

การวิเคราะห์พันธุกรรมของยีน *OsDFR* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ในข้าวดำพื้นเมืองไทย

Genetic Analysis of Genes *OsDFR* Associated to Anthocyanin Biosynthesis in Thai Purple Rice Landraces

ชนิสร์ สุริยา¹ ศันสนีย์ จำจด^{1,2} เพ็ญภา จักรสมศักดิ์^{1,2} และ ต่อนภา ผุสดี^{1,2*}
Chanisorn Suriya¹, Sansanee Jamjod^{1,2} Pennapa Jaksomsak^{1,2} and Tonapha Pusadee^{1,2*}

¹ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

¹Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์วิจัยข้าวล้านนา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

²Lanna Rice Research Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author. Email: tonapha.p@cmu.ac.th

(Received: 13 December 2023; Accepted: 19 April 2024)

Abstract: Khao Kum (purple rice) contains an important active ingredient, anthocyanin. However, purple rice landrace gives lower yield compared to modern varieties. Therefore, breeding programs to increase yield and grain quality including the utilization of other parts of purple rice landrace besides consumption offers an alternative to boost income for farmers. The purpose of this study was to investigate the relationship between the expression of *DFR* gene and anthocyanin content in purple rice landrace, in the leaves at 45 days after transplantation and in brown rice grains, across nine purple rice landrace varieties which were selected by plant morphology: group 1 purple shoot and leaves: Kum Doi Saket, Kum Phayao, Kum Wiang Sa and K4 and group 2 green shoot and leaves: Hom Nin, Kum Hom-CMU, Kum Jao-CMU, Leum Pua, and BL3, including with the two check varieties of white rice, Pathum Thani 1 and Khao Dawk Mali 105. Three replications of a completely randomized design (CRD) were conducted in the pot experiment. The *DFR* gene exhibited the highest expression in Kum Doi Saket and Kum Wiang Sa. It was observed that K4 had the highest anthocyanin content in leaves at 45 days after transplanting. The anthocyanin content in brown rice was the highest in K4 and Kum Doi Saket. A negative correlation was observed between the expression levels of the *DFR* gene and anthocyanin content in leaves, and between the grain anthocyanin content and yield and between the anthocyanin content in brown rice and yield. The data obtained from this study revealed that measuring the expression level of the *OsDFR* gene alone is not effective enough to be used as a molecular marker for selecting purple rice varieties with high grain anthocyanin. However, it can still provide important fundamental information and the development of appropriate molecular markers for selecting suitable and efficient rice varieties in the future.

Keywords: Anthocyanin biosynthesis, gene expression of *DFR*, anthocyanin content, purple rice landrace

บทคัดย่อ: ข้าวก่ำมีสารแอนโทไซยานินเป็นสารสำคัญ แต่พันธุ์ข้าวก่ำให้ผลผลิตต่ำกว่าพันธุ์ข้าวที่ปรับปรุงสมัยใหม่ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดข้าว รวมถึงการใช้ประโยชน์จากส่วนต่าง ๆ ของข้าว กำนอกจากการบริโภค เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *OsDFR* และปริมาณแอนโทไซยานินในใบข้าวอายุ 45 วันหลังย้ายปลูก และในเมล็ดข้าวกล้อง โดยการจำแนกข้าวก่ำที่ใช้ในงานวิจัยเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ข้าวก่ำที่มีใบและลำต้นสีม่วง ได้แก่ ก่ำดอยสะเก็ด ก่ำพะเยา ก่ำเวียงสา และ K4 กลุ่มที่ 2 ข้าวก่ำที่มีใบและลำต้นสีเขียว ได้แก่ หอมนิล ก่ำหอม มข. ก่ำเจ้า มข. ข้าวเหนียวดำลิ้มผัว และ BL3 โดยมีข้าวขาวพันธุ์ ปทุมธานี 1 และข้าวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบกับวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* มีความแตกต่างกันภายในข้าวก่ำที่มีลักษณะใบและลำต้นสีม่วง โดยก่ำดอยสะเก็ด และก่ำเวียงสา มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* มากที่สุด แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในข้าวก่ำกลุ่มที่มีใบและลำต้นสีเขียว พันธุ์ K4 มีปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในใบมากที่สุด ในขณะที่ K4 และก่ำดอยสะเก็ด มีปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวกล้องมากที่สุด สำหรับระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในใบที่อายุ 45 วันหลังย้ายปลูกพบที่มีความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินในใบที่อายุ 45 วันหลังย้ายปลูก และระหว่างผลผลิตเมล็ดต่อปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวกล้อง ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าการวัดระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* เพียงอย่างเดียวยังไม่มีความเพียงพอต่อการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวก่ำที่มีแอนโทไซยานินสูง แต่สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาเพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกพันธุ์ข้าวก่ำที่มีปริมาณแอนโทไซยานินและผลผลิตสูงต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: กระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน การแสดงออกของยีน *OsDFR* ปริมาณแอนโทไซยานิน ข้าวก่ำพื้นเมือง

คำนำ

ข้าวก่ำ (purple rice) เป็นชื่อตามภาษาพื้นเมืองทางภาคเหนือของประเทศไทยสำหรับเรียกข้าวที่มีเมล็ดเป็นสีม่วงดำ หรือสีแดงก่ำ สีของข้าวก่ำเกิดจากการสะสมแอนโทไซยานินในเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น ใบ ลำต้น กาบใบ หรือเยื่อหุ้มเมล็ด จนเกิดเป็นสีม่วงดำหรือแดงตามที่ปรากฏ โดยมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ (Huttayanun *et al.*, 2016) การสังเคราะห์แอนโทไซยานินถูกควบคุมโดยยีนควบคุม (regulatory genes) โดยการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเริ่มหลังจากกระบวนการสังเคราะห์ phenylalanine เสร็จสิ้นลง ได้เป็นสารประกอบ p-coumaroyl-CoA ผ่านการทำงานของยีนโครงสร้าง (structural genes) ซึ่งประกอบด้วยยีนหลายชนิด ได้แก่ *OsCHS*, *OsCHI*, *OsF3H*, *OsF3'H*, *OsDFR*, *OsANS* และ *OsUFGT*

โดยในข้าวก่ำยีน *OsDFR* หรือ *Rd* เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกในขั้นตอนท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (late biosynthesis genes) มีความสำคัญในด้านการสังเคราะห์ dihydroflavonols ด้วยเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase ได้เป็น leucoanthocyanins สำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินหรือโปรแอนโทไซยานิน (Figure 1) โดยจากการศึกษาของ Zheng *et al.* (2019) พบว่า ยีน *OsDFR* มีความสัมพันธ์ต่อปริมาณของแอนโทไซยานินที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และจากการศึกษาในพืชชนิดอื่น เช่น ในมันเทศสีม่วงพบว่าการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase มีความสัมพันธ์กับปริมาณของแอนโทไซยานินที่พบ กล่าวคือเมื่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase ใน

มันเทศสีม่วงลดลง จะส่งผลให้ปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในส่วนของใบอ่อน ลำต้น และรากส่วนที่สะสมอาหารลดลง ในขณะที่การแสดงออกของยีน *DFR* ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในส่วนของใบอ่อน ลำต้น และรากส่วนที่สะสมอาหารของมันเทศสีม่วงมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามไปด้วย (Wang *et al.*, 2013)

การศึกษาเกี่ยวกับระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในใบพบว่าส่งผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่พบทั้งในใบ และในเมล็ด ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในใบและในเมล็ด และพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินในใบส่งผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ด รวมถึงการส่งผลของแอนโทไซยานินที่สะสมในใบและเมล็ดต่อผลผลิตของข้าว จึงเป็นส่วนสำคัญในการทำความเข้าใจเกี่ยวกับยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างแอนโทไซยานินในข้าวก่ำพื้นเมืองของไทย นอกจากนี้การประเมินความแตกต่างของปริมาณแอนโทไซยานินในพันธุ์ข้าวก่ำพื้นเมืองมีส่วนช่วยในการพัฒนาพันธุ์เพื่อการใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ ให้เพิ่มมากขึ้น โดยในประเทศไทยข้าวก่ำมี

การเพาะปลูกบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือเป็นส่วนมาก ส่งผลให้มีการพบความหลากหลายทางพันธุกรรมในพื้นที่ดังกล่าวสูง (Fongfon *et al.*, 2021; Pusadee *et al.*, 2019) การใช้ประโยชน์ของข้าวก่ำได้มีการเปลี่ยนแปลงไปตามข้อมูลแต่ละยุคสมัย นอกเหนือจากการเพาะปลูกเพื่อผลผลิตสำหรับการใช้ประโยชน์ในครัวเรือนเช่นในอดีต แม้ว่าข้าวก่ำพื้นเมืองจะมีคุณสมบัติในด้านความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม ทนทานต่อโรค และแมลง แต่มีข้อด้อยคือให้ผลผลิตที่ต่ำจึงไม่นิยมปลูกกันแพร่หลาย (Pusadee *et al.*, 2014) แต่เนื่องจากปัจจุบันผู้บริโภคตระหนักถึงความสำคัญเกี่ยวกับอาหารเพื่อสุขภาพกันเป็นจำนวนมาก ในการหาทางเลือกเพื่อการบริโภคในชีวิตประจำวันที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น ข้าวก่ำที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ จึงเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่ได้รับความสนใจ ส่งผลให้ความต้องการในการบริโภครวมถึงการใช้สินค้าแปรรูปผลิตภัณฑ์จากข้าวก่ำเพิ่มมากขึ้น (Fongfon *et al.*, 2019)

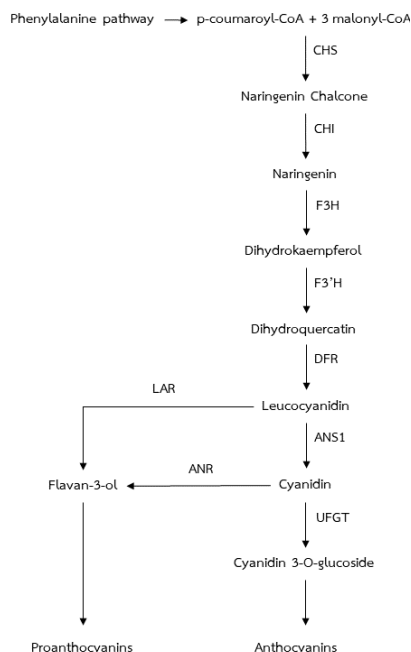


Figure 1. Anthocyanin biosynthesis pathway edited from Zhu *et al.* (2017)

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามามีส่วนในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเก่าพื้นเมืองเพื่อเพิ่มผลผลิตและปริมาณแอนโทไซยานิน เนื่องจากสามารถช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะต่าง ๆ ในการตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค รวมถึงเป็นการส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากข้าวเก่าเพิ่มเติมนอกเหนือจากการใช้บริโภคโดยตรง เช่น การใช้ประโยชน์จากการสกัดสารเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพอื่น ๆ ซึ่งเป็นการเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรรวมถึงเป็นการอนุรักษ์และพัฒนาสายพันธุ์ข้าวเก่าพื้นเมืองต่อไป การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *OsDFR* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวเก่า ตรวจสอบชนิดของอัลลีลของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวเก่า และเพื่อประเมินปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในใบและในเมล็ดข้าวกล้องในข้าวเก่าพื้นเมืองของไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมพันธุ์ข้าวและการปลูกข้าว

พันธุ์ข้าวเก่าที่ใช้ในงานวิจัยประกอบด้วย พันธุ์ข้าวเก่า 9 พันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะของสีใบ และลำต้น กลุ่มของลำต้นและใบสีม่วง ได้แก่ ก่ำตอย สะเกิด ก่ำพะเยา ก่ำเวียงสา K4 และกลุ่มของลำต้นและใบสีเขียว ได้แก่ หอมนิล ก่ำหอม มข. ก่ำเจ้า มข. ข้าวเหนียวดำลิ้มผัว และ BL3 โดยใช้ข้าวขาว 2 พันธุ์ ได้แก่ ปทุมธานี 1 และข้าวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ โดยเพาะพันธุ์ข้าวที่ทำการศึกษาก่อนจำนวนตัวอย่างละ 100 เมล็ด เมื่อต้นกล้าอายุครบ 7 วัน คัดเลือกต้นที่มีลักษณะแข็งแรงและสมบูรณ์ จำนวน 10 ต้น ย้ายปลูกในกระถางพลาสติกบรรจุดินแบบขังน้ำที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ลึก 27 เซนติเมตร โดยปลูก 1 ต้น ต่อหลุม จำนวน 5 ต้นต่อกระถาง พันธุ์ละ 2 กระถาง ระยะต้นกล้าใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 20 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวถึงระยะแตกกอใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ และในระยะกำเนิด

ช่อดอกใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ (Division of Rice Research and Development, 2016) เก็บข้อมูลผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตที่ระยะเก็บเกี่ยว โดยบันทึกข้อมูลจำนวนหน่อต่อต้น จำนวนรวงต่อต้น จำนวนดอกต่อรวง เปอร์เซ็นต์การเต็มเต็มเมล็ด และน้ำหนัก 1000 เมล็ด

การวิเคราะห์พันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแอนโทไซยานิน

เก็บตัวอย่างใบข้าวใบที่สองรองจากใบแรก จากต้นข้าวอายุ 45 วันหลังย้ายลงปลูก (ระยะแตกกอ) พันธุ์ละ 2 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

นำตัวอย่างใบข้าวมาบดด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) สกัดอาร์เอ็นเอด้วย TriZOL RNA extraction reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) และ phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1 v/v) ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ละลายตะกอน RNA ด้วย TE-buffer จากนั้นนำไปตรวจสอบคุณภาพ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (Phasri *et al.*, 2016)

การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

วิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยนำ RNA มาสังเคราะห์เป็น cDNA โดยอาศัยปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ด้วย Revert Aid First Stand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ซึ่งส่วนผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย อาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม, 5X RT buffer 10 ไมโครลิตร, Oligo (dT) 18 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร, RiboSafe RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร, Tetro Reverse Transcriptase (200u/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร, DEPC-water 6 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นให้นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การประเมินการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR analysis

นำ cDNA ที่ได้มาประเมินการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยอาศัย

เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ใช้ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับยีนที่เกี่ยวข้อง (Table 1) (Sakulsingharoj *et al.*, 2014)

การวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน

วิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้โปรแกรม ImageJ เวอร์ชัน 1.50i (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) โดยเปรียบเทียบความหนาแน่น (Intensity area) ของแถบ cDNA ระหว่างยีน *OsDFR* และ *Actin1* โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Relative intensity of gene expression} =$$

$$\frac{\text{Intensity of target gene}}{\text{Intensity of actin gene}}$$

Intensity of target gene คือ ความหนาแน่นของแถบดีเอ็นเอของยีนที่ศึกษา

Intensity of actin gene คือ ความหนาแน่นของแถบดีเอ็นเอของยีน *Actin*

การวิเคราะห์แอนโทไซยานิน

ใช้ตัวอย่างพันธุ์ข้าวชุดเดียวกับที่ใช้ในการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* โดยวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในใบที่อายุ 45 วัน

หลังย้ายปลูกและปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในเมล็ดข้าวกล้องหลังการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีการ pH-differential (Lee *et al.*, 2005)

สุ่มเก็บตัวอย่างจากใบข้าวที่อายุ 45 วันหลังย้ายปลูก นำมาบดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปอบแห้งด้วยเครื่อง freeze-dry 48 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่ได้จากการเก็บเกี่ยวพันธุ์ข้าวที่ทำการศึกษานำมาแกะเปลือกออกก่อนนำไปอบด้วยเครื่อง freeze-dry เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่าง 0.25-0.3 กรัมสกัดด้วยเมธานอล pH 1.0 ปริมาตร 24 มิลลิลิตรเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (orbital shaker) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที กรองสารสกัดส่วนใส (supernatant) ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล pH 1.0 ให้ได้ 25 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันแบ่งละลายใสออกเป็นสองส่วน ส่วนละ 2 มิลลิลิตร ส่วนแรกเติม KCl pH 1.0 และส่วนที่สองเติม $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pH 4.5 ปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยเทคนิค pH-differential ซึ่งอาศัยหลักการการเปลี่ยนโครงสร้าง

Table 1. The primer used for study of 10 gene expression

Genes	Forward Sequence (5' → 3')	Reward Sequence (5' → 3')	Successfully Amplification in all 11 rice varieties*
<i>OsDFR</i>	CGG-GTT-CAG-GTT-CAG-GTA-CA	TGA-AAC-CGG-AGG-GAG-TAA-C	+
<i>OsANS1</i>	GAA-GAG-GGA-GTG-GGA-GGA-CT	CAG-AAG-ACG-ACC-CAG-GAG-AG	-
<i>OsCHS1</i>	CGG-ACT-GGA-ACT-CCA-TCT-TC	TAA-AAG-ATG-ACG-TGT-GGC-GTA	-
<i>OsF3'H</i>	CCG-CTA-CAG-TAC-CAG-CCT-TC	TGC-CAC-CAT-TTC-TAG-AGT-TCC	-
<i>OsC1</i>	CGG-GTT-CTT-CTT-CCA-CGA-C	CCC-GCA-ACT-GCA-CTT-AAA-AT	-
<i>OsCHI</i>	TCC-ATC-CTC-TTC-ACC-CAC-TC	TGT-CAA-ACA-CGA-GGG-CAG-TA	-
<i>OsB1</i>	GGA-TGG-TCT-CCT-TGG-ACT-GA	GGG-TGG-CAG-ATT-CAT-CAC-TT	-
<i>OsF3H</i>	GAG-CAA-TGG-GAG-GTT-CAA-GA	CTT-CGA-TTT-TCG-ACG-GAA-GA	-
<i>OsB2</i>	GTG-GCA-ATA-ACG-ACG-ACT-CC	CGT-ACG-GTG-TTG-ACG-AGG-TA	-
<i>Actin1</i>	GAC-TCT-GGT-GAT-GGT-GTC-AGC	GGC-TGG-AAG-AGG-ACC-TCA-GG	+

* Only 1 genes in the anthocyanin biosynthesis pathway and *Actin* were successfully amplification and consistency in all 11 rice varieties in this study

ของแอนโทไซยานินที่เปลี่ยนแปลงไปตามค่า pH และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด (520 นาโนเมตร) ที่ pH 1.0 และ 4.5 นำมาหักลบเพื่อกำจัดการดูดกลืนแสงจากสารอื่นที่ไม่ใช่แอนโทไซยานิน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรเพื่อหักลบค่าความขุ่นที่อาจจะเกิดขึ้นเพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำก่อนนำไปหาปริมาณแอนโทไซยานิน โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{MAP} = \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000}{\epsilon \times 1}$$

MAP คือ Monomeric anthocyanin pigment

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ หาได้จาก (ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 – ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0) - (ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 - ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรของตัวอย่างที่ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5)

MW คือ มวลโมเลกุลของแอนโทไซยานิน (molecular weight) มีค่าเท่ากับ 449.2

DF คือ อัตราเจือจาง (dilution factor) มีค่าเท่ากับ 12.5

ϵ คือ การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์ (molar absorptivity) มีค่าเท่ากับ 26900

นำปริมาณแอนโทไซยานินที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัม) ที่พบต่อน้ำหนักใบ 100 กรัม โดยใช้สูตร

ปริมาณแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนักใบ 100 กรัม =

$$\frac{\text{MAP} \times \text{ปริมาณสารสกัด}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(กรัม)} \times 10}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของข้อมูล (analysis of variance, ANOVA) โดยใช้ Statistix version 8 (analysis software) และเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกรรมวิธีทดลองโดยหาค่า LSD (least significant difference) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นระหว่างตัวแปร (linear regression)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การแสดงออกของยีน *OsDFR*

พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ภายในกลุ่มข้าวเก่าที่มีลักษณะใบและลำต้นสีม่วง โดยพบว่าพันธุ์ข้าวเก่าที่มีลักษณะใบ และลำต้นสีม่วงที่มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* สูงที่สุดคือ ก่ำดอยสะเก็ด และก่ำเวียงสา รองลงมาคือก่ำพะเยา ส่วน K4 มีระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* น้อยที่สุด และไม่พบการแสดงออกของยีนในกลุ่มข้าวเก่าที่มีลักษณะใบและลำต้นสีเขียว รวมถึงพันธุ์เปรียบเทียบ (Figure 2)

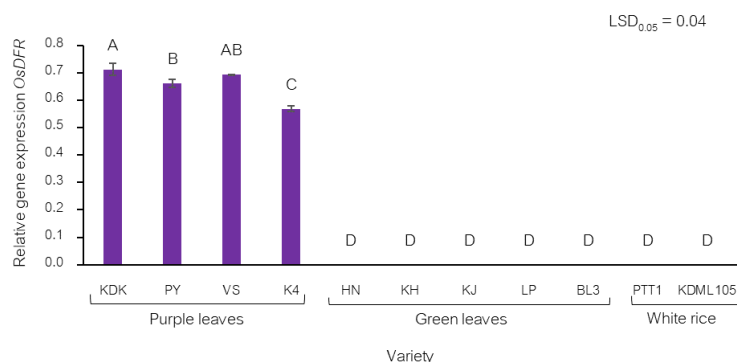


Figure 2. Relative intensity of gene *OsDFR* expression in 11 rice varieties at 45 days after transplanting

ปริมาณแอนโทไซยานินในใบที่อายุ 45 วันหลังย้ายปลูก

ปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในใบที่อายุ 45 วันหลังย้ายปลูกในข้าวเก่าทั้ง 9 พันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ภายในกลุ่มข้าวเก่าที่มีลักษณะใบและลำต้นสีม่วง (Figure 3) โดยปริมาณแอนโทไซยานินที่พบอยู่ระหว่าง 73.2 –

232.9 มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 154.1 มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ข้าวเก่าที่มีปริมาณแอนโทไซยานินที่พบใบในมากที่สุดคือ K4 รองลงมาคือ ก่ำดอยสะเก็ด และก่ำพะเยา ส่วนก่ำเวียงสามมีปริมาณแอนโทไซยานินที่พบใบในน้อยที่สุด และไม่พบแอนโทไซยานินในใบในกลุ่มข้าวเก่าที่มีลักษณะใบและลำต้นสีเขียว รวมถึงพันธุ์เปรียบเทียบ (Figure 4)

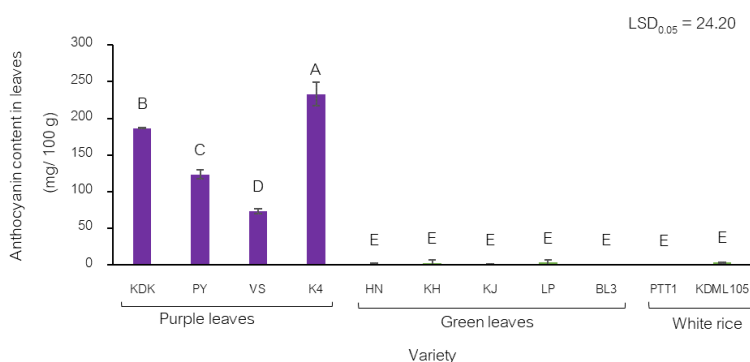


Figure 3. Anthocyanin content in rice leaves at 45 days after transplanting in 11 rice varieties.

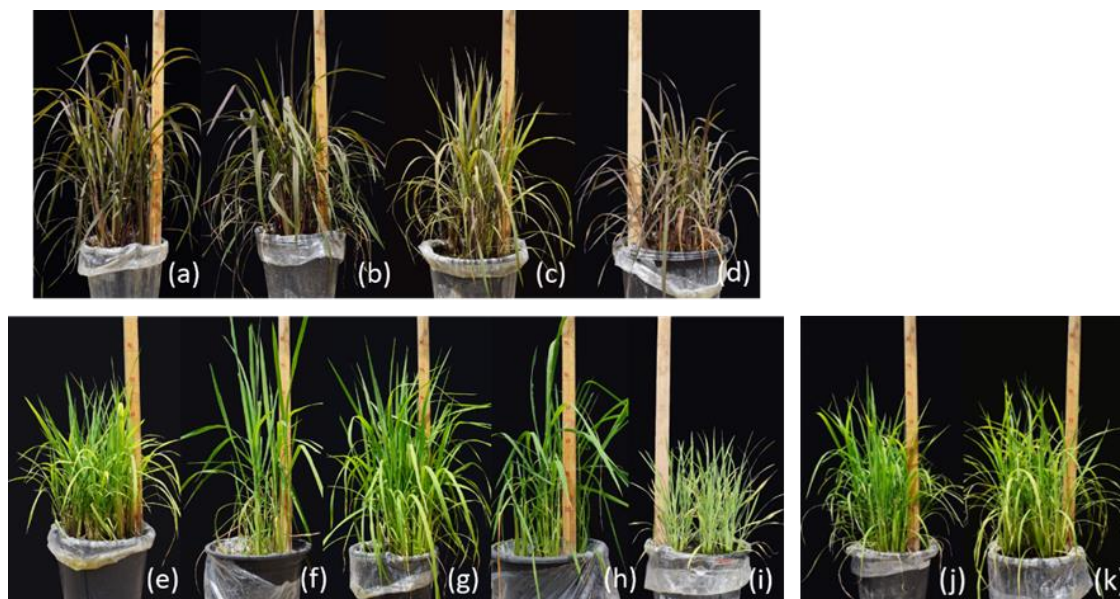


Figure 4. Characteristics of 11 rice varieties at 45 days after transplanting (a) Kum Doi Saket (b) Kum Phayao (c) Kum Wiang Sa (d) K4 (e) Hom Nin (f) Kum Hom-CMU (g) Kum Jao-CMU (h) Leum Pua (i) BL3 (j) Pathum Thani 1 and (k) Khao Dawk Mali 105

ปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวกล้อง

พบความแตกต่างของปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวกล้องแต่ละพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยปริมาณแอนโทไซยานินที่พบอยู่ระหว่าง 4.2-89.1 มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 48.1 มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ในกลุ่มของข้าวเก่าที่มีใบและลำต้นสีม่วงมีปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในเมล็ดข้าวกล้องอยู่ระหว่าง 4.19-89.13 มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง โดยพบว่าพันธุ์ข้าวเก่าในกลุ่มที่มีใบและลำต้นสีม่วงที่มีปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในเมล็ดข้าวกล้องมากที่สุดคือ K4 และกาดอยสะเกิด รองลงมาคือก่าพะเยา ส่วนก่าเงิงสามมีปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในเมล็ดข้าวกล้องน้อยที่สุดในกลุ่มของข้าวเก่าที่มีใบและลำต้นสีเขียวมีปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในเมล็ดข้าวกล้องอยู่ระหว่าง 41.25-62.21 มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และไม่พบแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์เปรียบเทียบกับ (Figure 5)

ผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิต

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตของพันธุ์ข้าวเก่า 9 พันธุ์ และพันธุ์เปรียบเทียบกับ (Table 3) พบว่ามีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่ศึกษา โดยมีจำนวนหน่อต่อต้นระหว่าง 4-11 หน่อต่อต้น มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 6 หน่อต่อต้น ในข้าวเก่ากลุ่มที่มีใบและลำต้นสีม่วงมีจำนวนหน่อต่อต้นอยู่ระหว่าง 5-7 หน่อต่อต้น ข้าวเก่ากลุ่มที่มีใบและลำต้นสีเขียวมีจำนวนหน่อต่อต้นอยู่ระหว่าง 4-8 หน่อต่อต้น และพันธุ์เปรียบเทียบกับมีจำนวนหน่อต่อต้นอยู่ระหว่าง

8 - 11 หน่อต่อต้น ตามลำดับ จำนวนรวงต่อต้นมีค่าระหว่าง 3-7 รวงต่อต้น โดยในข้าวเก่ากลุ่มที่มีใบและลำต้นสีม่วงมีจำนวนรวงต่อต้นอยู่ระหว่าง 4-7 รวงต่อต้น ข้าวเก่ากลุ่มที่มีใบและลำต้นสีม่วงมีจำนวนรวงต่อต้นอยู่ระหว่าง 3-7 รวงต่อต้น ขณะที่พันธุ์เปรียบเทียบกับมีจำนวนรวงต่อต้นอยู่ระหว่าง 7-10 รวงต่อต้น ตามลำดับ จำนวนดอกต่อรวงมีค่าอยู่ระหว่าง 80-171 ดอกต่อรวง มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 134 ดอกต่อรวง โดยในข้าวเก่ากลุ่มที่มีใบและลำต้นสีม่วงมีจำนวนดอกต่อรวงอยู่ระหว่าง 120-162 ดอกต่อรวง ข้าวเก่ากลุ่มที่มีใบและลำต้นสีเขียวมีจำนวนดอกต่อรวงอยู่ระหว่าง 80-171 ดอกต่อรวง และพันธุ์เปรียบเทียบกับมีจำนวนดอกต่อรวงไม่แตกต่างกันคือ 149 และ 130 ดอกต่อรวงตามลำดับ เปอร์เซ็นต์เมล็ดดีมีค่าอยู่ระหว่าง 62.0-92.4 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ระหว่าง 86.5 เปอร์เซ็นต์ โดยในข้าวเก่ากลุ่มที่มีใบและลำต้นสีม่วงมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีอยู่ระหว่าง 81.32-92.37 เปอร์เซ็นต์ ข้าวเก่ากลุ่มที่มีใบและลำต้นสีเขียวมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีอยู่ระหว่าง 62.00-91.82 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์เปรียบเทียบกับมีจำนวนรวงไม่แตกต่างกันคือ 92.0 และ 89.9 ตามลำดับ น้ำหนัก 1000 เมล็ดมีค่าอยู่ระหว่าง 20.6-39.2 กรัม มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 28.4 กรัม ในข้าวเก่ากลุ่มที่มีใบและลำต้นสีม่วงมีน้ำหนัก 1000 เมล็ดอยู่ระหว่าง 20.6-31.9 กรัม ข้าวเก่ากลุ่มที่มีใบและลำต้นสีเขียวมีน้ำหนัก 1000 เมล็ดอยู่ระหว่าง 21.0-39.2 กรัม และพันธุ์เปรียบเทียบกับมีน้ำหนัก 1000 เมล็ดไม่แตกต่างกันคือ 28.0 และ 27.0 กรัม ตามลำดับ

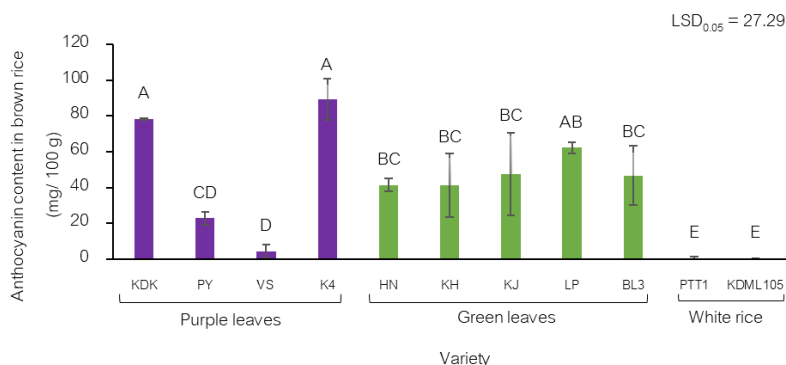


Figure 5. Anthocyanin content in brown rice after harvesting in 11 rice varieties

Table 3. Analysis of variances yield components in 9 purple rice and 2 white rice varieties

Varieties	Groups	Tillers/ plant	No. panicles/ plant	No. spikelets/ panicle	Filled grains (%)	1000 grain weight (g)	Yield (g/plant)
Kum Doi Saket	Purple leaves	5cde	4cd	162ab	88.2ab	31.2c	19.0bcde
Kum Phayao	Purple leaves	7bc	7bc	133abc	92.4a	31.9c	25.6b
Kum Wiang Sa	Purple leaves	5cde	4cd	150abc	84.1bc	29.5d	15.8bcdef
K4	Purple leaves	5cde	5bcd	120c	81.3c	20.6h	8.7ef
Hom Nin	Green leaves	7bc	7bc	120c	91.8a	23.5g	17.5bcdef
Kum Hom-CMU	Green leaves	4e	3d	139abc	90.8a	34.2b	13.6def
Kum Jao-CMU	Green leaves	7bcd	6bc	171a	90.7a	26.2f	24.9bc
Leum Pua	Green leaves	4de	4cd	80d	62.0d	39.2a	7.5f
BL3	Green leaves	8ab	6bc	124bc	88.2ab	21.0h	14.4cdef
Pathum Thani 1	White rice	11a	10a	149abc	92.0a	28.0e	38.7a
Khao Dawk Mali 105	White rice	8ab	7ab	130bc	89.9a	27.0ef	23.0bcd
<i>P</i> -value		**	*	*	***	***	**
LSD _{0.05}		2.7	2.8	39.2	5.1	1.3	10.9
CV (%)		18.3	20.9	13.2	2.7	2.1	26.0

*, ** and *** indicate the significant at $P \leq 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively, while ns is not significant. Means in the same column followed by different letter significant at $P < 0.05$

ผลผลิตต่อต้นอยู่ระหว่าง 7.5-38.7 กรัมต่อต้น มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 19.0 กรัมต่อต้น ในกลุ่มของข้าวเจ้าที่มีใบและลำต้นสีม่วงมีผลผลิตอยู่ระหว่าง 8.7-25.6 กรัมต่อต้น กลุ่มของข้าวเจ้าที่มีใบและลำต้นสีเขียวมีผลผลิตอยู่ระหว่าง 7.5-24.9 กรัมต่อต้น ในพันธุ์เปรียบเทียบ ปทุมธานี 1 มีผลผลิตสูงกว่าข้าวดอกมะลิ 105 โดย ปทุมธานี 1 มีผลผลิตเท่ากับ 38.7 กรัมต่อต้น ส่วนข้าวดอกมะลิ 105 มีผลผลิตเท่ากับ 23.0 กรัมต่อต้น

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *OsDFR* และปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในใบข้าวเจ้า 9 พันธุ์

พบมีความสัมพันธ์ในเชิงลบ ($r = -0.53$) ระหว่างการแสดงออกของยีน *OsDFR* กับปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในข้าวเจ้า 4 พันธุ์ที่มีลักษณะลำต้นและใบเป็นสีม่วงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (Figure 6) และไม่มีการแสดงออกของยีน *OsDFR* รวมถึงไม่พบปริมาณแอนโทไซยานินในข้าวเจ้าอีก

5 พันธุ์รวมถึงในข้าวขาวที่ใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบที่มีลักษณะใบ และลำต้นเป็นสีเขียว

ความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิต และปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในข้าวเจ้า 9 พันธุ์

พบว่าข้าวเจ้า 4 พันธุ์จาก 9 พันธุ์ที่มีลักษณะของลำต้นและใบมีสีม่วงมีความสัมพันธ์ต่อผลผลิตต่อต้นในเชิงลบ ($r = -0.40$) โดยปริมาณแอนโทไซยานินที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ผลผลิตต่อต้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (Figure 7a)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตต่อต้น และปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในเมล็ดข้าวกล้องหลังการเก็บเกี่ยวในข้าวเจ้า 9 พันธุ์ความสัมพันธ์ในเชิงลบ ($r = -0.52$) โดยพบว่าพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงจะให้ผลผลิตที่น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (Figure 7b)

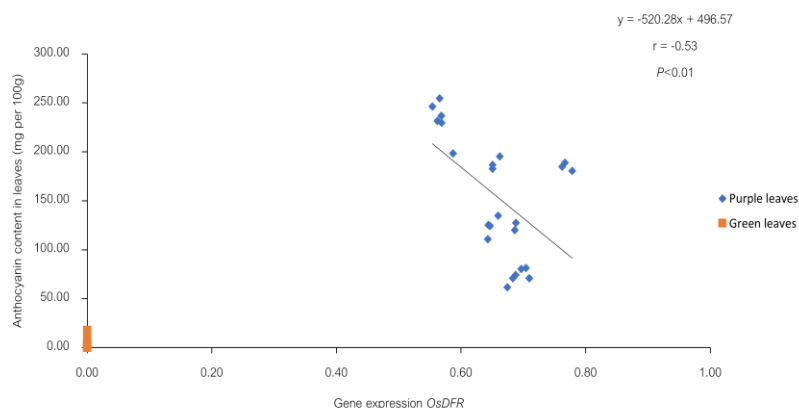


Figure 6. Relationship between anthocyanin content in leaves at 45 days after transplanting and relative gene expression of *OsDFR* in 4 purple leaves and 5 green leaves varieties

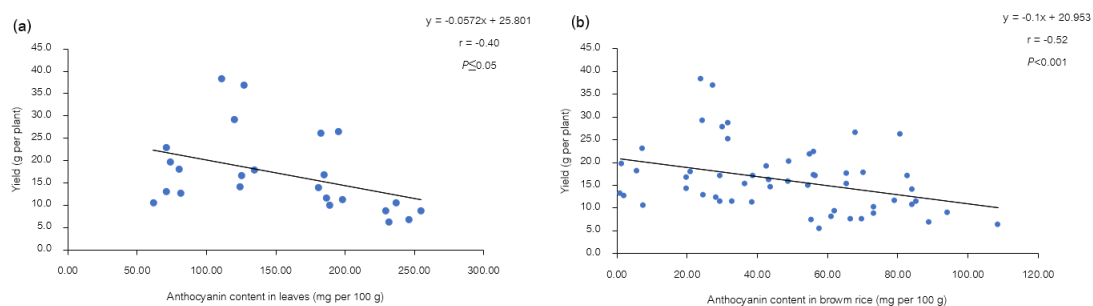


Figure 7. Relationship between yield per plant and anthocyanin content in leaves at 45 days after transplanting in 4 purple leaves (a) and relationship between yield per plant and anthocyanin content in brown rice after harvesting in 9 purple rice varieties (b)

จากการศึกษาพบว่ายีน *OsDFR* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยการพบการแสดงออกของยีน *OsDFR* ในใบข้าวบ่งบอกถึงการสังเคราะห์และสะสมแอนโทไซยานิน ซึ่งปริมาณแอนโทไซยานินที่พบมีปริมาณแตกต่างกันออกไปตามพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์ที่ทำการศึกษ และในพันธุ์ข้าวกลุ่มที่มีใบและลำต้นสีเขียวไม่พบการแสดงออกของยีน *OsDFR* แต่พบว่าปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ด แสดงให้เห็นว่ากลไกการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดน่าจะเป็นอิสระกับกลไกการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับสังเคราะห์แอนโทไซยานินในใบหรือลำต้น

(Xia *et al.*, 2021) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาทำความเข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์การแสดงออกของยีน *OsDFR* ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญในขั้นตอนส่วนท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในใบข้าวเก่าพื้นเมืองของไทยยังไม่ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยการทำความเข้าใจถึงความสัมพันธ์การแสดงออกของยีน *OsDFR* และปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในใบข้าวเก่านั้นสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาเพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกพันธุ์ข้าวเก่าที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงเหมาะกับการใช้

ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไปในอนาคตนอกเหนือจากการใช้ประโยชน์โดยการบริโภคเพียงรูปแบบเดียว โดยจากผลการศึกษาในระดับการส่งออกของยีน *OsDFR* พบความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณแอนโทไซยานินในใบที่อายุ 45 วัน อาจเนื่องจากยีน *OsDFR* อยู่ในขั้นตอนการเปลี่ยน dihydroquercetin ไปเป็น leucocyanidin เพื่อสังเคราะห์โปรแอนโทไซยานิน หรือแอนโทไซยานิน ในขั้นตอนต่อไป leucocyanidin มีโอกาสที่จะถูกเปลี่ยนเป็นโปรแอนโทไซยานินจากการทำงานของยีน *OsLAR* หรือโอกาสที่จะถูกเปลี่ยนเป็นแอนโทไซยานิน โดยผ่าน cyanidin จากการทำงานของยีน *OsANS* หรือในขั้นตอนจาก cyanidin มีโอกาสที่จะถูกเปลี่ยนเป็นโปรแอนโทไซยานินจากการทำงานของยีน *OsANR* (Figure 1) ได้เช่นเดียวกัน (Furukawa *et al.*, 2007) ดังนั้นการศึกษาระดับการส่งออกของยีน *OsDFR* เพียงอย่างเดียวจึงยังอาจจะไม่สามารถสรุปได้ว่าการเพิ่มการแสดงออกของ *DFR* จะส่งผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายได้โดยตรง จึงควรมีการศึกษายีน *OsDFR* ร่วมกับยีนอื่นในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เช่น *OsANS*, *OsLAR* หรือ *OsANR* จะช่วยให้เข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และปริมาณแอนโทไซยานินที่พบได้มากยิ่งขึ้น

จากการศึกษาผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของข้าวท่า 9 พันธุ์และข้าวขาวพันธุ์เปรียบเทียบ 2 พันธุ์ พบว่าผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตมีความแตกต่างกันออกไปตามแต่ละพันธุ์ โดยในกลุ่มข้าวท่าที่ทำการศึกษา มีผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตต่ำกว่าข้าวขาวที่ใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ และพบว่าข้าวท่าที่มีการสะสมแอนโทไซยานินในใบจะให้ผลผลิตน้อยลง การลดลงของผลผลิตในข้าวท่าดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยจำกัดของปริมาณคลอโรฟิลล์ที่พบในใบที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตที่ได้ เนื่องจากข้าวเป็นพืชที่ตอบสนองอย่างรวดเร็วต่อการลดลงของคลอโรฟิลล์เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ อันเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของแอนโทไซยานินในใบในระยะแตกกอที่เริ่มมีการปรากฏของสีม่วงในใบข้าวท่า

จึงส่งผลทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์แสงลดลง ซึ่งสัมพันธ์ต่อช่วงการเติมเต็มเมล็ดส่งผลให้ผลผลิตของข้าวท่าลดลง (Danpreedanan *et al.*, 2023; Khan *et al.*, 2020) เช่นเดียวกันพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินที่เพิ่มขึ้นในเมล็ดส่งผลให้ผลผลิตต่อต้นลดลง เช่นเดียวกัน อาจเนื่องจากการดึงเอาน้ำตาลที่สะสมไปใช้เป็นพลังงานในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเมล็ดทำให้น้ำหนักของเมล็ดข้าวท่าลดลง อีกทั้งปริมาณคลอโรฟิลล์ในเปลือกของข้าวท่าที่ลดลงก็อาจส่งผลกระทบต่อเติมเต็มเมล็ดของข้าวท่าด้วยเช่นกัน (Danpreedanan *et al.*, 2023; Rahman *et al.*, 2016; Yamuangmorn *et al.*, 2022)

นอกจากนี้จากการศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในพันธุ์ข้าวท่าพื้นเมืองทั้งในส่วนของใบและเมล็ดพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินในใบของข้าวท่ากลุ่มที่มีใบและลำต้นสีม่วงมีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกับปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในเมล็ด ข้าวกล้องของข้าวท่า ซึ่งความแตกต่างของปริมาณแอนโทไซยานินดังกล่าวมีผลต่อรูปแบบการใช้ประโยชน์จากข้าวท่าพื้นเมืองซึ่งการนำเอาข้าวท่าพื้นเมืองที่มีแอนโทไซยานินสูงไปใช้ประโยชน์ เป็นการส่งเสริมการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวท่าพื้นเมืองให้เหมาะแก่การใช้ประโยชน์มากขึ้น จากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานิน และยีน *OsDFR* สามารถใช้ยีนดังกล่าวในการช่วยคัดเลือกเป็นการเบื้องต้นสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ข้าวท่าที่มีลักษณะใบและลำต้นสีม่วงตรงตามความต้องการในการปรับปรุงพันธุ์ได้ โดยในอนาคตอาจมีการศึกษาร่วมกับยีนอื่นในกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวท่าพื้นเมืองไทยซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นการช่วยร่นระยะเวลาในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในการปรับปรุงพันธุ์ อีกทั้งเพื่อเป็นทางเลือกในการใช้ประโยชน์เพิ่มเติมจากส่วนของใบและลำต้นของข้าวทานอกเหนือจากส่วนของเมล็ดที่มีการใช้ประโยชน์อยู่แล้ว รวมถึงเป็นทางเลือกในการจัดการส่วนของใบและลำต้นของข้าวท่าอันเป็นส่วนเหลือจากกระบวนการเก็บเกี่ยว ลดปริมาณตอซังที่เกษตรกรต้องจัดการหลังการเพาะปลูกลงได้

สรุป

ระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* ที่พบในใบที่อายุ 45 วันหลังย้ายปลูกมีความแตกต่างกันภายในกลุ่มของข้าวเก่าที่มีใบและลำต้นสีม่วงโดยก่อดอยสะเกิดและก่าวีเียงสามีระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* ต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในกลุ่มของข้าวเก่าที่มีใบและลำต้นสีม่วงมีความสัมพันธ์เชิงลบ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *OsDFR* ที่พบในใบที่อายุ 45 วันหลังย้ายปลูกต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในเมล็ดข้าวกล้องของข้าวเก่าทั้ง 9 พันธุ์ โดยจากการศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในใบที่อายุ 45 วันหลังย้ายปลูกและในเมล็ดข้าวกล้องพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในใบที่อายุ 45 วันหลังย้ายปลูกในกลุ่มของข้าวเก่าที่มีลักษณะใบและลำต้นสีม่วง พันธุ์ K4 มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด ส่วนปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในเมล็ดข้าวกล้องของข้าวเก่าทั้ง 9 พันธุ์ K4 และก่อดอยสะเกิดมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด และนอกจากนี้จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในใบพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงลบเช่นเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในเมล็ดข้าวกล้อง จากการศึกษาดังกล่าวสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญต่อการศึกษาและพัฒนาค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวเก่าที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูง และนอกจากนี้ยังควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเพื่อความแม่นยำในการคัดเลือกพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเก่าพื้นเมืองให้เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

ประจำปีงบประมาณ 2564 สัญญาเลขที่ GSCMU (HRD6405069)/01/2564 และบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- Danpreedanan, N., S. Yamuangmom, S. Jamjod, C. Prom-u-thai and T. Pusadee. 2023. Genotypic variation of purple rice in response to shading in yield, anthocyanin content, and gene expression. *Plants* 12(13): 2582. doi: 10.3390/plants12132582.
- Division of Rice Research and Development. 2016. Khao' Jow Hawm Phisanulok 1. (Online). Available: <https://newwebs2.ricethailand.go.th/webmain/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=022.htm> (July 5, 2021). (in Thai)
- Fongfon, S., T. Pusadee, C. T. Prom-u-thai and S. Jamjod. 2019. Classification of morphological, agronomic and special grain quality characters among highland purple rice landraces from northern Thailand. *Khon Kaen Agriculture Journal* 47(6): 1139-1150. (in Thai)
- Fongfon, S., T. Pusadee, C. T. Prom-u-thai, B. Rerkasem and S. Jamjod. 2021. Diversity of purple rice (*Oryza sativa* L.) landraces in northern Thailand. *Agronomy* 11(10): 2029. doi: 10.3390/agronomy11102029.
- Furukawa, T., M. Maekawa, T. Oki, I. Suda, S. Iida, H. Shimada, I. Takamure and K. Kadowaki. 2007. The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. *The Plant Journal* 49(1): 91-102.
- Huttayanun, T., C. Prom-u-thai, and S. Jamjod. 2016. Selection for photoperiod insensitive

- advanced lines and high grain anthocyanin of purple glutinous rice. *Journal of Agriculture* 33(1): 81-90. (in Thai)
- Khan, A., S. Jalil, H. Cao, Y. Tsago, M. Sunusi, Z. Chen, C. Shi and X. Jin. 2020. The purple leaf (*p/6*) mutation regulates leaf color by altering the anthocyanin and chlorophyll contents in rice. *Plants* 9 (11): 1477. doi: 10.3390/plants9111477.
- Lee, J., R. W. Durst and R. D. Wrolstad. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wine by pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC international* 88(5): 1269-1278. doi: 10.1093/jaoac/88.5.1269.
- Phasri, W., K. Panjama, T. Ohyama and P. Hongpakdee. 2016. Quality and quantity of extracted RNA from soybean young leaf by the use of TRIzol[®] reagent test kit. *Khon Kaen Agriculture Journal* 44 (1): 193-198. (in Thai)
- 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.
- Pusadee, T., P. Oupkaew, B. Rerkasem, S. Jamjod and B.A. Schaal. 2014. Natural and human-mediated selection in a landrace of Thai rice (*Oryza sativa*). *Annals of Applied Biology* 165(2): 280-292.
- 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.
- 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 Genetic* 7(3): 173-182. doi: 10.14456/tjg.2014.24.
- Wang, H., W. Fan, H. Li, J. Yang, J. Huang and P. Zhang. 2013. Functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweet potato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses. *PLoS ONE* 8(11): 278484. doi: 10.1371/journal.pone.0078484.
- 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(3): 598-608.
- Yamuangmorn, S., S. Jumrus, S. Jamjod, K. Sringarm, C. Arjin and C. Prom-u-thai. 2022. Responses of purple rice variety to light intensities and soil zinc application on plant growth, yield and bioactive compounds synthesis. *Journal of Cereal Science* 106, doi: 10.1016/j.jcs.2022.103495.
- 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.
