บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การเก็บรวบรวมสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำ

จากการเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียวดำ จากสถานที่ราชการต่างๆ และจากพื้นที่ที่มีการปลูกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือในปีเพาะปลูก 2551-2552 แล้วนำมาจัดเรียงหมายเลขตามลำดับของการได้มาสามารถรวบรวมเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียวดำได้ 90 สายพันธุ์ ได้แก่

จากศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 72 สายพันธุ์

จากหมวดวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 4 สายพันธุ์

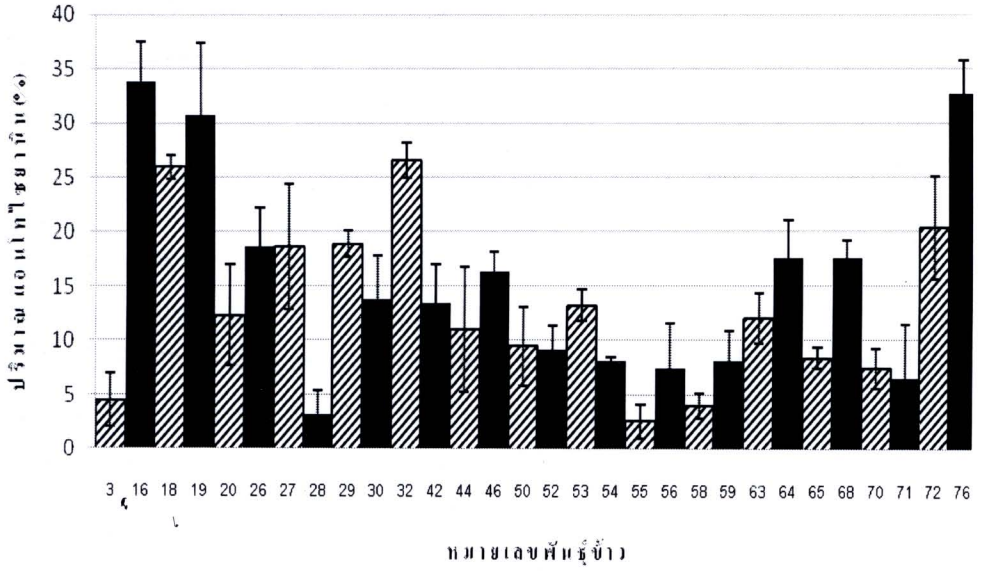
จากพื้นที่ที่มีการปลูกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปี 2551 จำนวน 8 สายพันธุ์ เช่น จากบ้านกุดแคน อ. เมือง จ. มหาสารคาม จำนวน 2 สายพันธุ์ อ. เมืองสรวง จ. ร้อยเอ็ด จำนวน 1 สายพันธุ์ อ. กุดชุม จ. ร้อยเอ็ด จำนวน 2 สายพันธุ์ อ. ชุมแพ จ. ขอนแก่น จำนวน 1 สายพันธุ์ อ. เมือง จ. ยโสธร จำนวน 2 สายพันธุ์

จากพื้นที่ที่มีการปลูกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปี 2552 จำนวน 6 สายพันธุ์ เช่น จาก อ. หนองสองห้อง จ. ขอนแก่น จำนวน 2 สายพันธุ์ อ.ห้วยทับทัน จ. ศรีสะเกษ จำนวน 2 สายพันธุ์ อ. กุฉินารายณ์ จ. กาฬสินธุ์ จำนวน 2 สายพันธุ์

จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียวดำทั้ง 90 สายพันธุ์ มาทำการบ่งชี้ลักษณะทั่วไป เช่น เปอร์เซ็นต์การงอก สีข้าวเปลือก สีเยื่อหุ้มเมล็ด และสีของใบข้าว (ภาคผนวก ข ตารางที่ 4) โดยทำการปลูกต้นกล้าข้าวในสารละลายธาตุอาหารเพาะเลี้ยงข้าว เป็นเวลา 14 วัน พบเมล็ดข้าวเหนียวดำที่มีสีข้าวเปลือกเป็นสีฟาง จำนวน 18 สายพันธุ์ สีข้าวเปลือกเป็นสีฟางดำ จำนวน 3 สายพันธุ์ และมีสีข้าวเปลือกเป็นสีดำ จำนวน 69 สายพันธุ์ สีข้าวกล้องเป็นสีก่ำล้วน 64 สายพันธุ์ และสีข้าวกล้องเป็นสีก่ำผ่า จำนวน 26 สายพันธุ์ และพบข้าวเหนียวดำที่มีใบสีเขียว จำนวน 72 สายพันธุ์ และมีใบสีม่วง จำนวน 18 สายพันธุ์ (ภาคผนวก ข ภาพที่ 9-11) ซึ่งความหลากหลายของลักษณะต่างๆของข้าวเหนียวดำที่รวบรวมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้นี้ น่าจะเป็นประโยชน์ต่อไปในด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เพื่อให้ข้าวไทยมีคุณลักษณะที่ดีหลายๆลักษณะเพิ่มมากขึ้น

4.2 การศึกษาปริมาณสารแอนโทไซยานินในส่วนของเปลือกเมล็ดข้าวเหนียวดำ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินในส่วนของเปลือกเมล็ดของข้าวเหนียวดำทั้ง 30 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นการหาปริมาณสารแอนโทไซยานินชนิดแอนโทไซยานิดิน ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ตามวิธีการของสุรัตน์ นักหล่อ (2544) ผลจากการวิเคราะห์ ดังแสดงในภาคผนวก ข ตารางที่ 5 ภาพที่ 7 ซึ่งจะพบได้ว่า ข้าวเหนียวดำทั้ง 30 สายพันธุ์ มีการสะสมสารแอนโทไซยานินในส่วนของเปลือกเมล็ด อยู่ในช่วง 2-34 เปอร์เซ็นต์ โดยมีข้าวเหนียวดำ 3 หมายเลขที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานินมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ ข้าวเหนียวดำใบสีเขียว หมายเลข 16 และหมายเลข 76 และข้าวเหนียวดำใบสีม่วงหมายเลข 19 โดยข้าวเหนียวดำทั้ง 3 หมายเลขนั้น มีปริมาณสารแอนโทไซยานิน เท่ากับ 33.76, 32.79 และ 30.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนข้าวเหนียวดำ ที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานินน้อยที่สุดคือ ข้าวเหนียวดำใบสีม่วง หมายเลข 55 ที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานินเพียง 2.60 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 7 แสดงปริมาณสารแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวเหนียวดำข้าว 30 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกมาจากเมล็ดข้าวกล้องของข้าวเหนียวดำ 30 สายพันธุ์

ซึ่งความแตกต่างของการสะสมสารแอนโทไซนินในส่วนของเปลือกเมล็ดของข้าวเหนียวดำแต่ละสายพันธุ์นั้น ดำเนิน กาละดี (2545) ได้ให้คำอธิบายไว้ว่า ปริมาณการสะสมสารแอนโทไซนินมากหรือน้อยนั้นเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังได้กล่าวว่า สิ่งแวดล้อมเช่น อุณหภูมิ หรือ แสงอาทิตย์ มีผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์และการสลายตัวของสารแอนโทไซยานิน ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินและความเข้มของสีที่ปรากฏเปลี่ยนไป จากการศึกษาในครั้งนี้ จะพบได้ว่า ปริมาณแอนโทไซยานินที่มีการสะสมในเปลือกเมล็ดของข้าวเหนียวดำ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างข้าวเหนียวดำ ที่มีใบสีเขียวและใบสีม่วง หรือระหว่างข้าวเหนียวดำ ที่มีสีข้าวเปลือกเป็นสีดำและที่มีสีฟางนั้นไม่แตกต่างกัน ดังนั้นความสามารถในการสะสมสารแอนโทไซยานินมากน้อยนั้นเป็นจึงลักษณะเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับ ดำเนิน กาละดี (2545)

Abdel-Aal *et al.* (2006) ได้รายงานว่า ในบรรดาธัญพืชชนิดต่างๆ ที่มีการสะสมสารสีนั้น ข้าวดำจะมีปริมาณสารแอนโทไซยานินที่สูงกว่าธัญพืชชนิดต่างๆ มากโดยมีค่าเท่ากับ 3,276 μg/g และสารแอนโทไซยานินที่พบในข้าวสีดำมากที่สุดคือ ไซยานิดีน 3-กลูโคไซด์ (cyaniding 3-glucoside) หรือ แอนโทไซยานิดิน ดังนั้นข้าวดำข้าวเหนียวดำหมายเลข 16, 76 และ 19 ที่เป็นข้าวเหนียวดำใบสีเขียว ใบสีเขียวและใบสีม่วง ตามลำดับ และมีปริมาณสารแอนโทไซยานิน เท่ากับ 33.76, 32.79 และ 30.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย มีการสะสมสารสีแอนโทไซยานินในปริมาณที่สูงมากกว่าข้าวเหนียวดำหมายเลขอื่นๆ จึงสมควรที่จะอนุรักษ์สายพันธุ์ไว้เพื่อเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดีสำหรับใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะอื่นๆที่ดีอยู่แล้ว ให้มีคุณลักษณะของสารสีเพิ่มขึ้นอีกลักษณะหนึ่ง

4.3 การศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนในใบข้าวเหนียวขาวและข้าวเหนียวดำ โดยใช้เทคนิค 2D-PAGE

จากการศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในใบข้าว อายุ 35 วัน ของข้าวเหนียว 2 สายพันธุ์คือ ข้าวเหนียวขาว สายพันธุ์ กข 6 และข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19 (ภาคผนวก ข ภาพที่ 13) โดยใช้เทคนิค 2D-PAGE

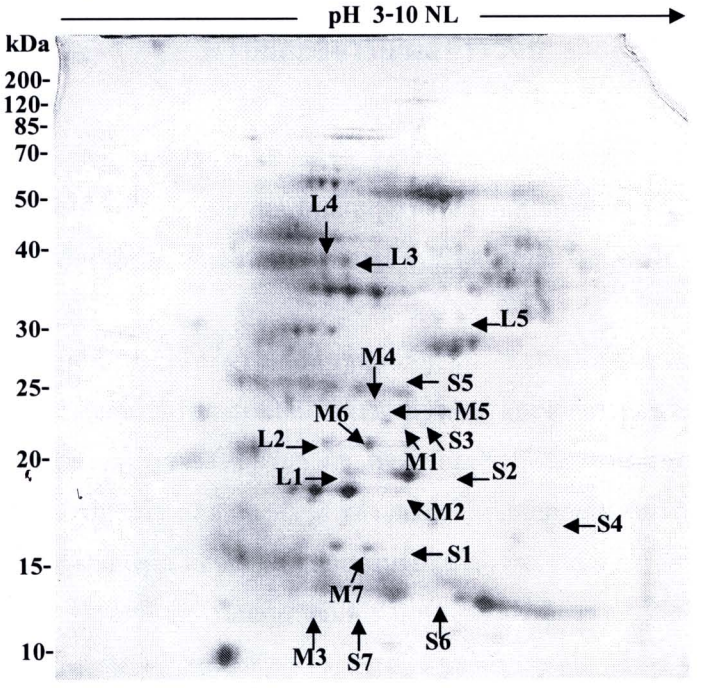
ซึ่งเทคนิคนี้ ประกอบด้วยการแยกโปรตีนบนแผ่นเจลในสองทิศทาง การแยกโปรตีนในทิศทางแรกจะอาศัย ค่าประจุสุทธิของโปรตีน โดยใช้เทคนิค IEF ซึ่งใช้ IPG strip ที่มีช่วงความกว้างของค่า pH คือ pH 3–10 NL โดยใช้เครื่อง Ettan IPG phor จากนั้นแยกโปรตีนในอีกทิศทาง เพื่อแยกโปรตีนที่มีค่า pI เท่ากันออกจากกัน ตามค่าน้ำหนักมวลโมเลกุล โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ซึ่งใช้ตัวกลางค้ำจุนที่เป็นสารพอลิอะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และย้อมจุดโปรตีนบนแผ่นเจลด้วยสีย้อมซิลเวอร์ไนเตรท ซึ่งแบบแผนโปรตีน ของใบข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ จะพบโปรตีนมากกว่า 100 จุด ในแต่ละแบบแผนโปรตีน

เมื่อนำแบบแผนของโปรตีนของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ มาศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของจุดโปรตีน พบว่า มีโปรตีนจำนวน 7 จุด ที่พบเฉพาะในข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19 คือ โปรตีน S1-S7 ส่วนโปรตีนที่พบในข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ มีจำนวนอย่างน้อย 12 จุด ซึ่งมีโปรตีน 7 จุด ที่พบในข้าวเหนียวดำหมายเลข 19 มากกว่าข้าวเหนียวขาว สายพันธุ์ กข 6 คือโปรตีน M1-M7 และมีโปรตีน 5 จุด ที่พบในข้าวเหนียวขาวสายพันธุ์ กข 6 มากกว่าข้าวเหนียวดำหมายเลข 19 คือโปรตีน L1-L5 (ภาพที่ 8)

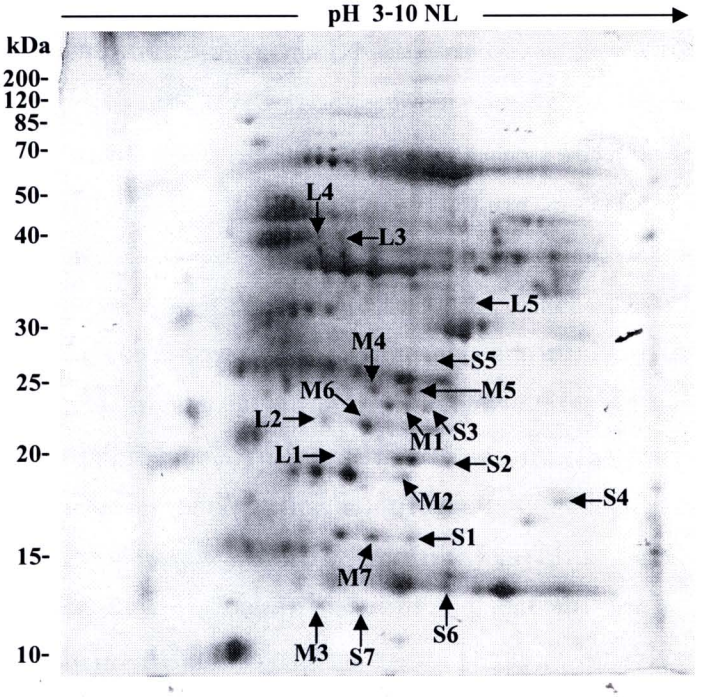
และเมื่อทำการวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum version 5 เพื่อหาค่า pI และ ค่าน้ำหนักมวลโมเลกุล ของจุดโปรตีนที่สนใจในข้าวเหนียวทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า โปรตีน S1-S7 มีมวลโมเลกุลขนาด 15, 19, 22, 17, 26, 13 และ 12 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 6.2, 6.5, 6.4, 8.6, 6.4, 6.5 และ 5.8 โปรตีน M1-M7 มวลโมเลกุลขนาด 18, 22, 12, 23, 23, 22 และ 16 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 6.2, 6.2, 5.4, 6.3, 6.1, 5.8 และ 5.9 ส่วนโปรตีน L1-L5 มีมวลโมเลกุลขนาด 19, 22, 36, 36 และ 30 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 5.7, 5.5, 5.7, 5.5 และ 6.6 ตามลำดับ (ภาคผนวก ข ตารางที่ 7)

จากนั้นนำค่ามวลโมเลกุลและค่า pI ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน Expasy เพื่อระบุชนิดและหน้าที่ของโปรตีนที่พบเฉพาะในข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19 ซึ่งไม่พบในข้าวเหนียวขาว พบว่า โปรตีน S1-S7 คือ CRS2-like protein, Montothiol glutaredoxin-S1, Putative germin-like protein 8-1, V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit, Expansin-B1, Ribulose bisphosphate carboxylase small chain และ Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9 ตามลำดับ (ภาคผนวก ข ตารางที่ 8) ส่วนโปรตีน M1-M7 ที่พบในข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19 มากกว่าขาวเหนียวขาว สายพันธุ์ กข 6 คือ Nuclear transcription factor Y subunit B-3, Germin-like protein 8-6 Cysteine proteinase inhibitor 5, Germin-like protein 8-11, Transcription factor LAX PANICLE, Ribosome-recycling factor, chloroplastic และ NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit J ตามลำดับ (ภาคผนวก ข ตารางที่ 9) และโปรตีน L1-L5 ที่พบในขาวเหนียวขาว สายพันธุ์ กข 6 มากกว่าข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19 คือCytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit (chloroplastic), Germin-like protein 3-5, Putative cyclin-D7-1, Nicotianamine synthase 3 และ Probable succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, (mitochondrial) ตามลำดับ (ภาคผนวก ข ตารางที่ 10)

A. ข้าวเหนียวขาว สายพันธุ์ กข 6



B. ข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19



ภาพที่ 8 แบบแผนโปรตีนของใบข้าวเหนียว 2 สายพันธุ์ จากต้นกล้าอายุ 35 วัน ปลูกในสารละลายธาตุอาหารพืช แยกโดยใช้เทคนิค 2D-PAGE ในทิศทางแรกใช้ช่วงความกว้างของค่า pH คือ 3–10 NL และทิศทางที่สองโดยใช้ 10 เปอร์เซ็นต์ พอลิอะคริลาไมด์ ย้อมแถบโปรตีนด้วยสีย้อมซิลเวอร์ไนเตรท (S คือ จุดโปรตีนที่พบเฉพาะในข้าวเหนียวดำ M คือ จุดโปรตีนที่พบมากขึ้นในข้าวเหนียวดำ และ L คือโปรตีนที่พบลดลงในข้าวเหนียวดำ)