



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุ์วิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณแป้ง และการแสดงออกของยีนสังเคราะห์แป้งใน
มันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

Study on the Growth, Starch Content and Starch Synthesis Gene Expression in Cassava
var. Kasetsart 50

นามผู้วิจัย นายเกียรติพงษ์ คัมภีรศาสตร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รongศาสตราจารย์สิริกัณฑ์ พรหมณีย์, Ph.D.)

กรรมการ

(รongศาสตราจารย์สุภา หารหนองบัว, Dr.rer.nat.)

กรรมการ

(รongศาสตราจารย์กล้าณรงค์ ศรีรอด, D.E.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พรพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รongศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณแป้ง และการแสดงออกของยีนสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง
พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

Study on the Growth, Starch Content and Starch Synthesis Gene Expression in Cassava *var.*
Kasetsart 50

โดย

นายเกียรติพงศ์ คัมภีรศาสตร์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

พ.ศ. 2552

เกียรติพงษ์ คัมภีรศาสตร์ 2552: การศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณแป้ง และ
การแสดงออกของยีนสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม
โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สิริภัทร พรหมณีย์, Ph.D. 170 หน้า

ปัจจุบันการเก็บเกี่ยวหัวมันสำปะหลังตัดสินใจโดยดูจากราคา โดยไม่คำนึงถึงน้ำหนัก
ผลผลิต และปริมาณแป้ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการเจริญเติบโตในแปลงปลูก ปริมาณแป้งที่อายุ
ต่างๆ กัน และการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แป้ง การทดลองใช้มันสำปะหลัง
8 พันธุ์ คือ ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 90, เกษตรศาสตร์ 50, หัวขบง 60, CMR 35-64-1, CMR 35-22-196,
CMR 35-21-199 และ CMR 36-55-166 พบว่า พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 มีความสูงดีกว่าพันธุ์อื่น
ส่วนน้ำหนักต้น และน้ำหนักหัวสด พบว่า ทุกอายุการเก็บเกี่ยวของทุกพันธุ์ไม่มีความแตกต่าง
อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนน้ำหนักหัวสด และปริมาณแป้งที่อายุ 10 เดือน และ 12 เดือนจะสูงกว่า 8
เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ควรเก็บเกี่ยวเมื่อปลูกอย่างน้อย 10 เดือน การวัดปริมาณอะมัยโลส
สามารถตรวจพบในทุกพันธุ์ตั้งแต่อายุ 4 เดือนถึง 12 เดือน ส่วนใหญ่พบว่าอายุ 6 เดือน และ 12
เดือนจะมีปริมาณมากกว่า 8 เดือน และ 10 เดือน

การศึกษาการแสดงออกของยีน ADP-Glucose pyrophosphorylase (AGPase) เป็นยีนที่มี
ความสำคัญต่อปริมาณการสังเคราะห์แป้ง ยีน Granule bound starch synthase I (GBSS I) เป็นยีน
เกี่ยวข้องกับการสร้างอะมัยโลส และยีน Starch Branching enzymes II (SBE II) เป็นยีนที่
เกี่ยวข้องกับการสร้างอะมัยโลเพคติน ในใบผลิตภัณฑ์ของ RT-PCR ของ AGPase, GBSSI และ
SBEII จะแสดงออกชัดเจนที่อายุ 4, 6 และ 10 เดือน แต่แสดงออกลดลงที่ 8 และ 12 เดือน แต่ใน
หัวพบการแสดงออกทุกอายุ จากงานวิจัยนี้ ขอแนะนำว่าอายุการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังที่
เหมาะสม คือ 10-12 เดือน

Kaettipong Kamprerasart 2009: Study on the Growth, Starch Content and Starch Synthesis Gene Expression in Cassava *var.* Kasetsart 50. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Siripatr Prammanee, Ph.D. 170 pages.

In the present, the harvest time of the cassava-root production is made a decision by the price not by the root weight and the starch quantity. This research studied on their growth in the field, starch quantity and the expression of starch synthesis gene at different age. Eight varieties of cassava (Rayong 5, Rayong 90, Kasetsart 50, HB 60, CMR 35-64-1, CMR 35-22-196, CMR 35-21-199 and CMR36-55-166) were studied. The results show that Kasetsart 50 had better height than others. The stem weight and the root weight at every age of all varieties had no different. The root weight and starch content at 10 months and 12 months were higher than 8 months age. So we harvest more than 10 months. The measuring of amylose content in every variety could be detected at 4-12 months age. Almost all of 8 varieties could be detected higher amylose content at 6 and 12 months age than 8 and 10 months age.

Study on the expression of ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) gene which is important to starch synthesis. Granule bound starch synthase I (GBSS I) gene is involved in the synthesis of amylose. Starch branching enzyme II (SBE II) gene is involved in amylopectin synthesis. In the leaf, RT-PCR products were present at 4, 6, 10 months age but at 8 and 12 months age were decrease. In the root SBE II gene expressed at 4-12 months age. These results suggest that the suitable harvest time of cassava is 10-12 months after planting.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สิริภัทร์ พรหมณีษ์ ประธานกรรมการ ที่ปรึกษาที่ได้สนับสนุน ให้คำปรึกษาถึงหัวข้อ วิธีการดำเนินการวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่อง ต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุภา หารหนองบัว กรรมการวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร.กมลฉัตร ศรีรอด กรรมการวิชาการ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ศุภชัย สารกาญจน์ ในการให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในการวิจัยในเรื่องพันธุ์ และงาน ปลูกมันสำปะหลังในแปลง ขอขอบพระคุณสถานีวิจัยพืชไร่ปราจีนบุรี ตำบลวังคินสอ อำเภอ กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่วิจัย พันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ในการวิจัย ในครั้งนี้ และเอื้อเฟื้อสถานที่พักขณะทำการวิจัย ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในศูนย์วิจัยทุกท่านที่ช่วย ในการปลูก ดูแล และเก็บข้อมูลสำหรับงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ตำบล ห้วยโป่ง อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง และเจ้าหน้าที่ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์มันสำปะหลังที่ ใช้ในการวิจัย คำแนะนำ และหาข้อมูลในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์สุณีย์ โชตินิรนาท และเจ้าหน้าที่หน่วยวิจัยแป้ง สถาบันคั้นคว่ำ และ พัฒนาผลิตภัณฑ์ผลผลิตทางการเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และสอนการใช้เครื่องมือ เพื่อวิเคราะห์แป้ง และการประเมินค่าในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่ ที่สาขาชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว สำหรับกำลังใจ และช่วยเก็บตัวอย่างที่ใช้ใน การวิจัย และเป็นกำลังใจเพื่อต่อสู้กับอุปสรรคต่างๆ และส่งเสริมสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้า ด้วยดีเสมอมา

เกียรติพงศ์ คัมภีร์ศาสตร์

เมษายน 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	44
อุปกรณ์	44
วิธีการ	50
ผลและวิจารณ์	63
สรุปและข้อเสนอแนะ	106
สรุป	106
ข้อเสนอแนะ	108
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	109
ภาคผนวก	127
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	170

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลำดับเบสของไพเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนสังเคราะห์เป็ง ที่มา อุณหภูมิ annealing ขนาดความยาวของ PCR product	45
2	วิธีเตรียมอะมัยโลสมาตรฐานจาก standard potato (sigma)	52
3	การเจริญในด้านความสูงเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 8, 10 และ 12 เดือน	63
4	การเจริญในด้านน้ำหนักหัวต้น และใบเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 8, 10 และ 12 เดือน	64
5	การเจริญในด้านน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 8, 10 และ 12 เดือน	65
6	การศึกษาปริมาณแป้งเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 8, 10 และ 12 เดือน	67
7	การศึกษาปริมาณมันเส้นแห้งเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 8, 10 และ 12 เดือน	68
8	การศึกษาปริมาณอะมัยโลสในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 8, 10 และ 12 เดือน	70
9	วิเคราะห์ความเข้มข้น ความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดด้วยวิธีตามข้อ 2.2 จากใบ และหัวมันสำปะหลัง โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต	73

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	แสดงอุณหภูมิ และปริมาณน้ำฝนในรอบเดือนที่สัมพันธ์กับอายุของ มันสำปะหลัง	128
2	การตรวจสอบผลผลิตต่อไร่ เมื่อปลูก 8 เดือน	129
3	การตรวจสอบผลผลิตต่อไร่ เมื่อปลูก 10 เดือน	133
4	การตรวจสอบผลผลิตต่อไร่ เมื่อปลูก 12 เดือน	137
5	การวัดความชื้นของแป้ง ข้าวที่ 1	141
6	การวัดความชื้นของแป้ง ข้าวที่ 2	144
7	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของแป้งเฉลี่ย	147
8	การวัดเปอร์เซ็นต์เถ้าของแป้ง ข้าวที่ 1	150
9	การวัดเปอร์เซ็นต์เถ้าของแป้ง ข้าวที่ 2	153
10	เปอร์เซ็นต์เถ้าของแป้งเฉลี่ย	156
11	การดูคดกลิ่นแสงของอะมัยโลสมาตรฐาน	159
12	ค่าการดูคดกลิ่นแสงเฉลี่ย	161
13	ปริมาณอะมัยโลส	164
14	ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง 8 พันธุ์	167

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	รูปเม็คแป้ง และการจัดเรียงตัวของเม็คแป้ง	27
2	Glucan trimming model	30
3	ลักษณะดิน และแปลงปลูก	44
4	เปรียบเทียบวิธีการสกัด total RNA จากใบ และหัวมันสำปะหลังพันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50 เมื่อปลูกเป็นเวลา 10 เดือน	72
5	ตะกอนจากการสกัด total RNA ด้วยวิธีต่างๆ	74
6	วิเคราะห์ผลจากการทำ reverse transcription-polymerase chain reaction จาก หัวมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่อายุ 10 เดือน	76
7	วิเคราะห์ผลจาก recombinant plasmid ที่ถูกตัดด้วย restriction enzyme (<i>EcoRI</i>) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RT-PCR	77
8	วิเคราะห์ผล insert DNA จากการ gene clean	78
9	ลำดับเบสของ AGPase 9	80
10	ลำดับเบสของ GBSSI 13	81
11	ลำดับเบสของ GBSSII 7	82
12	ลำดับเบสของ SBEI 15	83
13	ลำดับเบสของ SBEII 12	84
14	เปรียบเทียบลำดับเบส ของ AGPase 9 กับ small subunit ของ AGPase (Muyikwa, 2001)	86
15	เปรียบเทียบลำดับเบสของ GBSSI 13 กับ GBSSI (X74160)	87
16	เปรียบเทียบลำดับเบสของ GBSSII 7 กับ GBSSII (AF173900)	90
17	เปรียบเทียบลำดับเบสของ SBEI 15 กับ SBEI (Salehuzzaman, 1992)	93
18	เปรียบเทียบลำดับเบสของ SBEII 12 กับ SBEII (X77012)	97
19	วิเคราะห์ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลังทั้ง 8 พันธุ์ ด้วยวิธี Southern blot	99

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	วิเคราะห์ผลสกัด total RNA จากใบ และหัวมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ณ อายุ 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน และการทำ RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน AGPase, GBSSI และ SBEII	100
ภาพผนวกที่		
1	กราฟอะมัยโลสมมาตรฐาน	160

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ADP	=	Adenosine diphosphate
ADPG	=	ADP-glucose
AGPase	=	ADP-glucose pyrophosphorylase
AMP	=	Adenosine monophosphate
AMY	=	alpha-amylase
ATP	=	Adenosine triphosphate
BAM	=	beta-amylase
Con A	=	Lectin concavanatin A
D enz	=	Disproportioning enzyme, Glucanotransferase
DB	=	Dry basis
DBE	=	Debranching enzyme
DHAP	=	Dihydroxyacetone phosphate
DP	=	Degree of polymerization
DPE 1	=	Disproportioning enzyme
DPE 2	=	Glucanotransferase
DSC	=	Differential scanning calorimetry
F-1,6-BP	=	Fructose-1,6-bisphosphate
G-1-P	=	Glucose-1-phosphate
G3P	=	Glyceraldehyde-3-phosphate
G-6-P	=	Glucose-6-phosphate
GBE	=	Glycogen branching enzyme
GBSS	=	Granule bound starch synthase
GWD	=	alpha-glucan, water dikinase
HB 60	=	มันสำปะหลังพันธุ์หัวขบง 60
HPSEC	=	High performance size exclusion chromatography
Inv	=	Invertase
ISA	=	Isoamylase
KU 50	=	มันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

LAI	=	Leaf area index
MEX 1	=	Maltase
MOS	=	Malto-oligosaccharide
OAA	=	Oxaloacetate
ORF	=	Open reading frame
P enz	=	Phosphorylase
PEPC	=	Phosphoenolpyruvate carboxylase
PGA	=	Phosphoglyceric acid
PGI	=	Phosphoglucose Isomerase
PGM	=	Phosphoglucomutase
Pi	=	inorganic phosphate
PPi	=	Orthoorganic phosphate, pyrophosphate
PWD	=	Phosphoglucan, water dikinase
PUL	=	Pullulanase
R 1	=	มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 1
R 5	=	มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5
R 90	=	มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 90
RACE	=	Random amplification of cDNA ends
RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction
SBE	=	Starch branching enzyme
SGP	=	Starch granule bound protein
SPS	=	Starch phosphate synthase
SS	=	Starch synthase
SSS	=	Soluble starch synthase
SuSy	=	Sucrose synthase
SUT	=	Sucrose transporter
UDP	=	Uridine diphosphate
U-1-P	=	Uridine-1-phosphate

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

UGPase = UDP glucose pyrophosphorylase

WSG = Water soluble glucan

การศึกษาการเจริญเติบโต ปริมาณแป้ง และการแสดงออกของยีนสังเคราะห์แป้งใน
มันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

Study on the Growth, Starch Content and Starch Synthesis gene Expression in
Cassava var. Kasetsart 50

คำนำ

การปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทย ยังไม่มีการกำหนดการปลูก และระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวที่แน่นอน เกษตรกรจะปลูกมันสำปะหลัง โดยไม่คำนึงถึงฤดูกาล และอายุการเก็บเกี่ยวของมันสำปะหลัง โดยการเก็บเกี่ยวจะขึ้นกับระยะเวลาในการเปิดตลาดรับซื้อมันสำปะหลัง และราคาซื้อมันสำปะหลัง อายุเก็บเกี่ยวยิ่งมากขึ้นเปอร์เซ็นต์แป้งจะลดลง แต่มีปริมาณเส้นใย (fiber) เพิ่มขึ้นซึ่งไม่เหมาะในการนำไปสกัดแป้ง อายุเก็บเกี่ยวจึงเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่ง มีรายงานว่า การปลูกมันสำปะหลังอายุ 4 เดือน จะเริ่มสร้างหัวเพื่อสะสมแป้ง แต่มีขนาดหัวเล็ก และมีการสะสมแป้งในปริมาณน้อย เมื่ออายุ 6-9 เดือนมีการเจริญ และการสะสมแป้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งอายุ 9-10 เดือนจะไม่มีการเพิ่มขนาด หรือเพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อย โดยเปอร์เซ็นต์แป้งจะคงที่ และเมื่ออายุมากกว่า 14 เดือน เปอร์เซ็นต์แป้งจะลดลง (ไพศาล, 2504) จากการศึกษาพบว่า เปอร์เซ็นต์แป้งที่สกัดได้จากมันสำปะหลังอายุ 10 เดือนจะมากกว่ามันสำปะหลังอายุ 12 เดือน แต่อัตรส่วนของอะมัยโลสต่ออะมัยโลเพคตินใกล้เคียงกัน โดยโครงสร้าง ความยาวของสายอะมัยโลส และจำนวนแขนงของ อะมัยโลเพคตินจะต่างกันตามอายุ (Stiroth, 1998) และการเก็บเกี่ยวในช่วงฤดูฝน แป้งที่ได้มีคุณสมบัติไม่เหมาะแก่การนำไปผลิตในอุตสาหกรรม (Vilai, 2001) ดังนั้นจึงควรพิจารณาว่า เกษตรกรจะต้องปลูกมันสำปะหลังในช่วงเดือนใด เพื่อไม่ให้ระยะเก็บเกี่ยวอยู่ในช่วงฤดูฝน และมีอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมแก่การนำไปสกัดแป้งเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมผลิตสารให้ความเหนียว และผลิตน้ำตาล ต้องการหัวมันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้งสูง และมีอะมัยโลเพคตินสูง

จากข้อมูลที่เคยมีรายงานทำให้ทราบว่า อะมัยโลเพคตินถูกควบคุมการสังเคราะห์โดย starch branching enzyme ซึ่งการศึกษาการแสดงออกของยีนนี้มีความสำคัญต่อการประเมินอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม เพื่อให้ได้แป้งปริมาณมาก และเหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์ และใช้ผลิตตัวตรวจเพื่อใช้คัดเลือกพันธุ์ และระบุอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมในแต่ละพันธุ์ เพื่อให้มีปริมาณ

อะมัยโลเพคตินสูงเหมาะแก่การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทำแป้งมันสำปะหลังแปรรูป (modified starch) ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงทำการศึกษการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลังที่ใช้ในอุตสาหกรรม โดยเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังที่อายุ 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน วัดการเจริญ ผลผลิต ปริมาณอะมัยโลส และการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 เพื่อใช้ประเมินอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโต ปริมาณแป้ง ในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์
2. เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนสังเคราะห์แป้งในใบ และหัวมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
2. แปลงทดลองมันสำปะหลัง สถานีวิจัยพืชไร่ปราจีนบุรี ตำบลวังดินสอ อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี
3. หน่วยวิจัยแป้ง สถาบันค้นคว้าวิจัย และพัฒนาผลิตภัณฑ์ผลผลิตทางการเกษตร (KAPI) ชั้น 8 ตึกอุตสาหกรรมเกษตร 3 คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (วิทยาเขตบางเขน)

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2547 สิ้นสุดการทดลอง เดือนเมษายน พ.ศ. 2552

การตรวจเอกสาร

1. ประวัติมันสำปะหลัง

1.1 แหล่งกำเนิด

แหล่งกำเนิดของมันสำปะหลังในสกุล *Manihot* spp. สันนิษฐานว่า อยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกาในเขตตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล ประวัติการปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทย เริ่มต้นปลูกในจังหวัดสงขลา ในปี พ.ศ. 2480 ต่อมาค่อยๆ หมดไป เนื่องจากปลูกแซมในแถวยางพารา เมื่อยางพาราโตจะคลุมทำให้ไม่สามารถปลูกได้ เกษตรกรจึงเลิกปลูกในพื้นที่ภาคใต้ แล้วมาปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ บริเวณจังหวัดชลบุรี และระยองแทน แล้วมีการขยายพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังมากขึ้นทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะจังหวัดนครราชสีมา (เจริญศักดิ์, 2532)

1.2 การจัดจำแนก

ในปัจจุบันศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical) จำแนกพันธุ์มันสำปะหลังได้มากกว่า 5,000 ชนิด โดยจัดแบ่งตามหลักเกณฑ์ทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

ORDER	GERANIALES หรือ EUPHORBIALES
CLASS	DICOTYLEDONEAE
SUB CLASS	ARCHICHLAMYDEAE
SUB DIVISION	ANGIOSPERMAE
FAMILY	EUPHORBIACEAE
TRIBE	MANIHOTEAE
GENUS	MANIHOT (กรมวิชาการเกษตร, 2537)

มันสำปะหลังมีชื่อเรียกได้ต่างๆ กัน เช่น cassava, manihot, manioc, mandioca, madioc, yuca, tapioca และ tapioka เป็นพืชจำพวกเดียวกับละหุ่ง และยางพารา ลักษณะของมันสำปะหลัง เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ประเภทพืชยืนต้น (perennial crop) เป็นไม้เนื้ออ่อนมีการเจริญเติบโตทางด้าน vegetative growth พักตัวในฤดูแล้งของทุกปี ทำให้มีการชะงักการเจริญเติบโต มีโครโมโซม polyploids มีลักษณะ allotetraploid จำนวนโครโมโซม $2n = 36$ โดยการออกของใบจะเรียงวนรอบ ลำต้น เป็นไม้พุ่ม สูง 2-4 เมตร ใบเป็นแบบ simple leaf ประกอบด้วยแฉกลึก (lobe) แบบติดกัน (palmate) รูปร่างรียาวาว มี 5-7 ใบ เป็นไม้มียางสีขาวขุ่น มีดอกแยกเพศคนละดอก อยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious) โดยดอกจะออกตามง่ามกิ่ง พันธุ์ที่ไม่มีการแตกกิ่งจะเป็นหมัน ผลมีลักษณะ เป็น capsule มีเส้นผ่านศูนย์กลาง $\frac{1}{2}$ นิ้ว ทรงสามเหลี่ยม มี 3 เมล็ดในผล ผลจะแก่เมื่อหลังผสมเกสร $2\frac{1}{2}$ - 3 เดือน เมล็ดมีสีน้ำตาลดำ กว้าง $\frac{3}{4}$ เซนติเมตร หนา $\frac{1}{2}$ เซนติเมตร ยาว 1 เซนติเมตร ลำต้น มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 3-6 เซนติเมตร รากมีความยาว 30-120 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง ขนาด 4-15 เซนติเมตร น้ำหนักของราก 1-8 กิโลกรัมตามพันธุ์ แบ่งอัตราส่วนโดยน้ำหนัก เป็นใบ 6 % ลำต้น 44 % ราก 50 % ในหัวมันจะมีน้ำปริมาณมาก 60-65 % ของน้ำหนักสด มีคาร์โบไฮเดรต 20-30 % ของน้ำหนักสด (กรมวิชาการเกษตร, 2537) การแยกพันธุ์สามารถแยกจากลักษณะทางกายภาพ เช่น จำนวนแฉกของใบ สีใบ สียอด สีก้านใบ สีลำต้น สีดอก และการแตกกิ่ง เป็นต้น

มันสำปะหลังสามารถแบ่งออกได้ 2 ประเภทคือ

1. ชนิดหวาน จะมีลำต้นเตี้ย และรากสะสมขนาดเล็ก อายุการเก็บเกี่ยวสั้น 6-8 เดือน มีเนื้อแน่น เหนียว ให้ผลผลิตแป้งในเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ ได้แก่ *Manihot esculenta* รับประทาน เช่น พันธุ์ห่านาที่
2. ชนิดขม จะมีลำต้นสูง และรากสะสมขนาดใหญ่ อายุการเก็บเกี่ยวนาน 10-14 เดือน ให้ผลผลิตแป้งในเปอร์เซ็นต์แป้งสูง ได้แก่ *Manihot palmata* หรือ *Manihot dulcis* ไม่เหมาะแก่การรับประทาน มักใช้ในอุตสาหกรรมผลิตแป้ง และอาหารสัตว์ เช่น พันธุ์ระยอง 5 (R 5), เกษตรศาสตร์ 50 (KU 50), หัวขบง 60 (HB 60), ศรีราชา 1 เป็นต้น โดยมีชื่อเดิมว่า *Manihot utilissima* Pohl. แต่ในปัจจุบันจะเรียกทั้ง 2 พันธุ์ว่า *Manihot esculenta* และที่ปลูกเป็นการค้ามีชื่อว่า *Manihot esculenta* Crantz (เจริญศักดิ์, 2532)

1.3 การเจริญของมันสำปะหลัง

แบ่งออกได้เป็น 5 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ระยะที่งอกและมีการเจริญของต้น โดยจะเริ่มมีการงอกของยอด และมีระบบราก (fibrous root) ระยะนี้เกิดในช่วง 2-3 สัปดาห์หลังปลูก ระยะที่ 2 ระยะการพัฒนาของทรงพุ่ม จะมีการเจริญทางด้านลำต้น ระยะนี้เกิดในช่วง 4 สัปดาห์หลังปลูก จนตลอดการเก็บเกี่ยว ระยะที่ 3 ระยะพัฒนาราก และการลงหัว (storage root) จะมีการสร้างและสะสมของแป้งในหัวมัน ระยะนี้เกิดในช่วง 8 สัปดาห์หลังปลูก จนตลอดการเก็บเกี่ยว ระยะที่ 4 ระยะการพักตัว จะทิ้งใบ หยุดการเจริญ จะสัมพันธ์กับความชื้นในดิน มักเกิดในช่วงฤดูแล้ง และ ระยะที่ 5 ระยะการเจริญเติบโตใหม่ หรือการฟื้นตัว จะมีการสร้างทรงพุ่มใหม่อีกครั้ง โดยจะดึงแป้งในหัวไปใช้ในการสร้างทรงพุ่มขึ้นใหม่อีกครั้ง จะเป็นระยะที่ต่อจากระยะพักตัว (โอภาส, 2531 ; Onwuem, 1978)

1.4 ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีความสำคัญรองลงมาจากข้าว อ้อย และยางพารา สามารถผลิตได้เป็นอันดับที่ 1 ในทวีปเอเชีย เป็นผู้ผลิตรายใหญ่ อันดับที่ 3 ของโลก รองมาจากประเทศ ไนจีเรีย และบราซิลเท่านั้น (กรมวิชาการเกษตร, 2550)

1.5 ประโยชน์

หัวมันสำปะหลังสามารถนำมาบริโภคโดยตรง ผลิตแป้ง และผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในทางอุตสาหกรรม มันอัดเม็ดใช้ผลิตอาหารสัตว์ มันเส้นผลิตแอลกอฮอล์ กรดซิตริก และเบียร์ แป้งมันผลิตอาหารและสารให้ความเหนียว ทำกระดาษ และแป้งมันมันแปรรูปนำไปใช้ผลิตพลาสติก และฟิล์ม นอกจากนี้ใบมันสำปะหลังใช้ในการผลิตอาหารสัตว์

การนำแป้งไปใช้จะพิจารณาจากปริมาณ amylose (อะมายโลส) และ amylopectin (อะมายโลเพกติน) โดยแป้งที่มีอะมายโลเพกตินสูง จะช่วยให้อาหารมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน เพิ่มความเสถียร ความแข็ง ความหนืด ความยืดหยุ่น และช่วยยึดอายุของอาหาร ดังนั้นจึงนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผ้า กระดาษ กาว และสารให้ความเหนียวต่างๆ เป็นส่วนผสมในอาหารแช่แข็งช่วยยึดอายุของอาหาร ยังช่วยในความเงางามของกระดาษ และผ้า เพิ่มความคมชัดในการพิมพ์ เพิ่มความเหนียวของกาว เป็นต้น แป้งที่มีเฉพาะอะมายโลเพกติน เรียกว่า waxy ในปัจจุบันนิยมนำ waxy จาก

ข้าวโพดมาใช้ในการเพิ่มความเสถียร ความแข็งแรงของอาหาร และผ้า ส่วนแบ่งที่มีอะมัยโลสสูงจะ ใช้ทำอาหาร ประเภท่าง ขนมหวาน และอาหารคบเคี้ยว ทำฟิล์มถ่ายภาพ

การนำแป้งมันสำปะหลังไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ ทำให้กระดาษมีความขาว และมันวาว เพิ่มความเหนียวของกระดาษ ทำให้กระดาษเรียบ ลดการ กระจ่ายตัวของหมึกในกระดาษทำให้ไม่เลอะ เพิ่มความแข็งแรงของผิวกระดาษ เวลาพิมพ์ลาย ไม่หลุดง่าย เพิ่มน้ำหนักกระดาษ โดยจะมีแป้ง 5 % ของน้ำหนักกระดาษ ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เคลือบผ้า จะใช้ใน 3 กระบวนการการผลิต คือ ขั้นที่ 1 เตรียมด้าย ชุบให้ด้ายลื่น ไม่เกิดขนเวลาทอ เพิ่มความยืดหยุ่น ขั้นที่ 2 การพิมพ์ผ้าช่วยให้ผ้าพิมพ์ติดง่าย ไม่เลอะ และมีความสม่ำเสมอของสี ที่พิมพ์ และขั้นสุดท้ายช่วยให้ผ้ามีความคงทน และเพิ่มความเงางาม ใช้ในอุตสาหกรรมกาว และ ไม้อัด เพิ่มความหนาของไม้อัด เพิ่มความแข็งแรง และทนทาน ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และ เครื่องดื่ม ผลิตน้ำตาล ทำขนม เช่น เจลลาติน เป็นต้น ผลิตผงชูรส สารให้ความเหนียว เพิ่มความ ยืดหยุ่นของอาหาร เพิ่มความเสถียรในอาหารแช่แข็ง (การ freeze-thawing) และใช้ผลิตสารให้ ความหวาน เช่น high fructose, glucose, dextrin monophosphate, dextrin anhydrate และ sorbitol เป็นต้น และยังเป็นส่วนประกอบในยา และเครื่องสำอางค์ ใช้ในการรักษาสิ่งแวดล้อม ทำกรรมนา (กรดซิตริก) เพื่อผลิตโซเดียมซิเตรดแทนการใช้โพลีฟอสเฟตในผงซักฟอก การผสมลงไปใน พลาสติกเพื่อผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ การทำเป็นส่วนผสมในยาฆ่าแมลง และสารทำความสะอาด การผลิตเอทานอลแทนน้ำมันเชื้อเพลิง (เจริญศักดิ์, 2532)

การตัดแปรแป้งมันสำปะหลัง โดยเพิ่มความเสถียรต่อสภาวะกรด ทนต่อแรงอัด โดย การทำ cross link เช่น เติม aldehyde group พัฒนาคูณสมบัติการเกิดเจล และทำให้แป้งมีความใส โดยเพิ่มความยาวสาย A และ B1 ของอะมัยโลเพคติน ลดการใช้สารเคมีในการตัดแปร เนื่องจาก สามารถเกิด cross link ได้เองโดยธรรมชาติ ปรับปรุงกลิ่น และพัฒนาคูณภาพกระดาษ โดยการกำจัด ไชมันในแป้งออก การลด retrogradation และลดอุณหภูมิในการเกิดเจล โดยเติม O-methyl, O-succinyl, O-glucosyl, O-acetyl, O-phosphatyl และ O-galactosyl group หรือการลดความยาวของ สาย A และ B ของอะมัยโลเพคตินให้สั้นลง แต่มีความยาวที่จะสามารถเกิด retrogradation ได้ แล้ว ทำการสร้าง cross link ระหว่างสายทั้งสองเส้น หรือการเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลของอะมัยโลส หรือการ เพิ่มปริมาณอะมัยโลสให้สูงกว่า 90 % โดยการเติม หรือการย่อยแป้ง โดย isoamylase แต่การเพิ่ม ความยาวของสาย A และ B ของอะมัยโลเพคติน จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการเกิด retrogradation และทำให้เกิดความขุ่นในเจล การป้องกันการเกิด co-polymer และเพิ่มความเหนียวโดยการเติม aldehyde group การเพิ่มความหนืด และความอุ่มน้ำ เพื่อให้เกิดเจลได้ดีขึ้น โดยการเติม cation (ประจุ

บวก) ในอะมัยโลส พัฒนาการเกิดฟิล์ม และการละลายลดการเกิด retrogradation โดยสร้าง cross link ในตำแหน่งอื่นๆ ที่ไม่ใช่ที่ตำแหน่ง alpha (1 → 4) glycosidic linkage และ alpha (1 → 6) glycosidic linkage ช่วยลดปริมาณน้ำในแป้ง ลดการละลายน้ำ เพิ่มความเหนียว โดยเติม Acetyl group ช่วยเพิ่มความหนืด ทำให้เสถียร ณ อุณหภูมิต่ำ และสามารถเกิดเจลได้ ณ อุณหภูมิต่ำ โดยการเติม Hydroxyl, Methyl, Acetyl, Succinyl, Glucosyl, Phosphatyl และ Galactosyl group ให้กับแป้ง การเพิ่มความเสถียรของอาหารแช่แข็ง โดยลดจำนวนของสาย B2, B3 และ B4 ของอะมัยโลเพคติน ลด paste viscosity ช่วยในการสร้างเจล และ retrogradation เพิ่มการอุ้มน้ำ โดยการเพิ่มปริมาณ phytyglycogen ให้มากกว่า 90 % (Johnson, 1999)

2. การปลูก

2.1 ภูมิประเทศ และภูมิอากาศ

มันสำปะหลัง สามารถปลูกได้ในพื้นที่ ตั้งแต่บริเวณเขตเส้นรุ้งที่ 30 องศาเหนือ จนถึง 30 องศาใต้ แต่นิยมปลูกกันมากในบริเวณเขตเส้นรุ้งที่ 15 องศาเหนือ จนถึง 15 องศาใต้ การเจริญใน ภูมิอากาศเขตอบอุ่น 25-29 องศาเซลเซียส พบว่า ถ้ามีอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียสจะหยุดการ เจริญเติบโต สามารถปลูกตั้งแต่ ความสูงน้ำทะเล จนถึงเหนือระดับน้ำทะเล 2,000 เมตร เจริญใน พื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝน 500 ถึง 6,000 มิลลิเมตรต่อปี สามารถทนแล้งในพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนที่ต่ำกว่า 50 มิลลิเมตรต่อปีได้ และทนต่อสภาวะดินเป็นกรดต่างได้ดี (ในช่วง pH ระหว่าง 3.8-8.0) (เจริญศักดิ์, 2532) การปลูกในพื้นที่ที่มีแสงแดด 10-12 ชั่วโมงต่อวัน จะให้ผลผลิตสูงกว่าพื้นที่ที่มี แสงแดดมากกว่า 12 ชั่วโมงต่อวัน ดินที่เหมาะสมแก่การปลูกเป็นดินร่วนปนทราย เนื่องจากสะดวก ในการเก็บเกี่ยว และสามารถระบายน้ำได้ดี ทำให้ไม่เกิดการเน่าของหัวมันในช่วงฝนตกชุก

2.2 ฤดูกาลปลูก

เกษตรกรจะปลูกมันสำปะหลังตลอดทั้งปี โดยนิยมปลูกมากในเดือน มีนาคม- พฤษภาคม คิดเป็นร้อยละ 65 พฤศจิกายน-กุมภาพันธ์ คิดเป็นร้อยละ 20 และ มิถุนายน-ตุลาคม คิดเป็นร้อยละ 13 พบว่า การปลูกต้นฤดูฝนจะให้ผลผลิตหัวสดสูงสุด แต่ถ้าดินหยาบ การปลูกใน ฤดูแล้งจะให้ผลผลิตสูงสุด ดังนั้นการปลูกต้องพิจารณาจากปริมาณน้ำฝน และลักษณะดิน (เจริญศักดิ์, 2532) ฤดูการปลูกมันสำปะหลังในจังหวัดระยอง ชลบุรี และนครราชสีมา จะปลูกตลอด ทั้งปีนิยมปลูกในเดือนพฤษภาคม และมิถุนายน ในจังหวัดสุโขทัย และกำแพงเพชร นิยมปลูก

ต้นฤดูฝนในเดือนพฤษภาคม ถึง กรกฎาคม ซึ่งจะให้ผลผลิตสูงกว่าการปลูกช่วงกลางฤดู และปลายฤดูฝน ในจังหวัดสุพรรณบุรี และกาญจนบุรี นิยมปลูกต้นฤดูฝน (เม.ย.- ก.ค.) ซึ่งจะให้ผลผลิตสูง แต่ปริมาณแป้งที่ได้ไม่แตกต่างกับการปลูกในช่วงเดือนอื่นๆ ในจังหวัดขอนแก่น และนครราชสีมา นิยมปลูกต้นฤดูฝนในเดือนพฤษภาคม ถึง มิถุนายน ซึ่งจะให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อเทียบกับการปลูกในช่วงเดือนอื่นๆ และจังหวัดอื่นๆ ส่วนใหญ่จะปลูกในช่วงเมษายน และพฤษภาคม พบว่า การปลูกในต้นฤดูฝน แม้อายุการเก็บเกี่ยวจะต่างกัน (8-18 เดือน) ก็จะให้ปริมาณแป้งสูงกว่าการปลูกในฤดูอื่นๆ (กรมวิชาการเกษตร, 2526) การปลูกต้นฤดูฝน (พ.ค.-มิ.ย.) จะให้ผลผลิตหัวสดมากกว่าการปลูกกลางฤดูฝน (ก.ค.-ส.ค.) และปลายฤดูฝน (ก.ย.-ต.ค.) แม้อายุการเก็บเกี่ยว 8-18 เดือน (อนุชิต, 2521, 2522a, 2523a) การปลูกในต้นฤดูฝน (พ.ค.-มิ.ย.) จะให้ผลผลิตหัวสด และปริมาณมันแห้งสูงกว่าการปลูกกลางฤดูฝน (ก.ค.-ส.ค.) และปลายฤดูฝน (ก.ย.-ต.ค.) แม้อายุการเก็บเกี่ยว 6-16 เดือน พบว่าการปลูก 6-16 เดือน ให้เปอร์เซ็นต์มันแห้งใกล้เคียงกัน (34.8-36.29) (อนุชิต, 2519) การปลูกมันสำปะหลังในช่วงฤดูฝน (พ.ค.-ต.ค.) โดยเก็บเกี่ยวเมื่อปลูกครบ 12 เดือน การปลูกเดือนพฤษภาคมจะให้ผลผลิตสูงกว่าการปลูกในเดือนอื่นๆ ทั้งนี้หน้าหัวสด เปอร์เซ็นต์แป้ง และเปอร์เซ็นต์มันแห้ง (ชาย, 2521) พบว่า ผลผลิตหัวสดจะให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อปลูกเดือนมิถุนายน แต่เปอร์เซ็นต์แป้งจะสูงสุดเมื่อปลูกเดือนพฤษภาคม แม้จะมีอายุการเก็บเกี่ยว 8-18 เดือน แต่อายุการเก็บเกี่ยวที่ 12-16 เดือน จะให้ผลผลิตหัวสดสูงสุดเมื่อปลูกเดือนพฤษภาคม ผลผลิตต่อไร่ เมื่อปลูกได้ 8-12 เดือนจะให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อปลูกเดือนพฤษภาคม (กรมวิชาการเกษตร, 2526)

การศึกษาคุณสมบัติทางโครงสร้าง ขนาดเม็ดแป้ง ปริมาณอะมัยโลส และอะมัยโลเพคติน ในมันสำปะหลังพันธุ์ KU 50 ที่มีอายุการปลูก 6-16 เดือน พบว่า การปลูก 10 เดือนจะให้อะมัยโลสสูงสุด แต่มีขนาดเม็ดแป้งเล็กลง โครงสร้างของอะมัยโลเพคติน กิ่งแขนงมากที่สุดเมื่อปลูก 12 เดือน แต่จะมีความยาวของสายสั้นที่สุด และพบว่าปริมาณน้ำฝน และการเก็บเกี่ยวช่วงฤดูฝนจะมีผลต่อคุณภาพแป้ง ซึ่งไม่เหมาะแก่การนำไปใช้ในอุตสาหกรรม พบว่า การเก็บเกี่ยวขณะมีปริมาณน้ำฝนมากจะทำให้ปริมาณของอะมัยโลส ลดลง และมีโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้น โดยโครงสร้างของอะมัยโลเพคติน จะมีความยาวในช่วง 1,349-1,635 หน่วย จำนวนกิ่ง 7-9 จุด ใน 1 โมเลกุลโดยแขนงที่นำเข้ามาต่อจะมีความยาว 148-211 หน่วย (Sriroth, 1998) การปลูกพันธุ์ระยอง 1 (R 1) ในพื้นที่ต่างๆ เมื่อปลูกครบ 365 วันจะให้ผลผลิตไม่แตกต่างทางสถิติ โดยที่สถานีวิจัยพืชไร่ศรีสำโรง การปลูกในเดือนมิถุนายน จะให้ผลผลิตหัวสดสูงกว่าการปลูกในเดือนอื่นๆ ที่สถานีวิจัยพืชไร่บ้านใหม่สำโรง การปลูกในเดือนมิถุนายน จะให้ผลผลิตหัวสดสูงสุด แต่เปอร์เซ็นต์แป้ง (16.66-20.72) และเปอร์เซ็นต์มันแห้ง (25.2-34.88) ใกล้เคียงกัน แม้จะปลูกในเดือนใดก็ตาม ที่สถานีวิจัยพืชไร่ขอนแก่นการปลูกในเดือน กรกฎาคม ให้ผลผลิตหัวสด และเปอร์เซ็นต์มันแห้ง (28.0-29.8) สูงสุด ในปี 2515-2516 จะให้ผลผลิตหัวสดสูงในเดือนพฤษภาคม มิถุนายน และตุลาคม ตามลำดับ

ในปี 2516-2517 ให้ผลผลิตหัวสดสูงในเดือนพฤษภาคม มิถุนายน และตุลาคม ตามลำดับ ในปี 2517-2518 ให้ผลผลิตหัวสดสูงในเดือนกรกฎาคม มิถุนายน และพฤษภาคม ตามลำดับ ในปี 2518-2519 จะให้ผลผลิตหัวสดสูง เดือนพฤษภาคม มิถุนายน และตุลาคม ตามลำดับ (สุวิษ, 2518) จะเห็นได้ว่าการปลูกในเดือนมิถุนายน พฤษภาคม จะให้ผลผลิตสูง จึงเชื่อว่า การปลูกต้นฤดูฝนมีผลต่อผลผลิตหัวสด

2.3 การเตรียมพื้นที่ปลูก

การปลูกสามารถทำได้ 2 แบบ คือ ยกร่อง และไม่ยกร่อง พบว่า การยกร่องหรือไม่ยกร่องนั้น ไม่มีความแตกต่างในปริมาณผลผลิตที่ได้ (เจริญศักดิ์, 2532) แต่การยกร่องจะทำให้เกิดการเน่าเสียลดลงในพื้นที่ที่มีฝนชุก การไถดินเพื่อใช้ปลูกแบบใช้พาน 3 ไถ 1 ครั้ง และพาน 7 ไถอีก 2 ครั้ง จะให้ผลผลิตสูงกว่าการไถแบบใช้พาน 3 ไถ 2 ครั้ง และพาน 7 ไถอีก 2 ครั้ง และแบบพาน 3 ไถ 2 ครั้ง และพาน 7 ไถอีก 1 ครั้ง ตามลำดับ การไถดิน 3-4 ครั้งจะให้ผลผลิตสูงกว่าการไถเพียง 1 ครั้ง และการไถถึงดินดาน (อุทัย, 2524a) การไถดินไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอก แต่ความชื้นจะมีผลในการงอกของท่อนพันธุ์ พบว่า การเจริญ ผลผลิต ความสูงของต้น น้ำหนักของใบ และลำต้น จำนวนราก และขนาดของราก เป็นผลจากลักษณะของดิน การปลูกในดินเหนียวจะมีการเจริญช้าสุด และให้ผลผลิตต่ำ พบว่า การปลูก 11 เดือนจะให้ปริมาณรากสูงสุด การขุดดินลึก 10 เซนติเมตร ทั้ง bulk density และ penetrometer resistance จะสัมพันธ์กับน้ำหนักรากสด (Wichit, 1994) การปักชำทำได้ 2 แบบ คือ แบบที่ 1 การวางนอนแล้วฝังกลบ และแบบที่ 2 การปักลงในดิน โดยปักลงในดินลึก 10-15 เซนติเมตร สามารถปักได้ทั้งแบบเฉียง หรือแบบตั้งตรง ซึ่งจะไม่มีความแตกต่างในผลผลิต (สุขุมาลัย, 2546) แต่การปลูกแบบปักจะทำให้ท่อนพันธุ์งอกได้เร็วกว่าการปลูกแบบวางนอน วิธีการปลูกไม่มีผลต่อจำนวนหัว การศึกษาระยะห่างในการปลูกระหว่างต้น โดยปลูกระยะ 60x60 เซนติเมตร จนถึง 120x120 เซนติเมตร พบว่า การปลูกระยะ 100x100 เซนติเมตร ที่สถานีวิจัย ห้วยโป่ง อุทอง ขอนแก่น และเลย จะให้ผลผลิตสูงกว่าการปลูกด้วยระยะ 200x50 เซนติเมตร, 150x66.66 เซนติเมตร และ 100x33.33 เซนติเมตร ตามลำดับ (อุทัย, 2524b) การปลูกระยะห่างระหว่างแถว 0-100 เซนติเมตร ที่สถานีวิจัยพืชไร่ห้วยโป่ง ขอนแก่น และบ้านใหม่สำโรง ให้ผลผลิตต่อต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ (อุทัย, 2524c) การใส่ปุ๋ยจะใส่ 2 ครั้ง โดยใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 หรือ 16-8-16 ในอัตราส่วน 50-100 กิโลกรัมต่อไร่ โดยการใส่ครั้งแรกเมื่อปลูก 1 เดือน และใส่ครั้งที่ 2 เมื่อปลูก 3 เดือน พบว่า การใส่ปุ๋ยเคมี 1,250 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ จะให้ผลผลิตที่สูงกว่าการให้ปุ๋ย 625, 313 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ และไม่มีการใส่ปุ๋ยตามลำดับ (โอภาส, 2539) แสดงว่า ปุ๋ยเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งในการเพิ่มผลผลิต

2.4 การเตรียมท่อนพันธุ์

การเตรียมท่อนพันธุ์ต้องใช้ท่อนพันธุ์จากต้นที่มีอายุ 8-12 เดือน เมื่อนำไปปลูกจะทำให้มีการสูญเสียที่ต่ำ 10-36 % (เจริญศักดิ์, 2532) เปอร์เซ็นต์การงอกของท่อนพันธุ์ พบว่า การปลูกมันสำปะหลังต้นฤดูฝนจะมีเปอร์เซ็นต์การงอก 97.6 % ซึ่งสูงกว่าการปลูกปลายฤดูฝนที่มีเปอร์เซ็นต์การงอก 86.9 % พันธุ์มันสำปะหลังที่มีการงอกสูง คือ KU 50, R 5 และ HB 60 ตามลำดับ (สุขุมาลัย, 2546) การปักชำกิ่งจะทำให้เกิด sprout และ adventitious root ภายใน 1 สัปดาห์ และเริ่มสร้างหัวในสัปดาห์ที่ 8 หลังปลูก โดยจำนวน adventitious root มีจำนวนจำกัด ซึ่งการงอกรากมีผลจากฮอร์โมน cytokinin ดังนั้นกิ่งชำควรมีความยาว 40-50 เซนติเมตร ซึ่งจะให้อัตราการงอกสูง และเพิ่มน้ำหนักหัวสดได้ดีกว่าการตัดกิ่งชำ 15-20 เซนติเมตร (เจริญศักดิ์, 2532) พบว่า การปลูกต้นฤดูฝนโดยใช้ท่อนพันธุ์ที่มีความยาว 20, 30 และ 40 เซนติเมตร จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกใกล้เคียงกันทั้ง 3 พันธุ์ แต่การปลูกปลายฤดูฝนควรใช้ท่อนพันธุ์ที่มีความยาวมากกว่า 30 เซนติเมตรขึ้นไป เพราะท่อนพันธุ์ที่มีความยาว 20 เซนติเมตรมีเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 70 % และพบว่า การปลูกต้นฤดูฝนจะมีจำนวนแขนงสูงกว่าการปลูกปลายฤดูฝน โดยพันธุ์ R 5 และ HB 60 ให้จำนวนกิ่งมากกว่า KU 50 แต่การปลูกปลายฤดูฝนจะได้ผลผลิตหัวสด และหัวแห้งสูงกว่าการปลูกต้นฤดูฝน พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง คือ HB 60, KU 50 และ R 5 ตามลำดับ การปลูกต้นฤดูฝนจะได้ปริมาณแป้งสูงกว่าการปลูกปลายฤดู พันธุ์ที่ให้แป้งสูง คือ KU 50, HB 60 และ R 5 ตามลำดับ การปลูกต้นฤดูฝนใช้ท่อนพันธุ์ที่มีความยาว 40 เซนติเมตร จะให้ปริมาณแป้งสูงกว่าท่อนที่ยาวกว่า 30 และ 20 เซนติเมตร แต่การปลูกปลายฤดูฝน การใช้ท่อนพันธุ์ที่มีความยาว 20 เซนติเมตรจะให้ปริมาณแป้งสูงกว่าท่อนที่ยาวกว่า 30 และ 40 เซนติเมตร (สุขุมาลัย, 2546) แสดงให้เห็นว่า ความยาวของท่อนพันธุ์ควรมีการเลือกให้เหมาะสมกับฤดูกาลที่จะปลูก เนื่องจากมีผลต่อการงอก และปริมาณแป้งที่จะผลิตได้

การศึกษาอิทธิพลความยาวของท่อนพันธุ์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของมันสำปะหลัง ซึ่งทำการทดลองที่จังหวัดปราจีนบุรี พบว่า ในด้านอายุของท่อนพันธุ์ หากใช้ท่อนพันธุ์ที่มีอายุมากกว่า 18 เดือน จะงอกได้ช้า และอัตราการรอดต่ำ การใช้ท่อนพันธุ์จากส่วนโคน และส่วนกลางลำต้น จะมีความงอก และผลผลิตสูงกว่าการใช้ส่วนปลาย แต่การใช้ส่วนปลายจะให้เปอร์เซ็นต์แป้งสูงกว่าการใช้ท่อนพันธุ์จากส่วนอื่นๆ ดังนั้นควรมีความยาวของท่อนพันธุ์ 20-30 เซนติเมตร หรือมีตาอย่างน้อย 7-10 ตา/ท่อน พบว่า ความสูงของต้น ความยาวของหัว และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวจะสัมพันธ์กับความยาวของท่อนพันธุ์ พบว่า การใช้ท่อนพันธุ์ยาว 25-45 เซนติเมตร จะมีจำนวนหัวมาก ท่อนพันธุ์ KU 50 ความยาว 40 เซนติเมตรจะให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้ท่อนพันธุ์ขนาด 20 เซนติเมตร และการศึกษาต่อความยาวของท่อนพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CMR 25-105-112 เมื่อ

ปลูกระยะปลูก 0.8 X 0.8 เมตร จะให้ผลผลิตสูงเมื่อใช้ท่อนพันธุ์ยาว 40 เซนติเมตร แต่การปลูก ระยะห่าง 1.0 X 1.0 เมตร จะให้ผลผลิตสูงเมื่อใช้ท่อนพันธุ์ยาว 20 เซนติเมตร ความงอกของท่อน พันธุ์ในฤดูแล้ง การปลูกควรให้น้ำอย่างน้อย 7 วัน จะทำให้มีเปอร์เซ็นต์การงอก มากกว่า 90 % (สุขุมาลัย, 2546) การนำท่อนพันธุ์มาตั้งไว้ก่อนปลูกไม่ควรตั้งนานเกิน 7-15 วัน เพราะจะทำให้ คุณภาพในการงอกของท่อนพันธุ์ลดลง

2.5 การเก็บเกี่ยว

การเก็บหัวมันที่อายุต่างกันจะมีผลต่อคุณสมบัติของแป้ง (Marlon, 2002) ซึ่งมีผลต่อ ลักษณะการหลอมเป็นพลาสติก (plasticization) และการเกิดเจล (gelatinization) ของเม็ดแป้ง (Pathama, 2003) เกษตรกรจะทำการเก็บเกี่ยวเมื่อปลูกได้ 8-14 เดือน แต่นิยมเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน เพราะให้ผลผลิตน้ำหนักสดสูงสุด และทันการปลูกในรอบปีถัดไป จากการศึกษาอายุการเก็บ เกี่ยว พบว่า การปลูก 12 เดือนจะให้ผลผลิตน้ำหนักสดสูงกว่าการปลูก 9 เดือน (โอภาส, 2539) เมื่อ อายุการเก็บเกี่ยวที่นานขึ้น ก็จะทำให้น้ำหนักหัวสดเพิ่มขึ้น แต่การปลูก 14-18 เดือนจะให้ปริมาณแป้ง ใกล้เคียงกัน (อนุชิต, 2523) การเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังพันธุ์ R 1 เมื่ออายุ 9 และ 12 เดือนให้ผลผลิต น้ำหนักสดต่อไร่ไม่แตกต่างกัน และการเก็บเกี่ยวเมื่อมันสำปะหลังอายุ 15-24 เดือนให้ผลผลิต น้ำหนักสดไม่แตกต่างกัน และในสถานีวิจัยพืชไร่อุทุมของการเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 9-24 เดือนให้ผลผลิต ไม่แตกต่างกัน แต่ที่สถานีวิจัยพืชไร่บ้านใหม่สำโรงการเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 15 เดือนจะให้ผลผลิตสูงสุด และหากปลูกนานออกไปจนถึง 24 เดือนจะให้ผลผลิตไม่แตกต่างกัน (วัฒนะ, 2523) แสดงถึงอายุ ลักษณะความอุดมสมบูรณ์ของดิน และสภาพภูมิอากาศจะมีผลต่อผลผลิต การศึกษาผลผลิตหัวสดใน มันสำปะหลังพันธุ์ R 1 ที่ปลูก 9-12 เดือนจะให้ผลผลิตหัวสดต่ำกว่าการปลูก 15-18 เดือน (วัฒนะ, 2523) การตัดต้นมันสำปะหลังมีผลต่อผลผลิต พบว่า การขุดมันสำปะหลังทันที กับการตัดต้นทิ้งไว้ 15-30 วันแล้วค่อยขุดไม่พบความต่างในเปอร์เซ็นต์แป้ง โดยการขุดทันทีจะทำให้ได้เปอร์เซ็นต์แป้ง สูงสุดโดยจะค่อยลดลงเมื่อตัดทิ้งไว้จนถึง 60 วัน แต่แป้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อทิ้งไว้ 75 วัน เนื่องจากแป้งถูก นำไปใช้ในการเจริญของยอดใหม่ แต่พอ 75 วัน เริ่มมีการสังเคราะห์แสง และเกิดการสะสมแป้งขึ้น ใหม่ จึงทำให้มีปริมาณแป้งเพิ่มขึ้น (อนุชิต, 2522b) แสดงว่า ควรรีบขุดหัวทันทีหลังตัดต้น โดยต้อง เก็บภายใน 30 วันเพื่อไม่ให้เปอร์เซ็นต์แป้งลดลง

2.6 ฤดูกาลเก็บเกี่ยว

ภาคเหนือ (กำแพงเพชร พิษณุโลก นครสวรรค์ และอุทัยธานี) เก็บเกี่ยวกันมากสุดในเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อุดรธานี บุรีรัมย์ กาฬสินธุ์ ขอนแก่น และชัยภูมิ) เก็บเกี่ยวกันมากสุดในเดือน ตุลาคม-กันยายน และมกราคม-กุมภาพันธ์ ภาคกลาง (ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว จันทบุรี ระยอง ชลบุรี และกาญจนบุรี) เก็บเกี่ยวกันมากสุดในเดือน มิถุนายน-กันยายน พบว่ามีผลผลิตจากการเก็บเกี่ยวมากในเดือน กุมภาพันธ์ มกราคม ธันวาคม มีนาคม และพฤศจิกายน ตามลำดับ (เจริญศักดิ์, 2532) แสดงว่า มีการรับซื้อกันในช่วง เดือนกันยายน-มีนาคม ดังนั้นการปลูกให้ได้อายุที่เหมาะสม และทันรอบการเก็บเกี่ยวของปีถัดไป โดยต้องให้อายุการเก็บเกี่ยวไม่อยู่ในช่วงฤดูฝนเนื่องจากทำให้ผลผลิตเสียหาย และการเก็บเกี่ยวหัวมันสำปะหลังหลังฝนตก จะเกิดการตอบสนองของมันสำปะหลังต่อสภาวะน้ำท่วม (water stress) ทำให้เปอร์เซ็นต์แป้งลดลง และทำให้คุณสมบัติแป้งไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม (Vilai, 2001; Sriroth, 1998)

3. แป้ง

3.1 ลักษณะ และองค์ประกอบของแป้ง

แป้งจะมีรูปร่าง กลม รี หรือหลายรูป ขนาด 1-100 ไมโครเมตร การอยู่ของเม็ดแป้งโดยอยู่แบบเดี่ยวๆ หรือจับกลุ่ม ขึ้นกับชนิดของพืช (Richard, 2004) โดยแป้งในพืชชั้นสูงสามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ transitory starch ซึ่งมีขนาดเล็ก เป็นแป้งที่สะสมในช่วงเวลาสั้นๆ สร้างที่ chloroplast ในใบ และเนื้อเยื่อ ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ การสร้างแป้งชนิดนี้จะเกิดในเวลา กลางวัน แล้วย่อยอย่างรวดเร็วในเวลากลางคืนจะได้น้ำตาล จากนั้นเคลื่อนย้ายไปสะสมในอวัยวะสะสม และ reserve starch หรือ storage starch จะถูกสร้างใน amyloplast หรือ chloroplast จะมีรูปร่างต่างกันตามแต่ละพันธุ์พืช โดยมักไม่มีการเปลี่ยนรูป แต่จะเพิ่มจำนวนวง หรือขนาดตามอายุของพืช

แป้งเป็น alpha-glucan สามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ amylose (อะมัยโลส) และ amylopectin (อะมัยโลเพคติน) แต่มีตัวกลางในการเปลี่ยนแปลงระหว่างอะมัยโลส กับ อะมัยโลเพคติน เรียกว่า intermediate molecule

อะมัยโลส มีความยาว 840-22,000 ขนาดโมเลกุล $1.4 - 36 \times 10^5$ มี degree of polymerization (DP) เฉลี่ย 2,600 จำนวนเฉลี่ยของสายเป็น 7.6 ความยาวสายเฉลี่ย 340 มีการแตกแขนงเป็นสายสั้นๆ มีความยาว 6-12 หน่วย จะเชื่อมต่อกันด้วย alpha (1 \rightarrow 4) glycosidic linkage ซึ่งอะมัยโลส ยังแบ่งได้ อีก 2 แบบ (Cura, 1995) คือ แบบไม่มีกิ่งก้าน [100 % ที่เป็นการเชื่อมด้วย alpha (1 \rightarrow 4) glycosidic linkage] กับมีกิ่งก้าน [มี 1 % ที่เป็นการเชื่อมด้วย alpha (1 \rightarrow 6) glycosidic linkage และมี 99 % ที่เป็นการเชื่อมด้วย alpha (1 \rightarrow 4) glycosidic linkage] อัตราส่วนระหว่างอะมัยโลสที่เป็นเส้นตรงกับเส้นกิ่ง มีความหลากหลายต่างกันจากจุดกำเนิดของแป้ง พบว่า จำนวนกิ่งของอะมัยโลสจากแป้งในธัญพืชจะมีน้อยกว่าแป้งที่ได้จากพืชที่ไม่ใช่ธัญพืช (ผลไม้ ถั่ว และหัวมัน) เช่น ในเมล็ดข้าว พบว่า อะมัยโลสจำนวน 2 ใน 3 เป็นโมเลกุลที่ไม่มีกิ่ง เป็นต้น การจัดเรียงตัวของอะมัยโลสในเม็ดแป้ง สายของอะมัยโลสจะจับกันด้วย helical complex โดยโมเลกุลของอะมัยโลส ส่วนใหญ่จะจับเป็นเกลียวคู่อยู่กับอะมัยโลเพคตินที่ใจกลางของเม็ดแป้ง ส่วนอะมัยโลสที่ไม่จับกับอะมัยโลเพคตินจะกระจายตัวอยู่ทั่วเม็ดแป้ง พบว่า อะมัยโลสในสารละลาย ณ อุณหภูมิห้อง จะเป็นเกลียวม้วน เกลียวคลายตัว และม้วนแบบไม่เจาะจง

อะมัยโลเพคติน มี 95 % ที่เป็นการเชื่อมด้วย alpha (1 \rightarrow 4) glycosidic linkage เกิดเป็นเส้นตรง และมี 5 % ที่เป็นการเชื่อมด้วย alpha (1 \rightarrow 6) glycosidic linkage มีน้ำหนักโมเลกุล $10^7 - 10^9$ มี DP เท่ากับ 9,600 – 15,900 ซึ่งประกอบด้วยสายโซ่ 3 ชนิด คือ สายโซ่ A เชื่อมต่อกับสายอื่นเพียง 1 ตำแหน่ง โดยไม่มีกิ่งเชื่อมอื่นๆอีก เป็น reducing 2 หมู่ DP เฉลี่ยของสาย A เท่ากับ 15 สายโซ่ B เชื่อมต่อสายอื่นๆ 2 สายขึ้นไป เป็น reducing 2 หมู่ DP เฉลี่ยของสาย B เท่ากับ 45 และสายโซ่ C เป็นสายแกน โดยมีหมู่ reducing 1 หมู่ อีกหมู่เป็น non-reducing อัตราส่วนของสาย A:B อยู่ในช่วง 0.8-0.9 : 1.0 โดยสายหลักของอะมัยโลเพคติน จะมีขนาดที่สั้นกว่าสายหลักของอะมัยโลส การเกิดสายกิ่ง จะเกิดทุกๆ 20-30 หน่วย เชื่อว่า การสร้างของอะมัยโลเพคติน ไม่ได้เป็นการสร้างอย่างอิสระ พบว่า มีการนำแขนงเข้ามาต่ออย่างจำเพาะ โดยอัตราส่วน ของสาย A/ สาย B เท่ากับ 1 และเอนไซม์ที่สำคัญคือ debranching enzyme (DBE) ซึ่งจะตัด alpha (1 \rightarrow 6) glycosidic linkage ทำให้เกิดในตำแหน่งที่จำเพาะ และแขนงมีความยาวจะประมาณ 25 หน่วย จากการวิเคราะห์สายแขนง โดยการสลายด้วย beta-amylase ซึ่งเป็น exo-enzyme จะสลาย maltose โดยเมื่อย่อยสาย A จะสลาย glucose ออกไป 2-3 หน่วย แต่สาย B จะสลาย glucose ออกไป 1-2 หน่วย พบว่า แขนงประมาณ 65 % เป็นแขนงที่ไม่ซับซ้อน แต่อีก 35 % จะมีแขนงจำนวนมาก พบว่า การต่อสายอะมัยโลเพคตินจะสัมพันธ์กับรูปแบบในการแสดงออกของเอนไซม์ที่ใช้ในการต่อสาย (Thompson, 2000) การเกิดเกลียวคู่ของอะมัยโลเพคติน โดยพันธะไฮโดรเจน และแรงวันเดอร์วาลส์

Intermediate molecule จะมีกิ่ง และน้ำหนักรวมโมเลกุลอยู่กึ่งกลางระหว่าง อะมัยโลส กับ อะมัยโลเพคติน โดยมีโมเลกุลของสายตรง DP 50-200 มีกิ่งก้านน้อย แต่มีความยาวสายโซ่มากกว่า อะมัยโลเพคติน และโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าอะมัยโลเพคติน ซึ่งมีกิ่งก้านจำนวนมาก เรียกว่า phytoglycogen มีคุณสมบัติในการละลายน้ำ แต่เมื่อผ่านกระบวนการ glucan trimming model จะได้ อะมัยโลเพคตินปกติ การแบ่งชนิดของแป้ง สามารถแบ่งจากปริมาณของอะมัยโลสต่อปริมาณ อะมัยโลเพคติน เช่น แป้งที่เป็น waxy จะมีอะมัยโลสน้อยกว่า 15 % แป้งธรรมดาจะมีอะมัยโลส 20 - 35 % และแป้งที่มีอะมัยโลสสูงมีอะมัยโลสมากกว่า 40 %

3.2 การสังเคราะห์แป้ง

3.2.1 กระบวนการสังเคราะห์แป้ง และการเคลื่อนย้าย

การสร้างแป้งจะเกิดหลังจากมีกระบวนการสังเคราะห์แสงใน chloroplast ได้ glucose แล้วเข้าสู่ glycolysis pathway และ TCA cycle ตามลำดับ เพื่อสร้าง triose phosphate ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จากนั้น triose phosphate 2 โมเลกุลจะถูกนำมาสร้าง fructose-1,6-bisphosphate (F-1,6-BP) แล้วจะถูกเปลี่ยนจนกระทั่งได้ glucose-1-phosphate (G-1-P) และ sucrose ตามลำดับ แล้วส่งมาเก็บในเนื้อเยื่อสะสม เพื่อสร้างเป็นแป้ง นอกจากการเคลื่อนย้ายในรูป sucrose แล้วยังสามารถอยู่ในรูปอื่น ๆ เช่น trisaccharide, tetrasaccharide และ sugar alcohol และยังมีการสะสม ในรูป fructan แต่การสังเคราะห์แป้งในเนื้อเยื่อสะสม เช่น เอนโดสเปิร์ม จะเริ่มจากการเปลี่ยน hexose เป็น dihydroxyacetone phosphate (DHAP) จึงจะสามารถเคลื่อนย้ายได้แล้วเข้าสู่ glycolysis pathway ใน cytoplasm ของเนื้อเยื่อสะสม แล้วนำเข้าสู่ amyloplast โดย phosphate translocator เพื่อนำไปสังเคราะห์แป้ง โดยเปลี่ยน adenosine triphosphate (ATP) เป็น adenosine diphosphate glucose (ADPG) โดย ADP glucose phosphorylase (AGPase) พบว่า การสร้าง phosphoglyceric acid (PGA) ใน chloroplast จะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ADPG ทำให้มีการสังเคราะห์แป้งเพิ่มสูงขึ้น แต่ในขณะเวลากลางคืนไม่มีการสร้าง PGA จึงทำให้สร้าง ADPG ลดลง จึงหยุดการสังเคราะห์แป้ง ในเวลากลางวันจะมีการสะสมแป้งใน chloroplast จะเรียกแป้งชนิดนี้ว่า transitory starch และเกิดการย้ายของแป้งในเวลากลางคืนไปยัง amyloplast ใน non-photosynthetic tissue ของเนื้อเยื่อสะสม เช่น เมล็ด ผล หัว เป็นต้น โดยเรียกแป้งชนิดนี้ว่า storage starch และนอกจากนี้ การเปลี่ยนรูปของ sucrose ให้เป็นแป้ง โดย sucrose จะถูกส่งผ่าน phloem ไปเก็บยังอวัยวะต่างๆ โดย sucrose transporter (SUT) โดยสลาย sucrose เป็น glucose และ fructose โดย invertase (Inv) หรือ sucrose synthase (SuSy) ใน cytosol วิธีที่ 1 การสลาย โดย SuSy แล้วสารจะถูกเปลี่ยนโดย fructokinase และ

UDP glucose pyrophosphorylase (UGPase) ตามลำดับ เพื่อนำไปสร้าง UDPG และ glucose-6-phosphate (G-6-P) แล้ว UDPG จะถูกเปลี่ยนเป็น uridine-1-phosphate (U-1-G) ใน cytosol ขณะมี PPi ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย UGPase แต่ G-6-P จะถูกส่งเข้า amyloplast และถูกเปลี่ยนเป็น G-1-P ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย phosphoglucomutase (PGM) การนำสารเข้าสู่ amyloplast นั้นสามารถทำได้หลายวิธี คือ การข้ามโดยอยู่ในรูป G-6-P และ G-1-P โดยตรง หรือการเข้ามาในรูป ADPG ขณะมี ATP (Richard, 2004) และวิธีที่ 2 การสลาย sucrose โดย Inv แล้วจะถูกเปลี่ยนโดย fructokinase, hexokinase และ AGPase ตามลำดับ นำไปสร้าง ADPG โดยมี phosphoglucose isomerase (PGI) และ PGM ควบคุมระดับของ hexose phosphate

เมื่อสร้าง ADPG แล้วจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์สายของอะมัยโลส และ อะมัยโลเพคติน โดย granule bound starch synthase (GBSS I) จะต่อ malto-oligosaccharide (MOS) ให้อะมัยโลส และ soluble starch synthase (SSS) จะต่อสายให้อะมัยโลเพคติน การเติม ADPG ทางปลาย non-reducing โดยเอนไซม์ Starch synthase (SS) สร้างพันธะ $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glycosidic ได้ อะมัยโลส และ starch branching enzyme (SBE) สลายพันธะ $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glycosidic สร้างพันธะ $\alpha(1 \rightarrow 6)$ glycosidic ได้ อะมัยโลเพคติน จากนั้นการสร้างผลึกจะมีเอนไซม์ที่ช่วยในการสร้างผลึกจำพวก debranching enzyme, DBE (Q enzyme) เช่น phosphorylase (P enzyme EC 2.4.1.1) และ glucanotransferase (D enzyme EC 2.4.1.25) การต่อสายอาจเกิดการสร้างกิ่งแขนงมากเกินไป หรือระยะกิ่งแขนงที่ห่างไม่เหมาะสม จะเกิดการตัดด้วย DBE สร้างเป็นอะมัยโลเพคตินที่ถูกต้อง และมี protein phosphorylation (phosphatase) เป็นตัวเติม phosphate ที่ C3 หรือ C6 ของน้ำตาล และ พบ phosphorylase ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในการสังเคราะห์แป้ง

3.2.2 การสังเคราะห์แป้ง

การสร้างแป้ง มีขั้นตอนหลักๆ 4 ขั้นตอน คือ ขั้น 1 ขั้นเริ่มต้น สร้าง ADPG ควบคุมการสังเคราะห์โดยเอนไซม์ ADP glucose phosphorylase (AGPase) ขั้น 2 ขั้นนำ ADPG ไปต่อสายของ oligosaccharide เช่น maltotriose และ MOS จะมีเอนไซม์ granule bound starch synthase (GBSS) คุมการสังเคราะห์อะมัยโลส เช่น GBSSI แต่ อะมัยโลเพคตินควบคุมการสังเคราะห์ โดยเอนไซม์ soluble starch synthase (SSS) เช่น SSI จะสร้าง glucan สายสั้นๆ ของอะมัยโลเพคติน, SSIIa สร้างสาย A และ B1 ของอะมัยโลเพคติน, SSIIb สร้างสาย B2 และ B3 ของอะมัยโลเพคติน, SSIII สร้างสาย B ของอะมัยโลเพคติน ขั้น 3 ขั้นต่อกิ่งก้าน ควบคุมการสังเคราะห์โดยเอนไซม์ starch branching enzyme (SBE) และขั้นสุดท้ายการสร้างเม็ดแป้ง โดยมีการ

จัดเรียงของ crystalline กับ amorphous โดยการจัดเรียงตัวนั้นขึ้นกับพันธะ และอัตราส่วนของ อะมัยโลส และอะมัยโลเพคติน

3.2.3 เอนไซม์ควบคุมการสังเคราะห์แป้ง

3.2.3.1 ADP-glucose phosphorylase (AGPase) (EC 2.7.7.23)

AGPase เป็นเอนไซม์ในขั้นกำหนดอัตรา (rate limiting step) ของการสังเคราะห์แป้ง (Smith, 1997) โดย ADPG จะเป็นสารที่กำหนดปริมาณในการสร้าง alpha-glucan พบว่า การลดลงของ AGPase ทำให้ปริมาณแป้งลดลง โดยเอนไซม์นี้อยู่บน *loci Shrunken-2* และ *Brittle-2* (Munyikwa, 1997) AGPase เร่งการสร้าง ADPG จาก ATP และ G-1-P เราสามารถแบ่ง AGPase ออกได้ 2 กลุ่ม จากตำแหน่งของการแสดงออกของเอนไซม์ คือ plastidial และ cytosolic โดยเอนไซม์นี้จะมีความหลากหลายในเนื้อเยื่อของพืช และความต่างของพันธุกรรม (genotype)

ความสำคัญของ AGPase ในมันฝรั่งจะทำให้ปริมาณอะมัยโลสลดลง และทำให้ อะมัยโล เพคติน มีความยาวของสายสั้นลง AGPase มีลักษณะเป็น heterotetrameric protein ขนาด 210-240 KDa ประกอบด้วย 4 subunit คือ 2 subunit ของ large subunit และ 2 subunit ของ small subunit พบว่า large subunit มีขนาด 51-60 KDa. มีลักษณะของ regulatory site แต่ small subunit มีขนาด 50-55 KDa. มีลักษณะของ catalytic site (Emes, 2003) พืชในพันธุ์เดียวกันจะมีลำดับเบสของ small subunit เหมือนกัน แต่ large subunit จะมีความหลากหลาย เชื่อว่า *AGPase* gene เป็น multigene family ซึ่งสร้าง 1 ใน 2 subunit โดยมีความแตกต่างในการแสดงออก เช่น ในมันฝรั่งมีการถอดรหัส 4 แบบ โดย 3 แบบจาก large subunit และ 1 แบบจาก small subunit โดยมีการแสดงออก ทั้ง 3 แบบของ large subunit ในหัว แต่จะพบเพียง 2 แบบในใบ การแสดงออกของยีนจะต่างกันตามระยะการเจริญ สักร้า และสารที่สร้างขึ้น (metabolic signal) แต่ยีนของ small subunit จะต่างกันตามลักษณะภายใน (spatial) และการกระตุ้นขณะนั้น (temporal) (Smith, 1997) พบว่า ในหัว จะมีการแสดงออก 2 ยีนของ large subunit ในระยะที่เอมบริโอกำลังเจริญ แต่มีเพียง 1 ยีนที่แสดงออกในตา และใบ ส่วน small subunit ที่แปลรหัสจาก *BRITTLE2* gene จะแสดงออกเฉพาะในเอมบริโอเท่านั้น แต่ small subunit ที่แปลรหัสจาก *AGP1* gene แสดงออกในเอมบริโอ และมีการแสดงออกในปริมาณน้อยในเอนโดสเปิร์ม (Smith, 1997) ในข้าวบาร์เลย์ มี 2 ยีนสร้าง large subunit โดยยีนแรกมีการแสดงออกเฉพาะในเอนโดสเปิร์ม และอีกยีนพบในใบ แต่ส่วน small subunit gene มีเพียง 1 ยีน จึงทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่สร้าง small subunit ในเอนโดสเปิร์ม กับยีนที่

เฉพาะในใบ พบว่า จะมีลำดับเบสเหมือนกัน 90 % โดยมีความต่างที่ปลาย 5' (Smith, 1997) และจากการศึกษาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะมีความหลากหลาย ใน exon แรก

จากการศึกษาการชักนำการแสดงออก พบว่า AGPase จะถูกควบคุมโดยน้ำตาล และการหายใจของพืช ในขณะที่เจริญของพืช (Emes, 2003) ในพืชชั้นต่ำ และ E. coli จะเป็น homotetrameric enzyme ควบคุมโดย F-1,6-BP และ adenosine monophosphate (AMP) แต่ในพืชชั้นสูงจะเป็น heterotetrameric enzyme ควบคุมโดย 3-phosphoglyceric acid (3-PGA) และ inorganic phosphate (Pi) การสังเคราะห์แบ่งจะมี pyrophosphate (PPi) เป็น cofactor และมีน้ำตาลเป็นตัวกระตุ้น (regulatory signal) ใน cytosol (Richard, 2004) นอกจากการกระตุ้นด้วย 3-PGA แล้วยังสามารถถูกกระตุ้นด้วย pyruvate, F6P, F-1,6-BP และนอกจากการยับยั้งโดย Pi แล้วยังสามารถถูกยับยั้งด้วย AMP (Thomas, 1996) การกลายพันธุ์ที่ large subunit ของ AGPase โดยเปลี่ยน proline ในตำแหน่งที่ 50 เป็น leucine ใน PAV motif (Proline, Alanine, Valine) จะทำให้ลดการตอบสนองจากการกระตุ้นโดย 3-PGA และการเปลี่ยน leucine เป็น phenylalanine ใน small subunit พบว่า เมื่อกระตุ้นโดย F-6-P จะเพิ่มกิจกรรมขึ้น 16 เท่า และการกระตุ้นโดย phosphoenolpyruvate (PEP) จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น 16 เท่า และการเปลี่ยน proline ให้เป็น leucine ในตำแหน่งที่ 50 ใน PAV motif ซึ่งจะลดความไวในการตอบสนองต่อ 3-PGA และการเปลี่ยน leucine เป็น phenylalanine ในตำแหน่ง 46 ของ large subunit จะทำให้มีการทำกิจกรรมเพิ่มขึ้นจากเดิม 25 เท่า เมื่อมีการกระตุ้นด้วย F-6-P จะเพิ่มกิจกรรมขึ้น 16 เท่า และกระตุ้นด้วย PEP จะเพิ่มกิจกรรมขึ้น 9 เท่า พบว่า บริเวณใกล้เคียงคาร์บอกซิลของ small subunit จะมี lysine ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ การกลายพันธุ์ใน *rb rug3* และ *rug4* loci ของถั่วจะมีผลต่อการสร้าง ADPG และการกลายพันธุ์ใน *STA1* และ *STA5* loci ของ *Chlamydomonas* จะมีผลต่อการสร้าง ADPG (Denyer, 2001) พบว่า AGPase ใน E. coli มี lysine-195 เป็นบริเวณที่มีการจับกับ G-1-P แต่ในพืชชั้นสูง จะอยู่ที่ lysine-188 และลำดับกรดอะมิโนที่อยู่เหนือ PAV motif ของ E. coli ที่ lysine-39 เป็นบริเวณ activator binding site โดยบริเวณ PAV motif จะมีลักษณะของ positively charged amino acid โดยมี lysine เป็นบริเวณจับของ 3-PGA ด้วย (Thomas, 1996)

การศึกษา cDNA ของ AGPase ในมันสำปะหลัง พบว่า มี 3 cDNA clones โดยให้ชื่อว่า *AGPaseS2* (Shrunken) *AGPaseS3* และ *AGPaseB* (Brittle) โดยมีการรายงานเป็นลำดับกรดอะมิโน (Munyikwa, 2001) การแสดงออกของ *AGPaseB* ในมันสำปะหลังจะมีการแสดงออกในใบ และหัว โดยพบมากในใบอ่อนมากกว่าในใบแก่ และหัว พบว่า การลดลงของ *AGPaseB* จะลดปริมาณการสะสมแป้งลง 1.5-3.0 เท่า แต่จะเพิ่มปริมาณของน้ำตาลที่ละลายน้ำ ได้แก่ sucrose, glucose และ

fructose การทำแผนที่ยีน (genetic map) พบ *AGPaseS* อยู่บน group E มีขนาด 2.3 kb. โดยมียีนเพียง 1 ตำแหน่ง แต่ *AGPaseB* อยู่บน group P มีขนาด 2 kb. โดยมียีนอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง พบว่า ทั้ง 2 ยีนมีลำดับเบสเหมือนกัน 54 % โดย *AGPaseS* จะมีการแสดงออกในทุกอวัยวะ แต่ *AGPaseB* จะพบมากในใบ และหัว (Munyikwa, 1994 , 2001)

3.2.3.2 Starch synthase (SS) (EC 2.4.1.21)

GBSS จะนำ ADPG ไปสร้างอะมัยโลส จะพบเฉพาะบนผิวของเมล็ดแป้งใน amyloplast หรือ chloroplast แต่ SSS จะนำ ADPG ไปสร้างอะมัยโลเพคติน โดยต่อสายสั้นๆ จะพบอยู่ใน stroma ของ amyloplast หรือ chloroplast (Smith, 1997; Richard, 2004) โดย SS สามารถแบ่งออก 4 กลุ่ม คือ SSI (57 KDa.), SSII (77 KDa.), SSIII (110-140 KDa.) และ GBSSI (60 KDa.) โดย SSII ยังสามารถแบ่งออกได้อีก 2 กลุ่มย่อย คือ SSIIa จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และ SSIIb จากพืช ใบเลี้ยงคู่ พบว่า SSI, SSII และ SSIII จะทำหน้าที่สังเคราะห์อะมัยโลเพคติน แต่ GBSS ทำหน้าที่สังเคราะห์ อะมัยโลส เมื่อ SSII จะมีผลทำให้สายที่มีความยาว 15-25 มีจำนวนลดลง และเพิ่มจำนวนของสายที่มีความยาวน้อยกว่า 10 ซึ่งส่งผลทำให้ปริมาณแป้งลดลง เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ SS พบว่า มีความต่างกันทางปลายอะมิโน โดย GBSSI จะมีลำดับคล้าย SS ในรูปอื่นๆ คือ มีความเหมือนใน domain I (แอนไซม์อื่นๆที่ไม่ใช่ SS จะไม่มี) domain II จะสามารถพบในแอนไซม์อื่นๆ แต่ domain III ซึ่งมีลักษณะเป็น glycosyl transferase domain พบในแอนไซม์ SS และ Sucrose phosphate synthase (SPS) พบว่า domain I [KTGGL motif (Lysine, Threonine, Glutamine, Glutamine, Leucine)] จะเป็นที่ยึดจับของ ADPG domain III [STGGLV motif (Serine, Threonine, Glutamine, Glutamine, Leucine, Valine)] จะเป็นบริเวณอนุรักษ์ของแอนไซม์ SS (Denyer, 2001)

GBSS ที่พบใน storage organ เรียกว่า GBSSI แต่ถ้าพบในเนื้อเยื่อสังเคราะห์แสง เรียกว่า GBSSII การทำ antisense ของยีน GBSSI จะเพิ่มการสังเคราะห์อะมัยโลเพคติน พบว่า SSII ในถั่วและมันฝรั่ง จะเกาะบนเมล็ดแป้ง แต่ SSIII ในมันฝรั่งอยู่ในรูปละลาย (Smith, 1997) GBSS จะต่อสายของ MOS ในกระบวนการสังเคราะห์อะมัยโลส โดย SSS จะต่อสายอะมัยโลเพคติน (Richard, 2004) ความแตกต่างระหว่าง GBSSI และ GBSSII ในการสร้างอะมัยโลส พบว่า GBSSI ใช้สร้างอะมัยโลสที่เก็บสะสม แต่ GBSSII จะสร้างอะมัยโลสที่สลายได้ง่าย และ GBSSI สามารถเติม glucose ให้ MOS มากกว่าทีละ 1 หน่วย glucose แต่ GBSSII จะไม่มีความจำเพาะต่อ MOS (Denyer, 1999) ปริมาณของ GBSSI และ SSII จะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของอะมัยโลเพคติน พบว่า GBSSI และ SSII

สามารถใช้อะมัยโลเพคติน และ MOS เป็นสารตั้งต้น แต่ GBSSI มีลักษณะของอะมัยโลเพคตินเป็น effector สูงกว่าการเป็นสารตั้งต้น โดยอะมัยโลเพคตินจะกระตุ้น GBSSI ให้ต่อสาย MOS แทนที่จะเป็นสารตั้งต้น แต่ SSII สามารถนำอะมัยโลเพคตินเป็นสารตั้งต้นในการต่อสาย แต่ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ SSII และจากการศึกษา GBSSI จะมีความจำเพาะต่อ MOS สูงกว่า อะมัยโลเพคติน แต่ SSII จะมีความจำเพาะต่อ MOS ต่ำกว่า GBSSI (Denyer, 1999) GBSS เป็น เอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างอะมัยโลส ซึ่งจะมี 3 แบบ หากมีการขาดหายไป 1 หรือ 2 รูปจะมีผลในการลดปริมาณของอะมัยโลส ยังพบว่า การสร้างแป้งในเมล็ดข้าวจะมีอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อ อัตราส่วนของ อะมัยโลส และอะมัยโลเพคติน (Denyer, 1999) การวัดกิจกรรมของเอนไซม์จากการจับกับ ADPG จะจับ GBSS สามารถจับได้ต่ำกว่า SSS 10 เท่า จึงเป็นสาเหตุให้สร้างอะมัยโลเพคติน สูงกว่าการสร้างอะมัยโลส (Denyer, 1999) ในถั่วจะพบ GBSSI 2 รูป คือ GBSSiA พบเฉพาะในเมล็ด และ GBSSiB พบเฉพาะในใบถั่วตัดแปรพันธุกรรมที่มีการกลายพันธุ์เฉพาะเอนไซม์ SSII แต่ไม่มีผลต่อ GBSSI จะสังเคราะห์อะมัยโลส ทั้งในขณะที่มี หรือไม่มี MOS โดย GBSSI จะมีความ จำเพาะต่อ MOS สูงกว่า SSII และ MOS ขนาดสั้นๆ จะสามารถผ่านเข้าออกได้ดีกว่า MOS สายยาว การเพิ่มความจำเพาะของ MOS ต่อ GBSSI จะลดจำนวนของอะมัยโลเพคติน (Denyer, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่า GBSSI จะสามารถนำ ADPG ต่อสายอะมัยโลเพคตินมากกว่าอะมัยโลส

ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน พบว่า GBSSI ของ Snapdragon (*Antirrhinum majus*) มี 1 ชุดโดยพบการแสดงออกใน floral whorls ในระยะเริ่มต้นของการเจริญ การแสดงออกของ GBSSI ของพืชจะถูกควบคุมการแสดงออกเป็นระยะเวลา (circadian clock) (Angel, 1999) GBSSI จะถูกควบคุมโดย endogenous biological clock และพบว่า การสะสมของแป้งในใบจะมีลักษณะเป็น circadian rhythm ควบคุมโดย sucrose จะชักนำการแสดงออกของ GBSSI แต่ไม่มีผลต่อลักษณะ circadian rhythm ควบคุมโดย protein phosphorylation/dephosphorylation จะมีผลจากสัญญาณ (signal) โดยตรงจาก sucrose และควบคุมโดยแสงจะมีทางอ้อมต่อการสะสม mRNA ของ GBSSI (Shu-Jen, 2001) การวัดปริมาณอะมัยโลสในใบของ Arabidopsis พบว่า ในใบอ่อนมีเพียง 5 % แต่ในใบแก่มี 34 % โดยมีการสะสมแป้งในเวลาสั้นๆ ขณะมีแสง โดยอัตราส่วนระหว่าง GBSS ต่อ SSS สูงจะทำให้มีการสังเคราะห์อะมัยโลสสูงขึ้น (Samuel, 2002) GBSSiB จะพบมากในใบถั่ว แต่พบได้น้อยในเอมบริโอ แต่ GBSSiA พบมากในเอมบริโอ และความต่างในการสร้างอะมัยโลส โดย GBSSiB จะสร้างสายที่ยาวกว่า GBSSiA (Anne, 2002) ศึกษาการแสดงออกของ GBSSI ใน sugarbeet เมื่อมีแสง พบว่า จะมีการสะสมแป้งในใบสูงสุดเมื่อมีการสังเคราะห์แสง 4 ชม. และจะคงที่ไปจนกระทั่งก่อนหมดแสงในรอบวัน 2 ชม. การเติม sucrose จะชักนำการแสดงออกของ GBSSI เพิ่มขึ้น แต่เมื่อใส่ sorbitol ซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อ osmotic pressure จะไม่มีผลต่อการแสดง

ออกของ GBSSI แสดงให้เห็นว่า sucrose ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตแป้ง ซึ่งมีผลต่อการชักนำโดยตรงไม่ใช่เกิดจากสภาวะ osmotic pressure ของเซลล์ การเติม glucoamine ซึ่งเป็นสารยับยั้ง hexokinase ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ GBSSI และการเติม cycloheximide ซึ่งเป็นสารยับยั้ง protein kinase และ phosphatase ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ GBSSI แสดงว่า hexokinase, protein kinase และ phosphatase ไม่มีผลโดยตรงต่อการสะสมแป้ง แต่เมื่อเติม okadaic acid ซึ่งเป็นสารยับยั้ง protein phosphatase type I และ type II จะลดการแสดงออกของ GBSSI (Shu-Jen, 2001) การศึกษา cDNA จาก waxy starch ของข้าวสาลีให้ชื่อว่า GBSSII ซึ่งจะต่อสายอะมิโนไลส ใน non-storage tissue โดยลำดับกรดอะมิโนของ GBSSI และ GBSSII มีความเหมือนกัน 66 % GBSSII จะพบในปล้องข้อเยื่อหุ้มรังไข่ (pericarp) แต่ไม่พบในเอนโดสเปิร์ม แต่ GBSSI พบในเอนโดสเปิร์ม โดย GBSSII จะอยู่บนโครโมโซม 2AL, 2B และ 2D แต่ GBSSI จะอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 7 cDNA ของ GBSSII มีขนาด 2,081 bp. เมื่อเทียบลำดับกรดอะมิโนของ GBSSI กับ GBSSII พบว่า มีบริเวณ consensus ที่ KXGG motif (Lysine, another amino acid, Glutamine, Glutamine) คาดว่า เป็นบริเวณที่จับกับ ADPG และพบว่า GBSSI สามารถชักนำการแสดงออกโดยน้ำตาล และทั้ง 2 รูป สามารถชักนำการแสดงออกโดยแสง (Patricia, 2000) การลดปริมาณของ 14-3-3 protein จะมีผลในการสะสมแป้ง คาดว่า SSIII มี 14-3-3 motif และยังพบว่า การเติม phosphate โดย Starch phosphate kinase จะทำให้ SSIII ไม่ทำงานเมื่อมีการจับกับ 14-3-3 protein

พบว่า GBSS ของมันสำปะหลัง และพืชชนิดอื่นๆ มีขนาดประมาณ 60 KDa. GBSSI จะสังเคราะห์อะมิโนไลสโดยใช้ MOS เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ จากการศึกษา cDNA ของ GBSS ในมันสำปะหลัง เมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนจะมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ GBSS ของมันฝรั่ง 74 % และพืชอื่นๆ 60-72 % การเคลื่อนย้ายโปรตีนจาก chloroplast ไปยัง amyloplast จะมีการเคลื่อนของกรดอะมิโนออก (transit peptide) 78 กรดอะมิโน ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุล 58.61 KDa. และพบว่า GBSSI พบในหัวมันสำปะหลัง มีจำนวนชุดใน genome ที่ต่ำ cDNA มี open reading frame (ORF) 1,824 nucleotide ที่เหนือจุดรหัสเริ่มต้นมี 74 nucleotide และหลังจากจุดหยุดมี 255 nucleotide มี poly A 12 nucleotide สร้างโปรตีนขนาด 608 กรดอะมิโน จะทำงานได้ต้องมีการตัดออกให้เหลือ 530 กรดอะมิโน มีค่า pI ของโปรตีนเท่ากับ 6.15 การแสดงออกของยีนนี้สามารถพบในหัว แต่พบได้น้อยใน petiole ลำต้น และใบ ไม่พบในรากที่ไม่สะสมแป้ง (รากฝอย) (Salehuzzaman, 1993) GBSSI ในมันฝรั่งกับมันสำปะหลังจะต่างใน intrinsic properties (Shan, 1999) พบว่า GBSSII ในมันสำปะหลังจะมีการเคลื่อนของกรดอะมิโนออก 193 กรดอะมิโน และปลายคาร์บอกซิลของ GBSSII จะมีกรดอะมิโนมากกว่า GBSSI 40 กรดอะมิโน พบว่า GBSSII ของมันสำปะหลังจะคล้ายกับ GBSSII ในมันฝรั่ง และถั่ว โดยมี domain I (KTGGL motif) จากนั้นทำ Southern blot พบว่า

GBSSII จะมีจำนวนซัคซินที่ต่ำ โดย GBSSII จะมีการแสดงออกในใบมากกว่าในที่อื่นๆ โดยการแสดงออกจะพบในระยะแรกของการเจริญเท่านั้น แต่ GBSSI จะแสดงออกในหัว โดยพบตลอดระยะการเจริญ พบว่า GBSSI และ GBSSII ยังต่างกันในด้านโครงสร้างอะมัยโลสด้วย GBSSI จะสร้างอะมัยโลสที่ใช้ในการสะสม เช่น หัว เอนโดสเปิร์ม แต่ GBSSII จะสร้างอะมัยโลสที่สลายง่ายและใช้เป็นพลังงาน เช่น ใบ (Munyikwa, 1997) การศึกษาการแสดงออกของ GBSS ในมันสำปะหลังพบว่า GBSSII จะพบมากในระยะแรกของการเจริญ แต่หลังจากนั้นจะมีการแสดงออกของ GBSSI เข้ามาทำหน้าที่แทน จึงทดสอบการแสดงออกระดับ mRNA พบว่า การแสดงออกของ GBSSI จะพบมากในราก แต่ GBSSII พบมากในใบ เมื่อศึกษาอายุต่อระดับการแสดงออก พบว่า เมื่อปลูกมันสำปะหลัง 180 วันจะมีการแสดงออกของ GBSSI มากในใบ และเมื่อปลูก 360 วันจะมีการแสดงออกของ GBSSII ลดต่ำลงในทุกเนื้อเยื่อ (Yona, 2003)

3.2.3.3 Starch branching enzyme (SBE) (EC 2.4.1.18)

SBE จะมีการสลายพันธะ alpha (1 → 4) glycosidic ออก แล้วสร้างพันธะ alpha (1 → 6) glycosidic แทนที่ใน hydroxy group (OH) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของน้ำตาล glucose พบการแสดงออก SBE ในส่วนละลายของ amyloplast (Smith, 1997) SBE จะนำ ADPG ไปสร้างอะมัยโลเพคติน โดย SBE มีความสำคัญต่อปริมาณ และคุณภาพแป้ง การขาดรูปใดรูปหนึ่งของ SBE จะทำให้อัตราส่วนอะมัยโลสต่ออะมัยโลเพคตินสูงขึ้น (Munyikwa, 1997) SBE สามารถจำแนกได้ 3 กลุ่ม คือ SBEI, SBEIIa และ SBEIIb (Dane, 1995) โดยอาศัย anion-exchange chromatography แยกขนาด โมเลกุล คุณสมบัติทางชีวเคมี คุณสมบัติของการเร่งปฏิกิริยาความจำเพาะของหมู่คีุ่มกัน โดย SBEIIa และ SBEIIb มีความเหมือนกันมากจนไม่สามารถแยกได้โดยคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติในความจำเพาะของหมู่คีุ่มกัน โดย SBE มักมีขนาด 40-152 KDa. เราสามารถจำแนกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ SBE family A (SBEII) จะจำเพาะต่ออะมัยโลสต่ำกว่า และชอบในการต่อสายขนาดสั้น (< 14 หน่วย glucose) กว่า SBE family B (SBEI) และมีการแสดงออกในระยะการเจริญที่ต่างกัน การศึกษากิจกรรม พบว่า SBE II ชอบต่อกิ่งแขนงให้อะมัยโลเพคติน แต่ SBEI ต่อสายให้อะมัยโลส โดย SBEII จะมีประจุสุทธิเป็นลบ (Joel, 2003) โดยสร้างสายสั้นจำนวนมาก (DP 6-9) และสร้างสายยาวเพียงเล็กน้อย (DP >14) ทางปลายคาร์บอกซิลมากกว่า 50 กรดอะมิโน (Smith, 1997) การทำงานของ SBEI จะต่อสายอะมัยโลสมากกว่าการต่อสายอะมัยโลเพคติน การแสดงออกของ SBEIIa จะพบใน vegetative tissue แต่ SBEIIb ไม่พบใน vegetative tissue โดย SBE จะแตกต่างทางคุณสมบัติของเอนไซม์ โดย SBEI จะชอบการเติมที่สายยาวของ alpha-glucan มากกว่า SBEIIa และ SBEIIb (Dane, 1995)

การลดลงของ SBEII จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณอะมัยโลส โดยยีน amylose extender (*ae*) และ rugosus (*r*) จะถอดรหัสได้ SBEII หากขาดยีนนี้จะมีผลต่อการสะสมของอะมัยโลส และมีผลต่อการสร้างแขนงของอะมัยโลเพคติน (Smith, 1997) เปรียบเทียบการสร้างอะมัยโลเพคติน กับ glycogen พบว่า ในจุลินทรีย์ จะมี glycogen branching enzyme (GBE) และในพืชมี SBEII โดยจะต่อสายขนาดต่ำสุด คือ DP 12 แต่ SBE ในพืชจะต่อสายขนาดต่ำสุด คือ DP 16 แต่ SBE ในพืชจะสร้างแขนง $6 \leq DP < 30$ โดย SBEII จะต่อสายขนาดสั้นๆ (DP 3-9) แต่ส่วนใหญ่เป็น (DP 6) หรือ (DP 7) (Buleon, 1998) การศึกษา SBE ใน kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) จะมี SBE 2 ชนิด คือ PvSBE1 และ PvSBE2 จะต่างกันของคุณสมบัติของเอนไซม์ การเร่งปฏิกิริยา จากการศึกษาหน้าที่จากลักษณะความต่างที่ปลายคาร์บอกซิล พบว่า PvSBE1 จะจำเพาะต่ออะมัยโลส โดย PvSBE2 จะชอบสายสั้น (DP 6) (Hiroyuki, 2004) การกลายพันธุ์ *r* และ *rb* ในถั่ว (*Pisum sativum* L.) โดยเปรียบเทียบกับถั่วปกติ แล้ววิเคราะห์แบ่งโดย size exclusion chromatography พบว่า การกลายพันธุ์แบบ *rb* จะมีผลเล็กน้อยต่อโครงสร้าง และองค์ประกอบ แต่การกลายพันธุ์แบบ *r* จะมีผลต่อ SBE ทำให้เพิ่มปริมาณของอะมัยโลส และมีผลในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะมัยโลเพคติน (Lloyd, 1996) ในข้าวโพดการกลายพันธุ์ *du1* จะมีผลโดยตรงต่อ SSIII และยังมีผลลดกิจกรรมของ SBEIIa และ SBEIIb ซึ่งมีผลอย่างมากในการต่อสายสั้น (DP 5-11) และจำนวนของสายยาวที่ลดลง (DP 18-36) คาดว่า SBEIIb มีผลต่อการสร้างสายสั้น (DP 5-6) และ SBEI จะย้ายสายสั้น แต่สามารถต่อสายได้ยาวกว่า SBEIIb คาดว่า SBEII จะเข้ามาต่อสายก่อน SBEI โดย SBEIIa จะต่อสายด้านนอกของอะมัยโลเพคติน จึงเชื่อว่า SBEIIa เป็นเอนไซม์หลักกว่า SBEIIb ในการสร้าง glucan (Beom-seok, 2002) ศึกษาหน้าที่ของยีน SBEIIa, SBEIIb และ GBSSI โดยการทำให้มีเฉพาะ SBEIIa พบว่า จะสร้างสายยาวจำนวนเล็กน้อย แต่สร้างสายสั้นจำนวนมาก การขาด SBEIIb และ GBSSI แต่มี SBEIIa และ SBEI จะสร้างสายยาวจำนวนมาก แต่ลดจำนวนของสายสั้น แสดงว่า SBEI จะมีผลในการต่อสายสั้น และยังคงสายยาวอย่างมีนัยสำคัญ เชื่อว่า SBEI มีหน้าที่หลัก คือ การสร้างสาย B ของอะมัยโลเพคติน การขาด SBEIIb จะลดแขนงของอะมัยโลเพคติน (Yuan, 2004) SBE ในมันฝรั่งจะเติมแขนง พบว่า โมเลกุลมีแขนงขนาด DP 9-35 เพียง 3.7 % โดย SBE ในมันฝรั่งมี 2 รูป ซึ่งต่างกัน ในอัตราเร็วของการต่อแขนงอะมัยโลเพคติน มีความยาวเฉลี่ย 23-29 หน่วย โดย SBEI จะสร้างสายอะมัยโลเพคติน ที่ DP 6, DP 11-12 และ DP 29-30 แต่ SBEII จะสร้างสายอะมัยโลเพคติน ที่ DP 6 และ DP 13-14 ซึ่ง SBEI มีการแสดงออกในช่วงแรก 0-60 นาที ซึ่งจะย้ายสาย 35-75 หน่วย แต่หลังจาก 60 นาที จะเริ่มมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ SBEII จะเพิ่มขึ้น แล้วลดลงอย่างช้าๆ โดย SBEI จะเพิ่มสายขนาดสั้นๆ DP 6-8 อย่างช้าๆ และ DP มากกว่า 33 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ SBEII จะย้ายสาย DP 6-44 โดย SBEI มี beta amylolysis 66 % และ SBEII มี beta amylolysis 74 % (Anderson, 2002)

การศึกษา genomic ของ SBEI gene ในข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) ทำการเพิ่มจำนวนโดย 5'RACE (Rapid amplification of cDNA ends) ได้ cDNA fragment ขนาด 4,563 bp. มีโปรตีนขนาด 152 KDa. ซึ่ง SBEIc ซึ่งมีความคล้าย SBEI ของพืชชนิดอื่นๆ แต่มีความแตกต่างใน domain แรก พบการแสดงออกของ SBEIc ของเอนโดสเปิร์มของข้าวสาลี (Monica, 2000) การศึกษา SBEI ของข้าวโพดที่มีขนาด 5.7 Kb. ประกอบด้วย 14 exon 13 intron มี TATA box, G box และ CCACGTGG palindrome ในปลาย 5' และพบว่า ใน intron จะมี AT จำนวนมากถึง 61 % แต่ใน exon จะมี AT 52 % โดยขนาด exon มีขนาด 73-565 bp. โดย exon ที่ 1 มี 27 bp. ของ untranslate region และ exon ที่ 2 เป็น transit peptide และมี TATA box อยู่เหนือจุดเริ่มถอดรหัส 25 bp. (Kyung-Nam, 1998)

การศึกษาการแสดงออก mRNA ของ SBEI ในถั่วจะมีการแสดงออกในระยะเวลาต่างกัน SBEII จะแสดงออกในช่วงแรก แต่ SBEI จะแสดงออกในระยะหลังของการเจริญของเอมบริโอ โดย SBEI จะแสดงออกในปริมาณมากในวันที่ 10-28 หลังงอก ส่วน SBEIIb แสดงออกขณะเอมบริโอกำลังเจริญ แต่ SBEI ในข้าวจะพบหลังงอก แต่ SBEIIb จะพบปริมาณมากในวันที่ 5-15 วันหลังงอก (Yona, 2004) การศึกษา cDNA library ของ SBEI ในข้าวสาลี มี 14 exon มีขนาดมากกว่า 5.7 Kb. แล้วทำการวิเคราะห์ RNA โดย RACE (rapid amplification of cDNA ends) และ RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) พบว่า ปลาย 5' จะมีความหลากหลาย แล้วนำลำดับที่ได้จาก RACE มาเทียบกับ genomic พบว่า 2 exon และ 1 intron แรกเป็นบริเวณที่ทำให้เกิดความต่าง สามารถแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม cDNA เนื่องจากการตัด (splicing) มี exon I+II+III ทางปลาย 5' ครบทั้ง 3 ส่วน หรือการมี intron I แทรกเข้ามา หรือมีการตัด exon II ออก การวิเคราะห์ RT-PCR ใน *sbeI-uidA::nptII* [*uidA* เป็น beta-glucuronidase ทำหน้าที่เป็น reporter gene ใน *Methanosarcina* และ *nptII* เป็น neomycin phosphotransferase II ทำหน้าที่เป็น selectable marker] พบว่า มีความต่างในการตัด และการย้ายกรดอะมิโนออก (transit peptide) จึงทำให้มีความแตกต่างกัน (Monica, 1999)

การยับยั้ง 2 รูปของ mRNA ของ SBEI ในมันฝรั่ง ทำให้หัวมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ขนาดของเมล็ดแบ่งเล็กลง และทำให้ปริมาณแป้งลดลง น้ำตาล reducing เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณ sucrose ไม่เปลี่ยนแปลง fructose เพิ่มขึ้น 40-50 % และ glucose เพิ่มขึ้น 40-133 % (Per, 2004) จากการศึกษา cDNA ของ SBEI ของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) มี ATG เป็นรหัสเริ่มการสังเคราะห์โปรตีนที่ตำแหน่ง 121 และมี TGA เป็นรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีนที่ตำแหน่ง 2,704 bp. มี ORF 861 กรดอะมิโน มีขนาด 99,083 KDa. พบว่า SBEI จะมี Serine และ Threonine ซึ่งทำให้มีลักษณะ positive charged domain (Peter, 1993) การศึกษาความแตกต่าง โดยการเปรียบเทียบการแสดงออกของข้าวโพดปกติกับข้าวโพดที่มีอะมิโนเลเพคตินต่ำ พบว่า ข้าวโพดที่มีอะมิโนเลเพคตินต่ำ จะมีการแสดงออกของ SBEII ในระดับต่ำ หรือไม่มีการแสดงออก เชื่อว่า การเพิ่มของอะมิโนเลส และการลดลงของน้ำหนักรวมของอะมิโนเลเพคติน เนื่องจากการขาด SBEII (Sidebottom, 1998) การศึกษากิจกรรมของ

SBEI และ SBEII ในมันฝรั่ง พบว่า SBEI จะมีความจำเพาะต่ออะมัยโลสมากกว่า SBEII โดย SBEII จะมีความจำเพาะต่ออะมัยโลเพคตินมากกว่า SBEI ทั้ง 2 เอนไซม์สามารถถูกกระตุ้นโดยการเติม phosphate พบว่า เมื่อขาดการแสดงออกของ SBEI จะทำให้ DP มากกว่า 60 และเมื่อขาดการแสดงออกของ SBEII จะสร้างสายที่มีความยาว DP มากกว่า 70 คาดว่า SBEI จะสร้าง DP 11-12 และ DP 29-30 ส่วน SBEII สร้างหลายแบบ แต่มักสร้างแบบ DP 13-14 โดยทั้ง 2 รูปจะสร้างแขนง 7-8 แขนง (Ulrika, 2001) การทำ antisense ของยีน SBE ของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) จะลดการทำงานของ SBE 5-98 % แต่ไม่มีผลต่อปริมาณของอะมัยโลส และความยาวของแขนง อะมัยโลเพคติน การที่กิจกรรมของ SBE ลดลงจะทำให้เพิ่มปริมาณของ phosphorous ในแป้ง และมีผลทำให้เกิดความต่างของคุณสมบัติในการเกิดเจล ระดับของ SBE ที่ต่ำลงมีผลในความต่างของความยาวของการเกิดเกลียวคู่ภายในเม็ดแป้ง (Richard, 1998) ศึกษาการแยกตัวของ transposon ใน *sbe1* gene ของ *Zea mays* L. พบว่า *sbe1* จะมีการแสดงออกปริมาณต่ำในใบของ homozygous mutant และไม่สามารถพบในเอนโดสเปิร์ม โดย SBEI จะมีค่า Km ต่ออะมัยโลสต่ำ และชอบต่อสายสั้นกว่า SBEIIa และ SBEIIb พบว่า mRNA ของ SBEI จะแสดงออกปริมาณปานกลางในระยะกลางของการเจริญของ kernel (12-20 วันหลังผสมเกสร) และแสดงออกปริมาณมากในระยะสุดท้ายของการเจริญของ kernel (22-43 วันหลังผสมเกสร) แต่ *sbe2a* จะแสดงออกปริมาณปานกลางในเอนโดสเปิร์ม แต่แสดงออกมากใน vegetative tissue (Susan, 2002) จากการศึกษา genome พบว่า transposon อยู่ใน exon ที่ 14 ณ ตำแหน่ง 761 และการขาด SBEI จะมีผลต่อการสร้างผลึกแป้งในเม็ดแป้ง (Susan, 2002) การศึกษากิจกรรมของ SBE พบว่า SBE จะถูกเติม phosphate ที่ serine ใน amyloplast (SBEI, SBEIIa และ SBEIIb) และ ใน chloroplast (SBEI และ SBEIIa) และพบว่า การดึง phosphate ออกโดย alkaline phosphatase จะลดกิจกรรมของ SBE และ GBSS แสดงถึงอะมัยโลเพคตินถูกควบคุมโดยการเติม phosphate ดังนั้น phosphatase และ phosphorylase จะเป็นตัวควบคุมการสร้าง และสลายแป้ง (Ian, 2004) ศึกษาการชักนำการแสดงออกของ *sbeII* ใน *Arabidopsis thaliana* โดยศึกษาจากการใช้ mRNA ของ SBEI ของมันฝรั่ง เป็น probe พบว่า *sbe2.1* มี 18 exon 17 intron มี ORF 2,574 bp. ขนาดโมเลกุล 97,660 Da. โดย promotor ของทั้ง 2 ยีน จะตอบสนองต่อ sucrose (sucrose responsive element) คือ SURE1 และ SURE2 การตอบสนองต่อแสงที่ light responsive element (G-box) ใน promotor ของ *sbe2.1* ยังพบว่า จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงในการถอดรหัสของยีน SBEII เมื่อป้อนด้วย sorbitol แม้ช่วงเวลากลางวัน หรือเวลากลางคืน แต่สามารถชักนำการแสดงออกได้โดย glucose, fructose และ sucrose (Khoshnoodi, 1998)

จากข้อมูลทราบว่า สามารถชักนำการแสดงออกของ mRNA ของ SBE โดย sucrose จึงทำการทดสอบการชักนำการแสดงออกของยีน โดยใช้ poor metabolisable เช่น mannose, 3-O-methyl, glucose, mannitol และ palatrinose พบว่า จะไม่สามารถชักนำการแสดงออกได้ คาดว่า การแสดงออก SBE เนื่องจาก osmotic effect จึงทดลอง turanose [glucose (1 → 3) fructose] และ palatinose [glucose (1 → 6) fructose] พบว่า Hydrogen ที่ตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของ fructose จะเป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของ SBE พบว่า turanose จะถูกส่งข้าม plasma membrane จึงพิจารณา พบว่า disaccharide จะต้องมีการมี fructose จึงจะข้าม plasma membrane (Yuna, 2004) การขาด SBEIIb จะลดแขนงของอะมัยโลเพคติน การขาด GBSSI, SBEIIb และ SBEI โดยมีเฉพาะ SBEIIa จะทำให้มีการสร้างสายยาวจำนวนเล็กน้อย แต่สร้างสายสั้นจำนวนมาก การมีแค่ SBEIIa และ SBEI จะสร้างสายยาวจำนวนมาก แต่ลดจำนวนของสายสั้น แสดงว่า SBEI จะมีผลต่อการต่อสายสั้น และยังคงสายยาวอย่างมีนัยสำคัญ คาดว่า SBEI มีหน้าที่หลัก คือ สร้างสาย B ของอะมัยโลเพคติน (Yuan, 2004) การศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ SBEIIb และ SBEI ของข้าวฟ่างจะเริ่มแสดงออกในวันที่ 10 และแสดงออกสูงสุดในวันที่ 16-22 ต่อจากนั้นจะมีการแสดงออกของยีนแบบคงที่ (steady-state level) และเป็นช่วงเวลา (rhythms) แบบ circadian clock โดยมีปัจจัย 3 อย่าง คือ แสง อุณหภูมิ สิ่งกระตุ้นจากสภาวะกลางวัน/กลางคืน โดยแสงเป็นตัวกระตุ้น โดยมีผลที่ light response element บริเวณ G box, GT1 และ GATA ใน promoter มี cis-acting element ซึ่งจับกับ transcription factor และการชักนำการแสดงออกโดยน้ำตาลมีผลที่ sucrose response element, SP8, TGGACGG palindrome, G box และ B box เป็นบริเวณรับสัญญาณ และมีผลจาก transcription factor (Yuna, 2004)

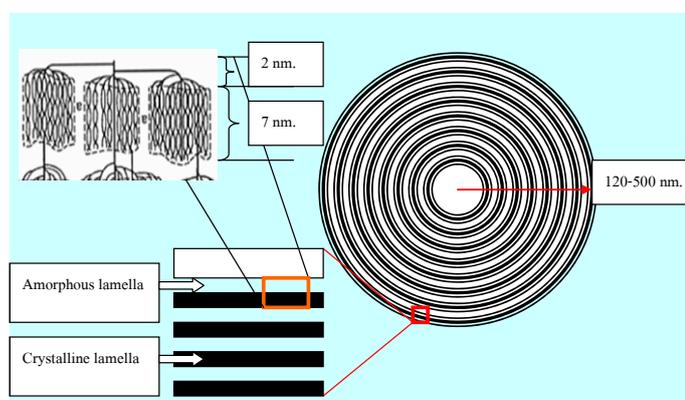
ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลัง พบว่า พันธุ์ที่มีปริมาณน้ำตาลอิสระ (free sugar) สูง จะมีการแสดงออกของ SBE ในระดับที่ต่ำกว่าพันธุ์ที่มีปริมาณน้ำตาลอิสระต่ำ (Luiz, 2004) การโคลนยีน SBE ของมันสำปะหลังโดยใช้ probe จาก mRNA ของ SBE ของมันฝรั่ง พบเพียง 1 โคลน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสจะคล้ายกับ SBEI ของพืชชนิดอื่นๆ โดยลำดับเบสของ SBE ในมันสำปะหลังมีความเหมือนกับมันฝรั่ง 80 % และมีการแสดงออกมากที่สุดในหัว การแสดงออกของ SBE ในระยะการเจริญของหัวจะมีการแสดงออกเท่ากันทุกระยะของหัวขณะที่ยังเจริญไม่เต็มที่ พบว่า SBE นี้ จะมีระดับการแสดงออกต่างกันตามลักษณะของพันธุกรรม (genotype) (Salehuzzaman, 1992) mRNA ในมันสำปะหลัง SBEI จะพบมากที่สุดในราก โดยระดับการแสดงออกทั่วกันทั้งรากไม่ว่าจะส่วนโคน หรือส่วนปลายราก จากการทดสอบมันสำปะหลังที่มีอายุการปลูกน้อยกว่า 1 ปี แล้วนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยวิธี Northern blot โดยแบ่งเป็น 4 ระยะ ระยะที่ 1 เมื่อมันมีน้ำหนัก 10 กรัม ระยะที่ 2 เมื่อมันมีน้ำหนัก 40 กรัม

ระยะที่ 3 เมื่อมันมีน้ำหนัก 80 กรัม และระยะที่ 4 เมื่อมันมีน้ำหนัก 150 กรัม พบว่า ในระยะที่ 1 จะมีการแสดงออกของ SBEI ต่ำที่สุด แต่ระยะอื่นๆ จะมีการแสดงออกที่เท่ากัน ความแตกต่างในระดับการแสดงออกของ SBEI จะต่างกันตามลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) พบว่า การแสดงออกของ SBEI จะมีผลต่อปริมาณแป้งที่แตกต่างกัน (Salehuzzaman, 1992) การแสดงออกของ SBEI และ SBEII ในระยะการเจริญต่างๆ กันของมันสำปะหลัง ทำการตรวจสอบ mRNA ของ SBEII โดยใช้ probe จาก SBEII ของมันฝรั่ง พบว่า เมื่อปลูกมันสำปะหลัง 180 วัน จะมีการแสดงออกของ SBEII ต่ำในทุกเนื้อเยื่อ เมื่อ 360 วันจะมีการแสดงออกสูงสุดในราก ศึกษาการแสดงออกของยีนในรอบวัน เมื่อให้แสงเวลา 06.00 น. จะมีการแสดงออก mRNA ของ SBEI และ SBEII สูงสุดเมื่อเวลา 12.00 น. แต่เมื่อให้แสง 00.00 น. จะมีการแสดงออกสูงสุดเมื่อเวลา 06.00 น. แต่หากให้แสงตลอดเวลาจะมีการแสดงออก 2 ช่วง คือ สูงสุดเมื่อเวลา 09.00 น. และ 18.00 น. แต่ถ้าไม่ให้แสงตลอดเวลาจะมีการแสดงออกสูงสุดเมื่อ 09.00 น. (Yona, 2003)

3.3 เม็ดแป้ง

3.3.1 การสร้างผลึกของเม็ดแป้ง

เม็ดแป้งจะมีโครงสร้างแบบกึ่งผลึก (semicrystalline) ประกอบด้วยอะมัยโลส และอะมัยโลเพกตินจัดเรียงตัวกันในเม็ดแป้ง สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนผลึก (crystallite) และส่วนอสัณฐาน (amorphous) โดยสายโซ่สั้นของอะมัยโลเพกตินจัดเรียงตัวแบบเกลียวคู่ โดยมีการจัดเรียงในส่วนผลึก ในส่วนอสัณฐานจะประกอบด้วยอะมัยโลส และสายโซ่ยาวของอะมัยโลเพกตินที่อยู่อย่างอิสระ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 รูปเม็ดแป้ง และการจัดเรียงตัวของเม็ดแป้ง (Alan,2000 ; Vandeputte,2004 ; Steven,1996)

การสร้างผลึกของเม็ดแป้งมี 3 แบบ คือ ผลึกแบบ A จะเป็น orthogonal pattern จะมีการจัดเรียงตัวกันแน่น พบจากแป้งประเภท ข้าวเจ้า ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และข้าวสาลี ผลึกแบบ B จะเป็น hexagonal pattern จะมีการจัดเรียงตัวแบบหลวม พบจากแป้งประเภท มันฝรั่ง มันเทศ และมันสำปะหลัง ผลึกแบบ C จะเป็น hexagonal pattern และ orthogonal pattern ปนกัน ในเม็ดแป้ง พบจากแป้งประเภท พืชตระกูลถั่ว โดยผลึกแบบ A จะมีความหนาแน่นของผลึกมากกว่าแบบ B โดยอะมัยโลเพคติน ในผลึกแบบ A จะมีความยาวของสายน้อยกว่าผลึกแบบ B แป้งที่มีผลึกแบบ A จะมีความยาวสายของ A และ B1 สั้นกว่าผลึกแบบ B โดยสาย A จะมีความยาวสาย 12-16 แต่สาย B1 มีความยาวสาย 20-24 (Richard, 2004) การศึกษาอะมัยโลเพคตินในผลึก (crystallite structure) แบบ A จะมีสาย A และ B1 สูงกว่าในผลึกแบบ B และอัตราส่วนระหว่าง $(A+B1)/(B2+B3)$ เท่ากับ 8.9 – 12.9 ในผลึกแบบ A และ 2.1-6.5 ในผลึกแบบ B โดยผลึกแบบ A จะมี branch/cluster สูงกว่าแบบ B 1.5-2 เท่า (Isao, 2002) การกลายพันธุ์แบบขาด GBSS จะทำให้เกิดผลึกแบบ A เพิ่มขึ้น แต่ถ้าขาด SSSII จะทำให้มีผลึกแบบ B ลดลง แต่ถ้าขาดเฉพาะ SSSI จะทำให้เกิดผลึกแบบ C โดย GBSSI จะเป็นตัวชักนำการสร้างผลึกแบบ B (Richard, 2004)

เม็ดแป้งแบ่งออก 2 แบบ คือ แบบ A มีขนาดมากกว่า 10 ไมโครเมตร มีรูปร่างแบบยาวรี (lenticular shape) เม็ดแป้งแบบ B มีขนาดน้อยกว่า 10 ไมโครเมตร มีรูปร่างแบบ กลมผิวขรุขระ (roughly spherical) โดยเม็ดแป้งแบบ A และ แบบ B จะต่างกันในเรื่องประกอบ และคุณสมบัติของเม็ดแป้ง (Rachel, 1999) พบว่า เม็ดแป้งแบบ A จะมีความยาวของแขนงที่สั้นกว่าเม็ดแป้งแบบ B โดยแบบ A จะมีแขนงทั้งใน amorphous และ crystalline แต่แป้งแบบ B จะพบแขนงเฉพาะใน amorphous โดยแป้งแบบ C จะพบแขนงทั้งแบบสั้น และแบบยาว

การกลายพันธุ์ของยีน GBSS แบบ antisense ทำให้ไม่มีอะมัยโลส แต่สามารถเกิดการสร้างแป้ง แสดงถึงว่า อะมัยโลสไม่จำเป็นในการเจริญของเส้นวงของเม็ดแป้ง แต่อะมัยโลเพคตินมีความสำคัญมาก โดย SSIII จะเป็นรูปหลักในการสังเคราะห์อะมัยโลเพคติน การทำ antisense ของ SSIII จะทำให้สายของอะมัยโลเพคตินมีขนาดสั้นลง และการทำ antisense ของยีน GBSS และ SSIII จะทำให้อะมัยโลเพคตินมีความยาวของสายสั้นลง จากการศึกษาสภาวะแสงที่มีผลต่อการเจริญของพืช โดยให้สภาวะแสง อุณหภูมิ และความชื้นคงที่ การเพิ่มเวลาในการสังเคราะห์แสงไม่มีผลโดยตรงต่อการเพิ่มความกว้างเส้นวงของเม็ดแป้ง โดยการเจริญของเส้นวงจะคงที่แม้มีอัตราการสังเคราะห์ที่เปลี่ยนไป นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง คือ พบ starch granule bound protein 1 (SGP-1) ในเม็ดแป้งของข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) จะมี 3 รูป มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 100, 108 และ 115 KDa. โดย SGP-1 จะมีลักษณะกึ่งกรรมคล้าย SSIIa โดยการแสดงออกของ SGP-1 protein จะพบในใบ

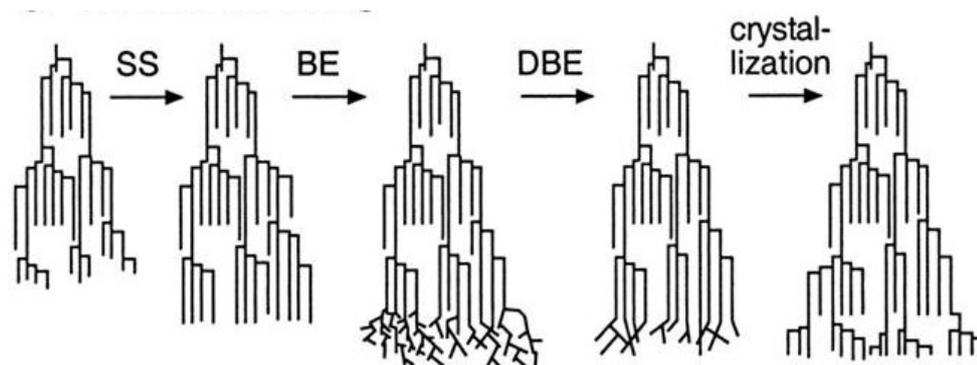
ช่อดอกที่ยังเจริญไม่เต็มที่ และเอนโดสเปิร์ม จึงศึกษา cDNA พบว่า *SGP-A1* มี 2,407 bp. *SGP-B1* มี 2,939 bp. และ *SGP-D1* มี 2,107 bp. โดยตั้งชื่อตามโครโมโซม (Zhongyi, 1999) SGP ของข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) มี 2 รูป คือ SGP 140 และ SGP 145 โดย SGP มักพบในแป้งที่มีโครงสร้างแบบ A (> 10 ไมโครเมตร) ในเมล็ดข้าวที่กำลังเจริญ หรือเจริญเต็มวัย โดยจะพบ SGP 140 และ SGP 145 ในเมล็ดแป้งของเอนโดสเปิร์ม แต่ไม่พบในส่วนละลายของเอนโดสเปิร์ม หรือ pericarp ในเมล็ดที่อ่อนกว่า 15 วันหลังได้รับการผสมเกสร การมี SGP 140 และ SGP 145 ทำให้มีการเจริญของเม็ดแป้งแบบ A แต่เม็ดแป้งหลังจาก 15 วันหลังได้รับการผสมเกสรจะมี SGP 140 และ SGP 145 ลดลง แล้วเกิดการสร้างเม็ดแป้งแบบ B (< 10 ไมโครเมตร) (Mingsheng, 2000) GBSSI ชักนำการเกิดผลึกแบบ B โดยอะมัยโลเพคตินจะอยู่ใน semicrystalline ในขณะที่อะมัยโลสจะอยู่ใน amorphous พบว่า *STA2* ใน *Chlamydomonas reinhardtii* จะควบคุมการสังเคราะห์อะมัยโลส และการมีกิจกรรมของ GBSSI โดย *STA2* จะสร้าง SS ขนาด 69 KDa. (Fabrice, 2002)

3.3.2 การสร้างวงของเม็ดแป้ง (growth rings)

เม็ดแป้ง มี 2 ชั้นหลักๆ คือ ชั้น crystalline lamellae (การสานเป็นร่างแหของอะมัยโลเพคติน) กับ amorphous lamellae (อนุพันธ์ที่ไม่เป็นร่างแห) ที่เรียงตัวสลับกัน โดยอะมัยโลสจะอยู่ภายในเม็ดแป้ง แต่อะมัยโลเพคตินจะอยู่บนผิวของเม็ดแป้ง (Denyer, 2001; Neil, 1999) โดยชั้นในจะเป็น crystalline lamellae ซึ่งสามารถต้านการสลายจากกรด เนื่องจากมีการจัดเรียงตัวของสาย A และ B ของอะมัยโลเพคติน ในชั้นนี้ซึ่งจะมีความหนา 9-10 nm. ส่วน amorphous lamellae เป็นชั้นถัดขึ้นมาจากชั้น crystalline lamellae ชั้นนี้ไม่ทนการสลายจากกรด โดยจำนวนชั้นของเม็ดแป้งจะแตกต่างกันตามชนิดพืช การสร้างแป้งจะเริ่มจากจุดกำเนิด (hilum) และขยายขึ้นตามระยะเวลาด้วยการเพิ่มจำนวนวง การเจริญของเส้นวง (growth rings) ในหนึ่งวงจะมีอะมัยโลเพคติน 16 อัน/วง โดยเม็ดแป้งจะมีความหนา 120-400 นาโนเมตร และในแต่ละชั้น (lamellae) จะมี crystallite หนา 5 นาโนเมตร และ amorphous หนา 2 นาโนเมตร ที่เรียงตัวสลับกัน (Richard, 2004)

การสร้างวงจะควบคุมโดย circadian rhythm และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์แป้ง โดย SS เป็นเอนไซม์หลักในการสร้างวงของเม็ดแป้ง แต่ยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกมากในการควบคุมการสังเคราะห์แป้ง (Emma, 2003) การลดความกว้างของเส้นวงโดย alpha-amylase (AMY) ในขณะที่อุณหภูมิต่ำจะมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ ADPG และ sucrose โดยคาดว่า การลดของเส้นวงจะมีผลเนื่องจากอัตราการสังเคราะห์อะมัยโลเพคติน (Isao, 2002) พบว่า SSS ใน

หัวมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) จะมี primer เริ่มต้นในการสร้าง glucan โดยโมเลกุลที่สั้นที่สุดในการรับ (acceptor) คือ maltose ขณะมี 0.5 M. Sodium citrate จะเพิ่มกิจกรรมของ SS (Anne, 1991) พบว่า การต่อสายของอะไมลโลส เมื่อมีกิ่งแขนงจำนวนมากทำให้ละลายน้ำ (pre-amylopectin) จึงไม่เกิดผลึก ดังนั้นจึงมีการตัดสายออกเพื่อสร้างให้เป็นอะไมลโลเพคติน โดย DBE ในการเล็มกิ่งแขนงของอะไมลโลเพคตินออก เรียกกลไกนี้ว่า glucan-trimming model ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 glucan trimming model (Alan, 2000; Vandeputte, 2004; Steven, 1996)

พบว่า สารตั้งต้นอย่างง่ายของ DBE จะต้องมีลักษณะเป็น MOS (Alan, 2000) การตัดของสายอะไมลโลเพคตินจะอาศัยการเติม phosphate โดย starch-dikinase enzyme ซึ่งจะมีผลต่อการสลายแป้ง (Gregory, 1996) และพบว่า มีการเติม phosphate ให้ MOS ขนาดสั้นๆ โดย phosphorylase A และเติม phosphate ให้ maltoheptaose ซึ่งจะทำให้เกิด glucan trimming process ในหัวมันฝรั่งจะมี phosphate สูงโดย phosphate จะอยู่ใน monoester ของคาร์บอนที่ 6 ของ glucose (70 %) หรือคาร์บอนที่ 3 ของ glucose (30 %) การที่มี phosphate ต่ำจะมีผลต่อคุณสมบัติของแป้ง เช่น มีผลต่ออุณหภูมิในการเกิดเจล ความหนืด การละลาย และ retrogradation นอกจากนี้ phosphate ยังมีผลต่อโครงสร้าง การจับกันของโมเลกุล และมีผลต่อ physicochemical properties ของแป้ง (Smith, 1999)

3.3.3 การสร้างอะไมโลส (amylose)

การสังเคราะห์อะไมโลสในใบของ Arabidopsis โดยใช้ ^{14}C labeling พบว่า จะใช้ MOS เป็นสารตั้งต้น (primer) ของ GBSSI จากสมมติฐานที่ว่า สามารถต่อสายอะไมลโลเพคตินด้วย MOS ได้ จากการทดลองพบว่า ไม่สามารถย้าย MOS ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสี ^{14}C ไปใช้สังเคราะห์อะไมลโลเพคติน แต่จะย้ายไปให้อะไมลโลส เชื่อว่า การสร้างอะไมโลสมาจาก MOS เท่านั้น

(Zeeman, 2002) อัตราส่วน และองค์ประกอบของอะมัยโลสในเมล็ดแป้งจะขึ้นกับความเข้มข้นของ ADPG โดยแสงมีผลต่อการสร้าง MOS ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์แป้ง (Smith, 1997) ซึ่ง MOS จะเป็นตัวกระตุ้นการสังเคราะห์อะมัยโลสในเมล็ดแป้ง โดย GBSSI จะจำเพาะต่อ MOS มากกว่า SSII อย่างน้อย 20 เท่า เมื่อ MOS แพร่มาที่เมล็ดแป้งจะถูกต่อสายโดย GBSSI เกิดการสังเคราะห์อะมัยโลส และ GBSSI ยังสามารถสร้างอะมัยโลเพคติน โดยต่อสายยาวของอะมัยโลเพคติน แต่กลไกยังไม่ทราบแน่ชัด (Denyer, 2001) GBSSI-like protein ซึ่งเกิดการกลายพันธุ์ เรียกขานนี้ว่า GBSSIb พบการแสดงออกในใบ ปล้อง ตาข้าง และตาขอของถั่ว แต่ไม่พบในเอมบริโอของต้นถั่ว (Denyer, 2001)

3.3.4 การสร้างอะมัยโลเพคติน (amylopectin)

การสร้างอะมัยโลเพคติน ต้องอาศัย SS และ SBE ซึ่ง SS จะมีผลต่อความยาวของสายอะมัยโลเพคติน แต่การมีเฉพาะ SS และ SBE ไม่เพียงพอต่อการสร้างอะมัยโลเพคติน ยังต้องอาศัย DBE ที่เรียกว่า isoamylase (ISA) ในการสลาย soluble polymer ที่เรียกว่า phytyglycogen พบว่า การขาด ISA จะมีผลต่อการสะสมของ phytyglycogen และทำให้ปริมาณแป้งลดลง การกลายพันธุ์โดยการยับยั้ง 1 หรือ 2 รูปของ SS จะทำให้สายสั้นของอะมัยโลเพคตินมีความยาวลดลง และสายยาวจะมีความยาวเพิ่มกว่าเดิม 8-60 หน่วย พบว่า ความจำเพาะกับสารตั้งต้นจะมีผลในการสร้างสายอะมัยโลเพคติน โดยการลดการแสดงออกของ SSII ไม่ค่อยมีผลต่อปริมาณแป้งในหัว แต่การลดปริมาณ SSIII จะลดปริมาณแป้งลง 80 % (Andreas, 2001)

3.4 คุณสมบัติของแป้งมันสำปะหลัง

มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว โดยเมล็ดแป้งมันสำปะหลังเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-35 ไมโครเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 15 ไมโครเมตร ลักษณะเมล็ดแป้งจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน 2-8 เม็ด จะมีลักษณะกลมคล้ายไข่ แต่มีรอยตัดด้านบน จำนวนเมล็ดแป้ง 5×10^8 เม็ดต่อแป้ง 1 กรัม มีโครงสร้างผลึกแบบ C มีความเป็นผลึก 38 % แป้งมันสำปะหลังจะมีความชื้น 12.27 ± 0.13 โปรตีน 0.11 ± 0.01 ไขมัน 0.07 ± 0.02 กากใย 0.12 ± 0.03 เถ้า 0.25 ± 0.03 (Rungnaphar, 2002) และ phosphorous 0.01 % ของน้ำหนักสด มีอะมัยโลเพคติน 83 % ของปริมาณแป้ง และอะมัยโลส 18-23 % ของปริมาณแป้ง degree of polymerization (DP) 1,100-3,220 unit การมีอะมัยโลสต่ำทำให้การพองตัวดี โดยการพองตัวของแป้งมันสำปะหลังจะพองตัวแบบขึ้นตอนเดียว (single stage swelling) การพองตัวเมื่อได้รับความร้อนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงพองอยู่ในลักษณะแป้งเปียก (paste) ทำให้เกิดความหนืดอย่างมาก เมื่อเย็นตัวลงจะเกิดเป็นเจล โดย

แป้งมันสำปะหลังจะมีอุณหภูมิเริ่มในการเกิดความหนืดที่ต่ำกว่าแป้งชนิดอื่นๆ แต่มีความหนืดที่สูงกว่าแป้งชนิดอื่น มีเนื้อสัมผัสที่ยาว (long texture) เนื้อสัมผัสเหนียว มีความใสของเนื้อแป้ง โปร่งแสง ทนต่อแรงเฉือนได้ดี อัตราการกิ่นตัวต่ำ มีอุณหภูมิในการเกิดเจลที่ในเซชัน 66 องศาเซลเซียส สามารถดูดน้ำได้ปริมาณ 42.9 กรัมต่อน้ำหนักแป้งแห้ง 100 กรัม คุณสมบัติในการพองตัว โดยมีกำลังการพองตัว 7.1 เท่า และการละลาย 48 % (w/v) ณ. อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส การเกิดเจลที่ในเซชัน มี Kofker gelatinization temperature ในช่วง 59-64-69 องศาเซลเซียส Brabender pasting temperature 8 % ที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส Brabender peak viscosity 8 % ที่ 1,200 BU. กำลังการพองตัวที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็น 71 เท่า critical concentration ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เท่ากับ 1.4 ตรวจสอบการเกิดเจลที่ในเซชันโดย differential scanning calorimetry (DSC) อุณหภูมิที่เริ่มเกิดเจลที่ในเซชันที่ 68 องศาเซลเซียส และสูงสุดในการเกิดเจลที่ในเซชันที่ 92 องศาเซลเซียส การเกิด retrogradation คือ อุณหภูมิที่เม็ดแป้งพองตัวสูงสุดแล้วแตกออก โดยโมเลกุลขนาดเล็กจะกระจายออกทำให้ความหนืดลดลง เมื่อปล่อยให้เย็นตัวลงอะมัยโลสจะมาจัดเรียงตัวใหม่ เกิดเป็นร่างแห 3 มิติ โครงสร้างใหม่นี้จะอุ้มน้ำ และไม่ดูดน้ำเข้ามาอีก ทำให้ความหนืดคงตัว เกิดเจลเหนียว (กล้าณรงค์, 2543) โดยมันสำปะหลังมีอะมัยโลส 17 % ของปริมาณแป้งทั้งหมด โดยอะมัยโลสจะมีความยาวสาย 1,000 หน่วย โดยมีการสร้างด้วยพันธะ alpha (1 → 4) glycosidic เป็นส่วนใหญ่ถึง 99 % ของจำนวนหน่วยแป้งทั้งหมด และพันธะ alpha (1 → 6) glycosidic เพียง 1 % ของจำนวนหน่วยแป้งทั้งหมด มีขนาดโมเลกุล $1-10 \times 10^5$ DP 324-4,290 มีแขนง 9-20 จุด มีสายต่อกัน 3-11 สาย/โมเลกุล และมีอะมัยโลเพคติน 83 % โดยสายด้านนอกของอะมัยโลเพคตินมีความยาว 12-23 หน่วย และสายด้านในมีความยาว 20-30 หน่วย การจัดเรียงตัวของสายอะมัยโลเพคตินที่อยู่ด้านนอก คือ สาย A และสาย B1 จะจับกันแบบ double helices ในเม็ดแป้งในชั้น crystallites การเกิด double helices จะมี 2 แบบ คือ แบบ A จะมีน้ำในโมเลกุลปริมาณที่ต่ำ ทำให้การละลายน้ำได้ยาก เกิด gelatinize ในอุณหภูมิสูง แต่แบบ B จะมีน้ำในแกนกลาง ทำให้ละลายน้ำได้ จึงเกิด gelatinize ในอุณหภูมิต่ำ (Richard, 2004)

3.4.1 amylopectin มีผลต่อคุณสมบัติของแป้ง

อะมัยโลเพคตินจะมีผลต่อความหนืด ความแข็งของวุ้น การยอมให้แสงผ่าน เพิ่มการพองตัว (swelling power) ซึ่งมีผลต่อการเกิดเจล และลักษณะแป้งเปียก โดยอะมัยโลเพคตินจะจับกับ iodine ทำให้มีสีน้ำตาลแดง แป้งที่ไม่มีอะมัยโลส (amylose free) จะเกิดเจลได้ง่ายกว่า และมีความใสมากกว่าแป้งปกติ ปริมาณอะมัยโลเพคตินที่สูงจะขัดขวางการจัดเรียงตัวของอะมัยโลสทำให้เกิด retrogradation ต่ำลง ความยาวของสายโซ่ที่สั้นที่สุดที่สามารถทำให้เกิด retrogradation ต้องมี

8-10 หน่วย glucose แป้งที่มีอะมัยโลเพคตินสูงจะมี peak viscosity สูง และหากมี starch bound phosphate หรืออะมัยโลสจำนวนมากจะทำให้ peak viscosity ต่ำ (Andreas, 2001) ความยาวของแขนงของอะมัยโลเพคตินจะมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของเม็ดแป้ง เช่น การเกิดเจล ความหนืด ความใสของแป้ง

3.4.2 amylose มีผลต่อคุณสมบัติของแป้ง

แป้งที่มีอะมัยโลสสูงเป็นเจลได้ดีในอุณหภูมิสูงกว่าแป้งที่มีอะมัยโลสต่ำ และมีความเหนียวสูง (viscous pastes) เนื่องจากการเกิดการสลายของแป้ง (retrogradation) (Denyer, 2001) สามารถละลายน้ำได้น้อย ทำปฏิกิริยากับไอโอดีนได้สีน้ำเงิน มี beta-amylolysis limit 75 % โดยอัตราส่วนของอะมัยโลเพคติน และอะมัยโลสจะมีผลต่อการเกิด retrogradation

3.5 การลดลงของปริมาณแป้ง

การสลายแป้งใน amyloplast เป็น glucose-1-phosphate (G-1-P) จะเกิดปฏิกิริยาในเวลา กลางคืน การสลายแป้งพบใน amyloplast จะถูกสลายโดย amylase และ maltase ซึ่งจะได้ G-1-P จากนั้นจะเข้าสู่ glycolytic pathway การควบคุมการสลายของแป้ง โดย disproportioning enzyme (DPE1) อาศัย starch phosphorylating enzyme ในการเร่งการสลาย โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการสลายแป้งมีหลายรูป เช่น alpha-amylase (AMY), beta-amylase (BAM), glucosidase, debranching enzyme (DBE), starch phosphorylase และ DPE1 แป้งจะถูกย่อยโดย AMY ได้ glucan ที่มีแขนงที่มีขนาดใหญ่ แล้วย่อยด้วย DBE จะได้ glucan ที่เป็นเส้นตรง แล้วย่อยอีกครั้งด้วย AMY จะได้ glucan ที่เป็นเส้นตรงขนาดสั้น ๆ แต่ถ้าย่อยด้วย starch phosphorylase จะได้ G-1-P และถ้าย่อยด้วย BAM จะได้ maltose แล้วถูกย่อยอีกครั้งด้วย alpha-glucosidase จะได้ glucose 2 โมเลกุล แต่ถ้า glucan สายตรงขนาดสั้น ๆ จะถูกย่อยด้วย DPE1 จะได้ glucose (Smith, 2003) พบว่า hydrolase จะตัดสายของอะมัยโลสออกจำนวนน้อยกว่าการตัดสายของอะมัยโลเพคติน การสังเคราะห์ MOS เนื่องจากได้รับความร้อนเกิดการสลายของอะมัยโลเพคติน (Denyer, 2001) DBE จะสลายพันธะ alpha (1 → 6) glycosidic ของอะมัยโลเพคติน โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แบบ direct โดย DBE จะสลายพันธะ alpha (1 → 6) glycosidic ของ polyglucan เช่น pullulanase (PUL) และ isoamylase (ISA) เป็นต้น และแบบ indirect จะทำการย้ายทีละหน่วยจากปลาย เช่น 4-alpha-gluconotransferase และ amylo-1,6-glucosidase เป็นต้น

เอนไซม์ในการสลายแป้ง (Smith, 2005; Samuel, 2004; Alison, 2003, 2005; Totte, 2004)

1. limit dextrinase [pullulanase (PUL), R enzyme (EC 3.4.1.412)] ถอดรหัสจาก *ZPU1* gene จะตัดสายสั้นเท่านั้น โดยสลายพันธะ alpha (1 → 6) glycosidic เอนไซม์นี้จะมีผลต่อการสลายอะมัยโลเพกติน และ pullulan (polymer ของ maltotriose ใน fungi) การย่อย pullulan จะได้ maltotriose (สร้าง maltosyl group) พบว่า สามารถย่อย pullulan ได้ดีกว่า glucan

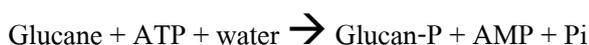
2. isoamylase (ISA) (EC 3.2.1.68) โดยสลายพันธะ alpha(1 → 6) glycosidic จะมีผลิตภัณฑ์เป็น maltose กับ maltotriose เอนไซม์นี้ถอดรหัสจาก *isa1* ในข้าวบาร์เลย์ และ SUGARY (*SU1*) ในข้าว โดย ISA ในพืชชั้นสูงมีลักษณะเป็น multimeric มีน้ำหนักโมเลกุล 340-500 KDa. จะมีผลต่อการสลายอะมัยโลเพกติน แต่ไม่สามารถย่อย pullulan แต่จะเปลี่ยนเป็น isopanose (สร้าง maltotriosyl group และ oligosaccharide)

DBE มี 2 กลุ่ม คือ ISA กับ PUL พบว่า การกลายพันธุ์ของ *dbe1-1* จะลดกิจกรรมของ BAM, starch phosphorylase, SS และ ISA แต่จะเพิ่มกิจกรรมของ AMY, maltase (MEX1), D-enzyme และ PUL พบว่า DBE1 จะมีผลต่อ chloroplastic isoamylase (cyt. ISA) โดยตรง การสูญเสียกิจกรรมของ ISA นี้จะทำให้เกิดการสะสมของ phyto glycogen โดยการสูญเสียกิจกรรมของ ISA ไม่มีผลโดยตรงต่ออัตราการสลายแป้ง โดยปกติในสภาวะมี ISA จะมีอัตราการสลายแป้ง 1.0 mg./hr. แต่ในสภาวะขาด ISA จะมีอัตราการสลายแป้ง 0.9 mg./hr. (Samuel, 1998)

3. disproportioning enzyme (D enzyme/ DPE1) (EC 2.4.1.25) [plastidial 1,4- α -D-glucan: 1,4- α -D-glucan,4- α -D-glucanotransferase] เป็น plastidial α -1,4 glucanotransferase โดย D enzyme จะตัดสาย MOS ที่มี glucose อย่างน้อย 3 หน่วย (maltotriose) เมื่อสลายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น MOS และย้ายบางส่วนของ alpha-1,4 glucan (donor) ไปยังปลายของสายอื่น (acceptor) โดยโมเลกุลที่สั้นที่สุดที่สามารถเป็นสารตั้งต้น (donor) ในการย่อยของ D enzyme จะต้องมีลักษณะเป็น maltotriose แต่ไม่สามารถย่อยสายที่มีความยาวมาก ๆ ได้ และโมเลกุลที่เล็กที่สุดที่สามารถเป็นสายรับ (acceptor) คือ glucose พบว่า การเพิ่ม D enzyme ลงไปในปฏิกิริยาจะเพิ่มการทำงานของ phosphorylase และ BAM ซึ่งบางทีเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างอะมัยโลเพกติน และเมตาบอลิซึมของ MOS ใน Arabidopsis พบว่า D enzyme ถอดรหัสมาจาก *dpe1* โดยการกลายพันธุ์ *dpe1-1* จะมีการเปลี่ยนกิจกรรมของเอนไซม์อื่น ๆ และทำให้อัตราส่วนระหว่างอะมัยโลส กับ อะมัยโลเพกตินเพิ่มขึ้น แต่โครงสร้างของอะมัยโลเพกตินไม่เปลี่ยนแปลง (Joanna, 2001) โดย

D enzyme ยังช่วยในการเปลี่ยน pre-amylopectin ให้เป็น mature-amylopectin (Alison, 2003) หากขาดเอนไซม์นี้จะทำให้เกิดการสะสมของ MOS

4. α -glucan, water dikinase (GWD) (EC 2.7.9.4) หรือ R1 protein พบใน matrix ของเม็ดแป้ง โดยการสลายแป้งจะมีการเติม phosphate โดย ATP ที่ตำแหน่ง C3 หรือ C6 ของ glucosyl residue ของอะมัยโลเพคติน แล้วจึงเกิดการสลายแขนงของอะมัยโลเพคติน ดังสมการ



การกลายพันธุ์ที่ *sex1* gene (R1 protein) จะเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง อะมัยโลสต่ออะมัยโลเพคติน และโครงสร้างของอะมัยโลเพคติน โดยเพิ่มจำนวนของสายที่มี DP 10-24 แต่สาย DP 31-46 จะมีจำนวนลดลง และมีผลต่อแป้งที่มีการเติม phosphate และยังคงอัตราการสลายของแป้ง (Tein-Shin, 2001)

5. phosphoglucan, water dikinase (PWD) (EC 2.7.9.4) มีปฏิกิริยาเหมือน GWD แต่จะชอบเติม phosphate ให้อะมัยโลเพคตินมากกว่า glucan และเติมที่ตำแหน่ง C3 ของ glucosyl residue ของอะมัยโลเพคตินมากกว่าที่ตำแหน่ง C6

6. α -1,4- glucan lyase (EC 4.2.2.13) จะเร่งการย้าย glucose จากปลาย nonreducing (1,5 anhydro-D-fructose)

7. glucoamylase (EC 3.2.1.3) เป็นเอนไซม์ในการสลาย pullulan ได้ glucose ซึ่งสามารถสลายพันธะ $\alpha(1,6)$ glycosidic และ $\alpha(1,4)$ glycosidic

8. glucosidase

8.1 α -glucosidase (EC 3.2.1.20) [maltase (MEX1), maltose transporter] เป็นเอนไซม์ในการสลาย maltose ได้ glucose พบใน chloroplast หากขาดเอนไซม์นี้จะมีการสะสมของ MOS และทำให้อัตราการสลายลดลง (Totte, 2004)

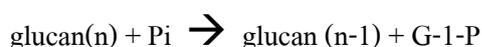
8.2 β -glucosidase (EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ในการสลาย MOS ได้ glucose

9. amylase ซึ่งมี 2 ชนิด คือ

9.1 alpha -amylase (1,4- α -D-glucan glucanohydrolase) (EC 3.2.1.1) เป็น endohydrolyase จะเร่งการสลายพันธะ alpha-1,4 glycosidic ของอะมัยโลส และอะมัยโลเพคติน

9.2 beta-amylase (EC 3.2.1.2) เป็น exohydrolyase โดยสลายพันธะ alpha (1 \rightarrow 4) glycosidic จากปลาย non-reducing สลาย MOS โดย MOS จะต้องมีความยาวมากกว่า 13 หน่วย glucose

10. Starch phosphorylase (P enzyme) (EC 2.4.1.1) หรือ alpha-glucan phosphorylase เร่งการเติม phosphate ทำให้สลายโมเลกุลของอะมัยโลเพคติน และสลาย maltose หรือ α -1,4-linkaged chain ได้ G-1-P ซึ่งสลายทางปลาย non-reducing แต่จะทำงานหลังจากเกิดปฏิกิริยาของ DBE หรือ AMY โดย G-1-P ที่ได้จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจ และใช้สังเคราะห์สารต่างๆ ภายในเซลล์



11. Serine/Threonine protein phosphatase1 (PP1) และ Serine/Threonine protein phosphatase2 (PP2) โดย PP2 ยังสามารถแบ่งออกได้ คือ PP2A, PP2B และ PP2C โดยต้องการ Ca^{2+} และ Mg^{2+} กลไกการควบคุมการแสดงออกของ Serine/Threonine protein phosphatase โดยระดับการแสดงออกของยีน ตำแหน่งที่โปรตีนอยู่ ปริมาณของสารตั้งต้น และการควบคุมจากเอนไซม์อื่น จะทำให้เกิด hydrophobic interaction ระหว่าง sucrose กับ sucrose transporter (SUT), PP1 และ PP2A จะมีผลต่อการถอดรหัสของ *sbe* gene การยับยั้ง PP1 โดย okasaic acid จะมีผลต่อ nucleocytoplasmic traffic และป้องกันการเพิ่มของ plastidic signal transduction ทำให้เพิ่ม SBE (Yona, 2004)

12. Maltose phosphorylase (EC 2.4.1.8) สลาย maltose เร่งปฏิกิริยาโดยการเติม phosphate ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น G-1-P และ glucose

13. Transglucosidase (DPE1) หรือ maltose metabolising glucosyl transferase (EC 2.4.1.24) สลาย maltose ได้ glucose (Samuel, 2004)

14. Glucanotransferase (EC 2.4.1.25) (DPE2) สลาย maltose ได้ glucose ซึ่งมีลักษณะคล้าย maltaseQ (MalQ) พบว่า การขาด DPE2 จะลดการสร้าง และการสลายแป้งในใบ เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ *DPE2* จะมีผลทำให้ปริมาณ sucrose ลดลง โดยเฉพาะเมื่อเข้าสู่เวลากลางคืน เมื่อเทียบกับพันธุ์ปกติ จะมีอัตราการสลายแป้งลดลง แต่ *DPE2* ไม่มีผลโดยตรงต่อการสลายของแป้ง แต่ไปมีผลต่อการทำงานของ *DPE1* และ *MEX1* protein ซึ่งจะทำให้เกิดการสะสมของ MOS โดยความเข้มข้นของ MOS สูงๆ จะไปยับยั้งการทำงานของ *DPE2* และมีผลทำให้การเจริญของพืชลดลง (Tansy, 2004)

15. Water soluble glucan (WSG) ถอดรหัสจาก *STA7* ของ *Chlamydomonas* มีขนาด 88 KDa. มีลักษณะเป็น hydrolase (Gregory, 1996)

การสลายอะมัยโลเพคตินในมันฝรั่งจะเพิ่ม phosphorous แต่อัตราส่วนระหว่าง phosphate ที่ C6 และ C3 ยังคงเท่าเดิม การสลายจะทำให้คุณสมบัติของแป้งที่เกี่ยวกับอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงไป เช่น อุณหภูมิในการเกิดเจล เป็นต้น เนื่องจากความยาวของสายภายนอกของอะมัยโลเพคตินที่เปลี่ยนไป เอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยแป้ง คือ starch phosphorylase ย่อยแป้งเป็น G-1-P เพื่อนำไปสร้างผนังเซลล์ ใช้ในกระบวนการหายใจ โดย starch phosphorylase ของข้าวโพดมีขนาด 112 KDa. ใน amyloplast จะมี pH optimum ที่ 6.0 จะถูกยับยั้งโดย thioreactive agents, diethyl pyrocarbonate, phenylglyoxal และ ADPG พบว่า จะสลาย glycogen มากกว่าอะมัยโลเพคติน (Helen, 2001) การกลายพันธุ์ *DBE* ที่ *SUGARY* (*SU1*) ของข้าวโพด และ *SUGARY* ของข้าวจะทำให้ปริมาณแป้งในเอนโดสเปิร์มลดลง แต่มี phyto glycogen เพิ่มขึ้น (Smith, 1997)

กลไกในการสลายแป้ง GWD และ PWD มาสลายพันธะในโครงสร้างผลึกของเม็ดแป้ง ได้ อะมัยโลส และอะมัยโลเพคตินอิสระ ซึ่งในสภาพปกติจะจับกันด้วยพันธะเกลียว (helix) จากนั้น ISA หรือ PUL จะเข้ามาสลายอะมัยโลเพคตินได้เป็นเส้นตรง แต่อะมัยโลสจะถูกย่อยด้วย BAM ได้ maltose กับ MOS โดย maltose จะถูกส่งออกนอก chloroplast โดย *MEX1* แต่ MOS ยังอยู่ใน chloroplast จะถูกย่อยโดย *DPE1* จากด้านปลายสายของ MOS ได้ glucose แล้ว glucose จะถูกส่งไป cytosol ผ่าน glucose transporter หรือถูกย่อยด้วย starch phosphorylase ได้ G-1-P ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น triose phosphate ส่งไปยัง cytosol ผ่าน triose phosphate translocator (Alison, 2005)

พบว่า เอนไซม์ในการสร้าง และสลายแป้ง เช่น PGI, PGM, AGPase, SS, GBSS, SBE, ISA, GWD, PUL, DPE1, DPE2, glucan phosphorylase, BAM, AMY, alpha- glucosidase, glucose transporter, triose phosphate/inorganic phosphate translocator และ maltose exporter (MEX1) ของ Arabidopsis ในรอบวันจะต่างกัน โดยจะถูกควบคุมการแสดงออกแบบ circadian clock (Steven, 2004)

3.6 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อปริมาณแป้ง

คุณภาพของข้าวจะมีผลจากอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม จากการศึกษา non-waxy indica ใน 2 การทดลอง 29/35 °C และ 22/28 °C โดยการปลูกจะคาบเกี่ยว 2 ฤดู จากนั้นวิเคราะห์อะมัยโลส และ อะมัยโลเพคติน พบว่า เมื่ออุณหภูมิ 29/35 °C จะมีการแสดงออกของ SSI ในเอนโดสเปิร์มในระดับที่สูงกว่าที่ 22/28 °C แต่ SBEI, SBEII และ GBSS จะมีระดับที่ลดลง คาดว่า อุณหภูมิสูง จะมีผลลดแขนงของอะมัยโลเพคติน แต่จะเพิ่มความยาวของสายอะมัยโลเพคติน (Jiang, 2003) คุณภาพของแป้งเนื่องจากอุณหภูมิจากสิ่งแวดล้อม การเจริญภายใต้อุณหภูมิสูง และต่ำในช่วงขณะการสุกของรวงข้าว พบว่า ข้าวประเภท non-waxy indica จะมีการแสดงออกของยีน RBE1, RBE3 และ GBSS ในเอนโดสเปิร์มสูง เมื่อลดการแสดงออกของ RBE จะทำให้ลดจำนวนแขนงของอะมัยโลเพคติน แต่กลับเพิ่มความยาวของสาย (Huawu, 2003) การศึกษาปริมาณของอะมัยโลส ใน non-waxy japonica rice (*Oryza sativa* cv. Akitakomachi) ซึ่งจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่ออุณหภูมิลดลงจาก 25 องศาเซลเซียส เป็น 15 องศาเซลเซียสขณะรวงข้าวสุก พบว่า ระดับการแสดงออกของ SS, AGPase, SBE และ SSS จะต่ำกว่า หรือเท่ากับเมื่ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ GBSS จะเพิ่มสูงขึ้น 3-3.5 เท่า แสดงว่า การสังเคราะห์อะมัยโลสขึ้นกับอุณหภูมิในขณะการสุกของรวงข้าว (Takayuki, 1995) อุณหภูมิสูงจะมีผลต่อปริมาณแป้ง และขนาดของเม็ดแป้ง โดยอุณหภูมิที่สูงจะเปลี่ยน sucrose เป็นแป้ง โดยอุณหภูมิจะมีผลต่อ SSS และปริมาณของอะมัยโลเพคติน ซึ่งจะมีผลต่อความหนืด อุณหภูมิสูงมีผลต่อการสะสมแป้งในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L. cv Butte86) ศึกษาการสะสมแป้งโดยคุมอุณหภูมิ 37/17 (อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน) ใน 6 วันแรก แล้วต่อด้วย 24/17 และ 37/28 ใน 21 วันแรก แล้วต่อด้วย 24/17 พบว่า มีปริมาณแป้งเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 19 % ภายใต้การคุมอุณหภูมิ 37/17 และเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 58 % ภายใต้การคุมอุณหภูมิ 37/28 เมื่อเทียบกับการปลูก 24/17 ตลอดเวลา ระยะเวลาการปลูก การปลูกภายใต้อุณหภูมิ 24/17 จะมีการแสดงออกของ AGPase, SSI, SSII, SSIII, GBSS, SBEI และ SBEII มีการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 12-16 หลังผสมเกสร การปลูกภายใต้ อุณหภูมิ 37/17 จะมีการแสดงออกคงที่ และการปลูกภายใต้อุณหภูมิ 37/28 จะมีการแสดงออกสูงในวันที่ 7 หลังผสมเกสร พบว่า อุณหภูมิที่สูงจะลดการแสดงออกของ SS มากกว่ายีนอื่นๆ (William,

2003) อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืนจะมีผลในการสร้างแป้ง ในข้าวสาลีที่อุณหภูมิ 37/17, 37/28 และ 24/17 ที่อุณหภูมิ 24/17 จะมีการแสดงออกของ AGPase, SSI, SSII, SSIII, GBSS, SBEI และ SBEII จะสูงขึ้นในวันที่ 12-16 หลังผสมเกสร ที่อุณหภูมิ 37/17 จะมีการแสดงออกเหมือน 24/17 และที่อุณหภูมิ 37/28 จะเริ่มพบการแสดงออกในวันที่ 7 หลังผสมเกสร อุณหภูมิที่สูงจะมีการแสดงออกของ SS สูงกว่าเอนไซม์อื่นๆ เม็ดแป้งแบบ A (มีเส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่า 16 ไมโครเมตร) จะพบในระยะแรกของการเจริญของเมล็ด เม็ดแป้งแบบ B (มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5- 16 ไมโครเมตร) จะพบในระยะถัดมาของการเจริญของเมล็ด และเม็ดแป้งแบบ C (มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 16 ไมโครเมตร) จะพบในระยะแรกของการเจริญของเมล็ด โดยอุณหภูมิ 37/17 จะเกิดผลึกแบบ B 63-67 % และ อุณหภูมิ 37/28 จะเกิดผลึกแบบ A 78 % การแสดงออกของยีน เมื่ออุณหภูมิ 24/17 ในช่วงแรก (8-12 วันหลังผสมเกสร) ทุกเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น ทำให้มีการสร้างแป้งอย่างรวดเร็ว และลดลงในวันที่ 36-41 หลังผสมเกสร โดย SS จะลดลงอย่างรวดเร็วกว่าเอนไซม์อื่นๆ พบว่า SBEII ลดลงกว่า SBEI ที่อุณหภูมิ 37/17 โดย SBEI จะสูงในขณะที่มีการเจริญของเมล็ด 19-22 วันหลังผสมเกสร SS ในเมล็ดจะมีการแสดงออกที่ต่ำ แต่ AGPase1 และ SBEII จะมีการแสดงออกที่คงที่ เมื่อ 13-16 วันหลังงอก AGPase2 และ SBEI จะมีการแสดงออกที่คงที่ เมื่อ 16-28 วันหลังผสมเกสร GBSS และ SS จะมีการแสดงออกที่คงที่ เมื่อ 13-23 วันหลังผสมเกสร อุณหภูมิ 37/28 จะมีการแสดงออกที่คงที่ของทุกเอนไซม์ และลดลงในวันที่ 16-20 หลังผสมเกสร ในเมล็ด AGPase1, AGPase2, GBSS, SS และ SBEII จะมีการแสดงออกที่สูงในวันที่ 7 หลังผสมเกสร แต่ SBEI จะมีการแสดงออกที่สูงในวันที่ 7-13 หลังผสมเกสร และทำให้มีการสร้างผลึกแบบ A เพิ่มจาก 25 % เป็น 80 % เมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 24/17 และทำให้มีการสร้างผลึกแบบ B ลดลงจาก 70 % เป็น 20 % (William,2003)

ความแตกต่างของพันธุ์มันฝรั่งที่มีผลต่อแป้ง ในคุณสมบัติทาง physicochem การสร้างแป้ง ขนาดแป้ง และคุณสมบัติของเจล (Mahyinar, 2003) ผลกระทบจากน้ำฝน เช่น ในข้าว (*Oryza sativa* L.) จะมี SuSy เพิ่มขึ้นเมื่อเกิดภาวะ water stress ซึ่งจะสัมพันธ์กับอัตราการสะสมแป้ง แต่ Inv ทั้งรูปที่ละลาย และไม่ละลายจะลดลงเมื่อเกิดภาวะ water stress แต่ไม่มีผลสัมพันธ์ต่อปริมาณแป้งที่สะสม แต่ปริมาณเอนไซม์ SBE และ SSS จะเพิ่มขึ้น สัมพันธ์ต่อปริมาณแป้งที่สะสม การตอบสนองต่อภาวะ water stress มีผลทั้งปริมาณ และคุณภาพของแป้ง แต่ AGPase จะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (Takayuki, 1995) พบว่า การเกิดภาวะ water stress จะทำให้แป้งมีความจุน้ำต่ำ และมี peak viscosity ต่ำ และหลังจากภาวะ water stress จะทำให้อุณหภูมิในการ pasting และการเกิดเจลจะสูงขึ้น (Vilai, 2001) น้ำหนักแห้งของพืชขึ้นกับปริมาณพื้นที่ใบ จึงใช้ดัชนีพื้นที่ใบ (leaf area index; LAI) เป็นตัววัดผลผลิตของน้ำหนักพืช พบว่า LAI ที่เหมาะสมสำหรับอัตราการเจริญของหัวมันสำปะหลัง ประมาณ 3-3.5 ระยะแรกของการเจริญเติบโต ค่า LAI จะ

เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งเจริญได้ 6 เดือน จากนั้น LAI จะลดลง เนื่องจากพื้นที่ใบลดลง โดยใบในส่วนล่างของลำต้นจะเริ่มร่วง พบว่า LAI จะสัมพันธ์กับปริมาณน้ำฝน ในมันสำปะหลัง พบว่าพันธุ์ที่มี LAI สูงจะมีอายุใบยาวนาน และให้ผลผลิตสูง ขนาดใบจะสัมพันธ์กับปริมาณน้ำ และธาตุอาหาร การปลูกมันจะเริ่มมีการสร้างเม็ดแป้ง ใน parenchyma cell ในรากเมื่อปลูกได้ 28 วัน แล้วรากจะขยายขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเจริญได้ 6 สัปดาห์ จากนั้นจำนวนรากจะคงที่เมื่อปลูกได้ 2-3 เดือน การใส่ปุ๋ยในโตรเจนจะทำให้ผลผลิตสูงขึ้น เนื่องจากจะเพิ่มจำนวนของหัว การปลูก 2-4 เดือน จะมีการเจริญของต้น และใบมากกว่าราก แต่หลังจาก 4 เดือน รากจะมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าต้นและใบ โดยคุณภาพของหัวสด ทั้งปริมาณแป้ง และน้ำหนักแห้งจะแปรผันตามฤดูกาล และพันธุ์ พบว่า LAI จะสูงในฤดูฝน และลดลงในฤดูแล้ง เนื่องจากความชื้นในดิน ซึ่งมีผลต่อน้ำหนักแห้งรวม น้ำหนักรากสด และน้ำหนักรากแห้ง ซึ่งแปรผันตรงต่อ LAI (โอภาส, 2531)

อายุเก็บเกี่ยวที่ต่างกันจะทำให้อะมัยโลสมีความยาว อัตราส่วนระหว่างอะมัยโลส ต่อ อะมัยโลเพคติน และขนาดของเม็ดแป้งต่างกัน นอกจากนี้ เมื่อทำการปลูก 14 เดือน แป้งที่มีลักษณะ unimodal เป็น bimodal (Sriroth, 1999) การเรียงของ integrity กับ crystalline ซึ่งสัมพันธ์กับสภาพแวดล้อม และมีผลต่อการเกิดเจล การละลายน้ำ การอุ้มน้ำ การพองตัว โดยลักษณะทางพันธุกรรม และสภาพแวดล้อมมีผลต่อคุณสมบัติของแป้ง และการเปลี่ยนแปลงขนาดของแป้ง

4. การวิเคราะห์แป้ง

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งในหัวมันสำปะหลัง

การหาปริมาณแป้งแบบหยาบ โดย Reimann scale balance นำหัวมันสำปะหลังมาสับเป็นท่อนๆ แล้วชั่งด้วยเครื่อง Reimann scale balance ซึ่งมีคันชั่งที่ประกอบด้วยตะกร้าลาด 2 อัน อันแรกอยู่เหนือภาชนะบรรจุน้ำ นำหัวมันสำปะหลังมาสับเป็นท่อนๆ แล้วชั่งน้ำหนักให้ได้ 5.0 กิโลกรัม แต่ถ้าไม่ถึงให้ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้วจดน้ำหนัก เรียกน้ำหนักที่ได้นี้ว่า น้ำหนักในอากาศ ส่วนตะกร้าอันที่ 2 จะอยู่ในน้ำหลังจากชั่งในตะกร้าอันที่ 1 เสร็จแล้วให้ปรับเข็มไปที่ 0 เหน้าให้เต็มภาชนะบรรจุน้ำ แล้วเทหัวมันสำปะหลังลงในตะกร้าอันที่ 2 แล้วจุ่มลงในน้ำปรับให้อยู่สมดุลแล้วบันทึกค่าที่ได้ เรียกน้ำหนักนี้ว่า น้ำหนักในน้ำ ถ้าน้ำหนักในอากาศถึง 5.0 กิโลกรัม สามารถอ่านปริมาณแป้งได้เลย แต่ถ้าไม่ถึง 5.0 กิโลกรัม ให้นำมาคำนวณหาความถ่วงจำเพาะ โดย

$$\text{ความถ่วงจำเพาะ} = \frac{\text{น้ำหนักในอากาศ}}{\text{น้ำหนักในอากาศ} - \text{น้ำหนักในน้ำ}}$$

หาปริมาณเป็งในหัวมันสด จากสมการ

$$\text{ปริมาณเป็ง} = 210.8 \times (\text{ค่าความถ่วงจำเพาะ}) - 213.4$$

หาปริมาณมันเส้นแห้ง จากสมการ

$$\text{ปริมาณมันเส้นแห้ง} = 18.4 + 0.72 \times (\text{ปริมาณเป็ง})$$

การหาปริมาณเป็งแบบละเอียด นำหัวมันสำปะหลังที่ได้ชั่งน้ำหนัก 10.0 กรัม ปั่นให้ละเอียดแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (rpm.) นำตะกอนมาล้างด้วยน้ำ ethanol และ acetone ตามลำดับ ตากไว้ ณ. อุณหภูมิห้อง จนแห้งแล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 125 ไมโครเมตร นำตะกอนที่ได้ไปละลายใน 95 % (v/v) DMSO ในความเข้มข้น 4 % (w/v) เป็นเวลา 3 วัน แล้วเติม ethanol 3 เท่าจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm. นำตะกอนมาล้างด้วย ethanol และ acetone ตามลำดับ ตากไว้ ณ. อุณหภูมิห้อง จนแห้งแล้วจะได้เป็งที่มีอะมัยโลส และ อะมัยโลเพคติน นำมาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 4 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที โดยเป่าก๊าซไนโตรเจนลงไปขณะละลาย แล้วตกตะกอนด้วย 4 % (w/v) Thymol จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 rpm. 15 นาที โดยนำส่วนใสเติม ethanol ปริมาตร 3 เท่า ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 rpm. 15 นาทีแล้วล้างตะกอนด้วย ethanol และ acetone ตามลำดับ นำตะกอนที่ได้มาตากที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนแห้งจะได้อะมัยโลส และส่วนตะกอนที่ได้นำมาละลายน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที และเป่าก๊าซไนโตรเจนลงไปขณะละลาย แล้วตกตะกอนด้วย 15 % (v/v) Butanol ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 rpm. 15 นาที แล้วทำการละลายน้ำอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 rpm. 15 นาทีแล้วฉีดล้างตะกอนด้วย ethanol และ acetone ตามลำดับ แล้วจึงตกตะกอนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนแห้งจะได้อะมัยโลเพคติน (Frazier, 1977)

การแยกอะมัยโลเพคตินออกจากอะมัยโลส นำเป็งที่สกัดได้ 2.0 กรัมละลายในน้ำ 20 มิลลิลิตร เติม 0.157 N. NaOH 400 มิลลิลิตร กวนเบาๆ จนกระทั่งสารละลายใสตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติม 5 % (w/v) NaCl 80 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH 7.0 โดยใช้ 1 N. HCl ตั้งทิ้งไว้ 12-16 ชั่วโมง แยกชั้นระหว่างส่วนเจล และส่วนใส ดูดส่วนใสออกนำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 rpm. 15 นาที แล้วเติม 1 % (w/v)

NaCl 40 มิลลิลิตร กวนแรงๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ทำการเติม 1 % (w/v) NaCl อีกครั้ง แล้วเติม ethanol 3 เท่าเพื่อตกตะกอนอะมัยโลเพคติน (กล้าณรงค์, 2543)

การแยกอะมัยโลส และอะมัยโลเพคติน โดยการนำ 10 % (w/v) สารละลายแป้ง 5 มิลลิลิตร เติม 0.16 M. NaOH 55 มิลลิลิตร กวนจนใส แล้วเติมสารละลาย 5 % (w/v) NaCl ใน 0.6 M. HCl 15 มิลลิลิตร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน ตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm. 15 นาที ล้างตะกอน ด้วย 1 % (w/v) NaCl ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm. 15 นาที จะได้ตะกอนของ อะมัยโลเพคติน นำส่วนใสที่เหลือมาเติม 1-butanol ตั้งทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยง 5,000 rpm. 15 นาที จะได้ตะกอนของอะมัยโลส (กล้าณรงค์, 2543)

อัตราส่วนอะมัยโลส และอะมัยโลเพคติน รวมทั้งการแข็งตัว และการเกิดวุ้น ความสามารถในการละลาย และความเสถียรในการแข็งตัว การวัดอะมัยโลสโดยสัคย์ไฟฟ้า กระแสไฟฟ้า และสีที่เกิดขึ้นจากการจับกับไอโอดีน อะมัยโลสจับกับไอโอดีนเกิดสารประกอบเชิงซ้อน วัดความยาวคลื่นแสงที่ 620 nm. อะมัยโลเพคตินจับกับไอโอดีนเกิดสารประกอบเชิงซ้อน วัดความยาวคลื่นแสงที่ 560 nm.

การศึกษาโครงสร้างอะมัยโลเพคติน โดยวัดอัตราส่วนของสาย A, B และ C อาศัยการคิดผลจากด้วย fluorescent 2 amino pyridine เพื่อดูความยาวของ glucose ภายในสาย พบว่า อัตราส่วน $(A+B_1)/(B_2+B_3)$ ในแป้งแบบ A เท่ากับ 8.9-12.9 และแป้งแบบ B เท่ากับ 2.1-6.5 แสดงว่า แบบ A จะมีแขนงมากกว่า แบบ B 1.5 – 2 เท่า (Isao, 2002)

4.1 การวิเคราะห์อะมัยโลส

4.1.1 การวัดปริมาณด้วยสารประกอบเชิงซ้อน

การวัดปริมาณ โดยการทำปฏิกิริยากับไอโอดีน (Lausanne, 1996; Elisabeth, 1991) พบว่า อะมัยโลสจับกับไอโอดีนให้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน แล้ววัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร (Knutson, 1986) อะตอมของไอโอดีน จะถูกล้อมรอบด้วยอะมัยโลสที่บิดเป็นเกลียว DP เท่ากับ 8 จะไม่มีสี DP เท่ากับ 9-12 จะมีสีเหลืองน้ำตาล จนถึงสีน้ำตาล DP เท่ากับ 21-24 จะมีสีน้ำตาล DP เท่ากับ 25-29 จะมีสีแดง DP เท่ากับ 30-38 จะมี สีม่วงแดง DP เท่ากับ 39-46 จะมีสีน้ำเงินม่วง และ DP >47 จะมีสีน้ำเงิน

การวัดปริมาณโดยการทำปฏิกิริยากับ lectin concanavatin A (Con A) (Gibson, 1997) อาศัยความแตกต่างในการตกตะกอนระหว่างอะมัยโลส กับอะมัยโลเพคติน โดย Con A จับกับแขนงของ polysaccharide ซึ่งเข้าจับที่ alpha-D-glucopyranosyl unit หรือ alpha-D-mannopyranosyl unit ทำให้อะมัยโลเพคตินตกตะกอน ส่วนอะมัยโลสอยู่ในสารละลายโดยทำปฏิกิริยากับ GOPOD แล้ววัดความยาวคลื่นแสง 510 นาโนเมตร

4.1.2 การวัดปริมาณด้วย Differential Scanning Calorimetry (DSC) โดยวัดพลังงานความร้อน แล้วนำมาหาปริมาณ (Sievert, 1993)

เทียบค่าเอนทัลปีของอะมัยโลสกับไขมัน โดยนำแบ่งที่ต้องการวัดมาให้ความร้อนตั้งแต่ 20 องศาเซลเซียส จนถึง 180 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที แล้วค่อยๆลดอุณหภูมิลงจนถึง 4 องศาเซลเซียส โดยอัตราการลด 10 องศาเซลเซียสต่อนาที เพื่อหาค่าเอนทัลปีเทียบกับอัตราส่วนอะมัยโลสต่ออะมัยโลเพคติน 95/5 , 75/25 , 65/35 , 50/50 , 40/60 , 25/75 และ 0/100 (w/w) โดยลำดับ

4.2 การวิเคราะห์อะมัยโลเพคติน

4.2.1 การวัดปริมาณด้วยสารประกอบเชิงซ้อน

ทำปฏิกิริยากับ ไอโอดีนให้สารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงแดง แล้ววัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 560 นาโนเมตร (Elisabeth, 1991)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ ระยะเวลา 5 (R5), ระยะเวลา 90 (R90), เกษตรศาสตร์ 50 (KU50), หัวขบง 60 (HB60), CMR 35-64-1, CMR 35-22-196, CMR 35-21-199 และ CMR 36-55-166 ปลูกในสถานีวิจัยพืชไร่ปราจีนบุรี ทำการปลูกแบบ split plot 3 ซ้ำ ใช้ระยะการปลูกระหว่างแถว 80 เซนติเมตร และระยะปลูกระหว่างต้น 80 เซนติเมตร ปลูกพันธุ์ละ 5 แถว แถวละ 10 ต้น (5X10 ต้น) โดยทำการเก็บเกี่ยวแต่ละพันธุ์ และช่วงอายุ 8, 10 และ 12 เดือน เริ่มปลูกในช่วงปลายฝน คือ วันที่ 20 พฤศจิกายน พ.ศ. 2547 เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูล ในปี พ.ศ. 2526 พบว่า การปลูกในเดือนพฤศจิกายน เป็นเดือนที่มีการปลูกมากที่สุด (เจริญศักดิ์, 2532)

ลักษณะของดินของจังหวัดปราจีนบุรี เป็นดินประเภท Gray Podzodic Soils มีลักษณะเป็นดินร่วน และดินร่วนปนทราย ระบายน้ำดี ความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ มีธาตุอาหารพืชในดินน้อย ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 1,465 มิลลิเมตร (เจริญศักดิ์, 2532) โดยระดับน้ำฝนในเดือนพฤศจิกายนเท่ากับ 0.2 มิลลิเมตร และเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 8 เดือนในกรกฎาคมมีน้ำฝนเท่ากับ 150.4 มิลลิเมตร เมื่อปลูก 10 เดือนในกันยายนมีน้ำฝนเท่ากับ 211.5 มิลลิเมตร เมื่อปลูก 12 เดือนในพฤศจิกายนมีน้ำฝนเท่ากับ 22.5 มิลลิเมตร ดังตารางผนวกที่ 1



ภาพที่ 3 ลักษณะดิน และแปลงปลูก

2. ไพรมเมอร์ (primer)

ใช้ไพรมเมอร์ที่ออกแบบจากยีน AGPase, GBSS I, GBSS II, SBE I และ SBE II ที่เคยมีรายงานในมันสำปะหลัง ดังตารางที่ 1 โดยใช้โปรแกรม primer3 ออกแบบให้มีผลิตภัณฑ์ในช่วง 500-1,000 bp. และมีอุณหภูมิ annealing 55 องศาเซลเซียส โดย primer มีความยาว 20 bp.

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนสังเคราะห์แป้ง ที่มา และอุณหภูมิ annealing ขนาดความยาวของ PCR product

ลำดับ	ยีน	ลำดับเบสของไพรมเมอร์	ที่มา	T _A (°C)	ความยาว product(bp)
1	AGPase	F 5' CCGCATGGATTATGAAAGGT 3' R 5' GCTTGCACTCTCTCATCCCAAT 3'	ADP-glucose pyrophosphorylase (Small subunit) Muyikawa, 2001	55	372
2	GBSS I	F 5' GCAAAACTGGTGGACTTGGT 3' R 5' TGATTTTCCTTCCCTTCACG 3'	Granule bound starch synthase I Accession number X 74160	55	833
3	GBSS II	F 5' GAGTCTGCTATGGGGATGGA 3' R 5' GTTGACCGGTGTCCCTTAGT 3'	Granule bound starch synthase II precursor Accession number AF 173900	55	888
4	SBE I	F 5' TCGCTTCCTTCTGTCCAAC 3' R 5' TAACTCCACCCATTGCCTTC 3'	Starch branching enzyme I Salehuzzaman, 1992	55	675
5	SBE II	F 5' GCCCTTGTTGGTGACAAAAT 3' R 5' CGCAGATGCACATAGGAAGA 3'	Starch branching enzyme II Accession number X 77012	55	698

3. สารเคมี

สารเคมีทั่วไป

- Agarose (Gibco BRL)
- Ampicilin (T.P. Drug laboratories (1969) CO., LTD)
- Bactoagar (Merck)
- Boric acid (Farmitaloo carlo erba, Scharlau)
- Bromophenol blue (Baker)
- Chloroform (Merck , BDH)
- Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma)
- Edthidium bromide (Bio-RAD)
- 8-Hydroxyquinolona (Merck)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Merck, Scharlau)
- Ethanol (Merck , Hayman)
- Glacial acetic acid (Merck)
- Glucose(D+) anhydrous (Fluka)
- Glycerol (Baker)
- IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) (Bio101)
- Isoamyl alcohol (Merck)
- Isopropanol (J.T. Baker , BDH)
- Lithium chloride (unilab)
- Magnesium chloride (Farmitaloo carlo erba)
- Maleic acid (Fluka)
- 2-Mercaptoethanol (SIGMA)
- MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) (Sigma)
- Nylon membrane positively charged (Amersham Pharmacia, Roche)
- Phenol (Merck)
- Potassium acetate (Farmitaloo carlo erba, Rideld-deHaen, Merck)
- Potassium chloride (Merck; Farmitaloo carlo erba)
- Resin (AG 501-X8) (BIO-RAD)

- Sodium acetate (Farmitaloo carlo erba)
- Sodium chloride (J.T. Baker, Merck)
- tri-Sodium citrate (Farmitaloo carlo erba)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck)
- Sodium hydroxide (Farmitaloo carlo erba, BDH)
- Tris Base (Amersham)
- Tryptone peptone (Difco)
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-GAL) (Bio101)
- Xylenecyanol FF (Fluka)
- Yeast extract power (Himedia)

เอนไซม์ และอื่นๆ

- 100 bp.+ 1.5 Kb. DNA Marker (Bio-labs)
- Competent cell (*Escherichia coli* JM109) (Promega)
- Geneclon kit II (Bio101)
- Deoxy nucleotide triphosphate (dNTPs) (Promega)
- DNase (Promega)
- DIG high prime DNA labeling and Detection Starter kit I (Roche)
- Lambda DNA/*Hind*III (Bio-labs)
- Lysozyme (Amresco, Fluka)
- pGEM-T[®]easy vector (Promega)
- PureLink[™] Plant RNA Reagent (Invitrogen)
- Reverse transcriptase (SuperScript[™] One-Step RT-PCR System with Platinum[®])

Taq DNA Polymerase)

- RNase A (Promega)
- *Taq* DNA polymerase (Promega, Finzyme)

4. เครื่องมือ

- Automatic pipette (Gilson)
- Balance 40SM200A (Precica)
- Balance BL 610 (Sartorius)
- Centrifuge bend top (Scientific promotion CO,LTD)
- Gel box Mini-Transilluminator (Bio-RAD)
- Gel documentation system Gel-doc 1000 (Bio-Rad)
- GeneAmp PCR system No. 2400 (Perkin Elmer)
- High speed centrifuge GS-15R (Beckman)
- High speed centrifuge J2-MC (Beckman)
- Horizontal electrophoresis GNA-200 (Pharmacia Biotech)
- Ice maker (Newton)
- Incubator shaker (Infors)
- Laminar air (Holten)
- Liquid nitrogen tank (Tayler-Wharton)
- pH meter and electrode (Beckman)
- Power supply PowerPac 300 (Bio-RAD)
- Vacuum Blotter Model 785 (BIO-RAD)
- SDS-PAGE electrophoresis (BIO-RAD)
- UV-visible spectrophotometer Ultrospec 30000 (Pharmacia Biotech)
- Stratalinker® UV crosslinker (Stratagene Ltd.)
- Waterbath (Mettler)
- Waterbath (Neslab endocal)

5. โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับประมวลผล

- โปรแกรม DNAsis รุ่น HIBIO DNASIS™ for Windows® version 2 (Hitachi Software Engineering Co. Ltd.)
- โปรแกรม primer3 ออกแบบ primer จาก web <http://frodo.wi.mit.edu/>
- โปรแกรม NCBI ในการหาฐานข้อมูล จาก web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- โปรแกรม STATGRAPHICS Plus ในการคำนวณค่าสถิติ

วิธีการ

1. การศึกษาการเจริญ ความสูง น้ำหนักต้น และใบ น้ำหนักหัวสด ปริมาณแป้ง ปริมาณมันเส้นแห้ง และปริมาณอะมัยโลส

1.1 ศึกษาการเจริญเติบโตความสูง น้ำหนักต้นสด น้ำหนักหัวสดของมันสำปะหลังช่วงอายุต่างๆ

ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ ระยะเวลาของ 5 (R 5), ระยะเวลาของ 90 (R 90), เกษตรศาสตร์ 50 (KU 50), หัวขบง 60 (HB 60), CMR 35-64-1, CMR 35-22-196, CMR 35-21-199 และ CMR 36-555-166 ปลูกในสถานีวิจัยพืชไร่ปราจีนบุรีทำการปลูกแบบ split plot 3 ซ้ำ (3 แปลง) แต่ละแปลงจะเว้นระยะห่างระหว่างแปลง ปลูกในวันที่ 20 พฤศจิกายน 2547 การศึกษาจะเก็บเกี่ยว 3 ครั้ง คือ เมื่ออายุ 8 เดือน (ก.ค.) 10 เดือน (ก.ย.) และ 12 เดือน (พ.ย.) ใช้ระยะการปลูกระหว่างแถว 80 เซนติเมตร และระยะปลูกระหว่างต้น 80 เซนติเมตร ปลูกพันธุ์ละ 5 แถว แถวละ 10 ต้น (5X10 ต้น) การทดลองจะเก็บข้อมูลจากแปลงย่อยของแปลงไม่นับผลผลิตจากด้านข้างของแปลงในแต่ละด้านโดยตัดด้านละ 1 แถว (3X8 ต้น) ข้อมูลที่ใช้จะต้องมีจำนวนต้นที่รอดตายมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจึงจะนำมาคิดหาค่าเฉลี่ย โดยการวัดความสูงจะวัดโดยสุ่มจำนวน 10 ต้นในแปลงย่อย โดยวัดจากระดับโคนที่เสมอดินจนถึงยอดสูงสุด น้ำหนักหัวสดทั้งหมดในแปลงย่อย โดยชั่งหัวที่ตัดออกจากโคนต้นแบบไม่ได้สับเป็นท่อน และนับจำนวนหัว เพื่อมาหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักต่อหัว น้ำหนักต้น และใบสดทั้งหมดในแปลงย่อย โดยชั่งจากส่วนจากโคนต้นขึ้นไป ทั้งต้น กิ่ง และใบ

1.2 วัดปริมาณแป้งในหัวสดด้วย Reimann Scale Balance

นำหัวมันสำปะหลังใน 3 ช่วงอายุเก็บเกี่ยว คือ 8, 10 และ 12 เดือน โดยวัดแยกในแต่ละแปลงย่อย (3 ซ้ำ) มาสับเป็นท่อนๆ แล้วชั่งด้วยเครื่อง Reimann scale balance ซึ่งมี คันชั่งที่ประกอบด้วยตะกร้าลวด 2 อัน อันแรกอยู่เหนือภาชนะบรรจุ น้ำ หัวมันสำปะหลังมาสับเป็นท่อนๆ แล้วชั่งน้ำหนักให้ได้ 5.0 กิโลกรัม แต่ถ้าไม่ถึงให้ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้วจดน้ำหนัก เรียกน้ำหนักที่ได้นี้ว่า น้ำหนักในอากาศ ส่วนตะกร้าอันที่ 2 จะอยู่ในน้ำ หลังจากชั่งในตะกร้าอันที่ 1 เสร็จแล้วให้ปรับเข็มไปที่ 0 เหน้ให้เต็มภาชนะบรรจุ แล้วเทหัวมันสำปะหลังลงในตะกร้าอันที่ 2 แล้วจุ่มลงในน้ำปรับให้สมดุล แล้วบันทึกค่าที่ได้ เรียกน้ำหนักนี้ว่า น้ำหนักในน้ำ ถ้าน้ำหนักในอากาศถึง 5.0

กิโลกรัม จึงสามารถอ่านปริมาณแ่ง แต่ถ้าไม่ถึง 5.0 กิโลกรัมให้นำมาคำนวณหาความถ่วงจำเพาะ โดย

$$\text{ความถ่วงจำเพาะ} = \frac{\text{น้ำหนักในอากาศ}}{\text{น้ำหนักในอากาศ} - \text{น้ำหนักในน้ำ}}$$

หาปริมาณแ่งในหัวมันสด จากสมการ

$$\text{ปริมาณแ่ง} = 210.8 \times (\text{ค่าความถ่วงจำเพาะ}) - 213.4$$

คำนวณปริมาณมันเส้นแห้งที่มีความชื้น 13 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณแ่งในหัวสดโดยมาจากสมการ

$$\text{ปริมาณมันเส้นแห้ง} = 18.4 + 0.72 \times (\text{ปริมาณแ่ง})$$

1.3 วัดปริมาณอะมัยโลสในหัวสด โดยวิธี Knutson, 1986

นำหัวมันสำปะหลังสดปอกเปลือกล้างให้สะอาด หั่นเป็นลูกเต๋าซึ่งน้ำหนักประมาณ 500 กรัม นำมาตีป่นด้วยเครื่องบดไฟฟ้า ในอัตราส่วนเนื้อมันต่อน้ำ 1 กรัม : 1 มิลลิลิตร กรองผ่านผ้าขาวบาง แล้วนำน้ำแ่งที่คั้นได้มากรองผ่านตะแกรงขนาด 170 mesh ตั้งให้ตกตะกอนประมาณ 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นด้วยปริมาตร 2 เท่า กรองผ่านตะแกรงขนาด 170 mesh ตั้งให้ตกตะกอนประมาณ 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างซ้ำ 2 รอบ นำแ่งที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อบแห้งบดให้เป็นผงตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแ่งในตัวอย่างไม่เกินร้อยละ 0.2 (ทำ 2 ซ้ำ) (AOAC, 1990) วัดความชื้นของแ่งโดยนำแ่งซึ่ง 5.0 กรัม แล้วบันทึกค่าจริงที่ซึ่งได้ไว้ นำมาอบ 105 °C ตั้งให้เย็นใน dissicator จนน้ำหนักแ่งคงที่ แล้วบันทึกค่าที่ซึ่งได้ (ทำ 2 ซ้ำ) เพื่อนำไปคำนวณหาความชื้น แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณอะมัยโลส (Knutson, 1986)

การทำกราฟมาตรฐานของอะมัยโลส ที่ผ่านการอบ 105 °C 2 ชั่วโมง และผ่านการทำให้เย็นใน dissicator ซึ่งอะมัยโลส 0.05 % (w/v) ละลายใน 1.5 mM I₂ / 90 % dimethyl sulfoxide (DMSO) จำนวน 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง (vial) ตั้งไว้ในที่มืดข้ามคืน แล้วทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นอะมัยโลส 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานของอะมัยโลสความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 2 โดยการเขียนกราฟมาตรฐานจะได้เส้นตรงควรมีค่า R² มากกว่า 0.9900 ถึงจะเชื่อถือได้

ตารางที่ 2 วิธีเตรียมอะมัยโลสมาตรฐาน จาก standard potato (sigma)

ความเข้มข้น	อะมัยโลสมาตรฐาน 0.05 % (w/v) ละลายใน 1.5 mM I ₂ / 90 % DMSO (ml.)	1.5 mM I ₂ / 90 % DMSO (ml.)
0 µg./ml.	0.0	1.0
100 µg./ml.	0.2	0.8
200 µg./ml.	0.4	0.6
300 µg./ml.	0.6	0.4
400 µg./ml.	0.8	0.2
500 µg./ml.	1.0	0.0

ปิเปตสารให้ครบ 1 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 2 เติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ให้สารทำปฏิกิริยา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

ชั่งตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังที่ต้องการตรวจสอบประมาณ 0.02 กรัม แล้วบันทึกค่าจริงที่ชั่งได้ นำแป้งมาละลายใน 1.5 mM I₂/ 90 % DMSO จำนวน 4 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง ทิ้งไว้ข้ามคืน ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (ทำ 3 ซ้ำ) คำนวณหาร้อยละของปริมาณอะมัยโลส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของอะมัยโลส การคำนวณหาปริมาณอะมัยโลสหลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ตัวอย่างละ 3 ครั้งแล้ว นำมาหาค่าเฉลี่ย เพื่อไปคำนวณหาจุดตัดในกราฟ

$$\text{หาค่าความชัน } Y = aX + b$$

DB (dry basis)

$$DB = [(100 - \% \text{ความชื้นของแป้ง}) \times \text{น้ำหนักแป้งที่ชั่งได้จริง}] / 100$$

ความเข้มข้นอะมัยโลสที่วัดได้ (conc.)

$$\text{conc.} = [\text{ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย} - \text{ค่าสัมประสิทธิ์คองที่ (b)}] / \text{ค่าความชัน (a)}$$

ปริมาณอะมัยโลส (amylose content)

$$\text{amylose content} = [\text{conc.} \times \text{dilute value} \times \text{volume DMSO} \times 100\% \times 10^{-6}] / \text{DB}$$

2. ศึกษาการแสดงออกของยีน AGPase, GBSSI, GBSSII, SBEI และ SBEII ในมันสำปะหลังพันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50 ที่อายุการปลูกต่างๆ กัน

2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

เก็บเกี่ยวตัวอย่างใบ และหัวมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50 (KU 50), หัวบง 60 (HB 60), ระยอง 5 (R 5), ระยอง 90 (R 90), CMR35-64-1, CMR36-55-166, CMR35-22-196 และ CMR35-21-199 ปลูกในพื้นที่จังหวัดปราจีนบุรี ในเดือนพฤศจิกายน 2547 - พฤศจิกายน 2548 เมื่อปลูกได้อายุ 4, 6, 8, 10, 12 เดือน เก็บตัวอย่างเวลา 12.00 น. นำหัวมันสำปะหลังที่เก็บมาทำความสะอาดล้างดินออก และเก็บตัวอย่างใบ และหัวในตู้เย็น -80°C ก่อนนำมาสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

2.2 เปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ 5 วิธี ได้แก่

2.2.1 วิธี Phenol/LiCl methods (Raha and *et al*, 1990)

นำใบ และหัวมันสำปะหลังพันธุ์ KU 50 ซึ่งน้ำหนัก ตัวอย่างละ 1.5 กรัม บดด้วย liquid nitrogen ในโกร่งให้เป็นผงละเอียดตัดตัวอย่างใส่หลอดที่มี STEL buffer 5.0 มิลลิลิตร (0.2 % (w/v) SDS, 10 mM. Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM. EDTA และ 100 mM. LiCl) เติมน้ำ phenol 5 มิลลิลิตร พลิกหลอดกลับไปมา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g. (8,700 rpm.) (Rotor JA-17, Beckman J2-MC) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดเอาส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วสกัดด้วย phenol:chloroform ปริมาตรเท่าที่ดูมาได้ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g. ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ และเติม 2.5 เท่า Ethanol เพื่อ

ตกตะกอนนิวคลีอิกแอซิด นำมาแช่ที่ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บตะกอน และล้างตะกอนด้วย 70 % (v/v) ethanol 1 มิลลิลิตร คูคตะกอนใส่ eppendorf 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,770 g. (8,700 rpm.) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทส่วนใสออก ตากตะกอนให้แห้ง ละลายด้วยน้ำที่ treated ด้วย DEPC ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กำจัดดีเอ็นเอ โดยเติม 0.5 U. DNase (1 U./ μ l.) บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เติม stop buffer 1 ไมโครลิตร บ่ม 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเติม 5 U. RNasin (40 U./ μ l.) ตรวจสอบคุณภาพ และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer และวิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel electrophoresis

2.2.2 วิธี LiCl methods (Felicia, 2001)

นำใบ และหัวมันสำปะหลังพันธุ์ KU 50 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 1.5 กรัม บดด้วย liquid nitrogen ในโกร่งให้เป็นผงละเอียดคักตัวอย่างใส่หลอดที่มี homogenization buffer 5.0 มิลลิลิตร (100 mM Tris-HCl, pH 9.0 และ 0.5 % (w/v) SDS) บ่มในน้ำแข็ง 2 นาที แล้วเติม phenol 5 มิลลิลิตร พลิกหลอดกลับไปมา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,500 g. (861 rpm.) (Rotor JA-17, Beckman J2-MC) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที คูคเอาส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วสกัดด้วย phenol ปริมาตรเท่าที่ดูมาได้ ปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 g. ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที คูคส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วสกัดด้วย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v) ปริมาตรเท่าที่ดูมาได้ปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 g. ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที คูคส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ และเติม 8 M. LiCl ให้มีความเข้มข้นของ LiCl สุดท้ายเป็น 2 M. เพื่อตกตะกอนนิวคลีอิกแอซิด นำมาแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g. (8,700 rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บตะกอน และละลายตะกอนด้วย 2 M. LiCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วย้ายใส่ eppendorf 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 17,530 g. (14,500 rpm.) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทส่วนใสออก ละลายด้วยน้ำที่ treated ด้วย DEPC ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กำจัดดีเอ็นเอ โดยเติม 0.5 U. DNase (1 U./ μ l.) บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เติม stop buffer 1 ไมโครลิตร บ่ม 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเติม 5 U. RNasin (40 U./ μ l.) ตรวจสอบคุณภาพ และความเข้มข้นของ อาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer และวิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel electrophoresis

2.2.3 วิธี LiCl methods (Salehuzzaman and *et al*, 1992)

นำใบ และห้วมันสำปะหลังพันธุ์ KU 50 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 1.5 กรัม บดด้วย liquid nitrogen ในโกร่งให้เป็นผงละเอียดตัดตัวอย่างใส่หลอดที่มี extraction buffer 5.0 มิลลิลิตร (0.2 % (w/v) Sakrosyl, 100 mM.Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM. EDTA และ 100 mM. NaCl) เติม phenol : chloroform (1:1) 5 มิลลิลิตร พลิกหลอดกลับไปมาบ่มในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 10,000 g. (8,700 rpm.) (Rotor JA-17, Beckman J2-MC) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดเอาส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วสกัดด้วย phenol:chloroform ปริมาตรเท่าที่ดูดมาได้ ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g. ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ และเติม isopropanol เพื่อตกตะกอนนิวคลีอิกแอซิด นำมาแช่ที่ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บตะกอน และล้างตะกอนด้วย 70 % (v/v) ethanol 1 มิลลิลิตร ดูดตะกอนใส่ eppendorf 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,770 g. (8,700 rpm.) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทส่วนใสออกตากตะกอนให้แห้ง ละลายด้วยน้ำที่ treated ด้วย DEPC ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม 8 M. LiCl ให้มีความเข้มข้นของ LiCl สุดท้ายเป็น 2 M. เพื่อตกตะกอน นิวคลีอิกแอซิด นำมาแช่ที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g. (8,700 rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บตะกอน และละลายตะกอนด้วย 2 M. LiCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และย้ายใส่ eppendorf 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,770 g. (8,700 rpm.) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทส่วนใสออก ละลายด้วยน้ำที่ treated ด้วย DEPC ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กำจัดดีเอ็นเอโดยเติม 0.5 U. DNase (1 U./ μ l.) บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เติม stop buffer 1 ไมโครลิตร บ่ม 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเติม 5 U. RNasin (40 U./ μ l.) ตรวจสอบคุณภาพ และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer และวิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel electrophoresis

2.2.4 วิธี LiCl methods จากการดัดแปลงวิธี Dellaporta, 1983 (Kanyaporn, 2005)

นำใบ และห้วมันสำปะหลังพันธุ์ KU 50 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 1.5 กรัม บดด้วย liquid nitrogen ในโกร่งให้เป็นผงละเอียดตัดตัวอย่างใส่หลอดที่มี homogeneization buffer 10.0 มิลลิลิตร(100 mM.Tris-HCl, pH 8.0 , 50 mM. EDTA , 500 mM. NaCl และ 10 mM. 2- mercaptoethanol) เติม 20 % (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พลิกหลอดกลับไปมา 5 นาที บ่ม 65 องศาเซลเซียส ทำการพลิกกลับหลอดทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาตั้งไว้อุณหภูมิห้อง 2 นาที เติม 5 M. Potassium acetate บ่มในน้ำแข็ง ทำการพลิกกลับหลอด

ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 20,000 g. (12,300 rpm.) (Rotor JA-17, Beckman J2-MC) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที คัดส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ และเติม 8 M. LiCl ให้มีความเข้มข้นของ LiCl สุดท้ายเป็น 2 M. เพื่อตกตะกอนนิวคลีอิกแอซิด นำมาแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g. (8,700 rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บตะกอน และตกตะกอนอีกรอบด้วย 2 M. LiCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตกตะกอนใส่ eppendorf 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,770 g. (8,700 rpm.) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทส่วนใสออก ละลายด้วยน้ำที่ treated ด้วย DEPC ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กำจัดดีเอ็นเอโดยเติม 0.5 U. DNase (1 U./ μ l.) บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เติม stop buffer 1 ไมโครลิตร บ่ม 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเติม 5 U. RNasin (40 U./ μ l.) ตรวจสอบคุณภาพ และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer และวิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel electrophoresis

2.2.5 วิธี PureLink™ Plant RNA Reagent

นำใบ และหวัมน้ำส้มหลังพันธุ์ KU 50 ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างละ 0.15 กรัม บดด้วย liquid nitrogen ในโถรงให้เป็นผงละเอียดคั่วอย่างใส่หลอดที่มี PureLink™ Plant RNA Reagent 0.5 มิลลิลิตร บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 20,000 g. (12,300 rpm.) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที คัดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 5 M. NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 10 นาที บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 20,000 g. (12,300 rpm.) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที คัดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 500 ไมโครลิตร บ่มอุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,770 g. (8,700 rpm.) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % (v/v) ethanol 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,770 g. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วเทส่วนใสออก ตกตะกอนให้แห้ง ละลายด้วยน้ำที่ treated ด้วย DEPC ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กำจัดดีเอ็นเอโดยเติม 0.5 U. DNase (1 U./ μ l.) บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เติม stop buffer 1 ไมโครลิตร บ่ม 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเติม 5 U. RNasin (40 U./ μ l.) ตรวจสอบคุณภาพ และความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer และวิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel electrophoresis

2.3 การเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

2.3.1 เตรียมตัวอย่าง total RNA

สกัดอาร์เอ็นเอจากพืชที่ใช้ศึกษาโดยวิธี PureLink™ Plant RNA Reagent ตามวิธีที่อธิบายในข้อ 2.2.5 โดยเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 (KU 50) ที่เก็บเกี่ยวเมื่อปลูกได้ 10 เดือน ตัวอย่างละ 0.15 กรัม

2.3.2 เพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR (SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.2.5 มาทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย Primer ที่จำเพาะต่อยีนทั้ง 5 ยีน คือ AGPase, GBSSI, GBSSII, SBEI และ SBEII ดังตารางที่ 1 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR ในปริมาตร 50 μ l. ซึ่งประกอบด้วย 2x Reaction Mix, primer forward และ primer reverse อย่างละ (10 pmole) และ 4 U. Platinum® Taq DNA Polymerase (2 U./ μ l.) ใช้สารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 1 μ g. เติมน้ำที่ treated ด้วย DEPC ให้ได้ปริมาตร 50 μ l. โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400) ตั้งโปรแกรมให้ initial denature ที่ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที และ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 1 รอบ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที extension ที่ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ แล้วต่อด้วย extension ที่ 68 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ วิเคราะห์ผลผลิตกัมมันต์ของ RT-PCR บน 1.0 % (w/v) agarose gel

2.4 การโคลนผลิตภัณฑ์ RT-PCR

ตัดชิ้นเจลของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้จากข้อ 2.3.2 เลือกแถบที่มีขนาดตรงตามที่ต้องการ ออกแบบไว้ มาทำ gene clean ด้วย gene clean kitII (Bio201) โคลนยีนจาก RT-PCR product ของยีน AGPase, GBSSI, GBSSII, SBEI และ SBEII ด้วย pGEM-T® easy vector (Promega) transform เข้าสู่ competent cell E. coli JM109 (Promega) 50 μ l. ด้วยวิธี heat shock นำมาบ่มในน้ำแข็ง 30 นาที แล้วบ่ม 42 เซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นบ่มในน้ำแข็ง 2 นาที ก่อนเติมอาหาร LB (10 g./L.

Bactotryptone, 15 g./L. Yeast extract powder และ 15 g./L. NaCl) 1 มิลลิลิตร นำมาเขย่าใน incubator shaker 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงสุด คุณส่วนใหญ่แล้วเติมอาหาร LB 100 μ l. แล้วมา spread ใน LA plate (10 g./L. Bactotryptone, 15 g./L. Yeast extract powder, 15 g./L. NaCl และ 10 g./L. Bactoagar) ที่มี 0.4 mg./ml. Ampicilin, 1.2×10^{-5} M. IPTG และ 0.01 % (w/v) X-GAL ทำการบ่ม plate ใน incubator 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง แล้วคัดเลือก colony ที่มีลักษณะสีขาวเลี้ยงในอาหาร LB ที่มี 0.2 mg./ml. Ampicilin ทำการบ่มใน incubator shaker 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง

2.4.1 สกัด recombinant plasmid ให้บริสุทธิ์

ปีเปิด cell 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยง 3,000 rpm. (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) 5 นาที เทส่วนใหญ่ทิ้งละลาย cell ด้วย lysozyme buffer; solution I [8 % (w/v) glucose, 100 mM.Tris, pH 8.0, 10 mM. EDTA และ 50 μ g./ml. lysozyme] 100 μ l. จากนั้นละลายเซลล์ แล้วเติม solution II [0.1 % (w/v) SDS, 0.2 NaOH] 200 μ l. บ่ม 37 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วเติม solution III [3.75 M. Potassium acetate, 2 M. Potassium acetate] 200 μ l. กลับหลอดแช่น้ำแข็ง ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm. 4 องศาเซลเซียส 15 นาที คุณส่วนใหญ่ใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol 800 μ l. ตั้งไว้ อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm. 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เทส่วนใหญ่ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70 % (v/v) Ethanol 1 ml. ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm. 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ตากตะกอนแล้วละลาย ด้วย TE buffer 50 μ l.

2.5 การหาลำดับดีเอ็นเอ โดยวิธี automated sequencing

การหาลำดับเบสของ recombinant plasmid จากการโคลนผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากข้อ 2.3.3 โดยส่งห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทค (automated sequence รุ่น ABI sequence 377 ยี่ห้อ ABI) ซึ่งการหาลำดับเบสด้วยวิธี dye terminator ที่ติดฉลาก nucleotide แล้วนำมาแยกขนาดโดย gel electrophoresis ใน 12 % (w/v) polyacrylamide gel ตรวจสอบโดยใช้ fluorescence detector อ่านผล gel นำ sequence ที่ได้เปลี่ยนมาอยู่ในรูป Fasta file เพื่อนำลำดับเบสไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่รู้ลำดับเบส เพื่อยืนยันว่า ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เป็นยีนเป้าหมายที่ต้องการ โดยการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ DNAsis เปรียบเทียบลำดับเบสจากยีนที่โคลนได้ เพื่อหาความเชื่อมั่นว่า DNA fragment เหมือนกับลำดับเบสที่เคยรายงาน

1. ยีน small subunit ของ ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase) จาก Muiyikawa (2001)
2. ยีน granule bound starch synthase II จาก accession number X74160
3. ยีน granule bound starch synthase I จาก accession number AF173900
4. ยีน starch branching enzyme I จาก Salehuzzaman (1992)
5. ยีน starch branching enzyme II จาก accession number X77012

2.6 การตรวจหา ยีน ใน genomic DNA ของมันสำปะหลัง ด้วยวิธี Southern blot

2.6.1 การติดฉลากตัวตรวจ (probe labeling) (Roche)

นำ RT-PCR ที่ได้จากข้อ 2.3.2 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดย GeneClean kit II (Bio 201) นำไปติดฉลากด้วย biotin kit (DIG-High Prime) นำ dsDNA 1 μ g. เติมน้ำจันมีปริมาตร 16 μ l. ต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วรีบแช่ในน้ำแข็งทันที เติม DIG-High Prime (หลอดเบอร์ 1) 4 μ l. บ่ม 37 องศาเซลเซียส ตลอดคืน หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 M. EDTA 2 μ l. และบ่ม 65 องศาเซลเซียส 10 นาที

2.6.2 สกัด genomic DNA ด้วยวิธี Dellaporta (1983)

นำหัวมันสำปะหลัง 8 พันธุ์มาสกัด DNA ด้วยวิธี Dellaporta (1983) ชั่งน้ำหนัก ตัวอย่างละ 2 กรัม บดด้วย liquid nitrogen ในโกร่งให้เป็นผงละเอียด ตักตัวอย่างใส่หลอดที่มี homogenization buffer 10.0 มิลลิลิตร (100 mM. Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM. EDTA, 500 mM. NaCl และ 10 mM. 2- mercaptoethanol) เติม 20 % (w/v) SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พลิกหลอดกลับไปมา 5 นาที บ่ม 65 องศาเซลเซียส ทำการพลิกกลับหลอดทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาตั้งไว้ อุณหภูมิห้อง 2 นาที เติม 5 M. Potassium acetate บ่มในน้ำแข็ง ทำการพลิกกลับหลอดทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 20,000 g. (12,300 rpm.) (Rotor JA-17, Beckman J2-MC) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ดูดส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ และเติม isopropanol ปริมาตรเท่าที่ดูมาได้ เพื่อตกตะกอนนิวคลีอิกแอซิด นำมาแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g. (8,700 rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ละลายตะกอน ด้วย 70 % (v/v) ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดตะกอนใส่ eppendorf 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วย

ความเร็ว 6,770 g. (8,700 rpm.) (Rotor F2402H, Beckman GS-15R) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเทส่วนใส่ออก ตากตะกอนให้แห้ง ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ย่อย RNA ออกด้วย RnaseA (10 mg./ml.) 1 μ l. บ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการบ่ม 65 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำ genomic DNA ของมันสำปะหลังทั้ง 8 พันธุ์ ย่อยด้วย restriction enzyme (*EcoRI*) โดยใช้ DNA 40 μ g. , 20 U. *EcoRI* (20 U./ μ l.), *EcoRI* buffer 1 μ l. และปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ครบ 20 μ l. บ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยา โดยการบ่ม 65 องศาเซลเซียส 10 นาที แยกขนาดด้วย 1 % (w/v) agarose gel run 100 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีเคลื่อนที่เป็นระยะ 2 ใน 3 ของความยาวเจล

2.6.3 การทำ capillary blotting

นำเจลจากข้อ 2.6.2 มาแช่ใน 0.25 M.HCl ปริมาตร 300 มิลลิลิตรเป็นเวลา 10 นาที จนแถบสีด้านล่างเปลี่ยนจากสีน้ำเงินกลายเป็นสีเหลือง จากนั้นตัดเจลใต้อก ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น แล้วเติม denature buffer (0.5 M. NaOH ใน 1.5 M. NaCl) ปริมาตร 300 มิลลิลิตรจากนั้น ตัดเจลใต้อก ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นแล้วเติม neutralize buffer (1 M. Tris pH 8.0 ใน 1.5 M. NaCl) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำมาทำ capillary blotting โดยใช้ 20X SSC ตามวิธี (Southern, 1975) นำ nylon membrane หลัง blotting แช่ 6X SSC 5 นาที โดย filter แช่ในขวดทำ hybridization แล้วนำแผ่น membrane ไปตรึง DNA โดยใช้เครื่อง Stratalinker® UV Crosslinker ใช้ energy 1,200 ไมโครจูล

2.6.4 การ Hybridization

2.6.4.1 การทำ prehybridization

นำ DIG Easy Hyb granule (ขวดเบอร์ 7) มาเติมน้ำกลั่น 64 มิลลิลิตร บ่ม 37 องศาเซลเซียส จนละลายหมด ใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อพื้นที่เมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร โดยเติมอย่างให้มีฟอง แล้วบ่ม 37 - 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างช้าๆ ขณะบ่ม จากนั้นเทบัฟเฟอร์ออก เพื่อทำ hybridization ต่อไป

2.6.4.2 การทำ hybridization

นำ DIG Easy Hyb granule (ขวดเบอร์ 7) ใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อพื้นที่เมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร โดยเติมน้ำให้เต็มแล้วเติม probe ที่ผ่านการ denature (ที่อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส 5 นาที แช่น้ำแข็งทันที) ให้มีความเข้มข้น probe 25 ng./ml. นำมาบ่ม 37 - 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถึงข้ามคืน เขย่าอย่างช้าๆ ขณะบ่ม จากนั้นเทบัฟเฟอร์ออกเพื่อทำ post-hybridization ต่อไป แต่หากใช้ probe เดิม ให้นำสารละลายที่มี probe ไปบ่ม 68 องศาเซลเซียส 10 นาที ก่อนนำมาใช้

2.6.4.3 การทำ post-hybridization

ล้างด้วย 2X SSC + 0.1 % (w/v) SDS นำมาบ่ม 15 - 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เขย่าอย่างช้าๆ ขณะบ่ม จากนั้นเทบัฟเฟอร์ออก แล้วล้างด้วย 0.5X SSC + 0.1 % (w/v) SDS นำมาบ่ม 65 - 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เขย่าอย่างช้าๆ ขณะบ่ม จากนั้นเทบัฟเฟอร์ออก

2.6.4.4 การตรวจสอบ

นำ filter membrane ที่ผ่านการ hybridization มาล้างด้วย Washing buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.3 % (v/v) Tween 20) นำมาบ่มอุณหภูมิห้อง 1-5 นาที จากนั้นเทบัฟเฟอร์ออก เติม Blocking solution (ขวดเบอร์ 6) ที่เจือจางอัตราส่วน 1/10 ด้วย Maleic acid buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5) บ่ม 15 - 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างช้าๆ ขณะบ่ม จากนั้นเทบัฟเฟอร์ออก เติม antibody solution (หลอดเบอร์ 4) นำมาปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm. 5 นาที ดูดส่วนบน เจือจางอัตราส่วน 1/5,000 ด้วย Maleic acid buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5) บ่ม 15 - 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างช้าๆ ขณะบ่ม จากนั้นเทบัฟเฟอร์ออก เติม Washing buffer บ่ม 15 - 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เขย่าอย่างช้าๆ ขณะบ่ม จากนั้นเทบัฟเฟอร์ออก (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) เติม Detection buffer (0.1 M. Tris-HCl, 0.1 M. NaCl, pH 9.5) บ่มอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 - 5 นาที เขย่าอย่างช้าๆ ขณะบ่ม จากนั้นเทบัฟเฟอร์ออก เติม Color substrate solution (หลอดเบอร์ 5) บ่ม 37 องศาเซลเซียส จนละลายหมด เจือจางอัตราส่วน 1/50 ด้วย Detection buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อพื้นที่เมมเบรน 100 ตารางเซนติเมตร บ่มอุณหภูมิห้องจนเกิดสี ห้ามเขย่าจากนั้นเทบัฟเฟอร์ออก เติม TE buffer (10 mM. Tris-

HCl, 1 mM. EDTA , pH 8.0) หรือน้ำกลั่น เพื่อหยุดปฏิกิริยา บ่มอุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นตากให้แห้ง แล้วเก็บผลในที่แห้ง และ scan ภาพเก็บไว้

2.7 ศึกษาการแสดงออกของยีน AGPase, GBSS I และ SBE II ด้วยวิธี RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

2.7.1 การเตรียมตัวอย่าง

สกัดอาร์เอ็นเอจากใบ และหัวของมันสำปะหลัง พันธุ์ KU 50 โดยวิธี PureLink™ Plant RNA Reagent ตามวิธีที่อธิบายในข้อ 2.2.5 ที่อายุ 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน ตัวอย่างละ 0.15 กรัม วิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel

2.7.2 เพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR (SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase)

ทำตามวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 2.3.2 โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ AGPase, GBSS I และ SBEII วิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาการเจริญ ความสูง น้ำหนักต้น และใบ น้ำหนักหัวสด ปริมาณแป้ง ปริมาณมันเส้นแห้ง และปริมาณอะมัยโลส

1.1 ศึกษาการเจริญเติบโตความสูง น้ำหนักต้นสด น้ำหนักหัวสดของมันสำปะหลังช่วงอายุต่างๆ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังจำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50, หัวยบง 60, ระยอง 5, ระยอง 90, CMR 35-64-1, CMR 35-21-199, CMR 35-22-196 และ CMR 36-55-166 โดยศึกษาความสูง น้ำหนักต้นและใบ และน้ำหนักหัวสด เมื่อปลูกอายุ 8, 10 และ 12 เดือน

ตารางที่ 3 การเจริญในด้านความสูงเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 8, 10 และ 12 เดือน

การเจริญ	พันธุ์	อายุ (เดือน)			เฉลี่ย
		8	10	12	
ความสูงเฉลี่ย (เซนติเมตร)	ระยอง 5	132	153	176	154 ^{bc}
	ระยอง 90	135	155	165	152 ^{bc}
	เกษตรศาสตร์ 50	144	209	203	186 ^a
	หัวยบง 60	166	169	183	172 ^{ab}
	CMR 35-64-1	158	189	192	180 ^a
	CMR 35-22-196	146	162	178	162 ^{abc}
	CMR 35-21-199	163	173	185	174 ^{ab}
	CMR 36-55-166	123	151	151	142 ^c
	เฉลี่ย	146 ^B	170 ^A	179 ^A	

หมายเหตุ a,b,c,..... เป็นค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($p \leq 0.05$)

A,B,C,.... เป็นค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($p \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติความสูงเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ที่ทำการเก็บเกี่ยว ณ อายุ 8, 10 และ 12 เดือน ดังตารางที่ 3 พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมของปัจจัยด้านพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว จึงทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากทุกพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว เมื่อพิจารณาพันธุ์ พบว่า พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50, CMR 35-64-1 จะมีการเจริญในด้านความสูงดีที่สุด รองลงมา คือ CMR 35-21-199, หัวยบง 60, CMR 35-22-196, ระยอง 5, ระยอง 90 และ CMR 36-55-166 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอายุการเก็บเกี่ยวในทุกพันธุ์ พบว่า การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน และ 10 เดือน จะมีการเจริญในด้านความสูงดีกว่า การปลูก 8 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4 การเจริญในด้านน้ำหนักต้น และใบเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 8, 10 และ 12 เดือน

การเจริญ	พันธุ์	อายุ (เดือน)			เฉลี่ย
		8	10	12	
น้ำหนักต้น และใบเฉลี่ย (กิโลกรัม)	ระยอง 5	17.8	20	28	21.9 ^{ns}
	ระยอง 90	14.1	23.5	22.5	20.0 ^{ns}
	เกษตรศาสตร์ 50	14.7	38.8	32	28.5 ^{ns}
	หัวยบง 60	31.7	28.8	30.3	30.3 ^{ns}
	CMR 35-64- 1	22.5	35	26.7	28.1 ^{ns}
	CMR 35-22-196	31.2	16.5	30.5	26.1 ^{ns}
	CMR 35-21-199	26.5	26.3	27.7	26.8 ^{ns}
	CMR 36-55-166	15.7	22.4	19.0	19.0 ^{ns}
	เฉลี่ย	21.8 ^{NS}	26.4 ^{NS}	27.1 ^{NS}	

หมายเหตุ ns เป็นค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกัน โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

NS เป็นค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกัน โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($p \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติน้ำหนักต้น และใบเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ที่ทำการเก็บเกี่ยว ณ อายุ 8, 10 และ 12 เดือน ดังตารางที่ 4 พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมของปัจจัยด้านพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว จึงทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากทุกพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว เมื่อพิจารณาทั้งพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว พบว่า ด้านน้ำหนักต้น และใบเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 5 การเจริญในด้านน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 8, 10 และ 12 เดือน

การเจริญ	พันธุ์	อายุ (เดือน)			เฉลี่ย
		8	10	12	
น้ำหนักหัวสดเฉลี่ย (กิโลกรัม)	ระยอง 5	28.2	52.8	63	48.0 ^{ns}
	ระยอง 90	36.8	50	75	53.9 ^{ns}
	เกษตรศาสตร์ 50	27.8	67	82	58.9 ^{ns}
	ห้วยบง 60	51.9	48	85.7	61.8 ^{ns}
	CMR 35-64- 1	31.8	66.2	83.3	60.4 ^{ns}
	CMR 35-22-196	29.3	41	55	41.8 ^{ns}
	CMR 35-21-199	39.6	57.2	49.7	48.8 ^{ns}
	CMR 36-55-166	22	44.7	87.7	51.4 ^{ns}
	เฉลี่ย	33.4 ^B	53.4 ^A	72.7 ^A	

หมายเหตุ ns เป็นค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกัน โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)
A,B,C,.. เป็นค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ที่ทำการเก็บเกี่ยว ณ อายุ 8, 10 และ 12 เดือน ดังตารางที่ 5 พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมของปัจจัยด้านพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว จึงทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากทุกพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว เมื่อพิจารณาพันธุ์ กับน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อพิจารณาอายุการเก็บเกี่ยว พบว่า การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน และ 10 เดือนจะให้น้ำหนักหัวสดดีกว่า 8 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ

ข้อสังเกตที่ได้จากการทดลองนี้ พบว่า

1. เมื่ออายุการเก็บเกี่ยวที่มากขึ้น จะทำให้ผลผลิตมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ทั้งความสูง น้ำหนัก หัวสด น้ำหนักต้น และใบ
2. การปลูก และอัตราการรอด มีผลจากความชื้นในดิน ทำให้อัตราการเจริญในแปลงไม่เท่ากัน แม้จะพันธุ์เดียวกัน ดังนั้น การปรับสภาพดิน และการให้น้ำควรทำให้อย่างทั่วถึง เพื่อให้มีการเจริญในแปลงปลูกเท่ากันทั้งหมด

สรุป ผลที่ได้จากการทดลองนี้ พันธุ์ที่ให้น้ำหนักหัวสดดีที่สุด คือ พันธุ์ห้วยบง 60 แต่ทั้ง 8 พันธุ์ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ พันธุ์ที่มีความสูงดีที่สุด คือ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และ CMR 35-64-1 พันธุ์ที่ให้น้ำหนักต้น และใบดีที่สุด คือ พันธุ์ห้วยบง 60 แต่ทั้ง 8 พันธุ์ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้ง 8 พันธุ์เหมาะให้แก่เกษตรกรในจังหวัดปราจีนบุรี นำไปใช้เป็นท่อนพันธุ์ เพื่อเพิ่มผลผลิต และควรทำการเก็บเกี่ยวหัวมันเมื่อปลูกได้ 12 และ 10 เดือน เพราะจะให้ผลผลิตสูงกว่าเมื่อปลูกได้ 8 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ

1.2 วัดปริมาณแป้งในหัวสดด้วย Reimann Scale Balance

ปริมาณแป้งของหัวสดจาก การวัดด้วย reimann scale balance นำหัวมันสำปะหลังมาสับเป็นท่อนๆ แล้วชั่งด้วยเครื่อง Reimann scale balance หาก 5.0 กิโลกรัม อ่านค่า แต่ถ้าไม่ถึง ให้ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้วจดน้ำหนัก เรียกน้ำหนักที่ได้นี้ว่า น้ำหนักในอากาศ ส่วนตระกร้าอันที่ 2 จะอยู่ในน้ำ หลังจากชั่งในตระกร้าอันที่ 1 เสร็จแล้วให้ปรับเข็มไปที่ 0 เหน้าให้เต็มภาชนะบรรจุน้ำ แล้วเทหัวมันสำปะหลังลงในตระกร้าอันที่ 2 แล้วจุ่มลงในน้ำ ปรับให้อยู่สมดุลแล้วบันทึกค่าที่ได้ เรียกน้ำหนักนี้ว่า น้ำหนักในน้ำ นำมาคำนวณหาความถ่วงจำเพาะ แล้วนำค่าที่ได้หาปริมาณแป้งในหัวมันสด จากสมการ ปริมาณแป้ง = $210.8 \times (\text{ค่าความถ่วงจำเพาะ}) - 213.4$

ตารางที่ 6 การศึกษาปริมาณแป้งเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 8, 10 และ 12 เดือน

การเจริญ	พันธุ์	อายุ (เดือน)			เฉลี่ย
		8	10	12	
ปริมาณแป้งเฉลี่ย (ร้อยละ)	ระยอง 5	18.0	22.5	23.5	21.31 ^d
	ระยอง 90	22.8	24.9	25.2	24.27 ^{abcd}
	เกษตรศาสตร์ 50	23.7	23.6	28.8	25.37 ^{ab}
	ห้วยบง 60	22.4	24.2	23.6	23.37 ^{bcd}
	CMR 35-64-1	22.9	27.2	29.2	26.42 ^{ab}
	CMR 35-22-196	24.5	27.8	30.5	27.57 ^a
	CMR 35-21-199	23.0	28.2	23.9	25.03 ^{abc}
	CMR 36-55-166	20.1	22.3	26.0	21.70 ^{cd}
	เฉลี่ย	22.15 ^B	25.08 ^A	25.91 ^A	

หมายเหตุ a,b,c,..... เป็นค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

A,B,C,..... เป็นค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติปริมาณแป้งเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ที่ทำการเก็บเกี่ยว ณ อายุ 8, 10 และ 12 เดือน ดังตารางที่ 6 พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมของปัจจัยด้านพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว จึงทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากทุกพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว เมื่อพิจารณาพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CMR 35-22-196 ให้ปริมาณแป้งสูงที่สุด รองลงมา คือ พันธุ์ CMR 35-64-1, เกษตรศาสตร์ 50, CMR 35-21-199, ระยอง 90, ห้วยบง 60, CMR 36-55-166 และ ระยอง 5 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอายุการเก็บเกี่ยว พบว่า การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน และ 10 เดือน จะให้ปริมาณแป้งสูงกว่า 8 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ

1.3 วัดปริมาณมันเส้นแห้ง

ปริมาณแป้งมันเส้นแห้งจากการคำนวณจากสูตร ปริมาณมันเส้นแห้ง = $18.4 + 0.72x$ (ปริมาณแป้ง) โดยมันแห้งจะมีความชื้น 13 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 7 การศึกษาปริมาณมันเส้นแห้งเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 8, 10 และ 12 เดือน

การเจริญ	พันธุ์	อายุ (เดือน)			เฉลี่ย
		8	10	12	
ปริมาณมันเส้นแห้ง เฉลี่ย (ร้อยละ)	ระยอง 5	31.3	33.3	35.3	33.30 ^c
	ระยอง 90	34.8	36.3	36.5	35.88 ^{ab}
	เกษตรศาสตร์ 50	35.4	35.4	39.1	36.67 ^{ab}
	ห้วยบง 60	34.5	35.8	35.4	35.23 ^{bc}
	CMR 35-64-1	34.9	37.7	39.4	37.31 ^{ab}
	CMR 35-22-196	36.0	38.4	40.4	38.25 ^a
	CMR 35-21-199	35.0	38.7	35.6	35.21 ^{bc}
	CMR 36-55-166	32.9	35.5	37.1	35.18 ^{bc}
	เฉลี่ย	34.35 ^C	35.93 ^B	37.36 ^A	

หมายเหตุ a,b,c,..... เป็นค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($p \leq 0.05$)

A,B,C,..... เป็นค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($p \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติปริมาณมันเส้นแห้งเฉลี่ยในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ที่ทำการเก็บเกี่ยว ณ อายุ 8, 10 และ 12 เดือน ดังตารางที่ 7 พบว่า ไม่มีอิทธิพลร่วมของปัจจัยด้านพันธุ์และอายุการเก็บเกี่ยว จึงทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลจากทุกพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว เมื่อพิจารณาพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CMR 35-22-196 ให้ปริมาณมันเส้นแห้งเฉลี่ยสูงที่สุด รองลงมา คือ CMR 35-64-1, เกษตรศาสตร์ 50, ระยอง 90, ห้วยบง 60, CMR 35-21-199, CMR 36-55-166 และระยอง 5 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอายุการเก็บเกี่ยว พบว่า การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน จะให้ปริมาณมันเส้นแห้งเฉลี่ยสูงกว่า 10 เดือน และ 8 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ

ข้อสังเกตจากการทดลองนี้ พบว่า ปริมาณแป้ง และปริมาณมันเส้นแห้งจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อมีอายุการปลูกที่เพิ่มขึ้นในพันธุ์ระยอง 5, ระยอง 90 และห้วยบง 60 จะมีปริมาณแป้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในช่วงอายุ 10 เป็น 12 เดือนเมื่อเทียบกับการเพิ่มในช่วงอายุ 8 เป็น 10 เดือน แสดงให้เห็นว่า อัตราสะสมของแป้งจะลดลง และเริ่มคงที่ แต่ในพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50, CMR 35-64-1, CMR 36-55-166 และ CMR 35-21-199 ยังสามารถเพิ่มขึ้นได้อีก คาดว่า เกษตรกรจะให้ความนิยมพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50, CMR 35-64-1 (ระยอง 7), CMR 36-55-166 (ระยอง 9) และ CMR 35-21-199 (เขียวปลัดหนี่) ในอนาคต เพราะอายุการเก็บเกี่ยวที่เพิ่มขึ้นทำให้มันสำปะหลังมีหัวขนาดใหญ่ น้ำหนักหัวสดเพิ่มแล้ว ปริมาณแป้งยังเพิ่มอีกด้วย

1.4 วัดปริมาณอะมัยโลสในหัวสด โดยวิธี Knutson, 1986

การวัดปริมาณอะมัยโลส เป็นการวัดจากการดูดกลืนแสงของสารละลายแป้ง มันสำปะหลัง 8 พันธุ์ เมื่ออายุ 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือนเทียบกับสารละลายแป้งมันฝรั่งมาตรฐาน ค่าที่อ่านได้ดังตารางที่ 8 โดยค่าที่ได้มาจากการหาค่าเฉลี่ยจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร จำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณอะมัยโลสเทียบกับกราฟอะมัยโลสมาตรฐาน ผลการดูดกลืนแสงอยู่ในตารางผนวกที่ 12 จากการวัดปริมาณอะมัยโลสด้วยวิธี Knutson, 1986 โดยทำปฏิกิริยากับไอโอดีน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาร้อยละของปริมาณอะมัยโลสเทียบกับกราฟอะมัยโลสมาตรฐาน

ตารางที่ 8 การศึกษาปริมาณอะมัยโลสในมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ณ อายุการเก็บเกี่ยว 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน

พันธุ์	อายุ (เดือน)									
	4		6		8		10		12	
ระยอง 5	23.54	ab,NS	22.93	ns,NS	22.35	ns,NS	22.32	b,NS	24.23	b,NS
ระยอง 90	21.07	c,C	23.42	ns,B	23.32	ns,B	22.71	ab,B	26.28	a,A
เกษตรศาสตร์ 50	24.47	a,NS	24.60	ns,NS	23.12	ns,NS	23.10	ab,NS	23.32	b,NS
ห้วยบง 60	23.38	ab,NS	22.15	ns,NS	21.83	ns,NS	21.83	b,NS	24.14	b,NS
CMR 35-64- 1	23.14	ab,B	24.93	ns,A	22.66	ns,B	24.10	a,AB	23.98	b,AB
CMR 35-22-196	23.97	ab,B	25.67	ns,A	22.13	ns,C	21.96	b,C	24.23	b,B
CMR 35-21-199	22.20	bc,AB	23.93	ns,A	21.01	ns,B	21.67	b,B	23.99	b,A
CMR 36-55-166	22.46	bc,NS	24.45	ns,NS	22.80	ns,NS	23.23	ab,NS	23.29	b,NS

หมายเหตุ a,b,c,..... เป็นค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($p \leq 0.05$)

A,B,C,..... เป็นค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($p \leq 0.05$)

ns เป็นค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกัน โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

NS เป็นค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกัน โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

($p \leq 0.05$)

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอะมัยโลสในแป้งมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ทางสถิติ พบว่า ปัจจัยด้านพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยวมีอิทธิพลร่วมกัน จึงทำการเปรียบเทียบความแตกต่างแยกตามพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 8

เมื่อพิจารณาพันธุ์ พบว่า พันธุ์ระยอง 5, เกษตรศาสตร์ 50, หัวบง 60, CMR 36-55-166 ไม่พบความแตกต่างในปริมาณอะมัยโลสอย่างมีนัยสำคัญ แต่พันธุ์ระยอง 90 เมื่อปลูก 12 เดือนจะให้ปริมาณอะมัยโลส สูงกว่าปลูก 6 เดือน, 8 เดือน, 10 เดือน และ 12 เดือน ตามลำดับ พันธุ์ CMR 35-64-1 เมื่อปลูก 6 เดือนจะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงกว่าปลูก 10 เดือน, 12 เดือน, 4 เดือน และ 8 เดือน ตามลำดับ พันธุ์ CMR 35-22-196 เมื่อปลูก 6 เดือนจะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงกว่าปลูก 12 เดือน, 4 เดือน, 8 เดือน และ 12 เดือน ตามลำดับ พันธุ์ CMR 35-21-199 เมื่อปลูก 12 เดือนจะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงกว่าปลูก 6 เดือน, 4 เดือน, 10 เดือน และ 8 เดือน ตามลำดับ

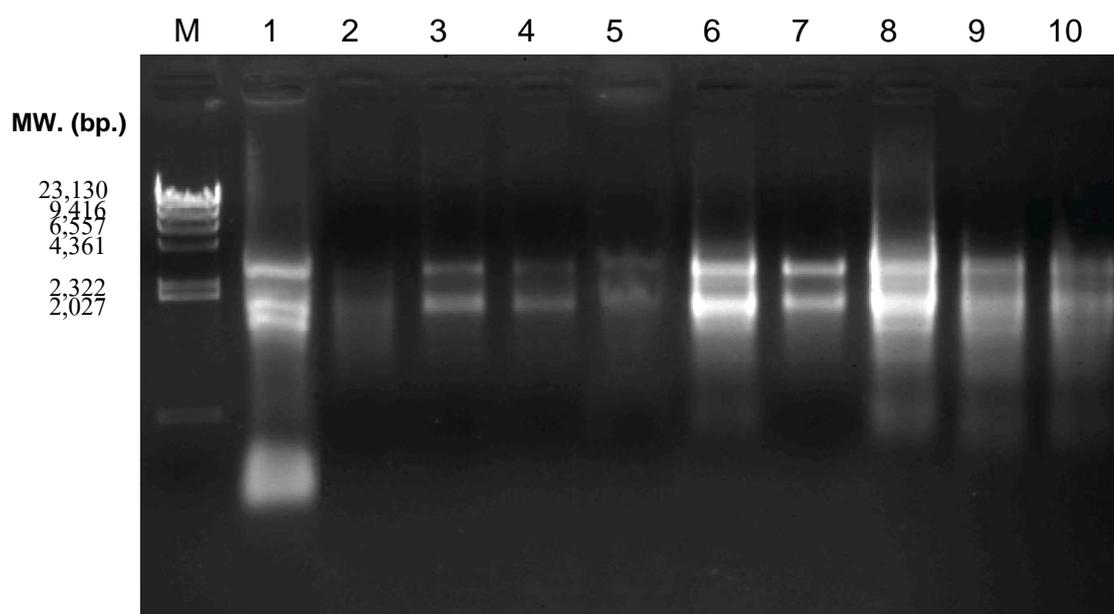
เมื่อพิจารณาอายุการเก็บเกี่ยว การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 6 เดือน และ 8 เดือน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 4 เดือน พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 จะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงที่สุด รองลงมา คือ CMR 36-55-166, CMR 35-22-196, ระยอง 5, หัวบง 60, CMR 35-64-1, CMR 35-21-199 และระยอง 90 ตามลำดับ การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 10 เดือน พันธุ์ CMR 35-64-1 จะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงที่สุด รองลงมา คือ CMR 36-55-166, เกษตรศาสตร์ 50, ระยอง 90, ระยอง 5, CMR 35-22-196, หัวบง 60 และ CMR 35-21-199 ตามลำดับ การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน พันธุ์ระยอง 90 จะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงที่สุด รองลงมา คือ ระยอง 5, CMR 35-22-196, หัวบง 60, CMR 35-21-199, CMR 35-64-1, เกษตรศาสตร์ 50 และ CMR 36-55-166 ตามลำดับ

ข้อสังเกตจากการทดลองนี้พบว่า ปริมาณอะมัยโลสที่ลดลงน่าจะสัมพันธ์กับระดับน้ำฝนและความชื้นในดิน เชื่อว่า เมื่อดินได้รับปริมาณน้ำฝนจนถึงระดับความชื้นที่เกินจะรับได้ จะมีการตอบสนองของมันเป็นสำปะหลังในแต่ละพันธุ์ต่อสถานะเครียด (water stress) ซึ่งมีผลทำให้อัตราส่วนของอะมัยโลสลดลง เนื่องจากพืชจะสลายอะมัยโลสในแป้งมาใช้เป็นพลังงาน เพื่อสร้างต้น และใบ เนื่องจากอะมัยโลสสลายได้ง่าย จึงทำให้อัตราส่วนของอะมัยโลสลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของโอภาส (2531) ที่ว่า ความชื้นในดินสูงจะเกิดการสร้างทรงพุ่มใหม่ทำให้ปริมาณแป้งลดลง ซึ่งจะสลายอะมัยโลสมาใช้ จึงทำให้อัตราส่วนของอะมัยโลสต่ออะมัยโลเพคตินลดลง ดังนั้น หากต้องการแป้งที่อะมัยโลสสูงควรเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 6 เดือน ในพันธุ์ CMR 35-64-1 และ CMR 35-22-196 และเมื่ออายุ 12 เดือน ในพันธุ์ CMR 35-21-199 และระยอง 90

2. การแสดงออกของยีน AGPase, GBSSI, GBSSII, SBEI & SBEII ในมันสำปะหลังที่อายุการปลูก ต่างๆ กัน

2.1 เปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ 5 วิธี

เปรียบเทียบวิธีการสกัด total RNA ตามวิธี Raha (1990), Felicia (2001), Salehuzzaman (1992), Kanyaporn (2005) และ PureLink™ Plant RNA Reagent จากใบ และหัวมันสำปะหลังพันธุ์ KU 50 เมื่อปลูกเป็นเวลา 10 เดือน (จากข้อ 2.2 ในวิธีการ) วิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel ผลดังภาพที่ 4 และนำไปวัดค่าความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ดังตารางที่ 9



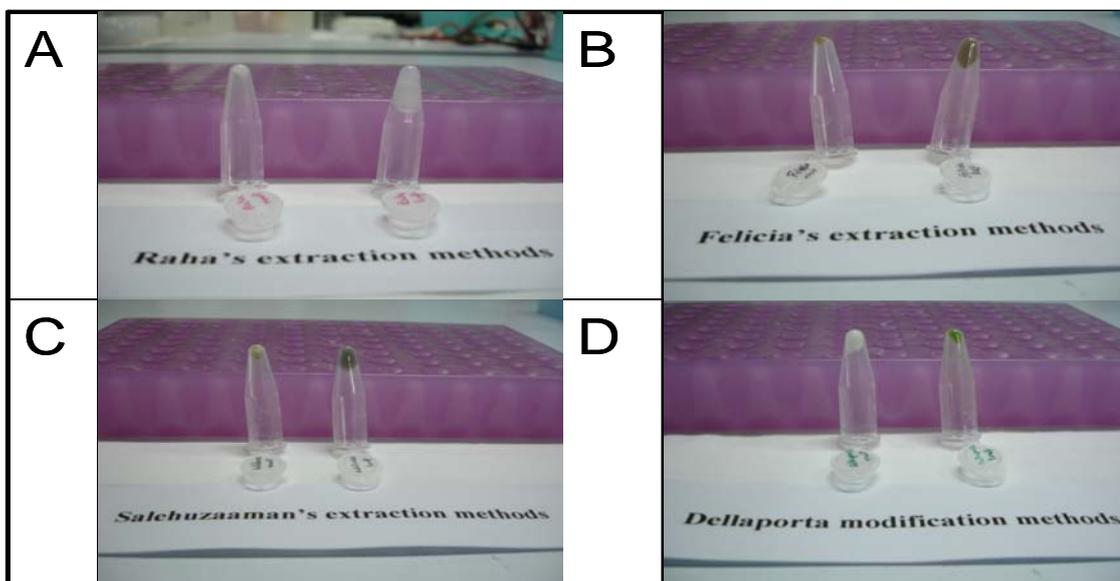
ภาพที่ 4 เปรียบเทียบวิธีการสกัด total RNA จากใบ และหัวมันสำปะหลังพันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50 เมื่อปลูกเป็นเวลา 10 เดือน วิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel lamda/*Hind*III ladder (M) วิธี สกัด phrnol/LiCl methods (Raha, 1990) หัว (1) ใบ (2) วิธีสกัด LiCl methods (Felicia, 2001) หัว (3) ใบ (4) วิธีสกัด LiCl methods (Salehuzzaman, 1992) หัว (5) ใบ (6) วิธีสกัด LiCl methods (Kanyaporn, 2005) หัว (7) ใบ (8) วิธีสกัดวิธี PureLink™ Plant RNA Reagent หัว (9) ใบ (10)

วิเคราะห์ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของ total RNA จากวิธีการสกัดทั้ง 5 วิธี คือ วิธี Raha (1990), Felicia (2001), Salehuzzaman (1992), Kanyaporn (2005) และ PureLink™ Plant RNA Reagent จากใบ และหัวมันสำปะหลังพันธุ์ KU 50 เมื่อปลูกเป็นเวลา 10 เดือน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer Ultrospec 30000 วัดค่าการดูดกลืนแสงผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 9 วิเคราะห์ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดด้วยวิธี ตามข้อ 2.2 จากใบ และหัวมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง อัลตราไวโอเลต

Sample	Ab. 260 nm.	Ab. 280 nm.	Concentration ($\mu\text{g./}\mu\text{l.}$)	purity
Raha root	0.067	0.044	2.68	1.52
Raha leaf	0.182	0.096	7.28	1.90
Felicia root	0.033	0.024	1.32	1.38
Felicia leaf	0.046	0.031	1.84	1.48
Salehuzzaman root	0.015	0.012	0.6	1.25
Salehuzzaman leaf	0.201	0.131	8.04	1.53
Kanyaporn root	0.055	0.037	2.2	1.49
Kanyaporn leaf	0.655	0.396	26.2	1.65
PureLink™ Plant RNA Reagent root	0.123	0.064	4.92	1.92
PureLink™ Plant RNA Reagent leaf	0.268	0.148	10.72	1.81

เปรียบเทียบตะกอน และขั้นตอนของวิธีการสกัด total RNA ตามวิธี Raha (1990), Felicia (2001), Salehuzzaman (1992) และ Kanyaporn (2005) จากใบ และหัวมันสำปะหลังพันธุ์ KU 50 เมื่อปลูกเป็นเวลา 10 เดือน ผลดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ตะกอนจากการสกัด total RNA ด้วยวิธีต่างๆ วิธี Raha (1990) (A) Felicia (2001) (B) Salehuzzaman (1992) (C) และ Kanyaporn (2005) (D) หลอดด้านซ้ายสกัดจากใบ หัว และ หลอดด้านขวาสกัดจากใบ

พบว่า วิธี Raha (1990) สกัด total RNA มีปัญหาแป้งสูง เพราะแป้งจะลงมาด้วยเมื่อตกตะกอนด้วย ethanol ซึ่งแป้งจะคุดน้ำ ทำให้สารละลายอาร์เอ็นเอลดลง ทำให้ปริมาณลดลง เมื่อมีการ freeze thaw หลายรอบ วิธี Felicia (2001) มีปัญหาเรื่องได้ total RNA น้อย และมีชั้นตอนมาก วิธี Salehuzzaman (1992) มีปัญหาเรื่องได้ total RNA น้อย และมีชั้นตอนมาก ต้องตกตะกอน 2 ครั้ง ทำให้เสียเวลา และวิธี Kanyaporn (2005) มีปัญหาเรื่องความบริสุทธิ์ต่ำ โปรตีนสูง

จากค่าการดูดกลืนแสง พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของ total RNA จะสอดคล้องกับผลจากเจล ยกเว้นวิธี Raha (1990) ในใบที่ได้ค่าสูง แต่แถบ band ไม่คมชัด โดยทุกตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสงในใบจะมีค่าที่สูงกว่าในหัวหลายเท่า คาดว่า เพราะปริมาณ chlorophyll ในใบที่ถูกกำจัดออกไม่หมดในสารละลายตัวอย่าง ทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าความเป็นจริง

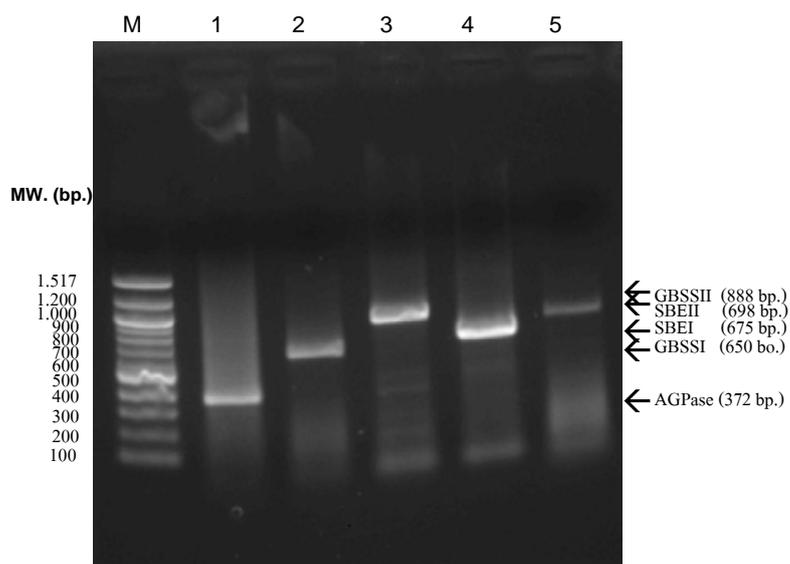
เปรียบเทียบการสกัดจาก spectrophotometer พบว่า วิธี Kanyaporn (2005) จะให้ปริมาณ total RNA ในใบสูงกว่าวิธี PureLink™ Plant RNA Reagent 10.72 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$., Salehuzzaman (1992) 8.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$., Raha (1990) 7.28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. และ Felicia (2001) 1.84 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. ตามลำดับ โดยวิธีของ

Kanyaporn (2005) จะได้ปริมาณสูงสุด 26.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. แต่สกัดจากหัววิธีสกัดของ PureLink™ Plant RNA Reagent จะให้ปริมาณ total RNA ในหัวสูงกว่าวิธี Raha (1990) 2.68 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Kanyaporn (2005) 2.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Felicia (2001) 1.32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. และ Salehuzzaman (1992) 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. ตามลำดับ โดย PureLink™ Plant RNA Reagent จะได้ปริมาณสูงสุด 4.92 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. เมื่อพิจารณาจากเจล เชื่อว่าทุกวิธีเหมาะสมสำหรับการสกัด total RNA เมื่อพิจารณาความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดได้ พบว่า วิธีของ Raha (1990) เมื่อสกัดใบจะมีความบริสุทธิ์สูงกว่าวิธี PureLink™ Plant RNA Reagent 1.81, Kanyaporn (2005) 1.65, Salehuzzaman (1992) 1.53 และ Felicia (2001) 1.48 ตามลำดับ โดย Raha (1990) มีความบริสุทธิ์สูงสุดเท่ากับ 1.90 และเมื่อสกัดหัววิธีของ PureLink™ Plant RNA Reagent จะมีความบริสุทธิ์สูงกว่าวิธี Raha (1990) 1.52, Kanyaporn (2005) 1.49, Felicia (2001) 1.38 และ Salehuzzaman (1992) 1.25 ตามลำดับ โดยมีความบริสุทธิ์สูงสุดเท่ากับ 1.92

พบว่า วิธี PureLink™ Plant RNA Reagent มีความเหมาะสมที่สุดในการสกัดตัวอย่าง เพราะมีความบริสุทธิ์สูงทั้งในใบ และในหัว และมีระยะเวลาการสกัดที่สั้น ขั้นตอนน้อยกว่าวิธีอื่นๆ จึงเลือกวิธีสกัดของ PureLink™ Plant RNA Reagent ในการสกัดตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2 การทำเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ของยีน AGPase, GBSSI, GBSSII, SBEI และ SBEII จากหัวมันสำปะหลังพันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50 ที่อายุ 10 เดือน

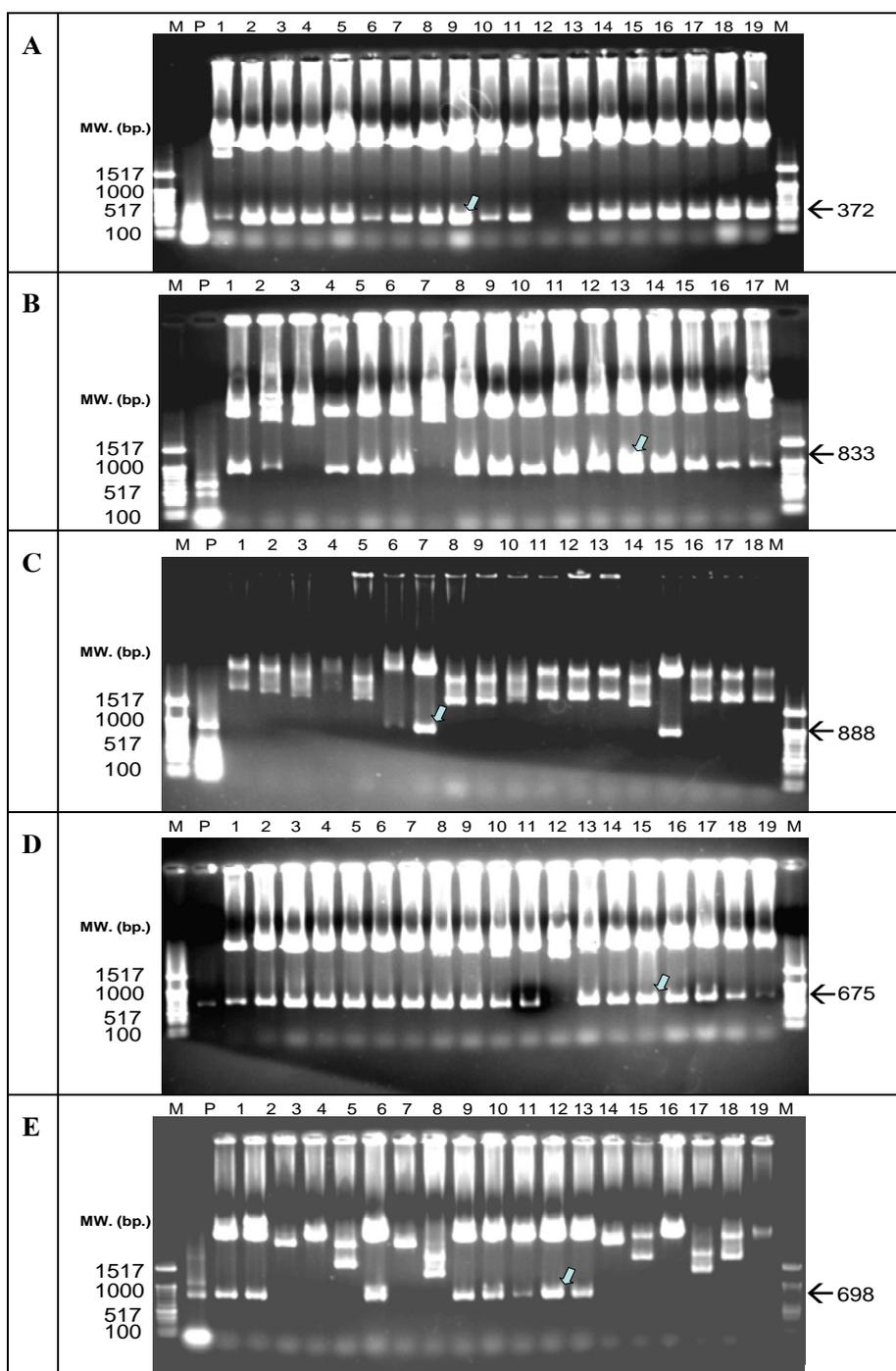
การทำปฏิกิริยา RT-PCR ของ total RNA ที่สกัดด้วยวิธี PureLink™ Plant RNA Reagent จากหัวมันสำปะหลังพันธุ์ KU 50 ที่อายุ 10 เดือน ด้วย primer ที่จำเพาะต่อยีน AGPase, GBSSI, GBSSII, SBEI และ SBEII วิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel ผลดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 วิเคราะห์ผลจากการทำ reverse transcription-polymerase chain reaction จากหัว
 มันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ที่อายุ 10 เดือน วิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel
 100 bp. + 1.5 kb. Ladder (M) RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน AGPase (1) ยีน GBSSI (2)
 ยีน GBSSII (3) ยีน SBEI (4) ยีน SBEII (5)

2.3 การคัดเลือก positive recombinant plasmid ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากยีน
 AGPase, GBSS I, GBSS II, SBE I และ SBE II จากข้อ 2.4 โดยการตัดด้วย restriction enzyme

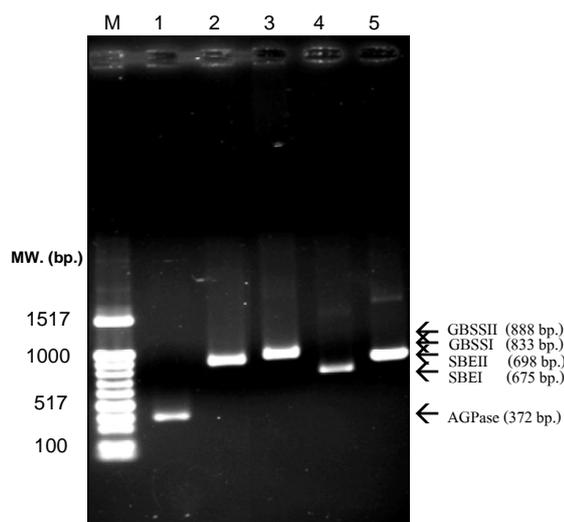
นำ DNA fragment ที่ผ่านการทำ gene clean kit II มาเชื่อมต่อกับ pGEM-Teasy vector
 (Promega) แล้วนำไปฝากถ่ายยีนเข้าสู่ competent cell E. coli JM109 (Promega) โดยทำ heat shock
 เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำมา spread plate ที่มี X-GAL, IPTG และ Ampicilin ปุ่ม plate ที่ 37
 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง เลือก white colony นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB) ที่มี ampicilin 0.2
 mg./ml. นำมาเขย่าด้วย incubator shaker ที่ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง นำเซลล์ที่เลี้ยงได้ นำมา
 แยก recombinant plasmid ด้วยวิธี miniprepation โดยใช้ lysozyme solution ตัด recombinant
 plasmid ด้วย EcoRI วิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel ผลดังภาพที่ 7 (A-E)



ภาพที่ 7 วิเคราะห์ผลจาก recombinant plasmid ที่ถูกตัดด้วย restriction enzyme (*EcoRI*) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน AGPase (A) GBSS I (B) GBSS II (C) SBE I (D) และ SBE II (E) วิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel 100 bp. + 1.5 kb. Ladder (M) RT-PCR product (P) 1, 2, 3, คือ โคลนลำดับที่ 1, โคลนลำดับที่ 2, โคลนลำดับที่ 3, ตามลำดับ

2.4 การทำ gene clean

ตัดชิ้นเจลของ insert DNA จากโคลนของยีน AGPase, GBSSI, GBSSII, SBEI และ SBEII (ที่ลูกศรชี้) ซึ่งโคลนมีขนาดใกล้เคียง RT-PCR product ที่ใส่เข้าไปใน vector ดังแสดงในภาพ 7 (A-E) วิเคราะห์ผลบน 1 % (w/v) agarose gel ผลดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 วิเคราะห์ผล insert DNA จาก gene clean บน 1 % (w/v) agarose gel 100 bp. + 1.5 kb.

ladder (M) insert DNA ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน AGPase (1) ยีน GBSSI (2) ยีน GBSSII (3) ยีน SBEI (4) และยีน SBEII (5)

2.5 การหาลำดับเบสของ insert DNA ที่โคลนด้วย pGEM-Teasy vector ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน AGPase, GBSSI, GBSSII, SBEI และ SBEII โดยวิธี Sanger methods

ทำการโคลนดังข้อ 2.4 (ในวิธีการ) และคัดเลือกโคลนที่มีลักษณะสีขาวเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี 0.2 mg./ml. Ampicilin โดยโคลนที่นำมาเลี้ยง คือ โคลนที่ลูกศรชี้ ในภาพที่ 7 แล้วเรียกโคลนนั้นว่า AGPase 9, GBSS I 13, GBSS II 7, SBE I 15 และ SBE II 12 ตามลำดับ ทำการบ่มใน incubator shaker 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง สกัด recombinant plasmid ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ lysozyme buffer ตรวจสอบ insert DNA ด้วย restriction enzyme (*EcoRI*) นำโคลนที่ได้ไปหาลำดับเบสที่ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทค (automated sequence รุ่น ABI sequence 377 ยี่ห้อ ABI) ซึ่งการหาลำดับเบสด้วยวิธี dye terminator ที่ติดฉลาก ได้ผลดังภาพ

1. ลำดับเบสของ insert DNA จากการโคลนผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน AGPase ในโคลน AGPase 9 ที่มีความยาว 551 bp. ดังภาพที่ 9
2. ลำดับเบสของ insert DNA จากการโคลนผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน GBSSI ในโคลน GBSSI 13 ที่มีความยาว 869 bp. ดังภาพที่ 10
3. ลำดับเบสของ insert DNA จากการโคลนผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน GBSSII ในโคลน GBSSII 7 ที่มีความยาว 970 bp. ดังภาพที่ 11
4. ลำดับเบสของ insert DNA จากการโคลนผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน SBEI ในโคลน SBEI 15 ที่มีความยาว 897 bp. ดังภาพที่ 12
5. ลำดับเบสของ insert DNA จากการโคลนผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน SBE II ในโคลน SBEII 12 ที่มีความยาว 867 bp. ดังภาพที่ 13

Locus 551 bp. DNA

A 160 bp. G 98 bp. C 147 bp. T 145 bp.

Base count

10	20	30	40	50	60
TGGGCCGATC	CCAGGTCCGG	CTTCCGNAGG	CCGCGGGAAT	TCGATCCGCA	TGGATTATGA
70	80	90	100	110	120
AAGGTTTATT	CAAGCACACA	GAGAAACTGA	TGCAGATATA	ACAGTAGCTG	CTCTACCAAT
130	140	150	160	170	180
GGATGAAAAA	CGTGCAACAG	CCTTTGGTCT	GATGAAAATT	GATGAAGAAG	GGCGCATAAT
190	200	210	220	230	240
TGAATTTGCT	GAGAAGCCAA	AAGGGGAGCA	ATTGAAAGCT	ATGAAGGTTG	ATACTACAAT
250	260	270	280	290	300
TCTAGGTCTT	GATGATGAGA	GAGCAAAAGA	GTTGCCTTTT	ATTGCTAGTA	TGGGGATATA
310	320	330	340	350	360
TGTCGTCAGC	AAAAATGTGA	TGTTAGATCT	TCTAAGAGAT	AAGTTTCCTG	GAGCCAATGA
370	380	390	400	410	420
TTTTGGAAGT	GAAGTTATTC	CTGGTGCTAC	ATCCATTGGG	ATGAGAGTGC	AAGCAATCAC
430	440	450	460	470	480
TAGTGAATTC	GCGGCCGCCT	GCAGGTCGAC	CATATGGGAG	AGCTCCCAAC	GCGTTGGATG
490	500	510	520	530	540
CATAGCTTGA	GTATTCTATA	GTGTCACCTA	AATAGCTTGG	CGTAATCATG	GTCATAGCTG
550	560	570	580	590	600
TGTTTCCGGA	A.....

ภาพที่ 9 ลำดับเบสของ AGPase 9 ที่ได้จากโคลน และจัดเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม DNASIS version 2.1 ที่มีความยาว 551 bp.

Locus 869 bp. DNA

A 241 bp. G 192 bp. C 207 bp. T 224 bp.

Base count

10	20	30	40	50	60
TTCTCGAAC	CGGCCGCNTT	NCCGNCCGCG	GGAATTCGAT	TGTGGACTTG	GTGCAAAACT
70	80	90	100	110	120
GTGGACTTG	GTGCAAAACT	GGTGGACTTG	GTGATGTTCT	TGGAGGACTC	CCCCCTGCCA
130	140	150	160	170	180
GGCCGCAAG	AGGGCACCCG	GTCATGACAG	TGTCTCCCCG	CTATGACCAG	TACAAGGATG
190	200	210	220	230	240
TTGGGATAC	CTCTGTATCG	GTGGAGATTA	AAATTGGAGA	TAGAATTGAA	ACTGTCCGCT
250	260	270	280	290	300
CTTCCACTC	CTACAAAAGA	GGAGTTGATC	GGGTCTTCGT	GGATCATCCA	ATGTTCCCTTG
310	320	330	340	350	360
GAAGGTATG	GGGCAAAACT	GGATCTAAAA	TATATGGCCC	AAGAGCAGGT	TTGGATTACC
370	380	390	400	410	420
GGACAACCA	ACTGCGATTT	AGCTTGTTAT	GCCTTGCTGC	TCTGGAGGCA	CCGAGAGTTC
430	440	450	460	470	480
GAAGTTGAA	CAGCAGCAAA	AATTTCTCAG	GACCCTACGG	AGAAGAAGTT	GCCTTCATTG
490	500	510	520	530	540
CAACGACTG	GCACACTGCT	CTGCTTCCAT	GTTATCTAAA	AGCCATTTAC	CAACCTATGG
550	560	570	580	590	600
GATTTACAA	ACACGCCAAG	GTTGCCTTTT	GCATCCACAA	CATTGCATAT	CAGGGAAGAT
610	620	630	640	650	660
TGCCTTCTC	AAACTTCCCA	CGACTTAATC	TGCCAAATAA	ATTCAAAAAGC	TCTTTTGACT
670	680	690	700	710	720
TTTCGATGG	GTATGAGAAG	CCGTGAAGGG	AAGGAAAATC	AATTGGATGA	AGGCCCGGGA
730	740	750	760	770	780
ATTGGAATC	AAACAGGGTT	TTGACTTACC	ATTCTATGCC	AAAAAATCAT	TTCTGGAGTT
790	800	810	820	830	840
AAAAAGCTC	ATGAAACTTC	TTCNTAAANT	GGGATTGCTG	GTTAAATGGT	GGACCCGAGG
850	860	870	880	890	900
GGGAACCTG	TTACAAAAAA	AACTTGACC.

ภาพที่ 10 ลำดับเบสของ GBSS I 13 ที่ได้จากโคลน และจัดเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม DNASIS version 2.1 ที่มีความยาว 869 bp.

Locus 970 bp. DNA

A 240 bp. G 238 bp. C 205 bp. T 255 bp.

Base count

10	20	30	40	50	60
TCCCCATAT	GGTCGACTGC	AGGCGGCCGC	GAATTCACATA	GTGATTTGTG	GCATCGTAGT
70	80	90	100	110	120
GATGTCAAT	GTATTTATCT	GTAACAGGAT	TCCACTCCTG	GACGTCCATG	CCATTTATAA
130	140	150	160	170	180
ACCAGCAAT	GCCAGTTTTA	CGAATGAAGT	TATCCAGCTC	GACGCCTCTT	TCAACTCCAG
190	200	210	220	230	240
GATGACTTC	TTGGGCATAG	TATGGGCTCA	CAGTCAAAAC	CCTGTCTGAT	TCCAATATCC
250	260	270	280	290	300
GGCCTTCAT	CCAATTGATT	TTCCTTCCCT	TCACGGGCTT	CTCATACCCA	TCGATAAAGT
310	320	330	340	350	360
AAAAGAGCT	TTTGAATTTA	TCTGGCAGAA	TAAGTCGTGG	GAAGCTGAG	AAGGCAAATC
370	380	390	400	410	420
TCCCTGATA	TGCAATGGTG	TGGATGCAAA	AGGCAACCTT	GGCGTGTTG	TAAATCCCCA
430	440	450	460	470	480
AGGTTGGTA	AATGGCTTTT	AGATAACATG	GAAGCAGAGC	AGTGTGCCAG	TCGTTGGCAA
490	500	510	520	530	540
GAAGGCAAC	TTCTTCTCCG	TAGGGTCCTG	AGAAATTTTT	GCTGCTGTTC	AAGTTCAGAA
550	560	570	580	590	600
TCTCGGTGC	CTCCTGAGCA	GCAAGGCATA	ACAAGCTAAA	TCGCAGTTGG	TTGTCCCTGGT
610	620	630	640	650	660
ATCCAAACC	TGCTCTTGGG	CCATATATTT	TAGATCCAGT	TTTGCCCCAT	ACCTTCTCAA
670	680	690	700	710	720
GAAACATGG	ATGATCCACG	AAGACCGATC	ACTCCTCTTT	TGTAGGAGTG	GAAGAAACGG
730	740	750	760	770	780
CAGTTTCAA	TCTATCTCCC	ATTTTATCCC	ACCGAACAAA	AGGTTTCCCA	GCATCCCCTGT
790	800	810	820	830	840
CTNGGTCAT	ANCGGGGANA	AACCGTTCTG	ACNCGGGNGN	CCNCTTGGGG	GCCCTGGGGA
850	860	870	880	890	900
GGGGGGAAT	CCNCCCANAA	NATTNCCCAA	NNCCCCNNTT	TTNNGCCCAA	ANANCAANTT
910	920	930	940	950	960
TTCCCAANC	CCCCNATTTT	NTTAANAAAA	ATNCCCCGCC	NCCNTGGGGG	CCGGGAAAAA
970	980	990	1000	1010	1020
TAAANTNNC

ภาพที่ 11 ลำดับเบสของ GBSS II 7 ที่ได้จากโคลน และจัดเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม DNASIS version 2.1 ที่มีความยาว 970 bp.

Locus 897 bp. DNA

A 220 bp. G 219 bp. C 195 bp. T 242 bp.

Base count

10	20	30	40	50	60
CTCTCCATA	TGGTCGACCT	GCAGGCGGCC	GCGAATTCAC	TAGTGATTTG	TGGCATCGTA
70	80	90	100	110	120
GTGGATGTCA	ATGTATTTAT	CTGTAACAGG	ATTCCACTCC	TGGACGTCCA	TGCCATTTAT
130	140	150	160	170	180
AATACCAGCA	ATGCCAGTTT	TACGAATGAA	GTTATCCAGC	TCGACGCCTC	TTTCAACTCC
190	200	210	220	230	240
AGAGATGACT	TCTTGGGCAT	AGTATGGGCT	CACAGTCAAA	ACCCTGTCTG	ATTCCAATAT
250	260	270	280	290	300
CCCGGCCTTC	ATCCAATTGA	TTTTCTTCC	CTTCACGGGC	TTCTCATACC	CATCGATAAA
310	320	330	340	350	360
GTCAAAAGAG	CTTTTGAATT	TATCTGGCAG	AATAAGTCGT	GGGAAGTCTG	AGAAGGCAAA
370	380	390	400	410	420
TCTTCCCTGA	TATGCAATGG	TGTGGATGCA	AAAGGCAACC	TTGGCGTGTT	TGTAAATCCC
430	440	450	460	470	480
CATAGGTTGG	TAAATGGCTT	TTAGATAACA	TGGAAGCAGA	GCAGTGTGCC	AGTCGTTGGC
490	500	510	520	530	540
AATGAAGGCA	ACTTCTTCTC	CGTAAGGTCC	TGAGAAATTT	TGCTGCTGTT	CAAGTTCAGA
550	560	570	580	590	600
ACTCTCGGTG	CCTCCTGAGC	AGCAAGGCAT	AACAAGCTAA	ATCGCAGTTG	GTTGTCCTGG
610	620	630	640	650	660
TAATCCAAAC	CTGCTCTTGG	GCCATATATT	TTAGATCCAG	TTTTGCCCCA	TACCTTCTCA
670	680	690	700	710	720
AGGAACATTG	GATGATCCAC	GAAGACCCGA	TCACTCCTCT	TTTGTAGGAA	TGGAAGAAAC
730	740	750	760	770	780
CGGACAGTTT	CAATTCTATC	TNCCAATTTT	ATCTNCCCN	AANCCAAAGG	GTNTCCCCAA
790	800	810	820	830	840
CAANCCTTGG	NNTNGGGCAT	AANNGGGGAA	AACCTGGTTT	TGGACCNGNG	GNCCCCNTTG
850	860	870	880	890	900
GGGGCCTTGG	GNNGGGGGGA	ATCCNCCCAA	AAATTCCCCA	ATNCCNCNT	TTTGCCC...

ภาพที่ 12 ลำดับเบสของ SBE I 15 ที่ได้จากโคลน และจัดเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม DNASIS version 2.1 ที่มีความยาว 897 bp.

Locus 867 bp. DNA

A 228 bp. G 167 bp. C 224 bp. T 246 bp.

Base count

10	20	30	40	50	60
TCTCCGCGTG	GGGAGCTCTC	CATATGGTCG	ACCTGCAGGC	GGCCGCGAAT	TCACTAGTGA
70	80	90	100	110	120
TTGCCCTTGT	TGGTGACAAA	ATTATTGCAT	TTTGGCTGAT	GGACAAGGAT	ATGTATGACT
130	140	150	160	170	180
TCATGGCTCT	TGACAGACCA	TCTACTCCTC	TCATAGATCG	TGGAGTAGCA	TTGCACAAAA
190	200	210	220	230	240
TGATCAGGCT	TATTACCATG	GGATTAGGCG	GAGAAGGATA	TTTGAATTTT	ATGGGAAATG
250	260	270	280	290	300
AATTTGGACA	CCCCGAGTGG	ATTGATTTTC	CAAGAGGTGA	TCTACATCTT	CCCAGTGGTA
310	320	330	340	350	360
AATTTGTTCC	TGGGAACAAT	TACAGTTATG	ATAAATGCCG	GCGTAGGTTT	GATCTAGGCA
370	380	390	400	410	420
ATTCAAAGCG	TCTGAGATAT	CATGGAATGC	AAGAGTTTGA	TCAAGCAATT	CAGCATCTTG
430	440	450	460	470	480
AAGAACCTAT	GGGTTTCTGA	CTTCTGAGCA	CCAATACATA	TCACGGAAGG	ATGAAAGGGA
490	500	510	520	530	540
TCGGATCATT	GTCTTCGAGA	GGGGAAACCT	CGTTTTTGTA	TTCAATTTTC	ATTGGACTAG
550	560	570	580	590	600
CAGCTATTCG	GATTACCGAG	TTGGCTGCTT	AAAGCCAGGA	AAGTACAAGA	TAGTCTTGGG
610	620	630	640	650	660
ATTCAGATGA	TCCTTTGTTT	GGAGGCTTTG	GCAGGCTTAG	TCATGATGCA	GACACTTCAG
670	680	690	700	710	720
CTTTGAAAGG	TGGTACGATA	ACCGGCCTCG	ATCCTTCTGG	TGTACCACCA	TGTAGAACAG
730	740	750	760	770	780
CAGTGGTCTA	TGCTTTATGG	AGGATGAATG	GAAAAGAANT	GGAANCTGTC	GCCGTTAATA
790	800	810	820	830	840
TATCTTAACC	ACGGGTCTGA	ACAGGAATGC	CATTATTGAC	TTCCTATGGG	CACTGCGAAT
850	860	870	880	890	900
CGAAATTCCG	CGGGCGCCTG	GGGGGCC...

ภาพที่ 13 ลำดับเบสของ SBE II 12 ที่ได้จากโคลน และจัดเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม DNASIS version 2.1 ที่มีความยาว 867 bp.

2.6 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบส insert DNA ของยีน AGPase, GBSSI, GBSSII, SBEI และ SBEII กับลำดับเบสจากฐานข้อมูล

การนำลำดับเบสของ AGPase9 จากเบสที่ 1 ถึง เบสที่ 551 เทียบกับ AGPase (small subunit) ของ Muyikwa (2001) จากเบสที่ 46 ถึงเบสที่ 420 ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่า มีความเหมือน 95.66 % ดังภาพที่ 14

การนำลำดับเบสของ GBSS I 13 จากเบสที่ 1 ถึง เบสที่ 869 เทียบกับ GBSS I ในฐานข้อมูล GenBank (X74160) จากเบสที่ 352 ถึงเบสที่ 987 ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่า มีความเหมือน 99.36 % ดังภาพที่ 15

การนำลำดับเบสของ GBSS II 7 จากเบสที่ 1 ถึง เบสที่ 970 เทียบกับ GBSS II ในฐานข้อมูล GenBank (AF173900) จากเบสที่ 1199 ถึงเบสที่ 2087 ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่า มีความเหมือน 26.7 % ดังภาพที่ 16

การนำลำดับเบสของ SBE I 15 จากเบสที่ 1 ถึง เบสที่ 897 เทียบกับ SBE I ของ Salehuzzaman (1992) จากเบสที่ 1265 ถึงเบสที่ 1931 ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่า มีความเหมือน 26.4 % ดังภาพที่ 17

การนำลำดับเบสของ SBE II 12 จากเบสที่ 1 ถึง เบสที่ 867 เทียบกับ SBE II ในฐานข้อมูล GenBank (X77012) จากเบสที่ 266 ถึงเบสที่ 1051 ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่า มีความเหมือน 94.52 % ดังภาพที่ 18

		10	20	30	40	50	
AGPase 9	1	TGGGCCGATC	CCAGGTCAGG	CTTCCCNAGG	CGCGGGGAAT	TCGATCCGCA	50
Muyikwa,2001	1	-CAAT---TC	TTTGAATTC--	TTGCTGGCCA	TC-----AT	TTATACCGCCA	50
		60	70	80	90	100	
AGPase 9	51	TGGATTATGA	AAGGTTTATT	CAAGCACACA	--GAGAAACT	GATGCAGATA	100
Muyikwa,2001	51	TGGATTATGA	A-GGTTTATT	CAAGCACACA	CAGAGAAACT	GATGCAGATA	100
		110	120	130	140	150	
AGPase 9	101	TATCAGTAGC	TGCTCTACCA	ATGGATGAAA	AACGTGCAAC	AGCCTTTGGT	150
Muyikwa,2001	101	TATACGTAGC	TGCT-TACCA	ATGGATGAAA	AACGTGCAAC	AGCCTTTGGT	150
		160	170	180	190	200	
AGPase 9	151	CT--GATGAA	AATTGATGAA	GAAGGGCGCA	TAATTGAATT	TGCTGAGAAG	200
Muyikwa,2001	151	CTCTGATGAA	AATTGATGAA	GAAGGGCGCA	TAATTGAATT	TGCTGAGAAG	200
		210	220	230	240	250	
AGPase 9	201	CCAAAAGGGG	AGCAATTGAA	AGCTATGAAG	GTTGATACTA	CAATTCATAGG	250
Muyikwa,2001	201	CCAAAAGGGG	GACAAATGAA	AGCTATGAAG	GTTGATACT-	CAATTCATAGG	250
		260	270	280	290	300	
AGPase 9	251	-TCTTGATGA	TGAGAGAGCA	AAGAGTTGC	CTTTTA-ATG	CTAGTATGGC	300
Muyikwa,2001	251	GTCTTGATGA	TGAGAGAGCA	AAGAGTTGC	CTTTTAATG	CTAGTATGGG	300
		310	320	330	340	350	
AGPase 9	301	GATATATGTC	GTCAGCAAAA	ATGTGATGTT	AGATCTTCTA	AGAGATAAGT	350
Muyikwa,2001	301	GATATATGTC	GTCAGCAAAA	ATGTGATGTT	AGATCTTCTA	AGAGATAAGT	350
		360	370	380	390	400	
AGPase 9	351	TTCCCTGGAGC	CAATGATTTT	GGAAGTGAAG	TTATTCCTGG	TGCTACATCC	400
Muyikwa,2001	351	TTCCCTGGAGC	CAATGATTTT	GGAAGTGAAG	TTATTCCTGG	TGCTACTTCC	400
		410	420	430	440	450	
AGPase 9	401	ATTGGGATGA	GAGTGCAAAGC	AATCACTAGT	GAATTCGCGG	GCCGCTGCTG	450
Muyikwa,2001	401	ATTGGGATGA	GAGTGCAAAGC	--TTACTTAT	A---TGATGG	GTAATCGGGA	450
		460	470	480	490	500	
AGPase 9	451	GTCGACCATA	TGGGGAGAGCT	CCCAACCCGT	TGGATGCATA	GCTTGAGTAT	500
Muyikwa,2001	451	G-----ATA	TGGGA-----	---CAATG---	-----	-----AGCCT	500
		510	520	530	540	550	
AGPase 9	501	TCTATGCTCT	CAACCTAAATA	GCTTGGCGTA	ATCATGGTCA	TAGCTGTGTT	550
Muyikwa,2001	501	A-TACTATGC	CA-----	-----	ATC-----	-----	550
		560	570	580	590	600	
AGPase 9	551	TCCGGAA...	600
Muyikwa,2001	551	-----	600

ภาพที่ 14 เปรียบเทียบลำดับเบสของ AGPase9 กับ AGPase small subunit (Muyikwa, 2001)

		10	20	30	40	50	
X74160	1	ATCAAATCTG	CACTCCACCA	CAACCACCAG	CGGATCCAT	TTTGGCCTA	50
GBSS I 13	1	G-----CTG	-----	-----	-----GATC	-----	50
		60	70	80	90	100	
X74160	51	AGCTTCTACA	CCGGAGAGAG	CACCATGGCA	ACTGTAATAG	CTGCACATTT	100
GBSS I 13	51	-----	-----	-----	-----G	CTGCT-ATC	100
		110	120	130	140	150	
X74160	101	CGTTTCAGG	AGCTACACT	TGAGCATCCA	TGCATTAGAG	ACTAAGGCTA	150
GBSS I 13	101	AGNCCGAGG	ATTCG---	-----	---ATTG---	-----	150
		160	170	180	190	200	
X74160	151	ATAATTTGTC	TCACACTGGG	GCCTGGACCC	AAACTATCAC	TCCCAATGGT	200
GBSS I 13	151	-----	---GGG---	CT-----	-----	-----	200
		210	220	230	240	250	
X74160	201	TTAAGGTCCC	TCAACACTAT	GGATAAACTC	CAAATGAAGA	CACAATCAAA	250
GBSS I 13	201	-----	-----	-----	-----	-----	250
		260	270	280	290	300	
X74160	251	AGCTGTGAAA	AAGGTCTCTG	CCACCGCAA	TGGTAGGCCT	GCTGCATAAA	300
GBSS I 13	251	-----	-----	-----	---GGT---	---AAA---	300
		310	320	330	340	350	
X74160	301	TATTGTGG	TCAATGGATG	AATTTAATCT	TTGTTGGAGC	TGAAGTTGGT	350
GBSS I 13	301	CTG-----	---GTTG---	-----	-----	-----	350
		360	370	380	390	400	
X74160	351	CCCTGGAGCA	AAACTGGTGG	ACTTGGTGAT	GTCTTTGGAG	GACTGCCCCG	400
GBSS I 13	351	---CTGGT---	AAACTGGTGG	ACTTGGTGAT	GTCTTTGGAG	GACTGCCCCG	400
		410	420	430	440	450	
X74160	401	TGCCATGGCC	GCAAGAGGGG	ACCGGCTCAT	GACAGTGTCT	CCCGGCTATG	450
GBSS I 13	401	TGCCATGGCC	GCAAGAGGGG	ACCGGCTCAT	GACAGTGTCT	CCCGGCTATG	450
		460	470	480	490	500	
X74160	451	ACCAGTACAA	GGATGCTTGG	GATACCTCTG	TATCGGTGGG	GATTAATAAT	500
GBSS I 13	451	ACCAGTACAA	GGATGCTTGG	GATACCTCTG	TATCGGTGGG	GATTAATAAT	500
		510	520	530	540	550	
X74160	501	GGAGATAGAA	TGAAACTGT	CCGTTCTTTC	CACTCCTACA	AAAGAGGAGT	550
GBSS I 13	501	GGAGATAGAA	TGAAACTGT	CCGTTCTTTC	CACTCCTACA	AAAGAGGAGT	550
		560	570	580	590	600	
X74160	551	TGATGGGGTC	TTCGTGGATC	ATCCAATGTT	CTTGAGAAG	GTATGGGGCA	600
GBSS I 13	551	TGATGGGGTC	TTCGTGGATC	ATCCAATGTT	CTTGAGAAG	GTATGGGGCA	600
		610	620	630	640	650	
X74160	601	AAACTGGATC	TAAAATATAT	GGCCCAAGAG	TAGGTTTGGG	TTACCAGGAG	650
GBSS I 13	601	AAACTGGATC	TAAAATATAT	GGCCCAAGAG	TAGGTTTGGG	TTACCAGGAG	650
		660	670	680	690	700	
X74160	651	AACCAACTGC	GATTTAGCTT	GTATGCTTT	GCTGCTCTGC	AGGCACCGAG	700
GBSS I 13	651	AACCAACTGC	GATTTAGCTT	GTATGCTTT	GCTGCTCTGC	AGGCACCGAG	700
		710	720	730	740	750	
X74160	701	AGTTCTGAAC	TTGAACAGCA	GCAAAAATTT	CTCAGGACCC	TACGGAGAAG	750
GBSS I 13	701	AGTTCTGAAC	TTGAACAGCA	GCAAAAATTT	CTCAGGACCC	TACGGAGAAG	750
		760	770	780	790	800	
X74160	751	AGTTTGGCTT	GATTTGCCAC	GACTGGCACT	CTGCTCTGCT	TCCATGTTAT	800
GBSS I 13	751	AGTTTGGCTT	GATTTGCCAC	GACTGGCACT	CTGCTCTGCT	TCCATGTTAT	800
		810	820	830	840	850	
X74160	801	CTAAAAGCCG	TTTACCAACC	TATGGGGATT	TACAACACG	CTAAGGTTGC	850
GBSS I 13	801	CTAAAAGCCG	TTTACCAACC	TATGGGGATT	TACAACACG	CTAAGGTTGC	850

ภาพที่ 15 เปรียบเทียบลำดับเบสของ GBSS I 13 กับ GBSS I (X74160)

		860	870	880	890	900		
X74160		851	CTTTGCATC	CACAACATTG	CATATCAGGG	AAGATTGGC	TTCTCAGCT	900
GBSS I 13		851	CTTTGCATC	CACAACATTG	CATATCAGGG	AAGATTGGC	TTCTCAGCT	900
		910	920	930	940	950		
X74160		901	TCCCACGACT	TAATCTGCCA	GATAAATTCA	AAAGCTCTTT	TGACTTTATC	950
GBSS I 13		901	TCCCACGACT	TAATCTGCCA	AATAAATTCA	AAAGCTCTTT	TGACTTTATC	950
		960	970	980	990	1000		
X74160		951	GATGGGTATG	AGAAGCCCGT	GAAGGGAAGG	AAAATCAATT	GGATGAAGGC	1000
GBSS I 13		951	GATGGGTATG	AGAAGCC-GT	GAAGGGAAGG	AAAATCAATT	GGATGAAGGC	1000
		1010	1020	1030	1040	1050		
X74160		1001	G-GGGATATT	GGAATCAGAC	AGGGTTTGA	CTGTGAGCC	ATAAATAGCC	1050
GBSS I 13		1001	GCGGGATATT	GGAATCAGAC	AGGGTTTGA	CT-TA---CC	ATAAATAGCC	1050
		1060	1070	1080	1090	1100		
X74160		1051	CAAGAGTCA	TCCTCTGGAGT	TGAAGAGGC	GTCGAGCTGG	ATAACTTCAT	1100
GBSS I 13		1051	-CAAAATCA	TCCTCTGGAGT	TAAAAAGCT	CATG-----	---AACTTC-T	1100
		1110	1120	1130	1140	1150		
X74160		1101	TGTAATACT	GGCATTGCTG	GTATTATAA	TGGCATGGAC	GTCCAGGAGT	1150
GBSS I 13		1101	TCNTAAN-T	GGGATTGCTG	GT-----TAAA	TGG--TGGAC	-CCAGGAG-	1150
		1160	1170	1180	1190	1200		
X74160		1151	GGATTCCTGT	TACAGATAAA	TACATTGACA	TCCACTACGA	TGCCACAAC	1200
GBSS I 13		1151	GGAA-CCTGT	TACA-----	-----	-----	-----	1200
		1210	1220	1230	1240	1250		
X74160		1201	GTTATGGACG	CAAAACCTTT	GTTGAAGGAA	GCCCTTCAAG	CAGAAGTCGG	1250
GBSS I 13		1201	-----	-----	-----	-----	-----	1250
		1260	1270	1280	1290	1300		
X74160		1251	ATTGCCCTGTT	GATAGGAATG	TTCCTTTGAT	AGGCTTCATT	GGTAGATTAG	1300
GBSS I 13		1251	-----	-----	-----	-----	-----	1300
		1310	1320	1330	1340	1350		
X74160		1301	AAGAGCAGAA	GGGTTCCAGAT	ATTTTTGTTG	CAGCTATTTC	CCAATTGGTT	1350
GBSS I 13		1301	-----	-----	-----	-----	-----	1350
		1360	1370	1380	1390	1400		
X74160		1351	GAACACAATG	TGCAGATAGT	AATCCTTGA	ACTGGCAAAA	AGAAATTTC	1400
GBSS I 13		1351	-----	-----	-----	---AA	AAAACCTTGA	1400
		1410	1420	1430	1440	1450		
X74160		1401	GAAGCAGATT	GAGCATCTGG	AGGTTTGTGTA	CCCTGACAAG	GCAAGAGGAG	1450
GBSS I 13		1401	-----	-----	-----	CC	-----	1450
		1460	1470	1480	1490	1500		
X74160		1451	TTGCAAAATT	CAATGTGCCG	TTGGCGCACA	TGATCACAGC	TGGTGCTGAC	1500
GBSS I 13		1451	-----	-----	-----	-----	-----	1500
		1510	1520	1530	1540	1550		
X74160		1501	TTTATGCTGG	TTCCAAGTAG	ATTTGAGCCC	TGTGGTCTCA	TTCAGTTGCA	1550
GBSS I 13		1501	-----	-----	-----	-----	-----	1550
		1560	1570	1580	1590	1600		
X74160		1551	TGCTATGCGA	TATGGAACAG	TTCCATTGT	TGCTTCTACT	GGTGGTCTTG	1600
GBSS I 13		1551	-----	-----	-----	-----	-----	1600
		1610	1620	1630	1640	1650		
X74160		1601	TTGATACTGT	TAAAGAAGGT	TACACAGGAT	TCCAAATGGG	GGCCTTGAT	1650
GBSS I 13		1601	-----	-----	-----	-----	-----	1650

ภาพที่ 15 (ต่อ)

X74160	1651	GTTGAATGTG	ACAAAATTGA	TTCAGCAGAT	GTAGCTGCCA	TAGTTAAAAC	1700
GBSS I 13	1651	-----	-----	-----	-----	-----	1700
		1710	1720	1730	1740	1750	
X74160	1701	TGTGGCAAGA	GCTCTTGGCA	CTTATGCTAC	CGCTGCATTA	AGAGAAATGA	1750
GBSS I 13	1701	-----	-----	-----	-----	-----	1750
		1760	1770	1780	1790	1800	
X74160	1751	TCCTGAATTG	CATGGCCCAA	GACTTGTCAT	GGAAGGGACC	AGCCAGAATG	1800
GBSS I 13	1751	-----	-----	-----	-----	-----	1800
		1810	1820	1830	1840	1850	
X74160	1801	TGGGAGAAAA	TGCTCCTGGA	CCTGGAAGTT	ACTGGCAGCG	AACCTGGCAC	1850
GBSS I 13	1801	-----	-----	-----	-----	-----	1850
		1860	1870	1880	1890	1900	
X74160	1851	TGAAGGGGAG	GAGATCGCTC	CTCTTGCTAA	GGAGAACGTT	CCCACGCCTT	1900
GBSS I 13	1851	-----	-----	-----	-----	-----	1900
		1910	1920	1930	1940	1950	
X74160	1901	GAGCAGCAAG	GATAATATTA	ATCTTGACGG	TGTAGAAAATA	TTGACATTTA	1950
GBSS I 13	1901	-----	-----	-----	-----	-----	1950
		1960	1970	1980	1990	2000	
X74160	1951	TGGATATACG	TTAACGCGCA	GATAAATATC	CATTCCAGTA	GGCTAGTCTG	2000
GBSS I 13	1951	-----	-----	-----	-----	-----	2000
		2010	2020	2030	2040	2050	
X74160	2001	CTGGGATCAA	AGGCACCCCT	TGTTTTTCTA	TTCCAACGGC	CATGATTCTT	2050
GBSS I 13	2001	-----	-----	-----	-----	-----	2050
		2060	2070	2080	2090	2100	
X74160	2051	TTGTGAAGGG	TGAATGGTGT	CTGAATCAGT	GTTAAAGAGA	ATTTACAAC	2100
GBSS I 13	2051	-----	-----	-----	-----	-----	2100
		2110	2120	2130	2140	2150	
X74160	2101	AACGTATTAC	AGCCTTTGCC	TGGCGTTATG	TGCGTAAATA	AAGGTTTCATC	2150
GBSS I 13	2101	-----	-----	-----	-----	-----	2150
		2160	2170	2180	2190	2200	
X74160	2151	TTCTGACAAA	AAAAAAAAA.	2200
GBSS I 13	2151	-----	-----	2200

ภาพที่ 15 (ต่อ)

		10	20	30	40	50	
AF173900	1	GTTTGATGAA	CCCCATCTCA	AGCTGTTGGG	GCTGTGCGAC	TTGTGAGAA	50
GBSS II 7	1	CT-----	CCCCAT	-----	-----	-----	50
		60	70	80	90	100	
AF173900	51	TGGCATTAT	AGGATCACTT	CCTTTTCTTA	TCCAAACCA	AGCAAAAAGT	100
GBSS II 7	51	TGG-----	---TCG---	---CTG---	C-----	GGGGC---	100
		110	120	130	140	150	
AF173900	101	TCTGTCCTTC	TCCATCCAA	AAACCTACAG	CGATCCAGT	TCTTCGTTTT	150
GBSS II 7	101	-----	CCGCCA	-----	---AT	TCAC---	150
		160	170	180	190	200	
AF173900	151	CCCATGTAGA	TCACAAAAC	CTTTTAAATTT	ACCCCTTTCG	TATCTTTGA	200
GBSS II 7	151	-----	TAG---	---TCATTT	---CTGCATCG	---	200
		210	220	230	240	250	
AF173900	201	GTTTAAAGCC	TGTAAGAGCT	ACAGGTAAGG	AAGGCCTTTC	TGGTGTATGGG	250
GBSS II 7	201	-----	-----	-----	---AG	TCG---ATG---	250
		260	270	280	290	300	
AF173900	251	TCAAGAGATA	CACCTCAAGC	CACCCCTCGAG	AAAAGCAAGA	AAGTTCTCGC	300
GBSS II 7	251	TCA---ATG	TCTTT---	---ATG---	---	---	300
		310	320	330	340	350	
AF173900	301	CTTGCATAGC	GACCTACTTC	TGAAGATTGC	TGAAAGAAGG	AAATTGGTTT	350
GBSS II 7	301	--TGTATCAG	GA---TTCG	---	---	---	350
		360	370	380	390	400	
AF173900	351	CTTCTATACA	AAGTAGTGT	GTGACCCCGC	ACCCAAACAA	AACTTCTCAT	400
GBSS II 7	351	CTCCG---	-----	GACCTCCCTC	CC-----	-----	400
		410	420	430	440	450	
AF173900	401	GAACAGAGGG	AAAACCTTTT	GGCAAATTCA	GATAAATATT	CAACTAGTGA	450
GBSS II 7	401	-----	TTT-----	-----	ATAAATAG	-----	450
		460	470	480	490	500	
AF173900	451	TGTGAATATG	CACCAAACAGC	AFAATCGCCG	AGTTCTTCCG	AGTAGCTTTC	500
GBSS II 7	451	-----	---CAGC	AA---TC---CG	AGTT---TAGG	TAAG---TAG	500
		510	520	530	540	550	
AF173900	501	TCCATTCCAA	TGCAGATGAG	GATCAGAAA	CTGCATCTTC	AGCTATTAAT	550
GBSS II 7	501	---TACCCAG	---CAGC	CCCTC---	-----TCTC	TAAT---	550
		560	570	580	590	600	
AF173900	551	AGAGGTCATG	CTAAGATCTA	TAAGGAACCT	GAACAACATG	CATCTCCCTAG	600
GBSS II 7	551	-----	CTCAGATGA	-----	-----	---CTTCTTC	600
		610	620	630	640	650	
AF173900	601	AAACGCCCTT	GTTAAGAATT	CTACCAAAC	GTAAAGAG	ATGGATCTTG	650
GBSS II 7	601	GGCA-----	-----	---TC	GT-----	ATGGGCTC---	650
		660	670	680	690	700	
AF173900	651	AGAAACTACA	GACAGCTGAG	ATACCTTTT	TCTTTCAAAA	CACCACAGAT	700
GBSS II 7	651	-----	ACGCTCAAG	-----ACCT	CTCT-----	---GAT---	700
		710	720	730	740	750	
AF173900	701	ATTTCCACTA	TAAATGAAGA	AAATAGTGAA	CAATTAAATG	AATTAACCTC	750
GBSS II 7	701	---TTCCA	-----	---	TTTCT---	---GGGCTT	750
		760	770	780	790	800	
AF173900	751	ACCTATGGTC	GACATTTTTC	AATGCTGATC	TATGACTGAA	GACATGAGC	800
GBSS II 7	751	-----	---CATCC---	---ATGATTT	---	-----	800
		810	820	830	840	850	
AF173900	801	CACTCTTTT	GGCTGGGGAC	AATGCTCTCA	ATGTTAATTT	GGTAGTGCA	850
GBSS II 7	801	--CTTCCCT	-----	---TCCTCG	GC---TTCT	CAATCCATC	850

ภาพที่ 16 เปรียบเทียบลำดับเบสของ GBSS II 7 กับ GBSS II (AF173900)

	860	870	880	890	900		
AF173900	851	CAATGTGCTC	CATGCTCCAA	ACACAGGTGG	CTTGGTGATG	TCGCCTGGATC	900
GBSS II 7	851	CA-----	TAAAGTCAAA	AG-----AGC	TTT-----	TCAG---	900
	910	920	930	940	950		
AF173900	901	TTTACCAAAG	GCTTTGGCTC	GGCGTGGAC	TCGGGTATG	GTCTGGCCAC	950
GBSS II 7	901	TTTATC-----	-----T	GGCA-GATT	-----A	GTCTGG---	950
	960	970	980	990	1000		
AF173900	951	CGCGATATGG	CAACTATGTT	GAACCTCAGG	ATACTCCGCT	CCGTAAGAGG	1000
GBSS II 7	951	-----	-----	-----	-----	-----	1000
	1010	1020	1030	1040	1050		
AF173900	1001	TATAAGGTGG	ATGGTCAGGA	TTTTGAAGTA	TCATACTTC	AAGCCTTCAT	1050
GBSS II 7	1001	-----	-----	-----	-----	-----	1050
	1060	1070	1080	1090	1100		
AF173900	1051	TGATGGGGTT	GATTTTGTAT	TCATTGACAG	TCCTATGTTT	CGCCACATAG	1100
GBSS II 7	1051	TGAT-----	-----	-----	-----	-----	1100
	1110	1120	1130	1140	1150		
AF173900	1101	GCATGATAT	ATATGGAGGA	AACAGAATGG	ATATTTTAA	GAGGATGGTA	1150
GBSS II 7	1101	---GATGTTG	-----	---GG	ATGCA---AAA	C-----	1150
	1160	1170	1180	1190	1200		
AF173900	1151	TTATTTTGA	AGCTGCTGT	TGAGGTTGCT	TGGGATGTC	CATGTTGGTG	1200
GBSS II 7	1151	-----GCA	A-----	-----GCT	TGGCGTGT	---TGTA	1200
	1210	1220	1230	1240	1250		
AF173900	1201	AGCTGCTAT	GGGATGGAA	ATTGGCTTT	CATTGCAAA	GATGGCTTA	1250
GBSS II 7	1201	AAATCC-GCAT	AGG-----	TTGGT---	AAAT	GGCTTTTCA	1250
	1260	1270	1280	1290	1300		
AF173900	1251	CGCCATGTT	GCCAGTGAT	CTGAGGGCT	TTATCGGGA	TAATGGTTTA	1300
GBSS II 7	1251	TAACAT-----	-----	---GGTAGCG	A-----	-----	1300
	1310	1320	1330	1340	1350		
AF173900	1301	ATGCAATATA	CAAGATCTGT	TCTTGAATT	CATAACATAG	CTCACCAGGC	1350
GBSS II 7	1301	---GACGTTG	CCAG-TC---	-----	-----	-----	1350
	1360	1370	1380	1390	1400		
AF173900	1351	TCCGGGTCCT	AGTGCACATT	TCTCTTACGT	GGGTCTACCA	GAACATTACA	1400
GBSS II 7	1351	TTGG-----	---ATGAGGC-	-----	-----	-----	1400
	1410	1420	1430	1440	1450		
AF173900	1401	TTGATCTCTT	CAAACTGCAT	GATCCGATTG	GTGGTGACCA	CTTCAATATC	1450
GBSS II 7	1401	--AACTCTT	C-----	---TCCG---	---TAG---	-----	1450
	1460	1470	1480	1490	1500		
AF173900	1451	TTTGCACCTE	GTCTTAAGST	GGCAGATCGT	GTGGTTAATG	TAGTCTTGG	1500
GBSS II 7	1451	-----G	GTCTTAG-	---AAAT---	---TTTGTG	CGTTC---	1500
	1510	1520	1530	1540	1550		
AF173900	1501	ATACGCCTGG	GACCTTAAG	GATCTGAAGG	TGGTGGGCT	GTTCACAATA	1550
GBSS II 7	1501	-----	---GCTTCAGAA	C-TCT---	CGGT-----	CTCC-----	1550
	1560	1570	1580	1590	1600		
AF173900	1551	TCATAAATGA	CAACCCTG	AAATTGACG	GCATGTTLA	TGGCATTGAT	1600
GBSS II 7	1551	-----TGA	GCA-----	---GCCAG	GCAT---	AA CAAG---	1600
	1610	1620	1630	1640	1650		
AF173900	1601	GCAAAAGAA	GGAATCAGA	GTTGATATT	CAACTGACAT	CAGATGGTTA	1650
GBSS II 7	1601	---GAAA-----	---TGGCA	GTT-----	-----	-----GGTTG	1650

ภาพที่ 16 (ต่อ)

AF173900	1651	GA	CTAA	CT	T	CCTGG	AAA	CA	CTTGA	TAC	TGG	CAAG	CCT	CAG	GC	AAGA	1700	
GBSS II 7	1651	TC	CTGG	TAT	CC	-----	AAA	C	-----	CTGC	TCT	TGG	---	CCC	---	AATA	1700	
						1710											1750	
AF173900	1701	CAG	CC	TTAC	GA	ACGAG	CTC	GG	TTG	GCCA	TC	CCCC	CAGA	TGT	CC	CTGT	1750	
GBSS II 7	1701	-----	TTT	GA	-----	TC	CA	TTT	-----	TG	CCCC	---	A	TAC	-----	AT	1750	
						1760											1800	
AF173900	1751	A	TGG	TTCA	TTG	GA	AGG	TT	GGAT	TATCAG	AA	CC	TGT	CG	ATC	TCATAGC	1800	
GBSS II 7	1751	CT	CAAG	-----	---	GAA	CAT	GGAT	GATC	CA	CG	AA	AC	CG	ATC	-----	1800	
						1810											1850	
AF173900	1801	TG	AGG	CAAT	CC	CTGG	TGG	GGT	CAGGA	TGT	GCA	ACTA	GTA	AA	CT	TGG	1850	
GBSS II 7	1801	-----	CA	CTC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1850	
						1860											1900	
AF173900	1851	GT	AC	GGC	AC	AAG	ACT	TC	GA	AG	ATC	TTA	GAC	CAAT	TG	AAAC	AAA	1900
GBSS II 7	1851	---	AG	GAG	-----	TC	GA	GA	AA	CC	---	GAC	CA	CT	---	---	AAA	1900
						1910											1950	
AF173900	1901	CAT	AG	AGATA	AAG	TG	AGGG	ATGG	GTGGT	TTT	CTC	GGA	AGAC	AG	CTGA		1950	
GBSS II 7	1901	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CTC	AT	---	---	CTC		1950	
						1960											2000	
AF173900	1951	CA	GG	ATACT	GCT	GGT	GCAG	ATA	TTT	GCT	CA	GC	CTGA	TG	ATT	TGAC	2000	
GBSS II 7	1951	CA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TTT	---	AT	CC	CC	CG	---	---	2000	
						2010											2050	
AF173900	2001	CAT	GTGG	CT	AA	ACC	AGTTA	TAT	GCT	TATGA	TGT	AC	GGC	GC	GAT	CC	TGT	2050
GBSS II 7	2001	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	CA	AA	AG	GT	CC	---	2050
						2060											2100	
AF173900	2051	CT	CA	AG	CTG	TGG	GTGG	ACT	AAGG	GACAG	GTG	CA	ACC	CT	TC	CA	CT	2100
GBSS II 7	2051	CT	CA	AG	CTC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2100
						2110											2150	
AF173900	2101	TA	ATG	AGT	CG	GG	CTT	GGT	GG	CA	TATGA	TAG	CG	GAA	TC	CA	TAAA	2150
GBSS II 7	2101	-----	AN	CG	---	GG	AN	AA	AG	---	---	---	---	---	---	---	---	2150
						2160											2200	
AF173900	2151	TG	TA	CA	TGC	ATT	AG	CAAT	TG	TTG	CTCA	CTT	ACC	GAGA	GT	CA	AAGA	2200
GBSS II 7	2151	TG	AC	N	---	---	GG	NG	NC	CT	---	---	---	---	---	---	---	2200
						2210											2250	
AF173900	2201	A	GG	TGG	AAG	G	CTC	AG	AA	AGG	ATG	ACT	CC	AA	CC	TC	AG	2250
GBSS II 7	2201	G	CC	-----	---	CTC	GG	GA	---	---	---	CNC	CC	AA	---	---	---	2250
						2260											2300	
AF173900	2251	CC	TGC	CGT	G	GAA	TATG	AGG	AGA	TCT	TG	TT	GC	AG	CC	AG	TCC	2300
GBSS II 7	2251	---	AN	T	NC	CA	ANN	CC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2300
						2310											2350	
AF173900	2301	GG	TG	AG	CAAT	AG	TGC	TTT	CT	TA	ATTTT	GA	TTTT	TTTT	TT	TC	GT	2350
GBSS II 7	2301	-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2350
						2360											2400	
AF173900	2351	AT	TA	AG	CTT	CA	AG	CTT	CC	CT	GATG	CT	AG	TA	AGG	GG	CA	2400
GBSS II 7	2351	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2400
						2410											2450	
AF173900	2401	TG	CC	ATG	TGA	TG	TTCT	GCTA	TAT	AG	CTCA	TGT	G	TA	ATCA	GCT	TAG	2450
GBSS II 7	2401	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2450
						2460											2500	
AF173900	2451	AT	GAT	CAG	AG	TTG	TAAT	CT	TT	CT	GTT	TT	AT	CA	CA	TT	AG	2500
GBSS II 7	2451	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2500

ภาพที่ 16 (ต่อ)

```

AF173900      2501 ATGGTTTGGG TGTGATGAGT GGTGACCCAT GTTTTATCCT TGTGCTTATT      2550
GBSS II 7      2501 -----
                2560      2570      2580      2590      2600

AF173900      2551 CTGTTATCTG AAAAAA... AAAAA... .. 2600
GBSS II 7      2551 -----C AAAAA... NTNNC... .. 2600
    
```

ภาพที่ 16 (ต่อ)

Salehuzzaman,1992 SBE I 15	1 TTATAATTG TTTGGGAGA GAGAAATAAG AACGATTGGC TAAGTGGC	50
	1 C-----CACC AAT-----GGT	50
	60 70 80 90 100	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	51 ATGATGTTAG GTTCTTTGGG TTTCTTTCC GGCCTGATT TTGGGCTTT	100
	51 G-----CCTC---AG GGC	100
	110 120 130 140 150	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	101 ATCACCTTCT TTAATAAAT CCAAAAG GGCTGTGGAA AGAAAGTC	150
	101 -----GGCCTT-----AGT	150
	160 170 180 190 200	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	151 AATAAGCAA ACAAACCAG ATTGAACTGA CTCATGGG AAAATGGCC	200
	151 GATGGG-----GGCAAG	200
	210 220 230 240 250	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	201 GGTGGTCTTA GATCCCTTTT TCTACCAAGA ATCCTTAG AAGAGGGT	250
	201 AATGG-----AGGCTAGT	250
	260 270 280 290 300	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	251 GAAGCAAGGT CAGCAAGG CAGCAGCTGT GGCAGATGAG AAGAAAACGA	300
	251 -----G	300
	310 320 330 340 350	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	301 TTTTAACTT TGAGGAGGA TTGAAATTA CTGGTTT TAGATG	350
	301 TAAAGGAAATC-----CCGAGGCTCC	350
	360 370 380 390 400	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	351 CCTGGGTTAG AATATTTAA AGATCTTT ATATATAG TCAATAA	400
	351 -----GCATTTT-----AC-----CCCT	400
	410 420 430 440 450	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	401 TAAACAG AACAACACTCA TTGAAAATA TGAAGTGGT CTTGAGGAAT	450
	401 TATGAAAT-----	450
	460 470 480 490 500	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	451 TTTCAAAG TTTCTGAAA TTTGATTTA ATAGGGAAGC AGGTGGAATT	500
	451 -----GAAATTTCTGCTCA-----	500
	510 520 530 540 550	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	501 GTCTATCTG AGTGGGCTC TGGGCTAG AGCACAAG TTATTGGG	550
	501 -----C-----TTTAAACA GAT-----	550
	560 570 580 590 600	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	551 TTTAATGG TGGATTGGTT CCAACGAGG AAAAG AATGAATTTG	600
	551 TTTCT-----TGGG-----TAGTTGG	600
	610 620 630 640 650	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	601 GTGTTTGGAG TATCAACATA CCTGATTCTG GCGGAAATCC AATTCATCA	650
	601 -----G	650
	660 670 680 690 700	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	651 TTTAATCAA GGTAAATTT CAGATTCAAG CATGGTGATG GAGTTGGGT	700
	651 TTT-----TAAAT-----	700
	710 720 730 740 750	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	701 TGATCGAATT CCAGCTTGGG TTAGATATGC CACTGTGGG CACAAAAT	750
	701 -----GAG	750
	760 770 780 790 800	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	751 TTGGAGCACC ATATGATGG TTTACTGGG ATCCTCCACC TCCAGAAAG	800
	751 -----GATCT-----GAA	800
	810 820 830 840 850	
Salehuzzaman,1992 SBE I 15	801 TAAATCA ACTTCTC TTTCTAAA CCAGGCC CTCGCATATA	850
	801 TTT-----TCTTT-----T	850

ภาพที่ 17 เปรียบเทียบลำดับเบสของ SBE I 15 กับ SBE I (Salehuzzaman,1992)

Salehuzzaman,1992	851	TGAGGCTCAT	GTGGGAATGA	GTAGCTCAGA	ACCTCGCATT	AAACATACA	900
SBE I 15	851	-----	-----	-----	ATTGAT	-----	900
		910	920	930	940	950	
Salehuzzaman,1992	901	GAGAGTTTGG	AGATGATGTT	CACCCCGTA	TACGGGAAA	CAACTATAAT	950
SBE I 15	901	-----	-----	-----	-----	-----	950
		960	970	980	990	1000	
Salehuzzaman,1992	951	ACGGTTCAGT	TAATGGCTGT	TATGGAGCAT	TCATATTATG	GGTCGTTTGG	1000
SBE I 15	951	-----	-----	-----	-----	-----	1000
		1010	1020	1030	1040	1050	
Salehuzzaman,1992	1001	GTAACAGGTT	ACAAACTTTT	TTGCTGTAAG	CAGTAGATCT	GGAACCTCTG	1050
SBE I 15	1001	-----	-----	-----	-----	-----	1050
		1060	1070	1080	1090	1100	
Salehuzzaman,1992	1051	AGGATCTTAA	ATATTTAATT	GATBBAGCTC	ATAGCTTGGG	TTTACGTGTT	1100
SBE I 15	1051	-----	-----	-----	-----	-----	1100
		1110	1120	1130	1140	1150	
Salehuzzaman,1992	1101	CTGATGGATG	TTGTTCACAG	TCACGCAAGT	AACAATATCA	CTGATGGACT	1150
SBE I 15	1101	-----	-----	-----	-----	-----	1150
		1160	1170	1180	1190	1200	
Salehuzzaman,1992	1151	TAATGGCTTT	GATGTTGCC	AAAGCACGEE	CGTTCTTAC	TTTCACACTG	1200
SBE I 15	1151	-----	-----	-----	-----	-----	1200
		1210	1220	1230	1240	1250	
Salehuzzaman,1992	1201	GAGATCBBGG	CTACCATAAG	CTATGGGATA	GCAGACTCTT	TAACATGCT	1250
SBE I 15	1201	-----	-----	-----	-----	-----	1250
		1260	1270	1280	1290	1300	
Salehuzzaman,1992	1251	AATTGGGAAG	TTATTCGCTT	CGTTCTGTC	AACTTAAGAT	GGTGGCTTGA	1300
SBE I 15	1251	-----	-----	-----	-----	-----	1300
		1310	1320	1330	1340	1350	
Salehuzzaman,1992	1301	GGAGTACAAE	TTTATGATGG	TCCGATTGCA	CGTCTTACA	TCAATGTTGT	1350
SBE I 15	1301	-----	-----	-----	-----	-----	1350
		1360	1370	1380	1390	1400	
Salehuzzaman,1992	1351	ACCATCAEBA	TGGGATCAAC	ATGGCATTTA	CAGGGGATA	TAAAGATAT	1400
SBE I 15	1351	-----	-----	-----	-----	-----	1400
		1410	1420	1430	1440	1450	
Salehuzzaman,1992	1401	TTCAGTCEGG	BACTGATAT	TGATGCCGTT	GTTTCTGGA	TGCTGGCCAA	1450
SBE I 15	1401	-----	-----	-----	-----	-----	1450
		1460	1470	1480	1490	1500	
Salehuzzaman,1992	1451	TCTTCTGAT	CAAAATCT	TGCCATATC	TACTGATAT	CTGAAATG	1500
SBE I 15	1451	-----	-----	-----	-----	-----	1500
		1510	1520	1530	1540	1550	
Salehuzzaman,1992	1501	TTTCTGCGAT	CCCTGGGCT	GGCCGTTCTG	CTCTGAGGG	GGGAAATAGG	1550
SBE I 15	1501	-----	-----	-----	-----	-----	1550
		1560	1570	1580	1590	1600	
Salehuzzaman,1992	1551	TTTACTATC	GCCTAGCAAT	GGCCATCCCT	TACAAATGGA	TCGATTAATT	1600
SBE I 15	1551	-----	-----	-----	-----	-----	1600
		1610	1620	1630	1640	1650	
Salehuzzaman,1992	1601	GAAAAACAAG	AGTGTGAG	AGTGGTCAAT	GAAGGAAATC	TCTGGAGCT	1650
SBE I 15	1601	-----	-----	-----	-----	-----	1650
		1660	1670	1680	1690	1700	

ภาพที่ 17 (ต่อ)

Salehuzzaman,1992	1651	TAAC	TAAT	AG	GAG	ATA	CT	GA	AA	AG	GG	TTG	CTT	TAT	GC	TG	AG	AT	CAT	1700	
SBE I 15	1651	-----	-----	G	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1700	
		1710			1720			1730			1740			1750							
Salehuzzaman,1992	1701	GAC	CA	CA	TT	AG	GA	CA	CG	CA	GG	T	G	CT	TT	TA	TA	AT	GG	ATA	1750
SBE I 15	1701	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1750
		1760			1770			1780			1790			1800							
Salehuzzaman,1992	1751	CA	AA	TG	TAT	GA	AT	TT	GAC	AG	TC	CA	CT	AT	CT	TT	CA	CT	AT	CT	1800
SBE I 15	1751	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1800
		1810			1820			1830			1840			1850							
Salehuzzaman,1992	1801	AT	CG	CG	GG	AG	CG	CA	AG	AT	CA	1850									
SBE I 15	1801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1850
		1860			1870			1880			1890			1900							
Salehuzzaman,1992	1851	AG	GT	AA	GC	CA	AA	TT	TAT	GG	GA	AAT	GAG	TT	G	CC	AT	GC	AT	GC	1900
SBE I 15	1851	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1900
		1910			1920			1930			1940			1950							
Salehuzzaman,1992	1901	TC	GA	TT	CC	CA	AG	AAG	CA	AT	GG	GT	GG	AT	GG	AT	GG	AT	GG	AT	1950
SBE I 15	1901	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1950
		1960			1970			1980			1990			2000							
Salehuzzaman,1992	1951	GAC	GC	CA	AT	GA	AC	TA	GT	GAC	AA	GC	ACT	TG	AG	ATA	CA	AG	TC	AT	2000
SBE I 15	1951	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2000
		2010			2020			2030			2040			2050							
Salehuzzaman,1992	2001	AAT	CA	TT	AC	AG	GC	TAT	GA	AC	GC	TT	GAT	GAA	AG	AT	TCA	TT	CA	TT	2050
SBE I 15	2001	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2050
		2060			2070			2080			2090			2100							
Salehuzzaman,1992	2051	AT	CA	CA	AAG	CA	CA	TG	TG	AG	CA	CA	AT	GA	AG	GATA	AG	GITA			2100
SBE I 15	2051	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2100
		2110			2120			2130			2140			2150							
Salehuzzaman,1992	2101	TC	CT	TC	CA	GT	GG	CA	CG	TT	GG	TC	TC	CA	TC	CA	TC	CA	TC	CA	2150
SBE I 15	2101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2150
		2160			2170			2180			2190			2200							
Salehuzzaman,1992	2151	AAT	CA	TC	AT	GG	TACA	GG	TT	GG	TC	GA	TC	TC	CA	TC	CA	TC	CA	TC	2200
SBE I 15	2151	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2200
		2210			2220			2230			2240			2250							
Salehuzzaman,1992	2201	AG	TT	CA	AG	GAT	CT	GG	AG	TT	GG	TC	2250								
SBE I 15	2201	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2250
		2260			2270			2280			2290			2300							
Salehuzzaman,1992	2251	GA	TC	TC	GG	AT	TT	AC	AT	CT	CT	TC	GG	AT	AC	TC	GG	AT	AC	TC	2300
SBE I 15	2251	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2300
		2310			2320			2330			2340			2350							
Salehuzzaman,1992	2301	GAA	CA	AA	TC	AA	TC	TC	CA	AA	TC	TC	CA	AA	TC	TC	CA	AA	TC	TC	2350
SBE I 15	2301	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2350
		2360			2370			2380			2390			2400							
Salehuzzaman,1992	2351	TC	GC	CA	TC	TC	TA	AT	AT	TC	2400										
SBE I 15	2351	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2400
		2410			2420			2430			2440			2450							
Salehuzzaman,1992	2401	AC	AG	TA	TT	GG	TC	CA	AA	TG	GA	CA	TC	2450							
SBE I 15	2401	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2450
		2460			2470			2480			2490			2500							
Salehuzzaman,1992	2451	CT	GG	GA	TC	GA	TC	2500													
SBE I 15	2451	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2500

ภาพที่ 17 (ต่อ)

	2510	2520	2530	2540	2550		
Salehuzzaman,1992	2501	AAAGGAGGAG	GAATCTAAGG	AGGAGCAAG	TTCTTGATT	GCCGATCATA	2550
SBE I 15	2501	NAANNCAAG	GGTNCCC--	CAACA-ANCC	TT-----	-----GGNN	2550
	2560	2570	2580	2590	2600		
Salehuzzaman,1992	2551	TTTCAACAAA	GGGAAACACA	GAAACAGAAG	AGTTGAGGA	AGGACATCG	2600
SBE I 15	2551	TNC-----	GGCATA-----	-----	ANNCGSGA	AA-----	2600
	2610	2620	2630	2640	2650		
Salehuzzaman,1992	2601	GATGACAAAT	GAAAGTGACA	ATCCATCATC	CAATTGCTGA	GTTTACGGTAT	2650
SBE I 15	2601	-----	-----	-----	-----	-----	2650
	2660	2670	2680	2690	2700		
Salehuzzaman,1992	2651	AGATATGAGG	CTTATACAT	GGGAGTTCT	TTTTCAAGTT	TTAAATTCA	2700
SBE I 15	2651	GGCCCNNGG	NCC--CNTT	GGG-----	-----	TTGGGNN--G	2700
	2710	2720	2730	2740	2750		
Salehuzzaman,1992	2701	AGGGATTTT	GTATGGACAT	CTCAGTAGA	CTCAGTAGG	TATGCTGCTG	2750
SBE I 15	2701	GGGATTC--	-----	-----	-----	-----	2750
	2760	2770	2780	2790	2800		
Salehuzzaman,1992	2751	TAAATAAGTC	AGCTTGCTGT	TAAGTTATGC	TTTATTAT	TGTGGGGAG	2800
SBE I 15	2751	-----	-----	-----	-----	-----	2800
	2810	2820	2830	2840	2850		
Salehuzzaman,1992	2801	TTGCTTCTA	AATAAAAAAT	AAATAAAT	TTATTTAAAA	AAA.....	2850
SBE I 15	2801	-CNTTTGC-	-----	-----	-----	-----	2850

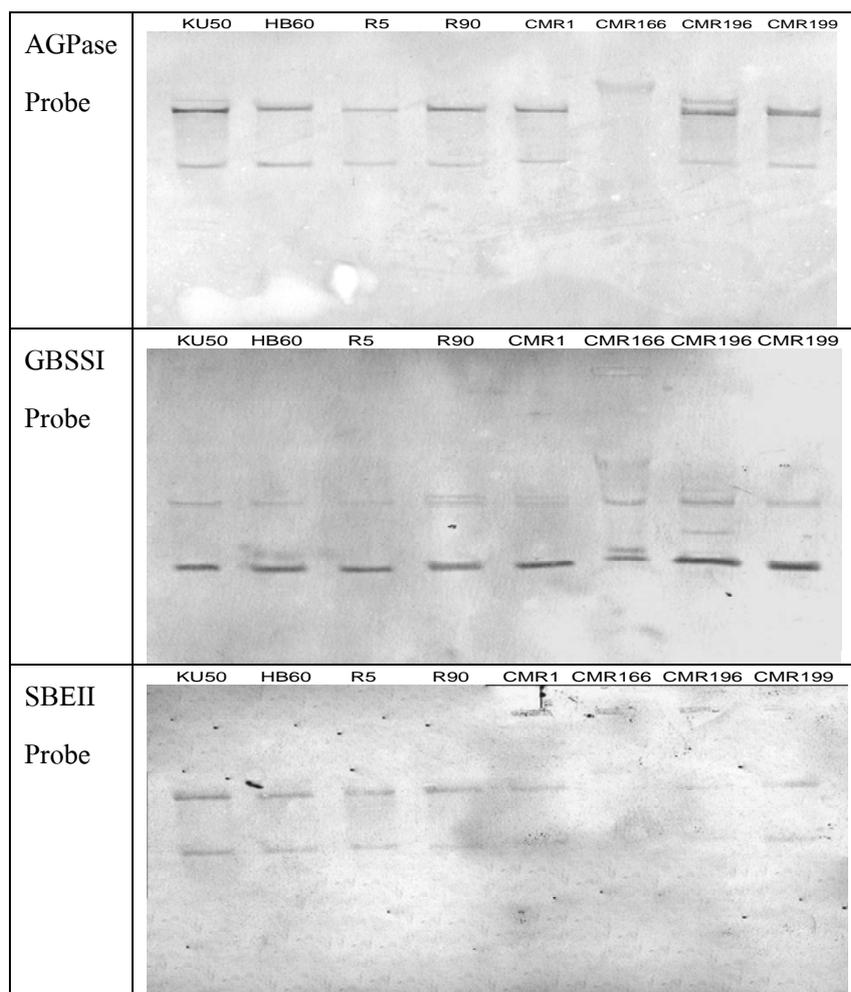
ภาพที่ 17 (ต่อ)

		10	20	30	40	50	
X 77012	1	ATGCTGTTGA	ATGATATGAT	TCATGGTCTC	TCCAGAGAG	GTGTCACCAT	50
SBE II 12	1	-----	-----	-----TCTC	C-----	-----	50
		60	70	80	90	100	
X 77012	51	TGTTGAAAT	GTTAGTTAGT	GGAATGCCAA	CAGTTTGCAT	TCCGGTTGAA	100
SBE II 12	51	---GTGGGA	-----	-----GG	-----	-----	100
		110	120	130	140	150	
X 77012	101	GATGGTGGTG	TTGGCTTTGA	TTATCGTCTC	TACTGGCTC	TTGTTTATAA	150
SBE II 12	101	-----	-----	-----TCTC	TACTGGCTC	AC-TTC	150
		160	170	180	190	200	
X 77012	151	ATGGGTGAG	ATTATTCCGA	AGAGAGATGA	AGATAGGAAA	ATGCTTAA	200
SBE II 12	151	-----	-----	-----	-----	-CAGGC	200
		210	220	230	240	250	
X 77012	201	TTGTACATAT	CTCCCTAC	AGCCGTGCT	TGAAAATGG	GTGACATTGT	250
SBE II 12	201	-----C	CCGATTAC	---TAGTGAT	TG-----	-----	250
		260	270	280	290	300	
X 77012	251	ACATATGCTG	ACCCAGCCCT	TGTTGGTGAC	AAAATTATTC	CATTTTGGCT	300
SBE II 12	251	-----	-----CCCT	TGTTGGTGAC	AAAATTATTC	CATTTTGGCT	300
		310	320	330	340	350	
X 77012	301	GATGAGACA	GATATGTA	GACTTCATGG	CTCTGACAG	ACCATCTACT	350
SBE II 12	301	GATGAGACA	GATATGTA	GACTTCATGG	CTCTGACAG	ACCATCTACT	350
		360	370	380	390	400	
X 77012	351	CTCTCATAG	ATCATGGAGT	AGCATTGCAG	AAAATGATCA	GGCTTATTAC	400
SBE II 12	351	CTCTCATAG	ATCATGGAGT	AGCATTGCAG	AAAATGATCA	GGCTTATTAC	400
		410	420	430	440	450	
X 77012	401	CATGGGATTA	GGCGGAGAAG	GATATTTGAA	TTTATGGGA	AATGAATTTG	450
SBE II 12	401	CATGGGATTA	GGCGGAGAAG	GATATTTGAA	TTTATGGGA	AATGAATTTG	450
		460	470	480	490	500	
X 77012	451	GACACCCCGA	GTGGATIGAT	TTTCCAAGAG	GTGATCTACA	TCITCCCAGT	500
SBE II 12	451	GACACCCCGA	GTGGATIGAT	TTTCCAAGAG	GTGATCTACA	TCITCCCAGT	500
		510	520	530	540	550	
X 77012	501	GGTAAATTTG	TTCCCTGGGA	CAATTACAGT	TATGATAAAT	GCCGGCGTAG	550
SBE II 12	501	GGTAAATTTG	TTCCCTGGGA	CAATTACAGT	TATGATAAAT	GCCGGCGTAG	550
		560	570	580	590	600	
X 77012	551	GTTTGATC	AGCAATTCAA	AGCGTCTGAG	ATATCATGGA	ATGCAAGAGT	600
SBE II 12	551	GTTTGATC	AGCAATTCAA	AGCGTCTGAG	ATATCATGGA	ATGCAAGAGT	600
		610	620	630	640	650	
X 77012	601	TTGATCAA	TTTCAGCAT	TTTGAAGAG	CTATGGTT	CAAGACTTCT	650
SBE II 12	601	TTGATCAA	AAATTCAGCAT	TTTGAAGAG	CTATGGTT	TCAGACTTCT	650
		660	670	680	690	700	
X 77012	651	GAGCACCAAT	ACATATCAGC	CAAGGATGAA	AGGGATCGGA	TCGATCATT	700
SBE II 12	651	GAGCACCAAT	ACATATCAGC	CAAGGATGAA	AGGGATCG	---GATCATT	700
		710	720	730	740	750	
X 77012	701	GTCTTCGAGA	GGGAAACCT	CGTTTSTA	TTCAATTTG	ATTGGACTAG	750
SBE II 12	701	GTCTTCGAGA	GGGAAACCT	CGTTTSTA	TTCAATTTG	ATTGGACTAG	750
		760	770	780	790	800	
X 77012	751	CAGCTATTCG	CATTACCGAG	TTGGCTGCTT	AAAGCCAGGA	AAGTACAAGA	800
SBE II 12	751	CAGCTATTCG	CATTACCGAG	TTGGCTGCTT	AAAGCCAGGA	AAGTACAAGA	800
		810	820	830	840	850	
X 77012	801	TAGTCTTGG	ATTCAGATGA	TCCTTTGTT	GGAGGCTTTG	GCAGGAGGC	850
SBE II 12	801	TAGTCTTGG	ATTCAGATGA	TCCTTTGTT	GGAGGCTTTG	GCAGG-----	850

ภาพที่ 18 เปรียบเทียบลำดับเบสของ SBE II 12 กับ SBE II (X77012)

3. การตรวจสอบยีน AGPase, GBSSI และ SBEII ใน genomic DNA ของมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ด้วยวิธี Southern blot

สกัด genomic DNA ด้วยวิธี Dellaporta (1983) 40 μ g. นำมาบ่ม ด้วย 20 U. *Eco*RI (20 U./ μ l.) run 100 โวลต์ 30 นาที นำมาทำ capillary blotting ตามวิธี Southern (1975)

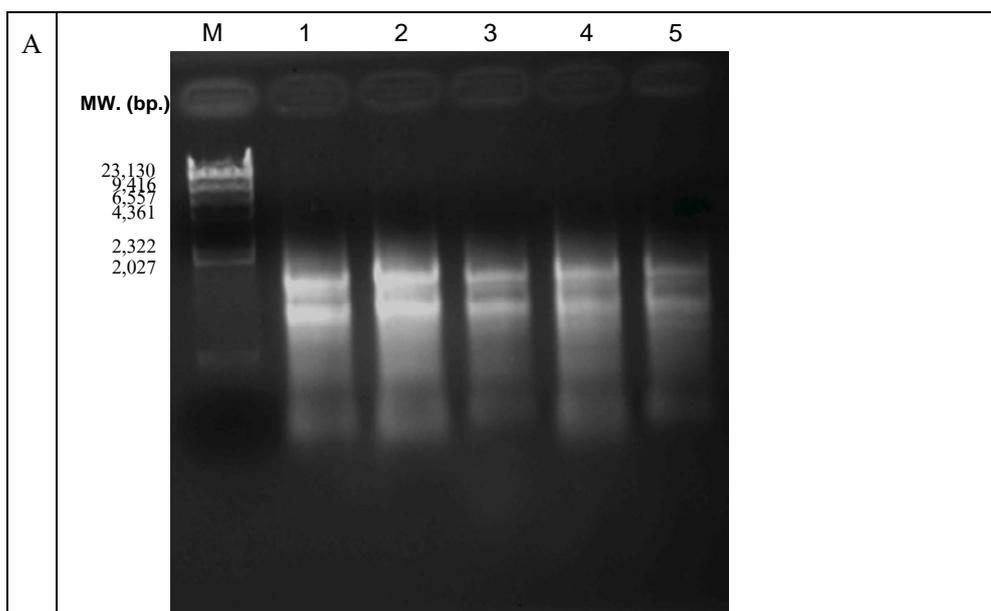


ภาพที่ 19 วิเคราะห์ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แป้งในมันสำปะหลังทั้ง 8 พันธุ์ด้วยวิธี Southern blot บน 1 % (w/v) agarose gel โดยใช้ probe ที่จำเพาะต่อยีน AGPase (AGPase) ยีน GBSSI (GBSSI) และยีน SBEII (SBEII)

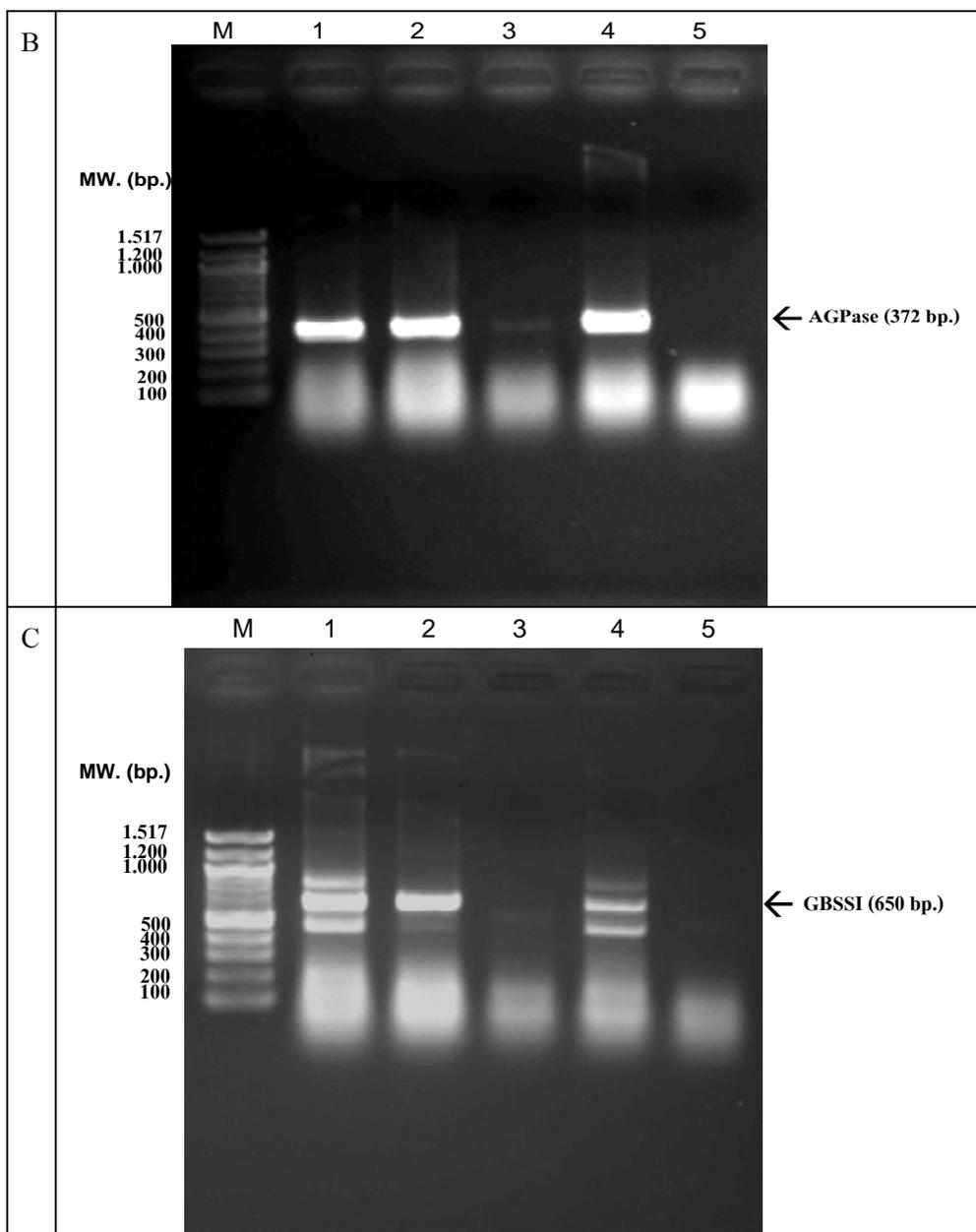
แสดงว่า probe ที่จำเพาะต่อยีน AGPase, GBSSI และ SBEII สามารถใช้เป็นตัวตรวจใน มันสำปะหลังได้ทั้ง 8 พันธุ์

4. การศึกษาการแสดงออกของยีน AGPase, GBSSI และ SBEII ของมันสำปะหลังพันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50 ณ อายุ 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือนโดยวิธี RT-PCR

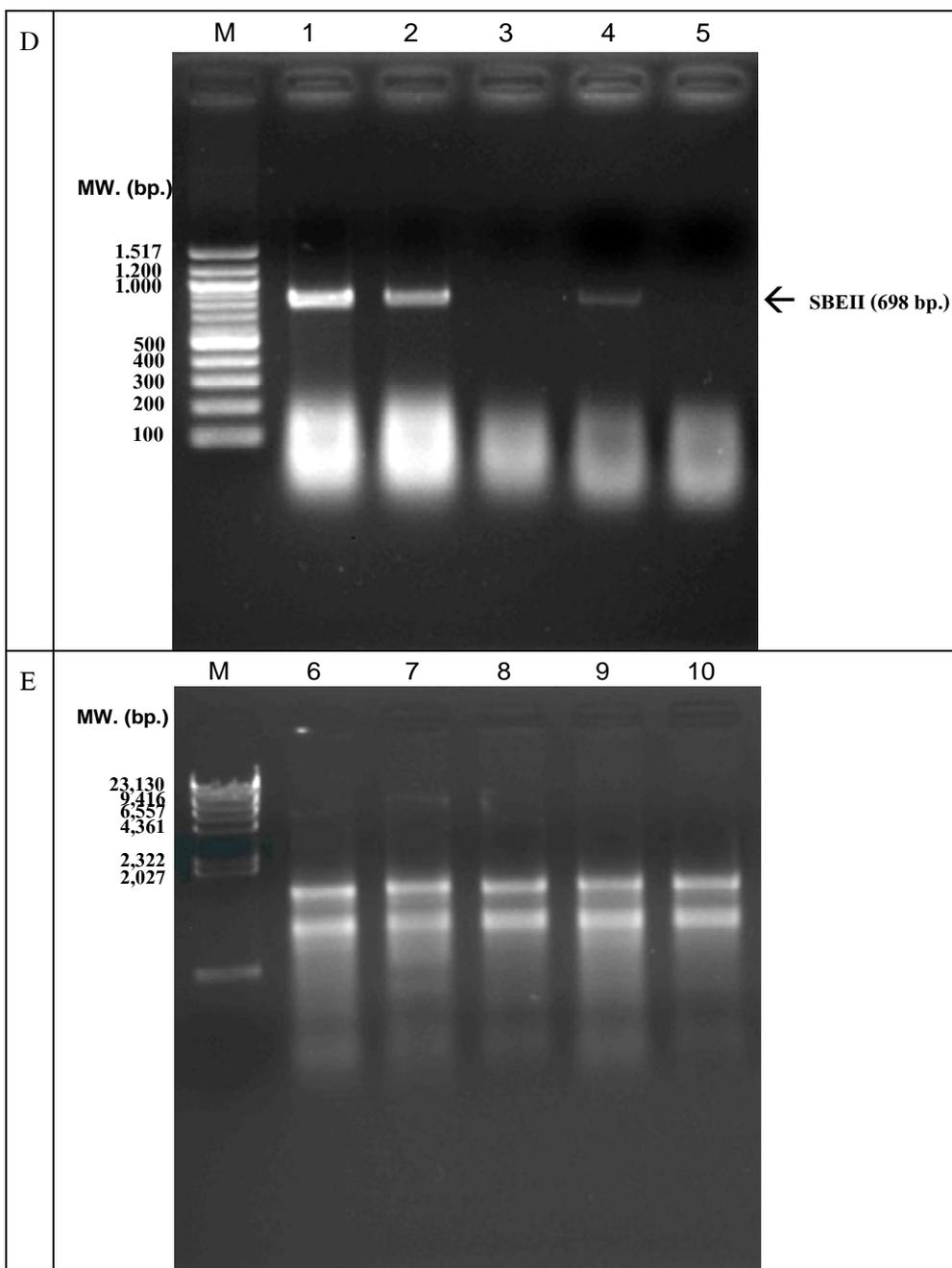
สกัด total RNA ด้วยวิธี PureLink™ Plant RNA Reagent ของมันสำปะหลังพันธุ์ KU 50 ณ อายุ 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน โดยวิธี RT-PCR ตามข้อ 2.7.2 ในวิธีการทดลอง แล้ววิเคราะห์บน 1 % (w/v) agarose gel run 100 โวลต์ 30 นาที



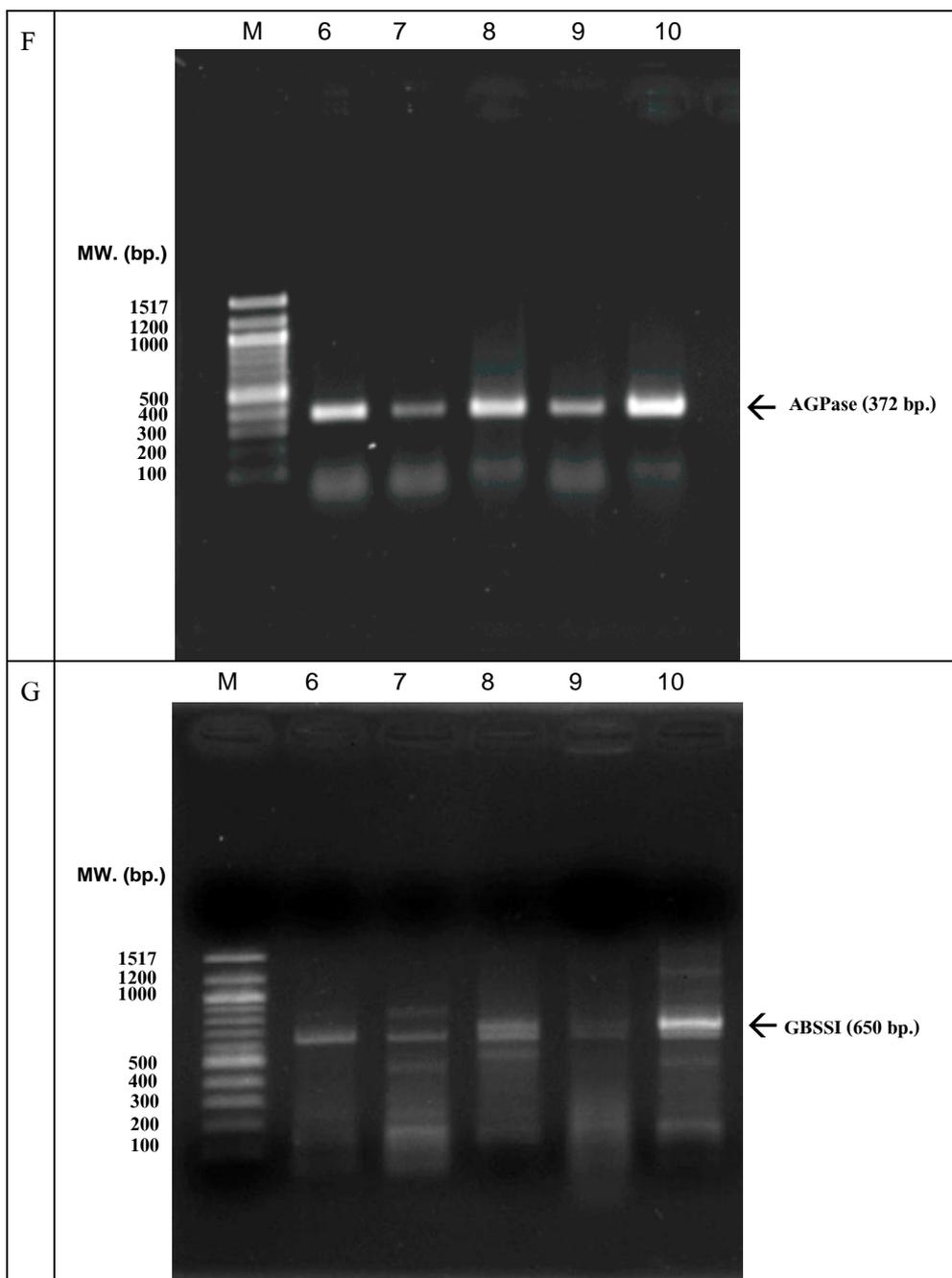
ภาพที่ 20 ภาพสกัด total RNA จากใบ และหัวมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ณ อายุ 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน และการทำ RT-PCR ที่จำเพาะต่อยีน AGPase, GBSSI และ SBEII วิเคราะห์ 1 % (w/v) agarose gel โดย total RNA จากใบ (A) หัว (E) ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของ AGPase จากใบ (B) หัว (F) GBSS I จากใบ (C) หัว (G) SBE II จากใบ (D) หัว (H) lamda/*Hind* III ladder (M1) 100 bp. + 1.5 kb. ladder (M2) total RNA อายุ 4 เดือนจากใบ (1) หัว (6) อายุ 6 เดือนจากใบ (2) หัว (7) อายุ 8 เดือนจากใบ (3) หัว (8) อายุ 10 เดือนจากใบ (4) หัว (9) อายุ 12 เดือนจากใบ (5) หัว (10)



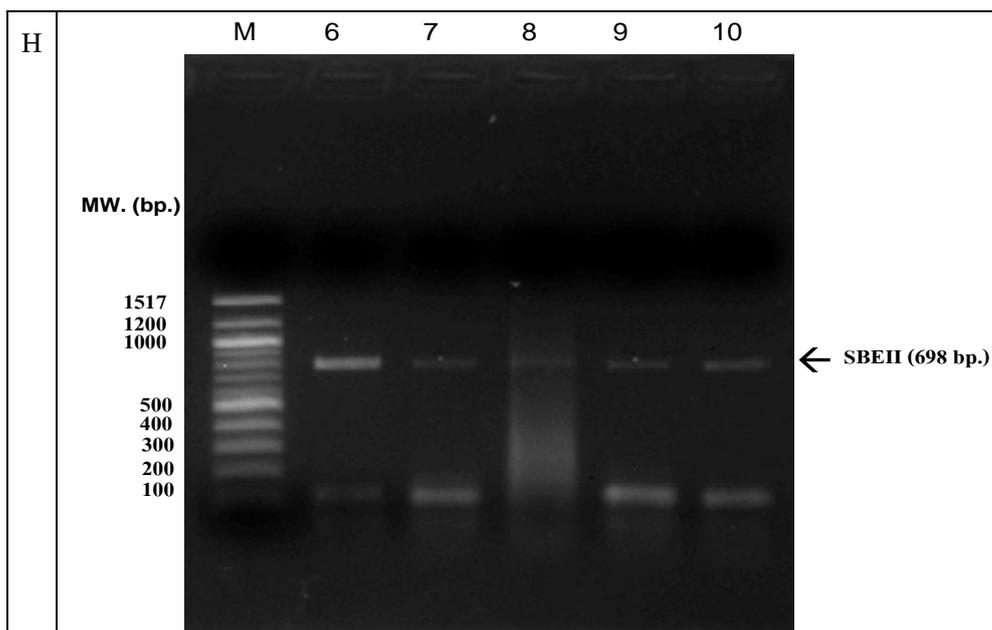
ภาพที่ 20 (ต่อ)



ภาพที่ 20 (ต่อ)



ภาพที่ 20 (ต่อ)



ภาพที่ 20 (ต่อ)

ผลที่ได้จากการทำ RT-PCR พบว่า ยีน AGPase ในใบจะมีการแสดงออก เมื่ออายุ 4, 6, 8 และ 10 เดือน แต่อายุ 12 เดือน ไม่มีการแสดงออก และมีการแสดงออกที่ลดลงในอายุ 8 เดือน เชื่อว่าเป็นช่วงการเจริญในระยะที่ 5 ของมันสำปะหลัง คือ ระยะการเจริญเติบโตใหม่ หรือพักฟื้นตัว ซึ่งมีการสร้างทรงพุ่มใหม่ โดยดึงแป้งในหัวไปใช้ในการสร้างทรงพุ่ม (โอภาส, 2531) โดยจะสลายอะมัยโลสมาใช้เป็นพลังงาน ทำให้ปริมาณอะมัยโลสลดลง ดังตารางที่ 7 ส่วนยีน AGPase ในหัวจะมีการแสดงออกในทุกอายุ ใบใบที่ไม่มีการแสดงออกอาจเกิดจากปริมาณแสงในการชักนำการแสดงออกไม่เพียงพอ ที่จะชักนำการแสดงออกของยีน จึงทำให้การแสดงออกในปริมาณที่น้อยหรือไม่แสดงออก แต่ในหัวใช้สารตั้งต้น (sucrose) จากการสลายแป้งในใบ และ sucrose ยังเป็นสารชักนำการแสดงออกของยีน (Munyikwa, 1994, 2001) จึงทำให้การแสดงออกในหัว กับในใบไม่เหมือนกัน

ยีน GBSS I ในใบจะมีการแสดงออก เมื่ออายุ 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน แต่มีการแสดงออกน้อยในอายุ 8 และ 12 เดือน เชื่อว่าเมื่อปลูก 8 เดือน เป็นช่วงการเจริญในระยะที่ 5 คือ ระยะการเจริญเติบโตใหม่ หรือพักฟื้นตัว ซึ่งจะมีการสร้างทรงพุ่มใหม่ โดยดึงแป้งในหัวไปใช้ในการสร้างทรงพุ่ม (โอภาส, 2531) ส่วนยีน GBSS I ในหัวจะมีการแสดงออกในทุกอายุ

ยีน SBE II ในใบจะมีการแสดงออก เมื่ออายุ 4, 6 และ 10 เดือน แต่ไม่มีการแสดงออกในอายุ 8 และ 12 เดือน) ส่วนยีน SBE II ในหัวจะมีการแสดงออกในทุกอายุ การที่ยีนมีการแสดงออกลดลง หรือไม่แสดงออกน่าจะขึ้นกับความเข้ม หรือปริมาณแสง ซึ่งต้องได้รับแสงอย่างน้อย 6 ชั่วโมง (Baguma, 2004) ในช่วง 6, 8 และ 10 เดือน เป็นฤดูฝน ฟ้าจะมีเมฆฝน ทำให้ความเข้มแสงน้อย และได้รับแสงไม่พอชักนำการแสดงออกของยีน โดยเชื่อว่า ระดับการแสดงออกของยีนจะถูกควบคุมแบบ circadian clock (Angel, 1999) แสง (Shu-Jen, 2001) sugar responsive element (Khoshnoodi, 1998; Yona, 2004; Patricia, 2000)

ปริมาณอะมัยโลสที่ลดลง อาจจะไม่ได้อันเนื่องมาจากการแสดงออกของยีนสังเคราะห์ (GBSS) แต่อาจมีผลจากยีนที่ควบคุมการสลายแป้งด้วย เช่น alpha-amylase (AMY), beta-amylase (BAM), Starch phosphorylase, DPE1, PUL และ ISA เนื่องจากอะมัยโลสย่อยสลายได้ง่ายจึงถูกนำไปใช้เป็นพลังงานในการสร้างต้น และใบใหม่

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. เมื่อพิจารณาพันธุ์ พบว่า พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50, CMR 35-64-1 จะมีการเจริญในด้านความสูงดีที่สุด รองลงมา คือ CMR 35-21-199, หัวขบง 60, CMR 35-22-196, ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 90 และ CMR 36-55-166 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอายุการเก็บเกี่ยวในทุกพันธุ์ พบว่า การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน และ 10 เดือน จะมีการเจริญในด้านความสูงดีกว่า การปลูก 8 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ
2. เมื่อพิจารณาพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยว พบว่า ด้านน้ำหนักต้น และใบเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
3. เมื่อพิจารณาพันธุ์ พบว่า ด้านน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อพิจารณาอายุการเก็บเกี่ยว พบว่า การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน และ 10 เดือนจะให้น้ำหนักหัวสดดีกว่า 8 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ
4. เมื่อพิจารณาพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CMR 35-22-196 ให้ปริมาณแป้งสูงที่สุด รองลงมา คือ พันธุ์ CMR 35-64-1, เกษตรศาสตร์ 50, CMR 35-21-199, ระยะเวลา 90, หัวขบง 60, CMR 36-55-166 และระยะเวลา 5 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอายุการเก็บเกี่ยว พบว่า การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน และ 10 เดือน จะให้ปริมาณแป้งสูงกว่า 8 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ
5. เมื่อพิจารณาพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CMR 35-22-196 ให้ปริมาณมันเส้นแห้งสูงที่สุด รองลงมา คือ พันธุ์ CMR 35-64-1, เกษตรศาสตร์ 50, ระยะเวลา 90, หัวขบง 60, CMR 35-21-199, CMR 36-55-166 และระยะเวลา 5 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอายุการเก็บเกี่ยว พบว่า การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน จะให้ปริมาณมันเส้นแห้งสูงกว่า 10 เดือน และ 8 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ
6. เมื่อพิจารณาพันธุ์ พบว่า พันธุ์ระยะเวลา 5, เกษตรศาสตร์ 50, หัวขบง 60, CMR 36-55-166 ไม่พบความแตกต่างของปริมาณอะมัยโลสอย่างมีนัยสำคัญ แต่พันธุ์ระยะเวลา 90 เมื่อปลูก 12 เดือนจะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงกว่าปลูก 6 เดือน, 8 เดือน, 10 เดือน และ 12 เดือน ตามลำดับ พันธุ์ CMR 35-64-1 เมื่อปลูก 6 เดือนจะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงกว่าปลูก 10 เดือน, 12 เดือน, 4 เดือน และ 8 เดือน ตามลำดับ พันธุ์ CMR 35-22-196 เมื่อปลูก 6 เดือนจะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงกว่าปลูก 12 เดือน,

4 เดือน, 8 เดือน และ 12 เดือน ตามลำดับ พันธุ์ CMR 35-21-199 เมื่อปลูก 12 เดือนจะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงกว่าปลูก 6 เดือน, 4 เดือน, 10 เดือน และ 8 เดือน ตามลำดับ

7. อายุการเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 6 เดือน และ 8 เดือน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 4 เดือน พันธุ์ เกษตรศาสตร์ 50 จะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงที่สุด รองลงมา คือ CMR 36-55-166, CMR 35-22-196, ระยอง 5, หัวยง 60, CMR 35-64-1, CMR 35-21-199 และระยอง 90 ตามลำดับ การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 10 เดือน พันธุ์ CMR 35-64-1 จะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงที่สุด รองลงมา คือ CMR 36-55-166, เกษตรศาสตร์ 50, ระยอง 90, ระยอง 5, CMR 35-22-196, หัวยง 60 และ CMR 35-21-199 ตามลำดับ การเก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน พันธุ์ ระยอง 90 จะให้ปริมาณอะมัยโลสสูงที่สุด รองลงมา คือ ระยอง 5, CMR 35-22-196, หัวยง 60, CMR 35-21-199, CMR 35-64-1, เกษตรศาสตร์ 50 และ CMR 36-55-166 ตามลำดับ

8. การศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์แป้ง

8.1 เปรียบเทียบวิธีการสกัด total RNA จากใบมันสำปะหลัง วิธีที่ให้ความเข้มข้นสูง คือวิธีดัดแปลงของ Kanyaporn (2005), Salehuzzaman (1992) และ Raha (1990) ตามลำดับ แต่วิธีของ Raha (1990) จะให้ความบริสุทธิ์มากกว่า ส่วนหัวมันสำปะหลัง วิธีสกัดที่ให้ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์สูง คือ วิธี Raha (1990) ในการทดลองใช้ชุดสำเร็จรูปที่เป็นการค้า (PureLink™ Plant RNA Reagent) ซึ่งให้ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์สูงกว่า แต่มีราคาแพง

8.2 เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนสังเคราะห์แป้ง ในใบมันสำปะหลัง ณ อายุ 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน พบว่า ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) จะพบการแสดงออกเมื่ออายุ 4, 6 และ 10 เดือนอย่างชัดเจน ใน 8 เดือนจะลดลง แต่ใน 12 เดือนไม่พบการแสดงออก ส่วน granule bound starch synthase I (GBSS I) จะพบการแสดงออกในทุกอายุ แต่ในอายุ 8 และ 12 เดือนจะพบการแสดงออกลดลง ส่วน Starch branching enzyme II (SBE II) จะพบการแสดงออกเมื่ออายุ 4, 6 และ 10 เดือนอย่างชัดเจน ใน 8 เดือนจะลดลง แต่ใน 12 เดือนไม่พบการแสดงออก

8.3 เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนสังเคราะห์แป้ง ในหัวมันสำปะหลัง ณ อายุ 4, 6, 8, 10 และ 12 เดือน พบว่า ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), granule bound starch synthase I (GBSS I) และ Starch branching enzyme II (SBE II) จะพบการแสดงออกในทุกอายุการเก็บเกี่ยว

ข้อเสนอแนะ

การทดลองที่จะทำต่อจากนี้ น่าจะทำการเปรียบเทียบแบบ 2 ช่วงการปลูก คือ ต้นฝน (มีนาคม-พฤษภาคม) และปลายฤดูฝน (พฤศจิกายน-กุมภาพันธ์) เพื่อเปรียบเทียบผลกระทบปัจจัยที่มีผลต่อการปลูก เช่น ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ทั้งในอากาศ และความชื้นในดิน เพราะจากข้อมูลของ อนุชิต (2521, 2522a, 2523) และชาญ (2531) พบว่า การปลูกในต้นฤดูฝนจะมีผลผลิตหัวสด และผลผลิตแป้งสูงกว่าการปลูกปลายฝน หากมีการตรวจสอบอาจทำให้ทราบว่า ยีนที่แสดงออกตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม มากกว่า อายุการเก็บเกี่ยวหรือไม่ เพื่อจะใช้ในการพิจารณาหาการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมได้ในอนาคต และควรทำการทดสอบหลายๆ สภาพภูมิประเทศ เพราะจากข้อมูลของสุวิช (2518) พบว่า พันธุ์เดียวกันมีการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน และพันธุ์ที่ต่างกันจะมีการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมือนกัน ดังนั้น ควรศึกษาพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม เพื่อได้กำหนดการปลูกได้อย่างแน่ชัดในอนาคต

อาจเพิ่มระยะเวลาในการทดลอง คือ เพิ่มอีก 2 ระยะ คือ 16 เดือน และ 18 เดือน ซึ่งจะเก็บเกี่ยวในเดือนมีนาคม และพฤษภาคม ซึ่งใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับเมื่ออายุ 4 เดือน และ 6 เดือน ว่าอัตราส่วนอะมัยโลสในแป้ง และการแสดงออกของยีนเหมือนกัน หรือไม่ หากเหมือนแสดงว่า อายุการเก็บเกี่ยวมีผลน้อยกว่า ฤดูกาลเก็บเกี่ยว

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2526. เอกสารวิชาการเล่มที่ 7: มันสำปะหลัง. กรมวิชาการเกษตร งานทะเบียน และประมวลสถิติ กองแผนงานและวิชาการ. cursa ลาดพร้าว, กรุงเทพฯ.

_____ 2537. เอกสารวิชาการ มันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. cursa ลาดพร้าว, กรุงเทพฯ.

_____ 2550. เอกสารวิชาการ เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง. สหกรณ์การเกษตร จำกัด, กรุงเทพฯ.

กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2543. เทคโนโลยีแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____ กาญจนา ภูโรจนวงศ์ และวิไล สันติโสภาสรี. 2541. โครงสร้างของอะมิโลส อะมิโลเพคตินของแป้งที่สกัดได้จากมันสำปะหลัง (เกษตรศาสตร์ 50) ในอายุการเก็บเกี่ยวต่างๆ กัน และคุณสมบัติ แหล่งที่มา <http://kucon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC3606008.pdf> 1 มีนาคม 2548

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2532. มันสำปะหลัง การปลูก อุตสาหกรรมแปรรูป และการใช้ประโยชน์. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชาญ ธีรพร เจริญ บัวคงดี และโสภณ สันธิประมา. 2520. หากปลูกที่เหมาะสมของมันสำปะหลัง. ตามเลขทะเบียนงานวิจัย ก.พร.-VI-12(2)/19. รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2520: 96-98.

วัฒนะ วัฒนานนท์ เจริญ บัวคงดี ร.ต.จ่านงศักดิ์ กาญจนะหุต และโสภณ สันธิประมา. 2522. การศึกษาอายุเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมของมันสำปะหลังที่ปลูกในดินที่อุดมสมบูรณ์. ตามเลขทะเบียนงานวิจัย 20 06 08 06 12 02. รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2522: 179-184.

ไพศาล อนุศาสนนันท์. 2504. การทดลองเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์แป้งในหัวมันสำปะหลังที่มีอายุ
ต่างๆ กัน. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุพุมาลัย เลิศมงคล. 2546. อิทธิพลของความยาวของท่อนพันธุ์ที่มีต่อการเจริญเติบโต และผลผลิต
ของมันสำปะหลัง 3 พันธุ์ที่ปลูกในช่วงต้นฤดูฝน และปลายฤดูฝน. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุวิษ ลิมยิ่งเจริญ ปัญญา เอกมหาชัย ชาญ ธีรพร และโสภณ สินธุประมา. 2518. หาฤดูปลูกที่
เหมาะสมของมันสำปะหลัง. ตามเลขทะเบียนงานวิจัย ก.พร. VI-12(2) (ปี 2517). รายงาน
ผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2518: 1-6.

อนุชิต ทองกล้า นเรศ สอนหลักทรัพย์ ชาญ ธีรพร และโสภณ สินธุประมา. 2520. หาฤดูปลูก
และอายุเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมของมันสำปะ หลัง เพื่อทำมันแห้ง และหัวสด. ตามเลขทะเบียน
งานวิจัย ก.พร.-VI-12(1)/19. รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี
2520: 89-95.

_____ ชาญ ธีรพร และโสภณ สินธุประมา. 2521a. หาฤดูปลูก และอายุเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม
ของมันสำปะหลังเพื่อทำมันแห้ง และหัวสด. ตามเลขทะเบียนงานวิจัย ก.พร.-VI-12(1)/19.
รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2521: 135-141.

_____ ชาญ ธีรพร และโสภณ สินธุประมา. 2521b. ผลของระยะเวลาการเก็บเกี่ยวหลังจากการ
ตัดต้นที่มีต่อผลผลิตและคุณภาพมันสำปะหลัง. ตามเลขทะเบียนงานวิจัย 20 06 08 06 12
03. รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2522: 142-145.

_____ ชาญ ธีรพร และโสภณ สินธุประมา. 2522. หาฤดูปลูก และอายุเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมของ
มันสำปะหลังเพื่อทำมันแห้ง และหัวสด. ตามเลขทะเบียนงานวิจัย 20 06 08 06 12 01.
รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2522: 168-178.

_____ นเรศ สอนหลักทรัพย์ ชาญุ ธิรพร และโสภณ สิ้นรุประมา. 2518. หากดูปลูก และอายุเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมของมันสำปะหลัง. ตามเลขทะเบียนงานวิจัย ก.พร.-VI-12(1) (ปี2517). รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2518: 1-6.

อุทัย เซ็นภักดี อนุชิต ทองกล้า ชาญุ ธิรพร และโสภณ สิ้นรุประมา. 2523d. ผลของการตัดยอด เมื่ออายุต่างๆที่มีผลต่อผลผลิตมันสำปะหลัง. ตามเลขทะเบียนงานวิจัย 22 06 08 06 12 03. รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2523: 227-232.

_____ อนุชิต ทองกล้า ชาญุ ธิรพร และโสภณ สิ้นรุประมา. 2523a. ผลของการเตรียมดิน ที่มีผลผลิตมันสำปะหลัง. ตามเลขทะเบียนงานวิจัย 22 06 08 06 12 04. รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2523: 239-244.

_____ อนุชิต ทองกล้า ปัญญา เอกมหาชัย เจริญ บังคงค์ และชาญุ ธิรพร. 2523b. ผลของการใช้ระยะปลูกที่มีต่อผลผลิตมันสำปะหลัง. ตามเลขทะเบียนงานวิจัย 22 06 08 06 12 01. รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2523: 220-222.

_____ อนุชิต ทองกล้า ปัญญา เอกมหาชัย วัฒนะ วัฒนานนท์ ชาญุ ธิรพร และโสภณ สิ้นรุประมา 2523c. หาระยะปลูกมันสำปะหลังแบบแถวคู่. ตามเลขทะเบียนงานวิจัย 22 06 08 06 12 02. รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2523: 223-226.

โอภาส บุญเส็ง. 2531. การศึกษาการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____ 2539. พันธุกรรม และปุ๋ยเคมี ในการเพิ่มผลผลิต และคุณภาพมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- Alan, M.M., K.M. Mathew, G.M. James and B.G. Steven. 2000. Recent Progress toward Understanding Biosynthesis of the Amylopectin Crystal. **Plant Physiology**. 122: 989-997.
- Alison, M.S., C.Z. Samuel and M.S. Steven. 2005. Starch Degradation. **Annual Review Plant Biology**. 56: 73-97.
- _____, C.Z. Samuel, T. David and M.S. Steven. 2003. Starch mobilization in Leaves. **Journal of Experimental Botany**. 54(382): 577-583.
- Anne, E., V. Jean-Paul, C.J.M.S. Luc, G.F.V. Richard, Z. Sam, S. Alison and M. Carthie. 2002. Discrete Forms of Amylose Are Synthesized by Isoforms of GBSSI in Pea. **The Plant Cell**. 14: 1,767-1,785.
- Anne, S.P., O. Koos, J.F. Will and W. Bernard. 1991. Starch Synthesis in Potato Tubers: Identification of the in vitro and the in vivo Acceptor Molecules of Soluble Starch Synthase Activity. **Starch/stärke**. 43(6): 208-220.
- Anderson, L., R. Anderson, E.R. Anderson, U. Rydberg, H. Larsson and P. Aman. 2002. Characterisation of the in vitro products of potato starch branching enzyme I and II. **Carbohydrate**. 50: 249-257.
- Andreas, B., M.B. Anne and B. Rogert. 2001. Amylopectin aggregation as a function of starch phosphate content studied by size exclusion chromatography and on-line refractive index and light scattering. **International Journal of Biological Macromolecules**. 28: 409-420.
- Angel, M., M.R. Jose, V. Coral and M.R. Jose. 1999. Expression of the Granule-Bound Starch SynthaseI (*waxy*) Gene from Snapdragon Is Developmentally and Circadian Clock Regulated. **Plant Physiology**. 120: 401-409.

- AOAC. 1990. **In Official Methods of Analysis**. 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.
- Basil, S.S. and A.D. Richard. 1992. Molecular characterization and expression of an isocitrate dehydrogenase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Molecular Biology**. 20: 801-807.
- Beam-seok, S., K. Seungtaek, M.P. Scott, W.S. George, W. Kit-sum, G.J. Martha and M.M. Alan. 2002. Functional Interactions between Heterologously Expressed Starch Branching Enzymes of Maize and the Glycogen Synthase of Brewer's Yeast. **Plant Physiology**. 128: 1,189-1,199.
- Buleon, A., P. Colonna, V. Planchot and S. Ball. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. 23: 85-112.
- Calatayud, P.A, C.H. Baron, H. Velasquez, J.A. Arroyave and T. Lamaze. 2002. Wild Manihot species do not C4 Photosynthesis. **Annals of Botany**. 89(1): 125-127.
- Cura, A.J., P. Jansson and R.C. Krisman. 1995. Amylose is not Strictly Linear. **Starch/Stärke**. 47(6): 207-209.
- Dane, K.F., K.N. Kim, G. Ming, D.B. Charles and J.G. Mark. 1995. A cDNA Encoding Starch Branching Enzyme I from Maize Endosperm. **Plant Physiology**. 108: 1,313-1,314.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**. 1: 19-21.
- Denyer, K., A. Edwards, C. Martin and A.M. Smith. 2001. The control of amylose synthesis. **Journal of Plant Physiology**. 158: 479-487.

- _____, D. Waite, S. Motawia, L.B. Moller and M.A. Smith. 1999. Granule bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. **Biochemical Journal**. 340: 183-191.
- Elisabeth, M. 1991. Qualitative and Quantitative Determination of Starch by a Colorimetric Method. **Starch/Stärke**. 43(10): 384-387.
- Emes, M. J., C. G. Bowsher, C. Hedley, M.M. Burrell, E.S.F. Scrase-Field and I.J. Tetlow. 2003. Starch synthesis and carbon partitioning in developing endosperm. **Journal of Experimental Botany**. 54: 569-575.
- Emma, P. and A.M. Smith. 2003. Growth Ring Formation in the Starch Granules of Potato Tubers. **Plant Physiology**. 132: 365-371.
- Fabrice, W., B. Alain, B. Brigitte, R. Jean-Philippe, L. Lue, D. David, B. Kim, D. David, B. Steven, and D. Christophe. 2002. Granule bound starch synthase I A major enzyme involved in the biogenesis of B-crystallites in starch granules. **European Journal of Biochemistry**. 269: 3,810-3,820.
- Felicia, H. 2001. Isolation of High Quality RNA from Seeds and Tubers of the Mexican Yam Bean (*Pachyrhizus erosus*). **Plant Molecular Biology Reporter**. 19: 65a-65e.
- Frazier, P.J., P. Richmond and A.M. Donald. 1997. **Starch:structure and functionally**. 1^o st ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 277.
- Gibson, T. S., V.A. Solah and B.V. McCleary. 1997. A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with concanavalin A. **Journal of cereal science**. 25: 111-119.

- Gregory, M., M. Marie-Lise, L. Nathalic, T. Philippe, D. Andre, D. Brigitte and B. Steven. 1996. Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. **The Plant Cell**. 8: 1,353-1,366.
- Helen, H.M., Y. Ying, W.P. Bruce, and C.M. George. 2001. Purification and characterization of the maize amyloplast stromal 112-kDa Starch Phosphorylase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 388: 155-164.
- Hiroyuki, I., H. Shigeki, I. Naoto, Y. Takayuki, U. Hiroshi, Y. Yasushi, T. Yasuhito and M. Hirukazu. 2004. Functional characteristics of C-terminal regions of starch branching enzymes from developing seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**. 166: 1,149-1,158.
- Huawu, J., D. Weimin and W. Ping. 2003. Effect of high temperature on fine structure of amylopectin in rice endosperm by reducing the activity of the starch branching enzyme. **Phytochemistry**. 63: 53-59.
- Ian, J.T., W. Jennifer, L. Zhenxiao, A. Rut, G.B. Caroline, E. Sergio, K. Behjat, K.M. Matthew and J.E. Michael. 2004. Protein Phosphorylation in Amyloplasts Regulates Starch Branching Enzyme Activity and Protein-Protein Interactions. **The Plant Cell**. 16: 694-708.
- Isao, H., T. Masataka, S. Shunpei, I. Kazutaka and T. Yasuhito. 2002. Examination of molar-based distribution of A, B and C chains of amylopectin by fluorescent labeling with 2-aminopyridine. **Carbohydrate Research**. 337: 1,211-1,215.
- Jack, P., K. Ball, B. Smith-White, L. Li and W.O. Thoams. 1991. Regulatory mechanisms involed in the biosynthesis of starch. **Pure&Apply chemistry**. 63(4): 535-544.

- James, H.C., N.M. Riano, M.A. El-Sharkawy, L.F. Yamel and G. Bastidas. 1987. C3-C4 intermediate photosynthetic characteristics of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). II Initial products of $^{14}\text{CO}_2$ fixation. **Photosynthesis Research**. 12(3): 237-241.
- Jiang, H., D. Weimin and P. Wu. 2003. Effect of high temperature on fine structure of amylopectin in rice endosperm by reducing the activity of the starch branching enzyme. **Phytochemistry**. 63: 53-59.
- Jindong, S., M.G. Kelly, K. Olavi, W.O. Thomas and E.E. Gerald. 2002. Interactions of nitrate and CO_2 enrichment on growth, carbohydrate, and Rubisco in Arabidopsis starch mutants significance of starch and hexose. **Plant Physiology**. 130: 1,573-1,583.
- Joanna, H.C., C.Z. Samuel, T. Takeshi, M.S. Alison and M.S. Steven. 2001. A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis. **The Plant Journal**. 26(1): 89-100.
- Joel, M., P. Sathish, S. Chuanxin, A. Lena, A. Staffan, B. Yona, P. Sara, O. Benjamin, A. Per and J. Christer. 2003. Starch branching enzymes in sorghum (*Sorghum bicolor*) and barley (*Hordeum vulgare*): Comparative analyses of enzyme structure and gene expression. **Journal Plant Physiology**. 160: 921-930.
- Johnson, A.L, C.P. Baumel, L.C. Hardy, and P.J. White. 1999. Identifying Valuable Corn Quality Traits for Starch Production : A project of the Iowa Grain Quality initiative Traits Task Team. **Funded by the Iowa Corn Promotion Board**. 1-22.
- Kanyaporn noknoy. 2005. Expression of ADP-glucose pyrophosphorylase(AGPase) gene in thai cassava during tuberous root development. **Master degree**, Kasetsart university.

- Khoshnoodi, J., C.T. Larsson, H. Larsson and L. Rask. 1998. Differential accumulation of *Arabidopsis thaliana* *Sbe2.1* and *Sbe2.2* transcripts in response to light. **Plant Science**. 135: 183-193.
- Knutson, C. A. 1986. A simplified colorimetric procedure for determination of amylose in maize starches. **Cereal chemistry**. 63(2): 89-92.
- Kyung-Nam, K., K.F. Dane, G. Ming and G.J. Mark. 1998. Genomic organization and promoter activity of the maize starch branching enzyme I gene. **Gene**. 216: 233-243.
- Lausanne, C.M. 1996. Determination of Amylose in Flour by a Colorimetric Assay: Collaborative Study. **Starch/Stärke**. 48(3): 86-89.
- Lloyd, L.R., C.L. Hedley, V.J. Bull and S.G. Ring. 1996. Determination of the effect of *r* and *rb* mutations on the structure of amylose and amylopectin in pea (*Pisum sativum* L.). **Carbohydrate Polymers**. 29(1): 45-49.
- Luiz, J.C.BC., R.B.deS. Claudia, C.deM.C. Julio, B.J. Carlos and C. Laura. 2004. Identification and characterization of a novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. **Plant Molecular Biology**. 56: 643-659.
- Marlon, M.R., M.C.F. Marcia and B.S.S. Silene. 2002. A multi-way analysis of starch cassava properties. **Chemometrics and Intelligent Laboratory System**. 64: 123-135.
- Mabrouk, A.E., M.D.T. Sara and F.O. Luis. 1992. Potential Photosynthesis of cassava as affected by growth conditions. **Crop Science**. 32: 1,336-1,342.
- Maria, D.F., T. Wilmer, R. Elizabeth and H. Ana. 2002. Lack of downregulation of photosynthesis in a tropical root crop, cassava, growth under an elevated CO₂ concentration. **Functional Plant Biology**. 29: 805-814.

- Marlon, M.R., M.C.F. Marcia and B.S.S. Silene. 2002. A multi-way analysis of starch cassava properties. **Chemometrics and Intelligent Laboratory System**. 64: 123-135.
- Mary, E.R., S.B.K. Maurice, C. Shu-Hua and E.E. Gerald. 1984. Photosynthetic characteristics of C3-C4 intermediate *Flaveria* Species. III. Reduction of photorespiration by a limited C4 pathway of photosynthesis in *Flaveria ramosissima*. **Plant Physiology**. 75: 993-996.
- Maurice, S.B.K., K.M. Russell, O.L. Jr. Robert, N. Hitoshi, B.F. Danad and E.E. Gerald. 2002. Photosynthetic characteristics of C3-C4 intermediate *Flaveria* Species. I Leaf anatomy, photosynthetic responses to O₂ and activities of key enzymes in the C3 and C4 pathways. **Plant Physiology**. 71: 944-948.
- Mahyinur, Y., F.T. Richard, T. Ray and S.E. Colin. 2003. Composition and properties of starches extracted from tubers of different potato varieties grown under the same environmental conditions. **Food Chemistry**. 82: 283-289.
- Mingsheng, P., G. Ming, B. Monica, H. Pirre and C.N. Ravindra. 2000. Starch Branching Enzymes Preferentially Associated with A type Starch Granules in Wheat Endosperm. **Plant Physiology**. 124: 265-272.
- Mitko, N.A., J. Sun, G.T. Byrd, R.H. Brown and B.C. Clanton. 1993. Novel characteristics of cassava, *Manihot esculenta* Crantz, a reputed C3-C4 intermediate photosynthesis species. **Photosynthesis Research**. 38(1): 61-72.
- Monica, B., B.N. Ramesh, R. Anne, J.S. Graham and C.N. Ravindra. 2000. Isolation of a cDNA Encoding a Granule Bound 152 kilodalton Starch Branching Enzyme in Wheat. **Plant Physiology**. 124: 253-263.

- _____, G. Salah, S.M. Clifford and C.N. Ravindra. 1999. A starch branching enzyme gene in wheat produces alternatively spliced transcripts. **Plant Molecular Biology**. 40: 1,019-1,030.
- Munyikwa, R.J.T., K. Jan, F. Martin, S. Luc, J. Evertand, G.F.V. Richard. 2001. Isolation and Characterization of cDNA, encoding the large and small subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**. 120: 71-83.
- _____, B. Chipangura, S.N.I.M. Salehuzzaman, E. Jacobsen and G.F.R. Visser. 1994. Cloning and Characterization of cassava genes involed in starch biosynthesis. **The Cassava Technology Network: Proceedings of the second International Scientific Meeting Begor Indonesia**. 2: 639-645.
- _____, J. Kreuze, M. Fregene, L. Suurs, E. Jacobsen and G.F.R. Visser. 2001. Isolation and characterisation of cDNA encoding the large and small subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**. 120: 71-83.
- _____, S. Langeveld, S.N.I.M. Salehuzzaman, E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 1997. Cassava starch biosynthesis: New avenues for modifying starch quantity and quality. **Euphytica**. 96: 65-75.
- Neil, J.A, L.C. Sophia, M.A. Rukmal and W.P. Anthony. 1999. Localisation of amylose and amylopectin in starch granules using amylose-Gold Labelling. **Starch/stake**. 51(5): 163-172.
- Onwuem, I.C. 1978. **Botany of Cassava. The Tropical Tuber Crops**, John Wiley&Son Ltd. NewYork.

- Patricia, L.V. and N. Toshiki. 2000. Wheat Granule-Bound Starch Synthase I and II Are Encoded by Separate That Are Expressed in Different tissues. **Plant Physiology**. 122: 255-263.
- Pathama, C., C. Pavinee, S. Klanarong, P. Kuakoon, C. Sunee, T. Hui-ru and H. Brian. 2003. The influence of time and conditions of harvest on the functional behaviour of cassava starch a proton NMR relaxation study. **Carbohydrate Polymers**. 53: 233-240.
- Per H., A. Mariette, L. Clas-Thomas and L. Hakan. 2004. Field performance and starch characteristics of high amylose potatoes obtained by antisense gene targeting of two branching enzymes. **Plant Biotechnology Journal**. 2(4): 311-320.
- Peter, P. and D.K. Jette. 1993. Starch branching enzyme cDNA from *Solanum tuberosum*. **Plant Physiology**. 102: 1,053-1,054.
- Rachel, A.B., Z. Xiao-Qi, H. Maria and B.F. Geoffery. 1999. A single limit dextrinase gene is expressed both in the developing endosperm and in germinated grains of barley. **Plant Physiology**. 119: 859-871.
- Raha, S., F. Mcrante, G. Proteau and J.K. Reed. 1990. Stimutaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride. **Gene Analytical Technology**. 7: 173-177.
- Richard, S., A.J. Steve, M.S. Chris, J.W. Roger, C. David, J.T. Karen, H.S. Barbara, L.R. Alison and G.J. Michael. 1998. Consequences of antisense RNA inhibition of starch branching enzyme activity on properties of potato starch. **Carbohydrate Polymers**. 35: 155-168.
- Richard, F. T., K. John and Q. Xin. 2004. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**. 39: 151-165.

- Rungnaphar, P., T. Parita and I. Shinya. 2002. Effect of Sucrose on RVA Viscosity Parameters, Water Activity and Freezable Water Fraction of Cassava Starch Suspensions. **Science Asia**. 28: 129-134.
- Salehuzzaman, S.N.I.M, E. Jacobsen and R.G. Visser. 1992. Cloning, partial sequencing and expression of a cDNA coding for branching enzyme in cassava. **Plant Molecular Biology**. 20(5): 809-819.
- _____, E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 1993. Isolation and characterization of a cDNA encoding granule bound starch synthase in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its antisense expression in potato. **Plant Molecular Biology**. 23(5): 947-962.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor press, Cold Spring Harbor, New York.
- _____, E.F. Fritsch and T. Maniatis. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3rd ed. Cold Spring Harbor press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuel, C.Z., M.S. Steven and M.S. Alison. 2004. Tansley review. The breakdown of starch in leaves. **New Phytologist**. 163: 247-261.
- _____, T. Axel, P. Emma, K.K. Lisa, M.D. Athene and M.S. Alison. 2002. Starch Synthesis in Arabidopsis. Granule Synthesis, Composition, and Structure. **Plant Physiology**. 129: 516-529.
- _____, U. Takayuki, L. Wei-Ling, A. Pui, M. Cathie, M.S. Alison and C. Jychain. 1998. A Mutant of Arabidopsis Lacking a Chloroplastic Isoamylase Accumulates Both Starch and Phytoglycogen. **The Plant Cell**. 10: 1,699-1,711.

- Shan, N.I.M.S., V. Jean-Paul, V. Marion, S. Irma, J. Evert and V.G.F. Richard. 1999. Expression of a cassava granule bound starch synthase gene in the amylose-free potato only partially restores amylose content. **Plant, Cell and Environment**. 22: 1,311-1,318.
- Shu-Jen, W., Y. Kai-Wun and T. Chia-Yin. 2001. Regulation of starch granule-bound starch synthaseI gene expression by circadian clock and sucrose in the source tissue of sweet potato. **Plant Science**. 635-644.
- Sidebottom, C., M. Kirkland, B. Strongithan and R. Jeffcoat. 1998. Characterization of the difference of starch branching enzyme activities in normal and low-amylopectin maize during kernel development. **Journal of Cereal Science**. 27: 279-287.
- Sievert, D. and J.H. Lausanne. 1993. Determination of amylose by Differential Scanning Calorimetry. **Starch/Stärke**. 45(4): 136-139.
- Smith, M.A., C.S. Zeeman, T. David and M.S. Smith. 2003. Starch mobilization in leaves. **Journal of Experimental Botany**. 54(382): 577-583.
- _____. 2005. Making starch. **Plant Biology**. 2: 223-229.
- _____, C.S. Zeeman and M.S. Smith. 2005. Starch Degradation. **Annual Review Plant Biology**. 56: 73-97.
- _____, K. Denyer and C. Martin. 1997. The synthesis of the starch granule. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular biology**. 48: 67-87.
- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal Molecular Biology**. 98: 503-517.

Sriroth, K., V. Santisopasri, C. Petchalanuwat, K. Kurotjanawong and K. Piyachomkwan.

1999. Cassava starch granule structure-function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**. 38: 161-170.

_____, K. Kurotjanawong and V. Santisopasri. 1998. Fine structure of amylose, amylopectin and functional properties of starches extracted From cassava (Kasetsart50) at different harvesting time. **The 36th Kasetsart University Annual Conference, 3-5 February 1998. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.**

Steven, M.S., C.F. Daniel, C. Tansy, T. David, C. Andrew, D. Hannah, H. Christopher, C.Z.

Samuel and M.S. Alison. 2004. Diurnal Changes in the Transcriptome Encoding Enzymes of Starch Metabolism Provide Evidence for Both Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. **Plant Physiology**. 136: 2,687-2,699.

Susan, L.B., K. Kyung-Nam, K. Jeffery, C.S. Jack, T. Donald and G. Mark. 2002.

Identification of *Mutator* insertional mutants of starch-branching enzyme1(*sbe1*) in *Zea mays* L. **Plant Molecular Biology**. 48: 287-297.

Takayuki, U., N. Yasunori and I. Norimitsu. 1995. Activity of Starch synthase and the

Amylose content in rice endosperm. **Phytochemistry**. 40(6): 1613-1616

Tansy, C., T. David, C. Andrew, M. Gaele, C. Jychain, C.Z. Samuel, M.S. Steven and M.S.

Alison. 2004. A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. **The Plant Journal**. 37: 853-363.

- Tein-Shin, Y., K. Heike, E.H. Rainer, H. Diana, F. Ulf-Ingo, C.Z. Samuel, M.S. Alison, K. Jens, L. James, R. Gerhard, S. Martin, L. Wei-Ling, C. Jychain and W. Andreas. 2001. The Arabidopsis *sex1* Mutant Is Defective in the R1 protein, a General Regulator of starch Degradation in Plants, and Not in the Chloroplast Hexose Transporter. **The Plant cell**. 13: 1,907-1,918.
- Thomas, W.G., E.C. Sue, L.K. Michael, F.B. Gerard, P. Jack and W.O. Thomas. 1996. Mutagenesis of potato ADP-glucose pyrophosphorylase and characterization of an allosteric mutant defective in 3-phosphoglycerate activation. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**. 93: 1,509-1,513.
- Thompson, D.B. 2000. On the non-random nature of amylopectin branching. **Carbohydrate Polymers**. 43: 223-239.
- Totte, N., M. Gaele, T. Martine, C. Jychain, M.S. Alison and C.Z. Samuel. 2004. A Previously unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves. **Science**. 303: 87-89.
- Ulrika, R., A. Lena, A. Roger, A. Per and L. Hakan. 2001. Comparison of starch branching enzyme I and II from potato. **European Journal of Biochemistry**. 268: 6,140-6,145.
- Vilai, S., K. Kanjana, C. Sunee, P. Kuakoon, S. Klanarong and O.G. Christopher. 2001. Impact of water stress on yield and quality of cassava starch. **Industrial Crops and Productions**. 13: 115-129.
- Wichit, S. 1994. Effect of land preparation on soil physical characteristics, germination and yield of cassava. **Masteral Thesis**, Kasetsart University.

- William, J.H., F.M. Kent, B.A. Susan, K. Anna, K.T. Charlene, M.K. Kerry, L.J. Erika, B.B. Donald, D.W. Jeff, D.A. Olin and M.D. Frances. 2003. Effect of temperature on expression of genes encoding enzymes for starch biosynthesis in developing wheat endosperm. **Plant Science**. 164: 873-881.
- Yuan, Y., B.T. Donald and G.T. Mark. 2004. Maize Starch Branching Enzyme Isoforms and Amylopectin Structure. In the Absence of Starch Branching EnzymeIIb, the Futher Absence of Starch Branching Enzyme Ia Leads to Increased Branching. **Plant Physiology**. 136: 3,515-3,523.
- Yona, B. 2004. Regulation of Starch synthesis in Cassava. **Doctoral Thesis**, Swedish University of Agricultural Sciences.
- _____, S. Chuanxin, A. Staffan, M. Joel, P. Sara, R.R. Patrick, J.M. Michael, G.E. Thomas, L. Hakan, and J. Christer. 2003. Expression patterns of the gene encoding starch branching enzyme II in the storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). **Plant Science**. 164: 833-839.
- Yves, G., E.B. Oliver, P. Natalia, P. Dejana, H.M.H. Janneke, F. Joachim, H. Melanie, A. Manuela and S. Mark. 2004. Adjustment of diurnal starch turnover to short days:depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. **The Plant Journal**. 39: 847-862.
- Zhongyi, L., C. Xiusheng, M. Gregory, Y. Liuling, K. Behjat, H. Sandra, N. Johnathan, S. Peter, C. Bryan, A. Rudi, K. Matthew and R. Sadequr. 1999. The Localization and Expression of the Class II Starch Synthases of Wheat. **Plant Physiology**. 120:1,147-1,155.

Zeeman, C.S., M.S. Steven and M.S. Alison. 2002. The Priming of Amylose Synthesis in Arabidopsis leaves. **Plant Physiology**. 128: 1,069-1,076.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 แสดงอุณหภูมิ และปริมาณน้ำฝนในรอบเดือน ที่สัมพันธ์กับอายุของมันลำปะหลัง

ปริมาณน้ำฝน คือ ปริมาณน้ำฝนทั้งหมดในเดือนต่างๆ อุณหภูมิสูงสุดในรอบเดือน คือ อุณหภูมิในเวลากลางวันที่สูงสุดในเดือนต่างๆ อุณหภูมิต่ำสุดในรอบเดือน คือ อุณหภูมิในเวลากลางคืนที่ต่ำสุดในเดือนต่างๆ

	พ.ย.-47	ธ.ค.-47	ม.ค.-48	ก.พ.-48	มี.ค.-48	เม.ย.-48	พ.ค.-48	มิ.ย.-48	ก.ค.-48	ส.ค.-48	ก.ย.-48	ต.ค.-48	พ.ย.-48
ปริมาณน้ำฝนในเดือน	0.2	0.0	0.2	27.0	78.4	54.5	157.0	78.4	180.4	185.4	211.5	133.9	22.5
อุณหภูมิสูงสุดในรอบเดือน	33.8	32.4	32.5	35.5	35.3	36.7	35.7	34.2	32.6	32.0	31.5	32.5	32.1
อุณหภูมิต่ำสุดในรอบเดือน	22.1	16.9	28.7	23.2	23.3	25.5	25.6	25.6	24.8	24.5	24.6	24.3	23.7

ตารางผนวกที่ 2 การตรวจสอบผลผลิตต่อไร่ เมื่อปลูกได้ 8 เดือน

ผลจากการทดลอง 3 แปลงที่เก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 8 เดือน โดยผลที่จะใช้ต้องมีอัตราการรอดมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละแปลงย่อย การวัดความสูงจะวัดแบบสุ่ม 10 ต้นในแปลงย่อย และนับจำนวนหัวทั้งหมดในแปลงย่อย ชั่งน้ำหนักหัวทั้งหมดที่ได้จากแปลงย่อย ชั่งน้ำหนักดิน และใบทั้งหมดในแปลงย่อย และวัดปริมาณแป้ง โดยวิธี Reimann scale balance จากตัวอย่าง 5 กิโลกรัม ในแต่ละแปลงย่อย ปริมาณมันเส้นแห้ง จากการคำนวณ [18.4+0.72(ปริมาณแป้งจาก reimann scale balance)]

	ระของ 5	ระของ 90	เกษตรศาสตร์ 50	ห้วยบง 60	CMR 35- 64-1	CMR 35-22- 196	CMR 35- 21-199	CMR 36-55- 166
จำนวนต้นต่อแปลง (5 แถว x 10 ต้น) ซ้ำที่ 1	46	48	46	49	47	39	45	48
จำนวนต้นต่อแปลง (5 แถว x 10 ต้น) ซ้ำที่ 2	41	46	49	44	49	45	20	20
จำนวนต้นต่อแปลง (5 แถว x 10 ต้น) ซ้ำที่ 3	39	48	43	49	19	22	47	49
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 1	92	96	92	98	94	78	90	96
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 2	82	92	98	88	98	90	40	40
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 3	78	96	86	98	38	44	94	98
จำนวนต้นต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 1	21	24	22	23	22	20	21	24
จำนวนต้นต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 2	18	24	24	24	23	24	9	8
จำนวนต้นต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 3	24	23	22	23	14	12	19	23

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

	ระของ 5	ระของ 90	เกษตรศาสตร์	ห้วยบง 60	CMR 35-	CMR 35-22-	CMR 35-	CMR 36-55-
			50		64-1	196	21-199	166
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 1	88	100	92	96	92	83	88	100
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 2	75	100	100	100	96	100	38**	33**
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 3	100	96	92	96	58**	50**	79	96
ความสูงเฉลี่ย (10 ต้น) ซ้ำที่ 1	159	145	139	168	170	153	183	129
ความสูงเฉลี่ย (10 ต้น) ซ้ำที่ 2	105	113	163	170	146	139	73**	60**
ความสูงเฉลี่ย (10 ต้น) ซ้ำที่ 3	131	147	131	159	109**	108**	142	117
ความสูงเฉลี่ย	132	135	144	166	158	146	162.5	123
จำนวนหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 1	146	207**	126	169	187	125	203	97
จำนวนหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 2	70	103	148	115	161	108**	N	N
จำนวนหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 3	95	162	63	122**	30	24	98	100
จำนวนหัวต่อแปลงย่อยเฉลี่ย	104	132.5	112	142	126	74.5	188	98.5

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

	ระของ 5	ระของ 90	เกษตรศาสตร์	ห้วยบง 60	CMR 35- 64-1	CMR 35-22- 196	CMR 35- 21-199	CMR 36-55- 166
			50		64-1	196	21-199	166
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8) ซ้ำที่ 1	47	50.6	24	56.8	41	34.6	60.6	24
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8) ซ้ำที่ 2	15	15.8	43	47	22.6	24	0.6**	0.8**
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8) ซ้ำที่ 3	22.6	44	16.4	51.8	7**	6.8**	18.6	20
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย	28.2	36.8	27.8	51.9	31.8	29.3	39.6	22
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 1	30	27	13	34	27	38.4	34	15.4
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 2	9	13	19	31	18	24	2.6**	1**
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 3	14.4	2.3	12	30	10.4**	7.6**	19	16
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อยเฉลี่ย	17.8	14.1	14.7	31.7	22.5	31.2	26.5	15.7
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance ซ้ำที่ 1	21.3	24.2	23.4	22.5	23.5	24	23.2	21.2
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance ซ้ำที่ 2	15.4	21	26.5	25.1	22.2	24.9	N	N

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

	ระของ 5	ระของ 90	เกษตรศาสตร์ 50	ห้วยบง 60	CMR 35- 64-1	CMR 35-22- 196	CMR 35- 21-199	CMR 36-55- 166
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance ซ้ำที่ 3	17.2	23.1	21.1	19.6	23**	22.2**	22.8	19
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance เฉลี่ย	18	22.8	23.7	22.4	22.85	24.45	23	20.1
ปริมาณมันเส้นแห้ง ซ้ำที่ 1	33.74	35.82	35.25	34.60	35.32	35.68	35.10	33.66
ปริมาณมันเส้นแห้ง ซ้ำที่ 2	29.49	33.52	37.48	36.47	34.38	36.33	N	N
ปริมาณมันเส้นแห้ง ซ้ำที่ 3	30.78	35.03	33.59	32.51	34.96**	34.38**	34.82	32.08
ปริมาณมันเส้นแห้ง เฉลี่ย	31.34	34.79	35.44	34.53	34.85	36.01	34.96	32.87

หมายเหตุ ** หมายถึงกลุ่มตัวอย่างที่จะไม่นำมาคิดค่าในการทดลองเพราะ มีประชากรไม่ถึง 70 เปอร์เซ็นต์

N หมายถึง ไม่มีหัว เลยไม่สามารถบันทึกค่า

CMR 35-64-1 คือ พันธุ์ระของ 9 CMR 36-55-166 คือ พันธุ์ระของ 7 CMR 35-22-196 คือ พันธุ์ระของ 80 หรือเจียวปลดหนี้

ตารางผนวกที่ 3 การตรวจสอบผลผลิตต่อไร่ เมื่อปลูกได้ 10 เดือน

ผลจากการทดลอง 3 แปลงที่เก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 10 เดือน โดยผลที่จะใช้ต้องมีอัตราการรอดมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละแปลงย่อย การวัดความสูงจะวัดแบบสุ่ม 10 ต้นในแปลงย่อย และนับจำนวนหัวทั้งหมดในแปลงย่อย ซึ่งน้ำหนักหัวทั้งหมดที่ได้จากแปลงย่อย ซึ่งน้ำหนักต้น และใบทั้งหมดในแปลงย่อย และวัดปริมาณแป้ง โดยวิธี Reimann scale balance จากตัวอย่าง 5 กิโลกรัม ในแต่ละแปลงย่อย ปริมาณมันเส้นแห้ง จากการคำนวณ [18.4+0.72(ปริมาณแป้งจาก reimann scale balance)]

	ระยอง 5	ระยอง 90	เกษตรศาสตร์ 50	ห้วยบง 60	CMR 35- 64-1	CMR 35-22- 196	CMR 35- 21-199	CMR 36-55- 166
จำนวนต้นต่อแปลง (5 แถว x 10 ต้น) ซ้ำที่ 1	44	32	47	48	48	39	49	48
จำนวนต้นต่อแปลง (5 แถว x 10 ต้น) ซ้ำที่ 2	46	50	45	49	48	39	50	50
จำนวนต้นต่อแปลง (5 แถว x 10 ต้น) ซ้ำที่ 3	48	47	46	36	50	36	50	46
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 1	88	64	94	96	96	78	98	96
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 2	92	100	90	98	96	78	100	100
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 3	96	94	92	72	100	72	100	92
จำนวนต้นต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 1	23	11	22	23	23	19	23	23
จำนวนต้นต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 2	23	24	22	24	23	15	24	24
จำนวนต้นต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 3	22	22	23	12	24	17	24	20

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

	ระยอง 5	ระยอง 90	เกษตรศาสตร์	ห้วยบง 60	CMR 35-64-1	CMR 35-22-196	CMR 35-21-199	CMR 36-55-166
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 1	96	46**	92	96	96	79	96	96
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 2	96	100	92	100	96	63**	100	100
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 3	92	92	96	50**	100	71	100	83
ความสูงเฉลี่ย (10 ต้น) ซ้ำที่ 1	167	111**	241	186	186	178	168	156
ความสูงเฉลี่ย (10 ต้น) ซ้ำที่ 2	143	154	163	152	184	177**	171	156
ความสูงเฉลี่ย (10 ต้น) ซ้ำที่ 3	150	156	224	195**	197	146	179	140
ความสูงเฉลี่ย	153	155	209	169	189	162	173	151
จำนวนหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 1	124	55**	172	101	202	144	169	205
จำนวนหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 2	110	139	112	126	183	119**	141	156
จำนวนหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 3	22	22	23	12**	24	17	24	20
จำนวนหัวต่อแปลงย่อยเฉลี่ย	85	80.5	102.3	113.5	136.5	80.5	96.5	112.5

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

	ระยของ 5	ระยของ 90	เกษตรศาสตร์	ห้วยบง 60	CMR 35- 64-1	CMR 35-22- 196	CMR 35- 21-199	CMR 36-55- 166
			50		64-1	196	21-199	166
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8) ไร่ที่ 1	57	6.5**	95	61.5	70	65	64	48
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8) ไร่ที่ 2	50.5	54	36	34.5	58.5	60**	48	51
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8) ไร่ที่ 3	51	46	70	29**	70	17	59.5	35
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย	52.8	50	67	48	66.2	41	61.75	41.5
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ไร่ที่ 1	24	6.5**	47.5	37.5	33	11	28.5	25.7
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ไร่ที่ 2	21	25	27	20	30	34**	24	20.5
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ไร่ที่ 3	15	22	42	31.5**	42	22	26.5	21
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อยเฉลี่ย	20	23.5	38.8	28.75	35	16.5	26.3	22.4
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance ไร่ที่ 1	24.8	23**	27.9	25	28.3	29	30	26.4
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance ไร่ที่ 2	19.8	25.2	20.6	23.3	25.6	27.3**	26	22.5

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

	ระของ 5	ระของ 90	เกษตรศาสตร์ 50	ห้วยบง 60	CMR 35- 64-1	CMR 35-22- 196	CMR 35- 21-199	CMR 36-55- 166
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance ซ้ำที่ 3	22.8	24.5	22.4	26.7**	27.7	26.5	28.7	18
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance เฉลี่ย	22.5	24.85	23.6	24.15	27.2	27.75	28.2	22.3
ปริมาณมันเส้นแห้ง ซ้ำที่ 1	32.26	34.96**	38.49	36.40	37.78	39.28	40.00	37.41
ปริมาณมันเส้นแห้ง ซ้ำที่ 2	32.66	36.54	33.23	35.18	36.83	38.06**	37.12	34.60
ปริมาณมันเส้นแห้ง ซ้ำที่ 3	34.82	36.04	34.53	37.62**	38.34	37.48	39.06	34.60
ปริมาณมันเส้นแห้ง เฉลี่ย	33.25	36.29	35.42	35.79	37.65	38.38	38.73	35.54

หมายเหตุ ** หมายถึงกลุ่มตัวอย่างที่จะไม่นำมาคิดค่าในการทดลองเพราะ มีประชากรไม่ถึง 70 เปอร์เซ็นต์

N หมายถึง ไม่มีหัว เลยไม่สามารถบันทึกค่า

ตารางผนวกที่ 4 การตรวจสอบผลผลิตต่อไร่ เมื่อปลูกได้ 12 เดือน

ผลจากการทดลอง 3 แปลงที่เก็บเกี่ยวเมื่อปลูก 12 เดือน โดยผลที่จะใช้ต้องมีอัตราการรอดมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละแปลงย่อย การวัดความสูงจะวัดแบบสุ่ม 10 ต้นในแปลงย่อย และนับจำนวนหัวทั้งหมดในแปลงย่อย ชั่งน้ำหนักหัวทั้งหมดที่ได้จากแปลงย่อย ชั่งน้ำหนักดิน และใบทั้งหมดในแปลงย่อย และวัดปริมาณแป้ง โดยวิธี Reimann scale balance จากตัวอย่าง 5 กิโลกรัม ในแต่ละแปลงย่อย ปริมาณมันเส้นแห้ง จากการคำนวณ [18.4+0.72(ปริมาณแป้งจาก reimann scale balance)]

	ระยอง 5	ระยอง 90	เกษตรศาสตร์ 50	ห้วยบง 60	CMR 35-64-1	CMR 35-22-196	CMR 35-21-199	CMR 36-55-166
จำนวนต้นต่อแปลง (5 แถว x 10 ต้น) ซ้ำที่ 1	44	42	38	37	48	37	50	49
จำนวนต้นต่อแปลง (5 แถว x 10 ต้น) ซ้ำที่ 2	36	46	38	50	46	40	17	50
จำนวนต้นต่อแปลง (5 แถว x 10 ต้น) ซ้ำที่ 3	46	34	27	44	45	33	43	49
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 1	88	84	76	74	96	74	100	98
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 2	72	92	76	100	92	80	34	100
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 3	92	68	54	88	90	66	86	98
จำนวนต้นต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 1	20	18	20	19	23	17	24	23
จำนวนต้นต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 2	18	21	15	24	21	17	24	24
จำนวนต้นต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 3	22	15	13	22	22	16	20	23

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

	ระยอง 5	ระยอง 90	เกษตรศาสตร์	ห้วยบง 60	CMR 35-	CMR 35-22-	CMR 35-	CMR 36-55-
			50		64-1	196	21-199	166
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 1	83	75	83	79	96	71	100	96
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 2	75	88	63**	100	88	71	100	100
คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ซ้ำที่ 3	92	63**	54**	92	92	67**	83	96
ความสูงเฉลี่ย (10 ต้น) ซ้ำที่ 1	171	147	203	188	227	186	220	151
ความสูงเฉลี่ย (10 ต้น) ซ้ำที่ 2	184	183	194**	165	162	170	148	153
ความสูงเฉลี่ย (10 ต้น) ซ้ำที่ 3	172	170**	161**	195	188	189**	188	149
ความสูงเฉลี่ย	176	167	203	183	192	178	185	151
จำนวนหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 1	101	26	102	92	190	85	139	122
จำนวนหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 2	114	145	76**	129	106	64	79	149
จำนวนหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 3	79	72**	50**	109	156	73**	15	95
จำนวนหัวต่อแปลงย่อยเฉลี่ย	98	85.5	102	110	151	74.5	77	109

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

	ระยของ 5	ระยของ 90	เกษตรศาสตร์	ห้วยบง 60	CMR 35- 64-1	CMR 35-22- 196	CMR 35- 21-199	CMR 36-55- 166
			50		64-1	196	21-199	166
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8) ซ้ำที่ 1	45	5	82	53	87	46	67	81
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8) ซ้ำที่ 2	114	145	76**	129	106	64	79	149
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8) ซ้ำที่ 3	30	31**	17**	75	57	32**	3	33
น้ำหนักหัวต่อแปลงย่อย	63	75	82	85.7	83.3	55	49.7	87.7
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 1	28	16	32	24	39	37	34	19
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 2	32	29	17**	27	16	24	19	16
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อย (3 แถว x 8 ต้น) ซ้ำที่ 3	24	22**	15**	40	25	34**	30	22
น้ำหนักต้น และใบต่อแปลงย่อยเฉลี่ย	28	22.5	32	30.3	26.7	30.5	27.7	19
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance ซ้ำที่ 1	24.2	22.6	28.8	24.3	28.8	32.2	27.7	29
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance ซ้ำที่ 2	24.3	27.8	22.5**	23.8	30.6	28.8	20	25

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

	ระของ 5	ระของ 90	เกษตรศาสตร์	ห้วยบง 60	CMR 35-64-1	CMR 35-22-196	CMR 35-21-199	CMR 36-55-166
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance	22	24.4**	N	22.6	28.2	26.7**	N	24.1
ข้าที่ 3								
ปริมาณแป้งจากการวัดด้วย reimann scale balance	23.5	25.2	28.8	23.6	29.2	30.5	23.85	26
เฉลี่ย								
ปริมาณมันเส้นแห้ง ข้าที่ 1	35.82	34.67	38.49	35.90	39.14	41.58	38.34	39.28
ปริมาณมันเส้นแห้ง ข้าที่ 2	35.9	38.42	34.60**	35.54	40.43	39.14	32.8	36.40
ปริมาณมันเส้นแห้ง ข้าที่ 3	34.24	35.97**	N	34.67	38.70	37.62**	N	35.75
ปริมาณมันเส้นแห้ง เฉลี่ย	35.32	36.54	39.14	35.37	39.42	40.36	35.57	37.14

หมายเหตุ ** หมายถึงกลุ่มตัวอย่างที่จะไม่นำมาคิดค่าในการทดลองเพราะ มีประชากรไม่ถึง 70 เปอร์เซนต์

N หมายถึง ไม่มีหัว เลยไม่สามารถบันทึกค่า

ตารางผนวกที่ 5 การวัดความชื้นของแป้ง ข้าวที่ 1

น้ำหนักถ้วยอบ 105 °C จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็น ใน dissicator ชั่งน้ำหนัก (ได้น้ำหนักถ้วย) ตักตัวอย่างใส่ถ้วย ชั่งน้ำหนัก (ได้น้ำหนักรวม) มาคำนวณหาน้ำหนักตัวอย่าง น้ำหนักรวม – น้ำหนักถ้วย (ได้น้ำหนักตัวอย่าง) นำไปอบ 105 °C จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็น ใน dissicator ชั่งน้ำหนัก (ได้น้ำหนักหลังอบ) มาคำนวณหาน้ำหนักที่หาย น้ำหนักรวม – น้ำหนักหลังอบ (ได้น้ำหนักที่หาย) แล้วมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (น้ำหนักที่หาย X 100) / น้ำหนักตัวอย่าง (ได้เปอร์เซ็นต์ความชื้น)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังอบ	น้ำหนักที่หาย	% ความชื้น
ระยอง 5	4	10.2761	2.1350	12.4111	12.1397	0.2714	12.71
ระยอง 90	4	10.3008	2.3751	12.6759	12.3693	0.3066	12.91
เกษตรศาสตร์ 50	4	10.1649	2.2698	12.4347	12.1542	0.2805	12.36
หัวขบง 60	4	10.1234	2.1261	12.2495	12.0048	0.2447	11.51
CMR 35-64-1	4	10.4964	2.3788	12.8752	12.5710	0.3042	12.79
CMR 35-22-196	4	10.4589	2.5064	12.9653	12.6422	0.3231	12.89
CMR 35-21-199	4	10.0890	2.2581	12.3471	12.0601	0.2870	12.71
CMR 36-55-166	4	10.4541	2.2762	12.7303	12.4462	0.2841	12.48
ระยอง 5	6	10.2348	2.0322	12.2670	12.0222	0.2448	12.05
ระยอง 90	6	10.1576	2.1130	12.2706	12.0081	0.2625	12.42
เกษตรศาสตร์ 50	6	10.2110	2.0408	12.2518	12.0055	0.2463	12.07
หัวขบง 60	6	10.1570	2.2797	12.4367	12.1547	0.2820	12.37

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังอบ	น้ำหนักที่หาย	% ความชื้น
CMR 35-64-1	6	10.2468	2.3084	12.5552	12.2740	0.2812	12.18
CMR 35-22-196	6	10.2003	2.0590	12.2593	12.0044	0.2549	12.38
CMR 35-21-199	6	10.2007	2.3830	12.5837	12.314	0.2697	11.32
CMR 36-55-166	6	10.1287	2.4805	12.6092	12.3087	0.3005	12.11
ระยอง 5	8	10.2718	2.1578	12.4296	12.1683	0.2613	12.11
ระยอง 90	8	10.3022	2.0003	12.3025	12.0742	0.2283	11.41
เกษตรศาสตร์ 50	8	10.1718	2.6209	12.7927	12.4673	0.3254	12.41
หัวขบง 60	8	10.1452	2.4738	12.6190	12.3187	0.3003	12.14
CMR 35-64-1	8	10.1437	2.1266	12.2703	12.0143	0.2560	12.04
CMR 35-22-196	8	10.0878	2.2546	12.3424	12.0728	0.2696	11.96
CMR 35-21-199	8	10.0709	2.0886	12.1595	11.9098	0.2497	11.96
CMR 36-55-166	8	10.2708	2.2674	12.3424	12.0728	0.2696	11.96
ระยอง 5	10	10.1703	2.1172	12.2875	11.9375	0.3500	16.53
ระยอง 90	10	10.1849	2.3855	12.5704	12.2173	0.3531	14.80
เกษตรศาสตร์ 50	10	10.4735	2.2676	12.7411	12.4169	0.3242	14.30
หัวขบง 60	10	10.1975	2.2725	12.4700	12.0442	0.4258	18.74

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังอบ	น้ำหนักที่หาย	% ความชื้น
CMR 35-64-1	10	10.4105	2.2422	12.6527	12.3761	0.2766	12.34
CMR 35-22-196	10	10.1686	2.1517	12.3203	12.0531	0.2672	12.42
CMR 35-21-199	10	10.1577	2.4051	12.5628	12.1488	0.4140	17.21
CMR 36-55-166	10	10.1050	2.2431	12.3481	11.9550	0.3931	17.52
ระยอง 5	12	10.4938	2.3721	12.8659	12.5296	0.3363	14.18
ระยอง 90	12	10.0683	2.1714	12.2397	11.9363	0.3034	13.97
เกษตรศาสตร์ 50	12	10.1715	2.0964	12.2679	11.9364	0.3315	15.81
หัวขบง 60	12	10.1234	2.0529	12.1763	11.9174	0.2589	12.61
CMR 35-64-1	12	10.1384	2.3870	12.5254	12.2228	0.3026	12.68
CMR 35-22-196	12	10.4965	2.0512	12.5477	12.2577	0.2900	14.14
CMR 35-21-199	12	10.0815	2.0582	12.1397	11.7472	0.3925	19.07
CMR 36-55-166	12	10.1645	2.1100	12.2745	11.8422	0.4323	20.49

ตารางผนวกที่ 6 การวัดความชื้นของแป้ง ข้าวที่ 2

น้ำหนักถ้วยอบ 105 °C จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็น ใน dissicator ชั่งน้ำหนัก (ได้น้ำหนักถ้วย) ตักตัวอย่างใส่ถ้วย ชั่งน้ำหนัก (ได้น้ำหนักรวม) มาคำนวณหาน้ำหนักตัวอย่าง น้ำหนักรวม – น้ำหนักถ้วย (ได้น้ำหนักตัวอย่าง) นำไปอบ 105 °C จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็น ใน dissicator ชั่งน้ำหนัก (ได้น้ำหนักหลังอบ) มาคำนวณหาน้ำหนักที่หาย น้ำหนักรวม – น้ำหนักหลังอบ (ได้น้ำหนักที่หาย) แล้วมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (น้ำหนักที่หาย X 100) / น้ำหนักตัวอย่าง (ได้เปอร์เซ็นต์ความชื้น)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังอบ	น้ำหนักที่หาย	% ความชื้น
ระยอง 5	4	10.1320	2.3115	12.4435	12.1613	0.2822	12.21
ระยอง 90	4	10.2485	2.4532	12.7017	12.3945	0.3072	12.52
เกษตรศาสตร์ 50	4	10.5275	2.2311	12.7586	12.4930	0.2656	11.90
หัวขบง 60	4	10.0786	2.0293	12.1079	11.8748	0.2331	11.47
CMR 35-64-1	4	10.3282	2.4996	12.8278	12.5171	0.3107	12.43
CMR 35-22-196	4	10.2891	2.3582	12.6473	12.3519	0.2954	12.53
CMR 35-21-199	4	10.5155	2.1226	12.6381	12.3730	0.2651	12.49
CMR 36-55-166	4	10.0745	2.1404	12.2149	11.9548	0.2601	12.15
ระยอง 5	6	10.4314	2.2742	12.7056	12.4413	0.2643	11.62
ระยอง 90	6	10.4177	2.6835	13.1012	12.7774	0.3238	12.07
เกษตรศาสตร์ 50	6	10.1912	2.5989	12.7901	12.4857	0.3044	11.71
หัวขบง 60	6	10.3105	2.4757	12.7862	12.4929	0.2933	11.85

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังอบ	น้ำหนักที่หาย	% ความชื้น
CMR 35-64-1	6	10.4615	2.7036	13.1651	12.8427	0.3224	11.92
CMR 35-22-196	6	10.2050	2.4170	12.6220	12.3278	0.2942	12.17
CMR 35-21-199	6	10.1490	2.2592	12.4082	12.1569	0.2513	11.12
CMR 36-55-166	6	10.2350	2.4060	12.6410	12.3541	0.2869	11.92
ระยอง 5	8	10.3207	2.3388	12.6595	12.3834	0.2761	11.81
ระยอง 90	8	10.2473	1.9990	12.2463	12.0216	0.2247	11.24
เกษตรศาสตร์ 50	8	10.4446	2.4030	12.8476	12.5564	0.2912	12.12
หัวขบง 60	8	10.2004	2.1089	12.3093	12.0626	0.2467	11.70
CMR 35-64-1	8	10.2756	2.2472	12.5228	12.2569	0.2659	11.83
CMR 35-22-196	8	10.2496	2.0991	12.3487	12.1016	0.2471	11.77
CMR 35-21-199	8	10.2796	2.2176	12.4972	12.2370	0.2602	11.73
CMR 36-55-166	8	10.4098	2.0970	12.5068	12.2608	0.2460	11.73
ระยอง 5	10	10.1286	2.1135	12.2421	11.9024	0.3397	16.07
ระยอง 90	10	10.2436	2.2881	12.5317	12.2027	0.3290	14.38
เกษตรศาสตร์ 50	10	10.0644	2.1900	12.2544	11.9485	0.3059	13.97
หัวขบง 60	10	10.5264	2.1980	12.7244	12.3201	0.4043	18.39

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังอบ	น้ำหนักที่หาย	% ความชื้น
CMR 35-64-1	10	10.4418	2.5188	12.9606	12.6559	0.3047	12.10
CMR 35-22-196	10	10.1323	2.2173	12.3496	12.0775	0.2721	12.27
CMR 35-21-199	10	10.2163	2.1467	12.3630	11.9961	0.3669	17.09
CMR 36-55-166	10	10.1479	2.1538	12.3017	11.9261	0.3756	17.44
ระยอง 5	12	10.2811	2.0264	12.3075	12.0323	0.2752	13.58
ระยอง 90	12	10.1970	2.2824	12.4794	12.1685	0.3109	13.62
เกษตรศาสตร์ 50	12	10.1673	2.2890	12.4563	12.1005	0.3558	15.54
หัวขบง 60	12	10.2696	2.1791	12.4487	12.1821	0.2666	12.23
CMR 35-64-1	12	10.2689	2.2711	12.5400	12.2602	0.2798	12.32
CMR 35-22-196	12	10.2334	2.0780	12.3114	12.0246	0.2868	13.80
CMR 35-21-199	12	10.2619	2.1990	12.4609	12.0440	0.4169	18.96
CMR 36-55-166	12	10.1986	2.0538	12.2524	11.8376	0.4148	20.20

ตารางผนวกที่ 7 เปอร์เซ็นต์ความชื้นของแป้งเฉลี่ย

นำค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นซ้ำที่ 1 (ตารางผนวกที่ 5) กับ ซ้ำที่ 2 (ตารางผนวกที่ 6) มาหาค่าเฉลี่ย

	เดือนที่	% ความชื้น ซ้ำที่ 1	% ความชื้น ซ้ำที่ 2	% ความชื้นเฉลี่ย
ระยอง 5	4	12.71	12.21	12.46
ระยอง 90	4	12.91	12.52	12.72
เกษตรศาสตร์ 50	4	12.36	11.90	12.13
หัวขบง 60	4	11.51	11.49	11.50
CMR 35-64-1	4	12.79	12.43	12.61
CMR 35-22-196	4	12.89	12.53	12.71
CMR 35-21-199	4	12.71	12.49	12.60
CMR 36-55-166	4	12.48	12.15	12.32
ระยอง 5	6	12.05	11.62	11.83
ระยอง 90	6	12.42	12.07	12.24
เกษตรศาสตร์ 50	6	12.07	11.71	11.89
หัวขบง 60	6	12.37	11.85	12.11
CMR 35-64-1	6	12.18	11.92	12.05
CMR 35-22-196	6	12.38	12.17	12.28

ตารางผนวกที่ 7 (ต่อ)

	เดือนที่	% ความชื้น ชั้นที่ 1	% ความชื้น ชั้นที่ 2	% ความชื้นเฉลี่ย
CMR 35-21-199	6	11.32	11.12	11.22
CMR 36-55-166	6	12.11	11.92	12.02
ระยอง 5	8	12.11	11.81	11.96
ระยอง 90	8	11.41	11.24	11.33
เกษตรศาสตร์ 50	8	12.42	12.12	12.27
หัวขบง 60	8	12.14	11.70	11.92
CMR 35-64-1	8	12.04	11.83	11.94
CMR 35-22-196	8	11.96	11.77	11.86
CMR 35-21-199	8	11.96	11.73	11.84
CMR 36-55-166	8	12.09	11.73	11.91
ระยอง 5	10	16.53	16.07	16.30
ระยอง 90	10	14.80	14.38	14.59
เกษตรศาสตร์ 50	10	14.30	13.97	14.13
หัวขบง 60	10	18.74	18.39	18.57

ตารางผนวกที่ 7 (ต่อ)

	เดือนที่	% ความชื้น ชั้นที่ 1	% ความชื้น ชั้นที่ 2	% ความชื้นเฉลี่ย
CMR 35-64-1	10	12.34	12.10	12.22
CMR 35-22-196	10	12.42	12.27	12.34
CMR 35-21-199	10	17.21	17.09	17.15
CMR 36-55-166	10	17.52	17.44	17.48
ระยอง 5	12	14.18	13.58	13.88
ระยอง 90	12	13.97	13.62	13.80
เกษตรศาสตร์ 50	12	15.81	15.54	15.68
หัวขบง 60	12	12.61	12.23	12.42
CMR 35-64-1	12	12.68	12.32	12.50
CMR 35-22-196	12	14.14	13.80	13.97
CMR 35-21-199	12	19.07	18.96	19.01
CMR 36-55-166	12	20.49	20.20	20.34

ตารางผนวกที่ 8 การวัดเปอร์เซ็นต์เถ้าของแป้ง ข้าวที่ 1

น้ำหนักถ้วยอบ 105 °C จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็น ใน dissicator ชั่งน้ำหนัก (ได้น้ำหนักถ้วย) ตักตัวอย่างใส่ถ้วย ชั่งน้ำหนัก (ได้น้ำหนักรวม)
 มาคำนวณหาน้ำหนักตัวอย่าง = น้ำหนักรวม – น้ำหนักถ้วย (ได้น้ำหนักตัวอย่าง) นำไปเผา 600 °C 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน dissicator ชั่งน้ำหนัก
 (ได้น้ำหนักหลังเผา) มาคำนวณหาน้ำหนักที่หาย = น้ำหนักรวม – น้ำหนักหลังเผา (ได้น้ำหนักที่หาย) แล้วมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เถ้า
 (น้ำหนักที่หาย X 100)/ น้ำหนักตัวอย่าง (ได้เปอร์เซ็นต์เถ้า)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังเผา	น้ำหนักที่หาย	% เถ้า
ระยอง 5	4	31.6867	1.4942	33.1809	31.6887	1.4922	0.13
ระยอง 90	4	25.1722	1.4937	26.6659	25.1726	1.4933	0.03
เกษตรศาสตร์ 50	4	26.3623	1.5015	27.8638	26.3629	1.5009	0.04
หัวขบง 60	4	27.1167	1.5093	28.6260	27.1178	1.5082	0.07
CMR 35-64-1	4	31.3680	1.4970	32.8650	31.3687	1.4963	0.05
CMR 35-22-196	4	35.9505	1.4976	37.4481	35.9512	1.4969	0.05
CMR 35-21-199	4	22.4326	1.4951	23.9277	22.4347	1.4930	0.14
CMR 36-55-166	4	34.2845	1.4949	35.7794	34.2854	1.4940	0.06
ระยอง 5	6	27.2530	1.4918	28.7448	27.2542	1.4906	0.08
ระยอง 90	6	28.3079	1.4545	29.7624	28.3082	1.4542	0.02
เกษตรศาสตร์ 50	6	26.6570	1.5099	28.1669	26.6575	1.5094	0.03
หัวขบง 60	6	26.5036	1.5013	28.0049	26.5046	1.5003	0.07

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังเผา	น้ำหนักที่หาย	% ฝ้า
CMR 35-64-1	6	29.4539	1.4999	30.9538	29.4546	1.4992	0.05
CMR 35-22-196	6	31.8319	1.4503	33.2822	31.8326	1.4496	0.05
CMR 35-21-199	6	30.1900	1.5047	31.6947	30.1910	1.5037	0.07
CMR 36-55-166	6	24.4365	1.4974	25.9339	24.4369	1.4970	0.03
ระยอง 5	8	34.5985	1.4697	36.0682	34.5989	1.4693	0.03
ระยอง 90	8	29.9538	1.4831	31.4369	29.9541	1.4828	0.02
เกษตรศาสตร์ 50	8	26.1830	1.4889	27.6719	26.1833	1.4886	0.02
หัวขบง 60	8	29.6555	1.4984	31.1539	29.6559	1.4980	0.03
CMR 35-64-1	8	30.1502	1.4580	31.6082	30.1504	1.4578	0.01
CMR 35-22-196	8	28.7737	1.4987	30.2724	28.7738	1.4986	0.01
CMR 35-21-199	8	30.7806	1.4720	32.2526	30.7815	1.4711	0.06
CMR 36-55-166	8	34.1483	1.4929	35.6412	34.1486	1.4926	0.02
ระยอง 5	10	26.3616	1.4780	27.8396	26.3620	1.4776	0.03
ระยอง 90	10	32.3148	1.4682	33.7830	32.3159	1.4671	0.07
เกษตรศาสตร์ 50	10	31.6860	1.4685	33.1545	31.6867	1.4678	0.05
หัวขบง 60	10	25.1714	1.4677	26.6391	25.1717	1.4674	0.02

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังเผา	น้ำหนักที่หาย	% ฝ้า
CMR 35-64-1	10	32.2217	1.4989	33.7206	32.2227	1.4979	0.07
CMR 35-22-196	10	26.5029	1.4924	27.9953	26.5040	1.4913	0.07
CMR 35-21-199	10	35.9499	1.4867	37.4366	35.9509	1.4857	0.07
CMR 36-55-166	10	31.2513	1.5278	32.7791	31.2531	1.5260	0.12
ระยอง 5	12	30.5560	1.4759	32.0319	30.5566	1.4753	0.04
ระยอง 90	12	30.9283	1.4617	32.3900	30.9285	1.4615	0.01
เกษตรศาสตร์ 50	12	29.7480	1.4908	31.2388	29.7487	1.4901	0.05
ห้วยบง 60	12	30.3936	1.4961	31.8897	30.3948	1.4949	0.08
CMR 35-64-1	12	29.1390	1.4961	30.6351	29.1396	1.4955	0.04
CMR 35-22-196	12	32.6256	1.4538	34.0794	32.6265	1.4529	0.06
CMR 35-21-199	12	31.2281	1.4599	32.6880	31.2288	1.4592	0.05
CMR 36-55-166	12	27.2532	1.4836	28.7368	27.2542	1.4826	0.07

ตารางผนวกที่ 9 การวัดเปอร์เซ็นต์เถ้าของแป้ง ชั้นที่ 2

น้ำหนักถ้วยอบ 105 °C จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็น ใน dissicator ชั่งน้ำหนัก (ได้น้ำหนักถ้วย) ตักตัวอย่างใส่ถ้วย ชั่งน้ำหนัก (ได้น้ำหนักรวม)
 มาคำนวณหาน้ำหนักตัวอย่าง = น้ำหนักรวม – น้ำหนักถ้วย (ได้น้ำหนักตัวอย่าง) นำไปเผา 600 °C 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน dissicator ชั่งน้ำหนัก
 (ได้น้ำหนักหลังเผา) มาคำนวณหาน้ำหนักที่หาย = น้ำหนักรวม – น้ำหนักหลังเผา (ได้น้ำหนักที่หาย) แล้วมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เถ้า
 (น้ำหนักที่หาย X 100)/ น้ำหนักตัวอย่าง (ได้เปอร์เซ็นต์เถ้า)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังเผา	น้ำหนักที่หาย	% เถ้า
ระยอง 5	4	33.4762	1.4969	34.9731	33.4781	1.4950	0.13
ระยอง 90	4	25.0971	1.4921	26.5892	25.0978	1.4914	0.05
เกษตรศาสตร์ 50	4	32.3156	1.5073	33.8229	32.3161	1.5068	0.03
หัวขบง 60	4	29.7973	1.5004	31.2977	29.7988	1.4989	0.10
CMR 35-64-1	4	30.3945	1.4950	31.8895	30.3955	1.4940	0.07
CMR 35-22-196	4	32.6252	1.4905	34.1157	32.6260	1.4897	0.05
CMR 35-21-199	4	29.2788	1.4990	30.7778	29.2807	1.4971	0.13
CMR 36-55-166	4	30.7816	1.5006	32.2822	30.7824	1.4998	0.05
ระยอง 5	6	30.8104	1.5043	32.3147	30.8111	1.5036	0.05
ระยอง 90	6	31.2290	1.4376	32.6666	31.2295	1.4371	0.03
เกษตรศาสตร์ 50	6	29.8488	1.4961	31.3449	29.8490	1.4959	0.01
หัวขบง 60	6	27.4149	1.5021	28.9170	27.4159	1.5011	0.07

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังเผา	น้ำหนักที่หาย	% ภูเขา
CMR 35-64-1	6	30.5312	1.4616	31.9928	30.5316	1.4612	0.03
CMR 35-22-196	6	30.4560	1.4466	31.9026	30.4568	1.4458	0.06
CMR 35-21-199	6	31.2026	1.4613	32.6639	31.2029	1.4610	0.02
CMR 36-55-166	6	27.9992	1.4854	29.4846	27.9993	1.4853	0.01
ระยอง 5	8	23.0331	1.5039	24.5370	23.0333	1.5037	0.01
ระยอง 90	8	30.0216	1.4826	31.5042	30.0219	1.4823	0.02
เกษตรศาสตร์ 50	8	31.0933	1.4977	32.5910	31.0942	1.4968	0.06
หัวขบง 60	8	31.7397	1.4520	33.1917	31.7404	1.4513	0.05
CMR 35-64-1	8	30.5554	1.4887	32.0441	30.5555	1.4886	0.01
CMR 35-22-196	8	27.4981	1.4596	28.9577	27.4984	1.4593	0.02
CMR 35-21-199	8	30.6557	1.5070	32.1627	30.6559	1.5068	0.01
CMR 36-55-166	8	30.7737	1.4710	32.2447	30.7739	1.4708	0.01
ระยอง 5	10	29.2780	1.4912	30.7692	29.2786	1.4906	0.04
ระยอง 90	10	27.4145	1.4978	28.9123	27.4147	1.4976	0.01
เกษตรศาสตร์ 50	10	22.4317	1.4942	23.9259	22.4325	1.4934	0.05
หัวขบง 60	10	29.7966	1.4729	31.2695	29.7974	1.4721	0.05

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

	เดือนที่	น้ำหนักถ้วย	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักรวม	น้ำหนักรวม หลังเผา	น้ำหนักที่หาย	% ฝ้า
CMR 35-64-1	10	27.1148	1.5048	28.6196	27.1156	1.5040	0.05
CMR 35-22-196	10	25.0957	1.4729	26.5686	25.0975	1.4711	0.12
CMR 35-21-199	10	24.4306	1.5058	25.9364	24.4312	1.5052	0.04
CMR 36-55-166	10	34.2838	1.4743	35.7581	34.2851	1.4730	0.09
ระยอง 5	12	33.4750	1.4866	34.9616	33.4765	1.4851	0.10
ระยอง 90	12	30.6375	1.4924	32.1299	30.6378	1.4921	0.02
เกษตรศาสตร์ 50	12	32.1055	1.4955	33.6010	32.1062	1.4948	0.05
ห้วยบง 60	12	30.3204	1.4992	31.8196	30.3219	1.4977	0.10
CMR 35-64-1	12	31.3680	1.4943	32.8623	31.3685	1.4938	0.03
CMR 35-22-196	12	26.3222	1.5078	27.8300	26.3233	1.5067	0.07
CMR 35-21-199	12	29.6269	1.4470	31.0739	29.6277	1.4462	0.06
CMR 36-55-166	12	25.6548	1.5021	27.1569	25.6559	1.5010	0.07

ตารางผนวกที่ 10 เปอร์เซ็นต์ถ้ำของแป้งเฉลี่ย

นำค่าเปอร์เซ็นต์ถ้ำซ้าที่ 1 (ตารางผนวกที่ 8) กับ ซ้าที่ 2 (ตารางผนวกที่ 9) มาหาค่าเฉลี่ย

	เดือนที่	% ถ้ำ ซ้าที่ 1	% ถ้ำ ซ้าที่ 2	% ถ้ำเฉลี่ย
ระยอง 5	4	0.13	0.13	0.13
ระยอง 90	4	0.03	0.05	0.04
เกษตรศาสตร์ 50	4	0.04	0.03	0.04
ห้วยบง 60	4	0.07	0.10	0.09
CMR 35-64-1	4	0.05	0.07	0.06
CMR 35-22-196	4	0.05	0.05	0.05
CMR 35-21-199	4	0.14	0.13	0.13
CMR 36-55-166	4	0.06	0.05	0.06
ระยอง 5	6	0.08	0.05	0.06
ระยอง 90	6	0.02	0.03	0.03
เกษตรศาสตร์ 50	6	0.03	0.01	0.02
ห้วยบง 60	6	0.07	0.07	0.07
CMR 35-64-1	6	0.05	0.03	0.04
CMR 35-22-196	6	0.05	0.06	0.05
CMR 35-21-199	6	0.07	0.02	0.04
CMR 36-55-166	6	0.03	0.01	0.02

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

	เดือนที่	% ฝ้า ซ้ำที่ 1	% ฝ้า ซ้ำที่ 2	% ฝ้าเฉลี่ย
ระยอง 5	8	0.03	0.01	0.02
ระยอง 90	8	0.02	0.02	0.02
เกษตรศาสตร์ 50	8	0.02	0.06	0.04
หัวขบง 60	8	0.03	0.05	0.04
CMR 35-64-1	8	0.01	0.01	0.01
CMR 35-22-196	8	0.01	0.02	0.01
CMR 35-21-199	8	0.06	0.01	0.04
CMR 36-55-166	8	0.02	0.01	0.02
ระยอง 5	10	0.03	0.04	0.03
ระยอง 90	10	0.07	0.01	0.04
เกษตรศาสตร์ 50	10	0.05	0.05	0.05
หัวขบง 60	10	0.02	0.05	0.04
CMR 35-64-1	10	0.07	0.05	0.06
CMR 35-22-196	10	0.07	0.12	0.10
CMR 35-21-199	10	0.07	0.04	0.05
CMR 36-55-166	10	0.12	0.09	0.10
ระยอง 5	12	0.04	0.10	0.07
ระยอง 90	12	0.01	0.02	0.02

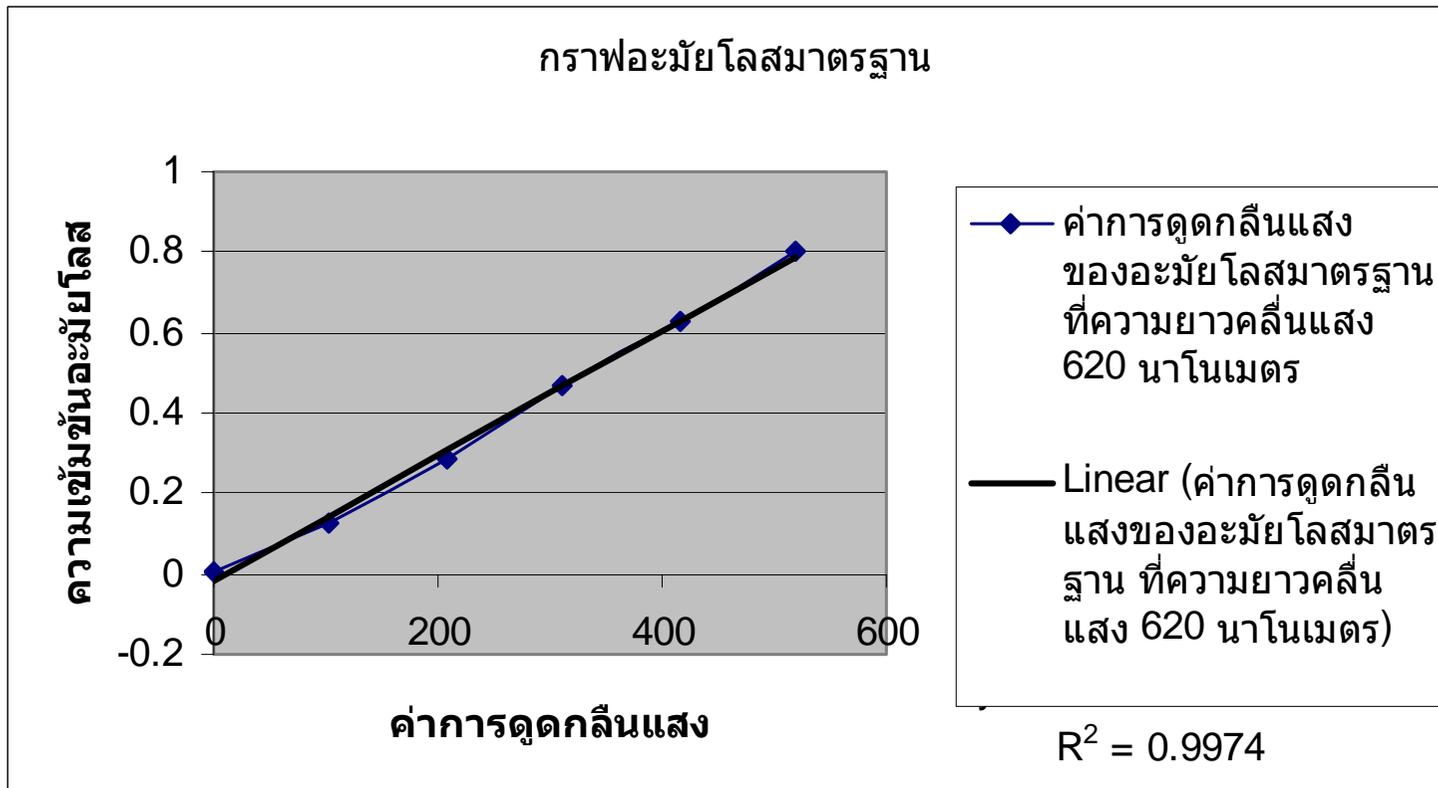
ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

	เดือนที่	% ฝ้า ซ้ำที่ 1	% ฝ้า ซ้ำที่ 2	% ฝ้าเฉลี่ย
เกษตรศาสตร์ 50	12	0.05	0.05	0.05
ห้วยบง 60	12	0.08	0.10	0.09
CMR 35-64-1	12	0.04	0.03	0.04
CMR 35-22-196	12	0.06	0.07	0.07
CMR 35-21-199	12	0.05	0.06	0.05
CMR 36-55-166	12	0.07	0.07	0.07

ตารางผนวกที่ 11 การดูดกลืนแสงของอะมีนโธสมมาตรฐาน

ซังอะมีนโธของมันเป็นมาตรฐาน (sigma) 0.0130 กรัม ละลายใน 1.5 mM I₂ / 90 % dimethyl sulfoxide (DMSO) จำนวน 25 มิลลิลิตร ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่า ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร วัด 3 ค่า แล้วหาค่าเฉลี่ย

ความเข้มข้น ($\mu\text{g./ml.}$)	ความเข้มข้นจริง ($\mu\text{g./ml.}$)	น้ำหนักตัวอย่าง	ค่าดูดกลืนแสง ซ้ำที่ 1	ค่าดูดกลืนแสง ซ้ำที่ 2	ค่าดูดกลืนแสง ซ้ำที่ 3	ค่าดูดกลืนแสง เฉลี่ย
0	0	0.0130 g. / 25 ml.	0.005	0.005	0.005	0.005
100	104	0.0130 g. / 25 ml.	0.127	0.128	0.127	0.127
200	208	0.0130 g. / 25 ml.	0.282	0.288	0.299	0.290
300	312	0.0130 g. / 25 ml.	0.476	0.462	0.460	0.466
400	416	0.0130 g. / 25 ml.	0.627	0.620	0.634	0.627
500	520	0.0130 g. / 25 ml.	0.786	0.808	0.811	0.802



ภาพผนวกที่ 1 กราฟอะมัยโลสมมาตรฐาน

Slop ที่ได้จากการ plot กราฟตัดแกน $Y = 0.0016 X - 0.0181$

ตารางผนวกที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย

ชั่งตัวอย่างแป้งมันสำปะหลัง 0.02 กรัม ละลายใน 1.5 mM I₂/ 90 % dimethyl sulfoxide (DMSO) จำนวน 4 มิลลิลิตร บีบตะมา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่า ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร วัด 3 ค่า แล้วหาค่าเฉลี่ย

	เดือนที่	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสง เฉลี่ย
ระยอง 5	4	0.225	0.238	0.225	0.229
ระยอง 90	4	0.195	0.207	0.198	0.200
เกษตรศาสตร์ 50	4	0.247	0.240	0.235	0.241
หัวขบง 60	4	0.248	0.222	0.230	0.233
CMR 35-64-1	4	0.236	0.216	0.221	0.224
CMR 35-22-196	4	0.224	0.229	0.229	0.227
CMR 35-21-199	4	0.208	0.223	0.214	0.215
CMR 36-55-166	4	0.200	0.217	0.228	0.215
ระยอง 5	6	0.217	0.239	0.217	0.224
ระยอง 90	6	0.229	0.220	0.225	0.225
เกษตรศาสตร์ 50	6	0.242	0.243	0.239	0.241
หัวขบง 60	6	0.237	0.212	0.198	0.216
CMR 35-64-1	6	0.245	0.248	0.252	0.248
CMR 35-22-196	6	0.239	0.249	0.262	0.250

ตารางผนวกที่ 12 (ต่อ)

	เดือนที่	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสง เฉลี่ย
CMR 35-21-199	6	0.227	0.254	0.249	0.243
CMR 36-55-166	6	0.228	0.246	0.232	0.235
ระยอง 5	8	0.219	0.231	0.233	0.228
ระยอง 90	8	0.233	0.244	0.241	0.239
เกษตรศาสตร์ 50	8	0.217	0.246	0.227	0.230
ห้วยบง 60	8	0.222	0.237	0.263	0.241
CMR 35-64-1	8	0.224	0.243	0.228	0.232
CMR 35-22-196	8	0.216	0.221	0.220	0.219
CMR 35-21-199	8	0.207	0.207	0.221	0.212
CMR 36-55-166	8	0.227	0.235	0.222	0.228
ระยอง 5	10	0.219	0.204	0.217	0.213
ระยอง 90	10	0.208	0.220	0.217	0.215
เกษตรศาสตร์ 50	10	0.247	0.220	0.218	0.228
ห้วยบง 60	10	0.191	0.200	0.202	0.198
CMR 35-64-1	10	0.236	0.241	0.231	0.236
CMR 35-22-196	10	0.224	0.214	0.214	0.217
CMR 35-21-199	10	0.206	0.204	0.207	0.206
CMR 36-55-166	10	0.227	0.219	0.212	0.219

ตารางผนวกที่ 12 (ต่อ)

	เดือนที่	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสง เฉลี่ย
ระยอง 5	12	0.236	0.229	0.231	0.232
ระยอง 90	12	0.255	0.255	0.275	0.262
เกษตรศาสตร์ 50	12	0.215	0.226	0.215	0.219
ห้วยบง 60	12	0.239	0.237	0.241	0.239
CMR 35-64-1	12	0.238	0.233	0.241	0.237
CMR 35-22-196	12	0.236	0.236	0.239	0.237
CMR 35-21-199	12	0.220	0.205	0.221	0.215
CMR 36-55-166	12	0.206	0.205	0.211	0.207

ตารางผนวกที่ 13 ปริมาณอะมัยโลส

นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ ค่าการดูดกลืนแสงจากตารางผนวกที่ 11 เปอร์เซนต์ความชื้นจากตารางผนวกที่ 7 จำนวน dry basis = [100-% ความชื้น (น้ำหนักตัวอย่าง)]/100 ความเข้มข้น = (ค่าดูดกลืนแสง-ค่าสัมประสิทธิ์คงที่ (b))/ ค่าความชัน (a) ปริมาณอะมัยโลส = (ความเข้มข้น X dilution factor X ปริมาตร DMSO X 100)/ (1000000 X dry basis)

	เดือนที่	น้ำหนักตัวอย่าง	ค่า dilution factor	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	เปอร์เซนต์ความชื้น	Dry basis	ความเข้มข้น	ปริมาณอะมัยโลส
ระยอง 5	4	0.0205	8 X	0.229	12.46	0.0179	132.02	23.54
ระยอง 90	4	0.0201	8 X	0.200	12.72	0.0175	113.69	20.74
เกษตรศาสตร์ 50	4	0.0207	8 X	0.241	12.13	0.0182	139.10	24.47
หัวขบง 60	4	0.0208	8 X	0.233	11.50	0.0184	134.52	23.38
CMR 35-64-1	4	0.0204	8 X	0.224	12.61	0.0178	128.90	23.14
CMR 35-22-196	4	0.0200	8 X	0.227	12.71	0.0175	130.77	23.97
CMR 35-21-199	4	0.0203	8 X	0.215	12.60	0.0177	123.06	22.20
CMR 36-55-166	4	0.0200	8 X	0.215	12.32	0.0175	123.06	22.46
ระยอง 5	6	0.0204	8 X	0.224	11.83	0.0180	128.90	22.93
ระยอง 90	6	0.0201	8 X	0.225	12.24	0.0176	129.10	23.42
เกษตรศาสตร์ 50	6	0.0206	8 X	0.241	11.89	0.0182	139.52	24.60
หัวขบง 60	6	0.0203	8 X	0.216	12.11	0.0178	123.48	22.15
CMR 35-64-1	6	0.0210	8 X	0.248	12.05	0.0185	143.90	24.93

ตารางผนวกที่ 13 (ต่อ)

	เดือนที่	น้ำหนักตัวอย่าง	ค่า dilution factor	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์ความชื้น	Dry basis	ความเข้มข้น	ปริมาณอะมัยโลส
CMR 35-22-196	6	0.0206	8 X	0.250	12.28	0.0181	144.94	25.67
CMR 35-21-199	6	0.0212	8 X	0.243	11.22	0.0188	140.77	23.93
CMR 36-55-166	6	0.0202	8 X	0.235	12.02	0.0178	135.77	24.45
ระยอง 5	8	0.0213	8 X	0.228	11.96	0.0188	130.98	22.35
ระยอง 90	8	0.0214	8 X	0.239	11.33	0.0190	138.27	23.32
เกษตรศาสตร์ 50	8	0.0209	8 X	0.230	12.27	0.0183	132.44	23.12
หัวขบง 60	8	0.0205	8 X	0.241	11.92	0.0181	112.23	21.83
CMR 35-64-1	8	0.0214	8 X	0.232	11.94	0.0188	133.48	22.66
CMR 35-22-196	8	0.0206	8 X	0.219	11.86	0.0182	125.56	22.13
CMR 35-21-199	8	0.0209	8 X	0.212	11.84	0.0184	120.98	21.01
CMR 36-55-166	8	0.0209	8 X	0.228	11.91	0.0184	131.19	22.80
ระยอง 5	10	0.0209	8 X	0.213	16.30	0.0175	122.02	22.32
ระยอง 90	10	0.0203	8 X	0.215	14.59	0.0173	123.06	22.71
เกษตรศาสตร์ 50	10	0.0212	8 X	0.228	14.13	0.0182	131.40	23.10
หัวขบง 60	10	0.0202	8 X	0.198	18.57	0.0165	112.23	21.83

ตารางผนวกที่ 13 (ต่อ)

	เดือนที่	น้ำหนักตัวอย่าง	ค่า dilution factor	ค่าการดูดกลืน แสงเฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์ ความชื้น	Dry basis	ความเข้มข้น	ปริมาณ อะมัยโลส
CMR 35-64-1	10	0.0206	8 X	0.236	12.22	0.0181	136.19	24.10
CMR 35-22-196	10	0.0207	8 X	0.217	12.34	0.0181	124.52	21.96
CMR 35-21-199	10	0.0209	8 X	0.206	17.15	0.0173	117.23	21.67
CMR 36-55-166	10	0.0210	8 X	0.219	17.48	0.0173	125.77	23.23
ระยอง 5	12	0.0205	8 X	0.232	13.88	0.0177	133.69	24.23
ระยอง 90	12	0.0215	8 X	0.262	13.80	0.0119	152.23	26.28
เกษตรศาสตร์ 50	12	0.0204	8 X	0.219	15.68	0.0172	125.35	23.32
ห้วยบง 60	12	0.0209	8 X	0.239	12.42	0.0183	138.06	24.14
CMR 35-64-1	12	0.0209	8 X	0.237	12.50	0.0183	137.02	23.98
CMR 35-22-196	12	0.0210	8 X	0.237	13.97	0.0181	136.81	24.23
CMR 35-21-199	12	0.0203	8 X	0.215	19.01	0.0164	123.27	23.99
CMR 36-55-166	12	0.0204	8 X	0.207	20.34	0.0163	118.27	23.29

ตารางผนวกที่ 14 ลักษณะประจำพันธุ์ของมันสำปะหลัง 8 พันธุ์

	ระของ 5	ระของ 90	เกษตรศาสตร์ 50	หัวขบง 60	CMR 35-64-1	CMR 36-55-166	CMR 35-22-196	CMR 35-21-199
พ่อพันธุ์ x แม่พันธุ์	27-77-10 กับ ระของ 3	CMC 76 กับ V43	ระของ 1 กับ ระของ 90	ระของ 3 กับ เกษตรศาสตร์ 50	CMR 31-19-23 กับ OMR 29-20- 118	CMR 30-70-25 กับ OMR 29- 20-118	ระของ 5 กับ OMR 29-20-118	ระของ 5 กับ เกษตรศาสตร์ 50
รับรองพันธุ์	พ.ศ. 2537	พ.ศ. 2534	พ.ศ. 2536	พ.ศ. 2546	พ.ศ. 2548	---	---	---
ลักษณะใบ	Lanceolate	Oblanceolate	Lanceolate	Lanceolate	Lanceolate	Lanceolate	Lanceolate	Oblanceolate
สีเขียว	ยอดอ่อนสีม่วง อ่อน ไม่มีขนใบ	ยอดอ่อนสีเขียว อ่อน ไม่มีขนใบ	ยอดอ่อนสีม่วง ไม่มีขนใบ	ยอดอ่อนสีม่วง ไม่มีขนใบ	ยอดอ่อนสีม่วง ไม่มีขนใบ	ยอดอ่อนสีเขียว อ่อน	ยอดอ่อนสีเขียว อมม่วง	ยอดอ่อนสีเขียว ไม่มีขนใบ
สีใบ	ใบสีเขียวแก่	ใบสีเขียวเข้ม	ใบสีเขียวอมม่วง	ใบสีเขียว	ใบสีเขียว	ใบสีเขียว	ใบสีเขียวเข้ม	ใบสีเขียวเข้ม
สีลำต้น	ลำต้นสีน้ำตาล อมเขียว	ลำต้นสีน้ำตาลอม ส้ม	ลำต้นสีเขียว เหลืองเงิน	ลำต้นสีเขียว เหลืองเงิน	ลำต้นสีน้ำตาล อมเหลือง	ลำต้นสีเขียว เหลืองเงิน	ลำต้นสีเขียว เหลืองเงิน	ลำต้นสีเขียว
สีก้านใบ	ก้านสีแดงเข้ม	ก้านสีเขียวอ่อน	ก้านสีเขียว	ก้านสีเขียว	ก้านสีเขียว	ก้านสีเขียว เหลืองแดง	ก้านสีเขียว เหลืองแดง	ก้านสีเขียว
ความสูง	170-220 เซนติเมตร	160-220 เซนติเมตร	221 เซนติเมตร	180 เซนติเมตร	183 เซนติเมตร	151 เซนติเมตร	182 เซนติเมตร	192 เซนติเมตร

ตารางผนวกที่ 14 (ต่อ)

	ระยอง 5	ระยอง 90	ห้วยบง 60	เกษตรศาสตร์ 50	CMR 35-64-1	CMR 36-55-166	CMR 35-22-196	CMR 35-21-199
ระดับในการ แตกกิ่ง	ระดับ 3 ลำต้น ตรงแตกกิ่งน้อย ทำมุม 15 – 30 องศา	ระดับ 0-1 ลำต้น ตรง ทำมุม 75-90 องศา	ระดับ 3 ลำต้น ตรงแตกกิ่งน้อย ทำมุม 15 – 30 องศา	ระดับ 2 ลำต้น ตรงทำมุม 60-75 องศา	ระดับ 0-1 ลำต้น ตรง ทำมุม 45 – 60 องศา	ระดับ 3 ลำต้น ตรงแตกกิ่งน้อย ทำมุม 15 – 30 องศา	ระดับ 3 ลำต้น ตรงแตกกิ่งน้อย ทำมุม 15 – 30 องศา	ระดับ 0-1 ลำต้น ตรง ทำมุม 75 – 90 องศา
ความสูงของ กิ่งแรกที่แตก	108 เซนติเมตร	120 เซนติเมตร	150 เซนติเมตร	155 เซนติเมตร	180 เซนติเมตร	36 เซนติเมตร	141 เซนติเมตร	185 เซนติเมตร
ลักษณะหัว	เปลือกสีน้ำตาล อ่อน หัวอ้วนสั้น มีจำนวนหัวเฉลี่ย ต่อต้น 10.3 หัว	เปลือกสีน้ำตาล เข้ม หัวเรียวยาว มีจำนวนหัวเฉลี่ย ต่อต้น 9.1 หัว	เปลือกสีน้ำตาล อ่อน มีจำนวน หัวเฉลี่ยต่อต้น 10.2 หัว	เปลือกสีน้ำตาล อ่อน	เปลือกสีน้ำตาล	เปลือกสีน้ำตาล	เปลือกสีน้ำตาล	เปลือกสีน้ำตาล
สีเนื้อหัว	เนื้อสีขาว	เนื้อสีขาว	เนื้อสีขาว	เนื้อสีขาว	เนื้อสีขาว	เนื้อสีขาว	เนื้อสีขาว	เนื้อสีขาว
ผลผลิตหัวสด	4420 กก./ไร่	3810 กก./ไร่	5751 กก./ไร่	4529 กก./ไร่	---กก./ไร่	6080 กก./ไร่	--- กก./ไร่	--- กก./ไร่
ผลผลิตมัน แห้ง	1554 กก./ไร่	1400 กก./ไร่	2138 กก./ไร่	1548 กก./ไร่	2110 กก./ไร่	--- กก./ไร่	--- กก./ไร่	--- กก./ไร่
ผลผลิตแป้ง	1027 กก./ไร่	966 กก./ไร่	1460 กก./ไร่	1012 กก./ไร่	1240 กก./ไร่	1710 กก./ไร่	--- กก./ไร่	--- กก./ไร่
เปอร์เซ็นต์ แป้ง	22.3 %	24.9 %	25.4 %	21.9 %	29.2 %	27.7 %	--- %	--- %

ตารางผนวกที่ 14 (ต่อ)

	ระของ 5	ระของ 90	ห้วยบง 60	เกษตรศาสตร์ 50	CMR 35-64-1	CMR 36-55-166	CMR 35-22-196	CMR 35-21-199
ข้อดี	ผลผลิตหัวสด และน้ำหนักหัว แห้งสูง ปรับตัว เข้ากับสภาพ แวดล้อมได้ดี หัว อ้วนสั้นเก็บเกี่ยว ง่าย	ผลผลิตหัวสด และน้ำหนักหัว แห้งสูง	งอกดี ทรงต้น สวย ลำต้นสูง ใหญ่คลุมวัชพืช	ผลผลิตหัวสด และน้ำหนักหัว แห้งสูง ปรับตัว เข้ากับสภาพ แวดล้อมได้ดี	เปอร์เซ็นต์แป้ง สูง ผลิตเอทานอลได้ สูง	เปอร์เซ็นต์แป้ง สูง	เปอร์เซ็นต์แป้ง สูง	เปอร์เซ็นต์แป้ง สูง
ข้อเสีย	---	หากตัดท่อนพันธุ์ แล้วไม่ปลูก ภายใน 3 สัปดาห์ จะทำให้ เปอร์เซ็นต์ความ งอกลดลงอย่าง มาก	---	---	ควรเก็บเมื่ออายุ มากกว่า 1 ปี เพราะมี เปอร์เซ็นต์แป้ง สูง แต่มีการ สะสมน้ำหนักช้า กว่าพันธุ์อื่น			

หมายเหตุ --- คือ ยังไม่มีการรายงานอย่างเป็นทางการของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายเกียรติพงษ์ คัมภีรศาสตร์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	30 เมษายน 2522
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลรามาริบดี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยระดับบัณฑิตโท-เอก (40,000 บาท)