

พันธุกรรมของการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* L. *indica*)

Genetics of anthocyanin synthesis in purple glutinous rice (*Oryza sativa* L. *indica*)

ช่อแก้ว อนินบอน¹, ปรมศ บรรเทง^{1,2*}, จิรวัดน์ สนิทชน^{1,2} และ พัชริน ส่องศรี^{1,2}

Chorkaew Aninbon¹, Poramate Banterng^{1,2*}, Jirawat Sanitchon^{1,2} and Patcharin Songsri^{1,2}

บทคัดย่อ: ข้อมูลพันธุกรรมและการถ่ายทอดของลักษณะแอนโทไซยานิน มีความสำคัญต่อการคัดเลือกพันธุ์ในโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์พืช การวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพันธุกรรมของการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำ การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะแอนโทไซยานิน และประเมินค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารแอนโทไซยานินกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าว ศึกษาโดยสร้างประชากรชั่วรุ่นที่ 1 (F_1) ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างข้าวเหนียวดำพันธุ์เหนียวดำ Gs.no.09475 และ ข้าวเหนียวดำพันธุ์ เหนียวดำ Gs.no.00621 (พันธุ์แม่) กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 (พันธุ์พ่อ) ในปี 2552 ที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำเมล็ดที่ได้จากทั้ง 2 คู่ผสมมาปลูกและปล่อยให้ประชากรต้นข้าวผสมตัวเองจนกระทั่งได้เมล็ดชั่วรุ่นที่ 3 จากนั้นปลูกประชากรชั่วรุ่นที่ 3 (F_3) ที่แปลงเกษตรกร จ.ขอนแก่น ในประชากรชั่วรุ่นที่ 2 (F_2) บันทึกข้อมูลเฉพาะสีเยื่อหุ้มเมล็ด และจะบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปริมาณสารแอนโทไซยานินของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และประชากรชั่วรุ่นที่ 3 ผลการศึกษาพบว่า ยีนที่ควบคุมการเกิดสีดำบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดในข้าวเป็นยีนเด่น และถูกควบคุมด้วยยีนจำนวน 1 คู่ ความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแบบกว้างและแบบแคบของการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินในคู่ผสม เหนียวดำ Gs.no.09475×กข6 เท่ากับ 0.68 และ 0.13 ตามลำดับ และในคู่ผสมเหนียวดำ Gs.no.00621×กข6 เท่ากับ 0.31 และ 0.14 ตามลำดับ ปริมาณสารแอนโทไซยานินมีสหสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับสีข้าวกล้อง โดยมีค่าสหสัมพันธ์ของลักษณะที่ปรากฏ และมีค่าสหสัมพันธ์ของพันธุกรรมเท่ากับ 0.64 และ 0.95 ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวดำต่อไป

คำสำคัญ: การปรับปรุงพันธุ์ข้าว, การถ่ายทอดทางพันธุกรรม, สารต้านอนุมูลอิสระ, ข้าว

ABSTRACT: The information on genetic basis and inheritance for anthocyanin synthesis is important for varietal selection in plant breeding program. The objectives of this experiment were to study genetics and inheritance of anthocyanin synthesis in black glutinous rice, and to evaluate the correlation between anthocyanin content and rice morphological traits. The progenies of the first generation (F_1) were from the crossing between Neiwdam Gs.no.09475 and Neiwdam Gs.no.00621 (female parents), and RD6 (male parent) initiated in 2009 at the Faculty of Agriculture, Khon Kaen University. The F_1 progenies were grown, and self-pollination was done to receive the progenies of the third generation (F_3). The F_3 progenies were then planted at a farmer's field in Khon Kaen province. Data recorded for the progenies of the second generation (F_2) was pericarp color. Data recorded for the male and female parents, and the F_3 progenies were morphological traits and anthocyanin content. The results indicated that anthocyanin synthesis traits were controlled by a single dominant gene. The estimated values for broad and narrow sense heritabilities of anthocyanin for Neiwdam Gs.no.09475×RD6 were 0.68 and 0.13, respectively; and for Neiwdam Gs.no.00621×RD6 were 0.31 and 0.14, respectively. Highly significant correlation between anthocyanin content and pericarp color was recorded. The values for phenotypic and genotypic correlations were 0.64 and 0.95, respectively. The data from this study would be valuable information for further improvement of black glutinous rice.

Keywords: rice breeding, heritability, anti-oxidant substance, rice

¹ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

² ศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
Plant Breeding Research Center for Sustainable Agriculture, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: bporam@kku.ac.th

บทนำ

แอนโธไซยานิน (anthocyanin) เป็นรงควัตถุที่พบในพืชผักและผลไม้หลายชนิดแต่จะพบมากเป็นพิเศษในผลไม้ ที่มีผลสีน้ำเงินและสีม่วงแดง ในปัจจุบันพบว่า รงควัตถุชนิดนี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ โดยการทำให้อนุมูลอิสระที่สามารถสร้างความเสียหายให้แก่เซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกายอยู่ในสภาพที่เป็นกลาง ไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ ผลของการต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญคือช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ ช่วยลดอัตราเสี่ยงจากการเกิดโรคหัวใจและเส้นเลือดอุดตันในสมอง ด้วยการยับยั้งไม่ให้เลือดจับตัวเป็นก้อน ชะลอความเสื่อมของดวงตา นอกจากนี้ แอนโธไซยานิน ยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงและอาหารเป็นพิษด้วย (พิเชษฐ, 2544; Cooke et al., 2005; Leardkamolkarn et al., 2011; Pitija et al., 2013) รงควัตถุชนิดนี้ นอกจากจะพบในผักและผลไม้แล้วยังสามารถพบได้ในข้าวหลายพันธุ์ โดยเฉพาะในข้าวเหนียวดำหรือข้าวดำ โดยมีสีแตกต่างกัน ตั้งแต่สีชมพูจนถึงสีม่วงดำ และมีการกระจายรงควัตถุไปตามส่วนต่างๆ ของต้นข้าวแตกต่างกันไปตามพันธุ์ (ดำเนิน และคณะ, 2545; Pitija et al., 2013; Somsana et al., 2013)

การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ที่มีปริมาณสารแอนโธไซยานินในเมล็ดสูงนั้น ข้อมูลพันธุกรรมและการถ่ายทอดของลักษณะแอนโธไซยานิน เป็นข้อมูลที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการกำหนดและวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ที่เหมาะสม ซึ่งมีผลต่อความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์ ถึงแม้ว่าจะมีรายงานเกี่ยวกับการค้นพบตำแหน่งของยีนบนโครโมโซมที่ควบคุมการสร้างเม็ดสีแอนโธไซยานิน (anthocyanin pigmentation) ในข้าว (Wang and Shu, 2007; Shao et al., 2011) และ Sahu et al. (2010) ได้ศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างเม็ดสีแอนโธไซยานินไว้แล้ว แต่อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับพันธุกรรมที่ควบคุมการสังเคราะห์สารแอนโธไซยานินของประชากรข้าวเหนียวดำที่ใช้สำหรับการศึกษา ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาพันธุกรรม

ของการสังเคราะห์สารแอนโธไซยานินในข้าวเหนียวดำ การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะแอนโธไซยานิน และประเมินค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารแอนโธไซยานินกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าว เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวเหนียวดำ ให้มีปริมาณสารแอนโธไซยานินในประชากรที่ศึกษาสูงขึ้น

วิธีการศึกษา

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในงานทดลอง

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์ กข6 เป็นข้าวเหนียวพันธุ์ดี มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวมีคุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอม เมล็ดยาวเรียวยาว และเกษตรกรรมปลูก ซึ่งใช้เป็นพันธุ์พ่อ ข้าวเหนียวดำพันธุ์ เหนียวดำ Gs.no.09475 มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ลักษณะเมล็ดค่อนข้างยาว ใบมีสีเขียวแต่ลำต้นมีสีดำ และมีปริมาณสารแอนโธไซยานินสูง และข้าวเหนียวดำพันธุ์ เหนียวดำ Gs.no.00621 มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ เมล็ดค่อนข้างป้อมสั้น มีใบและปล้องสีดำ และมีปริมาณสารแอนโธไซยานินสูง (ช่อแก้ว และคณะ, 2554) ซึ่งใช้เป็นพันธุ์แม่

การสร้างประชากร

สร้างประชากรชั่วรุ่นที่ 1 (F_1) ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างข้าวเหนียวดำพันธุ์ เหนียวดำ Gs.no.09475 กับข้าวพันธุ์ กข6 และ ข้าวเหนียวดำพันธุ์ เหนียวดำ Gs.no.00621 กับข้าวพันธุ์ กข6 นำเมล็ดที่ได้จากทั้ง 2 คู่ผสมมาปลูกและปล่อยให้ประชากรต้นข้าวชั่วรุ่นที่ 1 ผลสมตัวเอง และเก็บเมล็ดประชากรชั่วรุ่นที่ 2 (F_2) จากนั้นนำเมล็ดข้าวมาปลูกต่อและปล่อยให้ประชากรต้นข้าวชั่วรุ่นที่ 2 ผลสมตัวเอง และเก็บเมล็ดประชากรชั่วรุ่นที่ 3 (F_3)

การปลูกและการดูแลรักษา

ปลูกข้าวพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2552 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2552 ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยปลูกในกระถางเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 12 นิ้ว ใส่ปุ๋ย

สูตร 15-15-15 ปริมาณ 11 กรัม/กระถาง (อัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่) 2 ครั้ง โดยใส่ครั้งแรกในช่วงที่ต้นกล้าอายุ 1 เดือน ครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งแรก 30 วัน และทำการผสมพันธุ์ข้าวเพื่อสร้างประชากรชั่วรุ่นที่ 1

เมื่อได้เมล็ดประชากรชั่วรุ่นที่ 1 จากต้นแม่ นำเมล็ดทั้งหมดที่ได้ไปปลูกในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 12 นิ้ว ในระหว่างเดือน ธันวาคม 2552 ถึงเดือน เมษายน 2553 ที่หมวดพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีการจัดการดูแลเหมือนข้าวพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ ปล่อยให้ผสมตัวเอง เก็บเมล็ดแบบแยกต้นเมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยว

ปลูกประชากรชั่วรุ่นที่ 2 ระหว่างเดือน มิถุนายน 2553 ถึงเดือนตุลาคม 2553 ที่หมวดพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยทำการสุ่มประชากรละ 150 ต้น ปลูกในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 12 นิ้ว มีการจัดการดูแลเหมือนข้าวพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ และมีการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช (ediphenphos อัตรา 15-20 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร) จำนวน 1 ครั้ง ในช่วงระยะการแตกกอ เนื่องจากมีการระบาดของโรคไหม้ (blast disease) หลังจากนั้นปล่อยให้ผสมตัวเอง และเก็บเกี่ยวแบบแยกต้น

ปลูกประชากรชั่วรุ่นที่ 3 ระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2553 ถึงเดือนมีนาคม 2554 ในแปลงเกษตรกร บ้านม่วง ต.บ้านทุ่ม อ.เมือง จ.ขอนแก่น โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) จำนวน 2 ซ้ำ ระยะปลูกเท่ากับ 50 เซนติเมตร $\times$ 25 เซนติเมตร ขนาดของแปลงย่อยกว้าง 0.5 เมตร ยาว 2 เมตร ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่ จำนวน 2 ครั้ง ครั้งแรกใส่หลังจากปักดำ 20 วัน ครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งแรก 30 วัน

การบันทึกข้อมูลทางฐานวิทยาศาสตร์และผลผลิต

บันทึกข้อมูลสีเยื่อหุ้มเมล็ดของประชากรชั่วรุ่นที่ 2 และบันทึกลักษณะทางฐานวิทยาศาสตร์ในประชากรชั่วรุ่นที่ 3 ตามวิธีของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI, 1996) โดยข้อมูลพื้นฐานที่ประกอบด้วย คะแนนสีแผ่นใบ (1= เขียวจาง, 2= เขียว, 3= เขียวเข้ม, 4= ม่วงที่ปลาย, 5= ม่วงที่ริม, 6= ม่วงผสมเขียว, 7= ม่วงทั้งใบ, X= สีอื่นๆ) คะแนนสีกาบใบ (1= เขียว, 2= เขียวเส้นม่วง,

3= ม่วงอ่อน, 4= ม่วง, X= สีอื่นๆ) คะแนนสีลิ้นใบ (1= ขาว, 2= เส้นม่วง, 3= ม่วง, X= สีอื่นๆ) คะแนนสีข้อต่อใบ (1= เขียวอ่อน, 2= เขียว, 3= ม่วง, X= สีอื่นๆ) คะแนนสียอดดอก (1= ขาว, 2= ฟาง, 3= น้ำตาลหรือเหลืองเข้ม, 4= แดง, 5= ชมพู, 6= ม่วง, 7= ดำ, X= สีอื่นๆ) และคะแนนสีข้าวกล้อง (1= ขาว, 2= น้ำตาลอ่อน, 3= น้ำตาลมัน, 4= น้ำตาลเข้ม, 5= แดง, 6= ม่วงอ่อน, 7= ม่วงดำ, X= อื่นๆ) และบันทึกข้อมูลผลผลิตรายต้นในแต่ละแปลงย่อย จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณเป็นผลผลิต/แปลงย่อย

การวัดปริมาณสารแอนโทไซยานินในห้องปฏิบัติการ

วัดปริมาณสารแอนโทไซยานินในเมล็ดของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และประชากรชั่วรุ่นที่ 3 ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี spectrophotometric ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Lee et al. (2005) โดยภายหลังจากเก็บเกี่ยว นำเมล็ดมาทำความสะอาด และตากให้แห้ง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานิน โดยนำเมล็ดแต่ละต้นมาแกะเปลือกออก บดตัวอย่างให้ละเอียดจนมีลักษณะคล้ายแป้ง นำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วชั่งน้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ethanol-0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทสารสกัดลงในขวดรูปชมพู่ ปรับปริมาณสารสกัดให้ครบ 25 มิลลิลิตรโดยใช้สารสกัด จากนั้นกรองสารสกัดตัวอย่างด้วย nylon membrane filter 0.45 ไมครอน 1 ครั้ง นำไปวัดปริมาณสารแอนโทไซยานินโดยวิธี spectrophotometric ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ปริมาณสารแอนโทไซยานิน (cyanidin 3-glucoside) สามารถคำนวณได้จาก

ปริมาณสารแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัม/ 100 กรัมของข้าวกล้อง) = $(A \times MW \times DF \times 1000) / (e \times 1)$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

MW = น้ำหนักโมเลกุลของ cyanidin 3-glucoside (449.2 g/mol)

DF = dilution factor (ปริมาตรสุดท้าย/ปริมาตรเริ่มต้น)

$$e = 26,900$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทดสอบสัดส่วนของต้นข้าวในประชากรชั่วรุ่นที่ 2 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ : สีขาว โดยวิธี Chi - square test และวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะต่างๆ ในพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่และลูกชั่วรุ่นที่ 3 ตามแผนการทดลองแบบ RCB (Gomez and Gomez, 1984) ประเมินความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแบบกว้าง (broad sense heritability, h^2_G) ของลักษณะแอนโธไซยานินในชั่วรุ่นที่ 3 ของแต่ละคู่ผสม โดยการนำค่าองค์ประกอบของความแปรปรวนที่ได้จาก Table 1 มาแทนในสมการ (พีระศักดิ์, 2525) ดังนี้

$$h^2_G = \sigma^2_G / \sigma^2_P$$

$$\sigma^2_G = \sigma^2_F$$

$$\sigma^2_P = \sigma^2_F + \sigma^2_E / r$$

เมื่อ σ^2_G คือ ความแปรปรวนทางพันธุกรรม σ^2_P คือ ความแปรปรวนทั้งหมด และ r คือ จำนวนซ้ำของการทดลอง และประเมินความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแบบแคบ (narrow-sense heritability, h^2_n) ของลักษณะแอนโธไซยานินในแต่ละคู่ผสม โดยใช้วิธีเกรสซัน (พีระศักดิ์, 2525) ดังนี้

$$h^2_n = (2/3)b(F_3 \text{ base on } F_2)$$

เมื่อ h^2_n = ค่าความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแบบแคบ

$b(F_3 \text{ base on } F_2) =$ ค่ารีเกรสชันของลูกชั่วที่ 3 บนลูกชั่วที่ 2

นอกจากนั้นยังประเมินค่าสหสัมพันธ์ของลักษณะที่ปรากฏ (r_p) และลักษณะพันธุกรรม (r_G) ของลักษณะแอนโธไซยานินและลักษณะทางสัณฐานวิทยาในประชากรชั่วรุ่นที่ 3 โดยการนำค่าความแปรปรวนใน Table 1 มาแทนในสมการ (Falconer and Mackay, 1996) ดังนี้

$$r_p = (M2^*M2)/((M2^*)(M2))^{1/2}$$

$$r_G = ((M2^*M2) - (M1^*M1))/((M2^*-M1^*)(M2-M1))^{1/2}$$

ผลการศึกษาและวิจารณ์

พันธุกรรมควบคุมการสังเคราะห์สารแอนโธไซยานิน

จากการศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมการสังเคราะห์สารแอนโธไซยานินใน 2 คู่ผสม คือ เหนียวดำ Gs.no.09475×กข6 และเหนียวดำ Gs.no.00621×กข6 พบว่า ในประชากรชั่วรุ่นที่ 1 ของทั้งสองคู่ผสม มีลักษณะของเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีดำทั้งหมด สำหรับประชากรชั่วรุ่นที่ 2 พบว่า ในคู่ผสมเหนียวดำ Gs.no.09475×กข6 มีต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจำนวน 32 ต้น และมีต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวจำนวน 9 ต้น และในคู่ผสม เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6 มีต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำจำนวน 59 ต้น และมีต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวจำนวน 18 ต้น ซึ่งทั้งสองคู่ผสม มีสัดส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ : สีขาว ใกล้เคียงกับ 3:1 เมื่อทดสอบตามวิธีการ Chi-square (c^2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยีนที่ควบคุมการเกิดสีดำบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดในข้าวเป็นยีนเด่น จำนวน 1 คู่ (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sahu et al. (2010)

ปริมาณสารแอนโธไซยานินและผลผลิต

เนื่องจากโดยส่วนใหญ่แล้ว การคัดเลือกประชากรในชั่วรุ่นที่ 3 จะคัดเลือกเป็นรายต้น ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้บันทึกข้อมูลปริมาณสารแอนโธไซยานิน และผลผลิตเป็นรายต้นด้วย และจากการศึกษาปริมาณสารแอนโธไซยานินในผิวเมล็ดของประชากรรุ่นที่ 3 ของคู่ผสม เหนียวดำ Gs.no.09475×กข6 เป็นรายต้นพบว่า สายพันธุ์ (เหนียวดำ Gs.no.09475×กข6)-1-37-11 มีสารแอนโธไซยานินสูงกว่าพันธุ์แม่และค่าเฉลี่ยของทั้งประชากร (Table 3) สำหรับคู่ผสมเหนียวดำ Gs.no.00621×กข6 พบว่า สายพันธุ์ (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-32-16, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-32-10, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-32-12, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-3-40-6, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-3-6-2, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-7-10-4, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-39-10, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-32-14, (เหนียวดำ Gs.no.00621×

กข6)-2-11-15, (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-7-22-16 และสายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-3-40-8 มีสารแอนโธไซยานินสูงกว่าพันธุ์แม่และสูงกว่าค่าเฉลี่ยของทั้งประชากร (Table 4)

สำหรับผลผลิต/ต้น ของประชากรรุ่นที่ 3 ของกลุ่มผสม เหินยวดำ Gs.no.09475×กข6 พบว่า สายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.09475×กข6)-1-38-16 มีผลผลิต/ต้น สูงกว่าค่าเฉลี่ยของประชากร แต่ยังต่ำกว่าพันธุ์พ่อ (Table 3) สำหรับกลุ่มผสมเหินยวดำ Gs.no.00621×กข6 พบว่า สายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-7-34-11, (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-32-15, (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-11-14 และสายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-3-12-9 มีผลผลิต/ต้น สูงกว่าพันธุ์พ่อและค่าเฉลี่ยของประชากร (Table 4)

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยปริมาณสารแอนโธไซยานินในผิวเมล็ดในแต่ละแปลงย่อยของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และประชากรชั่วรุ่นที่ 3 ของกลุ่มผสม เหินยวดำ Gs.no.09475×กข6 พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 1) โดยข้าวพันธุ์ เหินยวดำ Gs.no.09475 มีปริมาณสารแอนโธไซยานินสูงที่สุดเท่ากับ 43.10 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ของข้าวกล้อง รองลงมาคือ สายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.09475×กข6)-3-37 และสายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.09475×กข6)-2-29 ซึ่งมีปริมาณสารแอนโธไซยานินเท่ากับ 23.85 และ 21.00 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ของข้าวกล้อง ตามลำดับ และสายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.09475×กข6)-3-4 มีปริมาณสารแอนโธไซยานินน้อยที่สุดเท่ากับ 0.15 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ของข้าวกล้อง และเมื่อพิจารณาในกลุ่มผสมเหินยวดำ Gs.no.00621×กข6 พบว่า ปริมาณสารแอนโธไซยานินมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 2) โดยพบว่า สายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-37 มีปริมาณสารแอนโธไซยานินมากที่สุดเท่ากับ 46.50 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ของข้าวกล้อง รองลงมาคือ สายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-1-22 และสายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-7-39 มีปริมาณสารแอนโธไซยานินเท่ากับ 41.85 และ 39.15

มิลลิกรัม/ 100 กรัม ของข้าวกล้อง ตามลำดับ และสายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-1 มีปริมาณสารแอนโธไซยานินน้อยที่สุดเท่ากับ 0.70 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ของข้าวกล้อง

สำหรับผลผลิต/แปลงย่อย ของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และลูกชั่วรุ่นที่ 3 ของกลุ่มผสม เหินยวดำ Gs.no.09475×กข6 พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 1) โดยสายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.09475×กข6)-4-35 มีผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 302.9 กรัม/แปลงย่อย รองลงมาคือ พันธุ์ กข6 และสายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.09475×กข6)-3-4 มีผลผลิตเท่ากับ 236.2 และ 209.7 กรัม/แปลงย่อย ตามลำดับ และสายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.09475×กข6)-1-2 มีผลผลิตน้อยที่สุดเท่ากับ 9.6 กรัม/แปลงย่อย เมื่อพิจารณาความสามารถในการให้ผลผลิตในกลุ่มผสม เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6 พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 2) โดยพบว่า สายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-7-34 มีผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 322.6 กรัม/แปลงย่อย รองลงมาคือ สายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-3-12 และสายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-18 มีผลผลิตเท่ากับ 264.5 และ 246.2 กรัม/แปลงย่อย ตามลำดับ และสายพันธุ์ (เหินยวดำ Gs.no.00621×กข6)-1-38 มีผลผลิตน้อยที่สุดเท่ากับ 18.8 กรัม/แปลงย่อย

ความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมของการสังเคราะห์สารแอนโธไซยานิน

ความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแบบกว้างของการสังเคราะห์สารแอนโธไซยานินในกลุ่มผสม เหินยวดำ Gs.no.09475×กข6 พบว่า มีค่าค่อนข้างสูง ซึ่งเท่ากับ 0.68 แต่ในกลุ่มผสมเหินยวดำ Gs.no.00621×กข6 มีค่าความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแบบกว้างค่อนข้างต่ำ ซึ่งเท่ากับ 0.31 ทั้งนี้เนื่องจาก ค่าความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะเป็นค่าเฉพาะในแต่ละกลุ่มผสม ดังนั้นค่าที่วัดได้จึงแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับประชากรที่นำมาศึกษา ซึ่งสอดคล้องกับ Sahu et al. (2010) ที่กล่าวไว้ว่า ความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมขึ้นอยู่กับ

กับการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่ที่นำมาใช้ในการผสมพันธุ์ สำหรับการประเมินความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแบบแคบของการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินพบว่า มีค่าต่ำทั้ง 2 คู่ผสม โดยที่คู่ผสมเหนียวดำ Gs.no.09475×กข6 และเหนียวดำ Gs.no.00621×กข6 มีค่าความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแบบแคบเท่ากับ 0.13 และ 0.14 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนของการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินส่วนใหญ่มาจากความแปรปรวนอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อม และมีความแปรปรวนอันเนื่องมาจากยีนที่แสดงผลแบบบวกลบ ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวดำเพื่อเพิ่มปริมาณสารแอนโทไซยานิน ก็มีโอกาสประสบความสำเร็จได้ โดยอาจทำการคัดเลือกจากประชากรในช่วงต้นๆ ที่มีความเป็นพันธุ์แท้ (homozygosity) มากขึ้น

สหสัมพันธ์ของลักษณะที่ปรากฏ (r_p) และสหสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรม (r_G) ของลักษณะแอนโทไซยานินและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาสหสัมพันธ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทั้งในด้านระดับความสัมพันธ์และทิศทาง ซึ่งการที่ทั้งสองลักษณะมีความสัมพันธ์กันหรือเปลี่ยนแปลงไปด้วยกัน มักเกิดจาก

สาเหตุใหญ่ๆ 2 ประการคือ การที่ยีนกลุ่มเดียวสามารถควบคุมได้ทั้งสองลักษณะ (pleiotropy) และยีนที่ควบคุมลักษณะทั้งสองตั้งอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน (linkage) และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสหสัมพันธ์นี้จะช่วยให้สามารถคัดเลือกพันธุ์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (พีระศักดิ์, 2525) และจากการศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารแอนโทไซยานินกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ปริมาณสารแอนโทไซยานินมีสหสัมพันธ์ทางบวกลบอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับสีข้าวกล้อง โดยมีสหสัมพันธ์ของลักษณะที่ปรากฏเท่ากับ 0.64 และมีสหสัมพันธ์ของพันธุกรรมเท่ากับ 0.95 ซึ่งให้เห็นว่าปริมาณสารแอนโทไซยานินในผิวของเมล็ดข้าวจะสูงขึ้นหากเมล็ดมีสีเข้มมากขึ้น ดังนั้น นักปรับปรุงพันธุ์สามารถใช้ลักษณะสีของข้าวกล้องช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานินสูงได้ อย่างไรก็ตามพบว่า ปริมาณสารแอนโทไซยานินมีสหสัมพันธ์ต่ำกับสีใบ สีหุใบ สีกาบใบ และสียอดดอก ดังนั้นลักษณะเหล่านี้จึงไม่เหมาะสำหรับนำมาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานินสูงในประชากรข้าวกลุ่มนี้ เพราะพฤติกรรมการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะแอนโทไซยานินและลักษณะสีใบ สีหุใบ สีกาบใบ และสียอดดอก เป็นอิสระต่อกัน (Table 5)

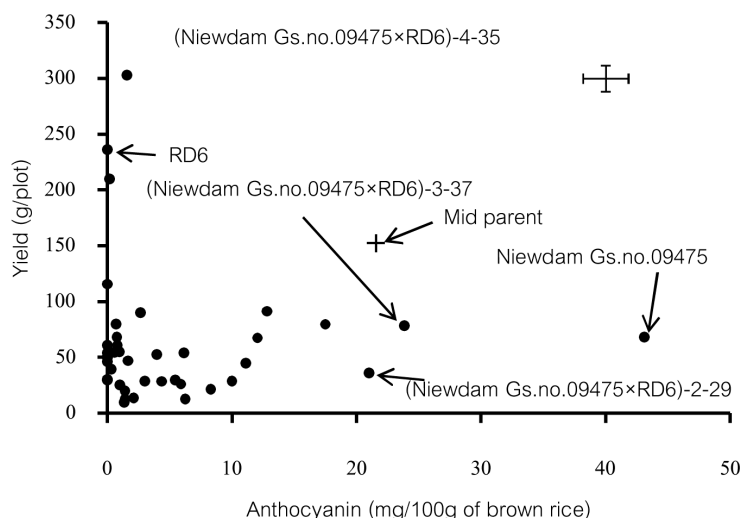


Figure 1 Anthocyanin content and yield of the parental lines and the progenies of third-generation for Niewdam Gs.no.09475×RD6.

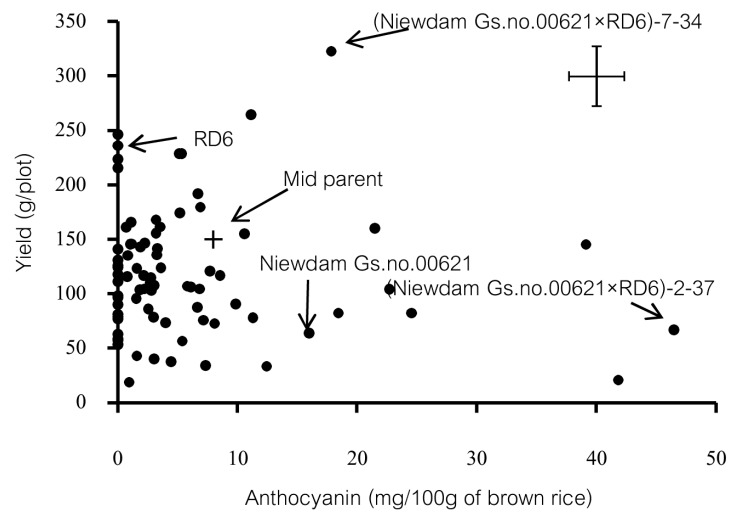


Figure 2 Anthocyanin content and yield of the parental lines and the progenies of third-generation for Niewdam Gs.no.00621×RD6.

Table 1 Analysis of variance in randomized complete block design.

Source of variation	Degree of freedom ^{1/}	Mean square Character		MCP ^{2/}	Expected mean square	EMCP ^{3/}
		X	Y			
Replications	r-1					
Families	f-1	M2*	M2	(M2* M2)	$s^2_E + rs^2_F$	$s^2_{E^*E} + rs^2_{F^*F}$
Error	(r-1)(f-1)	M1*	M1	(M1* M1)	s^2_E	$s^2_{E^*E}$

^{1/} r = number of replications, f = number of lines

^{2/} MCP = Mean square of cross product

^{3/} EMCP = Expected mean square of cross product

Table 2 The ratio of pericarp color and chi-square test for Niewdam Gs. no. 09475×RD6 and Niewdam Gs. no. 00621×RD6.

Cross	Pericarp color for F ₁ population	No. of F ₂ plants		c2 ratio	c2 value	p-value
		Purple pericarp	White pericarp			
Niewdam Gs. no. 09475×RD6	purple	32	9	3:1	0.65	0.50-0.25
Niewdam Gs. no. 00621×RD6	purple	59	18	3:1	0.039	0.90-0.75

Table 3 Anthocyanin content (mg/100 g) and yield (g/plant) for RD6, Niewdam Gs.no.09475 and for the selected progenies of third-generation for Niewdam Gs.no.09475×RD6.

Cultivar/line	Anthocyanin (mg/100g of brown rice)	Yield (g/plant)
RD6	ND ^{1/}	31.38
Niewdam Gs.no.09475	43.10	8.10
(Niewdam Gs.no.09475×RD6)		
-1-3-10	32.06	9.15
-1-37-11	127.85	12.36
-1-38-16	15.43	21.51
-2-29-2	12.22	6.89
-2-29-3	20.24	9.05
-2-29-4	28.45	9.13
-2-29-9	26.25	8.65
-2-33-2	11.02	6.43
-2-38-1	11.22	6.17
-3-6-9	11.62	10.14
-3-22-6	13.03	5.91
Average ^{2/}	10.64	5.01

^{1/}ND = Not detected^{2/} Average value for the whole third-generation of Niewdam Gs.no.09475×RD6**Table 4** Anthocyanin content (mg/100 g) and yield (g/plant) for RD6, Niewdam Gs.no.00621 and for the selected progenies of third-generation for Niewdam Gs.no.00621×RD6.

Cultivar/line	Anthocyanin (mg/100g of brown rice)	Yield/plant (g)	Cultivar/line	Anthocyanin (mg/100g of brown rice)	Yield (g/plant)
RD6	ND ^{1/}	31.38	(Niewdaw Gs.no.00621×RD6)		
Niewdam Gs.no.00621	16.00	11.23	-2-39-6	9.81	17.23
(Niewdaw Gs.no.00621×RD6)			-2-39-9	12.22	16.98
-1-7-2	8.02	14.88	-2-39-10	21.44	28.5
-1-23-1	11.82	19.51	-3-6-2	23.41	18.93
-1-24-1	12.22	21.79	-3-12-9	8.62	32.12
-2-1-12	11.42	16.69	-3-12-10	7.61	28.63
-2-1-14	11.22	19.98	-3-15-9	14.63	19.66
-2-5-16	14.63	13.09	-3-17-16	9.6	17.03
-2-10-9	11.02	21.79	-3-40-6	69.33	15.43
-2-10-15	8.2	24.83	-3-40-7	15.23	21.33
-2-10-16	12.22	28.12	-3-40-8	18.03	19.97
-2-11-14	9.82	35.47	-7-10-4	22.04	14.75
-2-11-15	19.84	17.17	-7-16-1	8.42	29.37
-2-16-14	9.82	22.89	-7-22-6	19.03	14.86
-2-32-1	8.42	14.99	-7-22-9	11.22	16.91
-2-32-10	75.74	23.14	-7-33-2	14.8	14.35
-2-32-12	74.74	21.81	-7-34-4	7.2	22.04
-2-32-14	20.44	30.71	-7-34-11	11.02	39.66
-2-32-15	12.62	35.62	-7-39-1	8.6	31.71
-2-32-16	79.95	19.73	Average ^{2/}	6.99	14.22

^{1/}ND = Not detected^{2/} Average value for the whole third-generation of Niewdam Gs.no.00621×RD6

Table 5 Phenotypic (r_p) and genotypic (r_g) correlations for some morphological characteristics and anthocyanin content.

Characteristic	Leaf color		Auricle color		Leaf sheath color		Ligule color		Tip flower color		Dehulled color	
	r_p	r_g	r_p	r_g	r_p	r_g	r_p	r_g	r_p	r_g	r_p	r_g
Auricle color	0.74**	0.75**										
Leaf sheath color	0.99**	1.00**	0.76**	0.78**								
Ligule color	0.91**	0.93**	0.87**	0.90**	0.92**	0.93**						
Tip flower color	0.98**	1.00**	0.74**	0.77**	0.99**	1.00**	0.91**	0.94**				
Dehulled color	-0.09	-0.11	0.41**	0.43**	-0.07	-0.09	0.16	0.17	-0.09	-0.10		
Anthocyanin	0.02	0.07	-0.25*	-0.35**	0.02	0.07	0.15	0.30**	0.01	0.02	0.64**	0.95**

*, ** = Significant difference at 95% and 99%, respectively.

สรุป

จากการศึกษาพบว่า ยีนที่ควบคุมการเกิดสีด้าบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดในข้าวเป็นยีนเด่น และถูกควบคุมด้วยยีนจำนวน 1 คู่ ความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแบบกว้างของการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินในคูลผสม เหนียวดำ Gs.no.09475×กข6 เท่ากับ 0.68 และในคูลผสมเหนียวดำ Gs.no.00621×กข6 เท่ากับ 0.31 ส่วนความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแบบแคบของการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน สำหรับคูลผสม เหนียวดำ Gs.no.09475×กข6 และเหนียวดำ Gs.no.00621×กข6 เท่ากับ 0.13 และ 0.14 ตามลำดับ และจากการศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารแอนโทไซยานินกับลักษณะสีข้าวกล้อง พบว่ามีสหสัมพันธ์ของลักษณะที่ปรากฏอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งเท่ากับ 0.64 และมีสหสัมพันธ์ของพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งเท่ากับ 0.95 ดังนั้นความเข้มของสีเมล็ดข้าวกล้องจึงสามารถใช้เป็นเกณฑ์ (criteria) ในการคัดเลือกพันธุ์ทางอ้อม (indirect selection) ที่ช่วยให้ประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณสารแอนโทไซยานินได้โดยไม่จำเป็นต้องวัดปริมาณสารนี้โดยตรงในระหว่างการคัดเลือกพันธุ์

จากการศึกษาในข้าวลูกผสมของทั้ง 2 ประชากรนี้ พบว่า สายพันธุ์ (เหนียวดำ Gs.no.09475×กข6)-1-37-11, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-32-16, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-32-10,

(เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-32-12, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-3-40-6, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-3-6-2, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-7-10-4, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-39-10, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-32-14, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-2-11-15, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-7-22-16, (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-3-40-6 และสายพันธุ์ (เหนียวดำ Gs.no.00621×กข6)-3-40-8 มีสารแอนโทไซยานินสูง และที่สำคัญมีผลผลิตดีกว่าพันธุ์แม่ ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ต่างๆ นี้ไว้เพื่อนำไปปลูกและคัดเลือกในชั่วรุ่นต่อไป ทั้งนี้จะเป็นการเพิ่มโอกาสให้การคัดเลือกพันธุ์ข้าวเหนียวดำพันธุ์ใหม่ที่มีสารแอนโทไซยานินสูงและให้ผลผลิตมากกว่าเดิมประสบผลสำเร็จมากขึ้น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร เพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน และศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนทุนในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ช่อแก้ว อนิลบล, ปรมศ บรรเทิง, จิรวัฒน์ สนิทชน และพัชริน สงศรี. 2554. การศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำโดยใช้วิธี HPLC และ spectrophotometric. วารสารแก่นเกษตร. 39 (ฉบับพิเศษ): 353-357.
- ดำเนิน กาละดี, ศันสนีย์ จำจด, เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม และ พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2545. โครงการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวเหนียวดำ. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พิเชษฐ เทปารุง. 2544. การสกัดแอนโทไซยานินสจากมะม่วง. รายงานผลการวิจัย. สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตร สกลนคร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน.
- พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2525. พันธุศาสตร์ปริมาณที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- Cooke, D., W.P. Steward, A.J. Gescher, and T. Marczylo. 2005. Anthocyanins from fruits and vegetables—does bright colour signal cancer chemopreventive activity? Eur. J. Cancer. 41: 1931-1940.
- Falconer, D.S., and T.F.C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetic 4th ed. Longman, London.
- Gomez, K.A., and A.A. Gomez. 1984. Statistical Procedures for Agricultural Research 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- IRRI. 1996. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute, Philippines.
- Leardkamolkarn, V., W. Thongthep, P. Suttiarporn, R. Kongkachuichai, S. Wongpornchai, and A. Wanavijitr. 2011. Chemopreventive properties of the bran extracted from a newly developed Thai rice: the Riceberry. Food Chem. 125: 978-985.
- Lee, J., R.W. Durst, and R.E. Wrolstad. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. Journal of AOAC International. 88: 1269-1278.
- Pitija, K., M. Nakornriab, T. Sriseadka, A. Vanavichit, and S. Wongpornchai. 2013. Anthocyanin content and antioxidant capacity in bran extracts of some Thai black rice varieties. Int. J. Food Sci. Tech. 48: 300-308.
- Sahu, G.R., A.K. Sarawagi, B. Sharma, and M. Parikh. 2010. Inheritance of anthocyanin pigmentation in rice. Journal of Rice Research. 3: 19-23.
- Shao, Y., L. Jin, G. Zhang, Y. Lu, Y. Shen, and J. Bao. 2011. Association mapping of grain color, phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity in dehulled rice. Theor. Appl. Genet. 122: 1005-1016.
- Somsana, P., P. Wattana, B. Suriham, and J. Sanitchon. 2013. Stability and genotype by environment interactions for grain anthocyanin content of Thai black glutinous upland rice (*Oryza sativa*). SABRAO J. Breed. Genet. 45(3): 523-532.
- Wang, C., and Q. Shu. 2007. Fine mapping and candidate gene analysis of purple pericarp gene Pb in rice (*Oryza sativa* L.). Chinese Science Bulletin. 52(22): 3097-3104.