

การถ่ายทอดลักษณะต้านออกซิเดชันของข้าวกล้องในประชากรข้าวรุ่น F₂ จากคู่ผสม “RD41” × “Riceberry”

Inheritance of antioxidant traits of the brown rice in F₂ population from the cross of “RD41” × “Riceberry”

ศรัณยู ถาวร¹, ชนิตา ปาลิยะวุฒิ² และ วรลักษณ์ เกษตรนันท์^{2*}

Saranyu Thaworn¹, Chanita Paliyavuth² and Waraluk Kasettranant^{2*}

¹ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

¹ Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

² ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

² Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

บทคัดย่อ: การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะต้านออกซิเดชันในข้าวกล้องเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญเพื่อการประมาณความเป็นไปได้ของการคัดเลือกข้าวที่มีสารต้านออกซิเดชันสูง ในประชากรรุ่นลูกจากคู่ผสม “RD41” × “Riceberry” ประชากรนี้ได้ถูกสร้างขึ้นและปลูกที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานีระหว่างเดือนสิงหาคม 2559 ถึงเดือนธันวาคม 2560 วัตถุประสงค์คือ ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้านออกซิเดชันของข้าวกล้องในประชากรรุ่น F₂ ที่ได้จากคู่ผสม “RD41” (P₁) × “Riceberry” (P₂) เมล็ดข้าวกล้องของ P₁ P₂ F₁ และ F₂ ถูกนำมาสกัดด้วย 1% HCl ในเมทานอล จากนั้น ปริมาณของลักษณะต้านออกซิเดชันที่ประกอบด้วย ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) และปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (TAC) ส่วนฤทธิ์ต้านออกซิเดชันประกอบด้วยวิธี ABTS radical scavenging (ABTS) และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ได้ถูกวิเคราะห์ ผลการศึกษา พบว่าสีของเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวควบคุมด้วยยีนด้อยสองคู่ ส่วนการกระจายความถี่ของลักษณะต้านออกซิเดชันของข้าวรุ่น F₂ เป็นการกระจายอย่างต่อเนื่องและไม่เป็นโค้งปกติ นอกจากนี้ การกระจายตัวยังแสดงว่าเกินขอบเขตของพ่อแม่ สหสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อกันสูงระหว่างทุกลักษณะต้านออกซิเดชัน (r=0.910-0.973, p=0.01) ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเนื่องจากพันธุกรรม (GCV) สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ (PCV) อัตราพันธุกรรม (H²) และค่าร้อยละความก้าวหน้าทางพันธุกรรม (%GA) แสดงค่าสูงและอยู่ในช่วงจาก 40.08-117.62 44.13-124.35 0.82-0.94 และ 75.16-229.74 ตามลำดับ และความแตกต่างระหว่าง GCV และ PCV มีค่าต่ำและอยู่ในช่วงจาก 1.57-6.73 ผลการทดลองทั้งหมดเสนอให้เห็นว่าลักษณะต้านออกซิเดชันของประชากรนี้ถูกแสดงออกด้วยการถ่ายทอดเชิงปริมาณของยีนหลายตำแหน่ง ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย และถูกบ่งชี้ว่าได้รับอิทธิพลจากยีนมากกว่าสภาพแวดล้อม ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ของการคัดเลือกพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีลักษณะสารต้านออกซิเดชันสูงจากประชากรนี้ได้เป็นผลสำเร็จ

คำสำคัญ: *Oryza sativa* L.; ปริมาณสารต้านออกซิเดชัน; ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน; ร้อยละความก้าวหน้าทางพันธุกรรม; อัตราพันธุกรรม; การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

ABSTRACT: A study on inheritance of antioxidant traits in brown rice was an important basic genetic information for estimating the possibility of rice selection with high antioxidant traits in the progeny population of “RD41” × “Riceberry”. This population was generated and planted at Pathumthani Rice Research Center between August 2016 and November 2017. The objective was to study the inheritance of antioxidant traits of brown rice in the F₂ population derived from RD41 (P₁) × Riceberry (P₂). The brown rice of P₁, P₂, F₁, and F₂ were extracted with 1% (v/v) hydrochloric acid in methanol. Then, the content of the antioxidant traits including total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and total anthocyanin content (TAC), and antioxidant activity including ABTS radical scavenging assay (ABTS), and Ferric reducing antioxidant power (FRAP) were analyzed. The results found that the

* Corresponding author: waraluk.k@chula.ac.th

colors of rice pericarp were regulated by two recessive genes, and the frequency distributions of F_2 antioxidant traits were continuous and non-normal distribution. Furthermore, the distribution showed transgressive segregation. The high positive correlations between all antioxidant traits were detected ($r=0.910-0.973$, $p=0.01$). The genotypic coefficient of variation (GCV), phenotypic coefficient of variation (PCV), heritability (H^2), and percentage of genetic advance (%GA) exhibited the high value and ranged from 40.08-117.62, 44.13-124.35, 0.82-0.94 and 75.16-229.74, respectively and the difference between GCV and PCV were low value and ranged from 1.57-6.73. The results suggested that the antioxidant traits in this population were expressed by quantitative inheritance of polygene, regulated by recessive genes, and indicated to be influenced by genes rather than the environment. Consequently, the possibility of selection in rice cultivar for the antioxidant traits from this population was successful.

Keywords: *Oryza sativa* L.; antioxidant compound; antioxidant capacity; percentage of genetic advance; heritability; Inheritance

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L., $2n=24$) เป็นธัญพืชที่มีความสำคัญต่อประชากรโลก เนื่องจากข้าวเป็นอาหารหลักที่ใช้บริโภคในหลายประเทศ และปัจจุบันผู้บริโภคมีความสนใจเกี่ยวกับสุขภาพ จึงมีความใส่ใจการเลือกรับประทานอาหารมากขึ้น การบริโภคข้าวจึงนิยมเลือกบริโภคข้าวกล้อง (brown rice) ซึ่งเป็นข้าวที่ผ่านการสีเพื่อเอาแกลบออกเท่านั้นทำให้เมล็ดข้าวยังเหลือส่วน รำ (bran) คัพภะ (embryo) เอนโดสเปิร์ม (endosperm) และเยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp) ข้าวกล้องมีสีต่าง ๆ ได้แก่ สีขาว สีน้ำตาลอ่อน สีแดง และสีม่วงดำ ซึ่งสีของข้าวกล้องอยู่ในส่วนเยื่อหุ้มเมล็ด (Babu et al., 2009; Ravichanthiran et al., 2018)

ข้าวกล้องที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดต่างกันจะมีปริมาณสารต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแตกต่างกันด้วย สารต้านออกซิเดชันในข้าวประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น กรดฟีโนลิก สารฟลาโวนอยด์ แกมมาออริซานอล แอนโทไซยานิน และวิตามินอี เป็นต้น (Reddy et al., 1995; Butsat and Siriamornpun, 2010) โดยจากงานวิจัยพบว่าข้าวกล้องที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและสีม่วงดำมีปริมาณสารฟีโนลิกทั้งหมด (total phenolic content, TPC) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content, TFC) (Shen et al., 2009) และปริมาณสารแอนโทไซยานิน (total anthocyanin content, TAC) (Phaiwan and Sudarat, 2016) รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ ABTS radical scavenging (ABTS) (Shen et al., 2009) และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Thitipramote et al., 2016) มากกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว สารต้านออกซิเดชันเหล่านี้เป็นสารอินทรีย์ที่สามารถป้องกันร่างกายจากความเสียหายที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ (free radical) และสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเบาหวานชนิดที่ 2 มะเร็งชนิดต่าง ๆ เป็นต้น (Tian et al., 2004; Butsat and Siriamornpun, 2010; Ravichanthiran et al., 2018)

จากงานวิจัยที่เคยศึกษามาแล้วนั้น พบว่าลักษณะต้านออกซิเดชันในข้าวควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง และมีการแสดงออกของยีนแบบพลบวก Jin et al. (2009) รายงานว่าลักษณะ TPC ควบคุมโดย QTLs (quantitative trait loci) 3 ตำแหน่ง ที่วางตัวอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 4 และ 12 ส่วนลักษณะ TFC ควบคุมโดย QTLs 3 ตำแหน่ง ซึ่งวางตัวอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 จำนวน 2 ตำแหน่ง และโครโมโซมคู่ที่ 11 และลักษณะฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทำการศึกษาดังวิธี ABTS นั้นมีความสัมพันธ์กับ QTLs 3 ตำแหน่ง ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 7 และ 11 ทำให้สามารถระบุได้ว่าทั้งสามลักษณะข้างต้นควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง และการแสดงออกของลักษณะทั้งสามเป็นผลมาจากยีนที่มีการแสดงออกแบบบวกสะสมเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้การศึกษาของลักษณะ TAC ของข้าวบาร์เลย์ในประชากร RIL พบว่าลักษณะนี้ควบคุมด้วย QTL 11 ตำแหน่ง ที่วางตัวบนโครโมโซมคู่ที่ 1H 2H 4H 6H และ 7H และมีค่า R^2 ตั้งแต่ 5.06% ถึง 23.86% ดังนั้นการแปรผันของลักษณะ TAC ในข้าวบาร์เลย์ จึงเป็นผลมาจากยีนหลายตำแหน่ง (Yang et al., 2020) ส่วนการศึกษาในประชากรข้าว พิรินันท์และคณะ (2557) ศึกษาลักษณะ TAC ในประชากรข้าวรุ่น F_2 และ F_3 พบว่ามีการกระจายตัวของลักษณะเป็นแบบต่อเนื่อง และส่วนใหญ่มีค่า TAC น้อยและค่อนข้างต่ำของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว จึงอธิบายได้ว่าลักษณะ TAC มีการถ่ายทอดเชิงปริมาณด้วยยีนหลายตำแหน่ง และต้นข้าวที่มี TAC ปริมาณสูงจะมีแอลลีลด้อยควบคุม นักปรับปรุงพันธุ์สนใจที่จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีสารต้านออกซิเดชันสูงเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของ

ลักษณะต้านออกซิเดชันเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานช่วยในการประเมินความเป็นไปได้ในการปรับปรุงพันธุ์ และสามารถกำหนดวิธีที่เหมาะสมในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีสารต้านออกซิเดชันสูง

RD41 เป็นข้าวที่กรมการข้าวปรับปรุงพันธุ์มาจาก ลูกผสม F_1 ของ CNT85059-27-1-3-2 กับ สุพรรณบุรี 60 นำไปผสมกับ พันธุ์ RP217-635-8 เป็นข้าวเจ้าที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ให้ผลผลิต 722 กิโลกรัมต่อไร่ ที่อายุเก็บเกี่ยว 105 วัน เมล็ดข้าวกล้องมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและมีสารต้านออกซิเดชันต่ำ (กองวิจัยและพัฒนาข้าว, 2563) ส่วน Riceberry (RB) เป็นข้าวที่ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ปรับปรุงพันธุ์มาจากข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวเจ้าที่ไม่ไวต่อช่วงแสง มีอายุเก็บเกี่ยว 130 วัน ให้ผลผลิต 300-500 กิโลกรัมต่อไร่ เมล็ดข้าวกล้องมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำ และมีสารต้านออกซิเดชันสูง (Poosri et al., 2019) งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการถ่ายทอดลักษณะต้านออกซิเดชันในประชากรข้าวรุ่น F_2 ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น โดยได้ศึกษาลักษณะต้านออกซิเดชันที่ประกอบด้วยปริมาณสารออกซิเดชัน (TPC TFC และ TAC) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ABTS และ FRAP) ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาร่วมกันทุกลักษณะมาก่อนในงานวิจัยที่ผ่านมา ดังนั้นการศึกษากายทอดลักษณะต้านออกซิเดชันของข้าวกล้องในประชากรข้าวรุ่น F_2 ที่ได้จากคู่ผสม RD41 \times RB จึงศึกษาเพื่อให้ทราบถึงการถ่ายทอดลักษณะต้านออกซิเดชัน และเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดเลือกข้าวที่มีสารต้านออกซิเดชันสูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณสารต้านออกซิเดชันสูงต่อไป

วิธีการศึกษา

การสร้างประชากรรุ่น F_2

ประชากรรุ่น F_1 ได้มาจากการผสมข้ามต้นระหว่างข้าวพันธุ์ RD41 (P_1) ซึ่งเป็นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันต่ำ และ RB (P_2) เป็นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำและมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันสูง ในการผสมพันธุ์ครั้งนี้ใช้ต้น RD41 เป็นต้นแม่ โดยปลูกพ่อแม่ในกระถางพันธุ์ละ 312 ต้น ทำการผสมพันธุ์เมื่อต้นข้าวพันธุ์พ่อแม่และแม่มีดอกบานพร้อมกันจำนวน 60 ต้น ได้เมล็ด F_1 จำนวน 982 เมล็ด ปลูก F_1 ในกระถางจำนวน 70 ต้น แล้วปล่อยให้ผสมตัวเอง เพื่อสร้างเมล็ด F_2 ซึ่งได้เมล็ด F_2 ตั้งแต่ 102 ถึง 438 เมล็ด โดยขั้นตอนนี้ได้ดำเนินการที่หน่วยปรับปรุงพันธุ์ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี อำเภอรัญบุรี จังหวัดปทุมธานี ระหว่างเดือนสิงหาคม 2559 ถึงเดือนพฤษภาคม 2560

หลังจากนั้น ปลูก P_1 60 ต้น P_2 60 ต้น F_1 120 ต้น และ F_2 255 ต้น ด้วยการปักดำเมื่อต้นกล้ามีอายุ 25 วัน ระยะห่างระหว่างกอ 20 เซนติเมตร และระหว่างแถว 25 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-8 หลังจากปักดำ 15 วัน และปุ๋ยยูเรียก่อนข้าวออกดอก 30 วัน ใช้สารป้องกันวัชพืชในนาข้าวหลังจากปักดำ 6 วัน และใช้สารกำจัดแมลงศัตรูและโรคข้าวเมื่อพบบนต้นข้าวที่แปลงนา ที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี อำเภอรัญบุรี จังหวัดปทุมธานี ระหว่างเดือนสิงหาคม ถึงเดือนธันวาคม 2560 เพื่อเก็บเมล็ดแยกต้น P_1 20 ต้น P_2 20 ต้น F_1 15 ต้น และ F_2 208 ต้น และนำเมล็ดไปวัดลักษณะต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่อไป

สารสกัดจากเมล็ดข้าว

เมล็ดข้าวจากประชากรรุ่น P_1 20 ต้น P_2 20 ต้น F_1 15 ต้น และ F_2 208 ต้น ที่เก็บเกี่ยวจากแปลงนาอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนที่จะนำเมล็ดข้าวจำนวน 10 g ต่อต้นไปสีเป็นข้าวกล้องเพื่อเอาเกลือบอกบันทึกผลสีของเยื่อหุ้มเมล็ด และนำเมล็ดข้าวกล้องเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

นำเมล็ดข้าวกล้องที่สีแล้วต้นละ 0.5 g มาสกัดด้วย 10 mL ของ 1% (v/v) HCl ในเมทานอล (Zhang et al., 2010) พร้อมกับใส่ลูกบิด จากนั้นเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ Rotator ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกสารสกัดด้วยความเร็วรอบ 4,000g ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แยกสารสกัดออกและนำตะกอนข้าวไปสกัดซ้ำอีกครั้ง และนำสารสกัดทั้งสองครั้งรวมกันและกรองด้วยกระดาษ Whatman® เบอร์ 542 เก็บสารสกัดทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการวัดปริมาณสารต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่อไป

การวัดปริมาณสารต้านออกซิเดชัน

การวัดปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content; TPC)

การวัดปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ทำโดยวิธี Folin-Ciocalteu method ซึ่งปรับปรุงจากวิธีของ Zhang et al. (2006) โดยนำสารสกัดจากเมล็ดข้าว 20 μL ใส่ลงในหลุมของ well plate จากนั้นเติมสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu 100 μL และน้ำกลั่น 100 μL ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด 1 นาที เติมสารละลาย 7.5% (w/v) Na_2CO_3 80 μL ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ด้วยเครื่อง UV-visible absorbance microplate reader (SpectraMax[®] M3, Molecular Devices, USA) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ใช้สารละลายมาตรฐาน gallic acid ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับสารสกัดจากเมล็ดข้าวและสร้างกราฟมาตรฐาน นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณ TPC ในหน่วย mg GAE/100g ข้าว

การวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content; TFC)

การวัดปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยการปรับปรุงวิธีการของ Herald et al. (2012) และ Shen et al. (2009) ใส่สารสกัดจากเมล็ดข้าว 10 μL กับสารละลาย 50% (v/v) $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 200 μL และสารละลาย 5% (w/v) NaNO_2 7.5 μL ลงในหลุมของ well plate บ่มเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 10% (w/v) AlCl_3 15 μL ผสมให้เข้ากัน และบ่มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 1 M NaOH 50 μL บ่มเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm ด้วยเครื่อง UV-visible absorbance microplate reader (SpectraMax[®] M3, Molecular Devices, USA) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ใช้สารละลายมาตรฐาน rutin ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับสารสกัดจากเมล็ดข้าว สร้างกราฟมาตรฐาน นำผลการทดสอบของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณ TFC ในหน่วย mg RE/100g ข้าว

การวัดปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin content; TAC)

การวัดปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด ด้วยวิธีของ Ghasemzadeh et al. (2018) นำสารสกัดจากเมล็ดข้าว 200 μL ใส่ลงในหลุมของ well plate แล้ววัดความค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 และ 657 nm ด้วยเครื่อง UV-visible absorbance microplate reader (SpectraMax[®] M3, Molecular Devices, USA) คำนวณปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดในหน่วย mg/100g ข้าว ด้วยสมการที่ (1) (2) และ (3) ตามลำดับ

$$\Delta A = A_{530} - 0.25(A_{657}) \tag{1}$$

$$l = \frac{V_s}{\pi r^2} \tag{2}$$

$$TAC = \frac{\Delta A \times V \times MW \times 100}{\epsilon \times l \times n} \tag{3}$$

โดยที่ ΔA = ค่าความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 (A_{530}) และ 657 (A_{657}) nm; V_s = ปริมาตรสารสกัดจากเมล็ดข้าวใน 96 well plate (cm^3); π = ค่าคงตัวทางคณิตศาสตร์ (≈ 3.14); r = รัศมีของช่องใน well plate (cm); l = ความสูงของสารสกัดจากเมล็ดข้าวใน well plate (cm); MW = น้ำหนักโมเลกุลของ Cyanindin-3-glucoside (449.2 g/mol); ϵ = ความสามารถในการดูดกลืนแสง (26,900); V = ปริมาตรของสารสกัดทั้งหมด (mL)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

วิธี ABTS radical scavenging (ABTS)

วิธี ABTS radical scavenging ดัดแปลงจากวิธีของ Re et al. (1999) เตรียมสารละลาย ABTS (ABTS^+ cation radical) โดยบ่มสารละลาย 2,2'-azino-bis-3-(ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt ความเข้มข้น 7 mM กับสารละลาย $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ความเข้มข้น 2.45 mM ในที่มีมืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสง 0.700 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 nm

นำสารสกัดจากเมล็ดข้าว 20 μL ผสมให้เข้ากับสารละลาย ABTS 200 μL ในหลุมของ well plate บ่มในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง UV-visible absorbance microplate reader (SpectraMax[®] M3, Molecular Devices, USA) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานจากความเข้มข้นของสารละลาย ascorbic acid และคำนวณ %

inhibition ตามสมการที่ (4) นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ascorbic acid และแสดงผลเป็นฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหน่วย mM AEAC/100 g ข้าว

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_{734} \text{ control} - A_{734} \text{ สารสกัดจากข้าว}}{A_{734} \text{ control}} \times 100 \quad (4)$$

โดยที่ $A_{734} \text{ control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ของสารละลาย ABTS กับ 1% (v/v) HCl ในเมธานอล;
 $A_{734} \text{ สารสกัดจากข้าว}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ของสารละลาย ABTS กับ สารสกัดจากเมล็ดข้าว

วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

วิธี Ferric reducing antioxidant power เป็นไปตามวิธีของ Benzie and Strain (1996) ด้วยการเตรียมสารละลาย FRAP โดยการผสมสารละลาย 300 mM Acetate Buffer (pH 3.6) สารละลาย 20 mM FeCl_3 และสารละลาย 10 mM TPTZ ในอัตราส่วน 10:1:1 นำไปบ่มในเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ

นำสารสกัดจากเมล็ดข้าว 50 μL ผสมกับสารละลาย FRAP 150 μL ใส่ในหลุมของ well plate บ่มในที่มืด 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ด้วยเครื่อง UV-visible absorbance microplate reader (SpectraMax[®] M3, Molecular Devices, USA) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานจาก Trolox นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเมล็ดข้าวเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหน่วย mM TEAC/100g ข้าว

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทดสอบอัตราส่วน 9:3:4 ของลักษณะสีของเยื่อหุ้มเมล็ดจากเมล็ดข้าวกล้องของข้าวรุ่น F_2 ด้วยการทดสอบ Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สร้างกราฟการกระจายตัวแบบฮิสโตแกรมของลักษณะ TPC TFC TAC ABTS และ FRAP ทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลว่าปกติ โดยวิธี Kolmogorov-Smirnova และวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของลักษณะทั้ง 5 ลักษณะนี้ด้วยวิธี Pearson correlation ด้วยโปรแกรม SPSS (IBM, 2013)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางพันธุกรรมของ P_1 P_2 F_1 และ F_2 เพื่อประเมินค่าความแปรปรวนเนื่องจากพันธุกรรม (V_G) และความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ (V_P) ประมาณค่าอัตราพันธุกรรมในแนวกว้าง (broad sense heritability, H^2) ด้วยวิธีของ Globerson et al. (1987) สัมประสิทธิ์ ความแปรปรวนเนื่องจากพันธุกรรม (genotypic coefficient of variation, GCV) และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ (phenotypic coefficient of variation, PCV) ตามวิธีของ Miller et al. (1958) และค่าร้อยละความก้าวหน้าทางพันธุกรรม (percentage of genetic advance, %GA) ตามวิธีของ Johnson et al. (1955) ตามสมการต่อไปนี้

$$H^2 = \frac{V_G}{V_P} \quad (5)$$

$$GVC = \frac{\sqrt{V_G}}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

$$PVC = \frac{\sqrt{V_P}}{\bar{x}} \times 100 \quad (7)$$

$$GA\% = \frac{K \times \sqrt{V_P} \times H^2}{\bar{x}} \times 100 \quad (8)$$

โดยที่ \bar{x} = ค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆ ; K= standardize selection differential at 5% selection intensity (2.06)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การกระจายตัวของลักษณะสีของเยื่อหุ้มเมล็ด

RD41 (P_1) จำนวน 20 ต้น มีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีขาว ส่วน RB (P_2) จำนวน 20 ต้น มีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีม่วงดำ และข้าวรุ่น F_1 จำนวน 15 ต้น มีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีน้ำตาลทุกต้น (Figure 1) ขณะที่ข้าวรุ่น F_2 มีการแสดงออกของสีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็น สีม่วงดำ 102 ต้น สีน้ำตาล 39 ต้น และสีขาว 52 ต้น เป็นอัตราส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำ: สีน้ำตาล: สีขาวเท่ากับ 9: 3: 4 และทดสอบ Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า มีค่า $\chi^2=1.342$ ($p=0.511$) ซึ่ง $p>0.05$ (Table 1) แสดงว่าลักษณะสีของเยื่อหุ้มเมล็ดมียีนควบคุมจำนวน 2 คู่ และมีปฏิกริยาต่อกันแบบ recessive epistasis โดยที่ homozygous recessive ของยีนตำแหน่งหนึ่งจะขัดขวางการแสดงออกของอีกยีนจากตำแหน่งหนึ่ง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rahman et al. (2013) ที่ได้ผสมพันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มสีม่วงดำพันธุ์ "Heugnambyeo" กับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวสามพันธุ์ พบว่าในข้าวรุ่น F_2 มีอัตราส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำ: สีน้ำตาล: สีขาวเท่ากับ

9: 3: 4 นอกจากนี้ฮู่มพรและคณะ (2563) ได้ศึกษาสีของเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวรุ่น F₂ ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ “Riceberry” กับ “Khao’Yipun DOA2” พบว่า อัตราส่วนของสีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำ: สีน้ำตาล: สีขาว เท่ากับ 9: 3: 4 เช่นกัน โดยที่ลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำมียีนสองตำแหน่งบนโครโมโซม 1 และ 4 คือ *Pp* และ *Pb* (*Ra*) ตามลำดับ ซึ่งมีปฏิกริยาต่อกันแบบ recessive epistasis โดยยีน *Pp* มีผลต่อการสะสมของแอนโทไซยานินในเยื่อหุ้มเมล็ดและแสดงออกแบบ incomplete dominant ขณะที่ยีน *Pb* มีการแสดงออกแบบ homozygous recessive มีผลต่อการมีสีหรือไม่มีสีในเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าว ทำให้จีโนไทป์แบบ *ppbb* สามารถขัดขวางการแสดงออกของยีน *Pp* ส่งผลต่อการมีสัดส่วนของข้าวสีขาวเป็น 4 ส่วนใน 16 ส่วน (Rahman et al., 2013; Wang and Shu, 2007)



Figure 1 The colors of the rice pericarps. (A) purple, (B) brown and (C) white.

Table 1 Segregation of the pericarp colors in 208 F₂ families from the cross of RD41 × RB.

rice	pericarp color			total	χ^2 9:3:4	P-value
	purple	brown	white			
RD41 (P ₁)			20	20		
RB (P ₂)	20			20		
F ₁		15		15		
F ₂	109	39	52	208	1.342	0.511

The ratio was not significantly different at $p > 0.05$.

การกระจายตัวลักษณะต้านออกซิเดชันในประชากรรุ่น F₂

ลักษณะต้านออกซิเดชันประกอบด้วยปริมาณสารต้านออกซิเดชัน (TPC TFC และ TAC) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ABTS และ FRAP) ในประชากรข้าวรุ่น F₂ มีการกระจายตัวอย่างต่อเนื่องมีลักษณะเบ้ทางขวา ไม่เป็นโค้งปกติ ($P=0.00$) แต่มีการกระจายตัวของลักษณะต้านออกซิเดชันในบางต้นของประชากรรุ่น F₂ มากกว่าข้าวพันธุ์ RB (P₂) ซึ่งแสดงให้เห็น transgressive segregation ที่เกิดจากการจัดกลุ่มใหม่ของยีน (Figure 2) แสดงว่าลักษณะทั้งหมดแสดงการถ่ายทอดเชิงปริมาณ (quantitative inheritance) เป็นผลมาจากการควบคุมของยีนหลายตำแหน่ง (polygenes) (Poehlman and Sleper, 1995) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้หลายงานวิจัยที่พบว่า ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สารต้านออกซิเดชันประกอบด้วย structural genes และ regulatory genes โดย structural genes ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์สารต้านออกซิเดชัน (Shih et al., 2008; Park et al., 2016) structural genes ที่มีบทบาทสำคัญต่อการมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกันของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว สีแดงและสีม่วงดำคือ *Rd* gene ซึ่งเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase เพื่อสังเคราะห์ลิวโคแอนโทไซยานิน (leucoanthocyanidins) สารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน (proanthocyanin) ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง และ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำ (Furukawa et al., 2007) ส่วน regulatory genes ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่ใช้ควบคุมการถอดรหัสทางพันธุกรรมของ structural genes โดย regulatory genes ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำ คือ *Pb* หรือ *Ra* gene ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการถอดรหัสทางพันธุกรรมของยีนที่สร้างเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Sakamoto et al., 2001) นอกจากนี้พีรนนท์และคณะ (2557) ได้ทำทดสอบการ

กระจายตัวของลักษณะ TAC ในข้าวรุ่น F₂ และ F₃ จากคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ก่ำตอยสะเกิดกับปทุมธานี 1 พบว่า ประชากรของข้าวทั้งสองรุ่นมีการกระจายตัวแบบต่อเนื่อง และส่วนใหญ่มีค่า TAC ต่ำค่อนข้างต่ำทางข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ดังนั้นลักษณะ TAC สูงมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเชิงปริมาณด้วยยีนหลายตำแหน่ง และถูกควบคุมด้วยยีนด้อย ซึ่งงานวิจัยนี้การกระจายของกราฟ TPC TFC ABTS และ FRAP มีลักษณะของกราฟมีแนวโน้มเหมือนกับ TAC จากงานวิจัยนี้และงานวิจัยของ พิรนนท์และคณะ (2557) ดังนั้นลักษณะ TPC TFC AC ABTS และ FRAP สูงมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเชิงปริมาณด้วยยีนหลายตำแหน่ง และถูกควบคุมด้วยยีนด้อยเช่นเดียวกับ TAC

อย่างไรก็ตามในหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้มักรายงานว่าไม่พบแอนโทไซยานินในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ซึ่งเป็นผลจากการใช้ตัวทำลายในการสกัดสารจากเมล็ดข้าว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ghasemzadeh et al. (2018) และ Maisuthisakul and Changchub (2012) ที่ได้ใช้ตัวทำลาย HCl ในเมธานอลในการสกัดสารจากเมล็ดข้าวทำให้ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวสามารถวัดค่า TAC ได้ ขณะที่พิทวัสและคณะ (2560) ใช้เมธานอลในการสกัดสารจากเมล็ดข้าวจึงไม่สามารถวัดค่า TAC จากข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวได้

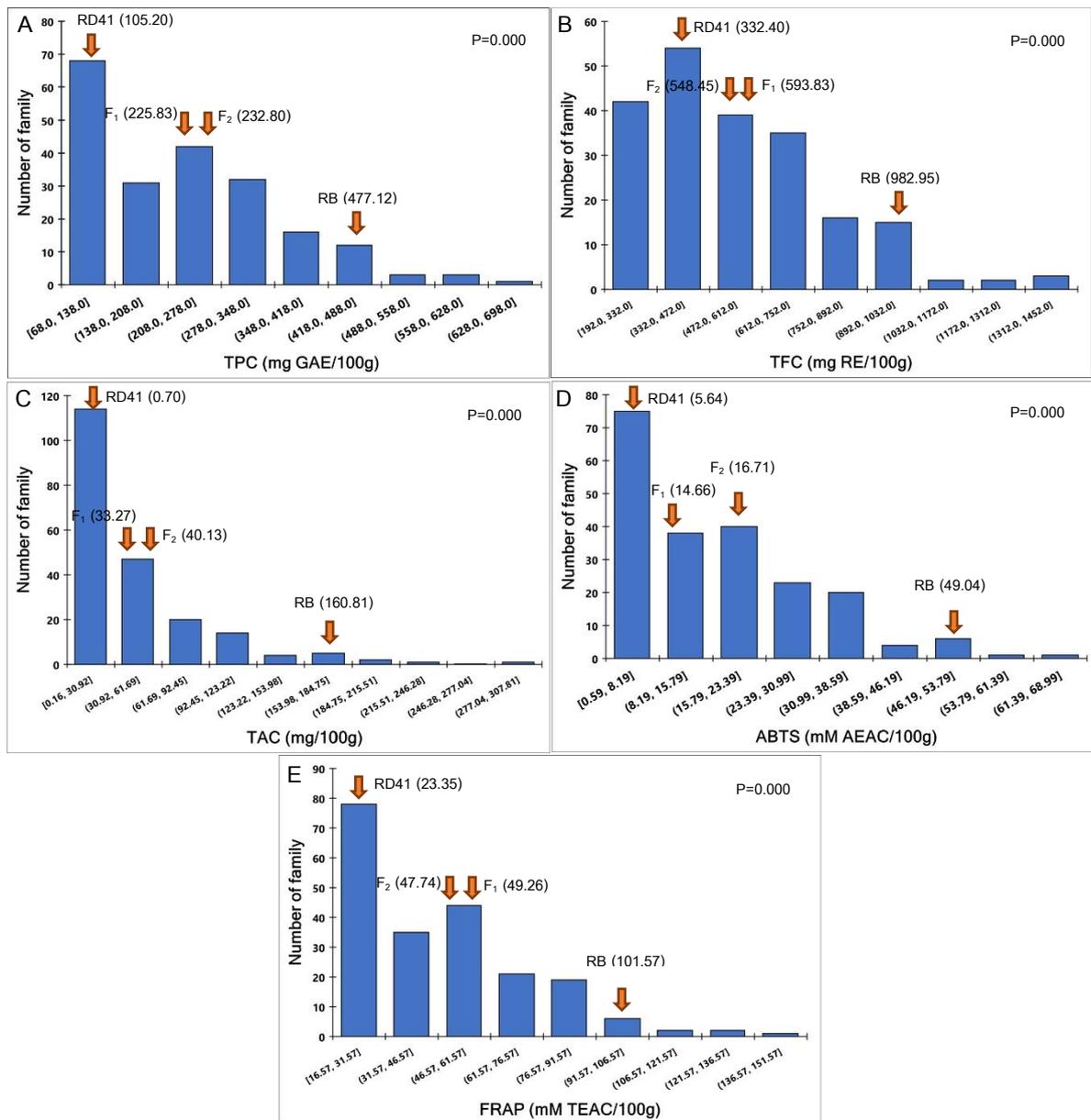


Figure 2 Frequency distribution of TPC (A), TFC (B), TAC (C), ABTS (D) and FRAP (E) of 208 F₂ families from the cross of RD41 × RB. The arrows indicate the average of antioxidant traits.

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของลักษณะต้านออกซิเดชัน

ลักษณะต้านออกซิเดชันของข้าวรุ่น F₂ มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ มีค่า r ตั้งแต่ 0.910-0.973 (Table 2) ซึ่งถือว่าเป็นค่า r ที่สูง แสดงว่าสารต้านออกซิเดชันในประชากรข้าวรุ่น F₂ มีปริมาณสารต้านออกซิเดชันสูงก็จะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงเช่นกัน บ่งชี้ว่าสารต้านออกซิเดชันที่มีศักยภาพคือ TPC TFC และ TAC สามารถออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ABTS และ FRAP) ได้ดี ดังนั้นเมื่อผู้บริโภครับประทานข้าวที่มีสารต้านออกซิเดชันเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงสารต้านออกซิเดชันเหล่านั้นก็จะออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ในระดับสูง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Umnajkitikorn et al. (2013) ที่ได้ศึกษาสารต้านออกซิเดชันในข้าวกล้องงอกพันธุ์เก่าตอยสะเกิดเป็นข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงดำ พบว่าค่า TPC มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับ ABTS โดยมีค่า r เท่ากับ 0.844 แสดงว่าในข้าวกล้องงอกพันธุ์เก่าตอยสะเกิดที่มีค่า TPC สูงสามารถออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี งานวิจัยของ Jin et al. (2009) ซึ่งศึกษาในประชากร doubled haploid ที่ได้จากคู่ผสม “Zhai-Ye-Qing 8” กับ “Jing-Xi” พบว่า ลักษณะ TPC มีความสัมพันธ์ทางบวกกับลักษณะ TFC และ ABTS ในระดับปานกลาง โดยมีค่า r เท่ากับ 0.581 และ 0.446 ตามลำดับ และงานวิจัยของ Phaiwan and Sudarat (2016) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะ TPC TFC TAC ABTS และ FRAP ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวย สีส้ม และสีม่วงดำ พบว่าทุกลักษณะมีความสัมพันธ์ในทางบวกต่อกัน และมีค่า r ตั้งแต่ 0.703-0.962 ดังนั้นจากที่พบว่าลักษณะ TPC TFC และ TAC มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันคือ ABTS และ FRAP เป็นการยืนยันว่าหากทำการปรับปรุงพันธุ์ให้มีปริมาณสารต้านออกซิเดชัน เช่น TPC TFC และ TAC สูงในเมล็ดข้าว นั่นคือข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงนั้นสามารถออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ในระดับสูงเช่นกัน

Table 2 Correlation analysis of antioxidant traits (TPC, TFC, TAC, ABTS and FRAP) of 208 F₂ families from the cross of RD41 × RB.

Traits	TFC	TAC	ABTS	FRAP
TPC	0.953**	0.942**	0.940**	0.973**
TFC	1	0.918**	0.910**	0.948**
TAC		1	0.939**	0.967**
ABTS			1	0.950**
FRAP				1

** significant for $p < 0.01$

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางพันธุกรรม

ประมาณค่า H² GCV PCV และ %GA ของลักษณะปริมาณสารต้านออกซิเดชัน และลักษณะฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ดังแสดงใน Table 3 จากการศึกษา พบว่า ลักษณะต้านออกซิเดชันทุกลักษณะมีค่า GCV และ PCV มีค่าตั้งแต่ 40.08-117.62 และ 44.13-124.35 ตามลำดับ โดย TAC มีค่า GCV และ PCV สูงที่สุดคือ 117.62 และ 124.35 ตามลำดับ แสดงว่าลักษณะ TAC นี้มีความหลากหลายสูงกว่าลักษณะต้านออกซิเดชันอื่น ๆ (Ahmad et al., 2016) และค่าความแตกต่างระหว่าง GCV กับ PCV ของทุกลักษณะมีค่าต่ำกว่า 10 ตั้งแต่ 1.57-6.73 แสดงว่าการแสดงออกของลักษณะต้านออกซิเดชันเป็นผลมาจากอิทธิพลของยีนมีมากกว่าสภาพแวดล้อม (Ahmad et al., 2016; Sanghamitra et al., 2018; Roy and Shil, 2020; พิลาลักษณ์และคณะ, 2564)

ค่าอัตราพันธุกรรมในแนวกว้าง (H²) ของลักษณะต้านออกซิเดชันทุกลักษณะมีค่าสูงตั้งแต่ 0.82-0.94 โดยลักษณะ TPC มีค่า H² สูงที่สุด และลักษณะ TFC มีค่า H² ต่ำที่สุด เช่นเดียวกับค่า %GA ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 75.16-229.74 แสดงว่าลักษณะต้านออกซิเดชันของประชากร F₂ ของคู่ผสมพันธุ์นี้แสดงออกจากอิทธิพลของยีน (Ahmad et al., 2016; Roy และ Shil 2020) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Roy and Shil (2020) ได้ผสมพันธุ์ข้าวหลายคู่ผสมในประชากรรุ่น F₅ และ F₃ พบว่าลักษณะที่ศึกษาทั้งหมด ได้แก่ ความสูง น้ำหนัก

1000 เมล็ด และอายุเก็บเกี่ยว มีค่า H^2 และ %GA สูง แสดงว่าลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีน จากการที่ลักษณะต้านออกซิเดชันมีค่า H^2 สูงทำให้การคัดเลือกลักษณะเหล่านี้จากพีโนไทป์มีโอกาสเป็นไปได้สูง

Table 3 Genetic variability parameters for antioxidant traits (TPC, TFC, TAC, ABTS and FRAP) of 208 F_2 families from the cross of RD41 × RB.

Traits	Mean±SD	Rang	PCV	GCV	PCV-GVC	H^2	%GA
TPC	232.79±123.14	68.00-666.67	52.77	51.20	1.57	0.94	102.57
TFC	548.45±242.64	192.00-1420.00	44.13	40.08	4.05	0.82	75.16
TAC	40.13±50.02	0.16-307.81	124.35	117.62	6.73	0.89	229.74
ABTS	16.71±12.87	0.59-65.99	76.81	71.98	4.83	0.88	127.38
FRAP	47.74±24.89	16.57-146.66	52.01	49.89	2.12	0.92	98.83

สรุป

จากการศึกษาข้างต้นจึงสามารถสรุปได้ ดังนี้ (1) การถ่ายทอดลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดของประชากรรุ่น F_2 มีอัตราส่วน 9:3:4 ซึ่งควบคุมด้วยยีนสองคู่ (2) ลักษณะ TPC TFC TAC ABTS และ FRAP ของประชากรรุ่น F_2 แสดง Transgressive segregation แต่มีต้น F_2 บางต้นมีปริมาณสารต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเมล็ดสูงกว่าข้าวพันธุ์ RB และการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะต้านออกซิเดชันที่มีค่าสูงเป็นการถ่ายทอดเชิงปริมาณด้วยยีนหลายตำแหน่ง และถูกควบคุมด้วยยีนน้อย (3) ลักษณะปริมาณสารต้านออกซิเดชันสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง นั่นคือถ้าปรับปรุงพันธุ์ให้เมล็ดข้าวมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันสูงจะทำให้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นในพันธุ์นั้นด้วย และ (4) ลักษณะ TPC TFC และ TAC มีค่า H^2 เป็น 0.94 0.82 และ 0.89 ตามลำดับ จากค่า GCV และ PCV มีความแตกต่างกัน้อยทุกลักษณะ แสดงว่าอิทธิพลของยีนมีมากกว่าสภาพแวดล้อม และการคัดเลือกลักษณะจากพีโนไทป์มีโอกาสเป็นไปได้สูง

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการศึกษาจากทุนการศึกษาลำดับที่ 100 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การสนับสนุนทุนวิจัยจากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (PRP6105020640) และได้รับการสนับสนุนพื้นที่ปลูกและสร้างลูกผสมจากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี

เอกสารอ้างอิง

- กองวิจัยและพัฒนาข้าว. 2563. องค์ความรู้เรื่องข้าว: กข41. กรมการข้าว, กระทรวงการเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร.
 แหล่งข้อมูล: <http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=121.htm>. ค้นเมื่อ 30 พฤศจิกายน 2563.
- พิลาลักษณ์ โพธิ์เพชร, อีระ เอกสมทราเมษฐ์, และ จักรัตน์ อโณทัย. 2564. ความแปรปรวนทางพันธุกรรม และอัตราพันธุกรรมในปาล์ม น้ำมันลูกผสมเทเนอราพันธุ์การค้า. แก่นเกษตร. 49: 856-863.
- พิทวัส สมบูรณ์, ชนาภานต์ เทโบลต์ พรหมอุทัยม, ต่อนภา ผุสดี, และ ศันสนีย์ จำจด. 2560. การกระจายตัวทางพันธุกรรมของปริมาณ แอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่างข้าวเหนียวดำจากที่สูงและข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่ปลูกที่ลุ่มและที่สูง. วารสารเกษตร. 33: 323-332.

- พินันท์ มาปิ่น, สุพรรณิศา ตีบขัน, ชนากานต์ เทโบลต์ พรหมอุทัย, ดำเนิน กาละดี, และ ศันสนีย์ จำจด. 2557. การคัดเลือกในชั่วต้นเพื่อลักษณะแอนโทไซยานินในเมล็ดสูงและไม่ไวต่อช่วงแสง ในลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่างข้าวพันธุ์เก่าดอยสะเก็ดและปทุมธานี 1. วารสารนเรศวรพะเยา. 7: 160-171.
- อุทุมพร ไทรชมภู, ปุณยาพร พุทธจักรศรี, ชนรติ จันทร์ผ่องศรี, ปพิชญา ทองเทพ, พศวัต นฤมลต์, และ ชเนษฎ์ ม้าลำพอง. 2563. การประเมินพันธุกรรมการเกิดสีที่เยื่อหุ้มเมล็ดและรูปร่างเมล็ดจากประชากรชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวจากปอนิกา x อินдика. วิทยาศาสตร์เกษตร. 51: 315-320.
- Ahmad, M., M. Iqbal, Z. Gul, B. A. Khan, A. Kanwal, M. Saleem, and N. I. Khan. 2016. Genetic analysis of F₂ population of tomato for quantitative traits in the cross bushbeef X nagina. *Advances in Plants & Agriculture Research*. 4: 422-424.
- Babu, P. D., R. S. Subhasree, R. Bhakayaraj, and R. Vidhyalakshmi. 2009. Brown rice-beyond the color reviving a lost health food- a review. *American-Eurasian Journal of Agronomy*. 2: 67-72.
- Benzie, I. F. F., and J. J. Strain. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-76.
- Butsat, S., and S. Siriamornpun. 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry*. 119: 606-613.
- Furukawa, T., M. Maekawa, T. Oki, I. Suda, S. Iida, H. Shimada, I. Takamura, and K.-I. Kadowaki. 2007. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. *The Plant Journal*. 49: 91-102.
- Ghasemzadeh, A., M. T. Karbalaii, H. Z. E. Jaafar, and A. Rahmat. 2018. Phytochemical constituents, antioxidant activity, and antiproliferative properties of black, red, and brown rice bran. *Chemistry Central Journal*. 12: 17.
- Globerson, D., A. Genizi, and J. E. Staub. 1987. Inheritance of seed weight in *Cucumis sativus* (L.) var. *sativus* and var. *hardwickii* (Royle) Kitamura. *Theoretical and Applied Genetics*. 74: 522-526.
- Herald, T. J., P. Gadgil, and M. Tilley. 2012. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92: 2326-2331.
- IBM 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Jin, L., P. Xiao, Y. Lu, Y. Shao, Y. Shen, and J. Bao. 2009. Quantitative Trait Loci for Brown Rice Color, Phenolics, Flavonoid Contents, and Antioxidant Capacity in Rice Grain. *Cereal Chemistry*. 86: 609-615.
- Johnson, H. W., H. F. Robinson, and R. E. Comstock. 1955. Estimates of Genetic and Environmental Variability in Soybeans1. *Agronomy Journal*. 47: 314-318.
- Maisuthisakul, P., and L. Changchub. 2012. Total phenolic, anthocyanin content, antiradical activity, color and visible spectrum of nine genotypes from Thai rice grains and correlations. pp. 113-121. In *Proceedings of 50th Kasetsart University Annual Conference 31 January-2 February 2012*. Bangkok, Thailand.
- Miller, P. A., J. C. Williams Jr., H. F. Robinson, and R. E. Comstock. 1958. Estimates of genotypic and environmental variances and covariances in upland cotton and their implications in selection. *Agronomy Journal*. 50: 126-31.

- Park, S., M. J. Choi, J. Y. Lee, J. K. Kim, S. H. Ha, and S. H. Lim. 2016. Molecular and biochemical analysis of two rice flavonoid 3'-hydroxylase to evaluate their roles in flavonoid biosynthesis in rice grain. *International Journal of Molecular Sciences*. 17: 1549.
- Phaiwan, P., and J. Sudarat. 2016. Chemometric classification of pigmented rice varieties based on antioxidative properties in relation to color. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 38: 463-472.
- Poehlman, J.H. and D. A. Sleper. 1995. *Breeding Field Crops*. 4th ed. Ames: Iowa State University Press.
- Poosri, S., T. Thilavech, P. Pasukamonset, C. Suparpprom, and S. Adisakwattana. 2019. Studies on Riceberry rice (*Oryza sativa* L.) extract on the key steps related to carbohydrate and lipid digestion and absorption: A new source of natural bioactive substances. *NFS Journal*. 17: 17-23.
- 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: 24-31.
- Ravichanthiran, K., Z. F. Ma, H. Zhang, Y. Cao, C. W. Wang, S. Muhammad, E. K. Aglago, Y. Zhang, Y. Jin, and B. Pan. 2018. Phytochemical Profile of Brown Rice and Its Nutrigenomic Implications. *Antioxidants (Basel)*. 7: 1-16.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231-1237.
- Reddy, V. S., S. Dash, and A. R. Reddy. 1995. Anthocyanin pathway in rice (*Oryza sativa* L): identification of a mutant showing dominant inhibition of anthocyanins in leaf and accumulation of proanthocyanidins in pericarp. *Theoretical and Applied Genetics*. 91: 301-312.
- Roy, S. C., and P. Shil. 2020. Assessment of Genetic Heritability in Rice Breeding Lines Based on Morphological Traits and Caryopsis Ultrastructure. *Scientific Reports*. 10: 1-17.
- 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^{lv}* Allele has a Complex Organization and Includes Two Genes Encoding Basic Helix-Loop-Helix Proteins Involved in Anthocyanin Biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*. 42: 982-991.
- Sanghamitra, P., R. P. Sah, T. B. Bagchi, S. G. Sharma, A. Kumar, S. Munda, and R. K. Sahu. 2018. Evaluation of variability and environmental stability of grain quality and agronomic parameters of pigmented rice (*O. sativa* L.). *Journal of Food Science and Technology*. 55: 879-890.
- Shen, Y., L. Jin, P. Xiao, Y. Lu, and J. Bao. 2009. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science*. 49: 106-111.
- Shih, C. H., H. Chu, L. K. Tang, W. Sakamoto, M. Maekawa, I. K. Chu, M. Wang, and C. Lo. 2008. Functional characterization of key structural genes in rice flavonoid biosynthesis. *Planta*. 228: 1043-1054.
- Thitipramote, N., P. Pradmeeteekul, J. Nimkamnerd, P. Chaiwut, P. Pintathong, and N. Thitilerdecha. 2016. Bioactive compounds and antioxidant activities of red (Brown Red Jasmine) and black (Kam Leum Pua) native pigmented rice. *International Food Research Journal*. 23: 410-414.
- Tian, S., K. Nakamura, and H. Kayahara. 2004. Analysis of Phenolic Compounds in White Rice, Brown Rice, and Germinated Brown Rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4808-4813.
- Umnajkitikorn, K., B. Faiyue, and K. Saengnil. 2013. Enhancing Antioxidant Properties of Germinated Thai rice (*Oryza sativa* L.) cv. Kum Doi Saket with Salinity. *Rice Research*. 1: 1-8.

- 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: 3097-3104.
- Yang, X., X. Li, X. Pu, J. Du, K. A. Muhammad, J. Yang, Y. Zeng, and T. Yang. 2020. QTL mapping for total grain anthocyanin content and 1000-kernel weight in barley recombinant inbred lines population. *Acta Agronomica Sinica*. 46: 52-61.
- Zhang, M. W., R. F. Zhang, F. X. Zhang, and R. H. Liu. 2010. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Black Rice Bran of Different Commercially Available Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 7580-7587.
- Zhang, Q., J. Zhang, J. Shen, A. Silva, D. A. Dennis, and C. J. Barrow. 2006. A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 18: 445-450.