

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวในประชากรชั่วที่ 2 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 กับก้าน้อย

SSR markers linked to genes related to antioxidant activity, anthocyanin content and pericarp color in F_2 progenies of cross between Pathum Thani 1 and Kham Noi

ธัญพรรณ ทอง¹, อนงค์นาฏ หรีจินดา¹, วราภรณ์ แสงทอง¹, แสงทอง พงษ์เจริญกิต¹, กฤษณะ ลานน้ำเที่ยง² และ ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์^{1*}

Thanyapat Thong¹, Anongnad Richinda¹, Varaporn Sangtong¹, Saengtong Pongjaroenkit¹, Krisana Lanumteang² and Chotipa Sakulsingharoj^{1*}

¹ สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

¹ Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

² สาขาวิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

² Program in Statistics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

บทคัดย่อ: ข้าวก่ำพื้นเมืองของไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเกิดจากแอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะช่วยปรับปรุงข้าวพันธุ์ดีให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวพันธุ์แม่ปทุมธานี 1 กับข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำพันธุ์พ่อก้าน้อย จำนวน 300 ต้น พบเครื่องหมาย RM17321 (*OsB1&B2*), RM11383 (*OsDFR*) และ RM15209 (*OsMYB3*) สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ เครื่องหมาย RM17321 และ RM15209 มีความสัมพันธ์กับค่าลอการิทึมของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ R^2 มีค่าเท่ากับ 51.95% และ 3.93% ตามลำดับ การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายร่วมกัน พบว่า R^2 มีค่าสูงขึ้นเท่ากับ 55.11% นอกจากนี้เครื่องหมาย RM17321 มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ดสูงมาก โดยจีโนไทป์ที่มีอัลลีลเหมือนพันธุ์พ่อย่างน้อย 1 อัลลีล เยื่อหุ้มเมล็ดจะมีสี ในขณะที่เครื่องหมาย RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับทุกลักษณะที่ศึกษา การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2 ด้วยวิธี DPPH พบต้นที่ 2 มีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดใกล้เคียงกับพันธุ์พ่อ ดังนั้น เครื่องหมาย RM17321 ร่วมกับ RM15209 ใช้คัดเลือกข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง อีกทั้งเครื่องหมาย RM17321 ยังใช้คัดเลือกสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้อย่างแม่นยำ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกข้าวด้วยวิธีผสมกลับได้

คำสำคัญ: ข้าว; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; แอนโทไซยานิน; สีเยื่อหุ้มเมล็ด

ABSTRACT: Kham, landrace rice of Thailand, has high antioxidant activity due to anthocyanin deposition in pericarp. Identification of DNA markers linked to antioxidant activity could assist improvement of elite rice cultivars for high nutritional value. This research aimed to study the SSR markers linked to *OsB1&B2*, *OsDFR* and *OsMYB3* genes and investigate the relationship between DNA markers and antioxidant activity in 300 plants of F_2 progenies of the cross between white pericarp rice Pathum Thani 1 as the female parent and black pericarp rice Kham Noi as the male

* Corresponding author: chotipa.cs@gmail.com

parent. The RM17321 (*OsB1&B2*), RM11383 (*OsDFR*) and RM15209 (*OsMYB3*) were able to distinguish between white and black pericarp rice. The RM17321 and RM15209 markers were related with \log_{10} antioxidant activity, which had R^2 equivalent to 51.95% and 3.93%, respectively. Multiple regression analysis showed that the RM17321 and RM15209 markers were highly related with antioxidant activity which had R^2 equivalent to 55.11%. In addition, the RM17321 marker had a highly positive correlation with the pericarp color. This suggested that pericarp pigmentation required at least a single allele from male parent Kham Noi. However, the RM11383 marker was not related to all phenotypes in this study. Analysis of antioxidant activity by DPPH method in F_2 progenies revealed that plant no. 2 had the highest antioxidant activity similar to that of Kham Noi. Thus, the use of RM17321 and RM15209 could assist for selection of rice with high antioxidant activity. The RM17321 marker can help to select pericarp color rice. These markers would be applied in rice selection by a marker-assisted backcrossing method.

Keywords: rice; DNA markers; antioxidant activity; anthocyanins; pericarp color

บทนำ

ข้าวเป็นอาหารหลักที่สำคัญและนิยมบริโภคทั่วโลก ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีคุณค่าทางโภชนาการสูงประกอบด้วยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ด้านเชื้อจุลินทรีย์ และด้านมะเร็ง (Sivamaruthi et al., 2018; Mbanjo et al., 2020) ซึ่งเกิดจากการสะสมของสารแอนโทไซยานิน โดยมีสารประกอบหลัก คือ cyanidin-3-O-glucoside (C3G) (รัชณี และริญ, 2553; Rahman et al., 2016) การศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า ปริมาณแอนโทไซยานินที่สะสมอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวดำมีปริมาณสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล แต่ไม่พบในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล และขาว (Sompong et al., 2011; Yang et al., 2019)

ลักษณะการเกิดสีดำจากแอนโทไซยานินบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดของลูกผสมชั่วที่ 1 และ 2 มีการแสดงออกแบบข่มไม่สมบูรณ์ (incomplete dominance) (พีรนนท์ และคณะ 2557; Rysbekova et al., 2017) การกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในลูกผสมชั่วที่ 2 พบว่า มีการกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในอัตราส่วน 9 สีม่วง: 3 สีน้ำตาล: 4 สีขาว แสดงว่าถูกควบคุมด้วย 2 ยีน (พิทวัส และคณะ, 2560) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rahman et al. (2013) พบว่า ยีนที่ควบคุมการเกิดสีดำบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ด มีการกระจายตัวของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในอัตราส่วน 9 สีดำ: 3 สีน้ำตาล: 4 สีขาว นอกจากนี้มีรายงานว่า การกระจายตัวของปริมาณแอนโทไซยานินเป็นแบบต่อเนื่องซึ่งส่วนใหญ่กระจายตัวไปในทิศทางของพันธุ์พ่อที่มีค่าต่ำ (พิทวัส และคณะ, 2560) สอดคล้องกับงานวิจัยของ พีรนนท์ และคณะ (2557) พบว่า การกระจายตัวของปริมาณแอนโทไซยานินเป็นแบบต่อเนื่อง ส่วนใหญ่มีค่าน้อย และค่อนข้างไปทางพันธุ์ทุหมธานี 1 และลักษณะแอนโทไซยานินมีการถ่ายทอดพันธุกรรมเชิงปริมาณควบคุมด้วยยีนจำนวนมาก

การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำเกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนควบคุมที่เป็นรหัสของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็น basic helix-loop-helix (bHLH) หรือ MYC ได้แก่ ยีน *OsB1* และ *OsB2* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 (Sakamoto et al., 2001; Sakulsingharoj et al., 2016) โดยพบว่ายีนควบคุมหลัก คือ ยีน *OsB2* (*kala4*) (Maeda et al., 2014; Oikawa et al., 2015) และยีน *OsB1* (*Pb*) (Rahman et al., 2013) อีกกลุ่มหนึ่ง คือ R2R3-Myb หรือ MYB ได้แก่ ยีน *OsMYB3* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 3 (Maeda et al., 2014) นอกจากนี้มียีนโครงสร้างที่สำคัญที่เป็นรหัสสร้างเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) คือ ยีน *OsDFR* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 (Nakai et al., 1998) โดยยีนควบคุมจะกระตุ้นยีนโครงสร้างให้มีการแสดงออกในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินทำให้ข้าวมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (ลลิตา และคณะ, 2562; Furukawa et al., 2007; Sakulsingharoj et al., 2014; Mbanjo et al., 2020; Xia et al., 2021) การศึกษาการเกิดสีม่วงบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวจากสารแอนโทไซยานิน พบว่าเกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนจำนวน 2 ยีน คือ ยีนควบคุม *Pb* (*OsB1*) และยีนโครงสร้าง *Pp* (*OsDFR*) ซึ่งการมีอัลลีลเด่น *Pb* อย่างน้อย 1 อัลลีล เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเกิดสีบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว (อนงค์นภา และคณะ, 2564; Rahman et al., 2013; Rahman et al., 2016; Lee et al., 2018) จากการศึกษาของ Maeda et al. (2014) พบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวสีดำอาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนจำนวน 3 ยีน ประกอบด้วย ยีนควบคุม คือ ยีน *OsB2* (*kala4*) กับ *OsMYB3* (*kala3*) และยีนโครงสร้าง คือ *OsDFR* (*Rd*) เมื่อจีโนไทป์ของทั้ง 3 ยีนเป็นแบบ homozygous เหมือนข้าวดำ (dominant allele) จะทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวมีสีดำ แต่ถ้าจีโนไทป์ของยีน *OsDFR* หรือ *OsMYB3* เป็นแบบ homozygous เหมือนข้าวขาว (recessive allele) เยื่อหุ้มเมล็ดข้าวจะมีสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม

ปัจจุบันมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีและมีปริมาณแอนโทไซยานินสูง โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะต่อยีน เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) พัฒนามาจากการกลายพันธุ์ของลำดับเบสในยีน *OsB1* โดยเกิดการเพิ่มจำนวน 2 คู่เบส (GT) ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงและขาว แต่ไม่พบในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (Sakulsingharoj et al., 2016) จึงนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการแยกความแตกต่างของสีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว และคัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ (อนงค์นาฏ และคณะ, 2562; อนงค์นาฏ และคณะ, 2564; Rahman et al., 2013; Lee et al., 2018) ส่วนยีน *OsDFR* เกิดการแทนที่เบส (base-pair substitution) ที่เปลี่ยนจากเบส C ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำเป็น A ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS แต่พบว่าการใช้เครื่องหมาย CAPS ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* ไม่สามารถแยกข้าวขาวบางสายพันธุ์ออกจากข้าวสีได้ (Lim and Ha, 2013)

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR เป็นเครื่องหมายชนิดข่มร่วมกัน (co-dominance) สามารถแยกจีโนไทป์แบบ homozygous และ heterozygous ได้ อีกทั้งใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำได้ และใช้คัดเลือกในประชากรชั่วที่ 2 (F_2) ระหว่างคู่ผสมที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ จากการศึกษาของ Maeda et al. (2014) ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ได้แก่ RM2441, RM8129 และ RM15191 ที่ยึดติดกับยีน *kala4* (*OsB2*), *kala1* (*OsDFR*) และ *kala3* (*OsMYB3*) ตามลำดับ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีดาบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวญี่ปุ่น ตรวจสอบข้าวลูกผสมกลับที่เกิดจากการผสมระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำได้ และพบว่าข้าวลูกผสมกลับที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM2441 (*OsB2*) เป็นเครื่องหมายสำคัญในการคัดเลือกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar et al. (2020) ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ได้แก่ RM17305, RM11541 และ RM15139 ที่ยึดติดกับยีน *kala4* (*OsB2*), *kala1* (*OsDFR*) และ *kala3* (*OsMYB3*) ตามลำดับ ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว และข้าวพื้นเมืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำของประเทศอินเดียได้ และพบว่าสารแอนโทไซยานินมีระดับแตกต่างกันในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดานอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในการตรวจสอบประชากร F_2 ระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำพบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM252 บนโครโมโซมที่ 4 สามารถใช้คัดเลือกข้าวลูกผสมในประชากร F_2 และ F_3 ได้ และพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM252 มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด และปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Kristamtini et al., 2018; Kristamtini et al., 2020) นอกจากนี้มีรายงานว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM251 บนโครโมโซมที่ 3 สามารถแยกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำออกจากข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและแดงได้ (Sari et al., 2021) เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR นอกจากสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำแล้ว ยังสามารถจำแนกข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดาของประเทศลาวออกเป็น 4 กลุ่มได้ (Bounphanousay et al., 2008) อีกทั้งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR สามารถจำแนกพันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดาของไทยออกจากกันได้ และในข้าวเก่าพื้นเมืองทุกพันธุ์พบว่า มีระดับของความเป็นพันธุ์แท้ภายในพันธุ์สูง และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ที่ชัดเจน (Pusadee et al., 2019)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทยโดยวิธีการผสมข้ามพันธุ์เป็นการนำพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะดีของข้าวแต่ละพันธุ์มาผสมกัน เพื่อจะได้รวมลักษณะดีไว้ในต้นเดียวกัน (วรวิทย์, 2563) ข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง คือ ข้าวเหนียวพื้นเมืองพันธุ์ก้าน้อยของจังหวัดยโสธร มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ เกิดจากการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน เป็นแหล่งของโฟเลต วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และลูทีนสูง จึงจัดเป็นข้าวพื้นเมืองที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (รัชณี และริญ, 2553) ส่วนข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว เป็นข้าวเจ้าพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณลักษณะที่ดีทางการเกษตร คุณภาพข้าวสุก นุ่ม มีกลิ่นหอมอ่อน ผลผลิตสูง ไร่ต่อไร่สูง แสง ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว โรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง (กรมการข้าว, 2563) การนำข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะที่ดีมาเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้สูงขึ้น โดยการใช้พันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่มีปริมาณแอนโทไซยานิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จะช่วยให้ได้ข้าวพันธุ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยในการคัดเลือกจะช่วยให้เกิดความแม่นยำ และช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้รวดเร็วมากยิ่งขึ้น โดยไม่ต้องรอให้ข้าวติดเมล็ด

งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับลักษณะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานิน และสีเยื่อหุ้มเมล็ด ในประชากรชั่วที่ 2 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 กับก้าน้อย

วิธีการศึกษา

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีนที่สนใจ แบ่งออกเป็น ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว จำนวน 3 พันธุ์ ประกอบด้วย นิปปอนบาร์เลย์ (Nip) เป็นชุดควบคุม, ปทุมธานี 1 (PTT1) และ กข-แม่โจ้ 2 (RD-MAEJO 2) เป็นข้าวพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณภาพการหุงต้มดี และมีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ และข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ จำนวน 3 พันธุ์ ประกอบด้วย กำแพง (KY), กำน้อย (KNO) และมะลิดำ (MLDUM) เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ได้รับความอนุเคราะห์จากข้าวพื้นเมืองในเขตปฏิรูปที่ดิน สำนักงานปฏิรูปที่ดิน อำเภอกุดชุม จังหวัดยโสธร

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ พันธุ์แม่ คือ พันธุ์ปทุมธานี 1 ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ส่วนพันธุ์พ่อ คือ พันธุ์กำน้อย ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ปลูกและผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 hybrid) ในฤดูนาปี พ.ศ. 2561 ปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 hybrid) และเก็บเมล็ด ในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2562 และสร้างประชากรชั่วที่ 2 (F_2) ทั้งหมด จำนวน 300 ต้น ในฤดูนาปี พ.ศ. 2562 โดยทำการปลูก 1 ไร่แถว ต่อ 1 ต้น ให้ปุ๋ยเหมือนกันตามช่วงระยะการเจริญเติบโตของข้าว และปลูกในสภาพแวดล้อมเดียวกันในโรงเรียนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

การหาและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3*

ค้นหาตำแหน่งของยีน *OsB1* หรือ *Ra* (EU095986.1) (Wang and Shu, 2007), ยีน *OsB2* (MK636610.1) (Zheng et al., 2019), ยีน *OsDFR* (AB003495.1) (Nakai et al., 1998) และยีน *OsMYB3* (D88619.1) (Suzuki et al., 1997) จากฐานข้อมูล GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ในข้าวพันธุ์นิปปอนบาร์เลย์ ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4, 4, 1 และ 3 ตามลำดับ จากนั้นดาวน์โหลดตาราง supplementary table 18 จากฐานข้อมูลพันธุกรรมข้าว Gramene (<http://www.gramene.org/markers/microsat>) แล้วแทรกตำแหน่งยีนที่สนใจ พบว่า ตำแหน่งของยีน *OsB1* และ *OsB2* อยู่ติดกัน (linked genes) จึงกำหนดการเขียนสัญลักษณ์ของทั้ง 2 ยีน คือ *OsB1&B2* จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ขนาดข้างยีนและอยู่ใกล้กับตำแหน่งยีนมากที่สุด ด้านละ 10 เครื่องหมาย จากตาราง supplementary table 18 โดยเลือกไพรเมอร์ที่มีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ ประมาณ 100 ถึง 300 bp เพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวรวมทั้งพันธุ์แม่ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำรวมทั้งพันธุ์พ่อ และลูกผสม F_1

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว อายุประมาณ 2 สัปดาห์ ประกอบด้วย พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการสร้างประชากรเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ พันธุ์แม่ปทุมธานี 1 พันธุ์พ่อกำน้อย และลูกผสม F_1 และพันธุ์ข้าวที่นำมาศึกษาเพิ่มเติม ได้แก่ ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว คือ นิปปอนบาร์เลย์ และ กข-แม่โจ้ 2 ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ คือ กำแพง และมะลิดำ จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ที่คัดเลือกได้จาก supplementary table 18 ปฏิบัติการประกอบด้วย 1x MyTaq™ HS Red Mix (BIOLINE, USA) จีโนมิกดีเอ็นเอประมาณ 50 นาโนกรัม ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรสุดท้าย เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที ปฏิบัติการทั้งหมด 35 รอบ ดังต่อไปนี้ denaturation 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ final extension 72 องศาเซลเซียส 5 นาที และตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้นเจล 4% ในสารละลาย 0.5x TBE buffer (Tris-borate-EDTA) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอต่างกัน (polymorphic band pattern) โดยพบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ (single band) ที่จำเพาะกับพันธุ์แม่ปทุมธานี 1 และพันธุ์พ่อกำน้อย ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่ และพันธุ์พ่อ ส่วนลูกผสม F_1 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมือนพันธุ์แม่ 1 แถบ และพันธุ์พ่อ 1 แถบ

การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ในประชากร F_2

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว อายุประมาณ 2 สัปดาห์ ประกอบด้วย พันธุ์แม่ปทุมธานี 1 พันธุ์พ่อกำน้อย และประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3*

ปฏิกิริยาประกอบด้วย 1x MyTaq™ HS Red Mix (BIOLINE, USA) จีโนมิกดีเอ็นเอประมาณ 50 นาโนกรัม ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 15 ไมโครลิตร สำหรับขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที ปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ ดังต่อไปนี้ denaturation 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing 58 หรือ 60 (Table 2) องศาเซลเซียส 30 วินาที extension 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ final extension 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้ความเข้มข้นเจล 4% ในสารละลาย 0.5x TBE buffer (Tris-borate-EDTA) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F₂ ด้วยวิธี DPPH

ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากสารอนุมูลอิสระ DPPH* (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) โดยสารละลาย DPPH* มีสีม่วงเข้ม เมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือสารสกัดจากเมล็ดข้าว สีของสารละลายม่วงเข้มจะจางลง หรือจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หากตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็นมาตรฐาน คือ Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) ดัดแปลงวิธีจาก Shao et al. (2014)

เตรียมสารละลาย DPPH* ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล/ลิตร ใส่ลงในหลุมของไมโครเพลท 96 ช่อง (96 well plate) เติมสารมาตรฐาน Trolox ปริมาณ 0-0.0099 ไมโครโมล บ่มในที่มืด นาน 30 นาที โดยใช้เมทานอลความเข้มข้น 100% ผสมกับสารละลาย DPPH* เป็นตัวควบคุม วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer-plate reader รุ่น SPECTRO star Nano (BMGLabTech, Germany) ที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร ที่ได้จากการคัดเลือกความยาวคลื่นที่ได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารมาตรฐาน Trolox ดังสมการ %DPPH inhibition = $[(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$ เมื่อ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ, A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH* ที่ผสมเมทานอล นำค่า %DPPH inhibition ที่ได้จากสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ สร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่แกน Y คือ %DPPH inhibition แกน X คือ ปริมาณของ Trolox (ไมโครโมล)

เตรียมสารสกัดจากเมล็ดข้าว ซึ่งเมล็ดข้าวกล้อง จำนวน 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดที่มีเม็ดบีด บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด เติมเมทานอลความเข้มข้น 80% เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสสารสกัดปริมาตร 800 ไมโครลิตร มาเจือจาง 4 เท่า ด้วยเมทานอลความเข้มข้น 80% ใส่ตัวอย่างสารสกัด ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครเพลท 96 ช่อง เติมสารละลาย DPPH* ปริมาตร 180 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังสมการ %DPPH inhibition = $[(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$ เมื่อ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่เจือจางผสมกับสารละลาย DPPH*, A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH* ที่ผสมกับเมทานอล แทนตัวอย่างของสารสกัด นำค่า %DPPH inhibition ของสารสกัดที่คำนวณได้มาคูณกับค่าการเจือจางของสารสกัด (dilution factor) แล้วนำไปแทนค่า Y ของกราฟมาตรฐานของสาร Trolox ที่ได้ตอนต้น จากนั้นรายงานผลในรูปของ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) หน่วยเป็นไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F₂ ด้วยวิธี pH differential

วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin content) ด้วยวิธี pH differential ดัดแปลงจาก อนงค์นาฏ และคณะ (2564) เตรียมสารสกัดจากเมล็ดข้าว ทำการชั่งน้ำหนักเมล็ดข้าวกล้อง จำนวน 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดที่มีเม็ดบีด บดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด เป็นเวลา 1.30 นาที แล้วเติมเมทานอลความเข้มข้น 80% ผสมกับ 1% กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารสกัดแอนโทไซยานินที่ได้ไปเจือจางให้มีความเข้มข้นของสาร ต่อ pH buffer (pH 1.0 และ pH 4.5) เป็น 1 ต่อ 4 บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer-plate reader รุ่น SPECTRO star Nano (BMGLabTech, Germany) และคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินใน

หน่วยมิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักเมล็ดแห้ง (มิลลิกรัม/100 กรัมเมล็ดแห้ง) จากสูตร คือ Anthocyanin pigment (cyanidin-3-O-glucoside (C3G) equivalents, mg/L) = $(A \times MW \times DF \times 10^3) / \epsilon \times 1$ โดยที่ $A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH 1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH 4.5}$, MW (molecular weight) = 449.2 g/mol, DF = (dilution factor = 1) และ $\epsilon = 26,900$ molar extinction ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* กับฟีโนไทป์ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของประชากร F_2 ด้วยโปรแกรม Minitab 18 โดยทดสอบอัตราส่วนจีโนไทป์ด้วยสถิติทดสอบวิธี Chi-square test, ทดสอบค่าเฉลี่ยฟีโนไทป์ของประชากร F_2 กลุ่มค่าสูงเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อกำน้อยด้วยสถิติทดสอบวิธี t-test, ทดสอบการแจกแจงปกติของฟีโนไทป์ด้วยวิธีของ Kolmogorov-Smirnov, ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยฟีโนไทป์กรณีมีจีโนไทป์มากกว่า 2 กลุ่ม ด้วยวิธี ANOVA, ทดสอบความสัมพันธ์ด้วย Pearson correlation coefficient (r) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์ของประชากร F_2 ด้วยการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) โดยวิธี simple regression และ multiple regression เพื่อหาสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับฟีโนไทป์ คือ สีเยื่อหุ้มเมล็ด ของประชากร F_2 โดยทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ด้วยสถิติทดสอบวิธี Chi-square test for association และประมาณค่าระดับความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ด้วย Cramer's V correlation coefficient นอกจากนี้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณแอนโทไซยานิน จำแนกตามจีโนไทป์โดยใช้แผนภาพการกระจาย (Scatterplot) และ Spearman's correlation coefficient (r_s)

กำหนดให้จีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ ใช้สัญลักษณ์ คือ PP ให้คะแนนเป็น 0 จีโนไทป์แบบ heterozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ เหมือนกับพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ ใช้สัญลักษณ์ คือ KP ให้คะแนนเป็น 1 และกำหนดให้จีโนไทป์แบบ homozygous ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ ใช้สัญลักษณ์ คือ KK ให้คะแนนเป็น 2 ส่วนฟีโนไทป์ของสีเยื่อหุ้มเมล็ด กำหนดให้เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ให้คะแนนเป็น 0 และเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลหรือดำ ให้คะแนนเป็น 1

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การหาและคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3*

จากฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *OsB1&B2* อยู่บนโครโมโซมที่ 4 ตำแหน่ง 27,916,190 ถึง 27,956,890, *OsDFR* อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ตำแหน่ง 25,381,935 ถึง 25,385,548 และ *OsMYB3* อยู่บนโครโมโซมที่ 3 ตำแหน่ง 16,879,444 ถึง 16,880,495 จากการสืบค้นฐานข้อมูล Gramene ได้เครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* จำนวน 22, 24 และ 22 เครื่องหมายตามลำดับ โดยเครื่องหมายเหล่านี้มีตำแหน่งขนาบข้างยีนและมีระยะอยู่ห่างจากยีนใกล้ที่สุดถึงไกลที่สุด เท่ากับ 31 ถึง 1,643 kb, 17 ถึง 3,482 kb และ 25 ถึง 2,800 kb ตามลำดับ โดยกำหนดระยะห่างจากยีนไม่เกิน 3,500 kb

ผลการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในข้าวพันธุ์นิปปอนบาร์เลย์ (ชุดควบคุม) ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ได้แก่ พันธุ์แม่ปทุมธานี 1 (PTT 1) และกช-แม่โจ้ 2 (RD-MAEJO 2) ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ได้แก่ พันธุ์พ่อกำน้อย (KNO) กำใหญ่ (KY) และ มะลิดำ (MLDUM) เมื่อวิเคราะห์ด้วยอิกาโรสเจลอเล็กโทรโฟรีซิส พบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ที่แยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ดำ (polymorphic markers) และลูกผสม F_1 จำนวน 5, 6 และ 7 เครื่องหมาย ตามลำดับ (Table 1) จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ของแต่ละยีน โดยเลือกที่ขนาดของผลผลิตของพีซีอาร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ และมีขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์แม่กับพันธุ์พ่อ และลูกผสม F_1 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เหมือนพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อได้ชัดเจนที่สุด และมีตำแหน่งอยู่ใกล้ยีนที่สุด (selected SSR marker) คือ เครื่องหมาย RM17321,

RM11383 และ RM15209 ที่ยี่ตติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบในประชากร F₂ (Figure 1, Table 1 และ 2)

Table 1 Selection of SSR markers linked to *OsB1&B2*, *OsDFR* and *OsMYB3* genes showing polymorphisms among white pericarp rice, black pericarp rice and F₁ hybrid

Gene	Chromosome	Number of polymorphic markers	Polymorphic markers	Selected SSR marker
<i>OsB1&B2</i>	4	5	RM17314, RM17317, RM17321, RM17322 and RM2441	RM17321
<i>OsDFR</i>	1	5	RM8129, RM11383, RM11392, RM11396 and RM7419	RM11383
<i>OsMYB3</i>	3	7	RM15139, RM15191, RM15196, RM15200, RM15209, RM15217 and RM15223	RM15209

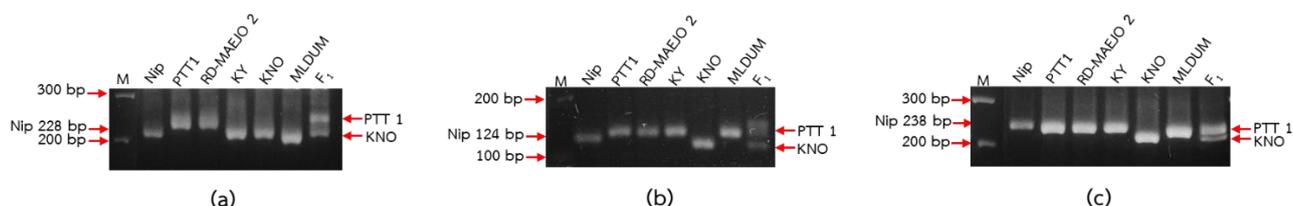


Figure 1 Profiles of SSR markers linked to (a) *OsB1&OsB2* (RM17321), (b) *OsDFR* (RM11383), and (c) *OsMYB3* (RM15209) genes which were tested in white rice, black rice and F₁ hybrid on 4% agarose gel. White rice were Nipponbare (Nip) as control, Pathum Thani 1 (PTT1) and RD-MAEJO 2. Black rice were Kham Yai (KY), Kham Noi (KNO) and Mali Dam (MLDUM). F₁ was hybrid rice. M was 100 bp DNA Ladder Plus.

Table 2 SSR markers linked to *OsB1&B2*, *OsDFR* and *OsMYB3* genes for detection in F₂ progenies.

Gene	SSR Marker	Forward primer sequence (5' – 3')	Reverse primer sequence (5' – 3')	Annealing temp (°C)	PTT1/KNO PCR Product size (bp)	Distance from gene (kb)
<i>OsB1&B2</i>	RM17321	AAAGACAACCGTGAG GCTAGTGG	CGATGATGTACATG GGCACTCC	60	238/228	218
<i>OsDFR</i>	RM11383	CTCTCCTTCACTTCTC CCTGATCC	AGCAATGGCGATGG AAGTAACG	58	130/114	103
<i>OsMYB3</i>	RM15209	ACGAGAAGAACAACA CGGTGACG	TTCTTGATCATCTC CGGCTTCC	58	230/220	25

primer sequences derived from supplementary table 18

การศึกษาก่อนหน้านี้มีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1*, *OsB2*, *OsMYB3* และ *OsDFR* บนโครโมโซมที่ 4, 4, 3 และ 1 ตามลำดับ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM2441 ที่ยึดติดกับยีน *Kala4* (*OsB2*) เป็นเครื่องหมายสำคัญในการคัดเลือกสปีรเวมเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวในข้าวลูกผสมกลับของข้าวญี่ปุ่น (Maeda et al., 2014) ในงานวิจัยนี้พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM2441 สามารถใช้คัดเลือกสปีรเวมเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวของไทยได้เช่นเดียวกัน แต่พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่เป็น single band ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและขาว และมีขนาดแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์แม่ พันธุ์พ่อ และลูกผสม F_1 ใกล้เคียงกันไม่สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจน ทำให้ยากต่อการนำไปใช้ในการตรวจสอบประชากร F_2 ด้วยเหตุนี้จึงได้เลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่มีระยะห่างจากยีน 218 kb (Table 2) ในการนำไปตรวจสอบประชากร F_2 ต่อไป ในส่วนของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM8129 ที่ยึดติดกับยีน *Kala1* (*OsDFR*) มีส่วนเกี่ยวข้องในการคัดเลือกเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำของข้าวญี่ปุ่น โดยมีระยะห่างจากตำแหน่งยีนเท่ากับ 314 kb (Maeda et al., 2014) งานวิจัยนี้พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM8129 สามารถใช้คัดเลือกสปีรเวมเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวไทยได้เช่นเดียวกัน นอกจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM8129 งานวิจัยนี้ยังพบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 สามารถใช้คัดเลือกสปีรเวมเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวของไทยได้ และพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็น single band ในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและขาว และมีขนาดแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์แม่แตกต่างจากพันธุ์พ่อชัดเจน และลูกผสม F_1 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่เหมือนกับพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ โดยมีระยะห่างจากตำแหน่งยีนเพียงแค่ 103 kb (Table 2) ซึ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งยีนมากกว่า ด้วยเหตุนี้จึงได้เลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ในการนำไปตรวจสอบประชากร F_2 ต่อไป นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15191 ที่ยึดติดกับยีน *kala3* (*OsMYB3*) มีส่วนเกี่ยวข้องในการคัดเลือกเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำของข้าวญี่ปุ่น โดยมีระยะห่างจากตำแหน่งยีน เท่ากับ 323 kb (Maeda et al., 2014) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15139 ที่ยึดติดกับยีน *Kala3* (*OsMYB3*) สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว และข้าวพื้นเมืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำของประเทศอินเดียได้ โดยมีระยะห่างจากตำแหน่งยีน เท่ากับ 1,147 kb (Kumar et al., 2020) ในงานวิจัยนี้ พบว่า ทั้งเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15191 และ RM15139 สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำได้เช่นเดียวกัน แต่ในงานวิจัยนี้พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำได้ และพบว่ามีระยะห่างจากตำแหน่งยีนเพียง 25 kb (Table 2) ซึ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งยีนมากกว่าจึงใช้เครื่องหมายนี้ในการตรวจสอบประชากร F_2 ต่อไป

การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ในประชากร F_2

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ที่คัดเลือกได้ (Table 2) มาตรวจสอบในประชากร F_2 จำนวน 300 ต้น พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 3 แบบ ได้แก่ แบบ KK (แถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ), KP (แถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่) และ PP (แถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่) (Figure 2) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 พบจีโนไทป์ แบบ KK จำนวน 73 ต้น, KP จำนวน 157 ต้น และ PP จำนวน 70 ต้น เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 พบจีโนไทป์ แบบ KK จำนวน 76 ต้น, KP จำนวน 158 ต้น และ PP จำนวน 66 ต้น และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 พบจีโนไทป์ แบบ KK จำนวน 66 ต้น, KP จำนวน 152 ต้น และ PP จำนวน 82 ต้น (Table 3)

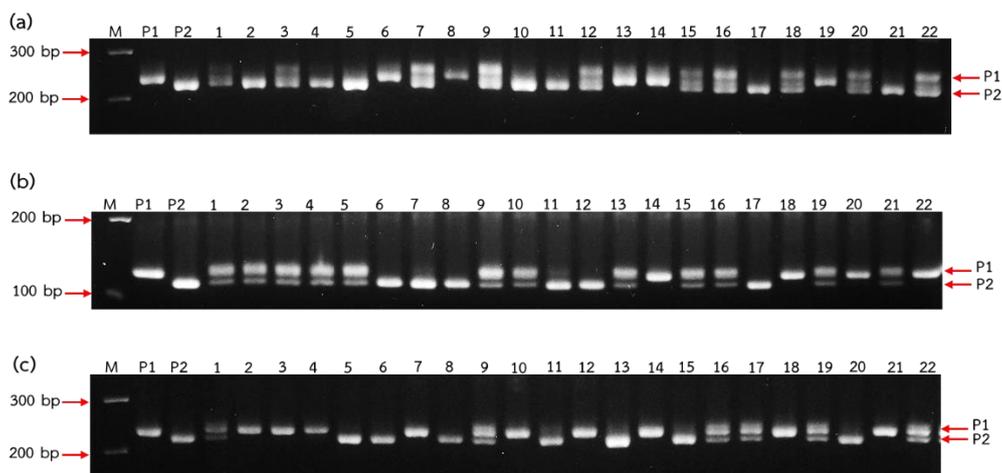


Figure 2 Profiles of SSR markers linked to (a) *OsB1&B2* (RM17321), (b) *OsDFR* (RM11383) and (c) *OsMYB3* (RM15209) genes which were tested in F₂ progenies on 4% agarose gel. P1 was Pathum Thani 1. P2 was Kham Noi. Lane 1-22 were F₂ no.67-88. M was 100 bp DNA Ladder Plus.

การทดสอบไคสแควร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในประชากร F₂

นำข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในประชากร F₂ จำนวน 300 ต้น มาทดสอบไคสแควร์ เพื่อทดสอบการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอตามกฎของเมนเดล โดยมีสมมติฐาน คือ อัตราส่วนจีโนไทป์ของ KK: KP: PP เท่ากับ 1: 2: 1 พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* มีการถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล โดยมีค่า χ^2 เท่ากับ 0.713, 1.520 และ 1.760 ($p > 0.05$) ตามลำดับ (Table 3) ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานวิจัยนี้สามารถใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกได้

Table 3 Chi-square test of inheritance of SSR markers linked to *OsB1&B2*, *OsDFR* and *OsMYB3* genes in the F₂ progenies at a significant level 0.05

Gene	SSR marker	Number	F ₂ segregation			Total	χ^2 (1: 2: 1)	p-value
			KK	KP	PP			
<i>OsB1&B2</i>	RM17321	Observed	73	157	70	300	0.713	0.700
		Expected	75	150	75	300		
<i>OsDFR</i>	RM11383	Observed	76	158	66	300	1.520	0.468
		Expected	75	150	75	300		
<i>OsMYB3</i>	RM15209	Observed	66	152	82	300	1.760	0.415
		Expected	75	150	75	300		

The p-value for the χ^2 was $p > 0.05$ (accepted our hypothesis and followed a Mendelian ratio of 1: 2: 1).

KK = homozygous for Kham Noi, KP = heterozygous for Kham Noi and Pathum Thani 1, PP = homozygous for Pathum Thani 1

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F₂

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ตัวอย่างเมล็ดข้าวพันธุ์แม่ปทุมธานี 1, พันธุ์พ่อกำน้อย และเมล็ดของต้น F₁ มีค่าเท่ากับ 1.6, 10.1 และ 4.8 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์เมล็ดของประชากร F₂ จำนวน 300 ตัวอย่าง พบว่า มีค่าเฉลี่ยของค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 3.4 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ค่าต่ำที่สุด (ต้นที่ 199) และค่าสูงที่สุด (ต้นที่ 2) เท่ากับ 0.7 และ 9.7 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ (Figure 3a) กลุ่มต้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง คือ ต้นที่ 2 (9.7) และ 13 (9.5) มีค่าเฉลี่ยของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 9.6 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งไม่แตกต่างกับพันธุ์พ่อกำน้อย ที่มีค่าเท่ากับ 10.1 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ($p>0.05$)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F₂ พบว่า มีการกระจายตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นแบบไม่ปกติ โดยกราฟมีลักษณะเบ้ไปทางขวา ($p>0.05$) อาจเนื่องจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นลักษณะเชิงปริมาณถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการกระจายตัวของปริมาณแอนโทไซยานินในประชากร F₂ ของข้าว (พีรพันธ์ และคณะ, 2557; วิทวัส และคณะ, 2560) และพบว่าต้นที่ 2 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมา คือ ต้นที่ 13 จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของต้นที่ 2 และ 13 พบจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* เหมือนกับพันธุ์พ่อกำน้อย (Homozygous dominant) และมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sutharat and Sudarat (2012) วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในข้าวไทยที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและขาว ด้วยวิธี TEAC และ FRAP พบว่าในข้าวพันธุ์เหนียวดำสูงกว่าข้าวเจ้าดำและข้าวขาวอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) นอกจากนี้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ม่วง และดำ ในหลายประเทศด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น DPPH, ORAC หรือ ABTS พบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วง และขาว ตามลำดับ (Shao et al., 2014; Zhang et al., 2015; Pang et al., 2018; Shao et al., 2018; Yuliana and Akhbar, 2020)

ในงานวิจัยนี้พบว่าต้นที่ 2 และ 13 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับพันธุ์พ่อกำน้อยมาก แต่ปริมาณแอนโทไซยานินมีค่าแตกต่างจากพันธุ์พ่อกำน้อย โดยต้นที่ 2 และ 13 มีค่าเท่ากับ 33.38 และ 23.31 มิลลิกรัม/100 กรัมเมล็ดแห้ง แต่พันธุ์พ่อกำน้อยมีค่าเท่ากับ 51.52 มิลลิกรัม/100 กรัมเมล็ดแห้ง (อนงค์นาฏ และคณะ, 2564) แสดงว่า แอนโทไซยานินอาจไม่ใช่สารชนิดเดียวในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจมีสารชนิดอื่นที่มีบทบาทสำคัญและทำหน้าที่ร่วมกันในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเมล็ดข้าว เช่น โพรแอนโทไซยานิน และลูทีน เป็นต้น (สุภาภรณ์ และคณะ, 2559) อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Chen et al. (2012) วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของข้าวด้วยวิธี ORAC พบว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดดำมีค่าสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีเขียว และขาว ตามลำดับ และพบว่า สารแอนโทไซยานินที่ทำให้เกิดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีเพียง 0.5% ถึง 2.5% ซึ่งสารสีแอนโทไซยานินมีส่วนเพียงเล็กน้อยต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของพันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำ ดังนั้น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจึงได้มาจากสารประกอบฟีนอลิกอื่น ๆ ร่วมด้วย

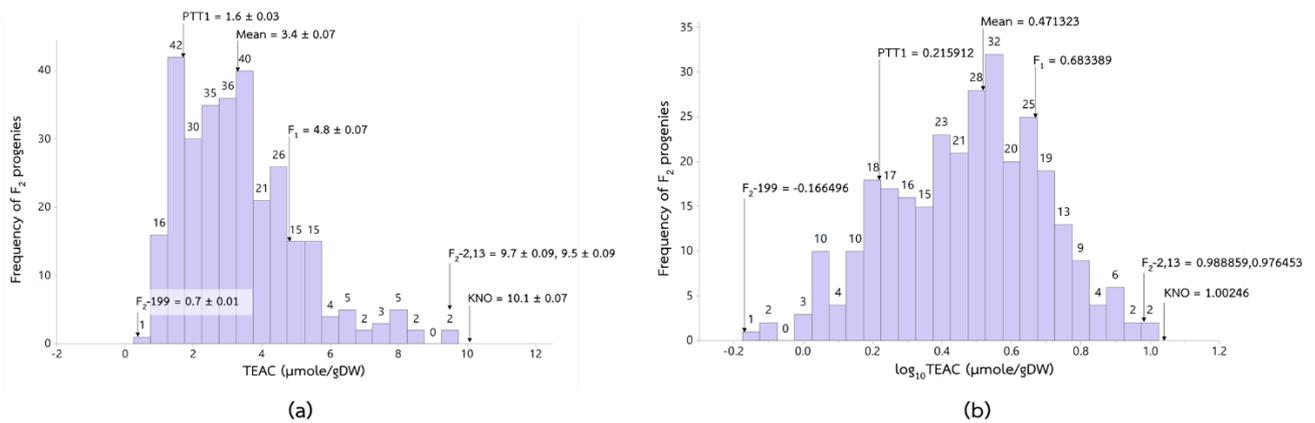


Figure 3 Histogram showing the distribution of antioxidant activity analyzed by DPPH assay in F₂ progenies. Pathum Thani 1 (PTT1) = female parent, Kham Noi (KNO) = male parent, F₁ = F₁ hybrid and F₂ progenies no. 2, 13 and 199 = F₂-2, F₂-13 and F₂-199. (a) Distribution of antioxidant activity. (b) Distribution of log₁₀ antioxidant activity.

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในประชากร F₂ ด้วยวิธี simple regression

เนื่องจากข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่ได้มีการแจกแจงปรกติ (Figure 3a) ดังนั้นจึงแปลงข้อมูลด้วยลอการิทึมฐาน 10 (log₁₀ antioxidant activity) พบว่า ข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีการแจกแจงปรกติ (p>0.05) (Figure 3b) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ANOVA พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 ที่ยัดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ มีความสัมพันธ์ต่อค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยค่าเฉลี่ยค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแต่ละจีโนไทป์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในส่วนของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยัดติดกับยีน *OsDFR* พบว่า ค่าเฉลี่ยค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแต่ละจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างกัน (p>0.05) แสดงว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Table 4)

Table 4 ANOVA analysis of relationship between RM17321, RM15209 and RM11383 markers linked to *OsB1&B2*, *OsMYB3*, and *OsDFR* genes, respectively and phenotype of \log_{10} antioxidant activity in F_2 progenies

SSR marker/Gene	Genotype	Number of F_2 progenies	Phenotype		
			\log_{10} antioxidant activity		
			Mean	SD	p-value
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	KK	73	0.655 ^a	0.147	0.000*
	KP	157	0.513 ^b	0.156	
	PP	70	0.188 ^c	0.131	
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	KK	66	0.539 ^a	0.257	0.003*
	KP	152	0.473 ^{a, b}	0.216	
	PP	82	0.413 ^b	0.190	
RM11383/ <i>OsDFR</i>	KK	76	0.484 ^a	0.226	0.203 ^{ns}
	KP	158	0.483 ^a	0.231	
	PP	66	0.428 ^a	0.197	

*Significant, ^{ns}non- significant, SD = standard deviation of phenotype, KK = homozygous for Kham Noi, KP = heterozygous for Kham Noi and Pathum Thani 1, PP = homozygous for Pathum Thani 1. Means with the same letter are not significantly different from each other ($P>0.05$ ANOVA followed by Tukey test).

การหาระดับและทิศทางความสัมพันธ์ รวมทั้งการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* กับค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีความสัมพันธ์ปานกลางค่า r เท่ากับ 0.721 และมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้สมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α และ β เท่ากับ -0.043 และ 2.234 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ แสดงว่า ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (x_1) มีอัลลีลจากพ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ที่ทำให้ค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้น 2.234 ไมโครโมล/กรัม น้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) เท่ากับ 0.480 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (R^2) ได้ 51.95% ($p<0.05$) แสดงว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* เป็นเครื่องหมายหลักในการใช้คัดเลือกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 กับค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความสัมพันธ์ต่ำค่า r เท่ากับ 0.198 และมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้สมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α และ β เท่ากับ 0.653 และ 0.623 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ แสดงว่าถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (x_2) มีอัลลีลจากพ่อเพิ่มขึ้น 1 อัลลีล ที่ทำให้ค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้น 0.623 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) เท่ากับ 0.689 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (R^2) ได้ 3.93% ($p<0.05$) แสดงว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3* เป็นเครื่องหมายรองในการใช้คัดเลือกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Table 5) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีความเที่ยงตรง (precision) สูงกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 เนื่องจากให้ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) ที่ต่ำกว่า และมีความแม่นยำ (accuracy) มากกว่า เนื่องจากสามารถอธิบายความผันแปรของค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ R^2 สูงกว่าเครื่องหมาย RM15209

Table 5 Simple regression analysis of SSR markers of *OsB1&B2* and *OsMYB3* genes with \log_{10} antioxidant activity of F_2 progenies

Genotype	Phenotype				
	\log_{10} antioxidant activity				
SSR marker	r	Regression coefficient ($y = \alpha + \beta x$)	SE	R ² (%)	p-value
RM17321 (x_1)	0.721	$\alpha=-0.043, \beta=2.234$	0.480	51.95	0.000*
RM15209 (x_2)	0.198	$\alpha=0.653, \beta=0.623$	0.689	3.93	0.001*

*Significant, ⁿnon- significant, r = Pearson correlation coefficient, y = antioxidant activity, x_1 = genotype of RM17321, x_2 = genotype of RM15209, SE = standard error, R² = Regression coefficient

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในประชากร F_2 ด้วยวิธี multiple regression

การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ กับค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (\log_{10} antioxidant activity) ได้สมการถดถอยที่มีค่าสัมประสิทธิ์ถดถอย α, β_1 และ β_2 เท่ากับ 0.185, 0.231 และ 0.056 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ตามลำดับ ถ้าจีโนไทป์ของเครื่องหมายทั้ง 2 ตำแหน่งเหมือนแม่ (PPPP) จะมีค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) ประมาณ 0.185 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง เมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (x_2) คงที่ เมื่อมีอัลลีลจากพ่อของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (x_1) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้นประมาณ 0.231 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ในทางตรงกันข้ามเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 (x_1) คงที่ เมื่อมีอัลลีลจากพ่อของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 (x_2) เพิ่มขึ้น 1 อัลลีล จะทำให้ค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (y) เพิ่มขึ้นประมาณ 0.056 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งในการทำนายดังกล่าวมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) 0.150 ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักเมล็ดแห้ง และสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของค่าลอกของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (R²) ได้ 55.11% (p<0.05) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายกับการวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณ พบว่า การวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณ มีความแม่นยำสูงกว่าการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่าย โดยมีค่า R² เท่ากับ 55.11% เมื่อเปรียบเทียบกับค่า R² จากการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของเครื่องหมาย RM17321 ซึ่งมีค่า R² เท่ากับ 51.95% แสดงว่า การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* ร่วมกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsMYB3* สามารถใช้คัดเลือกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แม่นยำมากยิ่งขึ้น (Table 6)

Table 6 Multiple regression analysis of SSR markers of RM17321 (*OsB1&B2*) with RM15209 (*OsMYB3*) with \log_{10} antioxidant activity of F_2 progenies

Phenotype	Regression coefficient ($y = \alpha + \beta x_1 + \beta x_2$)	SE	R ² (%)	p-value
\log_{10} antioxidant activity (y)	$\alpha=0.185, \beta_1=0.231, \beta_2=0.056$	0.150	55.11	0.000*

*Significant, ⁿnon- significant, y = \log_{10} antioxidant activity, x_1 = genotype of RM17321, x_2 = genotype of RM15209, SE = standard error, R² = Regression coefficient

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* และ *OsMYB3* ตามลำดับ มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับงานวิจัยของอนงค์นาฏ และคณะ (2564) รายงานว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ในงานวิจัยนี้พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับงานวิจัยของอนงค์นาฏ และคณะ (2564) รายงานว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel ที่จำเพาะต่อยีน *OsDFR* ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ($p > 0.05$) เนื่องจากในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ประกอบด้วยยีนโครงสร้างหลายยีน นอกเหนือจากยีน *OsDFR* ดังนั้นอาจจะต้องศึกษา ยีนโครงสร้างที่สำคัญอื่นในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินร่วมด้วย เช่น *OsLAR*, *OsANS1,2*, *OsUGT*, และ *OsANR* เป็นต้น (Mbanjo et al., 2020; Xia et al., 2021)

การทดสอบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับสีเยื่อหุ้มเมล็ดในประชากร F_2

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับสีเยื่อหุ้มเมล็ดด้วยสถิติทดสอบวิธี Chi-Square test for association พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* ที่มีจีโนไทป์แบบ KK จะมีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสี มีค่าเท่ากับ 100% ส่วนจีโนไทป์แบบ KP ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดมีสี มีค่าเท่ากับ 99.36% และจีโนไทป์แบบ PP จะมีเยื่อหุ้มเมล็ดไม่มีสี มีค่าเท่ากับ 97.14% จากสถิติทดสอบ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีความสัมพันธ์สูงกับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ($p < 0.05$) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าการเกิดสีบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดจะต้องมีอัลลีลเหมือนพันธุ์พ่อ (K) อย่างน้อย 1 อัลลีล โดยระดับความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ Cramer's V เท่ากับ 0.9447 เมื่อพิจารณาเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ($p > 0.05$) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ Cramer's V มีค่าต่ำมาก เท่ากับ 0.0088 และ 0.0003 ตามลำดับ (Table 7)

Table 7 Chi-square test for association between RM17321, RM11383 and RM15209 markers linked to *OsB1&B2*, *OsDFR*, and *OsMYB3* genes, respectively and phenotype of pericarp color in F_2 progenies

SSR marker/Gene	Genotype	Number	Pericarp color		p-value	Cramer's V correlation coefficient
			Number of Color (%)	Number of Colorless (%)		
RM17321/ <i>OsB1&B2</i>	KK	73	73 (100)	0 (0)	0.000*	0.9447
	KP	157	156 (99.36)	1 (0.64)		
	PP	70	2 (2.86)	68 (97.14)		
RM11383/ <i>OsDFR</i>	KK	76	60 (78.95)	16 (21.05)	0.876 ^{ns}	0.0088
	KP	158	120 (75.95)	38 (24.05)		
	PP	66	51 (77.27)	15 (22.73)		
RM15209/ <i>OsMYB3</i>	KK	66	50 (75.76)	16 (24.24)	0.955 ^{ns}	0.0003
	KP	152	118 (77.63)	34 (22.37)		
	PP	82	63 (76.83)	19 (23.17)		

*Significant, ^{ns}non- significant, KK = homozygous for Kham Noi, KP = heterozygous for Kham Noi and Pathum Thani 1, PP = homozygous for Pathum Thani 1.

จากการศึกษาของ อนงค์นาฏ และคณะ (2564) พบว่า การวิเคราะห์สี่เยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวประชากร F₂ เป็นไปตามกฎของเมนเดล (3 มีสี: 1 ไม่มีสี) สอดคล้องกับอัตราส่วนการถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS ที่จำเพาะต่อยีน *OsB1* เท่ากับ 3:1 โดยการเกิดสีม่วงบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดจะต้องมีอัลลีลเด่นของยีน *OsB1* อย่างน้อย 1 อัลลีล ในงานวิจัยนี้ การถ่ายทอดเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* มีอัตราส่วนจีโนไทป์เป็นไปตามกฎเมนเดล เท่ากับ 3:1 สอดคล้องกับการถ่ายทอดสี่เยื่อหุ้มเมล็ดมีสี: ไม่มีสี เท่ากับ 3:1 ดังนั้น จีโนไทป์เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2* ที่มีอัลลีลเหมือนพันธุ์พ่อกำน้อยอย่างน้อย 1 อัลลีล สามารถใช้คัดเลือกเยื่อหุ้มเมล็ดที่มีสีได้ เช่นเดียวกับ Rahman et al. (2013) ที่รายงานว่า การเกิดเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลหรือดำ จำเป็นต้องมีอัลลีล *Pb (OsB1)* เด่น อย่างน้อย 1 อัลลีล และงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในการตรวจสอบข้าวประชากรลูกผสมกลับของกลุ่มสมระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและดำ พบว่า ยีน *Kala4 (OsB2)* เป็นยีนควบคุมที่จำเป็นต่อการทำให้เกิดสีบริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว (Maeda et al., 2014; Oikawa et al., 2015)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์ระดับและทิศทางความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานิน ในประชากร F₂ ด้วยวิธี Spearman's correlation coefficient พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r_s) มีค่าเท่ากับ 0.917 ($p < 0.05$) แสดงว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์กันสูงมากและมีความสัมพันธ์เชิงบวก ดังนั้นการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 ที่ใช้ในการคัดเลือกลักษณะที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงในประชากร F₂ จะมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงเช่นเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ถดถอยอย่างง่ายของความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานิน พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 เป็นเครื่องหมายหลักที่มีความสัมพันธ์ทั้งกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานิน เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วยแผนภาพการกระจาย (Scatterplot) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 เป็นเครื่องหมายหลัก เมื่อมีสภาพของจีโนไทป์เป็นแบบ KK (homozygous เหมือนพันธุ์พ่อ) และ KP (heterozygous เหมือนพันธุ์พ่อและแม่) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ Spearman's ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานิน (r_s) จะมีค่าเข้าใกล้ 1 ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.653 ถึง 0.891 ($p < 0.05$) แสดงว่าเมื่อเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีจีโนไทป์แบบ KK หรือ KP โดยที่เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีจีโนไทป์แบบใดก็ได้ พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณแอนโทไซยานินมีความสัมพันธ์กันในระดับสูงและมีความสัมพันธ์เชิงบวก ($p < 0.05$) (Figure 4 a-f) ในกรณี que เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีจีโนไทป์แบบ PP (homozygous เหมือนพันธุ์แม่) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r_s) จะมีค่าเข้าใกล้ 0 ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง -0.129 ถึง 0.131 แสดงว่า เมื่อเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีจีโนไทป์แบบ PP โดยที่เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีจีโนไทป์แบบใดก็ได้ พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานิน ($p > 0.05$) (Figure 4 g-i) เมื่อพิจารณาเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2 ตำแหน่งร่วมกัน โดยที่เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีจีโนไทป์แบบ KK หรือ KP ร่วมกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีจีโนไทป์แบบ KK หรือ KP พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานิน (r_s) (Figure 4 a,b,d,e) สูงกว่าในกรณีที่เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีจีโนไทป์แบบ KK หรือ KP ร่วมกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีจีโนไทป์แบบ PP (Figure 4 c,f) ดังนั้นเมื่อใช้เครื่องหมาย 2 ตำแหน่งนี้ร่วมกันจะสามารถช่วยคัดเลือกข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแอนโทไซยานินสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งสามารถประยุกต์ใช้เครื่องหมายที่ได้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้คัดเลือกข้าวลูกผสมจากการผสมข้ามพันธุ์ และการผสมกลับต่อไป

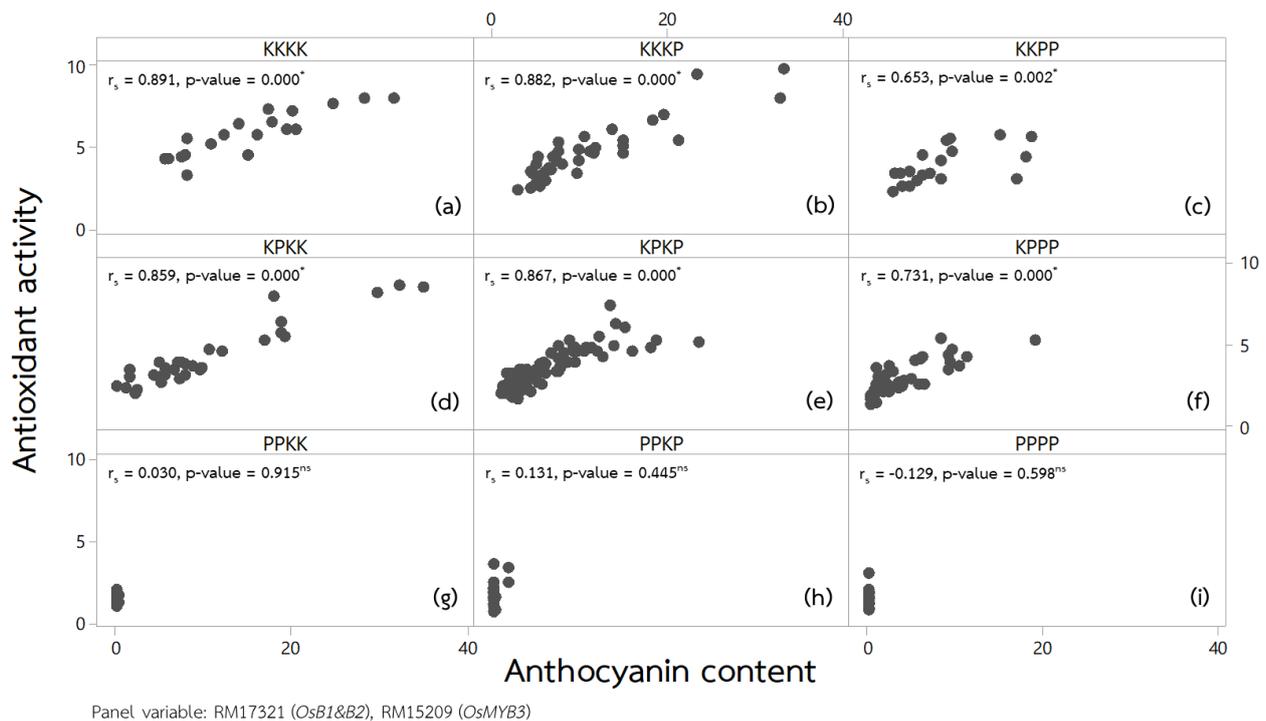


Figure 4 Scatterplot showing the Spearman's correlation coefficient (r_s) between antioxidant activity and anthocyanin content in F_2 progenies of RM17321 and RM15209 by Minitab 18. *Significant, ^{ns}non-significant, KK = homozygous for Kham Noi, KP = heterozygous for Kham Noi and Pathum Thani 1, PP = homozygous for Pathum Thani 1

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 ที่ยึดติดกับยีน *OsB1&B2*, *OsDFR* และ *OsMYB3* ตามลำดับ ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาว ดำ และลูกผสม F_1 ได้ชัดเจน และมีตำแหน่งอยู่ใกล้ยีนมากที่สุดจากเครื่องหมายทั้งหมดที่ทำการทดสอบ การถ่ายทอดของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321, RM11383 และ RM15209 เป็นไปตามกฎของเมนเดล คือ อัตราส่วน 1:2:1 การวิเคราะห์ถ้อยถี่ด้านอนุมูลอิสระ พบว่า ต้นที่ 2 ในประชากร F_2 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดและมีค่าใกล้เคียงกับพันธุ์พ่อกำน้อย

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ โดยศึกษาในประชากร F_2 ของลูกผสมระหว่างพันธุ์แม่พทุมธานี 1 กับพันธุ์พ่อกำน้อย พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 มีความสัมพันธ์สูงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีความสัมพันธ์สูงมากต่อสีเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถใช้คัดเลือกข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำและน้ำตาลได้ และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM15209 มีความสัมพันธ์ต่ำกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับสีเยื่อหุ้มเมล็ด ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM11383 ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสีเยื่อหุ้มเมล็ด การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 ร่วมกับ RM15209 กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า มีความสัมพันธ์สูงกว่าการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 เพียงเครื่องหมายเดียว โดยเครื่องหมาย RM17321 เป็นเครื่องหมายหลัก ส่วนเครื่องหมาย RM15209 เป็นเครื่องหมายรอง

ดังนั้น เมื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM17321 และ RM15209 ทั้ง 2 ตำแหน่งนี้ร่วมกันจะช่วยให้การคัดเลือกข้าวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ด เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น เพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก หรือนำไปใช้กับประชากรอื่น ๆ ต่อไป อย่างไรก็ตาม

การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ในงานวิจัยนี้ไปใช้กับคู่ผสมอื่น ควรต้องทำการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพิ่มเติมในพันธุ์แม่ พันธุ์พ่อ และประชากรที่จะทำการศึกษาก่อนเป็นกรณีไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ผ่านมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2563 และทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา “ทุนศิษย์ก้นกุฏิ” ประจำปีการศึกษา 2561 มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เอกสารอ้างอิง

- กรมการข้าว. 2564. พันธุ์ข้าวปทุมธานี 1. แหล่งข้อมูล: <http://www.ricethailand.go.th/Rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=67.htm>. ค้นเมื่อ 14 พฤษภาคม 2564.
- พิทวัส สมบูรณ์, ชนากานต์ เทโบลต์ พรหมอุทัย, ต่อนภา ผุสดี และศันสนีย์ จำจด. 2560. การกระจายตัวทางพันธุกรรมของปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่างข้าวเหนียวดำจากที่สูงและข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่ปลูกที่ลุ่มและที่สูง. วารสารเกษตร. 33(3): 323-332.
- พีรพันธ์ มาบ้น, สุพรรณิกา ตีบขัน, ชนากานต์ เทโบลต์ พรหมอุทัย, ดำเนิน กาละดี และศันสนีย์ จำจด. 2557. การคัดเลือกในชั่วต้นเพื่อลักษณะแอนโทไซยานินในเมล็ดสูงและไม่ไวต่อช่วงแสงในลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่างข้าวพันธุ์เก่าดอยสะเก็ดและปทุมธานี 1. วารสารนเรศวรพะเยา. 7(2): 160-171.
- รัชณี คงอุยฉาย และริญ เจริญศิริ. 2553. ปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของข้าวพื้นเมืองในเขตปฏิรูปที่ดิน อำเภอกุดชุม จังหวัดยโสธร. วารสารโภชนาการ. 45(2): 14-32.
- ลลิตา ณ ราชสีมา, กนกภรณ์ คำโมนะ, แสงทอง พงษ์เจริญกิต, วราภรณ์ แสงทอง, นฤมล เข้มกสิ์เงิน, ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ และศรีเมฆ ชาวโพพวง. 2562. การถ่ายยีนและวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *OsB2* ที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 8(5): 517-531.
- วรวิทย์ พาณิชพัฒน์. 2563. ข้าว : ผลงานที่ถึงมือชาวนา. สำนักพิมพ์ โอ เอส พรีนติ้ง เฮ้าส์, กรุงเทพฯ.
- สุภาภรณ์ ญะเมืองมอญ และชนากานต์ เทโบลต์ พรหมอุทัย. 2559. ความแปรปรวนของปริมาณแอนโทไซยานินและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของข้าวเหนียวเก่าพันธุ์พื้นเมืองของไทย. วารสารเกษตร. 32(2): 191-199.
- อนงค์นาฏ หรีจันดา, วราภรณ์ แสงทอง, แสงทอง พงษ์เจริญกิต และช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์. 2562. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีน *OsB1* สำหรับใช้ตรวจสอบข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวและม่วง. น. 181-189. ใน: ประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 21 “พันธุศาสตร์เพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน” 20-22 มิถุนายน 2562. โรงแรมเดอะฮายน์ เมืองพัทยา, จังหวัดชลบุรี.
- อนงค์นาฏ หรีจันดา, วราภรณ์ แสงทอง, แสงทอง พงษ์เจริญกิต และช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์. 2564. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินและสีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวในประชากรชั่วที่ 2 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 กับก้าน้อย. วารสารแก่นเกษตร. 49(5): 1301-1312.
- Bounphanousay, C., P. Jaisil, K. L. McNally, J. Sanitchon, and N. R. S. Hamilton. 2008. Variation of microsatellite markers in a collection of Laos black glutinous rice (*Oryza sativa* L.). Asian Journal of Plant Sciences. 7(2): 140-148.
- Chen, X. Q., N. Nagao, T. Itani, and K. Irifune. 2012. Anti-oxidative analysis, and identification and quantification of anthocyanin pigments in different coloured rice. Food Chemistry. 135(4): 2783-2788.
- Furukawa, T., M. Maekawa, T. Oki, I. Suda, S. Iida, H. Shimada, I. Takamura, and K. i. Kadowaki. 2007. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. The Plant Journal. 49: 91-102.

- Kim, J., H. J. Lee, Y. J. Jung, K. K. Kang, W. Tyagi, M. Kovach, M. Sweeney, S. McCouch, and Y. G. Cho. 2017. Functional properties of an alternative, tissue-specific promoter for rice NADPH-dependent dihydroflavonol reductase. *PLoS ONE*. 12(8): e0183722.
- Kristamtini, Taryono, P. Basunanda, and R. H. Murti. 2018. Use of microsatellite markers to detect heterozygosity in an F₂ generation of a black rice and white rice cross. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 23(1): 28-34.
- Kristamtini, Taryono, P. Basunanda, and R. H. Murti. 2020. Application of Microsatellite Markers as Marker Assisted Selection (MAS) in the F₃ Generation Results Crosses of Black Rice and White Rice. Vol. 2260. pp. 060002. In *Proceeding of the 6th International AIP Conference on Biological Science ICBS 2019*.
- Kumar, D., P. K. Das, C. Singha, and B. K. Sarmah. 2020. Mining and Characterizing the SSR Markers for Black Rice Using the Illumina Sequencing Platform. *Preprints*. 3-10.
- Lee, K. E., M. M. Rahman, J. B. Kim, and S. G. Kang. 2018. Genetic Analysis of Complementary Gene Interactions of *Pb* and *Pp* Genes for the Purple Pericarp Trait in Rice. *Journal of Life Science*. 28(4): 398-407.
- Lim, S. H., and S. H. Ha. 2013. Marker development for the identification of rice seed color. *Plant Biotechnology Reports*. 7(3): 391-398.
- Maeda, H., T. Yamaguchi, M. Omoteno, T. Takarada, K. Fujita, K. Murata, Y. Iyama, Y. Kojima, M. Morikawa, H. Ozaki, N. Mukaino, Y. Kidani, and T. Ebitani. 2014. Genetic dissection of black grain rice by the development of a near isogenic line. *Breeding Science*. 64(2): 134-141.
- Mbanjo, E. G. N., T. Kretzschmar, H. Jones, N. Ereful, C. Blanchard, L. A. Boyd, and N. Sreenivasulu. 2020. The Genetic Basis and Nutritional Benefits of Pigmented Rice Grain. *Frontiers in Genetics*. 11: 229.
- Nakai, K., Y. Inagaki, H. Nagata, C. Miykzaki, and S. Iida. 1998. Molecular Characterization of the Gene for Dihydroflavonol 4-Reductase of *Japonica* Rice Varieties. *Plant Biotechnology*. 15(4): 221-225.
- Oikawa, T., H. Maeda, T. Oguchi, T. Yamaguchi, N. Tanabe, K. Ebana, M. Yano, T. Ebitani, and T. Izawa. 2015. The Birth of a Black Rice Gene and Its Local Spread by Introgression. *The Plant Cell*. 27: 2401-2414.
- Pang, Y., S. Ahmed, Y. Xu, T. Beta, Z. Zhu, Y. Shao, and J. Bao. 2018. Bound phenolic compounds and antioxidant properties of whole grain and bran of white, red and black rice. *Food Chemistry*. 240: 212-221.
- Pusadee, T., A. Wongtamee, B. Rerkasem, K. M. Olsen, and S. Jamjod. 2019. Farmers Drive Genetic Diversity of Thai Purple Rice (*Oryza sativa* L.) Landraces. *Economic Botany*. 73: 76-85.
- Rahman, M. M., K. E. Lee, E. S. Lee, M. N. Matin, D. S. Lee, J. S. Yun, J. B. Kim, and S. G. Kang. 2013. The genetic constitutions of complementary genes *Pp* and *Pb* determine the purple color variation in pericarps with cyanidin-3-O-glucoside depositions in black rice. *Journal of Plant Biology*. 56: 24-31.
- Rahman, M. M., K. E. Lee, and S. G. Kang. 2016. Allelic Gene Interaction and Anthocyanin Biosynthesis of Purple Pericarp Trait For Yield Improvement in Black Rice. *Journal of Life Science*. 26(6): 727-736.
- Rysbekova, A. B., D. T. Kazkeyev, B. N. Usenbekov, Zh. M. Mukhina, E. A. Zhanbyrbaev, I. A. Sartbaeva, K. Z. Zhambakin, K. A. Berkimbay, and D. S. Batayeva. 2017. Prebreeding Selection of Rice with Colored Pericarp Based on Genotyping *Rc* and *Rd* Genes. *Russian Journal of Genetics*. 53: 43-53.
- Sakamoto, W., T. Ohmori, K. Kageyama, C. Miyazaki, A. Saito, M. Murata, K. Noda, and M. Maekawa. 2001. The Purple leaf (*Pl*) Locus of Rice: the *Pl^w* Allele has a Complex Organization and Includes Two Genes Encoding Basic Helix-Loop-Helix Proteins Involved in Anthocyanin Biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*. 42(9): 982-991.
- Sakulsingharoj, C., P. Inta, R. Sukkasem, S. Pongjaroenkit, S. Chowpongpan, and V. Sangtong. 2014. Overexpression of *OSB2* gene in transgenic rice up-regulated expression of structural genes in anthocyanin biosynthesis pathway. *Thai Journal of Genetics*. 7(3): 173-182.

- Sakulsingharoj, C., P. Inta, R. Sukkasem, S. Pongjaroenkit, S. Chowpongpan, and V. Sangtong. 2016. Cloning and characterization of *OSB1* gene controlling anthocyanin biosynthesis from Thai black rice. *Thai Journal of Genetics*. 9(1): 7-18.
- Sari, D. R. T., A. Paemanee, S. Roytrakul, J. R. K. Cairns, A. Safitri, and F. Fatchiyah. 2021. Black rice cultivar from Java Island of Indonesia revealed genomic, proteomic, and anthocyanin nutritional value. *The Journal of the Polish Biochemical Society and of the Committee of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences*. 68(1): 55-63.
- Shao, Y., F. Xu, X. Sun, J. Bao, and T. Beta. 2014. Phenolic acids, anthocyanins, and antioxidant capacity in rice (*Oryza sativa* L.) grains at four stages of development after flowering. *Food chemistry*. 143: 90-96.
- Shao, Y., F. Xu, X. Sun, J. Bao, and T. Beta. 2014. Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*. 59(2): 211-218.
- Shao, Y., Z. Hu, Y. Yu, R. Mou, Z. Zhu, and T. Beta. 2018. Phenolic acids, anthocyanins, proanthocyanidins, antioxidant activity, minerals and their correlations in non-pigmented, red, and black rice. *Food Chemistry*. 239: 733-741.
- Sivamaruthi, B. S., P. Kesika, and C. Chaiyasut. 2018. Anthocyanins in Thai rice varieties: distribution and pharmacological significance. *International Food Research Journal*. 25(5): 2024-2032.
- Sompong, R., S. S. Ehn, G. L. Martin, and E. Berghofer. 2011. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food chemistry*. 124(1): 132-140.
- Sutharut, J., and J. Sudarat. 2012. Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice. *International Food Research Journal*. 19(1): 215-221.
- Suzuki, A., T. Suzuki, F. Tanabe, S. Toki, H. Washida, C. Y. Wu, and F. Takaiwa. 1997. Cloning and expression of five *myb*-related genes from rice seed. *Gene*. 198(1-2): 393-398.
- 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.
- Xia, D., H. Zhou, Y. Wang, P. Li, P. Fu, B. Wu, and Y. He. 2021. How rice organs are colored: The genetic basis of anthocyanin biosynthesis in rice. *The Crop Journal*. 9: 598-608.
- Yang, X., X. Xia, Z. Zhang, B. Nong, Y. Zeng, Y. Wu, F. Xiong, Y. Zhang, H. Liang, Y. Pan, G. Dai, G. Deng, and D. Li. 2019. Identification of anthocyanin biosynthesis genes in rice pericarp using PCAMP. *Plant Biotechnology Journal*. 17(9): 1700-1702.
- Yuliana, N. D., and M. A. Akhbar. 2020. Chemical and physical evaluation, antioxidant and digestibility profiles of white and pigmented rice from different areas of Indonesia. *Brazilian Journal of Food Technology*. 23: e2018238.
- Zhang, H., Y. Shao, J. Bao, and T. Beta. 2015. Phenolic compounds and antioxidant properties of breeding lines between the white and black rice. *Food Chemistry*. 172: 630-639.
- Zheng, J., H. Wu, H. Zhu, C. Huang, C. Liu, Y. Chang, Z. Kong, Z. Zhou, G. Wang, Y. Lin, and H. Chen. 2019. Determining factors, regulation system, and domestication of anthocyanin biosynthesis in rice leaves. *New Phytologist*. 223(2): 705-721.
- Zhu, Q., S. Yu, D. Zeng, H. Liu, H. Wang, Z. Yang, X. Xie, R. Shen, J. Tan, H. Li, X. Zhao, Q. Zhang, Y. Chen, J. Guo, L. Chen, and Y. G. Liu. 2017. Development of "Purple Endosperm Rice" by Engineering Anthocyanin Biosynthesis in the Endosperm with a High-Efficiency Transgene Stacking System. *Molecular Plant*. 10(7): 918-929.