



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานที่ตำแหน่ง <i>LOC_Os06g08550</i> ที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว		
	Detection of the polymorphism at <i>LOC_Os06g08550</i> locus associated with anthocyanin content in rice grain.		
ชื่อนิติ	นางสาวสโรชา สามารถ	เลขประจำตัวนิติ	6032153323
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์		
ปีการศึกษา	2563		

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานที่ตำแหน่ง LOC_Os06g08550 ที่สัมพันธ์กับปริมาณ
แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว

นางสาวสโรชา สามารถ

6032153323

โครงการวิทยาสตรนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

Detection of the polymorphism at *LOC_Os06g08550* locus associated with
anthocyanin content in rice grain

Miss Sarocha Samat

6032153323

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Degree of Bachelor of Science

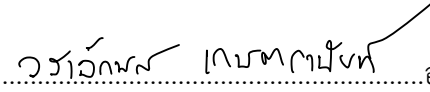
Genetics program, Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2020

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์ (ภาษาไทย)	การตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานที่ตำแหน่ง LOC_Os06g08550 ที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว
ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์ (ภาษาอังกฤษ)	Detection of the polymorphism at LOC_Os06g08550 locus associated with anthocyanin content in rice grain
ชื่อนิติกร	นางสาวสโรชา สามารถ
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิตา ปาณิชะวุฒิ
ปีการศึกษา	2563

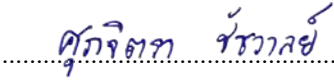
ภาควิชาพฤกษศาสตร์อนุมัติให้โครงการวิทยาศาสตร์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิตา ปาณิชะวุฒิ)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

ลิขสิทธิ์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานที่ตำแหน่ง <i>LOC_Os06g08550</i> ที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว
ชื่อนิสิต	นางสาวโรชา สามารถ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิตา ปาปิยะวุฒิ
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว (*Oryza sativa*) เป็นสารให้สีที่ได้รับความนิยมมากจากกลุ่มผู้รักสุขภาพทั้งหลาย จึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ตรวจสอบเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวเพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ก็เพื่อตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานที่ตำแหน่ง *LOC_Os06g08550* กับปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวจากประชากรข้าวรุ่นที่ 2 (F_2) จากคู่ผสมพันธุ์ “กข 41” กับ “ไรซ์เบอร์รี่” (RD41 x RB) จำนวน 77 ตัวอย่าง และคู่ผสมพันธุ์ “กข41” กับ “ทับทิมชุมแพ” (RD41 x RD69) จำนวน 33 ตัวอย่าง จากนั้นนำเมล็ดทั้งหมดมาสกัดแอนโทไซยานินด้วยตัวทำละลาย 1% HCl ในเมทานอล พบว่าสารสกัดแอนโทไซยานินที่ได้มีความสัมพันธ์กับสีของเมล็ดข้าว โดยเรียงลำดับปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยจากมากไปน้อย คือ ข้าวสีดำอยู่ที่ 25.49 ± 15.15 mg/g, ข้าวสีแดงอยู่ที่ 18.16 ± 2.14 mg/g, ข้าวสีน้ำตาลอยู่ที่ 2.96 ± 0.77 mg/g และข้าวสีขาวอยู่ที่ 0.66 ± 0.30 mg/g ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมที่ตำแหน่ง *LOC_Os06g08550* ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินเมื่อทดสอบในประชากรข้าวรุ่น F_2 ของทั้งคู่ผสม RD41 x RB และ RD41 x RD69 (Sig.>0.05) แต่เครื่องหมายพันธุกรรมที่ตำแหน่ง *LOC_Os06g08550* สัมพันธ์กับสีของเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวในประชากรข้าวรุ่น F_2 ของคู่ผสม RD41 x RD69 (Sig.=0.030) หากเครื่องหมายพันธุกรรมนี้แสดงภาวะพหุสัณฐานมีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณแอนโทไซยานิน จะเป็นประโยชน์ในการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อการคัดเลือกลักษณะนี้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

คำสำคัญ เครื่องหมายพันธุกรรม, แอนโทไซยานิน, ข้าว, ภาวะพหุสัณฐาน, *Oryza sativa*, สีของเมล็ด

Title	Detection of the polymorphism at <i>LOC_Os06g08550</i> locus associated with anthocyanin content in rice grain.
Student name	Miss Sarocha Samat
Advisor	Dr. Waraluk Kasettranan
Co-Advisor	Assistant professor Dr. Chanita Paliyavuth
Program	Genetics
Department	Botany
Academic Year	2020

Abstract

Anthocyanin in the seed of rice (*Oryza sativa*) is the pigment that received a lot of attention in the health care group. So, many papers of research detected molecular markers that involved the anthocyanin synthesis pathway in rice seeds useful for breeding. The purpose of this study to detect the polymorphism at *LOC_Os06g08550* locus associated with anthocyanin content in rice seed of F₂ from “RD41” and “rice berry” (RD41 x RB) total 77 samples and F₂ from “RD41” and “RD69” (RD41 x RD69) total 33 samples. Next, total rice seed brings to extract anthocyanin with 1% HCl in methanol. The result showed that anthocyanin content associated with seed color that black seed present 25.49±15.15 mg/g, red seed present 18.16±2.14 mg/g, brown seed present 2.96±0.77 mg/g, and rice seed present 0.66±0.30 mg/g in descending order. In addition, the genetic marker at *LOC_Os06g08550* non associated with anthocyanin content when testing in F₂ from both RD41 x RB and RD41 x RD69 (Sig.>0.05) but marker at *LOC_Os06g08550* associated with color seed in F₂ from RD41xRD69 (Sig.=0.030). If this genetic marker showed polymorphism associated with anthocyanin content which helpful selection this phenotype for rice breeding in the future.

Keywords: Molecular marker, Anthocyanin, Rice, Polymorphism, *Oryza sativa*, seed color

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิทยาศาสตร์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิตา ปาณิชวุฒิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการวิทยาศาสตร์ ที่ให้ข้อคิดเห็นและคำปรึกษาต่าง ๆ ตลอดจนการแก้ไขและตรวจทานโครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ให้ถูกต้อง และสมบูรณ์สำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์ กรรมการสอบที่กรุณาตรวจสอบและแก้ไขโครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ พี่นิติตปริญาโทและปริญาเอก ห้องปฏิบัติการ 306 และห้องปฏิบัติการกลางภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทำโครงการวิทยาศาสตร์ รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการทดลองและเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทดลอง

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการเพาะปลูกข้าว และขอขอบคุณทุนอุดหนุนการเรียนการสอนเพื่อสร้างเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน และผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	10
4. ผลการทดลอง	13
5. อภิปรายผลการทดลอง.....	20
6. สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง.....	23
ภาคผนวก	26

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การกระจายของข้อมูลโดยจัดเป็นกลุ่มตามภาวะพหุสัณฐานในข้าวรุ่น F ₂	14
2	Chi-square test ทดสอบอัตราส่วนสีเมล็ดข้าวในประชากรข้าวรุ่น F ₂ จากทั้งสองคู่ผสม เป็นอัตราส่วน 3 : 1.....	17
3	วิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างสีของเมล็ดข้าว และปริมาณแอนโทไซยานินในประชากรข้าวรุ่น F ₂ จากคู่ผสม กข41 x ไรซ์เบอร์รี่ และ กข41 x ทับทิมชุมแพ.....	17
4	ตาราง ANOVA สำหรับวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และสีของเมล็ดข้าวจากคู่ผสมพันธุ์ กข41 x ไรซ์เบอร์รี่.....	18
5	ตาราง ANOVA สำหรับวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และสีของเมล็ดข้าวจากคู่ผสมพันธุ์ กข41 x ทับทิมชุมแพ.....	18
6	ตาราง ANOVA สำหรับวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวจากคู่ผสมพันธุ์ กข41 x ไรซ์เบอร์รี่.....	19
7	ตาราง ANOVA สำหรับวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวจากคู่ผสมพันธุ์ กข41 x ทับทิมชุมแพ.....	19
8	สีเมล็ด และปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยในแต่ละประชากรข้าวพันธุ์ RD41, RB, F ₁ และ F ₂ จากคู่ผสมพันธุ์ กข41 (RD41) x ไรซ์เบอร์รี่ (RB).....	27
9	สีเมล็ด และปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยในแต่ละประชากรข้าวพันธุ์ RD41, RB, F ₁ และ F ₂ จากคู่ผสมพันธุ์ กข41 (RD41) x ทับทิมชุมแพ (RD69).....	30

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1	โครงสร้างพื้นฐานของแอนโธไซยานินดิน4
2	โครงสร้างแอนโธไซยานินเมื่อ pH เปลี่ยนไป5
3	การแสดงออกของยีน <i>Rc</i> และ <i>Rd</i> จากข้าวตัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plants).....7
4	การแสดงออกของยีน <i>Kala4</i> ในข้าวสายพันธุ์ Koshihikari (BBA-type NIL), Hong Xie Nuo (BBB-type NIL) และข้าวตัดแปลงพันธุกรรม (<i>Os04g0557500</i> O/E) 7
5	กราฟระดับการแสดงออกของยีน <i>OsC1</i> ในข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์.....8
6	ภาวะพหุสัญญาณของตัวอย่างข้าวจากทั้ง 2 คู่ผสม13
7	สีของเมล็ดข้าวที่แตกต่างกันโดยใช้การสังเกตด้วยตาเปล่า15
8	Box plot ของปริมาณแอนโธไซยานิน โดยแยกตามกลุ่มสีเมล็ดข้าวในตัวอย่างข้าว F_2 จากคู่ผสม กข41 x ไรซ์เบอร์รี่.....16
9	Box plot ของปริมาณแอนโธไซยานิน โดยแยกตามกลุ่มสีเมล็ดข้าวในตัวอย่างข้าว F_2 จากคู่ผสม กข41 x ทับทิมชุมแพ16
10	ปริมาณแอนโธไซยานินเฉลี่ย โดยแยกตามกลุ่มจีโนไทป์ในตัวอย่างข้าว F_2 จากทั้งสองคู่ผสม19
11	ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมและยีน <i>OsC1</i> บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ในข้าว21

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

แอนโทไซยานิน (anthocyanin) คือสารให้สีชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) แอนโทไซยานินมีด้วยกันอยู่หลายชนิด แต่ทุกชนิดจะมีโครงสร้างหลักที่มีชื่อเรียกว่า แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) และจะมีแอนโทไซยานิดินเพียง 6 ชนิดเท่านั้นที่พบในพืช คือ เพลาโกนิดิน (pelargonidin) ไชยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) เพโอนิดิน (peonidin) เพทูนิดิน (petunidin) และมอลวิดิดิน (malvidin) ซึ่งจะอยู่ในดอกไม้ ผัก และผลไม้แตกต่างกันไป ทำให้ผักและผลไม้มีสีอยู่ในโทนน้ำเงิน ม่วง และแดง นอกจากนี้ยังสามารถพบแอนโทไซยานินได้ในข้าวอีกหลายพันธุ์ (Ryan et al., 2011)

ปัจจุบันข้าวพันธุ์ที่มีเปลือกเมล็ดข้าวสีแดง ม่วง หรือดำ เช่น ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวหอมนิล ได้รับความสนใจจากผู้บริโภคเพิ่มขึ้น เพราะแอนโทไซยานินไม่เพียงให้สีที่แตกต่าง แต่ยังมีงานวิจัยอีกมากที่กล่าวถึงประโยชน์ต่อสุขภาพด้านโภชนาการ และสรรพคุณของแอนโทไซยานิน เช่น แอนโทไซยานินชนิด cyanidin-3-glucoside และ peonidin-3-glucoside ที่สกัดได้จากข้าวสีดำ สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง (Chen et al., 2006), แอนโทไซยานินจากข้าวสีดำป้องกันการทำลายเซลล์บุผนังหลอดเลือดจากภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชันในเด็ก (Zhang et al., 2006), ไชยานิดิน และเพโอนิดิน จากข้าวดำสามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ (Tanaka et al., 2011) เป็นต้น และประโยชน์จากที่กล่าวมา ทำให้สารสกัดแอนโทไซยานินเป็นสารที่น่าสนใจในยุคปัจจุบัน โดยเฉพาะในกลุ่มผู้รักสุขภาพทั้งหลายที่ให้ความสนใจในการเลือกบริโภคข้าว โดยพิจารณาจากสีของเปลือกเมล็ดข้าว เพราะเชื่อว่ามีประโยชน์ต่อร่างกายมากกว่า

จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า ข้าวพันธุ์ที่มีเมล็ดข้าวสีดำ มีปริมาณแอนโทไซยานินที่สูงกว่าข้าวที่มีเมล็ดข้าวสีขาวถึง 4 เท่า (Yawadio, Tanimori, and Morita, 2007) ยังพบอีกว่าพันธุ์ข้าวที่มีเมล็ดข้าวสีแดง และสีม่วงมีปริมาณแอนโทไซยานิน รวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ สูงกว่าพันธุ์ข้าวที่มีสีอ่อน เช่น พันธุ์ข้าวที่มีสีขาว และน้ำตาล (Walter et al., 2013) ซึ่งแอนโทไซยานินที่พบในข้าวส่วนใหญ่คือ cyanidin-3-glucoside (Lee, 2010)

จากข้อมูลที่ได้รวบรวมมาทั้งหมด พบว่าการศึกษเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวมีไม่มากนัก เช่น ยีน *Rd* (Furukawa et al., 2007) ยีน *Kala4* (Oikawa et al., 2015) และยีน *OsC1* (Rachasima et al., 2017) เป็นต้น นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการใช้เทคนิค genome-wide association study (GWAS) (Liu and Yan, 2019) เข้าช่วยในการค้นหายีนในพืชได้รวดเร็วขึ้น ซึ่งข้อมูลจากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสิ่งแวดล้อม และสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ศึกษาประชากรข้าวไทย 147 สายพันธุ์ จากเทคนิค GWAS พบว่าตำแหน่ง *LOC_Os06g08550* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 และแสดงภาวะพหุสัณฐานแบบ A/C มีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิกทั้งหมดในเมล็ดข้าว งานวิจัยนี้จึงต้องการตรวจสอบเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด InDel ที่ใกล้เคียงกับตำแหน่ง *LOC_Os06g08550* ว่ามีความเกี่ยวข้องกับปริมาณแอนโทไซ

ยานินที่พบในเมล็ดข้าวมากน้อยเพียงใด จึงได้ทำการตรวจสอบในประชากรข้าวรุ่น F₂ จากคู่ผสมพันธุ์ระหว่าง “กข41” x “ไรซ์เบอร์รี่” และ “กข41” x “ทับทิมชุมแพ”

Insertion-Deletion (InDel) เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีการตรวจสอบขนาดของ PCR product ในการแยกความแตกต่างในสายพันธุ์สิ่งมีชีวิต โดยอาศัยการแทรกเข้ามาของเบส (Insertion) หรือ การขาดหายไปของเบส (Deletion) ที่แตกต่างกันในตำแหน่งเป้าหมาย ซึ่งในปัจจุบัน InDel ถูกใช้ประโยชน์ทั้งในด้านความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังใช้เป็นเครื่องมือในการแยกความแตกต่างและระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในสปีชีส์เดียวกันได้อีกด้วย (สุรินทร์ ปิยะโชติคุณกุล, 2552) หากผลที่ได้จากการวิจัยพบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมและลักษณะปริมาณแอนโทไซยานิน จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกประชากรข้าวรุ่นลูกให้มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงจากคู่ผสมพันธุ์ดังกล่าวต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใกล้ตำแหน่ง LOC_Os06g08550 กับลักษณะปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เครื่องหมายพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับลักษณะปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อการคัดเลือกข้าวในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 แอนโธไซยานิน (Anthocyanin)

แอนโธไซยานิน เป็นสารที่ให้อสีอยู่ในช่วงน้ำเงิน-แดง ซึ่งพบในพืชและผักทั่วไป ซึ่งแอนโธไซยานินจะถูกสะสมอยู่ในแวคิวโอล (vacuoles) พบได้ทั้งในส่วนของใบ ลำต้น เมล็ด และในเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Goto and Kondo, 1991)

2.1.1 ประโยชน์ของแอนโธไซยานินต่อต้นพืช

อย่างที่ได้อกล่าวไปข้างต้นว่า แอนโธไซยานินมีส่วนทำให้ส่วนต่าง ๆ ของพืชมีสี หากพบในส่วนของดอกไม้ ก็จะนำพาให้แมลงเข้ามาช่วยผสมเกสร เช่นเดียวกันหากพบในผลหรือเมล็ด ก็จะดึงดูดให้สัตว์มารับประทาน และนำไปสู่การแพร่กระจายของเมล็ดผ่านอุจจาระที่สัตว์ได้ถ่ายทิ้งไว้ตามสถานที่ต่าง ๆ (Harborne and Williams, 2001) นอกจากนี้แอนโธไซยานินยังช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) ที่อาจเป็นอันตรายต่อต้นพืช (Mazza and Miniati, 1993) ไม่เพียงเท่านั้นแอนโธไซยานินยังสามารถทำหน้าที่อื่น ๆ ได้ เช่น ปกป้องพืชจากความเย็น ความเครียด หรือสร้างความต้านทานให้พืชบางชนิดทนต่อความแห้งแล้งได้ (Chalker-Scott, 1999)

2.1.2 โครงสร้างทางเคมีของแอนโธไซยานิน

2.1.2.1 แอนโธไซยานิดิน

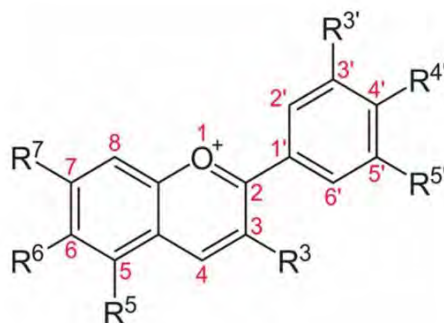
แอนโธไซยานิดินเป็นอนุพันธ์ของ phenyl-2-benzopyrylium หรือ flavylum salts ซึ่งถือได้ว่าเป็นสารประกอบพลาโวนอยด์ หากกล่าวถึงโครงสร้างพื้นฐานของแอนโธไซยานิดินจะประกอบไปด้วย วงแหวนคาร์บอน 3 วง (C-6-C-3-C-6) เชื่อมต่อกัน (แสดงในรูปที่ 1) และมีแอนโธไซยานิดินเพียง 6 ชนิดเท่านั้นที่พบในพืช คือ เพลาโกนิน (pelargonidin) ไชยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีโอนิน (peonidin) เพทูนิน (petunidin) และมอลวิดิดิน (malvidin) (Kong et al., 2003)

2.1.2.2 น้ำตาล

น้ำตาลจะสร้างพันธะกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 หรือตำแหน่งที่ 5 ในโครงสร้างหลักของแอนโธไซยานิดิน โดยน้ำตาลที่พบบ่อยที่สุด คือ กลูโคส นอกจากนี้ยังมีไซโลส (xylose), กาแลคโตส (galactose), อะราบินอส (arabinose), แรมโนส (rhamnose) และรูทีโนส (rutinose) ที่พบบ้าง (Khoo et al., 2017)

2.1.2.3 กรด

กรดอาจจะมีหรือไม่มีก็ได้ในโครงสร้างแอนโธไซยานิน โดยทั่วไปกรดจะสร้างพันธะเอสเทอร์กับน้ำตาลที่จับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 หรือ 5 ผ่านปฏิกิริยาการเตรียมเอสเทอร์ (Esterification) ซึ่งแอนโธไซยานินในรูปที่ทำปฏิกิริยากับกรดจะถูกเรียกว่า Non-acylated anthocyanin และในรูปที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับกรดจะถูกเรียกว่า Acylated anthocyanin (Khoo et al., 2017)



รูปที่ 1 โครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิน (Kong et al., 2003)

2.1.3 ความเสถียรของแอนโทไซยานิน

ความเสถียรขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ดังนี้

2.1.3.1 pH

pH มีผลต่อทั้งสีและโครงสร้างของแอนโทไซยานิน ในสารละลายที่เป็นกรดมาก แอนโทไซยานินจะมีสีแดง และเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ความเข้มของสีแดงจะลดลง จนเมื่อถึงสภาวะที่เป็นกลาง แอนโทไซยานินจะมีสีน้ำเงิน-ม่วง ซึ่งเมื่อ pH เปลี่ยนไปจะพบแอนโทไซยานินอยู่ในรูปของโครงสร้างทั้งสี่ ดังนี้ Quinoidal base (pH 8-10), Flavylium cation (pH<2), Carbinol pseudo-base (pH 3-6) และ Chalcone (pH 3-10) (Brouillard, 1982) (รูปที่ 2)

2.1.3.2 อุณหภูมิ

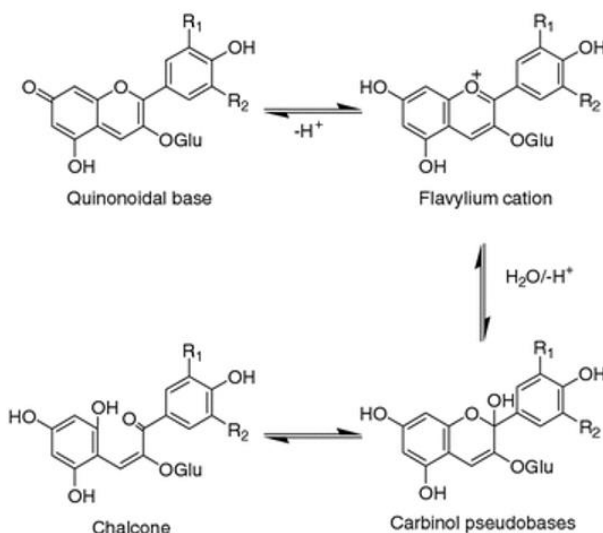
อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ส่งผลในเรื่องการสลายตัวของเม็ดสี การเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำ จะช่วยให้แอนโทไซยานินคงรูปที่เสถียรไว้ได้ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็น chalcone ที่ไม่เสถียร และถูกย่อยสลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Delgado-Vargas and Paredes-López, 2003)

2.1.3.3 แสง

ปกติแสงจะเป็นอันตรายมากต่อโครงสร้างของแอนโทไซยานิน โดยมีรายงานว่า แอนโทไซยานินจากน้ำอุ่นมีค่าครึ่งชีวิตถึง 416 วันในความมืด หากแต่ในตอนกลางวันที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิตเพียง 197 วัน อย่างไรก็ตาม แสงจะมีผลน้อยมากหากแอนโทไซยานินอยู่ในรูปที่เกิดปฏิกิริยากับกรด (Acylated anthocyanin) (Giusti et al., 1999)

2.2 แอนโทไซยานินในข้าว

แอนโทไซยานินสามารถพบได้ในหลาย ๆ ส่วนของต้นพืช รวมถึงในเมล็ดข้าวด้วยเช่นกัน (Ryan et al., 2011) และเมล็ดข้าวที่มีการสะสมของแอนโทไซยานินมากยังเป็นที่น่าสนใจในสังคมปัจจุบันอีกด้วย เนื่องจากสีที่สวยงาม และคุณประโยชน์ที่หลากหลาย



รูปที่ 2 โครงสร้างแอนโธไซยานินเมื่อ pH เปลี่ยนไป (Brouillard, 1982)

2.2.1 คุณสมบัติของแอนโธไซยานินจากเมล็ดข้าว

มีรายงานผลการตรวจสอบสารในเมล็ดข้าวพบว่า แอนโธไซยานินที่ถูกตรวจพบได้ทั่วไปในชั้นรำข้าว (rice bran) คือ โปรไซยานิดิน (Procyanidin) ซึ่งสามารถออกฤทธิ์เป็นกรดและมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Yoshida et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณที่สามารถรักษาโรคต่าง ๆ ได้อย่างเหลือเชื่อ เช่น แอนโธไซยานินชนิด cyanidin-3-glucoside และ peonidin-3-glucoside ที่สกัดได้จากข้าวสีดำ สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง (Chen et al., 2006), แอนโธไซยานิดิน จากข้าวสีดำ ป้องกันการทำลายเซลล์บุผนังหลอดเลือดจากภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชันในเด็ก (Zhang et al., 2006) เป็นต้น

2.2.2 ยีนที่เกี่ยวข้อง

สีของเมล็ดข้าวที่แตกต่างนำมาซึ่งการค้นพบยีนในหลายตำแหน่ง ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างเม็ดสีในเมล็ดข้าว โดยมีข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาว่ามียีนจำนวนมากกว่า 26 ตำแหน่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีที่เกิดจากแอนโธไซยานิน และมียีนจำนวนมากกว่า 10 ตำแหน่งที่ยับยั้งการสร้างเม็ดสีที่เกิดจากแอนโธไซยานิน นอกจากนี้ยังมียีนจำนวนมากกว่า 15 ตำแหน่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีที่เกิดจากสารตัวอื่นที่นอกเหนือจากแอนโธไซยานิน เช่น โพรแอนโธไซยานิน (Proanthocyanins) เป็นต้น (Furukawa et al., 2007) ต่อจากนี้จะยกตัวอย่างยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโธไซยานินในข้าว ดังนี้

2.2.2.1 ยีน *Rc* และ ยีน *Rd*

ยีน *Rc* ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 7 โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ basic helix-loop-helix (bHLH) ซึ่งเป็น transcription factor ชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน โดยส่วนใหญ่ยีน *rc* ที่เป็นอัลลีลด้อยจะทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวมีสีขาว เนื่องจากเกิดการหายไป (deletion) 14 คู่เบสในบริเวณเอกซอนที่ 7 แล้วทำให้เกิดรหัสหยุด (stop codon) ซึ่งมีผลต่อบริเวณ DNA-

binding domain ที่เป็น bHLH ทำให้ยีนแสดงออกไม่ได้ (Nagoa, Takahashi, and Miyamoto, 1957; Furukawa et al., 2007)

ในขณะที่แอลลีลเด่น *Rc* สามารถทำงานได้ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของยีน *Rc* ซึ่งเป็นยีนควบคุม และยีน *Rd* ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 ซึ่งเป็นยีนโครงสร้างที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ Dihydroflavonol reductase (DFR) โดยที่แอลลีลเด่น *Rc* จะทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวมีสีน้ำตาล และแอลลีลเด่น *Rd* จะช่วยส่งเสริมให้เพิ่มการสร้างสีในเมล็ดข้าว ทำให้เมล็ดข้าวมีสีแดง (รูปที่ 3) (Nagoa, Takahashi, and Miyamoto, 1957; Furukawa et al., 2007)

2.2.2.2 ยีน *Kala4* หรือ *OsS1*

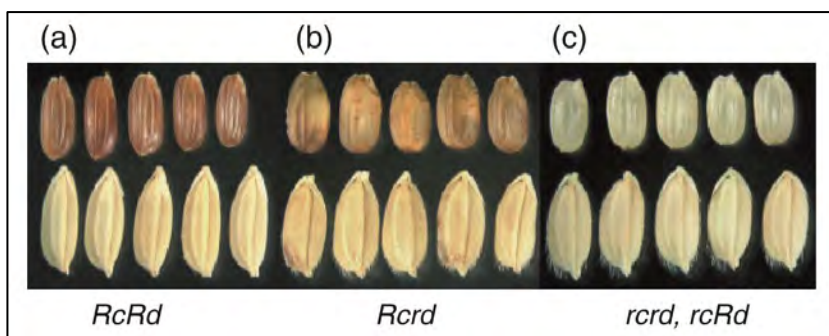
เป็นยีนที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 (*Os04g0557500*) มีส่วนเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เอนไซม์หลายตัวในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ ทั้ง chalcone synthase, dihydroflavonol-4-reductase (DFR), leucoanthocyanidin reductase (LAR), leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) ซึ่งจะแสดงออกในชั้นของรำข้าวเช่นเดียวกับยีน *Rd* แต่แตกต่างกันตรงที่ยีน *Kala4* จะทำให้เมล็ดข้าวมีสีดำ (Oikawa et al., 2015)

โดยในการศึกษาของ Oikawa และคณะ (2015) ซึ่งเป็นการศึกษาและปรับเปลี่ยนโครงสร้างรวมถึงการแสดงออกของยีน *Kala4* ที่นำไปสู่การกระตุ้นวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวสีดำ โดยที่ได้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *Kala4* ระหว่างข้าวสายพันธุ์ “Koshihikari” (BBA-type NIL) ซึ่งมีเมล็ดสีขาว และ “Hong Xie Nuo” (BBB-type NIL) ซึ่งมีเมล็ดสีดำ ด้วย RT-qPCR พบว่า BBB-type NIL มีการแสดงออกของยีน *Kala4* ที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับ BBA-type NIL ไม่เพียงเท่านั้นในข้าวสายพันธุ์ที่มีการตัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น (overexpression) ในยีนดังกล่าวยังพบว่าเมล็ดสีดำที่เข้มกว่าสายพันธุ์ BBB-type NIL อีกด้วย (รูปที่ 4)

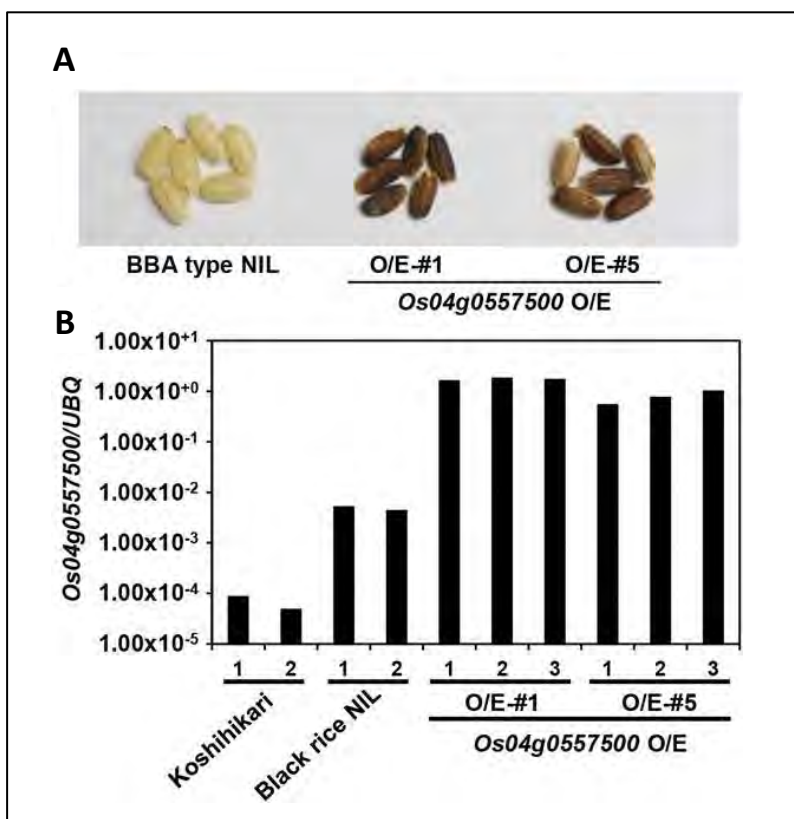
2.2.2.3 ยีน *OsC1*

เป็นยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 (*LOC_Os06g10350*) (Saitoh et al., 2004) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ R2R3-Myb transcription factor ซึ่งเป็นตัวควบคุมการแสดงออกในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ทำให้เกิดการแสดงออกของสีในทั้งส่วนของเนื้อเยื่อใบและเมล็ด โดยสามารถพบยีน *OsC1* ได้ในใบอ่อนและเมล็ดข้าวในทุกสายพันธุ์ และมีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp) ในชั้นรำข้าว (rice bran) ของเมล็ดข้าวสีดำที่มีอายุ 25 วันนับจากวันที่ต้นข้าวออกดอก หากแต่พบว่าในข้าวสีแดงจะมีระดับการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างจากในข้าวสีขาว (รูปที่ 5) (Rachasima et al., 2017)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกมาก ที่อ้างถึงการสะสมของแอนโทไซยานินบริเวณส่วนอื่นของต้นข้าวที่สัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน *OsC1* เช่น ยีน *OsC1* เป็นตัวควบคุมกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณกาบใบ (leaf sheath) และปลายยอดดอก (apiculus) ของต้นข้าว (Fan et al., 2008; Chin et al., 2016) เป็นต้น



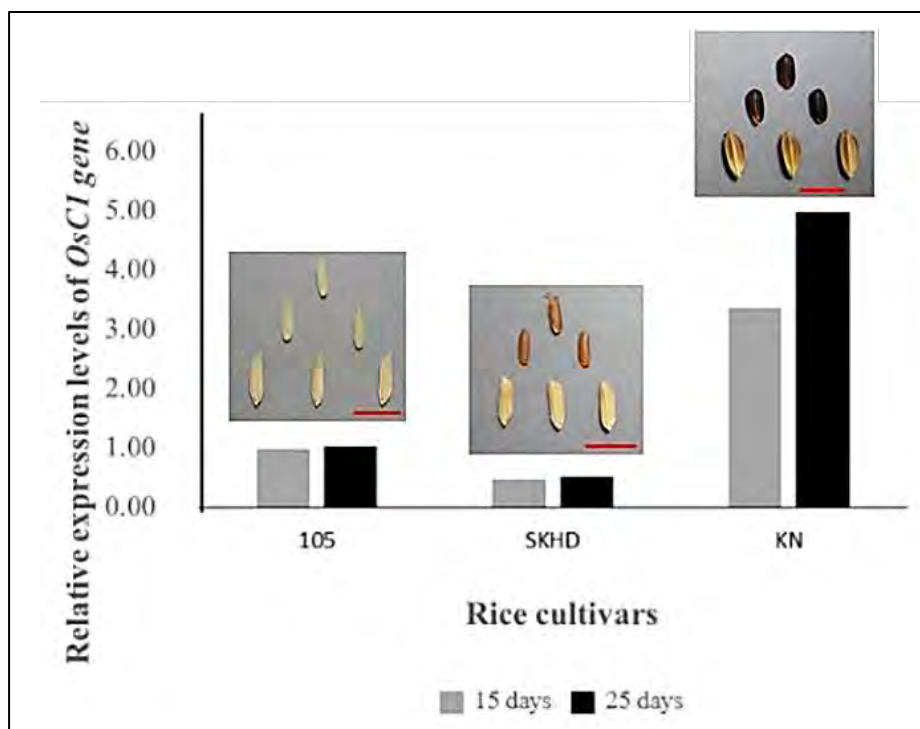
รูปที่ 3 การแสดงออกของยีน *Rc* และ *Rd* จากข้าวตัดแปลงพันธุกรรม (transgenic rice); โดยใช้พลาสมิด pCAMBIA1301 ถ่ายยีน *Rc* และ *Rd* เข้าสู่ข้าวสายพันธุ์ Nipponbare (*rcrd*) แถวล่างคือ เมล็ดที่มีเปลือกหุ้ม (hulled seeds) แถวบนคือ เมล็ดที่ปราศจากเปลือกหุ้ม (dehulled seeds) (Nagoa, Takahashi, and Miyamoto, 1957; Furukawa et al., 2007)



รูปที่ 4 การแสดงออกของยีน *Kala4* ในข้าวสายพันธุ์ที่มีเมล็ดสีขาว “Koshihikari” (BBA-type NIL), สายพันธุ์ที่มีเมล็ดสีดำ “Hong Xie Nuo” (BBB-type NIL) และข้าวตัดแปลงพันธุกรรม (*Os04g0557500* O/E)

(A) การแสดงออกของสีเมล็ดข้าว

(B) ระดับการแสดงออกในยีน *Kala4* (Oikawa et al., 2015)



รูปที่ 5 กราฟระดับการแสดงออกของยีน *OsCI* ในข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยวัดด้วย Semi-quantitative RT-PCR จากเมล็ดข้าวที่มีอายุ 15 (กราฟแท่งสีเทา) และ 25 วัน (กราฟแท่งสีดำ) โดยนับจากวันที่ต้นข้าวออกดอก

“ขาวดอกมะลิ 105” (105) คือข้าวเมล็ดสีขาว

“หอมแดงสุโขทัย” (SKHD) คือข้าวเมล็ดสีแดง

ข้าวเก่า (KN) คือข้าวเมล็ดสีดำ โดย Bar=1 cm. (Rachasima et al., 2017)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาของ Lim และ Ha (2013) ในการศึกษาการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อระบุและแยกสีเมล็ดข้าว โดยศึกษาจากข้าว 34 สายพันธุ์จาก Agricultural Genetic Resources Center ประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งเป็นข้าวเมล็ดสีขาวจำนวน 10 สายพันธุ์ เมล็ดสีดำจำนวน 13 สายพันธุ์ และเมล็ดสีแดงจำนวน 11 สายพันธุ์ พบว่ามีเครื่องหมายพันธุกรรมจำนวน 3 เครื่องหมาย ที่ออกแบบมาให้ครอบคลุมตำแหน่งของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และสามารถแยกพันธุ์ข้าวที่มีสีของเมล็ดข้าวแตกต่างกันได้ ดังนั้น CAPS-DFR สามารถแยกต้นข้าวที่มีเมล็ดสีขาวออกจากต้นข้าวที่ให้เมล็ดสี (ดำและแดง) ด้วยการเกิด Nonsense mutation (C>A) ที่นำไปสู่การแปรหัสเป็น stop codon ในข้าวพันธุ์เมล็ดสีขาวบริเวณ exon 2 ไม่เพียงเท่านั้นยังมี CAPS-OSB1 สามารถแยกต้นข้าวที่มีเมล็ดสีดำออกจากต้นข้าวที่มีเมล็ดสีขาวและแดง ด้วยการแทรกเบส (insertion) จำนวน 2 คู่เบสที่นำไปสู่การกลายพันธุ์แบบ frameshift mutation ในต้นข้าวที่มีเมล็ดสีขาวและแดงบริเวณ exon 10 และสุดท้าย Indel-Rc สามารถแยกต้นข้าวที่มีเมล็ดสีแดงออกจากต้นข้าวที่มีเมล็ดสีดำและขาว ด้วยการหายไปของเบส (deletion) จำนวน 14 คู่เบสที่นำไปสู่การกลายพันธุ์แบบ frameshift mutation ในต้นข้าวที่มีเมล็ดสีดำและสีขาวบริเวณ exon 6

ไม่เพียงเท่านั้น ยังมีการศึกษาของ Kim และคณะ (2020) ในการศึกษาวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของสีที่เกิดจากแอนโทไซยานินใน sterile lemma และ apiculus ในข้าว โดยศึกษาภายในประชากรข้าวรุ่น F₂ จากคู่ผสม “Josaengjado” x “Daeribbyeon” 1 จำนวน 428 ตัวอย่าง ซึ่งปลูกที่สถานที่ทดลองของมหาวิทยาลัยแห่งชาติชุงนัม (Chungnam National University) ประเทศเกาหลีใต้ พบว่า เครื่องหมายพันธุกรรมที่ออกแบบมาครอบคลุมบริเวณตำแหน่ง *Os01g0633500* ซึ่งใกล้กับยีน *Rd* บนโครโมโซมคู่ที่ 1 แสดงภาวะพหุสัณฐานที่สัมพันธ์การแสดงออกของสีที่ sterile lemma และ apiculus ในข้าว โดยจะเกิดการแทนที่เบสจาก A เป็น C ในข้าวสายพันธุ์ที่มี sterile lemma และ apiculus เป็นสีม่วง และในตำแหน่ง *Os06g0205100* ซึ่งใกล้กับยีน *OsC1* บนโครโมโซมคู่ที่ 6 สามารถแยกการแสดงออกของสีในส่วนดังกล่าวในข้าวได้เช่นเดียวกัน โดยจะเกิดการหายไปของเบสจำนวน 3 คู่เบส (3-bp deletion) ในข้าวสายพันธุ์ที่มี sterile lemma และ apiculus เป็นสีเขียว ทั้งนี้มีการสนับสนุนผลการทดลองดังกล่าวว่า *OsC1* เป็นยีนที่จะแปรรหัสเป็น *R2R3-MYB* transcription factor ซึ่งเป็นตัวควบคุมการแสดงออกในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Saitoh et al., 2004) ดังนั้นการขาดหายไปของเบสจำนวน 3 คู่เบส จะทำให้กรดอะมิโนหายไป 1 ตัว ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของ *R2R3-MYB* transcription factor ในการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

- เครื่องสีข้าว
- เครื่องสำหรับทำปฏิกิริยา PCR รุ่น T100™ ยี่ห้อ BIO-RAD
- Microplate readers ยี่ห้อ Molecular Devices
- Spectrophotometer ยี่ห้อ Hewlett Packard
- Genomic DNA Isolation Kit (Plant) (Cat. No.: PDC10-0100, Brand: Bio-Helix)
- RNase
- Isopropanol
- Ladder 100 bp
- Loading dry
- 5x green buffer
- Primer จาก Smart Science Co., Ltd.
- 50 mM MgCl
- 10 mM dNTP
- Taq polymerase
- conc.Hydrochloric acid (conc.HCl)
- 95% Methanol (CH₃OH)

3.2 ตัวอย่างข้าวที่ศึกษา

ตัวอย่างข้าวรุ่น F₂ ที่ได้จากคู่ผสมพันธุ์ 2 คู่ คือ “กข41” (RD41) x “ไรซ์เบอร์รี่” (RB) จำนวน 77 ตัวอย่าง และ “กข41” (RD41) x “ทับทิมชุมแพ” (RD69) จำนวน 33 ตัวอย่าง ปลูกที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี ในฤดูนาปี (เดือนสิงหาคม) ปี พ.ศ. 2563

3.3 สกัดดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบข้าวอายุ 1 เดือนแบบแยกต้น ต้นละ 2-3 ใบจากตัวอย่างทั้งหมด ใส่ถุงกระดาษพร้อมติดฉลากหมายเลขตัวอย่าง และนำไปบรรจุในภาชนะปิดที่มี silica gel เพื่อดูดความชื้น หลังจากใบข้าวแห้ง จึงนำมาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดคิท (Genomic DNA Isolation Kit (Plant)) จาก Bio-Helix Co., Ltd. ด้วยการนำใบข้าวที่บดละเอียด 25 mg ผสมกับ lysis buffer 500 µl และ RNase ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 0.5 µl ก่อนจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที ก่อนจะนำส่วนใสปริมาตร 350

μl ไปผสมกับ isopropanal ปริมาตร 350 μl กลับหลอดไป-มาให้สารละลายผสมเข้ากันดี แล้วย้ายสารละลายทั้งหมดไปใส่ใน column จากนั้นนำหลอดตัวอย่างที่บรรจุ column ไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาที ก่อนจะนำ column ที่มี DNA ไปชะล้างเอาสารตกค้างอื่น ๆ ออกด้วย washing buffer 2 รอบ จากนั้นชะล้างให้ DNA ตกกลงไปใน tube ด้วย elution buffer 2 รอบ รอบละ 50 μl พร้อมนำไปป้อนที่ 75 °C เป็นเวลา 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง 2 นาที ตามลำดับ ก่อนจะนำไปตรวจสอบผลการสกัดด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

3.4 ตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรม

นำ genomic DNA ที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิด InDel primer จำนวน 1 คู่ ที่ใกล้เคียงกับตำแหน่ง *LOC_Os06g08550* ที่สามารถแสดงภาวะพหุสัณฐานระหว่างข้าวสายพันธุ์ “กข41” (RD41), “ไรซ์เบอร์รี่” (RB) และ “ทับทิมชุมแพ” (RD69) ซึ่งมี forward primer มีลำดับเบสเป็น 5'-CATATTTACTGGAGGGGACG-3' และ reverse primer มีลำดับเบสเป็น 5'-TTTGTTTATGCCCGTACCAT-3' โดยการทำปฏิกิริยา 1 ตัวอย่างประกอบด้วย

- น้ำที่ไม่มีกรปนเปื้อน 4.4 μl
- 5x green buffer 2 μl
- forward-primer 0.5 μl
- reverse-primer 0.5 μl
- 50 mM MgCl 0.35 μl
- 10 mM dNTP 0.2 μl
- Taq polymerase 0.05 μl
- genomic DNA (ความเข้มข้น 10 ng/ μl) 2 μl

จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR (รุ่น T100™ ยี่ห้อ BIO-RAD) โดยตั้งค่าอุณหภูมิ ดังนี้ denaturation 94 °C, annealing 54 °C, extension 72 °C ทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยานำไปตรวจสอบผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis

3.5 ตรวจวัดปริมาณแอนโทไซยานิน

เก็บเมล็ดข้าวเปลือกรุ่น F_2 แยกต้น นำมาผ่านการขัดสีโดยเครื่องสีข้าว เพื่อแยกแกลบออกจากเมล็ดข้าว จากนั้นนำเมล็ดข้าวดังกล่าวมาสกัดแอนโทไซยานิน โดยดัดแปลงวิธีของ Mancinelli (1990) ซึ่งนำเมล็ดข้าว 0.5 g มาสกัดด้วย 1% HCl ใน methanol ปริมาตร 10 ml จากนั้นนำไปป้อนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่อง rotator shaker และนำไปปั่นเหวี่ยง 4000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บของเหลวส่วนใส จากนั้นนำตะกอนกลับไปสกัดซ้ำอีกรอบ

วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน นำสารที่สกัดได้มา 200 μl ใส่ลงใน 96 well plate และวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate readers ที่ความยาวคลื่น 530 nm และ 657 nm จากนั้นใช้สูตรคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin) ดังนี้

$$\text{Total anthocyanin content (mg/g)} = \frac{\Delta A \times V}{W}$$

โดย $\Delta A = A_{530} - 0.25 (A_{657})$

V = ปริมาตรของสารสกัดทั้งหมด (ml)

W = น้ำหนักของข้าวที่ใช้สกัด (g)

3.6 วิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

ใช้การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression analysis) โดยจะเป็นการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในแต่ละชุดข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS ดังนี้

ชุดข้อมูลที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และสีของเมล็ดข้าวใน
คู่ผสมที่ 1 (RD41xRB)

ชุดข้อมูลที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และสีของเมล็ดข้าวใน
คู่ผสมที่ 2 (RD41xRD69)

ชุดข้อมูลที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และปริมาณแอนโทไซยานินในคู่ผสมที่ 1 (RD41xRB)

ชุดข้อมูลที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และปริมาณแอนโทไซยานินในคู่ผสมที่ 2 (RD41xRD69)

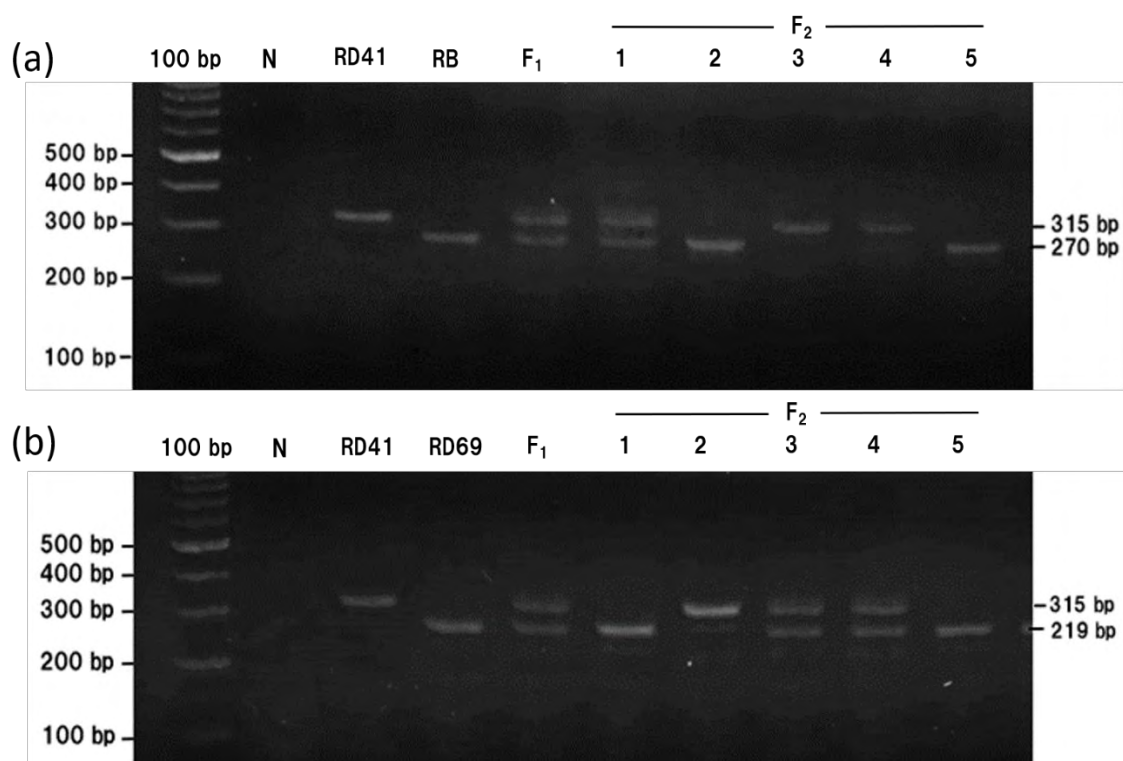
และใช้การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) หาความสัมพันธ์ระหว่างสีของเมล็ดข้าว และปริมาณแอนโทไซยานินในทั้งสองคู่ผสมพันธุ์ ด้วยโปรแกรม SPSS

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรม

เครื่องหมายพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้นมาอยู่ใกล้กับตำแหน่ง *LOC_Os06g08550* ในโครโมโซมคู่ที่ 6 สามารถตรวจสอบด้วยเทคนิค Gel electrophoresis ได้ PCR product ที่มีขนาดโมเลกุลที่ต่างกันอย่างชัดเจนในตัวอย่างข้าวรุ่น F₂ จากทั้ง 2 คู่ผสม ดังนี้ ในคู่ผสม กข41 x ไรซ์เบอร์รี่ แสดงขนาดโมเลกุลของ PCR product ที่แตกต่างกัน 45 bp โดยที่ กข41 จะมีขนาดโมเลกุลเป็น 315 bp, ไรซ์เบอร์รี่มีขนาดโมเลกุลเป็น 270 bp และ F₁ มีทั้งขนาด 315 bp และ 270 bp (รูปที่ 6a) สำหรับคู่ผสม กข41 x ทับทิมชุมแพ แสดงขนาดโมเลกุลของ PCR product ที่แตกต่างกัน 96 bp โดยที่ กข41 จะมีขนาดโมเลกุลเป็น 315 bp, ทับทิมชุมแพมีขนาดโมเลกุลเป็น 219 bp และ F₁ มีทั้งขนาด 315 bp และ 219 bp (รูปที่ 6b)



รูปที่ 6 ภาวะพหุสัณฐานของตัวอย่างข้าวจากทั้ง 2 คู่ผสม; (a) กข41 x ไรซ์เบอร์รี่, (b) กข41 x ทับทิมชุมแพ โดยประกอบด้วย ladder 100 bp, Negative control (N), ข้าวขาว (RD41), ข้าวสี (RB/RD69), F₁ และ F₂ ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่แสดงภาวะพหุสัณฐานที่ต่างกันไปตามลำดับ

ตารางที่ 1 การกระจายของข้อมูลโดยจัดเป็นกลุ่มตามภาวะพหุสัณฐานในข้าวรุ่น F₂ จากทั้งสองคู่ผสมพันธุ์

	F ₂			
	A ₁ A ₁	A ₁ A ₂	A ₂ A ₂	Heterozygosity
RD41×RB	30	33	14	0.43
RD41×RD69	7	16	10	0.48

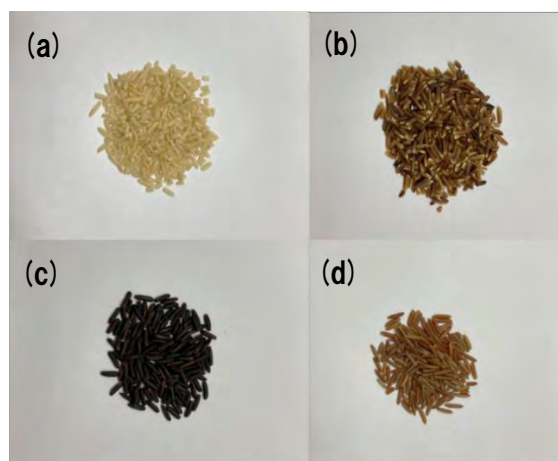
จากการตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของตัวอย่างข้าวรุ่น F₂ จากทั้งสองคู่ผสม ให้ผลดังนี้ ในคู่ผสมที่ 1 คือ กข41 × ไรซ์เบอร์รี่ มีข้าวรุ่น F₂ ที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมด 77 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีจีโนไทป์ A₁A₁ ซึ่งมีขนาดของ PCR product เท่ากับ 315 bp จำนวน 30 ตัวอย่าง, กลุ่มที่มีจีโนไทป์ A₂A₂ มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 270 bp จำนวน 14 ตัวอย่าง และกลุ่มที่มีจีโนไทป์ A₁A₂ มีจำนวน 33 ตัวอย่าง แสดง PCR product 2 ขนาด คือ 315 bp และ 270 bp และมีค่า Heterozygosity = 0.43 สำหรับคู่ผสมที่ 2 คือ กข41 × ทับทิมชุมแพ มีจำนวนข้าวรุ่น F₂ ที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมด 33 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีจีโนไทป์ A₁A₁ ซึ่งมีขนาดของ PCR product เท่ากับ 315 bp จำนวน 7 ตัวอย่าง, กลุ่มที่มีจีโนไทป์ A₂A₂ มีขนาดของ PCR product เท่ากับ 219 bp จำนวน 10 ตัวอย่าง และกลุ่มที่มีจีโนไทป์ A₁A₂ มีจำนวน 16 ตัวอย่าง แสดง PCR product 2 ขนาด คือ 315 bp และ 219 bp และมีค่า Heterozygosity = 0.48 (ตารางที่ 1)

4.2 ลักษณะสีของเมล็ดข้าว และปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว

จากการเก็บข้อมูลสีของเมล็ดข้าวในรุ่น F₂ ของคู่ผสมที่ 1 คือ กข41 × ไรซ์เบอร์รี่ จำนวน 77 ตัวอย่าง โดยสังเกตด้วยตาเปล่า สามารถแบ่งกลุ่มสีของเมล็ดข้าวออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีสีเมล็ดเป็นสีขาว จำนวน 20 ตัวอย่าง, กลุ่มที่มีเมล็ดเป็นสีน้ำตาลจำนวน 10 ตัวอย่าง และกลุ่มที่มีเมล็ดเป็นสีดำจำนวน 47 ตัวอย่าง (รูปที่ 7a-c) สำหรับข้อมูลสีของเมล็ดข้าวในรุ่น F₂ ของคู่ผสมที่ 2 คือ กข41 × ทับทิมชุมแพ จำนวน 33 ตัวอย่าง สามารถแบ่งกลุ่มสีของเมล็ดข้าวออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีเมล็ดเป็นสีขาวจำนวน 10 ตัวอย่าง และกลุ่มที่มีเมล็ดเป็นสีแดงจำนวน 23 ตัวอย่าง (รูปที่ 7a, d)

การสืบทอดลักษณะของสีเมล็ดข้าว แบ่งลักษณะการแสดงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่มีสี และกลุ่มที่มีสี สำหรับในรุ่น F₂ ของคู่ผสม กข41 × ไรซ์เบอร์รี่ พบว่ามีเมล็ดข้าวที่มีสี (สีดำและน้ำตาล) จำนวน 57 ตัวอย่าง และมีเมล็ดข้าวที่ไม่มีสี (สีขาว) จำนวน 20 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงคิดเป็นอัตราส่วนการแสดงออกของลักษณะสีเมล็ดข้าวในรุ่น F₂ ของคู่ผสม กข41 × ไรซ์เบอร์รี่ เป็น 3: 1 ($X^2 = 0.039$, Exact Sig. = 0.895) (ตารางที่ 2) จึงสรุปได้ว่า อัตราส่วนการแสดงออกของลักษณะสีเมล็ดข้าวในรุ่น F₂ ของคู่ผสม กข41 × ไรซ์เบอร์รี่ เป็น 3: 1 นั่นคือลักษณะสีของเมล็ดข้าวน่าจะมียีนควบคุมเพียง 1 ตำแหน่ง

และในรุ่น F₂ ของคู่ผสม กข41 × ทับทิมชุมแพ พบว่ามีเมล็ดข้าวที่มีสี (สีแดง) จำนวน 23 ตัวอย่าง และมีเมล็ดข้าวที่ไม่มีสี (สีขาว) จำนวน 10 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงคิดเป็นอัตราส่วนการแสดงออกของลักษณะสีเมล็ดข้าวในรุ่น F₂ ของคู่ผสม กข41 × ทับทิมชุมแพ เป็น 3: 1 ($X^2 = 0.495$, Exact Sig. = 0.546) (ตารางที่ 2) จึงสรุปได้ว่า อัตราส่วนการแสดงออกของลักษณะสีเมล็ดข้าวในรุ่น F₂ ของคู่ผสม กข41 × ทับทิมชุมแพ เป็น 3: 1 นั่นคือลักษณะสีของเมล็ดข้าวน่าจะมียีนควบคุมเพียง 1 ตำแหน่ง



รูปที่ 7 สีของเมล็ดข้าวที่แตกต่างกันโดยใช้การสังเกตด้วยตาเปล่า

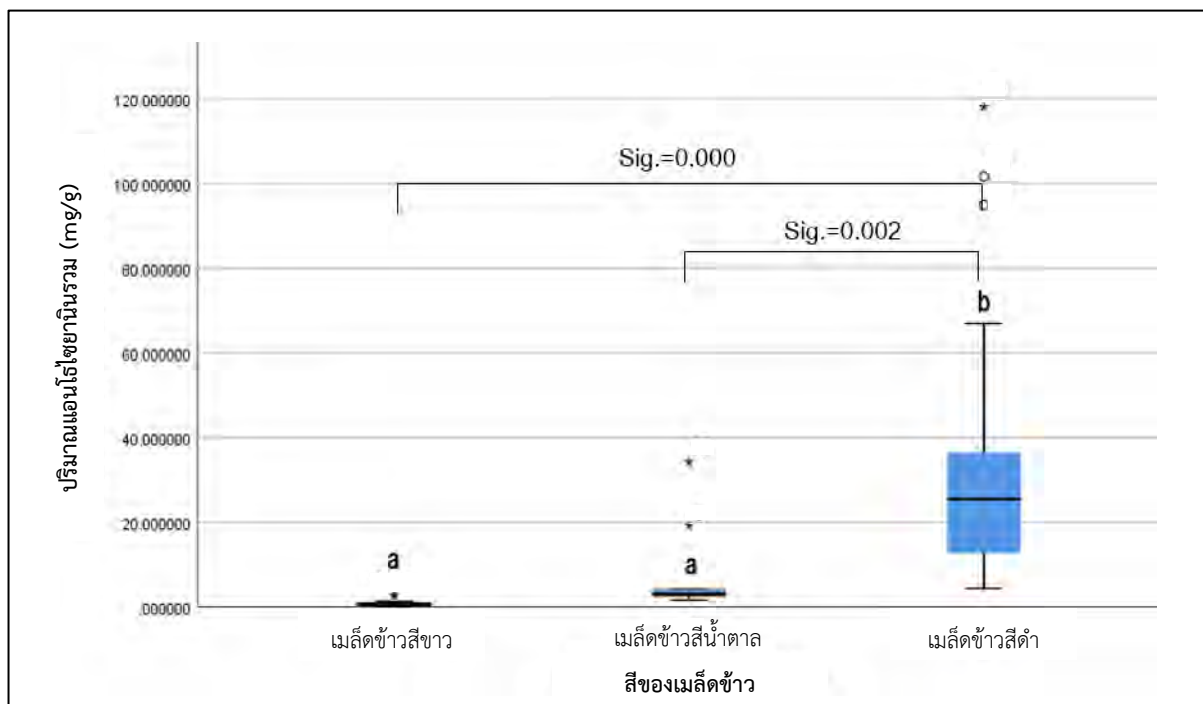
- (a) เมล็ดข้าวสีขาว
- (b) เมล็ดข้าวสีน้ำตาล
- (c) เมล็ดข้าวสีดำ
- (d) เมล็ดข้าวสีแดง

ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินของประชากรข้าวรุ่น F_2 จากคู่ผสม กข41 x ไรซ์เบอร์รี่ ในกลุ่มเมล็ดข้าวสีขาว พบว่ามีค่า 0.662 mg/g โดยพบการกระจายของข้อมูลอยู่ในช่วง 0.197-1.235 mg/g และมีข้อมูลที่เป็น outlier 2 ค่า คือ 2.663 และ 2.685 mg/g สำหรับกลุ่มที่มีเมล็ดข้าวสีน้ำตาลมีค่าเฉลี่ย 2.960 mg/g โดยพบการกระจายของข้อมูลอยู่ในช่วง 1.639-4.322 mg/g และมีข้อมูลที่เป็น outlier 2 ค่า คือ 19.135 และ 34.215 mg/g สุดท้ายคือกลุ่มที่มีเมล็ดข้าวสีดำ พบว่ามีค่าเฉลี่ย 25.491 mg/g โดยพบการกระจายของข้อมูลอยู่ในช่วง 4.357-66.907 mg/g และมีข้อมูลที่เป็น outlier 3 ค่า คือ 94.818, 101.579 และ 117.959 mg/g เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD พบว่า ข้าวสีดำมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าในข้าวสีน้ำตาลและสีขาว (Sig.<0.05) (รูปที่ 8)

ส่วนค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินของประชากรข้าวรุ่น F_2 จากคู่ผสม กข41 x ทับทิมชุมแพ ในกลุ่มเมล็ดข้าวสีขาว พบว่ามีค่า 1.286 mg/g โดยมีการกระจายของข้อมูลอยู่ในช่วง 0.560-2.121 mg/g และกลุ่มเมล็ดข้าวสีแดง พบว่ามีค่า 18.156 mg/g โดยมีการกระจายของข้อมูลอยู่ในช่วง 14.703-22.996 mg/g เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วย LSD พบว่า ข้าวสีแดงมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าในข้าวสีขาว (Sig.<0.05) (รูปที่ 9)

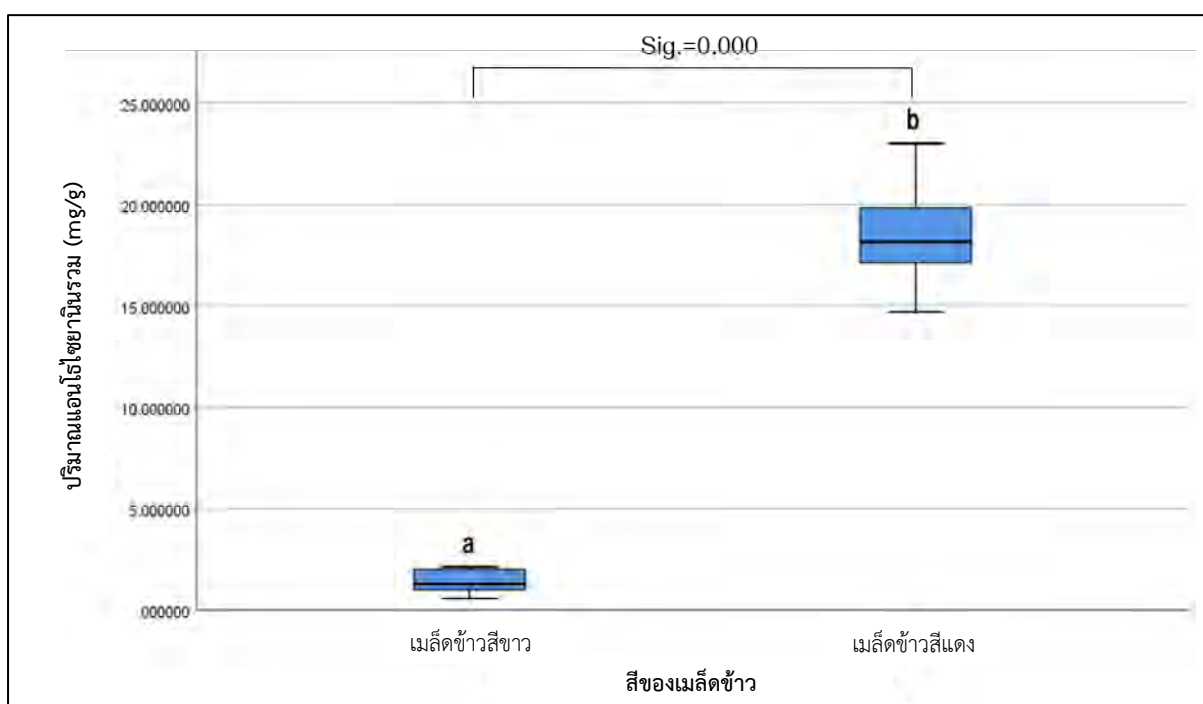
การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างสีของเมล็ดข้าว และปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดจากเมล็ดข้าวในรุ่น F_2 ของคู่ผสมที่ 1 คือ กข41 x ไรซ์เบอร์รี่ พบว่ามีสหสัมพันธ์ระหว่างสีของเมล็ดข้าวกับปริมาณแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (Sig.=0.000) และจากค่า Pearson correlation (r) = 0.562 แสดงว่าข้อมูลทั้งสองมีสหสัมพันธ์กันแบบบวกที่ระดับปานกลาง (moderate relationship)

ส่วนในรุ่น F_2 ของคู่ผสมที่ 2 คือ กข41 x ทับทิมชุมแพ พบว่ามีสหสัมพันธ์ระหว่างสีของเมล็ดข้าวกับปริมาณแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (Sig.=0.000) เช่นกัน และมีค่า Pearson correlation (r) = 0.975 แสดงว่าข้อมูลทั้งสองมีสหสัมพันธ์กันแบบบวกที่ระดับดี (strong relationship) (ตารางที่ 3)



รูปที่ 8 Box plot ของปริมาณแอนโธไซยานิน โดยแยกตามกลุ่มสีเมล็ดข้าวในตัวอย่างข้าว F₂ จากคู่ผสม กข 41 x ไรซ์เบอร์รี่

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันในกลุ่มตัวอย่าง จากการเปรียบเทียบด้วย LSD test, สัญลักษณ์ ★ และ ○ แสดงถึงข้อมูลที่เป็น outlier



รูปที่ 9 Box plot ของปริมาณแอนโธไซยานิน โดยแยกตามกลุ่มสีเมล็ดข้าวในตัวอย่างข้าว F₂ จากคู่ผสม กข 41 x ทับทิมชุมแพ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันในกลุ่มตัวอย่าง จากการเปรียบเทียบด้วย LSD test

ตารางที่ 2 Chi-square test ทดสอบอัตราส่วนสีเมล็ดข้าวในประชากรข้าวรุ่น F₂ จากทั้งสองคู่ผสม เป็นอัตราส่วน 3 : 1

คู่ผสม	ลักษณะ	จำนวน		Test statistics	
		ค่าสังเกต	ค่าคาดหวัง	Chi-Square	Exact Sig.
RD41 x RB	มีสี	57	57.75	0.039	0.895
	ไม่มีสี	20	19.25		
	รวม	77	77		
RD41 x RD69	มีสี	23	24.75	0.495	0.546
	ไม่มีสี	10	8.25		
	รวม	33	33		

ตารางที่ 3 วิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างสีของเมล็ดข้าว และปริมาณแอนโทไซยานินในประชากรข้าวรุ่น F₂ จากคู่ผสม กข41 x ไรซ์เบอร์รี่ และ กข41 x ทับทิมชุมแพ

		คู่ผสมพันธุ์	
		RD41xRB	RD41xRD69
Anthocyanin content	Pearson's correlation	0.562	0.975
	Sig. (2-tailed)	0.000	0.000
	N	77	33

4.3 ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม และลักษณะสีของเมล็ดข้าว

การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression analysis) พบว่าภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรมและสีของเมล็ดจากประชากรข้าวรุ่น F₂ ในคู่ผสม กข41 x ไรซ์เบอร์รี่ ไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.=0.620) (ตารางที่ 4) โดยได้ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ข้าวเมล็ดสีดำในแต่ละกลุ่มจีโนไทป์ ได้ผลดังนี้ ในกลุ่มจีโนไทป์ A₁A₁ พบข้าวที่มีเมล็ดสีดำเป็น 56.67% ในกลุ่มจีโนไทป์ A₁A₂ พบข้าวที่มีเมล็ดสีดำเป็น 63.64% และในกลุ่มจีโนไทป์ A₂A₂ พบข้าวที่มีเมล็ดสีดำเป็น 64.29% และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันจะเห็นได้ว่าจีโนไทป์ทั้งสามสามารถพบข้าวเมล็ดสีดำได้ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นเครื่องหมายพันธุกรรมนี้ไม่สามารถบ่งบอก หรือใช้แยกสีเมล็ดข้าวในประชากรข้าวรุ่น F₂ ในคู่ผสม กข41 x ไรซ์เบอร์รี่ ได้

การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงจากประชากรข้าวรุ่น F₂ ในคู่ผสม กข41 x ทับทิมชุมแพ พบว่าภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรมและสีของเมล็ด มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.=0.030) (ตารางที่ 5) และได้ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ข้าวเมล็ดสีแดงในแต่ละกลุ่มจีโนไทป์ ได้ผลดังนี้ ในกลุ่มจีโนไทป์ A₁A₁ พบข้าวที่มีเมล็ดสีแดงเป็น 85.71% ในกลุ่มจีโนไทป์ A₁A₂ พบข้าวที่มีเมล็ดสีแดงเป็น 81.25% และในกลุ่มจีโนไทป์ A₂A₂ พบข้าวที่มีเมล็ดสีแดงเป็น 50% และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันจะเห็นได้ว่าจีโนไทป์ A₁A₁ และ A₁A₂ สามารถพบข้าวเมล็ดสีแดงได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าจีโนไทป์ A₂A₂ จึงมีการคำนวณเปอร์เซ็นต์ข้าวเมล็ดสีแดงในทั้งสองแอลลิลต่อไป พบว่าแอลลิล A₁ มี 53.33% และแอลลิล A₂ มี 46.67% เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันจะเห็นได้ว่า แอลลิลทั้งสองมีโอกาสพบข้าวเมล็ดสีแดงในเปอร์เซ็นต์ที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นเครื่องหมายพันธุกรรมนี้สามารถใช้คัดเลือกสีของเมล็ดข้าวได้ในประชากรข้าวรุ่น F₂ ใน

คู่ผสม กข41 x ทับทิมชุมแพ ในระดับจีโนไทป์ โดยเมื่อเป็นจีโนไทป์ A_1A_1 หรือ A_1A_2 โอกาสที่เมล็ดข้าวจะเป็นสีแดงมีมากกว่า 80%

ตารางที่ 4 ตาราง ANOVA สำหรับวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และสีของเมล็ดข้าวจากคู่ผสมพันธุ์ กข41 x ไรซ์เบอร์รี่

Model	Sum of Squares	df	Mean square	F-test	Sig.
Regression	0.193	1	0.193	0.247	0.620
Residual	58.690	75	0.783		
Total	58.883	76			

ตารางที่ 5 ตาราง ANOVA สำหรับวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และสีของเมล็ดข้าวจากคู่ผสมพันธุ์ กข41 x ทับทิมชุมแพ

Model	Sum of Squares	Df	Mean square	F-test	Sig.
Regression	1.000	1	1.000	5.196	0.030
Residual	5.969	31	0.193		
Total	6.970	32			

4.4 ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม และปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว

การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรง ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรมและปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดจากเมล็ดข้าวในรุ่น F_2 ของคู่ผสมที่ 1 คือ กข41 x ไรซ์เบอร์รี่ พบว่าภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรมและปริมาณแอนโทไซยานิน ไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.=0.451) (ตารางที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มจีโนไทป์ พบว่าในกลุ่มที่มีจีโนไทป์ A_1A_1 มีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยอยู่ที่ 19.22 ± 22.78 mg/g ในกลุ่มที่มีจีโนไทป์ A_1A_2 มีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยอยู่ที่ 15.64 ± 20.45 mg/g และในกลุ่มที่มีจีโนไทป์ A_2A_2 มีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยอยู่ที่ 27.47 ± 23.69 mg/g ซึ่งข้อมูลทั้งสามกลุ่มมีการกระจายภายในกลุ่มค่อนข้างสูง และค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานินในแต่ละกลุ่มไม่ได้แตกต่างกัน (รูปที่ 10)

การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรง ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรมและปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดจากเมล็ดข้าวในรุ่น F_2 ของคู่ผสมที่ 2 คือ กข41 x ทับทิมชุมแพ พบว่าภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรม และปริมาณแอนโทไซยานินจากตัวอย่างข้าวรุ่น F_2 ในคู่ผสม กข41 x ทับทิมชุมแพ ไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.=0.066) (ตารางที่ 7)

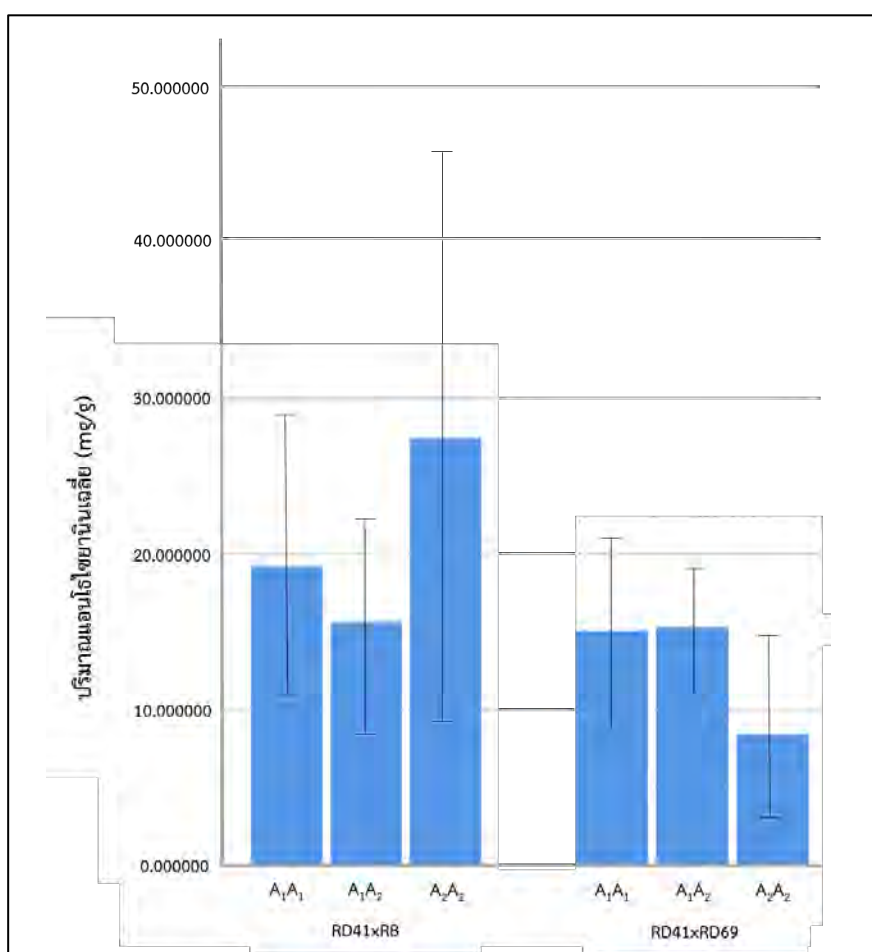
และเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มจีโนไทป์ พบว่าในกลุ่มที่มีจีโนไทป์ A_1A_1 มีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยอยู่ที่ 15.07 ± 6.39 mg/g ในกลุ่มที่มีจีโนไทป์ A_1A_2 มีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยอยู่ที่ 15.33 ± 7.45 mg/g และในกลุ่มที่มีจีโนไทป์ A_2A_2 มีปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยอยู่ที่ 8.45 ± 8.77 mg/g ซึ่งข้อมูลทั้งสามกลุ่มมีการกระจายภายในกลุ่มค่อนข้างสูง และค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานินในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 10)

ตารางที่ 6 ตาราง ANOVA สำหรับวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และปริมาณแอนโธไซยานินในเมล็ดข้าวจากคู่ผสมพันธุ์ กข41 x ไรซ์เบอร์รี่

Model	Sum of Squares	df	Mean square	F-test	Sig.
Regression	324.777	1	324.777	0.575	0.451
Residual	42342.748	75	564.570		
Total	42667.525	76			

ตารางที่ 7 ตาราง ANOVA สำหรับวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรม และปริมาณแอนโธไซยานินในเมล็ดข้าวจากคู่ผสมพันธุ์ กข41 x ทับทิมชุมแพ

Model	Sum of Squares	df	Mean square	F-test	Sig.
Regression	219.872	1	219.872	3.640	0.066
Residual	1872.390	31	60.400		
Total	2092.262	32			



รูปที่ 10 ปริมาณแอนโธไซยานินเฉลี่ย โดยแยกตามกลุ่มจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรมในตัวอย่างข้าวรุ่น F₂ จากทั้งคู่ผสม RD41 x RB และ RD41 x RD69

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 ความสัมพันธ์ระหว่างสีของเมล็ดข้าว และปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสีของเมล็ดข้าว กับปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่าสีของเมล็ดข้าวมีสหสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากรข้าวรุ่น F₂ ของทั้งสองคู่ผสม (Sig.=0.000) โดยพบว่าข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินมากที่สุดคือ ข้าวสีดำที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงถึง 25.49±15.15 mg/g ถัดมาคือข้าวสีแดงมีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่ที่ 18.16±2.14 mg/g, ข้าวสีน้ำตาลมีอยู่ 2.96±0.77 mg/g และข้าวสีขาวมีอยู่ 0.66±0.30 mg/g ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่กล่าวว่า ข้าวที่มีเมล็ดสีดำจะมีปริมาณแอนโทไซยานินที่สูงกว่าข้าวที่มีเมล็ดสีขาวมากกว่า 4 เท่า (Yawadio, Tanimori, and Morita, 2007)

อีกทั้งพันธุ์ข้าวที่มีเมล็ดข้าวสีแดง และสีดำจะมีปริมาณแอนโทไซยานิน รวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ สูงกว่าพันธุ์ข้าวที่มีสีอ่อน เช่น พันธุ์ข้าวที่มีสีขาวและน้ำตาล (Walter et al., 2013) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ก็แสดงให้เห็นว่าข้าวที่มีเมล็ดสีเข้มอย่างเช่น สีดำและสีแดงมีปริมาณแอนโทไซยานินที่สูงกว่าข้าวสีอ่อนอย่างเช่น สีน้ำตาลและสีขาว

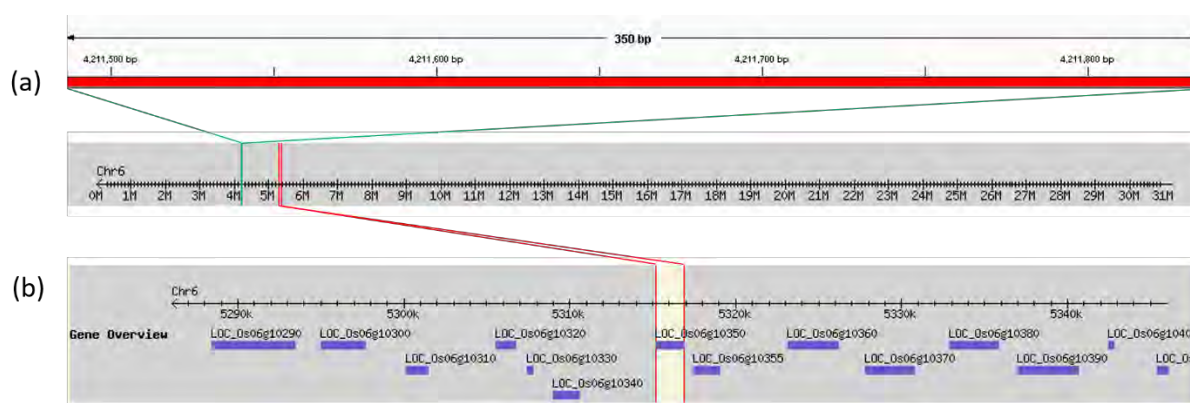
5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม และสีของเมล็ดข้าว

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรม กับสีของเมล็ดข้าว พบว่าภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรมมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับสีของเมล็ดข้าวในประชากรข้าวรุ่น F₂ จากคู่ผสม กข41 x ทับทิมชุมแพ (Sig.=0.030) โดยเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ในการพบข้าวเมล็ดสีแดงในแต่ละกลุ่มจีโนไทป์ พบว่าจีโนไทป์ A₁A₁ และ A₁A₂ มีโอกาสพบข้าวเมล็ดสีแดงมากกว่าจีโนไทป์ A₂A₂ แต่เมื่อหาเปอร์เซ็นต์ในการพบข้าวเมล็ดสีแดงแยกตามแอลลีล กลับไม่พบความแตกต่างกันในแอลลีล A₁ และ A₂ ดังนั้นมีโอกาสเป็นไปได้ว่าแอลลีล A₁ ที่พบในประชากรรุ่น F₂ อาจจะเป็นแอลลีลเด่นในการควบคุมการมีสีแดงบนเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวที่มาจากสารให้สีชนิดหนึ่งในพันธุ์พ่อ - แม่ที่มีเมล็ดสีขาว และหากต้องการนำเครื่องหมายพันธุกรรมนี้ไปคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีเมล็ดสีแดง สามารถใช้คัดเลือกได้ในระดับจีโนไทป์

ทั้งนี้จากการหาข้อมูลในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทำให้ทราบว่า การแสดงออกของสีเมล็ดข้าวนี้อาจไม่ได้มาจากแอนโทไซยานินเพียงอย่างเดียว แต่ในเมล็ดข้าวโดยเฉพาะชั้นของรำข้าวยังมีสารให้สีอีกมากมาย นอกเหนือจากแอนโทไซยานิน ไม่ว่าจะเป็นสารประกอบฟีนอลิก ที่เคยมีการรายงานที่สามารถพบได้ในปริมาณที่สูงถึง 1.0103-1.0494 GAE/mg ในข้าวสีแดงเมื่อเทียบกับข้าวสีขาว (Muntana and Prasong, 2010) นอกจากนี้ยังมีเบต้าแคโรทีน (β-carotene) ที่เคยมีการรายงานว่า ข้าวสีที่ได้มีการคัดเลือกจากพื้นที่ราบสูงในประเทศฟิลิปปินส์มีปริมาณเบต้าแคโรทีนเฉลี่ยอยู่ที่ 0.13 μg/g โดยเบต้าแคโรทีนจะทำให้เมล็ดข้าวมีสีเข้มยิ่งขึ้น เมื่อมีการชักนำให้มีการแสดงออกของปริมาณเบต้าแคโรทีนที่สูงขึ้น (Frei and Becker, 2004)

5.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม และปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณของเครื่องหมายพันธุกรรม ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *OsC1* (*LOC_Os06g10350*) ในโครโมโซมคู่ที่ 6 กับปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่าภาวะพหุสัญญาณของเครื่องหมายพันธุกรรม ไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากรข้าวรุ่น F_2 จากทั้งสองคู่ผสมพันธุ์ ($\text{Sig.} > 0.05$) ทั้งนี้ตำแหน่งที่ออกแบบไพรเมอร์มีระยะห่างจากตำแหน่งของยีน *OsC1* ประมาณ 1.1 ล้านคู่เบส (รูปที่ 11) ซึ่งอาจเป็นระยะห่างที่มากเกินไปและมีโอกาสในการเกิด crossing over ระหว่างทั้งสองตำแหน่งนี้ได้ ดังนั้นตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรมนี้อาจจะไม่มี ความเชื่อมโยงหรือเกี่ยวข้องกับตำแหน่งของยีน *OsC1* จึงนำมาสู่ข้อสรุปที่ว่า ภาวะพหุสัญญาณของเครื่องหมาย พันธุกรรมนี้ไม่ได้แสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดของประชากรข้าวรุ่น F_2 ในทั้งสองคู่ผสมพันธุ์ด้วยเช่นกัน



รูปที่ 11 ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมและดั่งยีน *OsC1* บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ในข้าว จากฐานข้อมูล

Rice Genome Annotation Project

- ตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม
- ตำแหน่งของยีน *OsC1*

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

เครื่องหมายพันธุกรรมทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของ PCR product ในประชากรข้าวรุ่น F₂ ในทั้งสองคู่ผสม โดยในคู่ผสม กข41 x ไรซ์เบอร์รี่ พบว่ามีความต่างของขนาด PCR product อยู่ที่ 45 bp และคู่ผสม กข41 x ทับทิมชุมแพ พบว่ามีความต่างของขนาด PCR product อยู่ที่ 96 bp และเมื่อนำไปคำนวณความถี่จีโนไทป์ พบว่ามีค่า heterozygosity อยู่ที่ประมาณ 0.4-0.5 ในทั้งสองคู่ผสม

ความสัมพันธ์ระหว่างสีของเมล็ดข้าวและปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว พบว่าสีของเมล็ดข้าวมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากรข้าวรุ่น F₂ ของทั้งสองคู่ผสม ซึ่งเมล็ดข้าวสีเข้มอย่างสีดำและสีแดง มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าในเมล็ดข้าวสีอ่อนอย่างสีน้ำตาลและสีขาว

ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมและสีของเมล็ดข้าว พบว่าภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับสีของเมล็ดข้าวในประชากรข้าวรุ่น F₂ ของคู่ผสม กข41 x ทับทิมชุมแพ โดยข้าวที่มีจีโนไทป์ A₁A₁ และ A₁A₂ มีโอกาสจะมีเมล็ดข้าวเป็นสีแดงมากกว่าจีโนไทป์ A₂A₂

ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมและปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว พบว่าภาวะพหุสัณฐานของเครื่องหมายพันธุกรรมไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวของประชากรข้าวรุ่น F₂ จากทั้งสองคู่ผสม

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการนำเครื่องหมายพันธุกรรมนี้ไปใช้ ควรศึกษาข้อมูลต่าง ๆ เพิ่มเติมสำหรับตำแหน่ง LOC_Os06g08550 ให้ละเอียดก่อน ทั้งนี้เครื่องหมายพันธุกรรมนี้ยังคงใช้กับการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่แสดงลักษณะปริมาณแอนโทไซยานินที่แตกต่างกันไม่ได้ ดังนั้นหากต้องการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของลักษณะปริมาณแอนโทไซยานิน ควรมีพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใกล้ตำแหน่งของยีน OsC1 มากกว่านี้

เอกสารอ้างอิง

- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5: 37-58.
- Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. Anthocyanins as Food Colors, pp1-40. New York : Academic Press.
- Chalker-Scott, L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress response. Photochemistry and Photobiology 70: 1-9.
- Chen et al., 2006. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. Chemico-Biological Interactions 163: 218-229.
- Chin, H.S., Wu, Y.P., Hour, A.L., Hong, C.Y. and Lin, Y.R. 2016. Genetic and evolutionary analysis of purple leaf sheath in rice. Rice 9(1): 1-14.
- Delgado-Vargas, F., and Paredes-López, O. 2003. Anthocyanins and betalains. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses, pp.167-219. Boca Raton : CRC Press.
- Fan, F.J., Fan, Y.Y., Du, J.H. and Zhuang, J.Y. 2008. Fine mapping of C (chromogen for anthocyanin) gene in rice. Rice Science 15(1): 1-6.
- Frei, M., and Becker, K. 2004. Agro-biodiversity in subsistence-oriented farming systems in a Philippine upland region: nutritional considerations. Biodiversity & Conservation 13(8): 1591-1610.
- Furukawa et al., 2007. The Rc and Rd genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. The Plant Journal 49: 91-102.
- Giusti, M.M., Rodríguez-Saona, L.E., Griffin, D., and Wrolstad, R.E. 1999. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. Food Chemistry 47: 4657-4664.
- Goto, T., and Kondo, T. 1991. Structure and molecular stacking of anthocyanins-flower color variation. Angewandte Chemi International Edition English 30: 17-33.
- Harborne, J.B., and Williams, C.A. 2001. Anthocyanins and other flavonoids. Natural Product Reports 18: 310-333.
- Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T., and Lim, S.M. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food & Nutrition Research 61(1): 1361779.
- Kim, W.J., Adeva, C., Lee, H.S., Jeon, Y.A., Shim, K.C., and Ahn, S.N. 2020. Genetic analysis of anthocyanin pigmentation in sterile lemma and apiculus in rice. Plant Breeding and Biotechnology 8(4): 378-388.
- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., and Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry 64(5): 923-933.

- Lee, J.H. 2010. Identifications and quantification of anthocyanins from the grains of black rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Food Science and Biotechnology 19: 391-397.
- Lim, S.H., and Ha, S.H. 2013. Marker development for the identification of rice seed color. Plant Biotechnology Reports 7(3): 391-398.
- Liu, H.J., and Yan, J. 2019. Crop genome wide association study: a harvest of biological relevance. The Plant Journal 97: 8-18.
- Mancinelli, A.L. 1990. Interaction between light quality and light quantity in the photoregulation of anthocyanin production. Plant Physiology 92(4): 1191-1195.
- Mazza, G., and Miniati, E. 1993. Grapes. Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains, pp.149-199. Boca Raton : CRC Press.
- Muntana, N., and Prasong, S. 2010. Study on total phenolic contents and their antioxidant activities of Thai white, red and black rice bran extracts. Pakistan Journal of Biological Sciences 13(4): 170.
- Nagao, S., Takahashi, M., and Miyamoto, T. 1957. Genetic studies on rice plant, XXI. biochemical studies on red rice pigmentation. The Japanese Journal of Genetics 32: 124-128.
- Oikawa et al., 2015. The birth of a black rice gene and its local spread by introgression. The Plant Cell 27: 2401-2414.
- Rachasima, L.N., Sukkasem, R., Pongjaroenkit, S., Sangtong, V., Chowpongpan, S., and Sakulsingharoj, C. 2017. Expression analysis and nucleotide variation of *OsC1* gene associated with anthocyanin pigmentation in rice. Genomics and Genetics 10(3): 46-53.
- Ryan et al., 2011. Rice bran fermented with *Saccharomyces boulardii* generates novel metabolite profiles with bioactivity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59: 1862-1870.
- Saitoh, K., Onishi, K., Mikami, I., Thidar, K., and Sano, Y. 2004. Allelic diversification at the *C* (*OsC1*) locus of wild and cultivated rice. Genetics 168: 997-1007.
- Tanaka et al., 2011. Purple rice (*Oryza sativa* L.) extract and its constituents inhibit VEGF-induced angiogenesis. Phytotherapy Research 26: 214-222.
- Walter et al., 2013. Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. Food Research International 50: 698-703.
- Yawadio, R., Tanimori, S., and Morita, N. 2007. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rice and their aldose reductase inhibitory activities. Food Chemistry 101: 1616-1625.

- Yoshida et al., 2010. Determination of free and bound phenolic acids, and evaluation of antioxidant activities and total polyphenolic contents in selected pearled barley. Food Science and Technology Research 16(3): 215-224.
- Zhang, M.W., Zhang, R.F., Guo, B.J., Chi, J.W., Wei, Z.C., and Xu, Z.H. 2006. The protective effects of anthocyanidin extracted from black rice fraction on endothelia cells injured by oxidative stress. Acta Nutrimenta Sinica 28: 216-220.

ภาคผนวก

ตารางที่ 8 สีเมล็ด และปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยในแต่ละประชากรข้าวพันธุ์ RD41, RB, F₁ และ F₂ จำนวน 77 ตัวอย่าง จากคู่ผสมพันธุ์ “กข41” (RD41) x “ไรซ์เบอร์รี่” (RB)

ประชากรข้าว	สีเมล็ด	ปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ย (mg/g)
RD41	ขาว	1.471555
RB	ดำ	79.284833
F ₁	น้ำตาล	16.545523
3F2-1-4	ดำ	4.357267
3F2-1-5	ดำ	8.807533
3F2-1-7	ขาว	0.276606
3F2-1-8	ดำ	8.596233
3F2-1-9	ขาว	0.196987
3F2-1-10	ดำ	8.902397
3F2-1-11	ดำ	8.116057
3F2-1-12	ดำ	9.761617
3F2-1-14	ดำ	36.368440
3F2-2-1	ดำ	17.440587
3F2-2-2	ดำ	24.126150
3F2-2-4	น้ำตาล	3.307687
3F2-2-6	ดำ	28.661100
3F2-2-7	ขาว	0.771700
3F2-2-8	ขาว	0.661995
3F2-2-11	ขาว	0.984123
3F2-2-12	ขาว	0.810283
3F2-2-16	น้ำตาล	2.640290
3F2-2-17	ขาว	0.616790
3F2-3-4	ดำ	7.779830
3F2-3-5	ดำ	42.176123
3F2-3-9	ขาว	0.490273
3F2-3-10	ดำ	33.770640
3F2-3-11	ดำ	117.958667
3F2-3-14	น้ำตาล	19.135443
3F2-3-15	น้ำตาล	3.048320
3F2-4-1	ดำ	46.181030
3F2-4-2	ดำ	28.757230
3F2-4-3	ดำ	38.759537
3F2-4-4	ขาว	1.025833

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ประชากรข้าว	สีเมล็ด	ปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ย (mg/g)
3F2-4-5	ขาว	1.123817
3F2-4-6	ดำ	8.635373
3F2-4-7	ดำ	45.600420
3F2-4-8	ดำ	12.824193
3F2-4-9	ดำ	25.880577
3F2-4-10	ดำ	15.242517
3F2-4-12	น้ำตาล	4.321770
3F2-4-13	ดำ	29.975233
3F2-4-14	ดำ	30.639443
3F2-4-16	ดำ	53.114753
3F2-4-17	ดำ	26.532603
3F2-5-1	ดำ	28.958300
3F2-5-3	น้ำตาล	2.444633
3F2-5-4	ดำ	61.024590
3F2-5-5	ดำ	25.291673
3F2-5-7	ดำ	11.155223
3F2-5-12	ดำ	12.748523
3F2-6-1	ขาว	0.983056
3F2-6-2	ดำ	20.902833
3F2-6-3	ขาว	1.057630
3F2-6-5	ขาว	1.235210
3F2-6-8	ดำ	4.570607
3F2-6-10	น้ำตาล	2.752650
3F2-6-12	ขาว	2.663113
3F2-6-13	ดำ	94.818303
3F2-6-14	ดำ	23.148773
3F2-6-15	ดำ	29.210070
3F2-7-1	ขาว	0.499368
3F2-7-2	ดำ	101.578947
3F2-7-3	ขาว	0.620104
3F2-7-4	ขาว	0.590145
3F2-7-5	ดำ	35.563143
3F2-7-7	ขาว	0.616432
3F2-7-8	น้ำตาล	2.871906
3F2-7-9	ขาว	0.426095

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ประชากรข้าว	สีเมล็ด	ปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ย (mg/g)
3F2-7-10	น้ำตาล	1.639445
3F2-7-11	ดำ	25.690317
3F2-7-12	ขาว	0.410815
3F2-7-13	ดำ	37.354083
3F2-8-1	น้ำตาล	34.215100
3F2-8-2	ขาว	2.684614
3F2-8-6	ดำ	21.494903
3F2-8-9	ดำ	17.031340
3F2-8-12	ดำ	9.612833
3F2-8-14	ดำ	12.609880
3F2-8-15	ดำ	23.370777
3F2-8-16	ดำ	66.907150

ตารางที่ 9 สีเมล็ด และปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ยในแต่ละประชากรข้าวพันธุ์ RD41, RD69, F₁ และ F₂ จำนวน 33 ตัวอย่าง จากคู่ผสมพันธุ์ “กข41” (RD41) × “ทับทิมชุมแพ” (RD69)

ประชากรข้าว	สีเมล็ด	ปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ย (mg/g)
RD41	ขาว	1.471555
RD69	แดง	16.408823
F ₁	แดง	16.227993
4F2-1-2	แดง	17.451353
4F2-1-10	แดง	16.133953
4F2-2-1	แดง	18.218850
4F2-2-3	ขาว	1.998850
4F2-2-6	ขาว	2.120577
4F2-2-8	ขาว	1.702793
4F2-2-9	แดง	18.038560
4F2-3-3	ขาว	0.947043
4F2-3-6	ขาว	0.995027
4F2-3-7	แดง	18.155673
4F2-4-2	แดง	21.037470
4F2-5-3	แดง	18.127700
4F2-5-4	ขาว	1.218880
4F2-5-5	ขาว	2.046083
4F2-5-6	แดง	20.227400
4F2-5-9	ขาว	1.299730
4F2-6-3	แดง	14.985817
4F2-6-4	ขาว	1.273260
4F2-6-5	แดง	20.968053
4F2-8-2	แดง	17.896607
4F2-8-3	แดง	18.164563
4F2-8-4	แดง	15.944183
4F2-8-5	แดง	18.483590
4F3-8-10	แดง	22.996623
4F2-9-1	แดง	19.176047
4F2-9-3	แดง	20.785503
4F2-9-6	แดง	17.366367
4F2-9-8	ขาว	0.560321
4F2-9-9	แดง	20.613037
4F2-10-3	แดง	19.403397

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ประชากรข้าว	สีเมล็ด	ปริมาณแอนโทไซยานินเฉลี่ย (mg/g)
4F2-10-8	แดง	16.865317
4F2-10-9	แดง	14.703230
4F2-10-10	แดง	15.401903