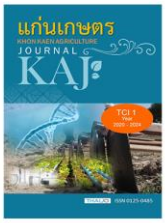
วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวในประชากรชั่วที่ 2 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 กับก่ำน้อย

DNA markers related to anthocyanin contents and pericarp color in F_2 progenies of the cross between Pathumthani 1 and Kham Noi

อนงค์นาฏ หรี่จินดา[1], วราภรณ์ แสงทอง[1], แสงทอง พงษ์เจริญกิต[1], นฤมล เข็มกลัดเงิน[1], สมจริง รุ่งแจ้ง[2], กฤษณะ ลาน้ำเที่ยง[3] และช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์[1]*

Anongnad Richinda[1], Varaporn Sangtong[1], Saengtong Pongjaroenkit[1], Naruemon Khemkladngoen[1], Somjing Roongjang[2], Krisana Lanumteang[3] and Chotipa Sakulsingharoj[1]*

[1] *สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290*
[1] *Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand*
[2] *คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200*
[2] *Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*
[3] *สาขาวิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290*
[3] *Program in Statistics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand*

บทคัดย่อ: ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเกิดจากการสะสมของแอนโทไซยานินสูง โดยการสังเคราะห์แอนโทไซยานินควบคุมด้วยยีนที่สำคัญ คือ *OsB1* และ *OsDFR* ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น ของคู่ผสมระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์แม่ปทุมธานี 1 กับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์พ่อก่ำน้อย การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี simple regression พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ($P<0.05$) มีค่า R^2 เท่ากับ 31.9% สีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 มีอัตราส่วนการเกิดสีและไม่เกิดสี คือ 3:1 โดยการเกิดสีเยื่อหุ้มเมล็ดต้องมีอัลลีลเด่นของยีน *OsB1* อย่างน้อย 1 อัลลีล นอกจากนี้ การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2 ด้วยวิธี HPLC พบต้นที่มี cyanidin-3-O-glucoside (C3G) สูงที่สุด เท่ากับ 39.52 มก./100 ก. เมล็ดแห้ง ซึ่งมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้ม ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* สามารถนำมาใช้คัดเลือกข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินและเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีได้ตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโต สะดวก รวดเร็ว และช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงได้

คำสำคัญ: ข้าว; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; แอนโทไซยานิน; สีเยื่อหุ้มเมล็ด; ประชากรชั่วที่ 2

ABSTRACT: Rice with purple pericarp has high anthocyanin accumulation. Anthocyanin synthesis is controlled by *OsB1* and *OsDFR* genes. In this study, relationship between the DNA markers of *OsB1* and *OsDFR* genes and anthocyanin content was performed in 300 plants of F_2 populations of the cross between white pericarp rice as female parent (Pathumthani 1) and purple pericarp rice as male parent (Kham Noi). Analysis of the relationship between genotype of DNA markers and phenotype of anthocyanin content and pericarp color by simple regression method was investigated. The result indicated that only *OsB1*, a functional marker, was highly related with anthocyanin content and pericarp color which had R^2 equivalent to 31.9%. The segregation of pericarp color in F_2

* Corresponding author: chotipa.cs@gmail.com

Received: date; February 15, 2021 Accepted: date; June 9, 2021 Published: date; October 5, 2021

population showed color: colorless ratio of 3:1 consistent with the genotypic ratio of *OsB1* gene, suggesting that pericarp pigmentation requires at least a single dominant allele of *OsB1* gene. Anthocyanin content in F_2 population was analyzed by HPLC method and the result revealed that the highest cyanidin-3-O-glucoside (C3G) content of 39.52 mg / 100 g of DW was found in F_2 progeny with dark purple pericarp. Therefore, the DNA marker of *OsB1* gene could be used to select rice with anthocyanin content and pericarp color. This marker will be beneficial for marker-assisted selection of rice plants at early stage of growth which will be convenient and shorten time for breeding rice with high nutritional value.
Keywords: rice; DNA markers; anthocyanins; pericarp color; F_2 population

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชหลักที่สำคัญสำหรับการบริโภคของประชากรโลก ข้าวหลากสี เช่น ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว แดง น้ำตาล เขียว และดำ ได้รับความสนใจ และมีความต้องการเพิ่มขึ้นจากผู้บริโภคทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีปริมาณแอนโทไซยานินและคุณค่าทางโภชนาการสูง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าว และเพิ่มศักยภาพการแข่งขันกับต่างประเทศ นอกจากนี้ยังช่วยให้ประชากรมีสุขภาพที่สมบูรณ์แข็งแรง (รัชนี และริญ, 2553) แอนโทไซยานินเป็นสารสีธรรมชาติที่จัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ ในข้าวดำมีแอนโทไซยานินหลักที่พบ คือ cyanidin-3-O-glucoside (C3G) และที่พบเป็นส่วนน้อย คือ peonidin-3-glucoside (P3G) (Rahman et al., 2016) ซึ่งสารกลุ่มแอนโทไซยานินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ ลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ และต้านโรคมะเร็ง (Samyor et al., 2017)

การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวสีม่วงควบคุมด้วยยีนหลักที่สำคัญ คือ *OsB1* และ *OsDFR* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 และ 1 ตามลำดับ Rahman et al. (2013) รายงานว่า ยีน *OsB1* และยีน *OsDFR* มีการทำงานแบบ recessive epistasis ในการควบคุมเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงของข้าว ยีน *OsB1* เป็นยีนควบคุมการสร้างโปรตีน transcription factor ที่อยู่ในกลุ่ม MYC basic helix-loop-helix (bHLH) และจากการศึกษาลำดับเบสในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว พบว่า มีการเกิด 2-bp addition ในบริเวณ เอกซอนที่ 7 แต่ไม่พบในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง (Sakamoto et al., 2001; Wang and Shu, 2007) การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) ของยีน *OsB1* มาใช้ในการวิเคราะห์ประชากร F_2 พบว่า ยีน *OsB1* เกี่ยวข้องกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด และใช้คัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงได้ (Wang and Shu, 2007) นอกจากนี้ยังพบ 2-bp addition ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ Sasanishiki แต่ไม่พบในข้าวก่ำที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงของไทย (Sakulsingharoj et al., 2016) จากการศึกษาเครื่องหมาย CAPS ของยีน *OsB1* พบว่า แยกความแตกต่างระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและข้าวดำได้ทั้ง japonica และ indica (อนงค์นาฏ และคณะ, 2562; Lee et al.; 2018; Lim and Ha, 2013; Rahman et al., 2013)

Lim and Ha (2013) รายงานว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* แยกความแตกต่างในข้าว 34 พันธุ์ โดยแยกข้าวดำออกจากข้าวแดงและขาวได้ จากการศึกษาของ Rahman et al. (2013) ที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* คัดเลือกข้าวที่เกิดจากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์แม่สีม่วง และข้าวพันธุ์พ่อสีขาว 3 พันธุ์ พบว่า แยกความแตกต่างระหว่างสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ และจากงานวิจัยของอนงค์นาฏ และคณะ (2562) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* แยกความแตกต่างของข้าว indica ของไทย คือ ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 กับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ได้

ยีน *OsDFR* เป็นยีนโครงสร้างที่สำคัญมีรหัสสร้างเอนไซม์ dihydroflavonol-4-reductase (DFR) ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของข้าว ประกอบด้วย 3 เอกซอน เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว indica พันธุ์ Teqing กับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง japonica พันธุ์ Murasaki พบการเพิ่มขึ้นของเบสจำนวน 11 และ 17 คู่เบส (11 และ 17-bp addition) ในบริเวณโปรโมเตอร์ของข้าวพันธุ์ Murasaki (Nakai et al., 1998)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบดั้งเดิมใช้เวลานาน การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยคัดเลือกจะทำให้ลดต้นทุน ลดการใช้แรงงาน ประหยัดเวลา สามารถตรวจสอบได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าโดยไม่ต้องรอให้ติดเมล็ด และมีความแม่นยำ ทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอเข้ามามีบทบาทที่สำคัญมากยิ่งขึ้น (จุฑาพร, 2555) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS และ Indel ถูกพัฒนาเพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว และข้าวสีได้ (Lim and Ha, 2013; Wang and Shu, 2007) และมีการใช้เครื่องหมาย CAPS ของยีน

OsB1 มาช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและมีแอนโทไซยานินสูงโดยวิธีผสมกลับได้ (Lee et al., 2018; Rahman et al., 2013)

ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 เป็นข้าวเจ้าพันธุ์ดีของไทย ให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพเมล็ดคล้ายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ต้านทานโรคไหม้ และขอบใบแห้ง รวมทั้งต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยกระโดดหลังขาว (กรมการข้าว, 2563) และข้าวพันธุ์ก่ำน้อยเป็นข้าวเหนียวก่ำพื้นเมืองของไทยที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงและต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าหรือพอ ๆ กับผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ ซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดีในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (รัชนี และริญ, 2553)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* ร่วมกับ Indel ของยีน *OsDFR* คัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและมีแอนโทไซยานินสูง ด้วยการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากร F_2 จากคู่ผสมระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวปทุมธานี 1 กับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อย เพื่อหาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ด

วิธีการศึกษา

การคัดเลือกพันธุ์ข้าว การสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากรชั่วที่ 2 (F_2)

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว จำนวน 7 พันธุ์ ประกอบด้วย ปทุมธานี 1 (PTT1), กข-แม่โจ้ 2 (RD-MAEJO2), Kitaake (Kit), Sasanishiki (Sasa), Nipponbare (Nip), กข6 (RD6) และไทชุง65 (Taichung65) พันธุ์ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มหรือดำ จำนวน 5 พันธุ์ ประกอบด้วย ไรซ์เบอร์รี่ (RIB), หอมนิล (HN), ก่ำหนองเต่าคำ (KN), เหนียวดำ (ND) และก่ำพะเยา (KP) ได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ และข้าวพื้นเมืองที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง จำนวน 3 พันธุ์ ประกอบด้วย ก่ำน้อย (KNO), ก่ำใหญ่ (KY), และมะลิดำ (MLDUM) ได้รับความอนุเคราะห์จากข้าวพื้นเมืองในเขตปฏิรูปที่ดิน สำนักงานปฏิรูปที่ดิน อำเภอกุดชุม จังหวัดยโสธร โดยเลือกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวเป็นพันธุ์แม่ คือ ปทุมธานี 1 ปลูกจำนวน 20 ต้น และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเป็นพันธุ์พ่อ คือ ก่ำน้อย ปลูกจำนวน 20 ต้น โดยปลูกในโรงเรือนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ปลูก 1 ต้นต่อ 1 กระถาง เพื่อผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 hybrid) ในฤดูที่ 1 นาปี พ.ศ. 2561 จากนั้นนำเมล็ด F_1 มาปลูกเพื่อผลิตเมล็ดชั่วที่ 2 (F_2 seeds) ในฤดูที่ 2 นาปรัง พ.ศ. 2562 และปลูกเมล็ด F_2 เพื่อสร้างประชากร F_2 ทั้งหมด 300 ต้น ในฤดูที่ 3 นาปี พ.ศ. 2562 โดยปลูก 1 ต้นต่อ 1 กระถาง (**Figure 1)** ในการดูแลต้นข้าว ปลูกในสภาพแวดล้อมเดียวกัน การให้ปุ๋ยเหมือนกันตามช่วงอายุการเจริญเติบโตของต้นข้าว

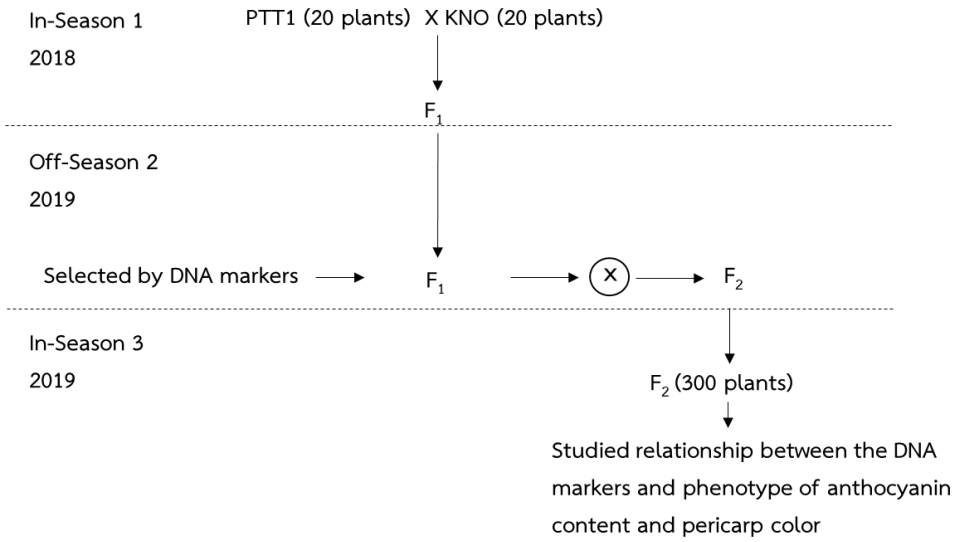


Figure 1 Schematic diagram showing the cross between white pericarp rice as female parent (Pathumthani 1) and purple pericarp rice as male parent (Kham Noi) to produce F_1 hybrid seeds and F_2 population

การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* และ *OsDFR*

นำข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank ของข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง japonica พันธุ์ Murasaki (AB003495.1) (Nakai et al., 1998) มาออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* บริเวณ upstream ของ +1 และวิเคราะห์ไพรเมอร์โดย OligoAnalyzer™ Tool (https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer) ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* มาจากงานวิจัยของ Rahman et al. (2013) การวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* และ *OsDFR* โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน (**Table 1**) นำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกบริสุทธิ์ด้วยชุด Universal DNA Purification Kit (TIANGEN, China) ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) จากนั้นนำลำดับเบสของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มาเปรียบเทียบกับยีนที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Clustalx 1.8 และ GeneDoc 2.7

การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและสีม่วง ลูกผสม F_1 และประชากร F_2

นำใบอ่อนของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ รวมทั้งข้าวลูกผสม F_1 และประชากร F_2 อายุประมาณ 15 วัน มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Hwang and Kim (2000) หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอดังต่อไปนี้ นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน (**Table 1**) ใช้ 2x My Taq HS Red mix (BIOLINE, USA) ปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอประมาณ 100 นาโนกรัม ไพรเมอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* มีขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 ℃ 3 นาที ปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ ดังต่อไปนี้ denaturation 95 ℃ 1 นาที annealing 55 ℃ 1 นาที extension 72 ℃ 1 นาที และ final extension 72 ℃ 5 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (Thermo Fisher Scientific, USA) และตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส ใช้ความเข้มข้นเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* มีขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 ℃ 3 นาที ปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ ดังต่อไปนี้ denaturation 95 ℃ 30 วินาที annealing 55 ℃ 30 วินาที extension 72 ℃ 30 วินาที และ final extension 72 ℃ 5 นาที จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส ความเข้มข้นเจล 4 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยวิธี pH differential

นำเมล็ดแก่ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน มากะเทาะเปลือกออก ชั่งน้ำหนักเมล็ด 100 มก. แล้วบดให้ละเอียด และวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin content) โดยวิธี pH differential ดัดแปลงจาก Lee et al. (2005) ใช้ Extraction buffer ที่ประกอบด้วย 80% เมทานอล ผสมกับ 1% กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารสกัดแอนโทไซยานินเจือจางโดยให้มีความเข้มข้นของสาร ต่อ pH buffer (pH 1.0 และ pH 4.5) เป็น 1 ต่อ 4 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer-plate reader รุ่น SPECTRO star Nano (BMGLabTech, Germany) และคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 กรัม (มก./100 ก. เมล็ดแห้ง) จากสูตร คือ Anthocyanin pigment (cyanidin-3-O-glucoside (C3G) equivalents, mg/L) = $(A \times MW \times DF \times 10^3) / \varepsilon \times 1$ โดยที่ $A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH\ 1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH\ 4.5}$, MW (molecular weight) = 449.2 g/mol, DF = (dilution factor = 1) และ ε = 26,900 molar extinction ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณ C3G โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำสารมาตรฐาน C3G (Chromadex, USA) 10 มก. มาละลายใน 0.1% HCl ใน methanol ให้ได้ปริมาตร 10 มล. (ความเข้มข้น 1 มก./มล.) หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.03, 0.11, 0.17, 0.22, 0.33 มก./มล. และกรองด้วยฟิวเตอร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณ C3G ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน โดยวิธีดัดแปลงจาก Ahmadiani et al (2016) แล้วนำสารสกัดแอนโทไซยานินที่ได้จากวิธี pH differential มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้เครื่อง

Shimadzu modular HPLC (Japan) ประกอบด้วย LC-20AD pump, CTO-20AC column oven, SPD-20A detector และ SIL-20A HT auto-injector วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ LC station data processing program และใช้คอลัมน์ Eurospher II 100-5 C18 (KNAUER); (250 x 4.6 mm, 5 µm) โดยใช้ mobile phase คือ 1% acetic acid และ methanol (60:40) ด้วยอัตราการไหล (flow rate) 1.0 มล/นาที ตรวจสอบสารที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (จีโนไทป์) ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ของประชากร F_2 มาหาความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานิน โดยโปรแกรม Minitab 15 กำหนดให้จีโนไทป์ของต้น F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ปทุมธานี 1 มีจีโนไทป์แบบ Homozygous recessive (R) ให้สัญลักษณ์เป็น *OsB1* = aa และ *OsDFR* = bb ให้คะแนนเป็น 0 ต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ปทุมธานี 1 และพันธุ์พ่อกำน้อยมีจีโนไทป์แบบ Heterozygous (H) ให้สัญลักษณ์เป็น *OsB1* = Aa และ *OsDFR* = Bb ให้คะแนนเป็น 1 และต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อกำน้อย มีจีโนไทป์แบบ Homozygous dominant (D) ให้สัญลักษณ์เป็น *OsB1* = AA และ *OsDFR* = BB ให้คะแนนเป็น 2 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ของประชากร F_2 ด้วยการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) โดยวิธี simple regression เพื่อหาสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient); ($y = \alpha + \beta x$) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R Square)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* และ *OsDFR*

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าว มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า เอกซอนที่ 7 บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (GGATCC) เกิดการแทรก 2 คู่เบส (2-bp addition) ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 และกข-แม่โจ้ 2 ซึ่งสอดคล้องกับข้าวขาวพันธุ์ Nipponbare (AP014960) แต่ไม่พบในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์กำน้อย กำใหญ่ และไรซ์เบอร์รี่ (**Figure 2**) สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าลำดับเบสของยีน *OsB1* มีความแตกต่างกันระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและข้าวสี โดยพบ 2-bp addition ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift จึงไม่สามารถสร้างเม็ดสีแอนโทไซยานินได้ (อนงค์นาฏ และคณะ, 2562; Sakamoto et al., 2001; Wang and Shu, 2007; Lim and Ha, 2013; Sakulsingharoj et al., 2016)

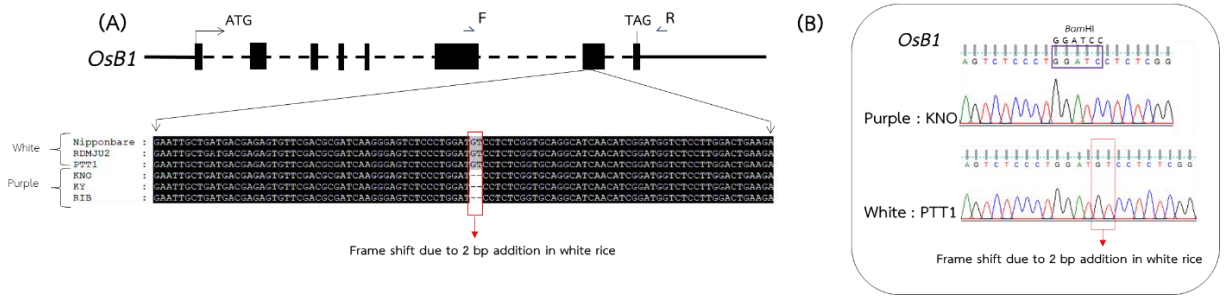


Figure 2 Partial nucleotide sequences of exon 7 in *OsB1* gene. (A) Sequence alignment of *OsB1* gene from white rice cv. Nipponbare (AP014960), RD-MAEJO2, Pathumthani 1 (PTT1) and purple rice cv. Kham Noi (KNO), Kham Yai (KY), Riceberry (RIB). The black box and dot line represented exon and intron, respectively. The red box showed 2-bp addition (GT). (B) Sequencing chromatograms of *OsB1* gene from Pathumthani 1 (PTT1) and Kham Noi (KNO). The purple box indicated *Bam*HI site (GGATCC)

Nakai et al. (1998) ศึกษาลำดับเบสของยีน *OsDFR* จากข้าว japonica ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ Murasaki (AB003495.1) และข้าว indica ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ Teqing (U70541) พบว่า ยีน *OsDFR* ประกอบด้วย 3 เอกซอน บริเวณ upstream ของ +1 ที่ตำแหน่ง -450 มีการเกิด 11-bp addition ในข้าวพันธุ์ Murasaki แต่ไม่พบในข้าวพันธุ์ Teqing ในงานวิจัยนี้จึงออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (**Table 1**) แล้วนำมาตรวจสอบข้าวพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ Kitaake, กข-แม่โจ้ 2 และปทุมธานี 1 ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์มะลิดำ และก่ำใหญ่ เกิด 11-bp addition สอดคล้องกับข้าวพันธุ์ Nipponbare (AP014957) และ Murasaki (AB003495.1) แต่ไม่พบในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อยและไรซ์เบอร์รี่ซึ่งไม่เกิด 11-bp addition (**Figure 3A**) บริเวณที่เกิด 11-bp addition อยู่ในส่วน upstream ของโปรโมเตอร์และไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของยีน *OsDFR* (Nakai et al, 1998; Kim et al., 2017) ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนามาจากบริเวณนี้เป็นเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* เป็นผลมาจากความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอซึ่งอาจจะไม่สัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด อย่างไรก็ตาม พบว่า ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 เกิด 11-bp addition แต่ไม่พบในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อย ดังนั้น จึงนำไพรเมอร์มาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์แม่ปทุมธานี 1 และพันธุ์พ่อก่ำน้อยได้ (**Figure 3B**)

Table 1 Primers used for DNA markers of *OsB1* and *OsDFR* genes

Marker	Gene	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')	Annealing temp (°C)	PCR product size (bp)	References
CAPS marker	*OsB1*	OB1ex6_F; = GGGAGAAGCTCA ACGAGATG	OB1R; = GGGTGGCAGATTCAT CACTT	55	1,200	Rahman et al., 2013
Indel marker	*OsDFR*	OsDFR-662F; = AGATGTACAAATG CGTGGGC	OsDFR-426R; = GGGTCGGATGGAGTA GACAG	55	240, 230	In this study

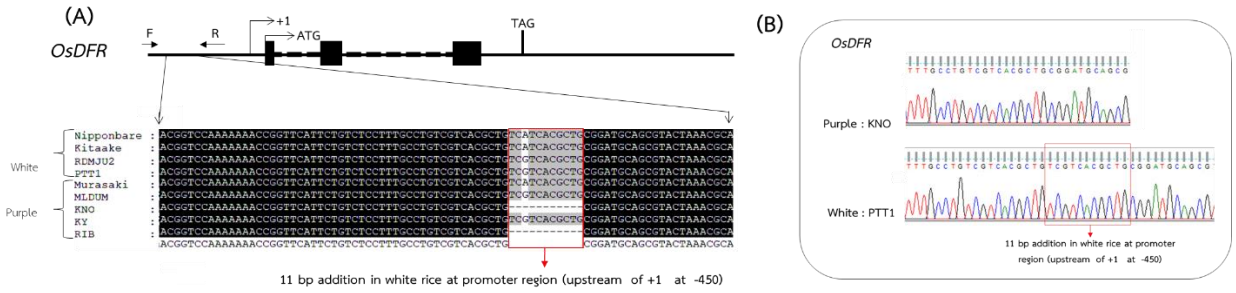


Figure 3 Partial nucleotide sequences of promotor region of *OsDFR* gene at -450 position upstream of +1 site. (A) Sequence alignment of *OsDFR* gene from white rice cv. Nipponbare (AP014957), Kitaake, RD-MAEJO2, Pathumthani 1 (PTT1), and purple rice cv. Murasaki (AB003495.1), Mali Dam (MLDUM), Kham Noi (KNO), Kham Yai (KY), Riceberry (RIB). The black box and dot line represented exon and intron, respectively The red box showed 11-bp addition region. (B) Sequencing chromatograms of *OsDFR* gene from Pathumthani 1 (PTT1) and Kham Noi (KNO)

การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและสีม่วง และลูกผสม F_1

เมื่อนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* มาตรวจสอบในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ ปทุมธานี 1, Kitaake, Sasanishiki, Nipponbare, กข6, ไทชุง 65 เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ที่ไม่ถูกตัดด้วย *Bam*HI เนื่องจากเกิด 2-bp addition ในบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ส่วนข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง ได้แก่ ไรซ์เบอร์รี่ กำน้อย หอมนิล กำหนองเต่าคำ เหนียวดำ และกำพะเยา พบแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส และ 700 คู่เบส ซึ่งเกิดจากการตัดด้วย *Bam*HI (**Figure 4A**) ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและสีม่วงได้ สอดคล้องกับข้าว indica (อนงค์นาฏ และคณะ, 2562; Sakulsingharoj et al., 2016) และข้าว japonica (Lim and Ha, 2013; Rahman et al., 2013; Lee et al., 2018) ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ เมื่อตรวจสอบในลูกผสม F_1 พบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากพันธุ์แม่ปทุมธานี 1 (1,200 คู่เบส) และพันธุ์พ่อกำน้อย (500 และ 700 คู่เบส) (**Figure 4B**) จึงนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* มาทดสอบในประชากร F_2 ต่อไป

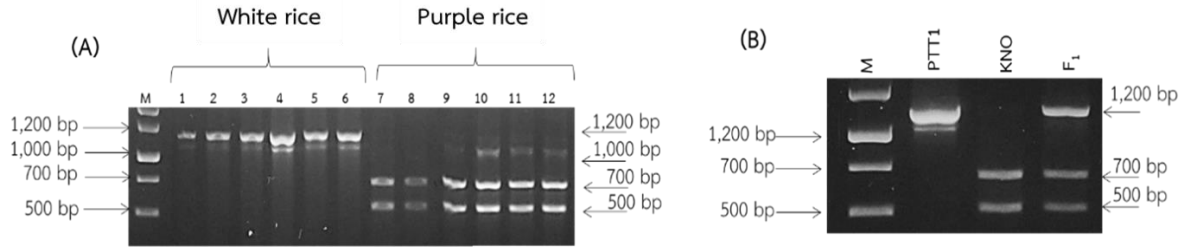


Figure 4 Profiles of CAPS marker of *OsB1* gene from white rice, purple rice and F_1 hybrid on 1.2% agarose gel. (A) Band patterns of white rice (Lane 1-6) were Pathumthani 1, Kitaake, Sasanishiki, Nipponbare, RD6 and Taichung 65, respectively and purple rice (Lane 7-12) were Riceberry, Kham Noi, Homnil, Kham Nong Tao Kham, Nieow Dam and Kham Phayao, respectively. (B) Band patterns of parental varieties and F_1 hybrid. PTT1 = Pathumthani 1. KNO = Kham Noi. M was 1 kb DNA Ladder

เมื่อนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* มาตรวจสอบในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ ปทุมธานี 1, Kitaake, Sasanishiki, Nipponbare, กข6 และไทชุง 65 เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 240 คู่เบส และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง ได้แก่ ไรซ์เบอร์รี่ กำน้อย หอมนิล กำหนองเต่าคำ เหนียวดำ และกำพะเยา เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 230 คู่เบส แต่ข้าวพันธุ์มะลิดำ และกำใหญ่ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 240 คู่เบส (**Figure 5A**) แสดงว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวกับสีม่วงบางพันธุ์ได้ เมื่อนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรวจสอบในลูกผสม F_1 (**Figure 5B**) พบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่มีสภาพ Homozygous และลูกผสมที่มีสภาพ Heterozygous ได้ จึงนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* มาทดสอบในประชากร F_2 ต่อไป

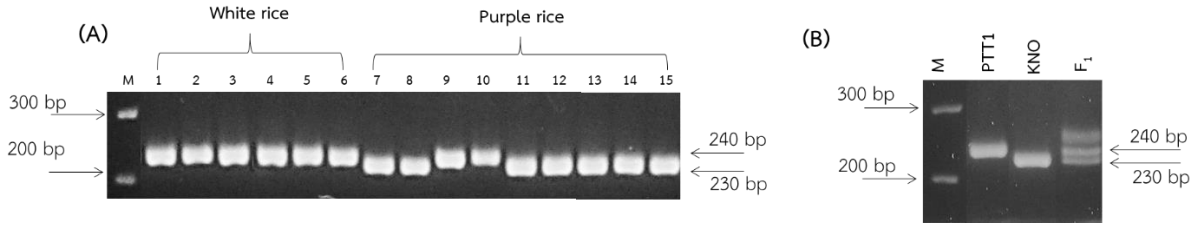


Figure 5 Profiles of Indel marker of *OsDFR* gene from white rice, purple rice and F_1 hybrid on 4% agarose gel. (A) Band patterns of white rice (Lane 1-6) were Pathumthani 1, Kitaake, Sasanishiki, Nipponbare, RD6, and Taichung 65, respectively and purple rice (Lane 7-15) were Riceberry, Kham Noi, Kham Yai, Mali Dam, Homnil, Kham Nong Tao Kham, Nieow Dam and Kham Phayao, respectively. (B) Band patterns of parental varieties and F_1 hybrid. PTT1=Pathumthani 1. KNO=Kham Noi. M was 100 bp DNA Ladder Plus

การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ในประชากร F_2

จากการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* และชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น และนำข้อมูลจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอมาทดสอบไคสแคร์ พบว่า มีการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ อัตราส่วนจีโนไทป์ เท่ากับ 1: 2: 1 สำหรับยีน *OsB1* มี χ^2 = 1.920 (P>0.05) และสำหรับยีน *OsDFR* มี χ^2 = 2.580 (P>0.05) (**Table 2**) ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ในงานวิจัยนี้สามารถใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกได้

Table 2 Chi-square test of inheritance of DNA markers of *OsB1* and *OsDFR* genes in the F_2 population at a significant level 0.05

Gene	Symbol	Number	F_2 segregation			Total	χ^2 (1:2:1)	P-value
			D	H	R			
OsB1	A/a	Observed	69	162	69	300	1.920	0.383^{ns}
		Expected	75	150	75	300		
OsDFR	B/b	Observed	80	157	63	300	2.580	0.275^{ns}
		Expected	75	150	75	300		

^{ns} non- significant (followed Mendelian law with the ratio of 1:2:1), D= homozygous dominant, H= heterozygous, R= homozygous recessive

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในประชากร F_2

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในประชากร F_2 ด้วยวิธี pH differential พบว่า พันธุ์แม่ปทุมธานี 1 พันธุ์พ่อก่ำน้อย และเมล็ดของต้น F_1 มีปริมาณแอนโทไซยานินเท่ากับ 0.00, 51.52 และ 13.29 มก./100 ก. เมล็ดแห้ง ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์เมล็ดของประชากร F_2 พบว่า มีการกระจายของค่าปริมาณแอนโทไซยานิน แบบไม่ปกติโดยการกระจายตัวเบ้ไปทางขวา (**Figure 6A**) เนื่องจากการสังเคราะห์แอนโทไซยานินควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการกระจายตัวของปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2 ของ zicaitai (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* var. *purpurea*) (Guo et al., 2015) โดยมีค่าเฉลี่ย ค่าสูงที่สุด (ต้นที่ 299) และค่าต่ำที่สุด (ต้นที่ 219) เท่ากับ 6.12, 35.04 และ 0.27 มก./100 ก. เมล็ดแห้ง ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณ C3G ในประชากร F_2 ด้วยวิธี HPLC พบว่า C3G มี retention time เท่ากับ 2.7 นาที ในพันธุ์แม่ปทุมธานี 1 ไม่พบสาร C3G ส่วนข้าวพันธุ์พ่อก่ำน้อย และเมล็ดของต้น F_1 พบสาร C3G เท่ากับ 44.76 และ 11.85 มก./100 ก. เมล็ดแห้ง ตามลำดับ ส่วนเมล็ดของประชากร F_2 มีการกระจายของปริมาณ C3G โดยมีค่าเฉลี่ย ค่าสูงที่สุด (ต้นที่ 299) และค่าต่ำที่สุด (ต้นที่ 203) เท่ากับ 11.67, 39.52 และ 0.42 มก./100 ก. เมล็ดแห้ง ตามลำดับ **(Figure 6B)** ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Somboon et al. (2017) ที่รายงานว่าไม่พบแอนโทไซยานินในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 จากงานวิจัยนี้พบปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง สอดคล้องกับที่มีรายงานว่าสาร C3G เป็นแอนโทไซยานินหลักของเมล็ดข้าวสีม่วงเข้มหรือดำ (Rahman et al., 2013; Rahman et al., 2016; Lee et al., 2018)

เมื่อนำค่าปริมาณแอนโทไซยานินที่ได้จากวิธี pH differential และ HPLC มาวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.944 แสดงว่า การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้ง 2 วิธี มีความสัมพันธ์เชิงเส้นในระดับสูง และมีความสัมพันธ์เชิงบวกหรือทิศทาง

เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ดังนั้น วิธี pH differential สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวได้ ซึ่งทำได้สะดวก รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย นำมาช่วยคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีแอนโทไซยานินสูงเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้

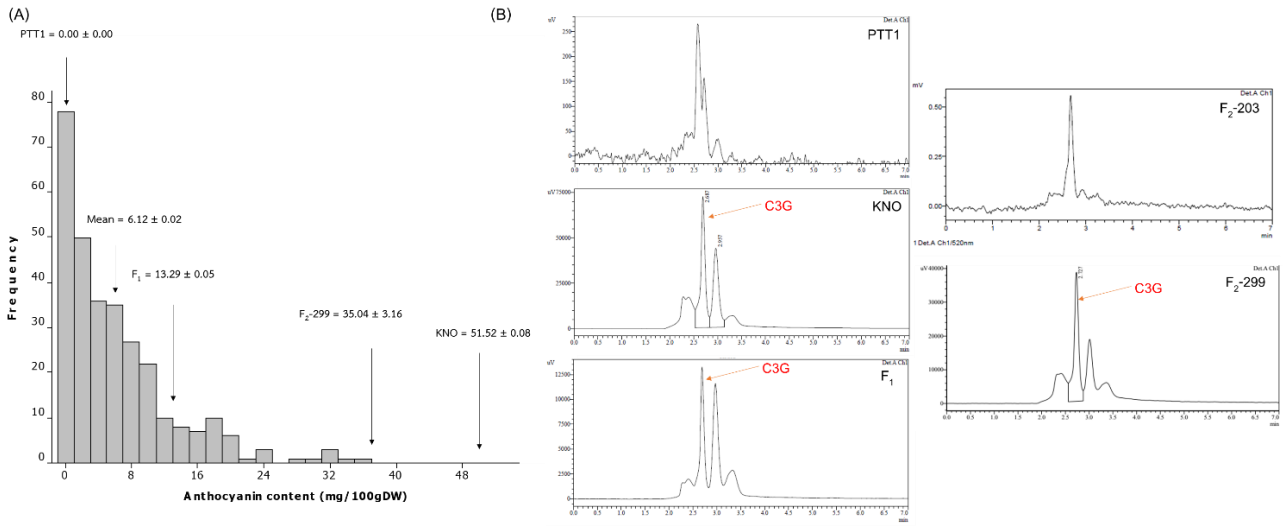


Figure 6 Analysis of anthocyanin content in seeds of F_2 progenies. (A) Histogram showing the distribution of anthocyanin content analyzed by pH differential method. Pathumthani 1 (PTT1) = female parent, Kham Noi (KNO)= male parent, F_2 progeny no. 299 (F_2-299). (B) Chromatogram of cyanidin-3-O-glucoside (C3G) obtained from the HPLC method in Pathumthani 1 (PTT1), Kham Noi (KNO), F_1 and F_2 progenies (F_2-299 and F_2-203)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2

ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ (จีโนไทป์) ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับฟีโนไทป์ปริมาณแอนโทไซยานินที่ได้จากวิธี pH differential ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี simple regression พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* กับปริมาณแอนโทไซยานินได้สมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย (**β**) เท่ากับ 0.055 มก./100 ก. เมล็ดแห้ง แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของยีน *OsB1* มีอัลลีล A อย่างน้อย 1 อัลลีล ที่ทำให้ค่าปริมาณแอนโทไซยานิน (y) จะเพิ่มขึ้น 0.055 มก./100 ก. เมล็ดแห้ง (P<0.05) ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) เท่ากับ 0.561 มก./100 ก.เมล็ดแห้ง และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของปริมาณแอนโทไซยานินได้ 31.9% ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินได้สมการถดถอยมีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย (**β**) เท่ากับ 0.004 มก./100 ก.เมล็ดแห้ง แสดงว่าจีโนไทป์ของยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับค่าปริมาณแอนโทไซยานิน (y) (P>0.05) ซึ่งหากใช้สมการดังกล่าวในการทำนายจะมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) เท่ากับ 0.689 มก./100 ก.เมล็ดแห้ง และสมการนี้อธิบายความผันแปรของปริมาณแอนโทไซยานินได้เพียง 0.3% (**Table 3**)

Table 3 Simple regression analysis of DNA markers of *OsB1* and *OsDFR* genes with anthocyanin content of F_2 population

Gene/Marker (x)	Regression coefficient ($y = \alpha + \beta x$)	SE	R-Square (%)	P-value
OsB1/CAPS	α=0.659, β=0.055	0.561	31.9	0.000*
OsDFR/Indel	α=1.026, β=0.004	0.689	0.3	0.388ns

*significant, nsnon- significant, y = anthocyanin content, x = genotype of DNA markers, SE = standard error

การทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2

การวิเคราะห์ฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวประชากร F_2 พบข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีจำนวน 231 ต้น และไม่มีสีจำนวน 69 ต้น นำมาทดสอบไคสแควร์โดยมีสมมุติฐาน คือ 3:1 (Color: Colorless) พบว่า การกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นไปตามกฎของเมนเดล (χ^2 = 0.640, P-value = 0.4237) (**Table 4**) สอดคล้องกับอัตราส่วนจีโนไทป์ของยีน *OsB1* คือ A_ และ aa เท่ากับ 3:1 และสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการผสมข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและสีขาวระหว่างพันธุ์ Kewha กับ Kumgangbyeo ที่พบว่า อัตราส่วนสีม่วงต่อสีขาว เท่ากับ 3:1 และในการเกิดสีเยื่อหุ้มเมล็ดจำเป็นจะต้องมียีน *OsB1* เด่นอย่างน้อยหนึ่งยีน (Rahman et al., 2013) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang et al. (2019) ที่ผสมข้าวพันธุ์ Donglanmomi ซึ่งมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกับพันธุ์ Huanghuazhan ซึ่งมีปริมาณแอนโทไซยานินต่ำ และทำการทดสอบไคสแควร์สีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 พบว่า อัตราส่วนฟีโนไทป์ของข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีต่อข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว เท่ากับ 3:1 แสดงว่ายีน *OsB1* มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีและมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า

Table 4 Chi-square test of pericarp color in the F_2 population with the hypothesis of phenotypic ratio of 3 Color : 1 Colorless

Number	Pericarp color		Total	χ^2 (3:1)	P-value
	Color	Colorless			
Observed	231	69	300	0.640	0.4237ns
Expected	225	75	300		

ns non- significant (followed Mendelian law with the ratio of 3:1)

สรุป

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* บริเวณ upstream ของ +1 ที่ตำแหน่ง -450 นำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 กับกำน้อยได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* และเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ใช้แยกความแตกต่างระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและสีม่วงในงานวิจัยนี้ได้ การถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* เป็นไปตามกฎของเมนเดล การถ่ายทอดฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 พบว่า อัตราส่วนการเกิดสีและไม่เกิดสี เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ 3:1 (Color: Colorless) โดยการเกิดสีเยื่อหุ้มเมล็ดจำเป็นต้องมีอัลลีลเด่นของยีน *OsB1* อย่างน้อย 1 อัลลีล การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential เป็นวิธีเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินและ C3G สูงในเยื่อหุ้มเมล็ดได้ ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์

ระหว่างจีโนไทป์ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2 พบว่า มีค่า R^2 เท่ากับ 31.9% และ 0.3% ตามลำดับ แสดงว่ายีน *OsB1* มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* สามารถใช้เพื่อคัดเลือกข้าวที่มีสารแอนโทไซยานินและเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีได้ โดยการเกิดสีเยื่อหุ้มเมล็ดควบคุมด้วยอัลลีลเด่นของยีน *OsB1* อย่างน้อย 1 อัลลีล เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้จะเป็นประโยชน์ในการใช้คัดเลือกต้นข้าวได้ตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโต สะดวก รวดเร็ว ช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ผ่านมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2563 ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยครั้งนี้ และได้รับการสนับสนุนการวิจัยแผนงานเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ตามทิศทางยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม: ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2562

เอกสารอ้างอิง

กรมการข้าว. 2563. พันธุ์ข้าวปทุมธานี 1. แหล่งข้อมูล: http://www.ricethailand.go.th/Rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=67.htm ค้นเมื่อ 15 ธันวาคม 2563.

จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. แก่นเกษตร 40: 299-308.

รัชนี คงคาฉุยฉาย และริญ เจริญศิริ. 2553. คุณค่าโภชนาการของข้าวพันธุ์พื้นเมืองอำเภอกุดชุม จังหวัดยโสธร รายงานฉบับสมบูรณ์ สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. นครปฐม.

อนงค์นาฏ หรี่จินดา, วราภรณ์ แสงทอง, แสงทอง พงษ์เจริญกิต และช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์. 2562. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* สำหรับใช้ตรวจสอบข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและม่วง. น.181-189. ใน: การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 21. โรงแรมเดอะซายน์ พัทยา, ชลบุรี.

Ahmadiani, N., R. J. Robbins, T. M. Collins, and M. M. Giusti. 2016. Molar absorptivity (**ε**) and spectral characteristics of cyanidin-based anthocyanins from red cabbage. Food chemistry. 197: 900-906.

Guo, N., J. Wu, S. Zheng, F. Cheng, B. Liu, J. Liang, Y. Cui, and X. Wang. 2015. Anthocyanin profile characterization and quantitative trait locus mapping in zicaitai (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* var. *purpurea*). Molecular Breeding. 35(5): 1-11.

Hwang, S.-K., and Y.-M. Kim. 2000. A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 33(6): 537-540.

Kim, J., H.-J. Lee, Y.-J. Jung, K.-K. Kang, W. Tyagi, M. Kovach, M. Sweeney, S. McCouch, and Y.-G. Cho. 2017. Functional properties of an alternative, tissue-specific promoter for rice NADPH-dependent dihydroflavonol reductase. PloS One. 12(8): e0183722.

Lee, J., R. W. Durst, and R. E. Wrolstad. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. Journal of AOAC international. 88(5): 1269-1278.

Lee, K. E., M. M. Rahman, J. B. Kim, and S. G. Kang. 2018. Genetic Analysis of Complementary Gene

Interactions of *Pb* and *Pp* Genes for the Purple Pericarp Trait in Rice. Journal of life science. 28(4): 398-407.

Lim, S.-H., and S.-H. Ha. 2013. Marker development for the identification of rice seed color. Plant Biotechnology Reports. 7(3): 391-398.

Nakai, K., Y. Inagaki, H. Nagata, C. MIYKZAKI, and S. IIDA. 1998. Molecular characterization of the gene for dihydroflavonol 4-reductase of japonica rice varieties. Plant Biotechnology. 15(4): 221-225.

Rahman, M. M., K. E. Lee, E. S. Lee, M. N. Matin, D. S. Lee, J. S. Yun, J. B. Kim, and S. G. Kang. 2013. The genetic constitutions of complementary genes *Pp* and *Pb* determine the purple color variation in pericarps with cyanidin-3-O-glucoside depositions in black rice. Journal of Plant Biology. 56(1): 24-31

Rahman, M. M., K. E. Lee, and S. G. Kang. 2016. Allelic gene interaction and anthocyanin biosynthesis of purple pericarp trait for yield improvement in black rice. Journal of Life Science. 26(6): 727-736.

Sakamoto, W., T. Ohmori, K. Kageyama, C. Miyazaki, A. Saito, M. Murata, K. Noda, and M. Maekawa. 2001. The Purple leaf (*Pl*) locus of rice: the Pl^{w} allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis. Plant and Cell Physiology. 42(9): 982-991.

Sakulsingharoj, C., P. Inta, R. Sukkasem, S. Pongjaroenkit, S. Chowpongpang, and V. Sangtong. 2016. Cloning and characterization of *OSB1* gene controlling anthocyanin biosynthesis from Thai black rice. Genomics and Genetics. 9(1): 7-18.

Samyor, D., A. B. Das, and S. C. Deka. 2017. Pigmented rice a potential source of bioactive compounds: a review. International Journal of Food Science. 52(5): 1073-1081.

Somboon, P., C.Thebault Prom-u-thai, T. Pusadee, and S. Jamjod. 2017. Gene segregation for anthocyanin contents in F_2 population between purple glutinous rice from highland and Pathum Thani 1 grown at lowland and highland locations. Journal of Agriculture. 33(3): 323-332.

Yang, X., X. Xia, Z. Zhang, B. Nong, Y. Zeng, Y. Wu, F. Xiong, Y. Zhang, H. Liang, and Y. Pan. 2019. Identification of anthocyanin biosynthesis genes in rice pericarp using PCAMP. Plant Biotechnology Journal. 17(9): 1700-1702.

Wang, C., and Q. Shu. 2007. Fine mapping and candidate gene analysis of purple pericarp gene Pb in rice (*Oryza sativa* L.). Chinese Science Bulletin. 52(22): 3097-3104.