การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและมีแอนโทไซยานินสูง

อนงค์นาฏ หรี่จินดา

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2564

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและมีแอนโทไซยานินสูง

อนงค์นาฏ หรี่จินดา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและมีแอนโทไซยานินสูง

อนงค์นาฏ หรี่จินดา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์

พิจารณาเห็นชอบโดย อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุพเยาว์ คบพิมาย)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)
รองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน
อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ชื่อเรื่อง การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีเยื่อหุ้มเมล็ด สีม่วงและมีแอนโทไซยานินสูง
ชื่อผู้เขียน นางสาวอนงค์นาฏ หรี่จินดา
ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์

บทคัดย่อ

ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเกิดจากการสะสมของแอนโทไซยานินสูง การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ควบคุมด้วยยีนที่สำคัญ คือ *OsB1* และ *OsDFR* ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยในการคัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง และหาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวขาวพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับข้าวม่วงพันธุ์ให้ก่ำน้อย จำนวน 300 ต้น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ที่พัฒนาในงานวิจัยนี้และเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* นำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงนำมาตรวจสอบในประชากร F_2 และทดสอบด้วยไคสแควร์ พบว่า การถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ 1:2:1 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2 ด้วยวิธี pH differential พบว่า ตัวอย่างที่ 299 มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดเท่ากับ 35.04 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง จากนั้นวิเคราะห์การกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 พบว่า อัตราส่วนการเกิดสีและไม่เกิดสี คือ 3:1 โดยการเกิดสีเยื่อหุ้มเมล็ดควบคุมด้วยอัลลีลเด่นของยีน *OsB1* อย่างน้อย 1 อัลลีล การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ดด้วยวิธี simple regression พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอเพียงหนึ่งตำแหน่ง คือ ยีน *OsB1* มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ($p<0.05$) มีค่า R^2 เท่ากับ 31.9% ในขณะที่เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* สามารถใช้เพื่อคัดเลือกข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง และเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีได้ เครื่องหมายชนิดนี้จะเป็นประโยชน์ในการใช้คัดเลือกต้นข้าวได้ตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโต สะดวก รวดเร็ว ช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงได้

คำสำคัญ : ข้าว, ยีน OsB1, ยีน OsDFR, แอนโทไซยานิน, สีเยื่อหุ้มเมล็ด

มหาวิทยาลัยแม่โจ้
MAEJO UNIVERSITY

Title DEVELOPMENT OF DNA MARKER FOR RICE IMPROVEMENT OF PURPLE PERICARP AND HIGH ANTHOCYANINS

Author Miss Anongnad Richinda

Degree Master of Science in Genetics

Advisory Committee Chairperson Assistant Professor Dr. Chotipa Sakulsingharoj

ABSTRACT

Rice with purple pericarp has high anthocyanin accumulation. Anthocyanin synthesis is controlled by *OsB1* and *OsDFR* genes. The DNA marker of *OsDFR* gene was developed and the DNA marker of *OsB1* gene was used in this study for selection of purple rice with high anthocyanin content were investigated. The relationship between DNA markers of *OsB1* and *OsDFR* genes and anthocyanin content and pericarp color was studied in 300 plants of F_2 population of the cross between white pericarp rice as a receptor (Pathum Thani 1) and purple pericarp rice as a donor (Kham Noi). The indel marker of *OsDFR* gene developed in this study and the CAPS marker of *OsB1* gene were used as DNA markers for the selection of rice in F_2 population. The Chi-square test showed that the inheritance of DNA markers of *OsB1* and *OsDFR* gene followed Mendalian law with the ratio of 1: 2: 1. Analysis of anthocyanin content in F_2 population by pH differential method showed that sample no. 299 had the highest anthocyanin content of 35.04 mg/100 gDW. The segregation of pericarp color in F_2 population showed the ratio of 3: 1 (color: colorless) consistent with the genotypic ratio of *OsB1* gene, suggesting that pericarp pigmentation requires at least a single dominant allele of *OsB1* gene. Analysis of the relationship between genotype of DNA markers and anthocyanin content and pericarp color by simple regression method showed that only *OsB1*, a function marker, was highly related with anthocyanin content ($p<0.05$) which had R^2 (R-squared value) equivalent to 31.9%. However, the DNA marker of *OsDFR* gene was not correlated with anthocyanin content. Therefore, the CAPS marker of *OsB1* gene

could be used to select rice with high 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, OsB1 gene, OsDFR gene, Anthocyanins, pericarp color

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นผลงานที่ผู้วิจัยมีความตั้งใจ อดทน และพยายาม ในการศึกษาและวิจัย จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์ คำแนะนำและความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ แนวความคิดทัศนคติที่ดี ที่คอยอบรมสั่งสอน คอยให้คำปรึกษา ทั้งการดำเนินชีวิต แนะนำแนวทางการเรียนรู้ และใส่ใจเป็นอย่างดี ตลอดจนช่วยสนับสนุน วัสดุ อุปกรณ์ภายในห้องปฏิบัติการเพื่อดำเนินงานทดลองทั้งหมด จนกระทั่งงานทดลองเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งยังกรุณาช่วยตรวจสอบแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์นี้ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบพระคุณความเมตตาที่อาจารย์มีให้เสมอมาขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง และรองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต กรรมการที่ปรึกษา ซึ่งได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยนี้อย่างมาก ตลอดจนช่วยแนะนำ และตรวจสอบแก้ไข จนสำเร็จลุล่วงเป็นเล่มวิทยานิพนธ์อย่างสมบูรณ์

ทั้งนี้ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนวิจัย จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผ่านมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปี 2562-2563 และทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททุนบัณฑิตศึกษาจากแหล่งทุนภายนอก มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้ จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณบิดา มารดา ที่คอยสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษา และเป็นกำลังใจอย่างดีที่สุดจนสำเร็จการศึกษา และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุก ๆ ท่านในสาขาพันธุศาสตร์ พี่ ๆ น้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่คอยห่วงใย ให้ความช่วยเหลือ ดูแลเปรียบเสมือนครอบครัว และให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณครู อาจารย์ทุกท่านจากสถาบันที่ข้าพเจ้าเคยศึกษามารวมทั้งมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาให้ข้าพเจ้ามีความรู้ และได้รับโอกาสที่ดี มีความสามารถนำไปใช้ในอนาคต และข้าพเจ้าขอขอบคุณตัวเองที่มีความอดทน ตั้งใจ เพียรพยายาม ไม่ยอมแพ้ต่ออุปสรรค ปัญหาต่าง ๆ จนสำเร็จการศึกษาได้ด้วยดี

อนงค์นาฏ หรี่จินดา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญ 1

วัตถุประสงค์ 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร 4

ความเป็นมาของข้าว 4

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว 4

การเจริญเติบโตทางลำต้น 4

คุณค่าทางโภชนาการของข้าวสี 9

ฟลาโวนอยด์ 9

แอนโทไซยานิน 10

วิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน 11

ยีนโครงสร้าง 13

ยีนควบคุม 14

เครื่องหมายดีเอ็นเอ 15

เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์ 18
ข้อดีของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์ 19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 22
วัสดุและอุปกรณ์ 22
เครื่องมือ 23
สารเคมี 24
ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25
เอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย 25
ชุดทดลองสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย 25
วิธีการดำเนินวิจัย 26
1. การคัดเลือกพันธุ์ข้าว และการสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2 27
การผสมพันธุ์ข้าว 27
2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าว 28
2.1 วิธี mCTAB 28
2.2 วิธี mCTAB ใช้ 96well Plate 29
3. การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* 30
4. การวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* และ *OsDFR* 30
การแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล 32
5. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* 33
6. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด indel ของยีน *OsDFR* 34
7. การศึกษาฟีโนไทป์ 35
8. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยวิธี pH differential 35
9. การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดยีน *OsB1* และ *OsDFR* และลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ด 36

10. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี ANOVA 37

11. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับกับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 37

สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย 38

สถานที่ทำการวิจัย 38

ระยะเวลาการวิจัย 38

บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ 39

1. การคัดเลือกพันธุ์ข้าว และการสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2 39

2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ 40

3. การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* และ *OsDFR* . 45

3.1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* 45

3.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* 50

4. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* 53

ข้าวขาวและข้าวสีพันธุ์ต่าง ๆ 53

ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) 54

ประชากร F_2 56

5. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด indel ของยีน *OsDFR* 59

ข้าวขาวและข้าวสีพันธุ์ต่าง ๆ 59

ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) 60

ประชากร F_2 61

6. การวิเคราะห์ฟีโนไทป์ 63

7. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2 64

8. การทดสอบไคสแควร์ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ในประชากร F_2 66

การวิเคราะห์การถ่ายทอด 1 ยีน 66
การวิเคราะห์การถ่ายทอด 2 ยีน 67
9. การทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ด 68
10. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี ANOVA 72
10.1 การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* กับค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน 72
11. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2 75
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 77
ภาคผนวก 80
การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานิน 81
บรรณานุกรม 84
ประวัติผู้วิจัย 90

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1 รากของข้าว 5

ภาพที่ 2 ลักษณะใบของต้นข้าว 6

ภาพที่ 3 ส่วนต่าง ๆ ของดอกข้าว 8

ภาพที่ 4 ส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดข้าว 8

ภาพที่ 5 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) 10

ภาพที่ 6 โครงสร้างแอนโทไซยานิน 11

ภาพที่ 7 วิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ประกอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ 12

ภาพที่ 8 การควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน 12

ภาพที่ 9 โครงสร้างยีน *OsDFR* 14

ภาพที่ 10 โครงสร้างยีน *OsB1* 15

ภาพที่ 11 การผสมข้าว 28

ภาพที่ 12 แผนการสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2 39

ภาพที่ 13 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ 40

ภาพที่ 14 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) 41

ภาพที่ 15 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 42

ภาพที่ 16 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 43

ภาพที่ 17 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 44

ภาพที่ 18 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 45

ภาพที่ 19 แผนภาพลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* 47

ภาพที่ 20 ผลการค้นหายีน *OsB1* ในข้าว 48

ภาพที่ 21 ผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอของยีน *OsB1* ในข้าว 48

ภาพที่ 22 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* 49

ภาพที่ 23 แผนภาพลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsDFR* 51

ภาพที่ 24 ผลการค้นหาบางส่วนของยีน *OsDFR* ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ 51

ภาพที่ 25 ผลการแยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* ในข้าว 52

ภาพที่ 26 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsDFR* บริเวณ upstream ของ +1 ที่ตำแหน่ง -450 52

ภาพที่ 27 ผลการค้นหาบางส่วนของยีน *OsB1* ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ 54

ภาพที่ 28 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ 54

ภาพที่ 29 ผลการค้นหาบางส่วนของยีน *OsB1* ของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) 55

ภาพที่ 30 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* ของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) 56

ภาพที่ 31 ผลการค้นหาบางส่วนของยีน *OsB1* ของข้าวประชากร F_2 57

ภาพที่ 32 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* ของข้าวประชากร F_2 .. 58

ภาพที่ 33 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* ของข้าวประชากร F_2 .. 59

ภาพที่ 34 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ .. 60

ภาพที่ 35 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) 61

ภาพที่ 36 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ของข้าวประชากร F_2 62

ภาพที่ 37 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ของข้าวประชากร F_2 63

ภาพที่ 38 ฟีโนไทป์ของข้าว 64

ภาพที่ 39 ฮีสโทรแกรมแสดงการกระจายของปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวประชากร F_2 65

ภาพที่ 40 ลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าว 70

ภาพที่ 41 เมล็ดของประชากร F_2 ทั้งหมด 300 ต้น แสดงสีเยื่อหุ้มเมล็ดที่แตกต่างกัน 70

ภาพที่ 42 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินกับจีโนไทป์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* ที่มีจีโนไทป์แบบ AA, Aa และ aa 73

ภาพที่ 43 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินกับเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* ที่มีจีโนไทป์แบบ BB, Bb และ bb 75

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR*..... 30

ตารางที่ 2 การผลิตเมล็ดข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2 40

ตารางที่ 3 จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด 66

ตารางที่ 4 การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ในประชากร F_2..... 67

ตารางที่ 5 การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ในประชากร F_2..... 68

ตารางที่ 6 การทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 71

ตารางที่ 7 การทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 71

ตารางที่ 8 การทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 71

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* (A) กับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2 73

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* (B) กับปริมาณแอนโทไซยานิน..... 74

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ simple regression ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2 76

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ simple regression ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2..... 76

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชหลักที่สำคัญสำหรับการบริโภคของประชากรโลก ข้าวหลากสี เช่น ข้าวขาว แดง น้ำตาล เขียว และดำ ได้รับความสนใจ และมีความต้องการเพิ่มขึ้นจากผู้บริโภคทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีปริมาณแอนโทไซยานินและคุณค่าทางโภชนาการสูง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวและเพิ่มศักยภาพการแข่งขันกับต่างประเทศ นอกจากนี้ยังช่วยให้ประชากรมีสุขภาพที่สมบูรณ์แข็งแรง (รัชนี และริญ, 2553) ข้าวดำหรือมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มมีการสะสมสารแอนโทไซยานินสูงซึ่งจะเกิดขึ้นในช่วงระยะการเจริญเติบโตของเมล็ดทำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกมีสีม่วงเข้ม (Liu et al., 2013; Peng et al., 2006) แอนโทไซยานินที่พบในเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวดำเป็นสารสีธรรมชาติที่จัดอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ มี 2 ชนิด คือ cyanidin-3-O-glucoside (C3G) และ peonidin-3-glucoside (P3G) (Rahman et al., 2016) และมีคุณสมบัติทางการแพทย์รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ ลดอัตราการเสี่ยงของโรคหัวใจ และต้านมะเร็ง (Samyor et al., 2017)

การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวดำควบคุมด้วยยีนหลักที่สำคัญ 2 ยีน คือ *OsB1* และ *OsDFR* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 และ 1 ตามลำดับ ยีน *OsB1* เป็นยีนควบคุมการสร้างโปรตีน transcription factor ที่อยู่ในกลุ่ม MYC helix-loop-helix (bHLH) จากการศึกษาลำดับเบสในข้าวขาว พบว่า มีการเกิด 2-bp addition ในบริเวณ exon ที่ 7 แต่ไม่พบในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง (Sakamoto et al., 2001; Wang and Shu, 2007) มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) ของยีน *OsB1* มาใช้ในการวิเคราะห์ประชากร F_2 พบว่า ยีน *OsB1* เกี่ยวข้องกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด และใช้คัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงได้ (Wang and Shu, 2007) นอกจากนี้ยังพบ 2-bp addition ในข้าวขาวพันธุ์ Sasanishiki แต่ไม่พบในข้าวก่ำที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงของไทย (Sakulsingharoj et al., 2016) จากการศึกษาเครื่องหมาย CAPS ของยีน *OsB1* พบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวขาวและข้าวดำได้ทั้ง japonica และ indica (อนงค์นาฏ และคณะ, 2562; Lee et al.; 2018; Lim and Ha, 2013; Rahman et al.,2013)

ยีน *OsDFR* เป็นยีนโครงสร้างที่สำคัญมีรหัสสร้างเอนไซม์ dihydroflavonol-4-reductase (*DFR*) ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของข้าว ประกอบด้วย 3 exon และ 2 intron เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างข้าวขาว indica พันธุ์ Teqing กับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง

japonica พันธุ์ Murasaki พบว่า มีการเกิด 11 bp และ 17 bp addition บริเวณโปรโมเตอร์ในข้าวพันธุ์ Murasaki (Nakai et al.,1998)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบดั้งเดิมใช้เวลานาน การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยคัดเลือกจะทำให้ลดต้นทุน ลดการใช้แรงงาน ประหยัดเวลา และมีความแม่นยำ ทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอเข้ามามีบทบาทที่สำคัญมากยิ่งขึ้น (จุฑาพร, 2555) เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS และ Indel ถูกพัฒนาเพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวขาว และข้าวสีได้ (Lim and Ha, 2013; Wang and Shu, 2007) และมีการใช้เครื่องหมาย CAPS ของยีน *OsB1* มาช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและมีแอนโทไซยานินสูงโดยวิธีผสมกลับได้ (Lee et al.,2018; Rahman et al.,2013)

ข้าวขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 เป็นข้าวเจ้าพันธุ์ดีของไทย ให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพเมล็ดคล้ายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ต้านทานโรคไหม้ และขอบใบแห้ง รวมทั้งต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยกระโดดหลังขาว (กรมการข้าว, 2563) และข้าวพันธุ์ก่ำน้อยเป็นข้าวเหนียวก่ำพื้นเมืองของไทยที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง ซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดีในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (รัชนี และริญ, 2553)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* และ Indel ของยีน *OsDFR* คัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและมีแอนโทไซยานินสูง และตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากร F_2 จากคู่ผสมระหว่างข้าวขาวปทุมธานี 1 กับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อย เพื่อหาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหายีนและโคลนบางส่วนของยีน *OsDFR* หรือ *OsB1* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน
2. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนที่ยึดติดกับลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ (จีโนไทป์) และลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ด (ฟีโนไทป์)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบลำดับเบส และความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *OsDFR* หรือ *OsB1* ในข้าวขาวและข้าวม่วง
2. ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนที่ยึดติดกับลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง
3. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ด

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

ความเป็นมาของข้าว

ข้าวเป็นพืชที่สำคัญของประชากรโลก จัดเป็นอาหารหลักที่สำคัญในด้านโภชนาการ ในการให้พลังงานแก่มนุษย์ ข้าวมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Oryza sativa* เป็นพืชล้มลุกวงศ์หญ้า (annual grass) จัดอยู่ในสกุลออไรซา (Genus *Oryza*) ของวงศ์เกรมินี (Family Paoceae หรือ Gramineae) สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งเขตร้อน และเขตอบอุ่น จำนวนชนิดทั้งหมดที่พบในสกุลออไรซาของข้าวมีประมาณ 20 ชนิด โดยส่วนใหญ่จะมีจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ชุด (Diploid, 2n=2x=24) และส่วนน้อยจะมีโครโมโซม 4 ชุด (Tetraploid, 2n=4x=48) (บุญหงส์, 2557)

แบ่งข้าวออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

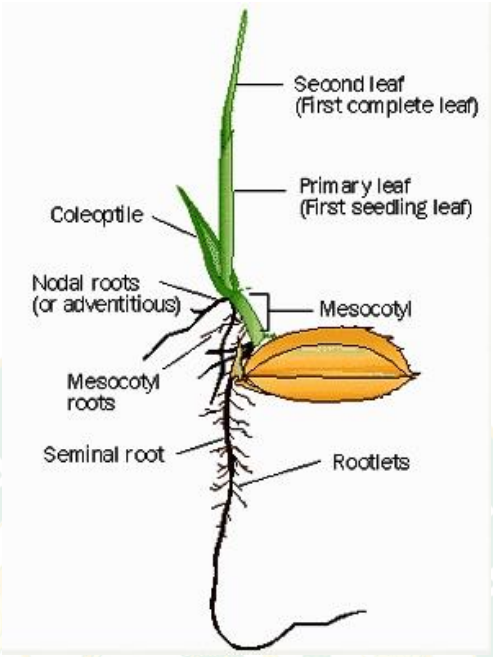
1. ข้าวอินดิกา (Indica) เป็นข้าวที่เมล็ดมีลักษณะ เรียวยาว เป็นวงรี ลำต้นสูง การตั้งชื่อได้มาจาก แหล่งที่พบครั้งแรกในประเทศอินเดีย เป็นข้าวที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชียเขตมรสุม ตั้งแต่ จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย อินเดีย ศรีลังกา และไทย
2. ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวที่เมล็ดมีลักษณะ สั้น ป้อม กลมรี เจริญได้ดีในเขตอบอุ่น เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี รัสเซีย ยุโรป และอเมริกา เป็นต้น มีการสันนิษฐานว่ามีแหล่งกำเนิดมาจากบริเวณลุ่มแม่น้ำเหลืองของประเทศจีน และตอนล่างลุ่มแม่น้ำแยงซีเกียง โดยมีการอพยพพันธุ์ข้าวจากเนปาล พม่า และอินโดจีน มาปลูกจนพันธุ์ข้าวมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม และเจริญเติบโตได้ดีในเขตอบอุ่น
3. ข้าวจาวานิกา (Javanica) เป็นข้าวที่เมล็ดมีลักษณะ ป้อม ใหญ่ สันนิษฐานว่าเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวอินดิกาและจาปอนิกา และนำเข้ามาปลูกในอินโดนีเซีย ต่อมามีการนำไปปลูกในประเทศฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และญี่ปุ่น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

การเจริญเติบโตทางลำต้น

ราก (root) เป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) ประกอบด้วยราก 2 ชนิด ได้แก่ รากปฐมภูมิ (primary root) หรือที่เรียกว่า รากแรกเกิด (seminal root) ซึ่งงอกออกมาจากส่วนของเรดิเคิล (radicle) เป็นรากชั่วคราว มีลักษณะโคนโตและปลายเรียวยาวไม่เกิน 15 เซนติเมตร ทิศทางของรากจะพุ่งสู่ใต้ดินในแนวดิ่ง ทำหน้าที่รองรับส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าวให้ทรงตัวอยู่ได้และรากทุติยภูมิ (secondary root) หรือที่เรียกว่า รากเสริม (adventitious root) รากชนิดนี้จะงอกออกมา

จากส่วนของข้อล่าง ๆ ใต้ดินของลำต้นใหม่ในทิศทางขนานกับผิวดินและมีการแตกแขนงของรากอย่างอิสระ เป็นรากที่เกิดขึ้นเพื่อทดแทนรากแรกเกิดเมื่อต้นข้าวเจริญเติบโตและมีอายุมากขึ้น (ภาพที่ 1)



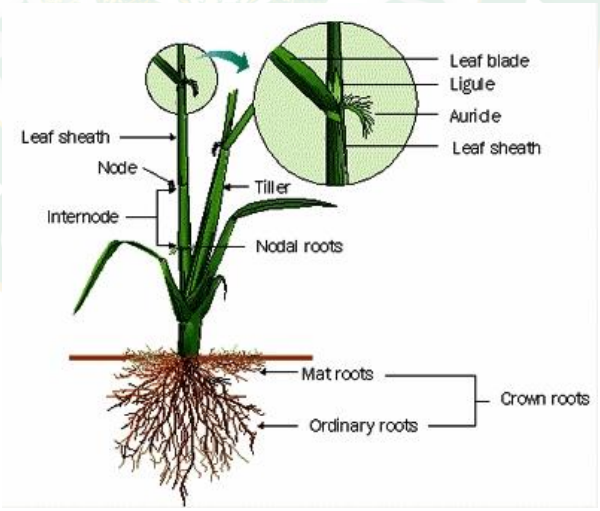
ภาพที่ 1 รากของข้าว

ที่มา: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2561)

ลำต้น (stem or culm) ลำต้นของข้าวมีลักษณะทรงกลม ส่วนกลางกลวงตรงส่วนของปล้อง (internode) และต้นตรงส่วนของข้อ (node) โดยทั่วไปลำต้นจะตั้งตรง ลำต้นข้าวอาจมีลักษณะเลื้อยหรือล้มราบโดยชูเฉพาะส่วนของยอดขึ้นตั้งตรง ในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative growth) ของข้าว อาจมองเห็นลำต้นไม่ชัดเจน เนื่องจากมีส่วนของกาบใบ (leaf sheath) หุ้มไว้ ลักษณะของปล้องที่โคนต้นจะสั้น และมีเนื้อหนากว่าปล้องที่อยู่ตรงส่วนปลายของลำต้น โดยปกติต้นข้าวจะมีปล้องประมาณ 25-30 ปล้อง ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวและสภาพแวดล้อม ปล้องสุดท้ายที่อยู่บนสุดใต้รวงจะมีความยาวมากที่สุด ส่วนข้อ (node) ของลำต้นทำหน้าที่แบ่งลำต้นออกเป็นปล้อง ๆ จะมีตา (bud) เกิดขึ้นข้อละ 1 ตา ที่บริเวณซอกใบของแต่ละใบซึ่งเกิดขึ้นสลับกันในแต่ละข้อของลำต้น ความสูงของลำต้นอาจอยู่ระหว่าง 100-200 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อม

ใบ (leaf) ข้าวจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีลักษณะเป็นแผ่นแบนบางค่อนข้างยาวรูป

หอก ใบข้าวประกอบด้วยตัวใบ (leaf blade) และกาบใบ (leaf sheath) โดยมีข้อต่อใบ (leaf collar) เป็นตัวแบ่งให้กาบใบแยกออกจากตัวใบ ตัวใบจะยื่นออกจากลำต้นโดยทำมุมกว้างหรือแคบกับลำต้น ขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ข้าว เส้นใบของข้าวจะขนานกันตั้งแต่โคนถึงปลายใบ และมีเส้นกลางใบ (midrib) แบ่งออกเป็น 2 ซีกเท่า ๆ กัน พันธุ์ข้าวส่วนใหญ่มีขนอ่อน (pubescence) บนใบ กาบใบทำหน้าที่ลำเลียงน้ำและแร่ธาตุจากรากและลำต้นไปยังตัวใบเพื่อใช้สังเคราะห์แสง ยังช่วยสะสมอาหารไว้สำหรับรวงข้าว และช่วยเสริมให้ลำต้นแข็งแรงอีกด้วย ตรงบริเวณด้านในข้อต่อใบจะปรากฏเยื่ออ่อนบาง ๆ รูปสามเหลี่ยมมีปลายแยก 2 แฉก แนบติดกับส่วนของลำต้น เรียกว่า เยื่อกันน้ำฝน (ligule) บริเวณนี้ยังมีเขี้ยวกันแมลง (auricles) 2 อัน มีลักษณะโค้งคล้ายเคียวติดอยู่ข้างละอันของข้อต่อใบ จุดนี้ทำให้ข้าวแตกต่างจากต้นหญ้า นอกจากใบปกติแล้วยังมีใบรูปร่างลักษณะพิเศษต่างกันคือ ใบแรกเกิด (primary leaf หรือ prophylum) เจริญออกมาเป็นใบแรกตอนต้นข้าวเริ่มงอก และใบธง (flag leaf) มีขนาดสั้นกว่าและอยู่ในตำแหน่งที่ตั้งตรงกว่าใบอื่น ๆ ของต้นข้าว ใบธงจะเกิดขึ้นที่ส่วนบนสุดของต้นข้าว โดยกาบใบธงหุ้มรวงข้าวอ่อนไว้ก่อนออกรวงบริเวณใต้รวงข้าวใบธงมีความสำคัญมากในการสังเคราะห์แสงในระยะที่ข้าวสร้างรวง ทั้งนี้เพราะใบอื่นเริ่มแก่และขาดประสิทธิภาพในสังเคราะห์แสงแล้ว (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลักษณะใบของต้นข้าว

ที่มา: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2561)

การเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์

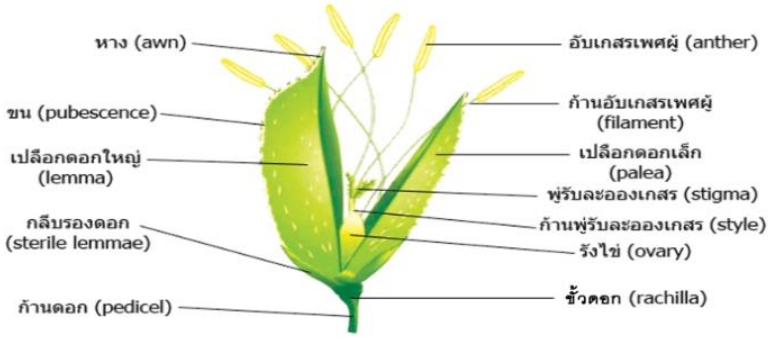
ช่อดอกหรือรวงข้าว (inflorescence หรือ panicle) ช่อดอกหรือรวงข้าวหลาย ๆ

ดอกที่รวมกันเป็นช่อโดยติดอยู่บนระแง้ (rachis) หรือแขนง (branches) ที่แตกออกไปจากแกนกลาง (main axis) ของช่อดอก เมื่อมีการผสมพันธุ์ในดอกข้าวระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศผู้และเพศเมียจะมีการพัฒนาเกิดขึ้นเป็นเมล็ดภายในแต่ละดอก (ภาพที่ 3)

ดอกข้าว (spikelet) ประกอบด้วยกลีบดอกใหญ่ (lemma) และกลีบดอกเล็ก (palea) 2 เปลือกประกบกัน ที่ผิวกลีบดอกทั้ง 2 ชนิดอาจมีขนหรือไม่มีขนก็ได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าในพันธุ์ข้าวที่ไม่มีขนใบก็จะไม่มีขนบนเปลือกด้วย ที่ปลายสุดของกลีบดอกใหญ่มีลักษณะแหลมยื่นออกมาเรียกว่า หาง (awn) ส่วนของกลีบดอกใหญ่และกลีบดอกเล็กจะประสานกันตรงเฉพาะส่วนของฐานซึ่งติดอยู่กับก้านสั้น ๆ เรียกว่า ขั้วดอก (rachilla) โดยมีแผ่นบาง ๆ 2 แผ่นที่เรียกว่า เยื่อรองรังไข่ (lodicules) อยู่บนขั้วดอกเพื่อทำหน้าที่บังคับให้กลีบดอกทั้ง 2 ชนิดปิดหรือเปิดได้ ที่ฐานของขั้วดอกจะมีเปลือกบาง ๆ ค่อนข้างยาว 2 แผ่นซึ่งมีขนาดเล็กกว่ากลีบเปลือกทั้ง 2 ชนิด เรียกว่า กลีบรองดอก (sterile lemmas) ทำหน้าที่รองรับฐานของกลีบดอกทั้งสองไว้โดยมีกลีบฝ่อ (rudimentary glumes) มีลักษณะเป็นปุ่มเล็ก ๆ 2 ปุ่ม อยู่ตรงข้ามกับฐานรองดอกอีกชั้นหนึ่ง ส่วนที่ยืดระหว่างกลีบฝ่อและระแง้ที่สองและสาม เรียกว่าก้านดอกย่อย (pedicel) ซึ่งจะรองรับดอกแต่ละดอกไว้ (ภาพที่ 3)

เกสรเพศผู้ (stamen) และเกสรเพศเมีย (pistil) จะอยู่ภายในดอกข้าวโดยมีกลีบดอกใหญ่และเล็กหุ้มไว้ในแต่ละดอกจะมีเกสรเพศผู้จำนวน 6 อัน ส่วนบนสุดของเกสรเพศผู้จะเป็น กะเปาะสีเหลืองเรียกว่า อับเรณู (anther) ภายในมีละอองเกสร (pollen grains) ขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก อับเรณูจะติดอยู่บนก้านเกสรเพศผู้ (Filament) และเชื่อมติดอยู่กับฐานดอก ส่วนเกสรเพศเมียจะอยู่ใกล้กับฐานดอกด้านใน ประกอบด้วย ยอดเกสรเพศเมีย (stigma) ซึ่งอยู่ส่วนบนมีลักษณะคล้ายรังนกขนาดเล็กจำนวน 2 อัน ทำหน้าที่รองรับละอองเกสรเพศผู้ และตั้งอยู่บนก้านเกสรเพศเมีย (style) ซึ่งเชื่อมติดอยู่กับรังไข่ (ovary) ภายในรังไข่จะมีไข่ (ovule) เมื่อได้รับการผสมจากละอองเกสรเพศผู้จะกลายเป็นเมล็ด (ภาพที่ 3)

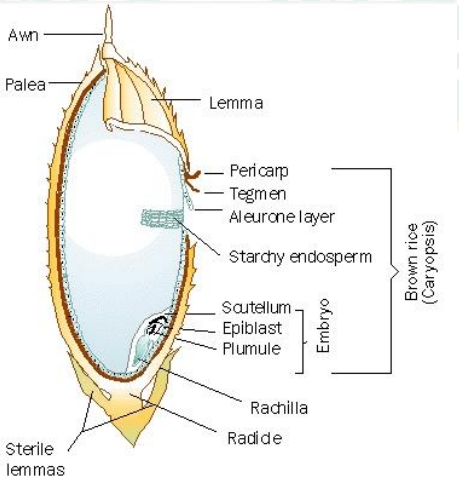
เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ภายในดอกเดียวกัน จัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) ที่มีการผสมตัวเอง (self pollination) เป็นส่วนใหญ่ มีการผสมข้าม (cross pollination) ตามธรรมชาติน้อยมาก 0.5-5% เท่านั้น (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ส่วนต่าง ๆ ของดอกข้าว

ที่มา: กรมการข้าว (2561)

เมล็ด (seed) เมล็ดข้าวหรือข้าวกล้องประกอบด้วยส่วนที่เป็นแป้ง (endosperm) และคัพภะ ซึ่งถูกหุ้มไว้ด้วยเยื่อหุ้มเมล็ดชั้นนอก (pericarp) เยื่อหุ้มชั้นกลาง (seed coat and nucellus) และเยื่อหุ้มชั้นใน (aleurone layer) เมล็ดข้าวจะถูกพัฒนาขึ้นมาหลังจากการผสมพันธุ์ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย โดยที่รังไข่จะกลายไปเป็นแป้งและส่วนของไข่ก็กลายไปเป็นคัพภะ เรียกส่วนของเมล็ดข้าวที่ถูกหุ้มด้วยกลีบดอกใหญ่และกลีบดอกเล็กว่า เมล็ดข้าวเปลือก (paddy) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดข้าว

ที่มา: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2561)

คุณค่าทางโภชนาการของข้าวสี

ข้าวส่วนใหญ่ที่พบทั่วไปจะประกอบด้วย 3 สี คือ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว แดง และดำ ปัจจุบันผู้บริโภคนิยมรับประทานข้าวสีเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะข้าวที่มีสีม่วงเข้ม และพบว่าข้าวสีต่าง ๆ เป็นแหล่งที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในธรรมชาติเช่น วิตามินอี เบต้าแคโรทีน ลูทีน และสารประกอบโพลีฟีโนลิค (รัชนี และริญ, 2553)

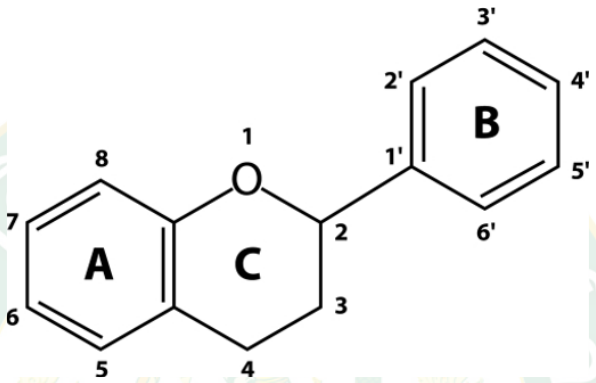
ในข้าวสีต่าง ๆ ข้าวดำมีลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มและมีปริมาณแอนโทไซยานินสูง ในระหว่างการพัฒนาของเมล็ด เยื่อหุ้มเมล็ดมีการสะสมแอนโทไซยานินได้เร็ว ทำให้ข้าวดำมีสีเมล็ดสีม่วงเข้ม (Abdel-Aal et al., 2006; Reddy et al., 1995; Shao et al., 2011) ในการที่ข้าวมีเมล็ดสีม่วงนั้นจะต้องมีการทำงานร่วมกันของทั้ง 2 ยีน คือ *OsDFR (Pp)* และ *OsB1* (*Pb*) จะทำให้เมล็ดข้าวมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง (Rahman et al., 2013) ซึ่งรงควัตถุที่เกิดขึ้นเกิดจากวิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานินมีบทบาทสำคัญ ช่วยดูดซับอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็นตัวต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะกระบวนการออกซิเดชัน ช่วยลดความเสี่ยงจากโรคมะเร็ง และโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553) ประโยชน์ของข้าวสีที่กล่าวมานี้ ทำให้ปัจจุบันมีนักวิจัยศึกษาเกี่ยวกับข้าวที่สร้างรงควัตถุเหล่านี้เป็นจำนวนมาก เนื่องจากมีประโยชน์ต่อผู้บริโภค

ฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid compounds) เป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (phenylbenzo-pyrones) มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีโครงสร้างประกอบด้วยการจัดเรียงตัวของคาร์บอน 15 ตัว C6-C3-C6 เป็นวงแหวน 3 วง ได้แก่ benzene ring 2 วง (A และ B) (ภาพที่ 5) เชื่อมอยู่กับ heterocyclic pyran ring ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง C^8 (วิภพ, 2556) สามารถแบ่งกลุ่มย่อยตามตำแหน่งหมู่ฟังก์ชันได้เป็น 7 กลุ่ม ดังนี้

- ฟลาโวนอล (Flavonols) เช่น quercetin, kaempferol และ myricetin
- ฟลาโวน (Flavones) เช่น agipenin, luteolin และ chrysin
- ฟลาวาโนน (Flavanones) เช่น hesperetin, naringenin และ eriodoctyol
- ฟลาวานอล (Flavanols) เช่น catechin, gallocatechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin-3-gallate และ epigallocatechin-3-gallate

- ฟลาวาโนนอล (Flavanonols) เช่น taxifolin
- ไอโซฟลาโวน (Isoflavones) เช่น daidzein, genistein, glycitein และ formononetindin
- แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เช่น cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin และ petunidin



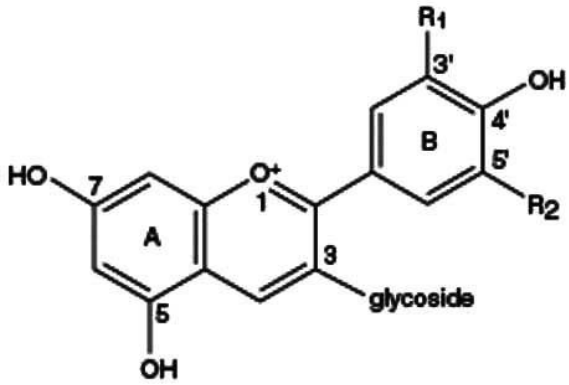
ภาพที่ 5 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ที่มา: วิภพ สุทธนะ (2556)

แอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุหรือสารสี (pigment) ที่ให้สีแดง ม่วง และน้ำเงิน ใช้เป็นสารให้สีธรรมชาติในการสกัดสารแอนโทไซยานินซึ่งมีสมบัติเป็นโภชนเภสัช เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ ช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ และเส้นเลือดอุดตันในสมอง ชะลอความเสื่อมของดวงตา ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคอีโคไล (*Escherichia coli*) ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ท้องร่วงและอาหารเป็นพิษ

แอนโทไซยานินจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างเป็นแบบ C6-C3-C6 ซึ่งเป็นไกลโคไซด์ (Glycoside) ของ 2-phenylbenzopyrylium หรือ flavylium cation (ภาพที่ 6) แอนโทไซยานินสามารถเกิดได้ 20 ชนิด แต่พบบ่อยในพืชมี 6 ชนิด คือ pelargonidin (Pg) 18%, cyanidin (Cy) 30%, delphinidin (Dp) 22%, peonidin (Pn), petunidin (Pt) และ malvidin (Mv) 20% (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553)



ภาพที่ 6 โครงสร้างแอนโทไซยานิน

ที่มา: อรุษา เชาวนลิขิต (2554)

วิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

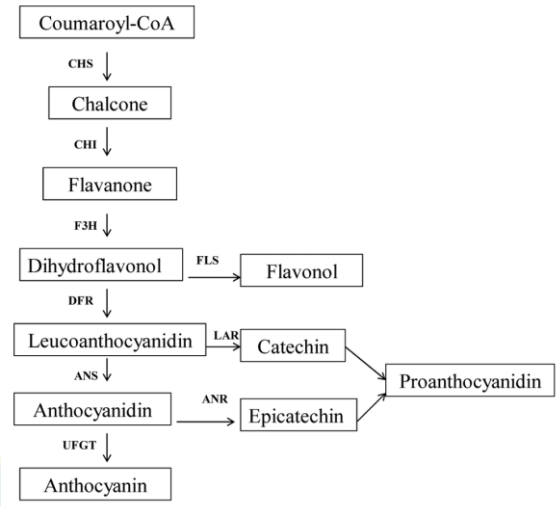
การสังเคราะห์แอนโทไซยานินมีขั้นตอนการสังเคราะห์อยู่ในช่วงต้นและกลางของวิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ ขั้นตอนในการสังเคราะห์เร่งโดยเอนไซม์ chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI) และ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ซึ่ง anthocyanidin จะได้จากการสังเคราะห์ของ anthocyanidin synthase (ANS) และ UDP-glucose flavonoid 3-o-glucosyl transferase (UFGT) (ภาพที่ 7) (Chen et al., 2013) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน แบ่งเป็น 2 ประเภท (ภาพที่ 8) คือ

1. ยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินมีรหัสสร้างเอนไซม์ที่สำคัญ คือ chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavanone-3 -hydroxylase (F3 H), flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) flavonoid-3', 5'-hydroxylase (F3'5'H), dihydroflavonol-4-reductase (DFR), anthocyanidin synthase (ANS) และ flavonoid-3 -O-glucosyl transtransferase (UFGT)

2. ยีนควบคุมเป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง มีรหัสสร้างโปรตีน transcription factor แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

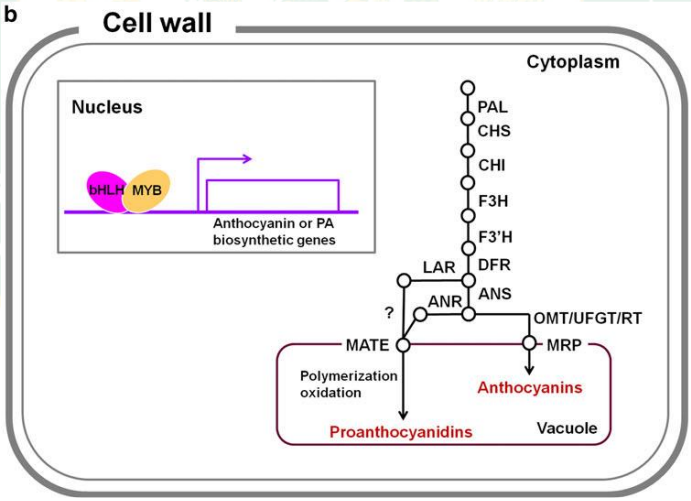
2.1 กลุ่ม MYC (Basic-helix-loop-helix) จัดอยู่ใน R/B gene family เช่น *OsB1* และ *OsB2* (Sakamoto et al., 2001)

2.2 กลุ่ม MYB จัดอยู่ใน C1/P1 gene family เช่น *OsC1* (Saitoh et al., 2004)



ภาพที่ 7 วิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ประกอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ

ที่มา: Chen et al. (2013)



ภาพที่ 8 การควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

ที่มา: Lim and Ha, (2013)

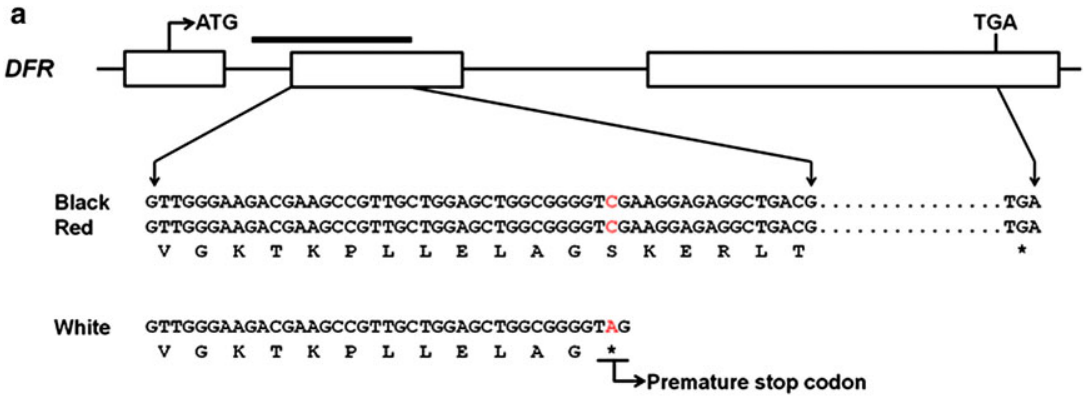
ยีนโครงสร้าง

การสังเคราะห์แอนโทไซยานินเกี่ยวข้องกับยีนโครงสร้างหลายยีน เพื่อเปลี่ยนกรดอะมิโน ฟีนิลอะลานีนไปเป็นแอนโทไซยานิน ยีนโครงสร้างที่สำคัญมีรหัสสร้างเอนไซม์ ได้แก่ chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavanone-3-hydroxylase (F3H), flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) flavonoid-3', 5'-hydroxylase (F3'5'H), dihydroflavonol-4-reductase (DFR), anthocyanidin synthase (ANS) และ flavonoid-3-O-glucosyl transtransferase (UFGT) โดยขั้นแรกในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน คือ การควบแน่นของโมเลกุล malonyl-CoA และ p-coumaroyl-CoA โดยการทำงานของเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) เร่งให้ปฏิกิริยา 3 โมเลกุลของ malonyl-CoA ทำงานร่วมกับ p-coumaroyl-CoA เพื่อสร้าง nardenin chalcone ในข้าว จากนั้นทำการเปลี่ยนโครงสร้าง nardenin chalcone ไปอยู่ในรูป flavanone naringenin และเอนไซม์ flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) เร่งปฏิกิริยาโดยการเติมหมู่ OH ที่ตำแหน่ง C-3 ได้เป็น dihydrokaempferol (DHK) จากนั้นเอนไซม์ flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ OH ที่ตำแหน่ง 3' ทำให้เปลี่ยน dihydrokaempferol (DHK) เป็น dihydroquerectin (DHQ) ที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็น cyaniding และเปลี่ยนรูป DHK ไปเป็น dihydromyricetin (DHM) สำหรับการสร้าง delphinidin จากเอนไซม์ dihydroflavonol-4- reductase (DFR) เร่งปฏิกิริยา reduction โดยเปลี่ยน dihydroflavonoid ได้เป็น leucoanthocyanidin โดย anthocyanidin synthase (ANS) เปลี่ยน leucoanthocyanidins ไปเป็น anthocyanidins และเอนไซม์ flavonoid 3-glucosyl – transferase (3GT/FGT/GT) เร่งปฏิกิริยาการขนส่งกลูโคสจาก UDP-glucose ไปยัง hydroxyl group ในตำแหน่งที่ 3 ของ C-ring ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายที่ทำให้การสังเคราะห์แอนโทไซยานินมีความเสถียร ซึ่ง 3GT เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Schijlen et al., 2004)

ยีนโครงสร้างที่สำคัญในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว คือ ยีน *OsDFR* เป็นกลุ่มของยีนโครงสร้างตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ของข้าว ประกอบด้วย 3 เอกซอน และ 2 อินทรอน (Nakai et al., 1998) ในเมล็ดข้าวขาวยีน *OsDFR* มีการแทนที่เบสจาก C ไปเป็น A ในเอกซอนที่ 2 ทำให้เกิด premature stop codon ซึ่งการกลายพันธุ์นี้อาจส่งผลทำให้เมล็ดข้าวขาวไม่สามารถสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้ (Furukawa et al., 2007)

จากการศึกษาของ Lim and Ha (2013) ที่ได้ทำการศึกษายีน *OsDFR* ในข้าวทั้งหมด 34 สายพันธุ์ พบว่าใน เอกซอนที่ 2 เกิดการแทนที่ของลำดับเบสโดยในข้าวสีจะพบเบส C เฉพาะข้าวขาวเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนไปเป็นเบส A ทำให้เกิด premature stop codon (ภาพที่ 9) จึงทำให้ยีน *OsDFR* ในข้าวขาวสังเคราะห์โปรตีนที่ไม่สมบูรณ์ จึงไม่เกิดสีในเยื่อหุ้มเมล็ด

จากการศึกษาของ Rahman et al. (2013) พบว่า การเกิดสีม่วงในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวจะต้องอาศัยการทำหน้าที่ร่วมกันระหว่างยีน *OsDFR* และ *OsB1* ช่วยส่งเสริมกันในการแสดงออกของเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง หากขาดยีนใดยีนหนึ่งจะทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดไม่เกิดสีม่วง



ภาพที่ 9 โครงสร้างยีน *OsDFR*

ที่มา: Lim and Ha, (2013)

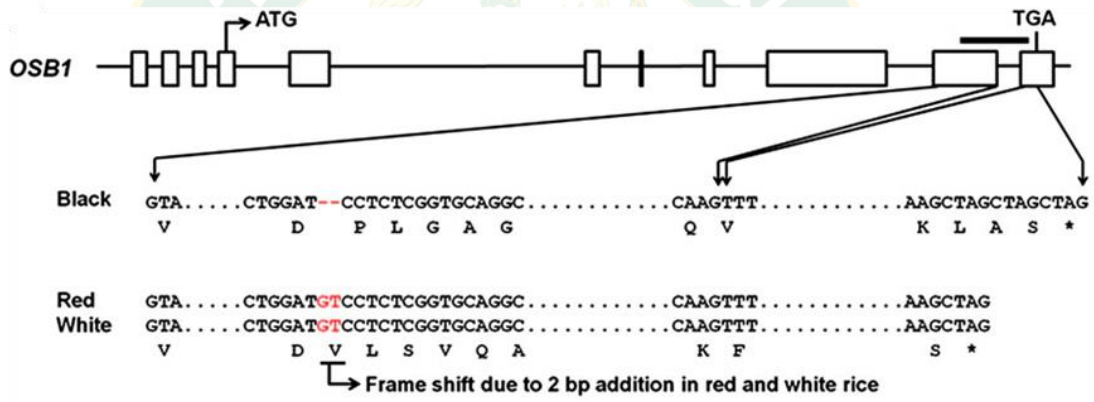
ยีนควบคุม

ยีนควบคุมมีอิทธิพลต่อการสะสมของแอนโทไซยานินและการแสดงออกที่แตกต่างกันของกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่สำคัญมี 2 กลุ่ม คือ *R/B* และ *C1/Pl* gene family กลุ่มของ *R/B* gene family เป็นรหัสของ basic helix-loop-helix (bHLH) MYC transcription factor (Lim and Ha, 2013) และ *C1/Pl* gene family เป็นรหัสของ MYB type transcription factor

ในข้าวมีการกำหนดให้ *R/B* gene ระบุว่าเป็นยีน *Ra/Rb* gene หรือ *OsB1/OsB2* gene เป็นรหัสของ basic helix-loop-helix (bHLH) MYC transcription factor (Hu et al., 1996; Sakamoto et al., 2001) ในข้าวโพดมียีนควบคุม 2 กลุ่มคือ *R/B* และ *C1/Pl* gene family ในกลุ่มของ *R/B* gene family (*R*, *Lc*, *Sn* และ *B*) เป็นรหัสของ basic helix-loop-helix (bHLH) MYC-type protein ส่วนในกลุ่มของ *C1/Pl* gene family เป็นรหัสของ MYB type protein การกระตุ้นยีนโครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับการทำงานของยีนในกลุ่ม *C1/Pl* อย่างน้อยหนึ่งยีนทำหน้าที่ในการสังเคราะห์รงควัตถุในเนื้อเยื่อพืช (Sakamoto et al., 2001)

จากการศึกษาของ Sakulsingharoj et al., (2016) พบว่า ในยีน *OsB1* ซึ่งเป็นกลุ่ม MYC helix-loop-helix (bHLH) ในข้าวขาวมีการเกิด 2-bp insertion ในเอกซอนที่ 7 ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟท์ และยีน *OsB1* ในข้าวสีดำมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

ยีน *OsB1* จากข้าวแดงและข้าวขาว แตกต่างจากข้าวดำ คือ ยีนในข้าวแดงและขาวเกิดการแทนที่ของ ACG codon ไปเป็น ATG โดยเบส C เปลี่ยนเป็นเบส T ที่ตำแหน่ง 191 การเพิ่มของลำดับเบส TG ที่ตำแหน่ง 1,632 และเกิดการขาดหายไปหนึ่งเบสที่ตำแหน่ง 1,721 ทำให้เกิด premature stop codon จึงทำให้กรดอะมิโนหายไป 12 ตัว ที่ C-terminus เป็นบริเวณ DNA binding domain ทำให้ยีน *OsB1* ไม่ทำหน้าที่ในข้าวขาวและข้าวแดง (ภาพที่ 10) (Lim and Ha, 2013)



ภาพที่ 10 โครงสร้างยีน *OsB1*

ที่มา: Lim and Ha, (2013)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers) คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่นำมาใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา อาจมีตำแหน่งบนโครโมโซมในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) ที่มีลำดับเบสแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) จึงสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (สุรีพร, 2546) ดังต่อไปนี้

1. Hybridization based marker เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP) มีคุณสมบัติเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วม เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ความแตกต่างของจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) (สุชาดา, 2553) สิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน จะมีลำดับเบสที่แตกต่างกัน ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ หรือเกิดจากสภาพแวดล้องและอาจเกิดจากข้อผิดพลาดของเซลล์ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสได้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้เกิดความแตกต่างส่งผลให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะเปลี่ยนแปลงไป เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาดและจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแตกต่างกัน เรียกว่า เกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ทำให้ตรวจสอบพบความแตกต่างของสายพันธุ์พืชได้ ลักษณะเด่นของเครื่องหมายอาร์เอฟแอลพีสามารถแยกความแตกต่างที่ดีเอ็นเอได้โดยตรง ดังนั้นจึงไม่มีอิทธิพลสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ผลที่ได้จึงมีความแม่นยำและสามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม และยังมีข้อจำกัดคือ ขั้นตอนซับซ้อน ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูง (สุรีพร, 2546)

2. PCR based marker เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction (PCR) technique) นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช (สุชาดา, 2553; สุรีพร, 2546) เช่นการตรวจสอบเกิดการแทนที่ (substitution) หรือการขาดหายไป (deletion) ของลำดับเบส เรียกว่า indel (insertion หรือ deletion) หรือการตรวจ single nucleotide polymorphism (SNPs) เป็นต้น (อารีย์รัตน์, 2564) สำหรับเทคนิคที่อาศัยหลักการพีซีอาร์มีหลายวิธีดังต่อไปนี้

2.1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสและถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มสมบูรณ์ (complete dominance)

เครื่องหมายอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สร้างจากจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ปฏิกิริยาใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) ขนาดไพรเมอร์สั้นประมาณ 10 เบส และใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ต่ำ ดังนั้นไพรเมอร์เหล่านี้จึงสามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอของพืชโดยสุ่มได้หลายตำแหน่งและไม่จำเพาะในจีโนม ซึ่งเครื่องหมายชนิดนี้ไม่เจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนโครโมโซมของพืชที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้นจึงไม่เฉพาะเจาะจงที่ตำแหน่งยีน และความแตกต่างหรือ

โพลีมอร์ฟิซึม เกิดขึ้นระหว่างจีโนมิกดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างเหล่านั้นมีจีโนไทป์ต่างกัน เครื่องหมายดีเอ็นนี้ถูกนำมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีวิธีดำเนินการไม่ยุ่งยาก ซับซ่อน ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ แต่มีข้อจำกัดในการทำซ้ำ ผลที่ได้แตกต่างจากเดิม เนื่องจากมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย

เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphisms, AFLP) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาโดย Zabeau และ Vos (Vos et al., 1995) ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ตรวจสอบความแตกต่างของขนาดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส พบแถบดีเอ็นเอขนาดต่างกันจำนวนมาก มีลักษณะเด่น คือ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน ใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาจำนวนน้อย การตรวจสอบซ้ำให้ผลเหมือนเดิม จึงถูกนำมาใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การบ่งชี้ลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ อย่างไรก็ตามค่าใช้จ่ายในการดำเนินการค่อนข้างสูง

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสและถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วม (codominant)

เครื่องหมาย cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) หรือ PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) เป็นเครื่องหมายที่วิเคราะห์ความแตกต่างของจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์ เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดีเอ็นเอจะถูกย่อยเป็นชิ้น จากนั้นวิเคราะห์ด้วยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส

เครื่องหมาย single strand conformational polymorphism (SSCP) เป็นเครื่องหมายที่วิเคราะห์คอนฟอร์เมชันของดีเอ็นเอสายเดี่ยว ใช้ตรวจความแตกต่างของเบสตัวใดตัวหนึ่งในชิ้นดีเอ็นเอ ขนาดที่เหมาะสมของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการวิเคราะห์อยู่ประมาณ 200 คู่เบส ตรวจสอบโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วทำให้ชิ้นดีเอ็นเอเสียสภาพกลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วยความร้อน นำไปลดอุณหภูมิให้ต่ำลงอย่างรวดเร็ว ดีเอ็นเอสายเดี่ยวในสภาพธรรมชาติ จะขดจับกันตามเบสคู่สมภายในสายของตัวเองเกิดโครงรูป (conformation) ที่จำเพาะมีผลต่อการเคลื่อนที่บนเจลพอลิอะคริลาไมด์อิเล็กโทรโฟรีซีสชนิดเจลไม่เสียสภาพ

เครื่องหมาย single nucleotide polymorphism (SNP) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ความแตกต่างของเบสหนึ่งตำแหน่ง อาศัยการกลายเฉพาะจุด ณ จุดใด

จุดหนึ่งภายในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำได้โดยการหาลำดับเบส แล้วเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน

2.3 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนลำดับเบสซ้ำและถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วม

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ (SSR marker) เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำแบบต่อเนื่อง ความยาวของเบสซ้ำ 1-6 เบส การตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จะใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลท์ เช่น $(C)_{10}$ หรือ $(CAG)_5$ โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวเท่านั้น และเนื่องจากลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์กระจายทั่วจีโนม ไพรเมอร์ข้างเดียวจึงสามารถจับกับ ดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งและทั้งสองทิศทาง ถ้าไพรเมอร์ปลาย 3' เข้าหากันและอยู่ตำแหน่งไม่ไกลกันจะเกิดผลผลิตพีซีอาร์ได้ ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจะแสดงถึงเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เพราะจำนวนชุดซ้ำที่มีไมโครแซทเทลไลท์แตกต่างกัน การตรวจสอบวิธีนี้จึงไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสมาก่อน ลักษณะเด่นของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ คือ มีหลาย อัลลีลในโลกัสทำให้ตรวจสอบความแตกต่างได้มากกว่าเครื่องหมายอื่น ๆ พบได้มากและครอบคลุมทั้งจีโนม จึงถูกนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืช หรือประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่ข้อจำกัดที่สำคัญคือ การพัฒนาหรือสร้างไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์นั้น มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงมาก

2.4 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนลำดับเบสซ้ำและถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มสมบูรณ์

เครื่องหมายชนิดมินิแซทเทลไลท์ (minisatellite) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สร้างโดยอาศัยคุณสมบัติของดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำแบบต่อเนื่องตั้งแต่ซ้ำไม่กี่ชุดจนถึงหลายกิโลเบส โดยมีความยาวเบสซ้ำ 10-60 เบส วิธีการตรวจคล้ายกับวิธีการของไมโครแซทเทลไลท์ต่างกันที่จำนวนซ้ำและความยาวของหน่วยซ้ำ

เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นลำดับเบสของดีเอ็นเอ โดยใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ และมีประโยชน์ทางด้านการเกษตร โดยนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ที่เรียกว่า การคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (marker assisted selection, MAS) (จีราพร และคณะ, 2563) เพื่อเลือกต้นที่

มีจีโนไทป์ที่ต้องการ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาใช้ช่วยคัดเลือก จำแนกได้ 2 แบบ คือ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนเป้าหมายในการคัดเลือก (indirect MAS; iMAS) และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน (direct MAS; dMAS หรือ functional marker assisted selection; fMAS) เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด fMAS มีความแม่นยำในการคัดเลือกมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด iMAS เนื่องจากเป็นการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากส่วนของยีนที่ทำหน้าที่กำหนดรหัสพันธุกรรมซึ่งควบคุมการทำงานของยีนที่ต้องการ การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือก เพิ่มความแม่นยำและร่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พืช (จันทร์จิรา และคณะ, 2557) และการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (MAS) ไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม และสามารถคัดเลือกพืชได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากมีเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) และแผนที่ยีน (genetic map) จึงทำให้การคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (marker assisted selection, MAS) มีความเป็นไปได้ที่จะควบคุมยีนที่สำคัญ ตลอดจนลักษณะเชิงปริมาณ (Francia et al., 2005)

ข้อดีของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์

เครื่องหมายดีเอ็นเอถูกนำมาใช้อย่างหลากหลายในการบ่งชี้ความแตกต่างหรือความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative traits) หรือลักษณะเชิงคุณภาพ (qualitative traits) เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้อย่างถูกต้องและแม่นยำกว่าการใช้ลักษณะรูปร่างสัณฐานของพืช ข้อดีที่นำมาใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์มี ดังต่อไปนี้

1. มีความเที่ยงตรง (accurate) เป็นเครื่องมือช่วยคัดเลือกจีโนไทป์ที่ต้องการจากพืชได้โดยตรง จึงมีความถูกต้องและแม่นยำสูงกว่าการคัดเลือกจากลักษณะฟีโนไทป์ซึ่งผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม
2. มีจำนวนเครื่องหมายในปริมาณมาก (abundance) โดยเครื่องหมายจะถูกพัฒนาจากดีเอ็นเอโดยตรง ต่างจากเครื่องหมายโปรตีนที่พัฒนาจากผลผลิตที่ยีนแสดงออก
3. ผลการวิเคราะห์คงที่ (constant nature) สามารถทำได้ทุกช่วงเวลาของการเจริญเติบโตของพืชและสามารถใช้ส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชมาทำการตรวจสอบ เนื่องจากดีเอ็นเอไม่มีการเปลี่ยนแปลงไม่ว่าจะวิเคราะห์ในระยะใดของการเจริญเติบโต จึงย่นระยะเวลาในการคัดเลือกสะดวกต่อการปรับปรับพันธุ์

4. ไม่ทำลายต้นพืช (no effect on organisms) การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยคัดเลือก สามารถนำชิ้นส่วนของพืชเพียงเล็กน้อยมาตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยต้นพืชสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

5. การถ่ายทอดยีนแบบลักษณะข่มร่วม (co-dominant manner) เครื่องหมายดีเอ็นเอบางชนิด เช่น อาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) และเอสเอสอาร์ (SSR marker) สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous genotype) และเฮทเทอโรไซกัส (heterozygous genotype) ได้ แต่เครื่องหมายบางชนิดเช่น อาร์เอพีดี (RAPD marker) ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous genotype) และเฮทเทอโรไซกัส (heterozygous genotype) ได้

6. สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้หลายลักษณะตั้งแต่ในระยะต้นกล้า ทำให้ประหยัดพื้นที่ปลูก เวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายอื่น ๆ

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS สามารถนำมาใช้ได้หลากหลายรูปแบบด้านชีววิทยาพืช มีการพัฒนาขึ้นสำหรับศึกษาพันธุกรรมพืช และการปรับปรุงพันธุ์ จากการศึกษาเครื่องหมายชนิด CAPS ที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในพืช เช่น คุณภาพของเมล็ด ความต้านทานโรค เป็นต้น มักนำมาใช้ในการทำแผนที่พันธุกรรมและการทำแผนที่ยีน เครื่องหมาย CAPS ถูกนำมาใช้วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต จึงสามารถใช้ CAPS ได้อย่างมีประสิทธิภาพสำหรับการศึกษาพันธุกรรมระดับโมเลกุลและการปรับปรุงพันธุ์พืช (Shavrukov, 2016)

จากการศึกษาของ Oshima et al. (2019) ที่ได้พัฒนาเครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินบริเวณกาบใบของข้าว โดยทำการถ่ายยีน *DFR* และ *C1/MYB* โดยใช้โปรโมเตอร์ 35S และถ่ายยีน *OsB2/bHLH* โดยใช้โปรโมเตอร์ที่จำเพาะกับบริเวณกาบใบ เข้าไปในข้าวพันธุ์ japonica และ indica แสดงให้เห็นว่า การสร้างแอนโทไซยานินจำเป็นต้องมีทั้ง 3 ยีน คือ ยีนควบคุมกลุ่ม MYB และ MYC (bHLH) และยีนโครงสร้าง คือ ยีน *OsDFR* สำหรับการสร้างเม็ดสีแอนโทไซยานินในข้าว

จากการศึกษาแผนที่ของยีน *Pb* (*OsB1*) ในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวขาวพันธุ์ Pei'al64S กับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ Yunanheixiannuo และคู่ผสม Pei'ai 64S กับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ Chuanheinuo โดยพัฒนาเครื่องหมายชนิด indel และ CAPS ใช้ในการศึกษานี้

พบว่า ลำดับเบสของยีน *OsB1* บริเวณ exon ที่ 7 ข้าวพันธุ์ Yunanheixiannuo และ Chuanheinuo ไม่เกิด 2-bp addition เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวขาวพันธุ์ Pei'ai 64S, 9311 และ Nipponbare และเมื่อนำเครื่องหมายชนิด CAPS มาวิเคราะห์ในประชากร F_2 พบว่า ประชากร F_2 มีความแตกต่างกันระหว่างข้าวขาวและข้าวสี โดยพบ 2-bp addition ผลดังกล่าวจึงชี้ให้เห็นว่ายีน *OsB1* เกี่ยวข้องกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด และใช้คัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงได้ (Wang and Shu, 2007) ในข้าวขาวทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift จึงไม่สามารถสร้างเม็ดสีแอนโทไซยานินได้ (Sakamoto et al., 2001; Lim and Ha, 2013; Sakulsingharoj et al., 2016)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. กรรไกรตัดแต่งกิ่งช่อดอกข้าว
2. กระดาษทิชชู่
3. กระติกน้ำแข็ง
4. กระติ๊กน้ำร้อน
5. กระถางไม่มีรูขนาด 12 นิ้ว
6. กระบอกตวง
7. กล้องถ่ายรูป
8. กล่องพลาสติก
9. กล้องสเตอริโอ (Olympus, Japan)
10. ขวดดูแรน
11. ขวดเพาะเมล็ด
12. ขวดรูปชมพู่ (flask)
13. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
14. คลิปหนีบกระดาษ
15. คิวเวทท์ (Cuvette)
16. จอบ
17. ช้อนตักสาร
18. เชือกไหมพรหม
19. ซองน้ำตาลสำหรับใส่เมล็ด
20. ซีล (Extreme seal)
21. ดิน
22. ดินสอ ยางลบ สมุดบันทึก
23. ตะเกียงแอลกอฮอร์
24. ตะแกรง
25. ถ้วยใส่สาร
26. ถังน้ำร้อนไฟฟ้า
27. ถุงผสม

28. ถุงมือยาง
29. ทัพพี
30. ทิป (Tip)
31. ที่วางหลอดทดลอง
32. เทอร์โมมิเตอร์
33. นาฬิกาจับเวลา
34. บีกเกอร์ (Becker)
35. ปากคีบปลายแหลม
36. ป้าย (Tag)
37. ปิเปตแก้ว (Measuring Pipette)
38. ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 และ 12-24-12
39. ผ้าโซล่อนสีดำ
40. พลาสติกแรป (Plastic wrap)
41. เพลทตกตะกอนดีเอ็นเอ (96-well PCR Plate)
42. เพลทพีซีอาร์ (96-well PCR Plate 0.2 ml)
43. เพลทวัดแอนโทไซยานิน (96-well Microplate)
44. เพลทสกัดดีเอ็นเอ (96-Well DNA LoBind Deep Well Plates)
45. เม็ดบีท (Glass beads)
46. ไมโครปิเปรต (Micropipette)
47. ไม้ปักป้าย
48. สติ๊กเกอร์ใส
49. หลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
50. หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
51. หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
52. หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 2.0 มิลลิลิตร
53. ห้องมืดควบคุมความยาวช่วงแสง
54. แอลกอฮอล์

เครื่องมือ

1. เครื่อง Spectrophotometer-plate reader รุ่น SPECTRO star Nano (BMGLabTech, Germany)

2. เครื่อง votex (Scienctific industry, USA)
3. เครื่องกวนสารและให้ความร้อน (Hotplate stirrer) (Jemway 1000, UK)
4. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ Orbital Shakering Incubation (Shall Lab, USA)
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
6. เครื่องบดละเอียดตัวอย่าง
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) (Eppendorf, USA)
8. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) รุ่นt 100™ thermal cycler (BioRad, USA)
9. เครื่องไมโครเวฟ
10. เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า หรือเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง STARTER 3100 PH BENCH (OHAUS, China)
12. เครื่องสำรองไฟ (Power supply)
13. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
14. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
15. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

สารเคมี

1. 10% Sodium hypochlorite (UNION Science, Thailand)
2. 2-mercraptoethanol (BIO BASIC INC, Canada)
3. Absolute ethanol (MERCK, Germany)
4. Acetic acid (Merck, Germany)
5. Agarose (Invitrogen, USA)
6. Boric acid (Fisher scientific, UK)
7. Chloroform (LAB-SCAN, Thailand)
8. Deionized Water (RCI LABSCAN, Thailand)
9. Diaminoethanetertra-acid disodium salt (EDTA) (Fisher scientific, UK)
10. Hydrochloric acid (Merck, Germany)
11. LC Premium None Skirt PCR Plate
12. Methanol for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur (Merck, Germany)
13. Mineral oil (Himedia, China)
14. Potassium chloride (Merch, Germany)
15. Sodium acetate (Merck, Germany)

16. Tris base (HIMEDIA, China)
17. สีย้อมดีเอ็นเอ RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (Boca Scientific Inc, USA)
18. สีย้อมดีเอ็นเอ SYBR safe DNA gel stain (invitrogen, USA)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

1. GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
2. GeneRuler 100 bp ladder Plus (Thermo Scientific, USA)

เอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. *Bam*HI –HF (New England Biolab, USA)
2. FastDigest *Bam*HI (Thermo Scientific, USA)

ชุดทดลองสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

1. Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA)
2. ชุด DNAsecure Plant Kit (TIANGEN, China)
3. ชุด Universal DNA Purification Kit (TIANGEN, China)
4. บัฟเฟอร์สำเร็จรูป My Taq HS Red Mix, (BIOLINE, USA)

วิธีการดำเนินวิจัย

วิธีดำเนินวิจัยแบ่งออกเป็น 10 ขั้นตอน ดังนี้

1. การคัดเลือกพันธุ์ข้าว และการสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2
2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าว
    2.1 วิธี mCTAB
    2.2 วิธี mCTAB ใช้ 96well Plate
3. การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR*
4. การวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* และ *OsDFR*
5. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1*
6. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด indel ของยีน *OsDFR*
7. การศึกษาฟีโนไทป์
8. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี pH differential
9. การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดยีน *OsB1* และ *OsDFR* และลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ด
10. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี ANOVA
11. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับกับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2

1. การคัดเลือกพันธุ์ข้าว และการสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ พันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 (RD-MAEJO2), Kitaake, Sasanishiki, ปทุมธานี 1 (PTT1), กข39 (RD39), Nipponbare, กข6 (RD6), ไทชุง 65 (T65) พันธุ์ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มหรือสีดำ ได้แก่ ไรซ์เบอร์รี่ (RIB), หอมดำสุโขทัย (HDSKT), หอมนิล (HN), กำหนองเต่าคำ (KN), เหนียวดำ (ND) และกำพะเยา (KP) ได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ และข้าวพื้นเมืองที่มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง ได้แก่ กำน้อย (KNO), กำใหญ่ (KY) และมะลิดำ (MLDUM) ได้รับความอนุเคราะห์จากข้าวพื้นเมืองในเขตปฏิรูปที่ดิน สำนักงานปฏิรูปที่ดิน อำเภอกุดชุม จังหวัดยโสธร โดยเลือกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวเป็นพันธุ์รับ คือ ปทุมธานี 1 (PTT1) และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเป็นพันธุ์ให้ คือ กำน้อย (KNO) เพื่อผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 hybrid) ฤดูนาปี (กรกฎาคม-ธันวาคม) พ.ศ. 2561 จากนั้นนำเมล็ด F_1 มาปลูกเพื่อผลิตเมล็ดชั่วที่ 2 (F_2 seeds) ฤดูนาปรัง (มกราคม-มิถุนายน) พ.ศ. 2562 และปลูกเมล็ด F_2 เพื่อสร้างประชากร F_2 ทั้งหมด 300 ต้น ในฤดูที่ 3 นาปี (กรกฎาคม-ธันวาคม) พ.ศ. 2562 สำหรับการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด

การผสมพันธุ์ข้าว

- เลือกต้นข้าวพันธุ์รับที่ดอกบานแล้วประมาณ 1-2 วัน สังเกตได้จากรวงข้าวจะมีเกสรเพศผู้ห้อยอยู่ข้างเมล็ดข้าวประมาณ 1 ใน 3 ของรวงข้าวทั้งหมด (ภาพที่ 11A)
- นำรวงข้าวมาแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 43-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เกสรเพศผู้เป็นหมันชั่วคราว (ภาพที่ 11B) จะสังเกตเห็นว่ากลีบดอกข้าวเปิดออก และอับเรณูเกสรเพศผู้ออกมาหลังจากแช่น้ำร้อนแล้ว (ภาพที่ 11C)
- ตัดแต่งช่อรวงข้าวให้เหลือเพียงดอกที่มีระยะที่เหมาะสมในผสมพันธุ์ (ภาพที่ 11D)
- ทำการตอนดอกเกสรเพศผู้ออก ให้เหลือเพียงเกสรเพศเมีย (ภาพที่ 11E)
- ผสมข้าวพันธุ์รับกับพันธุ์ให้ โดยนำข้าวพันธุ์รับที่ทำการตอนดอกเกสรเพศผู้ออกหมดแล้ว นำมาผสมกับข้าวพันธุ์ให้โดยใช้ปากคีบปลายแหลมคีบละอองเกสรเกสรเพศผู้มาแตะลงบนยอดเกสรเพศเมีย เบา ๆ เพื่อป้องกันยอดเกสรเพศเมียช้ำ (ภาพที่ 11F) (เมื่อเปลี่ยนพันธุ์ข้าวที่ผสมจะต้องแช่ปากคีบปลายแหลมด้วย แอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ ก่อน เพื่อป้องกันการผสมข้าม
- ครอบรวงข้าวที่ได้รับการผสมแล้วด้วยถุงไข พร้อมเขียนชื่อพันธุ์ข้าว ที่เป็นพันธุ์รับและพันธุ์ให้ วันที่ในการผสม และผู้ผสมลงบนถุงไข (ภาพที่ 11G)

ภาพที่ 11 การผสมข้าว (A) เลือกต้นข้าวพันธุ์รับ (B) นำรวงข้าวมาแช่น้ำร้อน (C) ตัดแต่งช่อรวงข้าว (D) ตอนดอกเกสรเพศผู้ออก (E-F) ผสมข้าวพันธุ์รับกับพันธุ์ให้ (G) ครอบรวงข้าวด้วยถุงไข

2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าว

2.1 วิธี mCTAB

- บดใบให้ละเอียด จากนั้นเติมสารละลาย mCTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) ที่มี 1% (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นผสมโดยใช้เครื่อง vortex
- เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยทำการผสมทุก 10 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ และเติม RNase A (10 mg/ml) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ต่อสารละลายดีเอ็นเอ 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที
- เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่า ของ ปริมาตรสารละลาย mCTAB และผสมให้เข้ากัน
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

- ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 3M Sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่าของสารละลาย และเติม Cold absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย จากนั้นผสมให้เข้ากัน สังเกตเห็นตะกอนขุ่นสีขาว หากไม่พบตะกอน อาจแช่สารละลายในหลอดไมโครทิวป์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หรือข้ามคืน
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเติม เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างตะกอน ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง
- ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

2.2 วิธี mCTAB ใช้ 96well Plate

- ใช้ที่เจาะกระดาษเจาะตัวอย่างพืช จำนวน 6 ชิ้น ใส่ลงใน Deepwell และใส่เม็ดบีทจำนวน 3 เม็ด
- เติมสารละลาย mCTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) ที่มี 1% (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นผสม (mCTAB 100 ul + 2-mercaptoethanol 1 ul) ปิดด้วยสติ๊กเกอร์ใส 2 ชั้น
- นำตัวอย่างเข้าเครื่องตีตัวอย่าง 2 รอบ ๆ ละ 1 นาที 30 วินาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เติม mCTAB ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปิดด้วยสติ๊กเกอร์ใส
- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 1 เท่าของสารละลาย 100 ไมโครลิตร ปิดด้วยสติ๊กเกอร์ใส
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- เติม RNase A (1 mg/ml) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน Deepwell plate ใหม่ และย้ายส่วนใสใส่ตามลงไป ปิดด้วยสติ๊กเกอร์ใส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที
- เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 100 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่า ของ ปริมาตรสารละลาย mCTAB
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ย้ายส่วนใสใส่ เพลทตกตะกอน เติม 3M Sodium acetate, pH 5.2 ถ้าไม่ขุ่น และเติม Cold absolute ethanol 100 ไมโครลิตร หรือ ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย ปิดสติ๊กเกอร์ใส จากนั้นผสมให้เข้ากันเพียงเล็กน้อย จะสังเกตเห็นตะกอนขุ่นสีขาว หากไม่พบตะกอน อาจแช่สารละลายในหลอดไมโครทิวป์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเติม เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างตะกอน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ตากดีเอ็นเอให้แห้ง
- ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

3. การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR*

ค้นหาลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsDFR* จากฐานข้อมูล GenBank ของข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ Murasaki (AB003495.1) Nakai et al. (1998) แล้วออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ให้ครอบคลุมบริเวณที่มีความแตกต่างกันระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง japonica และสีขาว indica ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) ของยีน *OsB1* ได้มาจากงานวิจัยของ Rahman et al. (2013) ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว และสีม่วง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR*

Marker	Gene	Forward primer	Reverse primer	Annealing temp (°C)	PCR product size (bp)	References
CAPS marker	*OsB1*	OB1ex6_F = 5' GGGAGAAGCTCAACGAGATG 3'	OB1R = 5' GGGTGGCAGATTCATCACTT 3'	55	1,200	Rahman et al., 2013
Indel marker	*OsDFR*	OsDFR-662F =5' AGATGTACAAATGCGTGGGC 3'	OsDFR-426R =5' GGGTCGGATGGAGTAGACAG 3'	55	240	In this study

4. การวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* และ *OsDFR*

การวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* และ *OsDFR* โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ทำตามวิธีข้อ 2.1 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* และยีน *OsDFR* (ตารางที่ 1) โดยใช้ 2x Phusion Flash PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยมีองค์ประกอบปฏิกิริยา ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2x Phusion Flash PCR master mix	10
10 µM OB1ex6_F	1
10 µM OB1R	1
gDNA	1
dH_2O	7
Total	20

สภาวะในการทำพีซีอาร์ของยีน *OsB1*

เงื่อนไขปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	98	30 วินาที	1
Denaturation	98	10 วินาที	34x
Annealing	55	10 วินาที	
Extension	72	40 วินาที	
Final Extension	72	5 นาที	1

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ให้แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 bp

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2x Phusion Flash PCR master mix	10
10 µM OsDFR-662F	1
10 µM OsDFR-426R	1
gDNA	1
dH_2O	7
Total	20

สภาวะในการทำพีซีอาร์ของยีน *OsDFR*

เงื่อนไขปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	98	30 วินาที	1
Denaturation	98	10 วินาที	34x
Annealing	58	10 วินาที	
Extension	72	10 วินาที	
Final Extension	72	5 นาที	1

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ให้แรงดันไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 230 bp

นำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกบริสุทธิ์ด้วยชุด Universal DNA Purification Kit (TIANGEN, China) แยกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์ บนเจลอะกาโรส ตัดแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังมาแยกบริสุทธิ์เจล โดยใช้ชุด Universal DNA Purification Kit (TIANGEN, China) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

การแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล

- ตัดเจลที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจากการทำพีซีอาร์ ใส่ในหลอดไมโครทิวป์
- ชั่งน้ำหนักเจล และเติม buffer PC ปริมาตร 1 เท่า ของน้ำหนักเจล (อัตราส่วนน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัม ใส่ buffer PC 100 ไมโครลิตร)
- บ่มเจลที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (จนกว่าจะละลายหมด พลิกหลอดทุก ๆ 3 นาที เพื่อให้เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน)
- จากนั้นเติม Buffer BL ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และทิ้งส่วนใส
- หลังจากเจลละลายแล้ว นำ spin column ใส่ใน collection tube จากนั้นดูดสารละลายเจลที่ละลายแล้วใส่ spin column จนหมด และปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง
- เติม Buffer PW ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่ม 3 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่ไหลผ่าน column ทิ้ง และทำซ้ำอีกรอบ
- ปั่นเหวี่ยง column เปล่า เป็นเวลา 2 นาที อีกครั้ง และทิ้งส่วนใส เปลี่ยนใส่หลอดธรรมดาเปิดฝารอให้แห้งสนิท
- ย้าย spin column มาวางใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

- ชะดีเอ็นเอ โดยเติม Buffer EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาทีปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และชะดีเอ็นเอ รอบที่ 2 อีกครั้ง
- ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) จากนั้นนำลำดับเบสของข้าวพันธุ์ ต่าง ๆ มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Clustalx 1.8 และ GeneDoc 2.7

5. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1*

นำจีโนมิกดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว สีม่วง ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2 ที่สกัดทำตามวิธีข้อ 2.1 และ 2.2 มาค้นหายีน *OsB1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จะเพาะต่อยีน *OsB1* คือ OB1ex6_F และ OB1R (ตารางที่ 1) โดยใช้ 2x My Taq HS Red mix (BIOLINE, USA) ปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ โดยมีองค์ประกอบปฏิกิริยา ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2x My Taq HS Red mix	10
10 µM OB1ex6_F	1
10 µM OB1R	1
gDNA	1
dH_2O	7
Total	20

สภาวะในการทำพีซีอาร์ของยีน *OsB1*

เงื่อนไขปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	95	3 นาที	1
Denaturation	95	1 นาที	34x
Annealing	55	1 นาที	
Extension	72	1 นาที	
Final Extension	72	5 นาที	1

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสที่มี RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution เป็นส่วนประกอบ ใช้ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ให้แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 bp ถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวี

นำผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *OsB1* จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้ FastDigest enzyme *Bam*HI (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยมีองค์ประกอบปฏิกิริยาดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Water, nuclease=free	12.5
10x FastDigest buffer	2
DNA (PCR product)	5
FastDigest enzyme	0.5
Total	20

นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสที่มี RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution เป็นส่วนประกอบ ใช้ความเข้มข้นเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ ให้แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 700 และ 500 bp ถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวี

6. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด indel ของยีน *OsDFR*

นำจีโนมิกดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว สีม่วง ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2 ที่สกัดทำตามวิธีข้อ 2.1 และ 2.2 มาค้นหายีน *OsDFR* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* คือ OsDFR-662F และ OsDFR-426R (ตารางที่ 1) โดยใช้ 2x My Taq HS Red mix (BIOLINE, USA) ปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ โดยมีองค์ประกอบปฏิกิริยา ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2x My Taq HS Red mix	10
10 µM OsDFR-662F	1
10 µM OsDFR-426R	1
gDNA	1
dH_2O	7
Total	20

สภาวะในการทำพีซีอาร์ของยีน *OsDFR*

เงื่อนไขปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (˚C)	เวลา	จำนวนรอบ
Intial Denaturation	95	3 นาที	1
Denaturation	95	30 วินาที	34x
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final Extension	72	5 นาที	1

จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสที่มี RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution เป็นส่วนประกอบ ใช้ความเข้มข้นเจล 4 เปอร์เซ็นต์ ให้แรงดันไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 230 และ 220 bp ถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวี

7. การศึกษาฟีโนไทป์

ศึกษาข้อมูลฟีโนไทป์ของข้าวพันธุ์รับ ข้าวพันธุ์ให้ ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2 ฟีโนไทป์ ได้แก่ การเจริญเติบโตและพัฒนาทางลำต้น สีของลำต้น กาบใบ แผ่นใบ เขี้ยวกันแมลง เยื่อกันน้ำฝน และการเจริญเติบโตพัฒนาการทางเซลล์สืบพันธุ์ สีเยื่อหุ้มเมล็ด

8. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยวิธี pH differential

- ชั่งเมล็ดข้าวที่กะเทาะเปลือกลงในหลอดไมโครทิวป์ 100 มิลลิกรัม และนำไปเข้าเครื่องตีตัวอย่าง เพื่อบดเมล็ดข้าวให้ละเอียด (ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)
- เติมสารละลาย ที่ประกอบด้วย ไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ กับ เมทานอล 80

เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร ผสมและเขย่าในที่มืดที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ ปรับปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร ด้วยสารละลาย ที่ประกอบด้วย ไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ กับ เมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์
- เจือจางตัวอย่างสารต่อ pH buffer (1 สารสกัด : 4 pH buffer) บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader
- คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินในหน่วย มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง (มก./100 ก.เมล็ดแห้ง) ตามสูตร [AxMWxDFx10^3]/ **ε**x1 จากสูตร คือ

Anthocyanin pigment (cyanidin-3-glucoside equivalents, mg/L) = (A x MW x DF x 10^3) / **ε** x 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)

ε = 26,900 molar extinction

9. การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดยีน *OsB1* และ *OsDFR* และลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ด

การทดสอบไคสแควร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* (A) และ *OsDFR* (B) ในประชากรต้น F_2 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับพันธุ์ให้ก่ำน้อย จำนวน 300 ต้น โดยนำข้อมูลเครื่องหมายดีเอ็นเอ (จีโนไทป์) ที่กำหนดให้ A/a คือ อัลลีลของยีน *OsB1* และ B/b คือ อัลลีลของยีน *OsDFR* มาทดสอบโดยใช้โปรแกรม Minitab15 เพื่อศึกษาว่าการถ่ายทอดยีนเป็นไปตามกฎของเมนเดลหรือไม่

การวิเคราะห์การถ่ายทอด 1 ยีน มีสมมุติฐาน ดังต่อไปนี้

ยีน *OsB1* (A) อัตราส่วนจีโนไทป์ลูก F_2 เท่ากับ 1:2:1 คือ 1AA : 2Aa : 1aa

ยีน *OsDFR* (B) อัตราส่วนจีโนไทป์ลูก F_2 เท่ากับ 1:2:1 คือ 1BB : 2Bb : 1bb

วิเคราะห์การถ่ายทอด 2 ยีน มีสมมุติฐาน ดังต่อไปนี้

ยีน *OsB1* (A) และ *OsDFR* (B) อัตราส่วนจีโนไทป์ลูก F_2 เท่ากับ 1:2:1:2:4:2:1:2:1 คือ 1AABB : 2AABb :1AAbb :2AaBB :4AaBb :2Aabb :1aaBB :2aaBb :1aabb

การทดสอบไคสแควร์การถ่ายทอดลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยนำเมล็ดแก่ F_3 จากต้นข้าว

ประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น มากะเทาะเปลือก จากนั้นทำการสังเกตสีเยื่อหุ้มเมล็ดด้วยตาเปล่า จัดกลุ่มสีเยื่อหุ้มเมล็ด ทดสอบไคสแควร์และหาค่าสหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r) ปริมาณแอนโทไซยานินกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด กำหนดให้ สีม่วงเข้ม (dark purple) = 4.00, สีม่วงกลาง (medium purple) = 3.00, สีน้ำตาล (brown) = 2.00 และสีขาว (white) = 1.00 โดยใช้โปรแกรม Minitab 15

10. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี ANOVA

นำจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ของข้าวประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น กับฟีโนไทป์ คือ ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินมาวิเคราะห์ด้วยวิธี ANOVA โดยโปรแกรม Minitab 15 ในการวิเคราะห์ข้อมูล กำหนดให้ยีน *OsB1* แทนสัญลักษณ์ A ยีน *OsDFR* แทนสัญลักษณ์ B

11. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับกับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (จีโนไทป์) ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ของประชากร F_2 มาหาความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยโปรแกรม Minitab 15 กำหนดให้จีโนไทป์ของต้น F_2 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1 มีจีโนไทป์ แบบ Homozygous recessive (R) ให้สัญลักษณ์เป็น *OsB1* = aa และ *OsDFR* = bb ให้คะแนนเป็น 0 ต้นที่แสดงแถบดีเอ็นเอของพันธุ์รับปทุมธานี 1 และพันธุ์ให้ก่ำน้อยมีจีโนไทป์ แบบ Heterozygous (H) ให้สัญลักษณ์เป็น *OsB1* = Aa และ *OsDFR* = Bb ให้คะแนนเป็น 1 และต้นที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์ให้ก่ำน้อย มีจีโนไทป์แบบ Homozygous dominant (D) ให้สัญลักษณ์เป็น *OsB1* = AA และ *OsDFR* = BB ให้คะแนนเป็น 2

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของประชากร F_2 กับฟีโนไทป์ ด้วยสมการถดถอย (regression) โดยวิธี simple regression เพื่อหาสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอย (regression coefficient, R^2) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบมีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ดหรือไม่

สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

โรงเรืองกระจก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระยะเวลาการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 24 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2563

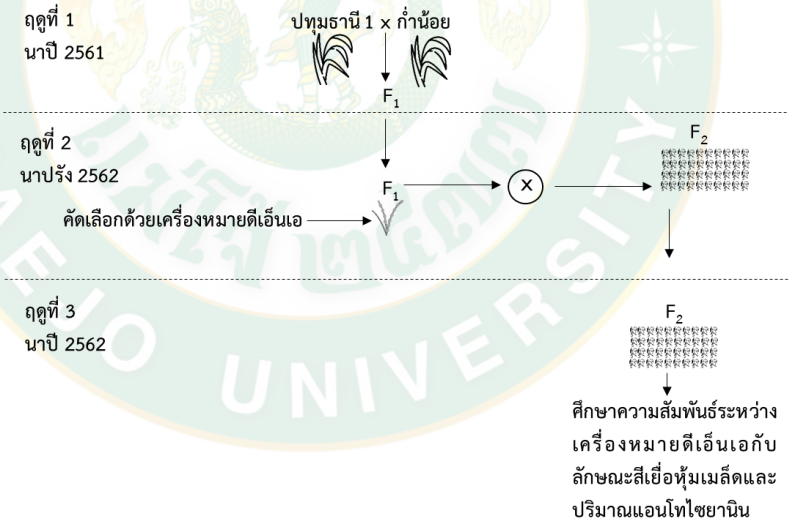
บทที่ 4
ผลการทดลอง และวิจารณ์

1. การคัดเลือกพันธุ์ข้าว และการสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2

จากการคัดเลือกข้าวพันธุ์รับที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว คือ พันธุ์ปทุมธานี 1 เป็นพันธุ์ดีของไทย ให้ผลผลิตสูง ต้านทานโรคไหม้ และข้าวพันธุ์ให้ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง คือ พันธุ์ก่ำน้อย เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง นำมาผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ทำการผสมพันธุ์ในฤดูที่ 1 นาปี 2561 (กรกฎาคม – ธันวาคม) ผลิตเมล็ด F_1 ได้จำนวน 6 เมล็ด ดังตารางที่ 2

ฤดูที่ 2 นาปรัง 2562 (มกราคม - มิถุนายน) ทำการเพาะเมล็ด F_1 และคัดเลือกต้น F_1 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ผลิตเมล็ด F_2 ได้จำนวน 996 เมล็ด (ตารางที่ 2)

ฤดูที่ 3 นาปี 2562 (กรกฎาคม – ธันวาคม) ทำการเพาะเมล็ด F_2 และปลูกประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น เพื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดและปริมาณแอนโทไซยานิน โดยวางแผนการผสมพันธุ์ข้าวดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แผนการสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับพันธุ์ให้ก่ำน้อย

ตารางที่ 2 การผลิตเมล็ดข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และประชากร F_2

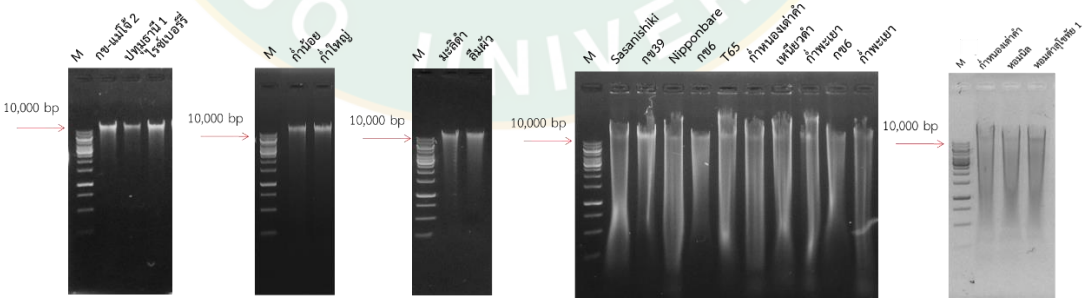
คู่ผสม	เมล็ดรุ่น	จำนวนเมล็ด	วันที่เก็บเมล็ด
ปทุมธานี 1 x ก่ำน้อย	F_1	6	15/5/2018
	F_2	996	27/1/2019

2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

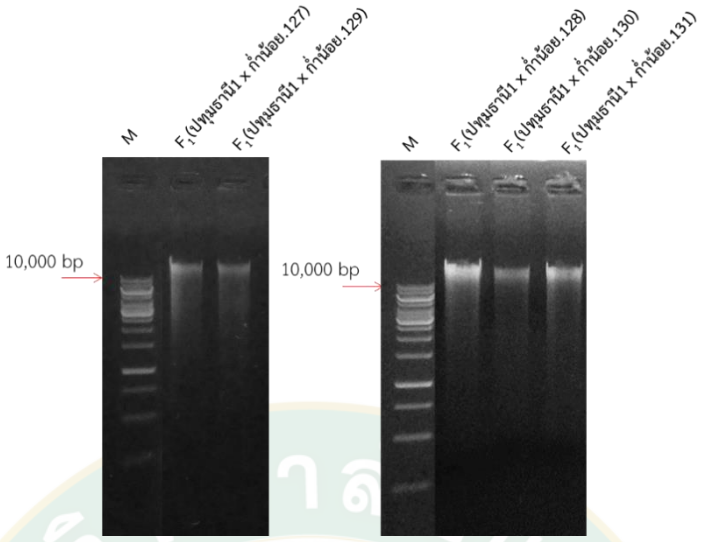
การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แสดงว่า ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี มีบางตัวอย่างเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (smear) แต่สามารถนำไปค้นหายีน โดยเทคนิคพีซีอาร์ในขั้นต่อไปได้ (ภาพที่ 13)

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ของคู่ผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับก่ำน้อย พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แสดงว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพดี และสามารถนำไปค้นหายีน โดยเทคนิคพีซีอาร์ในขั้นต่อไปได้ (ภาพที่ 14)

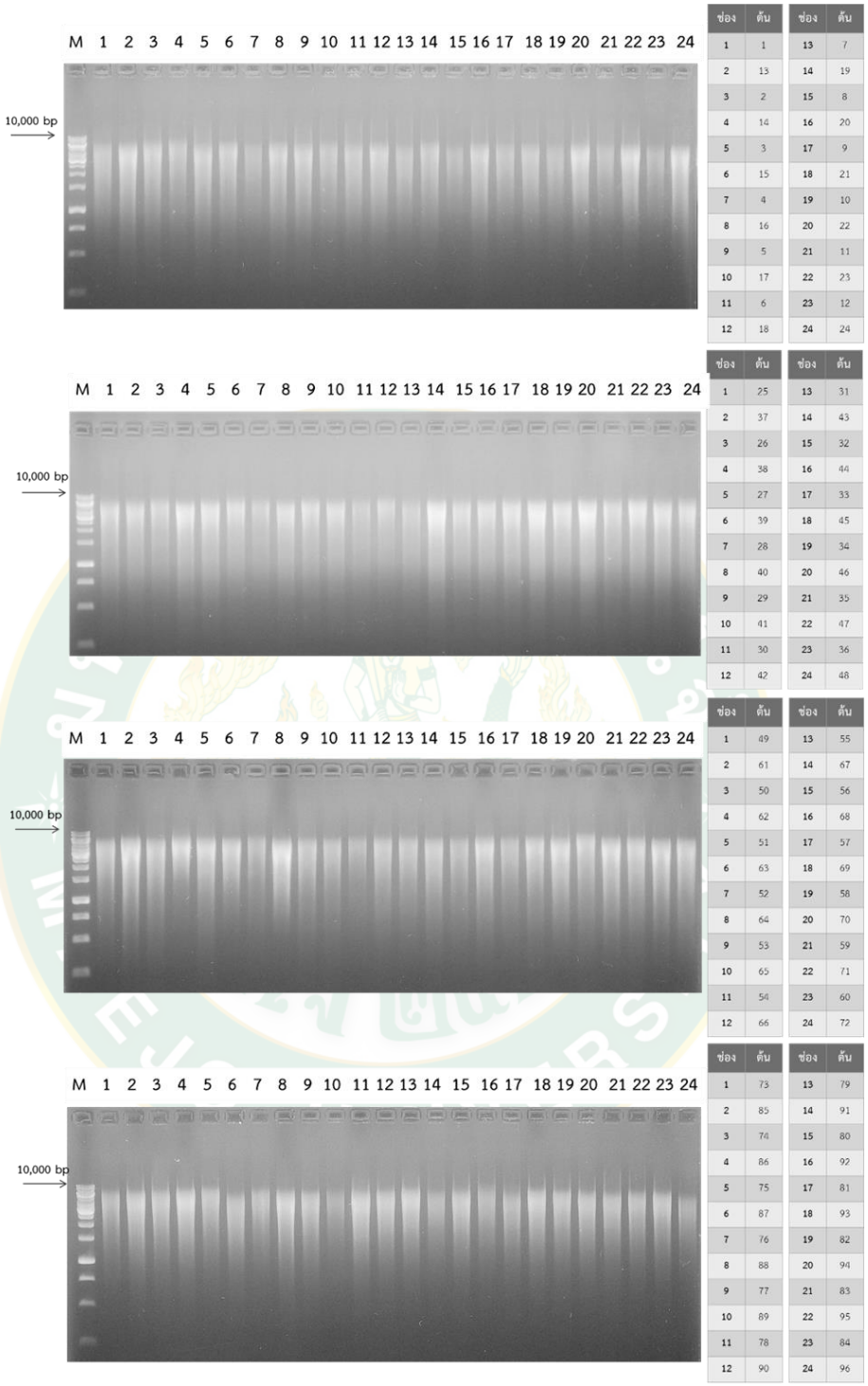
การสกัดดีเอ็นจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับพันธุ์ให้ก่ำน้อย จำนวน 300 ต้น โดยใช้ Deepwell plate ขนาด 96 หลุม สกัดโดยวิธี CTAB ดัดแปลง (Hwang and Kim, 2000) พบว่า ทุกตัวอย่างได้ดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (smear) ในหลายตัวอย่าง แต่สามารถนำไปค้นหายีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ในขั้นต่อไปได้ (ภาพที่ 15-18)



ภาพที่ 13 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder



ภาพที่ 14 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จากคู่ผสมระหว่างปทุมธานี กับกำน้อย ต้นที่ 127 - 131 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder



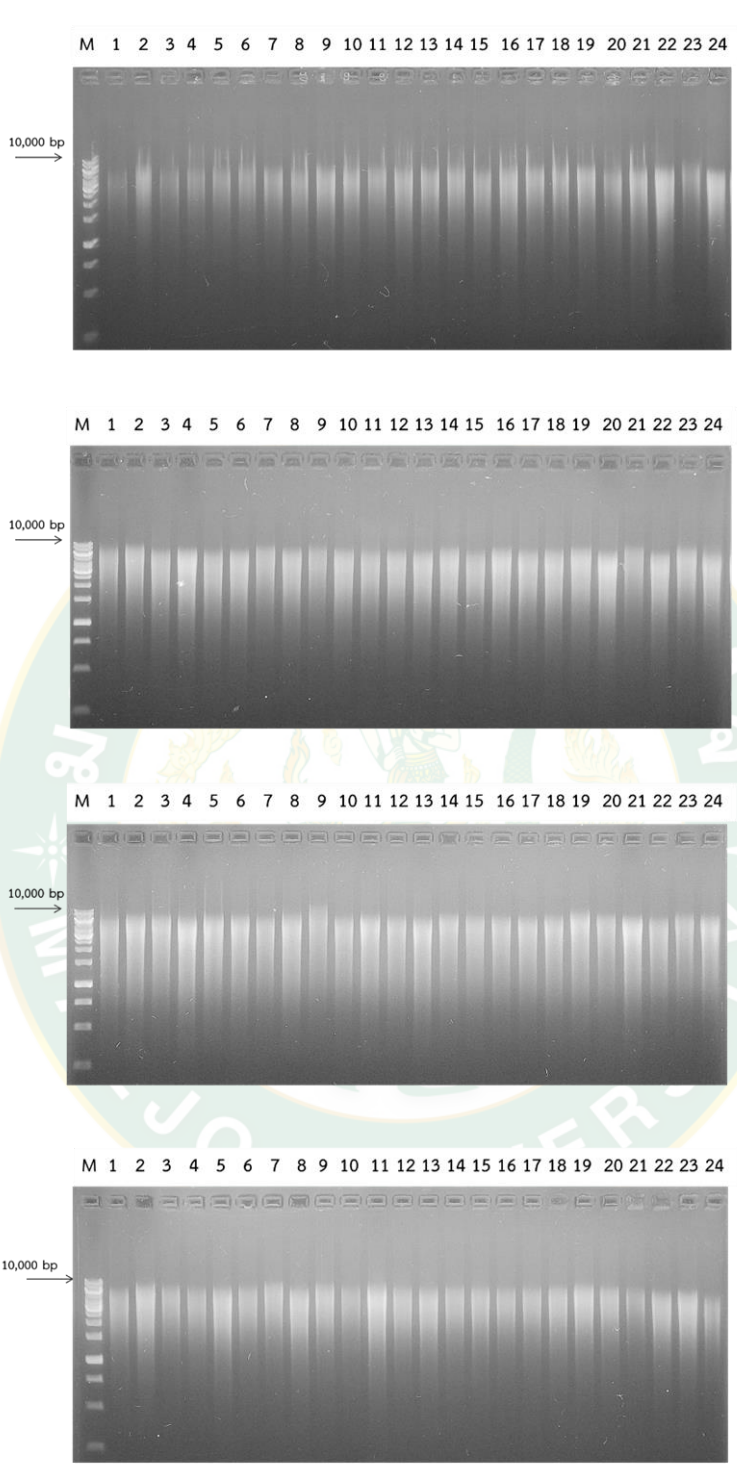
ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	1	13	7
2	13	14	19
3	2	15	8
4	14	16	20
5	3	17	9
6	15	18	21
7	4	19	10
8	16	20	22
9	5	21	11
10	17	22	23
11	6	23	12
12	18	24	24

ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	25	13	31
2	37	14	43
3	26	15	32
4	38	16	44
5	27	17	33
6	39	18	45
7	28	19	34
8	40	20	46
9	29	21	35
10	41	22	47
11	30	23	36
12	42	24	48

ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	49	13	55
2	61	14	67
3	50	15	56
4	62	16	68
5	51	17	57
6	63	18	69
7	52	19	58
8	64	20	70
9	53	21	59
10	65	22	71
11	54	23	60
12	66	24	72

ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	73	13	79
2	85	14	91
3	74	15	80
4	86	16	92
5	75	17	81
6	87	18	93
7	76	19	82
8	88	20	94
9	77	21	83
10	89	22	95
11	78	23	84
12	90	24	96

ภาพที่ 15 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับพันธุ์ให้ก่ำน้อย ต้นที่ 1 - 96 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder



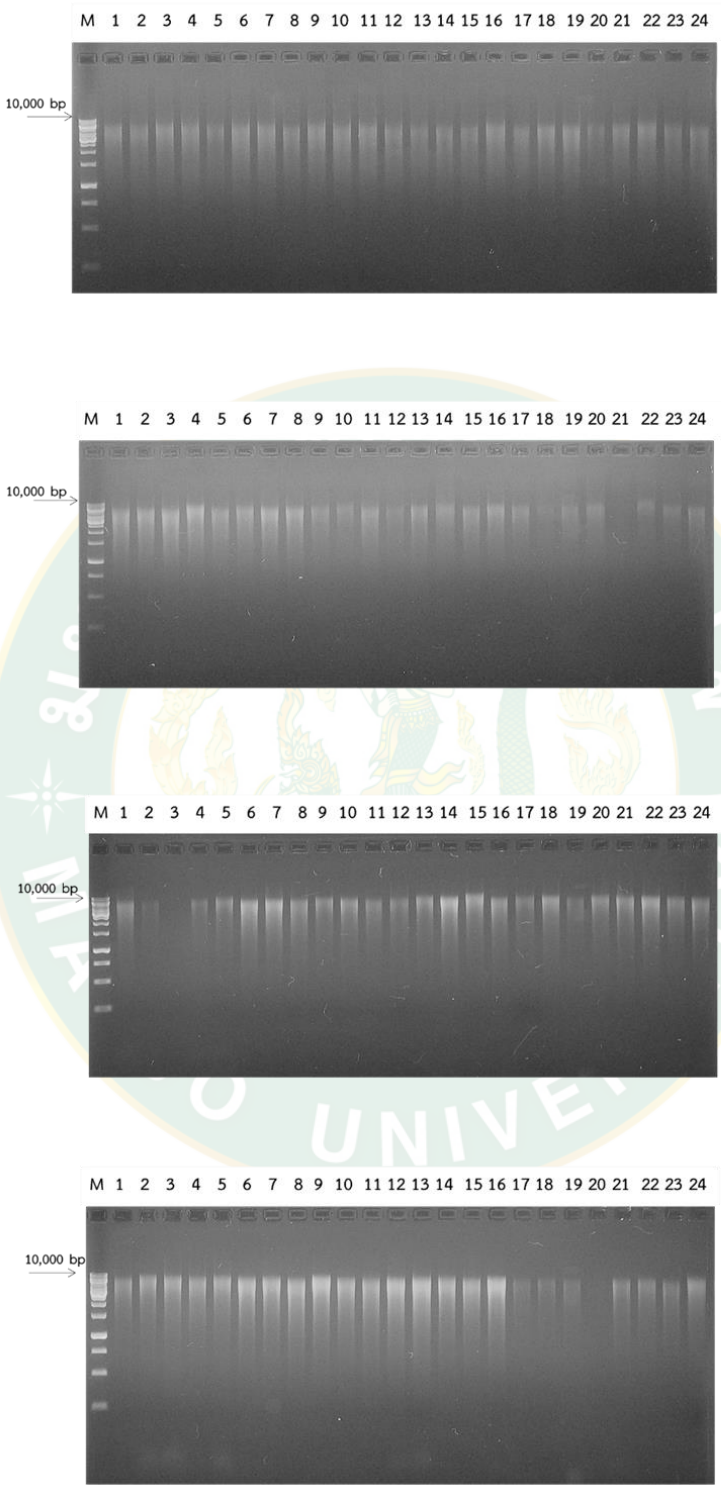
ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	97	13	103
2	109	14	115
3	98	15	104
4	110	16	116
5	99	17	105
6	111	18	117
7	100	19	106
8	112	20	118
9	101	21	107
10	113	22	119
11	102	23	108
12	114	24	120

ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	121	13	127
2	133	14	139
3	122	15	128
4	134	16	140
5	123	17	129
6	135	18	141
7	124	19	130
8	136	20	142
9	125	21	131
10	137	22	143
11	126	23	132
12	138	24	144

ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	145	13	151
2	157	14	163
3	146	15	152
4	158	16	164
5	147	17	153
6	159	18	165
7	148	19	154
8	160	20	166
9	149	21	155
10	161	22	167
11	150	23	156
12	162	24	168

ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	169	13	175
2	181	14	187
3	170	15	176
4	182	16	188
5	171	17	177
6	183	18	189
7	172	19	178
8	184	20	190
9	173	21	179
10	185	22	191
11	174	23	180
12	186	24	192

ภาพที่ 16 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับพันธุ์ให้ก่ำน้อย ต้นที่ 97 - 192 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder



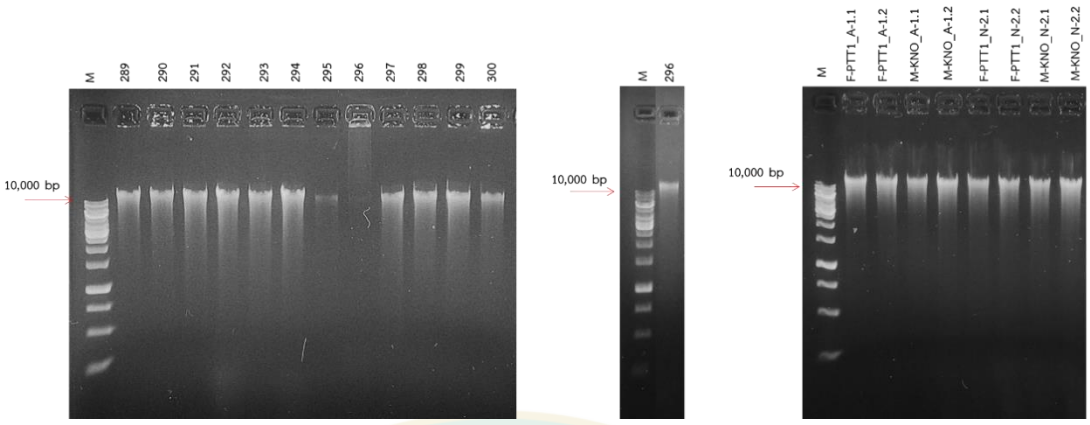
ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	193	13	205
2	195	14	207
3	194	15	206
4	196	16	208
5	197	17	209
6	199	18	211
7	198	19	210
8	200	20	212
9	201	21	213
10	203	22	215
11	302	23	214
12	204	24	216

ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	217	13	229
2	219	14	231
3	218	15	230
4	220	16	232
5	221	17	233
6	223	18	235
7	222	19	234
8	224	20	236
9	225	21	237
10	227	22	239
11	226	23	238
12	228	24	240

ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	241	13	253
2	243	14	255
3	242	15	254
4	244	16	256
5	245	17	257
6	247	18	259
7	246	19	258
8	248	20	260
9	249	21	261
10	251	22	263
11	250	23	262
12	252	24	264

ช่อง	ต้น	ช่อง	ต้น
1	265	13	277
2	267	14	279
3	266	15	278
4	278	16	280
5	269	17	281
6	271	18	283
7	270	19	282
8	272	20	284
9	273	21	285
10	275	22	287
11	274	23	286
12	276	24	288

ภาพที่ 17 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับพันธุ์ให้กำน้อย ต้นที่ 193 - 288 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder



ภาพที่ 18 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับพันธุ์ให้ก่ำน้อย ต้นที่ 289 - 300 ต้น 296 และพันธุ์รับปทุมธานี 1 (F-PTT1) พันธุ์ให้ก่ำน้อย (M-KNO) M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

3. การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* และ *OsDFR*

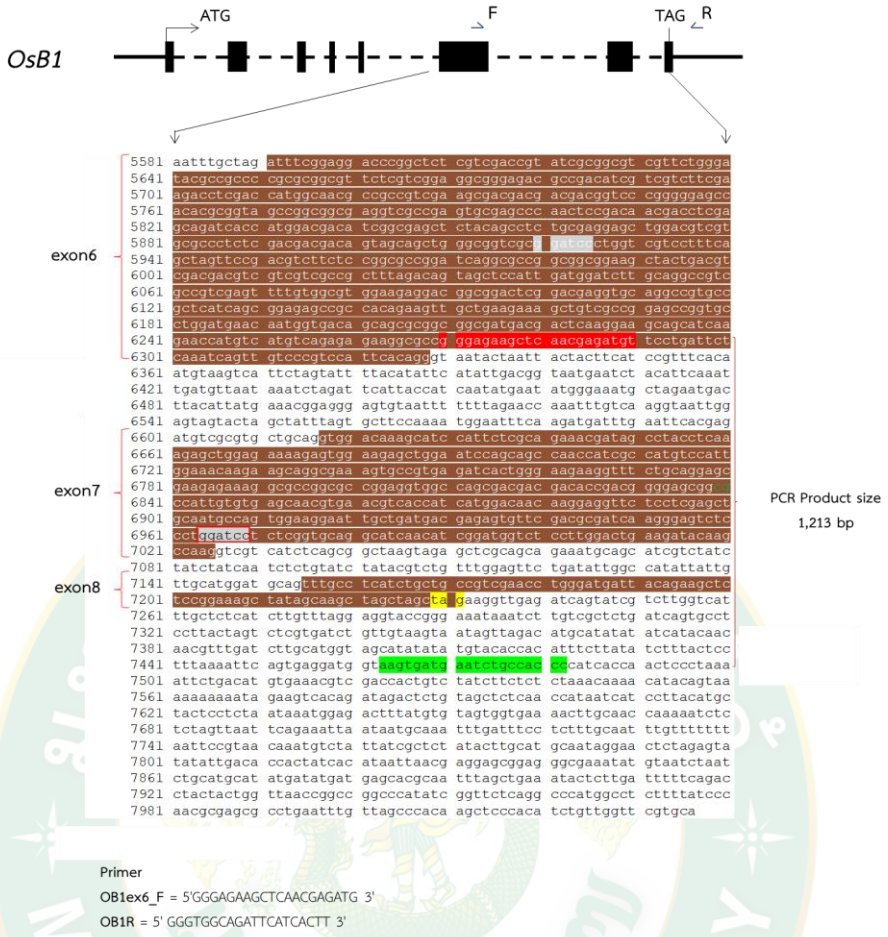
3.1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *OsB1*

Wang and Shu (2007) ศึกษาลำดับเบสข้าวพันธุ์ Chuanheinuo (EU095986) เปรียบเทียบกับข้าวขาวพันธุ์ Pei'ai, 64S, 9311 และ Nipponbare พบว่ามีการเกิด 2-bp addition บริเวณ exon ที่ 7 และนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค พีซีอาร์ในประชากร F_2 จำนวน 106 ต้น พบว่า ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง 20 ต้น พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาดประมาณ 653 และ 203 bp ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว 63 ต้น และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง 23 ต้น พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาดประมาณ 858 bp แสดงว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ CAPS สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงได้

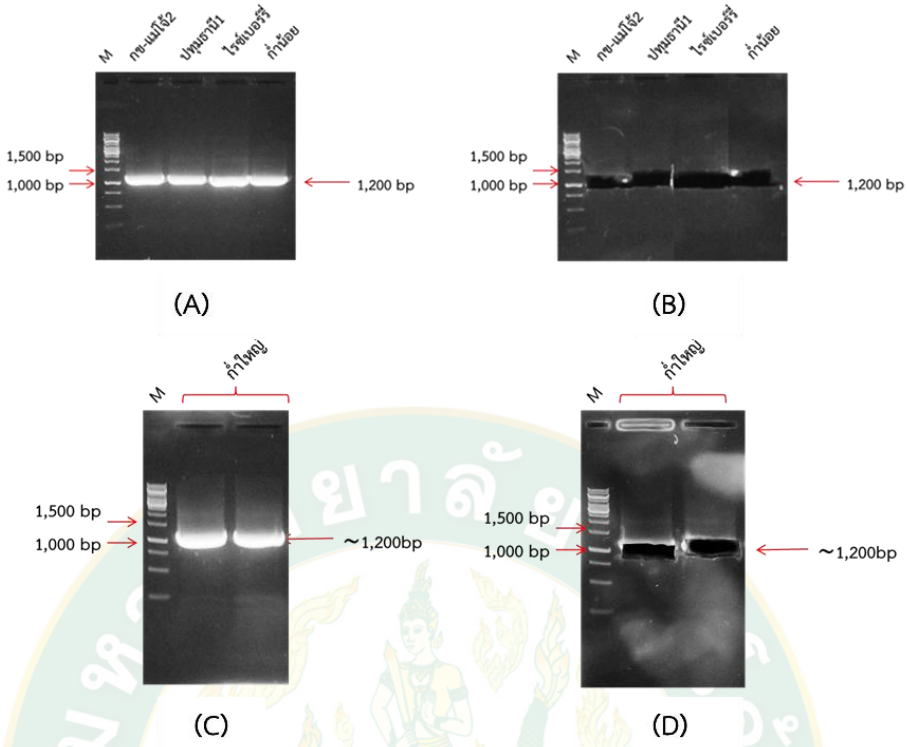
Rahman et al. (2013) วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OsB1* ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ Hugnambyeo ที่มีบริเวณจดจำเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI แต่ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ Ilpoombyeo เกิด 2-bp addition ที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ทำให้ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* ได้ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ ประชากร F_3 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว พบแถบ ดีเอ็นเอ 1 แถบ แสดงว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงได้

การค้นหาข้อมูลลำดับเบสของยีน *OsB1* จากฐานข้อมูล GenBank ของข้าว

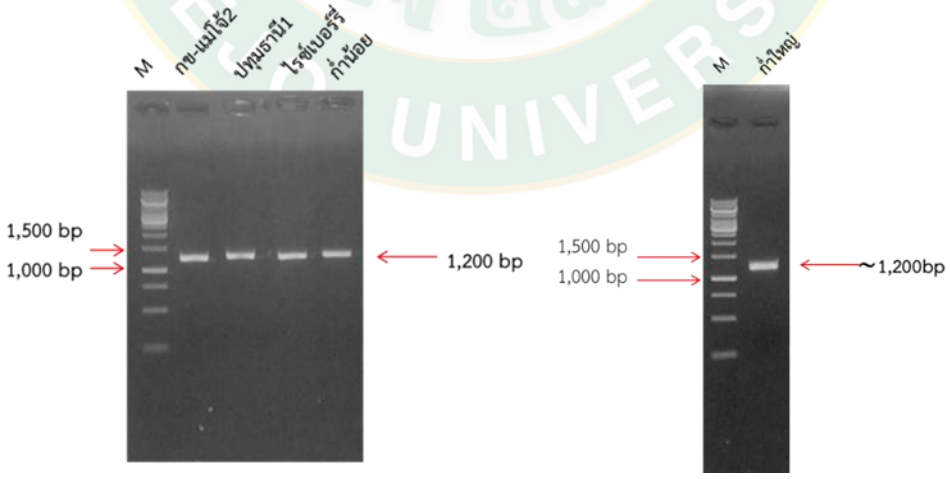
japonica พันธุ์ Chuanheinuo (EU095986) ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ประกอบด้วย 8 exon และ 7 intron พบว่า บริเวณ exon ที่ 7 มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเกิด 2-bp addition ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift (ภาพที่ 19) จึงนำเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* มาใช้ในงานวิจัยนี้ โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2, ปทุมธานี 1, ไรซ์เบอร์รี่, ก่ำน้อย และก่ำใหญ่ มาค้นหายีน *OsB1* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* คือ OB1ex6_F และ OB1R (ตารางที่ 1) และใช้ 2x Phusion Flash PCR master mix พบว่า ข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2, ปทุมธานี 1, ไรซ์เบอร์รี่, ก่ำน้อย และก่ำใหญ่ พบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังขนาดประมาณ 1,200 bp แสดงว่าในข้าวทุกพันธุ์มีบริเวณของยีน *OsB1* (ภาพที่ 20A และ 20C) และตัดแถบดีเอ็นเอเพื่อนำไปแยกบริสุทธิ์ (ภาพที่ 20B และ 20D) จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยใช้ DNA Purification Kit (TIANGEN, China) (ภาพที่ 21) ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสโดยบริษัท 1st BASE (Malaysia) และเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* พบว่า บริเวณ exon ที่ 7 ที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (GGATCC) มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเกิด 2-bp addition ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2 และปทุมธานี 1 ซึ่งสอดคล้องกับพันธุ์ Nipponbare (AP014960) ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank แต่ไม่พบ 2-bp addition ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อย, ก่ำใหญ่, ไรซ์เบอร์รี่ และ Purpleputtu (AB021079) (ภาพที่ 22A) บริเวณ exon ที่ 7 ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 มีการเกิด 2-bp addition (ภาพที่ 22B) ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าลำดับเบสของยีน *OsB1* มีความแตกต่างกันระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและข้าวสี โดยพบ 2-bp addition ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift จึงไม่สามารถสร้างเม็ดสีแอนโทไซยานินได้ (Sakamoto et al., 2001; Wang and Shu, 2007; Lim and Ha, 2013; Sakulsingharoj et al., 2016) และผลการวิจัยยังสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 เกิด 2-bp addition (อนงค์นาฏ และคณะ, 2562)



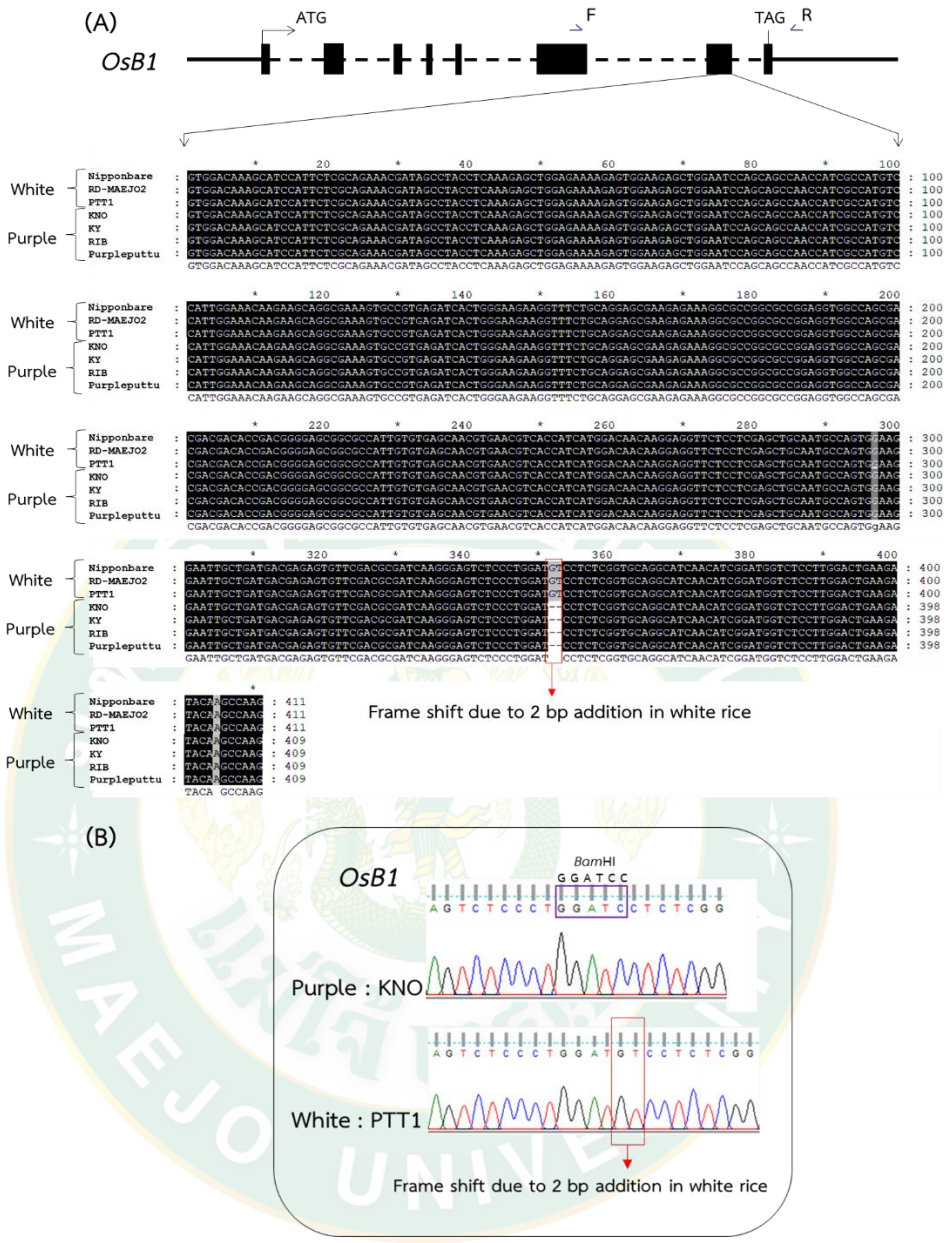
ภาพที่ 19 แผนภาพลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* และแสดงเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ครอบคลุมบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ใน exon ที่ 7 ของข้าวพันธุ์ Chuanheinuo (EU095986) TAG คือ Stop codon กล่องสี่เหลี่ยมสีแดง คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI สีแดง คือ ไพรเมอร์เส้น Forward สีเขียว คือ ไพรเมอร์เส้น Reverse กล่องสีดำ คือ exon เส้นประ คือ intron สีน้ำตาล คือ exon 6-8 ลูกศรสีฟ้า คือ บริเวณไพรเมอร์ (F และ R คือ OB1ex6_F และ OB1R ตามลำดับ)



ภาพที่ 20 ผลการค้นหายีน *OsB1* ในข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2, ปทุมธานี 1, ไรซ์เบอร์รี่, ก่ำน้อย และก่ำใหญ่ (A) และ (C) คือ ภาพก่อนตัดแถบดีเอ็นเอ (B) และ (D) คือ ภาพหลังตัดแถบดีเอ็นเอ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder



ภาพที่ 21 ผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอของยีน *OsB1* ในข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2, ปทุมธานี 1, ไรซ์เบอร์รี่, ก่ำน้อย และก่ำใหญ่ M คือ 1 kb DNA Ladder

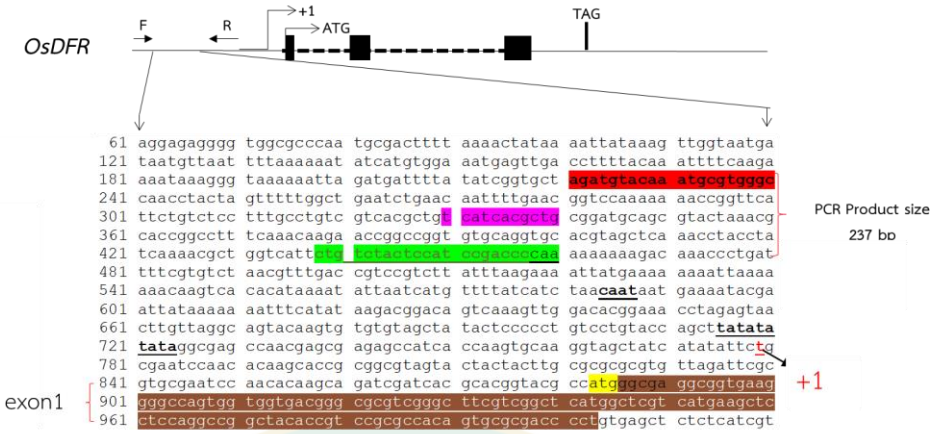


ภาพที่ 22 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsB1* บริเวณ exon ที่ 7 (A) การเปรียบเทียบลำดับเบสในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ Nipponbare (AP014960), กข-แม่โจ้ 2 (RD-MAEJO2), ปทุมธานี 1 (PTT1) และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อย (KNO), ก่ำใหญ่ (KY), ไรซ์เบอร์รี่ (RIB) และ Purpleputtu (AB021079) กล่องสีดำ คือ exon เส้นประ คือ intron ลูกศรสีฟ้า คือ บริเวณไพรเมอร์ (F และ R คือ OB1ex6_F และ OB1R ตามลำดับ) กล่องสีแดง คือ การเกิด 2-bp addition (B) คือ โครมาโทรแกรม กล่องสีม่วง คือ บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (GGATCC) ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อย (KNO) และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวปทุมธานี 1 (PTT1)
ซึ่งเกิด 2-bp addition (GT) ในบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

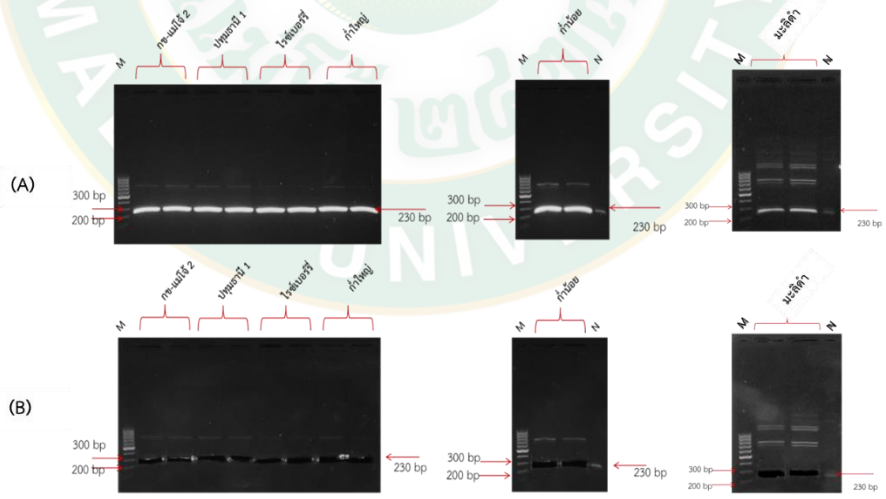
3.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR*

Nakai et al. (1998) ศึกษาลำดับเบสของยีน *OsDFR* จากข้าว japonica ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ Murasaki (AB003495.1) และข้าว indica ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ Teqing (U70541) พบว่า ยีน *OsDFR* ประกอบด้วย 3 exon และ 2 intron บริเวณ upstream ของ +1 ที่ตำแหน่ง -450 มีการเกิด 11-bp addition ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ Murasaki แต่ไม่พบในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ Teqing ซึ่งแตกต่างกันระหว่างข้าว japonica กับ indica (ภาพที่ 23) ในงานวิจัยนี้จึงออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (ตารางที่ 1) แล้วนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2, ปทุมธานี 1, ไรซ์เบอร์รี่, ก่ำใหญ่, ก่ำน้อย และมะลิดำ มาค้นหายีน *OsDFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* คือ OsDFR-662F และ OsDFR-426R (ตารางที่ 1) และใช้ 2x Phusion Flash PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, USA) พบว่า ข้าวทุกพันธุ์ที่นำมาศึกษาพบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 230 bp แสดงว่าในข้าวทุกพันธุ์มีบริเวณของยีน *OsDFR* (ภาพที่ 24A) ตัดแถบดีเอ็นเอเพื่อนำไปแยกบริสุทธิ์ (ภาพที่ 24B) จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ DNA Purification Kit (TIANGEN, China) (ภาพที่ 25) ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสโดยบริษัท 1st BASE (Malaysia) และเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsDFR* พบว่า ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ Kitaake, ปทุมธานี 1 และกข-แม่โจ้ 2 ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์มะลิดำ และก่ำใหญ่ เกิด 11-bp addition สอดคล้องกับ Nipponbare (AP014957) และ Murasaki (AB003495.1) ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank แต่ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อยและไรซ์เบอร์รี่ไม่มีการเกิด 11-bp addition (ภาพที่ 26A) บริเวณที่เกิด 11-bp addition อยู่ในส่วน upstream ของโปรโมเตอร์ และไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของยีน *OsDFR* (Nakai et al., 1998; Kim et al., 2017) ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนามาจากบริเวณนี้เป็นเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* จึงอาจให้ผลการคัดเลือกที่แตกต่างกันในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและสีม่วงพันธุ์ต่าง ๆ ที่นำมาทดสอบ

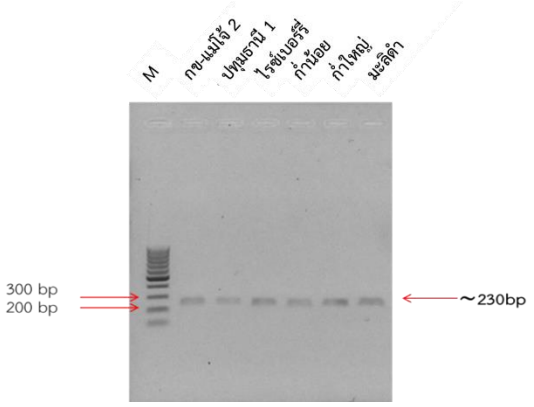
อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ พบว่า ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 เกิด 11-bp addition แต่ไม่พบในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อย ดังนั้น จึงนำไพรเมอร์ที่พัฒนาได้มาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์รับปทุมธานี 1 และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ให้ก่ำน้อยได้ (ภาพที่ 26B)



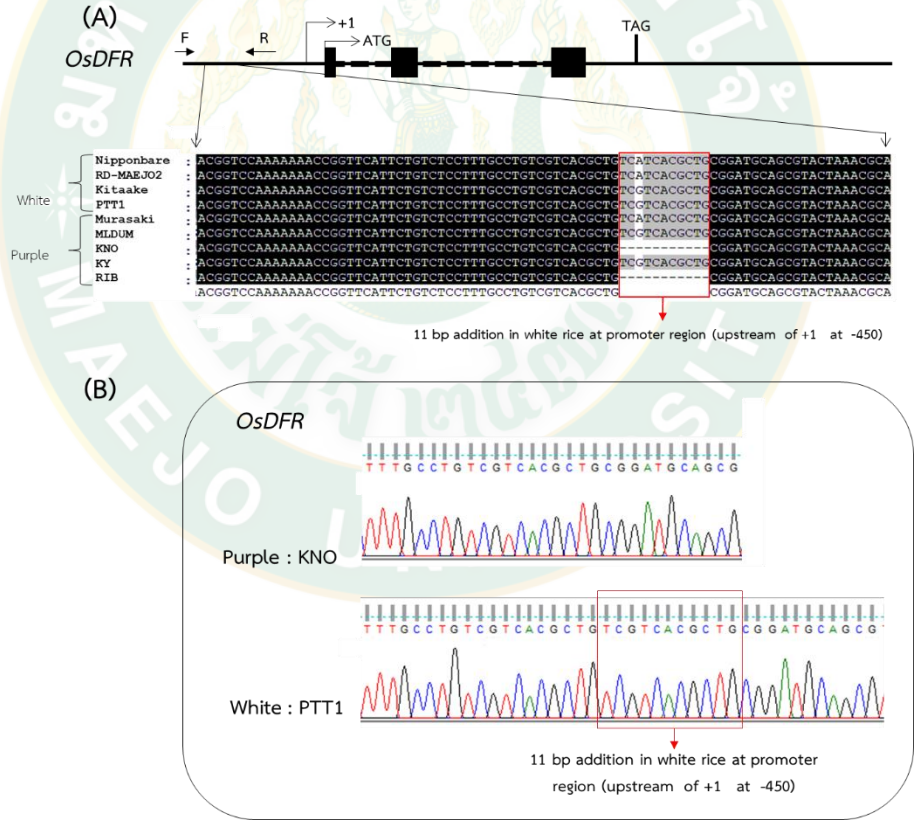
ภาพที่ 23 แผนภาพลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsDFR* แสดงบริเวณที่เกิด 11-bp addition และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่บริเวณโปรโมเตอร์ upstream ของ +1 ที่ตำแหน่ง -450 ในข้าวพันธุ์ Murasaki (AB003495.1) สีเหลือง คือ Start codon, สีชมพู คือ บริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส 11-bp addition, อักษรสีแดง คือ ตำแหน่งของ +1, สีแดง คือ ไพรเมอร์เส้น Forward (OsDFR-662F), สีเขียว คือ ไพรเมอร์เส้น Reverse (OsDFR-426R), กล่องสีดำ คือ exon, เส้นประ คือ intron, ตัวหนาสีดำและขีดเส้นใต้ คือ บริเวณ TATA box และ CAAT box, สีน้ำตาล คือ exon1



ภาพที่ 24 ผลการค้นหาบางส่วนของยีน *OsDFR* ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ กข-แม่โจ้ 2, ปทุมธานี 1, ไรซ์เบอร์รี่, ก่ำใหญ่, ก่ำน้อย, และมะลิดำ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder N คือ น้ำ (A) คือ ภาพก่อนตัดแถบดีเอ็นเอ (B) คือ ภาพหลังตัดแถบดีเอ็นเอ



ภาพที่ 25 ผลการแยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* ในข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2, ปทุมธานี 1, ไรซ์เบอร์รี่, ก่ำใหญ่, ก่ำน้อย และมะลิดำ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



ภาพที่ 26 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *OsDFR* บริเวณ upstream ของ +1 ที่ตำแหน่ง -450 (A) คือ การเปรียบเทียบลำดับเบสของข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ Nipponbare (AP014957), Kitaake, กข-แม่โจ้ 2 (RD-MAEJO2), ปทุมธานี 1 (PTT1) และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ Murasaki

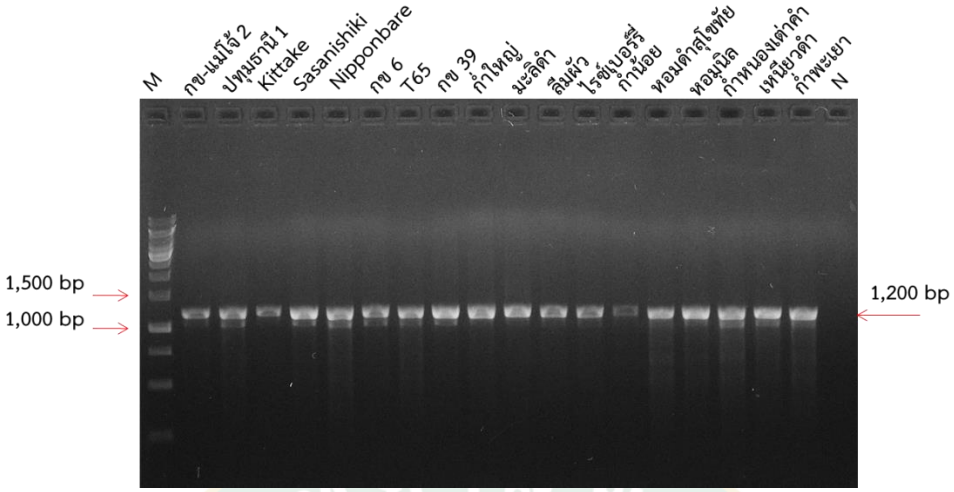
(AB003495.1), มะลิดำ (MLDUM), กำน้อย (KNO), กำใหญ่ (KY), และไรซ์เบอร์รี่ (RIB) กล่องสีดำ คือ exon เส้นประ คือ intron ลูกศรสีฟ้า คือ บริเวณไพรเมอร์ (F และ R คือ OsDFR-662F และ OsDFR-426R ตามลำดับ) กล่องสีแดง คือ ตำแหน่งลำดับเบสที่มีความแตกต่างกันบริเวณที่เกิด 11-bp addition (B) คือ โครมาโทรแกรม แสดงการเกิด 11-bp addition ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวปทุมธานี 1 (PTT1) เปรียบเทียบกับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์กำน้อย (KNO)

4. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1*

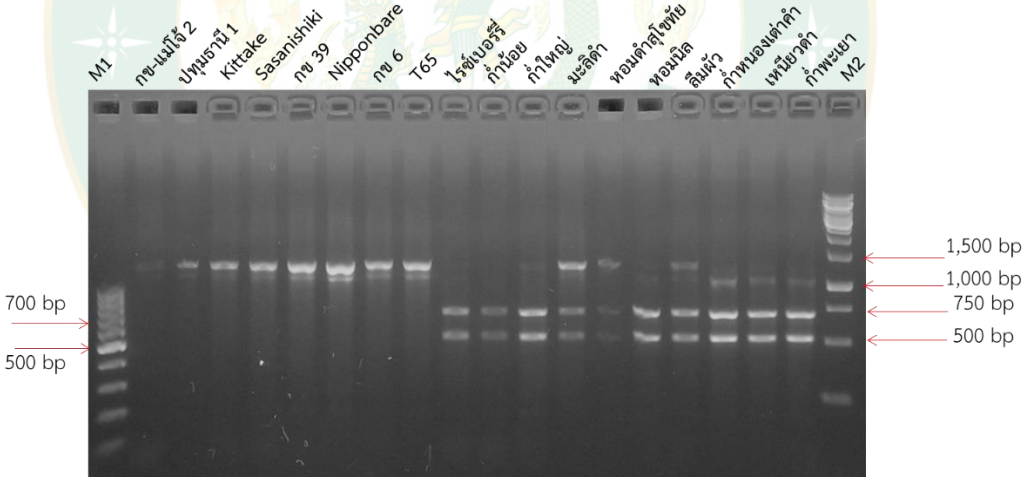
ข้าวขาวและข้าวสีพันธุ์ต่าง ๆ

การนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2, ปทุมธานี 1, Kitaake, Sasanishiki, กข39, Nipponbare, กข6, ไทชุง65 และข้าวดำหรือม่วงเข้มพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่, กำน้อย, กำใหญ่, มะลิดำ, หอมดำสุโขทัย, หอมนิล, ลืมผัว, กำหนองเต่าคำ, เหนียวดำ และกำพะเยา มาค้นหายีน *OsB1* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน คือ OB1ex6_F และ OB1R (ตารางที่ 1) และใช้ 2x My Taq HS Red mix (BIOLINE, USA) พบว่า ข้าวทุกพันธุ์ที่นำมาศึกษาพบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 1,200 bp แสดงว่าในข้าวทุกพันธุ์มีบริเวณของยีน *OsB1* สามารถนำไปตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ CAPS ของยีน *OsB1* ต่อไปได้ (ภาพที่ 27)

การนำผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *OsB1* จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้ FastDigest enzyme *Bam*HI (Thermo Fisher Scientific, USA) พบขนาดดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 1,200 bp ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวทุกพันธุ์ และขนาดดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 500 และ 700 bp ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่, กำน้อย, กำใหญ่, หอมนิล, กำหนองเต่าคำ, เหนียวดำ และกำพะเยา ยกเว้นพันธุ์มะลิดำ, หอมดำสุโขทัย และลืมผัว ที่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,200, 500 และ 700 bp อาจเกิดจากพันธุ์ข้าวที่ไม่บริสุทธิ์ หรือไม่ใช่พันธุ์แท้ ในงานวิจัยนี้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS สำหรับยีน *OsB1* สามารถแยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ ปทุมธานี 1 กับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์กำน้อยได้ (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 27 ผลการค้นหาบางส่วนของยีน *OsB1* ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder N คือ น้ำ



ภาพที่ 28 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder Plus

ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, ก่ำน้อย และข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ของคู่ผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับก่ำน้อย ต้นที่ 127-131 มาค้นหายีน *OsB1* ด้วยเทคนิค

พีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* พบว่า ข้าวทุกพันธุ์ที่นำมาศึกษาพบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 1,200 bp แสดงว่าในข้าวทุกพันธุ์มีบริเวณของยีน *OsB1* (ภาพที่ 29)

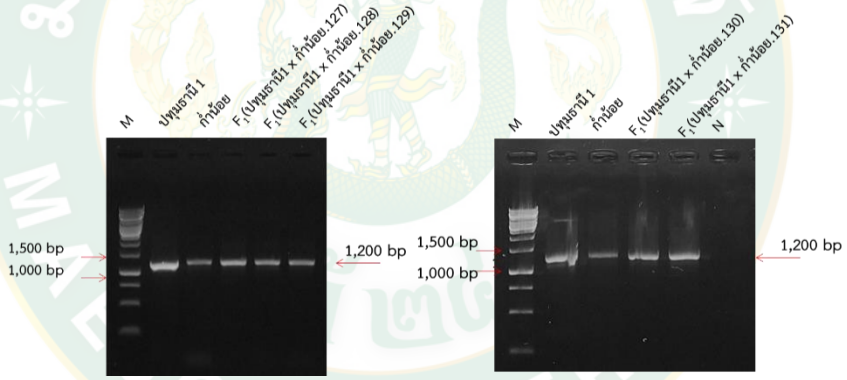
จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *OsB1* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, ก่ำน้อย และข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ต้นที่ 127-131 มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI พบว่า เกิดแถบ ดีเอ็นเอ 3 แบบ ดังนี้ (ภาพที่ 30)

แบบที่ 1 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 1,200 bp เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

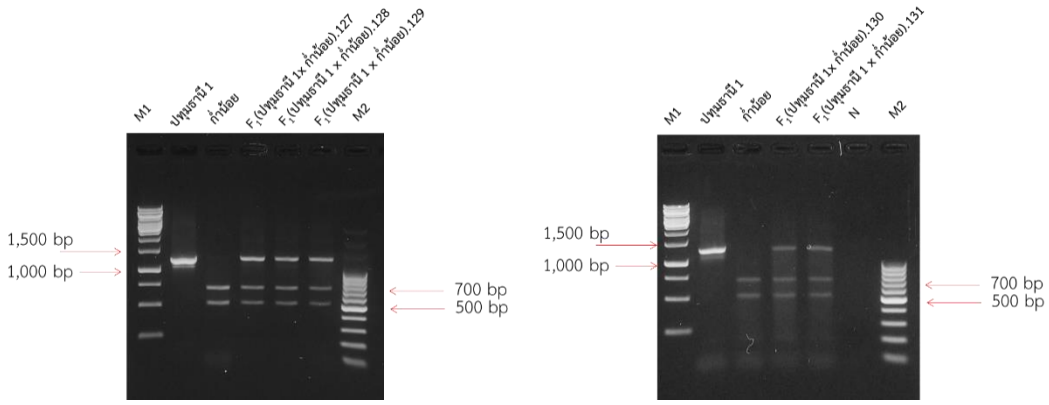
แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 700, 500 bp เหมือนกับพันธุ์ให้ก่ำน้อย

แบบที่ 3 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาด 1,200, 700 และ 500 bp เหมือนกับพันธุ์รับและพันธุ์ให้

แสดงว่า การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS สำหรับยีน *OsB1* สามารถแยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง และตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 1 ได้ จึงนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* มาตรวจสอบในประชากร F_2 ต่อไป



ภาพที่ 29 ผลการค้นหาบางส่วนของยีน *OsB1* ของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ปทุมธานี 1 และก่ำน้อย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder N คือ น้ำ



ภาพที่ 30 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* ของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ปทุมธานี 1 และกำน้อย M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder M2 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder Plus N คือ น้ำ

ประชากร F_2

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับ กำน้อย จำนวน 300 ต้น มาค้นหายีน *OsB1* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* พบว่า ข้าวทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษาพบแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 1,200 bp แสดงว่ามีบริเวณของยีน *OsB1* (ภาพที่ 31) นำผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *OsB1* จากข้าว F_2 จำนวน 300 ต้น และต้น F_1 มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอ 3 แบบ ดังนี้ (ภาพที่ 32)

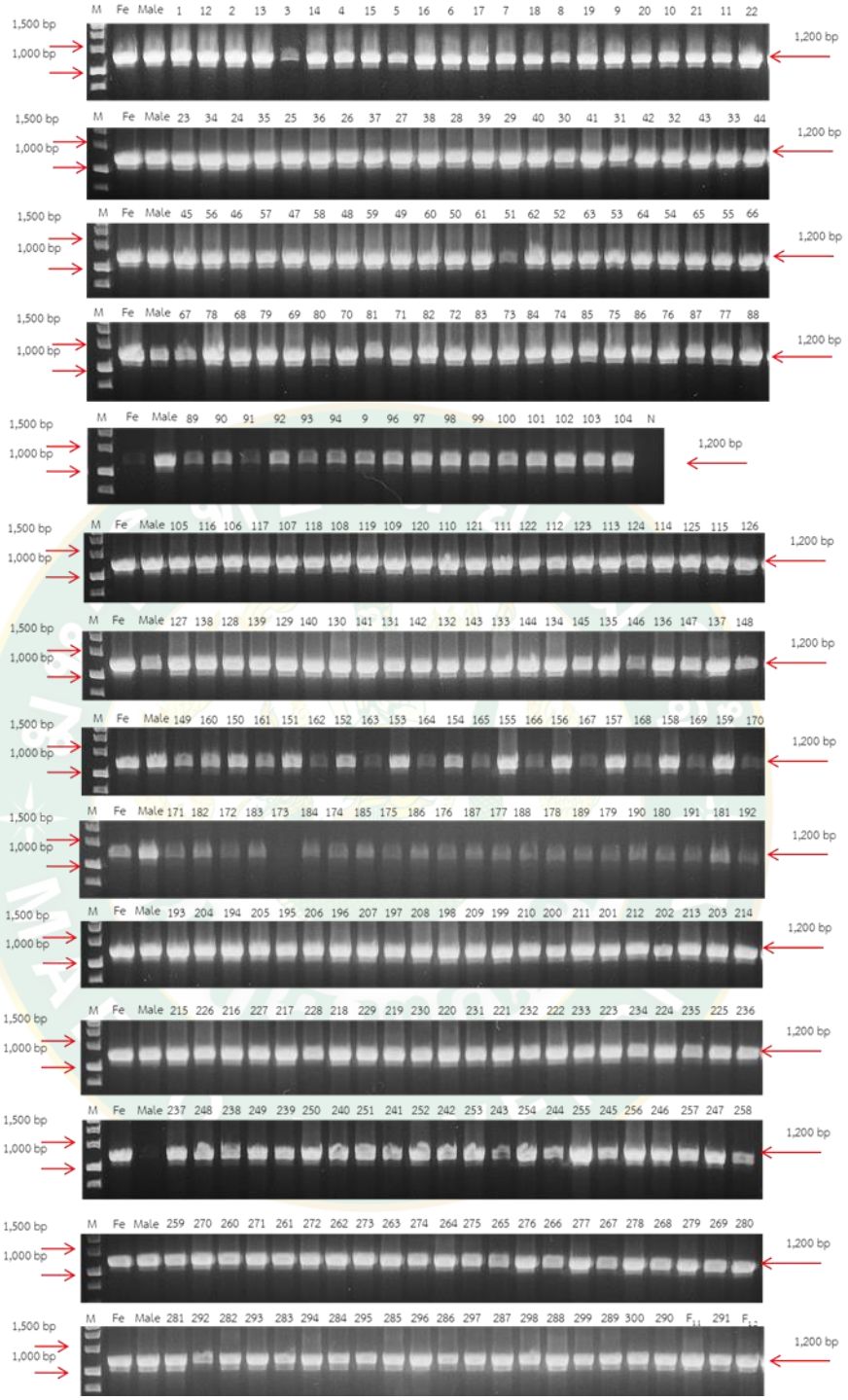
แบบที่ 1 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 1,200 bp เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 700, 500 bp เหมือนกับพันธุ์ให้กำน้อย

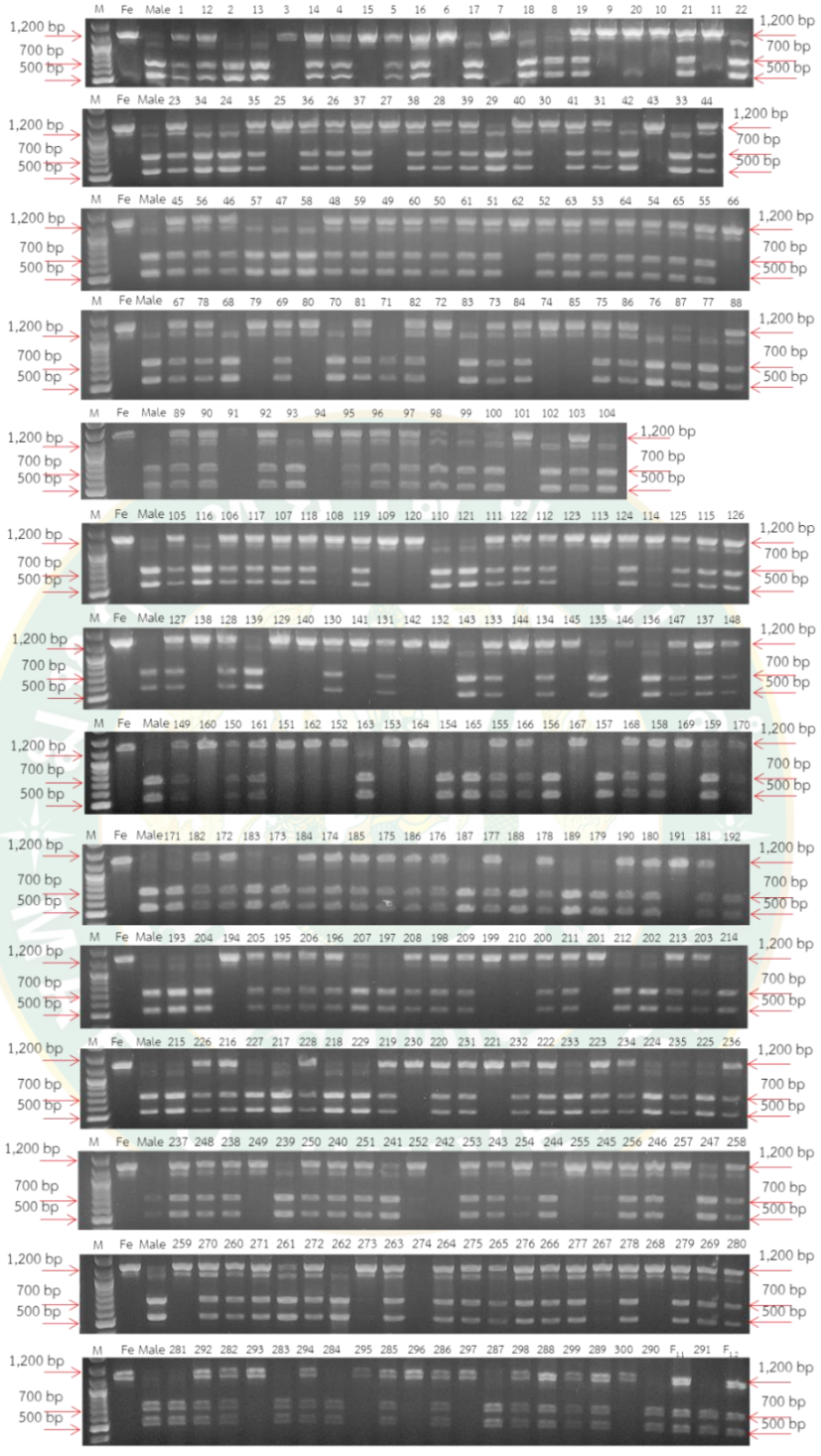
แบบที่ 3 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาด 1,200, 700, 500 bp เหมือนกับพันธุ์รับและพันธุ์ให้

ต้นที่ 32, 91, 98, 99, 100, 121, 159, 207, 242, และ284 พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้ยังไม่ชัดเจน ต้องทำการแก้ไขโดยการทำซ้ำอีกครั้ง (ภาพที่ 33)

การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* เพื่อคัดเลือกข้าว F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับกำน้อย ต้นที่ 1-300 พบว่า ต้นที่เหมือนพันธุ์รับ จำนวน 69 ต้น เหมือนพันธุ์ให้ จำนวน 69 ต้น เหมือนลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จำนวน 162 ต้น

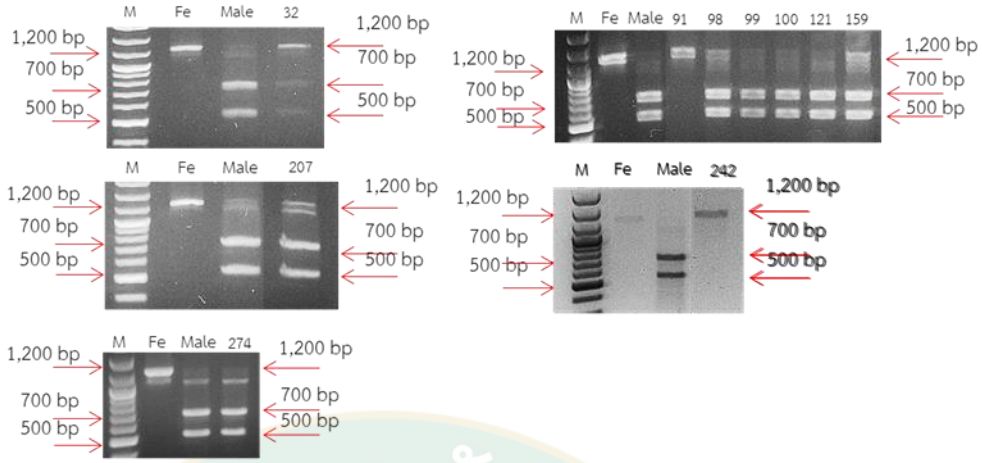


ภาพที่ 31 ผลการค้นหาบางส่วนของยีน *OsB1* ของข้าวประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับพันธุ์ให้กำน้อย ต้นที่ 1 - 300 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder Plus



ภาพที่ 32 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* ของข้าวประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับก่ำน้อย ต้นที่ 1 - 300

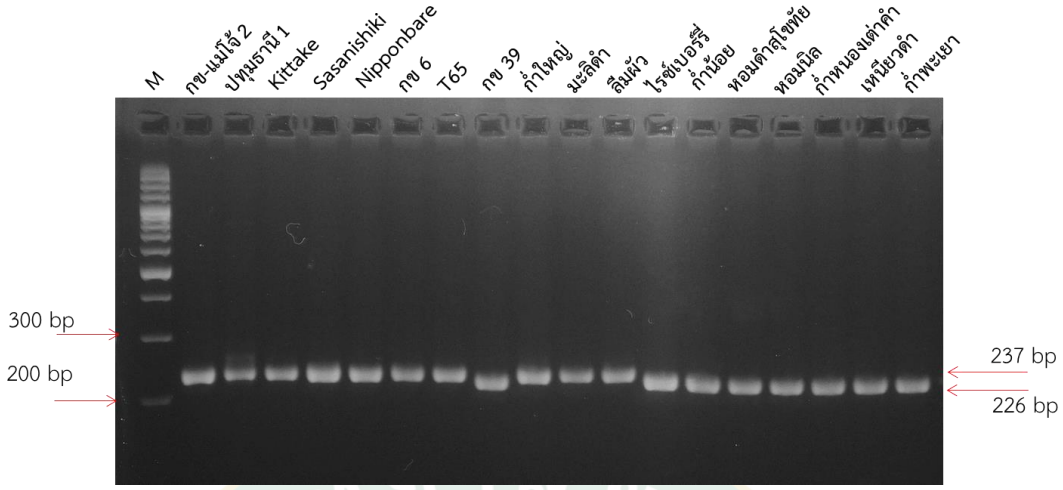
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder



ภาพที่ 33 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* ของข้าวประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับก่ำน้อย ต้นที่ 32, 91, 98, 99, 100, 121, 159, 207, 242, และ 284 โดยนำผลผลิตพีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

5. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด indel ของยีน *OsDFR* ข้าวขาวและข้าวสีพันธุ์ต่าง ๆ

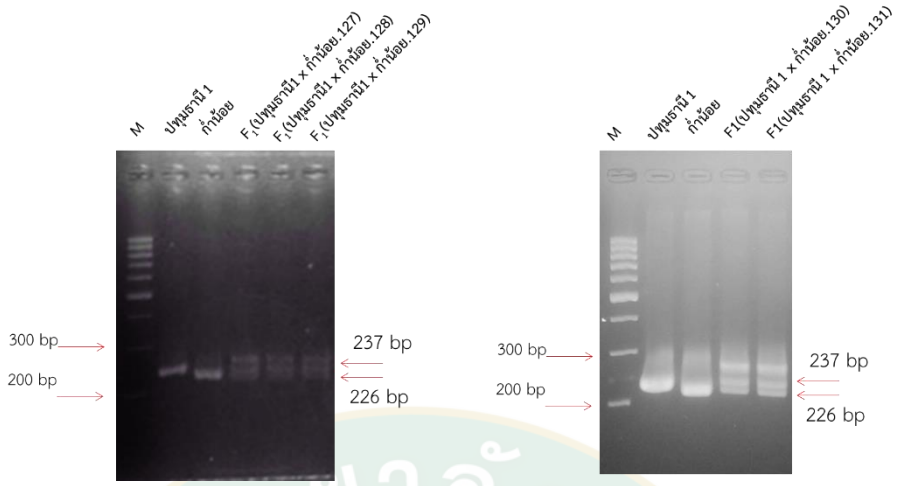
นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2, ปทุมธานี 1, Kitaake, Sasanishiki, Nipponbare, กข6, ไทชุง65, กข39 และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำใหญ่, มะลิดำ, ลืมผัว, ไรซ์เบอร์รี่, ก่ำน้อย, หอมดำสุโขทัย, หอมนิล, ก่ำหนองเต่าคำ, เหนียวดำ และก่ำพะเยา มาค้นหายีน *OsDFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน คือ OsDFR-662F = 5' และ OsDFR-426R (ตารางที่ 1) และใช้ 2x My Taq HS Red mix (BIOLINE, USA) พบว่า ข้าวพันธุ์ กข-แม่โจ้ 2, ปทุมธานี 1, Kitaake, Sasanishiki, Nipponbare, กข6, ไทชุง65, ก่ำหใญ่, มะลิดำ และลืมผัว พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 230 bp และในข้าวพันธุ์ กข39, ไรซ์เบอร์รี่, ก่ำน้อย, หอมดำสุโขทัย, หอมนิล, ก่ำหนองเต่าคำ, เหนียวดำ และก่ำพะเยา พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 220 bp (ภาพที่ 34) แสดงว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด indel ของยีน *OsDFR* สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและสีม่วงบางพันธุ์ได้



ภาพที่ 34 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, ก่ำน้อย และข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ของคู่ผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับก่ำน้อย ต้นที่ 127-131 มาค้นหายีน *OsDFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน คือ OsDFR-662F และ OsDFR-426R (ตารางที่ 1) และใช้ 2x My Taq HS Red mix (BIOLINE, USA) พบว่า ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 พบแถบดีเอ็นเอประมาณ 230 bp ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อย พบแถบดีเอ็นเอประมาณ 220 bp และลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ขนาดประมาณ 220 และ 230 bp ที่ได้จากพันธุ์รับและพันธุ์ให้ แสดงว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* สามารถแยกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 กับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อย และใช้ตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 1 คู่ผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับก่ำน้อยได้ (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 35 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ปทุมธานี 1 และกำน้อย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

ประชากร F_2

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวในประชากรรุ่น F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับกำน้อย ต้นที่ 1-300 มาตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* พบว่า ได้ผลแถบดีเอ็นเอ 3 แบบ ดังนี้ (ภาพที่ 36)

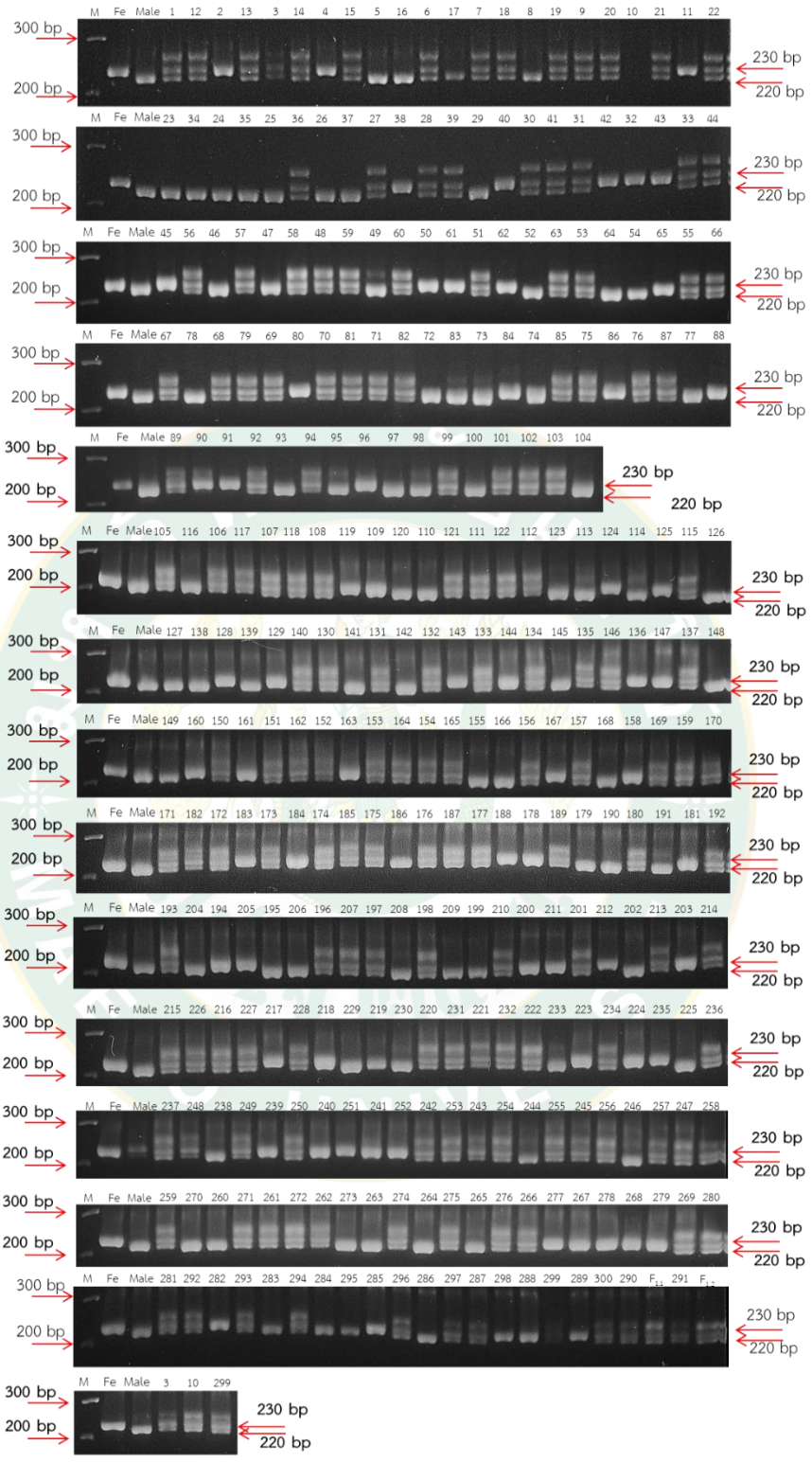
แบบที่ 1 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 230 bp เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1

แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 220 bp เหมือนกับพันธุ์ให้กำน้อย

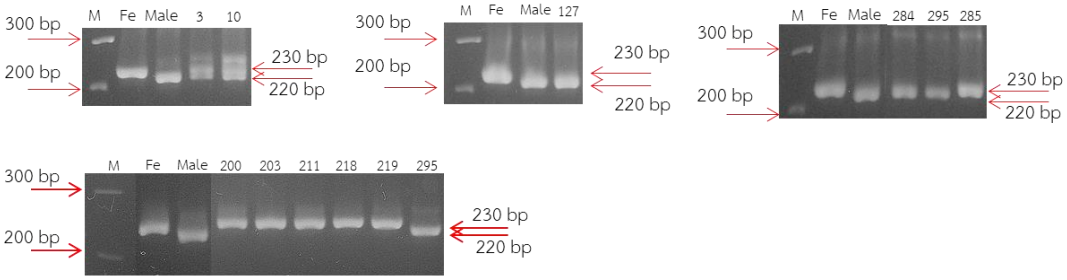
แบบที่ 3 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 230, 220 bp เหมือนกับพันธุ์รับและพันธุ์ให้

จากการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* เพื่อคัดเลือกข้าว F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับกำน้อย ต้นที่ 1-300 พบว่า ต้นที่เหมือนพันธุ์รับจำนวน 63 ต้น เหมือนพันธุ์ให้ 80 ต้น และเหมือนลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) 157 ต้น

ต้นที่ 3, 10, 127, 200, 203, 211, 218, 219, 284, 185, และ295 พบว่า แถบดีเอ็นเอที่พบ ยังไม่ชัดเจน ต้องทำการแก้ไขโดยการทำซ้ำอีกครั้ง (ภาพที่ 37)



ภาพที่ 36 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ของข้าวประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์รับ ปทุมธานี 1 กับพันธุ์ให้ ก่ำน้อย ต้นที่ 1-300 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder Plus



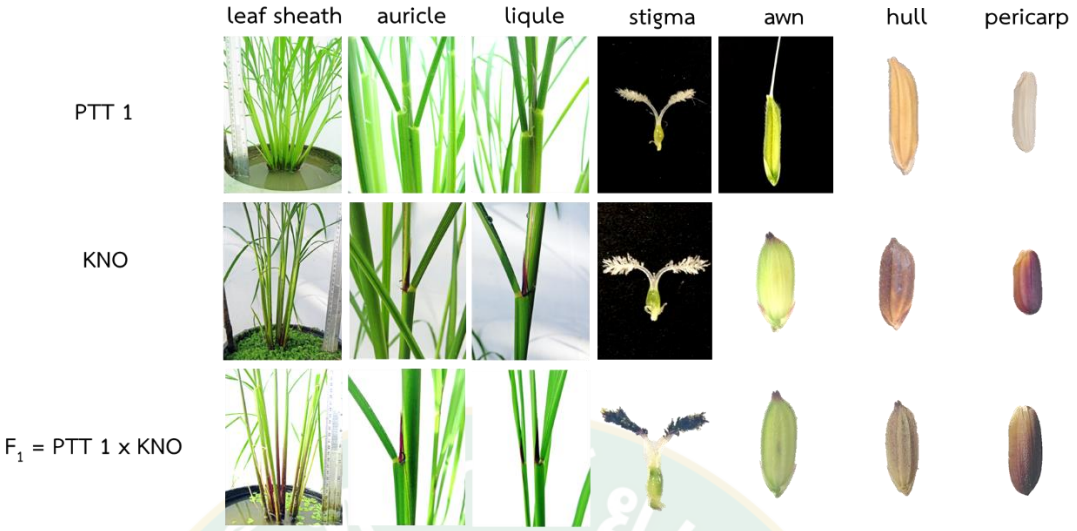
ภาพที่ 37 ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ของข้าวประชากร F_2 ที่ได้จากการคู่ผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับ กำน้อย ต้นที่ 3, 10, 127, 200, 203, 211, 218, 219, 284, 185, และ295 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

6. การวิเคราะห์ฟีโนไทป์

การสังเกตฟีโนไทป์ของข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว สีม่วง และลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ของคู่ผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับกำน้อย (PTT1 x KNO) ลักษณะทางการเจริญเติบโตทางลำต้น ได้แก่ ลักษณะกาบใบ เขี้ยวกันแมลง เยื่อหุ้มกันน้ำฝน พบว่า ข้าวพันธุ์รับ มีสีเขียว ส่วนข้าวพันธุ์ให้ และข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) มีสีม่วง

ลักษณะการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์ เกสรเพศเมีย พันธุ์ปทุมธานี 1 และกำน้อย มีสีขาว ลักษณะหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ สีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่า พันธุ์รับ ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) มีสีขาว ส่วนพันธุ์ให้มีสีม่วง สีเปลือกเมล็ด พบว่า พันธุ์รับและข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) มีสีน้ำตาล ส่วนพันธุ์ให้มีสีม่วง

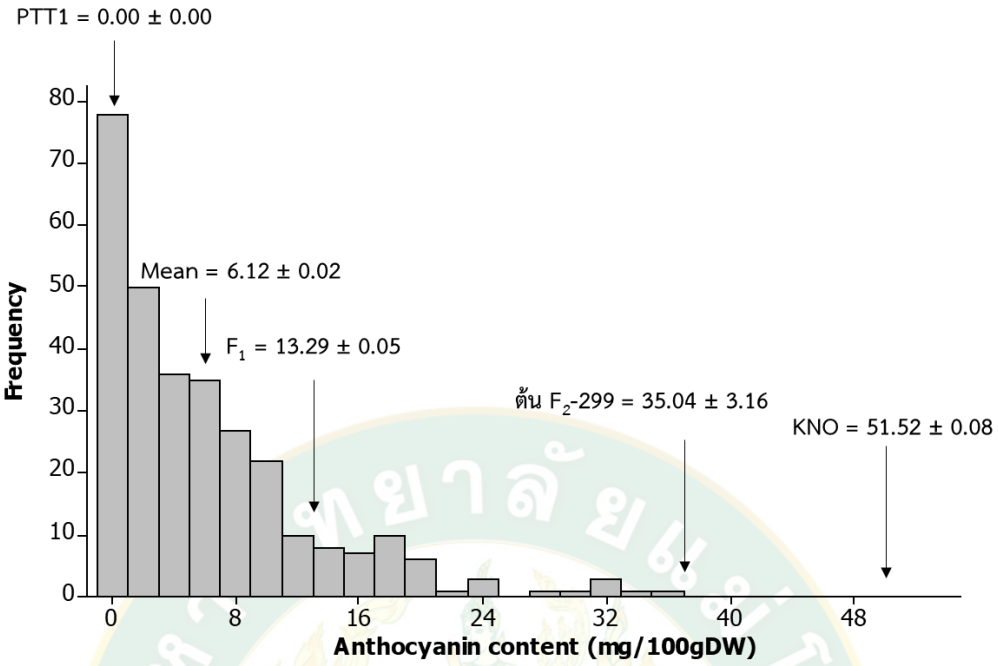
ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) มีฟีโนไทป์เหมือนพันธุ์ให้ ยกเว้นลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีขาวเหมือนพันธุ์รับ เนื่องจากเยื่อหุ้มเมล็ดพัฒนามาจากรังไข่ของแม่จึงมีสีเยื่อหุ้มเมล็ดเหมือนพันธุ์รับ แต่อย่างไรก็ตามข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ที่ได้จากการผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับกำน้อยมีสีเกสรเพศเมียสีม่วง (ภาพที่ 38)



ภาพที่ 38 ฟีโนไทป์ของข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 (PTT 1) พันธุ์ให้ คือ กำ่น้อย (KNO) และลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ของคู่ผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับกำ่น้อย (PTT1 x KNO)

7. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้เมล็ดแก่ของประชากร F_2 จำนวน 300 ตัวอย่าง โดยวิธี pH differential พบว่า พันธุ์รับ ปทุมธานี 1 พันธุ์ให้ กำ่น้อย และต้น F_1 มีปริมาณแอนโทไซยานินเท่ากับ 0.00, 51.52 และ 13.29 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ พบว่า มีการกระจายของค่าปริมาณแอนโทไซยานิน (ภาพที่ 39) โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 6.12 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง ค่าสูงที่สุด เท่ากับ 35.04 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง โดยพบในตัวอย่างที่ 299 และค่าต่ำที่สุด เท่ากับ 0.27 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง โดยพบในตัวอย่างที่ 219



ภาพที่ 39 ฮีสโทรแกรมแสดงการกระจายของปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น วิเคราะห์โดยวิธี pH differential หน่วย คือ มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง ปทุมธานี 1 (PTT1) คือ พันธุ์รับ, ก่ำน้อย (KNO) คือ พันธุ์ให้, F_2-299 คือ ต้นที่ 299

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินของประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น พบว่า ต้นที่ 299 มีค่าปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด เท่ากับ 35.04 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง มีจีโนไทป์ คือ AaBb และเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีม่วงเข้ม และต้นที่ 219 มีค่าปริมาณแอนโทไซยานินต่ำที่สุด เท่ากับ 0.27 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง มีจีโนไทป์ คือ AaBB และเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีน้ำตาล (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด

Rice	Genotype		Anthocyanin content (mg/100gDW)	Pericarp color
	OsB1	*OsDFR*		
PTT1	aa	bb	0.00	white
KNO	AA	BB	51.52	dark purple
F_1	Aa	Bb	13.29	medium purple
F_2-299	Aa	Bb	35.04	dark purple
F_2-219	Aa	BB	0.27	brown

หมายเหตุ ปริมาณแอนโทไซยานินวิเคราะห์จากเมล็ดแก่ของต้น F_1 และ F_2

8. การทดสอบไคสแควร์ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ในประชากร F_2

จากการทดสอบไคสแควร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* (A) และ *OsDFR* (B) ในประชากรต้น F_2 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์รับปทุมธานี 1 กับพันธุ์ให้ก่ำน้อย จำนวน 300 ต้น โดยนำข้อมูลจีโนไทป์มาทดสอบไคสแควร์โดยใช้โปรแกรม Minitab 15 เพื่อวิเคราะห์การถ่ายทอดยีนว่าเป็นไปตามกฎของเมนเดลหรือไม่

การวิเคราะห์การถ่ายทอด 1 ยีน

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับก่ำน้อย จำนวน 300 ต้น มาตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอ 3 แบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 1,200 bp เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1 จำนวน 69 ต้น โดยกำหนดให้มีจีโนไทป์ aa แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 700 และ 500 bp เหมือนกับพันธุ์ให้ก่ำน้อย จำนวน 69 ต้น โดยกำหนดให้มีจีโนไทป์ AA แบบที่ 3 พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาด 1,200, 700 และ 500 bp เหมือนกับลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จำนวน 162 ต้น โดยกำหนดให้มีจีโนไทป์ Aa นำข้อมูลจีโนไทป์มาทดสอบไคสแควร์ พบว่า มีการถ่ายทอดยีนเป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ AA: Aa: aa เท่ากับ 1: 2: 1 (χ^2 = 1.920, *p*-value = 0.383) (ตารางที่ 4)

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างปทุมธานี 1 กับก่ำน้อย จำนวน 300 ต้นมาตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอ 3 แบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 230 bp

เหมือนพันธุ์รับปทุมธานี 1 จำนวน 63 ต้น โดยกำหนดให้มีจีโนไทป์ bb แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 220 bp เหมือนกับพันธุ์ให้ก่ำน้อย จำนวน 80 ต้น โดยกำหนดให้มีจีโนไทป์ BB แบบที่ 3 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 230 และ 220 bp เหมือนกับลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จำนวน 157 ต้น โดยกำหนดให้มีจีโนไทป์ Bb นำข้อมูลจีโนไทป์มาทดสอบไคสแควร์ พบว่า มีการถ่ายทอดยีนเป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ BB: Bb: bb เท่ากับ 1: 2: 1 (χ^2 = 2.580, *p*-value = 0.275) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ในประชากร F_2 ที่ระดับนัยสำคัญ 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		

หมายเหตุ ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (การถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ 1:2:1)

D คือ จีโนไทป์ที่เหมือนพันธุ์ให้ แบบ homozygous dominant

H คือ จีโนไทป์ที่เหมือนพันธุ์ F_1 แบบ heterozygous

R คือ จีโนไทป์ที่เหมือนพันธุ์รับ แบบ homozygous recessive

การวิเคราะห์การถ่ายทอด 2 ยีน

การทดสอบไคสแควร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* (A) และ *OsDFR* (B) ในประชากร F_2 พบว่า จากการคำนวณค่าไคสแควร์ที่ได้จากการทดลอง เท่ากับ 5.52 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าไคสแควร์ในตารางที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ค่า df เท่ากับ 8 มีค่าเท่ากับ 15.5 ไคสแควร์ที่ได้จากการคำนวณน้อยกว่าค่า แสดงว่าการทดลองเป็นไปตามสมมุติฐาน คือ อัตราส่วนจีโนไทป์ เท่ากับ 1:2:1:2:4:2:1:2:1 (χ^2 = 5.52, *p*-value = 0.701) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ในประชากร F_2 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05
สมมุติฐาน คือ อัตราส่วนจีโนไทป์ประชากร F_2 = 1AABB :2AABb: 1AAbb :2AaBB :4AaBb :2Aabb :1aaBB :2aaBb :1aabb

Gene	Genotype	Observed	Expected	χ^2	*p*-value
OsB1/OsDFR	AABB	22	18.75	5.52	0.701^{ns}
	AABb	33	37.50		
	AAbb	14	18.75		
	AaBB	40	37.50		
	AaBb	86	75.00		
	Aabb	36	37.50		
	aaBB	17	18.75		
	aaBb	38	37.50		
	aabb	14	18.75		
Total		300	300		

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (การถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล)

9. การทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ด

การวิเคราะห์ฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดแก่ของประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น พบว่า สีเยื่อหุ้มเมล็ดมี 3 แบบ คือ สีม่วง (purple) จำนวน 177 ต้น ซึ่งสามารถแบ่งเป็น สีม่วงเข้ม (dark purple) จำนวน 69 ต้น และ สีม่วงกลาง (medium purple) จำนวน 108 ต้น สีน้ำตาล (Brown) จำนวน 54 ต้น และสีขาว (white) จำนวน 69 ต้น (ภาพที่ 40 และภาพที่ 41)

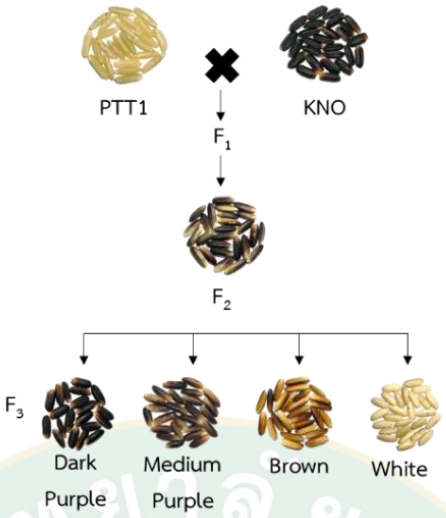
จากการศึกษาของ Rahman et al. (2013) ในประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ข้าวดำกับขาว พบว่า มีการทำงานของยีน *OsB1* และ *OsDFR* แบบ recessive epistasis โดยมีอัตราส่วนสีเยื่อหุ้มเมล็ด คือ 9:3:4 (purple : brown : white) ในงานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 พบว่า ผลการทดลองเป็นไปตามสมมุติฐาน คือ 9:3:4 (purple : brown : white) (χ^2 = 0.973, *p*-value = 0.614) (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตามฟีโนไทป์สีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและสี

น้ำตาล เมื่อพิจารณาจีโนไทป์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* พบว่า ไม่สอดคล้องกับการทำงานของยีนแบบ recessive epistasis ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Rahman et al., 2013) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด indel ของยีน *OsDFR* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งอยู่บริเวณ upstream ของโปรโมเตอร์ไม่สามารถใช้แยกสีเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีม่วงและน้ำตาลได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้การจัดกลุ่มสีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและน้ำตาลของบางตัวอย่างอาจยังไม่สามารถจัดกลุ่มแยกจากกันได้อย่างชัดเจน

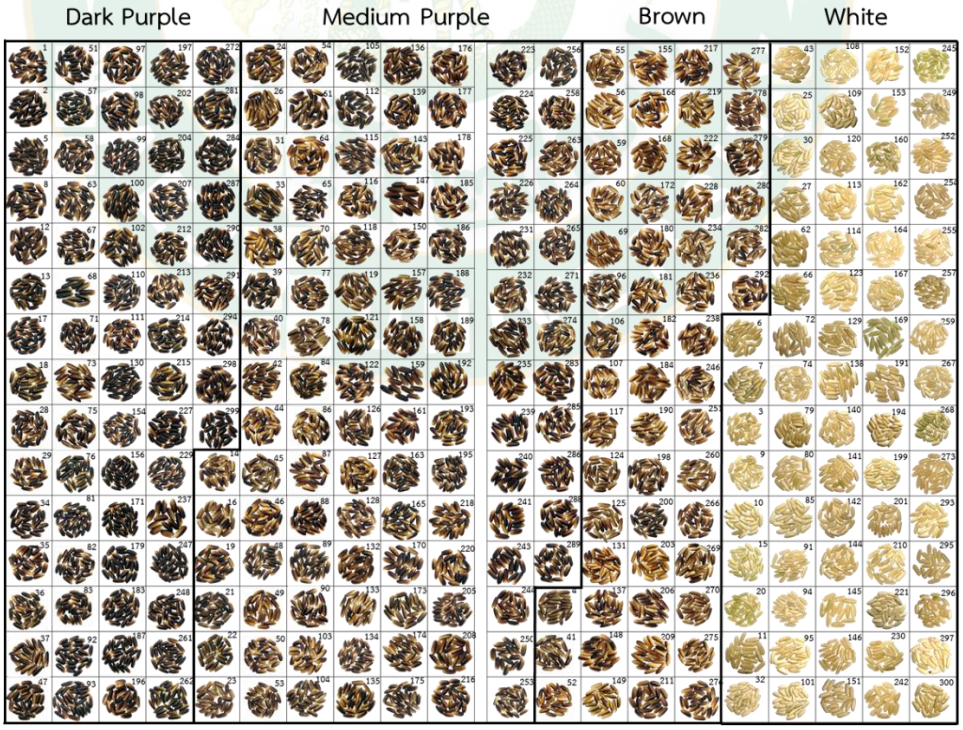
การทดสอบค่าไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีม่วงเข้ม (dark purple) และสีม่วงกลาง (medium purple) ในประชากร F_2 มีการกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดตามสมมุติฐาน คือ 2:1 (medium purple: dark purple) (χ^2 = 2.542, *p*-value = 0.110) (ตารางที่ 7) สอดคล้องกับรายงานของ Rahman et al. (2013)

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์จีโนไทป์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่า มีบางต้นที่ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Rahman et al. (2013) ในงานวิจัยนี้พบว่า ข้าวสีม่วงเข้มมีจีโนไทป์ *A_BB* , *A_B_* และ *A_bb* และสีม่วงกลางมีจีโนไทป์ *A_Bb*, *A_B_* และ *A_bb* แสดงว่า การเกิดสีม่วงต้องมียีน *OsB1* เด่นอย่างน้อย 1 ยีน ส่วนการเกิดสีม่วงเข้มหรือม่วงกลาง ไม่ขึ้นอยู่กับยีน *OsDFR* ยีนเดียว แต่อาจถูกควบคุมด้วยยีนในตำแหน่งอื่น ๆ ด้วย เนื่องจากการจัดกลุ่มสีเยื่อหุ้มเมล็ดยังไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน ในงานวิจัยนี้จึงแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดมีสี (color) และกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดไม่มีสี (colorless) ซึ่งสอดคล้องกับจีโนไทป์ของยีน *OsB1* คือ A_ และ aa ดังนั้นจึงนำมาทดสอบการกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดของประชากร F_2 โดยมีสมมุติฐาน คือ 3:1 (color: colorless) เมื่อทำการทดสอบค่าไคสแควร์ในประชากร F_2 พบว่า มีการกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ 3:1 (color: colorless) (χ^2 = 0.640, *p*-value = 0.423) (ตารางที่ 8) และสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการผสมข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงและสีขาว ระหว่างพันธุ์ Kewha กับ Kumgangbyeo เมื่อทำการทดสอบไคสแควร์สีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 พบว่า มีข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง ต่อข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว เท่ากับ 3 : 1 และในการเกิดสีเยื่อหุ้มเมล็ดจำเป็นจะต้องมียีน *OsB1* เด่นอย่างน้อยหนึ่งยีน (Rahman et al., 2013) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang et al. (2019) ที่ผสมข้าวพันธุ์ Donglanmomi ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง กับพันธุ์ Huanghuazhan ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินต่ำ และทดสอบไคสแควร์สีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 พบว่า อัตราส่วนฟีโนไทป์ของเยื่อหุ้มเมล็ดมีสี : เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว เท่ากับ 3 : 1

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอนโซยานินกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่า มีค่าสหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r) เท่ากับ 0.780 แสดงว่าปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ดมีความสัมพันธ์เชิงบวกมีทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



ภาพที่ 40 ลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าว ข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวปทุมธานี 1 (PTT1) ผสมกับข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงกำน้อย (KNO) เพื่อผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และเมล็ดแก่ประชากร F_2 แสดงสีเยื่อหุ้มเมล็ดแตกต่างกัน คือ ม่วงเข้ม (dark purple) ม่วงกลาง (medium purple) น้ำตาล (brown) และขาว (white)



ภาพที่ 41 เมล็ดของประชากร F_2 ทั้งหมด 300 ต้น แสดงสีเยื่อหุ้มเมล็ดที่แตกต่างกัน คือ ม่วงเข้ม (dark purple) ม่วงกลาง (medium purple) น้ำตาล (brown) และขาว (white)

ตารางที่ 6 การทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2
สมมุติฐาน คือ อัตราส่วนฟีโนไทป์ลูก F_2 = 9 purple : 3 brown : 4 white

Number	Pericarp p			Total	χ^2 (9:3:4)	*p*-value
	purple	brown	white			
Observed	177	54	69	300	0.973	0.6147^{ns}
Expected	168.75	56.25	75	300		

หมายเหตุ ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (การถ่ายทอดเป็นไปตามสมมุติฐาน คือ 9: 3: 4)

ตารางที่ 7 การทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2
สมมุติฐาน คือ อัตราส่วนฟีโนไทป์ลูก F_2 = 2 medium purple : 1 dark purple

Number	Pericarp color		Total	χ^2 (2:1)	*p*-value
	medium purple	dark purple			
Observed	108	69	177	2.542	0.1108^{ns}
Expected	118	59	177		

หมายเหตุ ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (การถ่ายทอดเป็นไปตามสมมุติฐาน คือ 2: 1)

ตารางที่ 8 การทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2
สมมุติฐาน คือ อัตราส่วนฟีโนไทป์ลูก F_2 = 3 color : 1 colorless

Number	Pericarp color		Total	χ^2 (3:1)	*p*-value
	color	colorless			
Observed	231	69	300	0.640	0.4237^{ns}
Expected	225	75	300		

หมายเหตุ ^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (การถ่ายทอดเป็นไปตามสมมุติฐาน คือ 3: 1)

10. การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินโดยวิธี ANOVA

นำจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ของข้าวประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น กับฟีโนไทป์ คือ ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินมาวิเคราะห์ด้วยวิธี ANOVA โดยโปรแกรม Minitab 15 ในการวิเคราะห์ข้อมูล กำหนดให้ยีน *OsB1* แทนสัญลักษณ์ A ยีน *OsDFR* แทนสัญลักษณ์ B ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

10.1 การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* กับค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน

นำจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* (A) ในประชากร F_2 กับฟีโนไทป์ คือ ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินมาวิเคราะห์โดยวิธี ANOVA พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมุติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินแตกต่างกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ANOVA จัดกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey ได้ผลดังตารางที่ 9 พบว่า

AA มีจำนวน 69 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 11.463 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 7.377 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 10.113 ถึง 12.812 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม A

Aa มีจำนวน 162 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 6.447 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 6.073 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 5.566 ถึง 7.328 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม B

aa มีจำนวน 69 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 0.000 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.000 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง -1.349 ถึง 1.349 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม C

ดังนั้น การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* (A) ในประชากร F_2 กับฟีโนไทป์ คือ ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน คาดว่ามีความสำคัญในการคัดเลือกต้นข้าวที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน โดยจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ จีโนไทป์ AA จัดอยู่กลุ่ม A จีโนไทป์ Aa จัดอยู่ในกลุ่ม B และจีโนไทป์ aa จัดอยู่ในกลุ่ม C จึงสามารถจัดกลุ่มโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินได้ (ภาพที่ 42)

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* (A) กับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

Genotype	N	Mean	StDev	95% Confidence Interval	Grouping
AA	69	11.463	7.377	(10.113, 12.812)	A
Aa	162	6.447	6.073	(5.566, 7.328)	B
aa	69	0.000	0.000	(-1.349, 1.349)	C

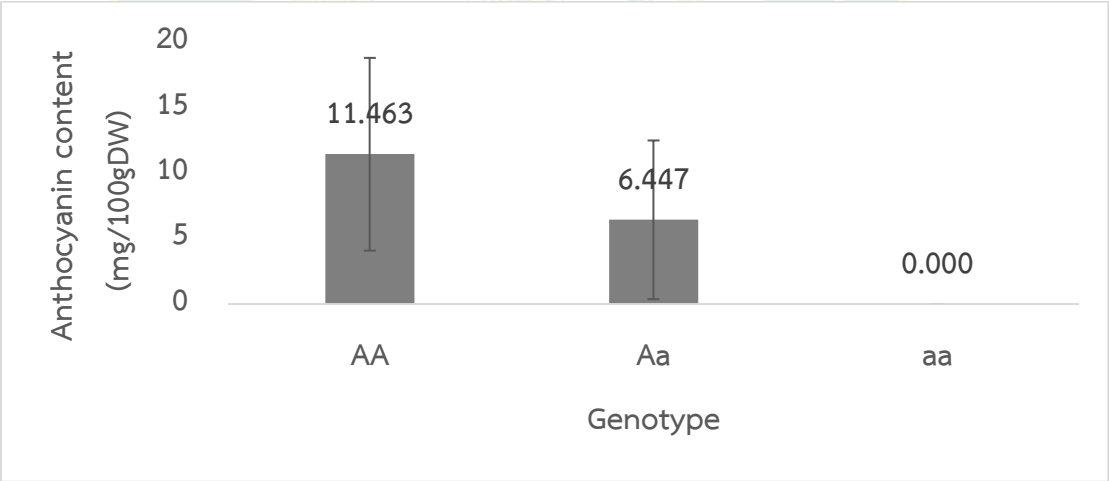
N คือ จำนวนต้น

Mean คือ ค่าเฉลี่ยของปริมาณแอนโทไซยานิน

StDev คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

95% Confidence Interval คือ ช่วงความเชื่อมั่นมีค่าเท่ากับ 95% เปรียบเทียบโดยวิธี Tukey

Grouping คือ รหัสอักษร Grouping ที่ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินของแต่ละจีโนไทป์แตกต่างกัน



ภาพที่ 42 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินกับจีโนไทป์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* ที่มีจีโนไทป์แบบ AA, Aa และ aa หน่วยปริมาณแอนโทไซยานิน คือ มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง

10.2 การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานิน

นำจีโนไทป์ของยีน *OsDFR* (B) ของข้าวในประชากร F_2 กับฟีโนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานินมาวิเคราะห์ด้วยวิธี ANOVA พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) แสดงว่ายอมรับสมมุติฐาน H_0 คือ กลุ่มของจีโนไทป์มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินไม่แตกต่างกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์ผล ANOVA จัดกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey ได้ผลดังตารางที่ 10 พบว่า

BB มีจำนวน 80 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 6.049 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 6.538 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 4.534 ถึง 7.563 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม A

Bb มีจำนวน 157 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 6.641 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 7.266 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 5.559 ถึง 7.722 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม A

bb มีจำนวน 63 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 4.903 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 6.300 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 3.196 ถึง 6.609 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม A

ดังนั้น การวิเคราะห์จีโนไทป์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* (B) ของข้าวในประชากร F_2 กับฟีโนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานิน คาดว่าไม่สามารถใช้คัดเลือกต้นข้าวที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินได้ เนื่องจากจัดกลุ่มตามจีโนไทป์ BB, Bb และ bb อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (ภาพที่ 43) แสดงว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* ในงานวิจัยนี้ไม่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยิน ซึ่งอาจจะมียีนอื่นที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* (B) กับปริมาณแอนโทไซยานิน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

Genotype	N	Mean	StDev	95% Confidence Interval	Grouping
BB	80	6.049	6.538	(4.534, 7.563)	A
Bb	157	6.641	7.266	(5.559, 7.722)	A
bb	63	4.903	6.300	(3.196, 6.609)	A

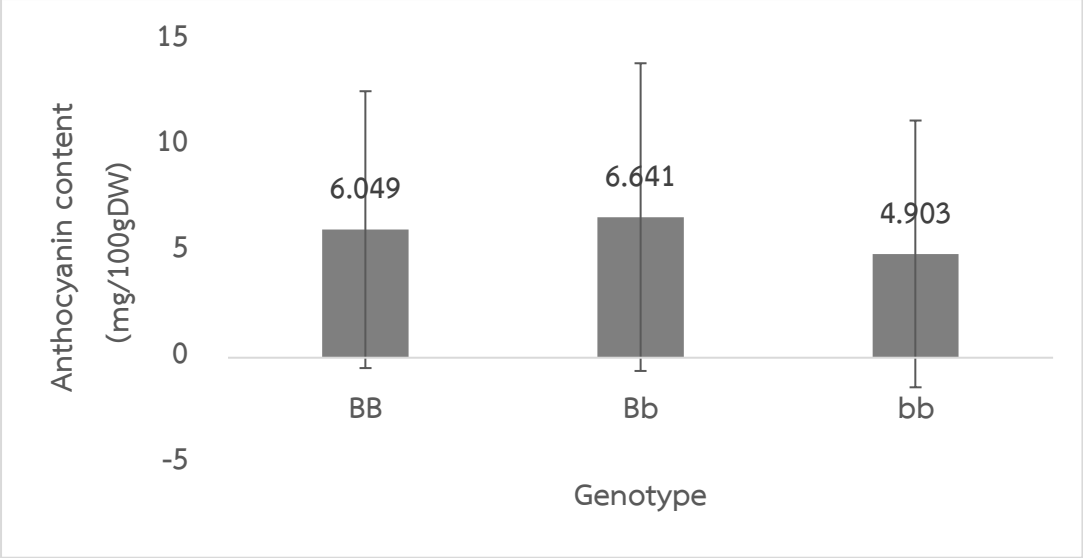
N คือ จำนวนต้น

Mean คือ ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน

StDev คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

95% Confidence Interval คือ ช่วงความเชื่อมั่นมีค่าเท่ากับ 95% เปรียบเทียบโดยวิธี Tukey

Grouping คือ รหัสอักษร Grouping ที่ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินของแต่ละจีโนไทป์แตกต่างกัน



ภาพที่ 43 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินกับเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* ที่มีจีโนไทป์แบบ BB, Bb และ bb หน่วยปริมาณแอนโทไซยานิน คือ มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง

11. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ (จีโนไทป์) ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับฟีโนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานินจากวิธี pH differential วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี simple regression โดยโปรแกรม Minitab 15 พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานิน มีค่า R^2 เท่ากับ 31.9 % และ 0.3 % ตามลำดับ ในเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน (ตารางที่ 11) ในงานวิจัยนี้มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* เพียงตำแหน่งเดียวที่มีความสัมพันธ์กับแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ (จีโนไทป์) ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ดด้วยวิธี simple regression โดยโปรแกรม Minitab 15 พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด มีค่า R^2 เท่ากับ 63.7 %

และ 0.3 % ตามลำดับ ในเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) แสดงว่า มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด (ตารางที่ 12) ในงานวิจัยนี้มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* เพียงตำแหน่งเดียวที่มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ simple regression ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2

Gene	Marker	R-Square (%)	*p*-value
OsB1	CAPS	31.9	0.000*
OsDFR	Indel	0.3	0.388ns

*คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ nsคือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ simple regression ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2

Gene	Marker	R-Square (%)	*p*-value
OsB1	CAPS	63.7	0.000*
OsDFR	Indel	0.3	0.314ns

*คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ nsคือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับคัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง และทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยคัดเลือกข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวเป็นพันธุ์รับ คือ พันธุ์ปทุมธานี 1 ที่เป็นข้าวพันธุ์ดีของไทย ให้ผลผลิตสูง และข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำหรือม่วงเข้มเป็นพันธุ์ให้ คือ พันธุ์ก่ำน้อย ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง ผสมพันธุ์ข้าวเพื่อผลิตเมล็ด F_1 และเมล็ด F_2 ปลูกประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ที่พัฒนาในงานวิจัยนี้อยู่บริเวณ upstream ของ +1 ที่ตำแหน่ง -450 ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 เกิด 11-bp addition และในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อย ไม่เกิด 11-bp addition จึงนำมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับปทุมธานี 1 และพันธุ์ให้ก่ำน้อย พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel ของยีน *OsDFR* ที่ได้จากงานทดลองนี้ นำมาใช้คัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 กับก่ำน้อยได้ และเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* บริเวณ exon ที่ 7 ในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์ปทุมธานี 1 เกิด 2-bp addition และในข้าวเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงพันธุ์ก่ำน้อยไม่เกิด 2-bp addition ทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* นำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 กับก่ำน้อยได้

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้เมล็ดแก่ของประชากร F_2 จำนวน 300 ตัวอย่าง โดยวิธี pH differential พบว่า พันธุ์รับปทุมธานี 1, พันธุ์ให้ก่ำน้อย และต้น F_1 มีปริมาณแอนโทไซยานินค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.00, 51.52 และ 13.29 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง ตามลำดับ และพบว่า ประชากร F_2 ตัวอย่างที่ 299 มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดเท่ากับ 35.04 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง ซึ่งมีจีโนไทป์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* คือ AaBa และเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้ม

เมื่อทดสอบไคสแควร์ของการถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* ในประชากร F_2 โดยวิเคราะห์การถ่ายทอด 1 ยีน พบว่า การถ่ายทอดจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ AA: Aa: aa เท่ากับ 1: 2: 1 (χ^2 = 1.92, *p*-value = 0.3829) และเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* พบว่า มีการถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ BB: Bb: bb เท่ากับ 1: 2: 1 (χ^2 = 2.580, *p*-value = 0.275) เมื่อวิเคราะห์การถ่ายทอด

เครื่องหมายดีเอ็นเอของ 2 ยีน พบว่า มีการถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ 1AABB :2AABb: 1AAbb :2AaBB :4AaBb :2Aabb :1aaBB :2aaBb :1aabb เท่ากับ 1:2:1:2:4:2:1:2:1 (χ^2 = 5.52, *p*-value = 0.701)

การวิเคราะห์สีเยื่อหุ้มเมล็ดแก่ของประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น พบว่า มีสีเยื่อหุ้มเมล็ด 4 แบบ คือ สีม่วงเข้ม (dark purple) สีม่วงกลาง (medium purple) สีน้ำตาล (brown) และสีขาว (white) เมื่อทดสอบไคสแควร์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่าเป็นไปตามสมมุติฐาน 9:3:4 (purple : brown : white) (χ^2 = 0.973, *p*-value = 0.614)

อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มสีเยื่อหุ้มเมล็ดในบางตัวอย่าง ยังไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน ในงานวิจัยนี้จึงแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดมีสี (color) และกลุ่มเยื่อหุ้มเมล็ดไม่มีสี (colorless) ซึ่งสอดคล้องกับจีโนไทป์ของยีน *OsB1* คือ A_ (color) และ aa (colorless) เมื่อทำการทดสอบค่าไคสแควร์ พบว่า มีการกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2 เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ 3:1 (color: colorless) (χ^2 = 0.640, *p*-value = 0.423)

การวิเคราะห์จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* จัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ จีโนไทป์ AA จีโนไทป์ Aa และ จีโนไทป์ aa แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* ไม่สามารถจัดกลุ่มตามจีโนไทป์ได้ คาดว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* มีความสำคัญในการคัดเลือกต้นข้าวที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F_2 พบว่า ยีน *OsB1* และ *OsDFR* มีค่า R^2 เท่ากับ 31.9 % และ 0.3 % ตามลำดับ แสดงว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน โดยมีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นของยีน *OsDFR* ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05) แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ในงานวิจัยนี้มีเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* เพียงตำแหน่งเดียวที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากร F_2 พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด มีค่า R^2 เท่ากับ 63.7 % และ 0.3 % ตามลำดับ ในเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แสดงว่า มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsDFR* พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด

ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ของยีน *OsB1* สามารถใช้เพื่อคัดเลือกข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง และเยื่อหุ้มเมล็ดมีสีได้ จึงสามารถจัดกลุ่มสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้จากยีน *OsB1* โดยที่จีโนไทป์ AA และ Aa ให้สีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง และจีโนไทป์ aa ให้สีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีขาว เครื่องหมายชนิดนี้จะเป็นประโยชน์ในการใช้คัดเลือกต้นข้าวได้ตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโต สะดวก รวดเร็ว ช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงได้

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY

ภาคผนวก

การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* และ *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานิน

นำจีโนไทป์ของยีน *OsB1* (A) และ *OsDFR* (B) ของข้าวในประชากร F_2 กับฟีโนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานินมาวิเคราะห์โดยวิธี ANOVA พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงว่ายอมรับสมมุติฐาน H_1 คือ มีจีโนไทป์อย่างน้อย 1 กลุ่ม ที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินแตกต่างกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์ผล ANOVA จัดกลุ่มโดยใช้วิธี Tukey ได้ผลดังตารางที่ 11 พบว่า

AABB มีจำนวน 22 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 11.78 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 7.55 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 9.41 ถึง 14.16 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม A และ B

AABb มีจำนวน 33 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 11.5 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 6.08 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 9.56 ถึง 13.44 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม A และ B

AAbb มีจำนวน 14 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 10.87 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 10.05 สามารถคาดเดาได้ว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน ของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 7.89 ถึง 13.84 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม A และ A, B และ C

AaBB มีจำนวน 40 ต้น ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 5.571 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 4.549 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน ของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 3.811 ถึง 7.332 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่มC และ D

AaBb มีจำนวน 86 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 7.71 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 7.274 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน ของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 6.509 ถึง 8.910 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม และ B, C และ D

Aabb มีจำนวน 36 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 4.403 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 2.996 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน ของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 2.548 ถึง 6.259 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม และ D และ E

aaBB มีจำนวน 17 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 0.000 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.000 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน ของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง -2.700 ถึง 2.700 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม และ E และ F

aaBb มีจำนวน 38 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 0.000 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.000 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน ของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง -1.806 ถึง 1.806 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม และ F

aabb มีจำนวน 14 ต้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน เท่ากับ 0.000 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.000 สามารถคาดเดาได้ว่าค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน ของประชากรกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 2.975 ถึง 2.975 ด้วยความเชื่อมั่นที่ 95% จัดอยู่ในกลุ่ม E และ F

ดังนั้น การวิเคราะห์จีโนไทป์ของยีน *OsB1* (A) และ *OsDFR* (B) ข้าวในประชากร F_2 กับฟีโนไทป์ คือ ปริมาณแอนโทไซยานิน ทั้ง 2 ยีนคาดว่ามีความสำคัญในการคัดเลือกต้นข้าว ที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน โดยจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ ถ้ามีจีโนไทป์ AA_ _ จัดให้อยู่กลุ่ม A ถ้ามีจีโนไทป์ Aa_ _ จัดอยู่ในกลุ่ม D และถ้ามีจีโนทป์ aa_ _ จัดให้อยู่กลุ่ม F (ภาพที่ 44)

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ ANOVA ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* (A) และ *OsDFR* (B) กับปริมาณแอนโทไซยานิน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

Genotype	N	Mean	StDev	95% Confidence Interval	Grouping
AABB	22	11.78	7.55	(9.41, 14.16)	A B
AABb	33	11.5	6.08	(9.56, 13.44)	A
AAbb	14	10.87	10.05	(7.89, 13.84)	A B C
AaBB	40	5.571	4.549	(3.811, 7.332)	C D
AaBb	86	7.71	7.274	(6.509, 8.910)	B C D
Aabb	36	4.403	2.996	(2.548, 6.259)	D E
aaBB	17	0.000	0.000	(-2.700, 2.700)	E F
aaBb	38	0.000	0.000	(-1.806, 1.806)	F
aabb	14	0.000	0.000	(-2.975, 2.975)	E F

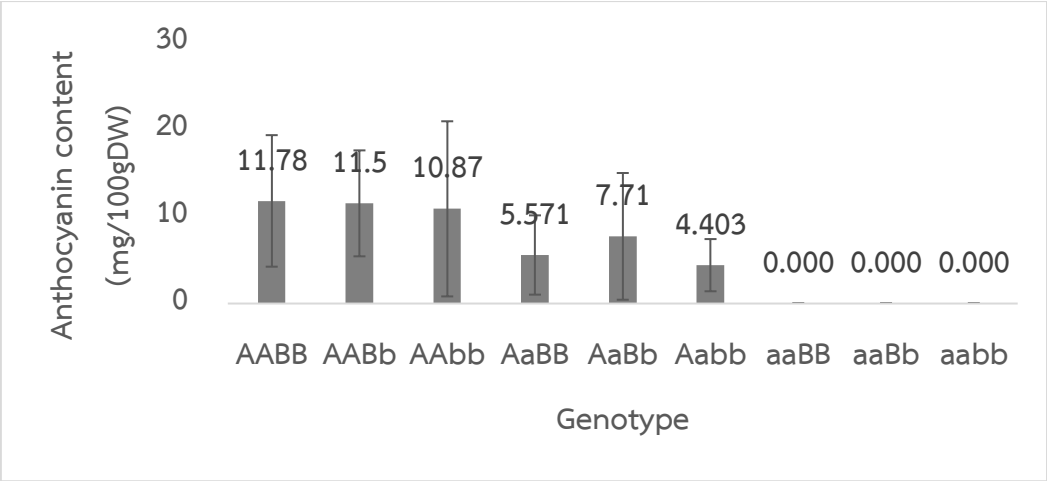
N คือ จำนวนต้น

Mean คือ ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานิน

StDev คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

95% Confidence Interval คือ ช่วงความเชื่อมั่นมีค่าเท่ากับ 95% เปรียบเทียบโดยวิธี Tukey

Grouping คือ รหัสอักษร Grouping ที่ค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินของแต่ละจีโนไทป์แตกต่างกัน



ภาพผนวกที่ 1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณแอนโทไซยานินกับเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* (A) และ *OsDFR* (B) ที่มีจีโนไทป์แบบ aabb, aaBb, aaBB, Aabb, AaBb, AaBB, AAbb, AABb และ AABB หน่วยปริมาณแอนโทไซยานิน คือ มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดแห้ง

บรรณานุกรม

กรมการข้าว. 2561. ดอกข้าว. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.ricethailand.go.th/rkb/varieties/index.phpfile=content.php&id=112.htm. (1 กรกฎาคม 2561).

กรมการข้าว. 2563. พันธุ์ข้าวปทุมธานี 1. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.ricethailand.go.th/Rkb/varieties/index.phpfile=content.php&id=67.Htm. (15 ธันวาคม 2563).

กรมวิทยาศาสตร์บริการ, กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2553. แอนโทไซยานิน. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://siweb.dss.go.th/fulltext/IR21.pdf. (4 กรกฎาคม 2561).

จันทร์จิรา โรหิตเสถียร. 2557. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสต่ำ ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบบันทึกประวัติ. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น**, 14(2), 15-120.

จีราพร แก่นทรัพย์. 2563. เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานโรค. **สารสารวิชาการเกษตร,** 38(2), 207-222.

จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. **แก่นเกษตร** 40.

ณัฏฐิกา ศิลาลาย. 2549. ฟลาโวนอยด์ในใบชา หน้าที่ การใช้ประโยชน์ และการวิเคราะห์. **วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม.**

บุญหงส์ จงคิด. 2557. ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2561. รากของข้าว. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://agron.agri.kps.ku.ac.th/index.php. (4 กรกฎาคม 2561).

รัชนี คงคาฉุยฉาย และริญ เจริญศิริ. 2553. คุณค่าโภชนาการของข้าวพันธุ์พื้นเมืองในเขตปฏิรูปที่ดินอำเภอกุดชุม จังหวัดเชียงใหม่

วิภพ สุทธนะ. 2556. ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์ กลไกการออกฤทธิ์. **ศรีนครินทร์เวชสาร**, 28, 567-582.

สุชาดา สุขหร่อง. 2553. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร.** โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. สำนักพิมพ์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช. **วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี,** 5(2), 37-58

อนงค์นาฏ หรี่จินดา. 2562. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* สำหรับใช้ตรวจสอบข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและม่วง. น.181-189. **ใน การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 21.** โรงแรมเดอะซายน์ พัทยา ชลบุรี.

อารีย์รัตน์ หนูนวล. 2564. เทคนิคการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing). [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://meded.psu.ac.th/binlaApp/class02/B2_364_221/Molecular_genetic_part3/index.html. (19 มกราคม 2564).

อรุษา เชาวนลิขิต. 2554. การสกัดและวิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา file:///C:/Users/SI4-22/Downloads/1826-5966-1-PB.pdf. (1 กรกฎาคม 2561).

อรรัตน์ มงคลพร. 2548. **เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์ กรุงเทพฯ.

Abdel-Aal, E.-S. M., Young, J. C. & Rabalski, I. 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. **Journal of agricultural and food chemistry**, 54(13), 4696-4704.

Chen, X., Itani, T., Wu, X., Chikawa, Y. & Irifune, K. 2013. Physiological factors affecting transcription of genes involved in the flavonoid biosynthetic pathway in different rice varieties. **Plant signaling & behavior**, 8(12), e27555.

Gordeeva, E., Shoeva, O. and Khlestkina, E. 2015. Marker-assisted development of bread wheat near-isogenic lines carrying various combinations of purple pericarp (*Pp*) alleles. **Euphytica**, 203(2), 469-476.

Guo, J., Han, W. and Wang, M. 2008. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: a review. **African Journal of Biotechnology,** 7(25):.

Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E. and Valè, G. 2005. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 82(3): 317-342.

Furukawa, T., Maekawa, M., Oki, T., Suda, I., Iida, S., Shimada, H., Takamure, I. & Kadowaki, K. i. 2007. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin

synthesis in rice pericarp. **The Plant Journal**, 49(1), 91-102.

Hu, J., Anderson, B. & Wessler, S. R. 1996. Isolation and characterization of rice R genes: evidence for distinct evolutionary paths in rice and maize. **Genetics**, 142(3), 1021-1031.

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

Lee, J., Durst, R. W. and Wrolstad, R. E. 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., Rahman, M. M., Kim, J. B. and Kang, S. G. 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. & Ha, S.-H. 2013. Marker development for the identification of rice seed color. **Plant biotechnology reports**, 7(3), 391-398.

Liu, Z., Liu, Y., Pu, Z., Wang, J., Zheng, Y., Li, Y. & Wei, Y. 2013. Regulation, evolution, and functionality of flavonoids in cereal crops. **Biotechnology letters**, 35(11), 1765-1780.

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

Oshima, M., Taniguchi, Y., Akasaka, M., Abe, K., Ichikawa, H., Tabei, Y. and Tanaka, J. 2019. Development of a visible marker trait based on leaf sheath–specific anthocyanin pigmentation applicable to various genotypes in rice. **Breeding science**, 18151.

Peng, C., Lin, Z., Lin, G. & Chen, S. 2006. The anti-photooxidation of anthocyanins-rich leaves of a purple rice cultivar. **Science in China Series C: Life Sciences**, 49(6), 543-551.

Rahman, M. M., Lee, K. E., Lee, E. S., Matin, M. N., Lee, D. S., Yun, J. S., Kim, J. B. & Kang,

S. G. 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., Lee, K. E. and Kang, S. G. 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.

Reddy, V., Dash, S. & Reddy, A. 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(2), 301-312.

Saitoh, K., Onishi, K., Mikami, I., Thidar, K. & Sano, Y. 2004. Allelic diversification at the C (*OsC1*) locus of wild and cultivated rice: nucleotide changes associated with phenotypes. **Genetics**, 168(2), 997-1007.

Sakamoto, W., Ohmori, T., Kageyama, K., Miyazaki, C., Saito, A., Murata, M., Noda, K. & Maekawa, M. 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., Inta, P., Sukkasem, R., Pongjaroenkit, S., Chowpongpang, S. & Sangtong, V. 2016. Cloning and characterization of *OSB1* gene controlling anthocyanin biosynthesis from Thai black rice. **Genomics and Genetics**, 9(1), 7-18.

Samyor, D., Das, A. B. and Deka, S. C. 2017. Pigmented rice a potential source of bioactive compounds: a review. **International journal of food science & technology,** 52(5), 1073-1081.

Schijlen, E. G., De Vos, C. R., van Tunen, A. J. & Bovy, A. G. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry**, 65(19), 2631-2648.

Shao, Y., Jin, L., Zhang, G., Lu, Y., Shen, Y. & Bao, J. 2011. Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice. **Theoretical and applied genetics**, 122(5), 1005-1016.

Shavrukov, Y. 2016. CAPS markers in plant biology. **Russian Journal of Genetics:**

Applied Research, 6(3), 279-287.

Somboon, P., Thebault Prom-u-thai, C., Pusadee, T. and Jamjod, S. 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**.

Yang, X., Xia, X., Zhang, Z., Nong, B., Zeng, Y., Wu, Y., Xiong, F., Zhang, Y., Liang, H. & Pan, Y. 2019. Identification of anthocyanin biosynthesis genes in rice pericarp using PCAMP. **Plant biotechnology journal,** 17(9), 1700.

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

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล อนงค์นาฏ หรี่จินดา

เกิดเมื่อ 21 สิงหาคม 2537

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2561 - ปัจจุบัน : ปริญญาโท คณะวิทยาศาสตร์ สาขาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2556 – 2560: ปริญญาตรี คณะผลิตกรรมการเกษตร สาขาพืชสวน (พืชผัก) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2550 – 2555: มัธยมศึกษาตอนต้น - มัธยมศึกษาปลาย โรงเรียนสตรีประเสริฐศิลป์ จังหวัดตราด

ประวัติการทำงาน Hortigenetics Research (S.E.Asia) Ltd. (มกราคม2560 - เมษายน2560)

นักศึกษาฝึกงานในแผนกปรับปรุงพันธุ์ มะเขือเทศ

ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยโป่ง (4-29 กรกฎาคม 2559)

นักศึกษาฝึกงาน (พืชผัก, พืชสวนประดับ, ไม้ผล)