประชากรลูกรุ่นที่ 2 คือ ตัวอย่างเมล็ด F₃ ที่ได้จากการปลูกประชากร F₂ ในฤดูนาปี พ.ศ. 2562 (กรกฎาคม-ธันวาคม) จำนวน 300 ต้น มาตรวจหาปริมาณสารลูทีนในแต่ละตัวอย่าง ด้วยเทคนิค HPLC โดยนำเมล็ดแก่ที่ได้มาทำการกะเทาะเปลือกใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร น้ำหนักประมาณ 5 กรัม บดเมล็ดข้าวด้วยไนโตรเจนเหลว นำตัวอย่างที่บดได้ประมาณ 3 กรัม ใส่ในหลอดขนาด 5 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยเมทานอล 4 มิลลิลิตร เขย่าสารนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 25 นาที นำส่วนสารละลายไปกรองสารผ่านตัวกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นนำสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) แยกด้วยคอลัมน์ C₁₈ โดยเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซิโตรไนโตรลีในเมทานอลต่อเอทิลอะซิเตต (70:30 โดยปริมาตร) ใช้ระบบการชะสารเป็นแบบไอโซครีติก อัตราการไหล 1.000 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดอาร์เรย์ ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานลูทีน (β , ϵ -carotene, α -Carotene-3,3'-diol, β , ϵ -carotene-3,3'-diol, Lutein, Xanthophyll, C₄₀H₅₆O₂, AR grade, Sigma-Aldrich, Fluka, USA) อยู่ในช่วง 1.00 – 50.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากการวิเคราะห์หาปริมาณลูทีนแล้วนั้นในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหาปริมาณสารซีแซนทีนในแต่ละตัวอย่าง ด้วยเทคนิค HPLC โดยขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณสารลูทีน และตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดอาร์เรย์ ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซีแซนทีน (β , β -Carotene-3,3'-diol, C₄₀H₅₆O₂, AR grade, Sigma-Aldrich, Fluka, USA) อยู่ในช่วง 1.00 – 50.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

คำนวณปริมาณสารลูทีนและซีแซนทีนจากพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับสมการจากกราฟมาตรฐาน

9. การศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณสารลูทีน

การศึกษาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ต้นประชากรรุ่นที่ 2 จำนวน 300 ต้น ที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณสารลูทีนด้วยโปรแกรม Minitab 18 เพื่อตรวจสอบความสอดคล้องของปริมาณสารลูทีนกับเครื่องหมายที่ได้จากการออกแบบ เริ่มด้วยการทดสอบไคสแควร์ (chi-square) เพื่อศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้ทดสอบในแต่ละยีนว่าเป็นไปตามกฎของเมนเดลหรือไม่ โดยจะทำการวิเคราะห์ไคสแควร์แยกจากกันในแต่ละเครื่องหมาย โดยมีสมมุติฐานอัตราส่วนการกระจายตัวของเครื่องหมายคือ 1:2:1 (KK : KP : PP) (df = 2 ระดับนัยสำคัญ 0.05) หากค่าที่ได้ p-value > 0.05 ยอมรับสมมุติฐาน และ p-value ≤ 0.05 ปฏิเสธสมมุติฐาน

นำจีโนไทป์ที่ได้จากเครื่องหมายของแต่ละยีนในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น กับพีโนไทป์คือปริมาณสารลูทีนมาวิเคราะห์ ANOVA วิธี Tukey เพื่อหาอิทธิพลความสัมพันธ์ร่วมกับระดับนัยสำคัญ ดังนี้

ค่า Sig. ที่ได้	มากกว่าหรือเท่ากับ	0.05	คือ	ไม่แตกต่าง
ค่า Sig. ที่ได้	น้อยกว่า	0.05	คือ	แตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แทนด้วย *

จากนั้นทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับปริมาณสารลูทีนด้วยการวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) โดยวิธี simple regression และ multiple regression เพื่อหาสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R square: R^2) ซึ่งจะเป็ค่าแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับปริมาณสารลูทีน

10. การศึกษาความสัมพันธ์ของสีของเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนและซีแซนทีน

การเก็บข้อมูลสีของเยื่อหุ้มเมล็ดที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งแบ่งสีของเยื่อหุ้มเมล็ดได้เป็น 2 แบบ คือ แบบที่ 1 คือ ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด เป็น 0 และมีสีเยื่อหุ้มเมล็ด เป็น 1 แบบที่ 2 กำหนดจากเยื่อหุ้มเมล็ดสีอ่อนไปหาสีเข้มได้เป็น เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว (white pericarp) เป็น 0 เยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล (brown pericarp) เป็น 1 และเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (black pericarp) เป็น 2 จากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนหรือซีแซนทีน ที่ได้จากข้อ 8 ด้วยโปรแกรม Minitab 18 โดยเริ่มจากการทดสอบไคสแควร์ (chi-square) เพื่อศึกษาการแบ่งกลุ่มของสีเยื่อหุ้มเมล็ดว่าเป็นไปตามสมมุติฐานหรือไม่ จำนวน 2 แบบ คือแบบที่ 1 สมมุติฐานอัตราส่วนการกระจายตัวของพีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดคือ 3:1 (มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด : ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด) และแบบที่ 2

จากการศึกษาของ Rahman et al. (2013) ในประชากร F_2 ที่ทำการผสมระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและขาว พบว่ายีน *OsB1* และ *OsDFR* ที่เป็นยีนใน Anthocyanin Biosynthesis ที่ทำหน้าที่ควบคุมสีของเยื่อหุ้มเมล็ดมีการทำงานแบบ recessive epistasis มีอัตราส่วนสีเยื่อหุ้มเมล็ด 9:3:4 (black : brown : white)

จากนั้นทำการวิเคราะห์ ANOVA วิธี Tukey เพื่อหาอิทธิพลความสัมพันธ์ร่วมกันของฟีโนไทป์ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนหรือซีแซนทีน จากนั้นหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน (spearman rank correlation coefficient หรือ spearman'S rho) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสีของเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนหรือซีแซนทีน เกณฑ์การแปลความหมาย (แสงเดือน, 2555) คือ

ระดับความสัมพันธ์	ค่าระดับความสัมพันธ์
ต่ำมาก	0.01 – 0.20
ค่อนข้างต่ำ	0.21 – 0.40
ปานกลาง	0.41 – 0.60
ค่อนข้างสูง	0.61 – 0.80
สูงมาก	0.81 – 1.00

สถานที่ในการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

- ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
- โรงเรียนกระเจก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้



บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. การศึกษาเครื่องหมาย RM ที่ขนานข้างยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

1.1 การค้นหาเครื่องหมาย RM ที่ขนานข้างยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

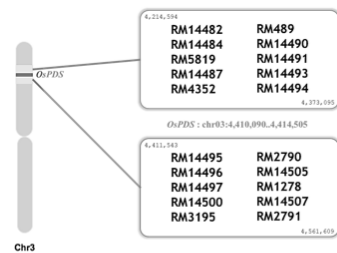
จากการค้นหาตำแหน่งของยีนทั้ง 7 ยีน ที่อยู่ในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) และ The Rice Annotation Project (RAP) ได้แก่ ยีน *OsZDS*, *OsZISO*, *OsPDS*, *OsCRTISO*, *OsCYP97A4*, *OsCYP97C2* และ *OsZEP* จากนั้นนำตำแหน่งที่ตั้งของยีนไปค้นหาเครื่องหมาย RM ขนานข้างยีนที่แสดงใน Supplementary Table 18 (McCouch et al., 2002) ซึ่งแสดงบริเวณที่พบความแตกต่างของลำดับเบสในรูปแบบ Simple Sequence Repeat หรือลำดับเบสซ้ำสั้นๆ ที่พบในข้าวพันธุ์ reference genome ที่สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ จึงทำให้บางตำแหน่งแสดงเฉพาะลำดับเบสซ้ำแต่ไม่แสดงไพรเมอร์ในตาราง ในการศึกษาครั้งนี้เลือกเครื่องหมาย RM ที่แสดงไพรเมอร์และมีขนาดของผลผลิตประมาณ 100 - 500 คู่เบส ที่สามารถความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดย 1 ยีนจะเลือกเครื่องหมายข้างละ 10 เครื่องหมาย รวมเป็น 20 เครื่องหมาย สำหรับยีนที่สนใจในครั้งนี้มีจำนวนเท่ากับ 7 ยีน ดังนั้น จำนวนเครื่องหมายที่เลือกในเบื้องต้นคือ 140 เครื่องหมาย ดังแสดงในภาพที่ 15

ก.) ยีน *OsPDS* (Phytoene desaturase)

Similar to Phytoene desaturase (Fragment).

Locus: Os03g0184000

Sequence position= chr03:4,410,090..4,414,505 (+ strand)



McCouch Locus ID	Motif	Repeats	Chromosome	Order (S-L)	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end
RM14482	CCG	7	3	250	AUT14482	GTCGATCACACCACTTTCC	189	4,214,974	4,214,994
RM14484	AC	11	3	252	AUT14484	CTACTCTCCGCGCAATCATCG	97	4,259,739	4,259,760
RM5819	ACT	12	3	253	AUT14485	TACGCTCAACGCTCAATACC	171	4,268,274	4,268,209
RM14487	AT	29	3	255	AUT14487	TGCACACTGCGCAATTTGCG	392	4,285,925	4,296,002
RM4352	AT	17	3	256	AUT14488	AATGCAATGGCAACCAACAGC	436	4,296,987	4,297,020
RM489	AAT	8	3	257	AUT14489	GACAGGAGCAATGATGAGG	220	4,316,616	4,316,639
RM14490	CCG	7	3	258	AUT14490	GGAGCAGCGCTAGAGCCTAGAAGG	192	4,354,269	4,354,289
RM14491	AC	10	3	259	AUT14491	TAAAGAAATCGGGCGAAGAGG	272	4,355,489	4,355,508
RM14493	AT	14	3	261	AUT14492	AACCTGACCTGCTCTTCTCG	198	4,357,550	4,357,577
RM14494	AGGG	5	3	262	AUT14494	CCATCCAGGAGCACTGGAACC	362	4,373,095	4,373,114
OsPDS chr03:4,410,090..4,414,505									
RM14495	CCG	7	3	263	AUT14495	ACCCTTCCCGGAGTGGATCG	398	4,411,543	4,411,563
RM14496	AGG	8	3	264	AUT14496	CTCAGCTTGGCTTGTCTCC	176	4,421,568	4,421,586
RM14497	CCG	7	3	265	AUT14497	CTAATCGCGCGCATGAGATCG	268	4,423,936	4,423,956
RM14500	AT	12	3	268	AUT14500	TCAACCAAGCAATGTTTACC	365	4,462,817	4,462,840
RM3195	AG	12	3	269	AUT14501	ACCGGAAGAGCCCATCAGC	199	4,464,494	4,464,517
RM2790	AT	17	3	270	AUT14502	AGTGGCTAGCTATGTTGACC	592	4,505,458	4,505,491
RM14505	CCG	8	3	273	AUT14505	CTCTGCGCTCTTCGCTACTCC	248	4,522,699	4,522,722
RM1278	AG	17	3	274	AUT14506	GAATTCAGGGGCTCACTTCTGC	260	4,544,321	4,544,354
RM14507	AT	12	3	275	AUT14507	GTCATCCAGAGCCAGAGG	92	4,551,368	4,551,391
RM2791	AT	24	3	276	AUT14508	GCAGCTCGTACTCTTAGTCC	285	4,552,352	4,552,420
RM3773	AG	18	3	277	AUT14509	AAATGCAAGGAGTGGTTTACC	361	4,561,974	4,561,609

ข.) ยีน *OsZISO* (ζ -carotene isomerase)

15-cis-zeta-carotene isomerase, chloroplastic.

Locus: Os12g0405200

Sequence position= chr12:12204433..12208019 (+ strand)



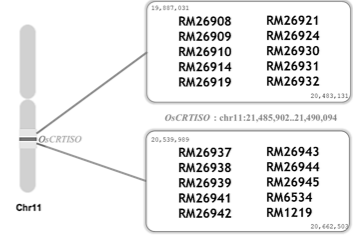
McCouch Locus_ID	Motif	Number of Repeats	Chromosome	Order (S-L)	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end		
RM1047	AC	16	12	560	ATT 27953	CACCTGGCTCTCATCAAGTACC	TGGCTTAGCTTGTGAGACACAG	291	11,223,797	11,223,828	
RM27954	AT	13	12	561	ATT 27954	CATATCCGCATTTGAGTCACTTCG	AACGGCACTATGGAACTGTTCG	445	11,263,949	11,263,974	
RM27955	AAC	9	12	562	ATT 27955	AATGGTGCTACTCCACAGCAATGG	TTCAATAGCTGTGCTTGTGG	117	11,441,649	11,441,675	
RM27956	AG	10	12	563	ATT 27956	AGCAACCTACTTCCCAATTACC	TGTGCATATCCATTGACACAGC	174	11,781,694	11,781,703	
RM27957	AG	10	12	564	ATT 27957	GTCCTCTCTCCCTCTCTTCG	GCTAGGTTTATGGCAGCAGCTTC	190	11,876,236	11,876,255	
RM27959	AT	23	12	566	ATT 27959	TGGAGATGGGTGGACGGTATGG	ATTAGCGAAGCGTGTGATATGACG	185	12,013,461	12,013,506	
RM1337	RM27961	AG	21	12	568	ATT 27961	AGTGGCCCGACCTGTATAACC	GACAGGTGCATGCTGAGG	147	12,042,418	12,042,459
RM27962	AG	10	12	569	ATT 27962	GGGAGTCTGGATTCTGAGACG	ATTCCCGCAAGGATATTAAGG	125	12,126,813	12,126,832	
RM27965	AT	15	12	572	ATT 27965	ACAAGATTCTCTCTCTCAACC	CATATAGGCCAATAACAGCTAGG	458	12,136,171	12,136,200	
RM27966	AT	28	12	573	ATT 27966	TCTGAGCCACAGATAAGATCAGG	TGTCACCGTATGTTGTACGG	263	12,166,956	12,167,011	
<i>OsZISO</i> chr12:12,204,433..12,208,019											
RM27970	ACC	10	12	577	ATT 27970	TCCACACCTCTGACCTCTACTAAC	CTGGGGAAGTATGAGAGAAAG	152	12,248,798	12,248,822	
RM27973	AGC	7	12	580	ATT 27973	CCAACCTGCCAGGATTAAGC	CTGTCCCATCATCCAAATGACC	288	12,313,653	12,313,673	
RM27978	AT	10	12	585	ATT 27978	ACGATGCATCATATGTTACTGC	TGAATTTGTAAGCCATACTCC	293	12,493,041	12,493,060	
RM27981	AGGG	5	12	588	ATT 27981	CTGGATGGACACTCTCTATTTCG	TCCCTCCTTAGTCTCCAAATCC	288	12,516,869	12,516,888	
RM27982	AG	15	12	589	ATT 27982	CTGGGAAGTCTTGAGACTTCG	ATCACTTCTTACAGCCCAAC	190	12,675,122	12,675,151	
RM27984	ATC	7	12	591	ATT 27984	AGCTTGAACGATGCTGATGAC	ACCTCTCTCTCTTACCCATTCG	257	12,753,667	12,753,687	
RM27985	AT	16	12	592	ATT 27985	GGCTGAATAGCCCTCATATTTCG	CCATCTTGCACACTAGTCTCC	592	12,805,035	12,805,066	
RM27988	AAT	36	12	595	ATT 27988	TCCACACATGACATCCACATCC	CATCGAACCAGGATGACG	763	12,884,602	12,884,709	
RM28002	AGAT	5	12	609	ATT 28002	GTCACACAGGATATGGGACG	GTACGTTGGCAAGAGATAATCC	361	12,996,337	12,996,356	
RM28004	AT	12	12	611	ATT 28004	GGCTGCTGCATGGATATATGG	ATTATTCAAGGTCGAGCCAAAG	573	13,161,862	13,161,885	

ค.) ยีน *OsCRTISO* (Carotenoid isomerase)

Carotenoid isomerase, Carotenoid biosynthesis.

Locus: Os11g0572700

Sequence position= chr11:21485902..21490094 (+ strand)



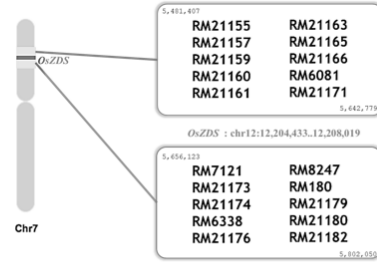
McCouch Locus_ID	Motif	Number of Repeats	Chromosome	Order (S-L)	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end		
RM26908	CGG	7	11	967	ATT 26908	TGTTGTTGCTTCTCTCTCTCC	GCTGGAGGCTGAGTAGTCTCG	193	19,887,011	19,887,031	
RM26909	ACG	7	11	968	ATT 26909	TGTTGTTGCTTCTCTCTCTCC	GCTGGAGGCTGAGTAGTCTCG	193	19,887,035	19,887,055	
RM26910	CGG	7	11	969	ATT 26910	GACGAGGCTCAGCGGTTGAGG	GTTCCTTTGAGGAGGCTGAGG	83	19,891,077	19,891,097	
RM26914	AT	10	11	973	ATT 26914	CTCTCTCTGAGTGGTTATTTCG	GCAACATGTGTGAGGATATGG	342	20,006,906	20,006,925	
RM26919	AT	23	11	978	ATT 26919	CTCGAGCTGAGCTTACTTCG	TGCGAGCAGTACAGAGGATAC	355	20,139,835	20,139,890	
RM26921	AT	46	11	980	ATT 26921	GTGAGTCTGAGGCTCTCTTCG	TTGCGCTCTGAGGCTCTTCG	701	20,142,283	20,142,283	
RM26924	AGCC	5	11	983	ATT 26924	TGACATCTTGGGTTGGGATTCG	AGCGAGGAGTATGCTACTTCG	159	20,181,870	20,181,895	
RM26930	AGC	7	11	989	ATT 26930	TTCGAGATGCGAGGAGAGCC	AGCTGAGTCAATCTCTCTTCG	183	20,423,317	20,423,337	
RM26931	AAAT	6	11	990	ATT 26931	AAATCATGTTGGTATGCAATCC	GCGAGTCTAGCCTATGCCATCC	127	20,428,445	20,428,468	
RM26932	AT	39	11	991	ATT 26932	TGTTTAGTACTGCTCCACTCG	TACAGTCTGTTGAACTAGAGC	573	20,483,131	20,483,208	
<i>OsCRTISO</i> chr11:21,485,902..21,490,094											
RM26937	AT	24	11	996	ATT 26937	AGAGTCACTACAGGCGAGC	CTGAGTGGAGTACTATGCTCC	298	20,539,989	20,540,036	
RM26938	AT	21	11	997	ATT 26938	ATGAGGACATGTTCACTGTC	ATCATGTTGCTCTGCTTCC	182	20,558,155	20,558,196	
RM26939	AGG	7	11	998	ATT 26939	GAGGACTCTGAGAGGAGCC	CGAGTCACTCTCTTTCG	127	20,589,167	20,589,187	
RM26941	CGG	7	11	1000	ATT 26941	TCACTCTGAGCTCTGAGAGCC	CAGTACAGAGGAGGCTATAGG	143	20,609,863	20,609,883	
RM26942	CGG	9	11	1001	ATT 26942	CTTGAATGTTGTTCTCTTCG	GGATTCAAGATGAGGATATCC	287	20,639,184	20,639,210	
RM26943	AG	26	11	1002	ATT 26943	TAAACAGCTCTCTGAGGAGCC	TTTACTGTCAAGTCACTCTTC	181	20,651,629	20,651,680	
RM26944	AACC	5	11	1003	ATT 26944	CAAGATTTCAACAGGCTTTC	TCTGCTTGTACATCACTCTTC	156	20,662,823	20,662,842	
RM26945	AG	10	11	1004	ATT 26945	GCGGAGGACATGAGCCCTTC	CGAGTAAAGAGGAGGCTCTCC	185	20,662,146	20,662,165	
RM6534	RM26946	CGG	9	11	1005	ATT 26946	GAGGAGTCACTAGTCAATCC	AACTCCAACTCTCTCAATCC	159	20,662,289	20,662,315
RM1219	RM26947	AG	14	11	1006	ATT 26947	CAAGGAGTGGAGGATTTTC	TGATATTTCAACCTGCTCTCC	435	20,662,476	20,662,503

ง.) ยีน *OsZDS* (ζ -carotene desaturase)

Similar to Zeta-carotene desaturase (Fragment).

Locus: Os07g0204900

Sequence position= chr07:5645630..5651129 (+ strand)



McCouch Locus_ID	Motif	Number of Repeats	Chromosome	Order (S-I)	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end		
RM21155	AT	13	7	381	AUT21155	GGTCATCTATCACCGGAGTCC	ATCATGTCGCCCAATCC	561	5,481,382	5,481,407	
RM21157	AGC	8	7	383	AUT21157	TGATCGGTTCGTGATTGATCG	CAOCTGGTTGAGGAGTATAGG	285	5,484,810	5,484,833	
RM21159	AGC	8	7	385	AUT21159	CATGGCAGGACTCAGACTCG	TGGAAACACCAATCTGAATGG	91	5,512,665	5,512,688	
RM21160	AAG	15	7	386	AUT21160	AACCAATCAOCTCGGGATCG	TGGAAACACCAATCTGAAGC	254	5,522,893	5,522,937	
RM21161	AG	13	7	387	AUT21161	ATCATCTCTCGGTTGATCAGC	CGGCTAGTGAATCTCTCTTCG	489	5,523,852	5,523,977	
RM21163	AGG	7	7	389	AUT21163	CTTCGACAAAGTTCGCGAAGC	GTGGATTCGAGTCGACGAGG	255	5,560,906	5,560,926	
RM21165	AAT	27	7	391	AUT21165	AGTTCGACCGCGATTTCGTTGG	CAAGGATTCGACCCCTATTAAGC	372	5,576,400	5,576,480	
RM21166	AGC	7	7	392	AUT21166	CAAGTCTCGGAAATTCCTGG	CGGCTAGTCACTCACTCTTCG	205	5,591,054	5,591,074	
RM6081	RM21170	AGG	9	7	394	AUT21170	CACTGACAGGACGACGAGGAGC	ACCTTCACACTACGCACTCC	180	5,631,461	5,631,487
RM21171	AAT	26	7	397	AUT21171	AGGACCTCATCAGATCTGACGC	CGTGGTTCACTGCTGATGG	467	5,642,779	5,642,856	
<i>OsZDS</i> chr07:5,645,630..5,651,129											
RM7121	RM21172	AAT	6	7	398	AUT21172	TACAGCTCATGTTACCGATAC	CGGATCAATTCACGACAGGC	223	5,656,100	5,656,123
RM21173	AGG	7	7	399	AUT21173	CGCATCTCTTCCACTCTCCG	ATCCCTCAGCTCACCAAGAGC	100	5,677,874	5,677,894	
RM21174	AG	10	7	400	AUT21174	TCAAACAAACCCAGGAAAGC	GACGACTCTCGAAGACTTCG	95	5,687,221	5,687,240	
RM6338	RM21175	AAG	8	7	401	AUT21175	GTCTCTCCTCTTCGCTCTCC	GGTGACTCTCTCTCCTCTCC	189	5,691,821	5,691,844
RM21176	ACC	7	7	402	AUT21176	CGAGAAAGAGTCCACAGTACG	GGAGTCTTACCTGAGAGGC	165	5,692,029	5,692,049	
RM8247	RM21177	AAT	16	7	403	AUT21177	TCAOCTCTCTGTCAGCAAAAC	CAAGATCAGGATAGACATGAGTCC	227	5,762,230	5,762,277
RM180	RM21178	AAT	10	7	404	AUT21178	CTTCTCTCTCTTCCACTCTCC	CAACTGCTCTACTCTCGGTGAGG	190	5,768,455	5,768,484
RM21179	AT	22	7	405	AUT21179	CAACTGAGATCGGAGGAGGC	ATACGTGAAACCGGCTTAAGTCC	549	5,789,914	5,789,957	
RM21180	AT	12	7	406	AUT21180	CGACAGATGCGTCCGATAGC	GAAACCGGCTTAACTAGCCACTCC	516	5,789,981	5,789,904	
RM21182	AT	31	7	408	AUT21182	CTCTGATCTCAGCTCAAAAC	CATGAGATTTAGACCGCATCG	344	5,801,989	5,802,050	

จ.) ยีน *OsCYP97A4* (Carotenoid beta-Ring Hydroxylase CYP97A4)

Cytochrome P450 family protein.

Locus: Os02g0817900

Sequence position= chr02:35091247..35099291 (- strand)



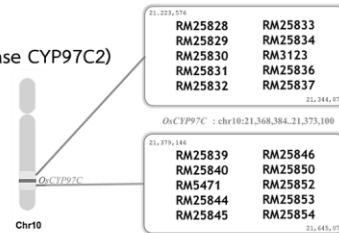
McCouch Locus_ID	Motif	Number of Repeats	Chromosome	Order (S-I)	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end		
RM16159	CCG	7	3	1927	AUF16159	GTGAAGTGCCTCGACTGCAAC	GACACCATGGAGAGGCTTTC	257	34,987,342	34,987,362	
RM16161	AGG	8	3	1929	AUF16161	GGAGAAACAATCCGACGCTCC	CAGATGTCGCCCGCAGAGC	307	34,999,103	34,999,126	
RM6712	RM16162	AAT	8	3	1930	AUF16162	CCAGCATCATCATTGATCATCG	ATCCATCCAGCGGAGAAACAGG	388	35,020,004	35,020,027
RM16163	AG	10	3	1931	AUF16163	GTGGCACTAATTAACAGGCAACAG	CACACCACTAGATTCGATGAAGG	169	35,026,223	35,026,242	
RM16164	AG	11	3	1932	AUF16164	CTTTCTCTTTCACCCAGGC	CTAGCGAGAGAGGAAAGC	277	35,041,174	35,041,195	
RM16165	AC	12	3	1933	AUF16165	GTTTACCAAGAGGAAAGCAAC	GCTTGCACCTCACTCTTTTACG	265	35,047,947	35,047,970	
RM16166	CCG	8	3	1934	AUF16166	AGGAGGAGTAAAGGCTCAATCG	CCCAACCTCGAAACCAAAAC	170	35,050,622	35,050,645	
RM16167	AT	16	3	1935	AUF16167	TAGAGCAATGGAGTACFAAGAAC	GAGTGAAGATGATTTCTGTC	429	35,058,116	35,058,147	
RM514	RM16169	AG	12	3	1937	AUF16169	CTTCTGATGATCTCCCAATCC	GGGAGAGGAGGAGCAAGG	491	35,074,716	35,074,739
RM16170	AG	10	3	1938	AUF16170	GTGCTGAGGTGGTCAAGAGC	AAGAGTATTCTCTAGTGGTATGC	451	35,078,570	35,078,589	
<i>OsCYP97A4</i> chr02:35,091,247..35,099,291											
RM16175	AG	11	3	1943	AUF16175	AGCTTGTGTTCTTGGCTTTC	ATTAGCTTGAACCCAGTGTGG	137	35,220,812	35,220,833	
RM16176	CCG	7	3	1944	AUF16176	ATATCTGTGACACCGCCATCC	GTAGTGAAGATGAGATGAAGC	242	35,254,476	35,254,496	
RM5665	RM16177	AAT	9	3	1945	AUF16177	GTAATATGGAGGCTAGCAATCC	CCCAATCCATCTGGTATTAGC	95	35,272,116	35,272,142
RM16178	AGG	7	3	1946	AUF16178	CGCTCTCTCTCGGCTTCTCC	AGAGGCTCAGGCCAAATCC	285	35,305,664	35,305,684	
RM16179	AT	20	3	1947	AUF16179	AGCCACATGTTCTGCTGTTCC	CAGTAACTGGGAGTACATATGAGC	299	35,322,929	35,322,968	
RM6484	RM16182	CCG	8	3	1950	AUF16182	TAGGTTCTTCGATCCTTGAAGC	AACAGCTTCCGATGCACTCC	200	35,376,041	35,376,064
RM4404	RM16183	AT	19	3	1951	AUF16183	GAGTGGGCTGTCAAGCTAACAGG	TGAGGACCCAAATGGGAGG	167	35,381,617	35,381,654
RM3329	RM16184	AG	15	3	1952	AUF16184	AGAAATGTAAAGATGGTCTACCG	CTGAATGTCTCAACTCCAGTCC	159	35,381,850	35,381,879
RM16189	AT	10	3	1957	AUF16189	TACTCGACTACGAGAGTGAAGC	CTTAACTAGACACCCATCC	542	35,406,697	35,406,716	
RM16190	CCG	7	3	1958	AUF16190	GACAGAGTGAATCTGATCACC	CTCCCTCTCTCTCTCTCTCC	285	35,444,193	35,444,213	

ฉ.) ยีน *OsCYP97C2* (Carotenoid epsilon-Ring Hydroxylase CYP97C2)

Cytochrome P450 97C2.

Locus: Os10g0546600

Sequence position= chr10:21368384..21373100 (+ strand)



McCouch Locus_ID	Motif	Number of Repeats	Chromosome	Order(S-L)	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end		
RM25828	CCG	7	10	581	AUT25828	GCTGTGGACGCGGACATCG	GC09AAGAGAAGAGCCGAGG	242	21,223,556	21,223,576	
RM25829	AAG	16	10	582	AUT25829	CCAAATTATACCCGGCGAAATAG	CCATCAACCTCGTCTTCAAC	325	21,238,934	21,238,981	
RM25830	AT	42	10	583	AUT25830	ATGGACAGCAACATCGAGAGG	AATGATTGACGGTGTGATGG	157	21,248,686	21,248,769	
RM25831	AAG	7	10	584	AUT25831	GGCCAGCGCCACAATCTCC	GCAGACAGATGGACAGCATGG	91	21,253,417	21,253,437	
RM25832	AG	10	10	585	AUT25832	CGTCTTCTCTTCTCTCTCAAG	CGTTCCTTATATATGGGTGTGC	222	21,279,567	21,279,586	
RM25833	ACC	7	10	586	AUT25833	GACACATCAAGACAGCATGG	CCAGAGAGGATACAGGTGAGC	248	21,291,175	21,291,193	
RM25834	ATCG	5	10	587	AUT25834	CACCTAGCCAGACACATGAGG	CATCCCTCTGATCGAATATGG	152	21,311,237	21,311,256	
RM3123	AC	12	10	588	AUT25835	ACACCTTAATGTATCCGTGCG	CAAACTCAGTTCGGTGTATCC	197	21,317,023	21,317,046	
RM25836	AG	13	10	589	AUT25836	GCTGTATGTGTGATGGCCAGC	TGGATCATAGGTCCCAATAGC	284	21,337,952	21,337,977	
RM25837	AT	10	10	590	AUT25837	GGTAGTCGATCACTCTGTCAAG	CACCTGACGTCTCACCTTGTATGG	448	21,344,871	21,344,890	
<i>OsCYP97C2</i> chr10:21,368,384..21,373,100											
RM25839	AG	10	10	592	AUT25839	TTAACCACAAGTCCACAACAGG	TAAGTTAGCAGCTGTGCTCATGG	385	21,379,146	21,379,165	
RM25840	CCG	7	10	593	AUT25840	GGTGGAGTCGAAGGTGGAGTGC	CCAACTAGCCAGCACTGAAAG	183	21,384,415	21,384,435	
RM5471	RM25841	AG	20	10	594	AUT25841	TCACAGGTAATGAACAGCTTGC	AAGGTGAAGAAGCACTAACC	99	21,403,192	21,403,231
RM25844	AT	18	10	597	AUT25844	CGCTTTGATGTCTACTCATGG	GAGGTGATGGACTCTCACTGC	350	21,477,295	21,477,330	
RM25845	CCG	7	10	598	AUT25845	TCTCTCAGTACATGGTGGATGG	GTCTTTAGCCAGGTCTCTTCC	194	21,523,391	21,523,411	
RM25846	AGG	7	10	599	AUT25846	TACTCTCCGAGGTCTGTGTGC	GCCTAGCTAGTATGAGTCCAAAC	93	21,523,745	21,523,765	
RM25850	AGG	8	10	1003	AUT25850	CGTCTCCGATTCGTGTCTCC	ACGGCAACCAAGAGAGTATATGG	189	21,564,627	21,564,650	
RM25852	AC	12	10	1005	AUT25852	FGAGTGTGATGTGTGTGTGTGC	AAACAGCTCATGAGGTCAACCC	479	21,605,343	21,605,366	
RM25853	AATC	5	10	1006	AUT25853	CTAGATCACGATACAGGTCACATCG	TCCACCATCTTCCCATACTTAGC	385	21,626,899	21,626,918	
RM25854	CCG	7	10	1007	AUT25854	GGTCCGAATCGTCTCTGACG	GAGGAGCTCCGGGTGATTC	236	21,645,051	21,645,071	

ข.) ยีน *OsZEP* (Zeaxanthin epoxidase)

Similar to Zeaxanthin epoxidase.

Locus: Os04g0448900

Sequence position= chr04:22369763..22376615 (+ strand)



McCouch Locus_ID	Motif	Number of Repeats	Chromosome	Order(S-L)	Forward Primer	Reverse Primer	Expected Marker Length	SSR start	SSR end	
RM17055	CCG	7	4	805	AUT17055	GCAAGTACTTCTGGGTGGAGTCC	CGAGATTGATACCGACTTTGG	497	22,134,656	22,134,696
RM17056	AT	16	4	806	AUT17056	GTGAAGCAGAGGAGTGGATGG	CCCACTAGCTGTCTACTATGAGCC	187	22,135,721	22,135,752
RM17057	CCG	8	4	807	AUT17057	GTGATGCCACCACTGACG	GGTACCGAGTAGGACGATCAGC	277	22,181,252	22,181,276
RM17059	AAT	8	4	809	AUT17059	AAATGTGGCTAGGGATGATGC	GGCAATGATCTCTCACTCACC	194	22,189,900	22,189,823
RM17061	CCG	9	4	811	AUT17061	GGCCACTCATTTCTAGATTAGC	GCACAGCTTGTATCTTGACAGC	266	22,219,587	22,219,613
RM17063	AG	24	4	812	AUT17063	ACGGAGACCAACCAAGTAAAGC	CCAACAGTCAAGTGGAAACAGC	271	22,280,058	22,280,105
RM17064	ACC	7	4	814	AUT17064	CAGGCAAGTCAACAACCTTCC	GTTCTGTCTGCTGAATTTATGG	84	22,281,182	22,281,202
RM17065	AAC	7	4	815	AUT17065	CTCCTTATGATGGCTGACCC	GTTCTTGTGATGTGCTACGC	172	22,322,039	22,322,059
RM17066	CCG	7	4	816	AUT17066	AGTCATTCGATGGAGGAGGAGG	GGTCCGGATCTGAGGAGAGG	284	22,269,459	22,269,479
RM17067	CCG	9	4	817	AUT17067	CGCTAATCTCCGATCCAAAGC	TGAGGGTGAAGGTGGTGAAGG	228	22,389,198	22,389,224
<i>OsZEP</i> chr04:22,369,763..22,376,615										
RM17068	CCG	8	4	818	AUT17068	CCGTACAGGAGGTGGTGAAGC	GTCTCTGCTGCTGCTCTTCC	245	22,410,786	22,410,809
RM17069	CCG	7	4	819	AUT17069	CTCGAGACTT CAGGCAAGAGC	GGACGCCAAGAGAGAGAGAGG	285	22,417,092	22,417,112
RM17070	AGG	8	4	820	AUT17070	ACTGGATCAGCTGTGGCATGG	ATGATCTCTCTCTCTGATGC	494	22,417,704	22,417,727
RM17071	AT	20	4	821	AUT17071	ATCTTAGGGCCCTGATTAAG	GTTCTTGTGCTGAGCTTACC	461	22,488,983	22,488,992
RM17074	AGG	7	4	824	AUT17074	CTTATCTCTCTCTCCAGTACC	TAGATGGATAGGGCTAGCTATCG	299	22,521,692	22,521,712
RM17075	ATC	11	4	825	AUT17075	CTAGTCCAAA GGTGGTGTGC	GAGATGCAGGACCAAACTGC	188	22,540,568	22,540,600
RM17076	AT	10	4	826	AUT17076	ACTTTCAGTTGGCTGTGATGC	CAGCAAGTCCAGATTTCAAGG	320	22,564,276	22,564,295
RM17078	AG	11	4	828	AUT17078	CGAGATATCCGCTGATCAAC	ACGATGTCATCTGCTCAACCC	124	22,592,509	22,592,530
RM17079	AT	16	4	829	AUT17079	GTGTGAATCTGGACATCCCTAAGC	TTTCTCTCTCTCATCTGGTTC	675	22,609,024	22,609,055
RM17082	AT	23	4	832	AUT17082	CAATTACACTGGCCTAATGC	CTGACAGTGAACAATCCAAAGC	546	22,746,053	22,746,111

ภาพที่ 15 ภาพตำแหน่งเครื่องหมาย RM ที่ขนานข้างยีนจากตาราง Supplementary Table 18 ของยีน (ก.) *OsPDS*, (ข.) *OsZISO*, (ค.) *OsCRTISO*, (ง.) *OsZDS*, (จ.) *OsCYP97A4*, (ฉ.) *OsCYP97C2*, และ (ช.) *OsZEP*

จากนั้นตรวจสอบระยะห่างระหว่างเครื่องหมาย RM ที่ได้กับบริเวณที่ตั้งของยีนได้จากการค้นหาตำแหน่งของยีนด้วยโปรแกรม Ricebase (แหล่งที่มา; <https://ricebase.org/>) โดยเลือกเครื่องหมายที่ห่างจากตำแหน่งที่ตั้งของยีนไม่เกิน 100 Kb ซึ่งจะเลือกด้านละ 3 คู่ไพรเมอร์ ทำให้ 1 ยีน เท่ากับ 6 คู่ไพรเมอร์ จึงได้เป็น 42 คู่ไพรเมอร์ สำหรับ 7 ยีน โดยไพรเมอร์ที่เลือกได้แสดงรายละเอียดในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เครื่องหมาย/ไพรเมอร์ RM ที่ขนานข้างยีน จำนวน 7 ยีน ที่คัดเลือก

ยีน	ลำดับที่	เครื่องหมาย/ไพรเมอร์	เบสซ้ำ	จำนวนซ้ำ	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ขนาด (คู่เบส)	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' ไป 3')	
OsPDS (chr03)chr03:4,410,090..4,414,505	1	RM14490	CGG	7	Chr3:4372390..4372581	192	RM14490_F RM14490_R	GGAGACGACGGCTAGAGCCTAGAAGG GCCGACCAGTACAACCACTTCAACG	
	2	RM14493	AT	14	Chr3:4375650..4375847	198	RM14493_F RM14493_R	AACTTGACCTGCTCACTTTCTCG AATAGGGCCTAATTCCGTTGC	
	3	RM14494	TCCC	5	Chr3:4391244..4391605	362	RM14494_F RM14494_R	CCATCACAAGGACCACTGAAACC TCCTCCAGTACTCTGAACCTTTGAAGC	
	4	RM14495	CGG	7	Chr3:4429536..4429933	398	RM14495_F RM14495_R	ACCTCTTCCCGGAGTGGATCG GAGGTTGCATGAGCCGACAGG	
	5	RM14496	TCC	8	Chr3:4439682..4439857	176	RM14496_F RM14496_R	CTCCATCTTGCCTGTTCTCC CCTCGCTTAAACCCCTTCTTCC	
	6	RM14497	GGC	7	Chr3:4442032..4442329	298	RM14497_F RM14497_R	CTAATCGGCGCATGAGGATCG CCGTGATGAAGATGGAGGGATCG	
	OsZISO (chr12)chr12:12,204,433..12,208,019	1	RM27970	CCA	10	Chr12:12204440..12204591	152	RM27970_F RM27970_R	TCCACCACTCTGACGTCTACTAACC CTGCGGGAAGTGTAGGAGAAGC
		2	RGNMS3677	CTT	7	Chr12:12206174..12206443	270	RGNMS3677_F RGNMS3677_R	AAAGCCTTGTGTCTTATAATC ATTACCATAGTAGCACACACGA
		3	RGNMS3684	GAT	7	Chr12:12232030..12232429	400	RGNMS3684_F RGNMS3684_R	AGATCGTCTACTTGAGGAAGG AATAAGAGGAAGAGGAAAGGAC
		4	RGNMS3650b	CTG	7	Chr12:12129114..12129346	233	RGNMS3650b_F RGNMS3650b_R	ATCAGACACAGATGATGGAAG CAGAAGATTGAGCTTCTTCTCTA
		5	RM27966	TA	28	Chr12:12122456..12122718	263	RM27966_F RM27966_R	TCTGAGCCAACAGTAAGAGTCAGG TGTCACCCGTAGTGTGTACGG
		6	RM27965	AT	15	Chr12:12091664..12092121	458	RM27965_F RM27965_R	ACACGATTTCTCTCTTCAACC CATATAGGCCCAATAACACGCTAGG

ยีน	ลำดับ ที่	เครื่องหมาย/ ไพรเมอร์	เบส ซ้ำ	จำนวนซ้ำ	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ขนาด (คู่เบส)	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' ไป 3')
OscRt150 (chr11) chr11:21,485,902..21,490,094	1	RM26941	CGC	7	Chr11:21463826..21463968	143	RM26941_F RM26941_R	TCATCTCGTCTGACTCTGAGAACC CAGGTACACCGAGAGGCTAATAACG
	2	RM26939	CCT	7	Chr11:21443160..21443286	127	RM26939_F RM26939_R	GACGACTCTTCCGAAGCACACC CGACCTCACCTCGCTTCTTGG
	3	RM26938	AT	12	Chr11:21412129..21412310	182	RM26938_F RM26938_R	AGTCGGCACATTGTCAACTCG ATCATGTTCTCTCCCTTTCACC
	4	RM26942	CGG	9	Chr11:21493093..21493379	287	RM26942_F RM26942_R	CTTGGATTTGGTGGTCTTCTTGG GGATTTCAAGATCGCAGGTATCG
	5	RM26943	CT	26	Chr11:21505590..21505770	181	RM26943_F RM26943_R	TAAACACGACTCTCTAGGAGGACAGC TTTACTGTCCACCATCACGTTGC
	6	RM26944	ACCA	5	Chr11:21506769..21506964	156	RM26944_F RM26944_R	CCACCAATCAACAAGCCTTTCC TCTGGCTTGATCATCACCTTCTTGG
OscZDS (chr07)chr07:5,645,630..5,651,129	1	RM21173	CTC	7	Chr7:5645681..5645780	100	RM21173_F RM21173_R	CCGCATCCTCTTCCACCTCTCG ATGCCTCAGCTACCAACCAACG
	2	RM7121	ATAA	6	Chr7:5623925..5624074	150	RM7121_F RM7121_R	GGAGATGGCACAGCTCAAAC AGGATCCCGTTTTGTAGCAG
	3	AUT21172	TATT	6	Chr7:5623807..5624029	223	AUT21172_F AUT21172_R	TACCAGCTGCATGTTACCCGATACC CGGAATCAAATCCAGCAACAGC
	4	RM21174	AG	10	Chr7:5655030..5655124	95	RM21174_F RM21174_R	TCAAACCAAACCAAGCAAAAGC GACAGCATCTTCGAGAACCTTCC
	5	RM6338	GAA	8	Chr7:5659619..5659760	142	RM6338_F RM6338_R	GAGAAGGTTCCGGGAGCTAG GTTCTTCTCCCTTTGCCTC
	6	RM21176	CCA	7	Chr7:5659791..5659955	165	RM21176_F RM21176_R	GGAGAAGAAGGTGCACCAGTACC GGAGGTCGTTACCTGGAGAGC
OscYP97A4 (chr02)chr02:35,091,247..35,099,291	1	RM6307	CTT	9	Chr2:35086052..35086273	222	RM6307_F RM6307_R	GGATCACGTCCAAGCAAATG CAGAAGGGATTGGTTGGTTG
	2	RM5894	ATT	13	Chr2:35066908..35067097	190	RM5894_F RM5894_R	ATCTCCCTAAGGCACAACCC CGTCATGCGATGTTCTCTTG
	3	RM14172	TA	10	Chr2:35036668..35036967	300	RM14172_F RM14172_R	GGTCTTTCAGCGTTACTTGAGC AGTGGCATATTGCTACTTCAGC
	4	RM14176	GA	10	Chr2:35098849..35099264	416	RM14176_F RM14176_R	AGCTCTCCATCAGATCATCAAAGG ACTCCACCACTGAGGAGTTCTCG
	5	RM1063	AC	19	Chr2:35105622..35105737	116	RM1063_F RM1063_R	GTGATTGGCTGCTGTCATTG TGGCAAGTGCAACTGCAAG
	6	RM14178	CGG	7	Chr2:35122601..35122787	187	RM14178_F RM14178_R	GAGAAGGTTTGCTTGCCTTTCG GGATTGGATAAGGCCATTTAGAGC

ยีน	ลำดับ ที่	เครื่องหมาย/ ไพรเมอร์	เบส ซ้ำ	จำนวนซ้ำ	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ขนาด (คู่เบส)	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' ไป 3')
<i>OsCYP97C2</i> (chr10:chr10:21,368,384..21,373,100)	1	RM25807	GCC	7	Chr10:21368387..21368672	286	RM25807_F RM25807_R	GCCAACGTGCTCATCTCGTCTCG CACCCACGAGGTGGTGATGG
	2	RM25806	GCG	7	Chr10:21338263..21338458	196	RM25806_F RM25806_R	ATCATCATCCCTCCAGTCGATCC GTCCAGCTCTTGGTGCAGTCC
	3	RM25804	GCG	7	Chr10:21257426..21257581	156	RM25804_F RM25804_R	CGATGACACCACCAATCCAATGC CGCCCACGACGATCTTGACG
	4	RM25808	AC	21	Chr10:21371878..21372073	196	RM25808_F RM25808_R	ACAACGTGTCCACTTATCATCG CACAATTGCTTCCAAGAGAGC
	5	RM5666	AAT	9	Chr10:21478924..21479074	151	RM5666_F RM5666_R	ACTTTCTCTCCATCGTTGCC AACAGAGTTGTTTCGCTGCC
	6	RM25810	GA	11	Chr10:21505841..21505974	134	RM25810_F RM25810_R	GAAGGGCAGGAGATAGTAGTAGG CGTCATTGTCCGACAAAAGC
<i>OsZEP</i> (chr04:chr04:22,369,763..22,376,615)	1	RM17063	CT	24	Chr4:22305385..22305755	371	RM17063_F RM17063_R	ACGGAGACCACCAAGTAAGC CCACAGGTCAAGATGGAACAGC
	2	RM17064	CCA	7	Chr4:22306508..22306591	84	RM17064_F RM17064_R	CAGGCAAGTCAACAACTTCC GTTGCTGTCGCTGAATTTATGG
	3	RM17065	CAA	7	Chr4:22357325..22357496	172	RM17065_F RM17065_R	CTCCTTATTAGCATGGCTGACC GTTCTTTGTTGATGTGCTACGC
	4	RM17066	CGC	7	Chr4:22393506..22393859	354	RM17066_F RM17066_R	AGTCATTGCAGTGGAGGAGAGC GGTCGGGATCTGAGGAGAGAGG
	5	RM17067	CGG	9	Chr4:22414417..22414651	235	RM17067_F RM17067_R	CGCCTAACTCCTCGATCCAACG TGAGGGTGAGGGTGGTGAAGC
	6	RM17068	CGC	8	Chr4:22435866..22436210	345	RM17068_F RM17068_R	CCGTACAGGAGGTGGTGAAGC GTCTCGTCGCTGCTCTTCC

1.2 การทดสอบเครื่องหมาย RM ที่ขนานข้างยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

ทดสอบไพรเมอร์ RM ที่ขนานข้างยีน 7 ยีน ที่อยู่ในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ได้แก่ ยีน *OsZDS*, *OsZISO*, *OsPDS*, *OsCrtISO*, *OsCYP97A4*, *OsCYP97C2* และ *OsZEP* ที่คัดเลือกได้จำนวน 42 คู่ไพรเมอร์กับตัวอย่างข้าวจำนวน 8 ตัวอย่าง คือ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, กข-แม่โจ้ 2, กำน้อย, กำใหญ่, มะลิดำ, ทับทิมชุมแพ, ลูกผสมรุ่น F₁ (ปทุมธานี 1 × กำน้อย) และลูกผสมรุ่น F₁ (กข-แม่โจ้ 2 × กำน้อย) ที่อุณหภูมิแอนนิลลิง (Annealing) เท่ากันกับทุกไพรเมอร์ คือ 55 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในแต่ละไพรเมอร์ก่อนการปรับสภาพการเพิ่มจำนวนต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 3 และดังภาพตัวอย่างแสดงการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ RM ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันหรือไม่แตกต่างกันในตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา และให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก (NA: not analysis) (ภาพที่ 16)

ชื่อยีน	เครื่องหมาย/ ไพรเมอร์	ขนาดจาก Table 18 (คู่เบส)	ขนาดจากการเพิ่มจำนวน (คู่เบส)							
			ปทุมธานี 1	กข-แม่โจ้ 2	ก้าน้อย	ก้าใหญ่	มะลิต้า	ทับทิมชุมแพ	F ₁ (ปทุมธานี 1 x ก้าน้อย)	F ₁ (กข-แม่โจ้ 2 x ก้าน้อย)
OsCYP97C2 chr10:21,368,384..21,373,100	RM25804	156	150	150	150	150	150	150	150	150
	RM25806	196	190	190	190	190	190	190	190	190
	RM25807	286	280	280	280	280	280	280	280	280
	RM25808	196	190	190	190	190	190	190	190	190
	RM5666	151	150	150	150	150	150	150	150	150
	RM25810	134	150,130	150,130	150,130	150,130	150,130	150,130	150,130	150,130
OsZEP chr04:22,369,763..22,376,615	RM17063	371	370	370	370	370	370	370	370	370
	RM17064	84	70	70	80	70	70	80,70	80,70	80,70
	RM17065	172	170	170	170	170	170	170	170	170
	RM17066	354	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	RM17067	235	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	RM17068	345	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

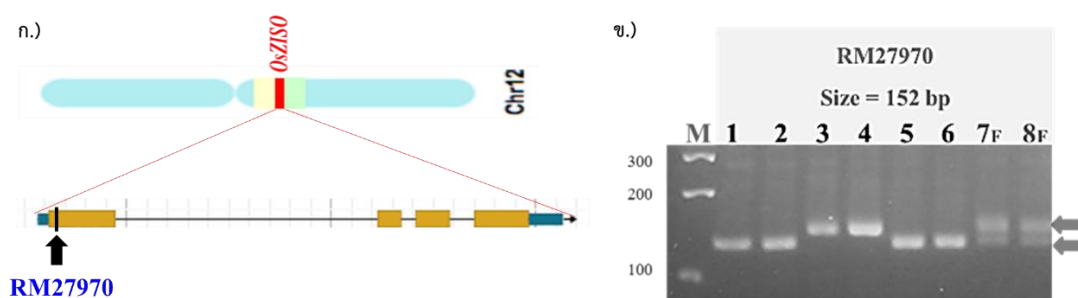
หมายเหตุ; - คือ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ, และ NA คือ ปรากฏแถบหลายแถบ (not analysis)

จากตารางที่ 3 แสดงผลการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ทั้ง 42 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิแอนนิลลิ่ง คือ 55 องศาเซลเซียส โดยมี 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ RM14497, RM26938, RM26939, RM21173, RM21174, RM6338, RM21176, RM17066, RM17067 และ RM17068 ที่เกิดแถบดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก (NA) และไม่ให้แถบดีเอ็นเอหลักตามขนาดคาดหวัง ความจำเพาะของไพรเมอร์ซึ่งอาจจะเกิดจากอุณหภูมิที่ใช้ไม่มีความเหมาะสม ซึ่งจะต้องเพิ่มอุณหภูมิในขั้นแอนนิลลิ่งให้สูงขึ้นเพื่อเพิ่มความจำเพาะซึ่งอาจจะให้แถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ

สำหรับไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มจำนวนและให้แถบดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการแต่ไม่แต่แสดงความแตกต่างในข้าวพันธุ์ที่นำมาใช้ในการสร้างประชากร F₂ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ไพรเมอร์ที่การแสดงขนาดเท่ากันในข้าวทุกพันธุ์ที่นำมาศึกษาได้มีจำนวน 24 ไพรเมอร์ ได้แก่ RM14490, RM14494, RM14495, RM14496, RGNMS3650b, RGNMS3677, RGNMS3684, RM26941,

RM26942, RM26944, RM7121, AUT21172, RM5894, RM6307, RM1063, RM14178, RM25804, RM25806, RM25807, RM25808, RM5666, RM25810, RM17063 และ RM17065 ไพรเมอร์ที่เกิดแถบดีเอ็นเอไม่ครบทั้ง 8 ตัวอย่างที่นำมาศึกษามีจำนวน 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ RM14493, RM27965, RM27966 และ RM26943 ไพรเมอร์มีการแสดงขนาดแถบแบนดีเอ็นเอในข้าวบางพันธุ์ แตกต่างแต่ไม่สามารถแบ่งกลุ่มที่นำมาศึกษาได้มีจำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ RM14172 และ RM14176 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพันธุ์ก้าน้อยและข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงพันธุ์ทับทิมชุมแพออกจากข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพันธุ์อื่น ๆ มีจำนวน 1 ไพรเมอร์ คือ RM17064 และไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการแยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำออกจากข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว และแดงที่นำมาศึกษาและสร้างประชากร F_2 เพื่อใช้ในการทดสอบมีจำนวน 1 ไพรเมอร์ คือ RM27970 (ภาพที่ 16 ก)

ในการศึกษานี้ได้ไพรเมอร์ที่สามารถใช้แยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำออกจากข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวที่นำมาศึกษาและสร้างประชากร F_2 เพื่อใช้ในการทดสอบมีจำนวน 1 ไพรเมอร์ คือ RM27970 (chr12:12204440..12204591) คัดเลือกจากยีน *OsZISO* (ζ -carotene isomerase) เมื่อเทียบกับไปยังฐานข้อมูล Ricebase (<https://ricebase.org/>) พบว่า อยู่บนโครโมโซมที่ 12 โดยบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณเอกซอนที่ 1 ของยีน (ภาพที่ 17 ก) โดยสามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว คือ พันธุ์ปทุมธานี 1 และ กข-แม่โจ้ 2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 150 คู่เบส กับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ คือ พันธุ์ก้าน้อย และก้าใหญ่ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 160 คู่เบส และเมื่อนำมาทดสอบในลูกผสมรุ่น F_1 (ปทุมธานี 1 \times ก้าน้อย) และลูกผสมรุ่น F_1 (กข-แม่โจ้ 2 \times ก้าน้อย) ได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 150 และ 160 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากต้นพ่อและต้นแม่ที่นำมาผสมกัน แต่เครื่องหมายดังกล่าวไม่สามารถใช้ในการแยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพันธุ์มะลิดำและข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงพันธุ์ทับทิมชุมแพออกจากข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวที่นำมาทดสอบได้ (ภาพที่ 17 ข)



ภาพที่ 17 ตำแหน่งของไพรเมอร์ RM27970 ในยีน *OsZISO* (ก.) และผลการเพิ่มจำนวน (ข.)

โดยช่อง M คือ 100 bp Plus DNA Ladder, ช่อง 1 – 8F คือ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, กข-แม่โจ้ 2, กำน้อย, กำน้อยใหญ่, มะลิดำ, ทับทิมชุมแพ, ลูกผสมรุ่น F_1 (ปทุมธานี 1 x กำน้อย) และลูกผสมรุ่น F_1 (กข-แม่โจ้ 2 x กำน้อย) ตามลำดับ size คือ ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง

นอกจากนี้ไพรเมอร์ RM17064 (chr04:22306508..22306591) ที่คัดเลือกมาจากยีน *OsZEP* (zeaxanthin epoxidase) มีตำแหน่งห่างจากยีนประมาณ 63 กิโลเบส สามารถแยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพันธุ์กำน้อยและข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงพันธุ์ทับทิมชุมแพที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 80 คู่เบส จากข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพันธุ์อื่น ๆ ที่ใช้ในการทดสอบซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 70 คู่เบส และปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ขนาดในลูกผสมรุ่น F_1 แต่เนื่องจากไพรเมอร์ดังกล่าวไม่สามารถแยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดดำกับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงจึงไม่ได้นำไปทดสอบกับประชากรลูกรุ่น F_2

2. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค Transcriptome Sequencing (RNA-Seq)

ในการศึกษานี้ต้องการพัฒนาเครื่องหมายที่ได้จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Transcriptome Sequencing (RNA-Seq) ที่จำเพาะกับยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ จากผลอ่านลำดับเบสของอาร์เอ็นเอทั้งหมดของข้าวจำนวน 4 พันธุ์ คือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ พันธุ์ปทุมธานี 1 และกข-แม่โจ้ 2 ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ พันธุ์ก้าน้อยและก้าใหญ่

2.1 การค้นหายีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

เนื่องจากลักษณะที่สนใจศึกษาคือ ปริมาณสารลูทีน ซึ่งสารลูทีนเป็นสารที่ได้จากวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ทำให้ในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องจึงมุ่งเน้นไปที่ยีนที่รายงาน KEGG Pathway โดยจำนวน Cluster ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของข้าวนั้นมีจำนวนเท่ากับ 15,166 Cluster จากทั้งหมด 69,254 Cluster ซึ่งจากการค้นหาด้วยคำสำคัญ พบว่าเป็น Carotenoid biosynthesis (Ko00906) เท่ากับ 111 cluster ดังแสดงในภาพที่ 18

No	Cluster	No	Cluster	No	Cluster
1	Cluster-12362.25545	41	Cluster-12362.16774	81	Cluster-12362.12570
2	Cluster-12362.44100	42	Cluster-12362.20800	82	Cluster-12362.25556
3	Cluster-12362.12567	43	Cluster-12362.12264	83	Cluster-12362.32335
4	Cluster-12362.38670	44	Cluster-12362.34924	84	Cluster-12362.16905
5	Cluster-12362.12569	45	Cluster-15044.0	85	Cluster-12362.21686
6	Cluster-12362.29396	46	Cluster-12362.31199	86	Cluster-8741.0
7	Cluster-12362.23586	47	Cluster-12362.45027	87	Cluster-12362.26565
8	Cluster-12362.5641	48	Cluster-12362.27937	88	Cluster-12362.18668
9	Cluster-12362.44099	49	Cluster-12362.43419	89	Cluster-12362.24014
10	Cluster-12362.24013	50	Cluster-2315.0	90	Cluster-12362.14575
11	Cluster-12362.5492	51	Cluster-6843.0	91	Cluster-12362.24829
12	Cluster-12362.26311	52	Cluster-12362.7986	92	Cluster-12362.24436
13	Cluster-12362.40618	53	Cluster-12362.18231	93	Cluster-12362.22844
14	Cluster-12362.30292	54	Cluster-12362.13869	94	Cluster-12362.14514
15	Cluster-12362.21644	55	Cluster-12362.25949	95	Cluster-5958.0
16	Cluster-12362.45025	56	Cluster-10483.0	96	Cluster-12362.18670
17	Cluster-12362.25494	57	Cluster-12362.5642	97	Cluster-12362.20190
18	Cluster-7930.0	58	Cluster-12362.40617	98	Cluster-12362.25859
19	Cluster-12362.25295	59	Cluster-12362.13635	99	Cluster-12362.35646
20	Cluster-7302.0	60	Cluster-12362.42742	100	Cluster-12362.24163
21	Cluster-12362.24674	61	Cluster-12362.26088	101	Cluster-12362.24481
22	Cluster-1548.1	62	Cluster-12362.16775	102	Cluster-12362.16904
23	Cluster-12362.6258	63	Cluster-12362.23950	103	Cluster-12362.37055
24	Cluster-12362.14570	64	Cluster-12362.15223	104	Cluster-12362.14573
25	Cluster-360.0	65	Cluster-12362.32336	105	Cluster-12362.32337
26	Cluster-12362.18602	66	Cluster-12362.19332	106	Cluster-12362.23260
27	Cluster-12362.24012	67	Cluster-12362.45026	107	Cluster-12362.44098
28	Cluster-12362.24199	68	Cluster-12362.15550	108	Cluster-12362.45028
29	Cluster-12362.26563	69	Cluster-12362.20727	109	Cluster-12362.25616
30	Cluster-12362.14513	70	Cluster-12362.26573	110	Cluster-12362.7985
31	Cluster-12362.29562	71	Cluster-1548.0	111	Cluster-12362.18603
32	Cluster-12362.4641	72	Cluster-12362.35645		
33	Cluster-12362.14574	73	Cluster-12362.28841		
34	Cluster-12362.34923	74	Cluster-12362.36926		
35	Cluster-12362.35008	75	Cluster-12362.32683		
36	Cluster-12362.14612	76	Cluster-12362.18671		
37	Cluster-12362.37104	77	Cluster-12362.17530		
38	Cluster-13693.0	78	Cluster-11555.0		
39	Cluster-12362.35344	79	Cluster-12362.24666		
40	Cluster-12362.22845	80	Cluster-12362.19683		

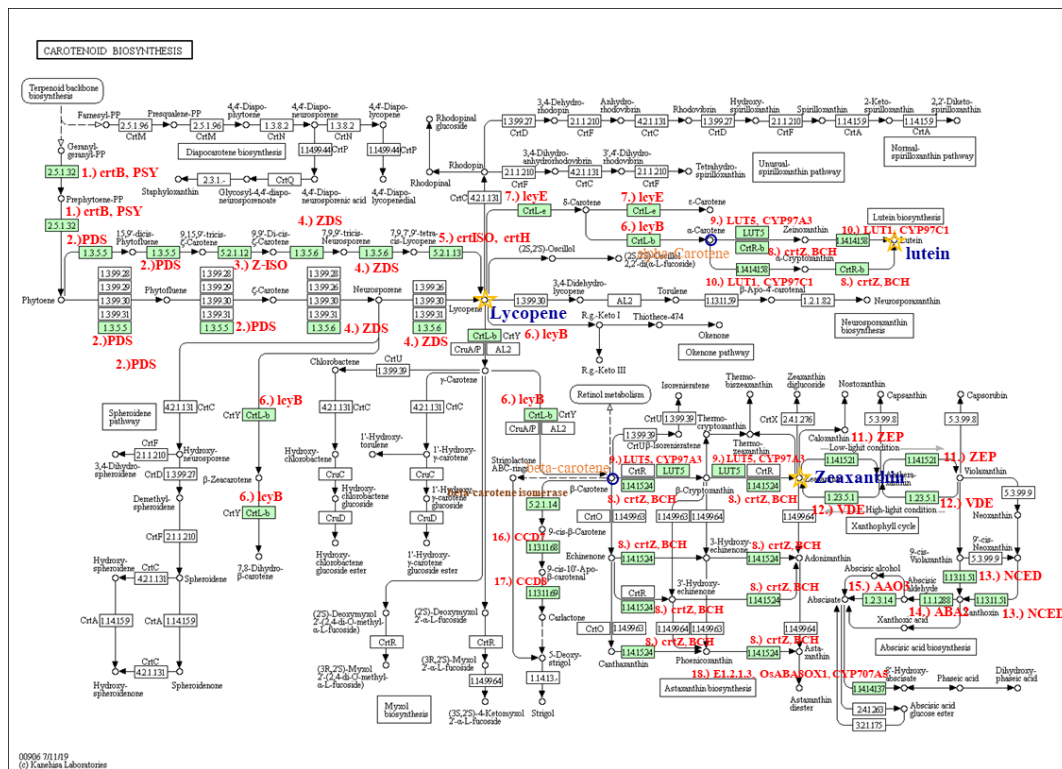
ภาพที่ 18 Cluster ที่เกี่ยวข้องกับ Carotenoid biosynthesis (Ko00906) จำนวน 111 cluster

จากนั้นได้นำทั้ง 111 Cluster ที่คาดว่าจะเป็ยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ไปตรวจสอบ พบว่ามี 39 Cluster ที่ไม่แสดงในส่วนของชื่อยีน (KO Name) ดังนั้นจึงทำให้เหลือ Cluster ที่จะนำไปศึกษาต่อเท่ากับ 72 cluster แล้วตรวจสอบความซ้ำซ้อนโดยตัด Cluster ที่มีเป็นยีนที่มี NR ID หรือลำดับของโคดีนิกลิโอไนด์เดียวกันทำให้เหลือ Cluster ที่ต้องวิเคราะห์เท่ากับ 61 cluster ที่มีลำดับเบสคล้ายกับยีนจำนวน 23 ยีน ดังแสดงในภาพที่ 19

No	KO ID	KO Name	KO Description	count
1	K02291	crtB, PSY	phytoene synthase	7
2	K02293	PDS, crtP	15-cis-phytoene desaturase	1
3	K15744	Z-ISO	zeta-carotene isomerase	1
4	K00514	ZDS, crtQ	zeta-carotene desaturase	1
5	K09835	crtISO, crtH	prolycopene isomerase	5
6	K06443	lcyB, crtL1, crtY	lycopene beta-cyclase	1
7	K06444	lcyE, crtL2	lycopene epsilon-cyclase	1
8	K15746	crtZ, BCH	beta-carotene 3-hydroxylase	5
9	K15747	LUT5, CYP97A3	beta-ring hydroxylase	1
10	K09837	LUT1, CYP97C1	carotene epsilon-monoxygenase	1
11	K09838	ZEP, ABA1	zeaxanthin epoxidase	4
12	K09839	VDE, NPQ1	violaxanthin de-epoxidase	1
13	K09840	NCED	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	4
14	K09841	ABA2	xanthoxin dehydrogenase	1
15	K09842	AAO3	abscisic-aldehyde oxidase	1
16	K17912	CCD7	9-cis-beta-carotene 9',10'-cleaving dioxygenase	2
17	K17913	CCD8	carlactone synthase / all-trans-10'-apo-beta-carotenal 13,14-cleaving dioxygenase	1
18	K00128	E1.2.1.3, OsABA8OX1, CYP707A5	aldehyde dehydrogenase (NAD+)	2
19	K09843	E1.14.13.93	(+)-abscisic acid 8'-hydroxylase	11
20	K00615	E2.2.1.1, tktA, tktB	transketolase	1
21	K02552	menF	menaquinone-specific isochorismate synthase	2
22	K00791	miaA, TRIT1	tRNA dimethylallyltransferase	5
23	K12451	UER1	3,5-epimerase/4-reductase	2
Total Cluster				61

ภาพที่ 19 จำนวน cluster ที่แบ่งตามจำนวนยีนทั้ง 23 ยีน รวมเป็น 61 cluster

ในขั้นตอนต่อมาทั้ง 23 ยีน ที่ได้จากการศึกษาขั้นต้นไปทำแผนที่กลับไปในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (carotenoid biosynthesis) (Ko00906) จากฐานข้อมูล KEGG PATHWAY Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) โดยจะทำการเลือกเป็น *Oryza sativa japonica* (Japanese rice) (gene model taken from RAPDB) ดังแสดงในภาพที่ 20 หลังจากทำแผนที่ยีนทั้งหมดลงไปบน Carotenoid biosynthesis พบว่ามี 5 ยีน ที่ไม่พบอยู่ในวิถี ได้แก่ ยีน No.19 (E1.14.13.93), No.20 (E2.2.1.1, tktA, tktB), No.21 (menF), No.22 (miaA, TRIT1) และ No.23 (UER1)



ภาพที่ 20 การทำแผนที่ใน Carotenoid biosynthesis (Ko00906) จากฐานข้อมูล KEGG PATHWAY Database ของทั้ง 18 ยีน

สำหรับยีนทั้ง 18 ยีน ที่พบภายในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (carotenoid biosynthesis) พบ 10 ยีน ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลูทีน ได้แก่ No.1 (crtB, PSY), No.2 (PDS, crtP), No.3 (Z-ISO) No.4 (ZDS, crtQ) No.5 (crtISO, crtH), No.6 (lcyB, crtL1, crtY), No.7 (lcyE, crtL2), No.8 (crtZ, BCH), No.9 (LUT5, CYP97A3), และ No.10 (LUT1, CYP97C1) (ภาพที่ 21) และมี 8 ยีน ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ แต่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลูทีน ได้แก่ No.11 (ZEP, ABA1), No.12 (VDE, NPQ1), No.13 (NCED), No.14 (ABA2), No.15 (AAO3), No.16 (CCD7), No.17 (CCD8), และ No.18 (E1.2.1.3) จึงได้คัดเลือกศึกษาเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลูทีน 10 ยีน จำนวน 24 Cluster

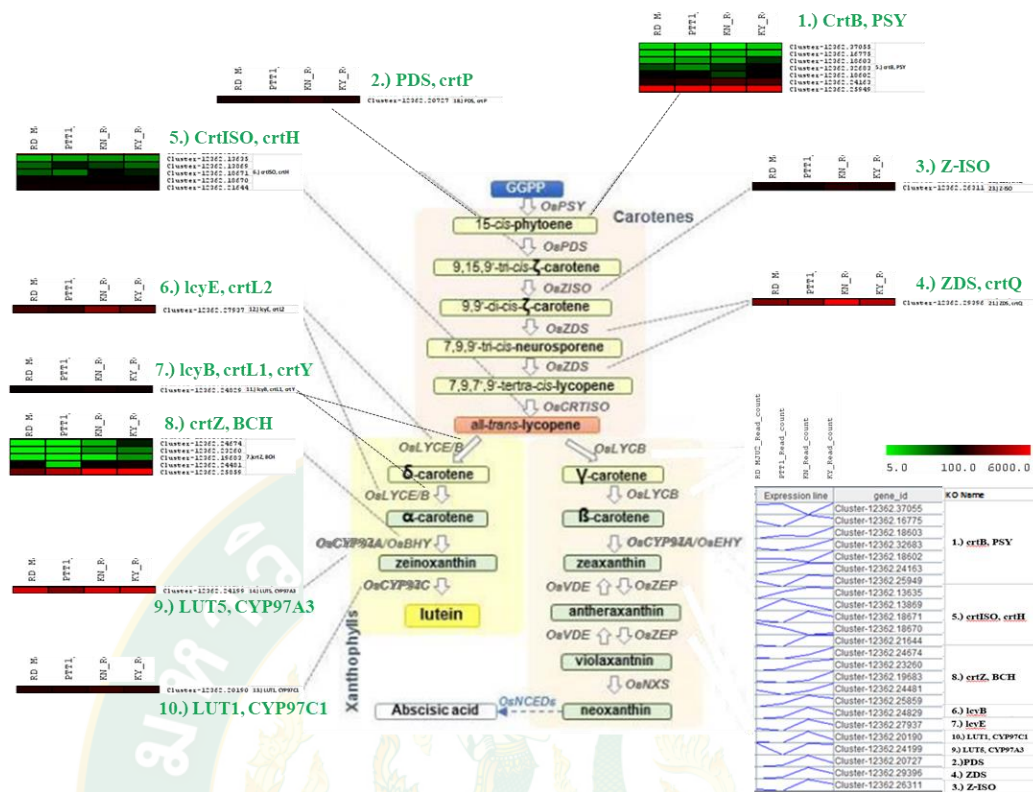
No	KO ID	KO Name	KO Description	count
1	K02291	crtB, PSY	phytoene synthase	7
2	K02293	PDS, crtP	15-cis-phytoene desaturase	1
3	K15744	Z-ISO	zeta-carotene isomerase	1
4	K00514	ZDS, crtQ	zeta-carotene desaturase	1
5	K09835	crtISO, crtH	prolycopene isomerase	5
6	K06443	lcyB, crtL1, crtY	lycopene beta-cyclase	1
7	K06444	lcyE, crtL2	lycopene epsilon-cyclase	1
8	K15746	crtZ, BCH	beta-carotene 3-hydroxylase	5
9	K15747	LUT5, CYP97A3	beta-ring hydroxylase	1
10	K09837	LUT1, CYP97C1	carotene epsilon-monooxygenase	1
Total Cluster				24

ภาพที่ 21 จำนวน Cluster ในแต่ละยีนของ 10 ยีน ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลูทีน

จากผลการเปรียบเทียบค่าการแสดงออกจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RNA-seq ของทั้ง 24 cluster สำหรับ 10 ยีน ในวิธีการสังเคราะห์ลูทีนไม่พบระดับการแสดงออกของยีนที่สามารถแยกกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวออกจากสีดำได้ (ภาพที่ 22 และ 23) ทั้งนี้อาจจะเกิดจากวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์นั้นต้องมีการทำงานร่วมกันหลายยีน ทำให้ในการศึกษาวิธีการสังเคราะห์สารแคโรทีนอยด์ต้องศึกษาทั้งระบบ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานเกี่ยวกับการทำงานของกระบวนการสังเคราะห์สารในวิถีแคโรทีนอยด์ที่มีการแสดงออกของยีนจำนวนมากแต่ยังไม่พบยีนที่เป็นยีนหลักในการควบคุมแต่เป็นการทำงานร่วมกันของหลายยีนที่เกี่ยวข้อง (Stanley and Yuan, 2019)



ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบค่าการแสดงออก (FPKM) ของ 24 cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลูทีน 10 ยีนของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ คือ กข-แม่ใจ 2 (RD-MJU2) ปทุมธานี 1 (PTT1) กำน้อย (KN) และกำใหญ่ (KY)



ภาพที่ 23 ค่าการแสดงออก (FPKM) ของ 24 cluster ใน 10 ยีน ในวิธีการสังเคราะห์ลูทีน

2.2 การค้นหาบริเวณ InDel และ SNP

การค้นหาบริเวณ InDel จากไฟล์สรุปตำแหน่งการเพิ่มขึ้น (Insertion) หรือการลดลง (Deletion) ที่พบในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ทั้ง 4 ตัวอย่าง โดยในขั้นต้นจะเริ่มค้นหาบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงใน 24 cluster ของทั้ง 10 ยีน ที่ได้จากการเลือกมาก่อนหน้านี้ พบยีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส จำนวน 5 ยีน ได้แก่ No.5 (*crtB*), No.6 (*crtISO*, *crtH*), No.14 (*LUT5*, *CYP97A3*), No.21 (*ZDS*, *crtQ*) และ No.23 (*Z-ISO*) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่ไม่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและกลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ แต่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเฉพาะพันธุ์ สำหรับยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงที่สามารถแยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำออกจากกันได้จำนวน 1 ยีน คือ No.9 (*LUT5*, *CYP97A3*) ของ Cluster-12362.24199 ซึ่งพบความแตกต่าง 3 ตำแหน่ง ดังนี้ ตำแหน่งที่ 1 บริเวณ 1,202 ตำแหน่งที่ 2 บริเวณ 3,223 และตำแหน่งที่ 3 บริเวณที่สามารถแยกได้คือ ตำแหน่งที่ 2 บริเวณ 3,223 ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวเป็นเบส G และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำเป็นเบส GAGC แสดงในภาคผนวก ก (ภาพที่ 24)

ตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลง

ขนาด Cluster (bp)

↓ ↓

ตัวอย่างที่ส่งไปวิเคราะห์ Transcriptome sequencing (RNA-seq)

Cluster ในแต่ละยีน			InDel		กำน้อย		กำใหญ่		กข-แม่จี 2		ปทุมธานี 1		
KO Name	Cluster	Length	POS	REF	ALT	BPR1.AD	BPR1.GT	BPR2.AD	BPR2.GT	WR1.AD	WR1.GT	WR2.AD	WR2.GT
<i>LUT5, CYP97A3</i>	Cluster-12362.24199	3578	1202	GA	G	2,8	GA/G	8,9	GA/G	23,0	GA/GA	20,3	GA/G
			3223*	GAGC	G	73,0	GAGC/GAG	47,0	GAGC/GA	0,4	G/G	0,4	G/G
			3424	C	CCG	2,0	C/C	3,0	C/C	0,5	CCG/CCG	NA	./.

↑ ↑ ↑ ↑

Nipponbare จำนวน เบส

การเปลี่ยนแปลงพบในตัวอย่างที่ส่งไปวิเคราะห์

ภาพที่ 24 ตัวอย่างผลการค้นหาบริเวณ InDel ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-seq

* คือ ตำแหน่งที่สามารถแยกกลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและกลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ

สำหรับการค้นหาบริเวณ SNP ที่พบในตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่าง จากการค้นหาบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงใน 24 cluster ของทั้ง 10 ยีน พบยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจำนวน 4 ยีน ได้แก่ No.7 (*crtB*), No.9 (*LUT5, CYP97A3*), No.4 (*ZDS, crtQ*) และ No.3 (*Z-ISO*) โดยเป็นยีนที่น่าสนใจมีจำนวน 2 ยีน ได้แก่ No.9 (*LUT5, CYP97A3*) และ No.3 (*Z-ISO*) เนื่องจาก No.9 (*LUT5, CYP97A3*) ของ Cluster-12362.24199 พบบริเวณ SNP จำนวน 17 ตำแหน่ง มี 13 ตำแหน่งที่สามารถแยกกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวออกจากกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำที่นำมาศึกษาได้ สำหรับยีน No.23 (*Z-ISO*) ของ Cluster-12362.26311 พบบริเวณ SNP จำนวน 3 ตำแหน่งที่สามารถแยกกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำที่นำมาศึกษาได้ แสดงในภาคผนวก ก (ภาพที่ 25)

ตำแหน่งที่พบการเปลี่ยนแปลง

ขนาด Cluster (bp)

ตัวอย่างที่ส่งไปวิเคราะห์ Transcriptome sequencing (RNA-seq)

KO Name	Cluster	Length	SNP			กำน้อย		กำใหญ่		กะ-เมใจ้ 2		ปทุมธานี 1	
			POS	REF	ALT	BPR1.AD	BPR1.GT	BPR2.AD	BPR2.GT	WR1.AD	WR1.GT	WR2.AD	WR2.GT
LUT5, CYP97A3	Cluster-12362.24199	3578	517	T	C	973,0	T/T	1060,2	T/T	11,244	C/C	0,683	C/C
			919	A	T	0,144	T/T	2,164	T/T	262,0	A/A	151,0	A/A
			950*	T	C	0,93	C/C	0,98	C/C	176,0	T/T	94,0	T/T
			1258*	T	G	0,8	G/G	0,14	G/G	23,0	T/T	26,0	T/T
			1330	A	C	1,14	C/C	0,18	C/C	34,0	A/A	34,1	A/A
			1435	C	T	137,0	C/C	93,1	C/C	1,80	T/T	0,79	T/T
			1495*	G	A	0,191	A/A	111,0	G/G	93,0	G/G	121,0	G/G
			1580*	C	A	257,0	C/C	141,0	C/C	0,108	A/A	0,131	A/A
			2039*	A	G	127,0	A/A	52,0	A/A	0,46	G/G	0,74	G/G
			2693*	C	T	96,0	C/C	43,0	C/C	0,40	T/T	0,69	T/T
			2810*	G	A	119,0	G/G	81,0	G/G	0,47	A/A	0,88	A/A
			2816*	G	A	119,0	G/G	87,0	G/G	0,48	A/A	0,89	A/A
			2903*	A	G	96,0	A/A	76,0	A/A	0,31	G/G	0,73	G/G
			2963*	C	A	103,0	C/C	85,0	C/C	0,31	A/A	0,69	A/A
			2970*	G	A	98,0	G/G	83,0	G/G	0,30	A/A	0,65	A/A
			3200*	A	G	92,0	A/A	56,0	A/A	0,3	G/G	0,3	G/G
3242*	G	A	66,0	G/G	45,0	G/G	0,4	A/A	0,5	A/A			
Z150	Cluster-12362.26311	1628	718*	T	C	195,0	T/T	117,0	T/T	0,85	C/C	0,74	C/C
			1130*	C	A	251,0	C/C	150,0	C/C	0,125	A/A	0,136	A/A
			1309*	T	A	104,0	T/T	142,0	T/T	0,44	A/A	0,40	A/A

Nipponbare

การเปลี่ยนแปลงพบในตัวอย่างที่ส่งไปวิเคราะห์

จำนวน

เบส

ภาพที่ 25 ตัวอย่างผลการค้นหาบริเวณ SNP ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค RNA-seq * คือ ตำแหน่งที่สามารถแยกกลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและกลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ

นอกจากยีนที่มีรายงานใน Carotenoid biosynthesis (Ko00906) ในส่วนวิถีการสังเคราะห์ลูทีนจำนวน 10 ยีน ได้ค้นหาบริเวณที่มีลำดับเบสแตกต่างของยีน cytochrome P450 type B (*CYP97B*) ซึ่งน่าจะเป็นยีนในการสังเคราะห์สารในวิถีแคโรทีนอยด์เนื่องจากโครงสร้างของยีนมีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของยีน *CYP97A* (Niu et al. 2020 และ Villa-Rivera et al. 2020) และตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 เช่นเดียวกับยีน *CYP97A* แต่คนละแขน พบจำนวน 1 cluster และจากการค้นหา SNP และ InDel พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของยีน *ZEP* พบจำนวน 2 cluster ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สารซีแซนทีน ดังนั้นผลการค้นหาตำแหน่งบริเวณเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสพบการเปลี่ยนแปลงใน 27 cluster ของ 12 ยีน ดังแสดงในตารางที่ 4 และมีรายละเอียดการเปลี่ยนแปลงทั้งหมดในภาคผนวก ก

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค Transcriptome ของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จาก 27 cluster ของ 12 ยีน

ลำดับที่	ยีน (ชื่อย่อ)	SNP (ตำแหน่ง)	InDel (ตำแหน่ง)
1	<i>PSY</i>	1	2
2	<i>PDS</i>	-	-
3	<i>ZISO</i>	3 ¹	2 ¹
4	<i>ZDS</i>	5 ²	2 ²
5	<i>CrtISO</i>	-	2
6	<i>LCYb</i>	-	-
7	<i>LCYe</i>	-	-
8	<i>BHY, HYD2</i>	-	-
19	<i>CYP97A, Lut5</i>	17 ¹	3 ¹
10	<i>CYP97B</i>	3 ¹	-
11	<i>CYP97C, Lut1</i>	-	-
12	<i>ZEP</i>	3 ³	1 ³

หมายเหตุ: - คือ ไม่พบความแตกต่างในข้าว 4 พันธุ์ที่นำมาศึกษา คือ ก้าน้อย, กำใหญ่, กข-แม่โจ้ 2 และปทุมธานี 1

1 คือ บริเวณ SNP หรือ InDel ที่แยกข้าวกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว (กข-แม่โจ้ 2 และปทุมธานี 1) จากข้าวกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (ก้าน้อย และกำใหญ่)

2 คือ แยกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 จากพันธุ์อื่น

3 คือ แยกข้าวพันธุ์ก้าน้อย จากพันธุ์อื่น

การเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างของลำดับเบสของยีนจำนวน 12 ยีน บริเวณ InDel พบ 2 ยีนที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ ยีน *ZISO* จำนวน 1 ตำแหน่ง และยีน *CYP97A* จำนวน 1 ตำแหน่ง และพบยีน *ZDS* ที่ตำแหน่ง InDel ในข้าวพันธุ์ปทุมธานีที่แสดงความแตกต่างจากข้าวพันธุ์อื่น เช่นเดียวกับยีน *ZEP* ที่บริเวณ InDel สามารถใช้แยกข้าวพันธุ์ก้าน้อยได้ ส่วนบริเวณ SNP ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ จำนวน 3 ยีน คือ ยีน *ZISO* จำนวน 3 ตำแหน่ง, ยีน *CYP97A* จำนวน 13 ตำแหน่ง และยีน *CYP97B* จำนวน 3 ตำแหน่ง สำหรับยีน *ZDS* ตำแหน่ง SNP ที่พบสามารถแยกเฉพาะข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ออกจากพันธุ์อื่นได้ เช่นเดียวกับยีน *ZEP*

ที่ตำแหน่ง SNP สามารถแยกข้าวพันธุ์ก้าน้อยออกจากพันธุ์อื่นได้ จากความแตกต่างของลำดับเบสในยีน *CYP97A* และ *ZISO* ที่พบทั้งบริเวณการเปลี่ยนแปลงแบบ SNP และ InDel ที่สามารถแบ่งกลุ่มได้นั้นมีความสอดคล้องกับการรายงานของ Chen et al. (2010) เกี่ยวกับผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีน *ZISO* ที่ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีนและ Wurtzel (2019) ที่ได้อธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงยีนหลักของวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เป็นยีน *ZISO* นอกจากนี้ในส่วนของยีน *CYP97A* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ lutein biosynthesis ในข้าวพบว่าหากเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจะส่งผลให้สารลูทีนที่ผลิตได้นั้นมีลดลงจากเดิม 12-24 เปอร์เซ็นต์ (Lv et al., 2012)

ความหลากหลายของลำดับเบสของยีนที่แสดงออกที่พบมากในยีน *CYP97A*, *CYP97B* และ *ZISO* ซึ่งแตกต่างกันในกลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำที่มีปริมาณลูทีนสูงกับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวที่มีปริมาณลูทีนต่ำ ดังนั้นความหลากหลายของลำดับเบสเหล่านี้จึงน่าจะสัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีน โดยการวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีรายงานถึง การศึกษาระดับแสดงออกของยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จากข้าวไทยพันธุ์ก้าน้อย ทับทิมชุมแพ และก้าน้อย ซึ่งมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ สีแดงและสีขาว ตามลำดับ พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจะมีปริมาณสารลูทีนสูงกว่าข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและขาว (Janphen et al., 2019)

เนื่องจากตำแหน่งของการเกิด InDel ในแต่ละยีนที่ได้กล่าวมานั้นมีการเพิ่มหรือลดของลำดับเบสจำนวนสั้น ๆ ซึ่งไม่นำบริเวณดังกล่าวมาศึกษาต่อได้ ดังนั้นเครื่องหมายที่ออกแบบจะเป็นไพรมอร์ T-ARMS (Tetra-primer Amplification Refractory Mutation System PCR) ที่จำเพาะกับการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบ SNP โดยมีเกณฑ์ในการเลือกบริเวณ SNP ที่จะนำไปออกแบบคือ ลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงต้องแตกต่างระหว่างข้าวกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำกับกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ลำดับเบสในแต่ละกลุ่มต้องเหมือนกัน และระดับการแสดงออกระหว่างกลุ่มต้องต่างกันและภายในกลุ่มต้องเหมือนกัน ซึ่งจากการเปรียบเทียบค่าการแสดงออกไม่พบระดับการแสดงออกของยีน ที่สามารถแยกข้าวกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจากกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว (ภาพที่ 23) ในการออกแบบไพรมอร์ T-ARMS จึงใช้เพียงเกณฑ์บริเวณ SNP ที่แยกข้าวกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจากกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว

2.3 การออกแบบไพรเมอร์ T-ARMS

การออกแบบไพรเมอร์จะเลือกออกแบบจากบริเวณ SNP ในยีนที่แยกข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีขาวจากข้าวเชื้อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ ยีน *ZISO*, *CYP97A/Lut5* และ *CYP97B* และได้ออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ SNP ในยีน *ZDS* และ *ZEP* เนื่องจากเป็นลำดับเบสที่แตกต่างกันในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และก้าน้อย ทำให้ยีนที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ T-ARMS จากผล Transcriptome รวมเป็น 5 ยีน โดยออกแบบได้ 12 ชุดไพรเมอร์ (ตารางที่ 5) ดังนี้

1. ยีน beta-ring hydroxylase (*LUT5*, *CYP97A3*) จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์
 2. ยีน zeta-carotene desaturase (*ZDS*) จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์
 3. ยีน 15-cis-zeta-carotene isomerase (*ZISO*) จำนวน 3 ชุดไพรเมอร์
 4. ยีน zeaxanthin epoxidase (*ZEP*) จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์
 5. ยีน cytochrome P450 97B2 (*CYP97B2*) จำนวน 3 ชุดไพรเมอร์
- รวมเป็น 12 ชุดไพรเมอร์

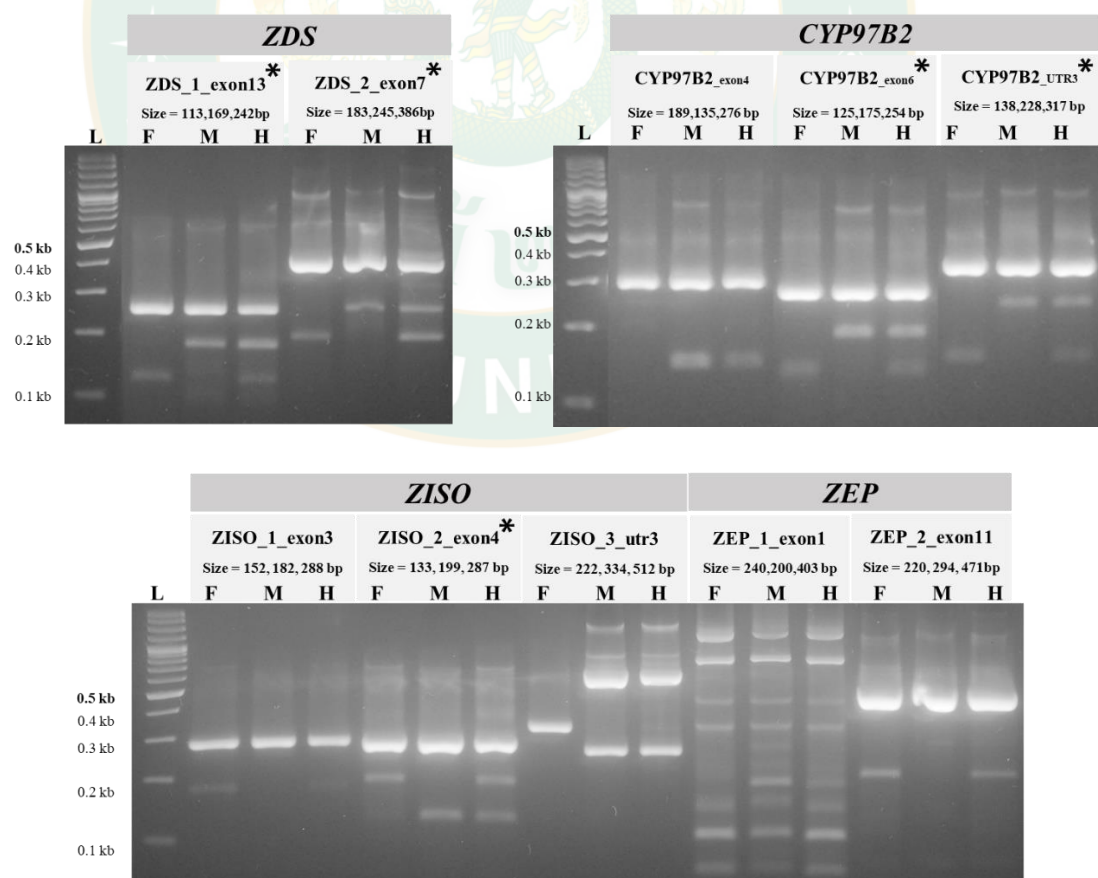
ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ T-ARMS จากผล Transcriptome จำนวน 5 ยีน 12 ชุดไพรเมอร์

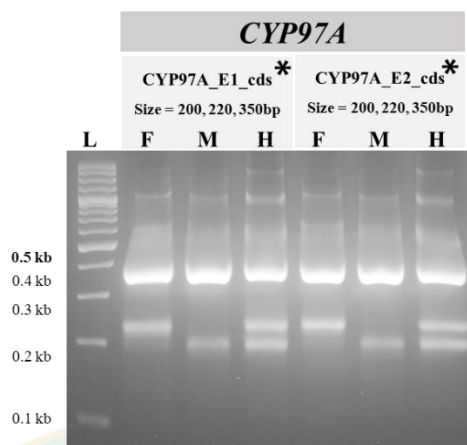
Gene	Gene Name	Cluster Name	Pos. In Cluster	variant	Set primer Name	Primer Name	Seq (5'-to-3')	Base call	Product Size (bp)
<i>CYP97A</i>	beta-ring hydroxylase (<i>LUT5</i> , <i>CYP97A3</i>)	Cluster-12362.24	2693	Exon4 (synonyms) (Ala203=)	CYP97A_E1_cds	CYP97A-Inner-F-E1	ATTGGTGGGTGCAGGGTATTCTGTCA	A	220
						CYP97A-Inner-R	CGTACCATCACAACTCTAAAATTGCC	G	200
						CYP97A-Outer-F2	AGTCTTTCCTCATTGTCTCTGATCCAGC		350
						CYP97A-Outer-R2	AAGAGACTTATCATTGCGGCAACGTACT		
		Cluster-199	2693	Exon4 (synonyms) (Ala203=)	CYP97A_E2_cds	CYP97A-Inner-F-E2	ATTGGTGGTGGTGCAGGGTATTCTGTCA	A	220
						CYP97A-Inner-R	CGTACCATCACAACTCTAAAATTGCC	G	200
						CYP97A-Outer-F2	AGTCTTTCCTCATTGTCTCTGATCCAGC		350
						CYP97A-Outer-R2	AAGAGACTTATCATTGCGGCAACGTACT		
<i>ZDS</i>	zeta-carotene desaturase	Cluster-12362.29	1635	exon13 (Arg-480-Gln) (missense)	ZDS_1_exon13	ZDS-1-Inner-A-F	ATTGTTCCCGTCATCCCA	A	113
						ZDS-1-Inner-G-R	GACCATGTAAGTTCCAAGCATC	G	169
						ZDS-1-Outer-F	AGAGATCCATTGCAATAATGAAG		242
						ZDS-1-Outer-R	CTTTTGATCAGGTCTAAATGGATC		
		Cluster-396	901	exon7 (synonyms) (Ser235=)	ZDS_2_exon7	ZDS-2-Inner-G-F	CAGCGATTGGTCTTGACG	G	183
						ZDS-2-Inner-C-R	TGCTCTCTCGAGTACCACCTATG	C	245
						ZDS-2-Outer-F	ATCTACTGTCTAGGCAATGCATCA		386
						ZDS-2-Outer-R	GTGAACCCCTTAGCATGCGT		
<i>ZISO</i>	isomerase or NnuU/NnuR	Cluster-12362.26	718	exon3 (synonyms) (Leu223=)	ZISO_1_exon3	ZISO-1-Inner-T-F	TCTTTCATCTCATTCTCTGT	T	152
						ZISO-1-Inner-C-R	AAGATTGAAAGTAGATGGATAAAG	C	182
						ZISO-1-Outer-F	TCTCAATGGCTAAGTTCTTCT		288
						ZISO-1-Outer-R	TATCTTTAAAATGGCCTCCT		

Gene	Gene Name	Cluster Name	Pos. In Cluster	variant	Set primer Name	Primer Name	Seq (5'-to-3')	Base call	Product Size (bp)
ZEP	zeaxanthin epoxidase	Cluster-12362.26565	1130	exon4 (Ala-360-Glu) (missense)	ZISO_2_exon4	ZISO-2-Inner-C-F	CTTTGTTTCATCCCTTAATGCAAGC	C	133
						ZISO-2-Inner-A-R	AAGGGAGTTGGTAGCTGGGCT	A	199
						ZISO-2-Outer-F	CGCTATGGTGAAGCCTTTGAAG		287
						ZISO-2-Outer-R	AGGCCAGGCTATCAGGTCTATCA		
						ZISO-3-Inner-T-F	GACTAACGAAAGAGTACCAGATT	T	222
						ZISO-3-Inner-A-R	TGAATACTCCCATCTACACCT	A	334
		Cluster-12362.17530	1309	(3 primer UTR)	ZISO_3_utr3	ZISO-3-Outer-F	TATTCCTTTTGCTGCAGTTA		512
						ZISO-3-Outer-R	GCTTAACATGACTTTTGTGC		
						ZEP-1-Inner-C-F	TCTCGTGGCGATCCCGGGAGC	C	242
						ZEP-1-Inner-T-R	GGCCATGGGGCAGGCGA	T	200
						ZEP-1-Outer-F	TGCTCGTTGGGTAGAGCGGATCGGA		403
						ZEP-1-Outer-R	GAACCCCTCCGCTTGGCCGC		
CYP97B2	cytochrome P450 97B2, epsilon hydroxylase	Cluster-12362.28097	523	exon4 (Asp-179-Glu) (missense variant)	CYP97B2_exon4	ZEP-2-Inner-C-F	TTTTACAATCATGTGAAGGCACAC	C	220
						ZEP-2-Inner-T-R	CATCGACGAAGCTGGGCA	T	294
						ZEP-2-Outer-F	GCTGGTTCTAGGAGGAAACAGG		471
						ZEP-2-Outer-R	GGGAGGAGGTACCACCTGCA		
						CYP97B2-exon4-In-F	GTTCCATGCCTTATTCATAAAT	T	135
						CYP97B2-exon4-In-R	ACTTAGTAAATACTCCACCATAACT	A	189
		Cluster-12362.28097	1120	exon6 (Gln-378-His) (missense variant)	CYP97B2_exon6	CYP97B2-exon4-Out-F	TGATATAATTAACACTATTTCTCTGCC		276
						CYP97B2-exon4-Out-R	CAGCTTCAAGGTCCACTATG		
						CYP97B2-exon6-In-F	CTCCAAGATGAGAAAAGCATAG	G	125
						CYP97B2-exon6-In-R	CTGAGTACAGAATCAACCTCTACA	T	175
						CYP97B2-exon6-Out-F	CTGTTTTTCTACTAGCCCAGG		254
						CYP97B2-exon6-Out-R	AGTTCAATTCACAGGAATGG		
Cluster-12362.28097	1881	3 prime UTR variant	CYP972_UTR3	CYP97B2-3UTR-In-F	TTCGCTCATGATGTGATAGT	T	228		
				CYP97B2-3UTR-In-R	AATAATCGAATAGTATATACTTCTATGCT	A	138		
				CYP97B2-3UTR-Out-F	CAAGAAGCACACAGGAATAA		317		
				CYP97B2-3UTR-Out-R	ACTGGATCATCCATACTATTCA				

2.4 การทดสอบเครื่องหมายที่พัฒนาได้

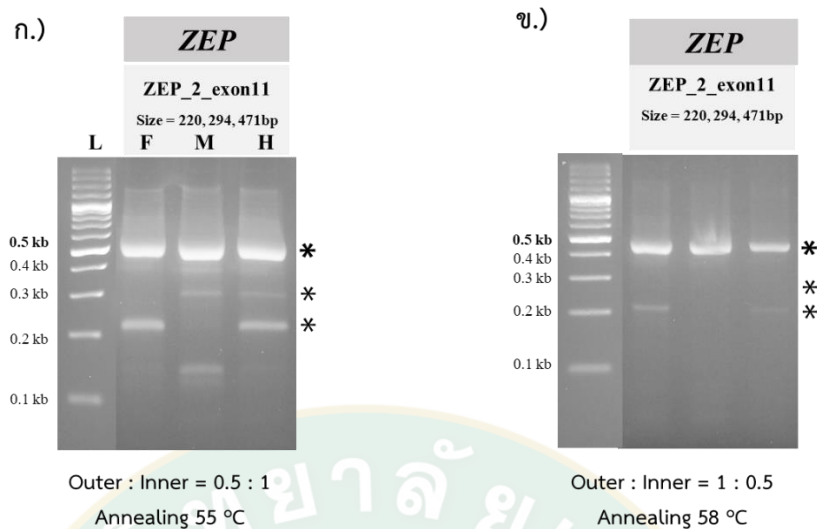
จากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จำนวน 5 ยีน ที่เป็นการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบ SNP จึงออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณดังกล่าว คือ ไพรเมอร์ T-ARMS ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จำนวน 12 ชุดไพรเมอร์ (ตารางที่ 5) เริ่มต้นการทดสอบไพรเมอร์ T-ARMS ทั้ง 12 ชุดไพรเมอร์ด้วยอุณหภูมิแอนนีลิ่ง 55 องศาเซลเซียส กับอัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner เท่ากับ 1 : 0.5 กับตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, กข-แม่โจ้ 2 และลูกผสมรุ่น F_1 (ปทุมธานี 1 \times กำน้อย) ซึ่งจะใช้เป็นคู่ผสมในการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อหาความสัมพันธ์ของเครื่องหมาย ผลการทดสอบพบว่ามี 7 ไพรเมอร์ สำหรับ 4 ยีน ที่ให้แถบดีเอ็นเอตามคาดหวัง คือ 1.) ยีน *ZDS* ไพรเมอร์ *ZDS_1_exon13* และ *ZDS_2_exon7*, 2.) ยีน *CYP97B2* ไพรเมอร์ *CYP97B2_exon6* และ *CYP97B2_UTR3* 3.) ยีน *ZISO* ไพรเมอร์ *ZISO_2_exon4* และ 4.) ยีน *CYP97A* ไพรเมอร์ *CYP97A_E1_cds* และ *CYP97A_E2_cds* (ภาพที่ 26)





ภาพที่ 26 ผลการทดสอบไพรเมอร์ T-ARMS ที่อุณหภูมิแอนนีลิ่ง 55 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner เท่ากับ 1 : 0.5 โดย L คือ 100 bp Plus DNA Ladder, F คือ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ), M คือ ข้าวพันธุ์ก้าน้อย (พันธุ์ให้) และ H คือ ลูกผสมรุ่น F₁ (ปทุมธานี 1 x ก้าน้อย) ตามลำดับ size คือ ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังในแต่ละชุดไพรเมอร์ * คือ ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอตามที่คาดหวัง

โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *ZEP* ได้ปรับสถานะของอุณหภูมิแอนนีลิ่งที่ใช้หรือปรับอัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner คือ อัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner จากเดิม 1 : 0.5 เป็น 0.5 : 1 (Alyethodi et al., 2018) อุณหภูมิแอนนีลิ่งเป็น 55 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 27 ก) และอัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner 1 : 0.5 อุณหภูมิแอนนีลิ่งเป็น 58 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 27 ข)



ภาพที่ 27 ผลการทดสอบไพรเมอร์ T-ARMS ของยีน ZEP

อุณหภูมิแอนนีลิ่ง 55 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner เท่ากับ 0.5 : 1 (ก.) และอุณหภูมิแอนนีลิ่ง 58 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner เท่ากับ 1 : 0.5 (ข.) โดย L คือ 100 bp Plus DNA Ladder, F คือ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ), M คือ ข้าวพันธุ์ก้าน้อย (พันธุ์ให้) และ H คือ ลูกผสมรุ่น F₁ (ปทุมธานี 1 x ก้าน้อย) ตามลำดับ size คือ ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง * คือ ขนาดของแถบดีเอ็นเอตามที่คาดหวัง

ซึ่งผลการปรับสภาวะทั้ง 2 แบบยังไม่ได้สภาวะที่เหมาะสมโดยการปรับอัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner จากเดิม 1 : 0.5 เป็น 0.5 : 1 ของยีน ZEP (ภาพที่ 27 ก) จะเห็นได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแต่ละอัลลีล แต่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการในพันธุ์ก้าน้อยและเพื่อกำจัดแถบดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการจึงปรับอุณหภูมิแอนนีลิ่งเป็น 58 องศาเซลเซียส พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ต้องการหายไปซึ่งอาจจะเกิดจากอุณหภูมิที่ใช้สูงเกินไป จึงทำให้การจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์เกิดขึ้นได้ยากเนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์ชนิด T-ARMS จำนวน 1 ชุดไพรเมอร์ประกอบด้วยไพรเมอร์ 4 สาย คือ outer forward, outer reverse, inner forward และ inner reverse โดยจะมีหลักการออกแบบไพรเมอร์ inner forward และ inner reverse เบสตำแหน่งที่ 3 ด้าน 3' เป็นเบสไม่คู่สมและต่างกลุ่มกัน เพื่อให้ประสิทธิภาพในการเลือกจับของไพรเมอร์ในแต่ละอัลลีล (Johnson, 2010; Mesrian Tanha et al., 2015)

ดังนั้นไพรเมอร์ T-ARMS ได้ทำการออกแบบจำนวน 5 ยีน 12 ชุดไพรเมอร์ มีจำนวน 4 ยีน 7 ชุดไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ตรงตามขนาดที่ต้องการ ได้แก่ 1.) ยีน *ZDS* ไพรเมอร์ *ZDS_1_exon13* และ *ZDS_2_exon7*, 2.) ยีน *CYP97B2* ไพรเมอร์ *CYP97B2_exon6* และ *CYP97B2_UTR3* 3.) ยีน *ZISO* ไพรเมอร์ *ZISO_2_exon4* และ 4.) ยีน *CYP97A* ไพรเมอร์ *CYP97A_E1_cds* และ *CYP97A_E2_cds*

3. การพัฒนาเครื่องหมายจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค WGS

3.1 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

การค้นหาคำบริวารที่แตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค whole genome sequencing โดยได้รับความอนุเคราะห์ข้อมูล WGS จากโครงการวิจัยของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกกุลสิงหาโรจน์ โดยจะค้นหาคำบริวารของยีนรวมถึงบริเวณด้านหน้า (upstream) และด้านหลัง (downstream) ที่อยู่ห่างจากยีนไม่เกิน 50 กิโลเบสของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทั้ง 15 ยีน ได้แก่ *PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZISO*, *ZDS*, *CrtISO*, *LCYb*, *LCYe*, *EHY*, *BHY*, *CYP97A*, *CYP97B*, *CYP97C* และ *ZEP* มี 5 ยีนที่พบความแตกต่างบริเวณยีนแบบ SNP หรือ InDel ที่สามารถแบ่งกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำออกจากกันได้ คือ *PDS*, *ZISO*, *LCYe*, *CYP97A* และ *CYP97B* (ตารางที่ 6) และพบ 2 ยีน ที่บริเวณความแตกต่างไม่สามารถใช้ในการแยกกลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวออกจากสีดำได้ คือ ยีน *ZDS* โดยที่บริเวณความแตกต่างสามารถแยกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ออกจากข้าวพันธุ์อื่นที่นำมาศึกษาได้ เช่นเดียวกับยีน *ZEP* ที่บริเวณแตกต่างสามารถแยกเฉพาะข้าวพันธุ์ก้าน้อยออกจากข้าวพันธุ์อื่น แต่ไม่สามารถแบ่งกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำออกจากกันได้ (ภาคผนวก ข)

สำหรับอีก 12 ยีนนั้นมีบริเวณ SNP ที่สามารถแยกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวออกจากสีดำ ได้แก่ 1.) ยีน *PSY1* พบ 1 ตำแหน่ง บริเวณ downstream, ยีน *PSY3* พบ 12 ตำแหน่ง คือ บริเวณ upstream 11 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 1 ตำแหน่ง, 3.) ยีน *PDS* พบ 27 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 7 ตำแหน่ง บริเวณยีน 1 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 19 ตำแหน่ง, 4.) ยีน *ZISO* พบ 724 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 399 ตำแหน่ง บริเวณยีน 5 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 320 ตำแหน่ง, 5.) ยีน *CrtISO* พบ 6 ตำแหน่ง บริเวณ upstream, 6.) ยีน *LCYb* พบ 51 ตำแหน่ง บริเวณ downstream, 7.) ยีน *LCYe* พบ 3 ตำแหน่ง

คือบริเวณ upstream 1 ตำแหน่ง บริเวณยีน 1 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 1 ตำแหน่ง, 8.) ยีน *EHY* พบ 2 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 1 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 1 ตำแหน่ง, 9.) ยีน *BHY* พบ 5 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 4 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 1 ตำแหน่ง, 10.) ยีน *CYP97A* พบ 327 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 191 ตำแหน่ง บริเวณยีน 52 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 84 ตำแหน่ง, 11.) ยีน *CYP97B* พบ 648 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 514 ตำแหน่ง บริเวณยีน 22 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 112 ตำแหน่ง และ 12.) ยีน *CYP97C* พบ 2 ตำแหน่ง บริเวณ upstream (ตารางที่ 6)

ยีนที่พบความแตกต่างแบบ InDel จำนวน 9 ยีน ได้แก่ 1.) ยีน *PSY2* พบ 2 ตำแหน่ง บริเวณ upstream, 2.) ยีน *PSY3* พบ 1 ตำแหน่ง บริเวณ upstream, 3.) ยีน *PDS* พบ 15 ตำแหน่ง คือบริเวณยีน 1 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 14 ตำแหน่ง, 4.) ยีน *ZISO* พบ 141 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 79 ตำแหน่ง บริเวณยีน 8 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 54 ตำแหน่ง, 5.) ยีน *LCYb* พบ 9 ตำแหน่ง บริเวณ downstream, 6.) ยีน *EHY* พบ 1 ตำแหน่ง บริเวณ upstream, 7.) ยีน *CYP97A* พบ 71 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 28 ตำแหน่ง บริเวณยีน 15 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 28 ตำแหน่ง, 8.) ยีน *CYP97B* พบ 135 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 106 ตำแหน่ง บริเวณยีน 2 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 27 ตำแหน่ง และ 9.) ยีน *CYP97C* พบ 1 ตำแหน่ง บริเวณ upstream (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 สรุปผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค WGS ของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

ลำดับ ที่	ยีน (ชื่อย่อ)	แบบ SNP			แบบ InDel		
		Upstream (ตำแหน่ง)	Gene region (ตำแหน่ง)	Downstream (ตำแหน่ง)	Upstream (ตำแหน่ง)	Gene region (ตำแหน่ง)	Downstream (ตำแหน่ง)
1	<i>PSY1</i>	-	-	1	-	-	-
2	<i>PSY2</i>	-	-	-	2	-	-
3	<i>PSY3</i>	11	-	1	1	-	-
4	<i>PDS</i>	7	1	19	-	1	14
5	<i>ZISO</i>	399	5	320	79	8	54
6	<i>ZDS*</i>	-	-	-	-	-	-
7	<i>CrtISO</i>	6	-	-	-	-	-
8	<i>LCYb</i>	-	-	51	-	-	9
9	<i>LCYe</i>	1	1	1	-	-	-
10	<i>EHY, HYD3</i>	1	-	1	1	-	-
11	<i>BHY, HYD2</i>	4	-	1	-	-	-
12	<i>CYP97A, Lut5</i>	191	52	84	28	15	28
13	<i>CYP97B</i>	514	22	112	106	2	27
14	<i>CYP97C, Lut1</i>	2	-	-	1	-	-
15	<i>ZEP*</i>	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ; - คือ ไม่พบความแตกต่างที่สามารถแยกกลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวออกจากสีดำได้

* คือ ยีน *ZDS* ความแตกต่างสามารถแยกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ออกจากพันธุ์อื่นได้ เช่นเดียวกับยีน *ZEP* ที่สามารถใช้ในการแยกข้าวพันธุ์ก้าน้อยออกจากข้าวพันธุ์อื่นได้แต่ไม่สามารถแบ่งกลุ่มได้

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนยีนที่ได้เทคนิค WGS จะพบความแตกต่างของลำดับเบสมากกว่าผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จาก RNA-seq เนื่องจากการอ่านลำดับเบสด้วยเทคนิค WGS นั้นสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่พบในบริเวณอินทรอน ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในข้าวพันธุ์ Chuanyou6203 ที่เปรียบเทียบการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้ง 2 วิธี ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จาก WGS จะพบความแตกต่างมากกว่าผลจาก RNA-seq (Ren et al., 2020) โดยในส่วนของยีนพบลำดับเบสที่แตกต่างกันระหว่างข้าวที่เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและสีดำสูงสุดคือในยีน *CYP97A*, *CYP97B* และ *ZISO* ตามลำดับ โดยการศึกษา ยีน *CYP97A* พบว่าลำดับเบสที่เปลี่ยนไปจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (Lv et al., 2012) จึงทำให้ลำดับเบสแสดงความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำในส่วนที่

เป็นบริเวณยีนสูงกว่ายีนอื่น โดยยีน *CYP97A* และ *CYP97B* นั้นมีรายงานก่อนหน้านี้ว่ามีลำดับเบสคล้ายกันและทำงานในกระบวนการเหมือนกัน (Niu et al., 2020; Villa-Rivera and Ochoa-Alejo, 2020) จึงอาจจะส่งผลให้ความแตกต่างที่พบในทั้ง 2 ยีนนี้มีค่าสูงเหมือนกัน เช่นเดียวกับยีน *ZISO* ที่เป็นยีนสำคัญในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และพบว่าในข้าวโพดและอะราบิโดพซิสหากเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจะส่งผลทำให้ปริมาณของสาร 15-cis-phytoene ลดลง ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารไลโคพีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (Chen et al., 2010; Wurtzel, 2019)

สำหรับยีนที่พบความแตกต่างของลำดับเบสทั้งในส่วนที่เป็นยีน, upstream และ downstream เพียงบางตำแหน่ง คือ ยีน *PSY1*, *PSY2*, *PDS*, *CrtISO*, *LCYb*, *LCYe*, *EHY*, *BHY* และ *CYP97C* ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่ยีนดังกล่าวนั้นถูกควบคุมการแสดงออกจาก Transcription Factor จึงทำให้ไม่พบความแตกต่างในบริเวณยีนแต่จะพบความแตกต่างที่เกิดขึ้นบริเวณ upstream และ downstream เป็นหลัก

3.2 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

จากการสืบค้นข้อมูลพบยีนที่คาดว่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ เพิ่มเติม จำนวน 13 ยีน โดยเป็นยีนในกลุ่มของ transcription factor จำนวน 8 ยีน คือ MADS-box transcription factor 26 (*MADS26*), DnaJ domain-containing protein (*DnaJ*), chaperone protein dnaJ (*DnaJ10*) ยีนในกลุ่ม MBW (MYB-bHLH-WDR) protein complexes (Xu et al., 2015) คือ R2R3-MYB transcription factor (*MYB_R2R3_C1*), R-type basic helix-loop-helix protein bHLH transcription factor (*bHLH_B1*), Regulation of anthocyanin pigmentation bHLH transcription factor (*bHLH_B2_Kala4*), Basic helix-loop-helix (bHLH) protein Proanthocyanidin synthesis, rc - bHLH transcription factor (*bHLH_Rc*) และ WD domain (*WDR_WD40*) transparent testa glabra 1 protein (TTG1 protein) ยีนในกลุ่ม cleavage ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (Sun et al., 2020) จำนวน 3 ยีน คือ 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1 (*NCED1*) carotenoid-cleavage dioxygenase 4a (*CCD4a*), 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2 (*NCED2*), carotenoid-cleavage dioxygenase 4b (zeaxanthin cleavage oxygenase (*CCD4b*)), lycopene cleavage dioxygenase (*LCD_CCD1*) ยีนในกลุ่ม SET DOMAIN (Chettry and Chrungoo, 2020; Chettry

et al., 2019) คือ histone methyltransferase (SET DOMAIN GROUP 8) (*SDG8*) (*ccr1*) และ ยีน Orange (*Or*)

การค้นหาลำดับยีนที่แตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำโดยจะค้นหาลำดับยีนรวมถึงบริเวณ upstream และ downstream ที่อยู่ห่างจากยีนไม่เกิน 50 กิโลเบสของยีนจำนวน 13 ยีน พบ 5 ยีนที่มีความแตกต่างบริเวณยีนแบบ SNP หรือ InDel ที่สามารถแบ่งกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำออกจากกันได้ คือ *SDG8*, *LCD_CCD1*, *MYB_R2R3_C1*, *bHLH_B1* และ *bHLH_B2_Kala4* (ตารางที่ 7) และพบ 2 ยีน ที่บริเวณความแตกต่างไม่สามารถใช้ในการแยกกลุ่มข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวออกจากสีดำได้ คือ ยีน *bHLH_Rc* ที่บริเวณความแตกต่างสามารถแยกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ออกจากข้าวพันธุ์อื่นที่นำมาศึกษาได้ เช่นเดียวกับยีน *CCD4b* ที่บริเวณแตกต่างสามารถแยกเฉพาะข้าวพันธุ์ก้าน้อยออกจากข้าวพันธุ์อื่น แต่ไม่สามารถแบ่งกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำออกจากกันได้ (ภาคผนวก ข)

สำหรับอีก 11 ยีนนั้นมีบริเวณ SNP ที่สามารถแยกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวออกจากสีดำ ได้แก่ 1.) ยีน *SDG8* พบ 1,253 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 355 ตำแหน่ง บริเวณยีน 94 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 804 ตำแหน่ง, 2.) ยีน *Or* พบ 7 ตำแหน่ง บริเวณ upstream, 3.) ยีน *CCD4a* พบ 2 ตำแหน่ง บริเวณ upstream, 4.) ยีน *LCD_CCD1* พบ 127 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 75 ตำแหน่ง บริเวณยีน 5 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 47 ตำแหน่ง, 5.) ยีน *DnaJ* พบ 6 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 2 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 4 ตำแหน่ง, 6.) ยีน *DnaJ10* พบ 1 ตำแหน่ง บริเวณ upstream 7.) ยีน *MADS26* พบ 45 ตำแหน่ง บริเวณ downstream, 8.) ยีน *WDR_WD40* พบ 5 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 2 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 3 ตำแหน่ง, 9.) ยีน *MYB_R2R3_C1* พบ 27 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 18 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 9 ตำแหน่ง, 10.) ยีน *bHLH_B1* พบ 721 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 287 ตำแหน่ง บริเวณยีน 51 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 383 ตำแหน่ง และ 11.) ยีน *bHLH_B2_Kala4* พบ 925 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 324 ตำแหน่ง บริเวณยีน 86 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 515 ตำแหน่ง (ตารางที่ 7)

ยีนที่พบความแตกต่างแบบ InDel จำนวน 9 ยีน ได้แก่ 1.) ยีน *SDG8* พบ 262 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 59 ตำแหน่ง บริเวณยีน 16 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream

187 ตำแหน่ง, 2.) ยีน *CCD4a* พบ 2 ตำแหน่ง บริเวณ upstream, 3.) ยีน *LCD_CCD1* พบ 34 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 23 ตำแหน่ง บริเวณยีน 2 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 9 ตำแหน่ง, 4.) ยีน *DnaJ* พบ 3 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 2 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 1 ตำแหน่ง, 5.) ยีน *MADS26* พบ 11 ตำแหน่ง บริเวณ downstream, 6.) ยีน *WDR_WD40* พบ 3 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 2 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 1 ตำแหน่ง, 7.) ยีน *MYB_R2R3_C1* พบ 9 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 6 ตำแหน่ง บริเวณยีน 1 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 2 ตำแหน่ง, 8.) ยีน *bHLH_B1* พบ 113 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 24 ตำแหน่ง บริเวณยีน 12 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 77 ตำแหน่ง และ 9.) ยีน *bHLH_B2_Kala4* พบ 129 ตำแหน่ง คือบริเวณ upstream 53 ตำแหน่ง บริเวณยีน 19 ตำแหน่ง และบริเวณ downstream 129 ตำแหน่ง (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 สรุปผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค WGS ของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

ลำดับ ที่	ยีน (ชื่อย่อ)	แบบ SNP			แบบ InDel		
		Upstream (ตำแหน่ง)	Gene region (ตำแหน่ง)	Downstream (ตำแหน่ง)	Upstream (ตำแหน่ง)	Gene region (ตำแหน่ง)	Downstream (ตำแหน่ง)
1	<i>SDG8</i>	355	94	804	59	16	187
2	<i>Or</i>	7	-	-	-	-	-
3	<i>CCD4a</i>	2	-	-	2	-	-
4	<i>CCD4b*</i>	-	-	-	-	-	-
5	<i>LCD_CCD1</i>	75	5	47	23	2	9
6	<i>DnaJ</i>	2	-	4	2	-	1
7	<i>DnaJ10</i>	1	-	-	-	-	-
8	<i>MADS26</i>	-	-	45	-	-	11
9	<i>WDR_WD40</i>	2	-	3	2	-	1
10	<i>MYB_R2R3_C1</i>	18	-	9	6	1	2
11	<i>bHLH_B1</i>	287	51	383	24	12	77
12	<i>bHLH_B2_Kala4</i>	324	86	515	53	19	87
13	<i>bHLH_Rc*</i>	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ; - คือ ไม่พบความแตกต่างที่สามารถแยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวออกจากสีดำได้

* คือ ยีน *bHLH_Rc* ความแตกต่างสามารถแยกข้าวพันธุ์พุมธานี 1 ออกจากพันธุ์อื่นได้ เช่นเดียวกับยีน *CCD4b* ที่สามารถใช้ในการแยกข้าวพันธุ์ก้านน้อยออกจากข้าวพันธุ์อื่นได้แต่ไม่สามารถแบ่งกลุ่มได้

จากการศึกษาของ Lu et al. (2018) ที่ได้ทำการศึกษาถึงตำแหน่ง TF binding site ของ *CsMADS6* ที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน *PSY* และ *PDS* ในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ และมีการศึกษาของ Sala et al. (2015) และ Tanaka et al. (2009) ที่รายงานถึงความสมดุลของบริเวณ upstream และ downstream ที่พบว่ามีความสำคัญและส่งผลกระทบต่อบริเวณการทำงานของยีน

3.3 การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์จะเลือกตำแหน่งของ SNP หรือ InDel ที่พบภายในยีนเป็นอันดับแรก แต่หากไม่มีความแตกต่างในส่วนของยีนหรือหากในบริเวณยีนมีความแตกต่างที่กระจุกตัวจนไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ จึงจะออกแบบไพรเมอร์จากตำแหน่งที่อยู่ upstream หรือ downstream ที่ขนาดข้างยีนไม่เกิน 50 กิโลเบส

การพัฒนาเครื่องหมายจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค WGS ยีนที่จะทำการออกแบบเครื่องหมายมีจำนวนทั้งสิ้น 22 ยีน จะเป็นการพัฒนาเครื่องหมายของยีนที่ยังไม่ได้ออกแบบจากเทคนิค Transcriptome แต่เป็นยีนที่อยู่ในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ จำนวน 9 ยีน คือ phytoene synthase 1 (*PSY1*), phytoene synthase 2 (*PSY2*), phytoene synthase 3 (*PSY3*), lycopene epsilon cyclase (*LCYe*), lycopene beta cyclase (*LCYb*), carotenoid epsilon-ring hydroxylase (*CYP97C2 (Lut1)*), phytoene desaturase (*PDS*), carotenoid isomerase (*CrtISO*) และ carotene beta-ring hydroxylase 3 (*HYD3, BCH1*) และ ยีน ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ จำนวน 13 ยีน ได้แก่ *SDG8, Or, CCD4a, CCD4b, LCD_CCD1, DnaJ, DnaJ1 0, MADS2 6, WDR_WD4 0, MYB_R2 R3_C1, bHLH_B1, bHLH_B2_Kala4* และ *bHLH_Rc*

โดยยีนที่ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จากผล WGS ได้เป็นจำนวน 22 ยีน 45 ชุดไพรเมอร์ (ตารางที่ 8 และ 9) ดังนี้

1. ยีน phytoene synthase 1 (<i>PSY1</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์
		InDel Primer	จำนวน 1 คู่ไพรเมอร์
2. ยีน phytoene synthase 2 (<i>PSY2</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 1 ชุดไพรเมอร์
		InDel Primer	จำนวน 1 คู่ไพรเมอร์
3. ยีน phytoene synthase 3 (<i>PSY3</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 1 ชุดไพรเมอร์
		InDel Primer	จำนวน 1 คู่ไพรเมอร์

4. ยีน lycopene epsilon cyclase (<i>LCYe</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer InDel Primer	จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่ไพรเมอร์
5. ยีน lycopene beta cyclase (<i>LCYb</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer InDel Primer	จำนวน 1 ชุดไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ไพรเมอร์
6. ยีน carotenoid epsilon-ring hydroxylase (<i>CYP97C2 (Lut1)</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 1 ชุดไพรเมอร์
7. ยีน phytoene desaturase (<i>PDS</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer InDel Primer	จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่ไพรเมอร์
8. ยีน carotenoid isomerase (<i>CrtISO</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 1 ชุดไพรเมอร์
9. ยีน carotene beta-ring hydroxylase 3 (<i>HYD3, BCH1</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์
10. ยีน R2R3-MYB transcription factor (<i>MYB_R2R3_C1</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer InDel Primer	จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่ไพรเมอร์
11. ยีน MADS-box transcription factor 26 (<i>MADS26</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 1 ชุดไพรเมอร์
12. ยีน histone methyltransferase (SET DOMAIN GROUP 8) (<i>SDG8 (ccr1)</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer InDel Primer	จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่ไพรเมอร์
13. ยีน DnaJ domain-containing protein (<i>DnaJ</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 1 ชุดไพรเมอร์
14. ยีน chaperone protein dnaJ (<i>DnaJ10</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 1 ชุดไพรเมอร์
15. ยีน R-type basic helix-loop-helix protein bHLH transcription factor (<i>bHLH_B1</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer InDel Primer	จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่ไพรเมอร์
16. ยีน regulation of anthocyanin pigmentation bHLH transcription factor (<i>bHLH_B2_Kala4</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer InDel Primer	จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่ไพรเมอร์
17. ยีน basic helix-loop-helix (bHLH) protein proanthocyanidin synthesis, rc - bHLH transcription factor (<i>bHLH_Rc</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 1 ชุดไพรเมอร์
18. ยีน WD domain (<i>WDR_WD40</i>) transparent testa glabra 1 protein (TTG1 protein)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์
19. ยีน 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1 (<i>NCED1</i>) carotenoid-cleavage dioxygenase 4a (<i>CCD4a</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer InDel Primer	จำนวน 1 ชุดไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่ไพรเมอร์
20. ยีน 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2 (<i>NCED2</i>) carotenoid-cleavage dioxygenase 4b, Zeaxanthin cleavage oxygenase (<i>CCD4b</i>)	ได้แก่	T-ARMS Primer	จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์

Gene	Gene Name	Pos. Gene	Pos. In Chro mosome	Variant	Primer Name	Seq (5'-to-3')	Base call	Product Size (bp)
CYP97C2 (Lut1)	Os10g0546600	Chro.10(2 1368384.. 21373100)	c10p2133 7180	Upstream 31204 bp	CYP97C2-21337180-In-F	GACCATCAAATTAATATGAATACCC	C	230
					CYP97C2-21337180-In-R	TGTTTCAAAGAGAGGAGGAAAA	T	299
					CYP97C2-21337180-Out-F	TCGTATGATGAAGTACCACATGA		481
					CYP97C2-21337180-Out-R	CTCCTCTCCTCCCGTTCTAA		
PDS	Os03g0184000	Chro.03:4, 410,090.4 ,414,505	c3p44034 05	Upstream = 6685 bp	PDS-4403405-In-F	AACCTGATAAATGGATATATGTT	T	136
					PDS-4403405-In-R	CTATATAGAAGTTACTTTAAAACTG	C	177
					PDS-4403405-Out-F	TTCAGTCTCATCACAGATT		264
					PDS-4403405-Out-R	TCTTTCCTTATTAAGATTCAG		
					PDS-4412597-In-F	TGCATATGAGTAATCTTCTGGTT	T	245
					PDS-4412597-In-R	CGTAAGTACTACTCCGGACAG	C	280
					PDS-4412597-Out-F	GAGTTATCCATGCAGTGCATT		472
	PDS-4412597-Out-R	ATGCCATCTTAGAACCATGC						
MYB_R2R3_C1	Os06g0205100	Chro.6: 5,315,178- 5,316,875	c6p5,311, 849	SNP Upstream = 3,329 bp (Black = G # White = A)	MYB_C6P5311849_Inner-G-F	TCCTTCACTCAAGTGTGTG	G	364
					MYB_C6P5311849_Inner-A-R	TACATTTAATACTACATGCATGGCT	A	151
					MYB_C6P5311849_Outer-F	GCATTTAAGCACCTGTCTCAG		471
					MYB_C6P5311849_Outer-R	CAGAAATCCGTCGAGATTTTGAG		
					MYB_C6P5321614_Inner-C-F	CGATCACACGTAGAACGC	C	135
					MYB_C6P5321614_Inner-T-R	GTACTGCTGCCACCGAA	T	102
					MYB_C6P5321614_Outer-F	AGTAAATATGTAGCCCGTCA		202
	MYB_C6P5321614_Outer-R	TCACCGATCGATCTACA						
MADS26	Os08g0112700	Chro.8: 679,358- 681,703	c8p686,64 6	SNP Downstream = 4,943 bp (KN = G # KY, RD MJU2, PTT1 = A)	MADS26_C8P686646_Inner-A-F	AAACCATTGGCGGATCTA	A	202
					MADS26_C8P686646_Inner-G-R	ACACCAATAAATCAATTTGCC	G	175
					MADS26_C8P686646_Outer-F	CGGGAACAACAACACT		339
					MADS26_C8P686646_Outer-R	AGCAGATGCAGTTTGTGAC		
SDG8	Os08g0244400	Chro.8: 8,811,774- 8,816,699	c8p8,812, 834	SNP in Gene (Black = T # White = G)	SDG8_C8P8812834_Inner-T-F	GGCATGCTTCACACTAG	T	177
					SDG8_C8P8812834_Inner-G-R	GGATGTTTCTTTATCTTCCTAAA	G	134
					SDG8_C8P8812834_Outer-F	GAGCACCATCCTGTCAATT		268
					SDG8_C8P8812834_Outer-R	TCATATGGTACGTGGGACA		
					SDG8_C8P8815189_Inner-C-F	TCGTATTTGAACTACCATTTTGC	C	106
					SDG8_C8P8815189_Inner-T-R	CTCTTGAGTTGGAAGACAAGGA	T	137
					SDG8_C8P8815189_Outer-F	GACTTGCTGGACACTTACATG		198
	SDG8_C8P8815189_Outer-R	AATGTTGGTGCCATGGG						
DnaJ	Os05g0562300	Chro.5: 27,972,29 1- 27,974,60 7	c5p27,981 ,490	SNP Upstream = 6,883 bp (KN = C # RD MJU2, PTT1 = A)	DnaJ_C5P27981490_Inner-C-F	ACAATCGTGCAAGTTATCGC	c	190
					DnaJ_C5P27981490_Inner-A-R	AATCTGTGTAGTTCTGTTGGGGT	A	254
					DnaJ_C5P27981490_Outer-F	CCTGGAAGGACCAAGATCA		401
					DnaJ_C5P27981490_Outer-R	TCTGCTGGTCTTGACCA		

Gene	Gene Name	Pos. Gene	Pos. In Chro mosome	Variant	Primer Name	Seq (5'-to-3')	Base call	Product Size (bp)	
<i>DnaJ10</i>	Os08g0522600	Chro.8: 25,979,47 1- 25,984,01 7	c8p25,994 ,546	SNP	DnaJ10_C8P25994546_Inner-T-F	AAAACGACGCTATATAAATTGGCT	T	184	
				Downstream	DnaJ10_C8P25994546_Inner-A-R	GAAGAGGTTGCCTTCAGGTT	A	150	
				= 10,529 bp	DnaJ10_C8P25994546_Outer-F	TCAACTTTTCGGCGCTG			
				(KN = T # KY, RD MJU2, PTT1 = A)	DnaJ10_C8P25994546_Outer-R	TGCATCCATCCCCACA		291	
<i>bHLH_B1</i>	Os04g0557800	Chro.4: 27,949,38 4- 27,955,64 0	c4p27,950 ,862	SNP in Gene	bHLH_B1_C4P27950862_Inner-C-F	TCCATCAATGGAGCTCCC	C	208	
				(Black = T # White = C)	bHLH_B1_C4P27950862_Inner-T-R	GTCGCCGCTTTAGCCA	T	255	
					bHLH_B1_C4P27950862_Outer-F	GCGCCTTCTCTGACATG		429	
					bHLH_B1_C4P27950862_Outer-R	ATCGGCGAGCTCTACAGC			
					bHLH_B1_C4P27953467_Inner-A-F	TTTCCAATGGGTACTATTACCCTA	A	297	
					bHLH_B1_C4P27953467_Inner-G-R	GAATGAAATTTACCACCAGAAAAC	G	395	
<i>bHLH_B2_Kala4</i>	Os04g0557500	Chro. 4: 27,915,59 8- 27,939,82 4	c4p27,932 ,676	SNP in Gene	bHLH_B2_C4P27932676_Inner-T-F	CATCGTCCAAGTCAGAACTCTATAT	T	180	
				(Black = T # White = G)	bHLH_B2_C4P27932676_Inner-G-R	AATTCATACAATATGTATAAAACACTGCC	G	243	
					bHLH_B2_C4P27932676_Outer-F	TCGCCGGACAGGAGAGAG		368	
					bHLH_B2_C4P27932676_Outer-R	ATGAACCTATATGTTACTCCAAC			
					SNP	bHLH_B2_C4P27941082_Inner-T-F	TTCGTGGGGAGGCCAAT	T	230
					Upstream =	bHLH_B2_C4P27941082_Inner-C-R	TGGAATCACAGGATATATATCG	C	200
<i>bHLH_Rc</i>	Os07g0211500	Chro.7: 6,062,889- 6,069,317	c7p6,061, 980	SNP	bHLH_Rc_C7P6061980_Inner-T-F	ATAAGAAAACCTACTACTCCCCT	T	202	
				Upstream =	bHLH_Rc_C7P6061980_Inner-C-R	CTCAAAATCTCTTATATTATAGGCCG	C	118	
				1,725 bp	bHLH_Rc_C7P6061980_Outer-F	GTTGCTCGGTGTTTGTAGTT		270	
				(Black = C # White = T)	bHLH_Rc_C7P6061980_Outer-R	GCAACGTTTGACCACTCG			
					SNP	WDR_C2P27893803_Inner-T-F	CGCCACGAGACCTATTT	T	155
					Downstream	WDR_C2P27893803_Inner-C-R	TTTGTGTCCGAACCTTGACG	C	218
<i>WDR_WD40</i>	Os02g0682500	Chro.2: 27,906,28 9- 27,909,38 9	c2p27,893 ,803	= 12,709 bp	WDR_C2P27893803_Outer-F	ACCACTTCATCGCAACTTC		337	
				(KN, RD MJU2	WDR_C2P27893803_Outer-R	GTCGGCGTATCCTTCTTTGG			
				= T # PTT1 = C)					
					SNP	WDR_C2P27941745_Inner-C-F	ATTAGTGTCTGGAGATGTATGC	C	208
					Upstream =	WDR_C2P27941745_Inner-T-R	CGGAGTTCAGTCGCGA	T	140
					32,356 bp	WDR_C2P27941745_Outer-F	GCATAGGTGTGTGGGTACG		309
<i>CCD4a_NCED1</i>	Os02g0704000	Chro.2: 29,026,07 0- 29,028,25 9	c2p29,040 ,115	SNP	CCD4a_C2P29040115_Inner-G-F	AGTGCAAAGTCTCCCAGAG	G	225	
				Upstream =	CCD4a_C2P29040115_Inner-A-R	TTTTTTCACAGATATACTGAATTTGTT	A	332	
				11,856 bp	CCD4a_C2P29040115_Outer-F	ACCTCTATGTAAAAGTGCA		511	
				(Black = G # White = A)	CCD4a_C2P29040115_Outer-R	TTTTCTATGGCAGGGTTCTT			
<i>CCD4b</i>		Chro.12:	c12p14,23	SNP in Gene	CCD4b_C12P14232969_Inner-C-F	ACTATAACTTCTCTTATGACCACTC	C	124	

Gene	Gene Name	Pos. Gene	Pos. In Chromosome	Variant	Primer Name	Seq (5'-to-3')	Base call	Product Size (bp)						
		14,232,90	2,969	(KN, = A # KY, RD MJU2, PTT1 = C) SNP in Gene (KN, = C # KY, RD MJU2, PTT1 = T)	CCD4b_C12P14232969_Inner-A-R	CTTCCAGCATTGATTCAT	A	378						
		3-			CCD4b_C12P14232969_Outer-F	GATTGGATATCATCGATAAATTTAGC								
		14,234,90			c12p14,23 3,667		CCD4b_C12P14232969_Outer-R	TGTGAAAAACCTTACCCACT	457					
		3					CCD4b_C12P14233667_Inner-T-F	CGTGTGCAACATATTAAGCT			T	311		
							CCD4b_C12P14233667_Inner-C-R	GATGTTTTGAGGTGCATG			C	263		
							CCD4b_C12P14233667_Outer-F	GCCATAGCGATTTTTGC			537			
							CCD4b_C12P14233667_Outer-R	TTCGCTACAATGTCTTCCAA						
		LCD_CCD1					Os12g0640600	Chro.12: 27,464,735- 27,472,036	c12p27,47 0,789	SNP in Gene (Black = G # White = A)	LCD_C12P27470789_Inner-G-F	GCAGCGGTATGTGATTTTCG	G	132
											LCD_C12P27470789_Inner-A-R	TCGCTATGCTGTTTAGAATCGT	A	100
											LCD_C12P27470789_Outer-F	TGCTTCTGAATCACTTGACTC	190	
LCD_C12P27470789_Outer-R	TTCTCTCACATTTCCCCC													
CrtISO	Os11g0572700	Chro.11: 21,485,90 2- 21,490,09 4	c11p21,48 5,572	SNP Upstream = 309 bp (Black = G # White = A)	CrtISO_C11P21485572_Inner-G-F	GCGCGGCTTTCGAGAGAGTACTG	G	177						
					CrtISO_C11P21485572_Inner-A-R	ACGGTGGCCGACGTGCCTTT	A	240						
					CrtISO_C11P21485572_Outer-F	GAGTGAGACAAGCGGTCGCCTTTT	373							
					CrtISO_C11P21485572_Outer-R	CCATGGCCCCCGCTTTGC								
HYD3	Os03g0125100	Chro.3: 1,436,356- 1,439,198	c3p1,390, 188	SNP Downstream = 46,168 bp (Black = A # White = G)	HYD3_C3P1390188_Inner-G-F	CATAAGCTTGACTGTCTTGG	G	225						
					HYD3_C3P1390188_Inner-A-R	AAGTTCGGCGTAACATT	A	180						
					HYD3_C3P1390188_Outer-F	CTTACGCTTGCGGTCTCT	366							
					HYD3_C3P1390188_Outer-R	TTCCAAGGCACCTTCGAG								
					HYD3	Os03g0125100	Chro.3: 1,436,356- 1,439,198	c3p1,456, 855	SNP Upstream = 17,657 bp (Black = A # White = G)	HYD3_C3P1456855_Inner-G-F	ATTAACTTTTATTCTCTAATAAGGTG	G	225	
										HYD3_C3P1456855_Inner-A-R	CATATATCATAATAAGCCAAACAT	A	146	
HYD3_C3P1456855_Outer-F	CTTGAATTTTTAAGTTGAATTTAAG	323												
HYD3_C3P1456855_Outer-R	CGTCTCGCTGTCGAC													
Or	Os02g0651300	Chro.2: 26,248,64 3- 26,251,98 0	c2p26,254 ,827	SNP Upstream = 2,847 bp (Black = C # White = T)	Or_C2P26254827_Inner-T-F	GCGCGCCGGTGAGCGTT	T	238						
					Or_C2P26254827_Inner-C-R	AGGCGCCGGCCATGTCG	C	163						
					Or_C2P26254827_Outer-F	CGCCGCCGCTCTGGTAGCC	368							
					Or_C2P26254827_Outer-R	GGCTGAGCGGCTAGGCGG								

หมายเหตุ: Pos. In Chromosome คือ ตำแหน่งบนโครโมโซมที่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส โดย c คือ โครโมโซม ตัวเลขต่อมา คือ แห่งที่ และ p คือ ตำแหน่งบนโครโมโซม

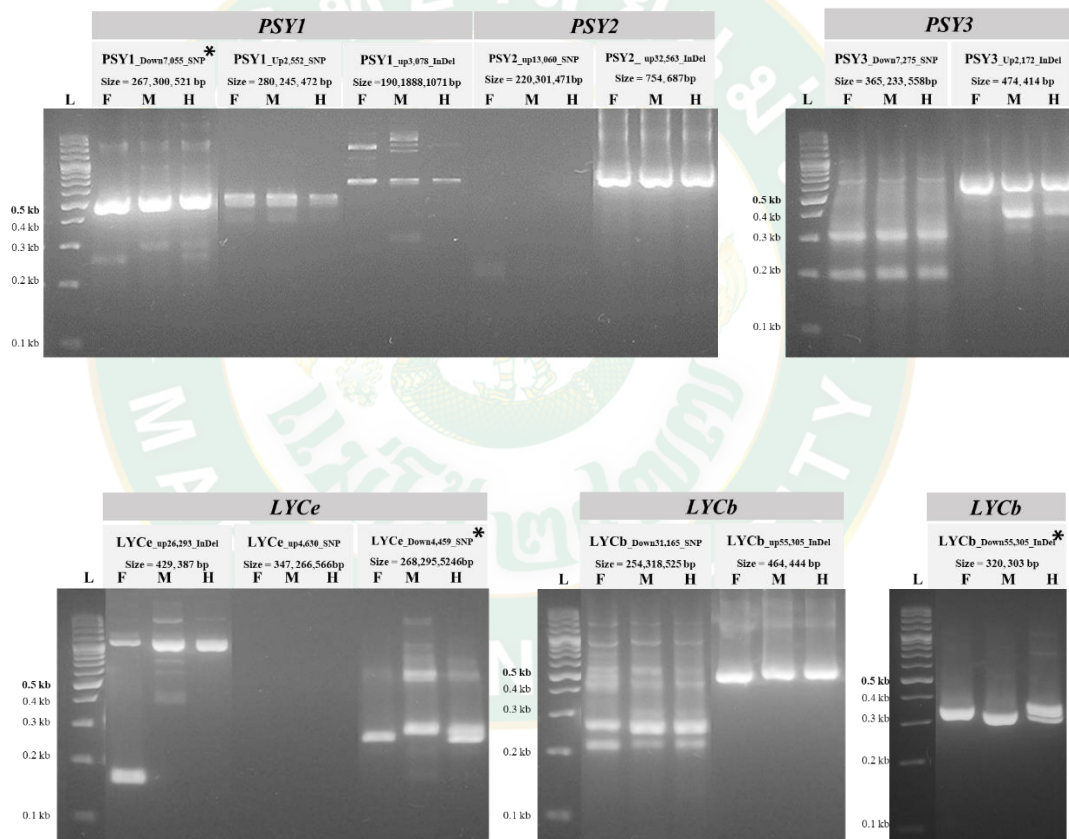
ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ InDel ที่ออกแบบจากผล WGS

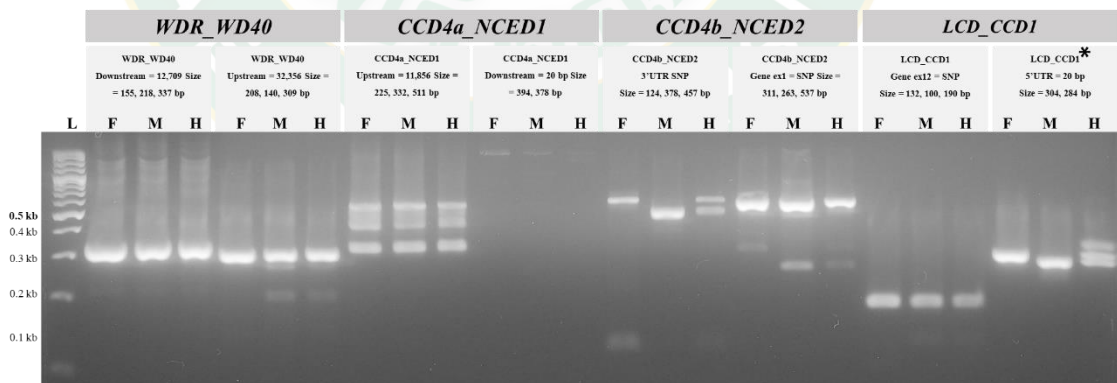
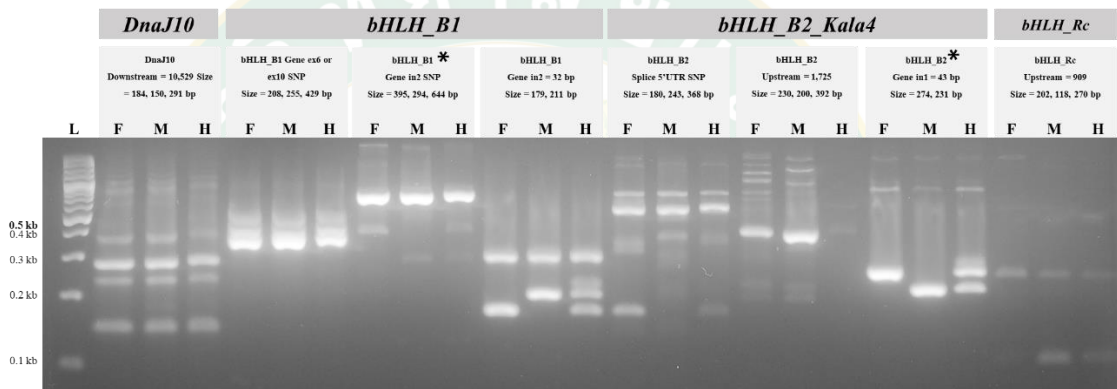
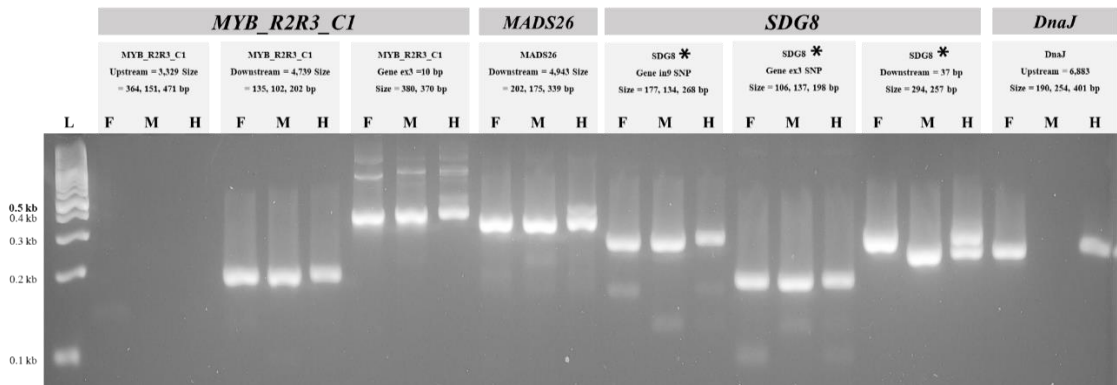
Gene	Gene Name	Pos. Gene	Pos. In Chromosome	Variant	Primer Name	Seq (5'-to-3')	Product Size (bp)
<i>PSY1</i>	Os06g0	Chro.6(31,051,59	c6p31059	Upstream 3,078	PSY1-InDel63-F	ACACCGTATCCGTATGTAGTGT	190 or
	72900	0...31,056,312)	390	bp	PSY1-InDel63-R	TGATCCAGGGAAATGGTACTGT	1008
<i>PSY2</i>	Os12g0	Chro.12(2678049	c12p2681	Upstream	PSY2-InDel69-F	CTCGGACATGGTTCACCTTGT	687 or
	626400	2...26,783,594)	6157	32,563 bp	PSY2-InDel69-R	TGGGATACTTACAAGGAAGCTCG	754
<i>PSY3</i>	Os09g0	Chro.9(22,042,09	c12p2204	Upstream 2172	PSY3-InDel60-F	CTTACGCACGAGCTCCCG	414 or
	55550	8...22,045048)	7220	bp	PSY3-InDel60-R	AGGTAGAGAGTATTTCTTGAAATGTGG	474
<i>LCYe</i>	Os01g0	chro.01:22535013	c1p22508	Upstream	LCYe-InDel62-104-F	AGCTATGTGGCTAACTAGTTGCT	387 or
	581300	..22538645	720	26,293 bp	LCYe-InDel62-104-R	GCCCAAGCCAAAAGAGAC	429
<i>LCYb</i>	Os02g0	Chro.02:5028576.	c2p49732	Downstream	LCYb-InDel20-F	CCCTCTCTGCTAGCTGTACG	320 or
			71	55305 bp	LCYb-InDel20-R	GAGAGGATGGAAGGAGCGG	303
	190600	.5030493	c2p50905	Upstream 60034	LCYb-InDel14-F	TGTGCTAATGTTCTAAGCA	464 or
			27	bp	LCYb-InDel14-R	GATTTAGTTGGTTCAAGTCTCT	444
<i>PDS</i>	Os03g0	Chro.03:4,410,09	c3p44165	Downstream =	PDS-InDel16-F	GCCACGAAATATCTGAGAGGC	181 or
	184000	0..4,414,505	84	2079 bp	PDS-InDel16-R	AGGAGAGAGAGAAGCAGGAGA	197
<i>MYB_R2R3_C1</i>	Os06g0	Chro.6:	c6p5,316,	Indel In Gene	MYB_C6P5316058_10bp_F	AGCTGGCTAACGCTAGACAA	380 or
	205100	5,315,178-5,316,875	058	(deletion 10 bp in White)	MYB_C6P5316058_10bp_R	TTGCTGTGTCGGTGTCCGG	370
<i>SDG8</i>	Os08g0	Chro.8:8,811,774-	c8p8,811,	Indel	SDG8_C8P8811160_37bp_F	GCCAGGCCACAGTTCAACAT	294 or
	244400	8,816,699	160	Downstream = 614 bp (Insertion 37 bp in white)	SDG8_C8P8811160_37bp_R	ACTTTCCGGCATCCAGTTT	257
<i>bHLH_B1</i>	Os04g0	Chro.4:7,949,384-	c4p27,952	Indel in Gene	bHLH_B1_C4P27952360_32bp_F	GCGCGCATGGAATAGTTTT	211 or
	557800	27,955,640	,360	(deletion = 32 bp in white)	bHLH_B1_C4P27952360_32bp_R	GAGGCTGCTAGCTGGTCAAC	179
<i>bHLH_B2_Kala4</i>	Os04g0	Chro.4:27,915,59	c4p27,931	Indel in Gene	bHLH_B2_C4P27931356_43bp_F	CAAGCACGCCACTCATGAAG	274 or
	557500	8-27,939,824	,356	(deletion = 43 bp in white)	bHLH_B2_C4P27931356_43bp_R	ACTCGCATGCTCTCTCTCTC	231
<i>CCD4a_NCE D1</i>	Os02g0	Chro.2:29,026,07	c2p29,018	Indel	CCD4a_C2P29040115_20bp_F	CCGATATAAGCGAAGTTGACG	394 or
	704000	0-29,028,259	,733	Downstream = 7,337 bp (insertion = 20 bp in PTT)	CCD4a_C2P29040115_20bp_R	AAACGGCCCAAGCTTTTTCAG	378
<i>LCD_CCD1</i>	Os12g0	Chro.12:27,464,7	c12p27,46	Indel in gene	LCD_C12P27464843_20bp_F	AGAGAAGCAACGGATGTGTG	304 or
	640600	35-27,472,036	4,843	(deletion = 20 bp in Black)	LCD_C12P27464843_20bp_R	TATGGCCTATGGGTATGGGG	284

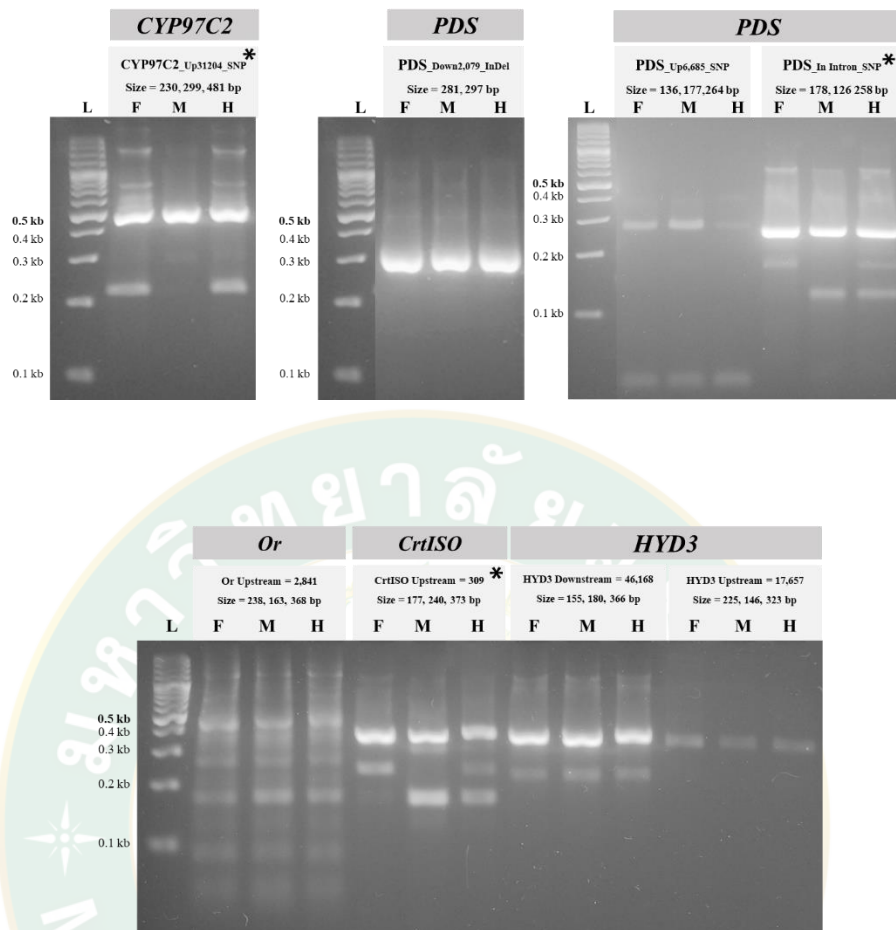
หมายเหตุ: Pos. In Chromosome คือ ตำแหน่งบนโครโมโซมที่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส โดย c คือ โครโมโซม ตัวเลขต่อมา คือ แห่งที่ และ p คือ ตำแหน่งบนโครโมโซม

3.4 การทดสอบเครื่องหมาย

ในการทดสอบเครื่องหมายที่ได้ออกแบบชนิด T-ARMS Primer ในขั้นต้นที่อุณหภูมิ แอนนีลิ่งเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส กับอัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner เท่ากับ 1 : 0.5 เช่นเดียวกับไพรเมอร์ชนิด InDel ที่เลือกใช้สภาวะอุณหภูมิแอนนีลิ่งเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส กับ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, กข-แม่โจ้ 2 และลูกผสมรุ่น F₁ (ปทุมธานี 1 x ก้าน้อย) เนื่องจากจำนวนไพรเมอร์ที่ทำการทดสอบมีจำนวนมากและมีชนิดของการออกแบบที่แตกต่างกัน เพื่อให้ง่ายต่อการปรับสภาวะสำหรับไพรเมอร์แต่ละชุดไพรเมอร์ในขั้นแรกจึงได้เลือกใช้สภาวะ เดียวกันกับทั้ง 45 ชุดไพรเมอร์ (ภาพที่ 28)







ภาพที่ 28 ผลการทดสอบไพรเมอร์ T-ARMS และ InDel ที่ออกแบบจากข้อมูล WGS อุณหภูมิแอนนีลิ่ง 55 องศาเซลเซียส

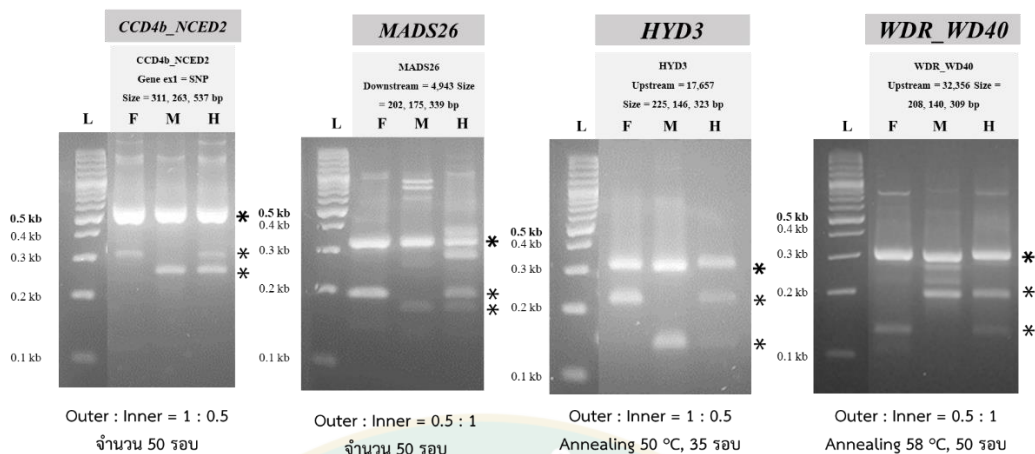
โดย L คือ 100 bp Plus DNA Ladder, F คือ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ), M คือ ข้าวพันธุ์ก้าน้อย (พันธุ์ให้) และ H คือ ลูกผสมรุ่น F₁ (ปทุมธานี 1 x ก้าน้อย) ตามลำดับ size คือ ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง * คือ ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอตามที่คาดหวัง

จากผลการทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 45 ชุดไพรเมอร์ที่อัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner เท่ากับ 1 : 0.5 อุณหภูมิแอนนีลิ่ง 55 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่ามีชุดไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอตามที่คาดหวัง (ตารางที่ 7 และ 8) จำนวน 12 ชุดไพรเมอร์ ของ 10 ยีน ได้แก่ 1.) ยีน *PSY1* ไพรเมอร์ PSY1_Downstream_7055 2.) ยีน *PDS* ไพรเมอร์ PDS_In_Intron 3.) ยีน *CrtISO* ไพรเมอร์ CrtISO_Upstream_309 4.) ยีน *LCYe* ไพรเมอร์ LCYe_Downstream_4459 5.) ยีน *LCYb* ไพรเมอร์ LCYb_Downstream_55305 6.) ยีน *CYP97C_Lut1* ไพรเมอร์ CYP97C_Lut1_

Upstream_31204 7.) ยีน *LCD_CCD1* ไพรเมอร์ LCD_CCD1_5'UTR 8.) ยีน *B2_Kala4* ไพรเมอร์ B2_Kala4_In_Intron1 9.) ยีน *B1* ไพรเมอร์ B1_In_Intron2 และ 10.) ยีน *SDG8* ไพรเมอร์ SDG8_In_Intron1, SDG8_In_exon1 และ SDG8_In_exon3

โดยยังมีพบชุดไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ จึงทำให้ต้องมีการปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ ดังนี้ อัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ outer ต่อ inner เท่ากับ 1 : 0.5 และเพิ่มรอบการเพิ่มจำนวนจาก 35 รอบเป็น 50 รอบ และปรับอัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ Outer ต่อ Inner จาก 1 : 0.5 เป็น 0.5 : 1 และเพิ่มรอบการเพิ่มจำนวนจาก 35 รอบเป็น 50 รอบ จำนวน 6 ชุดไพรเมอร์ คือ 1.) MADS26_Downstream_4943, 2.) WDR_WD40_Downstream_12709, 3.) WDR_WD40_Upstream_32356, 4.) CCD4b_NCED2_3'UTR, 5.) CCD4b_NCED2_Gene ex1 และ 6.) HYD3_Downstream_46168 หรืออัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ Outer ต่อ Inner เท่ากับ 1 : 0.5 และเพิ่มอุณหภูมิแอนนิลลิง จาก 55 องศาเซลเซียส เป็น 60 องศาเซลเซียส จำนวน 2 ชุดไพรเมอร์ คือ 1.) DnaJ10_Downstream_10529 และ 2.) CCD4a_NCED1_Upstream_11856 หรืออัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ Outer ต่อ Inner เท่ากับ 1 : 0.5 และลดอุณหภูมิแอนนิลลิง จาก 55 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ชุดไพรเมอร์ คือ 1.) DnaJ_Upstream_6883, 2.) CCD4a_NCED1_Downstream_20bp และ 3.) HYD3_Upstream_17657 หรือปรับอัตราส่วนระหว่างไพรเมอร์ Outer ต่อ Inner จาก 1 : 0.5 เป็น 0.5 : 1 หรือเพิ่มอุณหภูมิแอนนิลลิง จาก 55 องศาเซลเซียส เป็น 58 องศาเซลเซียส และเพิ่มจำนวน 50 รอบ จำนวน 3 ชุดไพรเมอร์ คือ 1.) WDR_WD40_Downstream_12709, 2.) WDR_WD40_Upstream_32356 และ 3.) HYD3_Downstream_46168

เนื่องจากการใช้อุณหภูมิแอนนิลลิงต่ำทำให้ไพรเมอร์สามารถเข้าคู่สมกับบริเวณที่ไม่ต้องการ จึงเกิดการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการ (non-specific band) ดังนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิแอนนิลลิง จึงทำให้กำจัดแถบดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการได้ (Medrano and de Oliveira, 2014) จากการปรับสภาวะการเพิ่มจำนวนของแถบดีเอ็นเอตามที่ได้กล่าวไปพบ 4 ชุดไพรเมอร์ของยีน 4 ยีน ที่สามารถเพิ่มจำนวนให้แถบดีเอ็นเอที่ตามคาดหวังได้ดังแสดงในภาพที่ 29 ได้แก่ ยีน *CCD4b*, *MADS26*, *HYD3* และ *WDR_WD40*



ภาพที่ 29 ผลการปรับสภาวะของไพรเมอร์ T-ARMS ที่ออกแบบจากข้อมูล WGS

โดย L คือ 100 bp Plus DNA Ladder, F คือ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ), M คือ ข้าวพันธุ์ก้าน้อย (พันธุ์ให้) และ H คือ ลูกผสมรุ่น F_1 (ปทุมธานี 1 x ก้าน้อย) ตามลำดับ size คือ ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง * คือ แถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง

ผลจากการทดสอบไพรเมอร์ 45 ชุดไพรเมอร์ ที่ออกแบบได้ พบว่า มี 16 ชุดไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) กับข้าวพันธุ์ก้าน้อย (พันธุ์ให้) จากยีนจำนวน 14 ยีน ได้แก่ phytoene synthase 1 (*PSY1*), lycopene epsilon cyclase (*LCYe*), lycopene beta cyclase (*LCYb*), carotenoid epsilon-ring hydroxylase (*CYP97C2 (Lut1)*), phytoene desaturase (*PDS*), carotenoid isomerase (*CrtISO*), carotene beta-ring hydroxylase 3 (*HYD3, BCH1*), MADS-box transcription factor 26 (*MADS26*), R-type basic helix-loop-helix protein หรือ bHLH transcription factor (*bHLH_B1*), regulation of anthocyanin pigmentation หรือ bHLH transcription factor (*bHLH_B2_Kala4*), WD domain (*WDR_WD40*) หรือ transparent testa glabra 1 protein (TTG1 protein), 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2 หรือ carotenoid-cleavage dioxygenase 4b, zeaxanthin cleavage oxygenase (*NCED2_CCD4b*), lycopene cleavage dioxygenase (*LCD_CCD1*) ได้ยีนละ 1 ชุดไพรเมอร์ และยีน histone methyltransferase (SET DOMAIN GROUP 8) (*SDG8 (ccr1)*) จำนวน 3 ชุดไพรเมอร์

4. เครื่องหมายที่ใช้ทดสอบกับประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น

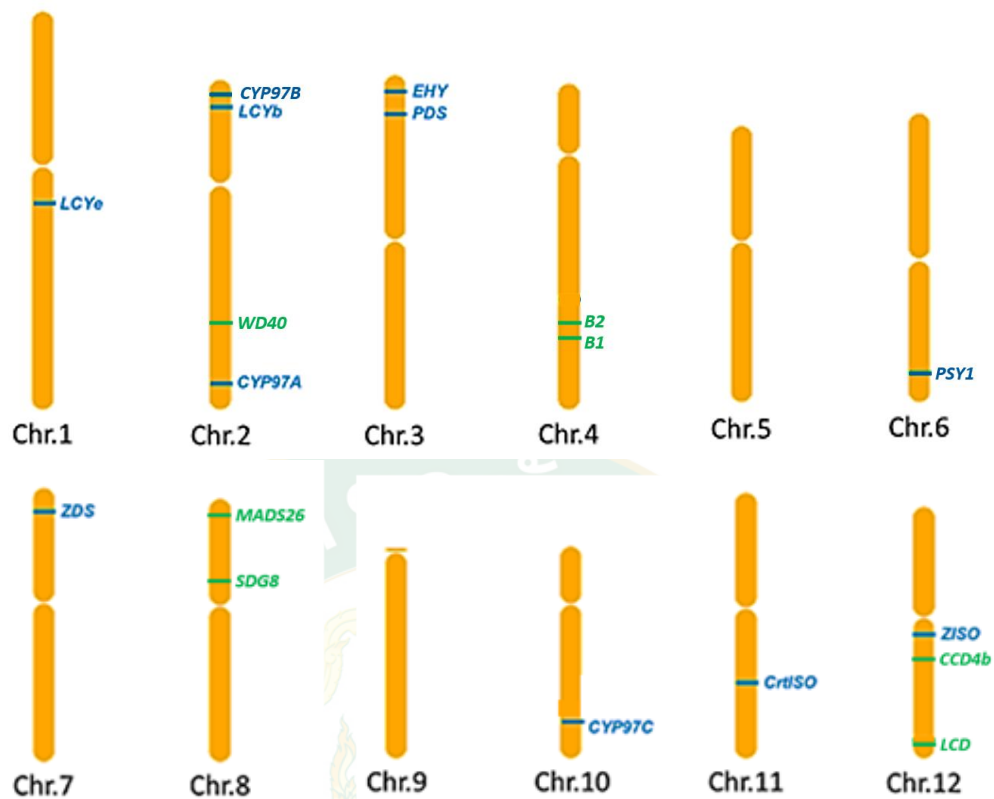
จากการพัฒนาเครื่องหมายของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทั้ง 3 วิธี ได้เครื่องหมายดังนี้

เครื่องหมาย RM ที่ขนานข้างยีนที่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) กับข้าวพันธุ์ก้าน้อย (พันธุ์ให้) จำนวน 1 เครื่องหมาย คือ RM27970 ที่คัดเลือกมาจากยีน *OsZISO* (ζ -carotene isomerase)

เครื่องหมายจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค transcriptome sequencing จำนวน 4 ยีน คือ ยีน *ZDS*, *CYP97B2*, *ZISO* และ *CYP97A*

เครื่องหมายจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเทคนิค WGS จำนวน 14 ยีน คือ ยีน *PSY1*, *LCYe*, *LCYb*, *CYP97C2* (*Lut1*), *PDS*, *CrtISO*, *HYD3* (*BCH1*), *MADS26*, *SDG8* (*ccr1*), *bHLH* (*B1*), *bHLH* (*B2_Kala4*), *WDR* (*WD40*), *NCED2* (*CCD4b*) และ *LCD* (*CCD1*) (ตารางที่ 9)

โดยเครื่องหมายที่พัฒนาได้มีจำนวน 19 เครื่องหมาย ที่เป็นเครื่องหมายที่จำเพาะกับจำนวน 18 ยีน ซึ่งยีนทั้ง 18 ยีนนี้ตั้งอยู่บนโครโมโซมจำนวน 10 แห่ง จากภาพที่ 30 ได้แสดงตำแหน่งของยีนบนโครโมโซมทั้ง 12 แห่ง ดังนี้ โครโมโซมที่ 1 ยีน *LCYe* โครโมโซมที่ 2 ยีน *CYP97B*, *LCYb*, *WD40* และ *CYP97A* โครโมโซมที่ 3 ยีน *EHY* และ *PDS* โครโมโซมที่ 4 ยีน *B1* และ *B2* โครโมโซมที่ 6 ยีน *PSY1* โครโมโซมที่ 1 ยีน *ZDS* โครโมโซมที่ 8 ยีน *MADS26* และ *SDG8* โครโมโซมที่ 10 ยีน *CYP97C* โครโมโซมที่ 11 ยีน *CrtISO* โครโมโซมที่ 12 ยีน *ZISO*, *CCD4b* และ *LCD* โดยยีนทั้ง 18 ยีน ได้มีการกระจายอยู่ใน 10 โครโมโซม และไม่พบยีนใดบนโครโมโซมที่ 5 และ 9



ภาพที่ 30 ตำแหน่งของยีนทั้ง 18 ยีนที่ทำการทดสอบบนโครโมโซมทั้ง 12 แห่งในข้าว โดย แถบสีน้ำเงิน คือ ตำแหน่งของยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ แถบสีเขียว คือ ตำแหน่งของกลุ่มอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

ในตารางที่ 10 ได้แสดงยีนที่ทำการทดสอบในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น จากตารางจะเห็นว่าเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *ZISO* ได้ทำการทดสอบ 2 เครื่องหมาย คือ เครื่องหมายที่ได้จาก RM และเครื่องหมายที่ได้จากเทคนิค WGS และจำนวนยีนที่ได้ทำการทดสอบเท่ากับ 18 ยีน แบ่งเป็นกลุ่ม carotenoid biosynthetic pathway จำนวน 11 ยีน ได้แก่ *OsPSY1*, *OsPDS*, *OsZISO*, *OsZDS*, *OsCrtISO*, *OsLCYe*, *OsLCYb*, *OsCYP97A* (*Lut5*), *OsCYP97B*, *OsCYP97C* (*Lut1*) และ *OsHYD3* (*EHY*) กลุ่ม methylation จำนวน 1 ยีน ได้แก่ *OsSDG8* กลุ่ม cleavage จำนวน 2 ยีน ได้แก่ *OsLCD* (*CCD1*) และ *OsNCED2* (*CCD4b*) กลุ่ม transcription factor จำนวน 4 ยีน ได้แก่ *OsMADS26*, *OsWD40*, *OsB2* (*Kala4*) และ *OsB1* ดังแสดงในภาพที่ 31

ตารางที่ 10 เครื่องหมายจำนวน 19 เครื่องหมายที่ใช้ในการทดสอบกับประชากร F₂ สำหรับยีนจำนวน 300 ต้น จำนวน 18 ยีน

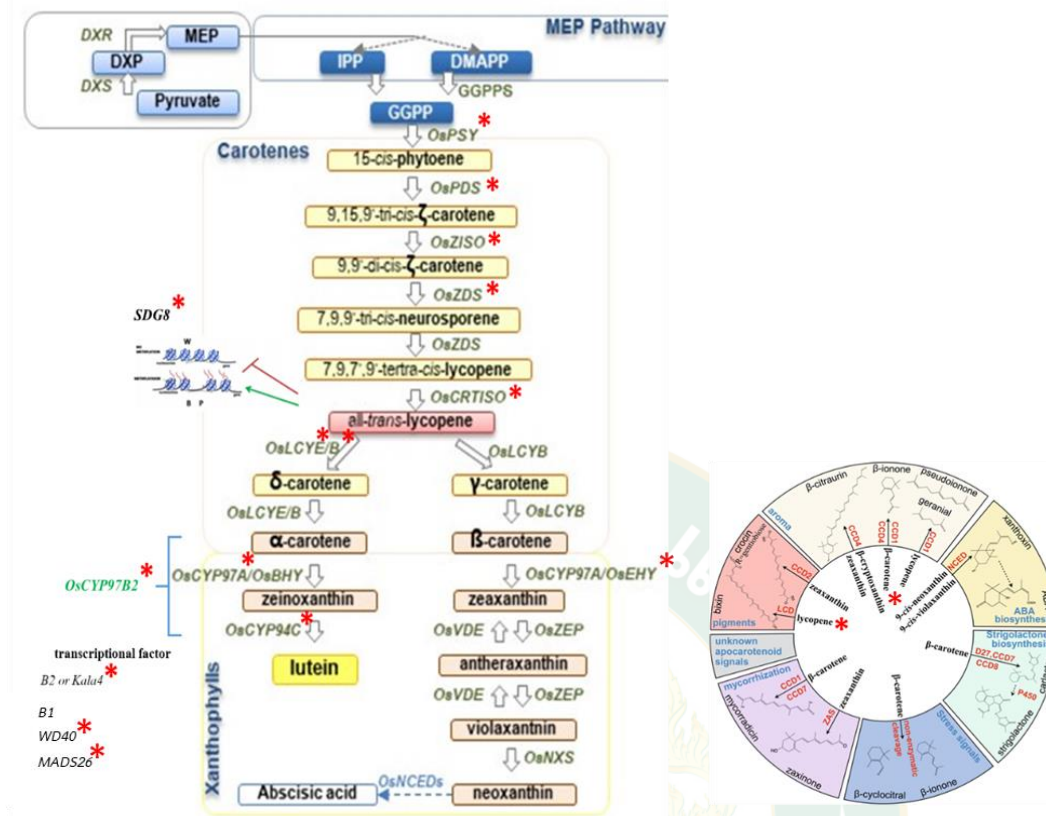
กลุ่มยีน	ที่	ยีน	เครื่องหมาย	การเปลี่ยนแปลง	ชนิด	พัฒนาจาก
carotenoid biosynthetic pathway	1	<i>PSY1</i>	PSY1-c6p31044535	downstream 7,055 bp	Tetra-Arms	WGS
	2	<i>PDS</i>	PDS-c3p4412597	in intron	Tetra-Arms	WGS
	3	<i>ZISO</i>	RM27970	in exon 1	SSR	RM
			ZISO-c12p12207440	in exon 4	Tetra-Arms	RNA-Seq
	4	<i>ZDS</i>	ZDS-c7p5648511	in exon 7	Tetra-Arms	RNA-Seq
	5	<i>CrtISO</i>	CrtISO-c11p21485572	upstream 309 bp	Tetra-Arms	WGS
	6	<i>LCYe</i>	LCYe-c1p22543104	downstream 4,459 bp	Tetra-Arms	WGS
	7	<i>LCYb</i>	LCYb-c2p4973271	downstream 55,305 bp	InDel	WGS
	8	<i>CYP97A_Lut5</i>	CYP97A-c2p35098348	in exon 4	Tetra-Arms	RNA-Seq
	9	<i>CYP97B</i>	CYP97B-c2p4000036	in exon 6	Tetra-Arms	RNA-Seq
	10	<i>CYP97C_Lut1</i>	CYP97C2-c10p21337180	upstream 31,204 bp	Tetra-Arms	WGS
11	<i>HYD3 (EHY)</i>	HYD3-c3p1456855	upstream 17,657 bp	Tetra-Arms	WGS	
Methylation	12	<i>SDG8</i>	SDG8-c8p8811160	downstream 614 bp	InDel	WGS
cleavage	13	<i>LCD_CCD1</i>	LCD-c12p27464843	in 5'UTR	InDel	WGS
	14	<i>NCED2_CCD4b</i>	CCD4b-c12p14233667	in exon 1	Tetra-Arms	WGS
transcription factor	15	<i>MADS26</i>	MADS26-c8p686646	downstream 4,943 bp	Tetra-Arms	WGS
	16	<i>WD40</i>	WDR-c2p27941745	upstream 32,356 bp	Tetra-Arms	WGS
	17	<i>B2_Kala4</i>	bHLH-B2-c4p27931356	in intron 1	InDel	WGS
	18	<i>B1</i>	bHLH-B1-c4p27953467	in intron 2	Tetra-Arms	WGS

หมายเหตุ; เครื่องหมาย คือ โดย c คือ โครโมโซม และ p คือ ตำแหน่งบนโครโมโซม

WGS คือ เครื่องหมายที่พัฒนาได้จากเทคนิค Whole genome sequencing

RNA-Seq คือ เครื่องหมายที่พัฒนาได้จากเทคนิค Transcriptome Sequencing

RM คือ เครื่องหมาย RM ที่แสดงใน Supplementary Table 18 (McCouch et al., 2002)



ภาพที่ 31 เครื่องหมายที่ออกแบบจากยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ โดยบริเวณ * สีแดง แสดงตำแหน่งของยีนที่ได้ทำการทดสอบกับประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น จำนวน 18 ยีน

5. การตรวจสอบจีโนไทป์ประชากร F₂ ด้วยเครื่องหมายที่พัฒนาได้

เครื่องหมาย RM27970 แยกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) กับข้าวพันธุ์ก้าน้อย (พันธุ์ให้) ที่ได้จากบริเวณเอกซอน 1 ยีน *OsZISO* (ζ -carotene isomerase) ซึ่งยีนดังกล่าวมีเครื่องหมายจากเทคนิค Transcriptome Sequencing เช่นเดียวกัน และเมื่อนำมาทดสอบกับประชากร F₂ พบว่าเครื่องหมายทั้ง 2 เครื่องหมายให้ผลของจีโนไทป์แบบเดียวกันทั้ง 300 ต้น ดังนั้นในการวิเคราะห์ผลในการทดสอบจะทำการเลือกผลที่ได้จากเทคนิค Transcriptome Sequencing เป็นตัวแทนของยีน *OsZISO*

นำเครื่องหมาย 18 เครื่องหมาย ที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ จำนวน 18 ยีน ได้แก่ ยีน *ZDS*, *CYP97B2*, *ZISO*, *CYP97A*, *PSY1*, *LCYe*, *LCYb*, *CYP97C2*

(*Lut1*), *PDS*, *CrtISO*, *HYD3* (*BCH1*), *MADS26*, *SDG8* (*ccr1*), *bHLH* (*B1*), *bHLH* (*B2_Kala4*), *WDR* (*WD40*), *NCED2* (*CCD4b*) และ *LCD* (*CCD1*) ทดสอบในประชากร F_2 ที่ได้จากคู่ผสมระหว่าง ปทุมธานี 1 กับ ก้าน้อย จำนวน 300 ต้น เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ของต้น F_2 แต่ละต้น โดยต้นที่แสดง แลบดีเอ็นเอเหมือนปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) จีโนไทป์เป็น Homozygous แทนด้วย PP, ต้นที่แสดง แลบดีเอ็นเอเหมือนทั้งปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) และก้าน้อย (พันธุ์ให้) จีโนไทป์เป็น Heterozygous แทนด้วย KP และต้นที่แลบดีเอ็นเอเหมือนก้าน้อย (พันธุ์ให้) จีโนไทป์เป็น Homozygous แทนด้วย KK ซึ่งผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 แสดงในตารางภาคผนวก ค

นำผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น ทดสอบไคสแควร์ (Chi-square) เพื่อศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอของแต่ละยีนว่าเป็นไปตามกฎของเมนเดลหรือไม่ โดยจะทำการวิเคราะห์ที่ละเครื่องหมายจากผลในประชากร F_2 โดยมีสมมุติฐานอัตราส่วนการกระจายตัวของเครื่องหมายคือ 1:2:1 (KK : KP : PP) ($df = 2$ ระดับนัยสำคัญ 0.05) หากค่า p-value มากกว่า 0.05 ยอมรับสมมุติฐาน และค่า p-value ที่ได้น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ปฏิเสธสมมุติฐาน คือ อัตราส่วนการกระจายตัวของเครื่องหมายไม่เป็น 1:2:1 (KK : KP : PP)

5.1 การศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในประชากร F_2

นำเครื่องหมายของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์มีจำนวน 11 ยีน ได้แก่ *OsPSY1*, *OsPDS*, *OsZISO*, *OsZDS*, *OsCrtISO*, *OsLCYe*, *OsLCYb*, *OsCYP97A* (*Lut5*), *OsCYP97B*, *OsCYP97C* (*Lut1*) และ *OsHYD3* (*EHY*) ทดสอบกับประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น ได้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ของแต่ละต้นจากนั้นนำข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้ในแต่ละยีนมาทดสอบไคสแควร์ด้วยสมมุติฐานตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล คือ การกระจายตัวของเครื่องหมายมีอัตราส่วนจีโนไทป์เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP) ที่ค่า $df = 2$ ระดับนัยสำคัญ 0.05 ค่าไคสแควร์ในตาราง คือ 5.991 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนี้

ยีนที่ควบคุมส่วนต้นของการสังเคราะห์แคโรทีน (carotenenes) จำนวน 7 ยีน ได้แก่ ยีน *OsPSY1*, *OsPDS*, *OsZISO*, *OsZDS*, *OsCrtISO*, *OsLCYe* และ *OsLCYb* ให้ผลการทดสอบไคสแควร์ของเครื่องหมายแต่ละเครื่องหมาย (ตารางที่ 11) ดังนี้

- ยีน *OsPSY1* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 58 : 153 : 89 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 6.527 ซึ่งมากกว่าค่าไคสแควร์ในตารางและค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายไม่เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsPDS* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 79 : 177 : 44 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 17.887 ซึ่งมากกว่าค่าไคสแควร์ในตารางและค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายไม่เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsZISO* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 76 : 153 : 71 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 0.287 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายเท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsZDS* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 66 : 176 : 58 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 9.444 ซึ่งมากกว่าค่าไคสแควร์ในตารางและค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายไม่เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsCrtISO* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 63 : 161 : 76 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 2.740 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายเท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsLCYe* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 29 : 222 : 49 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 71.787 ซึ่งมากกว่าค่าไคสแควร์ในตารางและค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายไม่เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsLCYb* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 72 : 152 : 76 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 0.160 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายเท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

ยีนที่ควบคุมส่วนที่สังเคราะห์แซนโทฟิลล์ (xanthophylls) จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *OsCYP97A* (*Lut5*), *OsCYP97B*, *OsCYP97C* (*Lut1*) และ *OsHYD3* (*EHY*) ให้ผลการทดสอบไคสแควร์ของเครื่องหมายแต่ละเครื่องหมาย (ตารางที่ 11) ดังนี้

- ยีน *OsCYP97A (Lut5)* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 35 : 184 : 81 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 29.520 ซึ่งมากกว่าค่าไคสแควร์ในตารางและค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายไม่เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsCYP97B* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 65 : 160 : 75 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 2.000 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายเท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsCYP97C (Lut1)* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 68 : 150 : 82 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 1.307 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายเท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsHYD3 (EHY)* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 46 : 180 : 74 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 17.227 ซึ่งมากกว่าค่าไคสแควร์ในตารางและค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายไม่เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

สรุปผลการศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จำนวน 11 ยีน ในประชากร F_2 ที่มีการกระจายตัวของจีโนไทป์เป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล คือ มีอัตราส่วนจีโนไทป์เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP) จำนวน 5 ยีน ได้แก่ ยีนที่ควบคุมส่วนต้นของการสังเคราะห์แคโรทีน (carotenes) 3 ยีน คือ ยีน *OsZISO*, *OsCrtISO* และ *OsLCYb* ยีนที่ควบคุมส่วนที่สังเคราะห์แซนโทฟิลล์ (xanthophylls) 2 ยีน คือ ยีน *OsCYP97B* และ *OsCYP97C (Lut1)*

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบไคสแควร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในประชากร F_2 สมมุติฐาน คือ มีอัตราส่วนจีโนไทป์เท่ากับ 1:2:1 (KK : KP : PP)

กลุ่มยีน	เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ยีน	ข้อมูล	จีโนไทป์			จำนวนประชากรทั้งหมด	χ^2 (1:2:1)	p-value
			KK	KP	PP			
carotenes	<i>PSY1</i>	ค่าสังเกต	58	153	89	300	6.527	0.038
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>PDS</i>	ค่าสังเกต	79	177	44	300	17.887	0.000
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>ZISO</i>	ค่าสังเกต	76	153	71	300	0.287	0.866
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>ZDS</i>	ค่าสังเกต	66	176	58	300	9.440	0.009
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>CrtISO</i>	ค่าสังเกต	63	161	76	300	2.740	0.254
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>LCYe</i>	ค่าสังเกต	29	222	49	300	71.787	0.000
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>LCYb</i>	ค่าสังเกต	72	152	76	300	0.160	0.923
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
xanthophylls	<i>CYP97A_Lut5</i>	ค่าสังเกต	35	184	81	300	29.520	0.000
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>CYP97B</i>	ค่าสังเกต	65	160	75	300	2.000	0.368
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>CYP97C_Lut1</i>	ค่าสังเกต	68	150	82	300	1.307	0.520
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>HYD3 (EHY)</i>	ค่าสังเกต	46	180	74	300	17.227	0.000
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		

($\chi^2_{df=2, 0.05} = 5.991$)

หมายเหตุ; p-value > 0.05 ยอมรับสมมุติฐาน และ p-value ≤ 0.05 ปฏิเสธสมมุติฐาน

5.2 การศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในประชากร F_2

นำเครื่องหมายของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ จำนวน 7 ยีน ได้แก่ กลุ่ม methylation จำนวน 1 ยีน ได้แก่ *OsSDG8* กลุ่ม cleavage จำนวน 2 ยีน ได้แก่ *OsLCD* (*CCD1*) และ *OsNCED2* (*CCD4b*) กลุ่ม transcription factor จำนวน 4 ยีน ได้แก่ *OsMADS26*, *OsWD40*, *OsB2* (*Kala4*) และ *OsB1* มาทดสอบกับประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น ได้ข้อมูลจีโนไทป์ของแต่ละต้น จากนั้นนำข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้ในแต่ละยีนมาทดสอบไคสแควร์ด้วยสมมุติฐานตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล คือ การกระจายตัวของเครื่องหมายมีอัตราส่วนจีโนไทป์เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP) ที่ค่า $df = 2$ ระดับนัยสำคัญ 0.05 ค่าไคสแควร์ในตาราง คือ 5.991 และค่า p-value มากกว่า 0.05 (ตารางที่ 12) ดังนี้

ยีนกลุ่ม methylation จำนวน 1 ยีน *OsSDG8* ให้ผลของเครื่องหมายในจีโนไทป์แต่ละแบบดังนี้

- ยีน *OsSDG8* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 74 : 141 : 85 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 1.887 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายเท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

ยีนกลุ่ม cleavage จำนวน 2 ยีน *OsLCD* (*CCD1*) และ *OsNCED2* (*CCD4b*) ให้ผลของเครื่องหมายในจีโนไทป์แต่ละแบบดังนี้

- ยีน *OsLCD* (*CCD1*) จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 78 : 147 : 75 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 0.180 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายเท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsNCED2* (*CCD4b*) จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 40 : 211 : 49 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 50.153 ซึ่งมากกว่าค่าไคสแควร์ในตารางและค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายไม่เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

ยีนกลุ่ม transcription factor จำนวน 2 ยีน *OsMADS26*, *OsWD40*, *OsB2* (*Kala4*) และ *OsB1* ให้ผลของเครื่องหมายในจีโนไทป์แต่ละแบบดังนี้

- ยีน *OsMADS26* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 52 : 154 : 94 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 11.973 ซึ่งมากกว่าค่าไคสแควร์ในตารางและค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายไม่เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsWD40* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 75 : 155 : 70 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 0.500 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายเท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsB2 (Kala4)* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 74 : 158 : 68 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 1.093 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายเท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

- ยีน *OsB1* จำนวนจีโนไทป์แต่ละแบบที่พบคือ 77 : 154 : 69 (KK : KP : PP) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 0.640 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น การกระจายตัวของเครื่องหมายเท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP)

สรุปผลการศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จำนวน 7 ยีน ในประชากร F_2 ที่มีการกระจายตัวของจีโนไทป์เป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล คือ มีอัตราส่วนจีโนไทป์เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP) จำนวน 5 ยีน ได้แก่ กลุ่ม methylation จำนวน 1 ยีน คือ ยีน *OsSDG8* กลุ่ม cleavage จำนวน 1 ยีน คือ ยีน *OsLCD (CCD1)* และกลุ่ม transcription factor จำนวน 3 ยีน คือ ยีน *OsWD40*, *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1*

จากการศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ในประชากร F_2 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่การกระจายตัวของจีโนไทป์ไม่เป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล คือ มีอัตราส่วนจีโนไทป์ไม่เท่ากับ 1 : 2 : 1 (KK : KP : PP) ซึ่งอาจจะเกิดจากพันธุกรรมที่นำมาผสมเพื่อสร้างประชากร F_2 นั้นมีฐานพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 นั้นเป็นข้าวพันธุ์ปลูกมีการแตกกอสูงและเมล็ดเรียวยาว สำหรับข้าวพันธุ์ก้านน้อยนั้นเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีการแตกกอต่ำและเมล็ดสั้น จึงทำให้การเข้าคู่การของโครโมโซมคู่เหมือนนั้นไม่แนบสนิทกัน ส่งผลให้เครื่องหมายดีเอ็นเอบางยีนไม่เป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล โดยได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการถ่ายทอดที่ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (non-Mendelian) ในประชากรข้าวที่ได้จากการผสมพันธุ์ป่าผสมกับข้าวพันธุ์ปลูก โดยมีบริเวณ

ตำแหน่งของ *qHMS7* ที่ประกอบด้วยยีน *ORF2* ทำให้เกษตรกรผู้เป็นหมันและ *ORF3* ป้องกันการเป็นหมัน พบว่า ในประชากรทุกต้นจะมียีน *ORF3* เป็นยีนเด่นจึงไม่เป็นหมัน ซึ่งอาจจะเกิดจากการคัดเลือกในระยะเวลาการพัฒนาของเมล็ด แต่ยีน *ORF2* นั้นพบการกระจายของจีโนไทป์ทั้ง 3 แบบ (Yu et al., 2018)

ตารางที่ 12 การทดสอบไคสแควร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในประชากร F_2
สมมุติฐาน คือ มีอัตราส่วนจีโนไทป์เท่ากับ 1:2:1 (KK : KP : PP)

กลุ่มยีน	เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ยีน	ข้อมูล	จีโนไทป์			จำนวนประชากรทั้งหมด	χ^2 (1:2:1)	p-value
			KK	KP	PP			
methylation	<i>SDG8</i>	ค่าสังเกต	74	141	85	300	1.887	0.389
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
cleavage	<i>LCD_CCD1</i>	ค่าสังเกต	78	147	75	300	0.180	0.914
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>NCED2_CCD4b</i>	ค่าสังเกต	40	211	49	300	50.153	0.000
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
transcription factor	<i>MADS26</i>	ค่าสังเกต	52	154	94	300	11.973	0.003
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>WD40</i>	ค่าสังเกต	75	155	70	300	0.500	0.779
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
	<i>B2_Kala4</i>	ค่าสังเกต	74	158	68	300	1.093	0.579
		ค่าคาดหวัง	75	150	75	300		
<i>B1</i>	ค่าสังเกต	77	154	69	300	0.640	0.726	
	ค่าคาดหวัง	75	150	75	300			

($\chi^2_{df=2, 0.05} = 5.991$)

หมายเหตุ; p-value > 0.05 ยอมรับสมมุติฐาน และ p-value ≤ 0.05 ปฏิเสธสมมุติฐาน

PP คือ เหมือนปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) จีโนไทป์เป็น Homozygous

KP คือ เหมือนปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) และก้าน้อย (พันธุ์ให้) จีโนไทป์เป็น Heterozygous

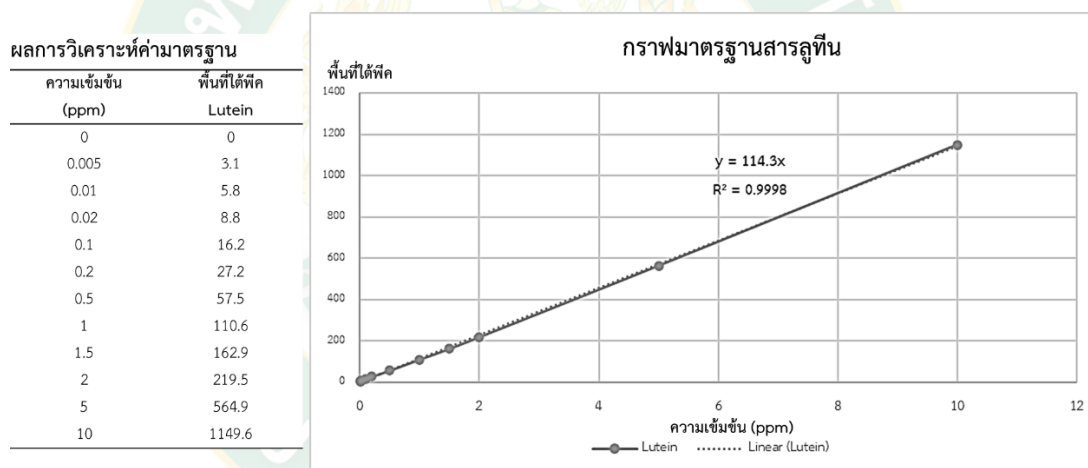
KK คือ เหมือนก้าน้อย (พันธุ์ให้) จีโนไทป์เป็น Homozygous

6. การวิเคราะห์ปริมาณของสารลูทีนและซีแซนทีนด้วยเทคนิค HPLC

6.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curves)

- การสร้างกราฟมาตรฐานสารลูทีน (lutein)

เตรียมสารละลายมาตรฐานลูทีน ($C_{40}H_{56}O_2$, AR grade, Sigma-Aldrich, Fluka, USA) อยู่ในช่วง 1.00 – 50.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้น 0 – 10 ppm) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารลูทีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดอาร์เรย์ ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ได้พื้นที่ใต้พีคแล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้กราฟมาตรฐานดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพที่ 32 กราฟมาตรฐานสารลูทีน (lutein) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

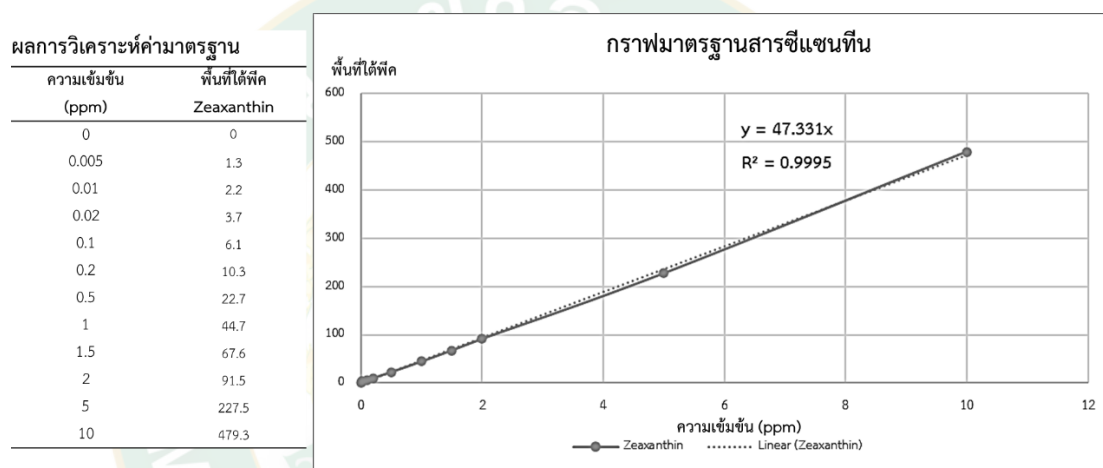
จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง สมการที่ได้เท่ากับ

$$y = 114.3x \quad (R^2 = 0.9998)$$

จากนั้นทำการแทนค่าพื้นที่ใต้พีค (y) ที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารลูทีนในแต่ละตัวอย่างในสมการดังกล่าว เพื่อหาความเข้มข้น (x) ของแต่ละตัวอย่าง โดยจะรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของสารลูทีนต่อข้าวกล้อง 100 กรัม

- การสร้างกราฟมาตรฐานสารซีแซนทีน (zeaxanthin)

เตรียมสารละลายมาตรฐานซีแซนทีน ($C_{40}H_{56}O_2$, AR grade, Sigma-Aldrich, Fluka, USA) อยู่ในช่วง 1.00 – 50.00 มิลลิกรัมต่อลิตร (ความเข้มข้น 0 – 10 ppm) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารซีแซนทีน ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดอาร์เรย์ ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ได้พื้นที่ใต้พีคแล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้กราฟมาตรฐานดังแสดงในภาพที่ 33



ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานสารซีแซนทีน (zeaxanthin) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

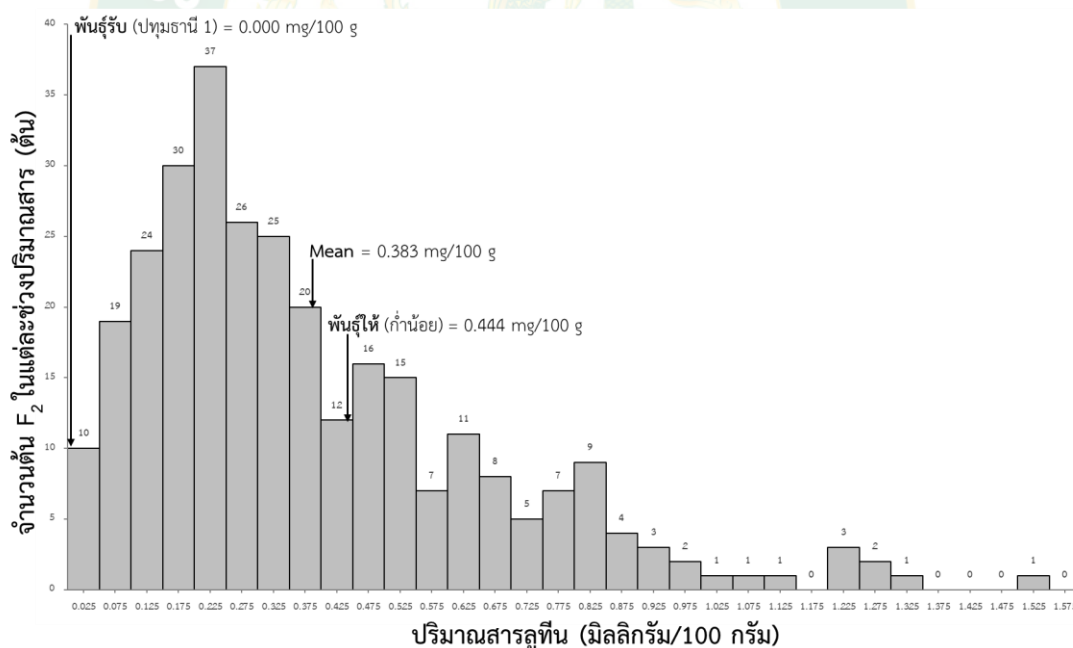
จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง สมการที่ได้เท่ากับ

$$y = 47.331x \quad (R^2 = 0.9995)$$

จากนั้นทำการแทนค่าพื้นที่ใต้พีค (y) ที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารซีแซนทีนในแต่ละตัวอย่างในสมการดังกล่าว เพื่อหาความเข้มข้น (x) ของแต่ละตัวอย่าง โดยจะรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมของสารลูทีนต่อข้าวกล้อง 100 กรัม

6.2 การวิเคราะห์ปริมาณของสารลูทีนในประชากร F₂

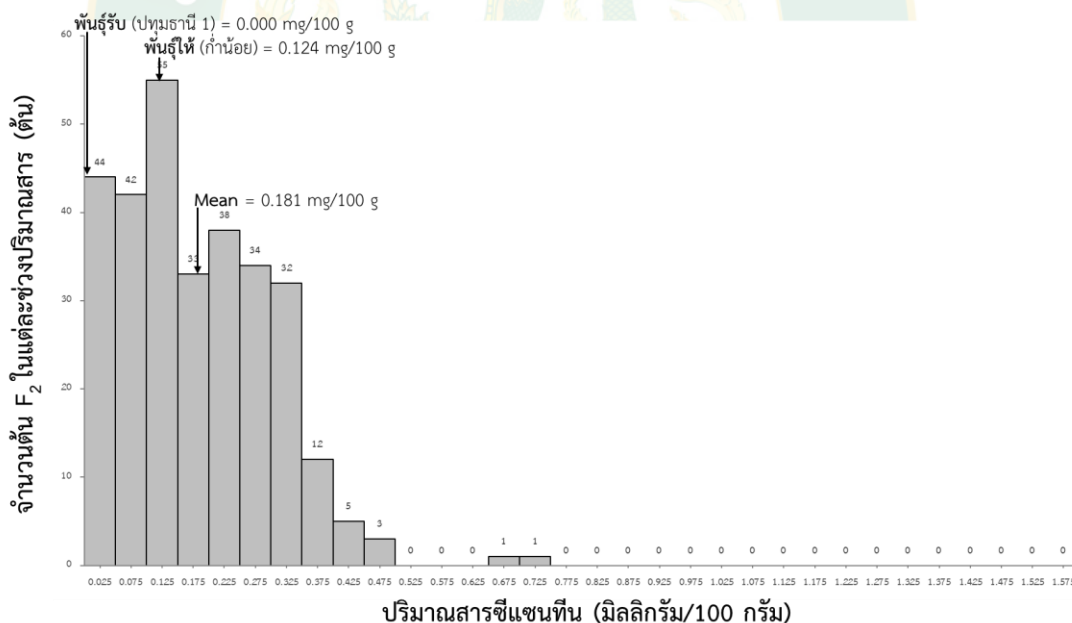
หลังจากทำการเก็บเมล็ด F₃ ที่ได้จากการปลูกประชากร F₂ ในฤดูนาปี พ.ศ. 2562 (กรกฎาคม-ธันวาคม) จำนวน 300 ต้น นำเมล็ดแก่ที่ได้มาทำการกะเทาะเปลือกประมาณ 5 กรัมต่อตัวอย่าง พร้อมกับเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) และก้าน้อย (พันธุ์ให้) ที่ปลูกในฤดูและโรงเรือนเดียวกันไปวิเคราะห์ปริมาณสารลูทีนด้วยเทคนิค HPLC ที่รายงานเป็นมิลลิกรัมของสารลูทีนต่อข้าวกล้อง 100 กรัม พบว่า เมล็ดข้าวกล้องของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) มีสารลูทีน 0.000 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และข้าวพันธุ์ก้าน้อย (พันธุ์ให้) มีสารลูทีน 0.444 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ผลการหาปริมาณลูทีนในประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น พบว่า ปริมาณสารลูทีนในประชากร F₂ มีการกระจายตัวแบบระฆังคว่ำโค้งเบ้ขวา (skewed to right) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.383 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยในประชากร F₂ มีสารลูทีนค่าสูงสุดเป็น 1.527 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และต่ำสุดเป็น 0.017 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ภาพที่ 34)



ภาพที่ 34 ฮิสโทแกรมปริมาณสารลูทีนในประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น

6.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณของสารซีแซนทีนในประชากร F_2

หลังจากทำการเก็บเมล็ด F_3 ที่ได้จากการปลูกประชากร F_2 ในฤดูนาปี พ.ศ. 2562 (กรกฎาคม-ธันวาคม) จำนวน 300 ต้น นำเมล็ดแก่ที่ได้มาทำการกะเทาะเปลือกประมาณ 5 กรัมต่อตัวอย่าง พร้อมกับเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) และก้าน้อย (พันธุ์ให้) ที่ปลูกในฤดูและโรงเรือนเดียวกันไปวิเคราะห์ปริมาณสารซีแซนทีนด้วยเทคนิค HPLC ที่รายงานเป็นมิลลิกรัมของสารซีแซนทีนต่อข้าวกล้อง 100 กรัม พบว่า เมล็ดข้าวกล้องของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์รับ) มีสารซีแซนทีน 0.000 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และข้าวพันธุ์ก้าน้อย (พันธุ์ให้) มีสารซีแซนทีน 0.124 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ผลการหาปริมาณซีแซนทีนในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น พบว่า ค่าปริมาณซีแซนทีนในประชากร F_2 มีการกระจายตัวแบบระฆังคว่ำโค้งเบ้ขวา (skewed to right) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.181 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยในประชากร F_2 มีสารซีแซนทีนสูงสุดเป็น 0.734 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และต่ำสุดเป็น 0.000 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 35 ฮิสโตแกรมปริมาณสารซีแซนทีนในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารในประชากร F_2 พบต้นที่มีปริมาณสารลูทีนหรือซีแซนทีนสูงกว่าพันธุ์ให้คือพันธุ์ก้าน้อย โดยในประชากร F_2 มีสารลูทีนค่าสูงสุดเป็น 1.527 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และมีสารซีแซนทีนสูงสุดเป็น 0.734 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม อาจเป็นผลจากความดีเด่นเหนือพ่อแม่ (Heterosis) สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ทดสอบข้าวสายพันธุ์แก้ความเป็นหมันของละอองเกสร (R) ที่เป็นสายพันธุ์แก้ความเป็นหมันที่ได้พัฒนามาจากข้าวไทยจำนวน 7 คู่ผสม พบว่าทั้ง 7 คู่ผสมที่มีความดีเด่นเหนือพันธุ์มาตรฐาน (RDH3) มากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ (วีรชัย et al., 2562)

7. การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารลูทีนกับเครื่องหมายที่พัฒนาในประชากร F_2

7.1 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารลูทีนกับเครื่องหมายที่พัฒนาในประชากร F_2

ในการทดสอบนี้เป็นการวิเคราะห์ ANOVA วิธี Tukey เพื่อหาอิทธิพลความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างปริมาณสารลูทีนกับเครื่องหมายที่พัฒนา จำนวน 18 ยีน เป็นเครื่องหมายของยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์มีจำนวน 11 ยีน แบ่งเป็น ยีนที่ควบคุมส่วนต้นของการสังเคราะห์แคโรทีน (carotenes) จำนวน 7 ยีน ได้แก่ ยีน *OsPSY1*, *OsPDS*, *OsZISO*, *OsZDS*, *OsCrtISO*, *OsLCYe* และ *OsLCYb* ยีนที่ควบคุมส่วนที่สังเคราะห์แซนโทฟิลล์ (xanthophylls) จำนวน 4 ยีน *OsCYP97A* (*Lut5*), *OsCYP97B*, *OsCYP97C* (*Lut1*) และ *OsHYD3* (*EHY*) โดยให้จีโนไทป์ดังนี้ PP คือ เหมือนพันธุ์รับ (ปทุมธานี 1) KP คือ เหมือนพันธุ์รับ (ปทุมธานี 1) และพันธุ์ให้ (ก้าน้อย) KK คือ เหมือนพันธุ์ให้ (ก้าน้อย) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p -value=0.05) พบว่า มี 9 ยีน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังรายละเอียดในตารางที่ 13 แสดงว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมาย ดีเอ็นเอของยีนเหล่านี้ ไม่สามารถการแบ่งกลุ่มค่าเฉลี่ยของปริมาณสารลูทีนได้หรือปริมาณสารลูทีนใน จีโนไทป์แต่ละกลุ่มมีค่าไม่ต่างกัน ได้แก่ ยีน *OsPSY1*, *OsPDS*, *OsZISO*, *OsZDS*, *OsCrtISO*, *OsLCYe*, *OsCYP97A* (*Lut5*), *OsCYP97C* (*Lut1*) และ *OsHYD3* (*EHY*)

โดยมี 2 ยีน ที่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการแบ่งกลุ่มจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายมีอย่างน้อย 1 กลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยของปริมาณสารลูทีนแตกต่างกัน คือ ยีน *OsLCYb* จีโนไทป์ PP เท่ากับ 0.330 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จีโนไทป์ KP เท่ากับ 0.433 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และจีโนไทป์ KK เท่ากับ 0.331 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่มพบว่าจีโนไทป์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม A คือ จีโนไทป์ KP จีโนไทป์ที่จัดอยู่ใน

กลุ่ม B คือ จีโนไทป์ PP และจีโนไทป์ KK ซึ่งยึดดังกล่าวเป็นยีนที่ควบคุมส่วนต้นของการสังเคราะห์แคโรทีน (carotenes) และยีน *O5CYP97B* จีโนไทป์ PP เท่ากับ 0.317 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จีโนไทป์ KP เท่ากับ 0.419 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และจีโนไทป์ KK เท่ากับ 0.369 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่มพบว่าจีโนไทป์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม A คือ จีโนไทป์ KK และจีโนไทป์ KP จีโนไทป์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม B คือ จีโนไทป์ PP และจีโนไทป์ KK (ตารางที่ 13) แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของสารลูทีนในกลุ่มต้นที่มีจีโนไทป์ PP (ต้นแม่/พันธุ์รับ) ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มที่มีจีโนไทป์ KK (ต้นพ่อ/พันธุ์ให้) ดังนั้นจึงสรุปว่าไม่พบอิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารลูทีนกับยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในประชากร F_2 กับปริมาณสารลูทีน

กลุ่ม ยีน	เครื่องหมาย ดี เอ็นเอ/ยีน	จีโน ไทป์	จำนวน ประชากร	ปริมาณสารลูทีน (มิลลิกรัม/100 กรัม)		กลุ่ม	p-value
				ค่าเฉลี่ย	SD		
carotenes	<i>PSY1</i>	KK	58	0.361	0.053	A	0.676 ^{ns}
		KP	153	0.380	0.078	A	
		PP	89	0.401	0.085	A	
	<i>PDS</i>	KK	79	0.376	0.061	A	0.969 ^{ns}
		KP	177	0.385	0.076	A	
		PP	44	0.382	0.102	A	
	<i>ZISO</i>	KK	76	0.399	0.093	A	0.237 ^{ns}
		KP	153	0.397	0.078	A	
		PP	71	0.334	0.050	A	
	<i>ZDS</i>	KK	66	0.340	0.057	A	0.051 ^{ns}
		KP	176	0.415	0.090	A	
		PP	58	0.333	0.044	A	
<i>CrtISO</i>	KK	63	0.418	0.068	A	0.052 ^{ns}	
	KP	161	0.399	0.089	A		
	PP	76	0.318	0.047	A		

กลุ่ม ยีน	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ/ยีน	จีโน ไทป์	จำนวน ประชากร	ปริมาณสารลูทีน (มิลลิกรัม/100 กรัม)		กลุ่ม	p-value
				ค่าเฉลี่ย	SD		
xanthophylls	<i>LCYe</i>	KK	29	0.384	0.068	A	0.693 ^{ns}
		KP	222	0.389	0.077	A	
		PP	49	0.352	0.071	A	
	<i>LCYb</i>	KK	72	0.331	0.074	B	0.005*
		KP	152	0.433	0.082	A	
		PP	76	0.330	0.053	B	
	<i>CYP97A_Lut5</i>	KK	35	0.358	0.042	A	0.220 ^{ns}
		KP	184	0.404	0.088	A	
		PP	81	0.344	0.060	A	
	<i>CYP97B</i>	KK	65	0.369	0.083	AB	0.025*
		KP	160	0.419	0.086	A	
		PP	75	0.317	0.039	B	
<i>CYP97C_Lut1</i>	KK	68	0.326	0.056	A	0.101 ^{ns}	
	KP	150	0.411	0.093	A		
	PP	82	0.378	0.056	A		
<i>HYD3 (EHY)</i>	KK	46	0.404	0.070	A	0.773 ^{ns}	
	KP	180	0.374	0.070	A		
	PP	74	0.390	0.092	A		

หมายเหตุ; ค่า Sig. (p-value) ที่ได้ มากกว่าหรือเท่ากับ 0.05 คือ ไม่แตกต่าง
 ค่า Sig. (p-value) ที่ได้ น้อยกว่า 0.05 คือ แตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แทนด้วย *

PP คือ เหมือนพันธุ์รับ (ปทุมธานี 1) มีจีโนไทป์แบบ Homozygous

KP คือ เหมือนพันธุ์รับ (ปทุมธานี 1) และพันธุ์ให้ (ก้าน้อย) มีจีโนไทป์แบบ Heterozygous

KK คือ เหมือนพันธุ์ให้ (ก้าน้อย) มีจีโนไทป์แบบ Homozygous

เครื่องหมายของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์มีจำนวน 7 ยีน ได้แก่ กลุ่ม methylation จำนวน 1 ยีน ได้แก่ *OsSDG8* กลุ่ม cleavage จำนวน 2 ยีน ได้แก่ *OsLCD (CCD1)* และ *OsNCED2 (CCD4b)* กลุ่ม transcription factor จำนวน 4 ยีน ได้แก่ *OsMADS26*, *OsWD40*, *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1* ทำการวิเคราะห์ ANOVA วิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p\text{-value}=0.05$) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 14 พบว่า มี 4 ยีน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แสดงว่าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนเหล่านี้ไม่สามารถแบ่งกลุ่มค่าเฉลี่ยของปริมาณสารลูทีนได้หรือปริมาณสารลูทีนในจีโนไทป์แต่ละกลุ่มมีค่าไม่ต่างกัน ได้แก่ ยีน *OsSDG8*, *OsLCD (CCD1)*, *OsMADS26* และ *OsWD40*

โดยมี 3 ยีน ที่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ แสดงว่าการแบ่งกลุ่มจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายอย่างน้อย 1 กลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยของปริมาณสารลูทีนแตกต่างกัน คือ ยีน *OsNCED2 (CCD4b)* จีโนไทป์ PP เท่ากับ 0.293 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จีโนไทป์ KP เท่ากับ 0.402 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และจีโนไทป์ KK เท่ากับ 0.388 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่มพบว่าจีโนไทป์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม A คือ จีโนไทป์ KK และ KP จีโนไทป์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม B คือ จีโนไทป์ KK และ PP ซึ่งไม่สามารถแยกจีโนไทป์ทั้ง 3 แบบออกจากกันได้ สำหรับยีน *OsB2 (Kala4)* จีโนไทป์ PP เท่ากับ 0.182 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จีโนไทป์ KP เท่ากับ 0.407 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และจีโนไทป์ KK เท่ากับ 0.514 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่มพบว่าจีโนไทป์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม A คือ จีโนไทป์ KK จีโนไทป์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม B คือ จีโนไทป์ KP และจีโนไทป์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม C คือ จีโนไทป์ PP และยีน *OsB1* จีโนไทป์ PP เท่ากับ 0.184 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จีโนไทป์ KP เท่ากับ 0.407 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และจีโนไทป์ KK เท่ากับ 0.511 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่มพบว่าจีโนไทป์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม A คือ จีโนไทป์ KK จีโนไทป์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม B คือ จีโนไทป์ KP และจีโนไทป์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม C คือ จีโนไทป์ PP (ตารางที่ 14) ซึ่งการจัดกลุ่มดังกล่าวเป็นการจัดกลุ่มแยกจีโนไทป์ทั้ง 3 แบบ ออกจากกันและเรียงลำดับจากกลุ่มข้าวที่มีปริมาณสารลูทีนต่ำ คือ PP สารลูทีนต่ำกลาง คือ KP และสารลูทีนสูง คือ KK แสดงให้เห็นว่ายีน *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1* มีอิทธิพลสัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีน

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในประชากร F_2 กับปริมาณสารลูทีน

กลุ่มยีน	เครื่องหมายดีเอ็นเอ/ยีน	จีโนไทป์	จำนวนประชากร	ปริมาณสารลูทีน (มิลลิกรัม/100 กรัม)		กลุ่ม	p-value
				ค่าเฉลี่ย	SD		
Methylation	<i>SDG8</i>	KK	74	0.411	0.074	A	0.586 ^{ns}
		KP	141	0.376	0.075	A	
		PP	85	0.369	0.077	A	
cleavage	<i>LCD_CCD1</i>	KK	78	0.403	0.085	A	0.466 ^{ns}
		KP	147	0.388	0.075	A	
		PP	75	0.350	0.067	A	
	<i>NCED2_CCD4b</i>	KK	40	0.388	0.077	AB	0.040*
		KP	211	0.402	0.080	A	
		PP	49	0.293	0.046	B	
transcription factor	<i>MADS26</i>	KK	52	0.346	0.087	A	0.564 ^{ns}
		KP	154	0.389	0.065	A	
		PP	94	0.392	0.085	A	
	<i>WD40</i>	KK	75	0.343	0.051	A	0.287 ^{ns}
		KP	155	0.404	0.077	A	
		PP	70	0.377	0.096	A	
	<i>B2_Kala4</i>	KK	74	0.514	0.103	A	0.000*
		KP	158	0.407	0.061	B	
		PP	68	0.182	0.019	C	
<i>B1</i>	KK	77	0.511	0.099	A	0.000*	
	KP	154	0.407	0.062	B		
	PP	69	0.184	0.020	C		

หมายเหตุ; ค่า Sig. (p-value) ที่ได้ มากกว่าหรือเท่ากับ 0.05 คือ ไม่แตกต่าง
 ค่า Sig. (p-value) ที่ได้ น้อยกว่า 0.05 คือ แตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แทนด้วย *

การหาอิทธิพลความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างปริมาณสารลูทีนกับเครื่องหมายที่พัฒนาด้วยการวิเคราะห์ ANOVA วิธี Tukey จากจำนวนยีนที่ได้ทำการทดสอบเท่ากับ 18 ยีน มี 2 ยีน ที่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ยีน *OsB2 (Kala4)* และยีน *OsB1* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม transcription factor ซึ่งอยู่ในกลุ่ม MBW (MYB-bHLH-WDR) protein complexes (Xu et al., 2015) ที่คาดว่าจะทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

7.2 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารลูทีนกับเครื่องหมายที่พัฒนาในประชากร F₂

ผลจากการวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารลูทีนกับเครื่องหมายของยีนจำนวน 18 ยีน ที่พัฒนาในประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น จากนั้นทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับปริมาณสารลูทีนด้วยการวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) โดยวิธี simple regression เพื่อหาสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R square: R²) พบว่ามี 2 ยีน ให้ค่า R² ในช่วงมากกว่า 1.00 แต่น้อยกว่า 10.00 เปอร์เซ็นต์ คือ *OsCrtISO* และ *OsNCED2 (CCD4b)* และยีนที่ให้ค่า R² ในช่วงมากกว่า 10.00 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ยีน คือ *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1* (ตารางที่ 15) และเมื่อทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับปริมาณสารลูทีนด้วยการวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) โดยวิธี multiple regression ของทั้ง 18 เครื่องหมายที่พัฒนาได้กับปริมาณสารลูทีนพบว่าให้ค่า R² เท่ากับ 23.07 เปอร์เซ็นต์

หากวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยวิธี multiple regression ของเครื่องหมายที่มีค่า R² จาก simple regression มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 ยีน คือ *OsCrtISO*, *OsNCED2 (CCD4b)*, *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1* ได้ค่า R² เท่ากับ 19.20 เปอร์เซ็นต์ และหากวิเคราะห์เพียง 2 ยีน คือ *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1* ได้ค่า R² เท่ากับ 17.30 เปอร์เซ็นต์ จากผลความสัมพันธ์เหล่านี้จึงสามารถให้ข้อเสนอแนะดังนี้ หากจะนำเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ไปใช้ในการช่วยคัดเลือกต้นที่มีปริมาณสารลูทีนสูงสามารถใช้เพียง *OsB2 (Kala4)* หรือ *OsB1* เครื่องหมายเดี่ยวก็นพอ

ตารางที่ 15 ค่าสหสัมพันธ์ (R-sq หรือ R²) ระหว่างเครื่องหมายจำเพาะกับยีนกับปริมาณสารลูทีน โดยวิธี simple regression

กลุ่มยีน	ลำดับ ที่	ยีน	การเปลี่ยนแปลง	ชนิดของ เครื่องหมาย	ค่า Regression (R-sq หรือ R ²) (เปอร์เซ็นต์)
carotenoid biosynthetic pathway	1	<i>PSY1</i>	downstream 7,055 bp	T-ARMS	0.26
	2	<i>PDS</i>	in intron	T-ARMS	0.01
	3	<i>ZISO</i>	in exon 4	T-ARMS	0.67
	4	<i>ZDS</i>	in exon 7	T-ARMS	0.00
	5	<i>CrtISO*</i>	upstream 309 bp	T-ARMS	1.66
	6	<i>LCYe</i>	downstream 4,459 bp	T-ARMS	0.14
	7	<i>LCYb</i>	downstream 55,305 bp	InDel	0.00
	8	<i>CYP97A_Lut5</i>	in exon 4	T-ARMS	0.20
	9	<i>CYP97B</i>	in exon 6	T-ARMS	0.52
	10	<i>CYP97C_Lut1</i>	upstream 31,204 bp	T-ARMS	0.36
	11	<i>HYD3 (EHY)</i>	upstream 17,657 bp	T-ARMS	0.01
Methylation	12	<i>SDG8</i>	downstream 614 bp	InDel	0.29
cleavage	13	<i>LCD_CCD1</i>	in 5'UTR	InDel	0.47
	14	<i>NCED2_CCD4b*</i>	in exon 1	T-ARMS	1.08
transcription factor	15	<i>MADS26</i>	downstream 4,943 bp	T-ARMS	0.26
	16	<i>WD40</i>	upstream 32,356 bp	T-ARMS	0.20
	17	<i>B2_Kala4**</i>	in intron 1	InDel	17.13
	18	<i>B1**</i>	in intron 2	T-ARMS	16.99

หมายเหตุ: * คือ เครื่องหมายของยีนที่ให้ค่า R² ในช่วงมากกว่า 1.00 แต่น้อยกว่า 10.00 เปอร์เซ็นต์

** คือ เครื่องหมายของยีนที่ให้ค่า R² ในช่วงมากกว่า 10.00 เปอร์เซ็นต์

ค่า R^2 ที่ได้จากการทดสอบพบว่ายีน *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1* ที่อยู่ในกลุ่ม transcription factor นั้นให้ค่าสูงสุดคือ 17.13 และ 16.99 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับปริมาณสารลูทีน แต่ทั้งสองยีนไม่มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ แต่พบว่าเกี่ยวข้องกับสีของเยื่อหุ้มเมล็ดซึ่งก็มีการศึกษาปริมาณสารลูทีนในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีต่าง ๆ พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีสารลูทีนสูงกว่าสีอื่น ๆ (รัชณี และ ริญ , 2555)

โดยที่ยีน *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1* เป็นยีนที่รายงานที่เกี่ยวข้องกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงศึกษาความสัมพันธ์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนในประชากร F_2

8. สีของเยื่อหุ้มเมล็ดและปริมาณสารลูทีนและซีแซนทีนในประชากร F_2

นำเมล็ดข้าวกล้อง F_3 มาเก็บข้อมูลสีของเยื่อหุ้มเมล็ดที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งสามารถแบ่งสีของเยื่อหุ้มเมล็ดได้เป็น 2 แบบ คือ

แบบที่ 1 แบ่งได้ 2 กลุ่ม โดยกำหนดให้ ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด เป็น 0 และมีสีเยื่อหุ้มเมล็ด เป็น 1

แบบที่ 2 แบ่งได้ 3 กลุ่ม โดยกำหนดให้ เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว (white pericarp) เป็น 0 เยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล (brown pericarp) เป็น 1 และเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (black pericarp) เป็น 2

8.1 การศึกษาการกระจายตัวของฟีโนไทป์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ด

แบบที่ 1 แบ่งได้ 2 กลุ่ม โดยกำหนดให้ ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด เป็น 0 และมีสีเยื่อหุ้มเมล็ด เป็น 1 จากการทดสอบไคสแควร์เพื่อศึกษาการแบ่งกลุ่มของสีเยื่อหุ้มเมล็ดว่าเป็นไปตามสมมติฐานหรือไม่ สมมติฐานอัตราส่วนของฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดคือ 3:1 (มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด : ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด) พบว่าจำนวนฟีโนไทป์แต่ละแบบคือ 231 : 69 (มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด : ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด) มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 1.717 มีค่าน้อยกว่าค่าไคสแควร์ในตาราง คือ 3.841 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น คือ อัตราส่วนของฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็น 3:1 (มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด : ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด) (ตารางที่ 16) เป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล

ตารางที่ 16 การทดสอบไคสแควร์การกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดแบ่งเป็น 2 กลุ่มในประชากร F_2 สมมติฐาน คือ อัตราส่วนของฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดคือ 3:1 (มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด : ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด)

ข้อมูล	สีเยื่อหุ้มเมล็ด		จำนวนประชากร ทั้งหมด	χ^2 (9:3:4)	p-value
	มีสี	ไม่มีสี			
ค่าสังเกต	231	69	300	1.717	0.424
ค่าคาดหวัง	225	75	300		

$$(\chi^2_{df=1, 0.05} = 3.841)$$

แบบที่ 2 แบ่งได้ 3 กลุ่ม โดยกำหนดให้ เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว (white pericarp) เป็น 0 เยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล (brown pericarp) เป็น 1 และเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (black pericarp) เป็น 2 จากการทดสอบไคสแควร์เพื่อศึกษาการแบ่งกลุ่มของสีเยื่อหุ้มเมล็ดว่าเป็นไปตามสมมติฐานหรือไม่ สมมติฐานอัตราส่วนของฟีโนไทป์สีของเยื่อหุ้มเมล็ดมีการทำงานแบบ recessive epistasis (Rahman et al., 2013) มีอัตราส่วนสีเยื่อหุ้มเมล็ด 9:3:4 (สีดำ : สีน้ำตาล : สีขาว) พบว่าจำนวนฟีโนไทป์แต่ละแบบคือ 177 สีดำ : 54 สีน้ำตาล : 69 สีขาว มีผลการทดสอบไคสแควร์เท่ากับ 0.973 มีค่าน้อยกว่าค่าไคสแควร์ในตาราง คือ 5.991 และค่า p-value มากกว่า 0.05 ดังนั้น อัตราส่วนของฟีโนไทป์สีของเยื่อหุ้มเมล็ดเป็น 9:3:4 (สีดำ : สีน้ำตาล : สีขาว) (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 การทดสอบไคสแควร์การกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดแบ่งเป็น 3 กลุ่มในประชากร F_2 สมมุติฐาน คือ อัตราส่วนของฟีโนไทป์สีของเยื่อหุ้มเมล็ดคือ 9:3:4 (สีดำ : สีน้ำตาล : สีขาว)

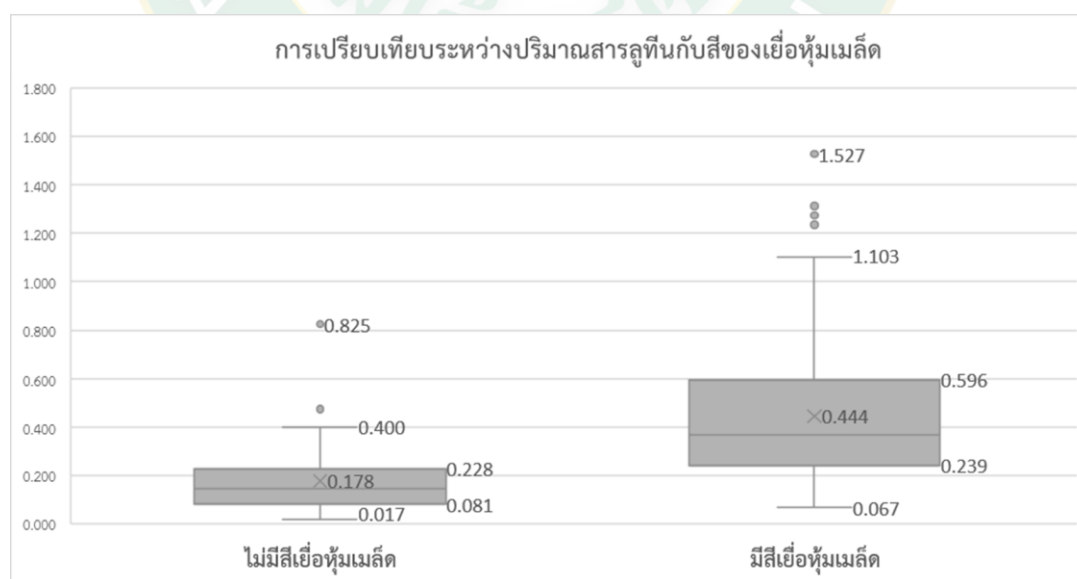
ข้อมูล	สีเยื่อหุ้มเมล็ด			จำนวนประชากร ทั้งหมด	χ^2 (9:3:4)	p-value
	ดำ	น้ำตาล	ขาว			
ค่าสังเกต	177	54	69	300	0.973	0.615
ค่าคาดหวัง	168.75	56.25	75	300		

($\chi^2_{df=2, 0.05} = 5.991$)

จากการจัดกลุ่มของการกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดทั้ง 2 แบบ พบว่ายอมรับสมมุติฐานทั้งการแบ่งกลุ่มฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดคือ 3:1 (มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด : ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด) และการแบ่งกลุ่มฟีโนไทป์สีของเยื่อหุ้มเมล็ดคือ 9:3:4 (สีดำ : สีน้ำตาล : สีขาว) ดังนั้นในการคำนวณการวิเคราะห์ ANOVA วิธี Tukey เพื่อหาอิทธิพลความสัมพันธ์ร่วมกันของฟีโนไทป์ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนหรือซีแซนทีน และหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน (spearman rank correlation coefficient หรือ spearman's rho) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสีของเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนหรือซีแซนทีนจึงได้เลือกทำการวิเคราะห์ทั้ง 2 แบบ

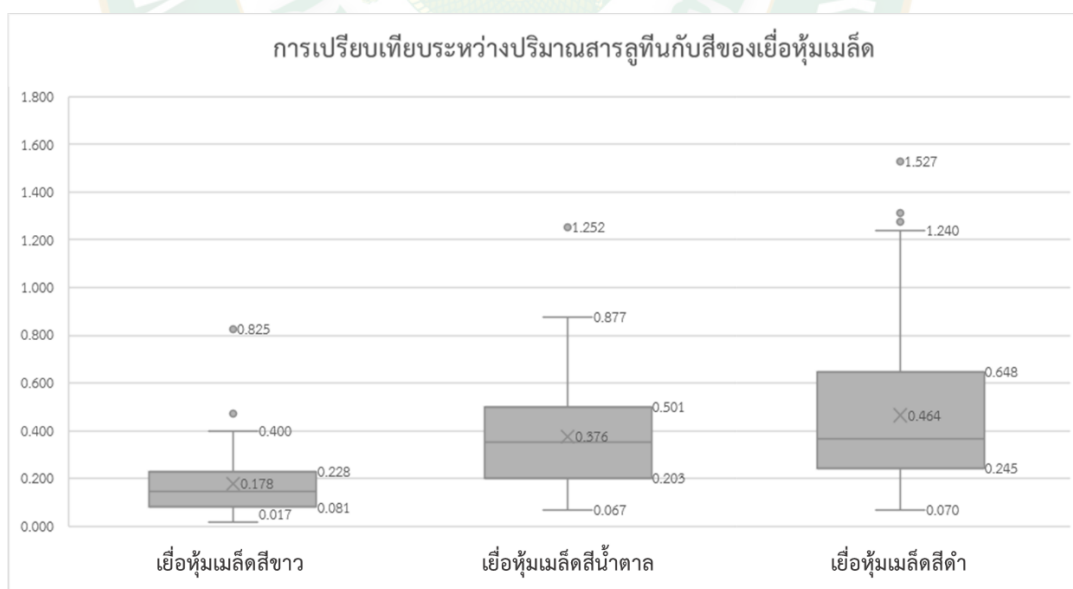
8.2 การวิเคราะห์หัตถิพลความสัมพันธ์ของการแบ่งกลุ่มของฟิโนไทป์ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนในประชากร F_2

การแบ่งกลุ่มฟิโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดแบบที่ 1 คือ 3:1 (มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด : ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด) เมื่อนำค่าปริมาณสารลูทีนไปวัดการกระจายของข้อมูลด้วยแผนภาพกล่อง จะเห็นได้ว่าค่าปริมาณสารลูทีนที่พบในแต่ละสีของเยื่อหุ้มเมล็ดนั้นมีการกระจายตัวของทั้ง 2 กลุ่ม โดยปริมาณสารลูทีนสูงสุดและต่ำสุดในแต่ละกลุ่ม คือ ข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดมีปริมาณสารลูทีนอยู่ที่ 0.238 – 0.596 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และข้าวที่ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดมีปริมาณสารลูทีนอยู่ที่ 0.081 – 0.228 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ภาพที่ 36) ผลการวิเคราะห์ ANOVA วิธี Tukey เพื่อหาหัตถิพลความสัมพันธ์ร่วมกันของฟิโนไทป์ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีน การแบ่งกลุ่มฟิโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดแบบที่ 1 คือ มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด : ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการแบ่งกลุ่มฟิโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดมีอย่างน้อย 1 กลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยของปริมาณสารลูทีน โดยเมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่มพบว่าสามารถแบ่งเป็นกลุ่มที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดจัดอยู่ในกลุ่ม A ค่าเฉลี่ยปริมาณสารลูทีนเท่ากับ 0.444 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และกลุ่มที่ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดจัดอยู่ในกลุ่ม B ค่าเฉลี่ยปริมาณสารลูทีนเท่ากับ 0.178 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ตารางที่ 18)



ภาพที่ 36 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณสารลูทีนในประชากร F_2 ตามกลุ่มมีสีและไม่มีสีของเยื่อหุ้มเมล็ด

การแบ่งกลุ่มฟิโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดแบบที่ 2 คือ 9:3:4 (สีดำ : สีน้ำตาล : สีขาว) เมื่อนำค่าปริมาณสารลูทีนไปวัดการกระจายของข้อมูลด้วยแผนภาพกล่อง จะเห็นได้ว่าค่าของปริมาณสารลูทีนที่พบในแต่ละสีของเยื่อหุ้มเมล็ดนั้นมีการกระจายตัวของทั้ง 3 กลุ่ม โดยปริมาณสารลูทีนสูงสุดและต่ำสุดในแต่ละกลุ่ม คือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวมีปริมาณสารลูทีนอยู่ที่ 0.081– 0.228 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลมีปริมาณสารลูทีนอยู่ที่ 0.205 – 0.479 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีปริมาณสารลูทีนอยู่ที่ 0.318 – 0.764 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ภาพที่ 37) ผลการวิเคราะห์ ANOVA วิธี Tukey เพื่อหาอิทธิพลความสัมพันธ์ร่วมกันของฟิโนไทป์ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีน การแบ่งกลุ่มฟิโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดแบบที่ 2 คือ สีดำ : สีน้ำตาล : สีขาว พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการแบ่งกลุ่มฟิโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดมีอย่างน้อย 1 กลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยของปริมาณสารลูทีน โดยเมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่มพบว่าข้าวที่จัดอยู่ในกลุ่ม A คือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ค่าเฉลี่ยปริมาณสารลูทีนเท่ากับ 0.464 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล ค่าเฉลี่ยปริมาณสารลูทีนเท่ากับ 0.376 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ข้าวที่จัดอยู่ในกลุ่ม B คือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวค่าเฉลี่ยปริมาณสารลูทีนเท่ากับ 0.178 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ตารางที่ 18)



ภาพที่ 37 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณสารลูทีนในประชากร F_2 ตามกลุ่มสีของเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว สีน้ำตาล และสีดำ

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนในประชากร F_2

การจัดกลุ่ม	สีเยื่อหุ้มเมล็ด	จำนวน ประชากร	ปริมาณสาร (มิลลิกรัม/100 กรัม)		กลุ่ม	p-value
			ค่าเฉลี่ย	SD		
แบบที่ 1	มีสี	231	0.444	0.076	A	0.000*
	ไม่มีสี	69	0.178	0.019	B	
แบบที่ 2	ดำ	177	0.464	0.083	A	0.000*
	น้ำตาล	54	0.376	0.046	A	
	ขาว	69	0.178	0.019	B	

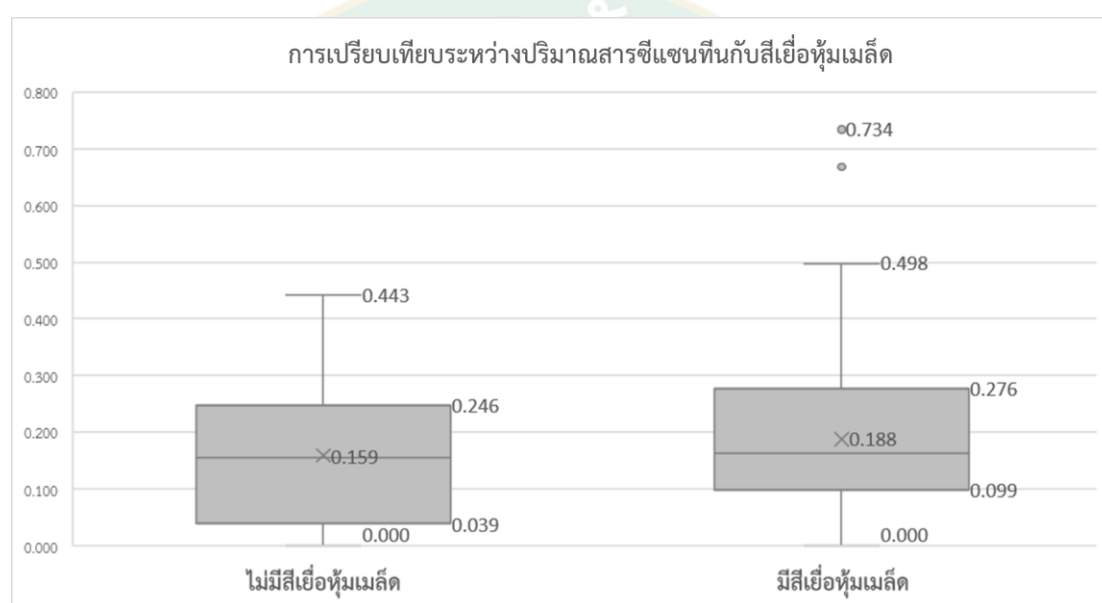
หมายเหตุ; ค่า Sig. (p-value) ที่ได้ มากกว่าหรือเท่ากับ 0.05 คือ ไม่แตกต่าง
 ค่า Sig. (p-value) ที่ได้ น้อยกว่า 0.05 คือ แตกต่าง
 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แทนด้วย *

เมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่ม พบว่า ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลมีปริมาณสารลูทีนอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และอยู่คนละกลุ่มกับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว จึงน่าจะอนุมานได้ว่าการแบ่งกลุ่มสีเยื่อหุ้มเมล็ดแบบมีสีและไม่มีสีมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีนมากกว่าการแบ่งกลุ่มแบบ 3 สี เนื่องจากกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีให้ค่าปริมาณสารลูทีนไม่แตกต่างกันในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและสีน้ำตาล

8.3 การวิเคราะห์อิทธิพลความสัมพันธ์ของการแบ่งกลุ่มของพีโนไทป์ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารซีแซนทีนในประชากร F_2

การแบ่งกลุ่มพีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดแบบที่ 1 คือ 3:1 (มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด : ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด) เมื่อนำค่าปริมาณสารซีแซนทีนไปวัดการกระจายของข้อมูลด้วยแผนภาพกล่อง จะเห็นได้ว่าค่าของปริมาณสารซีแซนทีนที่พบในแต่ละสีของเยื่อหุ้มเมล็ดนั้นมีการกระจายตัวของทั้ง 2 กลุ่ม ไม่สามารถจัดกลุ่มออกจากกันได้ โดยปริมาณสารซีแซนทีนสูงสุดและต่ำสุดในแต่ละกลุ่ม คือ ข้าวที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดมีปริมาณสารซีแซนทีนอยู่ที่ 0.099 – 0.276 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และข้าวที่ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดมีปริมาณสารซีแซนทีนอยู่ที่ 0.039 – 0.246 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ภาพที่ 38) ผลการคำนวณการวิเคราะห์ ANOVA วิธี Tukey เพื่อหาอิทธิพลความสัมพันธ์ร่วมกันของพีโนไทป์ระหว่างสี

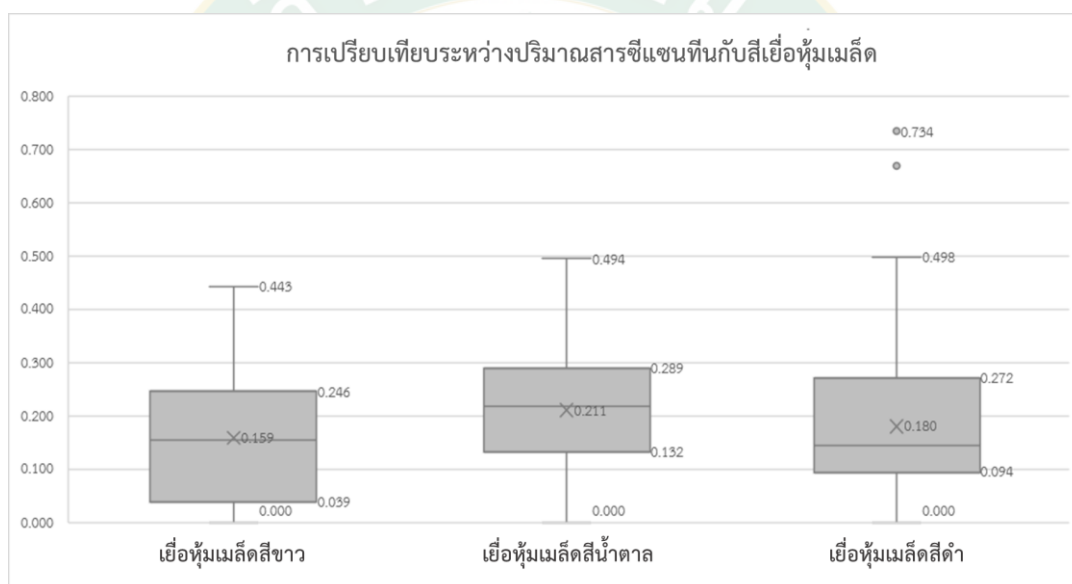
เยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารซีแซนทีน การแบ่งกลุ่มพีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดแบบที่ 1 คือ มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด : ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าไม่สามารถการแบ่งกลุ่มพีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดจากค่าเฉลี่ยของปริมาณสารซีแซนทีน โดยเมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่มพบว่ากลุ่มที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดค่าเฉลี่ยปริมาณสารซีแซนทีนเท่ากับ 0.188 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และกลุ่มที่ไม่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดค่าเฉลี่ยปริมาณสารซีแซนทีนเท่ากับ 0.159 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ตารางที่ 19)



ภาพที่ 38 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณสารซีแซนทีนในประชากร F_2 ตามกลุ่มมีสีและไม่มีสีของเยื่อหุ้มเมล็ด

การแบ่งกลุ่มพีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดแบบที่ 2 คือ 9:3:4 (สีดำ : สีน้ำตาล : สีขาว) เมื่อนำค่าปริมาณสารซีแซนทีนไปวัดการกระจายของข้อมูลด้วยแผนภาพกล่อง จะเห็นได้ว่าค่าของปริมาณสารซีแซนทีนที่พบในแต่ละสีของเยื่อหุ้มเมล็ดนั้นมีการกระจายตัวของทั้ง 3 กลุ่ม ไม่สามารถจัดกลุ่มออกจากกันได้ โดยปริมาณสารซีแซนทีนสูงสุดและต่ำสุดในแต่ละกลุ่ม คือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวมีปริมาณสารซีแซนทีนอยู่ที่ 0.039– 0.246 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลมีปริมาณสารซีแซนทีนอยู่ที่ 0.132 – 0.289 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีปริมาณสารซีแซนทีนอยู่ที่ 0.094 – 0.094 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ภาพที่ 39) การแบ่งกลุ่มพีโนไทป์

สีเยื่อหุ้มเมล็ดแบบที่ 2 คือ สีดำ : สีน้ำตาล : สีขาว พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าไม่สามารถการแบ่งกลุ่มฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ด จากค่าเฉลี่ยของปริมาณสารซีแซนทีน เมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่มพบว่าข้าวที่จัดอยู่ในกลุ่ม A คือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล ข้าวที่จัดอยู่ในกลุ่ม B คือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว โดยข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำค่าเฉลี่ยปริมาณสารซีแซนทีนเท่ากับ 0.180 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลค่าเฉลี่ยปริมาณสารซีแซนทีนเท่ากับ 0.211 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวค่าเฉลี่ยปริมาณสารซีแซนทีนเท่ากับ 0.159 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ตารางที่ 19)



ภาพที่ 39 แผนภาพกล่องแสดงปริมาณสารซีแซนทีนในประชากร F_2 ตามกลุ่มสีของเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว สีน้ำตาล และสีดำ

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารซีแซนทีนในประชากร F_2

การจัดกลุ่ม	สีเยื่อหุ้มเมล็ด	จำนวน ประชากร	ปริมาณสาร (มิลลิกรัม/100 กรัม)		กลุ่ม	p-value
			ค่าเฉลี่ย	SD		
			แบบที่ 1	มีสี		
	ไม่มีสี	69	0.159	0.015	A	
แบบที่ 2	ดำ	177	0.180	0.016	A B	0.065 ^{ns}
	น้ำตาล	54	0.211	0.012	A	
	ขาว	69	0.159	0.015	B	

หมายเหตุ; ค่า Sig. (p-value) ที่ได้ มากกว่าหรือเท่ากับ 0.05 คือ ไม่แตกต่าง
 ค่า Sig. (p-value) ที่ได้ น้อยกว่า 0.05 คือ แตกต่าง
 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แทนด้วย *

8.4 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างสีของเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนหรือซีแซนทีนในประชากร F_2

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างสีของเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารด้วยการวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) โดยวิธี simple regression เพื่อหาสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R Square: R^2) และหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน (Spearman rank correlation coefficient หรือ Spearman's rho) พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างสีของเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีน แบบที่ 1 (มีสี : ไม่มีสี) ค่า R^2 เท่ากับ 16.77 เปอร์เซ็นต์ และค่า correlation เท่ากับ 0.496 แสดงให้เห็นว่าสีของเยื่อหุ้มเมล็ดและปริมาณสารลูทีนมีความสัมพันธ์เชิงบวกมีทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่าระดับความสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.41 – 0.60 แสดงระดับความสัมพันธ์ปานกลาง แบบที่ 2 (ดำ : น้ำตาล : ขาว) ค่า R^2 เท่ากับ 17.65 เปอร์เซ็นต์ และค่า correlation เท่ากับ 0.461 แสดงให้เห็นว่าสีของเยื่อหุ้มเมล็ดและปริมาณสารลูทีนมีความสัมพันธ์เชิงบวกมีทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่าระดับความสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.41 – 0.60 แสดงระดับความสัมพันธ์ปานกลาง (ตารางที่ 20)

ความสัมพันธ์ระหว่างสีของเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารซีแซนทีน แบบที่ 1 (มีสี : ไม่มีสี) ค่า R^2 เท่ากับ 0.98 เปอร์เซ็นต์ และค่า correlation เท่ากับ 0.100 แสดงให้เห็นว่าสีของเยื่อหุ้ม

เมล็ดและปริมาณสารซีแซนทีนไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่าระดับความสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.01 – 0.20 แสดงระดับความสัมพันธ์ต่ำมาก แบบที่ 2 (ดำ : น้ำตาล : ขาว) ค่า R^2 เท่ากับ 0.22 เปอร์เซ็นต์ และค่า correlation เท่ากับ 0.021 แสดงให้เห็นว่าสีของเยื่อหุ้มเมล็ดและปริมาณสารซีแซนทีนไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่าระดับความสัมพันธ์อยู่ในช่วง 0.01 – 0.20 แสดงระดับความสัมพันธ์ต่ำมาก (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างสีของเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนหรือซีแซนทีนในประชากร F_2

การแบ่งกลุ่มสีเยื่อ หุ้มเมล็ด	สาร	ค่า regression (R-sq)		ค่า correlation	
		R^2 (เปอร์เซ็นต์)	p-value	Spearman's rho	p-value
แบบที่ 1 (มีสี : ไม่มีสี)	ลูทีน	16.77	0.000*	0.496	0.000*
	ซีแซนทีน	0.98	0.088 ^{ns}	0.100	0.083 ^{ns}
แบบที่ 2 (ดำ : น้ำตาล : ขาว)	ลูทีน	17.65	0.000*	0.461	0.000*
	ซีแซนทีน	0.22	0.417 ^{ns}	0.021	0.717 ^{ns}

หมายเหตุ; ค่า Sig. (p-value) ที่ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 0.05 คือ ไม่แตกต่าง
 ค่า Sig. (p-value) ที่ได้น้อยกว่า 0.05 คือ แตกต่าง
 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แทนด้วย *

การทดสอบทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนหรือซีแซนทีนในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น พบว่า สีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีนมีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับปานกลาง ทั้งการจัดกลุ่มสีเยื่อหุ้มเมล็ดแบบที่ 1 และ 2 แต่เมื่อเทียบกับสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารซีแซนทีนไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ

ผลการศึกษาแสดงถึงสีของเยื่อหุ้มเมล็ดมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีนสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจะมีปริมาณสารลูทีนสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลและขาว (Chetry et al., 2019; Kim et al., 2010; Pereira-Caro et al., 2013) และจากระดับความสัมพันธ์ต่ำมากของสารซีแซนทีนแสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารซีแซนทีน

ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับสีของเยื่อหุ้มเมล็ดและอาจจะไม่สัมพันธ์กับเครื่องหมายที่ได้พัฒนาในงานวิจัยนี้

จากผลการทดสอบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายของยีนกับปริมาณสารลูทีน พบว่ายีน *OsB2_Kala4* และ *OsB1* ซึ่งเป็นยีนควบคุมของสีเยื่อหุ้มเมล็ดสัมพันธ์กับปริมาณสารลูทีนในขณะที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ไม่พบความสัมพันธ์ ซึ่งจากผลการทดสอบที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดกับปริมาณสารลูทีน ทำให้อาจจะสรุปได้ว่ายีน *OsB2/B1* ซึ่งเป็นยีน Transcription factor ควบคุมทั้งการสร้างสีของเยื่อหุ้มเมล็ดและสารลูทีนซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสของยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์และยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ที่ได้จากการอ่านลำดับเบสอาร์เอ็นเอทั้งหมด (RNA-seq) จำนวน 12 ยีน และจากการอ่านลำดับเบสของจีโนม (WGS) ในบริเวณยีน บริเวณหน้ายีน และหลังของยีน จำนวน 28 ยีน ได้แก่ *OsPSY1*, *OsPSY2*, *OsPSY3*, *OsPDS*, *OsZDS*, *OsZISO*, *OsCrtISO*, *OsLCYe*, *OsLCYb*, *OsCYP9 7A (Lut5)*, *OsCYP9 7B*, *OsCYP9 7C (Lut1)*, *OsHYD2 (BHY)*, *OsHYD3 (EHY)*, *OsZEP*, *OsSDG8*, *OsOr*, *OsLCD (CCD1)*, *OsNCED1 (CCD4 a)*, *OsNCED2 (CCD4b)*, *OsDnaJ*, *OsDnaJ10*, *OsMADS26*, *OsWD40*, *OsRc*, *OsC1*, *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1* พบการเปลี่ยนแปลงทั้งในรูปแบบ SNP และ InDel ที่สามารถแบ่งกลุ่มข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวจากข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ จำนวน 24 ยีน ยกเว้นในยีน *OsZDS*, *OsZEP*, *OsNCED2 (CCD4b)* และ *OsRc* และพบการเปลี่ยนแปลงจำนวนมากในยีน จำนวน 7 ยีน ซึ่งเป็นยีนในวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ได้แก่ ยีน *OsZISO*, *OsCYP97A (Lut5)* และ *OsCYP97B* ยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ได้แก่ ยีน *OsSDG8*, *OsLCD (CCD1)*, *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1*

จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นความหลากหลายของลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในข้าวไทย ที่น่าจะทำงานร่วมกันในการสังเคราะห์ลูทีนทำให้ข้าวไทยมีปริมาณสารลูทีนแตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างของลำดับเบสในรูปแบบ SNP หรือ InDel เหล่านี้จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนได้

2. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการอ่านลำดับเบสอาร์เอ็นเอทั้งหมด (RNA-seq) ได้เครื่องหมายชนิด T-ARMS จำนวน 5 ยีน และจากการอ่านลำดับเบสของจีโนม (WGS) ได้เครื่องหมายชนิด T-ARMS และ InDel จำนวน 22 ยีน รวมเป็น 27 ยีน เมื่อนำไปทดสอบได้เครื่องหมายที่สามารถแยกจีโนไทป์ของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ก้าน้อยและลูกผสมรุ่นที่ F₁ ได้จำนวน 18 ยีน โดยเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนในวิธีสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ จำนวน 11 ยีน ได้แก่ *OsPSY1*, *OsPDS*, *OsZISO*, *OsZDS*, *OsCrtISO*, *OsLCYe*, *OsLCYb*, *OsCYP97A (Lut5)*, *OsCYP97B*, *OsCYP97C (Lut1)* และ *OsHYD3 (EHY)* ยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จำนวน 7 ยีน ได้แก่ *OsSDG8*, *OsLCD (CCD1)*, *OsNCED2 (CCD4b)*, *OsMADS26*, *OsWD40*, *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1*

3. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีน 18 ยีน กับปริมาณสารลูทีนในประชากร F_2 (ปทุมธานี 1 x ก้าน้อย) ด้วยการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ regression (R^2) พบเครื่องหมายของยีน *OsB2 (Kala4)* และ *OsB1* แสดงค่าสูงสุดคือ 17.13 และ 16.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นยีนโปรตีนควบคุมการถอดรหัส (transcription factor) ที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับสีของเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ซึ่งพบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจะมีปริมาณสารลูทีนสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลและขาว ตามลำดับ โดยสีของเยื่อหุ้มเมล็ดมีความสัมพันธ์เชิงบวกมีทิศทางเดียวกันกับค่าปริมาณสารลูทีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่าระดับความสัมพันธ์ 0.496 แสดงระดับความสัมพันธ์ปานกลาง ดังนั้นยีน *OsB2/B1* จึงน่าจะควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสีของเยื่อหุ้มเมล็ดและการสังเคราะห์สารลูทีน ที่ควรจะต้องทำการศึกษาต่อไป



บรรณานุกรม

- เรวัต เลิศฤทัยโยธิน. 2541. พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- แสงเดือน วณิชดำรงศักดิ์. 2555. การรับรู้ภาพลักษณ์และคุณภาพบริการ: กรณีศึกษาธนาคารเกียรตินาคิน สาขา กรุงเทพมหานครและปริมณฑล. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
- แสงทอง พงษ์เจริญกิต. 2561. การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ: จากความรู้พื้นฐานสู่เทคโนโลยีเอ็นจีเอส. สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ (งานสำนักพิมพ์) อาคารเทพศาสตร์สถิตย์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- จันทนา โชติมณี. 2564. รายงานภาพรวมตลาดข้าวในอาเซียน เดือนเมษายน 2564: กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์.
- จันทร์จิรา โรหิตเสถียร, ธาณี ศรีวงศ์ชัย, ประภาศรี พิจิตต์, และ รังสฤษดิ์ กาวิตะ. 2557. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสต่ำในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบบันทึกประวัติ (Marker Assisted Selection for Aroma and Low Amylose Content Traits in Pedigree Breeding of Rice (*Oryza sativa* L.)). **KKU Research Journal (Graduate Studies)**, 14(2), 15-22.
- จุฑาทพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทาง พันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. วารสารแก่นเกษตร, 40(3), 299-308.
- ชัชวาลย์ ศรีสวัสดิ์. 2548. ทรานสคริปโตมของมนุษย์, ทรานสคริปโตมิกส์และการประยุกต์ (Human Transcriptome, Transcriptomics, and Applications). [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://www.si.mahidol.ac.th/department/biochemistry/home/articles/transcriptomics%20synopsis.htm> (28 เมษายน 2565).
- ชัยวัช โขวเจริญสุข. 2565. แนวโน้มธุรกิจ/อุตสาหกรรม ปี 2565-67 อุตสาหกรรมข้าว. วิจัยกรุงศรี: ธนาคารกรุงศรีอยุธยา จำกัด (มหาชน).
- ดิสไทย (disthai). มปป. ลูทีน ประโยชน์สรรพคุณ และงานวิจัยข้อดีข้อเสีย. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.disthai.com/16653547/%E0%B8%A5%E0%B8%B9%E0%B8%97%E0%B8%B5%E0%B8%99> (10 ตุลาคม 2563).
- มุกกรีน สวนขวัญ และ จีรวุฒิ หลอมประโคน. 2564. องค์ประกอบของปัจจัยการตลาดและพฤติกรรม การซื้อผลิตภัณฑ์ข้าวบรรจุถุงเพื่อสุขภาพของผู้บริโภคในเขตกรุงเทพมหานคร. **University of the Thai Chamber of Commerce Journal Humanities and Social Sciences**, 41(4), 61-82.
- รัชณี คงคาอุยผาย และ ริญา เจริญศิริ. 2555. รายงานฉบับสมบูรณ์ “ศึกษาคูณค่าทางโภชนาการของข้าว

พื้นเมืองในเขตปฏิรูปที่ดิน อำเภอกุศุม จังหวัดยโสธร”: สำนักงานการปฏิรูปที่ดินเพื่อเกษตรกรรม (ส.ป.ก.).

- วิมล ศรีสุข. 2013. กินอะไร...ชะลอจอประสาทตาเสื่อม. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/189/ชะลอจอประสาทตาเสื่อมต้องกินอะไร/> (10 ตุลาคม 2563).
- วีรชัย มัธยัสถ์ถาวร, ประภา ศรีพิจิตร และ ธาณี ศรีวงศ์ชัย. 2562. สมรรถนะการผสมและความดีเด่นเหนือพ่อแม่ของสายพันธุ์ R ที่พัฒนาขึ้นจากข้าวไทย ในข้าวลูกผสมระบบ 3 สายพันธุ์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 50(2), 122-134.
- ศูนย์เลสิก (Laser Vision International LASIK Cente). มปป. สารลูทีน (Lutein) และ ซีแซนทีน (Zeaxanthin) มีความสำคัญต่อดวงตาอย่างไร. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.laservisionthai.com/health-corner/สารลูทีน-lutein-และ-ซีแซนทีน-zeaxanthin-มีความสำคัญต่อดวงตาอย่างไร> (10 ตุลาคม 2563).
- อนงค์นาฏ หรีจันดา, วราภรณ์ แสงทอง, แสงทอง พงษ์เจริญกิต, นฤมล เข็มกลัดเงิน, สมจริง รุ่งแจ้ง กฤษณะ ลาน้ำเที่ยง และ ช่อทิพา สกุศลสิงหาโรจน์. 2564. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวในประชากรข้าวที่ 2 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 กับก้าน้อย. วารสารแก่นเกษตร, 49(5), 1301-1312.
- Al-Babili, S. & Beyer, P. 2005. Golden Rice—five years on the road—five years to go? **Trends in plant science**, 10(12), 565-573.
- Alyethodi, R. R., Singh, U., Kumar, S., Alex, R., Deb, R., Sengar, G. S., Raja, T. & Prakash, B. 2018. T-ARMS PCR genotyping of SNP rs445709131 using thermostable strand displacement polymerase. **BMC research notes**, 11(1), 1-5.
- Ashokkumar, K., Govindaraj, M., Adhimoolam Karthikeyan, V. & Warkentin, T. D. 2020. Genomics-integrated breeding for carotenoids and folates in staple cereal grains to reduce malnutrition. **Frontiers in genetics**,
- Badro, H., Ndjondjop, M.-N., Furtado, A. & Henry, R. 2020. Sequence variants linked to key traits in interspecific crosses between African and Asian rice. **Plants**, 9(12), 1653.
- Bai, C., Capell, T., Berman, J., Medina, V., Sandmann, G., Christou, P. & Zhu, C. 2016. Bottlenecks in carotenoid biosynthesis and accumulation in rice endosperm are influenced by the precursor-product balance. **Plant Biotechnology Journal**, 14(1), 195-205.

- Cazzonelli, C. I. & Pogson, B. J. 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. **Trends in plant science**, 15(5), 266-274.
- Chen, Y., Li, F. & Wurtzel, E. T. 2010. Isolation and characterization of the *Z-ISO* gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants. **Plant Physiology**, 153(1), 66-79.
- Chettry, U. & Chrungoo, N. K. 2020. A multifocal approach towards understanding the complexities of carotenoid biosynthesis and accumulation in rice grains. **Briefings in Functional Genomics**, 19(4), 324-335.
- Chettry, U., Chrungoo, N. K. & Kulkarni, K. 2019. Comparative transcriptomics approach in elucidation of carotenoid biosynthesis regulation in grains of rice (*Oryza sativa* L.). **Scientific reports**, 9(1), 1631.
- Colasuonno, P., Lozito, M. L., Marcotuli, I., Nigro, D., Giancaspro, A., Mangini, G., De Vita, P., Mastrangelo, A. M., Pecchioni, N. & Houston, K. 2017. The carotenoid biosynthetic and catabolic genes in wheat and their association with yellow pigments. **BMC genomics**, 18(1), 122.
- Collins, A. & Ke, X. 2012. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. **The Open Bioinformatics Journal**, 6(1).
- Davidson, R. M., Gowda, M., Moghe, G., Lin, H., Vaillancourt, B., Shiu, S. H., Jiang, N. & Robin Buell, C. 2012. Comparative transcriptomics of three Poaceae species reveals patterns of gene expression evolution. **The Plant Journal**, 71(3), 492-502.
- Endo, A., Saika, H., Takemura, M., Misawa, N. & Toki, S. 2019. A novel approach to carotenoid accumulation in rice callus by mimicking the cauliflower *Orange* mutation via genome editing. **Rice**, 12(1), 1-5.
- Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R. P. & Pogson, B. J. 2016. Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants. **Trends in plant science**, 21(9), 792-803.
- Howe, E., Holton, K., Nair, S., Schlauch, D., Sinha, R. & Quackenbush, J. 2010. Mev: multiexperiment viewer. In **Biomedical informatics for cancer research** (pp. 267-277): Springer.
- Janphen, K., Sangtong, V., Sakulsingharoj, C., Leethanatudom, S., Phaisansuthichol, S. &


- Pongjaroenkit, S. 2019. Expression analysis of genes in carotenoid biosynthesis pathway from Thai rice with different pericarp colors. p. 111-118. In **Proceeding National Genetics Conference (NGC2019) "Genetics for Sustainable Development"**.
- Johnson, A. D. 2010. An extended IUPAC nomenclature code for polymorphic nucleic acids. **Bioinformatics**, 26(10), 1386-1389.
- Kim, J. K., Lee, S. Y., Chu, S. M., Lim, S. H., Suh, S.-C., Lee, Y.-T., Cho, H. S. & Ha, S.-H. 2010. Variation and correlation analysis of flavonoids and carotenoids in Korean pigmented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Journal of agricultural and food chemistry**, 58(24), 12804-12809.
- Li, J., Wang, S., Yu, J., Wang, L. & Zhou, S. 2013. A modified CTAB protocol for plant DNA extraction. **Chinese Bulletin of Botany**, 48(1), 72.
- Lu, S., Zhang, Y., Zhu, K., Yang, W., Ye, J., Chai, L., Xu, Q. & Deng, X. 2018. The citrus transcription factor *CsMADS6* modulates carotenoid metabolism by directly regulating carotenogenic genes. **Plant Physiology**, 176(4), 2657-2676.
- Lv, M.-Z., Chao, D.-Y., Shan, J.-X., Zhu, M.-Z., Shi, M., Gao, J.-P. & Lin, H.-X. 2012. Rice carotenoid β -ring hydroxylase *CYP97A4* is involved in lutein biosynthesis. **Plant and Cell Physiology**, 53(6), 987-1002.
- McCouch, S. R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K. B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z. & Xing, Y. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). **DNA research**, 9(6), 199-207.
- Medrano, R. F. V. & de Oliveira, C. A. 2014. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. **Molecular biotechnology**, 56(7), 599-608.
- Mesrian Tanha, H., Mojtabavi Naeini, M., Rahgozar, S., Rasa, S. M. M. & Vallian, S. 2015. Modified tetra-primer ARMS PCR as a single-nucleotide polymorphism genotyping tool. **Genetic testing and molecular biomarkers**, 19(3), 156-161.
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C. & Pogson, B. J. 2015. Carotenoid metabolism in plants. **Molecular plant**, 8(1), 68-82.
- Niu, G., Guo, Q., Wang, J., Zhao, S., He, Y. & Liu, L. 2020. Structural basis for plant lutein biosynthesis from α -carotene. **Proceedings of the National Academy**

- of **Sciences of the United States of America**, 117(25), 14150-14157.
- Pereira-Caro, G., Cros, G., Yokota, T. & Crozier, A. 2013. Phytochemical profiles of black, red, brown, and white rice from the Camargue region of France. **Journal of agricultural and food chemistry**, 61(33), 7976-7986.
- Pongjaroenkit, S., Kanokwan, J., Chotipa, S. & Varaporn, S. 2017. Development of allele-specific SNP markers for *PPR10* gene at Rf4 locus of Fertility Restorer Gene for Identification of Maintainer and Restorer lines. **Genomics and Genetics**, 10(1&2), 38-45.
- Rahman, M. M., Lee, K. E., Lee, E. S., Matin, M. N., Lee, D. S., Yun, J. S., Kim, J. B. & Kang, S. G. 2013. The genetic constitutions of complementary genes *Pp* and *Pb* determine the purple color variation in pericarps with cyanidin-3-O-glucoside depositions in black rice. **Journal of Plant Biology**, 56(1), 24-31.
- Ren, J., Zhang, F., Gao, F., Zeng, L., Lu, X., Zhao, X., Lv, J., Su, X., Liu, L. & Dai, M. 2020. Transcriptome and genome sequencing elucidates the molecular basis for the high yield and good quality of the hybrid rice variety Chuanyou6203. **Scientific reports**, 10(1), 1-15.
- Sala, A., Shoaib, M., Anufrieva, O., Mutharasu, G., Yli-Harja, O. & Kandhavelu, M. 2015. Origins of transcriptional transition: balance between upstream and downstream regulatory gene sequences. **MBio**, 6(1), e02182-02114.
- Shumskaya, M. & Wurtzel, E. T. 2013. The carotenoid biosynthetic pathway: thinking in all dimensions. **Plant Science**, 208(58-63).
- Stanley, L. & Yuan, Y.-W. 2019. Transcriptional regulation of carotenoid biosynthesis in plants: so many regulators, so little consensus. **Frontiers in Plant science**, 1017.
- Sun, T., Tadmor, Y. & Li, L. 2020. Pathways for carotenoid biosynthesis, degradation, and storage. In **Plant and Food Carotenoids** (pp. 3-23): Springer.
- Sun, T., Yuan, H., Cao, H., Yazdani, M., Tadmor, Y. & Li, L. 2018. Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. **Molecular plant**, 11(1), 58-74.
- Tanaka, T., Koyanagi, K. O. & Itoh, T. 2009. Highly diversified molecular evolution of downstream transcription start sites in rice and *Arabidopsis*. **Plant physiology**, 149(3), 1316-1324.

- Toth, A. L., Varala, K., Newman, T. C., Miguez, F. E., Hutchison, S. K., Willoughby, D. A., Simons, J. F., Egholm, M., Hunt, J. H. & Hudson, M. E. 2007. Wasp gene expression supports an evolutionary link between maternal behavior and eusociality. **Science**, 318(5849), 441-444.
- Villa-Rivera, M. G. & Ochoa-Alejo, N. 2020. Chili pepper carotenoids: nutraceutical properties and mechanisms of action. **Molecules**, 25(23), 5573.
- Watkins, J. L. & Pogson, B. J. 2020. Prospects for carotenoid biofortification targeting retention and catabolism. **Trends in plant science**, 25(5), 501-512.
- Welsch, R., Wüst, F., Bär, C., Al-Babili, S. & Beyer, P. 2008. A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. **Plant Physiology**, 147(1), 367-380.
- Wilantho, A., Praditsup, O., Charoenchim, W., Kulawonganunчай, S., Assawamakin, A. & Tongsimma, S. 2012. Next generation sequencing (NGS) technologies and their applications in omics-research. **Genomics and Genetics**, 5(2), 104-129.
- Wurtzel, E. T. 2019. Changing form and function through carotenoids and synthetic biology. **Plant physiology**, 179(3), 830-843.
- Xu, W., Dubos, C. & Lepiniec, L. 2015. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. **Trends in plant science**, 20(3), 176-185.
- Yu, X., Zhao, Z., Zheng, X., Zhou, J., Kong, W., Wang, P., Bai, W., Zheng, H., Zhang, H. & Li, J. 2018. A selfish genetic element confers non-Mendelian inheritance in rice. **Science**, 360(6393), 1130-1132.
- Zhou, X., Welsch, R., Yang, Y., Álvarez, D., Riediger, M., Yuan, H., Fish, T., Liu, J., Thannhauser, T. W. & Li, L. 2015. Arabidopsis OR proteins are the major posttranscriptional regulators of phytoene synthase in controlling carotenoid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 112(11), 3558-3563.



ภาคผนวก

The logo of Maejo University is a circular emblem. It features a central figure, likely a deity or a personification of knowledge, seated on a throne and holding a staff. The figure is surrounded by a golden, flame-like border. The emblem is set against a light green background. The text "มหาวิทยาลัยแม่โจ้" is written in Thai script along the top inner edge of the circle, and "MAEJO UNIVERSITY" is written in English along the bottom inner edge. The Thai text "แม่โจ้ ๒๕๓๗" is also visible at the bottom of the emblem.

ภาคผนวก ก
การค้นหาคำบริเวณ SNP และ InDel ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบส Transcriptome
Sequencing

Cluster ในแต่ละยีน			SNP			กำน้อย		กำใหญ่		กข-แม่ใจ 2		ปทุมธานี 1	
KO Name	Cluster	Length	POS	REF	ALT	BPR1.AD	BPR1.GT	BPR2.AD	BPR2.GT	WR1.AD	WR1.GT	WR2.AD	WR2.GT
<i>crtP</i>													
<i>ZDS, crtQ</i>	Cluster-12362.29396	2574	739	T	C	600,0	T/T	405,0	T/T	275,1	T/T	1,333	C/C
			901	C	G	422,0	C/C	276,1	C/C	181,0	C/C	2,249	G/G
			1635	G	A	770,1	G/G	561,0	G/G	434,0	G/G	0,425	A/A
			1735	G	A	1030,0	G/G	795,2	G/G	582,0	G/G	2,605	A/A
			2108	T	C	770,0	T/T	615,2	T/T	550,0	T/T	2,548	C/C
<i>ZISO</i>	Cluster-12362.26311	1628	718	T	C	195,0	T/T	117,0	T/T	0,85	C/C	0,74	C/C
			1130	C	A	251,0	C/C	150,0	C/C	0,125	A/A	0,136	A/A
			1309	T	A	104,0	T/T	142,0	T/T	0,44	A/A	0,40	A/A
<i>CYP97B2</i>	Cluster-12362.28097	2126	523	T	A	28,0	T/T	22,0	T/T	0,20	A/A	0,22	A/A
			1120	G	T	0,68	T/T	0,44	T/T	99,0	G/G	43,0	G/G
			1881	A	T	0,71	T/T	0,51	T/T	95,0	A/A	60,0	A/A
<i>ZEP</i>	Cluster-12362.17530	2872	1063	G	A	0,11	A/A	65,0	G/G	5,0	G/G	8,0	G/G
	Cluster-12362.26565	1558	480	C	A	0,31	A/A	63,0	C/C	27,0	C/C	14,0	C/C
			685	C	T	0,34	T/T	96,0	C/C	16,0	C/C	13,0	C/C

ตารางที่ 2 บริเวณ InDel ที่พบใน 27 cluster ของทั้ง 12 ยีน

Cluster ในแต่ละยีน			InDel			ก้าน้อย		ก้านใหญ่		กข-แมโจ 2		ปทุมธานี 1	
KO Name	Cluster	Length	POS	REF	ALT	BPR1.A D	BPR1.G T	BPR2. AD	BPR2. GT	WR1.A D	WR1.G T	WR2.A D	WR2.G T
<i>crtB, PSY</i>	Cluster-12362.37055	873											
	Cluster-12362.16775	967											
	Cluster-12362.18603	752											
	Cluster-12362.32683	658											
	Cluster-12362.18602	2267											
	Cluster-12362.24163	2337											
	Cluster-12362.25949	2426	207	TAA	T,TA	6,20,9	T/TA	8,19,3	TAA/T	5,21,10	T/TA	2,10,1	T/TA
<i>crtISO, crtH</i>			2417	TG	T	32,12	TG/T	28,7	TG/T	18,3	TG/T	26,11	TG/T
				T	TGGG	0,9	TGGGG/ TGGGG	0,6	TGGGG /TGGGG	0,4	TGGG G/TGG	0,6	TGGG G/TGG
			931		G				G		GG		GG
				G	GAGT	0,7	GAGTA	0,6	GAGTA	0,2	GAGTA	0,5	GAGTA
					ACGA		CGACG		CGACG		CGAC		CGAC
					CGCG		CGATC		CGATC		GCGAT		GCGAT
					ATCG		GT/GAG		GT/GA		CGT/G		CGT/G
				934	T		TACGAC		GTACG		AGTAC		AGTAC
							GCGAT		ACGCG		GACG		GACG
							CGT		ATCGT		CGATC		CGATC
										GT		GT	
	Cluster-12362.13869	3749											
	Cluster-12362.18671	3641											
	Cluster-12362.18670	3655											
	Cluster-12362.21644	3642											
<i>crtZ, BCH</i>	Cluster-12362.24674	616											
	Cluster-12362.23260	572											
	Cluster-12362.19683	700											
	Cluster-12362.24481	3298											
	Cluster-12362.25859	2845											
<i>lcyB, crtL1, crtY</i>	Cluster-12362.24829	2019											
<i>lcyE, crtL2</i>	Cluster-12362.27937	2946											
<i>LUT1, CYP97C1</i>	Cluster-12362.20190	4903											
<i>LUT5, CYP97A3</i>			1202	GA	G	2,8	GA/G	8,9	GA/G	23,0	GA/GA	20,3	GA/G
			3223	GAGC	G	73,0	GAGC/G AGC	47,0	GAGC/ GAGC	0,4	G/G	0,4	G/G
			3424	C	CCG	2,0	C/C	3,0	C/C	0,5	CCG/C CG	NA	./.
<i>PDS, crtP</i>	Cluster-12362.20727	2511											
<i>ZDS, crtQ</i>			2221	TTGA	T	223,1	TTGA/T TGA	202,2	TTGA/ TTGA	146,2	TTGA/ TTGA	0,241	T/T
	Cluster-12362.29396	2574	2448	AGTC	A	0,7	A/A	0,4	A/A	0,4	A/A	20,0	AGTCG GTACC TT/AG

ภาคผนวก ข
การค้นหาคำบริเวณ SNP และ InDel ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบส Whole Genome
Sequencing



ตารางที่ 1 บริเวณ SNP ที่พบในบริเวณยีนของทั้ง 28 ยีน

ลำดับที่	ยีนย่อชื่อ	Os.	ตำแหน่งที่พบ	การเปลี่ยนแปลง	Ref.		เทคนิค WGS				
					Allele 1	Allele 2	PTT1	RD MJU2	KN	KY	
1	<i>PSY1</i>	Os06g072900	N/A								
2	<i>PSY2</i>	Os12g0626400	N/A								
3	<i>PDS</i>	Os03g0184000	4,412,597	intron	C	T	T	T	C	C	
4	<i>ZISO</i>	Os12g0405200	12,206,881	exon3 = synonymous (Leu223=)	T	C	C	C	T	T	
			12,207,012	intron	T	A	A	A	T	T	
			12,207,120	intron	T	C	C	C	T	T	
			12,207,440	exon4 = missense (Ala-360-Glu)	C	A	A	A	C	C	
			12,207,619	3 prime UTR	T	A	A	A	T	T	
5	<i>ZDS</i>	Os07g0204900	N/A								
6	<i>CrtISO</i>	Os11g0572700	N/A								
7	<i>LCYb</i>	Os02g0190600	N/A								
8	<i>LCYe</i>	Os01g0581300	22,535,599	intron	A	T	T	T	A	A	
9	<i>EHY, HYD3</i>	Os03g0125100	N/A								
10	<i>BHY, HYD2</i>	Os10g0533500	N/A								
11	<i>CYP97A, Lut5</i>	Os02g0817900	35,092,097	3 prime UTR	G	T	G	G	T	T	
			35,092,112	3 prime UTR	C	T	C	C	T	T	
			35,092,234	3 prime UTR	C	T	C	C	T	T	
			35,092,952	3 prime UTR	T	C	C	C	T	T	
			35,093,037	3 prime UTR	G	T	G	G	T	T	
			35,093,684	intron	T	A	A	A	T	T	
			35,093,715	intron	T	C	T	T	C	C	
			35,094,024	intron	T	G	T	T	G	G	
			35,094,096	splice region	C	A	A	A	C	C	
			35,094,201	exon15 = missense (Val-623-Ile)	C	T	T	T	C	C	
			35,094,346	exon15 = missense (Glu-574-Asp)	C	A	A	A	C	C	
			35,094,610	intron	C	T	T	T	C	C	
			35,094,861	intron	G	A	A	A	G	G	
			35,095,097	intron	A	G	A	A	G	G	
			35,095,531	intron	C	T	C	C	T	T	
			35,095,669	intron	A	G	G	G	A	A	
			35,097,198	splice region and exon9 = synonymous (Tyr421=)	A	G	G	G	A	A	
			35,098,095	exon5 = missense (Thr-261-Ser)	T	A	T	T	A	A	
			35,098,099	exon5 = synonymous (Ala259=)	T	C	T	T	C	C	
			35,098,135	exon5 = premature stop codon (Tyr-247-*)	A	T	A	A	T	T	
			35,098,137	exon5 = missense (Tyr-247-Asp)	A	C	A	A	C	C	
			35,098,161	exon5 = missense (Thr-239-Ala)	T	C	C	C	T	T	
			35,098,188	intron	C	G	C	C	G	G	
			35,098,193	intron	C	G	C	C	G	G	
			35,098,197	intron	C	T	C	C	T	T	
			35,098,210	intron	T	A	T	T	A	A	
			35,098,232	intron	C	A	C	C	A	A	
35,098,234	intron	G	A	G	G	A	A				
35,098,348	exon4 = synonymous (Ala203=)	T	C	T	T	C	C				
35,098,374	intron	A	T	A	A	T	T				
35,098,385	intron	G	C	G	G	C	C				
35,098,398	intron	T	C	T	T	C	C				
35,098,399	intron	A	G	A	A	G	G				
35,098,543	intron	A	T	A	A	T	T				
35,098,550	intron	G	A	G	G	A	A				
35,098,566	intron	C	A	C	C	A	A				
35,098,610	intron and splice region	T	C	T	T	C	C				

ลำดับที่	ยีนย่อชื่อ	Os.	ตำแหน่งที่พบ	การเปลี่ยนแปลง	Ref.		เทคนิค WGS			
					Allele 1	Allele 2	PTT1	RD MJU2	KN	KY
			35,098,651	exon2 = synonymous (Tyr164)	A	G	A	A	G	G
			35,098,657	exon2 = synonymous (Leu162)	A	G	A	A	G	G
			35,098,744	exon2 = synonymous (Gly133)	G	A	G	G	A	A
			35,098,804	exon2 = synonymous (Leu113=)	A	C	A	A	C	C
			35,098,811	exon2 = missense (Val-111-Ala)	A	G	A	A	G	G
			35,098,870	intron	A	C	A	A	C	C
			35,098,887	intron	G	C	G	G	C	C
			35,099,060	exon1 = synonymous (Ser60=)	C	G	C	C	G	G
			35,099,063	exon1 = synonymous (Ala59=)	G	C	G	G	C	C
			35,099,068	exon1 = missense (Ala-58-Ser)	C	A	C	C	A	A
			35,099,077	exon1 = missense (Leu-55-Ile)	G	T	G	G	T	T
			35,099,096	exon1 = synonymous (Ser48=)	T	G	T	T	G	G
			35,099,150	exon1 = synonymous (Gly30=)	G	A	G	G	A	A
			35,099,274	5 prime UTR	A	G	A	A	G	G
			35,099,287	5 prime UTR	G	A	G	G	A	A
12	<i>CYP97B</i>	Os02g0173100	3,996,654	intron and splice region	C	T	T	T	C	C
			3,997,137	intron	G	A	A	A	G	G
			3,997,211	intron	C	G	G	G	C	C
			3,997,360	intron	C	T	T	T	C	C
			3,997,758	intron	T	A	A	A	T	T
			3,998,726	intron	T	A	A	A	T	T
			3,998,826	exon4 = missense (Asp-179-Glu)	T	A	A	A	T	T
			3,999,100	intron	C	T	C	A	T	T
			3,999,642	exon7 = missense (Arg-281-His)	G	A	A	A	G	G
			4,000,036	3 prime UTR	G	T	G	A	T	T
			4,000,560	intron	G	A	A	A	G	G
			4,000,583	intron	G	A	G	A	A	A
			4,000,743	intron	T	A	A	A	T	T
			4,000,869	intron	T	C	C	A	T	T
			4,000,891	intron	G	A	A	A	G	G
			4,001,036	intron	C	T	T	A	C	C
			4,001,868	intron	C	G	G	A	C	C
			4,002,136	intron	T	C	C	A	T	T
			4,002,179	intron	T	A	A	A	T	T
			4,002,334	3 prime UTR	A	C	C	A	C	C
			4,002,394	3 prime UTR	T	A	A	A	T	T
			4,002,637	3 prime UTR	A	G	G	A	A	A
13	<i>CYP97C, Lut1</i>	Os10g0546600	N/A							
14	<i>ZEP</i>	Os04g0448900	N/A							
15	<i>PSY3</i>	Os09g0555550	N/A							
16	<i>SDG8</i>	Os08g0244400	8,811,855	3 prime UTR	T	A	A	A	T	T
			8,811,898	3 prime UTR	G	A	A	A	G	G
			8,812,067	3 prime UTR	G	A	G	G	A	A
			8,812,075	3 prime UTR	T	C	C	C	T	T
			8,812,150	3 prime UTR	G	A	G	G	A	A
			8,812,223	3 prime UTR	C	G	G	G	C	C
			8,812,264	3 prime UTR	C	G	G	G	C	C
			8,812,271	3 prime UTR	C	G	G	G	C	C
			8,812,276	3 prime UTR	G	A	A	A	G	G
			8,812,533	exon11 = synonymous (Ala517=)	T	C	C	C	T	T
			8,812,539	exon11 = missense (Asn-515-Lys)	A	C	C	C	A	A
			8,812,680	exon10 = missense (Gly-500-Asp)	C	T	T	T	C	C
			8,812,685	exon10 = synonymous (Gly498=)	T	C	C	C	T	T
			8,812,758	intron and splice region	C	T	T	T	C	C
			8,812,764	intron	A	G	G	G	A	A
			8,812,765	intron	G	A	A	A	G	G

ลำดับที่	ยีนย่อชื่อ	Os.	ตำแหน่งที่พบ	การเปลี่ยนแปลง	Ref.		เทคนิค WGS			
					Allele 1	Allele 2	PTT1	RD MJU2	KN	KY
			8,812,770	intron	T	G	G	G	T	T
			8,812,834	intron	T	G	G	G	T	T
			8,812,919	exon9 = synonymous (Val457=)	T	C	C	C	T	T
			8,812,937	exon9 = synonymous (Gly451=)	C	A	A	A	C	C
			8,812,940	exon9 = synonymous (Tyr450=)	A	G	G	G	A	A
			8,812,943	exon9 = synonymous (Thr449=)	C	A	A	A	C	C
			8,813,012	exon9 = synonymous (Ser426=)	G	A	A	A	G	G
			8,813,059	intron and splice region	T	C	C	C	T	T
			8,813,071	intron	T	C	C	C	T	T
			8,813,137	intron	G	A	A	A	G	G
			8,813,148	intron	C	T	T	T	C	C
			8,813,361	exon8 = synonymous (Thr395=)	A	C	C	C	A	A
			8,813,362	exon8 = missense (Thr-395-Ile)	G	A	G	G	A	A
			8,813,435	exon8 = missense (Leu-371-Val)	G	C	C	C	G	G
			8,813,470	exon8 = missense (Arg-359-Gln)	C	T	T	T	C	C
			8,813,821	intron	G	C	C	C	G	G
			8,813,845	intron	T	A	A	A	T	T
			8,813,847	intron	A	G	G	G	A	A
			8,813,868	intron and splice region	G	A	A	A	G	G
			8,813,973	intron	T	C	C	C	T	T
			8,813,979	intron	A	T	T	T	A	A
			8,814,085	exon5 = missense (Arg-237-Trp)	G	A	G	G	A	A
			8,814,104	exon5 = synonymous (Leu230=)	C	T	T	T	C	C
			8,814,206	intron	A	C	C	C	A	A
			8,814,243	intron	C	T	T	T	C	C
			8,814,247	intron	T	C	C	C	T	T
			8,814,256	intron	G	A	G	G	A	A
			8,814,461	intron and splice region	T	C	C	C	T	T
			8,814,471	exon4 = missense (Gly-212-Asp)	C	T	T	T	C	C
			8,814,623	intron	T	G	G	G	T	T
			8,814,695	intron	G	C	C	C	G	G
			8,814,705	intron	A	G	G	G	A	A
			8,814,792	intron	T	A	A	A	T	T
			8,814,848	intron	T	C	C	C	T	T
			8,814,889	intron	A	C	C	C	A	A
			8,814,943	intron	C	A	A	A	C	C
			8,814,953	intron	T	C	C	C	T	T
			8,814,999	intron	A	T	T	T	A	A
			8,815,004	intron	T	C	C	C	T	T
			8,815,006	intron	A	G	G	G	A	A
			8,815,074	intron	A	T	T	T	A	A
			8,815,128	exon3 = synonymous (Glu162=)	C	T	T	T	C	C
			8,815,189	exon3 = missense (Asp-142-Gly)	T	C	C	C	T	T
			8,815,223	exon3 = missense (Ile-131-Leu)	T	G	G	G	T	T
			8,815,287	exon3 = synonymous (Thr109=)	C	T	T	T	C	C
			8,815,350	exon3 = synonymous (Phe88=)	G	A	A	A	G	G
			8,815,356	exon3 = missense (Asp86Glu)	A	C	C	C	A	A
			8,815,380	intron and splice region	A	G	G	G	A	A
			8,815,403	intron	C	A	A	A	C	C
			8,815,417	intron	T	A	A	A	T	T
			8,815,426	intron	A	G	G	G	A	A
			8,815,429	intron	G	A	A	A	G	G
			8,815,461	intron	A	G	G	G	A	A
			8,815,475	intron	G	T	T	T	G	G
			8,815,516	exon2 = missense (Ala-70-Ser)	C	A	A	A	C	C
			8,815,526	exon2 = missense (Ile-66-Met)	T	C	C	C	T	T
			8,815,598	exon2 = synonymous (Arg42=)	T	C	C	C	T	T

ลำดับที่	ชื่อย่อชื่อ	Os.	ตำแหน่งที่พบ	การเปลี่ยนแปลง	Ref.		เทคนิค WGS			
					Allele 1	Allele 2	PTT1	RD MJU2	KN	KY
			8,815,637	intron	A	G	G	G	A	A
			8,815,639	intron	T	C	C	C	T	T
			8,815,661	intron	C	T	T	T	C	C
			8,815,667	intron	C	A	A	A	C	C
			8,816,062	intron	T	G	G	G	T	T
			8,816,068	intron	A	C	C	C	A	A
			8,816,074	intron	T	C	C	C	T	T
			8,816,168	intron	A	T	T	T	A	A
			8,816,183	intron	C	T	T	T	C	C
			8,816,270	intron	T	C	C	C	T	T
			8,816,313	intron	G	A	A	A	G	G
			8,816,333	intron	C	T	T	T	C	C
			8,816,344	intron	A	C	C	C	A	A
			8,816,381	intron	A	G	G	G	A	A
			8,816,384	intron	C	G	G	G	C	C
			8,816,444	intron	G	T	T	T	G	G
			8,816,520	exon1 = missense (Gln-27-Glu)	G	C	C	C	G	G
			8,816,524	exon1 = synonymous (Leu25=)	A	G	G	G	A	A
			8,816,538	exon1 = missense (Arg-21-Cys)	G	A	A	A	G	G
			8,816,635	5 prime UTR	A	T	T	T	A	A
			8,816,687	5 prime UTR	T	C	T	T	C	C
17	<i>Or</i>	Os02g0651300	N/A							
18	<i>CCD4a</i>	Os02g0704000	N/A							
19	<i>CCD4b</i>	Os12g0435200	N/A							
20	<i>LCD</i>	Os12g0640600	27,466,069	intron	A	G	G	G	A	A
			27,467,073	intron	T	A	T	T	A	A
			27,468,861	intron	A	G	A	A	G	G
			27,470,789	exon12 = missense (Ala-418-Thr)	G	A	A	A	G	G
			27,471,082	intron	A	T	T	T	A	A
21	<i>DnaJ</i>	Os05g0562300	N/A							
22	<i>DnaJ10</i>	Os08g0522600	N/A							
23	<i>MADS26</i>	Os08g0112700	N/A							
24	<i>WD40</i>	Os02g0682500	N/A							
25	<i>C1</i>	Os06g0205100	N/A							
26	<i>B1</i>	Os04g0557800	27,950,427	intron	C	T	T	T	C	C
			27,950,460	intron	T	C	C	C	T	T
			27,950,475	intron	G	A	A	A	G	G
			27,950,495	intron	C	T	T	T	C	C
			27,950,501	intron	G	A	A	A	G	G
			27,950,508	intron	T	G	G	G	T	T
			27,950,514	intron	A	G	G	G	A	A
			27,950,522	intron	G	A	A	A	G	G
			27,950,564	exon10 = missense (Arg-427-Lys)	C	T	T	T	C	C
			27,950,862	exon10 = missense (Ser-328-Gly)	T	C	C	C	T	T
			27,950,923	exon10 = synonymous (Pro307=)	C	T	T	T	C	C
			27,951,418	intron	G	A	A	A	G	G
			27,951,439	intron	C	G	G	G	C	C
			27,951,479	intron	C	G	G	G	C	C
			27,951,656	intron	C	G	G	G	C	C
			27,951,677	intron	A	C	C	C	A	A
			27,951,678	intron	C	G	G	G	C	C
			27,951,682	intron	G	T	T	T	G	G
			27,951,702	intron	G	C	C	C	G	G
			27,951,780	intron	G	A	A	A	G	G
			27,951,789	intron	A	G	G	G	A	A
			27,951,820	intron	A	T	T	T	A	A
			27,951,856	intron	C	T	T	T	C	C

ลำดับที่	ยีนย่อชื่อ	Os.	ตำแหน่งที่พบ	การเปลี่ยนแปลง	Ref.		เทคนิค WGS			
					Allele 1	Allele 2	PTT1	RD MJU2	KN	KY
			27,952,081	intron	A	T	T	T	A	A
			27,952,172	intron	C	T	T	T	C	C
			27,952,507	intron	C	T	T	T	C	C
			27,952,559	intron	T	C	C	C	T	T
			27,952,567	intron	C	T	T	T	C	C
			27,952,572	intron	C	T	T	T	C	C
			27,952,870	intron	T	A	A	A	T	T
			27,952,905	intron	G	A	A	A	G	G
			27,952,962	intron	G	A	A	A	G	G
			27,953,059	intron	G	A	A	A	G	G
			27,953,172	intron	T	G	G	G	T	T
			27,953,224	intron	C	T	T	T	C	C
			27,953,467	intron	A	G	G	G	A	A
			27,953,508	intron	T	C	C	C	T	T
			27,953,525	intron	T	C	C	C	T	T
			27,953,645	intron	T	C	C	C	T	T
			27,953,673	intron	G	A	A	A	G	G
			27,953,678	intron	C	T	T	T	C	C
			27,953,839	intron	G	T	T	T	G	G
			27,953,912	exon6 = missense (Arg-122-Gly)	G	C	C	C	G	G
			27,953,982	exon6 = synonymous (Ala98=)	T	C	C	C	T	T
			27,954,360	intron	C	A	A	A	C	C
			27,955,200	intron	T	C	C	C	T	T
			27,955,428	intron	C	T	T	T	C	C
			27,955,512	5 prime UTR	C	G	G	G	C	C
			27,955,568	5 prime UTR	A	T	T	T	A	A
			27,955,589	5 prime UTR	C	T	T	T	C	C
			27,955,609	5 prime UTR	A	C	C	C	A	A
27	B2_Kala4	Os04g0557500	27,915,619	3 prime UTR	T	C	C	C	T	T
			27,915,625	3 prime UTR	C	A	A	A	C	C
			27,915,705	3 prime UTR	G	A	A	A	G	G
			27,915,741	3 prime UTR	C	T	T	T	C	C
			27,915,746	3 prime UTR	C	T	T	T	C	C
			27,915,871	3 prime UTR	C	A	A	A	C	C
			27,916,875	intron	A	C	C	C	A	A
			27,916,895	intron	G	C	C	C	G	G
			27,916,949	intron	G	A	A	A	G	G
			27,917,136	intron	C	T	T	T	C	C
			27,917,156	intron	T	C	C	C	T	T
			27,917,157	intron	G	A	A	A	G	G
			27,917,227	intron	A	T	T	T	A	A
			27,917,281	intron	T	C	C	C	T	T
			27,917,392	intron	T	A	A	A	T	T
			27,917,398	intron	T	C	C	C	T	T
			27,917,421	intron	C	A	A	A	C	C
			27,917,508	intron	A	C	C	C	A	A
			27,917,529	intron	T	C	C	C	T	T
			27,917,537	intron	A	T	T	T	A	A
			27,917,543	intron	G	C	C	C	G	G
			27,917,552	intron	T	C	C	C	T	T
			27,917,599	intron	T	A	A	A	T	T
			27,917,602	intron	A	T	T	T	A	A
			27,917,649	intron	C	T	T	T	C	C
			27,917,683	intron	G	A	A	A	G	G
			27,917,700	intron	A	G	G	G	A	A
			27,917,708	intron	T	A	A	A	T	T
			27,917,719	intron	G	A	A	A	G	G

ลำดับที่	ยีนย่อชื่อ	Os.	ตำแหน่งที่พบ	การเปลี่ยนแปลง	Ref.		เทคนิค WGS			
					Allele 1	Allele 2	PTT1	RD MJU2	KN	KY
			27,917,754	intron	A	G	G	G	A	A
			27,917,868	intron	A	G	G	G	A	A
			27,917,908	intron	T	A	A	A	T	T
			27,917,909	intron	T	C	C	C	T	T
			27,917,941	intron	G	A	A	A	G	G
			27,917,950	intron	G	A	A	A	G	G
			27,917,955	intron	C	A	A	A	C	C
			27,917,977	intron	G	T	T	T	G	G
			27,917,984	intron	A	C	C	C	A	A
			27,917,985	intron	G	A	A	A	G	G
			27,917,999	intron	A	C	C	C	A	A
			27,918,108	intron	C	T	T	T	C	C
			27,918,166	intron	A	T	T	T	A	A
			27,918,210	intron	T	C	C	C	T	T
			27,918,213	intron	C	T	T	T	C	C
			27,918,279	intron	C	T	T	T	C	C
			27,918,285	intron	G	T	T	T	G	G
			27,918,286	intron	A	G	G	G	A	A
			27,918,315	intron	G	A	A	A	G	G
			27,918,333	intron	G	A	A	A	G	G
			27,918,347	intron	C	T	T	T	C	C
			27,918,375	intron	C	T	T	T	C	C
			27,918,377	intron	G	T	T	T	G	G
			27,918,641	intron	G	A	A	A	G	G
			27,918,700	intron	C	T	T	T	C	C
			27,926,207	intron	A	G	G	G	A	A
			27,926,396	intron	C	T	T	T	C	C
			27,930,979	intron	G	A	A	A	G	G
			27,930,995	intron	C	T	T	T	C	C
			27,931,054	intron	C	T	T	T	C	C
			27,931,093	intron	T	A	A	A	T	T
			27,931,417	exon4 = synonymous (Arg165=)	G	A	A	A	G	G
			27,931,428	intron and splice region	A	G	G	G	A	A
			27,931,973	intron	A	G	G	G	A	A
			27,932,107	intron	A	G	G	G	A	A
			27,932,110	intron	G	A	A	A	G	G
			27,932,676	intron and splice region	T	G	G	G	T	T
			27,932,721	intron	T	A	A	A	T	T
			27,932,726	intron	T	C	C	C	T	T
			27,932,744	intron	G	A	A	A	G	G
			27,932,772	intron	C	T	T	T	C	C
			27,932,775	intron	G	A	A	A	G	G
			27,932,782	intron	G	A	A	A	G	G
			27,932,832	intron	A	G	G	G	A	A
			27,932,890	intron	T	A	A	A	T	T
			27,932,923	intron	T	A	A	A	T	T
			27,932,994	intron	C	T	T	T	C	C
			27,933,000	intron	C	T	T	T	C	C
			27,933,324	intron	T	A	A	A	T	T
			27,935,717	intron	T	C	C	C	T	T
			27,935,718	intron	A	G	G	G	A	A
			27,935,890	intron	T	C	C	C	T	T
			27,936,816	intron	G	T	T	T	G	G
			27,936,830	intron	C	T	T	T	C	C
			27,936,849	intron	T	C	C	C	T	T
			27,937,461	intron	T	C	C	C	T	T
			27,939,166	intron	A	G	G	G	A	A

ลำดับที่	ชื่อย่อชื่อ	Os.	ตำแหน่งที่พบ	การเปลี่ยนแปลง	Ref.		เทคนิค WGS			
					Allele 1	Allele 2	PTT1	RD MJU2	KN	KY
28	Rc	Os07g0211500	N/A							

หมายเหตุ: N/A คือ ไม่พบตำแหน่งบนยีนที่แยกข้าวกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำได้



ตารางที่ 2 บริเวณ InDel ที่พบในบริเวณยีนของทั้ง 28 ยีน

ลำดับที่	ยีนชื่อ	Os.	ตำแหน่งที่พบ	การเปลี่ยนแปลง	Ref.		เทคนิค WGS				
					Allele 1	Allele 2	PTT1	RD MJU2	KN	KY	
1	<i>PSY1</i>	Os06g072900	N/A								
2	<i>PSY2</i>	Os12g0626400	N/A								
3	<i>PDS</i>	Os03g0184000	4,411,054	intron	G	GTGCATTCG GCACGCGCA ATTTCTTTT CCCCAGTCA GCCACCTTT TCGGTGACG GT	GTGCATTC GGCACGC GCAATTC TTTTCCC AGTCAGC CACCTTT CGGTGCA GGT	GTGCATT CGGCACG CGCAATTT CTTTTCCC CAGTCAG CCACCTTT TCGGTGC AGGT	G	G	
4	<i>ZISO</i>	Os12g0405200	12,204,484 12,204,486 12,205,963 12,206,218 12,206,313 12,206,410 12,207,052 12,207,707	5 prime UTR 5 prime UTR intron intron intron intron intron downstream gene	CA CCACCACCA CCACCA A C GAC A GTTT A	C C AAC CTGTG G AT G ATAAAATGC ACCGATTCA TCAAACACC TCTCTCCTC TGACCCTTA GAT	C C AAC CTGTG G AT G ?	C C AAC CTGTG G AT G A	CA CCACCAC CACCACC A A C GAC A GTTT A	CA CCACCAC CACCACC A A C GAC A GTTT A	
5	<i>ZDS</i>	Os07g0204900	N/A								
6	<i>CrtISO</i>	Os11g0572700	N/A								
7	<i>LCYb</i>	Os02g0190600	N/A								
8	<i>LCYe</i>	Os01g0581300	N/A								
9	<i>EHY, HYD3</i>	Os03g0125100	N/A								
10	<i>BHY, HYD2</i>	Os10g0533500	N/A								
11	<i>CYP97A, Lut5</i>	Os02g0817900	35,093,967 35,097,919 35,097,922 35,097,946 35,098,433 35,098,441 35,098,520 35,098,573 35,098,839 35,098,896	intron intron intron intron intron intron and splice region intron and splice region intron intron intron and splice region	GAA TGA A CA T CA TG GGGAGTTGC AG TGAGAGAGA GAGA	G,GA T ACG C TG C T G A	GA TGA A CA T TG GGGAGTT GC AG TGAGAGA	GA TGA A CA T TG GGGAGTT GC AG TGAGAGA	G T ACG C TG C T G A T	G T ACG C TG C T G A T	

ลำดับที่	ชื่อย่อชื่อ	Os.	ตำแหน่งที่พบ	การเปลี่ยนแปลง	Ref.		เทคนิค WGS			
					Allele 1	Allele 2	PTT1	RD MJU2	KN	KY
			35,099,026	exon1 = inframe deletion	AGCCGTC	A	AGCCGTC	AGCCGTC	A	A
			35,099,050	exon1 = inframe insertion	C	CGTT	C	C	CGTT	CGTT
			35,099,093	exon1 = inframe insertion	A	AC	A	A	AC	AC
			35,099,094	exon1 = inframe insertion	G	GAC	G	G	GAC	GAC
			35,099,107	exon1 = inframe deletion	CAGCAGCAG CAGA	C	CAGCAGC AGCAGA	CAGCAGC AGCAGA	C	C
			35,099,173	exon1 = inframe insertion	G	GAGC				
12	<i>CYP97B</i>	Os02g0173100	3,996,743	intron	AT	A	A	A	AT	AT
			4,001,826	intron	TCGTGACAA CATCTCC	T	T	T	TCGTGAC AACATCTC C	TCGTGAC AACATCTC C
13	<i>CYP97C, Lut1</i>	Os10g0546600	N/A							
14	<i>ZEP</i>	Os04g0448900	N/A							
15	<i>PSY3</i>	Os09g055550	N/A							
16	<i>SDG8</i>	Os08g0244400	8,811,854	3 prime UTR	A	AG	AG	AG	A	A
			8,811,862	3 prime UTR	C	CTA	CTA	CTA	C	C
			8,813,116	intron	TA	T	T	T	TA	TA
			8,813,224	intron	C	CT	CT	CT	C	C
			8,813,504	intron and splice region	GA	G	GA	GA	G	G
			8,814,298	intron	C	CGA	CGA	CGA	C	C
			8,814,346	intron	T	TAAAAA	TAAAAA	TAAAAA	T	T
			8,814,765	intron	TTAA	T	T	T	TTAA	TTAA
			8,814,865	intron	GA	G	G	G	GA	GA
			8,814,903	intron	T	TATAC	TATAC	TATAC	T	T
			8,815,056	intron	AGT	A	A	A	AGT	AGT
			8,815,072	intron	TG	T	T	T	TG	TG
			8,816,332	intron	T	TA	TA	TA	T	T
			8,816,480	intron	T	TG	TG	TG	T	T
			8,816,605	5 prime UTR	CG	C	C	C	CG	CG
			8,816,650	5 prime UTR	TGAA	T	T	T	TGAA	TGAA
17	<i>Or</i>	Os02g0651300	N/A							
18	<i>CCD4a</i>	Os02g0704000	N/A							
19	<i>CCD4b</i>	Os12g0435200	N/A							
20	<i>LCD</i>	Os12g0640600	27,464,843	5 prime UTR	TAAGCAGAA GCAGACGCA CCA	T	TAAGCAG AAGCAGA CGCACCA	TAAGCAG AAGCAGA CGCACCA	T	T
			27,465,846	intron	TATTC	T	TATTC	TATTC	T	T
21	<i>DnaJ</i>	Os05g0562300	N/A							
22	<i>DnaJ10</i>	Os08g0522600	N/A							
23	<i>MADS26</i>	Os08g0112700	N/A							

ลำดับที่	ชื่อย่อชื่อ	Os.	ตำแหน่งที่พบ	การเปลี่ยนแปลง	Ref.		เทคนิค WGS				
					Allele 1	Allele 2	PTT1	RD MJU2	KN	KY	
24	WD40	Os02g0682500	N/A								
25	C1	Os06g0205100	5,316,058	intron	TACTGGAAC AG	T	T	T	TACTGGA ACAG	TACTGGA ACAG	
26	B1	Os04g0557800	27,949,921	exon11 = frameshift deletion	GAC	G	GAC	GAC	G	G G	
			27,950,387	intron	C	CT	CT	CT	C	C C	
			27,951,681	intron	C	CCATAATA	CCATAATA	CCATAATA	C	C C	
			27,951,738	intron	TCAAA	T	T	T	TCAAA	TCAAA	
			27,951,760	intron	T	TTG	TTG TTG	TTG TTG	T	T	
			27,952,360	intron	ATAGCGAGA GAACAACAG TTCGTTACA GTATAC	A	A A	A A	ATAGCGA GAGAACA ACAGTTC GTTACAGT ATAC	ATAGCGA GAGAACA ACAGTTC GTTACAG TATAC	
			27,952,553	intron	A	AC	AC	AC	A	A	
			27,953,062	intron	CT	C	C C	C C	CT	CT	
			27,953,500	intron	CT	C	C C	C C	CT	CT	
			27,953,560	intron	GA	G	G G	G G	GA	GA	
			27,954,225	intron	TGTGTGGC GCGC	T	T T	T T	TGTGTGC GCGCGC	TGTGTGC GCGCGC	
			27,954,994	intron	T	TA	TA	TA	T	T	
27	B2_Kala4	Os04g0557500	27,915,944	3 prime UTR	GAC	G	G	G	GAC	GAC	
			27,916,974	intron	TC	T	T	T	TC	TC	
			27,916,980	intron	AAAAAAAAAT	A	A	A	AAAAAAAA T	AAAAAAA AT	
			27,917,173	intron	G	GCA	GCA	GCA	G	G	
			27,917,174	intron	TGTA	T	T	T	TGTA	TGTA	
			27,917,378	intron	C	CA	CA	CA	C	C	
			27,917,454	intron	G	GAA	GAA	GAA	G	G	
			27,917,581	intron	TTTG	T	T	T	TTTG	TTTG	
			27,917,591	intron	T	TAAGAAA	TAAGAAA	TAAGAAA	T	T	
			27,918,325	intron	C	CAAAAA	CAAAAA	CAAAAA	C	C	
			27,918,689	intron	CG	C	C	C	CG	CG	
			27,918,692	intron	CT	C	C	C	CT	CT	
			27,918,703	intron	C	CTCTTTTT TCTTTT	CTCTTTTT TCTTTT	CTCTTTTT TCTTTT	C	C	
			27,930,947	intron	G	GGTTATTTT GAA	GGTTATTT TGAA	GGTTATTT TGAA	G	G	
			27,931,356	intron	T	TCAATTTGA AAACTGAAA TACTCCGTA CTATGTACA GTATACAC	TCAATTTG AAACTG AAATACTC CGTACTAT GTACAGT ATACAC	TCAATTTG AAACTG AAATACTC CGTACTAT GTACAGT ATACAC	T	T	
			27,931,990	intron	T	TA	TA	TA	T	T	
			27,932,275	intron	T	TTC	TTC	TTC	T	T	

ลำดับที่	ยีนยอชื่อ	Os.	ตำแหน่งที่พบ	การเปลี่ยนแปลง	Ref.		เทคนิค WGS			
					Allele 1	Allele 2	PTT1	RD MJU2	KN	KY
			27,932,796	intron	A	AGTT	AGTT	AGTT	A	A
			27,936,131	intron	CG	C	C	C	CG	CG
28	Rc	Os07g0211500	N/A							

หมายเหตุ: N/A คือ ไม่พบตำแหน่งบนยีนที่แยกข้าวกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำได้





ภาคผนวก ค

ปริมาณสารลูทีนและซีแซนทีนกับจีโนไทป์ของ 18 เครื่องหมาย ในประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น

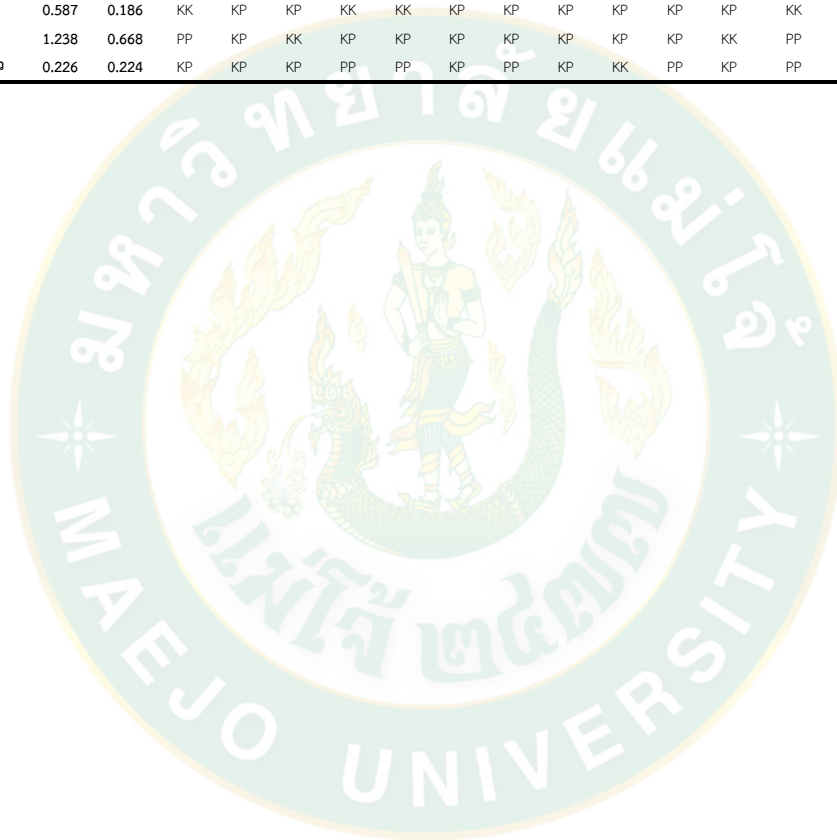
No.	ชื่อ	เทคนิค HPLC		carotenoid biosynthetic pathway										SET domain	cleavage		TFs				
		lutein (mg/100 g)	zeaxanthin (mg/100 g)	1_G	2_G	3_T	4_T	5_G	6_G	7_G	8_T	9_G	10_T	11_G	12_G	13_G	14_G	15_G	16_G	17_G	18_G
				<i>PSY1</i>	<i>PDS</i>	<i>ZISO</i>	<i>ZDS</i>	<i>CrISO</i>	<i>LCYe</i>	<i>LCYb</i>	<i>CYP97A4</i>	<i>CYP97C</i>	<i>CYP97B2</i>	<i>HYD3</i>	<i>SDG8</i>	<i>LCD</i>	<i>CCD4b</i>	<i>WD40</i>	<i>MADS26</i>	<i>B1</i>	<i>B2_Kalca4</i>
95	ขาว	0.062	0.017	KK	KP	KK	KK	PP	KP	PP	KP	KK	PP	KP	PP	KP	PP	PP	PP	KP	
96	น้ำตาล	0.257	0.154	KP	KP	PP	PP	PP	PP	KK	KP	KK	KK	KP	PP	PP	PP	PP	KP	KP	KP
97	ดำ	0.651	0.151	KP	KP	PP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	PP	PP	PP	KP	KP
98	ดำ	0.445	0.139	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	PP	KK	KP	KP	PP	KK	KK	KK
99	ดำ	0.627	0.262	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	PP	KK	KK	KK
100	ดำ	0.506	0.161	PP	KK	KK	KP	KP	KP	PP	KP	PP	PP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KK
101	ขาว	0.135	0.064	KP	KP	KP	KK	KK	KP	KK	KP	KK	KK	KP	KP	KP	KK	KP	PP	PP	PP
102	ดำ	0.454	0.177	KK	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	KK	PP	KP	PP	PP	KK	KK	KK
103	ดำ	0.740	0.332	PP	KK	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP
104	ดำ	0.640	0.327	KP	KP	PP	KP	KK	KP	PP	KP	KK	PP	KP	KK	PP	KP	KK	KK	KK	KK
105	ดำ	0.518	0.171	KK	KP	KP	KK	KP	KP	KK	KP	KK	KP	PP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP
106	น้ำตาล	0.509	0.226	KK	KP	PP	KP	PP	KP	KP	PP	PP	KP	KP	PP	KK	PP	PP	PP	KP	KP
107	น้ำตาล	0.581	0.290	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
108	ขาว	0.071	0.052	PP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	PP	KK	PP	KP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP
109	ขาว	0.045	0.032	KP	PP	KK	PP	KP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP
110	ดำ	0.503	0.182	KK	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KK	KP	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KK
111	ดำ	0.842	0.372	KP	PP	KP	KP	KP	KK	KK	KP	KP	KK	PP	KK	KK	KP	KP	KP	KP	KP
112	ดำ	0.795	0.368	PP	KK	KP	KP	KK	KP	KK	KP	KK	KK	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP
113	ขาว	0.324	0.405	PP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KK	KP	PP	KP	PP	PP	PP
114	ขาว	0.135	0.104	KP	KK	KK	KP	KK	KP	KP	PP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	PP	PP
115	ดำ	0.561	0.253	KK	KK	KK	KP	KP	KP	PP	KK	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP
116	ดำ	0.532	0.000	PP	KK	PP	KK	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	PP	KK	PP	KK	KK	KK
117	น้ำตาล	0.251	0.148	KP	PP	KP	KK	PP	KP	KP	PP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP
118	ดำ	0.164	0.417	KP	KK	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
119	ดำ	0.070	0.267	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KK	KP	KK	KK	KP	KK	KP	KP	PP	KP	KP	KP
120	ขาว	0.125	0.231	PP	PP	KK	KP	PP	KP	KK	KP	PP	KK	PP	KP	KK	KP	KP	PP	PP	PP
121	ดำ	0.179	0.153	KP	KP	KP	KK	KP	KP	PP	KK	PP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KK	KK	KK
122	ดำ	0.305	0.146	KP	KK	PP	KK	PP	KP	KP	KK	KP	KK	KP	PP	PP	KK	KK	KP	KP	KP
123	ขาว	0.120	0.144	PP	PP	PP	KK	KP	KP	PP	PP	PP	KP	KP	PP	PP	KP	KK	PP	PP	PP
124	น้ำตาล	0.241	0.145	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KK	KP	KK	KP	PP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP
125	น้ำตาล	0.479	0.292	KP	KP	KK	KP	KK	KP	KK	KK	KP	PP	KP	KP	KK	KP	KK	KP	KP	KP
126	ดำ	0.405	0.257	KP	KP	KK	KK	KK	KK	KP	PP	KK	KP	KP	KP	KK	KP	PP	KP	KP	KP
127	ดำ	0.347	0.198	KK	KP	PP	KK	PP	KP	KP	PP	PP	PP	PP	KP	PP	KK	KP	KP	KP	KP
128	ดำ	0.294	0.320	PP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KK	KP	KP	KP	KK	KP	KP
129	ขาว	0.228	0.206	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	PP	PP	KP	KP	KK	KK	PP	PP	PP
130	ดำ	0.464	0.294	KP	KP	KK	KK	KK	KK	KP	KP	PP	KK	KP	KK	KP	PP	KK	KP	KP	KP
131	น้ำตาล	0.179	0.220	KP	KK	KK	KP	KP	KP	PP	PP	KP	KP	PP	PP	KP	PP	KP	KP	KP	KP
132	ดำ	0.200	0.127	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KK	KP	KP	KP	PP	PP	PP
133	ดำ	0.273	0.226	KP	KP	KP	KK	KK	KP	KP	KP	PP	KP	PP	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KP
134	ดำ	0.273	0.227	PP	KP	PP	PP	KP	KP	KK	KP	PP	KK	KP	PP	KP	PP	KK	KK	KP	KP
135	ดำ	0.182	0.242	KP	PP	KK	KP	KK	PP	KP	PP	PP	KP	PP	KK	KK	KP	PP	KK	KK	KK
136	ดำ	0.187	0.225	KK	KK	KP	KP	PP	PP	KP	PP	KP	KP	PP	PP	KP	KP	KP	KK	KK	KK
137	น้ำตาล	0.173	0.153	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KK	KP	PP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP
138	ขาว	0.168	0.329	KP	KP	KP	KP	KK	KK	KK	KP	PP	PP	PP	KP	KP	KP	KK	PP	PP	PP
139	ดำ	0.141	0.138	PP	KP	PP	KP	PP	KP	KK	PP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	PP	KK	KK	KK
140	ขาว	0.195	0.244	KP	KP	KP	PP	PP	KP	KK	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	PP	PP
141	ขาว	0.192	0.207	KP	KK	KK	KK	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	PP	KP	KK	PP	PP	PP	PP
142	ขาว	0.203	0.329	KP	KK	PP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KK	KP	PP	KP	KP	PP	PP	PP
143	ดำ	0.087	0.191	KP	KP	KK	KP	KP	PP	KK	PP	PP	PP	KP	KK	KP	KP	PP	KK	KK	KK
144	ขาว	0.188	0.378	PP	KK	KK	KP	PP	KP	KK	PP	KP	KK	KP	KP	KK	PP	KK	PP	PP	PP

No.	Sex	เทคนิค HPLC		carotenoid biosynthetic pathway										SET domain	cleavage		TFs					
		lutein (mg/100 g)	zeaxanthin (mg/100 g)	1_G	2_G	3_T	4_T	5_G	6_G	7_G	8_T	9_G	10_T	11_G	12_G	13_G	14_G	15_G	16_G	17_G	18_G	
				<i>PSY1</i>	<i>PDS</i>	<i>ZISO</i>	<i>ZDS</i>	<i>CrtISO</i>	<i>LCYe</i>	<i>LCYb</i>	<i>CYP97A4</i>	<i>CYP97C</i>	<i>CYP97B2</i>	<i>HYD3</i>	<i>SDG8</i>	<i>LCD</i>	<i>CCD4b</i>	<i>WDR40</i>	<i>MADS26</i>	<i>B1</i>	<i>B2_Katla4</i>	
145	ชาย	0.206	0.333	PP	KK	KK	KK	KP	KP	KK	KP	PP	KK	KK	KP	KP	KK	KP	KK	PP	PP	
146	ชาย	0.133	0.173	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	PP	KP	PP	KP	PP	KP	KP	PP	PP
147	ตำ	0.081	0.298	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KK	PP	KK	KP	KP	KK	KK	KP	PP	KP	KP	KP	KP
148	น้ำตาล	0.132	0.320	KP	KP	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KK	KP	KP	PP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP
149	น้ำตาล	0.140	0.270	KK	PP	PP	KP	PP	KP	KP	PP	PP	KP	PP	PP	KK	PP	KP	PP	KP	KP	KP
150	ตำ	0.163	0.315	KP	KK	PP	KP	KP	KP	KK	KK	KK	KP	KK	PP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP
151	ชาย	0.186	0.111	KP	KP	KP	PP	PP	KP	KK	KK	KP	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	PP	PP	PP
152	ชาย	0.218	0.172	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KK	PP	KP	PP	KP	PP	KP	KP	PP	PP	PP	PP	PP
153	ชาย	0.320	0.295	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	PP	PP	PP
154	ตำ	0.654	0.204	PP	KP	KK	PP	KK	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KK	KK
155	น้ำตาล	1.252	0.494	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	PP	KP	KP	KP
156	ตำ	1.527	0.734	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KK	KP	KK	KP	KP	PP	KK	KK	KK	KK
157	ตำ	0.672	0.323	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KP	KK	KK	KK	PP	KK	KP	KP	KP	KK	KK	KK
158	ตำ	0.924	0.390	PP	KP	KP	KK	KK	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
159	ตำ	0.648	0.276	KK	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KP	PP	PP	PP	KP	KK	KP	KK	KP	KK	KP	KP
160	ชาย	0.367	0.293	PP	PP	KK	PP	KP	PP	KK	PP	KP	KK	PP	KK	KK	KK	KK	KK	PP	PP	PP
161	ตำ	0.799	0.415	PP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP
162	ชาย	0.372	0.326	KK	KK	PP	PP	PP	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KP	KP	PP	KK	PP	PP	PP	PP
163	ตำ	0.468	0.222	PP	KK	KP	KK	PP	PP	KP	PP	KK	KP	KP	KK	KP	KP	PP	KP	KK	KK	KK
164	ชาย	0.284	0.370	PP	KP	KP	PP	PP	KP	KK	PP	KP	KK	KP	KP	PP	KP	PP	KP	PP	PP	PP
165	ตำ	0.146	0.063	PP	KK	KP	KK	KK	KP	KP	PP	KP	KP	KK	PP	PP	KP	KP	PP	KK	KK	KK
166	น้ำตาล	0.522	0.265	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KK	KK	KP	KK	KP	KP	KP	KP
167	ชาย	0.473	0.443	KP	KK	KK	KP	KK	PP	KP	KK	KP	KK	KP	PP	KP	KP	KP	PP	PP	PP	PP
168	น้ำตาล	0.350	0.305	KP	KK	PP	KK	KP	KP	KK	PP	KK	KP	KK	PP	KP	PP	KK	KP	KP	KP	KP
169	ชาย	0.255	0.178	KK	KP	PP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	PP	PP	PP	KP	PP	KP	KP	PP	PP	PP
170	ตำ	0.382	0.307	KP	KK	KP	KP	KP	KP	PP	PP	KP	PP	KK	KP	KP	KP	PP	KK	KP	KP	KP
171	ตำ	0.738	0.306	KK	KK	KP	KK	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KK	KK	KK	KK
172	น้ำตาล	0.438	0.214	KP	KK	KK	PP	KK	KP	PP	KP	PP	PP	KK	KK	KK	KP	PP	KP	KP	KP	KP
173	ตำ	0.258	0.107	KP	KP	PP	KK	KK	KP	KP	KP	KK	KP	KK	KP	KP	PP	PP	KP	KK	KK	KK
174	ตำ	0.309	0.191	KK	KP	PP	KP	KP	KK	KP	KP	PP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KP	KP
175	ตำ	0.232	0.211	PP	KP	KK	PP	PP	KP	KP	KP	PP	PP	KP	PP	KK	KP	KP	PP	KP	KP	KP
176	ตำ	0.368	0.195	KP	PP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP
177	ตำ	0.344	0.126	KP	KP	KK	KP	PP	KP	PP	PP	KP	PP	KP	KK	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP
178	ตำ	0.330	0.246	KP	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KP	KK	KP	KK	KK	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP
179	ตำ	0.509	0.136	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KK	KP	PP	KK	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KK	KK	KK
180	น้ำตาล	0.267	0.217	KK	KP	PP	KK	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KP
181	น้ำตาล	0.199	0.191	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP
182	น้ำตาล	0.553	0.449	KP	KP	KP	KP	PP	KP	PP	PP	KK	PP	KP	KK	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP
183	ตำ	0.192	0.140	KK	KP	PP	KP	KK	PP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	PP	PP	PP	KP	KK	KK	KK
184	น้ำตาล	0.215	0.236	PP	KP	KK	PP	KK	KP	PP	KP	KK	PP	KP	KK	PP	KK	KK	KP	KP	KP	KP
185	ตำ	0.319	0.239	KK	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KP	PP	KK	KP	KP	KP	KK	KK	KP	KP	KP	KP
186	ตำ	0.458	0.320	KP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KK	PP	KP	KP	KP
187	ตำ	0.605	0.251	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	PP	KK	KK	KK
188	ตำ	0.659	0.158	PP	KP	KP	KP	KK	PP	PP	KP	KK	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KK	KK	KK
189	ตำ	0.974	0.331	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KK	KK	KP	KK	PP	KP	KK	KP	KP	PP	KK	KK	KK
190	น้ำตาล	0.479	0.252	KP	PP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	PP	KK	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP
191	ชาย	0.292	0.210	KK	KK	KP	KP	KK	PP	KP	KK	KP	KK	KK	KK	KK	KP	KK	KK	PP	PP	PP
192	ตำ	1.313	0.498	PP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KP	PP	KP	KP	PP	PP	KK	KK	KK	KK
193	ตำ	1.069	0.329	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	PP	PP	PP	PP	KK	KK	KK
194	ชาย	0.134	0.059	KK	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KP	PP	PP	PP	PP

No.	ชื่อ	เทคนิค HPLC	carotenoid biosynthetic pathway											SET domain	cleavage		TFs						
			1_G	2_G	3_T	4_T	5_G	6_G	7_G	8_T	9_G	10_T	11_G	12_G	13_G	14_G	15_G	16_G	17_G	18_G			
			<i>PSY1</i>	<i>PDS</i>	<i>ZISO</i>	<i>ZDS</i>	<i>CrtISO</i>	<i>LCYe</i>	<i>LCYb</i>	<i>CYP97A4</i>	<i>CYP97C</i>	<i>CYP97B2</i>	<i>HYD3</i>	<i>SDG8</i>	<i>LCD</i>	<i>CCD4b</i>	<i>WDR40</i>	<i>MADS26</i>	<i>B1</i>	<i>B2_KatId4</i>			
195	ตำ	lutein (mg/100 g)	0.901	0.213	PP	KK	KK	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KK	PP	PP	KP	KP	
196	ตำ	zeaxanthin (mg/100 g)	0.273	0.091	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	KK	KP	KP	KK	KP	KK	KK	KP
197	ตำ		0.767	0.340	KK	KP	KP	KP	KK	PP	KP	PP	PP	KP	KK	KK	KP	KP	PP	KK	KP	KK	KP
198	น้ำตาล		0.535	0.166	PP	KP	KK	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KK	KP	KP	KK	KK	KK	KP	PP	KP
199	ขาว		0.243	0.155	KP	KP	KP	PP	PP	PP	PP	KP	PP	PP	KP	KK	PP	KP	KK	KK	KP	KP	PP
200	น้ำตาล		0.877	0.293	PP	KK	KK	KP	KK	KK	KK	KP	KP	KK	KK	KK	PP	KK	KP	PP	KP	KP	KP
201	ขาว		0.127	0.048	PP	KP	KP	KP	PP	KK	PP	KP	KK	KP	KK	KP	KP	PP	KK	PP	KK	PP	PP
202	ตำ		0.522	0.203	KP	KP	KP	PP	KK	KP	PP	KP	PP	PP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KK
203	น้ำตาล		0.312	0.235	KP	KK	KP	KK	PP	PP	PP	PP	PP	PP	KK	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP
204	ตำ		0.822	0.294	KK	KP	PP	KP	KP	KK	KP	PP	PP	KP	PP	KK	KP	PP	KP	KP	KK	KK	KK
205	ตำ		0.810	0.309	KP	KK	PP	KK	KP	KP	PP	KK	KP	PP	KP	KK	KK	KP	KK	KP	KP	KP	KP
206	น้ำตาล		0.521	0.246	KP	KP	KK	KK	KK	KP	PP	KP	KK	KP	PP	KP	PP	KK	KK	KP	KP	KP	KP
207	ตำ		0.858	0.243	PP	KK	KP	KK	KK	KK	KP	KP	KP	KP	KK	PP	KK	KP	KP	KP	KK	KK	KK
208	ตำ		1.240	0.394	PP	PP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KP	KK	KP	PP	PP	KK	KP	KK	KP
209	น้ำตาล		0.605	0.386	KP	KK	KK	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KK	PP	KP	PP	KP	KP	KP
210	ขาว		0.178	0.136	KP	PP	KP	KK	KK	KK	KK	PP	KP	KK	PP	KP	KP	KP	PP	PP	PP	PP	PP
211	น้ำตาล		0.471	0.301	KP	KP	PP	KK	KP	KP	PP	KP	KP	PP	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP
212	ตำ		0.475	0.162	KK	PP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KK	KP	PP	KP	KP	KP	KK	KP	KK	KK	KK
213	ตำ		0.871	0.316	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KP	PP	KK	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
214	ตำ		0.698	0.158	KP	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	PP	KP	KK	KK	KK
215	ตำ		1.005	0.322	KP	PP	KK	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	KK	PP	KK	KP	KK	KK	KK	KK
216	ตำ		0.771	0.274	KP	PP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP
217	น้ำตาล		0.248	0.126	KK	KK	KK	KP	KK	PP	PP	KP	KK	PP	KP	PP	PP	KK	PP	PP	KK	KK	KK
218	ตำ		0.798	0.283	PP	KP	KK	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KK	KP	KK	KP	PP	KK	KK	KK
219	น้ำตาล		0.645	0.386	PP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KK	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
220	ตำ		0.755	0.323	KP	KK	KK	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	KK	KK	KP	KP	KK	PP	KP	KP	KP
221	ขาว		0.154	0.146	KP	KK	KK	PP	PP	KP	PP	KK	KK	PP	KP	KK	PP	KK	KK	KP	PP	PP	PP
222	น้ำตาล		0.630	0.315	PP	KP	KK	KP	KP	PP	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
223	ตำ		0.819	0.327	KK	KP	KP	KK	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	KP	PP	PP	PP	KP	KP
224	ตำ		1.236	0.313	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KK	KP	KK	KP	KK	KK	KK
225	ตำ		0.966	0.372	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KK
226	ตำ		0.321	0.122	KP	KP	KK	KP	KP	KK	KK	KP	KK	KP	KK	PP	KP	KK	KK	KP	KP	KP	KP
227	ตำ		0.943	0.366	KP	PP	KK	KP	KK	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KP	KK	KK	KK	KP	KK	KK	KK
228	น้ำตาล		0.457	0.208	PP	KP	KP	PP	PP	KP	KP	KK	KK	KP	KP	KK	PP	KP	KK	KK	KK	KP	KP
229	ตำ		1.274	0.497	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	PP	PP	KP	KP	KP	KP	KK	KK
230	ขาว		0.400	0.271	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	PP	PP
231	ตำ		0.697	0.333	KP	KK	KK	PP	KP	KP	PP	KK	KK	PP	KP	PP	KP	KK	KK	KP	KP	KP	KP
232	ตำ		0.224	0.106	KP	PP	PP	PP	PP	KK	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KK	PP	KP	PP	KP	KP	KP
233	ตำ		0.224	0.033	KK	KP	KP	KP	KK	KP	PP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KK	KK	KK
234	น้ำตาล		0.198	0.027	PP	KP	KP	KK	KP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
235	ตำ		0.384	0.043	KP	KK	KP	KP	KK	PP	PP	KK	KP	KP	KK	PP	KP	KP	KP	PP	KK	KK	KK
236	น้ำตาล		0.529	0.098	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KP	KK	KK	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
237	ตำ		0.877	0.084	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KK	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP
238	น้ำตาล		0.470	0.265	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP
239	ตำ		0.835	0.128	KP	KP	PP	PP	KP	KP	KK	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KK	KK
240	ตำ		0.831	0.124	KK	KP	KK	KK	KP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KK	KK	KP	KP	KP	KP	KP
241	ตำ		0.636	0.269	KP	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KK	KK
242	ขาว		0.225	0.211	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KK	PP	KP	KK	KK	KK	KP	KP	PP	KK	PP	PP	PP
243	ตำ		0.241	0.115	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KK	KP	PP	KP	KP
244	ตำ		0.456	0.206	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KP

No.	ชื่อ	เทคนิค HPLC		carotenoid biosynthetic pathway										SET domain	cleavage		TFs				
		lutein (mg/100 g)	zeaxanthin (mg/100 g)	1_G	2_G	3_T	4_T	5_G	6_G	7_G	8_T	9_G	10_T	11_G	12_G	13_G	14_G	15_G	16_G	17_G	18_G
				<i>PSY1</i>	<i>PDS</i>	<i>ZISO</i>	<i>ZDS</i>	<i>CrtISO</i>	<i>LCYe</i>	<i>LCYb</i>	<i>CYP97A4</i>	<i>CYP97C</i>	<i>CYP97B2</i>	<i>HYD3</i>	<i>SDG8</i>	<i>LCD</i>	<i>CCD4b</i>	<i>WD40</i>	<i>MADS26</i>	<i>B1</i>	<i>B2_Kalca4</i>
245	ขาว	0.365	0.321	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	PP	PP	
246	น้ำตาล	0.217	0.103	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	
247	ดำ	0.556	0.059	PP	KK	KP	KP	PP	KP	KK	KP	KP	KK	KP	PP	KK	KP	KP	PP	KK	
248	ดำ	0.489	0.018	KP	KK	KP	KK	PP	KK	KP	PP	KP	KK	KP	KK	KP	KP	PP	PP	KP	
249	ขาว	0.825	0.212	KP	PP	KP	PP	KK	KP	KP	PP	KP	PP	KK	KP	KP	KP	KP	PP	PP	
250	ดำ	0.526	0.307	KP	KP	KP	PP	PP	PP	KK	KP	PP	KK	PP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	
251	น้ำตาล	0.382	0.185	KP	KK	PP	PP	KP	PP	KK	KP	KP	KK	KK	PP	KK	KP	KK	PP	KP	
252	ขาว	0.331	0.282	PP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KK	KP	KK	PP	KP	KP	KK	PP	
253	ดำ	0.607	0.392	PP	KP	PP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	
254	ขาว	0.221	0.288	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KK	KP	KP	PP	KP	KP	PP	PP	
255	ขาว	0.144	0.226	KP	KK	KK	PP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KK	KP	KP	KK	KK	KP	PP	
256	ดำ	0.419	0.238	PP	KK	PP	PP	PP	KP	KP	PP	KK	KP	KK	PP	KK	KP	KP	PP	KP	
257	ขาว	0.228	0.196	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KK	KK	KK	KK	KP	KP	KP	KP	PP	PP	
258	ดำ	0.475	0.282	KK	KP	KP	PP	KK	KP	KP	KP	KK	KP	KK	KP	KK	KP	KP	KP	KP	
259	ขาว	0.131	0.176	KP	KP	KK	KP	PP	KP	KP	PP	PP	KK	KP	PP	KP	KK	PP	PP	PP	
260	น้ำตาล	0.412	0.324	KP	KP	PP	KK	KP	KK	KK	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	
261	ดำ	0.731	0.018	KP	KP	KP	KP	KK	KP	PP	KP	PP	KP	KP	KK	PP	KP	KP	PP	KK	
262	ดำ	0.782	0.308	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	
263	ดำ	0.403	0.214	KP	KK	KK	KK	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KP	KP	KK	KK	KK	KP	KP	
264	ดำ	0.492	0.231	KK	KK	PP	KP	KK	KK	KP	PP	KP	KP	PP	PP	KP	KP	KK	PP	KP	
265	ดำ	0.715	0.015	KK	PP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KP	KP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	
266	น้ำตาล	0.421	0.217	KK	KK	PP	PP	KK	KK	KK	PP	KP	KP	KP	KK	KP	PP	PP	KP	KP	
267	ขาว	0.179	0.213	PP	KP	KP	PP	KK	PP	KK	PP	PP	KK	KK	KK	KP	PP	KK	PP	PP	
268	ขาว	0.186	0.248	KP	PP	KK	PP	KK	KK	KK	KK	KP	KK	PP	PP	KK	KK	KP	KP	PP	
269	น้ำตาล	0.313	0.267	KP	PP	KK	KP	KP	PP	PP	KP	KP	KP	PP	PP	KK	KP	KK	PP	KP	
270	น้ำตาล	0.354	0.182	KK	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KP	KP	PP	KP	PP	PP	KP	KP	PP	KP	
271	ดำ	0.280	0.167	PP	KP	KK	KP	KP	PP	PP	KP	KK	PP	PP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	
272	ดำ	0.609	0.114	PP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KK	PP	KP	KP	KP	KP	
273	ขาว	0.302	0.234	KK	KP	KP	PP	KP	KK	KP	KP	KK	KK	KP	KP	PP	KP	KK	KP	PP	
274	ดำ	0.561	0.308	KP	KP	KK	KP	KK	PP	KP	PP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KK	KK	
275	น้ำตาล	0.383	0.300	KK	KP	KP	KP	PP	KP	PP	KK	KK	PP	KP	KK	KP	KK	KP	KP	KP	
276	น้ำตาล	0.340	0.283	KP	KK	KK	PP	KP	KP	KP	KP	PP	KK	KK	PP	KP	PP	KP	KP	KP	
277	น้ำตาล	0.274	0.278	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	
278	น้ำตาล	0.139	0.013	KP	KP	KP	KP	PP	PP	PP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	PP	KP	
279	น้ำตาล	0.432	0.215	PP	KP	KK	PP	KP	PP	PP	KP	KK	PP	KP	PP	PP	KP	KP	KP	KP	
280	น้ำตาล	0.440	0.134	KP	KK	PP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	PP	KP	PP	PP	PP	KK	KP	KP	
281	ดำ	0.379	0.113	KK	KK	PP	PP	KK	KP	KP	KK	KK	KP	KK	PP	KK	PP	KP	KP	KK	
282	น้ำตาล	0.683	0.274	PP	KP	KK	KP	KP	PP	KP	PP	PP	KP	KP	KP	KK	KK	PP	KP	KP	
283	ดำ	0.824	0.091	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KK	KK	
284	ดำ	0.695	0.135	KK	PP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	PP	KP	KP	KK	PP	KK	KK	
285	ดำ	0.705	0.293	KP	KP	PP	PP	KP	KK	PP	KP	KP	PP	KP	KK	KP	KK	KP	KP	KP	
286	ดำ	0.507	0.000	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	
287	ดำ	0.243	0.000	KK	KK	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	PP	KK	PP	KP	KK	KK	KK	KK	
288	ดำ	0.141	0.000	KP	KK	PP	KK	KP	PP	PP	KP	KK	PP	KK	KP	KK	PP	PP	KP	KP	
289	น้ำตาล	0.520	0.289	KP	KP	KK	PP	KK	PP	KP	PP	KP	KP	KK	PP	KP	KK	PP	KP	KP	
290	ดำ	0.267	0.000	KK	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KP	PP	PP	KP	KP	PP	KK	KK	
291	ดำ	0.328	0.110	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KK	KK	KP	PP	PP	KP	KK	KK	KK	
292	ดำ	0.556	0.338	PP	KP	KP	KK	KK	KP	KP	KP	PP	PP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	
293	ขาว	0.203	0.174	KP	KP	KP	PP	KK	PP	KK	KK	KP	KK	KP	KK	PP	KK	KP	PP	PP	
294	ดำ	1.103	0.196	KP	PP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	

No.	ชื่อ	เทคนิค HPLC		carotenoid biosynthetic pathway														SET domain	cleavage		TFs			
		lutein (mg/100 g)	zeaxanthin (mg/100 g)	1_G	2_G	3_T	4_T	5_G	6_G	7_G	8_T	9_G	10_T	11_G	12_G	13_G	14_G	15_G	16_G	17_G	18_G			
				<i>PSY1</i>	<i>PDS</i>	<i>ZISO</i>	<i>ZDS</i>	<i>CrtISO</i>	<i>LCYe</i>	<i>LCYb</i>	<i>CYP97A4</i>	<i>CYP97C</i>	<i>CYP97B2</i>	<i>HYD3</i>	<i>SDG8</i>	<i>LCD</i>	<i>CCD4b</i>	<i>WDR40</i>	<i>MADS26</i>	<i>B1</i>	<i>B2_KaIa4</i>			
295	ขาว	0.228	0.258	KP	KK	KP	PP	KP	KP	KP	KK	KK	KP	KK	KP	KK	KP	KK	KP	PP	PP			
296	ขาว	0.085	0.145	PP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	PP	PP	PP	PP			
297	ขาว	0.493	0.375	KK	KP	KP	KP	PP	PP	KP	KK	PP	PP	KP	PP	KK	KP	KK	PP	PP	PP			
298	ดำ	0.587	0.186	KK	KP	KP	KK	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KK	KK	KP	KK	KP	KP	KP			
299	ดำ	1.238	0.668	PP	KP	KK	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	PP	KP	KP	KP	PP	KP	KP			
300	ขาว	0.226	0.224	KP	KP	KP	PP	PP	KP	PP	KP	KK	PP	KP	PP	KP	KP	KK	PP	PP	PP			



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ
เกิดเมื่อ	31 ตุลาคม พ.ศ.2531
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2549 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสันทรายวิทยาคม จังหวัดเชียงใหม่ พ.ศ.2553 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ พ.ศ.2559 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาพันธุศาสตร์) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการทำงาน	พ.ศ.2553-2555 ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศูนย์วิจัยชีวโมเลกุลและเซลล์วิทยาของโรคติดเชื้อ พ.ศ.2554 เข้ารับการฝึกอบรมทำวิจัยร่วมกับห้องปฏิบัติการวิจัยโปรตีนโอมิกส์ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) สถาบันวิทยากร สวทช